3L0900

線虫 C. エレガンスのタッチ感覚細胞での細胞内記録の試み

○田辺 憲子（第一保育短大）

線虫 C. エレガンスは全細胞系譜があきらかにされ、ゲノムも解読されている。またたくさんの突然変異体も取り出されているモデル生物である。電子顕微鏡による観察やレーザー光線による焼殺によって神経回路網も明らかにされている。それにもかかわらず電気生理の研究はあまりなされていない。細胞に直接微小電極を刺入して記録をとることが出来れば機能などもっと直接に知る事が出来るであろう。そこでガラス微小電極による細胞内記録を試みた。体表近くに6個のタッチ感覚細胞が存在する。そのうち2個が尾部の肛門近くにある。この PLM 感覚細胞に電極の刺入を試みた。線虫のタッチ感覚細胞は GFP でラベルしてあるのをを用いた。刺激はまつげでマニピュレーターを用いて、軽く体表にタッチした。タッチ感覚細胞に電極を刺入し、まつげで軽くタッチすると、タッチしている間だけ静止電位の変化が観察できた。

N. Tanabe : Attempt at intracellular recording from touch neuron of C. elegans

3L0930

大腸菌走化性レセプターの温度受容部位の探索

○深見 賢二、西岡 典子、本間 道夫、川岸 郁朗（名古屋大・院・理・生命理学）

大腸菌は外界の温度を感じ、生存に適した温度の場所へ移動する温度走性を示す。温度変化は、細胞膜に存在する 2 回膜貫通型走化性レセプターによって認識される。走化性レセプターは 4 種類存在するが、温度上昇を誘引刺激、温度低下を忌避刺激として感知する温レセプターと、全く逆の性質を示す冷レセプターに分けられる。この温度受容能の違いは何に起因するのであろうか？当研究室では、この問いに答えるため、温レセプター（Tar：アスパラギン酸レセプター）と冷レセプター（Tap：ジペプチドレセプター）の間で作成したキメラレセプター（Tarp, Tapr）について温度受容能を解析している。これまでに、細胞質領域で切り替えたレセプターの解析から、切り替え部位より N 末端側の性質があらわれるという結果を得ている。本研究では、さらに切り替え範囲を狭めたキメラレセプターを多数作成した。ところが、レセプターが発現しなかったり、発現しても菌の運動能が著しく低下してしまったりして、温度受容能を測定できなかった。そこで、キメラレセプターを発現する菌から、運動能を回復する変異体を単離したところ、レセプターの発現量が低下していた。次に、厳密に発現調節ができるよう、araBAD プロモーター下流にキメラレセプター遺伝子をつなげた。アラビノースによる発現誘導の条件を検討し、温度受容能の測定が可能になった。その結果、膜外ドメインまたは膜貫通領域が温度受容に重要であることが示唆された。今後は、他のキメラレセプターについても同様に発現量を調節して、温度受容能を解析する予定である。

K.Fukami, N.Nishioka, M.Homma and I.Kawagishi : In search of the region involved in thermosensing of the Escherichia coli chemoreceptors

3L0915

機械刺激に応答する ATP 受容体

○中岡 保夫¹、大岩 和弘²（¹阪大・基礎工・生物工学、²通信総合研・生体物性）

G 蛋白連結型の ATP 受容体 (P2Y) 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、再度一過性 Ca²⁺ 放出が起きる、すなわち細胞外の ATP により細胞が温度感受性になることを報告した。この温度感受性は、温度下降時に細胞外 ATP の ATP 受容体への結合が一過的に強くなることによるとする結果が、蛍光性 ATP アナログ (TNP-ATP, Cy5-ATP) を用いた蛍光顕微鏡観察から得られている。同じ実験方法で、細胞膜に機械的な刺激を加えた時、細胞外 ATP と ATP 受容体との結合量の変化を調べた。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速に増大した。蛍光強度の増大は TNP-ATP が ATP 受容体に結合したことによると考えられる。いろいろな濃度の TNP-ATP 存在下で機械刺激による蛍光強度の増大量から求めた解離定数は 5x10⁻⁷ M、一方、いろいろな濃度の TNP-ATP を添加した時の Ca²⁺ 濃度上昇から求めた解離定数は 5x10⁻⁶ M であった。したがって機械刺激を加えると ATP と ATP 受容体との結合量が増大するような応答をしている可能性がある。また細胞にくりかえし機械刺激を加えると、徐々に細胞全体にわたって TNP-ATP の蛍光強度が増大し、機械刺激終了後も蛍光強度が増大した状態になった。細胞内 Ca²⁺ 濃度は、機械刺激時に急速で細胞全体にわたる濃度上昇が見られた。これらの結果から細胞膜に加えられた機械刺激により ATP 受容体が ATP との結合性を高くする応答をしていることが示された。

Y.Nakaoka and K. Ooiwa : ATP receptors respond to mechanical stimulation

3L0945

ホヤ脳における光受容細胞と生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) ニューロンの局在

○三島 幸子、堀江 健生、日下部 岳広、津田 基之（姫路工大・理・生命科学）

原素動物であるホヤは、進的には最も原始的な脊索動物に位置し、脊椎動物の脳神経系の基本設計を理解する上で重要な動物である。ホヤでは、生殖に関わる生物時計（生殖時計）は光によって駆動すると考えられている。すでに我々は、細胞外電位記録法によりマボヤ頭神経節で GnRH ニューロン特有の自発的活動が光により抑制されること、レチナール蛋白質イメージング法と免疫組織学的実験により頭神経節皮層に光受容体レチナール蛋白質と GnRH ニューロンが局在していることを示した。（昨年度年会で報告）マボヤは変態してから配偶子放出が可能になるまで 3 年ものかかること、配偶子放出時期が 1 年の冬季に限られることなど、生理、行動を解析するのに不利である。一方コスモポリタン種のカタユレイボヤは配偶子放出できるまで 1 ヶ月と短期間であること、通年受精可能であること、被嚢が透明であるため、体内の観察が可能であるなど利点が多い。また特定の遺伝子の発現を観察するのに発生工学的手法が使える。既に岡らのグループによりユレイボヤ頭神経節における細胞内記録がされておき、光応答細胞が数種類見いだされている。本研究では、カタユレイボヤを用いて、レチナール蛋白質の局在と、光受容細胞と GnRH ニューロンとの関係を明らかにすることを目的としている。レチナール蛋白質イメージング法を用い、頭神経節の whole-mount と凍結切片での解析を行ったところ、レチナール蛋白質は頭神経節と神経線に局在し、頭神経節においては特に腹側の皮層に局在することが明らかとなった。現在、抗ヒト GnRH 抗体と抗タコロドプシン抗体を用いた免疫染色を行っており、光受容細胞と GnRH ニューロンとの相対的局在についての結果も合わせて報告したい。

S.Mishima, T.Horie, T.kusakabe and M.Tsuda : Localization of the Retinal Protein and Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) in Cerebral Ganglion of Ascidian, Ciona intestinalis