

イモリ嗅細胞における匂い応答の電気生理学的解析

靄田 奈津希 (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

嗅覚は化学物質を受容し、感知する感覚である。脊椎動物の嗅上皮に存在する嗅細胞 (olfactory cell neuron) では、1つの嗅細胞に1種類の嗅覚受容体 (olfactory receptor) が発現しているといわれており、匂い物質が結合することにより嗅細胞で電気的応答が生じる。

脊椎動物では一般的に、陸上生活を行う哺乳類などでは空気中の揮発性化学物質を、水中生活を行う魚類などは水溶性物質 (アミノ酸など) を受容している。両生類であり陸上でも水中でも生活するイモリは、これら両方を受容することが先行研究により明らかにされたが、アミノ酸受容における嗅細胞でのシグナル伝達機構の詳細はまだわかっていない。そこで今回はイモリ嗅細胞でのアミノ酸受容の仕組みを明らかにする目的で、単離した嗅細胞の電気応答および電気的特性について解析を行った。

材料と方法

動物業者から購入したイモリ (*Cynops pyrrhogaster*) を雌雄区別することなく使用した。まず低温麻酔したイモリを断頭し、2価イオン (Ca^{2+} , Mg^{2+}) free Ringer で満たしたチャンバーに切り落とした頭を移し、実体顕微鏡下ではさみを使用して鼻孔から切り込みを入れ、嗅上皮を露出させた後、それを摘出した。摘出した嗅上皮はカミソリで細かい切片にし、0.1% コラゲナーゼを含んだ2価イオン free Ringer 中に移し、室温で10分間放置した。その後 Ringer 溶液で3回リンスし、パストールピペットで30~50回程ピペッティングすることによって嗅細胞を単離した。この時気泡が入って細胞を壊さないように注意した。単離した嗅細胞を含む溶液をコンカナバリン A でコートした記録用ディッシュに分け入れ、しばらく放置して底に定着させた後、ディッシュ全体を Ringer 液で満たし、それを倒立顕微鏡ステージに設置した。

嗅細胞からの電気シグナルの記録は、ホールセルパッチクランプ法を用いて顕微鏡下で行った。パッチ用ガラス電極は micropipette puller (Sutter instrument, P-97) を用いて作製し、電極内には K^+ pipette solution を充填した。実験には電極抵抗が8~15 Ω ほどの電極を使用した。顕微鏡をのぞきながら電極の先端を嗅細胞に近づけた後、陰圧を与えて細胞膜と電極を密着させ、膜抵抗値がギガオーム以上になった状態 (ギガ・シール) で強い陰圧やパルスを与え、細胞膜に穴を開けてホールセルを形成した。

ホールセルパッチでは、細胞全体を流れる電流の測定が可能である。ホールセルを形成した後、-70 mV から +70 mV まで 10 mV ステップの脱分極パルスを与えて、匂い刺激がない状態でのイモリ単離嗅細胞の電気的特性を調べた。また、ステップ電位を与えて電位依存性の応答を確認した後、匂い物質をピコスプリッターを用いて投与し、電位固定下 (-60 mV) での応答を解析した。

結果と考察

ホールセルを形成した嗅細胞に -70 mV から +70 mV まで 10 mV ずつ段階的にステップ電位を与え、電流を記録した。図1は各電位に対する電流を示す。電位を上昇させると、一過性の内向き電流の後に持続性の外向き電流が観察された。このような一過性の内向き電流と持続性の外向き電流について、与えた電圧に対して生じた電流の大きさをプロットし、I-Vカーブを作成した (data not shown)。内向き電流の大きさは電圧の上昇に伴い増加し、0 mV 付近でピークに達した後減少した。+70 mV で電流が0に近づいたが、反転電位には達しなかった。外向き電流は -40 mV 付近から、電圧の上昇と共に増加した。このことから、一過性の内向き電流は電位依存性 Na^+ 電流であり、持続性の外向き電流は電位依存性 K^+ 電流であると推測される。

続いて、嗅細胞における匂い応答についての解析を行った。本実験は現在進行中であり、結果の詳細及び考察については卒業研究発表会で報告する。

今後の展望

揮発性の匂い物質の受容は、アデニル酸シクラーゼが関与するシグナル経路によって行われていることが明らかになっているが、アミノ酸受容についてはまだ分かっていない。今後はイモリ嗅細胞のアミノ酸に対する応答の、細胞内シグナル伝達経路を明らかにすることが目標である。そのために、アミノ酸に対する電気応答および電気的特性について解析を行い、さらに各種阻害剤を作用させた時の変化について検証していく。

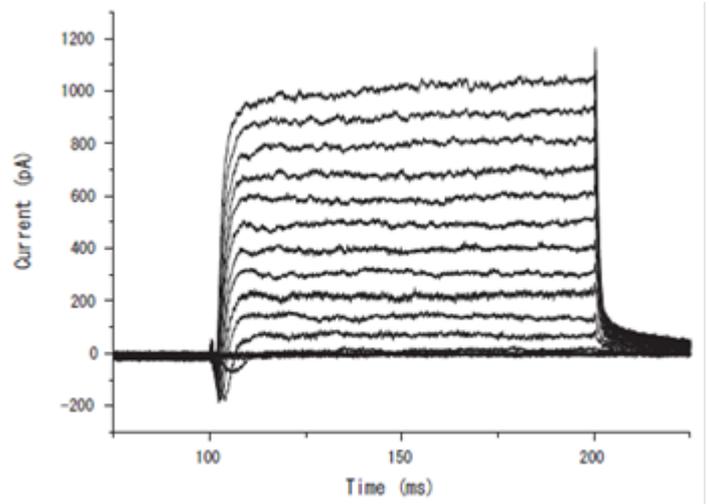


図1. イモリ単離嗅細胞の電位依存性電流