

アカハライモリ松果体に存在する光受容体の生理的役割の検証

小柳 堯廣 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 櫻井 啓輔 (筑波大学 生命環境系)

導入

松果体は下等脊椎動物では光受容能をもち第3の眼とも呼ばれている。眼は左右一対の器官であるが、松果体は脳上部の正中線上に存在する不對の器官である。松果体は袋状の構造をもち、内腔に向かって光受容細胞の光受容部位を突出させている。松果体の光受容細胞は側眼の視細胞と同じく繊毛型の視細胞であるが、視覚情報の感知というよりは明暗を検知し、内分泌系の制御や神経性情報を中枢神経系へ伝達していると考えられている。光受容能をもつ松果体は概日時計の光位相同調や日長時間の認識などに関わるとされているが、光受容細胞の生理的役割はまだ不明な点が多い。そこで今回、松果体光受容細胞が比較的発達した構造を持つアカハライモリ (*Cynops pyrrhogaster*) を実験材料として用い、その生理的役割の検証を行った。本研究では、まず、周辺光が頭蓋骨内に存在する松果体ほどの程度到達するかを明らかにするために頭部における光透過率を測定した。また、側眼の網膜に存在する桿体細胞と松果体の光受容細胞の光応答の測定を試みた。さらに、松果体組織で発現している光受容体の種類を RT-PCR 法により調べた。

材料・方法

1. 光透過率の測定

可視光領域における光透過率の測定は、出力光源はキセノン光源を、受光部はツェルニーター型分光光度計を用いて波長スペクトルを計測した。試料はイモリ断頭後、頭上の表皮と頭蓋骨を含む組織を摘出し計測ステージ上に置いた。松果体が位置する部位に表皮側から白色光を当てた際のスペクトル強度 $I(\lambda)$ と、試料無しの場合のスペクトル強度 $I_0(\lambda)$ を測定し、光透過率 $I(\lambda)/I_0(\lambda)$ を導出した。

2. 光受容細胞の電気生理学的測定

動物業者から購入した成体アカハライモリ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、弱赤光下で眼または松果体を摘出した。網膜に存在する視細胞の場合は、暗視スコープを備えた実態顕微鏡下で、0.7×PBS に浸した眼球の角膜とレンズを取り除いて眼杯状にし、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、組織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。細胞は赤外光によりカメラを通して観察し、吸引電極法で光応答を測定した。マイクロピペットの内径は、視細胞外節の外径に合わせて作製した。光刺激は 520 nm 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 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、全て暗室条件下で行った。

3. RT-PCR 反応

イモリを氷上で低温麻酔させ、断頭した後、4°C に冷やした 0.7 × PBS (リン酸緩衝生理食塩水) に入れて解剖した。眼・松果体・脳の各組織を取り出し、RNA 分解が進まないようにドライアイス上で凍結させた。その後 RNAase 阻害剤を含む細胞溶解液を加え、ホモジェナイザーで細胞を破碎した。細胞破碎液から RNA 抽出キットを用いて全 RNA を抽出した。抽出 RNA は、-70°C で保管した。次に、この RNA をオリゴ dT プライマーで逆転写反応により cDNA を合成し PCR 反応を行った。PCR 反応ではピノプシン、オプシン 5、メラノプシン、VA オプシン、EF1 α (コントロール) 遺伝子配列に相補的なプライマーを用い、得られた PCR 産物をゲル電気泳動にて調べた。

結果・考察

1. 頭部における光透過性

成体イモリ頭部に光を照射し、その光の透過率を測定した結果、図 1 のような結果が得られた。イモリ頭上部では光強度が約 0.1% に減弱され、短波長領域に比べ長波長領域の方が高い光透過性をもつことが分かった。松果体に光受容能をもつ他の脊椎動物の頭蓋骨の光透過率は 0.1~5% 程度と報告されているが、イモリの光透過率は比較的低いことが分かる。頭部透過で減弱された光を受容するために、イモリ松果体光受容細胞の外節が発達した構造をもつと推察される。

2. 光受容細胞の電気生理学的測定

イモリ松果体に存在する光受容細胞は、網膜の光受容細胞とよく似た構造をしている。そこで比較のためにまず、網膜に存在する桿体視細胞の光応答の測定を行った。桿体細胞に光刺激を与えると、電流応答が変化した。応答の大きさは、飽和電流 (細胞における最大応答値) に達するまで、刺激光の強度に依存して増大した。現在、同様の手法を用いて松果体光受容細胞からの電気生理学的測定を行っている。

3. RT-PCR 反応

松果体組織から得られた増幅産物をゲル電気泳動した結果、ピノプシンの PCR 産物が観察された。このことから、松果体には光受容体としてピノプシンが発現していると考えられる。

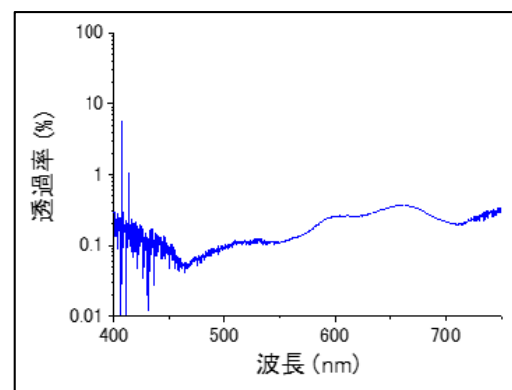


図 1. イモリ頭上部の可視光透過率