

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：11101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19369

研究課題名(和文)ホヤ幼生におけるキラルな筋原線維の形成原理と動作原理の解明

研究課題名(英文)Formation and operation of chiral myofibrils in ascidian larval muscle cells.

研究代表者

西野 敦雄(Nishino, Atsuo)

弘前大学・農学生命科学部・准教授

研究者番号：50343116

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：動物の運動の多くにはキラリティーが見られ、また生体高分子も通常、キラリティーをもつ。しかし、細胞がキラルな構造体/運動体であるという認識は一般的でない。我々は、海産動物ホヤのオタマジャクシ幼生が右ネジ方向に螺旋を描きながら泳ぎ上がる性質をもち、また尾部の筋肉細胞の筋原線維(筋肉細胞内部の伸縮性の繊維)が左右で同じ方向にねじれていることを見出した。本研究により、このねじれた筋原線維の形成過程が明らかされ、また阻害剤ライブラリの活用により、このネジれた筋原線維形成を制御するシグナル因子の候補が見いだされた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトがボールを投げるときのような「キラルな運動」は他の動物で見ることができ、またその多くが個体差のない画一的な方向性を示す。本研究は、海産動物のホヤのオタマジャクシ幼生が、運動パターンにも、筋肉細胞の収縮装置にも画一的なキラリティーが見られることに注目して、この筋細胞の「螺旋性ができる仕組み」と、このねじれた筋原線維が「個体運動レベルの螺旋性を生み出す仕組み」の双方の解明に取り組んだ。本研究は、細胞がキラルな存在であること、そしてそのキラリティーに基づいて個体運動の回転が生み出される場合があることを明示する。

研究成果の概要(英文)：While many motor patterns exhibited by animals are known to be chiral and biogenic macromolecules are also chiral in general, it is not so well recognized that animal cells are chiral in organizations and in movements. We depicted that tadpole-shaped larvae of ascidians, marine invertebrate chordates, tend to swim up along sinistral helices, and they possess twisted myofibrils in both of left and right side of the tail with the same chirality. In this study, we uncover the intrinsic process to form the chiral myofibrils in the muscle cells and using a library for molecular-signaling blockers we found several candidate factors that can regulate the formation of chiral myofibrils.

研究分野：動物生理学

キーワード：筋収縮 キラリティー 遊泳運動 細胞骨格 尾索動物 運動解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

“右利き/左利き”というように、ヒトや動物が示す運動の多くでは特定のキラリティーが優先する。また分子レベルでも、自然にはL型のアミノ酸、D型の糖が優占するが故に、生体高分子は特定のキラリティーをもつ。しかし他方で、細胞がキラルな構造体/運動体であるとの認識は一般的ではない。つまり、この「**個体運動のキラリティー**」と「**分子のキラリティー**」の間には乖離があり、相互が繋がる生物学的事例も乏しい。

ホヤは、脊椎動物に最も近縁な無脊椎動物の系統に属する海産動物で、その幼生は脊椎動物とボディプランを共有したオタマジャクシ型の形態を示す。このホヤ幼生の体は、脊椎動物の体とは対照的に、極めて単純で、例えばカタユレイボヤ幼生の尾部筋肉は18個の筋細胞が一層、左右対称なパターンで配置されるのみである。我々は、このホヤ幼生が行う遊泳運動について、

ホヤ幼生は右ネジ方向に螺旋を描いて泳ぎ上がることで、筋原繊維が、体の左にあって右にあって、筋細胞の表層で螺旋を描いて配向していることを明らかにした。応募者は、ホヤ幼生の単純さを生かし、この筋細胞の螺旋性ができる仕組みと、それが運動のネジレを生み出す仕組みを調べれば、これまでいかなる系でも未解明だった細胞レベルのキラリティーの形成原理と動作原理に迫ることができると考えた。

2. 研究の目的

我々は、ホヤ幼生の筋細胞が体の左右のどちら側でも同一のキラリティーをもった螺旋状の筋原繊維をもつこと、およびホヤ幼生が右ねじの螺旋を描いて泳ぎ上がることで、この二点を見出して本研究を立案した。本研究は、このホヤ幼生の「**筋細胞がもつキラリティー**」すなわち「**キラルな筋原繊維走行**」の“**形成原理**”と“**動作原理**”を明らかにすることを目的として研究に取り組んだ。

3. 研究の方法

(1) キラリティーをもった筋原線維の形成プロセスの解明

細胞がキラリティーをもつのか、その意義は何か、キラリティーをもつ細胞はそれをどのように作り上げるのか、それらすべての面がこれまでよく明らかにされていない。我々はホヤ幼生の筋細胞を、容易にキラリティーを観察できる細胞のモデルとし、筋原繊維のネジレの形成過程を明らかにすることを考えた。すなわち、ホヤ胚の発生過程に沿って、蛍光ファロイジン染色を行うことで、およびGFPを共役させた筋肉アクチン遺伝子を筋肉細胞系列に発現させることによって、ネジレた筋原線維がどのようなプロセスを経て形成されるかを調べた。

(2) キラリティーをもった筋原線維の形成を攪乱する因子の探索

上の観察によってネジレた筋原線維が形成され始める時期をまず明らかにした上で、その時期の直前の段階から、各種細胞内シグナリングを阻害する薬剤のコレクション(“**阻害剤ライブラリ**”)を処理し、筋原繊維に起こる異常を網羅的に分析した。これについては、ライトシート顕微鏡を用いて、効率的に異常の有無を調べることを行った。阻害剤ライブラリとしては新学術領域「**がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動：化学療法基盤支援活動**」が提供する“**標準阻害剤キット**”を利用した。この薬剤ライブラリの処理により、ネジレ形成を攪乱する化合物のスクリーニングを行い、キラルな筋原線維の形成に関わる因子を探索した。

(3) 単離筋肉細胞の発生と筋原線維形成

ホヤ胚では、筋肉系列の割球を単離しても筋肉細胞に自律的に分化することが知られている。この性質を使って、初期胚の時期に単離した筋肉系列の細胞において螺旋状の筋原線維形成が起こるかを検証した。

(4) ホヤ幼生の自動形状分析アルゴリズムの開発

ホヤ幼生には、筋肉細胞が左右にそれぞれ18個しか存在せず、また、近年はこの幼生の神経系のコネクトーム解析が進められ、遊泳運動を制御する神経回路も明らかにされてきている。すなわちカタユレイボヤ幼生は、一つ一つの筋肉細胞・神経細胞の活動を個体運動に結び付け、さらには周囲の流体との相互作用を含めた運動力学の総体を理解する格好のモデルであると考えられる。この点に注目し、平面的に遊泳するホヤ幼生を高速度カメラで撮影した画像から、ホヤ幼生の形状を自動的に抽出して、尾部の屈曲パターンを定量化するアルゴリズムの開発を、弘前大学大学院理工学研究科の岩谷靖准教授とともに行った。

(5) ホヤ類2種の幼生に関する遊泳運動の比較

水槽内でホヤ幼生を自由に泳がせ、これを直交する2方向からビデオ撮影することにより、運動軌跡を立体的に分析することができる。これについて、マボヤ幼生とカタユレイボヤ幼生の2種の泳ぎ上がり運動について、運動軌跡の比較を行った。

(6) アセチルコリン受容体の分子生理学的研究

ホヤ幼生と成体における筋収縮の神経制御機構を比較するために、幼生と成体におけるアセチルコリン受容体の発現と機能に関する研究を行った。成体の体壁筋と鰓におけるアセチルコ

リン受容体の発現が見いだされたことを受け、それらに発現するアセチルコリン受容体の分子機能を詳しく解析した。

4. 研究成果

(1) キラリティーをもった筋原線維の形成プロセスの解明

ホヤの発生過程に沿ったアクチン繊維の蛍光ファロイジンによる可視化を経時的に行い、螺旋型の筋原線維がどのように出来上がるかを解析した。観察結果は以下のようにまとめることができる。初期尾芽胚期までは筋細胞の表層にはメッシュ状のアクチン・ネットワークが張り巡らされているが、中期尾芽胚期になると、斜め方向に太いファイバーの集積が見られるようになった。その後、後期尾芽胚期になると斜め方向に形成されたアクチンファイバーは均質化し、さらにサルコメア構造が形成され、収縮運動が開始された。この観察から、螺旋型の筋原線維構造は中期尾芽胚期に形成される螺旋型のアクチンの太いファイバー形成として最初にとらえられうると分かった。すなわち、螺旋状の筋原線維は、形成されてから徐々に傾くのではなく、アクチンの束の形成初期から既にキラリティーをもってネジれていると判明した。

次に中期尾芽胚期から後期尾芽胚期にかけて出来上がる螺旋性をもったアクチン繊維の束が、細胞質型アクチンから筋肉型アクチンへの切り替えによって起こる可能性を検証した。筋肉型アクチン遺伝子のコーディング領域に成熟の速いタイプの緑色蛍光タンパク質の遺伝子を組み込み、この融合遺伝子を受精卵に導入して筋肉型アクチンタンパク質の発現時期を調べたところ、神経胚期にはすでに発現が見られた。このことから、尾芽胚期初期から見られる予定筋肉細胞表層に存在するアクチン繊維のメッシュワークは、既に発現していた筋肉型アクチンから構成されるものであり、その束化はアイソフォームのスイッチングによるものではないことが示された。

(2) キラリティーをもった筋原線維の形成を攪乱する因子の探索

上記の結果から、中期尾芽胚期から筋原線維の形成が開始されることが明らかになったので、この時期から阻害剤ライブラリを処理し、孵化幼生期の筋原線維をライトシート顕微鏡で観察することにより、このネジれた筋原線維形成を制御するシグナル因子の探索を行った。なおライトシート顕微鏡を用いての分析の結果、筋原線維のネジレの方向は、当初、我々の分析で信じていた左ネジ方向ではなく、右ネジ方向であることが判明した。

「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動：化学療法基盤支援活動」が提供する“標準阻害剤キット”1と2の計188種類の阻害剤を処理したところ、61種類の阻害剤において、孵化しなかったり、孵化をしても形態に異常がみられるなど、発生を攪乱する効果が見られた。形態異常を示さないものにおいては、筋原線維に異常がみられる場合はなかった。発生に攪乱が見られたもののうちで、14種類の阻害剤処理幼生において、筋原線維に明確な異常が見られた。特に細胞呼吸、シャペロン、細胞極性、イオン濃度制御に関わる因子の阻害剤が筋原線維形成を攪乱する効果を示すことが明らかになった。

(3) 単離筋肉細胞の発生と筋原線維形成

ホヤの幼生の発生においては、筋肉の分化は細胞質内に局在する母性 mRNA により指定され、他の細胞非自律的な機構を必要としない。そこで、初期胚の段階で単離した割球から細胞自律的に分化した筋細胞がねじれた筋原線維を発達させるのかどうかを検証した。その結果、筋肉系列の割球を培養すると、細胞分裂停止など、確かに筋分化に応じたサインは見られるものの、正常な筋肉細胞のように伸長せず、球形の形状のままであった。現在ここにネジれた筋原線維が存在するか確認を行っている。

(4) ホヤ幼生の自動形状分析アルゴリズムの開発

高速度カメラによる運動解析においては、非常に多くの連続画像の中で、移動する運動体の形状変化を画一的な手法によって定量的に分析することが主なアプローチとなる。我々は、ホヤ幼生の運動解析の自動化を行うために、本研究では2次元平面内にほぼ限定されている運動を対象として、250フレーム/秒の間隔で連続する画像内で運動(変形)するカタユレイボヤ幼生を、折れ線形状として抽出するアルゴリズムを考案した。このアルゴリズムにより、高速度カメラにより撮影されたカタユレイボヤ幼生の運動を自動的に、「体幹部コア」に対応する“楕円”と“折れ点1~n”の座標情報により抽出し、表現することに成功した。これは、同様に撮影された異なる幼生の遊泳運動に関して適用可能であることが示された。本研究でまとめられたアルゴリズムは、フレームレートに依存せず、また、一部に特殊な形状を備えた細長運動体の平面内運動一般に応用できると考えられる。

(5) ホヤ類2種の幼生に関する遊泳運動の比較

ホヤ幼生の鉛直泳ぎ上がり運動の様子を二方向からビデオ撮影して立体的に運動軌跡を再構成する研究を、筋原線維の傾きの大きさが異なる二種のホヤについて行った。以前、筋原線維のネジレの程度がより強いマボヤの幼生を用いて遊泳運動を観察は行っていたが、よりネジレが

弱いカタユレイボヤの幼生の遊泳運動も立体的に分析して比較をすることを意図して行った。これは現在執筆中の論文に含めるために行っているもので、現在詳細に分析中である。マボヤ幼生の遊泳運動に比べて、カタユレイボヤ幼生の遊泳運動の方が螺旋の半径が小さいという予備的な結果が得られている。

(6) アセチルコリン受容体の分子生理学的研究

筋収縮の生理的制御機構を明らかにするために、アセチルコリン受容体の機能解析を行ってきた。その結果、幼生の筋肉のアセチルコリン受容体は A1, B2/4, BGDE3 と呼んでいる 3 種類のサブユニットにより構成されているのに対して、成体の筋肉においては A1, B2/4, BGDE3 に加えて BGDE2 が発現していることが分かった。また、これらをアフリカツメガエルの卵母細胞に発現させた場合には、BGDE2 サブユニットが加わることにより、前者 3 つのみの場合とは異なる電流 電圧関係が得られることが明らかになった。また A7/8-1 と呼んでいるサブユニットが成体の鰓の繊毛細胞に発現していたことから、この機能分析も行った。その結果、アフリカツメガエルの卵母細胞に発現させた A7/8-1 が、鰓で見られる繊毛停止反応と類似の薬理的な反応を示すことが確かめられた。このことは A7/8-1 が鰓繊毛細胞における繊毛停止反応を媒介する受容体チャネルの本体であることを示している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Jokura Kei, Nishino Junko M., Ogasawara Michio, Nishino Atsuo	4. 巻 223
2. 論文標題 An $\alpha 7$ -related nicotinic acetylcholine receptor mediates the ciliary arrest response in pharyngeal gill slits of <i>Ciona</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Experimental Biology	6. 最初と最後の頁 jeb209320
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jeb.209320	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 西野敦雄, 岡村康司	4. 巻 91
2. 論文標題 NaVチャネル全史 細菌からヒトまで	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 210-223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2019.910210	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nishino Atsuo	4. 巻 1029
2. 論文標題 Morphology and Physiology of the Ascidian Nervous Systems and the Effectors.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Advances in Experimental Medicine and Biology book series	6. 最初と最後の頁 179 196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-981-10-7545-2_16	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nishino Atsuo, Okamura Yasushi	4. 巻 246
2. 論文標題 Evolutionary History of Voltage-Gated Sodium Channels.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Handbook of Experimental Pharmacology book series	6. 最初と最後の頁 3-32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/164_2017_70	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 大塚 玄航, 広瀬 裕一, 西野 敦雄	4. 巻 97
2. 論文標題 しっぽの形態からみたオタマボヤ類の多様性	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 うみうし通信	6. 最初と最後の頁 10-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 広瀬航平, 西野敦雄
2. 発表標題 ワカレオタマボヤの消化管における餌粒子の移動と濃縮
3. 学会等名 日本動物学会令和元年度東北支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩谷靖, 長谷川修也, 西野敦雄
2. 発表標題 カタコウレイボヤ幼生の遊泳運動における自動形状解析
3. 学会等名 日本動物学会第90回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 笠原享祐, 足立千尋, 望月遊, 大塚玄航, 西野敦雄, 小沼健, 西田宏記, 横堀伸一
2. 発表標題 オタマボヤ綱ミトコンドリアゲノムの進化
3. 学会等名 日本動物学会第90回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 窪川かおる, 西野純子, 西野敦雄, 豊田敦, 浦野明央
2. 発表標題 ナメクジウオにおける内分泌関連遺伝子の発現の性差
3. 学会等名 日本動物学会第90回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤香澄, 渡部翔, 西野敦雄
2. 発表標題 ホヤ幼生筋における筋原線維の形成プロセス
3. 学会等名 日本動物学会平成30年度東北支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川口愛翔, 大塚玄航, 西野敦雄
2. 発表標題 ワカレオタマボヤの筋肉細胞分化には細胞間相互作用が必要である
3. 学会等名 日本動物学会平成30年度東北支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 黒岩夏澄, 西野敦雄
2. 発表標題 マボヤの幼生被嚢は脱コリオンによって何が変化するのか
3. 学会等名 日本動物学会第89回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西野純子, 西野敦雄, 浦野明央, 窪川かおる
2. 発表標題 ナメクジウオ内分泌器官における発現遺伝子の比較解析
3. 学会等名 日本動物学会第89回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤掛雄馬, 西野敦雄
2. 発表標題 カタコウレイボヤの心臓における細胞構築と拍動方向反転現象の研究
3. 学会等名 日本動物学会第89回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西野純子, 西野敦雄, 浦野明央, 窪川かおる
2. 発表標題 頭索動物の様々な組織における内分泌物質の遺伝子発現
3. 学会等名 第43回日本比較内分泌学会大会仙台大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西野敦雄, 渡部翔, 原隆志
2. 発表標題 ホヤ幼生の遊泳運動を規定する内的要因
3. 学会等名 日本動物学会第88回大会, シンポジウム「海産無脊椎動物 生命情報の宝の山Ⅴ」(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 横堀伸一, 笠原享祐, 大塚玄航, 西野敦雄, 小沼健, 西田宏記, 山岸明彦
2. 発表標題 18S rRNA遺伝子並びにミトコンドリアゲノムに基づくオタマボヤ綱の分子系統解析
3. 学会等名 日本動物学会第88回大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 公益社団法人日本動物学会	4. 発行年 2018年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 800
3. 書名 動物学の百科事典	

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----