

## 第98回近畿生理学談話会

日 時：2005年9月10日（土）  
場 所：滋賀医科大学看護学科棟  
当 番：滋賀医科大学生理学講座

2005年9月10日土曜日、滋賀医科大学看護学科棟第一および第四講義室に99人の参加者を迎え、第98回近畿生理学談話会を開催致しました。午前中は1会場、午後は2会場に分かれて合計37演題の口演発表が行なわれ、活発に質疑応答がなされました。午後の部の開始に先立ってミーティングを開き、評議員会での議論や主な話題が参加者全員に紹介されました。運営は若手中心の原則に従い、座長も大半を他大学の院生の方々に引き受けていただきました。この場をお借りして御協力に感謝いたします。（当番幹事 陣内・松浦）

### 1. ホ乳類蝸牛神経核に存在する Golgi cell の電気生理学的特性とムスカリンによる興奮性の修飾

入江智彦, 福井 巖, 大森治紀 (京大院・医・生理)

ホ乳類の背側蝸牛神経核 (DCN) では、主細胞は聴神経からの入力と体性感覚を中心とした入力を統合し下丘に投射する。この体性感覚を中心とした情報の入力は、granule cell の軸索である平行繊維により伝えられる。DCN の特徴は小脳とニューロン構成が類似している点であり、granule cell は抑制性の Golgi cell と相互にシナプスを形成する。小脳の Golgi cell は協調性運動の発現に必須であり、蝸牛神経核の Golgi cell も DCN の機能に大きな役割を果たしている可能性がある。しかし、Golgi cell は散在して分布しており、電気生理学的研究は殆ど行われていない。そこで Golgi cell が mGluR2 を発現することに着目し、このプロモーターで GFP を発現する遺伝子改変マウスを用いて、パッチクランプ法による生理学的研究を行った。

聴神経の電気刺激により誘発された EPSC は、一回の刺激に対してピークが複数回出現する特徴が見られた。また、形態学的実験により、コリン作動性ニューロンの終末が Golgi cell とシナプスを形成している可能性が示唆されたため、アセチルコリンのアゴニストを用いて薬理学実験を行った。その結果、Golgi cell はムスカリン性受容体を介して過分極が引き起こされることが分かった。ムスカリンで誘導される電流の電流-電圧曲線は内向き整流性を持ち、反転電位はほぼ  $E_K$  であった。これより、この応答には GIRK チャネルの関与が示唆された。

### 2. ニワトリにおける音圧差計算回路の細胞生理学的基盤

佐藤達雄, 福井 巖, 大森治紀 (京大・神経生物)

音源定位には音情報の両耳間時間差 (ITD)、両耳間音

圧差 (ILD) が重要である。鳥類では音情報は周波数ごとに時間経路と音圧経路が平行処理され、上位核で両耳音比較される。ITD 計算過程は様々な鳥類で *in vivo*, *in vitro* とも調べられてきたが、ILD 計算過程についてはメンフクロウを用いた *in vivo* 研究 (外側毛帯背側核後部: LLDp) に限られており、*in vitro* 知見は知られていない。

我々は麻醉下ニワトリの LLDp 核の単一細胞から記録をとった。対側音圧に応じて発火頻度は上昇し、同側音圧に応じて発火頻度が抑制されるので、ニワトリ LLDp 核においてもメンフクロウ同様、音圧差が計算されていることを明らかにした。

我々は最終的に音圧差計算の細胞生理学的基盤を解明することを目標としている。そこで、current clamp 法にて予備実験を行った。tonic な発火特性が LLDp 核の細胞膜の性質であり、注入電流量に応じて発火頻度が上昇した。

この膜特性にどのような興奮性・抑制性シナプスの特性が加わることで音圧差計算を可能とするのか今後明らかにしていきたい。

### 3. 両耳間時差情報に対するトリ層状核ニューロンの *in vivo* 応答

西野恵里, 久場博司, 船曳和雄, 大森治紀 (京都大・医・神経生物)

水平面における音源定位の一つの手がかりは、左右の耳に音が到達する時間差 (両耳間時差: ITD) である。鳥類では、両側の大細胞核で抽出された音の時間情報が層状核 (NL) に投射され、NL で ITD 情報が符号化される。

これまでに、我々は金属電極を用いて麻醉下のニワトリ NL 付近からフィールド電位 (ニューロフォニック電位: NP) を記録し、これが NL の興奮性シナプス後電流に由来することを明らかにした。

今回、ガラス管微小電極を使用することでNLから単一細胞記録を行い、ITD情報処理の詳細を調べた。NL細胞の活動は、刺激音に位相応答し、周波数特異性を示した。(最適周波数:BF) 両耳刺激を与えると、発火頻度はITDに応じて周期的に増減(山と谷)し、谷の発火頻度は片耳刺激時よりも低かった。さらに、強い刺激では、中～高周波数に特異的に応答する(BF $\geq$ 1kHz)細胞ではどのITDにおいても発火頻度が増加したのに対し、低周波数に特異的に応答する(BF<1kHz)細胞では、谷の発火頻度は増加しなかった。これらの結果は、NLにおいて何らかの抑制性機構が存在し、ITD検出精度を高めるのに役立っている可能性を示唆する。

#### 4. 層状核神経細胞における同時検出精度の向上

山田 玲, 久場博司, 石井孝広, 大森治紀(京都大学医学部生理学教室)

両耳に到達する音の時間差(ITD)は音源定位の手がかりである。鳥類においては層状核(NL)神経細胞が両側蝸牛神経核からのシナプス入力 of 同時検出器として働くことによりITDが検出される。NLにおける同時検出精度にはEPSPの時間経過が関わる事が知られている。以前我々はNLにおいて過分極で活性化する陽イオンチャンネル電流( $I_h$ )がノルアドレナリン(NA)によって修飾を受け電位依存性が脱分極側に移行することを示した。今回我々はNAによる $I_h$ 修飾の同時検出精度への効果を検討した。NAによりNL細胞は約5mV脱分極し、EPSPの時間経過の加速とそれに伴う同時検出精度の向上が観察された。通電による脱分極でも同様の効果が得られたこと、また $I_h$ の阻害剤の存在下ではこの脱分極は観察されないことから、静止膜電位での $I_h$ 活性の増加によって引き起こされる脱分極が同時検出精度の向上に重要であると考えられた。EPSPの時間経過の加速には、脱分極に伴うdendrotoxin感受性の電位依存性 $K^+$ チャンネル活性の増加が関わっていると考えられる。また脱分極にともない、活動電位の閾値の上昇と最大立ち上がり速度の減少も観察されることから、 $Na^+$ チャンネルの不活性化も同時検出精度の向上に関わる可能性が示唆された。

#### 5. 聴覚同時検出器細胞における受動的細胞体の意義

久場博司<sup>1</sup>, 山田 玲<sup>1</sup>, 福井 巖<sup>1</sup>, 出澤真理<sup>2</sup>, 大森治紀<sup>1</sup>(<sup>1</sup>京都大院・医・神経生物, <sup>2</sup>機能微細形態)

層状核(NL)神経細胞は両耳からのシナプス入力 of 同時検出器として働くことにより音源定位に関わる。NL細胞はNL内で特徴周波数(CF)毎に配列され、その形態及び細胞特性はCFに応じて異なる。これまで我々はニワ

トリを用いて、NLの高いCF(mid-high CF)の細胞が低いCF(low CF)の細胞に比べ、低閾値で活性化する $K^+$ チャンネル( $K_v1.2$ )を多く発現することによりEPSPを加速し、同時検出の精度を向上していることを明らかにした。一方、NLのmid-high CF細胞では活動電位の振幅が小さく(約20 mV)、かつ軸索起始部がミエリンで覆われていることから、NL細胞は活動電位を発生する過程もCF毎に特殊化している可能性が示唆される。今回、我々は電気生理学的及び組織学的手法を用いてNL細胞の活動電位発生様式を調べた。その結果、NLのmid-high CF細胞では $Na^+$ チャンネルが軸索の細胞体から離れた部位(約20  $\mu$ m)に分布し、細胞体は受動的であることが明らかとなった。さらに、mid-high CF細胞では高頻度入力に対する応答特性が向上していた。つまり、NL細胞は細胞体での情報の統合を効率的に行うために、細胞体を受動的にしていると考えられた。

#### 6. 下丘内での局所回路の形態学的、電気生理学的解析

小野宗範, 大森治紀(京都大学医学部神経生物学教室)

下丘は、中脳に存在し、上位下位聴覚伝導路からの入力を受け、それらの統合的処理を行う神経核である。下丘における情報処理過程において、下丘内で形成される複雑な局所回路が重要な役割を果たしていることが予想されているが、その詳細は未だ明らかでない。我々は、下丘内の様々な部位にトレーサーを、微量注入することによって、下丘同側内で形成される局所回路および、対側との間で形成される投射パターンを解析した。また、GAD67に対する免疫染色を組み合わせることで、GABA作動性神経と非GABA作動性神経それぞれの局所回路形成パターンを解析した。その結果、下丘中心核と下丘皮質では、1) 同周波数の情報を受けると考えられているlaminae構造内で強い結合関係を形成しており、対側下丘と対称的な投射関係を持つこと、2) 対側下丘との投射回路を形成する神経細胞は、主に非GABA作動性神経であることが明らかとなった。一方、1) 下丘皮質は皮質内で強い結合関係を持ち、2) 対側投射回路には、中心核に比較してより多くのGABA作動性神経が含まれることが明らかとなった。さらに、トレーサー注入によって得られた下丘局所回路の形態学的情報をもとに、それらを形成する神経細胞の電気生理学的性質を、ホールセルパッチクランプ法を用いて研究した。

#### 7. 無呼吸負荷による蝸牛内直流電位の低下は $Ca^{2+}$ チャンネル阻害剤により抑制される

二村吉継<sup>1,2</sup>, 森 禎章<sup>1</sup>, 崇 樹<sup>2</sup>, 山路純子<sup>1</sup>, 吉田龍

太郎<sup>1</sup>, 竹中 洋<sup>2</sup>, 窪田隆裕<sup>1</sup> (<sup>1</sup>大阪医科大学第二生理, <sup>2</sup>同耳鼻咽喉科)

目的: 蝸牛内リンパ腔は+80 mV程度の蝸牛内直流電位(EP)を有しているが, その発生メカニズムは未だ確定していない。本研究ではCa<sup>2+</sup>キレート剤およびCa<sup>2+</sup>チャネル阻害剤を用いて, EPの発生に対するCa<sup>2+</sup>の役割を検討した。

方法: EP測定用およびCa<sup>2+</sup>測定用電極は, モルモット蝸牛第2回転より経血管条的に内リンパ腔に刺入した。また, 薬剤は灌流用ピペットを用いて, 内リンパ腔または外リンパ腔に灌流した。

結果: コントロール条件および無呼吸負荷時にはEPと内リンパ液のCa<sup>2+</sup>濃度([Ca]<sub>i</sub>)の対数値との間に相関が認められたが, EGTA溶液の内リンパ灌流により[Ca]<sub>i</sub>を低下させてもEPは殆ど変化しなかった。しかし, EGTA-AM溶液を内リンパ腔に灌流するとEPは軽度上昇し, 無呼吸負荷によるEPの低下が抑制された。一方, EGTA-AM溶液を外リンパ腔に灌流しても, EPの上昇は認められなかった。さらに, ニフェジピンを内リンパ腔に投与すると, 無呼吸負荷によるEPの低下は抑制された。

結論: EPの発生には, 内リンパ腔に直接面した細胞の細胞内Ca<sup>2+</sup>が重要な役割を担っているものと思われた。

## 8. 線条体における長時間持続するCa<sup>2+</sup>振動の発生機構と大脳皮質の影響

小山内 実, 山田尚宏, 大星文人, 八木哲也 (大阪大学大学院工学研究科)

大脳皮質から線条体への投射は, 大脳皮質-基底核ループの中で主要な情報の入力経路である。我々は, 大脳皮質付きのラット線条体スライスに対してCa<sup>2+</sup>蛍光指示薬を用いた多細胞Ca<sup>2+</sup>イメージングを行った。その結果, 大脳皮質-線条体スライス中の線条体の細胞において, 数秒から数百秒持続する自発的な細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)上昇(振動)が観測された。この[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>振動は, 細胞外のCa<sup>2+</sup>を除去した場合でも多くの細胞で観測され, 小胞体のCa<sup>2+</sup>ポンプを阻害した結果, 多くの細胞で観測されなかったことから, 主に小胞体由来のCa<sup>2+</sup>によるものであることが分かった。また活動電位の阻害や, イオンチャネル型グルタミン酸受容体の阻害により, この[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>振動は抑制されなかった。次にこの[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>振動への大脳皮質-線条体投射の関与を調べるために, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>振動の規則性(周期性)を解析したところ, 大脳皮質を取り除いた線条体スライスの方が, 大脳皮質付きの線条体スライスよりも, 振動の周期性が高くなる傾向が見られた。このことから, 大脳皮質-線条体投射が, 線条体における[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>振動に何ら

かの影響を与えていると考えられる。

## 9. シナプス伝達長期抑圧の誘導に関わるカルシウムシグナリング

宇田川理恵, 中野真人, 加藤伸郎 (京都大学・医学研究科・認知行動脳科学)

長期抑圧はシナプス可塑性の一種であり, ある特定の神経活動後にシナプス伝達効率が長期間に渡って減弱する現象である。海馬CA1領域のシナプスでは, この長期抑圧の誘導に後シナプス細胞内のカルシウム濃度の上昇が必要である。カルシウムは神経活動にともなって複数の経路より細胞内へ流入するが, それぞれの経路は長期抑圧誘導に関して固有の役割を果たしていると考えられる。今回, 我々は幼若ラットの海馬スライス標本を用いて, 細胞外カルシウムの主な流入口である, NMDA受容体, T型カルシウムチャンネル, L型カルシウムチャンネルのそれぞれの長期抑圧誘導における役割について検討した。900回の刺激を0.5, 1, 2 Hzの頻度で施したところ周波数依存的な長期抑圧の誘導が観察され, また全ての刺激周波数でNMDA受容体依存性であった。一方T型カルシウムチャンネルの遮断では長期抑圧の誘導に通常条件との差が見られなかったことから, 長期抑圧の誘導に関与していないことが考えられた。L型カルシウムチャンネルは, その遮断, 促進ともに低シナプス活動性条件で長期抑圧の減弱化を招いたことから, シナプス伝達効率変化を安定化させる働きがあるのではないかと推測された。

## 10. Homer1a発現は海馬可塑性を後シナプス性に調節する

植田禎史<sup>1</sup>, 杉浦重樹<sup>2</sup>, 井ノ口 馨<sup>3</sup>, 加藤伸郎<sup>1</sup> (<sup>1</sup>京都大学・医・認知行動脳科学, <sup>2</sup>奈良医大・総合研究施設部, <sup>3</sup>三菱化学生命科学研究所)

シナプスは, その活動に依存して伝達効率が長期的に増強(LTP)あるいは減衰(LTD)される性質(シナプス可塑性)を持っており, これは一般には学習や記憶のモデルだと考えられている。しかし, その分子機構にはまだ不明の点が多く, 実際に学習や記憶の本質であるのかという点も解決されていない。

神経細胞がシナプス可塑性を導入するような入力を受けると, シナプス後側の細胞において極初期遺伝子の一群が速やかに一過的に発現誘導される。そのようにして発現する分子の中で, 我々はHomer1aという蛋白質に注目して研究を進めている。Homer1aはPSDで恒常的に発現するアダプター蛋白質であるHomer1b/cに対して競合阻害的に働いてPSDの再構成に関わる。我々がHomer1a蛋白質

を直接注入して海馬CA1錐体細胞のLTPおよびLTDを調べた結果、これらの可塑性変化の誘導自体には変化がなかったが、その後の発現維持が時間依存的に損なわれていた。この結果を踏まえ、極初期遺伝子Homer1a発現を通して見た活動依存的なシナプス可塑性の調節機構について議論したい。

#### 11. RIP-1/2ダブルノックアウトマウスの大脳皮質錐体細胞における抑制性シナプス後電流の特性

小川丈夫<sup>1</sup>、小林真之<sup>1</sup>、平田雅人<sup>2</sup>、姜 英男<sup>1</sup> ( <sup>1</sup> 大阪大学・歯・高次脳口腔機能、<sup>2</sup> 九大院・歯・口腔常態制御)

新規Ins (1,4,5) P<sub>3</sub>結合性蛋白質であるPRIP-1/2は、GABA<sub>A</sub>受容体 (GABA<sub>A</sub>R) の膜輸送に関係するとされる分子GABARAPに結合し、GABA<sub>A</sub>R発現量を抑制すると考えられている。しかし、同蛋白質の遺伝子をダブルノックアウトしたマウス (DKO-M) で発現するGABA<sub>A</sub>Rの性質については不明である。そこで、生後2~3週齢の野生型マウス (WT-M) 及びDKO-Mの大脳皮質一次体性感覚野薄切標本 (300 μm厚) を用い、皮質II/III層錐体細胞からホールセル記録を行い、抑制性シナプス後電流 (IPSC) を観察した。GluR阻害薬及びTTX存在下での微小IPSC (mIPSC) の発生頻度、平均振幅及び10-90%立上り時間はWT-MとDKO-M間で有意差は認められなかったが、50%持続時間はDKO-Mで有意に短かった。一方、DKO-Mの細胞にGABAをパフ投与して誘発される電流の振幅はWT-Mに比して有意に大きく、10-90%立上り時間と50%持続時間は有意に短かった。以上の結果から、DKOマウスではGABA<sub>A</sub>Rが過剰発現し、その性質が変異している可能性が示唆された。

#### 12. 脈絡膜上一経網膜刺激で生じる網膜興奮の広がり の評価

神田寛行<sup>2,4</sup>、三好智満<sup>1</sup>、森本 壮<sup>2</sup>、不二門 尚<sup>2</sup>、田野保雄<sup>3</sup>、澤井 元<sup>1</sup> ( <sup>1</sup> 大阪大学大学院医学系研究科システム生理学、<sup>2</sup> 感覚機能形成学、<sup>3</sup> 眼科学、<sup>4</sup> (株) ニデック人工視覚研究所)

我々は人工視覚用の網膜電気刺激手法として脈絡膜上一経網膜刺激 (STS) を考案した。人工視覚の質に大きな影響を与える、STSによる網膜の興奮の限局性について昨年の本会で報告したが、刺激電極近傍のデータが少なかつたため、今回データを増やしその詳細な評価を報告する成ネコの眼球後極部の強膜閉塞部に設置した白金製刺激電極 (φ 0.1 mm) と硝子体中に刺入した不関電極を通じて、単発のSTS (二双性矩形波、パルス幅0.5 ms) を網膜へ与えた。同側の外側膝状体背側核A1層の中継細胞より細胞外

ユニット活動を記録し、STSによるスパイク応答の出現率を計測した。ユニットの受容野と網膜の電極設置部位の間の距離と、STSによるスパイクの出現率との関係を調べると、刺激電流が下がるにつれて、出現率の高いユニットが電極設置部位に近い場所に限局する傾向が認められた。刺激強度150 μAでの興奮の範囲は、スパイク出現率に対する半値幅で視野角3.6度までに限局した。これはヒトの視野角の約2.7度に相当する。従って、供給可能かつ安全な範囲内の電流強度のSTSにより、限局した光覚が誘発される可能性を示唆している。

#### 13. ネコ外側膝状体と一次視覚野における刺激空間周波数に依存した受容野サイズの変化

尾崎弘展<sup>1</sup>、定金 理<sup>2</sup>、内藤智之<sup>2</sup>、岡本正博<sup>3</sup>、佐藤宏道<sup>2</sup> ( <sup>1</sup> 大阪大学医学部、<sup>2</sup> 大阪大学大学院医学系研究科、<sup>3</sup> 生命機能研究科)

一次視覚野 (V1) ニューロンでは、刺激コントラストに依存して空間周波数 (SF) 選択性が変化することが知られている (Sceniak et al. 2002)。我々は麻酔非動化したネコV1ニューロンの細胞外記録を行い、刺激サイズと反応のSF選択性の関係を調べた (N=63)。その結果、多くの細胞で刺激サイズの増大に伴いSFチューニングがシャープになった。さらに様々な刺激SFにおけるサイズチューニングカーブから、多くの細胞で高SF刺激時には受容野サイズの縮小と受容野周辺抑制の増強が生じることが明らかとなった。同様の現象は、外側膝状体 (LGN) においても観察された (N=30)。これらの結果は、高SF刺激時にV1で生じる受容野サイズ縮小と周辺抑制の増強に、LGNにおけるそれが寄与していることを示唆する。またこの現象は、視覚情報処理システムが視野内の刺激配置に応じて動的に情報処理特性を変化させるメカニズムを反映していると考えられる。即ち、視覚情報の持つSF特性に応じて、高SF情報に対しては局所・高選択的フィルターを、低SF情報に対しては広域・低選択的フィルターを使い分けている可能性が示唆された。

#### 14. ネコ初期視覚系における刺激の時間周波数に依存した受容野サイズの変化

定金 理<sup>1</sup>、尾崎弘展<sup>2</sup>、内藤智之<sup>1</sup>、岡本正博<sup>3</sup>、佐藤宏道<sup>1</sup> ( <sup>1</sup> 大阪大学医学系研究科、<sup>2</sup> 医学部、<sup>3</sup> 生命機能研究科)

大脳皮質一次視覚野 (V1) ニューロンの受容野サイズは従来考えられてきたように固定されたものではなく、刺激コントラストや空間周波数などのパラメータに依存して変化する (e.g., 刺激コントラスト, Sceniak et al. 1999; 空間周波数, 尾崎他, 2005)。今回我々は、正弦波編刺激

の時間周波数 (Temporal frequency, TF) が受容野サイズに与える影響を検討した。麻醉非動化したネコ V1 ニューロン (N = 52) において、様々な TF 条件下における刺激サイズチューニングを調べた結果、低 TF 条件と比較して高 TF 条件の場合には周辺抑制が減少し、最適刺激サイズが拡大する傾向が観察された。刺激サイズを固定して TF チューニングカーブを得た場合、小サイズ条件に比較して大サイズ条件ではチューニングカーブがブロードになり、より高い TF の刺激に対しても応答を示した。同様の傾向は外側膝状体ニューロン (N = 28) においても観察された。これらの結果は、詳細かつ変化速度の小さい情報と大まかで変化の速い情報を初期視覚系の単一ニューロンレベルで、ダイナミックに処理し分けていることを示唆する。

### 15. ネコ LGN 細胞における方位選択性

内藤智之<sup>1</sup>, 定金 理<sup>1</sup>, 岡本正博<sup>2</sup>, 尾崎弘展<sup>3</sup>, 佐藤宏道<sup>1</sup> (<sup>1</sup>大阪大学大学院医学系研究科, <sup>2</sup>生命機能研究科, <sup>3</sup>医学部)

ネコおよび霊長類の視覚情報伝達経路において、最初に方位選択性が生じるのは1次視覚野 (V1) であると考えられている (Hubel and Wiesel, 1962)。我々は麻醉非動化したネコ外側膝状体 (LGN) ニューロンから細胞外記録を行い、LGN ニューロンにおける方位選択性について検討した。視覚刺激として正弦波グレーティング刺激を用いた。記録ニューロンの最適空間周波数 (SF), 最適刺激サイズだけでなく、カットオフ値付近の高SFおよび、受容野周辺抑制の程度がプラトー状態となる大きな刺激サイズについて方位選択性を検討した。記録した21個のLGNニューロンのうち19個が高SFで大きなサイズの刺激に対して有意な方位選択性を示した。これらの細胞の内、最適SF・刺激サイズで方位選択性を示した細胞は3つであった。LGN 受容野を2つのガウス関数の差分で近似して、刺激方位選択性に対するシミュレーションを行った結果、LGN 受容野が真円ではなく1.2程度の縦横比をもつと高SF刺激に対して方位選択性が生じることが明らかになった。LGN でみられる方位選択性がV1の方位選択性形成にどのような役割を果たすのかを今後検討していく。

### 16. 視覚野における逆向き眼優位可塑性の年齢依存性

阪本広志<sup>1,2</sup>, 森島 佑<sup>2</sup>, 畠 義郎<sup>3</sup> (<sup>1</sup>大阪大学大学院生命機能研究科, <sup>2</sup>鳥取大学医学部生命科学科, <sup>3</sup>鳥取大学大学院医学系研究科)

生後発達期のネコに片眼遮蔽を行うと、大脳皮質視覚野のニューロンは両眼反応性を失い、健常眼にのみ反応する

ようになる (眼優位性シフト)。しかし抑制性伝達物質 GABA の A 型受容体作動薬 Muscimol を長期投与し、視覚野ニューロン活動を抑制した状態で片眼遮蔽を行うと、遮蔽眼により強く反応するようになる (逆向き眼優位性シフト)。

片眼遮蔽による通常の眼優位性シフトは生後発達期特有の現象である。この年齢依存性が逆向きのシフトにも見られるかどうかを調べるため、成熟ネコの一次視覚野に Muscimol を投与し片眼遮蔽を行って逆向きのシフトが起こるかを調べた。

その結果、成熟期一次視覚野においては逆向きのシフトは見られず、同様に通常の眼優位性シフトも見られなかった。このことから Muscimol による逆向きの眼優位性シフトは通常の眼優位性シフトと同様に、発達期に働く可塑性メカニズムによる現象である事が示された。

### 17. IP3 受容体は 5-10Hz の集成的膜電位振動及び発火の維持に必要である

山本 亮, 後藤史子, 加藤伸郎 (京都大学医学研究科認知行動脳科学)

ラット視覚野スライス標本にフィールド電位記録とパッチクランプ記録を適用して、II/III 層の錐体細胞における 10Hz 前後の集成的電気活動 (膜電位振動及び発火) の導入や維持に必要な因子について調べた。この周期的な活動はスライスにおいては、1) 低マグネシウム外液、2) GABA 受容体ブロック、3) カフェイン投与の各条件でそれぞれ起こる。1), 2), 3) の条件で起こる活動は NMDA 受容体をブロックすることで消失し、AMPA 受容体をブロックすることで消失する。この3種類の条件下で起こる周期的活動は共に IP3 受容体をブロックすることによりその周期性を失った。ところが、細胞内のカルシウムストア・容量性カルシウム流入のいずれもこの周期的活動の維持に必要なではなかった。また IP3 産生系の関与を調べるために、mGluR, mAChR, PLC をそれぞれ抑制したが周期的活動への影響は少なかった。これらのことから IP3 受容体は 10Hz の集成的電気活動 (膜電位振動及び発火) がその周期性を維持するために必要であると推察される。ここで IP3 受容体は、従来知られているようなカルシウム放出経路としてではなく、別な働き方をしている可能性が示唆される。

### 18. 静止物体の提示時間と周辺視力の関係

平山幸人<sup>1</sup>, 山下勝幸<sup>2</sup>, 和田佳郎<sup>2</sup> (<sup>1</sup>中部大・大学院, <sup>2</sup>奈良医大・第一生理)

高速運動物体に対する動体視力と頭部-眼球協調運動の

関係についての実験の中で、retinal errorが大きくても動体視力が良好な場面が多く見られた。これは、わずかな提示時間であっても周辺視力が動体視力に大きく寄与していることを示唆しているが、その詳細はよくわかっていない。そこで今回、静止物体の提示時間と周辺視力の関係について検討した。実験は6人の被験者を対象とし、頭部をCRTモニタの正面(0 deg)から56 cmの距離に固定した状態で正面に表示したspotを注視させ、ビーブ音の2秒後に提示した視角0.6 degの数字(1~9)を回答させた。数字の提示時間は10, 20, 40, 80 msの4種類、提示位置は左右15 degの間に2.5 deg間隔で設定した13ヶ所とした。数字はランダムな位置に提示し、各条件20トライアルおこなった。いずれの提示時間においても $\pm 2.5$  deg以内ではほぼ100%の正答率であったが、提示時間が短く、提示位置が周辺になるにしたがって正答率は低下した。しかし、10 msという非常に短い提示時間においても、 $\pm 10$  degで約45%という高い正答率を示し、 $\pm 15$  degでも約15%の正答率であった。

#### 19. 動体視力トレーニング 1. 動体視力スコアの変化

菅生貴仁<sup>1</sup>、松田昌之<sup>1</sup>、小堤隆広<sup>1</sup>、平山幸人<sup>2</sup>、山下勝幸<sup>3</sup>、和田佳郎<sup>3</sup> (<sup>1</sup>奈良医大・医学部3年、<sup>2</sup>中部大・大学院、<sup>3</sup>奈良医大・第一生理)

能動的頭部運動中の動体視力の特性を検討する目的で、以下の2つの実験をおこなった。まず、健常成人84人を対象に、CRTモニター上を右方向に等速運動(30, 60, 90, 120 deg/s)しながらランダムな順序で変化する3つの数字(1~9)を、頭部静止(Stationary条件)、右回転(Ipsi条件)、左回転(Contra条件)条件にて読ませ、その正答数を動体視力スコア(3数字 $\times$ 20回=60満点)として評価した。結果より、動体視力スコアは数字の速度が速くなるほど低下する傾向を示したが、頭部条件による差は認められなかった。次に、右方向90 deg/sの数字を、頭部を右回転(Ipsiトレーニング群、3人)、左回転(Contraトレーニング群、3人)しながら追わせるトレーニングを2週間(100回/日)実施し、トレーニング前、中、後のIpsi条件、Contra条件における動体視力スコアを測定した。6人の動体視力スコアの伸びについてみると、トレーニング前後ではIpsi条件(39.3 $\rightarrow$ 48.8)とContra条件(36.8 $\rightarrow$ 48.2)で差はなかったが、Ipsi条件ではトレーニング開始直後から大きく上昇、Contra条件ではゆっくり直線的に上昇というtime courseの違いが認められた。また、Ipsi条件ではIpsiトレーニング群、Contra条件ではContraトレーニング群のスコアの伸びがより大きいというトレーニング効果が認められた。

#### 20. 動体視力トレーニング 2. 頭部—眼球運動パターンの変化

宮前誠亮<sup>1</sup>、平賀 俊<sup>1</sup>、堀中昭良<sup>1</sup>、平山幸人<sup>2</sup>、山下勝幸<sup>3</sup>、和田佳郎<sup>3</sup> (<sup>1</sup>奈良医大・医学部3年、<sup>2</sup>中部大・大学院、<sup>3</sup>奈良医大・第一生理)

健常成人6人を対象に、CRTモニター上を右方向90 deg/sで等速運動する3つの数字を右方向に頭部回転しながら読ませるIpsi条件トレーニングを2週間(100回/日)実施し、動体視力スコアと同時に頭部回転(ポテンシオメータ、ジャイロ)および眼球運動(角膜反射法)を経時的に測定した。頭部回転の大きさやタイミングは、数字が読みやすくなるよう各自の自由に任せた。トレーニング前には、いずれの被験者も右方向の頭部回転によって誘発される左方向の前庭動眼反射(VOR)が右方向のgaze(=頭部+眼球)を抑え、retinal errorやslipを大きくなることにより動体視力を低下させた。トレーニングが進むにつれて右方向のgazeを大きくする方向で頭部—眼球運動が変化したが、そのパターンは被験者により異なった。ある被験者は、トレーニングにより右方向の頭部回転を小さくし、左方向のVORを抑制する戦略をとった。別の被験者は、右方向の頭部回転を大きくかつ時間的に早く開始し、数字提示時期には頭部回転を減速し角加速度を左方向に逆転させることによって、右方向のVORを誘発する戦略をとった。今後、各被験者の頭部—眼球運動パターンを詳細に解析することにより、動体視力とVOR、pursuitとの関係を明らかにしていく予定である。

#### 21. サル7野の運動性および意欲依存性の活動

玄番央恵、中尾和子、松崎竜一、雨夜勇作(関西医科大学・生理学第二講座)

サルを訓練して自発性に手によるレバー上げ運動を行わせて7野を含む多くの大脳皮質の表面と2.0-3.0 mm深部に電極を埋め込み、大脳皮質電場電位を記録したが、その際レバーに荷重(最大400 g)をかけた。既に報告しているように、運動に約1 s先行する表面陰性—深部陽性の運動準備電位が運動前野、運動野、体性感覚野、5野および7野に出現した。5野および7野の運動準備電位は、運動前野、運動野および体性感覚野と同様(Brain Res., 197: 415-423)、荷重の増加と共に増大した。これは荷重に対する頭頂連合野の予測制御を示唆する。さらにサルがレバー上げ運動を視覚刺激に応じて行えるようになるまでの学習期間中、大脳電場電位を記録した。学習早期、左前頭前野に認知学習—関連性の表面陰性—深部陽性電位の出現後、左7野に表面陰性—深部陽性電位が出現し、学習の進展と共に増大した。その左7野の電位の生理的意義を調べるた

め、運動習熟後の左7野の電位振幅と反応時間の関係を検討した。その結果、電位振幅と反応時間の間には負の関係が見られ、各記録日の第1セッションは電位振幅が大きく反応時間は短い、振幅の減少と共に反応時間が延びた。これは7野に意欲依存性活動のあることを示唆する。

## 22. サルの追従眼球運動の基盤となる運動検出機構

松浦清人, 三浦健一郎, 瀧 正勝, 田端宏充, 稲場直子, 河野憲二, Frederick A. Miles (京都大学医学研究科)

追従眼球運動 (OFR) は広い視野全体が突然動くことによって誘発される、短潜時の眼球運動である。最近、Sheligaらは矩形波からその基本周波数成分を差し引いた波 (mf 縞) の仮現運動刺激を用いて、ヒトの OFR の特性が時空間視覚フィルターを使って説明できることを示した。今回、我々は2種類の仮現運動刺激 (mf 刺激, 3f4f 刺激) を用いて、サルの OFR を計測した。mf 刺激とは振幅が1/3, 1/5, …と減少していく奇数調波 (3f, 5f, …) から構成される波を基本周期の1/4ずつ移動させる刺激である。3f4f 刺激とは基本周期の3倍 (3f) と4倍 (4f) の周期の振幅の等しい波を足して得られる波を基本周期の1/4ずつ移動させる刺激である。これらの刺激は共に刺激の動く方向と最も影響力のある3f要素の動く方向が逆であるという特徴がある。計測の結果、サルの OFR はヒトと同様に刺激の動く方向とは反対の方向、即ち3f要素の動く方向に起きていることが分かった。この結果はヒトとサルは似通った運動検出機構を用いて OFR を起こしていることを示唆しており、サルはヒトの OFR を研究するのに適したモデル動物だと言える。

## 23. 空間内の動きは MST 野においてどのように表現されるか

稲場直子, 河野憲二 (京都大・医・認知行動脳科学, 産総研・脳神経)

我々が空間内で動いている視標を眼で追いかけているとき、背景にある物体が空間内で静止していても、その網膜像は眼球の動きと反対方向に動く。しかし我々は、その物体が空間内で静止していることを正しく知覚することができる。このことから、脳は、眼球運動によってもたらされる網膜像の動きから、空間内で実際に起きている動きを再構築して知覚するメカニズムを有していると考えられる。我々は、視覚世界が脳内でどのように再構成されるかを明らかにすることを目的とし、追跡眼球運動遂行中のサルの MT 野および MST 野から単一ニューロン活動を記録した。固視中と追跡眼球運動遂行中に全く同様の網膜像の動きを生じさせ、網膜像の動きに対するニューロンの応答を解析

した。その結果、MTニューロンの多くは、眼球運動の違いに関らず常に網膜座標上の刺激速度に応答した。一方、ほとんどの MSTニューロンは、網膜座標上の像の動きではなく、絶対空間内での視覚刺激の速度に応答することが明らかとなった。これまでの研究から、MT野から MST野へは直接の投射があることが知られている。したがって、本研究により、網膜座標から絶対空間座標への座標変換は、MT野から MST野への情報伝達の間起こっている可能性が示唆された。

## 24. 心筋細胞内 Na<sup>+</sup> 濃度の刺激頻度依存性変化のメカニズム, モデル考察

野間昭典, 竹内綾子, 寺島啓介, 皿井伸明 (京都大学医学研究科・細胞機能制御学)

我々は心筋細胞の電気的、機械的活動を ATP の産生と消費のバランスも含めて包括的に考察できる心筋細胞モデル (Kyoto モデル) を開発している。刺激頻度を 2.5Hz から上昇させたとき、活動電位に伴って L 型 Ca<sup>2+</sup> チャネルを介する Ca<sup>2+</sup> 流入が増え、Na/Ca 交換機転を通じて細胞内 Na<sup>+</sup> 濃度の上昇をもたらすと考えられるにも関わらず、これまでの Kyoto モデルでは細胞内 Na<sup>+</sup> 濃度は減少した。これは刺激頻度依存性に細胞内 Na<sup>+</sup> 濃度が上昇するというこれまでの実験報告に反する。この原因は、刺激頻度が上昇すると活動電位が占める時間が相対的に増大するが、プラトー相では電位依存性に Na/K ポンプ回転率が上昇することと非選択性陽イオンチャネルを介する Na<sup>+</sup> 流入が減少するためであることが解った。そこで、これ等の因子を変化した際の定常状態細胞内 Na<sup>+</sup> 濃度変化と収縮変化を含めた細胞活動を系統的に調査し、パラメータを最適化した。非選択性陽イオンチャネルの調節は細胞容積調節のシミュレーションにも必要であった。以上のモデル考察により、実験的に求めることが困難な背景電流の妥当な値を推測し、Na<sup>+</sup> 濃度変化のメカニズムを明らかにすることができた。

## 25. 心筋細胞モデル (Kyoto model) と循環モデルとの連成シミュレーションによる心臓力学・エネルギー解析

高畑隆之<sup>1</sup>, 皿井伸明<sup>2</sup>, 松岡 達<sup>2</sup>, 野間昭典<sup>2</sup> (1シスメックス株式会社, 2京都大学大学院医学研究科)

心機能の評価法として収縮末期圧容積面積 (PVA) は心臓標本の1心拍あたりの総機械的エネルギーと相関が高く、また酸素消費量と比例関係にあることが知られている。犬などのモデル動物のみならず、拡張型心筋症や心筋梗塞症患者における検討も行われ有用性が報告されている。このような指標について、心筋細胞モデル (Kyoto Model)

を組み込んだ循環モデルを使って検討を行った。この循環モデルはKyoto Modelによって心筋収縮が計算される球状の仮想心臓と前負荷・後負荷を表すコンポーネントで構成される。Kyoto Modelによって心筋収縮時に消費されるATP量、つまり興奮収縮連関における総Ca<sup>2+</sup>ハンドリングに要する心筋酸素消費量 (V<sub>o2</sub>) を定量的に推定することができ、また組み合わせた循環モデルにより心臓の総機械エネルギー、PVAを同時に計算することができる。この循環モデルについて心力学的検討を行い報告する。

## 26. The role of titin in the Frank-Starling law—a simulation study

Natalie Schneider<sup>1</sup>, Takao Shimayoshi<sup>2</sup>, Akira Amano<sup>3</sup>, Tetsuya Matsuda<sup>3</sup>, and Akinori Noma<sup>4</sup> (Kyoto Univ. Group in Leading Project for Biosimulation, <sup>2</sup>ASTEM RI/Kyoto, <sup>3</sup>Dept. Systems Sci., Grad. Sch. Informatics and <sup>4</sup>Dept. Physiol. Biophys., Grad. Sch. Med., Kyoto Univ.)

A new cardiac muscle contraction model has been developed that combines crossbridge mechanical elements with a seven state Ca<sup>2+</sup> activation and crossbridge kinetics part, aiming for a simple model with molecular mechanisms correctly modelled in a microscopic level. This is the first myocyte contraction model that introduces experimental data of titin-based passive tension to account for the sarcomere length (SL) dependent Ca<sup>2+</sup> sensitivity. Using this model, hypotheses concerning the mechanism underlying the Frank-Starling effect have been tested. Simulation results show that (1) interfilament lattice spacing modulation by a radial titin-based force is sufficient to account for a steep length-tension relationship and a SL dependent Ca<sup>2+</sup> sensitivity, (2) lattice spacing changes affect the weak crossbridge formation rate and not the force generating step and (3) the Hill coefficient is SL dependent.

## 27. HCN4 プロモーター制御下で GFP を発現するトランスジェニックマウスの作製

中島則行, 石井孝広, 大森治紀 (京都大学医学部生理学教室)

過分極により活性化される陽イオンチャネル (HCN チャネル) は、心臓や脳での自発的な周期的発火など、生体内において様々な役割を担っていると考えられているが解明されていない部分も多い。4つあるサブタイプの一つである HCN4 遺伝子の5'非翻訳領域に、大腸菌テトラサイクリン耐性オペロンの転写調節に働く Tet リプレッサータン

パク質をコードする DNA 配列を相同組換えで挿入し、HCN4 のプロモーターで Tet リプレッサータンパク質を発現するトランスジェニックマウスを作製した。Tet オペレーター配列の制御下で GFP を発現する別のトランスジェニックマウスとかけ合わせることにより、HCN4 を発現する細胞の可視化を試みた。現在までに HCN4 の発現が知られている脳、心臓、消化管、舌において GFP の発現が認められた。さらに、抗 HCN4 抗体を用いた免疫組織化学により HCN4 の免疫反応性と GFP の分布を細胞レベルで比較することによって、HCN4 の生理学的機能を解明する上でのこのトランスジェニックマウスの応用性を検討した。

## 28. des-acyl-ghrelin の疎水性部位 Phe4Leu5 とラット延髄孤束核の循環調節に対する作用について

坪田裕司, 真壁恭子, 湯川和典, 前田正信 (和歌山県立医科大学・医・第二生理)

des-acyl-ghrelin (DAG) は脳腸ペプチドである ghrelin から Ser3 のオクタン酸の修飾が外れた分子で、ghrelin の受容体である成長ホルモン分泌促進因子受容体 (GHSR-1a) には結合しない。しかしながら、DAG はラット延髄孤束核 (NTS) の循環調節領域に微量投与すると血圧心拍数を低下させる効果を示すことから、GHSR-1a 以外の受容体の存在が示唆されている (昨年度本学会)。DAG は 1-10 の断片でも上記効果を示すが、そのペプチドは Phe4Leu5 において特徴的に疎水部位を持つ。そこで、この特徴と生理活性の関わりを明らかにするために、これを Ala4Lys5 に置換した合成ペプチドの NTS 循環調節に及ぼす効果を検討した。その結果、80 と 200 pmol/100 nl の濃度において活性を示さず、200 pmol では DAG とグレリンに対する阻害活性も示さなかった。以上から合成ペプチドは結合能を失ったと考えられ、この部位の疎水性が生理活性に重要である可能性が示唆された。

## 29. 食塩感受性高血圧ラットにおける腎臓 ENaC 発現のフラボノイドによる減少

青井 渉, 新里直美, 宮崎裕明, 丸中良典 (京都府立医科大学大学院 生理機能制御学)

【目的】天然植物成分であるフラボノイドの摂取により血圧の上昇が抑えられることが報告されているが、そのメカニズムについては不明である。一方、上皮型 Na<sup>+</sup>チャネル (ENaC) は尿管における Na<sup>+</sup>再吸収を制御することによって血圧の調節に重要な役割を果たす。本研究では、Dahl salt-sensitive (DS) rat における高食塩食に起因する血圧上昇および α ENaC 発現に対するフラボノイドの一種

であるケルセチンの効果を調べた。

【方法】DS ratを普通食(0.3%NaCl)群, ケルセチン添加(10 mg/kg/day)普通食群, 高食塩食(8%NaCl)群, ケルセチン添加高食塩食群の4群に分けて飼育した。収縮期血圧を毎日測定した。4週間飼育後, ラットを解剖し, 腎臓からRNAを抽出して $\alpha$ ENaC mRNA発現量を測定した。

【結果・考察】腎臓での $\alpha$ ENaC mRNAの発現は, 高食塩食摂取により増大し, ケルセチン摂取により有意に抑制された。高食塩食摂取により経時的な血圧上昇が見られたが, ケルセチン摂取はこの血圧上昇を有意に抑制した。このことより, 腎臓 $\alpha$ ENaC発現の抑制を介した体液調節がフラボノイドの高血圧抑制作用のメカニズムのひとつになることが示唆された。

### 30. Roles of receptor tyrosine kinases on the hypotonicity-induced $\text{Na}^+$ reabsorption through PI3K-SGK1-independent pathway

Akiyuki Taruno, Naomi Niisato, and Yoshinori Marunaka (Dept. Mol. Cell Physiol., Kyoto Pref. Univ. Med., Kyoto, Japan)

In renal epithelial A6 cells, hypotonicity induces  $\text{Na}^+$  reabsorption by translocating epithelial  $\text{Na}^+$  channel (ENaC) to the apical membrane in a protein tyrosine kinase (PTK)-dependent manner. However, it is unknown what type of PTK is involved in the hypotonic action. On the other hand, it is suggested that a change in membrane tension acts as a signal of hypotonicity on some cell function, leading us to a hypothesis that receptor tyrosine kinases (RTKs), sensing a change in membrane tension, is involved in the hypotonic action. Further, it is also reported that the PI3K-SGK1 signaling pathway, generally known as the downstream pathway of RTKs, is partially involved in the hypotonicity-induced  $\text{Na}^+$  reabsorption. We studied whether RTKs existing in cell membrane is involved in the hypotonic action on ENaC translocation by sensing the hypotonicity-induced change of cell volume. Our experimental data show that hypotonicity requires a membrane-tension-induced activation of EGFR and PDGFR converting to a PI3K-SGK1-independent signaling pathway in addition to an RTKs-independent PI3K-SGK1 signal in order to show the stimulatory action on ENaC translocation.

### 31. 三叉神経運動核咬筋領域内の $\alpha$ 及び $\gamma$ 運動ニューロンの電気生理学的分類

太田雅裕, 齋藤 充, 姜 英男 (大阪大院・歯・高次脳口腔機能)

三叉神経運動核咬筋領域には, 咬筋 $\alpha$ 運動ニューロン及び咬筋紡錘の錘内筋を支配する $\gamma$ 運動ニューロンが存在している。蛍光色素を混入した電極内液を用いてホールセル記録を行なうと, 細胞体が大きく樹状突起の発達したニューロンと, 細胞体が小さく単純な樹状突起を持つニューロンが認められ, 前者が $\alpha$ 運動ニューロン, 後者が介在ニューロン或いは $\gamma$ 運動ニューロンであると推測されている。そこで, 三叉神経運動核咬筋領域のニューロンからホールセル記録を行ない, 連続発火特性やそのイオン機構に基づいた電気生理学的分類を試みた。その結果, 咬筋領域のニューロンは, その膜特性から少なくとも3つのサブタイプに分類できた:(1)低閾値型 $\text{Ca}^{2+}$ スパイク(LTS)が顕著でA型 $\text{K}^+$ 電流が小さいもの,(2)LTSは明確でないがA型 $\text{K}^+$ 電流が明らかなもの,(3)通電パルスのオフセットで顕著な脱分極性後電位を示すもの。形状が単純な小さいニューロンは(3)に該当した。これまでの研究成果からそれぞれ,(1)がGABA作動性ニューロン,(2)が $\alpha$ 運動ニューロン,(3)が $\gamma$ 運動ニューロンに相当する可能性が示唆された。

### 32. ホスホリパーゼC連関型受容体刺激による細胞膜ホスファチジルイノシトール-4,5-二リン酸の一過性の減少

藤居祐介, 尾松万里子, 松浦 博 (滋賀医科大学・生理学講座・細胞機能生理学部門)

ホスホリパーゼC(PLC)は細胞膜リン脂質の一員であるホスファチジルイノシトール-4,5-二リン酸(PIP<sub>2</sub>)を分解し,ホスファチジルイノシトール-三リン酸(IP<sub>3</sub>)及びジアシルグリセロール(DAG)を生成する。PIP<sub>2</sub>の動態はPIP<sub>2</sub>に対して高い親和性を持つプレクストリンホモロジー(PH)ドメインと融合させた蛍光タンパクGFPを培養細胞に発現させることによって観察されてきたが,単離細胞において観察することは困難であった。今回,我々は抗PIP<sub>2</sub>抗体を用いて受容体刺激による細胞膜PIP<sub>2</sub>の減少を経時的に測定する方法を確立した。褐色脂肪細胞をノルアドレナリン(NA)あるいはATPで刺激して細胞膜PIP<sub>2</sub>の変化を測定したところ,細胞膜における減少のピークはNA刺激後2.5秒,ATPでは刺激後10秒であり,その後は徐々に再合成され,2分後には刺激前と同レベルまで回復することがわかった。ホスファチジルイノシトール-4-キナーゼ阻害剤であるウオルトマンニン存在下では,

NA及びATPによって細胞膜PIP2は分解されたが再合成は見られなかった。これらのことから、受容体刺激による細胞膜PIP2の一過性の減少について検討した。

### 33. FRETを用いたCa<sup>2+</sup>プローブの作製とその特性の解析

高塚賢二, 石井孝広, 大森治紀 (京大・医・生理)

Fluorescence resonance energy transfer (FRET) を用いたプローブは細胞内の情報伝達を可視化する技術として生命現象の解析に多用されており、なかでもCa<sup>2+</sup>を可視化するプローブは早くから開発されてきた。今回我々はFRETを用いた新しいCa<sup>2+</sup>プローブを作製したので報告する。

FRETのドナーとアクセプターをつなぐ配列としてa-Spectrin (Fodrin) のカルパイン感受性配列を用い、膜移行シグナルとしてGAP43のバルミトイル化配列を用いて融合タンパク質を作製した。Vanderklishらは同様の構造を持つタンパク質が哺乳類の細胞に広く発現しているカルパインによって切断されると報告しており (Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 2000), このタンパク質も切断されることが予想されたが, Ca<sup>2+</sup>存在下でも切断されずに反復的な蛍光波長の変化を示した。このタンパク質を発現する神経細胞にFura2を充填し蛍光波長を測定したところ, Fura2とはほぼ同様のCa<sup>2+</sup>感受性を示した。また数百ミリ秒の時間解像度ではFura2とほとんど重なる時間経過で蛍光変化を示すことなどから, Ca<sup>2+</sup>指示タンパク質として有用であることが明らかになった。

### 34. PLC $\gamma$ 2とTRPC3の機能的相互作用によるB細胞受容体シグナルの増幅

沼賀拓郎, 森 泰生 (総研大・生命・生理, 京大院・工・合成生物)

B細胞受容体刺激に惹起される細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度上昇は, 細胞内ストアからの放出による一過的な上昇と, それに引き続く細胞外からの流入による持続的なオシレーションにより構成される。これまでに我々は, ニワトリ免疫系B細胞株であるDT40を用いて, Ca<sup>2+</sup>流入によるホスホリパーゼC (PLC)  $\gamma$ 2の, 形質膜への集積を伴う活性化が, BCRシグナリングの増幅に重要であるということを示した。また, PLC  $\gamma$ 2のこの活性化にはTRPC3との機能的・物理的相互作用が重要であることを示した。今回, DT40に内在的に発現するTRPC3のノックアウト (KO) 細胞株を作製した。その解析から, 内在的TRPC3が, ジアシルグリセロール (DAG) 活性化チャンネルを構成していることが示唆された。またTRPC3-KO細胞において,

PLC  $\gamma$ 2の膜集積が抑制されることを明らかにした。この結果と一致してCa<sup>2+</sup>オシレーションの抑制が観察された。またTRPC3チャンネルの欠損によりPKC  $\beta$ の形質膜への移行, およびERKの活性化が抑制されていることも明らかにした。これらのことから, TRPC3とPLC  $\gamma$ 2は, 協調してB細胞シグナル伝達全体を増幅させることを明らかにした。

### 35. 代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR1) によるP/Q型Ca<sup>2+</sup> (Ca<sub>v</sub>2.1) チャンネル活性の3種類の制御

若森 実<sup>1</sup>, 山崎浩史<sup>1</sup>, 中西重忠<sup>2</sup>, 森 泰生<sup>1</sup> (<sup>1</sup>京都大学 工学研究科 合成・生物化学専攻 分子生物化学分野, <sup>2</sup>大阪バイオサイエンス研究所)

小脳プルキンエ細胞のspineのCa<sup>2+</sup>上昇はCa<sub>v</sub>2.1チャンネルによるCa<sup>2+</sup>の流入やmGluR1受容体の活性化により産生されるIP<sub>3</sub>が引き起こす小胞体からのCa<sup>2+</sup>放出によってもたらされる。我々はシナプス後膜に存在するCa<sub>v</sub>2.1チャンネルとmGluR1受容体の機能的相互作用を検討するため, Ca<sub>v</sub>2.1チャンネルを安定発現させたHEK293細胞にmGluR1受容体を一過性に発現させCa<sub>v</sub>2.1チャンネルの機能解析をパッチクランプ法で行った。mGluR1受容体を発現させるだけでCa<sub>v</sub>2.1チャンネル活性は約半分に低下した。また, グルタミン酸1  $\mu$ Mを投与すると瞬時にCa<sub>v</sub>2.1チャンネル電流は56%に低下するが, 2分後には77%のレベルまで回復した。その後, グルタミン酸を除去すると電流は最初の電流値より15%大きくなった。この様にspineにあるCa<sub>v</sub>2.1チャンネル活性はmGluR1受容体やグルタミン酸により, 時間依存的に制御を受けている可能性が示唆された。

### 36. ヒト唾液中の $\beta$ -エンドルフィン, コルチゾル, アミラーゼによる心理ストレスの評価

高井規安<sup>1</sup>, 内橋賢二<sup>1</sup>, 山口昌樹<sup>2</sup>, 西川泰央<sup>1</sup> (<sup>1</sup>大阪歯科大 生理学, <sup>2</sup>富山工科大学物質生命システム)

心理的ストレスによる唾液アミラーゼの変動を, 視床下部-下垂体-副腎皮質系のストレス指標のコルチゾルおよび $\beta$ -エンドルフィンと比較した。被験者は85名の成人男女で, 各個人のストレスの感受性を特性不安テスト (STAI) で評価した。ストレスサとして角膜移植手術ビデオをみせ (15分), 無刺激唾液を3分毎にビデオ開始から終了後15分まで採取した。ビデオ開始直後に98%の被験者のアミラーゼ濃度が増加し, ビデオ終了直後に安静時レベルに戻った。一方, コルチゾルも増加したが, アミラーゼよりも3分以上遅れて上昇し, 安静時レベルに戻るのもビデオ終了3.9分後であった。また, アミラーゼの増加率と特性不安スコアの間には正相関が認められた。次に,

ストレスをリラクゼーションビデオにかえて同様の実験を行ったところ、コルチゾルは変動しないが、85.7%の被験者にアミラーゼの低下がみられた。唾液アミラーゼは、交感神経-副腎髄質系の指標であると考えられ、視床下部-下垂体-副腎皮質系の指標であるコルチゾルおよび $\beta$ -エンドルフィンよりも鋭敏にストレスに反応することが明らかになった。また、アミラーゼは“快適指標”でもある可能性が示唆された。

### 37. 肝再生過程におけるプラスミノゲン/プラスミン系の役割

河尾直之<sup>1</sup>，岡田清孝<sup>1</sup>，川田修平<sup>1</sup>，岡本知可子<sup>1</sup>，上嶋繁<sup>1,2</sup>，松尾 理<sup>1</sup>（<sup>1</sup>近畿大・医・第二生，<sup>2</sup>農・臨床栄養）

【目的】プラスミノゲン遺伝子欠損マウス（Plg-KO）では肝再生能の低下が見られ、細胞外基質の集積や、障害肝細胞のクリアランスの低下が関与することを既に報告し

た。今回、四塩化炭素（CCl<sub>4</sub>）誘起肝障害後のERK1/2リン酸化および、アポトーシス促進性タンパク質Bim発現におけるプラスミノゲン/プラスミン系の関与を検討した。【方法】CCl<sub>4</sub>腹腔内投与前および投与1，3，7日後に、Plg-KOとその野生型マウス（WT）より肝臓を採取した。ERK1/2のリン酸化およびBim発現をウェスタンブロット法，Bim mRNAを定量的RT-PCR法により検討した。【結果】CCl<sub>4</sub>投与3日後，WTにおいてERK1/2のリン酸化が見られた。Plg-KOでは投与7日後に著明なERK1/2のリン酸化が誘起された。また，WTにおけるBimおよびそのmRNAは，CCl<sub>4</sub>投与1日後に増加した。一方，Plg-KOでは投与1，3，7日後にBimの発現増加が見られたが，mRNAは1日後でのみ増加した。【考察】Plg-KOで見られる肝再生の遅延に，再生初期でのERK1/2シグナル経路の抑制，さらにBimの持続的な発現増加が関与する可能性が示唆された。