

## 第52回西日本生理学会

日 時：第1部 平成13年10月13日（土）

第2部 平成13年11月3日（土）

場 所：琉球大学医学部臨床講義棟

当番幹事：第1部 琉球大学医学部生理学第一 小杉忠誠

第2部 琉球大学医学部生理学第二 寺嶋眞一

今回は鹿児島大学が当番となり、開催される予定です。

## 第1部

## 1. ハイブリドーマFE-3細胞のIgE FE-3 mRNA発現量のノーザンブロット法による定量

渡慶次賀博, 花城 和彦, 砂川 昌範, 小杉 忠誠 (琉球大学医学部生理学第一講座)

【目的】我々は、IgE産生ハイブリドーマFE-3細胞のIgE産生機構、とりわけmRNA発現の機序を解明するためにIgE FE-3 mRNA発現量の測定法を開発した。即ち、RI標識DNA probeを用いたノーザンブロット法によるIgE FE-3 mRNA発現量の測定法を開発した。【方法】FE-3からAGPC法を用いてtotal RNAを抽出した後、total RNA量が5 $\mu$ gから20 $\mu$ gになるように調製したサンプルを7%ホルムアルデヒドを含む1%アガロースゲルを用いて電気泳動した。10 $\times$  SSCを用いてtotal RNAをナイロン膜にtransferした後、UVクロスリンカーを用いてUV固定を行った。次に、IgE FE-3 CH3, CH4ドメインcDNAを[a-32P] dCTP存在下にPCR法を用いて増幅した。3 kcpm/mlのRI標識DNA probeを用いて、42 $^{\circ}$ C、3時間hybridizationした。最後に、65 $^{\circ}$ Cの洗浄液を用いてナイロン膜を洗浄した後、Imaging plateに3時間感光させBAS-1500を用いてRIシグナルを検出した。【結果】total RNA量が5 $\mu$ gから20 $\mu$ gまでの範囲では、total RNAの濃度依存性に2.2 kbの位置 (IgE FE-3 mRNA) のRIシグナルが増強するのが認められた。【考察】本実験により得られた測定条件を用いて、IgE FE-3 mRNA発現量の測定が可能となった。

## 2. ウサギurokinase-type及びtissue-type plasminogen activatorsの全長cDNAクローニングとその構造解析

杉木 雅彦, 大村さゆり, 吉田 悦男, 穴井 慶太, 丸山 真杉 (宮崎医科大学 第二生理)

ウサギを用いた線溶系の病態実験モデル確立のため、今回我々は5'-及び3'-RACE法によりurokinase-typeとtis-

sue-type plasminogen activator (uPA, tPA) のcDNAをクローニングし、その構造解析を行った。uPAのcDNAは2350塩基で433個のアミノ酸がコードされており、全アミノ酸配列のヒトとの相同性は83%であった。構造としてはN末側からepidermal growth factor-like domain (EGF), kringle domain (K), serine-protease catalytic domain (SPC) をもち、ヒトとの相同性はEGF, 74%; K, 79%; SPC, 88%であった。一方、tPAのcDNAは2561塩基で564個のアミノ酸がコードされており、全アミノ酸配列のヒトとの相同性は76%であった。その構造はN末側からfibronectin type 1 domain (FN1), EGF, 2つのkringle domains (K1, K2), SPCであり、ヒトとの相同性はFN1, 65%; EGF, 89%, K1, 81%; K2, 76%; SPC, 79%であった。両者ともCys残基、酵素活性部位、糖鎖結合部位はよく保存されていた。ウサギ腎虚血再灌流障害モデルにおいて、非虚血腎に比べて虚血腎のuPA, tPA mRNA発現は抑制され、plasminogen activator inhibitor-1のmRNA発現は増強していた。虚血腎の線溶抑制が再灌流後の腎障害に関与している可能性が示された。

## 3. 肥満細胞由来物質の血管内皮細胞IgE透過性亢進

仲宗根敏幸<sup>1,2</sup>, 下地 森夫<sup>2</sup>, 花城 和彦<sup>1</sup>, 中村真理子<sup>1</sup>, 小杉 忠誠<sup>1</sup> (<sup>1</sup>琉球大学医学部生理学第一講座, <sup>2</sup>同歯科口腔外科)

【目的】ラット腹腔内肥満細胞の刺激後に放出される肥満細胞由来物質が、IgEの血管透過性を亢進させるか否かを検討するためにdual chamberを使用して実験を行った。【方法】IgEおよびCalcium ionophore A 23187刺激後の肥満細胞の培養上清をlower chamberに添加後、upper chamberにIgEを静置し、単位時間当たりのlower chamberへのIgEの移行量を調べた。さらに、Diphenhydramine, Cimetidine, Suraminおよびt-AMCHAを用いてIgEのlower chamberへの移行に対する抑制実験を行った。【結果】IgEおよびCalcium ionophore A 23187刺激後

の肥満細胞の培養上清を lower chamber に添加し、内皮細胞に暴露した群では、血管内皮細胞の IgE 透過性を亢進させた。また、IgE 刺激後の肥満細胞の培養上清を暴露した群では、suramin および t-AMCMA による血管内皮細胞の IgE 透過性は、それぞれ 92%、59% 抑制されたが、Calcium ionophore A 23187 刺激後の肥満細胞培養上清を暴露した群では、suramin および Cimetidine による血管内皮細胞の IgE 透過性は、それぞれ 35%、34% 抑制された。「結論」IgE の血管内皮細胞透過性亢進には、肥満細胞由来物質の histamine、VEGF、および線溶系酵素が関与している。

#### 4. ウシ thrombin 活性部位の primary specific pocket に単クローン抗体 mAbCC<sub>2</sub> は結合する

金城紀代彦<sup>1</sup>、中村真理子<sup>1</sup>、根占 哲也<sup>2</sup>、小杉 忠誠<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>琉球大学医学部生理学第一講座、<sup>2</sup>セロテック研究所)

【目的】 Postclotting thrombin (Intact thrombin および Bound thrombin) は Native thrombin の生理的機能の部分的機能を保持しており、その存在様式を考慮すると、前者の活性部位の分子形状は後者の活性部位の分子形状から変化していると予想される。Postclotting thrombin の活性部位の分子形状を解析するために、まず始めに Native thrombin の活性部位に結合する単クローン抗体の作製を試みた。

【方法】 DFP 処理したウシ thrombin を免疫源とし、免疫した BALB/c マウスの脾細胞とミエローマ細胞 P3U1 を融合し clone CC2 を得た。この融合細胞が生成する単クローン抗体 (mAbCC<sub>2</sub>) は Protein A カラムを用いて精製した。遊離 FPA 量は逆相 HPLC を用いて定量した。

【結果】 mAbCC<sub>2</sub> のサブクラスは IgG<sub>1</sub> (κ) であった。精製した mAbCC<sub>2</sub> は、thrombin の FPA 遊離を抑制し、さらに argatroban は mAbCC<sub>2</sub> と thrombin の結合を競合阻害するのが判明した。

【考察】 argatroban は thrombin の活性部位の primary specific pocket に結合する事実を考慮すると、mAbCC<sub>2</sub> は Native thrombin の primary specific pocket に結合すると推察された。

#### 5. “ブランコとブラウン運動とミオシン振動” 振動エネルギーで駆動するモーター

緒方 道彦 (九州大学健康科学センター)

ブランコは身体の屈伸 (重心の上下) で一周中に kinetic energy を二度補給しながら漕ぎ続ける。パラメータ励振である。

全くデータメなブラウン運動を続けるミオシンだが、振

り子の一周中に二回アクチンに接触し、その度に強い ATPase 活性を発揮する。そこで Cross-bridge はアクチン線維の長軸に沿って働くことになる。

但し、ブランコの励振は前後均等で変位ゼロ。ミオシン・ブランコ説では、筋は仕事が出来ないようだが、生命現象はランダムな事象の組合わせを巧みに利用している。個々の結合・解離は独立だが、その生起確率をポアソン過程として解析すると、外部負荷に比例して張力の発生時間分布が変化し、さらに伸長と短縮の相反する方向の張力発生に時間差が認められ、負荷が少ない程短縮速度は速い。時間分布は指数分布であり、筋の負荷・速度関係が、 $V = e^{-\beta x} - e^{-\beta}$  で表現される根拠を示している。 $\beta = W/kBT$  (kB: Boltzman 常数, T: 絶対温度)

実際の収縮曲線に、ポアソン過程の式を適用すると 0.98 以上の相関であった。Poisson process model (POP) の進展を期したい。

#### 6. 自由行動意識下ラットにおける Neuromedin U の心血管系に対する中枢作用

初 春平、加藤 和男、渡部 正一、鍋倉 隆、國武 孝人、中里 雅光\*、寒川 賢治\*\*、河南 洋 (宮崎医科大学 第一生理、第三内科\*、国立循環器病センター研究所\*\*)

Neuromedin U (NMU) は 1985 年にブタの脊髄から分離され、平滑筋収縮作用を有することが知られている。最近、NMU に対する二つの受容体が同定され、中でも NMU2 受容体は脳のとりわけ視床下部室傍核などに多く発現している。さらに、脳室内投与すると摂食行動の抑制を引き起こす事が報告されている。しかし、NMU の中枢内投与時の心血管系に対する作用は明らかにされていない。そこで、我々は覚醒ラットを用いて、脳室内投与したラット NMU-23 の心血管系に対する効果を調べた。NMU (0.05 nmol と 0.5 nmol) の脳室内投与により血圧と心拍数が有意に増加した。血圧に関しては、NMU 投与に対して容量依存的な応答がみられた。また、NMU (0.5 nmol) の脳室内投与により血漿ノルアドレナリン濃度も有意に増加した。一方、NMU (0.5 nmol) を末梢静脈に投与すると血圧だけ一時的に有意に増加したが、その応答は脳室内投与時に比べ、持続時間も昇圧度も異なるものであった。以上より NMU は交感神経系を介して中枢性循環調節に関わることが示唆された。

#### 7. 糖尿病ラットの脳海馬におけるマイクロダイアリシス法による一酸化窒素と神経伝達物質の測定

紀麻 有子<sup>1</sup>、大和 孝子<sup>1</sup>、藤田 守<sup>1</sup>、辻 真知恵<sup>2</sup>

青峰 正裕<sup>1</sup> (<sup>1</sup>中村学園大学・食物栄養, <sup>2</sup>アニマルセンター)

糖尿病では脳神経伝達物質(セロトニン以下5-HT, ドーパミン以下DA)レベルは低下している。一方,一酸化窒素(NO)は糖尿病の発症や合併症と関係しているという報告がある。そこで,本研究ではこれらの関連性を見出すため,ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラット(以下STZ群)と正常ラット(以下C群)において,マイクロダイアリシス法を用い,脳海馬における5-HT, DA, NOレベルを測定し,NO供与剤であるニトロプルシッドNa(以下SNP),インスリン,Cキナーゼ阻害剤であるスタウロsporin(以下STS)の影響を比較検討した。脳海馬におけるNOレベルは,STZ群がC群に比してやや増加しており,5-HTとDAレベルは低下していた。SNPを作用した場合,NOの増加率はSTZ群で有意に大であった。STZラットではiNOS pathwayの発現が増加していることが報告されているが,この結果はSTZ群におけるiNOSによるNO産生の増加を示唆している。また,SNPによりNOレベルは両群ともに増加傾向,5-HTは低下傾向を示した。NOと5-HT, DAの同時測定実験で,STZラットにインスリンを投与すると,NOは減少し,5-HTは増加した。STSを作用すると,C群ではNOが増加,5-HTとDAは減少してPKC阻害効果がみられたがSTZ群ではみられなかった。このことはSTZ群での5-HTレベルの低下によるものではないかと推測された。

#### 8. 電解質異常および代謝阻害の効果を再現する教育用心室筋活動電位波形シミュレータの開発

清末 達人(大分医科大学 生理学講座(第二))

カリウムやカルシウムなどの体液電解質濃度が変わると特徴的な心電図波形の変化が生じる。これらの変化は同時に心臓収縮力の変化を伴っており临床上重要である。しかしながら,これらの現象を理解するには,心臓のイオンチャンネルやイオン交換機構についての詳細な知識が必要とされ,学部学生にとって教科書等を読むだけでは包括的な理解は困難と思われる。そこで,心電図教育の補助教材としてパーソナルコンピュータを用いた心室筋活動電位シミュレータを開発する試みを行った。

Windows 98/2000/Me上のパスカル言語, Delphi 6(Borland社)を使用して,主要な心筋イオンチャンネル電流, Na<sup>+</sup> pumpを組み込んだモルモット心室筋細胞活動電位の数式モデルを作成した。電位依存性イオンチャンネル電流はHodgkin Huxleyタイプの微分方程式で記述し, Runge Kutta法にて解を求めた。細胞外各種イオン濃度, 細胞内ATP濃度をそれぞれ, 対照とテストの2つの条件で入力

して心室筋活動電位波形およびイオン電流に及ぼす電解質異常, 代謝阻害の効果をシミュレートできるよう工夫した。

#### 9. モノクロタリン誘発右心不全ラットの心拍変動異常と心臓自律神経障害

S. N. Sanyal, 小野 克重(大分医科大学 生理学講座(第二))

ピロリジジナルカロイドの1種であるモノクロタリン(MCT)の投与によってラットは4週以降に肺高血圧症を呈し右心不全症を続発する。MCT誘発右心不全ラットの心臓支配自律神経機能の異常とその障害様式の解明を行った。MCTを8週令雄生ラットに皮下注射して肺高血圧症発症させ, 6週目以降に右心肥大大型心筋症に続発する右心不全症ラットモデルを作成した。テレメトリー方式心電図(ECG)送信機を, 右心不全症ラットと対照Wistarラットの皮下に装着し, 無麻酔無拘束下で12時間ごとにECGを30分間, 5 kHzで長期間連続記録した。ECGのRR間隔データを高速フーリエ変換(FFT)してそのスペクトラムの全パワー値, 周波数帯パワー値等を比較検討した。MCT誘発右心不全症ラットの心拍変動全パワー値(TP), 及び高周波領域パワー値(HF)は対照Wistarラットより有意に低値であった。一方, 低周波領域パワー値/高周波パワー値比(L/H)は両群間に差は無かった。MCT誘発右心不全ラットのTP及びHFのアトロピンに対する感受性は対照ラットのそれと同程度に維持されていた。右心不全症ラットの心臓支配自律神経障害は迷走神経シナプス前障害が中心であることが示唆され, 交感神経機能は心不全末期まで維持されている事が判明した。

#### 10. 心不全ラット心筋のCa電流依存性収縮機構の変調とT型Caチャンネルの作用

竹林 聡, 李 玉龍, 清末 達人, 小野 克重(大分医科大学 生理学講座(第二))

モノクロタリン(MCT)誘発肺高血圧症ラットではMCT投与6週以降に右心不全症を続発する。右心不全ラットの心筋細胞においてT型Caチャンネルがリモデリングを受けるか否かを確認する目的でMCT誘発心不全ラットと対照ラットの右室自由壁標本の収縮張力を冠状動脈灌流下で記録しそのCa拮抗薬感受性を比較した。更にT型CaチャンネルのmRNAの発現程度を比較した。L型Caチャンネル拮抗薬Nifedipine 50nM)の投与によって対照ラットと心不全ラットの右室心筋の収縮張力は0.2Hz, 1Hz, 5Hzの刺激頻度において約20%抑制された。L型及びT型両方のCaチャンネル拮抗薬(Efonidipine 0.5 μM)の存在下で対照心の収縮張力はどの刺激頻度においても約10%抑制さ

れたのに対し不全心では刺激頻度に依存する収縮張力の有意な低下が認められた。T型Caチャンネル拮抗薬(Mibefradil 0.5  $\mu$ M)により対照心の収縮張力は影響を受けなかったが不全心の収縮張力は対照心に比べ使用頻度依存性に有意に大きい抑制を受け5Hzの刺激では20%以上の抑制を受けた。一方Northern blot解析の結果不全心におけるT型Caチャンネルの $\alpha$ サブユニット( $\alpha$ 1G,  $\alpha$ 1H)のmRNA発現量が対照心に比べ有意に増加していた。以上の結果より不全心ではT型Caチャンネル( $\alpha$ 1G,  $\alpha$ 1H)の発現が増加しさらにこれらのT型Caチャンネルが収縮張力に影響を及ぼす程度にリモデリングを受けている可能性が示唆された。

### 11. cAMPはPKGI $\beta$ を介して血管平滑筋L型カルシウムチャンネル電流の減少を引き起こす

砂川 昌範, 中村真理子, 小杉 忠誠(琉球大学医学部生理学第一講座)

高濃度cAMPはPKGクロスアクチベーションの結果, 血管平滑筋 $I_{Ca(L)}$ が減少するのが報告されている。本研究では, 血管平滑筋に多く発現しているタイプI $\beta$  PKG (PKGI $\beta$ )の関与を調べるために, アンチセンス法を用いて培養血管平滑筋細胞のPKGI $\beta$ 発現を抑制し, パッチクランプ法によりcAMPの $I_{Ca(L)}$ 減少効果を対照と比較して調べた。PKGI $\beta$ の塩基配列(320~339, X54289)に対するantisense oligonucleotide (AS-PKG)をリポフェクション法を用いて細胞内に導入し96時間インキュベーションを行い, cAMPによる $I_{Ca(L)}$ の変化を調べた。その結果, AS-PKG群では対照のScramble-PKG群に比してcAMPによる $I_{Ca(L)}$ の減少が抑制された。従って, cAMPによる $I_{Ca(L)}$ の減少はPKGを介しているのが示唆された。さらに, カルシウムチャンネル $\beta$ サブユニットの共通配列(148~167, NM012828)に対するantisense oligonucleotide (AS-beta)を用いて $\beta$ サブユニットの発現を抑制して, cAMPによる $I_{Ca(L)}$ の減少効果を調べた。Scramble-beta群ではcAMPによる $I_{Ca(L)}$ の減少が見られたが, AS-beta群では見られなかった。従って, カルシウムチャンネル $\beta$ サブユニットはcAMPのPKGクロスアクチベーションに関与するのが示唆された。

### 12. L型Ca<sup>2+</sup>チャンネルのAキナーゼを介するリン酸化部位の同定

黒木佐知子, Hao Li-Ying, 徐 建軍, 亀山亜砂子, 亀山 正樹(鹿児島大学医学部第二生理学教室)

心筋L型Ca<sup>2+</sup>チャンネルはアドレナリン受容体の刺激により, cAMP依存性蛋白質キナーゼ(Aキナーゼ)を介す

るリン酸化を受け, 活性が増大する。我々はこの時のリン酸化部位が $\alpha_1$ サブユニットC末部にあることを報告した。今回は, C末部の5つのリン酸化可能部位を変異させたmutantをBHK細胞に発現させ, forskolinとH89の効果をcell-attached方法により調べ, リン酸化部位を同定することを試みた。結果: (1) Wild-typeモルモット心筋 $\alpha_1c$ を発現させたとき, チャンネル活性はforskolinによって増加し, H89によって減少した。これに対して, C末部全てのリン酸化可能部位のserine/threonineを全部alanineに替えたmutantではforskolin及びH89の作用が見られなかった。これにより, リン酸化部位はC末部5つのリン酸化可能部位のなかにあることが確認された。(2) 5番目のリン酸化部位を変異させたmutant (S1927A)ではforskolin及びH89の作用がWild-typeのものと同じように見られ, リン酸化部位はserine1927ではなく, 他にあると考えた。(3) 3, 4, 5番目のリン酸化部位を複数変異させたmutant (S1699A + T1908A + S1927A)または2, 3, 4, 5番目のリン酸化部位を複数変異させたmutant (S1626A + S1699A + T1908A + S1927A)ではforskolinまたはH89の作用が見られたが, 1, 3, 4, 5番目のリン酸化部位を複数変異させたmutant (S1574A + S1699A + T1908A + S1927A)ではforskolin及びH89の作用が見られなかった。これらの結果から, 1番目のリン酸化可能部位serine1574がL型Ca<sup>2+</sup>チャンネルのAキナーゼを介するリン酸化部位であると考えられた。

### 13. In situ hybridization法を用いた家兎培養血管平滑筋細胞のミオシン重鎖アイソフォーム発現同定法の確立

吉長 正富<sup>1</sup>, 砂川 昌範<sup>2</sup>, 島田 誠二<sup>2</sup>, 中村真理子<sup>2</sup>, 小杉 忠誠<sup>2</sup>(琉球大学医学部放射線医学講座<sup>1</sup>, 同生理学第一講座<sup>2</sup>)

血管平滑筋細胞におけるミオシン重鎖遺伝子のmRNAレベルでの調節機構の解明と内皮細胞障害後の内膜肥厚の病態生理学的解明を目的として, ミオシン重鎖アイソフォーム発現同定法の確立を試みた。移植片培養法により家兎胸部大動脈血管平滑筋細胞の培養を行い, 細胞数 $1.0 \times 10^6$ の培養細胞よりtotal RNAを抽出した。RT-PCR法によりSM1, SM2及びSMemb特異的cDNA部分配列を増幅し, T7及びSp6 RNAポリメラーゼのプロモーター塩基配列を含む鋳型DNAを作製した。in vitro transcription法にてジゴキシゲニンまたはビオチン標識化RNAプローブを作製し, ドットプロットハイブリダイゼーションにて, 各アイソフォームのcRNAに特異的に反応することを確認した。培養細胞を用いてin situ hybridizationを行った結果, アンチセンスRNAプローブでは核周辺に強い発色が見ら

れたが、センスRNAプローブでは発色の程度が弱かった。培養血管平滑筋細胞を合成型から収縮型へと形質変換する作用が知られている vitamin A を用いて、培養細胞を刺激しミオシン重鎖アイソフォーム mRNA の発現を *in situ* hybridization で調べた。その結果、SMemb の発現の減少、SM1, SM2 の発現の増加を認め、vitamin A による培養血管平滑筋細胞の形質変換を本法を用いて再確認された。

#### 14. 筋ジストロフィーは筋成長障害：相対身長成長の男女差

戸塚 武, 渡辺 貴美 (愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・生理)

Dystrophin 離れが進み (例えば「生化学」誌の大会号の Subject Index から Dystrophin が消えた), 筋ジストロフィー (MD) 研究は再び混乱状態に陥っている。通説が根本で間違っているためであろう。我々は、MD モデル動物 dy マウスの初期病態は、筋変性 (通説) ではなく筋成長障害で、骨の伸長成長が筋病変や症状の発現・悪化に関係しているらしいことを明らかにした (筋成長障害説; 一歩進めた筋-骨不均衡説)。

MD 患者でも骨 (身長) 成長が筋病変と症状の発現・悪化に深く関わっていて、MD が男子に好発することとも関係があるのではないかと考え、健常男女の相対身長成長を比較分析したところ、興味深い男女差を観た。すなわち、女子の顕著な成長特性として、身長を体重の立方根で割った値 (以下、F 値) が 11 歳過ぎに急速に減少し、15 歳頃以降低い値で落ち着くことを見出した (資料: 厚生省国民栄養調査と文部省学校保健統計調査)。15 歳頃以降の F 値が 6~7 歳頃の値に近い程小さいことから、身長と体重の関係に女子では何らかの余裕がある (緊張関係が緩い) のではないかと推測している。

MD が男性に好発するのは、MD の中で最も頻度の高い Duchenne 型 MD が X 染色体性劣性遺伝するためとされるが、我々は、そうではなく成長特性の男女差によるのだらうと推察している。

## 第2部

### 1. 単一神経終末から放出される GABA に対する $Ca^{2+}$ チャネルの役割

赤池 紀生, 桂林秀太郎, 窪田 寿彦, 村上 信哉

神経終末部からの伝達物質放出には  $Ca^{2+}$  チャネルから流入する  $Ca^{2+}$  が重要で、このことはスライス標本や培養細胞を用いた研究から明らかになっている。しかし、単一神経終末レベルで、 $Ca^{2+}$  流入に如何なる  $Ca^{2+}$  チャネルサ

ブタイプが関与しているかは不明な点が多い。この問題を解決するため、神経終末が多数付着した“シナプスブートン標本”を作製し、自発性 GABA 遊離で発生する sIPSC ならびに単一神経終末部のみを“フォーカル (焦点) 電気刺激”して発生する eIPSC を観察し、両条件下での GABA 放出に対する  $Ca^{2+}$  チャネルの種類や役割を検討した。その結果、GABA 作動性 sIPSC には L, N, P/Q 型  $Ca^{2+}$  チャネルが主に関与していた。フォーカル電気刺激による eIPSC は L 型チャネルブロッカーで完全に抑制され、P/Q 型  $Ca^{2+}$  チャネルブロッカーも有効であった ( $n = 5/6$ )。また、N 型  $Ca^{2+}$  チャネルが関与する神経終末も少数例あった ( $n = 2/6$ )。一方、スライス標本において、入力神経の低頻度刺激では L 型は関与せずに N, P/Q 型  $Ca^{2+}$  チャネルが活性化されて GABA を放出し、高頻度刺激でのみそれらに L 型  $Ca^{2+}$  チャネルが加わり GABA 放出の増強 (Post Tetanic Potentiation: PTP) を惹起した。これらの結果から、単一神経終末部のフォーカル電気刺激で活性化される  $Ca^{2+}$  チャネル群はスライス標本のテタニック刺激時のものに相当することが明らかとなった。以上の結果は伝達物質の放出様式の変化に対して  $Ca^{2+}$  チャネルサブタイプが使い分けられている可能性を示唆している。

### 2. ラット急性単離中枢神経細胞に於ける ATP 応答

若森 実, 山神和比己, 浦村 一秀, 反町 勝 (鹿児島大学医学部第1生理学講座)

生後 2~3 週齢のラット hypothalamic arcuate nucleus (ARH) から神経細胞を急性単離し、パッチクランプ法 (ホールセル法) で膜電位固定下 (保持電位  $-70mV$ ) に ATP 応答を記録した。ATP は濃度依存的に内向き電流を惹起し、 $EC_{50}$  は  $42.1 \mu M$ 、ヒル係数 1.8 であった。ATP の他に ATPgS と 2-methylthio-ATP は電流を惹起し、 $100 \mu M$  の濃度で比べると ATP 応答の約 60% の大きさであった。しかし、 $\alpha \beta$ -methylene-ATP と  $\beta \gamma$ -methylene-ATP は電流を惹起しなかった。PPADS は ATP ( $100 \mu M$ ) 応答を時間依存的、濃度依存的に抑制し、その  $IC_{50}$  は  $19 \mu M$  であった。外液 2 価陽イオンの効果を検討したところ、 $Ca^{2+}$  は ATP 応答を濃度依存性に抑制し ( $IC_{50} = 6.9mM$ )、 $Zn^{2+}$  は低濃度で増強 ( $EC_{50} = 6 \mu M$ ) したが、高濃度で活性化の遅延を伴う抑制 ( $IC_{50} = 100 \mu M$ ) を引き起こした。一般的に陽イオンチャネル遮断薬である  $Cd^{2+}$  も  $500 \mu M$  以下の濃度で 2 相性の増強効果 ( $EC_{50} = 0.8$  と  $76 \mu M$ ) が見られた。以上の結果より、ARH の神経細胞には P2X 受容体が発現していることが明らかになった。

細胞内  $Ca^{2+}$  濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) が上昇した。この  $[Ca^{2+}]_i$  上昇

を指標に ATP 受容体阻害薬，活性薬，外液  $\text{Na}^+$  除去， $\text{Ca}^{2+}$  除去， $\text{Ca}^{2+}$  拮抗薬の効果を検討した．更に，パッチクランプ法を適用し膜電位固定下に ATP で惹起される電流

を記録した．その結果，VTA と ARH の神経細胞には ATP 受容体が発現しているが，受容体のタイプや発現量が異なっていることが明らかになった．