

イモリ嗅細胞の電気的特性の解析

角田 圭輔 (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

匂いによって動物は食料の探索, 危険の察知, 生殖活動, コミュニケーションといった様々な活動のための情報を得ている. 匂いを感知する嗅覚は化学物質に対する感覚である. 脊椎動物では, 匂い分子が嗅上皮に存在する嗅細胞で受容され電気信号に変換される. この信号が高次の中樞神経系へと伝達されて匂いは認識される.

本研究では実験動物としてイモリ (*Cynops pyrrhogaster*) を用いた. イモリ嗅細胞は他の動物と比べてサイズが大きく電気生理学的解析が行いやすい. またイモリは, 先行研究により空気中の揮発性物質及びアミノ酸といった水溶性物質を匂いとして受容することが明らかとなっている. しかしアミノ酸受容のシグナル伝達機構の詳細はまだ解明されていない. そこで本研究では, イモリ嗅細胞での匂い応答の詳細を明らかにする目的で, 単離したイモリ嗅細胞の電気的特性の解析を行った.

材料と方法

動物業者から購入したイモリを雌雄区別することなく使用した. 4 °C のインキュベーターで 30 分ほど保管することで低温麻酔したイモリを断頭し, 頭部を 2 価イオンフリー溶液 (Ca^{2+} , Mg^{2+} free) で満たしたチャンバーに浸した. 実体顕微鏡下でハサミを用い鼻孔を切開し嗅上皮を露出させた. ここから摘出した嗅上皮をピンセットで破断し 0.1 % collagenase を含む 2 価イオンフリー溶液に浸し, 36 °C 恒温器で約 10 分間放置した. この溶液を Ringer solution で 3 回リンスしたあと, パスツールピペットで約 40 回ピペッティングした. この操作によって単離された嗅細胞を含む溶液を ConcanavalinA でコート済みのディッシュに分注し, 細胞がディッシュに定着するまで約 20 分間放置した. この後ディッシュ全体に Ringer solution を満たした.

倒立顕微鏡ステージ上にディッシュを移し, 単離した嗅細胞を探した. さらにパッチ用ガラス電極を micropipette puller (Sutter instrument, P-97) を用いて作成し, ピペット抵抗が 8~13 m Ω となるようにした. このガラス電極に K^+ pipette solution を満たした. 倒立顕微鏡で観察しながらガラス電極を嗅細胞に接近させ, 十分に接近したところで陰圧を加えた. 膜抵抗値がギガオーム以上になることで細胞と電極が高密着した状態であることを確認した. 次に陰圧や電気パルスを細胞とピペットの接着面と与えて細胞膜に穴を開け, ピペット内液と細胞内が一体となるホールセルを形成した.

ホールセルを形成したのち, 電位を -60 mV に固定した. さらに -70 mV から +70 mV までのステップ電位を与えることで, イモリ嗅細胞における電位依存性チャンネルの存在および電気的特性を調べた. 電位依存性電流が観察され, ホールセルの形成が安定して

いる場合は 40 mV に電位固定のもと揮発性匂い物質を投与し応答を解析した.

結果と考察

単離した細胞を顕微鏡下で観察すると, 細胞体の一方から樹状突起を伸ばしてその先端に繊毛があり, さらに細胞体の反対側からは軸索を伸ばす細胞がみられた. この形態的特徴から嗅細胞であると特定できた. これらの細胞にガラス電極を用いてギガシールおよびホールセルを形成することに成功した. この細胞に対して電位固定法により膜電位を -70 mV から +70 mV まで 10 mV ステップで変化させると電位依存性の電流が観察された.

続いて嗅細胞に匂い物質を投与した際の応答を観察した. 本実験は現在進行中であり, 結果の詳細およ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

今後はホールセルを形成したイモリ嗅細胞に対して, 各種匂い物質を投与した際の電気応答を観察し, それぞれの電気的特性を解析する予定である.