

氏名・(本籍)	なわ 繩	た 田	とも 朋	き 樹
学位の種類	理	学	博	士
学位記番号	理博第	4	9	6号
学位授与年月日	昭和5	1	年	3月25日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当			
研究科専攻	東北大学大学院理学研究科 (博士課程)生物学専攻			
学位論文題目	ヤコウチュウの興奮-発光関連機構に関する研究			
論文審査委員	(主査) 教授 柴岡孝雄		教授 小西和彦 助教授 和田俊司	

## 論 文 目 次

まえがき

第1章 培 養

第2章 形 態 —— 液胞周辺表層 ——

§ 1 はじめに

§ 2 方 法

§ 3 結果及び論議

§ 4 要 約

第3章 液胞液のイオン組成とpH

§ 1 はじめに

§ 2 方 法

§ 3 結 果

(1) 液胞液のpH値

(2) 液胞液主イオン分析

(3) 外液組成変化に対する液胞液組成変化

§ 4 論 議

§ 5 要 約

#### 第 4 章 発光誘発活動電位の電気イオン機序

§ 1 はじめに

§ 2 方 法

§ 3 結 果

(1) 電極挿入後数分間の膜電位, 膜抵抗及び発光の変化

(2) 表層膜の電流-電圧関係

(3) FTPの誘発

(4) 液胞液のイオン濃度変化に対するFTP振幅の変化

(5) H<sup>+</sup>の重要性を示す間接的な知見

§ 4 論 議

§ 5 要 約

#### 第 5 章 in vitro 発光のいくつかの性質

§ 1 はじめに

§ 2 方 法

§ 3 結 果

(1) 発光分画のいくつかの性質

(2) 懸濁液のpHの低下と塩溶液添加の効果

(3) 懸濁液のpH, 誘発発光量, 最大発光強度の関係

(4) 重金属類のin vivoとin vitro発光への作用の違い

(5) in vitro発光のスペクトル

§ 4 論 議

§ 5 要 約

#### 第 6 章 まとめと今後の研究への手がかり

#### 引用文献

## 論文内容要旨

筋細胞の膜に生じた電気的变化(興奮)が、細胞内に新たな反応を誘起し、筋収縮運動という巨視的な現象を引き起こしている。このように膜の興奮現象によって誘起され、あるいは調節される細胞質の二次的応答現象は、繊毛の方向決定、葉枕での急激な膨圧変化、原形質流動の停止、神経終末での化学伝達物質の放出等、さまざまな形をとって現われる。一見、性質を異にした両現象が、如何なる機構で関連し、エネルギーの変換を行なっているかが、次第に明らかにされつつある。

海産の渦鞭毛藻類ヤコウチュウ(*Noctiluca*)では、活動電位が引金となって一過性の明るい生物発光をし、興奮-発光の連関機構に興味がもたれる。本研究では、活動電位の発生によって、細胞質内に何が起きるのかの問題を中心に行なわれたものである。各章の結果から最も重要と思える知見を列挙すると(1)発光源の存在する細胞質が極めて小さい体積であると考えられること(第2章)、(2)液胞液のpHが3.5前後であること(第3章)、(3)発光誘発活動電位(以下、FTPと略記)の電位決定イオンが $H^+$ ではないかと思われること(第4章)、(4)in vitro系での発光がpHの低下で有効に誘発されること、である。これらを基礎に $H^+$ を連関因子とした興奮-発光連関機構を考えた。

ヤコウチュウは直径500 $\mu m$ 位のほぼ球形をした単細胞で、細胞体の大部分は植物細胞と同様液胞で占められている。FTPの電気的諸性質はChang(1960)、Eckert(1965)、Eckert & Sihaoka(1968)等によって調べられた。その結果、多くの興奮性細胞での電位変化が、細胞質膜上でおきるのと違って、FTPは液胞液に面する液胞膜上で発生する構造的特徴を持っていた。しかし、一般の活動電位と同様の電気的特徴を備えていた。つまり、FTP発生の外液としての役割は、環境水(海水)ではなく、液胞液が担っている。

液胞液の分析の結果次の組成であった。 $Na^+ \div [490mM]$ 、 $Cl^- \div [500mM]$ を主イオン成分とし、 $K^+ \div [25mM]$ 、 $Ca^{2+} \div [6.5mM]$ と海水に近いが、 $Mg^{2+} \div [3mM]$ 、 $SO_4^{2-} + CO_2 \div [<0.5mM]$ と少なく、 $NH_4^+ \div [20mM]$ と多い。特にpH値が $3.5 \pm 0.18$ と低いことが、FTPの電気イオン機構を考える上でも重要な特徴である。この異常とも思える低い値は、pH感受性ガラス微小電極で生細胞から得られ、破壊細胞液のpH測定、液胞液への種々のpH溶液の注入実験からの値やすでに報告されていた値とも大体一致していた。また液胞液は、細胞内外の浸透圧差による水の出入(細胞体積の増減を伴う)で説明しうる希釈あるいは濃縮を受けるのみで、環境水の特定イオン濃度を変えても、その影響を受けない。このことから環境水側からの実験が、ほとんどFTPに影響を与えないことが理解できると同時に、FTPの電気イオン機序を調べるには、液胞液の直接的な変化実験が必要なことを示している。

さて、FTPの電位決定イオン種は何か、連関機構を探る重要な問題であると考えられる。通常

FTPは、液胞環境水間の通電による分極で誘発し、同じく液胞環境水間で測定する。細胞の表層は複数の膜で構成されており、FTPを発生する液胞膜のみの反応を分離して得ることは技術的にできない。その上、ヤコウチュウには、もう1つ自発性の電位変動 (TRPと略記) が絶えず発生しており、FTPの理解を一層困難にしている。しかし、一定の分極度で誘発したFTPの振幅は、TRPには左右されないことが確かめられ、通常 $-150mV$ の分極度で $50\sim 60mV$ の振幅のFTPが発生する。この振幅の意味については、仮定を含めた論議が必要であるが、これを指標に液胞液のイオン濃度変化 (高濃度塩溶液等の微量注入法) に対する反応を調べてみた。液胞液のpHをpH緩衝液の注入によって変化させると、pH2.4以下、pH4.0以上では、細胞は破壊し、pH2.5 $\sim$ 3.7前後の極く限られた範囲でのみ電気的反応が保たれる。この範囲でのFTPの振幅とpHの間には、液胞膜があたかもpH感受性ガラス電極に似た振舞いをしていような関係が得られる。つまり、本来の液胞液のpH3.5では約 $50mV$ であったFTPの振幅は、pHを下げて2.9、2.5にすると、それぞれ約 $80mV$ 、約 $100mV$ とNernstの式の要求する傾きで顕著な増加がみられるからである。(この実験には、まだかなりの数の失敗を伴う)。この実験では通常みられない弱い持続型の発光がおきるが、発光の有無はFTP振幅に影響しないことが確かめられる。また、FTPやTRPの反応の中には、ヤコウチュウが液胞液のpHを本来の値に保つ能力のあることを示唆するものがあつた。他方、高濃度に存在する $Na^+$ 、 $Cl^-$ を除いて、液胞液構成イオンの各塩溶液を注入して元の10倍以上に濃度を変えても、FTPの発生、その振幅、さらにTRPにもほとんどその影響が認められない。また $Na^+$ に関しては“ふぐ毒”の注入でみる限り、その影響を認めない。 $Cl^-$ は今のところ不明であるが、これらの反応は一般の興奮性細胞の活動電位のイオン依存性とは、かなり異なっている。この反応を最も単純に解釈すると、FTPが液胞と細胞質間のpH勾配で発生している $H^+$  スパイクである可能性を示している。しかし、細胞質 (pHは中性付近と考える) と液胞の間には、3 $\sim$ 4のpH勾配があると考えられ、FTPの振幅として実測される $50\sim 60mV$ の3 $\sim$ 4倍の大きさが期待される。この矛盾は細胞表層の形態的特徴を考慮すると一応理解でき、発光誘発に関して重要な予測を導くことができる。

液胞膜と環境水の間は、数 $\mu m$ の厚さに満たず、細胞質に相当すると思えるところは $1\mu m$ 以下である。しかも環境水のpHを6 $\sim$ 10にわたって変えてもFTPには変化が現われないことから、FTPによって拡散した $H^+$ はこの極めて薄い層の細胞質内に留まって、そのpHを自ら大きく低下させると考えられる。伝導させないFTP誘発法をとっているから、表層膜の電気容量 ( $0.8 \times 10^{-6} F/cm^2$ ) は、FTP振幅の値だけ充電されていなければならない必要性がある。このことから逆に細胞質内のpHがどれだけ低下するかが算定できる。それによると、細胞質の厚さ $0.1\mu m$ の仮定 (この厚さは表層の観察からは断定できないが、否定されるオーダーではない) の下に、FTP振幅 $50mV$ の頂点時に細胞質内は4.36になる。従つて、F

TPの発生は細胞質内のpHを中性付近から数msec以内に急激に低下させる働きをすると推定する。このことを他の方法で検証することはできないが、いくつかの現象を説明することができる。本研究の目的であった発光誘発もその1つである。

in vivo系において興奮現象と発光現象を分離する方法は見い出せなかった。両現象が不可分の関係にあることを思わせ、細胞を破碎したin vitro系で発光誘発に有効な手段を見出すことが1つの方法であると考え。ヤコウチュウの発光物質を詳細に調べた報告はないが、酵素-基質レベルで詳細に研究されている近縁のウズオビムシ (*Gonyaulax*)のそれと極めて類似し、 $H^+$ の添加(懸濁液のpHの低下)で発光がおきると言われている。予備的な実験としてウズオビムシで用いられる抽出液(10mMEDTA, 1mM dithiothreitol, 50mM Tris-HCl buffer pH8.2)の中で機械的に破碎し、遠心して得た分画(13万×g, 60分間遠心後の上澄を1/100に希釈)が、pHを5.5へ急激に低下させるだけでin vivo系の発光と類似の閃光型発光をするのがわかった。液胞液を構成する他のイオン種の添加では、前者の発光強度の1/500以下で、その時間経過も極めて緩慢であり、有効ではないと思える。その他、(1)細胞内での発光源が顆粒状に存在すると報告されていること (2)in vitro発光のスペクトルが約471nmに極大波長をもつこと (3)重金属イオンで発光の障害がおきことは確かにウズオビムシのそれらと類似している。しかし、全く同一のものであるとは思えない点もあり、今後検討を必要とする。

以上の結果等から、興奮-発光連関機構に $H^+$ を連関因子とした次のような可能性を指摘した。つまり、「刺激→液胞膜上でのFTP( $H^+$ -スパイク)の発生——液胞膜の $H^+$ 透過性の増加→ $H^+$ の液胞から細胞質内への拡散→発光顆粒近傍(細胞質内)のpH5.5以下への低下→発光酵素-基質反応→発光」である。Fogel & Hastings (1972)はウズオビムシの発光物質の研究から、発光顆粒近傍のpHの低下が必要であることを述べ、それが膜電位変化によるだろうとの予測をしている。今回の研究は電氣的反応の側からその可能性を指摘したと言える。また、このときの $H^+$ の挙動は、繊毛虫ゾウリムシで知られている興奮-繊毛逆転反応連関における $Ca^{2+}$ -電流説(Eckert & Naitoh (1972))での $Ca^{2+}$ の挙動に似ているともみえる。

上記スキームは、1つの見込みある作業仮説であり、仮定の下に論じた部分、またもっと強く多方面から示めされる必要のある部分も多分にある。これらの部分は、おそらく液胞液のpHが他の多くの細胞ではみられない低い値であることと深く関る問題として解決されてゆくだろう。

## 論文審査の結果の要旨

細胞膜に発生した一過性の活動電位により細胞に二次的な化学的あるいは物理的な応答が誘発されることが広く種々の細胞で知られている。最もよくその機構が究明されているのは筋細胞膜の活動電位が筋原繊維の収縮を誘発する現象で、興奮-収縮連関とよばれている。ヤコウチュウの発光も活動電位により誘発されるもので、本論文はこの単細胞生物の興奮-発光連関の機構を明らかにすることを目的とした。この細胞は直径約  $0.5\text{ mm}$  のほぼ球形をしており、細胞の大部分は液胞で占められ、最外層のペリクルの内側にそって、きわめて薄い細胞質があり、そこに発光果粒が散在している。活動電位は普通の興奮性細胞と違い液胞に接する液胞膜に発生するので、この膜の発電機構を知るためには液胞液のイオン組成を知り、さらにその組成を変える必要がある。液胞液の分析結果により、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{Cl}^-$ 、 $\text{Ca}^{++}$  の濃度は海水のそれとほぼ等しいことがわかった。自作した微小ガラス電極を液胞内に挿入し pH を測定したところ、3.5 というきわめて低い（海水は約 8）値が得られた。液胞液の  $\text{H}^+$  以外の各イオンの濃度を大きく変えても活動電位の大きさを変えるものは見出せなかったが、種々の pH 値の高濃度緩衝液を注入し、液胞の pH を変えてみると、pH 2.4 以下、4.0 以上では細胞は破壊し、pH 2.5~3.7 のせまい範囲でのみ活動電位は発生し、正常の pH 3.5 で  $50\text{ mV}$  の大きさが、2.9 では  $80\text{ mV}$ 、2.5 では  $100\text{ mV}$  とほぼ Nernst の式に従った傾斜を示し、活動電位が液胞膜における  $\text{H}^+$  の透過性増大でおこる可能性を示した。この活動電位により液胞から細胞質に運ばれる  $\text{H}^+$  の量を概算すると、中性であると思われる細胞質の pH は活動電位の頂点時に 4.4 となる。すなわち発光果粒を含む細胞質の pH は中性附近から数 msec 以内に急激に低下する。生細胞で活動電位を介しないで発光させることは出来なかったが、pH 8 の抽出液の中で細胞を破碎し、遠心して得たある分画が pH を 5.5 に急激に低下するだけで生体と類似の発光をすることをつきとめた。以上の実験から、この生物の興奮-発光連関は、活動電位  $\rightarrow$  液胞の  $\text{H}^+$  の細胞質への透入  $\rightarrow$  発光酵素と基質の  $\text{H}^+$  濃度上昇による反応  $\rightarrow$  発光という図式を結論することができた。これは生物学における重要な貢献であり、この研究は自立して研究活動を行なうに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。よって、縄田朋樹提出の論文は理学博士の学位論文として合格と認める。