

第 62 回西日本生理学会

日 時：平成 23 年 10 月 14 日（金）、15 日（土）
 場 所：佐賀大学医学部・臨床大講堂（佐賀県佐賀市鍋島）
 当番幹事：佐賀大学医学部・生体構造機能学講座神経生理学分野 熊本栄一
 参加者数：86 名
 演 題 数：40 題

第 62 回西日本生理学会は、佐賀大学医学部・臨床大講堂にて、同医学部・生体構造機能学講座 器官・細胞生理学分野 柳 圭子准教授の協力の下、10 月 14 日（金）、15 日（土）の二日間にわたり開催された。86 名の参加者、40 題の口演発表（口演：9 分、質疑応答：3 分）があり、非常に活発な討議が行われた。37 歳以下の若手研究者を対象とした「日本生理学会九州奨励賞」には例年よりも多い 11 題もの応募があった。今回から、当学会以外での各種受賞歴を把握するために、応募者自身の学歴、職歴、受賞歴および受賞内容のわかるような抄録などの資料を提出することが義務づけられた。5 名の審査員により、研究内容、研究の独創性、研究の将来性や発展性、プレゼンテーション能力などを評価基準として厳正なる審査が行われた。その結果、熊本大学大学院・生命科学研究部・分子生理学分野の魏 范研先生による「Cdkal1 機能欠損による 2 型糖尿病発症機序の解明」、および、九州大学大学院・薬学研究院・病態生理学分野の毛利 優希先生による「ミクログリアの機能に及ぼす甲状腺ホルモンの作用解明」の 2 題が受賞した。この賞が優秀な若手研究者の育成とともに、西日本生理学会の活性化に役立つことを期待する。初日の学会終了後の夜には恒例の懇親会が行われ、会員相互の親睦を深めた。2 日目は朝早くから昼過ぎまで学会が行われ、初日同様、活発な質疑応答が交わされた。評議員会および総会において、常任幹事会の報告、次回、次々回の当番校の紹介、決定が行われた。次回の当番校である大分大学・医学部の神経生理学 横井 功教授より、10 月 19 日（金）、20 日（土）に大分市の大分県労働福祉会館ソレイユで開催される旨の案内があった。また、次々回当番校は産業医科大学に決定した（医学部・第 1 生理学 上田陽一教授、医学部・第 2 生理学 井上真澄教授）。

A1. スフィンゴミエリン合成酵素遺伝子欠損による難聴とその内耳機構に関する研究

竹本 誠¹、呂 美紅¹、渡辺 研²、矢野正人¹、西村方孝¹、富本秀和³、岡崎俊郎⁴、尾池雄一¹、宋 文杰¹（¹熊本大学大学院生命科学研究部、²国立長寿医療センター、³三重大学医学部、⁴金沢医科大学）

スフィンゴ脂質やその代謝産物の聴覚機能への関与が、近年示唆されてきた。スフィンゴミエリン（SM）は、SM 合成酵素（SMS）によって合成されるスフィンゴ脂質である。我々は、SMS を介した SM ホメオスタシスが聴覚に関与するかどうかを明らかにするため、これまでに哺乳類で同定されている SMS 遺伝子（SMS1、SMS2）の欠損マウスを解析した。

まず、音一報酬連合学習を用いて行動実験を行ったところ、SMS1 欠損マウスは音圧レベルの低い音刺激に应答しないことが分かった。さらに、聴性脳幹反応を解析したと

ころ、野生型に比べて閾値の有意な上昇が見られ、難聴であることが明らかになった。一方、SMS2 欠損マウスは野生型と同等な聴力を示した。SMS1 欠損マウスにおける難聴の原因を探るために、内耳蝸牛の異常を形態レベルで調べたところ、血管条の形態異常が見つかった。そこで、血管条の主な働きである蝸牛内電位を電気生理学的手法を用いて調べたところ、野生型に比べて電位の有意な低下が見られた。さらに、蝸牛内電位の生成に必須であり蝸牛における K⁺ 循環に関わる分子の発現分布を免疫組織化学法により解析したところ、血管条辺縁細胞に発現する遅延整流性 K⁺ チャンネル KCNQ1 の局在に異常が見られた。

以上により、SMS1 が蝸牛血管条における聴覚機能に関与することが示唆された。

A2. c-fos-mRFP トランスジェニックラットの視床下部および脳幹部における浸透圧負荷後の赤色蛍光発現

吉村充弘¹, 加藤明子¹, 大久保淳一¹, 大野素子¹, 石倉透¹, 加隈哲也², 吉松博信², 上田陽一¹ (¹産業医科大学医学部第1生理学, ²大分大学医学部総合内科学第一講座)

【目的】我々は *c-fos*-単量体赤色蛍光蛋白 (mRFP) 融合遺伝子を導入したトランスジェニックラットを用いて, 脱水および再飲水後における赤色蛍光の発現変化を視床下部および脳幹部において検討した。【方法】成熟雌性 *c-fos*-mRFP トランスジェニックラットを用いて, A 群: コントロール, B 群: 48 時間飲水制限, C 群: 46 時間飲水制限 + 2 時間再飲水, D 群: 46 時間飲水制限 + 6 時間再飲水, E 群: 46 時間飲水制限 + 12 時間再飲水に分けて各処置後にペントバルビタール麻酔下で灌流固定した。脳を取り出し, 後固定の後に視床下部 (室傍核など) および脳幹部 (孤束核など) を含む薄切切片を作成し, 蛍光顕微鏡下で観察した。【結果】A 群では, 視床下部および脳幹部に散在する赤色蛍光蛋白陽性細胞が見られた。B 群では, 視床下部 (室傍核など) において赤色蛍光蛋白陽性細胞が著明に増加した。C 群では, 視床下部 (室傍核など) における赤色蛍光蛋白陽性細胞は減少傾向であったが, 脳幹部 (孤束核など) においては著明に増加した。D 群では, 観察した諸核のほとんどで赤色蛍光蛋白陽性細胞数は A 群の場合と同程度であり, E 群では観察した全ての部位で赤色蛍光蛋白陽性細胞数は A 群と同程度であった。【結語】*c-fos*-mRFP トランスジェニックラットでの浸透圧負荷後の脳内赤色蛍光蛋白発現パターンを明らかにした。

A3. オレキシン神経機構の超日リズム形成への関与

宮田紘平, 大塚曜一郎, 桑木共之 (鹿児島大学医歯学総合研究科統合分子生理学教室)

我々はこれまで体温, 心拍数, 褐色脂肪組織温が約 90 分周期で同期して一過性に増加することを明らかにしてきた (Ootsuka et al., Neuroscience (2009) 164: 849-861)。この一過性の増加には覚醒レベルと相関がある海馬 θ 波の増加が先行する。すなわち, 覚醒-睡眠制御で重要なオレキシン神経機構が超日リズム形成に関わっていることが考えられる。本研究では, この可能性についてマウスを用いて検討した。野生型マウス (C57BL/6 (WT マウス)) とオレキシン欠損マウス (orexin knockout (KO マウス)) の体温, 心拍数, 運動量を無麻酔・無拘束で 24 時間 (Light12h/Dark12h) 記録し, 比較した。その結果, 概日リズムはいずれのマウスでも同様に見られたが, 超日リズムはオレキシン欠損マウスで, 減弱していた。したがって, オレキシン神経機構が超日リズム形成に関与していることが示唆された。

A4. Cdkal1 機能欠損による 2 型糖尿病発症機序の解明

魏 范研, 富澤一仁 (熊本大学大学院生命科学研究部分子生理学分野)

Cdkal1 はごく最近同定された 2 型糖尿病の危険因子である。Cdkal1 遺伝子に変異を持つヒトでは, インスリン分泌能が低く, 2 型糖尿病を発症しやすいことが明らかになった。我々は, Cdkal1 の生理機能ならびに同機能欠損による 2 型糖尿病発症機序を解明したので報告した。

Cdkal1 は, リジンに対応する tRNA [tRNA^{Lys} (UUU)] の 37 番目のアデニンをチオメチル化する酵素であった。Cdkal1 が欠損すると, リジン翻訳時に誤翻訳が生じやすくなった。Cdkal1 を膵 β 細胞特異的に欠損させたマウスは, インスリン分泌能が低下し, 高脂肪食負荷によりヒト 2 型糖尿病様の病態を呈した。

A5. ミクログリアの機能に及ぼす甲状腺ホルモンの作用解明

毛利優希, 奥野祐子, 藤田慶大, 別府 薫, 秋元 望, 井福正隆, 野田百美 (九州大学大学院薬学研究院病態生理学分野)

ミクログリアは高い遊走性と脳内異物排除能力から中枢神経系の恒常性維持に非常に重要な存在だが, その特性やアルツハイマー病と深い関係にあることが示唆されている。甲状腺ホルモンとの関係については未だに不明な点が多い。本研究ではミクログリアの特徴的な機能の一つである遊走性に活性化型甲状腺ホルモンである T3 が与える作用と要因を薬理的に検討すると共に, 甲状腺ホルモン輸送体及び受容体阻害とノックアウトがそれらに与える影響を検討した。

その結果, ミクログリアは T3 へ向かう化学走性増加を濃度依存的に示し, T3 により細胞運動性が有意に増加し membrane ruffling 形成が誘導された。この運動性増加は PKC 阻害によっては抑制されず, 甲状腺ホルモン輸送体及び受容体, PI3K, MAPKK, Na⁺/K⁺-ATPase, G_i タンパク質, 甲状腺ホルモンとの関連が示唆される GABA_A 受容体及び GABA_B 受容体の阻害により, それぞれ有意に抑制された。更に受容体サブタイプである TR α の欠損マウス初代培養ミクログリアは野生型と比べ, control および T3 処置後の遊走性が有意に低下した。以上の結果から, T3 によるミクログリアの遊走性増強作用の大部分は甲状腺ホルモン受容体を介し, 様々な細胞内シグナル伝達因子と他のリガンドに対する受容体も作用機構に大きく関与することが示唆された。

A6. マウスでのうま味応答における代謝型グルタミン酸受容体の関与

楠原庸子^{1,2}, 安松啓子¹, 大栗弾宏¹, 吉田竜介¹, U. Boehm³, A. Voigt⁴, S. Hübner⁴, 前田勝正², W. Meyerhof⁴, ニノ宮裕三¹ (¹九州大学大学院歯学研究院口腔常態制御学講座口腔機能解析学分野, ²九州大学大学院歯学研究院口腔機能修復学講座歯周疾患制御学分野, ³Institute for Neural Signal Transduction, Center for Molecular Neurobiology, Germany, ⁴Dept. of Molecular Genetics, German Institute of Human Nutrition Potsdam-Rehbruecke, Germany)

うま味は monosodium glutamate (MSG) などのグルタミン酸がもたらす5基本味の一つであり, その受容体候補に T1R1 + T1R3 ヘテロダイマーと代謝型グルタミン酸受容体 mGluRs が挙げられている。前者はその機能解析から広くアミノ酸応答に関与するが, グルタミン酸特異性は低く, 逆に, 後者はグルタミン酸特異的受容能をもつが, 舌のうま味応答への関与はまだ全く不明である。本研究は, うま味受容体コンポーネント T1R1 のノックアウトマウスを用いてその神経応答, 行動応答に対する mGluRs 阻害剤の効果を解析した。鼓索神経応答における MSG 応答の IMP による相乗効果は, WT マウスでは見られたが T1R1-KO マウスでは消失した。T1R1-KO マウスの MSG に対する鼓索神経応答は WT と比べて減少するも残存し, また残存する MSG 応答は mGluR1 及び mGluR4 の阻害剤により有意に減少した。行動実験では, 条件刺激として MSG を使用し条件付け味覚嫌悪を行った結果, WT, T1R1-KO マウスとも条件付け味覚嫌悪が成立した。これら条件付け味覚嫌悪が成立したマウスにおいて MSG に mGluRs 阻害剤を添加し提示すると, MSG への嫌悪が緩和された。以上の結果から, mGluRs もうま味の受容・味の弁別に関与することが示唆された。

A7. 海馬神経回路の非対称性形成に関与するシグナル分子の探索

川原愛子¹, 倉内翔太郎¹, 深田優子², 深田正紀², 八木橋輝美¹, 板谷祐也¹, 伊藤 功¹ (¹九州大学理学研究院生体物理化学研究室, ²生理学研究所生体膜研究部門)

マウス海馬神経回路には NMDA 受容体 $\epsilon 2$ サブユニット分布が異なる2種類のシナプスが存在し, 海馬の左右および錐体細胞の apical-basal (上下) で非対称に配置されていることを我々は明らかにした。さらに, 内臓器官の左右非対称な配置に異常を示す iv マウスの解析から, 内臓と脳では左右差の形成機構が異なること等を示した。このような非対称性を有する神経回路の形成には, 脳の左右や神経

細胞の上下といった位置情報を担うシグナル分子の存在が必須と思われる。我々は, このシグナル分子の候補として MHC class I に注目した。MHC class I は免疫系の抗原提示機構に重要な因子として知られているが, 近年これらが中枢神経系にも発現し, 神経系の回路形成や可塑性の発現にも関与することが明らかになった。我々はまず, MHC class I の構成因子である $\beta 2m$ がマウス海馬シナプスに存在することを確認した。次に $\beta 2m$ を欠損し, 細胞表面に MHC class I を発現できない $\beta 2m$ ノックアウトマウスの海馬を用いた解析を行った。その結果, 海馬の左右, 錐体細胞の上下における全ての CA1 シナプスが薬理学的特性および可塑性の性質において $\epsilon 2$ -dominant シナプスの特徴を示し, その神経回路は非対称性を完全に消失していた。以上により, 海馬神経回路の非対称性形成において MHC class I の重要性が示唆された。

A8. PIP2-DAG シグナルによる TRPC3/6/7 チャネル制御キネティックスの差異

齊 郷平^{1,2}, 今井裕子¹, 岡村康司³, 森 誠之¹, 井上隆司¹ (¹九州大学大学院歯学府全身管理歯科, ²福岡大学医学部生理学, ³大阪大学医学研究科統合生理学)

TRPC3/6/7 チャネルは血管平滑筋の収縮を制御し, 血圧調整に関与するカチオンチャネルである。これらのチャネルは G 蛋白質共役型受容体などの活性化に伴い, ホスホリパーゼ C (PLC) の働きにより, ホスホイノシチドの一種である PI (4,5) P₂ (PIP₂) から産生される DAG によって活性化される。我々は昨年, TRPC6 の PIP₂ 枯渇による抑制について報告した。今回 TRPC3, TRPC7 において C6 と同様, 電位依存性ホスファターゼ (DrVSP) を用いた検討を行った。その結果, C3/C6/C7 チャネルにおいて DrVSP の活性化 (PIP₂ 枯渇) に伴う抑制が共通して認められた。しかし, その抑制強度, 出現・回復時間はサブタイプ別に異なり, C7 > C6 > C3 の順であった。また, ムスカリン性受容体 (M1R) を過剰発現させ, PLC を強く活性化すると, DrVSP による抑制 (VMI) とほぼ同様の順でチャネル活性が速く不活性化 (減衰) されることが明らかとなった。更に FRET (蛍光エネルギー移動) を用いた PIP₂ と TRP 電流の同時測定を行い, DrVSP, M1R を刺激した時に得られる PIP₂ 濃度変化とチャネル活性との相関性について検討した。この結果, PIP₂ 枯渇に対する感受性がチャネルごとに異なることで, カチオン (カルシウムなど) 流入に差を生じるだけでなく, 細胞全体の PIP₂ にも差異を生じることが示唆された。

A9. 蛙坐骨神経の複合活動電位に対するメントールの抑制作用

川崎弘貴, 水田恒太郎, 藤田亜美, 蔭 昌宇, 上村聡子, 八坂敏一, 井上将成, 松下晋大, 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))

メントールは1次感覚ニューロンの末梢端に存在するTRPM8を活性化して冷感を起こすことはよく知られている。以前我々は、TRPV1の作動薬カプサイシンを始めとする一連のバニロイド化合物がTRPV1とは無関係に伝導抑制を起こすことを明らかにしている。今回、メントールおよびその基本骨格である*p*-メンタン基を持つ化合物が活動電位の伝導に及ぼす作用を調べた。実験は、蛙坐骨神経にair-gap法を適用し複合活動電位(CAP)を記録することにより行った。メントールの光学異性体である(-)メントールと(+)メントールは同程度のIC₅₀値(1.0mM)でCAPの振幅を減少させた。また、*p*-メンタン基を持つカルバクロール、チモール、(-)メントン、(+)-メントン、プレゴンおよび1,8-シネオールは、それぞれで抑制の程度は異なるがメントールと同様な作用を示した。一方、TRPM8作動薬イチリンは、それを活性化させるのに十分な濃度でCAPに作用せず、TRPの非選択的阻害薬ルテニウムレッドは(-)メントール作用を抑制しなかった。

以上より、メントールとその関連物質は、バニロイド化合物と同様、TRPと無関係にCAPつまり活動電位の伝導を抑制し、この作用にはその化学構造の違いが重要であることが明らかになった。この結果は*p*-メンタン基を基本骨格とした新規の局所麻酔薬の開発に役立つかもしれない。

A10. 褐色脂肪細胞におけるカルシウムを介したミトコンドリア-滑面小胞体連関:発熱維持機構での役割

早戸亮太郎¹, 日暮陽子¹, 久場雅子¹, 長井宏樹¹, 山下均², 久場健司¹ (¹名古屋学芸大学管理栄養学部管理栄養学科, ²中部大学生命健康科学部生命医科学科)

発熱器官である褐色脂肪細胞では、寒冷暴露により交感神経からノルアドレナリンが放出され、 α と β のノルアドレナリン受容体が活性化される。前者はIP₃を生産し、滑面小胞体からのCa²⁺遊離と容量性Ca²⁺流入の活性化により、速い大きな細胞質内Ca²⁺濃度上昇を引き起こす。一方、後者は中性脂質の分解から、ミトコンドリアでのTCAサイクルの活性化と産生された遊離脂肪酸による脱共役タンパク(UCP1)の活性化を介して強力な熱産生を促す。しかし、ミトコンドリアでの脱共役と滑面小胞体からのCa²⁺遊離がどの様に相互作用し、熱産生に関わるか不明である。

今回の研究で、 β 作用は2~3相性の持続的な細胞内Ca²⁺濃度上昇を起こし、第1相は脱共役によるミトコンド

リアからのCa²⁺遊離、第2と第3相はこれによる滑面小胞体からのCa²⁺遊離と容量性Ca²⁺流入による事が解った。更に、ミトコンドリアから滑面小胞体へのCa²⁺連関は、IP₃受容体を介するCa²⁺誘起性Ca²⁺遊離(CICR)によることが明らかになった。

以上の結果から、ミトコンドリアから滑面小胞体へのIP₃依存性のCICRが褐色脂肪細胞内での持続的なCa²⁺濃度上昇を来とし、Ca²⁺依存性NADH脱水素酵素の活性化を介して、熱産生の基盤であるミトコンドリアでのH⁺勾配が維持され、長時間の熱産生が維持されることが示唆される。

A11. ストレス誘発性の摂食行動は個体の情動特性と関連する

染矢菜美, 成清公弥, 粟生修司 (九州工業大学生命体工学研究科脳情報専攻)

実験動物に一過性のストレスを負荷し摂食行動を誘発する方法として、テイルピンチが知られている。しかし、テイルピンチによる摂食行動と個体の情動特性との関連については明らかにされていない。また、この摂食行動は、ストレス対処行動として機能していると考えられるが、その詳細は不明である。そこで本研究では、テイルピンチ後の摂食行動発現の程度と、個体の情動特性との関連について評価するとともに、ストレス後の摂食行動が、摂食行動以外の行動に与える影響について評価した。情動特性の評価には高架十字迷路試験(EPM)およびオープンフィールド試験(OFT)を用いた。テイルピンチ後の摂食行動の発現が顕著であったグループでは、摂食行動の発現がわずかであったグループと比較して、EPMにおけるオープンアーム侵入時間および、OFTにおけるセンターエリア侵入時間が有意に短かった。このことから、不安傾向の高い個体ほどストレス後の摂食行動が促進することが示された。また、テイルピンチ後に摂食が制限されたグループでは、摂食を行ったグループと比較して、テイルピンチ後の活動量が増加していた。このことから、ストレス誘発性の摂食行動が、ストレス後の活動性の上昇に対して抑制効果を示すことが示唆された。

A12. 副腎髄質細胞におけるシナプトタグミンサブタイプ-1, -4, -7, -9の局在解明

原田景太, 松岡秀忠, 井上真澄 (産業医科大学・医学部・第2生理学教室)

シナプトタグミンは神経細胞のシナプス小胞や末梢分泌細胞の分泌顆粒に存在する膜タンパク質である。Ca²⁺およびリン脂質感受性を有するC2ドメインを持つことから分

泌の Ca^{2+} 調節を担っていると考えられており、現在までに 16 のサブタイプが同定されている。副腎髄質 (AM) 細胞にはクロマフィン顆粒 (LDCVs) とシナプス様小胞が存在する。これら二種類の分泌小胞におけるシナプトタグミンサブタイプの発現分布の決定は、小胞の Ca^{2+} 依存性分泌の分子機序解明に重要である。本研究では、AM 細胞の両分泌小胞におけるサブタイプ (Syt1, 4, 7, 9) の発現分布について免疫学的手法により検討した。ラット AM 細胞では Syt1 は両分泌小胞に、Syt7 は LDCVs のみに局在した。Syt4 と Syt9 はゴルジ体と小胞体にそれぞれ局在していた。一方、PC12 細胞では Syt9 は小胞体と共に LDCV でもその発現が観測された。INS-1 細胞に Syt1 を強制発現させると Syt9 の小胞体における発現量が倍増したことから、このラット AM 細胞と PC12 細胞における Syt9 の局在の違いは両細胞における Syt1 の発現量の違いが関与している可能性があることが示唆された。

A13. オキシトシンによる膵 β 細胞の保護作用

松永奈々美, 魏 范研, 貝塚 拓, 富澤一仁 (熊本大学大学院生命科学研究部分子生理学分野)

オキシトシンは分娩時の子宮収縮促進、ならびに授乳時の射乳促進作用を有するホルモンである。また、オキシトシンが社会行動や母性行動の制御、長期記憶能力の向上、抗不安作用などを有していることが明らかとなり、オキシトシンの更なる生理機能の解明が期待されている。我々は、膵臓 β 細胞にオキシトシン受容体が多く発現していることを見出したので、同細胞におけるオキシトシンの生理機能について検討した。オキシトシンは、膵 β 細胞におけるブドウ糖応答性インスリン分泌を促進した。さらに、小胞体ストレス下にある膵 β 細胞に対して保護作用をもつことが明らかになった。

A14. 甘味・うま味受容体コンポーネント T1R3 を発現する味細胞の応答性

吉田竜介¹, 高井信吾¹, RF. Margolskee², ニノ宮裕三¹
(¹九州大・歯・口腔機能解析学, ²モネル化学感覚研究所)

G タンパク質共役型受容体である T1R3 は T1R2 と共に甘味の、T1R1 と共にうま味の受容体として機能する。しかし、T1R3 を発現する味細胞の各種味刺激に対する応答特性は不明である。本研究では T1R3 発現味細胞を同定するために T1R3-GFP マウスを用い、茸状乳頭味蕾に存在する GFP 発現味細胞の基本味刺激 (甘味: サッカリン, シュクロース, 塩味: NaCl, 酸味: HCl, 苦味: キニーネ, うま味: グルタミン酸ナトリウム (+イノシン酸)) に対する応答を

記録し、T1R3 発現細胞の味応答特性について検討した。その結果、多くの T1R3-GFP 味細胞は甘味刺激に応答し、一部はうま味刺激に応答を示した。また、T1R3-GFP 細胞は基本味刺激に対する応答特性から、甘味応答細胞、うま味応答細胞、甘味とうま味両方に応答する細胞に分類された。さらに、T1R3, gustducin, TRPM5 の各遺伝子欠損により、T1R3-GFP 味細胞から明確な味応答が記録できなくなった。これらの結果は、T1R3 発現細胞が甘味、うま味の受容細胞で、その受容・情報伝達には T1R3, gustducin, TRPM5 のいずれもが重要な働きを持つ可能性を示唆する。

A15. 味覚受容における $G\alpha_{14}$ の機能解析

堀尾奈央¹, 日下部裕子², 河合崇行², ニノ宮裕三¹
(九州大・院歯・口腔機能, ²(独) 農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所)

G 蛋白質共役型受容体 T1rs, T2rs は味覚の受容体として機能する。G 蛋白質 α サブユニット $G\alpha_{14}$ は、舌前部の茸状乳頭味細胞では発現が確認されず、舌後部の有郭・葉状乳頭では、甘味受容体 T1r2+T1r3 と共発現する。しかし、 $G\alpha_{14}$ の味覚情報伝達における機能は未だ明らかとなっていない。そこで、舌後部の甘味伝達経路における $G\alpha_{14}$ の機能解明のため、 $G\alpha_{14}$ ノックアウトマウスを作成し、味覚解析を行った。その結果、舌後部の味蕾を支配する甘味応答は、舌前部を支配する鼓索神経と同様に、ノックアウトマウスで野生型マウスと比較して有意な差が見られなかった。塩・苦・酸・うま味応答も両神経ともに有意な差がなかった。マウスの甘味抑制物質であるグルマリンを舌処理した後の応答もノックアウトマウスと野生型マウスで有意な差が見られなかった。本研究では、 $G\alpha_{14}$ の味覚情報伝達における機能に関する明瞭な結果は得られなかったため、 $G\alpha_{14}$ の機能解明にはさらなる解析が必要である。

A16. 腸管狭窄線維化の進行における消化管筋線維芽細胞 TRP チャネルの役割

倉原(海)琳, 井上隆司 (福岡大学医学部生理学)

【背景】難治性疾患である炎症性腸疾患 (IBD) において、腸管線維化による腸狭窄が大きな問題となっている。この線維化薬物治療法開発のターゲットである筋線維芽細胞は病変部へ遊走し創傷治癒に寄与し、その過剰反応が慢性腸病変の線維化に関わる。重要な線維化促進因子である TGF- β は狭窄部位で増加がみられ、細胞の分化・遊走・接着・細胞外マトリックスの構築に重要な役割を担う。

【目的】本研究は腸管組織線維化調節のセンサー蛋白質と

考えられる筋線維芽細胞 TRP チャンネルを標的として、筋線維芽細胞の線維化刺激に応答する Ca^{2+} シグナル分子の潜在的な役割の探索を目的とする。

【結果】1%FBS 培地中で TGF- β 1 で筋線維芽細胞株 CCD 18Co を刺激すると、 α SMA, コラーゲン I, III などの線維化マーカーの上昇に伴って、TRPC1, C4, C6, M4 の mRNA, TRPC1, C6 タンパク発現が著しく上昇した。この結果を踏まえて、TRPC のアイソフォームの RNA 干渉実験を行った結果、TRPC6 の siRNA は TGF β 1 による筋線維 α SMA の発現増加を抑制した。また 10%FBS 中の創傷治癒 assay において、TRPC1 の発現抑制により CCD18Co の遊走能の減弱が確認された。

【考察】線維化刺激に応答する TRP チャンネルは消化管筋線維芽細胞において、その活性化や細胞遊走能に関与し、筋線維芽細胞の Ca^{2+} シグナルを介して線維化の進行を制御する可能性が示唆された。

A17. PIP2 の枯渇による TRPC6 抑制機構の作用基盤とその生理的意義

今井裕子^{1,2}, 齊 郷平^{1,2}, 岡村康司³, 井上隆司², 森 誠之² (九州大学大学院歯学府全身管理歯科,²福岡大学医学部生理学,³大阪大学医学研究科統合生理学)

ホスホイノシチド (PIPs) は、種々のイオンチャンネルの重要な制御因子である。TRPC 分子ファミリーに属する TRPC6 は PI (4,5)P₂ から産生されるジアシルグリセロール (DAG) によって活性化される。昨年、電位作動性 PIPs 脱リン酸化酵素 Voltage-Sensing Phosphatase (VSP) を活性化することで、TRPC6 チャンネル電流の一過的な抑制 (VMI) を見出し、その抑制過程に PI (4,5) P₂ 脱リン酸化が関与していることを報告した (第 61 回西日本生理学会)。今回、PI (4,5) P₂ 枯渇作用を確認するため、分子・薬理的検討、更には抑制からの回復におけるキネティカルな解析を行った。その結果、PI (4,5) P₂ の VSP による枯渇は不完全であり、PI (4,5) P₂ 枯渇からの回復過程もしくは PI (4,5) P₂ バッファリング作用は非常に強いことが予測された。PI (4,5) P₂ 枯渇による抑制は、平滑筋由来 A7r5 細胞における TRPC6 様電流においても重要な機構であることが VSP 等を用いた実験から明らかとなった。最後に TRPC6 における PI (4,5) P₂ 作用部位について TRP-box 近傍領域について検討した。その結果 TRPC6 (R758Q) では VMI の減少とそれに伴った速い不活性化が観察された。以上の結果により、VMI と受容体刺激による不活性化には共通の分子機構の存在が示唆された。

A18. 破骨細胞分化に伴って発現する TRPM7 様電流の性質

岡本富士雄, 鍛冶屋 浩, 大城希美子, 根本哲臣, 岡部幸司 (福岡歯科大学・細胞分子生物学講座・細胞生理学分野)

【目的】我々は、前駆破骨細胞を破骨細胞分化誘導因子 RANKL で刺激すると、TRPV2 と TRPM7 の発現が高まることを見出し、TRPV2 が破骨細胞分化に必要な Ca^{2+} oscillation の形成に関与することを明らかにした。今回は、破骨細胞から TRPM7 様電流を導出してその性質を明らかにし、破骨細胞に TRPM7 が発現する意義を考察した。【方法】マウス骨髄マクロファージを RANKL で刺激して破骨細胞へ誘導した。細胞へ whole-cell patch-clamp 法を適用し、膜電位固定下にて陽イオン電流を記録した。【結果】破骨細胞に分化した細胞では、 Mg^{2+} 非存在下で、強い外向き整流性の陽イオン電流が誘発された。一方、RANKL 非刺激細胞ではこのような電流はほとんど誘発されなかった。破骨細胞に誘発される外向き整流性陽イオン電流は、細胞内液または細胞外液に生理的濃度の Mg^{2+} を添加すると強く抑制された。また、2-APB, carvacrol の細胞外投与によっても抑制された。逆に、この電流は細胞外液中の 2 価陽イオン除去、細胞外液の酸性化によって活性化した。酸性細胞外液中では電流の内向き成分のみが Mg^{2+} による抑制を受けなかった。【考察】破骨細胞から誘導した外向き整流性陽イオン電流は、その性質から TRPM7 の活性を反映している可能性が高い。酸性細胞外液中では、 Mg^{2+} 存在下でも内向き電流の活性化が保たれることは、酸性環境を形成し骨吸収を行う破骨細胞において、骨から溶出した Ca^{2+} や Mg^{2+} の細胞内輸送に適した性質であり、これらの輸送に起因するシグナルが骨吸収を制御する可能性が考えられた。

B19. マウス心筋 NCX 電流の細胞内カルシウム緩衝能依存性

塩谷孝夫 (佐賀大学医学部生体構造機能学講座器官・細胞生理学分野)

【目的】心筋細胞膜の Ca^{2+} -ATPase (PMCA) は、Na/Ca exchanger (NCX) の活性を調節していると考えられる。本研究では、この調節に対する細胞内 Ca^{2+} レベル ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の影響について調べた。【方法】マウス心筋細胞を 37°C の生理的条件下でホールセルクランプし、筋小胞体のリアノジン受容体および SERCA を抑制した条件で、保持電位 -48 mV からのランプパルスを用いて NCX 電流を記録した。【結果】NCX 電流の振幅は $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 依存性を示した。その EC₅₀ 値は、細胞内液のカルシウム緩衝能によって異なり、高い緩衝能の条件 (10mM-BAPTA) では 0.39 μ M, 低い緩

衝能の条件(0.1mM-EGTA)では0.76 μ Mであった。しかし、5(6)-carboxyeosin (20 μ M)の細胞内投与によってPMCAを選択的に阻害した条件では、NCX電流振幅の $[Ca^{2+}]_i$ 依存性はカルシウム緩衝能の影響を受けず、そのEC₅₀値は10mM-BAPTA存在下で0.43 μ M、0.1mM-EGTA存在下では0.45 μ Mであった。【結論】以上の結果は、心筋NCX活性の見かけの $[Ca^{2+}]_i$ 依存性がPMCAによって調節されていることを示し、その調節を、NCX分子やPMCA分子の存在する膜近傍のローカルなCa²⁺レベル変化が媒介していることを示唆する。

B20. 細胞レベルの酸素濃度勾配測定法

高橋英嗣 (佐賀大学大学院工学系研究科先端融合工学専攻)

酸素はミトコンドリアにおけるエネルギー産生に必須の分子であるが、最近、低酸素が広範な遺伝子応答を惹起し、癌をはじめとする種々の病態に中心的な役割を果たしている事が明らかとなった。しかしながら、肺胞や動脈血とミトコンドリアや細胞の酸素センシング分子の間にはきわめて大きな酸素濃度勾配が形成されるため、低酸素の病態生理解明には、ミトコンドリアや酸素センシング分子の存在する細胞内部の酸素濃度をダイレクトに測定する必要がある。われわれは光学的方法を用い、サブミクロンの空間分解能で単一細胞内部の酸素濃度を測定する手法を開発してきた。ラット単一心室筋細胞では、細胞質に存在するミオグロビンの光吸収およびミトコンドリアNADHの自家蛍光から、それぞれ細胞質酸素濃度とそれに対するミトコンドリア代謝応答をイメージングした。培養細胞においては一過性に発現したGFPの蛍光が低酸素で赤色化することを利用して、monolayer中に形成される酸素濃度勾配をイメージングした。現在、L-cysteineで表面を修飾した量子ドットを培養細胞内に導入し、ナノスケールの酸素イメージングを試みている。

B21. モルモット精囊の神経活動に依存しない機械刺激応答性収縮

武谷三恵¹、林篤正²、伊藤政之¹、石松秀¹、蓮尾博¹、中村桂一郎³、鷹野誠¹ (¹久留米大学・医学部・生理学講座統合自律機能部門、²久留米大学・医学部・泌尿器科学講座、³久留米大学・医学部・解剖学講座顕微解剖・生体形成部門)

我々は、高率に射精障害の副作用を呈することが知られている選択的 α_1A 遮断薬silodosinが交感神経作用遮断による精囊収縮不全をもたらすことを観察した際、精囊が神経活動に依存せず機械刺激に応答して収縮することを見出

した。モルモット精囊を摘出し、イルリガートルに接続し管腔内圧を測定した。精囊を拡張するためにイルリガートルの水面高を標本より0.5~1cm高くすると伝播性の収縮が発生し、さらに0.5cm刻みで上昇させると収縮頻度と収縮力がともに増大した。TTX (1 μ M)は精囊の電気刺激による収縮を完全に消失させたが、機械刺激応答性収縮には影響を与えなかった。細胞外液のCa²⁺を除去すると機械刺激が誘発する伝播性収縮は完全に消失した。Nifedipine (10 μ M)、thapsigargin (1 μ M)投与によっても、機械刺激応答性収縮は消失した。以上より、精囊には神経活動を介さず伸展刺激を感知して収縮を発生させる機構が存在し、それには細胞外のCa²⁺流入と貯蔵Ca²⁺の放出両者の関与が示唆された。免疫組織学的検討では精囊筋組織にc-kit陽性間質細胞は見出せず、ICC様細胞以外の関与が示唆された。

B22. CaMKII-dependent and independent facilitation of L-type Ca²⁺ channels by hydrogen peroxide in guinea-pig ventricular myocytes

L. Yang, J. Xu, E. Minobe, R. Feng, A. Kameyama, K. Yazawa, M. Kameyama (Department of Physiology, Graduate School of Medical & Dental Sciences, Kagoshima University, Kagoshima, Japan)

Cardiac voltage-gated Ca²⁺ channels (Cav1.2) are suggested to be modulated by reactive oxygen species (ROS), contributing to disorders of intracellular Ca²⁺ dynamics during cardiac ischemia. However, the mechanisms underlying the effect of ROS on the Ca²⁺ channels are so far controversial. In this study, we investigated possible underlying mechanisms using a patch-clamp method in guinea-pig single ventricular myocytes. Treatment of the myocytes with hydrogen peroxide (H₂O₂, 1mM) in the extracellular solution significantly increased Ca²⁺ channel activity in the cell-attached mode. A specific CaMKII inhibitor KN-93 (10 μ M) partially attenuated the H₂O₂-mediated facilitation of the channel, suggesting both CaMKII dependent and independent pathways for the H₂O₂ effect. To explore the possible CaMKII-independent mechanism of the H₂O₂ effect, we recorded Ca²⁺-channel currents in the inside-out mode, in which the channel activity was maintained with 1 μ M calmodulin (CaM) and 3mM ATP in an artificial intracellular solution. H₂O₂ (1mM) increased Ca²⁺ channel activity that was not inhibited by KN-93 (10 μ M). Since pretreatment of CaM with H₂O₂ did not reproduce the H₂O₂ effect on the channels, it was suggested that direct oxidation of the channel by H₂O₂ might underlie the facilitation of chan-

nel activity. Based on these results, we suggest that H_2O_2 facilitates the cardiac L-type Ca^{2+} channels probably through direct oxidation of the channels as well as indirect pathways involving activation of CaMKII.

B23. p38 MAP キナーゼ活性によって調節を受ける転写因子 Csx/Nkx2.5 及び GATA4 に依存する心筋イオンチャンネルの初期分化

鄭 明奇, 劉 剛, 小野克重 (大分大学医学部病態生理学)

【背景】 Csx/Nkx2.5 等の転写因子は心筋細胞固有イオンチャンネルの初期発現を制御する。【目的】 MAP キナーゼ (MAPK) 活性が心筋自動拍動の初期シグナルであることを証明する。【方法】 未分化 P19CL6 細胞に心筋分化誘導をかけ MAPK の心筋分化過程に及ぼす作用を検討した。【結果】 p38MAPK は分化誘導直後より活性化を受け、続いて Csx/Nkx2.5 の発現が上昇した。p38MAPK 阻害剤の存在下では分化誘導後にも細胞は自動能を示さず、L 型 Ca^{2+} 電流、T 型 Ca^{2+} 電流、及び過分極誘発内向き電流 (I_h) も記録されなかった。p38MAPK は GATA4 等の Csx/Nkx2.5 の下流転写因子の発現制御因子であることが示唆される。

B24. 先天性洞不全症候群 2 家系に同定された心筋 Na チャンネル変異の機能解析

阿部圭祐, 岡村 拓, 峰 沙織, 蒔田直昌 (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科内臓機能生理学)

今回、我々は 2 家系の先天性洞不全症候群を経験し、その遺伝子解析と機能解析を行った。家系 1 の発端者 (17 歳男性) は、母親が Brugada 症候群という家族歴を持ち、ホルター心電図で 6.6 秒の洞停止を示した。家系 2 の発端者 (19 歳女性) は、7.7 秒の洞停止を認めた。遺伝子解析の結果、家系 1 の発端者には心筋 Na チャンネル遺伝子 *SCN5A* の変異を 2 個 (M1880V, p.del801_803S) 同定した。家系解析の結果、p.del801_803S・M1880V 変異はそれぞれ父方・母方から遺伝した複合ヘテロ変異であることが判明した。家系 2 にはミスセンス変異 (R219H) を認められた。それぞれの変異 Na チャンネルを tsA-201 細胞にトランスフェクションし (複合変異は 2 つの変異を同時にトランスフェクション)、Na 電流を whole-cell パッチクランプ法で解析した。Na チャンネルの電流密度は、複合ヘテロ変異も R219H も正常に比べて低下していた。一方、Na チャンネルのゲート特性は、R219H が不活性化の膜電位依存性が有意に過分極側に 11.5mV シフトしていたのに対して、複合ヘテロ変異では活性化の膜電位依存性が有意に脱分極側に 8mV シフ

トしていた。また R219H では、不活性化からの回復が有意に遅延していた。これらのチャンネル特性は、いずれも Na チャンネルの電流低下をもたらす機能異常である。以上の結果から、今回同定した先天性 SSS の 2 つの *SCN5A* 変異は、それぞれ異なる電気生理学的機序によって洞結節内 (特に周辺部) の Na 電流が大きく低下させ、そのため活動電位の exit block が生じ洞機能が著明に障害されたものと推測された。

B25. Chemical modifications of mitochondrial tRNA by Cdk5rap1 regulates mitochondrial functions through the enhancement of precise protein synthesis.

(Cdk5rap1 によるミトコンドリア tRNA の化学修飾とそのミトコンドリア機能制御)

B. Zhou, F-Y. Wei, T. Kaitsuka, K. Tomizawa (Department of Molecular Physiology, Faculty of Life Sciences, Kumamoto University)

Cylin dependent kinase 5 regulator subunit associated protein 1 (Cdk5Rap1) was identified as an interacting protein of p35, an activator of Cdk5. However, the protein nature as well as its physiological function of Cdk5Rap1 is unknown. We reported the molecular and the physiological basis of Cdk5Rap1 in mammalian cells.

We identified that Cdk5rap1 was a radical-adenosylmethionine enzyme involved in thiolation and methylation of mitochondrial tRNA such as tRNA^{Phe} and tRNA^{Tyr}. Cdk5rap1 mediated the biosynthesis step for generating 2-methylthio-N⁶-isopentenyl-adenosine (ms²i⁶A), present at position 37 in tRNA, from the isopentenyl-adenosine (i⁶A) precursor. The ms²i⁶A modification of tRNA was critical for maintaining the precise reading frame during protein translation. In mammalian cells, knockdown of Cdk5rap1 caused aberrant protein synthesis in mitochondrial, and subsequent mitochondrial dysfunction.

B26. 8-アミノフラビンのメチル基置換による中点電位の変化

佐藤恭介¹, 二科安三², 志賀 潔³ (¹熊本大学大学院生命科学部・分子生理学分野, ²同 構造機能解析学分野, ³九州看護福祉大学・看護学科)

8-アミノフラビンは天然型フラビン分子の 8 位メチル基をアミノ基で置換したものである。アミノ基の二つの水素のうち一つをメチル基置換しても中点電位はあまり変化しないが、二つともメチル基置換すると、中点電位は大幅に

上昇することが知られている。この現象について、量子化学計算（密度汎関数法）を用いて解明を試みた。酸化型では π 相互作用がフラビン環全体に広がっており、8-Nとの二重結合性も強い。一方、還元型ではフラビン環の中心線を境に、二つの π 電子系が独立しているため、8-Nとの結合はより単結合に近い。アミノ基水素の一つは7位メチル基に近接している。一つ目のメチル基置換では、7位メチル基から遠位側の水素が置換されるため、構造変化も少なく、中点電位の変化も少ない。しかし、二個目のメチル基は7位メチル基と立体障害を生じるため、ジメチルアミノ基がフラビン環との結合軸を中心に回転する。この回転により二重結合性の強い酸化型の方が還元型よりエネルギーが上昇する。そのため、二つのメチル基がつくと、中点電位が上昇するものと考えられる。

B27. マウス一次視覚野における方位選択性の3次元的な機能構築

根東 覚, 大木研一 (九州大学大学院医学研究院分子生理学分野)

大脳皮質には、解剖学的に“ミニカラム”と呼ばれる微小単位構造が縦に存在し、これが機能的な単位構造でもある可能性が示唆されている。マウス1次視覚野において皮質表面に対して平行な平面で2光子カルシウムイメージングを行うと、方位選択性を同じくする細胞はネコやサルの場合のように集団を作らず分散している。しかしながら、方位選択性を同じくする細胞が3次元的にどのように配置しているかはイメージング装置の技術的な問題から未だ明らかになっていない。ミニカラムのように3次元的な細胞の配置を機能的に調べるためには、速い細胞活動の解析にも対応する高速でボリュームイメージングが可能な顕微鏡が必要だが、そのようなイメージング装置はなかった。この発表では方位選択性を同じくする細胞が3次元的にどのように配置されているのかについて、新しく開発された2光子励起顕微鏡を用いて調べた。これにより、 512×256 素子の平面画像を毎秒60フレーム撮像することが可能で、25倍の対物レンズを用いるとおよそ $400 \times 200 \times 100 \sim 200$ ミクロンの体積を持つ画像を毎秒1.5回取得することができる。この顕微鏡を用いて、視覚刺激を提示しながら高速に4次元(xyzイメージの経時画像)2光子カルシウムイメージを取得することに成功したので報告し、その結果について議論したい。

B28. 虚血再灌流負荷に対するフルクトース1,6ニリン酸の脳保護作用

徳丸 治¹, 黒木千尋¹, 尾方和枝¹, 北野敬明², 横井

功¹ (¹大分大学医学部神経生理学講座, ²大分大学医学部医学教育センター)

【目的】フルクトース1,6ニリン酸(FDP)は、解糖系の中間代謝産物であることに加えて、ラジカスカベンジ能をもち、心筋などで虚血再灌流(IR)負荷に対する保護効果が報告されている。我々は、リンを観測核とする核磁気共鳴法(³¹P-NMR)によりIR負荷前後のラット脳スライスエネルギー代謝を測定し、FDPの脳保護作用を検討した。【方法】ラット(6週齢, ♂)の脳スライスを人工脳脊髄液で灌流し、脳スライス中のクレアチンリン酸を³¹P-NMRにより経時的に測定した。IR負荷前後のATPはルシフェリン/ルシフェラーゼ法により定量した。FDPのラジカスカベンジ能は、電子スピン共鳴法(ESR)により測定した。【結果・考察】5mM FDPの灌流液への添加により、IR負荷後の脳組織中のクレアチンリン酸の回復が有意に改善した($p < 0.01$)。IR負荷後のATPの回復も有意に良好であった($p < 0.05$)。FDPのピークの化学シフトより虚血負荷および再灌流開始時に細胞内pHの環境に存在し徐々に減少するFDP分画が観察され、FDPの細胞内移行と消費が示唆された。ESRにより、5mM FDPには約20%のヒドロキシルラジカルのスカベンジ能が認められた。これらのことより、IR負荷に対し、FDPは細胞内に移行してエネルギー基質およびラジカスカベンジャーの両面から脳保護作用を有すると考察された。

B29. Naftopidilの脊髄膠様質細胞に対する作用の電気生理学的解析

謝 篤傑^{1,2}, 歌 大介^{2,3}, 服部 剛⁴, 笠原憲一⁴, 吉村 恵^{1,2} (¹熊本保健科学大学大学院・保健科学研究科, ²九州大学大学院・医学研究院・統合生理分野, ³自然科学研究機構・生理学研究所, ⁴旭化成ファーマ・開発薬理研究部)

Naftopidil(NP)は前立腺肥大症に伴う排尿障害改善薬として処方されている。その作用機序は前立腺平滑筋弛緩や、前立腺部尿道内圧を低下させることが考えられている。近年、NPをラット髄腔内投与することにより排尿反射を抑制したことが報告されており、NPの作用点が脊髄にも存在することが示唆されている。NPの脊髄作用機序を明らかにするため、ラット脊髄スライス標本を用いて膠様質細胞からパッチクランプ記録を行い、自発性sIPSCsと刺激誘起のeIPSCsの記録を行った。NPはsIPSCsの頻度を上昇させ、外向き電流を惹起した。また、eIPSCsの振幅も増加させた。以上の結果からNPは脊髄に作用し、GABAとglycineのリリースを増強して、下部尿路から求心性(痛覚等の)情報伝達に対して抑制的に働いている可能性が示唆された。

B30. 成熟ラット脊髄膠様質のTRPA1活性化を介したオイゲノールによる自発性グルタミン酸放出の促進

井上将成, 藤田亜美, 水田恒太郎, 上村聡子, 蔭昌宇, 八坂敏一, 柳 涛, 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)

パニコイド化合物のオイゲノールは月桂樹などの植物に含まれる油状成分で, 歯の鎮痛や抗炎症の作用を持つことから歯科で広く使用されている。昨年, 我々は, オイゲノールがtransient receptor potential (TRP) V1以外のTRPを活性化して脊髄後角第II層(膠様質)ニューロンの自発性興奮性シナプス伝達を促進することを報告した。今回, 我々は, 成熟ラット脊髄スライスの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膜電位を -70 mVに保持し, そのオイゲノール作用を詳しく調べた。オイゲノールによる自発性興奮性シナプス後電流の発生頻度の増加は濃度依存性であり, EC_{50} 値は 4.6 mMであった。保持膜電流変化について, 5 mM以下の濃度では外向き膜電流を生じたが, 7 mMのような高濃度では, この外向き膜電流に先行する内向き膜電流が見られた。TRPV1阻害薬のカプサゼピンに抵抗性であったオイゲノール効果は, TRPの非選択的阻害薬のルテニウムレッドばかりでなく, TRPA1の選択的阻害薬のHC-030031により抑制された。これらの阻害薬のすべては, オイゲノール誘起膜電流に作用しなかった。以上より, オイゲノールは, TRPA1活性化により自発性興奮性シナプス伝達をシナプス前性に促進すると共に, このチャネル非依存性に膜電位変化を生じると結論できる。

B31. ラット後根神経節ニューロンの活動電位のオピオイドによる抑制

水田恒太郎, 藤田亜美, 蔭昌宇, 井上将成, 上村聡子, 徐年香, 川崎弘貴, 松下晋大, 八坂敏一, 柳涛, 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)

我々は, 以前, 一連のオピオイド(モルヒネ, コデイン, エチルモルヒネ)がその受容体と無関係に蛙坐骨神経のA線維由来の複合活動電位を抑制することを明らかにしている。今回, このことをさらに検討するため, 成熟ラットの坐骨神経付き後根神経節のニューロンに細胞内ガラス微小電極法を適用し, 坐骨神経の電気刺激により誘起される活動電位(AP)を記録した。それらのオピオイドが異なった伝導速度の線維をもつ個々のニューロン($A\alpha/\beta$, $A\delta$, Cニューロン)のAPにどのような作用を及ぼすかを調べた。モルヒネ, コデインおよびエチルモルヒネは可逆的かつ濃度依存的に $A\alpha/\beta$ ニューロンのAP振幅を減少させた。 $A\delta$

ニューロンとCニューロンのAP抑制は強弱2つのパターンを示し, その弱い抑制は $A\alpha/\beta$ ニューロンのものとはほぼ同程度である一方, その強い抑制は $A\alpha/\beta$ ニューロンのものより大きかった。いずれのオピオイド作用もその受容体の非選択的阻害薬ナロキソン抵抗性で, μ , δ , κ 型オピオイド受容体作動薬(それぞれDAMGO, DPDPE, U-69593)はAPに作用しなかった。以上より, 一連のオピオイドは3種類のニューロンのいずれのAPもその受容体の活性化と無関係に抑制することが明らかになった。この作用は伝導速度が異なるニューロン間で異なること, また, 一連のオピオイドの抑制作用にその化学構造の違いが重要であることが示された。

B32. 脊髄後角膠様質興奮性介在ニューロンと非侵害受容神経終末間コンタクトの解析

八坂敏一¹, SYX.Tiong², E.Polgár², 藤田亜美¹, 熊本栄一¹, AJ.Todd² (¹佐賀大学医学部生体構造機能学講座, ²グラスゴウ大学神経科学心理学研究所脊髄グループ)

脊髄後角は末梢からの感覚情報を脳へと中継すると同時にその情報を修飾している。侵害受容線維の投射を受ける膠様質には多様な形態を持つ興奮性や抑制性の細胞が存在する。これらは全て介在ニューロンで感覚情報の修飾に重要であり, 形態学的に4つのグループに分類される。興奮性細胞の一種vertical cellは, 細胞体が膠様質浅層部に位置し, 樹状突起を深層へ, 軸索をI層の投射細胞へ伸ばしている。一方, 侵害受容性のA δ 線維はI層に, 非侵害受容性のA線維はIII層周辺から深層へと投射している。また, 前者の終末には小胞型グルタミン酸トランスポーター2(vGlut2), 後者の終末にはvGlut1が特異的に発現している。Vertical cellはA線維の入力を受けるが, どちらの入力を受けているのかは明らかでない。そこで, 今回vertical cellがvGlut1とコンタクトしているかを調べた。その結果, 調べた複数の細胞で, そのスパインとvGlut1終末がコンタクトしていることを観察することができた。このことは, vertical cellが, 侵害受容性I層投射細胞への非侵害受容性ポリシナプス入力のソースとなっている可能性があり, 興味深い。痛覚異常のメカニズムにこの‘非侵害受容性A線維-Vertical cell-I層投射細胞’の神経回路が関わっている可能性が示唆された。

B33. 急性疼痛による脊髄および視床下部における Fos タンパクの発現動態: c-fos-mRFP トランスジェニック ラットを用いた検討

石倉 透, 鈴木仁士, 大久保淳一, 吉村充弘, 大野素子, 加藤明子, 上田陽一 (産業医科大学医学部第1生理

学)

我々は、ニューロンの活動性の指標として汎用されている *c-fos* 遺伝子の発現を赤色蛍光タンパク (monomeric Red Fluorescent Protein : mRFP) で標識した *c-fos*-mRFP トランスジェニックラットを作出した. mRFP 蛍光を指標に *in vivo* の状態でニューロンの活動性を可視化することが可能となっている. mRFP 蛍光の発現パターンや時間経過は Fos タンパクの場合と同様と考えられるが、詳細は不明である.

そこで我々は、*c-fos*-mRFP トランスジェニックラットならびにウィスター系成熟雄性ラットにホルマリンもしくは生理食塩水を両足底部に皮下注射することで急性疼痛ストレスを負荷し、脊髄および視床下部における mRFP 蛍光を蛍光顕微鏡で、および Fos タンパクの発現を免疫組織学的染色法により観察した.

脊髄後角 (L3-5, I, II 層) および視床下部室傍核にホルマリン投与群では多数の、生理食塩水投与群では少数の赤色蛍光および Fos タンパク免疫陽性細胞が観察された. コントロール群では上記の部位には赤色蛍光および Fos タンパク免疫陽性細胞はほとんど観察できなかった. さらにこれらを皮下注射後 90 分、3 時間および 6 時間で比較することを試みた.

c-fos-mRFP トランスジェニックラットは中枢神経系での侵害受容機構を調べる上で有用な動物モデルである.

B34. db/db マウスの低重力適応性

渡邊佑基¹, 粟生修司¹, 成清公哉¹, 増田 明², 長谷川克也³, 糸井康弘⁴ (¹九州工業大学大学院生命体工学研究科, ²理化学研究所, ³宇宙科学研究所, ⁴東京医科歯科大学)

生物が水中 (0.15G) から地上 (1G) へ進出する時にレプチンが重要な役割を果たしていることが知られている. このことから、重力環境調節信号としてレプチンが使われている可能性があり、レプチン受容体が欠損している db/db マウスは低い重力に応答するかもしれない. そこで本研究ではレプチン受容体が欠損している db/db マウスを用いて、低重力フライト時の行動応答について調べた. 火星の重力である 0.3G 下での control 群と db/db マウスは共にわずかなもがき行動を示したが、組み合わせ行動を示す個体はいなかった. 月の重力である 0.15G 下でも同様に、わずかなもがき行動を示すだけで、組み合わせ行動までには至らなかった. μG ($<0.01\text{G}$) 下では、両群共にもがき行動を示し、組み合わせ行動を示す個体もいた. その中でも db/db マウスは仲間同士でしがみつくまでの潜時が短く、その持続時間も長かった. 低重力フライト後の回復も、db/db マウスの

方が早く、摂食行動が早期に復活し、静止・睡眠へ早期に移行した. 低重力環境では体重増加の負担が軽減され、また骨量減少に対する抵抗性もあるため、db/db マウスの方が control 群と比較して、低重力環境に適応しやすいと示唆される.

B35. ラットセルフグルーミングの情動的意義

塩田 昇^{1,2}, 成清公哉¹, 粟生修司¹ (¹九州工業大学生命体工学研究科, ²西南女学院大学保健福祉学部看護学科)

健常状態のラットは鼻先・顔面から駆幹部に至る一連の順序だった毛づくろい行動 (グルーミング) を示すが、ストレス環境では分断的なグルーミングが誘発され、その機能的意義が異なる可能性が示唆されている. 不安レベルの高いラットはストレス環境でグルーミングを長時間示し、その情動的意義が調べられているが、健常状態のグルーミングの情動的意義はよくわかっていない. 本研究では雄性 Wistar ラットを用い、順化暗条件下の霧吹きにより誘発したグルーミングと新奇明条件下のオープンフィールド試験および高架十字迷路試験におけるグルーミングの情動特性を比較検討した. 順化暗条件下の霧吹き誘発性グルーミングは顔から駆幹部に至る非ストレス性の特徴を示し、その持続時間は強制水泳試験における不動時間 (うつ様行動) と負の相関を示した. 一方、新奇明条件下のオープンフィールドおよび高架十字迷路試験におけるグルーミングはストレス性の分断的グルーミングであり、これらの持続時間とうつ様行動には相関がなかった. 以上の結果は、非ストレス性グルーミングの特徴を示す霧吹きにより誘発されたグルーミング行動がうつ抵抗性に関係する可能性を示唆する.

B36. 社会性の生存戦略

粟生修司¹, 成清公哉¹, 金丸 愛¹, 河村尚葵¹, 増田明² (¹九州工業大学大学院生命体工学研究科, ²理化学研究所)

他個体が存在する社会的環境ではさまざまな行動が修飾されることが明らかになっているが、その基本法則はよくわかっていない. ラットおよびサルを用い、報酬獲得行動、危険回避行動およびこれらに付随する情動反応に社会的環境がどのような影響を及ぼすか系統的に検討した. 他者の存在下でラットに食物を提示すると、非存在下と比較して食物探索時間が増加し、新奇食物への接近行動も促進した. さらに食物摂取までの潜時が短縮したが摂食量は差がなかった. 他者存在下の受動的回避学習試験では、ラットの回避行動が安全な環境では減弱し、危険な環境では増強した. 社会性の獲得や維持には化学環境も重要な因子であり、

1-ブロモプロパンの胎生期曝露で群れ環境におけるラット個体間距離が延長し、雄ラットの活動性が増加した。テストステロンの雌サルへの鼻腔投与は血中テストステロン増加時には性行動の促進と攻撃性の増加が認められ、さらにその後も報酬認知の攪乱が認められた。報酬獲得・危険回避ともに自己の生存確率を高めるような社会的修飾を受けるが、状況や経験、化学環境に依存することが明らかになった。

B37. 高血圧自然発症ラット青斑核における Norepinephrine 応答

井形幸代, 石松 秀, 伊藤政之, 鷹野 誠 (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モデル動物である高血圧自然発症ラット (SHR) および対照ラット (Wistar) の青斑核 (LC) スライス標本を用いて、whole cell patch clamp 法にて膜電位固定し LC ニューロンより全膜電流を記録した。保持電位 -70mV において Norepinephrine (NE, $3\mu\text{M}$) は SHR においてのみコンダクタンスの上昇を伴う内向き電流を発生させた。高濃度 NE ($>10\mu\text{M}$) は内向き整流性 K^+ 電流を活性化させ外向き電流を発生させたが、その振幅は Wistar より SHR において有意に小さかった。一方、 $\alpha 1$ 受容体の antagonist である Prazosin (30nM) は SHR において NE 誘起外向き電流を大きくした。また、 $\alpha 1$ 受容体 agonist である Phenylephrine (PE, $30\mu\text{M}$) は SHR において NE ($3\mu\text{M}$) 同様の内向き電流を発生させた。この PE 誘起内向き電流は transient receptor potential (TRP) channels の阻害剤である 2APB により抑制された。以上のことから、SHR では NE により $\alpha 1$ 受容体が活性化し TRP channel が活性化することで内向き電流が発生し、NE 誘起外向き電流が相殺しているものと考えられた。

B38. 抗うつ薬フルオキサセチン慢性投与によるマウス海馬歯状回におけるシナプス伝達の促進効果

蓮尾 博¹, 首藤隆秀², 西 昭徳² (¹久留米大学医学部生理学講座統合自律機能部門, ²久留米大学医学部薬理学講座)

近年、抗うつ薬の海馬歯状回における作用として、成体ニューロン新生の促進が知られている。最近、抗うつ薬であるフルオキサセチン (FLX) が成熟した歯状回顆粒細胞の未熟化(脱成熟化)を誘導することが報告されている。我々の研究でも、FLX の慢性投与 (14 日間) した C57BL/6 マウスの歯状回で成熟ニューロンのマーカーとなるタンパク群の発現量が減少しており、脱成熟化が示唆されている。また興味あることにドーパミン受容体 (D1R) 遺伝子発現量

の増加がみられている。今回我々は FLX 慢性投与による神経機能的変化について、*in vitro* で電位感受性色素を用いた光学的測定法により、貫通線維刺激によって誘発される歯状回における神経活動を検討した。その結果、プラセボ投与群に比べて FLX 投与群では有意に光学的応答が強く、シナプス伝達が促進されていることが示唆された。この光学的応答は D1-like-R 選択的阻害剤の灌流投与では影響を受けなかったが、この受容体の選択的作動薬を投与すると光学的応答の促進がみられた。これらのことから、FLX 慢性投与により海馬歯状回における内側貫通線維—顆粒細胞シナプス伝達の可塑的促進が起り、これに D1R を介する調節系が働いている可能性が示唆された。

B39. 新しいベンゾジアゼピン受容体作動薬 JM1232 (一)は脊髄後角ニューロンの抑制性シナプス伝達を促進する

上村聡子, 藤田亜美, 八坂敏一, 蔭 昌宇, 水田恒太郎, 川崎弘貴, 井上將成, 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)

JM1232(-) はイソインドリン誘導体の構造を持つ水溶性の新しいベンゾジアゼピン受容体作動薬であり、その鎮痛作用が注目されている。ラットのくも膜下および腹腔内に JM1232(-) を投与すると、疼痛閾値が上がるのが行動学的に証明されている。しかし、細胞レベルでの鎮痛薬としての作用機序は不明である。脊髄後角第 II 層(膠様質)において、末梢から入力した痛み情報が、脊髄に内在する、あるいは上位中枢から投射している疼痛調節機構により修飾される。我々は、成熟雄性ラットの脊髄横断スライスの膠様質ニューロンにパッチクランプ法を適用して、自発性の興奮性および抑制性のシナプス伝達に及ぼす JM1232(-) の作用を調べた。JM1232(-) $1\mu\text{M}$ は自発性興奮性シナプス後電流の振幅、発生頻度および下行相に影響を及ぼさなかった。一方、抑制性シナプス伝達に関しては、 GABA_A 受容体を介した自発性抑制性シナプス後電流 (sIPSC) の振幅を変化させずに発生頻度を増加させ、下行相を延長させた。またグリシン作動性 sIPSC でも振幅を変化させずに発生頻度を増加させた。一方、下行相の延長は認められなかった。以上の結果から JM1232(-) は脊髄膠様質において、神経終末からの GABA やグリシンの自発放出を増加させたり、 GABA_A 受容体活性化の持続時間を延長させて抑制性シナプス伝達を促進することが明らかになった。

B40. 成熟ラット脊髄後角膠様質ニューロンの自発性興奮性シナプス伝達に対するピペリンとオルバニルの作用

楊 柳, 藤田亜美, 蔭 昌宇, 水田恒太郎, 井上將

成, 上村聡子, 八坂敏一, 柳 涛, 徐 年香, 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)

脊髄後角第II層(膠様質)における1次感覚ニューロンの中枢端に発現しているtransient receptor potential (TRP)チャンネルの性質にはまだ不明な点が多い。これを明らかにするため、脊髄横断薄切片の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、自発性興奮性シナプス伝達に対するピペリン(黒胡椒に含まれるバニロイド化合物)とオルバニル(合成バニロイド)の作用を調べた。オルバニル(0.1~20 μ M)は自発性興奮性シナプス伝達に作用しなかった。一方、ピペリンは可逆的および濃度依存的に自発性興奮性シナプス後電流の発生頻度を増加さ

せ、そのEC₅₀値は52 μ Mであった。この促進作用は繰り返し見られた。ピペリン作用はTRPV1阻害薬カプサゼンとTRPA1阻害薬HC-030031の両方により抑制されたが、後者の作用はTRPV1への非特異的作用によると考えられた。以上より、1次感覚ニューロンの細胞体においてTRPV1作動薬として働くピペリンとオルバニルについて、ピペリンはその中枢端においてTRPV1チャンネルを活性化させて膠様質ニューロンへ起こるグルタミン酸の自発放出を促進することが明らかになった。オルバニルはそれらのTRPチャンネルを活性化しなかった。これらの結果より、1次感覚ニューロンの細胞体と中枢端においてはTRPV1チャンネルの性質が異なる可能性が示唆された。