

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：35303

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21453

研究課題名（和文）運動と循環の起源と進化：新たな指標による地球環境変遷との関連解明

研究課題名（英文）Origin and evolution of locomotion and circulation: new indicator to elucidate relationships with global environmental change

研究代表者

花島 章（Hanashima, Akira）

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：70572981

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、地球環境変遷と運動循環進化の関連を弾性蛋白質コネクチンを指標として解明した。特に哺乳類・鳥類の祖先は古生代-中生代境界の低酸素環境にコネクチン弾性領域を独立に短縮し、強ポンプ心臓獲得で適応したことを示した。また両生類は陸上進出に伴う水陸両生への適応のため、コネクチン弾性領域のアミノ酸配列を変化させ、生活環境の酸素濃度に合わせた血液ポンプ機能調節能力を得たことを示唆した。さらにコネクチン弾性領域が硬骨魚類型を祖先として、四肢動物と軟骨魚類で各々の運動機能に合わせて独自に進化したことを明らかにした。また無脊椎動物の多様な心臓とコネクチン構造との相関を解析し、動物進化について解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

運動や循環を司る筋肉の起源と進化は、全地球レベルの環境変遷に駆動されてきたと考えられるが、筋肉が軟組織で化石として残っておらず、相関は未解明である。本研究では、筋肉の巨大弾性蛋白質コネクチンに記録された環境変化の情報を動物横断的に取り出すことで、環境変遷による運動・循環の起源と進化という難問の解明を進めるとともに、化石に残らない軟組織の進化に対する新たな研究アプローチを確立した。本研究の成果は、地球史を解き明かす上で有益な情報になることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, the relationship between global environmental changes and the evolution of locomotion and circulation were elucidated using the elastic protein connectin as an indicator. In particular, mammalian and avian ancestors independently shortened their connectin elastic regions during hypoxia at the Palaeozoic-Mesozoic boundary and adapted by acquiring a strong pumping heart. The amphibians also changed the amino acid sequence of the connectin elastic region to adapt to the amphibious environment, suggesting that they acquired the ability to regulate the blood pump function according to the oxygen concentration of their living environment. Furthermore, connectin elastic regions evolved independently in tetrapods and cartilaginous fishes to suit their locomotor functions, based on the ancestry of the bony fish type. The correlation between various invertebrate hearts and connectin structures was also investigated to elucidate animal evolution.

研究分野：進化生理学

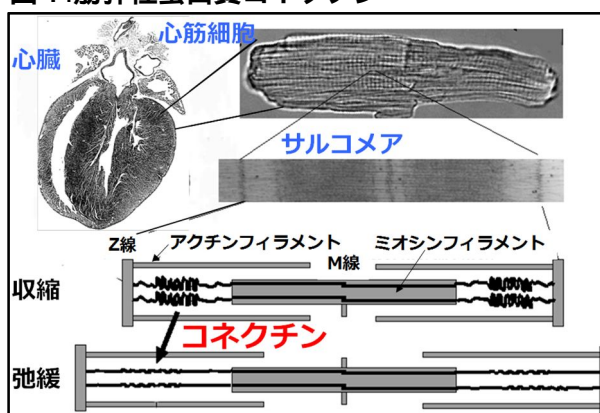
キーワード：コネクチン 心臓進化 筋進化 地球史 環境変遷

1. 研究開始当初の背景

運動や循環は動物の活動性全般を規定する重要な機能である。その起源と進化の解明は、運動や循環を司る筋肉が軟組織で、骨や外骨格とは違って化石として残らないため、現生動物の分子解析で行われている。これまでに、筋の収縮装置を構成する主要素であるミオシンのタイプや、アクチンフィラメント構成分子の存在を指標として筋進化解明が行われ、近年では、横紋筋の左右相称動物と刺胞動物における独立進化(Steinmetz et al. Nature 2012)、左右相称動物における横紋筋と平滑筋の相互転換(Brunet et al. eLIFE 2016)、脊椎動物骨格筋の進化的起源(Inoue and Sato. Mol Biol Evol 2018)などの解明が進んだ。しかし、運動や循環の進化の駆動要因として、地球環境変遷が大きな鍵を握ってきたと考えられるが、その相関は不明である。脊椎動物の循環を担う心臓は、血液中の酸素や栄養を心筋内に取り込む方法により、冠循環心臓と類洞循環心臓の2種類に分類される。哺乳類や鳥類などが持つ冠循環心臓は、血液中の酸素や栄養を、心臓中に張り巡らされた血管を介して心筋内に取り込むため、心筋細胞の緻密な配列が可能で、強い血液ポンプ機能を持つ。そのため哺乳類や鳥類は、エネルギーを大量に消費する活動が可能である。一方、両生類などが持つ類洞循環心臓は血液中の酸素や栄養を心室内腔から直接取り込んでおり、心筋を緻密に配置出来ず、スポンジ様の心室構造で、そのポンプ機能は弱い。そのため、両生類はエネルギーを大量に消費する活動に不適である。これらの相違のため、冠循環心臓の出現は脊椎動物進化に大きく影響したと考えられるが、その出現時期と出現理由は、心臓が軟組織で化石として残っておらず、冠動脈発生の分子機構も不明なため、未解明である。

私たちは、現生動物の遺伝情報、及び冠循環心臓と類洞循環心臓の機械特性に着目した。心室収縮期には血管が圧迫されて冠血管内の血流は遮断される。心室拡張期には冠血管内の血流が生じるが、心室の過度な拡張でも冠血管内の血流は遮断されると考えられるため、冠循環心臓の心筋には伸びにくい性質が必要である。筋弾性蛋白質コネクチンは心筋細胞弛緩時の拡張性を規定することで心臓ポンプ機能を支えている(図1)。哺乳類の胎児では長い弾性領域を持つコネクチンアイソフォームが発現するが、成体では弾性領域が短いコネクチンアイソフォームの発現へと転換することが知られている。私たちは、コネクチンが各動物の心形態や機能により弾性構造を変化させていることを明らかにしてきた。特に、脊椎動物及び近縁な無脊椎動物のうち、頭索類ナメクジウオ横紋筋(Ohtsuka and Hanashima et al. 2011)、尾索類ホヤ心臓(Hanashima et al. 2012)、硬骨魚類ゼブラフィッシュ心臓(Hanashima et al. 2017)、爬虫類カメ心臓(Honda et al. 2018)の構造と弾性蛋白質コネクチンについて解明した。そこで私たちは、心臓や筋進化の時期や理由を、コネクチン弾性領域の分子配列変化として明らかに出来るのではないかと考えた。

図1.筋弾性蛋白質コネクチン



2. 研究の目的

運動や循環を司る筋肉の起源と進化は、全地球レベルの環境変遷に駆動されてきたと考えられるが、筋肉が軟組織で化石として残っておらず、相関は未解明である。本研究では、筋肉の巨大弾性蛋白質コネクチンに記録された環境変化の情報を動物横断的に取り出すことで、環境変遷による運動・循環の起源と進化という難問の解明、及び化石に残らない軟組織の進化に対する新たな研究アプローチの確立に取り組むことを目的とする。

3. 研究の方法

各動物の心臓・筋の多階層構造機能とコネクチン構造を詳細に解析し、動物間比較の相違点から環境変遷による影響の情報を取り出し、運動・循環の進化を解明する。特に心臓ではエコー検査と圧容積計測で血液ポンプ機能を評価し、筋では筋張力測定で筋の収縮弛緩機能を評価する。また心臓や筋の切片を作製し、組織染色し顕微鏡で観察する。また細胞構造やサルコメア構造を電子顕微鏡で観察する。そしてコネクチン抗体を作製し、ウエスタンブロットで検出するとともに、コネクチンの局在を免疫蛍光顕微鏡で観察する。巨大蛋白質解析用 SDS-Agarose ゲル電気泳動でコネクチンの分子量及びミオシン当たりの分子数を解析する。また各動物のゲノム情報からコネクチン遺伝子構造を決定する。さらに、筋から大規模 RT-PCR にて巨大蛋白質コネクチン一次構造を決定する。最後に動物間で筋とコネクチン構造を比較し、相違点からバネの長さなどの環境変遷情報を取得し、地球史と運動や循環の進化との相関関係を解明する。

4. 研究成果

(1) 脊椎動物は約 5.2 億年前の出現以降、心臓の構造及び血液ポンプ機能を高機能化することで、地球上で最も繁栄した動物となった。特に哺乳類の心臓は、酸素や栄養を冠循環で心筋に供給することで心筋を緻密に配置し、強い血液ポンプ機能により高い活動性を可能とした。本研究では、各脊椎動物のコネクチン配列を決定し、コネクチンの中でもバネ機能を有する N2B 領域を各脊椎動物間で比較した。その結果、N2B 領域の長さは、両生類から爬虫類のカメでは長く、爬虫類のワニや鳥類及び哺乳類では短くなっていた。カメとワニ・鳥の分岐は 2.5 億年前の古生代と中生代の境界 (P-T 境界) であり、この時代は地球の酸素濃度が極度に低下した時期であることから、哺乳類・鳥類の祖先は独立にコネクチンを短縮して強い血液ポンプ機能を持つ心臓を誕生させ、酸素を効率的に循環させたと考えられる。さらに、コネクチン N2B 領域のアミノ酸配列中に含まれるシステインの数 (酸化ストレスでジスルフィド結合を形成してバネを硬化させる) を脊椎動物間で比較した。その結果、魚類に比べて両生類ではシステインの数が約 10 倍に増えたことを発見した。両生類は陸上進出に伴う水陸両生への適応のため、生活環境の酸素濃度に合わせた血液ポンプ機能の調節システムを創り上げたと考えられる。続いて、これまでに得た各脊椎動物コネクチン弾性領域を統合的に比較した。その結果、硬骨魚類に比べ哺乳類～両生類では、10 個のドメインから構成される繰り返し構造が 2 つ増えて長くなり、軟骨魚類では、6 個のドメインから構成される繰り返し構造が 5 つ増えて長くなっていた。一方、無顎類では、哺乳類～軟骨魚類まで共通で見られる繰り返しが欠損して、代わりにコネクチンの 8 個のドメインから構成される繰り返し構造が 3 つ増えて長くなったことを見出した。これらの結果から、顎口類 (哺乳類～軟骨魚類) の共通祖先は硬骨魚類のようなコネクチン弾性領域の構造を持っていて、そこから硬骨魚類は変わらず、哺乳類～両生類、軟骨魚類はそれぞれ独自進化を果たしたと考えられた。また、無顎類は他の脊椎動物とは独立して進化したことが示唆された。しかし、この独自進化した領域を構成するドメインの大部分は心室において選択的スプライシングで読み飛ばされていた。そこで各動物の骨格筋を解析したところ、これらの独自進化したドメインの多くの発現が見られたため、独自進化のドメインは主に骨格筋の働きを支えるために進化したと考えられる。その理由を推定すると、両生類～哺乳類までは、陸上重力下で脚の持久的な運動が可能になるよう独自進化したと考えられ、軟骨魚類や無顎類は骨の軟骨化に伴う体を大きくしなせる運動が進化したと考えられた。

(2) 無脊椎動物の心臓循環系は開放循環系と閉鎖循環系の 2 種類存在しており、大部分は開放循環系である。そこで特に、哺乳類と異なり開放循環系を持つ節足動物甲殻類ロブスター心臓について多階層的に解析した。エコーで心室壁の動きを観察し、殻を開けると心室が虚脱することから心室への血液流入は心室に付着する弾性組織によると考えた。収縮期心室圧は 10mmHg 程度であった。組織染色では哺乳類と異なり冠血管が無く心筋組織は粗であり、電子顕微鏡像では横断面でのミオシンフィラメント密度は低かった。一方、心筋細胞は哺乳類と同様に太く、T 管様構造が存在し、サルコメアは短く、心筋細胞の拡張性を規定する I-コネクチン分子のバネ領域は極端に短かった。従って、甲殻類の心臓は開放循環系で大きな心室収縮力を必要としないため臓器組織レベルで哺乳類と異なるが、心房を持たないことにより細胞分子レベルでは心房が退化しつつある哺乳類と類似することが示唆された。しかし、心房の大きさと心室の力学的特性の関係については十分に解明されていない。そこで、脊椎動物と同様に心房心室型的心臓を持つ軟体動物カキの心臓を臓器から分子レベルまで多階層的に解析し、その進化を比較した。X 線 CT による循環系の可視化と圧力測定の結果、カキの心臓は血管系を持つが開放循環系であり、閉鎖循環系の脊椎動物と比較して心房心室圧は極めて低いことがわかった。カキの心臓は 2 つの心房と 2 つの心室を持ち、房室伝導はないものの、哺乳類と同様に心房と心室は交互に収縮していた。カキの心室組織はスポンジ状で、心筋細胞は細長く、大きな心房を持つ両生類の心室と似ていた。カキの心臓は貝柱などに囲まれた等容積の内腔にあり、心室収縮時に内腔が陰圧になることで、血液が心房に流入するようになっていた。電子顕微鏡像では、心筋細胞の収縮を担うミオシンフィラメントの間隔は粗だが、心筋細胞の伸展性を規定するコネクチン分子は非常に長いバネ領域を有し、大きな心房を持つ両生類の心室と同様の高い拡張能力を持つことが予測された。また、脊椎動物と並んでレンズ眼と高度な脳を持ち、活動性も高く分離した体・心循環を持つ軟体動物タコの心臓について解析を進めた。タコの解剖では、2 心房 1 心室の体心臓と 2 つの鰓心臓、拍動静脈などを確認した。体心室は緻密な筋構造と冠血管を持ち、拡張期圧 容積計測で、高い伸展性を示した。心電図測定ではヒトと同様に QRS 間隔は狭く、高い同期性が見られた。単離心筋細胞は哺乳類に比べ細長く、電顕像では長いサルコメアを認めた。SDS-PAGE で確認された高分子量タンパク質はコネクチン抗体に反応し、免疫蛍光顕微鏡観察でサルコメア内局在を示した。さらにタコのゲノム情報からコネクチン遺伝子構造を推定し、定量 PCR で心筋での高発現を確認した。RT-PCR で部分的に決定した心室コネクチンの一次構造ではコネクチンバネ領域がヒトより長い可能性が推定されたが、コネクチン全長を決定するのが困難であったため、ロングリードシーケンサーで mRNA を決定し、コネクチンに該当する配列のつなぎ合わせを実施した。これらの結果、脊椎動物は進化の過程で心房による心室血液充填のメカニズムを獲得したが、心房による心室充填が主体の心臓において、コネクチンの長い弾性領域と高い心室伸展性は、脊椎動物のみならず動物門を超えた普遍的原理であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 花島章, 木元弥咲, 伊原魁, 大平桃子, 白居優, 橋本謙, 毛利聡
2. 発表標題 ロブスター心臓解析による心房非依存的哺乳類心臓進化解明
3. 学会等名 第24回日本進化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 花島章, 木元弥咲, 大平桃子, 白居優, 橋本謙, 毛利聡
2. 発表標題 無顎類ヤツメウナギにおける独自の血液ポンプシステム進化
3. 学会等名 第93回日本動物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 毛利聡, 白居優, 花島章, 橋本謙
2. 発表標題 脊椎動物の心臓進化：無顎類から魚類における骨格との共進化
3. 学会等名 日本生理学会第74回中国四国地方会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 花島章, 白居優, 橋本謙, 毛利聡
2. 発表標題 脊椎動物の心臓進化：地球史とバネ分子コネクチン解析による両生類以降の変遷
3. 学会等名 日本生理学会第74回中国四国地方会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 花島章, 木元弥咲, 大平桃子, 白居優, 橋本謙, 毛利聡
2. 発表標題 軟体動物カキの心房心室システムと弾性蛋白質コネクチン
3. 学会等名 2023 年 生体運動研究合同班会議
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 花島 章, 木元 弥咲, 大平 桃子, 白居 優, 橋本 謙, 毛利 聡
2. 発表標題 Comparative analysis of myoelastic protein connectin to elucidate vertebrate heart evolution
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 花島章、木元弥咲、伊原魁、大平桃子、白居優、橋本謙、毛利聡
2. 発表標題 口プスター心臓の多階層解析による哺乳類心臓進化解明
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 花島章、木元弥咲、伊原魁、大平桃子、白居優、橋本謙、毛利聡
2. 発表標題 軟体動物カキ心臓のメカニクスとバネ分子コネクチン
3. 学会等名 第62回日本生体医工学会大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

川崎医科大学生理学1教室HP
<https://physiology1kawasaki.wixsite.com/website-2>
Researchmap (花島 章)
<https://researchmap.jp/hanashima>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	毛利 聡 (Mohri Satoshi) (00294413)	川崎医科大学・医学部・教授 (35303)	
研究分担者	橋本 謙 (Hashimoto Ken) (80341080)	川崎医科大学・医学部・准教授 (35303)	
研究分担者	氏原 嘉洋 (Ujihara Yoshihiro) (80610021)	名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授 (13903)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------