

## 第41回日本生理学会東北生理談話会

会 期：平成20年10月18日（土）

場 所：弘前大学医学部コミュニケーションセンター

当番幹事：弘前大学大学院医学研究科統合機能生理学講座 蔵田 潔

参加者：36名

東北生理談話会はこれまで金曜午後から土曜午前にかけての開催を慣例としていたが、本年度は土曜日全日の開催とした。また、細分化されつつある専門分野以外の領域でも、徹底した議論を進めることにより互いの理解を得るという「談話会」設立時の精神に立ち返り、厳密な口演発表時間の制限はせず、座長に進行を一任した。その結果、近年になく非常に活発な質疑応答が行われ、予定された時間を大幅に超えたことは極めて意義深いものと思われた。当日は、日本生理学会副会長の小西真人先生（東京医科大学）がお見えになり、東北地区代表の丸山芳夫先生（東北大学）とともに、来年京都で開催される国際生理学会 IUPS2009 への学会員の協力を促すアナウンスをされた。さらに、2010年に盛岡で開催される日本生理学会大会に関するアナウンスが、主催される岩手医科大学医学部生理学講座の佐々木和彦先生から行われたが、これらの機会に東北地区の生理学の一層の活性化を期待したい。来年度の当番幹事は岩手医科大学医学部生理学講座器管制御生理学分野が担当する事となった。

### 1. 化学刺激によって誘発される膀胱上皮細胞からの ATP 放出

○松本-宮井和政<sup>1</sup>、百田芳春<sup>2</sup>、河谷正仁<sup>1</sup>（<sup>1</sup>秋田大医機能制御医学、<sup>2</sup>同 保健学科）

膀胱上皮細胞は尿からのバリアー機能を担うのみならず、種々のシグナル因子やその受容体の発現によって膀胱機能の調節や感覚の伝達にも寄与している。中でも、アデノシン3リン酸(ATP)は、膀胱伸展などの機械刺激によって膀胱上皮細胞から分泌され、痛覚伝達や排尿機能の調節に関わると考えられる。そこで本研究では、カプサイシン、アセチルコリン、そしてプロスタグランジン受容体EP1作動薬(ONO-DI-004)の投与が膀胱上皮細胞からのATP放出に与える影響を検討した。いずれの薬剤も添加後30—60分をピークに膀胱上皮細胞初代培養液中のATP量を同程度に増加させた。これらの有意な増加はecto-ATPase阻害剤の投与により更に増強されたことから、全ての薬剤はATPの分解を阻害しているのではなく、その放出を誘発していることが示された。興味深いことに、培養液中に終濃度1mMのCaCl<sub>2</sub>を添加して更に分化を誘導した膀胱上皮細胞では、どの薬剤によってもATP放出は誘発されなかった。これらの結果は、膀胱上皮細胞ではこれら薬剤の受容体の下流に共通のATP放出機構が存在していること、またその機構は分化状態や層特異的である可

能性を示唆している。

### 2. interferon- $\gamma$ (IFN) によるヒト近位尿管細胞 K<sup>+</sup>チャネル活性上昇の作用機序検討

○中村一芳、駒切 洋、古城俊之、久保川 学（岩手大医器管制御生理学）

ヒト正常腎由来の近位尿管培養細胞に存在する内向き整流性K<sup>+</sup>チャネル(Gi 40pS)は膜電位形成に寄与している。炎症性サイトカインの一つであるIFNはこのK<sup>+</sup>チャネル活性に対して急性の促進作用をあらわす。今回我々はその細胞内機序についてパッチクランプ法とNO imagingを用いて検討した。cell-attached patchにおけるIFN(20 ng/ml)のチャネル活性上昇作用はJAK阻害剤のP6(1  $\mu$ M)によりブロックされた。従って、IFN受容体/JAK複合体の関与が示唆された。また、MEK阻害剤のU0126(20  $\mu$ M)もIFNの作用をブロックした。一方、PKA、PKG、PI3Kに対する阻害剤はIFNの作用に影響しなかった。IFNは長期的効果としてNO合成酵素(NOS)の発現を誘導し、またNOはチャネル活性を上昇させる。しかし、IFNによる急性のNO産生増加はNO imagingにて認められず、さらにNOS阻害剤はIFNによるチャネル活性化に影響しなかった。以上からK<sup>+</sup>チャネル活性に対するIFNの急性促進作用はIFN受容体を介しており、その下流にはMEKが関与していることが示唆された。

### 3. ドーパミンにより引き起こされる Na<sup>+</sup>電流応答に対する低分子量 G 蛋白 Rho の受容体リサイクリングを介した調節

○落合 仁<sup>1</sup>, 川崎 敏<sup>1</sup>, 木村真吾<sup>1</sup>, 藤田玲子<sup>2</sup>, 佐々木和彦<sup>1</sup> (<sup>1</sup>岩手医大生理学講座神経筋感覚器生理学分野, <sup>2</sup>同 共通教育センター化学)

*Aplysia* 腹部神経節には, ドーパミン (DA) 投与により, コレラ毒素感受性 G 蛋白を介して緩徐な Na<sup>+</sup>電流応答を発生する細胞がある. 我々はこれまでにこの DA 応答が Rho と脂質分解酵素の phospholipase D (PLD) の活性化により促進的に調節されている事を報告した. この応答は, カベオラが介在する endocytosis の阻害剤である methyl-β-cyclodextrin や filipin の細胞外投与により増大した. また, エンドソーム間の膜輸送を阻害する monensin の投与や, 形質膜への小胞融合に関わる SNARE 蛋白 SNAP-25 の C 末端ペプチドの細胞内投与により顕著に抑制された. さらに monensin や SNAP-25 C 末端ペプチドを前投与した後では, RhoGEF 投与による Rho の活性化を介した DA 応答の増大は起こらなくなった. これらの結果から Rho と PLD は DA 受容体のリサイクリングを介して DA 応答を促進的に調節する事が示唆された.

### 4. 電位依存性カルシウムチャンネル β3 サブユニット過剰発現による交感神経系の変化

○村上 学, 大場貴喜, 尾野恭一 (秋田大学医学部機能制御医学講座細胞制御学分野)

N 型カルシウムチャンネルは交感神経終末におけるカルシウム流入経路であり, CaV2.2 と β3 サブユニットが主要な構成成分である. そこで β3 過剰発現マウスを作製し, マウス個体, 組織, および細胞レベルの各段階において, 交感神経系への影響を調べた. β3 過剰発現により上顎神経節における N 型チャンネル数の増加が認められた. β3 過剰発現マウスは血漿カテコールアミン値が上昇しており, 心拍数も増加していた. さらに直接血圧, 心超音波, ラングENDORF 心による心拍出量を測定したところ, 各項目において N 型カルシウム阻害薬に対する反応性の増強が認められた. 上顎神経節の神経細胞を電気生理学的に検討したところ, カルシウムチャンネル電流量の増加, 特に N 型と L 型チャンネル成分の増加が認められた. 本研究により, β3 サブユニットが交感神経における N 型カルシウムチャンネル数を決定する重要な因子であることが確定された.

### 5. 点変異導入を用いたチャンネルロドプシン-2 の構造-機能解析

○杉山友香<sup>1,3</sup>, 王紅 霞<sup>2,3</sup>, 引間卓弥<sup>2,3</sup>, 石塚 徹<sup>2</sup>,

八尾 寛<sup>1,2,3</sup> (<sup>1</sup>東北大院医神経細胞制御, <sup>2</sup>東北大院生命・脳機能解析, <sup>3</sup>東北大院脳科学 GCOE)

微生物ロドプシンの一種である, チャンネルロドプシン-2 (ChR2) は 470nm 光により開く非選択的陽イオンチャンネルである. イオンチャンネルとしての機能は ChR 特徴的なアミノ酸配列を示す, N 側領域に存在していると推測される. 特に TM2-3 領域に存在する 5 つのグルタミン酸残基は ChR ファミリーで保存されており, これら極性アミノ酸残基がイオン透過性に関わることが予測される.

今回, これらの極性グルタミン酸残基それぞれを非極性アミノ酸であるアラニンに置換した, 計 5 つの変異体の光電流応答を解析し, ChR2 のイオンチャンネル機能への関与を調べた. 光電流解析の指標として, ①電流振幅, ②電流の不活性化, ③ ON 速度定数, ④ OFF 速度定数を用い, 膜発現量やイオン選択性と合わせて解析を行った.

Glu97Ala 変異体では, チャンネルコンダクタンスの低下が見られたことから, このグルタミン酸残基が ChR2 のイオン透過性に関与していることが示唆された. また, この変異体では波長依存性がわずかにシフトしていたことから, Glu97 が ChR2 のコアに存在するレチナル発色団と相互作用している可能性も示された.

### 6. K<sup>+</sup>-Rb<sup>+</sup>共イオン条件下での非対称性 Rb<sup>+</sup>電流コンダクタンス

大佐賀 敦<sup>1</sup>, 村田喜理<sup>2</sup>, 平 理一郎<sup>2</sup>, 丸山芳夫<sup>2</sup> (<sup>1</sup>秋田大病院医療情報, <sup>2</sup>東北大院医細胞生理)

K 選択性イオンチャンネルは一個以上のイオンを一列に受け入れ, 飽和現象を示す. K 類似イオンである Rb は, K 選択性チャンネルを通過すると同時に通過阻害をも引き起こすとの二重性を持ち, チャンネルの機能的構造を推定するための探針として用いられてきた. K と Rb 共存環境下, 顎下腺からの MaxiK チャンネル単一チャンネル電流振幅を計測し, その電流・電圧関係から, Rb のチャンネル通過特性を, イオン流の方向性において検討した. バッチクランプ下, 細胞膜の一方に K イオンのみを配置し, 対側に K と Rb 共イオンを, 総イオン濃度を一定として配置した. 十分な電圧域にわたって電流振幅を計測し, 電流・電圧関係を得た. Rb がチャンネルに入る方向に陽電圧を加えた時のコンダクタンス (K と Rb の共イオンコンダクタンス) を Rb 濃度に対してプロットすると, Rb 濃度増加に伴い, 特異なコンダクタンス減少曲線が得られた. 減少率は, Rb を細胞外にした場合, 細胞内と比べ 3—4 倍高かった (減少率は単一イオン速度論近似から評価した). Rb の流入方向性による Rb 非対称性コンダクタンスは, チャンネルの Rb 結合能が非対称であり細胞外方向へ偏っていることとして説明できる.

## 7. 人工海水足浴の生体へ及ぼす効果の電気生理学的解析

○梅木 創, 松浦哲也, 一ノ瀬充行 (岩手大院工福祉システム)

足浴は疲労回復やリラクゼーションのために利用されるが, 基礎医学的な有効性や効能の検証が必要とされる。海水を利用した海洋療法 (タラソセラピー) は, 疾病予防, 健康の維持増進に役立つようとする自然療法である。本研究は, 塩水による足浴の生体へ及ぼす効果を客観的に評価するために脳波, 呼吸頻度, 心拍, 血流量を計測・解析した。被験者は健康な4人の大学生である。被験者には白湯 (対照), 食塩入り (3%, 海水の10分の1程度) の2条件で足浴をしてもらった。脳波電極は, 国際脳波学会による標準10-20電極配置法に基づき, 被験者の頭皮上に25個の皿型電極を装着した。脳波は安静状態で5分, 足浴開始後20分の計25分間を記録した。δ波帯域の振幅増加やPSD傾きの増加より, 足浴の傾眠作用が認められた。頰での血流量は, 4人のうち3人の被験者で増加し, 血管拡張が示唆された。また, 足浴開始15分過ぎから全ての被験者で心拍ゆらぎのLF/HF成分の増加, HF成分の減少が見られた。これより, 熱刺激による交感神経活動の促進が示唆される。白湯の足浴と比べて塩浴では, δ波あるいはα波より大きな増加, LF/HF成分増加の抑制が見られた。以上より, 足浴の傾眠促進やリラックス効果が塩水においてより高められることが示唆された。

## 8. 生直後から成熟段階までの過程におけるマウス心拍数および内因性心拍数の生後発達の特徴

○佐藤伸一, 尾野恭一 (秋田大学医学部機能制御医学講座細胞制御学分野)

非侵襲的にマウス心拍数を計測することができるピエゾ方式心拍・呼吸モニターを使用し, 生直後から成熟段階までの過程におけるマウス心拍数および自律神経系の影響を除去した内因性心拍数の変化を記録した。マウス心拍数は生後3日間で急激に上昇し約2週間で成熟マウスと同等の心拍数に達した (Sato, 2008)。しかしながら, 内因性心拍数は生後5日目まではほぼ一定で生後6日から8日の短期間に急激に上昇した。即ち, 生直後から5日目までの心拍数増加は主として交感神経系の刺激作用によると考えられ, 洞房結節細胞自身の興奮性変化は5日目以後に起こることが示唆された。この時期に自動能に関与するイオンチャネルの発現変化が生じていると推察される。一方, 2時間を超える連続心拍数記録を行ったところ, 成熟マウスにおいては心拍数は睡眠中にときおり内因性心拍数 (~450b/m) よりさらに減少 (~400b/m) した。長時間記録時の心拍数低

下は生後5日が最も小さくその後年齢依存的に増加した。この所見は, 侵襲刺激に対する防衛反応の解析から導き出される副交感神経系の発達の時間経過と合致しており, 副交感神経系の生後発達を反映していると推測された。

## 9. 介在ニューロン付随性オリゴデンドロサイトの形態と機能

○山崎良彦<sup>1</sup>, 八月朔日泰和<sup>2</sup>, 金子健也<sup>1</sup>, 藤井 聡<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>山形大医神経機能統御学, <sup>2</sup>同 組織細胞生物学)

近年, グリア細胞の脳機能への積極的な関与が多数報告され, 神経系における情報処理機構の解明には, グリア細胞を含めて神経回路網を検討することが必須となっている。われわれは, ニューロンとグリア細胞の相互作用を直接的に調べるために, 海馬CA1放線層の介在ニューロンに付随するグリア細胞に着目した。これまでに, このグリア細胞にはアストロサイト (perineuronal astrocyte: PNAC) とオリゴデンドロサイト (perineuronal oligodendrocyte: PNOG) がほぼ同数あり, 形態学および電気生理学的に分類できることを報告した。そして, PNACへの脱分極刺激により, 介在ニューロンでの興奮性シナプス後電流や活動電位の発生に対し修飾効果が生じることがわかった。本研究では, PNOGによる神経活動への関与について検討した。脱分極刺激では介在ニューロンの発火に影響を与えなかったが, 発火頻度が高い状態でPNOGを逆に過分極させると, 発火頻度の減少がみられた。そこで, PNOGを過分極させるような条件を調べたところ, 代謝型グルタミン酸受容体およびアデノシン受容体を介した機序によって過分極性の反応を示すことがわかった。以上のことから, PNOGは神経活動に反応し, 介在ニューロンの発火を抑制的に修飾する可能性が示唆された。

## 10. 視床下部における筋緊張調節系について

○高橋和巳<sup>1</sup>, 小山純正<sup>2</sup>, 阿部由佳<sup>2</sup>, 佐久間彩央<sup>2</sup>, 香山雪彦<sup>1</sup> (<sup>1</sup>福島県医大医神経生理, <sup>2</sup>福島大共生システム理工)

視床下部は種々の恒常性維持, 自律神経機能の中核であると同時に, 運動時の筋緊張調節においても重要な役割を果たしている。我々は近年, 視床下部に発見されたオレキシンニューロン群が, 黒質網様部 (SNr) を介して中脳, 橋被蓋の筋緊張調節系に影響を及ぼすことで, 筋緊張調節に関与していることを示した。オレキシン系が欠損している動物では, 情動刺激によって全身の脱力発作が生じることが知られている。本研究では, 視床下部の筋緊張調節機構を明らかにするため, 麻酔下のラットにおいて, 脳波, 血圧とともに両側後肢の筋電図を記録しながら視床下部の各

所を電気刺激し、筋トヌスへの効果を観察した。その結果、不確帯 (ZI) を含む視床下部の背側部では歩行様のリズムカルな、もしくは相動的な筋電活動が誘発されたのに対し、その腹側では持続的な筋緊張が誘発された。筋緊張が最も強く誘発される部位は、脳波覚醒や血圧変化の誘発部位とは異なっていた。これらの結果は、これまでに示されたオレキシン系による筋緊張調節の機構を示唆すると同時に、視床下部に関わる種々の自律系機能は、近接する別々のニューロン群によって担われていることを示唆している。

### 11. 空間学習における海馬と視床前核群の機能的連携

○岡田佳奈<sup>1,3</sup>、岡市廣成<sup>2</sup>、小林和人<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>福島県立医大医学生体機能、<sup>2</sup>同志社大文・心理、<sup>3</sup>CREST・JST。)

海馬が空間記憶に関係することは多くの研究で報告されている。一方、視床前核群もまた空間記憶に関係する。海馬と視床前核群にはこのような機能上の類似性が示唆されることに加え、解剖上の連絡があることも知られている。海馬と視床前核群はともに Papez 回路を構成する部位であり、脳弓や乳頭体視床路、内包、帯状束を介した投射を持つ。なかでも脳弓は、海馬から視床前核群に至る最も顕著な遠心性線維の束である。従って、海馬と視床前核群が機能的に連携するならば、その連携が脳弓を経由する可能性は非常に高い。本研究では、海馬と視床前核群が、海馬採一脳弓を経由した機能的連携によって空間記憶に関与するかどうかを検証した。海馬採一脳弓と視床前核群を対側損傷した群 (Contra) と同側損傷した群 (Ipsi) の遂行を、物体探索課題と Morris 型水迷路課題にて比較した。海馬から海馬採一脳弓を介して視床前核群に至る投射は同側性であり、もし海馬と視床前核群が海馬採一脳弓を経由して同一の記憶システムに関与するならば、Contra 群は Ipsi 群に比して課題遂行が劣る筈である。結果、海馬と視床前核群が海馬採一脳弓を経由した機能的連携によって空間記憶に関与することが示された。

### 12. 蛍光法によるグルコース輸送研究の新たな展開

○山田勝也<sup>1</sup>、山本敏弘<sup>2</sup>、渡邊誠二<sup>3</sup>、菅 世子子<sup>4</sup> ( <sup>1</sup>弘前大院医統合機能生理、<sup>2</sup>(株)ペプチド研究所・彩都研究所、<sup>3</sup>弘前大院医学生体構造医科学、<sup>4</sup>弘前大生涯学習教

育)

脳はグルコースを唯一のエネルギー源として機能すると言われるが、グルコースの脳細胞への取り込み過程については不明の点が多く、長年の論議がある。大きな要因に、脳の複雑な細胞構築、ならびに従来のグルコース輸送研究に用いられてきた放射性標識グルコースの空間的・時間的分解能の限界が挙げられる。我々は以前、蛍光分子で標識したグルコース誘導体 2-NBDG が、グルコースに似たキネティクスで単一哺乳動物細胞に取り込まれることを報告し、蛍光法により個々の単一哺乳動物細胞のグルコース取り込みの様子が可視化される可能性を示した (Yamada, et. al., *J. Biol. Chem.* 2000)。しかし実際に 2-NBDG が多くの組織に利用され、また脳のエネルギー利用についての新たな説をもたらすようになると、解決すべき基本的な問題点が改めて浮き彫りになってきた (Yamada, et. al., *Nature Protocols* 2007)。これらの問題を議論すると共に、2-NBDG の高純度化を初めとする、問題点の克服を目指した新しい試みについて報告する。

### 13. 脳磁図計によるヒト脳の視覚運動変換機構の解析

○蔵田 潔、相澤 寛 (弘前大院医統合機能生理)

視覚目標への到達運動時に、脳内では目標点の視覚座標系への認知が行われた後、その視覚空間情報をもとに運動座標系への変換が行われているものと考えられる。このとき、大脳皮質では後頭葉の視覚皮質から空間認知の処理系である視覚情報の背側経路 (dorsal pathway) を経て頭頂皮質が前者に、そして頭頂皮質から入力を受けている前頭皮質の運動関連領域が後者に、それぞれ重要な役割を果たすことが示唆されている。ヒトの脳において動的変換がこのような経路を経ているか、また、どのようにして起こっているかは明らかではない。これらを調べることを目的として、到達運動課題遂行中のヒトの脳活動を 206 チャンネル脳磁図計 (Magnetoencephalogram, MEG) を用いて計測し、各チャンネルからのデータを解析した。信号の伝達経路や双極子の時間的移動を検出した結果、ほぼ上記の仮説に相当する結果が得られた。さらに、各チャンネルにおける信号のうちの特異的周波数帯がこの情報処理に関与することが示唆されたので、それらを報告する。