

生物科学総合研究機構

生理学研究所年報

第 1 卷



1980

巻 頭 言

生理学研究所年報第1号に寄せて

内 蘭 耕 二

昭和52年5月2日に正式に設立された生理学研究所の年報第1号を出版することが出来ることを、関係の方々と共に慶びたい。3年前の設立当時は仮設の研究棟に基礎生物学研究所の方々と同居せざるを得ない状態であった。

狭い空間を極度に利用する工夫を行い乍ら研究の継続がはかられて来た。研究に中断が許されないことは、研究者自身がもっともよく知っている。研究のための建築物、研究器材、研究支援グループの完成を待って研究を再開するというスケジュールは、到底研究者にとって耐えられることではない。いかにして与えられた環境下で稔りある研究を維持することができるかという一点に、研究者の最大の関心が払われて来たわけである。

馴れ親しみ完備した大学の研究室から移ってきた研究者たちは研究のための部屋はおろか、研究器材に至っては全くの零状態という悪環境下で、研究は進められざるを得なかった。研究所の設立を進めながら、一方では世界のレベルにおくれることのない研究実績を維持することは至難の業であった。当研究所に研究の場を得た研究者の心の支えとなったものは、恐らく数年後には美事に完成されるであろう新研究所の姿であつたろうと思われる。それは今正に指呼の間に迫っている。

全国の大学の共同利用機関の一つとして、やがて当研究所はその負託にたえるべく内容をいやが上にも充実させなくてはならない。研究上の人材と、研究の情報において、当研究所は唇齒輔車の関係を維持しなくてはならない。大学の研究者との相補性が名実ともに確立されるとき、日本の生理学に新しい時代の誕生が告げられるのである。

主 な 職 員（昭和54年度）

所 長 内 蘭 耕 二

分子生理研究系 超微小形態生理研究部門

教 授 亘 弘
助 教 授 志 賀 潔
助 手 東 晃 史
" 二 科 安 三

細胞内代謝研究部門

客 員 教 授 矢 内 原 昇
客 員 助 教 授 小 林 繁
助 手 佐 藤 晴 子

細胞器官研究系 生体膜研究部門

教 授 山 岸 俊 一
助 教 授 杉 山 博 之
助 手 久 木 田 文 夫
" 古 家 喜 四 夫

能動輸送研究部門

客 員 教 授 中 尾 真
客 員 助 教 授 太 田 英 彦

機能協同研究部門

教 授 渡 辺 昭

生体情報研究系 神経情報研究部門

教 授 金 子 章 道
助 教 授 大 塚 輝 彌
助 手 立 花 政 夫
" 田 内 雅 規

高次神経機構研究部門

客 員 教 授 塚 原 仲 晃
客 員 助 教 授 外 山 敬 介
助 手 村 上 富 士 夫

生体調節研究系 高次神経性調節研究部門

教 授 入 沢 宏
助 教 授 野 間 昭 典

高次液性調節研究部門

客 員 教 授 大 村 裕

生 理 機 能 超 高 圧 電 子 顕 微 鏡 室

研 究 施 設 助 教 授 有 井 達 夫

組織培養標本室

助 手 古 家 園 子

技 術 課 課 長 大 平 仁 夫

市 川 修
山 下 幸 子
小 原 正 裕
前 橋 寛
池 田 明 聡

特 定 領 域
奨 励 研 究 員

星 野 稔
谷 裕 一 郎

目 次

巻 頭 言	i
主 な 職 員	ii
部門別研究の概要	
分子生理研究系	1
細胞器官研究系	17
生体情報研究系	21
生体調節研究系	34
生理機能研究施設	40
奨 励 研 究 員	41
技 術 課	44
研 究 活 動	
論 文	45
学 会 報 告	56
共同 研究報告	
昭和 52 年度	65
昭和 58 年度	77
研 究 会 報 告	
昭和 52 年度	103
昭和 53 年度	111
研 究 会 抄 録 集	
昭和 52 年度	131
昭和 53 年度	155

部 門 別 研 究 の 概 要

分子生理研究系

《超微小形態生理研究部門》

神経細胞内エネルギー動態の解析

研究課題

亘 弘

研究目的

神経での情報伝達はイオン透過性の変化により惹起される活動電位の発生に依存している。活動電位の発生は細胞内外にイオン濃度差を持っていることが必要であり、このため常に能動輸送が行われている。能動輸送のエネルギー供給は物質代謝によっており、多くの生化学的研究によって解明されて来た。しかしエネルギー代謝経路は他の細胞と変るところは見出されないにも拘らず、クレアチン磷酸あるいはアルギニン磷酸が少ないことが指摘されて来た。このことが神経細胞が酸素欠乏に対して弱い原因の一つであると推定されて来た。これらの実験は抽出精製という生化学的手法によったものであるので、生きたままの状態での測定が必要であろう。エネルギー代謝の推測は有機燐化合物である sugarphosphate, ATP やクレアチン磷酸あるいはアルギニン磷酸の時間的消長をもって行い得るので、燐核磁気共鳴 (^{31}P -NMR) の適用が好ましいと考えられる。最近フーリエ変換核磁気共鳴 (FT-NMR) の導入により測定時間の短縮が可能となり、同一時間の測定では加算平均により感度が数十倍向上した。しかしながら他の計測法に比べ感度的には劣っていても、非破壊的計測の優位を生かして、神経における燐化合物の分析を行った。神経細胞での ^{31}P -NMR の測定に先立ち、筋肉内での有機燐化合物や無機燐の検出を行って測定条件の決定や、有機燐化合物の同定などを行った。また無機燐の化学シフトから pH の測定も可能であるので細胞内 pH 測定も併せ行った。

研究方法

筋肉の試料は食用ガエルの大腿二頭筋の一对 (約 1.6 g) を用いた。筋はリンガー液 (pH 7.4, トリス緩衝液) とともに試料管に入れ、さらに M メチレン二磷酸と重水を封入した毛細管を入れて外部基準と内部磁場ロックとして使用した。好氣的条件とする場合には後述の灌流装置を用いた。脳のスライスは成熟モルモットから作ったが、厚さ 0.5 mm のものを試料管に入れ、クレブス・リンガー液で灌流するようにして測定した。神経はサリガニ腹側神経束を用いたが、測定の際にはハルベルト液を灌流するようにしてある。

NMR 測定の場合、磁場の不均一性を除去するため試料管のスピンニングを行う必要がある。このような試料管に灌流できるようにして、好氣的条件や種々の薬剤の影響を見れるような灌流装置を使用した。

^{31}P -NMR の測定は JOEL-PFT-100 を用い、40, 29 MHz で測定した。測定温度は室温であり、30°パルスか、45°パルスの FID を加算した後、フーリエ変換してスペクトルを得た。

研究経過 1) 細胞内 pH の測定

カエル筋肉の ^{31}P -NMR スペクトルは左の低磁場側より外部基準メチレン二磷酸 (ext. ref), (ref), 無機磷酸 (P_i), クレアチン磷酸 (C~P), ATP の γ , α , β 位の磷のシグナルを得た。磷酸緩衝液の pH を変化させたものの化学シフトを実例し、第 1 磷酸イオンと第 2 磷酸イオンが rapid exchange をするとして Henderson Hasselbalch の解離平衡の式から

$$\text{pH} = \text{PK}_2^1 + \log \frac{W_m - W_1}{W_2 - W_m}$$

を求めたものを対比するとよく一致した。ここに K_2^1 は磷酸の第 2 段の解離定数で、 W_1 , W_2 は第 1 および第 2 磷酸イオンの化学シフト、 W_m は測定される無機磷の化学シフトである。新鮮な筋肉では -1.79 ± 0.1 ppm の化学シフトであるので、 7.32 ± 0.10 の pH が得られた。

細胞内無機磷の信号は水溶液中のそれよりも半値巾が広い。この原因として考えられる磁場の不均一性の寄点は C~P の信号の半値巾よりも狭い故に否定できる。次に細胞内での P_i の運動の束縛度や種々の交換反応などによる半値巾の寄点を見積るために、横緩和時間 (T_2) の測定を行った所、平均値として 80 m sec を得た。これは 0.1 ppm の半値巾に対応し、細胞内 P_i の半値巾 0.24 ± 0.07 ppm とは大きく異なる。これは細胞内では pH の不均一性があるためと考えられ、pH の変動として 0.24 pH unit となる。

嫌気条件下での筋肉は解糖系乳酸産生による緩徐な細胞内 pH の酸性化が認められ、 ΔpH は減少する (図 1A)。解糖系モノヨード醋酸 (IAA) で抑制すると酸性化が認められず、かつ ΔpH も減少する。しかし同時に測定される C~P が消失し、ATP も消失した時点から酸性化が生ずる (図 1B)。次に、Lohman 反応 ($\text{C~P} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{C} + \text{ATP}$) の阻害剤である DNFB を加えるとき急速な酸性化を認め、ATP の減少とともに新たに酸性の分画を認めた (図 1C)。この分画はグリセリン処理で横行小管系を破壊すると出現しないので、

細胞内に由来するものと推定した。(Jap. J. physiol. (1979) 29 211-255)

ii) 脳スライスでのエネルギー代謝

脳細胞が酸素に対して非常に弱いとされている。しかし ^{31}P -NMRの測定で酸素を十分に供給する条件ではC~Pが $4.3 \mu\text{mole/g}$, フルクトース-6-リン酸が $1 \mu\text{mole/g}$ 存在することが確認できた。しかも10時間後においてもこの条件である限り、これらの含量の変化せず、しかも電気興奮に対する応答性が保存されている。ATPの信号はS/N比の悪さから観測されなかった。上記のC~Pやフルクトース-6-リン酸の量は生化学的な方法で見出されている含量に比べ多いし、フォスホフルタクトロイネーズがVate limiting enzyme となっていることを示している。

(J. Biochem. (1980) 87

668-666)

iii) ザリガニ神経束のエネルギー代謝

10本のザリガニ腹側神経束を

NMR 試料管に入れ、灌流を行いつつ ^{31}P -NMRの測定を行ったところ、アルギニン磷酸とATP、さらに糖質化合物の信号が検出できた。このことは十分な酸素の供給されている限り、エネルギー代謝系が正常に働くことを示している。つまり、神経細胞内での酸素のreservoirが少ないことを示していることを推量させる。(Proc. Japan Acad. (1978) 54 397-401)

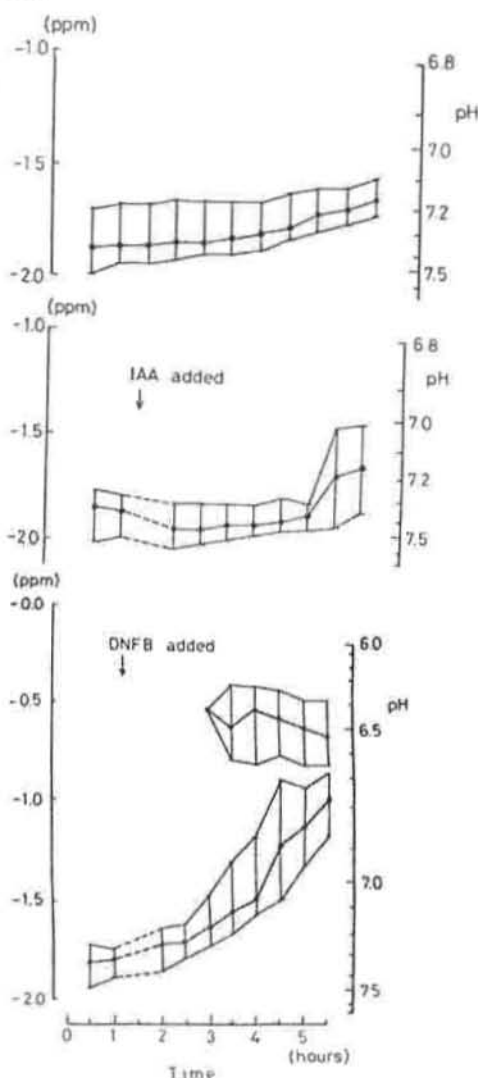


図1 筋肉内pHの種々の薬剤による影響

考 察 以上の研究を行って来て神経細胞では酸素の供給さえ充分であれば正常のエネルギー代謝を示すことがわかったが、おそらく細胞内の酸素の reservoir 機能が無いのではないかと推定される。本実験には 40 MHz の ^{31}P -NMR を用いたので、感度的には不十分であるので、有機リン化合物の時間的変動を正確にはとらえることは出来なかった。これは昭和54年度末に設置された超電導磁石 NMR を用いると更に明確な結果を得ることができると思われる。

なお、筋肉・神経組織には膜に磷脂質が多量に存在するが、緩和時間が有機リン化合物に比べ早いので測定には寄与していない。しかし膜成分の研究にも大いに利用できるので、膜の動態の研究にも応用した。

研 究 課 題 生体内酸化還元機構の検討

(とくにフラビンおよびフラビン蛋白について)

志賀 潔 二科 安三 亘 弘

研 究 目 的 生命現象はエネルギーの補給なしでは存在しえない。生体におけるエネルギー産出は生体内酸化還元反応に依存するがその機構は複雑であり、現象的には極めて多様な化学反応を伴う。フラビン分子はこれら酸化還元反応における主役をなすものであるが、フラビン分子それ自身ではこの極めて多様な化学反応を触媒する事はできず、アポ蛋白との結合(フラビン酵素となる)によりはじめて可能になる。すなわちフラビン-蛋白相互作用の結果、多種多様な機能が生みだされ、これが生体内各部でそれぞれ異った役割をはたす事になる。従ってフラビン-蛋白相互作用およびフラビン酵素の反応機構の検討は生体内酸化還元反応の統一的理解に必須のものであり、これが我々の研究目的となっている。

研究方法・結果 上記目的のため本年度は以下の事につき検討をすすめた。

(i) カラムクロマトグラフ法による新しいフラビン酵素(Quasi D-アミノ酸酸化酵素)の存在と精製法を報告した。(Medical J. of Osaka Univ. 80, 71 (1980)。

(ii) 分光学的方法と量子化学的計算の両者によりフラビンの π 電子構造について検討した。

(J. Biochem. 85, 931 (1979), J. Biochem. 87, 281 (1980), J. Biochem. in press)

- iii) 分光学的方法により共有結合型フラビン酵素（コリン酸化酵素とコレステロール酸化酵素）の活性中心の構造とそこにおけるフラビンの位置関係について論じた（J. Biochem. in press）。
- iv) ラマンスペクトルの測定によりフラビンの分子振動について考察し、反応機構の検討を行った。（J. Biochem. 84, 925 (1978), J. Am. Chem. Soc. 101, 3376 (1979), J. Biochem. 87, 831 (1980), Flavins and Flavoproteins 395 (1980).）
- v) オキシダーゼ酵素の典型例である D-アミノ酸酸化酵素の反応機構を β -シアノー D-アラニンを基質として用いる事により確立した。（J. Biochem. 87, 1469 (1980)）
- vi) D-アミノ酸酸化酵素のアポ蛋白がフラビンとの結合に伴い重合する機構を光散乱測定により検討した。（FEBS Letters. 114, 4 (1980)）

フラビン（ビタミン B₂）は栄養学的見地より古くから興味をもたれてきた物質であるが、その生理学的意義は現在においてもなお明らかでない。我々はこの問題にフラビン分子のもつ性質を物理化学的に理解する事により接近したいと考えている。

本年おこなった(i)～(vi)までの結果をながめつつ生体内酸化還元反応の統一的機構に思いをはせ生理機能の分子レベルでの解明についてイメージを育てているところである。

脳内活性物質の抽出・精製及び合成

東 晃史

脳の有する高次の中樞神経機能については、従来電気生理学的な面から追求されてきたが、これに比して物質レベルからの研究はほとんど未開拓の状況にある。本研究は脳の高次中樞神経機能に関連する物質、すなわち脳内活性物質について理工学的、生態学的立場から総合的に解明することを目的としている。本研究グループは多年にわたり脳内活性物質のうち特に睡眠促進物質について基礎的研究を積み上げ、睡眠促進物質の存在をほぼ確認し、その物質の活性検定システムを完成することができた。これらの成果を踏まえて、本研究においては睡眠促進物質の単離とその構造を決定し、睡眠という生理学上の重要課題を解決したい。

考 察

研 究 課 題

研 究 目 的

研 究 方 法

a) 粗抽出物の作製：1000匹単位の雄ラット（体重 250 g）を大量奪眠器を使用し、電気刺激により24時間奪眠し、脳幹を分離した。これをまとめて水でホモジナイズした後、ホモジネートを水に対して透析し、透析外液を凍結乾燥して粗抽出物（Brain Stem Extract：BSE）を得た。現在まで5000匹のラットを使用した。

b) 生物検定：①ザリガニ腹部の tonic な伸展受容器（stretch receptor）の自発放電の抑制度を指標として用いた。②マウス、ラットの脳波（徐波及び REM 睡眠）及び行動量の増減を指標として用いた。分画された試料は主として脳室、次いで腹腔及び尾静脈から投与した。

c) 精製：BSE に対してまず SP-Sephadex イオン交換クロマトグラフィーを行い、ついで Sephadex G-10 ゲル濾過クロマトグラフィーを3度繰り返し、高性能液体クロマトグラフィー（HPLC）で精製を行った。図1に精製のフローチャートを示す。

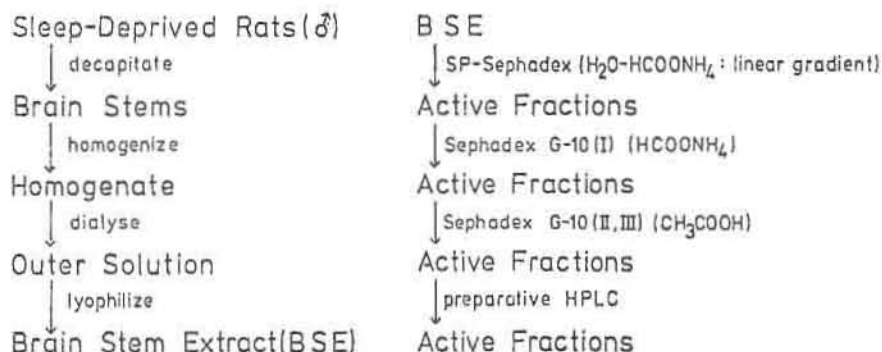


図1 睡眠促進物質の精製

研 究 経 過

図2 AはSPセファデックスカラムで溶出した各分画をザリガニのstretch receptorで生物検定した結果である。矢印で示した部分をまとめてSephadex G-10でゲル濾過を行い、各分画について再度stretch receptorで検定した。

図2 Bはその結果である。さらに図中(2B)に示した分画をSephadex G-10でゲル濾過すると、図3に示すような260nmにおける溶出パターンが得られ、矢印で示した分画がstretch receptor及びマウス、ラットに対して有効な結果（活性）を示した。さらに図3の矢印で示した分画を高

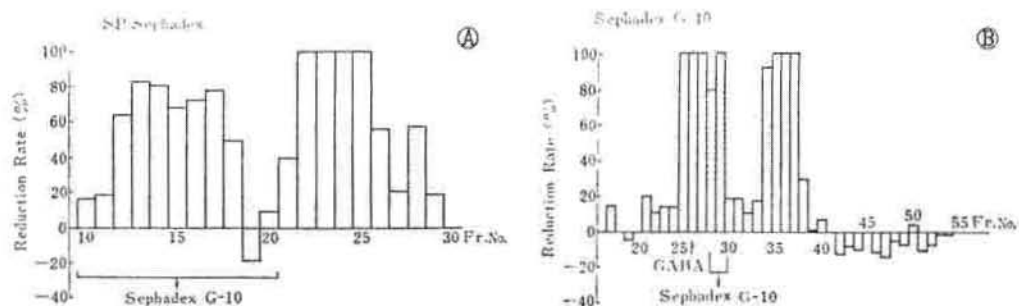


図2 ザリガニによる検定

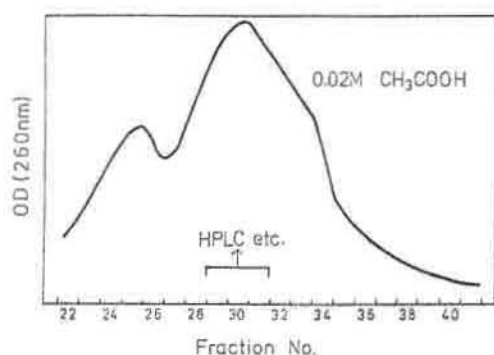


図3 260 nm による溶出パターン

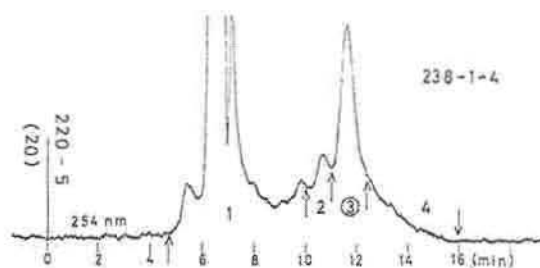


図4 高速液体クロによるクロマトグラム

性能液体クロマトグラフィー (HPLC) にかけると図4に示すクロマトグラムが得られ、図4中の③で示した single peak にマウス・ラットの睡眠効果 (徐波睡眠及び REM 睡眠) を高める性質のあることが明らかになった。図5はマウスの脳室に精製過程の活性物質 (図2 A. 及び B 参照) を連続注入したときの効果で、長時間 (約1日) マウスの行動の抑制と徐波睡眠量の増加を示すことがわかる。精製が進むにつれ、REM 睡眠量も顕著に増加させる作用のあることがわかった。

1976年スイスの Monnier たちはウサギの脳の血液から睡眠を一過的に誘発する delta-sleep inducing peptide (DSIP) を同定し、合成した。これの効果に関しては世界各国の睡眠研究室で検討中であり、現状ではその効果の信頼性に関して賛否両論あるといえる。日本のいくつかの睡眠研究室での結果もほぼ同様な傾向にある。いずれにしても睡眠促進物質は未だ分子構造を決定するには到っていないが、時間の問題といえるであろう。

考 察

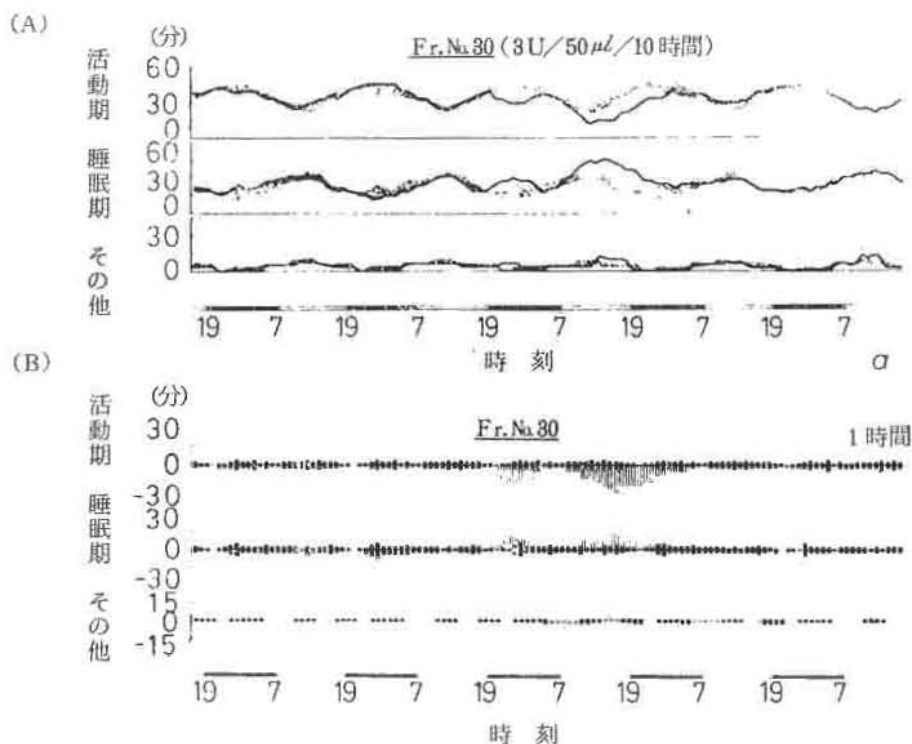


図 5. 睡眠促進物質 (SPS) を含む活性フラクション (Fr. Na₃₀) をマウスの側脳室に10時間連続注入したときの効果

(A): 点線のバンドは実験マウスの注入前3日の各時刻における変動の平均を示し、実線は経時的变化を示す。

(B): (A) の表示の変化分のみを経時的に示す。

黒棒は(A) のバンド幅を示し、白棒は個体の標準リズムからの変化分を示す。

《細胞内代謝研究部門》

最近のペプチド化学の発展により、純粋なペプチドが単離され、構造決定されると、提出された推定構造にもとづき化学合成が行われる。さらにこれらペプチドの抗血清が作成され、ラジオイムノアッセイ系の確立によって、組織あるいは体液中のホルモン測定が可能になるとともに、免疫組織化学的研究によりホルモン産生細胞が明らかにされることになった。

プロインスリンのごとく、すべてのペプチドホルモンについては、まず大分子型の前駆物質が細胞内で生合成され、特定の酵素によりそのペプチド鎖の特定の位置が開裂され、終局的に活性型のホルモンに転換されるというプレプロホルモン→プロホルモン→ホルモンの過程を経る一般的な生合成過程が推定されるようになった。ここにすべてのペプチドホルモンまたは生理活性ペプチドは体液中あるいは産生細胞においても均一なものではないと考えられるようになった。これらペプチド分子の多様性は、その生理反応を追求する場合しばしば問題になる。また、構造が明らかにされているペプチドホルモンの多くはブタ、ウシ、ヒツジから抽出されたものであり、他の動物由来のものと類似の生理活性を示すとしても必ずしも一致した構造を持つとはいえない。したがって、天然品または合成品により作製した抗血清を用いて、他動物の組織あるいは体液中のペプチドを検討する場合、免疫化学的性質が大きく異なることがある。

すでに消化管と脳に共存するペプチドの存在が知られ、注目されてきたが、それらのなかでもっとも古いのが substance P であり、それが神経伝達物質として作用したことが、大塚らによりほぼ確実に証明されるにいたった。そのほか、ソマトスタチン、VIP、エンケファリン、ボンベシン、ニューロテンシン、CCK、グルカゴンなどが脳-腸管ペプチドとして確認されるにいたった。また、ガストリンおよびモチリン免疫活性の存在が下垂体あるいは松果体において検出された。このように消化管と中枢神経系の細胞で同一または類似のペプチドホルモンの産生が示唆されてきた。

ここに、本研究は生体内組織および培養細胞系における生理活性ペプチドまたはペプチドホルモンについて、それらに関連する合成ペプチドを用いて分子の多様性を生物化学的ならびに免疫化学的に追求し、ペプチドの生合成過程とくにホルモンとプロホルモンの関係を明らかにすることを目的としている。

概 要

研究課題 ポンベシンに関する研究

研究方法 合成ペプチド：ポンベシン関連物質としてポンベシン, N^{α} -glycyl-[1-Glutamine]-bombesin, N^{α} -tyrosyl-[1-Glutamine]-bombesin, ならびにポンベシンフラグメントとして bombesin (2-14), bombesin (4-14), bombesin (6-14), bombesin (8-14), bombesin (1-6)-NHNH₂ および Des-14-amide-bombesin を液相法により合成した。

免疫抗原： N^{α} -glycyl-[1-Glutamine]-bombesin を水溶性カルボジイミドの作用で BSA と縮合させ、反応生成物を Sephadex G25 カラムによるゲル濾過で精製し、定量的に bombesin-BSA conjugate を得た。

免疫：上記 bombesin-BSA conjugate を complete Freund's adjuvant とともに乳化、これを家兎およびモルモットに免疫し、抗血清を作製した。これらのなかでモルモットに産生した抗ポンベシン血清 GP-3303 をラジオイムノアッセイに使用した。

標識抗原： N^{α} -tyrosyl-[1-Glutamine]-bombesin をクロラミン T 法でヨウ素化し、¹²⁵I- N^{α} -tyrosyl-[1-Glutamine]-bombesin を得、Sephadex G-10 によるゲル濾過で精製し、アッセイに使用した。

ラジオイムノアッセイ：標準希釈液として 0.5% BSA および 0.025 M EDTA を含む 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を用い、B を分離はデキストラン-炭末法で行った。

組織の抽出：凍結した組織を 5~10 倍量の 0.1 M 酢酸の存在でホモジナイズし、ついで 5 分間熱湯中加熱したのち、遠心し、上清を凍結乾燥し、試料とした。

研究結果

表 1 *Relative Crossreactivities of Bombesin-related Peptides in Bombesin Radioimmunoassay with Antiserum GP-3303*

Compound	Relative crossreactivity
Bombesin	accepted as 100
N^{α} -Tyrosyl-[1-Glutamine]-bombesin	100
N^{α} -Glycyl-[1-Glutamine]-bombesin	100
Des-14-amide-bombesin	25
Bombesin (2-14)	≈100
Bombesin (4-14)	≈100
Bombesin (6-14)	≈100
Bombesin (8-14)	<0.01
Bombesin (1-6)-NHNH ₂	<0.01
Ranatensin C	2.6

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
Bombesin: pGlu-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂

本研究においてモルモットに産生した抗ボンベシン血清 GP-3303 の主要抗原認識部位はフラグメントの交差反応性から bombesin (6-7) 位に存在することが明らかになった。(表1) 標準品として合成ボンベシン、標識抗原として ^{125}I -N $^{\alpha}$ -tyrosyl-(1-Glutamine)-bombesin および上記抗血清 GP-3303 を用いるラジオイムノアッセイ系によりブタ、イヌ、サル、ラットおよびモルモットなど哺乳動物消化管組織抽出物を測定した結果、組織中のボンベシン様免疫活性はきわめて低濃度か、または検出限界以下であった(表2)。

表2 Bombesin-like Immunoreactivity in Mammalian Tissue Extracts Measured by GP-3303 Bombesin Radioimmunoassay

Tissue	Bombesin immunoreactivity*
Pig (n=2)	
Stomach	< 0.5
Duodenum	< 0.5
Jejunum	< 0.5
Dog (n=4)	
Antrum	0.28
Duodenum	0.25
Jejunum	< 0.1
Monkey (n=2)	
Stomach	< 0.5
Duodenum	< 0.5
Papilia vateri	2.24
Jejunum	0.56
Rat (n=2)	
Stomach	< 0.85
Duodenum	12.8
Jejunum	1.51
Guinea pig (n=1)	
Stomach	< 0.5
Duodenum	< 0.5
Jejunum	< 0.5

*pg bombesin equivalent/mg wet weight

本研究によりボンベシンに特異的なラジオイムノアッセイ系を確立した。しかし、本アッセイ系では哺乳動物消化管組織抽出物中にボンベシン様免疫活性はほとんど検出されず従来の報告に大きく相違する結果が得られた。最近、ブタ消化管からガストリン放出ペプチドが単離され、そのアミノ酸配列が明らかにされたが、27アミノ酸残基からなる配列中、C末端デカペプチド配列が bombesin (5-14)

考 察

ときわめて類似し、ボンベシンの7位 Gln 残基が His 残基に置換されていることのみが、ボンベシンと相違するところであった。この部位は本研究の抗ボンベシン血清 GP-3303 の主要抗原決定基に相当することを考えると、本研究の結果は、哺乳動物のボンベシン様免疫活性として従来考えられていたものが、ガストリン放出ペプチドまたはそれに関連したペプチドによることを示す重要な知見であった。

研究課題 免疫活性VIPに関する研究

研究方法 ラジオイムノアッセイ：本研究に使用した抗VIP血清は合成VIPまたはそのフラグメントを抗原として作製したR502、R5503およびR505である。抗血清R502はVIPをポリビニルピロリドンに吸着させ、これを免疫抗原として作製したものであり、VIP分子の7-10位を主要抗原認識部位としている。R5503はVIP(7-28)を免疫抗原として作製したものであり、VIP(7-18)以内に主要抗原認識部位が存在する。なお、抗血清、R502およびR5503の両者ではその抗原-抗体反応にVIPの立体構造が関与していることが示唆された。R505は免疫抗原としVIP C末端フラグメント、VIP(18-28)を用いて作製し、その抗原認識部位はVIPのC末端18-28位に存在する。

組織の抽出：イヌ消化管(結腸)を粘膜と筋層に分け、前記の方法で抽出した。

一方、ヒト神経芽細胞腫培養細胞系NB-1は京都府立医科大学三宅清雄教授により確立されたものであり、この培養細胞をリン酸緩衝液(pH 7.5)でホモジナイズし、遠心、上清をラジオイムノアッセイに供した。

ゲル濾過：組織抽出物のゲル濾過はSephadex G50カラムで行った。溶出液として1M酢酸を用いた。

研究結果 イヌ消化管結腸筋層のVIP免疫活性は、ゲル濾過の結果、上記3種類の抗VIP血清を用いるラジオイムノアッセイ系のいずれにおいても主として合成ブタVIPの溶出位置に一致する位置に溶出された。(図1)一方、粘膜抽出物のゲル濾過では、ブタVIPに相当する免疫活性分画はほとんど認められず、多様な分子型からなることが示唆された。(図2)

ヒト神経芽細胞腫培養細胞系NB-1抽出物のゲル濾過における各分画を3種類の上記ラジオイムノアッセイ系で測定した。R502およびR5503を用いる系では、合成ブタVIPに相当する分画に主要な免疫活性ピークが認められた。また、僅かであるが大分子分画にも免疫活性が認められた。一方、C端特異抗血清であるR505を用いた系では同様に合成ブタVIPに一致するピークが認められたほか、低分子分画にも免疫活性が検出された。なお、上記2種の系で認められた大分子分画は認められなかった(図3)。

つぎにVIP以外の神経ペプチドとして知られている substance P、ニューロテンシンおよびソマトスタチン免疫活性について検討した結果、いずれの

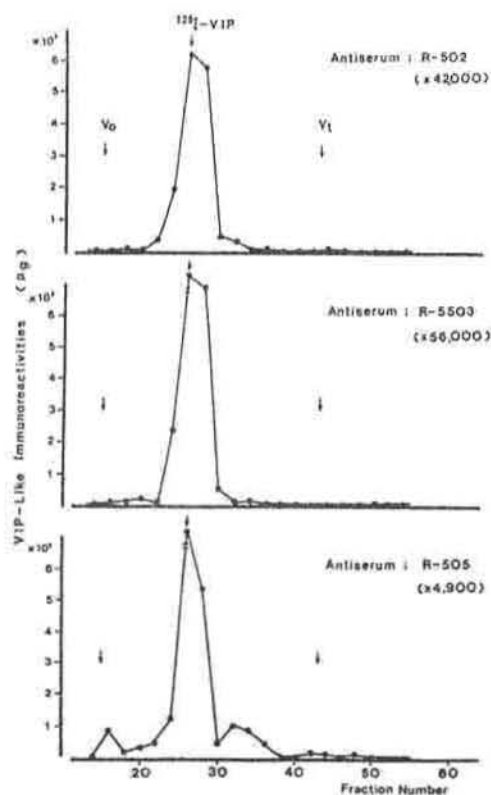


図1 Gel Filtration Profiles of
in Extract from Dog Colon
Muscle

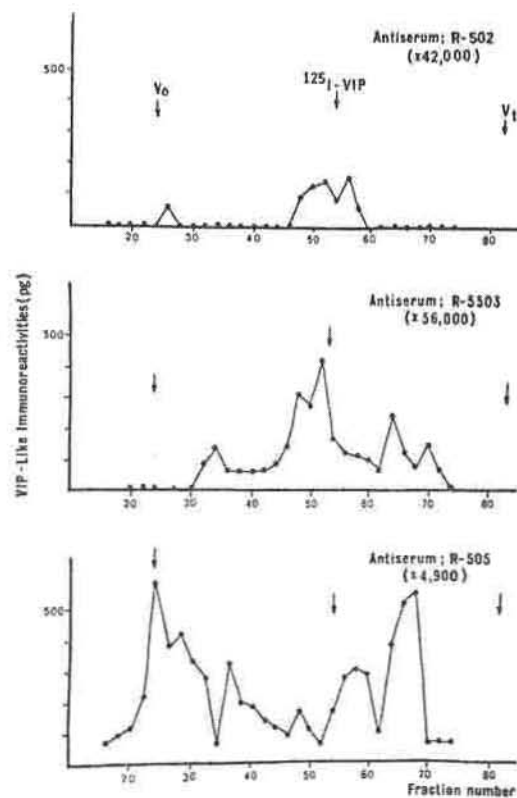


図2 Gel Filtration Profiles of
VIP Immunoreactivity in
Extract from Dog Colon
Mucosa

免疫活性も存在する
ことがわかった(表
3)。

本培養細胞系NB
-1について抗合成
ブタVIP血清R502
を用い酵素抗体法に
より検討した結果,
VIP陽性細胞が明
らかに認められた。

表3 Substance P-, neurotensin- and somatostatin-like
immunoreactivities in extract of human
neuroblastoma cell line NB-1

(n = 6)

Immunoreactivity	Concentration ($\times 10^{-6}$ pg equiv./cell)
Substance P	490.0 ± 60.8
Neurotensin	367.0 ± 6.9
Somatostatin	343.3 ± 20.8

考 察

3種類の性質の異なる抗VIP血清, R502, R5503およびR505を用いたラジオイムノアッセイ系でイヌ結腸筋層および粘膜抽出物のゲル濾過分画をそれぞれ検討した結果, 筋層由来のVIP免疫活性は28アミノ酸残基からなるブクVIPのそれと一致するが, 粘膜由来の免疫活性は明らかに異なることがわかった。

神経芽細胞腫培養細胞系NB-1の抽出物のゲル濾過分画を上記3種類のVIPに特異的なラジオイムノアッセイ系で検討した結果, いずれの系においても主要なVIP免疫活性は28アミ

ノ酸残基からなるVIPそのものであることが明らかになった。また, 大分子VIP免疫活性の存在も検出され, C端特異抗血清R505を用いた系ではVIPの分解産物と考えられる低分子量分画の存在も認められた。なお, C端特異抗血清R505では大分子分画が認められなかったが, これは本抗血清の抗原認識部位であるC端部が大分子型では遮蔽されたためと推定される。R502およびR5505を用いる系で検出された大分子分画はVIPの前駆物質と推定される。この神経芽細胞腫培養細胞系にソマトスタチン, ニューロテンシン, substance Pなど他の神経ペプチドが検出されたことは興味深く, これらについてさらに詳細な検討を行っている。

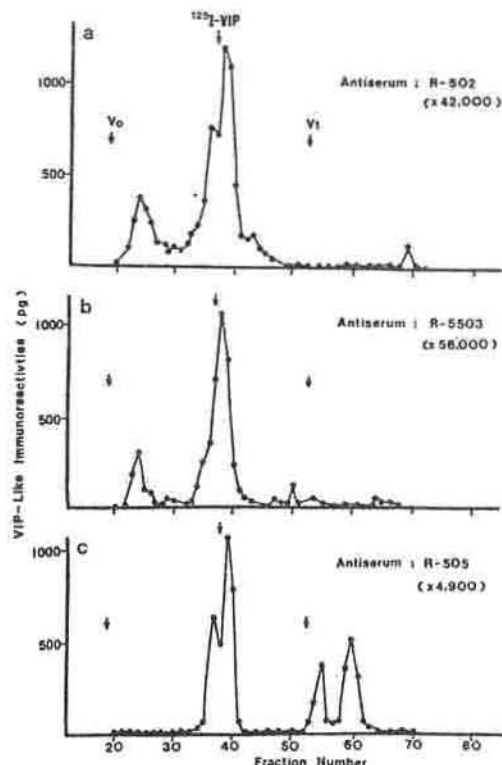


図3 Gel Filtration Profiles of VIP-like Immunoreactivity in NB-1 cell extract

研究課題 セクレチンに関する研究

セクレチンはVIPと比較的類似したアミノ酸配列をもつ消化管ホルモンの一つであり, 強力な膵液分泌作用を有することが知られている。セクレチンN

端部は活性に重要なことが示唆されていることから、本研究ではN端部を置換した数種のセクレチン誘導体を合成し、それらの構造と活性の関係を考察した。

合成は液相法により行った。合成したセクレチン誘導体は〔1-Pyr(3)ala〕-secretin, 〔1-Tyr〕-secretin, 〔4-D-Ala〕-secretin, 〔4-D-Trp〕-secretin, 〔6-D-Phe〕-secretin, N^{α} -triglycyl-secretin, N^{α} -glycylglutaminylsecretin および N^{α} -glycyllysyl-secretin である。これら誘導体の膵液分泌刺激作用にもとづく活性の比較を表4に示す。ついで、これら誘導体のCDスペクトルを測定した。

セクレチン1位His残基をPyr(3)alaに置換した場合、88%の活性を保持し、His側鎖イミダゾールの塩基性は活性発現に関与していないことが明らかにになった。4位Gly残基をD-Alaに置換した場合、さきに報告した4位L-Ala置換誘導体よりも高活性を示すことがわかった。一方、アシル化誘導体はいずれももとのセクレチンに比し活性の低下がみられ、持続性も認められなかった。

本研究で合成した誘導体はアシル化体を含め、そのCDスペクトルは低活性を示す〔4-D-Trp〕-secretinをのぞき、いずれもセクレチンと類似のス

ペクトルを示し、1位および4位の置換はセクレチンの立体構造に大きい影響を与えていないことが示された(図4, 図5, 図6)。

消化管ホルモン分泌に関する研究

小林は消化管内分泌細胞のホルモン分泌機構を考察し、図7に示すとき過程を提出した。

研究 方 法

研究結果および考 察

表4 Biological Activities of Synthetic Secretin Analogues

Compound	Relative potency (%) (pancreatic juice secretion)
Secretin	Accepted as 100
〔1-Pyr(3)ala〕-secretin	88.3 $\pm$ 16.8
〔1-Tyr〕-secretin	4.3 $\pm$ 3.1
〔4-D-Ala〕-secretin	36.8 $\pm$ 1.6
〔4-D-Trp〕-secretin	5.3 $\pm$ 0.3
〔6-D-Phe〕-secretin	19.2 $\pm$ 3.5
N^{α} -Triglycylsecretin	18.8 $\pm$ 3.6
N^{α} -Glycylglutaminylsecretin	8.4 $\pm$ 1.3
N^{α} -Glycyllysylsecretin	3.4 $\pm$ 0.2

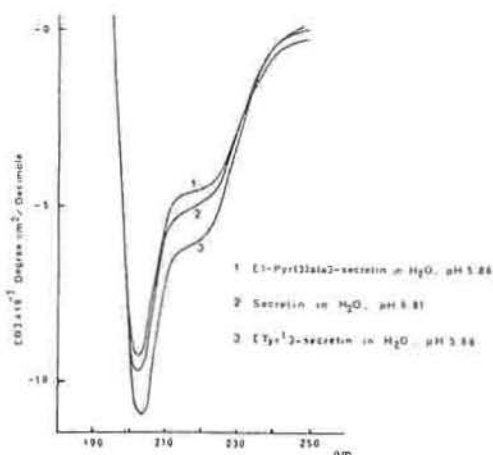


Fig 4 CD spectra of secretin and its 1-substituted analogues. The spectra were obtained at 26°C using a JASCO Model J-40A automatic recording spectropolarimeter.

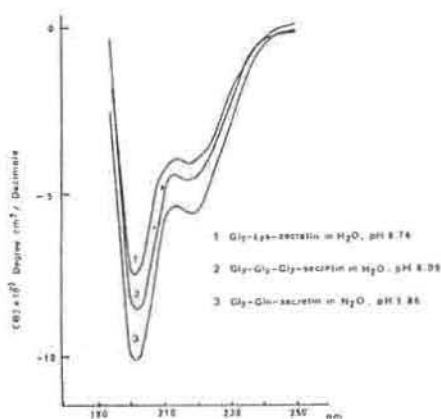


Fig 5 CD spectra of N-acylated secretin analogues. The spectra were obtained at 26°C using a JASCO Model J-40A automatic recording spectropolarimeter.

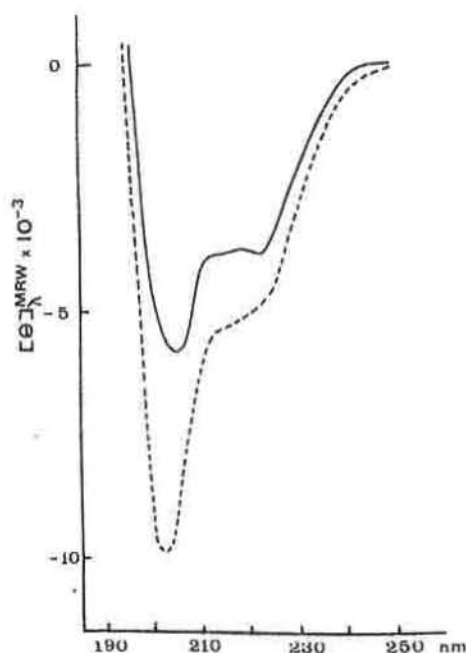


Fig 6 CD Spectra of secretin and its analogs. (---)Secretin, [1-Pyr(3)ala]-secretin, [4-D-Ala]-secretin and [6-D-Phe]-secretin (—) [4-D-Trp]-secretin. The spectra were taken in water at 26°C with a JASCO Model J-40A automatic recording spectropolarimeter.

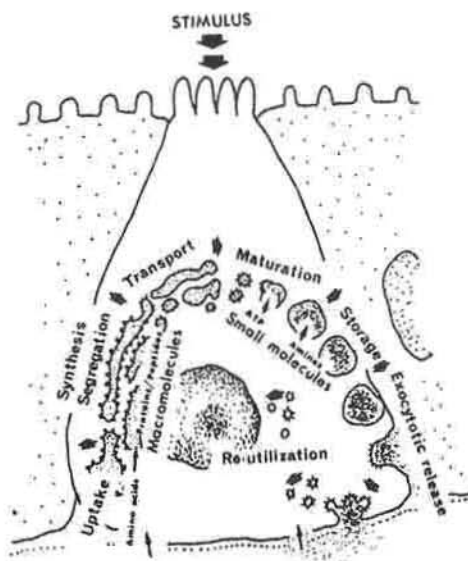


Fig 7 Schematic illustration of our present working hypothesis for the "secretory machinery" of gut endocrine cells.

細胞器官研究系

《生体膜研究部門》

本部門はイカ巨大神経を用いた神経膜興奮のメカニズムの解析と培養神経筋細胞を用いたアセチルコリンリセプターの形成とその同定に関する生化学的研究を進めてきた。

概 要

細胞内 2 価イオンの神経膜内表面に対する基本作用

研 究 課 題

山岸 俊一 古家喜四夫 久木田文夫

細胞内 2 価イオンは 1 mM 以上のイオン状態では神経膜の興奮性を非可逆的に消失させてしまう。しかし、短時間低イオン濃度条件で様々な生理作用を営んでいると考えられるので、濃度条件を確定できる灌流イカ巨大神経を用いて膜の生理機能に対する基本作用を明らかにすると共に、2 価イオンと相互作用をする膜内表面および外表面の高分子構成を明らかにしたい。

研 究 目 的

イカ巨大神経を用いて各種濃度条件の 2 価陽イオンの細胞内灌流を行い、膜の基本的諸特性の解析を行った。

研 究 方 法

(1) 静止膜抵抗は 0.1 mM 以上の Ca, Mg, Mn などの 2 価イオン灌流により減少の一途をたどる。静止膜電位ははじめの数分間に一過性の過分極を示すことが多いが、漸次脱分極に転ずる。1 mM 濃度 2 価イオン灌流が 7 分以上続くと電気刺激による活動電位の発現そのものも消失してしまう。

研究結果と考察

(2) 0.1 mM 以上の濃度の 2 価イオンの灌流により、60%以上の灌流イカ巨大神経において一過性の急激な脱分極が発生する。これは Ca その他の 2 価イオンそのものの作用によって発生した化学興奮と見ることができる。この電位は外液 Na 依存性であり、大きさは電流刺激による活動電位に匹敵する。

以上の結果から、神経膜内表面に対する Ca その他 2 価イオンの基本作用は、外表面に対する安定化作用とは全く性質を異にする非安定化作用であり、この両様の性質を発現するサイトは膜の興奮チャネルの中で極めて相接して存在していると推定される。そして、膜内 2 価イオンによる一時的な非安定化作用が生理機能発現の引き金になっていると考えられ、2 価イオン作用が長時間 (10

～20分)に亘ると生理機能発現を保証する膜の基本構造を破壊してしまうと考えられる。

研究課題 中性分子を用いた, NaチャンネルとKチャンネルの機能及び大きさの解析
久木田文夫 山岸 俊一

研究目的 親水性の中性分子はイオンや疎水性分子に比べ、神経膜との相互作用が少ないと思われる。種々の中性分子がイオンの神経膜透過の量及び神経興奮の時間経過に及ぼす影響を解析することにより、神経膜が正常な興奮をする際のNa及びKチャンネルの動的な構造を調べることができる。

研究方法 細胞内を灌流したイカ巨大神経を用いると、細胞内外液の浸透圧を正常体液の10倍程度にしても神経膜は長時間、興奮を続けることができる。高浸透圧溶液を種々の中性分子（エチレングリコール、グリセリン、ブドウ糖、蔗糖など）を加えることにより調整し、このような溶液中での神経の活動電位及び膜電位固定下での膜電流を解析する。TTX及びTEAを用いてNaチャンネル及びKチャンネルに対する中性分子の影響を別々に解析する。

研究結果及び考察 中性分子を細胞内外液に加えると神経興奮の時間経過は緩やかになり、膜電位固定下での膜電流は小さくなる。このような効果は中性分子の種類に依らず、細胞内外液に同種の中性分子を加えると見いだされる。この効果は中性分子による溶媒の粘性の増加と関係があり、Naチャンネル及びKチャンネルに同じように現れる。この結果、活動電位は大きさが変わらず、形も時間軸に対して引き延ばしただけで殆んど変化しない。

同じ系で、細胞内外液に種類の異なる中性分子を加えて、浸透圧やイオン濃度を一定にして比較すると中性分子の種類に依存した効果を見ることができる。この場合、Na電流とK電流の割合が変わり、活動電位の形も変わる。この現象は主として、中性分子の種類によりチャンネルの出入口でイオンの流入、流出を阻げる程度が異なるためだと思われる。特に膜透過性の大きい、エチレングリコールやグリセリンと殆んど膜を透過しないブドウ糖、蔗糖では膜電流の阻止能が著しく異なることが分った。この結果はグリセリンぐらいの大きさをもつ分子がチャンネル細孔内に、僅かに入りこむことを示唆している。

このような仮定のもとに、TTX又はTEAを加えたイカ巨大神経を用い、NaチャンネルとKチャンネルの大きさを測定することができる。

このような測定は神経興奮時の中性分子の透過性の増大を放射性同位元素を用いて測定する実験と相補的であるが、透過性の実験では検出できない、僅かな中性分子の流入を測定できる点、実際の神経興奮の時間経過で測定できる点、Na及びKチャンネルの大きさを別々に測定できる点で優れている。

神経筋シナプスアセチルコリン受容体の形成と作動機序

研究課題

杉山 博之 山下 幸子

神経系の機能素子・構成素子はシナプスであり、その形成、成熟の機構、作動機序の理解は生理学の基本課題のひとつである。シナプスはまた、特殊に分化した細胞膜を通して細胞同志が相互作用を行う場所であり、生体膜が最も特殊に分化した例のひとつでもある。生体膜研究部門では、このようなシナプスの形成機構と作動機序を分子レベルで理解することを目的のひとつとしている。このため、シナプスとしての基本的特徴を全て備え、かつ最も単純で、いろいろな知見の集積された系として、神経筋シナプスに注目し、特に、シナプス後膜部分に高濃度に集中局在しているアセチルコリン受容体分子を直接の手がかりとして、細胞膜の分化の過程、神経筋細胞間相互作用の仕方を生理学的、生化学的に究明する。

研究目的

神経筋シナプスの形成過程を十分に制御された環境下で観察し、かつその物質的基盤を生化学的に追求するには、組織培養系が非常に適した材料である。培養した骨格筋細胞および神経細胞を用いて、骨格筋細胞膜上のアセチルコリン受容体の生化学的特徴を調べ、神経の存在によってそれがどのように変化するかを検討している。特に、受容体分子を抽出し、等電点電気泳動法によってその等電点を測定し、神経細胞が及ぼす影響を調べた。

研究方法

またアセチルコリン受容体をケイ光色素で染色、可視化し、超高感度TVカメラを用いて顕微観察することによって生きた細胞の細胞膜上の受容体分子の動き、分布の様子を追跡することを計画し、その予備的実験を行った。

一方、シナプス作動機序の研究については、培養神経細胞膜上の α -アドレナリン性受容体をモデルとして取り上げ、微小電極挿入法と生化学的方法を組合わせて、その反応機構についての研究を行った。

研究結果と考察

骨格筋のアセチルコリン受容体分子にはシナプス型と非シナプス型と言われる2つの型があり、シナプス型は神経筋接合部にのみ集中していると言われていた。培養骨格筋細胞のアセチルコリン受容体について、そのタイプを調べたところ、マウスの骨格筋クローン細胞においては前記2型と非常によく似た2つの種類の受容体分子が見いだされた。それらの分子の等電点は、シナプス型および非シナプス型アセチルコリン受容体の等電点とそれぞれ極めて近い値を示し、おそらくその2型に対応するものであらうと示唆された。一方、鶏胚由来の骨格筋細胞から得られるアセチルコリン受容体分子について同様の検討をしたところ、非シナプス型に対応すると思われる一種類の分子のみが見いだされた。

この結果から、ひとつの可能性として次の仮説が推論される。骨格筋細胞は少なくとも培養系においてはシナプス型・非シナプス型両型のアセチルコリン受容体分子を合成する能力を有し、実際合成している。ニワトリの場合には、シナプス型・非シナプス型の区別が哺乳類の場合ほど著しくないか、同じものであるかも知れない。

また、超高感度 TV カメラを用いてケイ光顕微鏡観察しながら培養を続ける技術について、条件の検討、特に培養容器の開発、試作を行った。

ニューロブラストーマとグリオーマの雑種細胞を培養し、その α -アドレナリン性受容体の反応様式を検討した。この細胞の場合、 α -アドレナリン受容体部位は明確に検出されるにも拘らず、受容体の活性化によって膜電位的には何ら反応が検出されなかった。細胞内環状ヌクレオチド濃度の変動という生化学的応答については、 α -受容体の活性化によって明らかに応答が見いだされているので、この結果は α -受容体の作動機構についてのひとつの示唆を与える。即ち、 α -受容体の作用の仕方は、 β -受容体に対してしばしば言われるような受容体活性化→環状ヌクレオチド濃度の変動→膜電位の変化、という直列的なものではなく、環状ヌクレオチド濃度と膜電位が互いに独立に並列的に起り得るものであらうと考えられることである。

生 体 情 報 研 究 系

《 神経情報研究部門 》

生体においては感覚情報を受容器がうけとめ、情報が受容された後、神経によって脳に達し、脳において解読、判断されるのであるが、生体情報研究系はこれらのシステムを総合的に研究することを目的としている。

神経情報研究部門においては感覚機構のうち視覚情報の受容、伝達、処理を行っている網膜の神経機構を明らかにする研究を続けている。網膜の視細胞はまず光信号を電気信号に変換する。この際、眼底に投写された2次元的に連続な入力像は個々の視細胞によって点に分解される。高次網膜内ニューロンにより、この量子化された信号から入力像の特徴抽出が行われ、視覚情報として視神経を経由して中枢に送られる。これらの過程を明らかにして行くために、本年度は次の3項目を重点的に研究した。

- (1) 網膜細胞の機能と形態との対応。
- (2) パターン視の基礎過程：主として各種錐体の配列について。
- (3) 双極細胞を中心とした網膜内情報伝達機構。

網膜細胞の機能と形態との対応

金子 章道 田内 雅規

脊椎動物網膜において、光照射の開始を伝える“ON”信号と、暗転を伝える“OFF”信号とは、異なった経路で処理・伝達されていることがこれまでの研究で明らかになっている。即ち、“ON”信号は光照射に伴い脱分極性応答を示すON型双極細胞で発生した後、内網状層b層（神経節細胞寄りの半分）でON型アマクリン細胞やON-中心型の神経節細胞へ伝達される。一方“OFF”信号は光照射により過分極性応答を示すOFF型双極細胞に発生し、内網状層のa層（強膜側の半分）でOFF型のアマクリン細胞やOFF-中心型の神経節細胞へと伝達される。

このように内網状層が“ON”信号と“OFF”信号との伝達に関して、2つの層に機能的に細分化されるという仮説は、細胞内染色法により、双極細胞、アマクリン細胞、神経節細胞の応答様式と形態との間に対応が見出だされて確かなものとなった。即ち、ON型双極細胞の軸索末端部は内網状層b層に達して

概 要

研 究 課 題

終っており、ON型アマクリン細胞やON型神経節細胞の樹状突起の拡がりも同じくb層に局限していること、一方、OFF型双極細胞の軸索末端部はa層に終っており、同じa層にOFF型アマクリン細胞やOFF型神経節細胞の樹状突起が局限しているという所見である。

さて、双極細胞の軸索の走向を考えると、これは網膜の層（内網状層も含めて）に対し垂直に走っている。内網状層のa層は双極細胞に近い側にあるので、OFF型双極細胞の軸索はb層を横切らず直接a層へ到達することが出来るが、ON型双極細胞の軸索はa層を通過してからでないとb層へ到達することが出来ない。ON信号とOFF信号の間で独立が保たれるためには、ON型双極細胞における求心性シナプス（双極細胞からアマクリン及び神経節細胞へのシナプス）が、a層を通過する軸索部分には存在せず、b層の部分に局限していることが必要であり、こうした形態学的知見を得ることが強く求められている。

これまでの細胞内染色法に好んで用いられたプロシオンイエローは、電子線を透過してしまうので電子顕微鏡下ではトレーサーとして役に立たなかった。最近用いられるようになった horseradish peroxidase (HRP) は、光学顕微鏡観察時のトレーサーとしてだけでなく、電子顕微鏡下でも観察出来る利点があるので、本研究においては HRP を用いて ON 型双極細胞を細胞内染色し、これを電子顕微鏡下で観察してそのシナプスの分布状態を検索した。

研究結果及び 考 察

明順応したコイの眼球を剔出し、網膜を色素上皮層から剥離した後、表面を人工液で灌流する。HRP 5% 溶液を詰めた微小電極を ON 型双極細胞に刺入して応答（図1）を記録した後、電極から +5 nA 程度のパルス電流を通電して

図1 ON 中心型双極細胞の応答。上段は直径 600 μm の小光点（光強度は 5×10^{11} フォトン/秒・ cm^2 ），下段は内径 1 mm，外径 3 mm の環状光（ 3.4×10^{11} フォトン/秒・ cm^2 ）。各記録の下に横線は 0.4 秒の光照射を示す。



電気泳動法的に HRP を細胞内に注入する。標本はアルデヒド混合液で4℃にて一晚固定した後、diamino benzidine (DAB) 及び過酸化水素と反応させ、細胞の存在を解剖顕微鏡下で確認した後、オスミック酸にて再固定する。脱水後、Quetol 樹脂に包埋する。

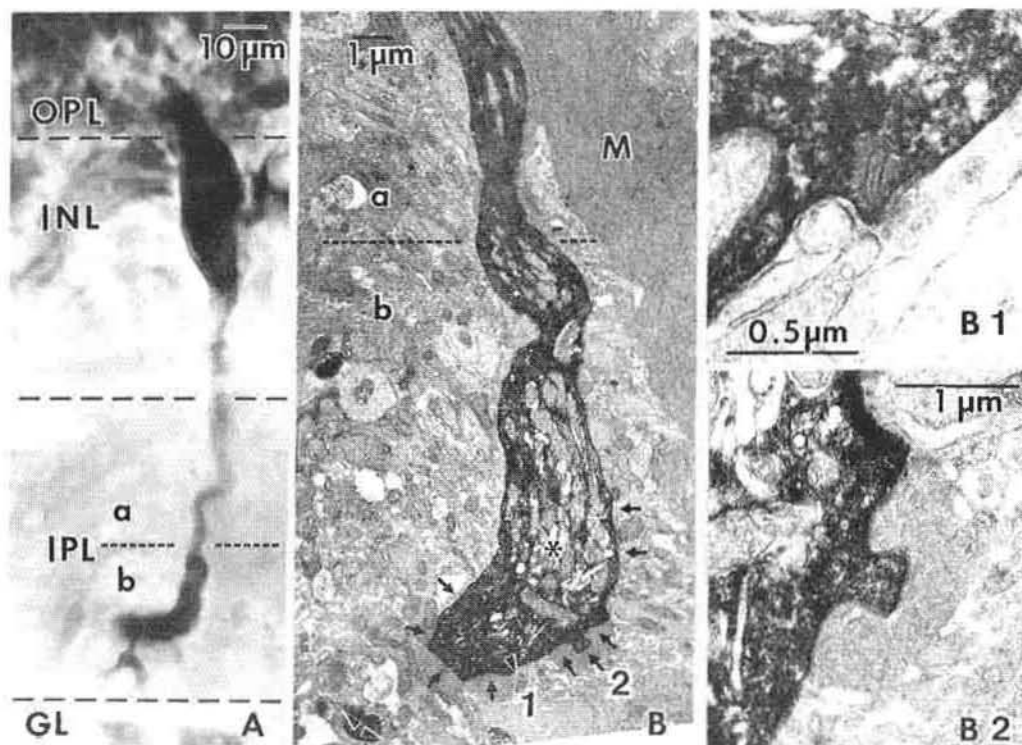


図2 図1の応答を記録した双極細胞の形態。

A ; 光学顕微鏡像。OPL : 外網状層, INL : 内顆粒層, IPL : 内網状層 (a : a層, b : b層), GL : 神経節細胞層。

B ; 同じ細胞の電子顕微鏡像。破線は内網状層 a, b層の境界を示す。三角はリボンシナプス, 矢印は他の細胞から双極細胞への遠心性シナプス。* ; ミトコンドリア, M : ミュラー細胞。

B 1 : 図B中 * 1 * と印したリボンシナプスの拡大像。B 2 ; 図B中 * 2 * と印した遠心性シナプスの拡大像。

標本は約 30 μm の厚い切片に切り、光学顕微鏡下で観察、写真撮影を行った後、再包埋し、30 μm の切片を約 400 枚の電子顕微鏡用の超薄切片とする。図2はこのようにして作成した ON 型双極細胞の軸索部分である。双極細胞の軸索部分には多数のミトコンドリア(*)が見られ、この図の断面の約39%の面積を占めていた。

この細胞について約 400 枚の超薄切片を電子顕微鏡下で観察した結果、6 個のリボンシナプスが同定出来たが (4 個は軸索末端膨大部に、他の 2 個は膨大

部から突出している細い突起内に)、その位置はいずれも軸索がb層内に存在する部分であり、a層を通過する部分には1つも見られなかった。a層を通過している軸索に添ってミュラー細胞が走っているのが認められた。

軸索膨大部を取り囲んで約200 Åのシナプス小胞を含んだ9個のシナプス前終末が双極細胞に終っており、b層の部分にある軸索表面の約84%を覆っていた。今回の研究においては、これらのシナプス前終末の起源を同定することは出来なかったが、これまで云われているように、恐らくアマクリン細胞由来のものと思われる。b層に突起を伸ばしているアマクリン細胞はON型であるから、これらのシナプス前終末はON型アマクリン細胞のものであると考えられる。このことは双極細胞とアマクリン細胞間に相互干渉が存在する場合、その相互作用は応答型を等しくする細胞間で行われていることを示唆している。

今回の研究は、網膜においてON信号とOFF信号とが互いに独立な経路を形成しているという仮説を強く支持する知見を提出するものであり、ON型アマクリン細胞とOFF型アマクリン細胞はその伝達物質を異にしているという最近のラジオオートグラフィーによる観察と相俟って、内網状層の機能分化を確立する基礎となるものである。

研究課題 パターン視の基礎過程：亀網膜の錐体の分布と配列

大塚 輝彌

研究目的 外界の物体像は視覚情報の中でも最も重要な情報の1つである。眼底に映じた外界の像はまず視細胞によって「連続的な像」から「点状の像」に量子化された後に、神経細胞の統合を受けて情報の抽出化が行われ、中枢に送られる。視細胞の分布及び配列を調べることは、視覚におけるこのようなパターン受容の基礎的な研究課題である。

網膜の視細胞は杆体と錐体より成る。著しい形態的な違いから両者は容易に識別出来るため、ヒトを始め多くの脊椎動物の網膜でその分布が詳しく調べられている。明所のパターン受容は、分光感度の異なる赤・緑・青の3種類の錐体によって8色に分解されて量子化されるので、これらの錐体が網膜上でどのように分布するのか、又どのような配列構造があるのかを調べることに、極めて重要な問題である。しかし、各錐体の形態とその分光感度を対応づけ、形態から分光感度を推定することは困難であったため、錐体の分布と配列に関する報告はすくない。

亀網膜の錐体内節には、直径4～8 μmのカロチノイドを含む球形の油滴が

存在する。この油滴の色と各錐体のスペクトル応答との間には以下の関係があった。即ち、赤錐体は赤色油滴を含み、緑錐体は橙色油滴、青錐体は無色油滴、複合錐体は黄色油滴を含むというものである (Ohtsuka, '78)。この関係を用いて各錐体を油滴の色から同定し、網膜上の分布と配列を調べた。

亀 (クサガメ) の眼球を摘出し、眼球杯標本を作る。これをホルマリン固定し、眼球内に 8% 寒天液を詰めて固化し、半球状の寒天の上に剥離網膜を移した。観察すべき箇所を切出してスライドガラスに広げ、顕微鏡下で観察した。油滴は退色・変形しやすいため、写真に撮り 1600 倍に拡大して画像解析装置にかけ油滴の数、直径を計測した。

研究方法・結果

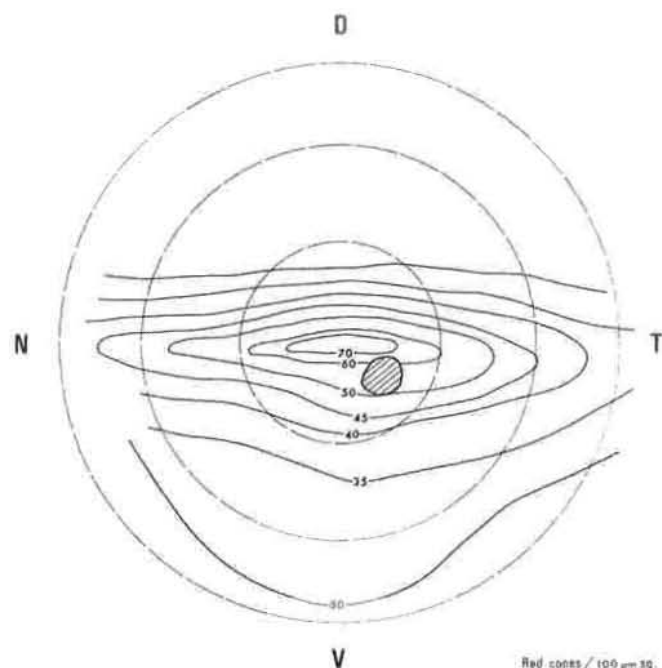


図3 亀網膜の赤錐体の密度分布等高線図。

クサガメ (甲長 21 cm) の左眼における赤錐体の密度 (100 μm 枠内の錐体数) を 1 mm 間隔で計数し等高線に描いた。

破線は網膜の中心から網膜上 1 mm (視角 12°) ごとの同心円。

斜線部は視神経乳頭。

D, V, N, T は各々背、腹、鼻、尾側を表わす。

図3は左眼の赤錐体の密度分布等高線図である。100 $\times$ 100 μm の枠内に数えられる錐体数をその部位の密度と定義して、等高線を引いた。既に報告されているように、錐体の密度分布は腹側に頂点をもつ逆三角形を呈し、密度が高くなるに従い、網膜の中心部に鼻-尾軸を長軸にもつ楕円形になる。最大密度は視神経乳頭の鼻-背側約 0.5 mm にある。この密度分布をさらに詳しく調べるため、背-腹軸と鼻-尾軸に沿って 200 μm ごとに 100 $\times$ 100 μm の枠内に数えられる各錐体数を調べた。

図4の左側は背-腹軸上の赤錐体の密度と油滴の直径 (赤錐体の直径) 及び

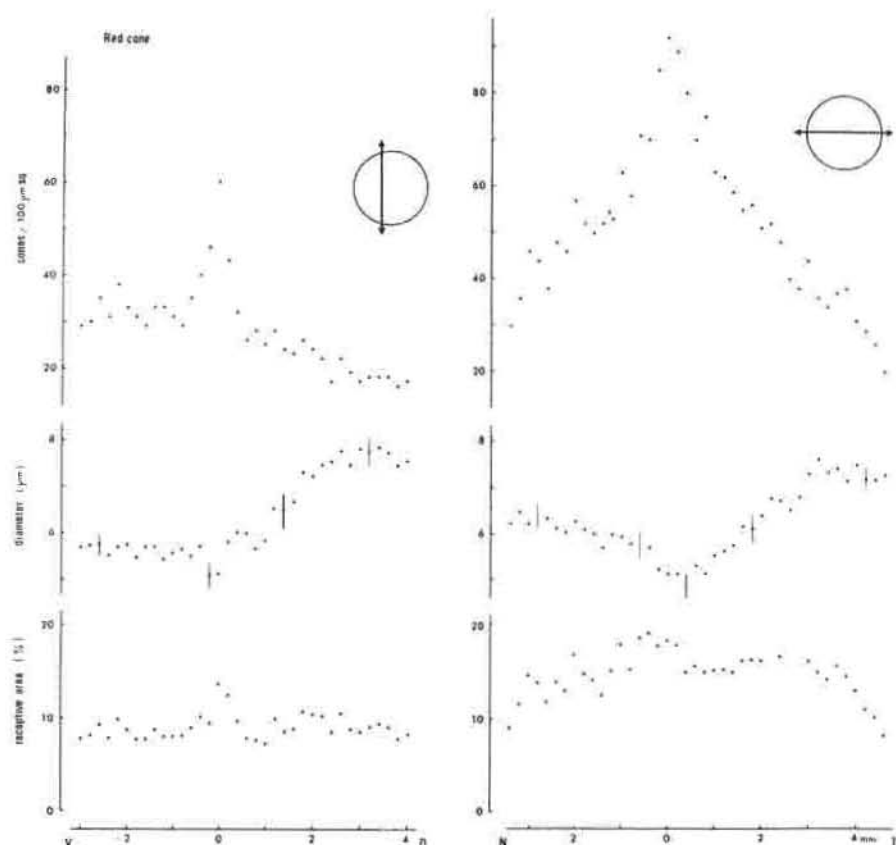


図4 背-腹軸，鼻-尾軸上の赤錐体の密度分布，錐体直径と受容面積。

左図は背-腹軸，右図は鼻-尾軸の各データを示す。

下線は網膜上の距離を表わしており，密度分布の最大値を示す部位をもって原点に定めた。

各データは $200\mu\text{m}$ 毎に計測した。

密度分布は $100 \times 100\mu\text{m}$ 枠中の赤錐体数，錐体直径は赤色油滴の直径，受容面積は密度分布 $\times$ 赤色油滴の平均面積を表わす。

直径の縦棒は各点における直径の標準偏差 (10 個) を示す。

赤錐体の受容面積 (単位面積当りに赤錐体の占める割合) を示している。横軸は網膜上の距離である。赤錐体の密度分布は，網膜の中心部に最大密度のある幅約 1mm の単峰状を呈し，腹側ではほぼ一定値を示すが，背側では中心からの距離と共に減少している。内節の直径は密度分布と鏡像関係にあり中心部では小さく腹側では一定値を示し，背側では距離と共に増大し，直径 $7.8\mu\text{m}$ に達している。このように，密度分布と内節の直径は部位によって異なるが，受容面積を見ると中心部の15%を除き，ほぼ一定の値 (8-10%) を保っている。図4の右側は鼻-尾軸で見たものである。水平軸上でも密度分布と直径をとる

と、網膜の中心部に最大値をもつ単峰状の分布を示し、錐体直径は密度分布と鏡像関係にあることが分かる。受容面積は周辺を除き15~20%を維持している。これは肉眼で剥離網膜を観察すると、水平軸に赤い筋が見られるが、赤錐体の密度が高いため赤色油滴の占める面積が多くなることによると考えられる。

緑錐体、青錐体の密度分布は赤錐体と異なり中心部分と周辺部分とで大きな違いが見られなかった。しかし、錐体の直径は中心部で小さくなる傾向が認められた。また受容面積は網膜全域に渡って緑錐体で4~5%、青錐体で3~5%の一定値を示している。

複合錐体は赤錐体とはほぼ同じ分布を示し、又直径も中心部で小さく、受容面積は網膜の中心部の鼻-尾軸上で8~10%、その他の領域では4~5%となっており、赤錐体と同じ傾向が認められた。

これらの結果から従来、亀の網膜には鼻-尾軸上に「線状中心窩」、と呼ばれる長い中心窩が存在するものとされていたが、詳しく分布を調べてみると、直径200 μm 以下の「中心窩」に相当すると考えられる部位が存在していることが明らかになった。中心窩における各錐体の割合は赤錐体50%、緑錐体11%、青錐体11%、複合錐体28%であった。4種の錐体の合計数は1 mm^2 あたり中心窩で18000、周辺で7000と約2倍の差があるが各錐体の比は中心窩でも周辺部でもほぼ同じであった。

次に錐体の配列を観察すると、中心窩では細胞数が多いため赤錐体が3~5個ジュズ状に連なっているように見えたが、周辺に向うに従い、赤錐体自身の直径が約1.5倍増大するためと杆体が現われるために錐体間の距離が拡大する。他の錐体についても同様の傾向が見られた。

魚類の視細胞には規則的な配列が報告されているが、亀の錐体の配列には規則性は認められない。しかし一見不規則な配列構造の中にかくされた規則性の存在を確認するため、レーザー光回折装置を用いて定量的に解析した。

密度分布に用いた錐体の顕微鏡写真から4種の錐体の位置を透明フィルム上に抽出し、縮少複写した後、レーザー光回折装置にかけて、錐体の網膜上の位置の光学的フーリエ変換像を得た。網膜全域に渡って各錐体、2種又は3種の錐体の組み合わせなど、あらゆる組み合わせの可能性を考慮して回折像を検討した。

この結果、亀網膜のどの視細胞にも、規則的な配列構造は認められなかった。このように、視細胞の配列が不規則であることはパターン受容にとってどのような役割を果たしているか今後さらに検討してゆきたい。

考 察

研究課題 鯉網膜の双極細胞におけるシナプス電位の解析

田内 雅規 金子 章道

研究目的 脊椎動物網膜の双極細胞の受容野は同心円状の中心部と周辺部からなり各々光応答の極性を異にしている¹⁾。双極細胞は受容野中心部の光照射に対して脱分極性に応答する ON 型と過分極性に応答する OFF 型が知られ形態的な差異も認められる²⁾。両細胞共に光順応条件によっては主入力が視細胞杆体あるいは錐体に変化し得ること、colour opponency を有するものがみられることも明らかになっている³⁾。このように二次ニューロンである双極細胞のレベルで視覚現象で知られる同時対比、プルキンエの移動および色対比の基礎となるような応答が観察され、さらに光刺激に対応する興奮と抑制の過程が細胞の機能分化によって成立していることは非常に興味深い。上述したような複雑な機能発現の成因となるであろう視細胞-双極細胞間のシナプス連絡機構あるいは視細胞-水平細胞-双極細胞間の相互干渉については未だ不明の部分が多く、種々の順応条件、空間的刺激の条件あるいは色光条件の下で双極細胞のシナプス電位を分析してゆくことが重要と思われる。

本実験は ON 型の双極細胞について、明順応状態で主入力が錐体である場合の受容野中心部照射に対する応答発生機構を電位固定法および定電流通電法を用いて膜特性の面から調べると共に応答のイオン依存性についても検討したものである。

研究方法 実験には体長30cm程度の鯉 (*Cyprinus carpio*) を用いた。動物は飼育槽中にて約1時間、200 lumen/m² の光で照射し明順応状態とした。pith した後、眼球を摘出し網膜を色素上皮から剥離して灌流槽中に視細胞側を上にして固定した。実験中は標本に約1 lumen/m² の定常背景光を与えた。電極の刺入および光照射は視細胞側からおこなった。光刺激には白色光を用い、400 msec 持続の小光点 (直径 200 μm) と環状光 (内径 1 mm, 外径 3 mm) を交互に適当な間隔で与えた。光強度は最大応答を得る所とした。細胞の刺入には二連式微小電極を用い一側を膜電位の記録に、他側を電流通電用とした。

研究結果 11例の ON 型双極細胞について膜電位固定実験を、また14例について定電流通電実験をおこなった。

細胞を暗時膜電位に固定して光照射をおこなった際に内向きの応答電流 (clamping current) が観察された。また光応答電位と膜電位固定時の光応答電流の時間経過は相似であった。固定膜電位を暗時膜電位よりさらに過分極させた場合は光刺激に対する応答電流は増大 (全例) し反対に脱分極させた場合は減少あるいは反転することが観察された。反転電位は一例 (+50 mV) についてのみ見られたが、反転しないものについても、暗時および光照射時の電圧-電流関係の延長から、+42 (± 10) mV と推定された。暗時の双極細胞膜の slope conductance は $3.6 (\pm 1.9) \times 10^{-8}$ S で、光照射時には $0.26 (\pm 0.17) \times 10^{-8}$ S の増大が認められた。膜電位を種々のレベルに固定した場合の電流の時間依存特性をみると、固定膜電位が暗時膜電位より凡そ ± 60 mV 以上、偏移した場合には顕著な非線形特性が現われる傾向がみられた。過分極の場合は内向き電流の緩徐な増大が、脱分極では外向き電流の減少とそれに続く増大という 2 相性の変化が認められた。

定電流通電による実験の結果、光応答電位は過分極によって増大し、脱分極によって減少するのがみられたが、0 膜電位付近からは脱分極による光応答の減少の程度は小さくなった。電流-電圧関係からみた膜の暗時での slope resistance は $24.6 (\pm 6.0)$ M Ω で、光照射によって $2.7 (\pm 2.5)$ M Ω の抵抗減少を認めた。また暗時膜電位から 30~40 mV 以上脱分極させた場合には電位-時間依存性の外向き整流特性の存在が知られた。

シナプスにおいて伝達物質放出を阻害する Co^{2+} (2 mM) を網膜灌流液に加えると膜電位は脱分極し、速かに最大光応答の膜電位付近まで達した。光応答は脱分極に伴い減衰、消失した。そのような状態の際、外液の Na^+ を choline $^+$ に置換すると、細胞は再び暗時の膜電位付近まで再分極した。

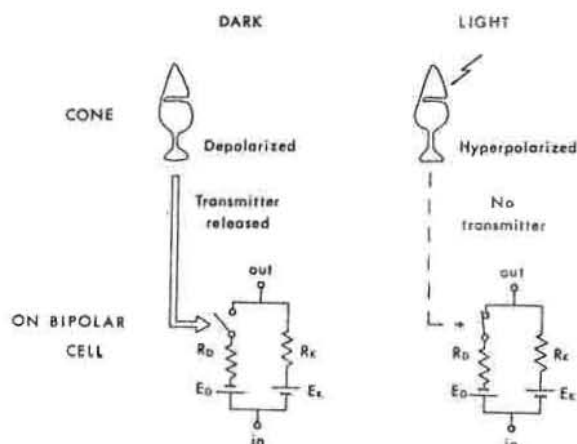


図5 暗時および光照射時の視細胞 (錐体) からの伝達物質放出と ON 型双極細胞に対するその作用。暗時、視細胞は脱分極して伝達物質が持続的に放出されている。この伝達物質は双極細胞のシナプス下膜に作用して、 Na^+ に対する膜透過性を抑制している (E_0 に連なるスイッチが開放していることで表わされる)。その結果、細胞は K^+ の平衡電位に近づき過分極の状態にある。光が照射された状態では視細胞は過分極し、伝達物質の放出が止むためシナプス下膜の Na^+ 透過性は増大し Na^+ の平衡電位に近づく方向に脱分極応答が現われる。

以上の結果から ON 型双極細胞の受容野中心部照射に対する脱分極応答は、応答に伴う conductance の増大があること、正の反転電位を有すること、および Na^+ 依存性のあることなどから Na^+ に対する膜透過性の亢進によって発現すると考えられる。一方、視細胞のシナプス終末からの伝達物質放出は暗時、視細胞が脱分極している際に起き、光照射によって過分極した際に止むという多くの証拠がある 4)5)。本実験における Co^{2+} の投与実験は光照射した場合の細胞応答を表現したものと解釈でき、伝達物質の ON 型双極細胞のシナプス下膜に対する作用は主として Na^+ に対する膜透過性の抑制にあると思われる (図5)。

- 1) Kaneko, A. (1970). Physiological and morphological identification of horizontal, bipolar and amacrine cells in goldfish retina. J. Physiol. 207, 623-638
- 2) Famiglietti, E. V. Jr., Kaneko, A. and Tachibana, M. (1977) Neuronal architecture of ON and OFF pathways to ganglion cells in carp retina. Science, N. Y. 198, 1267-1269
- 3) Kaneko, A., E. V. Famiglietti, Jr. and Tachibana, M. (1979) Physiological and morphological identification of signal pathways in the carp retina. in "Neurobiology of chemical Transmission" (Eds. Hall, Z. and Otsuka, M), John Wiley & Sons, Inc. New York. P. 235-251
- 4) Trifonov, Yu. A. (1968) Study of synaptic transmission between photoreceptors and horizontal cells by means of electric stimulation of the retina (in Russian) Biofizika 13, 809-817
- 5) Kaneko, A. and Shimazaki, H. (1975) Effects of external ions on the synaptic transmission from photoreceptors to horizontal cells in the carp retina. J. Physiol. 252, 509-522

《 高次神経機構研究部門（客員部門） 》

高次神経機構の研究

塚原 伸晃 外山 敬介 村上富士夫

研 究 課 題

高次神経系における感覚と運動の連関機構を研究する。

研 究 目 的

上記の目的遂行のため、電気生理学的方法、電子顕微鏡を含む形態学的方法、および計算機画像処理技術などの工学的手法を有機的に結合させて研究を行う。また、高次神経系すなわち、高等動物の脳の機能を理解するための鍵ともいえるべき、最も脳らしい機能、すなわち、学習、記憶、適応といった高次神経活動の基礎にある神経系の可塑性に焦点をあて、集中的に研究を行うことを試みており、そのために必要な実験系の開発を行う。

研 究 方 法

中枢神経細胞のシナプスの可塑的变化は神経回路の可塑性に重要と考えられるが、当研究室のスタッフは既に中枢神経細胞の入力の一部を破壊することにより新しく形成されたシナプスが機能しうることを、生理学的方法を用いて定量的に示した。また、より生理的な、中枢ニューロンの入出力が健全な場合も末梢神経の屈伸筋神経の交叉接合のような中枢神経系での回路の組み換えが必要とされるような状況を実験的に作ることによって、ネコ、中脳赤核において新しくシナプス結合が形成されることを示した。これらは、主として、電気生理学的方法と、それに基づく、樹状突起の数学模型（Rall 模型）の数値計算による機能的方法によるものであった。これと相補的な、電子顕微鏡を用いた研究を行うことを当面の研究目標においた。電気生理学-数学模型的研究と組合せて形態的研究を行うわけであるから、電位記録を行った細胞に色素注入を行って、これを標識し、この神経細胞の樹状突起の形態を定量的に計測することが必要となる。このため計算機を用いた画像処理システムを製作し、樹状突起の直径を細胞体中心よりの距離の関数として自動計測することを行った。このデータは、記録した神経細胞の数学模型を作成することと基礎データであると共に、電子顕微鏡画像と光学顕微鏡画像とを対応させるときの資料となる。

研 究 経 過

本年度は、計算機（NOVA8）と、計算機用ビデオとをインターフェシングし、画像処理用プログラムのソフトウェアの開発を中心に行ったが、ソフトウェアはアセンブリー言語で約3万ステップの長さのものであり、本シス

テムは嫁動を開始し、その概要は、日本生物物理学会、日本神経科学協会学術集会、および電気通信学会で発表した。次に、電子顕微鏡による予備的研究を開始したが、本格的な研究は次年度となろう。

また、本研究室の塚原伸晃は、大阪大学基礎工学部と協力して、古典的条件反射系が赤核系で構成できることを証明する実験を行った。これは上記の方法で明らかにされた。中脳の赤核巨大細胞に接続する大脳皮質運動野からの入力の種類の実験操作により発現するシナプス結合の可塑性（発芽）が、正常な脳機能をどのように関係するかを明らかにする目的で行われたものである。換言すれば、本研究室で行っている神経回路の微視的側面の研究はより明らかにされた現象の行動学的側面を解明することを目的としたものである。条件づけを、大脳赤核線維の電気刺激で行い、無条件刺激を前肢の電撃で行うと、約1週間で、古典的条件反射が形成されることが明らかになった。

刺激（大脳-赤核線維）から、前肢の筋電図までの潜時8ミリ秒は、この条件応答が、大脳赤核-脊髄介在細胞1ヶ-運動細胞を介する簡単な径路を介したものであることがわかる。

また、この実験では、赤核脊髄路以外の下径路は切断してあるのでその径路は単純化されており、今後条件反射の細胞レベルの解析のいいモデル系となりうると考えられる。

更に、客員助教授の外山敬介は、東京大学医学部等と協力して、眼球運動中の視覚中枢でのニューロン活動を分析し、サッケード性眼球運動を条件づけたネコで、サッケード興奮型のニューロンと、サッケード抑制型のニューロンの2種類があり、前者は、図形刺激に対して単純型の反応を示し、後者は複雑型の反応を示すことを明らかにした。また、複雑型細胞へ送られてくる非視覚性の興奮反応を解析し、この応答が、眼筋に対する遠心性と求心性の支配を除去する Retrobulbar paralysis でも同様の興奮反応を示すことから、眼筋からのフィードバック情報によるものではなく、眼球運動中枢の運動信号の遠心性コピーによるものではないかとの可能性を示唆した。すなわち、17野の複雑型細胞が視覚情報と、眼球運動情報の統合の場たりうることを示したものである。

考

察

計算機画像処理技術は現在急速な進展をみせている技術分野であり、複雑な形態を対象とする医学分野に広汎な応用分野を有するものである。生物工学、情報工学、電気工学と、対象である生理形態学の境界領域であって、対象に応

じ、また、刻々に進展する技術をとり入れながら、システムの改良を行っていくことが必要である。また、現在は、光学顕微鏡レベルの画像を主たる対象としているが、将来は電子顕微鏡画像にも拡張していくことが必要であろう。

高次神経系感覚と運動の変換機構を研究するとき、感覚系の研究や、運動指令の研究に加えて、情報の記憶や学習という脳の基礎過程の研究を行うことが必要であり、このような観点から、視覚中枢の研究、脳の可塑性の研究、単純化された運動系における条件反射の研究を行ってきた。これらの研究は、また本研究所で行っている「感覚の成り立ちと中枢機構に関する研究」という特別研究の一翼を担うものである。

生 体 調 節 研 究 系

《 高次神経性調節研究部門 》

研 究 目 的

生体調節系は高次神経性調節部門、高次液性調節部門、生体システム工学部門の三部門から成立っていて、各部門は互いに関係を保ちつつ生体における諸種のホメオスタシスの機構を動的かつ定量的に理解する方向に研究を進めている。

高次神経性調節部門は当面の目標として、スタッフの最大の関心事である自律機能のうち心拍動の調節を取り上げその自発興奮の発生源である結節細胞を対象として自動能の成立機転を明確にしようとしている。

結節細胞は脳よりの心臓に対する自律神経系で最も稠密に分布している部分である。従来多くの心臓に対する脳の研究は心拍数を対象として研究を行っているのでその調律発生機構を研究することは部門のプロジェクトを完成させる上に必須である。さらに結節への神経信号の発生部位、中枢における干涉、統合様式等を細胞のレベルで理解することが出来て、はじめて心臓を中心とする自律機能の高次神経系調節の細部が解明されることとなろう。

後者を長期間の研究目的とし、目下は当面の目標に向け全力を注ぐことにした。

従来は洞房結節膜電位の変化よりのみ自律系の末梢機構を論じ、膜電位の背景にあってこれを制御している電圧-時間、依存性の電流変化については殆んど論及されなかった。

この点を解明すべく多くの研究者が心筋を使用してion流解析を試みたが、最も自律神経系の関与の大きな結節細胞についての研究は全く行われず、プルキンエ線維の研究よりの外挿のみが、行われていた。

1972 Irisawa, 1976 Noma, Irisawa の洞房結節の電圧固定法の利用に始まる一連の論文はこの面の研究に先鞭をつけた。

洞房結節細胞におけるイオン流を解明し、続いてこれに対する自律神経の効果を定量的に解明する事が出来れば、自律機能の巨視的な統御法の研究に1つの転機をもたらし得る。

また心筋におけるこれら自律神経機能の研究は一般生理学上の種々な疑問を解決する上で、生理学の歴史的発展からみても、興味ある問題として常に関心が払われてきたので、生理学研究所における他系部門の研究対象と多くの接点を保ちながら研究を進めうる研究分野であると考ええる。

Noma & Irisawa (1976) により開発された微小洞房結節標本を用いて主 研 究 方 法
に電圧固定実験をした。今年度はさらに房室結節にも研究が発展した。

微小標本は多細胞標本における電圧固定実験に適していることを明らかにし
(Noma, Irisawa Kokubun, Nishimura and Watanabe, Nature,
1980)

ウサギ洞房結節における過分極側電位において活性化する電流 (ih) につい 研 究 成 果
て, Yanagihara, K, and H. irisawa Pflügers

Archiv. 1980

洞房結節の静止電位は -40 mV 付近にあるが、この電位より過分極側にテストパルスを与えると -50 mV , -55 mV の付近までは外向き流の漸減がみられるのに対し -60 mV より負電位側のパルスを与えると内向き電流が流れ始める。この電流系はいかなる Kinetics を有するか、その生理的意義は何かについて検討した。この電流はKの逆転電位を超えても内向きに流れ -70 mV においてその時定数は約 2 sec であり、この電流系を ih と称した。ih の逆転電位は -25 mV にあり E_{Cl} に最も近かった。

ih 電流は長期間における心拍数の決定、ペースメーカー野の決定、長時間過分極後の膜電位等に対し生理的な役割をつとめることが明らかとなった。

歩調取り電位に対する K^+ 電流の関与

Yanagihara, K, and H. Irisawa Pflügers Archiv
in Press. (1980)

歩調取り電位は外向き流 (ik) が徐々に減少しこれとともに、内向き背景電流が漸増することによっておこるとされている。今回、ik の Kinetics を再検討し、実験式を作製し、歩調取り電位の再構成を行った結果、ik の関与は最大拡張期電位とそれにつづく $\frac{1}{3}$ の歩調取り電位までであって、後 $\frac{2}{3}$ は遅い内向き流 is 電流によっていることを明らかにした。ik と ibgk とをブロックする Ba^{++} を作用させると、自発活動は停止するが、過分極通流を行うことによって ik なしに自発興奮がocこりうることを示した。

房室結節の遅い電流系による興奮

Noma, A, H. irisawa, S, Kokubun, M, Nishimura and Y.
Watanabe Nature. (1980) 生理学会 (於神戸大学) に発表。

房室結節の微小標本を作成し、二本電極法による電圧固定を行った。房室結節細胞も、洞房結節細胞と同様のイオン流系をもち、その立上り相は遅い内向き流(is)によることを明らかにした。

洞房結節細胞に及ぼすアドレナリンの作用

Noma A, H. Kotake and H. Irisawa

生理学会(於神戸大学)に発表。

アドレナリンの陽性変時作用機転を検討した結果、主な影響はisにあることを明確にした。特にはじめてisのKineticsを明らかにし、d∞の活性閾が-55~-60mVにあることを示した。この結果、歩調取り電位の後 $\frac{2}{3}$ で電位が-55mVより陽電位となる範囲では積極的にisが歩調取り電位の発生に寄与しているという仮説をつよめる実験的根拠を示した。プルキンエ線維とことなり、ikのKineticsにアドレナリンは大きな影響を与えず、isの変化に影響を与えたことも一つの大きな所見であった。

家兎洞房結節細胞におけるアセチルコリン誘発電流測定におけるカリウム蓄積効果の関与について

Pflügers Archiv 379 (1979)

W. Trautwein, A. Noma, D. DiFrancesco ドイツ生理学会

アセチルコリンによって誘発されるカリウム電流の電位及び時間依存性の変化を測定するには一定電位変化に対する膜電流変化を薬物投与前後に記録し、それ等の電流変化の差を求めなければならない。これは薬物は固有のイオン流を誘発し他の電流系には影響を与えないとの仮定に基づいている。アセチルコリンはカリウム透過性を増強させるので流出したカリウムが細胞間のカリウムイオン濃度を上昇させカリウム電流を間接的に変化させる可能性について検討した。活動電位に寄与しているカリウム電流の大きさ及び時間変化をアセチルコリン投与中に測定し、コントロールと比較したところ、4例中1例において電流の大きさが減少しているのを見出した。この事実は細胞膜に面した空間のカリウム濃度が薬物投与中変化しうる事を示しているが、他の多くの例ではそのような所見はなかった。先に発表したアセチルコリンによって誘発されたカリウム電流の時間変化は上記現象でほとんど影響されてない事が示唆された。

家兔洞房結節カリウムチャンネル 透過性の高カリウム液中における変化

Pflugers Archiv 379 (1979) ドイツ生理学会

W. Ostrrieder, A. Noma, W. Trautwein.

細胞外カリウム濃度を上昇させると心筋におけるカリウム電流に対する膜コンダクタンスは上昇する事がよく知られている。この機序を明らかにするためアセチルコリンで誘発されたカリウム電流についてその単一チャンネルのコンダクタンス及び時間依存性変化の速度について測定した。外液カリウム濃度を4倍(12mA)にした場合、膜コンダクタンスは約1.8倍に上昇したけれども電流変化速度は変化しなかった。一方単一チャンネルコンダクタンスは約1.7倍に増加することがいわゆるノイズ解析により明らかになった。したがって外液カリウム濃度はカリウム電流の動態を変化させるのではなくイオンチャンネルの電導度をよくしている事が結論され、この事は膜の Constant field theory とよく一致した。

家兔洞房結節に対するアセチルコリンのイオン作用機序の反応モデル

Pflugers Archiv 382 (1979)

W. Ostrrieder, A. Noma, W. Trautwein.

アセチルコリンによって誘発されたカリウム電流の電位及び時間依存性の変化はイオンチャンネルの変化のみでなく薬物分子と受容分子との反応の総合として解釈される。最も基本的なKatz-Miledi モデルは記録された電流変化及び薬物濃度の影響についてよく説明した。その結果、カリウムチャンネルの開く速度定数は 10^{-6}M Ach で 11.5S^{-1} , 閉じる速度定数は 10S^{-1} , Achと受容分子との反応の解離定数は約 10^{-6}M であった。

家兔洞房結節におけるアセチルコリン誘発カリウム電流の微小振動について

Pflugers Archiv 381, 255-262 (1979)

A. Noma, K. Peper, W. Trautwein.

家兔洞房結節で微小電極法による膜電位固定下で記録されるアセチルコリンによって誘発されたカリウム電流に振幅約 10^{-10}A の微小振動を認めた。これを定量的に解析するため薬物を投与前後に膜電流に含まれるノイズのパワースペクトルを計算し、その差スペクトルを求めたところ、ほぼ1 Hz 付近でノイズレベルが半減するローレンツ型のパターンを得た。これはノイズが少なくとも一つの律速反応段を有するランダムなプロセスに基づいている事を示している。さらにノイズレベルとアセチルコリンによって誘発されたカリウム電流の大き

さの関係を持つ放物曲線の関係が予測された。二項定理に基づいて単一チャンネルコンダクタンス及びチャンネル総数を計算すると約 4 ps のコンダクタンス、 $1/\mu m^2$ の channel 密度が得られた。方法論的には我々の開発した膜電位固定法は薬物により誘発されたノイズの解析に十分使用できる事がわかった。

家兔洞房結節でアセチルコリンによって誘発されたカリウムチャンネルコンダクタンスに及ぼす外液カリウム濃度の影響

A. Noma, W. Osterrieder, W. Trautwein.

Pflugers Archiv. 381, 263-269 (1979)

アセチルコリンにより誘発されたカリウム電流に対する膜コンダクタンスは外液カリウム濃度を 4 倍にすると約 1.8 倍増加する。これは単一チャンネルコンダクタンスの上昇によるのか、チャンネルの life time が延長するのか、あるいは総イオンチャンネル数が増加するのかについてノイズ解析及び電位時間依存性電流変化を測定することによって調べた。

電流時間依存性変化はカリウムイオン濃度によって影響されない事がわかった。異なったイオン濃度で行ったノイズ解析の結果はイオンチャンネル数はほぼ一定であるがチャンネルコンダクタンスが約 1.7 倍増加している事がわかった。Constant field theory において、細胞内 K 濃度を仮定して 3 mM 及び 12 mM 外液 K イオン濃度の際の Conductance を計算すると 7.8 倍の Conductance の増加が見込まれ実験事実がよく説明できた。これ等の結果も洞房結節におけるノイズ解析が大きな誤差なく行われている事を示している。

家兔洞房結節における時間依存性カリウム電流。外液カリウムイオンの影響

D. DiFrancesco, A. Noma, W. Trautwein.

Pflugers Archiv 381, 271-279 (1979)

洞房結節におけるカリウム電流については Noma & Irisawa (1976) によって調べられているが、本論文では主として外液カリウムイオンの影響について調べた。その結果、脱分極時に記録される外向き電流は二つの成分に分解できるかより速い成分が電気的活動を荷っている。速い成分を i_k と定義すると i_k の時間依存性変化速度及び活性化曲線は外液カリウムイオンによっては影響されない。カリウム電流完全活性化曲線を求めると、イオンチャンネルコンダクタンスが高カリウム液で上昇する事が見出された。

《 高次液性調節研究部門 》

1979年度には、教授として九州大学医学部 大村裕教授，助教授として富山 概 要
医科薬科大学 西野仁雄助教授の発令がきまって，新しく客員部門の発足をみ
た。部門としての活動は1980年度からはじまることとなった。

生 理 機 能 研 究 施 設

《 組 織 培 養 標 本 室 》

研 究 課 題 培養神経芽細胞を用いた興奮性及びシナプス形成能獲得過程の解析
古家 園子 古家喜四夫（生体膜部門）

研 究 目 的 神経グリアトハブリッド細胞（NG108-15）は通常の培養条件下では興奮性を示さないが、ジブチルサイクリック AMP 処理により、長い突起を伸ばし、興奮性を持つようになり、培養筋細胞とシナプスを形成することができるようになる。この分化の各段階の細胞について電気生理学的、薬理学的検索を行うとともにその同一の細胞の微細形態を超薄切片法、フリーズフラクチャー法によって調べ、どのような段階を経てどのような興奮性があらわれ、それがどのような微細形態の変化と対応しているかを詳細に比較検討する。

研 究 経 過 ジブチルサイクリック AMP 処理した神経細胞と無処理の細胞を培養し比較することにより今までに以下のような知見が得られた。長い突起を持つ処理された細胞は電気生理的には深い静止電位を持ち、電流刺激による活動電位発生がみられる。形態的には超薄切片法で細胞内小器官が多くなることがわかり、フリーズフラクチャー法によって膜内蛋白粒子の数が倍増することがわかった。しかし上記の結果は平均としての結果であり、詳細に分化の過程を追うためには電気生理的、形態的検索を同一細胞によって行う必要がある。現在電気生理的に調べた細胞に HRP を注入してマーカーとし、その細胞の超薄切片法による形態観察を行っている。今後フリーズフラクチャー法によっても同様に同一細胞で調べるとともに、電気生理的にもより詳しく細胞の諸性質を明らかにしていく予定である。

《日本学術振興会特定領域奨励研究員》

脳内活性物質の抽出・精製・同定

研 究 課 題

星 野 稔

研 究 目 的

針麻酔とは、東洋医学で謂う所の「ツボ」に針を刺入し低周波で通電したとき痛覚閾値が上昇する現象をいう。痛覚閾値は通電後徐々に上昇し、通電を停止すると徐々に低下する。これは、針麻酔に物質性の因子が関与していることを示唆する。一方、エンケファリンやエンドルフィンなどの生体内に存在するモルヒネ様物質が発見され、未知のモルヒネ様物質も含めてこれらの物質が針麻酔の発現に関係している可能性が大きい。ところが、針麻酔の効果は個体差が大きく、針麻酔の有効な群と無効な群に分割できる。この差異は、モルヒネ様物質の放出量の差あるいは分解速度の差によるものと考えられる。そこで、針麻酔に関与する物質性因子の研究の一環として、モルヒネ様物質の定量のためにモルモット回腸を用いた生物検定装置を製作し、エンケファリンを指標にこれを分解する酵素の性質を調べるためにその抽出・精製を試みた。

研 究 方 法

モルモット回腸から縦走筋と腸筋神経叢の複合体を調製した。この標本の両端を糸でしばり、一端はオーガンバス（容量 3 ml）の底部に固定し、他端はUゲージ（東洋ボールドウイン製、T7-8型）に懸けて張力を測定した。記録は、ひずみ計（三栄測器製、6M52型）を介して、ペンレコーダー（三栄測器、レクチグラフ8S）で行った。クレブス液の組成はKosterlitzらの処方にしたがった。ただし、 NaHCO_3 量を約 $\frac{1}{2}$ に減じた。35℃に保温し、95% O_2 -5% CO_2 を通気した。電気刺激は、上下に1 cm離した白金製の輪状電極を用いて、刺激間隔0.2 Hz、持続時間3 msec、電位差64 Vの条件で行った。Met-エンケファリンを用いて検量線を作製すると、およそ 2×10^{-8} ~ 2×10^{-7} Mの範囲で直線性が得られた。

ラット全脳を10倍容の50 mM Tris-HCl (pH 7.4) でホモゲナイズし、エンケファリンを分解する酵素を抽出した。酵素によるエンケファリン分解反応は、35℃で行い、沸とう湯浴中で分解酵素を変性させて反応を停止した。上清に残っている未分解のエンケファリンを生物検定して酵素活性を求めた。

結果・考察 ラット全脳ホモジェネートは、1 μ gのタンパク当り毎分 4.86×10^{-9} モルのMet-エンケファリンを分解した。次に、ホモジェネートを 18,000 rpm, 20分間遠心し、上清を可溶性分画とし、沈澱を不溶性分画として、分解酵素の活性を測定した。可溶性分画の比活性は 2.17×10^{-8} モルMet-エンケファリン/ μ gタンパク/分、不溶性分画の比活性は 3.59×10^{-9} であり、分解酵素の85%が可溶性分画に回収された。さらに、可溶性分画をセファデックス G-150のカラムにかけてゲルろ過を行った所、 $K_d = 0.15$ の位置に溶出された。現在この先の段階の精製を進めているところである。

研究課題 長期に亘る脳活動記録法および脳内活性物質の測定

谷 裕 一 郎

研究目的 脳内活性物質の作用機序を脳活動としての脳波、並びに個々の細胞レベルの活動である神経インパルスの発火パターンから考察し、脳内活性物質と脳活動との関連を明らかにすることを目的とする。

研究方法 脳活動を細胞レベルで把握する必要があることから、実験対象として比較的脳地図のしっかりしているネコを用いる。脳活動としての脳波及び神経インパルスを出来る限り自然に近い状態で記録するためには、無麻酔、無拘束で実験を行う必要がある。そこで、以下に述べる実験方法で行った。脳波 (EEG) の記録に対して慢性埋込み電極を用いた。同時に、脳活動全体の指標としての睡眠レベルを判定するための眼球運動 (EOG)、筋電図 (EMG) を記録する電極

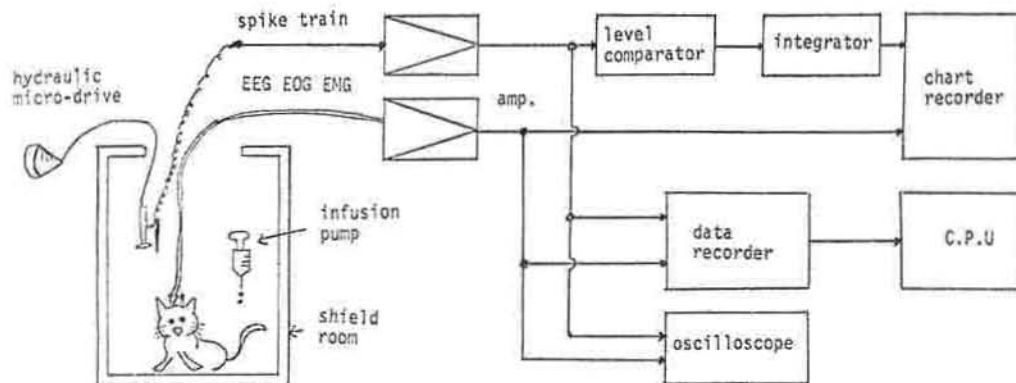


図1 慢性実験システムのブロック図

を装着した。中枢神経インパルスの導出には、慢性実験に最近広く用いられている白金イリジウム電極を使用し、微小電極の挿入には頭蓋取付油圧マニピュレータにより遠隔操作を行う。導出した電気信号は増巾器を経て、データレコーダに記録する。神経インパルスの発火パターンの解析は、計算機システムを利用し統計的処理を行う。脳内活性物質の注入は、あらかじめ脳室内へ装着した細いパイプを介して微量注入器で行う。図-1に慢性実験システムのブロック図を示す。

構成した上記の慢性実験システムにより現在脳内活性物質の作用機序を明らかにする研究を進めている。そこでは、脳活動のレベルを考慮にいれて、覚醒、徐波睡眠、逆説睡眠の3段階における脳活動の変化に対する活性物質の影響を考察する。また、個々の細胞の活動としての神経インパルスの発火パターンが、脳内活性物質によりどのように変化するかを考察することにより、その作用機序を明らかにすることが期待できる。

研究結果・考察

技 術 課

昭和54年度には、技術課技官は7名となり、ようやく課としての体制ができてきたが、技術課に所属する技官が新しい研究組織の中で専門技術を修得し、また技術課として個々の技術を集約してどのように研究面へ対応させてゆくかといったことなどは、まだ充分確立されていない。

また、各自専門技術を修得し、研究体制に充分対応できるまでにはある程度の時間の経過が必要であるが、研究部門ではすでに研究活動が開始されているので、このギャップを1日も早く埋め、技術課が真の技術協力組織として確立されることが望まれている。

1. 昭和54年2月24日～27日の両日、生理学研究所において「生理学技術研究会」を開催し・生理学の研究機器の保守管理と運用、開発はどのように進めたらよいか。という主題のもとに阪大医学部、兵庫医科大などの共同研組織をもっている技官に集って頂き研究会を開催した。研究会の内容は以下の出版物（B5、5月刊）にまとめられている。

●生理学技術研究会報告 第1号：1～20

また、昭和55年2月22日～23日の両日、生理学研究所において「生理学技術研究会（第2回）」を開催し、愛媛大医学部を始め医学関係の技官約40名の参加を得て、技官による研究機器の開発、専門技術職のありかたなどについての研究会を開催した。報告書は次年度に印刷される。



生理学技術研究会（第2回）参加者（22～23-II, 1980）

Ⅲ. 技術課は毎週月曜日の午前8:45分より1時間、定例の技術課ミーティングを開き、技官相互の連絡、技術研修を実施している。また、勤務時間終了後には2時間ほど自主研修を行い「ニューロンの生理学」「D-A回路の設計」などについてのゼミを開いている。

研 究 活 動

Nishikawa, H., Yamada, S., K, Yoshizaki. and Watari, H. (1978) 発表論文
 ^{31}P -NMR study on perfused ventral nerve cords of
 crayfish, Proc. Japan Acad. 40, 397-401.

西川弘恭, 山田誠二, 吉崎和男, 亘 弘 (1978) ザリガニ神経の ^{31}P -NMR
 による研究, 日本生理誌 40, 168.

内齒耕二, 東 晃史, 入来正躬, 長崎紘明, 石川正幸, 蒔田泰夫, 井上昌次郎,
 本多和樹 (1978) 睡眠のリズムと睡眠物質, 須田正己, 早川 修, 中川八
 郎 編 続・バイオリズムとその機構, 155-167.

Uchizono, K., Higashi, A., Iriki, M., Nagasaki, H., Ishikawa,
 M., Komoda, Y., Inoue, S. and Honda, k. (1978)
 Sleep-promoting fractions obtained from the brainstem
 of sleep-deprived rats, Integrative control functions of
 the brain vol. 1 ed. Ito, M., Tsukahara, N., Kubota, K. and
 Yagi, K. 392-396.

横野 論, 吉崎和男, 西川弘恭, 山田誠二, 亘 弘 (1978) ^{31}P -NMR 法
 による筋細胞内 pH 測定, 日本生理誌 40, 203-204.

亘 弘, 西川弘恭, 山田誠二, 吉崎和男 (1978) ^{31}P -NMR によるザリガ
 ニ神経細胞リン化合物代謝の研究, 日本生理誌 40, 272.

西川弘恭, 山田誠二, 吉崎和男, 亘 弘 (1978) 赤血球膜リン脂質の動態
 の ^{31}P -NMR による研究, 日本生理誌 40, 208.

西川弘恭, 山田誠二, 吉崎和男, 藤井崇知, 亘 弘 (1978) ^{31}P -NMR に
 よる脳切片に関する研究, 生化学 50, 908.

二科安二, 北川禎三, 志賀 潔, 堀池喜八郎, 松村勇一, 亘 弘, 山野俊雄
 (1978) リボフラビン結合タンパクに結合したリボフラビン及びその誘導体
 の共鳴ラマンスペクトル, 生化学 50, 825.

長崎紘明, 入来正躬, 本多和樹, 井上昌次郎, 菰田泰夫, 石川正幸, 東 晃史, 内藤耕二 (1978) マウスの脳波の自動分析による睡眠ペプチドの効果検定, 日本生理誌 40, 267.

本多和樹, 井上昌次郎, 菰田泰夫, 石川正幸, 長崎紘明, 入来正躬, 東 晃史, 内藤耕二 (1978) 睡眠促進物質の生理効果, 日本生理誌 40, 273.

Nishina, Y., Kitagawa, T., Shiga, K., Horiike, K., Matsumura, Y., Watari, H. and Yamano, T. (1978) Resonance raman spectra of riboflavin and its derivatives in the bound state with egg riboflavin binding proteins, J. Biochem. 84, 925-932

Higashi, A., Uchizono, K., Hoshino, M., Tani, H., Yano, T. and Yazawa, K. (1979) New technique for EEG recording and drug infusion in the free-moving mouse, Med. Biol. Eng. & Comput. 17, 131-132.

亘 弘, 山田誠二 (1979) 腎における分泌と再吸収のアロステリック理論による解析, 日本生理誌 41, 18-19.

Yoshizaki, K., Nishikawa, H., Yamada, S., Morimoto, T. and Watari, H. (1979) Intracellular pH measurement in frog muscle by means of ^{31}P -nuclear magnetic resonance, Jap. J. Physiol. 29, 211-255.

吉崎和男, 瀬尾芳輝, 丸山圭史, 西川弘恭, 山田誠二, 亘 弘 (1979) ^1H -NMR 法による筋肉および他組織の ^1H -スペクトルの測定, 日本生理誌 41, 42.

Shiga, K., Horiike, K., Nishina, Y., Otani, S., Watari, H. and Yamano, T. (1979) A study of flavin-protein and flavoprotein-ligand interactions. Binding aspects and spectral properties of D-amino acid oxidase and riboflavin binding protein, J. Biochem. 85, 931-942.

志賀 潔, 堀池喜八郎, 二科安三, 亘 弘, 山野俊雄 (1979) D-アミノ酸酸化酵素における解離-会合系, 徳重, 小池, 浜口編 *蛋白質の分子集合と機能, 学会出版センター, 73-95.

吉崎和男, 瀬尾芳輝, 西川弘恭, 山田誠二, 森本武利, 亘 弘 (1979)

^1H -NMR法における選択的水飽和法の基礎的研究, 日本生理誌 41, 118.

Higashi, A., Uchizono, K., Hoshino, M., Tani, Y., Yano, T. and Yazawa, K. (1979) Real time online data processing system for the e. e. g. and body movement during the lifetime of a freely moving mouse, Med. Biol. Eng. & Comput. 17, 416-418.

東 晃史, 内藤耕二, 入来正躬, 長崎紘明, 石川正幸, 蒔田泰夫, 井上昌次郎, 本多和樹 (1979) 脳内の睡眠促進物質とその生物検定, ホルモンと臨床 27, 127-132.

Kitagawa, T., Nishina, Y., Shiga, K., Watari, H., Matsumura, Y. and Yamano, T. (1979) Resonance Raman evidence for charge-transfer interactions of phenols with the flavin mononucleotide of old yellow enzyme, J. Am. Chem. Soc. 101, 3376-3378.

Watari, H., Yoshizaki, K., Nishikawa, H., Yamada, S. and Morimoto, T. (1979) Nondestructive measurement of triglycerides in muscle by ^1H NMR, J. Physiol. Soc. Japan 41, 284.

Shiga, K., Nishina, Y., Horiike, Kitagawa, T. and Watari, H. (1979) Spectral properties of flavins and flavoproteins, J. Physiol. Soc. Japan. 41, 278.

福山美徳, 山野俊雄, 志賀 潔, 二科安三, 亘 弘, 三宅可浩 (1979) 共有結合型フラビン酵素の研究, 構造の同定とその分光特性について, 生化学 51, 652.

三浦 洌, 三宅可浩, 志賀 潔, 亘 弘, 山野俊雄 (1979) D-アミノ酸酸化酵素と β -シアノ-D-アラニンとの反応の中間代について, 生化学 51, 652.

二科安三, 志賀 潔, 亘 弘, 北川禎三, 山野俊雄 (1979) 旧黄色酵素-フェノール誘導体複合体の共鳴ラマンスペクトル, 生化学 51, 791.

亘 弘, 山田誠二 (1979) 腎における分泌と再吸収のアロステリック理論による解析 (結), 日本生理誌 41, 556.

Higashi, A., Uchizono, K., Tani, Y., Hoshino, M., Yano, T. and Yazawa, K. (1980) New apparatus to unmoobilise the head of a mouse, *Med. Biol. Eng. & Comput.* 18, 123-124.

Nishikawa, H., Fujii, T., Yamada, S., Yoshizaki, K. and Watari, H. (1980) ^{31}P nuclear magnetic resonance study on perfused brain slices of guinea pig, *J. Biochem.* 87, 663-666.

Watari, H., Isogai, Y. and Nishikawa, H. (1980) Graphic method for determination of allosteric constants, *J. Theor. Biol.* 83, 209-213.

Nishina, Y., Kitagawa, T., Shiga, K., Watari, H. and Yamano, T. (1980) Resonance raman study of flavoenzyme-inhibitor charge-transfer interactions, *J. Biochem.* 87, 831-839.

Shiga, K., Nishina, Y., Ohmine, I., Horiike, K., Kasai, S., Matsui, K., Watari, H. and Yamano, T. (1980) A study of the absorption, circular dichroism and magnetic circular dichroism spectra of a flavin derivative, The π -electronic structure of 8-amino-8-damethyl-D-riboflavin, *J. Biochem.* 87, 281-287.

Kitagawa, T., Nishina, Y., Shiga, K., Matsumura, Y. and Yamano, T. (1980) Resonance Raman Spectra and band assignment of riboflavin derivatives, in "Flavins and Flavoproteins.", ed. Yagi, K. and Yamano, T., Univ. Park Press, Baltimore 395-404.

Nishina, Y., Shiga, K., Horiike, K., Tojo, H., Kasai, S., Yanase, K., Matsui, K., Watari, H. and Yamano, T. (in press) Vibrational modes of flavin bound to riboflavin bound to riboflavin binding protein from egg white, Resonance Raman spectra of lumiflavin and 8-substituted riboflavin, *J. Biochem.*

Shiga, K., Nishina, Y., Horiike, K., Tojo, H., Watari, H. and Yamano, T. (1980) On the existence of quasi D-Amino acid oxidase in hog kidney extract *Medical J. of Osaka Univ* 30, 71-78.

Miura, R., Shiga, K., Miyake, Y., Watari, H. and Yamano, T.
(1980) Studies on the reaction of D-Amino acid oxidase
with β -cyano-D-alanine, J. Biochem. 87, 1469-1481

Ohta-Fukuyama, M., Miyake, Y., Shiga, K., Nishina, Y., Watari, H. and Yamano, T. (in press) The circular dichroism studies on flavoproteins containing covalently bound coenzymes, J. Biochem.

Tojo, H., Horiike, K., Shiga, K., Nishina, Y., Watari, H. and Yamano, T. (in press) Coenzyme-Induced subunit association of the flavoenzyme D-Amino acid oxidase; a kinetic light scattering study, FEBS letter.

矢内原昇 (1979) ニューロンとパラニューロンのペプチド性分泌物, 神経研究の進歩 23, 678-683.

矢内原昇 (1979) ペプチドホルモン生合成の分子生物学, 生体の科学 30, 360-369.

矢内原昇 (1979) 間脳とLH放出ホルモン, 代謝 16, 555-562.

矢内原昇 (1979) 消化管の内分泌 I, 生化学的アプローチ, 細胞 11, 520-529.

Yanaihara, N., Kubota, M., Sakagami, M., Yanaihara, C., Ito, Z. and Shiga, K. (1979) Secretin analogues substituted in position 1 and N-acylated secretin, in "Gut Peptides," ed. Miyoshi, A., Kodansha Ltd, Tokyo, 41-43.

Kobayashi, S. (1979) Cellular background in gut hormone secretion, in "Gut Peptides," ed. Miyoshi, A., Kodansha Ltd, Tokyo, 53-58.

Yanaihara, C., Inoue, A., Mochizuki, T., Ozaki, J., Sato, H., and Yanaihara, N. (1980) Bombesin-like immunoreactivity in mammalian tissues. Biomedical Research 1, 96-100.

Yanaihara, N., Yanaihara, C., Kubota, M., Sakagami, M., Itoh, Z., Otsuki, M., Baba, S. and Shiga, K. (1980) Secretin analogs modified in position 1,4 or 6, in "Peptides," ed. Gross, E. and Meinenhofer, J., Peirce Chemical Company, Rockford, Illinois, U.S.A., 539-542.

矢内原昇, 永井賢二 (1980) 膵パラニューロンと分泌ホルモン, 日本臨床 38, 9-15.

Yamagishi, S. and Grundfest, H. (1977) Regional difference of propionate permeability in crayfish giant axons., J. Membrane Biol. 31, 65-79.

Yamagishi, S. (1977) Effect of intracellularly perfused Ca ion on the membrane properties of squid giant axons., Proc. 26th IUPS, 13, 824.

山岸俊一, (1977) イカ巨大神経膜内表面に対する Ca, Mg, Mn の作用, 日本生理誌 39, 227

山岸俊一, 久木田文夫 (1977) 細胞内 2 価イオンによるイカ神経膜の動的変化, 日本生物物理学会第 16 回年会予稿集, 208.

久木田文夫, 山岸俊一, 古家喜四夫 (1978) イカ巨大神経と中性分子の相互作用, 日本生理誌, 40, 220.

山岸俊一, 久木田文夫, 古家喜四夫 (1978) 細胞内 2 価イオンによる神経静止膜の動的変化, 日本生理誌, 40, 221

Sugiyama, H., (1979) Heterogeneity of Acetylcholine Receptor Molecules on the Surface of Clonal Muscle Cells. Proc. Japan Acad., 55B, 75-78.

杉山博之 (1979) In vitro における神経筋シナプス, 第20回日本医学会総会会誌, 924-926.

Yamagishi, S. (1979) Intracellular induced spike in internally perfused squid axons., Brain Res. Bulletin, 4, 195-196.

Kukita, F. and Yamagishi, S. (1979) Slowing the time course of the excitation of squid giant axons in viscous solutions J. Membrane Biol., 47, 303-325.

Furuya, K. and Mitsui, T. (1979) Phase transitions in bilayer membranes of dioleoylphosphatidylcholine/dipalmitoyl-phosphatidylcholine., J. Phys. Soc. Japan., 46, 611-616.

Yamagishi, S., Furuya, K. and Kukita, F. (1979) Initiation of the Ca induced spike in intracellularly perfused squid giant axons., J. Physiol. Soc. Japan, 41, 296

Kukita, F. and Yamagishi S. (1979) Difference of effects of solution viscosity on the excitation from the inside and the outside of squid axons., J. Physiol. Soc. Japan, 41, 298.

久木田文夫, 山岸俊一 (1979) 興奮性膜の物理化学的アプローチ, 日本臨床 37, 2572-2758.

久木田文夫, 酒井哲朗, 山岸俊一 (1979) グルタルアルデヒド処理したイカ巨大神経の興奮, 日本生物物理学会第 17 回年会予稿集, 95.

山岸俊一, 古家喜四夫, 久木田文夫 (1979) 細胞内 Ca に誘発されたイカ神経膜の興奮, 日本生物物理学会第 17 回年会予稿集, 98.

杉山博之 (1979) 培養骨格筋細胞のアセチルコリン受容体-神経筋接合の形成とのかかわり -, 日本生物物理学会第 17 回年会予稿集, 292.

東田陽博, 杉山博之, 芳賀和子, 芳賀達也 (1979) ニューロブラストーマ・グリオーマ雑種細胞の α -アドレナリン性受容体, 神経化学, 18, 300-303.

Kukita, F. and Yamagishi, S. (1979) Excitation of squid giant axons in hypotonic and hypertonic solutions., Jpn. J. Physiol., 29, 669-681.

Kukita, F. and Yamagishi, S. (1980) Modification of sodium and potassium channel activities of squid giant axon by non-electrolytes, Proc. Jpn. Acad. B56, 55-55.

Sugiyama, H. (1980) Isoelectric focusing analysis of acetylcholine receptors in mouse and chick muscle cells in culture., Biomed. Res. 1, 91-95.

Kaneko, A. and Tachibana, M. (1978) Convergence of rod and cone signals to single bipolar cells in the carp retina, Sensory Processes. 2, 383-387.

Kaneko, A., Famiglietti, E. V. Jr. and Tachibana, M. (1979) Physiological and morphological identification of signal pathways in the carp retina. in "Neurobiology of Synapse", eds. Otsuka, M. and Hall, Z., John Wiley & Sons, Inc. N. Y. 235-251.

Kaneko, A. (1979) Physiology of the retina, Ann. Rev. Neurosci. 2, 169-191.

Tachibana, M. and Kaneko, A. (1979) Identification of displaced ganglion cells in carp retina by using the Horseradish Peroxidase technique, J. Physiol. Soc. Japan. 41, 352.

金子章道 (1979) 視覚のメカニズム, 第20回日本医学会総会学術展示 要旨 36.

Tauchi, M. and Tanaka, I. (1979) Reciprocal relation between intensity and duration of light stimulus required to elicit an electrical response in single rods, J. Physiol. Soc. Japan. 41, 347.

田内雅規 (1979) 単一杆体の電氣的応答を指標とした光刺激強度と持続時間との相補的關係について, 東女医大誌. 49, 457-470.

田内雅規 (1979) 脊椎動物視細胞膜のイオン透過性におよぼすカルシウムイオンの影響, 東女医大誌. 49, 471-480.

田内雅規, 田中一郎 (1979) 電流および電位固定法からみた単一杆体の膜特性について, 第1回日本動物生理学会要旨. 83.

Ohtsuka, T. (1978) Combination of Oil Droplets with Different Types of Photoreceptor in a Freshwater Turtle, Geoclemys reevesii, Sensory Processes. 2, 321-325.

Tsukahara, N. (1979) Plastic and dynamic properties of red nucleus neurons, in "Brain Mechanisms in Memory and Learning," ed. Brazier, M. Raven Press New York 301-328.

Tsukahara, N. (1979) Synaptic and network plasticity in the adult nervous system, in "Integrative Control Functions of the Brain," ed. Ito, M., Tsukahara, N. Kubota, K. and Yagi, K. vol II. Kodansha/Elsevier, Tokyo/Amsterdam, 383-393.

Tsukahara, N., Oda, Y. and Notsu, T. (1979) Associative conditioning mediated by the red nucleus in the cat. Proc. Jap. Acad. Ser. B. 537-541.

Bando, T., Ishihara, A. and Tsukahara, N. (1979) The mode of cerebellar control on the lens accommodation, in "Integrative Control of Function of the Brain," ed. Ito, M., Tsukahara, N., Kubota, K. and Yagi, K. Vol. II. Kodansha/Elsevier, Tokyo/Amsterdam, 145-146.

Bando, T., Ishihara, A. and Tsukahara, N. (1979) Interpositus neurons controlling lens accommodation, Proc. Japan Acad. Ser. B 55, 153-156.

Bando, T., Ishihara, A. and Tsukahara, N. (1979) Interpositus neurons correlated with the lens accommodation, *Neuroscience letters*, suppl. 2, S33.

Kimura, M., Komatsu, Y. and Toyama, K. (1979) Neuronal responses to saccadic eye movements in the cat's striate cortex, in "Integrative Control Functions of the Brain", ed. Ito, M., Tsukahara, N., Kubota, K. and Yagi, K. vol. II Kodansha/Elsevier, Tokyo/Amsterdam, 73-75.

Komatsu, Y. and Toyama, K. (1979) Corollary motor inputs to striate neurons of the alert cat during saccadic eye movement, *Neuroscience Letter*, Supplement S37.

Toyama, K. (1980) Neuronal mechanisms of visual cortical plasticity, in "Neurobiological basis of learning and memory", ed. Tsukada, Y. and Agranoff, B. W. John Wiley and Sons Inc, New York, 65-77

Kimura, M., Shiida, T., Tanaka, K. and Toyama, K. (1980) Three classes of area I_a cortical cells of the cat classified by their neuronal connectivity and photic responsiveness. *Vision Res.* 20, 69-77.

Kimura, M., Komatsu, Y., and Toyama, K. (in press) Differential responses of "Simple" and "complex" cells of cat's striate cortex during saccadic eye movements.

塚原仲晃 (1980) 神経生理学からみた記録, 数理科学, 3

前田 純, 塚原仲晃 (1980) 神経細胞の画像処理による計測, 電子通信学会 MBE 47-56, 58-61.

伊藤正男, 外山敬介 (1979) 医学におけるコンピュータの応用, 情報処理, 5, 425-431.

外山敬介 (1979) 大脳におけるパターン識別, 日本医学総会誌, 558-564.

外山敬介(1979) 視覚情報処理の神経機構, テレビジョン学会誌, 33, 987-994.

外山敬介(1979) 視覚領の細胞配列, 医学のあゆみ, 108, 141-143.

村上富士夫(1980) シナプスの可塑性, 生物物理, 107, 47-53.

Irisawa, H. (1979) Editor's Commentary: Central nervous system control of cardiovascular and respiratory functions, in "Integrative Control Functions of the Brain," ed. Ito, M. Vol II, Kodansya Scientific, 205-206.

Yanagihara, K. and Irisawa, H. (1979) Ionic currents responsible for the pacemaker activity of rabbit sino-atrial node cells., J. Physiol. Soc. Japan 41, 289.

Trautwein, W., Noma, A. and DiFrancesco, D. (1979) Acetylcholine induced relaxation current and K-accumulation in the rabbits S-A node. Pfluger's Archiv. 379.

Osterrider, W., Noma, A. and Trautwein, W. (1979) Potassium conductance is increased at higher $[K]_o$ in the rabbit S-A node. Pfluger's Archiv. 379.

Osterrieder, W., Noma, A. and Trautwein, W. (1979) Kinetics of the acetylcholine-activated K channel in the rabbit sinoatrial node cell. Pfluger's Archiv. 382.

Noma, A., Peper, K. and Trautwein, W. (1979) Acetylcholine induced potassium current fluctuations in the rabbit sino-atrial node. Pfluger's Archiv. 381, 255-262.

Noma, A., Osterrider, W. and Trautwein, W. (1979) The effect of external potassium on the elementary conductance of the acetylcholine induced potassium channel in sino-atrial node. Pfluger's Archiv. 381, 263-269.

DiFrancesco, D., Noma, A. and Trautwein, W. Kinetics and magnitude of the time-dependent potassium current in the rabbit sinoatrial node. *Pflüger's Archiv.* 381, 271-279.

入沢 宏(1979) 洞房結筋の構造と機能 *Nova Angiologicae* 17
Fasc-5, 1.

入沢 宏(1979) 基礎的心臓学の進歩と臨床とのつながり, 生理的分野, 医学のあゆみ, 108, 836-839.

入沢 宏(1979) 心興奮の生理学, 総合医学, 28, 600-605.

入沢 宏(1979) 洞房結節歩調取り細胞のイオン流について, 日大医学雑誌 38, 1551.

学会報告講演

横野 諭, 吉崎和男, 西川弘恭, 山田誠二, 亘 弘

「 ^{31}P -NMR法による筋細胞内pH測定」

日本生理学会 55回大会 1978.4 新潟

西川弘恭, 山田誠二, 吉崎和男, 亘 弘

「赤血球膜リン脂質の動態の ^{31}P -NMRによる研究」

日本生理学会 55回大会 1978.4 新潟

亘 弘, 西川弘恭, 山田誠二, 吉崎和男

「 ^{31}P -NMRによるザリガニ神経細胞リン化合物代謝の研究」

日本生理学会 55回大会 1978.4 新潟

長崎紘明, 入来正躬, 本多和樹, 井上昌次郎, 菰田泰夫, 石川正幸, 東 晃史,
内藤耕二

「マウスの脳波の自動分析による睡眠ペプチドの効果検定」

日本生理学会 55回大会 1978.4 新潟

本多和樹, 井上昌次郎, 菰田泰夫, 石川正幸, 長崎紘明, 入来正躬, 東 晃史,
内藤耕二

「睡眠促進物質の生理効果」

日本生理学会 55回大会 1978. 4 新潟

Nishikawa, H., Yamada, S., Yoshizaki, K. and Watari, H.

「Comparative study of erythrocyte ghosts by means of
 ^{31}P -NMR」

Sixth International Biophysics Congress 1978. 9 Kyoto

Yamada, S., Nishikawa, H., Yoshizaki, K. and Watari, H.

「 ^{31}P -NMR study on living nerve cord of crayfish」

Sixth International Biophysics Congress 1978. 9 Kyoto

Yoshizaki, K., Nishikawa, H., Yamada, S. and Wasari, H.

「Study on the heterogeneity of pH in frog muscle」

Sixth International Biophysics Congress 1978. 9 Kyoto

Watari, H., Nishikawa, H., Yoshizaki, K. and Yamada, S.

「Sodium-23-NMR study on the nerve code of crayfish」

VIIIth International Conference on Magnetic
Resonance in Biological Systems 1978. 9 Nara

Yamada, S., Yoshizaki, K. and Watari, H.

「 ^{31}P -NMR study on energy metabolism of nervous system」VIIIth International Conference on Magnetic
Resonance in Biological Systems 1978. 9 Nara

二科安三, 北川禎三, 志賀 潔, 堀池喜八郎, 松村勇一, 亘 弘, 山野俊雄

「リボフラビン結合タンパクに結合したリボフラビン及びその誘導体の共鳴
ラマンスペクトル」

日本生化学会 51回大会 1978. 11 京都

西川弘恭, 山田誠二, 吉崎和男, 藤井崇知, 亘 弘

「 ^{31}P -NMRによる脳切片に関する研究」

日本生化学会 51回大会 1978. 11 京都

Uchizono, K., Higashi, A., Tani, Y. and Hoshino, M.
 「Multichannel data processing of long term EEG in free-moving mice」

Third International Congress of sleep Research
 1979. 7 Tokyo

Inoue, S., Honda, K., Komoda, Y., Iriki, M., Nagasaki, H.,
 Higashi, A. and Uchizono, K.
 「Purified Sleep-promoting substance: Its effect on the rat circadian sleep-waking rhythm」

Third International Congress of Sleep Research
 1979. 7 Tokyo

東 晃史, 内藤耕二, 谷裕一郎, 星野 稔

「複数マウスの脳波・行動に対する長期薬理実験法」

日本脳波筋電図学会 8回大会 1979. 10 金沢

東 晃史, 内藤耕二, 谷裕一郎, 星野 稔

「マウスの睡眠—覚醒リズムと奪眠の影響」

日本脳波筋電図学会 8回大会 1979. 10 金沢

二科安三, 志賀 潔, 亘 弘, 北川禎三, 山野俊雄

「旧黄色酸素—フェノール誘導体複合体の共鳴ラマンスペクトル」

日本生化学会 52回大会 1979. 10 東京

福山美徳, 山野俊雄, 志賀 潔, 二科安三, 亘 弘, 三宅可浩

「共有結合型フラビン酵素の研究, 構造の同定とその分光特性について」

日本生化学会 52回大会 1979. 10 東京

三浦 洸, 三宅可浩, 志賀 潔, 亘 弘, 山野俊雄

「D-アミノ酸酸化酵素と β -シアノ-D-アラニンとの反応の中間体について」

日本生化学会 52回大会 1979. 10 東京

吉崎和男, 瀬尾芳輝, 西川弘恭, 山田誠二, 亘 弘

「 ^1H -NMR法による筋肉の高分解能スペクトル」

日本生物物理学会 17回大会 1979. 10 名古屋

西川弘恭, 安里令人, 吉崎和男, 亘 弘, 森本武利

「lipid dispersion の ^{31}P -NMRによる赤血球ゴースト膜リン脂質動態の
解析」 日本生物物理学会 17回大会 1979. 10 名古屋

吉崎和男, 瀬尾芳輝, 西川弘恭, 亘 弘

「選択的水飽和法による生体組織の ^1H 高分解能スペクトル」
NMR 討論会 18回大会 1979. 11 大阪

西川弘恭, 安里令人, 吉崎和男, 森本武利, 亘 弘

「生体膜極性基部位と陽イオンの相互作用」
NMR 討論会 18回大会 1979. 11 大阪

矢内原昇

「消化管ホルモンの基礎」
第 20 回日本医学総会 1979. 4 東京

矢内原昇

「神経ペプチドをめぐって - 神経ペプチドの生体内分布」
第 52 回日本内分泌学会 1979. 6 京都

Yanaihara, N., Yanaihara, C., Sato, H., Ishikawa, S., Kobayashi, S. and Fujita, T. Immunoreactive VIP in neuroblastoma cell line NB-1.

Symposium on VIP, Motilin and Glucagon 1979. 7 Kyoto

Kobayashi, S.

Secretory granules and synaptic vesicles. A morphologist's view on their identity and difference

Symposium on paraneurons 1979. 7 Hokkaido

Yanaihara, N.

Species specificity of immunoreactive neurotensin and bombesin

Symposium on paraneurons 1979. 7 Hokkaido

佐藤晴子, 矢内原昇, 矢内原千鶴子, 大輿靖彦

「Neuroblastoma cell line NB-1における中枢ペプチドの免疫活性」

第17回日本臨床代謝学会総会 1980. 1 大阪

矢内原昇

「生理活性ペプチドの免疫学的研究」

講演会「ライフサイエンスにおけるペプチド化学」1980. 1 東京

久木田文夫, 山岸俊一

「イカ巨大神経と中性分子の相互作用」

日本生理学会 55回大会 1978. 4 新潟

山岸俊一, 久木田文夫

「細胞内2価イオンによる神経静止膜の動的変化」

日本生理学会 55回大会 1978. 4 新潟

久木田文夫, 古家喜四夫, 山岸俊一

「イカ巨大神経膜の内側と外液に対する粘性効果の差違」

日本生理学会 56回大会 1979. 4 東京

山岸俊一, 古家喜四夫, 久木田文夫

「細胞内Ca灌流によるイカ巨大神経のスパイク発生」

日本生理学会 56回大会 1979. 4 東京

杉山博之

「In vitro における神経筋シナプス」

第20回日本医学会総会 1979. 4 東京

杉山博之

「培養骨格筋細胞のアセチルコリン受容体 - 神経筋接合の形成とのかかわり」

第17回日本生物物理学会 1979. 10 名古屋

久木田文夫, 酒井哲郎, 山岸俊一

「グルタールアルデヒド処理したイカ巨大神経の興奮」

日本生物物理学会第 15 回年会 1979. 10 名古屋

山岸俊一, 古家喜四夫, 久木田文夫

「細胞内 Ca に誘発されたイカ神経膜の興奮」

日本生物物理学会第 15 回年会 1979. 10 名古屋

東田陽博, 杉山博之, 芳賀和子, 芳賀達也

「ニューロブラストーマとグリオーマ雑種細胞の α アドレナリン性受容体」

第 22 回日本神経化学会 1979. 11 東京

Kukita, F. and Yamagishi, S.

「Properties of Channels of Squid Giant Axons Changed by
Perfusing Solutions with Non-electrolytes」

5th Taniguchi International Symposium

Biophysics Division 1979. 11 Tsukuba

杉山博之

「マウス及びニワトリ骨格筋培養細胞 Ach 受容体の等電点比較」

第 57 回日本生理学会大会 1980. 3 神戸

山岸俊一, 古家喜四夫, 久木田文夫

「細胞内 Ca, Mg, Mn イオンに誘発された神経興奮」

第 57 回日本生理学会大会 1980. 3 神戸

金子章道

「視覚のメカニズム」

第 20 回日本医学会総会学術展示 1979. 4 東京

立花政夫・金子章道

「HRP 法によるコイ網膜の迷入性神経節細胞の同定」

日本生理学会第 56 回大会 1979. 4 東京

大塚輝彌, 金子章道

[Photoreceptor responses and oil droplets in the retina of turtle]

第1回色覚研究セミナー, 1979. 8 名古屋

金子章道・斉藤建彦

「OFF型双極細胞の光応答のイオン機構」

日本神経科学協会第3回学術集会, 1980. 1 東京

金子章道

Signal Transmission in the Retina -A Physiological and Morphological Study-

US-Japan Joint Seminar on "Advanced Analytical Techniques applied to the Vertebrate Visual System., 1979. 10 東京

田内雅規, 金子章道

「双極細胞におけるON型およびOFF型応答の発生機序」

日本生理学会第57回大会 1980. 3 神戸

大塚輝彌

「網膜視細胞の配列」

日本生理学会第57回大会 1980. 3 神戸

田内雅規, 山田雅弘

「ウシガエル網膜杆体の動特性」

日本生理学会第57回大会 1980. 3 神戸

田内雅規, 田中一郎

「単一杆体の量子応答について」

日本生理学会第57回大会 1980. 3 神戸

塚原伸晃

「神経科学の進歩, 神経系の可塑性」

第20回日本医学会総会 シンポジウム, 1979. 4 東京

塚原仲晃

「脳と老化，脳のプログラミングと老化」

日本老人医学会シンポジウム 1979. 10 大阪

塚原仲晃

「単純化された条件反射回路とその解析」

日本生物物理学会シンポジウム 1979. 10 名古屋

塚原仲晃

「神経回路網の可塑性より学習行動へのアプローチ」

脳の統御機能シンポジウム 1980. 1 東京

塚原仲晃，前田 純

「生物と認識」

粉体工学会 1980. 1 東京

前田 純，塚原仲晃

「計算機画像処理による神経細胞の形態計測」

日本生物物理学会 1979. 10 名古屋

前田 純，村上富士夫，塚原仲晃

「HRP細胞内染色赤核細胞の計算機画像処理による形態計測」

第3回神経科学学術集会 1980. 1 東京

漆木克栄，外山敬介

「ネコの視覚連合野（Clare-Bishop 領）のニューロン反応」

第3回日本神経科学学術集会 1980. 1 東京

前田 純，塚原仲晃

「画像処理による神経細胞の形態計測」

電気通信学会 1980. 2 大阪

外山敬介

「眼球運動と視覚認識」

第2回平衡神経研究会 1980. 2 箱根

外山敬介, 渋谷克栄

「ネコの視覚領(17野)に対するサッケード性眼球運動の随伴信号入力:

Clare-Bishop 領破壊の効果」

第57回日本生理学会 1980. 3 神戸

入沢 宏

「洞結節歩調取り細胞のイオン流について」

日本大学医学部記念シンポジウム 1979. 9 東京

入沢 宏

「心歩調取りの機構について(特別講演)」

脈管学会総会 1979. 10 東京

野間昭典

[Slow inward current and its role mediating the chronotropic effect of epinephrine in the rabbit sinoatrial node.]

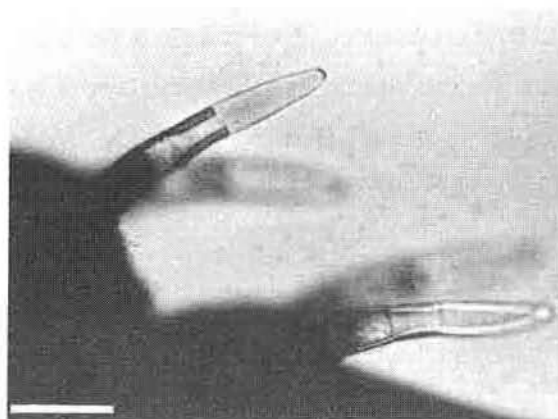
Annual meeting of the working group of cardiac cellular electrophysiology; European Society of Cardiology 1979. 11 Homburg

共同研究報告

秩父志行（近畿大医学部），久木田文夫，古家喜四夫，山岸俊一（生理研）

ザリガニ第一触角外枝上には化学受容器と機械刺激受容器がヒゲのように並んで存在している。この化学受容器にGretin法，Kossaの銀法など種々の組織化学的染色法を試み，化学受容器の成り立ち，とくに受容器内におけるカルシウムとマグネシウムの局在性を顕微鏡下で確かめることができた。

また，化学受容器からの神経束と機械刺激受容器からの神経束を外枝の根元で分離し，化学的及び機械的刺激に対するそれぞれの神経束の応答の電気信号を記録することができた。



Kossaの銀染色を施したザリガニ化学受容器（スケールは50 μ ）

生体試料の核磁気共鳴について

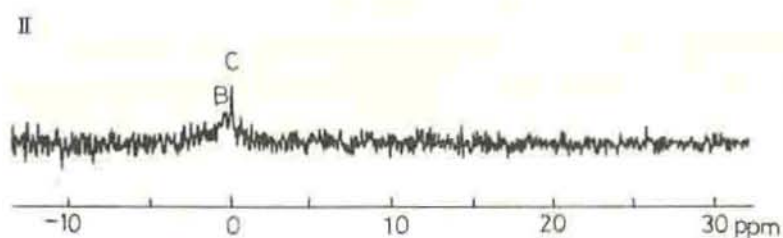
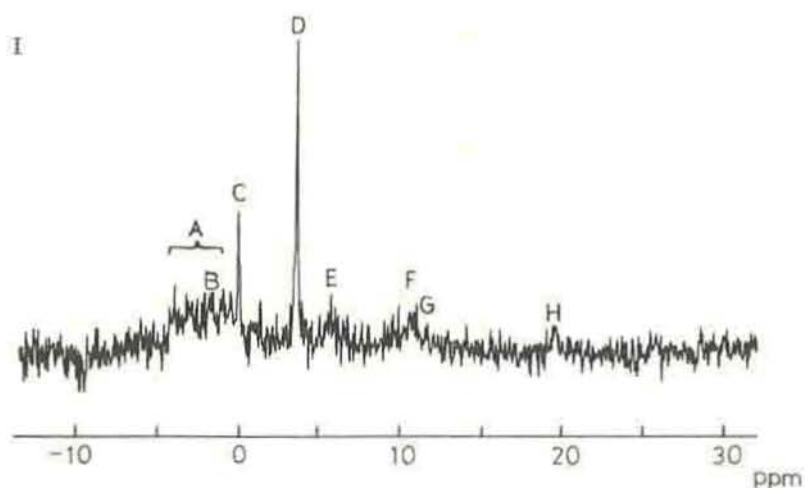
西川弘恭（京都府立医大） 村山公一（北大院理第二生理）
 吉崎和男（京都府立医大） 佐藤秀一郎（滋賀医大）
 山田誠二（京都府立医大） 西尾恭介（滋賀医大）
 横野 論，小栗顕二（京都府立医大） 亘 弘（生理研）

最近，パルス・フーリエ変換核磁気共鳴法を用い，生体試料中の種々の化合物が非破壊的に計測され， ^{31}P -NMR では筋肉，腫瘍細胞および細菌のリン化合物代謝の研究が報告されている。しかし神経細胞に関しては，その試料中のリン化合物が少なく，しかも測定中 intact な状態に保つことが困難なためにいまだ報告はない。我々はザリガニ神経索を intact な状態に保てるように灌流法を工夫し，神経細胞のリン化合物の NMR スペクトルを得，かつスペクトルのピークを同定した。

装置は JEOL PFT-100NMR で，リンの共鳴周波数 40.3 MHz である。 S/N 比改善のため ^1H -decoupling および試料管 ($\varnothing 10\text{mm}$) の spinning をなし，しかも 2 本のチューブを試料管内に入れ，酸素あるいは窒素ガスで bubbling した Harreveld 氏溶液でザリガニ神経索を灌流した。化学シフトの基準に 5% 正リン酸を用いた。

酸素飽和溶液を灌流した好氣的条件下での神経索の ^{31}P -NMR スペクトルには，低磁場側より sugar-phosphates ($-3.97\text{ ppm} \sim -3.10\text{ ppm}$)，無機リン酸 (-1.54 ppm)，アルギニンリン酸 ($+3.40\text{ ppm}$)，ATP の γ, α, β 位 ($+5.98\text{ ppm}, +11.22\text{ ppm}, +11.49\text{ ppm}$) のリンのピークが認められた。窒素ガスで脱酸素化した溶液で灌流した嫌氣的条件下ではアルギニンリン酸と ATP の消失とともに無機リン酸および sugar phosphates の増加が認められた。以上の様に酸素飽和をした溶液を NMR 測定中に灌流することにより始めて intact な神経のリンのスペクトルを得ることが可能となるとともに，好氣的条件下では酸化的リン酸化によるエネルギー産生によりアルギニンリン酸や ATP が保たれるが，嫌氣的解糖のみによるエネルギー産生では，sugar phosphates の増加，すなわち解糖系の促進にもかかわらず，アルギニンリン酸や ATP の消失がみられ，細胞のエネルギー消費に対し十分なエネルギー産生をなし得ないことが明らかとなった。

Nishikawa, H. Yamada, S. Yoshizaki, K. and Watari, H(1978)
 ^{31}P -NMR Study on Perfused Ventral Nerve Cords of Crayfish.
 Proc. Japan Acad., 54:Ser.B 397-401



ザリガニ腹側神経束の ^{31}P -核磁気共鳴スペクトル

I pH 7.3 ハルペルト液で灌流

II 灌流なし

A : 糖リン酸化化合物, B : 無機リン, C : 磷酸 (マーカー), D : アルギニン
 ン磷酸, E, F, H : ATP, G : NAD^+

蛋白のアフィニティークロマトグラフによる精製法および反応のキネチクスの検討

志賀 潔(生理研) 三浦 列・今井清博, 魚住光郎
 (阪大医) 梶谷洋司(東工大) 黒田正男(阪大医)
 二科安三(和歌山医大・現生理研) 橋本正史(阪大医)
 亘 弘(生理研)

生命現象はエネルギーの補給なしでは存在しえない。生体におけるエネルギー産生は主として生体内酸化還元反応に依存するが、その機構は複雑であり現象的には極めて多様な化学反応を伴う。フラビン分子は疑いもなくこれら酸化還元反応の主役をなすものであるが、フラビン分子それ自身ではこの極めて多様な化学反応を触媒する事はできず、アポ蛋白との結合(フラビン酵素となる)によりはじめて可能になる。すなわちフラビン-蛋白相互作用の結果多種多様な機能が生みだされ、これが生体内各部でそれぞれ異った役割をはたす事になる。従ってフラビン-蛋白相互作用およびフラビン酵素の反応機構の検討は生体内酸化還元反応の統一的理解に必須のものである。ここではオキシダーゼ酵素の代表としてD-アミノ酸酸化酵素を例にとりその反応機構を検討した。

ブタ腎より精製されるD-アミノ酸酸化酵素(D-AO)はフラビン酵素のなかでもっともよく研究されているもののひとつであるがその反応機構はよく理解されていない。今回我々は β -シアノ-D-アラニンを経質として用いる事により、本酵素の反応機構を調べた。D-AOは本基質の酸化反応のみならずシアノ基脱離反応をも触媒する事が見出された。この二反応の分配比は200以上である。又本反応を分光学的に調べたところ長波長領域に幅広い電荷移動型吸収帯(CT)をもつ中間体が検出され、このもののCDおよびMCDスペクトルはD-AOとアミノ安息香酸とのCT複合体のそれらに類似していた。さらに生物に対する若干の考察をも合せて図に示すような反応機構を提案した。

最後に本酵素の精製について少々考察を記す。

よく知られているように本酵素の拮抗阻害剤として安息香酸およびその誘導体が存在する。従ってこれらを利用したアフィニティークロマトグラフィーによる精製法が考えられてもよい。しかし最近我々はD-AOとは明らかに異った分子種であるがその機能がはなはだ似かよった新しい酵素(Quasi-D-AO)をやはりブタ腎より精製している(この両酵素はハイドロキシアパタイトカラムにより分離される)。このように活性中心の類似した蛋白をアフィニティークロマトによりいかに分離するかはかなり難しい問題で現在さらに検討を重

さねているところである。

反応機構については文献(1)に, Quasi-D-AOの存在については(2)に報告されている。

(1) J. Biochem., in press

Studies on the Reaction of D-Amino Acid Oxidase with β -Cyano-D-alanine.

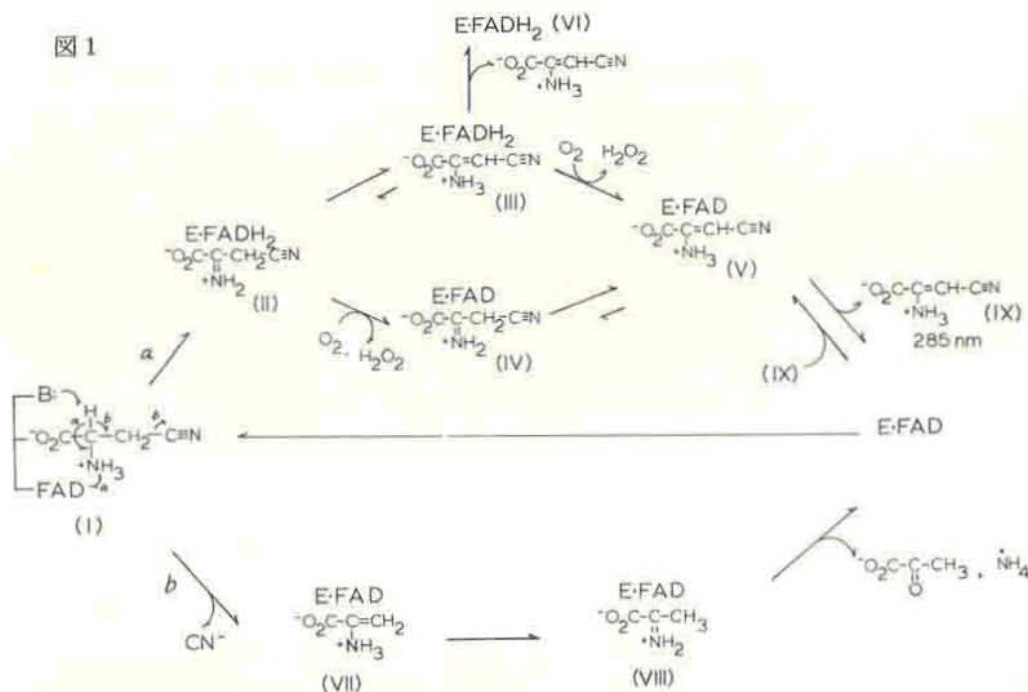
R. Miura, K. Shiga, Y. Miyake, H. Watari, T. Yamano

(2) Medical J. of Osaka Univ., in press

On the Existence of Quasi D-Amino Acid Oxidase in Hog Kidney Extract.

K. Shiga, Y. Nishina, K. Horiike, H. Tojo, H. Watari, T. Yamano

図 1



D-アミノ酸化酵素と β -シアノ-D-アラニンとの反応図

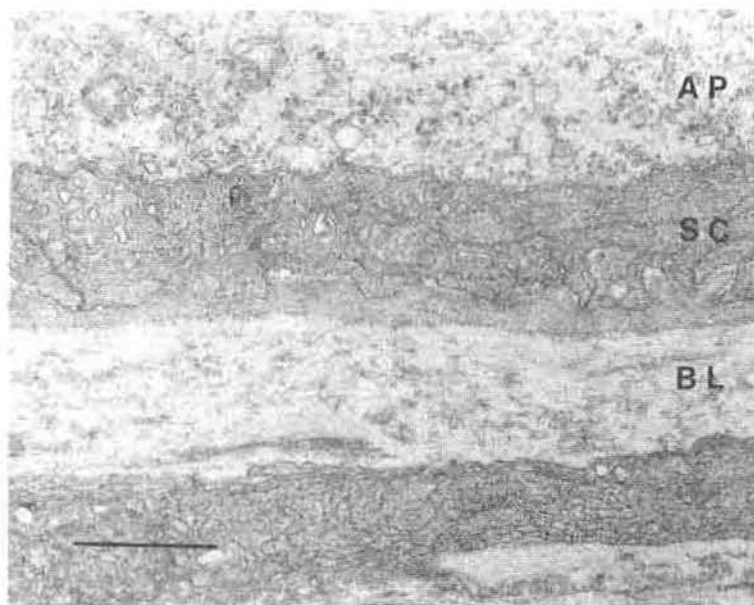
E·FADは酵素を示す。

免疫化学的方法による細胞膜の形態学的アプローチ

平野 寛(杏林大医) 山岸俊一, 古家喜四夫(生理研)

電子顕微鏡レベルの標識方法としてはオートラジオグラフィ法の外に細胞免疫反応を利用したフェリチン抗体法と酵素抗体法とがあるが、イカ巨大神経や、ザリガニ巨大神経に両方法を適用する場合の基本的な手技およびそれに伴う問題点について検討した。フェリチン抗体法にも酵素抗体法にもそれぞれ長短があり実験系や目的によって選択する必要があるからである。

まず新規に購入した電子顕微鏡(日本電子 100CX)で、細胞内灌流を行ったイカ巨大神経について、protease 灌流により細胞質を溶出させる時間条件や、各種の溶液灌流下での神経線維内外の膜構造状態について検討を行った。ひき続きグルタルアルデヒド固定をしたコンカナバリン A, コリンエステラーゼを用い膜の内外表面における標識実験を継続することとした。



ヤリイカ巨大神経の横断面図

神経線維は2-3層のシュワン細胞(SC)と基底層(BL)に覆われている。 AP: Axoplasm
バーは1 μ を示す。

生体試料における分子間相互作用の研究（特に分光学的方法の適用について）

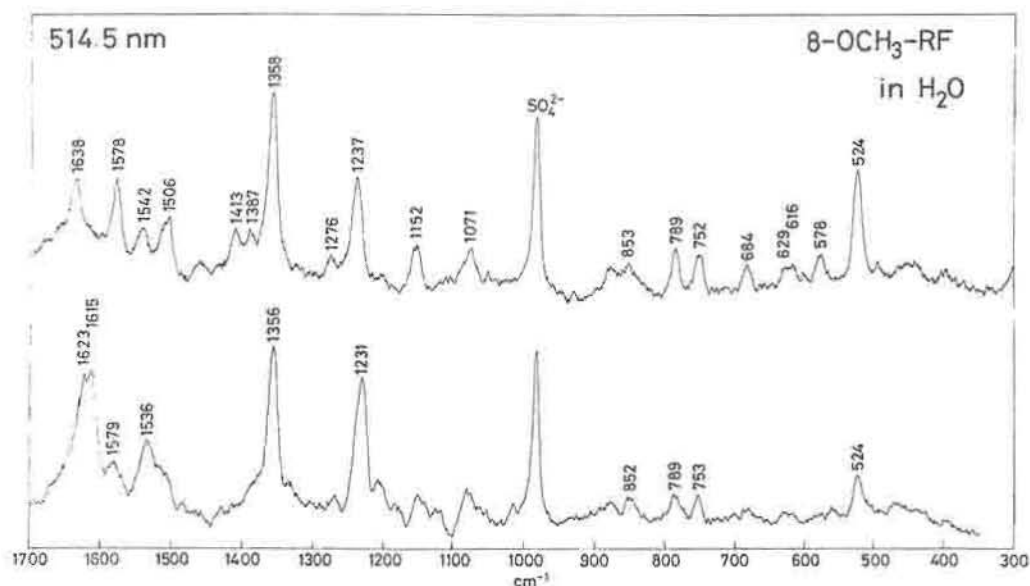
志賀 潔（生理研） 二科安三（和歌山医大・
現生理研） 亘 弘（生理研）

フラビン-蛋白相互作用の検討は、前述したように、生体内酸化還元反応の統一的理解のために必須である。

今回はこの問題への分光学的方法の適用を試みた。

①フラビンおよびフラビン酵素のCDおよびMCDスペクトル。

MCDスペクトルは多くのフラビンおよびフラビン酵素に共通したスペクトル（330nm～600nmの範囲に二つのピーク）を示し、これはFaradayのB項と考えられる。Faraday A項は観察されず、従ってフラビンの励起状態には縮重がない。フラビンと芳香族化合物（アデニンや芳香族アミノ酸）との相互作用（両分子の重なり）の存在はMCDスペクトルの370nm周辺の楕円率（絶対値）を減少させた。CDスペクトルについては、各分子において大きく異ったスペクトルが観察された。従ってCDスペクトルはMCDスペクトルよりもはるかに鋭敏にフラビン周辺の様子を反映すると考えられる。



リボフラビン結合タンパクに結合した8-Xトキシリボフラビンの共鳴ラマンスペクトル。514.5nmのレーザー光で励起。酸化型(上),セミキノン型(下)

②セミキノン型フラビンの共鳴ラマンスペクトル。

フラビンおよびフラビン酵素は反応過程で三つの状態（酸化，セミキノン，還元型）にて存在可能である。反応機構検討のため共鳴ラマン散乱法が酸化型フラビンに適用され大きな成果をあげたのは最近のことである（2.3.4.5）。今回はこれをさらにセミキノン型フラビンへ適用する事を試みた。

遊離のフラビンセミキノンは共鳴ラマンスペクトルを測定するには不安定である。従って卵白のリボフラビン結合蛋白に遊離フラビンを結合させ、光還元により安定なセミキノンを作り共鳴ラマンスペクトルを観測した（図）。

リボフラビンのセミキノン型で特徴的なのは酸化型ではない 1617cm^{-1} に強いラマン線が現われている事である。このラマン線は重水中でもほとんどシフトせず、酸化型での強い 1583cm^{-1} のラマン線がシフトしたのと考えられる。このように酸化型とセミキノン型で著しく異ったラマン線が存在する事は反応中間体の研究に本方法が有効に利用できる事を示す。詳細は文献(6)にまとめられている。

- (1) K. Shiga, K. Horiike, Y. Nishina, S. Otani, H. Watari and T. Yamano
A Study of Flavin-Protein and Flavoprotein-Ligand Interaction
Binding Aspects and Spectral Properties of D-Amino Acid Oxidase and Riboflavin Binding Protein, J. Biochem., 85, 931 (1979)
- (2) M. Tsuboi
Raman Spectroscopy of Nucleic Acids and Proteins in Proceedings of the Fifth International Conference on Raman Spectroscopy, eds Schmid, E.D. et al., 135-143 (1976)
- (3) Y. Nishimura and M. Tsuboi
Raman Spectra of Flavins: Avoidance of Interference from fluorescence, Chem. Phys. Letters 210-213 (1978)
- (4) Y. Nishina, T. Kitagawa, K. Shiga, K. Horiike, Y. Matsumura, H. Watari and T. Yamano
Resonance Raman Spectra of Riboflavin and its Derivatives in the Bound State with Egg Riboflavin Binding Proteins, J. Biochem., 84, 925 (1978)
- (5) T. Kitagawa, Y. Nishina, K. Shiga, H. Watari, Y. Matsumura and T. Yamano
Resonance Raman Evidence for Charge-Transfer Interactions of Phenols with the Flavin Mononucleotide of old Yellow Enzyme, J. American Chemical Soc., 101, 3376 (1979)

- (6) Y. Nishina, K. Shiga, K. Horiike, H. Tojo,
S. Kasai, K. Matsui, H. Watari, and T. Yamano
Resonance Raman Spectra of Semiquinone Forms of
Flavins Bound to Riboflavin Binding Protein,
in preparation

脳内活性物質と消化管ホルモンとの関連

磯貝芳徳（京都府立医大） 宮沢辰雄，稲垣冬彦（東京大
理学部） 片岡喜由（愛媛大医学部） 菅野富夫（北海
道大獣医学部） 矢内原昇，矢内原千鶴子（静岡薬科大学）
奥田柘道（愛媛大医学部） 山田誠二（京都府立医大）
亘 弘（生理研）

近年，ペプチドの一次構造決定，合成の技術の進歩が著しく，多数のペプチド性消化管ホルモンが同定された。そのうちの多くは脳にも存在し，中枢神経制御物質として特種な機能を発揮していることが強く示唆されている。具体的には substance P, neurotensin, VIP, gastrin, CCKなどが挙げられるが，その他に脳下垂体ホルモン分泌を制御する LH-RH, TRH, CRH, somatostatin も視床下部のみならず，脳の特定位点に局在することが明らかとなった。また，Edorphins, Enkephalins の如く，脳内に特異的に存在するものも同定されている。

ペプチドホルモンの構造・機能研究には合成が必要である。またペプチド機能発現機構の解明には前駆物質の純品が必要である。ヒト膵ラング細胞の腫瘍中に見出されたプロインスリンはホルモンの前駆物質として最初に発見されたが，粗生成物はゲル濾過，イオン交換クロマトグラフィーにより精製し，免疫学的にブタプロインスリンとほぼ同等に反応するヒトプロインスリン製品を得た。これは世界で最初のプロホルモンの化学合成である。

このようなペプチドの構造を決定するのに理論的に計算する方法と，NMRにより構造をきめる方法がある。すなわち分子内相互作用エネルギーを計算することにより，立体構造を予測しようとするものである。若し特異的な立体構造を有するものなら，その構造は分子内相互作用エネルギーを最小とする筈である。相互作用エネルギーの計算には，ECEPPと呼ばれるプログラムを利用した。ECEPPでは，非共有結合エネルギー，静電的相互作用，水素結合回転のポテンシャルの四種類の相互作用の和として分子内相互作用エネルギーを与える。この様にしてエンケファリンの最小エネルギーの構造は次の様な特徴を有することを見出した。1) Tyr¹の側鎖のOH基のGly³のCO基の間に水素結合を有する。2) Gly³-Phe⁴の部分にtype II¹のbend構造を有する。3) Met⁵のNH基は分子内部に埋れている。4) Phe⁴，Met⁵の側鎖は溶媒中につき出ている。これらの特徴はNMRによる実験結果と良い一致を示してい

る。一方、サブスタンス P のアミノ末端側の残基の欠けたモデル分子のうちで、 n 番目の残基から 11 番目までを含むものを SP($n-11$) と略記するが、SP(4-11)、SP(5-11) は SP と同程度の生理活性があるにも拘らず、SP(6-11) は活性がすこし低くなり、SP(7-11)、SP(8-11) にはほとんど活性がない。そこでこれらのモデル分子について、270MHz でプロトン核磁気共鳴を観測した。その結果、生理活性のある SP(4-11) と SP(5-11) のいずれにおいても、Gln(6) 残基の NH プロトンが分子内水素結合を形成し、Phe 残基の $C\alpha-C\beta$ 結合に関して特定の内部回転配置の存在率が高くなることが明らかとなり、これらの構造上の特性は生理活性の発現と関連すると考えられる。

β -Endorphin, substance P, somatostatin についてラジオイムノアッセイ法により脳内の詳細な分布を検索したが、これらの含量が脚間核に特異的に高いことを明らかにした。また、すでに手綱核-脚間核路が特異的にコリン作動ニューロンと substance P ニューロンを含むことも明らかにした。そこで手綱核破壊、ラットの術後一週間の脚間核の β -Endorphin を分析した所、含量の著しい減少が誘発されていることを確認した。この事実は、 β -Endorphin がアセチルコリンや substance P と同様に手綱核-脚間核路のニューロンに存在することを示しており、特定ニューロン内存在の具体的証明ともなった。この物質が内在性オピオイドと言われるように強力なニューロン抑制作用を持つことから、化学伝達物質として機能している可能性も高く、今後電気生理学的手法などによる検討が期待される。

最近、消化管ホルモンの分泌細胞の生理学的検索を行った。VIP 分泌細胞の刺激-放出連関について研究をすすめた。生後約 8 箇月の幼若ネコから、十二指腸・脾摘出灌流標本を作成した。この標本の灌流流入血管は上腸間膜動脈と腹腔動脈であり、流出血管は門脈である。十二指腸粘膜面に何も刺激を与えなくとも門脈への流出液には VIP が放出される。このような細胞の放出の方向性は、神経分泌細胞やニューロンに対応している。しかし、VIP 細胞の刺激受容体のような機構で細胞対側の Ca 依存性放出をひきおこすのかについては全くわかっていない。VIP 細胞をパラニューロンの一種と考えると、その機構には細胞膜の脱分極や活動電位が関与している可能性がある。

脂肪細胞における成長ホルモン(GH)の受容体の研究を通じてこのホルモンの構造と機能の関係を明らかにすることを目指して研究を行った。GH を脂肪細胞に作用させると脂肪分解反応が促進するが、細胞に GH を加えた後数分以内に細胞を洗うとホルモン作用は見られなくなる。これは GH と脂肪細胞膜上

の受容体の結合は緩いものであることを示している。一方脂肪細胞をその外側から phospholipase C で処理することにより GH の作用は消失する。

phospholipase D ではこのような現象は見られない。このような事実は細胞膜上のリン脂質、特にその phosphorylcholine 部分が GH の受容体の一部であることを示すものである。阻害物質の立体構造の解析から Lys の N 端周辺に 2 つの hydrophobic sites が存在することが阻害活性発現に重要な意味をもっていることが推測された。牛、人、羊、の 114-115 番目附近の Lys-Asp の周辺構造はこのような条件を満たすものであることが確認された。

脳の活性ペプチドの生理機能に関する研究はようやく曙期を迎えた所である。ある種の分泌腺細胞は神経細胞と共通の発生原基を有し、パラニューロンの概念で統一的に理解しうる可能性も生じている。従って神経伝達に対する視点も拡張する一方、ペプチド化学や物性研究も含めた総合体制が脳ペプチド研究に要求されよう。

Isogai, Y. Nemethy, G. Shera, H.A. (1977)
Enkephalin: Conformational Analysis by Means of Empirical
Energy Calculations. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74:414-418

Yanaihara, C. Sato, H. Hirohashi, M. Sakagami, M.
Yamamoto, K. Hashimoto, T. Yanaihara, N. Abe, K. and
Kaneko, T. (1976)
Substance P Radioimmunoassay Using N^α-Tyrosyl-substance
p and Demonstration of the Presence of Substance P-like
immunoreactivities in Human Blood and Porcine Tissue
Extracts.
Endocrinol. Japon. 23: 457-468

Yanaihara, N. Sakagami, M. Sato, H. Yamamoto, K.
Hashimoto, T. Yanaihara, C. Ito, Z. Yamaguchi, K.
and Abe, K. (1977)
Immunological Aspects of Secretin, Substance P, and VIP.
Gastroenterology 72: 808-810

磯貝芳徳, 小栗顕二, 西川弘恭, 森本武利, 山田誠二,
吉崎和男(京都府医大) 亘 弘(生理研)
林 浩平(群大医) 下山雄平(函館高専)

目的 生体膜構成素子個々について種々の物理・化学的手法で研究され、それらに基づいたモデルが提出されてきた。真の生体膜の形態と機能を解明するにはそれらの総合的な把握を必要とする。このため膜構成素子グループ間および、素子とその周囲環境との相互作用の解明が重要である。そこで近年急速に発展しつつある核磁気共鳴法、磁気円偏光二色性、蛍光寿命を用い、これらの相互作用を明らかにし、膜機能と構造との関連を研究することを目的とする。

成果 (1)赤血球ゴースト膜の ^{31}P -核磁気共鳴測定により軽度の超音波処理の場合2つ線巾の広い吸収ピークが得られ、低磁場側はphosphatidylserine phosphatidylethanolamine, 高磁場側はphosphatidyl cholineと sphingomyelin によるものである。 Ca^{2+} および Mg^{2+} により低磁場側の吸収ピークはbroadeningにより見られなくなる。これら線巾および化学シフトから、リン脂質dispersionの ^{31}P -核磁気共鳴スペクトルにほぼ一致し、極性基部のmobility および配向は多層ラメラ構造にほぼ等しいと考えられる。(2)ゴースト膜構成リン脂質は動物種により異なるが、 ^{31}P -核磁気共鳴スペクトルではphosphatidylcholineとsphingomyelinの分画比の違いがphosphatidylethanolamineとphosphatidylserineの吸収ピークに影響し、それらのbroadeningにより低磁場側のピークが見られない。すなわち、ヒトにイヌのゴースト膜では2つの吸収ピークが見られるが、ウシでは高磁場側ピークのみがみられる。これはリン脂質間相互作用を示すものである。(3)赤血球ゴースト膜、シナプトソーム、ミトコンドリア、dipalmitoyl phosphatidyl cholineにANSでラベルし、蛍光測定を行い、膜の親水性部分の動態のinhalation anaestheticsによる変化を観察した。蛍光強度は生体膜では増加し、中性リン脂質膜では減少した。これらはinhalation anaestheticsは膜の流動性のみでなく膜表面電荷を変化させる。

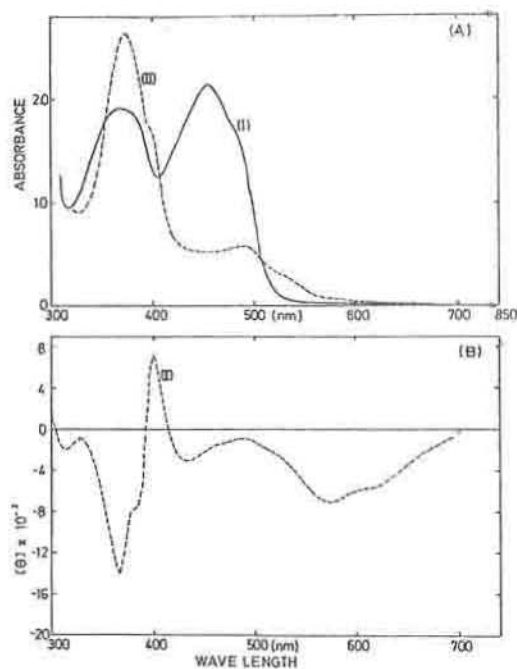
(文 献)

1. VIIIth International Conference on Magnetic Resonance in Biological System, 1978
2. Sixth International Biophysics Congress ABSTRACTS 1978
3. FEBS LETTERS vol. 101, No. 2 1979

志賀 潔(生理研) 三宅可浩, 魚住光郎, 杉山俊博,
 橋本正史(阪大医) 村松勇一(和歌山医大)
 三浦 洵, 山野俊雄(阪大医) 二科安三(和歌山医大・
 現生理研) 亘 弘(生理研)

数百にもものぼるフラビン酵素が報告されているが, その大多数においてフラビンとアポ蛋白の結合は非共有結合による。他方十種程度の酵素においては共有結合による事が最近明らかになってきている。今回我々は共有結合型酵素であるコレステロール酸化酵素とコリン酸化酵素をえらびそのスペクトルの性質を調べた。前者の結合様式は 8α -[N(1)-histidyl]-FADであり, 後者については 8α -[N(3)-histidyl]-FADであって, これらは共有結合型フラビン酵素の典型でありこのため両蛋白を用いる事にした。

円偏光二色性の測定の結果, 両酵素とも(その酸化ならびに還元型で)可視領域のほぼ同じ波長に同程度の楕円率を示すがその正負は逆転していた。さらにEDTA存在下で光照射を行なうと両酵素ともRedセミキノンの吸収スペクトルを示し(図1), さらにそのESR スペクトルは $g=2$ 付近にシグナルを示した。これらのセミキノンのCDスペクトルは長波長領域に新しいCDバンドを示し, やはりその正負は両酵素



コリン酸化酵素セミキノンの吸収(A)および円偏光二色性スペクトル(B)
 I) 酸化型酵素
 II) セミキノン型酵素

で逆転していた。これらの結果は、この二種類の共有結合型フラビン酵素において、フラビンとその周辺の遷移モーメントの相互配置は異っているが、アポ蛋白自身の作る活性中心の様子は両蛋白できわめて類似している事を示す(1)。

(1) J. Biochem., in press

The Circular Dichroism Studies on Flavoproteins
Containing Covalently Bound Coenzymes

M. Ohta-Fukuyama, Y. Miyake, K. Shiga, Y. Nishina,
H. Watari, T. Yamano

山田雅弘 (通産・工技院電総研)

金子章道・立花政夫 (生理研)

魚類網膜の水平細胞は光照射に対し持続性の緩電位を示すが、その応答の極性は与えられた光の波長に依存し、4型に分けられる。即ち全ての単色光に対し過分極性の応答を示し錐体から入力を受けるLp型、杆体から入力を受け過分極性応答を示すLs型、短波長側では過分極、長波長側では脱分極を示す2相性C型、短波長と長波長で過分極し中間の波長帯で脱分極する3相性C型である。いずれのタイプの水平細胞も網膜照射面積を広げる程応答振幅が増大する。この空間的加重は水平細胞間の電気的結合によりもたらされていることはKaneko(1971)の実験により実証されたが、サメ網膜の水平細胞はLs型のみであったので、タイプの異なる水平細胞間における電気的結合の存在を検討する目的で本実験を行なった。コイ網膜を剝離し視細胞側から2個の水平細胞を同時に刺入した。Table 1に示すように54組の水平細胞についてそれぞれの応答型を検した後その一方に細胞内通電をして膜電位を変化させ、他方の細胞への影響を検討した。その結果、Lp型水平細胞間には32組中20組に電気的結合が証明され(図1にその1例を示す)、2相性C型間では8組中1組に電気的結合が検出された。タイプの異なる17組には電気的結合は検出出来なかった。他の2組については十分な結果が得られず判定を保留した。

Table 1. Number of Horizontal Cell Pairs
Tested for Electrical Coupling

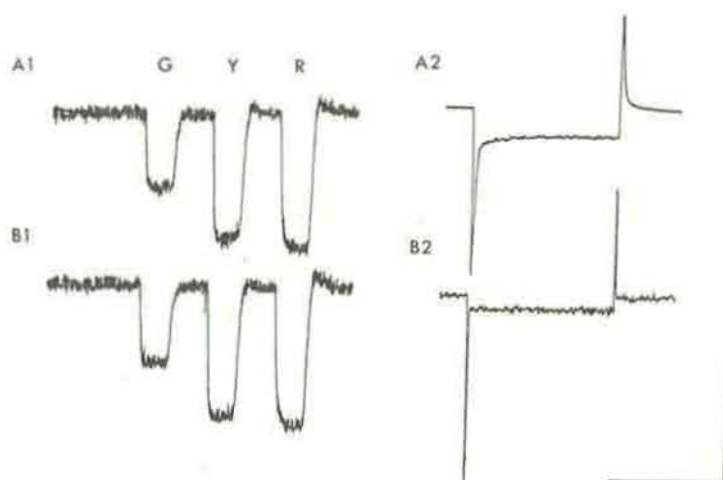
Cell Type		Coupling		Total
current- injected	recorded	detected	undetectable	
Lp	Lp	20	12	32
C2	C2	1	1	2
Lp	C2	0	3	3
C2	Lp	0	10	10
Lp	Ls	0	3	3
Lp	C3	0	1	1
Ls	C2	0	1	1

Lp: Luminosity cell with cone inputs

Ls: Luminosity cell with rod inputs

C2: Diphasic chromaticity cell

C3: Triphasic chromaticity cell



先端を $190\mu\text{m}$ 離れた 2本の微小電極 (1本は2連式, 他は単連式) を同時に A, B 2つの水平細胞に刺入した。A1, B1はこの2つの水平細胞の緑 (G), 黄 (Y), 赤 (R) 色光刺激に対する応答。光刺激には3種類の発光ダイオードを用いた。全て過分極性の応答で, A, Bの両細胞共にLp型であることを示している。

2連式微小電極の片方から -20nA の電流を細胞Aに通電すると, A2のような電圧降下が記録されたが, 同時に細胞BからもB2のような電気緊張性電位 (振幅はA2の約4%) が記録された。細胞Aに脱分極性電流を通電した場合にも同様な関係が観察出来た。

時間軸の calibration: A1, B1 に対しては 2sec , A2, B2 に対しては 0.4sec 。

電圧軸の calibration: A1, B1 に対しては 10mV , A2 に対しては 60mV , B2 に対しては 6mV 。

この実験では可能な全ての組合せを検討することは種々の制約があったために実現出来なかったが, 同型の水平細胞間には高率に電氣的結合が検出され, タイプの異なる細胞間には検出出来なかったという事実は, 水平細胞間の電氣的結合が同型の細胞間に限られていること, 水平細胞の空間的加重がこの電氣的結合によりもたらされていることを示唆するものである。

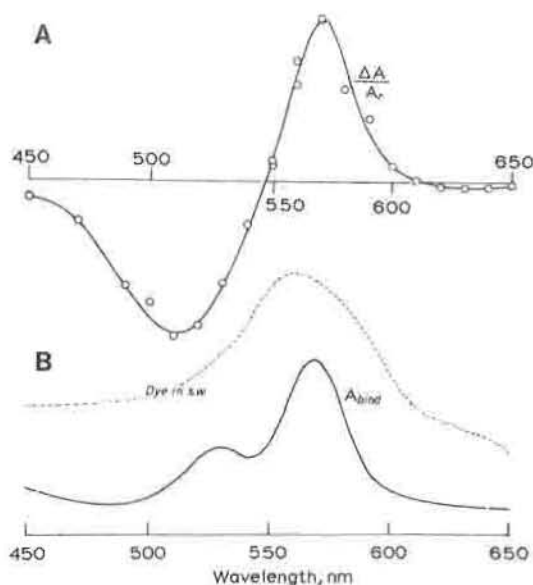
神野耕太郎(東医歯大) 亘 弘(生理研)

メロシアニン、メロシアニンローダニン、メロシアニンオキサゾロ系の色素は、膜電位の光学的測定用の有効なポテンシャル・プローブとして用いられる。膜電位変化、特に興奮性細胞の活動電位の光学的測定は、これらの色素の次のような光学的挙動を基礎にしている。

- 1) 膜に結合して、その吸光度あるいは蛍光が膜電位に依存して変化し、膜電位変化に対する応答時間がひじょうに短い。
- 2) 光学的変化の大きさは50mVの膜電位変化に対して背景光の 10^{-3} のオーダーで、かつ、シグナル・雑音比がひじょうに大きく、加算平均する必要がない。
- 3) 光学的変化の大きさは静止電位から ± 100 mVの範囲では、膜電位との間に直線関係が成り立つ。
- 4) イオン電流あるいは膜コンダクタンスとの関係はない。

イカ巨大神経線維を用いて、これらの光学的挙動は詳細に調べられたが、そのメカニズムについてはまだ充分明らかではない。

そこで、この研究では、メロシアニン色素について、intactなイカ巨大神経線維の膜電位変化にともなう吸光度変化のスペクトルと、イカ神経線維から



イカ神経線維膜に結合したメロシアニン色素の膜電位変化にともなう吸光変化のスペクトルと膜に結合したメロシアニン色素の吸光スペクトル。(A)メロシアニン色素で染色したイカ巨大神経線維の膜電位を脱分極側へ50mVのレベルに電位固定したときの吸光度の変化のスペクトルを示し、矢印の方が吸光度の増大を示す。(B)海水中的のメロシアニンだけの吸光スペクトルを点線で示してある。実線で示した膜結合色素のスペクトルは膜サスペンション中での吸光から遊離色素の吸光を差し引いたものである。

重層遠沈法で分離した形質膜と色素の結合における吸光スペクトルを比較することによって、膜に結合した色素の状態および膜電位変化にともなう吸光度変化のメカニズムについて知る手がかりを得る目的で行われた。

1. イカ巨大神経線維を静止電位から脱分極側へ50mVのところに膜電位を固定したとき、膜に結合したメロシアニン色素の吸光度は450から540nmの波長では増加を示し、550nmから600nmでは減少する。そして、520nm附近と570nm附近にピークを示す。すなわち、膜電位に依存した吸光度の変化は520および570nm附近でもっとも大きく、その変化の方向は逆である。

神経線維の軸に垂直に直線偏光を入射した場合も平行な直線偏光を入射した場合もスペクトルの形状には変化は見られない。これは、この色素の場合、吸光度の変化が膜内での色素分子の配向の変化によらないことを示している。

2. ショ糖重層遠沈法によって、イカ巨大神経から径100~200 μ mぐらいの小胞として膜を分離することが出来た。この膜小胞のサスペンションに色素を共存させてin vitroで分光測定を行った。メロシアニン色素は海水に溶かした場合560nm近辺にピークを持つ単調な吸光スペクトルを示す。ところが、これに膜小胞を共存させると520~530nmと570nmに2つのピークを持つスペクトルに変化する。色素量を一定にして膜小胞の濃度を変えると、この2つのピーク比は変化し、膜小胞の濃度が小さい場合、530nmでのピークは570nmのピークより大きいが、色素の濃度対膜小胞のタン白濃度比が1:25より小さくなるとこのピーク比は逆転する。

このスペクトルとintactな神経線維での膜電位変化による吸光変化のスペクトルの両方でそのピークの位置は殆んど一致している。これらのスペクトルは、アルブミン溶液、エタノール中で得られるスペクトルとは違っており、リポイドのサスペンションでのスペクトルに同じである。

ところで一方、色素がaggregateした場合と分散した場合とではその吸光スペクトルには大きな違いが見られ、メロシアニンの場合520nmでのピークはダイマー、570nmのピークはモノマーの状態での吸光に対応することがわかっている。このことから、膜小胞のサスペンションでの530nm附近でのピークは色素のダイマー、570nmでのピークはモノマーの状態に対応していることが示唆され、ポテンシャル・プローブの膜電位に依存した挙動はモノマー⇌ダイマー平衡の移動として説明できるように見える。

発表文献

1. Hirota, A., Fujii, S., Kamino, K., Optical monitoring of spontaneous electrical activity of 8-somite embryonic heart. Jap. J. Physiol., 29(1979) 635-639.
2. Kamino, K., Optical approaches to monitoring membrane potential activity, Topics in gen. Physiol. Biophys. (1980) 45-51.
3. Fujii, S., Hirota, A., Kamino, K., Optical signals from early embryonic chick heart stained with potential sensitive dyes. J. Physiol. (Lond.)(1980). in press.
4. Fujii, S., Hirota, A., Kamino, K., Optical monitoring of development of electrical activity in embryonic chick heart during early phases of cardiogenesis. J. Physiol. (Lond.)(1980) in press.

高次神経機構の研究

板東武彦, 藤戸 裕, 前田 純 (阪大基礎工)
塚原伸晃, 村上富士夫 (生理研)

神経回路網の可塑性は、適応・学習・記憶の基礎として脳の最も重要な性質である。中枢神経細胞のシナプスの可塑的变化は、神経回路網の可塑性に重要な役割を果たしていると考えられる。神経回路網の可塑性に関する電気生理学的な研究は、すでに本研究代表者らによってなされ、中枢神経細胞で、入力線維の一部を破壊することにより、新しくシナプスが形成され、機能し得ることを証明し、さらに生理的条件下での末梢神経交叉接合標本においても新しいシナプスが形成されることが示されている。本研究では、これらの電気生理学的結果と表裏一体の関係にある新生シナプスの形成に伴う形態的变化を定量的に解析することにより、高次神経機構の解明を行なうことを目的とした。

神経回路網の形態的变化を定量的に解析するためには、計算機による画像処理技術の導入が必要であるが、神経細胞標本のような複雑な画像を迅速に処理するためには、画像処理システムを対話型処理で行なう必要がある。そのため本研究においては、画像処理システムのハードウェアシステムの設計・製作を行ない、計算機にビデオテレビカメラからの画像情報を入力することが可能となり、また処理された結果をモニターテレビ画面上に映し出し、対話的に処理することが可能となった。また画像処理に適したミニコンピュータを導入した。ハードウェアシステムの作成と並行して、画像処理のためのソフトウェアシステムの開発を行ない、HRP細胞内注入による神経細胞光学顕微鏡像の神経細胞部の抽出、雑音除去、樹状突起の細線化処理を行なった後での分岐パターンの自動追跡、及び特定の部分の面積測定等のソフトウェアを作成した。尚、電子顕微鏡画像の処理は画像が複雑であるため、標本作成法とソフトウェアによる処理の双方に検討を加え、実際に標本を作成し、対話型システムによる処理を試みた。

(文 献)

日本生物物理学会第17回年会予稿集 1979.

神経膜の組織化学的研究

平野 寛, 西山文朗(杏林大医) 山岸俊一
古家喜四夫, 久木田文夫(生理研)

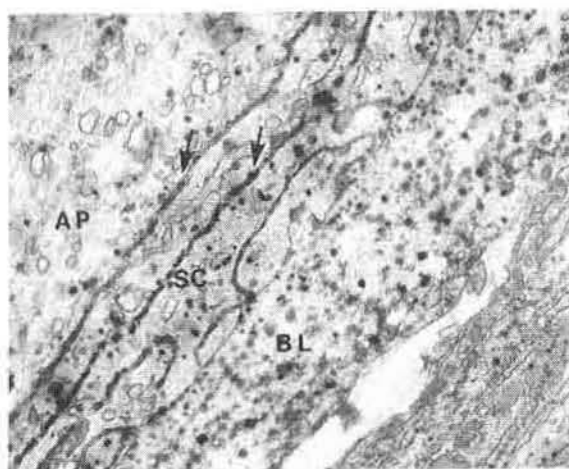
神経膜外面および内面の物質をしらべる目的でイカ巨大神経およびザリガニ巨大神経を材料とし、電子顕微鏡により、まず神経線維の基礎構造を検討するとともに、酵素化学的、免疫化学的研究を行った。

イカ巨大神経は直径約 $500\mu\text{m}$ の無髄神経線維であり、巨大神経の周囲は2～3層のシュワン細胞が取り巻いている。更にその外周は結合組織で囲まれている。Ach esterase活性はCu-ferrocyanide denseの反応産物として検出されるが、これはaxolemmaとSchwann cell membraneの間に所見が認められた。活性所見は連続でなく、途切れつつ認められるのが特徴である。Schwann細胞膜間隙な所見が認められた。ATPase活性については神経膜Schwann細胞膜間隙に所見が認められたがSchwann細胞層の最外周膜表面にもっとも明瞭な所見が認められたのが特徴である。

また組織固定剤や組織化学試薬投与時の膜の生理的反応についても同時に並行して検討をはじめた。

(文 献)

Yamagishi, S. Furuya, K. & Kukita, F. (1979. 8)
Initiation of the Ca induced spike in intracellularly perfused squid giant axons.
J. Physiol. Soc. Japan 41, p296



ヤリイカ巨大神経線維のアセチルコリンエステラーゼ活性。矢印は神経膜・シュワン細胞膜間隙およびシュワン細胞膜間隙の reaction productsを示す。

AP; Axoplasm, SC; Schwann cell
SL; Basal lamina

顎反射生理の基礎的研究

菅野義信(広島歯学部) 黄 志昭(香港大
医) 古河太郎(東医歯大) 宗岡洋二郎
(広島大医) 志賀 潔, 杉山博之, 山岸俊一
亘 弘(生理研)

顎運動は意識的に大脳より強力な統制により行う面がある一方反射運動の関与が大きい運動系でもある。下顎運動を動力学的に描記する研究も各種の研究
方法の改発と発展で大きな進展をみせたが、運動の基本である反射生理学的研究も重要である。特に主たる顎運動機能の咀嚼運動の意義を考えると反射生理学的研究が期待される。

顎反射の研究としては支配神経回路の探索と回路の機能の研究にしばられてくる。黄志昭教授はすでにウサギを用いて中枢神経系中の三叉神経諸核からの電気的活動を分析し顎反射運動の解明を行ってきたが、顎運動そのものとの関連や、微細形態学的な神経回路網の結合状態が明らかになっていない。

本共同研究では顎反射運動を自動制御論的考察をもとに一部神経回路電気生理学的研究と電子顕微鏡によるシナプスの結合状態の追跡を主な研究課題として研究と討論を実施し以下の結果を得た。

1. 顎運動の自動制御機構としては、定値制御、プログラム制御、追値制御のすべてが関与するが、プログラム制御に関する神経生理学的研究は困難で、このような短期の研究では他の2制御の研究に集中することに合意した。

2. 微小電極による電気生理学的研究により、定値制御に関する神経回路のモデルが明らかになった。すなわち制御対称の咀嚼筋への操作信号は制御要素である三叉神経運動細胞より入力に入る。そして制御量は下顎の位置と筋長であり、これは筋紡錘、顎関節の感覚情報の検出要素として高位中枢より三叉神経運動細胞への入力を修飾する。

3. 検出要素からの修飾過程へのシナプス機構の微細構造に関しては125KVの電顕でシナプスの立体構造の解明を試みたが、立体構造を解明するにはより厚い標本の微細構造を明らかにできる超高圧の電顕が必要ながことが判明し、これのすみやかな導入が期待された。

Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology

45(No.1)45-50 1978

J. Dent. Res. 56(Special Issue D)

D;46-146

1977

化学受容膜と神経膜表面物質の検索

秩父志行, 若桑和夫 (近畿大医) 久木田文夫,
古家喜四夫, 山岸俊一 (生理研)

昨年引きつづき、ザリガニ第一触角外枝に存在する化学受容器について実験を行った。まず化学受容器からの神経束と機械刺激受容器からの神経束を分離し、さらに化学受容器からの神経束を細分化することにより、多くの重ったシグナルではなく、化学受容器からの単一のシグナルが記録できる状態でタウリン、GABA等に対する反応性をみた。

また、単一の化学受容器及び神経繊維の形態的つながりをみるためにHRPによる染色を試みた。

神経伝達物質放出の生化学的機構

田中 亮, 堀田 健(名市大医) 西賀鷹子
杉山博之, 山岸俊一, 内菌耕二(生理研)

神経伝達物質の放出機構を, 脳スライス, シナプトゾーム画分, シナプス小胞画分を用いて調べ, 次のような結果を得た。

1) 放出機構の特異的要求:

Ca^{++} イオノフォアを用いた実験, 放射性ドーパミンを取り込ませた脳スライス・シナプスゾーム画分を用いた実験, ケイ光性 Ca^{++} アナログとしての Tb を用いた実験等により, 放出機構は

- (i) エネルギー依存性であること。
- (ii) 神経終末内の Ca^{++} 濃度の上昇に依存した過程であること。
- (iii) シナプス小胞に依存した機能であること。
- (iv) Ca^{++} の結合部位はシナプス小胞上に高濃度に存在していること。

2) 有核小胞について:

ウシ脳より得た有核小胞 (coated vesicles) 画分をタンパク化学的・酵素化学的に検討した結果, 有核小胞は

- (i) 伝達物質を取り込まず,
- (ii) 酵素活性の特性についても, 通常のシナプス小胞とは異っている

(ATPase, ドーパミン水酸化酵素等) ことが分った。

このことは, Heuser-Reese らの recycling 仮説を単純にあてはめただけでは説明できないことを示唆している。

(文 献)

- (1) 後藤香糸子, 田中 亮: 牛大脳のコーテッドベシクル画分の分離とその性質。神経化学 17巻 117-120 (1978)
- (2) 奥村久仁子, 田中 亮, W. T. Hoss: Fluorescent Ca analog としての Tb と brain synaptic vesicle 画分との相互作用。神経化学 17巻 121-124 (1978)
- (3) 田中 亮: モノアミン放出の機構。脳研究会誌 5巻 187-193 (1979)

外山敬介（東京大学医学部） 塚原伸晃（生理研）

空間の認識のためには網膜からの視覚情報と眼球運動の情報の統合が必要である。我々はオペラント条件づけによりネコの眼球運動を制御し、149個の17野ニューロンの眼球運動に対する反応を調べ、下記の結果を得た。

- 1) 全てのニューロンはしま模様をネコの眼前のスクリーンに呈示している際のサッケードに反応した。これらの反応は興奮型と抑制型の2型に大別される。興奮型の反応（図1A-D）は、107個のニューロンに見られた。サッケードの際に興奮する細胞（サッケード興奮型細胞）は眼球が静止している時にはほとんど発火しない。抑制型の反応（図1I-L）は42個の細胞に見られ、眼球静止時に高頻度で発火する（図1E-H）。
- 2) サッケード興奮型ニューロンのうち、大部分のもの（104/107）は暗黒中でもサッケードに対して興奮する。一方、サッケード抑制型の全ての細胞の反応は消失する。

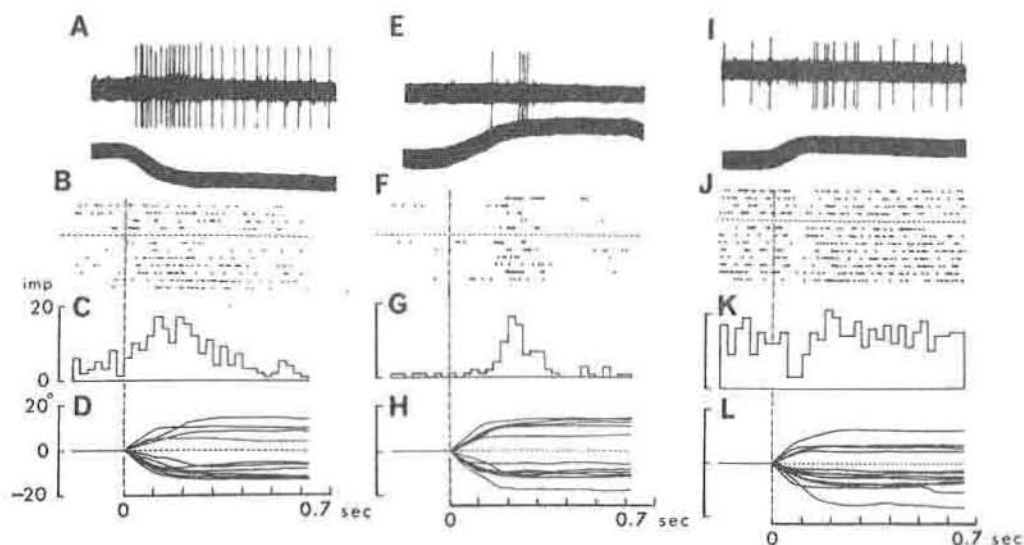


図1 サッケード性眼球運動に対する視覚領ニューロンの反応

A-D, 格子じまを呈示した時のサッケード興奮型細胞の反応。A, 上のトレースインパルス反応, 下のトレース, 水平方向の眼球運動電位。B, インパルス反応のドットディスプレイ。C, PST ヒストグラム。D, 眼球運動電位。E-H, A-D と同じサッケード興奮型細胞の反応, ただし暗黒中で得られたもの。I-L, 格子じま呈示中のサッケード抑制型細胞の反応。

3) 60個のサッケード興奮型ニューロンについて、図型に対する反応を調べた結果、38個が複雑型、6個については反応型の判定困難であり、16個はスリット図形に対して反応しなかった。同様の15個のサッド抑制型ニューロンの全てが図形に対する反応性に基づいて単純型と判定された。

以上の実験観察は、単純型と複雑型の2型の細胞が明視時のサッケード運動の際に対照的に動作することを示している。前者は眼球の静止時、興奮性が高まり、サッケード運動時に興奮性が低下する。一方、後者はサッケード運動時に興奮性が上昇する。したがって無麻酔の条件下では、単純型と複雑型は、一方が動作する時は他方が機能を停止するという二者択一的な視覚情報のチャンネルを形成していると思われる。

(文 献)

1. M. Kimura, Y. Komatsu and K. Toyama (1979) Neuronal responses to saccadic eye movements in the cat's striate cortex. In *Integrative Control Functions of the Brain II* 73.
2. Y. Komatsu and K. Toyama (1979) Corollary motor inputs to striate neurons of the alert cat during saccadic eye movement. *Neuroscience Letter*, Supp. 2, S37.
3. M. Kimura, Y. Komatsu and K. Toyama Differential responses of simple and complex cells of cat's striate cortex during saccadic eye movements. *Vision Research*, in press.
4. K. Toyama Neuronal mechanisms of visual cortical plasticity. In *Neurobiological Basis of Learning and Memory*, John Wiley & Sons Inc., New York, in press.
5. M. Kimura, T. Shiida, K. Toyama and K. Tanaka (1980) Three classes of area 19 cells of the cat classified by their neuronal connectivity and photic responsiveness. *Vision Research*, 20, 69-77.

NG108-15細胞を用いた α -受容体作用機構の研究

芳賀達也(浜松医大) 東田陽博(名大環境医研)
杉山博之(生理研)

本研究においては、芳賀(浜松医科大学助教授)と杉山(生理学研究所助教授)の共同研究という形で出発し、途中から名古屋大学環境医学研究所助手の東田陽博氏の追加参加を得て、実施した。神経芽種細胞由来の交雑細胞 NG108-15 を培養して、その細胞膜上の α -受容体に関して、以下のような問題を検討した。

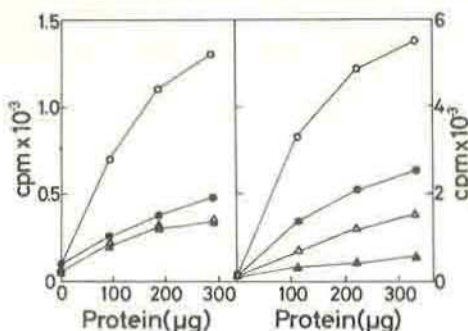
- 1) この細胞膜上に、果たして α -受容体が存在するか否か?
- 2) もし存在するのなら、その受容体は α -アゴニストに対して細胞がどのように反応することを中介するのか?
- 3) この細胞が我々に興味ある最大の理由は、それが培養系において高い効率でシナプスを形成することであるが、そのシナプス機能に対して、 α -受容体は如何なる影響を与えるか?

以上の諸問題に対して、本年度の共同研究によって次のような結果を得た。

1) NG108-15細胞膜上に

は、明らかに α -受容体が存在する。 ^3H でラベルした dihydroergocryptine (^3H -DHE, α -受容体の特異的阻害剤)の結合反応で調べた結果、明らかに α -受容体部位であると考えられる部位が明瞭に検出された。予備的測定値は、数十 f mol/mg タンパクのオーダーと考えられる。

- 2) 受容体部位の明瞭な存在にもかかわらず、この細胞は α -アゴニストに対して、電気生理学的には何ら有意の膜電位反応を示さないこ



MG108-15細胞膜分画への α -アゴニストの結合。 α -受容体にはサブクラス α_1, α_2 が知られており、 ^3H -DHE(丸印)はその両者に、 ^3H -WB4101(三角印)は α_1 -受容体のみ結合する。 $1.0 \mu\text{M}$ フェントラミンの存在下(●, ▲)と非存在下(○, △)での結合量の差が特異的な受容体部位量を表す。図の左側にNG108-15細胞、右側に比較のためラット脳の粗膜分画への結合をした。

とが分った。このような例は比較的珍しく、更に詳しい検討が極めて重要であると思われる。おそらく、プレシナプス型の受容体であることに依っているのではないかと考えられる。

- 3) この細胞が実際にシナプスを形成することを確認し、そのための培養条件を確立した。第8の問題点については、54年度に共同研究を継続し、更に詳しく検討を加える予定である。

(文 献)

神経化学 Bulletin of the Japanese Neurochemical Society.
18. (1979)

細胞内記録によるカエル視蓋神経回路の解析

松本修文(阪大基礎工) 塚原伸晃(生理研)

カエル視蓋の神経回路を明らかにするため、細胞内記録および染色法を適用し、細胞の応答と形態との関連を調べた。

ネンブタール麻酔後、クラールで不動化したウシガエル (*Rana catesbeiana*) の視蓋ニューロンの視神経電気刺激に対する応答を、種々の層から記録した。応答には2シナプス性EPSPとそれに続くIPSPを発生するもの(I型)と、単シナプス性、2シナプス性の連続するEPSPとそれに続くIPSPを発生するもの(II型)が見出された。25例中21例がI型、4例がII型であった。入力線維の伝導速度は4m/s以上で、これらは有髄線維であることが確かめられた。しかし、強い刺激の下では無髄線維によるとと思われる応答も、多くの細胞で観察された。

つぎに、プロシオン・イエローによる細胞内染色を行った。その結果、22例の染色された細胞は図1に示すように、1)細胞体が6層または8層にあり、上方に1本の dendroite をのびし、表層で分岐する vertical type (V-type, a~j), 2)主として8層から7層にかけて細胞体があり、複数の dendroite を細胞体から直接出して、複雑に分岐する multipolar type (MP-type, k~u), 3)9層にある小さな細胞 small neuron (S neuron, V) の3つに大別された。これら種々の形態をもつ細胞は、ゴルジ標本とも対応が付き、たとえば細胞Cは large pear-shaped neuron, 細胞d は small pear-shaped neuron, 細胞Cは pyramidal neuron, 細胞V は stellate または

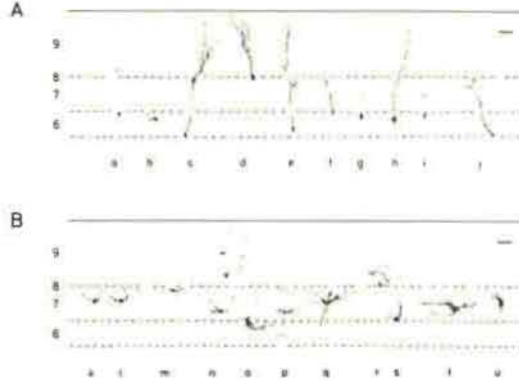


図1. プロシオン・イエローによって染色された細胞のスケッチ。A: vertical type (a-j) B: multipolar type (k~u) および small neuron (V)。左側の数字は視蓋の層、右上の短かい横線は50μmを表わす。

amacrine neuron と考えられる。また large ganglionic neuron は細胞 k-u の MP-type の中に含まれている。II 型の応答は MP-type の一部の細胞 (n, o) から、I 型の応答は他のすべてから記録された。

Szekely らによる電子顕微鏡の知見によると、large pear-shaped neuron は表層部のデンドライトに直接視神経線維からの入力を受けており、また、これらの細胞同志は dendro-dendritic contact を有している。これらの結果からは、large pear-shaped neuron に単シナプス性 EPSP が発生することが期待されるが、今回の実験においては、6 層の細胞からは単シナプス性 EPSP が検出されなかった。

(文 献)

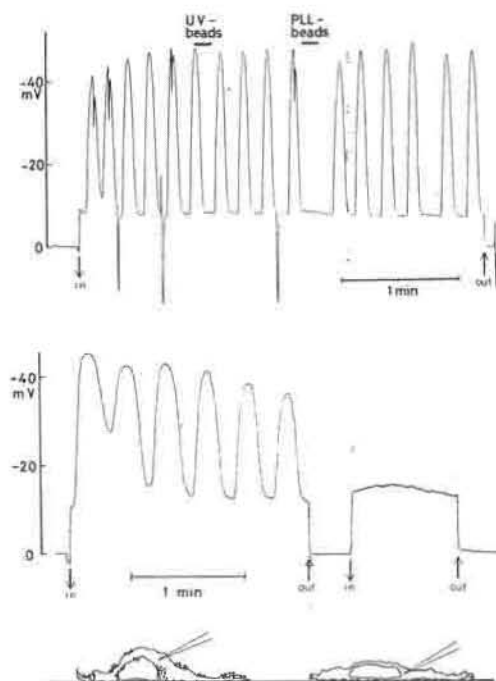
1. Matsumoto, N. and Bando, T., Intracellular recordings of tectal cells of the frog, Proc. Jap. Acad. 54 B (1978) 386-390.
2. Matsumoto, N. and Bando, T., Intracellular recording and staining of tectal cells of the frog, Neuroscience Letters, Suppl. 2 (1979) S39.
3. 松本修文, 坂東敏博, カエル視蓋ニューロンの視神経電気刺激による応答と、プロシオンイエローによる細胞の同定。日本動物生理学会第1回大会発表論文抄録, 11, 1979.
4. Matsumoto, N. and Bando, T., Excitatory synaptic potentials and morphological classification of tectal neurons of the frog, Brain Research 199(1980) in press.

培養線維芽細胞膜における過分極性膜興奮現象の生理学的研究

岡田泰伸(京都大医学部) 山岸俊一(生理研)

培養線維芽細胞は、膜への機械的又は電氣的刺激に対して、一過性の過分極性膜応答(振幅約 -25 mV)を示す所の一種の「興奮性」を有している¹⁾。更に、適当な条件下では自発的にその膜応答を繰返す所の膜電位振動(周期約4回1分¹⁾)を示す。これらの膜応答は主として K^+ のコンダクタンス増に因っている^{2,3)}事が、種々の電気生理学的実験により明らかにされている。

これらの点を踏まえて、53年度には当共同研究からも一部研究費補助を受け、次の諸点を明らかにする事が出来た。即ち、(1) 刺激で誘発された膜応答の場合でも、自発的膜電位振動の場合にも、まず Ca^{2+} が細胞外から膜を横切り輸送され、それによる細胞内 Ca^{2+} 濃度増がいわゆる Ca^{2+} -activated K^+ channelの開閉を促し、 K^+ コンダクタンス上昇が引き起こされる事が、そのイオン機序である事が判明した。⁴⁾ (2) この細胞膜は、二、三の血清蛋白(β -リポ蛋白など)により化学的にも過分極性の膜応答を発生し、それに続いて活発な貪飲作用を示す事が新たに明らかになった。(3) 又この細胞は貪飲のみならず、固形物質の貪食も活発に行い、この定量的観察が、表面をpoly-l-lysine



(PLL) や紫外線 (UV) 照射により処理されたラテックス・ビーズを用いる事により可能となった。このビーズの膜表面投与自体では膜電位に何の影響も与えないが、このビーズの貧食能と、膜応答発生能との間にはよい対応関係があった (図)。又、膜応答の原因である Ca^{2+} 流入を制御する所の各種イオンや薬物はすべて貧食活動をも抑制した。(4) これらの諸結果から、この L 細胞における過分極性膜応答は、 Ca^{2+} 流入を媒介として、貧食、貧飲活動を中心とした細胞膜の運動性に関係する所の、膜の一種の「興奮」現象である事が示唆された。

以上の研究は、当教室大学院生の土屋和興氏と共同でなされたものである。

(文 献)

- 1) Y. Okada et al. (1977) J. Membrane Biol. 35, 319-335.
- 2) Y. Okada et al. (1977) J. Membrane Biol. 35, 337-350.
- 3) G. Roy & Y. Okada (1978) J. Membrane Biol. 38, 347-357.
- 4) Y. Okada et al. (1979) J. Membrane Biol. 47, 357-376.
- 5) Tsuchiya et al. (1978) VI Int. Congr. Biophys.
(Abstr.) pp. 223

上皮細胞膜におけるイオン透過と能動輸送

齊藤禎隆（東北大医） 山岸俊一（生理研）

腎、膀胱膜、腸などの上皮細胞は同一細胞の粘膜側が全く異なる物質透過・輸送機能を持ちながら、両面が統合して働くことにより電解質や糖の体内吸収を実現しているので、この機能の解析的研究法の開発を検討した。

上皮細胞系に対する生理機能面からのアプローチは①上皮細胞シートを挟んでの短絡電流計測による能動輸送イオン量の測定②ラジオアイソトープ法などによる細胞内外の物質輸送の測定③細胞内電位と細胞壁間電位の同時計測による粘膜側細胞膜と漿膜側細胞膜の生理活動の解析が挙げられる。①、②については長時間にわたる安定した生理活動を発現する標本の作成と各種物質の極微量検定法の開発が極めて重要である。③については超微小電極使用条件下で、電解質および試薬投与実験が可能な実験チャンバーの作成が重要であり、試作と実験を重ねている。

一方、生化学的アプローチとしては膜表面のリセプター、輸送キャリアー、酵素の同定と膜面上の配列を明らかにすることが重要であり、緊急の課題である。

分泌過程における細胞内Ca, Hイオンおよび膜電位の動態

小川正晴(京大医) 亘 弘(生理研)

分泌過程の放出機構を調べるべく、(A)遊離クロマフィン細胞を用い細胞レベルにおけるアドレナリン(Ad)の放出現象、(S)クロマフィン顆粒を用い顆粒レベルにおけるAd放出を検討した。

(A)牛副腎髄質部のコラゲナーゼ処理により遊離してくるクロマフィン細胞において、 $(Ca^{2+})_0$ に依存したアセチルコリンによるAd放出がみられた。

CaイオノフォアA23187を用いた場合、 $(Ca^{2+})_0$ に依存した著明なAd放出がみられた。アルセナゾIIIを用い、細胞へのCaの取り込みを調べたところ、アセチルコリンにより細胞内へのCaの取込みが増大することがみられた。一方、膜電位依存性の蛍光変化を示すdis-Ca-(5)を用い膜電位を調べたところアセチルコリン、A23187いずれにおいても脱分極現象が見られた。またアセチルコリン作用では $(Cl^-)_0$ を (SO_4^{2-}) に置換するとAd放出は抑制された。

(B)クロマフィン顆粒ではその貯留Adが $Mg^{2+} + ATP$ によって特異的に放出されてくる。顆粒膜電位の測定、Ad放出のkineticsによりこの機構を調べてみた。 $Mg^{2+} + ATP$ によって顆粒膜電位は脱分極し、この脱分極中に比例した速度をもってAdが拡散的に放出された。この現象はATPに特異的であり、かつCa, Sr, Ba等では効果はみられなかった。又この現象は顆粒膜Mg ATPaseによるATPの分解と、これにcoupleした H^+ の能動的なとりこみ、顆粒 K^+ の流出等によることを証明した。また、 Cl^- を SO_4^{2-} に置換した場合、ATP分解能には変化がないものの、Ad放出および顆粒膜電位の脱分極が共に抑制され、このことは顆粒膜を介してのイオンの輸送過程が貯留ホルモン放出の重要なstepであることを示唆している。

Pollard等の報告と総合すると、クロマフィン細胞において、アセチルコリンにより細胞膜電位が脱分極し、Caが細胞内へとりこまれる。増大した $(Ca^{2+})_i$ によって顆粒と細胞膜との融合が引き起こされる。この結果顆粒は高 $(Cl^-)_0$ に接し、上記 $Mg^{2+} \cdot ATP$ 作用によりAdを放出するにいたる。

(文 献)

- | | |
|------------------------|---------------|
| 日本生理学会(予稿集) | 1979 |
| Jap. J. Physiol. | in press 1979 |
| Membrane Biochemistry. | in press 1979 |

神経芽細胞腫 NG108-15 に対する β -Bungarotoxin の作用と結合様式

阿部輝雄（新潟大脳研） 杉山博之（生理研）

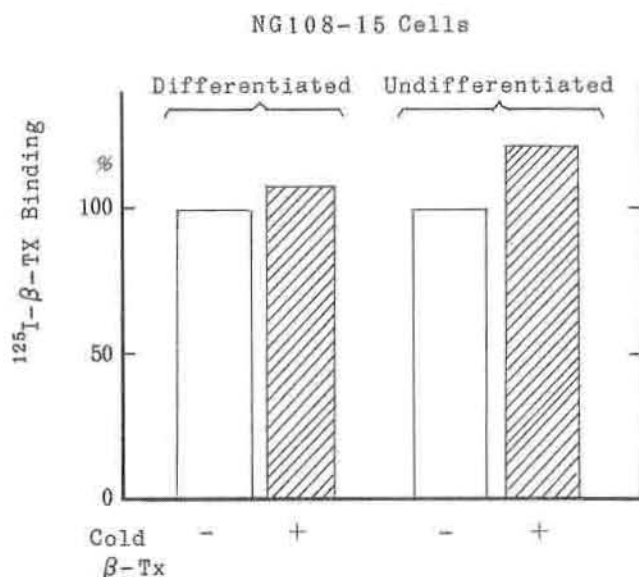
神経細胞腫 NG108-15 は、培養系において神経細胞としての分化を果たし、アセチルコリンを合成し、骨格筋細胞と機能的なシナプスを形成することが知られている。本共同研究では、この NG108-15 細胞を用い

て、 β -Bungarotoxin の作用の仕方を検討することを試みた。

β -Bungarotoxin はコリン作動性シナプス前細胞膜に作用して、アセチルコリンの放出を阻害することが分っている。

結果：① NG108-15 細胞の培養条件を検討し、実際にシナプスを形成することを確認し、その為の培養条件を確立した。

② また、十分に分化した NG108-15 細胞に対する β -Bungarotoxin の作用を調べる第一段階として、光学顕微鏡レベルでの作用を検討した結果、生理的に有効な濃度の数十倍もの高濃度の β -Bungarotoxin によっても、光顕的に有意な作用は検出されなかった。このことは、 β -Bungarotoxin の作用が比較的特異的なものであり、広範囲に及ぶ非特異的なダ



NG108-15 細胞膜分画に対する ^{125}I - β -ブンガロトキシン (β -TX) の結合。ジブチリル環状 AMP によって分化させた細胞と未分化の細胞の両者について検討した。いずれの場合にも、過剰の非標識 β -ブンガロトキシンの存在によって（斜線）、特異的にブロックされる結合部位は検出できなかった。

メージによるものではないことを示唆するものと考えられる。

- ③特異性結合部位の有無，検出の可非を検討するため， β -Bungarotoxin を放射性ヨウ素で標識し，この ^{125}I - β -Bungarotoxin を用いて，十分に分化した NG108-15 細胞膜と全く未分化の NG108-15 細胞膜に対する結合を比較検討した。

結果はネガティブで，いずれの場合にも特異的結合と思われるものは検出されなかった（図）。このことは， β -Bungarotoxin の作用の仕方の一つの示唆を与えられ。即ち， β -Bungarotoxin は，特異的作用部位を含めた，多数の部位に，同程度の親和性をもって結合し，そのうちの，特異的部位への結合が最もクリティカルな作用を示すことになる（言い換えれば，特異的作用部位はあるとしても特異的結合部位は定義し難いということ）。



生理學研究所研究會報告

伊藤 文雄 伊藤 嘉房 名古屋大学・医

カエル縫工筋または半腱様筋から単一遊離した筋紡錘では、求心性有髄神経が囊内で2~8段にわたって分枝を作り、その先端からそれぞれ数本の無髄神経線維を出している。この無髄神経の先端部が伸張されると、受容器電位が発生し、その細くて長い無髄神経に沿って abortive spike や Ca spike などの増幅機構を介して、有髄神経末端にある符号化膜が脱分極され、それが閾値に達すれば求心性放電が起る。この符号化部は、単純型筋紡錘（縫工筋内）では1個であるが、複雑型筋紡錘（半腱様筋内）では複数個ある。この複数個の符号化部の内1個から起きた求心性放電は求心性軸索に沿って中枢へ伝導すると共に、軸索反射で他の分枝に沿う符号化部に侵入し、それらを1時的にクリアーするであろう。各符号化部からの求心性放電の発生が at random であると仮定した場合に、有髄神経軸索部に如何なるパターンインパルス列が作られるか、point process を使って推計学的に解析することができる。これを逆に使って、実験結果のインターバル・ヒストグラムとその予測ヒストグラムとを比較検討することによって、各符号化部での内在性の放電様式を識別できるようになった。この方法を使って筋紡錘からの放電様式を分析した結果、複数個の符号化部の内1個が圧倒的に優位にあるものとか、各符号化部が平等な活性能力を持つものとか、その中間のものも含めていろいろな例が見出され、それぞれの放電様式と有髄分枝の長さとの間に一定の相関が見出された。

心筋の直列弾性要素の起源

杉 晴夫 帝京大学・医

骨格筋の直列弾性要素は大部分がクロスブリッジの弾性に由来すると考えられているが、確実な証拠は全く提出されていない。この起源を明確にすることは筋収縮の分子的機構の解明に不可欠と考えられる。我々は硬直(rigor)状

態の筋を伸長することにより、筋フィラメントの伸展性を直接測定しうるのではないかと考え、硬直状態（外液のATP除去）にしたウサギ腰筋のグリセリン筋を種々の程度に伸長し電子顕微鏡下に観察した。伸展時の筋節長変化はHe-Neレーザー光により測定した。電顕観察の結果、筋節の伸長（8-30%）はもっぱらフィラメントの重なり合いのない部分におけるアクチンフィラメントおよびミオシンフィラメントのH帯の伸長によるものでありうることがわかった。この結果は筋フィラメントがかなりの程度伸長しうることを、したがって直列弾性要素の起源となりうることを示している。

細胞間の一つの情報伝達機構について

菅野 義信 広島大学・歯

唾液腺細胞、肝細胞はじめ各種の細胞間には形態学的にも明らかに観察できるギャップ結合が存在する。この結合部を通して、比較的分子量の小さい、すなわち分子量約1,000以下の細胞内物質が交通していることが実験的に報告されており、電気的にも低抵抗の結合状態にある。1つの細胞に矩形波通電をした場合の、通電細胞と隣接細胞の電気緊張電位の比を結合比(coupling ratio)として表現し、細胞間の結合状態を数値化できるので、これを指標としながら各種細胞間結合の検索ができる。

ゼノバスの卵割球は顕微鏡下で寄せ合わせて相互に接触させると数分内に細胞間結合が生じ、結合比は段階的に増大して約50分で完成することがわかった。

ショウジョウバエの唾液腺細胞間結合は結合比0.8を示すが、これはトリプシン処理やCaイオンの細胞内注入で結合を消失させることができる。また各種動物の肝細胞どうしは極めて低抵抗で結合されており、例えばラット肝細胞は結合比0.9を示す。ところが肝ガン細胞は結合比0.02以下であり、通常の細胞とは全く異質の結合状態である。

このように各種の生体細胞は信号伝達および物質交換のための固有の連結状態があり、これが細胞内外のCaイオン濃度や様々なmediatorによって、刻々と動的な変化をしながら生理機能を発現していると考えられる。

パラニューロンについて

小林 繁 新潟大学・医

従来、神経系と内分泌系とは生体機能調節系の両極をなすとみなされてきた。しかしながら近年の、細胞学の分野における研究資料の蓄積の結果、神経細胞（ニューロンと同義に用いる）とペプチドホルモン産生細胞との間には明瞭な境界が無く、両者は、電子顕微鏡的に明らかにされる微細構造の上からも、組織化学や免疫組織化学的に解明される代謝の面でも連続的であることが確定した。そこで、藤田と小林(1)は1975年に、普通にはニューロンと扱われないが、構造的にも代謝の面でも、また発生学的にもニューロンに似た一群の細胞をパラニューロンと呼んだ。下垂体前葉、松果体、上皮小体、副腎髄質、膵島、消化管の内分泌細胞はパラニューロンである。

- (a) パラニューロンは、分泌顆粒またはシナプス小胞（両者のこともある）を持つ。
- (b) パラニューロンは、神経伝達物質と同じ化学物質を含む。たとえば、アセチルコリン、カテコールアミン、セロトニン、GABA、ATP などが、神経性ペプチドと同時に存在する。
- (c) パラニューロンは、外からの刺激に反応して(b)の物質を放出する受容分泌細胞 *recepto-secretory cell* である。
- (d) 神経外胚葉に由来する可能性が考えられる。

パラニューロンに似た考えに英国の A. G. E. Pearse 教授によって提出された APUD (Amine-Precursor-Uptake-and Decarboxylation) 説がある(2)これは APUD の性質を持った内分泌細胞をひとまとめにして APUD 系としたものだが、神経終末はいったん放出した伝達物質を再吸収して再び利用する性質を持っている訳で、同様の吸収機構はアミン以外の物質にも存在するはずである。Pearse の APUD 説は、ニューロンとパラニューロンの連続性のうち、再吸収機構のアミンに関する部分のみを取り出して組み立てられたと評価する。

- (1) 医学のあゆみ 94, 1975
- (2) Arch. histol. jap. Suppl. "Paraneurons" 40, 1977

脳幹および大脳基底核における高次神経機構について

塚原 伸晃 生理学研究所

脳における感覚と運動の連関機構を研究するために、皮質と皮質下核の相互作用を理解することが重要であると考えられるので、大脳基底核および小脳核、脳幹部、神経機構につき研究の現状、将来の戦略展望などを討議することを目的として3日間、集中的に討議を行い、次の結果をえた。

大脳基底核の感覚と運動連関機構を研究するには、まず神経回路を確立することが必須であるが、そのためには、電気生理学的手法、電顕などの組織学的方法が必要であるが、特に細胞内HRP注入など、電気生理学的方法と結合できる組織学的方法を用いることが、必要であり、かつ有効であることが明確になった。また、将来は画像処理技術により形態的所見を定量化することが必要であろうと思われる。

また、小脳核、脳幹部と感覚—運動直関の関係を研究するためには、神経回路がかなり明確になってきているので、次のステップとして、特定のシステムをモデルとして集中的に研究し、感覚運動を切りはなさないシステムのアプローチが有効であることが認識された。また、神経回路レベルの動的様態を把握することも重要であると考えられた。

大脳半球の優位性について

柳沢 慧二 鶴見大・歯

大脳における音声・言語情報の把握の経路とそれぞれのレベルの情報の収納部位、とくに大脳左半球、右半球の判別と相互支配の関係は近年、新たな注目をあびつつある。この最新の問題点について、知見を交換して認識を深めると共に、これからの研究方向を開拓するために、次の諸氏の参加を得て研究会を開催した。

米国ウィスコンシン大学教授（医学部）	C.N.Woolsey
東京医科歯科大学教授（難治研）	村田 計一
東京医科歯科大学講師（難治研）	角田 忠信
岩手医科大学教授（医学部）	川村 光毅
東京医科歯科大学助教授（医用器材研）	橋本 享
東京医科歯科大学（医学部）	寺島 真一
独協医科大学教授	斉藤 望
独協医科大学助教授	野本 昌弘
独協医科大学助手	谷口 郁雄
鶴見大学教授（歯学部）	柳沢 慧二
鶴見大学助教授（歯学部）	田中 康夫

光受容の生理学的研究

金子 章道 生理学研究所

研究会参加者はそれぞれ下記の研究発表を行った。

1. 大塚輝彌 カメ網膜視細胞の有色油滴の機能。
2. 霜田幸雄 細胞内二重染色法による電極刺入部位の同定。
3. 橋本葉子 視細胞モザイク構造と網膜ニューロンの空間的、分光的応答様式の関係。
4. 金子章道 網膜内信号伝達路の生理学的、形態学的分析。

大部分の網膜細胞は活動電位を発生せず、緩電位のみによる応答を示すので、専ら電気緊張的細胞内信号伝達を行なう。霜田の研究は電気緊張的信号伝達における細胞の特性を明らかにする上で有効な手段を提供するものであり、発展が期待される。大塚はカメ網膜の4種類の有色油滴が特定の視細胞（杆体及び3種類の single cone 及び1種類の double cone と、の組合せを持つ可能性を示唆した。この点が確立されれば光学顕微鏡による形態観察のみによって特定の視細胞の分光感度を知ることが可能となり、色覚情報処理機構の解明に

役立つことと思われるが、そのためには微小分光測光など有効な装置が必要である。橋本は整然とした視細胞モザイクを持つウグイの網膜細胞分光応答特性がコイやキンギョと大きな相違を持つことを示したが、その原因が視細胞の分光特性の差によるものなのか、神経回路の差によるものなのか明らかになっていない。金子はON型細胞とOFF型細胞の形態学的相違を発見し、これが視細胞—双極細胞間のシナプスにおいて形成されていることを示唆した。このシナプス機構の解明が待たれる。

本研究会においては視細胞とそれに連がる網膜細胞の応答特性に関する最新の研究成果の交換が行なわれて相互理解が深まったのみならず、今後の問題点、およびそれに対する研究方法の検討が行なわれ、将来の発展に役立つ討論がなされた。

生体膜の微細構造

山田 英智 石川 春律 東大・医

種々の分子が集まって、細胞顆粒、細胞、組織や器官そして個体を形成し同時に、生理機能を発現する。しかし生理機能の発現する分子集合は生体膜の構成にあるといって過言ではない。この意味で生体膜の微細構造の研究は、生理機能の解明に大きな役割を持つ。

脊椎動物の光受容組織である網膜視細胞の光受容分子はすべていわゆる“膜”の中に組み込まれて存在している。この様な膜の微細構造と膜内でのこれらの分子の存在様式、すなわち形、大きさ、配列、分布密度などを電子顕微鏡を用いて形態学的に解析した。

光受容細胞である杆状体細胞の外節には閉鎖した扁平状の杆状体囊があり、この膜に光受容分子であるロドプシンが組み込まれて局在している。凍結切断レプリカ法で杆状体膜を観察すると、そのB面には殆んど粒子が認められず、P面には多数の膜内粒子が認められる。粒子の大きさ、形、膜面からの突出度は一様でなく、配列は不規則である。外節の膜に含まれているタンパク質の大部分はロドプシンであり、膜にタンパク質が組み込まれれば粒子が見られるこ

とから、外節膜に認められる膜内粒子の大部分が、ロドプシン分子に依るものであることが推測される。しかし1個の粒子がロドプシンの1分子に相応するものかどうかは、今後に残された問題点である。

一方、ロドプシン分子から成るバクテリア (*Halobacterium*) の紫膜を形態学的に分析し、光感受性膜の微細構造についても検討した。この好塩菌紫膜の光受容蛋白 (バクテリオロドプシン) は光感覚に関係なくプロトンポンプとして働き、ATP合成に寄与していることがすでに明らかにされている。通常、この蛋白は膜中で三量体として存在してヘキサゴナルな配列を示すのが紫膜増殖中の好塩菌では単量体のバクテリオロドベシンの配列はオルソゴナルになっていた。

このように近年、光感受性膜の微細構造 — 光受容分子の膜中における存在様式が明らかになってきている。

医学生物学と超高压電顕

亘 弘 生理学研究所

超高压電子顕微鏡は、従来、金属を始めとする結晶性物質を対象とする研究分野で極めてよく用いられてきた。もちろん医学生物学分野においても通常の100KV電顕に比較しての高い透過能、少い試料損傷および高分解能化への期待があり超高压電顕の応用の可能性は大きいものがある。

研究会においては、装置サイドおよび結晶性物質を材料とするサイドから、走査型透過電顕、電顕内その場実験とビデオ技術、Environmental cell法、支持膜の開発照射損傷等についての報告があり、超高压電顕の現状に対する医学生物学分野の関係者の理解を深めた。次いで医学生物学サイドより細胞内小器官の立体観察を行うにあたっての超高压電顕の意義、細胞内の特定の部分の選択染色法、無包埋材料の観察等についての報告が行なわれ、電子光学、金属学および結晶学関係者をまじえて、超高压電顕の医学生物学分野への応用について活発な議論が行なわれた。

細胞膜の興奮

山岸 俊一 生理学研究所

細胞膜の興奮現象は神経細胞膜および筋細胞膜のもつ基本的性質であるが、その興奮機能に関する最新の知見について研究会に参加した8氏より精細な報告があった。

膜のチャンネルと膜の物理化学的性質について、竹中、吉岡、北里、岸本、高橋の各氏から、筋小胞体膜について遠藤氏、神経筋接合形成について杉山氏、卵細胞膜受精時の膜変化について宮崎氏より報告があり、報告にもとずく長時間の相互討論により、膜チャンネル解明への総合的なアプローチの全体像を浮び上がらせることができた。

- | | |
|---------------------------|-------|
| 1) Kチャンネルとヒスチジン残基 | 竹中 敏文 |
| 2) Naチャンネルの光化学的標識法 | 吉岡 亨 |
| 3) ザリガニ巨大神経の Tail current | 北里 宏 |
| 4) gNa, gK, Cmと膜起電力 | 岸本卯一郎 |
| 5) 筋小胞体のCa遊離 | 遠藤 実 |
| 6) 卵細胞膜の電気的性質の解析 | 宮崎 俊一 |
| 7) 卵細胞膜の興奮とその意義 | 高橋国太郎 |
| 8) 神経・筋相互作用の in vitro モデル | 杉山 博之 |
| 9) 総 合 討 論 | |

村田 計一 東京医科歯科大学・難治疾患研

本研究会に於ては聴機能に関し内耳の機械的振動系における情報の符号化に初まり、各種音響・音声聴取の機能について工学的・生理学ならびに心理学的な立場より論ぜられ、実り多い成果を挙げることができた。

Hind は蝸牛基底膜振動時の電気抵抗変化を蝸牛内に刺入した微小電極を介し、新しく開発した方法により計測して新たな知見を発表した。その結果は従来信ぜられていた Davis の抵抗変化の蝸牛モデルとは一致せず、非線形性電位発生の要素を示唆し、蝸牛活動の理解に大きな影響を与えた。磯らは非線形性を導入したアナログモデルを用い、結合音・二音抑圧現象などをシミュレートし、生理学的・心理学的現象を基底膜の非線形性振動により解決し得ることを示した。又大野は、基底膜の変位と一次ニューロン発火との関係を表現する確率的モデルにより伝達物質放出の様式の仮定のもとにニューロン発火の時系列をシミュレートし、その統計的性格が一次ニューロン発火性質に良く一致することを示し、符号化機構解明に大きな手掛りを与えた。大山のカエル聴器末梢での末梢抑制に関する新しい観察事実と共に評価すべき結果と考える。村田及び丸山は各々音声及び疑似音声刺激を用い末梢での符号化或いは皮質聴領での応答性を分析し、音声認識の生理学的機構解明に寄与する所大である。又亀田の子音母音の両耳交替刺激による融合の心理学的研究は左右両半球の活動の非対称性を示し、最近各方面で興味を持たれ、本会でも討議の対象となった角田の半球優位説と共に興味深い。大串の純音に対する一次ニューロンの同期性活動の時間間隔と心理的ピッチとの関係付けの新しい考えは、神経系での時間情報の伝達方式に新しい示唆を投げかけた。

以上の様な各分野からの事実意見の交換により、研究者間の相互の連携により意義ある研究会を持つことができた。

日本人の脳	大修館書店	1978
J. Physiol. Soc. Japan	39, 351	1977
歯基礎誌	19, 401	1977
子信学誌	58D(6)352-359	1975
音響学会聴覚研資	H-53-7	1978

睡眠促進物質研究会

井上 昌次郎 東京医科歯科大学

日本において現在睡眠物質の研究を強力におし進めている研究グループによる最近の成果の報告会が行われた。睡眠のメカニズムについては諸説紛々として帰する所を知らないといっても過言でない。しかし Jouvet を中心とする研究者グループはカテコラミンとアセチルコリンを伝達物質とするニューロンの回路網によって睡眠のメカニズムを著しく解明したといわれている。とくに locus coeruleus や raphe nucleus による睡眠のコントロールに関する学説はこれまでの睡眠研究の最も輝かしい側面を示してきた。

一方、睡眠は体液性によってコントロールされているとの仮説から研究を進めているグループが世界に三つある。最も早くから研究を開始し、見るべき成果を与えているのはスイスの Monnier 博士のグループであろう。彼はすでに睡眠誘発物質として DSTP なるペプチドを精製することに成功し、その協同研究者はその化学合成に成功している。またハーバード大学の Pappenheimer 教授グループも類似の研究を展開し、睡眠物質を精製しつつあると伝えられている。

日本においては生理学研究所グループ、医科歯科大学グループおよび東京都老人研グループによって睡眠促進物質が精製されつつある。

この研究会においては、これら三グループによる最近の研究成果の報告が行われ、将来の戦術について討論された。

大脳皮質における聴覚情報処理

柳沢 慧二 鶴見大学・歯

菅はコウモリを用いて10数年間聴覚情報処理の研究を行ってきたが、これまでの成果を概説しながら、最近の研究成果であるコウモリの大脳皮質における

聴覚情報の表示について詳述した。特に大脳皮質聴覚情報処理を詳細に研究したのはヒゲコウモリである。この種のコウモリの大脳皮質聴覚野の80%は61~63 KHzの音によって運ばれる情報を処理するために使われている。これは、ヒゲコウモリがこの範囲の音を発生しながらこども定位を行っていることによる。この働きをする皮質をDS-CF処理野と名づけたが、ここでは相対速度を表示するための周波数軸が放射状にあり、また標的の立体角を表示するための振巾軸が周波数軸に直交している。更により複雑な機能を営む複合音処理野についても精密な観察を行い、多くの事実が判明した。こども定位という特殊な機能を持つために特に聴覚系の発達したコウモリを用いたこの成果は、今後の聴覚系の比較生理学的研究を進める上で、大きな手がかりを与えるものである。菅はこれらの事実から大脳皮質におけるパターン認識の機能構成の仮説としてdetector説の妥当性について論じた。多くの参加者から熱心な討論が行なわれたが、この問題に関しては更に橋本がどのようなパラメータを用いれば音声認識機構の研究が可能かを論じた。菅の結果はきわめて明快なものであったが、一たび高等動物になるとこの間の事情は一変してしまうことを野本がネコの実験について報告した。このような高等動物の脳情報の多様性についても橋本の考察は今後の研究の方向づけとなるものである。亀田は心理学的な手法による情報処理機構解明への試みについて述べた。またデオキシゲルコース法を用いた谷口、斎藤の研究、同じく村田の研究も新しい研究方法による脳機能の解明として注目される。十分な時間をわけて発表及び討論を行うことが出来たことも本研究会の成果の一つといえる。

生体膜における受容器とイオンチャネルの構造と機能

大村 裕 九州大学・医

最初に行われた興奮性膜のNa, K, Caコンダクタンスに関するセッションでは、ホヤ卵(高橋), ヒトデ卵(Hagiwara), 軟体動物ニューロン(Klæe), 神経筋(Ritchie), イカ巨大神経線維(渡辺, 山岸)についてそ

れぞれ最新の知見が報告され、活発な討論が行われた。第二のチャンネル機構の解析のセッションでは、bilayer channel (Mueller), multi-ionic single-file channel (Hille), キナクリンによる終板チャンネルのブロック機構 (Adams), カタツムリニューロンの Ca チャンネル (Brown, 赤池), イカ巨大神経線維の周期的微小反応 (Tasaki) についての報告があり、出席者の間で熱心な意見の交換が行われた。第三のレセプターおよびチャンネルの化学的構造のセッションでは電気的非興奮性膜 (化学膜) のチャンネル (Edwards), 軟体動物ニューロンのチャンネルおよびレセプター (大村, 佐藤), 粘菌やテトラヒラメの化学受容 (小畠) に関する口演が行われ、特にアプローチの異なる小畠の研究は出席者の興味をひいた。第四の膜内層の化学構造のセッションではイカ巨大神経線維 (竹中, 吉岡), カタツムリニューロン (Kostyuk) についてそれぞれ最近の業績の紹介に続いて活気に満ちた討論が交された。最後の受容膜のイオン機構のセッションではレセプターとイオノフォアとの組合せの互換性 (Carpenter), ザリガニ抑制シナプスの IPSC (竹内), グラミサイディンに代表されるチャンネルの特性 (Eisenman), 終板 (前野), イカ巨大シナプス (Llinás), ザリガニ筋 (Zachar) について報告と討論が行われ、本研究会は盛会のうちに終了した。限定されたトピックスに関し三日間にわたって集中的な討議を重ねる事は各自で行っていた研究の問題点を整理し、解決を容易にただけでなく、研究者間の相互理解を深める上でも非常に有意義であった。この研究会の終りに当たって出席者の全員がこのような会合を今後も積み重ねる必要性を痛感し、そう努力することを誓った。

Brain Research Bulletin Jan.-Feb. 1979

高次神経系の特異性と可塑性

塚原 伸晃 生理学研究所

神経回路網の構成が生得的なものか、生後の学習によって形成されるものであるかは、古くから議論の対象になってきたが、この問題の実験的研究は、Hubel と Wiesel による大脳視覚領ニューロンの反応パターンが、生後種々

の視覚環境においた動物でどのようなになるかという研究によってスタートした。そこで、本研究会では、Wiesel教授の発表を中心に討議を行った。Wieselは、2-Deoxyglucose法や、電気生理学的方法によって、生後、閉眼を一側の目に行った動物のocular dominance columnを調べ、閉眼した側の目から信号を受けるcolumnが正常のものに比して縮少し、閉眼しない側から信号を受けるcolumnは正常のものより、拡大していることを見事に示した。また、これに対する解釈として、columnが縮少した例では、樹状突起の領域の縮少が、拡大した側では、樹状突起領域の拡大が、細胞レベルでおこっているのではないかと示唆した。また、ocular dominance columnと、ほぼ直角に、orientation columnが存在することを示すデータをも示した。

これらの成績は、高次神経系の特異性と可塑性の問題に重要な知見を加えたものであり、活発な質問や討論が行われた。

培養細胞の細胞間相互作用

菅野 義信 広島大学・歯

本研究会は西独ストツガルト大学フーザー教授を迎えて、日本側からは主として培養細胞を用いて生化学的に又電気生理学的に細胞間同士の相互作用を研究している東大の寺山教授に参加を要請し開催した。

フーザー教授は現職の前にはチュービンゲンのマックスプランクの基礎生物学研究所で培養細胞の電気生理学的研究に彗星の如く出現した奇才である。先ず研究者発表の第1はフーザー教授で、BT5C2という彼の確立した哺乳類の培養細胞の細胞相互作用を紹介した。すなわちこの細胞は条件の相違により電気的細胞間連絡を形成するものとしめないものとある。これは細胞膜の流動性の変化によって、ギャップ結合形成に関与する蛋白質の細胞膜中の横すべり移動が影響をうける。細胞膜の流動性をNaKATP酵素の阻止剤であるウワバインにより低下させるとギャップ結合形成の開始時期が遅れてくる。細胞間連絡は細胞膜の環境による変化でも影響されるので必ずしも細胞の遺伝的素質によら

ない部分もある。そしてこの培養細胞は上記研究課題の絶好のモデルたりうることを示した。

寺山宏教授は肝癌細胞を用いてプロスタグランジン、エピネフリン、コーチソンの細胞膜レセプター機構を調べた。その結果エピネフリンに対しては正常、癌細胞ともにレセプターを有するが、プロスタグランジンに対しては癌細胞は正常細胞と異ってレセプターを欠如する。コーチゾンに対しては両者質的にレセプターに相違がある。以上より肝癌細胞は細胞性質表現系が少なくともホルモンレセプターに関する限り細胞膜上に出現していることを証明した。

猶研究代表者グループの中からは宗岡洋二郎広歯学部助教授が大食細胞の細胞相互間作用につき講演した。猶本研究の継続のため本研究代表者はフォーザー教授との国際共同研究に両者合意し、現在日本学術振興会に申請中である。

Biochimica et Biophysica Acta	372, 1974
Cytobiologie Europeale of Cell Biology	17, 1978
Nature	274, 1978
Federation Proceeding	37, 1978
Methods in Cell Biology	8巻 1974

INSULIN RELEASE IN EXPERIMENTAL HYPERTHYROIDISM

R.Rodriguez Univ.Buenos Aires

ロドリゲス教授は日本学術振興会1978年度交換教授としてアルゼンチンのラプラタ大学より来日された。生理学研究所において、上記の演題で講演された。生体の血糖レベルはインシュリンによって刺激されており、膵におけるインシュリンの分泌はさらに甲状腺刺激ホルモン、成長ホルモン、グルココルチコイド等によって調節をうけている。甲状腺機能亢進ではATP-AMP代謝量を介してインシュリン分泌抑制がおこること、グルコース刺激によるインシュリン放出が2つのピークを持つパターンの解析など、諸知見についての発表があった。

BRAIN AND PERCEPTION

D. M. Mac Kay, Keele University

心理物理学などで我々の知覚体験を分析することは脳内機構を解明して行く上で大きな手掛りを与えてくれる。知覚体験の分析なしに神経機構の研究は不可能であるといっても言い過ぎではないであろう。例えば円運動をしている random dotsを見つめていた被験者にとってその運動が停止すると、あたかもそれらが逆方向に回転するように見える。このような残像現象からヒントを得て Barlow と Hill はウサギの網膜にこのような性質を有する細胞を発見した。また放送終了後のテレビ受像機のスクリーン上に見られるノイズはランダムであるが、この上にボール紙の窓を置いてそれを動かすとノイズの点が追従して動くように見える。この事実は視覚神経系においては各要素が独立したチャンネルを持っているのではなく、それらが互いに連絡してネットワークを作り干渉しあっていることを示唆している。

しかしながらこれらの知覚体験はそれ自体で神経機構を予言出来るものではない。例えば有名なマッカロッチ効果（補色残像）は17野の単純型細胞の一群が疲労した結果ではないかと想像されていたが、詳細に分析した結果それは疲労というよりも視覚神経系の可塑性によるものではないかと考えられる。

これらの例にも見られるように神経機構の研究は知覚体験を脳の機構に翻訳しようとしてなされるものではないし、またそうあるべきでもない。脳研究者は種々な知覚体験に対応する脳機構を発見することを目差しているのである。

神経伝達物質のリセプター

杉山 博之 生理学研究所

本研究会では、小規模で非公式・親密な研究集会であることをねらいの一つとして、神経伝達物質のリセプターのうち、特に数種の伝達物質に範囲を限定

して、以下のような内容で所外から講師を招いて研究会を行った。

1) ムスカリン性アセチルコリン受容体：

吉田 博（大阪大学医学部）・出口武夫（東京都立神経研）

2) オピエート受容体：

野崎正勝（岐阜大医学部）・高木博司（京都大学薬学部）

3) GABA 受容体：

栗山欣弥（京都府立医科大学）

4) カテコールアミン受容体：

芳賀達也（浜松医科大学）・吉岡正則（東京大学薬学部）

オブザーバー・前野弘夫（山之内製薬中央研究所）

以上の講師の方々により、1)ムスカリン性アセチルコリン受容体部位の同定とその代謝による制御の仕方、グアニレートサイクレスの活性化との関係、2)オピエート受容体の同定と、結合様式の諸性質および痛覚過程への受容体の関与、3)GABA 受容体の同定法と結合反応の検討、4) α -受容体の同定法の検討、カテコールアミン・カテコールアミン受容体、及びサイクリックAMPの特異的同定、定量法の開発、ドーパミン受容体とアデニレートサイクレスの可溶化分離と再構成、等の問題について最新の知見、成果の発表・討論が行われた。

機械受容と化学受容機構の接点

伊藤 文雄 名古屋大学・医

機械受容の変換機構に化学的要因が介在するという仮説がある。たとえば魚類聴側線器のように水流や振動に応ずると共に、化学物質にも敏感に応ずることが判っている。また哺乳動物の聴器や筋紡錘ではクブラとか内囊にムコ多糖類が存在し、それが丁度ロッシェル塩のように圧電効果をもっていて、力学的変化をインパルスに変換しているという仮説もある。一方、化学受容器もその変換過程で受容膜ないし受容細胞の変形を必要とする者もある。そこで、この研究会において、機械受容と化学受容機構の接点を討議し、相互に情

報を交換することによって、研究のより一層の進展をはかった。

佐藤俊英は味細胞の受容器電位の面から、小野田法彦、高木貞敬は嗅球の応答について、更に森田弘道はハエの水・塩・糖受容器の分子構造を機能から推測する報告があった。古河太郎は聴受容器から第一感覚ニューロンへのシナプス伝達と順応との関係を、久田光彦はザリガニ機械感覚毛から受容細胞への機械的増幅装置について興味ある結果が報告された。また上原康生は鳥類筋紡錘内に錘外筋線維の一部や、結合織線維が混入することを発見し、その機能的意味を推定している。浜清による聴側線系感覚細胞の微細構造についての報告は正に本研究会の目的と、将来の指針を提示したものといえる。伊藤文雄は筋紡錘におけるカルシウム・スパイクの発生が受容機構に重要な関係をもっていることを報告した。

MOVEMENT CONTROL, A CENTURY OF STUDY

Prof. T.M. Brookhart, Univ. Oregon

生体膜の機能要素の生物々理学的性質

星 猛 東京大学・医

本研究会では生体膜の機能要素であるイオンチャンネル、キャリア、レセプターやそれに影響すると考えられる表面電位、膜電位等の諸因子に関する生物物理学的な最近の知見と国内の専門的研究者9名によって夫々の研究的立場から提示してもらい、互に情報交換とすると共に、十分に時間をかけて討議するのと目的としたものである。研究会の正規のメンバーの所属氏名、発表演題、プログラム、並びに各メンバーの発表内容要旨は別紙添付資料の通りである。当日実際に参加した人数は上記メンバーおよび同伴者と含めて16名であった。

尚 9 名の講演の外に、当日参加した神野耕太郎（東京医歯大、生理）が感光色素を用いたイカ巨大神経の膜電位の光学的測定について、岡田泰伸（京大、医、生理）が L 細胞に見られる膜電位振動現象と Ca 電流について夫々追加発表を行った。これらを含めて夜遅くまで長時間に亘り、熱心な質疑討論がなされた。

今回の研究会で扱われた生体膜は、分泌腺細胞膜（今井）、小腸刷子縁膜（大沢）、筋小胞体膜（葛西）、興奮性膜（岸本、品川、神野、山岸）、ミトコンドリア膜（北里）、卵細胞膜（宮崎）、腎尿細管細胞膜（星）、線維芽細胞膜（岡山）と多種類に亘ったが、上記機能要素、膜の基本的性質に関してはすべての膜に共通するところが多く、殊に近年の生物物理学的研究の進展に伴い、互に共通する未解決の問題が存在すると共に、ある膜系で得られた新しい知見が他の膜系にも適用しうる可能性のあることが種々気付かれた。その意味においても互の情報交換の意義の大きいことが痛感されたが、今回の研究会はその点においても極めて有意義であったし、また成功であったと考える。

MECHANISM OF CHEMORECEPTOR FUNCTION IN THE CAROTID BODY

Prof. C. Eyzaguirre, Univ. Utah

自律神経中枢機構の研究会

佐藤 昭夫 東京都老人総合研究所

昭和54年2月9日（金）午後2時より10日（土）11時迄、生理学研究所において、8名の参加者が各自の専門とする分野の問題点について話題を提供し、全員で活発に討論した。討論の中心は「自律神経中枢機構」に関するものであり、先ずこの分野の生理学的研究の現状を把握し、自律神経中枢機構の今後の研究方針を検討した。第一日目の会は夕食をはさんで夜10時過ぎまで行われた

が、この会合は我が国における自律神経研究の将来の方向にとって大変有効であったと信ずる。

8名の提供した話題は次のようである。

生理研における一般的及び自律神経系の研究について	内菌 耕二
生理研における今後の研究についての抱負	入沢 宏
体温調節と循環	入来 正躬
延髄一脊髓、循環調節神経回路	三浦 光彦
循環計測による自律神経研究	入内島十郎
無麻酔・自由行動下の自律神経活動の計測技術の開発とその応用に関する問題点	二宮 石雄
神経性血糖調節機構	新島 旭
体性一自律神経反射について	佐藤 昭夫

会の終りに当たり、54年度にも生理学研究所で自律神経中枢機構に関する同様の研究会の開催の必要性が全員一致のもとに確認され、佐藤昭夫が引き続き代表者として申請することになった。

今後生理学研究所を中心にこの分野の生理学者、解剖学者、薬理学者などを含めて、自律機能の神経性およびホルモン性調節機構の本態の研究の発表・討論が進められて行くことが望ましい。

生理学における数学的方法

伊藤 嘉房 名古屋大学・医

このようなシンポジウムが試みられたのは日本の生理学においては始めてであったと思われる。従来、方程式に表すことはできるが複雑な非線形性のためとても解くことはできなかった複雑な生物現象が、コンピューターのハード・ソフト両面の進歩により数値解析可能となり、このことは生物学のある分野、遺伝学とか生態学における数学的方法の成功に反映している。生理学においても数学的方法をいろいろな角度から検討すべき時期に来ているのではないかと

いうことでこのシンポジウムが計画された。従来の生理学の枠の中でそれを聞くのは困難であったかも知れないが、幸い新しい研究態勢をめざす国立生理学研究所が発足し、このような境界領域のシンポジウムの開催が認められた。

以下の口演とディスカッションが行なわれた。

1. 序にかえて(名大・理・飛田武幸)。数学が記述の手段として以上の深い機能をもつこと、生理学者が期待してよいと思われる数学の最近の動きの紹介、数学的方法はそれによる予測ができなければならないこと、などについて話しがあった。
2. WienerのNon-linear Random Theoryの最近の生理学への応用(阪大・基礎工・佐藤俊輔)。Marmarelis-Nakaに始まるWienerの理論の生理学への応用例の紹介、問題点・線形理論との関係などについて話しがあった。見かけ上の非線形性について我々は十分に注意深くなければならないとの甘利のディスカッションがあった。
3. 空間構造をもつゆらぎと population dynamics(名工大・教養・清水昭信)。ゆらぎをもつ生物現象を取り扱うのに確率微分方程式が有効であることが示された。
4. 数理生物学におけるカオス(京大・理・山口昌哉)。従来、生物学において離散的な量が連続量で近似されてとり扱われてきたことは多いし、逆に変数が連続量である微分方程式は数値解析の手段として離散化されるのが普通であった。しかし連続量を離散化したとたん解の様相は全く違ってカオスを生ずることがしばしばある。しかもこのカオスが離散的生物量の挙動を本質的に表していることもあるのではないか。
5. 両性集団の生態学における数学的方法(京大・理・寺本英)。従来、生態学は生物集団を単性の集団として扱ってきたが両性とするとならしい問題も生ずるし以外な結果が得られることもある。単性集団の場合には多くの場合現象は安定的であるが両性集団とするとちょっとしたパラメーターの変化に対してdrasticな結果を生ずることがある。
6. 心筋活動電位のシミュレーション(山口大・医・伴隆之)。心筋の活動電位をHodgkin-Huxley流に解析し(パラメーターはずっと多いが)、抗不整脈剤の薬理作用をパラメーターの変化で説明。薬物と Na^+ チャネルの結合のKineticsが実験事実をよく説明した。
7. Nernst-Plank-Poisson 方程式の解法(京大・医・品川嘉也)。各イオンが膜を受動的に透過する際のFlux, 膜内濃度分布, 膜電位等は

Nernst-Plank-Poisson 方程式を解くことによって得られる筈であるが方程式が非線形であるため種々の近似が行われてきた。厳密な解は級数解として得られる。従来の解は級数解をなんらかの意味で第1項または第1次項で打ち切った事に相当し、そのため種々の不合理を生じていた。

8. Spreading depressionのモデルの紹介(名大・環研・東田陽博)。

Spreading depressionの生理学的意義は? ということになると今一つははっきりしないが、その伝搬はregenerativeな過程とrefractoryによって保証されておりインパルスの伝導と共通する。多くの人の興味をひいて種々のモデルが提称されており、現象論的なものからSynapseの機能まで組み入れた実体的なものまである。

9. Lateral inhibitionのモデルについて(名大・医・伊藤嘉房)。

Lateral inhibitionのモデルの通常の取り扱い方はまずそのパターンを与えそこから生ずる現象・考えられるLIの機能・LIの出力を表す方程式の解の存在の証明などであった。逆にLIについてパターンには何の仮定を置かず生理学的な機能のみを想定し、それによって必然的に生ずるパターンが実はLI型でなければならないことを限定された条件下で示した。

10. 学習についてのRandom Walk Model(阪府大・工・石原忠重)。

R.W.Hallの学習モデルの解説。競合的可塑性のRandom Walk Modelというのがその本質である。この種のモデルはシミュレーションによって扱われてきたが、実は初等数学を使って厳密に取り扱えることを強調したい。

11. 神経インパルス時系列およびDRL学習過程におけるマルコフ性(東北大・脳研・中浜 博)。

インパルス時系列を扱うためこの方法を始めた。情報理論を応用し、Dependencyという量を導入することにより、インパルス列をtonicなものとphasicなものに分類することができる。ある種の学習過程の解析にもこの方法は応用できる。

12. 多細胞系の発生と細胞系統樹(京大・理・西尾英之助)。

①各細胞の分裂時間は卵細胞からその細胞に到る先祖の列の関数としその関数をきめてやれば、ある時点における一個体に属する細胞の次数分布は一意的に定まり、適当な条件下でそれを求めることができる。②神経組織のように相互にNet Workが形成されて行く細胞集団を考える。細胞間の結合は"単純"な法則にしたがってRandomに形成されて行くとし、他方それが"単純"なcriteriaを満たす場合にのみ結合は生き残るとする。このような方

法で“複雑”なNetworkを形成することができる。

13. 神経回路網の自己組織（東大・工・甘利俊一）。神経回路網が学習を重ねてトポグラフィ結合ないし特徴抽出細胞を形成する過程を適当なモデルを用い学習方程式を解くことによって調べた。出来あがったトポグラフィ結合の一部をこわしても結合の再構成が行なわれ、全体としてトポグラフィ結合が再現する。同じ入力に対して種々の特徴抽出細胞が種々に反応するのは方程式の解の多安定性による。適当な条件下では神経回路網はCortexのcolumnの様なMicrostructureをもって安定する。以上において抑制性のシナプスが重要な役割を果たす。

このシンポジウムを生理学研究所で開催された他のいくつかのシンポジウムと較べて異なる点はまずは参加者の構成にある。半数近くは生理学者であったが残りも数学者・工学者・物理学者で分ちあった。テーマの性質の必然の結果であった。もちろん参加した生理学者は平均値と較べると随分数学的方法に関心の強い人々であったし、数学者・工学者・物理学者にはその逆がいえ。これは当然とみえるが実はここに問題があり、この種の会合に数学に関心の深い生理学者のみが出席している間は数学的方法が生理学に根をおろしたのはいえない。将来、数学的方法が生理学にとって重要な情報をもたらすようになるとは参加者一同が期待するところであるが、そのような状況になって初めて生理学者に広く理解され必要とされるようになろう。

細胞膜・筋肉などのようにその理解が深まるにつれて物理・化学との関連がますます密接となり、そのため数学的方法が有効になりつつある分野がある。他方、巨大なニューロン集団が個々のelementや回路の併列としてではなく、巨大な集団としてのみ本質的に可能な機能を発揮しているとの理解のためには数学は不可避との考え方もある。通信工学が情報理論という数学を得て始めてその本質的理解が可能となったのと同じとする考え方であろう。

しかしだからといって数学をやっていればそのうちに生理学がわかるというものではない。elementや回路の知識の集積が不可欠であることは論を待たないが、実験生理学と併行して数学的方法の可能性がたえず深られていることも必要と思われる。

以上、ディスカッションをまとめて結論とする。

開口分泌、開口吸収の分子機構 (Exocytosis and Endocytosis)

田代 裕 関西医大

細胞膜を介する輸送現象には、イオンや低分子物質などの膜を貫通しての膜透過のほか、細胞膜自身の形態学的変化を伴う輸送現象として開口分泌 (exocytosis) と開口吸収 (endocytosis) が存在し、これら開口現象 (cytosis) は細胞の重要な機能の1つとなっている。すなわち開口分泌は単に消化酵素、蛋白ホルモンその他の高分子物質の分泌のみならず、ペプチドやトランスミッターなどの中、小分子の分泌、放出にも関与する。他方開口吸収は蛋白その他の高分子物質の非特異的とりこみのみならず、抗体、ホルモン、トランスミッターなどのように広義の受容体との結合を伴う特異的なとりこみにも関与し、生体の種々の調節機構に重要な役割をはたしている。開口現象の研究は初期には形態学的研究がその主流を占め、現象そのものの形態学的過程の概要はほぼ明らかにされたが、現在では開口現象のイオン調節機構、膜融合の分子機序やそれに伴う生体膜成分の動きなど分子レベルでの研究が中心的課題となりつつある。

研究会ではA・形態学的アプローチを主とする黒住、山元、金関、小林、山科5題、B・生化学ないし生物物理学的アプローチを主とする浅野、田代、西川らの8題、C・イオンの動きその他の生理学的アプローチを主とする菅野ら、西山、今井、佐々木、岡田ら、菅野、友野らの8題(小川の追加討論を含め)が報告され、活発な討論があった。

開口現象の研究は欧米とくに米国ではこれを細胞生物学的研究課題として統一的に研究しようとする傾向が強く出て来ている。現在我国では医学教育における講座制を反映してか、このような学際的研究を円滑に行うことは大変困難な事情にあるが、各演者の紹介された研究内容には、たとえば電気生理的研究と電顕的研究を併用するなど学際的研究その努力のあとが覗かれた。

SPECIFICITY VERSUS "RANDOMNESS" IN NEURAL CONNECTIVITY

Prof. J. Szentagothai, Hungarian Acad. Sci.

神経の膜系と脳活性物質

内菌 耕二 生理学研究所

本研究会の狙いは日本における膜系の若い研究者の最近の研究成果の発表と、脳内活性物質についてのトピックスの紹介であった。第一のテーマについては次の各研究者によって報告が行われた。

- | | | |
|------------------------------|--------|----------------|
| 1. ホ乳類のシナプス小胞について | 独協医大 | 小西 克利
横山 勝雄 |
| 2. コリン作動性シナプスの Stoichiometry | 東大医 | 大沢 一爽 |
| 3. シビレエイ電気器官のコリン性シナプス小胞 | 東大医 脳研 | 田代 明子 |
| 4. サソリ毒素の Na-channel への結合 | 東大医 脳研 | 岡本 治正 |
| 5. ソデウムポンプの微細構造に関する研究 | 慶大医 | 出口 修宏 |
| 6. 神経終末の有殻小胞について | 千大医 薬理 | 門田 健 |
| 7. シナプス小胞の生化学的研究 | 名市大医 | 田中 亮 |

上記の各若手研究者は主としてシナプス小胞の生理学的、生化学的側面に関する多彩な研究を発表した。

さらに今回の研究会のもう一つの狙いである脳内活性物質についてはノーベル賞受賞者 Schally 博士の強力な協同研究者の一人であった宮医大の生化学教授 松尾寿之博士によって紹介が行われた。特に同博士の研究室で最近発見

された α -ネオエンドルフィンに就ての報告は極めて注目すべき研究と思われた。

筋収縮の諸問題

遠藤 実 東北大・医学部

筋収縮機構は分子レベルに至るまで、かなりの程度解明されているが、その分子反応が実際に生きた筋肉でどのように力を発生するかは、まだ不明である。本研究会にはこの分野の若手の第一線の研究者が参加した。そして、それぞれの研究者は骨格筋の生理機能の解析(杉, 山田, 遠藤, 吉崎, 亘), 筋フィラメント構造の解析(若林, 前田, 吉野, 藤目), ミオシン・アクチン分子反応と構造の諸問題(井上, 岡本, 大概, 児玉, 高橋)に関する最新の成果を持ち寄ってレポートを行い, それにもとずきながら, 自由な雰囲気の中で十分に時間をかけた突込んだ討論を行うことができた。これは今後の研究展望の上で大変勉強になり, 且つ相互に与え合った研究上の刺激も大きなものがあつたと云えよう。

1. ミオシンの2つの頭部の構造と機能 井上 明男(阪大・理)
2. ミオシン軽鎖の交換を用いた構造変化の検出 岡本 洋(順天堂大・医)
3. ネガティブ染色でみたミオシン分子の構造 高橋 興威(北大・農)
4. ミオシンATPase反応中間過程のエンタルピー変化と筋肉の熱発生 児玉 孝雄(順天堂大・医)
5. 収縮のくり返しによる短縮熱産生の変化 山田 和広(大分医大)
6. 骨格筋中のリン酸化合物のNMRによる研究 吉崎 和男(京府医大)
- 亘 弘(生理研)
7. I 横紋筋直列弾性要素の起源
II 横紋筋収縮時の高時間分解能X線回折 杉 晴夫(帝京大・医)

8. Skinned fiberの収縮における二,三の問題について

北沢 俊雄, 遠藤 実 (東北大・医)

9. トロポニン, トロポミオシンの分子構造とCa制御

大槻 磐男 (九大・医)

10. 筋肉の細いフィラメントの構造

若林 健之 (東大・理)

11. 細いフィラメントの弾性率のカルシウム濃度依存性

吉野 茂雄, 藤目 智 (三菱生命研)

12. カニ横紋筋のX線且折

前田雄一郎 (東北大・医)

磁気共鳴の生理学への応用

亘 弘 生理学研究所

基礎生物学研究所, 生理学研究所の共通施設である分析室に導入予定の超電導磁石核磁気共鳴 (SC-NMR) の生理学研究への応用についての討論を行った。同時に使用容易な機種種の調査も行った。

I 超電導磁石について

NMRの感度は磁場の強い程, 感度が高いが, 使用容易性が失われると応用性は低下する。NMRに使用できて, 使用性のよい磁石の磁場は8.5Tが限度であろうとの結論に達した。また液体ヘリウムや液体窒素の消費速度はそれぞれ5ℓ/day, 20ℓ/dayであるが, 今後その速度は $\frac{1}{10}$ になるものと推定された。

II 生理学研究での応用

現在先理学では ^1H , ^{13}C , ^{23}Na , ^{31}P での利用がある。 ^1H -NMRは自然存在比が99.85%と高く, しかも, 共鳴周波数が大きいために感度が高いが, 生体の中のある成分の検出は H_2D が多くて不可能となる。しかし, 緩和時間の差を利用して細胞内外の水分布およびその動きを知る研究は数多くなされている。腫瘍細胞の T_1 と T_2 を測定し, 正常細胞のそれらより大きい値を示すことを報

告している。これは、腫瘍細胞には結合していない自由な水分子が多いためとされている。また、自身の各部位における T_1 および T_2 を測定し、 T_1 、 T_2 地図を作るという研究がある。これを Zeugmatography という。

これによって腫瘍組織の検出を企図しているのであるが、実用化までにはなお数年を要するものと判断される。

また、pulse NMR を用いて循環血量の測定を行なっているグループがある。たとえば手の部分を静磁場の中に入れて電磁波のパルスを与える。応答 (FID) はその場所で行なうのが普通であるが FID の検出コイルの位置をずらして検出することとし、この距離を FID の大きさから血流速度を検出する。

^{31}P -NMR を用いて、第 1 磷酸と第 24 磷酸イオンの化学交換を利用し、細胞内の pH を測定することができる。最近イギリスの生理学者である Wilkie らが、生きたままの筋肉を用い、磷化合物についての測定を行なったものを報告している。これは 8 T の超電導磁石を用いたもので、感度的に大きく向上した結果、充分な S/N 比のスペクトルが 1 分間以内に得られている。これを利用すると、収縮過程の磷化合物の変化を知ることができるので、この研究は今後急速に飛躍するものと思われる。

参 加 者 山田和広 (大分医科大学), 森野能昌 (熊本大学医学部)
前田信治 (愛媛大学医学部), 吉崎和男 (京都府立医科大学)
荒田洋治 (東京大学理学部), 森島 績 (京都大学工学部), 赤坂一之 (京都大学理学部), 山野俊雄 (大阪大学医学部), 谷口郁雄 (独協医科大学), 旗野昌弘 (東北大学非水溶液研究所), 安河内昂 (日本大学理工学部)
宮沢辰男 (東京大学理学部), 飯塚哲太郎 (慶応義塾大学医学部), 田中邦雄 (旭川医科大学), 下山雄平 (函館工業高等専門学校), 京極好正 (大阪大学蛋白質研究所),
オブバーザー 田崎 明 (筑波大学物理工学系)



生理學研究所研究會抄錄集

大脳半球の優位性について

ネコの大脳皮質第一次聴領の反応

野本 昌弘 独協医科大学

ネコの大脳皮質第一次聴領の単一ニューロンの種々の音刺激に対する応答について調べた。ペントバルビタール軽麻酔または無麻酔で実験を行ったが、大した違いは見られなかった。

先ず第一に、三つの基本的音刺激として、クリックと白色雑音 burst, 純音 burst を用い、それ等に対する応答をそれぞれ観察した。その結果理論的に考えられる 8 種の組合せ中 7 組の組合せに応答する単一ニューロンを見出した。クリック音だけに応答するニューロンは見つからなかった。これが、何を意味するかは不明である。得られたニューロン 107 例中一番多いものは、三種の音、総べてに応答するもので約 86% であった。このニューロンの応答特性は、3 種の基本的刺激全部に含まれている共通因子に応答するのであろうと考えられる。次に多いのは純音のみに応ずるものと、三種の音、総てに応じないもので、それぞれ約 20% であった。以上のような事実は、これらの音に、共通に含まれている周波数成分に対して特徴的に応答を示すと考えられる。

次に複雑な音刺激としては、周波数変調音 (FM) がある。皮質聴ニューロンは普通連続純音には応答しないが、連続音の FM を行なうと応答するようになる。特に周波数が、応答野の境界を往復する時には応答すると考えられる。しかし例えば連続 FM 音に応答するものであっても、FM burst には応答しない。これは音の ON の時に強い抑制がかかり、FM burst に応答しなくなる。FM burst に応答するようにするには、大部分が FM 音の前に連続純音を加えてやると FM 音に応答するようになる。この ON 抑制は大体数百 msec 持続する。逆に ON 抑制の影響のないニューロンや ON-興奮性の FM に感受性の高いニューロンも見られた。また FM 音に対する応答で特徴的なことは、一定の周波数帯域で一様に興奮性を示すものと、種々の周波数帯域で興奮性を示すものが観察された。すなわち、PST ヒストグラム (post-stimulus histogram) で、単峰性のものや多峰性のものが認められた。この多峰性を示すニューロンは、下位聴覚系のニューロンから興奮性及び抑制性の入力収束していること

を示唆している。

更に非常に高次の音刺激因子にしか、応答しないようなニューロンも認められた。これは対比上、前述のニューロンを単純性ニューロンとすれば、複雑性ニューロンと呼べるであろう。例えば、単純な連続FM音では応答せず、変調度が大きくなる時にだけ一過性に応答する。或いは大きくなる時と小さくなる時だけ一過性に応答する。すなわちFM音のFMにだけ応答する。更に或るニューロンでは、くりかえし一定の周期で音刺激burstsが与えられると、音刺激に先行して応答するようになる。いわゆる期待ニューロンと呼ばれるものであろう。更に第2音として連続白色雑音を加えた時のみ、第1の純音に応答するようなニューロンもあった。

以上大脳皮質聴ニューロンで特徴的なことは、或る特定の周波数帯域で或る特定の時間パターンをもった刺激の特徴を抽出することであろう。

RESPONSE PATTERNS OF SINGLE NEURONS IN AUDITORY
CORTEX AI OF CAT

M. Nomoto

Dokkyo University, School of Medicine,
Department of Physiology, Mibu, Tochigi-Ken

Responses of single neurons in the auditory area AI of unanesthetized cats were obtained by means of tungsten microelectrodes.

Three types of sound stimuli namely clicks, white noise bursts and pure tone bursts were applied separately as fundamental stimuli. The neurons studied were classified responding to all three, two, one or none of these stimuli but no neuron was found responding only to clicks. This suggests that the firing of some cortical neurons needs a special sound spectrum.

Frequency modulated (FM) sounds were generally more effective in eliciting responses than the three fundamental sounds. Response patterns to FM sounds grouped the cortical neurons into three categories according to the shape of their PST histograms. First, a sharp monopeak response in the PST's was often observed. The second type of neurons showed the broad monopeak PST's. The last type showed the sharp multipeak PST's. The last response patterns suggest that the neuron the observed receives the several convergent inputs from the low level of neurons which presumably have a narrow tuning curve.

All neurons mentioned above were classified as a simple type but the complex type of neurons was frequently found responding only to sounds with complex temporal and spatial patterns.

POTENTIALS OF THE SUPRA-AND SUB-RETICULAR REGIONS
IN THE ORGAN OF CORTI

Yasuo Tanaka and Keiji Yanagisawa

Department of Physiology,
Tsurumi University School of Dental Medicine,
Yokohama

Sources of potentials encountered during electrode penetrations from the round window to the scala media were investigated in the guinea pig cochlea. Recording sites of potentials were identified by a new marking technique of Alcian Blue. DC potentials recorded in the subreticular space to which the upper side of the reticular membrane faced, were mostly 60-70 mV. The cochlear microphonics of the space were phase-reversed to those in the scala tympani. These facts indicate that the potential of the supra-reticular region is the same as in the scala media. Therefore, it is obvious that the subreticular space communicates with the scala media and so the sensory hairs of hair cells are bathed in the endolymph of high potassium concentration.

Both intracellular and extracellular dc potentials of the sub-reticular region were unstable and tended to move toward positive polarity. The phase of microphonics was similar to that of the scala tympani. Problems that arise in understanding the unstableness of the potentials are still under examination.

ASYMMETRY OF OLFACTION, EMOTION AND AUTONOMIC SYSTEM

Tadanobu Tsunoda

Medical Research Institute, Tokyo Medical
& Dental University, Tokyo

In 1974, Tsunoda found that in the Japanese, human voices except speech, cries of animals and chirps of insects as well as steady-state vowels are dealt in the verbal hemisphere dominance, but that in the Westerner, those are in the non-verbal hemisphere. In the Westerner, the verbal hemisphere deals with verbal sounds in the syllable units containing consonants which are expressed by logos and deals with calculation, while emotional voices expressed by pathos and cries in the natural world are in the non-verbal hemisphere. In the Westerner, the dominant hemisphere deals with logos and the non-dominant hemisphere deals with pathos and nature. On the other hand, in the Japanese, the dominant hemisphere deals with logos, pathos and nature, and the non-dominant hemisphere deals with materials. In short, in both the Japanese and Westerner, logos is localized in the verbal hemisphere. However, there is a difference in the localization of pathos and emotion in the brain between them. The difference in the mode of recognizing sounds in the natural world (that is, the difference in the localization of pathos and emotion) is presumed to be closely related to the difference in the mental structure and culture between the Japanese and the Westerner (the theory of mental structure and vowels). In the present study the author tried to confirm the above hypothesis by emotional

stimulation of human olfaction.

Material and Methods

The subjects consisted of 35 Japanese, 2 white Americans brought up in Japan, and 7 Westerners having European languages as their mother tongue, all of whom indicated the normal type in the dominance test (Tsunoda), and had normal sensation of smell. For all of olfactory stimulation alcohol for disinfection was used, and partly employing perfume, rose fragrance, sycitol, isovalerianic acid and gamma-andecalactone, it was confirmed that there was no difference of effect existed. A naris was closed tightly with an wet cotton to let a subject inhale a whiff of alcohol gently once from another naris avoiding direct contact with the naris. Immediately after loading, dominance of 1 KHz pure tone was examined. Whenever a dominance changed from that before loading, changes with the lapse of time are followed by every 10 minutes. After sufficient time of interval, or even on some other day, the same test is carried with exchanged side of nares having an wet cotton swab in the naris where to stimulation was given before. Such loading test was carried more than 3 times with the same subject on different days.

Results

Results with Japanese: The dominance of 1 KHz pure tone with 35 Japanese before loading the olfactory stimulation was 18.7 dB in non-verbal hemisphere, and that of vowel "a" was 18.4 dB in verbal hemisphere being in a symmetrical relation with each other. After giving an olfactory stimulation to the naris on the same side as

non-verbal hemisphere (right naris: 30, left naris: 5), dominance of pure tone hardly changed indicating the result of 16.8 dB in non-verbal hemisphere, in which however no significant difference was observed stochastically ($0.05 < p$). After giving an olfactory stimulation to the naris on the same side as verbal hemisphere (left naris: 30, right naris: 5) marked reversal of pure tone to verbal hemisphere appeared, and soon after that the dominance became 19.4 dB in verbal hemisphere ($p < 0.001$). It was also stochastically identified that among the results of pure tone dominance before and after giving olfactory loading, there was a mirror-like reversal ($0.05 < p$). It was confirmed that the Americans brought up in Japan not only indicated the Japanese type dominance pattern but also showed the same reaction as Japanese against olfactory stimulation.

Results with Westerners: As to 7 Westerners against any olfactory stimulation either left or right, change of pure tone dominance was hardly observed.

Discussion

Generally in sensory-motor nerve contralateral nerve fiber shows dominance, however, in case of olfaction, being different from other cranial nerves, unilateral nerve is supposed to show dominance having a close relationship with higher emotional brain. Gordon and Sperry (1969) confirmed by olfactory test with both sides of human nares after commissurotomy that olfactory perception is responsible only to stimulation of the naris on the same side as far as one hemisphere is concerned. A scent given to right naris cannot be expressed by language in the non-verbal hemisphere, but the subject could correctly select a corresponding substance with his left hand. Gordon et al.

confirmed that a stimulation from right naris to non-verbal hemisphere causes emotional reaction too. The case of Gordon et al. is considered to have more apparent independence of both left and right brains due to commissurotomy however, in the author's olfactory stimulation of both sides, too, Japanese having left brain dominance reacted only to stimulations on left naris and not responded with right naris stimulation, which identified a strong independence. The phenomenon that dominance of non-verbal sound is reversed from non-verbal to verbal hemisphere can be found specifically under language activities, such as reading, hearing and speaking (1969, Tsunoda). The appearance of the same phenomenon by olfactory stimulations indicates that via emotional brain and autonomic nerve system, verbal hemisphere is stimulated and thus the automatic switch mechanism works to switch over the verbal hemisphere side. As explained above the phenomenon that among Japanese emotional stimulation by olfactory sense acts selectively to verbal hemisphere only well endorse the hypothesis of Tsunoda stating that the brain in relation to emotion of Japanese corresponds with verbal hemisphere. As to Westerners there was no reversal phenomenon of dominance in non-verbal sound against either side of olfactory stimulation, which can be explained that when listening to the instrumental music there is no reversal in dominance of pure tone (1969), thus cerebral hemisphere involved to emotion being dominant on the same side as non-verbal hemisphere, the switch mechanism does not work by emotional stimulation. Since white Americans brought up in Japan showed the same dominance pattern as Japanese and reaction against olfactory stimulations as Japanese, it was clarified that difference between Japanese and Westerner is not based on the genetic

factor but some postnatal environmental factor, i.e., difference in languages.

REFERENCE

1) T. Tsunoda:

Contralateral shift of cerebral dominance for non-verbal sounds during speech perception.

J. Aud. Res., 221-229, 9 (1969)

2) T. Tsunoda:

The characteristic pattern of the cerebral dominance for vowel sound found in Japanese second-generations.

Proc. Japan Acad., 643-647, 49 (1973)

3) T. Tsunoda:

The difference of recognition mechanism toward natural sounds between Japanese and Westerners, and the spiritual characteristics.

Medicine & Biology., 309-314, 88 (1974)

4) T. Tsunoda:

Functional differences between right and left cerebral hemispheres detected by the key-tapping method.

Brain and Language., 152-170, 2 (1975)

5) T. Tsunoda and M. Oka:

Lateralization for emotion in human brain and auditory cerebral dominance.

Proc. Japan. Acad., 528-531, 52 (1976)

6) T. Tsunoda:

Japanese brain.

Taishukan (1978)

世界の超高压電顕の現状と将来への展望

橋本 初次郎 大阪大学・工

現在世界中で稼動している 300 kV 以上の加速電圧をもつ超高電圧電子顕微鏡は 51 台で、設置が決定しているものが 1 台である。

電源の安定度や機械的な精度や安定度が同じであるとする高電圧になる程都合がよくなることが多いので、電子顕微鏡の電圧はここ 16 年間に 500 kV, 750 kV, 1,000 kV, 3,000 kV と高められた。そして、多数の有力な研究者がこの分野で目ざましい成果をあげ超高電圧電子顕微鏡の有効性が明らかにされてきた。

すでに超高電圧電子顕微鏡学のための国際会議が 5 回も開催され、日米セミナーのような小規模の国際集會も 3 回ひらかれ、次第に応用研究の数が増しつつある。

今後は、従来の研究を参考にして、各々の分野の研究に適したユニークな超高電圧電子顕微鏡を建設し、その分野の研究進展に寄与すべきであろう。又これを、流動研究員の制度等を活用してなるべく多くの研究者が利用できるようにすべきであろう。

従来は結晶性物質を研究対象とする科学分野で極めてよく用いられて来たが、今後医学生物学関係への応用研究にも非常に勢いで用いられるのではないかと思われる。

現在までに知られている超高電圧電子顕微鏡学の概要を筆者の身近な問題をひらいて述べ、今後の研究の進展の参考に資したい。

超高压電顕内その場実験 (in situ experiments) とビデオ技術

井村 徹 名古屋大学・工

超高压電子顕微鏡を利用する側の研究者としては、それを用いた研究手段の長所を最も効果的に利用することを考えるとともに、短所をよく認識して、それへの対応策ないし相補的手段を用意しておく必要がある。

従来の電子顕微鏡の場合よりも、観察時の試料の周辺にいくらか広い空間が得られ、また、厚い試料の透過観察ができることもこの方法の大きな特長で、それにより、制御した任意の雰囲気中での試料のその場観察 (in situ observation) が可能になった。

しかしながら、試料の電子線照射損傷を抑制した観察や、動的現象の連続記録法に対する用意が十分になされていることが、このその場実験法 (in situ experiment) の有用性を更に高める上で是非とも必要である。

生物、非生物をとわず、その場実験を進めてゆく上では、(1) environmental cell (あるいは単に capsule) を初めとする種々の試料処理装置の開発・改良と、(2) 観察・記録法の改良ないし、全く新しい記録法の開発などがこれからのポイントとなるものと思われる。また、それとともに、CTEMよりも検出効率やコントラストが良く、従って、電子線照射損傷の低減とか、高速度記録の可能性をひめた HV-STEM の発展と採用を十分検討してみる必要があるように思われる。

こういった観点から、材料科学分野で、その場実験法を推進してきた際に得た若干の経験や知見をご参考までに述べる予定である。

＊ 超高压電顕内で試料に直接処理をほどこして、所望の現象をその場で起させ、それに伴う試料の構造変化を連続的に記録することによって、その現象の過程を追って、現象の本質、発生や進展の機構を研究する実験法を、超高压電顕内その場実験 (in situ experiments in a HVEM) と呼ぶ。

走査型透過電顕について

丸勢 進 名古屋大学・工

従来、超高圧STEMは通常電圧のSTEMと同様に、超高分解能撮影や厚い試料観察時の有利性、像コントラストの電気回路的修正と電子エネルギー分析の適用、さらに電子光学系製作上の容易性の理由で建設されてきたようであるが、超高圧においては検出効率の優位性を重要視すべきである。超高圧CTEMによって電子照射による試料損傷の低減が実現できない主要な原因は、加速電圧の上昇に伴う写真フィルムの感度の低下にあって、その防止のために厚い乳剤を使用すればフィルム分解能が低下することは周知の通りである。STEMの場合は検出器内での電子のひろがり分解能に影響しないので、例えば蛍光物質を使用する場合、加速電圧に対応した厚い蛍光膜を選ぶことができる。測定は100～1,000KVの加速電圧範囲について行われ、加速電圧ごとの最適蛍光膜厚さを見出した。この最適膜厚における検出器出力は入射電子流に比例していることを確かめ、また出力は予期どおり加速電圧と共に上昇し、P-46蛍光物質について1,000KVにおける出力は100KVの場合の約6倍に達していることがわかった。

つぎに超高圧STEMの分解能について考察する。STEMの理論的分解能は従来、照射電子流、輝度およびレンズ収差によって幾何光学的に算出されているが、50KVでの分解能測定の結果えられた数10Åの値は、この理論値とよく一致することがわかった。一方超高圧の場合の輝度の値はすでに確めているし、必要電子流は、上述のように検出器の効率が上昇することから、50KVの場合と等しい値をとれば十分であろう。これをもとに50KVと同様の計算をした結果、通常の電子銃の場合に1,000KVに対する分解能値として6Åをえた。このような高分解能に対しては、正確には波動光学的計算が必要であって、結果はまだえていないが、更に小さい分解能値が期待できる。

低ノイズ支持膜によるフェリチン粒子の観察

美浜 和弘 名古屋大学・工

透過電子顕微鏡の試料支持膜として広く用いられているカーボン蒸着膜は、その像にあらわれる位相コントラストに起因するノイズのため 10Å 以下の試料の微細構造を覆いかくしてしまう。これはカーボン膜が非晶質であることに起因しているものであるため、低ノイズの試料支持膜を得るためには結晶性支持膜を用いることが要請される。我々はこの目的のためBeO蒸着膜を開発した。このBeO支持膜は低ノイズおよび低コントラストの特徴を持ち、その作成には真空蒸着法を用いるため取扱いはカーボン膜とほとんど同様である。とくにこのBeO膜は水面からマイクログリッド上にのせた直後は親水性を示すため、水溶液中の試料に対しては特別の処理をしないでもよい分散が得られる。このBeO膜は径 $100\sim 300\text{Å}$ の単結晶のグレインから成っており、その粒界のコントラストは検鏡の障害となるが、そのグレイン内部に位置している試料については単結晶支持膜を用いたことになる。

フェリチン粒子の観察については多くの報告がなされているが、その多くはカーボン支持膜を用いたものであり、このため粒子の微細構造はノイズに覆われ、鉄化合物を含むコアのサブユニットの間隔($\sim 30\text{Å}$)の情報を大きな焦点外れの量(Δf)の像から得たに止まっている。高分解能像を得るためには高倍率(~ 20 万倍)を用い、最適焦点位置($\Delta f \sim 500\text{Å}$)で像を撮影することが必要であり、これによってフェリチン粒子のコアを構成しているサブユニットの形及びその個数についての情報が得られている。さらに明視野像および暗視野像において数Åから 10Å の間隔の縞状の像も見られている。またBeO支持膜上でP.T.A.染色をした試料の観察から、P.T.A.自身のもつノイズのため、染色により新しい情報は得られるにせよ、その微細構造の観察は却って困難になることがわかっている。

Environmental Cell法によるHydrated Biological Specimensの観察

深見 章 日本大学・文理

生物体の諸反応、構造の形成や機能には水の存在が不可欠である。従ってこれらの機能と構造との関連を解明するためには、試料が水を含む状態でなされなければならない。構造解析の有力な手段の一つである電子顕微鏡法は、試料を真空下に置くという根本的な欠点を有し、試料の脱水後の構造しか解析することができない。この問題は非生物領域においても、層間水・結晶水などをもつ多数の無機化合物試料にあてはまる。Environmental Cell(水蒸気環境試料室)は、前述の限界を越えて含水状態での各種の試料の電子顕微鏡解析を可能にさせるための特殊な試料室であり、開放型と隔膜型との二種の型式がある。試料を置くガス環境の小室の上下に電子線の出入のための小孔がある。前者の型式は孔からリークするガスを差動排気法によって取り除く。後者は孔の表面を特殊な隔膜で覆いガスを洩らさないようにして加水状態の試料を観察する。演者らは高分解能の隔膜型 Environmental Cellを開発した。その分解能は1nm以下である(ガス圧力: 100Torr以下, 加速電圧: 100KV)。この方法を利用すれば単に加水(含水)状態の生物試料の構造が観察できるだけでなく、水をもった機能する反応状態で動的な生物試料の構造解析が可能となる。しかしながら、生物試料を取扱う限り以下に述べる問題点を解決しないことには真の構造解析の道の大きな障害となる。第一の問題は試料の電子線照射損傷である。ガス環境で電子線を照射すると、真空下では見られない異常な試料の損傷が現われる。この現象の機構は未だ明らかではないが、電子線照射量を減少させることにより発生量を著しく低減することはできるが、像をどのようにして記録させるかという別の問題を提起することになる。第二の問題は生物試料の機能に影響を与えない試料の新しい増コントラスト法の開発のことである。これらの問題点の解決もすでにメドはついており、超高圧電顕の観察手段の一つとなり得る。

結晶の電子線照射損傷の超高压電顕によるその場観察

井形 直弘 東京大学・工

1. 序 結晶の電子線照射損傷は超高压電子顕微鏡のように高いエネルギーの電子線により結晶を観察しようとする場合問題となるばかりでなく、原子炉材料のように中性子線によって損傷を受ける材料の挙動をしらべる場合のシミュレーションとしても重要な意味をもつ。電子線照射損傷（超高压電顕による）をシミュレーション照射実験として行なう場合の利点は点欠陥が一樣に形成されるので解析がし易いことと、短時間に多量の照射損傷を与えることが出来る点、更に全過程をその場観察で追及することができる点、電子ビームの方位ならびにエネルギーがある狭い範囲になっている点、温度雰囲気などが精密にコントロールされる点、試料として単結晶を用いることができる点などである。

2. 実験方法 本研究ではステンレス鋼、Mo及びMo-C, Mo-Nb, Mo-Hf, Mo-Ni, Mo-Re合金を用い室温～1,000℃の範囲で照射を行ないその場観察を行なっている。電流密度は $\sim 3.14 \times 10^{10}$ e/cm² Sで行なっており加速電圧は1250KVとしている。

3. 実験結果及び考察 観測した全温度範囲にわたって先ず転位ループの形成がみとめられ、照射時間の関数として転位ループの成長がみとめられた。先ず転位ループ密度は次のような形で記述された。

$$N = N_0 \exp \frac{E_m + B}{2RT}$$

N_0 は照射速度の $\frac{1}{2}$ 乗、不純物原子の濃度（又は合金原子濃度）の $\frac{1}{2}$ 乗に比例する定数、 E_m は格子間原子の移動エネルギー、 B は格子間原子と不純物原子との相互作用のエネルギーである。また原子空孔の移動がみとめられる温度範囲では転位ループ形成につづいて原子空孔集合体（ボイド）の形成がみとめられた。ステンレス鋼についてはこのボイド密度の形成の見掛け上の活性化エネルギーは1eVであった。ボイドの占める全容積率をスエリングと云うがこれは時間に比例して増大し、また温度の上昇にともなって増大した。

超高压電顕による筋肉の研究

石川 春律 東京大学・医

超高压電顕の細胞生物学への応用は①その大きな透過能、②高い分解能、および③少ない試料損傷の利点を期待している。応用範囲を列举すると次のようになるが、今後その他の応用面が開発されるであろう。

1) 厚い切片の観察——とくに立体的観察——

包埋材料——自然の電子密度の高い構造の観察

染色試料における構造の観察

- { 重なり合い効果（ラジオオートグラフィを含む）
- { 選択的染色（細胞化学を含む）

無包埋材料——凍結切片法——

2) 全載試料の観察——無包埋の厚い試料（例えば培養細胞）

3) (薄切片の) 高分解能観察
(薄試料の)

われわれは数年来、超高压電顕を筋の形態学的研究に応用してきたので、その経験を紹介したい。

横紋筋における横細管系(T-system)は興奮と収縮を結びつける重要な構造である。この構造の立体的分布の分析に超高压電顕を応用している。試料は横細管のみをDAB-ferrocyanide法またはLanthanum nitrate法により選択的に染め出したもので、包埋後1—3 μm の厚い切片について立体的に観察した。

厚い切片内で横細管は連続した管として見え、筋原線維の横紋の一定のレベルを規則的に横走していた。その表面への開口も容易に示された。筋の発達過程をみると、横細管は初め不規則な分布・配列を示すが、成熟するにつれ規則的な配列をとるようになる。厚い切片の観察にて立体的分布配列のみならず、大まかな発達程度も容易に調べることができる。

渡 仲三 名古屋市立大学・医

電子顕微鏡（以下電顕）は、光学顕微鏡（以下光顕）に比べ少くとも500倍以上の拡大率が得られる。しかし、光顕に比べ数十分の1の薄い切片が要求され、しかも写真は光顕がカラーなのに反し、一般にモノクロームである。これらの電顕の欠点をカバー出来るのがいわゆる超高压電顕であって、形態学を主とする解剖学においては超高压電顕は極めて有用な機器となる。演者はここに着目して、超高压電顕の応用を幾つか試みたのでその一端を紹介する。

(1) 細胞内小器官の全体像の立体観察：通常の電顕で細胞内小器官の全体像を観察するためには、その小器官が直径1 μ の厚さを有するとしても、約10枚の連続切片を作製し、その切片像を積み重ねて再構築する必要があり、この場合、切断や写真撮影時の歪み効果を生じ、必ずしも正しい元の立体像を復元出来ない。ところが超高压電顕を用いれば1～数 μ 程度の大きな小器官が厚切切片内でそのまま観察可能であり、これを $\pm 7^\circ$ 程度の傾斜法によって観察すればその小器官の正しい立体像が観察される。演者はこの方法によって、ヘビその他のインスリン結晶が菱形十二面体であることを証明した。(2) 光顕・透過電顕（特に超高压電顕）・走査電顕による同一細胞要素・同一切片内連続観察法：前述したように、光顕では細胞が色彩的に観察されるが、倍率が低く細胞小器官の超微形態が観察されない。一方、電顕では細胞の超微形態的观察は可能であるが重要な色彩観察が出来ない。この両者の所見が同一細胞内で連続的に観察されれば今までの光顕所見と電顕所見との間のギャップが埋まり極めて有用であることが解る。ここに着目して、エボン包埋厚切切片（0.5～1.5 μ ）を染色して先ず光顕で観察、ついで超高压電顕で観察、さらに走査電顕で観察し、それらの所見を対比する方法を開発したので報告する。さらにパラフィン切片についても同様の観察法を開発しつつある。

小川 和朗 馬屋原 宏 安部 省吾 京都大学・医

1～数 μm の、比較的厚い切片を用いて、細胞の三次元的立体像を把握することができるのが、超高压電子顕微鏡の医学生物学への応用の際の一つの利点であるとされているが、通常のアルデヒド・四酸化オスミウム二重固定組織の超薄切片を酢酸ウラニールとくえん酸鉛で重染した試料では、切片の、主として表面と裏面およびこの両面に近い部位のみが染色され、立体構造を観察する際に、試料の中程にある構造が不明瞭で、目的とするオルガネラ（細胞小器官）が一連の構造として観察され難いことが多い。これに対し、試料に細胞化学的反応を施した場合には、反応の種類により、ある特定のオルガネラのみが特異的に染出される。たとえば、酸性ホスファターゼ活性をGomoriの鉛法で検出した場合には、ライソゾーム、ゴルジ装置などに、全体として、高電子密度の反応産物（りん酸鉛）が沈着され、さらに、切片を酢酸ウラニール、くえん酸鉛で後染色すると、電子密度が増強されるので、オルガネラ全体の三次元的立体像を把握するのに極めて理想的である。この利点を利用し、オルガネラの構造と機能を超高压電子顕微鏡で観察しようとするのが我々の主目的である。

この主目的に沿った一連の研究の中で、今回は、(1)培養したヒトおよびマウス線維芽細胞のゴルジ装置の立体構造とライソゾームの関係、および(2)腹水型吉田肉腫細胞に酢酸コルチゾン投与した場合に見られる自己貪食現象に関係したライソゾームのwrapping mechanismについて述べる。反応としては酸性ホスファターゼ活性検出を行なっている。

ザリガニ巨大神経線維の Tail current

北里 宏 滋賀医科大学

従来の Voltage clamp 装置の周波数特性を改善し、膜電位変化後の速い容量性電流をザリガニ巨大神経線維において記録出来るようにした。また、S/N 比を改善するために得られた現象を AD コンバータを通して外部記憶装置に記録し、ここで加算平均をすると共に、得られたデータを高速でカセットテープに集録した。実験終了後計算機の制御のもとに任意のデータと呼び出し、データ間の加算・減算および計測が自由に出来るような計算機システムを完成し、このシステムを用いて実験条件の設定およびデータの解析を行った。

Voltage clamp 法を用いて脱分極性の膜電位変化を与えた後にもとの holding potential にもどすと、通常内向きの tail current が流れる。細胞外液の Na を Cs でおきかえると、Cs 濃度が 80mM 以上になると tail current は次第に小さくなり、100mM になると殆んど完全に抑制される。このような条件下で、脱分極を与えた後、一度或るレベル迄膜電位をもどし、その後再び最初の脱分極のレベル迄もどすと、第 1 の脱分極と第 2 の脱分極間の時間に従って第 2 の脱分極の際の膜電流は減少する。この膜電流の減少の時間経過は gk の変化の時間経過と考えられる。この時間経過は第 1 の脱分極と第 2 の脱分極との間の膜電位のレベルに応じて変化する。また、この gk の時間経過が早ければ早い程、最初の脱分極後膜電位を或る値までもどしたときの容量性電流は増大する。以上のことについて説明を加え報告した。

GNa, GK, Cm と膜起電力

岸本 卯一郎 大阪大学・教養

電圧制御の条件でテストパルスを加え、そのレスポンスの形から細胞膜の直列抵抗、膜抵抗、膜容量、膜起電力の大きさとその変化が求められる。経過の長い興奮を示すイカの giant axon でこの方法を適用することによって、活動電位の立ち上りと、再分極の時期に著しい膜のイオンコンダクタンスの増加と膜容量の増加を伴うことを明らかにした。

膜電位制御の条件で膜電位を種々の周波数で変動させた場合、ある周波数範囲 (40~150Hz) で興奮の閾値が最小となる現象について報告した。

卵細胞膜の興奮とその意義

高橋 国太郎 東京大学・医

ホヤ発生卵における興奮膜の分化にともなう NaチャンネルCaチャンネルにチャンネルの密度の変動が胚細胞内のCa濃度の変化に起因する可能性を検討するために、未受精ホヤ卵の細胞内Caイオン濃度を变化させて膜の興奮性の変化を惹くことを試みた。このために細胞内に直接的にCa緩衝液を灌流することを試みて成功した。これによって細胞内のCaイオン濃度が 10^{-6} M以上に増加するとNa電流は増えるがCa電流は減少するという相反的な効果が見られた。

卵細胞膜の電気的性質の解析

宮崎 俊一 自治医科大学

- ① 卵細胞膜は発生学的研究材料である他に、興奮性膜の解析の材料としても重要である。微小電極を二本、ヒトデ卵の細胞内に刺入し、膜電位固定法により、 K^+ イオンに対する細胞膜の異常整流を解析した。それにより、このイオンチャンネルの kinetics は、 $g_K = g_{Kn}$ の形になることがわかった。このイオンチャンネルの性質からそのモデルを考察した。このモデルから実験式としてえた形と同じ式がみちびかれ、膜電位に依存する voltage gating の性質を示す部分と、一個一個のチャンネルのコンダクタンスを示す部分があることが示唆された。
- ② 膜電位が受精卵に対して制御機能をもつことをしらべた。ヒトデ卵をある膜電位レベルに人工的にもっていくと、受精はおこらず、あるレベルではおこる。受精時には activation potential というものがとれるが、これに対応して成熟過程のいろいろなステージに於て、activation potential が大きいものと小さいものがあり、これは monospermy と polyspermy に対応することがわかった。

末梢抑制存在下での刺激音の立ち上り速度 tuning curve

大山 浩 金沢医科大学

カエルの音受容器の一つ、両生類乳頭には末梢抑制とよばれる現象が見られる。これは試験音刺激に対する神経の応答が、高音の持続背景音により抑圧される現象で、哺乳類蝸牛でも類似した現象が見られる。何れも通常の神経活動を仲介とする抑制ではなく、より末梢の音刺激から神経活動電位発生までの現象にかかわるものと考えられるが、なおその機構は明らかでない。

実体顕微鏡直視下で両生類乳頭支配神経にガラス管微小電極を刺入して、正弦波バースト刺激に対する単一神経線維の応答を記録する。速い立ち上りのバーストに対する tuning curve は、ある特徴周波数を中心として、低域側の閾値はゆるやかに上昇する。高域側の閾値の上昇はそれよりやや急ではあるが、それほど鋭い遮断特性は示さない。

一方この刺激音に対する反応を消失させる各高周波の背景音の閾値をつなぐ完全抑制曲線は、上の tuning curve とほぼ平行である。

刺激音自身が末梢抑制特性を持つような特徴周波数より高音に対する応答の閾値を求める際に、立ち上りの遅いバーストを刺激音とすれば、末梢抑制の充分に発生した条件下で閾値を測定することになり、抑制の入り込む余裕のない急速な立ち上りのバーストによる閾値より高くなることが予想される。

実際に試験音 burst の 90% 立ち上りを 0 から 20 msec まで増大すると立ち上り時間の延長につれて、tuning curve の高域遮断特性がより急峻になる。従来立ち上りの急なバーストは、立ち上り部に高周波成分を持つことが嫌われ、ゆるやかな立ち上りの試験音を用いることが通則となっているが、これによる tuning curve の高域遮断特性は末梢抑制存在下ではその急峻さが強調されている可能性がある。

ELECTRICAL IMPEDANCE MEASUREMENTS IN THE COCHLEA

J. E. Hind

University of Wisconsin Medical School,
Department of Neurophysiology,
Wisconsin, U. S. A

This report summarizes the work of Allyn Hubbard (3) and David Mountain (4) who carried out their Ph. D. thesis research in our laboratory under the supervision of Professor C. D. Geisler. These investigators developed an improved technique for measuring the impedance between a shielded micropipette electrode in the scala media of the guinea pig cochlea and a remote reference electrode (2). The method involves recording of the a.c. potential produced in scala media by the injection of from 0.5 to 7.5 microamperes of a.c. current through a second pipette electrode also located in scala media. If ω_1 is the angular frequency of the injected current and ω_2 is the angular frequency of a pure tone acoustic stimulus, the recorded potential in general contains many frequencies and may be analyzed in several ways.

Strelhoff, et., (5) were the first workers to show a sinusoidally-varying resistance change which is synchronized with the acoustic stimulus. In their method, ω_2 is viewed as modulating ω_1 , for which reason ω_2 must be small in comparison with ω_1 and ω_1 cannot exceed about 1 kHz. These limitations are removed in the method of Hubbard (3) in which the spectrum of the recorded potential is analyzed, either with a wave analyzer or by means of a digital computer, and components identified which correspond to the changing resistance, the static value of resistance,

and the cochlear microphonic. A further modification was introduced by Mountain (4) in which the recorded potential is multiplied by a signal representing the injected current. The new method permits measurement of much smaller changes in resistance than were previously possible.

Mountain has used this method to study the effect on impedance and cochlear potentials of varying the dc potential of scala media (EP, endocochlear potential) by the injection of dc current into scala media and by electrical stimulation of the efferent system, thereby increasing the current flow through the outer hair cells. The results of these studies are not consistent with a linear, time-varying model of hair cell resistance (1). Instead, a model which incorporates a nonlinear voltage element produces results similar to the experimental data.

REFERENCE

(1) H. Davis:

A Model for Transducer Action in the Cochlea.

Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 30, 181-190(1965)

(2) C. D. Geisler, D. C. Mountain, A. E. Hubbard, H. Adrian and A. Ravindran:

Alternating Electrical-Resistance Changes in the Guinea-Pig Cochlea Caused by Acoustic Stimuli.

J. Acoust. Soc. Am., 61, 1557-1566(1977)

(3) A. E. Hubbard:

A Comparison Between the Spectra of the Cochlear Microphonic and the Spectra of the Apparent Changing Resistance in Scala Media.

Ph. D. Thesis, University of Wisconsin, Madison(1977)

- (4) D. C. Mountain:

A Comparison of Electrical Changes in the Cochlea
Caused by Stimulation of the Crossed Olivocochlear
Bundle and by DC Polarization.

Ph. D. Thesis, University of Wisconsin, Madison (1978)

- (5) D. Strelhoff, G. Hass and V. Honrubia:

Sound Induced Electrical Changes in the Guinea Pig
Cochlea.

J. Acoust. Soc. Am., 51, 617-620 (1972)

基底膜変位の聴神経活動への変換を表現するモデルについて

大野 克郎 九州大学・工

1 次聴ニューロンの発火と、それをひきおこす基底膜の機械的変位との関係
を表現する確率的モデルを提出し、このモデルと他で独立に発表された
Schroeder らのモデルとを比較検討し、このモデルが神経生理学での実験結
果を良く表現するのに対し、Schroeder らのモデルは実験結果に適合しない
ことを具体的に指摘し、その理由を明らかにした。

このモデルは、1 次聴ニューロンに関する生理実験データを抽象した次の二つ
の前提、すなわち入力音響が大きくなると発火頻度が飽和すること及び発火の
周期ヒストグラムは入力の半波整流波形に近似していることを前提として論
理的に組立てられており、次の三つの法則に従う。

法則 1 発火の単位時間当りの確率は、存在している伝達物質の量及び膜の
透過率に比例し、透過率は基底膜変位の半波整流波形である。

法則 2 発火は伝達物質の放出によりおこり、伝達物質の放出は一定比で行
われる。

法則 3 伝達物質はロジスティック方程式に従って変化する。

上記の法則に従うモデルは生理実験データにおける周期ヒストグラム、間隔ヒ
ストグラム、PST ヒストグラムなどを良く表現する。これに対し、Schroeder
らのモデルは、法則 2 に対応する法則として、伝達物質の放出量は一定である
とする法則を採用しているが、この放出量は飽和発火頻度により定まり、伝達
物質の最大量の数分の一に達する。また、法則 3 に関しては、抵抗容量回路の
充電の方程式を採用している。これらのことのため、モデルのダイナミックレ
ンジが狭く、また異った動作点間の移動が急激に行われるので、各種ヒストグ
ラムに歪みを生じる。

- 1) 大野、朱雀：1 次聴ニューロンの発火の確率的モデル

〔子信学誌 57D(8)159-169 1974〕

- 2) 大野、朱雀：聴覚第 1 次ニューロンの発火に見られる自動制御機構のモデル

〔子信学誌 58D(6)352-359 1975〕

- 3) 大野、香田：1 次聴ニューロンの発火における伝達物質の放出法則について

〔音響学会聴覚研資 H-53-7 1978〕

非線形な基底膜のモデル

磯 泰行 坂本 博康 九州工業大学

電気回路による基底膜のモデルにダイオードによる非線形抵抗を導入し、この回路を用いて各種の非線形な聴覚現象をシミュレートする実験を行なった。

- 1) RhodeおよびRhodeとRoblesによって測定された非線形性、すなわち
 - ① 振巾が大きくなるほど共振の山がつぶれ、共振周波数が低い方にずれる。
 - ② 振巾の増大とともに、共振より高い周波数では位相が進み、低い周波数では位相が遅れる。
 - ③ クリック応答の第 n 番目のピークの大きさは、クリックの大きさを減らすときそれに比例しては小さくならない。などモデルにおいても同傾向の非線形性を示す。
- 2) コンビネーショントーン。① $2f_L - f_H = f_{CT}$ の成分のピークは、同周波数の入力を単独に加えたときのピークと同じ位置に生じる。② 外部から第3の f_{CT} 入力を適当な振巾と位相で加えることにより、 f_{CT} 成分をピーク位置前後の多数のセクションにわたり打ち消すことができる。③ 打ち消しに要する入力レベルの、一次音レベルによる変化や、その周波数比に対する変化はGoldsteinの結果ときわめてよく似た傾向をもつ。
- 3) 二音抑圧。周波数 f_1 の第一音を一定レベルで加えておき、周波数 f_2 の第二音を加えたときの抑圧を調べた。スパイクレートのあらい近似として電圧の平均値（整流した電圧の平均値）を用いた。 f_1 より高い f_2 領域で顕著な抑圧を、また低い f_2 領域でわずかながら抑圧を見ることができた。SachsとKiangの結果とくらべると傾向はよく似ているが抑圧のていどははるかに小さい。この問題は基底膜振巾とスパイクレートの関係についてさらに検討を必要とする。

本モデルにはまだ欠点もあるが、心理的および生理的に知られた非線形現象をかなりよくシミュレートできる。現状での不一致はモデルの一部改良によって減少する可能性がある。

猫聴覚ニューロンの連続型反応

丸山 直滋 齊藤 勝則 新潟大学・脳研

局所麻酔を用い、ガラクチン非動化猫の聴覚領ニューロンの純音および帯域雑音に対する反応を調べた。87ユニット中63ユニットが純音に反応した。on型が27, off型が7, 連続型反応が29ユニット見られた。連続型反応の潜時は80 msec程度のものが多かった。帯域雑音に対する反応でも on型, off型の反応も見られたが、連続型反応だけを問題とした。帯域雑音に対する反応を調べた53ユニット中、45ユニットが連続型反応を示した。この45ユニットの純音に対する反応は、無反応が12, onまたはoff型が23, 連続反応型が10ユニットであった。帯域雑音に対する連続型反応は、一般に純音に対するそれよりも潜時が短く10~20 msec程度のものがほとんどであった。帯域雑音に反応を示した45ユニット中21ユニットで最良帯域巾を決定できた。30HzBW(BW:帯域巾)以下で最もよく反応する狭帯域型が8ユニット, 180HzBW程度で最もよく反応する中帯域型が10ユニット, 1,000HzBW以上でよく反応する広帯域型が8ユニットあった。狭帯域型は、純音でoff型を示すものが多く、帯域雑音の振巾変化に対応して発火する傾向が見られ100HzBW以上では反応しなかった。中帯域型は、反応中の発火頻度が低い傾向があり、10~20 spikes/sec位のものも多く、最高でも約40 spikes/secであった。広帯域型は反応中の発火頻度が高く90~150 spikes/secであった。

村田 計一 谷口 郁雄 東京医歯大、難研
橋本 享 材研

内耳における符号化の段階では、特定のニューロンの活動が刺激パタンの或る種の特徴に対応すると言った様な機能の特殊化は見られない。即ち、或るニューロンは、母音／ア／および／オ／の刺激に应答し、／イ／や／ウ／では興奮せず、或るものでは全ての母音に多かれ少なかれ反応を示す。これは各ニューロンに其れ其れ個有の周波数閾値曲線の中に刺激音のスペクトルが如何程含まれるかによって決まり、特徴周波数帯にフォルマントが落ちる場合に活動することが統計的に示される。或る母音に应答する場合、音声ピッチに同期してピッチ毎に興奮を繰返し、特定位相で放電確率が高まる。このピッチ同期の活動はピッチ周波数がそのニューロンの应答野の外にあっても特徴周波数の高低とかかわらず見られ、母音からピッチ周波数を除去した刺激では興奮しない。第一次ニューロンは、その支配する受容器の部分の基底膜振動をそのままニューロンの発火確率の時間経過にディジタル変換し、蝸牛神経束全体として基底膜振動の有様をそのまま符号化して中枢に送り込んでいる。

中脳、或いは視床の聴ニューロンは一次ニューロンと非常に異なり、特に視床では、純音に対してほとんどのニューロンはON, OFFなどの過渡应答のみしか示さないことは良く知られている。しかし、音声刺激に対しては約8分の1の内側膝状体ニューロンは多かれ少なかれ持続的な应答を示す。また、純音に対する应答から得たフィルター特性からは理解し得ない挙動を示し、音声から应答野に含まれるスペクトル帯を除去した刺激に应答するニューロンや、純音に対しては如何なる周波数にも应答しないにかかわらず、音声刺激に应答するものなどが見られ、すでに或る程度特徴抽出の処理を受けていることを示している。

耳間交替させた聴覚信号とその融合

亀田 和夫 北海道大学・歯

数年来、われわれは音声を中断することによる聴覚印象の変化を研究してきた。例えば子音(C)と母音(V)よりなる音節の場合、CV間での中断が最も大きな変化を与えることなどが明らかになった。このような時間的中断と対比させて空間的切断——両耳間での信号の切り替え(交替)——を考えてみた。このような耳間交替(interaural switching)を試みたところ、やはりCV間での交替が最も効果が大きいことは同様であったが、それとともに左右耳間に非対称性(asymmetry)が現われることが注目された。

例えば単音節/sa/をCV間で交替すると、融合して「サ」に聞かれるとは限らず、sとaとが分離して聞かれる場合もある。両耳の信号間に多少の混信を許すと融合は起りやすくなり、CV間に時間的中断を与えると融合は妨げられた。しかし、いずれの場合も先行するCが右耳に入る場合の方が融合しやすく、言語音の右耳の有利性(right ear advantage)の新しい実例となった。融合を助けた原因は、右耳がCを受容したことによるとも、右耳が先行音を聴取したことによるとも解釈できる。確定的ではないが、2音節音声による予備実験では、先行音効果のようである。

2音節以上での同種の実験は技術的に困難であったので、長い文章についての一定頻度の左右間の交替を行った。英語国での類似の実験の結果と同じく2-4回/秒の交替が最も聞きとりにくかった。交替と同期して音源は左右に振れるように感ずるが、交替頻度が増すとこの振れは減少し、一方交替による雑音が増加する。音声源はこの雑音に対して常に右に位置して感ぜられ、左右の非対称がここでも観察された。さらに音声と音楽の同時交叉交替により、音源の振れや中心位置について音声と音楽との差が見られた。

- 1 Kameda et al: Temporal structure of speech:
Effect of splitting between C and V
J. Physiol. Soc. Japan 35:522 1973
- 2 亀田他: 音声の中断と再結合の際の知覚的特性 歯基礎誌 17:501 1975
- 3 Kameda et al: Interaural switching of a syllable:
fusion and REA J. Physiol. Soc. Japan 39:351 1977
- 4 亀田他: 音声の耳間交替 歯基礎誌 19:401 1977
- 5 亀田他: 音声の耳間交替(II): 非言語音との比較 歯基礎誌 20:216 1978

自然音と楽器音の脳半球優位性について

角田 忠信 東京医歯大・難疾研

人間を対象とした脳半球優位性テスト（角田）を用いて、言語音以外に自然音、楽器音の優位性を日本人、非日本人、日系二世について測定した。日本人では持続母音は左半球優位となるが、母音の音響スペクトルに似た、二つ以上の構成音からなる複合音で周波数比が inharmonic なもの、及び二つ以上の構成音の一つが 2.5% 以上の FM 音を含むときには左半球優位となった。西欧人、他の東洋人、日系二世では二つ以上の構成音の一つが 10% 以上の FM 音を含むときには左半球優位の成績を示した。この形は破裂子音のスペクトルに合致する。言語音以外にも自然界にある感情音、動物の鳴声、虫の音、邦楽器音、波、風、川の流れ、雨などの音は日本人では左半球優位となるが、非日本人、日系二世では持続母音と同様に左半球優位の成績が得られた。これらの自然音のスペクトルは前述の inharmonic な性質を持つが、僅かな FM を含むと推測される。

母音、自然音の脳半球優位性パターンは日本人、日本文化にみられる基本的な特徴－自然性、情緒性、非論理性－と暗合する点が多いことが注目される。日本人の情動の中核メカニズムが左脳優位であることは、後天的な言語環境によって作られた母音、感情音の優位性の左脳優位性に基ずくと説明した。

- 1 角田 忠信 日本人の脳 大修館書店 1978
- 2 角田 忠信 ヒトの嗅覚系、情動脳・自律系の非対称性について
神経神歩 21(6)1217-27 1977

Some Relations between Temporal Responses of Auditory
Nerve Fibers and Psychoacoustical Phenomena.

太串 健吾 NHK基礎研

一般に純音の心理的オクターブは物理的オクターブよりも広くなることが知られている。この報告はこのような心理現象が聴神経のいかなる活動に対応して生じるのかについて考察したものである。まず、音は周波数が2倍になったときに、もとの音と類似した印象を与えることが知られている。このような音の性質を音調性と呼ぶ。聴神経は音刺激波形の周期にはほぼ同期したパルスが発生するので、周波数が2倍になればパルス間隔のうち周期の偶数倍に対応するパルス間隔はもとのパルス間隔にはほぼ一致する。一方心理的にはこのときオクターブ感という一種の類似性を知覚する。また周波数が5KHZ以上になると音刺激波形と聴神経のパルスの発生時期との対応がなくなるが、心理的にはこのとき音調性が消失する。これらのことから、音調性は基本的には聴覚系の中を伝送されるパルスの時間間隔という時間情報により生じるものと考えられる。そこで次に音刺激波形とパルスの同期性について考える。音刺激周波数が高くなっていくと聴神経はその不応期のために音刺激波形のピークよりもわずかに遅れて発火することが予想される。そこでRoseらによって報告された聴神経のパルス間隔ヒストグラムを詳細に観察し、音刺激波形の周期およびの整数倍とパルス間隔の最大頻度値の関係を調べた。その結果、音刺激波形の周期情報は聴神経の中においてはわずかに異なった値として伝送されていることが見出された。この結果から、心理的オクターブは物理的オクターブよりもほぼ1%程度広くなることが予測された。この結果は心理実験データとよく合っており、心理的オクターブの伸張現象を聴神経の活動から説明することができた。

断眠ラット脳幹に含まれる睡眠促進物質の分離・精製

石川 正幸 菰田 泰夫 東京医歯大・医用研

断眠ラットから得られた脳幹抽出物に含まれる睡眠促進物質の精製を各種の液体クロマトグラフィーを繰返すことにより試みた。クロマトグラフィーにより得られる多数の分画から活性分画を選びだすための生物検定法は、まずスクリーニング的なものとして、ザリガニ腹部伸展受容器の自発放電抑制作用を用い、この間接的な方法で活性を示した分画について、ラットとマウスの脳波および行動量を測定する直接的な方法で検定し睡眠促進作用をもつ分画を決定した。まず脳幹抽出物をSPセファデックスイオン交換クロマトグラフィーにかけると、睡眠促進物質はγ-アミノ酪酸の直前に溶出された。この活性分画をまとめて、それぞれ条件の異なる8回のセファデックスC10ゲル濾過クロマトグラフィーで精製すると、いずれの場合も今度はγ-アミノ酪酸の直後に睡眠促進物質は溶出された。この4回の液体クロマトグラフィーにより得られた活性分画(AF)は現在のところ最も精製されたものであり、詳細に生物検定が行なわれている。

AFを高速液体のクロマトグラフィーで分析すると少なくとも10本のピークを示し、またクロマトグラム全体を分取したものには睡眠促進活性が強く認められた。さらにAFのアミノ酸分析の結果、睡眠促進活性はアミノ酸と無関係であることが分った。クロマトグラフィーにおける溶出位置から考えて、睡眠促進物質は芳香環をもった中性に近い化合物と推定され、またブローネーゼ処理により失活することからペプチドである可能性が高い。最近スイスのMonnier教授らによりウサギの血液から徐波睡眠誘発ペプチドが単離、構造決定されたが、本研究の睡眠促進物質と直接比較の結果、クロマトグラム上の溶出位置が一致せず、両者は異なる物質であることが示唆された。

今後は高速液体クロマトグラフィーを主力にして、AFをさらに精製していく予定である。

断眠ラットの脳抽出物の睡眠促進効果の検定

井上 昌次郎 本多 和樹 東京医歯大・材研

24時間断眠させたラットの脳幹抽出物に含まれる睡眠促進物質の効果を生物検定法により判定した結果を報告した。被験動物には60～70日令の雄ラットを用い、直径0.35mmのステンレススチール製カニューレが第三脳室内に達するように、また大脳皮質表面には脳波導出用電極、頸筋および眼筋にはそれぞれ筋電および眼球運動記録用の電極を植込んでおく。被験動物は、脳室内注入および生体電気情報記録が長期間にわたって継続できるよう特製のケージで飼育する。このケージは内蔵する振動トランスジューサーにより、その振動が連続的に記録できるよう考案してあり、これによって被験動物の行動が解析できる。脳波は帯域フィルターを通して、 δ 、 θ 、 α 、 β_1 、 β_2 の5帯域に分離しそれぞれを5分間隔で積分し、アナログ表示するとともに δ 波の波数をデジタルカウントしておく。行動、原脳波、筋電図、眼球運動、 $\delta \sim \beta_1$ はポリグラフに記録しておく。このほか、高感度テレビカメラを長時間ビデオ録画(96時間連続)を行って、被験動物の行動を直接観察し、ハイブリッド・コンピュータによる生体情報のオンライン処理で睡眠段階の自動判定を行うことも、補助的に利用できるようになっている。

断眠ラットの脳幹抽出物は、5匹分を生理食塩水200 μ lに溶かし、夜間10時間にわたって被験ラットに注入する。最も有効な分画については、精製過程が進んでも活性は失われず、明らかな睡眠促進効果を検出することができた。注入された夜間の行動量と徐波睡眠相を、前夜生理食塩水のみ注入されたときに比較すると、それぞれ50～60%減少および60～100%増加となった。REM睡眠については大きな変化はみられなかった。

睡眠促進物質の生物検定法はいちおう完成したと考えられ、今後はこのシステムを利用して物質の単離・構造決定に貢献するつもりである。

- 1 本多, 若松, 和田, 井上: 断眠ネズミの脳抽出物の睡眠促進効果

動物学雑誌 86(4) 446, 1977

- 2 本多, 井上, 菰田, 石川, 長崎, 入来, 東, 内菌:

睡眠促進物質の生理効果 日本生理学雑誌 40(8・9) 印刷中, 1978

脳はどのように聴覚情報を表示するか

菅 乃武男 ワシントン大学

一般に聴覚系は発音系と共に進化してきているので、聴覚系は動物が使う音、動物にとって重要な生物学的意味をもつ音の検出とその処理に都合の良いように構成されているはずですが、したがって聴覚系が実際にどのように機能的に構成されているか調べるためには、先ず、動物が使う音、動物にとって重要な音の性質を調べねばなりません。次に、これらの音に含まれる情報がその動物の脳でどのように処理されるか微小電極を脳に挿入して調べねばなりません。

ヒゲコオモリはこだま定位によって昆虫を捕食し、生活しています。このために使う音、定位音はconstant-frequency(CF)成分とfrequency-modulated(FM)成分からなります。

CF成分は標的の検出とその相対速度の測定に、FM成分は標的までの距離とその方向の測定、および標的の等徴抽出に使われます。各々の成分には第一倍音から第四倍音まで含まれます。その中で第二倍音が強く、こだま定位のために特に重要な成分です。第二倍音のCF成分(61kHz)はドップラー変換補償と呼ばれる聴覚性行動に使用されます。

蝸牛には第二倍音のCF成分の検出と詳細な周波数分析を行うためのresonator(?)があります。61kHzに感度の良いニューロンでは閾値曲線の傾斜は1500~1800dB/octave、その“Q”は210です。ヒゲコオモリはこのようなすぐれた特性をもつフィルターとドップラー変換補償とを結びつけることによって動く標的の検出とその分析をすぐれたものに行っています。

ヒゲコオモリでは大脳皮質聴覚野は非常に広く、こだま定位に必要な情報処理を行うためのDS-CF処理野(Doppler-shifted-CF processing area)と複合音処理野があります。DS-CF処理野は聴覚野の30%を占め、61~63kHzの音によって運ばれる情報を処理するために使われています。この領域では標的の相対速度を表示するための周波数軸が放射状にあり、標的の立体角を表わすための振幅軸が周波数軸に直交して輪状にあります。複合音処理野には定位音のFM成分とドップラー効果を受けたこだまのFM成分との組合せに敏感なニューロンがあり、標的距離についての情報を処理している場所(FM-FM処理野)と倍音関係にあるCF成分の組合せに敏感なニューロンがある場所(CF/CF処理野)とがあります。

複合音処理野には周波数の部位的表示も振幅の部位的表示も殆んどなく、定位音とこだまの中にある成分の特定の組合せに敏感なニューロンが塊りになって存在しているので、DS-CF処理野の機能的構成とは明らかに違います。複合音処理野は聴覚野の機能的構成についての一つの仮説、detector theoryに合う構成を示します。一方、DF-CF処理野はもう一つの仮説、spatio-temporal pattern theoryに合う構成を示しています。大脳皮質聴覚野の機能的構成は動物が使う音信号の性質とその目的によって異なりますが、個々のニューロンは特定の情報要素またはその組合せに応ずるように特殊化しています。

— デオキシグルコース法による観察 —

谷口 郁雄 齊藤 望 独協医科大学

聴覚中枢における可塑性をしらべる目的で、片側蝸牛破壊後の両側下丘への $[^{14}\text{C}]$ -deoxyglucose(DG)の取込みをオートラジオグラフィによって経時的に観察した。

生後21日目のICRマウスを使い、尾静脈からDG $5\mu\text{Ci}$ を注入した後、直ちに防音室で雑音による音刺激を与えた。45分後、断頭し脳を取出し凍結切片(30μ)を作成し、X線フィルムに感光させてオートラジオグラフを作成した。

破壊した蝸牛に対して反対側の下丘へのDGの取込みは、蝸牛破壊後1日目及び4日目の急性期には減少し、非対称のパターンを呈した。この結果は従来一般に認められている、末梢から下丘への神経支配は交叉性のものが優位であるということと一致する。しかし、反対側の下丘へのDGの取込みは日時の経過と共に増加することがわかった。11日目、18日目のオートラジオグラフは左右の下丘にはほぼ対称のDGの取込みが認められ、正常な動物の場合と比べてほとんど差はなく、新しい神経の連絡が生じたことを示唆した。

再支配が起る可能性のある経路としては (i) 反対側の下丘から *commissura colliculorum inferiorum* を経てくる場合、(ii) 同側性に下位の外側毛帯から来る場合の二通りが考えられる。

(i) の可能性を検討するために、牛側の蝸牛を破壊した後、再支配が起ったと思われる時点(31日目)で *commissura* を切断し、オートラジオグラフを作成したところ、正常の動物の場合とほとんど同じような、対称的な両側下丘のDGの取込みが認められた。このことから、*commissura* を経て反対側から来る経路はこの再支配の現象には関与しないことがわかる。

(ii) の可能性については、これまでに発表されている資料に基づいて考察する。蝸牛を破壊すると、同側の外側上オリブ核に *transneuronal degeneration* が起るという事実は Powell and Erulkar によって報告された。また最近の報告によると、 $[^3\text{H}]$ leucine の外側上オリブ核への注入及び horseradish peroxidase の下丘への注入を行うことによって、外側上オリブ核から下丘へ両側性の投射があることが明らかにされた。

これらの事実から、下丘における塑性的な再支配は同側の外側上オリブ核

から外側毛体を経て投射される神経路によって起ったものと推定される。ニューロンレベルでの再支配の機序については、中枢神経系のいろいろな場所に損傷を与えると生き残った神経細胞に神経終末の sprouting が起って新しいシナプスが形成されるという、中枢神経系に共通の過程に基づくものと考えられる。

亀田 和夫 北海道大学・歯

一連の聴覚信号を左右耳間に交替させて与える手続, interaural alternation または interaural switching をここでは、「耳間交替」と訳しておく。種々の頻度でこのような切替を行うとき、了解度がどの様に変化するか? を問う実験が従来試みられてきた。われわれはこの切替を頻度によってコントロールするのではなく、音節の構造に即して行なう手続に拡張してその聴覚的印象を調べてみた。まず最も単純な子音(C)+母音(V)型の単音節についてこれを行ない、切替える点がC Vの連結部である場合に最も顕著な効果を示すことが判った。つまりCが一方の耳に、Vが他方の耳に与えられるのであるが、融和した本来の一音節が聴かれる場合と、分離した二つの単音が聴かれる場合とがあった。この融合の難易は多くの条件によって決まるが、特に注目されるのは左右耳間に非対称(asymmetry)が存在することである。すなわち先行するCが右耳に入った場合の方が融合が起りやすいのである。言語音についての右耳の有利性(REA: Right Ear Advantage)が多くの実験によって証明されているが、今回の結果はこれと関連するものと解釈される。

単音節以上になると技術的に困難があつて、十分なデータは得られていないが、先行音が右耳に入ることが融合を助けること、単音節よりも融合が起りやすいこと、などが認められた。従来の頻度を定めて交替させる実験も、音声のみならず音楽などを含めて行なった。特に複雑化した実験として、音声と音楽(など)を同時に、しかし交叉させて切替えること(交叉交替)をも試みた。この場合も個々の了解、分離には著しい障害がなく、いわゆる「カクテルパーティの効果」の特殊な形と考えてよい。これらの実験で音源の見かけの位置についても言語音に対するREAが存在することが発見された。なにゆえこのような明白な現象が従来見逃されてきたかは理解しがたいが、了解度にのみ注意が払われていたことも理由であろう。

近時、ヒトの左右の大脳皮質の役割分担についての関心が急速に高まり、多くの憶測を交えた議論が発表されている。しかしその根拠となるべき実験は技法が十分に確立されておらず、推論と実験とのギャップは著しい。上記の小実験はこの間隙を埋める多少の寄与となると考えている。なおこれら話題に先立

って、体性感覚の脳皮質投影について、二つの知見を紹介した。いずれも不動化ネコの単一ニューロン活動に基くものである。第一は皮質が柱状構築と同時に群塊状の構成が存在することを、数学的モデルを使って示したものである。第二は方向感受性の単純なシェーマと、その実験的根拠を示したものである。どちらもヒトの皮質機構についても示唆するものがあると考えた。

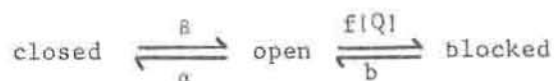
EFFECTS OF DIMETHYLDIETHANOLAMMONIUM ON THE IONIC PERMEABILITY OF CHEMICALLY MODULATED CHANNELS IN THE FROG ENDPLATE AND THE ONCHIDIUM NEURON. Takashi Maeno, Masashi Sawada and Koichi Enomoto. Dept. Physiol., Shimane Med. Univ., Izumo, Japan.

While studying effects of certain chemicals on the endplate membrane, we noticed that 10 mM dimethyldiethanolammonium [bis(2-hydroxyethyl)dimethylammonium, DMDEA] shifted the Y intercept of the double reciprocal plot of ACh potential versus ACh concentration relation obtained with a classical moving electrode technique (Fatt, 1950). Theoretically, this suggested that DMDEA modified the electromotive force of an ACh induced conductance change. Such a possible alteration in the equilibrium potential of ionic channels in the endplate membrane was investigated with the voltage clamp technique. Obtained results that 2 mM DMDEA shifted the reversal potential of the EPC by about 40 mV towards positive strongly implied that this compound blocked rather specifically the movement through the ionic channels in the endplate membrane of particular ions such as potassium.

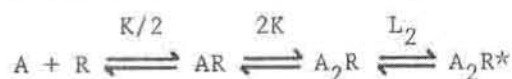
To confirm the specific effect of DMDEA on the ionic selectivity of chemically activated conducting pathways, we applied this compound on the neurons of a mollusc, Onchidium verruculatum. It was found in the present experiments that DMDEA potentiated sodium dependent depolarizing reaction induced by ACh, that potassium dependent hyperpolarizing response elicited by glutamate was suppressed inversely with this agent, and that these effects were associated with alterations in the reversal potential and the ionic conductance change.

KINETIC ANALYSIS OF BLOCK OF ENDPLATE CHANNELS BY A FLUORESCENT PROBE. P. R. Adams & A. Feltz, Dept. of Physiology, UTMB, Galveston, TX 77550, U.S.A., & Lab Neurobiologie, ENS, Paris, France.

Quinacrine appears to produce a voltage dependent block of open endplate channels according to the scheme (Nature, 269, 609):



We have now evaluated the 2 time constants predicted by the model as a function of quinacrine and agonist concentration and of membrane potential, using mepc decays, iontophoretic double pulses and voltage jump relaxations. The data demonstrate the very high affinity of agonist for the receptor when the channel is open. The blocking rate constants are $f = 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $b = 5 \text{ s}^{-1}$ at -60 mV and $b = 1 \text{ s}^{-1}$ at -140 mV. The very high forward rate may reflect a negative surface charge. Variation of the block with pH shows that the blocking species is charged both in the ring and on the side chain. Evaluation of the slow relaxation time permitted calculation of the fraction of channels open in the absence of quinacrine, $\beta/(\beta + \alpha)$ as a function of agonist concentration. The data for ACh and carbachol could be fitted to the activation scheme (J. Physiol. 268, 271):



with $K = 19 \text{ } \mu\text{M}$ and $200 \text{ } \mu\text{M}$, $L_2 = 1.64$ and 0.44 for ACh and carbachol respectively. Comparison of L_2 for ACh and carbachol with the single channel conductances for these two compounds shows that the isomerization step is rate limiting.

TRANSPORT OF Ba AND Sr IONS BY THE Ca CONDUCTANCE OF NEURONS. Norio Akaike, Syozo Yasui, Kai S. Lee, and Arthur M. Brown. Department of Physiology & Biophysics, University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas 77550, U.S.A.

Ba and Sr ions are transported more readily than Ca ion across the membrane of Balanus muscle (Hagiwara, Eaton & Fukuda, 1974) and Helix neurons (Akaike, Lee & Brown, 1978). Mg and Be ions are not conductive. Ba and Sr transport through the Ca conductance was compared with Ca transport in more detail in Helix neurons using the suction pipette method (Lee, Akaike & Brown, 1977); this method combines voltage clamp and internal perfusion. In general, results for Ba and Sr were similar. Small fluctuations in current (Ba noise) were measured and their spectral shapes determined. Spectral shapes have a Lorentzian configuration and are consistent with channel and not carrier-mediated transport (Kolb & Laüger, 1978). We found that Ba noise was much greater than Ca noise and calculations of unit conductance, γ , gave values for Ba that were 5-10X larger than those reported for Ca (Akaike, Fishman, Lee, Moore & Brown, 1978). Corner frequencies were also much smaller (1-5 Hz). These values are consistent with the slower turn off kinetics for $\langle I_{Ba} \rangle$. Results have been interpreted using Eyring rate theory and a two barrier model with a single saturable site between the barriers. The linear ascending limb of the I-V curves and their concentration dependence are accounted for satisfactorily by this model. Supported by U.S.P.H.S., NS-11453 and NS-13778.

INTERCHANGEABLE ASSOCIATION OF NEUROTRANSMITTER RECEPTORS WITH SEVERAL IONOPHORES.

David O. Carpenter. Neurobiology Dept., AFRRRI, Bethesda, Maryland USA.

Aplysia neurons have specific receptors for a number of neurotransmitters, including acetylcholine, dopamine, octopamine, phenylethanolamine, histamine, glutamate, aspartate, serotonin and GABA. For each of these substances three kinds of response are found, due to conductance increases to Na^+ , Cl^- and K^+ , respectively. Not all neurons respond to all of these substances, and the frequency of occurrence of a particular ionic response to a particular transmitter varies greatly. However, a given identified neuron always has the same profile of responses from one preparation to the next. The following kinds of evidence support the view that each of these nine specific receptors can be associated in different cells with any of three distinct ionophores passing Na^+ , Cl^- or K^+ . 1) All combinations of transmitter elicited ionic response have been found. 2) The time course of a given ionic response is independent of which transmitter caused it. 3) Na^+ and Cl^- responses are relatively temperature insensitive, while all K^+ responses are blocked by cooling. 4) All Cl^- responses but not Na^+ or K^+ responses are blocked by bicuculline, picrotoxin and penicillin. 5) All Na^+ and Cl^- responses are blocked by curare, but K^+ responses are unaffected. 6) The ionic selectivity of the Cl^- channel is similar in responses activated by different transmitters.

In addition to these three common types of ionic responses there are three less usual responses which have been found for some but not all transmitters. These include a slower and curare-insensitive Na^+ conductance increase response to GABA, serotonin and dopamine, a depolarizing conductance decrease response to GABA, acetylcholine and serotonin and a hyperpolarizing conductance decrease response to serotonin reported by others. In addition serotonin, dopamine and octopamine act at specific receptors to stimulate an adenylate cyclase. The simplest explanation for these observations is that each of the nine specific receptors may on different neurons be associated with each of up to seven different ionophores or effectors.

PORE SIZE ANALYSIS OF ELECTRICALLY INEXCITABLE (CHEMICAL) MEMBRANE.

Charles Edwards. Dept. Biol. Sci., State Univ. New York at Albany,
New York, U.S.A.

The membrane voltage response of the frog sartorius muscle to bath applied acetylcholine (ACh) was measured. Both normal and denervated muscles were studied. The ability of various organic cations to depolarize the muscles in the absence of sodium was examined to estimate the size of the channel through which sodium moves to initiate the endplate potential. The magnitude of the maximum voltage response was used to estimate the permeability of the channel to the organic cation. The ACh-activated endplate was very permeable to ammonium and its methyl and hydroxy derivatives, and moderately permeable to guanidine derivatives and tris (hydroxymethyl) aminomethane. The permeability of alkyol derivatives of ammonium diminished progressively with increase in molecular size. The results suggest that the endplate ionic channel can be represented by a pore of about $6.4 \text{ \AA}$ in diameter. In denervated muscles, which have a large increase in the number of extrajunctional ACh receptors, the channel size seemed to be about the same.

The data of Lassignol and Martin (J. Gen. Physiol. 70:23, 1977) suggest the size of the ACh activated channel in eel electroplaques to be quite similar.

Supported by a grant from the USPHS (NS07681).

MULTI-SITE, MULTI-BARRIER, MULTI-OCCUPANCY MODELS FOR THE ELECTRICAL BEHAVIOR OF SINGLE FILING CHANNELS LIKE THOSE OF GRAMICIDIN. Jarl Hägglund, Bruce Enos and George Eisenman. Dept. Physiol., UCLA Medical School, Los Angeles, Ca. 90024.

The theoretical expectations for concentration dependences of a number of electrically measurable properties of channels are examined for models of increasing degrees of complexity, with the aim of establishing experimental criteria for distinguishing between these and finding the simplest one appropriate to ionic channels, such as gramicidin A. Only symmetrical channels permeable solely to cations in the presence of a single electrolyte are considered. Solely cation-binding models having 2, 3, and 4 cation binding sites and 3, 4, and 3 rate determining barriers, respectively, are examined, as well as a model with 2 cation binding sites, and 2 (modulatory) anion binding sites. The models take into account the voltage dependence of the rate constants across all barriers; and the "shape" of the central barrier has been modeled as a region of symmetrically spaced equilibrium sites of low occupancy. All models are compared for the concentration dependent behavior of three sets of electrical properties: the channel conductance at zero current (G_0), the shape of the conductance-voltage (G-V) characteristic, and the flux ratio exponent. The behavior of each of these properties is compared and related to the occupancy and to the rate constants. After the common, as well as distinguishing, features of the models have been compared generally, a specific comparison is made for gramicidin A utilizing relatively complete data now existing for RbCl, as well as other alkali cation salts. The G-V characteristic is especially emphasized since, contrary to the present view of a simple monotonic change from "saturating" to "hyperbolic" G-V shape with increasing concentration, models with more than two cation sites exhibit not only different levels of saturation for different occupancies but also can show an additional saturating-hyperbolic transition at lower concentrations. For comparison with theory we will present the results of our studies in progress on single-channel G-V characteristics of gramicidin A at ultra-low concentrations (e.g. .02mM) deduced from many-channel measurements as well as unpublished single channel conductance-voltage measurements for RbCl at conventional concentrations made available to us by Andersen. For comparison in the ultra low concentration region the concentration dependence of G_0 of single channels will be cited from the unpublished noise measurements of Neher, Sandblom and Eisenman, where conductances as low as 8×10^{-15} siemens per channel have been measured.

Supported by NSF (PCM 7620605) and by USPHS (GM 24749 and Fogarty International Research Fellowship TW 2468).

PROPERTIES OF MEMBRANE CHANNELS FOR THE ANOMALOUS RECTIFICATION IN STARFISH EGG.

Susumu Hagiwara. Dept. Physiol., U.C.L.A. Medical School, Los Angeles, Calif., U.S.A.

The resting membrane of a starfish egg is predominantly permeable to K^+ and this K conductance shows anomalous or inward rectification (2,3) similar to that originally found in frog twitch fiber by Katz (1). Voltage clamp analysis shows the rectification has instantaneous and time dependent components. When the external ion composition is altered: (A) The rectification depends on $V-V_K$ rather than V alone (4). (B) The K conductance at a given $V-V_K$ is roughly proportional to the square root of the external K concentration (2). (C) External Na^+ and Li^+ and organic monovalent ions such as NH_4^+ , Choline⁺, Tris⁺, Arginine⁺, etc. have no effect on the rectification (2). (D) Cs^+ is impermeant but shows a strong membrane potential dependent blocking effect (2,4). (E) Rb^+ is slightly permeant but it also shows a blocking effect (2). (F) Tl^+ is more permeant than K^+ when the total K is replaced with Tl but a small amount of Tl in K solution shows a blocking effect, thereby resulting in so called "mole fraction" dependent permeability (2,5). (G) Ba^{++} at low concentrations shows a membrane potential dependent blocking effect. A similar but much smaller blocking effect is seen for Sr^{++} (6). The result is different in a number of points when the internal ion composition is altered by intracellular dialysis and this will be discussed in detail (7).

(1) Katz, B., 1947, Arch. Sci. Physiol. 3:285. (2) Hagiwara, S. & Takahashi, K., 1974, J. Gen. Physiol. 18:61. (3) Miyazaki, S., Ohmori, H. & Sasaki, I., 1975, J. Physiol. 246:55. (4) Hagiwara, S., Miyazaki, S. & Rosenthal, P., 1976, J. Gen. Physiol. 67:621. (5) Hagiwara, S., Miyazaki, S., Krasne, S. & Ciani, S., 1977, J. Gen. Physiol. 70:269. (6) Hagiwara, S., Miyazaki, S., Moody, W. & Patlak, J., 1978, J. Physiol. Vol. 279 (in press). (7) Hagiwara, S. & Yoshii, M., 1978, (in preparation).

THE SURPRISING PROPERTIES OF LONG PORE, SINGLE-FILE IONIC CHANNELS. Bertil Hille and Wolfgang Schwarz. Dept. Physiol. and Biophys., Univ. Washington, Seattle, Washington, U.S.A. and Physiol. Inst., Univ. Saarland, Homburg, Germany.

A theoretical study was made of a pore with multiple internal binding sites in which ions move in single file by a vacancy-diffusion mechanism. Such multi-ion models were first proposed by Heckmann (1965) to explain the observations of Hodgkin and Keynes (1955) on uni-directional fluxes of potassium ions in Sepia axons deviating from the Ussing (1949) ratio. These models also have the following properties found in a variety of delayed rectifier and inward rectifier K channels:

(1) Ionic conductance can depend upon the 0.5 (or other) power of $[K]$. (2) The block with small blocking ions, e.g., Cs, can vary as the Cs concentration raised to a power higher than 1 and can depend upon membrane potential more steeply than a one electron process. (3) Block by an impermeant ion placed on one side may be strongly antagonized by a permeant ion placed on the other side. As proposed by Armstrong (1969), these first three properties make such models with blocking ions well suited for explaining the properties of inward rectification. The steepness of the rectification and its dependence on $E - E_K$ are well explained. (4) The ionic selectivity (P_S/P_K) measured by reversal potential depends not only upon the barriers inside the channel, but also on the concentration of ions on the two sides of the membrane. Selectivities may even reverse in going from low concentrations to high concentrations, and in mixtures of the ions, so-called "anomalous mole fraction dependence" of reversal potentials and conductances can be observed. These effects arise because the apparent permeability of the channel depends upon the number and type of occupying ions. The similarity of our calculations with the properties of K channels studied in axons, muscle, and a variety of eggs provides new evidence that inward rectifier and delayed rectifier K channels are multi-ion, single-file pores.

TEA AND 4-AP AFFECT SEPARATE POTASSIUM AND CALCIUM CHANNELS DIFFERENTLY IN APLYSIA S- AND F- NEURONS. Manfred R. Klee, MPI Brain Research, Dept. Neurobiology, Frankfurt-M., Federal Republic Germany

In the visceral ganglion of Aplysia californica two types of neurons exist: Cells with slowly repolarizing action potentials (S cells) and those with fast repolarization (F cells). Their differences are: In low Ca^{++} solution the slope of rising and falling phases of APs of S cells is reduced, but enhanced in F cells. In O-Na^+ solution inward current of both types is strongly reduced but more in F cells. In voltage clamp F cells display a linear I/V relationship for the outward current which is N-shaped in S cells due to a Ca^{++} dependent K^+ current $\text{I}_{\text{K}(\text{Ca})}$. Double pulses with short interval or short hyperpolarizing pulses during depolarization can activate additional outward current in S cells within the range of maximum and even minimum $\text{I}_{\text{K}(\text{Ca})}$. I: Extracellular tetraethylammonium (TEA, 5-50 mM) induces Ca^{++} dependent plateau spikes in S cells but not F cells. TEA extensively reduces the outward current in the voltage range up to +100 mV, in S more than in F cells. In contrast, in the range up to +250 mV the reduction is minimal and the remaining current is resistant to cobalt. TEA blocks the Ca^{++} and frequency activated component of the K^+ current in S cells. The fast outward current I_{A} , only observable in S cells, is unchanged. II: 4-aminopyridine (4-AP, 5-25 mM) slows repolarization and increases spike duration in F cells more than in S cells. The outward current is reduced in both types in the lower voltage range but, as in TEA, is unchanged in the higher range. Maximum and minimum $\text{I}_{\text{K}(\text{Ca})}$ in S cells is shifted to lower voltages, by as much as 150 mV. I_{A} is blocked. F cells exposed to TEA after 4-AP generate plateau spikes.

PHYSICOCHEMICAL ASPECTS IN FUNCTIONAL MEMBRANES. Yonosuke Kobatake
 Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido Univ. Sapporo, Japan

Chemotactic responses of lower organisms are considered to be a prototype of chemoreception and its transducing systems in higher vertebrates. Stimulus-response relations were examined with ciliate protozoan *Tetrahymena*, plasmodia of *Physarum polycephalum* and excitable alga *Nitella*. The threshold concentration (C_{th}) to various chemicals were determined by measuring the membrane potential ($\Delta\psi$), extrinsic fluorescence, zeta-potential (ζ), motive force of taxis (ΔP) and chemotactic response.

(1) The C_{th} determined from $\Delta\psi$, ζ , ΔP , etc. agreed well each other in all cases examined. (2) The C_{th} for salt reception followed the Schulze-Hardy rule. (3) The C_{th} for 1:1 salts decreased with the lyotropic number of anions, N , and followed the equation: $\log C_{th} = -\alpha N + \text{const.}$ α represents the cation selectivity of the membrane, and follows the sequence: $\text{Li}^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+ > \text{NH}_4^+$ for *Physarum*. (4) Reception of a chemical stimulus induced a remarkable change in the sequence of cation selectivity. (5) Interference between sugar and salt receptions was correlated intimately with the lyotropic number of anions, suggesting that the interactions are coupled through the water structure around the membrane. (6) An increase in the number of $-\text{CH}_2-$, n , in a homologous compounds, e.g. n -alcohols, decreased the C_{th} systematically, and expressed as $\log C_{th} = -\beta n + \text{const.}$ β represents the difference in chemical potential of a $-\text{CH}_2-$ group between aqueous medium and membrane phase, and affords a measure of the hydrophobicity of biosurfaces.

These results are compared with those of vertebrates, and physicochemical mechanism of chemoreception is discussed.

KINETICS OF CALCIUM INWARD CURRENT ACTIVATION. P.G.Kostyuk,
O.A.Krishtal, V.I.Pidoplichko, Yu.A.Shakhovalev. Bogomoletz Inst.
 Physiol., Acad. Sci. Ukrainian SSR, Kiev, USSR.

A further modification of the method of intracellular dialysis has been developed which allows to achieve resolution times about 70-150 μ sec. In such experiments the isolated cell is located between two dialyzing pores. One of them is used for the potential measurement, and the feed-back current is injected through the other one. This technique of experiments allows to eliminate about 95% of the series resistance and simultaneously makes the substitution of the intracellular medium very rapid and effective.

Using this technique, precise measurements of the Ca inward and corresponding gating currents were made in neurones enzymatically isolated from the ganglia of the snail *Helix pomatia*. Temperatures between 2 and 22°C were used. Gating and ionic currents were digitally separated in order to obtain reliable information on the initial period of the Ca current development. A definite delay in the development of the Ca ionic current is detected after the subtraction of the gating current. The residual net ionic current can be perfectly approximated by the m^2 model. τ_m for the ionic current and τ_{on} for the corresponding gating current are practically the same. A good fit of the Ca current to m^2 kinetics is well supported by the voltage dependence of the gating charge distribution curve, which coincides with the m_∞ voltage dependence. The especially slow inactivation of Ca current which does not interfere in practice with the activation process may be one of the reasons helping to obtain more precise data about the activation kinetics of this current.

A MODEL FOR SYNAPTIC TRANSMISSION. Rodolfo Llinás, Izchak Z. Steinberg and Kerry Walton. Dept. of Physiology & Biophysics, New York Univ. Med. Ctr., 550 First Ave., New York 10016, U.S.A.

A microelectrode voltage clamp study was performed in the presynaptic terminal of the squid giant synapse in order to determine the magnitude and kinetics of the inward calcium current which triggers transmitter release. Sodium and potassium voltage-dependent conductances were blocked with tetrodotoxin and tetraethylammonium respectively. The results obtained were utilized to develop a model for synaptic transmission. Basically, the calcium conductance was found to follow a fifth order kinetic dependence on time and voltage, while the tail current seemed to obey a first order scheme. The model includes a calcium-dependent release process and many of the functional properties of the postsynaptic element and reproduces many of the properties of chemical synaptic transmission. (Supported provided by USPHS grants NS-13742 and NS-14014)

EFFECTS OF 4-AMINOPYRIDINE ON THE MYONEURAL SYSTEM. Takashi Maeno, Mitsuo Anraku and Saburo Hashimura. Dept. Physiol., Shimane Med. Univ., Izumo, Japan and Dept. Physiol., Fac. Med., Kagoshima Univ., Kagoshima, Japan.

4-Aminopyridine (4AP) has been shown to block the increment in potassium conductance of the excitable membrane. Recently, it was found that 4AP enhanced the twitch contraction of normal as well as dantrolene treated muscle preparations. Since such a potentiating effect of 4AP on the muscle contraction was not observable on the glycerol treated muscle preparations, one of highly possible sites of action of 4AP was thought to be the transverse tubular system of the muscle fiber.

While studying the effects of 4AP on the neuromuscular transmission, we found that 4AP potentiated the EPP by increasing the probability of release of an ACh quantum from the nerve terminal by an impulse. The facilitatory effect of 4AP on the myoneural junction was so remarkable that in the presence of 1 mM 4AP about 90% of readily available ACh quanta were released by a single nerve activity; thus resulting in transmission block due to depletion of the transmitter. TEA has been known to possess similar effect, but its effectiveness was about 40 times weaker than that of 4AP.

Since calcium ions play very important role in both muscle contraction and transmitter release, the effects of 4AP described above might be explained that it opens up the gate of particular calcium channels in the membrane, majority of which remains in the closed state under normal conditions.

MEMBRANES, CHANNELS AND GATES, Paul Mueller. Dept. Mol. Biol., Eastern Pennsylvania Psychiatric Institute, Philadelphia, Pennsylvania, U.S.A.

Many of our current ideas about membrane channels and gating mechanics have been derived from bilayer studies. By now about a dozen molecules forming channels in bilayers have been analyzed in detail and prototypes of several molecular channel structures and possible gating mechanisms have been identified. They can be classified according to their structural aspects. In the simplest case, e.g., a covalently linked gramicidin dimer, a single peptide chain forms a beta helix spanning the entire bilayer in which the polar groups face inward toward a central pore, while the outer non-polar groups interact with the hydrocarbon chains. In other cases, e.g., the polyenes, alamethicin, and perhaps EIM, the channel is formed by the aggregation of several individual molecules or subunits, each spanning part or all of the hydrocarbon region, forming a central pore between the subunits. In cases where a single large protein forms a channel, e.g., colicin K, it is not known if the channel itself is a single helix or an aggregate of beta chains or alpha helices. In several cases (nystatin, amphotericin, gramicidin A) the channels extend only through one half of the bilayer, a complete channel being formed through the link up of such half channels. Just as there are several structural principles governing channel structure, there also seem to be different gating mechanisms. Insertion of the channel former into the hydrocarbon region followed by aggregation seems to be operative for alamethicin, monazomycin and certain polyenes. Even the simple gramicidin helix shows electrical gating, but the mechanism is not yet understood. A field induced change of membrane thickness, a configurational change of the helix or a voltage induced lateral phase separation between lipids and channel former are the three possibilities currently being considered. Kinetic measurements alone cannot determine which one of these different mechanisms is operative in the channels of nerve or muscle but current evidence seems to favor models involving changes of subunit interactions or configurational changes rather than the aggregation of freely diffusing subunits.

GABA RECEPTOR AND IONIC CHANNELS ON THE ONCHIDIUM NEURON. Yutaka Oomura, Juro Maruhashi*, and Nobuaki Shimizu. Dept. Physiol., Fac. Med., Kyushu Univ., Fukuoka 812 Japan and *Dept. Biol., Daiichi Col. Pharmaceu. Sci., Fukuoka 815 Japan.

In the ganglia of onchidium verruculatum, there are a few GABA responding neurons which have two different membrane potential changes: one is an early transient hyperpolarization caused by desensitization; the other is a later continuous hyperpolarization. The membrane conductance increases about 5 fold in the first phase (phase I) and two fold in the second (phase II). Phase I is produced by an increase in Cl^- permeability, and phase II by K^+ permeability increase. Chemical modification of $\epsilon\text{-NH}_3^+$ of lysine residues by 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid or pyridoxal 5-phosphate block phase I. N-acetylimidazole, a tyrosine-specific reagent, and tyrosinase always block phase II almost completely, and partially block phase I. These results indicate that GABA opens Cl^- channels which contain $\epsilon\text{-NH}_3^+$ groups of lysine residues and K^+ channels which contain OH groups of tyrosine residues. Other possible amino acid side chain residue interactions on GABA receptor sites and ionic channels are discussed.

SODIUM CHANNELS IN MUSCLE AND NERVE. J. Murdoch Ritchie, Department of Pharmacology, Yale University School of Medicine, New Haven, CT 06510.

The two toxins, saxitoxin and tetrodotoxin, which specifically block the sodium channels in excitable tissue, have been used as specific chemical markers for this important component of excitable membranes. Experiments with exchange-labelled saxitoxin confirm the conclusion from electrophysiological experiments that these toxins have a high affinity for the sodium channel, having an equilibrium dissociation constant of the order of a few nanomolar. They bind to a metal cation binding site in the sodium channel to which a variety of trivalent, divalent and monovalent cations (including hydrogen ions) also bind. Local anesthetics do not interfere with this binding and clearly bind to some other site(s) in the channel. The maximal saturable binding capacity binding of the toxins to excitable membrane, which provides a measure of the density of sodium channels, indicates that in most tissues (mammalian and amphibian muscle; mammalian, fish and squid non-myelinated nerve) the channel density lies between $35\text{--}500/\mu\text{m}^2$. In mammalian myelinated nerve, however, the internodal axonal membrane seems to be devoid of sodium channels: on the other hand, the channel density in the nodal region is extremely high, being about $10,000/\mu\text{m}^2$. The latter calculation is based on a nodal area (for a $15\text{ }\mu\text{m}$ diameter fiber) of $60\text{ }\mu\text{m}^2$. There is, however, a good deal of uncertainty about this latter value; and the nodal density may be smaller by a factor of 2-3.

COMPARATIVE PHARMACOCHEMICAL STUDY ON THE ACETYLCHOLINE-RECEPTORS OF THE EXCITATORY AND INHIBITORY TYPES. Makoto Sato, Juro Maruhashi, and Hideko Yai. Dept. Physiol., Sch. Med., Iwate Med. Univ., Morioka, JAPAN.

Using the abdominal ganglion cells of *Aplysia*, we analyzed the effects of various enzymes and chemical modification reagents on the ACh-induced responses of the excitatory (Na^+ dependent) and inhibitory (Cl^- dependent) types. ACh-induced responses were evaluated from the conductance increase (ΔG) of the receptor membrane. (1) Phospholipase A: ACh-induced responses of either type were not greatly altered. (2) Phospholipase C: Both types of ACh-responses were markedly depressed after a 20-minute exposure to this enzyme (2mg/ml), suggesting that the phosphoryl group of the phospholipid is an important site common to both types of receptors. (3) Carboxypeptidase A: ACh-responses of either type were not altered by this enzyme. (4) Carboxypeptidase B: ACh-responses of the inhibitory type were significantly depressed by a 60-minute exposure to this enzyme (0.1%) whereas those of the excitatory type were not altered appreciably. (5) Pyridoxal-5'-phosphate (PLP): A 10-20 minute exposure to 1.0 mM PLP irreversibly depressed the ACh-responses of the inhibitory type, whereas one hour exposure did not alter the ACh-responses of the excitatory type. These findings (4,5) suggested that the inhibitory ACh-receptor includes a C-terminal lysine which may play an active role in the movement of Cl^- across the receptor membrane. (6) L-leucine aminopeptidase: ACh-responses of the excitatory type were significantly depressed after a 30-minute exposure to this enzyme (1mg/ml), whereas those of the inhibitory type were not appreciably altered even after a 3-hour exposure. (7) p-Nitrothiophenol (NTP): ACh-responses of the excitatory type were significantly depressed after a 5-minute exposure to 1 mM NTP, whereas those of the inhibitory type were not affected even after one hour exposure. These findings (6,7) suggested the presence of a certain N-terminal amino acid related to L-leucine near a glutamate or aspartate residue within a molecular moiety of the excitatory ACh-receptor.

SOME PROPERTIES OF IONIC CHANNELS IN THE EGG CELL MEMBRANE. Kunitaro Takahashi, Dept. Neurophysiol., Inst. Brain Res., Fac. Medicine, Univ. of Tokyo, Tokyo, Japan.

Recent studies on the egg cell membranes of the tunicate, the echinoderm and the mammal have demonstrated the existence of the electrical excitability which is characteristic for the differentiated excitable membranes of nerve and muscle cells. Ionic channels found in the egg membrane showed identical properties with those of other excitable membranes. The selectivity ratios for Na channels in the tunicate egg were estimated as $\text{Li}:\text{Na}:\text{K}:\text{Rb}:\text{Cs} = 1.0:1.0:0.14:0.05:0.04$ and the kinetics of the current was described by Hodgkin & Huxley typed parameters. The egg Na channels had permeability to divalent cations as the Na channels in the squid axons, having the selectivity sequences of $\text{Ca} > \text{Sr} > \text{Ba}$. The Ca channels which are known to be characteristic for the crustacean muscle or the nerve terminal were also found in the tunicate egg. Those densities of ionic channels in the egg membrane were specifically modified by intracellular fluoride ions or Ca ions during intracellular perfusion applied upon the tunicate egg cell. The effects of fluoride ions were to enhance the Na channel densities and to abolish the Ca current, being similar to those in case of intracellular perfusion of the squid giant axons or the molluscan giant nerve cells. The intracellular Ca ions showed also a reciprocal effect on the egg Na and Ca channels, with Ca ion concentration more than 10^{-6}M Na current being doubled while Ca current becoming less than half. The effects seem very specific for egg cell membrane. It is suggested that the Ca effect may be closely related to the dynamic changes of the egg membrane during activation by the fertilization or the Ca ionophore.

PHYSIOLOGICAL ROLE OF HISTIDINE RESIDUES IN THE
INNER SURFACE MEMBRANE OF THE SQUID GIANT AXON.

Toshifumi Takenaka, Tohru Yoshioka, Hidenori Horie, Hiroko
Inoue and Kimie Inomata, Dept. Physiol., Yokohama City Univ.,
Urafune-cho, Minamiku, Yokohama, JAPAN.

The phenomenon of the membrane excitability was studied by modifying imidazole group through the exposure of the interior of squid axons to potent photo-oxidizing agents. The giant axon of squid, *Doryteuthis bleekeri*, were intracellularly perfused with KF solution and voltage-clamped with an axial wire system. After 1 - 2 μ M rose bengal was introduced into the perfusion solution, the axon was illuminated with a 100 quartz-iodine lamp. The resting potential was depolarized about 4 - 6 mV, but the excitability was completely maintained. Then the rose bengal was washed out with the dye free perfusion solution before conducting a voltage-clamp experiments. After photo-oxidation the amplitude of the late outward current was strongly depressed, while the early inward current had little effect. Radio-labelled iodosulfanic acid was used as a membrane labelling agent. The perfusate and the membrane material were counted and analyzed by the SDS gel electrophoresis. During the photo-oxidation, the radio-activity of the perfusate was increased. These results indicate that the histidine residue is mainly associated with the membrane components involved in the control of the late outward current.

INHIBITORY POSTSYNAPTIC CURRENT IN THE CRAYFISH MUSCLE.

Akira Takeuchi. Dept. Physiol., Juntendo Univ. Schol. Med. Hongo, Tokyo, Japan.

The inhibitory postsynaptic currents (i.p.s.c.) were recorded from the neuromuscular junction of the crayfish (Cambarus clarkii). For this purpose the opener muscle of the claw in the crayfish was cannulated with a longitudinal metal electrode and the voltage clamp method was employed. The i.p.s.c. reversed its sign at about -70 mV and the time course of i.p.s.c. was several times longer than that of excitatory postsynaptic current (e.p.s.c.) recorded from the same muscle fiber. The effects of membrane potential, temperature, foreign anions and repetitive stimulation on the time course of i.p.s.c. were investigated. The declining phase of the i.p.s.c. was approximately exponential and the decay time constant was decreased by hyperpolarization and increased by depolarization of the membrane potential. Thus the voltage dependence was opposite in direction to that seen at frog end-plates, but in the same direction with that of e.p.s.c. in crayfish muscle. Q_{10} for the decay time constant was 2.4.

CHEMICAL AND ELECTRICAL RECEPTOR SITES ON THE SURFACE OF THE SQUID AXON MEMBRANE.

Ichiji Tasaki. Lab of Neurobiology, National Institute of Mental Health, Bethesda, Md. 20014 U.S.A.

Using various chemical stimulants combined with real-time spectrum-analyzer, periodic electric signals of 1 to 30 μ V (peak-to-peak) across the squid axon membrane were recorded. The chemical stimulants used include reagents which alter the primary structure of proteins (such as N-bromosuccinimide, glutaraldehyde, rose-bengal combined with light, etc.), nerve poisons (scorpion venoms, veratridine, etc.) as well as low Ca. The frequency spectra of these responses were always broad extending usually from 100 to 200 Hz at room temperature (19° C). The frequency of response maximum (usually about 150 Hz) was decreased by lowering of the temperature, as well as by intracellular injection of tetraethylammonium (TEA). Tetrodotoxin (TTX) was found to suppress the miniature responses completely.

The spectra of the miniature responses evoked by scorpion venoms were found to be very irregular. There is little doubt that this irregularity is caused by the difference in the frequency of periodic responses at different membrane sites. As the effect of the chemical stimulant advanced, there was a gradual enhancement of the response amplitude, indicating that the number of membrane sites involved in production of miniature responses was increased. When the response amplitude exceeded about 100 μ V, there was a strong tendency toward synchronization of periodic responses.

The resting membrane potential was measured during the course of the development of miniature responses. With scorpion venoms, 4-dimethylaminopyridine, low calcium, etc., the production of miniature responses was not preceded by a fall in the membrane potential. This finding strongly suggests that these responses are not produced by potential-dependent changes in the membrane conductance. The origin of these responses is discussed.

MULTILAYERED STRUCTURE OF THE SQUID AXON MEMBRANE REVEALED BY CONDUCTANCE MEASUREMENTS. Akira Watanabe and Misako Nagano, Dept. Physiol., Tokyo Med. Dent. Univ., Bunkyo-ku, Tokyo, 113 Japan.

When a uniform membrane separates two solutions of an identical electrolyte at different concentrations, the mobility $\bar{u}$ of the counterion is correlated with the membrane conductance g by a simple formula: $g = F^2 \bar{X} \bar{u} / \Delta$, where F is Faraday, $\bar{X}$ the fixed charge density, and Δ the membrane thickness. We attempted to obtain relative values of $\bar{u}$ from squid giant axons under these mono-ionic conditions. However, the squid axon, immersed in 100 mM NaCl solution with no Ca and intracellularly perfused with 30 mM NaF, gave very small membrane potentials (several millivolts) although the theory predicts about 30 mV. This shows that the squid axon membrane does not behave as an ideal cation-exchange membrane without external Ca. When Ca was added to the external medium, the excitability was maintained, and the membrane potential at the peak of impedance loss agreed with the ideal value within several millivolts. With the use of the voltage-clamp we measured the membrane conductance at this time. The conductance of (Na/Na) system (left of the bar: cation in external medium; right: cation in internal medium), was almost the same with that of the (K/K) system. The (Rb/Rb) system gave lower conductances. In a homogeneous membrane the theory predicts that the conductance under the bi-ionic conditions is given by the formula

$$g(\text{Na/K}) = \frac{g(\text{Na/Na}) \cdot g(\text{K/K})}{g(\text{Na/Na}) - g(\text{K/K})} \ln \frac{g(\text{Na/Na})}{g(\text{K/K})}$$

where g 's represent conductances under ionic environments indicated. With (Na/Rb) and (K/Na) the observed values were close to the prediction, but with (Na/K) the observed values were about twice as large as the calculated values. The experiment shows that the membrane is asymmetric in its properties toward the univalent cations. Conceivably the solubilities of Na and K are different between external and internal layers.

Ca_i PRODUCED SPIKE IN INTRACELLULARLY PERFUSED SQUID GIANT AXONS.

Shunichi Yamagishi. Laboratory of Membrane Biology, National
Institute for Physiological Sciences, Myodaiji, Okazaki, Japan.

Squid giant axons obtained from Doryteuthis bleekeri were immersed in artificial sea water and were perfused intracellularly with 25mM KF solution. The tonicity of the solution was adjusted to about 1.2 Osmoles by adding glycerol. In this condition, the resting and action potentials were -35mV and 120mV respectively. When the 25mM KF solution was replaced with a CaCl₂ solution at the concentration between 10 and 30mM, a gradual small hyperpolarization was observed. Then the membrane potential abruptly turned to a large depolarization, or a spike which reached to about 100mV. During this event no electrical stimuli were applied. When the membrane potential was clamped at the resting level, an inward current suddenly appeared during the intracellular perfusion of Ca ions. Therefore, this phenomenon is considered to be a chemically stimulated excitation caused by an action of Ca ions to the internal surface of the membrane of the axon.

CHEMICAL MODIFICATION OF MEMBRANE PROTEINS IN THE SQUID GIANT AXON. Tohru Yoshioka, Toshifumi Takenaka, Hidenori Horie, Hiroko Inoue, Kimie Inomata and Hideaki Hori. Dept. Physiol. Yokohama City Univ. Urafune-cho Minami-ku Yokohama JAPAN.

The membrane labelling techniques currently in use are derived from the chemical modification methodology developed for studying structure-function relationships in protein. Since it was rarely possible to determine which protein was crucial to maintain excitability, several independent labelling methods were examined.

The major breakthrough in the analysis of membrane proteins occurred with the application of SDS polyacrylamide electrophoresis to the fractionation of the membrane proteins.

Visualization of the proteins in SDS polyacrylamide gels can be achieved by staining with Coomassie Blue. Radioactive labels have been used in our study, and radioactivity of sliced gels was counted by gamma counter and liquid scintillation counter. The obtained results are summarized as follows.

- 1) Iodination of isolated nerve fiber membrane was performed by [125 I]-Bolton-Hunter reagent. Isolation of nerve membrane fraction was carried out according to Villegas's method. Major peaks of iodinated protein were 180, 70, 63, 47 and 17×10^3 daltons.
- 2) Iodination of inner surface of perfused squid giant axon membrane by enzymatic iodination procedure yielded a major peak of $17-12 \times 10^3$ daltons.
- 3) Iodination of inner and outer surface of squid giant axon membrane by [125 I]-diazotized iodosulfanilic acid determined transmembrane proteins, whose molecular weight were 150, 63, 55 and $17-12 \times 10^3$ daltons.
- 4) Protein phosphorylation of the intact axon showed a major peak at the molecular weight of $17-12 \times 10^3$ daltons.
- 5) Photoaffinity labelling of intact axon by [3 H]-Arylazido- β -alanin-TTX made a dominant peak at 250×10^3 daltons.
- 6) Incorporation of [14 C]-Thiamin into membrane protein was found at 250, 180, 150 and 70×10^3 daltons.
- 7) Distribution of tublin (55×10^3 daltons) were visualized in a perfused axon and intact axon by immunofluorescent anti-tublin staining technique.

EXCITABLE ION CHANNELS IN A CALCIUM TYPE MUSCLE MEMBRANE OF THE CRAYFISH. Jozef Zachar, Michal Henček, Inst. Normal and Pathological Physiology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Czechoslovakia.

A circular membrane patch ($d = 60 \mu m$) was isolated reversibly by means of an annular sucrose gap method (1) in striated muscle fibres of the crayfish. The total ionic current recorded under voltage clamp conditions (2) was found to consist from at least four ionic components. The early inward current is carried by calcium ions; the remaining outward currents by potassium ions. The individual current components were separated from each other by means of pharmacological agents and using the differences in the reversal potentials. Quantitative analysis of the individual ionic chord conductances as functions of time and membrane potential showed, that the ion conductances can be described by Hodgkin-Huxley equations (3) of the following type. The calcium conductance (g_{Ca}) by $g_{Ca} = \bar{g}_{Ca} m^6 h$; the early (g_{K1}) and the late (g_{K2}) by $g_{K1} = \bar{g}_{K1} u^3 k$ and $g_{K2} = \bar{g}_{K2} n^4$ respectively, where $\bar{g}_{Ca}$, $\bar{g}_{K1}$ and $\bar{g}_{K2}$ are constants, m , n , u represent the activation and h , k the inactivation variables, which obey differential equations of the following type $dy/dt = \alpha_y (1 - y) - \beta_y \cdot y$, where y stands for m , n , u , h and k respectively. The rate constants (α_y , β_y) were determined by fitting the solutions of the above equations to the experimental values of corresponding ion conductances. The data obtained by the fitting procedure enabled to stimulate the membrane behaviour under the current a voltage clamp conditions.

(1) Henček M., Nonner W., Stämpfli R. (1969): Pflügers Arch. 313, 71-79

(2) Henček M., Zachar J. (1977): J. Physiol. 268: 51-71

(3) Hodgkin A.L., Huxley A.F. (1952): J. Physiol. 117: 500-544

癌細胞のホルモンレセプター

寺山 宏 東京大学・理

正常細胞における各種代謝活性は各種のホルモンにより厳重に調節されている。細胞増殖に關係する代謝活性についても決して例外ではない。一方癌細胞の増殖は従来自律的増殖性と呼ばれ、ホルモン支配からの逸脱が考えられる。

以上の見地に立って、肝その他の組織細胞の増殖を阻害する事の知られている3種のホルモン、即ちプロスタグランジンE₁ (PG E₁)、エピネフリン(Epi)およびグルココルチコイドについて、その作用機構に關係があるホルモンレセプター、アデニルシクラーゼ、両者のカップリングに必要な因子としてのGTPの作用、その他について各種の肝癌細胞を用いて、ホルモン感受性のある正常肝細胞その他と比較しながら解析を行なった。その結果、次々要約する如き成績を得た。

- (1) PGE₁ に対し正常肝細胞膜は親和性を異にする2種のレセプターを有し、その何れもがPG E₁ によるアデニルシクラーゼの活性化に關与する。一方腹水肝癌細胞膜には、PG E₁ に対する特異的結合部位もなければ、そのアデニルシクラーゼも全く影響を受けなかった。
- (2) Epi に対し正常肝細胞膜は α -と β -の両種のレセプターを有するが、Epiによるアデニルシクラーゼの活性化に關与するものは、その中 β -レセプターのみである。一方肝癌細胞膜も量的にも質的にも全く同様な両レセプターを有することが判明した。にもかかわらず肝癌細胞膜のアデニルシクラーゼはエピネフリンに対し非感受性であった。この原因を解析した結果、レセプターシクラーゼのカップリングに必要なGTPに対する親和性が肝癌細胞膜系では正常肝細胞膜系に比し遙かに低下していることが明らかにされた。
- (3) 細胞質中のグルココルチコイドに対するレセプターは質的には感受性(肝, Fu5)と非感受性(AH-130, AH-7974)で差はないが量的には感受性細胞の方が非感受性のものより多い。またホルモンレセプター結合体の活性化を阻害したり、活性化結合体の核への移行を阻害する細胞膜質因子は非感受性細胞の方が量的に多かった。グルココルチコイドの作用は最終的には核に入り、その遺伝子活性の発現を調節することにあると考えられるので、ホルモンとインキュベート後に核を分離し核中に入ったホルモン

量を比較した結果非感受性細胞核の方がとりこみ量が少なかった。しかし上述の様な量的な差が果して、肝やFu5と各種腹水肝癌細胞間にみられたDNA合成阻害やチロシンアミノトランスフェラーゼ誘導についてのall or none的な感受性の相違を説明しうるか否かについては尚疑問が残る。今後核内のホルモン結合部位の解析等を行なう予定である。

一方、肝細胞膜についてコルチゾル結合部位の存在が確認されたが、細胞膜上のコルチコイド結合部位は肝癌では量的に著しく低下していた。この膜上の結合部位がいかなる生理活性に関与するかわ今後の研究に俟つ所が多い。

Onset of ionic coupling between mammalian cells
demonstrated with homocaryons of BT5C2 tumor cells

Prof. Dieter F. Hülser

Universität Stuttgart
D-1000 Stuttgart-60

Cultures of permanently growing cells may be separated by their ability to form low resistance junctions between each other. This different ionic coupling is not necessarily correlated to their different growth after retransplantation in vivo (malignancy). The membrane junctions allowing the passage of ions from one cell to an adjacent one are the so called gap junctions. It appears as if the total number of gap junctions per unit area is of the same order in both coupled and uncoupled types of membranes. The lateral mobility, however, may be changed and, therefore, no protein aggregation can take place in the membranes of noncoupled cells. Experiments to change the fluidity in these cells by addition of lipophilic and fatty acids were until now not successful. Since in many cases microfusions occurred, the effect of gap junctions was mimiced.

For an indirect determination of a different membrane fluidity in these two cells clones, we chose the membrane-bound $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase, which was inhibited by ouabain. The investigation of 9 different cell lines clearly subdivided the cells lines into two groups (10^{-6} M ouabain and 10^{-3} M ouabain for depolarization). The first group consists of non-coupled cells, the second one of coupled cells.

Fusion of the cells with 45% polyethylene glycol led to homocaryons which enables long term experiments with

microelectrodes. The electrical properties of the homocaryons were always similar to that of their parental cells and thus, we were able to follow the onset of intercellular coupling between homocaryons of BT5C2 tumor cells. The mean time after which coupling appeared about 20 min. (30 exp.):

- During long term experiments sometimes spontaneous hyperpolarizing oscillation of the membrane potential occurred.

ムスカリニック・アセチルコリン・リセプター

吉田 博 大阪大学・医

I ラット脳シナプス形質膜への ^3H -Ach (アセチルコリン) および ^3H -atropineの結合を検討して次のような結果を得た。

- a) シナプス形質膜に対し両者とも可逆的で高親和性の結合部位をもつ、 K_p 値はAch $2 \times 10^{-8} \text{ M}$, atropine 10^{-9} M , 最大結合量: Ach, $0.8 \sim 1.2 \text{ pmoles/mg 蛋白}$, atropine 1.5 pmoles/mg 蛋白 であった。このAchのsaturableな結合は殆んど凡てatropineで阻害され、阻害様式は拮抗的で、ムスカリニックリセプターへの結合と考えられる。
- b) シナプス形質膜をDTNBで前処置するとAchの最大結合量を約 1.5 pmoles/mg 蛋白 に増加させたが、atropine結合には影響を与えなかった。同様な知見はNEM処置によっても得られ、agonist結合にはニコチンクリセプターと同様にS-S基が重要な意味を持つが、antagonist結合には有意でない。
- c) muscarinic agonistは ^3H -atropineあるいはQNBの結合を阻害するが、その作用は上述の K_p 値および末梢臓器への作用強度から予測されるよりも遙かに弱い。
- d) Na^+ , Ca^{++} の有無はagonist, antagonistの結合に無影響であった。

II a) ラットにくり返し寒冷刺激を加えるとその小腸のAch反応性は低下する。この際、小腸のmuscarinic receptor量は ^3H -QNBの結合法により著明に減少していた。

- b) ラットにDFPを注射しても小腸のAch反応性が低下し、同様に小腸でのmuscarinic receptor量の減少がみられた。これらの変化は平滑筋弛緩薬のpapaverinを同時に投与することにより、ある程度抑えることが出来た。

これらの知見からリセプターも活潑に代謝回転され、条件により増減するので、平滑筋のmuscarinic receptor量を調節している一因は筋の運動状態と思われる。

アセチルコリンの作用とグアニレートサイクレーズの活性化

出口 武夫 東京都神経研

アセチルコリンは、脳切片をはじめ種々の組織中のサイクリック GMP の含量を増加させるにもかかわらず、組織のホモジネートや精製したグアニレートサイクレーズを活性化することはない。この矛盾は未だ解決されていない重要な疑問点であった。我々はラット脳の細胞分画を行ったところ、グアニレートサイクレーズ活性は、その大部分がシナプトゾームに局在することを見出した。このサイクレーズ活性はシナプスゾームを低張処理することにより、容易に可溶化された。また、サイクレーズとともに、内在性活性化因子も可溶化されて来ることが明らかとなった。この活性化因子を部分精製したが、これは分子量 300~600 ぐらいの小分子であることが判った。この活性化因子の添化により、サイクレーズ活性は 5~10 倍の活性化を受ける。また、この因子による活性化は、メチールヒドロキシルアミンとリゾレシチンによって阻害されることも判った。

一方、培養神経芽細胞 NIE115 では、アセチルコリンやプロスタグランジンにより、細胞中のサイクリック GMP 量の顕著な増加が認められるが、この細胞の中にも内在性活性化因子が存在することが判った。この因子も分子量の小さい物質である。また、この細胞中のサイクレーズ活性は $MnCl_2$ と $MgCl_2$ で同様の活性を検出することが出来る。これは、活性化因子により $MgCl_2$ 依存性が出現したものと考えられる。メチールヒドロキシルアミンやリゾレシチンは、この活性化をも同様に阻害する。

この細胞にアセチルコリンやプロスタグランジンを作用させたときにみられるサイクリック GMP の増加はメチールヒドロキシルアミンの添加によって阻害される。この事実は、これら神経伝達物質によるサイクリック GMP の増加が内在性活性化因子によって媒介されていることを示唆するものである。

藤村 一 野崎 正勝 岐阜大学・医

脳内で麻薬性鎮痛薬の作用薬 (opiate agonist)あるいはその拮抗薬 (antagonist) が特異的に親和性を示す特定の部位が発見され薬物receptorとしての opiate receptorが提唱されたのは1972年のことである。その後 endogenous opioidの発見は opiate receptorが麻薬性鎮痛薬, すなわち exogenous opioidに対する receptor というよりもむしろ神経伝達物質としての endogenous opioid類に対する receptorとして考える必要性がでてきた。この opiate類が立体特異的に結合する部位 (opiate receptor) は無脊椎動物では見い出されず, 脊椎動物の中樞神経系および例外的にモルモット回腸とマウス輸精管に見い出されている。その結合部位は膜成分であり, タンパクーリン脂質複合体と考えられている。

opiate agonistとantagonistが同一の siteに結合するかどうか議論が続いているが, 我々は種々の実験事実より同一ではないと考えている。また opiate類の receptor占有過程はnegative co-operativityを示し, 総receptor濃度 $0.28 \text{ pmol/mg protein}$ のうち約86%で最大占有となると思われた。これらの値は agonistあるいはantagonistでほぼ同値を示すが Na^+ イオンが存在した場合, 総receptor濃度には変化をあたえないで構造変化を生じ, agonistでは結合定数および最大占有率の低下, antagonistでは結合定数と占有率の増大が認められ, その程度はagonistで著明に出現した。 Na^+ イオンがallosteric effector様作用を示している可能性がある。しかしこの構造変化に加えて opiate類がreceptorに結合することによってさらに構造が変化することも認められ, 結合部位の様相はきわめて複雑であり不均一性が大きな系となっている。膜lipidがreceptor siteの主たる構成とも報告されているがliposomeを用い蛍光寿命測定, 蛍光偏光解消測定などから否定的な成績を得ている。最近になって opiate receptorが流動性を有するかなのような知見を得ており, 非常に興味深いと思われる。

- 1) H.Fujimura et al; Analgesic activity and opiate receptor binding of 1-cyclohexyl-4-(1,2-diphenylethyl) piperazine Japan. J. Pharmacol., 28(4)505~506 1978
- 2) 藤村一, 野崎正勝; オピエート・リセプター 神経研究の進歩 22(6)1128~1139 1978

オピエート・リセプターとその endogenous ligand

高木 博司 京都大学・薬

オピエート・リセプターの発見からスタートして、その endogenous ligandの脳における存在が予言され、化学的本体が追求され、5種のペプチドが分離された。すなわちメチオニン・エンケファリン；ロイシス・エンケファリン、 α -、 β -、 γ - エンドルフィンである。この他にも化学構造の不明な物質が数種分離されている。これらのうちエンケファリンが痛覚制御物質として働いていることを示す諸種の知見を提示した。

アミノ酸神経伝達物質とそのリセプター：GABAリセプターを中心として

栗山 欣弥 京都府立医科大学

中枢神経内に存在する遊離アミノ酸のうち神経伝達物質としての可能性を有するものとしては、 γ -アミノ酪酸 (GABA)、 β -グルタミン酸、グリシン、 β -アラニン、タウリン、セリンなどが知られている。これらのうちGABAは抑制性神経伝達物質としてもっとも有力視されているものの一つであり、従ってリセプターについてもアミノ酸系神経伝達物質の中ではもっとも詳しく研究がなされている。

先づ電気生理学的には甲殻類を用いた研究が多く、ザリガニの神経筋接合部では興奮性神経終末に存在する前シナプス性のGABAリセプターは、筋膜に存在する後シナプス性のGABAリセプターと異なった性質を有するとされる。

GABA作動薬としてはGABAの外に β -(p-chlorophenyl)-GABA (baclofen), imidagole-4-acetic acidおよびmuscimolが知られ、一方GABA拮抗薬としてはbicucullineとpicrotoxinが知られている。これらの中で現在リセプターの性質を研究するために用いられているのはGABA, muscimolおよびbicucullineである。picrotoxinのGABA拮抗薬としての作用はGABAリセプターにおける拮抗よりもリセプターとionophoreのcouplingを遮断するためであると考えられて居り、従ってGABAリセプターのligandとしては不適当とされる。

一般にシナプス膜への $[^3\text{H}]$ -GABA結合にはNa依存性と非依存性のものがあり前者は膜輸送系への結合、後者はシナプス・リセプターへの特異的結合を意味するとされている。このGABAリセプターへの結合はsaturableなものであり、 $K_D=23\mu\text{M}$, $B_{\text{max}}=0.199\text{mol}/\mu\text{g protein}$ を持つとされる。このGABA結合は拮抗薬bicucullineによりcompetitiveな阻害を受け、また $[^3\text{H}]$ -bicuculline自体もシナプス・リセプターを特異的結合を持つが、この場合 $K_D=380\text{nH}$, $B_{\text{max}}=0.0045\text{pmol}/\mu\text{g protin}$ である。同様な研究はGABA作動薬 $[^3\text{H}]$ -muscimolを用いても行われて居り、略は $[^3\text{H}]$ GABAの特異的結合と類似な結合様式をとる。このmuscimolの場合非特異性結合が殆んどなく、リセプターとaffinityが強く、しかも生理学的実験でGABAリセプターの密度がもっとも高いとされる脳内部位(小脳、海馬など)で結合能のもっとも高いことなど、GABAリセプターのligandとして重要な性質を具備しているものと考えられる。GABAリセプターはTriton X-100処置によ

よりシナプス膜から容易に solubilize され得る lipoprotein の一種であるとされるが、その単離と生理学的・薬理学的特性の詳細については今後の研究に待たねばならない。

- 1) 栗山欣弥：シナプス受容体の生化学，蛋白質核酸酵素
22(6) 572~579(1977)
- 2) 栗山欣弥：GABA レセプター，神経研究の進歩
22(6) 1149~1157(1978)

Dopamine receptorとdopamine-sensitive
adenylate cyclase

前野 弘夫 山之内製薬・中央研究所

哺乳動物の中樞系における dopamine receptor は多様性で薬理学的及び電気生理学的に少なくとも2種類存在することが明らかにされている。生化学的には、adenylate cyclaseと複合体を形成し、CAMPを介して刺激伝達を行う系とadenylate cyclaseと無関係な系とに大別される。私共の研究室では、尾状核のDopamine-sensitive adenylylase cyclaseをシナプス膜よりLubrol PXで可溶化し、Sephadex G-200のカラムクロマトグラフィーで $[^3\text{H}]$ dopamine binding proteinとdopamineに感受性を失ったadenylate cyclaseに分離した。このadenylate cyclaseは $[^3\text{H}]$ dopamine binding proteinの存在下でdopamineに対する感受性を回復するので、dopamine sensitive adenylylase cyclaseのdopamine受容部は $[^3\text{H}]$ dopamine結合蛋白と同一と考えられる。

脳の α リセプターの同定

志賀 達也 浜松医科大学

中枢神経系に、末梢神経系のリセプターと同様の薬物親和性を示す α -型のアドレナリンリセプターが存在することが報告されている。本報告は、ラット脳の α -リセプターを同定する際の問題点を再検討し、 α -アドレナリン性リガンドである(^3H)-ジヒドロエルゴクリプチン(以下DHEと略)と脳シナプス膜のリセプターの結合様式を調べたものである。

DHEの結合は、30℃の時30秒で極大に達し、以後減少するという特異な時間経過を示した。この現象は、一過性の早く結合・解離する成分と、比較的ゆるやかな結合・解離速度を持つ成分がある為と解釈された。比較的ゆっくり結合し、1 μM フェントラミンで阻害されるDHE結合成分は、 α -リセプターと考えられる。その結合様式を平衡論的及至速度論的に解析した。Scatchardプロットより、解離定数は約1nM、最大結合量は1pmol/mg蛋白質と計算された。結合したDHEの解離速度の測定から、解離の速度定数(k_2)は0.03min $^{-1}$ と算出され、結合速度の解析から、 k_2 は0.037min $^{-1}$ 、結合の速度定数 k_1 は $5 \times 10^7 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$ と算出された。これより計算される k_2/k_1 は約0.4~0.7nMとなり、Scatchardプロットより得られた1nMに近い値である。このDHE結合部位は、実験誤差内で均一で、 $\text{R} + \text{CHE} \xrightleftharpoons[k_2]{k_1} \text{R} \cdot \text{DHE}$ の型の単純な結合をすると考えられる。DHEの結合に対する各種アドレナリン性リガンドの阻害効果を調べ、これからリガンドとリセプターの結合の見掛けの解離定数を算出した。結果は、エピネフリン(48nM) < ノルエピネフリン(120nM) < フェニレフリン(3.5 μM) < インプロテレノロール(11 μM)、フェントラミン(3nM) < プロプラノロール(500nM)となり、末梢神経系の α 作用の強さの順に一致した。これは1 μM フェントラミンで阻害されるDHEの結合は、 α -リセプターへの結合であることを示すものであると考えられる。 α -リセプターは、 α_1 と α_2 というサブグループに分類されると言われている。 α_1 に特異的な、メトキサミン、フェニレフリン、 α_2 に特異的なクロニジンのDHE結合に対する効果を調べた。

カテコールアミン情報受容機構の分析化学的研究

吉岡 正則 東京大学・薬

カテコールアミンすなわちエピネフリン、ノルエピネフリンおよびドーパミンはホルモンおよび神経刺激伝達物質として生体内で重要な働きをしているが、適当な手法がないためにそれらが作用する細胞の受容体が解明されておらず、受容体における刺激伝達の機序も不明のまま残されている。本研究はカテコールアミンの微量定量法、アデニルシクラーゼの活性測定法、受容体の光化学的親和標識法などの手法を開発活用することにより、上記のカテコールアミン情報受容機構を解明することを目的とする。

1. カテコールアミンの特異的抗原および抗体の調製法を開発した。エピネフリンの抗血清では他のカテコールアミンおよび代謝物の影響をうけることなくエピネフリン 0.05~1 pmole の範囲で定量できた。¹⁻²⁾
2. カテコールアミン受容体の光化学的親和標識法を開発した。本法はカテコールアミン自身を標識剤として使い、生理状態でのカテコールアミンと受容体の相互作用をしらべる上で有力な手段となるであろう。³⁾
3. カテコールアミンの刺激により増加する CAMP を定量的にけい光性誘導体に変え、高速液体クロマトグラフィによる信頼性および感度の高い分析法を開発した。本法よれば数十 fmole の CAMP およびアデニン類を分離定量できた。⁴⁾

1) A. Miwa, M. Yoshioka, A. Shirahata, Z. Tamura, Preparation of specific antibodies to catecholamines and L-3, 4-dihydroxyphenylalanine.

Chem. Pharm. Bull. 25, 1904 1977

2) M. Yoshioka, A. Miwa, Z. Tamura, Radioimmunoassay of catecholamines.

4th Int. Catecholamine Symp., Pacific Grove, CA 1978

3) I. Takayanagi, M. Yoshioka, K. Takagi, Z. Tamura, Photoaffinity labeling of the β -adrenergic receptors and receptor reserve for isoprenaline.

Europ. J. Pharmacol. 35, 121 1976

4) M. Yoshioka, Z. Tamura, Fluorimetric determination of adenine, adenosine and its nucleotides by high-performance liquid chromatography.

J. Chromatogr. 123, 220 1976

the same time, the *Journal of the American Medical Association* (JAMA) published a letter to the editor that stated:

...the American Medical Association is not a political organization and it is not the place for the expression of political views. The AMA is a medical organization and its primary concern is the health of the American people. It is not the place for the expression of political views.

The letter was signed by the AMA's president, Dr. James H. Jones, and it was published in the JAMA's "Letters to the Editor" section. The letter was a response to a letter from the American Civil Liberties Union (ACLU) that had criticized the AMA's support of the war effort.

The letter stated that the AMA's support of the war effort was a patriotic duty and that it was not a political statement. The letter also stated that the AMA's support of the war effort was a reflection of the AMA's commitment to the health of the American people.

The letter was a clear statement of the AMA's position on the war effort and it was a reflection of the AMA's commitment to the health of the American people. The letter was a patriotic statement and it was a reflection of the AMA's support of the war effort.

The letter was a clear statement of the AMA's position on the war effort and it was a reflection of the AMA's commitment to the health of the American people. The letter was a patriotic statement and it was a reflection of the AMA's support of the war effort.

The letter was a clear statement of the AMA's position on the war effort and it was a reflection of the AMA's commitment to the health of the American people. The letter was a patriotic statement and it was a reflection of the AMA's support of the war effort.

The letter was a clear statement of the AMA's position on the war effort and it was a reflection of the AMA's commitment to the health of the American people. The letter was a patriotic statement and it was a reflection of the AMA's support of the war effort.

The letter was a clear statement of the AMA's position on the war effort and it was a reflection of the AMA's commitment to the health of the American people. The letter was a patriotic statement and it was a reflection of the AMA's support of the war effort.

味細胞の受容器電位について

佐藤 俊英 東京医科歯科大学・歯

カエル味細胞の受容器電位の電気的性質及びイオン機構を調べた。実験にはウシガエル (*Rana catesbeiana*) を使用した。ガラス微小電極を舌茸状乳頭の味覚円盤味細胞に刺入して、味刺激で誘発される膜電位変化を測定した。静止膜電位は舌のリンガー液順応下では平均約 -24mV であった。NaCl, 酢酸, キニーネやスクロース刺激で誘発される脱分極性受容器電位は緩徐電位で、濃度の上昇と共に振幅は増大した。味細胞の膜抵抗は NaCl 刺激ではかなり減少したが、酢酸やキニーネではほとんど変化しないか、逆にわずかに増大した。通電によって膜電位を変化させながら、味刺激で誘発される受容器電位の逆転電位を求めた。塩刺激に対する値は数 mV 正側にあったが、酸やキニーネに対する値は静止電位レベルより更に負側にあるようであった。

静止電位及び受容器電位のイオン機構を調べるために、味細胞外液を種々のイオンで置換した。 $[K]_o$ を10倍増大させると膜電位は約 16mV 減少した。 $[Na]_o=0$ のとき、膜電位は約 10mV 増大した。 $[Ca]_o=0$ 又は $[Cl]_o=0$ でも膜電位は変動しなかった。それ故、静止電位は K^+ と Na^+ の拡散電位であるといえる。 $[Na]_o=0$ のとき、NaCl, 酢酸及びキニーネ刺激に対する脱分極電位の大きさは約50%減少した。TTX (10^{-6}g/ml) 処理後、3種類の味刺激による反応は減少した。 $[Ca]_o=0$ のときにも、脱分極反応はすべて減少した。 $[Cl]_o$ をすべてイセチオネートイオンで置換しても3種刺激に対する反応は変化しなかった。以上の結果から、食塩、酢酸やキニーネの受容器電位の発生にはNaイオンとCaイオンが関与しているといえる。しかし、酢酸やキニーネで脱分極性電位の発生時、膜抵抗の変化がみられず又逆転電位も静止電位より深いところにある事実などから、Kイオンなどの関与や他の機構が電位発生メカニズムに考慮されるべきである。

人工かき込み法による嗅球ニューロンの周期性

小野田 法彦 群馬大学・医

鼻先に十分に空間を得るために、一週間前にウサギの頭頂部に頭部固定用台座を取り付ける。ウレタン麻酔下で、気管を切断し、その両端にカニューレを入れ、頭部を不動化する。脱臭空気を鼻先に流しながら、artificial sniffing(AS)を行う。嗅球よりAS相に一致して周期的に応答するsingle unitを277個記録した。外側嗅索の電気刺激により28個はmitral cellで、23個はgranule cellであった。226個はmitral cell層より表層で記録された。嗅粘膜電位(EOG)及び嗅球誘起波(IW)の時間経過と嗅球ニューロン応答の時間経過を比較すると、EOG, IWの開始後に放電頻度が増加するものと、EOG, IWの終了後に頻度が増加するものがある。前者は吸息時に興奮し、呼息時に抑制を示していることになる。後者はその逆の応答を示した。鼻腔への空気の流れを遮断すると、前者の放電頻度は消失するものが多く、後者では自発呼吸との時間関係が全く見られない自发放電がある。ニオイを与えないのに、AS相に一致する周期的な応答を示す細胞が、mitral cell層より表層に多くあり、この周期性は呼吸中枢等からの遠心性入力によるのではなく、鼻腔への空気流入に伴う機械的刺激によるか、微量の化学的刺激による。次にASより同期信号を得て嗅球ニューロンのPSThistogramを作ると、peakが一つのもので、複数のものがあり、嗅球の表層の細胞群の応答はpeakが一つのもので多いが、mitral cell層に近づくとも複数のpeakを持つものが増え、逆にpeakが一つのは減少する。嗅球の表層の細胞は嗅細胞で生ずる変化を比較的忠実に受け取っているが、奥に入るに従い、色々と修飾を受け複雑なpatternを形成すると同時に、mitral cellでは、ニオイを与えないと周期性を示さないものが多くなる。sniffingに伴う嗅球ニューロンのImpulse列には嗅覚に関する必要十分な情報を含むと言う仮定は情報処理機構の重要な手がかりとなる。

ハエ糖受容細胞の界面活性剤処理後における機能回復

森田 弘道 九州大学・理

ハエ腎弁糖受容細胞に界面活性剤 (0.3% DOC, 3分間) 処理をすると、激しい injury discharge を見せた後、糖刺激に対する応答が完全に消失するが、しばらくすると糖に対する応答が除々に出はじめ、処理後60分もたつとほぼ処理前の応答を示すまでに回復する。ところが1%コルヒチンで前処理しておくと、DOC処理後の回復が著しく阻害される (1%コルヒチン処理のみでは応答に何の変化も認められない)。ビンブラスチン処理でも同様である。そこで微小管による“回復因子”の輸送を仮定し、外側から“回復因子”を加えてやれば、コルヒチン前処理の場合もDOC処理後の回復が正常に起るのではないかと考え、腎弁ホモジネートの各分画の回復促進能を調べてみた。結果は、P分画 (受容体蛋白ではないかと考えている α -グルコシダーゼを含む分画) のみに部分的回復促進のあることを示した。この分画の回復促進能が脂質などの低分子物質でないことは、高温処理後のP分画には回復促進能のないことから、ほぼ確かである (したがって、蛋白質のような高分子物質である可能性が高い)。

次に、1%コルヒチン・0.3%DOC二重処理後の回復過程を長時間追跡してみると、処理後8~10時間頃から、ゆっくりした回復過程が始まり、15時間後には、定性的にほぼ正常な応答を示すまでに回復することがわかった。そこで微小管が8~10時間で完全に再構成され、“回復因子”が受容膜に補給されるのではないかと考え、コルヒチン処理後1時間、5時間、15時間後に固定、電子顕微鏡で微小管の様子を調べた。例数が少くまだ確定的なことは言えないが、15時間後のものは対照 (無処理のもの) に比べ相異が見られなかったのに対し、1時間、5時間後のものでは細胞に著しい変形が見られた (微小管はどの場合もほぼ正常に存在するように見えた)。さらに研究を続行して受容膜再成の機序を究明していきたい。

聴器における順応について

古河 太郎 東京医科歯科大学・医

聴覚の順応は視覚に比すると僅小で、感度がたかだか1/100位に低下するに過ぎないが、その特徴は感度の低下にも拘らず音強度の変化は鋭敏に感知されることである。文献によるとこの順応の主要な部分が末梢聴器で生じるとされているので、本研究においてはキンギョの聴器を用いて実験し、その聴神経の末端から細胞内記録法によって音に対する応答を調べ、それにより順応の機作を解明しようと試みた。そのさいTTXを局所に適用し、スパイク電位を除去し興奮性スパイク電位(EPSP)のみを記録出来るようにし、また音強度低下の効果を調べるために音の開始から約100 msec後に音強度をステップ状に増加或は減少させた。

音の開始に应答するEPSPの振幅を音強度に対してプロットするとS字状のカーブが得られる。一方EPSPの振幅は音開始後すみやかに小となり、定常状態での振幅は開始時より著しく小さい。ところが音強度を増加させると過渡的にEPSPの振幅が大となり、また逆に強度を小とすると定常状態より振幅が同じく一過性にずっと小さくなることが認められ、その時の音強度-振幅関数はS字状を呈し、音開始時の応答関数がほぼ平行移動した形になることがわかった。このように順応によって強度-振幅関数が平行移動を示すことは感受性の低下にも拘らず、音強度の変化には鋭敏に応じることを示すものである。この様な現象の生じる理由であるが、有毛細胞においては受容器電位には順応は見られないとされているから、今回観察された順応過程は有毛細胞と求心神経との間のシナプスにおいて生じる現象であると考えられる。

筋の三角波状伸展と筋紡錘一次終末発射

本間 三郎 中島 祥夫 千葉大学・医

筋紡錘一次終末は核袋、核鎖線維の赤道部にそれぞれ分布し、その神経線維は集って1本となり、第I群a線維となる。神経終末はらせん状に各線維を取巻いている。Iaインパルスがどの終末部位の伸び変化により発生するかは、終末とそれを収める錘内筋線維の物理的性質に基づいていると思われる。現象論的には、Iaインパルスは正弦波状振動で、100Hz前後で最も小さな振幅で応答する。振幅をあげ、振動体を筋紡錘に近づけると、Iaインパルスは数百ヘルツまで応答する。静的ガンマ運動神経の数百ヘルツのインパルスに対応して、Iaインパルスが発生する。これは静的ガンマ運動神経のインパルスに追隨して核鎖線維が収縮し、一次終末が引き伸ばされ、Iaインパルスが駆動されたという。このことは核鎖線維の単収縮の収縮時間が短いことによって確かめられている。

筋をランプ状に伸展した場合、動的ガンマ運動神経の刺激でIaインパルスは相動性伸展時に増加し、静的ガンマ運動神経刺激では持続性伸展時にIaインパルスは増加する。核袋線維は粘性に富み、相動性変化を感覚するに役立つとされている。それに比べ、核鎖線維は弾性に富み、静的ガンマ運動神経に駆動されることにより、緊張状態の維持に役立つとされている。

筋の三角波状伸展は一次終末の刺激に有効であり、三角波の立上り、立下りとも4msecが適当である。三角波を脈波の形で繰返すとき、核鎖線維をそれに対応して伸展し、Iaインパルスを駆動できると考えられる。この有効性はヒトでもこの三角波脈波伸展により、緊張性振動反射の成立から確かめられている。

SABURO HONMA and YOSHIO NAKAJIMA
AVERAGE MUSCLE TENSION TRIGGERED BY STIMULATION OF
GAMMA FUSIMOTOR FIBERS

Neuroscience Letters 6, 35-39 1977

ザリガニ機械感覚毛の受容機構

久田 光彦 北海道大学・理

ザリガニ平衡胞底面に分布し、重力軸に対しての体傾斜の検出を行なっている平衡胞感覚毛とその受容細胞の性質および動作様式を調べた。平衡胞感覚毛一細胞の機械受容器としての特徴は、1)感覚毛の機械的感受性部分が、外骨格キチン質の毛であること、2)受容細胞は感覚毛から数100 μ m離れて位置し、その間をキチン繊維と見られるchordaが機械的に連結していること、3)感覚毛自体は構造上一平面内で屈倒しやすく、これに直角には動き難いこと、4)受容細胞は双極細胞であり、細胞体部は平衡胞底に固定され、樹状突起部がchordaにつながって、感覚毛の屈倒により伸展あるいは弛緩してスパイク発射への変換をおこすこと、5)スパイク発射はいったん遠位側の樹状突起部でおこり、これが細胞体部をへて軸索スパイクとなるとみられること、などである。

これらの平衡感覚毛は平衡膜底面に100以上が整列して半月弧状の複数列を形成し、感覚毛の持つ構造極性と、この整列から生ずる応答方向性によって、動物体がどの方向に傾斜したかが、スパイク発射増加を示す感覚毛の部位によって識別される機構を形成している。また受容細胞の膜性質に由来するとみられる順応性の異なる二種の受容細胞が区別され、tonicなものは、傾斜方向、静止傾斜角の検出に役立っているとみられ、一方phasicなものは傾斜運動の動的要素、速度、振動の検出に関係していると考えられる。

さらに中枢内で、これらの受容細胞からの入力を受ける介在神経を同定し、その傾斜応答を調べたところ、いずれも左右平衡胞また平衡胞内でも部位の異なる感覚毛-受容細胞群から、単シナプス、多シナプス両種の接続を持っていた。これは傾斜、位置情報のcodingが、主として平衡胞内の感覚毛の位置によっているという仮説の妥当性を示すものである。

伸展受容器の微細構造, 特に知覚終末部における結合組織性要素について

上原 康生 出崎 順三 愛媛大学・医

無脊椎動物の伸展受容器から脊椎動物の筋紡錘にいたるまでの微細構造上の比較形態学的研究を試みて来たが, その目的とする所は, (1)各種動物間に認められる知覚終末の著しい形態的な差異がどのような系統発生に基づくものであるか。(2)動物間に認められる形態学的差異の中で, 伸展受容器としての基本的で, しかも共通の構造は何か, と云う事柄を明確にすることである。

今回の報告では, 蛾の腹部伸展受容器, ザリガニの背部伸展受容器, 蛙, 鳥トカゲ及び2.3の哺乳動物筋紡錘の微細構造を総括しながら, これらの知覚終末部をとりまく結合組織性要素についての検索を行なって見たい。観察したすべての動物において, 筋線維(錘内筋線維或はreceptor muscle fiber)を支配する知覚終末は, ほとんど常にシュワン或はglia性の被覆を欠く裸の神経突起であり, 従って終末は直接周囲の細胞間隙に露呈されており, これを覆う結合組織性要素は, 筋伸展受容器の機能を理解する上で重要な役割をはたしていることが推測される。

哺乳動物筋紡錘鞘内腔はヒアルロン酸を多量含むことが知られているが, 電顕下では少量のコラーゲンと弾性線維が知覚終末部に観察されるのみである。一方トカゲや十姉妹では, 知覚終末部を輪状に取り巻くコラーゲン線維の覆いによって特徴づけられる。蛙の筋紡錘は, 赤道部の知覚終末部において複雑な突起を持つ錘内筋線維で特長づけられるが, この部位は非常に微細な線維性構造物によって密に覆はれている。又同じ外観を示す線維性構造物は, intramuscular tendonと称される筋細胞の突起を持つ, ザリガニの知覚支配部位や, 蛾の伸展受容器の赤道部においても観察される。

これらの結合組織性要素の持つ意味は明らかではないが, (1)受動的に伸展され易い構造を持ち裸の知覚終末部の存在する知覚部位の機械的保護
(2)receptor potential発生時に要求されるイオンの貯蔵場としての役割
(3)錘内筋線維の伸展—知覚終末の変形に際しての機械的刺激の伝達への関与等が推測される。

聴側線感覚器有毛細胞の微細構造, 特に感覚毛およびシナプスの
微細構造について

浜 清 東京大学・医科研

聴側線系感覚上皮の有毛細胞は規則正しく配列した不動毛と1本の動毛(哺乳類コルチ器の有毛細胞では動毛を欠く)をもつ。不動毛中には長軸と平行に配列する微細繊維をもっている。隣接微細繊維相互間および微細繊維と細胞膜の間は繊維物質のブリッジによって結合されている。ヘビーメロマイオシン処理によって微細繊維は基底方向に向う矢頭形成を行い、アクチン繊維であることが示された。

有毛細胞の求心性シナプスはシナプス前膜にそってデンスボディー(DB)をもっている。デンスボディーに接するシナプス膜は活性部分を形成している。この部には棒状のシナプス前デンスプロセクション(PSD)とその両側に配列するシナプス小胞をもっている。フリーズレプリカ像ではこのPSD部に一致してP破面上に膜内顆粒の集合、B破面上にピットの集合をみとめる。またシナプス小胞の配列部分に一致して、シナプス小胞の開口像をみとめることができた。

- 1) K. Hama and K. Saito Gap junctions between the supporting cells in some acoustico-vestibular receptors. J. of Neurocytology 6, 1-12, 1977
- 2) K. Hama and K. Saito Fine structure of the afferent synapse of the hair cells in the saccular macula of the goldfish, with special reference to the anastomosing tubules. J. of Neurocytology 6, 361-373, 1977

筋紡錘における機械受容機構

伊藤 文雄 名古屋大学・医

カエル筋紡錘の受容機構において、Caスパイクが出ていることが明らかになった。正常リンガー液中でも、このCaスパイクがNaスパイク（伝播性インパルス）の引き金になっている可能性があることを報告する。

トノサマガエル縫工筋または半腱様筋から筋紡錘を単一分離し、その求心性神経末端を空気隔絶する。筋紡錘はこの求心性神経を中心にして両端に向かって伸張する。これにより隔絶部での神経線維の横ゆれと、それによる人工的電位変化の発生を防止する。リンガー寒天橋とカロメル電極を介して隔絶両側のリンガー氏液間の電位差を測定・記録した。この軸索末端では絞輪間距離が $400\mu\text{m}$ 前後と短かいので、隔絶間抵抗が $20\sim 30\text{M}\Omega$ と低く、Naスパイクの振幅も約 25mV と低いものであった。

テトロドトキシンでNaスパイクを遮断すると、起動電位が筋紡錘の伸張中に起る。この伸張速度を早めると、スパイク成分の振幅が高まる。屢々、伸張の動的相の後、数発のスパイク放電を起す。このスパイクは勿論テトロドトキシン耐性であるが、コバルトを外液に添加することにより遮断される。またこのスパイクの振幅は外液内Ca濃度の対数にほぼ比例して増大する。これらの実験結果から、このスパイクがCaの細胞内への流入によって誘き起されるものと推定された。

このCaスパイクの発生部位は求心性神経末端の無髓線維部である可能性が強い。Naスパイクは隔絶法で2相性に記録されるが、Caスパイクは常に単相性である。また外液中にCa濃度を高めても、10分以上も経て始めて振幅はその時の最大値に達する。おそらく無髓神経線維を擁囲している内囊物質（ムコ多糖類と推測されている）中にCaが高濃度に貯えられ、それによって正常時でもNaスパイクの引金になっていると考える。

「生体膜の機能要素の生物物理学的性質」膜系の容量体要素についての考察

今井 雄介 大阪医科大学

生体膜において成分の輸送速度を定量的に測定することはきわめて重要である。輸送速度が確定して初めてそれが能動輸送によるものか、拡散によるものか、または溶媒牽引によるものかの検討が可能となる。しかし膜に直列に流速計を接続して測定することは一般にできない。したがって膜に接するコンパートメントでの成分量の変化速度 dn_i/dt をもって流速とする。

血液で灌流されている組織では、細胞、細胞外液、動脈、静脈の4つのコンパートメントを考え、相互間の流速を考えていくことができる。各コンパートメントを容量体と考えそこで成分の量的変化から、膜または概念的な境界を通過する成分流速を推測することができる。容量体の容量値 C は成分変化に対する化学ポテンシャルの変化で示されるから、各流速は次式で示される。

$$J_i = \frac{dn_i}{dt} = \frac{dn_i}{du_i} \frac{du_i}{dt} = C \frac{du_i}{dt}$$

国 成分 n_i がコンパートメントの溶液中で自由形 n_1 と反応形 n_2 として存在するとき、流速は次式になる。

$$J_i = \frac{d(n_1 + n_2)}{dt} = \frac{d(c_1 V + c_2 V)}{du_i} \cdot \frac{du_i}{dt}$$

$$= \left(1 + \frac{c_2}{c_1}\right) c_1 \frac{dV}{dt} + \left(1 + \frac{dc_2}{dc_1}\right) V \frac{dc_1}{dt}$$

$\left(1 + \frac{c_2}{c_1}\right) = A$ および $\left(1 + \frac{dc_2}{dc_1}\right) = B$ は各々定濃度容量係数および定容積容量係数であって、自由形 c_1 と反応形 c_2 の関係を滴定実験を通じて明らかにすることができる。

生体組織をいくつかのコンパートメントについて考え、各々のコンパートメント溶液についての容量係数 A および B と、濃度 c_1 、濃度変化 dc_1/dt 、容積 V と容積変化 dV/dt を測定することにより初めて流速が求めることが可能になる。細胞膜を通過する成分の流速を測定するためには、各コンパートメントの容量係数を前もって求めるほかに、イオン電極等による正確な濃度測定と血

流量計等による容積流測定が必須となる。

- 1) Imai, Mori, Murakami, Yoshida, :Flow analysis in a biological system adopting the buffer capacitor concept
J. Theor. Biol. Submitted 1978
- 2) 今井・森・村上・後藤：容量体概念の生体系への適用
日本生理誌 40 (7) 169 1978
- 3) 今井・森・村上・後藤：容量概念を用いた物質輸送速度速定法
第2回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム集(京都) p80-83 1978

刷子縁膜小胞の分離精製と小胞の諸性質

大沢 一爽 東京大学・医

生体膜機能の中でcarrier分子の実体が判然としていない。その障壁の一つは、現在までのところ、carrier分子を純粋分離できないことにある。carrier分子の単体をhomogeneousに抽出することはcarrier分子を研究する上に必要なことである。この研究に近づくためには、活性物質の純粋分離をしなくてはならない。ここでは高分子物質を分離させるためにガラスビーズクロマトグラフィーを使用した。ガラス粒子がもっている高分子物質ふるいわけの有効率は、ガラス粒子にある細孔又は溝に存在する分配係数による分子篩の原理に依存する。3000 Å 細孔をもったガラス粒子に刷子縁小胞 800 Å 直径(平均)をもつ物質を一時止めて、size separation chromatographyさせる。分離調製をするのに超遠心機を使用しないのも大きな特長となった。

カラム分画後、酵素活性、¹⁴C-glucose及びmannitol uptake、電顕による形態等を調べ、glucose uptakeの最も高い値を示すfractionを、刷子縁膜richな部分と確認した。刷子縁膜小胞へのglucose uptakeの指標値は、従来報告された値よりも数倍高い値が得られた。

これらの結果を電気生理学にintact cellで調べられた研究結果と比較して検討を加えた。刷子縁膜小胞を通してfluxするglucoseにはNa⁺イオンが必要であること、Ca²⁺など二価イオンは全く影響を与えないこと、これらfluxはfacilitated diffusionに従うこと等が確められた。熱力学的にはNa⁺とglucoseのinflux effluxの散逸理論式から、そのtime courseを推定して、小胞に存在するcarrier機構を推察した。

carrierの単体を分離する技術が確立されていないが、ガラスビーズクロマトグラフィーの応用によって、その分離調製は格段の進歩があるものと思われる。

1. K. Ohsawa et al. Preparation of ultra-pure synaptic vesicles from the electric organ of *Torpedo marmorata* by porous glass bead chromatography and estimation of their acetylcholine content.

Exp. Brain Res., 24, 9 1976

筋小胞体のイオン透過性とチャネル

葛西 道生 大阪大学・基礎工

筋小胞体膜のイオン透過性は興奮収縮連関を研究する上で重要な情報であるが、 K^+ や Cl^- などの透過は非常に速く、通常のトレーサー法では追跡できない。そこでわれわれは浸透圧差を与えたときの体積変化を、ストップドフロー装置を用いて散乱強度変化として追跡する方法を考案した。筋小胞体ベシクル懸濁液の塩濃度を急激に上昇させると、光散乱強度ははじめ急激に増加し、つづいて減少する。速い増加は浸透圧差によって、水が流出し、ベシクルが収縮したことによる。この速度から水の透過性求められる。遅い減少は溶質が小胞内に流入し、これに伴って水が流入したことによる。この速度から溶質の透過性が求められる。透過性の目安として、散乱強度変化が $\frac{1}{2}$ になる時間を透過時間と呼び τ で表わす。

各種の塩や中性分子について透過性を求めると、塩ではイオンは電気的中性を保って透過し、遅いイオンの透過が律速的であることがわかった。 KCl の場合は Cl^- の透過が大きく、 K^+ の透過が律速的である。これにバリノマイシンを加えて K^+ の透過を大きくすると、塩としての透過が大きくなる。このようなイオンの透過はNernstの式を用いて解析できる。その式は塩の拡散定数はイオンの拡散定数の調和平均になるというもの。ここで、透過性は拡散定数に比例し、透過時間は逆比例すると考えられる。その結果、各種イオンなどの透過時間は次のようになった。単位は秒。

水 0.1, Li^+ 36, Na^+ 26, K^+ 20, Rb^+ 16, コリン $^+$ 720, Cl^- 0.4, メタンスルホン酸 $^-$ 20, リン酸 10.5, シュウ酸 40, この結果、筋小胞体はアニオン選択性が高く、アニオン、カチオンのチャネルの存在を示唆する。カチオンチャネルは水和イオン半径によってイオンを透過させると考えられる。アニオンチャネルは赤血球のアニオンチャネルの阻害剤SITSによって阻害された。

興奮時の R_m , C_m 測定におけるいくつかの問題点

岸本 卯一郎 大阪大学・教養

電流と電圧をつなぐ伝達関数としてインピーダンスがあり、定常的で受動的な系ならオーム則に従う抵抗が定義できる。生体膜のような必ずしも受動的でない系で、とくに興奮時にみられるような負抵抗性を示すときの抵抗の内容は何か？ 原点にもどれば、そのような場合でも膜を内部インピーダンスをもつ一つの起電力(emf)の系と表現できる(Theveninの定理)。過渡的な特性を含めてそのインピーダンスは容量と抵抗の並列回路で表現できる(Bodeの定理)。一方Hodgkin-Huxleyの解析によれば、 Na^+ の活性化は容量性であり、 Na^+ の不活性化と K^+ の活性化は誘導性の過程であり、それらの変化は膜電位の関数であるパラメータで表される。従って膜電位が変化すれば抵抗だけではなく、emfも変化することになる。抵抗の値を決めるにはこのemfの変化の補正が必須の条件である。

技術的な制約から、プラトー型の遅い経過の活動電位を発生する条件を選んで、その経過中の膜抵抗、容量、emfの変化を測定した。それによると興奮の上昇期に著しい膜抵抗の減少以外に容量とemfの増加があり、プラトーの終りに通常みられるみかけの抵抗増大(時定数の増大)の過程には、膜抵抗の増大の途中に一過性の抵抗の減少と容量の増大emfの増大を含んでいることがわかった。つまり興奮の上昇期と下降期はともに膜抵抗の減少と、容量とemfの上昇を伴った膜電位の転移過程であることが確かめられた。

ミトコンドリアの膜電位と呼吸酵素

北里 宏 滋賀医科大学

ミトコンドリアにおける H^+ の電気化学ポテンシャル勾配が electrogenic H^+ pump によって形成されるならば、イオンポンプの効率および ATP 変換の効率から考えて、ATP 合成の効率は 20% 程度になるだろう。ところで、膜を貫いて電子伝達系があり、これが実質的に膜電流を運ぶならば、基質の酸化から取り出されるエネルギーはもっと効率よく ATP 合成の駆動力に変換される可能性がある。酸化還元系、電子伝達系および H^+ pathway から成るこのような閉回路の H^+ pathway に ATP 合成系があり、これがこの閉回路の主な負荷であれば、基質の酸化から取り出されるエネルギーは殆んど 100% H^+ の電気化学ポテンシャル差に変換され、膜電位は次のように表わされる。

$$E \cong E_H - (E_{NAD}^{\circ'} - E_A^{\circ'}) + \frac{RT}{2F} \ln \frac{[S]}{[SH] P_{O_2}^{1/2}}$$

上の場合とは逆に、ATP 合成系が電子伝達系中に介在し、これがこの閉回路の主な負荷である場合には基質の酸化から取り出されるエネルギーは殆んど全て電子の動きに対する駆動力に変換され、膜電位は次のようになる。

$$E \cong E_H$$

ミトコンドリアにおいて実際に起っている ATP 合成反応は H^+ flux の持っているエネルギーを利用して進むか、それとも electron flux のエネルギーを利用しているかは、ミトコンドリア内外の pH および膜電位を測定することによって決定される。今回は ^{31}P の NMR の chemical shift を指標として、ミトコンドリア内の pH を求め約 7.4 と云う値を得たことを報告する。

表面電位、膜電位に関する Nernst-Planck 方程式の厳密解の性質について

品川 嘉也 京都大学・医

イオンの膜透過の基本方程式は Nernst-Planck-Poisson 微分方程式系であるが系の非線型性のためこれまで厳密解が知られている例は極めて少ない。膜電位については Nernst 平衡のときの von Lane の解があるが、これはイオン一種類のみの場合であり、膜透過には適用できない。イオン 2 種のときは Verwey と Niessen の解があるがこれは表面電位のみに関するものである。われわれは Donnan 平衡のときの膜電位の解析解を求めた。この解の性質は、膜の両端での電位差を定めたとき 2 種の解が存在する、一つは滑らかに電位が増大し膜の端で $\tanh^{-1} \sinh K\xi$ (ξ は Debye 単位で測った膜内の法線方向座標、 K は Debye 半径の逆数) 型の急激な増加を示す、他の一つは最初から急激な電位増加を示し一たん ∞ に発散したのち $\coth^{-1} \sinh K\xi$ 型の降下を示す。后者の解の右方減少部分が Verwey と Niessen の表面電位の解に対応しており、表面電位と膜電位が統一的に理解できる。解の発散部分に膜の固定電荷が存在すると考えられ、膜構造との対比がつけられる(文献 1)。

非平衡のときは各変数の Taylor 展開により級数解が求められた。すなわち膜内の陽・陰イオン濃度をベキ級数で表わし Poisson 方程式を項別積分により解いて Nernst-Planck 方程式に代入して漸化式が得られた。級数の収束は極めて速い(2, 3)。級数解は、平衡のとき上記平衡解に一致する、陰・陽イオンの流束が等しい定常流に対する解では膜電位の大きさに極小値が現われる。

級数解を用いて電気的中性の条件(constant field の仮定)をいたるところで満す解は uniformly charged membrane、中性膜では流束がゼロとなる trivial な解しか得られない。Constant field と流束を満す解は、膜内を自由に動くが膜外には出ないイオンが存在するときに限られ、これはかなり特殊な場合であろう(3)。

- 1) Y. Shinagawa, Analytical solution of the Poisson - Boltzmann equation J.theor Biol. 72 603-610 1978
- 2) Y. Shinagawa & Yasuko Shinagawa. Solution of the Nernst-Planck-Poisson equations 6th Int.Biophys.Cong. 1978
- 3) Y. Shinagawa, Solution of the Nernst-Planck-Poisson equations in non-equilibrium states by the power series expansion. J.theor Biol.to be published 1978

卵細胞の膜電位による受精制御機構について

宮崎 俊一 自治医科大学

受精という現象には、精子と卵細胞間の接着、両細胞膜の融合をその初期の段階で含んでいる。この受精の初期の段階が、卵細胞の膜電位によってコントロールされていることがわかった。受精時に二個以上の精子が卵に侵入しないための機構、(多精拒否機構)がなければならない。卵の表層顆粒の崩壊と受精膜の形成はslowな多精拒否機構の役割を果たすが、一方fastな多精拒否機構は、受精的に卵におこる付活電位がこの役割をはたす。卵の膜電位があるレベルよりこえて脱分極すると、精子は侵入できない。従って一発目の精子によって大きな付活電位を発生し、このレベルをこえると、二発目以後の精子は侵入できない。ヒトデ卵の受精は、卵の成熟過程でだいぶ様子が異なる。

あるstageではほとんどの卵が単精となり、あるstageではほとんどの卵が多精になる。これらstageでの付活電位を比較して、たしかに付活電位の差が単精か多精かに関連していることが証明された。膜電位がどうして精子の侵入をおさえるのか、そのメカニズムは不明であるが、ある程度の推測をこころみた。

膜興奮性に対する細胞内外2価イオンの役割

山岸 俊一 生理学研究所

興奮性膜は膜の外表面と内表面とで、著しい生理的性質の違いを示している。たとえば、イカ巨大神経の膜の外表面に接する細胞外液の組成としては、膜の興奮発現にとって、Caその他の2価イオンは必要不可欠であるが、Na, Kなど1価イオンは必ずしも必要としない。一方、膜内表面に接する細胞内液については、Kイオン濃度が数100mMに及んでも膜興奮は維持されているが、0.3 mM以上のCaその他の2価イオンが存在すると10分以内に不可逆的に膜興奮性が消失する。

本発表では、灌流イカ巨大神経について、細胞内Caイオンのもたらす効果を報告する。Meech(1972), Krnjevic(1972)の神経細胞内Caの注入実験では、大きな過分極反応が見出され、彼等はCaイオンによるK透過性増大効果と結論した。しかし、イカ巨大神経においては25 mM K^+ 溶液を1 mM~80 mM Caイオンのみの溶液に置換することにより、Caイオン濃度に応じた過分極反応が認められ、Caイオン自身の透過性発現による膜電位表現が存在することが判明した。さらに、10 mM以上のCaないしMnイオンの灌流により、過分極経過中に一過性のスパイク発生が見出された。これは電気刺激によらない細胞内Caイオンにより引き起こされた興奮である。

共輸送担体系におけるゲート現象

星 猛 東京大学・医

腎尿細管細胞における糖、アミノ酸とNaとの共輸送系による荷電輸送の機序を解明するため、荷電輸送と膜コンダクタンスの関係、荷電輸送の膜電位依存性、急速メジウム組成変化に対する過渡現象等を観察した結果、次の所見を得た。

- 1) 糖、アミノ酸の管腔内注入時に発生する膜の脱分極は有意の膜抵抗変化と伴わない。この事は高濃度L-alanineで60mV以上の脱分極と発生させた時にも言えることで、従って単純に膜のNaコンダクタンス上昇によつては説明し得ない。
- 2) 膜電位レベルを直流通電によって種々変えた条件で、糖、アミノ酸による誘発脱分極(ΔPD)を測定すると、通常 ΔPD は+10~-110mVの膜電位(V_m)の範囲内で、 V_m に直線的に比例して変化した。但しごく新鮮な標本や低濃度での観察では全く膜電位依存性を示さない場合もあった。
- 8) 膜電位をあるレベルにまで減少させると荷電輸送が全くおこらぬようになる。そのゼロ電流膜電位は多くの場合+20~-20mVの範囲にあった。その膜電位レベルをこえて更に細胞内を正にして糖を注入すると過分極反応が見られた。このゼロ電流膜電位はいわゆる共輸送系平衡電位では説明出来ず、むしろ膜のすぐ内側の局所Naと細胞外Naの間のNa平衡電位と考える方が妥当と思われる。糖、アミノ酸の添加は共輸送を通してのNaの通過に対してゲートを開く役割を演ずるものと思われる。加えた糖を急速に除去すると一過性のオーバーシュートする脱分極を発生するが、ゲートには先にeffluxをブロックする特殊な機構を備えていることが想定される。

交感神経のシナプスについて

西 駕 鷹 子 内 國 耕 二 生理学研究所

組織蛍光法や電気生理学的研究により交感神経節特に上頸神経節中には伝達物質としてドーパミンをもった小型の神経細胞が存在し、介在ニューロンとして節後細胞に抑制的に働いていることが知られている。この様なドーパミンニューロンが交感神経節に一樣に存在するものであるか、またドーパミンニューロンの形態的特徴をみつけドーパミン含有シナプス小胞と他の伝達物質含有シナプス小胞とを電子顕微鏡学的に識別する手がかりを得るためにラットの腹腔神経節のシナプスの微細構造を中心に観察した。

腹腔神経節のシナプスをシナプス小胞の形態によって分類すると2種類に分けられる。第1のタイプは直径 $500\text{\AA}$ 前後の中空シナプス小胞（いわゆるアセチルコリン含有シナプス小胞）のみをもったシナプス、第2のタイプは直径 $500\text{\AA}$ 前後の中空シナプス小胞と直径 $1200\text{\AA}$ 前後で中に直径 $700\text{\AA}$ 前後の暗調な芯をもった顆粒小胞とを合わせもったシナプスである。両者の比率は4:6で混合型のシナプスの方が多い。介在ニューロンの存在が知られていない副交感神経節の一つである毛様体神経節では腹腔神経節と同じ2種類のシナプスが存在するか、第1のタイプのシナプスの方が77%と多い。

一般に顆粒小胞はカテコールアミン含有シナプス小胞と言われているが、腹腔神経節のシナプス中に多く見られた顆粒小胞がアミン性のものであるかどうかを調べるために、ドーパミン放出作用のあるレゼルピンを投与してシナプスの変化をみた。体重1kgあたり10mgのレゼルピンではシナプス中の中空小胞にも顆粒小胞にも変化は見られず、この大型顆粒小胞はドーパミン含有小胞ではないと思われる。ラットの交感神経節中のドーパミンニューロンの数は光顕的には400個位と言われているが、それを普通の電顕的方法でとらえるのは困難であり組織化学的方法や蛍光組織法との併用が必要である。

循環計測による自律神経研究

入内島 十郎 東京大学・医

心臓および血管を支配する自律神経の研究の場合、神経の活動電位を観察する方法と血行力学的パラメーターを測定する方法は共に一長一短がある。前者の最大の欠点は観察中の活動電位が果たして心臓又は血管に送られるか否か分らず、又、仮にそうであるにせよそれらの特にどの部分に送られるかが分からないことである。

無麻酔の動物の血流の観察は血圧のみの観察では到底得られないような貴重な情報を与える。ラットは高血圧の研究に欠くべからざる実験動物であり、この動物において無麻酔の状態で血流を測定することは多年の懸案であったのであるが、最近ようやくラットの大動脈血流の測定が可能となり、時々刻々の心拍出量の追跡が出来るようになった。

ラットをthiamylal sodium 50 mg/kg i.p で麻酔して気管切開により人工呼吸を行ない、胸部正中切開を行なって上行大動脈を露出し、Biotronex 電磁流量計プローブを装着する。胸部を閉じ、留置カテーテルによって減圧し自然呼吸に戻し、気管切開部を縫合する。プローブからの導線は皮下を通して頸部に導き、ここにプラグを固定する。プローブ埋め込みののち8日もたてばラットはほぼ正常と変らない行動を示すに至る。

血圧の記録は細いポリエチレン管を大腿動脈から挿入し、腸骨動脈分岐部より少し上の腹部大動脈に先端が止るようにし、管の他端はやはり皮下を通し、頸部に固定して行なう。大動脈血流曲線と血圧を同時に記録し、心拍出量、総末梢抵抗、心仕事、および大動脈血流の微分を連続的に観察する。

ラットを新しい箱に移したときの循環系の反応は運動時の反応、痛みに対する反応、イヌにおけるヒトに対する反応などと共に自律神経の1つのまとまった反応として特記、検討するに価するものと思われる。この反応はどのラットでも繰返して確実に起こすことが出来る。このresponse to new boxは心拍数、心拍出量、大動脈血流の微分値の増加を起こすが、血圧は変化しない。総末梢抵抗は減少する。しかしpropranolol 1 mg/kgの注射により β -adrenoreceptorをブロックしたのちnew boxの刺激を反復すると、上記の、心臓交感神経の興奮に帰せられる変化はすべて起こらなくなるが、血圧が顕著に増加するようになる。このとき総末梢抵抗が血圧と同様増加するので、

この血圧上昇は交感神経血管収縮線維の興奮による α -adrenoreceptor を介するものと考えられる。

この α -receptorの興奮がpropranolol投与以前にも存在したとすれば、このとき総末梢抵抗が減少するのであるから、これと平行して血管抵抗の減少が β -receptorの興奮によって起こらねばならない。存在しなかったとすると、propranololは中枢神経に作用して、new box responseに際し血管収縮線維が興奮するようにしたと考えねばならないであろう。

体温調節と循環

入来 正躬 東京都老人研

体温調節は物理的体温調節と化学的体温調節に大別される。物理的体温調節では、主として熱放散が調節され、体表面より輻射、伝導、対流、水分蒸散による熱放散が関与する。輻射、伝導・対流により放散される熱量は皮膚温と環境温の差により決定され、皮膚温は皮膚血流量に左右される。一方熱の生成される体内核心部より、熱の放散される体表外層部への熱の移動は、組織を伝わる熱の伝導ではなく、“体流”すなわち血流による熱の移動が主となる。すなわち熱の放散の調節には、体深部血流による核心部より外層部への熱の移動と、皮膚血流により左右される体表部よりの熱の放散が主な要因となる。化学的体温調節では、主として熱生成が調節されるが、熱生成に要する酸素などの必要物を運搬するのは血流であり、血流量はこの点でも体温調節に関与している。

以上のように循環系は体温調節機構の主要な効果器の一つであり、加温または冷却刺激により引き起される血流の両分配は興味ある問題である。我々も皮膚、脊髄、視床下部などの温度受容組織の温度刺激により惹起される体内部と体表部の拮抗性血管反応、およびこの血管反応の基礎となる体内部と体表部血管を支配する交感神経の拮抗性地域性反応について詳しく研究を進めて来た。除脳動物、脊髄動物を用い、この反応における中枢神経系の役割についても検討した。さらに最近では血圧変動に対する腎交感神経の応答が、冷環境、温環境ならびに発熱により変化することを確認し、この事実からさらに体温調節機構と循環調節機構の相互関連についても研究を進めつつある。

本日のセミナーでは、これら多くの試みの中から、皮膚交感神経の皮膚血管支配に関して、“皮膚交感神経は、動静脈吻合と毛細血管のいずれを支配しているか”の問題について行った実験結果を中心として報告する。

実験はpentobarbitone麻酔した不動化家兎を用い、毛細血管血流量は15 μ のmicrosphereを用いて測定した。この大きさのmicrosphereの大部分は動静脈吻合を通過するので、組織のcount数は、毛細血管血流量に比例する。

脊髄加温、軀幹部加温では、耳皮膚交感神経活動性が減少し、耳温が上昇し、毛細血管流量も軽度が増加するが、耳を水中に入れ耳温の上昇を妨げると、毛細血管血流量は増加せず、動静脈吻合血流量のみの増加がみられる。

室温上昇、耳の直接加温により、耳皮膚の局所温の上昇がみられる場合には、

耳皮膚交感神経活動性の抑制，促進に無関係に毛細血管血流量が増加する。

以上の結果より，動静脈吻合血流量増加は皮膚交感神経活動性低下により左右されるが，毛細血管血流量増加は皮膚交感神経活動性よりむしろ局所皮膚温度上昇に左右される。局所の代謝増加には，毛細血管血流量増加が必要なことから，この反応は合目的的であるといえよう。毛細血管血流量増加が局所温度上昇により惹起される機序については今後の検討を必要とする。

生理研における研究の抱負

入沢 宏 生理学研究所

生理研に出向することになったのを機会に自分の研究をまとめて、将来の研究に資することとした。研究の出発において出会った井上清恒教授と西丸和義教授の話をし、さらに留学先でDr. Rushmer との研究対話を回想し、生理研ではkeyになるような仕事をする必要を感じていることをのべた。

生理研では、先づ広島時代の研究を総括することを目下行っているが、この作業から次の研究の方向を模索したいと考えている。第1の研究は洞房結節に対する迷走神経や交感神経の作用で、これらの神経末端における細胞膜への作用を単細胞にしらべてゆく方針である。さらに、この研究と併行して器官培養を習らい洞房結節内の神経素子が、培養中にいかに変化するか、培養中に心拍数はどのような変化をするかについてしらべたい。第2の研究目標は循環中枢への研究方法についてもう少しの間模索してみたい。この研究も出来れば新しい接近法が望ましいので、数年間あまり実りを期待しない努力をしてみようと考えている。第3の研究は、生理学の多くの同僚との共同研究である。今年度は充分準備ができなかったが、来年度には長期滞在による本当の共同研究を1-2件やってみたい。このような共同研究がどのような成果をもつかについて、生理研の試みになるような努力をしてみたい。

神経性血糖調節作用

新島 旭 新潟大学・医

血糖値が常にある一定範囲内に維持されるのは調節機構が存在するためであり、インシュリン、アドレナリン、グルカゴンなどの各種ホルモンおよび肝臓が血糖調節に重要な役割を演じていることはよく知られている。血糖値の上昇時には膵臓からのインシュリン分泌が亢進して肝臓におけるグリコゲン生成や、組織におけるブドウ糖利用を高めるが、低血糖時には副腎髄質からのアドレナリン分泌や膵臓からのグルカゴン分泌が促進されて、肝臓からの糖の生成を促す。これらのホルモンのうちアドレナリン分泌は副腎髄質を支配する交感神経の活動に依存していることはよく知られているが、近年、インシュリン、グルカゴンなど膵臓ホルモンの分泌調節も自律神経が大切な役割を演じると考えられるようになった。

われわれは内臓神経副腎枝および迷走神経腹腔枝（膵臓枝）より遠心性の神経活動を記録して血糖値の上昇、あるいは下降時にこれら両神経はどのような反応を示すかを観察し、血糖値調節に果たす役割を考えてみた。1) ブドウ糖注入により血糖値が上昇すると、副腎神経では遠心性活動の低下、迷走神経腹腔枝では神経活動の増強がみられた（ウサギ）。2) インシュリン投与による血糖値の低下では、副腎神経活動の増強、迷走神経腹腔枝の神経活動の低下がみられた（ウサギ）。

これらの両神経の活動を調節する部位は多分、視床下部に存在するブドウ糖感受性ニューロンであろう。

我々の教室ではまた、モルモットによる実験で肝臓一門脈系に血糖値のセンサーがあり門脈内の血糖濃度に応じて迷走神経を通り、中枢に向けて血糖濃度に関する情報を送っていることを明らかにした。前記の遠心系に接続して機能しているものであろう。

さらに、味覚刺激が反射性にインシュリン分泌をおこす機構についての電気生理学的データ、またコンダクティブプラスチック使用刺激電顕についても報告し、研究はさらに自律神経活動—体液環境の相互関係の解明の方向に進みつつあることを報告し貴重なコメントを頂いた。

無麻酔・自由行動下の自律神経活動の計測技術の開発とその応用に関する 問題点

二宮 石雄 国立循環器病センター研究所

自律神経活動の計測技術の開発価値は、1)定性的に新しい情報を得ることが可能となる。2)計測精度を上げる。3)計測時間を短縮する。4)操作が容易で、経済的である、等種々あるが、なかでも定性的に新しい情報を得ることが可能な技術開発が最も重要と考えられる。

従来の自律神経活動の記録分析は主として麻酔下・不動化状態で行われており、計測技術の面からは単に神経活動の定量化技術の改良に主点がおかれていた。しかし、もし無麻酔・自由行動下で自律神経活動を記録・分析することが可能となれば、定性的に新しい放電様式や制御機構を発見する機会が飛躍的に増加する。そこで上記の開発に着手する必要があった。

1)記録電極の開発：最も重要で困難である。動物が動いても連続記録出来るためには体内埋込み型にする必要があり、他方動きに伴う機械的及び生体電気による雑音を軽減することが要求された。これを解決するため、埋込式4極コラーゲン記録電極を開発し、猫及び家兎の腎交感神経並びに大動脈神経、猫の心臓神経活動の記録に応用している。

2)テレメータ装置の開発：上記電極と記録装置をリード線で結ぶ方法は動物の動きによって連続記録がしばしば中断される。そのために小動物の自律神経活動が記録出来る小型の多チャンネルテレメータを開発し、現在その実地応用に際しての改良点を検討している。

3)分析データ表示装置：従来標準化された自律神経活動表示装置がなかった。そこで特に循環系との関係をみるため心臓・血管運動神経活動専用の分析・表示装置を開発したので報告し、その応用例について検討した。

延髄一脊髓、循環調節神経回路

三浦 光彦 群馬大学・医

1. ネコを用いて、心臓に放散する交感神経の脊髓内下行路について検討した。
 - (1) 交感神経性心臓応答のための刺激源として、左右の視床下部昇圧領域、小脳室頂核昇圧領域、頸動脈神経化学受容性線維を選んだ。それぞれの電気刺激に対し、心臓交感神経から50回平均加算法で、ほぼ潜時を等しくする誘発電位応答が記録できた。
 - (2) 脊髓(C₆)の後側索を刺激し、最大の誘発電位応答を示す点を確認してから、その部を電気凝固により破壊した。破壊後、上記の交感神経誘発電位応答の減少、消失を観察した。
 - (3) 下行路は、側索背部に広く分布し、集中していないことがわかった。また、対側の側索の破壊が、誘発電位の完全消失に必要であった。交感神経源の差に基づく、下行路内での局在性は殆ど無かった。
2. ラットを用いて、心拍促進性の交感神経節前ニューロンに放散する上位中枢組織をHRP法で検討した。
 - (1) ECGを示標にT2レベルの中間質外側核を刺激して、心拍促進応答最大点を探し、当該部にHRPを注入した。
 - (2) HRP陽性ニューロンを、視床下部の室傍核及び外側核、橋の青斑核、延髄の傍正中網様体核・縫線核・外側網様体核・延髄中心核・巨大細胞核などに認めた。
 - (3) 循環反射中枢の延髄以外に、青斑核、室傍核からの直接投射のあることは、今後の研究の進路に大きな示唆を与えた。

体性—自律神経反射について

佐藤 昭夫 東京都老人研

体性—自律神経反射は如何なる生理学的意味を持っているのだろうか。

自律神経の中樞は常時緊張して、トーンスを保持しているが、これまでのところ、この中樞のトーンスの発現機序についての明らかな説明はなされていない。体性—自律神経反射学の視野に立つと、体性感覚器から体性感覚神経を介して常時中枢神経系に伝えられる情報が、恐らく中樞のトーンスを維持するのに非常に重要な役割を果しているに相違ないと考えられる。

これまでマッサージとか温湿布、冷湿布、あるいは鍼灸のような各種理学療法の効果は臨床的によく知られているにもかかわらず、その機序が不明のまま取り残されてきた。理学療法の際の各種体性求心性刺激は多分、内臓器官の運動とか分泌とか、さらにホルモン分泌を反射的に調節し、その結果、効果を現わすに相違ないと考えられる。したがって、そのような現象を体性—自律神経反射学を中心とする基礎医学の立場からまず研究していくことが重要である。特にその際、麻酔した実験動物を用いて実験成績の再現性を確実なものにする努力が必要であるように思う。次いで、その基礎的実験成績の無麻酔動物あるいはヒトへの応用を試みるべきであろう。

さらに自律神経系の遠心性調節には、内臓の求心性線維の活動によるホメオスタティックな調節あるいはフィードバック調節が重要な役割を果している。このような内臓性求心性神経活動により自律神経遠心性活動を調節する反射は、内臓—内臓反射あるいは内臓—自律神経反射とも呼ばれる。そこで内臓からの求心性入力と、体性求心性入力が中枢神経系内で干渉し合い、統合されて、その結果私達の生体の自律神経機能の調節が巧妙に行われていると考えられる。今後この方面における詳細な基礎的研究を行う必要性が大きい。

数理生物学とカオス

山口 昌哉 京都大学・理

最近の数学の注目すべき話題の一つに "Chaos" がある。

これは、簡単な決定論的な数学プロセスが、同時にストカスティックな数学的プロセスであるというパラドキシカルなものである。

ここでは、Li-Yorke(1974), Lasota(1977), 山口-俣野(1979)の仕事をもつ2つの生物学的な例にあてはめてお話ししたい。

その2つは次のものである。

i) 1種の生物群(特に non-overlapping generation のとき)の増殖のモデル

ii) 骨髓における赤血球生産のモデル

いずれの場合も、これらの現象を記述するモデルの方程式は簡単であるが、1つのパラメーターを含み、その増加にしたがって解の時間的変化は、

安定平衡, 周期解, 2倍の周期解, ……………

と、無限の分岐を行い、あるパラメーターの値以後では、"Chaos" とよばれる複雑な様相を呈する。

説明の順序は i) から始めて、理論、ii) という順におこなう。

i) 1種の生物個体群の増殖

1種の生物個体群の増え方については、古く、マルサス, Verhulst-Pearl の微分方程式がある。u を population とすると、

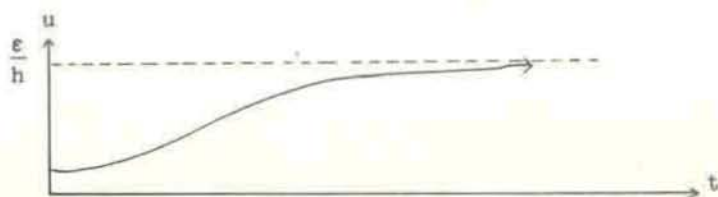
$$(1) \frac{du}{dt} = \epsilon u \quad (\text{Malthus}) \quad \text{であり} \quad \epsilon > 0$$

1870

$$(2) \frac{du}{dt} = u(\epsilon - hu) \quad (\text{Verhulst-Pearl}) \quad \text{であり} \quad \epsilon, h > 0$$

1920

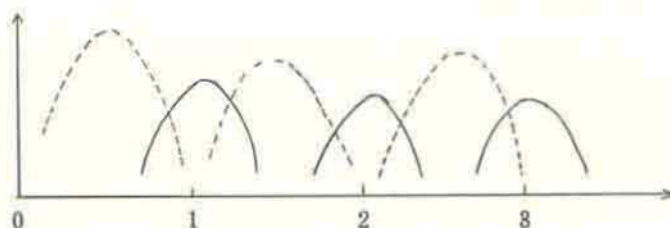
前者はバクテリアなど、後者はショウジョウバエのある種等の増え方によくあてはまっていた。ちなみに(1)は、求種法で解けて、その解の様子は、S字型とよばれる曲線であり、



このような形をしている。 $\frac{\epsilon}{h}$ は飽和値であり、 h は容度効果 density effect とよばれた。

ところが、1940年代、温帯昆虫の生態をしらべていた生態学者は、この式が必ずしもよくあてはまらないことを発見した。

例えば、京大農学部、内田俊郎氏は1941年、マメゾウ虫の1種（これは条件によるが、non-overlapping generationである。）の増殖を観察し、



先のカーブを調べると、飽和値に達する前に、減衰振動がおこることを発見している。

最初は、内田氏の努力は、この(2)の微分方程式の離散化にむけられた。最初あてはめようとしたモデルは、第 n 世代の population を X_n とかけば

$$(3) \quad X_{n+1} = \frac{X_n}{b + CX_n}$$

であって、 $b = e^{-\epsilon \Delta t}$ 、 $C = (1 - e^{-\epsilon \Delta t}) \frac{h}{\epsilon}$ ととると、実は(2)の Exact sol. なのである。これでは、勿論振動はおこり得ない。

そのために、これを modify して

$$(4) \quad X_{n+1} = X_n \left(\frac{1}{b + CX_n} - \sigma \right) \quad (0 < \sigma < 1)$$

とされた。 b 、 C 、 σ を適当にとると、見事に減衰振動がおこると、それ以上に、別の種のマメゾウ虫でみられた周期2のきれいな周期振動まで記述できることがわかった。(1953)

ところが、それ以降20年たって、R. May は、実に次のことを、コンピュー

タ実験によって確かめた。モデルは、意外にも(2)の Euler 差分化である。

$$(5) \frac{u_{n+1} - u_n}{\Delta t} = u_n (\varepsilon - h u_n)$$

ここでスケールをかえて、 $\frac{\Delta t h u_n}{1 + \varepsilon \Delta t} = X_n$ とおけば、 $a = 1 + \varepsilon \Delta t$

$$(6) X_{n+1} = a X_n (1 - X_n)$$

R. May が確かめたのは、次のことである。

(6)の方程式の解について、パラメーター a (すなわち $1 + \varepsilon \Delta t$) の値を $0 \leq a \leq 4$ で考えると、 $0 \leq X_n \leq 1$ ならばつねに $0 \leq X_{n+1} \leq 1$ である。

a を 0 から 4 まで変化させると、解の様相には大きな変化が生じる。

$$(イ) 0 \leq a \leq 1, X_0 \text{ 任意で } X_n \rightarrow 0 \quad (n \rightarrow \infty)$$

$$(ロ) 1 \leq a \leq 2, \quad // \quad X_n \rightarrow 1 - \frac{1}{a} \quad (n \rightarrow \infty)$$

(Utida) (ハ) $2 < a \leq 3$, X_0 任意で $X_n \sim 1 - \frac{1}{a} \quad (n \rightarrow +\infty)$ 減衰振動

(ニ) $3 < a \leq 1 + \sqrt{6} = 3.44$, $X_0 = 1 - \frac{1}{a}$ 以外の X_0 について、周期 2 の周期振動 $1 + \sqrt{6} < a$, はじめは 4 周期, 8 周期, 16 周期, …… という無限の分岐を重ね、分岐するパラメーター a の値は 3.59 に集積する。

(ホ) $3.59 \dots \leq a$ については、計算機では誤差の問題もあってむずかしいが、とにかく、無数の周期の異なる周期解があり、きわめてデリケートに X_0 に depend して、解 X_n の $n \rightarrow +\infty$ での様子がちがってくるのである。この (ニ), (ホ) の部分について数学の理論ができています。

Nicholson の例 羊にたかる青バエの増殖の様子は (ホ) の場合があてはまるといわれる。

○ 理論

一般に $f(x)$ を実数上の実数値関数で連続とする。この $f(x)$ により実数の列 $\{X_n\}$ を

$$(7) X_{n+1} = f(X_n) \quad n = 0, 1, 2, \dots$$

で定める。

言葉として、 $f^p(x) = X$, かつ、 $f^s(x) \neq X \quad 1 \leq s < p$ になりたつとき X は (7) の p -periodic point とよぶ。

◎ Sarkouski (1964) の定理

すべての正の整数を次のようにならべる。

$$3 < 5 < 7 < \dots < 2 \cdot 3 < 2 \cdot 5 < \dots < 2^2 \cdot 3 < 2^2 \cdot 5 < \dots$$

$$\dots < 2^n \cdot 3 < 2^n \cdot 5 < 2^n \cdot 7 < \dots < \dots < 2^n < 2^{n-1} < \dots < 2 < 1$$

この系列の順序で、今 $p < q$ とすると、もし(7)が p -periodic sol. をもてば、すべての q -periodic sol. が(7)に存在する。(4)は $P=2$ であり、(4)で述べた結果の一部の証明でもある。何故なら $a=3.82$ では(6)の f^2 について 3-periodic point の存在が証明される。それから10年、

◎ Li-Yorke (1974) の定理

差分方程式(7)において、 f は区間 I (無限でもよい) から I への連続な変換であるとし、次のような4点があるとする

$$(8) \begin{cases} d \leq a < b < c, \quad d, a, b, c \in I, \text{ かつ} \\ f(a)=b, \quad f(b)=c, \quad f(c)=d \end{cases}$$

以上の仮定のもとに、(Generalised period 3 condition とよぶ)

(1) すべての自然数 k について、 k -periodic pt. がある。

(2) uncountable set $S \subset I$ で

$$p, q \in S \Rightarrow \lim_{n \rightarrow \infty} |f^n(p) - f^n(q)| > \delta, \quad \lim_{n \rightarrow \infty} = 0$$

(3) $p \in S$, q を任意の k -periodic pt. として、

$$\lim_{n \rightarrow \infty} |f^n(p) - f^n(q)| \geq \delta > 0 \text{ が成り立つ。}$$

◎ 山口-呉野 (1979) の定理

$f(x)$ は実数軸から実数軸への連続な変換であり、かつ、微分方程式：

$$(9) \quad \frac{du}{dt} = f(u)$$

を考えたとき、 $f(u)=0$ となる、少なくとも2つの値があり、その一つが漸近安定であるとする。1次変換により、具体的には、次のことをみたされているとする。

$$(10) \begin{cases} f(0)=f(\bar{u})=0, \quad \exists \bar{u} > 0 \\ f(u) > 0 \quad (0 < u < \bar{u}) \\ f(u) < 0 \quad (\bar{u} < u < k) \end{cases}$$

この $k=+\infty$ のときもある。(R. May の例(1))

そのとき、(9)の Euler 差分化：

$$(11) \quad X_{n+1} = X_n + \Delta t f(X_n)$$

を考えると、次の結論が成立する。

A) (10)の仮定のもとに、ある C_1 があって、 $\Delta t > C_1$ ならば、(11)は Li-Yorke の意味で Chaotic になる。

B) (10)の仮定 + $k=+\infty$ のときは、ある C_2 があって、(11)の変換はある有限区間 $[0, \alpha]$ から $[0, \alpha]$ への変換 ($\Delta t < C_2$ ならば) になる。 $C_2 > C_1$ である。

II) 赤血球の生産 Production of red cells:

主要な血液生産は bone marrow 骨髄でおこなわれる。普通、血球数の変化に応じて、その生産調整が骨髄でおこなわれるので、それぞれの血球は生れて死ぬものであるにもかかわらず、あまり変化なしで血球数が保たれるらしいが、溶血性貧血の場合には、赤血球のレベルでの強い振動が見られる。このモデルとして、1968年の Orr, Kirk, Gray, Anderson の兎を用いた実験がある。

すなわち、若年又は成年の兎に、incompatible red cell iso-antibody を注射し (2 days), これによって人工的に溶血性貧血 Haemolytic anaemia をおこさせることである。結果は成年の場合 haemoglobin と reticulocyte (網状体) のはっきりした周期振動がおこり、その周期は注射の周期よりずいぶん大である。(20 days) 又、若年の兎では、この振動はきわめて不規則なもので、周期をみつけられない。reticulocyte と haemoglobin の位相は 1 周期ずれている。非常に簡単なモデルとして赤血球の個数を $x(t)$ とし単位時間に赤血球が破壊される量 d は x に正比例するとし、

$$d = \sigma' x$$

とする。生産される方は

$$p = (k' x)^s e^{-qx} \quad (\text{Wazewska-Czyzewska})$$

$$(12) \quad \frac{dx}{dt} = -d + p = [-\sigma' x + (k' x)^s e^{-qx}], \quad s > 1, \sigma', q > 0$$

を考える。右辺は Yamaguti-Matano の条件をみたすので、この Euler 差分をとって、時間きざみを Δt とし、

$$X_{n+1} - X_n = \Delta t [-\sigma' X_n + (k' X_n)^s e^{-qX_n}]$$

ここで $\Delta t \sigma' = \sigma$, $q X_n = U_n$, $\frac{1-s}{q^s} \frac{1}{\Delta t^s} k' = C$ とおけば

$$(13) \quad U_{n+1} - U_n = -\sigma U_n + (C U_n)^s e^{-U_n} \quad 0 < \sigma < 1$$

というモデルが得られる。これについては、上の定理で Δt がある程度大きいとき Chaos が得られることは応用としてわかる。

σ の大きさにより次のことが Lasota によって観察されている。

$$(a) \quad \sigma = 0.1 \quad (\text{Normal}) \quad C = 0.47, S = 8$$

$$U_n \leq 2.4 \quad U_n \downarrow 0 \quad (n \rightarrow +\infty)$$

$$U_n \geq 2.5 \quad U_n \nearrow \bar{u} = 15.4 \quad \bar{u} \text{ 平均 } 15.4 \text{ -----}$$

(b) $\sigma=0.4$ (Disease)

$$u_0 \leq 3.3$$

$$u_n \downarrow 0$$

$$u_0 \geq 3.4$$

$$u_n \text{ } \nearrow \searrow \nearrow \searrow \nearrow \searrow \text{ 2 periodic pt. } \begin{cases} 15.5 \\ 10.7 \end{cases}$$

$$\lim_{n \rightarrow \infty} \frac{1}{n} \sum_{k=0}^{n-1} u_k = \frac{1}{2}(15.5+10.7)=13.1$$

(c) $\sigma=0.8$ (Severe disease)

$$S(u) = (1-\sigma)u + (Cu)^S e^{-u}$$

とすると $S(u)$: 区間 $[4.2, 15.1] \rightarrow [4.2, 15.1]$ map

$$u_0 \geq 4.2 \text{ Chaos になり}$$

$$u_0 \leq 4.1 \quad u_n \rightarrow 0 \quad (n \rightarrow \infty)$$

しかし, Lasata は別のモデル

$$\frac{du}{dt} = -\sigma u + (ku_1)^S e^{-qu\tau} \text{ を適当としている。}$$

 $u\tau$ は u の τ -時間おくれである。

- 1) T.Y.Li-J. Yorke, Period 3 implies chaos
Amer. Math. Monthly 82(1975) 985-992
- 2) Aın. Sarkoski, Co-existence of the cycle of continous mapping of the line into itself.
Ukrain. Math. 2.16(1964) 61-71
- 3) M. Yamaguti-H. Matano, Eulers finite difference scheme and chaos.
Proc. Jap. Acad.(1979)to appear.
- 4) J.S.Orr, J. Kirk, K.G.Gray and J.R.Anderson
A study of the inter dependence of red cell and bone marrow stem cell populations
Brit. J. Haematology 15(1968) 23-34

Skinned fiber の収縮における、二、三の問題について

北沢 俊雄 遠藤 実 東北大学・医

筋収縮の分子反応は近年かなりの程度まで明らかにされてはきたものの、生きた筋細胞において張力の発生がどのような分子機構によって起こるかの詳細はまだほとんど分っていない。ところでskinned fiberの発生する張力は種々の要因によって増大もしくは減少する。張力減少の機構を考えるのは容易であるが、張力増大化の機構には興味をもたれ、その追究は力の発生機構解明の何らかの手がかりになるかも知れないと考えられる。我々はskinned fiberの張力増大因子について、二、三解析を加えた。

アフリカツメガエル骨格筋から単一筋線維を取り出し、弛緩液中でskinned fiberを作った。張力はストレインゲージトランスデューサーで測定し、筋の最大短縮速度は定常的な等尺性収縮中に線維を一定の長さ急激に縮め、ゼロに落ちた張力が再び上昇しはじめるまでの時間から測定した。

張力増大化の要因として、イオン強度の減少、水の重水による置換、PVP (polyvinylpyrrolidone)の添加の3種について主に調べた。イオン強度を0.2から0.13に低下すると、すでに知られている通りCa感受性は約2倍高くなり、Ca高濃度下での最大張力は30%以上増加したが、無負荷での最大短縮速度はほとんど変化しなかった。水を重水で置換すると、置換の割合に比例して最大張力は大きくなり、全置換では約40%も増加したが、最大短縮速度は逆に約40%減少した。PVPを少量加えるとCa感受性が僅かに増加すると共に最大張力も15~30%程度増加したが、この場合も最大短縮速度は逆に約30%減少した。PVP大量では逆にCa感受性も最大発生張力も減少した。PVPはその分子量にもよるが、容易に筋原線維内に入らないと考えられ、確かにskinned fiberの直径はPVP中で減少する。しかし、太さを変えない小分子の糖類を加えたときも最大発生張力は増加するので、直径すなわちフィラメント間隔の減少がこの張力増大の原因であるか否かは不明である。なお、この他にたとえばhalothaneのような薬物によっても最大発生張力は増大する。

以上の張力増大因子は、いずれも筋節長 $2.0\mu\text{m}$ 以上の領域で節長に無関係にほぼ一様に増大効果を示した。

PVPは重水または低イオン強度下では張力増大作用は全く見られなかったが、

重水中で低イオン強度にすると張力はさらに増大した。以上の結果は、少なくとも重水と低イオン強度の張力増大化機構はそれぞれ別々の機序によるものであることを示唆する。

今後、収縮中にアクチン近傍に存在するクロスブリッジの数が張力増大化因子によって変るか否かをX線回折法で、また、クロスブリッジのバネ因子が変るか否かを硬直筋の弾性係数の変化で観察することなどにより強力増大化の機構をさらに追究する予定である。

神経終末の有殻小胞について

門田 健 千葉大学・医

目的 ネコ分離上頸交感神経節を、種々の温度下、代謝基質・阻害剤等を含む Krebs 液中に浸し、その節前神経線維に電気刺激を加える。刺激終了直後または適当な休止（回復）期をおいた後に材料を固定、神経終末の各微細構造の変化を電子顕微鏡で観る。

方法 ネコ両側上頸交感神経節を分離、グルコース（ $10\mu\text{M}$ ）を含む Krebs 液中に浸し、 O_2/CO_2 混合気（95%/5%）を十分に通気する。 37°C または 10°C 下で電気刺激を加え（ 20V , 10Hz , 1msec 持続, 30min ），直ちに通常の方法により、二重固定した。一部のものは固定することなく、種々の温度（ $0-37^\circ\text{C}$ ）下で、次のような代謝基質・阻害剤等を加えた Krebs 液中で、 $0-30$ 分間回復させた後に固定した；グルコース； $10\mu\text{M}$ ，焦性ブドウ酸： $10\mu\text{M}$ ，モノヨード酢酸； $500\mu\text{M}$ ，2,4-ジニトロフェノール： $400\mu\text{M}$ ， KCN ， $400\mu\text{M}$ ）。神経節に長軸方向の切片を調製し、電顕で観察した。

結果 (I) 刺激直後の像 37°C 下では、シナプス小胞の枯渇、終末形質膜の拡大・波動化が観られた。 10°C 下で刺激したものでは、シナプス小胞数に著変はなく、有殻小胞がみられた。また終末形質膜の波動化は軽度であった。

(II) 回復像 1) 温度の効果 30min 後に 37° ， 10°C 下では、ほぼ完全な回復がみられたが、 0°C ではなかった。 37° ， 10°C 下， 5min では、少数のシナプス小胞、有殻小胞、時に空胞がみられ、終末形質膜の拡大・波動が強かった。

2) グルコースを除くと、終末には変性像がみられた。焦性ブドウ酸（ $10\mu\text{M}$ ）を加えると、回復がみられた。3) (エネルギー) 代謝阻害剤 上記 3 種の代謝阻害剤を加えた溶液中で、 37°C ， 15min おいた場合、不完全ながら回復がみられ、有殻小胞が混在していた。 37°C ， 5min おいたものでは、コントロールに比し、回復の遅れがみられた。

結論と考察 電気刺激を加えた場合、シナプス小胞数の変化、終末形質膜像の変化（拡大・波動化）には温度依存性があり、低温下ではシナプス小胞の消耗は少なく、有殻小胞がみられる。刺激後の回復の初期過程には有殻エンド

シトース、有殻小胞の形成が含まれている。回復過程は温度依存的であり、エネルギー代謝依存的（とくにミトコンドリアを経由する代謝に）である。これらの所見を参照しながら、神経終末におけるシナプス小胞の動き、それとエンドシトースとの関係を考察した。

脳内活性物質検索のための一つのアプローチ

松尾 壽之 宮崎医科大学

視床下部ホルモンによる下垂体前葉制御説がHarrisによって提唱されてから、実に30年後に始めて、TRH, LH-RHの構造が証明された。極めて高度の生理活性を有するこれらペプチドホルモンは非常に単純な構造をもっていたため、直ちに化学的合成が行われ、それらの抗体も作られ、神経内分泌学領域に新しい展開が生れた。

このように、一つの生理活性物質の単離、構造決定、合成が新しい展開に必須であるにもかかわらず、脳研究において、遅々として進まなかったのは、その存在量が極微量（ナノグラム／匹）であることが最も大きな原因であり、生理活性の微量検定法、微量化学分析法の開発をまって、最近、漸く進展し始めたといえる。

Substance P(1971), somatostatin(1973), neurotensin(1975), ついでMetおよびLeu-enkephalin(1975)と種々のアプローチによって、脳内生理活性ペプチドの構造が明らかにされると共に、それらの生理学的意義、脳内分布、生合成機構、臨床面への応用と多方面への展開がなされつつある。

これらの諸例から明らかなように、脳内に存在する極微量の物質を検索するには、一つの特定の生理活性を指標として、高感度、しかも特異的な活性測定法を用いて、脳分画を追跡して行くのが常道である。しかし、この方法だけでは、精製の過程において、分離してくるであろう未知物質を見逃してしまうことがしばしばである。一方、生理的意義不明のまま、多くの物質の精製、構造決定を行うのは、賢明な方法ではあるまい。

われわれは、過去のLH-RH研究の経験を背景に、独自の視点にたって脳内活性物質の検索を試み、新しいモルヒネ様ペプチド(α -neo-endorphin)を発見、その構造解析の結果、現在の問題点の一つであるLeu-enkephalin前駆体の存在に解答を与える知見を得た。最近、われわれが行った α -neo-endorphin研究を例にとって、脳内活性物質検索の一つのアプローチを紹介したい。

哺乳類のシナプス小胞について

小西 克利 横山 勝雄 独協医科大学

シナプス小胞は神経終末部に存在し、神経系の化学的情報伝達物質の貯蔵放出調節機能を有すると考えられ、その機能に関する詳細な研究が神経化学の分野では強く要請されている。本研究では哺乳動物のシナプス小胞の粒子としての基本的諸性質を明らかにすることにより、分子レベルにおけるシナプス小胞の機能と構造の解明に寄与しようとするもので、その初段階における成果を報告する。

試料と方法：シナプス小胞試料はウシ大脳皮質から、ゾーナルローターとスイングローターを併用したショ糖密度勾配遠心分離法により調製した。ショ糖濃度 0.3M および 0.4 M 分画から夾雑物の少ないシナプス小胞試料を得た。これらの試料について電子顕微鏡観察・超遠心分析・等電点分析・ゲル電気泳動分析・高速液体クロマトグラフ分析を行った。

結果と検討：ネガティブ染色法による電顕観察では 0.3M 分画および 0.4 M 分画から得られたシナプス小胞試料に顕著な差異は認められなかったが、超遠心分析から求めた沈降係数は明らかに異なる。0.3M 分画から得た試料の沈降係数は 70~80 S であり、0.4 M 分画から得た試料のそれは 160~180 S であった。後者はシビレエイの発電器官から得られるシナプス小胞の沈降係数 180 S には近い値であり、それに対応する粒子であると考えられるが、前者については全く別種の粒子であるか、あるいは哺乳動物に特有のシナプス小胞であるか更に検討を要する。アンフォラインと蔗糖を用いた密度勾配等電点分析の結果では、0.3M 分画、0.4 M 分画の試料共に等電点は pH 4 でほぼ似た値を示した。シナプス小胞に含まれるタンパク質のアミノ酸組成で、酸性アミノ酸含量が目立って多いことを考慮すれば、シナプス小胞の表面には酸性タンパク質が存在するのかも知れない。つぎに、0.3M 分画および 0.3M 分画を 2% SDS, 5%メルカプトエタノール処理を行なった後、12.5%アクリルアミドゲル電気泳動で成分タンパク質の分析を行なったところ、およそ 40 本ほどのバンドが認められ、両分画試料に共通するタンパク質のバンドが検出された。これらのうち、分子量が 2 万、3 万 5 千、3 万 9 千、4 万 3 千、6 万 8 千、7 万 3 千のタンパク質はシビレエイのシナプス小胞構成タンパク質に類似するものである。なお Kelly 等によって指摘されたように本シナプス小胞試料でも分子量 1 万以下

のタンパク質は存在しないようである。SDS処理を行なった試料は同時に分子ふるい型カラムTSK-8000SWを用いて高速液体クロマトグラフ分析を行なったが、ゲル電気泳動の分析結果に対応する結果を得た。高速液クロ分析はゲル電気泳動分析に比べて分析能は多少劣るが、操作が簡単で迅速な分析が行なえることや、シナプス小胞試料から構成タンパク質その他を分離し、更に分子レベルでの研究を進めて行く上での成分試料調製の有力な武器となるのではないかと考えられる。

シナプス小胞の生化学的研究

田中 亮 名古屋市立大学・医

神経化学伝達物質がどのような機構により放出されるかは、まだ部分的にし
 か明らかになっていない。伝達物質放出の機構は物質分泌の機構と、少なくとも
 基本的には同様なものと仮定して実験を進め、結果を解釈する研究者が多い。
 これまで提出された放出機構の仮説はすべてこうした方法に基づいている。
 加えて、2つの前提をふまえている。a)小胞は *in vivo* で実在すると考えて、
 様々な実験事実をほとんどすべて上手に説明できるので、そのように前提をお
 く。b)伝達物質がシナプス小胞から直接にシナプス間隙へ放出されるという慣
 習的な考え方は正しいとする。これを基礎として一時認めた上で、我々は実験
 とその解釈を進めてきた。ここでは主にその結果を中心として、伝達物質放出
 に関与するシナプスの構成成分の役割について考えていきたいと思う。

シナプス小胞が伝達物質を放出する時、シナプス前膜に一時的に付着し放出
 が終われば前膜と小胞膜との間に物質の授受がないまま離れるのか、あるいは小
 胞膜は前膜と融合し放出と共にその一部と成り後に回収されるのかという問題
 がある。

シナプトソームの構成成分を単離し、その構成タンパク質と糖タンパク質を
 SDSポリアクリルアミド電気泳動法により比較してみる。その限りでは各構
 成分は質的に良く似ているので、シナプス小胞膜がシナプス前膜に融合すると
 考えて良いらしい。また小胞のリサイクリングが膜糖タンパク質への糖の付加
 と除去により制御されていると考えても良いようだ。

放出に Ca^{2+} が必要である事は多くの種類の実験から確められているが、作
 用機構については憶説の域を出ない。我々のイオノフォアを使った実験、シナ
 プス構成成分から ATPase タンパク質を分離し酵素としての性質を調べた実験
 からは、神経終末にあるアクチンミオシン様のタンパク質が放出に関与してい
 ると考えて、不都合はないらしい。これが ATP を加水分解する時に Mg^{2+} を要求
 し、微量の Ca^{2+} で作動をはじめるもののようだ。

シナプス小胞がリサイクリングするならば、そしてその速度が放出過程のそ
 れより低くければ、放出状態ではシナプスソーム内の小胞数は減って良い。電
 子顕微鏡を使い数えてみると放出をおこす条件下では確かに減る。

このように小胞とシナプス前膜とが相互作用した結果伝達物質が放出される

らしい。小胞とシナプトソーム構成成分との組合せを作り、小胞からの伝達物質の放出を調べてみる。シナプス・ジャンクションが放出作用が最も強く、シナプトソーム膜、マイクロソームと続き、ミエリンは非常に弱い。また放出は ATP , Mg^{2+} , Ca^{2+} を取り除くような条件下にすると抑えられる。したがって放出に必要な因子は、他にもあるだろうが、少なくともこれらのものであると考えて良いようだ。

コリン作動性神経シナプス小胞の Stoichiometry

大沢 一爽 東京大学・医

○電気魚発電器管 *Torpedo marmorata* のシナプス小胞

発電器管組織にシナプスをもつ神経末端から大型無芯シナプス小胞（直径約 $880\sim 950\text{\AA}$ ）を取り出す抽出方法が、遠心機とガラス粒子カラムクロマトグラフィーによって確立された。分離調製されたシナプス小胞を生化学的に分析した結果次の組成が明らかになった。

蛋白質 $28.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 分取標本溶液

脂質 $1.60\mu\text{g}/\text{ml}$ " "

Ach $123.6\text{ nmoles}/\text{ml}$ 分取標本溶液

ATP $15.4\text{ nmoles}/\text{ml}$ " "

シナプス小胞数 3.8×10^{11} 個/ ml 分取標本溶液

これからコリン作動性神経のシナプス小胞にはアセチルコリンが 19.9×10^{-4} 分子ユニット量として存在することが認められた。

○哺乳動物のシナプス小胞

Guinea pig の大脳皮質からシナプス小胞を分取して、電顕による形態では homogeneous とみられる小型無芯小胞（直径約 $350\sim 500\text{\AA}$ ）の Ach 含有量を調べると 300 分子/シナプス小胞の結果が得られた。電気生理学的に報告されたシナプス小胞含有量の Ach よりも小さい値となった。

contamination があるのか、分画中のシナプス小胞が含有物質を放出してしまったのかの判定は困難である。

○シナプス小胞の表面荷電密度

シナプス小胞の electrophoresis を行って、表面荷電密度 σ を求めるため、 ζ -電位を測定した。

その結果イオン強度 0.15, イオン雰囲気 $K = 1.259\times 10^7$, 電気泳動移動距離 $= -0.79\mu\text{M}\cdot\text{sec}^{-1}\cdot\text{v}^{-1}\cdot\text{cm}$ の時、 $\zeta = -10.358\text{ mV}$ を得た。

計測の結果 $\sigma = 9.5\times 10^{-7}\text{ c}\cdot\text{cm}^{-2}$ を得た。

分画されたシナプス小胞には $1685\text{\AA}^2$ に 1 個の negative charge をもっていることが明らかになった。

イオン強度及び pH, と時間経過の ζ -電位の測定値を報告する。

シビレエイ電気器官のコリン性シナプス小胞

田代 朋子 東京大学・医

シビレエイ (*Torpedo marmorata*) 電気器官から高純度のコリン性シナプス小胞を単離し、その化学組成及び蛋白質構成を分析した。従来の抽出・単離法を改良することにより小胞蛋白質あたりのアセチルコリン (Ach) 比濃度を10倍高めることができた。こうして得られたシナプス小胞は蛋白質1 μ gあたり、Ach 6.9 μ mol, ATP 1.0 μ molを含み、脂質含量は蛋白質の8.5倍(%)と高い値を示す。

精製シナプス小胞はSDSゲル電気泳動で一定の蛋白質パターンを示し、その分子量は20,000~160,000にわたる。小胞のコア物質を形成すると考えられてきた低分子量酸性蛋白質「ヴェシキュリン」(分子量10,000)は見出されない。また、ミオシン、チューブリン、「クラスリン」と一致するバンドも存在しない。しかし、このシナプス小胞にはシビレエイ筋肉アクチンと一致する濃いバンドがみられる。二次元電気泳動で更に詳しく比較したところ、この蛋白質は筋肉アクチンよりわずかに塩基性側の等電点を示し、非筋肉性アクチンに属するものと思われる。

以上の観察はシビレエイシナプス小胞が蛋白質のコアを持たないことを強く示唆しており、「ヴェシキュリン」の化学的本体の再検討が必要となった。その結果、「ヴェシキュリン」は蛋白質ではなく、そのアミノ酸の90%以上はペプチド結合を形成していない遊離アミノ酸であることが明らかになった。更に、「ヴェシキュリン」には、ウロン酸とアミノ糖がほぼ1対1のモル比で含まれており、グリコサミノグリカン的一种であることが示された。精製小胞のグリコサミノグリカン含量は蛋白質1 μ gあたり約0.2 μ gである。現在のところ、「ヴェシキュリン」が小胞の内側にあるのか、外側に付着しているのかは不明であるが、内側にあるとすれば、マスト・セルのヘパリンとの類似が考えられる。

シビレエイ電気器官はまた、コリン性シナプスゾームの材料としても好適で、純度の高いものが得られる(蛋白質あたりのAch含量は哺乳動物脳のシナプトゾームの500~1000倍に達する)。このようなシナプトゾームからシナプトゾーム形質膜(SPM)を分離し、シナプス小胞との比較を試みた。 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase, 5'-nucleotidase, アセチルコリンエステラーゼ(AchE)を指

標にして精製したSPMの蛋白質構成をSDSゲル電気泳動で調べると、分子量100,000と75,000に主要なバンドがあり、シナプス小胞のパターンとは大きく異なる。

Sodium pump の微細構造に関する研究

出口 修宏 慶応義塾大学・医

腎より精製した膜結合性酵素蛋白の Na-K-ATPase を電子顕微鏡的に観察を行い、得た知見を述べる。

試料は, Jørgensen がすでに報告している精製方法を用いたが, まず腎髄質外層部のホモシネイトからミクロゾーム分画を遠心分離し, これに ATP 存在のもとにドデシル硫酸ソーダで反応し, 密度勾配沈降平衡法にて得られた沈渣である。脂質と結合したままで精製されているが, 試料中の酵素活性値は 35 単位以上に上昇している。ポリアクリルアミド電気泳動法でみると, 脂質以外にはわずかに 2 本の蛋白沈降帯がみられるのみである。触媒作用を有する分子量 100,000 と糖蛋白の 40,000 で, この 2 つの蛋白分子が 1 対 1 のモル比で存在するところから, 140,000 が蛋白単位として推測される。この試料の超薄切片像は, 3 層構造をもつ膜片のみでなりたっていることがわかる。ネガティブ染色では膜片は円盤状を呈し, 無構造の平面に, 電子密度の低い小粒子状物として認められる。これらの小粒子は諸々で集簇したり帯状の連なりを示し, 粒子のみられない平面と種々の割合で存在している。大部分の膜片においても, また折れ曲り膜の反対側を示していると思われる部分においても, ほぼ類似の分布を示すことは, この小粒子が膜の両面より突出する粒子であることを示唆する。この膜表面粒子を 2 つの方法で大きさを測定した。第 1 に, 写真にみられる粒子の直径を直接測定することと, 第 2 には, 粒子の中心点と中心点を測定する方法で, 前者で約 $27\text{\AA}$, 後者では $30-50\text{\AA}$ にこの粒子の直径があることが分った。直接法の直径は膜突出部のみ測定していることがネガティブ染色の原理から推測でき, 後者で測定されたものが, 本来の直径に近いと思われる。さらにフリーズフラクチャー法でこの膜片を観察すると 2 種類の断面が認められ, 凸面が膜内粒子数の少ないものと凹面で多いもので, 通常の形質膜にみられるものとはほぼ同じ像である。この膜内粒子は直径 $100\text{\AA}$ を有し, 表面粒子の 2 倍にちかい値を示している。また表面粒子の出現頻度は, $12,500/\mu^2$, 膜内粒子は両断面を合せて約 $8,800/\mu^2$ である。ここで観察された粒子は蛋白分子で脂質膜を僅かに突き抜ける高さ $90\text{\AA}$ をもつと仮定したとき, この試料で知られている脂質量, 蛋白量を用い, 直径, 出現頻度を計算すると, この酵素の最小蛋白単位と考えられる分子量 140,000 では, $51\text{\AA}$, $18,700/\mu^2$, 2 倍

体の280,000で、 $73\text{\AA}$ 、 $6,800/\mu^2$ 、560,000で $102\text{\AA}$ 、 $3,400/\mu^2$ を得た。表面粒子は、140,000の計算値と一致している。一方膜内粒子は、切断の際、蛋白自身の破断が起り得ること、直径についても金属の蒸着して厚めになっていることを考慮すると560,000より分子量280,000の計算値に近づくことになる。このことは分子量280,000の蛋白が、ATP 1分子とウワバイン1分子とも結合することから、この酵素の最小機能単位である考えを支持する。以上の点から、2つの方法は、蛋白分子の異った面を観察しており、Na-K-ATPase そのものをみていることが強く示唆される。

サソリ毒素のNa-channelへの結合

岡本 治正 東京大学・医

脳神経系における迅速な情報処理は二種の電気信号、即ち活動電位及びシナプス後電位により遂行されている。いずれの電位も興奮膜におけるイオン透過性の選択的な変化により発生する。興奮膜内には各種のイオンに対し個別的な通路構造（イオンチャンネル）が存在し、イオン透過性を規定する事が示唆されている。

近年、ヘビの α 毒素（アセチルコリンによるシナプス後電位を特異的に抑制する分子量7,000前後のペプチド）の結合を指標として、ニコチン性アセチルコリン受容体分子の同定、精製が成功した。一方活動電位発生に与るNa、或はKチャンネルについては分子的研究が遅れており、その第1の理由は、チャンネル物質に対して α 毒素に匹敵する特異的リガンドの検討が進んでいないためである。本研究の目的はNaチャンネルに対するこの種の特異的リガンドを確立し、その結合を指標にNaチャンネル分子を同定、精製する事にある。

我々は先ず、活動電位を延長する作用のあるサソリ粗毒より、分子量7,400の有効成分を単離して、その作用機序を検討した。その結果、精製毒素は非常な低濃度で（陽イオンのない条件では解離定数約10mMと計算される）特異的にNaチャンネルに作用を及ぼす事、従ってそのマーカーとして有用である事を見出した。

次に我々はNaチャンネルの化学的同定の第一歩として、サソリ毒素のNaチャンネルへの結合を膜断片のレベルで検討して以下の結果を得た。

- (1) 精製サソリ毒素 ^{125}I により標識化し、モノヨード誘導体（ ^{125}I -サソリ毒素）を単離した。 ^{125}I -サソリ毒素の生理活性は、未標識毒素のそれと等しかった。
- (2) 電気ウナギの発電器官より粗膜分画を調製し、 ^{125}I -サソリ毒素の結合活性を種々の濃度の未標識毒素共存下に測定した。Scatchardプロット上の解析から、高親和性（解離定数 μM の桁）の二つの結合部位が見出された。前者の結合部位数は42 pmole/g組織（6.3 pmole/mg蛋白）と算出され、従来テロトキシシン結合部位数として推定されてきたNaチャンネルの数に匹敵した。又同じ発電器官でもNaチャンネルを含まないシビレエイの場合には、低親和性結合のみで、高親和性の部位は見出されなかった。

- (3) サソリ毒素の高親和性部位への結合は1対1の様式であり、 Na^+ 、 Mn^{2+} 、 La^{3+} など種々の陽イオンにより競争的に阻害された。これはサソリ毒素のNaチャンネルへの結合について、従来の生理学的検索より得られた知見と一致する。

ミオシン軽鎖の交換を用いた構造変化の検出

岡本 洋 順天堂大学・医

筋肉の働きを分子的に理解する一つの道は、ミオシンの示す ATPase 作用、アクチン結合能、及び太いフィラメント形成能の間のつながりを明らかにすることであろう。ミオシンのサブユニット構造はそれらの働きと密接に係っているだろうという予想のもとに主鎖と軽鎖をおのおの分離し、個々の性質を明らかにした上で再構成しようという試みがされてきたが、成功していない。主な原因は主鎖が軽鎖に較べて非常に不安定で、容易に不可逆的変性を起すためと思われる。そこでミオシンの軽鎖が主鎖から離れ易くなる程度の変性条件で外から大量の軽鎖を加えてやれば、軽鎖間の組み換えが起るものと考えた。この際、外から加える軽鎖にスピンラベルやけい光ラベルをしておけば、軽鎖と主鎖の結合部位の構造変化や、軽鎖のどのようなアミノ酸残基がミオシンの機能に関係するかが調べられる。ここではニワトリ砂のう平滑筋のミオシンについて得た結果を述べる。

ニワトリ砂のう平滑筋ミオシンは分子量20万の主鎖と2万及び1.7万の二種の軽鎖が各2モルずつより成っている。この軽鎖を5 M グアニジン塩酸処理で主鎖から分離し、システイン残基をけい光試薬 ANM でラベルした。この試薬はSH基に反応してはじめてけい光性となり、そのスペクトルは環境によって大きく変化するため、構造変化のリポーターとなる。けい光ラベル軽鎖混合物を2 M 尿素存在下にミオシンとインキュベートした後尿素を透析によって除くと、けい光ラベルした軽鎖混合物のうち、分子量1.7万のG₂鎖を特異的に交換したミオシンが得られた。このミオシンは未処理のそれと、ATPase 活性、アクチンとの結合について差がなかった。SDSスラブ電気泳動及び5 M グアニジン塩酸中でのけい光分析から、ミオシンの全G₂鎖のうち約85%がけい光G₂鎖と置換したことが示された。

このミオシンのANMけい光はfreeの軽鎖それより長波長側に極大をもつことから、ラベルはミオシンの中でよりpolarな環境に存在すると思われる。ミオシンのANMけい光は二価金属イオンでは変化しないが、Mg²⁺存在下にATP

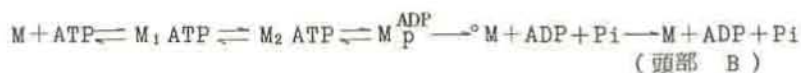
を加えるとけい光強度が増し、極大が青方移動する。この変化はATPがADPに分解し尽されるとともにもどった。ADPではけい光スペクトルは変化しないが、他のヌクレオチドミりん酸では変化した。ADP,CTPを除いて、他のヌクレオチドの効果はトリプトファンけい光の増大効果とよく対応した。

freeのけい光ラベル軽鎖及びミオシンとの混合物のけい光スペクトルは、ATPによって変化しなかった。以上の結果は平滑筋G₂鎖がATPase 活性中心の近くに存在することを示し、この軽鎖に類似の骨格筋軽鎖がアクチンとの相互作用に係っているとする、Weedsらの報告とあわせて考えると、この軽鎖はミオシンの重要な機能の二つに係る領域に存在すると推定される。

ミオシンの2つの頭部の構造と機能

井上 明男 大阪大学・理

ミオシン・ATPase反応のメカニズムの詳しい解析から、ミオシンの2つの頭部が異なるATPase反応を行うことを明らかにした。すなわちATPase反応を 1) Transient kineticsによる反応素過程の解析、2) 定常状態におけるATPase反応の速度の解析、3) ATP加水分解中における反応中間体の検出、の3つの方法で解析した。いずれの方法においてもATPが片方の頭部(B)では活性ミオシン-リン酸-ADP複合体, M_p^{ADP} , を経て、他の頭部^(A)ではミオシン-ATP複合体, MATP, を経て加水分解されていることが示された。



上記のメカニズムはミオシンの頭部(S-1)を M_p^{ADP} を形成するもの(S-1B)と MATP を形成するもの(S-1A)に分離することによってより明確にされた。S-1の分離はいずれもアクチンとの結合の性質を利用した 1) 超遠心分離法、2) アフィニティーカラムクロマトグラフィー、3) S-1の化学修飾、の3つの方法で行われ、S-1は M_p^{ADP} をより多く形成する分画とより少なく形成する分画に分離された。さらに分離したS-1を用いて、 Mg^{2+} -ATPase反応は頭部A,Bの両方で、 Ca^{2+} -ATPase, EDTA(K^+)-ATPase ならびにアクトミオシン型ATPase反応は頭部Bのみで行われることが明らかにされた。

頭部AとBの構造の違いをミオシンのTNBSによる化学修飾から研究した。ミオシンはピロリン酸の存在下では頭部Bのみが、ピロリン酸の非存在下では頭部A, Bの両方がそれぞれ頭部モルあたり1モル修飾された。TNBSによって修飾されたS-1と修飾されていないS-1はDEAE-celluloseカラムクロマトグラフィーによって分離された。TNBSによる修飾によってミオシンのリン酸の初期放出(M_p^{ADP} の形成)ならびにEDTA(K^+)-ATPase活性は著しく減少した。頭部Aに結合したTNP基はピロリン酸の添加によって蛋白質内部に埋もれることが紫外吸収の変化から示された。したがって、頭部Aの特定のリジン残基がピロリン酸によって蛋白質内部に埋もれ、このことが

ピロリン酸の存在下では頭部Aが修飾されない原因となることが結論された。TMPの結合部位はさらにミオシンのheavy chain上の分子量25,000のトリプシンフラグメント上に存在することが示された。

頭部Bはアクトミオシン-ATPase反応を行うので筋のエネルギー変換に関与しているものと思われる。アクトミオシン-ATPase反応のメカニズムはさらにアクト-H-メロミオシンのATPによる解離、再結合から調べた。その結果、アクチンとHMM^{ADP}_Pの再結合は非常に遅く、ATPはアクト-HMMの解離を経ずに加水分解されることが示された。さらにATPase反応中のアクチンとHMMの結合はATPaseにほぼ比例して起こることが明らかにされた。他方、頭部AはCa²⁺による筋収縮の制御に関与していることがTM-TN存在下のアクト-HMM-ATPase反応の速度と反応中間体の量の関係から示唆された。

ネガティブ染色で見たミオシン分子の構造

高橋 興威 北海道大学・農

横紋筋の収縮時に、太いフィラメント表面にある架橋がどのような状態変化をすることによって、細いフィラメントを滑らせるのかという問題は現在なお解明されていない。それは、ミオシン分子特に架橋を形成している頭部の形と大きさが正確に知られていないことによると考えられる。ミオシンのように複雑な形状のたんぱく質の場合、物理化学的手法によって確度の高いパラメーターを得るのは困難なので、電子顕微鏡的に分子を直接観察することにより正確な情報が得られる事を期待した。従来、ミオシンモノマーには適用不能とされていたネガティブ染色法を改良し、分子を直接観察して、頭部の形状および分子内柔軟構造の局在に関する知見を得た。

頭部の形と大きさ：ミオシン頭部は球あるいは回転円体ではなく、洋梨型である。長さは $208 \pm 17 \text{ \AA}$ であり、先端に近い膨大部の直径は $95 \pm 10 \text{ \AA}$ で、付け根附近の直径は $55 \pm 8 \text{ \AA}$ である。2ケの頭部がいずれも直径約 $210 \text{ \AA}$ の円型に観察されるものは2%の頻度で出現するが、これらは試料支持膜に対して垂直に位置していると思えば、頭部は回転対称であると考えられる。これらの結果から、頭部の大きさは従来考えられていた値よりかなり大きいものであることが判った。

分子内柔軟構造の局在：ミオシン分子には、1)頭部と尾部の接合部ならびに2)尾部内部の2ヶ所に柔軟構造のあることが観察された。頭部一尾部接合部の柔軟性は、2ケの頭部の配置が多様であるので容易に知ることができる。1対の頭部が互いになす角は $80^\circ \sim 270^\circ$ の間に広く分布しているが、全体の約80%は 90° である。また、1ケの頭部が尾部となす角は $45^\circ \sim 270^\circ$ の間にあるが、全体の約30%は 135° である。従って、2ケの頭部がY字型に配置したものの出現頻度が最も高く、ミオシン頭部はこの配置の時に安定状態にあると考えられる。このことは架橋の存在様式を考える上で重要である。ミオシン尾部の長さは約 $1,400 \text{ \AA}$ 、直径 $30 \text{ \AA}$ であるが、柔軟構造は頭部一尾部接合部から $555 \pm 150 \text{ \AA}$ の範囲に広く存在しており、 $300 \text{ \AA}$ にわたるこの部位はS2の中のプロテアーゼに分解され易い部分と一致すると考えられる。頭部一尾部接合部から $430 \text{ \AA}$ のところに等異的柔軟構造があるとする考えを支持する結果は得られなかった。

太いフィラメント表面では、 $148\text{\AA}$ の周期でミオシン1分子中の2ヶの頭部がそれぞれ異なる細いフィラメントと結合すべく突出しており、1ヶの頭部は1ヶの架橋を形成していると推定できる。収縮時には、長さ $210\text{\AA}$ の架橋が $150\text{\AA}$ に短縮しつつ首振り運動をして細いフィラメントを滑らせると仮定すると、1回の首振り運動当りに細いフィラメントを滑らせる距離は $140\text{\AA}$ となる。

ミオシン ATPase 反応中間過程のエンタルピー変化と筋肉の熱発生

児玉 孝雄 順天堂大学・医

筋収縮は化学エネルギーが機械エネルギーに変換される過程であり、その機構を理解する上でのエネルギー論的解析は不可欠である。基本的な解析法のひとつとして、収縮タンパク質の関与する反応の反応熱 (ΔH) の微少熱量計による直接測定がある。 ΔH は平衡定数の温度依存性から、熱容量変化 ($\Delta C_p = 0$) と仮定して、便宜的に計算されている (Van't Hoff ΔH)。しかし、タンパク分子の大きな構造変化を本質とする反応の ΔC_p はしばしば大きいことがあるので、Van't Hoff ΔH の無制限な評価・適用は危険である。

現在市販されている微少熱量計は高感度でありかつ基線安定性がよいので、適当な改良を行えば、全反応熱の精密測定には最適である。Woledge と筆者は熱量滴定ができるように改良した LKB バッチ型熱量計を用いて、ミオシンおよびそのサブフラグメントへの ADP 結合を詳細に解析し、結合定数の再評価、 ΔH 、 ΔC_p の測定を行った。結合定数は Trentham らが速度論的に得た値とよく一致する。この結合反応はかなりの発熱過程であり、熱容量変化も大きい ($\Delta C_p = -1.4 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)。この反応はミオシン ATPase 反応の最終段階、 $M \cdot \text{ADP}$ (M : ミオシン頭部の活性中心) の解離の逆反応であるから、正反応は吸熱であり、 $\Delta C_p > 0$ である。ATP 加水分解の正味の ΔC_p はきわめて小さいから、ミオシン ATPase 反応の他の中間過程のうちで少くともひとつは $\Delta C_p < 0$ であることになる。

熱発生速度論的解析を行う上での困難な点は、第一に、熱量計の与える温度-時間曲線は一般に、応答速度が充分でないことと熱漏洩定数が大きいことにより、大きくひずんでいること、第二にかなり大量の試料が必要とされることである。われわれは、これまでの熱量計と比較して、第一の点ですぐれた熱量計を自作している。反応液量は 1.0 ml で、1 mJ 程度までの熱パルスに応答時定数 1 S で検出できる。この装置を用いて、ミオシン-サブフラグメント 1/ATP 相互作用の熱産生経過を追跡した。得られた温度-時間曲線を A. V. Hill の線型計測理論によって解析した結果から、以下のようなミオシン ATPase 反応 energy profile をえがくことができる。

1) ATP の M への結合は著しい発熱過程である ($\Delta H = -90 \text{ kJ mol}^{-1}$, 0.1 M KCl, pH 7.8, 20°C)。2) M に結合した ATP の加水分解は、水溶液中の場合

合 ($\Delta H = -23 \text{ kJ mol}^{-1}$) と対照的に、吸熱反応であるが ($\Delta H = +88 \text{ kJ mol}^{-1}$)、著しいエントロピー増加が自由エネルギー変化 ($\Delta G^\ominus$) をわずかに負にしている。

3) 全過程の律速段階である $\text{M} \cdot \text{ADP} \cdot \text{Pi}$ から Pi が解離する反応は著しく発熱する ($\Delta H = -88 \text{ kJ mol}^{-1}$) が、エントロピーの大きな減少により $\Delta G^\ominus$ は小さい。

4) 最終段階の ADP 解離は吸熱である ($\Delta H = +72 \text{ kJ mol}^{-1}$)。

このように中間過程が加水分解の全反応熱よりずっと大きい反応熱を伴っていることと筋収縮におけるエネルギー変換過程の関連をつけることが今後の課題である。

収縮のくり返しによる短縮熱産生の変化

山田 和廣 大分医科大学

筋が短縮するとき、等尺性収縮時よりも高い率で熱を産生する。この余分の熱産生は短縮熱とよばれる。この短縮熱産生は、短縮によって余分に生じた反応によるものであらうと考えられる。Rallらによると、少くともある条件下では、短縮熱はATP又はクレアチン磷酸の分解によるものでなく、又この「短縮熱反応」は短縮後数秒後にはATP分解と結合して逆転する。このような短縮熱反応がまだ十分に逆転していない時期に第2の短縮が生じると、この第2の短縮による熱産生は第1のそれと比べて减小していることが期待される。

このような測定の試みはDickinsonとWoledgeによって行われたが、それによると二つの収縮における短縮が5秒の間隔で行われたとき、第2の収縮における短縮熱産生は第1の収縮における短縮熱の75%に减小した。

本実験では、とくにこのような測定において生じることの予想されるアーティファクトに注意して、同種の測定を行った。先ず、熱電堆より長い縫工筋を2本用いた測定では、短縮熱はくり返しにより増大し、Dickinsonらの結果とは明らかにことになっている。Dickinsonらは1本の縫工筋を用い、その長さは熱電堆より短かく、かつ筋のほぼ全長より温度変化を記録している（本実験における方法Bに相当）。このような結果の相違はどちらかの結果にアーティファクトによるエラーが存在することを示している。この種のアーティファクトは、収縮によって温度の上昇した筋が短縮し、熱電堆の表面を移動することによって生じるものであらうと考えられる。

このような「動きのアーティファクト」を二種の独立な方法で測定した結果、本実験で用いた方法（方法A）による短縮熱の測定には、動きによるエラーは加わっていないことが明らかにされた。一方Dickinsonらの方法（本実験における方法B）によると短縮熱産生はくり返しにより减小するが、このときの「動きによるアーティファクト」を測定し、これによる補正を行った結果、短縮熱産生は、本実験における結果と一致し、くり返しによってわずかに増大した。このような「筋の移動によるアーティファクト」をモデルに基づいて求めると、定量的に、実験結果と一致することが示された。

このように、短縮熱産生は、収縮をくり返すとき増大するが、本実験では又、短縮中の全熱産生率は変化せず一定であることも明らかにされた。この結果は、短縮熱産生の増加はベースラインとしての等尺性収縮時の熱産生が、収縮のく

り返しによって減小していることを示している。このことは又、等尺性収縮における labile heat 部分が、収縮をくり返すとき減小することと一致している。この結果は、等尺性収縮時の熱産生が短縮時にも変化しないで持続しているとの考えが誤っていることを示唆している。

筋の短縮熱産生の機序を明らかにするために、とくに児玉と山田の短縮熱産生のモデルに基づいて、どのような実験が必要であるかについて議論を行った。

骨格筋中のリン酸化合物のNMRによる研究

吉崎 和男 京都府医科大学
亘 弘 生 理 研

核磁気共鳴(NMR)法を用いると非破壊的に細胞内の化合物が測定できる。主にカエル大腿二頭筋につき ^{31}P -NMR(40MHz, JEOL)で測定した結果を報告する。

食用ガエル筋肉の ^{31}P -スペクトルには高磁場側からATPの β , α , γ 位の磷, クレアチン磷酸および無機磷酸が約80分の積算で検出できた。さらに冬ガエルでは時々磷酸モノ・ジュステルの領域に2つのシグナルが出現し, うち1つはglycerol-3-phosphoryl-cholineと同定されているが,¹⁾末だその機能はわかっていない。次にATPの β 位の磷の化学シフトがfreeのATP溶液の場合に比して低磁場側にあり, 細胞内ATPが Mg^{2+} とcomplexを形成している。さらに無機磷酸の化学シフトから細胞内pHを求めると7.8となった。また無機磷酸のシグナルの半値巾はfreeの溶液の場合に比して広く, この原因として静磁場の不均一性や分子運動等による緩和機構に由来するものでなく, 筋肉内pHの不均一性(ΔpH , 0.2 pH)を示している。

次にこの非破壊的測定の利点を用い種々の条件下でのこれらの代謝物の変化を追跡した。静止筋では嫌氣的条件下でクレアチン磷酸の減少が生じ, 好氣的条件にすると逆にその増加が生じた。この間ATPはほぼ一定でありLohmann反応が効率良く働いている。このLohmann反応をジニトロフルオロベンゼン(DNFB)で抑制すると嫌氣的条件でクレアチン磷酸の減少・消失が認められた。このLohmann反応の速度はATPの γ 位の磷とクレアチン磷酸の化学シフト差から10 msより遅い。筋収縮に伴う代謝物の変化の追跡ではエネルギー産生系を抑制すると1分間の強縮刺激によりATP, クレアチン磷酸は消失するが, 嫌氣的解糖では部分的な回復が生じ, 好氣的な酸化的磷酸化を許すと元のレベルまで回復した。すなわち筋収縮後一過性のエネルギー産生の亢進がみられるが元のレベル以上にはならず, また80分以内にその亢進は終了する。

次に細胞内pHの経時的变化を追跡すると, 嫌氣的条件下では解糖による乳酸産生により細胞内pHの酸性化が生じるが, 解糖系を抑制するとクレアチン磷酸の分解により若干のアルカリ化を生じた。DNFBでLohmann反応

を抑制すると急速な酸性化を生じ、さらにATPの減少に伴い新しい酸性の分画の出現をみた。この新しい分画の出現はT-tubulesをglycerine処理で破壊した筋肉では抑制された。このDNFBによる酸性化はLohmann反応の抑制によるATPの減少により解糖が促進されたためと考えられ、さらに新しい酸性の分画の出現はDNFBがT-tubulesを介してSR膜のcreatine Kinaseを抑制し、SR膜周辺のpHの著明な酸性化を生じたためと考えられる。

- 1) Burt et al.(1976), Biochemistry, 15, 4850
- 2) Burt et al.(1976), J.Biol.Chem., 251, 2584

横紋筋直列弾性要素の起源および収縮時の高時間分解能 X 線回折

杉 晴夫 帝京大学・医

1. 横紋筋直列弾性要素の起源

硬直状態にしてウサギの *psoas muscle fiber* のグリセリンモデルを伸長すると、筋フィラメント間の重なり合いの部分の長さは変化せず、I 帯および H 帯の長さが著しく伸長する。乙膜部分はわずかに伸長するが、その度合は前二者に比し無視しうる程度である。以上の結果は、I フィラメント、A フィラメント両者とも A, F, Huxley の横型に仮定されているような剛体ではなく、伸展性を有するものであることを示しており、横紋筋の直列弾性要素の起源が筋フィラメントのコンプライアンスによることを示唆する。

2. 横紋筋収縮時の高時間分解能 X 線回折

カエル骨格筋 (*sartorius*) の赤道反射 (1,0 および 1,1) の強度比 ($I_{1,0}/I_{1,1}$) は強縮時の筋の伸長により高い張力が発生するにもかかわらず、伸長の前後で変化しない。この結果は伸長による張力上昇が個々のクロスブリッジの発生する張力の増加にもとづくことを示唆する。

また、等張性短縮中の筋の $I_{1,0}/I_{1,1}$ の値は、荷重が軽い場合等尺性強縮時よりも明らかに減少する。このことは短縮時に存在する結合クロスブリッジ数が等尺性収縮時よりも少いという A, F, Huxley の横型と合致する。

トロポニン、トロポミオシンの分子構造とCa制御

大槻 馨男 九州大学・医

Caによる筋収縮の制御の制御に関与する調節蛋白質—トロポニン三成分、トロポミオシンの生理的な分子配置に関して現在まで得られた結果を述べる。

- (1) トロポニン三成分の局在。免疫電顕法によってトロポニン三成分(T, I, C)はいずれも細いフィラメント全長にわたって88nm周期で分布するが、抗トロポニンTの形成する縞は巾が約15nmであり他成分の抗体の縞が巾狭いのと対照的である(Ohtsuki, 1975)。
- (2) トロポニンTサブフラグメントの局在。キモトリプシン処理によって得られるトロポニン—Tの二種のサブフラグメント(T_1 及び T_2)の局在を免疫電顕的に検討すると、1)で示された抗トロポニン抗体が形成する巾広い縞のうち2帯寄りの部分を抗 T_1 抗体がそしてフィラメント先端寄りの部分を抗 T_2 抗体が各々特異的に染め分けることが明らかとなった。抗トロポニン T_2 の位置は抗トロポニン—C及び—Iの位置に一致していた。
- (3) トロポニン—Tサブフラグメントの性質。アフィニティクロマトグラフィを用いることによってトロポニン T_2 はトロポニンC(及びI)と親和性をもつことが判明した。この結果は(2)の局在のそれと一致している。トロポニン T_2 とトロポニン—Cの相互作用はCa濃度に依存することも明らかとなった。これに対してトロポニン— T_1 はトロポニン—C;Iとは結合を示さず、トロポミオシンと強い親和性を示した。トロポニン T_2 もトロポミオシンと結合する結果が得られている。超沈澱のCa感受性は、トロポニン T_2 によって回復するが、トロポニン T_1 は何らの影響も与えなかった。
- (4) トロポニン—T—トロポミオシン・パラクリスタルの構造。既に構造解析が行なわれているCohen-Longley型(I型)パラクリスタルとの移行部の形状を調べることによって新しい型のパラクリスタル(II型)内部のトロポニンTとトロポミオシンの分子配列が明らかとなった。この結果にもとづいてトロポニン—Tの分子長が7-9nmであるとの結論を得た。さらにII型パラクリスタルが移行する菱型クリスタルネット上において単一のトロポミオシン分子とトロポニン—T分子が形成する構造の観察が出来ることを示した。

以上の結果にもとづいて、細いフィラメント内でのトロポニン三成分とトロ

ボミオシンが形成する立体的な分子配置とこのCa制御との関係について議論する。また認知の一次構造から高次構造を予測する手法（長野）によって得られた所見についても言及する。

筋肉の細いフィラメントの構造

若林 健之 東京大学・理

1. 細いフィラメントのラセン対称性

Hanson & Lowy ('68)は負染色法による電顕像からのアクチンフィラメントは直径55Åのアクチン分子が二重ラセンになっているとし、Depue & Rice ('65)は陰投影法により約360Å^{シフト}周期のラセンは右巻きであるとした。その後X線回折像からも細いフィラメントがラセン対称性をもつことが確認されている(Elliott et al., '67; Huxley & Brown, '67)。

Hanson ('68, '73)は数十mMのMgCl₂による準結晶形成を見出し、電顕法による精密構造解析のための道を開いた。準結晶の中ではアクチン分子は6回転、13分子または18回転、28分子のラセン対称性をもつ(O'Brien et al., '75)。生きた筋肉中では必ずしもこのような厳密な整数関係にあるとは限らない。

2. 細いフィラメントを構成する蛋白の分子数比

江橋モデル(Ebashi & Endo, '68)ではアクチン：トロポミオシン：トロポニンの分子数比は7：1：1であるが、準結晶の電顕像の光回折解析も之を支持する(Ohtsuki & Wakabayashi, '72; Spudis et al., '72)。ミオシンはすべてのアクチンとほぼ同等に相互作用するとされているが、その場合、1分子のトロポニンが7分子のアクチンを制御する機構が問題となる。細いフィラメントには、 α -、 β -アクチニンなどの蛋白もあるが、分子数比は不明である。

3. トロポミオシンの^{シフト}移動

X線回折像のうちアクチン層線の強度変化とモデル計算からトロポミオシンがアクチンの長周期溝の中で動くことが期待された(Huxley, 1971, '72; Haselgrove, '72; Parry & Squire, '73)。電子顕微鏡像からの三次元再構成法によりアクチン-トロポミオシンとアクチン-トロポミオシン-トロポニン(T+I)とではトロポミオシンの位置が約10Å、アクチンからの方位角で約20°だけシフトしていることが示された(Wakabayashi et al., '75)。しかしトロポミオシンの位置はHuxleyらが期待したようにアクチンと結合した箇所でシフトする訳ではなく、むしろアクチンと結合していない所でシフトしており、古いステリック・ブロックモデルは修正が必要である。また弛緩時

のトロポミオシンの位置がミオシンをブロックできる位置であるとの直接的証明はまだない。

4. アクチンの形と方向性

アクチン分子の形には異方性があり、ヒヨコ型である。そのサルコメアの中での方向はまだ決定されていない。I-セグメントの中の細いフィラメントの構造解析の予備的な結果はヒヨコの頭がM線の方を向いていることを示唆している。

細いフィラメントの剛性率のCa濃度依存性、温度依存性とその比較生理

吉野 茂雄 名古屋大学・理
藤目 智 三菱化成生科研

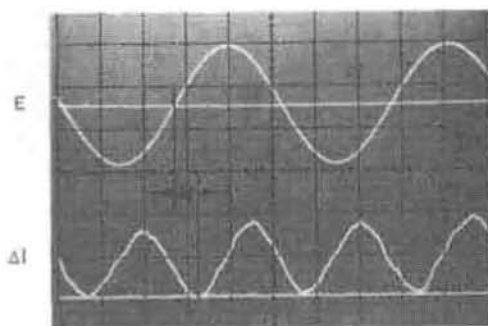


図-1 印加電場と回折強度の応答

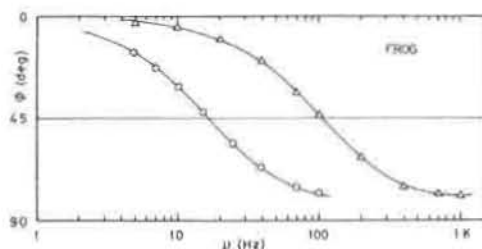
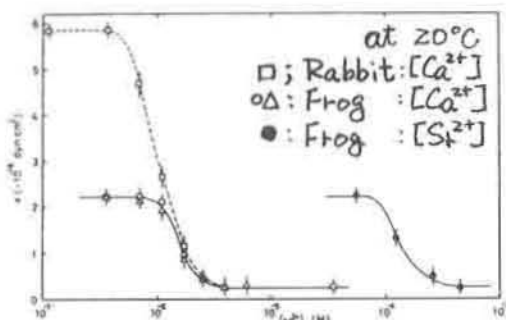
図-2 分散曲線 $0; 100 \mu\text{M Ca}^{2+}, \Delta: 0.1 \mu\text{M Ca}^{2+}$ 

図-3 剛性率の金属イオン濃度依存性

横紋筋は屈折率の異なるA帯とI帯の単位のくり返しから成り、周期が $2 \sim 10 \mu\text{m}$ なので可視光に対して回折格子となる。太・細両面フィラメントの重なりがない筋節長 $5 \sim 8 \mu\text{m}$ まで骨格筋の筋線維をのばして周囲を流動パラフィンで覆い軸方向に交番電場をかけると2倍の周波数を含む回折光強度の増加を生ずる(図1)。通常かける電場は $1 \sim 5 \text{ Vp-cm}$ であり、回折光強度の変化は少なくとも2つの周波数成分から成るのでロックインアンプで各成分の位相差を検出し分散曲線を得る。われわれはすでに分散曲線から細いフィラメントの剛性率 ϵ が求まることを確立した^{1,2)}。位相差が 45° の点の周波数 ν_1 とすると $\epsilon = 3.1 \times 10^{-19} (\eta + \eta_{293}) \times 2\pi\nu_1$ [dyn·cm] で与えられる。 η_T はTKでの水の粘度である。

図2は $\pm \text{Ca}^{2+}$ での分散曲線の移動を示すものである。

図3はCa-EGTAあるいはSr-EGTA溶液により各金属イオン濃度を変えて剛性率 ϵ を求めたものである。測定は 20°C であり① $1 \mu\text{M}$ 前後の Ca^{2+} 濃度で急激な ϵ の変化が生ずる。② Sr^{2+} に対しては約100倍程度濃度の高い所で同様なことが生ずる。③これらのskinned fiberの発生する張力の金属イオン濃度依存性と非常によい平行性にある。④過剰な $+\text{Ca}^{2+}$ (1 mM)にしても、剛性率はほとんど変化しない。

図4は $-\text{Ca}^{2+}$ ($3.6 \times 10^{-7} \text{ M}$)と Ca^{2+} ($8.8 \times 10^{-6} \text{ M}$)と $+\text{Ca}^{2+}$ ($8.8 \times 10^{-6} \text{ M}$)での剛性率の温度依存性を示す。結果は①Frog及び

Rabbitの各々の体温における剛性率の変化は約5～6倍である。②蛋白が変性を受けない温度範囲において $\pm\text{Ca}^{2+}$ での状態で温度を変化させても剛性率が $7 \times 10^{-17} \text{ dyn}\cdot\text{cm}$ 前後の値はとらず両状態が変わることはない。

以上のことから細いフィラメント内の蛋白間の分子間力を反映している剛性率の変化は、少なくとも筋収縮の初期過程において重要な意味を含むものと期待される。

* 三菱化成生命科学研究所 Pre-doctoral fellow.

- Ref 1) Fujime, S and Yoshino, S(1978)
Biophys. Chem. 8, 305-315.
2) Yoshino, S, et al.(1978)
Biophys. Chem. 8, 317-326.

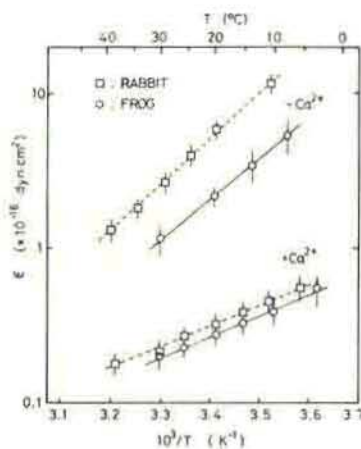


図-4 剛性率の温度依存性

カニ横紋筋のX線回折

前田雄一郎 東北大学・医

X線回折法で、収縮中の筋肉におけるクロス・ブリッジ及びフィラメントの挙動をくわしく知ろうとする時、数多くの反射についてその強度等を高い時間分解能で記録する必要がある。即ち空間分解能をも高めたい。しかし、記録すべき反射の数を増やすだけではなく、生物種を変えて、異なった情報をもたらす反射を記録することによってもそれは可能であることに注目する。

甲殻類（カニ等）の横紋筋のrelax及びrigor状態でのX線回折図の解析より、この筋肉では、例えば、88nmの反射は、細いフィラメントに実際に結合するクロス・ブリッジに由来すると結論された。このように、結合を反映する適当な反射はカエル骨格筋からは得られない。それ故、カニ横紋筋では、カエルでよりも多面的にクロス・ブリッジの挙動を追跡できる可能性がある。

今回は、以上の計画の一環として実行した実験のうち、145Åの（子午反射を含む）層線反射の収縮に伴う強度変化について報告する。

ショウジンガニ歩脚の屈曲筋を0.3秒間電気刺激して等尺性に収縮させる。
S.L.=5.3μm、張力は最大で約2kg/cm²、温度約20℃。

X線の強度はシンチレーション・カウンターにより記録し、収縮をくり返し、各時相の強度を加算する。時相は、0.1秒ごとにとる。カウンターは鉛板の後方に置き、鉛には反射の位置にのみ窓をあける。よって、バック・グラウンドの強度をも計測することとなる。

X線強度は、張力発生時（約0.3秒）約8%増加し、その後約3秒間逆に1%程度減少する。その後restの値に回復する。この反射の近くでは、収縮中にはB.G.のみの強度の変化は無視できる。全強度中、反射の強度は5～10%と見積られるので、強度変化を、反射のみに押付け可能として、収縮中に～40%の強度の増加、その後約10%の減少があることになる。

この変化の解釈については討論したい。

筋小胞体のCa遊離

遠藤 実 東北大学・医

筋小胞体は刺激によってCaを遊離し、そのCaが収縮蛋白系に作用して筋収縮が起こる。このCa遊離が筋小胞体膜における“興奮”であると言えよう。生理的Ca遊離機構の研究は1975年ごろまでにかなりの進展を見たが、それ以後は停滞状態にある。本研究においては、Ca遊離を起こす薬物の作用機序を解明することを通じて筋小胞体のCa遊離機構を明らかにしようとした。

カフェインや種々の局所麻酔剤は生筋に対して低濃度では単収縮を増強し、高濃度では自発性の筋拘縮を起こす。この薬物による筋拘縮はいずれの場合も筋小胞体からのCa遊離の結果であるが、そのCa遊離の機序はカフェインと局所麻酔剤とで全く異っていることが分った。

カフェインは筋小胞体が本来有する“CaイオンによるCa遊離”の機構を特異的に強く促進することによりCa遊離を起こす。したがってカフェインによる拘縮はCaによるCa遊離を抑制するMgやプロカインなどによって完全に抑制される。一方、ジブカイン、キニーネその他の局所麻酔剤はやはり①CaによるCa遊離機構促進作用を有するが、それをプロカインやMgで抑制した後にもなお②小胞体膜のCa透過性を増大する作用もあり、その他に③小胞体の能動的なCaとりこみを抑制する作用も有していた。さらに収縮蛋白系に対して④Ca感受性増加作用、および⑤最大張力減少作用を有していた。これらの多様な局所麻酔剤の作用は⑤を除いていずれも定性的には筋拘縮の原因となり得るが、定量的に調べた結果では②のプロカイン等によって抑制されないCa遊離が筋拘縮の第一原因であろうと考えられる。ただし、それ以外の作用がいずれも拘縮を助けていることは疑いを入れない。なお、プロカインなどCaによるCa遊離を抑制する作用を持つ局所麻酔剤も高濃度では②以下の作用を示すものの如くである。

生理学研究所年報 第1卷

印刷 昭和55年8月20日

発行 昭和55年8月25日

編集者代表 金子章道

発行者 生物科学総合研究機構

生理学研究所

〒444 岡崎市明大寺町字西郷中38

代表電話：岡崎〈0564〉52-9770

