

第 102 回近畿生理学談話会

日 時：平成 21 年 12 月 13 日（日）
場 所：大阪大学 豊中キャンパス基礎工学部 B 棟 103 講義室（発表会場）、
105 講義室（評議委員会会場）
当番幹事：大阪大学大学院生命機能研究科生理学教室 倉橋 隆
参加人数：64 名
演 題 数：26 題

第 102 回近畿生理学談話会は、大阪大学豊中キャンパスにて開催された。終日を通して、口演会場にて合計 26 題の口演とともに活発な討議が行われた。演題、座長とも若手中心にやって頂き、活気ある有意義な談話会になった。評議委員会では、第 103 回近畿生理学談話会当番幹事である、大阪大学岡村教授からのご挨拶や、2010 年生理学会（盛岡大会）についての連絡事項、生理学会奨励賞規定の改変、2009 年 IUPS に関する報告などの議題が話し合われた。次期開催は大阪大学大学院医学系研究科（吹田キャンパス）で開催予定である。

第 I セッション

1. 嗅覚マスキングと匂い物質による電位依存性 K チャネルの抑制

吉田太一、竹内裕子、倉橋 隆（大阪大学大学院生命機能研究科生理学研究室）

匂い物質は嗅粘膜中の嗅細胞を興奮させ匂い知覚を引き起こすと同時に、嗅覚順応（単一の匂いに対する匂い知覚の変化）や嗅覚マスキング（複数の匂いを嗅いだときの匂い知覚の変化）を引き起こすことが知られている。近年、匂い物質による CNG チャネルの抑制と嗅覚マスキングが正の相関を示すことが分かり、匂い物質による CNG チャネルの抑制が嗅覚マスキングのメカニズムだと考えられている。また、匂い物質は様々な電位依存性イオンチャネルを抑制することが分かっている。本研究は 26 種類の匂い物質によるイモリ嗅細胞に発現する電位依存性 K チャネルの抑制を定量的に測定した。26 種類中、18 種類の匂い物質は 0.1% 濃度において電位依存性 K チャネル電流を有意に減少させた。匂い物質は、電位依存性 K チャネル電流の不活性化速度を増加させた。しかしながら、不活性化曲線に変化は見られなかった。電位依存性 K チャネル電流の抑制は、CNG チャネルの抑制と正の相関を示した。このことから、匂い物質による抑制のメカニズムは、電位依存性 K チャネルと CNG チャネルで共通していると考えられる。

2. 塩酸コカインによる嗅細胞 Na⁺電流の抑制作用と安全性検討

玉利健悟¹、竹内裕子²、小林正佳³、倉橋 隆²、山本哲朗¹（¹三重大・院医・システム神経、²大阪大・院生命機能・生理学、³三重大・院医・耳鼻咽喉・頭頸部外科）

近年、嗅覚研究の成果が様々な用途で社会還元されており、臨床的にも患者の QOL 改善等に利用される可能性が高まっている。しかし、ヒト嗅覚関連細胞の活動性を直接記録した報告はない。耳鼻科での鼻内手術麻酔下の患者から組織提供を受ける可能性が考えられるが、局所麻酔薬として使用される高濃度塩酸コカインが嗅細胞に対する悪影響が危惧される。そこで、本研究ではまずイモリ嗅細胞を用いて塩酸コカインの安全性を検討した。嗅上皮を 0.1% コラゲナーゼで処理し嗅細胞を単離した。単離細胞をコンカナバリン A でコートした培養皿に乗せ倒立顕微鏡下で同定後、whole cell 記録法により電位依存性膜電流を測定した。塩酸コカインを灌流すると主に Na チャネルを流れる一過性内向き電流と K チャネルを流れる外向き電流が共に抑制された。電位依存性 Na⁺電流を薬理的に分離し、塩酸コカインによる Dose suppression 曲線をプロットした結果は Hill 式で近似され、Half-blocking concentration (IC₅₀)は 43μM、Hill 係数は 1.03 であり、塩酸コカインは嗅細胞電位依存性チャネルに対し強力な抑制剤として働くことが明らかとなった。しかし、チャネル活動は 10mM という高濃度塩酸コカインへの暴露後でも洗浄によって直ちに完全に回復した。すなわち、ヒト鼻内手術での塩酸コカイン局所麻酔効果は劇的ではあるが、細胞には可逆的作用であると確信でき、摘出組織が生理学的実験に使用できるものと解釈された。同時にヒト単離細胞からの記録に成功し、

細胞同定や電流解析を行っているので、それらのデータも合わせて報告する。

3. 嗅繊毛内におけるセカンドメッセンジャーの拡散制限：電流解析と可視化

竹内裕子，倉橋 隆（大阪大学大学院生命機能研究科生理学研究室）

嗅覚は、匂い分子が嗅繊毛上の受容体と結合することから始まる。その後情報は繊毛内でG蛋白，アデニル酸シクラーゼと伝わり，セカンドメッセンジャーとしてのcAMPが産生し，サイクリックヌクレオチド感受性(CNG)陽チャネルの開口によってチャージ流入が起こる。更にCNGチャネルを通して流入するCa²⁺は近傍の興奮性Cl (Cl_(Ca))チャネルを活性化し，脱分極性電流を増幅する。嗅覚の情報変換を決定する上で，嗅繊毛内の情報伝達を仲介する低分子(cAMP・Ca²⁺)の時間的・空間的な動態は重要なパラメータである。しかし，嗅覚繊毛直径が100nmしかないという技術的困難さから，いずれの分子動態も不明瞭である。両分子は水中で1秒以内に繊毛の長さを超えて1次元拡散を起こすはずであるが，嗅覚応答にはこれでは説明できない現象が多く，セカンドメッセンジャーが拡散制限を起こしている可能性がある。この疑問点を明らかにするため，1本の生体繊毛内での2点を局所的にレーザー光で刺激し，ケージドcAMPの光解離による2点の膜電流応答を測定した。細胞内因子が拡散すれば2点目の応答は非線形に加算するかCaにより順応するはずだが，数μm離れた部位では応答は独立様式であった。このことは細胞内因子cAMP・Ca²⁺が共に拡散制限されている可能性を示唆する。更に，局所cAMPジャンプ時におけるCa²⁺濃度変化と拡散動態をCa²⁺測光法を用いて解析した。

4. 内向き整流性K⁺チャネルKir4.1と薬物相互作用の双方向性解析

○古谷和春^{1,2}，大野行弘^{1,3}，稲野辺 厚^{1,2}，日比野浩^{1,2}，倉智嘉久^{1,2}（¹大阪大学大学院医学系研究科分子・細胞薬理学，²大阪大学臨床医工学融合研究教育センター，³大阪薬科大学薬品作用解析学）

イオンチャネル機能が薬物との相互作用により修飾される。この構造的理解は十分進んでいない。これまでに我々は，代表的な三環系抗うつ薬及び選択的セロトニン再取り込み阻害薬がグリア細胞に発現しK⁺緩衝作用を担う内向き整流性K⁺(Kir)チャネルKir4.1を阻害することを示してきたが，詳細な作用機序は不明であった。今回，電気生理学的手法と計算科学的手法を用い，チャネル側の薬物受容部位と薬物側の相互作用部位の両方の構造基盤を調べる

ことにより，薬物—チャネル相互作用を双方向性に解析した。我々の結果は，Kir4.1チャネルのcentral cavityに面しているThr128，Glu158が薬物との相互作用に直接関与することを示している。Kir4.1チャネルの薬物による阻害機構を構造的に理解することは，選択性の高い薬物の論理的デザインを可能にし，Kir4.1チャネルの生理機能及び病態への関与を解明するための有効なツールの開発に繋がる可能性がある。さらに，Kirチャネルの生理的制御機構の理解も進める可能性がある。

5. 電位依存性プロトンチャネル(mVSOP/Hv1)はS4-like segmentの半分を失っても機能する

坂田宗平¹，黒川竜紀¹，M. Nørholm²，高木正浩³，大河内善史¹，G. von Heijne²，岡村康司¹（¹阪大院・医学系研究科，²Department of Biochemistry and Biophysics, Stockholm University，³生理学研究所）

近年，我々が発見した電位依存性プロトンチャネル(mVSOP/Hv1)は電位センサー部分のみを持ち，ポアドメインがないにもかかわらず，プロトンチャネルとして機能する(Sasaki et al.)。電位依存性イオンチャネルにおいて，S4と呼ばれる4番目の膜貫通ヘリックスに存在するアルギニン残基が，その電位依存的な活性に重要であることが多くの研究により示唆されている。今回，我々はmVSOP/Hv1のS4部分に存在する3つのアルギニンのうち，N末端側から数えて2番目のアルギニンよりC末端側1残基を残して，それ以降をすべて欠いた場合でも，電位依存的なプロトンチャネルとして機能することを見出した。このことは，mVSOP/Hv1の電位依存性の有無は3番目のアルギニンのみで決まらないこと，そしてプロトンの透過性にはS4ヘリックスのC末端側は重要でないことを示唆している。

第IIセッション

1. FRET based voltage sensing

筒井秀和¹，唐澤智司²，宮脇敦史²，岡村康司¹（¹阪大・医・統合生理，²理研・脳・細胞機能）

細胞膜電位の信頼性の高い時空間測定法を確立することは，現代生理学の重要な課題である。私たちは，電位センサー蛋白質や，蛍光蛋白質に関する知見を動員し，膜電位の光学計測法の開発に取り組んでいます。今回，その試みについて紹介させていただきます。

2. In vivo イメージングによる骨格筋細胞内Ca²⁺動態の評価

曾野部 崇¹, 狩野 豊², 白井幹康¹ (1国立循環器病センター研究所心臓生理学部, 2電気通信大学生命情報工学講座)

骨格筋は細胞内 Ca^{2+} 濃度変化によって収縮・弛緩を制御しているが, 筋細胞内 Ca^{2+} 濃度のバランスが乱れると筋機能の低下, すなわち筋疲労や筋損傷を惹起すると考えられている。これまで細胞内 Ca^{2+} の研究には *in vitro* の標本を用いることが多かったが, 本研究では, *in vivo* の顕微鏡観察が可能な薄膜状骨格筋である脊柱僧帽筋に蛍光 Ca^{2+} 指示薬を用いたバイオイメージングを適用し, 筋細胞内の Ca^{2+} 動態を検討した。

血流を維持した *in vivo* の脊柱僧帽筋組織において, 安静時細胞内 Ca^{2+} は低値を維持していた。一方で, 筋細胞の損傷を誘発する伸張性収縮を脊柱僧帽筋に負荷すると, 安静時と比べて大きな細胞内 Ca^{2+} の増加を示した。さらに, 伸張性収縮後の Ca^{2+} 増加経路を検討するため, 細胞の伸張にตอบสนองを示すストレッチ感受性イオンチャネル (SAC) に着目した。SAC 阻害薬を用いて Ca^{2+} 蓄積への SAC の関与を検討したところ, SAC 阻害薬は伸張性収縮後の Ca^{2+} 蓄積を有意に抑制することが明らかになった。これらの結果から, 伸張性収縮後には SAC を介した Ca^{2+} 蓄積が生じ, 筋機能の低下に関与している可能性が示された。

3. Roles of Mitochondrial NCX and Ca^{2+} uniporter on BCR-mediated Ca^{2+} responses in DT40 cell

B. Kim, S. Matsuoka (Center for Innovation in Immunoregulatory Technology and Therapeutics, Graduate School of Medicine, Kyoto University)

Roles of mitochondrial Na^{+}/Ca^{2+} exchange (NCX_m) and Ca^{2+} uniporter (CaU) on B cell receptor (BCR)-mediated Ca^{2+} responses have been unclear. To clarify the roles, we measured cytoplasmic Ca^{2+} (Ca^{2+}_c), mitochondrial Ca^{2+} (Ca^{2+}_m), and apoptosis using Fura-2, Rhod-2, and FITC-labeled Annexin V, respectively, in DT40 B lymphocytes. In control, BCR stimulation with anti-IgM antibody (M4, 3 or 5 μ g/ml) evoked an initial Ca^{2+}_c transient of \sim 680nM followed by a sustained oscillatory Ca^{2+}_c increase (\sim 226nM). Ca^{2+}_m increased during the M4-stimulation by \sim 40%. Twelve hours after the stimulation, annexin V positive apoptotic cells increased to \sim 32.8%. Ru360, an inhibitor of CaU, did not significantly affect the M4-induced Ca^{2+}_c increase and apoptosis. In contrast, the inhibition of NCX_m with CGP-37157, which significantly augmented the M4-induced Ca^{2+}_m increase by \sim 115%, significantly attenuated the oscillatory Ca^{2+}_c increase to \sim 95nM and decreased the popu-

lation of apoptotic cell to \sim 20%. However, thapsigargin induced store-operated Ca^{2+} entry was not significantly affected by CGP-37157. These results suggested that Ca^{2+} flux through NCX_m into cytoplasm is an essential factor to maintain the BCR-induced oscillatory Ca^{2+} increase and apoptosis in DT40 lymphocytes.

4. G-CSF は TLR アゴニスト刺激によって誘導されるヒト好中球からのサイトカインの産生を負に制御する

福菌駿介, 加藤隆幸, 藤田寿一, 渡邊哲史, 北川誠一 (大阪市立大学大学院医学研究科細胞情報学)

LPS (TLR4 アゴニスト) 及び Pam₃CSK₄ (TLR2 アゴニスト) は, ヒト好中球に作用してサイトカイン (IL-8 及び TNF- α) の産生を誘導した。この反応は ERK, p38 及び PI3K の活性化に依存しており, JNK の活性化には依存していなかった。LPS または Pam₃CSK₄ 刺激によって誘導されるサイトカインの産生は G-CSF により抑制された。一方, GM-CSF はこれらのサイトカインの産生を増強し, その増強作用は G-CSF によって抑制された。GM-CSF と異なり, G-CSF は STAT3 を強く活性化した。G-CSF による STAT3 のリン酸化とサイトカイン産生抑制作用は JAK2 阻害剤により阻害された。LPS または Pam₃CSK₄ 刺激による ERK, p38, JNK, Akt 及び I κ B α のリン酸化は G-CSF 及び GM-CSF による影響を受けなかった。これらの結果は, G-CSF と GM-CSF が TLR アゴニスト刺激によって誘導されるヒト好中球からのサイトカイン産生制御において互いに相反する作用を示し, また, G-CSF が STAT3 の活性化を介してサイトカインの産生を負に制御していることを示唆している。

5. イソプロテレノール誘導肥大心の左心室心筋スライスのカルシウムトランジェントの変化

服部宇孜, 竹下大輔, 張 国興, 小畑孝二, 松吉ひろ子, 三澤裕美, 高木 都 (奈良県立医科大学生理学第二講座)

背景: これまでの研究で, イソプロテレノール誘導肥大心 (IH) では, 筋小胞体の Ca^{2+} ポンプの機能障害が起こり, その結果細胞膜の $Na^{+}-Ca^{2+}$ 交換体の活性化が起こっている可能性を報告した。

目的: 本研究では, IH における Ca^{2+} ハンドリングの変化を, 機械的無負荷状態の心筋スライスを用いて明らかにする。

方法: 雄性ウイスターラットの頸部の皮下に浸透圧ミニポンプを植え込み, イソプロテレノール (2.4mg/kg/日, 3日間) または生理食塩水 (2.4 μ l/日, 3日間) を持続投与し

た。両群の左心室から、ミクロスライサーで300 μ mの厚さの心筋スライスを作成し、Fluo-3AMをロード後、1Hzの電気刺激によって起こるCa²⁺トランジェントを測定した。

結果：IIIの心筋スライスにおいては、蛍光強度比0.2におけるCa²⁺トランジェントの持続時間(D₂₀)が長くなると考えていた。しかし、逆に生理食塩水持続投与心の心筋スライスのD₂₀に比べて有意に短縮していた。一方、4倍のCa²⁺濃度下では、Ca²⁺トランジェント後に細胞内Ca²⁺濃度の有意な減少が見られ、それはIIIで大きかった。

結論：以上の結果から、イソプロテレノール誘導肥大大心(III)における筋小胞体のCa²⁺ポンプの機能障害に伴って起こる、細胞膜のNa⁺-Ca²⁺交換体の活性化が示された。

第IIIセッション

1. 心臓ペースメーカー機序に対する細胞内Ca²⁺濃度変化の寄与

姫野友紀子¹、佐藤広康²、天野 晃³、野間昭典³ (1京大・医、2奈良医大・医、3立命館大・生命)

ウサギ洞房結節ペースメーカー細胞にCa²⁺キレーター細胞内注入と筋小胞体機能薬物阻害をおこない、ペースメーカー機序における細胞内Ca²⁺濃度変化の寄与を検討した。20 μ M以上のEGTA注入、リアノジン、タブシガルギンによる筋小胞体機能阻害のいずれの場合にも、収縮は消失したが活動電位周期にはほとんど変化が見られなかった。これらの結果は、拡張期緩徐脱分極時の筋小胞体からの自発Ca²⁺放出がペースメーカー機序に大きな役割を果たすMLモデル(Maltsev & Lakatta, 2009)から予測される結果と異なるものであった。次に、Kyotoモデル(Himeno *et al.*, 2008)を用いて拡張期緩徐脱分極におけるCa²⁺チャンネルを介するフラックスがもたらす細胞膜下のCa²⁺濃度分布を理論的に計算した。Ca²⁺の拡散は1ミリ秒の間に細胞質と膜直下の分画で濃度がほとんど均一になってしまうほど速いことが明らかになった。MLモデルで仮定されている細胞膜直下のCa²⁺の局在は、Na⁺/Ca²⁺交換電流の大きさを計算する上で必ずしも適当でないこと示唆された。自発Ca²⁺放出のペースメーカー機序への寄与はあるとしても極めて小さいことが結論された。

2. イオンチャンネルやトランスポーターの膜電位変化への定量的寄与度；リードポテンシャル解析法

○車 采映¹、姫野友紀子²、嶋吉隆夫³、天野 晃¹、野間昭典¹ (1立命館大学生命科学部生命情報学科、2京都大学医学部、3ASTEM京都高度技術研究所)

細胞の活動電位はイオンチャンネル、トランスポーター、

細胞内イオン濃度、シグナル伝達物質など、様々な細胞内要素の複雑な相互作用によって発生する。各要素の役割を明らかにすることは電気生理学の基本的な命題であるが、これまで殆ど定性的な示唆にとどまっていた。定量化することは難しい問題であった。我々は細胞の数理モデルを用いて、膜電位の時間変化における各要素の役割を定量的に決定する新しい方法を開発した。この方法ではある瞬間での各チャンネルやトランスポーターの時間変化に基づいて膜電位が向かう値を求める。その膜電位を‘リードポテンシャル’と呼んでいる。各要素の寄与度はその時間変化を瞬間的に止めてリードポテンシャルの微分値がどれだけ変化するかを測定することによって定量化することに成功した。この発表ではリードポテンシャル法の原理を説明し、心臓洞房結節ペースメーカー細胞モデルと心室筋細胞モデルに適用した結果を紹介する。このリードポテンシャル解析法は活動電位以外にもあらゆるタイプの膜電位変化に適用できる。

3. Overexpression of calmodulin in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy by a calcineurin-dependent pathway

K. Obata¹, G.X. Zhang¹, H. Matsuyoshi¹, M. Yokota², M. Takaki¹ (1Department of Physiology II, Nara Medical University, 2Department of Cardiovascular Genome Science, Nagoya University, School of Medicine)

Objective: Transgenic (TG) mice that overexpress calmodulin (CaM) in the heart develop cardiac hypertrophy in a manner thought to be dependent on Ca²⁺, CaM-dependent protein kinase II. Other studies have implicated the Ca²⁺, CaM-dependent protein phosphatase calcineurin in cardiac hypertrophy. The possible role of calcineurin in cardiac hypertrophy induced by CaM overexpression in the heart was investigated.

Methods: CaM-TG mice were studied up to 14 days of age with or without subcutaneous injection of FK506 (1 mg/kg per day) from birth.

Results: CaM-TG mice developed a marked cardiac hypertrophy and exhibited up-regulation of atrial natriuretic factor (ANF) and β -myosin heavy chain gene expression in the heart during the first 14 days after birth. The activity of calcineurin in the heart was also significantly increased in CaM-TG mice at 10 and 14 days after birth compared with that apparent in wild-type littermates. Treatment of CaM-TG mice with the calcineurin inhibitor FK506 for 10 days after birth prevented the increase in

calcineurin activity in the heart, reduced the increase in the heart-to-body weight ratio by 75%, and rendered the increase in cardiomyocyte width insignificant. CaM-TG mice at 14 days of age also exhibited an increased left ventricular end-diastolic dimension and reduced fractional shortening. FK506 treatment prevented the development of both. FK506 also inhibited the induction of fetal-type cardiac gene expression in CaM-TG mice. Overexpression of CaM in cultured rat cardiomyocytes also activated the atrial natriuretic factor gene promoter and potentiated the stimulatory effect of phenylephrine on this promoter in an FK506-sensitive manner.

Conclusion: Activation of a calcineurin-dependent pathway contributes to the development of cardiac hypertrophy induced by overexpression of CaM in the heart.

4. Possible mechanisms of AT1 receptor blockade on β -adrenergic receptor stimulation-induced cardiac hypertrophy

GX. Zhang¹, S. Kimura², K. Murao³, K. Obata¹, H. Matsuyoshi¹, M. Takaki¹ (¹Department of Physiology II, Nara Medical University, ²Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Kagawa University, ³Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Kagawa University)

A close interaction between adrenergic nerves and angiotensin systems has been documented. Recently, we reported that β -adrenergic receptor stimulation-induced cardiac hypertrophy was suppressed by a potent angiotensin II receptor blocker (ARB). However, the underlying mechanism still remains unknown. Methods and results. In the present study, we firstly confirmed that development of cardiac hypertrophy was inhibited by ARB (CV11974; CV) in response to chronic β -adrenergic receptor stimulation by isoproterenol (ISO). The effects of CV on the augmentation of the cardiac mitogen-activated protein kinases (MAPKs) cascade and cAMP responsive element-binding protein (CREB) by acute ISO stimulation were investigated in conscious rats. CV completely suppressed increase in phosphorylation of ERK1/2 MAPK by acute ISO-infusion, whereas CV only partially suppressed ISO-induced increases in phosphorylation of p38 and JNK MAPKs and had no effect on ISO-induced increase of phosphorylated CREB in rat hearts. Captopril, an angiotensin converting enzyme inhibitor (ACEI), had no effect on

acute ISO-induced cardiac MAPKs and CREB phosphorylations. Analysis of MAPK upper-stream regulating protein Raf-1 activity indicated that ISO markedly increased both of Ras (stimulator of Raf-1) and Rap-1 (inhibitor of Raf-1). However, CV suppressed only Ras activity, but not Rap-1 activity. Raf-1 immunoprecipitation results revealed that CV completely suppressed ISO-induced increases in its association with total and phosphorylated forms of MEK. Conclusion. The mechanisms by which CV protects cardiac hypertrophy in response to β -adrenergic receptor stimulation may through (1) direct blockade of the cross-talk between AT1 receptor and β -adrenergic receptor; (2) inhibition of the Raf/MEK/ERK cascade depending on changes in the activities of Ras and Rap-1. Our present results might provide a molecular basis for the beneficial effects of AT1 receptor antagonists on cardiac remodeling and functions in patients with sympatho-excitatory heart failure.

5. 2種の β_2 アゴニストによるマウス細気管支線毛運動活性化機構

大黒恵理子, 中張隆司 (大阪医科大学生理学教室)

気道線毛運動は肺の宿主防御機構である粘液線毛クリアランスに重要な役割を果たしている。今回我々はマウス細気管支線毛細胞をエラスターゼ処理により単離しその線毛運動を高速度カメラ付き顕微鏡で観察・記録した。得られた画像から周波数 (CBF) を測定した。

β_2 アゴニストの一つである terbutaline は CBF を活性化した。また PKA 阻害薬 (H-89) 存在下で procaterol の効果は抑制されるものの terbutaline の効果は抑制されなかった。そこで、PKA および PTK 阻害剤 (genistein) 存在下で terbutaline を作用させると線毛運動の活性化は完全に抑制された。さらに β 受容体非選択的拮抗薬 (propranolol) によって terbutaline の効果は完全に抑制されるが、 β_2 選択的阻害薬 (ICI) では完全には抑制されなかった。

以上より、terbutaline は β_2 のみならずわずかながら β_1 を刺激すること、また PTK を活性化し線毛運動を上昇させる可能性が示された。そして細気管支線毛運動における terbutaline の効果は、PKA だけではなく PTK の関与も大きな役割を果たしていると考えられた。

6. マウス第三脳室上衣細胞線毛運動に対するエタノールとアセトアルデヒドの効果

不破直人, 萩原史記, 吉田 繁 (近畿大・理工・生命科学)

飲酒後に胃や小腸から吸収されたエタノールは、血液を介して脳脊髄液に血中とほぼ同濃度のまま移行し、脳機能に影響を及ぼすことが知られている。また、エタノールの代謝産物であるアセトアルデヒドは毒性が強く「悪酔い」の原因とされている。

脳室壁上衣細胞の繊毛運動は、脳脊髄液の循環だけでなく薬物排除にも関与していると想定されるが、詳細は不明である。よって、各種濃度のエタノールおよびアセトアルデヒドを37℃で灌流投与した時に、マウス第三脳室壁上衣細胞の繊毛打頻度と細胞内ATP濃度にどのような変化が現われるのかを、脳スライス(150μm厚)を使用して毎秒250枚の撮影速度で調べた。

エタノールの場合、1%未満の濃度では繊毛打頻度に変化は認められず、1%以上で低下し始め、3%以上の濃度で繊毛は完全に停止した。しかし、エタノール除去で可逆的に打頻度は回復した。アセトアルデヒドの場合は、30mMを超える濃度で繊毛打頻度の低下が始まり、完全停止には100mMを要したが、やはり可逆的であった。繊毛打頻度を低下させるエタノールとアセトアルデヒド濃度で上衣細胞層と周囲脳実質の細胞内ATP濃度を測定すると、上衣細胞層では有意にATP濃度は低下していたが、脳実質での低下は認められなかった。

第IVセッション

1. ラットの血圧日内リズム調節における Prokineticin 2 の役割

向阪 彰¹, M. ER Bhuiyan¹, 和気秀文¹, S. Gouraud¹, 高岸美和¹, 崔 鶴¹, L. Negri², 前田正信¹ (1和歌山県立医科大学医学部生理学第二講座, ²Department of Human Physiology and Pharmacology 'V Erspamer', University of Rome 'La Sapienza', Rome, Italy)

哺乳類の血圧および心拍数に日内リズムがあるということは、覚醒して活動する時間に合わせて臓器への血液供給量を増やす、すなわち各臓器の機能を最大限発揮させるという意味で重要である。哺乳類の体内時計の分子メカニズム、すなわち分子時計の解明にともない、血圧日内リズムも他の多くの生理学的なリズムと同様に分子時計の支配下にあることが証明された。しかしながら、分子時計が発振する分子レベルあるいは細胞レベルでのリズムが、血圧および心拍数という生体レベルでのリズムにどのように変換されているのかは現在でも不明のままである。そこで我々は、自然発症性高血圧ラット(SHR)を用いて、時計出力分子として注目を集めている Prokineticin 2 (PK2) と血圧日内リズム調節との関係について調べ、以下の結果を得た。

(1) SHR では高血圧のみならず血圧日内リズムの減弱がみられた。(2) 循環調節の中核の一つである延髄孤束核(NTS)においてPK2発現の日内リズムに異常がみられた。(3) NTSへのPK2の投与により血圧・心拍数の低下が認められ、その効果は時間依存的であった。以上の結果は、ラットNTSにおけるPK2が、循環調節、とくに血圧・心拍数の日内リズムの形成に重要な役割を果たしている可能性を示唆していた。

2. 自然発症性高血圧ラットにおける循環と代謝リズムの解析

崔 鶴, 向阪 彰, 和気 秀文, M. ER Bhuiyan, S. Gouraud, 前田正信 (和歌山県立医科大学医学部生理学第二講座)

糖・脂質代謝と循環動態には昼間あるいは夜間に機能が高まる日内リズムがある。これらの日内リズムは体内時計によって時間ごとに最大の機能が発揮できるように最適化されている。もし、それらのリズムに異常が生じると、糖尿病、高脂血症および高血圧の発症や予後に深く関わってくるが知られている。しかしながら、高率に併発するこれらの疾患で、代謝と循環リズムの異常が、それぞれ独立して起きるのか、それとも何らかの共通の病態から生じるのかは分かっていない。そこで我々は自然発症性高血圧ラット(SHR)を用いて、循環と代謝調節の日内リズムを解析した。これまでの報告のとおり、SHRでは高血圧だけではなく血圧の日内リズムの減弱も認められた。また、血中の糖、遊離脂肪酸およびインスリンはいずれも上昇し、インスリン抵抗性に基づく糖・脂質代謝異常がみられた。さらにSHRでは、血中の遊離脂肪酸や肝臓での脂質代謝を担う遺伝子に発現リズムの異常が認められた。しかしながら、循環調節に関わる組織および肝臓での時計遺伝子の発現リズムには異常がみられなかった。この結果は、SHRの代謝と循環リズムの異常が、体内時計の異常によるものではなく、体内時計より下流にあるリズムの出力系の異常によるものであることを示唆していた。リズムの出力系のシステムは不明な点が多いが、体内時計の下流には代謝および循環双方の調節に関わる因子が知られており、代謝と循環リズムには何らかの相互作用があり、一方の異常が他方の異常を引き起こす可能性が考えられた。

3. Voltage-sensitive dye imaging study of electrical stimulation in mouse visual cortex V1 and V2L areas

T. Fehervari, Y. Okazaki, T. Yagi (Graduate School of Engineering, Osaka University)

In a voltage-sensitive dye imaging study we investigate

mouse visual cortex response to electrical stimulation in the primary and adjacent lateral visual areas. The cortical surface is revealed and stained transdurally with RH795 or RH1691 voltage-sensitive dye through a cranial window over the right hemisphere in urethane anesthetized adult C57BL/6J mice. Glass micropipette electrodes of circa 10 μm tip diameter are used to deliver cathodic-first biphasic single stimuli at depths $<1000\mu\text{m}$ in the primary visual area (V1) and in the laterally adjacent visual area (V2L) where the strongest secondary response appears on stimulation in V1. After V1 electrical stimulation we observed cortical activity spreading over V1 followed by a several hundred milliseconds long phase of hyperpolarisation. In addition, activity peaks were present in several adjacent visual areas with typical peak delays of 10-30 milliseconds after stimulus, depending on stimulation location and visual area. Stimulation of the V2L area evoked depolarization activity in V1 suggesting retrograde signal propagation, and also evoked cortical activation in other visual areas. We believe that our research, beyond providing some insight on signal propagation between mouse visual areas, might also prove helpful in the creation of a V1 or V2 cortical visual implant in humans.

4. 眼球運動計測から明らかになったマウス視覚運動検出機構の性質

杉田祐子, 三浦健一郎, 清水直樹, 河野憲二 (京都大学大学院医学研究科認知行動脳科学)

視運動性応答 OKR (Optokinetic response) は, 広い視野の視覚刺激が一様に持続的に動くときに誘発される眼球運動である. マウスの OKR の基盤となる視覚運動の検出がどのように行われているかを明らかにするため, OKR の初期相 (early OKR) に注目し, マウスの右眼からビデオ方式で眼球運動を計測した. 視覚刺激としては, 矩形波縞からその基本周波数の正弦波を引き算した縞-MF (missing fundamental) 波一刺激を使用した. この視覚パターンは様々な周波数要素で構成されており, この視覚パターンを 1/4 周期ごとに動かした場合, 視覚パターンを構成する要素のうち最も大きい要素は, パターンの動く方向と逆方向に動くという特徴がある. CRT 上に呈示した視覚パターン (MF 刺激) を T \rightarrow N 方向 (耳から鼻方向) に呈示すると, 視覚パターンとは逆向き (N \rightarrow T 方向) の OKR が誘発された. 眼が視覚パターンの動く方向とは逆方向, つまり, 視覚パターンに含まれる 1 番大きい要素の方向に動くというこの結果は, マウス OKR の視覚運動検出機構は視覚刺激

を要素に分けて処理していることを示唆している.

第 V セッション

1. ネコ外側膝状体における空間周波数選択性の形成に果たす視床内抑制の役割

木村晃大, 七五三木 聡, 原 真一郎, 岡本正博, 佐藤宏道 (大阪大学大学院医学系研究科認知行動科学教室)

網膜から大脳皮質視覚野に至る初期視覚経路の各段階においてニューロンは刺激の空間周波数 (SF) に対して選択性を示し, SF 反応曲線 (チューニングカーブ) は網膜では特定の周波数以下であれば反応する lowpass タイプを示すが, 初期視覚経路の中で変化し大脳皮質では中間帯域の周波数にチューニングした bandpass タイプを示す. この SF 選択性がどのような神経回路によって形成されるのかはまだ明らかにされていない. 今回の研究では, 麻酔・非動化したネコを使い, 外側膝状体 (LGNd) ニューロンの SF 選択性の形成に果たす視床内抑制の役割を調べた. 様々な SF のグレーティング刺激をドリフト提示した時の単一ニューロン応答を細胞外記録し, GABA-A 受容体アンタゴニストであるビククリンをイオン泳動投与し, その効果を調べた. LGNd ニューロンの SF 反応曲線 (チューニングカーブ) は GABA を介した視床内抑制をブロックすることにより bandpass タイプから lowpass タイプに変わり, またそれは高い刺激コントラスト条件において著しかった. GABA を介した抑制は LGNd 内の SF 選択性の形成に重要な役割を果たしていると思われる.

2. ネコ外側膝状体における明るさの表現

○原 真一郎¹, 七五三木 聡², 木村晃大², 岡本正博¹, 石川理子², 佐藤宏道^{1,2} (¹大阪大学大学院生命機能研究科, ²大阪大学大学院医学系研究科)

面の明るさ (brightness) の知覚は, 観察している部分の輝度 (luminance) だけではなく, 周囲の輝度に強い影響を受ける. このような広域輝度情報に基づく明るさ知覚の神経メカニズムを明らかにするために, 本研究では, 麻酔・非動化したネコの視床外側膝状体 (LGN) から, 細胞外単一ユニット記録を行なった. 受容野とその周囲を円形状に大きく覆う中心領域 (中心刺激, 直径 = 20°) と, 中心刺激の外側領域 (背景刺激, 30° \times 40°) を, 一様な輝度の面刺激として, 様々な輝度の組み合わせで 500 ミリ秒間呈示した時の LGN ニューロン応答の時間特性を検討した. その結果, 中心刺激に対するニューロン応答の中でも, 反応潜時 50-120 ミリ秒の応答は, 背景刺激が中心刺激に近い輝度方向に変化した場合に有意な応答の抑制を, 遠い輝度方向に

変化した場合は有意な応答の促進を生じることが明らかになった。一方、反応潜時 0-50 ミリ秒の初期応答では、背景刺激による影響はほとんど見られなかった。以上より、LGN ニューロンの遅い反応は、視対象の面領域における主観的な明るさの脳内表現に関与する可能性が示唆された。

3. サル追従眼球運動における動き情報の大域的相互作用

青木佑紀, 三浦健一郎, 河野憲二 (京都大学大学院・医学研究科・認知行動脳科学講座)

平行に提示された 2 本の横長で縦縞模様のスリットが動くとき、それに囲まれた空白領域に動く錯覚像が知覚される。この現象は visual phantom と呼ばれ、視覚情報の大域的相互作用の結果であると考えられている。この大域的相互作用の性質を、visual phantom 刺激に対するサルの追従眼球運動を観察することにより調べた。視覚刺激として、画面横 (62°) 一杯に広がる、高さ 6° の正弦波状縞のスリットを以下の 2 条件で用いた: ① phantom 条件: 2 つの縞刺激を、1 つを注視点の上に、他を注視点の下に、それぞれ注視点から同じ距離になるように提示。② 単刺激条件: 1 つの縞刺激を注視点の上か下に提示。縞刺激の注視点からの距離は固定し (5.5°-22°), その空間周波数を変化させた (0.02-2.48 cycle/deg)。動きは 1/4 波長ずつステップさせることで与えた (時間周波数 25 Hz)。Phantom 条件で観測された追従眼球運動は、単刺激条件における反応の線形和から予測されるものと比べて大きかった。また、その差を最大にする空間周波数は注視点と縞の間の距離に依存した。この結果は、空間的に離れた領域間に非線形な相互作用があることを示唆する。

4. サル一次視覚野におけるアセチルコリンの機能

相馬祥吾¹, 尾崎弘展², 木村晃大², 内藤智之², 原真一郎¹, 七五三木 聡², 佐藤宏道² (¹大阪大学大学院生命機能研究科, ²同 医学系研究科)

アセチルコリン (ACh) は哺乳類の中樞神経系におけるニューロモジュレーターとして多くの脳内の情報処理に関与している。ACh 受容体にはニコチン性受容体とムスカリン性受容体が存在することが知られており、サル一次視覚野 (V1) では外側膝状体 (LGN) からの軸索終末にニコチン性受容体 (Disney *et al.*, 2007) が、V1 内の GABA 作動性介在ニューロンにはムスカリン性受容体が部位特異的に発現していることが報告されてきた (Disney *et al.*, 2006, 2008)。しかし、ACh がそれらの受容体を介してどのように視覚情報処理を修飾するかを含め、各受容体の機能的役割、特異的な発現の生理的意義は明らかになっていない。

そこで、我々は生理学的・薬理学的手法を組み合わせることで、麻酔非動化したサルの V1 ニューロンの細胞外記録を行い、局所投与した ACh が刺激コントラスト-反応曲線に対してどのような効果を持つか調べた。その結果、多くのニューロンで促進性の効果が観察された。層差についても報告する。

5. サル前頭前野における試行錯誤の神経メカニズム

藤本 淳, 田中智広, 小川 正 (京都大学大学院医学研究科)

未知の問題に直面したとき、我々は試行錯誤をすることにより知識を獲得し適切に問題を解決することができる。しかしその過程における神経メカニズムについては十分に知られていない。この問題を調べるため、我々は試行錯誤を伴う視覚探索課題 (trial-and-error visual search task) を開発し、前頭前野背外側部 (DLPF) から単一神経細胞記録を行った。この課題は 6 つの異なる色の刺激配列のうちターゲットとなる 1 つの色の刺激を選択するものであり、ターゲットの色はブロックが変わるごとにランダムに変更されるが、サルはターゲットの色およびその変更に関する情報を与えられないため、報酬のフィードバックに基づき試行錯誤により探索することになる。サルはターゲット変更後数試行においてはターゲット以外を選択したが、一旦ターゲットを選択した後は 90% 程度の高い正答率を維持するという、階段状の正答率の上昇を示した。我々は同一ブロック内において 1 度目の成功試行の前 (試行錯誤期間) と後で DLPF の神経活動を比較し、試行錯誤期間に特異的な活動が見られることを発見した。この結果から、試行錯誤を用いた知的学習に DLPF が重要な役割を果たしていること、そしてその神経メカニズムが示唆された。

6. 延髄孤束核における Ccl5 異常発現と高血圧発症との関係

和気秀文, S. Gouraud, M. E. R. Bhuiyan, 向阪 彰, 前田正信 (和歌山県立医科大学医学部第 2 生理)

我々は以前 PCR アレーにより自然発症性高血圧ラット (SHR) と正常血圧ラット (WKY) の延髄孤束核 (NTS) におけるケモカイン系遺伝子発現を比較したところ、Ccl5 発現が SHR の NTS において有意に低下していることを明らかにした。本研究ではこの遺伝子発現プロファイルが SHR の高血圧発症に関与しているかどうか調べるために、ウレタン麻酔下 (1.45 g/kg, i.p.) の雄性 SHR と WKY (共に 10 週齢) の NTS に Ccl5 を微量注入した時の血圧および心拍数変化について観察した。NTS への Ccl5 微量注入は WKY および SHR の血圧と心拍数を直ちに減少させたが、

これらの反応は SHR で有意に大きかった。また、免疫組織化学的手法により SHR および WKY の NTS では Ccl5 受容体 (Ccr1, Ccr3 および Ccr5) が主として神経細胞に発現していることがわかった。以上より、NTS における Ccl5

は、神経調節因子として循環調節の恒常性維持に重要であり、Ccl5 発現の低下は SHR の高血圧発症に関与している可能性が示唆された。本研究の一部は科学研究費補助金 (19599022, 19・07458) によって行われた。