Osaka University Knowledge Archive

Title	ゾウリムシにおける温度受容電位
Author(s)	豊玉, 英樹
Citation	大阪大学, 1981, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/1922
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

博士学位論文

ゾウリムシにおける温度受容電位

物理系 生物工学専攻

豊玉 英樹

Thermo-receptor potential in *Paramecium*

by

HIDEKI TOYOTAMA

Department of Biophysical Engineering
Faculty of Engineering Science
Osaka University

This paper has been submitted in partial fulfillment of the requirements for the Degree of Doctor of Engineering at Osaka University.

Thesis supervisor: Professor Fumio Oosawa

March, 1981

目　次

要旨
I. 序論
1. 緒言
2. 温度感覚研究の現状
3. ゾウリムシの行動研究の現状
3-1. 膜の興奮性と行動との関連
3-2. ゾウリムシの温度感受性

II. 実験方法
1. 材料
2. 行動解析の方法
3. 膜電位の測定方法

III. 結果
1. 行動解析 − P. multi. の温度感受性
2. 温度受容電位 − 急激な温度変化に対する膜電位の一過的応答
3. 温度受容電位発生中の膜抵抗の変化
4. 温度受容電位のイオン依存性
5. 温度受容電位と興奮性 Caチャネル
6. 膜電位固定条件下の温度受容電流
7. 蛍光色素による温度受容電位の検出

IV. 考察
1. 実験上の問題点
2. 温度受容電位発生のメカニズム

V. 脂質モデル膜を使った温度受容電位のシミュレーション
1. 実験方法
2. 結果

2-1, モデル膜における温度受容電位
2-2, 温度受容電位と塩溶液の組成
2-3. 温度受容電位と脂質の種類
2-4, 温度受容電位と膜抵抗の変化
3. 考察
3-1. モデル膜の温度受容電位発生のメカニズム
3-2, 温度受容電位応答のモデル

Ⅵ. まとめと将来の問題
1. 温度適応と温度応答
2. 温度受容

Ⅶ. 引用文献

Ⅷ. 謝辞

要　旨

生物が温度感受性を持つことは、生命の維持のための不可欠な条件の一つである。しかし、温度感覚機構の研究は、それに適した温度感覚器管や温度感覚細胞の種類が少ないため、細胞レベル以下では、ほとんど行なわれていないのが現状である。

温度感覚は、温度の変化、いわば熱に対する応答で、生物の行動に直結する。ゾウリムシも、温度の変化に応答し、その泳ぎ方が変化することが、見つけられている。本論文では、行動様式が単純であり、比較的よく調べられているゾウリムシの温度感受性について、主に細胞電気生理学的な手法によって研究を行ない、次の事柄を明らかにした。

1). 温度刺激によって、ゾウリムシの膜に、温度受容電位が発生する。25℃で培養したゾウリムシに、25℃から20℃への温度変化を与えると、膜電位は、一時的に脱分極し、その応答時間は、約60秒間である。温度を20℃から25℃に戻すと、膜電位は一時的に過分極をするが、その程度は、脱分極応答に比べて小さい。これらの温度受容電位は、ガラス微小電極によって記録されたが、蛍光色素diS-C_3-(5)を使った膜電位の間接的測定によってもとらえることができる。

2) 膜抵抗は、温度変化に応じて、ゆっくり変化し、温度受容電位に対応するような一過的な変化は示さない。

3). 外液のKイオン濃度が増加すると受容電位の

大きさが減少するが、外液のCaイオン濃度には、あまり影響をうけない。

4) 繊毛を除去されたゾウリムシや、興奮性Caチャネルを欠く突然変異種でも、温度受容電位が発生する。

5) 膜電位固定下で、一過的な温度受容電流が記録できる。この温度受容電流の大きさは、外液のKイオン濃度が増加すると減少し、外液のCaイオン濃度が増加すると増大した。

6) 脂質とフィルターで構成した透過性の高いモデル膜に温度変化を与えて、ゾウリムシの温度受容電位と似た一過的な膜電位応答をシミュレートすることができる。

以上の実験結果より、ゾウリムシの温度受容電位発生中は、膜のKコンダクタンスが下がっており、また受容電位の発生には、興奮性Caチャネルの寄与が少ないと考えられる。モデル膜の実験では、膜に温度変化を与えた時に、膜電位を形成している陽イオン、陰イオンのコンダクタンスが、温度変化に応じて変わるが、その変化の速度に差がある場合、一過的な膜電位応答を示すというメカニズムが示された。

更に、温度受容電位とスパイクの発生について、解析を行ない、受容電位の脱分極の程度が大きいほど、スパイクの発生する確率が増大するという関係が得られ、

温度刺激——温度受容電位——スパイクの発生——方向変換

という情報の流れがあることが示された。

I 序論

1 緒　言

温度感覚は、生物にとって最も重要な感覚の一つである。にもかかわらず、その研究は、現在のところ、あまり進展していない。私は、原生動物のゾウリムシを材料として、温度感受性に関する研究を行なってきた。

一般に、生き物の持つ機能を解明しようとする時、材料の選択が非常に重要である。分子レベルにまで研究を進めようとする時には、特にこの点が重要となる。そして研究者は、自分自身が扱っている材料で研究をすることが、多くの生物に共通する普遍的な機能を明らかにすることにつながるという確信を持って研究を進めている。客観的に書いたけれども、私自身も同様である。

では、なぜゾウリムシを温度感受性の研究に使うのかという理由を考えてみる。第一にゾウリムシは、高い温度感受性を持つ。感受性が高いゆえに、いくつかの方法を使ってそれを観測することが可能である。温度感受性が高くても、その応答が細胞の局所で終わってしまうならば、研究者の眼にふれにくい。ゾウリムシの場合は、温度変化に対する応答を、行動の変化として表わす。そして、これは、我々の肉眼で、観察することができる。第二に、ゾウリムシは、扱い易い材料である。(17) 単細胞の真核生物で、その泳ぎは、繊毛の動きで制御されている。大きさが、数百ミクロンと大きく、電気生理学的測定の対象となりうる。培養は簡単であり、近年、無菌培養も行なわれるようになって、生化学的な分析にも適している。(1),(2),(13) さらに、突然変異種を用いた遺伝学的なアプローチも行なえる。(5) 第三に、やや主観的にすぎるかも

しれないが、ゾウリムシは、我々になじみがある。ゾウリムシは、子供でも知っている生き物であって、他の高等動物の細胞のように、運動のエネルギーをATPの分解より得ることや、細胞膜のKイオン透過性が高いことなども、親近感を覚える点である。以上が、温度感受性の研究に、私がゾウリムシを材料として選んでいる理由である。

哺乳類等の温度感覚の研究は、古くから行なわれている。これらの高等動物では、皮膚に存在する温度感覚受容器につながっている温線維、あるいは、冷線維と呼ばれる神経線維のインパルス応答が主として調べられている。そして、これら温度受容器に対する刺激は、温度というよりはむしろ熱であることが見つけられた。すなわち高等動物の温覚受容器は、温度上昇（熱を与えること）に応答し、冷覚受容器は、温度降下（熱を取り去ること）に応答する。ゾウリムシも、温度の上昇あるいは温度の下降に対して応答をすることがわかっている。この様に、温度受容器は、温度の時間変化を感じて、それに応答する。

刺激が温度受容器に伝わると、そこでは何らかの分子の物理化学的変化がおこり、さらに何段かのステップを経て行動が変化すると考えられる。後の方のステップは、それぞれの生物で、大幅に異なる経路をとる。しかし、最初の温度（熱）刺激 — 受容器の分子の構造変化 — 温度（熱）受容の段階は、生物の種類が異なっても本質的な差はないと期待される。この研究の目的は、温度変化という刺激が、ゾウリムシという受容器細胞に与えられた時に、細胞の中でどのような変化が起こるかを明らかにすることである。

2 温度感覚研究の現状

すべての生物は変化する環境の中に身をおいていて、環境の変化を感受し、それに応答する。温度は、すべての生物に影響を与える環境要因の1つであるが、その変化を感受するメカニズムに関しては、研究があまり進んでいない。感受から応答に到る過程は、ある程度調べられている。

温度感覚は他の感覚と同様に静的応答と動的応答とからなる。温度変化に対する動的応答は、生物によって示すものと示さないものとがあるが、静的応答は、すべての生物が何らかの形で示す。一般に温度を感受するために分化した感覚器管や、バクテリア、ゾウリムシのように、特に温度感受性の高い細胞は、動的応答、静的応答の両方を示す。

哺乳類の温覚、冷覚は、それぞれ温受容器、冷受容器により感受されている。いずれも皮膚に存在し、受容器管としては、前者にルフィニ小体、後者にクラウゼ小体が考えられているが明らかでない。いずれの場合も受容電位の細胞内記録には成功しておらず、受容器につながっている神経線維のインパルス応答が調べられている。例えばネコの温受容器の場合、それが体温以上に暖められると、温線維に多数のインパルスが発生する。温度が元に戻された時には、インパルスの発生頻度が一時的に抑えられる。(図1) 冷受容器が体温以下に冷やされると、冷線維のインパルス応答が一時的に増加し、温度が元に戻されると、やはり一時的に抑制される。温受容器は、温度上昇時にのみ、インパルス頻度の増大を引きおこし、冷受容器は、温度下降時にのみ、インパルス頻度を増大させる。(21)

インパルス頻度でみた静的応答は、温線維が体温より高い温度で鋭いピークを示し、冷線維は、体温より低い所でゆるやかなピークを示す。(図2)
ラットやサルの場合についても、同様の結果が得られている。(19)。これらのことから哺乳類の温度感覚は、二種類、独立して存在し、それぞれが電気インパルスとして脳に伝達されていることを示している。

ヘビ類の赤外線受容器は、高度に特殊化した温度感覚器として有名である。毒ヘビ類の目と鼻の間にあるピットと呼ばれるくぼみが、温度受容器として働く。ピットで赤外線あるいはマイクロウェーブが熱に変換されて温受容器に伝えられる。受容器電位は、細胞外から記録されている。(62)
この温受容器につながる温線維のふるまいは、哺乳類における温線維の応答と同様で、温度の上昇に対してのみ一時的にインパルスの頻度が増加する。体温は一定でないが、静的応答のピークは、25°C付近にある。温線維終末にある終末神経塊は、ミトコンドリアで満たされている。電子顕微鏡観察により、温度変化前後で、このミトコンドリアの形態が変化することが報告され、ミトコンドリアが温度変化の受容体ではないかという説もある。(14)、(15)、

昆虫の温度受容器は触角に存在する。蚊の類では、雌の触角の先端の節にある窩状感覚子が温度受容器であることが明らかにされた。ヤブ蚊の雌では、2個の窩状感覚子があり、そのうちの1つは温受容器、他の1つは冷受容器である。温受容器は、温度の上昇期に激しくスパイクを発生し、温度が元に戻されると、スパイクの発生が

一時的にとまる。冷受容器では、逆の応答がみられる。(6), (61) 昆虫で温受容器の存在が明らかにされているのは、ヤブ蚊の類だけである。ヘビ類の中でも、温血動物を襲う毒ヘビの類に、特に敏感な温受容器が発達し、昆虫の中でも、温血動物の血を吸うヤブ蚊の類に温受容器が備わっていることは興味深い。

昆虫より下等なレベルの生物では、ネマトーダ(線虫)、粘菌(64)、白血球などの温度感覚について、いずれも温度勾配のある寒天プレート上での行動が研究されている。例えば、20℃で培養したネマトーダを16℃から25℃の温度勾配のついたプレート上に一様に載せる。一時間後に、ネマトーダのプレート上での分布をみると、20℃の付近に最も多く集まっていることがわかる。(18) このように、下等な生物が温度勾配中に入れられた時に、特定の温度のところに集まろうとする性質は、走熱性と呼ばれる。ネマトーダの場合には、温度感受性を欠く(走熱性を示さない) mutantが得られており、それを使った遺伝学的な解析が始められている。(9) 粘菌や白血球も走熱性を示す。白血球の場合には、その食作用との関連について議論されている。(29)

大腸菌を温度勾配中に置くと、培養温度に集まることから、走熱性、即ち、温度感覚機構が存在することが示された。大腸菌の泳ぎは、まっすぐな泳ぎ(スムース)と、2~3秒に1回起こる方向転換(タンブル)から成る。培養温度から急に温度降下をさせると、タンブルの頻度が増す。一方、急な温度上昇を与えると、一時的にタンブルの

頻度が減少してスムースな泳ぎのみとなる。温度変化に対する、この非対称な応答は、大腸菌が化学物質の濃度変化に対して示す応答と同じであり、走熱性の原因となっている。(36)。大腸菌の、一般走化性欠損変異株が、温度に対する感受性を失っていることから、これら2つの感覚の情報伝達機構が一部共通していることがわかった。さらに、温度感受性が、低濃度のセリンで特異的に阻害されることが見出された。そして、セリン受容体からの情報が最初に集められる tsr 蛋白質の欠損株では、温度感受性が全くみられないことが確められ、大腸菌の温度感覚機構は、セリン感覚機構と密接な関係があることが明らかにされている。(37)。

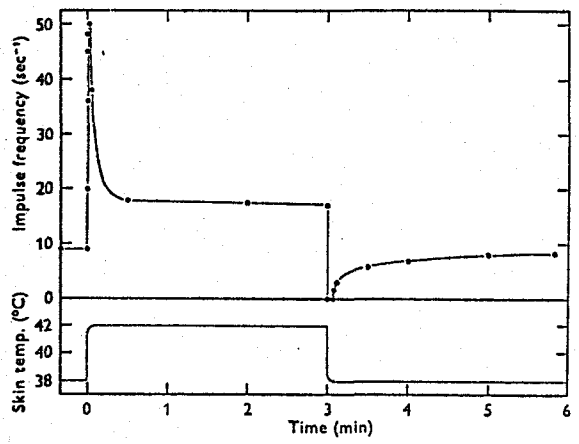


図1 ネコ鼻の上の皮膚の温度と温線維のインパルス応答(21)

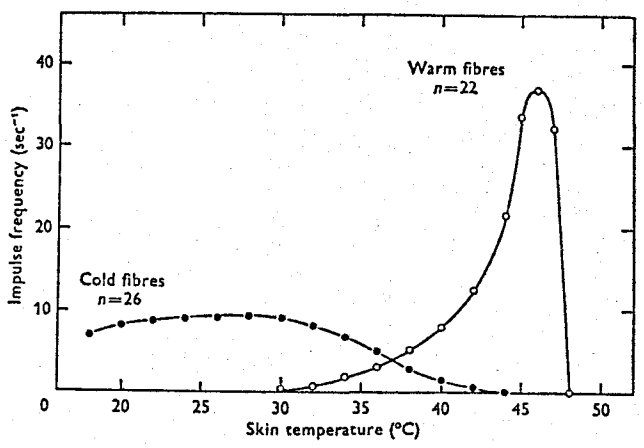


図2 ネコの温線維と冷線維の定常状態での各温度におけるインパルス頻度(21)

3. ゾウリムシの行動研究の現状

3-1. 膜の興奮性と行動との関連

ゾウリムシは、よく知られた単細胞の原生動物で、繊毛運動によって水中を泳ぐ。運動のエネルギーは、ATPの分解より得る。泳ぎ方は、直進しながら、時々急にその向きを変えるという単純なものである。まわりの温度、イオン組成などが変わると、これらが刺激となって泳ぎ方が変化する。(20),(22),(23), 変化は、泳ぎの速度、或いは、方向変換の頻度の増減として表われる。

ゾウリムシの細胞には、ガラス微小電極を挿入することができ、それによって、膜の電気的性質が調べられている。(25),(30)(31), 細胞内は普通の条件で約−30 mVの電位をもつ。細胞膜の透過性は、陽イオンに対して高く、陰イオンに対して低い。外液の陽イオン濃度が増加すれば、ほとんどの場合、静止電位の値は浅くなるが、陽イオンのうちでは、Kイオンに対する透過性が一番高い。(46). 普通、ゾウリムシが棲んでいる条件では、外液中の主な陽イオンは、mM程度のKイオンとCaイオンであり、細胞内のKイオン濃度は数10 mM, Caイオン濃度はμM以下に保たれている。(55) 膜電位は、内外のKイオン及びCaイオンの濃度とそれらの透過性によって決まっている。(10),(11),(39).

ゾウリムシの行動は、その細胞膜の興奮性と密接な関係がある。その一つの例は、ゾウリムシに機械的刺激を与えた時の反応である。ゾウリムシの頭部を細いガラス棒でたたくと、膜電位は一時的に脱分極をし、尾部を刺激すると一時的に過分極する。膜電位の脱分極応答は、その応答の大きさと外液イオンとの関係が調べられ、頭部刺激に

よって、膜のCaイオンの透過性が一時的に増加することが原因であることが明らかにされた。過分極応答についても同様に調べられ、Kイオンの透過性の一時的増加によることがわかった。(12)(41)(47)
膜電位の脱分極応答は、繊毛膜上に存在する膜電位依存性のCaチャネルを開き、Caスパイクを発生させる。(8)(53)(56)スパイクの発生により、Caイオンが流入し、繊毛内のCaイオン濃度が上昇する。増加したCaイオンは、繊毛に直接働きかけて、それを逆転させる。(11) すなわち、頭部刺激——脱分極応答——Caスパイク発生——Caの流入——繊毛打逆転という過程で応答が起こる。

流入したCaイオンによる繊毛打の逆転については、内藤らによって詳しく調べられた。(48)彼らは、ゾウリムシを界面活性剤で処理して、トライトン・モデルを作った。このモデルは、細胞膜がこわされて、繊毛運動が停止している。しかし、トライトンを除き、mM程度のATPとMgを加えると、再び前進して泳ぐようになる。この時、同時にCaイオンがμM以上あると、このモデルは、連続して後ろ向きに泳ぐ。このことから、繊毛の逆転は、CaイオンとATPによって引き起こされることが明らかにされた。(45)しかし、このトライトンモデルを使って、Caイオン非存在下でも、ATPとMgイオンの濃度によって繊毛の逆転が起こる場合があることを筆者らが見出しており、繊毛打逆転のメカニズムは単純ではない。(50)

更に、細胞内に流入したCaイオンは、チャネル自体に影響を与えることが報告されている。Brehmらによって、スパイクの発生の結果流入したCaイオンは、細胞の内側からチャネルに働きかけ、開いているCaチャネルを

閉じる作用があることが確かめられた。(3)また、佐藤らは、流入したCaイオンがKチャネルを活性化する作用があることを示した。(57)

膜の興奮性と行動との関連を示す事実として、ゾウリムシの行動に異常のある突然変異種が数多く存在し、これらの多くは、その膜機能に異常のあることが知られている。興奮性Caチャネルを持たないmutantでは、その泳ぎ方は、前進するだけで、方向変換をしない。(34)(57)(59)(60)。反対に、非常に興奮しやすい膜を持っているmutantは、頻繁に方向変換をしたり、連続的に、後進したりする。(16)、(35)。これらのmutantは、いずれもトライトンモデルが作られ、運動器管そのものには異常が見られないことが確かめられている。前述の佐藤らの結果は、mutantとwild typeとの比較から得られたものである。

以上のように繊毛打逆転に伴なう方向変換と、膜の興奮性との関連については詳しく調べられている。しかし、繊毛打頻度、つまり泳ぐ速度の調節のメカニズムについては、ほとんどわかっていない。膜に電流を流して過分極状態にすると繊毛打頻度が上昇することが知られているが、その理由は明らかでない。(38)(40)

3-2. ゾウリムシの温度感受性

ゾウリムシを温度勾配のある容器に入れると、一方の側に集まることを、Mendelssohnが、1895年に報告している。(24) これは、温度を感じていることに他ならない。ゾウリムシのParamecium caudatumという種を用いて、温度勾配の中で、どのような行動をとることによって一方の側に集まるのか、が調べられた。(49)

25℃で培養したゾウリムシを、両端が20℃と30℃になるような温度勾配の中に入れて、温度が上昇する方向に泳いでいるもの、温度が下降する方向に泳いでいるもの、あるいは、温度勾配に垂直な向きに泳いでいるものについて、行動解析が行なわれた。そして適温、すなわち培養された温度25℃に向かって泳ぐ時は、方向変換の頻度が低く、比較的まっすぐに泳ぐが、適温から遠ざかる向きに泳ぐ時には、方向変換の頻度が高くなることがわかった。泳ぐ速度は、温度が高い程速く、泳ぐ向きには関係がなかった。すなわち、ゾウリムシは、温度の勾配を上がる時と下がる時で、方向変換頻度の異なる泳ぎ方とすることによって、適温に集まる。このような走熱性の発現の仕方は、バクテリアの走化性や走熱性の場合と同様である。(36).

ゾウリムシが温度勾配中を泳ぐ時は、彼らは、温度を熱、すなわち、温度の時間的変化として感じている。実際に、ゾウリムシのまわりの液の温度を急変させた時には、方向変換頻度の一時的な変化がみられる。25℃で培養したゾウリムシのまわりの温度を25℃から20℃に急に下げると、方向変換頻度は、定常値の0.1回/秒から、一時的な増加を示す。その増加は、温度変化後10秒ぐらいで最大値0.45回/秒に達し、60秒ぐらいで元の0.1回/秒の値に戻る。反対に20℃から25℃に戻した時には、方向変換頻度の一時的な減少がみられる。温度変化を感じる閾値は、0.05℃/秒以下である。又、速度は、温度の急変に対して、一時的な増減を示さず、温度が高い程、速くなる。(49) ところが、その

ゾウリムシを用いて、前述のトライトンモデルを作り、それに急激な温度変化を与えると、泳ぐ速度、繊毛打頻度ともに一過的に増加することが、筆者らによって見出されている。(63) ゾウリムシには多くの種類が知られている。いろいろな種類やsyngenについて温度感受性を調べてみると、かなりの差がある。P. multimicronucleatumは、その中でも特に、温度感受性が高い。私は、このP. multimicronucleatumを用いて、温度感受性に関する電気生理学的な研究を行ない、温度の急激な変化に伴なう細胞内電位の一時的な変化をとらえることができた。P. multimicronucleatumは、日本で一般に見られるP. caudatumに比べると、体長が一回り大きく(250～300 μm)、名前のとおり、生殖核である小核を複数個持つ特徴がある。

II 実験方法

1. 材料

実験に用いたゾウリムシは、*Paramecium multimicronucleatum* の wild type, *Paramecium caudatum* の wild type と CNR (caudatum non-reversal) mutant の3種である。3種類とも、東北大学の樋渡先生より頂いたものである。培養は、稲ワラ抽出液に aerobactor を植えた培養液で行ない、特にことわらない限り、25°C で培養した。すべての実験は、培養開始後10日以上経過し、定常期にいるゾウリムシを用いて行なわれた。ゾウリムシは実験に先立ち、7.5mM KCl, 0.25mM $CaCl_2$, 0.5mM $MgCl_2$, 2mM Tris·HCl (pH 7.2) を含む水溶液(標準液)で洗われ、約1時間、同じ液に慣らされたものを用いた。

2. 行動解析の方法

P. multimicronucleatum の温度感受性を調べるために、*P. caudatum* について行なわれたのと同様の実験を行なった。銅のプレート上に、ゾウリムシが自由に泳げる深さ約2mm, 縦2cm, 横3cm のプールを作り、プレートの両端に銅パイプを接着し、その中を、それぞれ温度の異なる水を流す。プールの中には、ほぼ傾きが一定の温度勾配ができる。(図3) 又、ゾウリムシ全体に急な温度変化を与えるためには、プールの下を直接水が流れるような観察用セルを作り、ある温度の水から、別の温度の水に切り換えて実験を行なった。プールの側面から光を当てて、ゾウリムシの行動をプール上方に配した35mmカメラによる暗視野撮影によって記録した。方向転換頻度, 及び泳ぎの速度を、ゾウリムシの2秒間

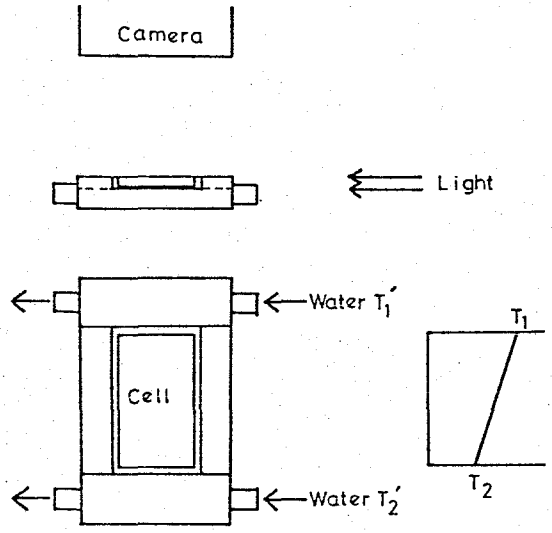


図3　温度勾配のあるプールの模式図
この様にして作られた温度勾配の傾きは一定である。急な温度変化を与えるためには、プールの底を直接水が流れる様にした。(49)

露出の軌跡写真から求めた。いずれも、通常約50ケのゾウリムシについての平均値である。

更に、ステップ状の急激な温度変化を与えた時の応答をみるために、プールの上にテレビカメラを配し、細いガラス管の中に入れたゾウリムシ浮遊液を、温度差のあるプール内の液に移した直後からの、ゾウリムシ一匹づつの泳ぎ方の時間経過を録画した。解析は、テレビのブラウン管を見て、方向変換の時間経過をレコーダに記録した。

3. 膜電位の測定方法

膜電位は、ガラス微小電極法による直接的方法と、ケイ光色素を用いる間接的方法とで測定した。電極による細胞内電位の記録の方法は、内藤、Eckert らのもの(44)と基本的に同様である。ただし従来の方法は、ゾウリムシを含む水滴を、カバーグラスの裏面に付け、先端を鋭角に曲げたガラス微小電極で下から上向きに電極を挿入するもので、高分解能の顕微鏡が使えるという長所がある

けれども、実験上の制約も多く、ここでは行なわなかった。今回の実験では、倒立顕微鏡を用いて、まっすぐな微小電極を上方から斜め下に向かって挿入する方法で膜電位を記録した。この様な方法では、ゾウリムシは、プールの底のスライドガラス上に固定されており、温度は、スライドガラスの下を流れる水の温度を切り換えることによって変化させた。

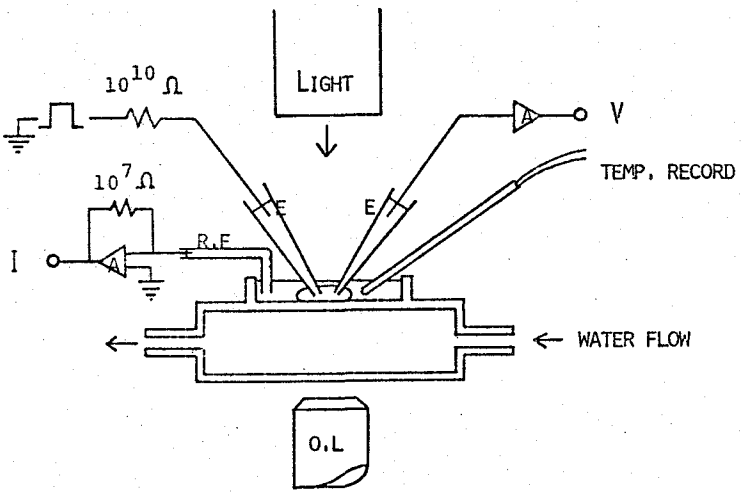


図4 ゾウリムシの膜電位を記録する装置の模式図
REは3MKCl寒天ブリッジとAg-AgClで構成した電極；O.Lは対物レンズ；Eは1MKClを充填したガラス微小電極。

膜電位はOPアンプ（テレダイン1026）を使った増巾器で100倍に増巾した後、レコーダに記録した。膜抵抗は、挿入された2本の微小電極の一本を通して、膜に一定の電流パルス（$\sim 10^{-10}$A）を流し、その時の膜電位の変化からもとめた。

膜電位固定は、OPアンプ（テレダイン1026, 1023, 1022）で構成された2000倍の利得を持つ増巾器を用いて行なった。電位固定された膜を流れる電流は、ゾウリムシの細胞の近くに置かれたAg-AgCl電極（飽和KClを含む寒天ブリッジを通したもの）を使って、温度変化と同時に記録した。電位固定の回路構成は、岸本やMeechらの論文(32)(42)を

参考にした。（図5）

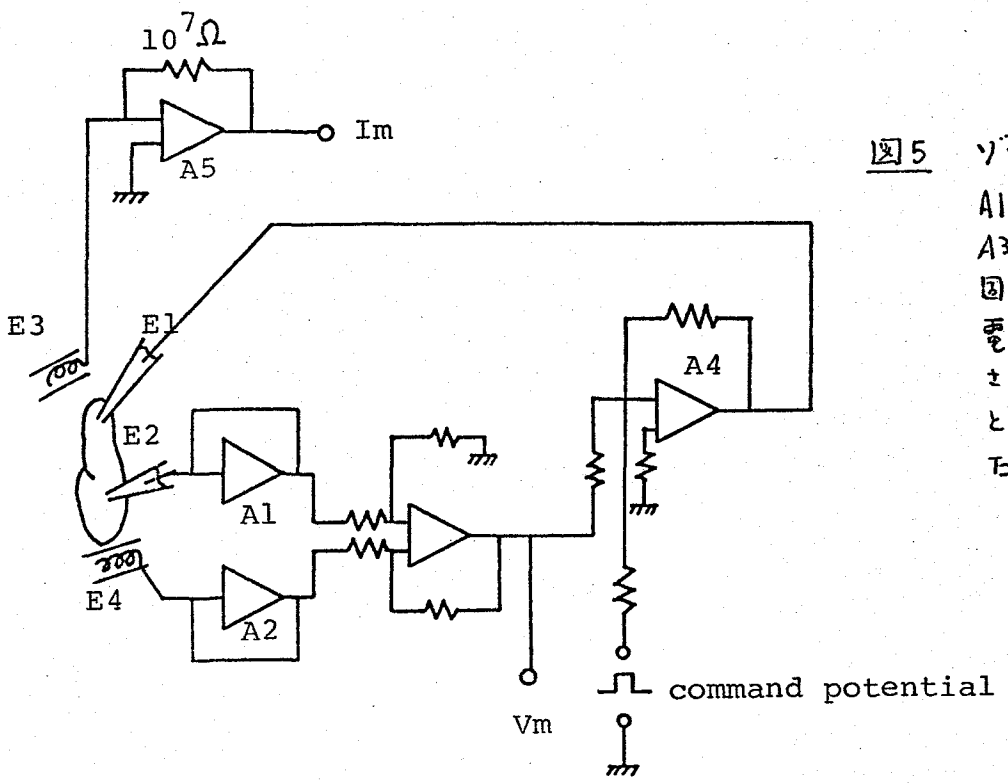


図5　ゾウリムシの膜電位固定回路
A1, A2 は Unity gain アンプ, A3 は差動アンプ, A4 は電位固定用のアンプを表わす。電流は A5 で電圧に変換される。E3, E4 は 3MKCl と寒天, Ag-AgCl で構成した電極。

ケイ光色素によるゾウリムシの膜電位の観測は、Doughty と同様の方法（7）で行なった。シアニン系色素 diS-C3-(5) を 1μM の濃度で用いた。温度の制御は、ケイ光分光器内の温度制御用セルホルダーの中を流れる水を切り換えることによって行なった。

すべての実験を通して温度はガラス封入型サーミスタプローブを用いて、ゾウリムシがいるプール内の水溶液の温度を直接測定した。

Ⅲ. 結果

1. 行動解析 —— P. multimicronucleatum の温度感受性

両端が25°Cと20°Cになっている温度勾配のあるプールの中に、P. multimicronucleatumを入れると、1分～2分で、ほとんどのゾウリムシが25°Cの近くに集まった。（図6）

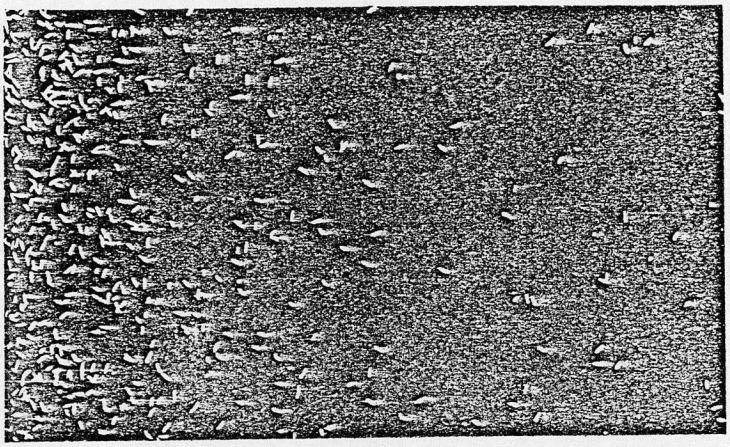


図6　25°Cの側に集まっているゾウリムシ。
25°Cで培養したゾウリムシを左端が25°C，右端が20°Cになるように直線的な温度勾配をつけたプールに入れた。

P. caudatum の場合は、培養液の組成や、培養の時期によって集まったり、集まらなかったりする。P. multimicronucleatum の場合には、培養条件によらずよく集まり、その集まる程度も、P. caudatum の場合に比べて顕著であった。

P. multimicronucleatum は、急な温度変化に対する応答を強く示した。標準溶液中、25°Cで、方向変換の頻度は、毎秒 0.03回であり、P. caudatum に比べて小さい。しかし、温度が20°Cに向かって急に下がり始めると、方向変換頻度は急激に増加し、10秒後には、毎秒約0.5回になった。

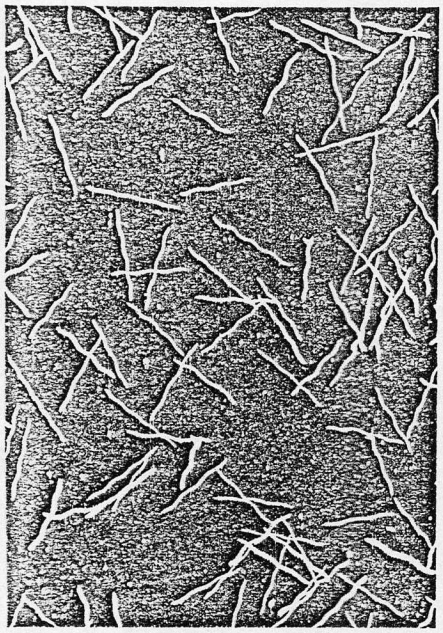
(図7). その後は、ゆっくり減少し、60～90秒でもとの毎秒0.03回の値に戻った。逆に、温度を20℃から25℃に向けて急に戻した時には、方向変換頻度は一時的に0になり、(図8) 約60秒後にもとの値に戻った。その後続いて、わずかに一時的な増加を示すという複雑な応答を見せるが、この2番目の応答も、温度変化を始めてから2分以内に終了し、もとの毎秒0.03回の値に落ち着いた。(図9)

P. multimicronucleatum は、この様に、dT/dtの符号の値によって、温度変化に対する応答を全く変える。実際の温度は、水を切り換えてから、ほぼ指数関数的に変化する。従って方向変換頻度が一過的な応答を示した後も、温度は変化し続けている。

泳ぐ速度については、*P. multimicronucleatum* は、*P. caudatum* の場合と同様に、温度変化に対して特別な応答を見せず、温度が低くなると単調に減少し、温度が高くなると単調に増加した。(図9.)

温度刺激と応答の時間経過をさらに調べるために、一匹のゾウリムシがステップ状の温度変化を受けた時に、どの様に応答するかを、前に述べた様な方法で解析した。温度が25℃から20℃に一瞬のうちに下がると、*P. multimicronucleatum* の方向変換頻度は、下がった直後に最大(毎秒1回)になり、その後は指数関数的に単調に減少し、約30秒後に0.06回/秒の値に落ち着いた。温度を25℃から20℃以外に、13℃、17℃、23℃へ変えた場合についても、同様の

TEMPERATURE CHANGE
(25°C→20°C)



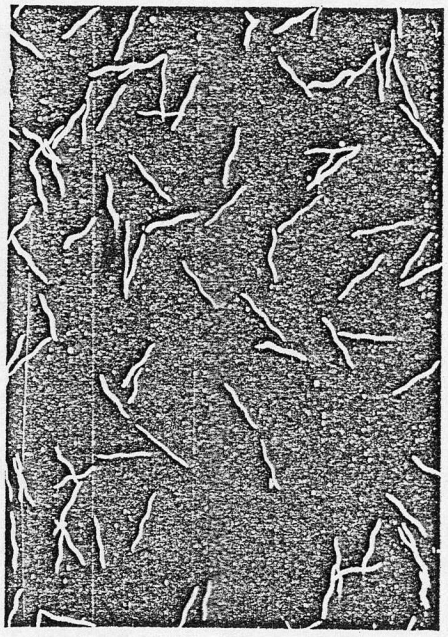
before temp. change

after 15 sec.

図7 温度の急変に対する応答（露出2秒の軌跡写真）
25°Cから下げる前（左）と、20°Cに向かって下げ始めてから15秒後（右）の軌跡。

TEMPERATURE CHANGE
(20°C→25°C)

before temp. change



after 15 sec.

図8 20°Cに落ち着いてから（左）と、25°Cに向かって上げ始めてから15秒後（右）の軌跡。

実験を行なったが、方向変換頻度はそれぞれ同様の時間経過を示した。しかし、方向変換頻度が一定の値に回復する速さは、低い温度に変えられた時ほど遅くなった。(図10)

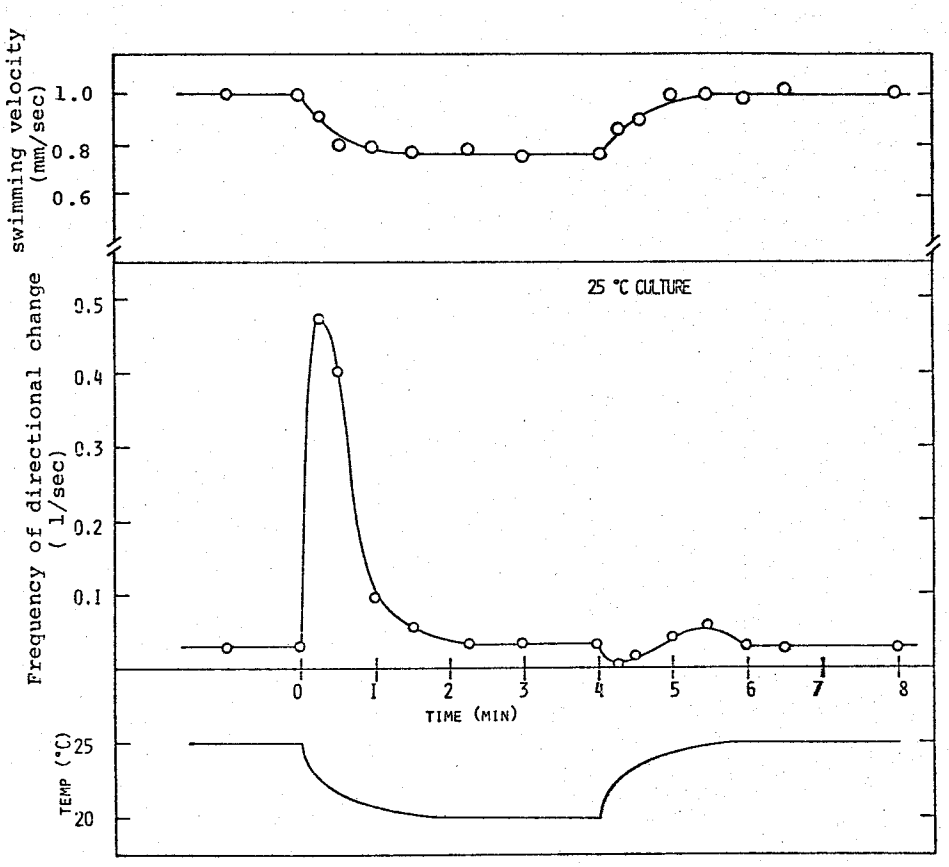


図9 温度の急変に対するゾウリムシの応答
25°Cで培養したP. multi. に25°Cから20°Cへの温度変化を与えた時の、速度(上図)と方向変換頻度の時間経過。

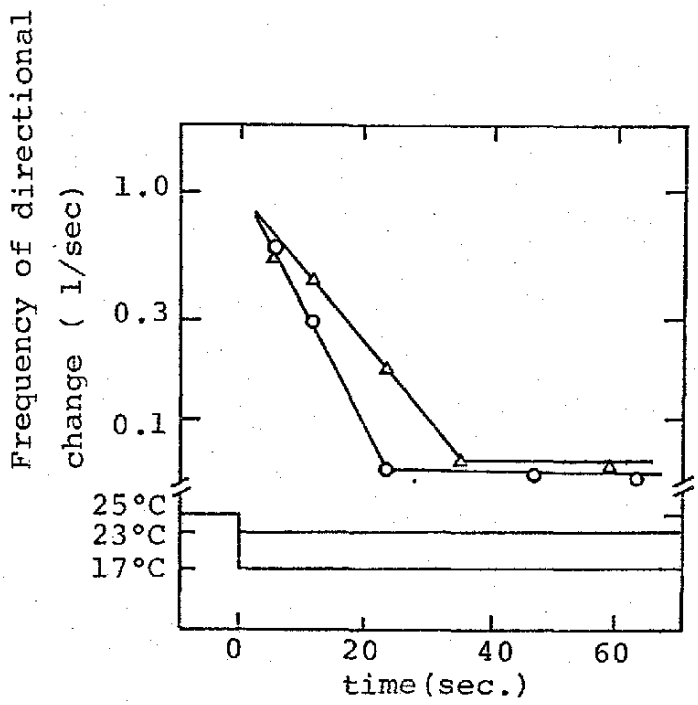


図10 ゾウリムシにステップ状の温度変化を与えた時の応答。

25°Cから23°C(○)、あるいは17°C(△)に瞬間的に温度を変えてからの方向変換頻度の変化。

一般にゾウリムシの実験に用いられる外液は、mM程度のKCl, $CaCl_2$と緩衝液だけを含んでいる。ワラの培養液中では、*P. multimicronucleatum*は、強い走熱性を示し、また温度変化に対しても顕著な応答をする。しかし、*P. multimicronucleatum*をKCl, $CaCl_2$,と緩衝液だけを含む液で洗うと、洗った直後から数十分の間は、走熱性を示さなくなる。そして30分から1時間後には、再び走熱性を回復する様になる。しかし、KCl, $CaCl_2$と緩衝液からなる溶液に少量の$MgCl_2$を加えた溶液で洗った場合には、洗った直後から走熱性を保持したままであることがわかった。加える$MgCl_2$の濃度はあまり多すぎても少なすぎても効果はなかった。以上の様な理由から、今回の実験の標準液には、0.5 mMの$MgCl_2$が含まれている。*P. caudatum*の場合はもっと複雑で、レタス培養液中か、ワラ培養液に少量のリボフラビンを加えた溶液

中以外では、走熱性を示さないことが調べられている。(51).

2. 急激な温度変化に対する膜電位の一過的応答

標準液中、25°Cでの P. multimicronucleatum の静止膜電位は、約 −25 mV であった。外液の温度を25°Cから20°Cに急に下げると、図11の様に膜電位は一過的に脱分極した。脱分極の大きさは、ゾウリムシの個体ごとに異なるので平均して述べると、温度が下がり始めてから約10秒後に最も大きい値を示し、静止膜電位から測って約 +7 mV になる。脱分極電位はその後、時間とともに元の値に戻り始め、約50秒後には、静止電位付近まで回復した。脱分極応答の開始から終了までにかかる時間の平均は、約60秒であった。また、この脱分極応答が最大となるあたりで、いくつかの脱分極性スパイクが発生した。

反対に温度を20°Cから25°Cに戻すと、小さい過分極応答が見られた。過分極応答の大きさは、脱分極応答に比べて小さく、最も大きい応答を示す時でも −3 mV 程度の大きさであり、見られない場合も多かった。応答の時間経過は、脱分極応答と同様に、温度上昇開始後、約10秒でピークに達し、その後、約30秒でもとの値に戻った。

以上の様な、温度変化の向きによる非対称な膜電位変化は、温度刺激に対する受容電位と考えられ、行動解析から得られた方向変換頻度の温度応答とも良く対応する時間経過を示す。

脱分極性受容電位が発生すると、興奮性の Ca チャネルが開き、スパイクが発生すると考えられる。

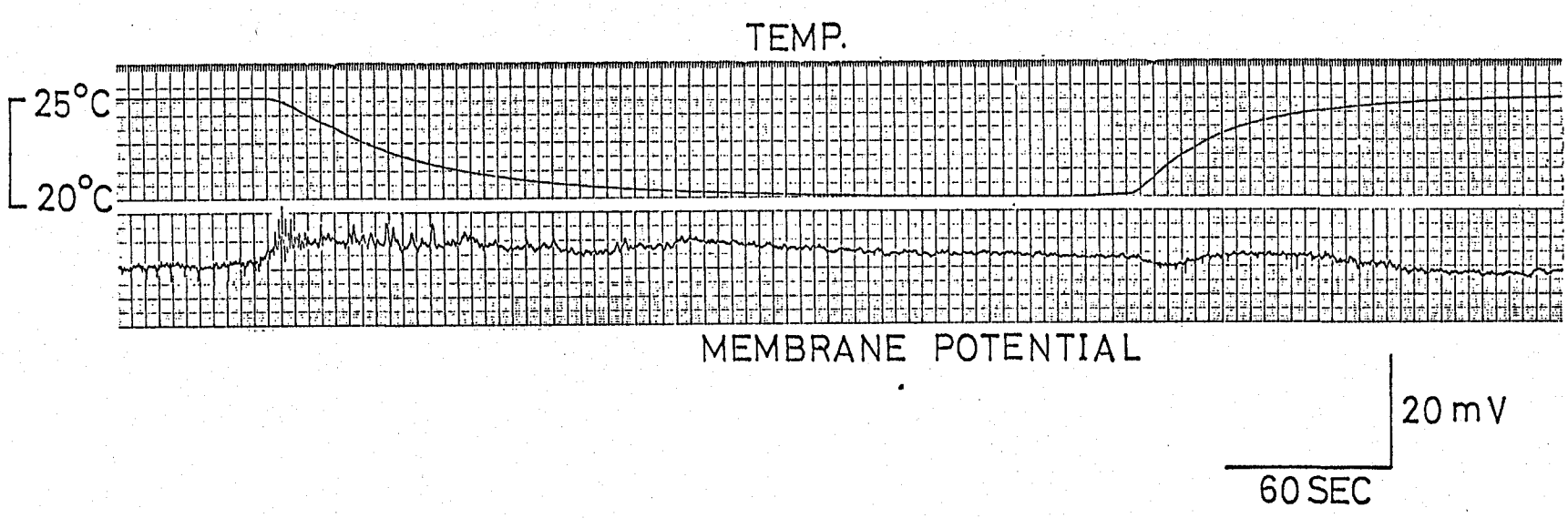


図11　P. multi の温度受容電位

25°Cで培養したゾウリムシに25°Cから20°Cへ向かう温度変化を与えた時の膜電位の一過的応答。25°Cでの静止電位は−25 mVであった。

実際に受容電位が発生している時のスパイクの発生と膜電位の関係を調べると、強い相関があることがわかった。脱分極性温度受容電位を、発生前の静止電位のレベルから2秒ごとに1mVの幅で分割する。そうした約20例の温度受容電位について、どのレベルに膜電位がある時にスパイクが立ち上がるかを調べて、各レベルでのスパイクの発生のしやすさを、頻度の確率で表わしたものが、図12である。

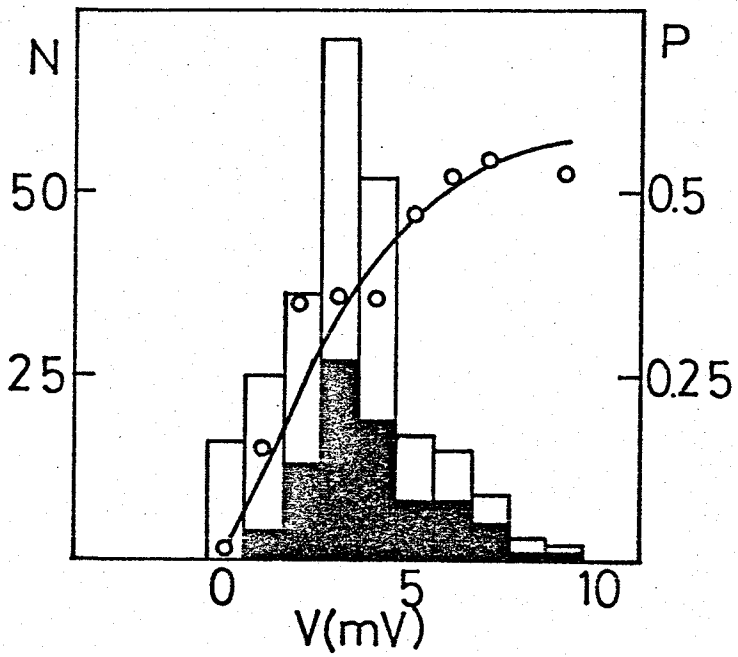


図12　温度受容電位と脱分極性スパイクの発生確率

P(o)は受容器電位(横軸)のいろいろなレベルでのスパイクの発生確率。

図中のNは度数を表わし、白枠で囲んだものが受容器電位そのもの(スパイクの有無にかかわらず)の度数分布、黒い部分が、スパイクを発生した膜電位レベルの度数分布になる。白丸は、スパイク発生時の膜電位レベルの度数(黒い所)を、受容器電位レベルの度数(白い所)で割った値である。この図から、膜電位の脱分極の程度が大きければ大きいほど、

スパイクの発生する確率が増すことがわかった。

3. 温度受容電位発生中の膜抵抗の変化

ゾウリムシの膜に 200 msec の duration で 10^{-10}A 以下の小さい電流パルスを流して膜抵抗を調べた。温度刺激を与えられた時に、同時に、3秒間隔でパルスを流し、膜抵抗の変化を測定した。その時の膜の抵抗値は、受容器電位に伴なう様な一過的な増減は示さず、温度変化に従って、単調に増減した。25℃で約 60 MΩ の膜抵抗は、温度が 20℃に下がり始め、受容器電位が発生し始めると、約 70 MΩ に増加し、その後受容器電位が回復しても、その値を保ち続けた。温度が逆に 25℃に戻されると、再び膜抵抗は 60 MΩ に単調に減少した。（図13）

ゾウリムシの膜抵抗は、一定の環境の下でも、非常に大きく揺らいでおり、1秒間の測定でも、前後で 20％近く変化することがある。そのため、この揺れ巾よりも小さい膜抵抗の変化は、このような測定では、確かなものとしてとらえることはできない。

図14は非常にゆっくり（10℃/20分）、温度を上昇させたときの各温度に於ける定常状態の膜抵抗と温度の関係である。定常状態での膜抵抗は、温度が高いほど小さくなった。

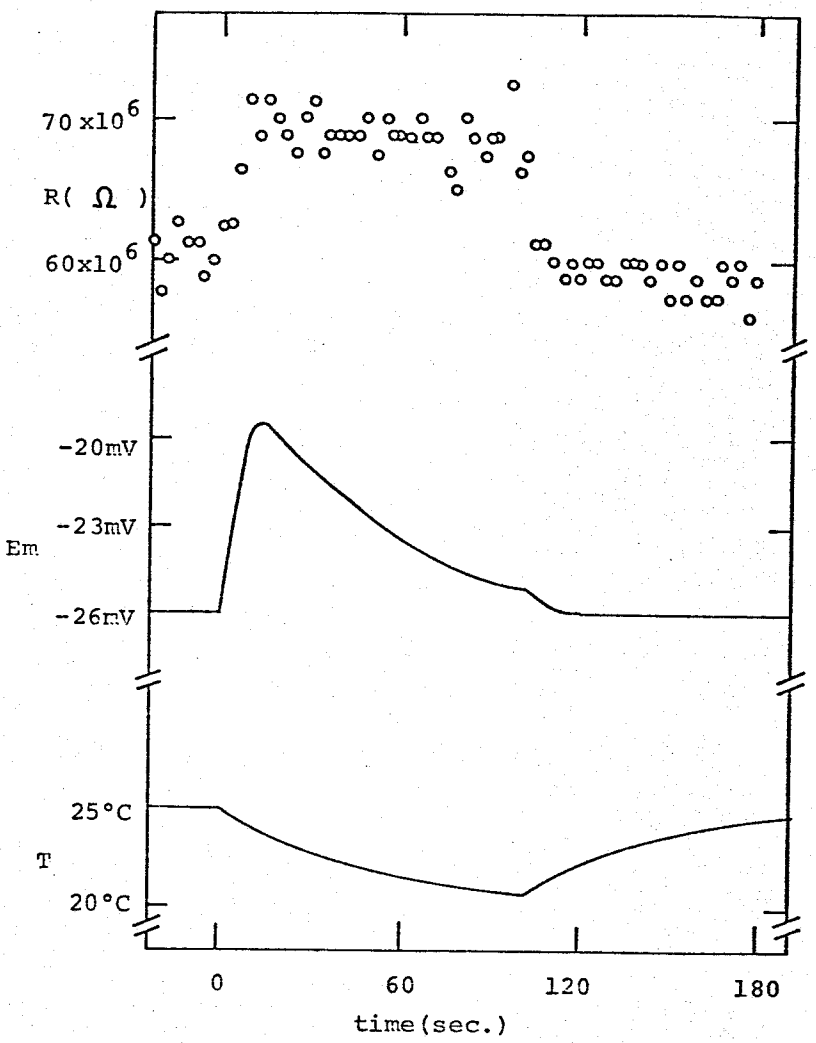


図 13　温度受容電位発生中の膜抵抗の変化
膜抵抗は膜に 10^{-10}A, 200msec の電流パルスを与えて求めた。(3秒間隔)
膜電位変化の記録は電流パルスによる変動分を除いてある。

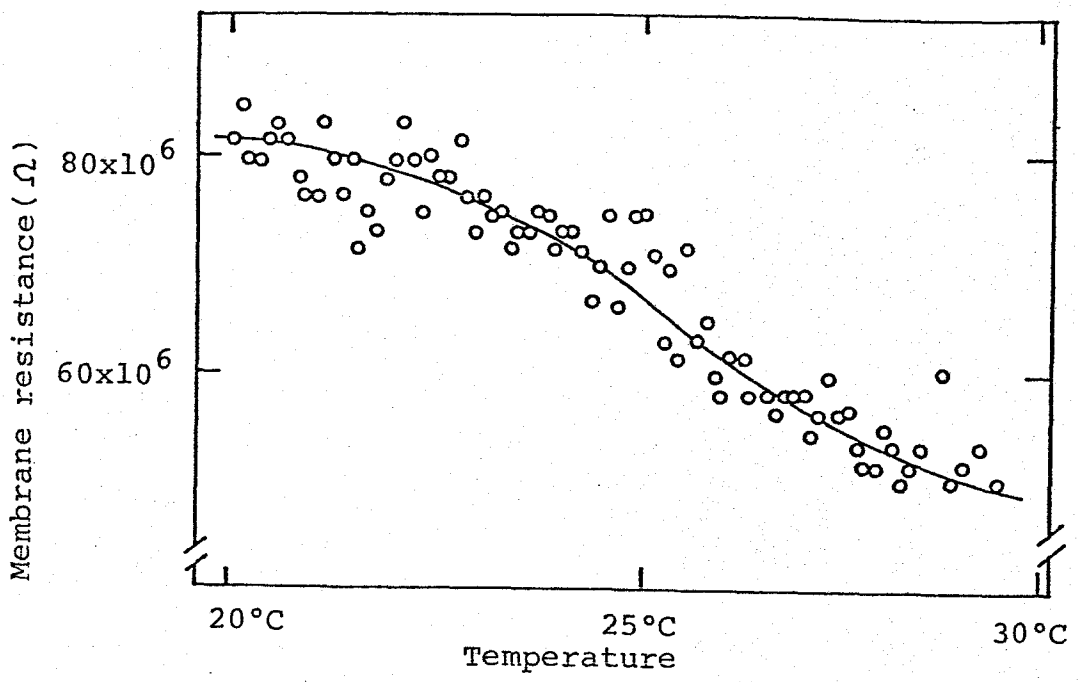


図14　定常状態での膜抵抗と温度の関係
抵抗の測定は図13の場合と同様である。
25°Cで培養したP. multiを使った。
温度は低温側からゆっくりと(10°C/20分)上昇させた。図は一匹のゾウリムシについての記録である。

4. 温度受容電位のイオン依存性

ゾウリムシの膜電位に関与していると一般に考えられているイオンは、主として、Kイオンと Caイオンである。P. caudatum の場合、細胞内のKイオン濃度は、20～30 mM, Caイオン濃度は 10^{-7} M 程度であることが報告されている。(11) P. multimicronucleatum については、詳しい分析は行なわれていないが、膜電位を形成しているイオンは、P. caudatum や P. tetraurelia の様に、Kイオンと Caイオンであろうと考え、細胞外のKイオン濃度や Caイオン濃度が、温度受容電位の大きさに、どう影響するかを調べてみた。いずれの場合も、他のイオン組成は、標準液のそれと同じ条件で行なった。受容電位の大きさとしては、温度を 25°C から 20°C に急に下げた時の、膜電位の脱分極応答のピークの値を用いた。

外液のKイオン濃度を増加すると、P. multimicronucleatum の静止膜電位はだんだん浅くなり、50 mM を越えるあたりで、0レベルに近づいた。(P. caudatum の場合は、30 mM 付近で 0に近づく。) この事から、P. multimicronucleatum の細胞内Kイオン濃度は、少なくとも 50 mM 以上であることが予想される。受容電位の大きさは、Kイオン濃度が増加するのに従って小さくなり、50 mM になると発生しなくなった。(図 15-1)

外液の Caイオン濃度を増加した時も、静止電位は、だんだん浅くなった。しかし、その程度は、Kイオンの時に比べると小さかった。また、受容電位の大きさは、外液の Caイオン濃度にあまり影響を受けなかった。(図 15-2)

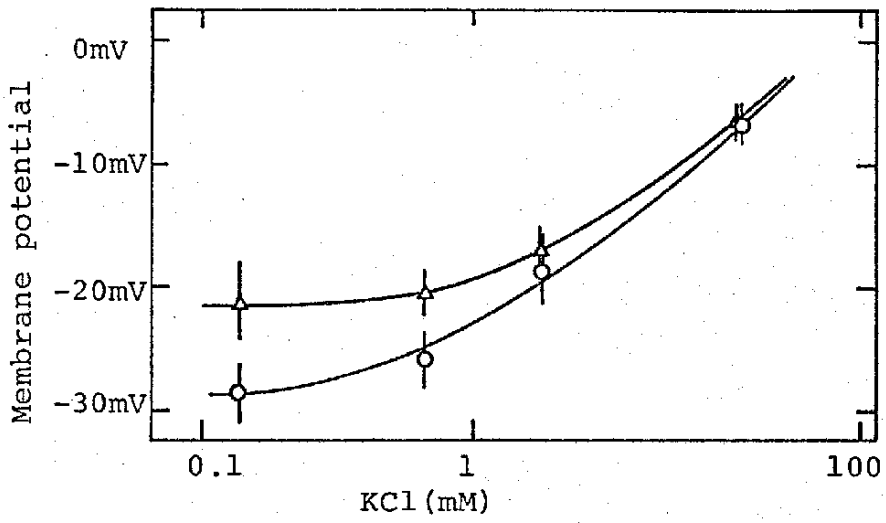


図15-1 静止電位と温度受容電位の外液KCl濃度による影響
25°Cで培養したP.multiの静止電位(○)と、温度を25°Cから20°Cに下げた時の受容電位のピークの値(△)。
それぞれの点は5〜10匹のゾウリムシの平均。

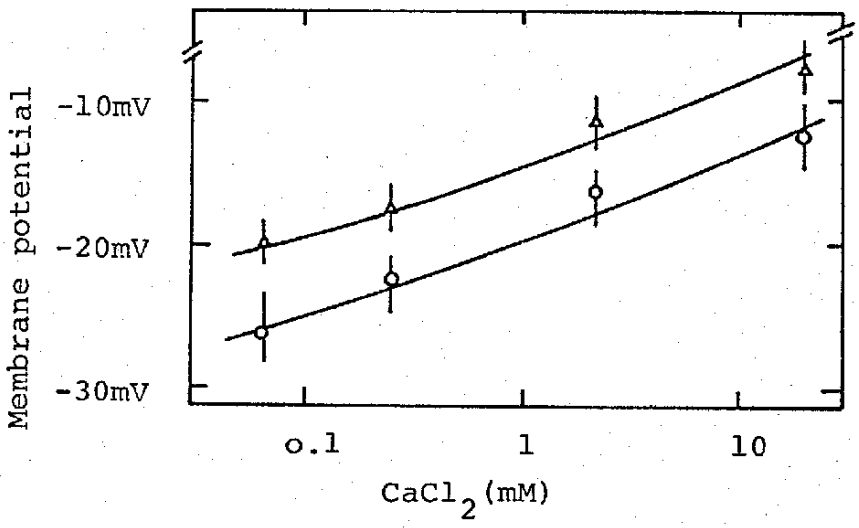


図15-2 静止電位と温度受容電位の外液$CaCl_2$濃度による影響
静止電位(○)と25°Cから20°Cに下がった時の温度受容電位(△)。

5、温度受容電位と興奮性Caチャネル

温度変化に伴って脱分極性の受容電位が発生すると、興奮性Caチャネルが開き、スパイクが発生すると考えられる。(11)。そこで、温度受容電位の発生に、直接、興奮性Caチャネルが関係しているかどうか調べてみた。ゾウリムシの興奮性Caチャネルは、繊毛膜上に局在していることがわかっている。(8)(53)。そこで、生きたまま繊毛を除去したゾウリムシを使い、その温度受容電位の発生を調べた。繊毛の除去は、抱水クロラールによる方法(8)と、エタノールによる方法(52)の両方を用いて行なったが、両者とも、同様の結果が得られた。

繊毛を除去した *P. multimicronucleatum* の外液の温度を25℃から20℃に下げると、膜電位は、一過性の脱分極応答を示した。ただし、繊毛除去後のゾウリムシの受容電位の大きさは、除去前に比べると50%以下であった。(図16)。このことから、繊毛膜上の興奮性Caチャネルの、受容電位への寄与は、あったとしても部分的であったことが考えられる。繊毛除去によって細胞表面積は、約50%に減少しており、従って、膜抵抗は増大しているにもかかわらず、膜電位変化は除去前に比べて小さい値を示した。薬品処理によって、膜が損傷を受けている可能性もある。

P. caudatum では、興奮性Caチャネルを欠損した *mutant* が得られており、CNRと呼ばれる。そこで *wild type* とCNRとの温度受容電位を比較した。*P. caudatum* は、*P. multimicronucleatum* に比べて受容電位の検出が困難であった。しかし *wild type*、CNR、ともに数例からは、温度受容

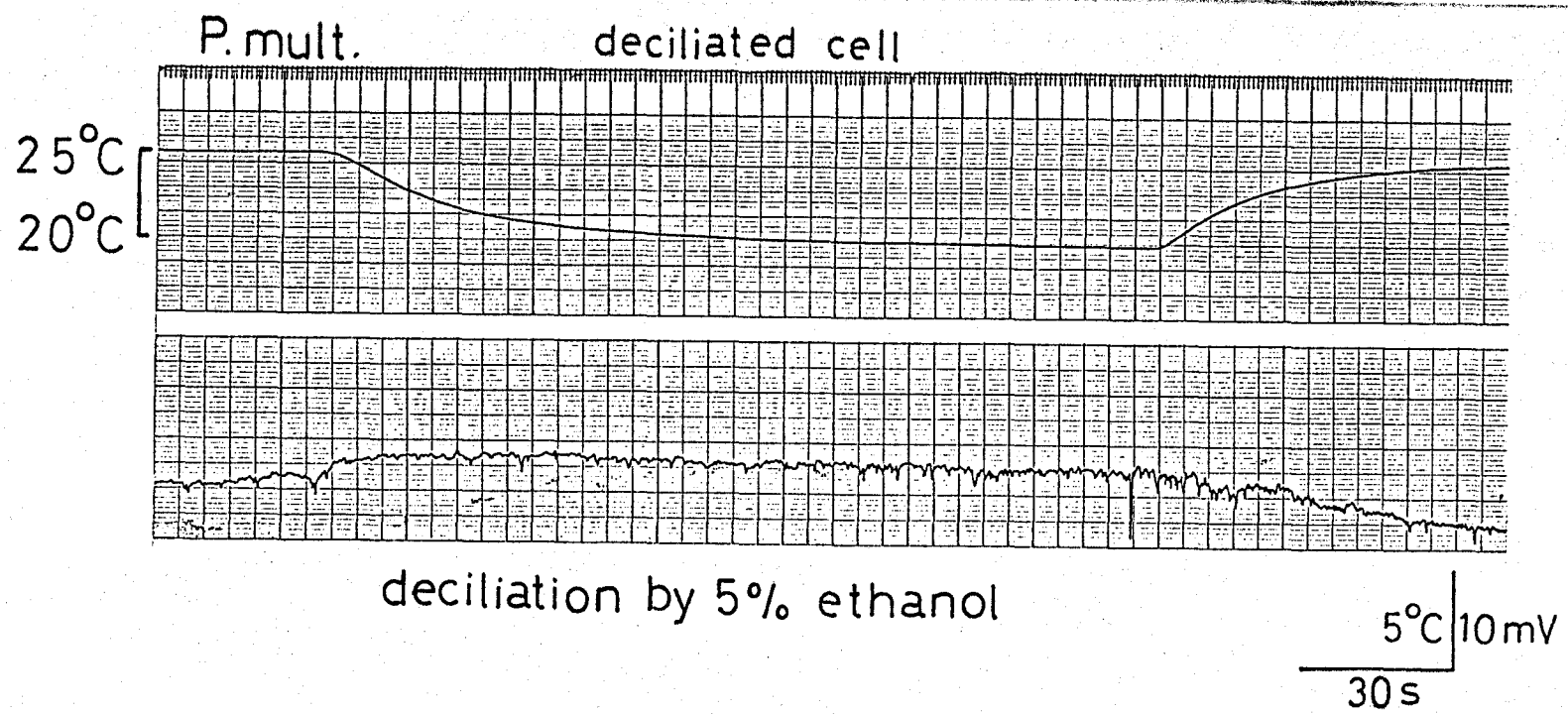


図16 繊毛を除去されたP.multiの温度受容電位
(5%エタノールによる) 25°Cでの R.P は -22mV。

電位が記録できた。（図17）

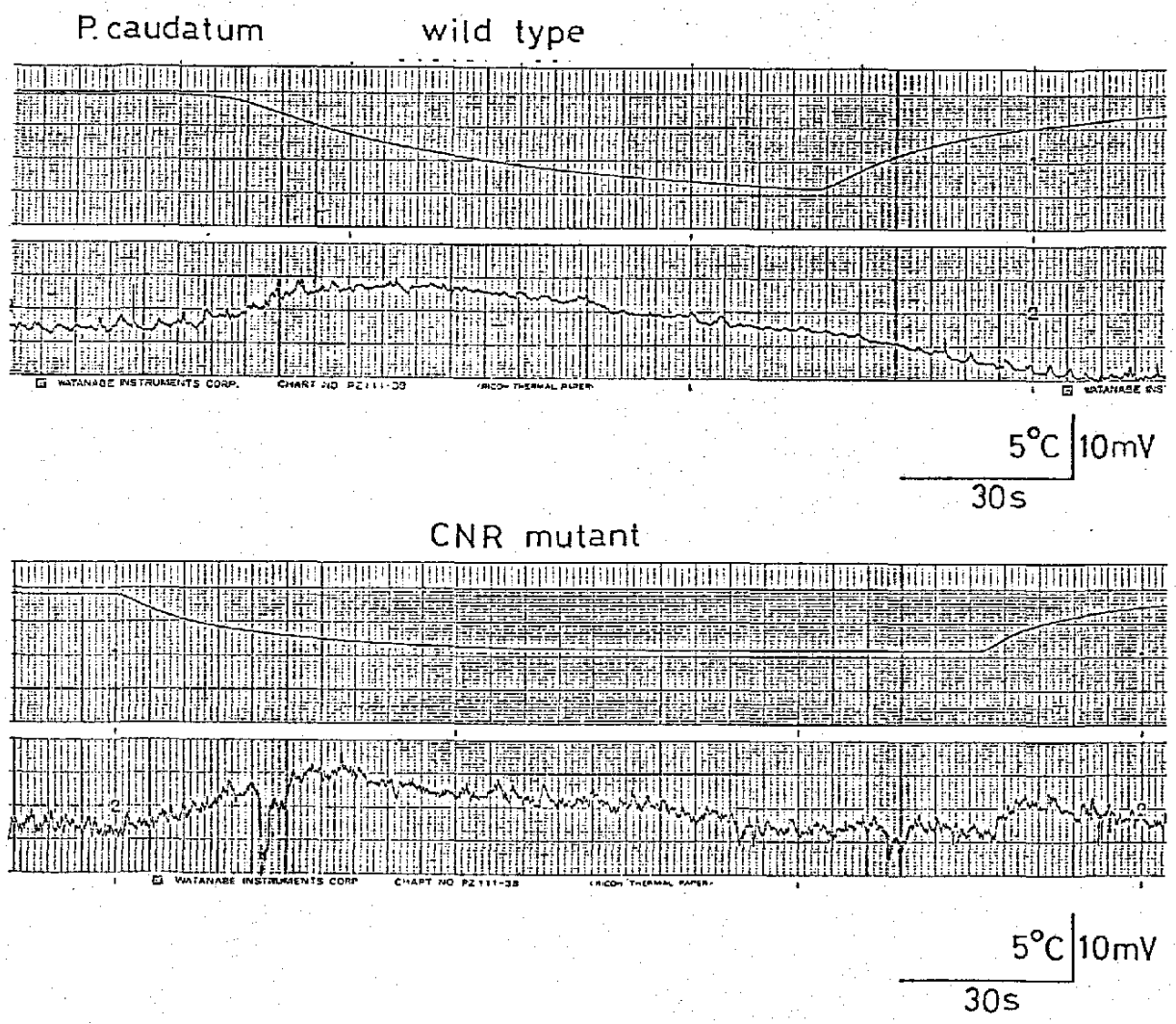


図17　P. caudatum の温度受容電位
上図は wild type，下図は CNR mutant の記録。
25°Cで培養した P. caudatum に 25°C から 20°C への温度変化を与えた時の応答。
25°Cでの静止電位は wild type が −28 mV，CNR が −24 mV であった。

両方から得られたものを比較すると、受容電位の大きさ、時間経過ともに、あまり差がなかった。やはり興奮性Caチャネルの温度受容電位への寄与は少ないことを示した。P. multimicronucleatumの温度受容電位と比較すると、時間経過の様子は似ているが、より遅かった。

6. 膜電位固定条件下の温度受容電流

膜電位を固定した状態で、ゾウリムシに温度変化を与えて、それに対する応答を、膜を流れる電流として検出することができる。P. multimicronucleatumの膜電位を静止電位に固定して、外液の温度を25℃から20℃に下げると、一時的に内向きの電流が増大して、その後もとのレベルに戻る電流応答がみられた。反対に、温度を20℃から25℃に戻すと、一時的な外向き電流の増大がみられた。(図18) これらの電流応答の時間経過は、温度受容電位の時間経過と同じであるので、受容電位発生の原因となる膜のイオン透過性の変化を反映しているものと考えられる。

さらに、この温度変化に対する電流応答に、外液のKイオンとCaイオンが与える影響を調べた。膜電位は、それぞれの塩溶液中での静止電位に固定し、温度を25℃から20℃に急に下げた時の電流応答のピークの値がどう変化するかを調べた。標準液中のKイオン、あるいはCaイオンの濃度を変えた溶液を外液とした。一過性の電流応答のピークの値は、外液のKイオン濃度の増加に伴って小さくなった。(図19) このことは、

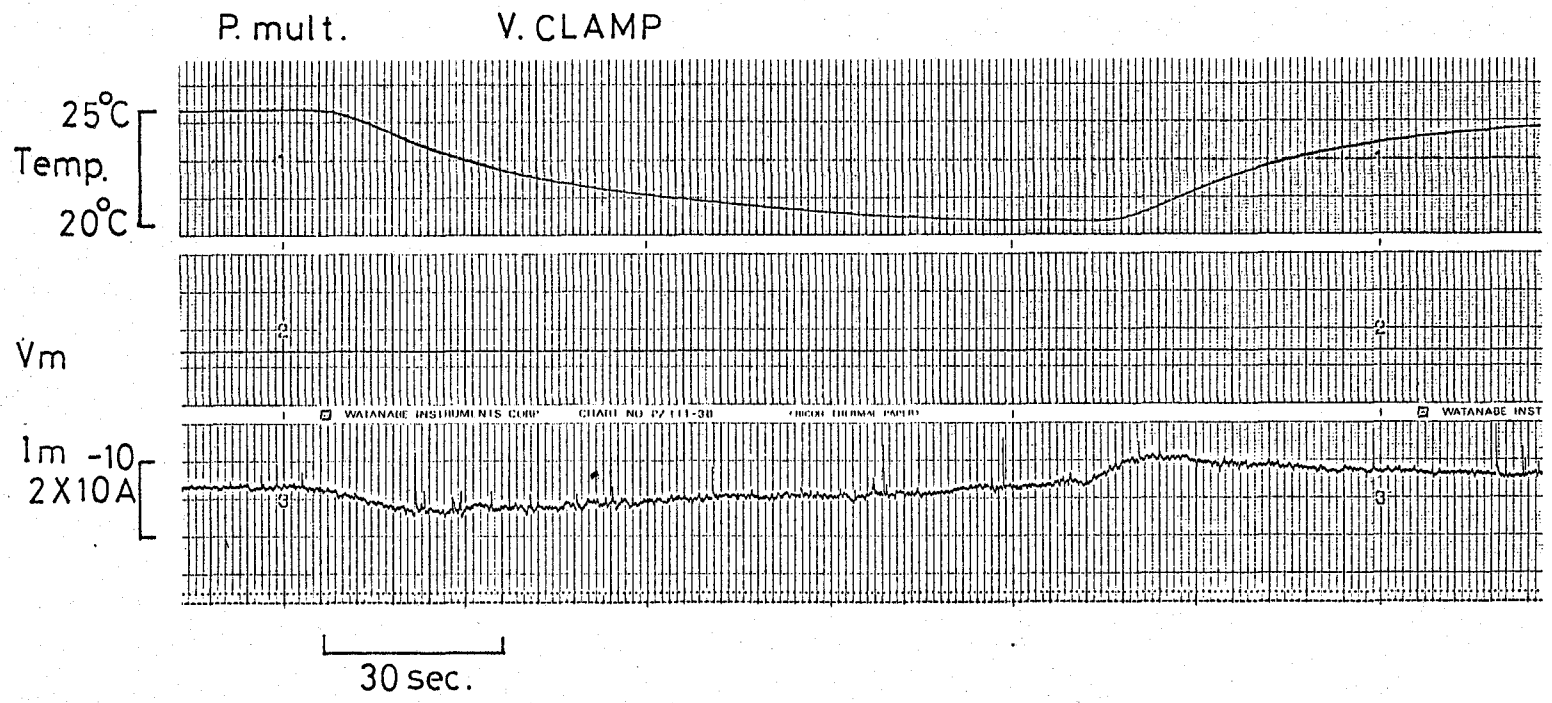


図18　膜電位固定された時の温度変化に対する電流応答
膜電位を静止電位(−25mV)に固定したP.multiに25°Cから20°Cに変わる温度変化を与えた時の電流の変化。25°Cでの電流レベルが0を表わし、それより上側が外向き電流、下側が内向き電流に対応する。

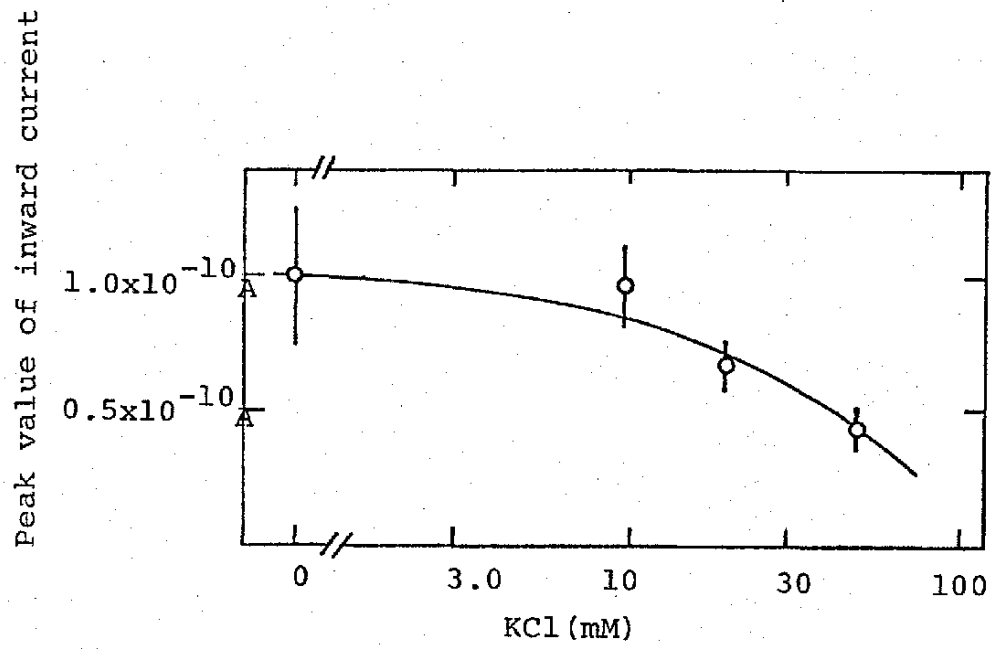


図19 膜電位固定時の膜電流応答の大きさとKCl濃度
25°Cから20°Cに温度を下げた時の、一過性内向き電流のピーク値と外液のKCl濃度との関係。
各点は5〜10匹のゾウリムシの平均。

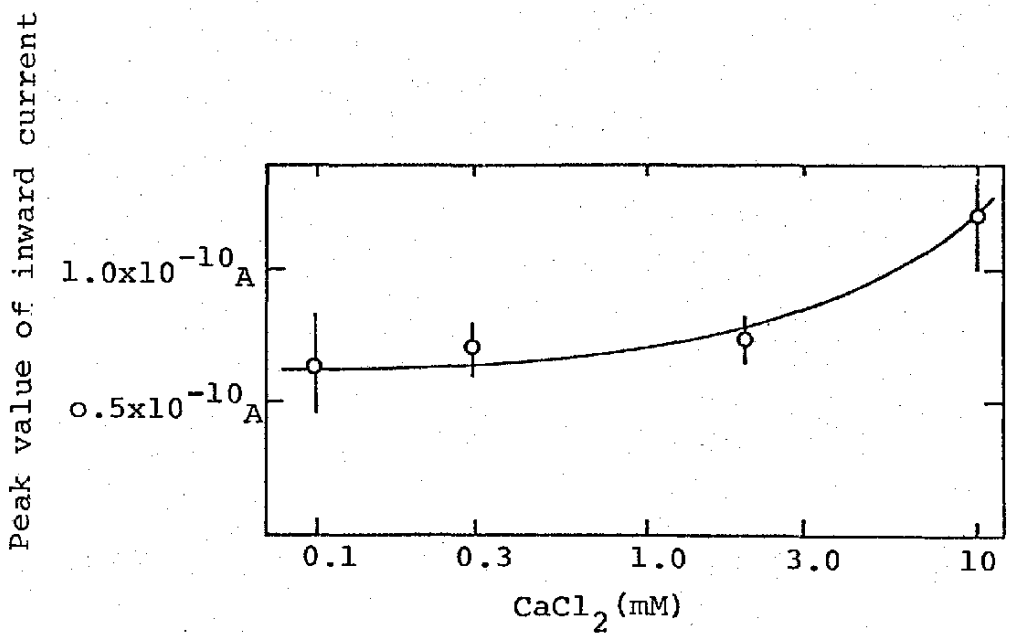


図20 膜電位固定時の膜電流応答の大きさとCaCl$_2$濃度
25°Cから20°Cに温度を下げた時の、一過性内向き電流のピーク値と外液のCaCl$_2$濃度との関係。

膜電位固定していない時の温度受容電位の大きさが、外液Kイオン濃度の増加によって、小さくなることと一致している。また、電流応答のピーク値は、外液のCa濃度の増加に伴なって大きくなった。(図20)

膜電位をいろいろなレベルに固定して、そこでの刺激応答を見ることによって、受容電位発生に関与しているイオンの平衡電位を見つけることができる。しかし、ゾウリムシの温度応答では、一連の実験に5分間以上の膜電位固定が必要であり、そのように長時間、膜に電流を流し続けることは、細胞内のイオン分布を変えるだけでなく、細胞自体にも損傷を与えるため、まだ十分信頼できる結果を得るにいたっていない。

7. 蛍光色素による温度受容電位の検出

1mlあたり300～1000匹の密度のゾウリムシに、ケイ光色素diS-C3-(5)を、1μMになるように加え、セルの中で一様にゾウリムシが分布する状態になるのを確かめて分光器にセットする。励起光(620nm)ケイ光(670nm)ともに、約3mm×5mmの楕円形の窓を通っており、ゾウリムシを数10匹程度含んだ空間からのケイ光強度を測定していることになる。

ゾウリムシと色素を含む溶液の温度を、25℃から20℃に急に下げると、ケイ光強度は、一時的に増加して、その後、ゆっくり、元のレベル近くに戻った。逆に20℃から25℃に戻すと、ケイ光強度の一時的減少がみられた。ケイ光強度変化の時間経過は、方向変換頻度の時間経過や、温度受容電位のそれと、ほぼ同様であった。(図21)

この色素の場合、ケイ光強度の増加は、膜電位

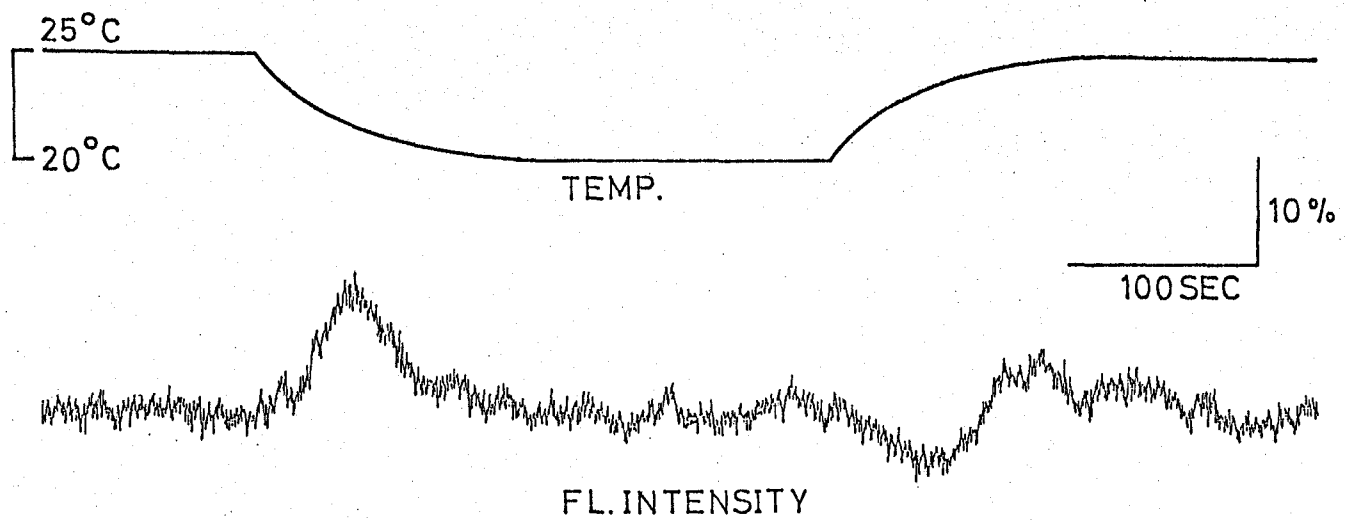


図21　温度受容電位のケイ光色素(discs(5))による検出
25°Cから20°Cに急に下げられた時の、ケイ光強度の時間経過。
ケイ光強度の増加(上向き)は、膜の脱分極に対応する。
25°Cで培養したP. multiを用いた。

の脱分極に、減少は過分極に対応する。ケイ光強度変化はピーク時で、約10%であった。ゾウリムシの静止電位の、外液Kイオン濃度依存性を、ケイ光法と微小電極法の両方で測定した結果を比較すると、ケイ光強度の10%の増加は、同一条件での、約5mVの膜電位の脱分極に相当した。

しかし、ケイ光色素法によるゾウリムシの膜電位変化の検出は、定量的再現性に乏しい。その理由としては、散乱光の影響や、ゾウリムシの向きや密度などが分光器用セルの中で一様にならないこと、などが考えられるが明らかでない。

Ⅳ. 考察

1. 実験上の問題点

微小電極による温度受容電位の記録は、容易である。しかし、電位応答の時間経過が遅いため、短かくても、5分間以上の記録が必要であり、時間が長くなればなるほど、安定した記録を得ることは困難になる。また受容電位は、回復の過程が特に遅いので、ゾウリムシ膜電位が静止電位のまわりを±1～2mVの大きさで揺らいでいるため、受容電位の持続時間の判定は困難であり、脱分極応答、或いは、過分極応答の程度も、バラツキが大きく、ゾウリムシの個体差によるものか、あるいは電極の挿入状態の差によるものか、明らかでない。更に、一匹のゾウリムシについて、25℃ → 20℃ → 25℃ という温度刺激を繰り返して与えた場合、その受容電位の大きさは、一回ごとにかなり異なる値を示すことから、一匹のゾウリムシについても、温度感受性が揺らいでいる可能性がある。

温度を20℃から25℃に戻した時の膜電位の過分極応答は、一般に小さく、ほとんど見られない場合も多いが、膜電位固定下での膜電流応答としては常にはっきりと表われた。しかし、その理由は明らかでない。

2. 温度受容電位発生のメカニズム

ゾウリムシの膜電位形成に関与しているイオンとして、Kイオンと Caイオンだけを考えると、図22のような等価回路で表わされる。ここで g はコンダクタンス、E_{Ca}, E_K は、それぞれのイオンの平衡電位を表わす。細胞内は、Kイオン濃度が高く、細胞外は Caイオン濃度が高いから、E_K はマイナスの値になり、E_{Ca} はプラスになる。

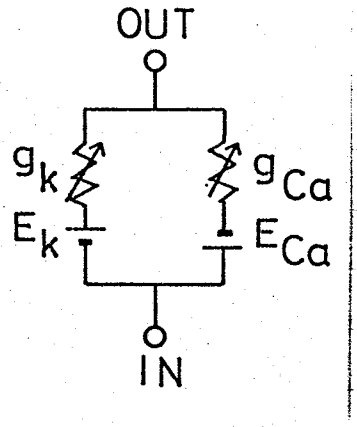


図22

静止状態で、膜はKイオン、Caイオンに透過性を持つから、外向きに流れ出ようとするK電流と、内向きに流れ込もうとするCa電流がちょうどつりあって、みかけ上、膜には電流が流れていない。

温度が25℃から20℃に下げられた時、膜電位は脱分極をするから、そのときには、Kイオンの膜電位に対する寄与が小さくなっているか、Caイオンの膜電位に対する寄与が大きくなっているか、あるいはその両方である。すなわち、g_K/g_{Ca}の値が、温度受容電位を発生する前に比べると小さくなっている。その時の膜抵抗を測ると、受容電位を発生する前に比べて大きくなっていることがわかった。つまり膜のコンダクタンスは減少している。g_K/g_{Ca}が小さくなっていることと、g_K+g_{Ca}が減少していることを考えると、受容電位発生中は、少なくともg_Kが減少しているといえる。

膜を流れる電流Iは、次式で与えられる。

$$I = g_K(E_m - E_K) + g_{Ca}(E_m - E_{Ca}) + \sum_i g_i(E_m - E_i)$$

普通の状態では、g_{Ca}はg_Kより小さく、g_iはg_{Ca}より、さらに小さいと考えられる。膜電位固定の条件で、外液のKイオンやCaイオン濃度を変えた場合の温度受容電流を考えてみる。膜電位は、静止電位に固定されているので、

静止状態では $I=0$ である。図19及び図20の結果は図15及び図16を参照すると、受容電流のピーク値がKイオン、Caイオンの両方の濃度の変化とともに、E_m-E_K に比例して変化していることを示している。ゆえに、受容電流は、Kイオンのコンダクタンス g_K の変化によると考えられる。すなわち、ゾウリムシに急激な温度降下が与えられると、g_K が小さくなり、そのため I が負となり、内向き電流が流れる。外液のKイオン濃度を増すと、E_m-E_K は小さくなるので、I は減少し、図19の結果と一致する。また、外液のCaイオン濃度を増加した場合は、E_m-E_K が大きくなり、温度降下によって g_K が変化すると受容電流は大きくなり、図20の結果と一致する。受容電位あるいは受容電流発生中、膜のコンダクタンスは、一過性の変化を示さず、徐々に新しい温度での値へ変化するのみであった。それゆえ温度変化によって g_K の急激な変化が起きた後、g_{Ca}（さらに他のイオンのコンダクタンス g_i）も g_K と同じ向きに変化し、電位がほぼ元の値に戻ると考えられる。

静止状態での膜抵抗の値（約60 MΩ）から、静止電位の値（−25 mV）を用いて、Kイオン、Caイオンの各電流の値を、（他のイオンの電流への寄与は無視できるとして）見積ると、

$$I_K = 5.0 \times 10^{-10}\ [A]$$
$$I_{Ca} = -5.0 \times 10^{-10}\ [A]$$

となる。

受容電位の発生が終わった後の状態でのK電流、Ca電流も、同様の手順で求められる。電位は、元のレベルと同じであるから、KとCaのコンダクタンスの比は同じである。20°Cに落ち着いてからの膜抵抗の

平均値は、約70MΩであるから、

$$I_K = 4.3 \times 10^{-10} [A]$$

$$I_{Ca} = -4.3 \times 10^{-10} [A]$$

となる。

以上のことから、電位固定された状態での膜電流値の変化を考えてみる。温度刺激前では、外向きのI_Kと内向きのI_{Ca}が、5.0×10^{-10}[A]でつりあっている。そして刺激が加えられると、g_Kが減少する。g_Kの減少は、I_Kの減少を招くが、膜抵抗は一過的な変化をしていないので、g_Kは減少したままであるとして、刺激が加えられてから充分時間がたった後にはI_KもI_{Ca}も、絶対値は、4.3×10^{-10}[A]の値になってつりあっていると考えられるから、g_{Ca}も減少しているはずである。このように、温度刺激が加えられた後、すぐにg_Kが減少し、g_{Ca}は遅れて、後から減少すると、考えると、温度変化直後の内向き電流の値が、0.7×10^{-10}[A]（$5.0 \times 10^{-10} - 4.3 \times 10^{-10}$[A]）となり、これは、電位固定の実験より得られたピーク時の内向き電流の値1.0×10^{-10}[A]に近い。

この説明は、膜のKイオン、Caイオンのコンダクタンスが外液の温度に依存した変化をするが、温度が急に変わった場合、KイオンとCaイオンのコンダクタンスの変化の速さに、時間的な"ずれ"を生じるために、一過性の膜電位変化を示すという考え方で行なったものである。その他にも、膜が脱分極応答をする可能性としては、一時的なKの透過性の減少や、一時的なCaの透過性の上昇も考えられる。膜を5mV脱分極するには、前者の場合、膜抵抗は、一時的に5%～6%減少すればよく、後者の場合には、膜抵抗は、一時的に20%程度、増

加すればよいが、実際の膜抵抗は、はっきりした一過的変化は示さなかった。しかし、いずれの場合も、変化分は、実験の誤差に近い値である。このような事から現状では、Kイオンあるいは Caイオンの透過性に一過的変化が起こっている可能性も否定できない。

上では、ゾウリムシの膜がKイオンとCaイオンに対してのみ透過性があるとして、膜電位の発生を考えたが、それも今のところ十分の根拠があるとはいえない。Kイオン、Caイオンのみを考え、Goldmanの膜内定電場を仮定した場合、膜電位は、細胞内外の、両イオンの濃度、温度、P_K/P_{Ca}（P_K：膜の、Kイオンに対する透過係数，P_{Ca}：膜の、Caイオンに対する透過係数）の値で決定される。P_K/P_{Ca}の値は、外液のKイオンやCaイオン濃度を変えた時の膜電位変化からもとめることができる。実際に図15-1を使って、膜電位変化の値を最も良く説明するP_K/P_{Ca}を求めると、約0.03という値を得る。ところが図15-2を使って同様にして求めたP_K/P_{Ca}の値は、1以上の値になる。（細胞の中のKイオン濃度は80mM，Caイオン濃度は10^{-7}Mとして計算した。）このように2つの実験から得られたP_K/P_{Ca}の値は、大幅に異なる。つまり図15-1と図15-2を同時に説明するP_K/P_{Ca}の値はみつけることができない。このことは、上述の仮定が不十分なものであることを示している。その原因としては、ゾウリムシの膜電位の場合、P_K/P_{Ca}の値が、いろいろな塩濃度で一定であるとは考えられないこと、膜電位形成に、KイオンやCaイオン以外のイオンの寄与がかなり大きく、細胞内にある多種のイオンの影響も考えなければならないこと、などがあげられる。

現状では、いずれの場合かを区別することは難しい。

V. 脂質モデル膜を使った温度受容電位のシミュレーション

1. 実験方法

ゾウリムシの膜電位は、温度の急変に対して、一過的に変動する。その温度受容電位の発生機構の解明は、まだ不十分である。

一般に、ある機能に注目し、それを明らかにしようとする場合には、巨視的なレベルから研究を始め、より微視的なレベルに進めていく。しかし時には、現在、研究を進めている立場と違った立場から研究を見ることが必要となってくる。このような考えから、脂質モデル膜を使った温度受容電位のシミュレーションを行なった。

脂質だけで構成した二重層膜の実験システムも可能であるが、実験上の制約も多く、技術的にも高度であるため、この研究では、フィルターに脂質をしみ込ませたモデル膜を使った。このような実験システムを使うことにより、生体が合成した脂質という化合物自体が持つ性質を、比較的純粋に取り出すことができる。

i 脂質－フィルターモデル膜の製作

実験に使った脂質は、卵黄から抽出したphosphatidyl choline (SIGMA, Type V-E)と、羊の脳から抽出したphosphatidyl ethanolamine (SIGMA, Type II-S)の2種である。脂質を溶かしたクロロホルム溶液(1g/ml)に、市販されているメンブランフィルター(SALTORIUS社製)や、ミリポアフィルターを1～2分間浸す。脂質のしみ込んだフィルターを、クロロホルム溶液から取り出し、空気中でクロロホルムを蒸発させる。このよう

にして得られた脂質－フィルター膜は、2～10 mg/cm² の脂質を含んでいる。乾燥させたモデル膜は、使用に先立って、10 mM Tris·MES (pH 7.0) 溶液に浸しておく。後で述べる PE 膜による膜電位応答は、浸しておく時間の長さに関係がある。25℃で30分間、緩衝液に浸した PE 膜は、ほとんど膜電位応答を示さないが、1時間浸したものは、50％以上が応答を示した。更に、3時間以上浸した PE 膜は、すべてが、温度変化に対して応答した。このように、脂質モデル膜が膜電位の温度応答を示すようになるには、必ず、一定時間以上の前処理が必要である。

なお、実験に用いたフィルターの孔径は、0.01 μm から、0.45 μm の大きさであった。

ii モデル膜電位測定の装置

膜電位を測定するための装置は、アクリル樹脂と、ガラス板を加工して製作した。アクリルで作られた2つの室の間に、脂質モデル膜を固定する。(図23) 膜と室のすき間から、イオンが通らないように、シリコンゴム板で作ったガスケットをはさみ、ネジでしっかりと密着させる。室の膜と反対側には、ガラス板で隔てられた大きい窓がある。これを透して、外を循環する水

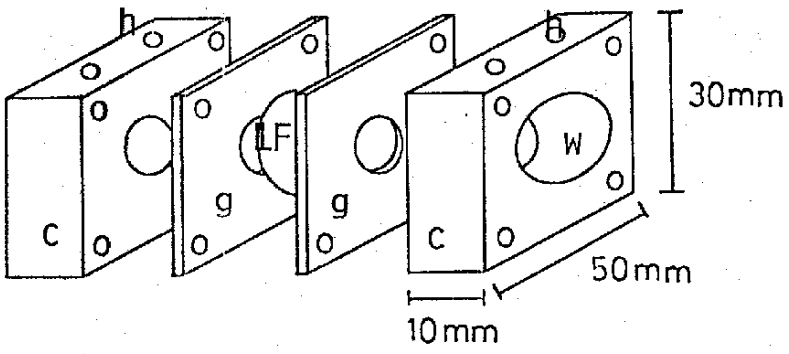


図23 モデル膜の膜電位測定装置
c; アクリルで作ったセル
g; シリコンゴム板のガスケット
w; ガラスを張った窓
h; 電極を入れる穴
LF; 脂質をしみこませたフィルター

と、スムースに熱交換を行なう。それぞれの隔室内の溶液は、室の上部にあけられた穴から、出し入れされる。（図24）

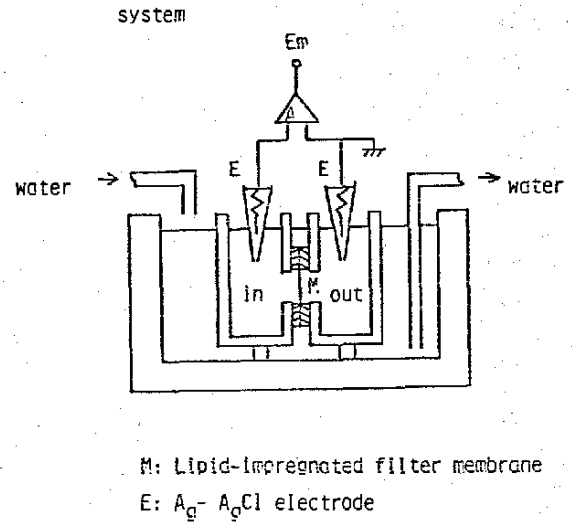


図24 モデル膜の実験装置

膜電位の記録は、銀-塩化銀電極を使い、飽和KClを充たした寒天橋を通して測定した。膜電位は、OPアンプ（テレダイン 1026）を用いた100倍のゲインを持つ増幅器をとおして記録した。今回の実験に使用したモデル膜は、透過性が非常に高く、安定であるので、膜抵抗の測定は、膜に定電流パルスを流した時の（0.5 Hz, 10^{-6} A）、電圧応答から求めた。

温度は、ガラス封入型のサーミスタ電極を、隔室の中に入れ、直接記録した。

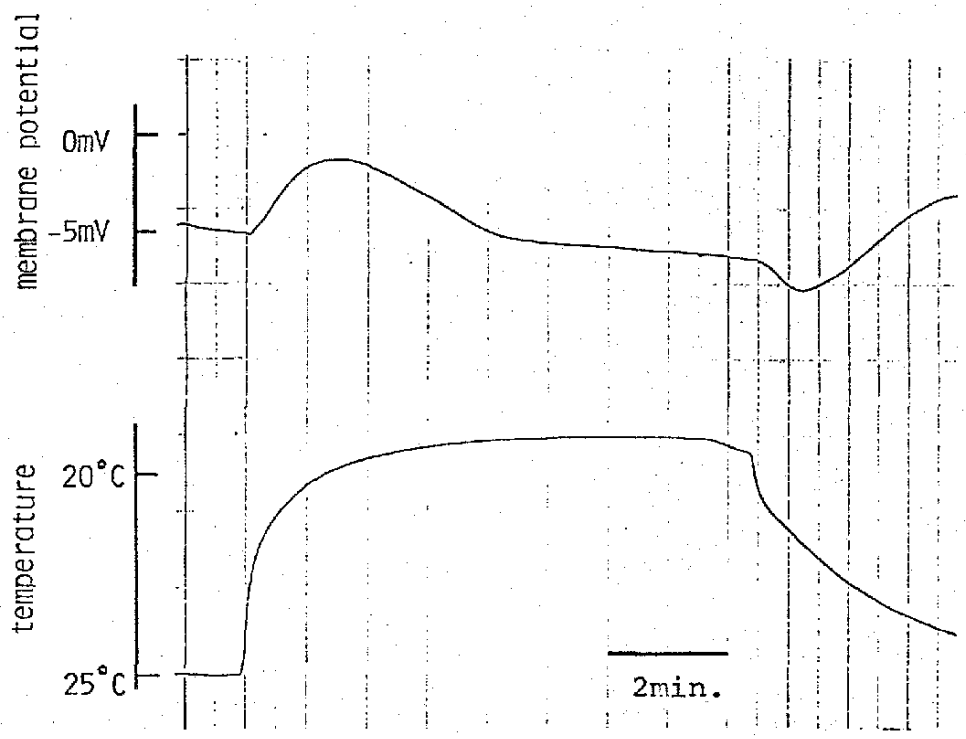
2、結果

2-1、モデル膜における温度受容電位

phosphatidyl ethanolamine－モデル膜（PE膜）を隔室の間に配し、一方に 2mM NaCl, 10mM Tris-MES（pH 7.0）を含む溶液を、他方に 20mM NaCl, 10mM Tris-MES（pH 7.0）を含む溶液を入れる。薄い NaCl が入った方を外室，濃い NaCl が入った方を内室として、外室内の溶液を接地した時の内室の膜電位を記録する。PE膜は、実験に先立ち、数時間、10mM Tris-MES 緩衝液（pH 7.0）に浸しておいたものを用いる。

この状態の 25℃における内室の電位は、平均値で 5mV 位であった。（モデル膜ごとに、かなり異なる値を示した。）隔室のまわりを流れる水の温度を 20℃に切り換えることによって、PE膜に、急激な温度変化を与えることができる。

温度が下がり始めると同時に、膜電位は浅くなり始め、約 1.5 分後にピークを示した。その後再び膜電位は深くなり、約 5 分後に元のレベルに落ち着いた。この一過的な膜電位の脱分極応答のピーク値は、25℃での静止電位から、プラス 2～3 mV であった。20℃での静止電位は、25℃の時と同程度であった。温度を 20℃から 25℃に戻すと、膜電位は、一時的に過分極した。過分極応答の大きさは、脱分極応答の値よりやや小さく、平均すると 2mV 位であった。どちらの場合も、温度変化は 3 分位で終わっており、膜電位応答の持続時間の方が、温度変化の時間よりも長かった。なお、この膜電位応答は再現性があり、同一のモデル膜で、数回のくり返しが可能であった。ただし応答の



pore size; 0.2μm, membrane filter
phosphatidyl ethanolamine; 3.9mg
over night incubation at room temp.

out-chamber	in-chamber
2mM NaCl	20mM NaCl
10mM trisMES pH7.0	10 mM trisMES pH7.0

図25　脂質モデル膜の温度変化に対する膜電位応答
10倍の濃度差のあるNaCl溶液を用い、薄いほうを接地し0電位とした時の濃いほうの電位（上図）と、温度変化（上下が逆になっている）。

大きさは、だんだん小さくなった。(図25)

2-2、温度受容電位と塩溶液の組成.

PE膜は、膜の両側に濃度の異なるNaCl溶液があるだけで、温度変化に対して一過性の膜電位応答を示した。(緩衝液は無くても応答した。)
そこでNaCl以外の種々の塩溶液の場合について、温度変化に対する応答を示すかどうかを調べた。

まず、両隔室に入れる塩溶液の種類は同じで、濃度差だけが10倍ある場合について、膜電位応答の有無をみた。(いずれも、調べようとする溶液のイオン成分と重ならないような成分を持つ10mM緩衝液[pH7.0]が加えてある。) その結果、一過性の膜電位応答を示したものは、NaCl, LiClの2種で、温度の急変に対してほとんど膜電位が変化しないものや、変化しても温度とともに単調に変わるだけであったものは、KCl, choline·Cl, Na MES, Na gluconate, Tris·Clであった。(表1)

sol. IN-chamber	sol. OUT-chamber	response
2mM NaCl	20mM NaCl	+
2mM LiCl	20mM LiCl	+
2mM KCl	20mM KCl	−
2mM cholineCl	20mM cholineCl	−
2mM trisCl	20mM trisCl	−
2mM NaMES	20mM NaMES	−
2mM Nagluconate	20mM Nagluconate	−
40mM KCl	40mM NaCl	−
40mM KCl	20mM $CaCl_2$	−
40mM NaCl	20mM $CaCl_2$	−

表1 モデル膜の温度変化に対する膜電位応答とイオン組成

静止膜電位の値は、同一イオン組成でも、モデル膜ごとに異なっており、平均値でみると、イオンの種類によって、大きな差はなかった。次に両方の隔室にそれぞれ違う種類の塩溶液が入っている時の膜電位変化を調べた。一方に40mM KCl，他方に40mM NaClの場合や、一方に40mM KCl，他方に20mM $CaCl_2$の場合は、いずれも応答が見られなかった。（表1）

2-3、温度受容電位と脂質の種類

脂質をしみ込ませる前のフィルターだけの場合は、PE膜でのような一過性の膜電位変化は起こらなかった。(図27) PE膜による膜電位応答は、ゾウリムシ膜に含まれる脂質の中で最も割合の多いのがPEである(27)，(28)，(54)という理由からためしてみて見つけた現象である。そこでゾウリムシ膜に2番目に多く含まれているphosphatidyl choline (PC)，(54)を使って、モデル膜を作り、その膜電位変化を調べた。その結果、PC膜は、温度変化に対する一過性の膜電位応答を示さないことがわかった。温度変化の大きさや、両隔室の中に入れる溶液の種類や濃度に依らず、一過性応答を示さなかった。

2-4、温度受容電位と膜抵抗の変化

脂質をしみこませる前のフィルターの膜抵抗値は、25°Cで約$3.5\times10^{2}\Omega cm^{2}$であった。（2mM NaCl－20mM NaClの条件下での値。）脂質をしみこませると、膜抵抗は、0～10%程増加した。両隔室内に同一の塩組成で10倍の濃度差があるNaClやKClを入れて膜電位差をみると、フィルター膜だけの時も、脂質－フィルター膜の場合も、わずかではあるが、電位差

が発生した。発生する電位差は、モデル膜ごとに異なるが、平均すると、NaCl溶液の場合の方が、KCl溶液の場合に比べ、やや大きかった。

PE膜が温度変化に反応して膜電位の一過性脱分極応答を示している時の膜抵抗の変化を調べた。溶液の条件は、2mM NaCl－20mM NaClに緩衝液を加えたものである（前述）。温度が25°Cから20°Cに向かって下がり始めると同時に膜抵抗は増加し始め、温度の減少に伴なって単調に増え続け、温度が20°Cに落ちつくと、膜抵抗も落ち着く。（図26）25°Cでの膜抵抗値は、$4.0\times10^{2}\Omega cm^{2}$であり、20°Cでは$4.6\times10^{2}\Omega cm^{2}$であった。膜抵抗値変化の時間経過は、膜電位変化より速く、抵抗の値が落ち着いてから後も、膜電位は、ゆっくりと元に戻った。同様の実験を、フィルターだけで行なった時の結果は図27に示してある。膜電位は温度下降に伴い、わずかに浅くなるが（0.3 mV）、一過的な変化は示さなかった。また、膜抵抗値の変化の時間経過は、脂質－フィルター膜の場合と同様であった。温度を20°Cから25°Cに戻した場合の膜抵抗値の変化は、25°Cから20°Cに下げた時と対称的であり、温度の上昇に伴なって単調に減少した。

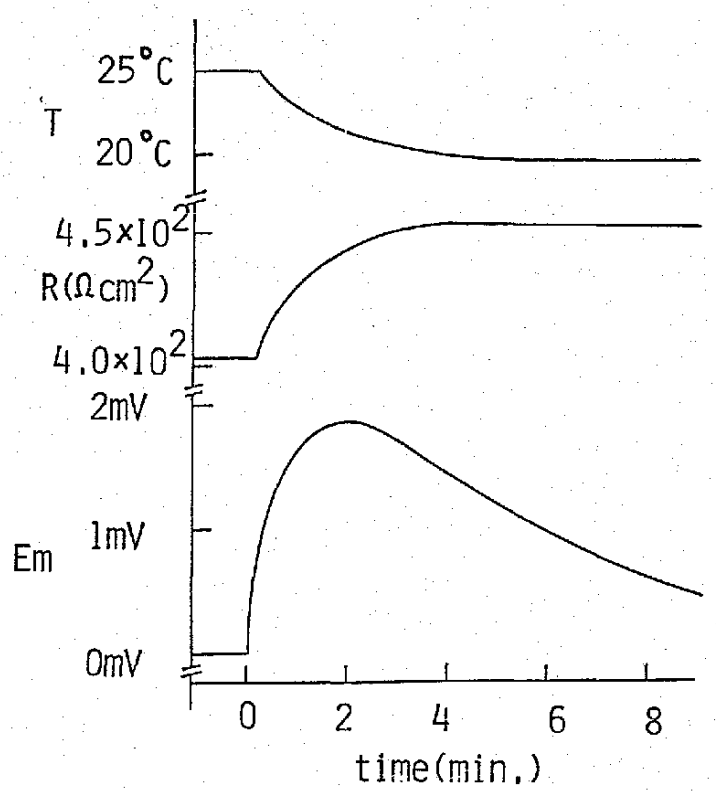


図 26 モデル膜の温度応答と膜抵抗の変化。(脂質とフィルターにしみこませた膜)

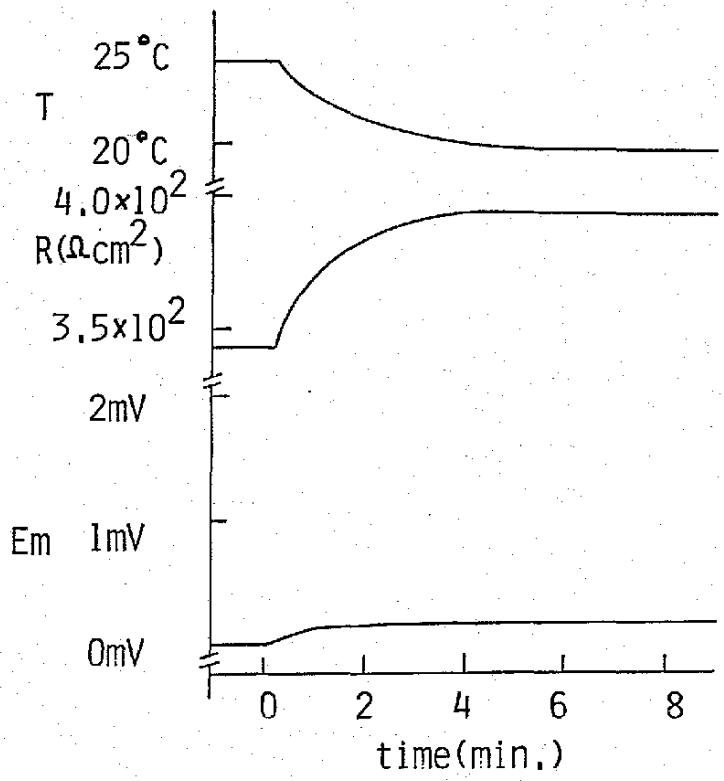


図 27 モデル膜の温度応答と膜抵抗の変化。(フィルターだけの膜)

3. 考察

3-1. モデル膜の温度受容電位発生のメカニズム

実験に用いたPEは、天然燐脂質であり、室温(~20℃)で、クロロホルムに良く溶けるので、相遷移温度は、室温以下であると考えられる。クロロホルムを蒸発させた直後のフィルターには、脂質分子が不均一に吸着している。ランダムに並んだ脂質分子が、一定時間、水溶液の中に入れられると、親水性部位を外側に、疎水性部位を内側にして、フィルター上で、一定の秩序を持って再配列を行なうだろう。再配列をした状態は、水溶液中で安定である。そして、温度変化に対する一過性の膜電位応答を示すには、この安定な状態になることが必要だと考えられる。すなわち、PE膜が完全に膜電位応答を示すようになるのに必要な1時間は、この再配列に要する時間に相当すると思われる。

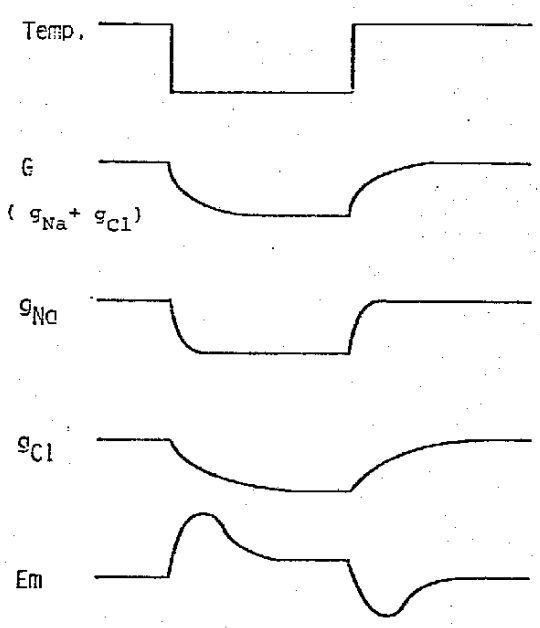
フィルターに脂質をしみこませたこのようなモデル膜では、生体膜で考えられているような整然とした脂質二重層構造は、考えられない。一般に脂質とフィルターとを使って構成されるモデル膜システムは、透過性が非常に低く、脂質二重層人工膜(黒膜)の代用として用いられるものが多い。(26), (58). このような膜の膜抵抗は、$10^{10}\Omega$以上の値であり、脂質で塗り固められた壁のようなイメージである。それに対して今回使った脂質-モデル膜は、穴のたくさんあいた網の様なものであるが、一本一本の網の目には脂質分子が並んで吸着しており、イオンの自由な透過に何らかの影響を与えている様な膜であろう。

次に静止電位について考察する。多孔性の膜の両側に濃度の異なった塩溶液がある場合、

膜電位差は、 $E = \frac{g_+ - g_-}{g_+ + g_-} \cdot \frac{RT}{F} \ln \frac{C_1}{C_2}$ で与えられる。ここで R は気体定数，T は絶対温度，F はファラデー定数，g_+ および g_- は、陽イオンおよび陰イオンのコンダクタンス、C_1 および C_2 はそれぞれの側における塩濃度を表わす。この式を用い、通常の濃淡電池の場合について電位差をもとめると、10倍の濃度差のある NaCl 溶液間の膜電位差は、25℃で約12mV（淡い方が電気的にマイナス）となる。同じ条件で KCl の場合は、約1mV（淡い方がマイナス）となる。フィルターだけの場合、あるいは、脂質－フィルター膜（PE膜）での場合に同一条件で膜電位差を測定すると、いずれの場合も、NaCl の場合は約5mV（濃い方がマイナス）になり、KCl の場合は約2mV（濃い方がマイナス）になった。この差は、フィルター膜，脂質フィルター膜ともに、電気的に中性でないためであろうと思われる。特に PE は弱酸性を示す脂質であり、膜表面がマイナスの電荷を帯びた状態になっているものと思われる。

一般に生体膜が、一過性の膜電位変化を示す場合には、一過性のコンダクタンスの変化を伴なう場合が多い。しかし、この脂質モデル膜の場合には、コンダクタンスの一過性変化を伴なわない、膜電位の一時的な脱分極が見られる。25℃での膜電位は、約−5mVであるから、g_{Na} は g_{Cl} より少し大きい。（$g_{Na\,25}$ と $g_{Cl\,25}$）。温度が20℃に下がってしまった後には、膜電位は、ほとんど25℃の時と等しいからやはり $g_{Na\,20}$ と $g_{Cl\,20}$ である。（20℃の時の方が少し浅い。）しかし、膜の抵抗値は、約10%増加しているから、$g_{Na\,25}$ は $g_{Na\,20}$ より大きく、同じ割合で

g_{Na}はg_{Cl}より大きい。温度降下に対して、g_{Na}、g_{Cl}は、それぞれ小さくなるような変化をする。そして、温度降下に対して、g_{Na}とg_{Cl}が時間的に同じ速さで、それぞれ減少したとすると、膜電位は全く変化しないはずである。しかしg_{Na}とg_{Cl}とが、時間的に"ずれ"て減少すると考えると、一過性の膜電位応答が現われる。つまり、g_{Na}がg_{Cl}よりも速く減少すると考えると、モデル膜の膜電位の一過性脱分極応答が説明できる。また、温度上昇時には、g_{Na}がg_{Cl}よりも速く増加すると考えると、一過性過分極応答が表われる。(図29)



$$Em = \frac{g_{Na}}{g_{Na}+g_{Cl}}E_{Na} + \frac{g_{Cl}}{g_{Na}+g_{Cl}}E_{Cl}$$

図29 モデル膜のコンダクタンスの時間変化

この様な"ずれ"で起こる膜電位変化の大きさを考える。簡単のために、温度は25°Cから20°Cにステップ状に減少した場合を考える。膜の抵抗は、その時、10%増加する。そしてg_{Na}は、温度変化に完全に追従して減少し、g_{Cl}は温度変化後、しばらくしてから減少を始めると仮定する。この様な条件で、温度変化直後の膜の脱分極の大きさを計算すると、約3mVが得られる。そしてこの値は、実際に観測される値に近い。

3-2. 温度受容電位応答のモデル

NaCl, LiCl溶液でのみ、一過性膜電位応答を示し、その他の溶液では示さないということから、陽イオンと陰イオンの移動度にある程度の差があることが、応答を起こすためには必要であるらしい。

さらに、PC膜では応答が起こらず、弱酸性のPE膜でのみ応答が起こることから、膜表面の電荷の分布が関係していることも考えられる。以上のことから、次に述べる様なモデルを考えてみる。

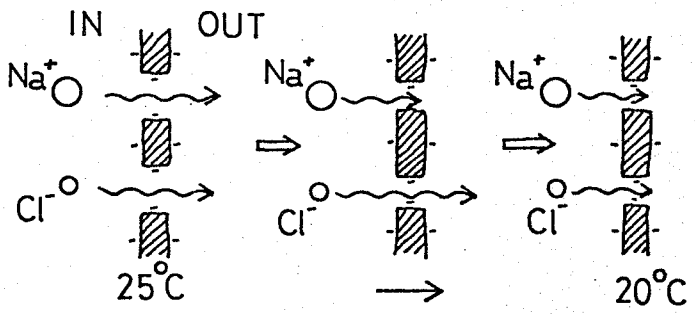


図30 脂質-フィルター膜の温度応答のモデル
10倍の濃度差のあるNaCl溶液の場合。
濃い方がIN、薄い方がOUT。〜〜→の長さはそれぞれのイオンのコンダクタンスをあらわす。

すなわち、図30のように、膜にNaイオン、Clイオンより少し大きい穴があいているモデルである。(イオンの移動度より、水和半径は、Cl^-を1とした時、K^+は1.04, Na^+は1.52, Li^+は1.97の割合である。) 穴の表面、内側は、軽く負に帯電している。そして定常状態では、Naの透過性は、Clの透過性よりわずかに大きい。温度が25°Cから20°Cに変えられると、膜にあいている穴は、少し小さくなる。するとNaイオンは、穴の大きさに近いため、すぐに影響を受け、g_{Na}がまず減少する。Clイオンは、穴の大きさに比べて充分小さいため、影響は遅れて現われる。温度上昇の時は、その逆のことが起こると考えればよい。温度によって穴の大きさが変わるのには、脂質の柔軟な構造が重要な役割りを果たしていると思われる。

Ⅵ. まとめと、将来の問題

1. 温度適応と温度応答

ゾウリムシの、温度刺激に対する方向変換頻度の応答は、培養温度を中心として、対称である。即ち、25°Cで培養されたゾウリムシは、25°Cから20°Cへの温度変化を受けた時と、25°Cから30°Cへの温度刺激を受けた時には、どちらも方向変換頻度が一時的に上昇する応答を示す。25°Cから20°Cに温度が変化する時には、行動の変化と非常に良く対応する温度受容電位が記録されているが、25°Cから30°Cに変わる時の温度受容電位は、まだ十分確かなものを得ていない。

25°Cを中心とした対称な温度応答を、先程の"ずれ"の立場で説明しようとすると、培養温度以下で温度が変化する時には、常にg_Kがg_{Ca}に比べて時間的に速く応答する機構を考えればよい。しかし、培養温度から、それ以上の温度に変えられた時には、膜のコンダクタンス（抵抗の逆数）が大きくなると考えられるから、g_Kがg_{Ca}より速く増加すると膜電位は過分極をする。つまりこの場合は、g_{Ca}がg_Kより速く変わると考えなければならない。また、温度変化に対する、一時的な膜コンダクタンスの変化であるとすると、20°Cから25°Cに戻される時と、25°Cから30°Cに上げられる時は、いずれも温度の上昇であるのに、正反対の応答を示す機構を考えなくてはならない。どちらの場合でも、かなり複雑なメカニズムになる。

ゾウリムシに、2度、温度刺激を与えた場合、例えば25°Cで培養していたゾウリムシに、25°Cから20°Cへの温度刺激を与え、その後、さらに20°Cから15°C

への温度刺激を与える。その時の応答の強さを見ると、2回目の応答は、1回目に比べると、はるかに弱い。しかし、1回目刺激の後、20℃に数10分間保っておくと、2回目の応答は、もとと同じ程度になる。この時は、20℃に慣れて、20℃に集まり始めるような反応を示し始めている。このことから、まわりの温度に適応することと、温度刺激に応答することとは、互いに関連しているようにみえる。もう少し具体的に言うと、膜の抵抗が、培養温度付近で変化が大きいことと、(図14) 培養温度付近から他の温度へ変えられたとき(1回目刺激)の感受性が高いこととは関係があるかもしれない。

さらにゾウリムシの、いろいろな温度での方向変換頻度(定常状態での)をみると、培養温度以下ではほぼ一定であるが、培養温度をこえると大きくなっていることがわかっている。(図31)

環境温度への適応は、何らかの生化学的な反応を伴なうはずであり、これらが温度感受性の形成に関与するであろう。

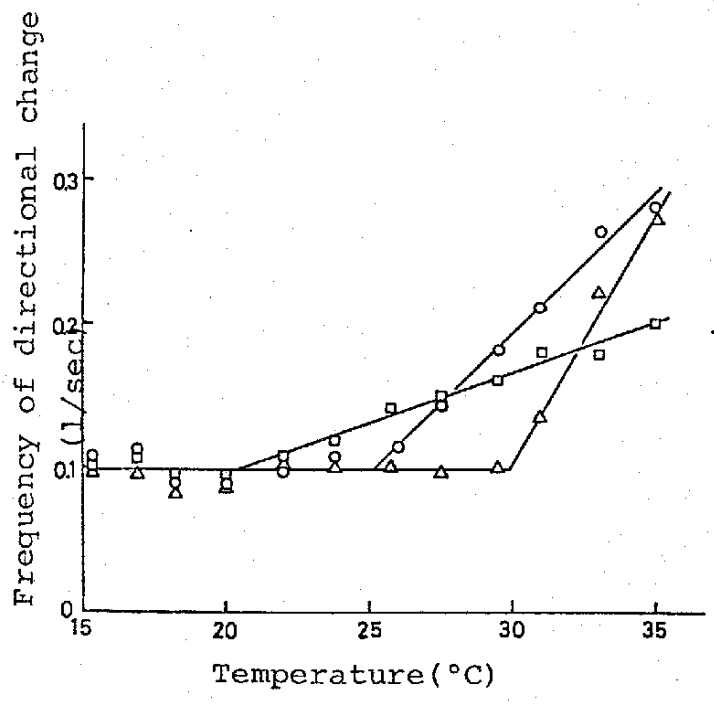


図31 ゾウリムシのいろいろな温度での方向変換頻度
培養温度 20℃(□), 25℃(○), 30℃(△)のゾウリムシについて・定常状態での方向変換頻度。

2. 温度受容

ゾウリムシは環境の温度変化を感じ、泳ぎの方向変換頻度を変えることによって、走熱性を発現する。方向変換は、スパイクの発生にともなうCaイオンの流入が原因であると考えられるから、次の様な情報伝達の経路が考えられる。

温度変化 ⟶ 受容電位 ⟶ 脱分極スパイク ⟶ 繊毛打逆転 ⟶ 方向変換

温度変化は、受容電位発生の原因となる脂質や蛋白質に直接作用し、膜の透過性を変える。そして同時に、新しい温度への適応のプロセスが始まる。新しい環境への適応は、膜だけにとどまらず、運動器官そのもので行なっている可能性もある。細胞膜の電気的機能を失なったトライトン処理ゾウリムシは、培養温度付近で、泳ぐ速度が最大となり、更に急激な温度変化に対して、膜の興奮をともなわない一過的な速度応答を示す。(63) この様に、温度という環境要因は、細胞のすべての機能に影響を与える。

従って、温度変化による受容電位の発生も、多種の原因の複合した結果であるかもしれない。ここで示した"ずれ"による一過性の膜電位応答は、2種類以上のイオンに対して透過性のある膜であれば、原理的には起こることが可能である。

また、"ずれ"の起こりうる場所を細胞膜上にだけ限定せず、細胞全体として見た時、結果的に、膜の透過性に"ずれ"が起こるとも考えられる。

高等動物の温度受容体は、ミトコンドリアであるという説がある。バクテリアが高い温度感受性を示す事や、ミトコンドリアは、バクテリアが細胞に寄生したものであるという説を考えると、ゾウリムシの場合

も、温度の一次受容体は、細胞内のミトコンドリアである可能性もある。ミトコンドリアは、細胞内のPHとCa濃度の制御に関係しており、実際に膜の透過性が細胞内のPHやCa濃度の影響を受けるという報告が、多くなされている。(4) (33) (43).

最後に、本論文では、*P. multimicronucleatum*の温度受容電位と、脂質モデル膜の温度変化に対する膜電位応答のアナロジーを示した。ゾウリムシの単位面積あたりの膜抵抗値は、$6\sim7\times10^{4}\,\Omega cm^{2}$ (39)であり、今回用いたモデル膜は、$3\sim5\times10^{2}\,\Omega cm^{2}$の膜抵抗値を示す。ゾウリムシ膜に比べると約1/100の膜抵抗しかないこのような膜が、生体膜と同様の応答を示すことは、興味深い。

VII 引用文献

1. Allen,S.L. & Thomas,A.N. 1978
Method for the simultaneous establishment of many axenic culture of paramecium. J.protozool. 25: 134-139

2. Andrews,D. & Nelson,D.L. 1979
Biochemical studies of the excitable membrane of paramecum tetraurelia. II. Phopholipids of ciliary and other membranes. B.B.A. 550: 174-187

3. Brehm,P. & Eckert,R. 1978
Calcium entry lead to inactivation of calcium channel in paramecium. Science 202: 1203-1206

4. Brehem,P., Eckert,R. & Tillotson,D. 1980
Calcium mediated inactivation of calcium current in paramecium. J.physiol. 306: 193-203

5. Cronkite,D,L. 1979
The genetics of swimming and mating behavior in paramecium. Biochemistry and physiology of protozoa. vol.2: 221-273. Academic Press Inc.

6. Davis,E.E. & Sokolove,P.G. 1975
Temperature responses of antennal receptors of mosquito ades aegypti. J.comp.physiol. 96: 223-236

7. Doughty,M.J. & Dodd,G.H. 1976
Fluorimetric determination of the resting potential changes associated with the chemotactic response in paramecium. B.B.A. 451: 592-603

8. Dunlap,K. 1977
Localization of calcium channels in paramecium caudatum. J.physiol. 271: 119-133

9. Dusenbery,D.B. & Barr,J. 1980
Thermal limit and chemotaxis in mutants of the nematode caenorhabditis elegans defective in thermotaxis. J.comp.physiol. 137: 353-356

10. Eckert,R. 1972
Bioelectric control of ciliary activity. Locomotion in the ciliated protozoa is regulated by membrane limited calcium fluxes. Science 176: 473-481

11. Eckert,R. & Brehm,P. 1979
Ionic mechanisms of excitation in paramecium. Ann.rev. biophys.bioeng. 8: 353-383

12. Eckert,R., Naitoh,Y. & Friedman,K. 1972
Sensory mechanisms in paramecium. I. Two components of the electric response to mechanical stimulation of the anterior surface. J.exp.biol. 56: 683-694

13. Fok.A.K. & Allen,R.D. 1979
Axenic paramecium caudatum. I. Mass culture and structure. J.protozool. 26: 463-470

14. Gamow,R.I. & Harris,J.F. 1973
The infrared receptors of snakes. Sci.Am. 228: 94-100

15. Harris,J.F. & Gamow,R.I. 1971
Snake infrared receptors: Thermal or photochemical mechanism? Science 172: 1253-1253

16. Hansma,H.G. & Kung,C. 1976
Defective ion regulation in a class of membrane excitation mutants in paramecium. B.B.A. 436: 128-139

17. Hanzel,T.E. & Rucker,W.B. 1972
Trial and error learning in paramecium: A replication. Behavioral biology 7: 873-880

18. Hedgecock,E.M. & Russell,R.L. 1975
Normal and mutant thermotaxis in the nematode caenorhabditis elegans. Proc.N.A.S. 72: 4061-4065

19. Hellon,R.F. & Henzel,H. 1975
Thermal receptors in the scrotum of the rat. J.physiol. 248: 348-357

20. Hennessey,T. & Nelson,D.L. 1979
Thermosensory behavior in paramecium tetraurelia: A quantitative assay and some factors that influence thermal avoidance. J.gen.microbiol. 112: 337-347

21. Hensel,H. & Kenshalo,D.R. 1969
Warm receptors in the nasal region of cats. J.physiol. 204: 99-112

22. Houten,J.V. 1978
Two mechanisms of chemotaxis in paramecium. J.comp.physiol. 127: 167-174

23. Houten,J.V. 1979
Membrane potential changes during chemokinesis in paramecium. Science 204: 1100-1103

24. Jennings,H.S. 1906
Behavior of the lower organisms. Indiana Univ.Press, Bloomington

25. Kamada,T.& Kinoshita,H. 1940
Calcium-potassium factor in ciliary reversal of paramecium. Proc.imp.acd. 16: 125-130

26. Kamo,N.,Miyake,M., Kurihara,K. & Kobatake,Y. 1974
Physicochemical studies of taste reception. I. Model membrane simulating taste receptor potential in response to stimuli of salt, acid and distilled water. B.B.A. 367: 1-10

27. Keneshiro,E.S. 1980
Positional distribution of fatty acids in the major glycerophospholipids of paramecium tetraurelia. J.lipid res. 21: 559-570

28. Kaneshiro,E.S., Beishel,L.S., Merkel,S.J. & Rhoads,D.E. 1979
The fatty acid composition of paramecium aurelia cells and cilia: Changes with culture age. J.protozool. 26: 147-158

29. Kessler,J.O., Jarvik,L.F., Fu,T.K. & Matsuyama,S.S. 1979
Thermotaxis,chemotaxis and age. Age 2: 5-11

30. Kinoshita,H., Dryl,S. & Naitoh,Y. 1964
Changes in the membrane potential and the responses to stimuli in paramecium. J.fac.sci.Tokyo Univ.Sect.IV. 10: 303-309

31. Kinoshita,H., Dryl,S. & Naitoh,Y. 1964
Relation between the magnitude of membrane potential and ciliary activity in paramecium. J.fac.sci.Tokyo Univ.Sect. IV. 10: 303-309

32. Kishimoto,U. 1972
Characteristics of the excitable chara membrane. Advan.in Biophys. 3: 199-226

33. Klein,M. & Kandel,E.R. 1980
Mechanism of calcium current modulation underlying presynaptic facilitation and behavioral sensitization in aplysia. Proc.N.A.S. 77: 6912-6916

34. Kung,C., Chang,S-Y., Satow,Y., Houten,J.V. & Hansma,H. 1975
Genetic dissection of behavior in paramecium. Science 188: 898-904

35. Kung,C. & Eckert,R. 1972
Genetic modification of electric properties in an excitable membrane. Proc.N.A.S. 69: 93-97

36. Maeda,K., Imae,Y., Shioi,J. & Oosawa,F. 1976
Effect of temperature on motility and chemotaxis of E.coli. J.bacteriol. 127: 1039-1046

37. Maeda,K. & Imae,Y. 1979
Thermosensory transduction in E.coli: Inhibition of the thermoresponse by L-serine. Proc.N.A.S. 76: 91-95

38. Machemer,H. 1974
Frequency and directional response of cilia to membrane potential changes in paramecium. J.comp.physiol. 92: 293-316

39. Machemer,H. 1977
Motor activity and bioelectric control of cilia. Fortschr. zool. 24: 195-210

40. Machemer,H. & Eckert,R. 1975
Ciliary frequency and orientational responses to clamped voltage steps in paramecium. J.comp.physiol. 104: 247-260

41. Machemer,H. & Ogura,A. 1979
Ionic conductances of membranes in ciliated and deciliated paramecium. J.physiol. 296: 49-60

42. Meech,R.W. & Standen,N.B. 1975
Potassium activation in Helix aspersa neurones under voltage clamp: A component mediated by calcium influx. J.physiol. 249: 211-239

43. Meech,R.W. & Thomas,R.C. 1980
Effect of measured calcium chloride injection on the membrane potential and internal pH of snail neurons. J.physiol. 298: 111-129

44. Naitoh,Y. 1972
Electrophysiology of ciliate protozoa. Physiology and Biochemistry. 5: 17-31

45. Naitoh,Y. 1973
Control of ciliary activities by adenosinetriphosphate and divalent cations in Triton-extracted models of paramecium. J.exp.biol. 58: 657-676

46. Naitoh,Y. & Eckert,R. 1969
Ionic mechanisms controlling behavioral responses of paramecium to mechanical stimulation. Science 164: 963-965

47. Naitoh,Y. & Eckert,R. 1973
Sensory mechanisms in paramecium. J.exp.biol. 59: 53-65

48. Naitoh,Y. & Kaneko,H. 1972
Reactivated Triton-extracted models of paramecium: Modification of ciliary movement by calcium ions. Science 176: 523-524

49. Nakaoka,Y. & Oosawa,F. 1977
Temperature sensitive behavior of paramecium caudatum. J.protozool. 24: 575-580

50. Nakaoka,Y. & Toyotama,H. 1979
Directional change of ciliary beat effected with Mg^{2+} in paramecium. J.cell sci. 40: 207-214

51. 中岡保夫、豊田英樹 1980
ゾウリムシの走熱性・生物物理 20: 1-7

52. Ogura,A. & Machemer,H. 1980
Distribution of mechanoreceptor channels in the paramecium surface membrane. J.comp.physiol. 135: 233-242

53. Ogura,A. & Takahashi,K. 1976
Artificial deciliation causes loss of calcium dependent responses in paramecium. Nature. 264: 170-172

54. Rhoads,D.E. & Kaneshiro,E.S. 1979
Characterization of phospholipids from paramecium tetraurelia. J.protozool. 26: 329-338

55. Saiki,M. & Hiramoto,Y. 1975
Control of ciliary activity in paramecium by intracellular injection of calcium buffers. Cell structure and function. 1: 33-41

56. Satow,Y. & Kung,C. 1979
Voltage sensitive Ca-channels and the transient inward current in paramecium tetraurelia. J.exp.biol. 78: 149-161

57. Satow,Y. & Kung,C. 1980
Membrane currents of pawn mutants of the pwA group in paramecium tetraurelia. J.exp.biol. 84: 57-71

58. Shieh,P.K., Lanyi,J. & Packer,L. 1979
Lipid impregnated filter membranes: A stable planer membrane system for assay of electrical properties across reconstituted liposomes and natural membrane vesicles. Method in Enzymology IV: 604-613

59. Takahashi,M. 1979
Behavioral mutants in paramecium caudatum. Genetics. 91: 393-403

60. Takahashi,M. & Naitoh,Y. 1978
Behavioral mutants of paramecium caudatum with defective membrane electrogenesis. Nature. 271: 656-659

61. 立田栄光、1975
昆虫の感覚、97-98、東大出版会

62. 寺嶋負一、1980
温熱を感じとる仕組み、自然、407: 64-74

63. Toyotama,H. & Yakaoka,Y. 1979
Effect of temperature on the swimming velocity of Triton-extracted models of paramecium caudatum. Cell structure and function. 4: 35-43

64. Whitaker,B.D. & Poff,K.L. 1980
Thermal adaptation of thermosensing and negative thermotaxis in dictyostelium. Exp.cell res. 127: 87-93

VIII 謝辞

この研究をおこなうにあたり、終始適切な助言と指導をして下さいました大沢文夫教授に深く感謝いたします。

共同研究者として常に有意義な議論と、指導をして下さいました中岡保夫博士に感謝いたします。

葛西道生教授をはじめ大沢研の職員、大学院生の皆様には有形、無形のお世話になりました。お礼申し上げます。

望月紀子さんには本論文の清書をして頂きました。深く感謝いたします。