

|         |   |
|---------|---|
| 氏名      | フジカ ユマ<br>藤掛 雄馬   |
| 本籍（国籍）  | 神奈川県  |
| 学位の種類   | 博士（農学）  |
| 学位記番号   | 連研第 870 号   |
| 学位授与年月日 | 令和 6 年 9 月 2 5 日  |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 5 条第 1 項該当課程博士  |
| 研究科及び専攻 | 連合農学研究科 生物資源科学専攻  |
| 学位論文題目  | <b>カタユウレイボヤの心臓における拍動反転機構の解明</b><br><b>(Elucidation of mechanisms of heart reversals in the ascidian <i>Ciona</i>)</b> |
| 学位審査委員  | 主査 弘前大学教授 西野 敦雄<br>副査 弘前大学准教授 横山 仁<br>副査 岩手大学教授 澤井 健<br>副査 山形大学教授 豊増 知伸   |

## 論文の内容の要旨

ホヤは海産の無脊椎動物であり、脊椎動物にもっとも近縁な動物の一群である。ホヤの心臓は、心臓管と呼ばれる単純な管状の構造からなり、その両末端をそれぞれ鰓側端（H 端）、臓側端（V 端）と呼ぶ。心臓管に生じる拍動は、一方の末端から他方の末端へと蠕動的に伝わり、それが血流を生み出している。しかし、その拍動方向は断続的に反転し、それに伴って全身の血流の方向も反転する。この拍動反転現象は、約 200 年前に Kuhl と van Hasselt (1822) によって初めて報告されたが、その根本的なメカニズムは未だ解明されていない。本研究は、この拍動反転の仕組みを明らかにすることを目的として行った。本研究では、モデル生物として世界中で広く利用され、心臓の研究にも用いられてきた歴史があるカタユウレイボヤ *Ciona robusta* の心臓を使用した。

拍動反転の仕組みを考える上で、拍動を制御するペースメーカーが心臓管のどこにあるのかは重要な問題である。それについては長く議論があったが、これまではっきりした答えは出ていなかった。拍動の波は基本的に心臓管の両端から発生するので、ペースメーカーは心臓管の末端領域に存在すると予測されていた一方で、心臓管のその他の領域にも、自律的に収縮する能力があることも報告されていたことから、ペースメーカーは心臓管に沿って遍在している可能性も考察されていた。そこでまず、ビデオカメラを用いた拍動リズムの分析を、心臓管を切断する実験と組み合わせて行うことによって、ペースメーカーの性質の解明とペースメーカー領域の特定を目指した。それにより私は、以下の 3 つの点を示唆する結果を得た。(1) 独立した 2 つのペースメーカーが心臓管の両末端に局在すること。(2) この両ペースメーカーの刻むリズムは、周期的に速くなったり遅くなったりする性質（バイモーダルリズムと呼ぶ）をもつこと。(3) 片方のペースメーカーが発する速いリズムは、他方の遅いリズムをマスクし、顕れ出ないようにすること。これら 3 つの要因は組み合わせると、拍動反転の仕組みを本質的に説

明しうると考えられた。

以上の結果を受けて私は、心臓管の両端のペースメーカーに固有の自律的な拍動リズムを人為的に改変できれば、拍動反転の仕組みの詳細に迫れると考えた。そこで、拍動反転の仕組みを分子レベルで明らかにするために、心臓において拍動リズムの生成に関与する可能性があるイオンチャンネルを同定し、その発現と機能の解析を行った。まず、カタユレイボヤの心臓において領域別の RNA-seq 解析を行い、カタユレイボヤの心臓におけるイオンチャンネルの発現を網羅的に分析した。その結果、H 端と V 端のペースメーカー領域 (P<sub>H</sub> 領域と P<sub>V</sub> 領域) と非ペースメーカー領域 (非 P 領域) が、イオンチャンネルの発現プロファイルによって明確に区別されることが明らかになった。P<sub>H</sub>/P<sub>V</sub> 領域において相対的に高い発現を示す因子には、哺乳類の心臓において拍動リズム生成に本質的な働きを担うことが知られる HCN チャンネルの相同遺伝子群 (Ci-HCNa, b, c) が含まれていた。また興味深いことに、Ci-HCNa, b が P<sub>V</sub> 領域で、Ci-HCNc が P<sub>H</sub> 領域で相対的に高い発現を示していた。続いて、心臓組織における HCN チャンネルの発現パターンをより詳しく調べるために、in situ ハイブリダイゼーションを行った。Ci-HCNa, b, c のうちでもっとも発現量が高かった Ci-HCNc について、アンチセンスプローブを作製し、それを用いて取り出した心臓に対する染色を行った。その結果、心臓管の H 末端にリング状に位置する細胞集団において、Ci-HCNc の特異的なシグナルが観察された。さらに、HCN チャンネルが拍動リズム生成に関与することを確かめるために、TALEN を用いたゲノム編集によって心臓特異的な Ci-HCNc の遺伝子破壊実験を行った。その結果、Ci-HCNc がカタユレイボヤの心臓において、拍動リズム生成と拍動反転を制御する分子メカニズムに関与することが示唆された。

本研究は、多くの研究者の関心を引き付けながらも 200 年近くの高きにわたって謎とされてきたホヤの拍動反転について、今までに得られている知見を踏まえて注意深い再検討を行った。それによって、拍動反転の仕組みを十分に説明することができた。さらに分子レベルで、拍動反転のより詳細な仕組みの解明を大きく前進させるとともに、重要な研究の基盤を構築した。

## 論文審査の結果の要旨

本研究論文は、藤掛雄馬氏が本学在学中に取り組んだカタユレイボヤ心臓における拍動反転機構に関する研究の集大成である。本研究で用いられたカタユレイボヤなどのホヤ類は、脊索動物門被囊動物亜門ホヤ綱に属する海産動物である。ホヤを含む被囊動物亜門は、脊椎動物に最も近縁な無脊椎動物の系統であることから、ホヤの研究は我々ヒトを含めた脊椎動物の体の進化的成立の理解に本質的な貢献をなすと考えられている。藤掛氏は本研究において特にホヤの心臓に注目した。ホヤの心臓は脊椎動物の心臓と相同な器官とされているが、拍動方向が反転するという奇妙な特徴を示すことが 200 年以上前から知られていた。1960-80 年代にこの拍動反転機構の研究が精力的に行われたが決定的な解決には至らず、現在までその仕組みは謎とされてきた。

藤掛氏は、カタユレイボヤの心臓が囲心膜に包まれたまま取り出すことができる点、またカタユレイボヤではゲノム解読が完了し大規模な遺伝子解析が可能である点に注目し、拍動反転機構の解明に取り組んだ。まずビデオカメラを用いた拍動リズムの分析を、心臓管を切断する実験と組み合わせることで、拍動を制御するペースメーカーの性質の解明とペースメーカー領域の特定を行った。その結果、拍動反転は心臓上に離れて位置する二つのペースメーカー

が生み出すバイモーダルリズムによって引き起こされると示された。また、拍動反転の仕組みを分子レベルで明らかにするために、心臓で拍動リズムの生成に関与する可能性があるイオンチャンネル分子種を同定し、その発現と機能の解析を行った。その結果、哺乳類の心臓で拍動リズム生成に本質的な働きを担うHCNチャンネルの相同遺伝子群が、カタユレイボヤの心臓のペースメーカー領域で特異的に発現し、拍動リズム生成に関与することが示された。

以上の知見は200年以上にわたって謎であったホヤ心臓の拍動反転の仕組みに対して科学的に適切な方法によって本質的な説明を与え、我々ヒトを含む脊椎動物の心臓の成り立ちについてこれまで見過ごされてきた視点を新規に、また独創的に提示するものとなった。本研究をさらに深めていくことで、脊椎動物の心臓がどのような進化的変遷を経て成立していったのか、新たな理解が進むと期待される。心臓に関する研究は診療医学的な側面からカエルやマウスなどを用いて集中的に進められてきた歴史があるが、本研究は、さらに遠いホヤのような動物における分子・細胞・組織レベルの比較生理学研究が、我々の心臓の基本的な成り立ちの理解に重大なヒントを与えうることを示した。この意味で、本研究は生理学一般に対して重要な意義をもつといえる。

以上を鑑みて、本審査委員会は、「岩手大学大学院連合農学研究科博士学位論文審査基準」に則り審査した結果、本論文を博士（農学）の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

Fujikake, Y., Fukuda, K., Matsushita, K., Iwatani, Y., Fujimoto, K., and Nishino, A. S. (2024)

Pulsation waves along the *Ciona* heart tube reverse by bimodal rhythms expressed by a remote pair of pacemakers.

Journal of Experimental Biology, 227(10): jeb246810.