

A-1. かつおだし摂取はバルブアルブミン (PV) 陽性ニューロン数を増大させマウス情動行動を変化させる

○J. Undarmaa¹, 松本惇平¹, 高村雄策¹, 西丸弘史¹, 中村友也¹, 堀悦郎¹, 近藤高史², 小野武年¹, 西条寿夫¹ (富山大学医学薬学研究部システム情動科学,²味の素株式会社イノベーション研究所)

本研究では、かつおだしの向精神作用について調べるため、C57BL/6J 系マウスを用い、二瓶法によるだし嗜好性を解析後、攻撃行動テスト、および強制水泳試験を行った。その後、攻撃行動やうつ傾向に関与する大脳辺縁系および前頭前野の PV 陽性ニューロン数を解析した。その結果、かつおだしの摂取は、迷走神経を介さず、PV 陽性ニューロン数を増加させ、攻撃性を低下および遊泳時間を増加させた。さらに PV 陽性ニューロン数と攻撃性および遊泳時間はそれぞれ負および正の相関を示した。以上の結果から、かつおだしの摂取により、PV 陽性ニューロンを介して向精神作用を呈する可能性が示唆された。(利益相反 なし)

A-2. 発育期早期のグルタミン酸ナトリウム経口摂取による攻撃性の低下

○西垣瑠里子, 三角吉代, 永井 遥, 丸本良介, 横山善弘, 清水由布子, 上田佳朋, 石田章真, 飛田秀樹 (名古屋市立大学大学院脳神経生理学)

【目的】発育期の情動形成において、外部環境の影響は大きい。本研究は、発育期の適切なうま味摂取が、成熟後の情動行動に変化をもたらすか否かについて検討し、さらにそのメカニズムを検討した。

【方法】発育期に多動性を示し注意欠陥多動性障害 (ADHD) のモデル動物として知られる自然発症高血圧ラット (SHR) を用い、離乳直後の生後 25 日齢 (P25) から P60 までの 5 週間、うま味物質であるグルタミン酸ナトリウム (MSG: 0.6% 水溶液) を飲水投与した。成熟後の社会性行動 (SI) 試験による情動行動を調べた。また、P25 に上部消化管からの迷走神経を横隔膜下で遮断することにより腸脳循環を遮断し、成熟後の SI 試験を実施した。

【結果】水投与群と比べ発育期の MSG 摂取により、SI 試験での新奇動物に対する攻撃性が著しく減少していた。P25 の迷走神経遮断により成熟後の攻撃性の減少は消失した。さらに P25-P39 のより早期の時期の MSG 投与によっても、攻撃性の減少が認められた。一方、塩化ナトリウム (0.6%) 水溶液のみの摂取により、社会性の変化は認められなかった。

【結語】ADHD モデルの SHR に対し、その発育期に MSG を経口から摂取させることによって、消化管上部から迷走神経刺激を介して、新奇動物に対する攻撃性が低下するこ

とが明らかになった。この変化は、発育期早期の MSG による特異的な刺激が重要であることが示された。(利益相反なし)

A-3. ビタミン C 欠乏が塩味及び酸味の末梢味覚受容情報伝達機構に及ぼす影響

○安尾敏明, 諏訪部 武, 碓 哲崇 (朝日大学歯学部口腔機能修復学講座口腔生理学分野)

ビタミンは、きわめて微量で動物の正常な生理機能を保持する不可欠の微量栄養素であり、不足すると特有の欠乏症を起こすことが報告されているが、末梢味覚器に及ぼす影響については未だ不明な点が多い。そこで、本研究ではビタミン C (以下、VC) 欠乏が末梢における味覚の受容機構に与える影響について電気生理学的手法を用いて検討した。

VC 合成能欠如ラットを正常群と VC 欠乏群に分け、通法により種々の基本味溶液に対する鼓索神経応答解析を行った。その結果、欠乏群ラットでは、正常群に比べ、塩化ナトリウム、VC、塩酸、酢酸、酒石酸及びコハク酸に対する応答が有意に低下していることを明らかにした。塩味応答は阻害剤アミロライドによって部分的に抑制されることから、少なくとも 2 種の経路 (アミロライド感受性受容機構; AS とアミロライド非感受性受容機構; AI) が存在することが報告されている。そこで、これらの塩味経路のいずれに VC 欠乏が影響を与えているのか検討するため、アミロライド含有塩化ナトリウムに対する鼓索神経応答を解析した。その結果、高濃度 (300mM 及び 1000mM) の塩化ナトリウムに対する応答では、欠乏群では正常群と比べて、AS 応答成分が有意に減少していたが、AI 応答成分には有意な差が認められなかった。以上の結果から、VC 欠乏は末梢味覚器における酸味及び一部 (AS) の塩味の経路に影響を与える可能性が明らかとなった。(利益相反 なし)

A-4. 輸液用アルブミン製剤のチオール酸化とカルボニル化の解析

○高橋哲平¹, 寺田知新¹, 有川 一², 恵良聖一¹ (岐阜大学大学院医学系研究科分子生理学分野,²中部学院大学短期大学部幼児教育学科)

【目的】ヒト血清アルブミン (HSA) の物性についてこれまで様々な研究がなされてきているが、今回我々は輸液用アルブミン製剤の翻訳後修飾、とくにチオール酸化とカルボニル化について解析し、健常者群 (若年者群と高齢者群) 並びに通常透析 (HD) 患者群のそれらと比較検討した。

【材料と方法】輸液用アルブミン製剤は 4 種類の製剤を対象とした: (#1) Albuminar-5%, (#2) Benesis-5%, (#3)

Benisis-25%, (#4) Kaketsuken-25%. 若年者群と高齢者群の血清はともにボランティアから提供を受けた。HD 群は福島医大・透析センターより提供された(倫理委員会の承認済, インフォームドコンセント済)。チオールの酸化状態解析は HPLC 法及び Ellman 法により, またカルボニル含量はカルボニルアッセイキット (Cayman 社, USA) を用いて分光学的手法により解析した。

【結果と考察】HSA は還元型 (HMA) と酸化型 (HNA : HNA-1 と HNA-2 の 2 種類あり) に分けられる。全ての製剤及び HD 前後の患者群の HMA 値 (%) は, 若年者群のそれに比して有意に低値を示した。分析した全ての HMA 値は, Ellman 法による SH 基含量と強い相関を示した ($r=0.983$, $P<0.01$)。また, 全ての製剤及び HD 前後の患者群の HNA 値 (%) は, HNA-1, HNA-2 ともに若年者群のそれに比して有意に高値を示した。カルボニル化については, 全ての製剤及び HD 後の患者群のカルボニル含量は, 若年者群のそれに比して有意に高値を示した。カルボニル含量と HNA-total (%) には強い相関がみられた ($r=0.894$, $P<0.01$)。これらのことから, アルブミン製剤は通常の人血清に比してかなり酸化的修飾を受けていることが分かったが, それらは精製過程において生じたことが示唆された。(利益相反 なし)

A-5. ノルアドレナリンによる脊髄排便中枢の制御メカニズム

○内藤清惟, 中森裕之, 佐野有希, 椎名貴彦, 志水泰武 (岐阜大学大学院連合獣医学研究科獣医生理学研究室)

過敏性腸症候群において, 「腹部の痛み・不快感」と「排便異常」が同時に引き起こされる。しかしながら, この二つの症状が同時に出現するメカニズムはこれまで不明であった。そこで, 本研究では脊髄において痛みの制御と深く関わっているノルアドレナリンに着目し, 脊髄排便中枢におけるノルアドレナリンの作用を検討した。麻酔下ラットを用いて, in vivo で大腸内腔圧および輸送量の変化を記録し, 大腸運動を評価した。ノルアドレナリンを脊髄腰仙髄部に投与したところ, 大腸運動が顕著に亢進した。この反応は, 胸髄を切断して脳との連絡を断った状態でもみられたが, 神経遮断薬のテトロドトキシンの適用および仙髄副交感神経核から大腸に伸びる骨盤神経の切断によって消失した。このようなノルアドレナリンの作用は, $\alpha 1$ 受容体作動薬であるフェニレフリンによって再現された。以上の結果から, 脊髄排便中枢において, ノルアドレナリンは $\alpha 1$ 受容体を介して神経性に作用し, 大腸運動を亢進することが明らかとなった。この反応は, ノルアドレナリンが仙髄副交感神経核を興奮させることで, 骨盤神経を介して引き

起こされると考えられる。ノルアドレナリンは脊髄における下行性疼痛抑制系の主要な伝達物質の一つであり, これらの結果は過敏性腸症候群において, 腹部の痛みによって脊髄に過剰に放出されたノルアドレナリンが, 排便障害を引き起こしている可能性を示唆している。(利益相反 なし)

A-6. ATP によるラット食道運動の調節機構

○椎名貴彦^{1,2}, 嶋 剛士¹, 内藤清惟¹, 中森裕之¹, 佐野有希¹, 堀井和広², 志水泰武^{1,2} (¹岐阜大学大学院連合獣医学研究科獣医生理学研究室, ²岐阜大学応用生物科学部獣医生理学研究室)

【背景と目的】ATP は, 細胞外情報伝達物質としての役割をもっており, 細胞膜上のプリン受容体を介して, 血管の収縮拡張や消化管の運動などを調節することが知られている。食道において, プリン受容体の存在は指摘されているものの, その生理機能は不明点が多い。そこで本研究は, ATP による食道運動の調節機構を明らかにすることを目的とした。【方法】ラットから摘出した食道標本をオルガンバスにセットし, 張力トランスデューサーを用いて, 縦走方向の機械的反応を記録した。薬物はオルガンバス内の栄養液に適用した。また, RT-PCR により, 食道組織における遺伝子発現を調べた。【結果と考察】迷走神経を電気刺激したところ, ラット食道横紋筋は収縮反応を起こした。ここに ATP を外部適用したが, 食道横紋筋運動に著明な変化は認められなかった。次に, カルバコール投与によって食道粘膜筋板平滑筋を収縮させた状態で, ATP を投与した。ATP により, 平滑筋は弛緩した。この弛緩反応は, プリン受容体の阻害薬によって抑制された。また, 食道におけるプリン受容体の発現を調べたところ, 複数種の P2X および P2Y 受容体が発現していることが明らかとなった。【結論】以上の結果から, ATP はプリン受容体を介して食道平滑筋を弛緩させることが明らかとなった。この知見は, 食道運動に対するプリン作動性調節機構が存在している可能性を示唆している。(利益相反 なし)

A-7. モルモット肝静脈神経収縮の細胞内 Ca^{2+} 制御機構の検討

○高野博充, 橋谷 光 (名古屋市立大学大学院医学研究科細胞生理学)

静脈還流量に影響を与える肝臓内血管抵抗の内, 肝臓出口側の抵抗を司る肝静脈の神経性収縮の細胞内 Ca^{2+} の役割についてモルモット肝静脈標本を用いて検討した。

経壁の神経刺激(持続時間 50 μ s, 頻度 30Hz, 1sec)により Phentolamine (3 μ M) で抑制される収縮を起こした。

nifedipine (1 μ M) はこの反応を抑制しなかった. Phenylephrine (30 μ M) も収縮を起こした. これらの収縮反応は CPA (10 μ M) や Y-27632 (10 μ M) によって抑制された. 細胞内 Ca²⁺濃度の変化について Ca²⁺蛍光指示薬 Cal-520 を用いて検討したところ, 経壁の神経刺激により Tetrodotoxin 感受性の細胞内 Ca²⁺濃度上昇反応が観察された. Phentolamine はこの反応を抑制した. Nifedipine 存在下では経壁神経刺激による細胞内 Ca²⁺濃度上昇反応の抑制が見られた. Phenylephrin も細胞内 Ca²⁺濃度上昇を起こした.

以上の結果より, モルモット肝静脈はアドレナリン作動性の興奮性神経支配を受けていることが分かった. その収縮メカニズムに電位依存性 Ca²⁺チャネルの関与は小さく, 筋小胞体からの Ca²⁺放出機構による信号伝達経路が主であると考えられた. (利益相反 なし)

A-8. 消化管筋層の物理的可動抑制領域における自発性電気活動微小電極アレイ解析

○中山晋介, 森下博隆 (名古屋大学大学院細胞生理学)

消化管筋層などの電氣的に結合した細胞組織は, 電氣的興奮の伝播によって協調的な活動が惹起され機能する. 消化管では特に, 蠕動・分節運動などの協調的収縮弛緩運動により, 管内容物が効果的に分解吸収を受け, 残渣が肛門側へ移送される. 腸管の法則としても知られるように, 従来は, 神経活動が消化管の協調的活動の基盤と考えられてきた. しかしながら, 近年の研究から, 間質細胞ネットワークや電氣的に連結した平滑筋組織自身の自発性興奮も同時に重要な働きをすることがわかってきた.

私たちは, 低インピーダンスの微小電極アレイシステムを用いて, 主に上部消化管筋層標本の自発性電気活動を計測・解析してきた. このシステムにおける白金黒ナノ粒子製低インピーダンス微小電極は, 微小領域で緩徐に変動する(低周波)電気信号に追従するという電氣的な矛盾を解決した. しかしながら, 電極が脆弱なため強固な標本固定が難しく, アクセス抵抗変化による影響を少なくするため, Ca拮抗薬存在下で収縮を抑制した状態で計測することが多い. そこで本研究では, スライスアンカー下に透析膜を配置し, その下部に消化管筋層標本を固定して, 低インピーダンス微小電極アレイ計測を行った. 小腸だけでなく, 結腸の筋層標本においても, 長時間の安定的な計測を行うことができた. 透析膜を介して神経作動薬・拮抗薬やチャネル阻害薬も浸透し, その効果を観察することができた. (利益相反 なし)

A-9. ダイヤモンド電極を駆使した生体内薬物濃度測定

○緒方元気^{1,2}, 任書晃^{1,2}, 石井雄也³, 浅井開³, 佐野大和⁵, 吉田崇正^{1,4}, 楠原洋之⁵, 栄長泰明³, 日比野浩^{1,2} (新潟大・院医・分子生理,²新潟大・超域学術院,³慶應大・理工・化学科,⁴九州大・医・耳鼻科,⁵東京大・院薬・分子薬物動態)

生体に投与した薬物が, 各々の臓器の微小領域に如何に分布しどのような濃度変化を示すかを経時的に観測することは, その化合物の性質や薬理作用を理解する上で不可欠である. 現在, 薬物濃度動態の把握には, 体液や臓器を採取し, それらの標本を体外の分析器にかける方法が主流である. しかし, 従来法では, 臓器・組織内の“局所”における薬物動態を, 「生体内」にて正確かつ長時間に渡りリアルタイムで追尾することは困難である. この重要課題を解決するため, 我々は, 次世代素材「ダイヤモンド」から成る微小電極を搭載した計測系を創出した. モデル薬物として, 利尿薬ブメタニドを使用した. この薬物は, 聴覚に必須な内耳体液の特殊な電位環境を破壊させる. ダイヤモンド微小電極と共に, 電位を測定するガラス微小電極を生モルモットの内耳体液空間へ挿入し, ブメタニドを静注した. 迅速なブメタニドの濃度上昇が測定された. それに少し遅延して, 体液電位の降下が観察された. 薬物の検知限界は, 1 μ M であった. 薬物とその効果を同時にモニターするこの局所生体計測基盤は, 多様な薬物や臓器に適用可能であり, 次世代の創薬や治療法の展開に大きく貢献する. (利益相反 なし)

A-10. 液滴接触膜を応用したイオンチャネル機能解析法

○岩本真幸, 老木成稔 (福井大学医学部分子生理学)

脂質平面膜 (PLB) 法は, 脂質組成や溶液条件などを厳密にコントロールできるため, イオンチャネルの機能解析法として普及してきた. 一方 PLB 法には, 大きな膜面積・膜容量に由来する電氣的ノイズの発生, および, チェンバー内溶液灌流効率の低さ, などといった短所も存在する.

本研究では以上の短所を克服すべく, 脂質単分子膜に囲まれた油中液滴同士の接触で形成する液滴接触膜 (CBB) を用いた新しい人工膜実験法を開発し, イオンチャネル研究への応用を試みた. 本法の特徴は, ガラスピペット先端に膨らませた微小な油中液滴 (約 300pL) を用いることである. これにより, 形成される CBB の面積は従来の PLB の 1/100 程度にすることができ, 電気生理測定時の特性が大きく向上した. また, チャネルタンパク質を再構成したりポソームを微小液滴内に加えておけば, チャネルが CBB に移行し, 単一チャネル電流, および, 巨視的チャネル電流を観測することができた. さらに, CBB 近傍の急速

溶液灌流を試みた。蛍光および電気生理学的測定から、CBB 近傍の溶液交換の時定数は 20ms 程度であることがわかり、CBB 法が急速投与実験にも応用可能であることが示された。(利益相反 なし)

A-11. C 末端側細胞内ドメイン間の相互作用による hERG チャンルの遅い脱活性化の制御機構の解析

○糸 慎一郎^{1,2}、久保義弘^{1,2} (¹生理学研究所神経機能素子部門、²総合研究大学院大学生理学専攻)

電位作動性 K⁺チャンネル (Kv) ファミリーに属する hERG チャンネルは、他の Kv と比べて脱活性化が極めて遅く、その制御には複数の細胞内ドメインの関与が示唆されている。このうち C 末端側には、C リンカードメイン (CLD) と、CLD を介してポア形成ドメインに繋がる環状ヌクレオチド結合相同ドメイン (CNBHD) が存在している。現在までに、これらのドメインによる遅い脱活性化への関与が多く報告されているが、未だにその詳細な機構の解明には至っていない。

本研究では、これらの C 末端側細胞内ドメイン同士の相互作用が遅い脱活性化の制御に関与すると仮定し、その解析を行った。CLD および CNBHD には、電荷をもつアミノ酸が多数存在し、CLD のアスパラギン酸 (D) 727、および CNBHD のアルギニン (R) 752 を、それぞれ逆の電荷をもつアミノ酸であるリジン、およびグルタミン酸に置換した 2 種の変異体は、著しく速い脱活性化を示した。しかし、興味深いことに、これらの変異を組み合わせた二重変異体では、脱活性化の速さが野生型と同じ程度まで回復した。さらに、この D727 は、同じく CLD の R696、および隣接するサブユニット内の CNBHD の D767 との相互作用を示唆する結果も得られた。これらの結果から、D727 を中心とした C 末端側細胞内ドメイン間の相互作用が、hERG チャンルの遅い脱活性化に重要である可能性が示唆された。(利益相反 なし)

A-12. 全般てんかんを伴う精神運動発達遅滞をもたらす Kv2.1 新生 (de novo) 突然変異体は神経連続発火活動を抑制する

○秋田天平¹、才津浩智²、松本直通²、福田敦夫¹ (¹浜松医科大学医学部医学科神経生理学、²横浜市立大学大学院医学研究科遺伝学)

種々の電位依存性 K⁺チャンネル (Kv) の点突然変異が、乳幼児期発症の様々なてんかん発作及び精神運動発達遅滞に関与することが知られているが、その発症機序はよく分かっていない。最近我々は、乳幼児期発症のてんかん患者 437 人の全エクソーム解析により、Kv2.1 をコードする *KCNB1*

遺伝子の 2 つの新生突然変異 (de novo 変異) を 2 人の患児で同定した。変異を有する 2 人の患児は、どちらも乳児期より運動発達遅滞が認められ、生後 1-1.5 年で脳波上びまん性の高振幅不規則多棘徐波結合を呈する全般てんかん発作を発症し、重度の知的障害を呈している。それぞれの変異は S4 電位センサー領域 (p.R306C) 及び S6 ポア領域 (p.G401R) に生じたミスセンス変異であり、R306C 変異を有する Kv2.1 では電位センサーの感受性及び協同性が強く障害され、G401R 変異 Kv2.1 は正常型 Kv2 に対する優性阻害作用を持つことが判明した。Kv2.1 は大脳皮質及び海馬の錐体神経細胞における主要な遅延整流性 K⁺チャンネルであるが、それぞれの変異体を錐体神経細胞に発現させると、いずれの場合も活動電位連発中のスパイク間電位が浅くなり、神経連続発火活動が強く阻害された。このことは、錐体神経細胞の不十分な発火活動により、神経回路網の発達及び安定性の双方が阻害され、疾患発症に至ることを示唆する。(利益相反 なし)

A-13. TRPC チャンネルを制御する新規膜貫通タンパク質 OGU1 の機能解析

○伊藤智哉^{1,2}、高橋重成⁴、加藤賢太⁴、西田基宏¹、森泰生^{4,5}、相澤康則^{2,3} (¹岡崎統合バイオサイエンスセンター (生理学研究所) 心循環シグナル研究部門、²東京工業大学大学院生命理工学研究科分子生命科学専攻、³東京工業大学バイオ研究基盤支援総合センター、⁴京都大学大学院工学研究科合成・生物化学専攻、⁵京都大学地球環境学環境適応生体システム論)

2003 年のヒトゲノム解読から 10 年経った現在でも、新規ヒト遺伝子の探索が精力的に進められている。ヒトゲノム解読の当初、ヒトゲノムには約 2 万 5 千種のタンパク質遺伝子がコードされていると見積もられたが、2005 年から報告され始めたトランスクリプトーム解析によって、ヒトを含む哺乳類ゲノムの遺伝子間領域には、機能未知な転写領域が数千箇所存在していることが明らかになっている。これら転写領域は近年、ノンコーディング RNA (Long non-coding RNA ; lncRNA) 遺伝子候補として注目されているが、その機能実体はほとんど仮説の域を出ていない。

我々は、OGU1 (osteogenesis upregulating transcript 1) と命名された lncRNA 候補の解析過程で、この lncRNA ゲノム座はノンコーディングではなく、実際はタンパク質遺伝子であることを実証し、その翻訳産物が TRPC チャンネルを介したカチオン流入を促進することを見出した。さらに、共免疫沈降の実験過程から、OGU1 と TRPC チャンネルは細胞内で相互作用していることが示唆されただけでなく、OGU1 タンパク質によって TRPC チャンネルの翻訳後修

飾が変化していることを突き止めた。詳細な解析から、OGU1 タンパク質は TRPC チャンルの細胞内輸送経路を変化させており、その制御によってイオン流入を制御していることを示唆することができた。(利益相反 なし)

A-14. 末梢循環障害における TRPC6 チャンルの役割

○富田拓郎¹, 島内 司^{1,2}, 西村明幸¹, 西田基宏^{1,2}
(¹自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター(生理研)心循環シグナル研究部門, ²九州大学大学院薬学研究院創薬育薬研究施設統括室)

動脈硬化症等による末梢循環障害に対して、閉塞部位を迂回する側副血行路形成が治療法として有効である。近年、末梢循環の修復には血管新生よりむしろその後の血管成熟が重要と考えられつつある。しかし未だ血管成熟を制御する分子メカニズムは明らかでない。我々は、血管の筋原性緊張に必須の非選択的カチオンチャンネル TRPC6 が末梢循環のリモデリングを負に制御する因子であることを本研究にて明らかにした。TRPC6 欠損マウスにおいて下肢虚血後の血流回復が WT よりも有意に促進していた。血流回復の促進は血管新生ではなく血管成熟の亢進を伴っていた。下肢虚血後の末梢血管における TRPC6 は一過的にリン酸化されており、その後時間経過に伴ってリン酸化レベルは低下した。末梢循環障害改善薬であるシロスタゾールは TRPC6 リン酸化レベルの増加と相関して血管成熟および血流回復を促進させた。以上の結果から、末梢血管における TRPC6 のリン酸化による抑制が下肢虚血後の血流回復度の決定因子であることを明らかにした。(利益相反 なし)

A-15. Identification of a single amino acid residue involved in the human TRPA1 inhibition by HC-030031 utilizing species specific differences

○R. Gupta, S. Saito, M. Tominaga (Division of Cell Signaling, Okazaki Institute for Integrative Bioscience (National Institute for Physiological Sciences), National Institutes of Natural Sciences, Okazaki 444-8787, Japan)

Pain is an adverse sensation that usually arises from noxious stimuli. Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1), a member of TRP superfamily, is one of the targets for studying the pain mechanism. TRPA1 is known to be activated by various stimuli such as noxious cold (potentially in rodents), pungent natural products (cinnamaldehyde; CA) and environmental irritants (acrolein). Since TRPA1 is an attractive target for pain therapy, many TRPA1 antagonists have been developed and some of

them function as analgesic agents. The purpose of this study is to find out the important residues involved in the antagonistic mechanism of HC-030031 (HC), one of the most potent mammalian TRPA1 antagonists. We show that HC failed to inhibit CA-evoked activation in western clawed frog TRPA1 (fTRPA1) and zebrafish TRPA1b (zTRPA1b) by HC while HC inhibited CA-evoked activation of human TRPA1 (hTRPA1) in a dose-dependent manner in a heterologous expression system with *Xenopus* oocytes. Chimeric and mutagenesis analysis between fTRPA1 and hTRPA1 revealed that a single amino acid residue located between the transmembrane domains 4 and 5 was effectively involved in the inhibitory action of HC. We here revealed structure-function relationships of TRPA1 by utilizing species-specific differences and provide novel insights into inhibitory mechanisms. (COI: none)

A-16. TRPM7 は尿路上皮細胞間結合の形成に関与する

渡邊成樹^{1,2}, ○鈴木喜郎^{1,3}, 内田邦敏^{1,3}, 宮崎直幸⁴, 村田和義⁴, 松本成史², 柿崎秀宏², 富永真琴^{1,3} (¹岡崎統合バイオサイエンスセンター(生理学研究所)細胞生理部門, ²旭川医科大学腎泌尿器外科, ³総合研究大学院大学生理学専攻, ⁴生理学研究所形態情報解析室)

TRPM7 は分子内にキナーゼドメインを持つ非選択性陽イオンチャンネルであり、 Mg^{2+} の恒常性維持に重要であると考えられている。本研究では、tamoxifen 投与時に尿路上皮特異的に TRPM7 がノックアウトされるマウス (TRPM7KO 群) を作製し、尿路上皮における TRPM7 の生理的意義を検討した。膀胱組織での TRPM7 発現部位を免疫組織染色にて検討した結果、Ctl 群では尿路上皮、特に最表層の被蓋細胞にその発現が強く認められ、TRPM7KO 群では有意に減少していた。またパッチクランプ法によって尿路上皮細胞における TRPM7 の機能的発現と TRPM7 KO 群における TRPM7 様電流の電流量の減少を確認した。次にマウスの排尿行動を解析した結果、平均 1 回排尿量が TRPM7KO 群において有意に少ないことが明らかになった。膀胱組織を観察したところ、炎症によるとみられる粘膜下層における浮腫が TRPM7KO 群のみで顕著に認められ、炎症性サイトカインである TNF- α および IL-1 β 遺伝子の発現も有意に亢進していた。さらに尿路上皮を透過型電子顕微鏡にて観察した結果、TRPM7KO 群において被蓋細胞間の結合が有意に開大していた。以上のことから、TRPM7 は尿路上皮において細胞間結合の形成に関与することが示唆された。TRPM7KO 群では尿路上皮バリア機能の低下によって間質性膀胱炎様の症状を呈すると考えられ

る。(利益相反 なし)

A-17. トリ層状核における周波数領域依存的な低電位活性化型 Ca チャネル発現とその役割

○深谷亮太¹, 山田 玲¹, 久場博司^{1,2} (1名古屋大学大学院医学系研究科細胞生理学, ²JST さきがけ)

両耳間時間差 (ITD) は音源定位の手がかりである。ITD は、脳幹の聴覚神経細胞が左右からの興奮性シナプス電位 (EPSP) の同時入力に対して活動電位を発生することで、検出される。精度の高い検出を行う上で、EPSP が速い時間経過と適切な大きさをもつことが重要だが、特に大きさを調節する仕組みはよく分かっていない。鳥類では層状核 (NL) が ITD を検出する。この神経核は特定の周波数の音に強く反応する性質を持つ。また、NL は低電位活性化型 Ca 電流 (LVA I_{Ca}) を持つことが知られているが、NL での役割は分かっていない。そこで、NL において LVA I_{Ca} が EPSP の大きさを調節する可能性を考え、ニワトリの脳幹スライスを用いて、電気生理学的な検討を行った。

NL ニューロンからのホールセル記録下に過分極通電を行うと、通電後に一過性脱分極 (ハンブ) を生じた。ハンブは Na 電流や h 電流を阻害してもみられ、LVA I_{Ca} の阻害でほぼ消失したことから、LVA I_{Ca} を反映すると考えられた。このハンブは低周波数領域に顕著であった。実際、電位固定下において低周波数領域でのみ明らかな LVA I_{Ca} が記録された。一方、ハンブは静止膜電位付近で活性化することから、LVA I_{Ca} が EPSP の伝播に寄与する可能性が考えられる。そこで、LVA I_{Ca} を阻害したところ EPSP は減弱した。すなわち、LVA I_{Ca} が EPSP を増強することがわかった。

したがって、長い樹状突起を持つ低周波数領域 NL では、LVA I_{Ca} が樹状突起での EPSP の伝播を増強することで、効率的な ITD 検出に寄与する可能性が示唆された。(利益相反 なし)

A-18. 聴覚同時検出器細胞の樹状突起におけるシナプス入力の分布とその機能的意義

○山田 玲, 久場博司 (名古屋大学大学院医学系研究科細胞生理学)

トリ層状核 (NL) 神経細胞は両耳からのシナプス入力の同時検出器として働くことで両耳間時間差検出を行い、音源定位に関わる神経核である。NL では音の周波数ごとの同時検出を行う為に、担当する周波数に応じた様々な最適化が行われている。特に低い周波数に応答する細胞ほど長い樹状突起を持つ事が知られているが、その機能的意義は明らかになっていない。

そこで我々はまず低周波数領域の細胞 (LF 細胞) における樹状突起上でのシナプス入力様式の解析を行った。caged グルタミン酸を用いた局所刺激によってグルタミン酸受容体分布を解析したところ、LF 細胞の樹状突起においては遠位部に受容体が集中していた。さらに局所で誘発させた mEPSC の解析から、単一シナプスにおける受容体密度は樹状突起上で均一であることが示唆された。つまり NL の LF 細胞においては興奮性シナプスが主に樹状突起の遠位部に集中していると考えられる。さらに細胞体での電位変化を計測したところ、遠位部への入力は細胞体へ伝わる過程で時間経過を損なわずに大きく減衰することが分かった。またこの減衰過程には樹状突起局所での脱分極が関与している可能性が示唆された。今後は樹状突起局所での電位変化による減衰過程の詳細を明らかにするとともに、長い樹状突起によって入力を減衰させる事の同時検出における意義を検討する予定である。(利益相反 なし)

A-19. 蝸牛らせん靭帯の持続的脱分極性膜電位に関する in silico 解析

○任 書晃^{1,2}, 吉田崇正^{1,2,3}, 村上慎吾⁴, 緒方元気^{1,2}, 上塚 学^{1,5}, 小宗静男³, 倉智嘉久⁵, 日比野 浩^{1,2} (1新潟大・医・分子生理, ²新潟大・超域学術院, ³九州大・医・耳鼻咽喉科, ⁴大阪大・医・分子細胞薬理, ⁵大阪大・医・耳鼻咽喉科)

内耳蝸牛の内リンパ液は、外リンパ液と比較して +80 mV の高電位 (EP) を定常的に有し、聴覚に必須の特性である。内リンパ腔の外側面に位置する蝸牛側壁は、外層と内層という 2 つの上皮層として機能する。内外層の側底膜と頂上膜、計 4 つの膜ドメインの電位の総和が EP を規定する。これらのうち、外リンパ液に面する外層の側底膜 (らせん靭帯) は、通常の細胞膜電位と異なり、+5~+10mV という正の膜電位を定常的に有するが、その機序は不明である。

近年の我々の研究により、らせん靭帯に発現する Na^+ , K^+ -ATPase が主として EP に寄与することが明らかとなった。この実験結果に基づいて、らせん靭帯における持続的脱分極性膜電位の数理モデルを構築した。膜を脱分極させる要素として、 Na^+ 選択性電流を設定し、 Na^+ , K^+ -ATPase との間で、局所で Na^+ がリサイクルするように仮定した。このモデルにおいて、らせん靭帯を浸す外リンパ液の Na^+ , K^+ , Cl^- 濃度を変化させると、低い Na^+ 濃度の時のみ膜電位が過分極することが予測された。さらに、らせん靭帯の Na^+ 選択性電流をモデル上で阻害すると、らせん靭帯の膜電位が低下することで内リンパ液電位が低下し、難聴が惹起されることも理論上予測された。(利益相反 な

し)

A-20. 蝸牛らせん靭帯の線維細胞が示す脱分極性静止膜電位に関する *in vivo* 解析

○吉田崇正^{1,2,3}, 任書晃^{1,2}, 緒方元気^{1,2}, 上塚学^{1,2,4}, 小宗静男³, 倉智嘉久⁵, 日比野浩^{1,2} (1新潟大・医・分子生理, 2新潟大・超域学術院, 3九州大・医・耳鼻咽喉科, 4大阪大・医・耳鼻咽喉科, 5大阪大・医・分子細胞薬理)

内耳蝸牛の内リンパ液は、外リンパ液と比較して+80 mVの高電位 (endocochlear potential: EP) を定常的に有し、これは聴覚に必須の特性である。EPの起源である蝸牛側壁は、内リンパ腔の外側面を構成し、外層と内層という2つの上皮層として機能する。各層の側底膜と頂上膜、計4つの膜ドメインの膜電位がEPを構成する。このうち、外リンパ液に面する外層の側底膜(らせん靭帯の線維細胞)の膜電位 (V_{FC}) は、+10mV前後であるが、この正の静止膜電位の成立機序は不明である。本研究では「膜電位 V_{FC} は膜の Na^+ 透過性に立脚する」という仮説を *in vivo* 電気生理実験により検証した。

生きたモルモットの蝸牛側壁に微小電極を挿入し、らせん靭帯を浸す外リンパ液のイオン組成と V_{FC} および EP の関係を解析した。外リンパ灌流液の Na^+ 濃度を 100mM から 1mM に低下させると、 V_{FC} は $+9.0 \pm 3.7mV$ (平均 \pm SD; $n=28$) から $-31.1 \pm 11.2mV$ ($n=10$) に過分極した。この変化は、 V_{FC} に対して膜の Na^+ 透過性が有意に寄与することを示す。一方、灌流液の K^+ あるいは Cl^- 濃度を変化させた時には、 K^+ あるいは Cl^- 透過性を示唆するような V_{FC} の変化は観察されなかった。以上の結果は、上記仮説を裏付けるものである。(利益相反なし)

A-21. 大脳皮質一次視覚野神経細胞の同期発火特性とその発達

○石川理子¹, 小松由紀夫², 吉村由美子¹ (1自然科学研究機構生理学研究所視覚情報処理研究部門, 2名古屋大学環境医学研究所視覚神経科学)

大脳皮質一次視覚野 (V1) の神経細胞が他の領野に効率よく情報伝達するには、複数の神経細胞が同期的に発火することが重要である。本研究では、V1 神経細胞の層依存的な同期発火特性とその発達を明らかにするために、正常な視覚環境で飼育した開眼直後のラット (13-15 日齢) および生後 24-28 日齢のコントロールラット、生後直後から暗室飼育したラット、両眼瞼縫合により形態視を遮蔽したラットの V1 神経細胞のスパイク活動の同期発火性を解析した。多チャンネル電極を用い、V1 全層から、様々な方向・空

間周波数の正弦波縞刺激により誘発されるスパイク活動を記録した。このスパイク活動に相互相関法を適用し、神経細胞間の同期発火を定量的に解析した。開眼直後の V1 浅層 (2-4 層) では同期発火はあまりみられなかったが、その後正常な視覚体験を経ると、類似した視覚反応性をもつ神経細胞ペアで同期発火が増大した。この視覚特徴選択的な同期発火の発達は、暗室飼育や形態視遮断により阻害された。深層 (5-6 層) の細胞ペアにおいても、開眼直後には同期発火があまりみられず、発達に伴い同期発火性は上昇したが、その視覚特徴選択性は浅層に比べて弱かった。また、暗室飼育や形態視遮断ラットにおいてもコントロールと同様に同期発火が観察された。以上の結果は、V1 細胞における同期発火特性およびその形成機構は、浅層と深層において大きく異なることを示す。(利益相反なし)

A-22. 大脳皮質におけるミクログリアによるシナプス活動修飾

○龜吉亮平^{1,2}, 和氣弘明^{1,2}, 鍋倉淳一^{1,2} (1自然科学研究機構生理学研究所生体恒常機能発達機構研究部門, 2総合研究大学院大学生命科学研究科生理科学専攻)

ミクログリアは中枢神経系免疫細胞であり、これまで障害あるいは病態時において障害部へ遊走・増殖し、死細胞や老廃物の除去を行うことが知られている。近年、2光子顕微鏡を用いた *in vivo* イメージングによって、生理的環境においてミクログリアは絶えずその突起の伸長・退縮を繰り返していることがわかった。さらにその動きによって、シナプスと活動依存的に直接接触することによって相互作用し、シナプスの消失に関与することが明らかとなった。さらに近年、ゼブラフィッシュの視蓋においてミクログリアの突起が神経細胞に直接接触することによってカリウムチャンネルを介してその神経活動を変化させることも明らかとなった。そこで、私たちはミクログリアがシナプスに直接接触することでシナプスの活動を制御・変化させようと考え研究を行った。ミクログリアの突起のシナプス後部への接触の有無による活動の変化を検証するために、ミクログリア特異的に緑色蛍光タンパク質を発現している Ionized calcium binding adapter molecule 1 (Iba-1)-EGFP トランスジェニックマウスに、赤色蛍光タンパク質である tdTomato、カルシウム感受性蛍光タンパク質である GFP-based Calcium Calmodulin probe (G-CaMP6f) をアデノ随伴ウイルスを用いて大脳皮質第一次運動野第 5 層の神経細胞に発現させ、2光子顕微鏡を用いて覚醒下でミクログリアの接触とシナプス後部のカルシウム上昇の相互相関を観察した。

その結果、ミクログリアの突起がシナプス後部に接触し

た際に、そのカルシウム上昇頻度が非接触時と比べて有意に増加していることが明らかとなった。一方、Lipopolysaccharide (LPS) を投与することで生理的なミクログリアの機能を破綻させるとこの現象は観察されなかった。さらに、生理的な環境におけるミクログリアが個体行動に与える影響を検証するために、レバー引きによる水報酬の運動学習課題を行ったところ、LPS を投与した群において有意に学習効率が減少していた。以上の結果から、生理的な環境におけるミクログリアが直接シナプスに接触することでその活動を制御し神経回路の可塑性を変化させる働きをもつことが示唆された。(利益相反 なし)

A-23. マウス ES 細胞由来一視床下部培養系における MCH ニューロンの免疫組織化学的解析

○小谷 侑¹, 須賀英隆², 金子葉子¹, 中島 昭³, 長崎弘¹ (¹藤田保健衛生大学医学部生理学 I, ²名古屋大学大学院医学系研究科糖尿病・内分泌内科学, ³藤田保健衛生大学医学部生理学)

近年、マウス ES 細胞 (mESC) から視床下部組織を分化誘導する手法が開発され、新たな *in vitro* 実験系としての活用や再生医療への応用が期待されている。これまでに我々は、パゾプレシンニューロンを始めとする種々の視床下部細胞の分化を報告しているが、個々の細胞種の特性に關して十分な検討はなされていない。本研究では、摂食行動や睡眠覚醒調節に関わるメラニン凝集ホルモン (MCH) ニューロンに焦点を当て、免疫組織化学的特徴を解析した。

分化誘導開始後 3 週目から、MCH の mRNA は指数関数的に増大し、多くの MCH 免疫陽性細胞が観察された。これらの細胞は神経細胞マーカー (Tuj1, HuC/D) 陽性であり、発達過程の MCH ニューロンとよく似た細胞形態を示した。また、生体内の MCH ニューロンと同様に、神経ペプチドである CART や、GABA 合成酵素である GAD67 等の共発現が認められた。他のニューロン種との二重染色を行ったところ、視床下部背外側領域において MCH ニューロンと近接するオレキシンニューロンまたはドーパミンニューロンとのシナプス様連絡が観察された。以上のように、mESC 由来 MCH ニューロンは生体内の MCH ニューロンと多くの共通点を有することから、視床下部における神経発生過程を再現していると考えられる。今後この系を用いて、MCH ニューロンの発生調節に関する解析を進めたい。(利益相反 なし)

A-24. ラット摘出心臓の血液交叉灌流実験系を用いたメカノエナジェティクスとカルシウムイメージング解析法の開発

○小畑孝二¹, 森田啓之¹, 高木 都^{1,2} (¹岐阜大学大学院医学系研究科生理学分野, ²奈良県立医科大学医学部医学科分子病理学)

ラット血液交叉灌流摘出心臓を用いたメカノエナジェティクス解析は、左心室圧—容積と冠循環流量と動静脈血液酸素濃度較差のリアルタイム測定により 1 心拍毎の心筋酸素消費量 (VO₂) と発生する総機械的エネルギー (PVA) の関係を算出する。得られた VO₂-PVA 関係は直線を表し、その勾配が PVA の酸素コスト、Y 軸切片が興奮収縮連関のカルシウムハンドリングと基礎代謝に利用される酸素消費量をそれぞれ表している。これは過去の心臓メカノエナジェティクス解析研究の積み重ねられた結果に基づいている。しかし従来の研究では、Y 軸切片の興奮収縮連関の酸素消費について、前負荷の増大に依存して増えるのか、つまり本当に PVA 非依存性か? という疑問に明確な証拠を示してはいない。本研究では、興奮収縮連関のカルシウムハンドリングに要するエネルギー計測と遺伝子組換え型蛍光カルシウムプローブ、G-CaMP による全(丸ごと)心臓でのカルシウムイメージングの同時リアルタイム計測法の開発を目指した。メカノエナジェティクス解析に加え、G-CaMP 遺伝子組換えラットの全心臓でのカルシウムイメージングとの同時リアルタイム計測を試みたところ、1 心拍毎の蛍光強度の変化を捉えることに成功し、左心室中に挿入したバルーンの容積を増大させることにより、蛍光強度の増大部位も認めた。しかし motion artifact が含まれ、正確なカルシウム動態とは言い難い結果であった。現在、この問題を解決する方法を考案中である。(利益相反 なし)

A-25. 光遺伝学を駆使した難聴モデルマウスの作成

○佐藤満雄^{1,2}, 樋口大河¹, 任 書見¹, 吉田崇正^{1,3}, 緒方元気¹, 上塚 学^{1,4}, 増田正次⁷, 渡部高久⁸, 神崎晶⁸, 小川 郁⁸, 竹林浩秀⁵, 土井勝美², 田中謙二⁶, 日比野 浩¹ (¹新潟大・院医・分子生理, ²近畿大・医・耳鼻咽喉科, ³九州大・院医・耳鼻咽喉科, ⁴大阪大・医・耳鼻咽喉科, ⁵新潟大・院医・神経生物・解剖学, ⁶慶應大・医・精神神経科学, ⁷杏林大・医・耳鼻咽喉科, ⁸慶應大・医・耳鼻咽喉科)

不可逆的な内耳性難聴の中には、初期に可逆性を示す場合が少なくない。従って、罹患当初での効果的な治療法の開発が必要である。内耳での障害部位は、上皮組織である血管条、感覚細胞である有毛細胞、そして神経系に大別される。本研究では、その中で、内耳疾患との関係に最も謎が多い血管条を標的とする可逆性難聴マウスを作成した。血管条は、内耳の特殊体液が示す +120mV の高電位の維持を主に担う。この Endocochlear potential (EP) は、有毛細胞

胞の高い感受性に寄与していると考えられている。独自の光遺伝学システム (Tanaka, 2012) を駆使し、血管条に発現する Proteolipid protein のプロモーターの下流に、光感受性非選択的陽イオンチャネル (ChR2) を導入した。免疫組織染色により、ChR2 の強い発現を血管条に確認した。内耳に青色光を照射すると、可逆性の中程度難聴が聴性脳幹反応にて測定された。さらに、電気生理実験において、光照射による速やかな約 20mV の EP 低下を見出した。照射を中止すると EP は完全回復した。このマウスは、可逆性難聴の治療法開発に有用となる。(利益相反 なし)

A-26. 新しい腹部大動脈瘤モデル動物の作製 —大動脈壁局所的虚血は瘤化を惹起する—

○田中宏樹¹, B. Tomasz¹, 佐野秀人¹, 鈴木優子¹, 海野直樹², 浦野哲盟¹ (¹浜松医科大学医生理学, ²浜松医科大学血管外科)

【目的】既存の腹部大動脈瘤 (AAA) モデル動物はヒトの病理と相違がある。我々はヒト AAA の病理観察から、腹部大動脈 (Ao) 壁内の血流を担う外膜 vasa vasorum (VV) が狭窄し瘤壁が虚血状態にあることを見出した。そこで、意図的に Ao 壁を局所的に虚血に導く新たなモデル動物の作製を試みた。【方法】12 週齢 SD ラットに対し、まず腎動脈以下 Ao を全長に渡り剥離。次に中枢方向から Ao 壁内に流入する VV を遮断するため、Ao 内径と同じ短いチューブを腎動脈以下の Ao 内に留置。Ao 内腔が狭窄せずに血流が維持されるようチューブごと壁を細い糸で結紮した。【結果】AAA はチューブ挿入部の末梢から Ao 分岐部の中枢側に 75% 形成された。処置 24 時間後では、組織血流低下と HIF-1 α が発現した。動脈瘤 (Sac) 最大径は 14 日で 1.4 倍、28 日で 1.9 倍と緩徐に拡大した。Sac では炎症細胞浸潤、MMP の産生、中膜平滑筋細胞のアポトーシスとエラスチン構造の破綻が認められた。28 日目ではヒト AAA と同様に外膜 VV の内腔は狭小化し、壁の虚血、組織 ATP 値の低下が認められた。また線維成分に富んだ壁に血栓も認められた。【結論】Ao 壁の虚血により瘤化が惹起され、ヒト AAA の病理組織像に類似した新しい AAA モデルの開発に成功した。今後、AAA の病態解明に本モデルを使用し解析を進めていく。(利益相反 なし)

A-27. 下肢運動障害をもつ脳室周囲白質軟化症モデルラットの感覚運動皮質の解析

○上田佳朋¹, 三角吉代¹, 鈴木美奈¹, 高瀬弘嗣², 伊藤紫野^{1,3}, 石田章真¹, 鄭 且均¹, 飛田秀樹¹ (¹名古屋市立大学大学院脳神経生理学, ²同 共同研究教育センター, ³同 産科婦人科学)

【目的】脳の発達が未熟な早産児では、オリゴデンドロサイト後期前駆細胞 (preOL) の特異的虚血脆弱性により脳室周囲白質軟化症 (PVL) が多く、脳性麻痺、認知障害 (発達障害を含む) が問題となっている。我々は、PVL の病態を反映するモデル動物を、生後 3 日齢の Wistar ラットを用い右総頸動脈閉塞と 6% 低酸素の条件により作製し、運動機能障害と preOL の生後発達との関係についての解析を進めている。

【方法】運動機能は、Motor Deficit Score, Rotarod, Digi-Gait を用い評価した。大脳皮質内微小電気刺激 (ICMS) により、電気応答性の感覚運動皮質マップを調べた。組織変化は、Fluoro-gold ラベリング、MBP 免疫染色および透過型電子顕微鏡により検討した。

【結果】運動機能テストにおいて、PVL モデルでは下肢を中心とした運動障害および協調運動障害が確認された。ICMS により、下肢領域の感覚運動皮質マップが生後変化していた。組織染色により、障害側大脳皮質の神経障害は認められないのに対し、障害側皮質上層で MBP 染色性が低下していた。しかし、電鏡では、運動皮質および感覚皮質領域において有髄神経軸索数に違いは認めなかった。

【結論】PVL モデルでは、大きな神経障害はなく協調運動が障害されていることが確認された。また、発育後の皮質マップの変化が確認され、preOL の生後発達の違いが運動機能障害と関連することが示唆された。(利益相反 なし)

A-28. 高脂肪食飼育ラットの循環中枢 RVLM における orexin の役割

○山口 葵¹, 小畑孝二², 森田啓之² (¹岐阜大学医学部医学科, ²岐阜大学大学院医学系研究科神経統御学講座生理学分野)

高脂肪食で飼育されたラット (HFD) は正常ラット (ND) と比較し、体重、動脈血圧 (AP)、血中 leptin 濃度が高く、生活習慣病の動物モデルとして知られている。今回私たちは、覚醒・摂食ホルモンである orexin が HFD における AP 上昇に関与しているのではないかと仮説を立てた。生後 3 週齢から 10 週間にわたり高脂肪食あるいは普通食で飼育した SD ラットを用いて、以下の実験を行った。脳脊髄液中の orexin A 濃度を ELISA 法で測定したところ、HFD で高い傾向が見られたものの有意な差はなかった (HFD: 62.5 ± 2.1 pg/mL, ND: 58.1 ± 3.0 pg/mL)。吻側延髄腹外側核 (RVLM) での orexin 受容体 (OX1R, OX2R) の mRNA 発現量を RT-PCR でそれぞれ測定したところ、RVLM での OX2R は、HFD で有意に上昇していた (HFD: 0.98 ± 0.21 , ND: 0.50 ± 0.10)。次に HFD における AP 上昇に orexin が関与しているかどうかを確かめるために、OX2R の発現

量が多かった RVLM に orexin B (3.5mM, 50nL) を直接投与して AP の応答をウレタン- α クロラロース麻酔下の HFD と ND で比較した。orexin B の投与により ND では緩やかに AP が上昇したのに対し、HFD では速やかに上昇した (time to peak, HFD : 184.3 ± 17.5 s, ND : 289.5 ± 8.5 s)。しかしながら AP 上昇は ND と HFD で有意な差はなかった (Δ AP, HFD : 15.8 ± 1.8 mmHg, ND : 12.6 ± 5.2 mmHg)。以上の結果から、HFD でみられる AP 上昇に RVLM における OX2R の発現増加および orexin B が関与している可能性が示唆された。今後 OX2R antagonist 投与を行い、さらなる仮説の検討をしていく。(利益相反 なし)

A-29. シリアンハムスターにおける cold-inducible RNA-binding protein の発現調節機構

○佐野有希, 内藤清惟, 中森裕之, 椎名貴彦, 志水泰武 (岐阜大学大学院連合獣医学研究科獣医生理学研究室)

【背景と目的】シリアンハムスターは、自発的に体温を低下させ冬眠を行う。この時、10°C 以下の低体温にもかかわらず低温障害が起らず、生命活動が維持されている。我々は、ハムスターの心臓において cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) 遺伝子のスプライシング調節が平常時から冬眠時に変化することを明らかにしてきた。そのため、CIRP が冬眠時の低温障害の回避に重要な役割を果たしていると推察している。そこで本研究では、冬眠時特異的な CIRP 調節機構をより詳細に検討するため、様々な臓器における CIRP 遺伝子発現を解析した。【方法】ハムスターを低温環境飼育することで冬眠を誘発し、臓器を採材した。CIRP mRNA の発現は RT-PCR 法により解析した。【結果】検索対象とした全ての臓器において、平常体温時では CIRP ホモログ mRNA 以外に複数のスプライシングバリエーションが検出された。それに対して冬眠時は、どの臓器においても CIRP mRNA 以外のバリエーションが減少していた。【考察】冬眠時特異的なスプライシング調節は CIRP タンパク質の合成効率の上昇に寄与していると考えられる。本研究において、心臓以外の臓器においても同様の調節機構の存在が示唆されたことから、CIRP タンパク質は低温時の生命維持のために重要である可能性がある。(利益相反 なし)

A-30. G 蛋白活性調節因子 AGS8 は VEGF2 型受容体の細胞内調節を介して血管新生を制御する

○林 寿来, A.A. Mamun, 佐喜真未帆, 高橋理恵, 佐藤麻紀, 西村直記, 犬飼洋子, 岩瀬 敏, 佐藤元彦 (愛知医科大学医学部生理学講座)

三量体 G 蛋白情報伝達系は生理学的に非常に重要であ

り、また多くの疾患の発症・進展に関与することから様々な観点から研究が進められている。近年、受容体とは独立して G 蛋白の活性調節を行う分子、G 蛋白活性調節因子 (Activator of G-protein Signaling, AGS) が存在することが明らかとなった。我々が注目する AGS8 はラット狭心症モデルの心臓から同定した分子であり、これまで研究してきた虚血心筋での機能に加えて、血管形成への関与が考えられる。本研究では血管内皮細胞における AGS8 の機能について、特に血管形成を促進する Vascular endothelial growth factor (VEGF) シグナル伝達系における AGS8 の関与について検討した。

培養血管内皮細胞に対して、siRNA を用いて AGS8 分子の発現を knockdown したところ、VEGF が誘導する細胞増殖・細胞移動・管腔形成が顕著に減少した。また AGS8 knockdown では、VEGF が惹起する VEGF2 型受容体 (VEGFR2) および下流シグナル分子のリン酸化が特異的に著しく減弱した。AGS8-G $\beta\gamma$ 結合阻害ペプチドの内皮細胞への導入でも同様の結果が得られた。さらに免疫沈降により、VEGFR2-AGS8-G $\beta\gamma$ が複合体を形成していることが明らかになった。次に、内皮細胞での VEGFR2 の局在を解析するために、FACS および細胞染色を行った。その結果、AGS8 knockdown では細胞膜上の VEGFR2 が減少し、逆に細胞質内のゴルジ装置および初期エンドソームに VEGFR2 が増加することが明らかになった。一方で VEGFR2 の細胞局在変化はエンドサイトーシス阻害剤による影響は受けなかった。以上の結果から AGS8 は細胞内で VEGFR2 および G $\beta\gamma$ と複合体をつくり、VEGFR2 の細胞膜への輸送制御を行うことで、VEGF シグナルおよび血管新生を制御していることが示唆された。(利益相反 なし)

A-31. クラス II PI3-キナーゼ PI3K-C2 α はエンドソーム上での TGF β /Smad2/3 シグナリングに必須である

○安藝 翔¹, 吉岡和晃¹, 岡本安雄¹, 多久和典子², 多久和 陽¹ (¹金沢大学医薬保健研究域医学系血管分子生理学, ²石川県立看護大学看護学科健康科学)

PI3 キナーゼ (PI3K) は PI-3-P, PI-3,4-P₂, PI-3,4,5-P₃ を産生する。主として PI-3,4,5-P₃ を産生し細胞増殖や細胞運動に関与するクラス I 型 PI3K とは異なり、PI-3-P, PI-3,4-P₂ を産生するクラス II 型 PI3K の機能はこれまで不明であった。我々はクラス II 型 PI3K-C2 α が血管内皮細胞において小胞輸送に必要であり、VEGF 受容体や S1P 受容体のエンドサイトーシスに関与していることを明らかにしてきた。本研究では、TGF β シグナリングにおける PI3K-C2 α の関与を検討した。内皮細胞において、TGF β が受容体

(TGF β R) に結合すると TGF β R はエンドソームに内在化され、PI-3-P 結合モチーフを有するエンドソーム局在足場タンパク質 SARA 依存的に Smad をリン酸化した。その後、リン酸化 Smad は核内に移行して VEGF を含む遺伝子の発現を促進した。PI3K-C2 α ノックダウンは TGF β 刺激後の TGF β R 内在化を抑制し、エンドソームにおける TGF β R-SARA-Smad 複合体の形成、Smad リン酸化と核移行、さらに VEGF 遺伝子発現をすべて抑制した。TGF β 1 はエンドソームの PI-3-P レベル及び SARA の局在に影響しなかったが、細胞膜葉状仮足において PI3K-C2 α 依存的に PI-3,4-P₂ レベルを増加させた。さらに、マトリゲルプラグ内インビボ血管新生アッセイにおいて、TGF β 1 は野生型マウス及び平滑筋特異的コンディショナル PI3K-C2 α KO マウスではマトリゲル内の微小血管数を増加させたのに対し、内皮特異的 PI3K-C2 α KO マウスにおいては TGF β 1 の血管形成促進作用が抑制された。

以上の結果から、内皮において PI3K-C2 α は TGF β R のエンドソームへの内在化に必要であり、この作用を介してエンドソーム上での Smad 活性化と血管新生に関与すると結論された。(利益相反 なし)

A-32. 腎尿細管における細胞間接着分子 claudin 発現に対する低浸透圧の影響

○藤井尚子¹、遠藤智史¹、松永俊之¹、山崎泰広²、山口賢彦²、菅谷純子²、五十里 彰¹ (¹岐阜薬科大学薬学部生化学、²静岡県立大学薬学部生体情報分子解析学)

上皮細胞は細胞間の隣接部位にタイトジャンクションを形成し、イオン透過性を制御する。タイトジャンクションには 20 種類以上のサブタイプからなる claudin が発現する。腎尿細管の各セグメントにおけるサブタイプの発現様式は異なるが、その調節機構は大部分が不明である。近年、尿細管からの電解質の再吸収が claudin によって調節されることが明らかになってきた。電解質の再吸収は尿の浸透圧調節に大きく関わるため、本研究では低浸透圧処理による claudin の発現変動とその調節機構を検討した。

イヌ尿細管由来の MDCKII 細胞を低浸透圧処理すると、claudin-1、-2 の発現が時間依存的に低下した。低浸透圧処理により claudin-1 mRNA 量は低下したが、claudin-2 mRNA 量は変化しなかった。タンパク質の安定性の低下が関与すると考えられたため、翻訳阻害剤のシクロヘキシミド存在下で claudin-1、-2 の発現を調べたところ、低浸透圧処理により claudin 発現の低下が促進された。リソソーム阻害剤であるクロロキシンやエンドサイトーシス阻害剤の共処理によって、claudin の発現低下が抑制された。低浸透圧処理により claudin のリン酸化量が変化した。

以上の結果から、尿細管上皮細胞が低浸透圧環境に暴露されると、claudin のリン酸化量の変化、エンドサイトーシスの亢進、リソソームにおける分解を介して、claudin の発現量を変化させると推察された。(利益相反 なし)

P-1. アナフィラキシー関連物質の麻酔下ラットにおける肺循環、体循環、気道内圧に及ぼす作用

○王 墨飛、宋 潔、張 涛、九田裕一、谷田守、倉田康孝、芝本利重 (金沢医科大学医学部生理学 II 講座)

【目的】麻酔下ラットにおいて左房圧 (LAP)、肺動脈圧 (PAP)、心拍出量を測定して肺血管抵抗 (PVR) を、気道内圧 (AWP) と体循環の総末梢血管抵抗 (TPR) とともに測定して、アナフィラキシー関連物質の肺循環、体循環、気道に対する作用を明らかにする。

【方法】Sprague-Dawley ラットを麻酔開胸人工呼吸下にて PAP、LAP、大動脈血流量 (ABF)、大動脈圧 (SAP)、中心静脈圧 (CVP)、AWP を直接連続的に測定して、PVR ((PAP-LAP)/ABF) と TPR ((SAP-CVP)/ABF) を算出した。血小板活性化因子 (PAF)、Histamine、Serotonin、Leukotriene (LT) C₄、Prostaglandin (PG) D₂ を原則 0.01~300 nmol/kg の量を静脈内投与した。

【結果】PVR は Histamine と Serotonin では変化しなかったが、PGD₂ ではわずかに増加し、LTC₄ では顕著に増加し、PAF で最も大きく増加した。TPR は LTC₄ で増加したのに対して、他の物質では低下した。AWP は PAF と Serotonin で増加したが、他の物質では変化しなかった。

【結論】In vivo ラットにおいてアナフィラキシー関連物質に対する肺循環、体循環、気道内圧の反応は各物質間で様ではなかった。肺血管収縮は Histamine、Serotonin ではみられず、PAF で強く、次いで LTC₄、そして PFD₂ では弱かった。気道収縮は PAF と Serotonin でみられた。体循環の血管拡張は LTC₄ 以外でみられた。(利益相反 なし)

P-2. マウス循環ショック時における腎臓交感神経活動反応

○張 涛、谷田守、宋 潔、王 墨飛、九田裕一、倉田康孝、芝本利重 (金沢医科大学生理学 II 講座)

【目的】我々はこれまでラットを用いたアナフィラキシーショックの防御機構として自律神経系の関与を示唆してきた。本研究では、マウスの循環ショックにおける自律神経反応を検討するために、in vivo 麻酔下マウスの腎臓交感神経活動を測定し、アナフィラキシーショックと出血性ショックでの反応を観察した。

【方法】 ovalbumin で感作した C57/BL6J マウスの動脈圧と遠心性腎臓交感神経活動 (RSNA) を麻酔下で測定し、静脈内より抗原を投与してアナフィラキシー低血圧を惹起した。また、大腿動脈から脱血し、出血性ショックを惹起した (平均血圧を約 50mmHg ; 10 分間維持)。

【結果】 アナフィラキシー低血圧では、抗原投与直後から投与後 2 分まで血圧上昇とともに RSNA 抑制反応が観察され、その後、血圧低下とともに RSNA 増大反応が惹起された。この二相性の RSNA 反応は圧受容器切除により消失した。一方、出血性低血圧では、出血直後に RSNA は増大し、その後、有意に低下した。この RSNA 抑制反応は迷走神経切除や TRPV1 アンタゴニスト (Capsazepine) 静脈内前投与によって消失した。

【結論】 マウスアナフィラキシー低血圧における二相性の RSNA の反応は圧受容器反射を介していることが示唆された。また出血性低血圧における RSNA の抑制反応は、求心性迷走神経系の TRPV1 チャンネルを介していることが示唆された。(利益相反 なし)

P-3. ラットアナフィラキシーショック時の腰椎交感神経活動と下肢骨格筋血流量反応

○宋 潔, 谷田 守, 張 涛, 王 墨飛, 九田 裕一, 倉田康孝, 芝本利重 (金沢医科大学生理学 II 講座)

【目的】 自律神経系はアナフィラキシーショック時における防御機構の一つである。我々はこれまで麻酔下ラットでアナフィラキシーショックを惹起させると腎臓交感神経活動が増大し、その調節経路に圧受容器反射経路が関与しないことを報告した。本研究では、下肢骨格筋血流量調節に関与する腰椎交感神経活動がアナフィラキシーショック時に変化するか否かを検討した。

【方法】 ovalbumin で感作した Sprague-Dawley ラットの動脈圧 (SAP)、遠心性腰椎交感神経活動 (Lumbar-SNA)、大腿動脈血流量 (FBF) を麻酔下で測定し、静脈内より抗原を投与してアナフィラキシー低血圧を惹起した。

【結果】 アナフィラキシー低血圧を惹起すると、Lumbar-SNA は抗原投与後 2 分から有意に増大した。抗原投与後 10 分で観察される Lumbar-SNA 増大反応は、圧受容器切除ラットで消失した。一方、FBF はアナフィラキシー低血圧時では、抗原投与後 10 分まで減少しその後回復した。この反応は、圧受容器切除ラット及び腰椎交感神経切除ラットにおいても同様に観察された。

【結論】 アナフィラキシー低血圧時の Lumbar-SNA は、圧受容器反射経路を介して増大反応を示すことが示唆された。一方、FBF は、アナフィラキシー低血圧では減少し、血圧回復とともに血流量が回復し、この反応は腰椎交感神

経や圧受容器反射経路に依存していないことが示唆された。(利益相反 なし)

P-4. サル海馬 CA1 領域の神経活動と睡眠ステージとの相関

○田村了以 (富山大学大学院医学薬学研究部 (医学) 統合神経科学)

げっ歯類の海馬 CA1 領域では、レム睡眠期に 4-10Hz の周期性徐波、また、ノンレム睡眠期に鋭波・リップルが優位に出現し、海馬内での入力情報処理、また、海馬から皮質領域への同期出力に関わる機能をそれぞれ反映した活動であることが提唱されている。しかし霊長類では、CA1 領域の神経活動と睡眠との関連性を調べた研究はあまりない。そこで今回われわれは、サルの CA1 領域から電場電位を記録し睡眠ステージとの相関を検討した。CA1 領域における電場電位記録用の同心電極、および、睡眠ステージ分類のための表在脳波、眼電図および筋電図記録用のワイヤー電極をサルに慢性埋め込みした。CA1 領域の電場電位は表在脳波に類似した変化を示し、覚醒期には低振幅速波が主体であるが、浅いノンレム睡眠期になると中振幅の徐波が出現しはじめた。さらに深いノンレム睡眠期には高振幅の徐波が優位になり、鋭波・リップルが出現した。この鋭波は放線層、リップルは錐体細胞層で最大振幅を示した。レム睡眠期には覚醒期と類似の速波を主体とする電場電位が出現したが、持続的な周期性徐波はほとんど見られなかった。以上より、①サルでもノンレム睡眠期に海馬から皮質領域へ同期出力が起こり、これが記憶固定の促進に関与すること、②サルではレム睡眠期に持続的な周期性徐波は出現せず、従ってレム睡眠時の入力情報処理様式はげっ歯類とはかなり異なることが示唆される。(利益相反 なし)

P-5. 自由行動下ラットの延髄孤束核味覚ニューロンの応答性

○内山久美子, 上野照子, 田村了以 (富山大学大学院医学薬学研究部 (医学) 統合神経科学)

味覚系の賦活は摂食や飲水により生じるが、その際には舌や顎の動きや嚥下反射等を必然的に伴うので、味覚の神経機構に関わる生理学的研究では、覚醒下の動物を用い実際に摂食時や飲水時に神経活動を記録することが望ましい。従来、延髄孤束核 (味覚中枢の第一次中枢) での味覚情報処理については、その解剖学的位置に起因する方法論的困難さのため麻酔下の動物が用いられてきた。覚醒行動下の動物を用いた研究は極少数あるが、それら研究間では知見が異なる。最近 Roussin らは、自由行動下では水の摂取

時に活動の高まるニューロンやリックとの活動相関を示すニューロンがラットの延髄孤束核で数多く記録されることを報告しているが、こうした応答性は、従来の典型的な麻酔下での孤束核ニューロンや過去に行われた覚醒拘束下でのニューロンの味覚応答とは異なる。この差異の原因として、動物の状態（麻酔下、覚醒拘束下、自由行動下等）の差異に加え、神経活動記録手技（味覚領域の同定法や電極特性）の差異も考えられる。本研究では、この原因を特定するため、延髄孤束核味覚領域を正確に同定後可動式記録電極を慢性埋め込みし、ラットが自由行動下で味覚溶液を摂取している時にニューロン活動を記録・解析した。その結果、記録したニューロンの多くは、典型的な味覚応答（水に対して活動が低下または無反応；味覚溶液に対して活動増加）を示すことが明らかとなった。（利益相反 なし）

P-6. マーカーレス 3 次元モーションキャプチャーによるサル的情動行動の定量的解析

○福澤匡純¹、中村友也¹、松本惇平¹、R.B. Vieira¹、西丸弘史¹、高村雄策¹、堀悦郎²、小野武年¹、西条寿夫¹
 (¹富山大学医学薬学研究部システム情動科学、²富山大学医学薬学研究部行動科学)

本研究では、サル用のマーカーレスモーションキャプチャーシステムを開発し、情動行動の解析に応用した。本システムはサルの 3 次元映像を撮影し、サルの骨格モデルに撮影した映像を当てはめることでサルの姿勢を半自動的に推定することが出来るため、従来のシステムと異なりサルの体の各部に追跡用のマーカーを取り付ける必要がない。実験では、まずシステムの動作検証のために、障害物を避けながら移動しているサルを撮影し、システムによって推定した姿勢と実験者が手動で推定した姿勢を比較した。その結果、各体部位位置の平均推定誤差は 10cm 未満であり、本システムが任意の姿勢の推定に有効であることが確認された。次に、ヘビのモデルの呈示によるサルの行動変化を本システムで解析した。その結果、ヘビのモデルの呈示中は、壁にしがみつく行動を示した時間がゴムボールの呈示中に比べて有意に長く（ヘビ：56±6%；ゴムボール：34±5%； $p<0.05$ ）。サルがヘビのモデルを避けていることが統計的に有意に明らかになった。最後に、メタンフェタミン (MAP) 投与によるサルの自発行動の変化を本システムで解析した。その結果、MAP の投与により頭部の動きが有意に増加し（MAP：5.7±0.2m/min；saline：4.6±0.4m/min； $p<0.05$ ）、歩行速度が減少する傾向（MAP：8.8±2.0cm/sec；saline：17.1±2.8cm/sec； $p<0.1$ ）がみられた。これらの結果は MAP 投与によってヒトが神経過敏になるという報告と一致している。以上の結果から本システ

ムは、サルの情動関連動作を高い再現性で解析できることが明らかになった。（利益相反 なし）

P-7. 迷走神経切除はラット扁桃体および視床下部外側野ニューロンのうま味溶液の胃内注入に対する応答を変化させる

M. Davaasuren¹、松本惇平¹、C. Chinzorig¹、中村友也¹、西丸弘史¹、高村雄策¹、E. Patrono¹、近藤高史²、小野武年¹、西条寿夫¹ (¹富山大学医学薬学研究部システム情動科学、²味の素株式会社イノベーション研究所)

近年の研究により、グルタミン酸ナトリウム (MSG) の胃内注入は、報酬効果および前脳の賦活化等の作用を呈し、この作用は迷走神経の切断により消失することが報告されている。本研究では、胃管を設置したラットの扁桃体および視床下部外側野からニューロン活動を記録し、MSG、イノシン酸、および食塩溶液等を胃内に注入してニューロン活動の変化を解析した。その結果、胃内注入により 30-60% のニューロンがこれらの溶液に応答したが、迷走神経切断により応答ニューロンの割合が有意に変化し、さらに MSG と食塩との間の識別性が低下した。以上から前脳は MSG 情報を迷走神経から受け摂取行動を調節していることが示唆された。（利益相反 なし）

P-8. Lymphocyte cell volume manipulations by self-assembling polyene nanopores

○R.Z. Sabirov^{1,2,4}、O.J. Khamidova¹、R.S. Kurbannazarova¹、P.G. Merzlyak^{1,2}、Y. Okada³ (¹Lab. Mol. Physiol., Inst. Bioorg. Chem., Uz. Acad. Sci., Tashkent, Uzbekistan, ²Dept. Cell Physiol., Natl. Inst. Physiol. Sci., Okazaki, Japan, ³SOKENDAI (Grad. Univ. Adv. Studies), Japan, ⁴Dep. Biophys., Natl. Univ., Tashkent, Uzbekistan)

Resting cellular volume is a result of finely tuned balance of oncotic pressure created by impermeable cytosolic macromolecules, osmotic pressure due to semipermeable organic and inorganic ions of the cell interior and exterior, primary active transport by Na, K-ATPases and membrane permeability (a double Donnan system with pump and leak). Here we demonstrated that the volume of thymic lymphocytes can be manipulated in a desirable way by introducing self-assembling pores with nanoscopic dimensions formed by a polyene antibiotics, nystatin. In isotonic medium, nystatin causes swelling of thymocytes in a dose-dependent manner. However, when the oncotic gradient was counter-balanced by a nonpermeable extracellular nonelectrolyte, the cellular volume could be set at a

new level, which was higher or lower than the initial value depending on the extra-osmolality created by the nonelectrolyte. The Stoverman reflection coefficients indicated formation of pores with a radius of 0.41 nm in the thymocytes plasmalemma. Under hypoosmotic stress conditions, the newly engineered nanopores dose-dependently suppressed a robust regulatory volume decrease (RVD) in thymocytes. This effective RVD inhibition was not due to anion transport blockage but rather to a loss of the K^+ gradient as a driving force for RVD, because nystatin-treated cells were still able to regulate effectively their volume in the presence of gramicidin D in NMDG-based extracellular medium, a condition in which RVD is governed chiefly by swelling-activated Cl^- conductance. We suggest that engineered self-assembling nanopores can be used as a convenient volume-regulating tool for nanobiological and nanomedicinal applications. (COI: none)

P-9. PKD2L1 カチオンチャネルの電位依存的不活性化機構の解析

○大野智恵¹, 樋口大河¹, 清水貴浩¹, 藤井拓人¹, B. Nilius², 酒井秀紀¹ (¹富山大学大学院医学薬学研究部 (薬学) 薬物生理学, ²KU Leuven)

Polycystic kidney disease 2-like 1 (PKD2L1) は, Transient receptor potential (TRP) ファミリーに属する Ca^{2+} 透過型非選択性カチオンチャネルであり, 我々はこれまでにマウス PKD2L1 チャネルが脱分極やアルカリなどの刺激に応じて不活性化するが, 刺激除去により一過性のチャネル活性化を生じることを明らかにしている. しかしながら, PKD2L1 チャネルの不活性化機構については不明である. 本研究では, マウス PKD2L1 チャネルの電位依存的な不活性化が電位依存性 K^+ チャネルの N-type および C-type 不活性化に類似したメカニズムで生じる可能性についてパッチクランプホールセル記録法を用いて検討した. PKD2L1 の N 末を欠損した変異体において, 電位刺激に対する電流応答は野生型チャネルの場合と同様であった. 次に, PKD2L1 のポア領域周辺のアミノ酸残基の点変異体 (N531Q および N533Q) について検討したところ, N531Q 変異体は野生型と類似した電流を生じたが, N533Q 変異体では, 脱分極刺激による不活性化が解除されるとともに, 再分極による一過性のチャネル活性化が抑制された. これらの結果から, PKD2L1 チャネルの脱分極による不活性化には, ポア外側領域に位置する 533 番目のアスパラギン残基が重要であることが示唆された. (利益相反 なし)

P-10. 胃酸分泌細胞の細胞防御機構における SLC26A7 の役割

○井上貴斗¹, 阿波加隼也¹, 藤田恭介¹, 藤井拓人¹, 清水貴浩¹, U. Seidler², 酒井秀紀¹ (¹富山大学大学院医学薬学研究部 (薬学) 薬物生理学, ²Hannover Medical School)

胃酸分泌細胞は, 絶えず過酷な環境に晒されているにも関わらず, その寿命は数カ月及び, 巧妙な細胞防御機構を備えているものと考えられる.

我々は, これまでに胃酸分泌細胞の基底側膜に, 静止膜電位形成に寄与する Cl^- チャネルが, 機能的に発現していることを見出している. この Cl^- チャネルは, 胃粘膜保護作用を有する PGE_2 により, 細胞内 cGMP 経路を介して活性化され, チャネルを予め活性化しておくこと, 胃酸分泌細胞におけるエタノール誘発性細胞傷害の程度が有意に軽減する. 従って, この Cl^- チャネルが胃酸分泌細胞の細胞防御機構に重要な役割を果たしていることが示唆されるが, チャネルの分子実体は未だ不明である. 近年, Solute carrier family 26 (SLC26A7) が胃酸分泌細胞の基底側膜に発現しており, Cl^- チャネルとして機能することが報告されている. そこで本研究では, SLC26A7 が胃酸分泌細胞の細胞防御機構に関与する可能性について検討を行った.

絶食させた野生型 (WT) マウスと SLC26A7 ノックアウト (KO) マウス双方に対してエタノール (99.5%) を経口投与し, 30 分後の胃粘膜傷害の程度を比較すると, KO マウスにおいて粘膜傷害は有意に増悪した. また, WT マウスおよび KO マウス双方から単離した胃腺の胃酸分泌細胞において, パッチクランプ法によりチャネル電流を測定したところ, KO マウス由来細胞の Cl^- チャネル電流は有意に小さかった. さらに HEK293T 細胞を用いたヒト SLC26A7 過剰発現系での, パッチクランプ実験より観測された SLC26A7 Cl^- 電流の電位依存性および薬物感受性は, 胃酸分泌細胞基底側膜の Cl^- 電流の性質と類似していた. 以上の結果から, SLC26A7 が胃酸分泌細胞の細胞防御機構に寄与している可能性が示唆された. (利益相反 なし)

P-11. TMEM16F が有するリン脂質スクランブラーゼ機能

○鍋島彰太¹, 清水貴浩¹, 藤井拓人¹, 小澤茂喜¹, 家原貴大¹, 岡田泰伸², 酒井秀紀¹ (¹富山大学大学院医学薬学研究部 (薬学) 薬物生理学, ²総合研究大学院大学)

Transmembrane protein 16F (TMEM16F) は, 細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇により活性化される Cl^- チャネル (CaCC) として機能するだけでなく, 血小板活性化時に Ca^{2+} 依存的にリン脂質を双方向に輸送するリン脂質スクランブラーゼとしても機能すると報告されていることから, 両機能の相関関

係が注目されている。そこで本研究では、TMEM16F のリン脂質スクランブラーゼ機能の制御メカニズムについて検討した。ヒト TMEM16F を過剰発現させた HEK293T 細胞におけるリン脂質スクランブラーゼ機能は、Annexin V-Phycoerythrin (PE) を用いた Fluorescence-activated cell sorter (FACS) 解析により観測した。

これまでにマウス TMEM16F の D409L 変異体において、リン脂質スクランブラーゼ機能の細胞内 Ca^{2+} 感受性が亢進すると報告されている。そこで本研究では、ヒト TMEM16F で保存されている 408 番目のアスパラギン酸残基をグリシン、アスパラギン、グルタミン酸にそれぞれ変異させた。D408G 変異体および D408N 変異体は D408E

変異体と比較してリン脂質スクランブラーゼ機能が亢進したことから、408 番目のアミノ酸残基の負電荷が細胞内 Ca^{2+} 感受性の低下に寄与していることが示唆された。また、CaCC 阻害剤であるニフルミン酸、NPPB、タンニン酸は D408G 変異体のリン脂質スクランブラーゼ機能を抑制した。さらに、D408G 変異体のリン脂質スクランブラーゼ機能における細胞外 Cl^- 濃度依存性を検討したところ、細胞外 Cl^- 濃度が低下するにつれてリン脂質スクランブラーゼ機能が亢進した。これらの結果から、TMEM16F のリン脂質スクランブラーゼ機能は Cl^- 輸送により制御されている可能性が示唆された。(利益相反 なし)