

氏名・(本籍)	おお 大	あみ 網	かず 一	のり 則
学位の種類	理	学	博	士
学位記番号	理博第	934	号	
学位授与年月日	昭和60年3月26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	ヤコウチュウにおける触手運動制御機構の電気生理学的研究			
論文審査委員	(主査) 教授 小西和彦 教授 駒嶺 穆 助教授 和田俊司 助教授 四釜慶治			

論 文 目 次

第1章 序論

第2章 材料と方法

- (1) 細胞の培養
- (2) 細胞の電氣的測定
- (3) Triton X-100抽出モデル

第3章 結果

- (I) 触手調節電位
 - (1) TRP の原形質層からの記録
 - (2) 電気刺激による TRP の誘発
- (II) 膜電位固定法による P-spike, N-spike に対応するイオン電流の解析
 - (1) 脱分極により活性化される膜電流
 - (2) 内向き電流に対する外液 Na⁺ 濃度の影響

(3) 内向き電流に対する外液 Ca^{2+} 濃度の影響

(4) 過分極により活性化される膜電流

(5) 外向き電流に対する外液 Cl^- 濃度の影響

[III] 触手運動のイオンによる制御

(1) 外液 Ca^{2+} 濃度と触手の運動様式

(2) Triton X-100抽出ヤコウチュウモデルの触手屈曲と Ca^{2+} 濃度の関係

(3) Triton X-100抽出ヤコウチュウモデルの触手屈曲と Mg^{2+} 濃度の関係

第4章 論議

[1] TRP を発生する膜

[2] 活動電位としての P-spike, N-spike

[3] P-spike のイオン機序

[4] N-spike のイオン機序

[5] 膜電流

(1) ヤコウチュウの膜電位固定法に関する問題点

(2) 脱分極により活性化される内向き電流と P-spike の関係

(3) 過分極により活性化される外向き電流と N-spike の関係

[6] P-spike に対する外液 Ca^{2+} の効果

[7] 触手運動の制御機構

[8] 膜の機能分化

摘 要

謝 辞

引用文献

図とその説明

論文内容要旨

序論

海産の単細胞生物のヤコウチュウ (*Noctiluca miliaris*) は、長さ約200 μ m の収縮性触手を持ち、その先端表面に食物となる緑藻などを付着させて細胞口へ運んで摂食する。触手の運動は周期的な屈曲一伸展のくり返しである。この運動は自発性の膜電位変動によって制御されている。従って、ヤコウチュウの触手運動の制御には、ゾウリムシの繊毛運動の膜電位による制御や筋細胞の収縮の膜電位による制御などと共通の機構の存在が考えられる。この研究は、ヤコウチュウの触手運動の制御機構を解明する目的で始められたが、一般の細胞運動の制御機構の解明につながるものである。

触手運動に伴う膜電位変動(触手調節電位; TRP)は、 -50mV 付近から -20mV 付近に達するゆるやかな脱分極相(pre-spike positive wave)と、それに続いて約 -90mV まで急激に変化する過分極性スパイク(N-spike)、そしてスパイク後の比較的安定した電位レベル(post-spike level)より成る。触手は脱分極相でゆっくりと屈曲を始め、過分極スパイクに伴って急激に強く屈曲し、post-spike levelを保つ間にゆっくりと伸長することが知られている(Eckert & Sibaoka 1967)。

Sibaoka & Eckert(1967)はTRPが液胞膜で発生すると考えた。しかし、後に磯野(1971)は、外液 Ca^{2+} 濃度を低下させると、TRPに新たに脱分極性のスパイク(P-spike)が現われることを見出し、TRPの少なくとも一部は原形質膜で発生する可能性を示した。さらに、大網(1982)は、P-spikeとN-spikeのピーク値がそれぞれ外液の Na^+ 濃度に依存することを示し、2つのスパイクが原形質膜で発生することを強く示唆した。

本研究では、まず、原形質層から直接、電位記録を行なうことにより、TRPを発生する膜を決定した。さらに、TRPに含まれる2つのスパイクの性質を膜電位固定法を用いて定量的に調べた。次に、界面活性剤処理細胞モデルを作製し、触手の収縮系を活性化する要素を決定した。これらの結果を総合的に判断して、ヤコウチュウにおける触手運動制御機構について論じた。

結果と論議

TRPを発生する膜を決定する目的で、ヤコウチュウの核内に微小電極を刺入することにより、原形質層からの電位を安定に記録した。原形質層から記録したTRP(原形質膜の電位)の振幅と時間経過は液胞から記録したTRP(原形質膜と液胞膜の電位の和)とほぼ一致しており、これはTRPが原形質膜で発生することを明確に示している。

次に、P-spikeは膜電位がpost-spike levelにある時、外向き通電により誘発され、N-spikeは膜電位がpre-spike levelにある時、内向き通電により誘発されることが示された。また、大網(1982)は、両スパイク発生時に膜のイオンコンダクタンスが一過的に増大することを示している。これらのことから、両スパイク共、膜電位依存性のイオンコンダクタンスの自己再生的

増大により生じる、一般の活動電位であると考えられる。

この原形質膜で生じる P-spike と N-spike の性質を定量的に調べるために、膜電位固定条件下における膜イオン電流の解析を行なった。保持電位を post-spike level よりやや過分極側の -80mV に設定し、階段状に膜を脱分極すると、 -50mV を越える付近から、P-spike に対応する一過性の内向き電流が生じた。この内向き電流のピーク値は、脱分極を増すと増大し、また、ピーク値に達する時間が短くなった。最大のピーク値は膜を -30mV まで脱分極した時に見られ、その値は $-0.15\mu\text{A}/\text{cell}$ であった。さらに脱分極を増すと、ピーク値はしだいに減少し、 $+25\text{mV}$ の時に極性が反転した。この脱分極により活性化される内向き電流のピーク値を指標にして描いた電流—電圧曲線は、閾値、負性抵抗領域、逆転電位が明確に表われた、神経、筋などの一般興奮性膜に見られるものと同様な、典型的な N 字状曲線となった。また、この電流の逆転電位は、外液 Na^+ 濃度の変化に伴ない、Nernst の式から予測される Na^+ の平衡電位の変化に近い割合で変化した。従って、この電流は Na^+ によって運ばれていると考えられる。

大網(1982)は、外液 Ca^{2+} 濃度を低下させると P-spike のピーク値が増大し、それに伴って膜コンダクタンス増加の程度が増すことを示している。そこで、P-spike に対応する、脱分極により活性化される内向き電流に対する外液 Ca^{2+} 濃度の効果を、膜電位固定法を用いて定量的に調べた。その結果、外液 Ca^{2+} 濃度は内向き電流の閾値、最大のピーク値に対応する電位、逆転電位には殆んど影響を与えなかったが、外液 Ca^{2+} 濃度の増加に従い、最大ピーク値が減少した。ここで内向き電流の時間経過を正確に調べたところ、この電流の増大期は Ca^{2+} 濃度の影響を受けていないが、その減少期が Ca^{2+} 濃度増加により顕著に速められていることが明らかになった。このことは、外液 Ca^{2+} 濃度が P-spike 発生に関与する Na^+ チャンネルの不活性化過程の時間経過を調節していることを示している。従って、外液 Ca^{2+} 濃度が高い場合に P-spike が見られなくなるのは、 Na^+ コンダクタンスが十分に活性化されないうちに不活性化されてしまうためと考えられる。逆に、 Ca^{2+} 濃度が低い場合には、不活性化が遅れるために P-spike が生じ、また、膜電位固定条件下では内向き電流が大きな値になると考えられる。

次に、保持電位を pre-spike level の -20mV に設定し階段状に膜を過分極すると、 -30mV を越える付近から、N-spike に対応する一過性の外向き電流が生じた。この電流のピーク値は過分極を増すと増大し、また、ピーク値に達するまでの時間が短くなった。最大のピーク値は膜を -40mV まで過分極した時に見られた。さらに過分極を増すと、ピーク値はしだいに減少し、 -90mV の時に極性が反転した。この過分極により活性化される外向き電流のピーク値を指標にして描いた電流—電圧曲線は、N 字型曲線を 180° 反転した形であった。これは、活性化される電位の向きが逆であるという点を除けば、一般の興奮性膜に見られる N 字型曲線と同じ性質を示している。また、この外向き電流の逆転電位は、外液 Cl^- 濃度の変化に伴ない、Nernst の式から予測される Cl^- の平衡電位の変化にほぼ等しい割合で変化した。従って、この電流は Cl^- によって運ばれていると考えられる。

Eckert & Sibaoka(1967)は触手の屈曲には外液 Ca^{2+} の存在が不可欠であることを報告して

いる。そこで、外液の Ca^{2+} 濃度を種々に変えた時の触手の運動様式の変化を調べた。外液の Ca^{2+} 濃度を低下させると、触手の運動はしだいに振幅が小さくなり、 0.1mM 以下の Ca^{2+} 濃度では伸長した状態で運動を停止した。逆に、外液の Ca^{2+} 濃度を正常の 10mM から 40mM に増すと、触手は1回から2回巻いたらせん状に屈曲し、巻きの程度が強くなったり弱くなったりする運動をくり返した。この結果は、外液 Ca^{2+} の膜電位変化に伴う細胞内への流入が触手の屈曲を引き起こしていることを示唆している。そこで次に、触手の収縮系に対する Ca^{2+} の直接的効果を調べる目的で、界面活性剤 Triton X-100でヤコウチュウを処理し、細胞膜は破壊されているが触手の収縮系は機能を保っているという、いわゆる抽出モデルを作製し、その触手に対する Ca^{2+} 濃度の効果を調べた。抽出モデルの触手は、 Mg^{2+} (6mM)と ATP (6mM)の存在下で、 Ca^{2+} 濃度を上げると屈曲を示した。触手の屈曲は 10^{-7}M 以下の Ca^{2+} 濃度でも見られ、 10^{-6}M 付近までは、 Ca^{2+} 濃度増加に伴ない比較的急峻に屈曲の程度が増した。 10^{-6}M を境として、 Ca^{2+} 濃度増加に伴う屈曲の増加分は小さくなった。この結果は、触手の屈曲が Ca^{2+} 濃度に依存していることを明確に示している。そこで、ヤコウチュウの触手運動は外液から細胞内への Ca^{2+} の流入による細胞内 Ca^{2+} 濃度変化により制御されていると考えられる。一方、触手の屈曲は膜電位変動 (TRP) と密接に関係している。すなわち、TRP の脱分極相 (pre-spike positive wave) で弱い屈曲が起こり、その後の過分極 (N-spike) に伴って強い屈曲が起こる。ところが、現在の所、この TRP の変動に伴う Ca^{2+} コンダクタンスの変動は見つけられていない。そこで、膜電位に反映されない程度の小さい Ca^{2+} コンダクタンスが TRP に伴う Ca^{2+} の細胞内流入に関係していることが推定される。この Ca^{2+} コンダクタンスは膜電位依存性であり、TRP の脱分極相で活性化され、その結果、 Ca^{2+} の細胞内流入が起こり、触手の屈曲がもたらされる。膜が過分極 (N-spike) すると、 Ca^{2+} の細胞内への駆動力が一過的に増大するために、すでに活性化されている Ca^{2+} チャンネルを通して流入する Ca^{2+} の量が増し、細胞内 Ca^{2+} 濃度がより増大し、強い触手の屈曲が引き起こされる。この Ca^{2+} コンダクタンスの不活性化の時定数は比較的大きく、N-spike に続く post-spike level の間に不活性化されて、 Ca^{2+} の細胞内流入が停止する。ついで膜に存在すると考えられる Ca^{2+} ポンプにより細胞内 Ca^{2+} が排出されて細胞内 Ca^{2+} 濃度が低下してゆき、触手はしだいに伸長すると考えられる。このように、ヤコウチュウの細胞内 Ca^{2+} 濃度の調節は、主に Ca^{2+} の駆動力の変化により行なわれていると考えられる。駆動力の変化による細胞内 Ca^{2+} 濃度の制御機構の例は、ヤリイカの巨大シナプスにおいて知られており、細胞内 Ca^{2+} 濃度変化によって化学伝達物質の放出が制御されている。このような機構による細胞運動の制御は、現在の所、ヤコウチュウの触手運動についてだけ見出されたユニークなものであるが、今後、いろいろな生物で発見される可能性を持っており、細胞運動の一つの標準的な制御機構であるかもしれない。

論文審査の結果の要旨

本研究はヤコウチュウ (*Noctiluca miliaris*) の触手運動の制御機構を解明する目的で行われたものである。

まず、核内に微小電極を刺入する手法で触手運動に伴う膜電位変動(触手調節電位)を発生するのは原形質膜であることを明らかにした。次でこの原形質膜で生じる脱分極性スパイク(P-spike)と過分極性スパイク(N-spike)の定量的性質を調べるため膜電位固定法での膜イオン電流の解析を行っている。保持電位を過分極側に設定し階段状に脱分極させP-spikeに対応する内向き電流を生じさせ、脱分極を増加させると極性が反転することを観察している。この内向き電流の電流-電圧曲線は通常の興奮性膜に見られるN字型であること、逆転電位は外液 Na^+ 濃度変化に伴い予想される Na^+ の平衡電位変化に近い割合で変化することから、この電流は Na^+ によって運ばれると示唆している。またこの内向き電流に及ぼす外液 Ca^{2+} 濃度の効果から、外液 Ca^{2+} 濃度がP-spike発生に関与する Na^+ チャネルの不活性化過程の時間経過を調節するとしている。

保持電位をpre-spike-levelに設定し、階段状に膜を脱分極するとN-spikeに対応する外向き電流が生じること、その電流-電圧曲線は通常のN字曲線を 180° 反転した型である結果をえている。また外向き電流の逆転電位の外液 Cl^- 濃度による変化から、この電流は Cl^- によって運ばれると示唆している。

触手運動様式に及ぼす外液 Ca^{2+} 濃度変化の効果から、外液 Ca^{2+} の膜電位変化に伴う細胞内への流入が触手の屈曲を引き起すことを予想し、Triton X-100で処理したヤコウチュウを用い、触手の屈曲が Ca^{2+} 濃度に依存していることを明らかにした。

以上の結果を基に、ヤコウチュウの触手運動は外液 Ca^{2+} の外液からの流入による細胞内 Ca^{2+} 濃度変化により制御されていること、また、細胞内 Ca^{2+} の濃度調節は主として Ca^{2+} の駆動力の変化によると示唆している。

これらの結果は細胞運動制御機構に於ける新知見であり、重要である。

以上、大網一則提出の論文は、本人が自立して研究活動を行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、大網一則提出の論文は理学博士の学位論文として合格と認める。