

カタユウレイボヤ光受容細胞の生理学的解析

杉原 堯歩 (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)

背景・目的

カタユウレイボヤ (*Ciona intestinalis*) は脊索動物門に属する、脊椎動物に最も近縁な海産無脊椎動物である。幼生は脊椎動物とも共通したボディプランであるオタマジャクシ型形態をもち、脊索のほかに眼点や平衡器、脳胞など単純でありながらもはっきりと分化した器官を有している。以上の特徴からカタユウレイボヤは脊索動物におけるモデル生物として、主に発生学や遺伝学での研究が進んでおり、脊椎動物の視細胞の進化的系譜を調べるのに適した実験動物といえる。ホヤ幼生の眼点には色素細胞と約 30 の視細胞が存在しており、脊椎動物と同様繊毛型の視細胞であるが、形態的特徴と局在部位により 3 タイプに分類されている。色素細胞に隣接する I 型視細胞の他に、脳室に繊毛部を突出させている II 型及び III 型視細胞に分類される (Horie *et al.*, *J Comp Neurol.* 2008)。分子生物学的、解剖学的知見に比べ、ホヤ光受容器の生理的機能については未解明な部分が多く、これらの細胞の光応答特性を明らかにすることは、光受容器の進化的起源を解く上で重要な研究である。本研究では、カタユウレイボヤ幼生に存在する視細胞の生理的特性を、光学イメージング法及び電気生理学的手法を用いて明らかにし、脊椎動物との関連性や相違点を調べることで、脊椎動物の視覚の進化を生理学的側面から解明することを目指す。

材料・方法

1) ホヤ幼生への遺伝子導入

カタユウレイボヤの成体は NBRP から提供を受け、人工海水中で 18°C の恒温条件下で飼育した。遺伝子導入実験では、別々の個体から採取した卵子と精子を同一シャーレに入れ受精させた後、受精卵を覆うコリオン膜を除去するために、チオグリコール酸ナトリウムを含む人工海水で約 5 分間処理した。その受精卵を、終濃度が 75 ng/μL のプラスミド DNA と混合し、受精から 30 分後にエレクトロポレーション (電気穿孔法) により受精卵にプラスミドを導入した。エレクトロポレーションした受精卵は予めゼラチンコーティングしておいたシャーレに入れ、抗生物質を含んだ人工海水にて 18°C で培養した。プラスミド DNA はホヤ光受容細胞で特異的に働くアレスチンのプロモーターに蛍光タンパク質遺伝子を連結させたコンストラクトを用いた。導入した蛍光タンパク質はカルシウムイメージング法では G-GECO を、電気生理学実験では mCherry を用いた。

2) カルシウムイメージング法

エレクトロポレーション法により遺伝子を導入したホヤ幼生の個体の中から、蛍光実体顕微鏡下で眼点に蛍光のシグナルを発する個体を選別しイメージング実験に用いた。蛍光性カルシウムイオンセンサータンパク質 G-GECO は、カルシウムイオン濃度に応じて蛍光強度が変化する。このタンパク質を視細胞特異的に発現させることにより、光受容により誘起される視細胞内カルシウムイオン濃度の変化をモニターすることが可能になる。G-GECO を導入したカタユウレイボヤの幼生を正立顕微鏡の

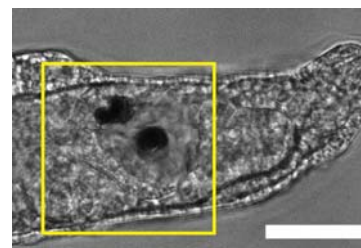
ステージへ移し、赤外光下で観察し 5 分以上暗条件で静置した。なお、幼生が動くとき正確なイオン変化が読み取れないため、あらかじめ幼生の尾部は切断しておいた。480 nm の単色光の LED 光源を用いて蛍光タンパク質を励起させ、幼生の眼点周辺における蛍光強度の変化を、冷却型 CMOS カメラで 20 ms 間隔で画像取得した。実験中に還流させている人工海水を、脊椎動物の光シグナル伝達タンパク質の構成タンパク質ホスホジエステラーゼの阻害剤 IBMX を含む灌流液に切り替えることで、IBMX がカタユウレイボヤ幼生の光受容細胞の応答に及ぼす影響を調べた。なお、取得画像は ImageJ と Origin で解析した。

3) 電気生理学的解析

mCherry 遺伝子を導入したホヤ幼生を酵素で処理し、ピペッティング操作を施し物理的処理により細胞を単離したサンプルを顕微鏡のステージに移した。単離細胞の中から、赤色蛍光タンパク質 mCherry の蛍光シグナルを指標として視細胞を同定した。同定された視細胞に対してパッチクランプ法を用いて電気生理学的な測定を試みた。

結果・考察

カルシウムイメージング法の結果、カタユウレイボヤ幼生の光受容細胞には、光刺激に応じて異なる 2 タイプのカルシウム動態が観察された。ひとつは、光刺激後によって細胞内の蛍光強度が低下する応答で、脊椎動物の繊毛型視細胞の光応答と同様のカルシウム動態である。ことから、カタユウレイボヤ視細胞には、脊椎動物の視細胞と同様、光依存的に過分極性の光応答を示すホスホジエステラーゼを介した光シグナル伝達系の存在が示唆される。他方、光照射前よりも蛍光強度が上昇するカルシウム動態を示す細胞も確認された。この結果は、ホヤ視細胞には脊椎動物型の視細胞と異なる細胞が存在する可能性が考えられるが、今後視細胞のタイプとの関連を明らかにする為に、詳細な解析を行う予定である。また、細胞を単離してパッチクランプ法を実施することで、電気生理学的な応答を調べられるのみならず、光受容細胞のタイプとの対応関係も判明させられると思われる。電気生理学の実験は現在実行中である。



左図: カタユウレイボヤ幼生の頭部。スケールバーは 50 μm。下図: 枠線内の蛍光観察画像。左から光照射直後、1 秒後、8 秒後の蛍光の様子。時間経過にしたがって蛍光強度が減少している。

