

脊椎動物の肺の獲得プロセスに関する進化発生学的研究

●岡部 正隆¹⁾ ◆近藤 周^{1,2)}

1) 東京慈恵会医科大学解剖学講座 2) 東京慈恵会医科大学 DNA 医学研究所器官発生研究室

<研究の目的と進め方>

水棲脊椎動物から陸棲の四足動物への進化は約3億7千万年前のデボン紀後期に生じた。この時代の初期四足動物の化石記録は極めて少ないため、四足動物が如何に進化したかを知る上で、進化発生学的解析による成果が期待される。

本研究課題では、脊椎動物の上陸の必要条件の一つである肺の獲得機構に注目する。脊椎動物の肺がどのように成立したかを知る目的で、これまでマウスとニワトリの研究で明らかとなっている肺芽形成遺伝子調節ネットワークの各素子（遺伝子）が、無尾両生類のツメガエル、四足動物に系統発生的に近縁であり肺を有する最も原始的な脊椎動物である肉鰭類の肺魚（オーストラリアハイギョ）、原始的な条鰭類で四足動物の肺によく似た肺を持つポリプテルス、肺を持たず空気を含む器官として浮力調節を担う鰾（ウキブクロ）を持つ条鰭類（ゼブラフィッシュ）、肺も鰾も持たない軟骨魚類（トラザメ）の各動物胚において、相互にどのようなかわり合いを持つかを明らかにし、その上で肺という器官がどのように獲得されたかを考察する。

ニワトリ胚における肺芽形成は、*Tbx4* 遺伝子を発現する前部消化管腹側の間葉系細胞が FGF10 タンパクを分泌し、前部消化管腹側上皮に *Nkx2.1* 遺伝子を発現させることによって誘導される。我々はこの *Tbx-Fgf10-Nkx2.1* という肺芽形成の遺伝子調節ネットワークが、肺を持つ脊椎動物間で保存されているのか、また肺を持たない脊椎動物にも存在するののかを調べている。これまでに我々はこの遺伝子調節ネットワークが肺を持たない硬骨魚において鰾の形成に関与している可能性を明らかにした。遺伝子組換えゼブラフィッシュと遺伝子組換えツメガエルを用いて肺と鰾が共通起源を持つか否かに関して研究を進める。また肺／鰾共通起源器官が存在するのであれば、系統進化のどの段階でこれが獲得されたのかを比較ゲノムと分子発生学の立場から考察する。

<2007年度の研究の当初計画>

1) これまで肺芽形成を解析してきた原始的肉鰭類オーストラリアハイギョと原始的条鰭類ポリプテルスの肺芽発生における *Tbx4*, *Fgf10*, *Nkx2.1* の各遺伝子の発現パターンを明らかにする。これまで外胚葉、中胚葉に関しては whole mount in situ hybridization (WISH) により発現パターンの解析に成功しているが、深部内胚葉系臓器に対してはまったく成功していない。原因を追求するとともにすみやかに発現パターンを明らかにしたい。

2) 昨年度明らかになったツメガエル肺芽およびゼブラフィッシュ鰾芽における *Tbx-Fgf10-Nkx2.1* 遺伝子調節ネットワークの機能を明らかにする目的で、*Tbx4*, *Fgf10*, *Nkx2.1* の各遺伝子に対するモルフォリーノアンチセンスをツメガエル胚とゼブラフィッシュ胚に顕微注入して肺と鰾の発生を抑制することを試みる。

3) 昨年度クローニングしたポリプテルスの *Tbx4* 遺伝子と *Nkx2.1* 遺伝子を含む BAC クローンに関して、各遺伝子座のゲノ

ムシークエンスを決定する。ショットガンライブラリーは当研究室で作成し、シークエンスは支援班の協力を得る。

4) 肺と鰾の発生で用いられている *Tbx-Fgf10-Nkx2.1* 遺伝子調節ネットワークが共通の起源を持つかを確かめるために、*Nkx2.1* 遺伝子の肺と鰾の発現エンハンサーを同定する。この解析には遺伝子組換えツメガエルとゼブラフィッシュを用いる。

5) これまでの研究から肉鰭類と条鰭類が分岐する以前から *Tbx-Fgf10-Nkx2.1* 遺伝子調節ネットワークが獲得されており、なんらかの肺／鰾共通起源となる器官が既に存在していた可能性が生じた。四足動物の神経形態学、脈管学的な解剖学的考察から、この肺／鰾共通起源器官が咽頭嚢である可能性が示唆されるため、より原始的でありゲノム情報が抱負なナメクジウオにおける *Tbx* 遺伝子、*Nkx* 遺伝子、*Fgf* 遺伝子の発現パターンを検討し、肺／鰾共通起源器官の存在の有無を検討する。この実験に関しては、京都大学佐藤矩行博士の協力を得て行う。

<2007年度の成果>

1) ニシツメガエル胚において、*Tbx4*, *Tbx5*, *Nkx2.1*, *Fgf10* が肺芽に発現していることが明らかとなり、これら遺伝子調節ネットワークが四足動物において普遍的に肺の形成に関わっていることが示唆された。

2) ハナカケトラザメの *Tbx4*, *Nkx2.1* 遺伝子の発現パターンの解析を行った。軟骨魚類において肺は存在しないが、発生中の肺芽相当領域にも明確な発現は観察されなかった。

3) 肺を持たないゼブラフィッシュ胚で、*Tbx4*, *Nkx2.1*, *Fgf10* が浮力を調節する鰾の組織芽に発現していることを明らかにした。*Fgf10* のアンチセンスモルフォリーノを胚へ顕微注入したところ、鰾芽における *Nkx2.1* の発現が消失した。また *Tbx4* と *Tbx5* に対するアンチセンスモルフォリーノを同時に顕微注入することによっても、*Nkx2.1* の発現が消失することを明らかにした。ただし *Tbx4* のアンチセンスモルフォリーノ単独注入では *Nkx2.1* の発現は抑制されなかった。また *Fgf10* のアンチセンスモルフォリーノ単独注入、*Tbx4* と *Tbx5* のアンチセンスモルフォリーノの同時注入により、鰾が低形成もしくは欠失することを明らかにした。

4) 肺と鰾がその形成に同じ *Tbx-Fgf10-Nkx2.1* 遺伝子調節ネットワークを用いていることが示唆されたため、肺を持つマウスと鰾を持つゼブラフィッシュのこの遺伝子調節ネットワークが同じ起源のものであるかを確かめるために各遺伝子の発現制御領域の比較解析を行った。マウスとゼブラフィッシュのゲノム情報を用いて *Nkx2.1* と *Tbx4* の cis 制御領域 (non-coding region) の比較を行った。*Tbx4* 遺伝子はマウス-ゼブラフィッシュ間で極めて類似しており、高度に保存されている領域が多数見つかった。これに対し、*Nkx2.1* 遺伝子近傍の non-coding region には高度に保存された配列が5箇所存在した。これらの保存された配列をレポーター遺伝子と組み合わせ、遺伝子組換えゼブラフィッシュを作成

してエンハンサー活性を明らかにすることを試みた。各配列単独では肺芽／鰓芽領域にレポーター遺伝子は発現しなかった。また前述の高度に保存されている5箇所の配列を結合させた人工エンハンサーを作成したがこれも鰓芽には発現しなかった。

5) ポリプテルスの *Tbx4* と *Nkx2.1* 遺伝子の *cis* 制御領域の解析のために BAC クローンをスクリーニングし、それぞれのクローンを得た。*Nkx2.1* の BAC クローンのショットガンライブラリーを作成した。

6) ナメクジウオの *Tbx2/3* と *Tbx4/5* をクローニングし、その発現パターンを WISH によって明らかに、両遺伝子が咽頭(鰓嚢)に発現していることを確かめた。

<国内外での成果の位置づけ>

タクサ間で解剖学的な相同性が既に詳しく解析されている肺を題材として、進化上鍵となるが一般に実験動物として扱われにくい動物を積極的に用いた比較分子発生学解析と、既にゲノムプロジェクトが進行しており実験発生の解析が可能な普及型モデル生物の解析を、組み合わせて研究を進める点が、本研究計画の特色である。古生物学的観点から、教科書には「肺の起源は古く脊椎動物の起源にまでさかのぼり、軟骨魚類ではそれが失われ、条鰭類ではこれが消化管の背側にある鰓に変化し、我々四足動物・肉鰭類においてはそのまま腹側に肺が保存されている」という仮説が記載されている。では最初の肺はいかにして生じたのか、軟骨魚類以降に肺が生じた可能性はないのか、様々な脊椎動物のもつ肺は複数の起源から生じた可能性はないのか、といった疑問が生じる。四足動物誕生の研究は主に古生物学の分野で成されてきたものであるが、詳細な構造やその機能に関わる軟部組織の復元が困難な化石のみから、この出来事の過程を推測するのは容易ではない。本研究計画では、近年の豊富なゲノム情報と現存生物を用いた実験発生の解析を用いて、この問題に取り組む。国内外においてこの問題にゲノム科学的アプローチをした研究は見いだせない。

今回、ニワトリ肺芽の形成で明らかとなった *Tbx-Fgf10-Nkx2.1* 遺伝子調節ネットワークが、ゼブラフィッシュの鰓の形成にも関与することが明らかとなった。肺と鰓で用いられている遺伝子調節ネットワークが同一起源のものであることが示されれば、その他の解剖学的知見と合わせて、肺と鰓が起源を同じとした相同器官であることが示される。肺と鰓が相同器官であるかどうかを最初に議論したのはチャールズ＝ダーウィン著の「種の起原」であるが、それ以降、肺が消化管の腹側に対をなして存在するのに対し、鰓は消化管の背中側に対をなして存在する点などから、肺と鰓は独立して獲得された器官であるという意見もあり、現在までのところ結論に至っていない。肺と鰓が相同器官であれば、肺様の空気を含む器官は、四足動物を含む肉鰭類と、条鰭類が分岐するよりも以前から存在していたことになり、肺の起源は少なくとも肉鰭類と条鰭類の共通祖先まで遡れる。また、原始的な条鰭類であるポリプテルスの肺が四足動物と同じように消化管の腹側に1対存在することから、鰓の持つ消化管の背中側に1対存在するという特徴は、条鰭類の分岐後にこの系統の中で獲得されたものであることが強く示唆される。さらに、この研究の過程で、*Tbx4*、*Tbx5* と祖先遺伝子を共有する *Tbx2* 遺伝子が咽頭嚢に発現しており、*Fgf10* 遺伝子が肺芽誘導のみならず咽頭嚢の誘導にも関わっていることを示唆する実験結果が得られた。哺乳類の肺動脈は第6咽頭弓動脈由来であり、また肺胞の知覚神経が咽頭弓の上鰓プラコードから発生する知覚神経と同じく延髄の弧束核に投

射するなどの解剖学的な状況証拠を合わせると、肺の発生機構は咽頭嚢の発生機構に極めて類似しており、「肺を持たない祖先動物において、鰓嚢(咽頭嚢)形成に関与していた *Tbx2/3/4/5* 遺伝子が、遺伝子重複によって *Tbx* 遺伝子群を生じ、各 *Tbx* 遺伝子群の機能特化によって、鰓嚢形成機構に由来する肺芽形成機構である *Tbx-Fgf10-Nkx2.1* 遺伝子調節ネットワークが生まれ、その活性化により鰓嚢後方に肺が形成された」という仮説を立てた。これを確かめるために、脊椎動物の祖先で、*Tbx2/3* 遺伝子と *Tbx4/5* 遺伝子を持ち、肺を持たない原索動物ナメクジウオにおいて、この2つの遺伝子の発現パターンを明らかにしたところ、どちらの遺伝子も鰓嚢に発現しており、四足動物にみられる心肺領域の *Tbx4* と *Tbx5* 遺伝子に相当する発現はまだ観られなかった。このことから、*Tbx4* および *Tbx5* 遺伝子は原索動物から脊椎動物に至る過程で、その発現を咽頭の後方にずらし、咽頭嚢類似器官として原始的な肺を得たのではないかと考察している。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

オーストラリアハイギョ、ポリプテルスにおける肺芽周辺における遺伝子発現を WISH で観察することに未だ困難が生じている。十分なシグナルを得られない理由は2点考えられる。1つは組織が胚の中心部に存在するため、十分に RNA プローブが浸透していない可能性であり、もう一つはゼブラフィッシュでも観察されたように胚芽における *Tbx4*、*Nkx2.1*、*Fgf10* の各遺伝子発現は比較的弱い可能性で、観察に十分なシグナルを得ることが難しいということである。実際に、パラフィン切片、凍結切片を用いた *in situ* hybridization 法を用いた際にも、観察に十分な強いシグナルを得ることはできなかった。プローブの浸透性とシグナル検出感度を上げるためにさらなる条件検討が必要である。

<今後の課題>

- ・ オーストラリアハイギョとポリプテルスの肺芽発生における *Tbx4*、*Fgf10*、*Nkx2.1* の各遺伝子の発現パターンを明らかにする。
- ・ ポリプテルスの *Nkx2.1* と *Tbx4* 遺伝子座のゲノムシーケンスを決定する。

<成果公表リスト>

なし