

## イモリ松果体におけるレチナール代謝経路の解析

大津 拓紘 (筑波大学 生物学類)

指導教員：中谷 敬 (筑波大学 生命環境系)

## 背景・目的

脊椎動物の間脳の背側に位置する小器官である松果体はホルモンを分泌する内分泌器官であるが、哺乳類以外の脊椎動物では、光受容能を有する器官でもあり、光によってメラトニン分泌を制御し概日リズムに関与すると考えられている。光受容能を有する松果体には微絨毛型の視細胞が存在しており、そこに発現している光受容体が光受容能を担っている。光受容体は、タンパク質部であるオプシンと発色団レチナール (ビタミン A のアルデヒド誘導体) で構成されている。多くの光受容体の発色団は 11 シス型で、光吸収により全トランス型に異性化されると光受容能を失う。光受容体が再び光受容能を獲得するには、全トランス型を 11 シス型に異性化させる反応経路が必要であるが、側眼においては色素上皮細胞やミュラーグリア細胞にその経路が存在すると報告されている。

松果体の発生過程は側眼と同じく間脳の壁が隆起して形成されることや、光受容細胞も側眼と同様の構造を持つことから、松果体にも側眼に存在するレチナール代謝経路と同様の機構が存在することが示唆される。しかし、側眼に比べ松果体の光受容のメカニズムやレチナールの代謝系はよく分かっていない。そこで本研究では、イモリ松果体を用いてレチナール代謝経路に関連する分子の同定と局在について解析を行った。

## 実験方法

## ・免疫組織化学

成体イモリを氷上で低温麻酔し断頭後、眼球、脳、舌を単離した。各組織は、4%パラホルムアルデヒド/PBS で 4°C 終夜固定し、15%及び 30%スクロース/PBS で順次置換した後、Tissue-Tek に包埋し 80°C で凍結させた。クリオスタットを用いて凍結切片を作成した。切片は、メタノール処理を施した後、5%スキムミルク/PBS でブロッキングし、一次抗体液、二次抗体液で反応させた。一次抗体は抗体原液を 5%スキムミルク/PBS で 300 もしくは 1000 倍希釈、二次抗体液は 200 倍希釈したものを使用した。抗体液で反応後カバーガラスに封入し、蛍光顕微鏡で観察を行った。

## ・ウェスタンブロッティング

イモリを低温麻酔し断頭後、眼球、脳、舌を単離し、組織破碎液に入れ超音波破碎した。試料は SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った後、PVDF メンブレンに転写させた。メンブレンを 2%ウシ血清アルブミン/PBS でブロッキングした後、一次抗体・二次抗体反応を行い、化学発光によりシグナルを検出した。

## 結果・考察

レチナール代謝関連タンパク質に対する抗体を用いて脳切片の組織染色を行ったところ、松果体の下部に位置する第三脳室の一部にシグナルが観察された。また、光受容に関連するタンパク質である Transducin と Gustducin に対する抗体を用いたところ松果体および脳領域においてシグナルは検出されなかった。また、ウェスタンブロッティングした結果、眼球、脳の抽出物においてレチナール代謝関連タンパク質のバンドが検出された。以上の結果から、松果体においても側眼と同様のレチナール代謝経路の存在が示唆された。