

## 学位論文題名

## Molecular studies on the evolution of teleost fish scales from odontogenic component on the dermoskeleton of armored fish (Ostracodermi).

(魚類の鱗進化に関する分子生物学的研究-硬骨魚類の鱗は  
甲冑魚類外骨格の歯様組織から進化した)

## 学位論文内容の要旨

脊椎動物の骨は外骨格（皮骨）と内骨格からなる。進化の過程において生物（魚類）はまず皮骨形成能力を獲得し、それらが徐々に体内に進入することで内骨格が形成されるようになったと推定されている。そのため、皮骨進化の解明が脊椎動物の骨進化の初期過程の理解に不可欠であると考えられる。最古の脊椎動物（カンブリア期末からオルドビス紀、無顎類）が持つ最初の骨（皮骨）は、アスピディンと呼ばれる無細胞性の骨様組織で、その表面には象牙質様の結節が付属し、象牙質結節表面はエナメル様組織が覆う場合もあった。すなわち、現生の脊椎動物が持つ骨と歯が合体したようなものであるといえる。しかし、進化の進行とともに、皮骨は退化していったため、高等脊椎動物を用いた皮骨進化の解明は困難である。

そこで注目されるのが魚類の鱗である。水中での生活を選択した魚類においては、進化の過程で皮骨が保存され、原始皮骨は様々な形を持つ鱗へと進化した。現時点での魚類の進化の最終到達点である硬骨魚類の鱗（骨鱗）は、不規則に配列したコラーゲンが強く石灰化した骨質層、コラーゲンが規則的に配向した線維層板、および非常に強く石灰化したエナメル様の outer limiting layer からなる。また、「古代魚」と呼ばれ原始的形質を多く保有するポリプテルスには、原始皮骨が持つ3つの構成要素、すなわちエナメル様組織（ガノイン）、象牙質様組織、および骨様組織からなる鱗（ガノイン鱗）が、また、シーラカンスにはガノインおよび象牙質様組織のみからなる鱗（コスミン鱗）が認められる。このように鱗を材料とすれば、「生きた魚」の多様な構造の鱗を比較することで、皮骨進化に関し化石研究ではできない研究を展開することが可能となる。実際これまでに、鱗の発生様式を詳細に組織学的手法で比較することで、鱗が骨様組織と歯様組織の構成比率を変化させることで進化し、骨鱗はガノイン鱗が骨様組織を失うことで形成されたことが示唆されている。しかしその分子生物学的な裏づけはなされていない。近年、組織形成の分子機構を比較することが進化の解明につながるものが明らかとなり、生きた魚から得られる様々な形態の鱗形成の分子機構の比較が、鱗進化のさらなる解明につながると考えられるが、鱗形成の分子機構は不明なままである。

また、鱗形成の分子機構の解明は、再生医療分野においても有用である。鱗の主成分であるコラーゲンは多くの組織の主要な基質タンパク質であり、その配向や石灰化などの修飾が細胞の増殖や分化を制御する。そのため、生体組織と同等の構造を持つコラーゲン性の人工基質は、その組織の再生を強くサポートする。たとえば、生体骨と同等の構造を持つコラーゲン性基質は人工骨として機能し、骨再生を強く促すものと考えられる。現在、このような目的で用いられるコラーゲンとして、人獣共通感染症を持たない魚類の鱗のコラーゲンの研究が進められているが、鱗形成の分子機構の解明は、鱗コラーゲンの配向制御機構や石灰化機構の解明につながるものであり、それを応用すれば優れた人工骨などの再生医療素材の開発につながると考えられる。

そこで本論文では、鱗形成の分子機構を解明し、それらの知見を用いて鱗進化を解析する事を目的として以下の研究をおこなった。

第一章では、キンギョを用いて鱗形成細胞の分化機構を解析した。その結果、キンギョの鱗形成細胞において哺乳類の骨芽細胞と象牙芽細胞の分化因子である *runx2* や、共通の基質タンパク質である *sparc* や *bgp* が発現していることが明らかとなった。また鱗再生過程において、*runx2* の発現量が増加した後に *sparc* の発現量が増加し、最後に *bgp* の発現量が増加していた。このような発現動態は、哺乳類の骨芽細胞や象牙芽細胞におけるこれらの遺伝子の発現動態と同様である。このため、鱗形成細胞が哺乳類の骨芽細胞や象牙芽細胞と類似した機構で分化することが示唆された。

第二章では、ゼブラフィッシュを用いて鱗形成細胞の分化機構をさらに詳細に解析した。その結果、*runx2* だけでなく、同じく骨芽細胞および象牙芽細胞に共通な分化因子である *osx* も鱗形成細胞に発現していることが明らかとなった。さらに鱗再生過程において、*runx2* の発現量が増加した後に *osx* の発現量が増加していた。哺乳類においては、*runx2* が *osx* を介して骨芽細胞や象牙芽細胞の分化を制御している。そのため、鱗においても *runx2-osx* 系が鱗形成細胞分化を制御していることが示唆された。また、象牙芽細胞に特異的に発現する基質タンパク質 (*scpp1* および *scpp5*) が鱗形成細胞においても発現していたのに対し、象牙芽細胞ではあまり発現せず、骨芽細胞で強く発現する *spp1* の発現は、一部の鱗形成細胞のみに認められた。そのため、鱗形成細胞は骨芽細胞よりも象牙芽細胞に近い性質を持つことが明らかとなった。これらの結果から、骨鱗は歯様組織であると考えられ、エナメル様組織、象牙質様組織、および骨様組織からなる鱗であるガノイン鱗が骨様組織を失って歯様組織だけから成る骨鱗に進化したとする仮説が分子生物学的に支持された。

第三章では、鱗形成細胞、象牙芽細胞および骨芽細胞の性状をさらに詳細に比較するために、ゼブラフィッシュの象牙芽細胞および骨芽細胞における遺伝子の発現動態を *in situ* hybridization 法を用いて解析し、それらを鱗形成細胞と比較した。その結果、鱗形成細胞と象牙芽細胞における遺伝子の発現動態は類似していることが明らかとなった。しかし、基質タンパク質 *bgp* の発現が鱗形成細胞では認められたのに対して、象牙芽細胞では認められなかった。そのため、鱗形成細胞は象牙芽細胞と類似しているが、基質タンパク質の発現動態は異なることが明らかとなった。

第四章では、鱗形成細胞の分化機構が進化の過程でどのように変化したのかを明らかにするために、古代魚であるチョウザメの骨組織の形成機構を、特に鱗様の組織である鱗甲 (scute) に着目して解析した。その結果、チョウザメの鱗甲においても *runx2* および *sparc* が強く発現しており、チョウザメの鱗甲においても *runx2* が鱗形成細胞分化を制御し、基質タンパク質として *Sparc* が含まれると考えられた。このような分化機構は、骨鱗の鱗形成細胞と同様である。そのため、*runx2* を中心とする鱗形成細胞の分化機構は、鱗進化の初期から保存されていると考えられた。

以上の結果から、ポリプテルスなどに見られる鱗が骨様組織を失うことで骨鱗が形成されたとする仮説が分子生物学的に支持され、鱗形成細胞が *runx2* を中心とする分化機構を維持しながら、基質タンパク質の発現動態を変化させることで鱗進化が進行したと考えられた。また、鱗形成細胞が象牙芽細胞と近い性状を持っていたことから、鱗が骨形成よりも象牙質形成のモデルとして適していると考えられた。さらに本研究により、様々な鱗基質タンパク質の遺伝子の発現動態が解明された。基質タンパク質はコラーゲンの配向制御に関与すると考えられているため、本研究で得られた知見は鱗コラーゲンの配向制御機構を解明するための基礎となると考えられた。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 足 立 伸 次  
副 査 教 授 荒 井 克 俊  
副 査 教 授 都 木 靖 彰  
副 査 助 教 浦 和 寛

## 学位論文題名

### Molecular studies on the evolution of teleost fish scales from odontogenic component on the dermoskeleton of armored fish (Ostracodermi).

(魚類の鱗進化に関する分子生物学的研究-硬骨魚類の鱗は  
甲冑魚類外骨格の歯様組織から進化した)

脊椎動物の骨は外骨格(皮骨)と内骨格からなる。進化において、まず皮骨が形成され、それらが体内に進入することで内骨格が形成されたと考えられている。そのため、皮骨進化の解明が骨進化の解明に不可欠であると考えられる。

皮骨は陸上脊椎動物では頭蓋骨や歯を残してその大部分が退化したが、魚類においては原始皮骨は様々な形の鱗へと進化した。「古代魚」と呼ばれ原始的形質を多く保有するポリプテルスには、原始皮骨が持つ3つの構成要素、すなわちエナメル様組織(ガノイン)、象牙質様組織、および骨様組織からなる鱗(ガノイン鱗)が、また、シーラカンスにはガノインおよび象牙質様組織のみからなる鱗(コスミン鱗)が認められる。現時点での魚類の進化の最終到達点である硬骨魚類の鱗(骨鱗)は、不規則に配列したコラーゲンが強く石灰化した骨質層、コラーゲンが規則的に配向した線維層板、および非常に強く石灰化したエナメル様の outer limiting layer からなる。このように鱗を材料とすれば、「生きた魚」の多様な構造の鱗を比較することで、皮骨進化に関して化石研究ではできない研究を展開することが可能となる。これまでに、鱗の発生様式を組織学的手法で比較することで、鱗が骨様組織と歯様組織の構成比率を変化させることで進化した、骨鱗はガノイン鱗が骨様組織を失うことで形成された、とする説が提示されている。しかしその分子生物学的な裏づけはなされていない。近年、組織形成の分子機構を比較することが進化の解明につながる事が明らかとなっており、様々な形態の鱗形成の分子機構の比較が鱗進化の解明につながると考えられるが、その分子機構は不明なまま残されている。

そこで本論文では、鱗形成の分子機構を解明し、それらの知見を用いて鱗進化を解析する事を目的として研究をおこない、以下の成果を得た。

第一章では、キンギョの鱗再生過程における遺伝子の発現動態を解析し、鱗形成細胞において哺乳類の骨芽細胞、象牙芽細胞に共通の分化因子である *runx2* や、骨、象牙質に共通の基質タンパク質である *sparc* および *bgp* が発現していることを確認し、鱗形成細胞が哺乳類の骨芽細胞、象牙芽細胞と類似した機構で分化することを示唆した。

第二章では、ゼブラフィッシュを用いて鱗形成細胞の分化機構をさらに詳細に解析し、骨芽細胞・象牙芽細胞に共通の分化因子である *osx* が鱗形成細胞に発現することを確認した。このことから、骨芽細胞、象牙芽細胞同様、*runx2-osx* 系が鱗形成細胞分化も制御することを示唆した。また、骨よりも象牙質に特に多く認められる基質タンパク質 (*scpp1* および *scpp5*) が鱗形成細胞において発現していることを確認し、鱗形成細胞は特に象牙芽細胞に近い性質を持つことを明らかにした。これらのことから、骨鱗は歯様組織から成ると考えられ、ガノイン鱗が骨様組織を失うことで骨鱗に進化したとする仮説が

分子生物学的にも支持される事を示した。

第三章では、ゼブラフィッシュの象牙芽細胞および骨芽細胞における遺伝子の発現動態を解析し、それを鱗形成細胞と比較することで、これらの細胞の性状をさらに詳細に比較した。その結果、鱗形成細胞と象牙芽細胞では、基質タンパク質 *bgp* の発現動態が異なることを確認し、基質タンパク質の発現動態の違いが両細胞の大きな違いであることを明らかにした。

第四章では、鱗形成細胞の分化機構が進化の過程でどのように変化したのかを明らかとするために、古代魚であるチョウザメの骨組織の形成機構を、鱗様の組織である鱗甲に着目して解析した。その結果、チョウザメの鱗甲における *runx2* および *sparc* の発現を確認し、チョウザメの鱗甲においても *runx2* が鱗形成細胞分化を制御し、基質タンパク質として *Sparc* が含まれることを示唆した。

以上の結果から、ガノイン鱗が骨様組織を失うことで骨鱗が形成されたとする仮説が分子生物学的に支持されることを示すとともに、鱗形成細胞が *runx2* を中心とする分化機構を維持しながら、基質タンパク質の発現動態を変化させることで鱗進化が進行したとする新しい仮説を提唱した。さらに、鱗形成細胞が象牙芽細胞と類似した性状を持っていたことから、鱗は象牙質形成のモデルとして有用であることを示唆した。近年、硬骨魚類の鱗を哺乳類の骨形成のモデルとして利用する研究が盛んになりつつあるが、本研究は、硬骨魚類の鱗を用いて研究を進める場合には、象牙質と骨の違いを認識して研究を推進する必要があることを示したものである。

以上の成果は鱗形成の分子機構から鱗進化を解明するまったく新しいものであるとともに、鱗をモデルとして利用するための応用研究に大いに寄与するものであると評価できる。よって審査員一同は申請者が博士（水産科学）の学位を授与される資格のあるものと判定した。