

### 奨励 01. ストレプトゾトシン投与ラットにおける高血糖の重症度やインスリン量と視床下部摂食促進・抑制ペプチド遺伝子発現の関係

園田里美<sup>1,2</sup>, 眞田賢哉<sup>1</sup>, 別府拓紀<sup>1</sup>, 西村和朗<sup>1</sup>, 西村春来<sup>1</sup>, 田中健太郎<sup>1</sup>, 上野啓通<sup>1</sup>, 吉村充弘<sup>1</sup>, 丸山崇<sup>1</sup>, 岡田洋右<sup>2</sup>, 田中良哉<sup>2</sup>, 上田陽一<sup>1</sup> (1産業医科大学医学部第1生理学, 2産業医科大学第1内科学)

ストレプトゾトシン(STZ)投与ラットの血糖およびインスリン量と視床下部室傍核および弓状核の摂食関連ペプチド遺伝子発現の関係を検討した。STZ (80mg/kg) を腹腔内投与し2週間後に断頭し, *in situ* ハイブリダイゼーション法にて摂食関連ペプチド遺伝子発現を定量化した。明期の血糖 300mg/dl 以下を PG1 群, 血糖 300mg/dl 以上のうち暗期 12 時間絶食後の血糖 200mg/dl 以下を PG2 群, 200 mg/dl 以上を PG3 群に分類した。その結果, proopiomelanocortin (POMC) と cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) は PG1 より PG2 で減少, PG3 でさらに減少した。Neuropeptide Y (NPY), agouti-related protein (AgRP), thyrotropin-releasing hormone (TRH) は PG1 より PG3 で増加したが PG2 は PG1 と差は無かった。PG2 と PG3 のうちインスリン 0.5ng/ml 以上を PII 群, 0.5ng/ml 未満を PI2 群とすると, POMC, CART, TRH は PII より PI2 で減少した。以上より STZ 投与ラットの摂食関連ペプチド遺伝子発現は高血糖の重症度やインスリン分泌能によって異なることが分かった。(利益相反 なし)

### 奨励 02. 機械受容 TRP チャネルは歯の移動による疼痛発症に関与する

森井 葵<sup>1,2</sup>, 人見涼露<sup>1</sup>, 氏原 泉<sup>1</sup>, 左合一伊藤美紗<sup>2</sup>, 水原正博<sup>2</sup>, 郡司掛香織<sup>2</sup>, 川元龍夫<sup>2</sup>, 小野堅太郎<sup>1</sup> (1九州歯科大学生理学分野, 2九州歯科大学顎口腔機能矯正学分野)

歯の矯正治療では, 装置装着後の歯牙の牽引に伴って疼痛が発生し, 患者に大きなストレスを与えている。歯牙への圧は歯根と歯槽骨の間に存在する歯根膜を圧迫・牽引し, この機械的刺激が歯根膜の侵害受容器を刺激する可能性が指摘されている。本研究では, 機械活性化チャネルである TRPA1 と TRPV4 が矯正痛に関与するかどうかについて検討した。実験動物には雄性 Wistar ラットを用いた。ラット上顎白歯の歯根膜において, 神経線維マーカー PGP 9.5 陽性線維は TRPA1 もしくは TRPV4 陽性像と共染色されるものがあつた。次に, ラット歯牙移動モデルとして, 上顎右側第一白歯と同側切歯間に Ni-Ti コイルスプリングを装着し, 50g の持続的牽引力を付与した。コイル装着翌日に, 疼痛指標である顔面グルーミング様行動が有意に延長

しており, TRPA1 拮抗薬 (HC-030031) および TRPV4 拮抗薬 (RN-1734) の腹腔内投与により抑制された。末梢神経と歯根膜での mRNA 発現量を比較するために, ヒト組織における定量性 RT-PCR を行った。ヒト歯根膜組織における TRPA1 の mRNA 発現量は, ヒト後根神経節と同等, もしくは非常に低く, 被験者間で大きなばらつきを示した。TRPV4 の mRNA 発現量は, ヒト後根神経節よりもヒト歯根膜組織の方が高発現しており, 被験者間のばらつきは小さかった。これらの結果より, TRPA1 と TRPV4 は歯根膜神経線維および歯根膜細胞に発現し, 歯の移動時の疼痛発症に関与することが示唆された。臨床では, 強く痛みを訴える患者とそうでない患者がいるが, 歯根膜組織での TRPA1 発現量の個体差が関与しているかもしれない。(利益相反 なし)

### 奨励 03. X 染色体連鎖性精神遅滞の分子機構解明に関する研究

永芳 友, 魏 范研, 中條岳志, 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)

X 染色体連鎖性精神遅滞 (以下 XLMR) は X 染色体上の遺伝子変異により, 知能低下・適応機能不全を引き起こす精神疾患である。近年の家系調査により, この XLMR の新規原因遺伝子として FTSJ1 遺伝子が同定された。

我々は Ftsj1 が細胞質に存在する tRNA をメチル化する酵素であることを見出した。大腸菌や酵母の研究で tRNA 修飾は翻訳の正確性維持に必須であることが知られている。Puromycin を用いたパルスチェイス法を用いて Ftsj1 欠損マウスから作成した胎児由来線維芽細胞と Ftsj1 欠損マウスの海馬における翻訳量の検討を行ったところ, Ftsj1 欠損マウスにおいて翻訳量が低下していた。またシナプス可塑性にとって重要な CaMKII $\alpha$  や NMDA 型グルタミン酸受容体の各サブユニットが Ftsj1 欠損マウスのシナプソーム分画で減少していた。

ゴルジ染色での検討で, Ftsj1 欠損マウスの海馬と大脳皮質において未熟な樹状突起スパインの形成増加を認めた。また Ftsj1 欠損マウスの海馬スライス標本において, 長期増強・長期抑圧の低下を認めた。さらにパーズ迷路による検討と恐怖条件付け学習の検討で, 空間記憶・学習の障害を Ftsj1 欠損マウスで認めた。以上の検討より tRNA 修飾酵素 Ftsj1 の欠損はタンパク質翻訳に悪影響を及ぼし, 形態学的・電気生理学的変化を伴いながら空間・記憶学習を呈すと考えられる。(利益相反 なし)

### 一般 01. 光誘発性電荷分離分子を利用した神経興奮制御

沼田朋大 (福岡大学医学部生理学講座)

神経による情報伝達や筋収縮の引金になるのが細胞膜の脱分極である。したがって、神経細胞の膜電位を人為的に制御することができれば、神経活動の調節を介した生理応答を制御することが可能になると期待される。本研究では、局所的な刺激により膜電位を制御するツールとして、光励起による電荷分離能を持つ連結分子 (Charge Separation (CS) molecule) を用い、膜興奮を光制御することを目的とした。PC12細胞に CS molecule を取り込ませ、光照射に反応する膜電位の経時変化をパッチクランプ法で測定した。その結果、光照射開始後緩やかに脱分極し、15mV 程度の変化で飽和した。この脱分極発生のメカニズムは、膜電流測定により、 $K^+$ チャネルの抑制が原因であることが判明した。さらに、ラット海馬神経細胞に光照射を行うと、緩やかな脱分極後に神経発火を観察した。これらの結果より、CS molecule を用いた神経活動の光制御は、今後、有望な膜電位制御のアプローチになることが示唆された。(利益相反なし)

#### 一般 02. IL-27 による感覚閾値の調節

笹栗智子<sup>1</sup>、田口 徹<sup>2</sup>、村田祐造<sup>3</sup>、小林希美子<sup>4</sup>、飯笹さやか<sup>5</sup>、飯笹英一<sup>6</sup>、津田 誠<sup>7</sup>、平川奈緒美<sup>1</sup>、原 博満<sup>6</sup>、吉田裕樹<sup>8</sup>、八坂敏一<sup>6</sup> (<sup>1</sup>佐賀大学医学部麻酔・蘇生学講座、<sup>2</sup>新潟医療福祉大学リハビリテーション学部運動機能医学研究所、<sup>3</sup>佐賀大学医学部組織・神経解剖分野、<sup>4</sup>兵庫医科大学解剖学講座神経科学部門、<sup>5</sup>鹿児島大学大学院連合農学研究科先端応用生命科学連合講座、<sup>6</sup>鹿児島大学大学院医歯学総合研究科免疫学分野、<sup>7</sup>九州大学大学院薬学研究院ライフイノベーション分野、<sup>8</sup>佐賀大学医学部免疫学分野)

近年免疫分子が慢性疼痛に関与することが多数報告されている。これらには、IL-17 を含む炎症性サイトカインが痛みを誘発するという報告や、IL-10 を含む抗炎症性サイトカインが痛みを抑制するという報告も含まれている。IL-27 は、免疫刺激などより抗原提示細胞等から分泌され T 細胞の分化を介して IL-17 産生を抑制し、IL-10 産生を促進することが知られている。我々は、IL-27 が痛みの調節に関与することを期待して遺伝子欠損マウスの行動解析を行った。IL-27 は EB13 と p28 からなり、その受容体は特異的受容体 WSX-1 と gp130 からなる。実験には EB13、p28、WSX-1 欠損マウスを用いた。これらの欠損マウスは、予想に反して未処置の状態で熱刺激、機械刺激において疼痛関連行動の増強を示した。IL-27 欠損マウスに IL-27 を補うことで、この表現型は速やかに正常化された。また、野生型マウスの IL-27 を中和抗体で阻害すると欠損マウスと同様の表現

型が速やかに誘導された。これらの欠損マウスに従来の慢性疼痛モデルを適用したところ、さらなる閾値の低下が観察された。この結果は、IL-27 シグナル欠損により閾値が低下する機序は、従来の慢性疼痛モデルのそれらとは異なることを示唆している。以上の結果から、IL-27 は新規な機序により基底の痛み感度を調節している可能性が示唆された。(利益相反なし)

#### 一般 03. 全身麻酔薬プロポフォールとそれに関連したフェノール類による蛙坐骨神経の複合活動電位抑制

馬郡信弥、熊本栄一、藤田亜美、王 獅、楊 帆、安田浩樹 (佐賀大学医学部生体構造機能学講座)

プロポフォール (2,6-diisopropylphenol) は GABA<sub>A</sub> 受容体や TRPA1 の活性化、 $Na^+$ チャネルの抑制など様々な作用を持っているが、それにプロポフォールのどんな化学構造が重要であるか不明である。我々は昨年、台湾檜成分ヒノキチオールの神経伝導抑制作用に、その  $\pi$  電子系の環構造に結合したイソプロピル基や水酸基が重要であることを報告した。プロポフォールはベンゼン環に結合した水酸基と 2 つのイソプロピル基を持っているので神経伝導を抑制する可能性がある。本研究では蛙坐骨神経に air-gap 法を適用し、プロポフォールとそれに関連したフェノール類が複合活動電位 (CAP) に及ぼす作用を調べた。その結果、プロポフォールは濃度依存的に CAP の振幅を減少させ、IC<sub>50</sub> 値は 0.14mM であることが明らかになった。4-Isopropylphenol、4-tert-butylphenol、4-tert-amylphenol、4-amylphenol および 4-sec-butylphenol も CAP を抑制し、それらの IC<sub>50</sub> 値はそれぞれ 0.85、0.60、0.28、0.20、0.33mM であった。CAP 抑制作用の大きさはオクタノール—水分配係数とよい相関を示した。以上より、プロポフォールによる神経伝導抑制にはイソプロピル基や水酸基、そしてその疎水性が重要であることが示された。(利益相反なし)

#### 一般 04. 精囊平滑筋の自動能は上皮下に分布する同期性間質細胞に誘発される

武谷三恵<sup>1</sup>、橋谷 光<sup>2</sup>、林 篤正<sup>3</sup>、東 龍平<sup>4</sup>、中村桂一郎<sup>5</sup>、鷹野 誠<sup>1</sup> (<sup>1</sup>久留米大学医学部生理学、<sup>2</sup>名古屋国立大学大学院医学研究科細胞生理学、<sup>3</sup>久留米大学医学部泌尿器科学、<sup>4</sup>久留米大学医学部先端イメージング研究センター、<sup>5</sup>久留米大学医学部解剖学)

自発収縮を有する既知の平滑筋では、ペースメーカー細胞は筋層内に分布し、自発収縮は粘膜除去標本においても観察される。近年、膀胱や消化管などで、粘膜細胞による平滑筋の自発収縮制御が明らかにされているが、我々は男性副生殖腺である精囊の自発収縮が粘膜依存性であること

を見出した。また自発収縮のベースとなる平滑筋の周期的な自発電気およびカルシウム活動の発生にも粘膜が不可欠であることを報告した。今回、精嚢の自発収縮をドライブする粘膜の細胞群を、モルモット精嚢を用いて同定した。精嚢壁は、上皮細胞層、上皮間質細胞層、平滑筋層で構成されていた。消化管自発収縮のペースメーカー細胞として知られるカハールの間質細胞は c-Kit 蛋白を発現するが、蛍光免疫染色法による観察では、精嚢壁には c-Kit 陽性間質細胞は検出されなかった。粘膜組織には、①不規則な自発カルシウムトランジェントと自発一過性脱分極を発生する上皮細胞群と、②周期的な自発カルシウムトランジェントと電気的スローウェーブを発生する上皮下の同期性間質細胞 (synchronous interstitial cells : SI 細胞) 群が存在した。SI 細胞群の周期的自発カルシウム活動は細胞間で同期し、直下の平滑筋の収縮に先行するものが観察されたことから、精嚢平滑筋の興奮は上皮下に分布する SI 細胞の同期性活動により誘発されることが示唆された。(利益相反 なし)

#### 一般 05. マウス副腎髄質細胞において P11 蛋白の発現の欠如は、TASK1 チャネルの酸性感知能を促進する

井上真澄, 松岡秀忠, 原田景太 (産業医科大学医学部第 2 生理学)

外液の pH 低下は、ラット副腎髄質 (AM) 細胞において TASK1 様チャネルを阻害することによってカテコールアミン分泌を誘発する。TASK チャネルは、TASK サブファミリー内においてヘテロマーまたはホモマーとして機能する。本研究は、遺伝子ノックアウトを用いてマウス AM 細胞における TASK1 様チャネルの機能、および分子実体を解明することを目的とする。酸性により誘発される脱分極性内向き電流およびカテコールアミン分泌は、TASK1 の遺伝的欠損により抑制されたが、TASK3 の遺伝子欠損では抑制されなかった。TASK1 の遺伝的欠損は、静止膜電流レベルに影響を及ぼさなかった。AM 細胞には、主に TASK1 様免疫反応物が細胞膜、またはその近傍に発現していたが、TASK3 様免疫反応物はわずかししか発現していなかった。

Proximity ligation assay は、AM 細胞および PC12 細胞には TASK1/3 ヘテロメリックチャネルが形成されていないことを示した。しかし、PC12 細胞に p11 を外因性に発現させると、TASK1/3 チャネルが発現し、おもに細胞質に局在した。p11 はラット副腎髄質または PC12 細胞には発現していなかった。これらの結果は、TASK1 ホモメリックチャネルが AM 細胞において酸性センサーとして機能し、この機能が p11 発現の欠如によって促進されることを示

す。(利益相反 なし)

#### 一般 06. Asparagine-linked glycosylation as a key regulator of gating properties in cardiac $\text{Na}_v1.5$ channels

王 普 (Pu Wang), 劉 衍恭 (Yangong Liu), 糸 慎一郎, 黒川竜紀, 小野克重 (大分大学医学部病態生理学講座)

SCN5A gene encodes the voltage-gated sodium channels  $\text{Na}_v1.5$  which is composed of a pore-forming  $\alpha$  subunit of the channel. Asparagine-linked (N-linked) glycosylation is one of the common post-translational modifications in proteins. We apply the whole-cell patch-clamp technique to study the effect of glycosylation inhibition on the human  $\text{Na}_v1.5$  channel expressed in HEK293 cells. Inhibition of the N-linked glycosylation with tunicamycin causes an increase of  $\text{Na}_v1.5$  channel current when applied for 24 hours. Tunicamycin significantly shifts the steady-state inactivation curve to the hyperpolarization direction, whereas the activation curve is unaffected. Recovery from inactivation is prolonged by tunicamycin, where the fast phase ( $\tau_{\text{fast}}$ ) is unaffected and the slow phase ( $\tau_{\text{slow}}$ ) is prolonged. These findings suggest that N-glycosylation contributes to the current density and gating properties of the  $\text{Na}_v1.5$  channel.(利益相反 なし)

#### 一般 07. ラット摘出心房標本に誘発した頻拍性不整脈 (tachycardia-like excitation : TE) の光学的膜電位イメージングによる興奮伝播パターンの可視化 : これまでの総括

酒井哲郎 (琉球大学大学院医学研究科システム生理学)

ラット摘出心房標本において細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics に各種の擾乱を加えた条件下で、短い tetanus 刺激を与えると頻拍性不整脈 (tachycardia-like excitation : TE) が誘発される。cMOS カメラと merocyanine-rhodanine 系膜電位感受性色素 (NK2761) の吸光測定による光学的膜電位計測を用いて不整脈発現時における興奮波伝播の時間的・空間的パターンの動画による可視化をおこなった。得られた動画では、多くの例において中心に解剖学的障壁を伴わない興奮旋回、すなわち micro re-entry が観察された。また一部の標本では高頻度の自発性興奮を起こす異常自動能 (abnormal automatism) の興奮巣 (focus) の発現がみられた。さらに得られた動画の中には、ひとつの標本の中にふたつの共役した re-entry 経路の loops がみられるものや複数の興奮巣が同時に存在する複雑な伝播パターンを示す例も見られた。Micro re-entry と異常自動能はヒトの心房細動を発現させる病態電気生理学的現象と言われている。TE は摘

出されたラット心房の 1cm 四方の小片で起こる現象で、発現条件も生理的状態からかなり deviate したものであるが、ヒトの心房細動と一定の類似性を持った電気生理学的現象である可能性が示唆される。(利益相反 なし)

#### 一般 08. 右心室圧負荷のマウスモデルにおける TRPM7 チャンネルの役割

倉原 琳<sup>1</sup>, Lixia Yue<sup>2</sup>, Jianlin Feng<sup>2</sup>, 平石敬三<sup>1</sup>, 井上隆司<sup>1</sup> (<sup>1</sup>福岡大学医学部生理学, <sup>2</sup>コネチカット大学医学部細胞生物学)

右心室 (RV) 不全は、しばしば右心室圧の過負荷の結果として起こる。TRPM7 チャンネルを介するシグナル伝達は、心筋線維症の重要な情報伝達分子である TGF- $\beta$ 1 を介した内皮細胞や筋線維芽細胞の形質転換に必要であることが知られているが、右心室リモデリング過程における役割は未だ不明である。我々は、野生型及び TRPM7 ノックアウトマウスを用いて、2 種類の右心室圧負荷モデルを作成し、右心室の形態・機能の変化および線維化について比較検討を行った。

モノクロタリピンロール投与で肺動脈肺高血圧症を誘発し右心室圧負荷を引き起こした場合、野生型マウスに比し、TRPM7 ノックアウトマウスでは RV 機能の低下が著しく改善されていた。一方、肺動脈縮窄術 (PAC: Pulmonary artery constriction) で作成した急性 RV 圧負荷モデルでは、TRPM7 ノックアウトマウスの方が野生型に比し、右室肥大や線維化の程度が有意に抑制されていた。これらの結果から、慢性及び急性圧負荷で誘発した右心不全のいずれの病態においても、TRPM7 チャンネルが重要な役割を果たしていることがわかった。(利益相反 なし)

#### 一般 09. 徐脈性不整脈遺伝子変異 TRPM4-E7K チャンネルの数理モデルシミュレーション

胡 耀鵬, 平石敬三, 倉原 琳, 沼田朋大, 井上隆司 (福岡大学医学部生理学)

TRPM4 チャンネルは、心臓の刺激伝導系や心房筋に多く発現しており、そのノックアウトマウスでは、多彩な不整脈性心電図変化が報告されている。p.E7K は、家族性房室伝導ブロックのゲノム解析によって同定された原因遺伝子変異で、強制発現系における検討では「機能亢進型」の性質を示す。しかし、これがどのようにして徐脈性不整脈の病態形成に関わるのか不明である。本研究では、この疑問の手がかりを得るため、E7K 変異体の数理モデルシミュレーションを行った。

E7K 変異を持つ TRPM4 チャンネルを HEK293 細胞に強制発現し、イオノマイシン透過型細胞接着型記録法を適用

して、チャンネル開閉の速度定数  $\alpha$ ,  $\beta$  の電位・Ca 濃度依存性を定量的に評価した。その結果、E7K 変異体では、開状態に偏位していることがシミュレーションで示唆された。この結果は開口の延長として確認できた。更にこれらの速度定数を活動電位モデル、2D 興奮伝播モデルに組み込むと、活動電位の延長や異常興奮の発生、自発活性頻度の増加、興奮伝導の遅延が見られた。同様の変化は、HL-1 細胞に E7K を強制発現した場合にも観察された。今後は、これらの変化と房室伝導ブロック病態形成との関係を更に詳しく検討する予定である。(利益相反 なし)

#### 一般 10. TGF- $\beta$ 1 シグナルを介した線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化における TRPV2 の役割

内田邦敏<sup>1</sup>, 石井太郎<sup>1,2</sup>, 八田光世<sup>1</sup>, 山崎 純<sup>1,3</sup> (<sup>1</sup>福岡歯科大学細胞分子生物学講座分子機能制御学分野, <sup>2</sup>福岡歯科大学成長発達歯科学講座矯正歯科学分野, <sup>3</sup>日本大生生物資源科学部獣医学科)

TGF- $\beta$ 1 を介した線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化が創傷治癒時の瘢痕収縮に関与することが知られている。本研究は、線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化並びに瘢痕収縮における TRPV2 チャンネルの役割を明らかにすることを目的とした。創傷治癒時に起きるケラチノサイトの重層化と皮膚の収縮を再現したモデルとして、ラット真皮由来線維芽細胞をコラーゲンゲル中に包埋し、表皮より単離したケラチノサイトをゲル上に播種した三次元培養モデルを使用した。その結果、ゲル収縮並びに筋線維芽細胞のマーカーである  $\alpha$ -SMA 発現量の増加は、TRPV2 阻害薬の処置により抑制された。ケラチノサイトを播種していないコラーゲンゲルにおいても、TGF- $\beta$ 1 処置によるゲル収縮が TRPV2 阻害薬によって抑制された。また、TGF- $\beta$ 1 処置により線維芽細胞の TRPV2 発現量が増大した。さらに、創傷を加えた皮膚組織において、創傷部位周囲にみられる  $\alpha$ -SMA 陽性細胞に TRPV2 チャンネルの発現が認められた。以上の結果より、線維芽細胞に発現する TRPV2 チャンネルが創傷治癒モデルの収縮に関与することが明らかとなった。(利益相反 なし)

#### 一般 11. TRPM7 によるエナメル質形成制御

進 正史, 岡本富士雄, 鍛冶屋 浩, 岡部幸司 (福岡歯科大学細胞生理学分野)

TRPM7 はイオンチャンネルとキナーゼの機能を合わせ持つユニークな分子で歯に高発現する。我々は TRPM7 キナーゼ機能欠失型点変異 K1646R マウス (KR) の解析により、TRPM7 キナーゼが BMP や CREB のリン酸化を介してエナメル質形成を調節することを報告した。今回、

TRPM7 のイオンチャネル機能の重要性を検討するためエナメル上皮特異的 TRPM7 コンディショナル欠損マウス (cKO) を解析し、野生型や KR マウスとの比較検討を行った。①cKO の切歯は破折や白濁化が観察され、 $\mu$ CT や硬度解析により KR に比べてエナメル質の顕著な石灰化低下や硬度低下を認めた。②組織解析により、cKO のエナメル芽細胞層では細胞配列の不正や嚢胞様構造を認めた。③パッチクランプ法や qPCR 法により、cKO のエナメル芽細胞群では TRPM7 様電流の発現量が有意に減少すると共に、エナメル質成熟関連因子の発現減少を認めた。④エナメル芽細胞様の培養細胞株に対する TRPM7 ノックダウンは、細胞間接着の異常や石灰化物の沈着抑制を呈した。以上より、TRPM7 のイオンチャネルとキナーゼの両方の機能を欠失した cKO では、KR と比較し著明なエナメル質形成不全を呈することが分かった。従って、TRPM7 のキナーゼ機能だけでなく、そのイオン輸送機能自体がエナメル芽細胞の分化やエナメル質形成の制御に極めて重要な役割を持つことが示唆された。(利益相反 なし)

#### 一般 12. マウス脊髄後角における HCN4 チャネル陽性細胞の分布

中川 拓<sup>1</sup>、八坂敏一<sup>2</sup>、中島則行<sup>1</sup>、鷹野 誠<sup>1</sup> (久留米大学医学部生理学講座統合自律機能部門、<sup>2</sup>鹿児島大学大学院医歯学総合研究科免疫学)

我々は過分極誘発陽イオンチャネル HCN4 の遺伝子座の一方のアレルにルシフェラーゼ cDNA をノックインし、他方のアレルにテトラサイクリントランスアクチベータとその応答配列からなる遺伝子スイッチをノックインした遺伝子改変マウス (HCN4<sup>luc/TA\_TRE</sup>) を作成した。このマウスでは HCN4 の発現部位をルシフェリンの化学発光により同定できると共に、ドキシサイクリン投与により HCN4 の発現を可逆的に抑制できる。今回我々は、脊髄において強い発光シグナルが後角表層に局在していることを発見した。そこで HCN4 の発現部位をさらに詳細に検討するため、抗 HCN4 抗体を用いて免疫染色を行った。同時に後角 innerII (Iii) 層のマーカーである抗 protein kinase C $\gamma$  (PKC $\gamma$ ) 抗体を用いて共染色を行った。その結果、HCN4 免疫シグナルの多くは PKC $\gamma$  免疫シグナルよりも腹側に存在していることが示唆された。ドキシサイクリン投与により HCN4 発現を抑制した場合には、この HCN4 免疫シグナルは全く検出できなかった。これまでに脊髄後角では parvalbumin 陽性細胞や PKC $\gamma$  陽性細胞での HCN4 発現が免疫染色により報告されている。しかしこれらの報告と、HCN4<sup>luc/TA\_TRE</sup> マウスの脊髄でラベルされた HCN4 発現細胞の分布とは異なっている可能性があり、今後さらに詳細

な比較検討が必要である。(利益相反 なし)

#### 一般 13. マウスにおける新規脳内因子 NPGL の生理機能解析

鹿野健史朗<sup>1,2</sup>、松浦大智<sup>1</sup>、齋藤鷹也<sup>1</sup>、古満芽久美<sup>1</sup>、岩越栄子<sup>1</sup>、浮穴和義<sup>1</sup> (広島大学大学院総合科学研究科脳科学分野、<sup>2</sup>大分大学医学部神経生理学講座)

我々は鳥類ニワトリの視床下部から分泌性小タンパク質をコードする新規遺伝子を発見し、Neurosecretory protein GL (NPGL) と命名した。NPGL はニワトリの摂食中枢に局在し、ニワトリヒナへの投与実験により、NPGL が体重を増加させる作用を示したため、成長やエネルギーホメオスタシスに関与することが示唆されている。また、NPGL は鳥類や哺乳類を含めた脊椎動物に高度に保存されている。しかしながら、哺乳類においてその局在や生理作用は明らかになっていないため、本研究では野生型マウスを用いて NPGL の生理機能解析を行った。NPGL の局在解析を行った結果、NPGL は視床下部にのみ発現し、摂食中枢の 1 つである弓状核に限局して発現することが明らかとなった。さらに、既知の摂食調節因子との蛍光二重免疫染色により、NPGL が摂食抑制に関わる POMC ニューロンに投射していることが示唆された。次にマウスの脳室内に NPGL を投与すると、摂食量が増加し、それに伴い体重の増加が認められた。以上の解析から、哺乳類において NPGL は摂食抑制に関わる POMC ニューロンの抑制を介して摂食行動を亢進させる作用を有することが示唆された。(利益相反 なし)

#### 一般 14. 高速蛍光イメージングを用いた概日時計中枢神経細胞の概日 Ca<sup>2+</sup>リズム形成機構の解析

織田善晃<sup>1,2</sup>、榎木亮介<sup>3</sup>、高須奈々<sup>1</sup>、中村 渉<sup>1</sup>、本間研一<sup>2</sup>、本間さと<sup>2</sup> (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科加齢口腔生理学分野、<sup>2</sup>北海道大学脳科学研究教育センター、<sup>3</sup>北海道大学電子科学研究所光細胞生理研究分野)

哺乳類の概日時計中枢である視床下部視交叉上核は、個々の神経細胞の細胞内カルシウムイオン (Ca<sup>2+</sup>) 濃度が約 24 時間周期で変動する (概日 Ca<sup>2+</sup>リズム) ことが知られている。一方、これらの神経細胞では電氣的刺激に伴って細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度が数百秒から数秒単位の時間経過で変化 (一過性変動) することも報告されている。このことから概日 Ca<sup>2+</sup>リズムは一過性変動の振幅や頻度が約 24 時間周期で変動することにより形成されていることが考えられる。しかし従来我々が行ってきた概日 Ca<sup>2+</sup>リズム計測は露光時間が数秒間の蛍光画像取得を 1 時間毎に 1 度行う手法であったため、概日 Ca<sup>2+</sup>リズムと一過性変動との関係は不

明であった。そこで本研究では1時間毎の高速蛍光  $\text{Ca}^{2+}$  イメージング (30Hz, 20 秒間) を 72 時間以上にわたり行い一過性変動を計測し、同時に計測した概日  $\text{Ca}^{2+}$  リズムとの関係を解析した。その結果、概日  $\text{Ca}^{2+}$  リズムを示す神経細胞 ( $n = 3136$ , 10 slices) のうち一過性変動を示すものは約 1% であり、99% は測定期間中一度も一過性変動を示さなかった。さらに高速蛍光イメージングから抽出した短露光時間画像と概日  $\text{Ca}^{2+}$  リズム計測の長露光時間画像の蛍光輝度変化を比較したところどちらも同位相の概日リズムを示すことが分かった。

本研究により、視交叉上核神経細胞の概日  $\text{Ca}^{2+}$  リズムは一過性変動の振幅や頻度が変動することによるものではなく、主に静止状態での細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が変動することにより形成されるものであることが示された。

(利益相反 なし)

#### 一般 15. ラット海馬スライスにおける、抑制性シナプス伝達制御を介した日周リズムによるカルバコール誘導振動の調節

重本昌也, 夏目季代久 (九州工業大学大学院生命体工学研究科)

生物は日周リズムを持っており、環境の光情報によって睡眠などの生理機能が調節される。さらに、哺乳類の行動実験により日周リズムが学習・記憶性能を調節している事がわかっている。しかし、記憶と関係のある海馬内脳波と日周リズムの関連性については明らかでない。そこで本研究では、ラット海馬スライスにアセチルコリン作動薬カルバコールを投与することで誘導される  $\beta$  波を用い、海馬内脳波と日周リズムの関連性を調査した。本研究では、ラットを 12/12 時間の Light/Dark サイクル下で 1 週間以上飼育後、海馬スライスの作成を行った。海馬スライスにカルバコールを投与するとバースト状の  $\beta$  波が観察される。この  $\beta$  波を様々な時間帯で測定し、周期、振幅、インターバーストインターバル (IBI)、自読時間振動パラメータを測定時の Zeitgeber Time (ZT) で示した。その結果、真夜中である ZT16-19 では、他の時間帯に比べて周波数の有意な低下が見られた。また、この周波数の有意な低下は、ZT16-19 以外の時間帯に  $\text{GABA}_A$  受容体阻害薬である Bicuculline, Gabazine を投与することでも見られ、更に低下後の周波数は ZT16-19 で計測されたものと近い値を示した。これらの結果から、海馬内脳波は日周リズムにより調節されており、その調節には  $\text{GABA}_A$  受容体シナプス伝達変化が寄与していると考えられる。(利益相反 なし)

一般 16. 甘草成分イソクイリチゲニンが  $\text{Na}_v$  チャネ

#### ル阻害により口内炎疼痛を抑制する

宮村侑一<sup>1,2</sup>, 人見涼露<sup>1</sup>, 氏原 泉<sup>1</sup>, 寺脇 潔<sup>3</sup>, 大宮雄司<sup>3</sup>, 森本泰宏<sup>2</sup>, 小野堅太郎<sup>1</sup> (九州歯科大学生理学分野,<sup>2</sup>九州歯科大学歯科放射線分野,<sup>3</sup>株式会社ツムラツムラ漢方研究所)

甘草に含まれるイソクイリチゲニン (isoliquiritigenin) は、電位依存性ナトリウムチャネル ( $\text{Na}_v$ ) の抑制による神経興奮抑制作用と、電位依存性カリウムチャネル抑制や TRPV1 および TRPA1 活性化による神経活性化作用といった 2 つの相反作用が知られている。我々は、甘草を含んでいる半夏瀉心湯が口内炎疼痛を抑制することを報告しているが、この鎮痛作用にイソクイリチゲニンがどのように寄与しているかは不明である。本研究では、イソクイリチゲニン単独にて口内炎疼痛が抑制されるか否か、およびその作用メカニズムを明らかにすることを目的とした。ラット口内炎モデルに観察される接触痛、自発痛、カプサイシン過敏応答などは、イソクイリチゲニンの口内炎部 5 分間塗布によって有意に抑制された。足底部への TRPV1, TRPA1, TRPV4 アゴニスト投与による疼痛発生に対してもイソクイリチゲニン共投与は抑制を示した。一方、イソクイリチゲニン単独での口腔内滴下および足底部投与では、疼痛関連行動は誘発されなかった。オートパッチクランプ法において、イソクイリチゲニンはヒト  $\text{Na}_v1.1$ ,  $\text{Na}_v1.3$ ,  $\text{Na}_v1.5$ ,  $\text{Na}_v1.7$ ,  $\text{Na}_v1.8$  発現細胞での電位誘発電流を非選択的に抑制した。単離ラット三叉神経節ニューロンにおいて、イソクイリチゲニンはテトロドトキシン感受性・抵抗性ナトリウム電流を抑制する一方、膜コンダクタンスの低下や外向き整流性カリウム電流の抑制を示した。H-H モデルを基軸とした神経活動シミュレーションにて、活動電位の発生はカリウム電流抑制による亢進よりも、 $\text{Na}_v$  チャネル阻害による発生抑制の方が優先された。以上の結果より、イソクイリチゲニンは  $\text{Na}_v$  チャネル阻害による神経活動抑制により鎮痛作用を示し、半夏瀉心湯による口内炎疼痛緩和に関与していることが示唆された。(利益相反 なし)

#### 一般 17. 慢性歯周炎による唾液腺萎縮は血中 $\text{TNF-}\alpha$ と B 細胞浸潤によって引き起こされる

鹿山武海<sup>1,2</sup>, 左合一伊藤美紗<sup>3</sup>, 浪花真子<sup>1,4</sup>, 人見涼露<sup>1</sup>, 氏原 泉<sup>1</sup>, 白井通彦<sup>2</sup>, 中島啓介<sup>2</sup>, 小野堅太郎<sup>1</sup> (九州歯科大学生理学分野,<sup>2</sup>九州歯科大学歯周病学分野,<sup>3</sup>九州歯科大学顎矯正学分野,<sup>4</sup>九州歯科大学健康促進学分野)

唾液分泌低下は歯周病の危険因子であることがよく知られているが、近年、歯周炎により唾液腺が萎縮 (アポトー

シス)して唾液分泌低下となる逆の可能性が指摘されてきている。これまでの *in vitro* 研究にて、TNF- $\alpha$  や B 細胞浸潤により唾液腺細胞がアポトーシスを引き起こすとの報告がある。本研究ではラット歯周炎モデルを用いて、TNF- $\alpha$  および B 細胞が唾液腺萎縮に関与する可能性について検討した。麻酔下にて 6 週齢 Wistar 系雄性ラットの右側上顎第二臼歯に糸糸を結紮し、歯周炎を惹起させた(歯周炎群)。結紮直後に糸糸を外したものを対照群とした。1 週あるいは 4 週間結紮後に唾液腺を摘出し、重量の測定、定量性 RT-PCR 及び蛍光免疫染色を行った。また、歯肉、血液、他の臓器も採取した。結紮 1 週後では唾液腺の萎縮は認められなかったが、歯周炎が慢性化した結紮 4 週後において耳下腺と顎下腺は有意に萎縮していた。涙腺と肺は逆に肥大しており、脾臓、副腎、下垂体などには変化がなかった。結紮 4 週後では血中 TNF- $\alpha$  は増加しており、IL-1 $\beta$  と IL-6 に変化はなかった。TNF- $\alpha$  の mRNA 量は、歯肉で増加を示したが、耳下腺では検出されず、顎下腺では歯周炎群では減少していた。TNF- $\alpha$  受容体の mRNA 量は、耳下腺ではむしろ低下しており、顎下腺では変化なかった。B 細胞マーカー CD19 の mRNA 量および陽性細胞数は、耳下腺で特に増加していた。これらの結果より、慢性歯周炎は唾液腺特異的に萎縮を引き起こすことが示唆され、患部より血中に入った TNF- $\alpha$  や粘膜免疫応答により唾液腺に浸潤した B 細胞が唾液腺萎縮に関与しているかもしれない。(利益相反 なし)

#### 一般 18. 舌への体性感覚刺激がラットの海馬に及ぼす影響について

小牧龍二<sup>1,2</sup>、西 健太郎<sup>1</sup>、田中哲子<sup>1</sup>、土井 篤<sup>1</sup>、吉村 恵<sup>3</sup>、福永貴之<sup>1</sup>、申 敏哲<sup>1</sup>(<sup>1</sup>熊本保健科学大学リハビリテーション学科、<sup>2</sup>リハビリテーションセンター熊本厚生会病院、<sup>3</sup>医療法人社団温故会直方中村病院)

舌には味覚だけではなく体性感覚を伝える感覚神経が、密に分布している。これまでの先行研究において、舌の味覚受容については多くの研究がなされているが、舌のもう一つの重要な役割である体性感覚についての研究は少なく、今日に至っても明らかではない。本研究では、舌への痛覚、触・圧覚刺激が脳の発達や記憶力に及ぼす影響を行動学的手法、免疫学的手法を用いて検討をした。特に記憶の中核であり、外部からの刺激を受けやすいラットの海馬を用いて、舌への末梢刺激による細胞の活性化は c-fos、成長因子は BDNF、細胞新生は Bromodeoxyuridine (BrdU) を用いて検討した。その結果、学習・記憶機能評価である 8 方向放射状迷路試験と Step-down 試験では、カプサイシンを用いた痛覚刺激群、SW 知覚テスターを用いた触・圧

覚刺激群ともにコントロール群に対し記憶力の増強が認められた。さらに、ラットの海馬における c-Fos 陽性細胞と BrdU 陽性細胞の増加が見られた。成長因子での検討では BDNF の増加が見られたが、有意差を認めるには至らなかった。また、酸化ストレスと抗酸化能力に及ぼす影響の検討でも、各群間において若干の差は認められたが、有意差を認められなかった。これらの結果から、舌への痛覚、触・圧覚刺激は、ラットの海馬を活性化させ、成長因子の増加や細胞新生を促進させることで、記憶力の増強に影響した可能性が示唆された。(利益相反 なし)

#### 一般 19. 嗅覚マーカー蛋白は cAMP を吸着する

中島則行<sup>1</sup>、中島輝恵<sup>2</sup>、田浦晶子<sup>3</sup>、中島明子<sup>4</sup>、大森治紀<sup>5</sup>、鷹野 誠<sup>1</sup>(<sup>1</sup>久留米大学医学部生理学講座統合自律機能部門、<sup>2</sup>京都大学大学院生命科学部研究科神経発生学、<sup>3</sup>藍野大学医療保健学部臨床工学、<sup>4</sup>東京大学医学部附属病院、<sup>5</sup>金沢医科大学医学部生理学 I)

成熟嗅細胞は、マーカー蛋白(Olfactory Marker Protein: OMP)を発現するが、OMP は発見より 40 年以上にわたり機能が不明であった。これまでに我々は、OMP の一次構造に cAMP 結合モチーフを発見し、実験的に cAMP の結合を確かめた。しかし、OMP の物理機能がどうして明らかになっていなかったのであろうか。一般的に、cAMP 結合モチーフは 10 アミノ酸ほどのサイズしかない上に、結合に関わる全体構造に至っては変異率が高い。さらに OMP にはパラログや関連タンパク質が知られていないため、機能比較が困難であったことも一因と考えた。そこで、オルソログのアミノ酸配列をカタログとして用いることで構造機能連関を補強するバイオインフォマティクス法を考案した。近年、次世代シーケンサーの登場により爆発的な勢いで数多くの生物種の全ゲノムがデータベース化されている。ネット検索により、遺伝子のオルソログが簡単にコレクションできるようになった。構造機能連関そのものの同定はさらなる Reverse genetics による解析が必要であるが、そのための手がかりを与える簡便な方法として報告する。(利益相反 なし)

#### 一般 20. 発達期の嗅球における自発神経活動依存的な神経回路形成

藤本聡志<sup>1</sup>、Marcus N.Leiwe<sup>1</sup>、室山優子<sup>2</sup>、斎藤哲一郎<sup>2</sup>、今井 猛<sup>1</sup>(<sup>1</sup>九州大学・医・疾患情報研究分野、<sup>2</sup>千葉大学・医・発生再生医学)

マウス嗅覚系において、約 1000 種類の嗅覚受容体によって検出される匂い情報は約 1000 種類の糸球体による「匂い地図」として嗅球上に表現される。2 次神経細胞である僧帽

細胞は発達初期に複数本の樹状突起を複数の糸球体へと伸ばすが、発達が進むにつれて樹状突起が刈り込まれ、最終的に 1 本の樹状突起を 1 つの糸球体へと接続する。しかしながら、どのようにしてこの特異的な接続が制御されているのかは不明であった。本研究において、僧帽細胞の神経活動を抑制すると、樹状突起の刈り込みが抑制されることが判明した。嗅神経細胞由来の神経活動を遮断しても刈り込みが正常であったことから、外部からの入力には依存しない嗅球内部の神経活動が必要であることが示唆された。実際に覚醒下のマウスの *in vivo* 2 光子カルシウムイメージングを行うと、嗅神経細胞に依存しない僧帽細胞の自発神経活動が観察され、それらの活動パターンは発達段階によって異なることがわかった。また、薬理学的実験からこれらの神経活動はグルタミン酸によるシナプス伝達とギャップ結合を介していることが分かった。さらに、NMDA 受容体を欠損した僧帽細胞では樹状突起の刈り込みが抑制されたこと。これらのことから、嗅球内で生成される自発的な神経活動が僧帽細胞の樹状突起の特異的な接続性を決定し、嗅覚回路の形成に寄与していることが示唆された。(利益相反 なし)

#### 学部 01. 主菜を含めた食事の順番による食後血糖値の変化

諏訪明日香, 伊藤有沙, 菖蒲沙也加, 豊里花波, 鳥井元歩砂, 野田千晶, 渡部優美, 石松 秀 (西九州大学健康栄養学部健康栄養学科)

【目的】2 型糖尿病の予防や治療は、食事療法が基本である。2 型糖尿病における大血管合併症の予防には、食後血糖値の平坦化が重要とされている。昨年度我々は、三角食べが食後血糖値を抑制することを報告した。今回我々は先行研究を比較検討し、主菜を加えた試験食により、食事の順番による食後血糖値の推移を比較検討したので報告する。

【方法】被験者は 21~22 歳の健康な成人 13 名で、次の順番により試験食を摂取させた。T1) 主菜, サラダ, 主食, T2) サラダ, 主菜, 主食, T3) 主食, 主菜, サラダ, T4) 三角食べ(サラダ, 主菜, 主食を少量ずつ繰り返して摂取)とし、それぞれ 20 分かけて摂取することとした。空腹時, 食後 30 分, 60 分, 90 分, 120 分, 180 分, 240 分の計 7 回, 採血し、血糖値, 血中インスリンを測定した。【結果・考察】食後 30 分の血糖は、T3 と T4 は、T1 と T2 に比して有意に高かった。一方で食後 180 分の血糖は、T1, T2 が T3, T4 に比べ有意に高かった。T1, T2 では食後早期に大きな血糖上昇がないためインスリンと血糖値は持続的に高値となり、T3, T4 では食後初期の血糖値とインスリンは速やかに高まり、短時間で血糖値とインスリンは低下した

ものと考えられた。健常者で検討した今回の結果では、サラダや主菜から先に食べると、長時間に渡り血糖値が高く推移し、必ずしも有利とはいえなかった。今後、糖尿病患者での検討も行っていきたい。(利益相反 なし)

#### 学部 02. GRAB<sub>DA</sub> センサーを用いたドーパミン動態解析

志手優仁<sup>1</sup>, 山口隆司<sup>2</sup>, 比嘉涼子<sup>1</sup>, 鹿野健史郎<sup>1</sup>, Yu-long Li<sup>3</sup>, 正田貴俊<sup>2</sup>, 花田礼子<sup>1</sup> (大分大学医学部神経生理学講座, <sup>2</sup>大阪大学蛋白質研究所高次脳機能学研究室, <sup>3</sup>北京大学生命科学研究院)

GRAB<sub>DA</sub> (GPCR-activation-based-DA) センサーは、遺伝学的に G タンパク共役型受容体にコードされているドーパミンセンサーで、ドーパミン反応性に蛍光を発するセンサー蛋白質である。最近、GRAB<sub>DA</sub> センサーを用いることにより、*in vivo* にて脳内ドーパミン量を観測しながら、マウスの行動解析ができることが示された (*Sun F, Li Y et al, Cell 174; 481-496, 2018*)。今回、我々は GRAB<sub>DA</sub> センサーを HEK293 細胞内に導入し、導入された細胞における本センサーの発現を確認したのち、ドーパミンやセロトニン等の神経伝達物質を本細胞に添加することで、GRAB<sub>DA</sub> センサーがドーパミン特異的に反応して蛍光を発するのかどうかの機能的検証をおこなった。併せて、GRAB<sub>DA</sub> センサーのドーパミンに対する反応性を *in vitro* の系を用いて経時的に解析した。今後、*in vitro* 実験系にて本システムを検証した後、GRAB<sub>DA</sub> センサーを発現させたウイルスベクターを作製し、ウイルスの抽出・精製をおこなったのち、*in vivo* にてマウスの標的脳部位に投与することで目的とする脳神経細胞におけるドーパミン動態を解析する予定である。(利益相反 なし)

#### 学部 03. ストレス応答における NMU システムの機能解析

上田哲平, 比嘉涼子, 鹿野健史郎, 花田礼子 (大分大学医学部神経生理学講座)

生理活性ペプチドの Neuromedin U (NMU) と Neuromedin S (NMS) は NMU 受容体 (NMUR1, NMUR2) に対する共通のリガンドであり、摂食・エネルギー代謝や概日リズムの調節、末梢組織における炎症反応の制御など様々な生理作用を有している。NMU/NMS ならびに NMUR1/NMUR2 は神経細胞に発現を認めるものの NMU システムの神経細胞に対する作用は明らかになっていない。今回我々は、ヒト神経芽細胞 (SH-SY5Y) を用いて、ストレスにおける神経細胞応答と NMU システムとの関連を *in vitro* において解析することとした。まず SH-SY5Y

における NMU/NMS, NMUR1/NMUR2 の発現を RT-PCR により解析した。その結果、本細胞では NMU が恒常的に発現しており、分化誘導によって NMUR1 の遺伝子発現が増加することが明らかとなった。そこで、NMU および NMUR1 のヒト神経芽細胞における生理機能を検討するために CRISPR-Cas9 システムを用いて、NMU および NMUR1 の遺伝子欠失ヒト神経芽細胞を作製し、より詳細なメカニズム解析を行っている。本研究によって神経細胞における NMU システムの新たな生理機能の解明につながることが期待される。(利益相反 なし)

#### 学部 04. ゼブラフィッシュにおける新規脳内因子 NPGM の生理機能解析

緒方将人, 鹿野健史朗, 梅田涼平, 比嘉涼子, 花田礼子  
(大分大学医学部神経生理学講座)

Neurosecretory protein GL (NPGL) は鳥類の視床下部より発見された分泌性の小タンパク質である。鳥類や哺乳類において NPGL は摂食行動やエネルギーホメオスタシスを制御することが示されている。また、NPGL は食餌嗜好性に関与することが示唆されており、情動などの脳内高次機能への関与が示唆されている。NPGL 遺伝子にはパラログ関係にある Neurosecretory protein GM (NPGM) 遺伝子が存在し、NPGM がエネルギー代謝調節機構等に関与することが考えられる。本研究では脊椎動物のモデルとして近年有用性が報告されているゼブラフィッシュを用いて、NPGL・NPGM システムの生理機能を解明することを目的に、Tol2 トランスポゾンシステムを用いて、ヒートショックプロモーターにより NPGM の発現を調節するトランスジェニックゼブラフィッシュの作製をおこなっている。同時に、このような遺伝子改変モデルを用いて、記憶や情動などの脳内高次機能に与える影響を解析するための行動学的解析システムをセットアップ中である。(利益相反 なし)

#### 一般 21. 超穿孔パッチ法による心筋 CICR 膜電位ゆらぎの解析

塩谷孝夫 (佐賀大学医学部生体構造機能学講座器官・細胞生理学分野)

心筋の細胞内カルシウム動態異常は、EAD や DAD を誘発して、心室性不整脈を引き起こす。そのメカニズムを調べるために、「超穿孔パッチ法」を新規に開発した。この方法では、ナスタチンを強アルカリ (KOH) で水に可溶化し、さらに界面活性剤 Pluronic F-127 を用いて水中に分散させた。ナスタチンを、有機溶媒を使わずに水中に溶かすことで、従来法を超える、速い膜穿孔が実現した。パッ

チ電極の直列抵抗は、ギガシール形成 5 分後で  $20\text{M}\Omega$  以下まで低下した。「超穿孔パッチ法」を用いて、マウス心室筋細胞の細胞内カルシウム動態を維持した条件下で、低  $\text{K}^+$  外液に対する催不整脈性の膜電位応答について調べた。外液  $\text{K}^+$  濃度を低下させると、静止膜電位は過分極し、それから数秒の遅延をへて、振幅  $10\text{mV}$ 、周期  $1$  秒ほどの膜電位ゆらぎが発生した。この膜電位ゆらぎは、EAD をともなう自発活動電位を誘発した。細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  をキレートした、通常のホールセル記録では、この膜電位ゆらぎは観察されなかった。また、膜電位ゆらぎの発生の遅延は、T 管内への外液の拡散を反映すると考えられた。これらの結果は、外液  $\text{K}^+$  濃度の低下によって、T 管膜に CICR による脱分極が発生し、それが筋形質膜に伝搬して、膜電位ゆらぎを生じることを示す。心筋細胞の T 管膜の膜電位は、筋形質膜の膜電位とは、まったく異なる波形なのかもしれない。(利益相反 なし)

#### 一般 22. $\text{Ca}_v1.2$ 型 $\text{Ca}$ チャネルへのカルモジュリンの結合モデル：分子シミュレーション研究

亀山正樹, 蓑部悦子, 徐 建軍, 高 青華 (鹿児島大学医歯学総合研究科神経筋生理学分野)

$\text{Ca}_v1.2$  型  $\text{Ca}$  チャネルの  $\text{Ca}$  依存性増強 (CDF) と  $\text{Ca}$  依存性不活性化 (CDI) の調節機構には、カルモジュリン (CaM) が関与することが知られているが、CaM のチャネルへの結合の分子モデルは複数あって統一していない。我々は、2 分子の CaM がチャネルに結合して、それぞれ CDF と CDI に関与するという 2 分子モデルを提唱している。本研究では、 $\text{Ca}_v1.2$  型  $\text{Ca}$  チャネルへの  $\text{Ca}^{2+}$ -free CaM (apoCaM) 結合の分子モデルをコンピュータシミュレーションで検討した。CaM2 分子がそれぞれチャネルの C 末 tail の preIQ 領域と IQ 領域に結合するモデル (Asmara ら, J Pharmacol Sci 2010; Evans ら, Biophys Chem 2011) や発表されている  $\text{Ca}_v1.2$  型  $\text{Ca}$  チャネルの preIQ-IQ ペプチドと  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM の結晶構造 (Fallon ら, PNAS 2009; Kim ら, EMBO J 2010), クライオ電顕法による  $\text{Ca}_v1.1$  型  $\text{Ca}$  チャネルの構造 (Wu ら, Science 2015; Nature 2016) などを参考に apoCaM の preIQ-IQ ペプチドへの結合の分子モデルを作成、解析した。(利益相反 なし)

#### 一般 23. N-glycosylation defect causes deranged cellular automaticity in neonatal cardiomyocytes: Roles on voltage-gated T type $\text{Ca}^{2+}$ channels and hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels

N-型糖鎖修飾障害において生じる新生ラット心筋の自

### 動能形成異常：T 型 $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルと過分極誘発内向き電流チャンネルに対する作用

劉 衍恭 (Liu Yangong), 王 普 (Wang Pu), 象 慎一郎, 黒川竜紀, 小野克重 (大分大学医学部病態生理学講座)

N-glycosylation is a major subclass of glycosylation, which is the most prevalent post-translation modification in proteins. We previously reported that N-glycosylation inhibition by tunicamycin reduced and passivated the  $\text{Ca}_v3.1$  channel. In this study, we report here that N-glycosylation inhibition in rat neonatal cardiomyocyte causes automaticity defect. The spontaneous beating frequencies of the neonatal cells, when incubated with Tunicamycin for 24 hours, were significantly slower than the cells with vehicle, which suggests that N-glycosylation defect obstructs pacemaker currents. Consistent with the speculation, the subsequent research results demonstrate that N-glycosylation defect significantly reduces T type  $\text{Ca}^{2+}$  channel current and hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel current. In conclusion, N-glycosylation inhibition by tunicamycin attenuates the spontaneous automaticity, thereby slows the beating ratio of neonatal cardiomyocytes, which also implies that pathology of pacemaker defect is potentially caused by disorders in glycosylation of the pacemaker channels. (利益相反 なし)

### 一般 24. 黒酢投与がラットの疲労と運動パフォーマンスに及ぼす影響

申 敏哲<sup>1</sup>, 矢澤一良<sup>2</sup>, 松本祥幸<sup>3</sup>, 田中哲子<sup>1</sup>, 土井篤<sup>1</sup>, 吉村 恵<sup>1,4</sup> (<sup>1</sup>熊本保健科学大学リハビリテーション学科, <sup>2</sup>早稲田大学ナノ理工学研究機構規範科学総合研究所, <sup>3</sup>株式会社えがお研究開発部, <sup>4</sup>医療法人社団温故会直方中村病院)

多くの人が日常生活の中で経験する疲労は、仕事効率を低下させ、これによる経済的損失は大きな社会問題となっている中で、近年、黒酢の抗疲労効果が散見される。黒酢は脂質代謝改善作用、高血圧抑制作用、糖代謝改善作用、肝機能改善作用など多くの様々な機能を持っていることが報告されている。さらに、黒酢は疲労回復と運動能力に対する効果も報告されているが、明確なデータがないのが現状であり、これらの効果を明らかにする必要がある。そこで、本研究ではトレッドミルランニング法と強制水泳法を用い、行動学的実験手法、血液分析法、免疫染色手法を用いて、黒酢の疲労、特に中枢性疲労と運動パフォーマンス

に及ぼす影響を検討した。本研究の結果、継続的な黒酢の摂取は活性酸素阻害剤である SOD の発生を上昇させ、また、TPH と 5-HT の発現量を減少させた結果、酸化ストレスにより誘導される疲労や中枢性疲労の軽減と疲労回復を促進させる可能性が考えられた。さらに黒酢摂取群の腓腹筋と肝臓内グリコーゲン量の高い維持は、黒酢がグリコーゲン損失の防止に関与し、グリコーゲンの枯渇による疲労誘発を抑制した可能性が示唆された。この様に黒酢の疲労軽減や疲労回復促進効果は仕事効率や QOL を向上させ、しいては医療費の軽減に寄与すると考えられる。(利益相反なし)

### 一般 25. ベージュ脂肪細胞における CD105 の機能解析

比嘉涼子<sup>1</sup>, 花田俊勝<sup>2</sup>, 花田礼子<sup>1</sup> (<sup>1</sup>大分大学医学部神経生理学講座, <sup>2</sup>大分大学医学部細胞生物学講座)

誘導型褐色脂肪細胞であるベージュ脂肪細胞の分子メカニズムを明らかにすることはエネルギー代謝調節機構の解明における有用な知見となり得る。我々は、マウス鼠蹊部白色脂肪組織よりベージュ脂肪様前駆細胞株と白色脂肪前駆細胞株を樹立し、遺伝子発現を比較したところ、ベージュ脂肪様前駆細胞株で CD105 の高発現を認めた。このことから CD105 がベージュ脂肪細胞において何らかの機能を有していることが示唆された。そこでベージュ脂肪前駆細胞における CD105 の機能解析を行うため、CD105 遺伝子欠失ベージュ脂肪様前駆細胞株を作製し、解析を行った。その結果、CD105 遺伝子の欠失によって、熱産生の指標となる脱共役たんぱく質 1 (UCP1) の発現の有意な低下が認められた。また、この細胞では Smad2 のリン酸化が亢進していた。そこで、Smad2 恒常活性化型プラスミドを導入したベージュ脂肪様前駆細胞を作製し、解析したところ、Smad2 の活性化によって UCP1 発現の有意な低下が認められた。このことから、CD105 が Smad2 を負に制御することでベージュ脂肪細胞の機能維持に重要な役割を担っている可能性が示唆された。(利益相反 なし)

### 一般 26. 代謝リプログラミングにおけるミトコンドリア膜電位の維持

高橋英嗣 (佐賀大学大学院工学系研究科先端融合工学専攻)

正常細胞においては酸素に依存した ATP 産生 (酸化的リン酸化) が欠かせないが、がん細胞では酸素が十分に存在するにも関わらず嫌氣的解糖が大きく亢進する Warburg 効果が知られている。これは、合目的観点からは細胞増殖に必要なマクロ分子 (タンパク質, 核酸, 脂質) の

生合成に有利な代謝プログラミングと説明されるが、この時、酸化的リン酸化（ミトコンドリア呼吸）は著しく低下するものと考えられる。一方で、ミトコンドリア呼吸とミトコンドリア膜電位は共役しているため、ミトコンドリア呼吸の低下はミトコンドリア膜電位の低下をもたらし、最終的には apoptosis や necrosis による細胞死が誘導される危険性がある。ミトコンドリア膜電位は、ミトコンドリア呼吸による電子伝達と複合体 V (F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP 合成酵素) 活性のバランスで決まるので、ミトコンドリア呼吸低下に際し、ミトコンドリアにおける ATP 合成も低下すれば膜電位の喪失は回避可能である。本研究では、がん細胞株 (Hep3B) と正常細胞株 (COS-7) において、dimethylolaloylglycine (DMOG) を用いて代謝プログラミングを誘導した時のミトコンドリア膜電位の維持メカニズムを検討した。(利益相反 なし)

#### 一般 27. 交替制勤務モデルマウスにおける耐糖能の検討

藤原広明, 笹野紗帆里, 藤木通弘 (産業医科大学産業生態科学研究所人間工学)

我々は、マウスに対して給餌制限とランニングホイール (RW) による運動制限を負荷することで、交替制勤務の動

物モデルを作成した。今回は本モデルにおける耐糖能の評価・検討を行ったので報告する。実験には C57BL/6 マウス (8 週齢) を用いた。記録開始 1 週間前に脳波・筋電図などの生体信号測定のための手術を行った。交替制勤務モデル群では、給餌と RW による運動を、休息する明期のみで許可し、暗期では制限した。対照群ではこれらの条件を逆転させた。交替制勤務負荷 1 週間および 2 週間目にそれぞれ糖負荷試験を行った。試験日前日 19 時に交替制勤務負荷を終了し、試験日 2 時から絶食とした。14 時間の絶食後、16 時に経口的に 2g/kg (BW) のグルコースを負荷し、0, 15, 30, 60, 120 分後の血糖値を測定した。その結果、交替制勤務モデル群において、糖負荷 15 分後の血糖値は、1 週および 2 週で有意に上昇した。また糖負荷前、糖負荷 30 分後、60 分後の血糖値は、2 週で有意に低下した。交替制勤務モデル群の血糖値は食後高血糖様の変化を示しており、インスリン追加分泌の低下や遅延の可能性が示唆された。交替制勤務モデル群では明期に覚醒量が増え、N-REM 睡眠量が低下し、また自発活動量および RW 活動量のピークが暗期から明期前半に移行するが、交替制勤務負荷による睡眠と糖代謝への影響の関連については、今後の検討を要する。(利益相反 なし)