

シンポジウム I

SI-1. 生きたまま分子機能を捉え・操る—オプトバイオアナリシス—

小澤岳昌 (東京大学大学院理学系研究科化学専攻)

細胞内や動物個体内ではたらく「生体分子の機能および動態」を詳細に解析することは、現在の生命科学研究において重要な技術的課題である。我々は、二分した蛍光タンパク質 (split GFP) あるいは発光タンパク質 (split luciferase) を再構成させ、発光能を回復させる新たな技術—タンパク質再構成法—を開発してきた。タンパク質再構成法の重要な特徴は、他の酵素や ATP 等の化学エネルギーを必要とせず、二分した GFP あるいは luciferase が自己触媒的に、蛍光・発光のシグナル変化を誘起する点にある。これまでに、RNA の動態検出や GPCR の活性評価法等を開発してきた。本シンポジウムでは、タンパク質再構成法の基本原理を概説し、生きた細胞や動物個体内で機能する生体分子の新たな可視化解析法ならびに光操作技術について紹介する。(利益相反 なし)

SI-2. リアルタイム分子生理学が解き明かす体内時計と適応防御システムの対話

田丸輝也 (東邦大学医学部生理学講座細胞生理学分野)

夜型化する生活、グローバル化する社会は体内時刻を攪乱している。その結果、長い進化の末に獲得した概日リズムをベースとした適応防御プログラムの作動不全をもたらす、様々な生活習慣病のリスクを高めていると考えられる。例えば、平均就寝時間の深化と 2 型糖尿病の増加には相関がみられる。時計遺伝子機能を破壊したマウスで生活習慣病に関連した表現型がみられるというエビデンスもある。このような問題に立ち向かうには、体内時計がどのような分子メカニズムで作動しているのか、体内時計と多様な適応防御システムがどのように対話して効率的な適応プログラムを発動しているのかを、分子～細胞～組織～個体レベルで明らかにしなければならない。生きた細胞内で分子機能 (遺伝子発現, 蛋白質相互作用, 蛋白質局在, 蛋白質修飾など) をリアルタイムで捉えるテクノロジーは、このような系におけるクリティカルな分子イベントを解き明かす上で強力なアプローチのひとつとなっている。(利益相反 なし)

SI-3. 体内時計をマウス脳や組織細胞で可視化すると見えてくる時計タンパク質の凄技

深田吉孝 (東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻)

約一日で繰り返す睡眠と覚醒や、昼夜の血圧変化に代表

されるように、多くの生理現象が約 24 時間周期の規則的な変動を示す。これらの日内変動現象は概日リズムと呼ばれ、概日時計という体内時計の一つによって駆動される。進化の過程で、明暗や温度など地球環境の規則的な変動に適応した生物は、長い時間をかけて環境リズムを自らの遺伝子プログラムに組み込み、時計遺伝子の発現リズムに基づく計時機構を獲得した。哺乳類の行動リズムの制御では、視床下部の視交叉上核 (SCN) が中枢時計として機能する。一方、全身のほぼ全ての細胞も自律的な時計機能を持ち、これら末梢時計は中枢時計と同調して生体の様々な概日リズムを生みだしている。このような体内時計システムにおいて、動物の活動時間帯を規定する神経ネットワークはいくつかの謎に包まれている。遺伝子改変マウスの中枢時計や末梢時計を対象にして時計遺伝子発現リズムを可視化することにより、時計タンパク質の翻訳後調節の大切さがわかってきた。(利益相反 なし)

一般演題 セッション I

OI-1. G-CaMP7 発現マウスを用いた大脳皮質神経活動のミクロ、マクロ解析法

○茂木優貴^{1,2}, 安藤恵子^{1,2}, 沖 篤志^{1,2}, 岩井陽一³, 毛内 拓³, 平瀬 肇^{1,2,3}, 大倉正道^{1,2}, 中井淳一^{1,2} (1) 埼玉大学大学院理工学研究科, (2) 埼玉大学脳末梢科学研究センター, (3) 理化学研究所神経グリア回路研究チーム)

G-CaMP などの蛍光センサータンパク質を用いた二光子蛍光ライブイメージングはシナプス動態から局所の回路レベルまで適用可能な脳機能研究方法である。近年、センサータンパク質を用いて領野レベルのマクロな脳活動の計測も試行されている。これまで局所回路レベルの研究ではマクロの脳活動を考慮せずに、個体間の反応のばらつきは個体差として処理されることが多かった。マクロとミクロの脳活動の関連の理解のためには、1 匹のマウスから双方のデータを取り、統一的に解析する必要があるが、これまでセンサータンパク質の性能、観察方法の違いの物理的制約、人の手による ROI 取得でのばらつきからこれは困難であった。今回、高性能化された G-CaMP7 をマウスに導入したトランスジェニックマウスをもちい、マクロ顕微鏡下とミクロ顕微鏡下双方で長期間ライブイメージングできる手術法を検討し、さらに統一した基準で ROI を取得する方法を開発した。(利益相反 なし)

OI-2. 常同行動モデルマウスの線条体投射ニューロンにおける電気生理学的解析

○井上律子, 三浦正巳 (東京都健康長寿医療センター研

究所老化脳神経科学研究チーム神経生理)

大脳基底核の主要な神経核である線条体はマトリックスとストリオソームという解剖学的、神経化学的特徴が異なるふたつの領域から成る。ドーパミンシグナルの異常はさまざまな行動異常をもたらすが、ストリオソームはドーパミン受容体の反復刺激により誘発される常同行動との関連が示唆されている。本研究では、常同行動が増悪するとき線条体投射ニューロンの興奮性がどのように変化しているのか、常同行動モデルマウスの線条体直接路投射ニューロンをマトリックスとストリオソームに分け、電気生理学的解析を行った。ドーパミン D1 受容体を持つ直接路投射ニューロンはストリオソームとマトリックス共に存在するにも関わらず、ドーパミン受容体の反復刺激に対する応答はストリオソームとマトリックスで異なった。このような局所神経回路の変化を明らかにすることで、習慣的な異常行動における線条体の機能領域の意義を検討する。(利益相反 なし)

OI-3. Aldoc-Venus ノックインマウスにおける小脳第 VIII 小葉の尾深部感覚受容領域の同定

○小野里 尊, 羅 媛君, 杉原 泉 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科システム神経生理学)

小脳皮質には、アルドラゼ C などの分子の発現により特徴づけられるプルキンエ細胞集団の配置により複雑な縦縞が認識される。この縦縞構造は入出力神経線維投射パターンとの関係があり、何らかの機能的区画構造を反映すると思われる。我々の作製した Aldoc-Venus マウスでは小脳縦縞構造を同定した上での *in vivo* 実験が可能である。

小脳虫部第 VIII 小葉の機能は、従来明確ではなかったが、我々はこの第 VIII 小葉 1+, 1- の縦縞部顆粒細胞層が尾からの深部感覚入力を受ける事を同マウスにおける電気記録により観察した。この領域の局所破壊により、協調運動能力低下が認められた。この領域の神経投射解析により、仙髄レベルより同部位に特異的な投射をする背側脊髄小脳路投射経路が順行性標識によって見いだされ、現在、逆行性標識により確認中である。この結果は、第 VIII 小葉 1+, 1- の縦縞部が仙髄から特異的に受ける尾の深部感覚情報を姿勢・歩行などの制御に反映させる機能を担うことを示唆する。(利益相反 なし)

OI-4. 細胞外電位勾配による軸索ガイダンス：網膜神経節細胞の軸索を誘導する電場強度

○山下勝幸 (国際医療福祉大学・基礎医学研究センター)

発生初期の網膜には細胞外電位勾配が存在し、網膜神経

節細胞の軸索はこの電位勾配に従って伸長する (Yamashita, *BBRC* 431: 280-283, 2013)。本研究では、網膜神経節細胞の軸索を誘導する電場強度を求めるために、一定の電位勾配が設定できる培養システムを開発した。孵卵 6 日目の鶏胚網膜から、視神経乳頭より背側の部分を切り出し、この網膜切片を Matrigel® に包埋して 24 時間培養した。網膜切片を挟む 2 点の電位差を常時記録し、この電位差が一定となるように培養液に直流電流を通電した。その結果、電場強度が 0.0005mV/mm から電位勾配に従う伸長が見られ、0.2-0.5mV/mm 以上では電場に沿った直進が観察された。以上の結果から、発生初期の網膜に内在する電位勾配 (15mV/mm) は、網膜神経節細胞の軸索を視神経乳頭へ正確に誘導するのに十分な強度であると結論された。(利益相反 なし)

OI-5. ストレス応答シグナルのリアルタイム可視化による炎症遺伝子の制御機構の解明

○富田太郎, 伊藤雅方, 関 由成, 杉本結衣, 赤羽悟美 (東邦大学医学部生理学講座統合生理学分野)

我々は、これまでにマウスモデルを用いて、脂質転移タンパク質 STARD10 が肝臓における脂質代謝調節に関わっており、*Stard10* KO マウス肝臓では高脂肪食負荷による脂肪の蓄積と炎症性遺伝子の発現が野生型に比較して有意に低いことを見出ししてきた。しかし、生体内の炎症シグナルの伝達機構には不明な点が多い。

そこで、炎症に関わる細胞内情報伝達を可視化して理解する目的で、代表的な炎症シグナルの一つであるストレス応答 p38 MAPK 活性のインジケータを開発した。培養細胞を用いて p38 活性化動態と炎症性遺伝子の発現を比較したところ、興味深いことに、刺激の種類や持続時間の情報は、細胞毎の MAPK 応答の不均一性 (heterogeneity) や活性化の時間的変動パターンの情報として伝えられ、p38 MAPK の総量ではなく、変動パターンの情報が鍵となって下流の炎症性遺伝子発現の効率を上昇させることが明らかになった。(利益相反 なし)

OI-6. モノカルボン酸トランスポーター SMCT2 細胞内結合蛋白質の同定

○鬼澤信之, 林 啓太郎, 大塚裕介, 大谷直由, 大内基司, 安西尚彦 (獨協医科大学医学部薬理学講座)

Na⁺ 依存性モノカルボン酸トランスポーター (SMCT) 2 は腎尿管および腸管の管腔側膜に存在するトランスポーターで腎尿管では SMCT1 と共に乳酸などのモノカルボン酸の再吸収を担っている。我々は SMCT2 の細胞内 C 末端に存在する PDZ モチーフと結合する PDZ タンパク

質を検索するため、同部位をベイトとして用いたヒト腎臓 cDNA ライブラリーに対して酵母 Two-hybrid 法を行った。その結果、PDZK1 (34 陽性クローン中 8 回)、Harmonin (34 陽性クローン中 1 回) を結合のパートナーとして同定し、その後免疫沈降法において SMCT2 と Harmonin の結合を確認した。さらに SMCT2 と Harmonin の結合による機能変化を確認する為に遺伝子共発現細胞を用いたモノカルボン酸輸送活性の検討を行い、その結果、共発現細胞において有意なニコチン酸輸送活性の上昇を認めた。(利益相反 なし)

OI-7. 中性子捕捉療法 BNCT 増感剤 4-boronophenylalanine 細胞内取込みの分子機構

○森田亜州華, P. Jutabha, 大内基司, 大谷直由, S. Yothaisong, H. Dokduang, 林 啓太郎, 安西尚彦 (獨協医科大学医学部薬理学講座)

ホウ素中性子捕捉療法は、腫瘍細胞特異的に蓄積したホウ素-10 に熱中性子線を照射して、核反応により細胞を破壊する放射線療法である。ホウ素運搬伸介物質に用いられる 4-boronophenylalanine (BPA) は腫瘍細胞で高発現する L 型アミノ酸トランスポーター 1 (LAT1) により輸送されることが報告されている。今回我々は、LAT の 4 つのアイソフォーム別の BPA に対する選択性を明らかにするために、アフリカツメガエル卵母細胞発現系と LC/MS-MS を用いて、LATs による BPA の取り込みを検討した。D 型 BPA は LAT1 を介してのみ細胞内に輸送されるが、L 型および DL 型 BPA は LAT1 と LAT2 を介して輸送され、LAT3 と LAT4 とは BPA を輸送しないことが明らかとなった。すなわち BPA は LAT1 に特異的な基質ではなく、より選択性の高い LAT1 基質の開発が必要であることが示唆された。(利益相反 なし)

一般演題 セッション II

OII-1. 2 型リアノジン受容体チャネルゲーティングにおける S4-S5 リンカーの役割

○村山 尚¹, 呉林なごみ¹, 小川治夫² (¹順天堂大・医・薬理, ²東大・分生研・高難度蛋白質立体構造解析センター)

2 型リアノジン受容体 (RyR2) は心筋筋小胞体の Ca²⁺ 遊離チャネルであり、興奮収縮連関に中心的な役割を果たしている。RyR2 は 6 回膜貫通型の P 型チャネルである。S4-S5 リンカー (S4S5L) は S4 と S5 セグメントを繋ぐ配列で、膜に平行な α ヘリックス構造を形成してゲーティングを制御すると考えられている。RyR2 では S4S5L のアミノ酸

変異は催不整脈性疾患を引き起こす。本研究では、RyR2 チャネルゲーティングにおける S4S5 リンカーの役割を知るため、S4S5L の各アミノ酸をアラニンに置換してチャネル活性に対する効果を調べた。RyR2 は HEK 細胞に安定発現した。チャネル活性は細胞内 Ca²⁺ 測定およびリアノジン結合法で評価した。アラニン置換変異体は部位特異的にチャネルを抑制または活性化した。最近、RyR の高分解能構造モデルが提唱され S4S5L が S5 および S6 と相互作用することが示唆されている。現在、相互作用に関連した変異体の解析を進めている。(利益相反 なし)

OII-2. TRPM7 は生理的 Mg チャネルなのか?

○田代倫子, 井上 華, 田井 忍, 小西真人 (東京医科大学細胞生理学分野)

TRPM7 チャネルは Mg を透過し、細胞内遊離 Mg 濃度 ($[Mg^{2+}]_i$) の低下により活性化されることから、Mg 流入経路であると考えられるが、生理的な役割は明らかになっていない。我々はラット心室筋細胞において $[Mg^{2+}]_i$ を経時的に測定し、Mg 流入速度と TRPM7 チャネル活性を比較検討した。細胞を無 Mg 高 K 溶液中に浸漬して $[Mg^{2+}]_i$ を低くした後、細胞外に Mg を添加すると $[Mg^{2+}]_i$ は回復する。 $[Mg^{2+}]_i$ 上昇過程は指数関数で近似でき、その微分値を Mg 流入速度として解析した。Mg 流入速度は細胞外高 Mg により上昇、脱分極により減少した。また、TRPM7 阻害剤存在下で減少、TRPM7 活性化剤により上昇した。ホールセルパッチクランプ法で測定した TRPM7/MIC 電流でも同様の変化が観察された。これらの結果は、TRPM7 チャネルが生理的 Mg チャネルであることを示唆する。(利益相反 なし)

OII-3. 腎機能低下が mdx マウスの骨ミネラル代謝異常を惹起する

○和田英治¹, 濱野高行², 林 由起子¹, 松田良一³ (¹東京医科大学病態生理学分野, ²大阪大学大学院医学系研究科腎疾患統合医療学, ³東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻)

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) は治療の確立されていない重篤な遺伝性の筋疾患である。大多数の患者が骨密度低下による骨粗鬆症や骨折を経験し、患者の高齢化に伴い腎機能低下が認められる。本研究では DMD モデルマウス (mdx) は腎機能が低下していると推測し、腎機能低下が骨ミネラル代謝に与える影響を検討した。Cystatin C の血中濃度と X 線 CT スキャナーを用いた腎機能評価の結果、mdx マウスは腎機能が低下していることを明らかにした。mdx マウスに食餌中リンを負荷すると、血中

リン酸濃度が増加し、副甲状腺ホルモン (PTH) が有意に上昇した。すなわち腎機能が低下しているため PTH 抵抗性が起こり、骨が正常の代謝・回転を維持できなくなることで骨粗鬆症が進行することが明らかとなった。これらの結果から、DMD 病態と腎機能低下による骨ミネラル代謝異常は、患者が骨を健康に保つ上で今後着目されるべきであり、対処療法の確立が重要であると考えられる。(利益相反なし)

OII-4. 平滑筋細胞における PGE₂-EP4 シグナルは腹部大動脈瘤の慢性炎症をつかさどる

○横山詩子, 石渡 遼, 石川義弘 (横浜市立大学医学部循環制御医学)

我々は先行研究で、PGE₂受容体 EP4 の欠損や阻害で腹部大動脈瘤の発症を抑制することを報告した。本研究では、PGE₂-EP4 が大動脈瘤を進行させる機序の解明を目的とした。ヒト大動脈瘤組織で平滑筋細胞に EP4 の過大発現を認めたことから、平滑筋細胞選択的 EP4 過大発現マウス (EP4 TG) を作製した。EP4 TG にアンジオテンシン II の持続投与をしたところ、EP4 TG は 8 匹中 7 匹が腹部大動脈瘤の破裂を呈し死亡し、コントロールマウス (NTG) での発症はなかった。EP4 TG の腹部大動脈瘤には Ly6G 陽性好中球・F4/80 陽性マクロファージが浸潤していた。さらに、EP4 TG の平滑筋細胞では、PGE₂により好中球走化性因子 CXCL1, 炎症性サイトカイン IL-6 が有意に多く産生された。これらの結果より大動脈瘤において平滑筋細胞が PGE₂-EP4 シグナルを介して主体的に慢性炎症を促進することが示唆された。(利益相反なし)

OII-5. Sarcolipin ヘテロ欠損マウスにおける心房機能解析

○志村大輔¹, 草刈洋一郎², 笹野哲郎³, 中島康弘⁴, 中井 岳¹, 焦 其 彬⁵, 金 美 花⁶, 横田知大⁷, 石川義弘⁶, 中野 敦⁷, 合田巨人¹, 南沢 享² (¹早稲田大学, ²東京慈恵会医科大学, ³東京医科歯科大学, ⁴京都大学, ⁵杭州師範大学, ⁶横浜市立大学, ⁷カリフォルニア大学ロサンゼルス校)

Cre-loxP 領域特異的組換えシステムを用いた遺伝子改変マウスは、心臓研究領域の発展に大きな貢献をもたらした。一方で、心房筋特異的に遺伝子発現を制御できるモデルマウスの開発は未発達である。我々の先行研究では、心臓で心房筋特異的な発現を示し、sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase の機能を制御するタンパク質として知られている Sarcolipin (SLN) に着目し、SLN 遺伝子座に Cre 組換え酵素を相同組換えにより導入した。この SLN-Cre

ノックインマウスは心房筋特異的遺伝子発現制御ができるマウスとして期待できるが、Cre の導入により内在性の SLN はヘテロ欠損状態にある。本研究では、生理学的及び分子生物学的観点から SLN ヘテロ欠損の影響を解析し、野生型マウスとは心房機能に有意な差はないことを示した。今後、心房筋特異的遺伝子発現制御マウスの作製への活用が期待される。(利益相反なし)

OII-6. 温熱刺激が骨格筋量に及ぼす影響

○大平宇志^{1,2}, 寺田昌弘^{1,2}, 須藤正道^{1,2}, 草刈洋一郎², 福田紀男², 南沢 享² (¹宇宙航空研究開発機構, ²東京慈恵会医科大学)

右坐骨神経のみを切除したラットを用い、温熱刺激が後肢骨格筋量に及ぼす影響を検討した。その結果、2 週間の飼育期間中、間欠的に温熱刺激を行うことにより骨格筋の成長に伴う肥大が促進され、除神経に伴う萎縮は部分的に抑制されることを確認した。その後、温熱刺激による筋萎縮抑制効果のメカニズム解明を目指し行った。ヒラメ筋内の遺伝子およびタンパク質発現解析の結果からは、温熱刺激を行うことにより、除神経に伴うタンパク質分解の亢進および細胞のストレス耐性能の低下が抑制されることが示唆された。また、先行研究では、温熱刺激によりタンパク質合成が促進されることも報告されている。以上の結果から、温熱刺激は神経系を介さず、骨格筋量に影響を及ぼし、運動処方効果を増大させる新たな処方となる可能性がある。さらに、温熱刺激は、運動が困難な患者や高齢者の骨格筋量低下を抑制する有効な処方となることも期待できる。(利益相反なし)

シンポジウム II

SII-1. 誤嚥性肺炎の病態生理とマルチモーダル介入

海老原 覚 (東邦大学医学部リハビリテーション医学研究室)

加齢と共に脳の機能が衰え、Dementia→Dysphagia→Dysstussia→Pneumonia→Death となっていくことが、多くの高齢者の自然経過と思われる。人口の高齢化に伴い誤嚥性肺炎による死亡は増え続け、肺炎は現在日本人の死因の 3 位である。超高齢社会の肺炎に対してはこれまでの起炎菌中心の抗生剤治療のみでは限界があり、人間の生理機能の衰えに焦点を当てた治療が重要となってくる。嚥下機能障害・咳嗽機能障害に対する介入である。多くの正常生理機能は様々なマルチモーダル入力为正しく感知され統合されて維持される。加齢によるその生理機能の衰えは、様々な知覚感受性の衰えあるいはそれらを統合し情報処理する

能力の衰えに基づく場合が多い。そこで誤嚥性肺炎に対する機能介入として、嚥下機能・咳嗽機能発現のために必要なマルチモーダルを組み合わせて介入することが重要となってくる。(利益相反 なし)

SII-2. 痛みのネットワークを探る—光遺伝学から超高磁場 MRI 画像解析まで—

加藤 総夫 (東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター・神経科学研究部, 先端医学推進拠点・痛み脳科学センター)

「痛み」は最も高頻度の患者の訴えであり、その緩和は臨床医学における重要なゴールの一つである。一方、「痛み」は、身体に生じた傷害・炎症などを検出して最適な運動・行動を選択させ、個体の生存可能性を高める合目的な機能である。前者を「病的痛み」、後者を「生理的痛み」と呼び分けることも可能だが、これは人間の都合による分類であって、進化の過程で生物個体の生存可能性を高めてきた

その機能は同一の神経システムによって担われている。しかもこのシステムは進化のさまざまな段階で実装された各要素(領域、微小回路、細胞間・細胞内情報伝達分子群)から構成されている。一次求心神経に始まり、脊髄後角や上行性投射路を経て、視床・体性感覚野などの「感覚」関連領域や、扁桃体、視床下部、帯状回、島皮質、側坐核などの「情動」関連領域、そして、その実体が十分に解明されていない「下降性制御系」などに関連する領域などからなる多要素ネットワークの活動の総体として「痛み」は成立している。近年、脊髄→腕傍核→扁桃体路が、視床・皮質系を介さずに侵害受容情報を直接扁桃体に送る系として注目を浴びている。この経路の情報が、「情動学習の教師信号」としての役割を担う事実を経路特異的な光遺伝学的活性化を用いて検証した結果、および、超高磁場 (9.4T) MRI とマンガン造影法を用いて慢性痛モデルの自発痛における扁桃体の最初期活性化を示した結果を紹介し、新しい「痛み脳科学」の視点を紹介したい。(利益相反 なし)