



Evolutionary Theory for

**CONSTRAINED & DIRECTIONAL DIVERSITIES**

Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas

Constrained & Directional Evolution Newsletter Vol. 2 No. S4 (2018)

新学術領域研究

## 進化の制約と方向性

～微生物から多細胞生物までを貫く表現型進化原理の解明～



号外

ヌタウナギとヤツメウナギの発生から読み解く  
内耳進化の新しいシナリオ

表紙: ヌタウナギ(*Eptatretus burgeri*、左)およびヤツメウナギ(*Lethenteron camtschaticum*、右)  
における内耳の膜迷路(下段)。(理化学研究所 樋口 真之輔、倉谷 滋)

# Inner ear development in cyclostomes and evolution of the vertebrate semicircular canals

*Nature* in press (2018)

doi: 10.1038/s41586-018-0782-y

<https://www.nature.com/articles/s41586-018-0782-y>

Shinnosuke Higuchi, Fumiaki Sugahara, Juan Pascual-Anaya, Wataru Takagi, Yasuhiro Oisi and Shigeru Kuratani\* ([shigeru.kuratani@riken.jp](mailto:shigeru.kuratani@riken.jp))

Jawed vertebrates have inner ears with three semicircular canals, the presence of which has been used as a key to understanding evolutionary relationships. Ostracoderms, the jawless stem gnathostomes, had only two canals and lacked the lateral canal. Lampreys, which are modern cyclostomes, are generally thought to possess two semicircular canals whereas the hagfishes—which are also cyclostomes—have only a single canal, which used to be regarded as a more primitive trait. However, recent molecular and developmental analyses have strongly supported the monophyly of cyclostomes, which has left the evolutionary trajectory of the vertebrate inner ear unclear. Here we show the differentiation of the otic vesicle of the lamprey *Lethenteron camtschaticum* and inshore hagfish *Eptatretus burgeri*. This is the first time, to our knowledge, that the development of the hagfish inner ear is reported. We found that canal development in the lamprey starts with two depressions—which is reminiscent of the early developmental pattern of the inner ear in modern gnathostomes. These cyclostome otic vesicles show a pattern of expression of regulatory genes, including OTX genes, that is comparable to that of gnathostomes. Although two depressions appear in the lamprey vesicle, they subsequently fuse to form a single canal that is similar to that of hagfishes. Complete separation of the depressions results in anterior and posterior canals in gnathostomes. The single depression of the vesicle in hagfishes thus appears to be a secondarily derived trait. Furthermore, the lateral canal in crown gnathostomes was acquired secondarily—not by de novo acquisition of an OTX expression domain, but by the evolution of a developmental program downstream of the OTX genes.

# ヌタウナギとヤツメウナギの発生から読み解く 内耳進化の新しいシナリオ

*Nature in press (2018)*

doi: 10.1038/s41586-018-0782-y

<https://www.nature.com/articles/s41586-018-0782-y>

樋口 真之輔、菅原 文昭、Juan Pascual-Anaya、高木 亙、大石 康博、倉谷 滋\*  
([shigeru.kuratani@riken.jp](mailto:shigeru.kuratani@riken.jp))

顎のある脊椎動物は、3つの半規管つまり三半規管を含む内耳をもつ。半規管の数は、脊椎動物の系統関係を理解するうえで鍵となる形質として注目されてきた。例えば、デボン紀の化石無顎類である甲皮類(ostracoderms)には半規管が2つしかなく、水平半規管を欠く。また、現生無顎類のヤツメウナギが一般的に2つの半規管をもつと考えられるのに対し、別の無顎類の系統であるヌタウナギは1つのみ半規管をもつ。したがって、ヌタウナギの一半規管はより祖先的な形質であろうとみなされてきた。ところが、近年の分子系統学的研究によりこれら2系統の無顎類が円口類という単系統群をなすことが示され、それとともに脊椎動物における内耳の進化過程も不明となった。我々は、ヤツメウナギ *Lethenteron camtschaticum* とヌタウナギ *Eptatretus burgeri* における内耳の発生および内耳原基での遺伝子発現を観察し、顎口類と比較した。すると、円口類の耳胞にも *Otx* を含むパターンニング遺伝子が顎口類と同様のパターンで発現し、耳胞がもつ基本的な極性がすべての脊椎動物に共通していることが分かった。次にヤツメウナギ成体の内耳を改めて詳細に観察したところ、半規管の形態は二半規管ではなく、むしろヌタウナギに似た一半規管とみるべきであることも分かった。ただし、ヤツメウナギ内耳の発生過程では顎口類に類似した2つの陥凹が耳胞に生ずるが、ヌタウナギでは1つのみ陥凹が生ずる。そのため、内耳の発生パターンについてはヌタウナギが派生的であるといえる。最後に、水平半規管をもたない円口類にも水平膨大部稜と相同な感覚斑が見出され、すべての脊椎動物が3つの感覚斑をもつことが分かった。つまり、祖先動物がすでに備えていた感覚斑が転用されて水平膨大部稜が獲得されたと考えられるのである。水平半規管は耳胞における新規な *Otx* の発現によってではなく、*Otx* の下流の発生プログラムの変更によって獲得されたい。今回得られた新しいシナリオでは、全脊椎動物の共通祖先が、これまで考えられていたより複雑な内耳をすでにもっていたことが分かった。

## 背景

ヒトを含む哺乳類では、内耳は主に聴覚器としてはたらくが、これは二次的な状態であり、脊椎動物の進化の歴史においてはもともと、重力や頭部の回転を受容する平衡感覚器として出現した構造である。ヒトやカエル、サメなどの顎口類においては、卵形嚢と球形嚢にある感覚斑で重力を、三半規管にある感覚斑で頭部の回転を感知する。三半規管は、前半規管、後半規管、水平半規管という3つの半規管からなる(図1左)。これら3つの半規管はそれぞれ片端に感覚斑を含む膨大部をもち、互いに直交することで三次元方向の回転を効率的に感知する。現生のほとんどの脊椎動物の内耳は三半規管をもつが、顎をもたない脊椎動物であるヤツメウナギ、ヌタウナギはその例外として知られている。

これまで長い間、ヤツメウナギは二半規管、ヌタウナギは一半規管をもつとされてきた(図1中央、右)。古典的には、ヌタウナギが他の脊椎動物に共通する特徴(背骨、眼のレンズ、神経堤細胞など)を欠くとされてきたこともあり、ヌタウナギはヤツメウナギを含む他の脊椎動物より前に分岐したと考えられてきた。また、デボン紀の化石無顎類である甲皮類(ostracoderms)も、二半規管の内耳をもっていたらしい(Janvier, 1996; Gai et al., 2012)。すなわち、脊椎動物の内耳形態について、ヌタウナギのような一半規管が祖先的であり、次いで二半規管、さらに三半規管というふうに、脊椎動物内耳にみられる半規管の数は1→2→3と増加したのだろうというシナリオが受け入れられてきた(Mazan et al., 2000; 図2の左側の系統樹)。ところが、近年の分子系統学的な解析により、ヌタウナギとヤツメウナギは顎口類の姉妹群の「円口類」という単系統群をなすことが示された。この系統関係は最近の形態学的、発生学的研究でも支持されているが、同時に、脊椎動物における内耳の進化シナリオは不明となった(Janvier, 2007; 図2の右側の系統樹)。

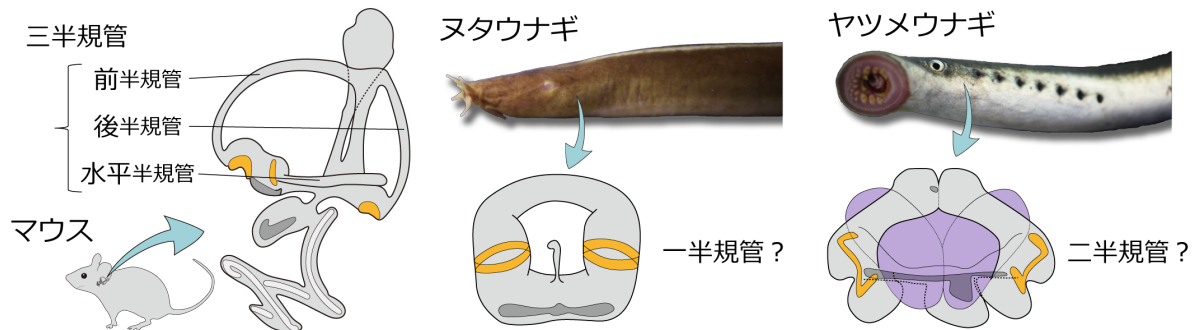


図1. マウスの内耳の三半規管と円口類に属するヌタウナギとヤツメウナギの内耳。

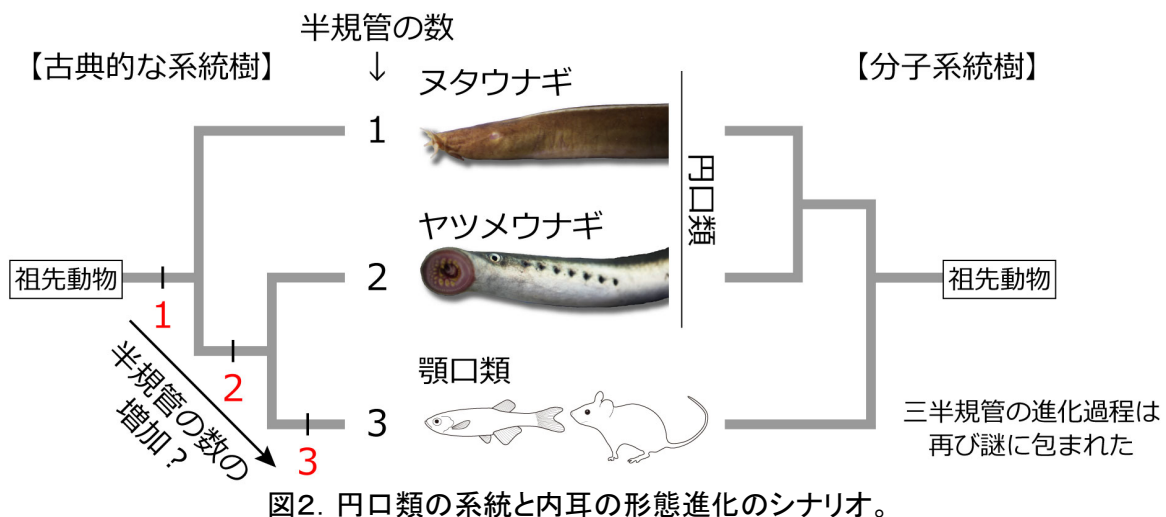


図2. 円口類の系統と内耳の形態進化のシナリオ。

また、顎口類内耳の形態進化における大きなイベントの1つに、水平半規管の獲得がある。顎口類における先行研究から、水平半規管の獲得には耳胞の外腹側への *Otx1* の発現が関わるとされている (Mazan et al., 2000)。その根拠の1つは、*Otx1* ノックアウトマウスが水平半規管を欠くことである。興味深いことに、このマウスでは水平半規管に対応する感覚斑(水平膨大部稜)も消失するが、卵形囊の一部が拡大して異所的に過剰な感覚斑を生じ、これを支配する神経枝が現れる (Fritzsche et al., 2001)。先行研究は、*Otx1* ノックアウトマウスとヤツメウナギにおける内耳神経分岐パターンが一致するとして、*Otx1* ノックアウトマウスはヤツメウナギの表現型模写 (phenocopy) であると指摘した (Fritzsche et al., 2001)。この先行研究で水平膨大部稜と相同だとされたのが、ヤツメウナギにのみ存在する機能不明の感覚斑 dorsal macula である (Fritzsche et al., 2001)。ところが、dorsal macula はその名の通り内耳の背側に存在し、水平膨大部稜とは形態学的位置関係が大きく異なるという問題が残されていた。

上記の問題を解決し、円口類の単系統性に基づいて内耳の進化シナリオを推定するために、我々は円口類における内耳の発生過程に着目した。つまり、発生プログラムの変遷を復元し、脊椎動物における内耳の進化シナリオを推定するために、発生過程を比較した。顎口類内耳の発生過程については比較的よく研究されており、内耳原基の上皮構造である耳胞に孔が生じ、辺縁に管腔が取り残されるというメカニズムにより半規管が形成される。そこで、本研究では成体の内耳形態を比較するのみならず、円口類の内耳の発生過程にも着目してその形態および遺伝子発現を観察し、顎口類と比較した。特にヌタウナギ内耳の発生についてはこれまでに記載されたことはなく、本研究で初めて観察を行った。

## 研究手法と成果

はじめに、内耳原基である耳胞の基本的なパターンニングを比較するために、耳胞の前後軸、背腹軸を決定する遺伝子発現を観察した。顎口類では、*Tbx1* が耳胞の後方、*Patched* が耳胞の腹側に発現し、それぞれ前後軸、背腹軸を決定することが知られている。これらの相同遺伝子をヤツメウナギ *Lethenteron camtschaticum* とヌタウナギ *Eptatretus burgeri* で単離し、耳胞での発現を観察した。すると、これらのパターンニング遺伝子は、円口類でも同様の発現を示したので、遺伝子発現が規定する耳胞の極性はすべての脊椎動物で共通であることが分かった。では、共通の遺伝子発現パターンをもった耳胞から、どのようにして異なる形態の内耳が生じるのだろうか。この疑問を解決するためには、耳胞から半規管が形成される過程の形態学的なパターンをヤツメウナギ、ヌタウナギと顎口類で比較する必要がある。

まず我々は、これまで長い間、二半規管であるとされてきたヤツメウナギ成体の内耳を改めて詳細に観察した。すると驚くべきことに、ヤツメウナギの内耳もヌタウナギ同様に一半規管とみるべきであると分かった。なぜなら、ヤツメウナギにのみ存在する「繊毛域」部分を取り除いて管の部分のみに着目すると、単一トラス状の半規管だとみなせるからである(図3)。なお、これまで二半規管だとされてきたのは、ヤツメウナギの内耳が複数方向の回転を感知する機能をもつからであるが、単一の半規管を「折り曲げる」ことでこれを達成しているのである。そのうえ、顎口類では前後2つの半規管をつくる孔が common crus で隔てられているのに対し、円口類ヌタウナギ、ヤツメウナギには相当する構造がないので、やはり円口類の内耳は形態学的には一半規管だといえる(図3)。

ところが、ヌタウナギとヤツメウナギにおける内耳の発生過程を観察したところ、両者とも成体では単一トラス状の半規管をもつにも関わらず、ヌタウナギは直接1つのみ孔を形成するのに対し、ヤツメウ

ナギは一時的に 2 つの孔を形成して、これらが癒合するという発生過程を経ていた(図4)。

以上から、脊椎動物における内耳の進化シナリオを読み解くことができる。内耳の発生過程で、ヌタウナギは 1 つのみ、ヤツメウナギは 2 つの孔を形成し、顎口類も一時的に 2 つの孔を作る(図4)。これらの動物の系統関係に基づくと、最節約的には、脊椎動物の共通祖先は 2 つの孔、つまり 2 つの半規管を「作りうる」発生プログラムをもっていたと考えられる(図4)。とすれば、1 つだけ孔が生じる発生過程は、ヌタウナギ類に派生的な形質であると推定できる。

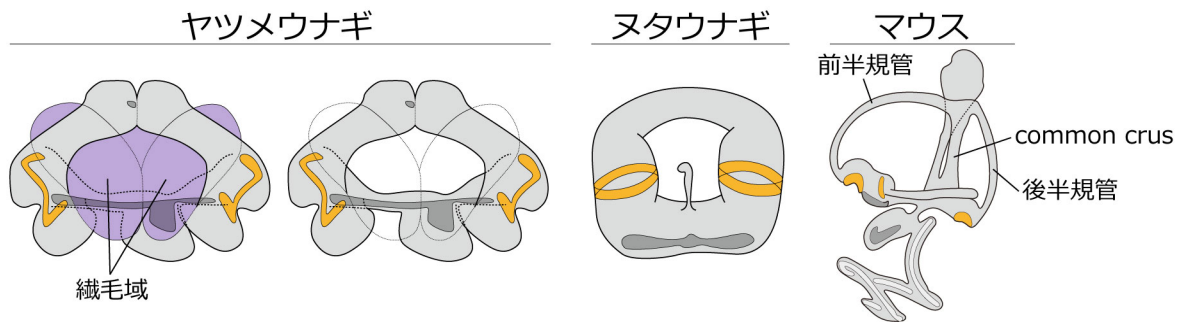


図3. ヤツメウナギと他の脊椎動物の内耳における半規管部分の比較。

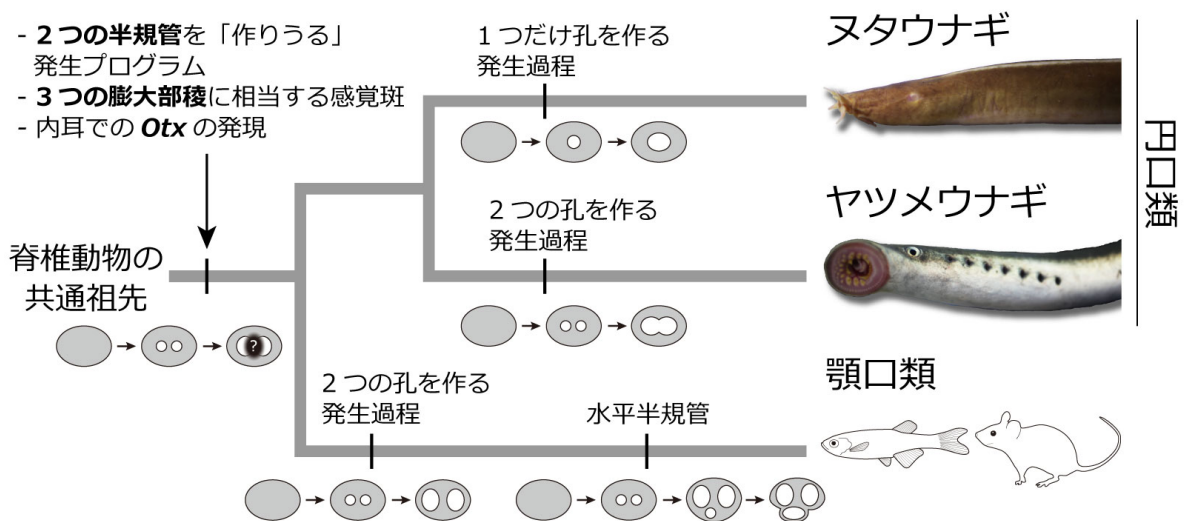


図4. 本研究で推定した脊椎動物における内耳の形態新化のシナリオ。

次に、顎口類において、前後 2 つの半規管より後に獲得された水平半規管について検討した。具体的には、耳胞における *Otx1* の新規な発現によって単純に水平半規管の獲得を説明できるかを検証するため、ヤツメウナギとヌタウナギで *Otx1* の相同遺伝子 *OtxA* をそれぞれ単離して耳胞での発現を観察した。円口類は水平半規管をもたないので耳胞には *OtxA* が発現しないと予想したが、結果、*OtxA* はヤツメウナギとヌタウナギの耳胞の腹側に発現した(図5)。すると、*Otx* の新規な発現により水平半規管が獲得されたと単純に考えることはできなくなる。むしろ、*Otx* の発現は水平半規管に付属する感覚斑(水平膨大部稜)の発生に関わるという推論も成り立つ。その理由は、*Otx1* ノックアウトマウスでは水平半規管が消失する一方、水平膨大部稜は卵形囊斑が拡大した異所的な感覚斑として形成されるからである(Fritsch et al., 2001)。

そこで Fritsch et al. (2001) が水平膨大部稜と相同であると示唆した、ヤツメウナギ成体の dorsal macula の発生過程を観察した。前述のように、ヤツメウナギの dorsal macula はその名の通り内耳の背側

に存在し、水平膨大部稜とは形態学的位置関係が大きく異なるため、発生過程こそが相同性を検討するための手がかりとなる。実際には予想通り、**dorsal macula** は水平膨大部稜と同じ形態学的位置関係を示すタイミングがあり、神経の分岐パターンも一致していた。ヌタウナギ胚でも同様に観察を行ったところ、**dorsal macula** や水平膨大部稜と一致する形態学的パターンをもつ感覚斑を新たに見出した。すなわち、円口類は水平半規管をもたないが、水平膨大部稜に相同な感覚斑をもつのである。

これらの結果から、脊椎動物の共通祖先の段階で既に耳胞に *Otx* が発現し、かつ 3 つの感覚斑を備えていたと推定できる(図4)。すなわち、顎口類における水平半規管の獲得は、*Otx* の新規発現ではなく、その下流遺伝子群の変化によると考えることが理にかなう。他方、水平半規管に対応する検出器である水平膨大部稜は、祖先動物がすでにもっていた感覚斑を転用して獲得したと推定できる。

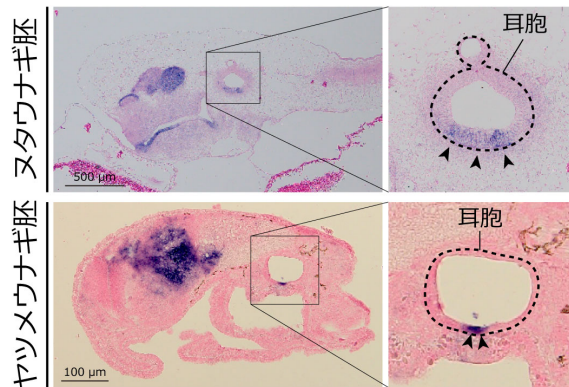


図5. 円口類における *OtxA* の発現。

最後に我々は、ヤツメウナギの表現型模写だとされてきた *Otx1* ノックアウトマウスについて再解釈を試みた。前述のようにヤツメウナギ内耳は **common crus** をもたないのに対し、*Otx1* ノックアウトマウスはこれを保持する点で、両者は形態学的に異なるという問題がある。そこで我々は、デボン紀の化石無顎類である甲皮類(*ostracoderms*; 図6左の系統樹)に目を向けた。甲皮類は現生のどの脊椎動物とも異なり、水平半規管を欠くが **common crus** をもつので、ヤツメウナギではなく、甲皮類こそが *Otx1* ノックアウトマウスの表現型模写だといえる(図6)。つまり、水平半規管の有無に目が行きがちだが、前後 2 つの半規管が **common crus** で隔てられているという特徴は甲皮類を含む顎口類のみにみられる。すなわち、**common crus** は顎口類の内耳を特徴づける構造だといえる。ただし、**common crus** が脊椎動物の共通祖先ですでに獲得されており、円口類の系統で失われたのか、または **common crus** が顎口類の系統で新規に獲得されたのかを推定するのは困難である。なぜなら、甲皮類以前に分岐した脊椎動物の化石は保存状態が悪いため内耳形態が明瞭ではなく、また、脊椎動物の現生する外群であるホヤやナメクジウオには内耳と呼べるような構造が存在しないため、内耳の形態を比較できないためである。

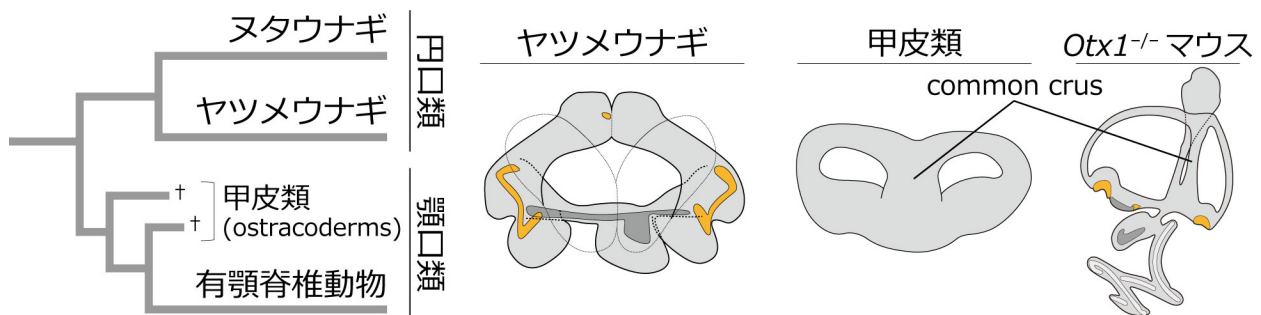


図6. Ostracoderm と *Otx1* ノックアウトマウスの内耳の比較。

本研究において、脊椎動物の内耳は、これまで考えられてきたよりも複雑な形態変化の歴史を辿って成立したことが分かり、内耳進化の新しいシナリオを提示した。脊椎動物にみられる半規管の数は 1→2→3 と単純に増加したのではなく、脊椎動物の共通祖先の段階で 2 つの半規管を「作りうる」発生プログラムと、3 つの半規管に対応する感覚上皮を備えた複雑な内耳をすでにもっており、顎口類ではこれらを巧みに転用して 3 つの半規管と膨大部稜を作り上げてきたのである。

## 今後の期待

我々ヒトがもつような複雑な三半規管の形態を作り出す材料の大部分は、5 億年以上前の円口類と顎口類の分岐時点ですでに獲得されていたことになる。しかしながら、単純な構造に見える円口類の内耳と、顎口類がもつ複雑な形態の内耳には、どのような発生プログラムの違いがあり、おののおのがいかに進化したかについては未解決の問題である。

また、内耳の構造は化石として残りやすく、古脊椎動物学において、化石魚類の同定や進化過程を推定するうえでの鍵となる形質として着目される。脊椎動物の進化の初期に現れた化石魚類の内耳を本研究で得られた理解に基づいて研究することで、これまで未分類であった化石動物の研究に貢献すると期待される。

## References

- Gai, Z., Donoghue, P. C., Zhu, M., Janvier, P. & Stampanoni, M. Fossil jawless fish from China foreshadows early jawed vertebrate anatomy. *Nature* **476**, 324–327 (2011).
- Fritzscht, B., Signore, M. & Simeone, A. *Otx1* null mutant mice show partial segregation of sensory epithelia comparable to lamprey ears. *Dev. Genes Evol.* **211**, 388–396 (2001).
- Janvier, P. *Early Vertebrates* (Oxford Univ. Press, Oxford, 1996).
- Janvier, P. Evolutionary biology: born-again hagfishes. *Nature* **446**, 622–623 (2007).
- Mazan, S., Jaillard, D., Baratte, B. & Janvier, P. *Otx1* gene-controlled morphogenesis of the horizontal semicircular canal and the origin of the gnathostome characteristics. *Evol. Dev.* **2**, 186–193 (2000).

## **Constrained & Directional Evolution Newsletter Vol. 2 No. S4**

発 行 : 2018 年 12 月 14 日

発行者 : 新学術領域研究「進化の制約と方向性～微生物から多細胞生物までを貫く表現型  
進化原理の解明～」(領域代表者 倉谷 滋)

編 集 : Constrained & Directional Evolution Newsletter 編集委員会(編集責任者 深津 武馬)

領域 URL : <http://constrained-evo.org/>