

テクニカルレクチャー

1 カスタムメイド膜でのチャネル研究法

○老木成稔 (福井大学医学部分子生理)

チャネル機能は膜から様々な影響を受けているが、チャネル-膜相互作用について十分明らかになっていない。生体膜は多種類の脂質分子だけでなく、膜の物理的特性が均一でないことがその原因である。このような中で、チャネルとリン脂質から膜系を構築する再構成法は有力な実験手法である。リポソームをはじめ再構成膜として様々な手法が生み出されてきたが、チャネルの場合、自由に膜電位を負荷できる脂質平面膜法は、実験の自由度が極めて高いことからチャネル研究に不可欠な方法である。最近になって脂質平面膜法は急速な進歩を遂げた。私達はそれらの方法をさらに発展させ、ガラスピペットから微小な液滴を油相中に吹き出し、接触させる方法を開発した(Contact bubble bilayer [CBB] 法)。従来の方法と比べた利点は、i) 脂質二重膜面積が小さいのでノイズレベルが低い、ii) 溶液を灌流できる、iii) 非対称性膜を簡単に形成できる、など、古典的な脂質平面膜法では困難な実験が可能になったことである。一方、膜に埋め込まれた状態のチャネルの構造を見るには原子間力顕微鏡は有力な方法であるが、この場合にもチャネルを再構成膜として観察する。この時チャネルの向きを揃えて再構成する必要があるがここでも技術的課題を解決する必要がある。CBB 法と原子間力顕微鏡によって得られた結果を中心に、チャネル-膜相互作用の現状を示したい。(利益相反 なし)

2 2 光子イメージングによる小脳回路研究：発達から運動機能まで

○喜多村和郎 (山梨大学大学院総合研究部神経生理学(旧生理学第2))

2 光子カルシウムイメージング法は、生きた動物の脳内における神経活動を 1 細胞レベルで観察することのできる強力な手法であり、近年、カルシウム指示遺伝子 (Genetically encoded calcium indicator: GECI) と組み合わせて用いることで、細胞種特異的な活動や樹状突起・軸索の活動を覚醒行動中の動物でイメージングすることが可能となっている。本講演では、これらの技術の概要とともに、我々が取り組んでいる以下の研究について紹介する。

1) 発達期小脳における同期的活動 (Jean-Marc Good, Mike Mahoney, 喜多村和郎, 狩野方伸)

発達期に起こる活動依存的なシナプスの刈り込みによって成熟した神経回路が形成される。小脳の登上線維-プルキンエ細胞シナプスでは、シナプス刈り込みに重要なシグ

ナル伝達分子が多数同定されているが、発達期の小脳活動がシナプスの刈り込みとどのように関係しているのかは不明であった。2 光子イメージングを用いることで、生直後の登上線維応答が非常に高い同期性を示し、発達期のシナプス刈り込みに伴って脱同期化していく様子が明らかとなった。

2) 目標指向行動における登上線維入力への役割 (堤新一郎, 狩野方伸, 喜多村和郎)

小脳皮質は帯状の機能構造 (ゾーン) を示す。生きたマウスでゾーンを可視化することのできる遺伝子改変マウスを作製し、目標指向性の運動課題 (Go/No-go 課題) を学習中のマウスにおいて、各ゾーンにおける登上線維入力への 2 光子イメージングによる解析を行った。その結果、Go 試行における反応の開始、No-go 試行における反応の抑制、感覚フィードバックに関する情報が異なるゾーンに入力し、学習の進行とともに変化することを明らかにした。(利益相反なし)

3 オルガネラ動態の生理機能に迫る最先端 3 次元微細構造解析法

○大野伸彦 (生理学研究所分子神経生理研究部門)

電子顕微鏡 (電顕) は数 nm-数十 nm 程度の解像度で細胞や組織の微細構造解析を可能にすることで、医学生物学の様々な分野の発展に貢献してきた。そして近年、「走査型電顕による連続断面観察法 (SSSEM)」が開発されたことで、こうした電顕の連続画像を自動的に取得し、多大な時間と労力が必要であった微細な構造の 3 次元的な解析を簡便・迅速に行うことが可能となってきた。細胞膜を明瞭に観察できる SSSEM は、正常な組織や様々な病態、遺伝子改変動物における細胞やミトコンドリア、小胞体などの膜性オルガネラの立体構造を詳細に解析する上で特に強力な手法であり、従来は得ることが容易ではなかった形態情報の取得を可能にし、細胞やオルガネラの生理的変化、あるいは病態生理における役割について、新しい知見が得られつつある。また免疫染色や genetically encoded tags などの分子をラベルする技術と併用することで、組織中の特定の細胞や構造を選択的に解析することも可能になってきた。本発表では SSSEM の中でも Serial block-face scanning electron microscopy (SBF-SEM) を中心にその特徴について概説し、こうした技術を応用した最近の研究を紹介して、その展望について議論したい。(利益相反 なし)

O-1 拘束ストレスによる腎虚血・再灌流障害の軽減作用には延髄 C1 ニューロンが関与する

○安部 力<sup>1,3</sup>, 井上 剛<sup>2</sup>, M.A. Inglis<sup>1</sup>, K.E. Viar<sup>1</sup>, L.

Huang<sup>2</sup>, H. Ye<sup>2</sup>, D.L. Rosin<sup>1</sup>, R.L. Stornetta<sup>1</sup>, M.D. Okusa<sup>2</sup>, P.G. Guyenet<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Department of Pharmacology, University of Virginia, Charlottesville, Virginia, <sup>2</sup>Department of Medicine, Division of Nephrology and Center for Immunity, Inflammation, and Regenerative Medicine, University of Virginia, Charlottesville, Virginia, <sup>3</sup>岐阜大学大学院医学系研究科神経統御学講座生理学分野)

延髄吻側腹外側野にあるカテコラミン陽性細胞の C1 ニューロンは、低血圧、低酸素や低血糖など様々なストレスに応答し、自律神経系の出力調節を行って生体のホメオスタシス維持に寄与している。我々は、腎虚血・再灌流を引き起こす 24 時間前に C1 ニューロンを光刺激 (5Hz, 10 分間) することで、腎虚血・再灌流障害が軽減されることを発見した。この軽減作用は神経節遮断薬によって消えることから、C1 ニューロン光刺激による腎虚血・再灌流障害の軽減作用は自律神経系を介することがわかった。そこで我々は、交感神経系を活性化するような拘束ストレスでも同様に腎虚血・再灌流障害の軽減作用を示し、それには C1 ニューロンが関与しているのではないかと考えた。腎虚血・再灌流 24 時間後の血中クレアチニン濃度は、拘束ストレス (10 分間) によって有意に抑えられた。C1 ニューロンに hM4Di を発現させ、clozapine-N-oxide 投与にて拘束ストレス中の C1 活動を抑制すると、腎虚血・再灌流障害の軽減作用は有意に抑えられたが、完全にブロックすることはできなかった。一方、カスパーゼ 3 活性化型のウイルスを用いて C1 ニューロンを特異的に除去 (95% 以上) すると、拘束ストレスによる腎虚血・再灌流障害の軽減作用は完全に消失した。これらの結果から、腎虚血・再灌流 24 時間前の拘束ストレスは延髄 C1 ニューロンを介して免疫細胞のプライムな状態を形成し、腎虚血・再灌流障害の重症化を抑えることが示唆された。(利益相反 なし)

#### O-2 Plasminogen Activator Inhibitor-1 欠損患者 iPSC 細胞由来内皮細胞の機能解析

○佐野秀人<sup>1</sup>, 大津 真<sup>2</sup>, 鈴木優子<sup>1</sup>, 田中宏樹<sup>1</sup>, 岩城孝行<sup>3</sup>, B. Tomasz<sup>1</sup>, 長橋ことみ<sup>4</sup>, 金山尚裕<sup>4</sup>, 浦野哲盟<sup>1</sup> (<sup>1</sup>浜松医科大学医生理学, <sup>2</sup>東京大学医科学研究所, <sup>3</sup>浜松医科大学薬理学, <sup>4</sup>浜松医科大学産婦人科学)

Plasminogen Activator inhibitor-1 (PAI-1) は、線維素溶解系の重要な調節因子である。近年では血栓症との関連以外に、血管新生、腫瘍増殖・転移、炎症反応等様々な疾患との関連性が指摘されているが、個々の細胞における固有の機能に関しては一定の見解が得られていない。我々は、PAI-1 KO マウスでは見られない致死的な出血症状と、創傷治癒の遅延という症状を呈す 2 例の PAI-1 欠損症例を

見出した。

本研究では、ヒト PAI-1 の生理的な役割を解析するため、PAI-1 欠損症例及びコントロール (PAI-1 産生) より iPSC 細胞を樹立し、血管内皮細胞 (iPS-ECs) へ分化させ機能解析を行った。PAI-1 欠損 iPSC-ECs は、in vitro での管腔構造形成時の分枝数抑制が観察され、Notch リガンドの一つである Dll4 遺伝子発現が亢進していることから、血管新生先端部 tip 細胞様の機能が優位に発現している可能性が示された。血管新生初期段階である血管発芽現象を観察したところ、PAI-1 欠損 iPSC-ECs では未熟な血管発芽が確認された。これは血管新生の未熟さを示唆しており、創傷治癒の遅延等につながっている可能性がある。現在、さらなる内皮細胞機能の解析を進めているところである。(利益相反なし)

#### O-3 加齢に伴う AT1R-P2Y6R 複合体形成によるアンジオテンシン II 誘発性高血圧の制御

○西村明幸<sup>1</sup>, C. Sunggip<sup>1</sup>, 富田拓郎<sup>1</sup>, 西田基宏<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>岡崎統合バイオサイエンスセンター (生理学研究所) 心循環シグナル研究部門, <sup>2</sup>九州大学大学院薬学研究院創薬育薬研究施設統括室)

昇圧ペプチドであるアンジオテンシン II (Ang II) は、血管恒常性の維持に重要な役割を担うが、高血圧を誘導するという負の一面も有している。Ang II は G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) である AT1R を介して、血管中膜を構成する血管平滑筋細胞の肥大を誘導することで慢性的な血圧上昇を引き起こす。一方、胎児由来の血管平滑筋細胞では Ang II による肥大応答は起こらず、Ang II の細胞応答性を決定する分子機構は不明である。我々は、プリン作動性 GPCR の 1 種である P2Y6R が Ang II 応答性を決定する因子であることを見出した。野生型マウスと P2Y6R 欠損マウスに Ang II を 4 週間投与したところ、欠損マウスで血圧上昇及び血管中膜の肥厚が抑制された。P2Y6R は細胞膜上で AT1R と複合体を形成し、P2Y6R 阻害剤 MRS2578 により AT1R-P2Y6R 複合体形成と Ang II による血圧上昇が抑制された。マウス血管平滑筋細胞において、P2Y6R は発生に伴い発現上昇すること、そして加齢に伴い AT1R-P2Y6R 複合体が増加することで Ang II 刺激に対する細胞応答が  $\beta$  アレスチン依存的な増殖から G 蛋白質依存的な肥大に変化することが明らかとなった。以上の結果は、加齢に伴う AT1R-P2Y6R 複合体の増加が Ang II の細胞応答性を決定し、高血圧の誘導に関与することを示唆している。(利益相反なし)

#### O-4 心臓仕事量増大時におけるエネルギー代謝産物安

**定性制御メカニズムに関する数理解析**

○竹内綾子<sup>1</sup>, 齋藤隆太<sup>2</sup>, 姫野友紀子<sup>3</sup>, 松岡 達<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>福井大学学術研究院医学系部門統合生理学, <sup>2</sup>田辺三菱製薬株式会社先端医薬研究所, <sup>3</sup>立命館大学生命科学部生命情報学科)

心臓は収縮と弛緩を繰り返し、大量の ATP エネルギーを消費する。心臓に含まれる ATP 量はわずかで、数回の拍動で消費される。これを補うために ATP は常に合成されて消費と供給のバランスが保たれる。また、エネルギー代謝産物 (ATP, ADP, NADH) は、心臓仕事量増大時にもほぼ一定に保持される。この一つの機序として  $Ca^{2+}$  による脱水素酵素や基質輸送体の制御が示唆されるが、未だコンセンサスは得られていない。本研究では、心臓仕事量増大時におけるエネルギー代謝産物安定性のメカニズムについて、数理モデル解析を行った。

実験データに基づき構成要素を数式化し、組み合わせて構築した詳細なミトコンドリアエネルギー代謝モデルは、単離ミトコンドリアを用いた種々の実験データ ( $Ca^{2+}$ ・無機リン酸依存性など) を再現できた。本モデルを簡易心筋細胞モデルと統合し、心臓仕事量とエネルギー代謝産物との関係を調べたところ、単離ミトコンドリア実験で汎用される基質条件 (malate/glutamate) では、 $Ca^{2+}$  による制御が代謝産物の安定化に重要であった。一方、生理的な基質組成 (malate/glutamate/pyruvate/citrate/2-oxoglutarate/aspartate) では、 $Ca^{2+}$  による代謝産物の安定化が消失した。生理的条件下では、 $Ca^{2+}$  による代謝制御の寄与は限定的であることが示唆された。(利益相反 なし)

**O-5 神経膠芽腫細胞遊走におけるミトコンドリア動態のシングルファイバーを用いた解析**

○河合佑介<sup>1</sup>, 竹内綾子<sup>2</sup>, 藤田 聡<sup>3</sup>, 松岡 達<sup>2</sup> (<sup>1</sup>福井大学大学院工学研究科繊維先端工学専攻, <sup>2</sup>福井大学学術研究院医学系部門統合生理学, <sup>3</sup>福井大学学術研究院工学系部門繊維先端工学)

癌は日本人の死因の 1 位である。癌は、転移と浸潤を繰り返して身体中に広がっていくため、癌細胞の遊走性を理解することは癌の理解には欠かせない。癌細胞遊走にはエネルギー (ATP) が不可欠であるが、ATP 産生のあるミトコンドリアが癌細胞遊走能にどの程度関与するか、明らかになっていない。本研究においては、癌細胞遊走の方向性や移動速度とミトコンドリア局在やミトコンドリア膜電位の関連を 1 細胞レベルで明らかにすることで、癌細胞の遊走能とミトコンドリアの細胞内局在と機能との関係を明らかにすることを目的とする。

神経膠芽腫細胞 (U251, U87) をミトコンドリア膜電位

感受性色素 (TMRE) で染色し、二次元平面上の細胞遊走を 30 秒間隔で 1.5 時間のタイムラプス観察したところ、ミトコンドリアが核周囲から仮足の方へ流動的に移動していく様子が観察された。細胞の前後方向を明確にする目的で、遊走方向を一次元方向に限定することが可能であるシングルファイバー (直径約 30 $\mu$ m) をエレクトロスピンング法により作成し、同様の実験を行ったところ、細胞進行方向に向かってミトコンドリアが局在することが明らかになった。このことから神経膠芽腫細胞の遊走においては、細胞進行方向にミトコンドリアが局在することが明らかになった。(利益相反 なし)

**O-6 発達期白質障害モデルラットにおける協調運動障害と皮質内微小電気刺激応答性の発達に伴う変化**

○上田佳朋, 小川紫野, 三角吉代, 石田章真, 近藤裕子, 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)

早産児の低酸素虚血は、オリゴデンドロサイト (OLG) 前駆細胞に特異的な虚血脆弱性とその後の発達が複雑に関与し、白質障害による脳性麻痺をもたらす。我々は生後 3 日齢 (P3) ラットを用い発達期白質障害 (DWMI) モデルを作製することに成功し、その障害メカニズムと運動機能再建に向けた研究を進めている。これまでに、感覚運動野の神経は障害されないこと、成熟 OLG が減少しミエリン化が障害されること等を報告した。

本研究は、DWMI モデル動物の成熟後の運動機能および皮質内微小電気刺激 (ICMS) により感覚運動野の電気応答性を検討した。

Motor deficit score による運動評価では、棒上歩行と下肢戻しに障害が認められ、下肢を中心とする運動障害が明らかになった。また Rotarod 試験で協調運動障害が確認され、DegiGate 歩行解析において歩行肢位の左右差が認められた。

ICMS により発達に伴う感覚運動野のマップ変化を解析すると、P35 では対照群と比べ皮質マップの差は認められなかったが、P65 に股関節領域の縮小に伴い背部領域が拡大していることが明らかになった。しかし、各部の刺激応答閾値に有意な差は認められなかった。

これらの結果から、P3 に対する低酸素虚血による脳ダメージが、成熟後の協調運動に影響を与えること、また P35 以後の感覚運動野の皮質マップの形成に影響を与えること、が示された。(利益相反 なし)

**O-7 発育期のグルタミン酸ナトリウム摂取による攻撃性の減少；神経細胞毒性の関与の有無について**

○西垣瑠里子, 横山善弘, 丸本良介, 永井 遥, 鄭 且均, 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モデルラットの発育期に, うま味物質であるグルタミン酸ナトリウム (MSG) を経口投与すると, 新奇動物に対する攻撃性が減少する. 上腹部迷走神経を介した延髄孤束核への入力刺激が関与しているが, その詳細な脳内メカニズムは明らかになっていない.

本研究は, MSG 経口摂取による攻撃性減少において MSG 神経毒性が関与するか否かについて, 血中の遊離グルタミン酸濃度の測定, 神経傷害を超早期から検出する Argyrophil III 染色法, および脳血液関門 (BBB) *in vitro* モデル系を用い検討した.

その結果, 血中遊離グルタミン酸濃度は, 生後 25 日齢から 5 週間の発育期に MSG 溶液 (60mM) を摂取した群と水を摂取した群との間に有意な差は認められなかった. しかし, 絶食後の MSG 投与によってその濃度は 30 分後に 2 倍以上に上昇することが分かった. Argyrophil III 染色では, MSG 摂取により攻撃性に関係する脳部位 (扁桃核, 視床下部腹内側核など) で神経傷害は認められなかった. *In vitro* 系では MSG (300 $\mu$ M) の投与により LDH が増加しニューロン障害を与えるのに対し, BBB モデル系では LDH 上昇は認められなかった. すなわち, BBB を介して神経障害はないことが明らかになった.

以上の結果から, MSG の経口摂取後の血中遊離グルタミン酸が脳の神経細胞に毒性を示さないことが証明された. (利益相反 なし)

#### O-8 高脂肪食負荷マウスの薬物代謝酵素/トランスポーター発現変動における PXR-シャペロン蛋白質経路の作用解析

○宮武将之<sup>1</sup>, 山口賢彦<sup>1</sup>, 山崎泰広<sup>1</sup>, 五十里 彰<sup>2</sup>, 菅谷純子<sup>1</sup> (<sup>1</sup>静岡県立大学薬学部生体情報分子解析学, <sup>2</sup>岐阜薬科大学薬学部生化学)

【目的】核内受容体 Pregnane X Receptor (PXR) は薬物代謝酵素やトランスポーターの発現を調節し, 生体異物の代謝・解毒・排泄に重要な役割を果たしている. これまでに我々は, PXR タンパク質の安定性や細胞内局在が薬物代謝酵素の転写活性に重要であることを示してきた. 高脂肪食投与マウスの肝臓および腸管においても薬物代謝酵素の発現が低下し, PXR タンパク質の不安定化を示唆する結果が得られたため, シャペロンタンパク質を中心にその制御機構の解析を行った.

【方法および結果】YFP-hPXR 融合タンパク質を発現させた HepG2 細胞 (ヒト肝癌細胞) にパルミチン酸/オレイ

ン酸を添加したところ, PXR の標的因子である薬物代謝酵素 CYP3A4 の mRNA ならびにタンパク質発現量が低下した. パルミチン酸/オレイン酸を添加した HepG2 細胞では, 細胞質画分における PXR-HSP70 複合体の形成不全, そして核画分における PXR タンパク質の発現低下が認められた. また, YFP-hPXR 融合タンパク質をマウス肝臓に発現させて通常食もしくは高脂肪食を投与したところ, 高脂肪食を投与したマウスの肝臓では HSP70 をはじめとするシャペロン蛋白質と PXR との複合体形成不全が認められた.

【考察】高脂肪食に含まれる飽和/不飽和脂肪酸は PXR とシャペロン蛋白質を不安定化し, 核への移行を低下させる可能性が示された. (利益相反 なし)

#### O-9 脂肪組織由来間葉系幹細胞を維持する Nuclear receptor 4a family の機能解析

○須山大輔<sup>1</sup>, 山口賢彦<sup>1</sup>, 石村裕樹<sup>1</sup>, 鈴木結衣<sup>1</sup>, 内山瑛美<sup>1</sup>, 嘉山節子<sup>1</sup>, 山崎泰広<sup>1</sup>, 五十里 彰<sup>2</sup>, 菅谷純子<sup>1</sup> (<sup>1</sup>静岡県立大学薬学部生体情報分子解析学, <sup>2</sup>岐阜薬科大学薬学部生化学)

組織幹細胞は一般的に G0 期かつ未分化な状態で維持されており, その制御機構は組織の恒常性を維持するために極めて重要である. 脂肪組織には増殖して脂肪細胞へと分化する間葉系幹細胞 (ADSC) が存在している. 本研究では ADSC を G0 期かつ未分化な状態で単離して網羅的遺伝子発現解析を行い, 幹細胞性を維持する遺伝子の解明を目的とした.

マウス脂肪組織から ADSC を分取して網羅的遺伝子発現解析を行い, ADSC にて高発現する核内受容体 Nuclear receptor 4a1/2/3 (Nr4a1/2/3) を同定した. 脂肪前駆細胞株 (3T3-L1) に Nr4a1/2/3 を強制発現させた結果, 脂肪分化を促進するマスター制御因子である C/EBPalpha と PPARgamma の発現低下, さらに脂肪滴の形成抑制が認められた. Nr4a は cAMP/PKA 経路を介して発現誘導されることが神経組織等で報告されている. そこで ADSC を播種して cAMP アナログを添加すると, 濃度依存的に Nr4a1/2/3 の発現は増加した. この時, C/EBPalpha と PPARgamma の発現は低下した. 以上の結果から Nr4a1/2/3 は cAMP によって発現が誘導され, 脂肪分化を抑制することが示唆された.

今後 *in vivo* における Nr4a1/2/3 の機能解明を進めることで, Nr4a1/2/3 を介した幹細胞性の維持機構の解明が期待される. (利益相反 なし)

#### O-10 中枢神経系による排便制御における下行性モノ

## アミン神経経路の関与

○内藤清惟, 中森裕之, 佐野有希, 島岡弘樹, 椎名貴彦, 志水泰武 (岐阜大学大学院連合獣医学研究科獣医生理学研究室)

中枢神経系による排便制御は, 脳の上脊髄排便中枢と腰仙髄部の脊髄排便中枢によって行なわれているが, これら二つの排便中枢がどのような神経回路を形成しているかは明らかになっていない. これまでに我々は, モノアミン神経伝達物質のドーパミンまたはノルアドレナリンを脊髄排便中枢に投与すると, 結直腸の運動が亢進することを明らかにした. 脊髄において, ドーパミンおよびノルアドレナリンは主に, 脳から投射する神経に由来する. そこで本研究では, 下行性のドーパミンおよびノルアドレナリン経路が, 排便中枢間の連絡に関与するかを検討した.  $\alpha$ クロラロースおよびケタミンで麻酔したラットの結直腸にカニューレをつなぎ, 内腔を生理食塩水で満たした. この結直腸の内腔圧の変化とそれに伴って肛門から排出される液量を測定し, 大腸の運動を評価した. 結直腸の内腔に感覚神経刺激剤のカプサイシンを投与したところ, 大腸運動が亢進した. この反応は, 大腸と脊髄排便中枢をつなぐ骨盤神経の切断, または脊髄排便中枢と上脊髄排便中枢をつなぐ胸髄の切断によって消失した. さらに, ドーパミンまたはノルアドレナリンの受容体拮抗薬を脊髄排便中枢へ前投与したところ, D2 様ドーパミン受容体の拮抗薬によってカプサイシンの作用が阻害された. 以上の結果から, 中枢神経系による排便制御において, 下行性ドーパミン経路が上脊髄排便中枢から脊髄排便中枢への連絡に関与していることが明らかになった. (利益相反 なし)

## O-11 化学遺伝学的手法によるマカクザル視床下核の神経活動制御

○長谷川 拓<sup>1</sup>, 知見聡美<sup>1</sup>, 小林憲太<sup>2</sup>, 南部 篤<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>生理学研究所生体システム研究部門, <sup>2</sup>生理学研究所ウイルスベクター開発室)

薬剤による特定の神経活動制御を行う系として, DREADD が 2007 年に Bryan Roth らによって報告された. Roth らはムスカリン受容体へ点変異を導入することで, アセチルコリンへの結合親和性を失わせ, クロザピン-N-オキシド (CNO) によって活性化されるよう改変した. この改変型受容体を目的の神経細胞に発現させ, CNO を全身投与することで, 神経細胞を興奮または抑制させることが可能になる.

DREADD は *in vivo* での可逆的な神経活動制御技術として広く活用されるようになったが, 現在の所, 齧歯類での報告がほとんどである. しかし, 広範囲な脳領域の可逆的

な操作が可能であり, 大型動物への適用も有効であると思われる. さらに, 非侵襲的な神経活動制御は神経疾患の遺伝子治療への応用が期待でき, 霊長類における DREADD の適用を検証した.

ニホンザルの視床下核へアデノ随伴ウイルス (AAV) を用いて, 改変型ムスカリン M4 受容体を発現させた. CNO の静脈投与後 5-10 分で, 視床下核の自発活動が減少し, 大脳皮質運動野の電気刺激による興奮性応答も減弱することが観測された. さらに, 改変型受容体を発現させたシナプス前終末へ CNO を局所注入することで神経伝達物質の放出が抑制されることが報告されている. ニホンザルの視床下核—淡蒼球内節投射において, この経路特異的な神経伝達の抑制を電気生理学的に計測した. (利益相反 なし)

## O-12 Mechanism Underlying L-Dopa Induced Dyskinesia in Parkinson's Disease Model Mice

○D.W. Indriani<sup>1</sup>, H. Sano<sup>1,2</sup>, S. Chiken<sup>1,2</sup>, A. Nambu<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>Division of System Neurophysiology, National Institute for Physiological Sciences, Okazaki-Japan, <sup>2</sup>Department of Physiological Sciences, Graduate University for Advanced Studies, Okazaki-Japan)

Parkinson's disease (PD) is motor disorders caused by the death of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta, part of basal ganglia (BG) nuclei that play role in controlling movement. Dopamine (DA) replacement therapy with L-dopa remains as gold standard treatment for PD. However, as the disease progresses prolong use of L-dopa narrows its therapeutic effect. Thus, most patients develop motor fluctuations and increase involuntary movements, known as L-dopa induced dyskinesia (LID). To elucidate the mechanisms of LID, we examined spontaneous neuronal activities and motor cortex-induced response patterns change in the globus pallidus (GP) and substantia nigra pars reticulata (SNr) of BG under awake state from LID mice. Hemiparkinsonian mice were injected intraperitoneally with L-dopa for 11 days, resulting in development of LID. Spontaneous neuronal activities of GP and SNr neurons showed a little difference between control, PD, dyskinesia-off (at least 24 hours after last L-dopa injection) and dyskinesia-on (20-120 min after L-dopa injection, when mice develop dyskinesia). During PD and dyskinesia-off, lack of DA induced increase cortically evoked inhibition and late excitation response of GP. But during dyskinesia-on, response pattern of GP similar to control. In SNr, DA depletion abolished cortically evoked

inhibition and increased late excitation response. The same responses, but with increased number of responses with inhibition can be seen during dyskinesia-off, indicating latent changes after prolong L-dopa treatment. During dyskinesia-on, cortically evoked movement-related inhibition was prolonged, and late excitation to stop movements was reduced in the SNr. Thus, LID can be explained by increased facilitation signal and decreased stop signal for movements from the basal ganglia. (COI: none)

**O-13 Excitatory roles of WNK3 in layer V pyramidal neurons in the prefrontal cortex**

○A.S. Sinha<sup>1</sup>, Y. Hosoi<sup>1</sup>, E. Sohara<sup>2</sup>, H. Mutoh<sup>1</sup>, T. Akita<sup>1</sup>, S. Uchida<sup>2</sup>, A. Fukuda<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Hamamatsu University School of Medicine, Department of Neurophysiology Hamamatsu, Japan, <sup>2</sup>Tokyo Medical and Dental University, Department of Nephrology, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo, Japan)

The with-no-lysine (WNK) kinases, a family of serine/threonine kinases, have been shown to play a key modulatory role in maintenance of chloride homeostasis by its action on the cation coupled chloride cotransporters. The regulation of the chloride ion concentration in neurons is central in determining the neuronal response to GABA as either excitatory or inhibitory. The WNK3 kinase which is expressed in cortical pyramidal neurons has been reported to enhance Cl<sup>-</sup> influx mediated by the Na-K-Cl cotransporter NKCC1 and reduce Cl<sup>-</sup> efflux by its action on the K-Cl cotransporter KCC2 during development periods and in response to brain injury. Furthermore, WNK3 may regulate expression of proteins involved in synaptic transmission and membrane excitability regulation. Recent studies have also reported an overexpression of WNK3 transcripts in the prefrontal cortex in subjects with Schizophrenia. In this study, we used a WNK3 knockout mouse and examined membrane properties and miniature postsynaptic currents in layer V prefrontal pyramidal neurons of the knockout mice at postnatal day 21-27, using brain slice preparations. Our results indicated that loss of WNK3 activity significantly reduced neuronal excitability, as evidenced by hyperpolarized resting membrane potential, decreases in input resistance and membrane time constant, and a resulting increase in the threshold current for action potential (AP) generation. Both the rise and fall of an AP were significantly slowed, resulting in a spike width

broader than that in wild type littermates. Also the interspike voltages during repetitive AP firing were observed to be more depolarized in the knockout mice. Analysis of miniature postsynaptic currents indicated an increase in frequency of inhibitory miniature events and in contrast a decrease in frequency of excitatory miniature events in WNK3 KO mice. Thus these results suggest that the basal WNK3 activity would maintain excitability of layer V pyramidal neurons in the prefrontal cortex. (COI: none)

**O-14 タウリン欠乏は生後の大脳皮質感覚野錐体細胞への抑制性シナプス入力を減少させる**

○細井泰志<sup>1,2</sup>, 秋田天平<sup>1</sup>, 武藤弘樹<sup>1</sup>, 渡部美穂<sup>1</sup>, 伊藤崇志<sup>3</sup>, 福田敦夫<sup>1</sup> (<sup>1</sup>浜松医科大学神経生理学, <sup>2</sup>浜松医科大学第一内科, <sup>3</sup>兵庫医療大学薬学部医療薬学科)

タウリンは中枢神経系に豊富に存在する含硫アミノ酸である。細胞外では GABA<sub>A</sub> 受容体 (GABA<sub>A</sub>R), グリシン受容体 (GlyR) の部分的アゴニストとして機能し, 細胞内にはタウリントランスポーター (TauT) により取り込まれ, with-no-lysine protein kinase 1 (WNK1) シグナル経路を活性化することが知られている。本研究では, 生後 21±2 日の TauT ノックアウトマウス (TauT<sup>-/-</sup>, TauT<sup>+/-</sup>) および野生型マウスを用いて, 大脳皮質体性感覚野 II/III 層の錐体細胞について, パッチクランプ法を用いた電気生理学的特性の解析, 蛍光免疫染色による解析を行った。微小抑制性シナプス後電流 (mIPSC) の解析では, TauT<sup>+/-</sup>マウスおよび TauT<sup>-/-</sup>マウスは野生型マウスと比較して, mIPSC の振幅, 頻度がともに低下していた。一方で, GABA<sub>A</sub>R, GlyR を介したトニック電流は genotype 間で差がみられなかった。GABA の濃度応答曲線による解析では, GABA<sub>A</sub>R の感受性は genotype 間で差はみられず, TauT<sup>+/-</sup>マウスおよび TauT<sup>-/-</sup>マウスでは野生型マウスと比較して GABA<sub>A</sub>R 電流の振幅低下がみられた。蛍光免疫染色では, genotype 間で抑制性シナプスの数に差はみられなかった。一方, 野生型マウスと比較して TauT<sup>+/-</sup>マウスおよび TauT<sup>-/-</sup>マウスではシナプス部位の GABA<sub>A</sub>R の蛍光強度が低下していた。以上より, TauT ノックアウトマウスではポストシナプスにおける GABA<sub>A</sub>R 数の減少が示された。タウリン欠乏は大脳皮質感覚野錐体細胞の抑制性シナプス入力を減少させる可能性がある。(利益相反なし)

**O-15 大脳皮質領野間結合の経験依存的な発達**

○石川理子, 吉村由美子 (生理学研究所視覚情報処理研究部門)

大脳皮質一次視覚野 (V1) で処理された視覚情報は、さらに高次な処理のために二次視覚野 (V2) へ伝えられる。この情報処理過程を知るために、領野間の神経結合パターンとその形成の視覚体験依存性を知ることは重要である。本研究では、生後発達期における視覚経験が、V1-V2 領野間の神経結合パターンに及ぼす影響を明らかにする目的で、正常な視覚環境で飼育したラット、両眼瞼縫合により視覚入力を遮断して飼育したラットを用い、V1-V2 間の領野間結合を解析した。V1 神経細胞の軸索投射を可視化するために、順行性ウイルストランスポゾン AAV-GFP を V1 に注入し、V2 における V1 軸索の投射パターンの解析を行った。正常ラット群では、V1 神経細胞から V2 の 4 層への強い投射が観察された。しかし、このようなフィードフォワード型の層特異的な投射パターンは、両眼瞼縫合ラットでは観察されなかった。この結果は、V1 から V2 へのフィードフォワード結合パターンが経験依存的に調整されることを示唆する。次に、麻酔下のラット V2 神経細胞から多点シリコンプローブ電極により視覚反応を記録したところ、両眼瞼縫合した V2 の神経細胞の視覚反応強度は、正常ラット群と比較して著しく低下していた。この視覚反応の低下は、発達期の視覚入力遮断により V1 から V2 への神経結合の発達が阻害されたことを反映していると考えられ、視覚情報を処理する V1-V2 間の神経結合が生後の視覚経験に依存し発達することを示す。(利益相反 なし)

#### O-16 大脳皮質 V4 野神経細胞の色の組み合わせに対する反応特性

○眞田尚久<sup>1,2</sup>, 小松英彦<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>生理学研究所感覚認知情報研究部門, <sup>2</sup>総合研究大学院大学)

私たちは、日常生活で見ている物体がどんな色であるか瞬時に識別しているようだが、色の見え方は照明環境や周辺の視覚情報によって大きく変わる。色の知覚は、物体とその周辺を含めた色情報が視野空間上で統合された結果だと捉えることができる。

これまでの色情報処理の生理学研究では、単色の色刺激に対する神経活動を調べる研究が主にされてきた。この方法では、神経細胞の色に対する基本的特性を調べることはできるが、色情報の統合の神経基盤を理解したとは言えない。そこで本研究では、2 色の組み合わせに対する V4 野神経細胞の応答特性を調べることで、色情報の空間的統合の生理学的基盤を明らかにすることを目的とする。

サル V4 野の単一神経細胞から細胞外電位記録を行い、受容野内外に 2 色を同心円状に組み合わせた色刺激を呈示し応答特性を計測した。これらの 2 色には同じ彩度の色相を均等にサンプルした 8 色を用い、64 の色の組み合わせを

提示した。

その結果、記録された V4 野神経細胞の約半数が中心と周辺の色が同一である場合よりも、ある特定の色の組み合わせに対してより強い応答を示すことが分かった。また、その 2 色を呈示する位置を中心と周辺とで入れ替えると反応が著しく減弱することから、色の組み合わせに対する応答には空間的な特性があることが示唆される。これらのことから、V4 野において色情報が空間的に統合されていると考えられる。(利益相反 なし)

#### O-17 マカクザルによる半側空間無視の動物モデル

○辻本憲吾<sup>1,2</sup>, 澤田真寛<sup>1</sup>, 福永雅喜<sup>3</sup>, 吉田正俊<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>自然科学研究機構生理学研究所認知行動発達機構研究部門, <sup>2</sup>総合研究大学院大学生命科学研究科生理科学専攻, <sup>3</sup>自然科学研究機構生理学研究所心理生理学研究部門)

半側空間無視 (以下, USN) とは主に右大脳半球の損傷によって引き起こされ、損傷と反対側の空間の感覚刺激に対する反応が低下する現象の事を指す。本研究はマカクザルによる USN の動物モデルの確立を目指す。これまでの解剖学的研究から USN の原因部位である側頭-頭頂接合部はサルの上側頭回と相同部位であることが示唆されている。この知見に基づいて、2 頭のマカクザルの右上側頭回を吸引にて除去し、USN が発現するか行動課題を用いて検証した。行動課題のひとつとして、ヒトの USN 患者の評価で用いる線分抹消課題を参考にして標的選択課題を考案した。また、USN 患者では視線が右に偏移するという報告に基づいて、Free-viewing 検査を行った。標的選択課題では、タッチパネル付き画面に 1 つの標的刺激と 9 つの妨害刺激が提示される。サルは 2 秒以内に標的刺激にタッチすると報酬がもらえる。実験結果の解析より、損傷後 8 週間以上にわたって損傷と対側の標的刺激に対する反応時間が有意に長いことが明らかになった。Free-viewing 課題では、損傷後 4 週間以上にわたって損傷と同側の画面上への視線の滞在時間が増加していた。また、損傷後に感覚障害と運動障害は認められなかった。以上の結果から、マカクザルの右上側頭回を損傷することでヒトの USN 患者と同じように損傷と反対側の空間に対して無視する症状が認められることが明らかになった。(利益相反 なし)

#### O-18 Retrosplenial cortical neuronal responses during spatial navigation in rats

○C. Chinzorig, 西丸広史, 高村雄策, 松本惇平, 小野武年, 西条寿夫 (富山大学医学薬学研究部 (医学) システム情動科学)

Human neuropsychological studies suggest that the ret-

rosplenial cortex (RSC) is important in spatial navigation. The RSC receives spatial information from hippocampal place cells, head direction cells in the thalamus, and grid cells in the entorhinal cortex. In the present study, activity of RSC neurons was recorded while rats were placed on a treadmill affixed to a motion stage that was translocated along a figure 8-shaped track. Of the 256 RSC neurons recorded, 49 showed differential responses to the directions to window (south) and door (north) sides of a recording room, along which the animals were translocated in the long axis of the trajectory (direction-related neurons), while activity of 21 RSC neurons increased non-differentially to the directions (translocation neurons). Activity of some direction-related neurons was decreased when translocation without locomotion was imposed. The translocation neurons were further tested with a running protocol on the treadmill under four-step speeds (1, 6, 12, 16cm/s) at the fixed location, and showed positive or negative linear relationships between neuronal firing rates and running speeds. Histological data indicated that the direction-related and translocation neurons were intermingled in the RSC, and were more concentrated in a granular part of the RSC.

Theoretical studies suggest that path integration, which sums up the vectors of distance and direction travelled from a start point to estimate current position, requires instantaneous information of head direction and locomotion speed. The present results indicate that the rodent RSC processes two important information for path integration; head direction and locomotion speed. (COI: none)

#### O-19 hERG チャネルの遅い脱活性化を制御する C 末端細胞内ドメイン間の相互作用様式とそのストイキオメトリの解析

○糸 慎一郎<sup>1,2</sup>, 久保義弘<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>生理学研究所神経機能素子研究部門, <sup>2</sup>総合研究大学院大学生理学専攻)

電位作動性 K<sup>+</sup>チャネルファミリーの hERG チャネルは、脱活性化が極めて遅く、これには細胞内ドメインの関与が知られている。このうち、C 末端側細胞内領域に存在する C リンカードメイン (CLD) と、それに続く環状ヌクレオチド結合相同ドメイン (CNBHD) も、遅い脱活性化の制御に重要であることが示唆されてきた。我々はこれまでに、CLD の Asp727 と CNBHD の Arg752 が、静電的に相互作用しており、この相互作用が遅い脱活性化の制御に重要であることを明らかにした。また、CLD の Arg696 と

CNBHD の Asp767 間の相互作用も示した。

本研究では、これらの相互作用が起きているのがサブユニット間かサブユニット内かを確認することを目的として、いずれかの場合のみ静電相互作用できる組み合わせとなるように変異を導入した二種類のタンデムコンストラクトを作製し、ツメガエル卵母細胞を用いた電気生理学的解析を行った。その結果、どちらの相互作用においても、サブユニット内相互作用のみが想定されたタンデムコンストラクトでのみ、遅い脱活性化が観察された。また、同様にタンデムコンストラクトを用いて、静電相互作用のペアの数を変化させた際の脱活性化への影響を解析した。その結果、静電相互作用が少なくなるにつれて脱活性化が加速したことから、相互作用の個数に依存した制御機構が示唆された。(利益相反 なし)

#### O-20 生理的味覚性発汗 (口腔内痛覚性発汗) は熱刺激受容体 TRPV1 への刺激により誘発される: 温熱性発汗としてのフィードフォワード制御の可能性

○犬飼洋子, 岩瀬 敏, 佐藤元彦, 菅屋潤堂 (愛知医科大学医学部生理学講座)

生理的味覚性発汗 (口腔内痛覚性発汗) は、capsaicin などの辛味成分による口腔内侵害受容器への刺激で起こるが、受容体の種類による反応の相違は明らかでない。味覚性半側発汗障害例の病態解析から、辛味成分の種類による口腔内痛覚性発汗の有無と、その反射経路を推察した。25 歳の男性。辛い物を食べると、顔面右側に多汗を自覚する。唾液分泌、ワサビ摂取時、暑熱時の発汗、味覚に左右差の自覚はない。発症時期は不明である。Horner 症候群はない。脳幹 MRI に異常なし。中性温環境下 (室温 25℃) で、味物質: タバスコ<sup>TM</sup> (capsaicin), 生姜 (gingerol) (以上、TRPV1 刺激), ワサビ, 和からし (以上, allyl isothiocyanate: TRPA1 刺激) (以上, 辛味), ガムシロップ (甘味), 塩 (塩味), 梅干し (酸味), インスタントコーヒー (苦味) (以上, 味蕾刺激) を、舌に片側ずつ塗布し、発汗分布を Minor 法で、皮膚温分布を赤外線サーモグラフィで観察した。舌 TRPV1 刺激で、発汗と皮膚紅潮は顔面左側で減退しており、皮膚温は額左側で下がらなかった。舌 TRPA1 と味蕾刺激では、皮膚温に左右差を生じなかった。以上より、当患者は、顔面左側の口腔内痛覚性発汗神経遠心路の障害が疑われた。健側で口腔内痛覚性発汗を、熱刺激受容体 TRPV1 の刺激で誘発し、同三叉神経節に発現している冷刺激受容体 TRPA1 の刺激では誘発しなかったため、同発汗は一種の温熱性発汗としてのフィードフォワード制御の可能性がある。(利益相反 なし)



### O-21 Extracellular $\text{Ca}^{2+}$ binding to specific amino acids is required for heat-evoked activation of TRPA1

○E. Kurganov<sup>1,2</sup>, S. Saito<sup>1,3</sup>, C. Saito<sup>1,3</sup>, M. Tomimaga<sup>1,2,3</sup> (<sup>1</sup>Division of Cell Signaling, NIPS, Okazaki, Japan, <sup>2</sup>The Graduate University for Advanced Studies, SOKENDAI, <sup>3</sup>Okazaki Institute for Integrative Bioscience, Okazaki, Japan)

Transient receptor potential, ankyrin 1 (TRPA1) is a homotetrameric nonselective cation-permeable channel with six transmembrane domains flanked by cytoplasmic N and C termini. Although many TRP channel family members contain the range of 3-6 ankyrin repeats (AR) within the N-terminal region, TRPA1 is distinguished by having an unusually large number of such repeats (16-17 ARs). A number of studies have shown that both intracellular and extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  is a key regulator of many TRP channels, including TRPA1. In the previous study, we found that extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ , but not intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  plays an important role in heat-evoked activation of green anole TRPA1 (gaTRPA1). In this study, we focus on extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent heat sensitivity of gaTRPA1 by comparing gaTRPA1 with other heat-activated TRPA1s from rat-snake and chicken. We found that rat-snake TRPA1 (rsTRPA1) and chicken TRPA1 (chTRPA1) are activated by heat with small inward currents in the absence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . We identified several negatively charged amino acid residues (glutamate and aspartate) in gaTRPA1, chTRPA1 and rsTRPA1 near outer pore vestibule for activation by heat in the presence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . These results suggest that the neutralization of the acidic amino acids by extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  is important for the heat-evoked activation of gaTRPA1, chTRPA1 and rsTRPA1. (COI: none)

### O-22 坐骨神経損傷後の運動機能回復における KCC2 発現低下の役割

○戸田拓弥<sup>1,2</sup>, 鍋倉淳一<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>生理学研究所生体恒常性発達機構研究部門, <sup>2</sup>総合研究大学院大学生命科学生理科学)

神経細胞特異的  $\text{Cl}^-$  汲出し分子  $\text{K}^+\text{Cl}^-$  co-transporter 2 (KCC2) は発達や神経細胞損傷でその発現がダイナミックに変化する。発達期の KCC2 発現上昇, 神経損傷後の低下は GABA/Glycine 作用をそれぞれ興奮から抑制性へ, 抑制から興奮性にスイッチさせる。未熟脳における GABA/Glycine の神経細胞興奮性作用は神経回路形成に寄与する

と考えられているが, 損傷後の脱分極作用が神経回路再建に関与するか, 未だ実証されていない。本研究で運動軸索損傷後の KCC2 発現低下と運動機能回復との連関を検討した。マウスの片側末梢運動神経線維を損傷すると, 損傷側脊髄前角の KCC2 発現量は損傷後 3 日で有意に低下し, 6 週目に非損傷側前角と同程度まで回復した。また, 運動機能も同時期には損傷前と同程度まで回復した。CaMKII プロモータ下に KCC2 を過剰発現させたマウス (KCC2 強制発現マウス) を用いて損傷後の脊髄前角 KCC2 発現量低下の阻害や, GABA<sub>A</sub> 受容体阻害薬の脊髄前角への損傷後早期投与による GABA の興奮性作用の阻害で運動機能回復が低下した。しかし, 運動軸索再生の指標の一つの sciatic static index は対照群と GABA 脱分極作用抑制群で差はなかった。一方で, 対照群では損傷後 6 週目に GABA 合成酵素 (glutamic acid decarboxylase; GAD) の発現量が損傷側脊髄前角で有意に減少していたが, KCC2 強制発現マウスでは見られなかった。この結果は損傷後早期に起こる KCC2 発現減少による GABA の脱分極は, その後の脊髄前角の GABA 産生量減少による脊髄神経回路の興奮性増加を促進し, 運動機能回復に関与していることが示唆される。(利益相反 なし)

### O-23 胃プロトンポンプ $\beta$ 鎖のシアル酸修飾によるポンプ活性制御

○藤井拓人<sup>1</sup>, 清水貴浩<sup>1</sup>, 竹島 浩<sup>2</sup>, 久代京一郎<sup>3</sup>, 高井まどか<sup>3</sup>, 酒井秀紀<sup>1</sup> (<sup>1</sup>富山大学薬物生理学, <sup>2</sup>京都大学生体分子認識学, <sup>3</sup>東京大学工学研究科)

胃プロトンポンプ ( $\text{H}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ ) は触媒サブユニットの  $\alpha$  鎖と糖タンパク質の  $\beta$  鎖で構成されている。本研究では,  $\beta$  鎖の糖鎖末端のシアル酸修飾が,  $\alpha$  鎖の酵素活性に与える効果を検討した。 $\text{H}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$  を安定発現させた LLC-PK1 細胞を neuraminidase 処理したところ, 原形質膜におけるシアル酸プローブの標識レベルが有意に減少し, 膜サンプル液中の遊離シアル酸量が増加した。興味深いことに, neuraminidase 処理により,  $\text{H}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$  の酵素活性が有意に減少した。pH5 の酸性溶液処理においても neuraminidase 処理と同様の効果が観察されたが, pH6 の溶液では効果がなかった。 $\text{H}_2$  ブロッカーの famotidine を投与したラットの胃酸分泌細胞において, シアル酸プローブによる標識が確認できたが, histamine 投与ラットの胃酸分泌細胞では有意な標識が確認できなかった。また, famotidine 投与ラットでは histamine 投与ラットに比べて,  $\alpha$  鎖蛋白質量当たりの  $\text{H}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$  活性が有意に上昇した。Neuraminidase 処理により, これらの famotidine による効果は消失した。以上より,  $\beta$  鎖のシアル酸は, プロトンポンプ活

性を正に調節すること, また胃酸による低 pH 条件下で,  $\beta$  鎖のシアル酸が切断されることが示唆された。(利益相反なし)

#### O-24 TMEM16F が有するイオンチャネル機能/リン脂質スクランブラーゼ機能

○清水貴浩, 鍋島彰太, 藤井拓人, 小澤茂喜, 家原貴大, 酒井秀紀 (富山大学大学院医学薬学研究部 (薬学) 薬物生理学)

Transmembrane protein 16F (TMEM16F) は, 細胞内遊離  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇により活性化する  $\text{Cl}^-$  チャネル (CaCC) として機能するだけでなく, 血小板活性化時に細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  依存的にリン脂質を双方向に輸送するスクランブラーゼとしても機能すると報告されている. そこで本研究では, TMEM16F における両機能の相関関係について検討した. ヒト TMEM16F を過剰発現させた HEK293T 細胞のイオンチャネル機能およびリン脂質スクランブラーゼ機能は, それぞれパッチクランプホールセル記録法および annexin V-phycoerythrin (PE) を用いた flow cytometry 解析により観測した. その結果, TMEM16F 電流を阻害するニフルミン酸, NPPB, タンニン酸処理により, TMEM16F 依存的なリン脂質スクランブラーゼ機能が抑制された. また TMEM16F の各種変異体におけるリン脂質スクランブラーゼ機能の変化が, CaCC 機能の変化と正に相関していることが明らかとなった. 以上の結果から, TMEM16F はイオンチャネル機能とリン脂質スクランブラーゼ機能を併せ持つ膜輸送蛋白質であることが示唆された。(利益相反なし)

#### O-25 麻酔下ラット 90° Head-up tilting 体位変換時の血圧応答に対する加齢による影響

○西村宗修<sup>1</sup>, 平岩徹也<sup>1</sup>, 橋本千穂<sup>2</sup>, 嘉山裕介<sup>2</sup>, 酒井有理<sup>2</sup>, 山崎将生<sup>3</sup> (<sup>1</sup>藤田保健衛生大学・院・保健学・生理学・学生, <sup>2</sup>藤田保健衛生大学・医療科学部・臨床工科学科・学生, <sup>3</sup>藤田保健衛生大学・院・保健学・生理学)

ヒトが体位変換すると圧受容器や前庭を介した自律神経系の調節が働き適切な体血圧を保つ. 私共は麻酔下ラットの 90° Head-up tilting (HUT) 実験で圧反射とその発達と老化を調べている (approval # H1442). 今回は SD ラットを週齢の異なる実験群に分けて (8-9; 12-19; 30-34; 44-55; 90 週齢), 水平仰臥位 (SP) から 30 分の HUT を行った時と 30 分後に再び SP へ戻した時の循環因子の変化を各週齢群間で比較し, 検討した. HUT を行うと静水圧勾配に従って体血圧 (BP) は全ての群で低下し (mean  $\pm$  SD; 8-9 週齢,  $n=6$ ,  $-15.9 \pm 3.8 \text{ mmHg}$ ; 12-19 週齢,

$n=12$ ,  $-13.2 \pm 6.2 \text{ mmHg}$ ; 30-34 週齢,  $n=4$ ,  $-14.6 \pm 6.0 \text{ mmHg}$ ; 44-55 週齢,  $n=7$ ,  $-11.7 \pm 5.7 \text{ mmHg}$ ; 90 週齢,  $n=1$ ,  $-14.6 \text{ mmHg}$ ), その後, HUT 前対照値に近づく. 12-19 週齢では HUT から  $30.7 \pm 13.1$  秒後に安定するが (対照値からの変化量,  $-2.7 \pm 7.4 \text{ mmHg}$ ), 90 週齢では 99.2 秒かかり ( $-9.3 \text{ mmHg}$ ), 週齢に伴って BP 安定までの時間は長かった (8-9 週齢,  $32.2 \pm 21.7$  秒,  $-2.6 \pm 6.7 \text{ mmHg}$ ; 30-34 週齢,  $43.3 \pm 16.6$  秒,  $-5.8 \pm 3.9 \text{ mmHg}$ ; 44-55 週齢,  $47.1 \pm 21.5$  秒,  $-3.8 \pm 7.8 \text{ mmHg}$ ). HUT 姿勢を長く保つと BP 維持能は加齢が進むに従って低下していた (HUT30 分時点での値,  $-4.0 \pm 7.1 \text{ mmHg}$ ;  $-7.0 \pm 12.3 \text{ mmHg}$ ;  $-9.0 \pm 8.7 \text{ mmHg}$ ;  $-11.5 \pm 8.0 \text{ mmHg}$ ;  $-16.5 \text{ mmHg}$ ). HUT30 分から SP へ戻した後の BP 回復の量的変化は軽微な変動を経て異なり, それらの発達と老化に伴う特徴は明確ではない. 以上より, 加齢が進むと圧受容器反射が弱い例が多く, 受容器, 神経伝導路ならびに効果器と受容器に関わる末梢血管などの老化に伴う機能低下との関連も十分に考えられる. (結果の一部は 11<sup>th</sup> AMS 2016 で発表. JSPS 科研費 26506024) (利益相反なし)

#### O-26 非冬眠動物における cold-inducible RNA-binding protein の発現調節

○佐野有希, 島岡弘樹, 内藤清惟, 中森裕之, 椎名貴彦, 志水泰武 (岐阜大学大学院連合獣医学研究科獣医生理学研究室)

【背景と目的】低体温状態では有害な活性酸素の産生が低いため, 細胞が障害を受けづらいたことが知られている. しかし, 低温自体に障害作用があるため, そのメリットを活かしきれていないのが現状である. 我々はこれまで, 冬眠動物を用いた研究により, 低体温耐性と関連する現象として cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) 遺伝子のスプライシング調節を明らかにしてきた. そこで本研究では, 非冬眠動物に低体温耐性を付与することを期待し, CIRP 遺伝子の冬眠様発現調節を人為的に誘導する方法を検討した.

【方法】非冬眠動物として ddY 系マウスを用いた. マウスに麻酔薬を用いて人為的に低体温へ誘導した. 様々な臓器における CIRP mRNA のスプライシングパターンを RT-PCR 法により解析した.

【結果】マウスの平常体温時では, 冬眠動物の平常体温時と同様に, CIRP 遺伝子から複数のスプライシングバリエントが発現していた. 体温を強制的に低下させ, 維持した場合, CIRP mRNA のスプライシングバリエントの発現は変化したものの, 冬眠時のような発現様式を完全には誘導できなかった. 一方, ゆっくりとした速度で体温を低下させ

たところ、スプライシングバリエーションの発現は明らかに減少し、CIRP をコードする mRNA の発現に集約した。これは、冬眠時に解析される CIRP 遺伝子の発現様式と非常に類似していた。

【考察とまとめ】本研究により、非冬眠動物であるマウスの CIRP 遺伝子において、冬眠様スプライシング調節の誘導が可能であることが明らかとなった。さらに非冬眠動物においても冬眠動物と同様の温度域の重要性が示された。我々は冬眠動物において CIRP の調節により、冬眠時の低体温耐性がもたらされていると推察している。非冬眠動物においても、低温障害を回避した低体温状態が作出できるものと期待される。(利益相反 なし)

#### O-27 内耳の恒常性維持システムと特殊な電気化学的性質を示す細胞との協同：理論と実験を併用した解析

○任 書晃<sup>1,2</sup>, 吉田崇正<sup>1,2,3</sup>, 村上慎吾<sup>4,5</sup>, 緒方元気<sup>1,2</sup>, 上塚 学<sup>6</sup>, 小宗静男<sup>3</sup>, 倉智嘉久<sup>4</sup>, 日比野 浩<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>新潟大・医・分子生理, <sup>2</sup>新潟大・超域学術院, <sup>3</sup>九州大・医・耳鼻咽喉科, <sup>4</sup>大阪大・医・分子細胞薬理, <sup>5</sup>東邦大・医・薬理, <sup>6</sup>大阪大・医・耳鼻咽喉科)

内耳蝸牛を満たす内リンパ液は+80mVの高電位を常に示す。聴覚に必須であるこの特性は、内リンパ液腔の外側面に位置する蝸牛側壁が産生する高電位や、その組織が駆動する内リンパ液へのK<sup>+</sup>輸送によって、恒常的に維持される。側壁は内層・外層の二層からなる上皮様組織である。以前、我々は、側壁に発現するチャンネル・トランスポーターの分布や、それらを阻害した際に得られた蝸牛のK<sup>+</sup>電位動態の実験結果に基づき、数理モデルを構築した。そして、側壁の電位とK<sup>+</sup>輸送が相互作用する結果、内リンパ液の特殊環境が維持されることを示した。このモデルでは、特性が不明であった外層の側底膜を十分に考慮していなかった。しかし近年、我々のin vivo実験により、側底膜は常に+5から+12mVの正值を示すこと、そしてこの稀な静止膜電位の成立はNa<sup>+</sup>透過性の優位性に依ることが明らかになった。今回、以上に立脚し改定した数理モデルを用い、外層側底膜の特殊電位環境や仕組みが、側壁のK<sup>+</sup>輸送にとって鍵となる調節機構であり、内リンパ液高電位の維持に貢献することを提示する。Na<sup>+</sup>透過性は、この膜で共存しNa<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPaseと相補的に働くことでK<sup>+</sup>輸送に関与すると設定した。以上の予測の妥当性は、外層側底膜の輸送系を薬物破綻させた際、側壁イオン動態と内リンパ液電位の変化について、実験値と理論値が合致することで保証された。(利益相反 なし)

#### O-28 内耳の上皮様組織におけるN-結合型糖鎖の網羅

#### 的解析

○野々村頼子<sup>1,2</sup>, 澤村晴志朗<sup>1</sup>, 任 書晃<sup>1</sup>, 上塚学<sup>3</sup>, 猪原秀典<sup>3</sup>, 奥田修二郎<sup>4</sup>, 堀井 新<sup>2</sup>, 高橋 姿<sup>2</sup>, 長束俊治<sup>5</sup>, 日比野 浩<sup>1</sup> (<sup>1</sup>新潟大・医・分子生理, <sup>2</sup>新潟大・医・耳鼻咽喉科, <sup>3</sup>大阪大・医・耳鼻咽喉科, <sup>4</sup>新潟大・医・バイオインフォマティクス, <sup>5</sup>新潟大・理・生物学科)

聴覚の受容器である内耳蝸牛を満たす内リンパ液は、+80mVの高電位と150mMのK<sup>+</sup>濃度を示す特殊な細胞外液である。これらの特徴は聴覚に必須であり、上皮様組織である血管条により維持される。我々は、以前、プロテオーム解析により、内リンパ液の恒常性に関連性のある約1800種の膜タンパク質を血管条から見出した(Eur J Neurosci, 2015)。

一般に生体内では半数以上のタンパク質は糖鎖が付加されており、これは血管条でも同様と考えられる。糖鎖には、N-結合型糖鎖とO-結合型糖鎖がある。特に、前者は、タンパク質のfolding, 細胞とマトリックス間の認識, 接着現象, チャンネルやトランスポーターなどの機能制御に重要である。これまで血管条の糖鎖については、レクチン染色などによる単糖レベルでの解析に留まっており、詳細な糖鎖構造は不明であった。本研究では、血管条に発現するN-結合型糖鎖を、高速液体クロマトグラフィーと質量分析法を駆使して解析し、76種を同定した。そのうち高マンノース型が44%を占め、M6BとM5Aが多く認められた。過去の我々の血管条プロテオーム解析にて、N-結合型糖鎖合成に必要な糖転移・分解酵素が16種同定されている。これらの情報を元に血管条におけるN-結合型糖鎖の合成経路図を作成した。以上の結果は、蝸牛機能成立の仕組みや難聴の病態生理の理解に貢献すると期待される。(利益相反 なし)

#### O-29 Roles of GABAergic inhibition in low-tuning frequency neurons of avian nucleus magnocellularis

○M.M. AL-Yaari, R. Yamada, H. Kuba (Department of Cell Physiology, Graduate School of Medicine, Nagoya University, Nagoya, Japan)

Avian nucleus magnocellularis (NM) receives excitatory inputs from auditory nerve fibers (ANF) and transmits phase information of sound bilaterally to coincident detectors in nucleus laminaris (NL), where interaural time difference is first computed for sound localization. The NM is arranged tonotopically, and each NM neuron is tuned to a specific frequency of sound (characteristic frequency (CF)). In NM, the highest density of inhibitory terminals

is formed on low-CF neurons. Furthermore, an in-vivo study revealed that lesion of superior olivary nucleus, the source of inhibition to NM and NL, reduced binaural responsiveness in low-CF NL neurons, suggesting the importance of GABAergic inhibition in regulating the output of NM neurons at low-CF. However, the role of inhibition in low-CF NM neurons is not well understood. To investigate this issue, we made thick slice preparation (1.8–2mm) of chick brainstem that preserved both excitatory and inhibitory circuits to NM, and performed cell-attached and whole-cell recordings by using blind patch clamp technique. We recorded extracellular spikes from a single low-CF neuron while stimulating ANFs, and found that the stimulus-intensity dependence of spike generation became steeper and shifted toward lower intensities after application of GABA<sub>A</sub> receptor blocker (SR-95531), suggesting a critical role of GABAergic inhibition in increasing the firing threshold and expanding the dynamic range of inputs. Indeed, whole-cell recording revealed that inhibitory inputs are generated at low stimulus intensity and comparable in size to excitatory inputs throughout stimulus intensity. Thus, GABAergic inhibition adjusts the output of low-CF NM, which may ensure the binaural computation of NL neurons for a wide range of sound intensity. (COI: none)

### O-30 トリ聴覚神経核の活動依存的な機能分化

○安達良太, 久場博司 (名古屋大学大学院医学系研究科細胞生理学)

鳥類の蝸牛神経核である大細胞核は聴覚入力の時間情報を上位の神経核に伝える。大細胞核の特徴の一つに  $K_{LVA}$  ( $K_{v1}$ ) 電流があり, これが正しいタイミングでの発火とそれによる時間情報の伝達に寄与している。大細胞核は領域毎に特定の周波数に対して応答し, 高周波数域では低周波数域に比べて  $K_v$  チャネルの発現が多いことが知られている。領域間の違いはシナプス入力にも見られる。高周波数域の細胞は一つの大きな入力を受け取るが, 低周波数域の細胞は複数の小さな入力を受け取る。この違いは, 聴覚入力が大細胞核の機能分化に影響する可能性を示している。そこで, 本研究ではニワトリ胚の培養脳幹切片を用いて大細胞核の機能分化における入力の影響を調べた。

培養切片で高周波数域と低周波数域の細胞を比較すると, 自発活動の頻度や VGLUT2 の分布に違いは見られなかった。また, 膜特性や活動電位のパラメータもほぼ同じであった。 $K^+$  電流にもほとんど違いはなかったが, in vivo と比べると電流量が小さかった。このことから培養細胞で

は分化が進んでおらず, 機能的に幼若だと考えられた。一方培地中の  $K^+$  濃度を 1.5 倍にすることで脱分極を誘導すると, 高周波数域の細胞で膜抵抗の低下, 閾電流の増加等が観察された。これらは  $K^+$  電流が増加したことを示し, 活動が大細胞核の機能分化を引き起こすトリガーの一つであると考えられる。(利益相反 なし)

### P-1 広汎な消化管電気現象の微小電極アレイ計測と解析

谷口瑞毅, 小谷 慧, 森下博隆, 望月直人, ○中山晋介 (名古屋大学大学院医学系研究科細胞生理学)

消化管では実にさまざまな電気現象が観察される。消化管は体内に存在する極めて長い組織であり, 少なくとも, 食道, 胃, 小腸, 結腸などの数セクションに区分されるうえ, 各部位のサブセクションにおいても機能状況に対応して電気現象の特徴は変化する。この消化管はほぼ全域にわたり, 平滑筋, 壁内神経, 間質細胞と複数種類の興奮性細胞組織がオーバーラップし電気活動を営む。

この多種多様の消化管電気活動の時間空間的モニタリングと解析のために, 私たちは透析膜で補助した低インピーダンス電極アレイを適用し研究を行った。本方法を用いることで, 標本へのガス交換やエネルギー基質供給を長時間維持しながら, 微小領域での広帯域の電気信号記録が可能となり, また多様な消化管筋層標本へも適用が拡大された。小腸筋層標本の計測では, アレイデータをフィールドポテンシャルビデオとして視覚化し,  $\sim 1\text{mm}^2$  微小領域でのペースメーカー電位伝搬特性のパターン解析を可能とした。さらに比較的強固な結腸筋層組織においても, 緩やかに進行する電気興奮及び, それに伴う速い電位振動とスパイク電位による電位複合体 (Myoelectric complex) が観察された。また電気刺激した小腸筋層標本において, 興奮性神経筋接合部電位 (電流) の域値下の伝導を描出した。本方法を用いれば, 低分子薬剤効果の継続的観察や, 遺伝子改変動物標本の個体間解析なども容易になると期待される。(利益相反 なし)

### P-2 クローディン-18 による肺腺がん細胞の増殖抑制における ZO-2 の関与

○秋月梨佐, 下馬場 駿, 松永俊之, 遠藤智史, 五十里 彰 (岐阜薬科大学学生化学研究室)

肺がんの患者数と死亡者数は増加傾向にあり, その発症・進展機序の解明と新しい治療薬の開発が切望されている。腺がんは肺がんの中で最も頻度が高く, 化学療法・放射線療法に感受性が低い。我々はヒト肺組織由来の cDNA を用いて, 細胞間接着分子であるクローディンの発現量を

解析し、正常組織と比較してがん組織でクロードイン-18 発現量が低下していることを見出した。本研究では、ヒト肺腺がん由来の A549 細胞を用いて、細胞間透過性と増殖能に対するクロードイン-18 の影響を検討した。

A549 細胞にクロードイン-18 は発現しておらず、FLAG タグを融合したクロードイン-18 を安定発現させたところ、内在性のクロードイン-1 や足場タンパク質の ZO-1 とともに細胞隣接部位に分布した。クロードイン-18 の発現により 10k-デキストランの透過性は変化しなかったが、4k-デキストランの透過性が低下した。さらに、上皮膜間電気抵抗値が増加したことから、イオン透過性の低下が示唆された。

クロードイン-18 の発現により、細胞増殖能が低下した。DNA マイクロアレイ解析により、クロードイン-18 で発現変動する遺伝子を調べたところ、ZO-2 が同定された。ZO-2 はタイトジャンクションや核内に分布し、細胞増殖の調節に関与することが報告されている。ZO-2 はコントロール細胞で主に細胞隣接部位に分布したが、クロードイン-18 発現細胞で核内に分布した。クロードイン-18 の発現により Akt リン酸化量が低下したが、クロードイン-18 の発現調節に Akt のリン酸化は関与しなかった。プロテインキナーゼ A (PKA) 阻害剤の H-89 処理によって ZO-2 の発現量が低下したため、クロードイン-18 による ZO-2 の発現増加に PKA が関与すると示唆された。現在、A549 細胞の増殖能に対する ZO-2 の効果を検討中である。(利益相反 なし)

### P-3 伸張性収縮による骨格筋からの ATP 遊離量における遅筋と速筋の違いについて

○横井美月<sup>1</sup>、内村佳子<sup>2</sup>、水村和枝<sup>2</sup> (<sup>1</sup>中部大学生命健康科学部理学療法学科 (4 年)、<sup>2</sup>中部大学生命健康科学部理学療法学科水村研究室)

【背景・目的】不慣れな激しい運動後に 1~2 日して現れる筋性疼痛は、遅発性筋痛 (DOMS) と呼ばれる。伸張性収縮を行うと、筋細胞から ATP が遊離されることがトリガーとなり、DOMS が生じると報告されている。DOMS は遅筋より速筋で生じやすく、伸張性収縮で生じやすい。しかし、この違いが生じる原因は不明である。そこで本実験では遅筋と速筋で伸張性収縮による ATP 遊離量に違いがないか調べた。【方法・対象】麻酔下の SD ラットから総腓骨神経付き長指伸筋、脛骨神経付きヒラメ筋を取り出し、Krebs-Henseleit 溶液で表面灌流し、神経に電気刺激を加えて筋に伸張性収縮を負荷した。灌流液を事前に決めた間隔で 10 秒間採取し、その ATP 濃度をルシフェリン-ルシフェラーゼ法により測定した。【結果】用いた実験条件にお

いて、灌流液の温度、筋長・幅、筋重量、閾値、収縮期間中 (1 秒間) の最大等尺性収縮力には有意な差がなかった。ATP 放出量は遅筋より速筋で有意に多かった。収縮期間中の最大等尺性収縮力に有意差はなかったが、収縮力発生パターンに違いがあった。遅筋では収縮力の増大がゆっくりで、刺激期間の最終点でピークに達していた。【考察】ATP 放出量が遅筋で少ないことが、遅筋で DOMS が生じにくい理由の一つであると考えられる。これには、収縮力発生パターンの違いが大きく関与していると推定される。(利益相反 なし)

### P-4 麻酔下マウスにおいて $\beta_2$ アドレナリン受容体阻害は体液の血管外漏出によりアナフィラキシー低血圧を増悪させる

○楊 巍<sup>1,2</sup>、芝本利重<sup>1</sup>、張 涛<sup>1,3</sup>、九田裕一<sup>1</sup>、谷田 守<sup>1</sup>、倉田康孝<sup>1</sup> (<sup>1</sup>金沢医科大学医学部第二生理学講座、<sup>2</sup>中国医科大学附属盛京病院感染症学講座、<sup>3</sup>中国医科大学附属第四病院結腸外科学講座)

アナフィラキシーショックが  $\beta$  ブロッカーを服用している患者に生じると重篤となることが知られている。しかしながら、その機序については十分に解明されていない。今回、我々は  $\beta_2$  アドレナリン受容体 (AR) の阻害が体液の血管外漏出を増強してアナフィラキシー低血圧を増悪させるとの仮説をたてて麻酔下マウスを用いて検証した。実験は C57BL マウスに抗原の卵白アルブミンを硫酸アルミニウムカリウムアジュバントとともに皮下に投与して感作した。2 週間後に麻酔下で総頸動脈より体血圧 (MAP) を測定し、抗原を静脈内投与して 20 分観察した。抗原投与前後でヘマトクリット (Hct) を測定した。はじめに、抗原容量依存性を検討した。MAP は low dose (1  $\mu$ g) では対照群と有意差はなかったが、medium (3  $\mu$ g) と high dose (10  $\mu$ g) では容量依存性に有意に低下した。また、Hct は対照群と low dose では変化がなかったが、medium と high dose ではそれぞれ、5% と 20% 増加した。次に、 $\beta$  ブロッカーの実験を抗原量 medium dose 群をアナフィラキシー対照 (Ana control) 群として検討した。非選択的  $\beta$  AR 阻害剤 propranolol、選択的  $\beta_1$  AR 阻害剤 atenolol、選択的  $\beta_2$  AR 阻害剤 ICI118,551 を静脈内投与してから 10 分後に抗原 medium dose を投与した。MAP は Ana control 群に比較して atenolol 群では有意差はなかったが、ICI 群と propranolol 群で有意に低いレベルであった。Hct は ICI 群と propranolol 群では Ana control 群に比べて有意に大きく増加した。一方、atenolol 群では有意差はみられなかった。以上より、マウスアナフィラキシー低血圧モデルでは血管外への体液漏出による血液濃縮が見られ、 $\beta_2$  AR の阻害は

その体液漏出を増強することでアナフィラキシー低血圧を増悪することが示唆された。(利益相反 なし)

**P-5 Exploring the factors causing remyelination arrest through studying Cystatin F gene expression regulatory mechanism**

○J. Li<sup>1,2</sup>, W. Wisessmith<sup>2</sup>, T. Shimizu<sup>2</sup>, K.F. Tanaka<sup>2,4</sup>, Y. Kimori<sup>3</sup>, K. Ikenaka<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>(SOKENDAI) Graduate University for Advanced Studies, School of Life Science, Japan, <sup>2</sup>National Institute for Physiological Sciences, Okazaki, Japan, <sup>3</sup>National Institutes of Natural Sciences, Center for Novel Science Initiatives, Imaging Science Division, <sup>4</sup>Present address: Keio University, School of Medicine, Department of Neuropsychiatry, Tokyo, Japan)

Demyelinating diseases (eg, multiple sclerosis (MS)) is a series of disorders that damage the protective myelin sheath surrounding neurons in the central nervous system (CNS). During the process of demyelinating disease, demyelination is accompanied by remyelination at the early phase forming the shadow plaque, which is in the border region surrounding demyelinating plaque. But at a late stage, remyelination become arrested. Cystatin F, a papain-like lysosomal cysteine proteinase inhibitor, and its main target, cathepsin C, have been demonstrated to be crucial factors in regulating remyelination arrest. It is found that the expression of cathepsin C and cystatin F are profoundly elevated and matched with ongoing demyelination/remyelination with different kinetics. The balance of cystatin F level and cathepsin C level seems to be a crucial factor to determine whether remyelination continues or not. In a chronic demyelination mouse model, named heterozygous PLP transgenic 4e (PLP<sup>4e/-</sup>) mouse, cystatin F expression is up regulated from 2.5M to 6M then decreased from 6M to 8M. In order to study cystatin F regulatory mechanism, we switched cystatin F endogenous promoter to tetO promoter by using Flexible Accelerated STOP Tetracycline Operator Knockin (FAST) system (Tanaka F K et al., 2010). We surprisingly found that cystatin F is automatically decreased in CysF<sup>stop,tetO/-</sup>::Iba-tTA<sup>-/-</sup> mouse from 3W to 2.5M. If there are some common mechanisms that modulate cystatin F expression in PLP<sup>4e/-</sup> and CysF<sup>stop,tetO/-</sup>::Iba-tTA<sup>-/-</sup> mouse, we may control cystatin F expression, then overcome remyelination arrest in demyelinating diseases. (COI: none)

**P-6 Two-pore Na<sup>+</sup> channel 3 (TPC3) の 2 つの S4 ヘリックス上の正電荷は、電位依存性に異なる貢献をする**

○下村拓史<sup>1,2</sup>, 久保義弘<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>生理学研究所神経機能素子研究部門, <sup>2</sup>総合研究大学院大学生命科学研究科生理科学専攻)

Two-pore Na<sup>+</sup> channel (TPC) は、膜電位依存性カチオンチャンネルファミリーの中でも他に類のない 12 回膜貫通型という構造を有している。これはファミリーに共通する基本単位である 6 本の膜貫通ヘリックスが同一分子中に 2 つ存在するためであり、TPC は 2 つの異なる電位センサーにより電位依存性が決定されていると考えられる。本研究ではこの 2 つの電位センサーの役割の違いを調べるため、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の卵母細胞に *Xenopus tropicalis* 由来の TPC ファミリー 3 (TPC3) を発現させ、二電極膜電位固定法による電気生理学的解析を行った。

6 本のヘリックスのうち 4 番目のヘリックス (S4) は膜電位感知に重要な複数のアルギニン残基を持つことが知られている。リピート I のアルギニンをグルタミンに置換した変異体 (Arg167Gln, Arg170Gln) について電位依存性を解析したところ、野生型と比べて明確な違いを示さなかった。一方で、リピート II の S4 の同様な変異体 (Arg517Gln, Arg523Gln) では、活性化により高い膜電位が必要になるように大きく電位依存性が変化した。この結果は、TPC3 においてはリピート I よりも II がチャンネル全体の電位依存性により大きく貢献していること、および 2 つの膜電位センサーが異なる役割を持つことを示唆している。(利益相反なし)

**P-7 代謝型プリン受容体 P2Y1R の膜電位依存性**

○立山充博<sup>1</sup>, 王 培冰<sup>1,2</sup>, 久保義弘<sup>1</sup> (<sup>1</sup>生理学研究所神経機能素子研究部門, <sup>2</sup>新潟大学医学部医学科)

我々は、Gq 共役型受容体である代謝型プリン受容体 P2Y1R の膜電位依存性の有無とその構造基盤を解明することを目的として、Gq 共役型受容により活性化される KCNK13 チャンネルを HEK293T 細胞に共発現させパッチクランプ法による電気生理学的解析を行った。その結果、二相性の濃度作用関係がみられ、最大作用をもたらす作用薬 ADPβS の濃度は、膜電位を -80mV に固定した時より 0 mV に固定した時の方が低いことが明らかとなり、P2Y1R が膜電位依存性を有することが示唆された。次に、P2Y1R の膜電位依存性に関与する部位を同定するために、膜貫通部位に位置する荷電性アミノ酸残基に変異を導入し機能解析を行ったところ、最大作用を示す作用薬濃度が膜電位により変化しない変異体として Asp97Ala と Asp320Ala を見出した。さらに、P2Y1R の C 末端に付加した YFP と

Gβ1 サブユニットの N 末端に付加した CFP の間で起こる FRET 効率を計測した結果、作用薬濃度に依存した FRET 効率の増加が見られ、膜電位固定下での FRET 解析から、野生型 P2Y1R 受容体では -80mV 固定時の EC<sub>50</sub> は +40mV 固定時より 2 倍高濃度側にシフトすること、Asp320Asn 変異体では EC<sub>50</sub> は膜電位により変化しないことが明らかとなった。以上により、Asp320 が P2Y1R の膜電位依存性の構造基盤であることが示された。(利益相反なし)

#### P-8 シスプラチン耐性細胞株 KCP-4 における LRRC8 分子群の役割の検討

○岡田俊昭<sup>1,2</sup>, Md. R. Islam<sup>1</sup>, N.A. Tsiferova<sup>1,3</sup>, R.S. Kurbannazarova<sup>3</sup>, 岡田泰伸<sup>4</sup>, R.Z. Sabirov<sup>1,3</sup> (<sup>1</sup>生理学研究所国際連携研究室, <sup>2</sup>生理学研究所細胞生理部門, <sup>3</sup>ウズベキスタン科学アカデミー分子生理, <sup>4</sup>総研大)

容積感受性アニオンチャネルの一つである volume-sensitive outwardly rectifying anion channel (VSOR) の分子実体は永らく不明であったが、近年、leucine-rich repeat containing 8A (LRRC8A) が VSOR に重要な分子として同定された。LRRC8A は単独では機能的なチャネルを形成せず、他の 4 つのアイソマー (LRRC8B-LRRC8E) の少なくとも一つとヘテロマーを構成することが必要であると考えられている。このうち LRRC8A/D 複合体はアニオンチャネルとして働くほかに、シスプラチンやプラストサイジン等、種々の薬剤の細胞内取込に関与することが示された。我々が所有するシスプラチン耐性 KCP-4 細胞株は、その親株のシスプラチン感受性 KB 細胞や他の細胞種に比べて極めて小さい VSOR 電流しか示さない。このことから KCP-4 細胞株の表現型には LRRC8A/D が寄与している可能性が考えられた。本研究では KCP-4 細胞に LRRC8D や LRRC8A/D の強制発現を行って VSOR 電流を記録したが、その増加は観察されなかった。又、LRRC8E 及び LRRC8A/E の強制発現についても検証したがやはり同電流の増加は観察されなかった。これらの結果は、正常な VSOR 電流の発生には LRRC8 以外の分子も必要であることを示唆している。(利益相反なし)

#### P-9 TRPC3-NADPH オキシダーゼ (Nox) 2 複合体形成による心臓リモデリングの制御

○富田拓郎<sup>1</sup>, 北島直幸<sup>2</sup>, 西村明幸<sup>1</sup>, 西田基宏<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>岡崎総合バイオサイエンスセンター (生理学研究所) 心循環シグナル研究部門, <sup>2</sup>九州大学大学院薬学研究院創薬育薬研究施設統括室)

心臓の拡張期の機械的伸展で惹起される細胞内シグナル

は心臓の生理的あるいは病的ストレス応答に重要である。拡張期の心筋線維長に比例した収縮力の増強 (フランクスターリングの法則) が、Nox2 の活性化に依存した局所的な活性酸素種 (ROS) の生成を介して調節されることが明らかにされ、心筋の圧容積適応における ROS の役割が注目されている。しかしながら、心筋細胞の機械的伸展による Nox2 活性化の分子機構については未だ不明である。我々は、非選択的カチオンチャネルである canonical transient receptor potential3 (TRPC3) が伸展刺激で惹起される Nox2 依存的な ROS 産生を仲介することを明らかにした。TRPC3 の薬理的・遺伝的阻害は、単離心筋細胞において、伸展刺激で惹起される Nox2 活性化を有意に抑制した。TRPC3 は、Nox2 と複合体を形成し Nox2 を安定化させた。TRPC3 欠損マウスに大動脈狭窄による圧負荷を施したところ、心臓の代償性肥大は野生型と同程度であったものの、線維化と拡張機能不全 (心臓の硬化) が有意に抑制された。さらに TRPC3 欠損は圧負荷依存的な Nox2 安定化および ROS 生成を抑制した。以上の結果は、TRPC3 が Nox2 と物理的・機能的共役することで心臓の圧負荷による ROS 産生とそれに伴う非代償性硬化を仲介することを強く示唆している。(利益相反なし)

#### P-10 アンジオテンシン II は心血管運動ニューロンの血圧応答特性を修飾する

○三枝岳志, 有田 順 (山梨大学大学院総合研究部生理学講座第 1 教室)

吻側延髄腹外側野 (RVLM) においてアンジオテンシン II (Ang II) が交感神経血圧反射を修飾するメカニズムを明らかにするため、ウレタン麻酔下のウサギを用いて、Ang II が RVLM 心血管運動ニューロンの血圧応答特性に及ぼす効果について検討した。血管作動薬の静脈内投与によって誘発した緩やかな血圧変動に対して、Ang II は反射曲線の slope を変えることなく upper plateau (反射曲線の上限) を引き上げ、その結果として、反射の working range を拡大させた。個々のニューロンの反射曲線を加算平均することによって得られたニューロン集団としての反射曲線は、Ang II 投与前後、ともに末梢交感神経活動の血圧反射曲線の特徴をよく反映するものであった。つぎに、心拍動に伴う急速な血圧変動によって誘発される心血管運動ニューロンの応答に対する Ang II の効果について検討した。Ang II は血圧の上昇期、下降期ともにニューロンの平均発火頻度を増加させたが、その増強作用は血圧の下降期に優位であった。この特徴もまた、Ang II が末梢交感神経活動に及ぼす効果とよく一致するものであった。以上の結果より、Ang II は RVLM 心血管運動ニューロンの静的お

よび動的な血圧応答特性を修飾し、これらの変化の集団としての効果が末梢交感神経活動の血圧反射特性の変化に反映されていることが示唆される。(利益相反 なし)

#### P-11 低酸素環境下での血管内皮増殖因子シグナル変化

○A.A. Mamun<sup>1</sup>, 林 寿来<sup>1</sup>, 佐喜真未帆<sup>1,2</sup>, 佐藤元彦<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>愛知医科大学医学部生理学講座, <sup>2</sup>修文大学健康栄養学部)

血管内皮増殖因子(VEGF)は血管新生を誘導する強力な因子であり、低酸素下の組織では VEGF の発現が上昇することが知られている。しかし、低酸素下での VEGF シグナル伝達については十分に明らかにされていない。我々は、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)を低酸素下(1%)で3および12時間培養し、VEGFのシグナルを検討した。低酸素曝露はHIF-1 $\alpha$ とVEGFの発現を上昇させたが、解糖系酵素の発現に変化はみられなかった。低酸素3時間の曝露により、VEGFによるVEGFR-2受容体リン酸化および下流シグナルは抑制された。興味深いことに、VEGFR-2受容体のリン酸化には細胞内ATPレベルが大きく影響していた。すなわち、低酸素により細胞内ATPは著しく低下し、また、薬剤(antimycin A, 2-Deoxy-D-glucose)により細胞内ATPを低下させると正常酸素分圧下でもVEGFR-2受容体リン酸化は抑制された。さらに、調整細胞膜上のVEGFR-2受容体リン酸化はATP濃度依存性に増強した。12時間の低酸素曝露により、VEGFR-2受容体の発現は低下し、受容体のリン酸化はATP添加によっても完全に回復しなかった。低酸素下のVEGFシグナル形成には細胞内ATPが大きく影響すること、長期低酸素曝露はVEGFR-2受容体リン酸化能を低下させることが示唆された。(利益相反 なし)

#### P-12 G 蛋白活性調節因子 AGS8 は VEGF を介するリンパ管新生を制御する

○佐喜真未帆<sup>1,2</sup>, 林 寿来<sup>1</sup>, A.A. Mamun<sup>1</sup>, 高橋理恵<sup>1</sup>, 佐藤元彦<sup>1</sup> (<sup>1</sup>愛知医科大学医学部生理学講座, <sup>2</sup>修文大学健康栄養学部)

リンパ管新生には血管内皮増殖因子(VEGF) Cとその受容体VEGFR-3が主要な役割を果たすが、その調節機構については十分に解明されていない。我々は、三量体G蛋白の調節因子であるActivator of G-protein Signaling 8(AGS8)が、VEGFR-2受容体を制御することを報告した。本研究では、AGS8がVEGFR-2と同じ受容体ファミリーに属するVEGFR-3受容体を制御し、リンパ管新生に関与する可能性について検討を行った。ヒト皮膚リンパ管内皮

細胞のAGS8をsiRNAによりノックダウンすると、VEGFCが誘導するリンパ管形成、細胞増殖および細胞移動が抑制された。次にVEGFR-3のリン酸化と下流シグナルを免疫沈降法およびウェスタンブロット法を用いて検討したところ、AGS8ノックダウンによりVEGFR-3のリン酸化とERK1/2, AKTのリン酸化が抑制された。さらにFACSを用いて細胞膜表面の受容体の発現を検討したところ、AGS8をノックダウンすると細胞膜表面上のVEGFR-3が減少した。これら結果はVEGFC-VEGFR-3シグナルへのAGS8の関与を示唆した。AGS8はVEGFR-3の細胞膜表面への輸送を介してリンパ管新生に関与しているという可能性が考えられた。(利益相反 なし)

#### P-13 エストロジェンの膜受容体 Gpr30 を介した細胞増殖調節機構

○三井哲雄, 石田真帆, 有田 順 (山梨大学医学部生理学第一)

エストロジェン(E2)は乳腺、子宮、下垂体前葉といった標的器官に作用して細胞増殖を促進することにより、これらの組織の正常な成長、発達を調節しているが、一方で、これらの組織における腫瘍の発症病理にも関与している。我々は、下垂体前葉のプロラクチン産生(PRL)細胞の増殖に対するE2の作用について調べた結果、insulin-like growth factor-1(IGF-1)等の成長因子の存在下では、E2が細胞増殖を逆に抑制するという興味深い現象を見出した。E2の作用は核内受容体に結合することによるgenomicな機構を介して発現すると従来から考えられているが、最近E2の膜受容体を介した早いシグナル伝達がE2の作用発現の一端を担っていることが示唆されている。そこで我々は、E2の増殖抑制が核内受容体を介するものなのか、あるいは膜受容体を介する作用なのかを調べた。E2の核内受容体には作用せず膜受容体にのみ作用するBSA-conjugated E2は、IGF-1によるPRL細胞の増殖促進作用に影響を及ぼさなかった。一方、核内受容体に作用するdiethylstilbestrol(DES)は、IGF-1による増殖促進作用を抑制し、さらにE2依存性遺伝子発現をE2と同様に変化させた。また、E2の膜受容体の一つであるGpr30の特異的アゴニストとして知られるG1はIGF-1によるPRL細胞の増殖促進作用を、E2と同様に用量依存性に抑制したが、E2依存性遺伝子発現には影響しなかった。

以上の結果より、E2によるPRL細胞の増殖抑制は核内受容体を介したgenomicな機構によるものであること、またG1によるPRL細胞の増殖抑制はE2による増殖抑制作用とは異なるメカニズムによるものであることが示唆された。(利益相反 なし)



**P-14 乳児焦点移動性部分発作は SLC12A5 遺伝子の両アレル変異によるカリウム-クロライド共役担体 (KCC2) 機能の低下により引き起こされる**

○渡部美穂<sup>1</sup>, 秋田天平<sup>1</sup>, 才津浩智<sup>2</sup>, 松本直通<sup>3</sup>, 福田敦夫<sup>1</sup> (<sup>1</sup>浜松医科大学神経生理学講座, <sup>2</sup>浜松医科大学医学化学講座, <sup>3</sup>横浜市立大学大学院遺伝学教室)

乳児焦点移動性部分発作は乳幼児期に発症し, 脳波上, 発作波が多焦点性に移動するという特徴を持つ難治性てんかんで, 進行性の精神運動発達遅滞をきたす。今回, 乳児焦点移動性部分発作を発症した患者とその家族の遺伝子の全エクソーム解析を行ったところ, 父母からそれぞれ異なる変異型 KCC2 遺伝子を受け継ぐ患者 (複合ヘテロ接合体) 4 人が 3 家系で認められた (1 家系目 患者 1&2 (姉妹): p.E50\_Q93del と p.A191V), 2 家系目 患者 3: p.S323P と p.M415V, 3 家系目 患者 4: p.W318S と p.S748del)。KCC2 は Cl<sup>-</sup> を細胞外にくみ出すトランスポーターで, [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> を低く保ち GABA やグリシンによる抑制性伝達を維持している。患者 1&2 と 3 の KCC2 変異体の機能変化をグラミシジン穿孔パッチクランプ法により解析した結果, 患者は KCC2 機能が強く低下した変異体 (p.E50\_Q93del, p.M415V) とやや低下した変異体 (p.A191V, p.S323P) の 2 つを持つことがわかった。KCC2 変異体の細胞膜での分布や発現量には変化が認められなかった。以上の結果より, KCC2 の変異が乳児焦点移動性部分発作の発症に関わる原因遺伝子であり, 2 つの異なる機能低下を示す KCC2 の変異体を持つことで, GABA やグリシンによる抑制力が低下することがてんかん発症に関わることが示唆された。(利益相反 なし)

**P-15 K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> 共輸送体 (KCC2) の過剰発現は運動学習効率とシナプスリモデリングの増加を促進する**

○中村佳代<sup>1,2</sup>, 鍋倉淳一<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>生理学研究所生体恒常性発達研究部門, <sup>2</sup>総合研究大学院大学)

KCC2 は神経細胞の細胞内塩素濃度を制御するのに重要な役割を担う。発達期以降の脳では KCC2 の発現により  $\gamma$ -アミノ酪酸 (Gamma-aminobutyric acid<sub>A</sub>: GABA<sub>A</sub>) 受容体を介した入力の抑制性が獲得される。一方 KCC2 は塩素イオンの細胞外への汲み出し機能に関係なくスパイン構造変化に対する機能を有する。これまでに, KCC2 ノックアウトマウスの培養早期 (14 日) の神経細胞において幼若スパインであるフィロポディアが増加することや, 幼若期からの持続的な KCC2 の過剰発現により成熟期皮質第 2/3 層錐体細胞のスパイン数が増加することが示された。しかし生体において KCC2 発現によるシナプス構造変化に伴う行動への影響は不明である。そこで本研究では KCC2 過剰発

現においてロータロッドを用いた運動学習時のシナプス形成と消失率の影響を検討した。当研究室ではテトラサイクリン誘導システムを用いて神経細胞特異的に KCC2 遺伝子発現を誘導できる遺伝子改変マウスを作製した。運動野の錐体細胞のスパインはアデノ随伴ウイルスを用いて EGFP を発現させ 2 光子顕微鏡を用いて観察した。運動学習において KCC2 過剰発現マウスは野生型マウスに比べて早い学習獲得能と高い成功率を示した。KCC2 過剰発現マウスのスパイン密度は KCC2 の過剰発現に伴い増加しさらに運動学習早期のスパインターンオーバーは野生型マウスと比較し高い増加率を示した。この結果より KCC2 過剰発現マウスの早い運動学習効率には, スパイン密度とターンオーバー率の増加が寄与したことが示唆された。(利益相反 なし)

**P-16 ニューロンの興奮毒性に対するミクログリアの神経保護作用**

○稲田浩之<sup>1</sup>, 加藤 剛<sup>1,2</sup>, 鍋倉淳一<sup>1</sup> (<sup>1</sup>生理学研究所生体恒常性発達研究部門, <sup>2</sup>佐賀県医療センター・好生館・脊髄外科・外傷センター)

本研究は, 神経損傷時のミクログリアによる神経機能の修飾機構について検討を行った。ミクログリアが蛍光標識されている Iba-1 eGFP マウスから大脳皮質スライスを作製し, カレントクランプ記録及び経電極の蛍光色素注入を行い, 2 光子顕微鏡下でニューロン及びその周辺部に存在するミクログリア突起の経時的挙動変化を観察した。大脳皮質 2/3 層の錐体細胞に活動電位を頻回発生させると, 刺激の持続時間依存的な軸索の腫脹が生じ, これに相関してミクログリア突起の軸索への接触が認められた。薬理学的実験により, この走化性には容量依存性陰イオンチャネルより放出される ATP が直接的または間接的に誘因物質として関与している可能性が考えられた。また上記と同様の現象は樹状突起やその周辺部位では生じなかった。

ミクログリアの突起は軸索腫脹に伴い伸展するが, その際に腫脹変化を生じた軸索部位への集中的な接触や貪食を行い, その結果錐体細胞膜電位を過分極させ静息膜電位付近まで誘導する現象が認められた。また容量依存性陰イオンチャネルの阻害によりミクログリア突起の軸索への接触の減少が認められ, 過活動後の膜電位の上昇の持続により錐体細胞が細胞死に至る比率が増加した。これらの観察結果から, ニューロンの過活動に伴うミクログリアの軸索特異的な接触や貪食は, ニューロンの細胞体に対して傷害性ではなくむしろ保護的に働くことが示唆された。(利益相反なし)

#### P-17 小脳登上線維-プルキンエ細胞間シナプスの精緻化へのグリア細胞の関与

○菊地原沙織<sup>1,2</sup>, 杉尾翔太<sup>1,7</sup>, 稲村直子<sup>1,8</sup>, 渡辺雅彦<sup>3</sup>, 田中謙二<sup>4</sup>, 渡邊貴樹<sup>5</sup>, 狩野方伸<sup>5</sup>, 山崎良彦<sup>6</sup>, 池田一裕<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>生理学研究所分子神経生理研究部門, <sup>2</sup>総合研究大学院大学生命科学研究科, <sup>3</sup>北海道大学大学院医学研究科, <sup>4</sup>慶應義塾大学医学部, <sup>5</sup>東京大学大学院医学系研究科, <sup>6</sup>山形大学医学部, <sup>7</sup>群馬大学大学院医学研究科, <sup>8</sup>愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所病理学)

脳の可塑性にはシナプスの形成・刈り込み・維持の一連の過程(シナプスの精緻化)が深く関係している。近年、シナプスの精緻化にグリア細胞が関与することが示唆され、注目されている。我々は、シナプスの精緻化におけるアストロサイトの役割を調べるために、Mlc1 過剰発現マウス(以下、Mlc1OE マウス)が有用なモデルであることを見出した。なお、Mlc1 は白質脳症 MLC 病の原因遺伝子で、アストロサイト特異的に発現する。

本研究では、小脳のプルキンエ細胞(以下、PC)上のシナプスの精緻化に、小脳特異的なアストロサイト(バグマングリア、以下、BG)が与える影響を調べた。まず、Mlc1OE マウスでは BG の位置が異常になった。大多数の BG の細胞体はプルキンエ細胞層から分子層へ移動し、それらはプルキンエ細胞層側へは突起を伸ばしていなかった。続いて、登上線維(以下、CF)-PC 間のシナプスの精緻化について解析した。免疫染色の結果、Mlc1OE マウスでは CF シナプスの刈り込みおよび PC 樹状突起への移行が阻害されていた。Mlc1 過剰発現の時期を制御する実験から、CF-PC シナプスの精緻化の異常は、Mlc1 過剰発現そのものではなく BG の位置異常に由来することが示された。電気生理学的には Mlc1OE マウスには以下の異常が見られた。1) 発達の初期に PC へ複数本入力している CF が 1 本までに刈り込まれる過程の阻害。2) PC の活動電位低下。したがって、CF-PC シナプスの精緻化のためには BG がプルキンエ細胞層にあることが重要であると考えられる。(利益相反 なし)

#### P-18 最適方位が類似した視覚野錐体細胞における選択的な神経結合

○唐木智充<sup>1,3</sup>, 金 亮<sup>2</sup>, 尾藤晴彦<sup>2</sup>, 吉村由美子<sup>1,3</sup> (<sup>1</sup>総研大院, <sup>2</sup>東京大院, <sup>3</sup>生理学研究所視覚情報処理研究部門)

大脳皮質視覚野神経結合の層特異的な特性を明らかにする目的で、ラット視覚野の 2/3 層および 5 層において特定の方位に反応する錐体細胞間の神経結合を調べた。神経活動依存的な人工プロモーター (E-SARE) の制御下で蛍光蛋

白 Venus を発現する遺伝子をアデノ随伴ウイルスベクターにより一次視覚野に導入した後、覚醒状態で縦縞の視覚刺激を提示することにより縦縞に反応した細胞に Venus を発現させた。次に視覚野切片標本を作製し、2/3 層あるいは 5 層内の Venus 陽性ペアおよび Venus 陽性・陰性ペアから同時ホールセル記録を行い、神経結合の有無を調べた。2/3 層の Venus 陽性ペアの結合確率(34.5%)は、Venus 陽性・陰性ペア(14.3%)および Venus 標識していないコントロール(16.7%)の約 2 倍であった。この結果は、2/3 層の最適方位が類似する錐体細胞は選択的に神経結合することを示し、マウス視覚野での先行研究結果と一致した。5 層の Venus 陽性ペアの結合確率は 44.3% で、陽性・陰性ペア(26.8%)やコントロール(21.8%)に比して高かった。さらに 5 層錐体細胞では、同種の発火パターンを示す細胞間で結合が多く見られた。これらの結果から、視覚野 2/3 層および 5 層において最適方位が類似する錐体細胞は選択的に神経結合すること、5 層錐体細胞の結合は細胞タイプにも依存することが示唆された。(利益相反 なし)

#### P-19 サル海馬の神経活動-場所相関

○岡 祐太郎, 田村了以(富山大学大学院医学薬学研究科(医学)統合神経科学)

【背景と目的】海馬には、環境内の特定の場所を移動しているときに活動が増加するニューロン(場所細胞)が存在し、これら場所細胞の集団活動が空間認知地図の神経基盤であると考えられている。場所細胞に関する多くの知見はげっ歯類を用いた研究から得られている一方、自由行動下のサルの海馬からニューロン活動を記録し場所応答性を調べた研究はほとんどない。そこでわれわれは、歩行移動しているサルの海馬からニューロン活動を記録し場所応答性を検討した。

【方法】自由行動下で直線道路上を往復移動しているサルの海馬から、可動式テトロドを用いてニューロン活動を記録した。これら活動は記録波形に基づき単一ニューロン活動に分離後、自己相関解析と直線道路に沿った放電頻度マップ作製を行なった。

【結果と結論】放電頻度マップ上でサル自身の居場所に依存した応答性が見られる海馬ニューロン(場所応答細胞)があったが、自己相関解析ではそれらニューロンの活動に明確な周期性は認められなかった。サルの海馬にも場所応答細胞が存在したことから、霊長類でもこれらニューロンの集団活動が空間認知地図の神経基盤であると考えられる。一方、げっ歯類では最も明瞭に周期性徐波が観察される条件である歩行移動時にも、サルの海馬ニューロンは周期性活動を示さなかったことから、海馬における空間情報の符

号化様式は、霊長類とげっ歯類で異なる可能性がある。(利益相反 なし)

**P-20 NMDA 受容体拮抗薬ケタミンは課題遂行に不必要な情報に対する感度を上昇させる**

○須田悠紀<sup>1,2</sup>, 宇賀貴紀<sup>1,2</sup> (山梨大学・医・生理 1,  
<sup>2</sup>玉川大学脳科学研究所)

状況に応じて柔軟に判断することは、人の日常生活において必要不可欠な能力である。この適応的な判断能力は、NMDA 受容体拮抗薬ケタミンの低用量全身投与により低下することが知られているが、その神経メカニズムは明らかでない。我々は、サルを用いて、柔軟な判断が求められるタスクスイッチ課題をしている際の判断に関わる LIP 野神経活動が、低用量ケタミンの全身投与によりどのように変化するか調べた。

2頭のマカザルに、画面上に呈示されるドットの運動方向と奥行きをいずれかを弁別する課題を、注視点の色でランダムに切り替えさせるタスクスイッチ課題を訓練した。低用量ケタミン (0.25-0.5ml/kg) の全身投与により、判断に関わる LIP 野の活動が、タスクスイッチ課題時においてどのように変化するのか、単一神経細胞活動と局所フィールド電位 (LFP) から調べた。

その結果、運動方向弁別課題において、課題に関連していない奥行き情報に対する感度が、行動成績と LIP 野活動いずれにおいてもケタミン投与に伴って上昇した一方で、課題に関連した運動情報に対する感度は変化しなかった。これは、生理食塩水投与下においては観察できなかったことから、課題遂行に不必要な情報に対する感度が、ケタミン投与により上昇したことが考えられる。このことは、状

況に応じて柔軟に判断する能力は、NMDA 受容体を介した不必要な情報処理の感度調節に起因している可能性を示唆する。(利益相反 なし)

**P-21 触覚性注意における指選択性：脳磁図による検証**

○木田哲夫<sup>1</sup>, 田中絵実<sup>1</sup>, 柿木隆介<sup>1,2</sup> (生理学研究所  
統合生理研究部門, <sup>2</sup>総合研究大学院大学)

本研究では、触覚性注意における指選択性を明らかにすることを目的とした。被験者は 10 名の健常成人であった。被験者の右手の 5 本の指にリング電極を用いて電気刺激をランダム順に提示した。刺激波形は矩形波、持続時間は 0.2 ms、強度は感覚閾値の約 2.5 倍で痛みの無い程度、間隔は 750~1250ms のランダム (平均 1s)、提示順序もランダムとした。稀に (10% の確率で) 2 連発刺激を提示し、標的的刺激とした。被験者は第 2 指 (D2) もしくは第 4 指 (D4) またはその両方に注意を向け、注意を向けた指への標的刺激を数えるように指示された。刺激後 70ms 以内に出現する 1 次体性感覚野 (SI) の反応は注意による影響を受けるものと受けないものがあった。80ms 以降に出現する 2 次体性感覚野 (SII) の反応は、刺激した指に注意を向けたときに最も顕著に増大した。また、注意を向けた指に隣接する指への刺激に対する SII 反応もわずかに増大した。さらに、D2 と D4 に同時に注意したとき、中指 (D3) 刺激に対する SII 反応は低下した。以上より、触覚性注意には選択性があるが、空間的な勾配を持つこと、また、非隣接 2 指に同時に注意を向けたときには、中間の指からの非関連入力に対する反応は抑制されることが示唆された。(利益相反 なし)