

## 第92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24年9月1日(土) 10:00~15:50

会 場：北海道大学医学部学友会館「フラテ」ホール

当番幹事：北海道大学医学研究科神経生理学分野 教授 田中真樹

演 題 数：17題

### 線条体ドパミンによる自発的な運動のタイミング調節

○國松 淳, 田中真樹 (北海道大学医学研究科神経生理学分野)

【背景】自発的な運動の開始には、外部の刺激に反応して行動を開始する場合とは異なった神経機構が存在すると考えられる。例えば、基底核の疾患であるパーキンソン病の患者は、外部からの運動のタイミングの指示がない状況で、自分から進んで運動を開始することは困難である。これらの症例報告や最近の研究から、基底核ドパミン系が適切なタイミングで自発運動を開始することに関与する可能性が示唆されている。ドパミンは、線条体でD1およびD2受容体を介し、それぞれ直接経路、間接経路への信号強度を調節している。その機能を明らかにするために、私たちは両経路の相対的な信号強度を薬理的に操作し、自発性眼球運動への影響を調べた。

【方法】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、一定の時間が経過した後に自発的に眼球運動を開始させる課題(Self-timed課題)をサルに訓練した。課題遂行中に線条体ニューロンの活動を記録し、課題に関連した活動を検証した。その後、直接経路、間接経路の信号強度を変化させる目的で、記録部位に薬剤を微量注入した。

【結果と考察】42個の線条体ニューロンの活動を記録したところ、18個(43%)で自発的な眼球運動に先行して徐々に増加する活動が確認された。それらの記録部位にD2受容体の拮抗薬(eticlopride, n=9)を注入したところ、Self-timed課題では自発サッカードの開始時間が早くなったが、Triggered課題では有意な変化がみられなかった。一方、D1作動薬(SKF38393, n=4)、D1拮抗薬(SKF38393, n=4)、D2作動薬(quinpirole, n=8)のいずれを投与した場合にも、有意な影響は見られなかった。これらの結果から、自発運動のタイミングは間接経路の信号によって調節されていることが示唆された。

**Saccade target selection determines direction of cerebellar adaptation**

○A. Habtemariam, 松嶋藻乃, 田中真樹 (北海道大学医学研究科神経生理学分野)

Saccades are fast ballistic eye movements. Due to their short duration they cannot be corrected online. Therefore, the motor command needs to be calibrated by cerebellar adaptation. In the laboratory, saccade adaptation can be induced using the double-step paradigm, in which the target is relocated during saccades. Although most studies have used single target, a recent study has shown that irrelevant distractor has no effect on adaptation (Madelain et al., 2010). In this study, we further examined the interaction between target selection and adaptation. In all experiments, the first target appeared 10° right or left of the fixation point (FP). As the saccade to the target was detected, the 1st target disappeared and the 2nd target and the distractor were presented simultaneously. Monkeys were rewarded for saccade to the 2nd target that had the same color as the 1st one. In Experiments 1 and 2, both stimuli appeared  $\pm 5^\circ$  horizontally (Exp 1) or vertically (Exp 2) from the first target. In Exp 3, the stimuli were presented 5° above and 5° closer to the FP, giving orthogonal retinal error. Exp 4 was similar to the third, but the distractor was identical to the targets in color and shape. The effects of distractor were quantified by computing the weight of averaging of adaptation induced by each stimulus presented alone. The averaging weights for the target in Exp 1-3 were  $>0.7$ . Adaptation toward the selected object was also found in trials with the identical stimuli in Exp 4. Our data suggest that the choice of target for saccade might also select retinal error signals that guide cerebellar adaptation.

**記憶すべき複数刺激の相対位置により異なる二つの符号化**

○松嶋藻乃, 田中真樹 (北海道大学医学研究科神経生理学分野)

【背景と目的】作業記憶の神経メカニズムは、主に1つの刺激を記憶する行動課題を用いて調べられてきた。しかし、私たちは、複数の事象を同時に覚えておくことができる。本研究では、訓練したサルを用いてその神経機構を探った。

【方法】本研究で用いた遅延見本合わせ課題では、2つの視覚刺激（手がかり刺激）と3つのテスト刺激が2秒間の遅延期間をおいて呈示される。テスト刺激のうち1つは、手がかり刺激の一方と同じ位置にあらわれ（一致刺激）、他の2つは異なる位置にあらわれる（不一致刺激）。サルは、遅延期間中スクリーン中央の固視点を見続け、それが消えた後に一致刺激に向かってサッカドすることが要求されている。手がかり刺激のどちらが遅延期間の後に現れるかは予測できないため、サルは両方の刺激位置を記憶しておかなければならない。対照試行では、1つの手がかり刺激と3つのテスト刺激（一致刺激×1、不一致刺激×2）を呈示した。

【結果と考察】課題遂行中のサルの背外側前頭前野より単一ニューロン記録を行い、記憶している刺激の数と位置によって遅延期間活動を比較した。両視野に1つずつ呈示された刺激位置を記憶している際には、対側視野に呈示された1つの刺激位置を記憶している時と同様の反応がみられた。一方、同側視野に呈示された2つの刺激位置を記憶している際には、各刺激が単独で呈示された際の平均値に近い神経活動を示した。これらの結果は、各視野の情報は独立に保持されており、同側視野内に複数の物体がある場合には統合されて保持されることを示唆する。こうした視野間の独立性と視野内の統合によって、物体の数と位置に応じて作業記憶の容量が異なるものと考えられる。

#### 毛様体筋の収縮持続相における主要 $\text{Ca}^{2+}$ 流入経路としての容量依存性 $\text{Ca}^{2+}$ チャネル

○赤尾鉄平, 宮津 基, 竹谷浩介, 高井 章 (旭川医科大学生理学講座自律機能分野)

【目的】毛様体筋のムスカリン受容体刺激に伴う収縮の持続相においては、単位コンダクタンスの異なる2種類の非選択性陽イオンチャネル (NSCCL と NSCCS; 30 pS と 100 fS) を介して流入する  $\text{Ca}^{2+}$  が重要な役割を演ずる。今回の実験は、NSCCL と NSCCS の電気生理学的特性を定量的に解析するとともに、それらと store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channel (SOC) との関連を検討することを目的として実施した。

【方法】ゴラゲナーゼ処理により単離したウシ毛様体筋細胞における全細胞電流膜電位固定法により記録した。指示薬として fluo4 を用い、細胞内遊離  $\text{Ca}^{2+}$  濃度  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  を記録した。免疫蛍光染色には ALEXA-Fluor ラベル抗体を使用した。等尺性張力記録には U-gauge トランスデューサを

用いた。

【結果】カルバコール (CCh) 刺激により開口する NSCCL (単位コンダクタンス 35 pS) についての全細胞電流の非定常分散分析により、その細胞一個あたりの数は10~数100個と非常に少ないことが判明した。細胞外陽イオン置換実験により  $\text{Na}^+$  を基準とした透過性比  $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}=0.3$  を得た。同様の実験によれば、NSCCS (100 fS) については、細胞あたりの数は NSCCL の約 3000 倍であり、 $\text{Ca}^{2+}$  透過性も比較的高い ( $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}=3$ )。また NSCCS は、カフェイン (1-20mM) により細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  を枯渇させると開口した。ウシ毛様体筋束の CCh 刺激による発生する等尺性張力は、TRPC3 阻害薬である ethyl-1-(4-(2,3,3-trichloro-acryl-amido) phenyl)-5-(trifluoromethyl)-1H-pyrazole-4-carboxylate [Pyr3; 10 $\mu$ M まで] には感受性を示さないが、SOC および TRPC4/5 の阻害薬である 4-methyl-4-[3,5-bis (tri-fluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]-1,2,3-thiadiazole-5-carboxanilide [Pyr2 (YM-58483); 0.1-10 $\mu$ M] により濃度依存性に抑制された。

【考察】ウシ毛様体筋の NSCCS は一種の SOC であり、収縮持続相の主要な  $\text{Ca}^{2+}$  流入経路として機能することがわかった。NSCCS に比べ、NSCCL の  $\text{Ca}^{2+}$  流入への寄与は限定的ようである。

#### 2型糖尿病ラット心室筋は $\text{Kv}4.2$ と $\text{KChIP2}$ の発現低下を介して一過性外向き $\text{K}^+$ 電流 ( $I_{\text{to}}$ ) が変化する

○佐藤達也<sup>1,2</sup>, 小林武志<sup>1</sup>, 久野篤志<sup>2,3</sup>, 前田佐知子<sup>1</sup>, 一瀬信敏<sup>1</sup>, 三浦哲嗣<sup>2</sup>, 當瀬規嗣<sup>1</sup> (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二講座, (3)札幌医科大学医学部薬理学講座)

【背景】2型糖尿病では心不全や不整脈が増加するが、2型糖尿病が及ぼす心筋のイオンチャネルへの影響は不明な点が多い。【方法と結果】まず、2型糖尿病モデルラット (OLETF) と非糖尿病コントロール (LETO) の左室心筋を単離し、patch-clamp 法を用いて、1Hz 刺激で活動電位を誘発したところ、心外膜側と心内膜側の両方で、OLETF は LETO に比して活動電位持続時間 (APD<sub>50</sub>) が有意に延長していた (心外膜側: 8.9±1.0 vs. 5.2±0.8ms, 心内膜側: 22.0±3.6 vs. 9.9±1.7ms)。L 型  $\text{Ca}^{2+}$  電流は OLETF と LETO で有意な差は認めなかったが、一過性外向き  $\text{K}^+$  電流 ( $I_{\text{to}}$ ) については、不活性化からの回復 (RFI: Recovery from inactivation) が心外膜側、心内膜側ともに OLETF で LETO よりも有意に延長していた。次に、 $I_{\text{to}}$  をコードするイオンチャネル分子に着目したところ、KChIP2 の蛋白発現は、OLETF で LETO より心外膜側で 45%、心内膜側で 35%、それぞれ減少していた。また、生理的な心内膜—心外膜の  $I_{\text{to}}$  の勾配に関与し、 $I_{\text{to}}$  を負に制御することが報告さ

れている転写因子 IRX5 は、OLETF で LETO よりも心外膜側、心内膜側ともに有意に mRNA の発現が亢進しており、IRX5 と Kv4.2 の mRNA は OLETF、LETO とともに、心外膜側と心内膜側の両方において有意な負の相関を認めた（心外膜側： $r = -0.59$ ，心内膜側： $r = -0.66$ ）。Kv1.4 と Kv4.3 の発現は OLETF、LETO の両群で差を認めなかった。【結論】2型糖尿病は心室筋の Kv4.2 と KChIP2 の発現低下を介して  $I_{to}$  の不活化からの回復を遅延させ、活動電位を延長させることが示唆された。また2型糖尿病心では IRX5 の発現が亢進しており、Kv4.2 と KChIP2 の発現低下に寄与している可能性が示唆された。

#### 光反応性ブロッカーを用いた AMPA 受容体シナプス移行のホールセルクランプ解析

○神谷温之（北海道大学医学研究科神経生物学分野）

脳の興奮性シナプス伝達を担う AMPA 型グルタミン酸受容体のシナプス発現は動的に制御され、恒常的ないし神経活動依存的な膜移行により細胞内プールの AMPA 受容体がシナプス下膜に補給される。我々はこれまでに、光反応性 AMPA 受容体ブロッカー ANQX による光不活化法をマウス急性海馬スライス標本に適用し、細胞外記録による興奮性シナプス後電位（フィールド EPSP）の光不活化後の回復を計測することでシナプスでの AMPA 受容体動態を調べた。この解析を通じて、AMPA 受容体のシナプス局在は安定で細胞内プールからの恒常的なシナプス移行はほとんど生じず、高頻度刺激を与えた直後に活動依存的なシナプス移行が加速されることを報告した。本研究では、単一ニューロンレベルで ANQX による光不活化の作用を検討するために、ホールセルクランプ法を用いて CA1 野錐体細胞からシャフター側枝入力 of 興奮性シナプス後電流（EPSC）を膜電位固定下に記録し解析を行った。ANQX を記録部位に局所的に投与し、短時間の紫外線照射と組みあわせると、EPSC は持続的に抑制されほとんど回復しなかったことから、細胞内プールからの AMPA 受容体の恒常的なシナプス移行は極めて遅いと考えられた。局所灌流による ANQX の投与と除去が細胞外記録での実験に比べて速やかであり、光不活化による抑制の程度も強かった。ホールセルクランプ法ではスライス表層の錐体細胞から記録するために、局所灌流による液交換が速やかで、組織による紫外線の減衰も少ないことによると考えられた。AMPA 受容体の光不活化解析には ANQX の急速投与と急速除去が不可欠であることが指摘されており、ホールセルクランプ法を用いることで、改善した条件で AMPA 受容体動態の解析が可能となった。

#### ラット下肢静脈の動脈血灌流

○小山富康（元北海道大学）

閉塞性動脈硬化症では、下肢組織は壊疽に陥り切断手術を受ける例が少なくない。笹嶋らは下肢の切断を救うために、健常な動脈を足底静脈につないで逆行性に動脈血を組織に灌流する術式（DVA）を工夫し、臨床的に良好な成績を得ている。ただし患者の下肢には正常な血行とは異なる血液循環が発生する。すなわち、逆流防止のための静脈弁の破壊が必須であり、毛細血管網に血流は期待できない、動脈圧による静脈壁破壊の可能性も検討を要する。これまで、細静脈網により骨格筋に酸素の供給され得ること、リンパ流量の増加は既存のリンパ系により処理されると推定してきた。今回は、ラットに DVA 術を施工し、サーモカメラによる皮膚温測定によって、術後の血流再配分を検討した。イソフルラン吸入麻酔下に、一側大腿部に股静脈を露出し、径 0.26mm の経皮的冠動脈再建カテーテルを股静脈へ挿入して静脈弁を破壊した。ついで、股動脈の結紮と股静脈への吻合を作成して逆行性灌流 DVA を実現した。1. DVA 側の大腿部皮膚温度が施術直後並びに4週間後ともに、非手術側よりも高いことがわかった。正常血行路を辿れば、血液は細動脈を通るので、高い血流抵抗をうける。本例の実験側下肢では血行は細動脈を通らない。大量の血液が直接 DVA 側大腿部細静脈網へ流れこむ。血管の総抵抗は低くなるので血流は増え、皮膚温度は高くなると推察した。2. 膝及び足部では手術側の皮膚温が正常側よりも低くなった。冠動脈再建カテーテルの膝関節部通過が困難であり、膝下の静脈弁が完全には破壊されず、動脈血の流入を妨げているかと思われる。3. このような難点が残るものの、術後の足の浮腫は2乃至3週間で解消し、手術ラットは元気に過ごしている。なお組織学的検討は目下進行中である。この動物実験は旭川医科大学動物実験規則委員会の審査を経て実施された。本研究は旭川医科大学笹嶋教授、菊池博士との共同研究である。

#### 黒質網様部—脚橋被蓋核投射とレム睡眠の神経機構

○高草木 薫，小原和宏，海老澤一人（旭川医科大学医学部脳機能医工学研究センター）

【目的】脚橋被蓋核（Pedunculo-pontine tegmental nucleus；PPN）はレム睡眠に関与する。この核は基底核の出力核である黒質網様部（Substantia nigra pars reticulata；SNr）から GABA 作動性投射を受ける。本研究では SNr-PPN 投射がレム睡眠の調節に関与するか否かを検討した。【方法】実験には除脳ネコ（ $n = 14$ ）を用いた。PPN に微小電気刺激（3 発，5ms 間隔，10-40  $\mu A$ ）を加え、後肢筋を支配する  $\alpha$  運動細胞（ $n = 121$ ）から抑制性シナプス後電位

(PPN-IPSP)を記録し、これがSNrからのGABA作動性投射により修飾されるか否かを解析した。【結果と考察】PPN-IPSPはpeak-latencyが40-50msであり、レム睡眠時に網様体への刺激によって誘発される“REM-specific IPSP”と同じ特徴を有していた。これは、PPN刺激がレム睡眠時に活動する筋緊張消失系を駆動したことを示している。次にPPNの投射領域である吻側橋網様核にムスカリン受容体拮抗薬であるatropine sulfateを注入(20mM, 0.25 $\mu$ l)するとIPSPの振幅は減少したことから、PPN-IPSPはPPNコリンニューロンの興奮によって誘発されたと考えられる。また、SNrへの条件刺激(40-60 $\mu$ A, 10-200Hz)はPPN-IPSPの振幅を減少させ、その効果は刺激頻度が50-100Hzの場合に顕著であった。しかし、PPNにGABA<sub>A</sub>受容体拮抗薬であるbicucullineを注入(5mM, 0.25 $\mu$ l)すると、SNr刺激によるPPN-IPSPの抑制作用はブロックされた。一方、SNrにグルタミン酸受容体作動薬であるNMDAを注入(5mM, 0.25 $\mu$ l)するとPPN-IPSPの振幅が減少し、bicucullineを注入(5mM, 0.25 $\mu$ l)すると、その振幅は増加した。これらの成績は、SNrからのGABA作動性投射がPPNコリンニューロンに作用してレム睡眠時の筋緊張抑制作用を修飾する可能性を示唆する。パーキンソン病に随伴するレム睡眠時行動障害などの睡眠障害は、この疾患の先行症状としても重要である。本研究の成績はSNr-PPN投射の機能低下がこの疾患における睡眠障害の一要因であることを推定させる。

#### 即時的な行動選択に関わる淡蒼球の神経活動

○吉田篤司, 田中真樹(北海道大学医学研究科神経生理学分野)

【緒言】Antisaccadeは視覚刺激に対して反対側へ視線を向ける課題であり、自己制御行動の指標として用いられる。以前、我々は同課題遂行中のサル淡蒼球外節(GPe)より単一ニューロン記録を行い、同部の関与を示したが(Yoshida & Tanaka 2009), Antisaccadeに必要な具体的などのような機能を制御しているのか明らかではない。【方法】自己制御行動へのGPeの役割を解明するために、従来のAntisaccade課題とProsaccade課題(視覚刺激に即座に視線を向ける課題)に加え、視覚刺激を無視して中央の固視点を見続ける課題(NoGo課題)を新たに考案した。また、固視点の色を変えることで課題の種類を事前に知らせるもの(Delay型)と、前もってルールを知らせず、ターゲットの色により初めて課題の種類を提示し、瞬時の行動選択を要求するもの(Immediate型)のふたつのタイプを用意し、計6種類の課題を十分に訓練した。【結果】以前の報告と同様に、Delay型では多くの細胞でAntisaccadeの準備中に

大きな活動変化が認められたが、ProsaccadeやNoGo課題での活動変化は小さかった。一方、Immediate型では3つの課題のいずれにおいても、ターゲット(ルール)が提示された直後に神経活動を変化させるものを多く認めた。

【考察】以上の結果から、(1)即時の判断を必要とする状況ではAntisaccadeだけではなく、Prosaccadeのような反射的な運動においてもGPeが関与すること、(2)Immediate型のNoGo課題では、ルールを理解するためにターゲットに注意を向けてから眼球運動を抑制する必要がある、神経活動の変化はこうした選択的な行動抑制に関与していること、が示唆された。即時性の有無によって、自己制御行動におけるGPeの関与が異なっている可能性がある。

#### サル視床ニューロンにおける反応性から予測性への活動変化

○松山 圭, 國松 淳, 田中真樹(北海道大学医学研究科神経生理学分野)

【背景と目的】最近、我々は、オドボール課題遂行中のサル小脳歯状核から単一ニューロン記録を行い、刺激を繰り返し提示することで抑制性の感覚応答が増大することを発見し、本学会等で報告している。これらの信号が、下流の視床大脳経路でどのように修飾され、処理されているかを調べた。

【方法】一定間隔で視聴覚刺激を提示し、その不意の欠落を検出して眼球運動で答えるようにサルを訓練した(欠落オドボール検出課題)。刺激間隔は、試行ごとに100~600msの5種類のいずれかをを用いた。また、追加実験として、一定間隔で視聴覚刺激を提示するが、欠落に対して眼球運動を行わないNo-Go課題を提示した。サルに課題を十分訓練した後、視床VL核周辺から単一ニューロン記録を行った。

【結果】課題に応答する33個のニューロンを記録したところ、3つのグループに大別できた。(1)約2割では、刺激に対して常に一定の応答が見られた(Sensory type)。(2)約3割では、歯状核ニューロンと同様に、刺激を反復提示することで徐々に応答が増大した(Entrainment type)。(3)約半数では、感覚応答の潜時と活動の方向が繰り返し刺激によって変化した(Switch type)。これらの細胞では、反復刺激後、刺激のタイミングにほぼ同期した予期的活動が見られた。No-Go課題では、Entrainment typeで応答ゲインの増大が低下し、Switch typeの一部では、応答潜時の短縮が見られなくなった。これらのニューロンでは、オドボール検出課題での神経活動からNo-Go課題での活動を引き算することで、刺激の反復によって増大する成分を抽出することができた。

【考察】 Switch type の神経活動は刺激の反復提示によって反応性のもから予測性のもに変換されており、こうした信号は他の二種類の細胞群がもつ情報を統合することによって作り出されると考えられる。この情報はさらに下流の前頭葉皮質に送られ、刺激タイミングの予測と誤差信号の生成に利用されている可能性がある。

#### 概日時計の生後発達と時計遺伝子 Cryptochrome

○小野大輔<sup>1</sup>、本間さと<sup>2</sup>、本間研一<sup>2</sup>（<sup>1</sup>北海道大学大学院医学研究科連携研究センター光バイオイメージング部門、<sup>2</sup>北海道大学大学院医学研究科時間医学講座）

視交叉上核（SCN）は哺乳類における概日時計の中核であり、個々の神経細胞の概日リズムが互いに同調し、安定したリズムが形成される。SCN の個々の細胞では、複数の時計遺伝子の転写・翻訳を介したネガティブフィードバックループによって約 24 時間のリズムが生み出され、そのリズムは行動リズムに出力される。時計遺伝子 *Cryptochrome* (*Cry*) 1, *Cry2* を欠損したマウス (*Cry1/Cry2* マウス) は恒常暗条件下で行動リズムが消失する事が分かっている。しかし、最近 *Cry1/Cry2* マウスの培養 SCN に概日リズムが存在する事が見だされてきた。本研究では、これらの乖離がマウスの年齢に関係していると仮説を立て、SCN の生後発達における概日リズムの変化を検討した。

*Per1* プロモーター下流にルシフェラーゼを組み込んだ *Per1-luc* マウス、および、*Per2* タンパク質にルシフェラーゼを結合させた *PER2::LUC* マウスを使用した。生後 1, 7, 14, 21 日目および 8 週齢以上の成獣マウスから SCN を切り出し、メンブレン上で培養し、発光量を光電子増倍管にて連続測定した。また、CCD カメラを用い、SCN スライスまたは分散培養から個々の細胞レベルの発光量を測定した。

*Per1-luc*, *PER2::LUC* ともに *Cry1/Cry2* マウスの SCN スライスでは生後 1, 7 日目には概日リズムが認められた。しかしながら生後 14 日目では振幅が減衰し、生後 21 日目では消失した。発光イメージングによる解析から、個々の細胞には概日リズムが存在し、スライスレベルのリズム消失は細胞リズム間の脱同調である事が明らかとなった。これらの結果から、時計遺伝子 *Cry* は、SCN の細胞間カップリングの生後発達に関与する事が明らかとなった。

#### シングルニューロン培養法を用いた中枢時計安定化機構の光イメージング解析

○平田快洋<sup>1</sup>、本間さと<sup>2</sup>、本間研一<sup>2</sup>（<sup>1</sup>北海道大学大学院医学研究科連携研究センター光バイオイメージング部門、<sup>2</sup>北海道大学大学院医学研究科時間医学講座）

生物時計の中核である視床下部視交叉上核（SCN）は、おおよそ 2 万個のニューロンが同期的活動を行うことで約 24 時間周期のリズムを脳内全領域および全身の生理機能に出力する。分散培養中の個々のニューロンは、ニューロンごとに不均一な活動リズムを示すため、組織中の同期的活動には多数のニューロン間の相互作用が背景にあると考えられている。しかしながら、それを検証するための方法論はこれまで限られていた。我々は、ニューロンのリズム活動の同期とその安定化に関わる神経基盤を明らかにするために新たな実験系の構築および改良を行った。時計遺伝子発現をホタルルシフェラーゼによる発光でモニタリング可能なトランスジェニックマウスを用い、SCN のシングルニューロンを物理的・空間的に隔離された微小区画（マイクロアイランド）で単離培養する方法を確立した。本方法を用い、他のニューロンとはシナプス結合を持たない空間的に隔離したシングルニューロン内で起こる時計遺伝子の一つである *Period* (*Per*) の発現を発光イメージング法により長期間可視化し、解析を行った。その結果、マイクロアイランド系においてシングルニューロンから時計遺伝子 (*Per*) の発現に伴うリズムミクシな発光シグナルを検出した。測定後、ニューロン特異的な抗体で免疫染色した結果、リズムミクシな発光現象を伴わない SCN ニューロンも存在することが明らかとなった。この結果は、SCN のニューロンは、空間的に隔離されたシングルニューロンにおいても時計遺伝子発現の概日振動をもつことを示唆する。

#### 覚醒マウス嗅球および皮膚における時計遺伝子発現の 4D イメージング

○浜田俊幸<sup>1</sup>、石川正純<sup>2</sup>、K. Sutherland<sup>2</sup>、宮本直樹<sup>2</sup>、白土博樹<sup>3</sup>、本間さと<sup>1</sup>、本間研一<sup>2</sup>（<sup>1</sup>北海道大学医学研究科光バイオイメージング部門、<sup>2</sup>北海道大学医学研究科医学物理学分野、<sup>3</sup>北海道大学医学研究科放射線医学分野）

ホタルルシフェラーゼとその基質ルシフェリンによる生物発光を遺伝子発現マーカーとして用いる光イメージングの手法は、生物を生きたまま高感度で生体内の遺伝子発現可視化を可能とした。しかしながら現在、全身の発光イメージングは麻酔条件下で短時間の測定に限定される。生理学的な研究には自由行動している動物の発光を長期間測定できることが望まれるが、そのためには基質であるルシフェリンを長時間血中で一定濃度に保ち、かつ発光測定カメラとの距離の変化に伴う発光量変化補正が必要になる。今回、我々はこの生物発光系を利用し、自由行動条件下で、全身の時計遺伝子発現を可視化できる *in vivo* イメージング装置を作製した。さらに我々が独自に開発した動物追跡定量プログラムを用いて、マウス嗅球および皮膚における時計

遺伝子発現を測定した。時計遺伝子 *Per1* および *Bmal1* プロモーターに *luciferase* 遺伝子を結合させた *Per1-luc* および *Bmal1-luc* トランスジェニックマウスの嗅球および皮膚における時計遺伝子発現は *Per1* と *Bmal1* は逆位相で発現し、サーカディアンリズムを示した。また HPLC を用いて血中ルシフェリン量の定量を行い、血中ルシフェリン濃度は一定であった。さらに我々は嗅球組織での mRNA 発現および嗅球培養スライスにおいて *Per1* と *Bmal1* は *in vivo* イメージングと同様、逆位相で発現にサーカディアンリズムを示すことを明らかとした。以上の結果はフリームービング条件下、我々が新規に開発した発光部位追跡定量法は長期間の時計遺伝子発現定量解析が可能であり、その他の実験系と連動させることで全身における時計遺伝子の役割が明らかになるものと期待される。

#### オオカミ尿中の恐怖誘発性物質の同定と副嗅球への影響

○長田和実<sup>1</sup>、柏柳 誠<sup>2</sup> (<sup>1</sup>北海道医療大歯学部口腔生物学系生理学分野、<sup>2</sup>旭川医科大学医学部生理学講座神経機能分野)

野生動物は天敵の匂いを本能的に忌避することがある。キツネの糞中より見出された trimethyl-thiazoline (TMT) は低濃度でも恐怖行動を誘発する因子である。オオカミはキツネよりも大型の肉食動物であり、尿マーキングの習性が強いことから尿中により強力な恐怖誘発物質を含んでいる可能性が期待できるが、詳細は不明である。本研究は、オオカミ尿に含まれる恐怖誘発性忌避物質の確認と同定、および副嗅球に対する作用の有無を明らかにすることを目的としておこなった。採取時期の異なった3種類のオオカミ尿を C57BL/6 雌マウスに提示すると、いずれのサンプルも忌避行動や恐怖誘発行動が見られたが、特にサンプル C (4月に購入) に強い活性が見られた。さらにオオカミ尿サンプルをマウスに提示すると、サンプル C を提示した群では副嗅球での c-fos 陽性細胞数が有意に増加したが、サンプル A、B では副嗅球刺激作用は弱かった。またガスクロマトグラム-マススペクトロメトリー (GC-MS) を用いた化学分析の結果、サンプル C に有意に高く含まれる3種類の化合物が見出されたので、構造決定を行った。これらの化合物をマウスに提示すると忌避行動や恐怖誘発行動が観察され、その程度は TMT と同等以上であった。さらに、これら3種類の化合物を混合してマウスに提示すると、オオカミ尿と同様に副嗅球での c-fos 陽性細胞数が有意に増加した。本結果はオオカミの尿中に強力な恐怖誘発成分が含まれており、本成分の恐怖行動の誘発には副嗅球への刺激が関与する可能性を示唆している。

#### 強制運動が味覚嫌悪学習に与える影響

○坪井寿典<sup>1</sup>、平井喜幸<sup>1</sup>、井上農夫男<sup>2</sup>、船橋 誠<sup>1</sup> (<sup>1</sup>北海道大学大学院歯学研究科口腔生理学教室、<sup>2</sup>北海道大学大学院歯学研究科高齢者歯科学教室)

【目的】全身運動により脳内の神経幹細胞数が増加することや、学習能力が向上することなどが、ラットを用いた研究によって明らかにされている (Itou et al., 2010; Griffin et al., 2009)。しかし、全身運動と口腔機能との連関については不明な点が多く、味覚との関係もよくわかっていない。そこで本研究では、全身運動が味覚の記憶に及ぼす影響を明らかにするために、ラットを用いて、トレッドミルによる強制運動が、味覚嫌悪学習の獲得とその後の保持に及ぼす影響を調べた。【方法】蒸留水を用いて、体重 160~230 g の SD 系雄性ラットに、5日間の飲水トレーニング (20分飲水→40分絶水→3時間飲水→20時間絶水) を行った。翌日を実験開始日とし、サッカリンを20分間飲水させ、その後後に LiCl を腹腔内投与した。40分間絶水の後、3時間蒸留水を飲水させた。2日後、絶水時間終了後に、20分間1ボトルサッカリン飲水テストを行った。ラットを、実験開始日に運動する群、その2日後に運動する群、3日後に運動する群 (各1回30分) に分けた。また、運動を行わせない群をコントロール群とし、各群において、CTA 獲得後のサッカリン飲水量の変化について調べた。【結果と考察】実験開始2日後に運動させた群において、コントロール群と比較して翌日のサッカリン飲水量が有意に減少した。実験開始当日に運動させた群、実験開始3日後に運動させた群では、コントロール群と比較してサッカリン飲水量に有意差は認めなかった。このことから、特定の時期に1回の運動を行わせることにより、味覚嫌悪学習の持続時間が延長することが示唆された。

#### L-ヒスチジンによる摂食抑制と味覚嫌悪学習の連関

○奥舎有加、平井喜幸、船橋 誠 (北海道大学大学院歯学研究科口腔生理学)

【目的】L-ヒスチジンのラット腹腔内投与により脳内ヒスタミン量が増加し、ラットの摂食量が減少することが明らかにされている (Yoshimatsu et al., 2002)。味覚嫌悪学習が L-ヒスチジンによる摂食抑制により惹起されるのかについては不明である。そこで以下の実験を行った。【方法】SD 系ラット (7~20 週齢) を用い L-ヒスチジン腹腔内投与による摂食抑制作用を確認した。同じ動物を用いて L-ヒスチジンを腹腔内投与し味覚試験を行った。味覚試験は24時間の2ボトル飲水トレーニング (キニーネ溶液、脱イオン水) を5日間行い、L-ヒスチジン腹腔内投与の前後3日の飲水量を測定し味覚異常の有無を調べた。その後、味

覚嫌悪学習を指標とした行動実験と免疫組織化学的解析を行った。全てのラットに対して23.5時間の絶水とそれに続く30分間の飲水トレーニングを7日間繰り返し行った。実験開始日にサッカリン溶液(0.1%)を30分飲水させ、直後にL-ヒスチジンを腹腔内投与し、その後の23.5時間は絶水させた。絶水時間終了後に2ボトル飲水テスト(サッカリン溶液, 脱イオン水)を行った。また最後野神経活動を調べるために*c-fos*発現を免疫組織化学的に可視化した。【結果と考察】L-ヒスチジン腹腔内投与により摂食量の有意な減少を認めたが、これは味覚異常によるものではないことが明らかになった。また味覚嫌悪学習の獲得は認められず、延髄最後野及び孤束核における*c-fos*陽性細胞数の増加が認められた。以上よりL-ヒスチジン腹腔内投与により摂食抑制が生じる際に最後野神経活動が上昇するものの、悪心誘発は生じないことが明らかとなった。

#### マウス副嗅球出力神経の情報量解析

○野口智弘, 笹島 仁, 宮園貞治, 柏柳 誠 (旭川医科大学生理学講座神経機能分野)

嗅覚系の一次中枢である嗅球は、両生類以上の動物になると、解剖学的に主嗅球と副嗅球の区分が生じる。魚類の嗅球にはそのような区分は見られない。機能的には主嗅球は匂い情報処理を担当し、副嗅球はフェロモンの情報を処理するものと考えられている。哺乳類のうち、とくにげっ歯類は発達した副嗅球を有している。マウスの副嗅球は主

嗅球の後背側に位置し、互いに類似した層構造を保持している。おおまかに分けて表面は感覚神経の軸索が走っており、その下は感覚神経終末と出力神経の樹状突起がシナプス接続する糸球体層であり、次に出力神経の細胞体が存在する層、最深部は出力細胞の興奮性を調節する顆粒細胞が密集した層となっている。一方で出力神経の形態には若干の違いが存在する。主嗅球出力神経の主樹状突起が一本であるのに対して、副嗅球出力神経は複数の主樹状突起を持つ。このことより、主嗅球の出力神経は単一の匂い情報を受け取り、副嗅球の出力神経は複数のフェロモン情報の入力を受けると考えられている。これらの相違点は、主嗅球では情報の抽出、副嗅球では情報の統合が行われることを示唆している。しかしながら、神経情報処理機構の基盤となる興奮性にはどのような違いがあるのか不明な点が多い。今回、我々はスライスパッチ法を用いて、副嗅球および主嗅球の出力神経についてその電氣的興奮性を比較した。その結果、副嗅球出力神経の活動電位は主嗅球のものより時間的な幅が広く、高頻度の発火に不利であることが分かった。さらに刺激電流量と発火頻度の相互情報量の解析によって、副嗅球と主嗅球の出力には入力の強度と時間に対する依存性の違いがあることが明らかになった。これは、主嗅球が匂い源探索のために匂い物質の濃度を忠実に表現する必要があること、一方、副嗅球は生殖や縄張り維持のためにフェロモンの種類を正確に同定する必要があることをそれぞれ反映しているものと考えた。