

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 29 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450463

研究課題名(和文) 鳥類特有の平衡感覚器官の機能解析

研究課題名(英文) Analysis of the function of the special equilibrium organ of the bird

研究代表者

北村 直樹 (Kitamura, Naoki)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：80301951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：鶏の脊髄アクセサリローブ(AL)より単離した細胞から電気的活動と細胞内Ca濃度変動を測定した。浸透圧刺激により細胞容積を変化させて細胞膜を伸展しても何も応答は見られなかった。アセチルコリン刺激はALニューロンのムスカリン様受容体を活性化して細胞内Ca濃度を上昇させた。ALニューロンから得られたCaチャンネル電流の振幅は一般的なニューロンと比較して非常に大きく、N型Caチャンネルの抑制薬である ω -conotoxin GVIAにより90%近く抑制された。本研究により、鶏脊髄ALニューロンに機能的な電位依存性Caチャンネルとムスカリン様アセチルコリン受容体が発現していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Electrical activity and changes in the intracellular Ca^{2+} concentration were measured from spinal accessory lobe (AL) neurons of the chick. AL neurons showed no significant response to the stimulation with the hypertonic solution that caused increase in the cell volume and stretch of the cell membrane. The stimulation with acetylcholine activated muscarinic receptors and evoked rises in the intracellular Ca^{2+} concentration. Amplitudes of currents through voltage-gated Ca^{2+} channels in AL neurons were much larger than those of other neurons. Ca^{2+} channel blocker against N-type channels, ω -conotoxin GVIA reduced the current by about 90%, suggesting that N-type Ca^{2+} channels are expressed at high density in AL neurons. These results indicate that chick AL neurons expressed functional muscarinic acetylcholine receptors and N-type Ca^{2+} channels.

研究分野：神経細胞生理学

キーワード：神経生理学 鳥類 平衡感覚 イオンチャンネル 受容体 パッチクランプ 細胞内カルシウム

1. 研究開始当初の背景

鳥類には翼に進化した前肢を用いた「飛行」と後肢を用いた「歩行」という全く異なる運動をするという特徴がある。鶏やハトをはじめとした多くの鳥類が後肢で陸上を二足歩行する場合、体全体の重心が後肢の付け根より前方にある。哺乳類と共通の平衡感覚器官である内耳半規管はさらにそれよりも前方に位置しており、歩行時に体全体の平衡状態を感知するには位置が不適切であることから、鳥類には体の体幹部分に別の平衡感覚器官が存在すると古くから考えられてきた。本研究計画で焦点を当てた脊髄アクセサリローブ (accessory lobe, AL) はそのような鳥類がもつ特殊な感覚器官の候補となっている組織である。

形態学的な証拠により AL 内には神経細胞があると報告されていたが、その細胞の機能を検討した報告はなかった。我々は、AL から単離した細胞が活動電位を発生する機能的なニューロンであることを電気生理学的に証明した。しかしながら、AL が平衡感覚器官として機能するためには、体外からの重力や運動に伴い発生する外力を感知する機構が備わってなければならず、その存在、あるいはその基盤となる細胞、分子機構は見つかっていなかった。本研究では、AL に機械的な入力を電気化学的な信号に変換する機構が備わっているかを検討した。

2. 研究の目的

本研究では、AL から単離した細胞が機械的な刺激に応答できるのかを電気的活動と細胞内 Ca^{2+} 濃度変動を測定することにより検討した。加えて、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルとアセチルコリン受容体の機能についても検討した。

3. 研究の方法

(1) AL ニューロンの単離と培養
 孵卵 14 から 18 日目の鶏有精卵から摘出した胚子の脊髄組織より AL を実体顕微鏡下で分離した。分離した AL 組織を消化酵素 (Papain) で消化し、細胞を単離した。単離した細胞は消化酵素を遠心洗浄した後に培養液に浮遊させて細胞懸濁液とした。単離した細胞をカバーガラス上に接着させて以下の実験に用いた。細胞内 Ca^{2+} 濃度を測定する実験では、DMEM/F-12 培養液を用いて 5% CO_2 条件にした CO_2 インキュベーター内で数日培養した細胞を用いた。

(2) 細胞内 Ca^{2+} 濃度測定

培養した AL 細胞に Ca^{2+} 蛍光指示薬 Fura-2 の細胞膜透過型分子 Fura-2/AM を負荷した。細胞内の Ca^{2+} 濃度に応じて変化する Fura-2 の蛍光像を蛍光画像解析装置により取得し、各細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度を個別に算出した。

(3) パッチクランプ法による細胞膜電位、電

流測定

酵素処理により単離した AL 細胞をパッチクランプ法による電気的活動記録に供した。細胞膜にガラス電極を密着させただけの on-cell 記録により細胞膜電位変化を、細胞膜に穴を開けて細胞内を人工液で灌流する whole-cell 記録により細胞膜電流と電位を記録した。

4. 研究成果

(1) AL ニューロンの機械刺激受容機構の探索
 単離 AL 細胞から on-cell 電位固定法により膜電流を測定しながら、記録電極内に陽圧あるいは陰圧を加え、細胞膜の電気的活動に変化が生じるかを検討したが、細胞膜電位に変化は見られなかった。ホールセル電位固定法により膜電流を測定しながら、AL 細胞を低浸透圧の実験液に曝し細胞容積を変化させて、細胞膜の電気的活動に変化が生じるかを検討したが、浸透圧刺激に応答して生じる電気的活動は見られなかった。Fura-2 を負荷した細胞に低浸透圧刺激を行ったところ、細胞が膨張して容積が増大することは確認できたが、それに伴って細胞内 Ca^{2+} 濃度が変動することはなかった。細胞膜の伸展に応答するイオンチャネルの存在を仮定して検討してきたが、その機能を示唆する成績は得られなかった。さらに実験条件を模索しつつ検討を進めることに加えて、近隣に存在するニューロン以外の細胞が機械的な入力を感じし、それをニューロンに伝達している可能性についても検討する必要がある。

(2) AL ニューロンの電位依存性 Ca^{2+} チャンネルの解析

単離 AL ニューロンより電位依存性 Ca^{2+} チャンネル電流を whole-cell 電位固定法により測定した。得られた Ca^{2+} チャンネル電流は一般的なニューロンのそれと比較して振幅が非常に大きく、活性化の電位依存性は哺乳類ニューロンの高閾値型チャンネルのものと相同であった。N 型 Ca^{2+} チャンネルの抑制薬である ω -conotoxin GVIA は Ca^{2+} チャンネル電流を 90% 近く抑制した (図 1)。

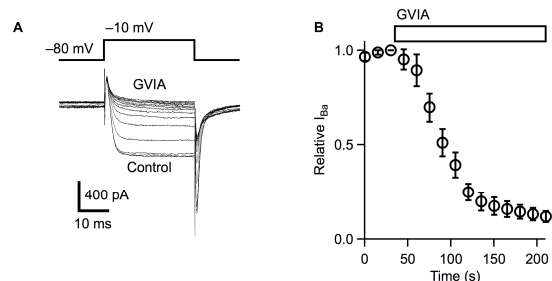


図 1. AL ニューロンの Ca^{2+} チャンネル電流. A. N 型チャンネル抑制薬存在下の Ca^{2+} チャンネル電流の波形. B. Ca^{2+} チャンネル電流の振幅の経時的変化.

一般的な他の細胞の Ca^{2+} チャンネル電流は測定

中に徐々にその振幅が減少していくが、ALニューロンでは全く減少せず、むしろ増大した。50Hz という高頻度の脱分極パルスで刺激した場合にも Ca^{2+} チャネル電流の振幅は減衰しなかった。以上の成績から、鶏 AL ニューロンには高密度に N 型 Ca^{2+} チャネルが発現しており、シナプス終末において高頻度の活動電位に対する神経伝達物質放出に貢献している可能性が示唆された。

(3) AL ニューロンのアセチルコリン (ACh) 受容体

Fura-2 を負荷した培養 AL ニューロンの細胞内 Ca^{2+} 濃度を蛍光顕微イメージング法により測定した。ACh は濃度依存性に AL ニューロンの細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させた。ACh に対する応答は細胞外 Ca^{2+} の除去には影響を受けず、細胞内 Ca^{2+} ストアの Ca^{2+} ポンプ抑制薬のシクロピアゾン酸とムスカリン型受容体拮抗薬のアトロピンにより消失した (図 2)。

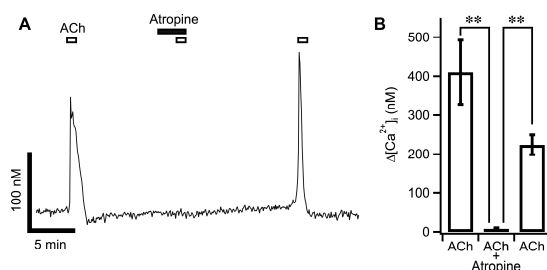


図 2. AL ニューロンの ACh 刺激に対する細胞内 Ca^{2+} 濃度変動。A. 典型的な反応。ACh 刺激を 3 回繰り返し行い、2 回目の刺激は Atropine 存在下で行った。B. ACh に対する応答の振幅の平均値 (6 例)。

RT-PCR により M2, M3, M4, M5 サブタイプのムスカリン型受容体 mRNA が AL に発現していることを確認した。以上の成績から、鶏 AL ニューロンにはムスカリン型アセチルコリン受容体が発現しており、神経伝達物質として放出されるアセチルコリンに反応して細胞内カルシウム濃度が上昇することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. T. Mashita, H. Kamishina, Y. Nakamoto, Y. Akagi, A. Nakanishi, Y. Harasaki, T. Ozawa, T. Uemura, Y. Kobatake, S. Shimamura, N. Kitamura, S. Maeda, Y. Uzuka, J. Yasuda. Combination of Serum Phosphorylated Neurofilament Heavy Subunit and Hyperintensity of Intramedullary T2W on Magnetic Resonance Imaging Provides Better Prognostic Value of Canine Thoracolumbar Intervertebral Disc Herniation. *The Journal of Veterinary*

Medical Science **77(4)**: 433-438 (2015) 査読有

DOI: 10.1292/jvms.14-0582

2. K. Takahashi, N. Kitamura*, Y. Suzuki, Y. Yamanaka, H. Shinohara, I. Shibuya. Activation of muscarinic acetylcholine receptors elevates intracellular Ca^{2+} concentrations in accessory lobe neurons of the chick. *Journal of Comparative Physiology A* **201**: 385-394 (2015) 査読有
DOI:10.1007/s00359-014-0971-6
3. T. Moriya, R. Shibasaki, T. Kayano, N. Takebuchi, M. Ichimura, N. Kitamura, A. Asano, Y. Z. Hosaka, O. Forostyak, A. Verkhatsky, G. Dayanithi, I. Shibuya. Full-length transient receptor potential vanilloid 1 channels mediate calcium signals and possibly contribute to osmoreception in vasopressin neurons in the rat supraoptic nucleus. *Cell Calcium* **57(1)**: 25-37 (2015) 査読有
DOI:10.1016/j.ceca.2014.11.003
4. N. Harayama, T. Kayano, T. Moriya, N. Kitamura, I. Shibuya, K. Tanaka-Yamamoto, Y. Uezono, Y. Ueta, T. Sata. Analysis of G-protein-activated inward rectifying K^+ (GIRK) channel currents upon $GABA_B$ receptor activation in rat supraoptic neurons. *Brain Research* **1591**: 1-13 (2014.11) 査読有
DOI:10.1016/j.brainres.2014.10.022
5. T. Imada, S. Nakamura, N. Kitamura, I. Shibuya, K. Tsubota. Oral administration of royal jelly restores tear secretion capacity in rat blink-suppressed dry eye model by modulating lacrimal gland function. *PLoS ONE* **9(9)**: e106338 (2014) 査読有
DOI:10.1371/journal.pone.0106338
6. Y. Suzuki, N. Kitamura*, Y. Yamanaka, I. Shibuya. Voltage-gated Ca^{2+} channels in accessory lobe neurons of the chick. *Journal of Comparative Physiology A* **200(8)**: 739-748 (2014) 査読有
DOI:10.1007/s00359-014-0917-z
7. T. Kayano, N. Kitamura*, S. Miyazaki, T. Ichiyanagi, N. Shimomura, I. Shibuya, T. Aimi. Gymnopilins, a product of a hallucinogenic mushroom, inhibit the nicotinic acetylcholine receptor. *Toxicon* **81**: 23-31 (2014) 査読有

読有

DOI:10.1016/j.toxicon.2014.01.014

8. T. Kayano, N. Kitamura*, T. Moriya, T. Kuwahara, Y. Komagiri, E. C. Toescu, I. Shibuya. Chronic NGF treatment induces somatic hyperexcitability in cultured dorsal root ganglion neurons of the rat. *Biomedical Research* **34(6)**: 329-342 (2013) 査読有
URL: https://www.jstage.jst.go.jp/article/biomedres/34/6/34_329/_article

[学会発表](計13件)

1. 中島純一, 守屋大樹, 柴崎梨奈, 北村直樹, 浅野淳, 澁谷泉. ラット視索上核ニューロンに発現する中枢性浸透圧感知分子の解明. 第67回日本生理学会中国四国地方会, 米子市, 米子コンベンションセンター 2015年10月24-25日
2. 松下有美, 坂本恵, 北村直樹, 澁谷泉. 体性感覚ニューロンの capsaicin 応答に対する noradrenaline の抑制作用. 第67回日本生理学会中国四国地方会, 米子市, 米子コンベンションセンター 2015年10月24-25日
3. Ryuta Sato, Yoshio Sakamoto, Naoki Kitamura, Tsuyoshi Ichiyanagi, Tadanori Aimi, Norihiro Shimomura. Stable cultivation of poisonous mushroom, *Gymnopilus junonius*. The 8th Meeting of Asia for Mushroom Science, 米子市, 米子コンベンションセンター 2015年10月20-23日
4. 中島純一, 守屋大樹, 柴崎梨奈, 北村直樹, 浅野淳, 澁谷泉. ラット視索上核ニューロンに発現する TRPV1 関連分子の探索及び機能解析. 第158回日本獣医学会学術集会, 十和田市, 北里大学 2015年9月7-9日
5. 松下有美, 坂本恵, 北村直樹, 澁谷泉. ラット背根神経節ニューロンの capsaicin 応答に対する noradrenaline の抑制作用. 第158回日本獣医学会学術集会, 十和田市, 北里大学 2015年9月7-9日
6. Taiki Moriya, Rina Shibasaki, Tomohiko Kayano, Nami Takebuchi, Momoko Ichimura, Naoki Kitamura, Atsushi Asano, Yoshinao Z. Hosaka, Oksana Forostyak, Alexej Verkhatsky, Govindan Dayanithi, Izumi Shibuya. RT-PCR and Ca²⁺ imaging analyses of osmoreceptor molecules in the rat SON. Neuroscience 2014, ワシントン DC (米国), The Walter E. Washington Convention Center 2014年11月15-19日

7. Ryota Sato, Yoshio Sakamoto, Naoki Kitamura, Tsuyoshi Ichiyanagi, Tadanori Aimi, Norihiro Shimomura. Effect of casing on fruiting body formation in *Gymnopilus*. International Symposium on Agricultural, Food, Environmental and Life Science in Asia (The 11th international Joint Symposium between Japan and Korea), チュンチョン (韓国), Ladena Condominium 2014年10月29-30日

8. 萱野智彦, 永見英利香, 北村直樹, 澁谷泉. 神経成長因子により誘発された感覚ニューロンの異常興奮性への TRPV1 の関与. 第157回日本獣医学会学術集会, 札幌市, 北海道大学 2014年9月9-12日

9. 守屋大樹, 柴崎梨奈, 萱野智彦, 竹淵奈美, 市村桃子, 北村直樹, 浅野淳, 保坂善真, Govindan Dayanithi, 澁谷泉. ラット視索上核ニューロンに発現する TRPV1 の機能解析および浸透圧受容器発現細胞の解析. 第157回日本獣医学会学術集会, 札幌市, 北海道大学 2014年9月9-12日

10. 佐藤竜太, 坂本吉生, 北村直樹, 一柳剛, 會見忠則, 霜村典宏. オオワライタケ子実体の安定生産技術の開発. 日本きのこ学会25周年記念大会, 京都市, 京都大学百周年時計台記念館 2014年9月11-12日

11. 辻野久美子, 椎名克秀, 岡崎良, 岡本芳晴, 北村直樹, 杉山晶彦, 田中あかね, 松田浩珍, 日笠喜朗. 三朝温泉水のアトピー性皮膚炎症状改善効果: NC/Nga マウスを用いた科学的検証. 第156回日本獣医学会学術集会, 岐阜市, 岐阜大学 2013年9月20-22日

12. 柴崎梨奈, 竹淵奈美, 北村直樹, 澁谷泉. ラット視索上核ニューロンの浸透圧感知機構への TRPV1 の機能的な関与について. 第156回日本獣医学会学術集会, 岐阜市, 岐阜大学 2013年9月20-22日

13. 鈴木夕貴, 北村直樹, 澁谷泉. 鶏 accessory lobe ニューロンの電位依存性 Ca²⁺チャネル電流. 第156回日本獣医学会学術集会, 岐阜市, 岐阜大学 2013年9月20-22日

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
北村 直樹 (KITAMURA, Naoki)
鳥取大学・農学部・准教授
研究者番号: 80301951

(2) 研究分担者

澁谷 泉 (SHIBUYA, Izumi)
鳥取大学・農学部・教授
研究者番号： 50162649