1PA101

ホヤ幼生の行動と神経情報伝達分子—ホヤ卵への遺伝子導入と行動解析の試み

○川上功、白石修平、中川将司、岩佐達郎、津田基之
(姫路工業大学・理学部・生命科学科)

我々はカタユレイボヤ幼生の光に対する遊泳行動を解析し、孵化後4時間程で明暗応答が始まり、8時間で最大応答することを明らかにした。さらに明暗の繰り返し刺激に対する慣れ、といった学習行動を観察している。ホヤ幼生の脳の中樞ニューロンは感覚器を除くと43個と少なく、脳の高次機能を分子レベル、神経回路網の発達から研究する上で格好な材料である。我々はホヤ幼生の脳の分化と光行動、光に対する学習行動を分子レベルで解明するため、受精卵に遺伝子導入を行い、それによる幼生の行動形態の変化の解析を計画している。本研究ではその準備として、ホヤ受精卵へのエレクトロポレーションによるGFP遺伝子の導入条件を検討し、発生した幼生の行動解析を行った。

受精卵の卵細胞にエレクトロポレーションにより遺伝子を導入するため卵膜等をアクチナーゼEを含む液で除去した。導入遺伝子としてホヤのプロモーター領域をもつGFP遺伝子を用いた。発生した幼生を実体蛍光顕微鏡で観察したところ、導入した遺伝子のプロモーター領域に対応して、脊索、筋肉に緑色の蛍光が見られた。卵膜等を除去後の胚、及びエレクトロポレーション後の胚は、卵膜を除去しなかった胚と比べると発生率はやや下がるものの、ほぼ同様な発生過程を示した。しかし幼生のヒレとなる被囊が欠落していた。これは卵膜除去により、被囊形成に関わるテスト細胞が流失したことによる。

卵膜除去の有無、エレクトロポレーションなど操作による幼生の行動への影響について調べた結果、被囊の欠損は著しい遊泳速度の低下を引き起こすが、孵化後の行動様態は基本的には同様であった。明暗刺激に対しては、未操作の幼生と同様の時期に応答していた。これらの結果から遺伝子導入した幼生の行動解析は可能と考えられる。今後は、目的とする遺伝子を導入することによりその行動を解析したい。

I.Kawakami, S. Siraisi, M. Nakagawa, T. Iwasa, M. Tsuda: Gene to behavior of ascidian larvae, preliminary studies.

1PA103

イオンチャネルの動作時間と水

○久木田文夫 (生理学研究所・生体膜)

膜電位依存性イオンチャネルは非電解質で水溶液の粘性や浸透圧を増加させると、その開閉の時間経過が緩やかになる。一方で、電解質で浸透圧を上げても、時間経過は変化しない。実験的得られる限りの情報では、非電解質によるこの現象は溶液粘性あるいは溶液浸透圧を変数にした物理学的に可能な単純な関係で説明できる。しかし、横軸にとったバルクの(測定可能な)粘性と浸透圧は独立変数ではない。

本研究ではまず非電解質の分子量を変えた際の、溶液の粘性と浸透圧の関係を実験的に求め、次にその関係を基にして時間経過を粘性依存性の部分と浸透圧依存性の部分に分けることを試みた。その結果、分子量の異なる非電解質の効果をよく説明できた。この解析方法で、イオン電流とゲート電流に対する、粘性依存性過程と浸透圧依存性過程(つまり水が関与する過程)を分離できた。

イオン電流の粘性依存性の時間経過はゲート電流の粘性依存性の時間経過で決まり、浸透圧依存性の時間経過は蔗糖では殆どみられないことから、恐らくポア内での水和過程が時間経過に影響を及ぼしていると言う結論に達した。ゲート電流の時間経過を変化させない電解質や低分子非電解質はイオン電流を殆ど変化させないという事実をうまく説明できる。更に、ポア内の5個の水が最終転移(最終閉状態から開状態への変化)に関与していることが示された。実際には沢山の水分子がポア内存在すると思われるが非電解質(グリセロールより大きい)を排除することにより構造変化の速度が遅くなる部位に配位する水の数を見積もったことに相当している。

Kukita, F: Water molecules in a pore during Na channel gating.

1PA102

ホヤ脳内光レセプターと生体時計ペースメーカーニューロンの光による調節

○大熊真人¹、丁畑勇一¹、片桐康雄²、津田基之¹
(¹姫路工大・理・生命科学、²東京女医大・看護)

原索動物ホヤは、日の出後一定時間で配偶子放出(放精・放卵)を行う。研究室でマボヤ(昼型)を暗順応(6時間)した後、光照射するとほぼ正確に4時間後に配偶子放出を観察できる。このことから、ホヤの生殖に関わる生物時計(生体時計)が光によって駆動されると考えられる。すでに我々は、ホヤの脳にあたる頭神経節末端の皮質にロドプシン様蛋白質が局在することをレチナール蛋白質イメージング法により明らかにした。

哺乳動物の下垂体からの生殖線刺激ホルモンの分泌を促し、生殖機能において中心的な役割を担う生殖線刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)がホヤにおいても発見された。このホルモンの産生に関わるニューロンがホヤの頭神経節から背索に沿って精巣・卵巣まで伸びていることから、脳内光レセプターによるGnRHニューロンの刺激が配偶子放出を誘導すると考えられる。GnRHニューロンは規則的な自発活動をしており、生体時計のペースメーカーニューロンである。

本研究では、ホヤの頭神経節における光受容細胞とGnRHニューロンとの相対的局在を、レチナール蛋白質イメージング法と免疫組織化学的手法により解析した。光レセプターのGnRHニューロンの駆動は、細胞外電位記録法により研究した。その結果、光受容細胞とGnRHニューロンの細胞体は共に頭神経節外周の皮質に共存していることが明らかになった。頭神経節の背側から細胞外電位を測定するとGnRHニューロン特有の規則的な自発活動が記録でき、光照射することでこの自発活動が抑制される結果を得た。このことから、光受容細胞のレチナール蛋白質で受けた光信号がGnRHニューロンの電気活動を制御していることが明らかとなった。

今後は光受容細胞内の情報伝機構、光受容細胞からGnRHニューロンへの情報伝機構を明らかにしたい。

M. Ohkuma, Y. Chouhata, Y. Katagiri, M. Tsuda: Coupling of photoreceptor with pacemaker neuron of reproductive clock in cerebral ganglion of ascidian, *Halocynthia roretzi*.

1PA104

温度、機械刺激によるATP受容体の応答

角晋輔、*大岩和弘、○中岡保夫(阪大・基礎工・生物工、*通信総合研・生体物性)

G蛋白連結型のATP受容体を発現しているラットグリオーマ細胞(C6BU-1)は、外部にATPを加えると細胞内のCa²⁺ストアーからCa²⁺が放出され、細胞内Ca²⁺濃度の一過的な上昇が起きる。数分後、細胞内Ca²⁺濃度が元のレベルに下がった時点で温度下降刺激を加えると、再度一過的にCa²⁺放出が起きることを昨年の学会で報告した。この温度下降刺激によって起きるCa²⁺放出は、(1)細胞外のATPとATP受容体との相互作用が強くなるか、(2)G蛋白からCa²⁺放出に至る伝達系が活性化されるか、のいずれかであると考えられる。(1)の可能性を検討するために蛍光性ATPアナログ(Cy5-ATP, TNP-ATP)を用い、ATP受容体との相互作用を調べた。

蛍光性ATPアナログ存在下でC6グリオーマ細胞に温度下降刺激を加え蛍光顕微鏡による観察、記録を行なった。TNP-ATP存在下では、細胞の蛍光強度が、温度下降開始直後一過的に増大した。Cy5-ATP存在下でも一過的な増大が記録されたが、その程度はTNP-ATPに比べ小さいものであった。このような蛍光強度の一過的な増大は、ATP受容体が温度下降刺激により何らかの変化を起こし蛍光性ATPとの相互作用が変化したことによると考えられる。一般に急速な温度下降は膜を構成する脂質、蛋白の構造変化を引き起こすことが予想される。

そこでより単純に細胞膜に機械的刺激を加え膜を変形させた場合、蛍光性ATPとの相互作用に変化があるかどうかを調べた。TNP-ATP存在下で、先端を丸くしたガラス針で突くことにより機械刺激を加えると、細胞膜の変形した部分の蛍光強度が急激に増大した。機械刺激をステップ状に加えた時の蛍光強度の時間変化の解析から、蛍光強度変化は、TNP-ATPとATP受容体との結合、解離による可能性が示された。

これらの結果は、ATP受容体が温度、機械刺激に応答性を持つことを示すと考えられる。

S. Kado, K. Ooiwa, Y. Nakaoka: ATP receptor responds to thermal and mechanical stimuli