

第237回生理学東京談話会

日 時：平成13年10月20日（土）午後1時～5時
 場 所：東京女子医科大学 臨床第二講堂
 当番幹事：東京女子医科大学 宮崎俊一，川上順子

第237回生理学東京談話会は2001年10月20日（土），東京女子医科大学臨床第二講堂で開催されました。今回はセッション1としてシンポジウム「シナプス伝達と可塑性」を企画し，持田澄子先生（東京医大）にSNARE蛋白質複合体とCa²⁺チャンネルの相互作用について，宮田麻理子先生（東京女子医大）に代謝型グルタミン酸受容体1型ノックアウトマウスを用いた小脳シナプス伝達長期抑圧のメカニズムの解析について，最新の研究成果を話していただきました。セッション2は一般口演で，いろいろなテーマの興味深い研究7題が発表されました。いずれも時間が足りないくらいに活発な討論がなされ，談話会は成功裏に終了しました。

今回より連絡はすべてE-mailで行うシステムができました。次回は順天堂大学の当番で開催される予定です。

セッション1：シンポジウム「シナプス伝達と可塑性」

1. 神経終末蛋白質に制御される伝達物質の放出

一特にSNARE蛋白質複合体とCa²⁺チャンネルチャンネルの相互作用一

持田 澄子（東京医大・第一生理）

神経終末への活動電位の到達に伴って膜電位依存性Ca²⁺チャンネルからCa²⁺が流入するとシナプス小胞膜と神経終末膜の融合が起り，小胞内に蓄えられた化学伝達物質が速やかにシナプス間隙に放出される。ナプス膜融合にSNARE蛋白質は必須な蛋白質と考えられている。Ca²⁺シグナルを素早く小胞に伝えるためのメカニズムとして，Ca²⁺チャンネルがSNARE複合体を介して小胞に結合し，活動電位によって同期された小胞開口放出を引き起こす。また，この結合が活動電位による神経終末膜の脱分極に依存した小胞プールの増大に一役を果たしている可能性がある。培養ラット交感神経節細胞間シナプスでの伝達物質放出はN型Ca²⁺チャンネルを介するが，P/Q型チャンネルを発現させたシナプスでは，w-AgaIVAによってシナプス伝達は阻害される。SNARE複合体との結合部位を欠くP/Q型チャンネルの発現によってw-AgaIVAによるシナプス伝達の阻害は弱まり，N型とのP/Q型キメラチャンネルの発現ではシナプス伝達が増強される。外因性P/Q型Ca²⁺チャンネルにおいてもSNARE複合体との相互作用が，シナプス伝達に重要な働きを担うことが示唆される。

2. ミュータントマウスを用いた小脳シナプス可塑性へのアプローチ

宮田麻理子（東京女子医大・医・第一生理）

神経科学研究においては，脳の学習記憶の仕組の要として，シナプス可塑性が重要視され，その生起の分子機構の解明が強力に進められてきた。特に，近年の遺伝子ノックアウトマウスの技法は，行動レベルとシナプス可塑性を直接対応づけ，関与する分子を同定することを可能にした。小脳Purkinje細胞には，平行線維シナプスに選択的に伝達効率の長期抑圧（LTD）が起こることが知られ，この可塑的現象は運動学習の基礎過程であることが示唆されている。我々は，LTD発現の細胞内分子機構を明らかにする目的で，代謝型グルタミン酸受容体1型（mGluR1）により駆動される分子に着目し，それらが欠損する種々の変異マウスを用いて電気生理学的解析と行動解析を行ってきた。本シンポジウムでは，そのうちGaq, PLCb4, dilute lethal miceの結果を紹介するとともに，これら変異動物を使う利点と問題点について報告したい。

セッション2一般口演

1. 嚥下・呼吸のパターン形成と協調に関わるラット孤束核のニューロン活動

斎藤 義朗^{1,2}，江連 和久¹，田中いく子¹（¹東京都神経研・病態生理，²東京女子医大・小児科）

除脳・筋弛緩下にラット（n = 13）の上喉頭神経を単発あるいは連続電気刺激し嚥下を誘発，刺激に順向性に短潜

時で応じる細胞外ニューロン活動を孤束核および周辺より記録した。下記のニューロン群が嚙下に関連した活動を示した。1) 非呼吸性嚙下ニューロン (n = 32) : 単発刺激直後から嚙下開始まで持続して発火する型 (n = 4), 嚙下開始とほぼ同期して発火する型 (n = 20), 嚙下開始から400ms以上遅れて発火する型 (n = 8)。2) 吸気 (I) ニューロン (n = 57) : 嚙下に同期して発火するIニューロン (type 1, n = 20), 嚙下前に群発し嚙下開始時に発火が止まるIニューロン (type 2, n = 34), 嚙下中の発火消失のみ見られるIニューロン (n = 4)。Type 2ニューロンが主に孤束核腹外部に分布するのに比べ, type 1は主に孤束核の内側・腹側に分布し, これは呼吸リズムのない嚙下ニューロンの分布部位と共通していた。以上より, 咽頭から食道に到る嚙下関連筋収縮のパターン形成や, 吸気中の嚙下抑制・嚙下後の呼吸相からの呼吸再開という嚙下・呼吸の相互調節が孤束核周辺の神経結合で生じており, 呼吸ニューロンも嚙下時に「嚙下中枢」の一部として積極的に活動していると考えられる。

2. 脳損傷における corticotropin-releasing hormone (CRF) の役割

今城 俊浩, 勝又 晴美, 小西俊一郎, 笠木 陽子, 南史朗 (日本医大老人病研)

CRFは視床下部-下垂体-副腎系の賦活化に必須の視床下部ホルモンであるが, 虚血後の神経損傷を修飾することも報告されている。今回, CRFの脳損傷における役割を明らかにする目的で, 以下の実験を行った。1) Wistar系雄ラットの大脳皮質に27Gのstainless cannulaで深さ2-3mmの脳損傷を加え, 経時的に脳を灌流固定し免疫染色を行った。手術翌日より, cannula周囲にはCRF1型受容体 (CRFR-1) 陽性細胞が多数認められた。蛍光2重免疫染色により, CRFR-1陽性細胞の大部分はグリア性線維性酸性蛋白 (GFAP) を発現していた。受傷後1~3日ではグリア細胞の細胞体と突起がCRFR-1抗体で一様に染色され, 7~28日後には細胞体のみが顆粒状に染まった。2) CRF受容体拮抗薬を損傷部の部位に浸透圧ミニポンプで微量投与したところ, 損傷部に集積するGFAP陽性細胞数が有意に減少した。一方CRFを脳内に持続投与すると, 側脳室から投与部位に向かってCRFR-1陽性細胞が遊走する像が認められた。3) ラット胎児脳組織より単層培養したグリア細胞に機械的損傷を加えると, 損傷部周囲のGFAP陽性細胞にCRFR-1の発現が誘導された。以上の結果から, CRFR-1は*in vivo*, *in vitro*いずれの系でも脳組織の損傷時に反応性アストロサイトに発現すること, CRFは脳損傷部位でのグリア細胞の増殖や集積 (遊走)

に促進的に働くことが示唆された。

3. ショウジョウバエを用いたボケの分子メカニズムの解析

田村 拓也^{1,2}, 齊藤 実¹ (¹東京都神経研・分子神経生理, ²群馬大・医・行動研)

ショウジョウバエは寿命が約60日と短く, 適切な系で多彩な学習記憶行動の解析も可能であるため, 加齢に伴う学習記憶障害 (ボケ) の分子メカニズムを解析するに適したモデル動物となり得る。ショウジョウバエでは, 獲得した記憶情報は短期記憶成分 (STM) から中期記憶成分 (MTM) へとプロセスされ, 麻酔耐性記憶成分 (ARM) に統合されることが分かっている。我々は匂い条件付け学習行動の解析から, 羽化後10日で学習獲得能 (LRN) が, 15日でMTMの形成能が低下することを見出した。しかし, 他の記憶成分の形成は15日以降も正常であった。また, 脳でいくつかの学習記憶関連遺伝子の発現が, 加齢に伴い上昇していた。これらの遺伝子がボケに関与しているなら, その変異体ではボケの程度が野生型と異なると考えられる。そこで加齢によってLRNとMTMが障害される分子メカニズムを調べるために, 各種学習記憶変異体でLRNの指標となる0時間記憶と, 中期記憶の指標となる1時間記憶の低下を野生型と比較した。その結果, DC0 (PKA catalytic subunit) 変異体では20日齢での1時間記憶の低下が抑制されており, PKAがボケの発現に関わっている可能性が示唆された。

4. 血管側 Ba²⁺ 投与によるモルモット大腸粘膜の振動性 Cl⁻ 分泌

錦谷まりこ¹, 小久保麻子², 竹村 尚志¹, 西元寺克禮², 河原 克雅¹ (¹北里大・医・生理学, ²第一内科学)

大腸粘膜の電解質・溶液輸送は, 自律神経系 (交感神経・副交感神経) と腸管神経叢 (おもに粘膜下神経叢) の活動により制御されている。単離したモルモット大腸粘膜をUssingチャンバーに固定し, 上皮短絡電流を測定した。大腸粘膜の血管側に低濃度 (0.2~1mm) のBa²⁺を投与すると, 振動性の正電流 (2~3strokes/min) が記録された。この振動電流の振幅は, 2mm Ba²⁺で低下し, 5mm Ba²⁺で消失した。一方, 1μMアトロピンや1μMテトロドトキシン (TTX) は, Ba²⁺誘発-振動電流を阻害した。また, チャンバー内液を低Cl⁻液 (11mm) に置換したり, 管腔側にNPPB (Cl⁻チャネル阻害薬) を投与すると, Ba²⁺誘発-振動電流は著しく低下した。さらに, チャンバー内液を0Ca²⁺液に置換するとBa²⁺誘発-振動電流は抑制された。しかし高K⁺液置換 (40mm) においても, Ba²⁺

誘発電流の振動性は失われなかった。これらの結果は、モルモット大腸粘膜下神経叢にBa²⁺感受性のコリナージュクニューロンがあり、刺激に応じて周期的Cl⁻分泌を誘発することを示した。

5. ヒト気道上皮細胞の低Cl⁻溶液感受性ATP放出

竹村 尚志¹, 玉置 淳², 永井 厚志², 河原 克雅¹
(¹北里大・医・生理学, ²東京女子医大呼吸器センター)

気管支喘息患者の気道内液のCl⁻濃度は、正常人に比べ低値を示す (Joris et al., 1993)。気道内液に含まれるATPの放出路とCl⁻濃度との関係を調べた。ヒト気道上皮(16HBE)細胞を35mmディッシュで継代培養した。表層液1200μl中から経時的に液(50μl)を採取し、細胞外に放出されるATP量を luciferin-luciferase 法による発光量から算出した。コントロール液から低Cl⁻液(74.5mm)に置換すると、細胞外ATP濃度は経時的に増加し、10~15分後に最大値を示した(3.3 ± 1.7 (time 0) → 13.9 ± 1.2 nM (time 10), n = 4, P < 0.001)。低Cl⁻刺激によるATP放出は、forskolin (10 μM) 10分前処置にて約2倍に増加した(n = 8)。16HBE細胞内液のCa²⁺を50 μM BAPTA-AMでキレートしても、低Cl⁻刺激によるATP放出は影響されなかった。まとめ、気道上皮細胞は、低Cl⁻刺激により細胞内ATPの放出を増加させ、その放出経路はcAMPにて活性化した。低Cl⁻溶液は、気道内にATPを放出させ、気道内への溶液分泌を維持している可能性を示唆した。

6. 細胞内ストアからのカルシウム放出による腸管壁内神経活動の制御

田村 謙二, 小林 裕, 高橋 聡子 (神奈川歯科大・口腔生理)

腸管壁内神経叢に存在するAH細胞は複数の軸索を持つ多極細胞で、腸管壁の主要な感覚神経細胞と考えられている。その活動電位はNa⁺成分に加えCa²⁺成分を持ち、長時間持続性の後過分極(AH)を伴う。AHはCa²⁺依存性K⁺コンダクタンスによるが、Ca²⁺のソースの詳細は不明である。我々は細胞内ストアから放出されたCa²⁺が電気的特性に与える作用を検討した。雄モルモット(250~450g)から摘出した下行結腸を切開し、粘膜層と内輪筋層を剥離して、外縦走筋層上にアウエルバッハ神経叢が付着した標

本を温クレブス液で灌流したチャンバー底に固定した。AH神経細胞に電極を刺入後、細胞外刺激による逆行性の活動電位とそれに続くAHを一定間隔(30~60秒)で発生させた。灌流液にカフェイン(0.1~10mm)を投与すると、膜抵抗の減少を伴う一過性の過分極とそれに続く膜抵抗の増大を伴う長持続性の脱分極が観察された。リアノジンRy(0.01~1.0 μM)投与時には持続性の過分極がみられ、AHは著明に抑制された。また自発性に発生する膜電位の周期的変動もRyにより抑制された。さらにRy存在下では上記カフェインの効果も減弱した。即ち細胞内ストアからのCa²⁺が電気的特性に対して大きな役割を果たしていることが判明した。即ち、活動電位によって流入したCa²⁺がストアからのCa²⁺放出を促進し、その結果としてAHが形成されると考えられた。また静止時にはストアから放出されたCa²⁺が膜のCa²⁺依存性K⁺チャネルを持続的に活性化し、静止膜電位の形成に寄与していると考えられた。

7. GFPを利用した定量的pHプローブによる細胞内マイクロドメインのpH測定

淡路 健雄, 白川 英樹 (東京女子医科大・医・第二生理)

細胞機能発現において細胞内pHは厳密に制御されており、その測定は重要である。従来の合成pHプローブは空間分解能や記録時間などに多くの制限がある。近年 green fluorescent protein (GFP) 変異体cDNAを細胞に導入して発現させたpHプローブの利用が試みられているが、蛍光強度変化として記録するため定量化が困難であった。我々は、励起光波長が異なり蛍光波長がほぼ同一であるH⁺濃度低依存性GFPuvとH⁺濃度高依存性EGFPもしくはEYFPを融合させることにより、蛍光強度比で定量可能なプローブを作成した。このプローブは顕微カルシウム測定機器が利用可能であり、pKaがそれぞれ6.1, 6.8と異なるpH測定レンジを持つ。この新規GFP pHプローブにミトコンドリア移行配列を融合した細胞内小器官選択的プローブにより、ミトコンドリア内pH測定が可能であった。またα1アドレナリン受容体融合pHプローブを作成し、リガンド刺激による受容体の細胞内移行(internalization)の可視化と、受容体近傍のpHの経時的同時測定が出来た。