

イモリ桿体・錐体細胞の電気生理学的解析

小池 紫央里 (筑波大学 生物学類)

指導教員：中谷 敬 (筑波大学 生命環境系)

導入

光を眼で受容することによって、私たちは物を見ることが出来る。眼は様々な組織で成り立っているが、脊椎動物では、神経細胞である網膜の視細胞(桿体細胞・錐体細胞)が、光を受容し電気信号に変換する役割を担っている(光応答)。視細胞で変換された電気信号は、網膜内の高次神経で情報処理され、脳中枢神経系に伝達される。このような重要な働きを担う視細胞の桿体細胞は暗所で主に働き、錐体細胞は明所で主に働いている。働きの異なるこれら2つの細胞の電気生理学的研究では、細胞のサイズが大きく、網膜に占める錐体細胞の割合が比較的多いため測定が容易であるという理由から、サラマンダーが実験動物としてよく用いられている。

サラマンダーと同じ有尾両生類に属するイモリの視細胞は、桿体細胞の大きさが他の動物よりも大きく、錐体細胞の割合も大きいため、電気生理学的研究に適している。さらに、近年アカハライモリ(*Cynops pyrrhogaster*)において遺伝子導入技術が確立されたことから、今後、この動物が視細胞の研究にとって欠かせない実験動物となると考えられる。しかしながら、イモリの桿体・錐体細胞の電気生理学的解析はこれまで行われていない。そこで、本研究では、実験動物としてアカハライモリを用い、一細胞単位で桿体細胞と錐体細胞の電気生理学的解析を行って、その特性を明らかにすることを試みた。

材料・方法

動物業者から購入したアカハライモリ(*Cynops pyrrhogaster*)を雌雄区別せず用いた。一晩暗順応させたイモリを氷上で低温麻酔させ、断頭した後、弱赤光下で両眼を摘出した。次に、赤外線イメージコンバーターを備えた実顕顕微鏡下で、0.7×PBS(リン酸緩衝生理食塩水)に浸した眼球の角膜とレンズを取り除いてeyecup状にし、ピンセットで網膜を摘出した。摘出した網膜はイモリRinger液(組成:NaCl 110 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 1.6 mM, CaCl₂ 1.0 mM, Na-HEPES 5.0 mM, D-Glucose 10 mM, EDTA 0.02 mM, BSA 0.1 mg/ml, pH: 7.8)中で記録に至るまで暗所で保存した。各記録では、1/8網膜片を細かく切り刻んだのち、倒立顕微鏡ステージ上のチャンバーに移した。細胞はCMOSカメラを通して観察し、吸引電極法[※]により、光応答を測定した。刺激は桿体細胞の場合は520 nm、赤錐体細胞の場合は620 nmの単色光を、刺激時間を10 msの条件で与えた。実験中はチャンバーにイモリRinger溶液を還流した。記録は室温で行った。なお、イモリの解剖から実際の細胞応答記録に至る一連の過程は、全て暗室内で行った。

※吸引電極法とは、ガラス製のマイクロピペット中に細胞を吸引し、細胞膜を流れる電流変化を記録する手法のことである。今

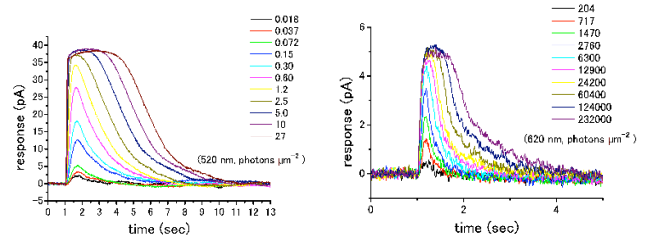
回吸引した細胞は、桿体細胞の外節と錐体細胞の外節である。なお、マイクロピペットの内径は、桿体細胞では7.3~8.7 μm、錐体細胞では4.0~5.3 μmのものを使用した。

結果・考察

イモリ桿体細胞とイモリ赤錐体細胞に光刺激を与えると、電流が発生した(電気的応答が観察された)。応答の大きさは、飽和電流 R_{max} (各細胞における最大応答値)に達するまで、刺激光の強度(1フラッシュあたりの光子数、単位は $\text{photons } \mu\text{m}^{-2}$)に依存して増大した。観察されたそれぞれの細胞の R_{max} の平均値は、イモリ桿体細胞 ($n=11$) では21.6 pA、イモリ赤錐体細胞 ($n=12$) では3.68 pAであった。図1、2に、観察したイモリ桿体細胞の光応答とイモリ赤錐体細胞の光応答の一例を示した。

次に各細胞の光感度を計算した。光感度は各細胞における応答の最大値の半分 ($1/2 R_{max}$) を与える光強度 (I_0) を指標とした。刺激光強度 ($\text{photons } \mu\text{m}^{-2}$) が横軸、応答の大きさ (pA) が縦軸のグラフにプロットした測定値に対し、関数 $y = a(1 - e^{-bx})$ [$a: R_{max}$, b : 定数]を用いた近似曲線から、応答の最大値が半分になる時の光強度 (I_0) を求めた。その結果、 I_0 の平均値は、イモリ桿体細胞 ($n=11$) では0.34 $\text{photons } \mu\text{m}^{-2}$ 、イモリ赤錐体細胞 ($n=12$) では2010 $\text{photons } \mu\text{m}^{-2}$ となった。この結果は、イモリ桿体細胞のほうがイモリ錐体細胞に比べて、約5900倍光感度が高いことを示している。

桿体細胞は主に暗所で、錐体細胞は主に明所で働くと言われていたが、イモリの電気生理学的にもこのことが言える。また、イモリの桿体細胞は他の動物よりも感度が高い。これには、イモリの細胞の大きさなどが関係していると考えられるが、詳しい考察は発表会にて報告する。



(左) 図1 イモリ桿体細胞の光応答 (R_{max} : 39.0, I_0 : 0.31)

(右) 図2 イモリ赤錐体細胞の光応答 (R_{max} : 5.29, I_0 : 1640)

※図1、2: 縦軸はそれぞれの刺激光強度における応答(流れる電流)の大きさを示す。横軸は経過時間であり、光刺激は時間1秒の時与えた。各線はそれぞれ同じ刺激光強度で約10回記録した応答を平均化したもの。凡例は刺激光の強度。