

## E316

## アメフラシ中枢神経の膜電位イメージングにおける プロテアーゼ処理の効果に関する考察

(芝浦工大) ○(正)吉見 靖男\*・(学)青木 一途・(学)島村 秀・(学)松本 直子

### 1. 緒言

神経細胞を素子とし並列処理機構の理解は、脳・神経系疾患の治療や、人工感覚器の開発において不可欠である。神経の並列処理の基礎研究に最適とされている実験動物に海洋腹足動物のアメフラシがある。このアメフラシの神経細胞が他の動物に比べて大きいこと、機能の同定が容易である。一方、神経の並列処理解析を目的として、複数の神経のシグナルを同時に検出する膜電位イメージング法が開発されたが、アメフラシに関して成功例が少ない。筆者らは前回<sup>1,2)</sup>、アメフラシ神経節をプロテアーゼで前処理することによって、蛍光膜電位イメージングにおける活動電位の感度を上げられることを報告した。しかしプロテアーゼの作用機構については、十分解明されなかった。

Wu<sup>3)</sup>らは、神経細胞の細胞外マトリックスが、膜電位感受性色素で染まることにより、活動電位による蛍光強度の変化が低下する可能性を示唆している<sup>3)</sup>。膜電位イメージングによるアメフラシ神経の活動電位検出を困難にしている主要原因が、この現象に帰結する可能性を考えた。そうであれば、プロテアーゼ処理によって、細胞外マトリックスが除去されて、活動電位に対する感度をあげたという仮説が成り立つ。この仮説を検証するために、アメフラシ神経のプロテアーゼ処理時間と、蛍光強度の関係を調べた。

### 2. 方法

膜電位感受性色素をDi-4-ANEPPSをエタノール、可溶性Cremophor ELとともにSL-15培養液に溶かし、ストック溶液を調製した。このストック溶液を、染色直前にアメフラシ体液で希釈して、染色に用いた。

塩化マグネシウムで麻酔したアメフラシの頭部を切開し、口球神経節を摘出した。口球神経節をシリコーン樹脂板にピンで固定し、眼科用ハサミで保護膜を切除し、神経細胞を露出した。この神経節を染色液に180 min浸し、人工海水で洗浄した。さらに神経節を、プロテアーゼ(タイプ IX, *Bacillus polymyxa* 製)を含むSL-15培養液に34 °Cで5-180 min浸し、蛍光強度と浸漬時間の関係を調べた。

### 3. 結果および考察

もし、細胞外マトリックスが膜電位感受性色素によって染まるのであれば、本実験結果では、プロテアーゼ処理によって蛍光強度は下がるはずである。しかし結果をFig.に示したように、プロテアーゼの処理による顕著な蛍光強度の低下は見られなかった。

したがって、プロテアーゼによって活動電位に対する感度が上がった原因を、染色された細胞外マトリックスの除去に帰することはできないことがわかった。

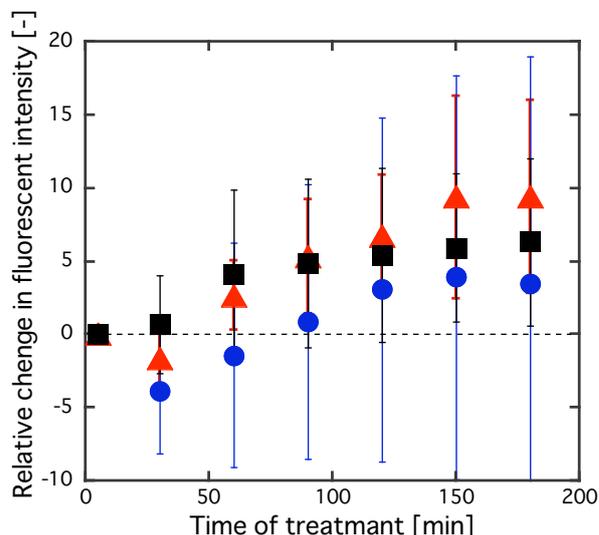


Fig. Relation between fluorescence intensity of the stained buccal ganglion and time of protease treatment. Protease concentration: 0 unit/mL (triangle), 6 unit/mL (circle), 12 unit/mL (square).

### 参考文献

- 1) 吉見ら：化学工学会第40回秋季大会(仙台)，R216, 2008
- 2) 吉見ら：化学工学会第74回年会(横浜)，S214, 2008
- 3) Wu, J.-Y., Cohen, L.B., In: *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity* (Ed. Mason, W.T.), Academic Press, San Diego, pp. 389-404, 1993

\*TEL&FAX: 03-5859-8158

E-mail: yosimi@sic.shibaura-it.ac.jp