

ウシガエルにおける視細胞の電気生理学的解析

田中 智行 (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

視覚は生物が環境中の光の空間的情報を知覚する手段として重要な感覚で、摂食行動や逃避など様々な行動に不可欠である。視覚における光受容を担うのは網膜の視細胞であり、脊椎動物では大きく分けて暗所視に関わる桿体視細胞と明所視・色覚に関わる錐体視細胞がある。ヒトを含めて脊椎動物の桿体細胞は緑色感受性の赤桿体 1 種類であるが、一部の両生類では赤桿体細胞に加えて緑桿体細胞の 2 種類が存在する事が知られている。赤桿体は他の脊椎動物の桿体細胞と同様に光を受容する視物質としてロドプシンをもち、緑色の光を最も吸収する。一方で緑桿体は、視物質として、青色感受性錐体オプシンをもっているが、その光感受性は赤桿体と同様に高い。このことから、これら 2 種類の桿体は、暗所での色弁別を担う可能性が示唆されているが、それを裏付ける生理学的な証拠は得られていない。

本研究は、暗所における色弁別を担う細胞を調べる為に、緑桿体が比較的多く存在しているウシガエルの網膜神経細胞から電気生理学的に光応答を取得することを目指した。まず、ウシガエル網膜における緑桿体細胞の数と分布を免疫染色法を用いて詳細に調べた。また、吸引電極法により両桿体視細胞の基本的な光応答特性を調べるために、膜電流の応答を測定した。

材料と方法

実験には業者より購入した成体のウシガエル (*Rana catesbeiana*) を性別の区別なく用いた。

ホールマウント免疫染色では、ウシガエルの眼球から網膜を単離し、4%パラホルムアルデヒドで固定しブロッキングを行なった後、一次抗体として抗ロドプシン抗体および抗青錐体抗体を用い、二重染色を行った。染色した網膜組織は、蛍光倒立顕微鏡を用いて網膜の背腹・前後軸において領域を設定し、赤桿体・緑桿体の単位面積当たりの細胞数を数えた。

電気生理学的な測定には吸引電極法により視細胞外節の膜電流を測定した。実験前は暗環境に動物を一晩おいたのち、赤色照明下で低温麻酔した個体を解剖し眼球の摘出を行った。これ以降は暗条件下で実験を行なった。次に、網膜を単離し、カミソリ刃で物理的に細かく分断したのち顕微鏡のステージ上の測定チャンバーへ移した。チャンバーの溶液は酸素ガスでバブリングした Amphibian Ringer (NaCl 110 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 1.6 mM, CaCl₂ 1.0 mM, HEPES 5 mM, Glucose 10 mM, EDTA 0.02 mM, BSA 0.1 g/L, pH 7.8) で灌流した。光刺激には白色 LED 光源と Neutral Density フィルターおよび 440, 480, 520, 560, 620, 660 nm の各干渉フィルターを用いた。暗条件下での操作は暗視ゴーグル、測定チャンバー内の観察には赤外線カメラを使用した。吸引用の電極は内径 8~10 μm となるようにガラスキャピラリーから作成した。測定は室温で行い、増幅器で測定した電流は 20 Hz のローパスフィルターに通し、1 kHz でサンプリングを行なった。

結果と考察

・免疫染色

図 1 は、ウシガエル前部における、染色例である。赤桿体に対して緑桿体の割合は 5.7~14.9%であり観察した網膜の箇所により若干の変動がみられた。なお単位面積あたりの細胞数に顕著な差は見られなかった。緑桿体の割合の最小値は腹側の網膜領域で、そして最高値は背側であった。それに対して、前後軸での明確な差は認められなかった。この結果からは、同様の傾向が網膜全体にわたり背腹軸に沿った密度勾配を形成している可能性が考えられる。

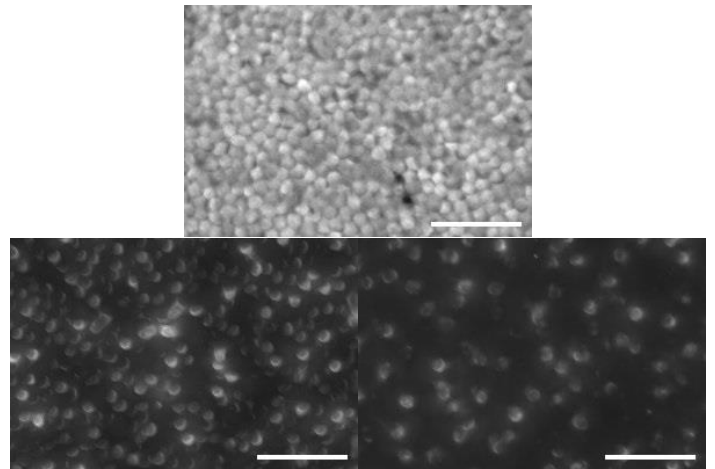


図 1. ウシガエル網膜前部における同一箇所の染色例
上:微分干渉像、左下:抗ロドプシン、右下:抗青錐体抗体
スケールバーは 50 μm

・電気生理学

吸引電極法により光刺激に対する視細胞外節の膜電流を測定した。測定中のシール抵抗は 1 MΩ のオーダーであった。応答の測定値は最大で約 20 pA であった。これら各応答の振幅から各波長の光感度を求めた。応答の測定に成功した細胞 (n = 10) はいずれも 480~520 nm の光刺激に対する感度が最も高かったことから、測定した細胞はいずれも赤桿体であったと考えられる。

今後の展望

今回の研究では、電気生理学的手法により、ウシガエル赤桿体の作用スペクトルを取得することに成功したが、当初の目的である緑桿体の測定にはまだ至っていない。今後は、緑桿体での同様の測定・解析を行なうべく、細胞の単離法や測定条件の最適化を行いたい。具体的には試行回数を増やすとともに吸引電極法に用いたプロトコールと同様の条件下で染色を行い緑桿体が残存しているか確認する。また、2 種類の桿体視細胞からの入力において反対の応答を示す網膜神経節細胞を調べるべく、パッチクランプ法を用いて光応答の測定も現在行なっている。