

博士論文

イソアワモチ眼外光受容器の光情報処理と
その機能に関する研究

1992年3月

鹿児島大学医学部 西 孝 子

目次

序論	-----	4
第1章 イソアワモチ眼外光受容器の細胞内光情報伝達系について		
1. はじめに	-----	6
2. 材料と方法	-----	7
1) 動物の入手及び飼育	-----	7
2) 細胞内環状ヌクレオチドの測定	-----	7
3) 電気生理学的測定	-----	8
4) 人工海水の組成	-----	9
5) 光刺激	-----	9
3. 結果		
1) 光応答におけるDb-cGMPの効果	-----	10
2) A-P-1の細胞内cGMP量の光による変動	-----	11
3) A-P-1の光応答に対するGDP-β-Sの効果	-----	12
4) A-P-1の光応答に対するIP ₃ とneomysinの効果	-----	13
4. 考察	-----	14
第2章 イソアワモチ眼外光受容系で生じる波長弁別機構について		
1. はじめに	-----	18
2. 材料と方法	-----	19

3. 結果		
1) 眼外光受容器Es-1の性質	-----	20
(1)Es-1の光応答のイオン機構	-----	20
(2)Es-1の分光感度	-----	21
(3)Es-1の感度	-----	22
2) 正常海水におけるEs-1の光応答	-----	22
(1)Es-1とA-P-1の光応答	-----	23
(2)Es-1とA-P-1の自発性の膜電位変動	-----	23
(3)Es-1におけるA-P-1からのシナプス入力	-----	24
3) A-P-1とEs-1の形態	-----	25
(1)Es-1の形態	-----	25
(2)Es-1とA-P-1の同時染色	-----	25
4. 考察	-----	27
第3章 イソアワモチの行動に対する光環境の影響		
1. はじめに	-----	31
2. 方法	-----	32
3. 結果および考察		
1) イソアワモチの生態観察	-----	33
2) 実験室内でのイソアワモチの行動	-----	34
まとめ	-----	37

謝辞

39

引用文献

40

付図とその説明

序論

体内に存在する網膜以外の光応答性の細胞または組織すなわち眼外光受容器は、脊椎動物を含む多くの動物に備わった光受容器官である。例えば、ハ虫類以下の脊椎動物の松果体 (Meissl & Dodt, 1981)、ザリガニを代表とする甲殻類のCaudal photoreceptor (尾部光受容器) (Wilkens, 1988)、頭足類の星状体 (Mauro, 1977) 及びウニ、イソギンチャク等多くの動物に存在する皮膚光覚細胞 (Millott, 1968) があげられる。しかし、網膜における光受容器 (視細胞) と比較すると、それらの構造及び機能に関する研究は遅れていて、眼外光受容器の存在意義は明らかでない。その原因は、眼外光受容器は組織としては光受容能があると確認されても、細胞レベルでの光受容能の有無が区別できず、従って電気生理学や生化学的な解析が困難であることによる (Yoshida, 1979; Wolken & Mogus, 1981; Wolken, 1988)。

Aplysia の中枢神経節における光受容性の神経細胞 (眼外光受容器) は、他の眼外光受容器と比較すると細胞がはるかに大きく、各種の操作が容易であるという利点を持つため、よく研究されている。Arvanitaki & Chalazonitis (1961) は電気生理学の対象として、この *Aplysia* の眼外光受容器を初めて導入した。*Aplysia* 神経節における同定された神経細胞 R2、R15 及び L12 はいずれも眼外光受容器としての機能を持つが、これらは全て光によって K^+ コンダクタンスの増加を伴う過分極性の応答をする (Arvanitaki & Chalazonitis, 1961; Brown & Brown, 1973; Nelson et al., 1976; Andresen & Brown, 1979)。これらの光応答は、細胞内の Ca^{2+} 貯蔵庫であるリポコンドリアから放出される細胞内 Ca^{2+} が、二次メッセンジャーとして作用することによると考えられている (Brown et al., 1977)。 Ca^{2+} を光応答の二次メッセンジャーとする考えは、その後、眼外光受容器のみならず無脊

脊椎動物の視細胞にも拡張されている (Payne, 1986)。

一方、*Aplysia* と近縁の *Onchidium* (イソアワモチ) は柄眼の他に背眼、皮膚光覚、中枢神経節に存在する眼外光受容器など複数の光受容系を持っている (平坂, 1912, Hisano et al., 1972a,b; Katagiri et al., 1985)。これらのうち、中枢神経節に存在する A-P-1 と名付けた眼外光受容器の光応答は K^+ コンダクタンスの減少によって生じることがわかってきた (Gotow et al., 1990)。従って眼外光受容器 A-P-1 は、*Aplysia* のそれよりも、同じく光応答がコンダクタンスの減少によって生じる、脊椎動物視細胞に似ていることが暗示された。

本論文では以下の 3 項目について順次述べる。

1) A-P-1 の細胞内情報伝達機構を調べ、その結果、光応答に対応して細胞内サイクリック GMP (cGMP) 量が減少することから、cGMP が A-P-1 の二次メッセンジャーであることを強く支持した。

2) この A-P-1 は、同じ腹部神経節に存在するもう一つの眼外光受容器、Es-1 と抑制性のシナプスによって結合していることを発見した。A-P-1 から Es-1 へのこのシナプス入力のため、Es-1 の出力は光の波長の違いによって正 (脱分極) から負 (過分極) へと極性が変化する光応答を行うことがわかった。これは A-P-1 と Es-1 が共同作業によって光の波長弁別を行っていることを示唆している。

3) 行動学的には 2) における波長弁別の機構に対応するような、外界の光環境に依存したイソアワモチの適応行動が観察された。

第1章 イソアワモチ眼外光受容器の細胞内情報伝達系について

1. はじめに

イソアワモチの光受容性の神経細胞すなわち眼外光受容器A-P-1は、 K^+ コンダクタンスの減少を伴った脱分極性の光応答を示す (Gotow, 1986, 1989)。この光応答時に見られる膜コンダクタンスの減少は脊椎動物視細胞の場合と類似性があり、他の無脊椎動物の光受容器の光応答時に伴うコンダクタンスの増大現象と異なる (Tomita, 1972)。一方、脊椎動物視細胞では、光によってphosphodiesterase (PDE) が活性化されcGMPが分解されることで光応答が生じるという細胞内情報伝達系におけるcGMP説の存在が知られている (Pugh & Cobbs, 1986)。

そこで、イソアワモチA-P-1の細胞内情報伝達機構、特にcGMPの関与とその作用機構について研究した。

2. 材料と方法

1) 動物の入手及び飼育

軟体動物後鰓類イソアワモチ (*Onchidium verruculatum*) は、桜島の潮間帯で採集した。動物は濾過した天然海水が入った室内の飼育槽で餌を与えずに保存した。この状態で動物は3~6ヶ月間健康に保つことができるが、実験には採集後1ヶ月以内のものを使用した。動物の体重は10-15g、体長は4~6cmであった。

2) 細胞内環状ヌクレオチドの測定

動物が腹側を下にして十分に体を伸展した状態でピンで固定し、背中側の皮膚を切開し環食道神経節を露出した。眼外光受容器A-P-1は、実体顕微鏡で見ながら細胞体の回りの組織をできるだけ取り除くようにして腹部神経節から取り出した。暗黒下の人工海水中に最長でも3時間静置した後、5個の細胞を一つの単位として人工海水が0.5ml入った試験管に移し換えた。5個の細胞を一つの標本にした時に、人工海水中で標本間にcGMP量に有意差がないことは予備実験で確かめている。さらに、30分間暗下で放置した後、490nmの単色光 ($5 \times 10^{-4} \text{W/cm}^2$) を1分間または3分間照射し、0.5mlの10%トリクロロ酢酸を試験管に加え固定した。暗条件下(コントロール)における細胞内cGMP量の測定は、30分間の暗下での放置後すぐにトリクロロ酢酸を加えて固定したもので行った。酵素(IBMx、p.9参照)処理を行うものは、標本を0.1mMのIBMxの入った人工海水に光刺激を与える10分前から移し換え、その後は上記と同様な手順で実験を行った。標本を移し変えたりするこのような作業は、すべて弱い光(赤色光、 10^{-6}W/cm^2)のもとで行った。固定した標本はテフロンーガラスホモジナイザーを用いてホモジナイズし、15分間遠心分離機(3,000 r.p.m.)にかけ、上清だけを採取した。この上清を脱脂のため、5mlの水飽和エーテルを加えて振盪後、再び

エーテル層を除く処理を3回繰り返した後に、減圧乾固させた。乾固した資料はヤマサ醤油株式会社製のサイクリックヌクレオチドアッセイキットを用いてラジオイムノアッセイ法により、その中に含まれるcGMPを定量した。

3) 電気生理学的測定

電気生理学的解析で使用する標本は、細胞を被っている結合組織をピンセットでできるだけ剥ぎ、神経細胞を露出させた後に腹部神経節を環食道神経節と一緒に切り出した。この環食道下神経節は、微小電極の刺入を容易にするために非特異的なタンパク質分解酵素（アクチナーゼE、科研製薬）を0.1%の濃度で含んだ人工海水中に5分間放置した。その後実験容器（容積2ml）に移し変え、少なくとも20分以上酵素を含まない人工海水を灌流した後（灌流速度3ml/分）に実験を行った。2.5MのKClをつめたガラス微小電極の抵抗は10~20M Ω であった。微小電極は必要に応じて一つの細胞に1本または2本刺入した。電極を1本刺入する時には、その電極はブリッジ回路を用いて通電及び膜電位記録に共用した。微小電極を2本刺入する時には、それぞれ通電または記録専用の電極とした。不関電極は2.5MのKCl寒天橋を銀-塩化銀で導いた。膜電気現象は増幅器で増幅したものをオシロスコープで観察しながら同時にPCMデータプロセッサ（ショーシンPCM-DP16）でA/D変換し、市販のVTRに保存し、あとでペンレコーダーに再現した。電圧固定の実験は上述の微小電極前置増幅器にフィードバック回路を加えて用いた。

4) 人工海水の組成

灌流した人工海水の組成は以下の通りである。

NaCl	450mM
KCl	10mM
CaCl ₂	10mM
MgCl ₂	50mM
THAM (Tris hydroxymethyl aminomethane)	10mM

HClで滴定し、pH7.8に調整。

使用した薬物はguanosine 3':5'-cyclic monophosphate (cGMP), Sigma; N²,2'-*o*-dibutyryl-guanosine-3':5'-cyclic monophosphate (Db-cGMP), Boehringer-Mannheim; N⁶,2'-*o*-dibutyryl-adenosine-3':5'-cyclic monophosphate (Db-cAMP), Boehringer-Mannheim; 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), Sigma; guanosine-5'-*o*-(2-thiodiphosphate) (GDP-β-S), Boehringer-Mannheim; D-*myo*-inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃), Sigmaであった。またPertussis toxin (百日咳毒素), Seikagaku Kogyoは5μ/mlの濃度で用いた。薬物のいくつかは微小ガラスピペットを介した圧力押出装置 (PV820, World Precision Instruments, Inc., USA) によって細胞内に注入した。

5) 光刺激

単色光はタングステン沃素光源 (6.3V、45W) 及び回折格子モノクロメーター (島津-ボシュロム) を用い、直径5mmのライトガイドを通して導いた。光の強度はニュートラルフィルターの装着で調節し、ラジオメーター (Model 4090, Spring Jarco Instruments, Inc., USA) で測定した。

なお、全ての実験は室温 (18~23°C) で行った。

3. 結果

1) 光応答におけるDb-cGMPの効果

膜透過性のcGMP類似体Db-cGMPを、人工海水に溶かして濃度0.5mMの溶液をつくり、A-P-1の光応答に与える効果を見た。図1-1はDb-cGMP投与前のA-P-1の490nmの光に対する応答を示し、Aは膜電位変化、Bは-40mVに膜電位固定した時の膜電流の変化を示す。A-P-1は光刺激に対し、ゆっくりとした脱分極性の応答を示し、この時Bに示すように内向き電流が流れた。

外液にDb-cGMPを加えると、時間と共にA-P-1は過分極し、光応答は増大していった(図1-A、2,3)。膜電位固定下ではDb-cGMPによって外向きの暗電流が発生したので、その分だけ光応答すなわち、光によって生じる内向き電流は増加した(図1-B、2,3)。Db-cGMPの効果は可逆的であり、15分間洗うと元に戻った。同様な結果は、cGMP分解酵素PDEの阻害剤IBMXを外液に0.1mM加えた時也得られた(図3-B参照)。しかしcAMPの膜透過性の類似体Db-cAMPを外液に2mMの高濃度で与えても、膜電位や膜電流の変化は見られなかった。

Db-cGMP存在下の膜特性を調べるために、0.5mM及び1.5mMのDb-cGMP存在下で、A-P-1の電流-電圧関係を測定した(図2)。膜電位は最初-40mVの静止電位レベルに固定した。図に示すように、電流-電圧曲線はDb-cGMPの濃度に依存して急勾配になった(▲、■で示す)。すなわちDb-cGMPの濃度に依存して膜コンダクタンスが上昇し、膜電流(暗電流)が増加したことを意味する。これらの電流-電圧関係の勾配は過分極側の膜電位でより急になっており、Db-cGMPで発生する電流が電位依存性であることを示す。さらにDb-cGMP投与前後の電流-電圧曲線は、いずれの濃度の場合でも-65.5mV付近で交わった。これはDb-cGMPで生じる電流の平衡電位が-65.5mV付近にあることを意味する。

Gotow (1989) によれば、光によって発生する内向きの電流（光応答）は暗下で外向きに流れている暗電流が抑制されることによって生じ、そしてこの暗電流は電位依存性で約 -67mV に平衡電位を示す K^+ 電流であった。従って、上述の結果において cGMP によって発生する電流が電位依存性であり、その平衡電位が約 -65.5mV であることはこの電流が光によって抑えられる暗下の K 電流（暗 K^+ 電流）と同じものであることを暗示する。

2) A-P-1の細胞内cGMP量の光による変動

図1と図2の結果からA-P-1における暗下の K^+ 電流（暗 K^+ 電流）は、cGMP によって制御されているために、この暗電流の抑制すなわち光応答は光照射で PDE が活性化されて細胞内 cGMP 量が減少することに由来するものと考えられる。このことを確かめるために A-P-1 の細胞内 cGMP 量を暗下と光照射時において測定し、それらを比較した（図3-A）。

図3-Aの○印に示されるように細胞内cGMP量は最初の光照射1分以内で減少し始め、少なくとも3分の光照射の間、その減少は維持された。このcGMP量の減少は統計学的にも有意であった。しかしながら、□印で示されるように同時に測定された細胞内cAMP量は光照射前後で変化しなかった。

一方cGMP、cAMPの分解酵素（PDE）阻害剤であるIBMXを 0.1mM の濃度で、あらかじめ暗下の標本に加えた後、cGMP及びcAMPの変動を調べた。図3-Aの●印に示されるように、cGMP量はIBMX処理後約4倍に増加したが、光照射後IBMX処理前と同様な時間経過で有意に減少した。しかしながら約3倍に増加したcAMPの量は光照射によって変わらなかった（■印）。

上に示したように、細胞内cGMPの正味の量はIBMX処理の標本の方が、未処理のそれよりも2倍多く減少した。このことは、A-P-1におけるcGMPの光による減少がguanylate cyclase（cGMP合成酵素）の不活性化に由来するよりも、むしろPDEの活性化に由来するも

のと考えられる。

図3-BはcGMPまたはcAMP測定用に準備された標本と同じ条件のA-P-1において、膜電位固定下の電流変化を記録したものである。この図において外向きの暗電流の発生は、細胞内cGMPの増加に対応し、暗電流の光による抑制は細胞内cGMPの光による減少とほとんど同じ時間経過を示した。

以上の結果は、暗電流すなわちcGMPによって生じる電流の光による抑制（光応答）は、細胞内cGMPの光による減少によることを示唆している。

3) A-P-1の光応答に対するGDP- β -Sの効果

脊椎動物視細胞ではcGMPを分解するPDEの活性化は、光を吸収したロドプシンによってGタンパク質（transducin）が活性化することに起因する（Pugh & Cobbs, 1986）。そこで次のステップとしてA-P-1でのGタンパク質の関与を検討した。図4-AはA-P-1を静止膜電位に固定し、490nmの光刺激を照射した時に得られる光応答に対するGDP- β -Sの効果を示す。このGDP- β -Sは、Gタンパク質上で起こるGDPとGTPとの交換を阻害することで、Gタンパク質の活性化を抑制することが知られている（Bigay et al., 1985）。10mMのGDP- β -SをA-P-1へ圧力注入すると、図4-Aの矢印3で示すようにA-P-1の光応答は抑制された。しかしこの時、暗下の保持電流は変化しなかった。

Gタンパク質をADPリボシル化することで不活性化することが知られている百日咳毒素（Pertussis toxin）（Van Dop et al., 1984）を5 μ g/mlの濃度で外液に灌流させても、GDP- β -Sと同様にA-P-1の光応答は抑制された。

図4-Bでは、引き続いて外液に0.5mMのDb-cGMPを投与させた効果を示す。Db-cGMP存在下では1の項で述べたように暗電流は増加したが、光応答は回復しなかった（図4-B、矢印4）。

しかしGDP- β -Sによる光応答の抑制の効果は、図4-Cで示すようにIP₃を注入すると回復した。IP₃の効果については次の項で述べる。

これらの結果は、A-P-1でも光によってGタンパク質が活性化され、一連の光応答が生じることを暗示する。

4) A-P-1の光応答に対するIP₃とneomycinの効果

最後に、無脊椎動物視細胞で光応答の二次メッセンジャー候補とされているIP₃の効果を見た。IP₃はphosphatidylinositol bisphosphate (PIP₂)がphospholipase C (PL-C)によって分解されて生じる。図5-Aは、A-P-1の膜電位を-45mVに保持し、PL-Cの阻害剤であるneomycin (Downes & Michell, 1981)のA-P-1の光応答に対する効果を見たものである。

Neomycin (10mM)を細胞内へ圧力注入すると、光応答は可逆的に抑制された。この抑制は約5後に回復した(図5-A,B, 矢印2,3)。NeomycinとIP₃を同時に注入すると、光応答はcontrolよりむしろ増大した(図5-A, 矢印4)。しかしneomycin、IP₃双方とも暗下の保持電流に影響を与えなかった。またneomycinとcGMPを同時に注入すると暗電流が増加し、光応答も増大した(図5-B, 矢印4)。これらの結果により、IP₃は暗電流を変えないこと、光応答を増大させるように修飾する作用を持つことが示された。

4. 考察

現在まで調べられた無脊椎動物の眼外光受容器を含む視細胞は全て Na^+ または K^+ コンダクタンスが増加する光応答を示している (Fulpius & Baumann, 1969; Brown et al., 1970; Brown & Brown, 1973; Pinto & Brown, 1977; Gorman & McReynolds, 1978; Alkon, 1979; Andresen & Brown, 1979; Bacigalupo et al., 1986)。しかし、イソアワモチの光受容性の神経細胞、すなわち眼外光受容器A-P-1は、光に対してコンダクタンスの減少を伴った脱分極性の受容器電位を発生し、これは暗下で流れている K^+ 電流 (暗 K^+ 電流) が光によって抑制され発生することが明らかにされている (Gotow, 1986; 1989)。一方、脊椎動物視細胞では光刺激に対して過分極応答するが、そのとき Na^+ のコンダクタンスは減少する (Tomita, 1972; Owen, 1986)。このことは、イオン種は異なるものの、コンダクタンスの減少という点でイソアワモチのA-P-1に似ている。脊椎動物視細胞の細胞内光情報伝達機構には光によるPDEの活性化に続き、細胞内cGMPが分解され、その結果として膜コンダクタンスが減少する (暗電流が抑制される、すなわちチャンネルが閉じる) というcGMPカスケード説が知られている (Pugh & Cobbs, 1986)。

本研究によって、A-P-1のcGMPで発生する電流は電位依存性であり、平衡電位が -65.5mV 付近にあることがわかった。このことは暗下で流れ、光によって抑えられる K^+ 電流 (暗 K^+ 電流) とcGMPで発生する電流とが同一であることを暗示した。一方、光応答に伴う細胞内cGMP量の変動を調べた結果では、細胞内のcGMP量は光照射後、有意に減少した。また、cGMPの光による減少の時間経過は、同じ光による電位または電流変化の時間経過に対応した。このように生化学的に測定した細胞内cGMP量の減少と、電気生理学的光応答の時間経過がほぼ一致していることは、光応答すなわち暗電流の光による抑制が、cGMPの光による

分解によって生じることを強く支持する。また IBMX 存在下では細胞内 cGMP 量が増加しており、これは同じ IBMX による暗電流の増大と対応した。IBMX 存在下では cGMP 量の光による減少の絶対値は、対照実験の約 2 倍であり、このことは cGMP の減少が PDE の活性化に由来することを支持した。

これらの結果から、イソアワモチの眼外光受容器 A-P-1 の光応答は、脊椎動物視細胞と同様に、光によって PDE が活性化され細胞内 cGMP が減少する一連の cGMP カスケードによって説明できる。

脊椎動物視細胞では cGMP の分解を引き起こす PDE の活性化は、光を吸収したロドプシンによる G タンパク質の活性化によって生じる (Van Dop et al., 1984)。本研究において、G タンパク質の活性化を阻害することが知られている GDP- β -S 及び百日咳毒素は A-P-1 の光応答を抑制した。これは A-P-1 も視細胞同様に G タンパク質を介した光応答が生じることを暗示した。一方、無脊椎動物視細胞の二次メッセンジャー候補である IP₃ の細胞内注入は A-P-1 の光応答を増大させたが、PIP₂ を加水分解して IP₃ を産生する酵素 phospholipase C (PL-C) の阻害剤 neomycin の投与は、その応答を抑制した。PL-C の活性化は、PDE の活性化と同様に膜結合の G タンパク質を介して生じることが知られている (Fein, 1986; Cockcroft & Gomperts, 1985)。以上のことを総合すると、図 6 に示すように、イソアワモチ眼外光受容器 A-P-1 には、G タンパク質 (図 6 においては T と略している) を共通のステップとする上述の cGMP カスケードと、もう一つの IP₃ カスケードが共存し、cGMP レベルの減少は光応答 (光受容器電位) を発現させ、IP₃ はそれを修飾するように働いていることが考えられる。

軟体動物の伝達物質やホルモンの細胞内二次メッセンジャーとしては、cAMP の関与が多く報告されている。例えば、Aplysia の水管からの感覚入力を受ける LE 細胞群ではセロト

ニン投与やシナプス前細胞の電気刺激により、 K^+ コンダクタンスの減少を伴う脱分極が生じるが、この時に細胞内cAMP量の増加が報告されている (Siegelbaum et al., 1982; Sweatt et al., 1989)。そしてこのcAMPが蛋白kinaseを活性化してチャネル蛋白をリン酸化し、その結果セロトニン感受性 K^+ チャネル (コンダクタンス) が不活性化され、脱分極が生じるとされている。一方、同じAplysiaの別の神経細胞R15や、Helixの神経細胞F1でもセロトニン投与で細胞内cAMP量が増加するが、この細胞では先の場合とは逆に K^+ コンダクタンスが増加して過分極が生じている (Cedar & Schwartz, 1972; Treisman & Levitan, 1976; Levitan & Norman, 1980; Levitan & Benson, 1981)。このように、光情報の細胞内変換過程のみならず他の細胞内情報変換過程にも環状ヌクレオチドが関与しており、従って、今回の研究は単に光応答の細胞内情報伝達機構だけでなく、軟体動物の神経系における多種感覚の刺激による応答に対する細胞内情報伝達機構の一つのモデルとなるであろう。

若干の無脊椎動物視細胞の光情報伝達系でも、脊椎動物視細胞と同様に、光によってGタンパク質が活性化されると考えられている (Fein, 1986; Tsuda, 1987)。しかしながら、この場合、Gタンパク質がその後どのような化学反応過程によって光応答を導くのか、全く示されていない。カプトガニ視細胞では、 IP_3 が Ca^{2+} 貯蔵庫を刺激し Ca^{2+} を細胞内へ放出させることで光応答が生じるという、 IP_3 カスケードが考えられており、 IP_3 が光の二次メッセンジャー候補である (Berridge & Irvine, 1984; Payne, 1986)。しかしこの視細胞において、Caキレート剤であるEGTAを細胞内へ注入した時に、 IP_3 の効果は抑制されても、光応答は抑えられないという矛盾がある。一方、カプトガニ視細胞やイカの視細胞において、cGMPが光照射によって増加することで光応答が生じるという報告もある (Johnson et al., 1986; Saibil, 1984)。このように、一般の無脊椎動物視細胞の光情報伝達系に關す

る知見は、現在定説がなく混乱している。

これまでの知見では、脊椎動物視細胞ではコンダクタンスが減少する光応答を行い、無脊椎動物視細胞ではコンダクタンスが増大する光応答を行うと区別され、また光情報伝達系でも両者は全く異なるとされてきた。しかし前述のように、無脊椎動物であるイソアワモチの眼外光受容器は受容器電位のコンダクタンス変化及び細胞内情報伝達系に関して、脊椎動物の視細胞と共通する点が見られる。従って、他の無脊椎動物視細胞においても、イソアワモチ眼外光受容器の光情報伝達系と共通の機構の存在が暗示される。

第2章 イソアワモチ眼外光受容系で生じる波長弁別機構について

1. はじめに

多くの動物は体表面に位置するいわゆる眼の他に、体内に光受容能を持つ器官、眼外光受容器を合わせ持つ。眼外光受容器の研究は遅れており、特にその機能に関してはあまり知られていない (Yoshida, 1979; Wolken & Mogus, 1981)。

イソアワモチの中樞神経節に存在する光受容性の神経細胞は、近縁種の *Aplysia* のそれと並んで、眼外光受容器の代表例である。これらの眼外光受容器では受容器電位の発生機構や細胞内情報伝達系について前章で報告した通り、かなりの知見が得られている (Brown & Brown, 1973; Brown et al., 1977; Andresen & Brown, 1979; Gotow, 1989; Nishi & Gotow, 1989; Gotow & Nishi, 1991)。しかし、このような眼外光受容器の機能的な重要性はいまだ、十分には理解されていない (Strumwasser, 1973; Gotow et al., 1973; Block et al., 1974; Gotow, 1975)。

本研究では、イソアワモチ眼外光受容器A-P-1の他に、同じ腹部神経節に存在するEs-1と名付けられた細胞 (Hisano et al., 1972a) も、眼外光受容器として機能することを発見し、これら両眼外光受容器の生体における役割を調べた。Es-1は、A-P-1に対してシナプス後細胞であり、A-P-1から抑制性のシナプス入力を受けていることが明らかになった。この抑制性のシナプスは、Es-1が長波長域の光で脱分極の、短波長で過分極 (抑制) の光応答、すなわち色に依存して応答する機構の存在を可能にした。

また本研究は、軟体動物では、光の波長 (色) 弁別を行う能力はないと考えられている (Messenger, 1981) のに対して、その色弁別が可能であることをイソアワモチ眼外光受容系において初めて示したものである。

2. 材料と方法

実験動物の標本の作製法、並びに電気生理学的測定法は第1章と同じである。

光刺激に関しては、実験によって白色光刺激を与えたが、白色光刺激は通常の顕微鏡照明装置の光源を用い、それをガラスファイバー製の直径1cmのライトガイドで導いた。

第2章では、正常の人工海水の他にシナプス伝達を遮断するために、無Ca人工海水も用いた。その組成は以下の通りである。

無Ca ²⁺ 海水	NaCl	360mM
	KCl	10mM
	MgCl ₂	120mM
	THAM(Tris hydroxymethyl aminomethane)	10mM
	HClで滴定しpHを7.8に調整。	

形態的観察は蒸留水で2.5%にしたLucifer yellow (Lucifer yellow CH、Sigma) を微小電極につめて、最低6時間、過分極性のパルス (1nA~3nA、1Hz、500msec) を与え、細胞内へ注入して行った。この時の電極の抵抗は15~30MΩであった。注入の後、環食道神経節は4%のホルマリン (ホルムアルデヒド錠をpH7.4のリン酸緩衝液に溶かして作製) で4℃、12時間固定した。リン酸緩衝液で1時間洗浄後、アルコール系列で脱水し、サリチル酸メチルで組織を透明化した。標本は切片にせず、そのままの状態ですら蛍光顕微鏡で観察し、写真撮影を行った。

3. 結果

1) 眼外光受容器Es-1の性質

Hisano et al. (1972a) は、Es-1を他からの入力によって二次的に光に興奮する細胞であるとみなしたが、本研究ではEs-1の光受容能の有無について再検討した。まず腹部神経節を無Ca²⁺海水で灌流し、化学シナプスを遮断した状況下においた。その結果、Es-1の光応答は、抑制されずに、正常海水中よりもむしろ大きくなった。次に、Es-1の軸索の回りの組織を鋭利な刃物でできるだけ取り除いた上で神経節上からEs-1を単離した。この場合もEs-1は光に応答した。これらの結果によってEs-1はそれ自体光受容能を持つ光受容性の神経細胞すなわち眼外光受容器として機能することが示された。

(1)Es-1の光応答のイオン機構

Es-1の光応答のイオン機構を、シナプス入力を除外するため、無Ca²⁺海水中で調べた。この時、Es-1の静止電位は-40mVから-50mVの範囲にあった。

図7-Aは中程度の白色光刺激 ($1.5 \times 10^{-3} \text{W/cm}^2$) に対するEs-1の応答を示す。Es-1は光刺激に対して約500msecの潜時の後、ゆっくりとした時間経過で脱分極し、10秒から15秒かかって最大の大きさの応答に達し、光刺激を止めた後、15秒から20秒かかって刺激前の膜電位に戻った。図7-A2は、1秒の定電流パルスを与えながら同じ光刺激を照射し、膜抵抗の変化をみたものである。図に示されるように、光応答の時間経過に一致して膜抵抗は増大した。図7-A3は、光応答時とほぼ同じ膜電位の変化を暗時に脱分極通電によって与え、膜電位変化前後の膜抵抗を比較したものであるが、膜抵抗の変化はみられなかった。従って光応答時の膜抵抗の増大は、光応答時の脱分極によって二次的に発生したものではなく、光

応答そのものの膜コンダクタンスの変化を表していることが示唆された。図7-A4は静止レベルに膜電位を固定した時の膜電流を示す。光刺激時に内向き電流が発生するのが観察され、これは光刺激によって生じる脱分極性の電位応答と同じ時間経過であった。

図7-BはEs-1に生じる光受容器電位の平衡電位を求めるために、静止膜電位をいろいろ変化させて白色光刺激 ($3 \times 10^{-3} \text{W/cm}^2$) に対する応答を見たものである。Es-1の膜電位を過分極させるにしたがって、光応答は小さくなり、 -70mV 付近ではほとんど消失した。しかしさらに膜電位を過分極しても光応答の逆転は見られなかった。このEs-1の光応答の電位依存性はA-P-1のそれ (Gotow, 1989) と同様であった。

光応答時に膜抵抗が増大すること、そしてA-P-1の光応答の逆転電位とほぼ等しい -70mV 付近で応答が0になることから、Es-1の光受容器電位はA-P-1と同様にKコンダクタンスが減少することで発生することが示唆される。

(2)Es-1の分光感度

400nmから700nmの範囲で単色光を照射した時のEs-1の応答は、白色光刺激に対する応答と同様な時間経過で脱分極した。ある一つの波長で生じる応答は他の波長を用いても光強度を変化させることで全く同一の応答を得ることができ、「単一変数の原理」(Naka & Rushton, 1966) に従っていた。このことは光応答を生じさせる光感受性色素は1種類であることを意味する。そこで、各波長の光で一定の大きさの応答 (3mV) を生じさせる強度 (単位は光量子数/cm²/秒) を測定してその逆数を算出し、Es-1の分光感度を求めた。その結果、どの標本でも全て、ほぼ580nmに最大の感度を示すことがわかった。そこで580nmでの値を1として他の波長の値を比較し、比較分光感度曲線を作成した (図8)。異なる3標本の測定は全て無Ca²⁺中で行われた。この感度曲線を示した図には、比較のためにA-

P-1の分光感度曲線 (Gotow, 1989) も加えた。Es-1とA-P-1の分光感度曲線はそれぞれ一つのピークを持つ、単純な山型となった。このことはEs-1とA-P-1の光応答が別々の光受容色素に由来することを示唆する。点線はDartnallのノモグラム (Dartnall, 1953) であり、580nmと490nmにそれぞれ最大感度を持つと仮定した仮想的な色素の分光感度曲線を示している。

(3)Es-1の感度

Es-1の光強度と応答の関係を求めるために、強度の異なる580nm, 30秒の光刺激を用い、各光強度に対する応答の大きさ (受容器電位の大きさ) を測定した。その結果は図9に示すように、光応答は光強度の増大に伴って大きくなり、約0log単位、 $2 \times 10^{-4} \text{ W/cm}^2$ の光強度で飽和した。またEs-1の応答は光強度が増すにつれて応答のピークに達する時間は短縮されたが、暗順応に要する時間は長くなった。

比較のために、490nmの光を用いたA-P-1の光強度-応答曲線 (Gotow, 1989) を同じ図中に示した。A-P-1とEs-1の曲線から、Es-1の感度はA-P-1の感度よりも1/10から1/100低いことがわかった。

2) 正常海水におけるEs-1の光応答

前項まで述べてきたことはシナプス遮断した状況でのEs-1の光応答であった。しかし、正常海水中でシナプスが存在する条件でのEs-1の光応答は、シナプスが遮断されたEs-1単独の単純な脱分極性のものではなく、脱分極した後に過分極したり、あるいは過分極性の応答だけ生じることもあった。現在の実験においてこのようなEs-1の光応答は、後述のようにA-P-1との抑制性のシナプス結合を考慮すると説明できることがわかった。

(1) Es-1とA-P-1の光応答

図10はEs-1とA-P-1の光応答を同時記録したものである。図10-Aに示したEs-1の応答は、図7-Bと同じ強度の白色光刺激によって得られた応答である。正常海水中のEs-1の応答は、前項で示されたようにシナプス遮断時の活動電位が重畳した大きな脱分極性の応答とは異なり（図7-B1と比較）、全体として小さな脱分極応答に変化した。

図10-Bでは490nmの単色光（青緑色）を照射した例である。Es-1はシナプス遮断時の脱分極性の応答とは逆に約3mV過分極した。580nmの単色光（黄色）刺激の場合にはEs-1は脱分極した（C）。この時、Dに示すようにA-P-1を予め過分極通電すると、Es-1はさらに大きく脱分極し、この例では受容器電位に活動電位が重畳した。

これらの結果は、シナプス伝達が遮断されない正常海水中でのEs-1の応答は、異なる波長の光によって応答の極性が変化することを示す。Dに示すようにA-P-1を過分極させるとEs-1の光応答は増大することから、A-P-1はEs-1に抑制性の入力を送っていると考えられる。一方、A-P-1は、白色光及び490nmと580nmの単色光刺激に対し、いずれもシナプス遮断時と同様な脱分極性の単純な応答を示した。

(2) Es-1とA-P-1の自発性の膜電位変動

図11は暗下でのEs-1とA-P-1の膜電位の同時記録を示す。図11-Aでは自発的な発火が両細胞に不規則に生じているが、A-P-1が活動するとEs-1が静止し、逆にA-P-1が静止している時はEs-1が発火するというように二つの細胞が交互に自発興奮するパターンを示した。図11-BはAと異なる標本から記録したものであるが、A-P-1が高頻度に自発放電し、不規則に発火が休止するというパターンを示している。A-P-1の発火の休止時にEs-1は脱分極するが、

その脱分極の大きさや持続時間はA-P-1の発火の「休止期」の長さにほぼ対応していた。

これらの結果はいずれもEs-1の活動がA-P-1のそれに抑えられることを示し、Es-1の光応答がA-P-1からの抑制を受けると考えられた。

(3)Es-1におけるA-P-1からのシナプス入力

Es-1におけるA-P-1からの抑制性のシナプス結合の存在を確かめるため、二つの細胞の膜電位の同時記録を行った(図12)。A-P-1に10秒間の脱分極通電をすると、A-P-1の活動電位が発生しない閾値以下の電位変化に対しても、Es-1はゆっくりとした時間経過で過分極した(A1)。A2では通電量を増加させ、A-P-1に活動電位を発生させた。Es-1はA1のときよりも大きく過分極した。A3ではさらに通電量を増し、A-P-1に発生する活動電位の頻度を上げた場合である。この時のEs-1における抑制性のシナプス電位の大きさはA2におけるそれとほとんど変わらず、これらシナプス電位の発生にはシナプス前細胞となるA-P-1の活動電位を必要としないことが示された。このことは図12-Bの実験からも支持された。A-P-1に対する短時間(100msec)の脱分極通電によって活動電位を発生させた場合に、Es-1にはA-P-1の活動電位に対応する何らのシナプス電位も現れなかった(B1)。またA-P-1の活動電位による促通効果もEs-1に生じなかった(B2、B3)。逆に、Es-1を脱分極させてもA-P-1には電位変化が生じなかったので(C)、Es-1からA-P-1のフィードバックはないことが示された。以上の結果から、A-P-1からEs-1のシナプス伝達は、一般に知られた前細胞(A-P-1)における活動電位を必要とせず、閾値以下の漸増的電位変化でも十分可能であることが示された。

次に、Es-1におけるA-P-1からのシナプスは、以下のような理由で化学シナプスであると考えられた。①シナプス後細胞であるEs-1に通電を行ってもA-P-1に電位変化が生じなかつ

た。②Es-1に生じる抑制性のシナプス電位はEs-1の膜電位を過分極させることで、逆転した(図に示されていない)。③正常海水を無Ca²⁺海水に置換すると抑制性のシナプス電位は消失した。④次に示すように、A-P-1またはEs-1にLucifer yellowを注入した時、色素が他方の細胞へ広がることはなかった。

3) A-P-1とEs-1の形態

(1)Es-1の形態

Es-1の形態はCoイオン注入によってすでに示されている(Gotow, 1975)が、本研究では、Lucifer yellowを用いて染色した。染色した標本を写真撮影したのが図13-Aであり、図13-Bはそれを再構成したスケッチである。

Es-1の軸索は腹部神経節内で3本に分枝し、そのうちの太い直径の2本がそれぞれ右と左の体側神経節へ入り、その後、それぞれ3本ずつある左右の体側神経から末梢(腹足、外套など)へ出ていく。残りの細い1本は腹部神経節から腹部神経を通り、神経節から出ていく。このようにEs-1の主な軸索分枝のパターンはCoイオン注入で得られた前の結果と同様であった(Gotow, 1975)。しかし、今回のLucifer yellowによる染色によって、Coイオン染色では見られなかった無数の毛根状の突起がEs-1から出ているのが観察された。このような細かい突起の走行や数は標本によってかなり異なっていたが、特に腹部神経節と左体側神経節内に数多く見られた。

(2)Es-1とA-P-1の同時染色

Es-1がA-P-1とシナプス結合していることが電気生理学的実験で示唆されたので、これら二つの細胞の空間的配置を知るため、Es-1とA-P-1をLucifer yellowで同時染色した(図14)。A-P-1の軸索分枝のパターンもCoイオン染色によって得られた先の形態とほぼ同じで

あった (Gotow, 1989)。しかし、A-P-1の軸索分枝がEs-1の軸索分枝と接触する部位にはCo染色で観察されないvaricosity状の膨らみを所々に持った細かい分枝が多数見られた。またLucifer yellowは電気シナプスを通ることが知られているが、二つの細胞のあいだでこの染色液は互いに他に拡散することはなく、A-P-1とEs-1の間には電気シナプスはないことが示唆された。

4. 考察

イソアワモチの腹部神経節に存在し、光に興奮する光受容性神経細胞Es-1は、それ自体光受容能がある眼外光受容器として働き、同じ神経節に存在する分光感度の異なるもう一つの眼外光受容器A-P-1と、Es-1をシナプス後細胞とする抑制性のシナプス結合を作っていることがわかった。このため、Es-1の光応答は波長の違いによってその応答の極性を変えることができ、A-P-1から抑制性の入力を受けたEs-1は光の波長を弁別することが示唆された。このように眼外光受容系において、細胞が波長識別をしていることが示されたのは初めての例である。

Es-1の光応答は、近接する一次の光受容性細胞の光応答に由来した二次的な反応であると考えられていた (Hisano et al., 1972a)。しかし今回の研究により、Es-1は一次の眼外光受容器であることが明らかにされた。Es-1の脱分極性の光応答は膜コンダクタンスの減少を伴った。このような光応答時における膜コンダクタンスの減少は、同じ腹部神経節に存在するA-P-1と共通するが、他の無脊椎動物の光受容器では知られていない現象である。またEs-1の受容器電位は膜電位を過分極させると小さくなり、約-70mVで応答が消失した。これらの結果からEs-1の光応答はKコンダクタンスが光によって抑制されて生じることが示唆された。-70mV以上に膜電位レベルを過分極させても受容器電位の極性が反転しなかったのは、A-P-1において示されたように (Gotow, 1989)、Es-1にもこのKコンダクタンスに電位 (及び時間) 依存性の性質があるためであると考えられる。

シナプス入力遮断されたEs-1の光応答は「単一変数の原理」 (Naka & Rushton, 1966) に従い、どの波長の光に対しても強さを調節すれば同じであった。最大感度はA-P-1が490nmにあるのに対し、Es-1は580nmであり、この点でA-P-1とは異なっていた。しかし、正

常海水中においてEs-1はA-P-1より抑制性のシナプス入力を受けており、このことによりEs-1は、短波長（490nm）域の光に対して、自らの長波長（580nm）域による脱分極応答とは逆の、過分極性のシナプス応答を示す結果となった。AplysiaのA cellもEs-1と同様な長波長の光で脱分極するが、同時に490nmの光で過分極するために（Arvanitaki & Chalazonitis, 1961）、これは「単一変数の原理」に従わずEs-1と明らかに異なる。

A-P-1からEs-1へのシナプス伝達は他のよく知られているシナプス伝達と異なり、シナプス前線維の遅い漸増的（graded）な電位変化によって生じていることが示唆された。このようにシナプス前線維の活動電位がシナプス伝達に必要な例として、他にはトンボの単眼と二次細胞におけるシナプスが知られている（Chappell & Dowling, 1972）。Es-1がA-P-1から活動電位によらない抑制性のシナプス入力を受けていることは、換言するとA-P-1の光応答が連続的に負のシナプス電位としてEs-1に変換され、出力されるという利点が考えられる。図15はA-P-1からシナプス入力を受けたEs-1で生じる色対立型応答、すなわち波長弁別の機構を模式的に説明するものである。図中の1及び2はそれぞれ図8から得られたA-P-1及びEs-1の平均のスペクトル感度曲線を示す。上述のように、A-P-1の応答は連続的にEs-1に負の出力として送られるので、Es-1におけるA-P-1からの出力応答は、曲線1の極性を反転させた曲線3になることが予測される。Es-1は、Es-1よりもA-P-1に効果的に吸収される短波長（490nm）域の光によって過分極するが、A-P-1よりもEs-1自体に効果的に吸収される長波長（580nm）域の光によって脱分極することが考えられる。かくてEs-1の連続的スペクトル応答曲線は、曲線2と3とを加算して作成した曲線4で表されることが推測される。これはEs-1が短波長と長波長の違いを識別することを意味するものである。なお、A-P-1とEs-1のシナプス結合は、現段階では介在ニューロンの存在を否定できないので破線で図中に介在ニューロンを描いた。

波長の違いによって光応答の極性が変化する例はハチ網膜のUV細胞 (Menzel & Blakers, 1976) やカメの緑感受性細胞 (Fuortes & Simon, 1974) でも知られているが、これらの現象の発生機構は明らかにされていない。

シナプス前線維におけるインパルスよりも時間経過のゆっくりした電位変化の方がシナプス伝達に有効なのは、活動電位の伝導が前線維の途中で遮断されるためであると考えられる。遮断の原因としては、low-pass filterとして機能するような形態的な変化が生じていることが考えられ、例えばA-P-1の軸索分枝に観察された多数のvaricosityの存在がその候補として推測される。同様なvaricosityの観察は、同じ軟体動物*Hermisenda* の神経においてすでに示されている (Stewart, 1978)。この場合、細い軸索分枝を伝導する活動電位は途中のvaricosityのような分枝の膨らみに到達すると、そこに充電効果すなわちlow-pass filterが生じ、遮断されることが期待される。しかし、このような軸索分枝の膨らみにも時間経過の長い電位変化 (電気緊張電位) は、充分侵入 (伝播) できるものと考えられる。このような説明は著者の以前の仕事 (Nishi, Kobayashi et al., 1988; Nishi, Gotow et al., 1988) における、太陽虫の軸足の融合に関する電子顕微鏡学的及び電気生理学的解析からも支持される。太陽虫の軸足は神経の軸索分枝に置き換え、細胞体はvaricosityに置き換えて考えることができる。軸足のある融合段階、すなわち軸足に対する細胞体の容積の比が大きい段階では、軸足を伝導する活動電位は細胞体へ侵入できなかった。

眼外光受容器Es-1は、また外套表面の接触刺激を中継する二次ニューロンであり、同時にその感覚によって生じる外套反転反射の運動神経でもあることから、外界の明暗に応答するEs-1は外套反転反射の調節を行っていることが示唆されていた (Gotow et al., 1973)。またEs-1は上述の反射以外に移動行動にも関与していることが暗示された (Gotow, 1975)。

従って、本研究で示された色対立型の反応を示すEs-1の存在によって、イソアワモチは外界の光の有無だけでなく、外界の光環境の違い（例えば曇と晴）をも弁別して行動することが想像される。イソアワモチの活動と光の波長との関係に関しては、次の第3章で述べる。

第3章 イソアワモチの行動に対する光環境の影響

1. はじめに

第2章の結果は、イソアワモチの眼外光受容系において、光の波長すなわち色の違いを電位応答の違いに変換して、その色を弁別する神経機構が存在することを示した。しかし、生物学的な意義からみると、神経レベルの色弁別の機構は動物の行動レベルに反映されるものでなければならない。

この章では、色を弁別する上述の神経機構がイソアワモチの行動と関連するのかどうかを調べた結果を述べる。

2. 方法

イソアワモチは東南アジアの太平洋岸で広く見られる動物と言われているが、筆者が調べた範囲では錦江湾にうかぶ桜島南側の海岸以上に高い密度で生息する場所は他に見あたらない。潮間帯に生息するこの動物は満潮時には海中の岩穴に潜み、姿を見ることはできない。しかし日中の干潮時に限って岩穴からはい出し、摂食および交尾行動をするべく、干潮帯域をはい回るように見える。そこでイソアワモチの行動がさかんになる5月から7月にわたって、干潮時の約2時間前にこの潮間帯に十数回出向き、イソアワモチ行動の野外観察および写真撮影を行った。

室内での観察は、屋外観察の後に採集してきた個体を用いた。これらの動物は実験箱（横50cm×縦40cm×高さ40cm）に移し、温度26～28°C、光条件は実験室の昼夜条件で約10日前後飼育して室内条件にならした。このとき海水の量はイソアワモチの背部が水で見え隠れするほど（深さ約1cm）に保持し、個体の動きが海水で妨げられないように配慮した。

刺激光源として通常の顕微鏡用照明装置を用いた。これはライトガイド（直径約2cm）の先端に装着した干渉フィルター（日本真空光学製、 $\Delta\lambda 1/2=8\text{nm}$ ）によって580nmおよび490nmの単色光に分光された。この場合、実験箱に照射された光の強さは490nm、580nm共に等しいエネルギー（ $4\times 10^{-4}\text{W}/\text{cm}^2$ ）であった。

3. 結果及び考察

1) イソアワモチの生態観察

ここ数年来の採集の経験から、いくつかのイソアワモチの習性を知ることができた。イソアワモチは一般に冬期、12月から2月の3ヶ月の間、潮間帯の岩場に深く潜り込み、姿を見せないが、春から秋にかけて特に5月から9月の間は、潮間帯に数多く出現する。出現の様子であるが、その日の干潮時間の約1時間前から干潟になった岩場からはい出して動き回り、摂食および交尾行動を行う。干潮時間を約1時間過ぎると、まだ潮が満ちていなくても動き回っていたイソアワモチは再び岩穴に姿を消してしまう。このようにイソアワモチの行動は干潮時に限ってみられるものであるが、干潟になった岩場に出現する個体数は太陽の高度が高く、直射日光の強い昼間には非常に少なく、太陽の高度が $10\sim 30^\circ$ 程度の午前または午後に多くみられる。従って昼間（11時～14時）の干潮時には、直射日光を避けるように岩陰を行動の場にするため、一見岩の表面に見られるイソアワモチが少なくなる。しかしながら昼間の干潮時でも、もし小雨が降るような曇天であれば、午前または午後に見られるように数多く岩場に出現するようであった。以上の観察をもとに筆者はイソアワモチの干潮時における行動を予測するべく、表1のような条件下の日程を設定して野外観察を行った。

表 1

No.	I	II	III
日時	1990年5月24日	1990年6月6日	1990年6月19日
撮影時刻	午前11時	午前11時	午後9時15分
干潮時刻	午後0時57分	午後0時01分	午後10時22分
天候	曇り、 ときどき小雨	快晴	薄曇り
気温	22°C	26°C	26°C

観察条件をI、IIで比較すると干潮時間は昼間でほぼ等しいが、気温はIIの方が高く、イソアワモチ個体の行動活性に対して有利にはたらく。しかし予測通り、曇天のIの場合図16の1、2に示すようにイソアワモチは干潟の岩場全体に出現したが、IIの快晴の場合、3、4に示すように直射日光を避けた岩陰にのみ出現した。一方、イソアワモチは昼行性の動物と考えられるため、試みに観察IIIの条件下、すなわち夜間の潮間帯を調べたが、実際、ごく少数の個体しか見られなかった（写真不出）。

以上の結果から、イソアワモチは日中の干潮時に岩場をはい回るが、朝方や夕方、そして曇天の日のように長波長成分が優勢である光環境を好み、真昼間の短波長優勢の光環境を避けることが暗示される。

2) 実験室内でのイソアワモチの行動

イソアワモチの活動が外界の光環境で異なる可能性があることを示したので、室内においてもイソアワモチの行動が光刺激によって影響されるか否かを調べた。その結果は図17に模式的に示すように、昼間の室内のうす明るい条件下で490nmの光を照射すると実験箱にならした30匹のうち7～8割のイソアワモチは約30分で白色の薄明るい方へ移動した。次

に、490nmと等しいエネルギーを持った580nmの光を照射すると、実験開始後約30分以内で約8割のイソアワモチが、照射側へ集まった。一方490nmと580nmの光照射を同時に行った時には、イソアワモチの動きに有意な片寄りは見られなかった。以上の室内観察からも、イソアワモチが580nm（黄色）の長波長光を好み、490nm（青緑）の短波長光を避けると思われる行動が示された。

以上の観察から、イソアワモチの移動行動は外界の明暗よりも、波長の違い、すなわち色の違いに左右されることが示された。イソアワモチは柄眼、背眼、皮膚光覚と他に複数の光受容器官を持つが、前章で述べた眼外光受容器の他には、波長弁別の前提条件となる異なる分光感度を持つ光受容細胞が同一組織内に存在する知見は得られていない

(Katagiri et al., 1985)。従って、イソアワモチが光環境の色を識別して行動するのに、A-P-1とEs-1のような眼外光受容器を仲介する可能性は高い。

眼外光受容器は冒頭の部分で述べたように多くの動物に存在するが、皮膚光覚に代表されるように明暗に対する局所的反射以外にその機能はよくわかっておらず (Yoshida, 1979)、ましてや眼外光受容器が色を識別することなど今まで全く考慮されなかった (Menzel, 1979)。

軟体動物は、タコやイカに代表されるように、視覚の発達した動物門である。従来この動物は行動学的な実験により光の波長を弁別する能力はないとされてきた (Messenger, 1981)。しかしながら、本研究で明らかにされたように眼外光受容にまで注目した時、軟体動物が色を弁別できないという根拠は疑わしく考えられる。

光の波長（色）弁別機能に関しては従来、形態視が可能な高度に分化した網膜においてのみ検討されてきた。しかし、本研究によって形態視が不可能なイソアワモチ眼外光受容系において、色弁別機能の存在が示された。この光受容系は外界の光環境に応答してイソ

アワモチの適応行動を導いていることが考えられた。一方、光受容器として高度に分化した網膜は、眼外光受容器のような未分化の光受容器から発達してきたと考えられる。かくて外界が長波長光優勢、例えば曇天であるのか、または短波長光優勢、例えば晴天であるのかを弁別するイソアワモチの眼外光受容系こそは、動物の視覚系における色弁別の原型を提示しているものと考えられる。また以上の考察から、視覚機能における形態視よりも色視の方が、長い進化の過程において生物が早期に獲得した機能であると推定できよう。

まとめ

網膜における視細胞と比較すると、眼外光受容器の光受容に関する研究は遅れている。

本研究の第1章ではイソアワモチの眼外光受容器A-P-1の細胞内光情報伝達機構が調べられた。その結果、A-P-1において、光感受性の K^+ イオン電流は細胞内cGMPによって発生するが、cGMPの加水分解はその電流を抑制し光受容器電位、すなわち光応答を導くことが示された。またA-P-1の光応答は、cGMPの加水分解に関与した同じGタンパク質を経由して生じる IP_3 によって促進されることも示唆された。

第2章では、A-P-1と同じ腹部神経節に存在するEs-1の光応答が調べられた。Es-1は、他からのシナプス入力がない状態では、 K^+ コンダクタンスの減少による脱分極性の光応答をおこない、A-P-1と同様に自ら光に応答する眼外光受容器として機能することが示された。このEs-1の光応答のイオン機構はA-P-1のそれと共通するが、580nmに最大感度を示す点でA-P-1と異なっていた。Es-1は正常では490nmに最大感度を示すA-P-1から抑制性のシナプス入力を受けた。このA-P-1からEs-1へのシナプス伝達は前細胞の活動電位を必要とせず、閾値以下の持続時間の長い電位変化で十分可能であった。かくて、Es-1の光応答は長波長域ではそれ自体の応答による興奮性（脱分極）の応答となるが、短波長域ではA-P-1由来の抑制性（過分極）のシナプス応答を示し、光の波長によって応答の極性が変化し、波長弁別を行っていることが示された。

最後の第3章において、イソアワモチの生息地での生態観察及び室内での行動実験を行った。イソアワモチに波長の違いに依存した行動が見られ、このような行動を制御するのに、上述のA-P-1とEs-1のような光受容系を利用する可能性が高いことを示した。

本研究のように、眼外光受容器の波長弁別（色弁別）機能を示した報告は他に知られて

いない。一方、色識別の機構は高度に分化した網膜において数多くなされているが、未だその解明にはほど遠いのが現状である。かくて、イソアワモチのように構造が単純で未分化の眼外光受容系における色識別の知見は、系統発生的に高度に発達した光受容系（網膜）における色識別の解明に、少なからず寄与することが期待される。

謝 辞

本研究を遂行するに当たっては、鹿児島大学医学部生理学教室の後藤 司助教授に終始ご指導いただき、ここに深く感謝の意を表します。

広島大学の恩師、小林 惇教授の御助言、御鞭撻は大きな支えになっており、加えて、宗岡 洋二郎、重中 義信両教授には有益な示唆をたまわり、心からお礼申し上げます。

最後に、広島大学総合科学部の諸先生方、先輩、後輩の皆様には、卒業後もずっと暖かく励ましていただきまして、本当にありがとうございました。

なお本研究は一部、鹿児島大学南方科学研究、昭和61, 62, 63年度の研究助成を受けておこなわれました。

引用文献

- Alkon, D.L. (1979) Voltage-dependent calcium and potassium ion conductances: a contingency mechanism for an associative learning model. *Science*, 205, 810-816.
- Andresen, M.C. & Brown, A.M. (1979) Photoresponses of a sensitive extraretinal photoreceptor in *Aplysia*. *J. Physiol. (Lond.)*, 287, 267-282.
- Arvanitaki, A. & Chalazonitis, N. (1961) Excitatory and inhibitory processes initiated by light and infra-red radiations in single identifiable nerve cells (giant ganglion cells of *Aplysia*). In: Nervous inhibition (ed. Florey, E.), Oxford: Pergamon, pp. 194-231.
- Bacigalupo, J., Chinn, K. & Lisman, J.E. (1986) Ion channels activated by light in *Limulus* photoreceptors. *J. Gen. Physiol.*, 87, 73-89.
- Berridge, M.J. & Irvine, R.F. (1984) Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature*, 312, 315-321.
- Bigay, J., Deterre, P., Pfister, C. & Chabre, M. (1985) Fluoroaluminates activate transducin-GDP by mimicking the γ -phosphate of GTP in its binding site. *FEBS Lett.*, 191, 181-185.
- Block, G.D., Hudson, D.J. & Lickey, M.E. (1974) Extraocular photoreceptors can entrain the circadian oscillator in the eye of *Aplysia*. *J. Comp. Physiol.*, 89, 237-249.
- Brown, A.M., Brodwick, M.S. & Eaton, D.C. (1977) Intracellular calcium and extra-retinal photoreception in *Aplysia* giant neurons. *J. Neurobiol.*, 8, 1-18.
- Brown, A.M. & Brown, H.M. (1973) Light response of a giant *Aplysia* neuron. *J. Gen. Physiol.*, 62, 239-254.
- Brown, H.M., Hagiwara, S., Koike, H. & Meech, R.M. (1970) Membrane properties of a barnacle photoreceptor examined by the voltage clamp technique. *J. Physiol. (Lond.)*, 208, 385-413.
- Cedar, H. & Schwartz, J.H. (1972) Cyclic adenosine monophosphate in the nervous system of *Aplysia californica*. II. Effect of serotonin and dopamine. *J. Gen. Physiol.*, 60, 570-587.
- Chappell, R.L. & Dowling, J.E. (1972) Neural organization of the median ocellus of the dragonfly. I. Intracellular electrical activity. *J. Gen. Physiol.*, 60, 121-147.
- Cockcroft, S. & Gomperts, B.D. (1985) Role of guanosine nucleotide binding protein in the activation of polyphosphoinositide phosphodiesterase. *Nature*, 314, 534-536.

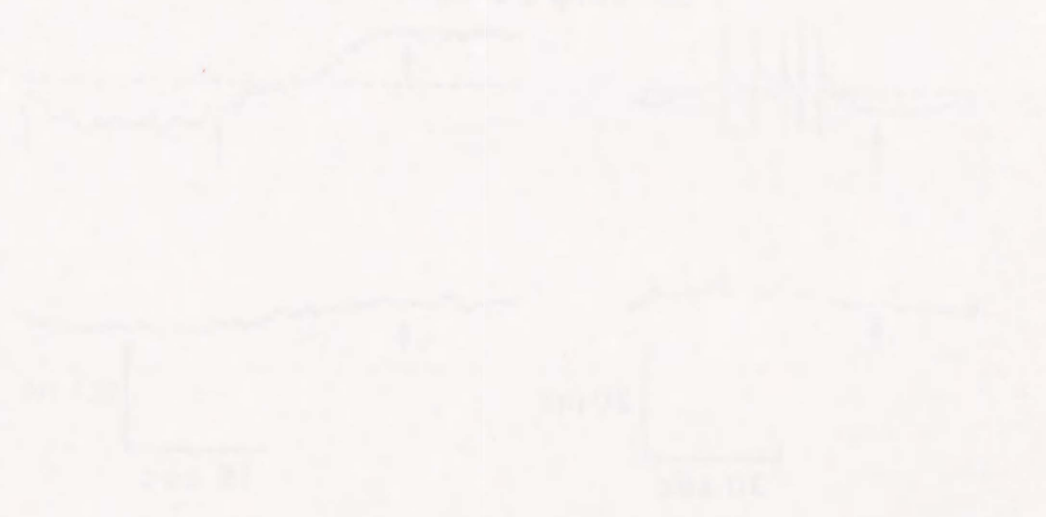
- Dartnall, H.J.A. (1953) The interpretation of spectral sensitivity curves. *Bri. Med. Bull.*, 9, 24-30.
- Downes, C. & Michell, R. (1981) The polyphosphoinositide phosphodiesterase of erythrocyte membranes. *Biochem. J.*, 198, 133-140.
- Fein, A. (1986) Blockade of visual excitation and adaptation in *Limulus* photoreceptor by GDP- β -S. *Science*, 232, 1543-1545.
- Fulpius, B. & Baumann, F. (1969) Effects of sodium, potassium and calcium ions on slow and spike potentials in single photoreceptor cells. *J. Gen. Physiol.* 53, 541-561.
- Fuortes, M.G.F. & Simon, E.J. (1974) Interactions leading to horizontal cell responses in the turtle retina. *J. Physiol. (Lond.)*, 240, 177-198.
- Gorman, A.L.F. & McReynolds, J.S. (1978) Ionic effects on the membrane potential of hyperpolarizing photoreceptors in scallop retina. *J. Physiol. (Lond.)*, 275, 345-355.
- Gotow, T. (1975) Morphology and function of the photoexcitable neurones in the central ganglia of *Onchidium verruculatum*. *J. Comp. Physiol.*, 99, 139-152.
- Gotow, T. (1986) Decrease of K⁺ conductance underlying a depolarizing photoresponse of a molluscan extraocular photoreceptor. *Experientia*, 42, 52-54.
- Gotow, T. (1989) Photoresponses of an extraocular photoreceptor associated with a decrease in membrane conductance in an opisthobranch mollusc. *Brain Res.*, 479, 120-129.
- Gotow, T. & Nishi, T. (1991) Roles of cyclic GMP and inositol trisphosphate in phototransduction of the molluscan extraocular photoreceptor. *Brain Res.*, 557, 121-128.
- Gotow, T., Nishi, T. & Kijima, H. (1990) The light-suppressible K⁺ conductance and evaluation of internal messenger candidates in the molluscan extraocular photoreceptor. *Neurosci. Res. Suppl.*, 12, S145-S159.
- Gotow, T., Tateda, H. & Kuwabara, M. (1973) The function of photoexcitatory neurones in the central ganglia for behavioral activity of the marine mollusc, *Onchidium verruculatum*. *J. Comp. Physiol.*, 83, 361-376.
- 平坂 恭介 (1912) イソアハモチ背眼の構造に就て。動物學雜誌, 297號, 20-35。
- Hisano, N., Tateda, H. & Kuwabara, M. (1972a) Photosensitive neurones in the marine pulmonate mollusc *Onchidium verruculatum*. *J. exp. Biol.*, 57, 651-660.
- Hisano, N., Tateda, H. & Kuwabara, M. (1972b) An electrophysiological study of the photo-excitatory neurones of *Onchidium verruculatum in situ*. *J. exp. Biol.*, 57, 661-671.

- Johnson, E.C., Robinson, P.R. & Lisman, J.E. (1986) Cyclic GMP is involved in the excitation of invertebrate photoreceptors. *Nature*, 324, 468-470.
- Katagiri, Y., Katagiri, N. & Fujimoto, K. (1985) Morphological and electrophysiological studies of a multiple photoreceptive system in a marine gastropod, *Onchidium*. *Neurosci. Res. Suppl.*, 2, S1-S15.
- Levitan, I.B. & Benson, J.A. (1981) Neuronal oscillators in *Aplysia*: Nodulation by serotonin and cyclic AMP. *TINS*, Feb., 38-41.
- Levitan, I.B. & Norman, J. (1980) Different effects of cAMP and cGMP derivatives on the activity of an identified neuron: biochemical and electrophysiological analysis. *Brain Res.*, 187, 415-429.
- Mauro, A. (1977) Extra-ocular photoreceptors in cephalopods. *Symp. zool. Soc. Lond.* 38, 287-308.
- Meissl, H. & Dodt, E. (1981) Comparative physiology of pineal photoreceptor organs. In: *Photobiology-Biochronometry-Endocrinology* (eds. Okshe, A. & Pevet, P.), Elsevier, North-Holland Biomedical Press, pp. 61-81.
- Menzel, R. (1979) Spectral sensitivity and color vision in invertebrate. In: *Handbook of Sensory Physiology*, vol. VII /6A (ed. Autrum, H.), Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, pp. 504-579.
- Menzel, R. & Blakers, M. (1976) Colour receptors in the bee eye: Morphology and spectral sensitivity. *J. Comp. Physiol.*, 108, 11-33.
- Messenger, J.B. (1981) Comparative physiology of vision in molluscs. In: *Handbook of Sensory Physiology*, vol. VII /6C (ed. Autrum, H.), Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, pp.93-200.
- Millott, N. (1968) The dermal light sense. *Symp. zool. Soc. Lond.*, 23, 1-36.
- Naka, K.-I. & Rushton, W.A.H. (1966) S-potentials from colour units in the retina of fish (*Cyprinidae*). *J. Physiol.(Lond.)*, 185, 536-555.
- Nelson, T.H., Kim, Y.I. & Kim, M. (1976) Photosensitivity of a bursting pacemaker neuron in *Aplysia californica*. *Brain Res.*, 105, 583-587.
- Nishi, T. & Gotow, T. (1989) A light-induced decrease of cyclic GMP is involved in the photoresponse of molluscan extraocular photoreceptors. *Brain Res.*, 485: 185-188.
- Nishi, T., Gotow, T. & Kobayashi, M. (1988) Changes in electrical connection during cell fusion in the heliozoan, *Echinopharium akamae*. *J. exp. Biol.*, 135, 183-191.

- Nishi, T., Kobayashi, M., Isomura, M., Ishida, H. & Shigenaka, Y. (1988) Direct evidence for axopodial fusion preceding cell-to-cell contact in a heliozoan *Echinospaerium*. *Zool. Sci.*, 5, 179-182.
- Owen, W.G. (1986) The light-induced conductance change in the vertebrate rod. In: *The Molecular Mechanism of Photoreception*, (ed. Stieve H.), Springer, Berlin, pp. 171-187.
- Payne, R. (1986) Phototransduction by microvillar photoreceptors of invertebrates: Mediation of a visual cascade by inositol trisphosphate. *Photobiochem. Photobiophys.*, 13, 373-397.
- Pinto, L.H. & Brown, J.E. (1977) Intracellular recordings from photoreceptors of the squid (*Loligo pealii*). *J. Comp. Physiol.*, 122A, 241-250.
- Pugh, E.N. & Cobbs, W.H. (1986) Visual transduction in vertebrate rods and cones: A tale of two transmitters, calcium and cyclic GMP. *Vision Res.*, 26, 1613-1643.
- Saibil, H.R. (1984) A light-stimulated increase of cyclic GMP in squid photoreceptors. *FEBS Lett.*, 168, 213-216.
- Siegelbaum, S.A., Camardo, J.S. & Kandel, E.R. (1982) Serotonin and cyclic AMP close single K⁺ channels in *Aplysia* sensory neurons. *Nature*, 299, 413-417.
- Stewart, W.W. (1978) Functional connections between cells as revealed by dye-coupling with a highly fluorescent naphthalimide tracer. *Cell*, 14, 741-759.
- Strumwasser, F. (1973) Neural and humoral factors in the temporal organization of behavior. *Physiologist*, 16, 9-41.
- Sweatt, J.D., Volterra, A., Edmonds, B., Karl, K.A., Siegelbaum, S.A. & Kandel, E.R. (1989) FMRFamide reverses protein phosphorylation produced by 5-HT and cAMP in *Aplysia* sensory neurones. *Nature*, 342, 275-278.
- Tomita, T. (1972) Light-induced potential and resistance changes in vertebrate photoreceptors. In: *Handbook of Sensory Physiology*, vol. VII /2, (ed. Fuortes, M.G.F.), Springer, Berlin, pp. 483-511.
- Treisman, S.N. & Levitan, I.B. (1976) Alteration of electrical activity in molluscan neurones by cyclic nucleotides and peptide factors. *Nature*, 261, 62-64.
- Tsuda, M. (1987) Photoreception and phototransduction in invertebrate photoreceptors. *Photochem. Photobiol.*, 45, 915-931.
- Van Dop, C., Yamanaka, G., Steinberg, F., Sekura, R.D., Manclark, C.R., Stryer, L. & Bourne, H.R. (1984) ADP-ribosylation of transducin by pertussis toxin blocks the light-stimulated hydrolysis of GTP and cGMP in retinal photoreceptors. *J. Biol. Chem.*, 259, 23-26.

- Wilkins, L.A. (1988) The crayfish caudal photoreceptor: Advances and questions after the first half century. *Comp. Biochem. Physiol.*, 91C, 61-68.
- Wolken, J.J. (1988) Photoreceptor of marine invertebrates: extraocular photoreception. *Comp. Biochem. Physiol.*, 91C, 145-149.
- Wolken, J.J. & Mogus, M.A. (1981) Extraocular photoreception. In: Photochemical and Photobiological Reviews, vol. 6 (ed. Smith, K.C.), New York, London: Plenum Press, pp. 181-199.
- Yoshida, M. (1979) Extraocular photoreception. In: Handbook of Sensory Physiology, vol. VII /6A (ed. Autrum, H.), Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, pp. 582-640.

付図とその説明



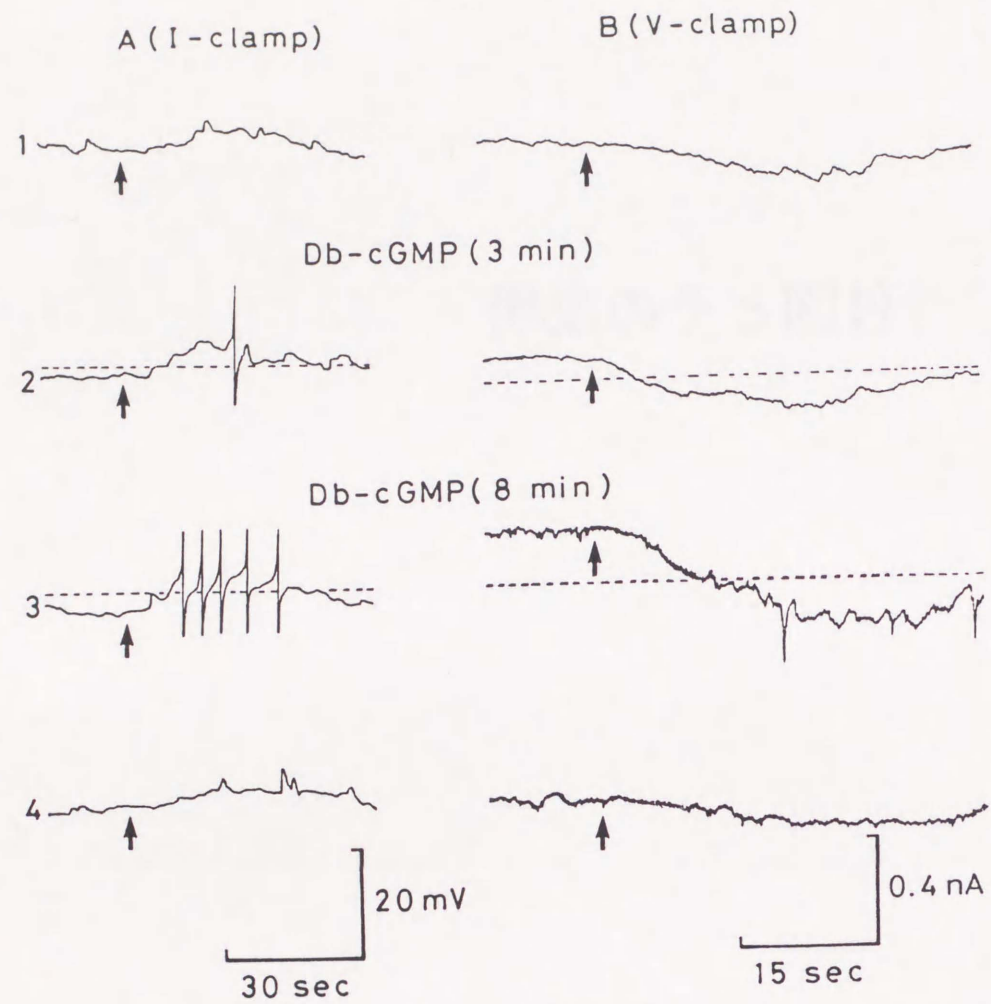


図1 A-P-1の光応答に対するDb-cGMPの効果

外液に0.5mMのDb-cGMPを与えた時のA-P-1の光応答を示す。Aは膜電位変化を、Bは-40mVに膜電位を固定した時の電流変化を示し、図では下向きにふれが内向き電流（符号は負）を表す。これらは全て同一標本から記録したものであり、矢印は490nmの光刺激（5秒間、 $1 \times 10^{-5} \text{W/cm}^2$ ）を与えた時点を示す。A1、B1は対照、A2、B2はDb-cGMPの投与3分後の記録、A3、B3は8分後の記録を示す。点線は対照における静止電位（-50mV、A2、A3）、及び保持電流（B2、B3）のレベルを示す。A4とB4はDb-cGMPを洗い流してから約30分後の回復を示す。

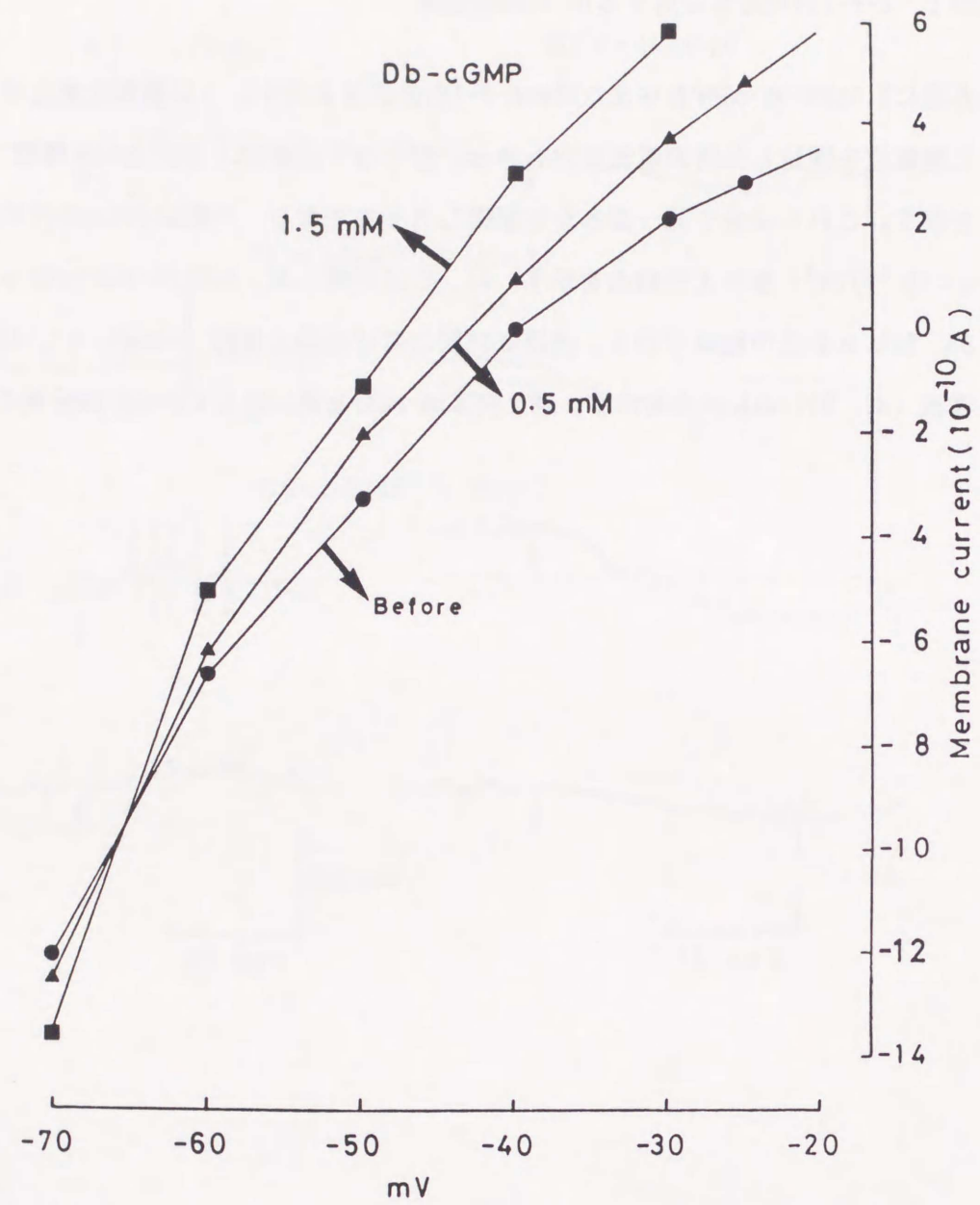


図2 Db-cGMPの投与前後における膜電位固定下のA-P-1の電流-電圧関係

暗下の条件で最初、約-40mVに膜電位を固定した後、外液にDb-cGMPを与えている。●は対照、▲は0.5mM、■は1.5mMのDb-cGMPが加えられた時の電流-電圧関係である。保持電流の値(縦軸)が電圧保持電位の値(横軸)に対してプロットされている。三つの電流-電圧曲線は約-65.5mVで交差する。

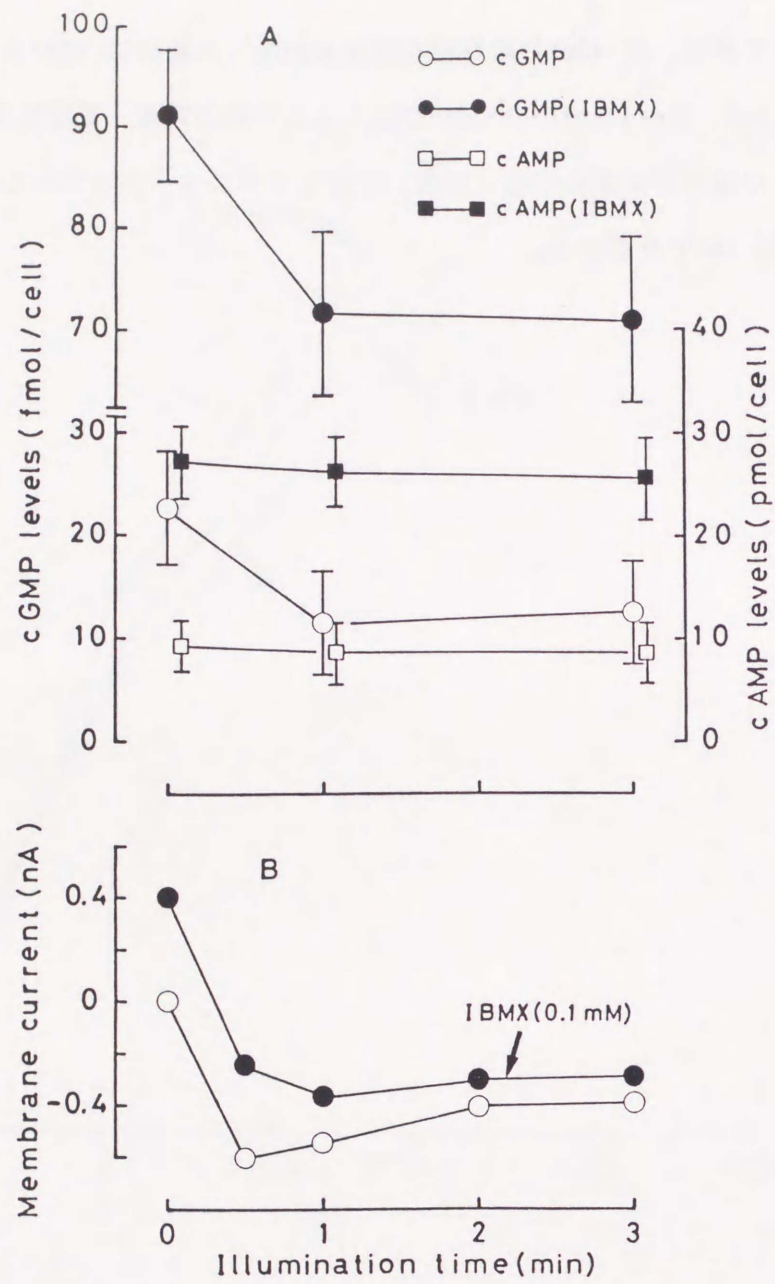


図3 A-P-1の細胞内cGMP及びcAMP量の変動と光応答電流

A: 対照 (光照射時間0)、光照射1分、3分後の細胞内cGMP量及びcAMP量を示す。○、□は正常海水、●、■は0.1mMのIBMXが存在する海水において測定したものである。各点はそれぞれ5つの標本から得た値であり、1個のA-P-1あたりの平均値とその標準偏差 (±S.D., n = 5) を示す。正常海水中のcGMP (○) とcAMP (□) 並びにIBMX存在下でのcGMP (●) とcAMP (■) はそれぞれ同一の標本を用いて測定されている。光強度は490nm、 $1 \times 10^{-5} \text{W/cm}^2$ である。光照射後の細胞内cGMP量は、正常海水中、IBMX存在下いずれにおいても有意に ($p < 0.05$, t-test) 減少した。

B: 上と同じ条件のA-P-1を-40mVに膜電位固定した時に、光を照射して生じる電流の変化を示す。○は正常海水、●はIBMX存在下の光によって生じる電流変化を示し、各点は2個体を使った6回の実験の平均値である。

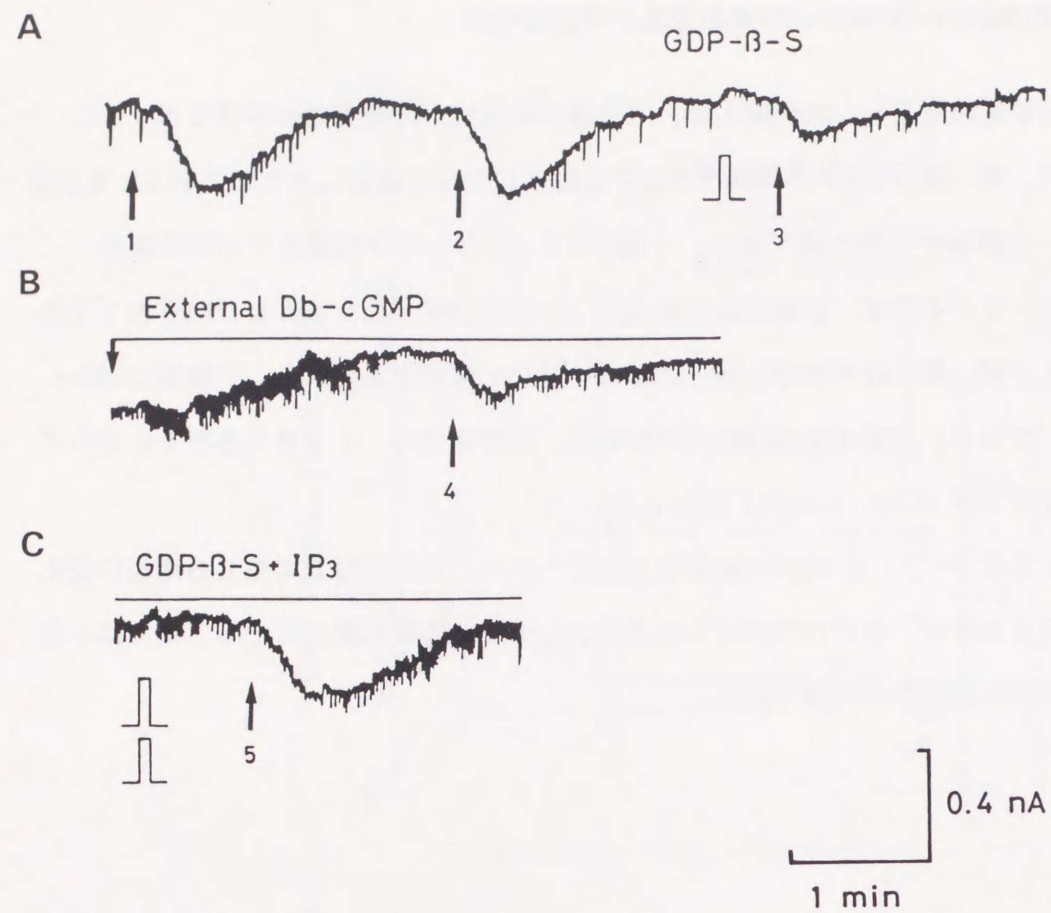


図4 A-P-1の光応答におけるGDP-β-SとIP₃の効果

上段から下段へ並べた電流記録は連続している。膜電位は実験中-45mVに保持された。矢印は490nmの光刺激（5秒間、 $1 \times 10^{-5} \text{W/cm}^2$ ）を与えた時点を示し、その矢印に添えられた数字は光刺激を行った順序を示す。GDP-β-Sは微小電極につめられ、矢印3の前の「」マークに示した時点で、圧力注入（5秒間、30psi）された。中段の記録の始めから、外液には0.5mMのDb-cGMPが加えられた。下段に示した「」マークの時点で、それぞれ微小電極につめたGDP-β-SとIP₃を同時にA-P-1に圧力注入した（双方とも5秒間、30psi）。

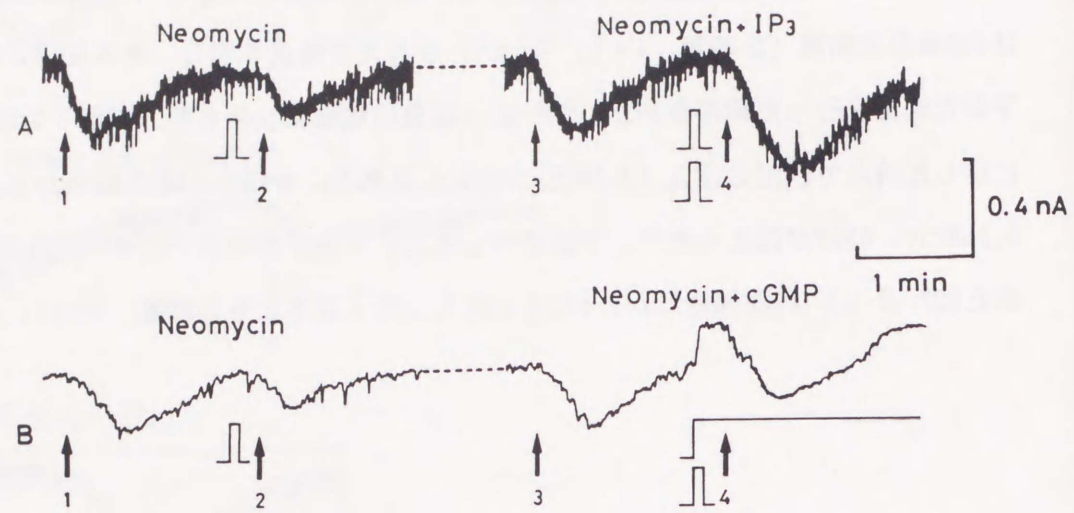


図5 A-P-1の光応答におけるneomycin、IP₃及びcGMPの効果

A、Bとも-45mVに膜電位を保持し、矢印の時点で490nmの光刺激（5秒間、 $1 \times 10^{-5} \text{W/cm}^2$ ）を照射した。矢印に添えられた数字は、光刺激の順序を示す。凡は微小電極につめた薬物の注入を示し、Aではまずneomycinが、次にneomycinとIP₃が同時に注入された。Bではまずneomycinが、その後neomycinとcGMPが同時に注入された。neomycin、IP₃はいずれも5秒間圧力注入（30psi）され、cGMPは継続的に圧力注入（30psi）された。A、Bとも記録図中の点線はneomycin注入後、A-P-1に光応答が回復するのに要した約5分を示す。AとBは異なった標本を用いた。

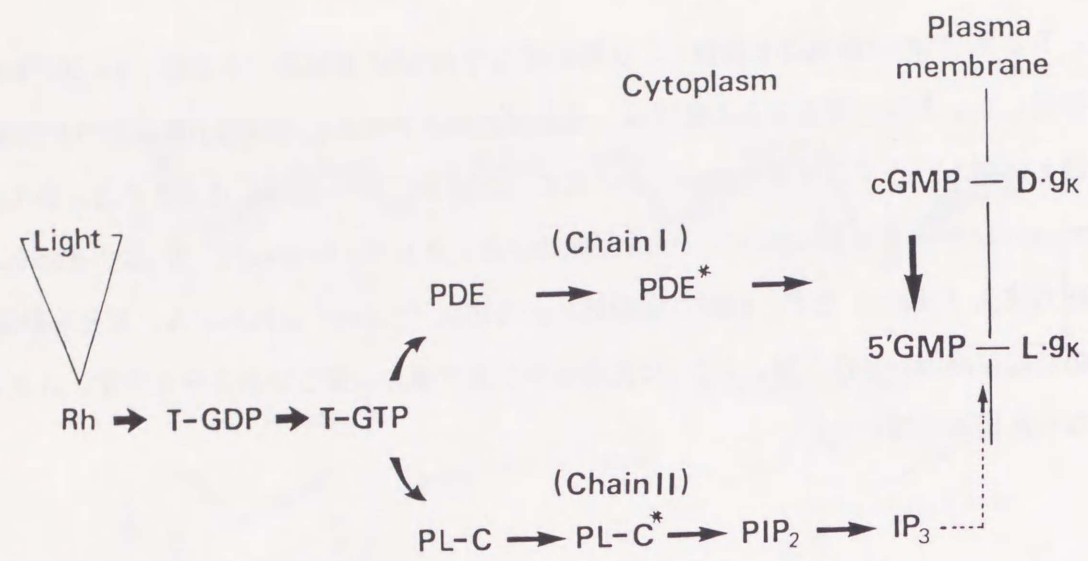


図6 イソアワモチ眼外光受容器の光変換機構に平行して存在するcGMPとIP₃カスケードの模式図

光を吸収したRh (photopigments) はGタンパク質を活性化 (T-GTP) へ導き、これを共通のステップとして、Chain I 及びChain II で示すように、平行するcGMPカスケードとIP₃カスケードが作動する。光感受性の暗コンダクタンス (D-gK) はcGMPによって仲介されるが、PDEの活性化 (PDE*で示す) によってcGMPは5'-GMPに加水分解されると、D-gKは減少してL-gKとなり、光応答(光受容器電位)が生じる。この光応答は同時にPL-Cの活性化 (PL-C*)によるIP₃によって促進されるように修飾を受ける。

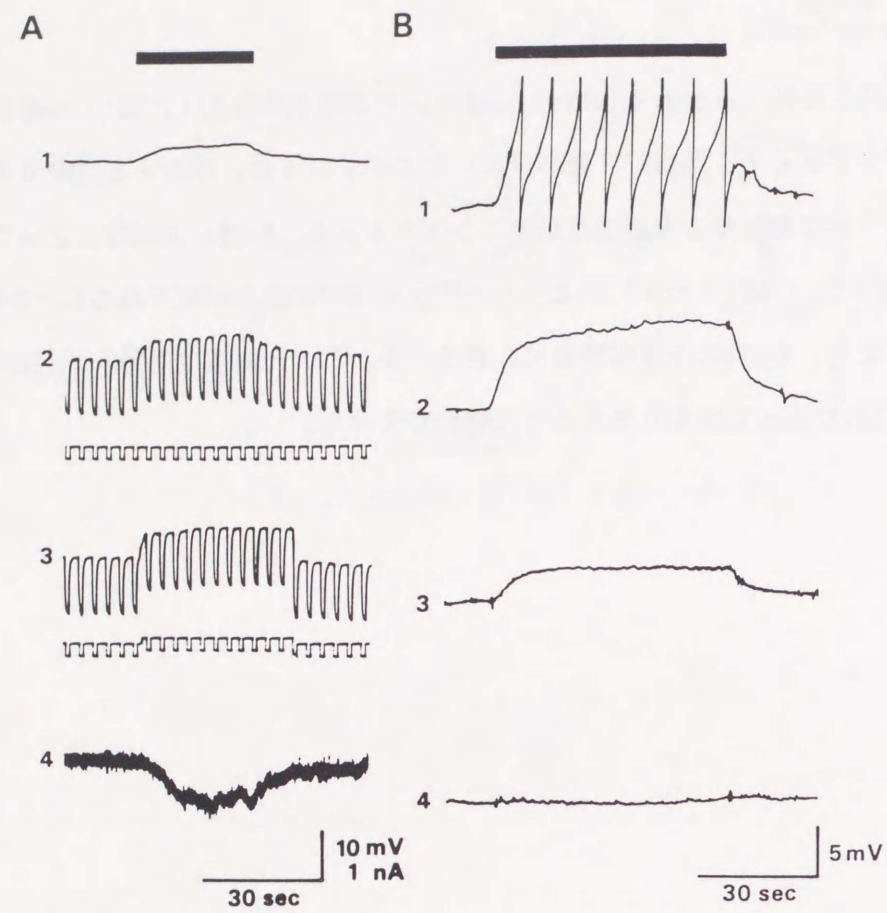


図7 白色光刺激に対するEs-1の応答

Es-1に対するシナプスの効果を抑えるために、記録は全て無Ca²⁺海水中でなされた。光刺激は上部の太い棒線（Aにおいて30sec、Bにおいて1min）によって示される。刺激の強さは $1.5 \times 10^{-3} \text{W/cm}^2$ （A）と $3 \times 10^{-3} \text{W/cm}^2$ （B）であった。A1：静止電位-43mVにおける脱分極応答。A2：膜抵抗の変化を測定するため、過分極性のパルス（1nA、1sec）を与えている。A3：暗下で光応答と同程度（約7mV）に通電により脱分極させ、2と比較した。A4：静止電位（-45mV）に膜電位を固定した時に、光によって生じる内向き電流を示す。B：光応答の膜電位変化による効果。静止膜電位は1、2、3、4の順に-45、-55、-60そして-70mVであった。

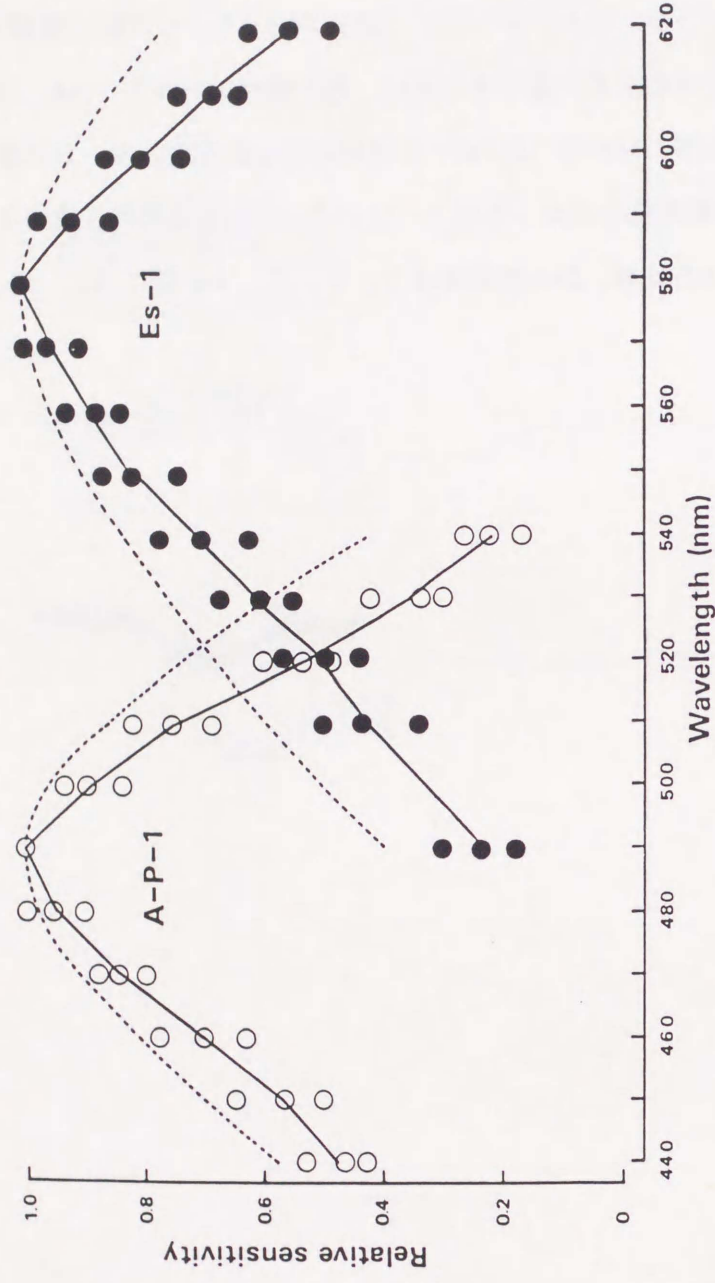


図8 Es-1とA-P-1の光スペクトル感度曲線

横軸は光の波長、縦軸は比較感度 (relative quantum sensitivity) を示す。実線は各波長でそれぞれ3標本から得た、Es-1とA-P-1のスペクトル感度の平均値を示す。Es-1は580nmでの値を、A-P-1では490nmでの値を1として換算した。Es-1に対する測定はシナプスの作用を抑えるために、無Ca²⁺海水中でなされた。A-P-1に関するデータはGotow (1989) より引用した。点線はそれぞれ490nm、580nmに最大の感度を示すと仮定した仮想的な色素のDartnall曲線である。

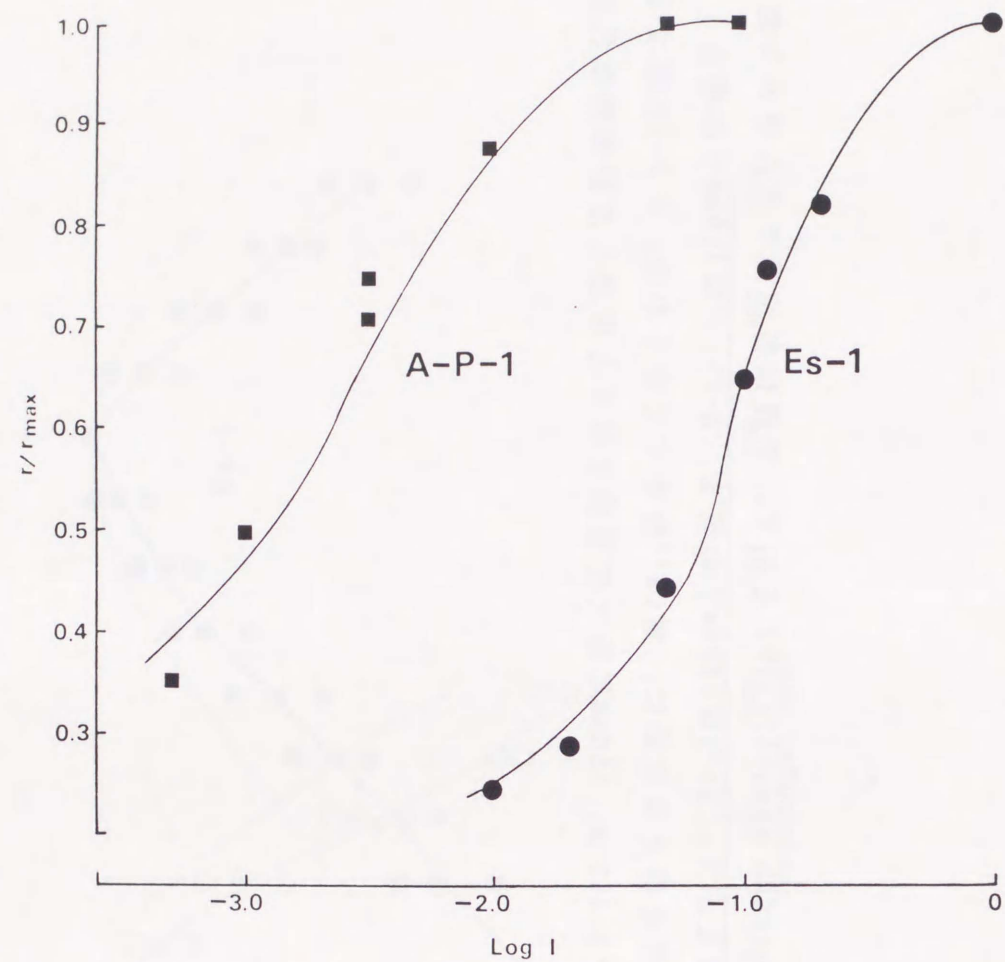


図9 Es-1とA-P-1の強さ-応答曲線

580nmの単色光（刺激時間30秒）の強度を変えて照射し、Es-1の光応答の大きさを測定し算出した。横軸は光強度、縦軸は最大の応答に対するそれぞれの強さの応答を比で表している。グラフは異なる3標本から作製したものである。A-P-1の490nmの単色光刺激に対する応答はGotow（1989）より引用した。

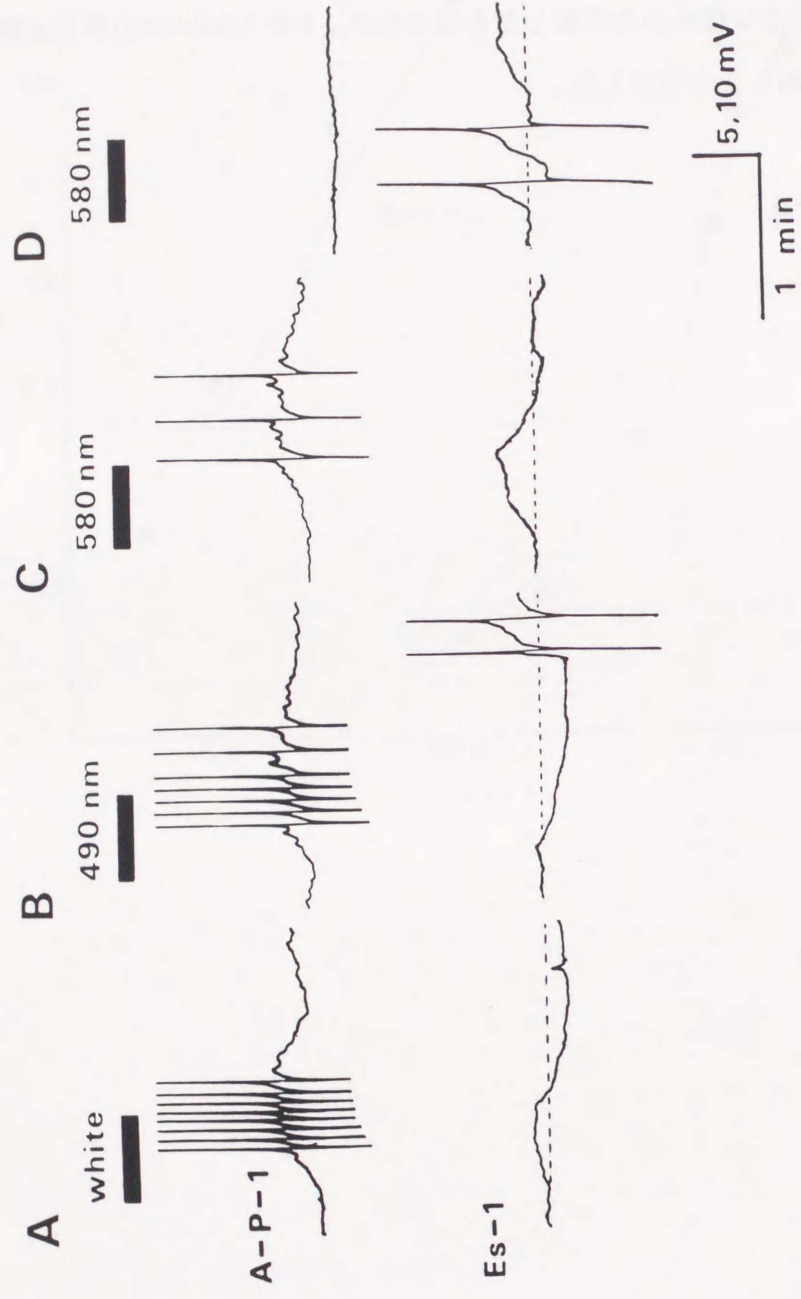


図10 同時に記録されたEs-1とA-P-1の光応答

上部の太い棒線によって示された各光刺激は長さ30secで、その強さはA、白色光において $3 \times 10^{-3} \text{W/cm}^2$ 、B、490nmにおいて $1.2 \times 10^{-4} \text{W/cm}^2$ 、そしてC、Dの580nmにおいて $1 \times 10^{-4} \text{W/cm}^2$ であった。光の強さを光子数の数に換算すると、490nmと580nmの光は共に約 $0.29 \times 10^{15} \text{quanta/cm}^2 \cdot \text{sec}$ となり、等光子数であった。Es-1は490nm(青緑)の光で過分極するが等光子数の580nm(黄色)の光で逆に脱分極することに注意。A-P-1の静止電位はA、B、Cでは-50mV、Dでは-60mVで、Es-1のそれは全て-45mVであった。電圧較正：各同時記録の上部(A-P-1)に対して10mV、下部(Es-1)に対して5mV。

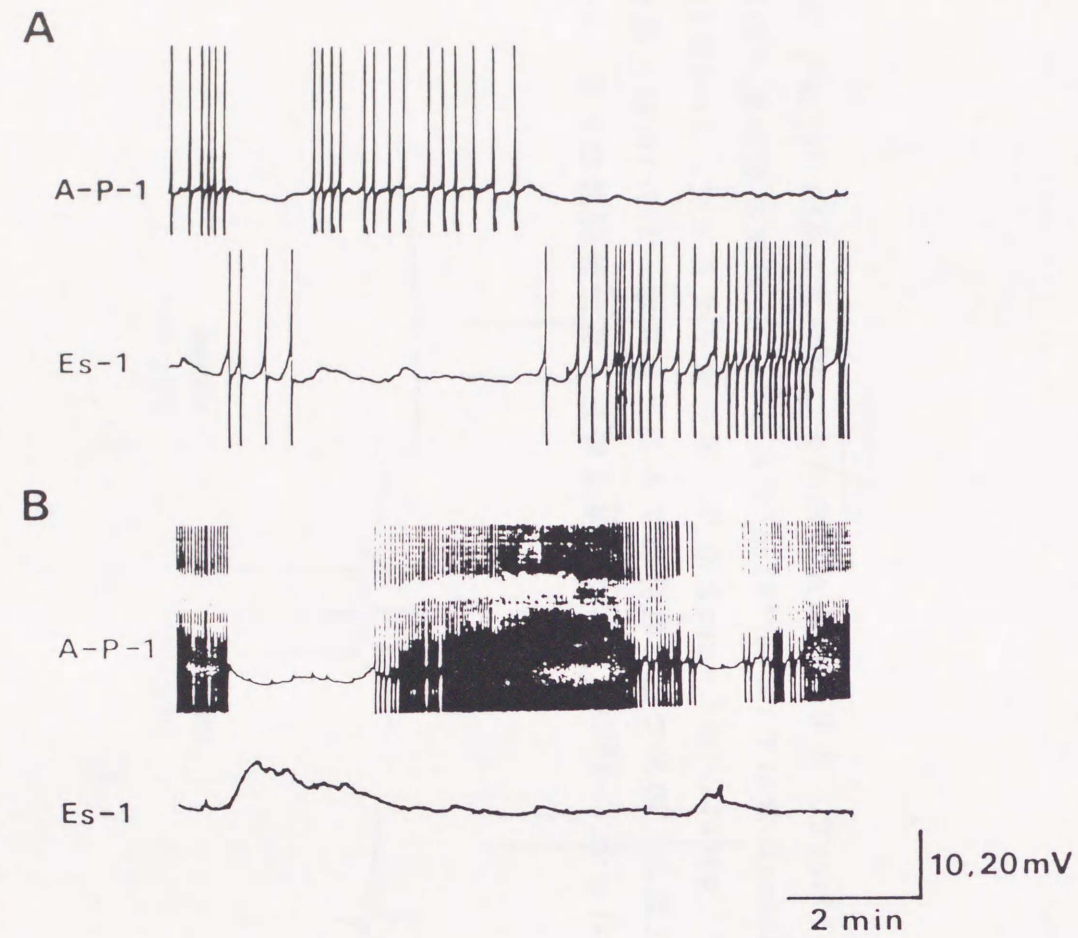


図11 同時に記録された暗下でのEs-1とA-P-1の膜電位変動

A、Bいずれにおいても上がA-P-1から下がEs-1から記録した膜電位。AとBは異なる標本から得られた。AではA-P-1とEs-1が、交互に自発放電している。BではA-P-1が高頻度に自発興奮を繰り返しており、A-P-1の興奮の休止時に対応してEs-1が脱分極している。A-P-1の静止電位は-43mV (A)と-40mV (B)、Es-1のそれは-40mV (A)と-50mV (B)であった。電圧較正：A、BともA-P-1の記録に対して20mV、Es-1の記録に対して10mV。

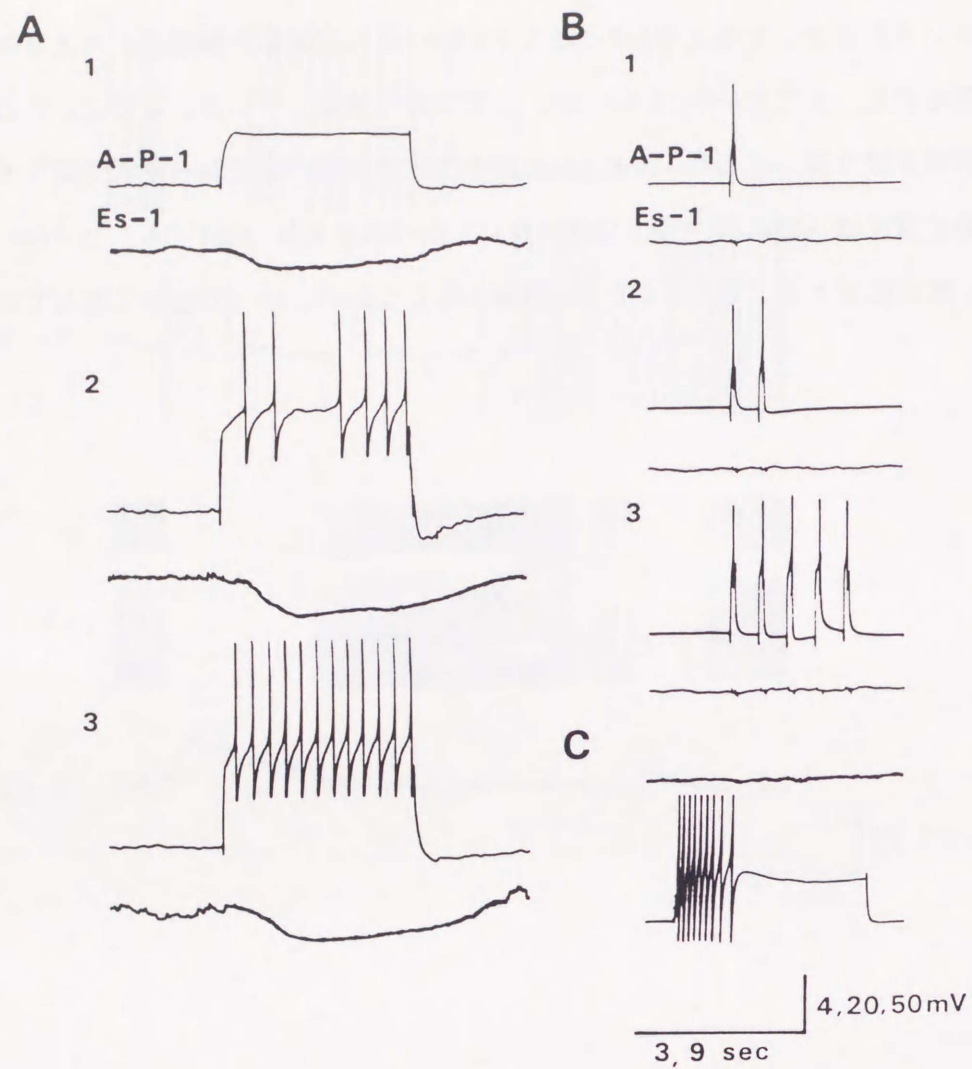
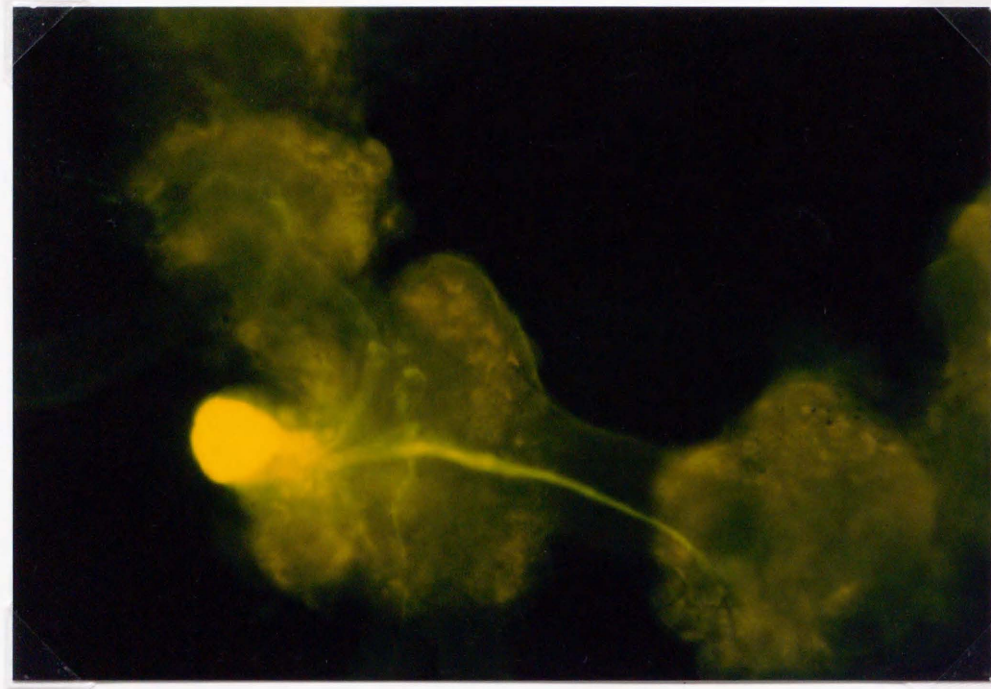


図12 Es-1を過分極させるA-P-1からの漸増性シナプス伝達

同一標本から得られたA-P-1とEs-1の膜電位の記録を示す。A：A-P-1に対する10秒の脱分極パルスによって生じたEs-1における時間経過の遅い抑制性シナプス電位。パルスの強さは3nA (A1)、6nA (A2) 及び7nA (A3) であった。B：100msec、10nAの短いパルスによって生じたA-P-1の活動電位に対するEs-1の反応。A-P-1における頻回の活動電位もEs-1に対して無効である (B2、B3)。C：Es-1に対する10sec、5nAの脱分極パルスはA-P-1に何らのシナプス電位も生じなかった。AとBにおいて、A-P-1の最初の静止電位は-50mVであったが、A-P-1の神経終末から定常的に遊離されると考えられる伝達物質を抑えるために、前もって膜電位は-80mVに保持された。Es-1の静止電位は全て-46mVに保持された。時間較正：A、Cに対して9sec、Bに対して3sec。電圧較正：A-P-1の記録に対して20mV (A)、50mV (B)、4mV (C)。Es-1の記録に対して4mV (A、B)、20mV (C)。

A



B

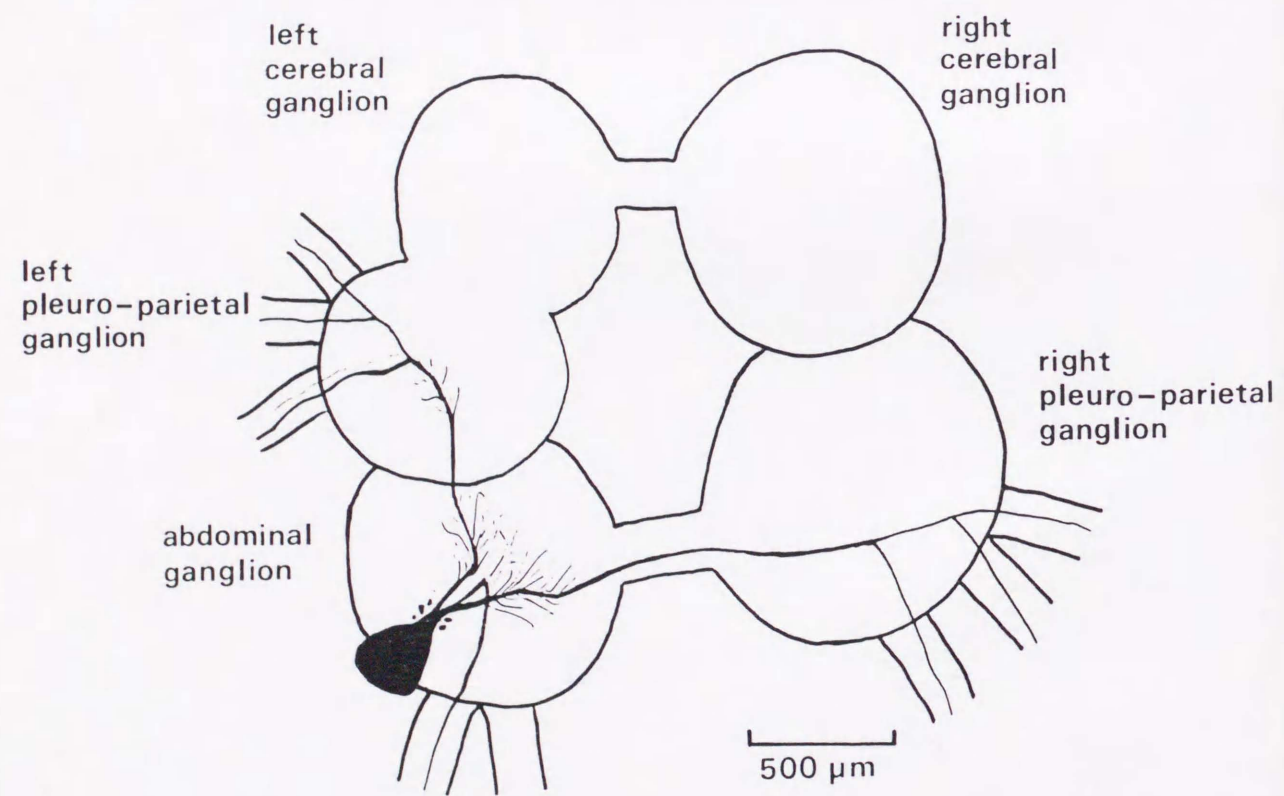
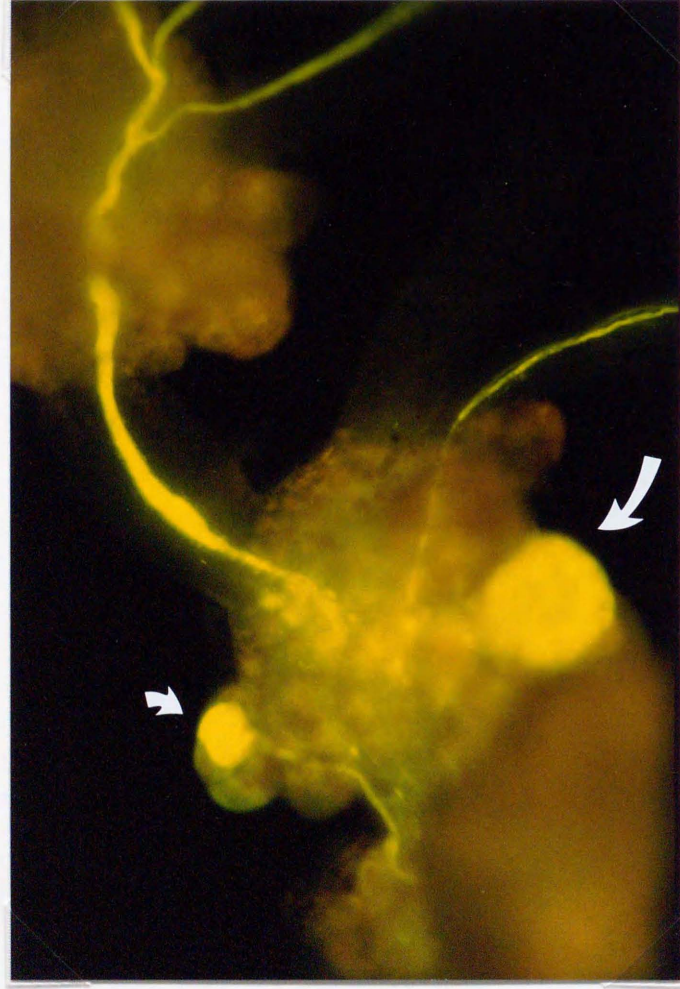


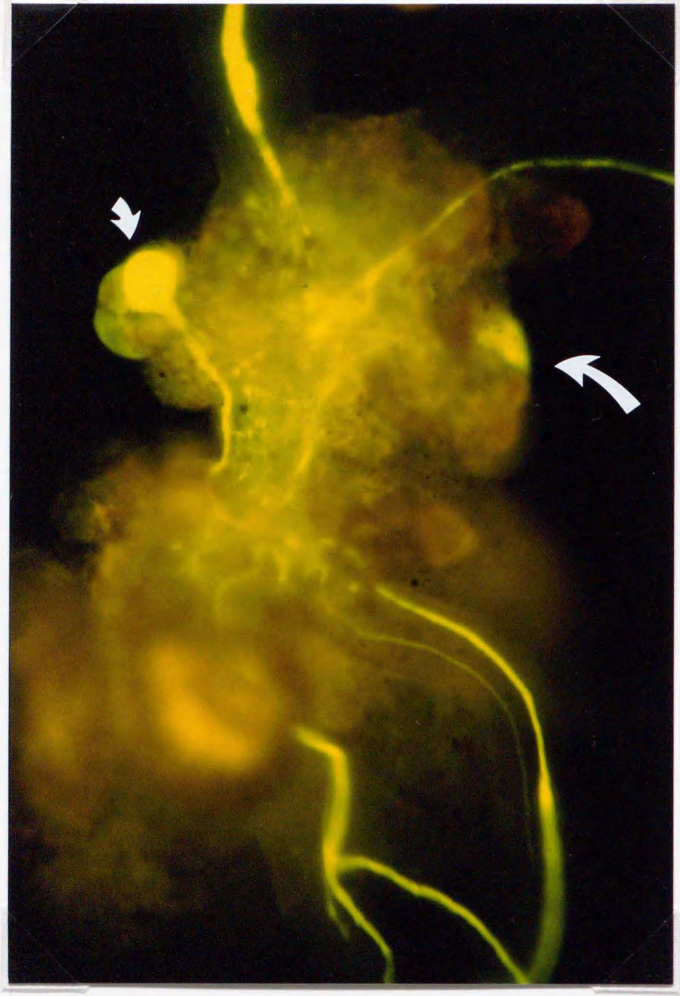
図13 Es-1の形態

A : Es-1にLucifer Yellow染色をおこなった標本を固定、脱水、透明化し、蛍光顕微鏡下、写真撮影を行った。B : 写真を基にして描かれたEs-1の神経節における形態。主な太い軸索の走行と、それらの相互的な配置は、個体が違っててもほぼ一定であった。すなわちEs-1の軸索は腹部神経節内で三つに分かれ、そのうちの太い2本は左と右の体側神経節に延びる。それらはさらに左右の体側神経節内でそれぞれ、前体側神経、中体側神経、後体側神経の3本に分岐し神経節から末梢へ出ていく。残りのやや細い直径の軸索は2本の腹部神経のうち、主に腹足へ入る方の1本へ入っている。細かい毛根状の分枝が多数生じているが、このような形態は標本によってかなり異なっていた。

Aa



b



B

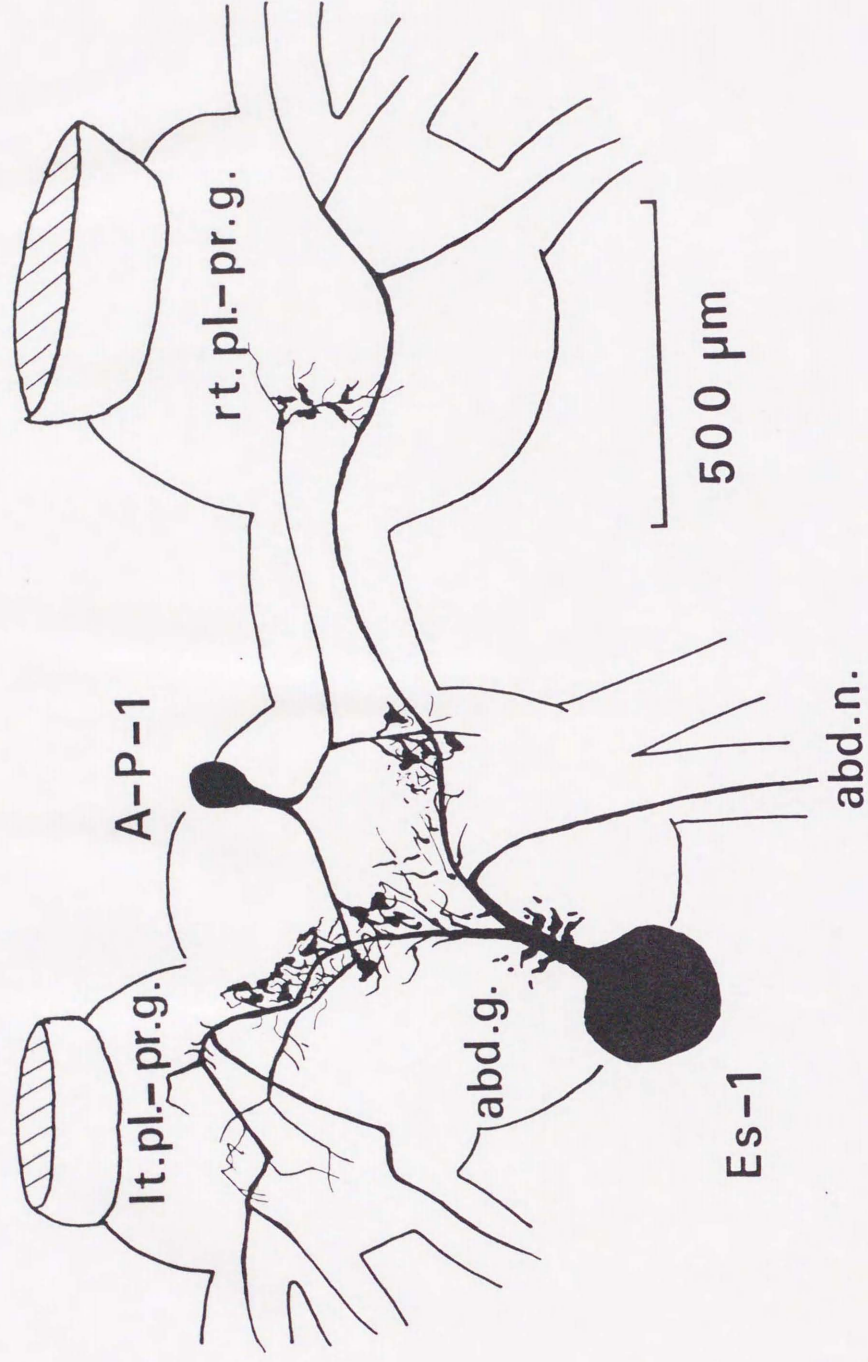


図14 Lucifer Yellowで同時に染色されたA-P-1とEs-1の形態

A : Es-1とA-P-1を同時にLucifer Yellowで染色した蛍光顕微鏡写真。aとbは異なる個体から得られた。a, bいずれにおいても、大きな矢印はEs-1の、小さな矢印はA-P-1の細胞体を示す。

B : 焦点深度の異なるいくつかの写真を基にして、スケールに従ってA-P-1とEs-1の形態を描いた。A-P-1の軸索にはvaricosityと思われる膨らみが所々で見られた。abd.g., 腹部神経節; abd.n., 腹部神経; lt.pl.-pr.g., 左体側神経節; rt.pl.-pr.g., 右体側神経節。

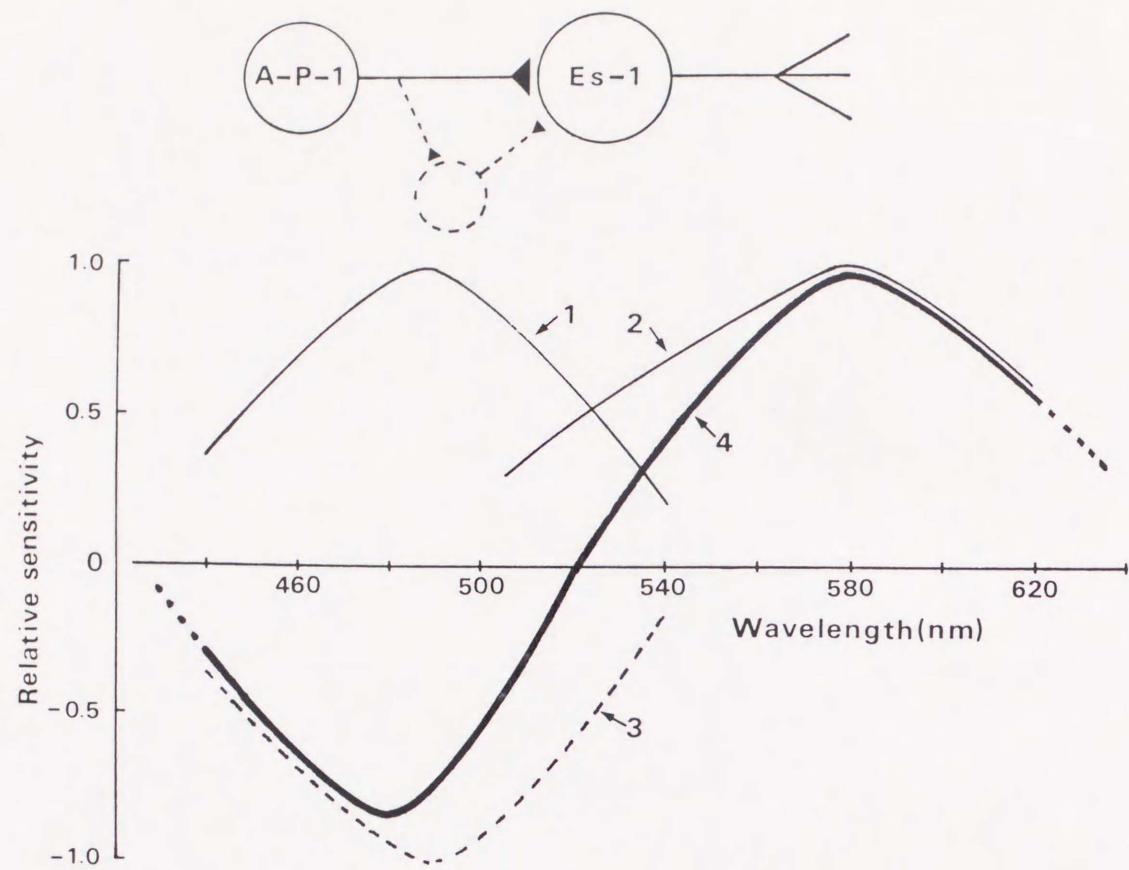


図15 A-P-1によって修飾されたEs-1の光応答のスペクトル感度曲線を示す模式図

1と2はそれぞれ図8から得られたA-P-1とEs-1の固有スペクトル感度曲線を示す。3は1の極性を変えたものであり、A-P-1のEs-1に対する抑制性のシナプス出力（スペクトル範囲）を表す。4は2と3を加算したもので、A-P-1からシナプス入力を受けたEs-1のスペクトル感度曲線を示す。

1



3



2



4



図16 生息地におけるイソアワモチの写真

1、2: 多数出現したイソアワモチ。撮影日は1990年5月24日。

3、4: 直射日光を避けたイソアワモチ。直射日光を受けた岩の表面は白っぽく写し出されている。イソアワモチは矢印で示す岩陰に潜んでいる。撮影日は1990年6月6日。



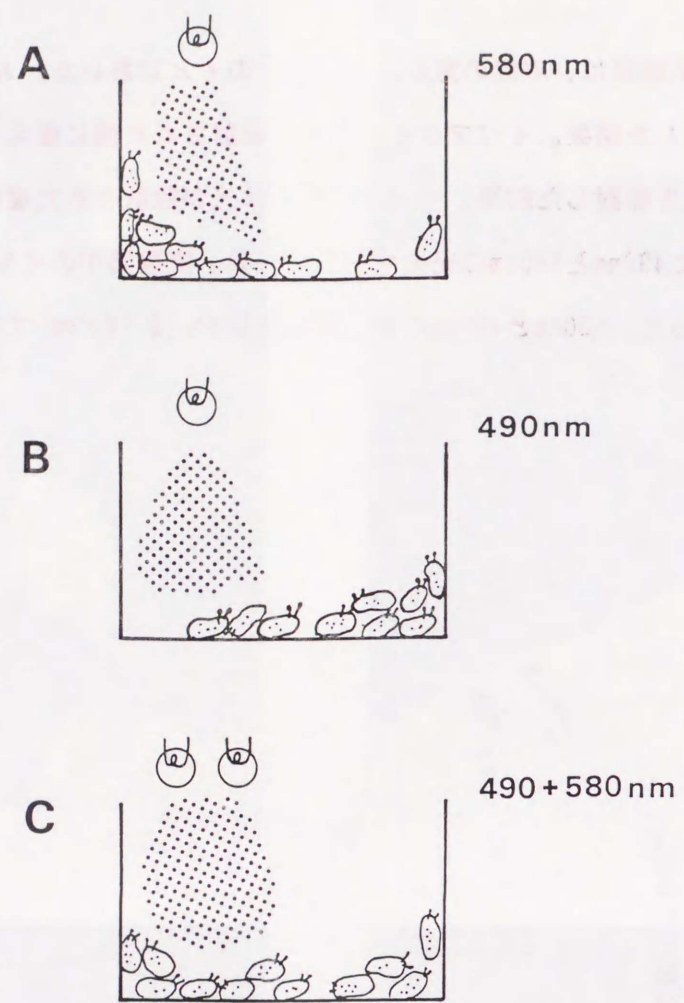


図17 実験室内におけるイソアワモチの行動

刺激光照射前の実験箱は、昼間の室内の薄明かりのもとにおいた。A. 実験箱の左半分に580nmの光を照射した結果。イソアワモチは光が照射された側に集まった。B. 実験箱の左半分に490nmの光を照射した結果。イソアワモチは光が照射された場所から遠ざかった。C. 実験箱の左半分に490nmと580nmの光を照射した結果。実験箱中のイソアワモチの分布に片寄りは生じなかった。580nmと490nmの光強度は共に $4 \times 10^{-4} \text{W/cm}^2$ であった。

