

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15138

研究課題名（和文）遅筋に発現する新規アセチルコリン受容体の筋収縮制御における機能の解明

研究課題名（英文）Physiological functions of slow muscle-type AChRs of zebrafish

研究代表者

善方 文太郎（ZEMPO, Buntaro）

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：90758541

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：ゼブラフィッシュの遅筋特異的に発現するAChRに関して機能解析を行った。その結果、遅筋型AChRが速筋型に比べて高いカルシウム透過性を示すことが示唆された。さらにゼブラフィッシュを用いて遅筋型AChRのカルシウム透過性を遺伝子改変によって喪失させたところ、発生初期において著しく運動機能が低下した。運動機能は発生が進むにつれて向上していったため、遅筋におけるカルシウム透過性は発生の初期段階の運動機能にとって重要であることが示唆された。未成熟な遅筋の収縮機構において、AChRを介して流入するカルシウムが重要であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果から、遅筋を介したCa<sup>2+</sup>流入は発生初期の遅筋のCa<sup>2+</sup>応答の持続に重要であり、これが失われることで運動機能が大きく低下することが示唆された。これにより、遅筋の収縮プロセスにおいてAChRを介したCa<sup>2+</sup>流入が重要であることが新たにわかった。従来の筋収縮機構のモデルに新たな知見が加わったといえる。遅筋のカルシウム透過性が収縮に重要であるという報告はこれまでにないものであり、筋収縮メカニズムの新たな仕組みの理解に繋がる成果が得られたと言える。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we found that the slow muscle-type AChR shows much higher Ca<sup>2+</sup> permeability than the fast muscle-type one. To analyze the physiological significance of the Ca<sup>2+</sup> influx through AChRs of slow muscles, we generated a transgenic (Tg) zebrafish that expresses Ca<sup>2+</sup> impermeable AChRs in its slow muscles. Loss of the Ca<sup>2+</sup> permeability markedly decreased locomotor activities at 1-3 days post fertilization (dpf) stages. However, locomotor activities of the Tg line improved during development, and 5dpf Tg showed locomotor activities comparable to zebrafish that express wild-type (WT) AChRs in their slow muscles. These results suggest that Ca<sup>2+</sup> influx through AChRs contributes to slow muscle contraction in early developmental stages.

研究分野：生理学

キーワード：筋収縮 ニコチン性アセチルコリン受容体 ゼブラフィッシュ 神経筋接合部

## 1. 研究開始当初の背景

運動機能を担う骨格筋には速筋と遅筋が存在し、動物の運動制御においては両者の収縮が精密に制御されることが重要である。

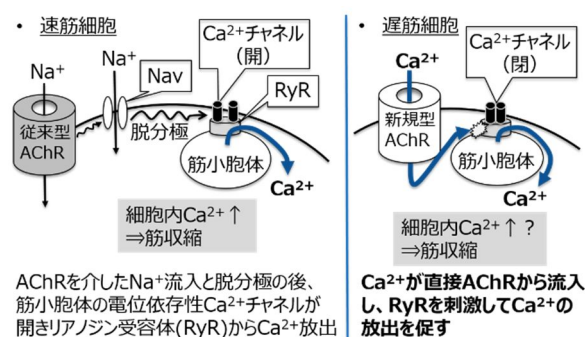
従来、速筋と遅筋の収縮過程について、運動ニューロンからの刺激の受容から筋収縮までのプロセスは共通と考えられてきた。この過程では、神経筋接合部のニコチン性アセチルコリン受容体(AChR)が、運動ニューロンと筋を繋ぐ重要な機能を担う。AChRは $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\delta$ 、 $\varepsilon$ (もしくは $\gamma$ )サブユニットで構成される5量体イオンチャネル型受容体であり、アセチルコリン受容に伴って陽イオンを細胞内に透過させ、膜電位を上昇させる。これにより電位依存性 $\text{Na}^+$ チャネル(Nav)が開口し、筋細胞が脱分極し、筋小胞体から筋収縮のトリガーである $\text{Ca}^{2+}$ が放出され、筋が収縮する。

しかし近年、遅筋が速筋とは異なる収縮制御メカニズムをもつ可能性が示唆されている。2004年、ゼブラフィッシュにおいて、遅筋がNavを発現しないという報告がなされた(Ali *et al.*, 2004)。これにより、速筋と遅筋の収縮制御過程が異なる可能性が示された。さらに、骨格筋のAChRは必ず $\varepsilon$ もしくは $\gamma$ サブユニットを含むと考えられていたが、2011年、ゼブラフィッシュの筋から、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\delta$ のみで構成されるAChR(新規型AChR)が発見された(Mongeon *et al.*, 2011)。私は、いち早く発現分布を解析し、新規型AChRが遅筋特異的に発現し、速筋には従来型AChRのみが発現することを示した(Zempo *et al.*, *Science Advances*, 2020)。

これらから、遅筋は従来知られていた筋収縮の過程とは異なる未知の収縮メカニズムをもつ可能性が示唆された。しかし新規型(遅筋型)AChRの機能には未解明な点が多く、遅筋の収縮にどのように関わるかは不明である。これを解明することは脊椎動物の運動機能制御の新たな仕組みの理解に繋がるため、極めて重要な意義をもつ。

AChRの特に重要な性質の1つはイオン選択性であり、この性質は、AChRの細孔(イオンを通す孔)部分のアミノ酸で決まる。AChR構成サブユニットの中で、 $\varepsilon$ と $\gamma$ は細孔部のintermediate ringと呼ばれる個所に非荷電性のグルタミン(Q)をもつが、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\delta$ はこの箇所に酸性のグルタミン酸(E)をもつ。興味深いことに、脊索動物のカタクウレイボヤのAChRは全サブユニットが当該箇所にEをもち、さらに $\text{Ca}^{2+}$ 透過性を示す(Nishino *et al.*, 2011)。脊椎動物の速筋型AChRは $\text{Ca}^{2+}$ を透過しないため、これは非常にユニークな性質である。さらにカタクウレイボヤのこの性質はintermediate ringのEをQに改変すると失われる。従って、AChRは、構成サブユニットのintermediate ringがすべてEであれば $\text{Ca}^{2+}$ を透過し、Qが含まれれば透過しないと予想される。すなわち、 $\varepsilon$ と $\gamma$ を欠く遅筋型AChRは $\text{Ca}^{2+}$ を透過する可能性が高いと考えた。

これに基づき、私は、脊椎動物であるゼブラフィッシュの遅筋型AChRが $\text{Ca}^{2+}$ を透過させる性質をもち、AChRから流入する $\text{Ca}^{2+}$ が遅筋の収縮に重要であると考え、遅筋の収縮メカニズムについて以下の仮説をたてた。速筋では、従来知られているように、Nav開口により細胞が脱分極することで筋小胞体上の電位依存性 $\text{Ca}^{2+}$ チャネルが



開き、これによってリアノジン受容体から  $\text{Ca}^{2+}$  が放出される（図参照）。一方、Nav をもたない遅筋では AChR から流入した  $\text{Ca}^{2+}$  が直接筋小胞体のリアノジン受容体を刺激し、 $\text{Ca}^{2+}$  放出を引き起こすと考えた。

## 2．研究の目的

上記の背景を踏まえ、本研究では「遅筋型 AChR がどのような特徴をもち、その特徴が遅筋の制御にどのように寄与するか」を学術的「問い」として、 $\text{Ca}^{2+}$  透過性を中心とした遅筋型 AChR のチャネル特性と、その遅筋の活動における寄与の解明に取り組むこととした。まず 発現系を用いた解析により速筋型、遅筋型 AChR の  $\text{Ca}^{2+}$  透過性の違いを確認した後、 $\text{Ca}^{2+}$  透過性を改変した AChR 構成サブユニットを作製し、この改変型 AChR サブユニットを用い、遅筋の AChR の  $\text{Ca}^{2+}$  透過性を喪失したゼブラフィッシュ系統を作製して筋の活動への影響を  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングで解析することとした。さらにこの系統を用い 遅筋の  $\text{Ca}^{2+}$  透過性の喪失が個体の運動機能に及ぼす影響を、運動解析により明らかにすることを目指した。

## 3．研究の方法

### (1)新規型 AChR のチャネル特性の解明

新規型 AChR の特性を、発現系を用いた電気生理学的手法にて解析した。アフリカツメガエル卵母細胞に AChR を発現させ、アセチルコリン投与中に流れる電流を膜電位固定法で記録した。 $\text{Ca}^{2+}$  透過性を解析するため、様々な  $\text{Ca}^{2+}$  組成のリンガー液中で実験し、それに伴うイオン電流の変化を記録した。これを速筋型、遅筋型で比較し、次に intermediate ring のアミノ酸を E から Q に改変した  $\delta$  を作製した。この改変型サブユニットを含む AChR について、同様の手法で  $\text{Ca}^{2+}$  透過性の変化を確認した。

### (2)遅筋細胞の活動における AChR の $\text{Ca}^{2+}$ 透過性の意義を解析

遅筋の AChR の  $\text{Ca}^{2+}$  透過性を喪失させたゼブラフィッシュ（稚魚）を用い、 $\text{Ca}^{2+}$  イメージングで遅筋の活動への影響を解析した。遅筋に  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬を導入し、アセチルコリン投与時の応答を記録した。

### (3)運動機能における $\text{Ca}^{2+}$ 透過性の意義を解析

AChR の  $\text{Ca}^{2+}$  透過性が運動機能にもたらす影響を解析した。 $\text{Ca}^{2+}$  透過性を喪失させたゼブラフィッシュを用いて運動機能解析を行った。ハイスピードカメラを用いて遊泳速度や遊泳時の身体の屈曲角度を解析した。

## 4．研究成果

速筋型と遅筋型 AChR の  $\text{Ca}^{2+}$  透過性について電気生理学的手法を用いて解析した結果、遅筋型の AChR は速筋型と比較して高い  $\text{Ca}^{2+}$  透過性を示すことが示唆された。改変を加えたサブユニットを含む遅筋型 AChR では  $\text{Ca}^{2+}$  透過性は認められなかった。次に、遅筋型 AChR の  $\text{Ca}^{2+}$  透過性を喪失させた遺伝子改変ゼブラフィッシュを作製し、運動機能を解析した。遅筋特異的プロモーター制御下で、アミノ酸改変により  $\text{Ca}^{2+}$  透過性を喪失させた AChR を発現させた。これを用い、受精後 1-3 日齢の稚魚で運動機能を解析したところ、 $\text{Ca}^{2+}$  透過性を喪失した個体では遊泳速度や遊泳時の尾の振幅などが著しく低下しており、運動機能が低下することが示唆された。しかし、成長が進むにしたがって運動機能は向上し、受精後 5 日齢では  $\text{Ca}^{2+}$  透過性を喪失した個体は正常な遅筋型 AChR をもつ個体と同等の運動機能を示した。これらの結果から、遅筋型 AChR を介して流入した  $\text{Ca}^{2+}$  は発生初期の遅筋の収縮において重要な機能をもつと考えられた。

さらに、この  $\text{Ca}^{2+}$  流入が遅筋の細胞レベルでの活動に及ぼす影響を  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングによって解析した。 $\text{Ca}^{2+}$  透過性を喪失した個体の遅筋細胞では、アセチルコリン投与によって細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇がみられたが、正常な AChR を発現する遅筋に比べ、上昇した  $\text{Ca}^{2+}$  濃度

の低下が速く、Ca<sup>2+</sup>応答がより短い時間で終息することがわかった。この短いCa<sup>2+</sup>応答が運動機能の低下の原因と考えられる。

これらの結果から、遅筋を介したCa<sup>2+</sup>流入は発生初期の遅筋のCa<sup>2+</sup>応答の持続に重要であり、これが失われることで運動機能が大きく低下することが示唆された。これにより、遅筋の収縮メカニズムにAChRを介したCa<sup>2+</sup>流入が重要であることが新たにわかった。従来の筋収縮機構のモデルに新たな知見が加わったといえる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Zempo Buntaro, Tanaka Natsuko, Daikoku Eriko, Ono Fumihito	4. 巻 11
2. 論文標題 High-speed camera recordings uncover previously unidentified elements of zebrafish mating behaviors integral to successful fertilization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-99638-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 善方文太郎、小野富三人、中條浩一
2. 発表標題 ゼブラフィッシュの遅筋特異的に発現するニコチン性アセチルコリン受容体の機能解析
3. 学会等名 日本動物学会 第93回早稲田大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Buntaro Zempo, Fumihito Ono, Koichi Nakajo
2. 発表標題 Slow muscle-type nicotinic acetylcholine receptor in zebrafish shows high Ca <sup>2+</sup> permeability.
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 Buntaro Zempo, Fumihoto Ono, Koichi Nakajo
2. 発表標題 Slow muscle-type nicotinic acetylcholine receptor in zebrafish shows high Ca <sup>2+</sup> permeability
3. 学会等名 第99回 日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------