

第239回生理学東京談話会

日 時：平成15年10月25日（土）午前10時～午後5時

会 場：東邦大学医学部付属大森病院5号館臨床講堂

当番幹事：東邦大学医学部 生理学第一講座 有田秀穂
生理学第二講座 高松 研

演 題 数：16題

参加者数：48名

本年度は若手の研究発表を中心に演題を募集し、合計16題の口演発表が行われた。15分間の発表と5分間の質疑応答（合計20分）とし、一演題に十分な時間をふりわけ、それぞれに研究分野が異なる参加者からも活発な意見交換がなされた。

なお、今回は昭和大学医学部生理学教室の本間生夫教授と久光正教授および歯学部口腔生理学教室の井上富雄教授に当番幹事をお願いすることとなった。

1. 神経成長円錐における局所的蛋白合成の生理的意義

竹居光太郎^{1,2}、李 蟬夏¹、仙石くみこ¹、佐々木幸夫¹、中村史雄¹、五嶋良郎^{1,2}（¹横浜市大 院医・分子薬理神経生物、²科技振団・CREST）

神経系の発生や再生の過程において、伸長する神経突起の先端には成長円錐と呼ばれる軸索誘導を担う実体が存在する。成長円錐上に数多くのmRNAが存在することから、成長円錐における局所的蛋白合成の生理的意義が議論されてきたが、未だ明らかでない。そこで、我々は軸索反発因子の一つであるSema3Aおよび神経成長因子NGFによる刺激における局所的蛋白合成の役割について検討した。近年我々はSema3A刺激によって軸索輸送が亢進することを見出したが、蛋白合成阻害剤anisomycinはこのSema3Aによる軸索輸送の亢進を顕著に抑制した。この阻害効果は細胞体を切り離れた神経突起上でも同様に観察された。また、免疫細胞化学的解析から成長円錐上でSema3A刺激による蛋白翻訳開始因子eIF4Eの活性化が認められた。他方、NGF刺激による神経突起伸長ではeIF4Eの活性化は認められなかったが、Ca²⁺依存的に活性制御される蛋白翻訳伸長因子eEF2による蛋白合成系が成長円錐上に存在し、神経突起伸長の制御機構に関わることが判明した。これらの事は、成長円錐上での局所的蛋白合成系がSema3AやNGFによる刺激-反応系に重要な生理的役割を持つことを示唆する。

2. ショウジョウバエ細胞死抑制因子DIAP1の分解はストレスキナーゼの活性化を促進する

倉永英里奈^{1,2,3}、嘉糠洋陸³、三浦正幸^{1,3}（¹東京大・薬・

遺伝、²阪大・院医・機能形態、³理研・脳セ・細胞修復）

ショウジョウバエ細胞死実行因子として知られるReaperは、DIAP1と結合することによってそのCaspase阻害活性を中和する機能に加えて、Caspase活性化因子であるDapaf-1を介した細胞死カスケードを活性化するというシグナル伝達機構を持つことが明らかとなっている。しかしその他の中間のシグナル分子を含めると、詳細な制御機構について未だ不明な点が多い。我々は、Reaperの作用機序に含まれる細胞死制御因子を同定する目的で、Reaperの細胞死誘導活性に基づく表現型を指標に、ゲノムの7割をカバーする染色体欠失系統のスクリーニングを行った。Reaperの強制発現による表現型を抑制する2系統においてその欠失領域に存在する原因遺伝子の候補を探索した結果、どちらもそれぞれJNK経路を活性化する能力を有する*Drosophila* ASK1 (DASK1)と*Drosophila* TRAF1 (DTRAF1)が、Reaperの細胞死誘導活性に関与するものとして同定された。さらに、DTRAF1、DASK1を介したJNKの活性化がどのようにしてReaperに制御されているのか知るために、遺伝学的・生化学的な解析を行ったところ、(1) DTRAF1による細胞死誘導とJNKの活性化はDIAP1により抑制され、その抑制はE3ユビキチンligase活性をもつDIAP1によるDTRAF1の分解に依存していること、(2) Reaperの発現でDIAP1は自己ユビキチン化が亢進して分解されるため、DTRAF1が安定化してJNKカスケードの活性化が見られることが明らかとなった。

3. 3型カベオリン遺伝子導入によるインスリン感受性の増強作用

大津恒治, 押川 仁, 南沢 享, 堀 英明, 石川義弘 (横浜市立大学 循環制御医学)

細胞膜陥入構造カベオリンには, 細胞内刺激伝達系に関わる緒因子が高密度に集積しており, 刺激伝達の間場となっている。我々は, インスリン受容体がカベオリン内に高密度に存在し, カベオリンの主要構造蛋白カベオリンが, インスリンシグナルにおいて促進的に作用することを報告した。カベオリンには多くの組織に分布する1型・2型と, 筋組織のみに分布する3型があり, 特に3型カベオリンがインスリンシグナルを強く増強することが明らかになっている。本研究では, 骨格筋とともに糖代謝における主要な臓器である肝臓に3型カベオリンを強制発現させた際の, インスリン感受性の増強効果を検討した。実験は, 肝細胞由来のHepG2細胞にアデノウイルスベクターにより3型カベオリンを強制発現させた系を用いた。インスリン受容体 β サブユニットのリン酸化を免疫沈降法を用いて検討したところ, 3型カベオリン過大発現群では, チロシンリン酸化が増強していた。このことより, 3型カベオリンの発現の無い肝細胞においても3型カベオリンがインスリン感受性増強作用を有し, 3型カベオリンが糖代謝異常を改善する可能性を示唆している。

4. ショウジョウバエ TNF スーパーファミリー分子 Eiger による細胞死実行機構の遺伝学的解析

菅田浩司^{1,2}, 井垣達吏¹, 相垣俊郎³, 三浦正幸¹ (東大院・薬・遺伝,²阪大院・医・時空生物,³都立大・理・生物)

我々はショウジョウバエを用いて細胞死実行分子をスクリーニングする過程で, TNF スーパーファミリー分子 Eiger を同定した。Eiger はショウジョウバエゲノム中に存在する唯一の TNF スーパーファミリー分子であり, Eiger のシグナル機構と生理機構を解析することにより進化的に保存された TNF スーパーファミリー分子の働きを明らかにできると考えられる。Eiger をショウジョウバエ複眼特異的に強制発現させると, JNK 経路の活性化を伴う細胞死を誘導した。Eiger の下流シグナル分子を同定する目的で, ショウジョウバエ染色体欠失系統を用いた遺伝学的スクリーニングを行った。Eiger を複眼特異的に強制発現するトランスジェニックショウジョウバエ ($GMR > eiger$) と一連の染色体欠失系統とを交配し, F1 の複眼の表現型を解析することで, Eiger によって誘導される細胞死を抑制する系統の探索を行った。本スクリーニングにより, ショウジョウバエ TNF レセプタースーパー

ファミリー分子 Wengen を同定した。また, Wengen 以外の下流シグナル候補分子として, 複数のエネルギー産生系に関与する遺伝子を得た。これら分子の Eiger シグナルへの関与を議論したい。

5. オリゴデンドロサイトアポトーシスにおける p38MAP キナーゼの関与

浜之上 誠, 高松 研 (東邦大学医学部生理学第二講座)

我々はこれまで, 転写因子である NF- κ B が, 中枢神経細胞, そしてオリゴデンドロサイトのアポトーシスを強力に阻害することを報告してきた。特にオリゴデンドロサイトの TNF- α 誘導性アポトーシスにおいては, p50 サブユニットが p65 サブユニットよりもより効果的であることも明らかにしている。今回は, この p50 サブユニットのオリゴデンドロサイトにおける作用機序を解明するため, 細胞生存と関連性のあることが知られる MAP キナーゼファミリー, 特にオリゴデンドロサイトに多量に発現しているがその機能が不明な p38MAP キナーゼとの関連性を検討した。結果, O2A 細胞株である CG-4 細胞に p50 発現プラスミドを導入した細胞においては, p38MAP キナーゼ関連因子が活性化していること, さらにこの細胞の生存が p38MAP キナーゼ阻害薬により著明に阻害されることを見出した。以上の結果は NF- κ B p50 サブユニットが, p38MAP キナーゼ関連因子の活性化を行うことでアポトーシス制御を行っている可能性を示唆しており, 現在更なる解析を続けている。

6. 孤束核シナプス前 P2X 受容体活性化によって発現する高振幅 miniature EPSC のシナプス伝達における意義

繁富英治, 加藤総夫 (東京慈恵会医科大学・総合医科学研究センター・神経科学研究部・神経生理学研究室)

内臓性1次求心情報の中継・統合核である孤束核は, 細胞外 ATP 活性化カチオンチャネル (P2X 受容体) が高発現しているとともに, 神経刺激による細胞外への ATP 放出および ATP 類縁体微量投与による生理応答が麻酔動物において実証されている数少ない神経核である。シナプス伝達制御におけるその意義の解明を目的として, 幼若ラット孤束核スライスにおける微小興奮性シナプス後電流 miniature EPSC (mEPSC) に及ぼす P2X 受容体活性化の影響を検討した。P2X 受容体作動薬は, 電位依存性 Ca^{2+} チャネル (VDCC) 遮断下においても mEPSC 頻度を増加した。この増加は細胞外 Ca^{2+} を必要とした。この時, 約 80% のニューロンで, 高振幅 mEPSC (large-mini) が発現したが, その発生中も, シナプス後 AMPA 受容体電流の振幅および記録細胞の膜特性は変化しなかった。その発

生に cyclopiazonic acid および ryanodine は影響しなかった。VDCC 遮断下, large-mini は高振幅 miniature EPSP を惹起し, 時間的加重によってシナプス後細胞を発火させた。孤束核細胞外 ATP 濃度の上昇は, シナプス前 P2X 受容体からの Ca^{2+} 流入によるグルタミン酸の高効率放出を起し, VDCC 活性化を介さない「シナプス伝達」を誘発すると結論された。

7. アロマターゼ欠損雄マウスの行動特性

守屋加奈子¹, 酒井ちさ乃¹, 山田一夫¹, 近藤保彦², 戸田勝巳³, 佐久間康夫² (¹目白大学人間社会学部, ²日本医科大学生理学第一講座, ³高知医科大学遺伝子病態制御学分野)

雄ラットの性行動制御では, アンドロゲンは芳香化されてエストロゲンとしても中枢に作用していることが知られている。芳香化酵素アロマターゼ遺伝子欠損雄マウス (ArKO) は, 性行動や攻撃行動に著しい障害を示すことが報告されているが, 本研究では, これらの行動以外に ArKO マウスはどのような行動特性を持つのかを検討した。ArKO 雄マウスを発情雌と一緒にして性行動を観察すると, 射精にまで至る動物の割合は, ヘテロおよび野生型マウス (C57BL/6) に比べて有意に低下していた。性行動の低下が ArKO 雄の発する匂いに対する発情雌の反応性低下に起因するのではないかという可能性を検討するため, 発情雌マウスをプローブとして ArKO 雄とヘテロおよび野生型マウスに対する性的嗜好性を調べたが, 雌マウスの嗜好性には差が認められず, ArKO は雄性行動の遂行自体を障害していることがわかった。さらに ArKO マウスの情動性について, オープンフィールドと高架式十字迷路を用いて検討した。高架式十字迷路ではこれらの動物に差は認められなかったが, オープンフィールドでは ArKO マウスが野生型に比べて有意に低い活動性を示し, ArKO は情動反応性にも影響を及ぼしていることがわかった。

8. 雄性老齢ラットにおけるオレキシン A の摂食亢進効果の減少

高野紗恵子^{1,2}, 植松 宏², 金井節子¹, 細矢博子¹, 太田 稔¹, 吉田由紀¹, 宮坂京子¹ (¹東京都老人総合研究所, 生体機能調節と加齢研究グループ, ²東京医科歯科大学, 口腔老化制御学講座)

オレキシンは視床下部外側野に限局して発現している神経ペプチドで, 摂食行動と覚醒・睡眠の制御における役割が示唆されている。オレキシンをラットの脳室内に投与すると摂食行動が誘発される。

我々はオレキシン A の脳室内投与による摂食行動の亢

進効果を若齢, 老齢ラット間で比較するため, 0.25, 1, 3 nmol のオレキシン A を側脳室に注入し, 1, 2, 4 時間後の摂食量を測定した。オレキシン A は若齢ラットにおいて用量依存的に食物摂取を増加させたが, 老齢ラットではどの濃度でも効果が見られなかった。

そこでその原因を調べるため, 我々は若齢, 老齢ラットの視床下部におけるオレキシン受容体 (OX1R, OX2R) のタンパク発現量をウェスタンブロット法により測定した。老齢ラットでは視床下部の OX1R のタンパク発現量が有意に減少していた。よって, 老齢ラットにおいてオレキシンが食物摂取を刺激しなかったことは, 視床下部の OX1R の減少と関連していると考えられる。OX2R については現在実験を進行中である。

9. 覚醒・あくび反応における CRF ニューロンの関与

関 由成, 中谷康司, 北 一郎, 鈴木郁子, 有田秀穂 (東邦大学医学部生理学第一講座)

これまで我々は視床下部室傍核を電氣的, 化学的に刺激することにより覚醒・あくび反応を誘発し, 脳内における覚醒・あくび反応に関する経路を検討してきた。今回, 室傍核に多く存在するといわれている CRF ニューロンの覚醒・あくび反応における関与について, c-fos および CRF による二重染色法を用い組織学的に検討した。同時に覚醒・あくび反応時に賦活される脳内部位について, c-fos 発現にて検討を行った。実験は, 室傍核に L-glutamate を微量注入してあくびを頻回にさせたラット群と L-glutamate 注入以外は同一の処理がなされたコントロール群を用いて行われた。結果として, あくび頻回群において c-fos および CRF により二重に染色された細胞が室傍核に認められ, 吻側の小細胞領域 (ap) および内側小細胞領域 (mp) の背側部に多く認められた。さらにコントロール群と比較してあくび頻回群では皮質における c-fos 発現に左右差が認められ, 刺激側に多く発現がみられた。扁桃体についても左右差が認められ, 刺激側反対の外側基底核で c-fos の発現が多く認められた。これらの知見について, これまでのデータを踏まえて考察する。

10. 寒冷時体温調節反応に対するラット視索前野への α -adrenoceptor antagonist 還流投与の影響

齊藤武比斗¹, 石渡貴之¹, 長谷川 博², 野本茂樹³, 相原康二¹ (¹東京都立大学大学院理学研究科, ²広島大学総合科学部, ³東京都老人総合研究所)

ラット視索前野 (preoptic area: PO) は, 破壊実験や刺激実験により体温調節不全や体温変動が観察されることから, 体温調節中枢と考えられている。また, この部位の

神経活動の調節にはモノアミン類が重要な役割を果たしている。我々はラットを寒冷暴露すると3時間後にPOでnorepinephrine (NE)が上昇するが、1日後から28日目までは暴露前と変わらない値を示すことを観察した。これは、POのNEが急激な寒冷刺激に対しては体温調節に影響しているが、継続的な寒冷刺激に対しては、NEの関与は少ない可能性を示唆している。本研究ではPOにおけるNEの役割を詳細に検証するため、マイクロダイアリシス法を用い、中立温度環境下(23℃)及び寒冷環境下(5℃)で2週間順化させたラットのPOへ α -adrenoceptor antagonistであるphenoxybenzamine (10mM)を還流投与し、その間の深部体温、心拍数(熱産生反応の指標)、尾部皮膚温(熱放散反応の指標)、活動量を測定したのでその結果を報告する。

11. 交尾刺激を報酬とした雌ラットの条件性場所選好

伊藤 舞¹、清水奈津江¹、山田一夫¹、近藤保彦²、佐久間康夫² (¹目白大学人間社会学部、²日本医科大学生理学第一講座)

雌ラットは、性行動を報酬として条件性場所選好課題(CPP)の学習が可能かを検討した。ギロチンによって区切られた3つの部屋からなるアクリル製の装置を用いた。両側の部屋うちの一方は、壁と床敷きが黒色で、もう一方は白色であった。エストロゲンとプロゲステロン処置により発情させた去勢雌を中央の部屋に入れ、自由に装置内を歩き来させて、それぞれの部屋に滞在した時間を10分間測定した。その後、去勢雄ラットと性的に活発な雄ラットをそれぞれ両側の部屋に入れ、雌ラットを再び中央の部屋に入れた。その際、部屋間の隙間を2.5~3.0cmに調節することにより雌は自由に装置内を移動できるが、雄は移動できないようにした。射精後雄ラットは取り除き、性行動のあった部屋に雌ラットを30分間放置した。これらの手続きを週に1回のペースで繰り返した。しかし4週目においても雌ラットの場所選好に変化は認められなかったため、5週目以降はさらに嗅覚手がかり(アーモンド臭)を性的に活発な雄ラットの部屋に加えたところ、性行動を行った部屋での滞在時間の割合は増加した。これらのことから、雌ラットの性行動によるCPPの成立には嗅覚手がかりが必要であると考えられる。

12. サッケード運動学習の促進

小島奉子、岩本義輝、吉田 薫(筑波大学基礎医学系生理)

サッケードの正確さ(ゲイン:サッケード振幅/目標までの距離)は、サッケード適応と呼ばれる運動学習により

維持されている。サッケード適応の速さは毎日繰り返しても上昇しないとされているが、ある種の運動学習では再学習は速く起こる。

そこでサルを用い、短時間で適応を繰り返すことにより、サッケード適応が速くなるか調べた。適応は、Intrascadic Step Paradigmで誘発し、適応中に視覚誤差の方向を2回逆転させ、一実験を3ブロックに分けた(第一、第二、第三適応)。

第一適応と第三適応のゲイン変化率を比較したところ、後者は前者よりも有意に大きかった(適応の促進)さらに、適応促進は第一適応で到達したゲインに関連して終了しており、ゲイン変化の情報が保存されること(学習痕跡)が示唆された。

次に、第三適応の前に誤差のないサッケードを30分間行くと、促進は認められなかった。一方30分間の視覚遮断後も促進は起こった。以上から、学習痕跡は時間の経過ではなく、誤差のない運動の繰り返しにより消去されることが明らかになった。翌日に繰り返しの効果がないのは、痕跡が消去されるためと解釈される。

13. マウス孤束核における誘発および自発グルタミン酸放出のカルシウム流入依存性の差異

山崎弘二、繁富英治、加藤総夫(東京慈恵会医科大学・総合医科学研究センター・神経科学研究部・神経生理学研究室)

内臓性一次求心情報の中継・統合核である孤束核二次ニューロンからは、孤束刺激誘発(evoked, e-)および自発(spontaneous, s-)の二種の興奮性シナプス後電流(EPSC)が記録される。これら両放出機構に関与する電位依存性カルシウムチャンネル(VDCC)を同定するために、マウス(3.5w)孤束核を含む脳幹スライスを作成し、孤束核二次ニューロンからEPSCを記録した。 ω -conotoxin GVIA、 ω -agatoxin IVAおよびnifedipineはe-EPSC振幅をそれぞれ45.4%、11.1%および6.5%抑制し、 Cd^{2+} はe-EPSCをほぼ完全に抑制した。一方、同時記録されたs-EPSCの振幅および頻度は、これらのVDCC遮断薬のいずれもよっても有意な変化を示さなかった。また、e-EPSCは細胞外 Ca^{2+} 除去によって消失したが、s-EPSCは有意な変化なく残存した。マウス孤束—孤束二次ニューロン間シナプスにおける Ca^{2+} 依存的放出が主にシナプス前N型VDCCおよび非N、P/Q、L型VDCCの活性化に依存していること、また、二次ニューロンに収斂する興奮性線維終末からの自発グルタミン酸放出が Ca^{2+} 流入非依存的機構によって発生することが明らかとなった。

14. 低酸素負荷に対する延髄吻側腹外側部ニューロンの反応

小金澤禎史, 照井直人 (筑波大学・基礎医学系・生理)

吻側延髄腹外側部 (RVLM) には, 心血管運動を支配する交感神経のプレモータ・ニューロン群 (RVLMニューロン) が存在することが知られている。これらプレモータ・ニューロン群は標的となる器官別に異なる種類のニューロンから構成されていると予想されているにもかかわらず, その証明はない。本研究では, urethane 麻酔下, 非動化処置を施し, 迷走神経を切断した日本白色種雌性ウサギを用い, RVLMニューロン, 心臓交感神経および腎臓交感神経の低酸素暴露時における応答性を調べた。

RVLMニューロンは, 低酸素暴露に対して抑制性の応答を示す群と興奮性の応答を示す群の2つに分けることが出来た。心臓交感神経は低酸素暴露に対し抑制性の応答を示し, 腎臓交感神経は興奮性の応答を示したことから, 前者のニューロン群は心臓交感神経活動を支配するプレモータ・ニューロンであることが示唆された。また, 後者のニューロン群は内臓あるいは筋血管交感神経活動を支配するプレモータ・ニューロンであると考えられた。

15. Endothelin-1 は疼痛伝達に抑制性に作用する

蓮江文男^{1,2}, 桑木共之^{1,3}, 山田寛明^{1,2}, 村上正純², 守屋秀繁², 福田康一郎¹, 下山恵美¹ (千葉大学大学院医学研究院 ¹自律機能生理, ²整形外科, ³分子統合生理)

〔背景〕Endothelin-1 (ET-1) は血管内皮細胞より同定された血管収縮因子である。ET-1とその受容体 (ET-A, B) は全身の血管・諸臓器に加え, 神経系にも存在が確認されている。諸家の報告では, ET-1を脳室・脊髄腔内に少量投与すると疼痛を抑制することが示されており, また我々も第79回日本生理学会において, 神経特異的ET-1欠損マウスの疼痛閾値が低下していることを報告した。

〔目的〕ET-1脳室投与後の鎮痛効果の機序を検討する。

〔方法〕ET-1脳室投与による鎮痛効果に対する受容体拮抗薬の効果を検討した。また naloxone, methysergide, yohimbine, prazosin を投与し効果を検討した。

〔結果〕ET-1は用量依存性に鎮痛効果を示し, ET-A拮抗薬で消失した。ET-B拮抗薬は単独で鎮痛効果を示し低用量ではET-1の鎮痛効果を増強した。yohimbineの全身及び脳室投与でET-1の鎮痛効果は増強し prazosinの脳室投与で減弱した。

〔結論〕ET-1はET-A受容体を介して鎮痛効果を発現し, noradrenalinが関与している可能性が示唆された。

16. 呼吸筋の Thixotropy に関与する因子

泉崎雅彦, 柴田雅彦, 本間生夫 (昭和大学医学部第二生理学)

呼吸筋の Thixotropy がその後の胸郭の呼気終末位 (End-expiratory position, EEP) に影響を及ぼすことが Hommaらにより報告されている。肺膨張位において気道を閉鎖し, 胸郭呼吸筋による吸気努力を行うと, その後その筋の受動的性質が変化し, 気道開放後に一過性の EEP 上昇がもたらされる。骨格筋の Thixotropy の進展に重要な4つの因子, 収縮の強さ, 収縮時間, 収縮の際の筋長, 収縮後の筋弛緩の有無が, 同様に吸気筋の Thixotropy に影響を与えるのか検討した。健康成人男性9人を対象とし, EEPの決定にはレスピトレースを用いた。収縮時間 (0, 2, 5秒), 気道解放前の筋弛緩の有無 (2秒), 吸気努力を行う際の肺気量位 (機能的残気量, 最大吸気量 [IC] の30%, 60%), 吸気努力時の口腔内圧 (0, -5, -20 cm H₂O) が EEP に与える効果を調べた。5秒間の吸気努力に続き2秒間の筋弛緩時間がある場合にその後の EEP 上昇は大きく, この変動は肺気量位60% ICでの吸気努力-20 cm H₂Oの後に顕著であった。4つの因子は呼吸筋の Thixotropy にも影響を与える。