

第94回近畿生理学談話会

日 時：平成13年9月8日（土）
場 所：神戸大学大学院医学系研究科・神緑会館
当 番：神戸大学大学院医学系研究科・脳科学講座（細胞・神経生理学分野）

前日に上陸した台風の影響も無く、50余名の会員の参加を得て、新築されたばかりの神戸大学・神緑会館を会場に第94回近畿生理学談話会が開催された。午前、午後のセッションを通じ、口頭発表による19演題に対して活発な議論が行われた。多岐にわたる広範な領域の研究者が一つの会場に集い質疑応答することができる地方会は、プログラムの専門領域の発表に限られる大規模な年次大会と違う良さがあることを改めて認識できた。修士課程や学部学生の初めての発表もみられ、この機会が若手研究者のモチベーションを高めるものとなってくれることを期待したい。また3名の新任教授の参加を得て、その意味でも交流を深める機会となったと思う。

神戸大学大学院医学系研究科・脳科学講座（細胞・神経生理学分野）真鍋俊也

1. 空間移動課題遂行時のラット側坐核ニューロンの活動特性

柴田 良子¹、玄番 央恵¹、Sidney I. Wiener²（¹関西医科大学医学部生理学第2講座、²CNRS-College de France）

海馬体の主要な出力系の1つである側坐核の空間認知における役割を調べるため、空間移動課題遂行中のラット側坐核のニューロン活動を記録し解析した。円形オープンフィールド（直径180cm）の内部に等価な手掛かり刺激付き報酬場所（4カ所、90°離れる）、一方外部に別の手掛かり刺激を設置した。課題は、1) フィールド内の手掛かりが指示する2つの報酬場所間の往復、2) フィールド外の手掛かり刺激のみを指標にして2つの特定報酬場所間の往復であり、2課題が交互に提示された。144個のニューロンの中で、80個がラットの行動と有意な相関を示した。80個の中で、50個が場所選択性を示したが、その80%は課題の交代やフィールドの回転にも応答した。側坐核の場所選択性ニューロンは、報酬という条件付きの場所に特異的な活動変化を示した。一方、同じ課題下で記録された海馬の場所選択性ニューロンは、報酬場所に関係せずただ1カ所のみで発火し、発火パターンは課題の変更に影響されなかった。これらの結果は、側坐核の場所選択性ニューロンは海馬から情報を受けると同時に、扁桃体など他の脳部位から入力を受け、それらを統合し目的な行動の発現に関与していることを示唆した。

2. 高次中枢機能とシグナル伝達系

湯川和典、坪田裕司、真壁恭子、前田正信（和歌山県立医科大学第二生理学教室）

学習・記憶における細胞内情報伝達系の役割を探るために転写因子やキナーゼを欠損するノックアウト・マウスの行動解析を行っている。Stat6転写因子の欠損マウスでは音響驚愕反射における可塑性のprepulse inhibition, PPIが消失していることが判った。Stat6（-/-）脳ではdopamine transporter遺伝子の発現が低下し側坐核には正常の2倍量以上のdopamineを認めた。従って側坐核にdopamineが過剰蓄積する結果、Stat6欠損マウスではPPIが消失することが示唆された。また海馬神経細胞死やneurogenesisと記憶との関連を問うためにアポトーシス関連分子のDAPキナーゼを欠損するマウスを用いて行動解析を行っている。calcium/calmodulin-regulated kinaseのDAPキナーゼは脳内では海馬特異的に発現が認められる。モリス水迷路学習においてDAPキナーゼ欠損マウスは正常マウスよりも学習能力が高いことが判明した。さらにDAPキナーゼ欠損マウスは脳虚血処置後も空間学習能力が正常に保持されることが判明した。DAPキナーゼは海馬神経細胞死とneurogenesisを制御することにより学習・記憶過程に関与する可能性が考えられる。

3. GFPレポーターを用いたラット延髄孤束核への遺伝子導入の試み

真壁 恭子¹、坪田 裕司¹、湯川 和典¹、梁 向明²、前田 武彦³、宗 正敏²、湯川 進²、岸岡 史郎³、前田 正信¹（和歌山県立医科大学 生理学第2講座¹・内科学第3講座²・薬理学講座³）

延髄孤束核（nucleus tractus solitarius, NTS）には、神経型一酸化窒素合成酵素（neuronal NO synthase、

nNOS) が多量に存在し, NTS内にNO放出剤を微量注入すると血圧が下降し, NOSのinhibitorで血圧上昇がみられる. NOの圧受容器機能への関与は明らかとなってきたが, NOSのNTS内での産生・消退については不明である. そこで我々は, NTS内のnNOSの発現を可視化するために, 先ずCMVプロモーター下流にEGFP (enhanced green fluorescent protein) の遺伝子を組み込んだプラスミド (pEGFP) の*in vivo*導入をラットを用いて様々な方法で試みた. リポフェクション法として, Lipofectamine PLUSとLipofectamine 2000 (Invitrogen) を使用し, 各リポソーム試薬とpEGFPをNTSに微量注入した. エレクトロポレーション法は, pEGFPをNTSに微量注入後, 延髄に電気パルスを与えて行った. 遺伝子導入後, 48, 72, 96時間後に延髄を摘出し, 凍結切片を作製して蛍光顕微鏡下でGFPの観察を行った. プラスミドベクターを用いたNTSへの*in vivo*遺伝子導入の成功例は未だないが, これまで我々の得た結果およびプロモーターをEF1 α (elongation factor 1 α) に組換えた遺伝子の導入の試みについても報告する.

4. アンチセンスオリゴDNAを用いた脳への遺伝子導入と中枢性循環調節

前田正信, 湯川和典, 坪田裕司, 真壁恭子 (和歌山県立医科大学・第2生理)

循環の中枢性調節を調べる実験において, 脳の切断実験, 破壊実験, 電気刺激, そして化学刺激が行なわれてきた. 発表者は, それらの方法を用いた研究成果を報告してきた. しかし, 化学刺激で薬剤を外来性に注入することは本来的に生理的なものではなく, 薬剤の濃度の問題, 薬剤がreceptorに対してhigh specific effectsであるかどうかの問題, 薬剤のside effectsの問題が指摘されていた. 一方, antisenseoligonucleotidesを用い細胞内のタンパク質を遺伝子レベルで抑制する方法が開発された. 今回は, 神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) のantisenseを用い延髄孤束核内でnNOSの発現を遺伝子レベルで抑制し, その時の循環変化を観察した. そして, これらの変化をWistar-Kyotoラット (WKY) と自然発症高血圧ラット (SHR) で比較検討した. urethaneで麻酔し非動化したWKYの孤束核へ両側性にantisenseを微量注入すると, 平均血圧は30~60分後にsenseおよびscrambledと比べ有意に上昇した. 免疫組織化学的に孤束核でnNOSの発現が抑制されていることを確認した. SHRでは, 平均血圧は15分後で有意に上昇した. この結果, 孤束核でnNOSの発現を遺伝子レベルで抑制し, 生体内で自然に産生されるNOを分子生物学的に制御した時, 血圧が上昇すること

が明らかとなった. また, SHRにおける血圧上昇反応はWKYに比べ早く出現した. WKYでもSHRでも, 孤束核に本来的にあるnNOSの遺伝子の発現は, 循環を調節している.

5. forskolinによるマウス海馬苔状線維の興奮性の増強

梅田和昌^{1,2}, 神谷温之¹, 清原壽一², 真鍋俊也¹ (¹神戸大・院医・細胞・神経生理, ²京都工芸繊維大・工芸科学・生体機能)

苔状線維から海馬CA3錐体細胞への興奮性シナプス伝達は, 高頻度刺激やアデニル酸シクラーゼ活性化剤forskolinの投与によって長期増強を引き起こす. これらの可塑的变化は, とくにシナプス前終末における伝達物質放出量の変化によるものと考えられてきた. しかし高頻度刺激では増強を誘発できないノックアウトマウスに対してもforskolinが増強作用を示すことから, 両者には異なる誘発・発現機構が存在する可能性が提唱されている. 本研究では, これらの増強作用と苔状線維の興奮性との関係を検討するため, マウス海馬スライス標本を用いて, 苔状線維のシナプス前線維集合活動電位 (presynaptic fiber volley: FV) を細胞外記録によって測定し, forskolinの作用を調べた. その結果, forskolin投与によってFVの振幅は約1.2倍に増大した. 一方forskolinの不活性アナログである1,9-dideoxyforskolinはFVに影響を与えなかった. これらの結果はforskolinがサイクリックAMP依存的に苔状線維の興奮性を高めることを示唆している.

6. 角状核を構成する神経細胞の発火特性とそれに関わるK⁺電流

福井 巖, 古谷野好, 大森治紀 (京大・医・生理)

音情報は内耳有毛細胞で電気信号に変換され, 鳥類では聴神経線維を介して大細胞核と角状核 (NA) に投射する. NAは音圧をコードするのに重要であると考えられているが, 構成する細胞群の性質についてあまり知られていない. 本研究ではNAの膜興奮特性を調べ, 以下のことを明らかにした. NAを構成する細胞は連続した脱分極通電刺激に対する応答で3種類に分けられた. 連続発火で応答する細胞 (regular), 刺激開始後時間を置いて連続発火を起こす細胞 (delay), 刺激開始時のみ発火を起こす細胞 (onset) である. Regular細胞は刺激強度増加によりスパイク頻度も増加し, 最大700Hz以上の頻度で連続発火が起こった. その発火頻度は1mM TEAで抑制され, 1 μ Mのアバミンにより上昇した. また, 200nM DTXを加えると低い通電刺激でも連続発火を起こした. Delay細胞は少し脱分極した膜電位から通電刺激を行うとregularに発火した.

Onset細胞に200nM DTXを加えると通電刺激により連続発火が起こった。アパミン、1mM TEA、200nM DTXはそれぞれSKチャネル、Kv3x、Kv1.1、1.2、1.6の阻害剤として知られており、音情報処理においてこれらのK⁺電流が深く関わっていることが示唆された。

7. 同時検出器としての層状核神経細胞の電気生理学的特性

久場博司, 古谷野好, 大森治紀 (京大・医・生理)

層状核神経細胞 (NL) は両耳間時差を検出する同時検出器 (CD) として働き、鳥類の音源定位回路を構成する。NLのCDとしての精度は非常に高く、フクロウにおいてはNLの発火率が最大値の1/2となる時間差 (半値幅) は両側からの音入力に対して1 ms以下であることが知られている。我々は胎齢16~17日齢 (E) 及び生後2~7日齢 (P) ニワトリの脳幹スライス標本を用いてその電気生理学的特性を比較することにより、NLのCD精度に関わる要因を検討した。PではEと比較してNLのCD精度は非常に高く (半値幅; E: 3.9 ms, P: 1.2 ms), これはPにおけるEPSP decay phaseの加速 (EPSP half amplitude width; E: 5.1 ms, P: 1.7 ms) と相関していた。さらにこのEPSP decay phaseの加速にはPにおけるEPSC decay time constantの短縮 (E: 1.1 ms, P: 0.7 ms) と膜抵抗の減少 (E: 273.2 Mohm, P: 55.0 Mohm) が関与していた。膜抵抗の減少は、主にDTX感受性K⁺電流 (E: 5.7 nS, P: 17.0 nS) とI_h (E: 2.1 nS, P: 9.6 nS) の増加によるものであった。PとEにおける膜容量の差は認められなかった。

8. 網膜神経節細胞に対する電気刺激による細胞死抑制効果

森本 壮^{1,2,3}, 三好智満¹, 井上 徹¹, 澤井 元¹, 不二門尚^{2,3}, 田野保雄³, 福田 淳¹ (大阪大学大学院医学系研究科情報生理学, ²感覚機能形成学, ³眼科学視覚科学)

[目的] 中枢神経系の細胞である網膜神経節細胞は軸索が切断されると逆行性変性に陥り細胞死に至る。この細胞死を何らかの方法で制御し、その生存を促進させることが、損傷した中枢神経系の機能修復における大きな課題となっている。これまで、*in vitro*の研究で高濃度K⁺による脱分極が培養神経細胞の生存を促進させることが知られている。そこで、我々は、切断された網膜神経節細胞を電気刺激を用いて賦活することで、その細胞死が抑制されるかどうかを検討した。[方法] 12週齢のオスのWistarラットを用い、両側上丘から網膜神経節細胞をfluorogoldを用いて逆行性に標識した。標識5日後にラットの視神経を切断し、

直後に視神経断端に電気刺激 (50 μA, 20 Hz, 2時間) を加えた。切断一週間後に網膜伸展標本を作製し、網膜神経節細胞の生存細胞数を数えて、生存率を求め、非刺激群と比較した。[成績] 電気刺激を与えた群では生存率が83%で、視神経切断のみの群の生存率54%に比べて有意に生存が促進していた。[結論] 電気刺激は軸索切断された網膜神経節細胞の細胞死を抑制し、生存を促進させることが明らかになった。

9. 機能的MRIを用いた局所温・冷刺激による脳内賦活領域の検討

森田貴義¹, 八木下知子¹, 岡田智久², 定藤規弘³, 永島計¹, 細野剛良¹, 米倉義晴³, 彼末一之¹ (大阪大学医学部保健学科, ²岡崎国立共同研究機構生理学研究所, ³福井医科大学高エネルギー医学研究センター)

温度に関係した感覚は、外界に向かう客観的な温度感覚“temperature sensation”と内部条件に依存する主観的な温熱的快・不快感“thermal comfort and discomfort”の二つに分けられる。最近の研究で全身の冷却刺激時に、温熱的快・不快感による扁桃体の賦活が報告されている (Kanosue et al., 2000)。本研究では機能的MRIを用いて局所温度刺激により賦活される脳内領域を検討した。刺激は手掌全体を覆うチューブ内を還流する水によって、左手・右手別々に、冷刺激 (25℃) と温刺激 (39℃) の二種類を行った。対象は健康被検者8名とし、被検者には温度刺激の強度を1 (very cold) から9 (very hot) の9段階で申告させた。温度刺激による痛みを申告した者はいなかった。冷刺激では対側のSII (第二次体性感覚野)、温刺激では両側のSIIに、被検者の温度感覚の申告値と相関した賦活がみられたが扁桃体ではみられなかった。

10. モルモット排便反射における統合的自律神経性調節の定量的解析

門脇 真¹, 山内昌哉², 杉森志穂², 米田 諭¹, 高木 都¹ (奈良県立医科大学第二生理学, ²第一外科)

[目的] 直腸—直腸収縮反射および直腸—内肛門筋弛緩反射の同時測定により、排便反射における統合的自律神経性調節機構の定量的解析を試みた。

[方法] モルモットをウレタンで麻酔後ガラミン非動化し人工呼吸を行った。肛門にトランスデューサを挿入し、直腸内にバルーンを留置した。1.5ml/minの速度でバルーン内に温水を注入して直腸を加圧伸展し、直腸における反射性の収縮反応 (R-R)、および内肛門括約筋における反射性の弛緩反応 (R-IAS) を惹起した。反射反応の定量的解析はそれぞれの反応曲線の積分により行った。

【結果】直腸加圧伸展によりR-RおよびR-IASが同期して惹起され、これらの反応は腰部結腸神経切除によりコントロールの2.2および2.3倍に増強された。さらに、第13胸椎を横断した動物ではR-RおよびR-IASはほぼ消失したが、腰部結腸神経切除によりコントロールレベルにまで回復した。また、腰仙髄破壊によりR-RおよびR-IASはほぼ消失が、NO合成酵素阻害薬を投与するとR-Rは再び出現しR-IASは収縮反応に変わった。

【結論】腰部結腸神経は上位中枢から抑制を受けてはいるが、外来神経性のR-RおよびR-IASを同時に強く抑制性に支配している。また、NO含有神経は内因性R-Rを抑制性に支配し内因性R-IASにも関与している。

11. 甲状腺機能低下症ラットの血液交叉灌流摘出心臓におけるメカノエナジェティクス

竹中千香子, 大賀好美, 坂田 進, 上月久治, 三澤裕美, 高木 都 (奈良医大, 第二生理)

【目的】以前に我々は甲状腺機能低下症ラットでは、左室心筋のミオシンアインザイムはV1からV3に変化していることを報告した。本研究では甲状腺機能低下症および正常ラットの血液交叉灌流摘出心臓標本を用いて、心力学的エネルギー学的な機能解析を行った。また、これら標本での筋小胞体のカルシウムポンプ (SERCA2) やホスホランパン (PLB) の蛋白発現レベルを調べた。

【方法】ラットに8-ブロピルチオウラシル水を飲ませ、甲状腺機能低下症ラットを作製した。この血液交叉灌流摘出心臓標本から収縮期末圧容積関係及び収縮期圧容積面積と一拍当たりの心筋酸素消費量の関係を得た。ついで、左室心筋のSERCA2とPLBの量比をWestern blotで求めた。

【結果と考察】甲状腺機能低下症心では収縮性と弛緩能ともに低下しており、基礎代謝および興奮収縮連関に要する酸素消費量も減少していた。また、PLB/SERCA2比は増加していた。以上より甲状腺機能低下症ラットのこのような左室メカノエナジェティクスの変化に、ミオシン変換に加え、PLB/SERCA2比の増加、すなわちSERCA2の機能障害が寄与していると結論づけた。

12. 脳血流の自動調節に拍動性は必要か？

新見英幸, 山川隆司, 山口三郎, 大西佳彦* (国立循環器病センター脈管生理部, *麻酔科)

脳血流自動調節に於ける拍動性の役割を明らかにする為、拍動および非拍動流におけるラット脳微小血管レベルの血流動態を分析した。ラットは5%イソフレンで麻酔し、人工心肺バイパスを行った。動脈圧はポンプ流量により変

え、無拍動流モデルは除細動による心停止により作成した。蛍光ラベル法により脳皮質の微小循環を可視化し、蛍光ビデオ顕微鏡システムで連続記録した。ビデオ画像から、細動脈の管径、赤血球速度を計測し、これから細動脈の流量 (Flow-rate) を評価した。拍動流では流量は60から160 mmHgまでほぼ一定に保たれたが、無拍動流では血圧の上昇 (低下) と共に増加 (減少) した。これは、拍動性の有無により、細動脈の内圧と血流ずり応力に対する血管反応に相違があることを反映したものであり、脳血流の自動調節に拍動性が必要であることを示唆している。

13. 平衡線図解析による閉ループ条件下動脈圧反射ゲインの推定

川田 徹, 柳谷雄介, 杉町 勝, 砂川賢二 (国立循環器病センター研究所循環動態機能部)

【目的】循環器疾患における血圧調節能を評価し病態を理解する上で、動脈圧反射ゲイン (G) の推定は必須である。しかしながら、ヒトでは動脈圧受容器を体循環から分離して閉ループ下にGを推定することは不可能であり、閉ループ下にGを推定する方法が必要となる。【理論的背景】動脈圧反射を圧入力から交感神経活動までの中枢弓と、交感神経活動から体血圧までの末梢弓に分けて記述し、同じ平面上にプロットすると、血圧動作点は2つの弓の交点で決まる。この平衡線図解析を用いると、Gは動作点における各弓の傾きの積に一致する。【方法】麻酔下の迷走神経切除家兎8羽において、中枢弓と末梢弓の入出力関係を独立に変化させる外乱 (頸部吸引と下半身陰圧負荷の模擬) を加えて、各弓の動作点付近での傾きからGを計算した。次に、動脈圧受容器を分離して、圧入力に対する体血圧変化から直接的にGを推定した。【結果】平衡線図を用いて閉ループ下に求めたGと、動脈圧受容器を分離して閉ループ下に求めたGは良く一致した ($y = 1.06x - 0.09$, $r^2 = 0.96$, $SEE = 0.15$)。【結論】動脈圧反射の中枢弓と末梢弓を独立に変化させる外乱を用いれば、動脈圧反射が閉ループ状態でも、平衡線図解析でGを推定できる。

14. 刺激間隔における1/fⁿゆらぎのミスマッチフィールド (MMF) およびN100m成分に及ぼす影響

原田暢善*, 増田 正***, 遠藤博史***, 中村亨弥*, 外池光雄*, 守谷哲郎*, 武田常広**** (*産業技術総合研究所, **科学技術振興事業団戦略的基礎研究推進事業, ***東京大学東京大学大学院新領域創成科学研究科)

生体にとって健康で快適な環境とは、極度に単調もしくは極度に複雑な環境ではなく、環境の中に適度の攪乱 (複雑さ) をともなった環境であると考えられる。環境の中の

様々な複雑さが生体に対しどのような影響を与えるのかについて、脳磁図計をもちいて検討を行った。

聴覚刺激間隔を、全くランダムな状態から段階的に規則性を増加させた時、すなわち、刺激間隔を $1/f^0$ ゆらぎ、 $1/f^1$ ゆらぎ、 $1/f^2$ ゆらぎ、 $1/f^3$ ゆらぎ（一定間隔）で変動させたとき、聴覚刺激により引き起こされる、N100m成分およびミスマッチフィールドに対する刺激間隔の影響について検討を行った。

聴覚刺激間隔が $1/f^0$ ゆらぎから $1/f^1$ ゆらぎに変化する際に、N100m成分の強度は減少し、ミスマッチフィールドは増加することが明らかになった。

以上のことから、環境の中の規則性の増加は聴覚誘発脳磁図反応において、N100m成分の強度の減少、ミスマッチフィールドの強度の増加を引き起こすことが明らかになった。またその変化は、変動の中にわずかに規則性が発生する、ゆらぎの $1/f^0$ と $1/f^1$ の間で引き起こされることが明らかになった。

15. ヒト好中球に対する G-CSF, GM-CSF 及び cAMP の抗アポトーシス作用：蛋白合成依存性及び非依存性機序

阪本親彦, 鈴木賢一, 長谷川太郎, 羽藤文彦, 日野雅之, 巽典之, 北川誠一 (大阪市立大学大学院医学研究科細胞情報学・血液病態診断学)

【目的】 cycloheximide (CHX) と actinomycin D (AD) を用いて、ヒト好中球に対する G-CSF, GM-CSF 及び cAMP の抗アポトーシス作用の相違を解析した。

【方法】 好中球のアポトーシスは生細胞数の算定と DNA の断片化で解析した。

【結果と考察】 ヒト好中球を *in vitro* で培養すると自然にアポトーシスを起こした。好中球の自然なアポトーシスは培養3時間後には認められ、CHX 及び AD により著しく促進された。CHX 及び AD により G-CSF の抗アポトーシス作用は完全に抑制されたが、GM-CSF の作用は完全には抑制されず、cAMP の作用は僅かな抑制であった。一方、TNF のアポトーシス誘導作用は CHX または AD により促進された。TNF + CHX によるアポトーシスの誘導を GM-CSF と cAMP は部分的に抑制したが、G-CSF は抑制作用を示さなかった。これらの結果は、G-CSF の抗アポトーシス作用は完全に蛋白合成に依存し、蛋白合成は転写レベルで制御されていることを示している。一方、GM-CSF と cAMP は蛋白合成依存性と非依存性の機序を介して抗アポトーシス作用を示すと考えられた。

16. ウロキナーゼ遺伝子欠損マウスの肺由来樹立化細胞における線溶活性

上嶋 繁, 深尾偉晴, 岡田清孝, 松尾 理 (近畿大学医学部第2生理学教室)

最近、血液線溶系に関わる各種因子が血管内での血栓溶解に作用するだけではなく、血管外での種々の生理学的・病態生理学的な現象にも重要な役割を演じていることが報告されている。線溶系はウロキナーゼまたは tissue-type plasminogen activator (t-PA) によるプラスミノゲンのプラスミンへの活性化により開始される。炎症などのストレス負荷がかからない時、ウロキナーゼ遺伝子欠損マウスにおいて肺でのフィブリン沈着は認められなかった。ウロキナーゼ遺伝子欠損マウスの肺における線溶活性を明らかにするために、野生型マウスとウロキナーゼ遺伝子欠損マウスの肺から継代培養が可能な細胞を樹立化した。培養細胞の培養液、細胞表面分画、細胞溶解分画を調整し、それぞれの分画に含まれるプラスミノゲンアクチベーター (PA) 活性を fibrin enzymography にて検討した。その結果、培養液、細胞表面分画および細胞溶解分画中の t-PA 活性は、野生型マウスの肺由来細胞よりもウロキナーゼ遺伝子欠損マウスの肺由来細胞の方が高値を示していた。代償的に亢進した t-PA 活性により非ストレス時においてもフィブリン沈着が生じないことが、示唆された。

17. P2 受容体刺激によるアクチン再重合

柴田 大, 尾松万里子, 磯野高敬*, 松浦 博 (滋賀医科大学・第二生理, *実験実習機器センター)

多くの細胞において細胞内 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 遊離を惹起する最も主要なメッセンジャーは G タンパク連関型受容体などの刺激で産生されたイノシトール 1, 4, 5-三リン酸 (IP_3) である。 IP_3 によって引き起こされる Ca^{2+} 放出はストアを枯渇させ、それに伴い容量性 Ca^{2+} 流入機構が活性化されることが知られている。この機構は、非興奮性細胞における主たる細胞外からの Ca^{2+} 動員経路であり、我々は、ラット褐色脂肪細胞において、細胞外 ATP がこの容量性 Ca^{2+} 流入を抑制することを見出した。

今回、ラット褐色脂肪細胞において、G タンパク共役型 ATP 受容体である P2 受容体ファミリーのうち、 $P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_{11}$, $P2Y_{12}$ が発現していることを RT-PCR 法により確認した。また、細胞外 ATP による Ca^{2+} 流入阻害と細胞骨格の関連を調べるため、F-アクチンを Alexa 488-ファロイジンによって蛍光ラベルし、共焦点レーザー顕微鏡による観察を行なったところ、P2 受容体刺激によりアクチンが細胞膜近傍に厚く再重合することがわかった。この P2 受容体を介するアクチンの再重合作用について、その細胞内情報伝達機構および容量性 Ca^{2+} 流入阻害との関係について検討する。

18. Essential role of cytosolic Cl^- in an amiloride-sensitive, Ca^{2+} -activated nonselective cation (NSC) channel in fetal rat pneumocyte

Yoshinori Marunaka and Naomi Niisato (Dept. of Cell. Mol. Physiol., Kyoto Pref. Univ. of Med., Kyoto, Japan)

We studied whether Ca^{2+} has an essential role in the beta agonist stimulation of the NSC channel in fetal rat pneumocyte contributing to Na^+ transport. In cell-attached patches, a beta agonist increased the channel's open probability (P_o) to 0.62 from 0.03. Removal of extracellular Ca^{2+} diminished the P_o of the stimulated channel. In stimulated cells with and without extracellular Ca^{2+} , $[\text{Ca}^{2+}]_e$ was respectively 100 and 20 nM, while $[\text{Cl}^-]_e$ was respectively 20 and 40mM. The diminution of $[\text{Ca}^{2+}]_e$ to 20 from 100nM itself had no significant effects on the P_o at 20mM $[\text{Cl}^-]_e$, while the P_o at 20nM $[\text{Ca}^{2+}]_e$ with 40mM $[\text{Cl}^-]_e$ was significantly lower than that at 100nM $[\text{Ca}^{2+}]_e$ with 20mM $[\text{Cl}^-]_e$, suggesting that the extracellular Ca^{2+} plays an important role in the beta agonist stimulation of the channel via reduction of $[\text{Cl}^-]_e$. Supported by the Salt Science Research Foundation (0143) and the Ministry of Education, Science, Culture and Technology of Japan (13670046).

19. cAMP activation of apical Cl^- channel and $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter via a PTK-dependent pathway in renal epithelial A6 cell

Naomi Niisato and Yoshinori Marunaka (Dept. of Cell. Mol. Physiol., Kyoto Pref. Univ. of Med., Kyoto, Japan)

Forskolin increased the transepithelial Cl^- transport by activating the apical Cl^- channel and basolateral $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter in renal epithelial A6 cells via an increase in cytosolic cAMP concentration. The cAMP-activation of apical Cl^- channel and $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter was partially mediated through a PKA-dependent pathway. Therefore, we assessed a possible role of PTK-dependent pathway as a PKA-independent pathway in the cAMP-activation by applying a PTK inhibitor, tyrphostin A23. Tyrphostin A23 abolished the forskolin-induced transepithelial Cl^- transport by partially reducing the activity of the Cl^- channel and completely inhibiting the $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter. Further, forskolin increased tyrosine phosphorylation, suggesting that cAMP activates PTK. These observations suggest that cAMP stimulates the Cl^- channel and the $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter by activating PTK. Supported by the Ministry of Education, Science, Culture and Technology (13670046) and the Salt Science Research Foundation (0143).