

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440127

研究課題名(和文) ほ乳類の進化過程における顎の基部 先端部軸位置遺伝情報の改変

研究課題名(英文) Alterations of regional specifications of the jaw elements along the proximal-distal axis in the mammalian evolution

研究代表者

鈴木 久仁博 (SUZUKI, Kunihiro)

日本大学・松戸歯学部・教授

研究者番号：30256903

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ほ乳類が単弓類から進化する過程では、顎の基部-先端部軸にそった領域特異的な特殊化がおきた。本研究では、顎原基におけるホメオボックス遺伝子群の発現を有袋類のオポッサム等複数の動物と比較し、その歯式との関連を調べた。その結果、Msx1、BarX1共発現領域から前臼歯が形成されることが示され、マウスの下顎原基ではこの領域が無いことがわかった。また、ほ乳類の進化過程では顎関節を形成する骨が中耳骨に転用され、新たな顎関節が形成された。有袋類の発生過程で顎の進化過程が再現される可能性が示唆されていたので、オポッサムの顎関節や中耳骨の発生過程を観察したが、進化過程の再現はみられなかった。

研究成果の概要(英文)：During the evolution of mammal from ancestral synapsid, regional specifications of the jaw elements have occurred along the proximal-distal axis. In this study, expression of homeobox genes in the jaw primordium of various animals, with special focus on marsupial opossum, was examined, and the results were correlated to the dental formula. Accordingly, Msx1-BarX1 double-positive domain would give rise to the premolars in basic mammals including opossum, while mouse lower jaw primordium lacked such domain. During mammalian evolution, the jaw joint was modified and the original joint bones were recruited to the middle ear ossicles. It has also been suggested that, in marsupial, the development of jaw joint and middle ear would recapitulate the evolutionary process. The development of jaw joint and middle ear ossicles in opossum, however, did not show such evolutionary events.

研究分野：発生生物学、進化生物学

キーワード：顎 単弓類 進化 異形歯性 ほ乳類 歯式 ホメオボックス 耳小骨

1. 研究開始当初の背景

(1) 祖先である単弓類からほ乳類が進化する過程では、顎とそれに由来する組織、器官の分化が起きた。例えば、切歯、犬歯、前臼歯、臼歯といった機能や形態の異なる歯の分化が顎の基部-先端軸にそっておこり(異形歯性)。顎の基部側にある顎関節が関節骨-方形骨間から歯骨-鱗状骨間に変化して、顎関節として使われなくなった関節骨と方形骨が耳小骨として聴感覚のために転用された。

ほ乳類の進化過程におけるこれらの変化は、顎原基の基部-先端部軸にそったプレパターンの変化として理解できる。これまでの研究から、顎原基の基部-先端部軸にそって異なるホメオボックス型転写因子をコードする遺伝子が発現しており、それらの遺伝子が異なる形態の歯を生じるための情報を担っているとされる(ホメオボックスコード仮説、引用文献)。また、耳小骨を含む顎原基の基部側の形態形成には Hoxa2 や Hoxb1 などのホメオボックス転写因子の機能が重要である(引用文献)。

これらのことから、ほ乳類の進化過程におけるホメオボックス型転写因子の発現変化が歯のパターンや耳小骨の形成に重要な役割を果たしたと類推されるが、ほ乳類の発生研究のほとんどがマウスを用いておこなわれたものであり、比較できる情報が無かった。また、マウスの歯列は前臼歯や犬歯が無い特殊な歯列をしており、顎原基の発生と歯列の対応がそのままヒトなど他のほ乳類に対応づけられるかどうかは不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、ほ乳類の祖先型に近い歯列を持つ有袋類の一種であるハイロジネズミオポッサム(以下オポッサム)を主な材料とし、顎原基におけるホメオボックスコードをマウスなどの他のほ乳類などと比較することで、異形歯性の進化の基盤となる遺伝子制御について明らかにすることを目的とした。また、有袋類の顎関節と耳小骨の発生が、単弓類からほ乳類への進化の過程を再現する可能性が過去に示唆されていたため、この点について組織学的、解剖学的解析を並行しておこなうこと立案した。

3. 研究の方法

(1) 異形歯性に重要とされるホメオボックス遺伝子群を、オポッサムよりクローニングし、神経堤発生期のオポッサム胚での発現パターンを調べる。また、同様の発生段階のマウス胚や他の動物についても調べ、比較検討する。

(2) オポッサムの発生過程をおって歯胚の発生を観察し、顎原基におけるホメオボックスコードの発現と形成される歯のタイプと

を関連付ける。

(3) 実験(1)、(2)によって得られた結果から、マウスと他のほ乳類との間で違いが見られた場合には、そのような違いを生じる分子メカニズムについて調べる。とりわけ、顎原基の領域化と異形歯性の成立に重要とされる BMP4 と FGF8 の発現について解析をおこなう。

(4) オポッサムの耳小骨と顎関節の発生を詳細に観察する。顎関節の発生は生後におきるので、生まれて以降の時系列にそって、マイクロ CT や骨染色で可視化する。また、顎原基の最も基部側で発現して、耳小骨や顎関節部分の発生に重要と考えられている Hox 遺伝子群をクローニングし、その発現を見る。

4. 研究成果

(1) オポッサム 11.5、13.5 日胚および出生直後の顎原基について、Alx3、Msx1、BarX1、Dlx1 の発現を insitu ハイブリダイゼーション法にて、調べた。その結果、Msx1 と BarX1 の発現領域が大きく重なっていた(図1)。これはマウスの下顎原基で報告されている Msx1 が先端よりに、BarX1 が基部側よりに発現してほとんど重ならないというパターンとは異なっていた(図1)。生後 1、2.5、10 日目のオポッサムの顎をパラフィン連続切片にして歯胚を同定し、その後 3D 再構成した結果、Msx1 と BarX1 の両方を発現している顎の領域が前臼歯を形成することが示唆された。また、フェレットの Msx1 と BarX1 をクローニングして、20 日胚での発現を調べたところ、オポッサムと同様に Msx1 と BarX1 が共発現している領域が見られたことから、祖先型ほ乳類で確立したホメオボックスコードのうち、Msx1 と BarX1 の共発現により規定される前臼歯領域がマウス胚では欠損しているものと考えられた(図1)。これについては、様々なほ乳類で下顎骨の前臼歯近傍に形成されるオトガイ孔が、マウスなどのげっ歯類では臼歯に近いところにみられることと矛盾しない(図1)。

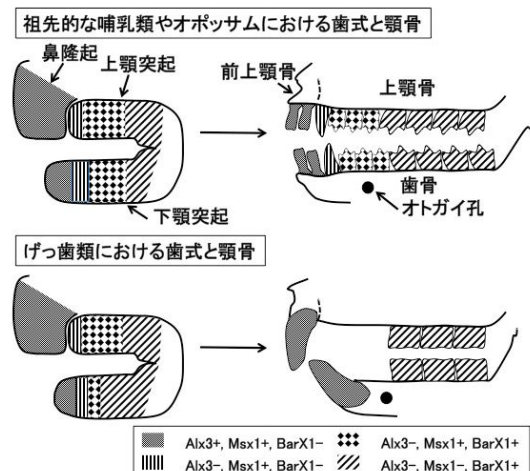


図1: ホメオボックスコードと歯式の対応

(2) オポッサム胚の下顎原基における Msx1 と BarX1 の発現を詳細に観察したところ、一見して一続きに見える Msx1 の発現が、先端部と基部側の二つの発現領域の連続によって成立していることがわかった。マウスにおいては、顎原基先端部に発現する BMP4 が Msx1 の発現を、より基部側に発現する FGF8 が BarX1 の発現をそれぞれ誘導することがわかっている(引用文献)。そこで、BMP4 と FGF8 の発現をオポッサムの下顎原基で調べたところ、先端部に BMP4、基部側に FGF8 が発現しており、マウスのそれと大差なかった。このことから、オポッサムの Msx1 の基部側での発現は BMP4 以外の別のシグナルによって誘導されているものと考えられた。

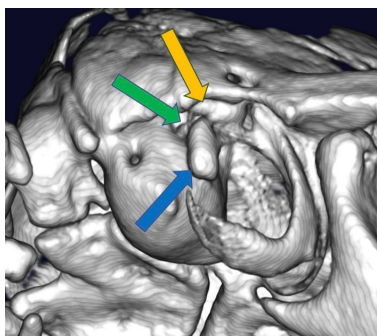


図2：3つの耳小骨はメッケル軟骨の後端に連続して生じる。(矢印)緑：アブミ骨、青：ツチ骨、黄：キヌタ骨

(3) 固形餌を食べ始める生後40日目までオポッサムの頭部を固定し、マイクロCTとアリザリンレッド/アルシアンブルーによる骨染色を併用し、顎関節や耳小骨の形成過程を調べた(図2)。その結果、単弓類からほ乳類が進化する過程で見られるような、古い顎関節から新しい顎関節への以降とそれに伴う耳小骨の形成は観察されず、ほ乳類特有の顎関節と耳小骨が形成されていく過程がみられた。これらのことから、有袋類の顎/耳小骨の発生過程においてほ乳類の系統発生が繰り返されるという説は否定された。オポッサム胚の後原基で Hoxa2 の発現を調べたところ、マウスと同様であったことは、上記の観察結果を裏付けるものであった。

これらの研究成果により、ほ乳類の異形歯性を成立させるホメオボックスコードの原型が明らかとなり、げっ歯類に特有の歯式の一部はこのホメオボックスコードの改変によることが示唆された。しかし、オポッサム胚の遺伝子操作実験系が無い現在では、これ以上の解析が困難であり、今後の技術的な改善が必須である。また、ほ乳類進化過程における顎関節と耳小骨の発生過程の変化がどのような遺伝的変化によるものかは、本研究では明らかにならなかった。これについては、今後ほ乳類とそれ以外の四足動物の間で顎関節の形成制御について比較検討することが必要になると思われる。

<引用文献>

- McCollum M, Sharpe, P. Evolution and development of teeth. *J. Anatomy* 199, 153-159, 2001.
- Gendron-Maguire M, Mallo M, Zhang M, Gridley T. Hoxa-2 mutant mice exhibit homeotic transformation of skeletal elements derived from cranial neural crest. *Cell* 75, 1317-1331, 1993.
- Tucker AS, Matthews KL, Sharpe PT. Transformation of tooth type induced by inhibition of BMP signaling. *Science* 282, 1136-1138, 1998.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

- (1) Gotouda H, Tamamura R, Kono T, Ootani Y, Kanno T, Kuwada-Kusunose T, Suzuki K, Sakae T, Okada, Nasu I. Immunohistological Study of the Major Salivary Glands in the Gray Short-Tailed Opossums (*Monodelphis domestica*) *J hard tissue Biol*, 査読有, 26(1), 2017, 75-80.
- (2) Nomura T, Ohtaka-Maruyama C, Yamashita W, Wakamatsu Y, Murakami Y, Calegari F, Suzuki K, Gotoh H, Ono K. The evolution of basal progenitors in the developing non-mammalian brain. *Development*, 査読有, 143, 2016, 66-74.
- (3) Shigentani Y, Wakamatsu Y, Tachibana T, Okabe M. Conversion of neural plate explants to preplacodal ectoderm-like tissue in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, 477, 2016, 807-813.
- (4) Shida H, Mende M, Takano-Yamamoto T, Osumi N, Streit A, Wakamatsu Y. Otic placode cell specification and proliferation are regulated by Notch signaling in avian development. *Develop Dyn*, 査読有, 244, 2015, 839-851.
- (5) Suzuki T, Osumi N, Wakamatsu Y. Identification of neural crest-specific enhancer of *Seraf* gene in avian peripheral nervous system development. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, 467, 2015, 1103-1109.
- (6) Kanno T, Suzuki K, Kono T, Tamamura R, Kuwada-Kusunose T, Sakae T, Okada H. Ultrastructure of the Salivary Glands in the Gray Short-tailed Opossum (*Monodelphis domestica*). *Int J Oral-Med Sc*, 査読有, 14(2/3), 2015, 61-66.
- (7) Wakamatsu Y, Nomura T, Osumi N, Suzuki K. Comparative gene expression

analyses reveal heterochrony for Sox9 expression in the cranial neural crest during marsupial development. Evolution and Development, 査読有, 16, 2014, 197-206.

- (8) Hatakeyama J, Wakamatsu, Y, Nagafuchi A, Kageyama R, Shigemoto R, Shimamura K. Cadherin based adhesions in the apical endfoot are required for active Notch signaling to control neurogenesis in vertebrates. Development, 査読有, 141, 2014, 1671-1682.

〔学会発表〕(計 7 件)

- (1) 鈴木久仁博, 大谷友加里, 桑田-楠瀬隆生, 玉村亮, 河野哲朗, 平山達也, 平山友彦, 岡田裕之, 寒河江登志朗「有袋類オポッサムにおける顎の発生-出生後の形成過程」第 122 回日本解剖学会、2017 年 3 月 30 日、長崎大学医学部、長崎県、長崎市。
- (2) 若松義雄「有袋類における頭部神経堤のヘテロクロニ的発生メカニズム」第 27 回日本色素細胞学会、2016 年 11 月 13 日、岐阜大学サテライトキャンパス、岐阜県、岐阜市。
- (3) 鈴木久仁博「オーストラリア有袋類にみられる「多生歯性」の問題について」第 16 回日大口腔科学会、2016 年 9 月 4 日、日本大学松戸歯学部、千葉県、松戸市。
- (4) 若松義雄、大隅典子、鈴木久仁博. Recruitment of Sox9 to the neural border specification program in marsupial cranial neural crest development. 日本発生生物学会年会第 48 回大会、2015 年 6 月 2 日、つくば国際会議場、茨城県、つくば市。
- (5) Kanno T, Suzuki K, Tamamura R, Sakae T, Okada H. Histological features of the salivary glands in the marsupial, IADR Annual Session 2015, 2015 年 3 月 13 日, Boston, USA
- (6) 若松義雄「有袋類の頭部形成におけるヘテロクロニ的発生機構解明の試み」4th Tokyo Vertebrate Morphology Meeting、2014 年 7 月 12 日、東京慈恵医科大学付属病院、東京都、港区。
- (7) 阿部達彦, 鈴木久仁博「オポッサムのセメント質の形態学的特徴」日本哺乳類学会 2014 年度大会、2014 年 9 月、京都大学吉田キャンパス、京都府、京都市。

〔図書〕(計 1 件)

倉谷滋(編), 医学書院, 生体の科学「特集: 進化と発生からみた生命科学」, 2015 年, 284 ページ(分担: 若松義雄、鈴木久仁博。「有袋類の繁殖戦略と特徴的な発生様式」, 217-221)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等
『環世界の窓から』に一部紹介。
(<http://nudmbiol.blogspot.jp>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木久仁博 (SUZUKI, Kunihiro)
日本大学・松戸歯学部・教授
研究者番号: 30256903

(2) 研究分担者

若松 義雄 (WAKAMATSU, Yoshio)
東北大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 60311560

(3) 連携研究者

()

研究者番号: