

第 58 回中部日本生理学会

会 期：平成 23 年 11 月 1 日（火）、2 日（水）

場 所：福井県民ホール（アオッサ 8 階）

当番幹事：福井大学医学部統合生理学講座/分子生理学講座 合同（大会長 樋口隆）

演 題 数：46 題

日本生理学会中部地方会は、第 58 回中部日本生理学会として上記日程で開催されました。口演 23 題、ポスター 23 題の計 46 演題が発表され、70 名を超える先生方にご参加いただき、活発な質疑応答が行われました。また特別講演を一般公開し、多くの聴講者に生理学研究の最先端の様子を伝えることができました。1 日目終了後には懇親会、2 日目終了後には毎年恒例のテニス大会が開催され、多数の方々の参加をいただき、盛会裏に終了いたしました。参加者の皆様に厚くお礼申し上げます。次回の当番幹事は自然科学研究機構 生理学研究所の予定です。

L-1. 社会能力の発達過程：脳機能画像法によるアプローチ

○定藤規弘（自然科学研究機構生理学研究所大脳皮質機能研究系）

社会能力とは、他人の性質や意図を正確に認知するための情報処理過程と定義され、その発達は、他者との関係において子どもの示す行動パターン、感情、態度ならびに概念と、それらの経時的な変化として観察されますが、その神経基盤および発達期における獲得過程については不明の点が多いのです。近年、機能的磁気共鳴画像（機能的 MRI）による非侵襲的脳機能画像の進歩が、ヒト脳の神経活動を観測することを可能にし、社会能力を含む高次脳機能の解明には欠かせない手段となっています。本講演では、機能的 MRI を用いて、自他同一性から自他区別、共感と心の理論の発達を経て向社会行動（利他行為）へ至る、というモデルに基づき社会能力の発達過程を解明する試みについてお話しします。特に人間の利他的行為において社会的承認（褒め）が重要であること、そしてそれが基本的報酬や金銭報酬と同様の神経基盤をもつことが明らかとなりました。さらに、社会能力発達の重要な指標である共同注意の神経基盤を 2 個体同時 fMRI 計測によって明らかにする取り組みについて紹介し、個体を対象とした従来のイメージング研究から、複数個体間の相互作用の神経基盤を探るといふ、新たな研究方向を展望します。最後に、ヒトの社会能力について物質レベルから行動レベルに至る統合的理解を目指すために、ミクロからマクロレベルにいたるまで各階層で進行している神経科学の成果を人文諸科学と結びつけてい

くことが重要であること、その結節点としてのイメージング研究の重要性を論じます。

O-1. S1P2 受容体遺伝子の破壊は apoE 欠損マウスにおける粥状動脈硬化を抑制する

○岡本安雄¹、王 飛¹、居軒 功²、吉岡和晃¹、多久和典子^{1,3}、多久和 陽¹（¹金沢大学医薬保健研究域医学系血管分子生理学、²同 内科学、³石川県立看護大学健康科学講座）

スフィンゴシン-1-リン酸（S1P）は、動脈硬化の発症に関与する血管内皮、平滑筋、マクロファージ（Mφ）などの様々な細胞種に対して、多彩な作用をおよぼす脂質メディエーターである。本研究では、S1P2 型受容体（S1P2）遺伝子欠損動脈硬化（ApoE^{-/-}背景）マウスを解析することにより、粥状動脈硬化における S1P2 の役割を検討した。高コレステロール食を負荷した S1P2^{-/-}マウスでは S1P2^{+/+}マウスに比較して、大動脈のプラーク面積が著しく減少し、プラークの Mφ 密度の低下、NO 合成酵素 eNOS のリン酸化亢進およびサイトカイン発現低下が観察された。骨髄移植実験により、Mφ に発現する S1P2 が粥状動脈硬化に主要な役割を果たすことが示された。S1P2^{-/-} Mφ においては、Rho/Rho キナーゼ/NF-κB 活性が低下し、サイトカイン発現低下、酸化 LDL 取り込み低下、コレステロール汲みだし亢進を示した。また、S1P2^{-/-}マウス由来の肺毛細血管内皮細胞においても Rho キナーゼ/NF-κB 活性が低下し、MCP-1 の発現低下および eNOS リン酸化の亢進が観察された。S1P2^{+/+}マウスに S1P2 選択的遮断薬を長期投与すると、プラーク面積が減少した。以上の結果

から、S1PR2は粥状動脈硬化において重要な促進的役割をはたし、粥状動脈硬化に対する新規治療標的となりうると結論される。

O-2. ラット腸間膜動脈でのU46619による張力制御機構

○高野 博 充¹, KA. Dora², CJ. Garland², 橋谷 光¹
(¹名古屋市立大学大学院医学研究科細胞生理学, ²Department of Pharmacology, University of Oxford)

生体内では様々なアゴニストが血管の収縮を引き起こすが、その機構は様々であり、結果として各々異なる血管反応を形成する。今回我々はTX受容体を介する血管収縮機構を、 α 受容体を介する血管反応と比較することでその特徴を明らかにしようと試みた。実験にはラットの腸間膜動脈を標本として用い、ワイヤミオグラフを用いて等尺性にその張力を測定した。またガラス微小電極法を用いて、張力測定と同時に血管細胞の膜電位を測定した。TX受容体アゴニストとしてU46619、 α 受容体アゴニストとしてフェニレフリンを用い、それぞれによる収縮(張力)と膜電位変化の関係を調べた。フェニレフリンとU46619はそれぞれ濃度依存的に脱分極と収縮を引き起こした。しかし、3 μ M以上の濃度のフェニレフリンを投与すると、膜電位変化と収縮はオシレーションし、両者は同期していた。U46619は10nMから脱分極と収縮を始めたが、フェニレフリンの閾値は1 μ Mであった。脱分極の大きさと張力変化の大きさの関係をみると、同じ脱分極の大きさでもフェニレフリンのほうがより大きな張力変化をさせていた。しかし、L-NAME存在下では両者の脱分極—張力変化の関係は差が見られなくなった。以上の結果からフェニレフリンとU46619はどちらも膜電位依存的に収縮する機構を有するが、U46619はより低い濃度で収縮を引き起こし、同時にNOを産生させるという、異なる血管張力制御機構を有していると考えられた。

O-3. ADHDモデルラットにおける豊かな環境飼育：発育期SHRの多動性と衝動性の減少

○清水由布子, 渡辺陽子, 横山善弘, 増田 匡, 三角吉代, 飛田秀樹(名古屋市立大学大学院医学研究科脳神経生理学)

注意欠陥/多動性障害(ADHD)は学齢期の約5~10%で見られる発達障害である。遺伝的要因に加え環境要因の影響も報告され、発育期の養育という点から環境要因による脳への影響が注目されている。ADHDの主症状は多動性、不注意、衝動性であるが、自然発症型高血圧ラット(SHR)が発育期にADHD様行動を示すことからADHDモデル動

物として広く用いられている。

本研究は、ADHDモデルのSHRを用い、発育期の外部環境の変化が脳にどのような影響を与えるのかを調べた。生後25日齢から8週齢までの発育期に3つの異なる環境下(豊かな環境:EE, 通常環境:SE, 孤独環境:IE)で飼育し、オープンフィールドテストにより多動性および衝動性の情動行動を評価した。

その結果、EEで飼育したSHRは、SEおよびIEで飼育した動物に比べ、多動性と衝動性が著しく減少していた。また、シリンダーテストにより、新奇環境への適応能力が向上していることが示された。

次に、脳内ドパミン(DA)系の変化を調べるため、内側前頭皮質(PFC)、側坐核(NAc)、扁桃体(Amy)においてDA関連遺伝子の発現変化を調べた。その結果、EEで飼育したSHRにおいて、coaine- and amphetamine-related transcript (CART)の遺伝子発現はNAcやAmyで変化は認められないが、PFCで増加していることが明らかになった。

これらの結果から、発達期の外部環境の変化がADHD症状(多動性および衝動性)の発現に影響を与え、この機構にはPFCにおけるCARTの発現変化が関与していることが示唆された。

O-4. マウス膀胱粘膜下に存在する傍血管間質細胞の機能形態学的解析

○三井 烈, 橋谷 光(名古屋市立大学大学院医学研究科細胞生理学)

【背景】ラット膀胱粘膜下の細静脈は自発収縮を有し、細静脈周囲に存在する間質細胞は自発細胞内カルシウム濃度($[Ca^{2+}]_i$)上昇を発生する(Hashitani et al. 2011)。本研究では、免疫組織化学法および透過型電子顕微鏡法を用いてマウス膀胱における傍血管間質細胞の形態学的解析を行い、カルシウムイメージング法により自発 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の発生機序について検討した。

【結果】傍血管間質細胞は、 α 平滑筋アクチン抗体陽性で細胞体から複数の突起を伸ばして細静脈周囲にネットワークを形成していた。電子顕微鏡観察によりカベオラや基底膜など平滑筋と同様の特徴も認められたが、細動脈周囲に観察される平滑筋と比較して収縮線維の量は少なかった。傍血管間質細胞の自発 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は、ニカルジピンおよびYM-244769(NCX阻害薬)では抑制されなかったが細胞外カルシウムに依存していた。またCPAおよび2APBにより抑制されたがリアノジンでは抑制されなかった。

【考察・結論】膀胱の傍血管間質細胞は細静脈周囲にネットワークを形成する α 平滑筋アクチン免疫陽性の細胞で、

平滑筋と類似する微細構造を示す。この細胞の自発 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇には、L型 Ca^{2+} チャネルおよびNCX以外の経路を介した細胞外からの Ca^{2+} 流入と、おそらく $InsP_3$ 受容体を介した細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 遊離が関与していると考えられた。

O-5. 低体温への耐性

○岩田ちひろ, 安部 力, 森田啓之 (岐阜大学大学院医学系研究科生理学)

非冬眠動物であっても、強制的に体温を下げることにより代謝を抑制し、人工冬眠状態にすることができる。この方法は、救急現場や手術室で低体温療法として用いられているが、呼吸抑制、不整脈、虚血再環流障害の出現といった重篤な副作用のために、低体温の程度や期間は限られている。より低い体温で、より長期間の生存を可能とするために、いくつかのカウンターメジャーを行い、低体温耐性に対する効果を評価した。例えば硫化水素は好気性代謝の抑制、炎症性メディエーターの抑制により代謝の抑制作用と、虚血に対する臓器保護作用があると報告されている。硫化水素ドナーであるNaHS (2mg/kg/h)を体内に持続投与することにより、低体温への耐性が向上するかどうかを、ラットを用いて調べた。生理食塩水を投与したラットは $21.3 \pm 1.1^\circ C$ で血圧低下(平均血圧50mmHg以下)が認められたのに対して、NaHSを投与したラットでは $17.1 \pm 1.0^\circ C$ まで血圧を保つことができた。いくつかのカウンターメジャーを併用することによって、ラットが死亡することなく、より長期間、より低い体温の維持ができるようになる可能性がある。

O-6. 高張NaCl溶液の小量投与による一過性の心不全

○安部 力, 飯田知宏, 森田啓之 (岐阜大学大学院医学系研究科生理学)

[目的]意識下および麻酔下のラットに0.9% NaCl溶液を静脈内に小量投与(2mL/kg)しても動脈血圧は維持されるが、9% NaCl溶液を静脈内に小量投与すると、動脈血圧は一過性に低下する。今回の実験では、動脈血圧の低下が末梢血管の拡張によるものか、もしくは心臓の収縮性の低下によるものかを調べることにした。[方法]ウレタン麻酔下で、すべてのラットの総頸動脈(左心室圧測定)、大腿動脈(動脈血圧測定)、大腿静脈(中心静脈圧測定と筋弛緩薬投与)、外頸静脈(9% NaCl溶液投与用)にカテーテルを挿入した。人工換気下で、5分ごとに9% NaCl溶液(2mL/kg)を投与した時の応答を記録した。[結果]9% NaCl溶液を投与すると動脈血圧は 33 ± 4 mmHg低下した。この動脈血圧の低下は、NOS阻害薬(L-NAME)およびニコチン受容体

遮断薬(Hexamethonium)では変化しなかった。一方、左心室収縮期圧は 40 ± 5 mmHg低下し、左心室拡張期圧は 6 ± 2 mmHg上昇し、中心静脈圧は 4 ± 0.3 mmHg上昇し、 dp/dt は $45 \pm 7\%$ 低下した。これらの応答は約30秒で元の状態に戻り、 10 ± 1 回の繰り返し投与後に死亡した。しかし、迷走神経を切断すると 4 ± 1 回の繰り返し投与で死亡し、一方、アトロピンを投与すると、 11 ± 1 回の投与で死亡した。[結論]9% NaCl溶液投与による動脈血圧の低下は一過性の心不全によるものであり、迷走神経の求心路が遮断されると一過性心不全からの回復が起こりにくくなることが分かった。

O-7. IB4陽性培養後根神経節細胞における機械感受性電流の低pHによる感作機構

○久保亜抄子^{1,2}, 水村和枝² (¹名古屋大学環境医学研究所神経系分野2, ²中部大学生命健康科学部理学療法学科)

運動・虚血・細胞壊死などにより引き起こされる組織内pHの低下は、機械刺激に対する末梢求心性神経の感受性を高めることが報告されているが、その感作機構は明らかになっていない。そこで今回、本感作機構について細胞レベルでの解析を行なった。新生ラットから単離培養した後根神経節細胞の細胞体膜を先端径3-5 μm のガラスピペットで直接機械刺激することで惹起される機械刺激応答電流は、pH7.0, 6.6, 6.2の低pH溶液投与により有意に増強された。機械刺激応答電流が増強された細胞の割合はpH依存的であり、コンドロイチン硫酸糖蛋白質であるパーシカンが発現している細胞(IB4陽性細胞)で有意に高かった(IB4陽性:58% (n=73) vs. IB4陰性:16% (n=57), $pH6.2$, $p < 0.001$, χ^2 test)。IB4陽性細胞での低pHによる機械刺激応答電流増強は細胞外液への0.1-0.3%コンドロイチン硫酸溶液添加によって抑制されたが、IB4陰性細胞での増強は抑制されなかった。さらに、コンドロイチナーゼABCによって前処理したIB4陽性培養細胞では、低pHによって機械刺激応答電流が増強された細胞の割合は有意に低下した。以上より低pHによる機械感作には、細胞膜糖蛋白質であるパーシカンが関与していることが示唆された。

O-8. 洞結節自動能の発現維持における細胞内 Ca^{2+} 動態ならびに Na^+/Ca^{2+} 交換電流の役割:分岐解析による理論的検証

○倉田康孝¹, 久留一郎², 芝本利重¹ (¹金沢医科大学生理学II, ²鳥取大学大学院医学系研究科機能再生医科学)

[目的]洞結節自動能の発現は、形質膜イオンチャネル電流の相互作用(Membrane Clock)によるとされてきたが、近年、筋小胞体 Ca^{2+} Clock(細胞内 Ca^{2+} 動態)の役割が注

目されている。本研究では、ウサギ洞結節細胞モデルの分岐構造を解析し、自動能の発現・維持における筋小胞体 Ca^{2+} Clock 及び $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体の役割を非線形力学的に検証した。

【方法】ウサギ洞結節細胞モデルの平衡点（定常状態）と周期解（自発性振動）及びその安定性のパラメータ依存性変化を示す分岐図を作成し、細胞内 Ca^{2+} 濃度及び膜電位の安定性とその変化を解析した。

【結果】1) 形質膜イオン電流を除去した閉システムでは筋小胞体 Ca^{2+} 取込・放出速度に依存して細胞内 Ca^{2+} 濃度の平衡点が不安定化し、自発性 Ca^{2+} 濃度振動が生じた。2) $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換電流は Hopf 分岐を抑制することにより細胞内 Ca^{2+} 濃度の平衡点を安定化した。3) Ca^{2+} Clock を除去すると L 型 Ca^{2+} チャネル電流抑制時に周期解の分岐が生じて自発性電位振動が不安定化（不整振動が出現）し、Hopf 分岐による平衡点の安定化が促進された。4) L 型 Ca^{2+} チャネル電流抑制下では筋小胞体 Ca^{2+} 取込速度減少により平衡点の Hopf 分岐が生じ、自動能が消失した。

【総括】生理的条件下での洞結節自動能の発現には主に Membrane Clock が寄与しており、 Ca^{2+} Clock は必須ではない。 Ca^{2+} Clock の基本的な役割は自動能のロバスト性を強化することであるが、L 型 Ca^{2+} チャネル抑制下での洞結節自動能は Ca^{2+} Clock 依存性となり得る。

O-9. In vivo- and in vitro-Imaging analyses of the exposure of phosphatidylserine on platelets' surface in a process of micro-thrombus formation

○T. Brzoska¹, Y. Suzuki¹, T. Hayashi¹, H. Mogami², T. Urano¹ (¹The 2nd Dept. of Physiology, Hamamatsu Univ. Sch. of Med., ²Dept. of Health and Nutritional Sci., Hamamatsu University)

An adequate surface exposure of phosphatidylserine (PS) on the platelet outer membrane leaflet promotes thrombin formation by providing a catalytic membrane surface for vitamin-K dependent coagulation factors. The exact mechanisms and the involved factors to regulate the exposure of PS during thrombus formation, however, remain to be defined. In the present study, we analyzed thrombus formation in living green fluorescent protein (GFP)-transgenic mice using intravital microscopy. After focal injury of mesenteric vessels by laser-irradiation through objective lens, both platelet aggregation and micro-thrombus formation were successfully visualized by the increase in fluorescent intensity of GFP-expressing platelets. PS exposure on platelets surface was also moni-

tored using fluorescent labeled annexin A5. PS was exposed only in a part of aggregated platelets predominantly localized in the center of the thrombus as was fibrin generation, suggesting that PS exposure is precisely regulated by time- and space-dependent mechanisms. To address the question how PS exposure is regulated in platelets existing in the thrombus, we employed an in-vitro experiment in which fibrin network was formed in the presence of platelets, and PS exposure on the platelets surface were analyzed. We found that outside-in signals in platelets generated by their bindings to rigid fibrin network are essential for PS exposure. PS exposure on platelets appeared to be also regulated by mechanical foci generated by surrounding fibrin network.

O-10. 発達期の脳皮質の各領域における移動細胞のカルシウム振動

○中西康彦, 福田敦夫, 熊田竜郎, 古川智範, 江川 潔 (浜松医科大学医学部生理学第一講座)

発達期の脳皮質における移動細胞では KCC2 よりも NKCC1 の発現が多く、細胞内クロライド濃度が高いため GABA_A 受容体は興奮性に作用し、細胞の増殖、分化、移動に関与すると考えられている。しかし GABA が枯渇した GAD67-GFP ノックインマウスの脳皮質で移動細胞の分布を調べたところ異常はみられなかった。一方 GABA_A 受容体阻害剤 SR95531 を持続的に投与したところ GABA_A 受容体アゴニストは細胞移動に対して抑制的に作用することが分った。

そこで GABA_A 受容体のコ・アゴニストであるタウリンに注目して分布を調べたところタウリンはサブプレート (SP) と辺縁帯に、GABA は中間帯と皮質板 (CP) に多いことが分った。この分布の相違が細胞移動を制御すると仮定し、タウリントランスポーター阻害剤 GES および GABA トランスポーター阻害剤 NPA を投与してタウリンと GABA の細胞外濃度を増加させ、細胞移動の指標としてカルシウム振動を計測したところ SP ではタウリンが、CP では GABA がその増加に寄与していることが分った。またタウリンと GABA の放出経路と考えられるアニオンチャネル阻害剤 DCPIB を投与し、タウリンと GABA の細胞外濃度を低下させたところ各領域でカルシウム振動が減少した。

以上から GABA_A 受容体を介したカルシウム振動に対し、タウリンは主に SP で、GABA は CP で作用しているといえる。

O-11. 抗 IL-6 受容体抗体を用いた外傷性嗅覚障害マウスの嗅神経再生

○玉利健悟^{1,2}, 小林正佳¹, 宮村朋孝¹, 山本哲朗², 竹内万彦¹ (¹三重大学大学院耳鼻咽喉・頭頸部外科学, ²三重大学大学院システム神経科学)

交通事故などで生じる頭部外傷性嗅覚障害は予後が悪いことが知られている。これまでの研究では、外傷性嗅覚障害モデルマウスを用いた嗅神経切断後の神経再生が局所傷害の重症度と炎症の強度に依存し、局所炎症に対して傷害急性期にステロイド薬を投与すれば、マクロファージの浸潤とグリア瘢痕形成を抑制し、嗅神経再生が促進されると報告されている。しかし、頭部外傷治療のガイドラインでは、急性期のステロイド薬投与を副作用への懸念を理由に推奨していない。

近年、関節リウマチなどの難治性炎症性疾患で、炎症性サイトカインであるインターロイキン6の受容体抗体(抗IL-6R抗体)が臨床的に実用化されている。本研究は、外傷性嗅覚障害に対して抗IL-6R抗体が有効であるかを検討した。

嗅神経の観察が容易なOMP-tau-lacZマウスの嗅神経をステンレス製カッターで切断し、外傷性嗅覚障害モデルマウスを作製した。その後の回復過程を組織学的、嫌悪学習を用いた行動学的解析、さらに神経再生の確認を電気生理学的実験により調べた。

抗IL-6R抗体(MR16-1)投与群は、コントロールIgG投与群よりも、局所炎症細胞浸潤とグリア瘢痕形成が軽度で、嗅神経の再生度が有意に高かった。また、嗅覚機能の回復も有意に良好であった。

以上から、外傷後急性期の抗IL-6R抗体投与は嗅神経切断後の嗅神経再生促進に有効であり、外傷性嗅覚障害の予後成績向上に貢献する可能性があると考えられる。

O-12. 生後初期に一過性のバグマングリア由来の小脳顆粒前駆細胞の分裂を促進する

森島寿貴¹, 熊田竜郎¹, 高山千利², 吉田祥子³, ○福田敦夫¹ (¹浜松医科大学医学部生理学第一講座, ²琉球大学大学院医学研究科分子解剖学講座, ³豊橋科学技術大学院環境生命工学系生命機能科学研究室)

小脳皮質発生過程において顆粒細胞は外顆粒層外層(oEGL)で長期にわたり分裂する顆粒前駆細胞から生じるが、分裂様式は発達時期により変化し、ラットでは生後の著しい分裂に伴い葉構造が形成される。この時期にGABA_A受容体の発現がダイナミックに変化するが、生理的な役割については分かっていない。近年我々が開発した酵素反応法によるGABAイメージング法(Morishima *et*

al., *Neurosci. Res.* 2010)により、生後ラットの小脳皮質における細胞外GABAの空間的分布を可視化した結果、生後1週齢以内のoEGLで細胞外GABA濃度が一過性に高くなることを見いだした。電気生理学的にも同時期のoEGL細胞でGABA_A受容体を介するトニック電流が記録された。GABAの放出と取り込み機構を薬理的に検討したところ、oEGLにおける細胞外GABA濃度はテタヌス毒素投与では変化しなかったが、bafilomycin投与により増加し、4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS)投与で減少したことから、GABAは容積依存性アニオンチャンネルで放出され、小胞性GABAトランスポーター(vGAT)で取り込まれることが示唆された。GABA合成酵素GAD65やvGATの発現はGLAST陽性線維と一過性に共局在し、バグマングリアがGABAの合成・放出・取込に関与する可能性が示唆された。oEGLにおける細胞外GABAの役割を検討するため、徐放性樹脂を用いてbicucullineを生後3日目から小脳皮質に慢性的に投与したところ、運動失調を伴う小脳皮質の形成不全を惹起し、oEGLでは分裂マーカーのPCNAやCyclin D1の発現が消失した。以上よりバグマングリア由来の細胞外GABAが葉形成期における小脳顆粒前駆細胞の分裂を促進していることが示唆された。

O-13. Activity of head direction cells in the thalamus is modulated by movement direction and locomotion

○N. Enkhjargal¹, 松本惇平¹, 堀悦郎¹, 小野武年², 西条寿夫² (¹富山大学医学薬学研究部(医学)システム情動科学, ²富山大学医学薬学研究部(医学)神経・整復学)

Head-direction (HD) cells are active only when the animal's head points in a specific direction within an environment, and are believed to encode the animal's perceived directional heading with respect to the environment. These neurons are found in the several brain areas including the post-subiculum, retrosplenial cortex, the thalamus (the anterior and the lateral dorsal thalamic nuclei), lateral mammillary nucleus, etc. Previous studies indicated that activity of head direction cells is dependent on both vestibular inputs and locomotion (proprioceptive inputs). In these previous studies, the animals were tested only in a condition in which the animals locomoted forward. In the present study, the rats were tested in a condition in which they locomoted forward, but they moved backward while HD cells were recorded from the thalamus. The rats were placed on a treadmill on a stage that moved in a figure 8-shaped pathway. The HD neurons were recorded under 3

conditions; 1) an initial control session, in which both the stage and the treadmill moved forward, 2) a backward (mismatch) session, in which the stage was moved backward while the rats ran forward on the treadmill, and 3) the same control condition as the initial control session. A total of 61 thalamic neurons were recorded during the 3 sessions. Of these, 26 displayed head direction-related activity only in the forward or backward session, but not both the sessions, and 21 displayed movement direction-related activity across the 3 sessions regardless of head direction. These results suggest that HD cells in the thalamus encode not just head direction, but combination of proprioceptive and vestibular inputs.

O-14. ヒトとニホンザルによる顔の視覚探索課題

○中田龍三郎, 田村了以, 永福智志 (富山大学医学薬学研究部 (医学) 統合神経科学講座)

<目的>本研究は複数の(顔以外の)オブジェクト画像から顔画像を検出する課題(顔の視覚探索課題)を研究対象としている。その特徴は、1度に呈示される画像数が多くなっても迅速な顔画像の検出が可能なことである(Hershler & Hochstein 2005 など)。これは並列的な視覚処理によって顔画像がポップアウトすることを示している。一方でヒト以外の動物を対象とした同様の研究はチンパンジーによる研究(Tomonaga & imura 2008)等少数であり、不明点が多い。本研究の目的は、顔の視覚探索課題においてポップアウトが生じる顔画像をサルとヒトで比較し、両種の顔処理メカニズムの差異について検討することである。

<方法>ヒトとニホンザルを対象とした。ターゲット刺激(顔画像)として自種顔・他種顔・顔と同様の布置を有する(顔に似た)オブジェクト画像を用いた。3~19枚のディストラクター刺激(顔以外のオブジェクト画像)と1枚のターゲット刺激を同時に呈示し、ターゲット刺激検出に要する時間を測定した。

<結果>ヒトを対象とした実験では、自種顔のみで顔画像のポップアウトを示した。さらに、迅速な検出には髪やあごといった顔の輪郭部分の情報が手がかりとなっていることが示唆された。目や口といった顔部位の布置情報は対象が顔であるのか否かを判断する際に手がかりとなる(例えば線を両眼と口に相当する布置に配置すると顔に見える(—))が、視覚探索場面における迅速な顔検出にはそれとは異なる顔の情報が利用されていると考えられる。サルの実験においても自種顔のみで顔画像のポップアウトを示し、ヒトと似た傾向があった。しかし手がかりとする顔部

位についてはヒトと差異が見られた。本発表にて、より詳細な報告を行う。

O-15. サル海馬における短期シナプス可塑性

○田村了以¹, 西田 悠^{1,2}, 永福智志¹, 伏木宏彰², 渡邊行雄² (¹富山大学大学院医学薬学研究部(医学)統合神経科学, ²富山大学大学院医学薬学研究部(医学)耳鼻咽喉科頭頸部外科学)

海馬は記憶の形成とその一定期間の保持に重要な役割を果たす。海馬における短期および長期のシナプス可塑性は、記憶痕跡の神経基盤であると考えられている。対パルス刺激法は、げっ歯類で短期シナプス可塑性を評価するための標準的な手法である。しかし、霊長類では海馬が脳深部に位置するため、これまでこの手法は開発されていなかった。本研究で我々は、サル海馬の対パルス刺激法を開発し、貫通路内側部の刺激による歯状回での対パルス反応性を検討した。その結果、集合興奮性シナプス後電位に関しては主として対パルス抑圧が観察された。この対パルス抑圧は、弱刺激では初期(10-30ms)に強く、中間期(50-70ms)には消失し、後期(100-1000ms)に再度弱く出現し、強刺激強では長期間(10-1000ms)持続した。また、強刺激で生じる集合スパイクに関しては、早期(10-200ms)には完全ブロックまたは強い抑圧、後期(500-2000ms)には抑圧の消失または弱い促進傾向が生じた。この後期促進傾向はジアゼパム(1.5mg/kg または 3.0mg/kg)投与により増強した。これらの結果より、貫通路内側部の刺激による歯状回の対パルス反応は、霊長類とげっ歯類とで類似しているが、集合スパイクへの対パルス抑圧効果が霊長類でより長く持続し、ジアゼパムに対する感受性も異なっていることが明らかとなった。

O-16. マウス TRPA1 の新規 splicing variant によるチャンネル活性の調節

○周一鳴^{1,2}, 内田邦敏^{1,2}, 鈴木喜郎^{1,2}, 富永真琴^{1,2} (¹岡崎統合バイオサイエンスセンター細胞生理部門, ²総合研究大学院大学生理学専攻)

TRPA1はTRPイオンチャンネルスーパーファミリーに属する非選択性陽イオンチャンネルである。TRPA1は主に後根神経節および三叉神経節細胞に発現し、さまざまな化学物質による刺激によって活性化されることが知られている。またTRPA1チャンネルは神経障害性疼痛などに関与していることが示唆されている。

我々はマウスにおいてTRPA1の新規 splicing variant を見出し、TRPA1Sと名付けた。TRPA1SはTRPA1の2番目の膜貫通ドメインを含む領域をコードする exon 20 を

欠失しているが、タンパク質に翻訳され細胞膜に存在し得ることが Western blotting および EGFP 標識したタンパク質の観察によって確認された。また TRPA1S はマウス後根神経節や三叉神経節において発現していることが RT-PCR 法で観察された。HEK293 細胞を用いた強制発現系における whole-cell patch clamp 法による解析では、TRPA1S 単独ではチャネル活性を認めなかったが、TRPA1 と共発現させると carvacrol や thymol のような化学物質への応答に有意な変化が認められた。以上のことから、生体内において TRPA1S が TRPA1 の活性を調節し得ることが示唆された。その際、TRPA1 の単一チャネルコンダクタンスに変化が認められなかったことから、TRPA1S は TRPA1 チャネルの化学物質感受性の変化のみに寄与していることが示唆された。

O-17. TRP チャネルの母子間ミネラル輸送における役割

○鈴木喜郎^{1,2}, MA. Hediger³, 富永真琴^{1,2} (¹岡崎統合バイオサイエンスセンター細胞生理部門, ²総合研究大学院大学, ³ベルン大学生物化学医学研究所)

TRPV6 は非常に高い Ca²⁺ 選択性を有するという特徴を持つ TRP チャネルである。これまでの研究によってマウス TRPV6 が食物からの小腸 Ca²⁺ 吸収に関与すること、また、Gain of function 型の TRPV6 ハプロタイプがヒトにおいて小腸 Ca²⁺ 過剰吸収に由来する尿路結石症の発症に関与することが明らかとなり、TRPV6 が小腸 Ca²⁺ 吸収の際の管腔膜 Ca²⁺ チャネルとして機能していることが強く示唆された。今回我々は TRPV6 の Loss of function によって起こると想定される Ca²⁺ 欠乏症に着目した。TRPV6 が胎盤において高発現していることから *Trpv6* ノックアウト胎仔を解析した結果、血中・羊水 Ca²⁺ 濃度および総ミネラル重量が WT 胎仔に比べ有意に減少していた。血中および羊水中の Mg²⁺ 濃度は変化しなかった。また、母親から胎仔への Ca²⁺ 輸送能は WT に比べ約 40% 減少していた。さらにマウス胎盤において TRPV6 は intraplacental yolk sac および visceral layer of yolk sac に局在し、胎仔の骨の石灰化が行われる妊娠終期に合わせて発現量が顕著に増加した。以上のことから TRPV6 はマウスにおいて、胎仔の骨石灰化のための母子間 Ca²⁺ 輸送に関与することが示唆された。また残りの 60% の輸送については別の分子の関与が同時に示唆されたため、候補分子においてスクリーニングを行った結果、TRPM6 がその機能を担い得ることが示唆された。

O-18. アストログリアにおける自己放出された ATP に

よる細胞容積感受性外向整流性アニオンチャネル (VSOR) の Ca²⁺ 依存的な活性化

○秋田天平¹, SV. Fedorovich^{1,2}, 岡田泰伸¹ (¹自然科学研究機構・生理学研究所・機能協同研究部門, ²ベラルーシ国立科学アカデミー研究所)

細胞容積感受性外向整流性アニオンチャネル (VSOR) はあらゆる細胞に発現しており、典型的には細胞容積の増大を感知して活性化されるが、その機序の詳細は依然謎である。一方、最近我々はマウス大脳皮質由来アストログリア細胞において、VSOR が炎症伝達物質のブラジキニンにより容積増大を伴わずに活性化され、それが細胞内各種 Ca²⁺ チャネルの開閉近傍に形成される高 Ca²⁺ 濃度領域「Ca²⁺ ナノドメイン」内での PKC 及び活性酸素種生成酵素 NOX の活性化に依存していることを明らかにした (Akita & Okada, *J Physiol* 589 (16) : 3909-3927, 2011)。そこで我々は、典型的な低浸透圧刺激時の容積増大による VSOR 活性化にも同様な機序が存在するか否かについて検討した。すると、アストログリアにおいては容積増大に伴って自己放出された ATP の作用による Ca²⁺ 依存的な VSOR 活性化が、低浸透圧刺激による VSOR 活性全体の 4 割程度を説明することが判明した。一方、同じ刺激により誘起される細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇は、ほぼ完全にその ATP の作用に依存しており、容積増大後の調節性容積減少は細胞外 ATP 分解酵素 apyrase の存在下では抑制されたことから、自己放出された ATP の作用は、恐らく K⁺ チャネルの活性化等を通じて、細胞容積調節そのものには不可欠なものであることが示唆されている。

O-19. SLC26A9 Cl⁻チャネルの細胞容積変化による調節

○清水貴浩, 二谷章大, 藤田恭輔, 藤井拓人, 竹口紀見, 酒井秀紀 (富山大学大学院医学薬学研究部薬物生理学)

Solute carrier (SLC) 26A9 は Cl⁻/HCO₃⁻ 交換輸送体として同定された SLC26 ファミリーに属するタンパク質であるが、最近 SLC26A9 が Cl⁻/HCO₃⁻ 交換輸送体としてではなく、Cl⁻ チャネルとして機能することが明らかになってきている。そこで本研究では、パッチクランプホールセル記録法を用いて SLC26A9 チャネルの電気生理学的性質を確認するとともに、その機能調節メカニズムを明らかにすることを目的とした。

SLC26A9 をサル腎臓由来 COS-7 細胞に一過性に発現させたところ、mock 細胞に比べ大きなホールセル電流が観測できた。その電流は電位・時間非依存的であった。また細胞外 Cl⁻ を aspartate に置換すると外向き電流が小さく

なり、逆転電位が脱分極側に大きくシフトした。さらにフルフェナミン酸 (500 μ M) が SLC26A9 電流を約 50% 阻害した。これらの結果は、SLC26A9 が Cl⁻チャネルとして機能することを示唆している。次に、SLC26A9 Cl⁻チャネルの浸透圧感受性を検討したところ、SLC26A9 電流は高浸透圧刺激により減少することが明らかとなった。一方で、低浸透圧刺激は SLC26A9 電流に影響を与えなかった。

以上の結果から、SLC26A9 は細胞縮小により抑制を受ける電位非依存性 Cl⁻チャネルであることが明らかとなった。

O-20. ウアバインによるヒト大腸癌細胞のバイアピリティ低下と容積感受性 Cl⁻チャネルの活性化

○藤井拓人, 船山佳佑, 清水貴浩, 本領 智, 竹口規見, 酒井秀紀 (富山大学大学院薬物生理学)

強心配糖体であるウアバインは、癌細胞においてアポトーシス性細胞死を引き起こすことが報告されているが、その分子機序については確定していない。本研究では、ヒト大腸癌由来 HT-29 細胞を用いて、ウアバインにより引き起こされるバイアピリティ低下と容積感受性外向き整流性 (VSOR) Cl⁻チャネルとの関連性について検討した。ウアバインは、HT-29 細胞のバイアピリティを濃度依存的に低下させた (IC₅₀ = 60nM)。興味深いことに、ウアバインによるバイアピリティの減少を VSOR 阻害剤 DCPIB (10 μ M) は有意に抑制させた。そこで、ホールセルパッチクランプ測定を行ったところ、等張条件下でウアバインは濃度依存的に外向き整流性の Cl⁻電流を活性化させた。この電流は、高電位において時間依存的な不活性化を示し、DCPIB により抑制されたことから VSOR Cl⁻チャネルによる電流であると示唆された。siRNA により Na⁺, K⁺-ATPase α 1-isoform (α 1NaK) を 90% 以上発現低下させたノックダウン細胞では、ウアバインによるバイアピリティ低下および VSOR Cl⁻チャネルの活性化は見られなかった。以上より、ヒト大腸癌細胞において、低濃度ウアバインの α 1NaK への結合は、VSOR Cl⁻チャネルの活性化を引き起こし、癌細胞のバイアピリティを低下させる可能性が示唆された。

O-21. 血小板由来成長因子 β 受容体遺伝子ノックアウトマウスにおけるガンマオシレーションの障害

○中村友也¹, PTH.Nguyen¹, 堀 悦郎¹, 浦川 将², 上野照子³, J. Zhao¹, R. Li¹, ND. Bac¹, 濱島 丈⁴, 石井陽子⁴, 松島貴子⁴, 小野武年², 笹原正清⁴, 西条寿夫¹
(¹富山大学医学薬学研究部 (医学) システム情動科学, ²富山大学医学薬学研究部 (医学) 神経・整復学, ³富山大学医学薬学研究部 (医学) 統合生理, ⁴富山大学医学薬学研究部

(医学) 病理学)

血小板由来成長因子 (Platelet-Derived Growth Factor, PDGF) は増殖因子の一つであり、多くの *in vivo* 研究で PDGF は胚形成や脳発達に重要な役割を果たしていることが報告されている。ヒトの関連研究により、これら PDGF および PDGF 受容体 β サブユニット (PDGFR- β) 遺伝子は、統合失調症や自閉症に関係していることが示唆されている。一方、統合失調症や自閉症では、神経生理学的障害としてガンマオシレーションの障害が示唆されている。しかし、これまで PDGF 受容体とガンマオシレーションとの関連性は検討されていない。そこで、我々は Cre/lox-P システムを用いて中枢神経特異的 PDGFR- β 遺伝子ノックアウト (PDGFR- β KO) マウスを作成した。同マウスを用いた行動学的実験では、これら PDGFR- β KO マウスにおいて、空間記憶、社会行動、恐怖条件付け、プレバルス抑制 (PPI)、および強制水泳等が障害されていた。一方、神経解剖学的解析では、PDGFR- β KO マウスにおいて、扁桃体、海馬体、および内側前頭前皮質におけるパルブアルブミン陽性ニューロン (GABA 作動性ニューロン的一种) 数が減少していた。さらに、神経生理学的解析により、PDGFR- β KO マウスにおいて、聴覚刺激誘発同期性ガンマオシレーションが有意に減少していた。以上より、PDGFR- β はパルブアルブミン陽性ニューロンの発達に重要な役割を果たし、その障害によりガンマオシレーションが障害されることが示唆された。

O-22. レプチンによる末梢組織での糖代謝調節に関わる視床下部腹内側核のシグナル伝達機構

○戸田知得, 箕越靖彦 (生理学研究所生殖・内分泌系発達機構研究部門)

【目的および方法】レプチンは摂食行動及びエネルギー代謝を調節するホルモンである。近年、我々は、レプチンが視床下部腹内側核 (VMH) に作用して骨格筋などにおいて糖の取り込みを促進することを明らかにした。この効果はレプチンによる抗糖尿病作用と関連すると考えられる。レプチンは VMH において MEK/ERK, PI3 kinase および Jak/STAT 経路を活性化する。そこで VMH の各シグナル伝達因子が、レプチンの糖代謝調節作用をどう制御しているかを Hyperinsulinemic-euglycemic clamp 法を用いて調べた。

【結果】レプチンを VMH に投与すると、インスリンによる全身の糖利用亢進作用および肝臓からの糖放出抑制作用が亢進した。MEK inhibitor を VMH に作用させると、レプチンによる糖利用増加作用が抑制されたが、肝インスリン感受性亢進作用は変化しなかった。また、STAT3 inhibitor

は肝インスリン感受性亢進作用を抑制したが、糖利用増加作用に効果はなかった。PI3 kinase inhibitor はレプチン作用に影響を及ぼさなかった。

【結論】レプチンはVMHにおいてMEK/ERKを介して骨格筋など全身のインスリン感受性を高め、Jak/STAT3を介して肝臓のインスリン感受性を亢進する。レプチンはVMHにおいて糖産生と糖利用を別々に制御すると考えられる。

O-23. ラット網膜における内在性 AVP (バソプレシン) 産生細胞の発見

○小泉 周^{1,2}, 森藤 暁¹, 佐藤かお理¹, 岡田泰伸^{1,2}
(¹自然科学研究機構生理学研究所機能協同研究部門, ²総合研究大学院大学生命科学研究科生理科学専攻)

最近10年ほどの研究成果から、網膜には様々な種類の神経細胞が複雑な神経ネットワークを作り、光感受以上の複雑な視覚情報処理や恒常性の維持を担っていることが分かってきた。中でも、網膜アマクリン細胞とよばれる介在神経は、形態学的に少なくとも20種類以上のものがあると予測されており、それぞれが異なる働きを担っているものと考えられている。今回、我々は、AVP (アルギニンバソプレシン)-GFP 遺伝子改変ラットの網膜を用いて、内在性AVPを産生する細胞を網膜内で発見した。AVP-GFP 遺伝子改変ラットは、AVPプロモーター下にGFPを発現するよう産業医大・上田研で開発されたラットである。このラットの網膜を免疫染色によって観察したところ、AVP-GFPを発現する細胞が網膜神経節細胞層と内顆粒層に分布していた。とくにGFP強陽性の細胞はAVPの抗体に対しても陽性であり、実際に内在性のAVPを産生する細胞であることがわかった。これらの細胞は上記2層に存在していること、また軸索の存在は観察されなかったことから、アマクリン細胞であると考えられた。さらに、AVP-GFP強陽性細胞を単離後採取し、RT-PCRを行ったところ、AVP-GFPのtransgeneとともに、内在性AVPのmRNAも確認された。AVPの受容体については、全網膜標本のRT-PCR解析により、V1aおよびV1b受容体が発見されたが、AVP-GFP強陽性細胞からはこうした受容体は発見されなかった。また、全網膜に対して、高K溶液や高浸透圧溶液による刺激を行っても、AVPの分泌は記録できなかった。以上より、網膜内には内在性AVPを産生する細胞が存在し、別の細胞にAVP受容体が存在するものの、生理学的にはほとんど分泌されていないものと考えられた。今後、眼圧上昇などの病的な状態での意義について検討を加えていきたい。

P-1. 脳室周囲白質軟化症モデルラットの長期の組織変化と運動機能変化

○増田 匡¹, 張 龍矢¹, 西垣瑠里子¹, 水野恵介², 三角吉代¹, 飛田秀樹¹ (名古屋市立大学大学院医学研究科脳神経生理学, ²静岡済生会病院小児科)

早産児での脳性麻痺の主な原因に脳室周囲白質軟化症(PVL)がある。その基本病態として、脳内のオリゴエンドロサイト(髄鞘形成細胞)前駆細胞の選択的虚血脆弱性が明らかになってきた。しかし、発育期以降の長期までPVL病態を反映するモデルは開発されておらず、その必要性が高まっている。我々は未熟児型PVL病態の組織変化を反映するPVLモデルラットを報告したが(Mizuno et al, 2008)、長期の組織変化と機能障害は明らかになっていない。本研究では、この未熟児型PVLモデルの発症直後から発育期以降までの組織変化と運動機能変化を解析した。

未熟児型PVLモデルは、Wistar ラット(生後3日)への虚血低酸素負荷で得た。その運動機能を生後60日においてRotaRod等で評価したところ、下肢を中心とする軽度の運動機能低下が認められた。次にPVL脳の組織学的評価を生後10, 20, 60日で行ったところ、ニューロン(NeuN陽性細胞)数に変化が認められなかった。一方、オリゴエンドロサイト(APC陽性細胞)数はどの時点でも障害側で約20%減少していた。さらに、PVL発症早期でのニューロン障害の有無を調べるため、発症後0, 12, 24, 48時間および3, 7日においてArgyophil III染色により障害超早期のニューロンを検出した。その結果、PVL発症早期においても障害ニューロンは殆ど検出されなかった。

以上の結果から、我々の未熟児型PVLモデルは、オリゴエンドロサイト選択的な障害の長期的持続により運動機能低下が発育期以降も生じることが示唆され、このモデルが長期モデルとしても有用である事が示唆された。

P-2. マウス iPS 細胞からオリゴエンドロサイトへの分化誘導と細胞移植

○三角吉代, 増田 匡, 上田佳朋, 飛田秀樹(名古屋市立大学大学院医学研究科脳神経生理学)

運動麻痺や認知障害を主とする低出生体重児における脳室周囲白質軟化症(PVL)は、発達期のオリゴエンドロサイト前駆細胞に対する特異的虚血脆弱性が関与する。未熟児型PVLモデルラットへのオリゴエンドロサイト系譜細胞の細胞移植により障害機能を再建させることを最終目的とし、本研究ではマウスiPS細胞から6段階の分化誘導法によるOPCへの分化、腫瘍化細胞の除去、移植後の脳内における生着について検討した。

マウスiPS細胞を5段階の過程を経てグリア前駆細胞へ

分化誘導させ、その後 PDGF (10ng/ml) 存在下で 6 日間培養すると、52% の細胞が A2B5 陽性 OPC へと分化することが明らかになった。この段階で残存する未分化な細胞を取り除くため、磁気マイクロビーズに結合した SSEA-1 抗体に結合する細胞の除去を行った。その結果大部分の SSEA-1 陽性細胞が除去され、残存する陽性細胞は 3% 以下となった。さらに、OPC 細胞を T3 (20ng/ml) により分化させると、O4 陽性の未熟オリゴデンドロサイトへと分化することが明らかになった。次に、選別した iPS 細胞由来 OPC を小さな細胞塊とし生後 5 日目のラット脳内へ移植したところ、移植 3 週間後においても移植細胞の生存と細胞移動が確認された。

これらの結果から、マウス iPS 細胞から OPC への分化誘導が *in vitro* で可能となり、さらにその細胞移植による脳内での生着が確認できた。しかし、長期の生存に関しては、栄養因子の投与などの工夫が必要であることが示唆された。

P-3. サル一次運動野における皮質脳波による運動関連皮質内神経活動の推定

○渡辺秀典^{1,2}、佐藤雅昭²、鈴木隆文³、川人光男⁴、西村幸男^{1,5,6}、南部 篤^{6,7}、伊佐 正^{1,6} (¹生理学研究所認知行動発達、²ATR 脳情報解析研究所、³東京大学大学院情報理工学系システム情報学専攻、⁴ATR 脳情報研究所、⁵さきがけ、⁶総研大、⁷生理学研究所生体システム)

ブレインマシンインターフェースにおいては比較的低侵襲で高周波数の情報を検出できる硬膜下皮質電位 (皮質脳波; ECoG) の適用が期待されている。皮質内から記録される局所電位 (LFP) は電極近辺の神経細胞膜の発生電流に起因する実質的な神経活動であり、運動に関する直接的な情報を与える。しかし LFP 記録は脳実質への侵襲を伴い、また長期の安定記録も容易ではない。そこで ECoG から LFP の推定が可能となれば低侵襲で運動を直接反映する脳情報の抽出に有益である。そこで我々はサル到達把持運動時の ECoG から皮質内 LFP 信号を推定し、周波数解析により評価した。運動軌跡はモーションキャプチャによって検出し、同時に対側第一運動野から 32 極 ECoG と 64 極 LFP を同時記録した。Sparse linear regression 法によって推定された LFP は実際の LFP に対して高い相関を得た (depth 0.2 mm, $r = 0.71 + / - 0.02$)。加えて周波数解析によって推定 LFP は運動に関連するベータ (10-35Hz) と高ガンマ (110-140Hz) 帯域の信号をよく再現した (depth 0.2mm, $r_{\beta} = 0.83 \pm 0.02$, $r_{\gamma} = 0.51 \pm 0.05$)。我々の結果は ECoG から運動関連 LFP 推定を実現し得ることを示し、ECoG と LFP の関係について示唆を与える。

P-4. グリア細胞由来神経栄養因子はラットの筋神経線維の機械応答性を増大する

村瀬詩織¹、加藤健祐²、田口 徹²、○水村和枝¹ (¹中部大学生命健康科学部理学療法学科、²名古屋大学環境医学研究所神経系分野 II)

我々はこれまでにグリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) が運動後に筋で増大すること、GDNF 抗体の筋注により遅発性筋痛が軽減されることを明らかにしてきた。本研究では GDNF の筋注が、筋機械逃避反応閾値と神経線維受容体の機械応答性に与える影響を調べた。

雄性 SD ラットの腓腹筋に GDNF (10ng/20 μ l) を筋注すると、1 時間後から筋機械逃避反応閾値が低下し始め、1 日後まで有意な低下が認められた。次に、麻酔下のラットより取り出した長指伸筋—総腓骨神経標本から機械刺激 (圧迫刺激) に応答する C 線維 (伝導速度 < 2m/s) および A δ 線維 (2-12m/s) の神経活動記録を行った。受容野近傍に GDNF (2.5ng/5 μ l) を筋注したところ、A δ 線維の機械反応閾値が有意に低下し、生じたインパルス数は増大した。C 線維の機械応答性は変化しなかった。さらに遅発性筋痛に A δ 線維が関与するかどうかを確認するため、免疫組織学的手法を用いて調べた。運動 2 日後に筋を圧迫した後ただちに L4 後根神経節を採取し、活性化細胞のマーカーである pERK と有髄線維のマーカーである NF200 を共染色した。運動をさせなかった対照群に比べて運動群では pERK 陽性細胞数が増加し、そのうちの NF200 陽性細胞の割合も増大した。以上の結果から、GDNF は A δ 線維の機械応答性を上げることで遅発性筋痛に寄与していることが明らかになった。

P-5. 異なる体位の Valsalva 負荷における血圧変動の伝達関数解析

○清水祐樹¹、桑原裕子¹、今井美香²、吉田 豊^{1,3}、西村直記¹、横山清子³、岩瀬 敏¹、平井真理³、菅屋潤壺^{1,4} (¹愛知医科大学生理学講座、²名古屋大学大学院医学系研究科看護学専攻、³名古屋市立大学大学院芸術工学研究科、⁴椋山女学園大学)

はじめに：排泄時のいきみにより急激な血圧変動が生じ、循環器の合併症や、失神などによる外傷発生の可能性が示唆されている。そのため身体負荷の少ない体位を調べることが重要である。本研究では、心拍数から血圧への伝達関数を求めることで、Valsalva 負荷における血圧変動の要因について検討した。

方法：健康な成人男女 20 名を対象とした。体位は仰臥位と座位の 2 種類として、10 分間安静の後、10、20、30mmHg

の3段階のいきみ圧を15秒間ずつ負荷し、負荷後にそれぞれ2分間の安静を設けた。負荷中およびその前後の心拍数と血圧を正規化し、LFおよびHF帯域における心拍数から血圧への伝達関数(利得、位相、2乗コヒーレンス)を求めた。

結果と考察:全条件で2乗コヒーレンス >0.5 で、心拍数と血圧に関連性が存在した。仰臥位では、LFでいきみ圧と利得に強い相関がみられ、10mmHgと20mmHgのいきみ圧に有意差があった。座位においては、LFでいきみ圧と利得の相関は仰臥位よりも小さく、HFの収縮期血圧(SBP)においていきみ圧と利得に強い相関がみられ、拡張期血圧(DBP)においては座位でいきみ圧との相関が無かった。血圧変動に対する筋交感神経活動の寄与は、弱いいきみ圧では座位が大きく、強いいきみ圧では座位・仰臥位でほぼ等しくなることが明らかになった。

P-6. ゼブラフィッシュにおけるOptokinetic responseの解析システムの検討

○鈴木崇文¹、美多佑樹²、馬場 嵩¹、加藤 聖¹ (¹金沢大学大学院医学系研究科脳情報分子学、²金沢大学大学院自然科学研究科電子情報工学専攻)

ゼブラフィッシュは視覚系の様々な研究に実験動物として用いられているが、その行動を自動的、客観的に定量できるシステムが求められていた。そこで我々は定位行動(Optomotor response:以下OMR)に注目し、定位行動観測解析システムを開発した。視覚依存性の行動の1つであるOMRを観測、撮影し、得られた画像データを解析するシステムである。しかし、OMRは目標物の像を網膜上の一定部位に保つように泳ぐ魚類の視覚依存性の習性であり、泳ぐという動作からも運動機能に依存することが多く、個体間のばらつきも大きいことが分かった。そこで我々はさらに視覚依存性行動の1つであるOKR(Optokinetic response)の解析システムの設計を試作した。OKRは視覚刺激に対する眼球運動のみを測定するため、OMRに比べて運動機能の依存性が少ない。また、実験刺激を物理的に回すことからコンピュータ上の画像出力の投影に変更した。刺激パターンを実際に回転させる事から見かけ上、回転しているように見える刺激パターンに変更したため、簡単に実験刺激の回転角速度、色、空間周波数特性などの条件を実験に合わせて変更できるようにした。今後、OMRとOKRの比較や相互の条件的な差異からOKRの信頼性と妥当性を検討していきたい。

P-7. 作業記憶能力高進前後の脳神経基盤の脳波学的解析

○榎原吉一、山室俊二(金沢工業大学心理情報学科)

我々は、作業記憶(WM)訓練によるWM成績向上を支える脳神経領域を脳波学的に明らかにすることを試みた。訓練と実験両目的に用いた作業記憶課題は言語性WM課題の一つn-backテストであり、そのn-数は予備実験で2、3、4の中から被験者各個人向けに中等度の難易度のものを決めた。訓練は一ヶ月で、12回同じ問題を繰り返した。実験は健康成人5名でWMテストの前と中の全期間脳波(18電極)を連続計測した。非訓練群も別の5人で、一ヶ月の空白期間の前後2回同じ要領で実験を行った。脳波はWM課題の呈示期と回答期をまとめて解析対象とした。但し、眼球運動等に伴うノイズは予め対象から外した。データ健康部をDFT処理し、 α と θ 波各脳波のパワースペクトルを求め、これら各脳波帯域のWM訓練後のパワー前後比とWM成績の前後比との相関性を求めた。

WM成績は訓練群で有意水準近くまで向上した($p=0.07$)。WM成績と相関を示した α 波帯域は、非訓練群では頭頂葉に局限したが、訓練群では頭頂葉から左前頭葉までの広範囲に広がった。 θ 帯域は逆に、非訓練群では右側頭頂・後頭両葉の広い脳域で相関性を示したが訓練群では左前頭葉に限って弱い相関傾向を示すのみと、相関域は大幅に縮小した。

これらの結果は、WM訓練によるWM能力向上には、後頭、頭頂、前頭葉の広大な脳域における α 波を介した神経網が関わっていることを示唆している。

P-8. 超小型発汗計及び解析法の開発

○打出喜義¹、根本 鉄²、北村敬一郎² (¹金沢大学附属病院産婦人科、²金沢大学医薬保健研究域保健学系)

<背景>更年期婦人の発汗(ホットフラッシュ)は睡眠時に起こると、睡眠障害や抑鬱状態さえも招くことから適切な治療が必要とされる。治療効果判定には睡眠時の発汗や体温測定は重要な指標となり得るので、患者に不快感を与えず長時間安定して測定可能な発汗計が求められている。

そこで我々は患者自身が簡便に装着できる超小型発汗計を開発したので報告する。この発汗計のサイズは $31 \times 20 \times 22$ mmで、その内に電池、センサ部、データ記録部および水分を吸収するシリカゲル部等が内蔵されている。

<方法>皮膚の水蒸気(発汗)は皮膚接触面の4孔(直径3mm)よりケース内に流入し、センサ基盤の遮蔽板で一定時間滞留するが、その後遮蔽板の孔より流出し、シリカゲル部で吸収される。発汗量はセンサで測定された絶対湿度とシリカゲル部の絶対湿度との差分、およびケースの形状と出入孔面積、水蒸気拡散係数から概算される。発汗の

タイミングと相対的な発汗の大きさは、このセンサ部の絶対湿度の変化を求めることで知ることができる。本装置での測定結果を、市販されている発汗計（SKD-1000（SKINOS））のほぼ同部位の発汗パターンと比較検討した。

＜結果＞本装置で得られた絶対湿度の変化パターンとSKD-1000（SKINOS）より得られた発汗パターンは、その発生タイミングおよび大きさが相似したことから、本装置でも定性的な発汗の評価ができることが示唆された。今後、ホットフラッシュ患者へ試用し治療効果の判定などの臨床応用が期待できる。

P-9. 淡蒼球脳深部刺激法の作用機序の検討

○知見聡美¹、南部 篤（生理学研究所生体システム）

大脳基底核の出力部である淡蒼球内節（GPi）に慢性的に電極を埋め込み、高頻度連続刺激を与える淡蒼球脳深部刺激療法（GPi-DBS）が、ジストニアやパーキンソン病の治療に用いられているが、電気刺激が局所の神経活動を抑制するのか、興奮させるのかなど、その作用機序は明らかではない。本研究では、正常サルGPiに2本の電極を刺入し、一方の電極を通して電気刺激を与えた際の近傍の神経活動を記録することにより、GPi-DBSの作用機序を検討した。

GPiへの単発刺激は、近傍ニューロンに短潜時の抑制を惹起し、100Hz前後の高頻度連続刺激は、自発発火を完全に抑制した。これらの抑制は、GABA_A受容体の拮抗薬の微量局所投与により消失したことから、GABA_A受容体を介していることが明らかになった。

一方、大脳基底核は大脳皮質との間でループ回路を形成している。大脳皮質運動野を電気刺激すると、GPiニューロンでは興奮—抑制—興奮の3相性の応答が記録され、これらは大脳基底核の各経路を介して伝達されることがわかっている。GPi-DBSが大脳皮質由来の応答に与える影響を調べたところ、GPiの高頻度連続刺激期間中、大脳皮質刺激に対する応答も完全に抑制された。

以上の結果から、GPi-DBSは、GPiに投射するGABA作動性軸索末端（線条体あるいは淡蒼球外節由来と考えられる）を刺激することによってGABAの放出を促し、GPiニューロンの活動を抑制するとともに、GPiを介する情報伝達を遮断することによって効果を表すことが示唆された。

P-10. 線条体-淡蒼球投射ニューロンが制御する運動調節機構の解明

○佐野裕美¹、知見聡美¹、小林和人²、南部 篤¹（¹生理学研究所生体システム研究部門、²福島県立医科大学生体機能研究部門）

大脳基底核は運動の制御に重要な領域である。線条体は大脳基底核の入力核であり、大脳皮質、視床、黒質緻密部などから線条体に入力した情報は線条体-黒質投射ニューロンと線条体-淡蒼球投射ニューロンを介して出力する。大脳基底核の回路モデルでは、線条体-黒質投射ニューロンは出力核である黒質網様部、淡蒼球内節を抑制して運動を促進し、線条体-淡蒼球投射ニューロンは出力核を興奮させて運動を抑制すると考えられている。これまでの我々の研究で、トランスジェニックマウスを利用して線条体-淡蒼球投射ニューロンを破壊したところ、自発運動の増加が認められた。しかし、このときの生理学的変化は解析してこなかった。

線条体-淡蒼球投射ニューロンの生理学的役割を解明するため、我々は線条体-淡蒼球投射ニューロンを破壊する前後で淡蒼球外節と黒質網様部の神経活動を覚醒下で記録した。淡蒼球外節および黒質網様部の自発発火には破壊前後で変化は認められなかった。次に、大脳皮質を刺激したときの応答を淡蒼球外節と黒質網様部で記録したところ、破壊前は興奮-抑制-興奮という三相性の応答が認められたのに対し、破壊後には淡蒼球外節では興奮、黒質網様部では興奮-抑制という応答が認められた。これらの結果から、線条体-淡蒼球投射ニューロンは、淡蒼球外節や黒質網様部における大脳皮質からの入力に対する応答パターンを制御して運動を調節していることが示唆された。

P-11. 皮膚創傷治癒におけるメカニカルストレスの役割の解析

○高田弘弥¹、古家喜四夫²、曾我部正博^{1,2}（¹名古屋大学大学院医学系研究科細胞生物物理学、²名古屋大学革新ナノバイオデバイス研究センター）

伸展可能なシリコン膜上に単層培養した血管内皮細胞に線状の細胞剥離部位（創傷）を作成して、その修復を観察する創傷治癒モデル系において、シリコン膜の伸展や収縮を介したメカニカルストレスが創傷治癒速度に強く影響することが報告されている（Tanaka et al. In "Biomechanics at Micro- and Nanoscale Levels, Volume I" ed. Wada H. World Scientific Publishing, pp75-87, 2005）。特に創傷軸に垂直な方向の伸展刺激は創傷治癒速度を著しく促進するが、伸展刺激を感知するメカノセンサーやその下流シグナル系の実体は不明である。

本研究ではヒト皮膚ケラチノサイト（HaCaT細胞）の創傷治癒モデルを用いて、伸展刺激の効果を確認するとともに、細胞内カルシウム（Ca²⁺）濃度との関係に注目して解析した。コラーゲンを塗布したシリコンチャンパー上に幅約0.5mmの創傷部位（細胞の非存在部位）を作成し、創傷

部の幅の減少を測定することで治癒速度を評価した。また、細胞内に予め Ca^{2+} 指示薬 Fluo-8 をロードすることで細胞内 Ca^{2+} 濃度のイメージングを行った。伸展刺激は治癒速度を促進するとともに、創傷境界部の先頭細胞群に大きな細胞内 Ca^{2+} 増大を惹起し、後方の細胞に Ca^{2+} 波が伝搬する様子が観察された。機械受容チャネルやプリン受容体 P2YR の抑制剤が、これらの Ca^{2+} 応答を抑制することから、伸展刺激は、遊走活性が上昇して機械刺激感受性が高まった先頭細胞集団の Ca^{2+} 透過性機械受容チャネルの活性化と機械刺激感受性 ATP 放出を促進したものと推定された。

P-12. 消化管におけるイオンチャネル遮断薬による電気伝播活動の変化

○谷口瑞毅, 澤村健太, 中山晋介 (名古屋大学大学院医学系研究科細胞生理学)

消化管運動において, Cajal の間質細胞 (Interstitial Cells of Cajal : ICC) がペースメーカ細胞として働くだけでなく, そのネットワーク状分布を利用して電気興奮の伝播にも貢献しているということが, これまでの研究で明らかになってきた。本研究では, 8×8 微小電極アレイ (microelectrode array : MEA) を使用し, 1mm^2 の微小領域での ICC ペースメーカ活動の空間的共時性を解析した。ICC の活動を描出するため, TTX と nifedipine を投与することにより, 神経と平滑筋の活動を抑制した。

野生型 (wild-type : WT) マウスと, ペースメーカ細胞数が減少しネットワークに障害のある W/W^e マウスの小腸筋層を用いて計測を行ったところ, 自発性電位活動は2つの標本間で大きく異なった。 W/W^e マウス標本では, 自発性活動のパワー (振幅) 減弱するだけでなく, 相互相関や位相差マッピング (phase-shift map) 解析ではペースメーカ活動の空間的な連携に大きな障害があった。

さらに WT マウスにおいては, TTX と nifedipine の投与前後で, ペースメーカ電位の伝播が見られるが, その伝播速度は著明に減少し, 相関も低くなっていた。このことは, 生理的条件下では, ICC ペースメーカ活動伝播は自身のネットワークを介してだけでなく, 神経活動によって修飾され, また平滑筋層の電氣的に結合も利用して行われることを示している。

P-13. ラット新生児期のレプチンサーージの効果の阻止による行動の変化

吉田和典¹, 墨谷香菜美¹, 水野敬子², 樋口 隆² (¹ 仁愛大学人間学部心理学科, ² 福井大学医学部統合生理)

レプチンは, 視床下部に働いて食欲を抑制するホルモン

とされている。このレプチンが生後5日-15日の齶歯類で, 血中濃度が非常に高い。この時期は視床下部のエネルギー調節に関与する神経経路が発達する時で, レプチン受容体が欠損したラットでは, この神経経路の発育が異常になって, その後の過食肥満を促進しているという報告がある。胎児期・出生直後の栄養状態が, レプチンサーージの大きさとタイミングに影響を与えて, 成熟後に過食・肥満をもたらすという仮説も提出されている。レプチンサーージの生理的役割を検討する目的で, 我々はレプチンの作用を阻止する働きのある, 抗体を作成して, レプチンサーージの効果を阻止する実験を行った。その結果, レプチンサーージの効果を阻止されたラットは, 成熟後の代謝に異常はみられず, 過食・肥満はみられなかった。しかしこのラットに行動上の差異が見られたので, その詳細を検討した。内径 $80\text{cm} \times 80\text{cm}$, 高さ 30cm のオープンフィールドにラットを入れ, さらにストレンジャーラットを入れた後の10分間の行動をビデオに記録して, 後に解析した。解析したのは能動的行動 (匂いかぎ行動, 接近行動, 攻撃行動, 後追い行動), 受動的行動 (逃避行動, 防御行動), 単独行動 (立ち上がり行動, 洗顔行動, 毛づくろい行動) である。これらの行動のうちで, レプチン抗体投与群と正常兎血清投与の対照群の間で, 統計学的に有意差がみられたのは, 接近行動, 攻撃行動, 逃避行動であった。レプチン抗体投与群は, 他のラットに興味を持ち, 積極的な接近行動示すが, 非攻撃的であることが明らかとなった。

P-14. 両側視床下部神経分泌細胞間の神経連絡に関する検討

○本田和正¹, 樋口 隆² (¹ 福井県立大看護福祉学部, ² 福井大医学部統合生理)

射乳反射時のオキシトシン (OT) 細胞のバースト発火が同期して起こる機構を明らかにする目的で, 両側視床下部視索上核 (SON) 間あるいは室傍核 (PVN) と対側 SON 間の神経連絡を解析した。授乳期ラットを用い, 下垂体後葉に注射する SON 神経分泌細胞の細胞外記録を実施した。射乳反射時のバースト発射の有無により OT 細胞とバゾプレッシン (AVP) 細胞を同定した。反対側 SON の電気刺激に対する応答を刺激前後時間ヒストグラム (PSTH) によって OT 細胞 13 個および AVP 細胞 9 個で解析した。逆行性興奮 (AD+) を示す細胞は両タイプで認めなかった。OT 細胞では 11 例が順行性興奮 (OD+) を示し 2 例が無反応であった。AVP 細胞では OD+ が 2 例, 順行性抑制 (OD-) が 1 例, 無反応が 6 例であった。反対側 PVN の電気刺激に対する応答を PSTH によって OT および AVP 細胞の各々の 3 個で解析した。AD+ を示す細胞は両タイプ

で認めなかった。OT細胞は3例ともOD+を示し、AVP細胞は2例が順行性抑制に続く興奮(OD-+)、1例がOD-を示した。反対側SONあるいはPVN刺激でOD+応答を示した4例のOT細胞で刺激中の発火頻度の変化を解析したところ全例で発火頻度の亢進が認められたが、3例のAVP細胞(OD+:1例, OD-:2例)では発火頻度の変化を認めなかった。

P-15. ラット子宮オキシトシンレセプターおよびエストロゲンレセプターの調節

○村田拓也, 成田和巳, 市丸 徹, 樋口 隆 (福井大学医学部統合生理)

ラット子宮オキシトシンレセプター(OTR)は、分娩の直前に著増し、子宮のオキシトシン感受性を増大させる。このOTRの増加は、妊娠末期に増加するエストロゲンの作用によるとされるが、エストロゲン感受性の関与を含めその調節機序は未だ解明されていない。本研究は、エストロゲンレセプター(ER)アゴニストを用いて、エストロゲンのOTRmRNA量およびERmRNA量に及ぼす作用について検討した。

まず、卵巣摘出(OVX)ラットに17 β -estradiol(12.5 μ g/rat)を投与すると、OTRmRNA量は1時間後から増加し、ER α およびER β mRNA量は2時間後に減少した。このOTRmRNA量の増加およびER β mRNA量の減少は24時間後も観察されたが、ER α mRNA量は24時間後には有意な差は見られなかった。次に、ER α アゴニストであるPPT(200 μ g/rat)をOVXラットに投与するとOTRmRNA量は3および6時間後に有意に増加した。ER β アゴニストであるDPN(200 μ g/rat)を投与すると、3時間後後のみ増加し、6時間後には増加は見られなかった。ER α およびER β mRNA量は、PPTおよびDPNの投与により、3および6時間後ともに有意に減少した。

これらのことは、エストロゲンが、ER α およびER β を介して、異なったOTRmRNA調節を行っていることを示唆している。

P-16. マルチ同位体標識化合物を用いた脳内ドーパミンの高感度分析

○成田和巳¹, 荒川 靖², 下平晴記³, 甲田公良⁴, 松川茂⁵ (¹福井大学統合生理学, ²北陸大学教育能力開発センター, ³大陽日酸KK, ⁴日立ハイテクノロジーズ, ⁵福井大学ライフサイエンス支援センター)

水溶液中で安定しており、またアミノ基と反応する新規化合物を開発した。さらにその新規化合物中の0から8個までの任意の個数の炭素原子を安定同位体の¹³Cで置換す

ることにより、化学的な性状は全く同じであるが分子量が1ずつ異なる9種類の同位体ラベル試薬を作製した。この9種類の同位体ラベル試薬はアミノ基を持つ物質、すなわち各種アミンやアミノ酸、ペプチドなどのアミノ基と共有結合することによりラベリングし、またその反応生成物は水溶液中で安定している。標識体は化学的性状が同じであるためHPLC分離では全て同一時間に溶出されるためピークの分別ができないが、分子量の差が1あるので質量分析装置を用いれば異なるピークとして認識することが出来る。そのため適切な内部標準物質と精製法、高感度の質量分析機であるnanoLC/MSを組み合わせると、目的物の高感度定量が可能となる。

本研究ではこの同位体ラベル試薬を用いてラット脳サンプル中のドーパミンを測定した。ラット脳をマイクロウエーブで固定した後、30 μ mの凍結切片を作製した。そしてレーザーマイクロダイセクションにより、500 μ m四方、厚さ30 μ m、7.5nL相当の組織片を作製し、その組織片中のドーパミン含量の定量に成功したので、その結果を報告したい。

P-17. 仔ラットにおけるエストロゲンの摂食抑制作用の発達と卵巣摘出の影響

○市丸 徹¹, 遅 菁華², 成田和巳¹, 村田拓也¹, 樋口隆¹ (¹福井大学医学部統合生理学, ²青島大学医学部)

ヒトを含めた多くの動物で、雌性ホルモンのエストロゲンには摂食抑制効果があることが知られている。しかしその作用機序については未だ不明な点も多い。脳の神経回路が発達する発育期においてエストロゲンに対する反応性が現れる時期を詳細に検討することで、この効果の発現に関わる中枢部位が推定される。正常な卵巣を持つ仔ラットを用いてこれを調べると、エストロゲンの摂食・体重抑制効果は生後27日から現れ始めること、またこれに同期して、視床下部室傍核においてc-Fos発現の特異的上昇が観察された。一方、卵巣摘出した仔ラットではエストロゲン作用は生後40日頃までは現れないとの古い報告がある。そこで、卵巣摘出仔ラットを供試し、春期発動にいたる齡以前における、エストロゲンの摂食抑制効果の発現時期について検討した。12時間明暗周期(明期0600-1800)のもとウィスターイマミチラットを妊娠させ、分娩日をP0として同腹仔数を10匹にそろえた。P20に離乳し、同日にエーテル麻酔下で両側の卵巣を摘出した。回復期間ののちP25-27およびP29-31の期間に、1200にestradiol benzoate(EB)20 μ g/kg/dayを3日間連続して皮下投与し、24時間毎の摂食量と体重増加量を測定し、対照群(sesame oil 50 μ l投与)と比較した。その結果EB投与群では摂食量と体重増加量の

抑制がみられ、卵巣の有無に関わらず、春期発動以前にエストロゲンに対する感受性が発達することが示唆された。

P-18. イオンチャネルのイオン透過を捉える：流れるイオンと水分子の配列を見る

○老木成稔, 岩本真幸, 炭竈享司, 三田建一郎 (福井大学医学部分子生理学)

イオンチャネル透過機構の解明はチャネル分子研究の最大の課題の一つである。チャネル蛋白質の結晶構造が明らかになって以来、立体構造をもとにイオン透過シミュレーションが具体的な透過のイメージを提供している。このことで、透過のダイナミックな機構はすべて解決済みの問題であるかのように考えられる傾向があるが、現状はイオンや水の流れの法則を抽出するまでには至っていない。もう一度原点に戻って、チャネルの透過実験を見直し、イオン透過機構を考える必要がある。そのような研究戦略の一つが1イオン測定である。現在の電気生理学的手法では1イオン流を直接捉えられるだけの時間分解能は備えていない。しかし一個一個のイオンが流れる個別性を実験的に明らかにする方法はあり、ここではその一つであるイオンと水の流束比の測定を紹介する。カリウムチャネルの細い選択性フィルタ (直径3Å) の中ではイオンや水分子が1列になり、その長さ(12Å)の中にはイオンか水分子が合わせて4分子しか収まらない。この限られた空間の中で取りうる配列により、イオンと水の流束比は単純な整数比になる。流動電位を測定することによりイオン-水流束比を実験的に求めることができる。KcsAカリウムチャネルの流動電位を様々なイオン条件で測定し、イオン透過がどのような反応経路をとるかを明らかにした。knock-on機構について検討する。

P-19. 計算機シミュレーションで見るイオンチャネルにおけるイオン透過

○炭竈享司, 老木成稔 (福井大学医学部分子生理学)

1998年、MacKinnonらによりK⁺チャネルのX線結晶構造解析がなされてから、イオンチャネルの研究手法として、伝統的な電気生理学的手法に加え、計算機によるシミュレーション実験が加わった。本発表では、計算機シミュレーションにより、K⁺チャネルでのイオン透過が原子レベルの運動としてどのように「見える」のかを紹介し、電気生理学的測定によるマクロな情報と原子レベルでの「観測」の仲介役を果たしたい。

K⁺チャネルでのイオン透過は、選択性フィルタと呼ばれる最も細い部分を水分子とイオンが交互に並んで1列に透過する、つまり、イオン間には水は1分子存在すると考え

られて来ている。当グループの実験は、そのような透過様式に加え、低濃度ではイオン間に水2分子を挟んで透過する様式が現れることを発見した。我々の計算機によるシミュレーションは、上記の2つの透過様式に加え、高濃度でさらに異なる透過様式、水分子を挟まずに透過する様式があることを示しており、それらの透過様式の濃度依存性と、そこから考えられる生体内濃度でのイオンの透過様式の新しい解釈について発表する。計算機シミュレーションの1つの特徴は、原子の運動のレベルから機能を解明することが出来ることである。そこで、どのような理由でこのような透過様式の違いが起きるのか、水分子やイオンの原子レベルでの運動に基づいて説明する。

P-20. KcsA チャネルのイオン選択性機構：フィルタ入口のLi⁺に対するバリア

○三田建一郎, 岩本真幸, 老木成稔 (福井大学医学部分子生理学)

Kチャネルのイオン選択性(Na⁺と比べ1000倍以上)は高い。選択性フィルタに適切な大きさのイオンだけが結合でき、それ以外のイオンは結合できないと考えられてきた(Snug-fit仮説)。しかし、KcsAチャネルの結晶構造でフィルタへのNa⁺結合像が得られ、さらに高電圧下では細胞内Na⁺がフィルタを通り抜ける現象(Punch-through)が報告され、フィルタ内にK⁺以外のイオンが存在可能なことが示された。今回、K⁺とNa⁺のフィルタ内への入りやすさの違い、及びNa⁺透過を調べるために細胞内Na⁺純溶液の条件で実験を試みた。不活化しないE71A変異体KcsAチャネルを使用し、フィルタ構造を変化させる可能性のあるNa⁺に代わりLi⁺を使用した。脂質平面膜法で単一チャネル電流を計測し、始め膜電位をマイナスとし(①)、プラスにステップさせ(②)、再びマイナスにステップさせた(③)。細胞内外200mM KClでは①—③でK⁺電流は計測され、チャネル開確率に変化はなかった。一方、細胞外200mM KCl、細胞内200mM LiClでは、①ではK⁺電流は計測されたが、②ではLi⁺電流は計測されなかった。③では電流は閉状態から始まり、潜時を経た後に開状態となった。これは②でLi⁺がフィルタをブロックし、③でLi⁺がリリースするまでに時間がかかることを示している。②のブロック確率と③の潜時に電位依存性があった。以上より、Li⁺がフィルタを内側から入る際には高い自由エネルギーバリアが存在すると考える。

P-21. KcsAカリウムチャネルのpH依存性のマグネシウムイオンの効果

○松本悠佳^{1,2}, 岩本真幸², 清水啓史², 老木成稔² (¹福

井大学医学部附属病院麻酔科蘇生科,²福井大学医学部分子生理学)

これまで我々の研究室では平面膜での KcsA カリウムチャンネルのヘリックスゲートの pH 依存性について研究してきた。平面膜に使用する脂質である Avanti Polar Lipids 社製の POPG (Phospho-rac-(1-Glycerol), 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-, Sodium Salt) にマグネシウムイオンが混入しているという情報があり、マグネシウムイオンの影響がない平面膜で実験を行いたいと考えた。マグネシウムイオンを除去する目的で細胞質側と細胞外側の 200mM KCl 溶液にそれぞれ EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) を投与し、KcsA カリウムチャンネルのヘリックスゲートの pH 依存性を調べた。マグネシウムが混入している POPG を用いた平面膜では、KcsA カリウムチャンネルの pH 依存性は pKa5.3, Hill 係数 2.2 であった。細胞質側の溶液のマグネシウムイオンを除去した状態での KcsA カリウムチャンネルの pH 依存性は pKa4.8, Hill 係数 2.0 であった。細胞外側の溶液のマグネシウムイオンを除去した状態での KcsA カリウムチャンネル pH 依存性は pKa4.2, Hill 係数 8.2 であった。この結果から細胞外側のマグネシウムイオンが KcsA カリウムチャンネルの pH 依存性に影響を与えている可能性があった。

P-22. 脂質二重膜組成が KcsA カリウムチャンネル活性に及ぼす影響

○岩本真幸, 老木成稔 (福井大学医学部分子生理学)

細胞の情報伝達や恒常性維持などを司るイオンチャンネルは、全ての細胞膜に存在する最も基本的な膜タンパク質である。細胞膜を構成する脂質の組成は生物・細胞種によって大きく異なり、イオンチャンネルの機能は各細胞膜の特異的な脂質環境で最適化されている。そのため、ある種のイオンチャンネルを取り出して別の脂質環境に置くと、その機能が喪失または修飾された例が数多く報告されている。しかし、細胞膜を構成する脂質分子がどのようにイオンチャンネルの機能に影響を及ぼしているのか、具体的なメカニズムについてはほとんど理解されていない。本研究では KcsA カリウムチャンネルを用い、イオンチャンネル機能に対する脂質効果の詳細な解析を試みた。KcsA チャンネルが高い活性を示すためには、脂質二重膜中にフォスファチジルグリセロール (PG) の存在が必須であることが知られている。様々な脂質組成のもと単一イオンチャンネル電流を測定

したところ、PG の KcsA チャンネル活性に対する効果は他の負電荷を持つ脂質でも代替可能であることが明らかになった。また、正電荷を持つ脂質や電荷を持たない脂質二重膜中では KcsA チャンネルの活性が著しく低下することが分かった。さらに、PG 分子が KcsA チャンネルのどの部位に作用することで効果を示すのか、様々な組み合わせの非対称脂質二重膜中で電流測定を行い、特定を試みた。

P-23. イオンチャンネル開閉構造変化の光トリガー X 線 1 分子計測システムの開発

○清水啓史¹, 岩本真幸¹, 今野 卓¹, A. Royant², V. D. von Stetten², L. Guerin³, M. Wulff⁴, 老木成稔¹ (¹福井大学医学部分子生理学, ²Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, UMR 5075 CNRS-CEA-CNRS-Université Joseph Fourier, 41 rue Jules Horowitz, Grenoble, F38027 France, ³Institut de Physique de Rennes- CNRS, UMR 6251 Université de Rennes 1 Campus de Beaulieu Bât 11A 35042, Rennes Cedex, France, ⁴European Synchrotron Radiation Facility, BP 220 Grenoble Cedex, 38043 France)

私達は以前、イオンチャンネルの開閉に伴うねじれ構造変化を X 線 1 分子計測法を用いて 1 分子で動画計測することに成功した (H. Shimizu, *et al.*, Cell (2008) 132 67-78)。ガラス基板上に固定した KcsA カリウムイオンチャンネルに金ナノ結晶を観測プローブとして導入し、白色放射光 X 線を観測光として照射すると、KcsA チャンネルの構造変化を金ナノ結晶の動き (2 次元 X 線検出器の検出面上での金ナノ結晶からの回折点の運動) として計測することができる。従来法では平衡状態の観測であったため、観測データとチャンネルの構造状態 (開状態, 閉状態, 遷移過程) の対応関係が明瞭でないという問題点があった。

本研究では、光分解化合物とレーザー光を用いて観測中に溶液条件を変化させることができる計測システムを大型放射光施設内 (ESRF) に構築することに成功した。KcsA チャンネルは pH 依存性のチャンネルであり、中性 pH では閉状態であり、酸性 pH で開閉する性質がある。溶液の pH 条件を変化させるため、使用する Caged H⁺濃度とレーザー照射条件を最適化した。その結果、観測開始時に閉状態であったチャンネルの開状態への遷移過程をとらえることに成功した。発表では計測システムの詳細と初期データについて発表する。