

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	四肢の多様な形態形成に寄与するプログラム細胞死とそのメカニズムの解析
Title(English)	Developmental Mechanisms for Programmed Cell Death Underlying Diverse Limb Morphology
著者(和文)	小野沙桃実
Author(English)	Satomi Ono
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京科学大学, 報告番号:甲第237号, 授与年月日:2025年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:田中 幹子,加藤 明,川上 厚志,鈴木 崇之,中村 信大
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Institute of Science Tokyo, Report number:甲第237号, Conferred date:2025/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	要約
Type(English)	Outline

令和 6 年度 博士論文

四肢の多様な形態形成に寄与する
プログラム細胞死とそのメカニズムの解析

Developmental Mechanisms for Programmed Cell Death
Underlying Diverse Limb Morphology

東京科学大学 生命理工学院 生命理工学系 生命理工学コース
田中幹子研究室

小野 沙桃実

指導教官 田中 幹子 教授

目次

要旨	5
序論	9
1. 胚発生中の細胞死は、動物の形態形成を多様にする発生システムである	9
2. 発生過程に起こる細胞死の種類と原因	9
3. 発生過程に起こる細胞死が形態形成に果たす役割	10
4. 本研究の目的	11
第一章:エゾアカガエルの空気呼吸行動が酸化ストレスを介して肢芽での細胞死を促す可能性の 検証	12
1. 序論	12
1.1 指間細胞死は多様な四肢の形態を羊膜類にもたらした	12
1.2 高濃度酸素は両生類の指間に細胞死を誘導する	12
1.3 両生類の幼生は空気呼吸を行う	13
1.4 エゾアカガエルについて	14
1.5 本研究の目的	14
2. 材料と実験手法	15
2.1 エゾアカガエル幼生とアフリカツメガエル幼生の入手と飼育	15
2.2 呼吸行動頻度の計測	15
2.3 エゾアカガエル幼生の肺の空気の観察	15
2.4 エゾアカガエルにおける細胞死と活性酸素種の検出細胞死	15
2.5 細胞死のカウントと統計処理	16
2.6 エゾアカガエル幼生の高濃度酸素下での飼育	16
2.7 エゾアカガエル血管の可視化	17
2.8 空気呼吸の阻害実験	17
3. 結果	18
3.1 エゾアカガエル幼生のステージング	18
3.2 エゾアカガエル幼生は頻繁な空気呼吸行動を行う	18
3.3 エゾアカガエル幼生の後肢芽では、まばらな細胞死が起こっている	19
3.4 環境中の酸素はエゾアカガエル幼生の後肢芽の細胞死を促す	19

3.5 エゾアカガエル幼生の空気呼吸行動は細胞死を促す	20
4. 考察	22
4.1 エゾアカガエル幼生の呼吸行動が寄与する指間細胞死	22
4.2 エゾアカガエル幼生の肢芽で生じる細胞死の解析	23
4.3 今後の展望	24
第二章:ニワトリの指間細胞死を制御する BMP シグナルと活性酸素種 (ROS) を繋ぐ分子メカニズムの解明	25
1. 序論	25
1.1 BMP シグナル経路は指間細胞死に必須である	25
1.2 ROS も指間細胞死を促す	25
1.3 指間領域で生じる ROS の産生経路	26
1.4 進化の過程で BMP シグナルが、ROS によって促される細胞死を制御するようになった可能性	27
1.5 本研究の目的	27
2. 材料と実験手法	29
2.1 ニワトリ胚の入手	29
2.2 細胞死と ROS の検出	29
2.3 RNA <i>in situ</i> ハイブリダイゼーション	29
2.4 ニワトリ後肢芽の組織培養	30
2.5 ビーズ移植	31
2.6 RNA sequencing (RNA-Seq) のためのライブラリ調整	31
2.7 RNA-Seq 解析	32
3. 結果	33
3.1 ニワトリ指間領域における ROS 産生の時空間パターンの解析	33
3.2 BMP シグナルは ROS 産生の上流で細胞死を制御する	34
3.3 BMP 下流で発現変化する ROS 産生関連遺伝子の探索	35
3.4 ニワトリ指間組織の細胞死の進行に伴う遺伝子発現プロファイルの変化	36
3.5 BMP 依存的な ROS 産生因子の Nox と抗酸化酵素の Sod の発現変化は指間領域での ROS 産生を促す	38
4. 考察	40

4.1 BMP の下流で促される ROS 産生酵素と抗酸化酵素.....	40
4.2 ROS 産生が指間細胞死で果たす役割.....	41
4.3 指間細胞死は進化の過程でどのように確立したのか.....	42
第三章:エミューの退化した翼の形成に二重のアイデンティティを有する筋前駆細胞の細胞死が 寄与する可能性の検証.....	44
1. 序論.....	44
1.1 卵殻内での胎動は正常な四肢の骨のパターン形成に必要不可欠である.....	44
1.2 エミュー胚の前肢では筋形成不全が生じる.....	44
1.3 本研究の目的.....	45
2. 材料と実験手法.....	46
2.1 ニワトリ胚とエミュー胚の入手.....	46
2.2 エミュー胚の卵殻内での前肢の動きの測定.....	46
2.3 Single cell RNA sequence (scRNA-Seq) のライブラリ作成とデータ解析.....	46
2.4 ニワトリ胚とエミュー胚の凍結切片の作成.....	47
2.5 筋肉と細胞死の検出.....	48
2.6 <i>In situ</i> Hybridization chain reaction (HCR).....	48
3. 結果.....	49
3.1 筋肉が欠損したエミュー前肢は、卵殻内での動きが制限される.....	49
3.2 エミュー前肢芽領域の scRNA-Seq 解析で特定された側板中胚葉と筋前駆細胞のア イデンティティを持つ細胞集団.....	49
3.3 エミュー前肢芽の Pax3+/Hand2+細胞集団は細胞死を起こす.....	51
4. 考察.....	52
4.1 エミューの筋前駆細胞が細胞死を引き起こす分子メカニズムの考察.....	52
4.2 エミューの翼の退化に寄与する複数のメカニズム.....	53
総合討論.....	54
1. 形態多様性を引き起こすプログラム細胞死の誕生についての考察.....	54
2. 細胞死が発生システムとなるメカニズムの考察.....	54
参考文献.....	57
謝辞.....	72

要旨

胚発生中の細胞死 (プログラム細胞死) は形態形成に大きく貢献する発生システムである。羊膜類の指間細胞死や神経管の閉鎖、中腎の消失、オタマジャクシの尾の退縮など、プログラム細胞死は様々な器官を適切に形成するのに重要な役割を果たす。このことから、プログラム細胞死の変化は動物の形態を多様にした原動力の一つであると考えられる。本研究では、多様な動物の四肢の発生中に起こる細胞死を引き起こすメカニズムに焦点を当て、以下の3つの研究課題を遂行した。

1. エゾアカガエルの空気呼吸行動が酸化ストレスを介して肢芽での細胞死を促す可能性の検証

羊膜類の四肢の形態を多様にした指間細胞死機構は、両生類では確立しておらず、羊膜類で確立された新しい形質である。近年、当研究室では、四肢発生中の環境酸素が指間細胞死に必須であること、酸素レベルの高い陸上で発生する両生類では指間に細胞死が生じることを明らかにした (Cordeiro et al., 2019)。両生類の多様な生息環境や行動様式を考慮すると、生息環境だけではなく、行動様式によっても体内に取り込まれる酸素レベルが上がると予想される。そこで、本研究では、両生類であるエゾアカガエル (*Rana pirica*) の頻繁な空気呼吸行動が指間で可塑的な細胞死を誘導する可能性を検証した。その結果、幼生期を水中で過ごすエゾアカガエルでは指間で細胞死が生じており、それらの細胞死の一部は酸化ストレスによって誘導される可能性が示唆された。さらに、幼生の頻繁な空気呼吸行動を阻害すると細胞死が減少した。これらの結果から、本研究では、エゾアカガエルは幼生期に頻繁な空気呼吸行動を行うことで、指間での酸化ストレスが増加し細胞死を引き起こしている可能性が示唆された。

2. ニワトリの指間細胞死を制御する BMP シグナルと活性酸素種 (ROS) を繋ぐ分子メカニズムの解明

指間細胞死は、分離したニワトリの指や水かきのあるアヒルの足、コウモリの皮膜など、羊膜動物の四肢の形態を多様にした重要な発生システムである。BMP (Bone Morphogenetic Protein) シグナルは、指間細胞死を制御する重要な因子であるが、同じく指間細胞死を促進させる活性酸素種 (Reactive Oxygen Species, ROS) との関係性は不明である。そこで、本研究では、ニワトリの後肢芽を題材として、指間細胞死を制御する2つの因子、BMP シグナルと ROS を繋ぐ分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。その結果、BMP の添加および阻害実験により ROS 産生が BMP シグナル下流で起こることが示された。また、トランスクリプトーム解析により、BMP シグナル下流で発現変化する ROS 産生の候補因子が明らかとなった。このうち、ROS 産生酵素 (*Nox2* および *Nox4*) と抗酸化酵素 (*Sod1*) がニワトリ後肢芽の指間領域で BMP シグナルにより発現が制御されている可能性が示唆され

た。以上より、本研究では、BMP シグナルが ROS 産生酵素の発現増加と抗酸化酵素の発現低下を介して ROS 産生と指間細胞死を制御するモデルを提唱する。本研究は、進化の過程で指間細胞死が誕生した経緯の解明に貢献することが期待される。

3. エミューの退化した翼の形成に二重のアイデンティティを有する筋前駆細胞の細胞死が寄与する可能性の検証

平胸類のエミューは、著しく退化した翼をもつ。近年、当研究室では、エミューの翼における左右非対称な骨格パターンが、筋形成不全が引き起こす卵殻内でのメカノストレスの減少により引き起こされる可能性を明らかにした。しかし、筋形成不全の背景にある発生メカニズムは不明のままである。本研究では、エミューの左右非対称な骨格パターンを形成する筋形成不全に、胚発生中の細胞死が寄与している可能性を検証した。エミューとニワトリの比較シングルセルトランスクリプトーム解析により、エミューの筋前駆細胞集団の一部で側板中胚葉のマーカー遺伝子が複数発現していることが明らかとなった。さらに、エミュー前肢の筋前駆細胞および側板中胚葉のマーカー遺伝子が発現する領域では、細胞死が生じていた。以上のことから、本研究では、異なる細胞集団である側板中胚葉のマーカー遺伝子を発現する筋前駆細胞が、筋肉に分化する時期に細胞死で除去されることによって筋形成不全が起こり、卵殻内でのメカノストレスの減少を介してエミューの退化した翼の形態形成に貢献する可能性が示唆された。

序論

1. 胚発生中の細胞死は、動物の形態形成を多様にする発生システムである

多種多様な動物の特徴的な形態は、胚発生期において多細胞が協調し高度に組織化された構造を形成する過程で決まっていく。この過程では、細胞の増殖、凝集、肥大、移動、細胞外基質の分泌や分解に加え、一度形成された構造を細胞死によって削り取ることで形態形成が進行する (Wolpert et al., 2011)。特に、胚発生中に起こるプログラム細胞死は、形態形成を支える重要な発生システムのひとつである。細胞死による形態形成は古くから記述されており、オタマジャクシの鰓や尾の消失、指間細胞死による指の分離、生殖器の形成、中腎の消失、神経管の閉塞など、発生期の様々な器官で細胞死が報告されている (Glucksmann, 1951)。

一度形成した組織を細胞死によって削り取ることで形態形成をおこなう細胞死の変化は、動物の形態多様性に寄与している。例えば、指間を削り取ることで指を分離する指間細胞死のパターンの多様性は、爬虫類、鳥類、哺乳類を含む羊膜類の四肢の形態多様性に貢献している。指間細胞死が抑制されるコウモリでは皮膚が (Weatherbee et al., 2006)、アヒルやオオバンなどの水鳥では水かきが形成され (Tokita et al., 2020)、指間細胞死が第2指と第3指の間に限定されるカメレオンでは、指骨は5本のまま幅広な2本の指が形成される (Diaz & Trainor, 2015)。また、発生中の水晶体で起こる細胞死は、光の届かない環境に適応した洞窟型メキシカンテトラの退化した目の形成に関与する (Jeffery & Martasian, 1998; Strickler et al., 2007)。このように、胚発生期における細胞死の量や場所の多様化は形態多様性をもたらし、それに伴い生活史の多様化にも寄与していると考えられる。

2. 発生過程に起こる細胞死の種類と原因

プログラム細胞死を引き起こす分子メカニズムについて、初期の研究では、プログラム細胞死はアポトーシス経路によって制御されていると考えられてきた (Kerr et al., 1972; Yuan et al., 1993; Fuchs & Steller, 2011)。しかし、近年では、アポトーシス経路を阻害してもプログラム細胞死が進行すること (Yuan and Kroemer, 2010)、細胞死命名委員会 (Nomenclature Committee on Cell Death, NCCD) が 2018 年に細胞死の分類を発表したこと (Galluzzi et al., 2018) により、従来アポトーシスのみだと考えられていたプログラム細胞死は、実は多くの分子メカニズムによって制御されている可能性が明らかとなってきた。現在、プログラム細胞死の制御には、10 種類を超える分子カスケードが関与していると指摘されている (Park et al., 2023; Chen et al., 2024)。例えば、肢芽の筋肉で生じる細胞死は、鉄イオンが過酸化脂質の産生を介して細胞死を誘導する、フェロトーシスという細胞死である (Co et al., 2024)。このように、発生過程における細胞死は様々な分子カスケードを介して制御される。

発生期の細胞死は、大きく分けて二つの要因により引き起こされる。一つは、特定の細胞にプログラムされた細胞死促進シグナルであり、もう一つは外的または周囲環境に依存する要因である。2 つ目の要因によって引き起こされる細胞死には、生存シグナルの不足、分化プロセスの失敗、上皮組織の融合等が含まれる。例えば、脊椎動物で見られる神経性細胞死は、生存シグナルである Nerve Growth Factor (NGF) を受け取れないことによって引き起こされる (Korsching, 1993; Kristiansen & Ham, 2014)。生存シグナルを受容できた交感神経は神経支配をすることが出来るが、受け取ることができなかった神経では細胞死が引き起こされる (Korsching, 1993; Kristiansen & Ham, 2014)。このようにシグナルを受け取れない事によって誘導される細胞死は、神経細胞以外にも、ショウジョウバエの移動性中胚葉などが知られている (Macabenta et al., 2022)。また、個体発生中は、幹細胞は、生存シグナルの欠如以外の様々な原因で分化に失敗することがあるが、分化に失敗した細胞の多くは、細胞死により排除される (Koto et al., 2011)。また、神経管の閉塞や頭骨の融合、腹壁の融合など、上皮組織が融合する部分でも細胞死が生じる (Weil et al., 1997, Salas-Vidal et al., 1998, Pai et al., 2012)。上皮組織の融合時に細胞死が生じる原因として、細胞外マトリクスの分解に伴いアノイキスが惹起される可能性が指摘されている (Pai et al., 2012)。このように、胚発生中のプログラム細胞死は、細胞死を引き起こす特定の分子カスケードに加え、ほとんどの細胞が持つ細胞死の引き金が周囲の環境によって刺激されることで誘導される場合もある。

3. 発生過程に起こる細胞死が形態形成に果たす役割

Glucksmann は、発生過程に起こる細胞死を、発生における役割という観点から 3 つのカテゴリー (morphogenetic, histogenetic, and phylogenetic degeneration) に分類しようと試みた (Glucksmann, 1951)。Morphogenetic degeneration は、組織を削ることで器官のかたちを作る役割を果たす細胞死を、Histogenetic degeneration は、発生において分化の途中で生じる細胞死を、Phylogenetic degeneration は、祖先的形質である一過的な器官が消失する役割を果たす細胞死を指す (Glucksmann, 1951)。形態形成に寄与すると考えられる細胞死は、一つ目の Morphogenetic degeneration であり、指間細胞死や神経管の閉塞などが挙げられる。この中には、形を削り取るだけでなく、機能的な組織を細胞死により除去することにより、形態形成に寄与する細胞死も存在する。例えば、ニワトリ胚やマウス胚の肢芽の遠位部の盛り上がった上皮組織である Apical Ectodermal Ridge (AER) は、肢芽の間葉組織の増殖を促すシグナルセンターとして働くが、肢芽組織が十分に大きくなると細胞死によって消失する (Fernández-Terán et al., 2006; Pizette & Niswander, 1999)。また、鳥類の中腎は発生中の造血に必要であるものの、発生後期になると細胞死により退縮する (Nacher et al., 2005)。このように、形態形成に寄与する細胞死は、単に組織を削りとり形態形成を整えるだけでな

く、複雑な発生プロセスの一部に影響を与えることによって、最終的な形態を変化させる働きを持つ。

発生中の細胞死は、1つのカテゴリーに明確に分類されるものではなく、3つのカテゴリーの特性を併せ持つことがある。例えば、指間組織の形を削ることで多様な形態の指を生み出す指間細胞死は **Morphogenetic degeneration** の性質を持つが、水かきが祖先的形質であることを考えると、**phylogenetic degeneration** の性質も持っているといえることもできる。また、指間組織は指骨になる能力を有していることから、分化の途中で細胞死を起こしたとも考えられ、**Histogenetic degeneration** の性質を持つとも考えられる。このように、発生中の細胞死が発生における役割を複数持ち併せていることは、細胞死が発生に組み込まれる際に複数の役割を担うようになった進化の過程が存在することを示唆している。

4. 本研究の目的

本研究では、発生学的に良く研究されている肢芽を題材として、多様な動物の四肢の発生中に起こる細胞死を引き起こすメカニズムに焦点を当て、エゾアカガエルの肢芽の細胞死、ニワトリの指間細胞死、エミューの筋前駆細胞の細胞死を引き起こす様々な条件について研究を行った。

第一章、第二章、第三章には未発表データが含まれるため、非公開とする。

第一章：エゾアカガエルの空気呼吸行動が酸化ストレスを介して肢芽での細胞死を促す可能性の検証

第一章における Figures 3B, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 は、以下の論文より引用された。

Ono, S. F., Cordeiro, I. R., Kishida, O., Ochi, H., & Tanaka, M. (2023). Air-breathing behavior underlies the cell death in limbs of *Rana pirica* tadpoles. *Zoological Letters*, 9(2), 1–9. <https://doi.org/10.1186/S40851-022-00199-X/FIGURES/3>

第二章：ニワトリの指間細胞死を制御する BMP シグナルと活性酸素種 (ROS) を繋ぐ分子メカニズムの解明

第三章：エミューの退化した翼の形成に二重のアイデンティティを有する筋前駆細胞の細胞死が寄与する可能性の検証

第三章における Figures 24B, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 の一部, 32 は、以下の論文より引用された。

Tsuboi, E., Ono, S. F., Cordeiro, I. R., Yu, R., Kawanishi, T., Koizumi, M., Shigenobu, S., Sheng, G., Okabe, M., & Tanaka, M. (2024). Immobilization secondary to cell death of muscle precursors with a dual transcriptional signature contributes to the emu wing skeletal pattern. *Nature Communications*, 15(1), 8153. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-52203-x>

総合討論

本研究では、3 種類の動物についての胚発生中の細胞死の背景にあるメカニズムを探り、細胞死を引き起こす様々なメカニズムの存在を明らかにした。

1. 形態多様性を引き起こすプログラム細胞死の誕生についての考察

本研究を通して、形態多様性に寄与するプログラム細胞死は、どのようなプロセスを経て誕生するのかについて考察する。進化の過程で、発生中の細胞死が形態形成に寄与するような発生システムの一部となるプロセスには、2 つの可能性が考えられる。ひとつは、(A) 遺伝子の突然変異によって、新しい細胞死促進シグナルカスケードの誕生や、分化または生存に必要なシグナルの喪失が生じ、胚発生期に大規模な細胞死が引き起こされ、それが形態形成を変化させるという可能性である。もう一つは、(B) 始めは形態の変化を生じさせないような小規模な細胞死が、進化の過程で徐々に形態形成を担うようになるという可能性である。

本研究では、動物の多様な四肢をかたちづくる発生システムである指間細胞死について、エゾアカガエルとニワトリという2種類の動物を題材としてそのメカニズムの研究を行った。エゾアカガエルで見られた指間領域での細胞死は、大きく形態形成には貢献していないと考えられ、原因も呼吸行動による酸化ストレスという周囲の環境に依存するものであった (Fig. 10)。一方で、ニワトリで見られた指間細胞死は、指の形態形成に大きく貢献するものであり、周囲の環境酸素という環境依存的な原因に加えて、指間組織独自の細胞死促進カスケードによって引き起こされていた (Fig. 24)。このように、両生類と羊膜類では細胞死が生じる場所は同じであるにも関わらず、羊膜類における形態形成への貢献度は大きく変化しており、細胞死を引き起こす原因も環境酸素に加えて新たな分子カスケードが加わった可能性が示唆された。したがって、指間細胞死は、(B) のようなプロセスによって、形態多様性に寄与するプログラム細胞死として確立したのではないかと考えられる。指間細胞死以外に報告されている、哺乳類や鳥類における中腎の消失や、鳥類後肢芽の筋肉の消失も、祖先的には、発生プロセスの中で周囲の環境依存的に引き起こされた、小規模な細胞死だったのかもしれない。今後、複数の動物種において相同な部位の細胞死を調べていき、さらには比較生理学や生態学の観点から細胞死が引き起こされる原因を調べていくことで、細胞死が発生システムとなる普遍的なプロセスが明らかになると期待される。

2. 細胞死が発生システムとなるメカニズムの考察

周囲の環境に依存してまばらに生じていた細胞死が、形態形成を司る新たな発生システムへと変化するには、必ず遺伝子発現の変化が伴う。しかし、胚発生期は、生物にとって遺伝子発現の変化やそれに伴う分子カスケードの変化に対して最も脆弱な時期であると考

えられている (Hamdoun & Epel, 2007)。そのため、胚発生期において遺伝子発現の変化をもたらす突然変異は、集団に固定されにくい可能性がある。このような遺伝子変異の定着のしにくさを回避して、細胞死が発生システムへと組み込まれるには、どのような進化のメカニズムが考えられるだろうか。私は、組織を縮小させるという特性から、細胞死は退化と類似した性質を持つのではないかと考えた。ここでは、退化における進化のメカニズムに着目し、細胞死から新たな発生システムが確立されるメカニズムについて考察する。

化石記録で四肢が残るヘビの祖先が見つかったことから、ヘビの四肢は緩やかに四肢形成能力を失ったと考えられている (Martill et al., 2015)。この緩やかな四肢の退化の背景には、四肢で遺伝子変異が徐々に蓄積していったプロセスが存在するのではないかと推測できる。実際、ヘビの四肢の退化をもたらした遺伝子調節領域が進化の過程においてどのような変化を遂げたのかを調べた先行研究では、四肢形成に関わる因子の調節領域の多くが失われていたが、その喪失は特定のシグナル経路に関する遺伝子に偏っていないことが示された (Roscito et al., 2018)。このことから、ヘビの祖先の四肢形成に関わる遺伝子調節領域では、ランダムに変異が生じていった可能性が示唆された (Roscito et al., 2018)。また、退化した後肢を持つニシキヘビ胚では、通常は後方側に限局して発現する Shh が前方側でも発現することが示されている (Cohn & Tickle, 1999)。Shh は四肢において前後軸を形成する役割を果たすことが知られている (Saunders & Gasseling, 1968; Tickle et al., 1975) が、痕跡としてしか残らないニシキヘビの後肢芽における Shh の前方側の発現は、生存に有利でも不利でもない変異であると推測される。変異が固定されるためには、その変異が集団において有利に働き自然選択により固定される場合と、その変異が自然選択に中立である場合がある (Katju & Bergthorsson, 2019) ことを踏まえると、ニシキヘビ胚の Shh 発現は、退化した四肢で起こった中立な変異の一つだと推測される (Cohn & Tickle, 1999; Roscito et al., 2018)。以上のことから、生き物の生活史に必要でなくなった部位で起こる遺伝子変異は、選択圧が働かないことで中立な変異が蓄積してき、少しずつ退化が進むのではないかと考えられる (Roscito et al., 2018; Cooper, 2024)。

私は、外部環境から受けたストレスによって常に細胞死が引き起こされるような組織では、遺伝子発現の変化が起こるような変異が生じたとしても、最終的に細胞死により取り除かれるため、自然選択が働かず、中立な変異が蓄積する可能性を考えた。集団内において、一定の確率でランダムに変異が生じ (Katju & Bergthorsson, 2019)、これにより胚組織で遺伝子の発現の変化が引き起こされる。遺伝子領域に変異が入ると、コドンがずれて正しいタンパク質が翻訳されなくなるが、遺伝子調節領域に変異が入ると、転写調節因子がエンハンサー領域への結合のしやすさが変化することによって、クロマチン構造やエンハンサー活性の変化が引き起こされ、遺伝子の転写量が変化する (Lupiáñez et al., 2015; Hill et al., 2021)。遺伝子発現の変化の蓄積によって分子カスケードが変化すると、正常発生が阻

害され、時には胎生致死が引き起こされることもある (Dickinson et al., 2016)。しかし、細胞死が起こる領域では、最終的に細胞死により取り除かれるために選択は働かず、変異は蓄積される可能性が考えられる。中立な変異の蓄積は、転写調節因子の結合レベルやクロマチン構造の変化を引き起こして、新しい遺伝子発現プロファイルを生み出す (Hill et al., 2021)。以上より、私は、外部環境によりストレスを受け細胞死の発生が常態化した組織では、中立な変異が蓄積し遺伝子プロファイルが変化することによって、新しい形質が生み出される場となるという進化のメカニズムを提案する。

エゾアカガエルの呼吸行動による酸化ストレスの蓄積は、指間での細胞死の増加をもたらした。発生中に細胞死が起こることが許容された指間領域では中立な変異が蓄積し、羊膜類では指間領域を決定する BMP シグナル経路が ROS 産生関連遺伝子などの細胞死を引き起こす遺伝子の発現の制御を担う、新しい分子カスケードが誕生したのかもしれない。また、エミューの筋前駆細胞が細胞死を起こす領域では、本来別の細胞集団で発現するような遺伝子が複数発現していた。これらの遺伝子が発現するような変異が起こったことにより細胞死を引き起こした可能性もあるが、反対に筋前駆細胞が細胞死を起こすようになったために別の細胞集団の遺伝子が誤発現するようになった可能性もある。今後、この進化の仮説を検証するためには、実際に胚発生期において細胞死を起こす領域は変異蓄積の場となっているのか、ゲノムレベルの解析を行っていく必要がある。

本研究を通して提案された、外部環境により決定された胚発生中の細胞死領域で新たな遺伝子発現が促進されるという仮説は、動物の生活史と深く結びついた形態がどのようにして生まれるのかという、適応を促進する進化の仕組みの一端を説明出来る可能性がある。発生生物学と進化遺伝学の双方の視点からこの仮説を検証することで、形態多様性の背景にある進化のメカニズムに新たな展開をもたらすことができると期待される。

参考文献

- Aram, L., Yacobi-Sharon, K., & Arama, E. (2017). CDPs: Caspase-dependent non-lethal cellular processes. In *Cell Death and Differentiation* (Vol. 24, Issue 8). <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.111>
- Bagaitkar, J., Huang, J., Zeng, M. Y., Pech, N. K., Monlish, D. A., Perez-Zapata, L. J., Miralda, I., Schuettelpelz, L. G., & Dinauer, M. C. (2018). NADPH oxidase activation regulates apoptotic neutrophil clearance by murine macrophages. *Blood*, *131*(21). <https://doi.org/10.1182/blood-2017-09-809004>
- Birchmeier, C., & Brohmann, H. (2000). Genes that control the development of migrating muscle precursor cells. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 12, Issue 6). [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(00\)00159-9](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(00)00159-9)
- Bladt, F., Riethmacher, D., Isenmann, S., Aguzzi, A., & Birchmeier, C. (1995). Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature*, *376*(6543). <https://doi.org/10.1038/376768a0>
- Brohmann, H., Jagla, K., & Birchmeier, C. (2000). The role of Lbx1 in migration of muscle precursor cells. *Development*, *127*(2). <https://doi.org/10.1242/dev.127.2.437>
- Burggren, W., & Mwalukoma, A. (1983). Respiration During Chronic Hypoxia Andhyperoxia in Larval and Adult Bullfrogs (*Rana Catesbeiana*) I. Morphological Responses of Lungs, Skin and Gills. *Journal of Experimental Biology*, *105*(1), 191–203. <https://doi.org/10.1242/JEB.105.1.191>
- Cameron, J. A., & Fallon, J. F. (1977). The absence of cell death during development of free digits in amphibians. *Developmental Biology*, *55*(2), 331–338. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(77\)90176-2](https://doi.org/10.1016/0012-1606(77)90176-2)
- Chen, Y., Li, X., Yang, M., & Liu, S. B. (2024). Research progress on morphology and mechanism of programmed cell death. *Cell Death & Disease* *2024* *15*:5, *15*(5), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41419-024-06712-8>
- Christopher, R. S., & Brandon, J. (2013). Plasticity of lung development in the amphibian, *Xenopus laevis*. *Biology Open*, *2*(12), 1324–1335. <https://doi.org/10.1242/bio.20133772>

Co, H. K. C., Wu, C. C., Lee, Y. C., & Chen, S. H. (2024). Emergence of large-scale cell death through ferroptotic trigger waves. *Nature* 2024 631:8021, 631(8021), 654–662. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07623-6>

Coelho, C. N. D., Sumoy, L., Rodgers, B. J., Davidson, D. R., Hill, R. E., Upholt, W. B., & Kosher, R. A. (1991). Expression of the chicken homeobox-containing gene GHox-8 during embryonic chick limb development. *Mechanisms of Development*, 34, 143–154.

Cohn, M. J., & Tickle, C. (1999). Developmental basis of limblessness and axial patterning in snakes. *Nature* 1999 399:6735, 399(6735), 474–479. <https://doi.org/10.1038/20944>

Cooper, K. L. (2024). The case against simplistic genetic explanations of evolution. *Development (Cambridge, England)*, 151(20). <https://doi.org/10.1242/DEV.203077/362254>

Cordeiro, I. R., Kabashima, K., Ochi, H., Munakata, K., Nishimori, C., Laslo, M., Hanken, J., & Tanaka, M. (2019). Environmental Oxygen Exposure Allows for the Evolution of Interdigital Cell Death in Limb Patterning. *Developmental Cell*, 50(2), 155-166.e4. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2019.05.025>

Cordeiro, I. R., & Tanaka, M. (2020). Environmental Oxygen is a Key Modulator of Development and Evolution: From Molecules to Ecology: Oxygen-sensitive pathways pattern the developing organism, linking genetic and environmental components during the evolution of new traits. *BioEssays*, 42(9). <https://doi.org/10.1002/bies.202000025>

Covarrubias, L., Hernández-García, D., Schnabel, D., Salas-Vidal, E., & Castro-Obregón, S. (2008). Function of reactive oxygen species during animal development: Passive or active? In *Developmental Biology* (Vol. 320, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.04.041>

Díaz-Hernández, M. E., Rios-Flores, A. J., Abarca-Buis, R. F., Bustamante, M., & Chimal-Monroy, J. (2014). Molecular Control of Interdigital Cell Death and Cell Differentiation by Retinoic Acid during Digit Development. *Journal of Developmental Biology* 2014, Vol. 2, Pages 138-157, 2(2), 138–157. <https://doi.org/10.3390/JDB2020138>

Dickinson, M. E., Flenniken, A. M., Ji, X., Teboul, L., Wong, M. D., White, J. K., Meehan, T. F., Weninger, W. J., Westerberg, H., Adissu, H., Baker, C. N., Bower, L., Brown, J. M., Brianna Caddle, L., Chiani, F., Clary, D., Cleak, J., Daly, M. J., Denegre, J. M., ... Murakami, A. (2016). High-

throughput discovery of novel developmental phenotypes. *Nature*, 537(7621). <https://doi.org/10.1038/nature19356>

Dietrich, S., Abou-Rebyeh, F., Brohmann, H., Bladt, F., Sonnenberg-Riethmacher, E., Yamaai, T., Lumsden, A., Brand-Saberi, B., & Birchmeier, C. (1999). The role of SF/HGF and c-Met in the development of skeletal muscle. *Development*, 126(8). <https://doi.org/10.1242/dev.126.8.1621>

Drachman, D. B., & Sokoloff, L. (1966). The role of movement in embryonic joint development. *Developmental Biology*, 14(3). [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(66\)90022-4](https://doi.org/10.1016/0012-1606(66)90022-4)

Eshkar-Oren, I., Krief, S., Ferrara, N., Elliott, A. M., & Zelzer, E. (2015). Vascular patterning regulates interdigital cell death by a ros-mediated mechanism. *Development (Cambridge)*, 142(4), 672–680. <https://doi.org/10.1242/dev.120279>

Farlie, P. G., Davidson, N. M., Baker, N. L., Raabus, M., Roeszler, K. N., Hirst, C., Major, A., Mariette, M. M., Lambert, D. M., Oshlack, A., & Smith, C. A. (2017). Co-option of the cardiac transcription factor Nkx2.5 during development of the emu wing. *Nature Communications*, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00112-7>

Feregrino, C., & Tschopp, P. (2022). Assessing evolutionary and developmental transcriptome dynamics in homologous cell types. *Developmental Dynamics*, 251(9). <https://doi.org/10.1002/dvdy.384>

Fernández-Terán, M. A., Hinchliffe, J. R., & Ros, M. A. (2006). Birth and death of cells in limb development: A mapping study. *Developmental Dynamics*, 235(9), 2521–2537. <https://doi.org/10.1002/DVDY.20916>

Fernando, P., Kelly, J. F., Balazsi, K., Slack, R. S., & Megeney, L. A. (2002). Caspase 3 activity is required for skeletal muscle differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(17). <https://doi.org/10.1073/pnas.162172899>

Fogel, J. L., Thein, T. Z. T., & Mariani, F. v. (2012). Use of LysoTracker to Detect Programmed Cell Death in Embryos and Differentiating Embryonic Stem Cells. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 68, 4254. <https://doi.org/10.3791/4254>

Fraker, M. E., Ludsin, S. A., Luttbeg, B., & Denver, R. J. (2021). Stress hormone-mediated antipredator morphology improves escape performance in amphibian tadpoles. *Scientific Reports*, 11(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84052-9>

Francis, P. H., Richardson, M. K., Brickell, P. M., & Tickle, C. (1994). Bone morphogenetic proteins and a signalling pathway that controls patterning in the developing chick limb. *Development*, 120(1). <https://doi.org/10.1242/dev.120.1.209>

Franssen, A. R., Marks, Sharyn., Wake, David., & Shubin, Neil. (2005). Limb chondrogenesis of the seepage salamander, *Desmognathus aeneus* (amphibia: plethodontidae). *Journal of Morphology*, 265(1), 87–101. <https://doi.org/10.1002/JMOR.10339>

Fuchs, Y., & Steller, H. (2011). Programmed Cell Death in Animal Development and Disease. *Cell*, 147(4), 742. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.10.033>

Fujimoto, S., Yamanaka, K., Tanegashima, C., Nishimura, O., Kuraku, S., Kuratani, S., & Irie, N. (2022). Measuring potential effects of the developmental burden associated with the vertebrate notochord. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 338(1–2). <https://doi.org/10.1002/jez.b.23032>

Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E. S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D. W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A. v., Arama, E., Baehrecke, E. H., Barlev, N. A., Bazan, N. G., Bernassola, F., Bertrand, M. J. M., Bianchi, K., ... Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. In *Cell Death and Differentiation* (Vol. 25, Issue 3). <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>

Gañan, Y., Macias, D., Duterte-Coquillaud, M., Ros, M. A., & Hurle, J. M. (1996). Role of TGFβs and BMPs as signals controlling the position of the digits and the areas of interdigital cell death in the developing chick limb autopod. *Development*, 122(8), 2349–2357. <https://doi.org/10.1242/DEV.122.8.2349>

Geetha-Loganathan, P., Nimmagadda, S., Huang, R., Scaal, M., & Christ, B. (2006). Expression pattern of BMPs during chick limb development. *Anatomy and Embryology*, 211(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1007/s00429-006-0129-6>

Gillis, J. A., Modrell, M. S., & Baker, C. V. H. (2013). Developmental evidence for serial homology of the vertebrate jaw and gill arch skeleton. *Nature Communications*, 4. <https://doi.org/10.1038/ncomms2429>

GLÜCKSMANN, A. (1951). CELL DEATHS IN NORMAL VERTEBRATE ONTOGENY. *Biological Reviews*, 26(1), 59–86. <https://doi.org/10.1111/J.1469-185X.1951.TB00774.X>

Gosner, K. L. (1960). A Simplified Table for Staging Anuran Embryos and Larvae. *Herpetologica*, 16(3), 183–190. https://www.jstor.org/stable/3890061?refreqid=excelsior%3A5920c644eab69c61bd7489a95c6d829d&seq=1#metadata_info_tab_contents

Gross, M. K., Moran-Rivard, L., Velasquez, T., Nakatsu, M. N., Jagla, K., & Goulding, M. (2000). Lbx1 is required for muscle precursor migration along a lateral pathway into the limb. *Development*, 127(2). <https://doi.org/10.1242/dev.127.2.413>

Guzy, R. D., & Schumacker, P. T. (2006). Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Experimental Physiology*, 91(5), 807–819. <https://doi.org/10.1113/EXPPHYSIOL.2006.033506>

H. Dehkordi, M., Tashakor, A., O'Connell, E., & Fearnhead, H. O. (2020). Apoptosome-dependent myotube formation involves activation of caspase-3 in differentiating myoblasts. *Cell Death and Disease*, 11(5). <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2502-4>

Hamanaka, R. B., & Chandel, N. S. (2010). Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(9), 505. <https://doi.org/10.1016/J.TIBS.2010.04.002>

Hamdoun, A., & Epel, D. (2007). Embryo stability and vulnerability in an always changing world. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Vol. 104, Issue 6). <https://doi.org/10.1073/pnas.0610108104>

Helder, M. N., Ozkaynak, E., Sampath, K. T., Luyten, F. P., Latin, V., Oppermann, H., & Vukicevic, S. (1995). Expression pattern of osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in human and mouse development. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 43(10). <https://doi.org/10.1177/43.10.7560881>

Hernández-García, D., García-Meléndrez, C., Hernández-Martínez, R., Collazo-Navarrete, O., & Covarrubias, L. (2024). Macrophages allocate before apoptosis initiation and produce reactive oxygen species during interdigital phagocytosis. *Biology Open*, 13(7). <https://doi.org/10.1242/bio.060492>

Hernández-Martínez, R., Castro-Obregón, S., & Covarrubias, L. (2009). Progressive interdigital cell death: Regulation by the antagonistic interaction between fibroblast growth factor 8 and retinoic acid. *Development*, 136(21), 3669–3678. <https://doi.org/10.1242/dev.041954>

Hill, M. S., vande Zande, P., & Wittkopp, P. J. (2021). Molecular and evolutionary processes generating variation in gene expression. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 22, Issue 4). <https://doi.org/10.1038/s41576-020-00304-w>

Huang, B. L., Trofka, A., Furusawa, A., Norrie, J. L., Rabinowitz, A. H., Vokes, S. A., Taketo, M. M., Zakany, J., & Mackem, S. (2016). An interdigit signalling centre instructs coordinate phalanx-joint formation governed by 5'Hoxd-Gli3 antagonism. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms12903>

Iwami, T., Kishida, O., & Nishimura, K. (2007). Direct and Indirect Induction of a Compensatory Phenotype that Alleviates the Costs of an Inducible Defense. *PLOS ONE*, 2(10), e1084. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0001084>

Jeffery, W. R., & Martasian, D. P. (1998). Evolution of eye regression in the cavefish *astyanax*: apoptosis and the pax-6 gene. *American Zoologist*, 38(4). <https://doi.org/10.1093/icb/38.4.685>

Jiang, Q., Fu, X., Tian, L., Chen, Y., Yang, K., Chen, X., Zhang, J., Lu, W., & Wang, J. (2014). NOX4 mediates BMP4-induced upregulation of TRPC1 and 6 protein expressions in distal pulmonary arterial smooth muscle cells. *PLoS ONE*, 9(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107135>

J.M. Brown, K.E. Robertson, S.E. Wedden, & C. Tickle. (1997). Alterations in Msx 1 and Msx 2 expression correlate with inhibition of outgrowth of chick facial primordia induced by retinoic acid. *Anatomy and Embryology*, 195, 203–207.

Jomova, K., Raptova, R., Alomar, S. Y., Alwasel, S. H., Nepovimova, E., Kuca, K., & Valko, M. (2023). Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging. In *Archives of Toxicology* (Vol. 97, Issue 10). <https://doi.org/10.1007/s00204-023-03562-9>

Jones, C. M., Lyons, K. M., & Hogan, B. L. M. (1991). Involvement of Bone Morphogenetic Protein-4 (BMP-4) and Vgr-1 in morphogenesis and neurogenesis in the mouse. *Development*, 111(2). <https://doi.org/10.1242/dev.111.2.531>

Jones, T. E. M., Day, R. C., & Beck, C. W. (2013). Attenuation of bone morphogenetic protein signaling during amphibian limb development results in the generation of stage-specific defects. *Journal of Anatomy*, 223(5). <https://doi.org/10.1111/joa.12098>

Kaltcheva, M. M., Anderson, M. J., Harfe, B. D., & Lewandoski, M. (2016). BMPs are direct triggers of interdigital programmed cell death. *Developmental Biology*, 411(2), 266. <https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2015.12.016>

Kastner, P., Mark, M., Ghyselinck, N., Krezel, W., Dupé, V., Grondona, J. M., & Chambon, P. (1997). Genetic evidence that the retinoid signal is transduced by heterodimeric RXR/RAR functional units during mouse development. *Development*, 124(2), 313–326. <https://doi.org/10.1242/DEV.124.2.313>

Katju, V., & Bergthorsson, U. (2019). Old trade, new tricks: Insights into the spontaneous mutation process from the partnering of classical mutation accumulation experiments with high-throughput genomic approaches. *Genome Biology and Evolution*, 11(1). <https://doi.org/10.1093/gbe/evy252>

Kawahata, K., Cordeiro, I. R., Ueda, S., Sheng, G., Moriyama, Y., Nishimori, C., Yu, R., Koizumi, M., Okabe, M., & Tanaka, M. (2019). Evolution of the avian digital pattern. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44913-w>

Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4). <https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33>

Kim, Y. M., Kim, S. J., Tatsunami, R., Yamamura, H., Fukai, T., & Fukai, M. U. (2017). ROS-induced ROS release orchestrated by Nox4, Nox2, and mitochondria in VEGF signaling and angiogenesis. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 312(6). <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00346.2016>

Kishida, O., & Nishimura, K. (2004). Bulgy tadpoles: inducible defense morph. *Oecologia*, 140(3), 414–421. <https://doi.org/10.1007/S00442-004-1609-0>

Korsching, S. (1993). The neurotrophic factor concept: A reexamination. *Journal of Neuroscience*, 13(7). <https://doi.org/10.1523/jneurosci.13-07-02739.1993>

Koto, A., Kuranaga, E., & Miura, M. (2011). Apoptosis ensures spacing pattern formation of *Drosophila* sensory organs. *Current Biology*, 21(4). <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.01.015>

Kristiansen, M., & Ham, J. (2014). Programmed cell death during neuronal development: The sympathetic neuron model. In *Cell Death and Differentiation* (Vol. 21, Issue 7). <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.47>

Li, Q., Kou, X., Qin, X., Li, Z., Li, J., & Chen, C. (2022). BMP-4 impedes endothelial cell migration in neointimal hyperplasia via FoXO-3 specific modulation of reactive oxygen species. *Atherosclerosis*, 351. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2022.05.004>

Luo, G., Hofmann, C., Bronckers, A. L. J. J., Sohocki, M., Bradley, A., & Karsenty, G. (1995). BMP-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning. *Genes and Development*, 9(22). <https://doi.org/10.1101/gad.9.22.2808>

Lupiáñez, D. G., Kraft, K., Heinrich, V., Krawitz, P., Brancati, F., Klopocki, E., Horn, D., Kayserili, H., Opitz, J. M., Laxova, R., Santos-Simarro, F., Gilbert-Dussardier, B., Wittler, L., Borschiwer, M., Haas, S. A., Osterwalder, M., Franke, M., Timmermann, B., Hecht, J., ... Mundlos, S. (2015). Disruptions of topological chromatin domains cause pathogenic rewiring of gene-enhancer interactions. *Cell*, 161(5). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.004>

Lyons, K. M., Pelton, R. W., & Hogan, B. L. M. (1990). Organogenesis and pattern formation in the mouse: RNA distribution patterns suggest a role for Bone Morphogenetic Protein-2A (BMP-2A). *Development*, 109(4). <https://doi.org/10.1242/dev.109.4.833>

Macabenta, F., Sun, H. te, & Stathopoulos, A. (2022). BMP-gated cell-cycle progression drives anoikis during mesenchymal collective migration. *Developmental Cell*, 57(14). <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2022.05.017>

Mandal, C. C., Ganapathy, S., Gorin, Y., Mahadev, K., Block, K., Abboud, H. E., Harris, S. E., Ghosh-Choudhury, G., & Ghosh-Choudhury, N. (2011). Reactive oxygen species derived from Nox4 mediate BMP2 gene transcription and osteoblast differentiation. *Biochemical Journal*, 433(2), 393–402. <https://doi.org/10.1042/BJ20100357>

Martill, D. M., Tischlinger, H., & Longrich, N. R. (2015). A four-legged snake from the Early Cretaceous of Gondwana. *Science*, 349(6246). <https://doi.org/10.1126/science.aaa9208>

Martin E. Feder. (1983). The Relation of Air Breathing and Locomotion to Predation on Tadpoles, *Rana berlandieri*, by Turtles. *Physiological Zoology*, 56(4), 522–531. https://www.jstor.org/stable/30155875?seq=1#metadata_info_tab_contents

Matsui, M. (1991). Original Description of the Brown Frog from Hokkaido, Japan (Genus *Rana*). *Japanese Journal of Herpetology*, 14(2), 63–78. https://doi.org/10.5358/HSJ1972.14.2_63

Maxwell, E. E., & Larsson, H. C. E. (2007). Osteology and myology of the wing of the emu (*Dromaius novaehollandiae*), and its bearing on the evolution of vestigial structures. *Journal of Morphology*, 268(5). <https://doi.org/10.1002/jmor.10527>

Merino, R., Rodriguez-Leon, J., Macias, D., Gañan, Y., Economides, A. N., & Hurle, J. M. (1999). The BMP antagonist Gremlin regulates outgrowth, chondrogenesis and programmed cell death in the developing limb. *Development*, 126(23), 5515–5522. <https://doi.org/10.1242/DEV.126.23.5515>

Montero, J. A., Lorda-Diez, C. I., Gañan, Y., Macias, D., & Hurle, J. M. (2008). Activin/TGF β and BMP crosstalk determines digit chondrogenesis. *Developmental Biology*, 321(2). <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.06.022>

Nacher, V., Carretero, A., Navarro, M., Armengol, C., Llombart, C., Blasi, J., & Ruberte, J. (2005). β -Catenin expression during vascular development and degeneration of avian mesonephros. *Journal of Anatomy*, 206(2). <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2005.00382.x>

Nagai, H., Mak, S. S., Weng, W., Nakaya, Y., Ladher, R., & Sheng, G. (2011). Embryonic development of the emu, *Dromaius novaehollandiae*. *Developmental Dynamics*, 240(1). <https://doi.org/10.1002/dvdy.22520>

Nishizawa, H., Matsumoto, M., Chen, G., Ishii, Y., Tada, K., Onodera, M., Kato, H., Muto, A., Tanaka, K., & Igarashi, K. (2021). Lipid peroxidation and the subsequent cell death transmitting from ferroptotic cells to neighboring cells. *Cell Death and Disease*, 12(4). <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03613-y>

Onimaru, K., Marcon, L., Musy, M., Tanaka, M., & Sharpe, J. (2016). The fin-to-limb transition as the re-organization of a Turing pattern. *Nature Communications*, 7(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/ncomms11582>

Ono, S. F., Cordeiro, I. R., Kishida, O., Ochi, H., & Tanaka, M. (2023). Air-breathing behavior underlies the cell death in limbs of *Rana pirica* tadpoles. *Zoological Letters*, 9(2), 1–9. <https://doi.org/10.1186/S40851-022-00199-X/FIGURES/3>

Pai, Y. J., Abdullah, N. L., Mohd.-Zin, S. W., Mohammed, R. S., Rolo, A., Greene, N. D. E., Abdul-Aziz, N. M., & Copp, A. J. (2012). Epithelial fusion during neural tube morphogenesis. In *Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology* (Vol. 94, Issue 10). <https://doi.org/10.1002/bdra.23072>

Park, W., Wei, S., Kim, B. S., Kim, B., Bae, S. J., Chae, Y. C., Ryu, D., & Ha, K. T. (2023). Diversity and complexity of cell death: a historical review. In *Experimental and Molecular Medicine* (Vol. 55, Issue 8). <https://doi.org/10.1038/s12276-023-01078-x>

Phillips, J. R., Hewes, A. E., Womack, M. C., & Schwenk, K. (2022). The mechanics of air breathing in African clawed frog tadpoles, *Xenopus laevis* (Anura: Pipidae). *The Journal of Experimental Biology*, 225(10). <https://doi.org/10.1242/JEB.243102>

Pitsillides, A. A. (2006). Early effects of embryonic movement: “A shot out of the dark.” In *Journal of Anatomy* (Vol. 208, Issue 4). <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2006.00556.x>

Pizette, S., & Niswander, L. (1999). BMPs negatively regulate structure and function of the limb apical ectodermal ridge. *Development*, 126(5). <https://doi.org/10.1242/dev.126.5.883>

Pollard, A. S., Charlton, B. G., Hutchinson, J. R., Gustafsson, T., McGonnell, I. M., Timmons, J. A., & Pitsillides, A. A. (2017). Limb proportions show developmental plasticity in response to embryo movement. *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/10.1038/srep41926>

Raspopovic, J., Marcon, L., Russo, L., & Sharpe, J. (2014). Digit patterning is controlled by a Bmp-Sox9-Wnt Turing network modulated by morphogen gradients. *Science*, 345(6196), 566–570. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1252960/SUPPL_FILE/RASPOPOVIC.SM.PDF

Rodriguez-Leon, J., Merino, R., Macias, D., Gañan, Y., Santesteban, E., & Hurle, J. M. (1999). Retinoic acid regulates programmed cell death through BMP signalling. *Nature Cell Biology* 1999 1:2, 1(2), 125–126. <https://doi.org/10.1038/10098>

Roscito, J. G., Sameith, K., Parra, G., Langer, B. E., Petzold, A., Moebius, C., Bickle, M., Rodrigues, M. T., & Hiller, M. (2018). Phenotype loss is associated with widespread divergence of the gene regulatory landscape in evolution. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07122-z>

Salas-Vidal, E., Lomeli, H., Castro-Obregón, S., Cuervo, R., Escalante-Alcalde, D., & Covarrubias, L. (1998). Reactive oxygen species participate in the control of mouse embryonic cell death. *Experimental Cell Research*, 238(1), 136–147. <https://doi.org/10.1006/excr.1997.3828>

Salas-Vidal, E., Valencia, C., & Covarrubias, L. (2001). Differential tissue growth and patterns of cell death in mouse limb autopod morphogenesis. *Developmental Dynamics*, 220(4), 295–306. <https://doi.org/10.1002/DVDY.1108>

Satoh, A., Suzuki, M., Amano, T., Tamura, K., & Ide, H. (2005). Joint development in *Xenopus laevis* and induction of segmentations in regenerating froglet limb (spike). *Developmental Dynamics*, 233(4), 1444–1453. <https://doi.org/10.1002/DVDY.20484>

Saunders, J. W., & Gasseling, M. T. (1968). Ectodermal-mesenchymal interactions in the origin of limb symmetry. In *Epithelial-Mesenchymal interactions*.

Schäfer, K., & Braun, T. (1999). Early specification of limb muscle precursor cells by the homeobox gene *Lbx1h*. *Nature Genetics*, 23(2). <https://doi.org/10.1038/13843>

Schnabel, D., Salas-Vidal, E., Narváez, V., del Rayo Sánchez-Carbente, M., Hernández-García, D., Cuervo, R., & Covarrubias, L. (2006). Expression and regulation of antioxidant enzymes in the developing limb support a function of ROS in interdigital cell death. *Developmental Biology*, 291(2), 291–299. <https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2005.12.023>

Schwartz, L. M. (2008). Atrophy and programmed cell death of skeletal muscle. In *Cell Death and Differentiation* (Vol. 15, Issue 7). <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.68>

Schweiger, S., Naumann, B., Larson, J. G., Möckel, L., & Müller, H. (2017). Direct development in African squeaker frogs (Anura: Arthroleptidae: Arthroleptis) reveals a mosaic of derived and plesiomorphic characters. *Organisms Diversity & Evolution* 2017 17:3, 17(3), 693–707. <https://doi.org/10.1007/S13127-017-0335-5>

Shan, S. W., Tang, M. K., Cai, D. Q., Chui, Y. L., Chow, P. H., Grotewold, L., & Lee, K. K. H. (2005). Comparative proteomic analysis identifies protein disulfide isomerase and peroxiredoxin 1 as new players involved in embryonic interdigital cell death. *Developmental Dynamics*, 233(2), 266–281. <https://doi.org/10.1002/DVDY.20404>

Strickler, A. G., Yamamoto, Y., & Jeffery, W. R. (2007). The lens controls cell survival in the retina: Evidence from the blind cavefish *Astyanax*. *Developmental Biology*, 311(2). <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.08.050>

Suda, N., Itoh, T., Nakato, R., Shirakawa, D., Bando, M., Katou, Y., Kataoka, K., Shirahige, K., Tickle, C., & Tanaka, M. (2014). Dimeric combinations of MafB, cFos and cJun control the apoptosis-survival balance in limb morphogenesis. *Development (Cambridge)*, 141(14). <https://doi.org/10.1242/dev.099150>

Takase, Y., Tadokoro, R., & Takahashi, Y. (2013). Low cost labeling with highlighter ink efficiently visualizes developing blood vessels in avian and mouse embryos. *Development, Growth & Differentiation*, 55(9), 792–801. <https://doi.org/10.1111/DGD.12106>

Tickle, C., Summerbell, D., & Wolpert, L. (1975). Positional signalling and specification of digits in chick limb morphogenesis. *Nature*, 254(5497). <https://doi.org/10.1038/254199a0>

Toffoli, B., Tonon, F., Tisato, V., Zauli, G., Secchiero, P., Fabris, B., & Bernardi, S. (2021). TRAIL/DR5 pathway promotes AKT phosphorylation, skeletal muscle differentiation, and glucose uptake. *Cell Death and Disease*, 12(12). <https://doi.org/10.1038/s41419-021-04383-3>

Tokita, M., Matsushita, H., & Asakura, Y. (2020). Developmental mechanisms underlying webbed foot morphological diversity in waterbirds. *Scientific Reports*, 10(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64786-8>

Tsuboi, E., Ono, S. F., Cordeiro, I. R., Yu, R., Kawanishi, T., Koizumi, M., Shigenobu, S., Sheng, G., Okabe, M., & Tanaka, M. (2024). Immobilization secondary to cell death of muscle precursors with a

dual transcriptional signature contributes to the emu wing skeletal pattern. *Nature Communications*, 15(1), 8153. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-52203-x>

Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology*, 552(Pt 2), 335. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.2003.049478>

Ujibe, K., Nishimura, K., Kashima, M., & Hirata, H. (2021). Direct-TRI: High-throughput RNA-extracting Method for All Stages of Zebrafish Development. *Bio-Protocol*, 11(17), 4136. <https://doi.org/10.21769/BIOPROTOC.4136>

Vlaskalin, T., Wong, C. J., & Tsilfidis, C. (2004). Growth and apoptosis during larval forelimb development and adult forelimb regeneration in the newt (*Notophthalmus viridescens*). *Development Genes and Evolution*, 214(9), 423–431. <https://doi.org/10.1007/s00427-004-0417-1>

Vogel, J., Kruse, C., Zhang, M., & Schröder, K. (2015). Nox4 supports proper capillary growth in exercise and retina neo-vascularization. *Journal of Physiology*, 593(9). <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.284901>

Wada, N., Tanaka, H., Ide, H., & Nohno, T. (2003). Ephrin-A2 regulates position-specific cell affinity and is involved in cartilage morphogenesis in the chick limb bud. *Developmental Biology*, 264(2). <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2003.08.019>

Wake, D. B., & Hanken, J. (2004). Direct development in the lungless salamanders: what are the consequences for developmental biology, evolution and phylogenesis? *International Journal of Developmental Biology*, 40(4), 859–869. <https://doi.org/10.1387/IJDB.8877460>

Wang, R. N., Green, J., Wang, Z., Deng, Y., Qiao, M., Peabody, M., Zhang, Q., Ye, J., Yan, Z., Denduluri, S., Idowu, O., Li, M., Shen, C., Hu, A., Haydon, R. C., Kang, R., Mok, J., Lee, M. J., Luu, H. L., & Shi, L. L. (2014). Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. In *Genes and Diseases* (Vol. 1, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2014.07.005>

Weatherbee, S. D., Behringer, R. R., Rasweiler IV, J. J., & Niswander, L. A. (2006). Interdigital webbing retention in bat wings illustrates genetic changes underlying amniote limb diversification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(41), 15103–15107. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0604934103>

Weil, M., Jacobson, M. D., & Raff, M. C. (1997). Is programmed cell death required for neural tube closure? *Current Biology*, 7(4). [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(06\)00125-4](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(06)00125-4)

Wells, K. D. (2007). *The ecology and behavior of amphibians*. University of Chicago Press. <https://doi.org/10.7208/9780226893334>

Wilkinson, D. (1992). Whole mount in situ hybridization of vertebrate embryos. In *In Situ Hybridization: A Practical Approach*.

Wolpert, L., Tickle, C., & Arias, A. M. (2011). *Principles of Development* (4th ed.). Oxford University Press.

Yokouchi, Y., Sakiyama, J. I., Kameda, T., Iba, H., Suzuki, A., Ueno, N., & Kuroiwa, A. (1996). BMP-2/-4 mediate programmed cell death in chicken limb buds. *Development*, 122(12), 3725–3734. <https://doi.org/10.1242/DEV.122.12.3725>

Young, J. J., Grayson, P., Edwards, S. v., & Tabin, C. J. (2019). Attenuated Fgf Signaling Underlies the Forelimb Heterochrony in the Emu *Dromaius novaehollandiae*. *Current Biology*, 29(21), 3681-3691.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.09.014>

Yuan, J., & Kroemer, G. (2010). Alternative cell death mechanisms in development and beyond. In *Genes and Development* (Vol. 24, Issue 23). <https://doi.org/10.1101/gad.1984410>

Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M., & Horvitz, H. R. (1993). The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β -converting enzyme. *Cell*, 75(4). [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90485-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90485-9)

Zelko, I. N., Mariani, T. J., & Folz, R. J. (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(3), 337–349. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00905-X](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00905-X)

Zhao, X., Brade, T., Cunningham, T. J., & Duester, G. (2010). Retinoic acid controls expression of tissue remodeling genes *Hmgn1* and *Fgf18* at the digit-interdigit junction. *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 239(2). <https://doi.org/10.1002/dvdy.22188>

Zou, H., & Niswander, L. (1996). Requirement for BMP Signaling in Interdigital Apoptosis and Scale Formation. *Science*, 272(5262), 738–741. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.272.5262.738>

Zuzarte-Luis, V., Montero, J. A., Kawakami, Y., Izpisua-Belmonte, J. C., & Hurle, J. M. (2007). Lysosomal cathepsins in embryonic programmed cell death. *Developmental Biology*, 301(1), 205–217. <https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2006.08.008>

Ingrid Rosenberg Cordeiro (2019) 博士論文 Environmental oxygen levels and interdigital cell death in tetrapods

坪井絵里子 (2021) 修士論文 エミューの前肢の退化メカニズムの解明