

脊索動物の遊泳運動：リズムックで可変的な進行波生成のための 似て非なる二つの方法

西野 敦雄 Atsuo Nishino

弘前大学農学生命科学部

Faculty of Agriculture and Life Science, Hirosaki University

概要

脊索動物の体制は、オタマジャクシ形態を基礎とするものであり、その遊泳運動は体幹に沿った屈曲波のリズムックな伝播によって実現される。その生理機構は、魚類において精力的に研究されてきた。しかし、その機構が進化の過程でどの段階でどのような形で成立したのか、どれほど進化的にロバストなシステムなのか、よく分かっていない。他方で、脊椎動物に最も近縁な無脊椎動物の系統に含まれるホヤ類のオタマジャクシ幼生は、脊椎動物の起源を考える上で重要な研究対象として、比較発生学的な解析が非常に深く行われてきたが、必ずしもその遊泳運動の生理機構はよく調べられてこなかった。本稿は、魚類の遊泳運動制御に関する知見を概説するとともに、ホヤ幼生の遊泳運動に関する最近の研究結果を紹介する。

1. 脊椎動物の遊泳運動制御

魚類や両生類のオタマジャクシなどの水棲脊椎動物は、体を左右に蛇行運動させて媒質を後方へ押し出し、推進する。そこでは、(1)左右交互に、(2)前から後に伝播する、(3)さまざまな強度の屈曲波が、体軸に沿って連続的に生み出されることによって、媒質中の自由な移動が達成される。この運動は、体軸の左右に連なる筋節 myotomes の、時空間的に制御された活動によって生み出されている。各筋節は基本的に電氣的に互いに絶縁されていると考えられており、したがって各筋節に対する中枢神経系からの制御は独立である。各筋節内には骨格筋繊維が収められているが、“力は弱いが何度連続収縮しても疲れにくい”赤色筋（遅筋）や、“力は強いがすぐ疲れる”白色筋（速筋）、あるいはそれらの中間タイプといった多様な筋線維のタイプが存在しており、脊髄の神経回路がそれらを精妙に制御することで、(1)～(3)の動きの速さ、強度、持続時間が決定される。このような制御が、緩やかな移動から急激な逃避行動まで、多様な行動を支える“ギア”システムを構成する[1]。

このような、脊椎動物が行う逃避運動や遊泳運動というリズムックな反復運動を支える神経回路の基本的機能は、ヤツメウナギやアフリカツメガエルのオタマジャクシ幼生、ゼブラフィッシュの幼魚、金魚、マウス胎仔などを用いて精力的に研究されてきた。その中で、魚類の遊泳運動や哺乳類の歩行といった基本運動の中枢パターン発生器 Central Pattern Generator (CPG) は、脊髄に完全に含まれていることが明らかになっている[2,3]。

上記の(1)~(3)を規定する神経回路上のロジックは、これまでの研究によって徐々に明らかにされてきた。脊髄のCPGを構成する神経回路は、運動ニューロン、その活動を正に制御する同側性の興奮性介在ニューロン、同じく負に制御する同側性および反対側性の抑

制性介在ニューロンによって構成されている(図1,2)。

(1)の左右交代性の保証は、このうち、左右間反対側の神経回路を抑制するグリシン作動性のシグナルによって担われている(図1)。さらに、(2)の屈曲波の下行伝播については、興奮性介在ニューロンによる順行性のシグナルと、抑制性介在ニューロンによる逆行性のシグナル成分が主に関与していると考えられている(図2) [4,5]。

(3)の収縮強度の可変性についても脊髄の神経回路が巧みに制御を行っている。魚類の筋節の場合、赤色筋は体の側面に局在し、いわゆる“血合い”部分を構成する。一般に、同程度の屈曲を行っている場合でも、高い運動周波数の(高速の)遊泳運動のときの方が強い力を要する。これは収縮速度の時間変化率が、筋肉が発生する力に対応することを考えると容易に理解できる。赤色の筋繊維は主に低速から中速の遊泳運動時に使用され、また

これらを支配している運動ニューロンは、細胞体が小型で軸索径も小さいという明確な傾向がある(図1)。逆に、白色筋は体軸側に存在して中から高速の遊泳運動から驚動反応を行うときに強い力を発生する役割を担う。これら白色筋繊維は一般に、大型の運動ニューロンに支配されている。これを「サイズ原理」という。小型のニューロンは一般に入力抵抗が大きく、また細胞体が小さい分、局所に生じた興奮性シナプス電流が軸索基部のスパイク発火帯に届きやすいので、同等の刺激を受けたとしても小型のニューロンは大型のニューロンよりも発火しやすい(図1)。すなわち、小型の運動ニューロンは脊髄の中で動員されやすく、赤色筋は脊髄の神経回路の活性状態が比較的低くても収縮し、脊髄の神経回路の活性状態が高いときには、大型の運動ニューロンも動員されて、白色

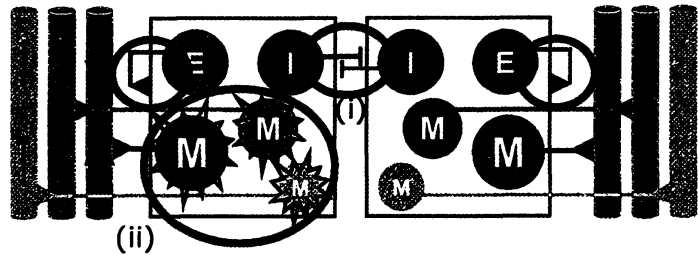


図1. 脊椎動物の遊泳運動を制御する基本神経回路。(i)で反対側の神経活動を抑制するグリシン作動性のシグナルを示す。(ii)は運動ニューロンのサイズに応じた動員のされやすさを示す。Eは同側興奮性介在ニューロン。Iは反対側抑制性の介在ニューロン。Mは様々なサイズの運動ニューロン。両側の円柱は筋繊維を示す。淡色は赤色筋。濃色は白色筋。

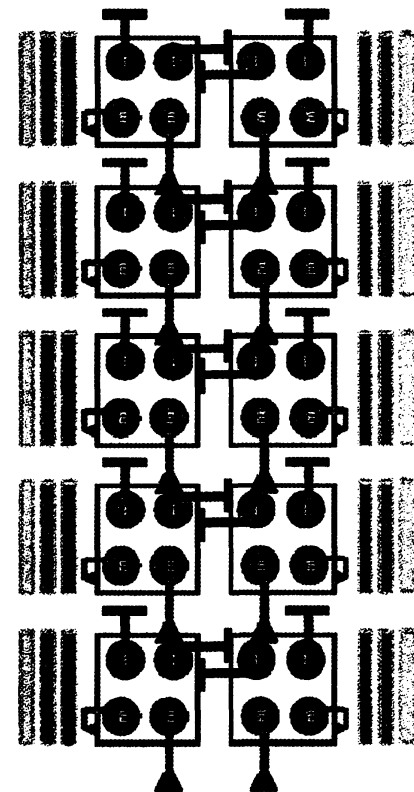


図2. 脊椎動物の遊泳運動を制御する基本神経回路。同側抑制性の介在ニューロンは前方に軸索を伸ばし、同側興奮性の介在ニューロンは後方に軸索を伸ばす。実際は、かなり遠くまで(数体節分以上)軸索を伸ばしている。

筋が大きな力を発生させる[1,6,7]。

このような複合的で洗練された筋線維の制御システムは、脊椎動物の進化にとって革新的な形質であったに違いない。しかしこの基盤的制御システムが、近縁の無脊椎動物にどこまでさかのぼることができるかについては、現在までのところほとんど分かっていない。

2. 尾索類のオタマジヤクシ形態

脊椎動物は、脊索動物門を構成する三亜門のうちの一つに含まれる。残る二亜門は、ナメクジウオの類を含む頭索動物亜門と、ホヤ、オタマボヤ、タリアの類を含む尾索動物亜門により構成されるが、近年、ゲノム情報に基づく大規模な分子系統解析により、尾索動物が、脊椎動物に最も近縁な姉妹群として確定された[8]。中でもホヤ類は、固着生の生物であり、一見、脊椎動物との類縁性を見て取るのは難しいが、その幼生期にオタマジヤクシ型の遊泳形態を示す（図3）。このオタマジヤクシ幼生は、尾部の中央に脊索、その左右に筋肉帯、背側には神経管が配置され、脊椎動物と基本体制を共有する証拠となっている。しかしながら、このような器官構成に関わらず、ホヤ幼生の細胞構成はきわめて単純である。例えばカタユウレイボヤという種の幼生では、片側の筋肉帯は18個の筋細胞が一層で構成されているのみで、本質的に分節性を欠いている。その収縮をコントロールする運動ニューロンは体幹部と尾部の境界近くにある運動神経節に4-5対存在するのみであるとされており、これらの運動ニューロンは尾部後方に向かって長い軸索を伸ばし、主に背側の筋肉細胞に入力している。他方で、神経入力を受けてい

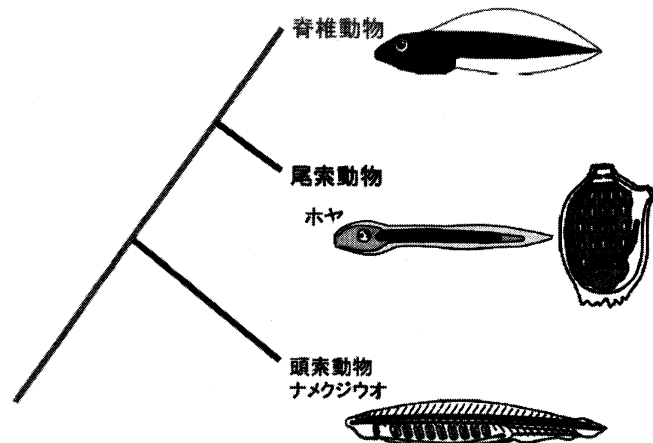


図3. 脊索動物。ホヤの成体は固着生だが、幼生はオタマジヤクシ型の体制を示す。

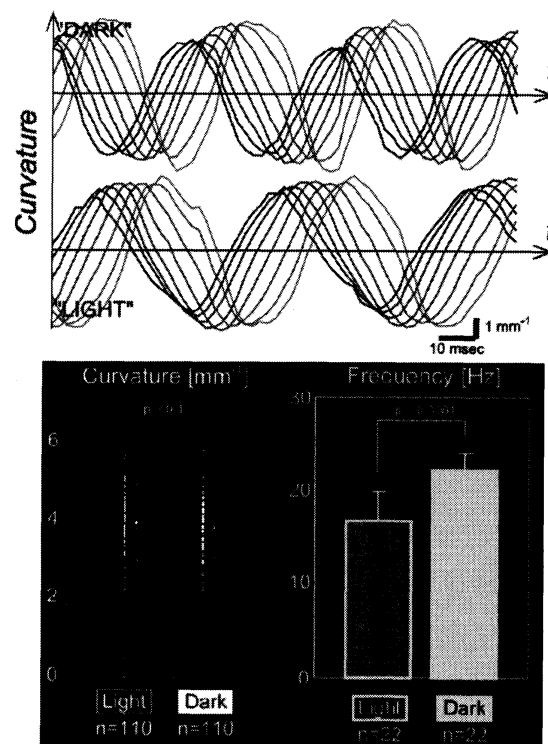


図4. カタユウレイボヤ幼生の遊泳運動。(上) 屈曲の伝播。濃淡は尾部に沿って前方から後方へ100マイクロメートルずつ離れた点における曲率の変化を示す。(下) 明/暗条件下における屈曲の大きさ(左)と運動周波数(右)。

ない腹側の筋肉細胞は、ギャップ結合を介して刺激を受け取っていると考えられている。以上のような知見が得られているが、ホヤ幼生がいったいどのようにこのような単純な運動器官で遊泳運動を行うことができるかという問題には、いまだ十分な解答が得られていない。

近年、カタユウレイボヤにおけるゲノム研究の蓄積が進み、この動物の生理学過程が分子レベルで解明される可能性が開かれた[9]。ホヤ幼生の遊泳運動に関する最近得られた知見を以下にまとめることにする[10,11]。

3. ホヤ幼生の遊泳運動

カタユウレイボヤ幼生の遊泳運動を、高速度カメラを用いて観察すると、ホヤ幼生は螺旋を描きながらではあるが、確かに魚類と同様に上記(1)~(3)の要件を果たした遊泳運動を示していた[11]。カタユウレイボヤ幼生は、明光下でおよそ 16.8 ± 3.1 Hz (average $\pm$ s.d.; $n = 22$.)の運動周波数で泳ぐ。またホヤ幼生は一般に、周囲が急激に暗くなると、運動を開始する、あるいは運動が激しくなる、という“shading response”が知られていたが、実際に幼生に見える光をカットするフィルターを用いて暗化条件を顕微鏡下でつくってやると、運動周波数が 22.3 ± 1.8 Hz ($n = 22$, $p < 0.0001$)に上昇した(図4)。このとき、屈曲の大きさの平均値は、明条件下でも暗条件下でも変わらなかったが、周波数が有意に大きくなっていることから、暗条件下でのほうが、幼生の尾の筋肉は、より大きな力を発生していることが理解される。また、暗条件下でも明条件下でも局所の屈曲の大きさは、大きくばらついていて(図4)。このばらつきによって左右の屈曲の大きさが不均衡になることが頻繁に起こり、そのとき、進行方向の変化が対応して起こっていた。これらのことは、ホヤ幼生の筋肉が収縮を行う上で、感覚入力に応じた、あるいはランダムな、強度の可変性を備えており、それは泳ぐ強さや進行方向の変化という目に見える変化を引き起こしうることを示している。

4. ホヤ幼生における収縮強度可変性の制御基盤

ホヤ幼生の筋肉は収縮の強さを変えることができる。もちろん遊泳体が媒質の中を自由に移動する上では当然備わっているべき能力といえる。しかし、その単純な筋肉細胞の構成と配置で、それがどのように可能なのか。脊椎動物の骨格筋を基礎に築かれた筋繊維収縮の制御機構は、“全か無か”の法則(悉無律)に依存したものである。魚類の遊泳に際しては、動員される運動ニューロンの数と種類、および興奮した筋繊維の機械的性質に依存して、さまざまな速さ、大きさの屈曲を体軸に沿って生み出す。しかし、電氣的につながった18個の細胞からなるホヤ幼生の筋肉帯に悉無律を当てはめれば、可変的な収縮が達成されるべくもないことは容易に想像できる。

実際に、筋肉細胞内にガラス電極を刺入して運動時の電位変化を記録すると、一周期に一回の電位変化が観察されるが、活動電位ではなくてシナプス電位様の脱分極パターンを示し、また暗条件下であるほうが明条件下よりも、大きな電位変化を行っていた(図5)。このことは、活動電位を発しない、“閾値以下”の細胞内電位変化であっても収縮が起こること、光条件に応じて筋肉への入力(おそらく量)が変化し、筋肉はそれに応じて反応量を変えうることを示唆している。

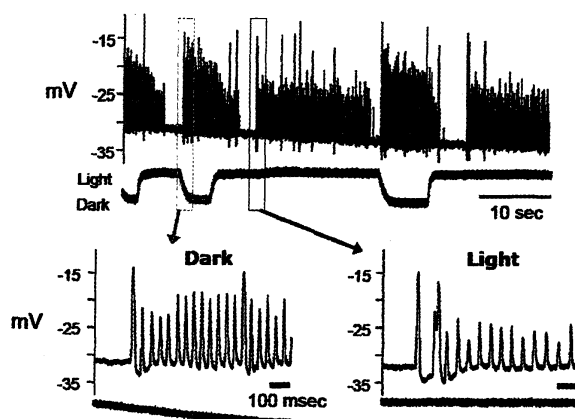


図5. カタウレイボヤ幼生筋の細胞内電位変化。暗刺激で運動開始させたときと、明条件のまま運動開始させたときでは、暗条件下のほうが周波数ばかりでなく脱分極のレベルが大きい。

過去の生理学研究において、ホヤ幼生の神経筋シナプスにおける興奮性伝達は、脊椎動物の神経筋シナプス同様にアセチルコリンにより担われていることが示されていた[12]。そこで我々はホヤ幼生の筋肉で発現しているアセチルコリン受容体チャネルのクローニングを行った[11]。要件を満たした3種類のアセチルコリン受容体サブユニットの合成 mRNA をアフリカツメガエル卵に注入すると、確かにアセチルコリンに濃度依存的に反応する電流が観察される。この形成されたイオンチャネルの性質をさらに調べると、脊椎動物の筋肉型アセチルコリン受容体と大きく異なる二つの性質、すなわち高カルシウム透過性および内向き整流性を示した(図6左)。

この二つの性質は、カタウレイボヤ幼生が可変的な屈曲強度を作る上で重要だろうか。そこでまず、ホヤからクローニングしたアセチルコリン受容体イオンチャネルのポア部分に変異を導入したところ、脊椎動物の筋肉型の配列に似せる変異を導入したときに、著しく内向き整流性が解除され、またカルシウム透過性もほぼ完全に失われることが分かった(図6右)。

ではこの変異体で、ホヤ幼生の筋肉のアセチルコリン受容体を挿げ替えてしまうとどうなるだろうか。内在性の筋肉型アセチルコリン受容体の発現を、配列特異的に翻訳抑制を行なうことができる Morpholino

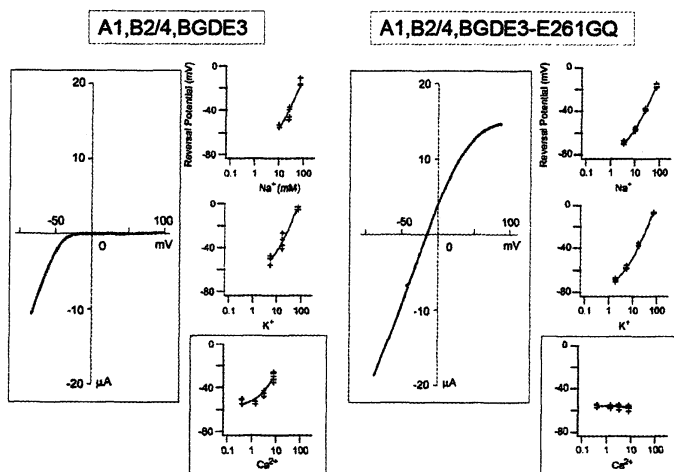


図6. カタウレイボヤ幼生筋のアセチルコリン受容体チャネルの電気特性。(左): アフリカツメガエル卵母細胞に発現した野生型チャネルの電流-電圧曲線(左)。顕著な内向き整流性が見られる。また高カルシウム透過性を示した(下)。(右): 変異型チャネルの電流-電圧曲線(左)。カルシウム透過性を失っている(下)。

Antisense Oligo (以下 MO ; Genetool 社)を用いてノックダウンした上で、同時に野生型ないし変異体型のアセチルコリン受容体の合成 mRNA を導入する実験を行った。結果は以下のようになった。(i) MO のみを注入した場合、筋収縮が見られなくなり、動かなくなった。(ii) MO と共に野生型のアセチルコリン受容体の合成 mRNA (MO による障害を受けないように改変を加えてある)を注入し

た場合、遊泳運動はほぼ完全に回復した。このことは、MO が特異的な障害を行っており、想定していないターゲットの抑制により遊泳運動が不全になったのではないことを保証する。(iii) MO と変異型のアセチルコリン受容体の合成 mRNA を共に導入すると、運動は起こるものの、遊泳パターンは異常だった。このとき、ほとんどの屈曲は微弱になる一方、まれに強い収縮が起こるという特徴的なパターンを示した (図 7)。

この結果は、ホヤ幼生の筋肉の収縮が、脊椎動物の骨格筋に類似の“全か無か”の過程に近い状況になったと解釈される。脊椎動物の骨格筋の場合は、筋小胞体からの Ca^{2+} 放出のトリガーとなる膜電位依存的 Ca チャンネルの開口が、膜電位依存的 Na チャンネルによる活動電位の発火に依存するシステムにより、悉無的に保証されている。すなわち、アセチルコリン受容体の活性化が Na^+ 性の活動電位の閾値に届くものであれば収縮し、達しなければアセチルコリン受容体が低カルシウム透過性であることもあり、収縮は起こらない。対して、ホヤの幼生筋にはこれまでのところ膜電位依存性の Na チャンネルが発現しているという証拠はなく、上記の結果は、アセチルコリン受容体と膜電位依存性 Ca チャンネルを通る Ca^{2+} が加算的に、筋小胞体からのカルシウム放出を促すシステムを構成していることを示唆する。このシステムでは、シナプス電流そのものと、それが引き起こす膜電位依存性カルシウムチャンネルの部分的な活性化が、筋収縮の入力量依存性の基盤となる (図 8)。もし上記の実験のように、アセチルコリン受容体チャ

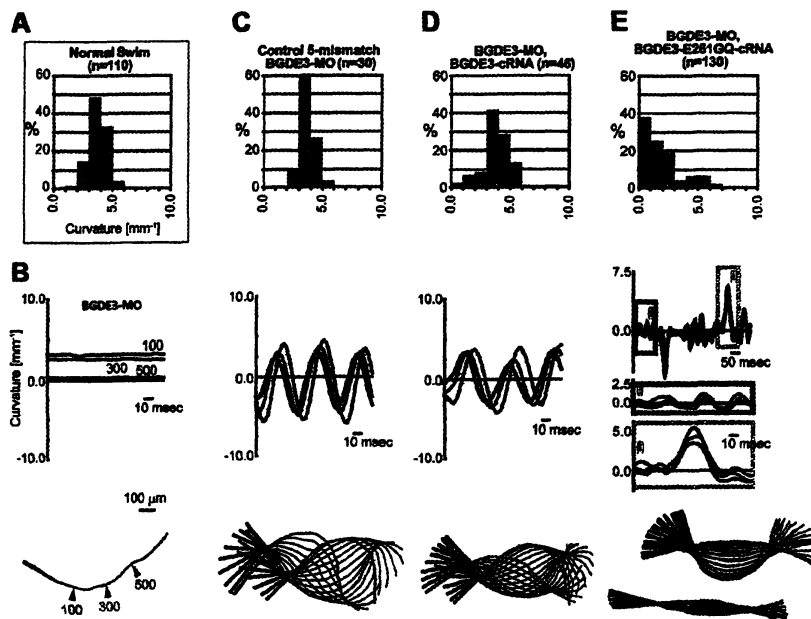


図7. 筋肉型アセチルコリン受容体チャンネルの改変による運動パターンの変更。(A)通常の遊泳運動時の屈曲の大きさの分布。尾部の付け根から 300 ミクロンの位置で計測した。(B)MO 注入により、内在性のアセチルコリン受容体の発現が抑制されると、泳がない。(C)配列特異性がない MO では遊泳運動は乱れない。(D)特異的 MO と共に、野生型アセチルコリン受容体の合成 mRNA を導入すると、遊泳運動は回復する。(E)特異的 MO と共に、変異型アセチルコリン受容体の合成 mRNA を導入すると、異常な遊泳運動が現れる。強い屈曲も見られるが、大半は微弱なものである。

ネルの Ca^{2+} 透過性がなくなると、細胞外からの Ca^{2+} 透過のルートは膜電位依存性 Ca チャンネルに限定される。そのカルシウム透過は膜電位依存的であるがゆえに、一定度の脱分極刺激がなければ引き起こされない。ゆえに、変異型のアセチルコリン受容体では、悉無的な筋収縮パターンになったと考えられる。また、内向き整流性がアセチルコリン受容体に備わっていなければ、強いアセチルコリンによって強い脱分極が引き起こされた場合、アセチルコリン受容体チャンネルには外向きの電流が流れることになり、それはむしろ Ca チャンネルの活性化を妨げる効果を引き起こすと考えられる (図 8)。

このように、ホヤ幼生筋のアセチルコリン受容体が持つ二つの電氣的性質は、入力量依存的

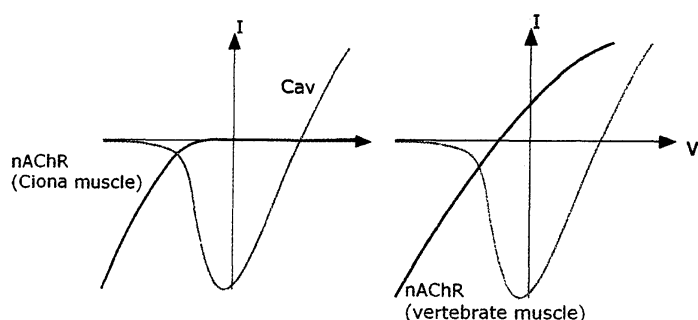


図8. アセチルコリン受容体(nAChR)と膜電位依存性カルシウムチャンネル(Cav)の電流電圧曲線の関係。(左)ホヤ筋肉型アセチルコリン受容体は内向き整流性を備える。nAChRの活性化がCavを刺激する。nAChRとCavを通る Ca^{2+} が加算的に、入力量依存的な反応を引き起こす。(右)ホヤ変異型/脊椎動物筋肉型アセチルコリン受容体は内向き整流性がない。強い活性化を受けると、むしろCavの活性化を抑制する。また、nAChRの Ca^{2+} 透過性が少ないことで、反応はCav依存的、すなわち悉無的になる。

な Ca シグナルの伝達、そして膜電位依存性 Ca チャンネルへのロスのないシグナルのリレーを可能にしている。このアセチルコリン受容体チャンネルと膜電位依存性 Ca チャンネルの二つによって、入力量に依存したカルシウム応答が広い範囲で可能な擬線形な応答ユニットを形成し、ホヤ幼生の遊泳運動に可変性を付与していると考えられる。

5. ホヤ幼生における左右交代性と屈曲の前後伝播の機構

以上のように、ホヤ幼生の自由な遊泳運動を規定する要件の(3)を保証する機構の一端は示された。しかし、(1)と(2)の要件については、上記の結果はその必要条件とはなりえても本質的な機構とはなりえない。

現在のところ、この問題に関して我々は、グリシン受容体を介したシグナルに注目して研究を進めている。上記のように脊椎動物ではグリシンを介した脊髄レベルでの反對方抑制シグナルが左右交代性の基盤となっている。カタユレイボヤでも、グリシン受容体に対する MO 処理によって、幼生の遊泳運動の左右交代性は著しく攪乱された[10]。グリシン受容体遺伝子の発現を見ると、運動ニューロンに発現をしていたことから、どこかにグリシン作動性介在ニューロンの交連線維が存在し (例えば[13]に報告があるものなど)、それが反對方の運動ニューロンを抑制するという神経回路の存在を示唆する。またさらに興味深いことに、カタユレイボヤ幼生では、筋肉帯の前半部にもグリシン受容体遺伝子の発現が観察された[10]。そしてグリシン受容体の MO 注入を行った幼生では、確かに前後の屈曲の伝播も抑制されているように観察された。つまりはグリシン受容体を介した抑制性の神経伝達は、(1)と(2)の両方の成立に本質

的に関わっているかもしれない、それぞれはその神経と筋肉に発現しているものによって担われている可能性がある。これまで節足動物や線形動物では、興奮性と抑制性の二重支配による筋肉の制御（グルタミン酸ないしアセチルコリンと GABA による）は一般的なものとして知られていたが、脊椎動物では知られていない。もし筋肉に発現するグリシン受容体が本質的な機能をはたしていれば、脊椎動物型の遊泳運動を支える似て非なる、それでいて新しい、筋肉の二重支配の機構の存在を明らかにすることになる。

謝辞 本稿の元になる研究は、大阪大学医学研究科の岡村康司教授、お茶の水女子大学の馬場昭次名誉教授、ナポリ臨海実験所の Euan R. Brown 博士、Stefania Piscopo 博士との共同で行われた。また、ここに述べられた知識を得るにあたって、生理学研究所の東島眞一博士には多くのことをご教示いただいた。

参考文献

- [1] Jayne BC, Lauder GV (1994) *J Comp Physiol A* 175:123-131.
- [2] Cangiano L, Grillner S (2005) *J Neurosci* 25: 923-935.
- [3] Nishimaru H, Kudo N (2000) *Brain Res Bull* 53: 661-669.
- [4] Higashijima S, Masino MA, Mandel G, Fetcho JR (2004) *J Neurosci* 24: 5827-5839.
- [5] Kimura Y, Okamura Y, Higashijima S (2006) *J Neurosci* 26: 5684-5697.
- [6] Henneman E, Somjen G, Carpenter DO (1965) *J Neurophysiol* 28: 560-580.
- [7] Cope TC, Sokoloff AJ (1999) *J Physiol (Paris)* 93: 81-85.
- [8] Delsuc F, Brinkmann H, Chourrout D, Philippe H (2006) *Nature* 439:965-968.
- [9] Okamura Y, Nishino A, Murata Y, Nakajo K, et al. (2005) *Physiol Genomics* 22:269-282.
- [10] Nishino A, Piscopo S, Okamura Y, Brown ER (2010) *BMC Neurosci* 11: no.6.
- [11] Nishino A, Baba S, Okamura Y (2011) *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 2599-2604.
- [12] Ohmori H, Sasaki S (1977) *J Physiol* 269: 221-254.
- [13] Horie T, Nakagawa M, Sasakura Y, Kusakabe TG, Tsuda M (2010) *Zool Sci* 27: 181-190.