

## 日本生理学会北海道地方会 (第 86 回北海道医学大会生理系分科会)

日 時：平成 18 年 9 月 9 日 (土)

場 所：北海道大学理学部 5 号館大講堂

当番幹事：北海道大学電子科学研究所 下澤楯夫

演 題 数：17 題

北海道地方会は例年通り、第 86 回北海道医学大会の中の生理系分科会として上記日程で開催された。一般演題 15 題、若手シンポジウム 2 題の計 17 題の発表があった。若手シンポジウムは地方会の活性化を目的として、平成 12 年より継続して行われており、主として大学院生を含む若手研究者が研究の背景を含めて講演するもので、時間も一般演題より長く討論含め 30 分(一般演題は 15 分)としている。当日は会場には常時 45 名程の参加者があり、活発な質疑応答が行われた。なお、講演発表終了後、個人参加によるボウリング大会および懇親会を市内の会場で開催した。24 名の参加者があり、会員相互の懇親を深め盛況であった。

## 【一般演題】

## 1. 前頭眼野視標追跡ニューロンに対する前庭応答の潜在時

○赤尾鉄平<sup>1</sup>、齊藤展士<sup>1,2</sup>、福島順子<sup>1,2</sup>、クルキン セルゲイ<sup>1</sup>、福島菊郎<sup>1</sup> (<sup>1</sup>北海道大学 大学院医学研究科 統合生理学講座 認知行動学、<sup>2</sup>北海道大学 医学部 保健学科 理学療法学専攻)

【目的】サル前頭眼野の視標追跡ニューロンの大多数は前庭入力を受け、その多くは視線(空間内眼球)速度信号をもつ。前頭眼野が眼球運動信号から視線信号への変換にどのように関わるかを理解するため、頭部回転中にサルに視標追跡課題を行わせ、前庭刺激に対する視標追跡ニューロンの応答を調べた。【方法】頭部を固定したニホンザルの前頭眼野後部領域から単一ニューロンを記録した。最適方向が水平方向の視標追跡ニューロンに対し正弦波状の水平回転刺激を与え、視標を回転台と同振幅、同方向に動かす前庭眼反射抑制課題と、回転中に空間で静止した視標を固視させる前庭固視課題を行い、視標追跡ニューロンを視線速度ニューロンと眼球・頭部速度ニューロンに分類した。個々のニューロンに対し回転速度を 20 度/s で step 状に与え、応答の潜時と時間経過を調べた。【結果と考察】29 個の視標追跡ニューロンは視線速度ニューロン(15)と眼球・頭部速度ニューロン(14)に分類された。大多数(70%)は、前庭刺激に対して短潜時(<80ms、最短潜時 20ms、mode 24ms)で応答した。これらの応答は、前庭眼反射抑制課題と固視課題、さらに視標を呈示しない完全暗室下でも同様であったので、水平半規管入力によることが示唆さ

れる。前庭眼反射抑制課題と固視課題を比較すると、刺激開始から 90ms 以降で応答が乖離した。この乖離の潜時は、同じニューロンで前庭刺激を与えない場合の滑動性追跡眼球運動に対する応答の潜時(>80ms)とほぼ一致した。またこの乖離は、視線速度ニューロンでは前庭応答に追跡眼球運動信号が加算されることにより、眼球・頭部速度ニューロンでは減算されることにより、よく説明できた。【結論】前頭眼野視標追跡ニューロンは追跡眼球運動信号と前庭入力を加算することにより、視線速度信号および眼球・頭部速度信号を形成する。

## 2. マウス培養 SCN における 2 振動体の局在解析

○稲垣奈都子、本間さと、本間研一(北海道大学大学院医学研究科 統合生理学講座 時間生理学分野)

季節変動に伴う日長変化への同調、即ち光周性は、中・高緯度地帯に棲息する生物の生存に必須の適応戦略と考えられ、哺乳類では視床下部視交叉上核(SCN)に存在する生物時計の重要な機能である。SCN は自律的にサーカディアンリズムを発振すると共に、網膜からの光入力にリズムを同調させている。夜行性齧歯類の光周性同調は、現在、朝日に同調し朝方の活動を支配する M 振動体と夕日に同調し、夕方の活動を支配する E 振動体の 2 振動体の関与が示唆され、両者のカップリングの変化が、長日下での活動期の短縮と短日下の延長を生じると想定される。しかし、二振動体の局在は未だ解明されていない。本研究では時計遺伝子 *Per1* プロモーター領域の下流にホタルルシフェラーゼ cDNA を結合したレポーター配列を遺伝子導入したトランスジェニックマウス (*Per1-luc*) の培養 SCN を用

い、SCN 内部位および単一細胞レベルで *Per1* 発現リズムを解析することにより二振動体の局在を検討した。*Per1-luc* マウスを LD12:12, LD6:18 (短日) または LD18:6 (長日) で3週間自発活動リズムを測定後、各マウスから切り出した 300 $\mu$ m 厚の連続2枚の冠状断 SCN スライス培養し吻側、尾側 SCN における *Per1* 発現リズムをディッシュ型ルミノメーターにて測定した。また、同様に 100 $\mu$ m 厚のマウスの冠状断スライス培養 SCN の発光リズムをデジタル冷却 CCD カメラにて連続撮像し、1細胞レベルで *Per1* 発現リズムを測定した。すべての SCN スライスにおいて明瞭な *Per1* 発現リズムが見られたが、リズム位相は、明暗サイクルと SCN 内部位に依存して変化した。日長に関わらず、尾側の *Per1* ピークは活動開始位相と相関し、吻側のピークは活動終了位相と相関した。長日下の吻側のみで、*Per1* 発現が二相性となり、5日の培養期間に徐々に融合して一相性となった。これらの結果から、尾側 SCN に M 振動体の、吻側 SCN に E 振動体の局在が強く示唆された。また、吻側 SCN には明期開始に相関する第3の振動体の局在が示唆された。

### 3. マウス老臭に対する行動学的、分析化学的研究

○長田和実, 和泉博之 (北海道医療大)

【目的】様々な野生動物において、高齢の雄は若齢よりも異性を引きつける魅力があることが行動学的に知られており、それらの内のいくつかは体臭に起因すると考えられている。しかし実験環境下の近交系マウスでも同様の作用があるかどうかは不明である。近年我々は、Y字型迷路を用いた系で C57BL/6J マウスは、加齢に伴うにおいの変化を識別していることを実験的に証明した<sup>1)</sup>。そこで本研究は、実際に雌マウスが高齢雄マウスのおいに興味を持つかどうかを検索し、その原因物質を同定することを目的として行われたものである。【方法】実験動物は、におい行動実験用のマウス(雌:2-4ヶ月齢)、におい提供動物、(成体群:4-8ヶ月齢、高齢群:15-20ヶ月齢、いずれも雄)として C57BL/6J を用いた。サンプルは尿を用いた。におい行動実験は、ケージの両端に直径1cmの穴を開け、そこから老若のおいを提供し、雌マウスのおい嗅ぎ行動量の差を比較した。次に HS-SPME を用い、38°C で30分間におい物質を抽出し、揮発性成分を気相中に移動させる目的で NaCl を添加した。化学分析はガスマススペクトル検出器、水素炎イオン化検出型ガスクロマトグラフィーにより行った。【結果と考察】行動実験の結果、高齢群に対するにおい嗅ぎ行動量が成体群に比べ有意に高かった。化学分析の結果、マウスのフェロモンである 2-sec-butyl-dihydrothiazole (BT)、dehydro-exo-brevicomin (DB) が高齢群で有意に高

かった。また限外濾過により尿中のタンパク質に結合している BT、DB を除去すると、高齢群、成体群の尿に対するにおい嗅ぎ行動量の差はなくなった。本結果は、実験環境下の近交系マウスにおいても雌は高齢雄マウスのおいに対してより強い興味を持ち、その原因として BT、DB の増加が関与していることを示唆している。1) Osada, K. et al. Proc. R. Soc. Lond. B. (2003) 270, 929-933.

### 4. カルシウムイオンチャネルの新規 $\beta$ サブユニットスプライスバリエーションのクローニングと機能解析

○白鳥香理<sup>1,2</sup>, 小林武志<sup>1</sup>, 山田陽一<sup>1</sup>, 深尾充宏<sup>1</sup>, 筒浦理正<sup>1</sup>, 永井 格<sup>2</sup>, 平塚博義<sup>2</sup>, 當瀬規嗣<sup>1</sup> (<sup>1</sup>札幌医科大学 医学部 生理学第一講座, <sup>2</sup>札幌医科大学 医学部 口腔外科学講座)

高電位活性型カルシウムイオンチャネル (L-, P/Q-, N-, R-type) は、チャネルの本体である  $\alpha$  サブユニットの他に、 $\beta$ ,  $\alpha 2\text{-}\delta$  ( $\gamma$ ) サブユニットで構成されている。 $\beta$  サブユニットは、 $\alpha$  サブユニットの I-II linker の AID に結合し、チャネルの膜への発現、活性化、不活性化を調節するキーとなる分子である。 $\beta$  サブユニットは、現在4種類 ( $\beta 1\text{-}\beta 4$ ) 存在することが知られている。今回、我々は  $\beta 4$  サブユニットの新規スプライスバリエーション ( $\beta 4v4$ ) をクローニングし、機能解析を行った。ヒト脳 RNA から RT-PCR 法により、従来報告されている  $\beta 4v2$  と、他のスプライスバリエーションである  $\beta 4v4$  をクローニングした。競合的 RT-PCR の結果から、ヒトの脳では  $\beta 4v4$  の発現は  $\beta 4v2$  に比較して、mRNA レベルでは 1/10-1/100 程度であった。シーケンスの結果、 $\beta 4v4$  は  $\beta 4v2$  のエクソン 17 全長が欠失していた。最近の結晶化構造解析の研究で  $\alpha\text{-}\beta$  サブユニット間の結合部位が明らかとなったが、 $\beta$  サブユニットのエクソン 17 には  $\alpha$  サブユニットとの結合に重要な部分が含まれている。よって、 $\beta 4v4$  は  $\beta 4v2$  に比較し  $\alpha\text{-}\beta$  サブユニット間の結合が不完全で、チャネルの発現、カイネティクスに与える影響が変化することが予想される。そこで、HEK293 細胞に  $\beta 4v4$  または  $\beta 4v2$  を  $\alpha 1C$ ,  $\alpha 2\text{-}\delta$  と共に発現させパッチクランプ法により、両者のカルシウム電流に与える影響を検討した。その結果、両者間ではカルシウムチャネルの電流量、カイネティクスに与える影響に大きな違いは認められなかった。現在、他の細胞系での検討および、組み換えタンパクを用いた  $\beta 4v4$  または  $\beta 4v2$  と  $\alpha$  サブユニットの AID との結合親和性を検討中である。

### 5. 冬眠に伴うハムスター脳内の抗酸化ストレス指標物質の変化

○橋本真明, Osborne Peter (旭川医大・医・生理・自律

機能)

ハムスター (*Mesocricetus auratus*) が冬眠から覚醒する時、5℃ の環境温度下でも体温は数時間以内に 30℃ 以上上昇する。体内臓器は強度の酸化ストレスに曝されるが、覚醒後の生体機能に異常が生ずる事は無く、酸化ストレスの実体となるフリーラジカル・活性酸素種などの中和解毒機構があると推定される。脳血管障害にともなう虚血・再灌流時に発生する活性酸素種は神経組織の損傷を増強する。本研究では、脳内の抗酸化機能を持つ水溶性物質に注目し、その冬眠に伴う消長を測定し、その関与について検討した。5℃ 人工気候室で冬眠期に入った動物の冬眠中途覚醒時に麻醉下で微量透析用ガイドカニューレを頭蓋骨に固定、手術からの回復後、再び冬眠を始めた個体を用いた。冬眠中に微量透析用プローブを線条核に挿入し、3.5µl/hr で人工脳脊髄液を灌流、冬眠-覚醒中の各相で透析液を採取した。冬眠各相で摘出した組織ホモジェネートと透析液中の物質を HPLC により分離、電気化学法により定量した。脳細胞外液中では、覚醒時と比べ、冬眠中にアスコルビン酸濃度が高く覚醒するに従い減少した。還元型グルタチオンはスコルビン酸変化と鏡像的变化を示した。尿酸は冬眠からの覚醒中エネルギー代謝が最も高まる時期に一致して濃度上昇し、それ以外の時には冬眠-覚醒を通じ有意な変化はなかった。脳組織ホモジェネート中のそれらの物質では、尿酸が覚醒時に比べ冬眠中に減少していたが、それ以外の物質に変動は見られなかった。冬眠からの覚醒中にキサンチン酸化還元酵素阻害薬 oxypurinol をプローブ局所に投与すると、尿酸濃度は減少し、アスコルビン酸は増加した。これらの結果は、アスコルビン酸が覚醒時の脳内における抗酸化ストレス物質として機能している可能性を示唆する。

## 6. レーザー血流画像組織血流計を用いた血流測定のための長所と短所

○渡邊秀和<sup>1,2</sup>、新潟丈治<sup>1</sup>、石井久淑<sup>1</sup>、和泉博之<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>北海道医療大学 歯学部 口腔生理学講座、<sup>2</sup>東北大学大学院医学系研究科 疼痛制御科学分野)

【目的】現在、血流測定には種々の方法が用いられるが、レーザードップラー血流計 (LDF) は、その簡便さから広く使用され、我々も顔面口腔領域の血流測定に長く使用してきた。しかし、近年、2次元のレーザー血流画像組織血流計 (OMEGAZONE) を用いて、血流分布を数値に加え、視覚的に、色の変化で測定することが可能となった。今回は、ラット下顎口唇やヒト手掌でみられる血流変化を、レーザー血流画像組織血流計と、従来のレーザードップラー血流計とを用いて測定、比較し、レーザー血流画像組織血流

計の有用性について検討したので報告する。【方法】実験 1) ラット下顎口唇血流変化はウレタン麻醉、筋弛緩薬で不動化後、舌神経を電気刺激 (20Hz, 2ms, 20V, 20sec) した時の副交感神経性血管拡張反応を測定した。実験 2) ヒト手掌は無麻醉下で対側の手を 4℃ の水に 30 秒間浸した時の交感神経性血管収縮反応を観察した (寒冷試験)。両部位ともレーザー血流画像組織血流計とレーザードップラー血流計で測定した。【結果&考察】固定した一部位の血流測定ではレーザー血流画像組織血流計とレーザードップラー血流計での相対血流変化は類似した。しかし、レーザー血流画像組織血流計での測定では以下のような長所が観られた。1) 視覚化できる、2) 広範囲 (20×20cm) の測定が可能 (どの部位が最も血流変化があるかがわかる)、3) 血流の測定範囲を任意に設定可能、データの保存後は測定範囲の変更も可能、4) 高速 (0.4 秒が最小間隔であるが通常 1.2 秒間隔) で血流変化を保存可能。今後は、顎関節症など、血流変化が関与、または起因する病態の診断、機序の解明の一助となるものと期待される。しかし、解析用ソフトの不備等の問題点もみられた。【結論】レーザー血流画像組織血流計を用いて血流変化を画像化して観察することが可能となった。

## 7. ウシ毛様体筋単離細胞におけるムスカリン受容体、G 蛋白ならびに TRPC チャネルの細胞膜局在の検討

○宮津 基<sup>1</sup>、安井史智<sup>1</sup>、大日向 浩<sup>1</sup>、高井佳子<sup>2</sup>、高井章<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>旭川医大 生理 自律機能分野、<sup>2</sup>名古屋大学 医学部 眼科)

【目的】毛様体筋の持続的収縮に必要な細胞外からの Ca<sup>2+</sup> イオン流入経路として機能するムスカリン受容体 (MR) 作動性非選択性陽イオンチャネルと、その分子本体候補として注目される TRPC 型陽イオンチャネルとの関連性を検討する。また、信号伝達に関与する MR と G 蛋白のサブタイプについても検討を加える。【方法】ウシ単離毛様体筋細胞において電位固定法により全膜電流を記録。筋束における張力記録には等尺性トランスデューサを使用。各種 TRPC、MR および G 蛋白の発現の検討には RT-PCR と免疫蛍光顕微鏡法とを併用した。【結果】カルバコール (CCh: 0.01-100µM) 投与により発生する電流のノイズ解析から、CCh が 2 種類の非選択性陽イオンチャネル [NSCCL (35pS) と NSCCS (100fS)] を開口させることがわかった。RT-PCR によりウシ毛様体筋に TRPC1、3、4 および 6 の mRNA が検出された。短期培養した毛様体筋細胞の表面膜の細胞質側をこれらの TRPC の特異抗体を用いて蛍光染色すると約 1spot/µm<sup>2</sup> の抗体結合を認めた。MR については M3 サブタイプ、G 蛋白については Gα<sub>q/11</sub>

サブタイプの mRNA と細胞膜ないしその細胞内表面での TRPC と同程度かそれ以上に高密度の蛋白レベルでの発現を観察した。【結論】MR 刺激に伴い NSCCL と NSCCS が開口、収縮持続相に必要な  $Ca^{2+}$  の流入経路を形成するものと考えられる。それらの有望な分子本体候補である TRPC のいくつかが筋細胞膜に発現していることが確認された。以前の薬理学的実験により毛様体筋の CCh 応答に関与する主なサブタイプであることが示唆されていた MR3、および MR3 と共役する G 蛋白としては標準的な  $G\alpha_{q11}$  の細胞膜ないしその周辺での発現が確認された。

## 8. 大脳基底核による歩行運動制御のメカニズム

○高草木 薫<sup>1</sup>、齋藤和也<sup>2</sup> (<sup>1</sup> 旭川医大 生理学、<sup>2</sup> カロリンスカ研究所 神経生理学)

大脳基底核（以下基底核）の疾患では歩行障害や筋緊張の異常が出現する。これは基底核が歩行や筋緊張を制御することを物語る。歩行や筋緊張を制御する基本的な神経機構は脳幹と脊髄に存在する。これまでの研究により、基底核は、1) 視床～大脳皮質投射と大脳皮質から脳幹への投射系と、2) 脳幹への投射系の2つを介して歩行を制御すると考えられている。また、前者は歩行の開始や停止、障害物の回避などの随意的な歩行の制御に、後者はリズムカルな上下肢の運動や筋緊張レベルの設定など自動的な歩行の制御に各々関与すると推定されている。そこで本研究では、基底核から脳幹への直接投射系がどのようなメカニズムで歩行を制御するのかを検討した。実験には、上位脳を中脳レベルで離断した除脳ネコ標本 ( $n=8$ , 6~3.4kg) を用い、後肢筋を支配する  $\alpha$  運動細胞 ( $n=21$ ) の細胞内活動を記録した。中脳歩行誘発野 (Midbrain locomotor region; MLR) に連続微小電気刺激 (30~40mA, 50Hz, 5~20s) を加えると運動細胞には脱分極と過分極とからなるリズムカルな膜電位のオシレーション (Fictive locomotion) が観察された。一方、基底核の出力核である黒質網様部 (Substantia nigra pars reticulata; SNr) に加えた連続微小電気刺激 (40~60mA, 50~100Hz, 5~10s) は、運動細胞の膜電位や入力膜抵抗に変化を誘発しなかったが、MLR 刺激により誘発される Fictive locomotion を抑制した。特に、オシレーションの数が減少すると共に過分極相の振幅も著明に減少した。その間、膜電位は持続的に脱分極を維持していた。これらの変化は、伸筋および屈筋運動細胞の双方において観察された。

## 9. 非特異的蛋白糖化は薬草・沙棘により抑制されるか？

○小山富康<sup>1</sup>、高明<sup>2</sup> (<sup>1</sup> 北海道大学名誉教授 電子科学

研究所、<sup>2</sup> エコ技研株式会社)

【背景】糖尿病の複合疾患は、蛋白の糖化を抑制すれば、軽減できるといわれている。しかしこれまで種々の薬物が試験されてきたものの、副作用や効果不十分のために実用化されていない。我々は古来薬用に供されてきた沙棘の乾燥粉末を添加した飼料を、脳出血易発症自然発症高血圧ラット (SHRSP) に投与したところ、循環動態と血液の生化学分析値が好転し、糖化ヘモグロビン (HbA1c) 値も低下したので報告する。【材料と方法】中国東北産の沙棘果実の乾燥粉末を添加した飼料を、60日間自由摂取させた。対照群は沙棘無添加飼料を与えた。血圧・心拍数を尾動脈間接法により測定した後、エーテル麻酔下に腹腔大静脈血を採取して種々の血液測定に供した。ついで左室心筋壁の毛細血管網は、酵素二重染色を施行して計数した。(北大医学部実験動物規約にしたがった)。【結果】それぞれの測定値は、括弧内に、対照群の平均値±S.D. 対投与群の平均値±S.D. を示した。平均血圧 (206±8 vs 181±5mmHg)、心拍数 (405±33 vs 362±11/mln) が減少し、中性脂肪 (45.8±12.1 vs 25.0±6.0mg/dl)、総コレステロール (57.3±0.5 vs 46.8±3.0mg/dl) も低下した。殊に興味深い結果は HbA1c (0.2±0.14 vs 0.0±0.1%) が強く減少したことである。他に、血漿過酸化脂質 (2.33±1.20 vs 2.05±1.60Nmol/ml) は低下傾向にあった。全毛細血管密度は上昇の傾向 (1672±340 vs 1842±222/mm<sup>2</sup>) にあったが、Alkaline phosphatase を発現する細動脈性毛細血管は減じた (214±55 vs 85±32/mm<sup>2</sup>)。これらの結果は、沙棘が血液の生化学的性状に良好な影響をあたえ、高血圧ラットの循環器系の負担を軽減して炎症性の傾向を抑制し、糖化蛋白を減少させることを示唆している。

## 10. 前頭眼野 (FEF) 追跡眼球運動ニューロンに対する頸部の固有受容器からの入力

○齋藤展士<sup>1,2</sup>、赤尾鉄平<sup>1</sup>、Sergei Kurkin<sup>1</sup>、福島菊郎<sup>1</sup> (<sup>1</sup> 北海道大学大学院 医学研究科 統合生理学講座 認知行動学分野、<sup>2</sup> 北海道大学医学部保健学科理学療法専攻)

【目的】ゆっくりと動く視覚対象を網膜中心窩で正確に保持するために滑動性眼球運動が働く。日常生活ではこの眼球運動と頭部運動の協調が必要となる。FEF には滑動性眼球運動に応答するニューロンが多数存在し、前庭入力を受け、視線運動信号を持つ (Fukushima et al. 2000)。前回、これらのニューロンは頭部非固定下で視線運動を伴わないアクティブな頭部運動にも応答することを報告したが (笠原ら 2005)、この時のニューロン応答が前庭入力によるものか、頭部と体幹の位置関係が変化したことによる頸部の固有受容器からの入力によるものかは区別できなかった。

そのため、今回、頭部固定下で他動的な体幹の回転に対する FEF 追跡眼球運動ニューロンの応答を調べた。【方法】コンピュータディスプレイ上で正弦波および台形波状に動く Spot を追跡するよう訓練された 2 頭のニホンザルを用い、滑動性眼球運動課題に回答した FEF のニューロン活動を記録した。これらのニューロンに対して、頭部を空間で固定し、Spot を静止させて固視させ(固視課題)、体幹に対して水平回転刺激を与えた。2 つの課題におけるニューロン応答の感度と潜時を調べた。【結果】滑動性眼球運動に回答した FEF ニューロン 73 個のうち最適方向が水平方向であったニューロンは体幹回転刺激に対し 76% が応答した。一方、最適方向が垂直方向であったニューロンの大多数 (79%) は応答しなかった。体幹回転刺激に対するニューロンの応答潜時は 109.3ms であった。体幹回転速度に対する応答感度 (0.61spikes/s/° /s) は滑動性眼球運動課題の視標速度に対する感度 (0.74spikes/s/° /s) とほぼ同等であった。【まとめ】水平方向に最適方向を持つ FEF 追跡眼球運動ニューロンの大多数は頭部固定下での体幹水平回転刺激に回答した。

#### 11. ウシ毛様体筋においてカルバコール刺激により誘発される収縮および細胞内カルシウム濃度上昇に対する $G_q$ 阻害剤 YM-254890 の効果

○安井文智<sup>1</sup>、宮津 基<sup>1</sup>、高井佳子<sup>2</sup>、高井 章<sup>1</sup> (<sup>1</sup>旭川医大 生理学 自律機能分野、<sup>2</sup>名古屋大 医学部 眼科)

【目的】副交感神経支配の平滑筋である毛様体平滑筋の収縮は筋細胞膜表面に存在する M3 サブタイプのムスカリン受容体の刺激により開始される。その初期相は、 $G_{q11}$  蛋白 ( $G_q$ ) に共役した信号伝達経路を介する細胞内からの  $Ca^{2+}$  遊離によって起るものと考えられている。収縮持続相についても  $Ca^{2+}$  は必須だが、この場合  $Ca^{2+}$  供給は受容体作動性の陽イオンチャネルを介する細胞外からの流入による。しかし、持続相における  $Ca^{2+}$  に関する信号伝達経路については、従来ほとんど調べられていない。最近、細菌由来 decapeptide の一種 YM-254890 (YM) が  $G_q$  の働きを特異的に抑制することが報告された。今回、ウシ毛様体筋においてカルバコール (CCh) で誘発される収縮と細胞内  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_i$ ) 上昇に対する YM の効果を検討した。

【方法】等尺性張力記録にはウシ毛様体筋から摘出した平滑筋束を用いた。細胞内  $Ca^{2+}$  の変動は、酵素処理で単離した毛様体筋細胞を用い、Fluo-4 蛍光法により記録した。

【結果と考察】 $2\mu M$  の CCh 投与により発生した収縮の持続相に YM (0.05–10 $\mu M$ ) を投与すると、収縮は濃度依存性に抑制された。収縮が完全に抑制されたあとに YM を数時間にわたり洗い流しても、CCh への反応性はほとんど回復

しなかった。単離細胞において、CCh (10 $\mu M$ ) は  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇を起したが、YM (3–10 $\mu M$ ) の細胞外投与により、その初期相、持続相とも完全に抑制された。これらの YM の抑制作用はいずれも時間依存性で、特に 30°C 以下の温度ではきわめて遅く現れた。毛様体筋のムスカリン受容体刺激による収縮には、初期相のみならず持続相においても  $G_q$  に共役した信号伝達経路が関与している可能性がある。

#### 12. 小脳背側虫部プルキンエ (P) 細胞の 3 次元性追跡眼球運動への関わり

○新田卓也<sup>1,2</sup>、赤尾鉄平<sup>1</sup>、クルキン セルゲイ<sup>1</sup>、福島菊郎<sup>1</sup> (<sup>1</sup>北海道大学 大学院 医学研究科 統合生理学講座 認知行動学分野、<sup>2</sup>北海道大学 大学院 医学研究科 感覚器病学講座 眼科学分野)

【目的】視覚対象が身近な空間内をゆっくり動く場合、前額面での追視に関わる滑動性眼球運動と奥行き方向の追視に関わる輻輳眼球運動の協調が必要となる。この 2 つは従来別個のシステムと考えられてきたが、前頭眼野で両信号が統合された 3 次元性追跡眼球運動信号が再現されている (Fukushima et al. 2002)。個々の眼球運動システム発現のためには、統合された信号は再度分解されなければならない。滑動性眼球運動の主要な経路である小脳片葉領域 P 細胞も 3 次元性追跡眼球運動信号を再現し、かつ大多数の細胞の発射は輻輳眼球運動の開始よりも遅れた (Tsubuku et al. Soc Neurosci Abst. 2004)。今回、私たちは滑動性眼球運動のもうひとつの経路である小脳背側虫部の応答を調べた。【方法】CRT display に LCD shutter を併用して仮想 3 次元空間を作成し、3 頭のニホンザルに視標追視を訓練した。視標追視中に背側虫部 P 細胞の simple spike の細胞外記録を行った。視標追視眼球運動に回答した P 細胞で滑動性眼球運動と輻輳眼球運動に対する応答を個別に調べた。【結果】99 個の P 細胞のうち、滑動性眼球運動と輻輳眼球運動の両方に回答したものが 40 個 (40%)、輻輳眼球運動、滑動性眼球運動のみに回答したものがそれぞれ 43 個 (44%)、8 個 (16%) であった。また調べた 40 個中 29 個 (73%) では、輻輳眼球運動の開始に先行して P 細胞の発火頻度が上昇した。【考察】追視運動に回答した背側虫部 P 細胞のうち、84% が輻輳眼球運動に関与しており、滑動性眼球運動同様この領域が輻輳眼球運動の制御に関与していることが明らかとなった。また滑動性眼球運動と輻輳眼球運動の両方の情報を持つ P 細胞が 40% みられ、両者の統合が背側虫部でも確認された。大半の P 細胞で輻輳眼球運動に先行した活動がみられたことから、同領域が輻輳眼球運動の開始に関与することが示唆された。

### 13. ラット孤束膠様核ニューロンのニコチン感受性

○船橋 誠<sup>1</sup>, 兒玉直紀<sup>2</sup>, 美藤純弘<sup>2</sup>, 松尾龍二<sup>2</sup>, 赤池忠<sup>1</sup> (北海道大院 歯 口腔生理細胞情報学, <sup>2</sup> 岡山大院 医歯薬学総合 口腔生理)

【目的】孤束膠様核は最後野に隣接する部位にある。最後野は脳室周囲器官のひとつで血液脳関門を欠く。我々はこれまでに、孤束膠様核ニューロンの樹状突起が最後野内に至っていることを明らかにし、孤束膠様核ニューロンが直接血液中の化学物質の情報を受ける可能性を示唆してきた。本研究は、孤束膠様核ニューロンのニコチン感受性について電気生理学的に調べ、その機能的意義を明らかにするためにを行った。【方法】SD 系幼若ラット (7-21 日齢) を用いて、最後野と孤束核を含む前額断脳スライス (150-200  $\mu\text{m}$ ) を作製し、スライスパッチクランプ法を用いて、ホールセル記録を行った。同時にニューロバイオチントレーサーを用いて形態的特徴を調べた。TTX 存在化にて実験を行い、ニコチン (50 $\mu\text{M}$ ) の灌流液内投与に対する、mEPSCs の頻度と振幅の分布および、シナプス後性に誘発される内向き電流について解析した。さらに、ニコチンの局所投与に対する応答を調べた。【結果と考察】ニコチンの灌流液内投与に対して、孤束膠様核ニューロンは興奮性の応答、すなわち持続的な内向き電流を示すものが多く検出された。細胞体近傍へのニコチン局所投与によっても興奮性の応答を示した ( $n=7/11$ )。このうち 2 ニューロンが、ニコチンの最後野内 (記録部位から 200-300 $\mu\text{m}$  の距離) への局所投与に対しても応答を示し、また、これらのニューロンの樹状突起が最後野内へ至っていることが観察された。これらの結果から、孤束膠様核ニューロンはニコチンに対して感受性に富むことが明らかになり、最後野内に至っている遠心部樹状突起にニコチン受容体をもつニューロンの存在が示唆された。

### 14. ウサギ跳躍運動時の前肢-後肢協調運動の特徴とその脊髄制御機構

○松山清治<sup>1</sup>, 石黒雅敬<sup>1</sup>, 青木 藩<sup>1,2</sup> (札幌医科大学 医学部 生理学第二講座, <sup>2</sup> 北海道文教大学 人間科学部 理学療法学科)

【目的】四足動物の歩行運動では前肢帯・後肢帯における左右肢交代性運動と前肢-後肢間の同期性運動が基本となる。しかし、ウサギでは左右後肢の非交代性運動すなわち跳躍運動が基本となっており、本研究ではウサギ跳躍運動時における前肢運動パターンと前肢-後肢の協調パターンの特徴、さらにその脊髄制御機構の解明を試みた。【方法】ハロセン深麻酔下でウサギの上丘前縁と乳頭体後縁を結ぶ面で上位脳を離断し除脳ウサギ標本を作製した。ウサギの

頭部を脳定位装置に固定し、胸・腹部をゴムベルトで保持した。跳躍運動を誘発するため、ウサギの中脳楔状核に刺激電極を刺入し連続微小電気刺激 (50Hz, 持続 0.2ms, 10~100 $\mu\text{A}$ ) を 10~15 秒間加えた。跳躍運動発現時の前肢・後肢運動をビデオ撮影するとともに、四肢伸筋・屈筋から筋電図を導出記録した。一連の観察後にウサギを再度ハロセン麻酔し、下部胸髄に半切断または全切断を施した。麻酔回復後にウサギの楔状核に電気刺激を加え、前肢・後肢に誘発された運動を観察した。【成績】除脳ウサギの楔状核刺激により後肢には常に左右非交代性の跳躍運動が誘発された。下部胸髄半切断後にも楔状核への強い電気刺激により後肢に左右非交代性運動が誘発された。一方、前肢では楔状核刺激で基本的に左右交代性運動が誘発され、とくに胸髄全切断後には、完全な左右交代性パターンに移行した。前肢・後肢の運動パターンの違いにも関わらず、前肢の歩行周期は後肢の跳躍運動発現時には後肢の歩行周期に一致し、この周期の一致は胸髄半切断後にも観察された。【結論】ウサギ跳躍運動では前肢と後肢の運動パターンが異なることから、頸髄と腰髄の歩行パターン発生機構はそれぞれ異なる神経構成を有するものと考えられる。しかし両者の神経機構の間には強固な機能的連絡が存在し、これには腰髄から頸髄に向かう脊髄固有神経機構が強く関わるものと考えられる。

### 15. 視交叉上核神経細胞内における概日リズムシグナル伝達

○馬場謙吉, 西出真也, 本間さと, 本間研一 (北海道大学 医学研究科 統合生理学講座 時間生理学分野)

哺乳類の生物時計が存在する視床下部視交叉上核 (SCN) は、固有のサーカディアン振動体を持つ多くの神経細胞から構成され、これらが同期して単一周期のリズムを発振すると考えられる。サーカディアン振動の分子メカニズムとして、時計遺伝子の転写とその産物による転写抑制の自律調節フィードバックループが想定されており、時計遺伝子 *Per* 転写に関わる基本ループにいくつかの補足ループが相互に連動し、安定した振動を生み出していると考えられる。しかし、分子ループから細胞膜電位のリズムに至る細胞内リズム情報伝達経路は不明である。Tetrodotoxin (TTX) を培養 SCN に数日間投与すると、投与終了後の電気活動再開時のリズム位相は投与前位相の延長線上にあり、分子時計の振動持続が確認されている。本研究では、培養 SCN に TTX を投与し、SCN 細胞への神経性入出力を停止させることにより、分子ループから膜電位リズムへの出力系に関与する分子を検討した。明暗 12:12h に同調させた 6~9 週齢の C57BL/6J のマウスから 300 $\mu\text{m}$  の冠状断 SCN 切片

を作製しメンブレン上で気水界培養を行い、培養3日目のPer1発現リズムピーク位相にTTXを投与した。投与開始12時間後から32時間後まで、4時間毎に培養SCNを回収した。採取したSCNより20 $\mu$ mの凍結切片を作成し、*in situ hybridization*法により基本ループに関与する時計遺伝子4種、補足ループに関わる遺伝子4種、発現にリズムが確認されている出力系遺伝子5種の発現リズムを検討した。その結果、基本ループに関わるすべての遺伝子、補足ループに関わるほとんどの遺伝子、および3種の出力系遺伝子でTTX投与下による遺伝子発現リズムに変化はなく、分子時計機構から膜電位への出力への関与が示唆された。一方、3種に有意な変動が確認され、細胞外からの神経入力が発現リズムに関わっていると考えられた。

### 【若手シンポジウム】

#### S-1. 興奮性シナプス伝達の生後発達変化に対するAMPA受容体脱感作の寄与

○小池(谷)真紀<sup>1</sup>、斉藤直人<sup>2</sup>、高橋智幸<sup>2</sup> (<sup>1</sup>北海道大学大学院 医学研究科 分子解剖学分野、<sup>2</sup>東京大学大学院医学系研究科 神経生理学)

AMPA受容体は中枢における速い興奮性シナプス伝達を担っている。ラット脳幹聴覚中継神経核calyx-MNTBシナプスにおけるAMPA受容体媒介性シナプス後電流(AMPA-EPSC)の波形及びシナプス抑圧の生後発達変化メカニズムを、受容体脱感作の寄与とサブユニット組成の観点から明らかにした。生後7日目、14日目、21日目のラットスライス標本にパッチクランプ法を適用し、whole-cell記録によりMNTBニューロンからAMPA-EPSCを得た。生後7日目のAMPA-EPSCのキネティクスは遅く、強いシナプス抑圧が観察された。シナプスの成熟に伴い(生後14日、21日)、AMPA-EPSCのキネティクスは次第に速くなり、同時にシナプス抑圧が減弱した。MNTB細胞体からのoutside-out patch膜にグルタミン酸を外液急速交換で投与を行い、AMPA受容体の脱感作と脱活性化キネティクスを記録し、AMPA-EPSC及びpaired-pulse depression(PPD)に対するAMPA受容体の寄与を検討した。生後7日ではEPSCの減少相におけるAMPA受容体の脱感作の寄与が大きいのに対し、生後14日、21日では寄与が減少することが明らかとなった。AMPA受容体の脱感作からの回復時間は生後7日では遅く、PPDの程度や時間経過に影響するが、生後14日以降ではPPDにAMPA受容体の脱感作は関与しなくなることが明らかとなった。また、生後6日から22日にわたる発達段階でMNTBニューロンに単

一細胞定量的RT-PCR法を適用し、サブユニット組成やスプライス変異体の変化を検討した。その結果GluR4のflop型の発現が増加し、GluR1の発現が減少することが明らかとなった。伝達物質の放出確率を減少させるとAMPA受容体の脱感作の寄与がなくなることから、PPDが発達に伴い弱くなる要因としてシナプス前側の放出確率の減少に加えて、GluR1減少による脱感作からの回復時間の短縮が重要であることが明らかとなった。

#### S-2. グルタミン酸・GABA共放出仮説の再検討

○神谷温之(北海道大学 医学研究科 分子解剖学分野)  
シナプスでは一種類のfast neurotransmitterを放出し、複数の神経伝達物質が同時に放出されることは無いと考えられてきたが、近年、発達期の脊髄や脳幹の一部の抑制性シナプスではGABAとグリシンが共放出されることが明らかとなった。また、海馬苔状線維シナプスでは興奮性伝達物質であるグルタミン酸に加えてGABAを放出する可能性が示され注目を集めている。苔状線維シナプスにおけるGABA放出は、幼弱期に一過性に発現することや、成熟脳においてもけいれん誘発に伴い誘導されること、などの点から、神経活動依存的な伝達物質スイッチングという未知のプレシナプス可塑性のメカニズムとしても興味深い。本研究では、幼弱期苔状線維シナプスからのグルタミン酸・GABA共放出仮説の妥当性について、スライスパッチクランプ法を用いて再検討を行った。生後2ないし3週のマウス海馬スライス標本において、歯状回顆粒細胞層に強い刺激と弱い刺激を与え、CA3野ニューロンから記録されるシナプス応答に対するグルタミン酸受容体阻害薬(CNQXとAP5)の効果を比較した。弱い刺激によるシナプス応答はCNQXとAP5の投与により完全に消失したのに対し、強い刺激に対する応答の一部は残存し、この成分はGABA<sub>A</sub>受容体阻害薬picrotoxinの投与により消失した。顆粒細胞層の強い刺激により苔状線維以外の成分(おそらく抑制性介在ニューロン)を同時に刺激し、順向性あるいは軸索反射の機構を介してCA3野ニューロンに単シナプス性IPSCを生じたと考えられた。歯状回顆粒細胞層の弱い刺激で選択的に苔状線維を刺激した際には単シナプス性IPSCを生じなかったことから、苔状線維シナプス自身はGABAを放出しない可能性が高い。幼弱期の苔状線維シナプスからグルタミン酸とGABAが共放出されるという仮説は、不適切な実験条件によるアーチファクトであると結論した。