

第 63 回日本生理学会中国四国地方会

日 時：平成 23 年 10 月 22 日（土），23 日（日）

場 所：広島大学 広仁会館

当番幹事：広島大学医歯薬学総合研究科神経生理学 橋本浩一

第 63 回日本生理学会中国四国地方会は、広島大学 霞キャンパス内 広仁会館において、10 月 22 日、23 日の 2 日間にわたり開催された。当日参加を含めて 69 人の先生方にご参加いただき、30 題の講演内容に対する活発な討論が行われた。また、地方会の活性化と参加者の交流促進や情報交換のため、22 日の夕刻から懇親会を行った。若手研究者を対象にした「日本生理学会中国四国地方会奨励賞」には、学生部門・一般部門を合わせて 8 題の応募があった。5 名の審査員により厳正な審査が行われた結果、岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 細胞生理学 鈴木 孝一朗氏「神経伝達物質放出を司る SNARE 複合体からの Ca^{2+} センサーシナプトタグミンの解離」と、山口大学 大学院医学系研究科 生体機能分子制御学 張 影氏「血管平滑筋アクチン・ストレスファイバーの形成におけるパキシリンの重要性」の 2 題が受賞した。

一般演題

1. S100 蛋白質による Protein phosphatase 5 の活性化： Ca^{2+} と蛋白質脱リン酸化シグナルのクロストーク

山口文徳¹、梅田嘉徳²、嶋本聖子²、土屋光正²、徳光浩²、小林良二²、徳田雅明¹（¹ 香川大学医学部細胞情報生理学講座、² 生体情報分子学講座）

Protein phosphatase 5 (PP5) は蛋白質-蛋白質間相互作用部位である Tetratricopeptide Repeat (TPR) ドメインを持つ、セリン/スレオニン脱リン酸化酵素であり、通常の状態では低い脱リン酸化活性を保っている。我々は GST-Pull down と surface plasmon resonance の結果から、S100A1, A2, A6, および S100B が PP5 の TPR ドメインと Ca^{2+} 依存性に結合することを見いだした。S100 蛋白質の PP5 への結合は PP5 と HSP90 の結合を阻害するが、両者の結合部位にあたる PP5 上の carboxylate clamp の mutants と S100 蛋白質の結合阻害は認められなかった。また、リン酸化された合成ペプチドを基質とした脱リン酸化実験では S100 蛋白質によって PP5 の脱リン酸化活性が数十倍に活性化されることがわかった。現在、S100 蛋白質による PP5 活性化の生理的意義についてさらなる検討をおこなっている。

2. 尿排泄機能に及ぼす加齢の影響：高齢女性と若年女性の比較

留加寿美江^{1,2}、松川寛二³（¹ 広島大学大学院保健学研究科博士課程、² 山口大学大学院医学系研究科、³ 広島大学大

学院保健学研究科）

【目的】本研究は、最大膀胱容量、排尿量、平均尿流率ならびに残尿量を用いて女性の加齢による尿排泄機能を比較した。

【対象】排尿機能障害のない高齢女性 11 名（平均年齢 65 歳）及び若年女性 12 名（平均年齢 23 歳）を対象とした。

【方法】飲水（500—700ml）後にみられる尿意出現時の膀胱容量、排尿量、尿排出時間、平均尿流率および残尿量を測定した。各項目について、初発尿意時と最大尿意時に分けて実験を 2 回実施した。膀胱容量を非侵襲的である超音波測定機器を用いて測定した。平均尿流率は排尿量/尿排出時間の式から求めた。残尿量は膀胱容量から排尿量を引いた値を用いた。

【結果】若年女性の最大尿意時の膀胱容量は 576ml、高齢女性の膀胱容量は 480ml であり両群間で有意な差はなかった。若年女性の最大尿意時の排尿量 556ml は高齢女性の 366ml に対し有意に多く、逆に高齢女性の最大尿意時の残尿量 98ml は若年女性 34ml よりも有意に多かった。最大尿意時において、若年女性と高齢女性は同等の平均尿流率（16ml/sec）を示したにも関わらず、高齢女性において排尿量は少なく残尿量が多かった。若年女性では膀胱尿量に比例して尿排出時間は延長したが、高齢女性では膀胱尿量に関わらず尿排出時間が固定されていた。高齢女性の尿排出時間は延長されないため、膀胱に貯留した尿を排出しきれなかった。

【結論】高齢女性においても、若年女性と同様に、蓄尿機能ならびに尿排出速度は維持されているが、膀胱収縮は膀

膀胱容量に比例して持続せず残尿量が多いと考えられる。

3. レンチウイルスベクターを用いた遺伝子改変動物作製の試み

ホームズ彩乃¹、高橋寿明^{1,2}、杉本香奈^{1,2}、矢野元^{1,2}、田中潤也^{1,2} (愛媛大学大学院医学系研究科分子細胞生理学,²愛媛大学プロテオ医学研究センター神経部門)

マイクログリアは中枢神経系を構成するグリア細胞の一つである。私達は中胚葉由来とされるマイクログリアを特殊な培養条件下で培養することで、外胚葉系の神経細胞などに分化しうることを報告している。このことはマイクログリアが貪食をはじめとする病変修飾作用に加え、「幹細胞」として神経外胚葉系細胞の補充を行い、脳傷害部位の速やかな修復に寄与している可能性を示唆している。この仮説を明らかにするには個体レベルでの解析が必要不可欠である。そこで、マイクログリアおよびマクロファージ系細胞で蛍光蛋白質を発現する遺伝子改変(トランスジェニック(Tg))動物を用いて、マイクログリアマクロファージ系細胞の細胞系譜解析を試みようと考えた。

Tg動物の作成方法として、外来遺伝子を受精卵の核内に直接注入するマイクロインジェクション(顕微注入)法が主流であるが、近年、レンチウイルスベクターを受精卵に感染させることでTg動物を作成する方法が注目されつつある。この方法はウイルスを扱うために安全面での配慮は必要であるが、マイクロインジェクション法に必要な高倍顕微鏡システムおよび熟練した技術が必要としない。また数多くの外来遺伝子の検討も可能である。現在、上述した研究目的のためにレンチウイルスベクターを用いてマイクログリアおよびマクロファージ系細胞で蛍光蛋白質を発現することが可能なTgマウスの作製を進めており、その経過を報告する。

4. ラットの長期暑熱馴化形成に視床下部神経新生が関与する可能性

松崎健太郎、片倉賢紀、原 俊子、橋本道男、紫藤 治(島根大学医学部環境生理学)

ヒトやラットでは、持続的な暑熱環境への暴露により自律的な熱放散機能の亢進を特徴とする暑熱馴化が形成されるが、中枢における制御機構は明らかになっていない。これまでに我々は長期暑熱馴化が形成されたラットの視床下部で神経前駆細胞の分裂と分化が促進されていることを見出した。本研究では、長期暑熱馴化したラット視床下部で新生した神経前駆細胞の局在や熱刺激への応答性を解析した。さらに、暑熱暴露による神経新生を阻害した場合に暑熱馴化が形成されるか否か解析し、新生した神経細胞の暑

熱馴化形成への関与について検討した。Wistar系雄性ラット(5週齢)を明暗周期12:12時間、自由摂食・摂水下、環境温24℃で2週間飼育した後、32℃の暑熱環境に暴露した。暴露開始直後からBromodeoxyuridine(BrdU;50mg/kg/day)を腹腔内へ5日間連続投与した。また、ラット脳室内には細胞の分裂阻害薬であるCytosine-β-arabinoside(Ara-C)を持続的に投与した。なお、Vehicleには生理食塩水を用いた。40日間の暑熱暴露による長期暑熱馴化形成後に耐暑熱性の確認を行った。暑熱暴露により新生した神経細胞は前視床下部/視索前野や視床下部背内側核、視床下部腹内側核に多く発現していた。また、暑熱馴化形成後に再度温熱刺激を加えたところ、新生した細胞の一部にc-Fos二重陽性像を認めた。さらに、Ara-Cを脳室に持続投与したラットでは、Vehicle群に比較して耐暑熱性が有意に減弱した。暑熱暴露により新生した神経細胞が長期暑熱馴化形成時の体温調節機能の向上に関与する可能性が示唆された。

5. マイクログリアの神経細胞保護的フェノタイプを誘導する薬物の探索

檜垣ひろみ、和田愛子、山泉文香、杉本香奈、高橋寿明、矢野 元、田中潤也(愛媛大学医学系研究科分子細胞生理学分野)

脳常在性マクロファージであるマイクログリアは、神経細胞や神経組織に対して脳保護的であるのか傷害的であるのかという議論が長らく行われてきた。マイクログリアは、脳病態に反応して急速に活性化し様々な生理活性物質を放出することが知られているが、起炎症性サイトカインや興奮性アミノ酸、一酸化窒素や活性酸素の放出が過剰な場合は脳傷害的となると考えられる。一方、マイクログリアは神経細胞保護的な成長因子、サイトカインの分泌も行い、この面では好ましい性質も有している。従って、マイクログリアによる傷害的因子の発現を抑え、脳保護的因子の発現を上昇させることが出来れば、新たな脳保護療法になる可能性がある。今回我々は、マイクログリアの機能を抑制することが報告されているアドレナリンβアゴニスト、抗うつ薬、NSAIDs、ステロイド、PPARγアゴニスト、テトラサイクリン等10種の薬物を、ラット一次培養マイクログリア培養液に添加し、定量的リアルタイムRT-PCRにより、起炎症性因子としてIL-1β、TNFα、神経保護因子としてIGF-1、HGFをそれぞれコードするmRNAの発現変動を調べた。また、NO産生をGriess法により定量した。その結果、グルココルチコイドであるデキサメサゾン、IL-1β、TNFαの発現、LPSが誘発するNO産生を濃度依存的に抑制する一方、IGF-1とHGFの発現を上昇させた。これ

らの結果は、マイクログリアの神経細胞保護的フェノタイプを誘導することによる新たな脳保護療法の可能性を示唆している。

6. 心筋細胞内アセチルコリン産生系の生物学的意義

柿沼由彦¹, 秋山 剛², 有川幹彦¹, 岡崎佳代¹, 佐藤隆幸¹ (¹高知大学医学部循環制御学, ²国立循環器病センター研究所心臓生理部)

循環器疾患に対する副交感神経系への介入研究は、Peter J. Schwartz らによる迷走神経刺激による抗不整脈効果の報告から始まったが、そのメカニズムは不明であったため、我々は「AChの心筋細胞における多様な直接効果」について検討し報告してきた。しかし、自律神経系終末の心臓への分布様式は特異的であり、交感神経系が左心室全体に均一に分布するのに対し、迷走神経の左心室への分布は非常に疎であることが明らかとなっている。AChEによるAChの速やかな分解系を考慮すると、AChの多種多様な効果が迷走神経終末のみから由来すると考えることは困難である。そこで、我々は心筋細胞自体にACh産生能があるのではという仮説をたて検討した。

【方法・結果】ラット心筋細胞(成獣・新生仔ともに)はACh合成酵素ChAT・細胞内ACh輸送体VACHTを発現しており、免疫電顕でも小胞構造をもつVACHTが観察された。HPLCにより培養ラット心筋細胞内AChはAChE抑制剤(0.1mMフィゾスチグミン)存在下でのみ測定可能であった。ラット心筋細胞以外にHEK293細胞・H9c2細胞などでもAChは確認できた。ラットChATプロモーター領域を用いたレポーターアッセイにより、ChAT転写活性はムスカリン受容体を介しACh・ピロカルピンにより上昇し、アトロピンにより抑制された。以上よりACh産生系はムスカリン受容体を介しpositive feedback調節を受けることが示唆された。細胞内ACh産生系の生物学的意義を調べるため、HEK293細胞を用いてChAT siRNAにより一過性に、ChAT miRNAベクターを用いて恒常的にChATをノックダウン(ChATKO)させた細胞を得た。コントロールHEK293細胞はAChによりMTT活性は低下し、一方一過性ChATKOでは活性は上昇した。コントロール細胞に比べ恒常的ChATKOでは細胞酸素消費量はより増加した。このことから、ChATは細胞酸素消費を本来負に調節し、エネルギー代謝系においてAChは分子ブレーキとしてはたらくことが示唆されたAChE抑制剤であるドネベジルを、十分なAChE抑制効果を持つフィゾスチグミンにさらに加えたところ、ChAT転写活性はさらに増加し、ChAT蛋白量・細胞ACh含量も同様に増加した。一方フィゾスチグミンのみでは転写活性化能は増

加しなかった。ドネベジル経口投与したマウスではその心臓ChAT発現量は増加し、また下肢骨格筋でのChAT転写活性化能は増加した。このことから、ドネベジルが非中枢性非神経性末梢組織ChATを特異的に修飾しうる特殊なAChE抑制剤であることが示唆された。

【結論】これまで報告されてきた細胞種に加えて、心筋細胞においても非神経性コリン作動系(細胞内ACh産生系)の存在が確認された。このシステムは、心筋細胞においてそのエネルギー代謝を抑制的に調節する分子ブレーキとしてはたらくことが示唆された。

奨励賞対象演題

7. 神経伝達物質放出を司るSNARE複合体からのCa²⁺センサーシナプトタグミンの解離

鈴木孝一郎, 増本年男, 大守伊織, 道上宏之, 西木慎一, 松井秀樹(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科細胞生理学講座)

神経伝達物質放出機構を解明するため、Ca²⁺センサーシナプトタグミンと小胞膜融合タンパク質SNARE複合体の結合に及ぼすCa²⁺の影響を調べた。ラット脳可溶性画分にCa²⁺を添加後、抗シナプトタグミン抗体により免疫沈降した。沈降物をイムノプロットング法により解析したところ、シナプトタグミンはSNARE複合体からCa²⁺濃度依存性に解離した(EC₅₀ ≈ 1mM)。両者のCa²⁺依存性解離は4℃では生じず、10℃で観察され始め、37℃まで温度上昇に伴い増加した。Ca²⁺以外にもBa²⁺で同程度の解離が見られた一方Sr²⁺及びMg²⁺では生じず、二価陽イオンに特異性があることが分かった。SNAREからの解離におけるシナプトタグミンの2つのCa²⁺結合ドメイン(C₂A, C₂B)の役割を、組換えタンパク質を用いて解析した。野生型シナプトタグミンは、脳から精製したSNAREと反応させると、天然のものと同様Ca²⁺依存性に解離した。C₂ドメインのCa²⁺結合部位を形成する5つのアスパラギン酸(Asp, D)残基のうち、二番目のAsp(D2)をアスパラギン(N)に置換したところ、C₂A D2N変異が野生型と同様に解離したのに対し、C₂B D2N変異ではCa²⁺依存性解離がほぼ完全に阻害された。この結果は、神経細胞からの伝達物質放出にはC₂AへよりもC₂BへのCa²⁺結合が重要であることとよく一致する。以上の結果から、神経伝達物質の放出には、細胞の興奮に伴い流入してきたCa²⁺と結合したシナプトタグミンがSNARE複合体から解離することが必須であると考えられる。

8. ラットにおける刺激弁別課題と海馬θ波の関係

崎本裕也¹, 武田 梢¹, 服部 稔², 坂田省吾¹ (広島大学大学院総合科学研究科,² 広島大学大学院医歯薬学総合研究科)

海馬から発生する EEG として海馬 θ 波がある。ラットでは 6-12Hz の周波数帯域の律動的で高振幅な脳の電気活動と定義されており, その機能として空間学習などの学習との関係が示されている。しかし, 刺激弁別課題など一部の学習との関係性については未だに明らかにされていない。そこで, 本研究では負パターン課題, 同時特徴負弁別課題, 単純弁別課題の3つの課題を用いて海馬 θ 波と刺激弁別課題の関係を明らかにした。本研究では負パターン課題と同時特徴負弁別課題で海馬 θ パワが増加したが単純弁別課題では海馬 θ パワの増加が見られなかった。また, 負パターン課題, 同時特徴負弁別課題, 単純弁別課題中の海馬 θ パワを比較したところ, 負パターン課題中で海馬 θ パワが最も増加し, 同時特徴負弁別課題, 単純弁別課題の順で海馬 θ パワは減少していた。学習に要したセッション数は負パターン課題で最も多く, 次に同時特徴負弁別課題, 単純弁別課題の順であった。これらのことから, 海馬 θ パワは刺激弁別課題において学習の難易度と関係していることが考えられる。

9. ドネベジルは, マウス心筋梗塞モデルにおいて, マクロファージ MMP-9 産生を抑制し急性心臓破裂の危険率を低減する

有川幹彦, 柿沼由彦, 野口達哉, 佐藤隆幸 (高知大学医学部循環制御学教室)

【目的】 コリンエステラーゼ阻害剤であるドネベジルは生体内アセチルコリン濃度を増加させ, 副交感神経刺激と同様に, 慢性心不全モデル動物の心機能低下を抑制し, 長期生存率を改善させる。しかし, その急性効果は未だ不明である。近年, 炎症性細胞からのサイトカイン産生の制御機構として, アセチルコリンを介した副交感神経活動の炎症反応経路の存在が提唱された。そこで本研究では, 心筋梗塞急性期における炎症性組織傷害に対するドネベジルの効果を検討した。

【方法】 マウス腹腔内よりマクロファージを単離・培養し, lipopolysaccharide (LPS) 刺激による細胞外基質分解酵素 (MMP-9) の産生・放出に対するドネベジルの影響を検討した。また, マウス心筋梗塞モデルを作成し, ドネベジル投与群 (DPZ) と非投与群 (untreated) とに分け, 急性期の心拍数 (HR), 血圧 (BP), および心臓破裂による死亡率を比較した。また, RT-PCR 法, Western blot 法, および酵素電気泳動法を用いて, 術後3日目における心筋組織内の MMP-9 発現量および酵素活性を比較した。

【結果】 単離マクロファージにおいて, LPS 刺激により培地中の MMP-9 量は有意に増加した ($116.16 \pm 5.37\%$ versus control, $P < 0.01$)。一方, ドネベジルは, 細胞内の MMP-9 合成を抑制し, 結果として培地中の MMP-9 量を減少させた ($76.90 \pm 10.92\%$ versus control, $P < 0.01$)。マウス心筋梗塞モデルにおいて, 心拍数および血圧に有意な差は認められなかった (HR: untreated, 548 ± 53 bpm and DPZ, 528 ± 43 bpm, N.S., BP: untreated, 81.6 ± 7.4 mmHg and DPZ, 78.3 ± 7.9 mmHg, N.S.) にも関わらず, ドネベジル投与群における急性心臓破裂による死亡率は非投与群に比べて有意に低かった (untreated, 30.6% and DPZ, 8.7%, $P < 0.01$)。組織形態学的解析により, ドネベジル投与群では左室壁の菲薄化と右室壁の肥大化が抑制され (left ventricle/septum wall thickness ratio: untreated, 0.51 ± 0.07 and DPZ, 0.69 ± 0.20 , $P < 0.05$, right ventricular wall thickness: untreated, $56.1 \pm 8.91 \mu\text{m}$ and DPZ, $43.9 \pm 7.31 \mu\text{m}$, $P < 0.05$)。軽度の抗リモデリング効果が認められた。さらに梗塞巣に浸潤してきた炎症性細胞数も減少していた (untreated, $4.42 \pm 0.36 \times 10^3/\text{mm}^2$ and DPZ, $3.50 \pm 0.29 \times 10^3/\text{mm}^2$, $P < 0.01$)。また, 非投与群に比べて, ドネベジル投与群では, 梗塞巣内の MMP-9 発現量および酵素活性が有意に減少していた。

【結論】 ドネベジルは MMP-9 によって引き起こされる炎症性組織傷害を抑制することにより, 心筋梗塞急性期における心臓破裂による死亡リスクを低減する。

10. 血中アンギオテンシン II の上昇は成熟海馬神経新生を促進する

椋田崇生, 小山友香, 濱崎佐和子, 古川康雄 (広島大学大学院総合科学研究科神経生物学研究室)

海馬は, 成熟個体であっても新たに神経細胞が生み出される脳部位のひとつであり, 海馬神経新生は運動によって促進される。我々は, その促進効果がアンギオテンシン II (Ang-II) I 型受容体 (AT1R) の阻害によって抑制されることを報告しているが, これらの因子がその促進機序にどのように関わっているか明らかではない。そこで本研究では, まず, 心房にカテーテルを留置した7週齢のオスラットにトレッドミルで走行運動をさせ, 運動直後の Ang-II 濃度を ELISA で測定した。運動直後の血中 Ang-II 濃度は, 安静時に比べて2.3倍程度上昇した。同様にカテーテルを装着したラットの静脈に Ang-II (10^{-5} M, 200 μL) を1日1回7日間連続して投与し, プロモデオキシウリジン (BrdU) で新生細胞を標識した。すると, 溶媒を投与した対照群にくらべて, Ang-II 投与群では海馬歯状回の BrdU 免疫陽性細胞の数はおよそ1.5倍に増加した。また, あらかじめ AT1R

の選択的阻害剤であるロサルタンを経口的に摂取させた実験群では、Ang-IIを投与してもBrdU免疫陽性細胞の数は対照群と同程度であった。これらのことから、運動による神経新生の促進には、その初期段階に血中Ang-II濃度の上昇とAT1Rの活性化が必須であると考えられる。

11. 蛋白合成阻害が副嗅球シナプスの長期増強に及ぼす影響

村田芳博, 梶 秀人 (高知大学医学部生理学講座(統合生理))

雌マウスが獲得する交配雄フェロモンの記憶は、妊娠の成立に不可欠である。この記憶の座は鋤鼻系の最初の中継核である副嗅球にあり、副嗅球へ蛋白合成阻害薬を *in vivo* 投与するとフェロモン記憶の形成は阻害されることが報告されている。また、副嗅球の僧帽細胞から顆粒細胞への興奮性シナプス伝達では、記憶の基礎過程とされる長期増強(LTP)が入力特異的に誘導されると報告されている。しかし、副嗅球のLTPに蛋白合成が必要かどうかはまだ分かっていない。そこで本研究では、蛋白合成を阻害することで副嗅球のLTPにどのような変化が生じるかを検討した。そのために、副嗅球の急性スライス標本を作製し、顆粒細胞由来の集合電位 (fEPSP) を記録した。外側嗅索にテタヌス刺激を与えると、fEPSPのスロープ値は増大し、180 min に渡って維持された。すなわち、LTPが誘導されたと考えられる。一方、蛋白合成阻害薬であるアニソマイシン存在下で外側嗅索にテタヌス刺激を与えると、その直後にfEPSPのスロープ値は増大したが、テタヌス刺激後180 min ではその増大が見られなくなった。以上の結果から、副嗅球におけるLTPの発現には新規の蛋白合成が関与していることが示唆された。

12. 起立に先行する頸動脈血流の変化と血圧との関連

北岡和義¹, 青井 瞬¹, 北村光夫¹, 芥川正武², 木内陽介², 吉崎和男¹ (¹徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部生理機能学分野, ²徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部ライフシステム部門)

我々は先行研究において総頸動脈の最大血流速度は起立に先行して有意に減少すること、そしてその減少はセントラルコマンドによるフィードフォワード制御に関連する可能性があることを既に報告した (Kitaoka et al., *Neurosci. Lett.*, 2011)。しかし、血流動態の把握には血流速度のみならず、血圧の変化を検討することが不可欠であると考えられる。そこで本研究では、健康成人男性を対象として起立時の頸動脈血流速度の記録と同時に、脈波波形の解析により連続血圧を測定する連続血圧測定装置を用いて連続血圧を

記録し、起立以前に認められる最大血流速度減少のメカニズムの検討と起立後の血圧変動との関連について検討を行った。

結果として、起立以前の最大血流速度の低下が認められた反応起立条件において起立に先行した脈圧の有意な上昇が認められた。このことから、起立以前に認められる最大血流速度の減少は血管コンプライアンスの低下との関連が示唆された。また、起立後の収縮期血圧は反応起立条件および最大血流速度の低下が有意でない任意起立条件の両条件において有意な上昇を示したが、その持続時間は反応起立条件で有意に延長した。この結果から、起立以前の血流動態変化の有無が起立後の血圧維持に関連する可能性が示唆された。

13. 血管平滑筋アクチン・ストレスファイバーの形成におけるパキシリンの重要性

張 影, 岸 博子, 加治屋勝子, 高田雄一, 小林 誠 (山口大学大学院医学系研究科器官制御医科学講座生体機能分子制御学)

Rhoキナーゼ (ROK) はストレスファイバー (SF) 形成において重要な役割を果たしている。我々は、その上流の新規シグナル分子としてFynチロシンキナーゼを同定した。さらに、SF形成時に活性化されたFynと接着斑キナーゼ (FAK) が、アクチンSF末端部位で共局在する事を見出した。以上の新規シグナル経路は線維芽細胞で発見されたが、血管緊張に関わる血管平滑筋のSF形成時のROKの上流経路は全く不明である。そこで、本研究では、ヒト血管平滑筋細胞のSF形成における、新規のFyn/ROK経路の重要性を検討し、さらに、SF形成を担う新規のFyn結合分子の同定を試みた。活性型・不活性型Fynは、それぞれROK依存性にSF形成を促進・抑制した。さらに、HaloTag-Fynの野生型・変異体 (活性型と不活性型) を強制発現させた後、免疫沈降法と細胞免疫蛍光染色法を用いてシグナル分子間相互作用を検討した。その結果、SF形成時には、アクチンSF末端部位において、Fyn-FAK複合体が形成され、Fynとパキシリンが直接結合する事が分かった。さらに、RNA干渉によってパキシリンをノックダウンすると、ROK活性化が抑制され、SF形成が阻止された。以上の結果から、Fyn/ROK経路によって血管平滑筋のアクチンSF形成が制御され、パキシリンは新規のFyn結合分子としてSF形成に重要な役割を果たしている事が分かった。

14. 光学的膜電位測定法を用いて解析したラット大脳皮質運動感覚野における感覚刺激応答の時空間パターンと

刺激強度の関係

濱 德行, 伊藤眞一, 廣田秋彦 (高根大学医学部神経・筋肉生理学講座)

体性感覚野における刺激応答時の活動は限局した領域にのみ生じるだけでなく, その周囲にも広がる事が知られている。我々は独自の光学的膜電位測定システムの開発・改良を行ってきており, 現在, 膜電位感受性色素で生体染色したラットの大脳皮質の膜電位を数百ヶ所から同時に記録し, 加算処理をすること無しに定量解析を行うことが出来るデータの連続記録が可能になっている。今回はこのシステムを用いて, ラットの後肢または前肢を電気刺激した時に大脳皮質運動感覚野にみられる刺激応答の時空間パターンに対する刺激強度の影響を, 時間分解能 1msec で同時記録した膜電位データから等時線図を作成し, 詳細に解析した。刺激応答の時空間パターンは刺激直前に自発活動があると大きく影響され, 応答シグナルが消失した例も見られたため, 試行毎に自発活動を確認し, 刺激に先行して 50msec 以内に自発活動が生じていなかったデータのみを解析に用いた。興奮の時空間パターンは, 前肢, 後肢のいずれを電気刺激した場合も, 最初に感覚応答が生じた部位は皮質上の体性感覚地図に対応する部位であったが, 興奮は後肢領域や前肢領域に限局せず体性感覚野全体に広がっていた。次に, 刺激強度を変化させ, 刺激応答との関係を解析したところ, 興奮した領域の大きさや広がるパターンに大きな変化はみられなかったが, 興奮が広がる速さは, 刺激強度が大きいかほど大きいことがわかった。

一般演題

15. 細胞表面抗原分子 X の腫瘍血管特異的な修飾の検討

小松加奈子¹, 高橋寿明^{1,2}, 濱田泰輔¹, 大西智也¹, 井上明宏³, 杉本香奈^{1,2}, 矢野 元^{1,2}, 大西丘倫³, 田中潤也^{1,2} (愛媛大学大学院医学系研究科分子細胞生理学,²愛媛大学プロテオ医学研究センター神経部門,³愛媛大学大学院医学系研究科脳神経病態外科学)

近年, 腫瘍の増大, 再生に腫瘍組織中にわずかに存在する腫瘍幹細胞が大きな役割を果たしていることが報告され, 責任細胞とも提唱されている。私達は脳腫瘍摘出組織において様々な幹細胞マーカーの発現を免疫染色で調べていたところ, 偶然に幹細胞マーカーの一つとして知られている細胞表面抗原分子 X (未発表のため仮名) が脳腫瘍内の血管内皮細胞 (すなわち腫瘍血管) に高発現していることを見いだした。そこで私は抗体医薬品として分子 X 抗体が応用可能かを検討すべく, 腫瘍血管に発現する細胞表面

抗原分子 X の生化学的性質について検討を行った。

まず脳腫瘍モデルラットを作製し, 分子 X 抗体を用いてラット脳の免疫染色を行ったところ, 分子 X は腫瘍内においてヒトと同様に腫瘍血管に発現していた。また作製した脳腫瘍モデルラットに対して分子 X 抗体を静脈投与すると, 補体作用による腫瘍血管内皮細胞の破壊が生じ, 腫瘍組織が壊死に陥った。しかしながら使用した市販抗体は正常な末梢組織に発現する分子 X も標的とするため, 重篤な副作用を引き起こすことが判明した。そこで分子 X について生化学的な検討を行ったところ, 脳腫瘍ラットの腫瘍組織中の分子 X の分子量が正常タイプに比べて少し大きいことを見だし, 分子 X が腫瘍血管特異的な分子修飾を受けることが考えられた。現在, ヒト脳腫瘍摘出組織を用いて解析中である。

16. PTEN regulates hair cell proliferation and differentiation in the mammalian inner ear

Y. Dong, F. Yamaguchi, K. Kamitori, Y. Hirata, A. Hossain, M. Tokuda (Department of Cell Physiology, Faculty of Medicine, Kagawa University, Kagawa, 761-0793 Japan)

PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) is a tumor suppressor gene that regulates various cell processes including proliferation, growth, and synaptogenesis. We studied the expression pattern of PTEN in the mouse inner ear during development and explored its function by analysis of PTEN heterozygous mice. Immunolabeling revealed that PTEN is expressed primarily in differentiating sensory neurons and hair cells, coinciding with the temporal and spatial gradients of hair cell differentiation. In PTEN heterozygous mice the sensory epithelial progenitors withdraw later from the cell cycle than PTEN wild-type mice and this is associated with an increase in hair cell number and disorganization and loss of hair bundles. These results show that PTEN plays an important role in regulating the proliferation and differentiation of mammalian cochlear hair cells.

17. 副交感神経作動薬で誘導されるラット顎下腺分離腺房細胞内 Ca²⁺濃度上昇に対する交感神経 β₁・β₂作動薬の効果

廣野 力, 杉田 誠, 柴 芳樹 (広島大学大学院医歯薬学総合研究科病態探究医科学講座口腔生理学研究室)

我々は交感神経・副交感神経作動薬による唾液腺での水・電解質分泌制御機構を調べている。これまで, 顎下腺

および顎下腺分離腺房細胞で副交感神経作動薬により誘導される水分泌およびCl⁻分泌が交感神経β作動薬やcAMPにより抑制されることを示した。今回、これらの分泌調節に対するβ₁受容体とβ₂受容体の関与を明らかにするために、副交感神経作動薬で誘導される水・電解質分泌活性の指標としての細胞内Ca²⁺濃度上昇に対するβ₁作動薬とβ₂作動薬の効果を調べた。

雄性ラット顎下腺をコラゼナーゼ処理で分散させて得られた分離腺房細胞にFure2-AMを負荷しARGUS-HiSCAシステムで細胞内Ca²⁺濃度を蛍光強度比(F340/F380)でモニターした。

副交感神経作動薬のカルバコール(CCh)で誘導される持続的な細胞内Ca²⁺濃度上昇はβ₁作動薬のドブタミンで増強された。ドブタミンはα活性作用もあるが、α拮抗薬のプラゾシンを添加した場合でも増強効果は残った。CChによる細胞内Ca²⁺濃度上昇はβ₂作動薬のテルブタリンでも増強されたが、ドブタミン存在下でテルブタリンをさらに添加してもドブタミンによる増強効果に変化は見られなかった。CChによる細胞内Ca²⁺濃度上昇は細胞内cAMP濃度を増加させるフォスコリン+IBMXでも増強され、ドブタミンやテルブタリンの添加はこの増強に影響しなかった。

以上のことから、β₁受容体刺激とβ₂受容体刺激のどちらもcAMP産生を介してCChによる細胞内Ca²⁺濃度上昇を増強することが示唆された。Cl⁻分泌調節におけるこれらの受容体の関与について考察する。

18. オキシトシンの抗うつ作用に関わるマウス海馬神経細胞内シグナル伝達経路

松崎光博¹、松下博昭¹、韓小建¹、沖本直輝¹、道上宏之¹、西木禎一¹、大守伊織¹、富澤一仁²、松井秀樹¹(¹岡山大学大学院医歯薬学総合研究科細胞生理学教室、²熊本大学大学院生命科学研究部分子生理学分野)

オキシトシンは、子宮収縮および乳汁分泌を促進することで知られている。これまで我々は、オキシトシンの脳内ホルモン作用として記憶の長期増強や抗不安、抗うつといった情動に対する研究を行ってきた。また、性的機能不全治療剤として知られているシルデナフィルがオキシトシン分泌を促進させるという報告があった。そこで我々は雄マウスを用いて、シルデナフィルのオキシトシンを介した抗うつ効果についての研究を行った。雄マウスにシルデナフィルを腹腔内投与し、強制水泳実験を行い抗うつ効果を評価した。シルデナフィル投与群では、溶媒投与群と比較してうつ状態の軽減が認められた。さらにシルデナフィル投与によるうつ状態の軽減は、オキシトシン受容体遺伝子欠

損マウスおよびオキシトシン受容体アンタゴニストを投与した雄マウスでは抑制された。抗うつ作用の機序として、海馬でのMAPキナーゼカスケードの活性化と転写因子の一つであるCREBのリン酸化の増加が報告されている。本研究においても、野生型雄マウスではCREBのリン酸化がシルデナフィル投与後で増加し、オキシトシン受容体遺伝子欠損マウスやオキシトシン受容体アンタゴニスト追加投与群では増加は認められなかった。以上より、シルデナフィルは海馬神経細胞内のMAPキナーゼカスケードを介したオキシトシンの作用により、抗うつ作用を示していると考えられる。

19. 発達期小脳登上線維—プルキンエ細胞間シナプス除去への抑制性シナプス伝達の関与

中山寿子^{1,2}、宮崎太輔³、橋本浩一^{1,2,4}、柳川右千夫⁵、小幡邦彦⁶、崎村建司⁷、渡辺雅彦³、狩野方伸²(¹広島大学医歯薬学総合研究科、²東京大学医学系研究科、³北海道大学医学研究科、⁴さきがけ、⁵群馬大学医学系研究科、⁶理化学研究所、⁷新潟大学脳研究所)

小脳登上線維—プルキンエ細胞間シナプスは、生後発達において多重支配から単一支配へとダイナミックな投射パターンの変化を示す。このシナプスの刈り込み過程は、発達期の登上線維の活動を過剰にすることによって障害されることから、神経活動度あるいはパターンが適切に制御されることが必要であると考えられている。本研究では、神経活動を制御する要素としてGABA作動性抑制性シナプス伝達に着目し、興奮性シナプスの刈り込みへの関与について検討した。GABA合成酵素GAD67のヘテロノックアウトマウス(GAD67-GFP)、プルキンエ細胞/籠細胞/星状細胞特異的GAD67ノックアウトマウスおよびGAD阻害剤を小脳皮質に慢性投与したマウスでは、生後10-16日目の登上線維のシナプス除去が障害された。逆に、GAD67ヘテロマウス小脳皮質に生後10日目からジアゼパムを慢性投与するとシナプス除去異常がレスキューされた。また、プルキンエ細胞へのGABA性入力のうち、介在ニューロンからプルキンエ細胞体への抑制性入力が特に減弱していることを示す結果を得た。以上の結果から、生後10日から16日においてプルキンエ細胞体へのGABA作動性入力が登上線維シナプス除去過程に関与することが示唆された。

20. ラット6-OHDA誘発パーキンソン病モデル黒質におけるグリア細胞の反応

田中潤也、ME.Choudhury、杉本香奈、高橋寿明、矢野元(愛媛大学医学系研究科分子細胞生理学分野)

様々な脳病態で神経細胞が変性あるいは細胞死を来すと

き、グリア細胞が迅速に反応することが知られている。本研究では、ラット脳線状体に6-ヒドロキシドーパミン (6-OHDA) を注入することによって、黒質ドーパミン (DA) 神経細胞を変性させるパーキンソン病モデルを作成し、黒質に存在するマイクログリア、アストロサイトおよびオリゴデンドロサイト前駆細胞でもある NG2 グリアの反応を分析した。また、IL-3 と GM-CSF からなるサイトカイン混合物の皮下注射により、DA 神経細胞死を抑制した際の反応も調べた。6-OHDA 投与により DA 神経細胞が変性すると、マイクログリアが形態的な活性化を起こし、起炎症性サイトカインの発現が増強した。アストロサイトは、特異的の間径タンパク質 GFAP の発現を増強、アストロサイト由来であると思われる抗酸化因子の発現も増加していた。一方、NG2 グリアには大きな変化はなかった。6-OHDA 注入の翌日より、IL-3 と GM-CSF からなるサイトカイン混合物を 1 日 1 回皮下注射した場合は、DA 神経細胞に抗アポトーシス因子の Bcl-xL の発現が上昇した。この場合も、マイクログリアの形態的な活性化が観察されたが、起炎症性サイトカインの発現は抑えられていた。また、アストロサイトの活性化は抑制され、抗酸化因子の発現上昇も見られなかった。しかし、NG2 グリアの黒質に占める面積や、NG2 グリアの DA 神経細胞への接着は増加していた。以上の結果は、DA 神経細胞の傷害レベルによってグリア細胞の反応様式が変化することを示している。

21. 心不全発症と重篤化における $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体の役割

岩崎慶一郎¹、毛利 聡^{1,2}、高津理美¹、氏原嘉洋^{1,2}、橋本 謙²、成瀬恵治¹、片野坂友紀¹ (¹岡山大学医歯薬学総合研究科システム生理、²川崎医科大学生理学 1)

心筋細胞の形質膜や筋小胞体には、多数の Ca^{2+} 輸送体が発現しており、心筋細胞でみられる収縮・弛緩、細胞分化や肥大応答等の生理機能は、これらの Ca^{2+} 輸送体が担う緻密な Ca^{2+} ハンドリングによって維持されている。これらの Ca^{2+} 輸送体のうち、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体 (NCX1) は、心臓の拍動ごとに流入してくる Ca^{2+} を、細胞膜を介した Na^+ の濃度勾配を利用して細胞外へと汲み出す実質上唯一の Ca^{2+} 排出系として働くことが知られている。これまでの研究より、不全心筋細胞では NCX1 発現量が高いことが報告されており、この現象は上昇した細胞内 Ca^{2+} 濃度に対する適応応答であろうと説明されている。一方で、NCX1 は、状況に応じて Ca^{2+} 流入系としても働きうること、さらに筋小胞体 Ca^{2+} ポンプ (SERCA) に比べてエネルギー効率の悪い Ca^{2+} 排出系であることを考慮すると、NCX1 の発現上昇が心不全増悪因子となることも否定できない。

我々は、心不全発症と重篤化における NCX1 の病態生理学的役割を検討するために、薬物投与により心臓でのみ NCX1 発現量を亢進することが可能なトランスジェニックマウスを作製した。本研究では、このトランスジェニックマウスを用いて、イソプレテノール長期投与、あるいは大動脈結紮手術によって心不全モデルを作製した。これらの心不全モデルマウスについて、エコーによる経時的な心機能評価を行うことで心機能低下を確認した後、薬物投与によって心臓での NCX1 発現量を上昇させた。これらのマウスの心臓において、形態学的変化、心筋細胞のストレス応答、細胞内 Ca^{2+} ハンドリング能力、心機能などについて経時的な解析を行い、著しく低下した心機能に対する NCX1 発現亢進の効果を評価した。これらの結果より、小胞体 Ca^{2+} ストア機能が低下した心不全心筋細胞では、NCX1 による細胞外への Ca^{2+} 排出機能亢進による Ca^{2+} ハンドリングの改善が有効な心不全治療となりうることを示す実験的証拠が得られたので報告する。また、正常心筋細胞における NCX1 の発現上昇は、肥大を引き起こす Ca^{2+} シグナルを活性化させることも併せて議論したい。

22. 赤血球の酸化ストレス度と加齢との関係 (抗加齢ドックのデータを用いて)

満田憲昭、青野賢治、青戸 守、鈴木洋司、大久保信孝 (愛媛大学大学院医学系研究科生理学分野)

【背景】赤血球は体内循環中に様々な酸化ストレスに曝され、膜上の脂質やタンパク質が徐々に酸化されることにより、微小循環障害を引き起こす。このような赤血球の機能障害は、生活習慣病の症状を悪化させる要因の一つとなっている。我々は、愛媛大学医学部附属病院抗加齢センターで実施している抗加齢ドックの受診者を対象として、赤血球膜上のタンパク質や脂質の酸化度を『加齢の指標』として利用することを検討している。

【方法】抗加齢ドックの受診者のうち、本研究の趣旨をご理解いただき、同意書にご署名いただいた方々 363 名より、1 回あたり 20ml を限度として血液を提供していただいた。提供いただいた血液から赤血球分画を分離し、赤血球膜タンパク質中の SH 基含有量 (非酸化)、赤血球膜中の酸化脂質含有量、メトヘモグロビン量を測定した。それらのデータと一般血液検査データや動脈硬化度等との関連性を解析した。

【結果と考察】SH 基の含有量と収縮期血圧・PWV との間に有意な逆相関があった。また酸化脂質含有量と拡張期血圧との間に有意な逆相関があった。これらは、特に男性において高い相関を示した。以上より、赤血球膜タンパク質中の SH 基含有量を動脈硬化度の指標として利用可能で

あると考えている。

23. 妊娠期母親マウスの摂餌制限が仔マウスの情動行動に及ぼす影響とそのメカニズム

清水紀之¹, 近久幸子¹, 岩城洋平¹, 北岡和義², 勢井宏義¹ (¹徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部統合生理学分野, ²徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部生理機能学分野)

妊娠期および授乳期での母親の栄養状態は、胎児、新生児から幼児にかけての代謝調節機構や脳機能の発達にさまざまな影響を与える。脳機能の発達では、妊娠ラットをモデルとした研究で、妊娠期および授乳期での母親の栄養不足が、生後の仔ラットの脳の発達に影響を与え、成熟後に不安・うつ様行動を示すことを報告している (Jaiswal AK *et al.*, *Indian J Exp Biol*, 1996)。しかし、これらの機構は、環境要因と遺伝要因が複雑に関係し合っており、今なお明らかとなっていない。

そこで、本研究では、妊娠後期(妊娠成立後12日目から18日目)に限定したカロリー制限を施行し、母親マウスから生まれた雄マウスが十分に成熟した段階(8~9週齢)での不安・うつ等の情動変化、深部体温、自発行動量を調べた。その結果、妊娠後期に50%のカロリー制限を施行した母親マウスから生まれた仔マウスは、成熟後に不安・うつ様行動の顕著な増大や、暗期での活動量の低下を示すことを見出した。加えて、20%のカロリー制限を施行したマウスでも、不安様行動の上昇や暗期活動量の低下を確認した。さらに、50%のカロリー制限を行ったマウスは、脳内モノアミン系の放出量や遺伝子発現に変化が認められた。以上の結果から、妊娠中のカロリー制限は、仔マウスの成熟後の高次脳機能に影響を及ぼすことが明らかになった。

24. アンジオテンシンII由来高血圧ラットの活動筋反射は活性酸素によって増強される

Oxidative stress contributes to enhanced muscle reflex in rats with hypertension induced by chronic infusion of angiotensin II

木場智史, 渡辺亮介, 狩野尚香, 渡邊達生 (鳥取大学医学部統合生理学分野)

Muscle contraction stimulates thin fiber muscle afferents and evokes reflex sympathoexcitation. In hypertension, angiotensin II (Ang II) is elevated. Ang II has been reported to trigger superoxide and other reactive oxygen species (ROS) production. In the present study, we tested the hypotheses that in Ang II-dependent hypertension the muscle reflex is enhanced and that the enhanced reflex is

mediated by oxidative stress. In male rats, subcutaneous infusion of Ang II at 450ng/kg per min for 14 days significantly ($P<0.05$) increased blood pressure, compared to sham-operated rats. Electrically induced 30 s hindlimb muscle contraction in the decerebrate rats with hypertension evoked larger pressor and renal sympathoexcitatory responses [35 ± 5 mmHg, 235 ± 42 arbitrary unit (a.u.); $n = 10$] as compared to the sham-normotensive rats (13 ± 2 mmHg, 84 ± 21 a.u.; $n = 11$). In the hypertensive rats, the enhanced responses were significantly reduced by intra-arterial injection into the hindlimb circulation of Tempol (10mg), a superoxide dismutase mimetic. In the sham rats, Tempol had no effect on the responses. The RT-PCR experiment showed that mRNA for gp91^{phox}, a NADPH oxidase subunit, in the skeletal muscle tissue was upregulated in the hypertensive rats. The muscle ROS production evaluated by dihydroethidium staining was increased in the hypertensive rats. These results in total suggest that oxidative stress in skeletal muscle tissue is elevated by Ang II, thereby enhancing the muscle reflex in rats with hypertension.

25. 虚血脳でNG2プロテオグリカンを発現するマイクログリア

池田愛璃, 杉本香奈, 西原 佑, 高橋寿明, 矢野 元, 田中潤也 (愛媛大学医学系研究科分子細胞生理学分野)

様々な病態においてラミファイドマイクログリアがNG2コンドロイチン硫酸プロテオグリカン(NG2)を発現することが報告されている。正常成熟脳においてオリゴデンドロサイト前駆細胞マーカーとして知られるNG2とマイクログリア/マクロファージのマーカーであるIba1は異なる細胞で発現する。一方、ラット一過性中大脳動脈閉塞による梗塞核心部にはNG2とIba1を同時に発現する骨髄由来のマクロファージ様細胞BINCsが集積する。梗塞巣では、BINCsが変性神経細胞を貪食する。脳梗塞虚血核心部の周辺(ペナンブラ)では、神経細胞は残存し、NG2陽性のマイクログリアが存在する。共焦点顕微鏡による観察からこのNG2陽性マイクログリアの多くは、貪食細胞マーカーであるCD68を発現していることが明らかになった。また、梗塞巣コアからやや離れたペナンブラでは神経細胞を取り囲むように分布するNG2陽性マイクログリアが多く、変性神経細胞の多いコアに近いペナンブラではNG2陽性マイクログリアはNeuN陽性物質を貪食していた。このことから、NG2が、マイクログリア/マクロファージによる貪食作用のいずれかのプロセスに関与していることを示

唆している。

26. STAT3 コンディショナルノックアウトマウスで見られる貧血の解析

大久保信孝¹, 鈴木洋司¹, 青戸 守¹, 山之内 純², 平川 聡³, 安川正貴², 満田憲昭¹ (愛媛大学大学院医学系研究科統合生体情報学講座生理学分野, ²臓器機能統御医学講座生体統御内科学分野, ³感覚機能医学講座感覚皮膚医学分野)

これまで STAT3 について報告は多数あるが, STAT3 が赤血球の生活環 (分化, 維持, 老化, 破壊) にどのように関わっているか明らかになっていない。我々は STAT3 の活性化に必要なチロシン残基の前後に loxP 配列を挿入した STAT3Flox マウスと Tie2Cre マウスを掛け合わせて STAT3 コンディショナル欠損マウスを作製し, STAT3 と赤血球との関係を調べた。

その結果, 作製したコンディショナル欠損マウスの一部において赤血球数の減少, ヘマトクリットの低下など貧血症状が見られた。これら貧血マウスの血漿では LDH 濃度の上昇, エリスロポエチン濃度の上昇, 網状赤血球数の増加が見られた。さらに, STAT3 コンディショナル欠損マウスは野生型マウスに比べ成熟赤血球寿命が短くなっていた。また組織染色を行ったところ, 脾臓の赤脾髄中で非ヘム鉄を多く含むマクロファージ細胞が見られ, さらに骨髄では赤血球を貪食しているマクロファージ細胞が見られた。これらの結果から, STAT3 コンディショナル欠損マウスでは脾臓マクロファージ細胞による成熟赤血球の貪食の亢進が起こり, これが原因で貧血になると考えられた。一方, 赤血球の造血機能や循環成熟赤血球の脆弱性においてコンディショナルノックアウトマウスと野生型マウスの間に有意な差は見られなかった。

本研究の結果から, STAT3 はマクロファージ細胞による赤血球の貪食機構の制御に重要な役割を持つことがわかった。

27. 細胞外二価陽イオンによる FMRFamide 作動性 Na⁺チャネルの機能修飾に関与するアミノ酸残基の同定

小谷 侑, 古川康雄 (広島大学大学院総合科学研究科神経生物学研究室)

FMRFamide 作動性 Na⁺チャネル (FaNaC) は, 神経ペプチドである FMRFamide が結合することで開口するリガンド作動性 Na⁺チャネルである。FaNaC は, 2つの膜貫通ドメインをもつサブユニットのホモ三量体として形成され, その構造的類似性から, 上皮性 Na⁺チャネル族に分類される。我々は以前, 細胞外二価陽イオン濃度に応じて,

FaNaC の FMRFamide 反応性や脱感作のキネティクスが変化することを見出すとともに, この現象は, 第2膜貫通ドメインに位置するアスパラギン酸残基 (D552) の点変異によって大きく影響されることを報告した (Kodani and Furukawa, Zool Sci, 27, 440-448, 2010)。今回, 細胞外二価陽イオンの作用に関与する他のアミノ酸部位を同定するために, ホモロジーモデリングにより FaNaC の構造モデルを作成して解析したところ, D552 に近接して複数の極性アミノ酸残基が配置していることがわかった。FaNaC のモデル構造は, 細胞外ドメインと膜貫通ドメインの境界部に空洞を有し, D552 および近接する極性アミノ酸残基の側鎖は, この空洞に面していた。空洞内面の静電ポテンシャルを計算した結果, この部位は電気的陰性度が高い状態にあり, 陽イオンの誘引に寄与することが推測された。この仮説に基づき, D552 および近接する極性アミノ酸残基の単独または多重変異体を作成し, 機能解析を行った。その結果, これらのアミノ酸残基が細胞外二価陽イオンとの相互作用に関与しており, 側鎖の組み合わせによって, 二価陽イオンとの結合親和性が変化することが示唆されたので報告する。

28. 膠芽腫の遊走・浸潤における Oct-3/4 の関与

高橋寿明^{1,2}, 小林加奈¹, 井上明宏³, 原田広信^{2,3}, 杉本香奈^{1,2}, 矢野 元^{1,2}, 大西丘倫³, 田中潤也^{1,2} (愛媛大学大学院医学系研究科分子細胞生理学, ²愛媛大学プロテオ医学研究センター神経部門, ³愛媛大学大学院医学系研究科脳神経病態外科学)

膠芽腫は高い浸潤能を有する神経膠腫であり, その強い浸潤性が治療抵抗性の主因となっている。一方で, 幹細胞性の維持に必要とされる Oct-3/4 の発現と神経膠腫の悪性化が相関することが知られている。そこで, 膠芽腫細胞における遊走・浸潤能への Oct-3/4 の関与について検討した。

ヒト膠芽腫摘出組織由来の初代培養細胞に Oct-3/4 遺伝子を過剰発現させた細胞 (GB/Oct-3/4) を樹立し, Wound healing assay, Matrigel invasion assay, Rat brain slice model にて運動性の評価を行うとともに, 遊走・浸潤関連因子の遺伝子発現を検討した。GB/Oct-3/4 における遊走能・浸潤能はコントロール細胞と比較して有意に亢進しており, integrin や FAK, Src の発現上昇が認められた。浸潤関連因子の中では特にマトリックスメタロプロテアーゼ-13 (MMP-13) の発現および活性が顕著に亢進していた。GB/Oct-3/4 に MMP-13 shRNA を恒常的に発現させて MMP-13 を抑制したところ, 亢進した浸潤能が抑制された。

これまでに我々は膠芽腫幹細胞が MMP-13 を介して強

い浸潤能を有することを明らかにしている。今回の結果と合わせて考えると膠芽腫幹細胞の強い浸潤能は、Oct-3/4によるものであると考えられ、Oct-3/4やMMP-13の機能抑制が膠芽腫の新たな治療標的となりうることが示唆された。

29. Rare sugar D-psicose protects pancreatic β -islets and thus improves insulin resistance in OLETF rats

MA. Hossain, Y. Hirata, K. Kamitori, Y. Dong, F. Yamaguchi, M. Tokuda (Department of Cell Physiology, Faculty of Medicine, Kagawa University)

Obesity is a dire health dilemma related to insulin resistance and hyperglycemia. In insulin resistance the pancreas initially responds by producing more insulin but ultimately fails and is associated with pancreatic β -cell failure. In the present study the protection of pancreatic β -islets with D-psicose has been studied.

Treated OLETF rats were fed 5% D-psicose in drinking water. A non-diabetic Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) counter group of OLETF was taken as control. Body weight, food and drink intake were measured weekly, and blood glucose and blood pressure, monthly. OGTT was performed on sacrifice day and liver, pancreas and other required organs were preserved. As a result, D-psicose reduced body weight and food intake and thus maintained blood glucose levels. OGTT showed reduced blood glucose and insulin. D-psicose significantly reduced abdominal fat deposition and plasma lipid levels. Pancreatic β -islets were preserved with minimum fibrosis assessed by HE, Masson's and α -SMA staining. Thus we introduce D-psicose as an anti-obese agent acts through the

protection of pancreatic β -islets.

30. 血管攣縮の細胞内情報伝達においてカベオリン-1と結合する新規シグナル分子の探索

松尾欣哉¹, 張 影², 岸 博子², 加治屋勝子², 高田雄一², 小林 誠² (¹山口大学医学部医学科4年生, ²山口大学大学院医学系研究科生体機能分子制御学)

【目的】我国死因の上位を占める血管病の本態として動脈硬化と血管攣縮があるが、後者は突発性のため突然死の主因として恐れられている。血管攣縮はCa²⁺非依存的な血管平滑筋の異常収縮であり、我々はその病的経路としてスフィンゴシルホスホリルコリン (SPC) /Fyn/Rho キナーゼ系を同定した。さらに、異常収縮の大きさは血清総コレステロール値と正相関がある事、SPC刺激によりFynやRhoキナーゼはコレステロールが局在した細胞膜ラフトへ移動し病的シグナルを伝達する事を見出した。種々の分子と結合するアンカー蛋白として膜ラフトに局在するカベオリン-1は、異常収縮のシグナル分子の膜ラフトへの会合も助けている可能性がある。今回、SPC刺激によりカベオリン-1と結合する分子を探索し、その中から血管異常収縮に関わる新規シグナル分子の同定方法を検討した。

【方法】HaloTagとカベオリン-1の融合蛋白 (HaloTag-カベオリン-1)をヒト冠状動脈平滑筋細胞に発現させ、低温下での界面活性剤処理により細胞溶解液を調製し、様々な破碎処理の後、遠心分離を行った。SPC刺激によってHaloTag-カベオリン-1と結合する分子をプルダウン・アッセイにより抽出し、電気泳動により蛋白質バンドを確認した。

【結果】細胞溶解液に対する処理のうち、目的蛋白質を捕捉する能力が高く、再現性の高い方法は遠心処理のみ行うことであった。