

第90回北海道医学大会生理系分科会（日本生理学会北海道地方会）

日 時：平成22年9月25日（土）10：40～16：00
 会 場：旭川医科大学臨床講義棟臨床第3講義室
 当番幹事：旭川医科大学生理学講座神経機能分野教授 柏柳 誠
 参加者：33名
 演題数：16題

日本生理学会北海道地方会が第90回北海道医学大会生理系分科会をかねて、上記の日程で開催されました。生理学研究を行う教室が集中している札幌を離れての開催でしたが、様々な分野から16演題が発表され、活発な質疑応答がなされました。また、以前は各教室対抗の野球大会が研究会とは独立した日程で開催されていましたが、教室員の減少のために最近では開催が不可能となっています。その代わりに個人単位で参加できるボーリング大会が研究会終了後に開催されました。さらに、その後、懇親会をとりおこない、研究と運動で疲れた1日を締めくくりました。野球大会が開催できないように総人数は減少しておりますが、明るい話題としては新たに2つの生理系研究室が北海道に誕生しております。北海道は雪に閉ざされた冬を迎えますが、緑の春を迎えるとともに、以前にも増した活発な生理学研究の展開が期待されます。なお、来年度は、札幌医科大学医学部細胞生理学講座が担当される予定です。

O-1. HDAC10による非エピジェネティックなミトコンドリア代謝制御

○笹島 仁^{1,2}, ツォバンヤオ², 柏柳 誠¹（¹旭川医科大学生理学講座神経機能分野, ²米国デューク大学メディカルセンター）

【目的】近年、HDAC阻害剤が、がんや神経変性疾患など多彩な疾患に対する治療薬として有益性を示すことが報告されている一方で、HDACが関与する細胞内分子機構に関しては、依然として不明な点が多い。そこで、HDACファミリー分子のひとつである機能未知分子HDAC10に関して解析する。

【方法】生化学的解析法、細胞生物学的手法により、細胞内在性HDAC10の局在解析を行った。また、siRNAを用いたHDAC10ノックダウン細胞を用いて、HDAC10による細胞内エネルギー代謝調節機構を探索した。

【結果】細胞内在性HDAC10は、ミトコンドリア外膜に局在することが明らかとなった。HDAC10ノックダウン細胞ならびにHDAC阻害剤処理細胞は、ATP飢餓状態にあり、飢餓応答としてのオートファジーを誘導した。さらに、HDAC10ノックダウン細胞では、ミトコンドリア代謝物輸送が抑制されていた。ミトコンドリア外膜における代謝物輸送チャネルVDACは、HDAC10ノックダウン細胞においてアセチル化され、HDAC10-VDACによる新規細胞内エネルギー代謝調節経路の存在が示唆された。

【考按】がん細胞では、解糖系鍵酵素HexokinaseとミトコンドリアVDACが共役し、解糖系の亢進、Warburg効果が見られる。HDAC阻害剤は、ヒストン脱アセチル化阻害というエピジェネティック経路のみならず、ミトコンドリア代謝調節という非エピジェネティック経路によりWarburg効果を制御しうる。これらは、HDAC阻害剤が、がん細胞においてのみ細胞死を誘導する端緒が、HDAC10の阻害に由来するものであることを示唆する。

O-2. β -アミロイドによるマウス嗅覚機能の低下

大畠 強¹, 渡辺 徹¹, ○野口智弘¹, 鈴木利治², 柏柳 誠¹（¹旭川医科大学生理学講座神経機能分野, ²北海道大学大学院薬学研究所）

アルツハイマー病の患者には β -アミロイド($A\beta$)蓄積による老人斑の形成が認められることから、 $A\beta$ による神経毒性が原因であると考えられている。また、アルツハイマー病では、特徴的な症状の一つに嗅覚機能の低下が認められている。アルツハイマー病患者では嗅覚系の一次中枢である嗅球において容積の低下が認められているが、生理機能との関連は不明である。一方、鼻腔内投与は、脳内に直接投与することなく $A\beta$ を嗅球から脳全体へ分布させることができる効率的な投与方法である。また、マウスではフェロモンが生理作用を有する特殊な匂いとして受容されている。そこで、アルツハイマー病における嗅覚機能の低下が

A β に起因するものかを評価するためにA β を鼻腔内に投与した後、匂いの一次中枢である主嗅球およびフェロモン受容の一次中枢である副嗅球での応答性を解析した。その結果、匂いおよびフェロモンに対する応答がA β の投与により抑制された。A β の産生を細胞内で抑制する分子として、X11-likeが報告されている。そこで、X11-like遺伝子を欠損したマウスを用いて、主嗅球および副嗅球での応答性を解析した。X11-like欠損マウスでは、匂いおよびフェロモンに対する応答が抑制された。さらに、アルツハイマー病では、脳内における神経新生が変化することが報告されている。脳室下層は成体でも神経が新生し、生じた神経細胞は嗅球に移動して介在神経として機能する。そのため、嗅覚機能の低下は脳室下層由来の神経細胞の機能が変化した可能性が考えられる。そこで、X11-like遺伝子を欠損したマウスを用いて脳室下層および嗅球での新生した神経細胞を評価した。その結果、嗅球において、脳室下層由来の神経細胞が減少することが観察された。本研究は、 β アミロイドが嗅球のレベルで匂い情報の伝達に抑制的な効果を有することを示した。

O-3. マウス尿臭の加齢変化に対するシトロネラル摂取の影響について

○長田和実、和泉博之（北海道医療大学歯学部口腔生物学系生理学分野）

【目的】体臭は、動物の生理状態に関する多種多様な情報を提供する。食物の違いによって体臭は短時間の内に変動することが知られている。食物中の化学成分が体液中に現れ、その芳香によって体臭が変化し、結果として動物の行動に影響することは十分にあり得ることであるが、意外にも研究報告はきわめて少ない。本実験では山椒やレモンガラスなどに含まれる芳香成分であるcitronellalをC57BL/6jマウスに経口摂取させ、マウスの尿臭を変化させるか否かについて行動学的、あるいは分析化学的な研究を行った。

【方法】B6 μ マウスをシトロネラル投与群と非投与群（各5匹）に分け尿を採取し、それらの匂いの違いが識別できるかどうかを匂い嗅ぎ専用のマウス（5匹）を用いてY字型迷路法により識別の可否を検討した。匂い嗅ぎマウスは23時間絶水の後にY字型迷路実験を行い、特定のサンプルにたどり着いた場合は1滴水を報酬として与えた。また尿中のシトロネラルの定量、内因性の尿中化学物質の定量はガスクロマトグラム-マススペクトロメトリー（GC-MS）を用いて行った。【成績】一連のY字型迷路実験の結果、匂い嗅ぎマウスはシトロネラル摂取および非摂取マウス尿の匂いを識別可能であり、それはシトロネラル自身の芳香により尿臭が変化した結果であることが示唆された。

さらに、老齢マウスと若齢マウスの匂いを識別できた匂い嗅ぎマウスは、50ppmのシトロネラル溶液を摂取した老若マウスの尿のにおい違いが認識できなかった。化学分析の結果、シトロネラルを摂取した老若マウスの尿中にはシトロネラルがおおよそ900ppb含まれていたが一方、加齢に伴い変化するフェロモン物質はシトロネラル摂取の影響を受けなかった。【結論】本研究は経口摂取した生体異物がマウス尿中に現れ、匂いを変化させる事を証明した初めての報告であり、マウスの老臭をマスクングする作用を確認したものである。

O-4. 下肢静脈の動脈血による逆行灌流はリンパ系を破壊するか

○小山富康、笹嶋唯博（北海道大学）

糖尿病によって誘発される足背動脈閉鎖は、下肢に深刻な痛みと壊疽を惹起し、下肢の指や下肢そのものをも失わせる。笹嶋はこの状態を開閉するための方法として、下肢静脈に、なお開存している動脈の枝を接ぎ木する手術を開発した。血流の再開により患足の皮膚に赤みが射し皮膚温は上昇し、浮腫は消失する。壊死状態の皮膚を除去して移植した皮弁は活着して歩行可能となる。今回は、このモデルについて酸素供給が理論的にも可能であることを報告した。すなわち、骨格筋内の細静脈叢の密度からクローの組織円筒を仮定し、安静時の酸素消費量を賄うに十分な酸素が供給されると計算した。しかし次の問題として、動脈圧が静脈に加えられることにより、静脈血管系が破綻するのではないかと言う疑念が残っていた。今回は、先行研究によるリンパ透過率の報告値を総合して、静脈系が破綻することはないであろうと推定した。細静脈から流出する水分量すなわちリンパ流量は、血管の透過度・細静脈表面積・血圧の積で与えられる。冠細静脈の透過性は $3.25 \times 10^{-7} \text{cm}^2/\text{min}/\text{cmH}_2\text{O}$ （Yuanら1993から計算）と報告されている。また細静脈表面積は前回用いた、細静脈密度（Engelsonら1985）から得られた $4.43 \text{mm}^2/\text{mm}^3$ という値と、先に仮定した直径 $30 \mu\text{m}$ から計算した。組織の比重を1とすると、リンパ流量は $0.011 \text{ml}/\text{min}/100 \text{g}/\text{mmHg}$ が得られた。この結果は、ラット下肢全体のリンパ流出量について報告された $0.03 \text{ml}/\text{min}/100 \text{g}/\text{mmHg}$ （Kamiya, Rippe, Fowler 1979）という値の1/3である。ここで100mmHgの動脈圧が静脈に加わる逆行灌流と、正常な静脈圧15mmHgが作用する下肢についてリンパ流量を推定すると、それぞれ1.1と0.45 ml/min/100gとなる。即ち逆行性灌流により、リンパ流量は2.4倍程増加すると推定される。リンパ系の予備能力は極めて大きいことが従来から知られており、十分に耐えられる増加量に止まると推定した。

O-5. 腎細動脈におけるミオシンリン酸化制御

○竹谷浩介 (旭川医科大学生理学講座自律機能分野)

平滑筋の収縮・弛緩はミオシンの制御軽鎖 (LC20) のリン酸化によって、制御されている。LC20 のリン酸化量はミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) とホスファターゼ (MLCP) の相対的な活性によって決まる。一般に、平滑筋は収縮刺激を受けると、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇し、 Ca^{2+} /CaM 複合体を介して MLCK を活性化する。更に、いくつかの刺激は MLCP のミオシン結合サブユニットや阻害タンパク質である CPII7 をリン酸化することによって MLCP の活性を抑制する。

これら二つの経路の重要性は平滑筋や刺激の種類によって異なっている。腎微小循環系はこのような多様な収縮特性を示す良い例である。しかし、腎微小循環系におけるミオシンリン酸化制御機構については、生化学的解析が困難であったことから、ほとんど知られていない。

本研究では微小平滑筋の LC20 リン酸化を定量する高感度な方法を開発し、腎輸入細動脈における LC20 のリン酸化を angiotensin II (ANG) または endothelin 1 (ET1) で刺激後、測定した。

【方法】単離した輸入細動脈を ANG、もしくは ET1 で刺激し、Phos-tag SDS-PAGE と高感度 western blotting により、LC20 のリン酸化を定量した。

【結果】輸入細動脈において ANG は濃度依存的に LC20 のリン酸化 (Ser19) を引き起こした。このリン酸化の増加は Rho キナーゼ阻害剤 H1152 により、抑制された。一方、ET1 は Ser19 のリン酸化だけでなく、Thr18 と Ser19 の二重リン酸化も引き起こした。H1152 は二重リン酸化を減少させたが、Ser19 のリン酸化はわずかに減少させただけだった。これらの結果は ANG と ET1 が異なるシグナル経路を活性化することを示唆している。

【結論】輸入細動脈を ANG や ET1 で刺激すると、異なるミオシンのリン酸化状態になり、このことは二つのアゴニストが異なるシグナル伝達経路を活性化することを示唆し、integrin-linked kinase や未同定のキナーゼが関与している可能性を示している。ミオシンの二重リン酸化は異常収縮を伴う平滑筋疾患との関連が指摘されていることから、ET1 による二重リン酸化は虚血性急性腎不全に関与しているかもしれない。

O-6. ウシ毛様体平滑筋における endothelin-1 の張力発生作用とその信号機構

○石居信人、宮津 基、高井 章 (旭川医科大学生理学講座自律機能分野)

【目的】眼内に広く存在する endothelin-1 (ET1) の、房

水流出率調節の主要因子である毛様体筋収縮への効果を検討する。

【方法】等尺性張力記録にはウシ毛様体の平滑筋束を用い、細胞内 Ca^{2+} 濃度と全膜電流の記録には単離筋細胞を用いた。蛋白発現と局在の検討は免疫蛍光染色による。

【結果】ET1 (1-100nM) は濃度依存性に張力を発生させた。この応答は、carbachol (CCh; 2 μ M) 投与により発生する張力と同様、細胞外 Ca^{2+} に依存し、また、 $G_{q/11}$ 阻害剤 YM-254890 により完全に、Rho キナーゼ阻害剤 Y-27632 により部分的に、抑制された。しかし、CCh 応答と比較すると、早い立上がり相を欠く、洗流しに時間が掛る、Ni でより強く抑制されるなど明らかな違いも見られた。ET1 の作用は A 型 ET1 受容体 (ET_A) 阻害剤で濃度依存性に抑制されるが B 型受容体阻害剤では抑制されなかった。ET1 は、CCh 刺激によって開口する 2 種類の非選択性陽イオンチャネルを開口させたが、その効果は CCh のそれに比べ微弱であった。免疫蛍光染色により筋細胞膜における ET_A 受容体の稠密な発現を確認した。

【考按】ET1 刺激は ET_A 受容体を介し $G_{q/11}$ と共役した信号伝達経路を介して毛様体筋を収縮させるが、CCh 刺激とは一部異なる経路を使用している可能性が示唆された。

O-7. ウシ毛様体筋の Ca^{2+} 貯蔵枯渇とムスカリン受容体作動性陽イオンチャネル活性化の関連

○宮津 基、石居信人、高井 章 (旭川医科大学生理学講座自律機能分野)

【目的】毛様体筋の収縮持続相は細胞外からの持続的 Ca^{2+} 補充を必要とするが、そのための Ca^{2+} 流入経路としては M3 型ムスカリン受容体刺激に応じて開口する 2 種類の非選択性陽イオンチャネル [NSCCL (35 pS) と NSCCS (100 fS)] が主要な役割を演ずる。しかし、M3 受容体からの信号がチャネルに至る経路については不明である。今回、筋小胞体 (SR) の Ca^{2+} 貯蔵の枯渇の関与を検討するため、ER Ca^{2+} ポンプ阻害薬である thapsigargin (TG) と ER Ca^{2+} の放出薬 caffeine の効果について調べた。

【方法】酵素処理で単離したウシ毛様体筋細胞を用い電位固定法により全膜電流を記録。細胞内 Ca^{2+} の変動は、同じく単離毛様体筋細胞において Fluo-4 蛍光法により記録した。

【結果と考察】カルバコール (CCh) によって活性化される 2 種類の非選択性陽イオンチャネルの中で、TG は NSCCS のみの開口を維持させた。カフェイン (5-20 mM) は、一過性の Ca^{2+} 上昇とそれに続く持続的な Ca^{2+} 上昇を惹起し、全膜電流測定から NSCCS のみを開口させた。ライアノジン (10 μ M) をカフェインと同時に数分間投与す

ると、両者の除去後もそのまま持続する NSCCS の開口が観察された。RT-PCR 法によりウシ毛様体筋組織から全長の Stim1, Orail の mRNA が検出された。毛様体筋細胞をジギトニンで処理したあと、STIM1 の特異抗体を用いて、IP₃受容体 1 の特異抗体と 2 重免疫蛍光染色すると、細胞内に両者が球状に共局在するのが観察された。これらの知見は、ウシ毛様体筋のムスカリン刺激により活性化される NSCCS は、SR の Ca²⁺貯蔵からの Ca²⁺放出を介して活性化される可能性を示唆する。

O-8. 心拍動開始時におけるカルシウムトランジェントの特徴

○小林武志¹、前田佐知子¹、一瀬信敏¹、佐藤達也^{1,2}、岩瀬岳人^{1,3}、山田陽一¹、當瀬規嗣¹ (1札幌医科大学医学部細胞生理学講座、2札幌医科大学医学部内科学第2講座、3札幌医科大学医学部整形外科学講座)

心筋細胞が収縮するためには、細胞内カルシウム濃度の上昇(カルシウムトランジェント)が必要である。一般的に心筋細胞では、1)細胞膜のL型カルシウムチャネル開口による細胞外カルシウムの流入、2)流入カルシウムによる筋小胞体のライアノジレンセプター(RyR)開口、3)RyRを介した筋小胞体内のカルシウム放出、といった過程を経てカルシウムトランジェントが形成される。他方RyR-ノックアウトマウスの心臓においてもカルシウムトランジェントおよび心拍動は観察される。ただし、心拍動開始後約1日で死亡することから、胎生初期の心拍動開始時とその後との時期とでカルシウムトランジェントの特徴に差異があることが示唆される。そこで今回我々は、ラット胎生10日目の心拍動開始時の心臓原基におけるカルシウムトランジェントを精査した。L型カルシウムチャネルのブロッカーであるニフェジピンを投与したところ、カルシウムトランジェントは消失した。一方RyRのブロッカーであるライアノジンや、筋小胞体カルシウムポンプのブロッカーであるタブシガルジンを投与してもカルシウムトランジェントは消失しなかった。以上より、胎生期の心拍動開始時には、筋小胞体から放出されるカルシウムではなく、L型カルシウムチャネルを介した細胞外からのカルシウム流入によってカルシウムトランジェントが構成されていることが判明した。

O-9. 欠落オドボールの検出に関与するサル小脳歯状核の神経活動

○大前彰吾、植松明子、田中真樹(北海道大学医学研究科認知行動学分野)

音楽を聴いているときに経験するように、私たちは周期

的なイベントのタイミングを無意識のうちに予測し、その乱れを鋭敏に感知することができる。小脳が1秒以下の短い時間の情報処理に関わるという多くの報告を手がかりに、その神経機構を調べるためにサルを用いた実験を行った。

【方法】周期的に提示される視聴覚刺激(固視点を囲む白い四角と1500Hzトーン)の不意の欠落を検出するように3頭のニホンザルを訓練した(欠落オドボール課題)。対照として、半数の試行では異なる刺激(赤い四角と667Hzトーン)を不意に提示し、これを検出させた(逸脱オドボール課題)。刺激周期(100, 200, 300, 400, 600ミリ秒)および欠落/逸脱条件は試行毎にランダムに選んだ。オドボールの100-800ミリ秒後に視野周辺に標的にサッカーすると正解とし、報酬を与えた。8割以上の成功率を達成するようになった後、小脳歯状核から単一神経細胞記録を行った。

【結果】周期的に与えた視聴覚刺激に反応する神経細胞群を発見し、2頭の3半球から合計109個を記録した。興味深いことに、このうち94%では刺激を繰り返すほどに反応の振幅が増大し、感覚経路で知られている順応(sensory adaptation)とは逆の様相を示した。この現象は刺激周期が長いほど顕著であり、オドボール直前の刺激に対する反応は刺激周期と線形に相関していた。これは、直前の刺激提示からの経過時間が発火率の変化の大きさに正確に変換されていることを意味する。また、約4割の神経細胞では刺激欠落後に強いバースト活動がみられた。記録部位に微量のムシモールを注入したところ、同側へ向かう眼球運動の潜在時間が延長した。不活化の効果は、欠落条件かつ刺激間隔が長い試行で顕著であった。

【結論】以上の結果から、歯状核の神経活動は内的なりズムを表現しており、その信号は刺激欠落の検出に役立っていると考えられる。

O-10. 自発運動のタイミング制御におけるサル前頭葉内側部の関与

○國松 淳、田中真樹(北海道大学医学研究科認知行動学分野)

自発的な運動の発現に、前頭葉内側部が関与しているとの報告がこれまで多くされてきた。しかし、その運動のタイミングがどのような神経機構によって制御されているのかは未だ明らかになっていない。最近、眼球運動の準備期間に徐々に増強する神経活動が運動性視床において報告され、これが自発性眼球運動のタイミング制御に関与することが示唆されている(Tanaka, 2006-7)。解剖学的な結合から、これら視床の信号は前頭葉内側部に送られ、自発運動のタイミングを制御している可能性がある。これを検証す

るため、視覚刺激に応じて即座に眼球運動を開始させる課題 (Triggered 課題) と、視覚刺激の提示後、一定の遅延期間において自発的に眼球運動を開始させる課題 (Self-timed 課題) を3頭のサルに訓練した。刺激実験に先立って、前頭葉内側部から集合電位を記録したところ、陰性の運動準備電位が記録された。これらの活動が記録された部位の近傍で、運動準備期間中に閾値以下の微小電気刺激を行った結果、90ヶ所で運動開始時間に有意な変化がみられた。それぞれの刺激部位で中央値の変化を比較すると、約65%の部位ではSelf-timed 課題のみで運動の遅延が見られた。また全体で比較しても、刺激効果はTriggered 課題よりもSelf-timed 課題で有意に大きかった。一方、それぞれの刺激部位で運動開始時間の分布を調べると、22% (n=20)の部位では中央値が延長しているにもかかわらず、一部の試行では刺激によって反応時間が短縮していた。電気刺激のタイミングを変えて調べたところ、この促進効果は手がかり刺激から電気刺激までの時間が長いほど大きかったことから、刺激の効果は運動の準備状態によって異なると考えられる。これらの結果から、運動の自発的なタイミング制御に前頭葉内側部の神経活動が関与していることが明らかとなり、その制御には運動準備期間中の徐々に増強する活動が重要であることが示唆される。

O-11. 反応課題遂行を中断する際の運動関連領域の関与

○矢澤省吾¹、村原貴史¹、石黒雅敬¹、長峯 隆¹、竹田里江²、豊島貴信²、白石秀明⁴、松橋眞生⁵ (1札幌医科大学医学部神経科学講座、2札幌医科大学医学部神経内科学講座、3札幌医科大学保健医療学部作業療法学科、4北海道大学医学部小児科学、5京都大学医学研究科高次脳機能研究センター)

【目的】Go/No-Go 課題などを用いた研究では運動抑制に前頭前野などの前頭連合野が活動することが示されてきたが、一次運動野などの運動関連領域の役割は明確ではない。反応運動を中断する運動関連領域の活動を検索する。

【方法】対象：健康成人10名。

刺激：1000Hzのtone burst刺激を700msの固定間隔で両耳に提示し、20%の確率でランダムに欠落させた。

課題：被験者には音刺激に反応して素早く右母指屈曲運動を行わせ、音欠落の際には運動を禁じた(運動課題)。対照として、全く同様の刺激を提示して運動を行わせない時の脳活動と比較した(安静課題)。

204Ch全頭型脳磁計を使用し、音刺激提示あるいは欠落を基点に-100~+700msの誘発反応を記録した。得られた結果より複数電流源推定を行い、被験者のMRIに重畳した。

【結果】両課題で音刺激に対する聴覚誘発磁場(N100m)の電流源は両側側頭平面に推定された。安静課題での音欠落への反応は、右側は全例で音刺激のN100m発生源付近に推定されたが、左側は被験者により位置が前後した。その他に右前頭葉下前頭回に活動を推定した。運動課題では、両側側頭葉の反応以外に左の感覚運動野、運動前野などの運動関連領域に信号源が推定された。音欠落で運動を中断したにもかかわらず、7例でこれらの運動関連領域に音欠落直後から出現する緩徐な活動を認めた。

【結論】本研究の安静課題では、Raijら(1997)による音欠落の際の脳活動を再現できた。さらに一連の音刺激に運動課題を加えて反応課題に改変することにより、運動と対側の運動関連領域にて音欠落に関連した誘発脳磁場が出現した。これは、反応課題遂行中で一定の運動準備状態の際に、予期せず刺激が欠落してその準備状態を解除する過程を反映している可能性がある。

O-12. 海馬CA1野シナプスにおけるAMPA受容体動態のその場解析

○神谷温之(北海道大学医学研究科神経生物学分野)

中枢神経系の多くの興奮性シナプスではAMPA型グルタミン酸受容体を介してシナプス後電位を生じる。AMPA受容体のシナプス下膜における発現は、細胞内プールやシナプス外受容体との交換により動的に制御されることが、主に初代分散培養やスライス培養系を用いたAMPA受容体のGFP標識分子追跡法により示されている。しかしながら、より生体内に近い急性スライス標本においてもAMPA受容体のシナプス発現が同様に動的な制御を受けるかについては明らかでない。本研究では、急性海馬スライスにおけるCA1野シナプスでのAMPA受容体の動態を解析する目的で、光反応性AMPA受容体ブロッカーANQXの光分解法を用いた検討を行った。細胞外から投与したANQXは紫外線照射に伴い細胞膜上のAMPA受容体と架橋形成し、受容体応答を不可逆的に阻害する。このため、光不活化後の受容体応答の回復の時間経過を計測することで、細胞内プールからシナプス下膜へのAMPA受容体の補給の程度と時間経過を測定できると考えられる。マウス海馬スライス標本においてCA1野シナプスでの興奮性シナプス後電位(EPSP)を細胞外記録法により測定し、局所灌流システムを用いてANQXをCA1野放射線層に急速投与して紫外線照射による光分解を行った。ANQXの光分解に伴いEPSPは減弱し、紫外線照射後10分ほどにわたり一部回復し、その後60分まで持続的に減弱したままであった。以上より、急性海馬スライスにおいてもANQXはシナプス下膜のAMPA受容体を光不活化できることが示された。ま

た、安静時のシナプス下膜の AMPA 受容体発現は比較的安定で、少なくとも 60 分ほどの時間経過では細胞内プールからの補給によるターンオーバーはほとんど生じないと考えられた。

O-13. マウス末梢時計の 8 時間位相前進させた明暗周期への再同調は新奇環境暴露により促進される

○山仲勇二郎¹、本間さと^{1,2}、本間研一² (¹北海道大学大学院医学研究科生理学講座時間生理学分野、²北海道大学大学院医学研究科時間医学講座)

哺乳類の生理機能には 24 時間を一周期とする概日リズムが観察される。概日リズムの中核(生物時計)は視床下部視交叉上核に局在する。視交叉上核は、外界の光情報を同調因子として個体内因性周期を補正し、神経性または液性出力を介して全身に適切な時刻情報を伝達し、生理機能の時間的統合を図っている。最近では、視交叉上核外の脳部位や末梢組織においても概日リズム振動が存在することが明らかになっている(末梢時計)。明暗周期の位相を急速にシフトさせるとマウスの行動リズムは位相シフト後数日間の移行期を経て新しい明暗周期に再同調する。また、視交叉上核内の時計遺伝子 *Per1* 発現リズムは直ちに新しい明暗周期に再同調するが、末梢組織の *Per1* 発現リズムは数日かけて再同調することが報告されている。このことは、明暗周期の位相変化により中枢時計と末梢時計間で内的脱同調が生じていることを示唆している。また、ヒトでの時差ボケ症状の背後には位相シフトした明暗周期と概日リズム間での外的脱同調、中枢時計と末梢時計間の内的脱同調が関与することを推測させる。本研究では、明暗周期を 8 時間位相前進させた際に、8 時間位相前進させた暗期開始に回転輸付ケージ(新奇環境+運動)、回転輸なしケージ(新奇環境)、新奇環境暴露なし(対象群)という 3 つの異なる条件を負荷し、位相シフトした明暗サイクルに 3 サイクル、新奇環境暴露に 4 回暴露した後、恒常暗で 2 週間フリーランさせた。そして、恒常暗に移行した 1 日目の自発行動リズムの行動開始位相、視交叉上核、肝臓、肺、骨格筋の時計遺伝子 *Per1* 発現リズムのピーク位相を解析し、3 群間で位相シフト量を比較した。その結果、マウスの自発行動リズムおよび肺、骨格筋の *Per1* リズムは新奇環境暴露により再同調が促進されることが明らかとなり、活動量の増加に起因する何らかの変化が末梢時計に影響していることが示唆された。

O-14. 時計遺伝子 *Cry1*, *Cry2* ダブルノックアウトマウス培養視交叉上核におけるサーカディアンリズム発振

○小野大輔¹、榎木亮介²、本間さと¹、本間研一¹ (¹北

海道大学大学院医学研究科生理学講座時間生理学分野、²北海道大学大学院医学研究科先端光イメージング研究拠点)

哺乳類の概日時計の中核は、視床下部視交叉上核(SCN)に存在する。現在、概日振動発振は複数の時計遺伝子の転写・翻訳を介するフィードバックループによると考えられている。時計遺伝子 *Cry1*, *Cry2* ダブルノックアウト(*Cry1*^{-/-}:*Cry2*^{-/-})マウスは恒常暗で行動リズムが消失し、このリズム消失は概日振動そのものの停止によるものと考えられている。しかし、明暗サイクル下の行動リズムの位相は、背後に概日振動体の存在を示唆しており、本研究では、*Cry1*^{-/-}:*Cry2*^{-/-}マウスの個々の SCN の細胞はリズム発振しているとの仮説に立ち、SCN の神経活動と時計遺伝子発現リズムを測定し、行動リズム消失との関連性を検討した。

SCN をスライス培養し、64 チャネル多電極ディッシュを用いて 1 分毎の発火頻度を測定した。時計遺伝子発現リズム測定は、発光イメージングシステムを用い 1 時間毎の発光画像から SCN の個々の細胞の *Per1* 発現を定量化した。

Cry1^{-/-}:*Cry2*^{-/-}マウスの個々の SCN の細胞では、有意な神経活動リズム及び *Per1* 発現リズムが認められた。しかし *Per1* 発現リズムは脱同調し、リズム振幅も低下していた。一方神経活動は対照群と有意差のない同調した明瞭なリズムが認められたが、約 2 週間の測定期間中に周期が急激に変化する不安定なリズムを示した。

本研究結果は、*Cry1*, *Cry2* が概日リズム発振に必ずしも必要ではないこと、安定した概日リズムを形成するのに *Cry1*, *Cry2* が必要であること、*Per1* 発現リズムと神経活動リズムには異なる同期メカニズムが存在すること、*Cry1*^{-/-}:*Cry2*^{-/-}マウスの恒常暗での行動リズム消失は個々の細胞の脱同調の結果であること、を示唆する。

O-15. タンパク質合成阻害によるマウス培養視交叉上核リズム停止の分子機構

○西出真也、本間さと、山田淑子、本間研一(北海道大学大学院医学研究科生理学講座時間生理学分野)

ヒトを含む多くの生物の生理機能には内因性リズム発振機構である概日時計に駆動された約 24 時間周期のリズムが観察される。哺乳類における概日中核は視床下部視交叉上核に存在する。概日リズム発生の細胞内分子機構として一群の時計遺伝子の転写・翻訳による負のフィードバックループモデルが提唱されているが、未だ不明な点が多い。タンパク質合成の長時間阻害により、可逆的な概日リズム振動の停止が起こることが報告されているが、その後のリズム再開のメカニズムは不明である。本研究において我々

は非特異的なタンパク質合成阻害剤シクロヘキシミドをマウス培養視交叉上核に投与することによりその振動を停止させ、培養液の交換により薬剤を除去し振動が再開する様子を観察した。我々はまずリズム形成に中心的な役割を果たす時計遺伝子の一つである *Bmal1* のプロモーター支配下にホタルシフェラーゼを発現するトランスジェニックマウスの視交叉上核を培養し、その発光量の変化からシクロヘキシミド投与前後の *Bmal1* 転写活性の変化を解析した。その結果、シクロヘキシミド投与により視交叉上核からの発光量はバックグラウンドレベルまで減少し、薬剤の除去後一過性の発光上昇を経て振動が再開した。薬剤投与が18時間以下の場合には再開したリズム位相が投与期間依存的に変化したが、投与が18時間を超えると投与期間に関わらず特定のリズム位相から振動が再開した。我々はさらに、シクロヘキシミド投与中および除去後の培養視交叉上核における主要な時計遺伝子の mRNA 量の変動を RT-PCR 法にて測定した。*Bmal1* mRNA 量はタンパク質合成阻害により上昇し、6時間後をピークに減少に転じた。一方、時計遺伝子 *Per1*、*Per2* mRNA 量は投与後18時間まで上昇し、その後プラトーに達した。これらの mRNA 量は薬剤除去後、元の位相関係を保ったリズムを示した。以上の結果より視交叉上核における振動の停止と再開機序について考察する。

O-16. 冬眠行動と低温下での褐色脂肪組織熱産生

○北尾直也¹、橋本真明^{1,2} (¹旭川医科大学生理学講座自律機能分野、²帝京科学大学医療科学部東京理学療法学科生理学)

【背景】通常、褐色脂肪組織 (BAT) では、交感神経終末

から分泌されたノルアドレナリンが $\beta 3$ アドレナリン受容体に結合、細胞内 cAMP の上昇を介して産熱する。冬眠動物において、BAT 熱産生は冬眠中の低体温からの復温において重要であると考えられてきた。しかしながら、氷点付近という体温のもとでの産熱メカニズムについては不明な点が多い。そこで本研究では、低温下での $\beta 3$ アゴニストに対する応答性が、冬眠期を通してどのように変容するのか、そして、その変容は何に起因するのか、を明らかにすべく、以下の実験を行った。

【方法】室温 25℃ で通常飼育した動物 (温暖群) と、室温 5℃・恒暗条件下で飼育し、冬眠前 (寒冷群) あるいは冬眠期の各相にある動物 (中途覚醒群・冬眠群)、それぞれから BAT を摘出し、実験に用いた。各々の BAT を $\beta 3$ アゴニスト (CL 316243) で刺激し、1) BAT 熱産生の指標として、酸素消費量 2) 細胞内の cAMP 蓄積量を、低温下 (12℃) および通常温度下 (36℃) で測定した。

【結果と考察】1) 低温下・通常温度下どちらの条件下でも、アゴニスト刺激によりいずれの群の BAT も、Basal の値に対して有意に酸素消費速度が亢進した。しかしながら、その最大消費速度を比較すると、通常温度下では群間に有意な差はなかったのに対し、低温下では冬眠期の BAT でのみ高い値を示した。また、2) 様々な濃度のアゴニストに対する細胞内 cAMP の蓄積量を測定すると、通常温度下では温暖群、冬眠群の間に差はなかったのに対し、低温下では、温暖群に比べ冬眠群において、低濃度のアゴニスト刺激時の蓄積量が有意に多かった。これらの結果は、冬眠動物の BAT はわずかな刺激に対してもそれを受容し、産熱できる機構を潜在的に持っているが、その機構は冬眠行動に対応して獲得されるものであることが示唆される。