

イモリ松果体における光受容タンパク質の局在

田中 千智 (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)

【背景と目的】

松果体は脊椎動物がもつ内分泌器官である。概日リズムに関係するメラトニンを分泌する役割だけでなく、哺乳類以外の脊椎動物は松果体で光を受容して光周性の調節に利用していると考えられている。また、両生類では松果体が偏光や地磁気の向きの感知に関わることも指摘されている。

アカハライモリ (*Cynops pyrrhogaster*) の松果体は第三脳室の背側にある無色で扁平な器官で、内腔には視細胞の光受容部 (外節) が存在する。その光受容細胞は網膜の視細胞と同様に繊毛型光受容細胞で、他の生物と比較してイモリでは網膜の視細胞に近い形態をしている。先行研究において、様々な光受容に関連するタンパク質の発現が松果体で報告されているが、両生類の松果体における知見は少ない。本研究ではイモリ松果体に発現する光受容タンパク質の種類と、その局在を明らかにすることを目的に、イモリ松果体組織において免疫組織化学染色を行った。

【材料と方法】

1. 免疫組織化学染色

成体のアカハライモリから脳を摘出し、4%パラホルムアルデヒド/PB で固定し、10%正常ヤギ血清/PBST でブロッキング後、一次抗体に抗オプシン抗体・抗Gタンパク質抗体を用いて、ホールマウント免疫染色を行った。また、細胞核を染めるために DAPI で処理した。蛍光観察は、倒立型蛍光顕微鏡で Z 軸方向 (図 1) に連続 XY 平面像を撮影し、深度の異なる画像を取得した。その連続画像にデコンボリューション処理 (Olympus cellSense) することで、焦点が合っていない部分に起因する光の広がりを取り除いた。

2. 蛍光画像の解析

1. で取得した連続画像を用いて蛍光の座標を cellSense で数値化し、松果体の視細胞外節に発現する光受容タンパク質の蛍光部位の長さや方向を解析した。

【結果】

1. 免疫組織化学染色

今までイモリの脳においてホールマウント免疫染色が確立していなかったため、まず実験条件を検討し染色法の最適化を行った。続いて、確立した染色法をもとに松果体に発現する光受容タンパク質と光受容関連タンパク質の局在を調べた。

免疫染色の結果では、松果体組織特異的に発現するタンパク質が同定された。これまで、松果体は無色のため周囲の組織と識別困難であったが、蛍光観察で得た情報を元に、無染色条件下で松果体を再現性よく摘出する方法を確立した。

2. 抗赤錐体オプシン抗体蛍光部の解析

松果体で抗赤錐体オプシン抗体によって蛍光が観察できる棒状部位は 62 本確認された。その長さは $15 \pm 5 \mu\text{m}$ となった。次に、画像から棒状蛍光の向きを角度 $-18 \sim 162^\circ$ の範囲で算出した。松果体内腔の容積は小さいため、視細胞の外節と考えられる、ほとんどの棒状蛍光は曲がっていた。そのため、一つの外節に対し複数の点を取り小さな直線に分割する作業を、62 本全てに対して

行った後、それを XY ベクトル、YZ ベクトル、ZX ベクトルそれぞれに関して 180° を五等分した範囲に振り分けて長さを足し合わせた (図 2)。その結果、YZ ベクトルでは約 40% が $-18 \sim 18^\circ$ に向いており、ZX ベクトルでは約 47% が $90 \sim 126^\circ$ に向いていた。つまり、外節は XY 平面方向に向く傾向を示すことが分かった。

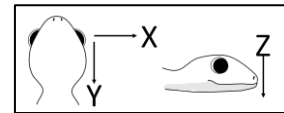


図 1 イモリ頭部と XYZ 軸

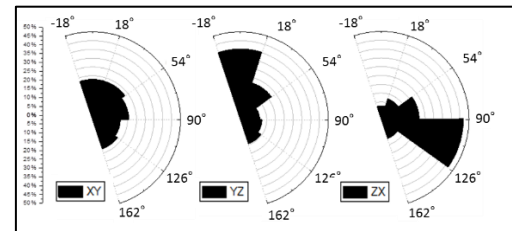


図 2 抗赤錐体オプシン棒状蛍光部位の方向

【考察】

1. イモリ松果体に存在する光受容タンパク質の種類

本研究では赤錐体オプシン、ロドプシンの強い蛍光が松果体で観察され、その蛍光は網膜の視細胞外節で確認される蛍光と似ていた。以上より、松果体では網膜と同様な光受容タンパク質が機能しており、概日リズムの調節に利用している可能性が示唆される。

2. 赤錐体オプシンの方向性の解析

蛍光画像を解析し得られた抗赤錐体オプシン抗体で染色された部位の長さや分布は電子顕微鏡観察による松果体視細胞光受容部の先行研究の知見とよい一致を示す。また、その研究では松果体視細胞は網膜の錐体細胞に近い構造を持つことが指摘されている。赤錐体オプシンは錐体細胞が持つオプシンであることと総合すると、本研究で観察された棒状の抗赤錐体オプシン抗体の蛍光は松果体視細胞の外節であると考えられる。

松果体光受容部は XY 平面方向に多く分布するという観察結果が得られた。従って、網膜の視細胞においては光の入射は、視細胞の外節の軸に平行であるが、松果体においては垂直であると考えられる。環境中から松果体に入射する光は主に Z 軸方向からと考えられるため、光の受容面積を広くし、頭蓋に入射した光を効率的に受容することに貢献すると考えられる。また、視細胞の外節の軸に垂直方向に入射した光受容に関しては、偏光特異性が報告されている。このことは、松果体の視細胞が偏光感知を担う可能性を示唆している。

【今後の展望】

両生類は細胞が大きくタフなため、電気生理学的手法を用いた研究に適した生物である。また、本研究より松果体を摘出する方法を確立した。そのため、電気生理学的手法を用いて、松果体の生理的特性とその役割を今後明らかにしたい。現在その準備として適切な松果体細胞解離方法の条件検討を行っている。