B850

レーザー細胞破壊によるホヤ幼生のモーターニューロンの確定と行動解析

○櫻井 大介、上野 元嗣、堀江 健生、中川 将司、日下部 岳広、津田 基之（姫路工大院・理・生命科学）

脊椎動物の祖先型に近いホヤ幼生は、脊索動物のボディープランの最も単純な構造をもち、ヒトの脳と共通の基本設計がみられる。幼生は全体で約2600個、頭部の神経細胞に限れば約100個の細胞数からなる。頭部には黒色素を備えた2つの感覚細胞があり、この2つの感覚細胞で受容した信号を後部感覚小胞で処理した後、運動神経節の数個のモーターニューロンにより尾部の筋肉細胞を駆動し、魚類が遊泳の際に示すS字状運動を行う。当研究室では、レーザー細胞破壊装置を用いた実験系を構築し、ホヤ幼生頭部にある2つの感覚細胞の機能の直接的な証明に成功した。本研究では、この実験系を用いて、6個から10個と言われているホヤ幼生のモーターニューロンの確定と、個々のモーターニューロンが40個の筋肉細胞をどのように駆動と抑制をしているかを明らかにすることを目指した。ホヤ幼生の特定のモーターニューロン（候補）をレーザー照射により破壊するため、生きた状態でホヤ幼生のモーターニューロンを可視化することを試みた。モーターニューロンのマーカーとして運動神経節で発現が確認されている小胞型アセチルコリントランスポーターと小胞型GABAトランスポーターを用いた。これら遺伝子の上流配列にGFPの配列をつないだコンストラクトを作製し、エレクトロポレーションによりホヤ卵に遺伝子導入を行った。その結果、両方のコンストラクトでもホヤ幼生のモーターニューロンでのGFPの発現が観察できた。小胞型アセチルコリントランスポーターの遺伝子産物からの抗体により運動神経節を染色できたので、GFPの蛍光像と合わせ、レーザー照射の標的ニューロンに番号付けする。これらニューロンを網羅的に破壊し、それらの幼生の尾部の動きを解析する。

D.Sakurai,M.Ueno,T.Horie,M.Nakagawa,T.Kusakabe and M.Tsuda : Laser ablation of ascidian motor neuron and its swimming behavior of resultant larva

B852

ミミズ腹髄神経系におけるNO-cGMP経路の神経活動に与える効果

○北村 美一郎¹、橋井 秀明¹、水谷 賢史²、青沼 仁志³、小川 宏人⁴、岡 浩太郎¹（¹慶大・理工・生命情報、²慶大・院・生命理工、³北大・電子研・神経情報、⁴埼玉医大・生物）

ミミズの主要な神経系である腹髄神経節では、一酸化窒素（NO）が定期的に産生され、この定期的な産生は神経興奮時に一過的に促進される事がわかっている。またNOは体壁刺激による巨大軸索中での活動電位の発生をcGMP経路を介して抑制することが示唆されているが、神経節におけるNO-cGMP経路による調節機構の詳しいメカニズムはよくわかっていない。本研究では神経節におけるcGMP作用を調べるため、グアニル酸シクラーゼの阻害剤であるODQ（10μM）およびcGMPアナログ体である8-Br-cGMP（200μM）を添加して体壁刺激を行い、この時に発生する活動電位をガラス吸引電極を用いて測定した。また、体壁に繰り返し刺激を行った際の活動電位数の時間的な変化もあわせて調べた。ODQおよび8-Br-cGMPを添加すると、両者の場合で体壁刺激による活動電位数はコントロールに比べて減少した。また体壁へ繰り返し刺激を与えていくと、活動電位数は1回目の刺激時に比べて減少することがわかった。これらの結果より、ODQは内因性cGMP産生を抑えることからcGMPは比較的低濃度の場合には活動電位の発生に対して興奮的に作用し、また8-Br-cGMP添加時には活動電位数が減少したことから高濃度cGMPは活動電位発生に対し抑制的に働くものと思われる。さらに繰り返し刺激時には活動電位数が減少したことから、体壁刺激により神経節中で放出されるNOによるcGMPはミミズ逃避行動時の神経活動調節に深く関わるものと考えられる。以上、ミミズ腹髄神経系は神経活動の調節機構にNO-cGMP経路を用いており、またcGMP濃度変化により慣れといったシナプス可塑性をも実現している可能性が示された。

Y. Kitamura, H. Hashii, K. Mizutani, H. Aonuma, H. Ogawa, and K. Oka : Effect of NO-cGMP signaling on neural activity of the earthworm ventral nervous system

B851

磁性細菌のラマン分光観察

○山中 正晴¹、酒井 彰²、渡辺 真悟¹、三澤 俊平¹、岩佐 達郎¹（¹室蘭工大・材料物性、²室蘭工大・電気電子）

【緒言】磁性細菌（Magnetospirillum）は、粒子径50～100nmほどのマグネタイトの磁気微粒子が10～20個ほど連なったマグネトソームと呼ばれるチェーンを形成する。磁性細菌が合成する磁気微粒子は、粒径が均一で有機超薄膜で均一に覆われ、粒子間の無秩序な会合が抑制されるという特性を有する。本研究では、バイオ磁性細菌のマグネタイトの生成機構を解明することを目的として、磁性細菌のラマン分光観察を行った。

【実験方法】磁性細菌は、化学合成培地を用いて25℃、微好気的条件下で培養した。また、マグネタイトの生成過程を比較検討するため鉄イオンを添加した培地（有鉄培地）と未添加の培地（無鉄培地）とを用いた。ラマン分光測定を試料には、遠沈した磁性細菌を凍結乾燥した粉末および、それより作製したミニディスクを用いた。また標準試料としてマグネタイトとレピドクロサイトの粉末を用いてピークの同定に使用した。

【結果】ラマン分光観察の結果、有鉄培地菌では670cm⁻¹付近にマグネタイトに帰属されるピークが観察されたが、無鉄培地菌ではマグネタイトに帰属されるピークは観察されなかった。またマグネタイト生成の中間体として考えられているレピドクロサイト（γ-FeOOH）のピークは、有鉄培地菌、無鉄培地菌ともに観察されなかった。740cm⁻¹付近に有鉄培地菌、無鉄培地菌ともにピークが観察された。このピークはマグネタイト、レピドクロサイトに帰属されるものではないことから、磁性細菌の持つ物質に起因するピークと考えられる。また、菌体を破碎して遠心により分離した分画についてもラマン測定を行っている。それらの結果をもとに磁性細菌のマグネトソーム生合成過程について議論する。

M.Yamanaka, A. Sakai, S. Watanabe, T. Misawa and T. Iwasa : Raman Spectroscopic Study on Biosynthesis of Magnetosome of Magnetospirillum

B853

長期抑圧誘導時におけるNeurorescineのイメージングによる機能解析

○清末 和之、中山 貴美子、植田 淳子、波佐間 久美子、川崎 隆史、田口 隆久（産総研・人間系・ニューロニクス）

Neurorescineは、神経突起伸張因子として我々のグループで発見、クローニングした分子であり、切断されて細胞外に放出されて機能していることが予想されている。また一方、エンドソームとの膜融合の制御蛋白として見つけられた分子Rabaptin-5と非常に相溶性が高い。このように、似た分子で異なる機能が示されていることは非常に興味深く、この分子の生きた細胞内での動態を観察することにより、その異なる機能の発現メカニズムについて検討した。可視化するためにNeurorescineの両端にCFP,YFPを融合した蛋白を作成した。神経細胞で発現させると、核をのぞく細胞体全体に比較的均一に存在したが、特にスパインに局在が強かった。近年、シナプス部位のAMPA受容体のエンドサイトーシス・エキソサイトーシスが非常に早く、かつ常に起こっていると考え合わせると、Neurorescineは、スパインでの受容体分子のエンドサイトーシスに関係することが示唆される。また、シナプス可塑性の」発現メカニズムのひとつの候補に、エキソ・エンドサイトーシスの効率変化が示唆されている。そこで、長期抑圧を誘導するNMDA刺激によって分子動態が変化するかを検討した。その結果、樹状突起内のいくつかのスポットに凝集する現象が観察された。この事は、Neurorescineの動態変化が長期抑圧と関係することを示唆している。

K.Kiyosue, K.Nakayama, A.Uyeda, K.Hazama, T.Kawasaki, T.Taguchi : Imaging of GFP-tagged Neurorescine in living neuron during synaptic plasticity.