

## イモリ嗅細胞における揮発性匂い物質とアミノ酸応答の電気生理学的解析

佐久間 貴之 (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

嗅覚は、外界の化学物質を受容し「匂い」として知覚する化学感覚であり、摂食行動や逃避行動、生殖行動といった、個の生存と種の存続に関わる活動において重要な役割を果たしている。

脊椎動物の嗅覚系において、外界の化学物質は、鼻腔中の嗅上皮の粘液に溶解込み、嗅上皮中の嗅細胞で受容される。その後、細胞内シグナル伝達経路を経てチャネルの開口が起き、電流が流れることで、匂い刺激が電気信号へと変換される。

脊椎動物が受容する化学物質は、数十万もの種類が存在すると言われており、嗅覚系ではこれら膨大な種類の化学物質を受容、識別している。鼻腔中で受容されるこれらの化学物質は、揮発性匂い物質と、水溶性物質であるアミノ酸に大きく分けられる。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匂い物質を、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。陸上でも水中でも生活する両生類であるアカハライモリでは、これら両方の化学物質を受容する嗅細胞が存在することが先行研究で示唆されているが、アミノ酸の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、本研究では、イモリ嗅細胞でのアミノ酸受容による応答電流の測定と、シグナル伝達機構の解明を目的とし、ホールセルパッチクランプ法により、単離した嗅細胞の揮発性匂い物質及びアミノ酸への特性について電気生理学的解析を行った。

## 材料と方法

## ・実験動物

業者から購入したアカハライモリ(*Cynops pyrrhogaster*)を雌雄の区別なく使用した。

## ・嗅細胞の単離

まず、低温麻酔したイモリを断頭し、2価陽イオン( $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ )フリーリングル液で満たした解剖皿上に固定した。実体顕微鏡下で、ハサミを使用し鼻孔から切り込みをいれ、嗅上皮を露出させた後、それを摘出した。摘出した嗅上皮は細かい切片にし、0.1% コラゲナーゼ / 2価陽イオンフリーリングル液中に移して35℃で5分間インキュベートした。その後、リングル液で3回リンスをし、コラゲナーゼ溶液を取り除いた。そして、パスツールピペットで30~50回程ピペティングすることで嗅細胞を単離し、細胞を含んだ溶液を観察用のディッシュに移した。しばらく放置して細胞を底に定着させた後、ディッシュをリングル液で満たし、それを倒立顕微鏡のステージに設置した。なお、観察用のディッシュは予めコンカナバリンAでコーティングしたものをを用いた。

## ・ホールセル穿孔パッチクランプ法

嗅細胞からの電気シグナルの記録は、ホールセル穿孔パッチクランプ法を用いて顕微鏡下で行った。パッチクランプ用ガラス電極は電極プレー(Sutter instrument, P-97)を用いて作製し、電極抵抗が8~15Ωほどの電極を使用した。

ホールセルパッチクランプ法では、電極内に $\text{K}^+$ 電極内溶液を充填した。その後、顕微鏡をのぞきながら電極の先端を嗅細胞に近づけ、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)で陰圧とパルスを与え、細胞膜に穴を開けてホールセルを形成した。

穿孔パッチクランプ法では、電極内に $\text{K}^+$ 電極内溶液と $\beta$ -エスシンを混ぜて充填した。その後、同様の手順でギガシールにし、 $\beta$ -エスシンが細胞膜にイオン透過性の高い小孔を形成することを利用してホールセルを形成した。これらのパッチクランプ法では、細胞全体を流れる電流の測定が可能である。

- 1) 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電流を記録し、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。
- 2) ステップ電位を与えて電位依存性の応答を確認した後、揮発性匂い物質をマイクロインジェクター(IM-31、NARISHIGE)を用いて投与し、電位固定下(-40 mV)での応答を記録し、イモリ単離嗅細胞の揮発性匂い物質への応答を調べた。また、-80 mV から+80 mV まで40 mV 間隔で段階的に固定電位を変化させ、応答を記録した。
- 3) 匂い刺激としてアミノ酸混合溶液を用いて行った。

## 結果と考察

- 1) 膜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、固定した電位に対して生じた電流の大きさをプロットし、電流-電圧曲線を作成した。内向き電流の大きさは、電圧の上昇に伴って増加し、0 mV 付近でピークに達し、その後減少した。この時、反転電位には達しなかった。外向き電流の大きさは、-40 mV 付近から電圧の上昇に伴って増加した。以上のことから、一過性の内向き電流は電位依存性 $\text{Na}^+$ 電流であり、持続性の外向き電流は電位依存性 $\text{K}^+$ 電流であると推測され、単離したイモリ嗅細胞が一般的な興奮性神経で見られる特徴を持ち、電気的な特性を失っていないことを確認した。
- 2) 膜電位を-40 mV に固定し揮発性匂い物質を与えたところ、一部の嗅細胞において、内向き電流が流れる匂い受容応答を示した。電流の大きさの平均値は63.26 pA ( $n = 5$ )であった。また、膜電位を-80 mV から+80 mV に段階的に変化させた条件では、揮発性匂い物質混合液によって誘導された電流の向きは膜電位に依存し、負の電位では内向き電流が流れ、正にシフトするにつれて電流は減少した。反転電位は0 mV 付近であった。以上のことから、揮発性匂い物質への受容応答には、陽イオンチャネルが関与していることが示唆される。
- 3) 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したい。