

■原 著■

## 両生類アフリカツメガエルの心臓の形態形成における Actomyosin の役割

秋永 薫<sup>1,3</sup> 茂木和枝<sup>1</sup> 安積良隆<sup>1,2</sup> 豊泉龍児<sup>1,2</sup>

The Role of Actomyosin Contraction Force in Heart Morphogenesis of *Xenopus* Tadpole Larvae

Kaoru Akinaga<sup>1,3</sup>, Kazue Mogi<sup>1</sup>, Yoshitaka Azumi<sup>1,2</sup> and Ryuji Toyozumi<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>2</sup> Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>3</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: akky0323biolaboratory@gmail.com

**Abstract:** Many researchers have long been investigating the mechanism of actomyosin contraction. Actomyosin is an interesting macromolecular complex, which enables energy conversion that generates mechanical force very efficiently at a temperature compatible for animals. Vertebrate embryos gradually develop striated muscles, and the embryos can make various body movements by muscular contraction as early as at the late embryonic stage before hatching. In lower vertebrates, pulsation of the heart is also observable in late stage embryos. Here, we examined whether active contraction of actomyosin is necessary for normal morphogenesis of the embryonic/larval heart.

*Xenopus* early larvae are very transparent, so they are suitable to observe the heart morphology and its contractile activities non-invasively. From such a viewpoint, the *Xenopus* larva is an ideal model organism. Thus, we first administered Blebbistatin, an inhibitor of actomyosin contraction, to *Xenopus* late stage embryos, and reared them until the early larval stage.

As the results, hypoplasia of heart morphogenesis was frequently induced. As a next step, we intended to perform a comparable experiment; we administered Omecamtiv, a cardiotonic reagent, to potentiate the actomyosin contraction of the developing heart. Unexpectedly, Omecamtiv also induced a dwarf heart at a high frequency. Immunostaining using the antibody for muscles revealed that both Blebbistatin and Omecamtiv caused changes of fine structures of the heart. Based on these complementary experiments, we concluded that moderate contraction of actomyosin is essential for the normal asymmetric morphogenesis of the heart. Finally we report that Phenylhydrazine significantly induced hyperplasia of the heart, and fasciculation of the ventricular muscles was disordered after Phenylhydrazine treatment.

**Keywords:** heart morphogenesis, actomyosin contraction, tadpole larva, *Xenopus laevis*

### 序論

動物は大きく分けて2種類のモーター蛋白質系をもつ。微小管と相互作用する kinesin・dynein 系と、actin と myosin の相互作用による actomyosin 系の二つである。これらのモーター蛋白質は ATPase をコードする領域を機能ドメインとして有しており、ATP を加水分解する前後でそのエネルギーによって

著しい構造転換を生じ、それぞれが相互作用するフィラメント上で運動を行う。本研究が注目する actin-myosin の相互作用による actomyosin 系は、細胞分裂や筋収縮などの生命現象に直接的に関与しているため、その研究は非常に活発に行われてきた。actin は球状 actin (G-actin) がサブユニットとして複数

鎖状に結合することで繊維状 actin (F-actin) を形成する。また、哺乳類と鳥類の actin では 6 種類のアイソフォームが存在し、その内の 4 種類は骨格筋、心筋、平滑筋にそれぞれ発現していることが知られている<sup>1)</sup>。actin と相互作用する myosin は重鎖と軽鎖の 2 種類のサブユニットにより構成される蛋白質複合体であり、myosin が持つ ATP 結合部位で ATP を加水分解して得た化学エネルギーを首振り運動による運動エネルギーに変換して actin 上を移動することで、筋肉では筋収縮が生じる。myosin は多数の種類が存在し、大きな蛋白質ファミリーを形成している<sup>2)</sup>。また、myosin ファミリーは旧口動物と新口動物の間でも広く保存されている。例えば、節足動物のモデル生物であるキイロシヨウジョウバエ *Drosophila melanogaster* は 3 種類の myosin I 遺伝子を持ち、新口動物のモデル生物であるアフリカツメガエル *Xenopus laevis* は 7 種類の myosin I 遺伝子を持っている<sup>3)</sup>。

本研究は、両生類アフリカツメガエルの心臓における形態形成を研究テーマとし、そこに actin と myosin の複合体である actomyosin 系が積極的に関与するとの作業仮説をもとに、薬理的手法および免疫染色法により研究を行った。脊椎動物の胚期の心臓の血流は頭側から見て時計回りに流れる。心臓は原始心筒とよばれる一本の管状構造が捩じれることでルーピングし、形態形成を行う。しかし、この原始心筒がどのような要因で捩じれるのか、細胞力学的なプロセスはよく分かっていない。我々は、原始心筒の捩じれについて、遺伝的な制御に基づいて組織細胞群が方向性を保って収縮し、各細胞の収縮の連携が細胞間で厳密にコントロールされたアウトプットとして捩じれるのではないかと予想している。生体内で力学的な力を発生させる代表的な器官として筋肉が挙げられる。筋肉を構成する筋線維は myosin フィラメントと actin フィラメントの相互作用により力学的な力を発生させる。actin と myosin の挙動は *in vitro* での実験や細胞レベルでの研究が多く、組織・器官レベルでの研究は少ない<sup>4)</sup>。また、胚期や幼生期の未熟な筋性組織において、細胞骨格の構成因子がどのようにその形態形成に関与し、成熟していくのかは不明な点が多い<sup>5)</sup>。そのため、*in vivo* および wholemount での、actomyosin 系の挙動や形態形成への関与を実験発生学的に研究することは非常に意義深いと考えられる。心臓は収縮性器官としての機能を果たすために心筋や平滑筋を豊富に含んでおり、これらの筋肉を構成する actomyosin も当然のことながら minor isoform を含めて多分に含まれ、組織内でシステマティックに構造化されてい

る。そのため、胚発生における心臓の形態形成時のルーピングに actomyosin 系の収縮が関与していることが予想される。

本研究を行うにあたり、アフリカツメガエルを実験動物として選択した。アフリカツメガエルは体外受精により受精卵を得られるため、胚の初期発生から実験処理を行い、長期に亘り経過観察が出来ることが利点として挙げられる。また、ツメガエル幼生を腹側から観察した時に黒色素胞が少ないため、心臓を非侵襲的に観察できることが研究を行う上での利点として挙げられる。アフリカツメガエルの心臓は左右非対称な形態形成を胚発生の途中から行い、脊椎動物一般の心臓で見られる遺伝的にコントロールされた左右性を示す。そのため、研究で得られた知見は脊椎動物の心臓の形態形成にも普遍的に適用できる可能性がある。上述のように、アフリカツメガエル幼生の透明度を活用することで、心臓のルーピングに関する研究を行う上でモデル生物として最適である。そのため、本研究ではアフリカツメガエル胚を用いて心臓の形態形成における actomyosin 系の役割を研究することにした。

次に心臓の形態形成について述べる。心臓は心筋の絶え間なく律動的な収縮によって血液を全身に送ることで、身体の随所の組織細胞に栄養や酸素を供給する。心臓は予定心臓中胚葉から分化する。初めに胚の前方左右両側の心臓形成予定領域から造心中胚葉が分化し、次いで心内膜原基が形成され、これら左右一対の原基が胚の正中に移動する。その後、左右両原基は正中で融合し、一本の原始心筒を形成する。この原始心筒が種ごとに遺伝的に決まった向きにルーピングすることにより、心臓が正常に形成される。

心臓のルーピングに関する研究の多くはニワトリやマウスの胚を用いて行われている。その一つの例として *hand* とよばれる遺伝子がある。マウスの心臓において basic helix-loop-helix (bHLH) Factor 構造をコードするドメインを持つ *ehand* と *dhand* が原始心筒で局所的に発現することが発見され、マウスの心臓のルーピングに *ehand* が関与していることが示唆された<sup>6)</sup>。その後ニワトリの心臓においても、*ehand* と *dhand* が心臓のルーピングに関与していることが分かり、これらの遺伝子をノックアウトすると心臓のルーピング不全が生じることも分かった。また、この 2 種類の *hand* 遺伝子は心室形成にも関与しており、*dhand* (*hand2*) は左右両方の心室形成に、*ehand* (*hand1*) は左心室の形成のみに、それぞれ関わっていることが明らかになった<sup>7)</sup>。さらに、心臓のルーピングに特定の蛋白質が局所的に発現す

ることに関わっているとの報告が散発的になされている。心臓のルーピングにおいて、myosin II の関与が報告されている<sup>8)</sup>。Flectin と呼ばれる myosin 様蛋白質はマウスの原始心筒のルーピング中に局所的に発現していることが免疫染色法により分かり、心臓のルーピングに関与していることが示唆された<sup>9)</sup>。また、この Flectin が左右非対称性の確立に関与する *pitx2* の下流で予定心臓領域で発現していることがニワトリ胚で報告されている<sup>10)</sup>。その後、この Flectin が非筋 myosin II 蛋白質であることが示され、ニワトリ胚やマウス胚を用いた実験から、哺乳類の心臓のルーピングに actomyosin 系などの細胞骨格分子が必要であるとの方向性を示唆したことに、Linask ら (2002) のグループの研究の意義がある。さらに、心臓のルーピングの方向は脊椎動物で保存されており、ゼブラフィッシュやニワトリの心臓は腹側から見て右巻きを示す。この 2 種の動物種の心臓のルーピングにおいて、BMP4 シグナルの下流経路である *Prrx1* が原始心筒の右側で発現することで BMP シグナル依存的に心筒が右巻きにルーピングすることが示されている。同様の報告がマウス胚でもなされているので、心臓のルーピングの方向決定に関与するシグナル経路が脊椎動物の間で進化的に保存されていることが示唆されている<sup>11)</sup>。

myosin ファミリーに属する *myosin I* が腸管および雄性生殖器の左右非対称性の確立に関与していることが知られている。ショウジョウバエは 3 種類の *myosin I* を持ち、その中の一種である *Myo31DF* が後腸 (背側から見たときに右に曲がる) の左右非対称性の確立に関与していることが、左右性の逆位を示す突然変異体の解析から明らかにされた<sup>12)</sup>。また、アフリカツメガエル胚においては、内臓の左右非対称性に *myosin I* が関与していることが示された<sup>13)</sup>。従って、前口動物と後口動物の双方にまたがって、内臓の左右非対称性の確立には *myosin I* が関与することが進化的に保存されている可能性が考えられる。

本研究で用いたアフリカツメガエルの心臓の形態形成は、非常によく観察されている。Kolker et al. (2000) の研究によると、アフリカツメガエル胚 / 幼生の心臓形成は、st. 27 (受精後 31 時間) で心臓原基が頭部側で狭くなる三角州状の形態を示す<sup>14)</sup>。st. 31 (受精後 38 時間) で、この三角州状の心臓形態は尾部側の領域が徐々に狭くなる。st. 33/34 (受精後 42 時間) で心臓は管が長軸に対して雑巾絞りのように捩じれ始め、st. 35 (受精後 50 時間) で遂に S 字状の形態になる。st. 41 (受精後 76 時間) から心筋が心室に密集し始める。st. 46 (受精後 106 時間) で心房が形成され、腹側から観察した時に心室と流出

路が見られる。

心臓の形態形成で特徴的な点は、一本の管構造が捩じれる形で管全体が蛇行しルーピングすることである。これらのルーピングに関与する遺伝子や機構は断片的にわかってきているが、組織細胞個々の形態やその相互作用の位置関係を加味した上で器官のルーピングが理解されているわけではなく、その機構には不明な点が多い。この器官のルーピングが着実に実行されるにあたり、遺伝的な発生プログラムの支配下で何らかの力学的な力が関与していることが予想される。心臓には心筋が豊富に含まれていることが自明のこととして扱われているが、我々は左右非対称性発生の一種の調節因子として心筋が機能しているのではないかと考えた。本研究では、その作業仮説を証明する手段として、心臓がループ形成する直前の発生段階で actomyosin の相互作用を調節する薬剤を投与することを出発点として実験研究を行った。

本研究では主に筋肉関連マーカーを抗原とする抗体を用いた免疫染色法と、3 種類の薬剤を用いた浸漬処理を主な方法として研究を行った。ツメガエル胚・幼生は体外発生なので、薬剤への浸漬による投与から洗浄まで、一定の発生段階の間だけに作用させることが出来る。薬剤実験の最初には、actomyosin を構成する myosin の機能を阻害した場合に心臓への影響を調べた。myosin の阻害剤として、Blebbistatin と呼ばれる非筋 myosin II ATPase 阻害剤を用いた。Blebbistatin は myosin II の ATPase によって生産された燐酸の放出を抑制することで myosin II の機能を阻害する<sup>15)</sup>。この Blebbistatin は細胞生物学の分野でよく用いられる薬剤であり、例えば、細胞のストレスファイバーの形成の阻害に用いられる。本研究の研究目的に適い、なおかつよく特徴付けられてその作用機序が詳細に解明されている利点があることから、myosin II の阻害剤として Blebbistatin を使用した<sup>16)</sup>。Blebbistatin を投与した実験群のツメガエル幼生では、心臓の低形成を示した。この観察結果をふまえて、次に myosin II の機能を逆に促進 (強縮) した場合にツメガエルの心臓の形態への影響を調べたいと考えた。myosin II の促進剤として Omecamtiv mecarbil を本研究で使用した。この薬剤は心筋 myosin II ATPase 促進剤であり、myosin II で生産されたリン酸の放出を促進する<sup>17)</sup>。つまり、Omecamtiv は効果として Blebbistatin と対極に位置しているため、Blebbistatin の実験結果と対比することができると考え、この薬剤を本研究で使用した。意外にも、myosin II の機能を促進した場合にも myosin を阻害した場合に似た心臓の低形

成を示した。これら2種類の、分子レベルでは相反する作用を示す薬剤を用いた研究により心臓の低形成がみられ、心筋の凝集がみられたことから、心筋の適切な収縮が心臓の正常な形態形成に必要であることが示唆された。そこで3番目に、心臓の低形成とは対照的に過形成を生じさせることでの心筋に及ぼす影響を調査した。心臓の過形成を誘起する薬剤として Phenylhydrazine hydrochloride を使用した。この薬剤はゼブラフィッシュの心臓において過形成を誘起することが先行研究により報告されており<sup>18)</sup>、両生類のアフリカツメガエルでも心臓の過形成を誘起できると予想して、この薬剤を本研究で使用した。Phenylhydrazine 処理により、心室および将来動脈円錐に分化する流出路の過形成が生じ、対照群に比べて実験群の心筋では束化が観察でき、心臓の正常な形態形成には適切な心筋の収縮が必要であることが示唆された。

これらの実験結果をもとに、心臓の形態形成における actomyosin 系の役割について考察する。さらに、器官の左右非対称性の確立における actomyosin 系の役割についても考察し、今後の本分野の展望を述べる。

## 材料と方法

### 実験動物

#### アフリカツメガエル *Xenopus laevis*

南～中央アフリカ原産のカエルである。生殖腺刺激ホルモン注射により通年で卵を得ることができる。体外受精で受精卵を得ることができ、発生段階の初期から観察できる。本研究における利点として、初期のツメガエル幼生の胸部腹側では黒色素が少なく非侵襲的に心臓を観察することができる点が挙げられる。

### 使用薬剤

#### (±)-Blebbistatin (1,2,3,3a-tetrahydro-3a-hydroxy-6-methyl-1-phenyl-4H-pyrrolo[2,3-b]quinolin-4-one)

分子式  $C_{18}H_{16}N_2O_2$ , 分子量 292.3

非筋 myosin II ATPase 阻害剤である。actin 線維と myosin 線維の間で生じる収縮において、myosin 頭部にある ATPase に ATP が結合し、分解され、ADP と無機リン酸 Pi を放出することで機械的な力が生じる。Blebbistatin はこの相互作用において ADP の放出を阻害することにより、actin および myosin 線維の収縮を阻害する<sup>15)</sup>。光学異性体を持ち、(+)-Blebbistatin および (-)-Blebbistatin に分けられる<sup>15)</sup>。

#### Omecamtiv mecarbil(CK-1827452) (Methyl(2-fluoro-3-(3-(6-methylpyridin-3-yl)ureido)-benzyl)piperazine-1-carboxylate)

分子式  $C_{20}H_{24}FN_5O_3$ , 分子量 401.43

心筋 myosin II ATPase 促進剤である。Blebbistatin とは対照的に、actin と myosin 線維による相互作用において ADP の放出を促進する作用を持つ<sup>17)</sup>。新たな心不全に対する治療薬として新規に合成された低分子化合物である。

#### Phenylhydrazine hydrochloride

#### (Monophenylhydrazine, Hydrazinobenzene)

分子式  $C_6H_5NHNH_2 \cdot HCl$ , 分子量 144.60

ゼブラフィッシュの心臓においてこの薬剤で処理することにより心臓の過形成が生じることが報告されている<sup>18)</sup>。マウスにおいて貧血を誘起する薬理作用が報告されている<sup>19)</sup>。血液中のヘモグロビンと結合することが分かっている<sup>20)</sup>。

### 受精卵の採取とゼリー層の除去

アフリカツメガエルの雌雄成体それぞれに、ヒト絨毛性 gonadotropin を雌 500unit, 雄 300unit ずつ注射した。注射翌日に得られた受精卵を採取した。受精卵は腰高シャーレに入れ、チオグリコール酸 (pH=8.6) を加えた。数分間攪拌し、ゼリー層を除去した。ゼリー層が剥離/溶解後ただちに、人工淡水として用いられる 10% Steinberg 氏液を用いてチオグリコール酸を洗い流し、受精卵を 10% Steinberg 氏液を入れたシャーレやタッパーなどに入れて目的の発生段階になるまで 16～24°C で飼育した。発生段階の同定には、Nieuwkoop and Faber (1967) の発生段階表を用いた<sup>21)</sup>。

### (±)-blebbistatin の浸漬処理

Myosin II 阻害剤である Blebbistatin をアフリカツメガエルの後期胚に投与した<sup>16)</sup>。発生段階 st. 38-39 の後期胚を 0.05, 0.1 μM (±)-blebbistatin/0.1% DMSO-10% Steinberg 氏液を 1 ml 入れた Organ Culture Dish に投入し、湿箱に入れたのちに 60 rpm で振盪した。対照群としては、0.1% DMSO/ 10% Steinberg 氏液に浸漬する同腹胚を用意した。6時間後、10% Steinberg 氏液で (±)-blebbistatin 処理胚を洗浄し、10% Steinberg 氏液を 2 ml 入れた 24 穴プレートに 1 個体ずつ投入し、24°C の恒温器で飼育した。対照群の発生段階が st. 46 に到達した段階で実体顕微鏡を用いて観察を行い、形態のスコアをつけた。一部の実験群と対照群の胚と幼生は動画を撮影した。

### Blebbistatin の各光学異性体への浸漬処理

発生段階 st. 38-39 のアフリカツメガエル後期胚に 0.05, 0.1  $\mu\text{M}$  R-(+)-Blebbistatin/ 0.1% DMSO-10% Steinberg 氏液 または 0.05, 0.1  $\mu\text{M}$  S-(-)-Blebbistatin/ 0.1% DMSO-10% Steinberg 氏液を 6 時間の浸漬処理で投与した。その溶液を 1 ml 入れた Organ Culture Dish に胚を投入し、湿箱に入れたのちに 60 rpm で振盪した。対照群としては、同量の 0.1% DMSO/ 10% Steinberg 氏液を用いた。6 時間後、10% Steinberg 氏液で処理胚を洗浄し、10% Steinberg 氏液を 2 ml 入れた 24 穴プレートに 1 個体ずつ投入し、24°C の恒温器で飼育した。対照群の発生段階が st. 46 に到達した段階で実体顕微鏡を用いて観察を行い、形態のスコアをつけた。

### Omecamtiv mecarbil (CK-1827452) への浸漬処理

発生段階 st. 26-27 のアフリカツメガエル尾芽胚を 0.1 mM Omecamtiv/0.1% DMSO-10% Steinberg 氏液を 1 ml 入れた Organ Culture Dish に投入し、湿箱に入れたのちに 60 rpm で振盪する形で投与した。対照群は 0.1% DMSO/10% Steinberg 氏液に投入した。24 時間後、10% Steinberg 氏液で処理胚を洗浄し、10% Steinberg 氏液を 2 ml 入れた 24 穴プレートに 1 個体ずつ投入し、24°C の恒温器で飼育した。対照群の発生段階が st. 46 に到達した段階で実体顕微鏡を用いて観察を行い、形態のスコアをつけた。

### 心拍の測定

心拍は (±)-blebbistatin あるいは Omecamtiv への浸漬処理終了直後と 10% Steinberg 氏液で洗浄後 20 時間または 24 時間の時点で測定した。心拍の測定は 30 秒間の心拍数をカウンターにより計測した。1 個体につき 3 回計測した。統計学的な有意差の有無の判定は Welch の *t* 検定により判定した。

### 行動の観察

(±)-Blebbistatin および Omecamtiv の処理群は、それぞれ 6 時間または 24 時間の浸漬後に Organ Culture Dish 中の処理胚を、顕微鏡下でヘアループにより接触刺激を与えた。その間、動画撮影を行った。

### Phenylhydrazine hydrochloride への浸漬処理

発生段階 st. 35-36 のアフリカツメガエル尾芽胚を 10  $\mu\text{M}$  Phenylhydrazine/10% Steinberg 氏液に投入し、24°C に設定した恒温器で飼育した。薬剤については、1 穴に 2 ml 入れた多穴プレートを用いて浸漬を行った。対照群の発生段階が st. 46 に到達した段

階で、対照群および実験群を顕微鏡下で観察した。

### 心臓の免疫染色

心臓の心筋の actin 線維の配向を観察する目的で免疫染色を行った。一次抗体として心筋と骨格筋を認識する Anti-Myosin, Heavy Chain, Mouse-Monoclonal 抗体 (MF-20 抗体: R&D SYSTEMS 社製) を用いた。二次抗体として Alexa Fluor 488-conjugated AffiniPure® Fab Fragment Goat Anti-Mouse IgG(H+L) (ThermoFisher 社製) を使用した。

主に st. 38-46 幼生期の免疫染色用サンプルを、4% パラホルムアルデヒド/PBS(-) により 1 時間 30 分以上、概ね 2 時間まで固定した後に 100% メタノールに置換、5 分間の振盪を 2 回行った。PBS(-) は、Phosphate-buffered Saline の略で、ここでは  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  を含まない pH 7.2-7.4 に pH を調整したものをを用いた。次に、75%、50%、25% メタノール/PBST の組成のメタノールの下降系列を用いて各 5 分間の振盪を行い、サンプルを水和した。PBST は、Tween20 を最終濃度 0.1% (V/V) 含む PBS である。その後、PBST へ置換し 5 分間の振盪を 2 回行った。PBST を捨て、3% Blocking reagent/PBST 400  $\mu\text{l}$  に置換し、室温で最低 1 時間静置した。1 時間のインキュベート後、Blocking/PBST を捨て、一次抗体を含んだ 150  $\mu\text{l}$  の 3% Blocking Reagent/PBST を加えて、4°C の冷蔵庫で 1 晩または 2 晩反応させた。その後、PBST による 20 分間の試料の洗浄を 5 回を行い、再び 400  $\mu\text{l}$  の 3% Blocking reagent/PBST に置換し、室温で 1 時間静置した。続いて、二次抗体を含んだ 150  $\mu\text{l}$  の Blocking Reagent/PBST に置換し、4°C の冷蔵庫で 1 晩反応させた。その後、PBST による試料の 20 分間の洗浄を室温で 5 回を行い、PBS による 5 分間の洗浄を 2 回を行い、蛍光実体顕微鏡 (SZX16, Olympus 社製)、培養倒立蛍光顕微鏡 (IX-73, Olympus 社製) および共焦点レーザー顕微鏡 (LSM700, Zeiss 社製) を用いて観察を行った。

### 心臓の面積測定

各薬剤処理群の個体について、MF-20 抗体を用いた上記の免疫染色法により、心臓領域 (心室と動脈球) を可視化した。次に IX73 で観察し、それぞれの個体の心臓領域の画像を取得した。この画像を用いて、画像処理ソフト GIMP2 (Windows 版フリーウェア) と Mac 版 Photoshop を用いて、心臓領域の占めるピクセル数を測定した。この測定したピクセル数を、予め対物マイクロメーターを撮影して測定した 100  $\mu\text{m}$   $\times$  100  $\mu\text{m}$  = 10<sup>4</sup> ( $\mu\text{m}$ )<sup>2</sup> の占めるでのピクセル数で割り、実際の面積を ( $\mu\text{m}$ )<sup>2</sup> ベースで算出した。同じ温

度履歴で飼育した実験群と同腹対照群の心臓領域の大きさの統計学的な有意差の有無の判定は、Welch の  $t$  検定により判定した。

## 結果

### st. 42 から st. 46 の幼生における心臓形態

はじめに、正常に発生している無処理の幼生の心臓について、骨格筋および心筋の myosin を抗原として認識する MF-20 抗体による免疫染色を施した上で観察した (図 1)。

心臓においては、st. 39 では腹側から見て三角形の形態を示し ( $n=9$ )、st. 40, 41 では三日月状の形態を示した (それぞれ、 $n=6, n=7$ )。腹側から見て、動脈球 (aortic bulb) は心室の影に隠れがちであった。st. 42 の段階で心臓のループ形成は著しく蛇行し、心室の右前方に動脈球が位置し ( $n=10$ ; 図 1A-A')、st. 43, 44, 45 でもこの相対的な位置関係は保持された形態を示した (それぞれ、 $n=10, n=9, n=10$ )。st. 46 でループ形成の歪度は飽和し、右巻きの形態を示した ( $n=10/10$ ; 図 1B-B')。これらの観察結果から、心臓については st. 39-40 の間で、少なくとも心室と動脈球 (後の動脈円錐、動脈幹) の位置関係において、心臓のループ形成は開始され、st. 46 で心臓のループ形成は完了することが観察された。

### Blebbistatin 投与による心臓の矮小化

非筋 myosin II ATPase 阻害剤である (±)-Blebbistatin を用いた後期尾芽胚期における浸漬実験を

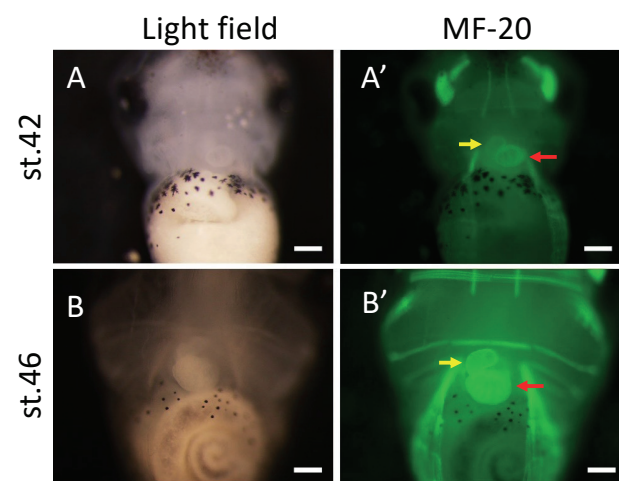


図 1. ツメガエル幼生心臓の正常発生. A-A') 心臓の形態形成は、22-24°C で培養 4 日後の st. 42 で頭側から見て心房-心室-動脈球 (後の動脈円錐、動脈幹、流出路ともいう) に至る血流が右巻き (頭側からみて時計回り) となる形態を示した. B-B') その後もこの右巻きの形態を示し、動脈球が心室に対して右前方 (向かって左前方) に位置し続け、st. 46 では st. 42 幼生と同様の心臓形態を示した. 全ての写真は腹側から撮影している. 赤矢印は心室を示し、黄色矢印は動脈球を示す. Bars, 200  $\mu\text{m}$ .

行った。その結果、実験群の心臓が対照群に比べて低形成であった (低形成は、同腹対照群  $n=0/60$ ; 0.05  $\mu\text{M}$ ,  $n=35/45$ ; 0.1  $\mu\text{M}$ ,  $n=41/51$  (分母は判定時の生存個体数); 図 2C-C')。また、特に心室の低形成が顕著であった。

Blebbistatin 処理による心筋の変化を観察するために、骨格筋および心筋の myosin に対する抗体である MF-20 を用いた免疫染色を行い、Blebbistatin 処理幼生の心筋を可視化した。その結果として、Blebbistatin 処理群の心臓は心筋が凝集し、同じ発生段階の対照群で見られるような心筋のメッシュ状の様態を示さなかった (0.05  $\mu\text{M}$ ,  $n=11/15$ ; 0.1  $\mu\text{M}$ ,  $n=14/15$ ; 図 2D-D')。心臓の低形成をより定量的に示すために、MF-20 抗体により免疫染色した個体の心臓の画像を基に Photoshop を用いて、画像上の心臓の面積を求めた。その結果、実験群の心臓領域は対照群に比べて腹側から見た面積の占有率が低下していた (対照群が  $11.1 \pm 0.9$ 、0.05  $\mu\text{M}$  処理群で  $6.7 \pm 2.1$ 、0.1  $\mu\text{M}$  処理群で  $6.5 \pm 1.4 \times 10000 \mu\text{m}^2$ ; 図 4C)。また、1% の有意水準で統計学的に有意な差があった ( $P < 0.01$ )。胸腔内の心臓領域の占有面積が低

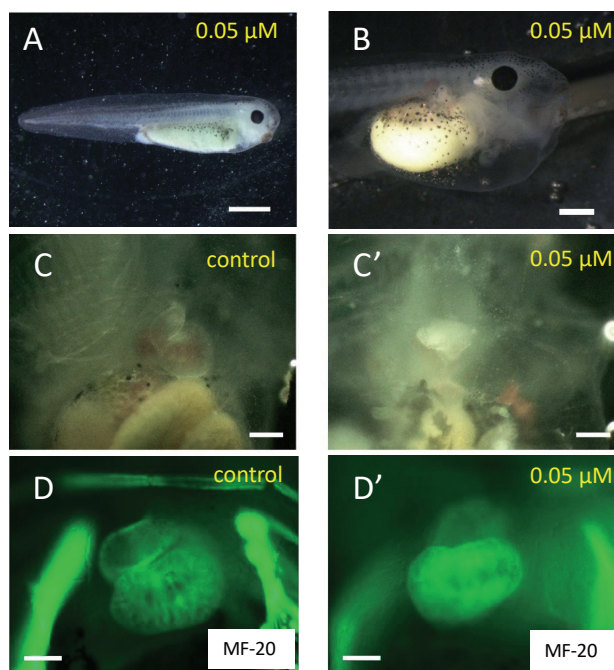


図 2. (±)-Blebbistatin 浸漬処理群の観察結果. A) 処理直後の幼生. 正常幼生と外形は殆ど変わらない. B) 0.05  $\mu\text{M}$  Blebbistatin 処理後に 2 日間にわたって飼養し同腹幼生が st. 46 に達した時の処理群の幼生. おそらくは心機能の低下に起因して胸部腹側に水疱化が生じた. C-C') myosin II の機能阻害剤である (±)-Blebbistatin 処理により心臓は低形成となった. D-D') 対照群 (D) と 0.05  $\mu\text{M}$  Blebbistatin 処理群 (D') の MF-20 抗体で染色した心臓を示す. Scale bars; A は 1mm, B は 0.5mm, C-C' は 200  $\mu\text{m}$ , D-D' は 100  $\mu\text{m}$ .

下していたことから心臓が低形成の状態を示していると言える。

myosin II の機能を阻害したことから、(±)-Blebbistatin 処理による心拍への影響を調べた。(±)-Blebbistatin に 6 時間浸漬した後に心拍を測定した。処理直後の心拍 ( $0 \pm 0$  回/30 秒) は同腹対照群 ( $53.8 \pm 1.31$  回/30 秒) に比べて顕著に低下した。また、 $P < 0.01$  の有意水準で帰無仮説は棄却され、対照群と処理群で統計学的に有意な差が生じていた。また、(±)-Blebbistatin の洗浄のために人工淡水に浸漬処理胚を移行して 20 時間後に再度心拍を測定したところ、同腹対照群 ( $78.5 \pm 1.06$  回/30 秒) と実験群 ( $0.05 \mu\text{M}$ ;  $66.6 \pm 1.60$  回/30 秒,  $0.1 \mu\text{M}$ ;  $67.1 \pm 1.39$  回/30 秒) で統計学的に有意な差があるものの ( $P < 0.01$ )、実験群の心拍は著しく回復した (図 4E)。また、(±)-Blebbistatin 処理による運動機能への影響を調べるために、薬剤処理直後にヘアーループによる接触刺激を浸漬処理中の胚に与えた。その結果、対照群では刺激を与えると逃避行動を示したが ( $n=4/4$ )、実験群では逃避行動を全く示さなかった ( $0.05 \mu\text{M}$ :  $n=4/4$ ,  $0.1 \mu\text{M}$ :  $n=4/4$ )。以上の心拍の計測と逃避行動の観察結果から、(±)-Blebbistatin は myosin II による筋収縮を阻害していることが確認された。

前述の浸漬実験で使用した (±)-Blebbistatin は 2 種類の鏡像異性体 (光学異性体) が混在したラセミ体である薬剤を使用した。この 2 種類の光学異性体 (R-(+)-Blebbistatin と S-(-)-Blebbistatin) の内でどちらが実際に心臓の低形成を引き起こしたのかを調査するために、それぞれの異性体を溶解した溶液にツメガエル胚を浸漬した。その結果、S-(-)-Blebbistatin に浸漬した個体においては心臓の低形成が観察された ( $0.05 \mu\text{M}$ ,  $n=11/19$ ;  $0.1 \mu\text{M}$ ,  $n=22/29$ )。しかし、もう一方の R-(+)-Blebbistatin に浸漬した個体では対照群と同様に全く正常に発生し、薬剤による影響は観察されなかった (低形成は、 $0.05 \mu\text{M}$ ,  $n=0/36$ ;  $0.1 \mu\text{M}$ ,  $n=0/36$ )。これらの観察結果から、2 種類の鏡像異性体の内で S-(-)-Blebbistatin の方が心臓の形態形成に影響を与えたことが分かった。

### Omecamtiv 投与による心臓の矮小化

心筋 myosin II ATPase 促進剤である Omecamtiv mecarbil を中期尾芽胚に投与したところ、実験群の心臓は対照群に比べて低形成となった ( $0.1 \text{ mM}$  で  $n=58/62$ ; 図 3C-C', D-D')。特に心室の低形成が顕著であった。Omecamtiv 投与によるペースメーカー機能への影響を調べるために心拍を測定した。Omecamtiv を含む人工淡水に 24 時間浸漬した直後

に心拍を測定したところ、対照群と比べて実験群は著しく心拍が低下した (それぞれ、浸漬処理群  $0 \pm 0$  回/30 秒、同腹対照群  $34.9 \pm 0.83$  回/30 秒)。心拍は 5% の有意水準で統計学的に有意な差が対照群と実験群で見られた ( $P < 0.01$ )。さらに、人工淡水に浸漬個体を移行して洗浄し、24 時間後に再度心拍を測定したところ、依然として実験群と対照群とで統計学的に有意な差があったものの ( $P < 0.01$ )、実験群の心拍は著しく回復した (図 4F)。これらの観察結果から、予想外の結果ではあるが、myosin II の促進剤である Omecamtiv の投与でも myosin II に関連した心臓とその心拍の機能分化を阻害していることが判った。また、Omecamtiv 処理による処理個体の運動機能への影響を調べるために、処理直後にヘアーループを用いた処理個体への刺激実験を行った。ヘアール

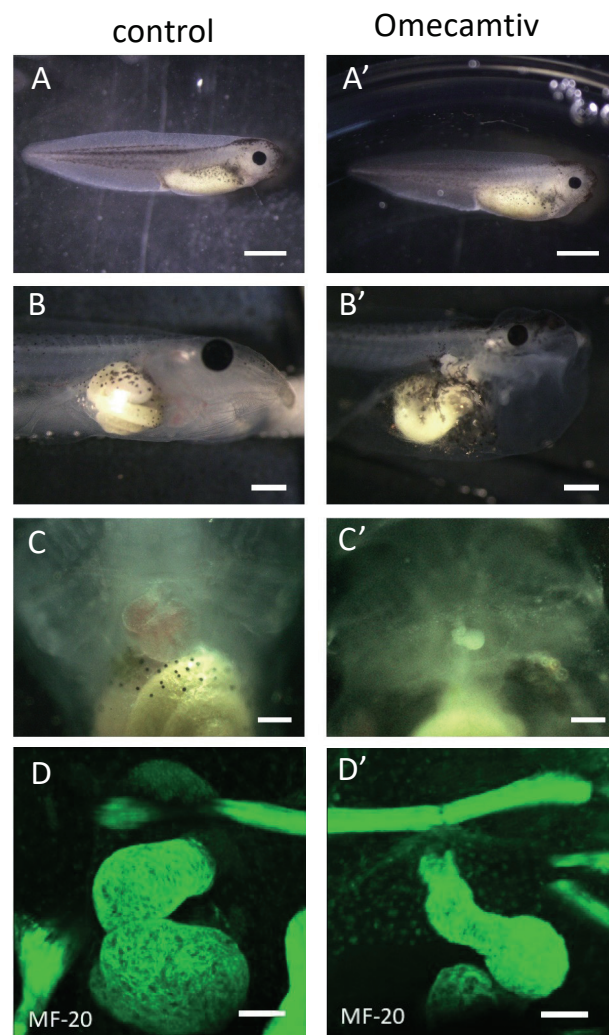


図 3. Omecamtiv 浸漬処理群の観察結果. A'-D' は処理群を、A-D は同腹対照群を示す. A-A') 処理直後の幼生 (A). 正常な幼生 (A) と外形は殆ど変化していない. B-B') 同腹幼生 (B) が st. 46 に達した時の処理群の幼生は胸部腹側に水疱化が生じていた (B'). C-C') 処理群では心臓の低形成 (C') が生じた. Scale bars; A-A' は 1mm, B-B' は 0.5mm, C-C' は 200  $\mu\text{m}$ , D-D' は 100  $\mu\text{m}$ .

ブにより刺激した st. 40-41 の処理個体は、対照群で全個体が逃避行動を示し (n=24/24)、実験処理個体においても逃避行動を示す個体が見られた (n=18/24)。この観察結果から、Omeacamtiv は運動に関係する骨格筋の収縮には影響を与えず、高い特異性を持って心筋 myosin II を標的としていることが示唆された。

Omeacamtiv 処理群においても、心筋への影響を、筋肉に対する抗体を用いた免疫染色を施した個体で調査した。心筋を認識する MF-20 抗体による免疫染色を行った Omeacamtiv 処理幼生の心臓においては、対照群に比べて心室の心筋の凝集が実験処理群でも観察された (0.1 mM, n=12/15)。共焦点レーザー顕微鏡による観察においても、対照群に比べて心室が凝集していた (n=5/5; 図 3D-D')。定量的に心臓の低形成の有無を示すために、心臓領域で MF-20 抗体による免疫染色で可視化される領域の面積を画像処理ソフトで測定した。その結果、腹側から見た実験群の心臓領域の占有面積 ( $2.6 \pm 0.5 \times 10000 \mu\text{m}^2$ ) が、対照群のそれ ( $10.4 \pm 1.1 \times 10000 \mu\text{m}^2$ ) よりも小さいことが示され、有意水準 1% で統計学的にも有意な差があった (P<0.01; 図 4D)。心臓領域の占有面積が低下していたことから、Omeacamtiv 処理で心臓が

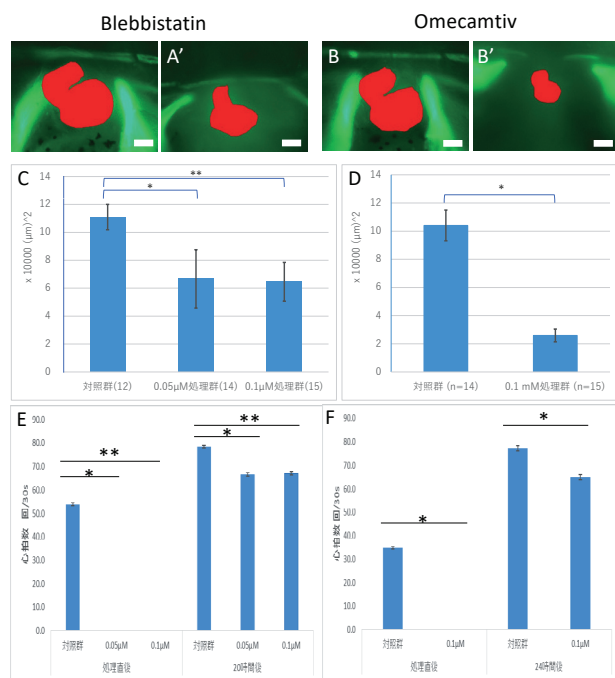


図 4. Blebbistatin 処理群と Omeacamtiv 処理群の心臓領域の面積と心拍数の定量。A-A', B-B') 腹側正中線からみた MF-20 抗体で染まった心臓領域の面積 (赤でハイライト; 心室と動脈球の面積) を画像処理ソフト Photoshop により測定した。C) Blebbistatin 処理により心臓領域の面積が有意に低下した (\*, \*\* は、いずれも P<0.01)。D) Omeacamtiv 処理によっても心臓領域の面積が有意に低下した (\* は P<0.01)。E, F) Blebbistatin 処理 (E) ならびに Omeacamtiv 処理 (F) により心拍数は著しく低下したが、飼育水に移行すると心拍数は回復した (\*, \*\* は、いずれも P<0.01)。

低形成となったことが示された。免疫染色の観察結果からも、心臓の形態形成に心筋の正常な配列・組織化が必要であることが示唆された。

## Phenylhydrazine 投与による心室と流出路の過形成

前述の myosin 阻害剤および賦活剤の浸漬実験の結果は、薬剤処理によって両生類幼生に心臓の低形成を極めて高頻度で作出する実験系を構築することができたと見做すことが出来る。その状況を踏まえて、心臓の過形成の実験系を作出し、心筋への影響を観察することを試みた。この実験系の作出のために使用する薬剤として Phenylhydrazine に注目した。この薬剤をゼブラフィッシュの稚魚に投与することで、その心臓に過形成を生じさせることが報告されている<sup>18)</sup>。硬骨魚類のモデル生物であるゼブラフィッシュでもこの薬剤の影響が見られたことから、両生類のモデル生物であるアフリカツメガエルでも影響が見られると予想し、この薬剤を後期尾芽胚期のツメガエル胚に投与した。その結果、心室部 (10 μM, n=34/39) および動脈幹 / 動脈円錐の予定領域である流出路 (outflow tract) で過形成が生じた (10 μM, n=33/39; 図 5A-A')。また、心拍においては、実験群において心室と流出路の非協調的な収縮が認められた。

MF-20 抗体による免疫染色個体の観察を行ったところ、Phenylhydrazine 処理群の心室部の心筋のクラスターの間隙のスペースは対照群に比べて広くなっており、心筋の束化が促進されているように見えた (10 μM, n=14/16; 図 5B-B')。また、共焦点レーザー顕微鏡による観察においてもこの判断は支持され、心室に位置する心筋は対照群に比べて束化が促進されていた (n=5/5; 図 5C-C')。さらに、心臓の過形成の有無を定量的に示すために、MF-20 抗体を用いた免疫染色により可視化した心臓について、前述の 2 つの薬剤処理と同じ手順、同じソフトウェアで心臓領域の面積を測定した。その結果、対照群 ( $10.8 \pm 1.2 \times 10000 \mu\text{m}^2$ ) に比べて実験群 ( $13.5 \pm 3.0 \times 10000 \mu\text{m}^2$ ) の心臓の面積の占有面積は増加し、統計学的にも有意差があった (P<0.01; 図 5D)。これらの観察結果から、心臓の正常な形態形成において心筋の正常な分布や束化が、その器官の大きさの制御に必要であることが示唆された。

## 討論

筆者らは myosin II の機能を阻害および促進する薬剤を用いて、心臓の形態形成への影響を調べた。薬剤投与の結果、心臓の形態形成に影響が生じ、



actomyosin 系の収縮がこれらの器官の形態形成に必要であることを明らかにした。本研究で注目した心臓は後期胚で左右非対称な形態を示し、これらの器官の左右非対称性の極性の決定は、中期-後期胚で側板中胚葉 (lateral plate mesoderm: LPM) で発現する *nodal* => *pitx2* 経路によって確立される<sup>22, 23)</sup>。

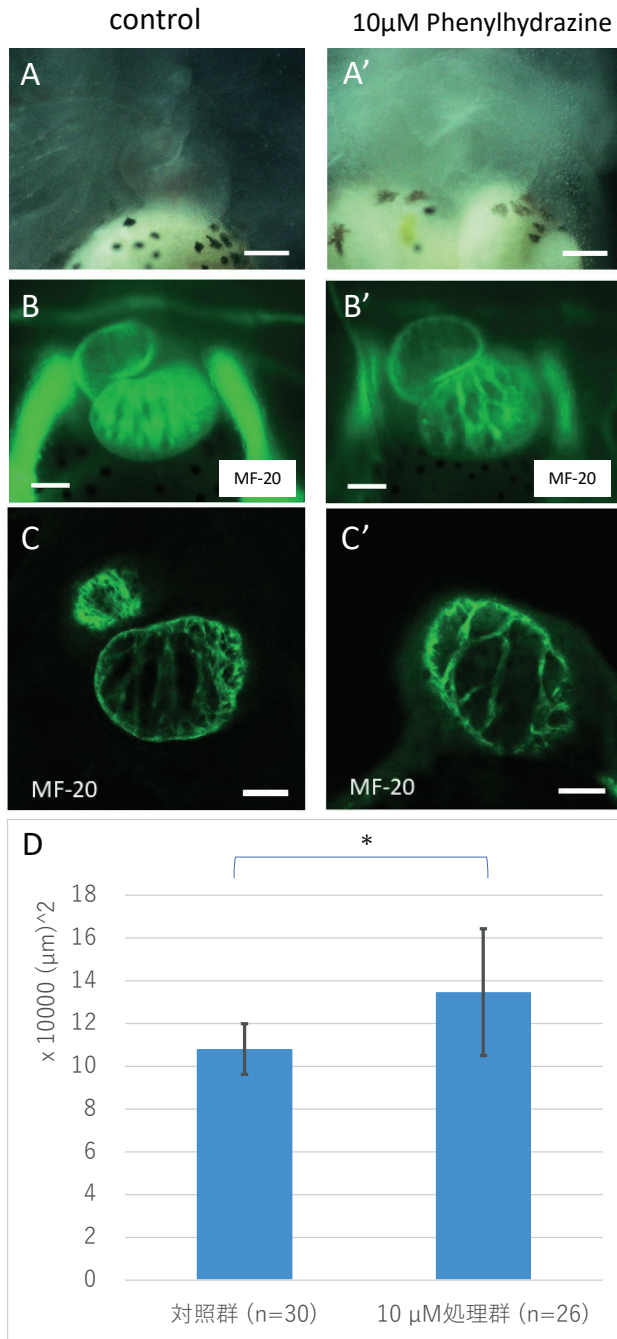


図5. Phenylhydrazine 処理群の心室における心筋の分布と心臓領域の面積の定量. A-A', B-B', C-C') Phenylhydrazine 処理群 (A', B', C') では、対照群 (A, B, C) に比べて心臓の過形成が生じていた. MF-20 抗体を用いた免疫染色により、実験群の心筋 (B', C') は対照群のそれ (B, C) に比べて束化が促進され、心筋同士の間隔が広がっていることが分かった. D) 心臓の面積は対照群に比べて処理群で増加していた (\*は  $P < 0.01$ ). 測定方法は図4と同じである. Scale bars: A-A', B-B', C-C' のいずれも 100 µm.

しかし、後期胚期から幼生期にかけての器官形成期に、咽頭胚期である初期尾芽胚期に発現する *pitx2* により決定した左右極性の情報をもとに実際に左右非対称な器官形態を構築する機構は不明な点が多い<sup>24)</sup>。本研究では両生類の左右非対称な器官の形態形成に actomyosin の収縮が直接的に関与している可能性を見出した。

### 心臓の形態形成への心筋の影響

MF-20 抗体を用いた免疫染色により心筋を染色し、st. 42 から 46 にかけてのツメガエル幼生的心臓の形態を観察した。この st. 42-46 の間では心臓の形態は右巻き (腹側から見て、心室に対して動脈球が向かって左側に位置する、頭部側から見て、血流が時計回り) の形態を示しており、心臓のループ形成はほぼ完了していた。今回の観察では心室に隠れて見られなかった心房は、st. 46 には形成されていることが先行研究により明らかになっている<sup>14)</sup>。さらに、この Kolker ら (2000) の当該論文では st. 41 から心室に心筋が密集し始めることが報告されていることから、今回の観察で st. 42-46 での心臓形態の劇的な変化は見られなかったが、その内部では心筋の筋肉量が発生段階が進むにつれて増加傾向を示すことが考えられる。また、共焦点レーザー顕微鏡による観察から、心室の心筋は少なくとも st. 46 の段階で束化した形態を示すことが本研究でも示された (図 5C)。

myosin II の機能を阻害する Blebbistatin による処理により、心臓の低形成が生じた (図 2C-C')。Blebbistatin 処理群の心臓を MF-20 で免疫染色したところ、心筋の凝集 (占める体積の矮小化) を観察した (図 2D-D')。これらの結果から、心臓の形態形成に actomyosin 系の st. 42-46 の時期での収縮が必要である可能性が示唆された。この発生段階では、すでに幼生的心臓は活発に拍動している。この結果を踏まえ、Blebbistatin 処理とは逆に myosin II の機能を促進し、actomyosin の強縮を生じさせた場合における心臓の形態への影響を調べるために、強心剤であり心筋の収縮を促進する Omecamtiv 処理を行った。その結果、意外なことに、Omecamtiv 処理においても心臓の低形成が生じ、MF-20 による処理群の免疫染色による観察では心室における心筋の凝集が観察できた。以上の結果から、心臓の形態形成にとって、強すぎず弱すぎない actomyosin 系の適度な収縮が必要である可能性が非常に高まった。

ツメガエルの場合、st. 33/34 から心臓の拍動が開始される。従って、適切な拍動の強さと律動の頻度が、後期胚 / 幼生の全身の酸素や栄養の供給のみならず、心臓自体の形態形成、特に心筋の増殖に寄与する

と予想される。器官形成期の心拍動が、心内膜から cardiac cushion への EMT (epithelial-mesenchymal transformation; 上皮間葉転換) を促進するのか、それとも、心筋分化後の増殖を促進するのかについて見極めることが、今後の重要な研究課題となる。Jackson ら (2017) は、初期の心臓原基に働く張力が EMT を経由したツメガエル初期尾芽胚期の心臓形成に重要であることを報告している<sup>25)</sup>。Omecamtiv 処理は心筋の強縮を誘起し、その結果、リズムカルな拍動を阻害したと思われる。現在、Omecamtiv は臨床試験の進む、強く期待される強心剤であるが<sup>26)</sup>、特に妊娠した女性においては慎重な投与量の決定が求められるであろう。以上をまとめると、2種の薬剤による実験結果から、心筋の適切な収縮が心臓の正常な器官形態と器官サイズの制御に必要であることが示唆された。

これら2種の処理群での心拍数が対照群と比較して双方とも大幅に低下していたことも、上記の「心臓の正常な形態形成に発生期の心筋の適切な収縮が必要である」との見解を支持した。収縮の強さが適切ではない場合には心臓の低形成が誘起された。そこで、心臓の低形成とは対照的に心臓の過形成を誘起した場合には心筋の分化への影響はどうなるのか、との問題意識から Phenylhydrazine による浸漬実験を行った。その結果、Phenylhydrazine 処理においては、いずれも心筋マーカーが陽性の領域である心室および動脈球(流出路)の過形成が生じた。さらに Phenylhydrazine 処理群の心筋を MF-20 抗体を用いた免疫染色により可視化した。その結果、同じ温度履歴で飼育しても、対照群に比べて Phenylhydrazine 処理群の心筋では束化が促進され、心筋束同士の間隔が広がった(図 5B-B', C-C')。Phenylhydrazine の拍動は対照群に比べて、心室と流出路とで相互に連携なくそれぞれバラバラに拍動していた。心筋束同士の間隔が広がったため、心筋の収縮の統御に異常が生じたと考えられる。Phenylhydrazine 処理胚の心臓の観察からも、心筋の適切な収縮が心臓の正常な形態形成に必要であることが示された。筋原性である心臓の正常な拍動の発達には、心筋の分化、特に束化のタイミングが適正であることが必要なのかもしれない。

Phenylhydrazine による処理によって、マウスで貧血症が生じることが報告されている<sup>19)</sup>。このことから Phenylhydrazine 処理がアフリカツメガエルに心臓の過形成を誘起した作用機序としては、ツメガエルにおいても貧血症に起因した可能性がある。筆者らは、貧血により血液量が低下したために心臓が単位時間あたりの血液循環量を上げることで貧血に

対応しようとしたと考えている。作業仮説としては、Phenylhydrazine 処理によって心臓に高い負荷がかかったことから、対象群に比べて心筋の束化が促進され、心筋の筋収縮パターンに異常が生じ、なおかつ心臓の過形成が生じたと考えている。今後は、この作業仮説を検証するために、Phenylhydrazine により貧血が生じているのか否かのエビデンスを得る必要がある。このエビデンスを得るために、貧血症の原因遺伝子の発現量の増減を定量 RT-PCR で調べたいと考えている。また、重篤度の高い貧血であれば血液中の赤血球の細胞数は単純に減少している可能性が考えられるため、Phenylhydrazine 処理群から血液をサンプリングし、血液中の赤血球密度を測定したいと考えている。

血管内皮細胞は血流による摩擦力により伸縮することが分かっている<sup>27)</sup>。外力に対して血管内皮細胞はその形態を変化させる<sup>28, 29)</sup>。心臓においても心室や動脈球の内壁が血流による強い流れずり応力(fluid shear stress)を受けているため、心臓を構成する細胞についても、この摩擦力に対し、細胞レベルで応力応答するために細胞の変形が生じると考えられる。また、本研究の3種類の薬剤による実験の結果から、心臓の形態形成には心筋の適切な収縮が必要であることが明らかになったので、この心筋の適切な収縮が心内膜細胞の形態を調節し、その後の心臓の発生プロセスに影響を及ぼして、最終的なアウトプットとして適切なサイズ(体積)の心臓になるよう導くのではないかと考えている。そのため、心臓の組織切片を作成し、あるいは心内膜層特異的に免疫染色を行い、可視化して共焦点レーザー顕微鏡による3D構築画像から、その上皮細胞形態を観察し定量する必要があると考えている。ラットの大動脈の血管平滑筋細胞の培養細胞を用いた研究では、層流(laminar flow)の有無により平滑筋 actin や smooth muscle protein 22 (SM22) などの平滑筋マーカーの発現の有無や発現量が変化することが報告されている<sup>30)</sup>。本研究の実験系では、心臓の低形成ないし過形成に起因して心臓にかかる血流からの fluid shear stress の変化が生じていると予想され、Shi ら (2010) の報告が示唆するように、ツメガエルの形成初期の心臓大血管系においても、血流の速さや粘度に応じて流れずり応力が変化している可能性がある。そのため、アフリカツメガエルの心臓大血管系におけるこれらの平滑筋マーカーの発現量を、まずは定量 RT-PCR 法により調査したいと考えている。

今後は薬理的ないし分子生物学的なアプローチで、心臓のごく狭い領域で特異的に actomyosin の収縮運動を阻害することで、ループ形成がどのように

変化していくのかを追う必要がある。あるいは、光照射で開環して、例えば ATP など内部に閉じ込められた低分子を放出する caged 化合物を利用し、狭い領域だけで actomyosin の収縮運動を活性化すると興味深い知見が得られるであろう<sup>31)</sup>。

myosin は、大きなファミリーを形成する分子種である。そのファミリーメンバーである myosin I は actin フィラメントと相互作用し、細胞内小胞輸送や細胞膜の張力の制御に関与する<sup>32)</sup>。ショウジョウバエの myosin I は胚期に消化管系に発現量が多い<sup>33)</sup>。ショウジョウバエの消化管が内臓逆位になる *souther* 変異体が現大阪大学の松野健治博士らのグループにより同定され、この内臓逆位の原因遺伝子が myosin I をコードする *Myo31DF* であることが明らかになった<sup>34)</sup>。さらに、後腸の曲がる方向は後腸上皮細胞の細胞形態の chirality により決まり、この chirality の形成に myosin I 遺伝子が関与していることが分かっており、anisotropic な後腸上皮の細胞形態の変形が後腸のループ形成に必要である可能性を示唆している<sup>35)</sup>。脊椎動物のアフリカツメガエルにおいて、myosin I は心臓および腸管に発現している<sup>3)</sup>。最近松野博士らの研究は別グループにより脊椎動物胚に拡張され、アフリカツメガエルの myosin I をノックダウンすると、内臓逆位を示す個体の割合が増加したことが報告されている<sup>13)</sup>。このことから、アフリカツメガエルとショウジョウバエの間では腸管の左右非対称性の決定への myosin I の関与が進化的に保存されていることが考えられる。そのため、ツメガエルの心臓(原始心筒)においても細胞形態の chirality とその変化が生じる可能性が推察できる。

まとめると、本研究において、心臓の正常な形態形成にも actomyosin の適切な収縮が必要であることが示された。今後の展望として、生体内での actin や myosin II の動態を観察することが課題として挙げられる。そこで遺伝子導入法によって蛍光蛋白質を繋げた actin または myosin 遺伝子を導入したトランスジェニックツメガエル幼生を作出し、実際の生体内での actomyosin の滑り運動の動態を経時的に観察し、心臓の形態形成への actomyosin 系の収縮の関与を、直接的に、かつリアルタイムで明らかにしたい。心筋細胞の細胞増殖と細胞移動を追うためには、リン酸化 Histone に GFP タグをつけたイメージング手法も有用と思われる。

### 内臓の左右非対称性決定の遺伝的カスケード (*nodal* => *pitx2* 経路) の下流としてのループ形態形成

本研究で注目した心臓の左右非対称性の向き(左

右極性)の確立には、*nodal* と呼ばれる TGF- $\beta$  superfamily に属する分泌因子をコードする遺伝子が関与していることが知られている。*nodal* は脊椎動物で共通して、原腸胚期にはオルガナイザー領域に、後期神経胚期(初期体節期)には、側板中胚葉(LPM)で左側特異的に発現する。この *nodal* の左右非対称な発現により、後期オルガナイザー領域(ツメガエル胚では神経胚原腸の後方天井蓋部)での繊毛運動が生成する液流による左右非対称性の破れが左右非対称な遺伝子発現として特異化され、内臓には左右性の情報が付加される<sup>36,37)</sup>。さらに、臓側板中胚葉から原始心筒が形成される<sup>38)</sup>。そのため、遺伝子発現による左右軸の確立から実際にその左右情報をもとに左右非対称に心臓がルーピングする一連の流れに対して、Nodal シグナルに対する心臓中胚葉の起源組織のコミットメントが関係する可能性は考えられる。実際、硬骨魚類のモデル生物であるゼブラフィッシュの心臓のルーピングには actomyosin の収縮が必要であり、そのルーピングの方向は Nodal シグナルによる左右軸の情報をもとに行われると報告されている<sup>39)</sup>。この研究は真骨魚類のゼブラフィッシュのものではあるが、Nodal シグナルの下流における心臓の左右非対称性の確立の実行者として actomyosin 系が関与していることを示唆している。*nodal* は脊椎動物間で広く保存されており、両生類であるアフリカツメガエルにおいても左側の LPM で *nodal* 関連遺伝子 *Xnr-1* (*Xenopus nodal related-1*) が発現し、左右非対称性決定に関与していることを我々は報告している<sup>40,41)</sup>。

## 展望

### actomyosin は脊椎動物の内臓進化のツールキットたり得るか

本論文の最後の論考として、心臓の発生を研究対象とした本研究の立脚点から、脊椎動物全般のそれを進化系統学的に展望する。今後は、脊索動物のうち、脊椎動物とは早期に分岐した頭索動物や、脊椎動物のプロトタイプたる円口類を用いて心臓や腸管などの円筒型の器官形成に actomyosin の収縮が関与しているのかとの問題意識をもとに研究を拡張し、器官形成期における actomyosin 系の構成因子のうち具体的に(マイナーな family member も含めて)どの構成分子が、どの程度、進化的に保存されているのかを研究したいと考えている。脊椎動物の心臓は右巻きにルーピングする。さらに、心臓は区画化される部屋の数は生物種によって異なるが、心室と心房により構成される<sup>42)</sup>。脊椎動物でも早期に系統学的に分岐した円口類であるカワヤツメの心臓は原始心筒

を形成し、他の脊椎動物の心臓形成の区画化に関与する *tbx* を原始心筒に発現していることが分かっている<sup>43,44</sup>。また、*nodal* の下流シグナルである *pitx* は、左側板中胚葉に加えて、心臓中胚葉にも左右非対称に発現している<sup>44</sup>。これらの点から、脊椎動物の心臓の形態形成期における actomyosin 系の関与が円口類以前の祖先種で既に獲得されたものなのかを研究することは非常に興味深いと考えている。何故、myosin がこれほどに多様なのか？については、「様々な動物で、様々な発生プロセスに、その組織細胞内の微小環境で求められる役割に最適化すべく fine tuning されて関与するように分子進化してきたから」という作業仮説を抱えている。本研究を発展させれば、あまりにも有名な actomyosin というツールキットが、脊椎動物の進化と多様性を語る上でも欠かせぬツールキットでもあることが示されるかもしれない。

## 謝辞

研究を遂行する上で、数々の御助言を賜りました小笠原強名誉教授、日野晶也名誉教授、泉進名誉教授、小谷享教授、大平剛教授に厚く御礼申し上げます。実験方法を教えていただきました教務技術職員の鶴岡慎哉先生に感謝申し上げます。また、ツメガエル胚・幼生の wholemount 免疫染色の技法を教えてくださいました、横浜市立大学の内山英穂教授、小林剛氏に感謝いたします。私たちの研究をご支援して頂きました総合理学研究所所長川本達也教授ならびに所員各位に感謝いたします。

## 文献

- Perrin BJ and Ervasti JM (2010) The actin gene family: function follows isoform. *Cytoskeleton* (Hoboken). **67**(10): 630-634.
- Sebé-Pedrós A, Grau-Bové X, Richards TA and Ruiz-Trillo I (2014) Evolution and classification of myosins, a paneukaryotic whole-genome approach. *Genome Biol. Evol.* **6**(2): 290-305.
- Session AM, Uno Y, Kwon T, Chapman JA, et al. (2016) Genome evolution in the allotetraploid frog *Xenopus laevis*. *Nature*. **538**(7625): 336-343.
- Marston DJ and Goldstein B (2006) Actin-based forces driving embryonic morphogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **16**(4): 392-398.
- Ma X and Adelstein RS (2012) *In vivo* studies on nonmuscle myosin II expression and function in heart development. *Front. Biosci.* (Landmark Ed). **17**(2): 545-555.
- Biben C and Harvey RP (1997) Homeodomain factor Nkx2-5 controls left/right asymmetric expression of bHLH gene eHand during murine heart development. *Genes Dev.* **11**(11): 1357-1369.
- McFadden DG, Barbosa AC, Richardson JA, Schneider MD, et al. (2005) The Hand1 and Hand2 transcription factors regulate expansion of the embryonic cardiac ventricles in a gene dosage-dependent manner. *Development* **132**(1): 189-201.
- Lu W, Seeholzer SH, Han M, Arnold AS, et al. (2008) Cellular nonmuscle myosins NMHC-IIA and NMHC-IIB and vertebrate heart looping. *Dev. Dyn.* **237**(12): 3577-3590.
- Tsuda T, Majumder K and Linask KK (1998) Differential expression of flectin in the extracellular matrix and left-right asymmetry in mouse embryonic heart during looping stages. *Dev. Genet.* **23**(3): 203-214.
- Linask KK, Yu X, Chen Y and Han MD (2002) Directionality of heart looping: effects of Pitx2c misexpression on flectin asymmetry and midline structures. *Dev. Biol.* **246**(2): 407-417.
- Ocaña OH, Coskun H, Minguillón C, Murawala P, et al. (2017) A right-handed signalling pathway drives heart looping in vertebrates. *Nature* **549**(7670): 86-90.
- Okumura T, Sasamura T, Inatomi M, Hozumi S, et al. (2015) Class I myosins have overlapping and specialized functions in left-right asymmetric development in *Drosophila*. *Genetics* **199**(4): 1183-1199.
- McDowell GS, Lemire JM, Paré JF, Cammarata G, et al. (2016) Conserved roles for cytoskeletal components in determining laterality. *Integr. Biol. (Camb)*. **8**(3): 267-286.
- Kolker SJ, Tajchman U and Weeks DL (2000) Confocal imaging of early heart development in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* **218**(1): 64-73.
- Kovács M, Tóth J, Hetényi C, Málnási-Csizmadia A and Sellers JR (2004) Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II. *J. Biol. Chem.* **279**(34): 35557-35563.
- Straight AF, Cheung A, Limouze J, Chen I, et al. (2003) Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II Inhibitor. *Science* **299** (5613): 1743-1747.
- Liu Y, White HD, Belknap B, Winkelmann DA and Forgacs E (2015) Omecamtiv mecarbil modulates the kinetic and motile properties of porcine  $\beta$ -cardiac myosin. *Biochemistry* **54**(10): 1963-1975.
- Sun X, Hoage T, Bai P, Ding Y, et al. (2009) Cardiac hypertrophy involves both myocyte hypertrophy and hyperplasia in anemic zebrafish. *PLoS One* **4**(8): e6596.
- Mirciov CS, Wilkins SJ, Dunn LA, Anderson GJ and Frazer DM (2017) Characterization of putative erythroid regulators of hepcidin in mouse models of anemia. *PLoS One* **12**(1): e0171054.
- Shetlar MD and Hill HA (1985) Reactions of hemoglobin with phenylhydrazine: a review of selected aspects. *Environ. Health Perspect.* **64**: 265-281.
- Nieuwkoop PD and Faber J (1967) *Normal Table of Xenopus laevis (Daudin): A Systematical and Chronological Survey of the Development from the Fertilized Egg Till the End of Metamorphosis*. Elsevier Science Publishing Co. pp. 1-258.

- 22) Shen MM (2007) Nodal signaling: developmental roles and regulation. *Development* **134**(6): 1023-1034.
- 23) Schweickert A, Ott T, Kurz S, Tingler M, et al. (2017) Vertebrate left-right asymmetry: What can Nodal cascade gene expression patterns tell us? *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* **5**(1). pii: E1.
- 24) Pai VP, Willocq V, Pitcairn EJ, Lemire JM, et al. (2017) HCN4 ion channel function is required for early events that regulate anatomical left-right patterning in a *nodal* and *lefty* asymmetric gene expression-independent manner. *Biol. Open.* **6**(10): 1445-1457.
- 25) Jackson TR, Kim HY, Balakrishnan UL, Stuckenholtz C and Davidson LA (2017) Spatiotemporally controlled mechanical cues drive progenitor mesenchymal-to-epithelial transition enabling proper heart formation and function. *Curr. Biol.* **27**(9): 1326-1335.
- 26) Tariq S and Aronow WS (2015) Use of inotropic agents in treatment of systolic heart failure. *Int. J. Mol. Sci.* **16**(12): 29060-29068.
- 27) Yamamoto K and Ando J (2015) Vascular endothelial cell membranes differentiate between stretch and shear stress through transitions in their lipid phases. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **309**(7): H1178-1185.
- 28) Dick M, MacDonald K, Tardif JC and Leask RL (2015) The effect of simvastatin treatment on endothelial cell response to shear stress and tumor necrosis factor alpha stimulation. *Biomed. Eng. Online* **14**: 58.
- 29) Sugden WW, Meissner R, Aegerter-Wilmsen T, Tsaryk R, et al. (2017) Endoglin controls blood vessel diameter through endothelial cell shape changes in response to haemodynamic cues. *Nat. Cell Biol.* **19**(6):653-665.
- 30) Shi ZD, Abraham G and Tarbell JM (2010) Shear stress modulation of smooth muscle cell marker genes in 2-D and 3-D depends on mechanotransduction by heparan sulfate proteoglycans and ERK1/2. *PLoS One* **5**(8): e12196.
- 31) Weinreich F, Riordan JR and Nagel G (1999) Dual effects of ADP and adenylylimidodiphosphate on CFTR channel kinetics show binding to two different nucleotide binding sites. *J. Gen. Physiol.* **114**(1): 55-70.
- 32) McIntosh BB and Ostap EM (2016) Myosin-I molecular motors at a glance. *J. Cell Sci.* **129**(14): 2689-2695.
- 33) Morgan NS, Heintzelman MB and Mooseker MS (1995) Characterization of myosin-IA and myosin-IB, two unconventional myosins associated with the *Drosophila* brush border cytoskeleton. *Dev. Biol.* **172**(1): 51-71.
- 34) Hozumi S, Maeda R, Taniguchi K, Kanai M, et al. (2006) An unconventional myosin in *Drosophila* reverses the default handedness in visceral organs. *Nature* **440**(7085): 798-802.
- 35) Hatori R, Ando T, Sasamura T, Nakazawa N, et al. (2014) Left-right asymmetry is formed in individual cells by intrinsic cell chirality. *Mech. Dev.* **133**: 146-162.
- 36) Essner JJ, Amack JD, Nyholm MK, Harris EB and Yost HJ (2005) Kupffer's vesicle is a ciliated organ of asymmetry in the zebrafish embryo that initiates left-right development of the brain, heart and gut. *Development* **132**(6): 1247-1260.
- 37) Schweickert A, Weber T, Beyer T, Vick P et al. (2007) Cilia-driven leftward flow determines laterality in *Xenopus*. *Curr. Biol.* **17**(1): 60-66.
- 38) van den Berg G and Moorman AFM (2011) Development of the pulmonary vein and the systemic venous Sinus: An interactive 3D Overview. *PLoS ONE* **6**(7): e22055.
- 39) Noël ES, Verhoeven M, Lagendijk AK, Tessadori F, et al. (2013) A Nodal-independent and tissue-intrinsic mechanism controls heart-looping chirality. *Nat. Commun.* **4**: 2754.
- 40) Toyozumi R, Ogasawara T, Takeuchi S and Mogi K (2005) *Xenopus nodal related-1* is indispensable only for left-right axis determination. *Int. J. Dev. Biol.* **49**(8): 923-938.
- 41) Toyozumi R, Takeuchi S and Mogi K (2006) Subtilisin-like proprotein convertase activity is necessary for left-right axis determination in *Xenopus* neurula embryos. *Dev. Genes Evol.* **216**(10): 607-622.
- 42) Jensen B, Wang T, Christoffels VM and Moorman AF (2013) Evolution and development of the building plan of the vertebrate heart. *Biochim. Biophys. Acta.* **1833**(4): 783-794.
- 43) Koshiha-Takeuchi K, Mori AD, Kaynak BL, Cebra-Thomas J, et al. (2009) Reptilian heart development and the molecular basis of cardiac chamber evolution. *Nature* **461**(7260): 95-98.
- 44) Kokubo N, Matsuura M, Onimaru K, Tiecke E, et al. (2010) Mechanisms of heart development in the Japanese lamprey, *Lethenteron japonicum*. *Evol. Dev.* **12**(1): 34-44.