

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

東京慈恵会医科大学解剖学講座

<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。このような大進化や新器官の獲得が、どのようなゲノム機能の変化によってもたらされたのかは明らかでない。本研究計画では、脊椎動物の進化全般を理解する上で鍵となる、肺を持つ古代魚ポリプテルスのゲノム研究の基盤を整備するとともに、他の脊椎動物のゲノム情報と各種脊椎動物胚を用いた実験発生学的解析により、肺の獲得プロセスを明らかにする。前年度までの研究成果として、「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誘導機構である *Tbx4/Tbx5-Fgf10* 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。この可能性を検証するために、咽頭嚢形成における *Tbx (s) -Fgf10* 遺伝子調節ネットワークの役割をナメクジウオ、ゼブラフィッシュ、ツメガエル、ニワトリなど分岐系統学上主要な複数種の動物胚を用いて解析する。特に条鰭類と肉鰭類の共通祖先における肺がどのようなものであったかを推測するため、古代魚ポリプテルスの肺形成メカニズムを明らかにし、肉鰭類のものと比較検討する。

<2008年度の研究の当初計画>

・咽頭嚢形成期と肺芽形成期の遺伝子発現パターンの解析

*Fgf10*遺伝子と*Tbx2*遺伝子などの*Tbx*遺伝子群の咽頭嚢形成時における詳細な時間的空間的発現パターンを、ゼブラフィッシュ、ツメガエル、ニワトリ胚、ポリプテルス胚をもちいて明らかにする。また比較ゲノム班員の佐藤矩行博士の協力を得て、ナメクジウオ胚における鰓嚢形成に関わる遺伝子の探索も試みる。

・咽頭嚢・肺芽形成関連遺伝子の機能阻害実験

各遺伝子の発現パターンを明らかにした後、各遺伝子の機能抑制を行い、咽頭嚢形成におけるこれら遺伝子の機能を解析する。*Fgf10*遺伝子や各*Tbx*遺伝子に対するモルフォリーノアンチセンスオリゴヌクレオチドおよびEnタンパクのリプレッサードメイン(EnR)とのキメラ転写因子のRNAを1細胞期のゼブラフィッシュ、ツメガエル、ポリプテルスの各胚に顕微注射、もしくはFGF受容体機能阻害剤SU5402(Calbiochem)を処理することによって、各遺伝子の咽頭嚢形成、肺芽形成における機能を明らかにする。

・ポリプテルスのゲノムBACライブラリーの構築と咽頭胚のEST解析

支援班と協力してポリプテルスのゲノムBACライブラリーを作成し、ポリプテルスの咽頭胚・肺芽発生期のEST解析を行う。初期胚のEST解析は現在相澤慎一博士(理研CDB)らと共同

で進めている。EST解析によって、他の動物との相同性を利用したPCRでは得られない遺伝子や、より長いcDNAを得ることが期待される。作成したライブラリーは他の研究者にも扱いやすいように整理し、適時公開する。

<2008年度の成果>

- ・*Fgf10*遺伝子、*Tbx*遺伝子群の発現パターンの解析を行った。ゼブラフィッシュ、ツメガエル、ニワトリ、ポリプテルスの各胚において、咽頭嚢に*Fgf10*の発現を認めた。ポリプテルスの*Tbx4*、*Tbx5*は肺芽に発現しており、咽頭嚢に発現していないことを確認した。*Tbx2*に関してはクローニングはできたが、発現パターンの解析まで進んでいない。
- ・*Tbx*遺伝子の機能阻害を行うために各種*Tbx*とENの転写抑制ドメインのキメラ転写因子を発現するベクターの構築を行った。ツメガエル胚のFGFシグナルの抑制を行うためにSU5402処理を行い、肺芽の形成抑制を確認した。ポリプテルスに関しては後述のように実験用の胚が十分量確保できずに成果を得るにいたっていない。
- ・ポリプテルスのゲノムBACライブラリーの作成を開始した。雄の成体の血液を採取し、有核赤血球からゲノムDNAを調整した。ゲノムサイズを測定し、3GB程度であることが明らかとなった。この実験は藤山秋佐夫博士と共同で行っている。
- ・ポリプテルス胚のEST解析を開始した。原腸胚期から神経胚期のポリプテルス胚からRNAを抽出しcDNAを作成後、約10000クローンの塩基配列を決定した。1クローンしか得られない遺伝子が80.1%を占めており、さらに10000クローン塩基配列を決定する予定である。神経胚期以降のEST解析に関しては現在cDNAライブラリーを作成中である。
- ・アフリカツメガエルに横隔膜があることを再発見した。哺乳類特異的だと一般に信じられている横隔膜が水棲で原始的なピパ科のカエルに存在することを1905年にKeithが報告している。その構造は哺乳類の横隔膜とほぼ同じ構造であり、それを支配する神経は哺乳類と同じように腕神経叢から生じていることを明らかにした。ツメガエルの腕神経叢は第3脊髄神経から生じており、口腔底の舌筋群を支配する舌下神経は横隔神経に隣接する第2脊髄神経から生じていることも確認した。*Keith A. The nature of the mammalian diaphragm and pleural cavities. J Anat Physiol, 39, 243-284, 1905

<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学的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。

本研究により、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す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。少なくともダーウィンは「鰓から肺ができたのではないかと」考えていた。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つ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。

今年度、我々は鰓嚢と肺芽の形態や発生機構の共通性だけでなく鰓呼吸運動と肺呼吸運動にかかる筋肉とそれを支配する運動神経の相同性に関しても検討した。鰓呼吸に用いる舌筋群を支配する舌下神経と哺乳類で肺呼吸に用いる横隔膜を支配する横隔神経は哺乳類では脊髄神経根として4本分離れているが、我々が再発見したツメガエルの横隔膜においては舌筋を支配する舌下神経は第2脊髄神経、横隔神経は第3脊髄神経に相当しお互いに隣接していること、さらに哺乳類においては舌筋群と横隔膜は移動性軸下筋前駆細胞(MMP)から生じるという共通点があることから、鰓呼吸運動と肺呼吸運動にかかる神経筋ユニットはかつて連続的な関係にあり、現在の哺乳類に進化する過程で、頸椎の増加によって、前後軸上離れた場所に位置することになったと考えられる。このことは肺が鰓嚢を形成するメカニズムを用いて獲得されたことを示唆するものである。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

咽頭嚢・肺芽形成関連遺伝子の機能阻害実験に関しては、ポリプテルスの初期胚が一定時間内に十分量確保できなかったことに原因がある。

<今後の課題>

- ・ポリプテルスの人工授精を試みる。
- ・ポリプテルスの後期胚のEST解析を行う。
- ・ポリプテルスのゲノムBACライブラリーの整備を行う。

<成果公表リスト>

Smith MM, Okabe M, Joss J. Spatial and temporal pattern for the dentition in the Australian lungfish revealed with sonic hedgehog expression profile. *Proc Biol Sci*. in press