



# 脊椎動物内耳の進化発生学的研究—円口類を中心に—

樋口, 真之輔

---

(Degree)

博士 (理学)

(Date of Degree)

2019-03-25

(Date of Publication)

2020-03-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7447号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007447>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



# 博 士 論 文

脊椎動物内耳の進化発生学的研究  
—円口類を中心に—

平成 31 年 1 月

神戸大学大学院理学研究科

樋口 真之輔

# 目次

要旨.....	3
第1章 序論.....	5
1.1. 内耳とは.....	5
1.2. 脊椎動物における半規管の進化.....	6
1.3. 顎口類における内耳の発生.....	8
1.4. 円口類ヌタウナギ・ヤツメウナギにおける内耳の発生.....	9
1.5. 顎口類の外側半規管と <i>Otx1</i> .....	10
1.6. 本研究の目的.....	11
第2章 材料と方法.....	12
2.1. 胚の入手と発生ステージの同定.....	12
2.2. ヤツメウナギ幼生の培養.....	13
2.3. 固定.....	14
2.4. 組織切片の作製.....	14
2.5. 組織切片の HE 染色と耳胞の三次元構築.....	15
2.6. ホールマウント免疫染色.....	15
2.7. 透明化と共焦点顕微鏡観察.....	16
2.8. 遺伝子の単離.....	17
2.9. 組織切片の <i>in situ</i> ハイブリダイゼーション.....	17
2.10. ホールマウント <i>in situ</i> ハイブリダイゼーション.....	18
第3章 結果.....	20
3.1. ヌタウナギとヤツメウナギの耳胞におけるパターンニング遺伝子の発現.....	20
3.2. ヤツメウナギ成体における内耳の観察.....	21
3.3. ヤツメウナギ内耳の発生.....	22
3.4. ヌタウナギ内耳の発生.....	23
3.5. ヌタウナギにおける前庭神経節の発生.....	24
3.6. 脊椎動物内耳の発生に共通のパターン.....	25
3.7. 円口類における <i>Otx</i> の発現.....	26
3.8. ヤツメウナギと顎口類における内耳神経分岐パターン的一致.....	26

第4章 考察 .....	28
4.1. 脊椎動物における耳胞パターンニングの一致 .....	28
4.2. 円口類に共通する単一トーラス状の「一半規管」 .....	29
4.3. 顎口類の半規管を特徴づける <b>common crus</b> .....	31
4.4. 有顎脊椎動物における外側半規管の獲得 .....	32
4.5. 外側膨大部稜と <b>dorsal macula</b> の相同性 .....	33
4.6. 甲皮類の内耳と <i>Otx1</i> ノックアウトマウスの類似性 .....	34
4.7. 今後の課題と展望 .....	35
第5章 結論 .....	36
謝辞 .....	38
参考文献 .....	40
図版 .....	48

## 要 旨

脊椎動物のうち顎をもつグループ（有顎脊椎動物，あるいは顎口類）の内耳は，前後2つの半規管と1つの外側半規管をもつ（三半規管）。顎をもたない顎口類のステムグループ，甲皮類（ostracoderms）は外側半規管を欠き，現生の無顎脊椎動物，すなわち円口類に属するヤツメウナギも一般には二半規管であるとされる。そして，円口類のもうひとつの系統であるヌタウナギは単一トラス状の半規管をもち，これが脊椎動物内耳の原始的な形質状態であると長らく考えられてきた。換言すれば，脊椎動物の内耳にみられる半規管の数は，1つから2つ，そして3つと段階的に成立したと想像されていたのである。しかし，近年の分子系統学および発生学的な解析により，円口類が単系統群であることが明らかとなった（対して，化石無顎類の多くは，顎口類のステムグループに相当する）。したがって，ヌタウナギの半規管は必ずしも祖先的な形質状態とは見なせなくなり，同時に半規管の進化シナリオも不明となった。

本研究では，脊椎動物の内耳の進化過程を明らかにするため，円口類の単系統性にに基づき脊椎動物における内耳の進化について発生学的探索を行った。まず，ヤツメウナギとヌタウナギの内耳について，その原基である耳胞におけるパターンニング関連遺伝子の発現，および耳胞から半規管が形成される過程を観察した。さらに，耳胞における *Otx* 遺伝子の新規発現によって獲得されたとこれまで考えられてきた外側半規管と，そこに分布する感覚斑，外側膨大部稜の進化についても検討した。

まず，ヤツメウナギ内耳は有顎脊椎動物と同様に，耳胞に2つの孔を生じる発生過程をもち，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があったと推測された。他方，ヌタウナギでは耳胞に1つのみ孔が生じた。外群比較の結果，ヌタウナギの状態が派生的なのであろうと推定された。その後，ヤツメウナギ耳胞の2つの陥凹は中央部で癒合し，ヌタウナギと同様の単一トラス状の半規管を作った。つまり，円口類の内耳はともに半規管をもつ。また，耳胞の前後軸，背腹軸を決定する遺伝子は，ヌタウナギとヤツメウナギにおいても顎口類と同様の領域に発現した。すなわち，耳胞における基本的なパターンニングはすべて

の脊椎動物で保存されている。そして、従来の予想に反し、円口類の耳胞にも *Otx* 遺伝子が発現した。また、内耳神経の分岐パターンの比較から、外側膨大部稜に相当する感覚斑をヤツメウナギおよびヌタウナギに見出すことができた。したがって、顎口類の外側半規管は *Otx* の新規発現獲得ではなく、その下流にある発生プログラムの変化により獲得され、その際、祖先動物がすでにもっていた外側膨大部稜が転用されたと考えられた。

以上から、顎口類と円口類の共通祖先は、2つの半規管を作りうる発生的プログラムと3つの膨大部稜に相当する感覚斑をすでに備えた、これまでに考えられてきたよりも複雑な形態の内耳を有していたと考えられた。

# 第1章 序論

## 1.1. 内耳とは

動物は、身の回りの情報を得るのにさまざまな感覚器を発達させてきた。そのなかで耳は、聴覚および平衡感覚器としてはたらく。ヒトを含む哺乳類ではこの器官は外側から外耳、中耳、内耳に分けられ、外耳は耳介から外耳道を経て鼓膜まで、中耳は鼓膜を含んでツチ骨、キヌタ骨、アブミ骨という3つの耳小骨と、耳管（エウスタキオ管）を含む。そして、内耳は三半規管、球形嚢、卵形嚢、蝸牛を含む、膜迷路と呼ばれる上皮性構造である（図1）。内耳は、哺乳類で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、平衡感覚器として出現したとされる（Fritzscht et al., 2006; Graf, 2009）。脊椎動物の成立前に祖先動物から分岐した脊椎動物の外群、尾索類（ホヤなど）や頭索類（ナメクジウオ）には、内耳と呼べるような、外界から分離された腔に感覚斑が配置された構造は見出されない。したがって、内耳は脊椎動物を定義する派生形質のひとつである（Fritzscht & Beisel, 2001）。

感覚器としての内耳にとって、適切な形態をもつ膜迷路内に有毛細胞からなる感覚斑が適切に配置されることは本質的に重要である。有毛細胞の頂端部には感覚毛があり、感覚毛に存在する機械刺激依存性イオンチャネルにより有毛細胞が発火し、感覚中枢に刺激が伝達される。平衡感覚および聴覚のいずれも、内耳での感覚は有毛細胞の機械-電気変換（*mechano-electrical transduction*）の機能に依存する（Pickles, 2013）。

顎口類においては、ひとつの半規管の片端にひとつの膨大部（*ampulla*）が付随し、その中に膨大部稜（*crista*）と呼ばれる感覚斑がある。これが、頭部回転に際して慣性により生じた内リンパの流れを受容する。膨大部稜は有毛細胞の頂端にゼリー状の物質であるクプラを備え、内リンパの流れをクプラが受け止める。また、球形嚢と卵形嚢では重力加速度が、平衡砂や平衡石が乗ったクプラの動きを介して、有毛細胞に受容される。聴覚については、内リンパの振動が基底乳頭やコルチ器の

有毛細胞で受容される。

## 1.2. 脊椎動物における半規管の進化

脊椎動物の内耳の初期進化を明らかにするために、円口類に属するヌタウナギ（図 2a）とヤツメウナギ（図 2b）の内耳形態を参照する必要がある。これらの 2 系統の動物は顎をもたず、デボン紀末までに絶滅した化石無顎類と共通する特徴を保持しており、しばしば脊椎動物の祖先的な系統として注目されてきた。そのうちヌタウナギ類は明瞭な脊椎骨や眼のレンズ、神経堤細胞など脊椎動物の共有派生形質を欠き、その理由でヤツメウナギ類と有顎脊椎動物の外群だとみなされたこともある（Forey & Janvier, 1993; Janvier, 1996; Gess et al., 2006; Khonsari et al., 2009）。

ヌタウナギは単一トラス状（ドーナツ型）の内耳、つまり一半規管をもち（Retzius, 1881; Janvier, 1996; 図 2c）、他方、ヤツメウナギは外側半規管を欠く前後 2 つの半規管をもつとされる（Retzius, 1881; Janvier, 1996 図 2d）。さらに、デボン紀の化石無顎類である甲皮類（ostracoderms）も二半規管であったらしい（Stensiö, 1927, 1969; Janvier, 1996, 2007; Gai et al., 2011）。これらの特徴から、ヌタウナギがもつような一半規管が祖先的な形質であり、次いでヤツメウナギのような二半規管が出現し、そして有顎脊椎動物の三半規管が成立したと考えられてきた（図 2e; Janvier, 1996; Mazan et al., 2000; Janvier, 2007）。いわば、単純な祖先型から複雑な構造が成立するという上昇的な進化観をもとに、内耳の形態進化のシナリオが想像されてきたのである。

近年の分子系統学的解析によると、ヌタウナギとヤツメウナギは、顎口類の姉妹群である円口類という単系統群をなす（Mallatt & Sullivan, 1998; Kuraku et al., 1999; Takezaki et al., 2003; Kuraku & Kuratani, 2006; Kuraku, 2008; Heimberg et al., 2010）。すなわち、ヌタウナギとヤツメウナギは顎口類から系統的に等しく離れており、ましてやヌタウナギがヤツメウナギよりも祖先的であるとはいえなくなった（図 2f）。

現在では発生学的な研究により、脊椎骨や眼のレンズ、神経堤細胞といった、ヌ

タウナギが欠くようにみえた形質は、この系統で二次的な変形や消失という独自の進化を遂げた、派生的な形質であることが分かっており (Ota et al., 2007, 2011; Oisi et al., 2013a, b, 2015a; Sugahara et al., 2016), 形態学的観察からも円口類説が受け容れられている。

しかし、このような円口類の系統関係と内耳の初期進化については、いまだ総合的な説明がなされていない (Janvier, 2007)。ヌタウナギは1つのみ半規管を、化石無顎類を含む顎口類は前後2つの半規管をもち、有顎脊椎動物はさらに外側半規管をもつ。化石無顎類にもこれら3つの形質の中間型はなく、ヌタウナギのみがもつような一半規管は、初期の脊椎動物がすでにもっていた形質であるか、二半規管の二次的な癒合が起こった結果であるかは不明である (Mazan et al., 2001; Janvier, 2007)。ただし、ヌタウナギの一半規管がその両端に膨大部をもつこと (図 2c) は、二半規管が癒合したというシナリオを支持する (Goodrich, 1909)。なぜなら、ヌタウナギ以外の脊椎動物に目を向けると、三半規管をもつ顎口類は3つの膨大部、二半規管であるヤツメウナギは2つの膨大部稜をもつので、あたかも半規管の数と膨大部の数は対応しているようにみえるからである (図 1, 図 2d)。加えて、機能的に見ても、1半規管の内リンパの動きを1つの膨大部稜が検出するのが効率的で、1半規管-1膨大部の組み合わせは普遍的なルールであるかのように見える。だが逆に、単一トラス状の一半規管に2つの膨大部稜が獲得されたことが、後に2つ以上の半規管を形成するための布石であるという前適応的な解釈をすることもできる。その場合はヤツメウナギ類と顎口類において、複数の方向を感知できる内耳形態が独立に獲得されたことになる。

したがって、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は、成体の内耳における比較形態学的研究のみでは不十分である。そこで本研究では、内耳の発生過程に着目し、異なる系統で共有されている発生パターンを抽出し、脊椎動物における発生プログラムの変遷を復元した。そのためには、円口類ヌタウナギ、ヤツメウナギおよび顎口類における内耳の発生過程における内耳原基の形態および遺伝子発現を比較する必要がある。円口類の内耳発生についての先行研究は非常に限

られている (Janvier, 2007)。

### 1.3. 顎口類における内耳の発生

顎口類における三半規管の発生は、球状の上皮構造がトリプルトラス状となる過程である (図 3a; Bissonnette & Fekete, 1996; Whitfield, 2015)。マウスでは、E11.5 以降で耳胞の上皮構造の形態変化によりその一部が扁平化し、背側には dorsal pouch (図 3a の E12 における dp) が、外側には lateral pouch (図 3a の E13 における lp) が形成される。E13 では dorsal pouch に 2 つの孔が生じ、前後 2 つの半規管が生じる。約 1 日遅れて lateral pouch にも孔が生じて外側半規管となり、この時点で内耳に 3 つの孔が形成される (図 3a の E15)。つまり、前後 2 つの半規管は、外側半規管に先立って形成される。この過程で、向かい合う上皮に陥凹が生じて癒合し、これがアポトーシスを介して消失することにより辺縁部に半規管が形成される (図 3b)。羊膜類では、上皮周辺の間葉の細胞分裂が上皮の形態変化の駆動力となる (Alsina & Streit, 2016; Alsina & Whitfield, 2017)。他方、ゼブラフィッシュやカエルでは、陥凹の周辺における細胞外基質の産生により上皮の形態変化が促進され、羊膜類にみられるよりも細い陥凹を生じる (図 3c; Bever et al., 2003)。この細い陥凹が癒合した構造は、「柱構造 (pillar)」とも呼ばれる (Waterman & Bell, 1984; Haddon & Lewis, 1991)。ただしこれらは、羊膜類、ゼブラフィッシュやカエルいずれにおいても、向かい合う上皮の陥凹、癒合、消失により半規管が形成される点で同じ現象であり、本研究では耳胞原基に生じる柱構造を単に「孔」と呼ぶ (図 3b, c の p)。これら、孔の位置の決定には、膨大部稜前駆細胞がシグナリングセンターとして機能するらしい (Hwang et al., 2009; Rakowiecki & Epstein, 2013)。ここから分泌される BMPs や FGFs により、陥凹部には *Netrin* が、辺縁部には *Dlx5* または *Lrig3* が (前者は dorsal pouch に、後者は lateral pouch において) 発現し、半規管形成が進行するとされる (Abraira et al., 2008; Brown et al., 2005; Merlo et al., 2002; Nishitani et al., 2017; Omata et al., 2007; Salminen et al., 2000)。耳胞において BMP や FGFs を阻害、または過剰発現

させると、陥凹が生じない、common crus が欠失して前後の半規管が融合する、などの表現型が生じる (Chang et al., 2004, 2008)。したがって、円口類ヌタウナギ、ヤツメウナギと顎口類の内耳の発生パターンを比較するためには、耳胞の発生過程における耳胞の形態変化について、陥凹、孔、膨大部稜の位置関係を理解する必要がある。

#### 1.4. 円口類ヌタウナギ・ヤツメウナギにおける内耳の発生

ヌタウナギについては、その胚を入手する困難さから、長らく発生学的研究が困難であった (Ota et al., 2006 に要約)。ところが、Ota et al. (2007) により、ヌタウナギの胚を得る手法が確立され、以来、ヌタウナギの形態形成についての理解が進んだ (Oisi et al., 2013a, b, 2015a; Sugahara et al., 2016)。しかし、ヌタウナギにおける内耳の発生については、いまだ顎口類と比較可能なレベルでは詳細に観察されていない (Janvier, 2007)。本研究では、Oisi et al. (2013b) により得られたヌタウナギ胚の組織切片や、新たに採取した胚を用いてヌタウナギにおける内耳の形態形成や耳胞のパターニング (前後軸, 背腹軸) に関わる遺伝子発現を観察した。

ヤツメウナギについてはそもそも、2つの半規管が顎口類の前後2つの半規管と同じものであるか、再検討の余地がある。というのも、ヤツメウナギ成体の半規管は他の脊椎動物に見られるような「管」ではなく、隔壁構造が内リンパの流れを制限する点で顎口類の半規管とは異なるのである (Maklad et al., 2014)。さらに、ヤツメウナギの一種ウミヤツメ *Petromyzon marinus* では2つの半規管とされる構造のそれぞれの末端が二分岐し、ヤツメウナギ特異的に外側半規管に相当する機能を有するとの報告もあり (medial duct, Maklad et al., 2014)、その形態学的理解はまだ不十分である。

ヤツメウナギの内耳の形態形成があまり研究されてこなかった理由の1つは、ヤツメウナギの生活環に幼生期が存在することにある。というのも、ヤツメウナギは胚発生後、アンモシーテスと呼ばれる約4年間の幼生期を経、特定の体長に達する

と変態して成体となる (Hardisty & Potter, 1971)。発生の最終段階 (ステージ 30) では内耳はボール状の構造であり, 隔壁や繊毛域はみられない (Tahara, 1988)。ところが, 欧州産スナヤツメ (*Lampetra planeri*) を用いた研究によると, 1年目のアンモシーテス幼生ですでに隔壁や繊毛域を備えた, 成体と同様な内耳形態となる

(Avallone et al., 2005)。すなわち, ヤツメウナギにおける内耳の形態形成を観察するためには, 初期アンモシーテス幼生を入手する必要がある。しかし, 従来は研究室でアンモシーテス幼生を育てるのは不可能であった (日下部, 2016)。そこで, 本研究では単細胞の緑藻を給餌してアンモシーテス幼生を培養する手法を新たに確立し, 内耳の形態形成を観察した。

### 1.5. 顎口類の外側半規管と *Otx1*

前述のように, ステムグループの顎口類である甲皮類 (ostracoderms) は二半規管をもつので, 外側半規管は顎口類の系統で新たに獲得されたと考えられている

(Mazan et al., 2000)。また, 耳胞の外腹側 (外側半規管の予定領域) に *Otx1* が発現し, *Otx1* ノックアウトマウスは外側半規管を欠くので (Acampora et al., 1996), 耳胞における *Otx1* の発現が, 外側半規管をもたらしたと推定されている (Mazan et al., 2000)。これが正しいなら, 外側半規管をもたない円口類の内耳には *Otx1* 相同遺伝子が発現しないと予想される (Mazan et al., 2000)。

興味深いことに, *Otx1* ノックアウトマウスでは外側膨大部稜が消失し, 他方, 卵形囊斑が後方に伸展して異所的な感覚斑と神経枝を形成する。これらの形質と, ヤツメウナギに存在する機能不明の感覚斑, dorsal macula (図 2d の dm) を支配する神経分岐パターン的一致から, 外側膨大部稜と dorsal macula との相同性が指摘されている (図 4; Fritzscht et al., 2001)。そのうえ, 形態学的なパターン的一致から, *Otx1* ノックアウトマウスの内耳はヤツメウナギ内耳を遺伝的に模写する, つまり表現型模写 (phenocopy) であるという (Fritzscht et al., 2001; Hammond & Whitfield, 2006)。この表現型模写の語は, もともと遺伝学において「生育条件によって, 遺伝子型は

変化せず、表現型だけが他の突然変異体と似たものに変化する現象」(Goldschmidt, 1935)と定義される(八杉ら, 1996)。これが、動物の形態進化の文脈においても準用されている(例えば Murakami et al., 2005)。

しかし、ヌタウナギの *dorsal macula* はその名の通り内耳の背側に存在する一方、顎口類の外側膨大部稜は外腹側にあり、内耳における位置関係が大きく異なるという問題が残されている。かりに両者が相同だとすれば、これらの発生過程において両者の前駆細胞が互いに類似した形態的位置関係を示すと期待できる。

## 1.6. 本研究の目的

本研究では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、脊椎動物における発生プログラムの変遷を復元することを試みた。そのためには、脊椎動物の各系統における内耳の発生過程を比較する必要があるが、円口類ヌタウナギ、ヤツメウナギの内耳発生に関する知見はごくわずかである(Janvier, 2007)。そこで、これらの情報を整備し、それを顎口類と比較した。

まず、耳胞の軸形成(パターンニング)が顎口類と同様であるかを確かめるために、顎口類で耳胞の前後軸、背腹軸それぞれの決定に関与する *Tbx1*, *Patched*, *Hmx3* の相同遺伝子を単離し、ヌタウナギとヤツメウナギにおいて発生中の耳胞における発現を観察した。次に、現生の脊椎動物の中で唯一、二半規管をもつとされるヤツメウナギ内耳の形態およびその発生を詳細に観察した。前述のように、アンモニーテス期の内耳形態に関する記載は限られたものである(Avallone et al., 2005; Hagelin, 1974; Lowenstein et al, 1968; Thornhill, 1972)。また、これまで記載すらされてこなかったヌタウナギ内耳の発生を記載し、ヤツメウナギや顎口類における内耳の発生との共通点、相違点を抽出した。さらに、有顎脊椎動物における外側半規管の獲得と耳胞における *Otx* 遺伝子の発現との関係を検討するため、ヌタウナギとヤツメウナギにおける *Otx1* 相同遺伝子を単離し、その発現を観察した。最後に、これらの結果から脊椎動物の各系統に見る内耳が辿った系統的進化過程を考察した。

## 第 2 章 材料と方法

### 2.1. 胚の入手と発生ステージの同定

ヌタウナギ (*Eptatretus burgeri*) 胚の入手は Oisi et al. (2015b) に従った。本研究で得た胚は 2014 年 8 月 18–19 日, 2016 年 8 月 22–23 日, 2017 年 8 月 16–17 日にそれぞれ捕獲された成体を交配して得たものである。島根県浜田市沖にて, アナゴ漁と同様の方法, すなわち反しのついた筒にアジやイワシを餌として入れておき, そこにヌタウナギを呼び込む漁法により捕獲した。1 日目の午後 3 時頃に浜田市沖に, 約 200 個の筒を 5 m おきにロープにつないで 1 晩海底に設置した。2 日目の早朝に筒を引き上げ, 捕獲されたヌタウナギ成体を江津漁港に設置し, 水温が 16°C に設定された生簀に搬入した。雌雄を選別し, 15 個の蓄養籠にそれぞれ雌 15 匹, 雄 7 匹を入れ, 江津沖の水深 70 m の海底に静置した。2 週間に 1 度程度給餌しておき, 10 月中旬から下旬にかけて産み落とされた卵を回収した。また, 捕獲されたヌタウナギ成体の一部は理化学研究所生命機能科学研究センターの水棲生物棟にて, 16°C に保たれた人工海水 (REI-SEA marine II, イワキ) 中, 遮光下で飼育し, 11 月初旬にかけて産み落とされた卵を回収した。これらの卵を, 同水棲生物棟に設置された FRP 水槽にて成体と同様の条件で培養した。翌年 2–5 月に正常に発生している胚を選び, 半透明な卵殻の外から発生の状況を観察し, 必要な発生ステージに達したら胚を卵殻から取り出して固定した。発生ステージの同定については Dean (1899) ならびに Oisi et al. (2013b) に従った。

ヤツメウナギ胚の入手は (Sugahara et al., 2015; 日下部, 2016) に従った。カワヤツメ (*Lethenteron camtschaticum*) 成体を繁殖期である 5–6 月に北海道および新潟県より集めた。実験に使用するまでは 12–13°C に設定した水槽中にて綿と備長炭で濾過した水道水を飼育水とし, 性成熟したものを人工授精に使用した。人工授精については, MS-222 (Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate, E10520, Sigma) で麻酔, 腹部にある生殖腺を指で圧迫し, 卵または精子を総排出孔から絞り出して両者を混合して行った。なお, 十分に性成熟しているかを調べるため, 雄の精液を採取し, 水を

加えて精子が遊泳していることを確かめた。雌については採取した卵がゼリー状成分によりシャーレに付着することにより性成熟状態を確かめた。これらの精子と卵を混ぜ、飼育水をかけて受精させた。受精膜が生じていることを目視で確認したら5回程度飼育水で洗浄した後、0.6 ppm メチレンブルー溶液 (Sigma-Aldrich, 19-3240-5) を含む 10% スタインバーグ液 (Steinberg, 1957) 中、9°C に設定したインキュベーターで培養した。*L. camtschaticum* は少なくとも 9–23°C の温度条件で最終の発生段階 (ステージ 30) まで正常に発生することが分かっており、必要に応じて 16°C または 23°C で培養した。発生ステージの決定は Tahara (1988) に従った。

トラザメ (*Scyliorhinus torazame*) 胚の入手は、Adachi & Kuratani (2012) に従った。理化学研究所生命機能科学研究センターの水棲動物飼育施設に設置された水槽において、16°C の人工海水 (REI-SEA marine II) で飼育し、産み落とされた卵を回収した。卵は成体のトラザメと同様に人工海水中で発生させ、目的の発生段階に達したら固定した。発生ステージについては Ballard et al. (1993) に従って同定した。

ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*, RIKEN wild type 系統) 胚は、14 時間明期、10 時間暗期に設定した部屋にて水温 28.5°C で飼育した雌雄の成体 (4 ヶ月齢以上 12 ヶ月未満) を交配して得た。

マウス (*Mus musculus*, C57BL/6 系統) 胚は、8–15 週齢の雌を、雄と交配して得た。

以上の動物の操作はすべて、理化学研究所 神戸事業所の動物実験委員会のガイドラインおよび承認された実験計画に従った。

## 2.2. ヤツメウナギ幼生の培養

ヤツメウナギ胚に *Chlorogonium capillatum* (NIES-3374) を給餌することで幼生を培養した。*C. capillatum* は単細胞の緑藻であり、ゾウリムシ、タイヨウチュウなど原生生物を培養するための餌としても用いられている (Omura et al., 2004; Higuchi et al., 2018)。本研究では簡易クロロゴニウム培地 [2%(w/v) 酢酸ナトリウム

(Nacalai Tesque, 31119-65), 10%(w/v) Yeast extract (BD, 212750) のストックをミネラルウォーター (Volvic, キリン) で 20 倍に希釈] で 25°C の明条件下で無菌培養したものを使用した。培養液を除くために遠心分離 (6,000 g, 3 分間) を 3 回行ったものを, 2-3 日に一度ヤツメウナギ幼生に給餌した。最初期のアンモシーテス幼生 (ステージ 30) では体長 7-8 mm 程度だったものを, 23°C に設定したインキュベーターで約 3 ヶ月間培養すると 20 mm 以上に成長した。その間, さまざまな体長の個体をサンプリングして内耳の観察に使用した。

### 2.3. 固定

サンプルは, 切片作製に供する際には Bouin's fixative [ピクリン酸 (Nacalai Tesque, 27925-25) 飽和水溶液, ホルマリン (Wako, 064-00401), 氷酢酸 (Nacalai Tesque, 00212-85) を 15:5:1 の割合で混合], 4% paraformaldehyde (PFA) (Merck, 1.04005.1000), または Serra's fixative [Serra, 1946; エタノール (Nacalai Tesque, 14713-24), ホルマリン, 氷酢酸を 6:3:1 の割合で混合] を用いた。4°C で 1 晩浸漬固定後, メタノールまたはエタノール系列で脱水して -30°C で保存した。ホルマウント染色に供する場合は 4% PFA を用い, 4°C で 1 晩浸漬固定し, PBS で洗浄後, 0.05% ProClin 300 (Sigma-Aldrich, 48912-U) を添加した PBS 中に 4°C で保存した。すぐに実験に供しない場合は切片用のサンプルと同様に脱水して -30°C で保存し, 染色前にエタノール系列で再水和した。

### 2.4. 組織切片の作製

脱水されたサンプルを 1% エオシン Y (Nacalai Tesque, 14410-42) /80% エタノールで 5-10 秒間染色し, 100% エタノールで 5-10 分間再脱水し, 次いで常温の安息香酸メチル (Nacalai Tesque, 22103-35) で 2 回置換した (各 30 分間以上, サンプルが沈むまで)。65°C に設定したインキュベーター内で, 液体パラフィン

(McCormick, 39502004) で3回置換し、サンプルと液体パラフィンで6 cm プラスチックシャーレ (Kord-Valmark, 2901) または4 cm プラスチックシャーレ (アズワン, 1-8549-01) に移し、ピンセットでサンプルの方向を整えてから氷水上で急冷して包埋した。作製したパラフィンケーキは薄切まで室温で保存した。薄切の際にはカッターナイフでサンプルを切り出して形を台形に整えたものを木製ブロック (アズワン, 2-173-01) に固定し、マイクロトーム (Micron, HM335E) を用いて6  $\mu\text{m}$  に薄切した。剥離防止コートスライドガラス (松浪硝子, S9901-S9905) に水を張って切片を乗せ、42°C に設定したパラフィン伸展器 (サクラ, PS53S または PS-52) で伸展した。切片を十分に伸展させ、余分な水を除き、一晚切片を乾燥させた。染色まで室温で保存した。

## 2.5. 組織切片の HE 染色と耳胞の三次元構築

切片をキシレン (Wako, 244-0081) にて脱パラフィン処理を行い、エタノール系列で再水和し、Mayer's Hematoxylin 溶液 (Wako, 131-09665) で染色した。染色時間は動物種やステージ、固定法によって異なるので、5分間を目安に検鏡して核や軟骨が適当な濃さに染色されるよう調節した。水道水で余分な Hematoxylin 溶液を落とし、アンモニア水 (石津製薬, 010-3473) を2-3滴入れた水道水 (佐野, 1981) 中で1分以上色出しを行った。続いて水道水で洗った後、70%、80% エタノールに漬け、0.25% エオシン Y / 80% エタノール溶液で2分間を目安に細胞質や各種線維を染色した。染色されたスライドを100% エタノールで5回素早く洗浄、キシレンで3回透徹し、Eukitt 液 (ORS, 6.00.01.0001.06.01.EN) で封入した。染色済みの切片を光学顕微鏡 (オリンパス, BX53) にマウントしたデジタルカメラ (オリンパス, DP74) で撮影した。

Avizo ソフトウェア v9.4 (Thermo Fisher Scientific) により三次元構築した。

## 2.6. ホールマウント免疫染色

固定済みのサンプルを PBS1TX2S [1% Triton X-100 (Nacalai Tesque, 35501-15), 2% saponin (Nacalai Tesque, 30502-42), 0.05% ProClin 300 を含む PBS] で 3 回洗浄後, 5% Goat serum (Thermo Fisher Scientific, 16210064) を含む PBS1TX2S で 1 晩室温で抗体の非特異的吸着をブロッキングした。神経及び繊毛域を染色するために, 一次抗体として Monoclonal Anti-Tubulin, Acetylated antibody (Sigma-Aldrich, T6793, Lot: 017M4806V) を 500 分の 1 に上記のブロッキング溶液で希釈し, 3 晩浸透させた。PBS1TX2S で 5 回以上洗浄した後, 二次抗体として F(ab')<sub>2</sub>-Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 647 (Thermo Fisher Scientific, A-21237, Lot # 1843705) を 200 分の 1 で, F-actin を染色するために Alexa Fluor 488 Phalloidin (Thermo Fisher Scientific, A12379), および対比染色のために 1 µg/mL の DAPI (Roche, 10236276001) および Rhodamine B isothiocyanate (Sigma-Aldrich, 283924) (Kopecky et al., 2012) を上記のブロッキング溶液で希釈し, 2 晩浸透させ, PBS1TX2S で 5 回以上洗浄した。

## 2.7. 透明化と共焦点顕微鏡観察

蛍光染色されたサンプルを, ガラスボトムディッシュ (松浪硝子, D11130H) に溶解した 1.5% 低融点 agarose (Nacalai Tesque, 01651-76 または invitrogen, 16520-100) /PBS で包埋した。このとき, サンプルの観察したい面がガラス面 (底面) に近くなるようにした。サンプルの透明化については, 処理中も含めてサンプルの収縮および膨張が少ない方法である SeeDB2G 法 (Ke et al., 2016) を参考にした。Omnipaque 350 (第一三共) の系列 (3 分の 1, 2 分の 1 および原液の Omnipaque 350 と 2% saponin の混合液) に入れ, 観察の 1 時間以上前に Omnipaque 350 原液に置換した。カバーガラスをかけてサンプルを固定し, 余分な Omnipaque 350 を吸い取り, 共焦点顕微鏡 Leica SP8X で観察した。グリセリン液浸レンズ HC PL APO 20x IMM CORR CS2 (Leica Microsystems) で観察を行った。画像の取得には LAS X ソフトウェア v3.1.5.16308 (Leica Microsystems) を用い, 1 µm または 2 µm 毎に Z-スタック撮

影を行った。Counting モード（光子計測法）を用い、シーケンシャルモードで最大 4 色（DAPI, 405 nm; Alexa 488, 442 nm; Rhodamine, 561 nm; Alexa 647, 561 nm でそれぞれ励起）で取得した。

## 2.8. 遺伝子の単離

ヌタウナギについては、ステージ 40–45 の胚から TRIzol Reagent（Thermo Fisher Scientific, 15596-018）を用いて単離された total RNA を使用した。逆転写には SuperScrip IV First-Strand Synthesis System（Thermo Fisher Scientific, 18091050）を用いて cDNA を得た。ヌタウナギ *NeuroD*, *Neurogenin*, *PatchedA–B*, および *OtxA–D* 遺伝子については、Pascual-Anaya et al. (2018) により得られたヌタウナギ胚のトランスクリプトームデータを対象に、顎口類の相同遺伝子をクエリーに TBLASTN によりそれぞれの配列を得た。これらの配列をもとに特異的なプライマーを設計してそれぞれの PCR 断片を得、pGEM-T Easy ベクター（Promega, A1360）に組み込んで単離した。これらの新規の配列については GenBank に登録した。

トラザメについては、ステージ 25–30 の胚を用いてヌタウナギと同様の方法で遺伝子を単離した。

## 2.9. 組織切片の *in situ* ハイブリダイゼーション

ジゴキシゲニン（DIG, digoxigenin）標識のアンチセンス RNA プローブは、DIG RNA labeling kit（Roche, 11175025910）により合成した。

切片をキシレンに漬けて脱パラフィン処理を行い、エタノール系列で再水和して 0.1% Tween-20（Nacalai Tesque, 28353-85）を含む PBS（PBSw）で 2 回洗浄した。その後、20 µg/mL の proteinase K（Nacalai Tesque, 29442-14）を含む PBSw 溶液で 10 分間処理し、PBSw で 2 回洗浄し、wash solution [50% ホルムアミド（Nacalai Tesque, 16229-95）、2 × SSC、0.1% Tween-20] に置き換えた。次いでハイブリダイゼ

ーション溶液 [50% ホルムアミド, 5×SSC, 1% SDS, 0.5 mg/mL 酵母由来 RNA (Sigma-Aldrich, R6625), 50 µg/mL ヘパリン (Nacalai Tesque, 17513-41), 5 mM EDTA (Wako, 345-01865), 硫酸デキストラン (Nacalai Tesque, 10912-34)] に置き換え、室温で1時間インキュベートした。その後、プローブを加えたハイブリダイゼーション溶液に置き換えて、乾燥を防ぐためにカバーガラスを静かに乗せ、65°Cで1晩ハイブリダイズさせた。ハイブリダイズしなかったプローブを除くため、wash solution で65°Cで15分間の洗浄を2回繰り返した。その後、0.1% Tween-20 を含むマレイン酸緩衝液 (MABT) [100 mM マレイン酸 (Nacalai Tesque, 21020-45), 150 mM NaCl (Nacalai Tesque, 31320-05) を NaOH (Nacalai Tesque, 31511-05) で pH7.5 に合わせ、0.1% Tween-20 と 0.05% ProClin 300 を加える] (MABT) と wash solution を等量混合した溶液に置き換えて5分後、室温に戻して MABT で2回洗浄した。DIG ラベルされたプローブの検出のために、10% Blocking Reagent (Roche, 11096176001), Goat serum を含む MABT で30分間ブロッキングを行い、Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments (Roche, 11093274910, Lot: 13050420) ブロッキング溶液で4000分の1に希釈し、この溶液で切片を2時間処理した。MABT で5回抗体を洗浄した後、NTMT [100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH9.8), 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Tween-20] に浸透させた。発色については、BM purple (Roche, 11442074001) または NBT (Roche, 11383213001) と BCIP (Roche, 11383221001) を含む NTMT でアルカリフォスファターゼ活性による発色を確認した。PBS 洗浄により発色を停止し、4% PFA/PBS で再固定した。エオシンで対比染色を行い、100% エタノールで6回洗浄/脱水を行い、キシレンで透徹して Eukitt で封入した。なお、BM purple や NBT/BCIP の反応産物はエタノールやキシレンにやや可溶であるが、対比染色後に念入りに脱水すれば、Eukitt 封入後も退色を防ぐことができる。*in situ* ハイブリダイゼーションの切片を封入する際はこの点に注意し、脱水に用いる最後の2回のエタノールには新しいものを使用した。

## 2.10. ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション

脱水後、 $-30^{\circ}\text{C}$  で保存されている胚のサンプルを 6 穴シャーレに移し、メタノール系列で再水和（90%, 50%, 30%メタノールの順に 5 分毎に液交換）して PBSw で 2 回洗浄した。その後、 $20\ \mu\text{g}/\text{mL}$  の proteinase K を含む PBSw 溶液で 20 分間処理し、PBSw で 2 回洗浄後、 $2\times\text{SSC}$  (pH 4.5) で置き換えてからホルマウント用のハイブリダイゼーション溶液 [50% ホルムアミド,  $5\times\text{SSC}$ , 1% SDS,  $0.5\ \text{mg}/\text{mL}$  酵母由来 RNA,  $50\ \mu\text{g}/\text{mL}$  ヘパリン,  $5\ \text{mM}$  EDTA] に移し、室温で 1 時間インキュベートした。その後、プローブを加えたハイブリダイゼーション溶液に置き換えて、 $65^{\circ}\text{C}$  で 1 晩ハイブリダイズさせた。ハイブリダイズしなかったプローブを除くため、wash solution で  $65^{\circ}\text{C}$  で 1 時間の洗浄を 5 回繰り返した。その後、MABT と wash solution を等量混合した溶液に置き換えて 30 分後、室温に戻して MABT で 2 回洗浄した。DIG ラベルされたプローブの検出のために、10% Blocking Reagent (Roche, 11096176001), Goat serum を含む MABT で 2 時間ブロッキングを行い、Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments (Roche, 11093274910, Lot: 13050420) ブロッキング溶液で 4000 分の 1 に希釈し、この溶液で胚を  $4^{\circ}\text{C}$  で 1 晩インキュベートした。MABT で 5 回抗体を洗浄した後、NTMT [ $100\ \text{mM}$  NaCl,  $100\ \text{mM}$  Tris-HCl (pH9.8),  $50\ \text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ , 0.1% Tween-20] に浸透させた。発色については、BM purple (Roche, 11442074001) または NBT (Roche, 11383213001) と BCIP (Roche, 11383221001) を含む NTMT でアルカリフォスファターゼ活性による発色を確認した。PBS 洗浄により発色を停止し、4% PFA/PBS で再固定して観察した。

## 第3章 結果

### 3.1. ヌタウナギとヤツメウナギの耳胞におけるパターンニング遺伝子の発現

はじめに、脊椎動物における耳胞の基本的なパターンニングの共通性を調べる目的で、円口類の耳胞における関連遺伝子の発現を調べた。すなわち、マウスやゼブラフィッシュなどの顎口類を用いた研究により、耳胞のパターンニングに関わる遺伝子が複数同定されているので、円口類においてこれらの遺伝子を単離して耳胞での発現を観察し、顎口類と比較した。

耳胞の前後軸は *Tbx1* によって決定される (Vitelli et al., 2003)。すなわち、*Tbx1* が耳胞の後方に発現し、*Neurogenin*, *NeuroD* などの神経分化因子の発現を抑制し、耳胞前方の *Tbx1*-陰性領域のみが脱上皮化して前庭神経節前駆細胞となる (Vitelli2003; Raft et al., 2004; Macchiarulo & Morrow, 2017)。ヤツメウナギおよびヌタウナギにおける *Tbx1* 相同遺伝子、*Tbx1/10A* の発現を観察したところ、両動物において *Tbx1/10A* は耳胞の後方に発現し (図 5a, b; ヤツメウナギについては Tiecke et al., 2007 も参照)、この点で、耳胞の前後軸特異化機構が顎口類と一致することがわかった。

次に、耳胞の背腹軸決定に関与する遺伝子、*Patched* の発現を解析した。*Patched* は、Hedgehog シグナルの受容体をコードし、耳胞腹側に発現することが背腹軸形成に重要である (Hammond & Whitfield, 2006; Zarei et al., 2017)。そこで、円口類における *Patched* 相同遺伝子を単離して耳胞における発現を観察したところ、ヌタウナギ胚において *PatchedB* は、ステージ 40 で耳胞の腹側に発現していた (図 5f)。同様に、ヤツメウナギでも、相同遺伝子 *PatchedA* が耳胞腹側に発現した (図 5e)。よって、*Patched* による背腹軸の耳胞パターンニングはヌタウナギ、ヤツメウナギを含めた脊椎動物で保存されていることがわかった。

また、背腹軸のパターンニングに関してはもう一つの遺伝子、*Hmx3* がマウスにおいて耳胞の背側に発現し、前庭への分化を調節するとされている (Hadrys et al,1998; Wang et al., 2004; Wang & Lufkin, 2005)。そこで、ヌタウナギの *Hmx3* 相同遺伝子を単離して、その発現パターンを観察したところ、ヌタウナギ胚の耳胞における *Hmx3*

の発現は顎口類よりもやや広く、耳胞腹側にまで及んだ（図 5h）。この発現パターンは、マウスが内耳の腹側に蝸牛をもち、ヌタウナギに比べて内耳における前庭部分の割合が小さいことを反映しているのであろう。とはいえ、内リンパ管には *Hmx3* が発現せず（図 5h の ed）、この点はマウスでも同様である（Wang et al., 2004）。したがって、形態から示唆される *Hmx3* の発現パターンはヌタウナギとマウスで一致するといえる。ただし、ゼブラフィッシュでは *Hmx3* は耳胞の背側よりもむしろ前方に発現し（Feng & Xu, 2010）、ヤツメウナギの *Hmx3* 相同遺伝子の発現も耳胞の前側に限られる（図 5g）。

したがって、マウスとゼブラフィッシュで *Hmx3* の発現領域は互いに異なり、円口類における *Hmx3* 相同遺伝子の発現は、ヌタウナギは前者に、ヤツメウナギは後者に似る。しかし、円口類と顎口類の間で発現パターンに違いはない。

以上の観察から、耳胞のパターニングに関与する遺伝子の基本的な発現は、すべての脊椎動物で一致することがわかった。にも関わらず、いかにして異なる形態の内耳が形成されるのであろうか。以後、脊椎動物の各系統における内耳の形態学的なパターンの共通点、相違点を抽出するための観察を行った。

### 3.2. ヤツメウナギ成体における内耳の観察

まず、これまで長いあいだ二半規管であるとみなされてきたヤツメウナギの成体の内耳を改めて詳細に観察するために、パラフィンワックス包埋の連続切片を作製し、コンピュータで三次元構築して観察を行った（図 6a-h）。すると、ヤツメウナギ内耳の半規管部分はこれまで考えられてきたような二半規管ではなく、一半規管の内耳をもつことがわかった（図 6i, j）。なぜなら、ヤツメウナギにのみ存在する繊毛域を取り除き、管の部分のみを可視化すると、前後 2 つの半規管を隔てる構造（common crus）が存在せず、単一トラス状の半規管が約 60° 曲げられた形態だとみなせるためである（図 6b）。

### 3.3. ヤツメウナギ内耳の発生

ヤツメウナギの単一トラス状の半規管がどのように形成されるかを明らかにするため、ヤツメウナギにおける内耳の発生を観察した。ヤツメウナギ胚では、ステージ 22 で耳プラコードの陥入がおこり、ステージ 24 で耳胞が形成される (Tahara, 1988)。最初期のアンモシーテス幼生 (ステージ 30, 体長 8 mm 程度) では耳胞はボール状の上皮構造で、そこに半規管や繊毛域は生じていなかった (図 7a)。すなわち、ヤツメウナギ内耳の形態形成ならびに細胞分化は、もっぱら幼生期に生じる。そこで、ヤツメウナギにおいて耳胞の形態変化が起こり、半規管の形成を観察するため、実験室で給餌したアンモシーテス幼生の内耳形態を観察した。

体長 9 mm 幼生では、ステージ 30 胚と同様に半規管は形成されておらず、前後方向にやや伸長した楕円形の耳胞であった (図 7b)。体長 10 mm 幼生では、耳胞内前側において、背腹のそれぞれの方向から陥凹が見られた (図 7c の ade)。体長 11 mm 幼生においてはこれら陥凹が伸長し、向かい合う上皮が癒合することによって孔が形成された一方、耳胞内後側では陥凹が生じるのみに留まった (図 7d)。

体長 12 mm 幼生および 13 mm 幼生では、後側の陥凹も癒合して孔を形成していた (図 7e, f の A, P)。すなわちこの時点では、ヤツメウナギの耳胞には 2 つの孔が形成されていた。体長 14 mm 幼生では 2 つの孔の背側がそれぞれ拡大して繊毛が生じた (図 7g の紫色の部分)。これらの繊毛が生じている領域は体長 17 mm 幼生でさらに拡大した (図 7h)。

前述のように、成体のヤツメウナギでは前後 2 つの孔が拡大して癒合し、内耳中央部の繊毛域となる (図 6b, i の紫色の部分)。したがって、これまで比較形態学的理解を難しくしてきたヤツメウナギの繊毛域は、耳胞に生じる 2 つの孔がそれぞれ背側から拡大して形成された部分であることがわかった (図 7 において f と g を比較)。また、顎口類ゼブラフィッシュの内耳発生においても、前後 2 つの孔は外側半規管に対応する孔に先んじて生じることが知られており (Baxendale & Whitfield, 2016; Waterman & Bell, 1984)、両者は 2 つの孔をもつ耳胞を経るという点で一時的に類似した発生過程をもつことがわかった (図 11c, d と e, f を比較)。

加えて、これまでヤツメウナギの半規管と顎口類の前後2つの半規管は相同であると推定できた。なぜなら、耳胞の遺伝子レベルの極性が同じであり（図 5a, e）、2つの孔から半規管が形成される点（図 7）は顎口類の前後2つの半規管と一致したためである。ただし、ヤツメウナギの半規管は顎口類に見られるような「管」ではなく、隔壁構造が内リンパの流れを制限する、いわば擬似的な管である点（図 6c-h）と、common crus によって半規管が前後2つに分離しない点で、形態学的に異なる。ゆえに、ヤツメウナギでは‘ヤツメウナギ’前半規管（‘lamprey’ anterior semicircular canal）および‘ヤツメウナギ’後半規管と名付けるのが適切である（図 6の lasc, lpsc）。

### 3.4. ヌタウナギ内耳の発生

ヌタウナギ内耳の発生過程を形態学的に明らかにするために、耳プラコードから一半規管が形成されるまでの上皮構造の形態変化を観察した。そして、耳胞から直接一半規管が生じるのか、二半規管様の形態（耳胞に2つの孔が生じた状態）を経て、2つの孔の癒合または退縮により一半規管が生じるのかを調べた。

まず、神経胚後期（ステージ 28）において耳プラコードの肥厚、陥凹がみられ（図 8a）、ステージ 30 で耳胞をつくる上皮が陥入していた（図 8b）。咽頭胚初期（ステージ 35）で外部との連絡を失って耳胞が形成され（図 8c）、咽頭胚中期（ステージ 45）で背側に内リンパ管に相当すると思しき部分が生じて耳胞背外側に伸長した（図 8d）。咽頭胚後期（ステージ 51）では耳胞が背腹方向に扁平化し、内リンパ管の根本が狭窄していた（図 8e）。ステージ 51–53（ステージ 51 と 53 の間の段階）で、耳胞のやや外側に1つのみ孔が生じていた（図 8f の A+P, 図 9）。このとき内リンパ管の起始は耳胞のやや前方にあった。ステージ 53 では半規管の孔が拡大し（図 8g の A+P）、ステージ 60 では膨大部が顕著になった（図 8h）。

このように、ヌタウナギの発生においては耳胞中央部の一箇所のみで陥凹が生じ、単一トラス状の一半規管が直接形成された。つまり、発生過程で二半規管を

形成しうるような、2つの孔が生じることはない。一方、ヌタウナギの内耳も耳プラコードの陥凹によって耳胞が生じ、向かい合う上皮が癒合・消失して孔を作ること  
で半規管が生じる点はヤツメウナギおよび顎口類と同様であった。

### 3.5. ヌタウナギにおける前庭神経節の発生

脊椎動物は一般に、内耳神経に1つの神経節をもつが、ヌタウナギでは例外的に2つの前庭神経節が観察されている (Retzius, 1881; Amemiya et al., 1985; McVean, 1998)。これら2神経節は、ヌタウナギ内耳の前後軸に沿った鏡像対称性の顕れであると考えられてきた。たとえば、ヌタウナギの内耳の発生において、耳胞の前後それぞれから脱上皮化して、2つの前庭神経節が生じるということ説が唱えられている (Fritsch et al., 2014)。そこで、この仮説を検討するために、ヌタウナギの耳胞の形態観察に前庭神経節の前駆細胞を追加して観察した (図 10)。

神経胚後期 (ステージ 28) では、脱上皮化した細胞群は観察されなかった (図 10a)。耳胞内部が外部との連絡が残る段階 (ステージ 30) では陥入部の前内側に脱上皮化した前庭神経前駆細胞の1集団がみられた (図 10b)。咽頭胚初期 (ステージ 35) および咽頭胚中期 (ステージ 40, 45) でも同様に耳胞の前内側に単一の集団として前庭神経節前駆細胞は存在したが (図 10c-e)、ステージ 50 ではこれが2つの集団に分かれた (図 10f)。そして、咽頭胚後期 (ステージ 53) 以降もこれら2つの集団が維持され、前後2つの前庭神経節となった (図 10g, h)。したがって、ヌタウナギ前庭神経節の発生において前庭神経節は耳胞の前内側のみから生じ、これが前後2つの前庭神経節に分かれ、耳胞の前後それぞれから2つの前庭神経節が生じるのではない。

以上の形態学的発生パターンは、神経分化に関与する遺伝子の発現領域とも整合的である。たとえば、*NeuroD* は顎口類では耳胞の前方から脱上皮化した前庭神経節前駆細胞に発現する (Raft et al., 2004)。ヌタウナギでも耳胞における *NeuroD* の発現を観察したところ、耳胞の前側のみが発現していた (図 5d)。すなわち、他の脊椎動

物と同様、ヌタウナギにおいても耳胞の前側からのみ前庭神経節が生じることは、遺伝子発現レベルの共通した背景に裏付けられている。

### 3.6. 脊椎動物内耳の発生に共通のパターン

上に述べたヤツメウナギ内耳原基の2つの孔をもつ耳胞の形態は、顎口類ゼブラフィッシュにおける内耳の発生過程 (Baxendale & Whitfield, 2016) と類似している。そこで、円口類と顎口類の耳胞のパターンが一致するかを形態的な観察により確かめるため、ヌタウナギとヤツメウナギ、および顎口類のゼブラフィッシュにおいて、耳胞に形成される孔の形態学的位置関係を比較した。

ヌタウナギではステージ 53 胚、ヤツメウナギでは体長 12 mm のアンモシーテス幼生、ゼブラフィッシュでは 57 hpf 胚を用いた。これらはいずれも、耳胞に孔が形成された直後の段階である。ゼブラフィッシュについては、最終的には前、後、外側という3つの半規管にそれぞれ対応する3つの孔が生じるが、55 hpf 胚では、前後2つの半規管に対応する2つの孔が、外側半規管の孔に先立って生じる

(Baxendale & Whitfield, 2016)。そこで、円口類との比較のために、外側半規管の孔が未形成である 57 hpf 胚を用いた。

これら三者では、いずれも耳胞の背内側から腹外側の方向に、向かい合う上皮が癒合し、孔が生じていた (図 11 の b, d, f を比較)。2つの孔を有するヤツメウナギとゼブラフィッシュのみならず、1つのみ孔を生じるヌタウナギにおいても孔が形成される方向は同じであった。ただし、ヤツメウナギではこれ以降、既述のように2つの孔が内耳の中央部で癒合して繊毛域となり、単一トラス状の半規管を形成する (図 6, 図 7)。これに対し、顎口類のゼブラフィッシュでは 57 hpf から 72 hpf にかけて、もう1つの孔が耳胞の腹側に形成され、その辺縁部が外側半規管となり

(Baxendale & Whitfield, 2016)、トリプルトラス状の三半規管が発生する点で異なる。

### 3.7. 円口類における *Otx* の発現

*Otx1* 相同遺伝子の発現を確かめるために、ヌタウナギで新規なものを含む *OtxA* から *OtxD* を単離し、これら遺伝子の発現解析を行った。すると、少なくとも *OtxA* が前脳、中脳に加えて耳胞の腹外側に発現した (図 13c-m)。ヤツメウナギにおいても、新規遺伝子である *OtxD* を含む *OtxA* から *OtxD* の 4 遺伝子を単離し、これらの発現を調べたところ、少なくとも *OtxA* が内耳の腹側に発現していた (図 13a, b)。

すると従来の説のように、顎口類における外側膨大部稜と外側半規管の獲得を、単純に *Otx* の発現の有無のみでは理解できない。むしろ、顎口類の外側半規管の形成に *Otx1* が必須であるように見えるのは、その下流遺伝子群のはたらきが変化した結果と考えることもできる。

### 3.8. ヤツメウナギと顎口類における内耳神経分岐パターンの一致

感覚斑の相同性について理解するために、ヤツメウナギの dorsal macula の発生過程を詳細に観察した。なぜなら、1.6. で述べたように顎口類の外側膨大部稜とヤツメウナギの dorsal macula という 2 つの感覚斑が相同ならば、*Otx* の発現は半規管よりもむしろ、感覚斑の形成に重要であるという推定も成り立つためである。

ヤツメウナギの dorsal macula は、その名が示唆するように内耳の背側に存在する機能不明の感覚斑であり、脊椎動物の中でヤツメウナギ類にのみみられる (Retzius, 1881; Fritzscht et al., 2001)。その神経分岐パターンから dorsal macula は顎口類の外側膨大部稜と相同であることが示唆されてきた (Fritzscht et al., 2001)。しかし、ヤツメウナギの dorsal macula と、有顎脊椎動物の外側膨大部稜とは形態学的位置関係が異なり、前者は内耳の背側、後者は前外側に存在する。そこで、発生過程における両者の前駆細胞の位置関係を比較した。

すると、ヤツメウナギの体長 12 mm アンモシーテス幼生 (前後 2 つの孔が形成された直後) では、dorsal macula 前駆細胞は耳胞の前外側に位置していた。Dorsal macula を支配する神経枝に着目すると、内耳神経 (CnVIII) がまず、後膨大部稜の

枝と分岐し、それより遠位で前膨大部稜を支配する枝と分岐し、**dorsal macula** を支配していた (図 14a, b)。この内耳神経の分岐パターンはトラザメやマウスと一致する (図 14c-e)。このように、耳胞における感覚斑原基の形態学的位置関係と神経の分岐パターンがヤツメウナギと有顎脊椎動物との間で一致することは、その発生機構の共有を示唆する。すなわち、ヤツメウナギの **dorsal macula** と顎口類の外側膨大部稜の位置関係と神経分岐パターンの一致は、先行研究で指摘されたように

(Fritsch et al., 2001)、両者の相同性を支持する。他方、**dorsal macula** は外側半規管を作ることはなく耳胞の背側に移動する点において顎口類の外側膨大部稜とは異なる。

また、ヌタウナギでも同様の解析を行うと、内耳神経は前膨大部稜と共通の枝からの分岐が **common macula** の一部を支配しており (図 14f において赤矢尻で示した神経枝)、**dorsal macula**/外側膨大部稜に相同な感覚斑は、ヌタウナギでは **common macula** の一部として同定でき、ヌタウナギの **dorsal macula** と名付けた (図 14f の dm)。

したがって、円口類は前後 2 つの感覚斑に加えて、第三の感覚斑を備え、それは顎口類の外側膨大部稜と相同であるということになる。では、その発生学的背景も脊椎動物を通じて保存されているのだろうか。

円口類の **dorsal macula** が顎口類の外側膨大部稜と同じ発生プログラムで制御されているとすれば、*Foxg1* の相同遺伝子の制御を受けていると推定できる。なぜなら、*Foxg1* ノックアウトマウスでは外側半規管が形成されるにも関わらず、外側膨大部稜を欠くからである (Pauley et al., 2006)。そこで、ヤツメウナギおよびヌタウナギで *Foxg1* 相同遺伝子、*Foxg* を単離してその発現を観察した。すると、ヤツメウナギ、ヌタウナギのいずれも、*Foxg* は耳胞に発現した (図 15)。したがって、上記の形態学的な観察と併せて、遺伝子発現レベルでも **dorsal macula** と外側膨大部稜の相同性が認められた。

## 第4章 考察

### 4.1. 脊椎動物における耳胞パターンニングの一致

円口類と顎口類では成体の内耳形態が異なるが、発生過程の耳胞のパターンニング遺伝子の発現が保存されていることが確認された。そのうち、前後軸のパターンニングの保存は特に重要な知見である。なぜなら、円口類の内耳は前後軸に沿って鏡像対称であると考えられ (Hammond & Whitfield, 2006), 円口類の耳胞には、顎口類と異なる前後軸のパターンニングが存在すると想像されてきたからである (Fritzscht et al., 2014)。とりわけヌタウナギにおいては、膜迷路自体が前後軸に沿って鏡像対称に見えること (Hammond & Whitfield, 2006) はもとより、前庭神経節が2つ存在するとされてきた (Retzius, 1881; McVean, 1996) ことも混乱の原因である。ヌタウナギにおける2つの前庭神経節の存在を説明する発生メカニズムとして、*Tbx1* が耳胞の中央部にのみ発現し、耳胞の前後それぞれから前庭神経節前駆細胞が脱上皮化するという説も提唱されてきた (Fritzscht et al., 2014)。しかし、本研究の観察で示されたように、ヌタウナギの前庭神経節は、はじめは1つの細胞集団として生じたものが、二次的に2つに分離して並び、前後2つの前庭神経節に分化する。その際には、前庭神経節の発生を抑制する *Tbx1/10A* が顎口類と同様に耳胞の後側に発現し、神経分化因子 *NeuroD* は *Tbx1/10A*-陰性領域である前側にのみ発現していた (図 5d)。すなわち、前庭神経節の発生プログラムは顎口類のものとは変わらないのである。実際、ヒトの前庭神経節を見ても、「前庭神経節、上部/下部 (vestibular ganglion, superior/inferior part)」と識別することができる (Streether, 1906)。このうち、上部の前庭神経節は前膨大部稜、外側膨大部稜と卵形囊斑を支配し、下部の前庭神経節は後膨大部稜と球形囊斑を支配するという、図 14e に示されるような、典型的な分岐パターンを示す。したがって、ヌタウナギの2つに分かれているようにみえる前庭神経節は特殊な形質ではなく、あくまでも脊椎動物の前庭神経の分岐パターンをよく反映しているに過ぎないことが分かる。

ヌタウナギの内耳については、他にも混乱を招きやすく、本研究で指摘しておく

必要がある。一部の教科書では、ヌタウナギの内耳は後半規管のみをもつ (Kent & Carr, 2000) という根拠不明な記述が散見される。が、ヌタウナギ *Tbx1/10A* の発現や前庭神経節の発生パターンが示すように、顎口類と同様にヌタウナギの耳胞には前後軸が存在するので、ヌタウナギの2つの膨大部稜についてはヤツメウナギや顎口類の前後2つの膨大部稜とそれぞれ相同であるといえる。したがって、上記の言及は誤りであるが、かといって前後2つの半規管が癒合したものではなく、ましてや一半規管が祖先的であるともいえない。後述のように、ヌタウナギの内耳形態はこれまでに想定されてきたどのシナリオよりも複雑な進化の過程を辿ったことがわかる。

背腹軸についても、遺伝子発現および耳胞に孔が生じる方向性を比較すると、円口類と顎口類で同じパターンであった (図5)。ヤツメウナギでは耳胞の前後に2つの孔が生じ、これと、顎口類ゼブラフィッシュの発生過程で現れる前後2つの孔の形態学的位置関係が一致する (図11)。さらに、ヌタウナギで形成される孔は1つのみだが、孔が生じる方向性に注目すると、耳胞の背外側と腹内側方向の陥凹により形成される点において、ヤツメウナギおよび顎口類と一致する。したがって、円口類を含む脊椎動物全体で、背腹軸についても耳胞の基本的なパターンニングは遺伝子発現、形態形成の両面で保存されているといえる。

#### 4.2. 円口類に共通する単一トラス状の「一半規管」

これまで長い間、ヤツメウナギの内耳は二半規管であると考えられてきたが、本研究で改めてヤツメウナギ成体の内耳を観察したことで、形態学的にはヌタウナギと同様な一半規管とみなすべきであることがわかった (図6)。ヤツメウナギの内耳には、半規管の間に繊毛域 (ciliated chamber) と呼ばれる機能不明な領域があり、これが他の脊椎動物の内耳との比較形態学的理解を困難にしてきたのである。しかし、半規管の部分にのみに注目すると、単一トラス状の半規管とみなすべきであり、これはヌタウナギの内耳と同様の形態である。

ヤツメウナギの発生においては、潜在的には前後2つの半規管を作りうる2つの孔が耳胞に生じる。ところが、発生が進むとこれら2つの孔の間、つまり顎口類の *common crus* に相当する部分にまで2つの孔が拡大して両者が癒合し、繊毛域になる。すなわち、ヤツメウナギが「二半規管」であるといわれてきた理由は、単一トールラス状の半規管が約60°曲げられた形態をもち、複数方向の頭部の回転運動を感知する機能がある (Lowenstein, 1970; Maklad et al., 2014) からである。さらに、Maklad et al. (2014) はウミヤツメ *Petromyzon marinus* の内耳を観察し、ヤツメウナギの前後2つの半規管 ('lamprey' anterior/posterior semicircular canal) の末端がそれぞれ二分岐し (medial duct; Maklad et al., 2014)、これが外側半規管に相当するはたらきをする、すなわちヤツメウナギ類に特有の方法ですべての方向を感知することを示唆した (Maklad et al., 2014)。これらはいずれもヤツメウナギが特異的に獲得した形質であり、顎口類の外側半規管とは異なると考えられる。

他方、ヌタウナギにおける内耳の発生を正確に記載した先行研究はなく、本研究が初めての報告である。仮に、ヌタウナギに個体発生において一時的に「二半規管様」の形態、すなわち2つの孔をもつ耳胞が生じ、次いで単一トールラス状の半規管になったとすれば、これはヌタウナギの系統において祖先動物の二半規管が癒合して半規管となったシナリオを強く支持する (Goodrich, 1909)。しかし、ヌタウナギ内耳の発生におけるどのステージにも2つの孔は現れず、直接1つのみ孔が生じて半規管を形成し、二次的な癒合のシナリオを支持しなかった。

これらの円口類における内耳形態形成の比較により、ヌタウナギの半規管は祖先動物の二半規管の癒合の結果とはいえない。むしろ、ヤツメウナギの内耳を形態学的には半規管とみなすことができ、単一トールラス状の内耳が円口類に共通する形態であるといえる。よって、円口類の内耳とは、①半規管部分がトールラス状であり、②膨大部を2つもつと仮定することが理に適う。

以上から、脊椎動物における内耳形態の初期進化のシナリオを、次のように推定できる。鍵となるのは、顎口類とヤツメウナギの発生過程の類似性である。つまり、57 hpf のゼブラフィッシュ胚 (外側半規管をつくる孔が未形成の段階) と 12

mm のヤツメウナギ幼生のそれぞれにおいて、耳胞に形成される2つの孔の形態的位置関係が一致する (図 11c, e)。他方、ヌタウナギでは直接1つのみ孔が生じる (図 8 の A+P, 図 11a)。これらの発生パターンと、ヌタウナギとヤツメウナギに対し顎口類が外群と見なせるという系統関係から考えると、最節約的に、脊椎動物の共通祖先が内耳の発生過程で耳胞に2つ孔を生じる発生機構をもっていたと推定できる (図 16)。すると、ヌタウナギにおいて直接1つのみ孔が生じる発生パターンは、この系統で独自に獲得されたことになる。また、繊毛域と、末端が二分岐した前後2つの半規管をもつヤツメウナギの内耳も、やはりヤツメウナギの系統に派生的であるといえる。

#### 4.3. 顎口類の半規管を特徴づける common crus

顎口類がもつ前後2つの半規管は、common crus によって2つの環に分離されている。デボン紀の化石無顎類である甲皮類 (ostracoderm) にも明瞭に common crus がみられる一方、円口類には相当する構造がないので、これはステムグループを含めた顎口類の内耳を特徴づける構造であるといえる。

しかしながら、顎口類の common crus の発生機構の詳細は不明である。現在のところ、ニワトリを用いた研究により、耳胞の背側には FGFs, Bmp2, Bmp7-陰性の領域があり、これが耳胞に生じた2つの孔が癒合せずに common crus として残り、前後2つの半規管が形成されるために重要であるとされる (Chang et al., 2004)。すなわち、common crus の形成には耳胞の中でも特殊な領域が必要であり、この領域が無ければ、耳胞に生じた2つの孔は癒合する性質があるとも考えられる。このように、前後2つの半規管をつくる孔が common crus によって分離される形態が、どのような発生メカニズムによって保障されているのかは未解決の問題であり、今後の顎口類を用いた発生学的研究が common crus の起源を知る手がかりとなるかもしれない。

Common crus についても一つ、本研究の知見を基に再検討すべきことがある。

上述の通り，ヤツメウナギの内耳に現れる2つの孔は，内耳の形成過程で背側から癒合して絨毛域となる。残された半規管は，形態的には単一トラス状，すなわち一半規管とみなすことができ，これは顎口類の前後2つの半規管とは異なっている。しかし，Fritsch et al. (2014) はヤツメウナギの半規管の結合部を指して“common crus”と呼んでいるが，これは顎口類の common crus とは異なる構造である。なぜなら，顎口類の典型的な common crus は前後2つの半規管の共通部分であり（図1），一端が前後2つの半規管に，他端が卵形囊に開口するが，ヤツメウナギの common crus は卵形囊に通じていないためである（図17a）。

#### 4.4. 有顎脊椎動物における外側半規管の獲得

本研究で初めて明らかになったように，円口類ヌタウナギ，ヤツメウナギの耳胞において *OtxA* がそれぞれ発現するので，*Otx* の発現のみで外側半規管の獲得を単純に説明できない。むしろ，脊椎動物の祖先はすでに耳胞の腹側で *Otx* を発現しており，顎口類の外側膨大部稜や円口類の dorsal macula の発生に関わるという推論も成り立つ。ならば，有顎脊椎動物における外側半規管の獲得は，耳胞における *Otx* の新規発現ではなく，*Otx* の下流遺伝子の改変によってもたらされたと考えられる。

ただし，*Otx* と外側半規管の形成が無関係であるかという点，依然問題は残る。外側半規管を欠く *Otx1* ノックアウトマウスにおいて，*Otx1* の制御領域下にヒト *OTX2* もしくはショウジョウバエの相同遺伝子 *Otd* をノックインしても外側半規管がレスキューされないことは，外側半規管形成と *Otx1* の密接な関わりを示唆する

(Acampora et al., 1998; Morsli et al., 1999)。今後，*Otx1* の下流遺伝子群や，*Otx1* 自体の DNA 結合ドメインの解析により，外側半規管の獲得をもたらした具体的な遺伝的プログラムの変更を明らかにする必要がある。

#### 4.5. 外側膨大部稜と dorsal macula の相同性

円口類における内耳の発生パターンの観察によると、外側膨大部稜とヤツメウナギの dorsal macula を支配する内耳神経の分岐パターン、および耳胞における位置関係が一致する (図 14)。これらのパターンは外側膨大部稜と dorsal macula の相同性を示し、Fritzscht et al. (2001) の指摘を支持した。しかし、この一致する神経分岐パターンを示す幼生ステージ (図 14a, b; 体長 12 mm 幼生) のあと、顎口類のように外側半規管を形成する代わりに dorsal macula は前側の孔を通して耳胞の背側に移動する点において、両者には質的な違いがある。初期の脊椎動物がもっていたであろう dorsal macula/外側膨大部稜に相同な感覚斑が、ヤツメウナギ類では dorsal macula として背側に移動し、他方、有顎脊椎動物では半規管形成能を獲得するに至った発生プログラムの変更については、さらなる発生学的研究が必要である。

ヌタウナギには dorsal macula に相当する独立した感覚斑を見出すことはできないが、common macula の一部は内耳神経のうち、前膨大部稜と共通の神経からの分岐の支配を受けており、これを dorsal macula と名付けた (図 14f)。先行研究においても、スウェーデン産のホソヌタウナギ (*Myxine glutinosa*) の common macula の中央部分には、有毛細胞の配向が周囲と異なり、複数の動毛をもつ有毛細胞を含む、特殊な領域の存在が示唆されている (Lowenstein & Thornhill, 1970)。この部分がヌタウナギの dorsal macula と対応するとも考えられるが、本研究では細胞あたりの動毛の数やその配向までは観察しておらず、検討できなかった。

本研究での形態学的な観察に加えて、遺伝子発現でも外側膨大部稜と dorsal macula の相同性は支持された。ヤツメウナギおよびヌタウナギそれぞれの耳胞において、*Foxg1* の相同遺伝子 *Foxg* が発現する。*Foxg1* ノックアウトマウスでは外側半規管は形成されるものの外側膨大部稜は消失するので、この遺伝子は外側膨大部稜の形成に必須だとされている (Pauley et al., 2006)。したがって、脊椎動物の共通祖先は、前後 2 つの膨大部稜の他にさらに 1 つの感覚斑をもっていたと推定できる。有顎脊椎動物では、この感覚斑を転用して外側膨大部稜を獲得したと考えられる。

では、感覚斑と半規管の発生プログラムは互いにどの程度関わっているのだろうか。本研究では詳らかにすることはできなかったが、次のように考えることはでき

るだろう。内耳の発生において、上皮の癒合が起こる部分、つまり耳胞に孔を作る場所の指定には、膨大部稜からのシグナルが重要であり (Rakowiecki & Epstein, 2013), 外側半規管の形成には外側膨大部稜が必要だと考えられてきた。事実、膨大部稜を欠く変異型の多くで半規管も消失する。しかし、外側半規管が未形成であっても対応する感覚斑が形成される表現型も、少数ながら知られている (Fritzscht et al., 2001; Pauley et al., 2006)。したがって、半規管の形成を前提としなくても、膨大部稜は形成されうる。つまり、半規管と膨大部稜は互いに非依存的な発生機構をもっているとも考えられる。

本研究で示されたように、外側半規管をもたない円口類でも *Otx* や *Foxg* が耳胞に発現し、3つの感覚斑の発生プログラムを備えているといえる。ゆえに、脊椎動物の共通祖先において、すでに3つの感覚斑が獲得されていたと推定できる。したがって、有顎脊椎動物における外側膨大部稜は祖先動物がすでにもっていた第三の感覚斑が転用されたものであり、他方、外側半規管は *Otx* によって制御される下流の遺伝子群の改変により新たに獲得されたと考えられる。

#### 4.6. 甲皮類の内耳と *Otx1* ノックアウトマウスの類似性

既述の通り、神経の分岐パターンの比較から、*Otx1* ノックアウトマウスはヤツメウナギの表現型模写 (phenocopy) だと考えられてきた (Fritzscht et al., 2001) が、この点について再解釈を試みた。というのも、ヤツメウナギの内耳は **common crus** をもたないのに対し、*Otx1* ノックアウトマウスはこの構造を保持する点で両者は形態学的に異なるとみるべきである (図 17 において a と b を比較)。そこで、本研究では、デボン紀の化石無顎類である甲皮類 (図 17c) に着目した。甲皮類は現生のどの脊椎動物とも異なり、外側半規管を欠くが **common crus** をもつ (図 17d)。したがって、*Otx1* ノックアウトマウスは、ヤツメウナギではなく甲皮類の表現型模写だといえる。つまり、外側半規管の有無に目が行きがちであるが、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にのみ見られる

(Stensiö, 1927, 1969; Janvier, 1996; Gai et al., 2011)。すなわち common crus は、化石種を含めたすべての顎口類の内耳を特徴づける構造であるといえる。

#### 4.7. 今後の課題と展望

本研究で推定された進化シナリオによると、前後2つの半規管の孔を隔てる構造 common crus はステムグループを含めた顎口類の内耳を特徴づける構造である。ただし、脊椎動物の共通祖先ですでに common crus が獲得されていて円口類の系統で失われたのか、もしくは顎口類の系統で新たに獲得された構造であるかは不明である。これを確かめるには、適切な外群の内耳形態と比較する必要があるが、現生の動物を用いた研究、化石研究のいずれも困難である。まず脊椎動物の外群であるホヤやナメクジウオは内耳と呼べる構造をもたず (Fritzscht et al., 2014)、形態比較が不可能である。他方、ステムグループの脊椎動物の化石についても、その保存状態の悪さからデータが不足しており、現在のところ取り組むのが困難な問題である。今後、ステムグループの脊椎動物についての研究が必要である。

また、外側半規管の獲得をもたらした *Otx* 遺伝子の下流遺伝子群における変更の詳細については、現生の脊椎動物における発生生物学的研究が必要である。たとえば、*Otx1* ノックアウトマウスと野生型マウスの耳胞から mRNA を抽出し、マイクロアレイや RNAseq により発現量を比較するといった研究が考えられる。このような発生学的研究をさらに深めることで、脊椎動物における内耳の進化の変遷を明らかにできると期待される。

## 第5章 結論

内耳の半規管の数と円口類の単系統性についての一見矛盾するシナリオは、ヌタウナギ、ヤツメウナギがともにトーラス状の「一半規管」と、2つの膨大部稜をもち、これを円口類に共通の内耳形態と見ることでなれば解決される(図16)。つまり、ヤツメウナギではトーラス状の半規管を「折り曲げる」ことで機能的には複数の方向を感知しており、形態学的には一半規管であるとみなせる(図6)。他方、ヌタウナギでは耳胞の向かい合う上皮が一箇所で癒合して1つのみ孔を生じる過程(図8)により、直接一半規管が発生する。すると、ヤツメウナギと顎口類に一時的に形成される2つの孔の類似性から、外群比較により、脊椎動物の共通祖先は内耳の発生過程において耳胞に前後2つの孔を生じるこの発生機構をもっていたと推定できる(図16)。だとすれば、ヌタウナギにおいて直接1つのみ孔を生じる発生機構は、ヌタウナギの系統に派生的なものだと結論づけられる(図16)。また、ヤツメウナギでは前後の2つの孔が融合し、さらに繊毛域を形成するという、やはりヤツメウナギの系統に派生的な形質をもつ(図6, 図7)。さらに、顎口類の系統については、デボン紀の化石無顎類(ステムグループの顎口類)である甲皮類(ostracoderms)が前後2つの半規管をもつことが明瞭に示されており(Stensiö, 1927, 1969; Janvier, 1996; Gai et al., 2011), 化石無顎類を含む顎口類が common crus をもつことは、円口類と比較したときに顕著な特徴であるといえる(図17)。

すべての脊椎動物において、*Otx*を含めた耳胞パターンニング遺伝子の発現は保存されている。外側半規管をもたない円口類でも *Otx* が発現するので、有顎脊椎動物における外側半規管の獲得は *Otx* の新規発現ではなく、その下流遺伝子群の変更によりもたらされたものと考えられる。他方、外側半規管に対応する感覚斑である外側膨大部稜は、ヤツメウナギの dorsal macula と相同であることが本研究でも支持された(図14a-eの dm と lcr)。ただし、ヤツメウナギの dorsal macula が耳胞の背側に移動することが祖先的な形質であるのか、またはヤツメウナギの系統独自の形質であるかは不明である。ヌタウナギでは dorsal macula や外側膨大部稜のように、他から独立した感覚斑はみられないものの、common macula の一部に外側膨大

部稜や dorsal macula と一致する神経支配が見られたので、ヌタウナギでは dorsal macula と common macula が癒合した状態であるといえる（図 14f）。

したがって、脊椎動物における半規管の進化はこれまで考えられてきたように、単純な構造の一半規管から二半規管，三半規管と上昇的に進化してきたのではない。むしろ，5 億年以上前の脊椎動物の最終共通祖先がすでに，外側膨大部稜に相当する感覚斑や複数の半規管を作りうる発生プログラムをもつ，複雑な内耳をもっていたと結論づけられる（図 16）。

## 謝 辞

本研究は、理化学研究所（理研）生命機能科学研究センター（BDR）形態進化研究チームの倉谷滋先生のもとで行われました。倉谷先生には、脊椎動物における内耳の進化という、壮大で興味深いテーマで研究を行う環境を与えていただきました。また、データをまとめて論文を書く方法を教えていただきました。心から感謝いたします。

林茂生先生、影山裕二先生、森本充先生、工樂樹洋先生には、理学研究科生物学専攻発生生物学講座における中間発表での議論、アドバイスをいただきました。林先生と影山先生には本論文の副査も引き受けていただきました。

兵庫医科大学の菅原文昭博士には、本研究の計画段階から最後まで、幾度となく議論いただきました。理研 BDR 形態進化研究チームの皆様には、日々の議論やプログレスレポート、実験に際してお世話になりました。日下部りえ博士、平沢達矢博士、高木互博士、足立礼孝博士、尾内隆行博士、平井珠美様、佐藤伊織様には、組織学実験や分子生物学実験についてご指導いただきました。Juan Pascual-Anaya 博士には、遺伝子の系統解析をしていただきました。香曾我部隆裕博士、上坂将弘博士、黒田春也様、堀坂恵美様には、論文へのコメントや議論をいただきました。また、太田欽也博士、大石康博博士が採集されたヌタウナギ胚のサンプルを本研究でも使用しました。

動物を入手するために、多くの支援を得ました。柿谷紀様（江津漁協）には、新しくヌタウナギの卵を得るために、多大なお力添えをいただきました。また、洲崎敏伸先生（神戸大学）には *C. capillatum* をご提供いただいたことで、はじめて実験室でアンモシーテス幼生を育てることができました。白土かつみ様（那珂湊漁業組合）にはトラザメの成体を譲渡していただきました。これらの動物の飼育には、澁谷繁美様、山本和子様、百田恵理様、中井弥生様、田中真子様にお世話になりました。山本佳紀様（株式会社イワキ）には、水生動物飼育のアドバイスを受けまし

た。また、理研神戸事業所動物実験施設からはマウスを分与いただきました。

技術的な支援も各方面からいただきました。今井猛先生、柯孟岑博士には光学顕微鏡観察のための組織の透明化法について、加藤寛子様（ライカマイクロシステムズ）には共焦点レーザー顕微鏡によるイメージング法について教えていただきました。本研究におけるイメージング実験の多くは、理研神戸事業所 光学イメージング施設で行われたものです。

理化学研究所 BDR 図書室の鴨川弥生様、神田亜希子様には文献資料の取り寄せにあたり、お世話になりました。また、小柳知子様、南奈永子様には研究を円滑に進めるためにお力添えいただきました。野海真奈美博士、茂木奈津様をはじめ、神戸大学大学院理学研究科の事務室の皆様にも、手続き上のご支援をいただきました。

私が博士後期課程まで進学して研究を継続できたのは、博士前期課程以前を含めた様々な形のご支援のおかげです。ここにそのお名前を挙げます。安藤元紀先生（岡山大学）、細胞生理学研究室の皆様（岡山大学）、井上邦夫先生（神戸大学）、工樂樹洋先生（理研）、理研神戸事業所 学生の会の皆様、財団法人 ノートルダム育英財団、公益財団法人 吉田育英会。

以上の皆様に、心より深謝の意を表します。

最後に、いつも暖かく見守り、励ましてくれる妻と息子、両親および友人たちに感謝します。

## 参考文献

- Abraira V. E., Del Rio, T., Tucker, A. F., Slonimsky, J., Keirnes, H. L. & Goodrich, L. V. Cross-repressive interactions between *Lrig3* and netrin 1 shape the architecture of the inner ear. *Development* **135**, 4091–4099 (2008).
- Acampora, D., Avantaggiato, V., Tuorto, F., Barone, P., Reichert, H., Finkelstein, R. & Simeone, A. Murine *Otx1* and *Drosophila otd* genes share conserved genetic functions required in invertebrate and vertebrate brain development. *Development* **125**, 1691–1702 (1998).
- Acampora, D., Mazan, S., Avantaggiato, V., Barone, P., Tuorto, F., Lallemand, Y., Brulet, P. & Simeone, A. Epilepsy and brain abnormalities in mice lacking the *Otx1* gene. *Nat. Genet.* **14**, 218–222 (1996).
- Adachi, N. & Kuratani, S. Development of head and trunk mesoderm in the dogfish, *Scyliorhinus torazame*: I. Embryology and morphology of the head cavities and related structures. *Evol. Dev.* **14**, 234–256 (2012).
- Alsina, B. & Streit, A. in *Organogenetic Gene Networks* (ed. Hombria, J. C. G. & Bovolenta, P.), Ch. 12, 235–258 (Springer, Basel, 2016).
- Alsina, B. & Whitfield, T. T. Sculpting the labyrinth: Morphogenesis of the developing inner ear. *Semin. Cell Dev. Biol.* **65**, 47–59 (2017).
- Amemiya, F., Kishida, R., Goris, R. C., Onishi, H. & Kusunoki, T. Primary vestibular projections in the hagfish, *Eptatretus burgeri*. *Brain Res.* **337**, 73–79 (1985).
- Avallone, B., Fascio, U., Senatore, A., Balsamo, G., Bianco, P. G. & Marmo, F. The membranous labyrinth during larval development in lamprey (*Lampetra planeri*, Bloch, 1784). *Hear. Res.* **201**, 37–43 (2005).
- Ballard, W. W., Mellinger, J. & Lechenault, H. A series of normal stages for development of *Scyliorhinus canicula*, the lesser spotted dogfish (*Chondrichthyes, Scyliorhinidae*). *J. Exp. Zool.* **267**, 318–336 (1993).
- Baxendale, S. & Whitfield T. T. Methods to study the development, anatomy, and function of

- the zebrafish inner ear across the life course. *Methods Cell Biol.* **134**, 165–209 (2016).
- Bever, M. M., Jean, Y. Y. & Fekete, D. M. Three-dimensional morphology of inner ear development in *Xenopus laevis*. *Dev. Dyn.* **227**, 422–430 (2003).
- Bissonnette, J. P. & Fekete, D. M. Standard atlas of the gross anatomy of the developing inner ear of the chicken. *J. Comp. Neurol.* **368**, 620–630 (1996).
- Brown, S. T., Wang, J. & Groves, A. K. *Dlx* gene expression during chick inner ear development. *J. Comp. Neurol.* **483**, 48–65 (2005).
- Chang, W., Brigande, J. V., Fekete, D. M. & Wu, D. K. The development of semicircular canals in the inner ear: role of FGFs in sensory cristae. *Development* **131**, 4201–4211 (2004).
- Chang, W., Lin, Z. S., Kulesa, H., Hebert, J., Hogan, B. L. M. & Wu, D. K. *Bmp4* is essential for the formation of the vestibular apparatus that detects angular head movements. *PLoS genet.* **4**, e1000050 (2008).
- Dean, B. *On the Embryology of Bdellostoma stouti: a General Account of Myxinoid Development from the Egg and Segmentation to Hatching* (Harvard Univ. Press, Harvard, 1899).
- Feng, Y. & Xu, Q. Pivotal role of *hmx2* and *hmx3* in zebrafish inner ear and lateral line development. *Dev. Biol.* **339**, 507–518 (2010).
- Forey, P. & Janvier, P. Agnathans and the origin of jawed vertebrates. *Nature* **361**, 129–134, (1993).
- Fritsch, B. & Beisel, K. W. Evolution and development of the vertebrate ear. *Brain Res. Bull.* **55**, 711–721 (2001).
- Fritsch, B., Kopecky, B. J. & Duncan, J. S. in *Development of Auditory and Vestibular Systems (Fourth Edition)* (ed. Romand, R. & Varela-Nieto, I.), Ch. 12, 339–367 (Academic, Oxford, 2014).
- Fritsch, B., Pauley, S., Feng, F., Matei, V. & Nichols, D. The molecular and developmental basis of the evolution of the vertebrate auditory system. *Int. J. Comp. Psychol.* **19**, 1–

- 25 (2006).
- Fritsch, 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).
- 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).
- Gess, R. W., Coates, M. I. & Rubidge, B. S. A lamprey from the Devonian period of South Africa. *Nature* **443**, 981–984 (2006).
- Goldschmidt, R. B. Gen und Ausseneigenschaft (Untersuchen an Drosophila) I. *Zeitschr. Ind. Abst. Vererb.* **69**, 38–69 (1935).
- Goodrich, E. S. in *A Treatise on Zoology, Vol 9* (ed. Lankster, R.), Vertebrata Craniata, 1–518 (Adam & Charles Black, London, 1909).
- Graf, W. M. in *Encyclopedia of Neuroscience* (ed. Binder, M. D., Hirokawa, N. & Windhorst, U.), Evolution of Vestibular System, 1440–1448 (Springer, Heidelberg, 2009).
- Haddon, C. M. & Lewis, J. H. Hyaluronan as a Propellant for Epithelial Movement: the Development of Semicircular Canals in the Inner Ear of *Xenopus*. *Development* **112**, 541–550 (1991).
- Hadrys, T., Braun, T., Rinkwitz-Brandt, S., Arnold, H. H. & Bober, E. Nkx5-1 controls semicircular canal formation in the mouse inner ear. *Development* **125**, 33–39 (1998).
- Hagelin, L.-O. Studies on the development of the membranous labyrinth in lampreys, *Lampetra fluviatilis* Linne, *Lampetra planneri* (Bloch) and *Petromyzon marinus* Linne. *Act. Zool. Suppl.* 1–218 (1974).
- Hammond, K. L. & Whitfield, T. T. The developing lamprey ear closely resembles the zebrafish otic vesicle: *otx1* expression can account for all major patterning differences. *Development* **133**, 1347–1357 (2006).
- Hardisty, M. W. & Potter, I. C. in *The Biology of Lampreys, Vol. 1* (ed. Hardisty, M. W. & Potter, I. C.), Ch. 3, The Behavior, Ecology and Growth of Larval Lampreys, 85–125 (Academic, London, 1971).

- Heimberg, A. M., Cowper-Sal-lari, R., Semon, M., Donoghue, P. C. & Peterson, K. J. microRNAs reveal the interrelationships of hagfish, lampreys, and gnathostomes and the nature of the ancestral vertebrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 45, 19379–19383 (2010).
- Higuchi, R., Song, C., Hoshina, R. & Suzaki, T. Endosymbiosis-related changes in ultrastructure and chemical composition of *Chlorella variabilis* (Archaeplastida, Chlorophyta) cell wall in *Paramecium bursaria* (Ciliophora, Oligohymenophorea). *Eur. J. Protistol.* **66**, 149–155 (2018).
- Hwang, C. H., Simeone, A., Lai, E. & Wu, D. K. *Foxg1* is Required for Proper Separation and Formation of Sensory Cristae During Inner Ear Development. *Dev. Dyn.* **238**, 2725–2734 (2009).
- Janvier, P. *Early Vertebrates* (Oxford Univ. Press, Oxford, 1996).
- Janvier, P. Evolutionary biology: born-again hagfishes. *Nature* **446**, 622–623 (2007).
- Ke, M. T., Nakai, Y., Fujimoto, S., Takayama, R., Yoshida, S., Kitajima, T. S., Sato, M. & Imai, T. Super-Resolution Mapping of Neuronal Circuitry With an Index-Optimized Clearing Agent. *Cell Rep.* **14**, 2718–2732 (2016).
- Kent, G. C. & Carr R. K. in *Comparative Anatomy of the Vertebrates (ninth edition)*, Ch17, 429–454 (McGraw-Hill, New York, 2001).
- Khonsari, R. H., Li, B., Vernier, P., Northcutt, R. G. & Janvier, P. Agnathan brain anatomy and craniate phylogeny. *Acta. Zool.-Stockholm* **90**, 52–68 (2009).
- Kopecky, B., Johnson, S., Schmitz, H., Santi, P. & Fritzsche, B. Scanning thin-sheet laser imaging microscopy elucidates details on mouse ear development. *Dev. Dyn.* **241**, 465–480 (2012).
- Kuraku, S. Insights into Cyclostome Phylogenomics: Pre-2R or Post-2R? *Zoolog. Sci.* **25**, 960–968 (2008).
- Kuraku, S., Hoshiyama, D., Katoh, K., Suga, H. & Miyata, T. Monophyly of lampreys and hagfishes supported by nuclear DNA-coded genes. *J. Mol. Evol.* **49**, 729–735 (1999).

- Kuraku, S. & Kuratani, S. Time scale for cyclostome evolution inferred with a phylogenetic diagnosis of hagfish and lamprey cDNA sequences. *Zoolog. Sci.* **23**, 1053–1064, (2006).
- Lowenstein, O. The electrophysiological study of the responses of the isolated labyrinth of the lamprey (*Lampetra fluviatilis*) to angular acceleration, tilting and mechanical vibration. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **174**, 419–434 (1970).
- Lowenstein, O., Osborne, M. P. & Thornhill, R. A. The anatomy and ultrastructure of the labyrinth of the lamprey (*Lampetra fluviatilis* L.). *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **170**, 113–134 (1968).
- Lowenstein, O. & Thornhill, R. A. The labyrinth of *Myxine*: Anatomy, Ultrastructure and Electrophysiology. *Proc. R. Soc. Lond. B* **176**, 21–42 (1970).
- Macchiarulo, S. & Morrow, B. E. *Tbx1* and *Jag1* act in concert to modulate the fate of neurosensory cells of the mouse otic vesicle. *Biol. Open* **6**, 1472–1482 (2017).
- Maklad, A., Reed, C., Johnson, N. S. & Fritsch, B. Anatomy of the lamprey ear: morphological evidence for occurrence of horizontal semicircular ducts in the labyrinth of *Petromyzon marinus*. *J. Anat.* **224**, 432–446 (2014).
- Mallatt, J. & Sullivan, J. 28S and 18S rDNA sequences support the monophyly of lampreys and hagfishes. *Mol. Biol. Evol.* **15**, 1706–1718 (1998).
- 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).
- Murakami, Y., Uchida, K., Rijli, F. M. & Kuratani, S. Evolution of the brain developmental plan: Insights from agnathans. *Dev. Biol.* **280**, 249–259 (2005).
- McVean, A. R. in *The biology of hagfishes* (ed. Jørgensen, J. M., Lomholt, J. P., Weber, R. E. & Malte, H.), Ch. 36, Physiology of the Inner Ear, 564–573 (Springer Science & Business Media, Dordrecht, 2012).
- Merlo, G. R., Palerai, L., Mantero, S., Zerega, B., Adamska, M., Rinkwitz, S., Bober, E. &

- Levi G. The *Dlx5* homeobox gene is essential for vestibular morphogenesis in the mouse embryo through a BMP4-mediated pathway. *Dev. Biol.* **248**, 157–169 (2002).
- Morsli, H., Tuorto, F., Choo, D., Postiglione, M. P., Simeone, A. & Wu, D. K. *Otx1* and *Otx2* activities are required for the normal development of the mouse inner ear. *Development* **126**, 2335–2343 (1999).
- Nishitani, A. M., Ohta, S., Yung, A. R., Del Rio, T., Gordon, M. I., Abraira, V. E., Aviles, E. C., Schoenwolf, G. C., Fekete, D. M. & Goodrich, L. V. Distinct functions for netrin 1 in chicken and murine semicircular canal morphogenesis. *Development* **144**, 3349–3360 (2017).
- Oisi, Y., Fujimoto, S., Ota, K. G. & Kuratani, S. On the peculiar morphology and development of the hypoglossal, glossopharyngeal and vagus nerves and hypobranchial muscles in the hagfish. *Zoological. Lett.* **1**, 6 (2015a).
- Oisi, Y., Kakitani, O., Kuratani, S. & Ota, K. G. in *In Situ Hybridization Methods* (ed. Hauptmann, G.), Ch. 12, 249–262 (Springer, New York, 2015b).
- Oisi, Y., Ota, K. G., Fujimoto, S. & Kuratani, S. Development of the chondrocranium in hagfishes, with special reference to the early evolution of vertebrates. *Zool. Sci.* **30**, 944–961, (2013a).
- Oisi, Y., Ota, K. G., Kuraku, S., Fujimoto, S. & Kuratani, S. Craniofacial development of hagfishes and the evolution of vertebrates. *Nature* **493**, 175–180 (2013b).
- Omata, Y., Nojima, Y., Nakayama, S., Okamoto, H., Nakamura, H. & Funahashi, J. Role of Bone morphogenetic protein 4 in zebrafish semicircular canal development. *Dev. Growth Differ.* **49**, 711–719 (2007)
- Omura, G., Ishida, M., Arikawa, M., Khan, S. M. M. K., Suetomo, Y., Kakuta, S., Yoshimura, C. & Suzaki, T. A bacteria-free monoxenic culture of *Paramecium bursaria*: its growth characteristics and the re-establishment of symbiosis with *Chlorella* in bacteria-free conditions. *Jpn. J. Protozool.* **37**, 139–150 (2004).
- Ota, K. G., Fujimoto, S., Oisi, Y. & Kuratani, S. Identification of vertebra-like elements and

- their possible differentiation from sclerotomes in the hagfish. *Nat. Commun.* **2**, 373 (2011).
- Ota, K. G., Kuraku, S. & Kuratani, S. Hagfish embryology with reference to the evolution of the neural crest. *Nature* **446**, 672–675 (2007).
- Ota, K. G. & Kuratani, S. The history of scientific endeavors towards understanding hagfish embryology. *Zool. Sci.* **23**, 403–418 (2006).
- Pascual-Anaya, J., Sato, I., Sugahara, F., Higuchi, S., Paps, J., Ren, Y., Takagi, W., Ruiz-Villalba, A., Ota, K. G., Wang, W. & Kuratani, S. Hagfish and lamprey Hox genes reveal conservation of temporal colinearity in vertebrates. *Nat. Ecol. Evol.* **2**, 859–666 (2018).
- Pauley, S., Lai, E. & Fritsch, B. *Foxg1* is required for morphogenesis and histogenesis of the mammalian inner ear. *Dev. Dyn.* **235**, 2470–2482 (2006).
- Pickles, J. O. *An Introduction to the Physiology of Hearing* (Brill Academic, Leiden, 2013).
- Raft, S., Nowotschin, S., Liao, J. & Morrow, B. E. Suppression of neural fate and control of inner ear morphogenesis by *Tbx1*. *Development* **131**, 1801–1812 (2004).
- Rakowiecki, S. & Epstein, D. J. Divergent roles for Wnt/beta-catenin signaling in epithelial maintenance and breakdown during semicircular canal formation. *Development* **140**, 1730–1739 (2013).
- Retzius, G. *Das Gehoerorgan der Wirbelthiere: I. Das Gehoerorgan der fische und amphibien* (Samson & Wallin, Stockholm, 1881).
- Salminen, M., Meyer, B. I., Bober, E. & Gruss, P. Netrin 1 is required for semicircular canal formation in the mouse inner ear. *Development* **127**, 13–22 (2000).
- Serra, J. A. Histochemical tests for proteins and amino acids; the characterization of basic proteins. *Stain Technol.* **21**, 5–18 (1946).
- Steinberg, M. A non-nutrient culture medium for amphibian embryonic tissues. *Carnegie Inst. Wash. Year Book* **56**, 347–348 (1957).
- Stensiö, E. A. The Downtonian and Devonian vertebrates of Spitsbergen. I, Family

- Cephalaspidae. *Skr. Svalbard Nordishavet* **12**, 1–391 (1927).
- Stensiö, E. A. Elasmobranchiomorphi Placodermata, Arthrodiros. *Traité de Paléontologie* **4**, 71–692 (1969).
- Streeter, G. L. On the development of the membranous labyrinth and the acoustic and facial nerves in the human embryo. *Am. J. Anat.* **6**, 139–165, (1906).
- Sugahara, F., Murakami, Y. & Kuratani, S. in *In Situ Hybridization Methods* (ed. Hauptmann, G.), Ch. 13, 263–278 (Springer, New York, 2015).
- Sugahara, F., Pascual-Anaya, J., Oisi, Y., Kuraku, S., Aota, S., Adachi, N., Takagi, W., Hirai, T., Sato, N., Murakami, Y. & Kuratani, S. Evidence from cyclostomes for complex regionalization of the ancestral vertebrate brain. *Nature* **531**, 97–100 (2016).
- Tahara, Y. Normal stages of development in the lamprey, *Lampetra reissneri* (Dybowski). *Zoolog. Sci.* **5**, 109–118 (1988).
- Takezaki, N., Figueroa, F., Zaleska-Rutczynska, Z. & Klein, J. Molecular phylogeny of early vertebrates: monophyly of the agnathans as revealed by sequences of 35 genes. *Mol. Biol. Evol.* **20**, 287–292 (2003).
- Thornhill, R. A. The development of the labyrinth of the lamprey (*Lampetra fluviatilis* Linn. 1758). *Proc. R. Soc. Lond. B* **181**, 175–198 (1972).
- Tiecke, E., Matsuura, M., Kokubo, N., Kuraku, S., Kusakabe, R., Kuratani, S. & Tanaka, M. Identification and developmental expression of two *Tbx1/10*-related genes in the agnathan *Lethenteron japonicum*. *Dev. Genes Evol.* **217**, 691–697 (2007).
- Vitelli, F., Viola, A., Morishima, M., Pramparo, T., Baldini, A. & Lindsay, E. *TBX1* is required for inner ear morphogenesis. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 2041–2048 (2003).
- Wang, W. & Lufkin, T. *Hmx* homeobox gene function in inner ear and nervous system cell-type specification and development. *Exp. Cell Res.* **306**, 373–379 (2005).
- Wang, W., Grimmer, J. F., Van De Water, T. R. & Lufkin, T. *Hmx2* and *Hmx3* homeobox genes direct development of the murine inner ear and hypothalamus and can be functionally replaced by *Drosophila Hmx*. *Dev. Cell* **7**, 439–453 (2004).

- Waterman, R. E. & Bell, D. H. Epithelial fusion during early semicircular canal formation in the embryonic zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Anat. rec.* **210**, 101–114 (1984).
- Whitfield, T. T. Development of the inner ear. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **32**, 112–118 (2015).
- Zarei, S., Zarei, K., Fritsch, B. & Elliott, K. L. Sonic hedgehog antagonists reduce size and alter patterning of the frog inner ear. *Dev. Neurobiol.* **77**, 1385–1400 (2017).
- 日下部 りえ. ヤツメウナギで解き明かす進化の謎—脊椎動物の祖先形を探る. *実験医学* **34**, 3086–3090 (2016).
- 佐野 豊. *組織学研究法*. (南山堂, 東京, 1981) .
- 八杉 龍一, 小関 治男, 古谷 雅樹, 日高 敏隆 (編) . *岩波 生物学辞典 第4版*. (岩波書籍, 東京, 1996) .

## 图 版

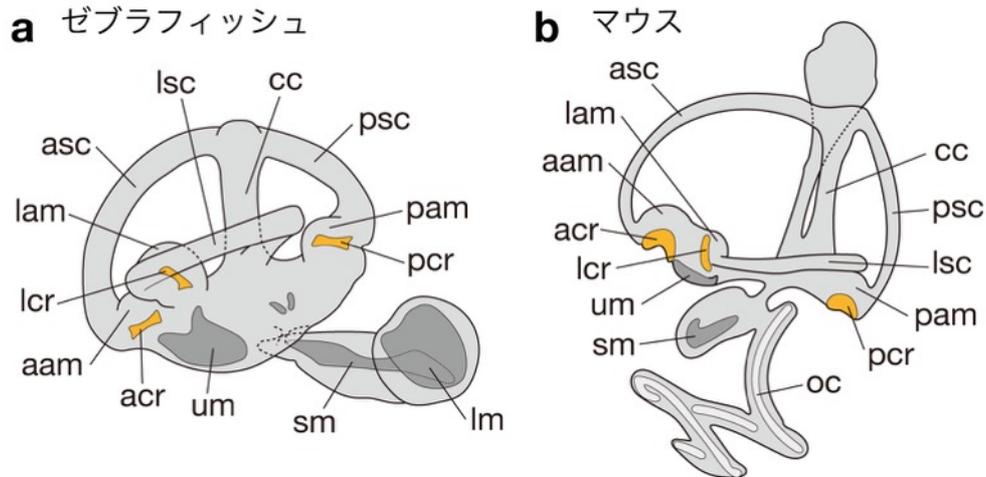


図 1. 顎口類の内耳形態。

(a, b) ゼブラフィッシュ (a) やマウス (b) を含む顎口類は、前半規管 (asc)、後半規管 (psc)、外側半規管 (lsc) の3つの半規管をもつ。asc と psc を合わせて垂直半規管 (vertical semicircular canals) ともいい、両者の共通部分は common crus (cc) とよばれる。外側半規管は、水平半規管とも呼ばれる。3つの半規管のそれぞれ片端には感覚有毛細胞からなる膨大部稜 (オレンジ; acr, pcr, lcr) がある。また、卵形嚢と球形嚢には、重力感知を担う卵形嚢斑 (um, utricular sac), 球形嚢斑 (sm, saccular sac) がある。聴覚は、ゼブラフィッシュでは主にラゲナ斑 (lm, lagena macula), マウスでは蝸牛 (co, cochlea) 内のコルチ器 (oc, organ of Corti) のはたらきによる。ed, 内リンパ管 (endolymphatic duct) ; es, 内リンパ嚢 (endolymphatic sac)。

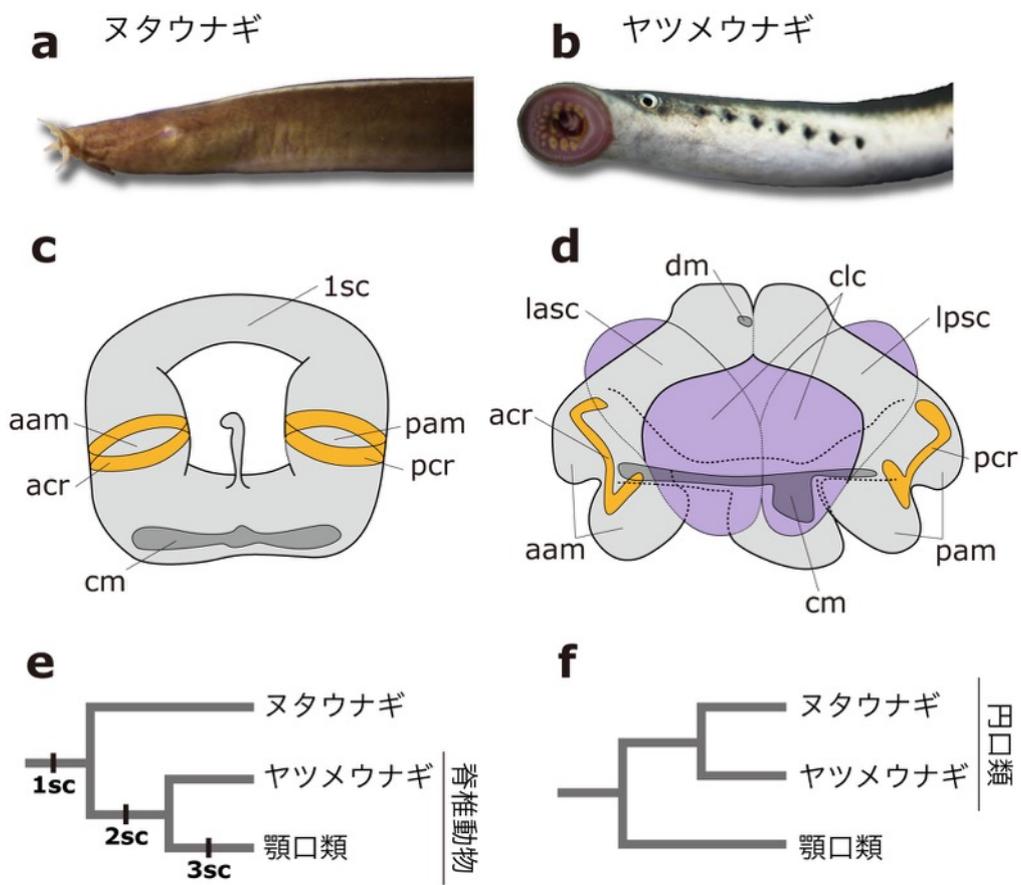


図 2. 脊椎動物の系統と内耳の形態。

(a, b) 現生の円口類であるヌタウナギ (a) およびヤツメウナギ (b)。(c) ヌタウナギ内耳は単一トラス状の管をもつ、一半規管 (1sc) である。一半規管の両端に膨大部稜 (acr, pcr) をもつ。(d) ヤツメウナギ内耳は複数の方向を感知することが生理学的に示されており、“二半規管” (2sc) であるされてきたが、詳細な形態学的研究は不十分であった。(e) 古典的な形態学的研究に基づく系統関係。ヌタウナギは脊椎骨を欠き、内耳に一半規管をもつので、過去にはヤツメウナギと顎口類の外群だと考えられてきた。したがって、三半規管 (3sc) は、祖先的な一半規管から二半規管を経て段階的に成立したと考えられてきた。(f) 近年の分子系統学的研究に基づく系統関係。円口類の単系統性は確実だとされている。オレンジ、膨大部稜 (crista) ; acr, 前膨大部稜 (anterior crista) ; asc, 前半規管 (anterior semicircular canal) ; cc, common crus; clc, 繊毛域 (ciliated chamber) ; cm, 総斑 (common macula) ; dm, dorsal macula; lasc, ヤツメウナギ前半規管 ('lamprey' anterior semicircular canal) ; lcr, (外側膨大部稜) lateral crista; lm, ラゲナ斑 (lagena macula; lpsc) ; sm, 卵形囊斑 (saccular macula) ; um, (卵形囊斑) utricular macula。

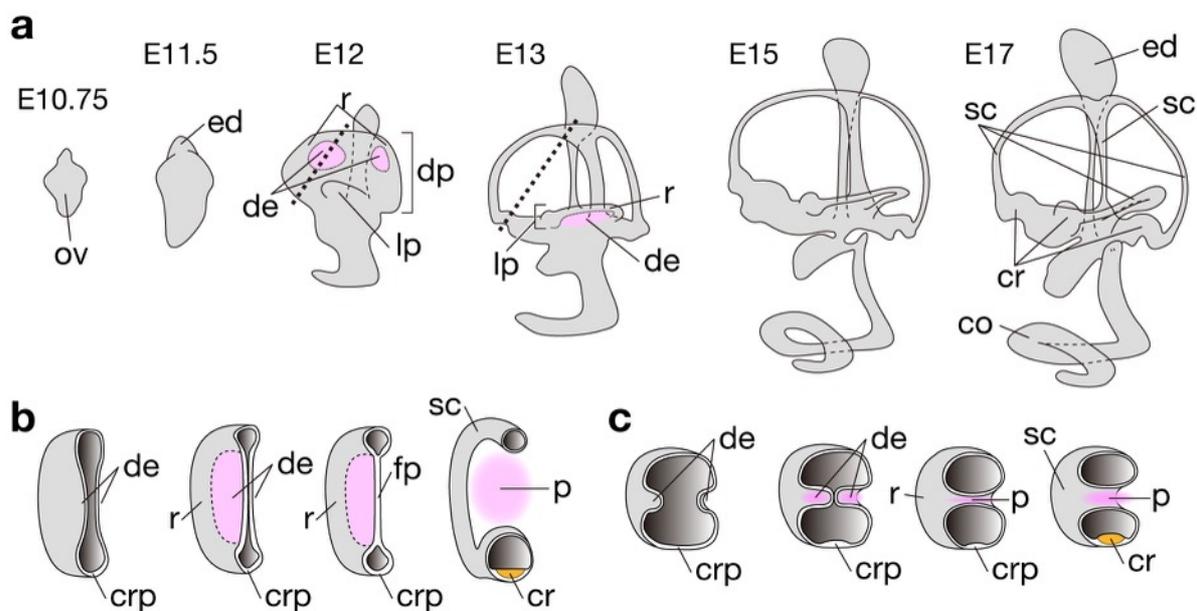
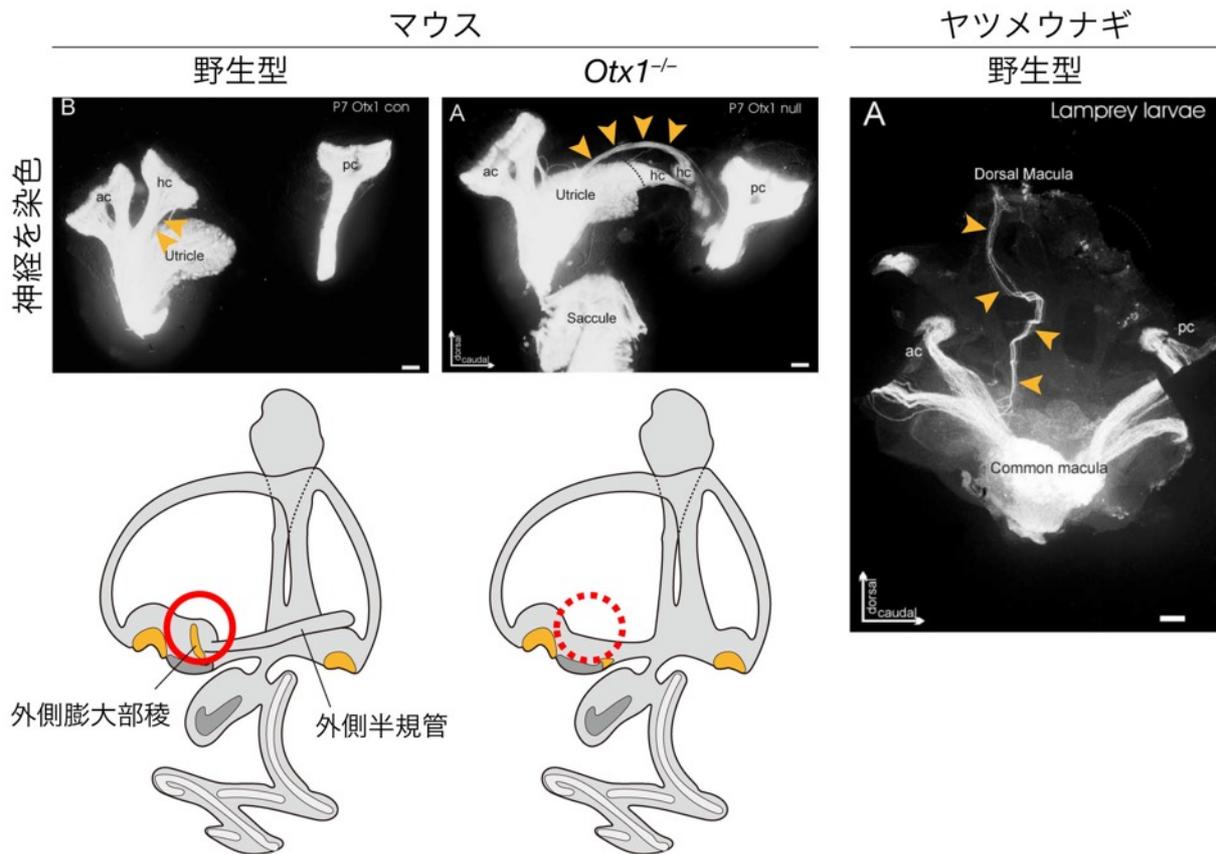


図3. 向かい合う上皮の癒合と消失を経て半規管が形成される。

(a) マウスにおける内耳の発生過程。E11.5以降で耳胞 (otic vesicle, ov) の形態変化が起こる。背側では耳胞が扁平化し dorsal pouch (dp) と lateral pouch (lp) を作り、さらに向かい合う上皮の癒合・消失を経て孔ができ、3つの半規管が形成される。破線で示した部分では、bに示すような機構で半規管が形成される。(b) 羊膜類における半規管形成過程を示したもの。周囲の間葉の細胞分裂が駆動力となり、向かい合う上皮に陥凹

(depression, de) が生じ、癒合する。癒合した上皮は fusion plate (fp) となり、これが消失することで孔 (もしくは柱構造 (pillar, p) と呼ぶ) が形成され、辺縁 (rim, r) に管腔が取り残されて半規管 (sc) となる。(c) ゼブラフィッシュやカエルでは、細胞外基質の産生により陥凹 (de) が生じて、孔が形成される。両者では孔ができる際の駆動力は異なるものの、向かい合う上皮の陥凹、癒合、消失のプロセスにより半規管が形成される点では同じであることに注意。Morsli et al., 1998; Whitfield et al., 2015; Alsina and Whitfield, 2017 を改変。co, 蝸牛 (cochlea) ; cr, 膨大部稜 (crista), crp, 膨大部稜の前駆細胞 (crista primordium) ; ed, 内リンパ管 (endolymphatic duct)。



**図 4.** *Otx1* ノックアウトマウスはヤツメウナギの表現型を遺伝的に模写するとされる。  
*Otx1* ノックアウトマウスでは、外側半規管と外側膨大部稜（赤丸）が消失する一方、野生型には見られない神経枝（*Otx1*<sup>-/-</sup>のオレンジの矢印）が見られ、これはヤツメウナギの dorsal macula と相同であるとも考えられてきた（写真は Fritzscht et al., 2001 から引用）。ac, 前膨大部稜（anterior crista）；pc, 後膨大部稜（posterior crista）。

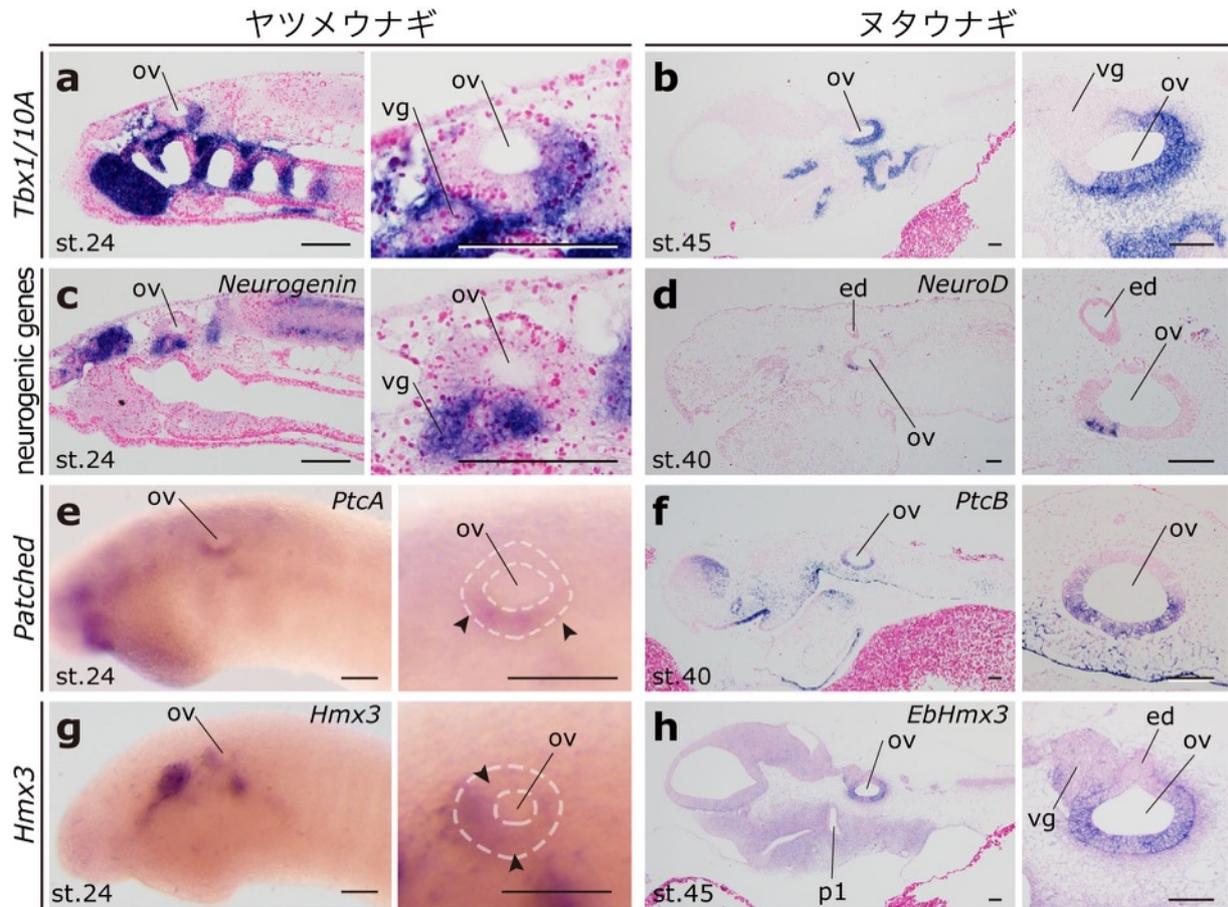
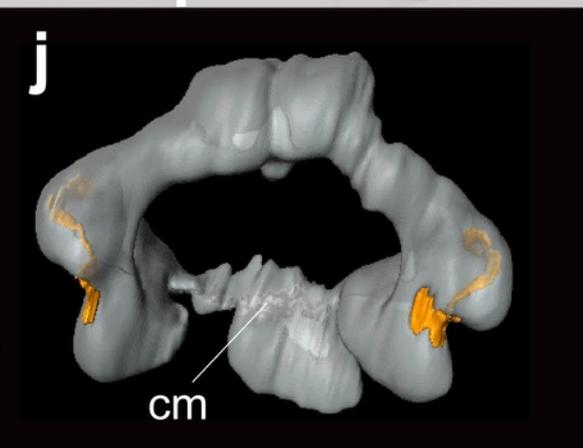
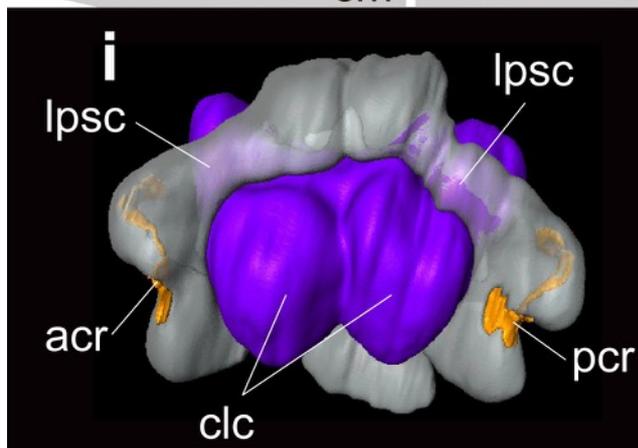
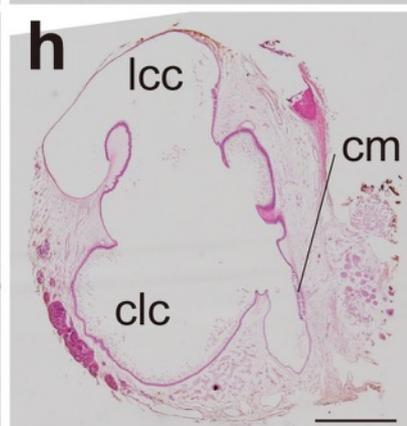
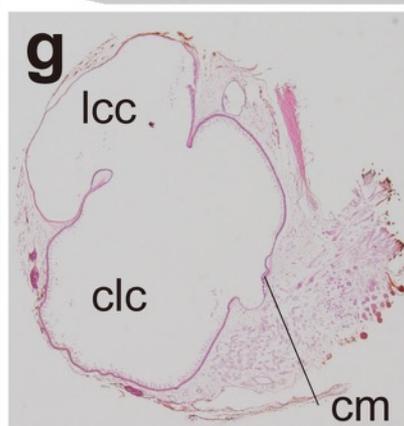
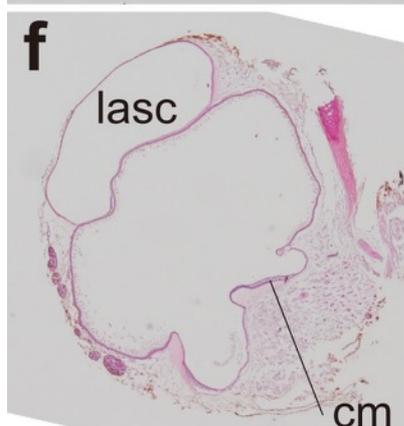
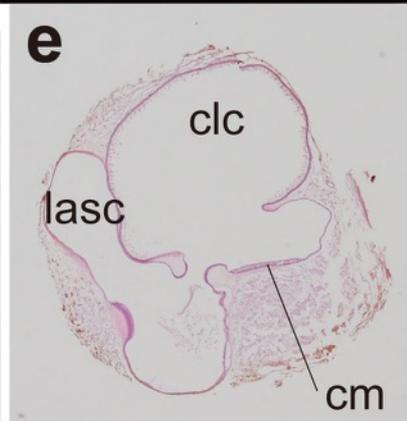
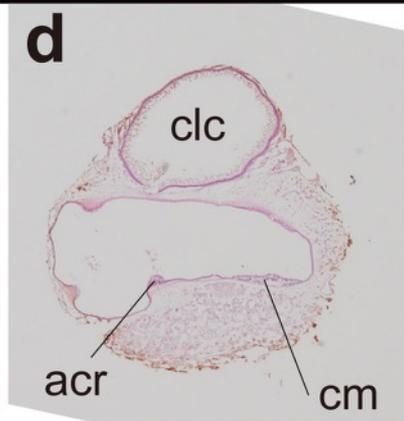
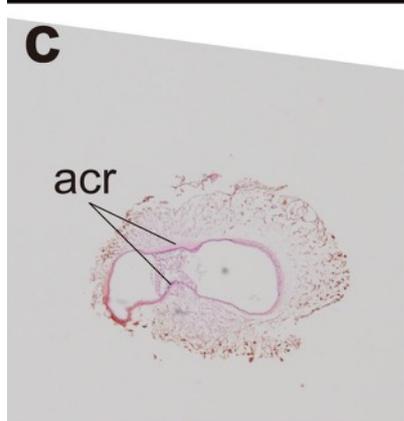
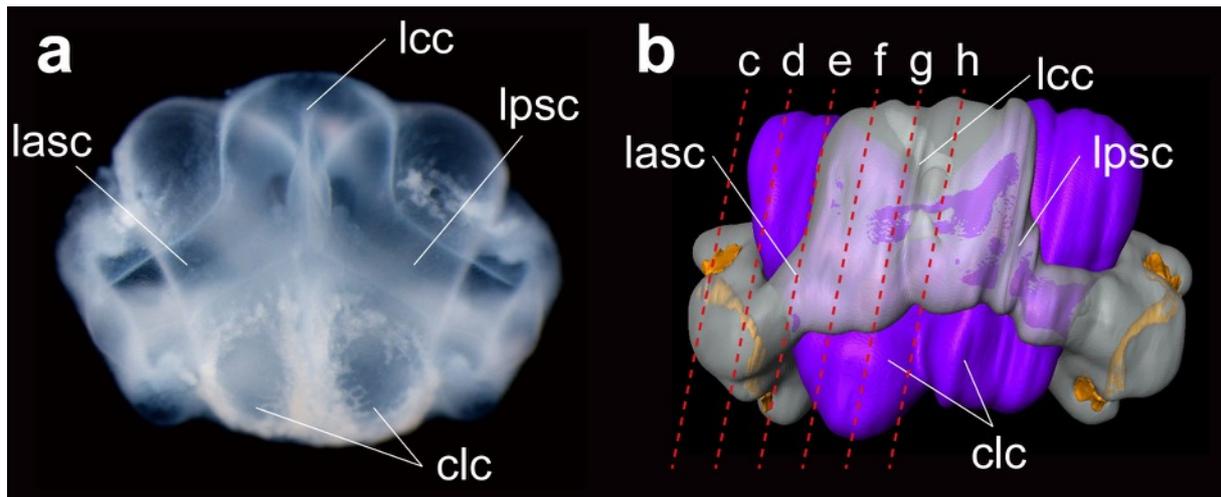


図5. ヌタウナギとヤツメウナギの耳胞における遺伝子発現。

(a, b) *Tbx1/10A* のヤツメウナギ胚 (a) およびヌタウナギ胚 (b) における発現。(c, d) 神経分化因子である *Neurogenin* のヤツメウナギ胚 (c) における発現。(d) 神経分化因子である *NeuroD* のヌタウナギ胚における発現。(e, f) Hedgehog レセプターである, *PatchedA* のヤツメウナギ胚 (e), ヌタウナギ胚 (f) における発現。(g, h) *Hmx3* のヤツメウナギ胚 (g), ヌタウナギ胚 (h) における発現。e, g は菅原文昭博士による。ed, 内リンパ管 (endolymphatic duct) ; ov, 耳胞 (otic vesicle) ; p1, 第1咽頭嚢 (pharyngeal pouch 1)。Scale bars, 100  $\mu$ m.



### 図 6. ヤツメウナギ成体の内耳形態。

(a) ヤツメウナギ成体から内耳膜迷路を取り出したもの。左耳を外背側から見たもので、左が前方、右が背側。(b) HE 染色された組織学的連続切片から三次元再構築された像。a と同様の方向。(c-h) b において破線で示されたレベルの組織切片。ヤツメウナギの前/後半規管 (lasc, pasc) と繊毛域 (clc) は互いに完全には分離しておらず、管は内リンパの流路を制限する隔壁により規定される。(i) a と同様のヤツメウナギ成体の内耳 (左耳) を、腹外側から見たもの。(j) i において繊毛域を透明にしたもので、半規管の形態は単一トラス状で、ヌタウナギの成体の内耳と類似する。clc, 繊毛域 (ciliated chamber) ; cm, 総斑 (common macula) ; lcc, ‘ヤツメウナギ’ common crus (‘lamprey’ common crus)。Scale bar, 500  $\mu$ m.

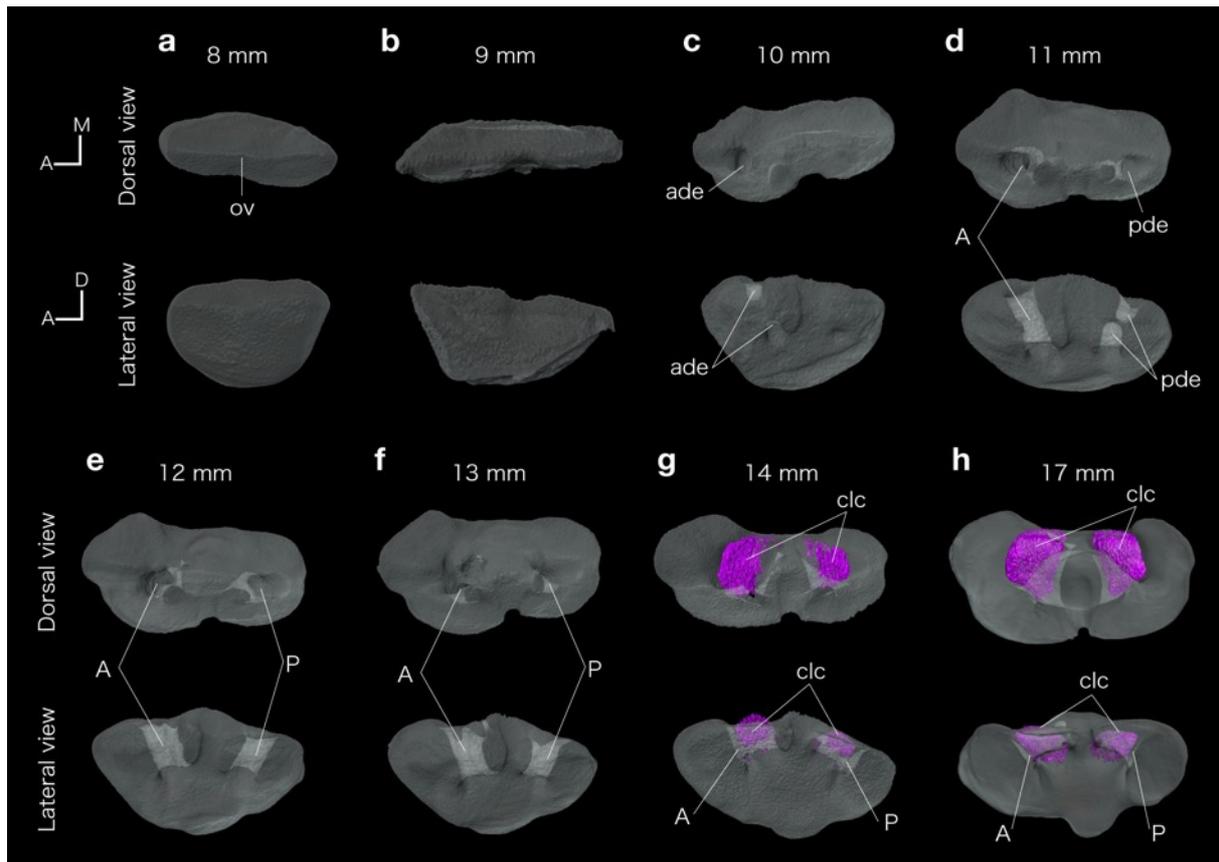


図7. ヤツメウナギのアンモシーテス幼生における内耳の形態形成。

(a-h) ヤツメウナギアンモシーテス幼生における内耳の形態形成。左耳を背側（各上段）および外側（各下段）から見たもの。方向は図中にも示した。内耳の形態形成は2つの孔（A, P）が形成されることで進行し、2つの孔は繊毛域（clc）になる（体長14 mmと17 mmの幼生において紫で示した部分）。acr, 前膨大部稜（anterior crista）; ade, 前側の陥凹（anterior depression）; pcr, 後膨大部稜（posterior crista）; pde, 後側の陥凹（posterior depression）。

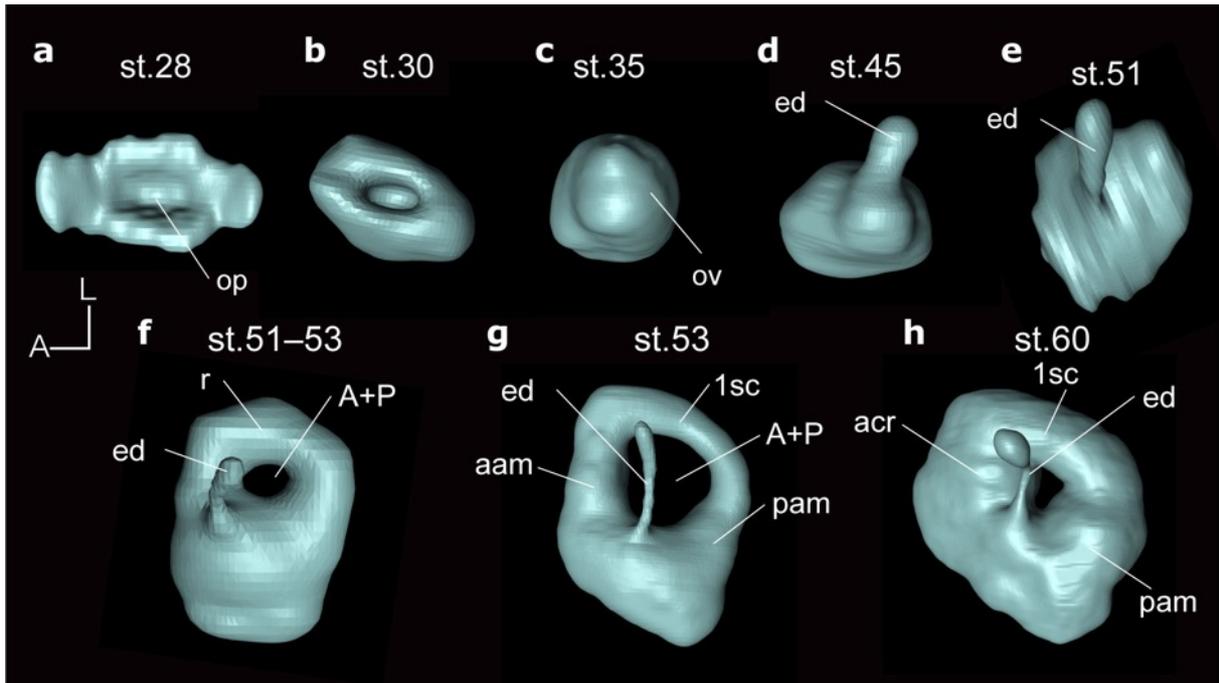


図 8. ニタウナギにおける内耳の発生。

(a-h) ニタウナギ胚の連続組織切片から耳胞 (ov; 深緑色) を立体再構築し, ステージごとに表示した。二半規管様の状態を経ることなく, 直接一半規管が発生する。すべて右側の耳胞を背側から見たもので, 左が前方, 上が側方である。1sc, 一半規管 (one semicircular canal) ; aam, 前膨大部 (anterior ampulla) ; A+P, ニタウナギにみられる単一の孔; ed, 内リンパ管 (endolymphatic duct) ; op, 耳窩 (otic pit) ; pam, 後膨大部 (posterior ampulla) ; r, 辺縁部 (rim)。

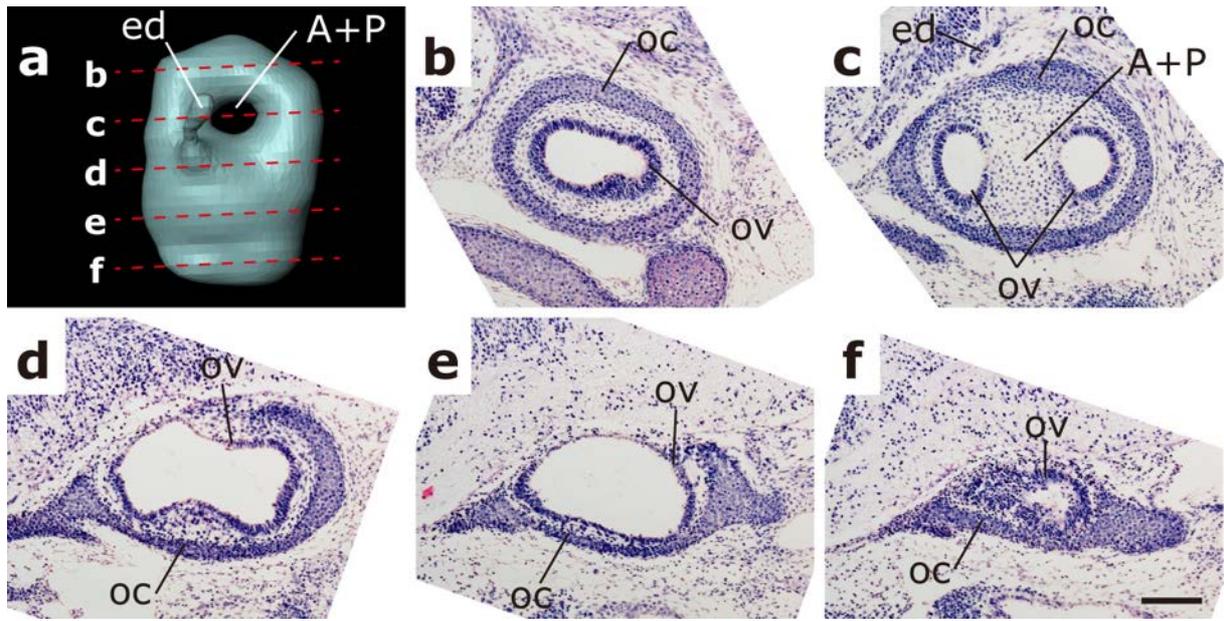


図9. ヌタウナギ胚ステージ 51-53 の内耳。

(a) HE 染色された組織学的連続切片から三次元再構築された像。右耳を背側から見たもので、左が前方、上が側方。(b-f) a において破線で示されたレベルにおける矢状面の組織学切片。左が前方、上が背側。A+P, ヌタウナギにみられる単一の孔; oc, 耳囊 (otic capsule) . Scale bar, 100  $\mu$ m.

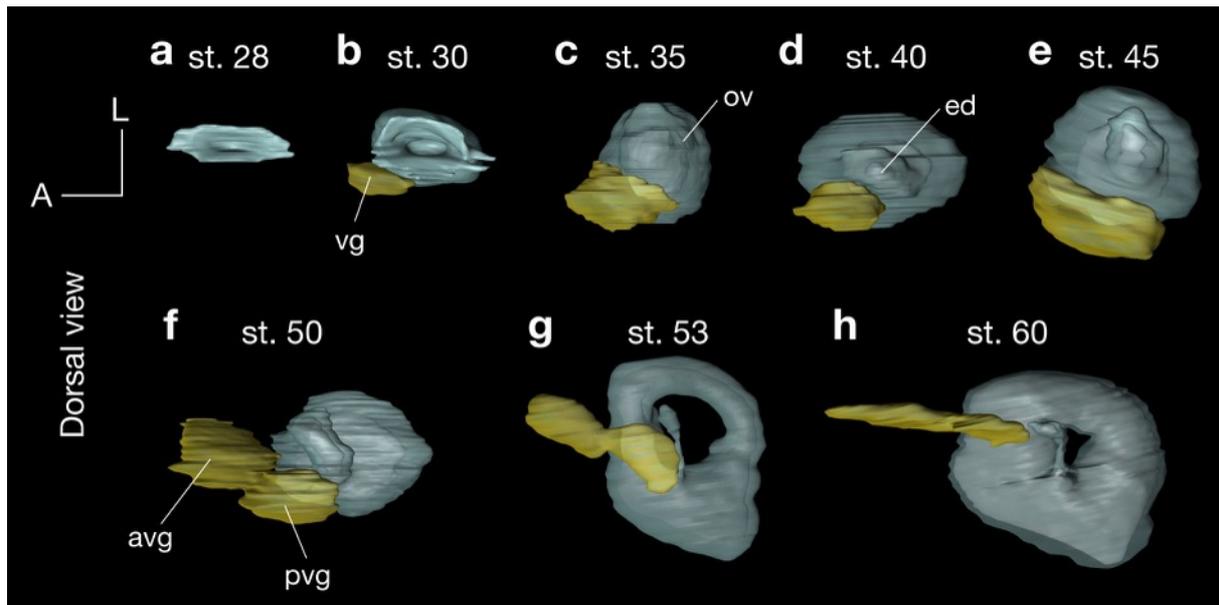
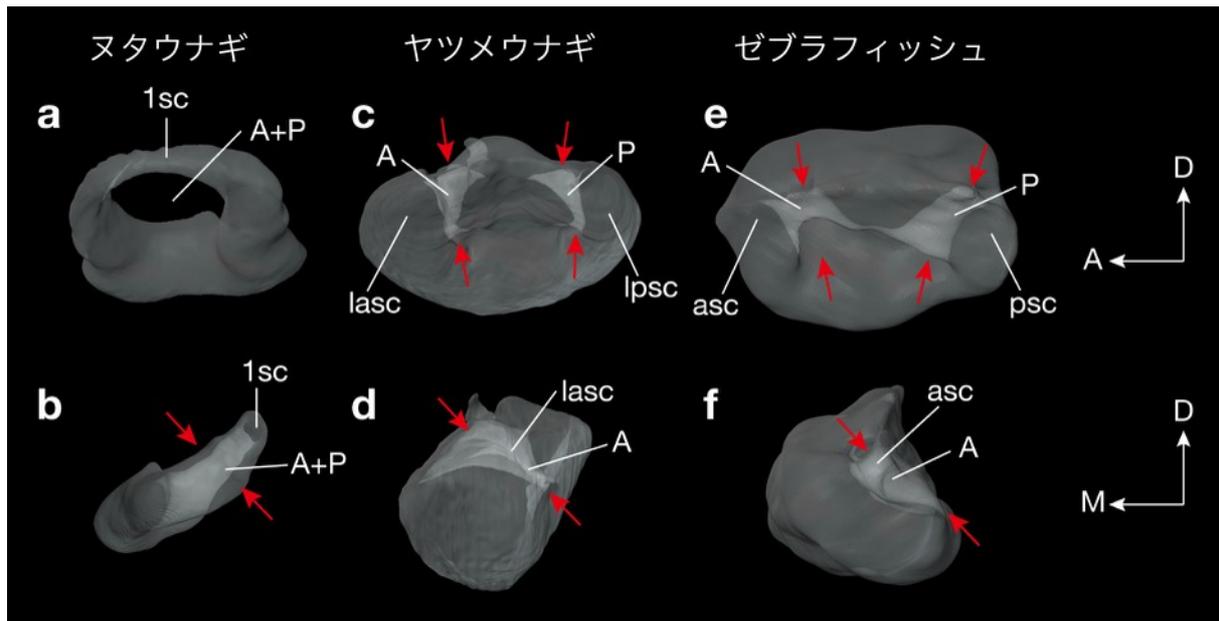


図 10. ヌタウナギ前庭神経節の発生。

(a-h) 図 8 と同様にして作成した立体構築像に、前庭神経節前駆細胞 (vg; 黄色) も表示したもの。ステージは各立体構築像の上に表示されている。ステージ 45 胚まで耳胞の前内側に生じる単一の集団である前庭神経節前駆細胞が、ステージ 50 以降では 2 つに分かれていた。右耳を背側から見たもので、左が前方、上が外側方。avg, 前側の前庭神経節 (anterior vestibular ganglion) ; ed, 内リンパ管 (endolymphatic duct) ; ov, 耳胞 (otic vesicle) ; pvg, 後側の前庭神経節 (posterior vestibular ganglion)。



**図 11. ヌタウナギとヤツメウナギおよびゼブラフィッシュにおける内耳発生過程の比較。**  
 耳胞に形態変化が起こり、半規管が形成されるステージにおける、ヌタウナギ、ヤツメウナギ、ゼブラフィッシュの比較。ヌタウナギ stage 53 の耳胞を (a) 外側から、(b) 前方から、ヤツメウナギ 12 mm 幼生の耳胞を (c) 外側から、(d) 前方から、ゼブラフィッシュ 57 hpf 胚の耳胞を (e) 外側から、(f) 前方からそれぞれ観察したもの。孔の形成が起こる方向性を赤矢印で示す。1sc, one semicircular canal 一半規管; ap, anterior pillar 前側の孔; A+P, ヌタウナギにみられる単一の孔; lasc/lpsc, 'ヤツメウナギ' 前/後半規管 ('lamprey' anterior/posterior semicircular canal) ; pp, 後側の孔 (posterior pillar) ; psc, 後半規管 (posterior semicircular canal)。

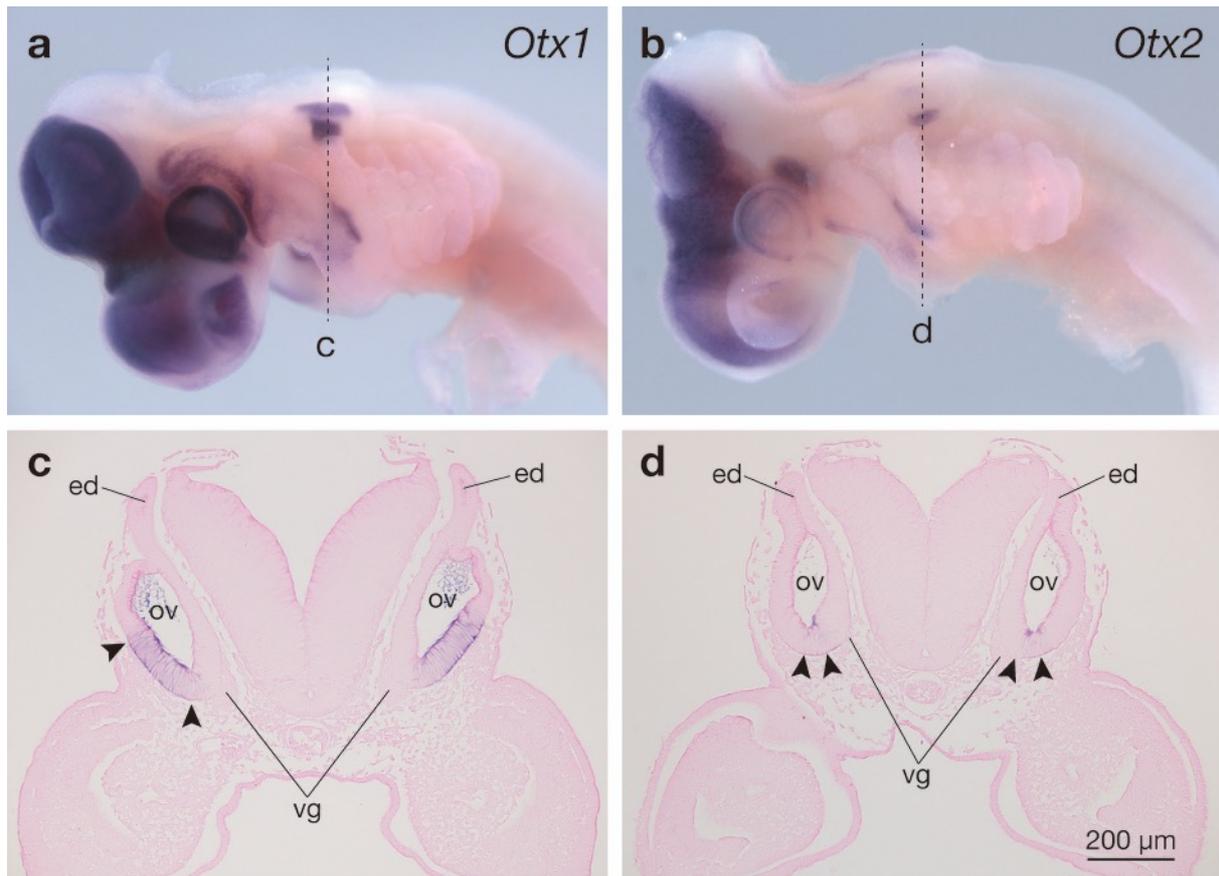


図 12. トラザメ胚の耳胞における *Otx1* の発現。

(a-b) トラザメ (*S. torazame*) 胚ステージ 26 における *Otx1* (a), *Otx2* (b) の発現。(c-d) a, b において破線で示したレベルの切片。*Otx1*, *Otx2* はともに耳胞に発現する。Mazan et al. (2000) は、ハナカケトラザメ *Scyliorhinus canicula* のステージ 20 胚の耳胞における *Otx1* と *Otx2* の発現を観察して *Otx1* のみが発現するとして、*Otx1* の発現と外側半規管の獲得を関連付けた。しかし、おそらく調べたステージが早すぎたのであって、すべての顎口類で *Otx1* と *Otx2* はどちらも耳胞に発現する。ed, 内リンパ管 (endolymphatic duct) ; ov, 耳胞 (otic vesicle) ; vg, 前庭神経節 (vestibular ganglion)。

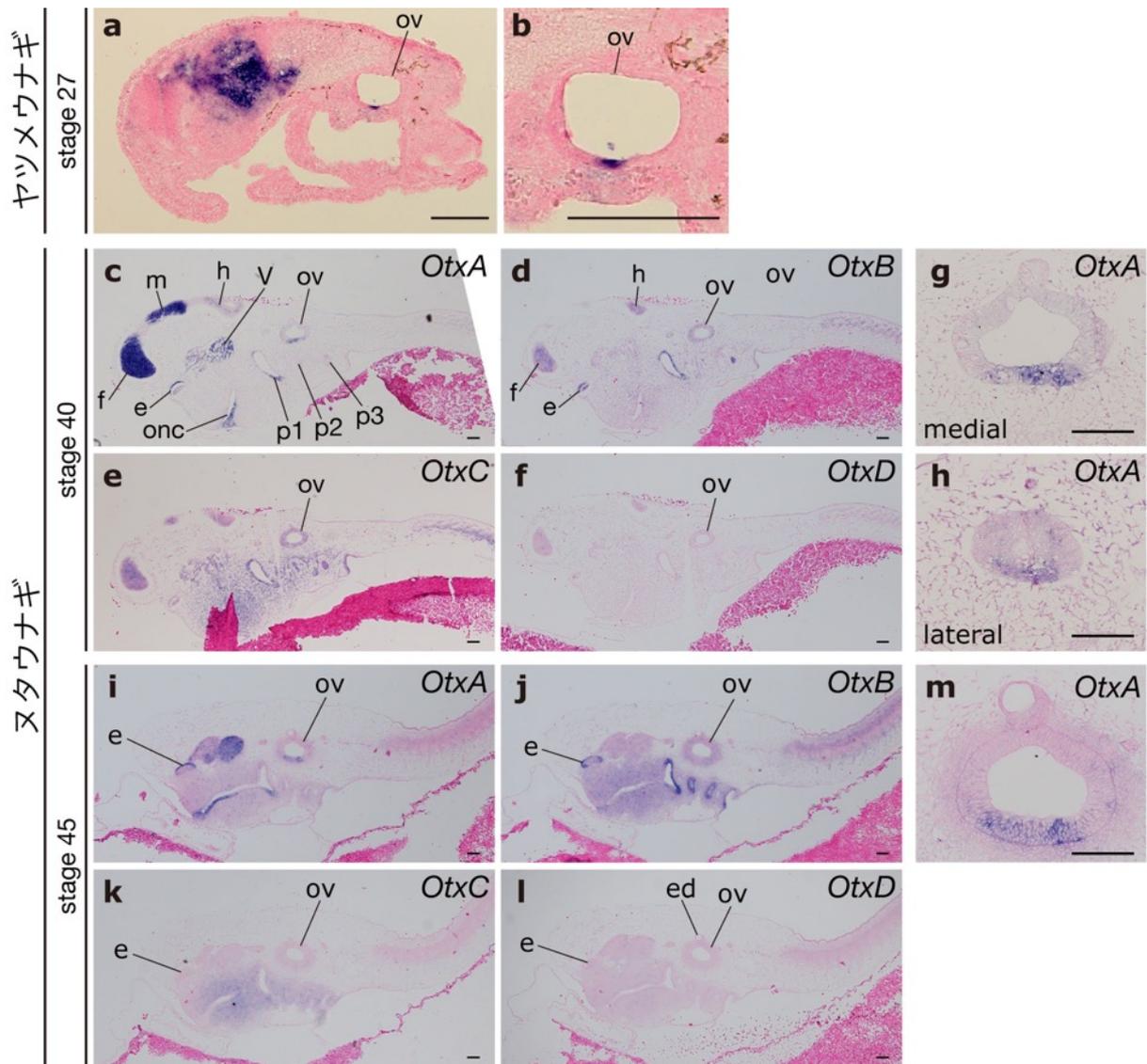


図 13. 又タウナギとヤツメウナギの耳胞における *OtxA* の発現。

(a, b) ヤツメウナギ胚ステージ 27 における *OtxA* の発現。(c-h) 又タウナギ胚ステージ 40 における *OtxA-D* の発現。g は c における耳胞部分の拡大で、h は g より外側の切片における *OtxA* の発現。(i-m) 又タウナギ胚ステージ 45 における *OtxA-D* の発現。m は i における耳胞部分の拡大。a, b は菅原文昭博士による。e, 眼 (eye) ; f, 前脳 (forebrain) ; h, 後脳 (hindbrain) ; ov, 耳胞 (otic vesicle) ; m, 中脳 (midbrain) ; onc, 口鼻下垂体腔 (oronasohypophyseal cavity) ; p1-3, 第 1-3 咽頭嚢 (pharyngeal pouch 1-3) ; V, 三叉神経 (trigeminal nerve)。Scale bars, 100  $\mu$ m。

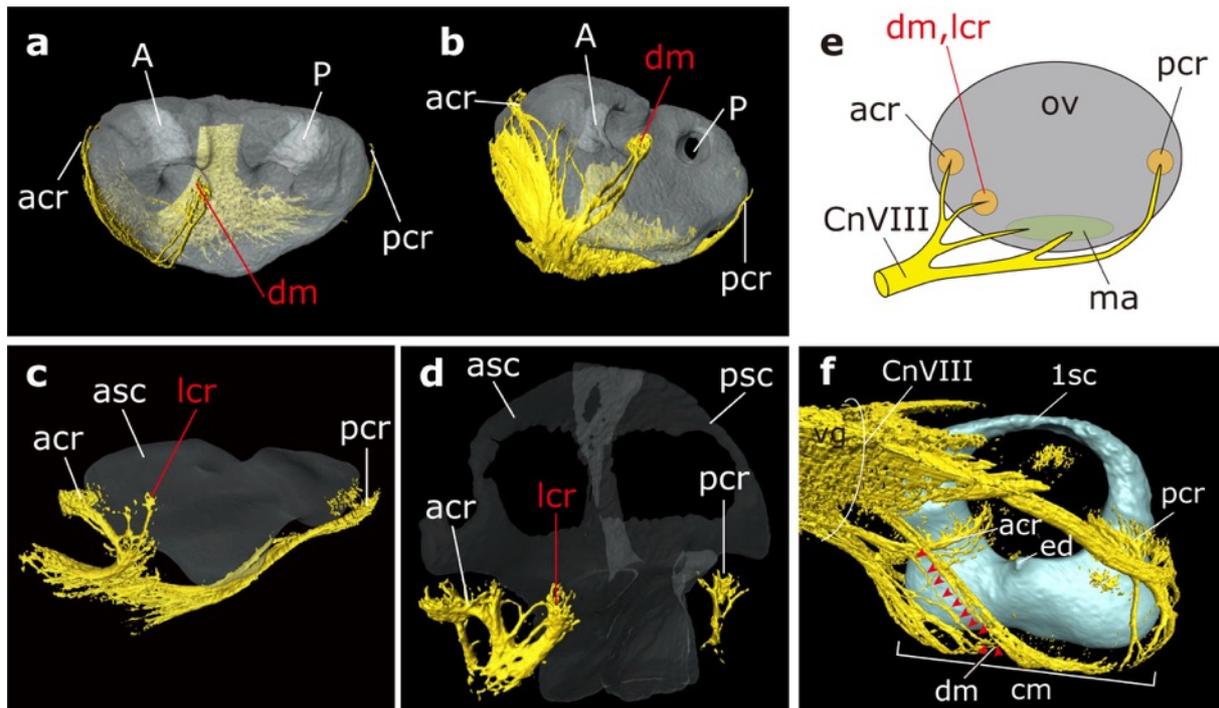


図 14. 円口類と顎口類にみる内耳神経分岐パターン的一致。

(a) ヤツメウナギ 12 mm 幼生の神経染色 (黄) により, dorsal macula (dm), 前膨大部稜 (acr), 後膨大部稜 (pcr) を支配する内耳神経 (CnVIII) の分岐パターンを側方から観察した。(b) a を前外腹側から見たもの。まず CnVIII から pcr を支配する枝が分岐し, より遠位で acr と dm に分かれる。(c) トラザメ stage 27 胚, (d) マウス E11.5 胚それぞれの内耳を外側から見たもの。いずれも, CnVIII はまず pcr を支配する枝との分岐より遠位で acr, lcr に分岐する。(e) ヤツメウナギと顎口類に共通する CnVIII の分岐パターン。(f) ヌタウナギ胚 stage.53 における内耳神経の観察。ヌタウナギ胚 stage53 の神経染色 (黄) により, 内耳神経 (CnVIII) を観察し, 耳胞内腔 (深緑) とともに示した。前膨大部稜 (acr) の枝から分岐して common macula の中央部を支配する枝 (赤矢尻) がある。1sc, 一半規管 (one semicircular canal) ; cm, common macula; ed, 内リンパ管 (endolymphatic duct) ; pcr, 後膨大部稜 (posterior crista) ; vg, 前庭神経節 (vestibular ganglion)。

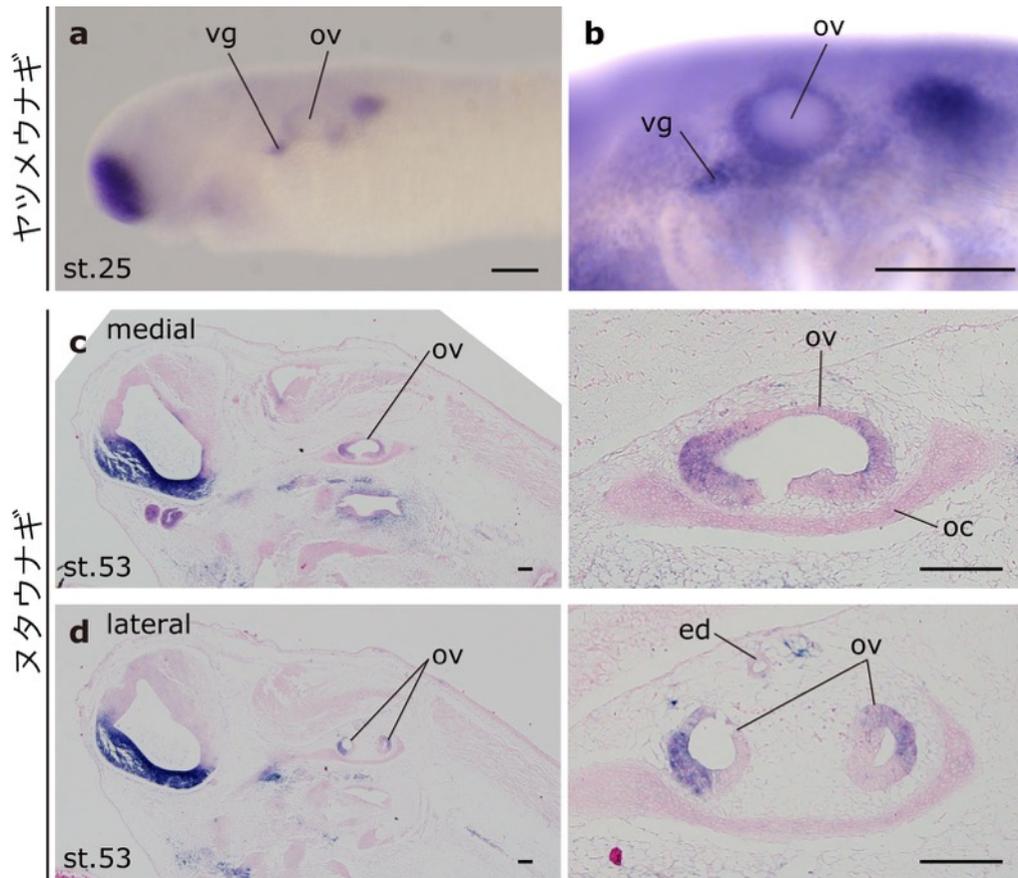


図 15. ヤツメウナギとヌタウナギの胚の耳胞における *Foxg* 遺伝子の発現。

(a) ヤツメウナギ胚 (ステージ 25) における *Foxg* の発現。(b) a を脱水して BABB に浸漬することで透明化し, 頭部を拡大して観察したもの。(c, d) ヌタウナギ胚 (ステージ 53) における *Foxg* の発現。d は c よりも外側の切片である。a, b は菅原文昭博士による。ov, 耳胞 (otic vesicle) ; vg, 前庭神経節 (vestibular ganglion)。Scale bars, 100  $\mu$ m.

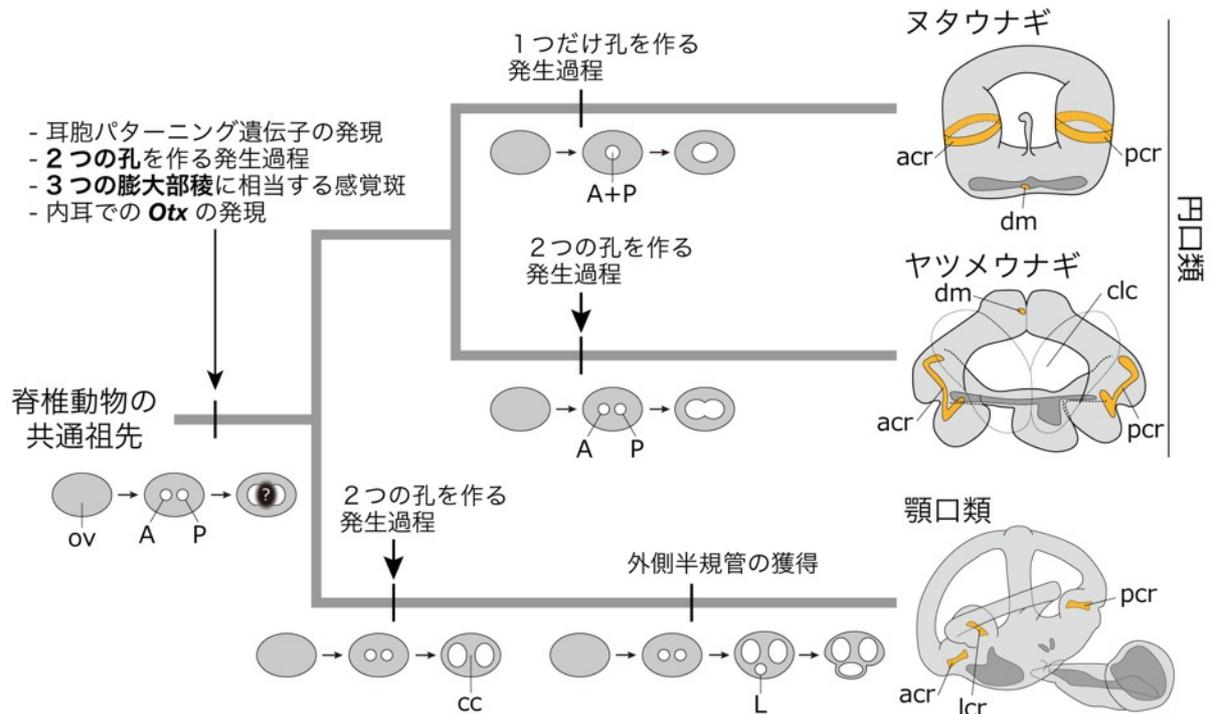


図 16. 脊椎動物における半規管発生パターンの進化のシナリオ。

ヌタウナギの一半規管は耳胞に1つだけ生じる孔 (A+P) により、直接形成される。ヤツメウナギの内耳も形態学的には一半規管であるが、一時的に形成された2つの孔 (A, P) が中央部で癒合して繊毛域 (clc) になるという発生パターンをもつ。顎口類の内耳もまず2つの孔が生じ、有顎脊椎動物においては、次いで外側半規管を作る孔 (L) が発生する。外群比較、すなわち顎口類をヌタウナギとヤツメウナギの外群として比較することにより、脊椎動物の共通祖先における内耳は、2つの孔を経る発生パターンであり、ヌタウナギの内耳発生は派生的な形質であることがわかる。ただし、内耳形態を比較可能な脊椎動物の外群が存在しないため、脊椎動物の共通祖先の成体の内耳形態は不明であるが、common crus (cc) は、顎口類の内耳形態を特徴づける構造であるといえる。

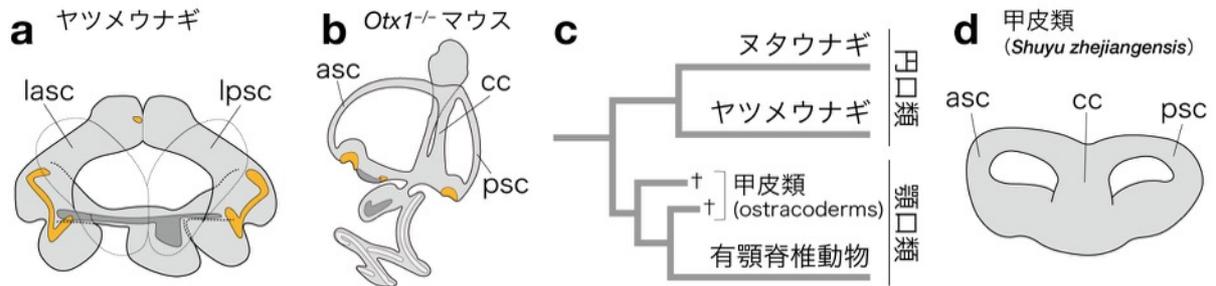


図 17. 甲皮類と *Otx1* ノックアウトマウスにおける内耳形態の比較。

(a) ヤツメウナギ内耳の ciliated chamber を除いた模式図。(b) *Otx1* ノックアウトマウスの内耳膜迷路。外側半規管を欠く一方、ヤツメウナギの内耳とは異なり、common crus を保持する点に注意。(c) 甲皮類の系統学的位置。顎をもたない、ステムグループの顎口類である。(d) 甲皮類の一種である *Shuyu zhejiangensis* の内耳。Gai et al. (2011) を基に描画。asc, 前半規管 (anterior semicircular canal) ; cc, common crus, lasc, ‘ヤツメウナギ’ 前半規管 (‘lamprey’ anterior semicircular canal) ; psc, 後半規管 (posterior semicircular canal)。