

## 第 105 回近畿生理学談話会

日 時：平成 24 年 9 月 29 日（土）  
 場 所：関西医科大学 滝井学舎 1 号館  
 当 番：関西医科大学第一生理学講座 松田博子  
 参加者数：80 名  
 演 題 数：37 題

9 月 29 日に、関西医科大学滝井学舎で、第 105 回近畿生理学談話会を開催しました。参加者は 80 名（一般 61 名、学生 19 名）、演題数は 37 題（一般 25 題、学生 12 題）でした。午前中のおもにイオンチャンネルに関する 9 題は一会場で、午後からは、神経生理と一般生理に分け、二会場それぞれ 14 題の発表がありました。座長は若手から選ぶという趣旨で、前回に引き続き、発表を終えた演者に、次の演題の座長を依頼しました。活発な討議が行われ、予定時間より 30 分遅れて、終了しました。評議員会で、次回の当番は奈良県立医科大学第一生理学講座の山下勝幸先生に決定しました。

## 膵臓導管細胞に機能発現するカリウムイオンチャンネル

○林 美樹夫<sup>1,2</sup>, J. Wang<sup>2</sup>, I. Novak<sup>2</sup>, 松田博子<sup>1</sup>（<sup>1</sup>関西医科大学生理学第一講座, <sup>2</sup>Department of Biology, University of Copenhagen）

カリウムイオンチャンネル（K チャンネル）は膜電位を維持することで、上皮細胞における陰イオン分泌に駆動力を与える。重炭酸イオン分泌上皮の膵臓導管細胞において、K チャンネルの生理機能については不明の点が多い。本研究では、膵臓導管細胞に機能発現する K チャンネルの分子基盤を明らかにした。まず RT-PCR 法を用いて、KCNN4, KCNQ1, KCNH2, KCNH5, KCNT1 および KCNT2 分子の発現を認めた。次に免疫組織化学法を用いて、KCNN4 がコードする K<sub>Ca</sub>3.1 蛋白が管腔側膜および血管側膜に分布することを観察した。さらに導管細胞の単層培養を用いた短絡電流測定において、K<sub>Ca</sub>3.1 蛋白が構成する Ca 依存性 K チャンネル機能を薬理的に認めた。また、K<sub>Ca</sub>3.1 チャンネル遮断薬は新鮮分離導管細胞の静止膜電位を脱分極させた。それに加えて非刺激時の導管細胞において、80pS の単一チャンネルコンダクタンスを認めた。これらの結果は、K<sub>Ca</sub>3.1 チャンネルが導管細胞の膜電位を維持し、膵液分泌に駆動力を与える可能性を示唆する。

環境温度による TRPM8 の温度閾値は PIP<sub>2</sub> の結合を介して変化する

○藤田郁尚<sup>1</sup>, 高石雅之<sup>1</sup>, 内田邦敏<sup>2</sup>, 曾我部隆彰<sup>2</sup>, 富永真琴<sup>2</sup>（<sup>1</sup>株式会社マンダム, <sup>2</sup>自然科学研究機構）

近年、温度感受性 TRP（Transient receptor potential）

チャンネルの研究の進展によって温度感覚の分子メカニズムが明らかになりつつある。しかし、環境温度の変化によって起こる温度感覚の相対性（同じ温度でもその前に暴露されている温度によって温かくも冷たくも感じることは、現在明らかになっている温度感受性 TRP チャンネルの温度受容分子メカニズムでは説明ができない。それは、温度感受性 TRP チャンネルの温度閾値が環境温度に左右されないと考えられているからである。冷刺激受容体である TRPM8 は約 27°C の活性化温度閾値を持つが、それが環境温度によって変化するという報告はない。本研究では、TRPM8 の活性化温度閾値が環境温度によって変化するかどうか、TRPM8 を強制発現させた HEK293 細胞を用いた電気生理学的手法によって調べた。その結果、ラット及びヒト TRPM8 の活性化温度閾値は環境温度に依存して変化する事が明らかになった。また、この活性化閾値の変化は phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) を減少させる種々の薬剤で、有意に抑制されることを見出した。PIP<sub>2</sub> は TRPM8 の C 末端に結合して活性を抑制することが知られているが、既知の PIP<sub>2</sub> 結合部位のうち、1008 番目のアルギニンの点変異体では、環境温度による活性化閾値変化が観察されなかった。これらの結果より、TRPM8 の活性化温度閾値は環境温度によって PIP<sub>2</sub> の結合を介して変換することが示された。

## 周産期の低酸素受容に対する TRPA1 チャンネルの関与

○志賀真理<sup>1</sup>, 小林希実子<sup>2</sup>, 下村英毅<sup>3</sup>, 谷澤隆邦<sup>3</sup>, 野口光一<sup>2</sup>, 荒田晶子<sup>1</sup>（<sup>1</sup>兵庫医科大学生理学・生体機能部

門,<sup>2</sup>同 解剖学・神経科学部門,<sup>3</sup>同 小児科学)

周産期における中枢性化学受容体の低酸素に対する反応性において、末梢性化学受容体で低酸素の情報を担う TRPA1 チャンネルが中枢性化学受容体に関与しているのかわかりませんが、そこで、周産期の中枢性化学受容体における低酸素作用に対する TRPA1 チャンネルの関与について検討した。実験には、胎生期および新生期のラットから延髄・脊髄を取り出した摘出脳幹-脊髄標本を用い、第4頸髄前根から吸気性活動を記録し、低酸素状態における呼吸リズムの反応性を調べた。さらに、TRPA1 チャンネルの分布を in situ hybridization 法を用いて明らかにした。その結果、胎生 18 日 (E18) から生後 1 日 (P1) では、低酸素負荷によって C4 リズムは促進し、生後 2 日 (P2) では抑制することが分かった。また TRPA1 チャンネルアゴニストは E18~P1 の呼吸リズムを促進し、P2 以降では抑制した。周産期の TRPA1 チャンネルは、中枢性化学受容体の存在する顔面神経核の後傍や疑核、後顔面神経核とその周辺に局限して出現していた。これらの結果は、周産期の化学受容体 TRPA1 チャンネルの関与の可能性が示唆された。

#### 内向き整流性カリウムチャンネルにおける G 蛋白質結合とゲート開閉の共役

○稲野 厚<sup>1</sup>、中川敦史<sup>2</sup>、倉智嘉久<sup>1</sup> (<sup>1</sup>大阪大学大学院医学系研究科分子・細胞薬理学、<sup>2</sup>大阪大学蛋白質研究所)

マルチドメインから構成される蛋白質の機能は、各ドメインにおける構造的平衡とドメイン間のアロステリックな共役によって調節される。内向き整流性カリウム (Kir) チャンネルは細胞質ドメインと膜貫通ドメインから構成される典型的なマルチドメイン蛋白質であり、その細胞質ドメインは多くの活性調節因子を結合し、膜貫通ドメインのゲートの開閉を調節する。今回我々は G 蛋白質制御 Kir チャンネル Kir3.2 におけるドメイン間の機能的な共役について解析した。電気生理学的、構造生物学的検討によって、細胞質ドメインには細胞膜に面した 2 つの特徴的な構造成分 (CD 成分と HI 成分) が存在することが判った。HI 成分はサブユニットの協働的な動きに関与し、ゲートの際に膜貫通ドメインと共に動いていた。一方、CD 成分は HI 成分と  $\beta$  シートを形成して隣接することで、HI 成分の動きを制限していた。G 蛋白質の結合は CD 成分の位置を変化させる。そのため、膜貫通ドメインと連動する HI 成分の動態の制御が、細胞質ドメインによる G 蛋白質依存性の Kir チャンネルの活性化に重要であると考えられた。

#### 電位依存性 H<sup>+</sup>チャンネルのゲーティングと構造基盤

○藤原祐一郎、黒川竜紀、岡村康司 (大阪大学大学院医学系研究科統合生理学)

電位依存性 H<sup>+</sup>チャンネルは電位依存性チャンネルの電位センサー領域 (S1-S4) に相同性の高い膜タンパク質で、2 量体として発現し機能する。2 量体化には S4 ドメインの直後に位置する細胞内コイルドコイル領域が寄与している。これまで、膜貫通領域 (S1-S4) の配置や細胞内コイルドコイル領域との関係、及びその機能的意義は明らかにされていない。今回、コイルドコイル領域を 1 アミノ酸残基ずつ上流及び下流に移動した変異体チャンネルのゲーティングキネティクスを解析したところ、 $\sim 100^\circ/\text{res.}$  の周期性を呈してキネティクスが変化した。膜貫通領域に Cys 残基を導入し、2 量体サブユニット間でのジスルフィド結合による架橋確率を計算した。2 量体間で近接する残基が明らかとなり、S4 ヘリックスの片側に一列に並び面を構成する形で存在した。ゲーティングのキネティクスが変化する変異体チャンネルでは S4 間の架橋が消失した。以上の解析は、細胞内コイルドコイル領域は膜貫通領域 S4 と一連のヘリックスを構成しており、2 量体間で S4 同士が近接し、その近接面はコイルドコイルコアから連続する形で形成されている。そして、S4 同士が近接した膜貫通領域の配置が特徴的な緩やかなゲーティングキネティクスを生み出していることを示唆する。

#### 分岐解析法の Na チャンネルによる不整電気活動への応用

○堀川悠介、野間昭典 (立命館大学大学院生命科学部生命情報学科)

心筋自発活動電位は正常な洞房結節細胞のみでなく、病態生理下の心室筋細胞にも見られる。我々は、ヒト心室筋細胞モデルにおいて、Na チャンネル遅延不活性化成分 ( $I_{\text{NaL}}$ ) 増大による Early After Depolarization (EAD) を観察した。そこで、洞房結節細胞を模した自発活動電位を作る minimum model を作成し、心室筋細胞モデルと minimum model に分岐解析法を適用して、平衡点 (EP) とリミットサイクル (LC) を求めた。minimum model の分岐図では、 $G_{\text{Na}}$  を変化させたところ、 $G_{\text{Na}}$  が小さいと静止電位付近に安定 EP が、適当な範囲では不安定 EP の周りに安定 LC が、大きい領域では脱分極レベルに安定 EP が見られた。つぎに心室筋細胞で  $I_{\text{NaL}}$  の不活性化指数を変化させて分岐図を求め、minimum model の分岐図と比較した。心室筋細胞モデルの分岐図では、安定と不安定、EP と LP の様々な組み合わせは minimum model より多様で、分岐点を境にして動作様態を分類でき、それぞれについて膜興奮パターンとそのイオン機序を特定することができた。そこで、心室

筋細胞のEADについて、その発生原理と安定性について考察する。

#### 細胞内Cl<sup>-</sup>がリソソームのpHを制御し、オートファジーを制御する

○細木誠之<sup>1</sup>、宮崎裕明<sup>1</sup>、横山紀子<sup>1</sup>、新里直美<sup>1,2</sup>、楠崎克之<sup>1,2</sup>、丸中良典<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>京都府立医科大学大学院医学研究科細胞生理学、<sup>2</sup>平安女学院大学日本食育・健康研究所)

リソソームはタンパク分解において重要な細胞内小器官であり、タンパク分解機能においてリソソーム内pHは非常に重要である。そのpH制御には細胞内Cl<sup>-</sup>が重要な役割を果たしている。さらにリソソームは自己成分の分解・再利用を行うため全真核生物が備える重要な細胞内大規模分解システムであるオートファジー機能を有している。今回我々は、細胞内Cl<sup>-</sup>濃度を変化させ、リソソーム内pHやオートファジー機構に及ぼす影響を胃癌細胞株であるMKN28を用いて評価した。その結果、細胞外Cl<sup>-</sup>濃度低下による細胞内Cl<sup>-</sup>濃度の低下を確認した。細胞内Cl<sup>-</sup>濃度低下により、1)細胞増殖抑制、2)G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> arrest、3)リソソーム内H<sup>+</sup>濃度低下(pH上昇)、4)リソソームマーカーLAMP1上昇、オートファジー障害マーカーp62増加を認めた。これらの結果から、細胞内Cl<sup>-</sup>濃度変化によりオートファジー機能が制御されていることが明らかとなった。癌細胞でのCl<sup>-</sup>輸送の特殊性を更に探索することにより、Cl<sup>-</sup>濃度調節を介してリソソーム内のオートファジー機能を制御しているCl<sup>-</sup>チャンネル・輸送体分子・調節分子が癌治療における新規標的分子になり得ることが示唆された。

#### 慢性心不全発症における体内時計の役割

○向阪 彰<sup>1</sup>、出口蓉子<sup>1</sup>、和気秀文<sup>1</sup>、ダスパルタ<sup>1</sup>、グホサピン<sup>1</sup>、村垣泰光<sup>2</sup>、前田正信<sup>1</sup> (<sup>1</sup>和歌山県立医科大学医学部生理学第二講座、<sup>2</sup>同 病理学第一講座)

生体リズムを支配する体内時計の異常が、さまざまな疾患の発症に関わっている可能性が報告されてきた。慢性心不全は、生活習慣とも密接にかかわる病態であるが、生体リズムの異常がその発症にどのように関わっているのかは未だ明らかではない。そこで我々は、時計遺伝子 *Bmal1* の心臓特異的ノックアウト (*H-Bmal1*<sup>-/-</sup>)マウスを用いて、慢性心不全発症における体内時計の関与について解析した。興味深いことに、*H-Bmal1*<sup>-/-</sup>マウスでは、心室壁の肥大を伴った心拡大が認められ、また、心不全のマーカーであるANPおよびBNPの遺伝子発現が有意に上昇していた。マイクロアレイを用いたゲノムワイドな遺伝子発現解析では、*H-Bmal1*<sup>-/-</sup>マウスの心臓において、細胞内カルシウム代謝、エネルギー代謝等、心機能維持に関わる遺伝子

の発現が低下していた。なかでもエネルギー代謝に関連した一連の遺伝子で広範な発現異常を認めた。以上の結果は、心臓の時計遺伝子が心臓のエネルギー代謝調節に必須であり、心機能維持において重要な役割を果たしている可能性を示唆していた。そして、生体リズムの障害が心不全発症に関与する可能性が考えられた。

#### イモリ嗅細胞膜におけるNFAによる電流抑制

○粗野太希、倉橋 隆 (大阪大学大学院生命機能研究科生理学研究室)

嗅細胞は双極性の受容器細胞で、細胞機能に合わせて機能分子が空間的に局在しており、細胞体やデンドライトには静止電位形成や活動電位発生に関与するイオンチャンネル(電位依存性Naチャンネル、電位依存性Kチャンネルなど)があることが知られているが、そのメカニズムの全ては未だ明らかになっていない。本研究ではイモリ嗅細胞細胞体膜及びデンドライトにNiflumic acid (NFA)によって阻害され反転電位を0mV付近に持つチャンネルが存在することが示唆されたので報告する。各種チャンネルをイオン置換や薬物により阻害し、パッチクランプ法のwhole cell-modeにて保持電位-100mVで200msのパルスを-80mVから+80mVまで10mV間隔で与え、嗅細胞膜を流れる電流を取得した結果、内向き電流成分は一過性のものと持続性のものが観察され、それぞれT型及びL型電位依存性Caチャンネル電流によるものであると考えられた。しかし、NFAを0.5mM加えて同様に観察したところ、一過性の内向き電流が大きく抑制された。また、NFAにより抑制された電流はネルンストの式より求められたCl<sup>-</sup>の反転電位(-2.76mV)に近い値で反転した。このことから、細胞体膜及びデンドライトでもシリアと同様にCa依存性Cl<sup>-</sup>チャンネル(Cl<sub>(Ca)</sub>)によって内向き電流が増幅されている可能性がある。

#### HCNチャンネルは、マウス嗅覚神経細胞の自発発火活動を制御し、嗅球への軸索投射に影響を与える

○中島則行、石井孝広、大森治紀 (京都大学大学院医学研究科神経生物学)

嗅神経細胞の嗅球軸索投射が自発発火活動で制御されることが知られている。今までに、マウス嗅上皮で大口徑パッチ電極によるマルチユニット記録を行い、嗅神経細胞の自発発火がHCNチャンネル活性による膜脱分極でブーストされること、さらにHCNチャンネルを活性化する基底cAMPレベルはβ2アドレナリン受容体ADRB2の基底活性化で維持されることを発見した。今回、HCN4サブユニットを過剰発現するノックインマウスでは嗅神経細胞の自発発火頻

度が上昇し、さらに嗅神経細胞の投射先である嗅球糸球体の数が減少することを Tet-off システムを用いることで発見した。Tetracycline 誘導体の投与により HCN4 発現をノックダウンする事で自発発火活動が減少し、糸球体の数も回復することは確認した。以上により HCN チャンルの基底状態での活性化が、嗅神経細胞の自発発火活動レベルを変えること、その結果として嗅球での嗅神経細胞のネットワーク形成が制御されることが強く示唆された。

#### コルク汚染は 2,4,6-Trichloroanisole による嗅細胞 CNG チャンネル抑制である

○竹内裕子<sup>1</sup>、加藤寛之<sup>2</sup>、倉橋 隆<sup>1</sup> (<sup>1</sup>大阪大学大学院生命機能研究科、<sup>2</sup>大和製罐総合研究所)

ワインのコルク汚染で有名な 2,4,6-Trichloroanisole (TCA) は、ワインに 1ppt (30pM) 含まれるだけで風味低下を引き起こす。今回、我々は単離嗅細胞において TCA が極低濃度で嗅覚情報変換チャンネルである CNG チャンネルを阻害することを見出した。TCA は CNG チャンネルの特異的阻害剤の L-cis-diltiazem の 100 倍、最強の嗅覚マスキング剤の 1 つ Geraniol の 1,000 倍の強度を持つ。最少有効濃度は 1aM で、1mm<sup>3</sup> に 1 分子以下の溶液でも抑制が見られた。この高効率性はチャンネル抑制の時間積分で生じるらしい。TCA 誘導体の抑制は TCA ≥ TBA > TCP ≥ Phenol となり、ヒト官能検査結果と一致することや 1ppt 溶液から一度空气中に揮発した TCA も阻害効果を持つことから CNG チャンネル抑制が風味阻害に直接関与する可能性が高い。既に我々は CNG チャンネル抑制と物質 LogD との間に正の相関を認めているが、高 LogD の TCA 誘導体 Haloarene (Trichlorofenotole) では更に強い電流抑制が見られた。本研究から食品風味阻害機構のみならず、強力なチャンネルロッカーを分子設計する可能性が示唆される。

#### 蛍光パッチ電極法による電気記録と蛍光信号の同時計測

○西野恵里、大森治紀 (京都大学大学院医学研究科神経生物学)

2 光子励起顕微鏡や Ca イメージングは高解像度で蛍光シグナルを画像化する優れたシステムであるが、脳表から 1 ミリ程度の深さが画像化の限界である。我々は、石英パッチ電極を光導体とすることで蛍光シグナルと細胞電気活動を同時計測できる蛍光電極法を開発した。この手法により、蛍光物質を指標とした神経細胞の同定や、蛍光指示薬による細胞内 Ca 等の物質動態と電気活動の同時計測が脳深部において可能となり、神経回路機能の解析に大きな成果が期待される。

現在、脳切片標本を用いた予備実験を行っている。これ

までは分光器を用いた画像化システムにより蛍光シグナルをスペクトル分解し様々な背景ノイズを同定して取り除き、目的とする蛍光シグナルの検出効率を上げる実験を進めた。その結果、細胞内 Ca 動態の FRET 計測等が可能になったが、蛍光スペクトルを画像化するために時間分解能が 1 秒程度と低いのが欠点である。そこで干渉フィルターで分光しホトマルで計測するシステムを新たに作成し、時間分解能を高めてアンサンブル平均を取ることでより高速に安定して微細な蛍光シグナルを計測することを可能にした。具体的には Ca 指示薬である Oregon Green BAPTA-1 を導入した神経細胞から、1 回の電気刺激に応答する蛍光シグナルと逆行性活動電位の同時計測が可能になった。今後、動物個体脳への応用に向けてシステムの改良と蛍光物質の選別等を進める。

#### 終神経 GnRH ニューロンにおけるバースト活動の誘起

○河合喬文<sup>1,3</sup>、阿部秀樹<sup>2,3</sup>、岡 良隆<sup>3</sup> (<sup>1</sup>大阪大学院・医・統合生理学、<sup>2</sup>名古屋大学院・生命農・水圏動物学、<sup>3</sup>東京大学院・理・生物科学)

ペプチドニューロンは脳内の広範な領域へ投射し、線維からのペプチド放出により神経回路の情報処理を調節するが、このペプチド放出にはとりわけ自らのバースト発火活動が重要である。本研究で着目する終神経 GnRH 神経系は神経ペプチド GnRH (生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン) を脳内に放出し、個体の感覚情報処理の促進などに関わると考えられている。終神経 GnRH 神経系は通常規則的な発火活動を示すが、そのバースト発火誘起機構についてはこれまで知見が存在しなかった。我々は本研究において、終神経 GnRH 神経系が、その近傍への単発電気刺激によって一過性のバースト活動を示すことを見出した。解析の結果、この現象はコリン作動性入力による slow IPSP によることが明らかになった。即ち、ムスカリン型アセチルコリン受容体の活性化によって K<sup>+</sup>チャンネルが開き、一過性の過分極応答がもたらされる。次にこの過分極応答によって電位依存性 Na<sup>+</sup>チャンネル及び電位依存性 Ca<sup>2+</sup>チャンネルの不活性化状態が解かれ、その結果リバウンドバースト活動が生じることが明らかとなった。以上の内容はペプチドニューロンにおけるバースト活動誘起について、新たな機構の存在を示唆する。

#### 慢性拘束ストレス後の中脳中心灰白質における GFAP および glutamate transporter の減少

○井辺弘樹、木村晃久、堂西倫弘、金桶吉起 (和歌山県立医科大学生理学第一講座)

ストレスは疼痛反応に大きな影響を及ぼすことが知られ

ているが、そのメカニズムは現在まで明らかにされていない。今回、我々は、亜急性 (6h/day, 3days) もしくは慢性拘束ストレス (6h/day, 3weeks) をラットに負荷し、中脳中心灰白質における GFAP および glutamate transporter (EAAT2) の発現変化を調査した。慢性拘束ストレス群では著明な機械刺激に対する反応閾値の低下と攻撃行動が観察された。そして、慢性拘束ストレス群では、中脳中心灰白質における GFAP は naïve 群に比し、有意に減少することが明らかとなった ( $32.0 \pm 8.9\%$ ,  $p < 0.05$ )。免疫組織化学的解析から GFAP の減少は中脳中心灰白質腹外側部において著明であった。さらに、慢性拘束ストレス群における EAAT2 レベル ( $79.6 \pm 6.8\%$ ) は naïve 群に比し、有意に低下していた ( $p < 0.05$ )。中脳中心灰白質は疼痛反応やストレスに対する行動のコントロールに重要な働きをすることから、これら変化が中脳中心灰白質の機能不全を生じ、機械刺激に対する反応閾値の低下や攻撃行動に関与している可能性が考えられる。

#### Altered expression of astrocytic RANTES in the NTS of SHR may be pro-hypertensive

○S. S. Gouraud, H. Waki, M. Takagishi, A. Kohsaka, M. Maeda (Department of Physiology, Wakayama Medical University School of Medicine)

Recent *in vivo* studies have suggested that an increased level of leukotriene B4 (LTB4), a potent pro-inflammatory molecule, within the nucleus tractus solitarius (NTS) increases arterial pressure via a down-regulation of one of the CC-chemokines, RANTES (Ccl5). In this study, we attempted to further characterize the LTB4 interactions with RANTES expression at the cellular level. Primary rat cortical astrocytes were pre-treated with different concentrations of LTB4 and the effect of IL1 $\beta$  and IFN $\beta$ , both of which are known as RANTES expression activators, on mRNA level and protein release of RANTES were evaluated. The levels of RANTES mRNA and protein in the medium were measured using quantitative real-time RT-PCR and Elisa methods, respectively. We found that LTB4 dramatically decreased the induced expression of RANTES mRNA and release of the protein in primary rat astrocytes in a dose-dependence manner, whereas we failed to see these kinetic responses when a neuronal cell line was tested. Using rat brainstem tissues, we also immunohistochemically revealed that the primary LTB4 receptors, BLT1 was expressed on astroglia in the NTS but not neurons or vessels. These results suggest that the high level

of LTB4 observed in the NTS of spontaneously hypertensive rats might contribute to hypertension phenotype via a decrease of astrocyte-originated RANTES expression in the NTS.

#### ミクログリアおよび骨髄由来細胞のアミロイド $\beta$ 貪食機能の解析

○高田和幸, 北村佳久, 芦原英司 (京都薬科大学病態生理学分野)

アミロイド  $\beta$  ( $A\beta$ ) はアルツハイマー病 (AD) 脳において異常蓄積しており、AD 病態形成の中核的役割を担う。この  $A\beta$  蓄積部位には脳構成細胞の一つであるミクログリアが集積しているが、病態生理学的意義は不明である。本研究では  $A\beta$  に対するミクログリアの応答反応について解析した。ラットミクログリアを初代培養後、 $A\beta$  を添加し、共焦点レーザー顕微鏡を用いた解析をおこなった。その結果、ミクログリアが形態変化をとめないながら  $A\beta$  を細胞内へ取り込む様子が観察され、ミクログリアは  $A\beta$  貪食機能を有することが明らかとなった。また、 $A\beta$  プラークを形成する遺伝子改変マウスや海馬内  $A\beta$  投与ラット脳の解析において、内在性のミクログリアが脳内の  $A\beta$  除去に積極的に関与していることが示唆され、さらに、外来性ミクログリアにより脳内の  $A\beta$  除去が促進された。また、マウスやヒトの骨髄細胞を macrophage-colony stimulating factor を添加して培養したところ、ミクログリアのマーカータンパク質を発現し、 $A\beta$  の貪食機能を有する細胞が多数得られた。以上より、AD 脳内で  $A\beta$  蓄積部位に集積するミクログリアは、 $A\beta$  を貪食して脳内の  $A\beta$  除去に機能していることが示唆された。

#### 安静時機能的 MRI を用いた長周期脳活動の個人差：第2指/4指比との関連

○堂西倫弘<sup>1</sup>, 寺田正樹<sup>2</sup>, 金桶吉起<sup>1</sup> (<sup>1</sup>和歌山県立医科大学医学部生理学第一講座, <sup>2</sup>医療法人昭陽会和歌山南放射線科クリニック)

BOLD 信号の長周期変化は脳活動の機能的結合を反映し、種々の病態で特徴的な変化を示すが、健常者の個人差や性格との関係は不明である。一方、胎児期のテストステロン暴露は脳の性分化を決定する主要因であり、気質・性格の基盤を形成すると考えられる。今回われわれは健常男性被験者 58 名 (18-30 歳) の安静時 BOLD 信号 (3T, Philips) からネットワーク解析を試みたうえで、胎児期テストステロン暴露の程度を反映する指標として知られる第2指と4指の長さの比 (2D:4D 比) との関連を検討した (この比が小さい、つまり第4指が相対的に長いほど胎生期テ

ストステロン暴露が大きい傾向にある)。BOLD 信号を SPM8 を用いて前処理 (頭の動きの補正・EPI 標準画像への対応・空間平滑化) した後、灰白質の各 voxel について、他の全ての voxel との機能的結合 (相互相関係数) の平均値を求めた (hub)。hub 値は両側の頭頂葉・後頭葉・前頭葉でそれぞれ極大となる分布を示した。さらに、hub 値は左の外側頭頂皮質において 2D:4D 比との有意な相関を示した。この結果は、この部位がヒトの性格形成にかかわることを示唆するものである。

#### 音刺激により誘発されるトリ大細胞核神経細胞の in vivo シナプス活動

○平井康治, 大森治紀 (京都大学大学院医学研究科神経生物学)

内耳の有毛細胞で符号化された音情報は、聴神経を通して脳幹の聴覚神経核に伝達される。鳥類では大細胞核のニューロンが、聴神経活動の位相同期性を改善する様に発火すると考えられている。本研究は in vivo において音刺激が具体的にどの様に大細胞核神経細胞にシナプス入力を生ずるかをニューロンの発火と閾値下のシナプス入力を同時に記録することで解析した。

#### 視床網様核における聴覚と視覚の干渉

○木村晃久, 井辺弘樹, 堂西倫弘, 金桶吉起 (和歌山県立医科大学生理学第一講座)

麻酔したラットで、視床核に抑制投射して視床-大脳皮質間の情報伝達を制御する視床網様核 (thalamic reticular nucleus, TRN) 細胞の聴覚と視覚入力の干渉を細胞近傍記録-染色法で調べた。音 (白色雑音) と光 (白色 LED) 刺激の両方に反応する TRN 細胞は、極めて少ないが、スパイクを誘発しない音あるいは光刺激 (閾値下刺激) が視覚あるいは聴覚反応 (スパイク発射) を修飾 (促進あるいは抑制) する現象を多くの細胞で認めた。修飾は、1 次反応 (onset-response) とその後くり返し誘発される 2 次反応に認めた。TRN 細胞はバースト活動を示すが、バーストの特性も修飾された。抑制が比較的多く、音刺激が視覚反応を強く抑制する傾向があった。修飾を認めた細胞は、1 次 (内側膝状核腹側重核と外側膝状核背側核) あるいは高次視床核 (内側膝状核背側及び内側重核と後外側核) に投射した。近年、大脳皮質 1 次感覚野で異種感覚情報が干渉することを示す研究が相次ぎ、感覚情報処理機構の階層性を見直す必要が求められている。結果は、大脳皮質-視床網様核-視床のループ回路が異種感覚情報の統合あるいは競合 (cross-modal switching of attention) に関与する可能性を示唆する。

#### ネコ網膜神経細胞と外側膝状体ニューロンにおける刺激コントラストに依存しない方位選択性の形成メカニズム

○内藤智之<sup>1</sup>, 末松尚史<sup>2</sup>, 佐藤宏道<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>大阪大学大学院医学系研究科認知行動科学, <sup>2</sup>同 生命機能研究科認知行動科学)

刺激コントラストに依存しない方位選択性は脳一次視覚野において初めて生じる特徴選択性であると考えられている。しかし我々は先行研究において約 90% のネコ外側膝状体 (LGN) ニューロンがコントラスト不変方位選択性を示すことを見いだした。LGN ニューロンのコントラスト不変方位選択性の形成メカニズムを検討するために、網膜神経節細胞 (RGC) と LGN ニューロンの同時記録を行い、コントラスト不変方位選択性を示す LGN ニューロンに対して直接投射を有する RGC ニューロンの方位選択性を計測した。逆相関法を用いた受容野解析から、RGC から LGN への直接投射は、RGC ニューロンが受容野中心の極性が同じ LGN ニューロンの受容野長軸に沿う位置に受容野を持ち、両者の長軸の方位が類似する場合に高い確率で観察されることが明らかとなった。更に記録したほとんどの RGC ニューロンもコントラスト不変方位選択性を示すことが明らかとなった。以上の結果から、コントラスト不変方位選択性は RGC の段階で既に存在しており、興奮性投射により LGN ニューロンへと引き継がれる可能性が示唆される。

#### マウス OKR における網膜 ON 型方向選択性神経節細胞の役割

○杉田祐子<sup>1</sup>, 三浦健一郎<sup>1</sup>, 小池千恵子<sup>2</sup>, 荒木章之<sup>2</sup>, 古川貴久<sup>2,3</sup>, 河野憲二<sup>1</sup> (<sup>1</sup>京都大学大学院医学研究科認知行動脳科学, <sup>2</sup>大阪バイオサイエンス研究所発生生物, <sup>3</sup>大阪大学蛋白質研究所分子発生)

網膜には視覚刺激が特定の方向に動いた時に反応する方向選択性神経節細胞 (DSGCs) が存在し、DSGCs には光照射時と終了時に一過性応答を示す ON-OFF 型 (ON-OFF-DSGCs) と、光照射時に持続的応答を示す ON 型 (ON-DSGCs) の 2 種類がある。ON-DSGCs が OKR 維持相に重要な役割を果たしているという報告がウサギであるが、OKR 初期相での役割はあまり知られていない。

我々は ON-DSGCs が OKR 初期相、維持相にどのように関与するのかを、視細胞から ON 型双極細胞への入力が変わっている 2 種類の遺伝子改変マウス (mGluR6 KO マウス, TRPM1 KO マウス) を使って調べた。これらのマウスでは野生型マウスと比較すると OKR 初期相の反応は減弱するものの視覚刺激に対する反応特性に変化はなかった。一方、OKR 維持相 (刺激開始後 30s~) ではほとんど反応

が見られなかった。

以上の結果から、ON-DSGCsはOKR維持相に関与し、ON-OFF-DSGCsはOKR初期相に関与していることが示唆された。

#### ネコ外側膝状体ニューロンの楕円形受容野と網膜一外側膝状体間結合の関係

○末松尚史<sup>1</sup>、内藤智之<sup>2</sup>、三好智光<sup>3</sup>、澤井 元<sup>3</sup>、佐藤宏道<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>大阪大学大学院生命機能研究科認知行動科学、<sup>2</sup>同 医学系研究科認知行動科学、<sup>3</sup>同 医学系研究科統合生理学)

私たちはこれまでに、ネコ外側膝状体 (LGN) ニューロンの受容野 (RF) が楕円形をしており、LGN ニューロンの方位選択性の形成に寄与しているということを報告した。しかしながら、そのような楕円形 RF 形成メカニズムに関しては不明な点が多い。そこで私たちは麻酔・非動化したネコの網膜と LGN から単一ニューロン活動同時記録を行い、スパイク時系列の相互相関解析により、結合関係のある網膜神経節細胞 (RGC) と LGN ニューロンのペアを同定したのち、各ニューロンペアについて刺激と反応の逆相関解析を用いて RF の定量的比較を行った。その結果、1) RGC の RF も楕円形であり、RF のアスペクト比は LGN のそれと比較して有意な差が無いこと、2) RF の光応答サインが同じニューロンペアでは RF 中心の長軸方位が揃っていること、3) LGN ニューロンの RF の拮抗的周辺領域に重なる逆サインの RF を持つ RGC が存在することが明らかとなった。これらの結果から、LGN ニューロンの RF は、その中心・周辺領域に重なる RF をもつ複数の RGC からの入力を反映していることが示唆された。

#### 視床下部外側野の報酬・嫌悪価値情報表現

○則武 厚、中村加枝 (関西医科大学生理学第二講座)  
中脳ドパミン (DA) ニューロンは、報酬予測誤差 (RPE: 予測された報酬期待値と実際に得た報酬の差分) を表現していると考えられているが、その計算過程の神経機構は不明である。視床下部外側野 (LH) ニューロンは DA ニューロンに投射しており、腹側線条体や扁桃体などの辺縁系の各領域とも相互結合がある。そこで、LH ニューロンにおける情報表現を明らかにするため、報酬・嫌悪情報の古典的条件づけをサルに行い、LH の単一神経細胞活動記録を行った。各試行の始めに注意を喚起する視覚刺激が呈示された後、100%・50%・0% の確率で報酬・嫌悪刺激を予測する視覚刺激 (CS) の内一つが1秒呈示された。その後、何も呈示されない遅延期間を1秒経て報酬 (ジュース) や嫌悪 (エアパフ) 刺激 (US) が呈示された。加えて、US

のみが与えられる試行も行われた。結果、報酬試行で CS・US・遅延期間で応答するニューロン数は嫌悪試行で応答するものより多かった。また、課題関連応答を示したニューロンの中で、予測確率により反応の強さが変化したものは、報酬試行では約30%程度であったのに対し嫌悪試行では5%程度であった。以上の結果から、DA ニューロンで観察される RPE 信号の一部が LH ニューロンの段階ですでに生成されていることが示唆された。

#### カルパイン阻害剤はフォルミル・ペプチド受容体と直接相互作用して細胞機能を活性化する

○藤田寿一、加藤隆幸、渡邊哲史、高橋達治、北川誠一 (大阪市立大学大学院医学研究科細胞情報学)

我々は、昨年の本会において構造および作用機序の異なるカルパイン阻害剤がフォルミル・ペプチド受容体 (hFPR あるいは hFPR-like 1; hFPRL1) を介して食細胞機能を活性化することを報告した。今回、ホモロジー・モデリングおよびリガンド・ドッキングシミュレーション、また hFPR あるいは hFPRL1 を安定的に発現している HEK 293 細胞を用いた脱感作実験により、構造の異なるカルパイン阻害剤は予測された hFPR あるいは hFPRL1 の fMLF 結合部位と直接相互作用することが強く示唆された。さらに、hFPR および hFPRL1 の予測 fMLF 結合部位に関与すると考えられるアミノ酸を、すべてアラニンに置換した変異受容体を発現する HEK293 細胞を樹立し、カルパイン阻害剤に対する反応性を、細胞内カルシウム濃度の一過性の上昇を指標にして解析した結果、カルパイン阻害剤刺激に対する応答は fMLF と同様に消失していた。以上より、カルパイン阻害剤はフォルミル・ペプチド受容体に直接結合して活性化することが明らかとなった。

#### 環境温度が睡眠時の神経性循環調節に及ぼす影響

○粟津裕子、佐藤邑子、助口知絵、三木健寿 (奈良女子大学大学院生活環境科学系統御生理)

【目的】環境温度は交感神経活動を変化させ、循環動態に影響を及ぼすことが知られているが、睡眠との相互関係は不明である。本実験は、意識下のラットを用いて寒冷及び暑熱負荷を行い、睡眠時の神経性動脈圧調節について検討した。

【方法】Wistar 系雄ラットを用いて腎及び腰部交感神経活動、脳波、心電図、筋電図、腹腔内温測定用電極、動脈圧測定用カテーテル、薬物投与のための静脈カテーテルを慢性留置した。ラットを 10℃ の寒冷負荷群と 34℃ の暑熱負荷群の 2 群に分けた。実験プロトコルは両群とも、環境温度変化前の 1 時間の対照期 (24℃)、96 時間の寒冷負荷

期 (10℃) あるいは暑熱負荷期 (34℃), その後 3 時間の回復期 (24℃) から成る.

【結果・考察】寒冷環境における睡眠ノンレム期には, 心拍数, 腎及び腰部交感神経活動は増加し, 動脈圧は上昇した. 一方, 暑熱環境における睡眠ノンレム期には, 心拍数と腰部交感神経活動は減少したが, 腎交感神経活動は増加し, 動脈圧は一定値を保った. 以上, 睡眠ノンレム期の心拍数及び腰部交感神経活動は環境温に比例した応答をし, 腎交感神経活動が調整的な役割を果たし, 環境温に適応した循環動態が形成されていることが明らかとなった.

#### Determining the contribution of myelinated (A-fiber) and unmyelinated (C-fiber) baroreceptors to the regulation of arterial pressure using electrical stimulation

○M. Turner, T. Kawada, M. Sugimachi (Department of Cardiovascular Dynamics, National Cerebral and Cardiovascular Center)

A sustained reduction in arterial pressure can be achieved in patients with resistant hypertension by electrically stimulating the arterial baroreceptors. The objective of this study was to identify the contribution of A-fiber and C-fiber baroreceptor central pathways to the arterial baroreflex using electrical stimulation of the aortic depressor nerve in anesthetized Sprague-Dawley rats. Two binary white noise stimulation protocols were used to activate reflex responses from either A- or C-fibers. To estimate the central arc transfer functions of A- ( $H_{A-FIBER}$ ) and C-fibers ( $H_{C-FIBER}$ ) we performed a fast Fourier transform on the input and output (splanchnic sympathetic nerve activity). The slope of the gain was higher for  $H_{A-FIBER}$  compared with  $H_{C-FIBER}$ . Coherence at 1Hz was not significantly different between  $H_{C-FIBER}$  and  $H_{A-FIBER}$ , but at 0.01Hz was higher in  $H_{C-FIBER}$ . After the application of resineratoxin, a blocker of C-fiber activity, gain and coherence of  $H_{C-FIBER}$  were reduced at all measured frequencies.  $H_{A-FIBER}$  was unaffected by resineratoxin. These observations indicate that C-fiber baroreceptors contribute to the regulation of arterial pressure at high and low frequencies and A-fiber baroreceptors are involved in the high frequency range. A sustained reduction in arterial pressure from electrical stimulation of arterial baroreceptors is likely mediated through C-fiber baroreceptors.

#### 心室筋細胞における CaMKII を介する FDAR の数理モデル化とその役割

○吉村 海, 野間昭典 (立命館大学生命科学専攻生命情報学)

哺乳類心室筋細胞では, 心拍の上昇とともに発生張力の持続時間は減少する. これは frequency-dependent acceleration of relaxation (FDAR) と呼ばれ, 高心拍でも拡張期時間を維持し, これによって心室への血液還流を確保するために重要なメカニズムである. これまでの研究結果から, 頻度依存活性効果を持つ  $Ca^{2+}/CaM$  依存性プロテインキナーゼ II (CaMKII) が高頻度に発生する  $Ca^{2+}$  トランジェントによって活性化し, SERCA の活性を上昇させ, 弛緩速度が増加するとの仮説が提唱されている. しかし, この反応には, phospholamban (PLB), SERCA 自身のリン酸化, RyR の修飾, 膜興奮性の変化など, 多くの因子が複雑に関与していて, 実験報告でも必ずしも一致した結論は得られていない. 今回, 私たちは CaMKII の活性化反応の数理モデル (Chiba et al, 2008) により PLB, SERCA モデルの修飾を加えて現在開発中のヒト心室筋細胞に組み込み, FDAR を再現し, SERCA の活性調節については,  $Ca^{2+}$  affinity の変化より  $V_{max}$  の増加が重要であることを確認した. 今回の報告では, モデルの妥当性を含めて考察する.

#### $Na^+/H^+$ 交換輸送体 NHE1 とカルシニューリンとの直接結合を介する新しい心肥大シグナル増強経路

○久光 隆, 西谷友重, 若林繁夫 (国立循環器病研究センター・分子生理部)

$Na^+/H^+$  交換輸送体 NHE1 は, 細胞内 pH を調節する膜トランスポーターである. 私たちは最近, この NHE1 に結合する新規分子として,  $Ca^{2+}$  依存性脱リン酸化酵素カルシニューリン (CaN) を発見した. 生化学的検討から, CaN の A サブユニットが, NHE1 の C 末端側細胞質領域にある CaN 結合モチーフと似た配列 (PVITID) に直接結合することがわかった. CaN は下流の転写因子 NFAT の脱リン酸化によって, NFAT の核内移行と心肥大関連遺伝子の発現を促し, 心筋細胞の肥大化を亢進させることが知られている. 線維芽細胞あるいは心筋細胞において, NFAT のプロモータ活性および NFAT の核内移行は野生型 NHE1 を過剰発現すると有意に上昇し, NHE1 阻害剤によって抑制された. また, 意外にも, CaN は  $Ca^{2+}$  だけではなく, 生理的な範囲内の pH 上昇によって著明に活性化されることが明らかになった. すなわち, NHE1 は細胞内 pH 上昇を介して CaN を活性化すると考えられ, 実際に輸送活性のない NHE1 変異体にはその効果がなかった. さらに, NHE1 による CaN/NFAT シグナル活性化には, NHE1 の CaN との相互作用と NHE1 の脂質ラフトへの集積が必要であった. 以上の結果から, NHE1 は高い pH 環境が形成される形質膜



近傍のマイクロドメイン内に CaN を集積させ、下流へのシグナル伝達を増強する CaN のプラットフォームとしての役割を果たすことが示唆された。心筋細胞を用いた実験から、そのようなシグナル伝達系が NHE1 依存性の心肥大形成にも関与することが考えられた。

#### メドミジンは心臓迷走神経活動を賦活化し、胃迷走神経活動を抑制する

○清水秀二<sup>1</sup>、川田 徹<sup>1</sup>、秋山 剛<sup>2</sup>、神谷厚範<sup>1</sup>、杉町勝<sup>1</sup> (<sup>1</sup>国立循環器病研究センター循環動態制御部、<sup>2</sup>同 心臓生理機能部)

近年、迷走神経刺激療法が心不全治療のひとつの strategy となりつつある。一方で、過度の迷走神経刺激は、胃などの消化管において様々な副作用をもたらすことが知られている。我々は先行研究で、選択的  $\alpha_2$  受容体作動薬であるメドミジンが、心臓迷走神経活動を賦活化することを明らかにした。また、メドミジンには、消化管保護作用があることから、消化管への副作用なしに心臓迷走神経活動を賦活化できる可能性がある。そこで、我々はメドミジンが心臓および消化管自律神経活動へ及ぼす影響を明らかにするため、心臓と胃にマイクロダイアリス法を適用した。麻酔下のウサギの右心房壁と胃前壁にマイクロダイアリス・プローベを植込み、リング液にて灌流し、透析液中のアセチルコリン (ACh) 及びノルエピネフリン (NE) 濃度を高速液体クロマトグラフィにて測定した。透析液中の NE 濃度は、メドミジンの経静脈的投与により心房・胃ともに有意に低下した。一方、透析液中の ACh 濃度は、心房ではメドミジン投与により上昇するのに対し、胃では有意に低下した。よって、メドミジンは、消化管への過度の迷走神経刺激なしに心臓迷走神経活動を賦活化できることが示唆された。

#### 骨格筋細胞におけるインスリン抵抗性への細胞外液 pH の関与

○早田洋樹<sup>1</sup>、宮崎裕明<sup>1</sup>、新里直美<sup>1,2</sup>、横山紀子<sup>1</sup>、丸中良典<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>京都府立医科大学大学院医学研究科細胞生理学、<sup>2</sup>平安女学院大学日本食育・健康研究所)

2型糖尿病などのインスリン抵抗性の病態では、インスリンの骨格筋への作用が不十分となり、細胞内へのグルコース取込が低下する。一方、インスリンは腎尿細管での  $\text{Na}^+$  再吸収を促進するが、骨格筋にインスリン抵抗性があっても腎臓への作用は通常に保たれていると考えられている。我々は、腎臓では血流が豊富なため細胞外液 pH は一定に保たれるが、骨格筋では相対的に血流が少ないため嫌氣的代謝により細胞外液 pH が低下し、これがインスリン

抵抗性に関与していると考えた。そこで本研究では、骨格筋由来細胞株 (L6 細胞) における、細胞外液 pH 低下時のインスリン応答性について検討を行った。細胞外液 pH を低下させた状態では、インスリンとインスリン受容体との結合が低下した。またインスリン受容体およびシグナル伝達経路の下流に存在する Akt はリン酸化により活性型となるが、細胞外液 pH 低下時にはどちらのリン酸化レベルも低下していた。また、同様の条件下において L6 細胞内へのグルコース取込についても検討を行った。以上の結果から、骨格筋細胞におけるインスリン抵抗性の病態に細胞外液 pH の低下が関与している可能性が示唆された。

#### 糖尿病性骨粗鬆症の病態機序における PAI-1 の役割

○田村行識、松尾 理、梶 博史 (近畿大学医学部再生機能医学)

近年、糖尿病に伴う骨折リスクの増加が問題となっており、糖尿病性骨粗鬆症の病態解明が急務となっている。そこで本研究では、線溶系阻害因子プラスミノゲンアクチベーターインヒビター 1 (PAI-1) の糖尿病性骨粗鬆症の病態における役割をマウス生体内で検討した。

雌雄の野生型および PAI-1 欠損マウスに、ストレプトゾトシン (STZ, 50mg/kg) を 4 日間連続で腹腔内投与し、糖尿病を誘発した。

STZ 投与により、雌雄の野生型および PAI-1 欠損マウスともに著明に血糖値が増加したが、群間で差は認められなかった。糖尿病誘発 1 カ月後の X 線 CT 解析の結果、雌性 PAI-1 欠損マウスでは、野生型マウスで認められた骨密度と骨強度指数の減少が有意に抑制された。また、この骨保護効果は雄性 PAI-1 欠損マウスでは認められなかった。同様に、糖尿病による Runx2 や Osterix などの骨分化関連因子の脛骨における発現低下も、雌性 PAI-1 欠損マウスでのみ改善が認められた。さらに、糖尿病による脂肪分化調節因子 PPAR $\gamma$  の脛骨における発現上昇は、雌性 PAI-1 欠損マウスで抑制された。

本結果より、PAI-1 の骨分化制御を介した糖尿病性骨粗鬆症の病態への関与が示唆され、その病態生理学的役割に性差が存在する可能性が考えられる。

#### Insulin action on forskolin-stimulated $\text{Cl}^-$ secretion in renal epithelial A6 cells

○H. Sun<sup>1</sup>、N. Niisato<sup>1,2</sup>、Y. Marunaka<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Department of Molecular Cell Physiology, Kyoto Prefectural University of Medicine、<sup>2</sup>Japan Institute for Food Education and Health, Heian Jogakuin (St. Agnes) University)

In renal epithelial A6 cells, cAMP stimulates  $\text{Cl}^-$  secre-

tion by activating both the basolateral  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  cotransporter 1 (NKCC1) and the apical  $\text{Cl}^-$  channel such as CFTR  $\text{Cl}^-$  channel. Although insulin is known to stimulate  $\text{Na}^+$  reabsorption, the insulin action on the  $\text{Cl}^-$  secretion is not fully understood. In this study, to clarify the insulin action on the  $\text{Cl}^-$  secretion, we pretreated A6 cells with 1 $\mu\text{M}$  insulin for overnight and measured  $\text{Cl}^-$  secretion and apical  $\text{Cl}^-$  channel activity detected as NPPB (a  $\text{Cl}^-$  channel blocker)-sensitive Isc and Gt, respectively. Insulin pretreatment had no effect on basal  $\text{Cl}^-$  secretion, but interestingly enhanced cAMP-stimulated  $\text{Cl}^-$  secretion with an increase in NPPB-sensitive Gt. The insulin action enhancing the cAMP-stimulated  $\text{Cl}^-$  secretion required at least 4 hours, suggesting a possibility that insulin enhances the cAMP-stimulated  $\text{Cl}^-$  secretion through expression of gene contributing to  $\text{Cl}^-$  secretion such as CFTR  $\text{Cl}^-$  channel and NKCC1. Indeed, insulin increased mRNA expression of CFTR  $\text{Cl}^-$  channel and NKCC1. Insulin action is mediated via a PI3 kinase-dependent pathway. Pretreatment with LY294002 (a PI3 kinase inhibitor) reduced the insulin action on both the  $\text{Cl}^-$  secretion and mRNA expression of CFTR  $\text{Cl}^-$  channel and NKCC1, suggesting that insulin potentiates the stimulatory action of cAMP on  $\text{Cl}^-$  secretion by upregulating mRNA expression of CFTR  $\text{Cl}^-$  channel and NKCC1 via a PI3 kinase-dependent pathway.

#### 膵β細胞におけるGLP-1受容体を介するcAMP制御機構のシミュレーション研究

○竹田有加里<sup>1</sup>, 天野 晃<sup>1</sup>, 野間昭典<sup>1</sup>, 藤本新平<sup>2</sup>, 稲垣暢也<sup>2</sup> (立命館大学生命科学部生命情報学科, <sup>2</sup>京都大学大学院医学研究科糖尿病・栄養内科学)

Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) の膵β細胞インスリン分泌増強作用の理解においてcAMP制御機構が重要であるが、依然としてそのメカニズムやcAMPシグナリングの統合的理解はなされておらず、定量的解析を行なう基盤が不足していた。そこで我々は、GLP-1受容体を介するcAMP制御機構の数理モデルを構築し、シミュレーションによって既知の実験結果の再現が可能であることを確認し、その挙動の定量的な解析を試みた。結果、GLP-1刺激で活性化された受容体には経時的に出現する二つの脱感作状態があり、刺激後上昇したcAMPの減衰動態を決定していることが明らかとなった。さらにcAMP濃度を調節するACやPDEの活性を確定することができた。また、ACやPDEの $\text{Ca}^{2+}$ 感受性をモデル化することによって、 $\text{Ca}^{2+}$ 感受性のあるそれぞれの酵素アイソザイムの割合を推

定し、cAMP生成に対するグルコースとGLP-1刺激の相乗的作用を検証した。また、PKAやEpacをモデルに組み込むことで、シミュレーション実験からGLP-1刺激によるPKAやEpacの活性も見積もることができた。

#### 2ステップ $\text{Cl}^-$ 分泌に関する時間依存的数理モデル

○笹本浩平<sup>1</sup>, 新里直美<sup>2,3</sup>, 丸中良典<sup>2,3</sup> (京都府立医科大学医学部医学科第3学年, <sup>2</sup>京都府立医科大学大学院医学研究科細胞生理学, <sup>3</sup>平安女学院大学日本食育・健康研究所)

上皮組織の一つである気道上皮組織は気道側細胞膜表面被覆層を形成して、感染防止や異物排泄などの重要な生体防御機能を発揮している。この生体防御機能構築の中心的な役割を担っているのが $\text{Cl}^-$ 分泌を駆動力とする水分分泌である。上皮細胞における $\text{Cl}^-$ の動態としては、細胞内への取込みは血管側に存在する $\text{Cl}^-$ 取込み輸送体によって行われ、細胞内に取り込まれた $\text{Cl}^-$ は気道側膜上に存在する $\text{Cl}^-$ 透過性イオンチャネルを通じて気道側内腔に分泌されたり、様々なチャネルによって血管側へリサイクルされたりすることが知られている。

気道上皮細胞における $\text{Cl}^-$ 分泌およびそれに伴う水分分泌機構の統合的制御機構に関しては、我々の研究グループを含め、多くの研究グループによって研究されてきたが、細胞の特殊性(極性)に起因する実験上の問題点のため、未解決の点も多い。そこで我々は上皮細胞における $\text{Cl}^-$ 分泌の数学的モデルを構築し、 $\text{Cl}^-$ 分泌に関与するイオン輸送体・チャネル活性が如何に変化するかを予測することによって、従来実験結果により得られていた結論より遥かに多くの情報を得ることが可能になったので報告する。

#### 2ステップ $\text{Cl}^-$ 分泌に関する時間依存的数理モデルによる上皮細胞機能解析の可能性

○笹本浩平<sup>1</sup>, 新里直美<sup>2,3</sup>, 丸中良典<sup>2,3</sup> (京都府立医科大学医学部医学科第3学年, <sup>2</sup>京都府立医科大学大学院医学研究科細胞生理学, <sup>3</sup>平安女学院大学日本食育・健康研究所)

気道上皮組織の分泌動態等を数学的に一般化し、上皮細胞の分泌機能を含む種々の機能をシミュレートする基盤が完成した。2ステップ分泌の議論での結論の一つとして投与薬剤の細胞感受性予測がある。特徴的な3パターンのグラフから薬剤活性・細胞感受性・標的分子を予測し、分子生物学的解析法を用いることで分子レベルでの上皮細胞機能解析も可能にするものと考えられる。

予測は数理的手法により導出した時間依存的関数式のグラフと、実験から得たグラフの比較検証により行う。相関

性が大きければ数理モデルで用いた条件・仮定（予測）が細胞にも実際に存在することを示唆し、相関性が小さく特徴的な誤差がある場合は細胞側に数理モデル想定外因子の存在が示唆される。

実験中に条件として設定し難い事柄でも容易に設定できる数理モデルと実験サイドの相互協力がより詳細な上皮細胞機能解析を可能なものとする。我々のグループはCl<sup>-</sup>の生理活性の解明を研究の一翼としているが、本研究の理論的部分の一つが解決し、薬理活性や細胞内情報伝達・標的分子の細胞内ダイナミクスをも明らかにし得ると考えられるため、ここに報告する。

#### 胃幽門腺粘液細胞においてPKG阻害剤が増強したCa<sup>2+</sup>調節性開口放出

○田中早織<sup>1,2</sup>, 幸田祐佳<sup>1,2</sup>, 松村人志<sup>1,2</sup>, 中張隆司<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>大阪医科大学生理学, <sup>2</sup>大阪薬科大学薬物治療学)

胃幽門腺粘液細胞において、ACh (1 $\mu$ M) は初期相と定常相からなるCa<sup>2+</sup>調節性開口放出を活性化する。cGMPはCa<sup>2+</sup>調節性開口放出初期相を増強し、この増強はPKG阻害剤 (Rp8BrPETcGMPS) により消失した。しかし、Rp8BrPETcGMPSは初期相増強抑制と同時に、定常相増強を引き起こした。本研究では、Rp8BrPETcGMPSによる定常相増強について検討した。

開口放出は、コラゲナーゼ処理により単離したモルモット遊離腺細胞を用いビデオ顕微鏡下に観察した。

Rp8BrPETcGMPSによる定常相増強は、PKA阻害剤により消失し、PDE2阻害剤 (BAY-60-7550) により再現された。また幽門腺粘液細胞にはPDE2Aが発現していた。胃幽門粘膜において、AChはcGMP含量を増加させ、Rp8BrPETcGMPSとBAY-60-7550は、cAMP含量を増加させ

た。胃幽門腺粘液細胞において、AChによるcGMP集積は、Ca<sup>2+</sup>調節性開口放出を増強する一方で、PDE2活性化を介しcAMPを分解することで、過剰な開口放出反応を抑制していることが示唆された。

#### 細胞周期制御におけるK<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup>共輸送体 (KCC) の役割解明

○北川真希<sup>1,2</sup>, 新里直美<sup>1</sup>, 細木誠之<sup>1</sup>, 塩崎 敦<sup>2</sup>, 大辻英吾<sup>2</sup>, 丸中良典<sup>1</sup> (<sup>1</sup>京都府立医科大学大学院医学研究科細胞生理学, <sup>2</sup>同 消化器外科学)

ヒト乳癌細胞株MDA-MB-231をG<sub>1</sub>後期に同調し、K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup>共輸送体 (KCC) 阻害剤 (DIOA) 存在下に同調を解除すると、S期、G<sub>2</sub>/M期進行後に2回目のG<sub>1</sub>期で細胞周期が停止した。G<sub>1</sub>後期からS期にかけて発現が増大することによりG<sub>1</sub>期からS期への移行を促進する働きを有するcyclin E<sub>2</sub>は、DIOA存在下では2回目のG<sub>1</sub>期でmRNA・タンパク質発現レベルの増大は全く認められなかった。このことにより、DIOAはcyclin E<sub>2</sub>合成を阻害することによりG<sub>1</sub>期停止を引き起こしたことが示唆された。cyclin E<sub>2</sub>合成はcyclin D<sub>1</sub>により制御されていることが知られているため、cyclin D<sub>1</sub>の発現を検討したところ、DIOA投与によりcyclin D<sub>1</sub>のmRNA・タンパク質発現の減少が引き起こされることが明らかとなった。これらの結果より、DIOAは、cyclin D<sub>1</sub>の発現抑制を介してcyclin E<sub>2</sub>の発現を減少させ、G<sub>1</sub>期停止を引き起こしたと考えられた。さらに、DIOAの標的がKCCであることから、細胞周期におけるサイクリンの発現制御には、KCCの活性制御およびそれに伴う細胞内クロライドイオン濃度変化が重要な役割を担っていることが示唆された。