

日本財団補助金による

1997年度日中医学協力事業助成報告書

- 在留中国人研究者研究助成 -

1998年3月10日

財団法人 日中医学協会

理事長 中島章殿

I. 研究者氏名 黄 樹明

研究機関 名屋大学医学部 研究指導者 久場 健司 職名 教授

所在地 〒466-8550 名古屋市昭和区鶴舞町65 電話 (052)744-2047 内線 _____

II. 過去の研究歴

1982年12月~1984年9月 黒龍江中医学院(現黒龍江中医薬大学)生理学講座 助手

1984年9月~1987年7月 同上大学大学院(生理学専攻)

1987年9月~1992年4月 同上大学生理学講座 講師

III. 過去の研究実績

Inhibitory effects of cyanide on mechanical and electrical activities in the circular muscle of guinea-pig gastric antrum. Jpn. J. Physiol. 34, 229-238

Effects of phosphodiesterase inhibitors on spontaneous electrical activity: slow wave, in the guinea-pig gastric antrum. J. Physiol. 485, 493-502.

IV. 本年度の研究業績

(1) 学会、研究会等における口頭発表(学会名・内容)

運動神経終末でのアドレナリンとACTHによる伝達物質放出の可塑的促進.
第75回日本生理学会大会, 1998年3月27日 金沢

(2) 学会誌等に発表した論文 (無) ・ 有 (雑誌名・論文名)

V. 今後の研究計画及び希望

神経筋接合部の交感神経伝達物質でのアドレナリンによる長期興奮増強という有意義な現象を発見したため、今後、神経終末内のCa²⁺濃度、特に微小範囲のCa²⁺濃度(D_{xy})を測定し、この長期増強のメカニズムを追求していく予定である。

別紙



VII. 指導教官の意見

黄樹明君はこの報告書の結果に示すように、 $1\mu\sim 2\mu$ の小さな運動神経終末から細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を測定するという非常に困難な実験を確実に成功させている。又、骨格筋でのシナプス伝達と自律神経ホルモンによる可塑性があることは、重要な発見である。

これらのことから、黄樹明君は本奨学金の主旨を十分生かして、着実にその成果を上げていると云える。

研究報告

カエル運動神経終末のインパルスによるカルシウム上昇に対するアドレナリンとアデノシンの作用

名古屋大学医学部第一生理 黄樹明、久場 健司

骨格筋の神経筋伝達は、交感神経の活動やアドレナリンにより促進され、これはオルペリーの効果として知られ、シナプス前性に起こることが分かっている。また、神経伝達物質であるアセチルコリンが放出される際に、ATPが同時に放出され、その分解産物であるアデノシンが、開口放出を抑制することが知られている。

本研究では、このアドレナリンの促進作用とアデノシンの抑制作用がインパルスによる細胞内カルシウム上昇過程に作用するのか、あるいは、伝達物質の動員や開口放出機構そのものに作用するのかを調べるために、Ca²⁺蛍光色相であるfura-2及びoregon greenを蛙胸皮筋の運動神経終末に神経断端に負荷し、細胞内Ca²⁺測定を行い、アドレナリンとアデノシンの作用を検討した。

実験方法

50g前後のカエルを断頭屠殺し、両方の胸皮筋を神経の付いたままに注意深く摘出し、神経周りの結合組織をきれいにのぞいた後、0.5mlのチェンバーに載せ、両端をピンで固定して、室温下(23-26°C)で、リンゲル液を、2mlのスピードで灌流する条件下で、標準ガラス微小電極で、神経筋接続部のシナプス後電位(Epp)を記録した。

上記の方法で取り出したカエル胸皮筋の神経筋標本を、特別に作ったシャーレに置き、神経の断端を、色素(Oregon green 及びFura-2)を0.2μL含んだ液中に置き、100%湿度の条件下で密閉する。色素は軸索輸送により、神経終末まで移動させる。神経断端のCa²⁺色素による負荷時間は12時間である。共焦点レーザー顕微鏡及び光電子倍增管で細胞内Caを測定した。また、神経の電気刺激が二本の電極で行った。

実験結果及び考察

1. 蛙骨格筋の神経筋接続部のEPPに対するアドレナリンの増強作用。

図1の示したように、上のAは、Low Ca^{2+} High Mg^{2+} リンゲル液で、Bは、正常リンゲル液にD-tubocurarine $2\mu M$ 存在下で行った実験である。過去の報告 (Jankinson et al. 1968, Kuba 1973) にあるように、両方のどちらの場合も、 $20\mu M$ のアドレナリンがEPP振幅を増幅したことが見られた。今度の実験で新に発見されたことは、アドレナリンの促進効果が、アドレナリン投与後でも、長く続くことである。この現象は、中枢神経で見られている記憶と学習の基礎過程と考えられる長期増強とはいえないが、中期増強と言える。このような数時間の可塑的効果の発見は、早いシナプス伝達で機能を発揮する運動神経終末においては、予想外のことであるが、後の考察に示すように非常に生理学的な意義があると考えられる。そこで、この促進現象が、インパルスにより起こる細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の増強によるかどうかを、細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定によって調べた。

共焦点レーザー顕微鏡を応用し、繰り返し刺激 (テタヌス) による細胞内 Ca^{2+} 濃度 [Ca^{2+}_i] 上昇を測定し、アドレナリンの作用を見た。テタヌスにより誘発した [Ca^{2+}_i] 上昇は、アドレナリンの存在下、及びアドレナリンを洗って30分後で変化しなかった。

の上昇の時間経過の変化を見るため、光電子倍增管による Ca^{2+} 測定法でFura-2の蛍光比により Ca^{2+} 濃度変化を測定した。図2のように、左はコントロールで、100Hzで10パルス、20パルス、50パルスのテタヌス刺激による細胞内 Ca^{2+} 上昇の時間経過を示したもので、右は、アドレナリン存在下での測定結果である。10パルスの場合のように Ca^{2+} の上昇が小さい場合は降下相 (減少相) の時間経過が遅いが、上昇の大きい場合は、減少相の時間経過早い相と遅い相に分かれる。これは、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇がある値に達すると早い Ca^{2+} 処理機構が働き始めることによると考えられる。図に示すように、アドレナリン投与する前と投与した後では、パルス刺激による細胞内 Ca^{2+} の上昇には、余り変化が見られなかった。従って、アドレナリンの神経期伝達促進効果は運動神経終末でのインパルスによる細胞外からの Ca^{2+} の流入以後の開口放出機構の促進によるものと考えられる。又、アドレナリンによるシナプス前終末からの伝達物質放出の促進作用が、アドレナリンを除いた後も数時間にわたって促進することは速いシナプス伝達でその機能

を発揮する骨格筋のシナプスでは驚くべきことだが、その生理学的意義は大きい。すなわち、運動機能はその機能が最大効率で働くためには、全運動神経系が有る程度の準備期間ウォーミングアップを必要とする。今回発見された機構はこの過程に交感神経系が関与することを示すものである。

2. アデノシンの骨格筋神経筋接続部伝達に対する抑制作用

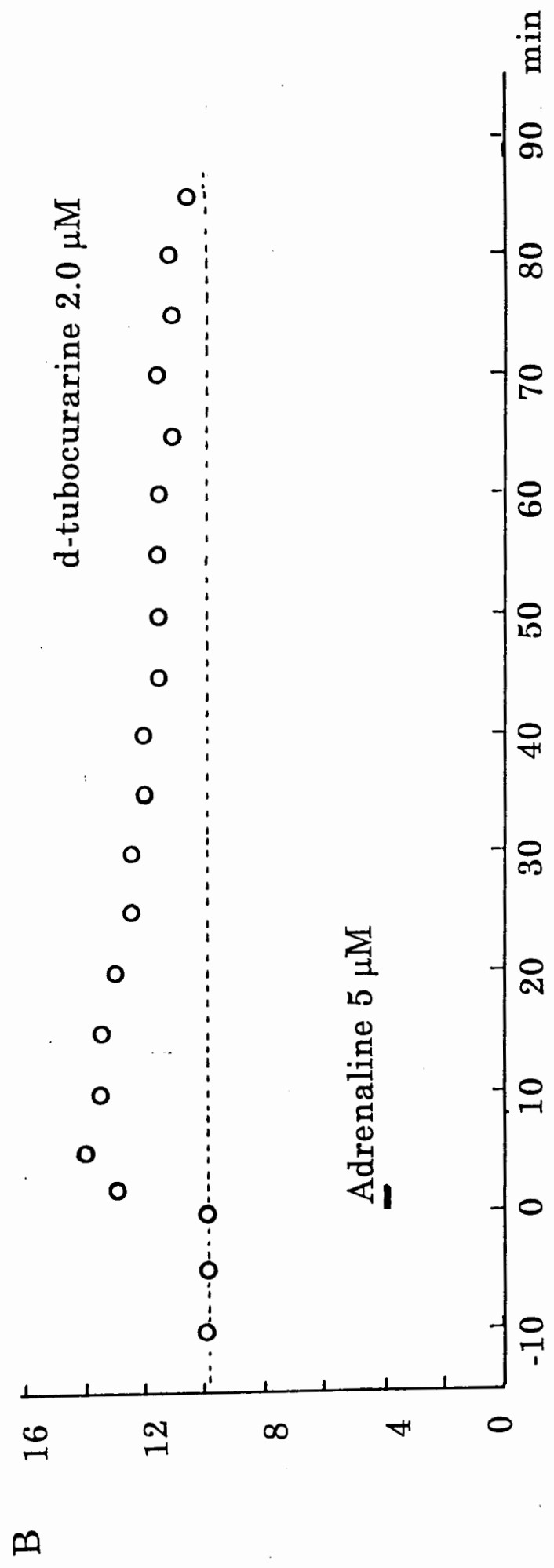
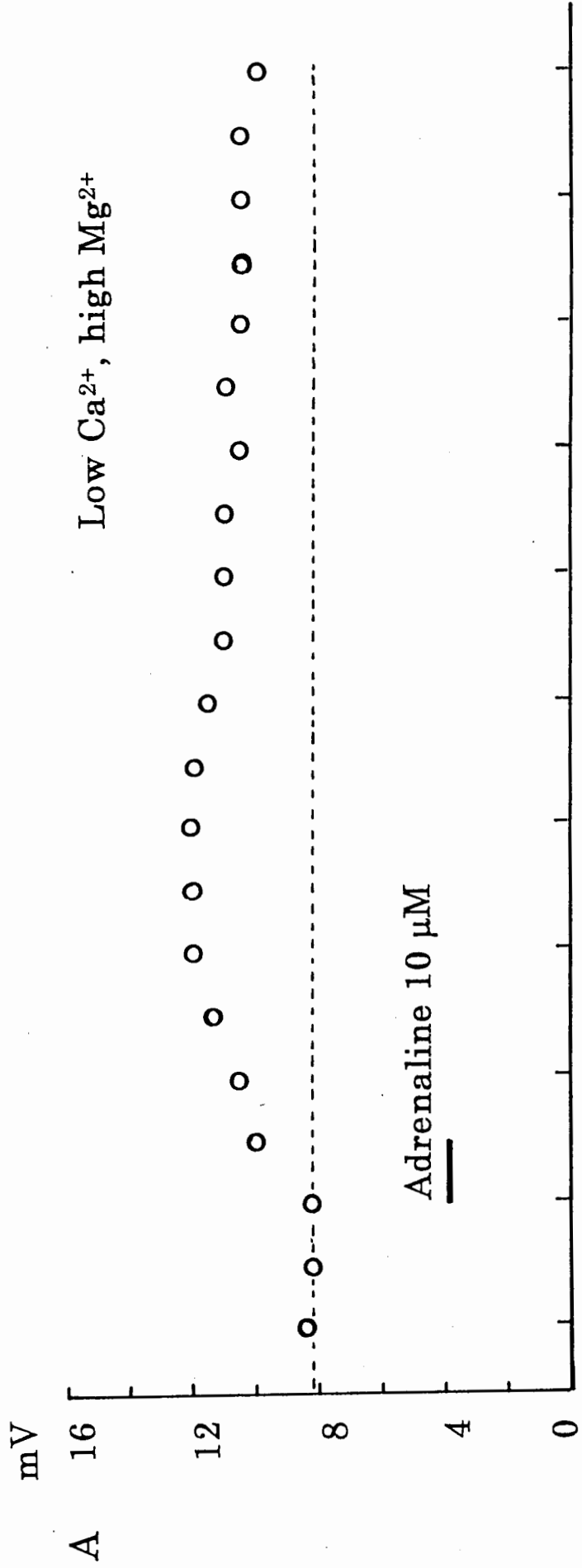
運動神経の終末では、神経のインパルスによりアセチルコリンが放出される同時、ATPも放出され、このATPは、アデノシンに分解され、それが、シナプス伝達に対し、抑制作用を示すことが、考えられている。図3の示したように、低 Ca^{2+} 高 Mg^{2+} 溶液とD-tubocurarine添加のリンゲル液で $100\mu M$ のアデノシンがほぼ同じように可逆的にEppの振幅を抑制しました。一般には、アデノシンが Ca^{2+} チャンネルに抑制作用を持つと言われているが、それによるかどうかを細胞内 Ca^{2+} 測定によって調べた。

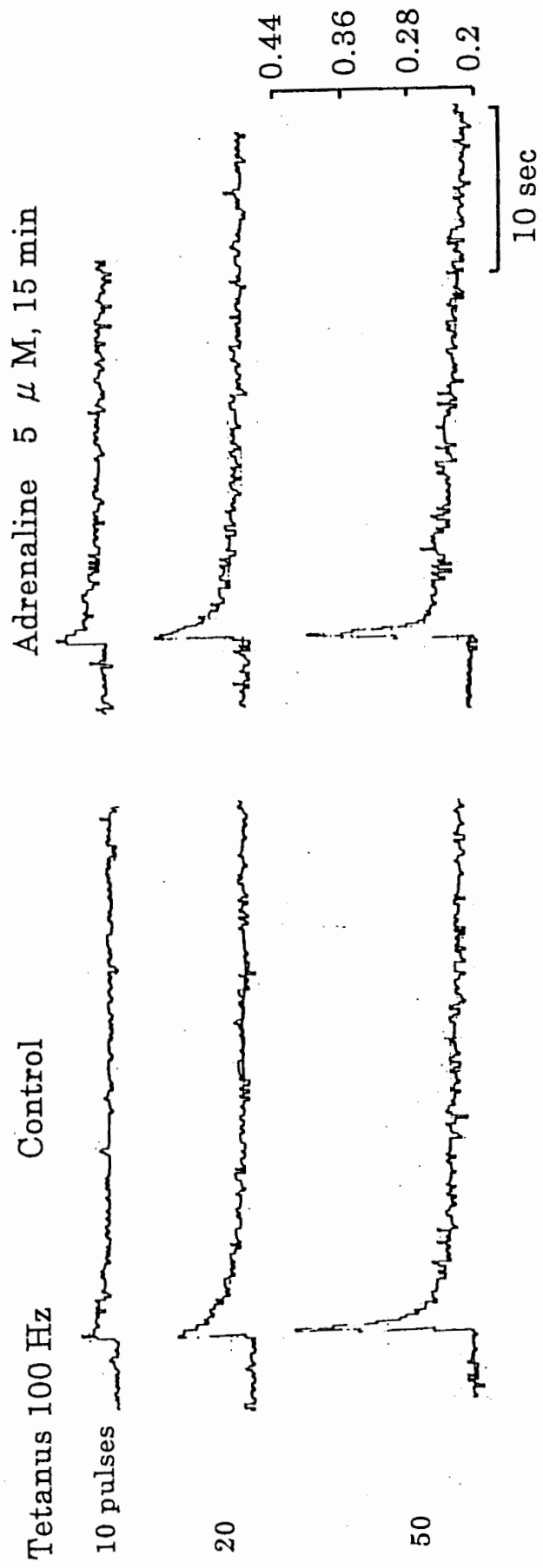
もし、アデノシンのEPPの振幅の抑制は、神経ターミナル膜の Ca^{2+} チャンネルを押さえて、 Ca^{2+} の流入を減少させるによるものならば、アデノシンの存在下では、テタヌス刺激による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は小さくなるはずだが、期待に反して、変化が見られなかった(図4)。この結果から、アデノシンの抑制作用も、 Ca^{2+} 流入以後の開口放出機構にあると推測される。この抑制作用は神経筋伝達にネガティブフィードバックをかけることを意味し、前記のアドレナリンの促進作用と拮抗することになり、筋運動の調節が末梢レベルでも微妙に調節されることを示唆する。

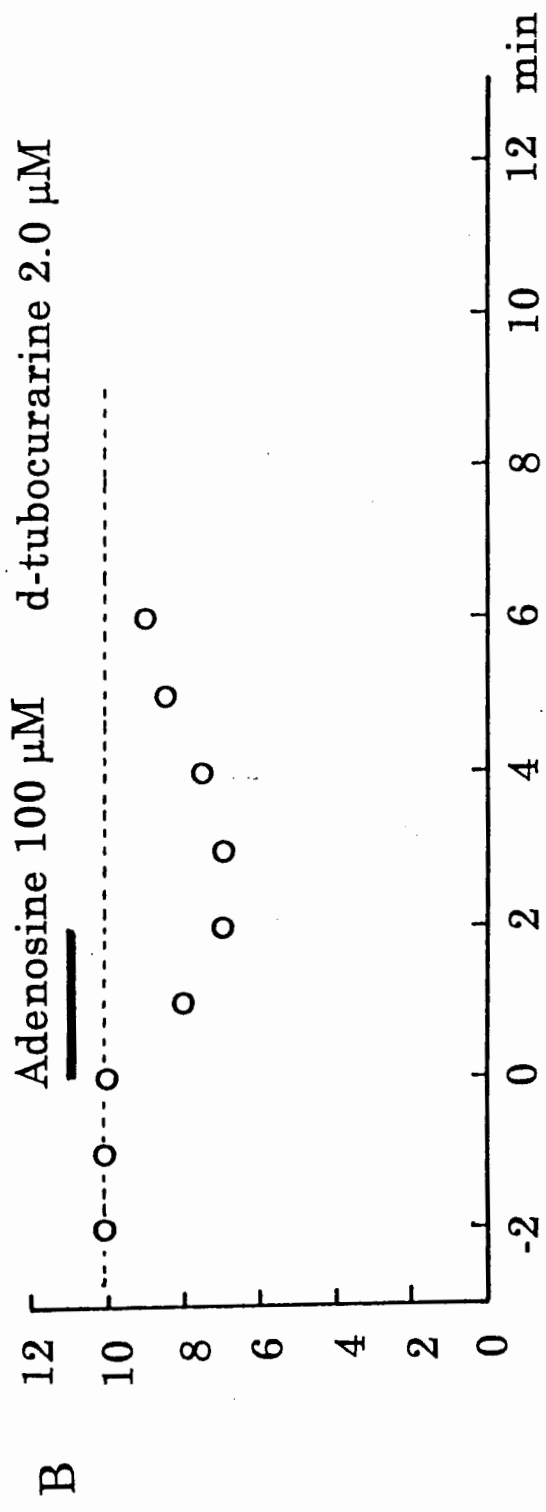
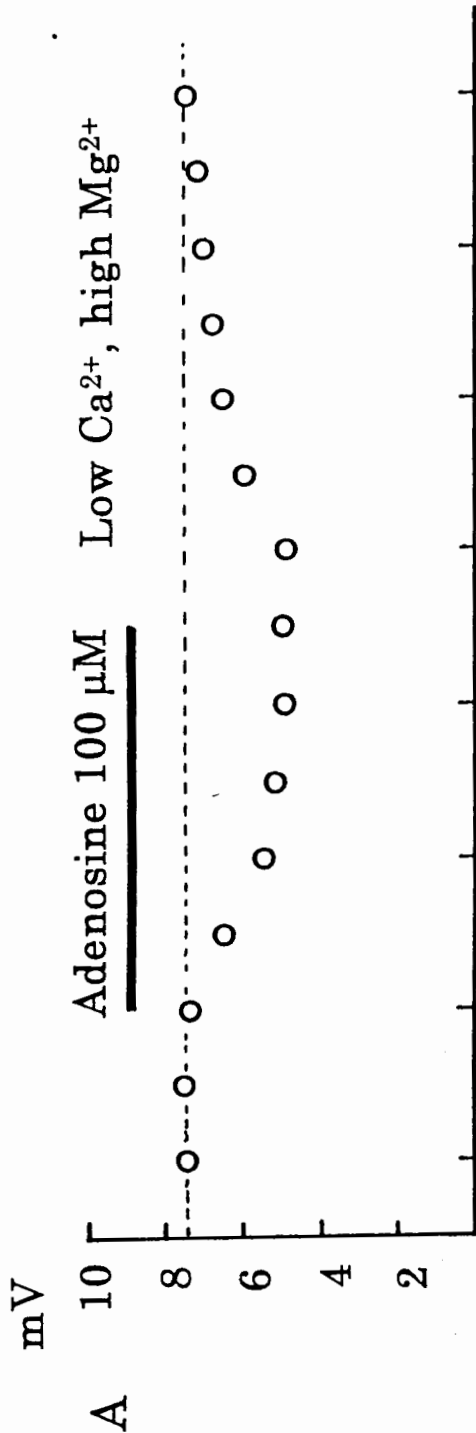
結 論

1. Adrenalineは、運動神経終末に作用し、インパルスによる Ca^{2+} 流入を変えることなく、開口放出の活性化機序を促進し、この促進作用はAdrenaline除去後の数時間続く。

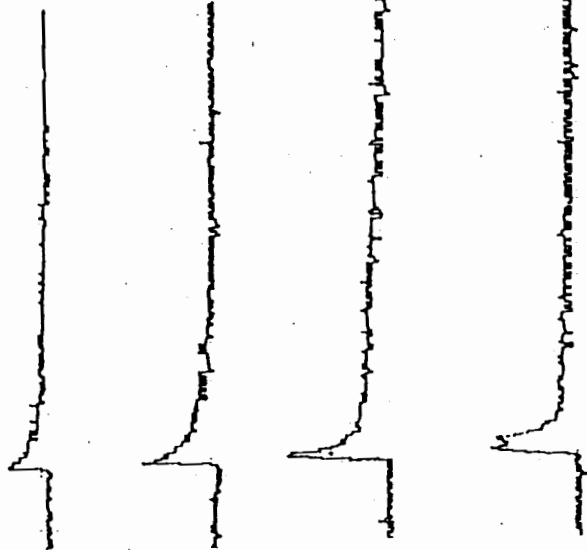
2. Adenosineは、定説とは異なり、インパルスによる Ca^{2+} 流入を抑制することなく、インパルスによる開口放出機構を可逆的に抑制する。





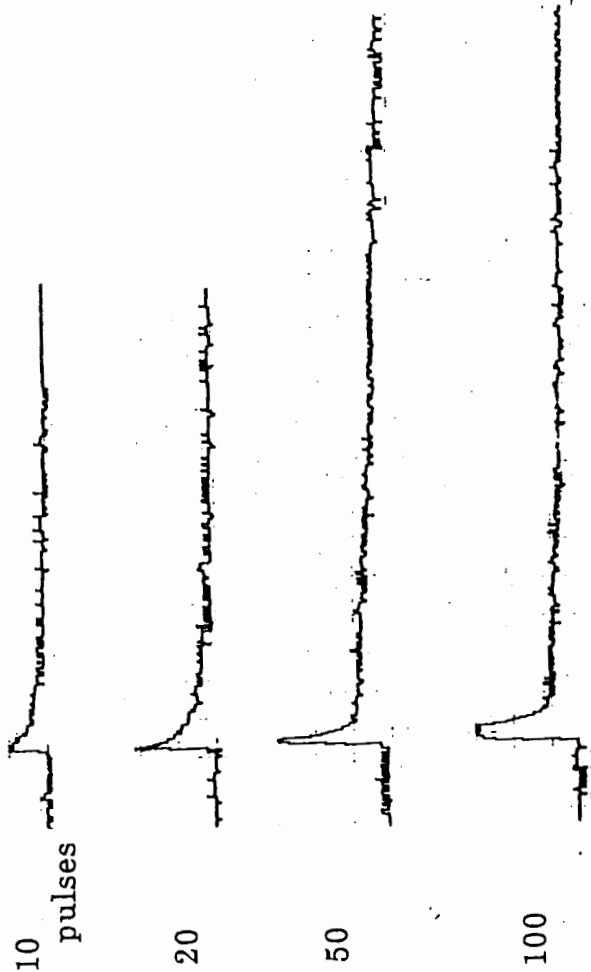


Adenosine 100 μ M, 15 min.



Control

Tetanus 100 Hz



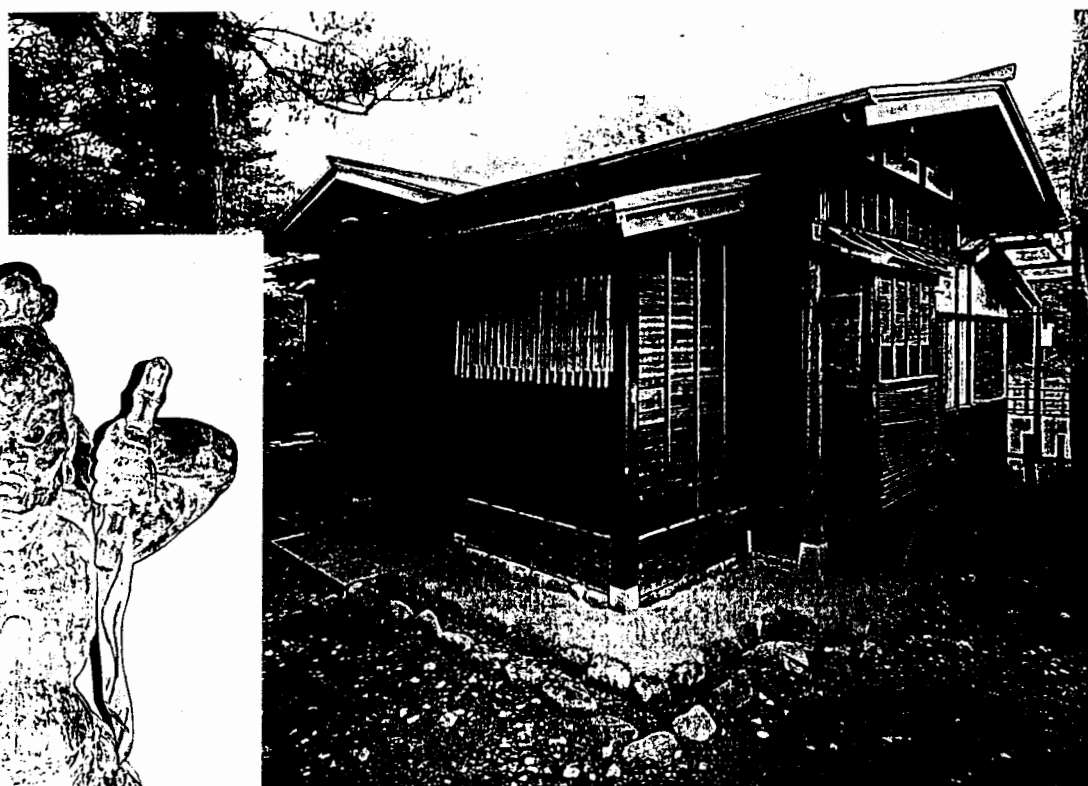
10
pulses

20

50

100

第75回 日本生理学会大会 予稿集



平成10年3月27～29日

金沢大学医学部

1E1520

運動神経終末でのアドレナリンと ACTH による伝達物質放出の可塑的促進

名古屋大学・医学部・第1生理

黄樹明、秋田天平、北村淳子、中山晋介、久場健司

アドレナリンと ACTH は、d-ツボクラリン添加リンガー液や低 Ca^{2+} 高 Mg^{2+} 液中で、終板電位の振幅を約 1.5 倍に増大し、この促進作用は薬物除去後も数時間持続した。アドレナリンは、運動神経終末の細胞内 Ca^{2+} 濃度の静止時の値とテタヌス刺激による上昇に影響しなかった。アドレナリンと ACTH の開口放出に対する作用機構について考察する。

1E1535

GABA_B 受容体によるシナプス前抑制機構

梶川是直、辻本 哲宏、高橋 智幸

東京大学・医学部・神経生理

ラット台形体内側核の巨大前シナプスとシナプス後細胞から同時にホールセル記録を行い、GABA_B 受容体によるシナプス伝達抑制機構を検討した。GABA_B 受容体アゴニスト baclofen は、GTP 結合蛋白質の活性化を介してシナプス前終末端の Ca^{2+} 電流を抑制したが、内向き整流性 K 電流、遅延整流性 K 電流には影響を与えなかった。

1E1550

伝達物質開口放出の C-キナーゼによる増強メカニズム

東北大学大学院医学系研究科・生体情報

八尾 寛

フォルボルエステルは、C-キナーゼを介して、ニワトリ胚毛様体神経節の巨大シナプス前終末からの伝達物質放出を長期にわたり増強した。これは、活動電位にともなう Ca^{2+} 流入の増加をともなわなかった。また、 Ca^{2+} -放出関係において、最大値よりは開口放出の Ca^{2+} 感受性の増加が認められた。リン酸化による Ca^{2+} 感受性の修飾が示唆される。

1E1605

AMPA 型グルタミン酸受容体 GluR2Q の flip/flop 依存性脱感作及び脱活性化特性

群馬大・医・第二生理

小池真紀、塚田昌大、都筑馨介、小澤静司

AMPA 受容体サブユニット GluR1-GluR4 には flip 型と flop 型の二種類の splice variant が存在する。今回、私達は GluR2 の Q/R site に点変異を導入した未編集型 GluR2Q をツメガエル卵母細胞に発現させ、outside-out patch 膜にアゴニストを急速投与し、flip 型と flop 型におけるチャンネル開閉の kinetics の差異を調べた。

1E1620

神経細胞傷害にともなうアミノ酸受容体応答の変化

九州大・医・第二生理

鍋倉淳一、古川義彦、赤池紀扶

生体内における神経細胞傷害—修復過程におこるアミノ酸受容体応答の変化をパッチクランプ法を用いて検討した。軸索傷害24時間後には傷害運動細胞におけるNMDA受容体 Mg^{2+} ブロックは減弱し14日目に回復した。メカニズムとして関連するキナーゼ活性やNMDA受容体サブユニットの変化の可能性を検討した。