

学位論文

Control of ciliary beating by neurotransmitters
in sea urchin larvae.

(ウニ幼生繊毛打の神経伝達物質による調節)

お茶の水女子大学大学院人間文化研究科人間環境学専攻
和田 祐子

Contents

☆ Summary (in Japanese)	1
☆ Summary	3
☆ Introduction	6
☆ Part 1: Control of ciliary beating by neurotransmitters in epithelial cilia		
★ Summary	11
★ Introduction	12
★ Materials and methods	15
★ Results	18
★ Discussion	24
★ Figures	31
☆ Part 2: Control of ciliary beating by neurotransmitters in isolated ciliated cells		
★ Summary	38
★ Introduction	40
★ Materials and methods	41
★ Results	44
★ Discussion	48
★ Figures	51
☆ Part 3: Phase plot analysis	59
☆ Conclusion	62
☆ References	64
☆ Acknowledgment	69

論文要旨

プルテウス期のウニ幼生において、神経伝達物質のもつ繊毛運動の調節作用を、単一繊毛（レベル）の運動記録をもとに、繊毛打の方向、運動周期のゆらぎの二つの側面から解析した。

ドーパミンをアカウニの幼生に作用させると、繊毛はその特徴である平面的な波形の屈曲パターンを維持したままで、繊毛打方向を180度回転させ、完全に逆方向に打つようになることを発見した。この新しい繊毛反応を「反転反応」、また結果として逆方向に打つようになったものを「反転打」と名付けた。ウニの幼生では、電気刺激などに応じて瞬時に繊毛打の方向が逆転する「逆転反応」という繊毛反応がこれまでに知られているが、この反転反応は繊毛打方向が徐々に回転する過程を含んでいるという点と、その過程で波形の屈曲パターンを維持するという点でこれとは明確に区別できる。この反転反応がアカウニ幼生のドーパミンによる後方遊泳の誘導の原因であるとしたら、ウニ幼生がドーパミンによるまったく新しい運動制御機構を有しているという可能性が示唆される。

反転反応中の繊毛においても正常打中と同様に電気刺激によって逆転反応を引き起こすことができた。従って、反転反応と逆転反応とは全く独立した機構によって起こる、両立しうる反応であると考えられる。繊毛打の面の回転を引き起こす機構に関しては現在のところ二つの仮説（基底小体の回転により繊毛軸系そのものが回転するという仮説と、軸系全体は回転せずに、例えば中心対微小管のような繊毛打の平面性を支配すると考えられている構造が回転することなどにより、軸系内でダブルット微小管同士の滑り活性のスイッチング・ポイントが回転するという仮説）を提唱している。

神経伝達物質、特にドーパミンとセロトニンはアカウニとバフンウニにおいて、繊毛打周期を調節する機能も合わせもつことを繊毛打周波数の測定によって示した。個々の繊毛はそれぞれ独自に変動する繊毛打周波数で運動しているが、それらの間での平均は比較的安定している。ドーパミンは繊毛打のこの空間的平均周波数を下げ、セロトニンは上昇させた。このとき、同時にドーパミンは繊毛打周波数の変動を増加し、セロトニンは減少させた。さらに、単一繊毛の周期の連続測定を行うことによってドーパミンが各繊毛打毎の運動周期の時間的不安定性を増し（運動のゆらぎの拡大）、セロトニンは逆に周期を安定化する（ゆらぎの縮小）ことを見いだした。これは、一打毎の繊毛周期の時間的不安定性が神経伝達物質による修飾を受ける可能性を初めて示したものである。繊毛軸系内の微小管の滑り運動を直接反映している角速度と、繊毛打周期との間には相関が低いので、繊毛打周期の安定性が軸系内微小管の滑り活性の調節機構とは独立した機構によって制御されている可能性は高い。

ウニ幼生の繊毛上皮細胞は、個々の細胞が単一の繊毛をもつことから、単離した細胞を用いることによって、より詳しい運動の解析が可能である。単離細胞の顕微操作（マイクロマニピュレーション）により、神経伝達物質の作用をより定量的に調べる実験を行った。その結果、単離繊毛細胞においても、ドーパミンを作用させたときに「反転反応」を観察することが出来た。これは細胞レベルにおいても繊毛がドーパミンに反応し、繊毛打の面を回転させる機構と能力とをもつことを示している。加えて、外液に Ca^{2+} が存在していない条件でも反転反応が観察されたことから、反転反応には膜のチャンネルを介した Ca^{2+} の流入は必要のないことがわかった。また、単離操作によって有効打がなくなり両方向に回復打のみを持つ波形変化も引き起こされることがわかった。これらの事実は、繊毛打に特有な非対称的波形形成の機構が内部構造によって強固に固定されているわけではなく、神経伝達物質などに応答して、屈曲形成が可逆的に起こり得る可能性を示すものである。

繊毛打周期の安定性は繊毛細胞の単離によって目立って増減するというのではなく、神経伝達物質によって上皮繊毛の場合と同様の修飾を受けた。ドーパミン存在下では繊毛が主に有効打の終わりの位置において一時停止することで周期がのびることが観察された。このことは先に述べた角速度変化と周期の安定性が異なる系で制御される可能性と強く一致している。さらに、繊毛打周期は個々の細胞レベルで、滑り速度の調節と、有効打と回復打の切り換え位置の変化や一時停止の挿入という二つのメカニズムによって制御されており、後者のみが神経伝達物質の支配を受けていることを示している。

以上のことから、ウニ幼生の繊毛は繊毛打波形の空間的形成パターンの決定と運動周期の安定性との制御に関して、神経伝達物質に応答し、その運動機構を変化させるシステムをもつことが明らかになった。

Summary

Regulation of ciliary beating by neurotransmitters in sea urchin pluteus larvae was studied at a cell level. The ciliary beat direction and fluctuation of the beat period were analyzed from recordings of the movement of a single cilium.

When dopamine was applied to larvae of *Pseudocentrotus depressus*, cilia began and continued to rotate the beat plane to the opposite direction without changes in bending configuration. This new type of ciliary response was termed the "beat-plane turning response (BPTR)", and the resultant beating "turned beat". In sea urchin larvae, it is known that cilia show "reversal response", in which they immediately reverse the beat direction in response to electrical stimulation. BPTR is completely different from the reversal response in that it accompanies gradual changes in beat plane while the wave pattern was maintained during response. Reversal response, similar in appearance to that before BPTR, could be induced by electrical stimulation even during BPTR. This suggests that mechanisms for BPTR and ciliary reversal work independently. If BPTR is used to cause larvae to swim backward under nervous control, it may serve as a novel type of regulatory mechanism of the behaviour.

The rotation of beat plane with little changes in bending wave pattern suggest the rotation of the whole motile apparatus without changes in the internal motile activities (model R) or alternatively modulation of the internal activities without rotation of the whole apparatus (model A).

It was also demonstrated that serotonin and dopamine have effects on

ciliary beat periods in *P. depressus* and *Hemicentrotus pulcherrimus*. Although the beat frequency of individual cilia fluctuated, the mean responded consistently to these neurotransmitters. The mean frequency was reduced by dopamine and increased by serotonin, while the standard deviation was increased and decreased by these neurotransmitters, respectively. Short term fluctuation in sequential beat period of a single cilium was also measured. It was increased by dopamine and decreased by serotonin. This suggests that beat period fluctuation beat by beat can be controlled by neurotransmitters. There was low correlation between angular velocity and ciliary beat period. This suggests that fluctuation of beat period may be regulated by other mechanisms from that of sliding activity.

Epithelial cells of sea urchin larvae have only one cilium per one cell. These cells isolated from larvae were used for detail analysis of ciliary movement. Isolated cells were held by micropipette to assess the effect of neurotransmitters quantitatively. The BPTR was observed in an isolated cilium in response to dopamine. This shows that the cells can respond to dopamine and turn their ciliary beat plane. The BPTR occurred in the absence of Ca^{2+} in the external solution. This fact shows that the BPTR does not need Ca^{2+} influx from the cell exterior *via* membrane channels. A new type of ciliary beating in which cilia beat in either direction with forms of the recovery stroke was observed. This beating was restricted only to isolated cilia, and has never been seen in epithelial cilia. This fact indicates that the recovery stroke can be separated from and replace the effective stroke.

Instability of beat period did not significantly change after isolation of cells. It undergoes the same control by neurotransmitters as before isolation. In the presence of dopamine, beat period may be elongated by insertion of pauses mainly at the end of the effective stroke. This is consistent with that angular velocity and stability of beat period are controlled by independent systems, i.e., one for control of angular velocity and the other for changes in the location of switching from the effective stroke to the recovery or inserting pauses between them. Only the latter may be regulated by neurotransmitters.

Cilia of sea urchin larvae have systems that react to neurotransmitters and change their movement, by controlling bending configuration and stability of the beat period.