

第 57 回西日本生理学会

日 程：平成 18 年 10 月 27 日（金）	11：00～12：00	評議員会
	13：00～13：48	一般演題（4 題）
	13：58～15：46	奨励賞対象演題（9 題）
	15：56～16：56	一般演題（5 題）
	17：15～18：30	総会（奨励賞表彰式）
	19：00～	懇親会
28 日（土）	9：00～12：34	一般演題（17 題）

会 場：宮崎市民プラザ オルブライトホール

当 番：宮崎大学

参加者：100 名

演題数：35 題

第 57 回西日本生理学会の口演発表は全て PC、液晶プロジェクターを用い、発表時間は 12 分間（口演 9 分、討論 3 分）で行った。交通のアクセスの点から、参加者の減少を当初危惧したが、幸い例年に近い参加者となり、また口演発表に対して活発な質疑応答が行われた。

地方学会の活性化は大きな課題であるが、その対応策の 1 つとして、昨年より若手研究者（37 歳以下）の学会への参加を促し、合わせて若手研究者育成を主眼として「西日本生理学会奨励賞」が設置された。今年度も幸い多くの会員の関心を呼び、9 演題の応募があった。いずれの応募演題も素晴らしく優劣付けがたいものであったが、5 人の審査員により、獨創性・プレゼンテーション能力等を総合的に評価していただき、2 名を選出した。受賞者は産業医科大学医・第 1 生理学・齊藤健氏「ラット視床下部-下垂体後葉系におけるサリューシン β の生理作用の検討」、九州大学大学院・医学研究院・統合生理・歌大介氏「ラット脊髄後角膠様質における TPRAI を介した興奮性シナプス伝達増強作用の解析」であった。この奨励賞が契機となり、今後地方学会への参加者が増加することを祈念する。奨励賞の結果発表と授賞式は総会終了時に行った。また昨年同様若手研究者の経済的負担軽減のため、参加費・懇親会費について若干の優遇処置を行った。

ヒトゲノム解説も終え、いよいよポストゲノム時代に突入し、これからは生理学が主題とする機能解析研究の重要性が高まっている。しかしながらここ数年生理学のアイデンティティーが問われ、各大学とも組織再編が進む中、生理学講座の存続が危ぶまれている。また初期臨床研修制度の導入も関連し、後継者特に大学院生の確保が喫緊の課題である。このような難しい問題について情報交換を行い、じっくり話し合う場として評議員会を口演発表前の午前中に実施した。評議員会では、報告事項に続き、1) 評議員会と総会のあり方、2) 次々当番校について、3) 「西日本生理学会奨励賞」選考規程の内、選考委員のあり方、等について審議し、また上記問題点について意見交換を行った。なお上記「西日本生理学会奨励賞」を日本生理学会の公認として頂くよう、後日地区常任幹事を介して申請することとした。次回開催は九州大学が担当し、平成 19 年 10 月 19—20 日百年講堂において、次々回当番校は熊本大学と決まった。

1. 2 型糖尿病ラット循環血中 ghrelin, leptin 及び cholecystokinin 濃度と肥満との関連

本村 真, 砂川昌範, 小杉忠誠 (琉球大学医学部形態機能医科学講座生理学第一分野)

本研究では、過剰な摂食行動により肥満及び 2 型糖尿病

を自然発症するラット (OLETF ラット) の 7 週齢及び 38 週齢時における循環血中 ghrelin, leptin および cholecystokinin (CCK) 濃度を ELISA 法を用いて測定した。ghrelin, leptin, CCK と肥満との関連、およびそれらの肥満発現への作用様式を検討した。対照として同一系統の正

常ラット (LETO ラット) を用いた。OLETF ラットでは LETO ラットに比して, active ghrelin および leptin 濃度が有意に増加し, CCK 濃度が有意に減少していた。重回帰分析の結果, 摂食量に最も強く寄与する因子は, OLETF ラットにおいては active ghrelin の desacyl ghrelin に対する比であった。体重増加に最も強く寄与する因子は, LETO ラットにおいては leptin であった。また, CCK 濃度が低いと Δ 摂食量/ Δ active ghrelin 比が増加し, Δ 体重/ Δ leptin 比が減少していた。これらの結果から, 血中 CCK は, ghrelin 及び leptin 作用への影響を有する事が示唆された。すなわち, OLETF ラットの血中 CCK 濃度の低下は, active ghrelin による摂食行動を亢進すると同時に, leptin による体重増加抑制作用を増強している可能性が示唆される。しかしながら, ghrelin が優位なために肥満となっている可能性が考えられた。

2. 食用油脂を用いた過食モデルラットの側坐核ドーパミン動態

成清公弥, 粟生修司 (九州工業大学大学院・生命体工学研究科・脳情報専攻)

近年, 砂糖や油脂等の高嗜好食品の摂取が, 薬物依存と類似の影響を中枢神経系とくにドーパミン系に及ぼしていることが示唆されている。本研究では, 高嗜好食品摂取におけるドーパミンの役割を明らかにするため, 油脂の断続的反復投与で binge (むちゃ食い) 様摂食が形成された雄ラットの側坐核外殻部ドーパミン動態をマイクロダイアリシス法で解析した。固形油脂を2日に1回1時間繰り返し与えると油脂に対する binge 様摂食を誘発した (Corwin et al. 1998)。Binge 誘発群の油脂の1時間摂食量は, 5回目までに, 1回目の約3倍に達した。Binge 様摂食の確認後, binge 処置群と無処置対照群の側坐核にマイクロダイアリシスプローブを留置した。プローブ留置2日後, ドーパミンを測定しながら, 油脂を20分間摂食させ, 摂食量およびドーパミン応答を両群で比較した。両群の20分間油脂摂取量に差はなく, 油脂摂取量とドーパミン上昇率の相関も両群とも認められなかったが, 油脂摂取時のドーパミンの上昇は油脂断続摂食群のほうが対照群と比べて有意に減弱していた。以上の結果, 油脂の binge 様摂食の発現に側坐核ドーパミンの上昇が関与している可能性は低く, 逆に側坐核ドーパミン応答の抑制が binge の形成に何らかの役割を果たしていることが示唆される。

3. ストレス性低カルシウム血症に関する胃酸分泌促進因子

劉 坤, 野口明子, 粟生修司 (九州工業大学大学院・

生命体工学研究科・脳情報専攻高次脳機能講座)

ストレス性低カルシウム血症の発生には胃酸分泌促進系が関与することが知られている。しかし, その詳細な時間経過や胃酸分泌促進作用のあるカルシウム低下因子はよく分かっていない。ヒスタミン H₂ 受容体遮断薬ラニチジンを用いて, ストレス性胃由来カルシウム低下因子ヒスタミンの関与を検討した。さらに胃酸分泌促進因子のグレリンおよびサイトロロピン放出ホルモン (TRH) のカルシウム低下作用を調べた。TRH (0.002, 0.02, 0.2mg) 静脈投与と (0.01mg) 脳室内投与を行い, またグレリン (0.05, 0.5, 5 μ g) を脳室内投与し, 経時的に血液カルシウム濃度を測定した。ラニチジン (5mg/kg, iv) を前処置しておくこと, 拘束ストレスによるカルシウム低下は完全に抑制され, 電気ショックによるカルシウム低下は部分的に減弱した。グレリンの脳室内投与では, 血液カルシウム濃度は有意の変化を示さなかった。TRH 静脈投与15分後から血液カルシウムレベルを徐々に低下させ始め, 120分まで持続した。脳室内投与では, TRH には強い血液カルシウム低下作用があることも明らかになった。以上の結果から, ヒスタミンと TRH はストレス性低カルシウム血症に関与しているが, グレリンは関与していないことを示唆される。TRH の標的部位が今後の課題である。

4. 神経心理テストによって設定した3段階の認知機能について

坂元健一¹, 中屋敷千鶴², 緋田 誠², 坂元藤雄², 石井祐司², 石河延貞² (¹鹿児島県鹿児島市立病院脳神経外科, ²霧島記念病院)

被験者は平均年齢 78.8 ± 0.36 (SEM) 歳の男女 96 人で, それぞれに Mini-Mental State Examination (MMSE) と「かな拾い」テスト (KHT) を課して脳の認知機能を評点化したところ, 両テストの得点 (スコア) 間には有意の相関が存在し, X に対する Y の回帰直線, $Y = -8.73 + 1.07X$ が得られた。ここで KHT の痴呆/非痴呆限界ラインを $Y = 10$ に設定すると $X = 17.5$ が Y 軸と直交する MMSE の限界ラインとなり, すべてのスコアは X, Y 軸限界線の上下・左右の4区画 (A, B, C, D) のどれかに分布する。今 A, B+D 及び C の各野に分布する MMSE スコア平均値で被験者の認知機能を表すと A は 24.8 ± 0.3 (SEM) と最も高く, 年齢相応の認知障害は軽度で, B+D 野の平均スコアは 20.9 ± 0.6 となって障害は中程度, 残る C 区画の平均スコアは 14 ± 0.9 で最も低く, 認知障害度は最も重い。

一方, 被験者への8年間の脳活性化リハビリテーションが認知機能を改善するかどうかを知るため, 毎年神経心理テストを実施し, 3段階の機能障害別に MMSE スコアの経

年変化を調べた。その結果、初年度のテスト評点がC段階の被験者は8年間に及ぶ脳活性化リハビリテーションにも拘らず年々痴呆が増悪したが、A及びB+D段階の被験者群の評点に著変なく、初年度の脳の認知機能が維持されることが分かった。

5. 破骨細胞形成における Tumor necrosis factor alpha (TNF α) のオートクライン作用

中尾彰宏^{1,2}, 鍛冶屋 浩¹, 福島秀文¹, 岡本富士雄¹, 岡部幸司¹ (¹福岡歯科大学・細胞分子生物学, ²口腔腫瘍学)

TNF α は、免疫系細胞が産生するサイトカインで、炎症反応や免疫反応を誘発することが知られており、骨代謝においては炎症性骨破壊の誘発因子であることが報告されている。さらに、最近リウマチによる炎症性骨破壊の治療に対してヒト可溶性抗 TNF α 抗体が有効であるという報告が見られ、臨床的にも注目されている。TNF α は、骨芽細胞に作用し破骨細胞の分化必須因子である (receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)) の発現を上昇させて間接的に破骨細胞形成させるが、近年、in vivo, in vitro において、TNF α 単独で直接的に破骨細胞前駆細胞から破骨細胞形成が可能であるという報告があり、破骨細胞形成における TNF α の直接的作用も明らかになっているが、その機序についてはまだ不明の点が多い。今回我々は、この直接作用について検討した結果、RANKL 依存的に破骨細胞前駆細胞から TNF α が分泌され、前駆細胞の TNF receptor 1 にオートクライン的に作用することを明らかにした。さらに、この TNF receptor 1 を介した破骨細胞形成には、NFATc1 の発現上昇を介することも明らかにした。さらに、今回の抗 TNF α 抗体や抗 TNF receptor 1 抗体が破骨細胞の分化・形成を抑制することから、抗 TNF α 抗体療法には破骨細胞におけるこのオートクライン作用の抑制作用を含むことが示唆された。

6. Transient receptor potential (TRP) 蛋白質 TRPC6 の cGMP を介した制御機構

○高橋真一, 瓦林靖広, 中村友紀, 海 琳, 本田 啓, 井上隆司 (福岡大学医学部生理学)

(背景・目的) 心血管組織に優勢に発現している TRPC 蛋白質 isoform TRPC6 は受容体作動性 Ca²⁺透過型陽イオンチャンネル (NSCC) である。最近の研究から、この蛋白質の活性が血管の緊張度や増殖能の増加を介して血圧の制御や血管リモデリングに密接に関わっていることが明らかとなってきた。本研究では、このチャンネル活性の新たな制御機構として、血管の強力な抑制性活性物質である NO 及び

その下流のシグナル伝達系 cGMP/protein kinase G (PKG) の潜在的な重要性に着目し、以下の実験を行った。

(結果) HEK293 細胞にマウス型 TRPC6 を発現し、カルバコールによるムスカリン受容体刺激を行うと、'S型' 整流特性を示す NSCC が活性化された。この電流は、一酸化窒素 (NO) 供与体 SNAP (10-100 μ M) 前処置によって約 70% の抑制を受けた。同等の抑制は膜透過型 cGMP アナログである 8-bromo-cGMP (100 μ M) の前処置によっても生じ、PKG 阻害薬 KT5823 前処置によってほぼ完全に消失した。またこの効果は、TRPC6 のアミノ酸配列解析から予想される PKG リン酸化モチーフの一つ 'RRQT' の 69 番目トレオニンをアラニン置換することによって著しく減弱した。

(結論) 以上より、発現した TRPC6 チャンネルは、NO/cGMP/PKG 系による負の制御を受けていることが強く示唆された。

7. 成熟ラット脊髄後角における proteinase-activated receptor-1 活性化ペプチドによる興奮性シナプス伝達促進作用

藤田亜美, 柳 涛, 青山貴博, 中塚映政, 熊本栄一 (佐賀大学・医学部・生体構造機能学講座 (神経生理学))

Proteinase-activated receptor (PAR) は PAR-1 から PAR-4 までの 4 つがクローニングされており、自身を活性化するリガンドを細胞膜外側の N 末端領域に内蔵している。PAR の活性化機構はユニークであり、トロンビンやトリプターゼなどのプロテアーゼの酵素作用によって内蔵リガンドが露出されると、これが受容体自身に結合することで受容体が活性化される。今回、PAR アゴニストが痛覚情報伝達制御に対してシナプスレベルでどのような作用をおよぼすのかを、成熟ラット脊髄膠様質ニューロンにホールセル・パッチクランプ法を適用して検討した。その結果、PAR-1 アゴニストペプチド SFLLRN (1 μ M) は自発性興奮性シナプス後電流 (sEPSC) の振幅を変化させずに、発生頻度を増加させることを発見した。この SFLLRN による sEPSC 促進作用は、テトロドトキシン (0.5 μ M) によっては影響を受けず、PAR-1 アンタゴニスト YFLLRNP (1 μ M) 存在下では抑制された。また、PAR-1 選択的アゴニスト TFLLR は濃度依存的に sEPSC の発生頻度を増加した。以上より、膠様質における PAR-1 活性化が直接に興奮性シナプス伝達をシナプス前性に促進することが明らかとなり、PAR-1 が中枢神経系において痛覚情報伝達を制御する可能性が示唆された。

8. エンドトキシンによる T 型 Ca^{2+} チャネルの isoform 依存性制御

山口 豪, 李 泰成, 鄭 明奇, 磯本正二郎, 小野克重 (大分大学医学部循環病態制御講座)

エンドトキシンショックの原因物質リポポリサッカライド (LPS) は循環動態に対して様々な効果を有することが知られているが, 心筋細胞の Ca^{2+} 動態における作用は明らかにされていない。本研究では, 心筋細胞 T 型 Ca^{2+} チャネルに対する LPS のインターロイキン等炎症性サイトカイン非依存性作用をパッチクランプ法を用いて検討した。LPS (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) の急性作用では $\text{Ca}_v3.1$ 及び $\text{Ca}_v3.2$ -T 型 Ca^{2+} チャネル電流は影響を受けなかった。一方, LPS (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 投与 3 時間後の亜急性作用では, 細胞内 Ca^{2+} が低濃度の条件下 ($p\text{Ca}=10$) では $\text{Ca}_v3.1$ -T 型 Ca^{2+} チャネル電流は増加し, $\text{Ca}_v3.2$ -T 型 Ca^{2+} チャネル電流は抑制された。細胞内 Ca^{2+} が高濃度の条件下 ($p\text{Ca}=3$) では $\text{Ca}_v3.1$ -および $\text{Ca}_v3.2$ -T 型 Ca^{2+} チャネル電流は共に抑制され, その作用は PKC 阻害剤である Chelerythrine (100 nM) の存在下で消失した。エンドトキシンショックの原因物質である LPS は T 型 Ca^{2+} チャネルを isoform 依存的に制御しており, conventional PKC 依存性作用と非依存性作用を有することが示唆された。

9. ラット視床下部-下垂体後葉系におけるサリューシン β の生理作用の検討

斉藤 健¹, 渡邊卓司², 卜部倫子³, 橋本弘史¹, 藤原広明¹, 横山 徹¹, 尾仲達史³, 平田結喜緒⁴, 上田陽一¹ (¹産業医科大学・医・第 1 生理学, ²ペプチド研究所, ³自治医科大学・医・神経脳生理学部門, ⁴東京医科歯科大学大学院・分子内分泌内科学)

サリューシン β は, バイオインフォマティクスにより 2003 年に発見されたアミノ酸 20 個からなる新規ペプチドである (Shichiri *et al.*, Nat Med, 2003)。サリューシン β の末梢における生理作用として, 著明な血圧降下, 徐脈, 血管平滑筋細胞および線維芽細胞の増殖作用が報告された。中枢においては視床下部-下垂体後葉系, 特にバゾプレッシン産生ニューロンに共存し, 下垂体後葉からのバゾプレッシン分泌を刺激する作用が報告されている。今回我々は, 浸透圧ストレスによってラット視床下部-下垂体後葉系においてサリューシン β 様免疫染色性が著明に増加することを見出した。また, *in vitro* 後葉ホルモン分泌試験において, サリューシン β はラット下垂体後葉からのバゾプレッシンおよびオキシトシンの分泌を刺激するが, 視索上核からの後葉ホルモン分泌に効果を示さないことを明らかにした。さらに, スライスパッチクランプ法を用いてラット視

索上核神経分泌ニューロンへの神経性入力に対するサリューシン β の作用について解析したところ, 興奮性および抑制性シナプス後電流ともに効果を示さなかった。以上より, サリューシン β は, 浸透圧ストレスにより視床下部-下垂体後葉系において増加し, 下垂体後葉から分泌されることが示唆された。また, サリューシン β は後葉ホルモン分泌を下垂体後葉の神経終末で自己分泌・傍分泌的に修飾することで浸透圧調節に寄与することが示唆された。

10. ガラニン はラット脳弓下器官ニューロンの神経活動を抑制する

甲斐 絢 (九州歯科大学 生理学講座)

ガラニン (GAL) は摂食, 疼痛, 記憶に関与する摂食促進ペプチドである。ラット中枢に GAL を投与すると飲水を抑制することが最近報告された。口渴中枢のひとつである脳弓下器官は, ANG II 投与により興奮し, 飲水を促進させる。したがって GAL による飲水の抑制は, 脳弓下器官ニューロンの神経活動を抑制して引き起こされた可能性がある。本研究では, ラット脳弓下器官スライス標本より細胞外記録を行い, GAL による反応を調べた。およそ半数の神経活動記録において, 濃度依存性 (10~1000nM) に自発性神経活動を抑制した。GalR1 アゴニスト M617 は GAL と同じく抑制性の反応を示したものの, GalR2/3 アゴニスト GAL (2-11) では無反応であった。また, GAL により抑制されたニューロンの多くは ANG II により興奮性の反応を示した。ホールセルパッチクランプにおいて, TTX 存在下で GAL 投与により外向き電流が観察された。自発性の EPSC および IPSC に影響は認められなかった。RT-PCR 法では 3 種類の GAL 受容体が脳弓下器官に発現していることが確認された。GAL に対する免疫電顕では抑制性シナプスに特異的な陽性像を認め, 電気生理学の結果と一致した。これらの結果より, 神経調節性に放出される GAL が脳弓下器官ニューロンの GalR1 を介して神経活動を抑制することが, 飲水を抑制するメカニズムの 1 つと考えられる。

11. 副腎髄質細胞における GABA 分泌顆粒の同定

○原田景太, 松岡秀忠, 井上真澄 (産医大・医・第 2 生理)

我々は以前, 副腎髄質において内在性の GABA 系の存在, すなわち GABA 合成酵素 (GAD), 小胞性輸送体 (VGAT) の発見を見出し報告した。副腎髄質における GABA の分泌機構を調べるため, ショ糖密度勾配を用いてウシ副腎髄質組織標本を分画し, GABA がどのような顆粒に含まれているか調べた。アミノ酸分析により 10~30% の低糖濃度分画に GABA が含まれることがわかり, 合成酵素

もこの分画で同定された。一方、小胞性GABA輸送体(VGAT)は10%および15%糖濃度分画で、クロマフィン顆粒のマーカであるDβHは低糖濃度(10, 15%)と高糖濃度分画(55-65%)で検出された。走査型および透過型電子顕微鏡を用いた解析で、異なる糖濃度分画から得られた小胞は異なるサイズ分布を示すことが示された。GABAはカテコールアミンと共にクロマフィン顆粒に貯蔵されていることが示唆されたがそれらの分布は完全には一致しなかった。GABAを含むと予想される顆粒は密度が低く、その直径も比較的小さいことがわかり、クロマフィン顆粒のheterogeneityを示唆する結果が得られた。

12. ラット脊髄後角膠様質におけるTRPA1を介した興奮性シナプス伝達増強作用の解析

歌 大介, MD H. Rashid, 古江秀昌, 吉村 恵(九州大学大学院 医学研究院 統合生理学)

成熟ラット脊髄スライス標本を用い、痛みの伝達や修飾に重要な役割を果たす脊髄後角第II層、膠様質細胞からパッチクランプ記録を行い、侵害性冷覚の受容体、TRPA1作動薬の興奮性および抑制性シナプス伝達に対する作用機序を解析した。TRPA1作動薬であるシナモールデヒドは、膠様質細胞に誘起される自発性EPSCの発生頻度と振幅を濃度依存性に増大した。高濃度では、その増強作用に脱感作が観察された。TTX存在下では、微小EPSCの発生頻度を増加させ、振幅に影響を与えなかった。これらの増強作用は拮抗薬であるルテニウムレッドにより抑制された。また、内向き電流などシナプス後性の作用は観察されなかった。一方、GABAやグリシンを介するIPSCの発生頻度や振幅には影響を与えなかった。以上より、TRPA1はC線維などの脊髄シナプス前終末部に発現し、その活性化によりグルタミン酸の放出が促進される事、また、その入力増大により興奮性介在ニューロンが発火し、痛覚伝達が増強される事が示唆された。

13. サル前頭眼窩皮質における食物および性の弁別に関する神経情報処理機構

○坂井健二, 井上貴雄, B. Lukáts, 高良沙幸, 水野雅晴, 粟生修司(九州工業大学大学院 生命体工学研究科 脳情報専攻)

食物摂取やパートナー選択は動物の生存にとって重要な機能である。それらの選択機構は食欲や性欲といった本能と、対象を特定のカテゴリーとして識別する高次認知機能から成り立っている。本研究では、生存に関連するカテゴリーの認識機構の解明を目的として、視覚、嗅覚や味覚などの多感覚種が収束し、報酬の価値の認知に関与している

前頭眼窩野のカテゴリー弁別関連ニューロンの特性を解析した。食物・非食物、雄ザル・雌ザルといった視覚情報を識別させる視覚的カテゴリー弁別課題をアカゲザルに訓練し、課題遂行中の前頭眼窩皮質(OBF)から単一神経活動を記録し、カテゴリー弁別関連ニューロンを検索した。約200個のニューロンのうち、報酬関連ニューロンが最も多く記録したが、5-10%のニューロンが食物や性のカテゴリーに選択的に応答した。食物カテゴリー関連ニューロンは11野尾側を中心として視覚投射部位に主として分布した。性カテゴリー関連細胞は11野のほか13野や14野など複数の感覚情報を受け取るように広範囲に分布した。食物弁別は視覚優位な情報処理に基づき、性弁別は複数感覚種に依存した情報処理を行っていることが示唆される。

14. グリシン作動性抑制性シナプス後電流に対する亜鉛の作用

○有村由貴子¹, 江藤 圭¹, 野田百美¹, 石橋 仁²(¹九州大学大学院・薬学研究院・病態生理学, ²九州大学大学院・医学研究院・分子機能生理学)

亜鉛は中枢神経系に存在する微量金属の一つで、シナプス小胞に多く含まれ、神経細胞の機能に重要な役割を担っていると考えられている。

今回我々は、グリシン作動性抑制性シナプス後電流(IPSCs)に対するZn²⁺の効果を検討した。IPSCsの記録は、2週齢のラット脊髄後角より作成したスライス標本から機械的に単離した神経細胞にホールセルパッチ法を適用して行った。Zn²⁺は低濃度では自発性IPSCsの頻度に影響を与えずに振幅のみを増強した。高濃度では、自発性IPSCsの振幅は抑制されたが、その頻度は著明に増加した。さらに、グリシン誘発電流に対しては低濃度のZn²⁺が増強効果を、高濃度のZn²⁺が抑制効果を示した。Zn²⁺のIPSCs増強作用は、テロドトキシン及びCa²⁺チャネル拮抗薬で抑制されたことから、シナプス前神経終末部の脱分極を介していることが明らかとなった。以上の結果より、Zn²⁺は、シナプス後膜のグリシン受容体を調節すると同時に、シナプス前神経終末部にも作用してグリシン作動性シナプス伝達を修飾することが示唆された。

15. 単一シナプス前終末からのグリシン遊離に及ぼす2価陽イオンの効果

○野中喜久^{1,2}, 正代清光^{1,2}, 前田 恵^{2,3}, 東 英穂³, 村山伸樹¹, 赤池紀生²(¹熊本大学大学院 自然科学研究科, ²熊本保健科学大学 衛生技術学科 生理, ³久留米大学大学院 医学研究科)

シナプス前神経終末部内のCa²⁺濃度の上昇は、活動電位

非依存性の化学伝達物質の自発的放出や活動電位依存性の放出に関与する。しかし、 Ca^{2+} と同じ2価陽イオンの Sr^{2+} や Ba^{2+} が哺乳動物の微小中枢神経終末部において Ca^{2+} 同様の働きを有するかは不明である。今回、我々は膀胱、子宮および大腸などの内臓痛覚を中継するラットの脊髄背側交連核(SDCN)領域ニューロンを機械的処理のみで急性単離した。この単離ニューロンには正常な生理機能を有した各種神経終末部がたくさん付着しており、「シナプス・ブートン標本」と呼ぶ。そこで本標本に付着するグリシン作動性神経終末部の1つのみを「フォーカル電気刺激法」で、選択的に興奮させグリシン作動性抑制性の誘発シナプス後電流(eIPSC)と自発性のmIPSCを指標にしてこれら2価陽イオンの作用を Ca^{2+} 作用と比較検討した。

その結果、グリシン作動性mIPSC放出頻度の増加は $\text{Ba}^{2+} > \text{Sr}^{2+} \geq \text{Ca}^{2+}$ 、電流の大きさは $\text{Ca}^{2+} \geq \text{Sr}^{2+} > \text{Ba}^{2+}$ の順であった。一方、eIPSCの電気刺激による発火頻度は $\text{Ca}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Ba}^{2+}$ 、電流の大きさは $\text{Ca}^{2+} \geq \text{Sr}^{2+} > \text{Ba}^{2+}$ であった。よって、eIPSCとmIPSCの電流の大きさへの Sr^{2+} と Ba^{2+} の作用の強度は同じであることがわかった。

16. 成熟ラット脊髄後角のホスホリパーゼA₂活性化による抑制性シナプス伝達の促進

柳 涛, 藤田亜美, 岳 海源, 水田恒太郎, 中塚映政, 熊本栄一(佐賀大学医学部生体構造機能学講座(神経生理学分野))

痛み伝達制御に重要な役割を果たす脊髄後角第II層(膠様質)ニューロンにおける興奮性シナプス伝達がホスホリパーゼA₂(PLA₂)活性化により促進することが知られている。痛み伝達制御におけるPLA₂の役割をより詳細に知るために、成熟雄性ラットから作製した脊髄横断スライス標本の膠様質ニューロンにブラインド・ホールセル・パッチクランプ法を適用し、PLA₂活性化ペプチドであるメリチン(1 μM)が抑制性シナプス伝達にどのような作用を及ぼすかを調べた。メリチンはGABAおよびグリシン作動性の自発性抑制性シナプス後電流(sIPSC)の振幅や発生頻度を増加し、前者のsIPSC促進はtetrodotoxin(TTX, 1 μM)により抑制されたが、後者はTTXやCNQX(10 μM)やindomethacin(100 μM)により殆ど影響を受けなかった。一方、メリチンによるグリシン作動性sIPSCの促進はPLA₂阻害剤4-bromophenacyl bromide(50 μM)やnordihydroguaiaretic acid(100 μM)存在下で消失した。以上の結果は、PLA₂活性化により生成されたlipoxigenase代謝物がグリシン作動性シナプス伝達をシナプス前性および後性に促進することを示している。脊髄後角におけるPLA₂活性化は痛み伝達を多様に制御することが示唆される。

17. 細胞接着因子欠損マウスにおける脊髄冷覚シナプス入力脱落

古江秀昌¹, 鈴木祥宏², 古賀浩平¹, 島崎由佳³, 能見光雄³, 竹市雅俊², 吉村 恵¹(¹九州大学大学院 医学研究院 統合生理学,²理化学研究所 発生再生科学 高次構造形成,³佐賀大学 総合分析実験センター)

選択的シナプス結合の形成に必須の分子と考えられている細胞接着因子(カドヘリン8)欠損マウスにおける脊髄シナプス入力を正常のものと比較・検討し、脊髄感覚シナプス伝達に対するカドヘリン8の役割を調べた。カドヘリン8は一部の脊髄後角第II層、膠様質細胞、TRPM8(冷受容体)を発現する小型の後根神経節細胞とその脊髄内終末部に観察された。欠損マウスでは、膠様質細胞に誘起されるC線維やA δ 線維誘起の単シナプス性EPSCの振幅が正常に比して有意に減少した。一方、A β 線維誘起の単シナプス性EPSCの振幅に差は得られなかった。カドヘリン8を発現する膠様質細胞から記録を行うと、TRPM8作動薬であるメンソール感受性でカイネティクスの遅いmEPSCとカイネティクスの速いmEPSCが観察された。欠損マウスではメンソール感受性が低下し、カイネティクスの遅いmEPSCの発生頻度が著明に減少した。後根神経節細胞におけるTRPM8の活性に差は見られなかった。以上より、TRPM8を発現する小型後根神経節細胞から膠様質細胞への選択的シナプス入力の形成にカドヘリン8が必須であり、欠損するとそのシナプスの機能的脱落が起こることが示された。

18. AD/HDモデルラットの青斑核ニューロンにおけるnorepinephrine性シナプス伝達

○木谷有里, 石松 秀, 赤須 崇(久留米大学 医学部生理学講座 統合自律機能部門)

注意欠陥/多動性障害(AD/HD)は、不注意、多動、衝動性を主症状とする軽度発達障害で、中枢神経におけるdopamine(DA)やnorepinephrine(NE)の伝達不全が原因と示唆されている。本研究ではAD/HDモデルラットの高血圧自然発症ラット(SHR)と対照ラット(WKY)を用いて、中枢神経におけるnoradrenergic神経の中核である青斑核(LC)のNE伝達について調べるために、HPLC法で脳スライス標本のNE、DA含有量を測定し、またwhole cell patch clamp法を用いてLCニューロンの神経活動を記録した。NE量は、LCと前頭前野においてWKYよりSHRの方が有意に多かった。一方WKYと比べSHRは、静止膜電位が有意に脱分極側にシフトしていたが、自発性活動電位の発射頻度は低下していた。 α_2 受容体作動薬clonidineおよび α_2 受容体阻害薬yohimbineを還流投与す

ると、それぞれの誘起電流に両者で有意差はなかった。しかし NE (3-100 μ M) 誘起外向き電流は WKY に比べて SHR が有意に減少していた。以上の結果から SHR では NE の合成が亢進しているが、NE 伝達の効率が低下しているものと考えられる。LC において NE 反応が減弱していることから NE transporter の機能障害が AD/HD 病態に関与しているものと示唆された。

19. habutobin cDNA クローニングと組換えタンパクの作製

○小杉忠誠, 砂川昌範, 中村真理子 (琉球大学医学部形態機能医科学講座生理学第一分野)

habutobin は、1) 家兎フィブリノーゲンの脱線維素原作用、2) 家兎血小板凝集抑制作用、3) 血管内皮細胞からの線溶酵素分泌促進作用等の多機能を有する約 65kDa のトロンビン様酵素である。habutobin の酵素特性の分子メカニズムを明らかにするために、cDNA クローニングおよび組換えタンパクを作製した。ハブ毒腺より total RNA を抽出し、oligo dT プライマーにより mRNA の逆転写反応を行い、first strand cDNA を合成した。habutobin の N 末端アミノ酸配列 (IGGDE-NINHRFLVV) と蛇毒由来の他のトロンビン様酵素 cDNA 配列情報を基に、作製した PCR プライマーを用いて cDNA をクローニングした。habutobin cDNA の全長は 1530bp、推定アミノ酸数は 233、推定分子量は 25.4kDa であった。さらに、pET-15b 蛋白発現用プラスミドベクターを用いて、His-tag mature habutobin 組換えタンパクを大腸菌 BL21-Codon plus (DE3)-RIL に発現させ、Ni-NTA agarose affinity chromatography にて精製を行った。ハブ粗毒中の habutobin は二量体で存在し、酵素活性発現には糖鎖付加等のタンパク翻訳後修飾が必要と考えられた。

20. 細胞内 cAMP 上昇はラット培養平滑筋細胞 (A7r5) の細胞増殖を抑制する

○木村安貴, 砂川昌範, 小杉忠誠 (琉球大学医学部形態機能医科学講座生理学第一分野)

【目的】血管平滑筋細胞の増殖・遊走の統御は、各種血管病態の理解と是正に有用である。血管平滑筋細胞の増殖・遊走と環状ヌクレオチド (cAMP, cGMP) の細胞内上昇との関連を検討した。【方法】WST-1 を用いてラット培養血管平滑筋細胞 (A7r5) の細胞増殖を評価した。すなわち dibutyryl-cAMP (db-cAMP)、db-cGMP (0.03–3mM) を培養液 (10% FBS-DMEM) に添加し、120 時間まで 24 時間おきに生細胞数の測定を行った。また、0.3mM db-cAMP を含む培養液に、type 3 phosphodiesterase (PDE3) inhibitor である olprinone hydrochloride (OPN) を 0.01 から 1

mM の濃度のものを添加し、96 時間まで 24 時間おきに生細胞数の測定を行った。次に、A7r5 を db-cAMP (3mM) を含む培養液を用いて 72 時間培養後、cell culture insert (pore size 8 μ m) に移し、24 時間後に calcein AM を加え細胞を蛍光染色し、蛍光顕微鏡にて遊走細胞数の測定を行った。【結果】db-cAMP は A7r5 の細胞増殖を濃度依存性に有意に抑制したが、db-cGMP は抑制しなかった。1mM OPN はコントロール群に比べて有意に細胞増殖を抑制した。0.3 mM db-cAMP による細胞増殖抑制効果は、OPN の濃度上昇に伴って有意に増強した。また、3mM db-cAMP は A7r5 の遊走能を有意に抑制した。【結論】細胞内 cAMP の濃度上昇が、ラット培養平滑筋細胞 (A7r5) の細胞増殖及び遊走を抑制するのが示唆された。

21. SMemb mRNA 標的 RNA 干渉は bound thrombin による家兎培養血管平滑筋細胞の遊走亢進を抑制した

○砂川昌範, 島田誠二, 中村真理子, 小杉忠誠 (琉球大学医学部形態機能医科学講座生理学第一分野)

SMemb mRNA の異なる部位を標的とする 3 種類の siRNA ベクター (ORF-1/pSilencer, ORF-2/pSilencer および 3' UTR/pSilencer) を構築した。VSM 細胞の増殖活性は WST-1 による代謝活性の測定および BrdU の DNA への取り込み量を指標とした。細胞遊走活性はセルカルチャーインサートを用いた遊走細胞数の計測により評価した。ノーザンプロットの結果、ORF-2/pSilencer (1 μ g/mL) が最も効果的に SMemb mRNA 発現を抑制した (0.51 \pm 0.09 倍, $P < 0.01$)。抗家兎 SMemb モノクローナル抗体を用いた蛍光免疫染色の結果、SMemb 蛋白発現が ORF-2/pSilencer により減少した。bound thrombin は、SMemb および PAI-1 mRNA 発現量を各 1.4 \pm 0.01 倍および 2.65 \pm 0.69 倍に増加したが ($P < 0.01$ vs. PBS 群)、これらの mRNA 発現増加は ORF-2/pSilencer 処理群ではみられなかった。bound thrombin 暴露 48 時間後では、VSM 細胞の DNA 合成・遊走能の有意な亢進がみられた。ORF-2/pSilencer 処理は bound thrombin により惹起された遊走亢進を有意に抑制したが、DNA 合成亢進は抑制しなかった。

22. バゾプレッシン-eGFP トランスジェニックラットの下垂体後葉における eGFP 蛍光の連続測定の試み

○藤原広明¹, S. Yao², J. Paton³, 上田陽一¹ (¹産業医科大学・医・第 1 生理学, ²ブリストル大学・医・神経内分泌学, ³ブリストル大学・医・生理学)

今回我々は生細胞に発現した緑色蛍光改変タンパクである enhanced green fluorescent protein (eGFP) 蛍光を光ファイバーにより連続的に計測するシステムを開発した。

このシステムはeGFPが存在するニューロンおよび神経終末に励起光を照射し、得られた光シグナルを電気シグナルに変換して観察、記録するものである。本システムを用いて、バゾプレッシン-eGFP トランスジェニックラットの下垂体後葉に発現したeGFP蛍光を *in vitro* 標本で連続測定しながら、様々な生理的刺激を行った。その結果、高カリウム溶液、サリユーンβおよびガラニン様ペプチド (galanin-like peptide : GALP) の投与により、分泌を示唆する蛍光強度減少を示すシグナルを観察した。これらのことから、本システムによるeGFP蛍光観察により、バゾプレッシン分泌をモニターすることができる可能性を見出したので報告する。

23. Kir2.1 (IRK1) チャネルの細胞内 pH 依存性開閉機構

DH. Yan, 穎原嗣尚, ○石原圭子 (佐賀大学・医・生体構造機能学・器官細胞生理)

Kir2.1 は心筋、骨格筋、血管内皮細胞など様々な細胞に発現している強い内向き整流性を示すカリウムチャネルであり、このチャネルの外向き電流は、細胞内のポリアミンや Mg^{2+} などの陽イオンがチャネル孔内面に存在する負電荷を帯びたアミノ酸残基と静電的に結合することによってブロックされることが知られている。私たちは Kir2.1 チャネルがポリアミンや Mg^{2+} 非存在下に細胞内 pH に依存するゆっくりとした電位依存性開閉を示すことを見出した。このチャネル開閉は pH 7.2 ではほとんどみられず、細胞内液を pH 6.8 よりも酸性側に変化させると現れ、pH 依存性に外向き電流を抑制した。細胞質領域のチャネル孔内面に在る酸性残基を中性化した変異体 (E299S, E224G) や pKa が 6 の側鎖を持つヒスチジン残基を塩基性残基に変えた変異体 (H226K) においても同様の pH 依存性開閉がみられたが、膜内領域のチャネル孔内面に在る酸性残基を中性化した変異体 (D172N) では消失した。

24. ヒト心筋由来 Na^+ チャネルに対する bepridil の制御作用

○康 林, 鄭 明奇, 李 泰成, 磯本正二郎, 小野克重 (大分大学医学部 循環病態制御講座)

抗不整脈剤 bepridil の電位依存性 Na^+ チャネルに対する制御機構は明らかではない。ヒト心筋 Na^+ チャネル (hNav1.5) を encode する遺伝子 *SCN5A* を安定発現させた HEK293 細胞を用い、 Na^+ チャネル電流 (I_{Na}) に対する bepridil の短期、及び長期作用を検討した。10 μM の bepridil を投与した直後に Na^+ 電流は $21.7 \pm 1.9\%$ ($n=9$) 抑制され、その作用は濃度依存性を示した (IC_{50} : 82.0 μM)。一方、10 μM bepridil の存在下で 36 時間培養した細胞の

Na^+ 電流密度は 21% 増加しており、この増加はカルモジュリン阻害剤存在下でも影響を受けなかった。Bepridil の慢性作用 (36 時間) によって Na^+ チャネル (Nav1.5) の定常状態不活性曲線は脱分極側に偏位した ($V_{1/2} = 8.8 \pm 0.3 mV$)。Bepridil は Na^+ チャネルを急性遮断する一方、 Na^+ 電流密度を長期的に増加させることで Na^+ チャネルに対する複合薬理作用を有することが示唆された。

25. 2-Deoxy-D-ribose (D-dRib) による微小環境への影響

○中島融一, K.S. Radha, K. Harish, 大村さゆり, 丸山真杉 (宮崎大学医学部・機能制御学講座・応用生理学分野)

[目的] Thymidine phosphorylase (TP) は、腫瘍に浸潤したマクロファージで発現し、癌細胞の浸潤、転移に関与する。TP は、核酸代謝においてチミジンから分解産物である 2-Deoxy-D-ribose (D-dRib) を産生する。我々は、この D-dRib が TP 機能の downstream mediator であることを明らかにした。本研究では、腫瘍や創傷治癒部位などの微小環境を形成する血管内皮細胞や線維芽細胞の活性化に対する D-dRib の影響を検討した。[方法] D-dRib による血管内皮細胞の遊走能を Chemotaxis assay にて、管腔形成能を Tube formation assay にて検討した。また、ラット角膜被膜下に D-dRib 含有ベレットを挿入し、血管新生能を検討した。さらに、線維芽細胞に D-dRib を添加し、Wound healing assay を行った。また、D-dRib による線維芽細胞の uPA mRNA 発現量を Northern blot 法にて、uPA の活性を Fibrin 平板法にて調べた。[結果と考察] D-dRib は、血管内皮細胞を活性化して血管新生を惹起させた。また、D-dRib は線維芽細胞に対して uPA の発現を亢進させた。線維芽細胞の D-dRib による運動能は、uPA 活性を抑制することにより有意に抑制され、この細胞の機能亢進に、uPA の関与が示唆された。

26. 腸管膜細胞における局所的脱分極によって惹起される Ca^{2+} 反応の伝播機構

○井上隆司, L.J. Jensen*, 内田俊毅, 安河内 緑, 上原明, 大場三榮 (福岡大学医学部生理学, *Department of Medical Physiology, The Panum Institute, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark)

(背景・目的) 微小循環系では、局所的な血管の収縮や拡張が伝播する現象 (conducted vasoconstriction or vasodilation) が生じることが知られている。しかしその機序については、膜電位の変化が重要な役割を果たしていること以外、技術的な困難もあって殆ど明らかになっていない。本研究では、この機序を探るため腸間膜細胞 (直径 50 μm 以下)

の筒状標本を用い、fura-PE3を用いたデジタルCa²⁺イメージングによるCa²⁺応答の興奮性伝播の解析を行った。

(結果)マイクロピペットからの圧駆出によって、生体接着糊で固定した筒状細動脈標本の一端に局所的に過剰カリウム溶液を投与すると、投与した領域から500μm以上離れた領域までCa²⁺濃度増加の伝播とそれに伴う血管径の減少が観察された。このCa²⁺増加の伝播はほぼ指数関数的に減衰し、その速度は250μm/s以上であることが、同時多点計測によるCa²⁺増加の時間経過の比較によって明らかになった。またこの伝播は、筒状標本の中央部の部分的切断、細胞外Ca²⁺の除去、ギャップ結合の阻害薬、各種の電位依存性Ca²⁺チャンネル阻害薬の前処置によって完全に抑制された。

(結論)末梢動脈部では、局所の脱分極が血管のギャップ結合を介して速やかに電気緊張的に伝播し、一定の範囲の血管にほぼ同期した収縮を引き起こしていることが示唆された。

27. Calpastatin domain L interacts with a C-terminal region of the CaV1.2 channel

ZA. Saud¹, E. Minobe¹, W. Wang¹, D. Han^{1,2}, A. Kameyama¹, LY. Hao^{1,3}, M. Kameyama¹ (¹Dept Physiol, Grad Sch Med & Dentl Sci, Kagoshima Univ, ²Dept Pharmacol, ³Dept Pharmac Toxicol, Sch Pharmac Sci, China Med Univ, China)

Calpastatin, an endogenous inhibitor of the calcium-activated protease calpain, is composed of N-terminal domain L (CS_L) and four repetitive calpain inhibitory domains I-4, and expressed in virtually all cell types. Our previous electrophysiological experiments have shown that CS_L modulates the activity of CaV1.2 channels in inside-out patch mode in guinea-pig cardiomyocytes. In this study, we have explored the CS_L interaction site in the channel by the pull-down method using GST-fused fragment peptides of the α1 subunit. CS_L interacted directly with the proximal C-terminal region of α1 subunit in which also calmodulin (CaM) binding site was also present. CS_L bound to IQ domain in the C-terminal tail in a Ca²⁺-independent manner and competitive manner with CaM. These results suggest that CS_L directly interacts with IQ domain of the C-terminal region of the channel, inhibits the CaM binding to this domain, and thereby regulates the activity of CaV1.2 Ca²⁺ channel.

28. T1R3-KO, TRPM5-KO マウス単一鼓索神経記録によるうま味受容・伝達経路の解析

安松啓子¹, 吉田竜介¹, 重村憲徳¹, S. Damak², R.F. Margolske³, ニノ宮裕三¹ (¹九大 院・歯・口腔機能解析学, ²Nestlé Research Center, ³Dept. of Physiol. & Biophys., Mount Sinai Sch. Med)

うま味は、その受容体候補として taste mGluR4, taste mGluR1, T1R1/T1R3 が提唱されているが、T1R3-KO マウスの結果が研究者により異なるなど、不明な点が多い。さらに受容体以降の細胞内情報伝達と神経情報伝達についてもまだ多くが不明である。そこで本研究では、T1R3、TRPM5-KO 及び野生型マウスの鼓索神経単一神経線維のうま味応答を解析し、その特性について比較検討した。その結果、野生型マウスでは、うま味物質 MPG に応答する神経線維に Sucrose-best (S 型) と MPG-best (M 型) 線維群があり、それらは、さらに MPG の IMP による強い相乗効果が見られる群 (S1, M1) および見られない群 (S2, M2) に分かれることが明らかになった。T1R3 及び TRPM5-KO マウスではそれらの群のうち、S1 線維群のみが消失し、他の群は残存していた。これらの結果は、うま味受容体候補 T1R1/T1R3 からの情報は TRPM5 を含む細胞内情報伝達経路を介して伝えられ、それら分子群を発現する味細胞からの情報は甘味感受性神経経路を通る可能性が高いことを示す。したがって、うま味に特異性の高い神経経路に伝えられる情報は異なる受容体と細胞内伝達経路を経たものであることが示唆された。

29. マウス塩味感受性味細胞の応答特性とその発現遺伝子の解析

吉田竜介, 大栗弾宏, 安松啓子, 重村憲徳, ニノ宮裕三 (九州大学大学院歯学研究院口腔機能解析学)

マウスの NaCl 感受性鼓索神経線維は、アミロライド感受性線維と非感受性線維に大別でき、その応答特性も詳細に調べられている。これに対し、味細胞の NaCl に対する応答性やアミロライド感受性、その他の刺激に対する応答性については不明な点が多い。そこで本研究では、味細胞の受容膜側のみを刺激し、基底外側膜側より活動電位を記録する味細胞応答記録システムを用い、マウス茸状乳頭味細胞の NaCl に対する応答性とアミロライド感受性、その他の刺激に対する応答性を調べた。鼓索神経線維と同様に、NaCl 応答味細胞の約半数はアミロライド感受性 (AS 細胞) で、残り半数は非感受性細胞 (AI 細胞) であった。NaCl に対する応答はいずれも濃度依存的であった。AI 細胞は KCl や HCl にも応答したが、AS 細胞は応答しなかった。応答記録後、細胞を回収し、シングルセル RT-PCR により

ENaCの発現を調べた結果、AS細胞ではENaCの発現が見られたが、AI細胞には見られなかった。以上の結果は、マウス茸状乳頭には少なくとも2種類のNaCl応答味細胞(AS細胞とAI細胞)が存在し、AS細胞の応答にはENaCが関与する可能性を示唆する。

30. 大腸由来筋線維芽細胞 CCD-18Co における TRP 蛋白質発現パターンと機能解析

○海 琳, 本田 啓, 波多江純真, 井上隆司 (福岡大学医学部生理学)

消化管の炎症・増殖異常には筋線維芽細胞から放出される活性物質が重要な役割を果たしており、そこでは何らかのCa²⁺動態の変化が生じていると推測されている。本研究ではこの可能性を探るため、腸管由来筋線維芽細胞株 CCD-18Co を用い、種々の物理化学刺激で活性化される新しいCa²⁺チャンネル群 TRP 蛋白質に焦点を絞り、その発現パターン・機能解析を行った。

RT-PCR 法によって TRPC1, TRPC5, TRPC6, TRPV2, TRPV4, TRPM3, TRPM7 の転写産物が検出された。更にこれらの TRP isoform の活性化物質 (OAG, 低浸透圧, 2-APB, sphinganine 等) の投与によって細胞外Ca²⁺濃度に依存した細胞内Ca²⁺濃度上昇が観察され、パッチクランプ法を用いた膜電流測定によってこれらの活性化物質による非特異的陽イオン電流の活性化が認められた。記録された電流の電流電圧関係や使用した薬物による活性化のプロフィール・阻害作用の有効濃度から、少なくとも5つの TRP isoform, すなわち TRPC6, TRPV2, TRPV4, TRPM3, TRPM7 が機能していることが示唆された。また、CCD-18 Co に作用する炎症性サイトカイン TNF α の投与によって、TRPC あるいは TRPV サブファミリーの特徴を示す電流が記録された。

31. コイの心拍動調節に関与する自律神経系の tone について

○一瀬千重¹, 土屋勝彦², 上山綾子², 田井村明博² (¹長崎大学大学院・生産科学研究科, ²長崎大学・環境科学部・自然環境保全講座)

コイの心拍動に対する両自律神経系の tone を評価する目的で、腹腔にテレメーターの送信器を挿入し、心電図等を連続記録した。安静状態での心拍数は40から90 beats/min の範囲にあった。胸腔へのアトロピン1mg/kg投与で心拍数は著しく増加し、平均心拍数増加(副交感神経効果)は67.2 beats/min と算出された。心拍数増加は投与前の心拍数が小さいほど大きい傾向が見られた。他方、プロプラノロール投与2mg/kgでは、心拍数が減少する例と、一過

性に増加してから減少する例が認められた。投与前の心拍数が大きい場合には直に心拍数は減少し、逆に投与前の心拍数が小さい場合、心拍数は一過性に増加し、その後次第に減少する傾向を示した。プロプラノロール投与による心拍数が直に減少した例について計算すると、平均心拍数減少(交感神経効果)は21.8 beats/min と算出された。両自律神経系の tone は算出された intrinsic HR に対する百分率で評価された。心拍動に関する副交感神経系及び交感神経系の Tone は各々58.5%, 19.0% と算出された。安静時、コイの迷走神経の心拍動抑制作用は、交感神経系の促進作用に勝っていることが示された。

32. 家兔洗浄血小板 FAK の Tyr³⁹⁷ リン酸化をハプトビンは抑制する

○吉岡美和, 中村真理子, 小杉忠誠 (琉球大学医学部形態機能医科学講座生理学第一分野)

【目的】これまでに、ハプトビンが家兔洗浄血小板コラーゲン凝集初期に、FAK のチロシンリン酸化を抑制し、コラーゲン凝集抑制を生じるのを報告した。しかしながら、ハプトビンが FAK のどのチロシン残基のリン酸化に影響を与えているかについては、検討されていなかった。ハプトビンが抑制する FAK のチロシンリン酸化サイトを確定するために、FAK の pTyr³⁹⁷ 抗体, pTyr⁸⁶¹ 抗体を用いて実験を行った。【方法】家兔洗浄血小板を作製し、コラーゲン添加3分後を凝集初期、添加8分後を凝集後期とし、各種濃度ハプトビンのコラーゲン凝集に与える影響を、凝集能を測定し検討した。ウェスタンブロット法は Laemmli 液で血小板を溶解後電気泳動を行い、血小板内蛋白のチロシンリン酸化認識抗体(clone4G10)および FAK の pTyr³⁹⁷ 抗体と pTyr⁸⁶¹ 抗体を用いて行った。【結果】ハプトビンは濃度依存性にコラーゲン凝集を抑制し、コラーゲン凝集初期にはハプトビンの濃度依存性に FAK の Tyr³⁹⁷ のリン酸化を抑制した。一方、ハプトビンによる FAK の Tyr⁸⁶¹ のリン酸化の抑制はみられなかった。【考察】ハプトビンのインテグリン β_3 への結合により、FAK の N 末端の構造が変化し、FAK が細胞骨格へと移行する。その結果、FAK の N 末端の Tyr³⁹⁷ を介するシグナル伝達の遅延によりコラーゲン凝集の抑制が生じたと推察される。

33. ラット脊髄後角深層に発現する P2X 受容体を介した痛覚情報伝達修飾機序の解析

塩川浩輝¹, 中塚映政², 古江秀昌¹, 吉村 恵¹ (¹九州大学大学院 医学研究院 統合生理学, ²佐賀大学 医学部医学科 生体構造機能学講座)

行動薬理学実験から、ATP は脊髄後角において P2X 受

容体を介して侵害性感覚情報を修飾することが知られている。今回、我々はラット脊髄スライス標本を用いて脊髄後角深層細胞からパッチクランプ記録を行い、P2X 受容体を介するシナプス前性および後性作用を薬理的に検討した。約 60% の脊髄後角深層細胞において、代謝安定型の ATP 受容体広作動域作動薬である ATP- γ S を灌流投与すると内向き電流が観察された。しかし、同一細胞に α , β -methylene ATP を投与しても内向き電流は再現されなかった。一方、ATP- γ S あるいは α , β -methylene ATP の投与によって、大半の深層細胞において EPSC の発生頻度が著明に増大した。ATP- γ S 投与によって生じた内向き電流と EPSC 発生頻度の増強効果は、いずれも P2X 受容体拮抗薬である PPADS によって阻害され、TNP-ATP では阻害されなかった。以上の結果から、脊髄後角深層細胞のシナプス前と後細胞にはそれぞれ異なるサブタイプの P2X 受容体が発現しており、痛覚情報の伝達が増強されることが示唆された。

34. 副腎髄質細胞における GABA のパラクリンとしての役割

○井上真澄, 原田景太, 松岡秀忠, 藁科 彬(産業医大・医・第2生理)

副腎髄質細胞が GABA により脱分極することは知られているが、その生理学的役割は不明である。そこでこの問題を細胞・組織レベルで検討した。GABA の合成酵素である GAD は mRNA と蛋白レベルでラット副腎髄質に存在した。GABA_A 受容体は副腎皮質には存在せず副腎髄質にだけ存在し、そのサブユニット構成は $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\beta 3$ と $\gamma 2$ または δ であった。一方、中枢神経系で GABA の抑制性シナプス伝達の終了に関わる GABA 輸送体 (GAT) の発現は、脳に比べて副腎髄質は著明に少なかった。副腎髄質の灌流標本において、GABA は静止時の分泌の 4 倍のカテコールアミン分泌を誘発した。分泌されるカテコールアミン中のアドレナリンの割合は、静止時と GABA 刺激時では

変わらず、約 80% であった。Ca 指示薬の fluo3 を取り込ませた灌流副腎髄質標本において、神経線維を電気刺激すると、副腎髄質細胞において蛍光の増加が起こった。GABA の投与でも副腎髄質細胞において蛍光の増加が観察され、この GABA による蛍光の増加の期間中は、神経刺激によるさらなる蛍光の増加が減弱した。これらの結果は、GABA が副腎髄質細胞においてパラクリンとして、カテコールアミン分泌の誘発またはその調節を行っていることを示唆する。

35. *In vivo* パッチクランプ法を用いた GABA_B 受容体を介した脊髄痛覚抑制機序の解析

竹島 香, 古江秀昌, 吉村 恵(九州大学大学院 医学研究院 統合生理学)

ラット脊髄後角表層の膠様質細胞から *in vivo* パッチクランプ記録を行い、機械的痛み伝達に対する GABA_B 受容体を介したシナプス前性および後性の抑制作用機序を解析した。後肢皮膚に pinch および touch 刺激を加えると、膠様質細胞は EPSP を誘起し活動電位を発生した。脊髄表面から投与したバクロフェンは膠様質細胞を過分極し、これらの活動電位の発生を完全に抑制した。GDP- β -S を細胞内に添加してシナプス後性の過分極を抑制した条件下においても、バクロフェンはシナプス前性に作用して pinch および touch 刺激誘起 EPSC の振幅を濃度依存性に減少した。選択的アンタゴニストである CGP55845 存在下では、これらバクロフェンの抑制作用は消失した。次に、CGP55845 のみを、あるいは GABA 取り込み阻害薬を投与すると、微小 EPSC の発生頻度が増大あるいは減少し、持続的な GABA 放出によるシナプス前性の抑制が見られた。一方、持続的な GABA によるシナプス後性への作用は観察されなかった。以上より、生理的条件下ではシナプス前性の GABA_B 受容体を介して機械的痛みの伝達を抑制する事が示唆された。