

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440150

研究課題名(和文)単純な細胞構成を備えたホヤ幼生筋における多重神経支配の意義の解明

研究課題名(英文)Significance of possible multiple innervation pattern in the ascidian larval muscle cells.

研究代表者

西野 敦雄 (Atsuo, Nishino)

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) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ホヤ幼生は片側約20個(左右で計約40個)の筋肉細胞で自由に泳ぐ。我々は、ホヤ幼生ではこの少数の筋細胞が、興奮性のアセチルコリンAChと共に抑制性のグリシンGlyを受容することで、柔軟な遊泳運動が可能になっていると考えた。

本研究で我々は、マボヤの幼生期に発現するACh, Gly, GABAの受容体チャネルの遺伝子を全て単離し、発現様式を定めた。結果、既知のカタクウレイボヤの場合と同様、筋肉には3種のACh受容体遺伝子と1種のグリシン受容体遺伝子が共発現していた。GABA受容体は神経系にのみ発現していた。遠縁二種でのAChとGlyの受容体の共発現は、ホヤ幼生筋での多重神経入力を強く示唆する。

研究成果の概要(英文)：Ascidian larvae freely swim in aqueous milieu using small number of muscle cells; only 18 in *Ciona* and 21 in *Halocynthia* on either side. We have a hypothesis that in ascidian larvae this simple muscle band may receive not only excitatory acetylcholine (ACh) but inhibitory glycine (Gly), and this compound innervation enables the larva to swim fluently.

Here, we isolated cDNAs encoding all the subunits for ACh, Gly, and also GABA receptor-channels expressed in the *Halocynthia roretzi* larvae. We also examined their expression patterns, revealing that three genes for ACh receptor subunits and the single gene for Gly receptor are coexpressed on the larval muscle, as previously reported in another ascidian *Ciona intestinalis* by us. We found no sign for GABA receptor expression on the muscle, but in the nervous system. Coexpression of ACh and Gly receptors in the larval muscles of distantly related two species suggests significance of the double innervation in the larval muscle.

研究分野：動物学

キーワード：神経筋結合 興奮 収縮連関 アセチルコリン受容体 グリシン受容体 筋肉入力 運動制御

1. 研究開始当初の背景

「動く」ことは、摂食や逃避、生殖、拡散など動物の生存に不可欠な要素であり、多くの動物が生存戦略にマッチした筋機能を発達させている。この意味で、「多様な動物の筋収縮制御機構」の研究は、動物体の適応的生存戦略の本質を知るうえで最も基本的な切り口の一つであるといえる。しかし筋収縮の比較生理学研究は、ザリガニ、フジツボ、二枚貝、カエルなど限られた種で古典的な研究がされて以降、光受容やホルモン応答に関する比較研究などに比べ、動物界全体にわたる分子レベルでの理解が大きく立ち遅れている。

これまでの研究では、脊椎動物の骨格筋はそれぞれ単一のコリン作動性の運動ニューロンにより支配される原則があるとされている一方、ザリガニや線虫などの無脊椎動物の筋システムにおいて、グルタミン酸 (Glu) あるいはアセチルコリン (ACh) による興奮性の神経入力と共に アミノ酪酸 (GABA) による抑制性の神経入力が入り込む多重神経支配が報告されている。この対照的なシステムの相違は、教科書にも取り上げられるほど敷衍されているが、各システムの適応的利点や、互いにどのようにして進化してきたのかという問題については、間をつなぐ動物群で分子レベルの生理学研究が進んでおらず、ほとんど理解は進んでいなかった。

ホヤは脊椎動物にもっとも近縁な無脊椎動物系統に含まれる。このホヤは、成体期は固着性だが、幼生期には、脊索、背側神経管、左右の筋肉帯を備え、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。このオタマジャクシ幼生は、サカナやカエルのオタマジャクシのように、水環境中を自由に遊泳するが、ホヤ幼生の体には、筋肉細胞は片側に約 20 個、神経細胞は 100 個程度、中でも運動ニューロンは尾の付け根に 3~5 対存在するのみであることが分かっていた。

2. 研究の目的

我々は、このホヤ幼生が少数の筋細胞とニューロンで脊椎動物と同様の運動パターンを生み出す仕組みを研究してきた。その中で、脊椎動物では抑制性の神経伝達物質としてはたらくグリシン (Gly) の受容体の相同遺

伝子が、ホヤの一種であるカタコウレイボヤ *Ciona intestinalis* の筋肉でアセチルコリン (ACh) の受容体と共に発現していることを見出した。そこで、本研究において我々は、「ホヤ幼生筋が ACh と Gly による多重神経支配という、ボディプランを共有する脊椎動物とは異なる筋収縮制御システムを持つことを検証する」ことを目的として研究に取り組んだ。

3. 研究の方法

(1) マボヤ *Halocynthia roretzi* における幼生筋に発現する ACh 受容体の同定、および Gly 受容体が幼生筋に発現するかの検証

マボヤは、カタコウレイボヤとは目レベルで異なる、遠縁の系統に属するホヤである。我々は、マボヤの幼生筋において、ACh 受容体と Gly 受容体が共発現することが示されれば、ホヤ幼生で普遍的に多重神経入力を筋肉に対して行っている証拠になると考えた。

そこで我々はゲノム配列の情報を利用して、マボヤ幼生に発現しているすべての ACh 受容体、Gly 受容体、さらには GABA_A 受容体のサブユニット遺伝子を同定することを試みた。

(2) カタコウレイボヤにおける成体期の ACh 受容体の発現解析

これまでホヤの成体期において、どのような組織にどのような神経伝達物質の受容体が発現しているか、ほとんど理解されていなかった。そこで我々は、カタコウレイボヤの幼若体を用い、ゲノムにコードされている全 ACh 受容体のサブユニット遺伝子の発現パターンを Whole-mount in situ hybridization によって定めた。

(3) ホヤの幼生筋の細胞構築に関する研究 ~ 筋原線維のネジレについて

ホヤ幼生の筋原線維を、蛍光ファロイジンを使って染色することを行っていたところ、ホヤ幼生の筋原線維は尻尾の長軸に沿ってねじれて配向していることが分かった。ホヤ幼生は遊泳の際にらせんを描いて泳ぐことが分かっているので、これとの関連性を明らかにするために、筋原線維の走行を詳細に調べた。

4. 研究成果

(1) マボヤ *Halocynthia roretzi* における幼生

筋に発現する ACh 受容体の同定、および Gly 受容体が幼生筋に発現するかの検証

マボヤの幼生期に発現している ACh、Gly、GABA の各受容体サブユニット遺伝子は、ゲノム上に同定できた各 11 種、1 種、3 種のサブユニットのうち、幼生期に全長の発現が見られるものが、各 6 種、1 種、3 種であった。これらすべての全長 cDNA を単離して配列決定を行った。

これらの遺伝子発現様式を定めたところ、カタユレイボヤ同様に 3 種類の ACh 受容体サブユニット遺伝子、我々が *Hr-nAChR-A1*、*-B2/4*、*-BGDE3u* と呼んでいるものについて幼生の筋細胞で遺伝子発現が見られた。また、単一の Gly 受容体サブユニット遺伝子 *Hr-GlyR* が筋肉でも発現していた。GABA_A 受容体サブユニット遺伝子はどれも幼生筋肉では発現しておらず、神経系にのみ発現が見られた。本研究の結果は、カタユレイボヤ同様、マボヤにおいても幼生筋に ACh 受容体と Gly 受容体が共発現していることを示している。ホヤ類の中で系統的に遠く離れたこれら二種で、興奮性と抑制性の神経伝達物質の受容体が共発現していたことは、ホヤ類の幼生筋が普遍的に多重神経入力を受けているという考えを強く支持する。

マボヤの GlyR が実際に Cl⁻透過性を持つのか検証するために、アフリカツメガエルの卵母細胞に発現させる実験を行ったが、Gly に反応する電流を発しなかった。今後、この原因を検証していくことが必要である。

(2) カタユレイボヤにおける成体期の ACh 受容体の発現解析

カタユレイボヤの幼若体を対象にして、既に単離していたカタユレイボヤのすべての ACh 受容体サブユニット遺伝子の発現様式の解析を行った。その結果、多くが神経節の細胞に、一部が心臓の細胞に発現していたが、我々が *Ci-nAChR-A7/8-1* と呼んでいる 1 種類のみが鰓の繊毛細胞に発現していることを見出した。ACh エステラーゼの組織化学染色でも鰓の繊毛細胞に活性が見られたことから、鰓の繊毛細胞にはコリン作動性の入力があるものと考えられた。そこで、生きた成体の鰓を取り出して、血洞内に ACh を注入してみたところ、ACh の注入に応じて繊毛停止反応が引き起こされることが分かった。アフリカツメガエルの卵母細胞に *Ci-nAChR-A7/8-1*

の合成 mRNA を注入し、これを発現させたところ、膜電位固定条件下で、投与する ACh の濃度に依存した電流が観察された。以上の結果は、*Ci-nAChR-A7/8-1* が成体の鰓の繊毛細胞に発現していて、これが神経入力に依存して繊毛停止反応を媒介する受容体チャネルであることを示唆する。

(3) ホヤの幼生筋の細胞構築に関する研究～筋原線維のネジレについて

カタユレイボヤの筋原線維を、蛍光フロロイジンを用いて観察したところ、筋原線維が尻尾の長軸に対してらせんを描いて配向していることを見出した。詳しく観察した結果、(i)筋原線維は筋肉細胞の表面に限定されていること、(ii)筋原線維は前後軸の周りにらせん型に配向しており、らせんの方向は左右どちらの筋肉帯においても左巻き(親指を後方に向けたとき、他の指がさす方向)にねじれていること、(iii)筋肉帯は 3 列の筋細胞列で構成されているが、中段の細胞ではらせんのピッチが表皮側におけるより脊索側において長いものに対して、背側と腹側の細胞列ではその逆になっていることが分かった。これは、筋原線維の配向に関して、左右対称の形質と左右非対称な形質が複合的に存在していることを示し、またこれらの特徴はカタユレイボヤ幼生とマボヤ幼生の間で共有されていたことから、これらの特徴がホヤ幼生の共通の形態的枠組みを構成していることが示された。ただし、マボヤ幼生においてはカタユレイボヤ幼生に比べてどの列の細胞においてもピッチが有意に短かった(らせんのねじれが強かった)。ホヤ幼生は一般にらせん運動を行うことが分かっているが、これら筋原線維のらせん構造における種間の違いが運動パターンにどのような違いを生み出すのか、興味深い問題であり、今後調べていくことが必要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Tatsuya Omotezako, Atsuo Nishino, Takeshi A. Onuma, Hiroki Nishida (2013) RNA interference in the appendicularian, *Oikopleura dioica*, reveals the function of the Brachyury gene. *Development Genes and Evolution* 223: 261-267.

〔学会発表〕(計12件)

大塚玄航、西野敦雄、中島啓介、広瀬裕一
「尾虫綱全3科における尾部微細構造の比較」日本動物学会第84回大会、岡山大学津島キャンパス、2013年9月27日

城倉圭、西野純子、西野敦雄「カタユレイボヤ鰓孔におけるアセチルコリンエステラーゼの組織化学活性」日本動物学会平成26年度東北支部大会、岩手大学復興祈念銀河ホール、2014年7月13日

渡部翔、西野敦雄「ホヤのオタマジャクシ幼生における螺旋型遊泳運動の解析」日本動物学会平成26年度東北支部大会、岩手大学復興祈念銀河ホール、2014年7月13日

大塚玄航、西野敦雄、広瀬裕一「オタマジャクシ科における尾部表皮細胞内基質層と筋原繊維の配置の多様性」日本動物学会第85回大会、東北大学川内北キャンパス、2014年9月11日

横堀伸一、山岸明彦、西野敦雄「ホソサイゾチボヤ *Fritillaria haplostoma* の分子系統解析」日本動物学会第85回大会、東北大学川内北キャンパス、2014年9月13日

Kei Jokura, Junko Nishino, Michio Ogasawara, Atsuo Nishino 「Possible involvement of an alpha7-class nicotinic acetylcholine receptor in the ciliary arrest response in *Ciona stigmatal* cells.」 The 8th International Tunicate Meeting, Aomori City Cultural Hall, Aomori, July 13-17, 2015.

Sho Watanabe, Atsuo Nishino 「Are the spiral swimming trajectories of the larva based on the spiral configuration of myofibrils in the tail muscle cells?」 The 8th International Tunicate Meeting, Aomori City Cultural Hall, Aomori, July 13-17, 2015.

原隆志、西野敦雄「カタユレイボヤ幼生の遊泳運動を生み出すパターン発生器の領域特定」日本動物学会平成27年度東北支部大会、東北大学農学部、2015年8月8日

西野純子、工藤千珠秀、西野敦雄「群体性被囊類ネンエキボヤの実験室内における無性・有性生殖の制御の試み」日本動物学会平成27年度東北支部大会、東北大学農学部、2015年8月9日

渡部翔、西野敦雄「ホヤのオタマジャクシ型幼生における螺旋型遊泳運動の解析」日本動物学会第86回大会、朱鷺メッセ(新潟コンベンションセンター)、2015年9月19日

城倉圭、西野純子、小笠原道生、西野敦雄「アセチルコリン(ACh)によるホヤの鰓の繊毛停止反応の誘起」日本動物学会第86回大会、朱鷺メッセ(新潟コンベンションセンター)、2015年9月19日

西野敦雄「次の35年のために、被囊動物学をもう一度考えてみる」日本動物学会第86回大会、関連集会「第35回ホヤの生物学談話会」、朱鷺メッセ(新潟コンベンションセンター)、2015年9月17日

〔図書〕(計1件)

西野敦雄「第7章 ウニ類とホヤ類新口動物の無脊椎動物」.(翻訳)『ギルバート発生生物学』(阿形清和、高橋淑子監訳). メディカル・サイエンス・インターナショナル. pp. 221-245. 2015.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)
取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://nature.cc.hirosaki-u.ac.jp/lab/animalphysiol/>

6. 研究組織

(1)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

(2)連携研究者

岡村 康司 (OKAMURA, Yasushi)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 80201987