

# ホヤ幼生の遊泳運動を制御する神経伝達機構の解明

## Elucidation of neurotransmission mechanisms to drive swimming locomotion in ascidian tadpole larvae

(日本動物学会推薦)

代表研究者 弘前大学

西野 敦雄

Hirosaki University

Atsuo Nishino

Ascidians represent the closest invertebrate animal group to vertebrates, and have been a research model of chordates. The tadpole larva of ascidians swims efficiently in seawater before it attaches on substrate to metamorphose. The cell-composition of the ascidian tadpole is quite simple; e.g. about 20 muscle cells on either side and 3-5 pairs of motor neurons to activate these muscle cells. In this project, we aimed to decipher structural and physiological bases for controlling the swimming locomotion in the ascidian tadpole larva. We first analyzed in detail their spiral swimming patterns using a high-speed video recording. In the course of seeking this structural basis, we noticed that the myofibrils within the larval muscle cells are restricted in the cortical region and are also spirally arranged in a left-right asymmetric manner. In another direction of this project, we identified ligand-gated ion channel subunit genes that are expectedly involved in the rhythm formation and swimming duration. Expression patterns of GABA<sub>A</sub> receptor subunits were well suited for the previously proposed function of neurotransmitter GABA in the ascidian larvae. Functional analyses of these molecular factors would untangle the neuronal/muscular interrelationships to regulate the locomotion of this simple organism.

### 研究目的

動物の運動や行動が精密に制御される仕組みを、同定可能な神経細胞と筋肉細胞の活動により完全に記述することは、動物生理学研究の一つの究極目標といえる。実際これまで、神経細胞や筋肉細胞の生理的振る舞いについての理解は大きく進んできた。しかし、個々の神経細胞・筋肉細胞に関する生理学的知見がいくら集まっても、我々ヒトのような脊椎動物を対象とすると運動の発現に関与する細胞の数が膨大で、運動制御に関する直接の理解につながらないジレンマがあった。

我々は近年、ホヤ類の幼生の運動制御機構に注目した研究を行っている。ホヤ類は、脊索動物門尾索動物亜門に属し、古くから単純な細胞構成を備えた脊索動物の研究モデルとして扱われてきた動物であり、最近の研究によって、脊椎動物に最も近縁な無脊椎動物群を構成する動物であることが明らかになった。ホヤ類はみな海産で、成体は海底に固着して

生きているが、幼生期にはオタマジックシ型の形態をとり、尾部を左右交互に C-S 型に振動させて海水中を自由に遊泳運動する。また光などに対し敏感な感覚反応を行うなど、高度に制御された運動パターンを示す。それにもかかわらず、ホヤ幼生の運動を担う筋肉細胞は約 20 対、運動ニューロンは 3-5 対、神経細胞全体でも 100 個程度しか持たず、その細胞構成は究極的に単純である(Fig. 1)。

本研究において我々は、この単純な細胞構成を備えたオタマジックシ幼生の運動制御機構に、細胞・分子レベルで迫るために、高速度カメラを用いた運動解析、神経・筋肉の細胞学的観察、神経・筋肉系で働く受容体型イオンチャネルの同定を進めた。

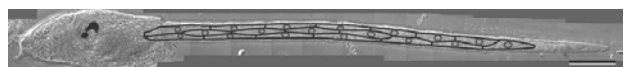


Fig. 1. *Ciona intestinalis* larva and its muscle cells. The larval body is composed of the trunk and tail. The tail has a pair of muscle bands; each of which contains 18 muscle cells only (outlined). Bar = 100  $\mu$ m.

## 研究経過

ホヤ幼生の運動制御機構を明らかにするために、以下の3つの研究に取り組んだ。

### (1)鉛直方向への運動パターンの解析

これまで水平方向へ泳ぐホヤ幼生の高速度カメラを用いた研究によって、ホヤ幼生は脊椎動物の遊泳体（魚類や両生類幼生）と同様に、左右交互の、前後に伝播する、可変的な強度をもった屈曲波が、左右の筋肉帯の働きによって体軸に沿って生成されることで、推進力が生み出されることを明らかにしていた。今回、上方に泳ぎ上がる動きを高速度カメラで撮影して解析したところ、ホヤ幼生は進行方向に対して、時計回りに体を回転させながら、螺旋運動を行っていることが明示された。この螺旋運動において、カタユウレイボヤ *Ciona intestinalis* 幼生では、尾部の一往復運動あたり約23度、マボヤ *Halocynthia roretzi* 幼生では約30度、体の長軸を中心とした回転（rolling）を行っていた。

### (2)筋原繊維の解析

ホヤ幼生の筋原繊維が立体的にどのような配置を取っているのか、その配置が遊泳運動パターンを説明できるのかを明らかにするために、繊維性アクチンを蛍光ファロイジンで染色して観察した。すると、筋原繊維は筋肉細胞の表層に存在するのみで、細胞内部には存在していないことが明らかになった。また、筋原繊維は前後軸に沿って走行しているが、前方から後方に向けてわずかに（後方から見て）右巻きに螺旋を巻いていくことが分かった(Fig. 2)。

興味深いことに、この筋原繊維の螺旋走行は、左右の筋肉帯の中で同一方向に巻いており、したがって、左右非対称な形質をなしていた。またマボヤ幼生の筋肉細胞においては、カタユウレイボヤ幼生の筋肉帯における筋原繊維よりも急角度で螺旋がきつく巻かれていることも分かった。

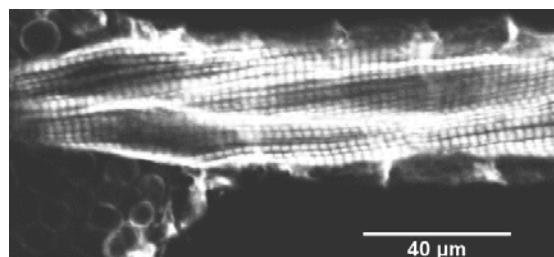


Fig. 2. Staining of actin fibers with fluorescent phalloidin reveals that *C. intestinalis* myofibrils are restricted in the cortical region of muscle cells and run along spiral paths. Anterior is left, and dorsal is up.

### (3)受容体型イオンチャネルサブユニット遺伝子の同定と単離

これまで、私たちはアセチルコリン受容体とグリシン受容体を構成するサブユニットに関して、カタユウレイボヤから遺伝子クローニングを行ってきた。本研究においてはカタユウレイボヤから得られた GABA<sub>A</sub> 受容体の主要サブユニットの遺伝子について発現の解析を行った。また、最近新たにゲノム解読が完了したマボヤからも、その幼生が、遺伝子レベル、神経回路のレベル、個体運動のレベルで比較可能な対象になると考え、アセチルコリン受容体、グリシン受容体、GABA<sub>A</sub> 受容体サブユニットの遺伝子クローニングを行った。アセチルコリン受容体サブユニットとグリシン受容体サブユニットをコードする遺伝子の数は、カタユウレイボヤでもマボヤでもそれぞれ10個と1個であり変わりがなかったが、GABA<sub>A</sub> 受容体サブユニットの数は、カタユウレイボヤでは7個であるのに対し、マボヤでは3つしか存在しないことがわかった。カタユウレイボヤの GABA<sub>A</sub> 受容体  $\alpha$ 、 $\beta$ 、および  $\pi$  サブユニットは、運動神経節のごく少数の細胞に発現しており、孵化後の幼生期では、脳神経節や表皮に散在する感覚神経細胞にも広く発現が見られることが分かった。

## 考察

### (1)筋原繊維の走行と螺旋運動

ホヤ幼生には光受容器である眼点の一つが存在し、この光受容器は、片側がメラニンを含んだ色素細胞に覆われている。受容器に入る光が、方向依存的に色素細胞に遮蔽されるという構造的な理由で、ホヤ幼生は、螺旋運動によって体軸をねじりながら推進する際、光が来る方向を感知できると考えられている。しかし、ホヤ幼生が螺旋運動を行うのはどのような仕組みによるものかは、これまで不明であった。今回の結果から、ホヤ幼生の尾部の筋肉帯では、筋原繊維が筋肉細胞の表面に限局し、左右の筋肉帯とともに後方から見て右巻きに螺旋を巻いていることが明らかになった。またマボヤ幼生においては螺旋の角度がカタユウレイボヤ幼生よりも急で、また実際に観察された螺旋運動時の体軸のねじれもマボヤ幼生のほうがカタユウレイボヤ幼生より大きかった。この結果は、筋原繊維の螺旋走行がホヤ幼生の螺旋運動の構造的基盤になっているという考えに矛盾しない。現在は、ホヤ幼生の体の左右非対称性の形成

メカニズムを攪乱することによって、この筋原繊維の螺旋走行を変更することを試みている。この実験によって生じた幼生を用いて螺旋遊泳運動が乱れるか検証し、実際に筋原繊維の螺旋走行が螺旋遊泳運動の構造基盤をなしているのか、明らかにしていく。

他方で、一つの細胞が螺旋型にねじれた極性を獲得するメカニズムは細胞生物学的にも新しく興味深い。このような特徴が細胞自律的に生じるのか、あるいは周囲の細胞からの影響を受けて確立されるのか、またどのようなシグナルによって、左右非対称に形成されるのか、今後、検証を行っていく。

## (2)受容体型イオンチャネルの機能

我々は過去の研究の結果から、ホヤ幼生において GABA<sub>A</sub> 受容体は、一続きの遊泳運動の継続時間を制限する働きがあると考えてきた。今回の GABA<sub>A</sub> 受容体サブユニット遺伝子の単離は、その機構の解明に大きく役立つと期待できる。今回 GABA<sub>A</sub> 受容体が運動神経節の細胞に発現していることが分かったが、これらの細胞への GABA による抑制性のシグナル入力が、リズム生成を行う神経回路の持続的な活動を抑える役割を担っている可能性が考えられる。また多くの感覚神経細胞を蔵している脳神経節や表皮の散在する感覚神経細胞にも GABA<sub>A</sub> 受容体が発現していた。感覚受容細胞の働きは一般に、中枢からの遠心性の入力により抑制され、これは自分自身の激しい運動時などにそれに起因する過剰な感覚器の興奮を抑制する機能があると考えられている（再帰性信号の抑制）。今回の結果はホヤ幼生の究極的に単純な神経系においても、感覚器に対する遠心性の制御機構がある可能性を示唆しており、興味深い。ホヤにおいては、脳神経節と運動神経節と表皮の感覚神経について、それぞれを形成する細胞系譜はきわめて初期に分離される。配列特異的な遺伝子発現阻害試薬を特定の細胞系譜のみに導入することによって、それぞれにおける GABA<sub>A</sub> 受容体の働きを明らかにし、これまで得られた結果に基づき考えられてきた仮説の真偽を検証していく。

アセチルコリン受容体とグリシン受容体の幼生で発現しているサブユニットについては、カタユウレイボヤとマボヤの両種で遺伝子の同定と単離ができた。カタユウレイボヤではこれらの受容体の機能をこれまでに明らかにしてきたので、マボヤにおける

機能性の検討も進めていく。カタユウレイボヤでは、アセチルコリン受容体は筋肉細胞に発現し、運動ニューロンからの興奮性の入力を受容する働きがあるとともに、運動神経節においても強く発現しており、これも運動の発現や維持にかかわっていると想定している。一方で、グルタミン酸による運動神経節への入力も運動の発現・維持に関わるというデータも得ている。アセチルコリンによる入力と、グルタミン酸による入力をどのように使い分けているかも興味深い問題である。

今回得られた研究結果は更なる取り組むべき課題を明らかにした。そして、単純な神経と筋肉のシステムをもつホヤ幼生を研究対象とすることで、“個体まるごと”の運動を支える機能の細部に関する構造的・生理的基盤を今後明らかにできる手ごたえも得られた。今後の解析によって、その全貌を明らかにしていく。

## 研究の発表

### 口頭発表

1. 西野敦雄 「海の青にも染まず漂うオタマボヤ」日本動物学会第 83 回大会、シンポジウム「数ミリ以下の動物学」、大阪大学豊中キャンパス、2012 年 9 月。
2. Atsuo Nishino “Swimming Their Way: Structural and Physiological Basis for Ascidian Larvae to Swim” at Mini-Symposium “Eco-Evo-Devo”, Kitashirakawa Campus, Kyoto University, Feb. 2014.

### 誌上発表

1. 西野敦雄 (2012) 脊索動物の遊泳運動:リズムで可変的な進行波生成のための似て非なる二つの方法. 数理解析研究所講究録 1796 「第 8 回生物数学の理論とその応用」京都大学数理解析研究所. pp. 85-92.
2. 西野敦雄 (2012) アナログかデジタルか? 滑らかな動きを生む進化. 生命誌 年刊号 vol.69-72 「遊ぶ」. JT 生命誌研究館、新曜社. pp. 161-167.