

Title	Cold-sensory response in Paramecium membrane
Author(s)	Kuriu, Toshihiko
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.11501/3144085">https://doi.org/10.11501/3144085</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	栗生俊彦
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第13970号
学位授与年月日	平成10年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 基礎工学研究科物理的専攻
学位論文名	Cold-sensory response in <i>Paramecium</i> membrane
論文審査委員	(主査) 教授 葛西 道生  (副査) 教授 村上富士夫 教授 佐藤 俊輔 助教授 中岡 保夫

## 論文内容の要旨

冷刺激感受機構について調べるために、繊毛虫の一種であるゾウリムシを用い、その行動解析、電気生理学的測定、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度測定を行った。ゾウリムシは、冷刺激に対して繊毛打逆転による遊泳方向変換と膜電位の脱分極応答を引き起こす。これらの応答を野生株とカルモジュリンに変異をもつ株について比較したところ、カルモジュリン変異株の一種 $\text{cam}^2$ がほとんど応答を示さないことが分かった。膜電位固定下で、野生株に冷刺激を与えると一過性の内向き電流を引き起こすが、 $\text{cam}^2$ ではこの電流応答も小さくなっていた。冷刺激に対する内向き電流応答は、 $\text{K}^+$ の平衡電位に近づくとき小さくなったこと、 $\text{K}^+$ 電流抑制条件下でその大部分が抑制されたことから、脱分極応答は主に $\text{K}^+$ コンダクタンスの減少によって引き起こされると考えられる。また、外液にカルモジュリン阻害剤であるW-7を加えたり、細胞内に $\text{Ca}^{2+}$ キレーターであるEGTAを注入すると野生株でみられる内向き電流応答は抑制された。これらの結果は、冷刺激に対する $\text{K}^+$ コンダクタンスが、 $\text{Ca}^{2+}/\text{calmodulin}$ によって調節されることを示唆している。

一方、ゾウリムシは冷刺激に対して $\text{Ca}^{2+}$ コンダクタンスの増大も引き起こすことが分かった。細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の測定条件下で冷刺激を与えると細胞の前端部で一過的に $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が増大した。また膜電位を固定し、 $\text{K}^+$ 電流を抑制した条件で冷刺激を与えると一過性の内向き電流が観察された。この電流応答は、静止電位より脱分極側でその振幅が小さくなり、外液の $\text{Ca}^{2+}$ を取り除くと消失した。この電流応答は、外液の $\text{Ca}^{2+}$ を $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ に置き換えると消失するが、 $\text{Ba}^{2+}$ 、 $\text{Sr}^{2+}$ に置き換えてもその振幅には影響がなかった。これらの結果は、ゾウリムシが細胞の前端部に $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Ba}^{2+}$ 、 $\text{Sr}^{2+}$ に透過性のある冷刺激感受性 $\text{Ca}^{2+}$ コンダクタンスを持っていることを示している。さらに、この $\text{Ca}^{2+}$ コンダクタンスは、外液のアミロライドや $\text{Ni}^{2+}$ などの2価カチオンによって抑制された。これらの性質は、冷刺激感受性 $\text{Ca}^{2+}$ コンダクタンスが、これまでにゾウリムシにおいて知られている脱分極、過分極、化学刺激、機械刺激、温度上昇刺激に対して活性化される $\text{Ca}^{2+}$ コンダクタンスとは異なる新しいタイプのものであることを示唆している。

以上の結果から、ゾウリムシの冷刺激応答は $\text{K}^+$ コンダクタンスの一過的減少と $\text{Ca}^{2+}$ コンダクタンスの一過的増大により引き起こされることが明らかにされた。今後、冷刺激によりこれらのコンダクタンスがいかに調節されるのかを明らかにする必要がある。

## 論文審査の結果の要旨

多くの生物は温度感覚機能を持っているがそのしくみはよく分かっていない。本論文は、敏感な温度感覚を持つ単細胞生物の一種であるゾウリムシを用い、環境温度の下降にともなう冷刺激によって引き起こされる細胞膜のイオンチャンネルの活性変化を研究し、新しいタイプのイオンチャンネルが働いていることを示したものである。

まず、いくつかのゾウリムシの突然変異株の中でカルモジュリン蛋白の一部に異常のあるものでは、野性株に比べ冷刺激に対する応答が極めて小さいことを見いだした。この変異体と野性株とを電気生理学的に比較したところ、冷刺激感受性を持つ $K^+$ チャンネルの活性が、変異体では低下していることが示された。このチャンネル活性はカルモジュリン阻害剤であるW-7を加えたり、細胞内に $Ca^{2+}$ キレーターであるEGTAを注入すると冷刺激時の応答が抑制された。したがって、冷刺激に応答する $K^+$ チャンネルの活性は、細胞内 $Ca^{2+}$ とカルモジュリンによって調節されているものであることを示している。次に、ゾウリムシは冷刺激により $K^+$ チャンネル活性の変化だけでなく、 $Ca^{2+}$ チャンネル活性の一過的な上昇を引き起こすことを明らかにした。細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度を、 $Ca^{2+}$ 指示用蛍光色素を細胞内に注入する方法で測定してみると、冷刺激により細胞前端部で一過性の $Ca^{2+}$ 濃度の上昇が起きた。一方、静止膜電位付近に電位を固定し、 $K^+$ 電流を抑制した条件で冷刺激を加えると一過性の内向き電流が記録された。この電流応答は、膜電位を脱分極された状態に固定するとその振幅が小さくなり、外液の $Ca^{2+}$ を取り除くと消失した。さらにこの電流応答は、外液の $Ca^{2+}$ を $Co^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ に置き換えると消失するが、 $Ba^{2+}$ 、 $Sr^{2+}$ に置き換えてもその振幅は変化しなかった。以上の結果は、ゾウリムシが細胞前端部に生理的条件下では $Ca^{2+}$ を通すチャンネルを持っており、冷刺激時に一過的に活性化されることを示している。さらにこのチャンネルの $Ca^{2+}$ 透過性は、外液のアミロライドや $Ni^{2+}$ などで抑制された。これらの性質は、冷刺激感受性の $Ca^{2+}$ チャンネルが、ゾウリムシについて既に知られている脱分極、過分極、化学刺激、機械刺激、温度上昇刺激などにより活性化される $Ca^{2+}$ 透過性のチャンネルとは異なる新タイプのものであることを示している。

以上のように、本論文はゾウリムシの冷刺激応答が、 $K^+$ チャンネル活性の減少と $Ca^{2+}$ チャンネル活性の一過的増大により引き起こされることを明確に示したものであり、この結果は温度感覚受容の分子生理学の分野で重要な知見を与えるものであり、学位論文として価値あるものと認める。