

## 第45回東北生理談話会

会 期：2013年10月5日（土）

会 場：東北大学片平キャンパス生命科学プロジェクト総合研究棟

当番幹事：東北大学大学院生命科学研究科・教授 八尾 寛

演 題 数：23題

平成25年度の日本生理学会東北地方会は、上記日程で開催されました。口演16題、ポスター7題の計23題が発表され、60名を超える参加者を迎え、活発な議論が交わされるとともに、親睦を深めました。今年度から東日本大震災義援金を原資として東北地方会賞が創設され、東北日本生理学会奨励賞候補者2名、東北日本生理科学有志賞候補者2名が選出されました。若手研究者に限らず、大きな刺激であり、東北地方のみならず我が国における生理学研究的活性化につながる印象を受けました。盛会裏に本学会を終了できましたこと、参加者ならびに協力者の皆様には厚く御礼申し上げます。次回の当番幹事は、福島県立医科大学（永福智志教授）の予定です。

#### O-01. HEK293細胞の核周辺小胞体膜における, MaxiKチャンネルタンパク質の配向

○村田喜理, 風間逸郎, 丸山芳夫（東北大・医・細胞生理）

核周辺小胞体(nuclear envelope: NE)標本における電気生理学的記録から、Ca<sup>2+</sup>依存性の電位依存性K<sup>+</sup>チャンネル(MaxiK)の小胞体膜に対する配向が、現在一般に受け入れられている小胞輸送機構から予測されるものとは逆であることが示唆された。これは、現在知られる小胞輸送機構では説明できない非常に興味深い現象である。本研究では、MaxiKの小胞体膜中における配向を、生化学的、組織学的手法により検討した。

タバコモザイクウイルス由来のTEVプロテアーゼは、タンパク質中の特異的なアミノ酸配列を認識し切断する。MaxiKタンパク質のC末端に、TEVプロテアーゼ認識配列をリンカーにして緑色蛍光タンパク質EGFPを付加した融合タンパク質を作成し、HEK293細胞にTEVプロテアーゼとともに発現させた。MaxiKが従来と逆の配向で小胞体膜上に存在する場合、リンカー部分は小胞体膜により保護され、細胞質にあるTEVプロテアーゼによる消化を受けない。融合タンパク質のTEVプロテアーゼによる消化の有無は、SDS-PAGEとウェスタンブロットにより確認した。また、NE標本におけるMaxiKチャンネルの細胞内領域の配向を、免疫金標識法を用いた電子顕微鏡観察により検討した。

#### O-02. 脊髄損傷後の歩行運動機能解析

○李 相勲<sup>1,2</sup>, 高島健太<sup>1,2,3,4</sup>, 石塚 徹<sup>1</sup>, 八尾 寛<sup>1</sup>,

小野寺 宏<sup>2,3</sup> (1東北大・生命・脳機能解析, 2国立病院機構北海道東北ブロック研究室, 3CREST, 4東北大・医・内部障害学)

正常歩行時、下肢の筋肉はリズムカルなパターンで活動しており、一般的にこれらの神経活動を担う神経回路を中枢パターン発生器(CPG)と呼び、歩行CPGは腰髄介在神経の神経回路が寄与すると考えられている。近年、脊髄損傷後の腰髄硬膜下電気刺激により、下肢のリズムカルな筋活動パターンが促進されると報告されているが、ある特定の神経のみを活動させることができればさらなる治療効果が期待される。そこで、本研究ではある特定の神経を光で刺激可能なオプトジェネティクスを用いた脊髄損傷疾患治療を目指している。腰髄部に光応答性のチャンネルロドプシンを発現させた後に、脊髄損傷ラットを作成し、チャンネルロドプシン発現領域に青色光刺激を行うことで、歩行機能回復効果の評価を行う。これらの歩行機能回復を正確に評価するためには、一般的に使用されている主観的なBBB歩行機能評価では不十分であり、より客観的な運動機能評価である動作解析と筋電図解析が必要である。今回、脊髄損傷ラットの客観的運動解析の結果を報告する。

#### O-03. インテリジェントナノビーズによる臓器内ピンポイント遺伝子発現方法の開発

○高島健太<sup>1,2,3,4</sup>, 坂本 聡<sup>5</sup>, 酒井誠一郎<sup>6</sup>, 八尾 寛<sup>3</sup>, 半田 宏<sup>5</sup>, 小野寺 宏<sup>1,2</sup> (1国立病院機構北海道東北ブロック研究室, 2CREST, 3東北大・生命・脳機能解析, 4東北大・医・内部障害学, 5東工大・生命理工, 6理研・BSI)

臓器内の特定部位に遺伝子を導入する場合、ウイルスベクターの目的部位への注射が頻用される。脳は微小な神経核から構成される複雑な構造を持つため、単純なウイルス液の定位的注入ではウイルスの脳内拡散による感染効率低下に加えて、目的外部位での遺伝子発現による副作用とデータ劣化が避けられない。そこで我々はアデノ随伴ウイルス(AAV)受容体分子を搭載するナノビーズ(インテリジェントナノビーズ)を開発し、AAVを脳内目的部位のみにピンポイントで発現できるシステムを構築した。光応答イオンチャンネル channelrhodopsin2-AAV を搭載するナノビーズをラット脳の特定位に(海馬, 線条体) 定位脳手術装置により注入した結果, 限局した channelrhodopsin2 発現と channelrhodopsin2 陽性神経細胞の青光応答性が観察された。インテリジェントナノビーズはミクログリア(マクロファージ)に貪食されること, インテリジェントナノビーズ注入部位の脳損傷は軽微であることも確認された。注入部位同定とウイルス搭載処理の簡便化のためナノビーズは蛍光物質と磁性体も搭載する。インテリジェントナノビーズは複数遺伝子を共載でき, 栄養因子も結合できるため, iPS細胞やES細胞の臓器内制御とDDSにも有用である。

#### O-04. 光遺伝学的に誘起された杯状シナプス前終末小胞体ストアからのCa<sup>2+</sup>放出

○江川 遼, 細島頌子, 加藤秀理, 石塚 徹, 八尾 寛 (東北大・生命・脳機能解析)

光で細胞機能进行操作・計測する光遺伝学は, 神経科学の広範な分野で応用が進んでいる。我々は, シナプス研究の実験モデルとして長年使われてきたニワトリ胚毛様体神経節杯状シナプスに対するシナプス前細胞特異的な遺伝子導入法を確立し, それによってシナプス前終末の光操作-Ca<sup>2+</sup>応答計測を世界に先駆けて行うことで, シナプス前終末研究における光遺伝学の有用性を評価した。2日胚(E2)中脳に対して光感受性陽イオンチャンネルChRFRと赤色蛍光Ca<sup>2+</sup>センサーR-GECO1を発現するプラスミドを同時にエレクトロポレーションし, E14で摘出した毛様体神経節を高速共焦点顕微鏡下で観察した。光ファイバーから単発の青色レーザーパルスで杯状シナプスに直接照射するとシナプス前終末におけるCa<sup>2+</sup>応答がみられた。一方, この応答はTTX投与・細胞外Ca<sup>2+</sup>フリー条件下でも消失せず, わずかに残った。残存する応答はRyanodine受容体やIP<sub>3</sub>受容体の阻害剤投与によってわずかに減少し, 小胞体Ca<sup>2+</sup>-ATPase阻害剤投与下で繰り返し刺激ストアを枯渇させることで消失した。これらの結果は, 光刺激が小胞体膜上に発現するChRFRを直接的・間接的に仲介してCa<sup>2+</sup>放出を誘起したことを示唆している。以上よりChR

の強制発現するにはこのようなCa<sup>2+</sup>動態が細胞機能に影響し得ることを十分に考慮する必要がある。

#### O-05. 線条体のニューロンとアストロサイトではmGluR5依存的・活動電位非依存的な長時間持続自発Ca<sup>2+</sup>振動が発生する

○田村篤史<sup>1</sup>, 山田尚宏<sup>2</sup>, 矢口雄一<sup>2</sup>, 小山内 実<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東北大・医・医用画像工学, <sup>2</sup>大阪大・工・電気電子情報工)

線条体の投射ニューロンに多く発現しているグループI代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)は, パーキンソン病との関係や, ドーパミン受容体との間の相互作用が示唆されている。グループImGluRは細胞内Ca<sup>2+</sup>シグナリングに重要な役割を果たしている。そこで, GFAP-GFPマウスの大脳急性スライス標本に対して, Ca<sup>2+</sup>イメージングを行い, 線条体のニューロンとアストロサイトから細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度を計測した。その結果, ニューロンとアストロサイトの双方で, 遅く, 持続時間の長い自発的なCa<sup>2+</sup>変動(自発Ca<sup>2+</sup>振動)が生じていた。薬理学実験の結果からニューロンとアストロサイトの自発Ca<sup>2+</sup>振動は活動電位非依存的に発生しており, mGluR5-IP<sub>3</sub>シグナル経路が関与していた。一方, 自発Ca<sup>2+</sup>振動は複数細胞間で繰り返し同期していたが, この自発Ca<sup>2+</sup>振動の同期活動は活動電位の阻害により減少した。このことから, 活動電位は自発Ca<sup>2+</sup>振動の発生には直接関与しないが, 振動状態を調節していることが示唆された。

#### O-06. MRIを用いた神経活動履歴計測

○菊田里美<sup>1</sup>, 中村幸代<sup>3</sup>, 山村行生<sup>3</sup>, 柳川右千夫<sup>2</sup>, 本間経康<sup>1</sup>, 笠原二郎<sup>3</sup>, 小山内 実<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東北大・医, <sup>2</sup>群馬大・医, <sup>3</sup>徳島大・薬)

さまざまな脳神経疾患は脳活動の変化により症状があらわれる。我々は, どの領域のどのような神経活動の変化が神経疾患における病態と関連しているのかを明らかにすることを目的とし, 同一個体についてin vivoとin vitroの手法を用い, 多方面からアプローチする研究を進めている。通常, in vivoで脳全体の神経活動の計測は非常に困難であるため, 脳のどの領域の神経活動の変化が病態と関係しているのかを示した例はfMRI及びPET等を用いた脳代謝計測以外にほとんどない。そこで, in vivoで非侵襲的に神経活動を計測できる手法として, 比較的新しいMRIの手法に着目した。この方法は, Mn<sup>2+</sup>が電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャンネルを透過するため, 活動が高い細胞ほど細胞内にMn<sup>2+</sup>が蓄積するという性質を用いたものである。しかし, 細胞内へのMn<sup>2+</sup>蓄積と細胞活動との関係を検証した報告は調べた

限りない。そこで我々は、まず、神経活動に伴う細胞内への  $Mn^{2+}$  流入を、 $Ca^{2+}$  イメージング法を応用して、定量的に解析し、神経活動と  $Mn^{2+}$  流入量に相関があることを明らかにした。この結果を受けて、神経疾患モデル動物に対して、この MRI の手法を適用し、病態との相関解析を行った。

#### O-07. 徐波振動発生メカニズム推定のための大脳皮質錐体細胞のモデル化

○成田慎弥<sup>1,2</sup>、小島晴樹<sup>1</sup>、虫明 元<sup>1,2</sup>、小山内 実<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>東北大・医、<sup>2</sup>JST.CREST)

大脳皮質では睡眠中または深い麻酔下において、大脳皮質局所電位の自発的な徐波振動が観察される。大脳皮質第5層錐体細胞では、膜電位が閾膜電位付近で揺らぐ up state、膜電位が過分極となる down state の2つの状態を遷移し、その細胞集団の同期発火により徐波振動が発生しており、記憶強化に関係すると考えられている。しかし、それを引き起こすメカニズムはまだ詳しく分かっていない。そこで本研究では、徐波振動のメカニズムを推定するのに先立ち、大脳皮質第5層錐体細胞に存在すると考えられるイオンチャネルの数理モデルを過去の生理学実験データをもとにして構築し、神経活動のコンピューターシミュレーションを行った。その結果、Regular Spiking Neuron の発火パターンをほぼ模擬することができた。また、神経細胞や心筋のペースメーカー機能を実現していると考えられている、HCN チャネルの有無で電流波形を比較した。その結果、HCN チャネルを導入しても発火パターンに変化が少なく、HCN チャネルは細胞体単体における発火パターンの形成にあまり作用していないことがわかった。

#### O-08. AMPA 型グルタミン酸受容体の睡眠-覚醒状態に依存した変化

○中村有孝<sup>1,2</sup>、辛島彰洋<sup>1</sup>、坪川 宏<sup>2</sup>、片山統裕<sup>1</sup>、中尾光之<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東北大・情報科学・バイオモデリング論、<sup>2</sup>東北福祉大・健康科学)

睡眠には様々な機能があると考えられており、最近では脳神経回路の再編成への関与に注目が集まっている。我々は、*in vitro* 実験により、睡眠および覚醒状態が大脳皮質興奮性神経回路の再編成に及ぼす影響について調べた。断頭前に覚醒状態が多く占めるラット（覚醒群）と、睡眠状態が占めるラット（睡眠群）から作成した大脳皮質スライス標本において、AMPA 型グルタミン酸受容体の分布に差があるかを以下の2つの方法で調べた。まず、膜電位を  $-60 \sim +50$  mV に固定した状態で興奮性シナプス後電流 (eEPSC) を測定し、電流電圧特性を調べた。覚醒群では内向き整流特性が見られたが、睡眠群では見られなかった。次に、

$Ca^{2+}$  透過性 AMPA 受容体の拮抗薬を灌流した時の eEPSC への影響を調べた。覚醒群では灌流後に eEPSC の振幅が減少したが、睡眠群では変化が見られなかった。この2つの実験結果は共に、 $Ca^{2+}$  透過性 AMPA 受容体が覚醒群のみに存在していることを示している。 $Ca^{2+}$  透過性 AMPA 受容体はシナプス長期増強が誘導された直後に存在するとされていることから、今回の結果はシナプス伝達効率の増大は覚醒時に生じていることを示唆している。

#### O-09. 中脳黒質網様部細胞のドーパミン D1 受容体発現解析

○長友克広<sup>1</sup>、菅 世智子<sup>2</sup>、山本欣郎<sup>3</sup>、山田勝也<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>弘前大院・医・統合機能生理、<sup>2</sup>弘前医療福祉大、<sup>3</sup>岩手大・農・獣医細胞システム)

脳のドーパミンは運動の制御と強く関係することが知られている。中脳黒質は、ドーパミン作動性ニューロンからなる緻密部と、主に GABA 作動性ニューロンからなる網様部 (SNr) に分けられる。緻密部ドーパミン作動性ニューロンの樹状突起は網様部に入り込み、ドーパミンを樹状突起放出するが、標的細胞については詳しく分かっていない。脳スライスの DIR 抗体による免疫染色では、SNr に DIR が強発現している。また SNr 組織のドーパミン受容体遺伝子発現解析を行うと、SNr では DIR 遺伝子の発現が確認された。しかし急性単離した SNr GABA 作動性ニューロンはほとんどドーパミンに反応しない。そこで、グリア細胞に DIR が発現している可能性について検討した。DI-YFP 遺伝子改変マウスから急性単離した SNr グリア細胞には YFP が発現しており、DIR の発現が示唆され、実際、免疫染色によっても裏付けられた。運動制御にグリア細胞が関与しているとすれば興味深い。

#### O-10. オレキシンによる交感神経制御 (Tg ラットによる循環系評価)

○村上 学<sup>1</sup>、櫛方哲也<sup>2</sup>、丹羽英智<sup>2</sup>、大場貴喜<sup>3</sup>、尾野恭一<sup>3</sup>、廣田和美<sup>2</sup> (<sup>1</sup>弘前大・医・病態薬理、<sup>2</sup>弘前大・医・麻酔科学、<sup>3</sup>秋田大・医・細胞生理)

オレキシンは後部視床下部に局限するペプチドであり、その神経は脳内において広範な軸索投射をする。外来性にオレキシンを脳内投与すると血圧や交感神経活動が上昇するという報告も提出されている。しかし、従来行われている脳内への投与はカテーテル挿入などの手術による侵襲を避けることができず、結果の評価には常に解釈の余地がある。

以上の背景から、オレキシン神経が欠乏するラット系列を用い、オレキシン欠乏状態のトランスジェニックラット

における交感神経トーンスを検討した。オレキシン欠乏ラットは強い心拍のゆらぎ（いわゆる R-R 間隔変動）を示した。すなわち、オレキシン神経は交感神経トーン維持に関与していることが強く示唆された。オレキシン欠乏ラットは上頸神経節においてオレキシン発現を認めなかった。さらにオレキシン欠乏により、同部における OX1 受容体と OX2 受容体の発現増加を認めた。血圧測定においては、収縮期低血圧を示したが、拡張期圧には異常を認めなかった。β 遮断薬に対する反応性も低下していた。以上のことから、オレキシン神経は末梢の交感神経トーン維持に重要と考えられた。

#### O-11. 生後発達に伴うマウス心拍数増加には自律神経系及び洞房結節細胞自身の内因性発火頻度の変化が関与している

○尾野恭一, 安達 健, 佐藤紳一, 柴田繁啓, 岡本洋介, 藤澤 進, 大場貴喜 (秋田大・医・細胞生理学)

一般的に、ヒトやブタなど体のサイズの大きな動物種において心拍数は生後発達と共に減少するもの、マウスやラットなどの小動物においては逆に増加する。我々はこれまで、ピエゾ方式心拍モニターを独自に開発し、小動物の心拍数をできる限り非侵襲的に測定することを可能にできた。その結果、マウス心拍数の生後増加には交感神経系による心拍増加作用及び内因性心臓自動能の亢進が関わっていると考えられる。本研究では、内因性心臓自動能亢進の細胞機序を探る目的で、洞房結節組織標本及び単離洞房結節細胞を用いた電気生理学の実験を行った。単離洞房結節細胞の自発性発火頻度は出生直後が約 300 回/分、2 週令が約 450/分と、除神経マウスの心拍数とほぼ同等であった。膜電位固定下でイオン電流を記録したところ、過分極活性化陽イオン電流、L 型及び T 型 Ca 電流など洞房結節細胞に典型的なイオン電流が観察された。このうち T 型 Ca 電流の電流密度は生直後において有意に低く、L 型 Ca 電流の活性化閾値は生直後マウスにおいて脱分極側にシフトしていた。マウス洞房結節細胞の自動能の変化にはこれらイオン電流系のキネティクス変化が関与していると考えられた。

#### O-12. フェニトインは海馬 CA3 錐体細胞へ投射する興奮性神経終末部に作用してグルタミン酸の放出頻度を抑制する

○窪田寿彦, 若森 実 (東北大・歯・歯科薬理)

抗痙攣薬であるフェニトインは、Na<sup>+</sup>チャネルを阻害して細胞の興奮性を調節することが知られている。一方、中枢神経情報伝達機構に対する修飾作用は未だ不明確であ

る。本研究は、ラット脳スライス標本を用いて海馬 CA3 シナプスに対するフェニトインの作用を検討した。1) フェニトインは、興奮性シナプス後電流 (mEPSC) の frequency のみを濃度依存的に抑制した。一方、抑制性シナプス後電流 (mIPSC) には影響しなかった。2) L-glumatic acid で惹起される興奮性シナプス後細胞の電流の大きさは、フェニトイン存在下で影響を受けなかった。3) 細胞外液中の Ca<sup>2+</sup>濃度を 0mM にしても、フェニトインによる mEPSC frequency の抑制は認められた。4) mEPSC frequency の抑制は、protein kinase C (PKC) を抑制しても認められたが、adenylate cyclase (AC) を抑制すると認められなかった。フェニトインは海馬 CA3 シナプスにおけるグルタミン酸の放出頻度を抑制するが、その作用は神経終末部内の PKC 経路よりも cAMP/protein kinase A 経路に対する修飾作用でグルタミン酸放出頻度を抑制することが考えられた。

#### O-13. Tumor necrosis factor-α (TNF-α) による培養ヒト近位尿細管細胞の K<sup>+</sup>チャネル活性上昇

○中村一芳, 駒切 洋, 久保川 学 (岩手医大・医・統合生理学)

我々はこれまで、培養ヒト近位尿細管細胞の K<sup>+</sup>チャネルの活性に対して、Interferon-γ と Interleukin-1β がそれぞれ促進性及び抑制性の作用を持つことを報告してきた。今回、この細胞の K<sup>+</sup>チャネル活性に対する TNF-α の作用について patch-clamp 法を用いて検討した。cell-attached patch において TNF-α (20ng/ml) は K<sup>+</sup>チャネル活性を上昇させ、この作用は可溶性 TNF 受容体アナログの etanercept (10μg/ml) によってブロックされた。TNF-α はラット腎において、ヘンレの太い上行脚の K<sup>+</sup>チャネル活性をチロシンホスファターゼ依存性に促進するとの報告がある。しかし、チロシンホスファターゼ阻害剤の phenylarsine oxide (1μM) を前投与していても、TNF-α は培養ヒト近位尿細管細胞の K<sup>+</sup>チャネル活性を上昇させた。一方、非特異的蛋白キナーゼ阻害剤の K252a (1μM) は TNF-α の作用をブロックした。以上から、TNF-α は培養ヒト近位尿細管細胞の K<sup>+</sup>チャネル活性に対して受容体特異的かつ蛋白リン酸化依存性の促進作用を有することが示唆された。

#### O-15. アストロサイト機能不全マウスにおけるシナプス伝達の変化

○山崎良彦<sup>1</sup>, 田中謙二<sup>2</sup>, 金子健也<sup>1</sup>, 藤原浩樹<sup>1</sup>, 後藤純一<sup>1</sup>, 藤井 聡<sup>1</sup> (<sup>1</sup>山形大・医・生理学, <sup>2</sup>慶應大・医・精神神経科学)

アストロサイト機能不全マウスでは、カイニン酸全身投与による痙攣発作の発現閾値が低下している。我々はこれ

までに、1)このマウスの海馬における興奮性シナプス伝達はコントロールマウスと同等であること、2)アストロサイトによるグルタミン酸取り込み機能が低下していることを本談話会で報告した。今回は、海馬 CA1 領域における抑制性シナプス伝達の変化について検討した。入力-出力関係、自発性抑制性シナプス反応の頻度・振幅の分布には変化がみられなかったが、集合活動電位のベアパルス抑制の減弱と GABA 放出機能の低下がみられた。また、このマウスでは細胞外アデノシン濃度がわずかに増加しており、それが抑制性シナプス伝達の抑制に関与していると考えられた。そこで、コントロールマウスにおいて、アデノシン投与によるシナプス伝達の変化を検討した。アデノシン濃度を 10 nM から 100 $\mu$ M まで変化させて調べたところ、興奮性シナプス伝達は 10 $\mu$ M 以上で抑制されたのに対し、抑制性シナプス伝達は 100nM でも抑制された。以上の結果から、アストロサイト機能異常-アデノシン濃度変化-抑制性シナプス伝達の抑制が、痙攣発作易誘発性の一因となっていることが示唆された。

#### O-16. 線条体間接路を介する刺激弁別学習の実行制御

○西澤佳代<sup>1</sup>、深堀良二<sup>1</sup>、岡田佳奈<sup>2</sup>、筒井雄二<sup>3</sup>、小林和人<sup>1</sup> (<sup>1</sup>福島医大・医・生体機能、<sup>2</sup>廣大・総合・行動科学、<sup>3</sup>福大・共生理工・人間支援)

大脳基底核回路の中心的な構造である背側線条体は、弁別学習の実行に重要な役割を持つことが知られている。弁別学習とは 2 種類以上の刺激弁別が要求されるような課題を学ぶことを指し、私たちの日常行動の多くはこの特徴を有している。背側線条体は、解剖学的に背外側線条体と背内側線条体の 2 領域にわけられ、両者は弁別学習の異なるプロセスに関係することが示唆されている。背側線条体からの出力は 2 種類の主要な経路（線条体黒質路と線条体淡蒼球路）によって媒介される。2 種類の投射ニューロンのうち、線条体黒質路は主にドーパミン D1 受容体を含有し、線条体淡蒼球路は主にドーパミン D2 受容体を含有することが知られている。しかし、これらの経路が学習の獲得や実行の過程を、どのように制御しているかは明らかにされていない。本研究ではイムノトキシン細胞標的を用いることで経路選択的な除去を誘導し、弁別学習の実行過程において線条体間接路は行動選択の正確性の制御に重要な役割を持つことを明らかにした。

#### O-17. 青斑核ノルアドレナリンニューロンの選択的破壊時の音刺激に対する反応

○今野浩平<sup>1</sup>、川村尚貴<sup>1</sup>、高橋和巳<sup>2</sup>、永福智志<sup>3</sup>、小林和人<sup>3</sup>、井樋慶一<sup>4</sup>、小山純正<sup>1</sup> (<sup>1</sup>福島大・共生システム理

工・神経生理、<sup>2</sup>福島県立医大・医・システム神経科学、<sup>3</sup>福島県立医大・医・生体機能、<sup>4</sup>東北大・情報科学学生体システム情報・情報生物)

遺伝子組み換えマウスを用いたイムノトキシン法により青斑核 (locus coeruleus; LC) のノルアドレナリン (NA) ニューロンを選択的に破壊したところ、睡眠・覚醒状態の総時間は変化せず、覚醒の持続時間が短くなり断続的に現れるようになった。つまり、LC-NA ニューロンは覚醒の維持に強く働いていると考えられる。本実験では、刺激によって覚醒が誘発される際にこのニューロン群が果たす役割を探るため、睡眠中に与えた音刺激 (45, 55, 75dB) によって皮質脳波の脱同期化と短潜時で一過性の頸部筋活動が出現する確率を LC-NA ニューロン破壊マウス (Tg) と野生型マウス (WT) の間で比較した。その結果、筋活動の出現確率は Tg においてイムノトキシン注入後 (4~10 日後) に上昇した。しかし、脳波の脱同期化の出現確率は、Tg と WT で差がなかった。これらの結果は LC-NA ニューロンが刺激により誘発される覚醒の開始に重要ではなく、聴覚性反射の経路に対して抑制性的の影響を与えていることを示唆している。

#### O-18. 古典的条件付け課題及び社会的活動中のラット腹側被蓋野ニューロンに対するフェンサイクリジン全身投与の影響

○片山規央<sup>1</sup>、浄土英一<sup>1</sup>、岡本正博<sup>1</sup>、鈴木喜明<sup>1</sup>、星野研洋<sup>2</sup>、永福智志<sup>1</sup> (<sup>1</sup>福島県立医大・神経生理学講座、<sup>2</sup>神経精神医学講座)

NMDA 阻害薬であるフェンサイクリジン (PCP) は統合失調症の陽性症状のみならず、意欲低下や感情鈍麻、社会的引きこもりなどの陰性症状と類似した症状を呈することがヒトと実験動物で報告されている。そのため、PCP を投与した動物は統合失調症の有用な薬理学的モデルと考えられている。一方、腹側被蓋野 (VTA) ドーパミン神経は報酬関連学習や動機づけに重要な役割を有すると考えられている。今回の実験では、PCP 全身投与前後の古典的条件付け課題中の無拘束ラットを被験体として、VTA ニューロン単一活動を記録した。PCP 投与前には、多くの VTA ニューロンは条件刺激 (音) に対して有意な一過性の興奮を示した。それらのニューロンの多くは社会的行動中も持続的な興奮を示した。PCP 投与後の施行では、条件刺激 (音) に対する一過性の興奮はすべて消失もしくは減弱した。社会行動中の VTA ニューロンの持続発火も PCP 投与前よりも抑制された。本研究から、PCP による陰性症状発現に、社会行動や報酬に関連した VTA ニューロンの活動の低下が関係している可能性が示唆された。

## O-19. 睡眠・覚醒調節における青斑核ノルアドレナリンニューロンの役割

○高橋和巳<sup>1</sup>, 今野浩平<sup>2</sup>, 川村尚貴<sup>2</sup>, 井樋慶一<sup>3</sup>, 小林和人<sup>4</sup>, 永福智志<sup>1</sup>, 小山純正<sup>2</sup> (<sup>1</sup>福島県立医大・医・システム神経科学, <sup>2</sup>福島大・共生システム理工・神経生理, <sup>3</sup>東北大・情報科学・生体システム情報学, <sup>4</sup>福島県立医大・医・生体機能)

青斑核 (LC) のノルアドレナリン (NA) ニューロンは覚醒状態の発現・維持に深く関わりとされている。睡眠・覚醒中のマウスでそれらの発火活動を記録したところ、覚醒状態の開始時には他の覚醒系ニューロン群に先行して活動を開始しており、覚醒の開始に重要な役割を果たすと考えられた。更にその役割を探るため、遺伝子組み換えマウスを用いたイムノトキシン法によりこのニューロン群の選択的な破壊を起こし、睡眠・覚醒サイクルへの影響を調べた。明期 (8-20 時), 暗期 (20-8 時) いずれにおいても覚醒、浅い睡眠、徐波睡眠、逆説睡眠の各総時間は LC-NA 破壊マウス (Tg) と非破壊マウス (WT) の間で差がなかった。しかし、Tg の覚醒の出現頻度はイムノトキシン注入後 5 日目から WT より多くなり、覚醒の平均持続時間は注入後 2 日目から WT より短くなった。この破壊実験の結果は、LC-NA ニューロンが覚醒の開始よりもむしろ覚醒の維持に重要であることを示唆しており、ニューロン活動記録の結果と合わせて更なる検討が必要と考えられた。

### P-1. 低温暴露による細胞障害メカニズムの研究

○三海正隆<sup>1</sup>, 荒木美弥<sup>2</sup>, 小林大輔<sup>3</sup>, 挾間章博<sup>3</sup> (<sup>1</sup>福島医大・医・4 学年, <sup>2</sup>福島医大・看・4 学年, <sup>3</sup>福島医大・医・細胞統合生理学)

細胞は物理的要因や化学的要因といった外的要因に曝されることで障害を受ける。我々は外的要因として低温による障害に着目し、低温暴露した HeLa 細胞の生死の評価を行った。HeLa 細胞を 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 環境下で培養した後 4°C 環境下に 1, 3 日間静置し、細胞を Calcein および PI で染色し、フローサイトメトリーを用いて細胞の生死を評価した。低温暴露 3 日間の細胞の生存率は 10% であった。一方、低温暴露 1 日の細胞の生存率は 85% で、37°C 環境下で培養した場合と大きな差が見られなかった。しかしながら、低温暴露後の細胞増殖は抑制されており、低温暴露 1 日後の細胞も障害を受けていると考えられたため、より詳細な解析を行った。

37°C 環境下での細胞は多角形であり、Acridine Orange (AO) 染色によってリソソームが観察できるが、低温に曝露すると細胞は経時的に膨潤していき、AO 染色で観察できたリソソームも減少した。また、Lamp1 の免疫染色でも

健全なリソソームの消失が観察できた。低温暴露した 1 日の細胞外 LDH 活性を測定した結果、低温暴露による差は見られず、細胞膜の完全性は保たれていた。これらのことから低温暴露によって生じる細胞障害は細胞内で起こり、少なくともリソソームの破壊が細胞障害に影響を与えていると考えられる。

### P-2. フローサイトメトリーを用いた細胞容積調節機構の再評価

○大槻瑠志亜<sup>1</sup>, 小林大輔<sup>2</sup>, 挾間章博<sup>2</sup> (<sup>1</sup>福島医大・医・3 学年, <sup>2</sup>福島医大・医・細胞統合生理学)

動物細胞の容積は一定の大きさに調節されており、一過性の異常浸透圧環境下に曝され細胞容積の収縮・膨張が強いられたとしても、その後速やかに元の容積へと戻る。低浸透圧性膨張後の細胞容積調節は Regulatory Volume Decrease (RVD) と呼ばれ、これまで多く研究がなされてきた。特に、低浸透圧暴露後の K<sup>+</sup>チャネルの活性化と細胞膨張による容積感受性 Cl<sup>-</sup>チャネルの活性化による細胞内から細胞外への KCl 流出とそれに牽引される水流出によって RVD が達成されるというメカニズムが RVD の主なメカニズムとして提唱されている。しかし、過去の報告では、細胞の種類により RVD 能は大きく異なり、細胞種による RVD メカニズムの相違が考えられる。我々は上皮由来 HeLa 細胞、副腎髄質由来 PC12 細胞、胎児腎由来 HEK293 細胞の RVD 能をフローサイトメトリーを用いて測定し、RVD 能の相違についての評価を行った。HEK293, PC12 については、細胞膨張後の回復が HeLa に比べ遅延した。RVD 能を検討するため Cl<sup>-</sup>チャネル阻害剤を投与した場合に、阻害剤添加のみでも細胞容積が変化していた。RVD メカニズムを解析する際に初期の細胞容積変化も考慮する必要がある。また、今回、過去様々な RVD 研究の際に用いられてきた HEPES が、RVD の抑制効果を持つことを見出したので重ねて報告する。

### P-3. 一次運動野への遺伝子導入による行動中のマカクザル前肢筋活動の光遺伝学的抑制

○木下正治<sup>1</sup>, 笠原洋紀<sup>2</sup>, 畑中伸彦<sup>3</sup>, 松井亮介<sup>2</sup>, 知見聡美<sup>3</sup>, 伊佐かおる<sup>5</sup>, 水上浩明<sup>4</sup>, 小澤敬也<sup>4</sup>, 南部篤<sup>3</sup>, 渡辺大<sup>2</sup>, 伊佐正<sup>5</sup> (<sup>1</sup>弘前大・統合機能生理, <sup>2</sup>京大院・医・生体情報, <sup>3</sup>生理研・生体システム, <sup>4</sup>自治医科大・遺伝子治療, <sup>5</sup>生理研・認知行動発達)

近年開発されたチャンネルロドプシン 2 やハロロドプシンなどの光遺伝学的ツールはミリ秒単位でニューロン活動を制御することを可能にし、神経回路の操作的な研究に非常に有用である。光遺伝学を用いた研究はマウスなどの小さ

な脳を持つ動物ではすでに多数の成果が報告されている一方で、マカクザルなどの大型の脳を持つ動物での報告はまだ僅かである。我々はこれまでに改変型ハロロドブシン eNpHR をマカクザルの一次運動野(M1)に導入し、光照射により M1 ニューロンのスパイク活動を抑制できることを確認している。今回我々はさらに行動課題中のマカクザルの筋活動を寛容させることに成功した。マカクザル左半球 M1 に AAV2-CMV-eNpHREYFP を、右半球 M1 に AAV1-CAG-ArchT.GFP をそれぞれ注入した。注入から数カ月後に、前肢到達保持課題遂行中に、オプトロードを用いて注入領域に 561 または 589nm の光を照射し、M1 スパイク活動だけでなく前肢筋活動の寛容を確認することが出来た。

#### P-4. 胸腺リンパ球 Kv1.3 チャネル電流に対するクロロキンの効果

○風間逸郎, 丸山芳夫, 村田喜理 (東北大・医・生理)

**【目的】**抗マラリア薬として知られるクロロキンは、T-リンパ球の増殖やサイトカイン産生を抑えることにより、免疫抑制作用をも発揮する。一方、T-リンパ球膜表面に多く発現する電位依存性遅延整流型 K<sup>+</sup>チャネル (Kv1.3) の活性は、細胞増殖やサイトカイン産生に深く関わっている。本研究では、胸腺リンパ球 Kv1.3 チャネルに対するクロロキンの効果を、電気生理学的手法により明らかにする。

**【方法】**マウス胸腺より単離した T-リンパ球に対し、ホールセル・パッチクランプ法を用いて細胞膜電流を測定し、クロロキン投与前後におけるピーク、およびパルス終末電流の変化を調べた。さらに、Kv1.3 チャネルにおける活性化および不活性化曲線を描き、それぞれに対するクロロキンの効果を調べた。

**【結果】**クロロキンにより、Kv1.3 チャネルのパルス終末電流は有意に抑制されたが、ピーク電流はむしろ増強した。また、チャネルの活性化および不活性化曲線はともに、過分極方向にシフトされ、膜電位が低いほどクロロキンの効果は強かった。

**【考察】**クロロキンは、胸腺リンパ球 Kv1.3 チャネル電流に対し、膜電位依存性に二相性の変化をもたらした。また、クロロキンは、Kv1.3 チャネル電流の活性化および不活性化の過程をともに促進すると考えられた。

#### P-5. 局所麻酔実験から探るクモヒトデの歩行制御の神経機構

○松坂義哉<sup>1</sup>, 佐藤英毅<sup>2</sup>, 加納剛史<sup>2</sup>, 坂本一寛<sup>2</sup>, 青沼仁志<sup>3</sup>, 石黒章夫<sup>2,4</sup> (<sup>1</sup>東北大・医・生体システム生理学, <sup>2</sup>東北大・電気通信研究所・実世界コンピューティング, <sup>3</sup>北大・生命・神経情報, <sup>4</sup>JST CREST)

底生棘皮動物の一種、クモヒトデは 5 本の腕を巧みに協調させて歩行する。しかしながら、クモヒトデの体は 5 放射相称で、前後方向を決めるような体軸は無い。更に、その神経系には脊椎動物の脳に相当する神経中枢もなく、単純な分散神経系しか持たない。このような構造を持つ生物が、如何にして進行方向を決定し、それに伴って各腕の役割を決定しているのかを探るため、放射神経・周口神経環の各所を局所麻酔し、それによる歩行運動への影響を検討した。実験の結果、周口神経環・放射神経は、歩行運動の開始、歩行中の各腕の運動の協調、進行方向の決定などにそれぞれ特有の役割を果たしていることが明らかになった。

#### P-6. 体性感覚野応答の睡眠-覚醒状態依存的変化

○辛島彰洋, 稲田浩之, 片山統裕, 中尾光之 (東北大・情報科学・バイオモデリング論)

睡眠にはシナプスの強度のバランスを一定に保つ役割があるというシナプスホメオスタシス仮説が 2006 年に提唱された後、シナプス伝達効率覚醒時には純増し睡眠時には純減することが分かってきた。一方で、伝達強度の時間経過を調べた研究はほとんどなく、睡眠時における伝達効率の純減にはノンレム睡眠とレム睡眠のどちらが関与しているのか?、どのくらいの長さの睡眠が必要なのか?などは不明なままである。本研究では、体性感覚刺激により誘発される感覚応答をシナプス伝達強度の指標として用い、睡眠前後の覚醒期において感覚応答を記録した。記録された感覚応答は、刺激の約 10ms 後に現れる陽性電位 (P1)、15ms 後の陰性電位 (N1)、約 30ms 後の陽性電位 (P2) から構成されていた。そして、i) 睡眠を経ると覚醒期に観測される感覚応答の振幅が小さくなる、ii) 持続時間が 4 分程度のノンレム睡眠前後でも応答振幅に差がある、iii) 睡眠後の振幅の減弱は N1 や P2 では顕著であるが、P1 には変化が見られない、ことを見出した。P1 は視床から大脳皮質への求心性入力を、N1 や P2 は皮質間の情報伝達を反映していると考えられていることから、本結果は、ノンレム睡眠後に大脳皮質内の伝達が減弱していることを示唆している。

#### P-7. アフリカツメガエル卵胞細胞の FSH 受容体応答とアデノシン受容体応答に対するインスリン作用の検討

○藤田玲子<sup>1</sup>, 木村真吾<sup>2</sup>, 原田美里<sup>2</sup>, 松本光比古<sup>3</sup>, 久保川 学<sup>2</sup> (<sup>1</sup>岩手医大・共通教育センター化学科, <sup>2</sup>同統合生理, <sup>3</sup>弘前大学・医学部・保健学科)

アフリカツメガエルの卵胞細胞の FSH や adenosine (Ade) 受容体を刺激すると、Gs に続き、adenylate cyclase

(AC) が活性化して cAMP が産生し、その結果 PKA の活性化により、K<sub>ATP</sub>-channel が開いて K<sup>+</sup>電流応答が発生する。FSH や Ade の K<sup>+</sup>電流応答はインスリンを前投与すると容量依存的に不可逆的に抑制された。これらの受容体応答は Protein tyrosine phosphates を抑制する phenylarsine oxide を前投与するとインスリン投与と同様に抑制された。また、細胞内に直接 cAMP を注入して発生する K<sup>+</sup>電流

応答や AC を活性化する forskolin を投与して発生する K<sup>+</sup>電流応答もインスリンの前投与によって抑制された。

これらの結果から、受容体刺激で発生する K<sup>+</sup>電流応答に対するインスリンの抑制作用は受容体刺激後、cAMP 増大から K<sub>ATP</sub>-channel 開口までの経路であることが示唆された。