

恐竜の系統における発生様式の進化：大腿骨について

The evolution of morphogenesis in the lineage of dinosaurs: on the thigh bone

東北大学	江川 史朗
派遣期間	2018年10月16日～2019年4月24日
研究機関	Department of Geology and Geophysics, Yale University 210 Whitney Avenue, New Haven, CT06511, United States
研究指導者	Bhart-Anjan S. Bhullar

The morphology evolves through the modification of morphogenesis. Thus, understanding the morphogenetic evolution enable us to reconstruct the concrete transitional process of morphological evolution from a mechanistic viewpoint. Hence, as a pioneering example, we reconstructed the morphogenetic evolution of the inward-directed head of the femur (thigh bone) of dinosaurs by virtue that this lineage has both extant and extinct clues (extant relatives and fossils).

First, we compared morphogenetic processes of femoral anlagen among birds and reptiles, and found the incipient shape is very similar while the following one is quite different, which results in the difference of the femoral head directions. Second, based on fossil surface landmark, which enable to distinguish the morphogenetic types, we found the early dinosaurs would have developed the femora through small modification of reptile-type morphogenesis.

Based on these results, we hypothesized the evolutionary scenario in which the inward-direction of the femoral head was firstly acquired through the modification of reptile-type morphogenesis, and later it was substituted secondarily by bird-type one. In this way, we demonstrated that the combinational analysis of embryos and fossils enables us to reconstruct even counterintuitive, elusive, and complex evolutionary history of dinosaurian morphogenesis.

研究目的

生物の形態は発生過程において形成されます。故に、形態の進化は発生過程の変化を通じて生じ、これを理解することによって初めて形態進化の機械論的理解が可能になります。しかしながら、形態進化は紆余曲折的な形態形成の歴史(e.g.発生システム浮動(Haag & True, 2018; True & Haag, 2001))を許容する為、背景にある形態形成の進化の復元が容易ではないことも少なくありません。

そこで私は、形態形成の進化的変遷を復元するのに最適なケースとして、恐竜の系統に着目しました。その理由は大きく2つあります。一つ目の理由は、

彼らの近縁種が現在でも生き残っていることです。“恐竜以前”の状態は鱗竜類(トカゲなど)やワニ類に見ることができ、場合によってはカメも用いることができます。また一方で“恐竜の状態”は彼らの直接の子孫に見ることができる場合が多く、鳥類として現在まで生き残っております。そして幸運なことに、鳥を筆頭に、その多くが胚の入手が容易であり、観察法や実験操作の知見が多く蓄積しております。二つ目の理由は、恐竜の系統では化石記録が充実していることです。絶滅してしまっている系統的位置の動物群では胚発生の観察はできないものの、成体の化石からでも形態形成に係る情報を十分に引

き出すことができる場合もあります。以上の利点を踏まえて、形態形成の進化を復元する具体的な形質として、内向きの大腿骨頭を選びました。

大腿骨の近位端(体に近い方、つまり股関節側)を大腿骨頭と呼びます。大腿骨頭の向きは恐竜の系統で変化していることが知られています(Carrano, 2000; Gauthier, 1986; Hutchinson, 2001)。祖先的な大腿骨頭の向きは、ワニや原始的な恐竜に見ることができ、大腿骨の遠位端(体から遠い方、つまり膝側)と比べて約 45° の角を成す一方、派生的な恐竜ではこの角が約 0° になっています。この恐竜型の向きの大腿骨頭は、後肢の運動器としての性能を高めるものとして、ひいては彼らの進化的成功の一要素として古くから注目されてきました(Charig, 1972; Parrish, 1986; Sennikov, 1989)。このように恐竜の進化にとって重要な形質に対し、本研究では次のように研究目標を設定しました：大腿骨頭の向きはどのような形態形成の進化的変遷を経て変化してきたのか？

研究経過

1. 鳥類と爬虫類の大腿骨頭は、異なる構造から生じる

はじめに、次の現生の竜弓類の胚を用いて、大腿骨の形態形成過程を比較しました。最も祖先的な状態を持つ動物であるヤモリ(*Paroedura pictus*)。系統特異的な特殊化をしていますが初期の形態形成ではヤモリの次に祖先的な状態を呈していることが期待できる動物のカメ(*Pelodiscus sinensis*)。次に祖先的な状態を呈しているワニ(*Alligator mississippiensis*)。原始的な恐竜はワニのそれと非常によく似た大腿骨を持っています。最も派生的な状態を呈している鳥類(ウズラ *Coturnix japonica*・ニワトリ *Gallus gallus*)。Avetheropoda は、少なくとも大腿骨頭の向きに関しては鳥類と非常によく似た大腿骨を持っています。本研究ではこれらの胚に対して、CLARITY 染色法にて軟骨細胞マーカーである Sox9 の空間局在を 3 次元的に可視化し、それに基づいて大腿骨および周辺の骨格要素の原基の形態を記載・比較しました。大腿骨原基の形態形成初期までは、大腿骨原基の形態および周辺骨格要素との相対的な位置関係は非常に保存的でした。この進化的保存性により、大腿骨原基近位端にある複数の突起/領域について種間での対応関係(相同性)を認めることが可能になりました。結果として、どの突起が将来大腿骨頭を形成するの

かを論じる基盤が成立しました。ヤモリ・カメ・ワニでは ADT と名付けた突起から大腿骨頭が生じてくる一方、ウズラでは VMT と名付けた領域から大腿骨頭が生じてくる様子が観察されました。つまり、爬虫類と鳥類の大腿骨頭は異なる胚領域に由来することが示唆されました。

このことは次のデータからも支持されました。続く解析では大腿骨近位端の突起と軟組織の相対的位置関係を観察しました。ヤモリ・ワニ・ウズラの三種において、大腿骨頭靭帯は一貫して VMT の派生物の近傍に付着していることがわかりました。大腿骨頭靭帯の付着点を相同な(つまり、生物間で対応している)領域と考えるならば、私が上記の 3 種で VMT と認識した領域もまた相同であると考えことができ、それにより VMT から生じた鳥類の大腿骨頭と、ADT から生じた爬虫類の大腿骨頭は、相同な(対応する)領域から発生したものではないと表現することができます。

2. 鳥類の個体発生において、膝の軸も変化していた

ヤモリ・ワニ・ウズラの大腿骨の形態形成初期において、遠位端(膝側)にも類似性が認められました。大腿骨遠位端の長軸の向きはおおよそ、ADT 同じ程度の方向性を持ち、腓骨の長軸とは約 45° を成していました。ヤモリ・ワニでは、個体発生が進行してもこの角度は大きく変化しませんでした。対照的にウズラにおいては、相対的に内側頭が腹後側に移動し、大腿骨遠位端の長軸が個体発生の過程で約 45° 変化する様子が観察されました。大腿骨遠位端は胚期の筋収縮による機械刺激に応答して形態を変化させることが報告されていること(Chandaria et al., 2016; Parisi, et al., 2018; Roddy et al., 2011; Roddy et al., 2011)、鳥類では腓腹筋の内側頭が大腿骨遠位端内側頭に停止している一方(Brinkmann, 2010; Chamberlain, 1943; George & Berger, 1966; Holmes, 1963)ワニでは同筋頭は大腿骨には停止していないこと(鈴木ら, 2011)から、この長軸の向きの変化は機械刺激により制御されているのではないかと予想し、ウズラ胚に対して薬理学的処理を施しました。結果として、筋麻痺処理では長軸の向きの変化が阻害され、過剰運動処理では長軸の向きの変化が促進されました。以上のことから、胚期における筋収縮由来の機械刺激は、鳥類の大腿骨遠位端の形態形成においてその長軸の向きを変化させるのに必要十分であることが示唆さ

れます。

3. 恐竜は爬虫類型、化石鳥類は鳥類型の大腿骨頭の形態形成様式をしていた

次に、「大腿骨近位端の突起と靭帯の付着位置の相対的な位置関係」に基づいて、成体の大腿骨の観察のみに基づいて、ADT/VMT どちらの突起から大腿骨頭を発生していたのかの推論を試みました。前述の通り、VMT から大腿骨頭を発生させていれば大腿骨靭帯は大腿骨頭の近くに位置し、ADT から大腿骨頭を発生させていれば大腿骨頭靭帯は大腿骨頭から離れたところに位置する筈です。幸いなことに、大腿骨頭靭帯の付着点は *fovea* という圧痕を硬骨組織上に残しており、それは化石になった大腿骨にも保存されています (Tsai & Holliday, 2015; Tsai et al., 2018)。Fovea の観察に耐えうるほど良好な保存状態の化石を私自身で観察したところ、基盤的 *Maniraptra* まで ADT から大腿骨頭を発生させていたと推論できました。

また、遠位端に関しても、少なくとも派生的な非鳥類恐竜では内側顆が外側顆よりも高くに位置しており、長軸の向きが現生鳥類のそれではなく未だ祖先的な状態であることがわかりました。

考察

1.の結果で見たように、現生爬虫類と鳥類において、大腿骨頭の発生学的に異なる構造/領域から由来することが示唆されました(爬虫類は ADT より、鳥類は VMT より)。このことを更に確証するためには、例えば、爬虫類と鳥類では「肢芽内の間充織の内、異なる位置値を持つ細胞群から大腿骨頭が発生してくる」というデータを示すなどが効果的かと思えます。

胚期の股関節には *interzone* と呼ばれる特殊は間充織組織が存在し (Egawa et al., 2018)、*interzone* は一般的に分泌因子を介して近傍の軟骨の成長を促進していることが知られています (Kronenberg, 2003; Longobardi et al., 2016; Merino et al., 1999; Storm & Kingsley, 1999)。予察的な観察では、爬虫類の寛骨臼 (大腿骨が嵌る寛骨の領域) は広く ADT と VMT を覆っているように見える一方、鳥類のそれは狭く VMT のみしか覆っていないように見え、寛骨臼の大きさは *interzone* の大きさと相関することが予想されます。この寛骨臼・*interzone* の相対的な大きさの違いにより、爬虫類は ADT が大腿骨頭のメインの構成要素と

なる一方、鳥類では VMT がメインの構成要素になったと考察できます。この仮説を検証するには、*interzone* の分布を種間比較することと、*interzone* が実際に大腿骨頭の成長を促進させることを実験的に示す必要があります。

1.の結果より、大腿骨形態形成初期において ADT と VMT の位置関係は現生竜弓類で非常に類似しているため、異なる突起/領域から大腿骨頭を形成すれば必ずと大腿骨頭の向きに差異が生じます。また、2.の結果より、鳥類では大腿骨遠位端の長軸の向きが個体発生の間に変化していたことが判明しました。これらの変化をまとめると、大腿骨頭の由来が変化したことにより約 90° 変化し (ADT と VMT の成す角は約 90° であるため)、遠位端の長軸が同じ方向に約 45° 変化したため、一部相殺されて正味約 45° の変化が生じたと結論できます。この角度の変化は恐竜の進化において生じたとされるものと整合的です。

しかしながら、機構の点では先行仮説 (Carrano, 2000; Gauthier, 1986; Hutchinson, 2001) とは対立します。特に (Hutchinson, 2001) は筋の付着痕や栄養孔などの軟組織の痕を詳細に記載し、大腿骨頭の向きは「捻じれ (*rotation*) によって変化した」と強い説得力を示しながら結論しています。大腿骨のような長骨は機械刺激により捻じれることが知られており (Botelho et al., 2015; Wilkinson, 1985)、興味深いことに、大腿骨頭の向きが変化した進化的タイミングで *M.iliotrichintericus caudalis* の付着点 (*lesser trochanter*) が発達したことが知られています (Hutchinson, 2001)。つまり、「特定の筋が進化的に発達したことにより、胚期で大腿骨近位端に及ぼされる機械刺激が変化し、それにより大腿骨近位端が個体発生中に捻じれた」というシナリオを描くことが可能です。本研究の結果との対立は、3.の化石記録の検討により解消できます。興味深いことに3.の結果は、「鳥類型の大腿骨形態形成様式が獲得された進化的タイミング」は「大腿骨頭の角度が変化した進化的タイミング」よりもかなり後であることを示唆しています。上記において「大腿骨頭の発生学的由来の変化は寛骨臼サイズの相対的な縮小と機械論的にリンクしている筈だ」と予想しましたが、整合的なことに、化石記録を追うと寛骨臼の相対的なサイズは「鳥類型の大腿骨形態形成様式が獲得された進化的タイミング」に至るまで進化的に縮小し続けています (Hutchinson & Gatesy, 2000)。

これらのことを纏めると次のようなシナリオを復元することができます(図)。基盤的獣脚類において、ADT から大腿骨頭を発生させるという祖先的な状態を保持したまま、個体発生中での大腿骨の捻じれ(rotation)により、大腿骨頭の向きを派生的な状態へと変化させた。続く進化過程で寛骨臼の相対サイズの縮小に起因して VMT から大腿骨頭を発生させるようになり、同時に遠位端の長軸の向きも変化することにより、大腿骨頭の向きはそのままにその発生機構のみが上書きされた。

本研究では、現生動物の個体発生の比較により“進化の前と後の状態”を明らかにした上で、化石記録の吟味により“進化の途中で起きていたこと”を推論することにより、発生システム浮動を見つけた点で類例がありません。このように胚と化石を上手く用いれば発生機構の複雑な進化的変遷を提示できることを示しました。

引用文献

Botelho, J. F., Smith-Paredes, D., Soto-Acuna, S., Mpodozis, J., Palma, V., & Vargas, A. O. (2015). Skeletal plasticity in response to embryonic muscular activity underlies the development and evolution of the perching digit of birds. *Sci Rep*, 5, 9840. doi:10.1038/srep09840

Brinkmann, J. (2010). Vergleichende Untersuchungen an der Hinterextremität palaeognather Vögel im Hinblick auf deren phylogenetische Systematik. *PhD Thesis, Eberhard Karls Universität Tübingen*.

Carrano, M. T. (2000). Homoplasy and the evolution of dinosaur locomotion. *Paleobiology*, 26(3), 489-512. doi:10.1666/0094-8373(2000)026<0489:Hateod>2.0.Co;2

Chamberlain, F. W. (1943). *Atlas of avian anatomy*: Michigan State College.

Chandaria, V. V., McGinty, J., & Nowlan, N. C. (2016). Characterising the effects of in vitro mechanical stimulation on morphogenesis of developing limb explants. *Journal of Biomechanics*, 49(15), 3635-3642.

Charig, A. J. (1972). The evolution of the archosaur pelvis and hindlimb: an explanation in functional terms. *Studies in vertebrate evolution*, 121-155.

Egawa, S., Saito, D., Abe, G., & Tamura, K. (2018). Morphogenetic mechanism of the acquisition of the dinosaur-type acetabulum. *Royal Society Open Science*, 5(10). doi:ARTN 180604 10.1098/rsos.180604

Gauthier, J. (1986). Saurischian monophyly and the origin of birds. *Memoirs of the California Academy of sciences*, 8, 1-55.

George, J. C., & Berger, A. J. (1966). *Avian mycology*: Academic Press.

Haag, E. S., & True, J. R. (2018). Developmental System Drift. *Evolutionary Developmental Biology: A Reference Guide*, 1-12.

Holmes, E. B. (1963). *Variation in the muscles and nerves of the leg in two genera of grouse (Tympanuchus and Pedioecetes)*. University of Kansas, Zoology.

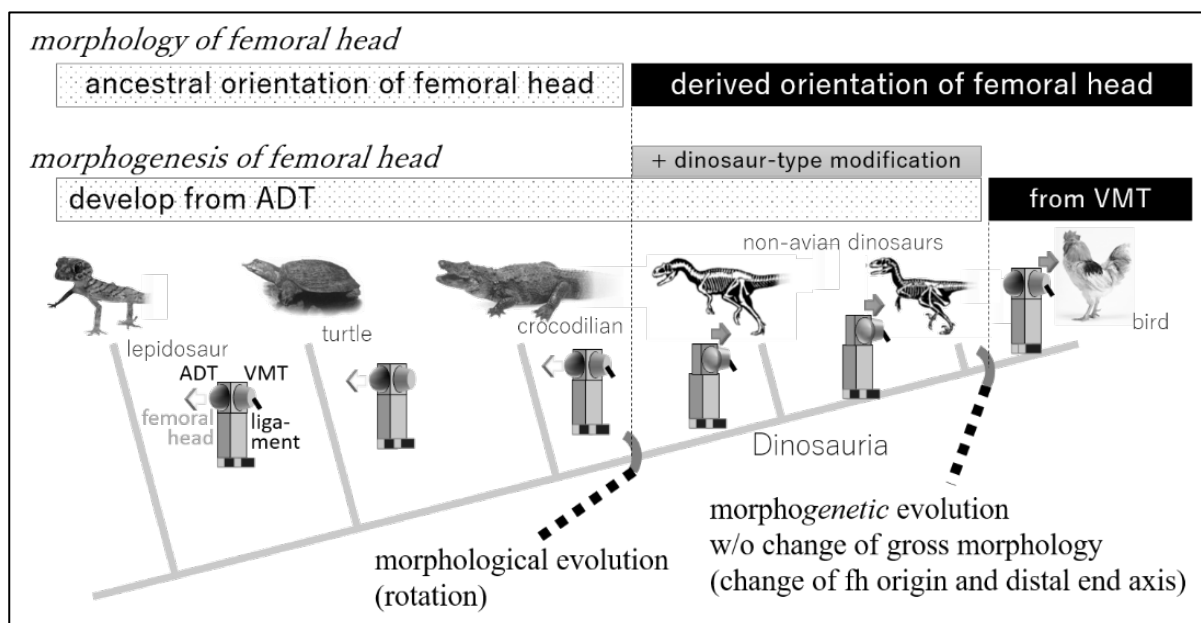
Hutchinson, J. R. (2001). The evolution of femoral osteology and soft tissues on the line to extant birds (Neornithes). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 131(2), 169-197. doi:10.1006/zjls.2000.0267

Hutchinson, J. R., & Gatesy, S. M. (2000). Adductors, abductors, and the evolution of archosaur locomotion. *Paleobiology*, 26(4), 734-751. doi:10.1666/0094-8373(2000)026<0734:AAateo>2.0.Co;2

Kronenberg, H. M. (2003). Developmental regulation of the growth plate. *Nature*, 423(6937), 332.

Longobardi, G., Ceolin, A., Ecay, A., Ghirotto, S., Guardiano, C., Irimia, M. A., . . . Barbujani, G. (2016). Formal linguistics as a cue to demographic history. *J Anthropol Sci*, 94, 147-155. doi:10.4436/JASS.94031

Merino, R., Macias, D., Ganán, Y., Economides, A., Wang, X., Wu, Q., . . . Hurle, J. (1999). Expression and Function of Gdf-5 during Digit Skeletogenesis in the Embryonic



- Chick Leg Bud. *Developmental Biology*, 206(1), 33-45.
- Parisi, C., Chandaria, V. V., & Nowlan, N. C. (2018). Blocking mechanosensitive ion channels eliminates the effects of applied mechanical loading on chick joint morphogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 373(1759), 20170317.
- Parrish, J. M. (1986). *Locomotor adaptations in the hindlimb and pelvis of the Thecodontia*: University of Col. Museum.
- Roddy, K. A., Kelly, G. M., Van Es, M. H., Murphy, P., & Prendergast, P. J. (2011). Dynamic patterns of mechanical stimulation co-localise with growth and cell proliferation during morphogenesis in the avian embryonic knee joint. *Journal of Biomechanics*, 44(1), 143-149.
- Roddy, K. A., Prendergast, P. J., & Murphy, P. (2011). Mechanical influences on morphogenesis of the knee joint revealed through morphological, molecular and computational analysis of immobilised embryos. *Plos One*, 6(2), e17526.
- Sennikov, A. G. (1989). Basic evolutionary laws of development of the locomotor apparatus of archosaurs (translated into English in 1990). *Paleontological Journal*, 4, 63-72.
- Storm, E. E., & Kingsley, D. M. (1999). GDF5 coordinates bone and joint formation during digit development. *Developmental Biology*, 209(1), 11-27.
- True, J. R., & Haag, E. S. (2001). Developmental system drift and flexibility in evolutionary trajectories. *Evolution & Development*, 3(2), 109-119.
- Tsai, H. P., & Holliday, C. M. (2015). Articular soft tissue anatomy of the archosaur hip joint: structural homology and functional implications. *Journal of Morphology*, 276(6), 601-630.
- Tsai, H. P., Middleton, K. M., Hutchinson, J. R., & Holliday, C. M. (2018). Hip Joint Articular Soft Tissues of Non-Dinosaurian Dinosauromorpha and Early Dinosauria: Evolutionary and Biomechanical Implications for Saurischia. *Journal of Vertebrate Paleontology*, 38(1). doi:ARTN e1427593
10.1080/02724634.2017.1427593
- Wilkinson, J. A. (1985). *Congenital Displacement of the Hip Joint*: Springer.
- 鈴木, 大., 千葉, 謙., 田中, 康., & 林, 昭. (2011). ワニの筋学-古脊椎動物学者に必要な解剖-: III. 腰帯・後肢. *化石*, 90, 37-60.

研究の発表

口頭発表

1. Egawa, S., Botelho, J., Bhullar, B.A.S. 主竜類における大腿骨の形態形成の進化史の復元 (The reconstruction of the evolutionary history of femoral morphogenesis in archosaur). 第 52 回日本発生物学会年会, 2019.05.15
2. Egawa, S., Botelho, J., Bhullar, B.A.S. On the Morphogenetic Historiography of the Archosaur Femur. International Congress of Vertebrate Morphology 12, 2019.07.23

誌上発表 なし