

S1-1. ペア型免疫グロブリン様受容体が神経回路の非対称性形成に関与する

鶴飼ひかり, 愛野翔太郎, 脇田 健, 宮部真裕, 笠行通代, 伊藤 功 (九州大学理学研究院生体物理化学研究室)

近年我々は、マウス海馬神経回路には NMDA 受容体 $\epsilon 2$ サブユニットの分布量の多い $\epsilon 2$ -dominant シナプスと、分布量の少ない $\epsilon 2$ -nondominant シナプスが存在し、これらがシナプス後細胞の細胞極性とシナプス前入力線維の起源が左右どちらの脳半球であるかに依存して非対称に配置されていることを明らかにした。また、この神経回路の非対称性形成には、海馬シナプスに存在する MHC class I (MHCI) が重要であることも示した。ペア型免疫グロブリン様受容体 B (PirB) は、免疫系における MHCI の受容体として知られており、中枢神経系のシナプス部位にもその存在が認められ、可塑性性質の発現などに関与していることが近年報告された。本研究では、神経回路の非対称性形成に MHCI の受容体として PirB が機能している可能性を確かめるために、PirB をノックアウトしたマウスから調整した海馬スライスを用いて、NMDA EPSC に対する $\epsilon 2$ サブユニット選択的阻害剤 (Ro 25-6981) による抑制効果を比較したところ、全てのシナプスにおいて $\epsilon 2$ -dominant シナプスと同等の感受性を示した。すなわち、PirB ノックアウトマウスの海馬神経回路は $\epsilon 2$ -dominant シナプスのみで構成され、非対称性が完全に消失していた。これは MHCI の機能阻害変異体マウスと同様の結果であり、したがって PirB は海馬神経回路の非対称性形成において MHCI とともに機能していると思われる。

S1-2. 1,8-シネオールと 1,4-シネオールによる成熟ラット脊髄膠様質における TRP チャネルの活性化

蔣 昌宇, 徐 年香, 藤田亜美, 朱 蘭, 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、ユーカリ精油成分 1,8-および 1,4-シネオールが脊髄膠様質ニューロンの自発性興奮性シナプス後電流 (sEPSC) の発生頻度を増加させることを報告している。これらの EC_{50} 値は、それぞれ 3.2mM と 0.24mM であり、1,4-シネオール作用の効果は 1,8-シネオール作用より著しく大きかった。今回、成熟ラットの脊髄横断薄切片の膠様質ニューロンにパッチクランプ法を適用し、このシネオール作用の詳細を調べた。1,8-シネオールによる sEPSC の発生頻度増加は TRPA1 阻害薬 (HC-030031 やニコチン受容体阻害薬でもあるメカミラミン) により抑制されたが、1,4-シネオール作用は影響を受けなかった。一方、TRPV1 阻害薬カプサゼピンは 1,4-シネオールの増加作用を抑制したが、1,8-シネオール作用に影響しなかった。TRPM8 阻害薬

BCTC はその作動薬 (-)-メントールによる sEPSC の発生頻度増加を抑制したが、1,4-と 1,8-シネオール作用には影響しなかった。以上より、後根神経節ニューロンの中枢端において、1,8-と 1,4-シネオールは、それぞれ TRPA1 と TRPV1 チャネルを活性化して膠様質ニューロンへのグルタミン酸の自発放出を促進すると結論した。シネオールの構造異性体間での TRP チャネルの活性化の違いはそのチャネルの性質の解明に役立つと期待される。

S1-3. TRPM2 の細菌クリアランス促進による敗血症に対する保護作用

沼田朋大^{1,2,3}, X.W. Qian⁴, 森 泰生^{2,3}, X.M. Fang⁴ (福岡大学医学部生理学,² 京都大学地球環境学堂,³ 京都大学工学研究科,⁴ 浙江大学医学部)

Transient Receptor Potential (TRP) M2 はカルシウムイオン透過型非選択的陽イオンチャネルであり、炎症や免疫応答に関わることが知られているが、全身性炎症反応症候群とも呼ばれる敗血症における役割についてはまだ理解されていない。そこで、TRPM2 欠損マウス (M2KO) を用いて盲腸結紮穿孔モデルによる敗血症を引き起こした際の表現型の違いを野生型マウスと比較、検討をした。その結果、M2KO では、血中における細菌数の上昇、肺および肝臓における傷害の増悪、炎症性サイトカインの上昇、臓器保護的役割があることが知られるヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) の発現低下がみられた。また TRPM2 の活性が HO-1 の発現調節をしている結果を得たので、M2KO に HO-1 誘導剤である Hemin を投与したところ敗血症の傷害が改善された。これらの結果より、TRPM2 は、HO-1 の発現、細菌のクリアランスを調節することで敗血症に対して保護作用を示すことが分かった。

S1-4. Cdkal1 機能異常を標的とした 2 型糖尿病治療薬の最適化

○渡部佐耶加, 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)

Cdkal1 は、2 型糖尿病発症と最も相関する危険因子の一つとして知られている。危険型 Cdkal1 遺伝子を保有しているヒトではインスリン分泌が低下することで、耐糖能が低下し 2 型糖尿病が発症する。これまで Cdkal1 の機能は不明であったが、我々はリジンに対応する tRNA を修飾する酵素であることを突き止めた。膵 β 細胞特異的 Cdkal1 欠損マウスでは、プロインスリンの翻訳異常が起点となり、インスリン分泌が低下し、糖尿病を発症する。Cdkal1 欠損マウスが危険型 Cdkal1 遺伝子を有する 2 型糖尿病患者の病態に酷似することから、本研究では同欠損マウスを用い

て、Cdkal1 遺伝子変異を有する糖尿病患者に対する治療薬の最適化を行った。具体的には、現在使用されている糖尿病治療薬を Cdkal1 欠損マウスに長期投与し、最も効果的な治療薬の同定とその薬効機序について検討した。その結果、グルカゴン様ペプチド (GLP1) を標的とするインクレチン関連治療薬の投与が小胞体ストレスを軽減し、耐糖能を改善することが明らかになった。一方、インスリン分泌を強制的に促進するスルフォニル尿素剤が Cdkal1 欠損マウスに対して有効性を示さなかった。以上の結果より、Cdkal1 遺伝子異常を有する 2 型糖尿病患者に対してインクレチン関連薬が有効な選択であることが示唆された。

S1-5. 消化管ホルモン末梢投与後の視床下部オキシトシンニューロンの活性化～オキシトシン-mRFP1 トランスジェニックラットを用いた検討～

元嶋尉士^{1,2}、松浦孝紀^{1,2}、齋藤玲子^{1,3}、大久保淳一^{1,4}、吉村充弘¹、橋本弘史¹、鈴木仁士⁵、川崎 展²、大西英生²、酒井昭典²、上田陽一¹ (1産業医科大学医学部第1生理学、2産業医科大学医学部整形外科学、3産業医科大学医学部小児科学、4産業医科大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科学、5産業医科大学医学部救急医学)

オキシトシンは、視床下部の視索上核 (SON) と室傍核 (PVN) に局在する大細胞性神経分泌ニューロン (mPVN) および小細胞性神経分泌ニューロン (pPVN) の細胞体で産生される。近年、mPVN においてオキシトシンが細胞体・樹状突起からも開口分泌されること、pPVN からの軸索が脳幹や脊髄に投射していることが注目されている。摂食抑制作用のある消化管ペプチドの一つであるコレシストキニン (CCK-8) は、オキシトシンニューロンを活性化させ、中枢神経系を介して摂食行動を調節している可能性がある。今回我々は、オキシトシン遺伝子に赤色蛍光タンパク (mRFP1) 遺伝子を挿入した融合遺伝子を用いて作出されたオキシトシン-mRFP1 トランスジェニックラットを用いて、CCK-8 末梢投与後の mRFP1 蛍光を経時的に定量評価することを試みた。SON、mPVN および pPVN において、CCK-8 (50 μ g/kg) 腹腔内投与 3 時間後に mRFP 蛍光が有意に増加した。また、延髄孤束核に投射している軸索終末の mRFP 蛍光も 3 時間後に有意に増加していた。以上より、末梢投与した CCK-8 は、SON、mPVN および pPVN におけるオキシトシン産生を亢進し、孤束核に投射した軸索終末に運ばれていることが示唆された。

S1-6. 二日酔い時の喉の渴きはアセトアルデヒドが原因で起こる

氏原 泉^{1,2}、人見涼露¹、小野堅太郎¹、柿木保明²、稲

永清敏¹ (1九州歯科大学生理学分野、2九州歯科大学老年障害者歯科学分野)

二日酔い時に起こる口渇感の原因として、バソプレシンの分泌低下によるアルコール利尿効果が考えられているが、多量に飲酒した時は尿量が逆に減少することが報告されている。本研究では、エタノール代謝産物であるアセトアルデヒドが原因ではないかとの仮説を立て、雄性ウィスター系ラットを用いて実験を行った。エタノール腹腔内投与により水分摂取量が増加し、アルデヒド脱水素酵素阻害剤との併用投与により水分と塩分の摂取量はさらに増加した。尿量はむしろ減少した。アセトアルデヒド腹腔内投与により水分と塩分の摂取量が増加した。この増加は、アンジオテンシン AT₁ 受容体拮抗剤により減弱した。アセトアルデヒドにより口渇中枢における c-Fos 陽性細胞数が増加し、この増加は AT₁ 受容体拮抗剤により抑制された。また、アセトアルデヒドにより血圧低下および血漿レニン活性の増加が認められたことから、レニン・アンジオテンシン系の関与が考えられた。一方で、アセトアルデヒドの脳室内投与により水分摂取量のみが増加した。電気生理学的実験において、アセトアルデヒドが脳弓下器ニューロンに対して直接作用することが示された。これらのことより、二日酔い時の喉の渴きは、アセトアルデヒドによる血圧低下がレニン・アンジオテンシン系の活性化を引き起こすこと、およびアセトアルデヒドが口渇中枢ニューロンに直接作用することによって起こる可能性が示唆された。

S1-7. ペプチド R の神経障害性疼痛に対する薬理作用

朝長大地、野田百美 (九州大学薬学研究院病態生理学分野)

神経障害性疼痛とは中枢、末梢神経障害時に起こる慢性疼痛疾患である。その具体的なメカニズムはいまだに解明されていないが、神経障害時に放出されるケモカインが原因の一つといわれている。ペプチド R はヒトのモノサイトに発現しているケモカイン受容体 CCR2 および CCR5 を阻害し、ラットの神経障害性疼痛を抑制することがわかっている。また、我々の以前の研究では、マウス坐骨神経障害後に産生されるケモカイン CCL1 とその受容体 CCR8 が、疼痛発現に関与していること、ミクログリアの CCR8 活性化によって化学走性、貪食性、形態変化が起こることを明らかにした。本研究では、マウス初代培養ミクログリアを用い、ペプチド R が CCL1/CCR8 シグナルを阻害するかどうかを検討した。結果としてペプチド R は CCR2、CCR5 よりも CCR8 に対してより低濃度で阻害作用を示した。したがってペプチド R は複数のケモカイン受容体を阻害することで、神経障害性疼痛の治療薬となることが期待

される。今後はアストロサイトとの関わりについても調べていきたいと考えている。

S2-1. 血管内皮細胞における TRPM7 発現・機能の亢進がもたらす血管障害の可能性

平石敬三, 倉原 琳, 住吉美保, 井上隆司 (福岡大学医学部生理学)

血管内皮細胞は、血管の最内層にある細胞で、血管の健康状態を維持するのに重要な役割を果たしている。血管内皮細胞は一酸化窒素 (NO) など数多くの血管作動性物質を放出し、血管壁の収縮・弛緩をはじめとして、血管新生、血管透過性、凝固・線溶系の調節などを行っている。我々は様々な物理化学刺激によって活性化される Transient receptor potential (TRP) チャネルファミリーに着目して、血管内皮の機能調節作用について検討を行った。

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いたマイクロアレイおよびリアルタイム RT-PCR の結果から、HUVEC に発現が観察される 14 種類の TRP ファミリーのうち、TRPM7 チャネルの mRNA 発現量が最も多いことが明らかになった。TRPM7 は非選択性の陽イオンチャネルであり、哺乳類細胞におけるマグネシウム (Mg^{2+}) の受動的な流入経路として知られている。HUVEC を低マグネシウム条件下で培養すると TRPM7 の発現量が増加した。一方、TRPM7 のノックダウン (RNA 干渉) や TRPM7 阻害薬 FTY720 $1\mu M$ は HUVEC 細胞の遊走能を著しく亢進し、低酸素状態で一酸化窒素合成酵素 (eNOS) の発現を回復させた。また、ゲル上に播種した HUVEC 細胞の管腔形成について検討した結果、TRPM7 の発現または機能抑制により、管腔形成が有意に亢進した。

以上の結果から、TRPM7 チャネルは内皮に対するストレス負荷時に重要な調節因子として働いている可能性が示唆された。

S2-2. Functional reconstitution of TRPC1 and 4 channels in PC12 cells

K. Harada, H. Matsuoka, M. Inoue (Department of Cell and System Physiology, University of Occupational and Environmental Health School of Medicine)

Our previous study of muscarine-induced excitation in guinea-pig adrenal medullary (gpAM) cells suggested the possible involvement of TRPC1 and TRPC4 channels. This possibility was further explored in gp AM cells and PC12 cells originating from rat AM cells. The majority of TRPC1 and TRPC4 channels in gpAM cells were immunologically detected in the cytoplasm, and they were traf-

ficked to the cell periphery in response to muscarine. Similar results were obtained when TRPC1 and TRPC4 channels were exogenously expressed in PC12 cells. The proximity ligation assay revealed that TRPC1 and TRPC4 form a heteromer in PC12 cells and this heteromer was also trafficked to the cell periphery upon muscarinic stimulation. Furthermore, the heteromer formation was enhanced by the simultaneous expression of STIM1, in which amino acid residues 1 to 448 were essential.

S2-3. チモールは TRPA1 活性化により成熟ラット脊髄膠様質ニューロンの自発性の興奮性シナプス伝達を促進する

徐 志昊, 蔣 昌宇, 藤田亜美, 朱 蘭, 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))

TRP チャネルは後根神経節ニューロンで痛み伝達に関与することが知られているが、その中枢端にあるチャネルの性質の詳細は不明である。本研究では、中枢端の TRP チャネルの性質を知る目的で、異種細胞発現系で TRP チャネルを活性化するタイム精油成分チモールが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及ぼす作用を調べた。実験は、ラット脊髄薄切片の膠様質ニューロンへパッチクランプ法を適用し、 $-70mV$ の保持膜電位で膜電流を記録することにより行った。チモール ($1mM$) は、調べたニューロン ($n=134$) の 99% で自発性の興奮性シナプス後電流の発生頻度を増加させる一方、78% では外向き膜電流も誘起した。これらの作用は 30 分の時間間隔で繰り返し見られ、また、 Na^+ チャネル阻害薬テトロドトキシンによる影響を受けなかった。発生頻度増加は TRPV1 阻害薬カプサゼピンによる影響を受けなかったが、TRPA1 阻害薬 HC-030031 により抑制された。一方、これらの TRP 阻害薬は外向き膜電流に影響を及ぼさなかった。以上より、チモールは以前報告したオイゲノールやカルバクロールと同様、膠様質において TRPA1 チャネルを活性化してグルタミン酸の自発放出を増加させると共に、そのチャネルと無関係に膜過分極を誘起することが示唆された。この結果は中枢端の TRP チャネルの性質を知るのに役立つことが期待される。

S2-4. 催不整脈性変異による TRPM4 チャネル PIP_2 感受性変化の動力学的解析

Kinetic analysis on PIP_2 sensitivity of an arrhythmic TRPM4 channel

胡 耀鹏¹, 倉原 琳¹, 市川 純¹, 岡村康司², 森 誠之³, 井上隆司¹ (¹福岡大学医学部生理学, ²大阪大学医学

部統合生理, ³京都大学大学院工学研究科合成生物化学)

(目的) 膜 PIP₂ はイオンチャネルや輸送体の重要な制御因子であることが知られている。本研究では、膜 PIP₂ 量の変化が Ca 活性化陽イオンチャネル TRPM4 やその不整脈型変異体 E7K に及ぼすダイナミックな効果を、FRET 法を併用した膜電流測定によって検討した。

(方法) HEK293 細胞にゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) 型電位依存性ホスファターゼ (VSP) と野生型 TRPM4 (EKE⁵⁷) あるいはその変異体 E7K (EKK⁵⁷) ないし ENE⁵⁷ を共発現してパッチクランプ法による電流測定を行った。膜 PIP₂ 量は PLCδ の PH 領域を連結した CFP/YFP ペアを発現して FRET 変化率として評価した。

(結果) 脱分極の強度や持続時間を調節して VSP 活性化の程度を変化させ膜 PIP₂ 量を段階的に減少させると、0.5 μM Ca²⁺ によって活性化された TRPM4 電流は、PIP₂ 量の減少の度合いに応じて一過的に抑制された。PIP₂ 減少による電流抑制は E7K 変異体では著しく減弱しており、ENE 変異体では逆に亢進していた。この時の電位依存性は、前者ではより過分極側に後者では脱分極側にシフトしていた。一方、親水性 PIP₂ アナログ diC₈PIP₂ の投与時には、これらと逆の変化が観察された。TRPM4 キネティクスを追加した Luo-Rudy 心筋活動電位 (AP) モデルに上記の PIP₂ 感受性の違いを導入すると、E7K 変異体では、野生型 TRPM4 の発現増加時に生じる AP 延長や早期脱分極誘発効果が、PIP₂ 減少によって殆ど影響を受けないことが示唆された。

(結論) 以上のことから、N 端の 5 番目から 7 番目のアミノ酸残基の陽電荷が膜 PIP₂ による TRPM4 活性維持に重要であることが推測された。またこの機序の著しい減弱が E7K 変異体の機能亢進による催不整脈性に寄与していることが示唆された。

S2-5. 温度侵害受容特性は非ペプチド性無髄感覚神経の TRPV1 発現により調節される

○小野堅太郎^{1,2}, 人見涼露¹, 稲永清敏¹, Y. Ye², C. T. Viet², D. Dang², B.L. Schmidt² (¹九州歯科大学生理学分野, ²ニューヨーク大学ブルーストーン研究所)

痛み感受性の個人差は遺伝要因が高いことが分かっているが、近交系マウス系統間にも侵害受容の感受性に違いがあることが知られている。本研究では、代表的近交系実験用マウス系統である C57BL/6 と BALB/c における温度侵害受容特性と感覚神経における侵害熱受容体 TRPV1 の発現を比較した。C57BL/6 は BALB/c よりも放射熱に対する逃避潜時が有意に短かった。リアルタイム RT-PCR 法において、三叉神経節中の TRPV1 の mRNA 量に種差はな

かった。しかし、蛍光免疫染色法とパッチクランプ法において、非ペプチド性無髄神経における TRPV1 の発現は C57BL/6 の方が高かった。一方、電気生理学的性質に関して種差はなかった。サポリン結合イソレクチン B4 の三叉神経への適用による非ペプチド性無髄神経を減少させると、C57BL/6 においてのみ放射熱に対する逃避潜時が有意に延長した。これらの結果は、C57BL/6 と BALB/c における熱侵害受容特性の違いは非ペプチド性無髄神経における TRPV1 発現レベルに依存することを示唆している。同様のメカニズムが、ヒト個人間における疼痛感受性の違いにも関与しているかもしれない。

S2-6. Chanzaimo: TRPM7 の硬組織石灰化における役割

福島秀文¹, 圓谷智之², 岡本富士雄¹, 片桐千秋², 鍛冶屋 浩¹, 松下正之², 岡部幸司¹ (¹福岡歯科大学細胞分子生物学講座細胞生理学分野, ²琉球大学大学院医学研究科分子・細胞生理学講座)

イオンチャネルとキナーゼドメインを併せ持つ TRPM7 は、その生物学的機能に不明な点が多い。今回、マウス胎児の TRPM7 の発現部位の検索を行ったところ、歯牙のエナメル芽細胞と象牙芽細胞に TRPM7 の高い発現を認めた。この両細胞には TRPM7 様電流が優位に存在し、shRNA による TRPM7 ノックダウンにより、その発現抑制と共に TRPM7 様電流が減少した。またその際、両細胞の ALP 活性には影響を示さず、石灰化物沈着が抑制された。以上より、TRPM7 の歯質石灰化機構における重要な役割が示唆された。

S2-7. アロマ精油成分の神経伝導抑制作用の構造活性連関

大坪瀬奈, 藤田亜美, 宮原 萌, 松下晋大, 蔣 昌宇, 朱 蘭, 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、アロマ精油成分に活動電位の伝導抑制作用があり、これにはその特異的な化学構造が重要であることを明らかにしている。今回、さらに多くのアロマ精油成分について、構造活性連関を検討した。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。アロマ精油成分の (+)-ボルネオール, (-)-ボルネオール, (-)-リナロール, α-テルピネオール, 酢酸ボルニルによる CAP 振幅減少の IC₅₀ 値は、それぞれ 1.5, 2.3, 2.0, 2.7, 0.65mM であった。p-シメン (2mM) は 22% だけ CAP 振幅を減少させた。この抑制作用の大小関係は以前報告したアロマ精油成分による CAP 抑制の序列

(アルデヒド類 \geq アルコール類 $>$ エステル類 \geq ケトン類 $>$ オキサイド類 $>>$ 炭化水素類)と一致していた。ボルネオールでは光学異性体間でCAP抑制に大きな差は無かった。一方、アルコール類では、環状アルコールよりも鎖状アルコールの方が強く抑制し、また、鎖状アルコールでは、-OH基が構造の端についている方がCAPをより強く抑制した。さらに、アロマ精油成分によるCAP抑制の大きさと、それらのオクタノール/水間の分配係数の間に相関は無かった。以上より、アロマ精油成分によるCAP抑制には、特異的な化学構造が重要であることが確かめられた。

S2-8. 海水魚・淡水魚の胃内に含まれるデカン酸・オクタン酸型グレリンの免疫活性量の比較検討

西 芳寛¹, 海谷啓之², 内田勝久³, 御船弘治⁴, 山田和也⁵, 毛良明夫⁵, 細田洋司², 田中永一郎¹ (久留米大・医・生理学, ²国循研・生化学, ³宮崎大・農・海洋生物環境, ⁴久留米大・医・動物実験センター, ⁵宮崎県水産試験場内水面支場)

【緒言】グレリンは胃で産生されるペプチドホルモンであり、中鎖脂肪酸の修飾で活性型となる。マウスやヒトの活性型グレリンの主要形態はオクタン酸修飾体(C8)だが、デカン酸修飾体(C10)も存在する。我々は、C10の生理作用を調べる目的でC10に特異的な免疫測定法(C10-RIA)を開発し、マウスやヒトでのC10の産生・分泌動態をC8と比較してきた。本研究では、脊椎動物で大グループを形成する魚類について、胃内のC10、C8グレリン量を測定し、C10の存在意義について検討した。【材料と方法】C10-RIAと既報のC8-RIAを用いて、無顎類から真骨類46種(淡水魚19種、海水魚27種)、哺乳類6種における胃内のC10、C8量を測定した。【結果】魚類胃内のC10の存在比(%C10/C8+C10: Ave. 67.0%)は、哺乳類(Ave. 5.2%)より有意に高く($p < 0.001$)、海水魚の胃内C10グレリンの比率(75.7%)は、淡水魚における比率(53.6%)よりさらに高値であった。海産の無顎類および軟骨魚類ではC10のみが検出された。【考察】本研究により、C10グレリンが魚類の胃に多く含まれることが明らかとなった。陸上動物の哺乳類と比較して、食性や棲息環境が異なることが一因と考えられるが、海水魚でより高値を示したことから体液調節、水・電解質代謝への関与について今後検討を進める。

S2-9. 過硫化物による tRNA チオール修飾の制御

○高橋 望¹, 魏 范研¹, 澤 智裕², 赤池孝章², 富澤一仁¹ (熊本大学大学院生命科学研究部分子生理学分野, ²東北大学大学院医学系研究科環境保健医学分野)

硫化水素 H₂S は NO、CO に続く第 3 のガスメディエー

ターとして注目を集め、様々な生理機能の研究が行われてきた。近年、生体内には H₂S よりもはるかに反応性の高い過硫化物(Sn-H)が豊富に存在していることが明らかになった。しかし、過硫化物がどのような生理現象に関わっているかは全くわかっていない。

翻訳を仲介する tRNA には、様々な転写後修飾が存在し、その中で特に硫黄を含むチオメチル化修飾(S-CH₃)が重要な翻訳制御機構として注目されている。リジンに対応する tRNA のチオメチル化修飾は、リジンの正確な翻訳に重要であり、その破綻はプロインスリンの翻訳異常を引き起こし、糖尿病の発症につながる。しかし、チオメチル化修飾の起点となるチオール基転移の分子基盤が不明である。今回我々は、過硫化物を産生する酵素 CBS、CSE をノックダウンすることで、リジン tRNA のチオール修飾が低下することを見出した。また、安定同位体標識した過硫化物を培養細胞に投与して検討したところ、修飾内チオール基への同位体取り込みが確認された。以上の結果から過硫化物はリジン tRNA の供給源であり、今まで H₂S によるものと認識されてきた様々な生理機能に関しても、過硫化物によって制御されている可能性が示唆された。

S2-10. Identification of muscarinic receptors involved in secretion in adrenal chromaffin cells

M. Inoue, K. Harada, H. Matsuoka (Department of Cell and Systems Physiology, University of Occupational and Environmental Health School of Medicine)

Muscarinic receptor subtypes responsible for catecholamine secretion in adrenal medullary (AM) cells still remain to be elucidated. This issue was examined by using pharmacological tools and genetic ablation of muscarinic receptors in mice. Genetic ablation of the M₁, but not the other subtypes, abolished catecholamine secretion in response to muscarine, and the muscarine-induced secretion was reversibly suppressed by MT7, a snake peptide toxin which is highly specific to M₁. Similarly, muscarine failed to produce an inward current in the presence of MT7 in mouse and rat AM cells. These results indicate that the M₁ receptor is responsible for muscarine-induced excitation in AM cells.

S2-11. 化学発光による HCN4 発現部位の可視化

小佐々優子^{1,2}, 大下健輔^{1,2}, 中島則行³, 杉山千絵美¹, 伊藤政之¹, 牛島一男², 鷹野 誠¹ (久留米大学医学部生理学講座統合自律機能部門, ²久留米大学医学部麻醉科, ³京都大学医学研究科神経生物学)

過分極誘発陽イオンチャネルはペースメーカーチャネルとも呼ばれ、HCN1~4 のサブタイプが存在する。このうち HCN4 のノックアウトマウスは胎生致死であるため、その機能には不明な点が多い。我々は HCN4 の発現部位を化学発光により可視化しつつ、ドキシサイクリン (DOX) により可逆的かつ完全に HCN4 の発現を抑制できるダブルノックインマウス HCN4^{Luc/TET}を開発した。このマウスにルシフェリンを投与したところ、*in vivo* では舌、四肢、尾において、*ex vivo* では洞房結節、脊髄、脳で HCN4 の発現が認められた。

DOX を 4 週間にわたり HCN4^{Luc/TET} に投与して HCN4 の発現を tet-off したところ、安静時心電図では、間欠的洞停止や洞不全が認められた。野生型マウスおよび HCN4 を tet-off したマウスにインプロテレンールを投与した場合、どちらも心拍数は上昇し有意差を認めなかった。一方、マウスの頸部迷走神経を露出し電気刺激を行ったところ、野生型では可逆的に徐脈が生じたが、HCN4 tet off マウスでは完全な洞停止が生じ、さらに回復が遅延した。これらの所見から HCN4 は迷走神経刺激時に過度の過分極を制限し、安定した心拍を保つリミッターとして機能している可能性が示唆された。

S2-12. ラット口内炎疼痛に対する半夏瀉心湯の効果

○人見涼露¹、小野堅太郎¹、山口喜一郎¹、寺脇 潔²、大宮雄司²、金子 篤²、黒木愛由¹、宮野加奈子³、上園保仁³、稲永清敏¹ (¹九州歯科大学生理学分野、²株式会社ツムラ研究所、³国立がん研究センター研究所)

ガン治療の副作用として発症する口内炎疼痛は、QOL を大きく低下させることから臨床上大きな問題となっている。最近、口内炎の痛みに対して漢方薬の半夏瀉心湯が有効であることが報告されたが、その鎮痛メカニズムは不明な点が多い。本研究では、以前我々が開発した覚醒下における口腔内刺激法を用いた疼痛評価法により、口内炎モデルラットに発症した口腔粘膜痛に対する半夏瀉心湯および構成成分による鎮痛効果を検討した。ペントバルビタール麻酔下にて下唇粘膜に 50% 酢酸を作用させることで口内炎モデルラットを作製した。口腔内疼痛評価のため、あらかじめオトガイ部皮膚に磁性リングを装着して下方へ牽引することによって、覚醒下において安定した口腔粘膜の露出が可能となり、直接粘膜への機械刺激および薬物塗布を行った。口内炎 2 日目において粘膜上皮が剥離し、炎症性細胞が多く浸潤していた。また、半夏瀉心湯を下唇粘膜へ滴下した後の疼痛関連行動に変化は認められなかったことから、半夏瀉心湯自体に疼痛誘発作用がないことが考えられる。口内炎部の機械的逃避閾値は、口内炎 2 日目にお

いて有意に低下したが、半夏瀉心湯塗布 30 分、60 分後においてコントロール群と比べて有意に閾値が上昇した。さらに構成成分である乾姜と人参の併用塗布により同様の鎮痛効果が認められた。以上より、半夏瀉心湯は、口内炎によって発症する機械的アロディニアの抑制に有効であることが示された。

S2-13. 口内炎誘発疼痛に対する 5-フルオロウラシルの影響

○山口喜一郎^{1,2}、人見涼露¹、小野堅太郎¹、原野望²、左合徹平²、渡邊誠之²、稲永清敏¹ (¹九州歯科大学生理学分野、²同 歯科侵襲制御学分野)

抗がん剤治療の際に副作用として口内炎が発症し、接触により重篤な痛みが引き起こされることから食事ができず、ひどい場合には抗がん剤治療を中断する場合もある。本研究では、抗がん剤による口内炎誘発疼痛への影響を調べるために、ラットにあらかじめ抗がん薬を投与し、口内炎作製後の誘発性疼痛について評価した。抗がん薬として 5-fluorouracil (5-FU, 40mg/ml/kg, 隔日 3 回投与) を用いた。ペントバルビタール (50mg/kg, 腹腔内投与) 麻酔下にて 50% 酢酸に浸したろ紙 (9mm²) を下唇粘膜に 30 秒間留置し口内炎を作製した。5-FU 前投与にて白血球数は有意に減少し、口内炎作製による白血球数の増加がみられなかった。肉眼的評価法による口内炎部位の炎症程度は、5-FU 投与群では有意に増し、コントロール群では酢酸処理後 5 日目には治癒するものの、5-FU 投与群では依然口内炎の所見がみられた。酢酸処理後 2 日目において、5-FU 投与群はコントロール群より自発顔面グルーミング時間は有意に延長し、下唇粘膜部位へのカプサイシン溶液の滴下後のグルーミング時間も有意に延長した。さらに下唇粘膜部への機械刺激に対する逃避閾値は、酢酸処理 2 日目において、コントロール群と 5-FU 群では共に同程度の機械閾値の低下を示したが、5-FU 群は 3, 4 日目でも機械閾値の低下を示していた。これらの結果から 5-FU によって口内炎が増悪し、治癒が遅延することで、化学及び機械刺激による疼痛感受性が充進することが示唆された。

S2-14. ミトコンドリア脳筋症関連遺伝子 MTO1 の機能解析

海江田崇史、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)

ミトコンドリア脳筋症は、ミトコンドリアの好氣的呼吸の異常によるエネルギー需要の多い骨格筋や心筋などが障害される疾患である。近年ミトコンドリア tRNA のアンチコドン 34 位の塩基に存在するタウリン修飾が、ミトコンド

リア脳筋症患者の tRNA で欠失していることが見出された。一般的にアンチコドンの 34 位の塩基はゆらぎ結合形成に関わっているから、tRNA のタウリン修飾の欠如によりコドン—アンチコドン間の結合が阻害され、翻訳異常を引き起こすと考えられる。その結果、ミトコンドリア機能が低下し、ミトコンドリア脳筋症が発症すると推測されている。しかし、タウリン修飾を行う酵素が不明であるため、タウリン修飾が仲介する詳細な生理機能が不明である。我々はタウリン修飾酵素の候補として MTO1 を同定した。本研究では、MTO1 欠損マウスを解析することでタウリン修飾の生理機能を検討した。MTO1 欠損マウスは胎生致死であり、心血管形成不全を示した。MTO1 欠損 ES 細胞では、タウリン修飾が完全に消失し、ミトコンドリア電子伝達系のタンパク質量ならびに複合体活性が著明に低下していた。これらのことから、ミトコンドリア tRNA のタウリン修飾がミトコンドリアにおける翻訳の正確性を維持することで組織発生、とくに心血管系の発達に極めて重要であることが示された。

S2-15. Lobe-specific interaction of calmodulin with C-terminal tail of cardiac Cav1.2 channel

D. Shao^{1,2}, J. Xu¹, M. Zhao², E. Minobe¹, L. Hao², M. Kameyama¹ (¹Department of Physiology, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University, ²Department of Pharmaceutical Toxicology, School of Pharmacy, China Medical University, Shenyang)

CaM interaction determines Cav1.2 channel activity, but the mechanism remains to be clarified. In the present study, we examined the binding of N- and C-lobe of calmodulin (CaM) with the fragment of proximal C-terminus of Cav1.2 channel (CT1) using pull-down assay. We found that both N- and C-lobe of CaM bound to CT1 with a Ca²⁺-dependent manner in C-lobe binding and a Ca²⁺-independent manner in N-lobe binding, suggesting that C-lobe is critical in sensing Ca²⁺. Bmax of C- and N-lobe were 3 and 1 respectively. Similar to intact CaM, individual N-lobe and C-lobe induced Cav1.2 channel activity at 80nM of Ca²⁺. It was notable that the channel activity induced by N-lobe was much larger than that induced by C-lobe (104% vs 44%), implying a dominant role of N-lobe in regulation of Cav1.2 channel at resting condition. Our results suggest that binding of CaM to Cav1.2 channel by its single lobe is enough to reprime the channel, N-lobe of CaM is responsible for maintenance of channel activity at resting condition while C-lobe for Ca²⁺-dependent regula-

tion of the channel.

S2-16. 心房細動心筋におけるイオンチャネルリモデリングを制御する microRNA

森島真幸¹, 岩田英里子^{1,2}, 中田知里³, 塚本善之³, 高成広起¹, 宮本伸二², 守山正胤³, 小野克重¹ (¹大分大学医学部病態生理学講座, ²同 心臓血管外科学講座, ³同分子病理学講座)

心房細動の持続によって生じるイオンチャネルのリモデリングに microRNA の制御異常が関わるという仮説を立て、洞調律患者と持続性心房細動患者の心筋筋(右心耳)に発現する microRNA (miR) のプロファイルを解析した。その結果、miR-3610, miR-210, miR-1181 等の有意な発現過剰が確認された。また、電位依存性 L 型 Ca²⁺チャネル (Cav1.2), 電位依存性 Na⁺チャネル (Nav1.5), アセチルコリン感受性カリウムチャネル (Kir3.1) の有意な発現低下, 及び内向き整流 K⁺チャネル (Kir2.1) の有意な発現上昇が確認された。この内、Kir3.1 の発現変化は心筋細胞内のカルシウム過負荷に起因する miR の発現上昇が関与することが判明した。これらの結果により細胞内カルシウム過負荷は PKC 活性化による Kir3.1 の転写活性を高め、アセチルコリン感受性カリウムチャネル電流を増大させるという新規の心房細動関連リモデリング機構が明らかになった。

S2-17. cMOS イメージセンサーと膜電位感受性色素による心筋興奮伝播の可視化

酒井哲郎 (琉球大学医学研究科システム生理学)

不整脈発現時における興奮波伝播の時間的空間的パターンを解析するためのツールとして、cMOS イメージセンサーと膜電位感受性色素により心筋での興奮伝播の可視化をおこなった。ラット心耳摘出標本を展開したシート状標本をサイトカラシン D で筋収縮を抑制し、merocyanine-rhodanine 系膜電位感受性色素 NK2761 で染色した。染色後標本を顕微鏡ステージに載せ、下から波長 700nm の準単色光を照射し、電気刺激で誘発された活動電位に伴う色素の吸光変化を、透過光強度の変化として科学計測用 cMOS カメラ (浜松ホトニクス ORCA flash4.0, Andor Zyla 5.5) を用いて動画として記録した。この動画にさらに画像処理を加えることにより、刺激部位からの興奮伝播を動画として可視化することに成功した。さらにこの技法を、刺激により誘発した実験的頻脈性不整脈 (tachycardia-like excitation) に適用し、不整脈発現中に興奮波が標本中を連続的に巡回 (re-entry) していることを動画として可視化して示すことに成功した。

S2-18. FM 音応答の聴覚皮質の周波数バンドにおける情報処理

細川 浩¹, 窪田道典², 杉本俊二³, 堀川順生³ (1琉球大学大学院医学研究科システム生理学講座, 2東京医科歯科大学難治疾患研究所, 3豊橋技術科学大学大学院工学研究科情報・知能工学系)

モルモットの聴覚皮質の周波数バンド構造で、時間的に周波数に変化する音 (FM 音) が周波数バンドにどのように表示され処理されるか光学的計測法で調べた。

モルモットの聴覚皮質を光感受性色素で染色し、上行 FM 音 (開始: 0.5kHz, 終了: 16kHz の線形増加), 下行 FM 音 (開始: 16, 終了: 0.5kHz の線形減少) および純音 (0.5-kHz, 16-kHz) に対する周波数バンドでの活動を可視化し、バンド内の平均応答を測定した。

0.5kHz の純音と上行 FM 音に対する 0.5, 1, 2, 4, 8, 16

kHz の周波数バンド (FB) での平均応答波形の最大振幅を比べた。0.5-kHz の純音に対して 0.5-kHz-FB の応答が持続時間に依存せず、他の FB より大きかった。上行 FM 音の場合は、周波数変調速度により、FB 高の分布が変化した。0.25-1kHz/ms では、16-kHz-FB の応答が最も大きく、0.4-0.1kHz/ms では、すべての FB の応答がほぼ同じ値になり、0.1-0.025kHz/ms では、16-kHz-FB の応答が最小であった。16-kHz 純音と下行 FM 音の周波数バンドの最大振幅を比較すると純音に対する 16-kHz-FB の最大振幅は、持続時間に関わらず最も大きかった。下行 FM 音では、1kHz/ms で全ての FB がほぼ同じ値だったが、16-kHz-FB の最大振幅は 0.4kHz/ms まで増加し、0.025-0.25kHz/ms では 16kHz 純音の場合と同じだった。

これらの結果は、上行 FM 音と下行 FM 音の周波数バンド間の情報処理の差異を示唆している。