

1. 心室筋細胞モデルによる興奮伝播シミュレーションと表面電位変化のシミュレーション

○山本菜月, 松本珠実, 野間昭典 (立命館大学生命科学部生命情報学科バイオシミュレーション研究室)

心筋組織内で活動電位はギャップジャンクション (GJ チャンネル) により細胞から細胞へと伝播する。我々の研究室では GJ チャンネルモデルを組み込んだヒト心室筋詳細モデルを多数連結した一次元ケーブルモデルを作成し、心室筋細胞の活動電位伝播について研究を行ってきた。GJ チャンネルは膜電位差には影響されないが、 Ca^{2+} 濃度が上昇すると、 $K_{1/2}=0.25\mu M$, $n_H=3.4$ のヒル式によって閉口遷移を示す。まず、一次元ケーブルモデルで GJ コンダクタンスを減少させると、興奮伝播速度は減少することを確認し、これによって、正常な興奮伝播速度 (60cm/s) を与える GJ コンダクタンスを推定することができた。しかし、正常な Ca^{2+} transient が発生するとき、伝播速度は殆ど影響されなかった。この原因は、反応時定数が遅いことによると考えられた。このモデルの汎用性を高めるため、一次元ケーブルモデルに細胞外電気抵抗を追加し、細胞外電位変化を同時に計算できるように改編した。その結果、細胞外記録には心電図の QRS 群と T 波にほぼ対応した波形を再現できた。

2. 詳細な Ca^{2+} 誘発性 Ca^{2+} 放出メカニズムを基盤とするヒト心室筋細胞モデルの構築

○姫野友紀子, 目見田 拓, 天野 晃, 野間昭典 (立命館大学生命科学部)

Ca^{2+} 誘発 Ca^{2+} 放出 (CICR) は、L 型 Ca^{2+} チャンネル (LCC) から流入した Ca^{2+} により、LCC と対を形成し Ca^{2+} 放出単位 (CaRU) を形成する RyR 集団 (クプロン) が自己再生的に活性化することによって起こり、筋小胞体 (SR) 内 Ca^{2+} が枯渇することで終結する。このクプロン内で起こる RyR の活性化については、従来個々のクプロンに確率的シミュレーションを適用して再現されることが多く、計算コストが非常に高かった。そこで Hinch ら (2004) は、ナノドメイン Ca^{2+} を決定する LCC-RyR 共役モデルを提案し、この問題を解消した。我々は Hinch のアルゴリズムを用い、クプロンレベルの CICR メカニズムと同様の計算を細胞モデルで実現できた。また、細胞モデルで重要な Ca^{2+} 放出部付近の Ca^{2+} 蓄積をモデルに加えることで再現できた。この場合、細胞内に存在するすべての CaRU が 1 つの共通の Ca^{2+} 分画の濃度 $[Ca^{2+}]_{inc}$ によって制御されることになるが、膜電位固定実験下の段階的な Ca^{2+} 放出がほぼ再現できた。本発表では、新規に開発した詳細な CICR メカニズム

を組み込んだヒト心室筋細胞モデルの開発過程と得られた結果について発表する。

3. 左心低形成症候群に対するハイブリッド手術の血行動態シミュレーション

○清水秀二, 川田 徹, マイケル・J・ターナー, 宍戸稔聡, 杉町 勝 (国立循環器病研究センター循環動態制御部)

近年、動脈管ステントリングと両側肺動脈絞扼術 (PAB) のハイブリッド手術が、左心低形成症候群に対する第 1 期手術としてしばしば行われているが、本術式が従来の Norwood 手術と比べ、血行動態上どのような利点があるかはあまり知られていない。そこで我々はコンピュータ・シミュレーションを用いて、ハイブリッド手術と Norwood 手術との血行動態の差異を明らかにした。本モデルでは心房・心室は時変弾性モデル、血管系は従来の三要素 Windkessel モデルを用い、シャントや絞扼術による圧較差は非線形関数で記述した。径 1.75mm の両側 PAB を用いたハイブリッド手術は、3.5mm の BT シャントおよび 6.0mm の RV-PA シャントを用いた Norwood 手術と同等の肺動脈圧、肺動脈血流、肺体血流比、動脈酸素飽和度を得ることができるが、BT シャントを用いた Norwood 手術と同様に体循環から肺循環への diastolic run-off を免れることができず、心室の収縮期圧・容積面積を増大させ、心筋酸素消費を増加させる。その結果として、RV-PA シャントを用いた Norwood 手術と比して心臓エネルギー効率を低下させる。

4. Dynamic carotid baroreflex characteristics are unaffected by the electrical stimulation of aortic baroreceptors

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

The electrical activation of the arterial baroreflex has been shown to effectively induce a long-term reduction in arterial pressure in resistant-hypertensive patients. However, the chronic stimulation of baroreceptors may restrict the normal short-term regulation of arterial pressure by the arterial baroreflex. We investigated the dynamic characteristics of the open-loop carotid baroreflex while simultaneously stimulating (2Hz and 10V) baroreceptors in the left aortic depressor nerve in anesthetized Wistar-Kyoto rats (n=6). The slope between a modulation frequency of 0.1 and 1Hz and gain at 1Hz of the neural arc transfer function were not significantly different between the control

and stimulation conditions (slope: 5.37 ± 0.61 dB/decade vs. 5.11 ± 0.69 dB/decade, $P = 0.33$; gain: 4.84 ± 0.55 au/mmHg vs. 4.67 ± 0.42 au/mmHg, $P = 0.64$). We can conclude from these data that the normal short-term carotid baroreflex regulation of arterial pressure is unaffected by electrical stimulation of aortic baroreceptors.

5. 糖尿病発症における心臓の時計遺伝子の関与について

○中尾友美, 向阪 彰, 北内真理子, 小形 光, グホ・サビン, 和気秀文, 前田正信 (和歌山県立医科大学医学部生理学第二講座)

近年, 糖尿病の発症に体内時計の異常が関与している可能性のあることが報告されてきた。体内時計を構成する時計遺伝子は全身の細胞に発現しており, 様々な臓器の時計遺伝子が糖代謝調節に重要であることが示唆されている。我々はこれまで, 時計遺伝子 *Bmal1* の心臓特異的ノックアウト (*H-Bmal1*^{-/-}) マウスが慢性心不全を発症することを報告してきたが, 興味深いことに, このマウスに耐糖能障害が起きることを見出した。*H-Bmal1*^{-/-} マウスでは, 対照群に比べて糖負荷試験における血糖値が上昇し, インスリン負荷試験での血糖値の低下が障害されていた。また, *H-Bmal1*^{-/-} マウスの肝臓においては糖新生に関わる遺伝子の発現が上昇していた。これらのことから, *H-Bmal1*^{-/-} マウスはインスリン抵抗性を主体とした耐糖能障害をもつことが分かった。インスリン抵抗性には体重の増加が関与していることが多いが, *H-Bmal1*^{-/-} マウスと対照群マウス間に体重の差は認められず, *H-Bmal1*^{-/-} マウスでみられたインスリン抵抗性は体重増加に伴う二次的なものではなかった。以上の結果により, 時計遺伝子は, 糖代謝調節に重要な臓器や臓器のような臓器のみならず, 糖代謝調節への関与の小さい心臓においても, その機能異常によって糖尿病発症を助長している可能性が示唆された。

6. Ca²⁺シグナル調節因子による新規肥満制御経路の解析

○西谷 (中村) 友重¹, 中尾 周¹, 若林繁夫^{1,2} (¹国立循環器病研究センター・分子生理部, ²同 心臓生理機能部)

肥満は糖尿病や心臓病など各種疾患のリスクを高めることから, 制御機構の解明は重要である。私たちは, 神経や心臓の Ca²⁺シグナル調節に重要な役割を担う Ca²⁺センサー NCS-1 の全身欠損 (KO) マウスにおいて, 体脂肪増加を伴う顕著な肥満を発症することを見出した (Circ. Res. 2011)。本研究ではその原因を明らかにするため, 小動物総合モニタリングシステムを用いて, エネルギー摂取量およ

び消費量を比較した。その結果, 摂食・摂水量, また自発運動量は両グループ間で差は認められなかったものの, 基礎代謝の指標である酸素消費量および二酸化炭素排出量が KO マウスで顕著に低下していることがわかった。その他 KO マウスでは, 脂肪組織における脂肪滴が巨大化しており, エネルギー消費関連タンパク質 (UCP-1 および PGC-1) の発現量の低下が認められた。これらの結果は, NCS-1 がミトコンドリアにおけるエネルギー消費に寄与しており, 欠損すると基礎代謝量が抑制され肥満になることを示唆している。KO マウスでは, 老齢になると血糖値が上昇し, 心不全を呈していた。NCS-1 による肥満抑制機構を明らかにすれば, 生活習慣病の軽減に役立つことが期待される。

7. 膵β細胞におけるイノシトール三リン酸受容体 (IP₃R) を介する Ca²⁺動態の数理モデル化及びそのメカニズム解析

○竹田有加里¹, 嶋吉隆夫², G.G.Holz³, 野間昭典¹ (¹立命館大学生命科学研究科生命情報学コース, ²京都大学大学院情報学研究所システム科学専攻医用工学分野, ³Department of Medicine, State University of New York, Upstate Medical University)

Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) による膵β細胞インスリン分泌増強作用のメカニズムの重要な要因として, PKA を介した IP₃R の活性化による小胞体からの Ca²⁺放出が考えられている。[Ca²⁺]_i の上昇は, Ca²⁺感受性イオンチャンネルやトランスポーター, 更には ATP や cAMP 濃度調節に関わる酵素活性に影響を及ぼし, 細胞機能を複雑に制御することが示唆される。しかしながら, 従来のβ細胞モデルに実装されている IP₃R モデルは, 簡単な記述式で表現されていて, IP₃R を介する Ca²⁺動態のメカニズムなどを解析するには不十分である。そこで我々は, より多くの実験結果を再現できる詳細な IP₃R モデルを構築し, 膵β細胞の Ca²⁺動態への IP₃R 活性の関与を解析した。その結果, Ca²⁺による IP₃R 活性の positive feedback によって Ca²⁺ transient や oscillation が発生し, また Ca²⁺による非常に遅いチャンネルの不活性化が, Ca²⁺ transient の減衰経過を決定し, さらにそれが Ca²⁺ oscillation を誘発する決定的要素であることが示唆された。

8. 生理学筆記試験の成績の経年変化と医学部学生の学力低下

○前田正信¹, 羽野卓三² (¹和歌山県立医科大学生理学第2講座, ²同 教育研究開発センター)

背景: 本研究の目的は, 医学部学生の生理学筆記試験の

成績がどのように変化しているかを調べ、試験の成績が入学定員増とどのような関係であるか明らかにし、入学定員増後の医学部学生の試験の成績よりみた学力低下が実際に生じている根拠を与えることである。

方法：医学部の入学定員増以前の学年、定員増以後の学年の生理学筆記試験の成績の平均値、標準偏差、平均値+標準偏差、平均値-標準偏差、学生数、不合格者数、学生数に対する不合格者の割合を調べた。

結果：医学部学生の試験の成績は入学定員増以後に有意に低下していることが明らかとなった。

考察：医学部学生の試験の成績よりみた学力低下は入学定員増が関与していると考えられる。考察として、医学部学生の現状も報告する。

9. 上皮組織クロライドイオン分泌に寄与する電気的中性クロライドイオン輸送体活性の電気生理学的測定の新展開

○笹本浩平¹、新里直美²、丸中良典^{2,3} (1京都府立医科大学医学部医学科5年生、²京都府立医科大学大学院医学研究科細胞生理学、³京都府立医科大学大学院医学研究科バイオイオノミクス)

上皮組織の一つである気道上皮組織は感染防止や異物排泄などの重要な生体防御機能を発揮するが、生体防御機能構築の中心的な役割を担っているものの1つがCl⁻分泌を駆動力とする水分分泌である。電気生理学手法は時間分解能に優れた研究手法ではあるが、Cl⁻分泌の統合的制御機構に関しては電気生理学手法のみでは解決し得ない点が多々存在している。特に電気的中性イオン輸送体活性は、電気生理学的手法では測定が不可能とされてきた。我々は上皮細胞におけるCl⁻分泌に関与する電気的中性クロライドイオン輸送体活性制御を含む統合的な制御機構を解明するための数理モデルを構築し、Cl⁻分泌に関与するイオン輸送体・チャンネル活性が如何に変化するかを数理モデルから導かれる予測関数を用いることにより、従来電気生理学的手法のみでは得ることの出来なかった多くの情報を得ることを可能にした。

我々が構築した数理モデルを電気生理学の実験に適用させることにより、電気生理学的手法のみでは測定することが不可能であった電気的中性イオン輸送体活性を予測することが可能となったので報告する。

10. Transcriptional regulation of NKCC and CFTR Cl⁻ channel through PI3K activation and ERK inactivation by insulin in renal epithelial A6 cells

○H.Sun¹、N.Niisato^{1,3}、Y.Marunaka^{1,2,3} (1Dept of Mol

Cell Physiol, ²Dept of Bio-Ionomics, Kyoto Pref Univ of Med, ³Japan Inst for Food Education & Health, St Agnes' Univ, Kyoto, Japan)

Insulin is known to stimulate epithelial Na⁺ channel-mediated Na⁺ reabsorption, however the insulin action on the Cl⁻ secretion is not fully understood. In the present study, we evaluated the insulin action on Na⁺-K⁺-2Cl⁻ co-transporter (NKCC) -mediated Cl⁻ secretion in renal epithelial A6 cells. Insulin treatment significantly enhanced the forskolin-stimulated Cl⁻ secretion with an increase in apical Cl⁻ conductance by upregulating mRNA expression of both NKCC and CFTR Cl⁻ channel, although insulin treatment alone without application of forskolin had no effect on the basal Cl⁻ secretion or apical Cl⁻ conductance. We next elucidated a role of PI3K on the insulin action by using a specific PI3K inhibitor, LY294002, because PI3K is known to be a major signal molecule in the downstream-pathway of insulin. Inhibition of PI3K reduced the Cl⁻ secretion by suppressing mRNA expression of NKCC, whereas insulin still had a stimulatory action on mRNA expression of CFTR even in the presence of LY294002. On the other hand, we found that PD98059 (a MEK inhibitor) further enhanced the insulin-stimulated CFTR mRNA expression and the Cl⁻ secretion in forskolin-treated A6 cells and that insulin induced slight, transient activation followed by significant, stable inactivation of ERK. These observations suggest that insulin enhances forskolin-stimulated Cl⁻ secretion through transcriptional regulation of NKCC and CFTR Cl⁻ channel via PI3K activation and ERK inactivation in renal epithelial A6 cells.

11. Pannexin 1 の単一イオンチャネルゲーティングキネティクスの膜電位依存性

○野村 健¹、樽野陽幸²、中張隆司^{2,3}、曾我部正博⁴、丸中良典^{1,2,3} (1京都府立医大・院・医バイオイオノミクス、²京都府立医大・院・医細胞生理学、³平安女学院大学日本食育健康研究所、⁴名古屋大学・院・医メカノバイオロジー)

Pannexin 1 は陰イオン選択性イオンチャネルを形成し、機械刺激、カスパーゼによる切断、細胞膜の脱分極、活性化した P2X₇ 受容体との相互作用により活性化し、気道上皮での粘液クリアランスやアポトーシス時の“find-me”シグナルとしての ATP 放出に関与することも知られている。Pannexin 1 チャネルの開口確率は膜の脱分極により増大することが知られているが、単一イオンチャネル開閉制

御機構については不明である。本研究では、cell-attached patch clamp 単一イオンチャネル電流記録法を用いて、マウス Pannexin 1 の single channel conductance・opening/closing rates を測定した。その結果、single channel conductance は内向き電流では約 20pS および外向き電流では約 80pS という外向き整流性を示し、逆転電位を境にして過分極側および脱分極側で single channel opening/closing rates の膜電位依存性は著しく異なることが明らかとなった。これらのことより、「charge carrier の移動方向および単位時間あたりの移動量が単一イオンチャネル開閉速度の膜電位依存性を制御している」という可能性を見出した。

12. 風味阻害と嗅覚情報変換チャネル抑制との関係

○竹内裕子¹、加藤寛之²、倉橋 隆¹ (¹大阪大学大学院生命機能研究科、²大和製罐株式会社)

昨年、我々はワインのコルク汚染の原因物質の1つである 2,4,6-Trichloroanisole (TCA) が極低濃度 (aM=10⁻¹⁸ M) で嗅覚情報変換チャネルである CNG チャネルを阻害したことを報告した。この高効率なチャネル電流抑制は、時間積分を生じ、電流抑制率と TCA 及び TCA 類似構造物質の LogD 値との間にも正の相関が認められたことから、チャネルタンパク質がターゲットであるよりもむしろ、膜の脂質二重層を介している可能性が推測されている。また、この TCA が飲食品内に ppt レベルで存在するだけでヒトの風味低下を引き起こすことから、TCA が風味阻害の一要因であると考えられ、ある分野では問題視されている。しかし、一方で、風味抑制が効果的に使用されている例もある。例えば「臭み消し」として、ある種の調味料や香辛料が生魚や肉の臭みを減少させることは古くから知られ、日常的に用いられている。本研究では、発酵食品である味噌・醤油から得られた香氣成分が嗅細胞の情報変換チャネルの応答電流に影響することを発見したので報告する。

13. 新規抗がん剤を目指した Naftopidil 誘導体のデザインと合成

○中尾周平¹、清水 忠¹、馬淵美雪¹、田中明人¹、西崎知之² (¹兵庫医療大学薬学部創薬化学講座、²兵庫医科大学生理学講座生体情報部門)

近年、前立腺肥大の治療に用いられる α_1 受容体遮断薬ナフトピジルに癌細胞増殖抑制効果が報告され注目されている。臨床的安全性が高いナフトピジルの抗がん活性は、新たな創薬の可能性を示唆するものと考え、発表者らはナフトピジル誘導体を新たに合成し、その抗がん活性を検討した。ナフトピジル誘導体 21 化合物を合成し、中皮腫由来癌細胞 NCI-H28、NCI-H2052、NCI-H2452 および MSTO-211H

細胞における細胞増殖抑制効果を検討した。その結果、HUHS1015 に目的とする強い上記 4 種細胞における増殖抑制効果を見出すことに成功した。HUHS1015 は正常中皮細胞 Met5A への影響が弱いものであった。また、HUHS1015 は肺、肝臓、胃、膀胱、前立腺、腎由来癌細胞など 19 種類の細胞に対しても同様に有効性を示した。HUHS1015 は caspase4 活性化に基づく caspase-3 活性化を介した apoptosis 誘導を惹起していた。

14. 新規ナフトピジル類似体 HUHS1015 による大腸癌細胞に対するアポトーシス誘導作用

○賀来佳子¹、土屋綾子¹、菅野武史¹、中尾周平²、清水忠²、馬淵美雪²、田中明人²、西崎知之¹ (¹兵庫医科大学生理学講座生体情報部門、²兵庫医療大学薬学部創薬化学講座)

前立腺肥大症や高血圧症の治療薬として使用されているナフトピジルは抗腫瘍作用があることが報告されている。我々は、21 種類の新規ナフトピジル類似体を合成し、様々な癌細胞に対する細胞死誘導効果を検討した結果、類似体の中で 1-[2-(2-Methoxyphenylamino) ethylamino]-3-(naphthalene-1-yloxy)propan-2-ol] (HUHS1015) が、ヒト肺癌、肝臓癌、胃癌、腎臓癌、膀胱癌、前立腺癌、悪性胸膜中皮腫細胞株に対してアポトーシスを誘導することを報告してきた。本研究は、大腸癌細胞株に対する HUHS1015 のアポトーシス誘導作用を既存の抗癌剤と比較し検討することを目的とした。CW2 および Caco-2 ヒト大腸癌細胞株に対して HUHS1015 は細胞生存率を低下させ、Annexin-V 染色および TUNEL 染色によりアポトーシスを誘導を判定した。いずれの細胞においても caspase-3、4、8、9 の活性化を認めため、caspase 依存性のアポトーシスを誘導することが示唆された。また、CW2 ヒト大腸癌細胞を皮下に移植したマウスを用いた実験において、抗腫瘍効果を示したことから、さらにメカニズムを解明することで新たな抗腫瘍薬としての有効性が期待される。

15. 閉塞性睡眠時無呼吸時の循環調節に果たす末梢性化学受容器の役割

○梶原千聖、吉本光佐、水上友里、三木健寿 (奈良女子大学大学院生活環境科学系統御生理)

閉塞性睡眠時無呼吸は、動脈圧の上昇など循環系に大きな影響を及ぼす。一方、末梢性化学受容器は酸素分圧をモニターし、呼吸および循環調節に重要な役割を果たす。本研究は、ラットの末梢性化学受容器を除神経し、閉塞性睡眠時無呼吸時の神経性循環調節に末梢性化学受容器が果たす役割について検討した。Wistar 系雄ラットを用いて、腎

及び腰部交感神経活動、脳波、心電図、筋電図測定用電極、動脈圧測定用カテーテル、薬物投与のための静脈カテーテル、気管閉塞用のバルーンを慢性留置した。睡眠ノンレム期に気管閉塞を 40 秒間行った。その後、末梢性化学受容器の除神経手術を行い同様の実験を行った。睡眠時に気管閉塞を行うと、動脈血圧は上昇し心拍数は急速に低下した。また同時に、腎及び腰部交感神経活動は増加し、脳組織酸素飽和度は低下した。末梢性化学受容器を除神経したラットでは、気管閉塞によって生じる心拍数の低下は減弱した。以上のことから、末梢性化学受容器は、閉塞性睡眠時無呼吸時の心拍数低下に大きな関与をしていることが示唆された。

16. 脳卒中易発症高血圧自然発症ラットにおいて交感神経活動が高血圧発症に果たす役割

○志波侑希, 吉本光佐, 岡野里香, 三木健寿 (奈良女子大学大学院生活環境科学系統御生理)

交感神経活動は高血圧発症に重要な役割を果たすと考えられているが、これらの相互関係についてはいまだ不明な点が多い。そこで本研究は、脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (SHRSP) と Wistar 京都ラット (WKY) を用いて、交感神経活動が高血圧発症に果たす役割について検討した。雄の SHRSP と WKY に、腎及び腰部交感神経活動測定用電極と動脈圧測定用テレメーターを慢性留置する手術を行った。術後、7 日間の回復期を経て 8 週齢から 12 週齢までの 28 日間、動脈圧、心拍数、腎及び腰部交感神経活動を連続測定した。また、目視による 90 分間の行動観察を隔日 1 回明期に行った。SHRSP の動脈圧は実験期間を通して上昇し続けたが、腎交感神経活動は一定値を保ち、腰部交感神経活動は減少した。SHRSP の心拍数は加齢に伴い低下した。また、SHRSP の動脈圧の日内差は実験期間を通して増加したが、心拍数、腎及び腰部交感神経活動の日内差には変化がみられなかった。以上の結果より、腎及び腰部交感神経活動と心拍数は SHRSP の動脈圧上昇に主要な役割を果たさないことが示唆された。

17. 発声—呼吸切り替えにおける橋結合腕傍核の呼吸性ニューロンの役割

○荒田晶子¹, 志賀真理¹, 西山紋恵², 下村英毅^{1,3} (¹兵庫医科大学生理学学生体機能部門, ²理研 QBic 生命システム研究センター, ³兵庫医科大学小児科学)

発声は、呼吸を随意的にコントロールすることで実現される。橋結合腕傍核 (Nucleus Parabrachialis; NPB) は、肺伸展受容器からと発声中枢からの信号が入力している場所である。呼吸から発声へ切り替える仕組みを NPB にお

いて明らかにするために、より単純系である摘出橋—延髄—脊髄標本を用いて電気生理学的な解析を行った。NPB を電気刺激すると吸息相から呼息相へと切り替わった事から、能動的吸息—呼息切り替え機構があると考えられた。そこで、この切り替えを起こしている仕組みを明らかにするため、NPB の呼吸関連ニューロンについて検討した。その結果、NPB には、吸息相から呼息相に掛けて発火するニューロン (I-E ニューロン) が多く存在し、迷走神経 (肺伸展受容器からの求心性入力) 刺激により、そのニューロンの発火頻度が上昇することが分かった。また、I-E ニューロンは傍顔面神経核にある呼吸リズムジェネレータ (para-Facial Respiratory Group; pFRG) から入力を受けている事、その発火パターンはフェントラミンで吸息先行相に発火するようになり、I-E ニューロンの吸息先行相はアドレナージックな抑制を受けている可能性を示唆した。以上の結果より、橋結合腕傍核には、新生児期に既に能動的吸息—呼息切り替えスイッチが存在し、その機構に I-E ニューロンが関与することが判明した。

18. 胃幽門腺粘液細胞 Ca^{2+} 調節性開口放出に対するインドメタシン (IDM) の効果: $10\mu M$ ACh では抑制, $1\mu M$ ACh では増強

○田中早織¹, 中張隆司² (¹大阪薬科大学薬物治療学, ²京都府立医科大学細胞生理学)

胃幽門腺粘液細胞において、ACh は濃度依存性に $[Ca^{2+}]_i$ を増加させ、 Ca^{2+} 調節性開口放出は、 $10\mu M$ では $1\mu M$ の約 4 倍に増加する。IDM ($10\mu M$) は $10\mu M$ ACh による開口放出を減少 (30%) させたが、 $1\mu M$ ACh の反応は増加 (100%) させた。 $10\mu M$ ACh 刺激時には、EP4 受容体阻害薬 (AH23848) は開口放出を約 50% に抑制したが、IDM を加えると 70% に増加した。さらに PPAR α 阻害薬 (GW6471) を加えることで 30% にまで減少した。このように、EP4 を抑えた条件では、IDM は PPAR α を活性化し $10\mu M$ ACh による開口放出を増強した。一方、 $1\mu M$ ACh 刺激時では、AH23848 の効果はなく、IDM による開口放出増加は、GW6471 により消失した。胃幽門腺粘液細胞では、 $10\mu M$ ACh 刺激時は PGE₂/EP4 と AA/PPAR α 機構が、 $1\mu M$ ACh 刺激時は AA/PPAR α 機構が、 Ca^{2+} 調節性開口放出を修飾していた。IDM は PGE₂/EP4 の抑制、AA/PPAR α の活性化により IDM の相反効果を引き起こしていた。

19. 光学活性な新規イノシトールリン脂質誘導体による PKC サブタイプ活性化研究

○清水 忠¹, 馬淵美雪¹, 田中明人¹, 西崎知之² (¹兵庫医療大学薬学部創薬化学講座, ²兵庫医科大学生理学講

産生体情報部門)

イノシトールリン脂質は細胞増殖, 分化, 細胞死などにおいて重要な役割を果たしていることが知られているが, イノシトールリン脂質自体の生理活性に関しては未解明な点も多く, その生理作用解明に興味を持たれている。そこで, 我々は特異的 PKC- ϵ 活性化リガンドであるリノール酸誘導体 DCP-LA を有する新規イノシトールリン脂質誘導体 diDCP-LA-PI (天然型イノシトール) およびその光学異性体 (diDCP-LA-PIe, 非天然型イノシトール) を合成し, 両者の PKC サブタイプに対する作用を検討した。 *in vitro* において 7 種類の PKC サブタイプに対する活性評価の結果, 全体的に diDCP-LA-PI と diDCP-LA-PIe との間に明確な活性の差は認められなかったが, 今回の誘導体の脂質部分に用いられた DCP-LA ターゲットである PKC- ϵ においては, 両者の活性に 2 倍程度の活性化の差が観測された。両者は化学的・物的には全く同一であるため, PKC- ϵ 活性化過程において, イノシトール立体構造を認識する受容体様構造の存在が, 新たに示唆され興味を持たれた。

20. 不飽和脂肪酸誘導体 DCP-LA の PKC ϵ 選択的活性化機構

○田村 尚¹, 菅野武史¹, 田中明人², 西崎知之¹ (¹兵庫医科大学生理学講座産生体情報部門, ²兵庫医療大学薬学部創薬化学講座)

アルツハイマー病などを原因とする認知症患者は既に日本国内で 260 万人を超え, 年々増加の一途をたどっている。しかし, 未だに有効な治療薬や予防薬が無いのが現状である。以前に我々は不飽和脂肪酸によるタンパク質リン酸化酵素 PKC の活性化により, 認知機能に密接に関係する興奮性神経伝達物質ニコチン性アセチルコリンの受容体反応が増強され, 海馬のシナプス伝達が長期に増強されることを示した。このことから不飽和脂肪酸が認知機能改善剤の候補として考えられたが, 経口摂取や末梢注入では脳内に達する前に分解されてしまうのが問題点であった。そこで, 生体内でも安定な生理活性を示すリノール酸誘導体 DCP-LA を開発した。DCP-LA は選択的且つ直接的に PKC ϵ を活性化することが分かった。PKC はホルボールミリスチン酸 (PMA) により活性化されるが, 細胞内では細胞質から細胞膜へのトランスロケーションが PKC 活性化の指標とされている。N 末側に蛍光タンパク質 mRuby を融合させた PKC ϵ を PC12 細胞に導入して PMA 及び, DCP-LA 処理によるトランスロケーションを観察した。その結果 mRuby-PKC ϵ は PMA により細胞膜へのトランスロケーションが観察されたが, DCP-LA によるトランスロケーションは観察されなかった。このことは, PKC ϵ の活性

化とトランスロケーションが必ずしも一致するわけではないことが示唆された。

21. ステロイド性骨粗鬆症の病態機序における Plasminogen activator inhibitor-1 の役割

○田村行識¹, 河尾直之¹, 矢野昌人¹, 岡田清孝¹, 松尾理², 梶 博史¹ (¹近畿大学医学部再生機能医学講座, ²近畿大学医学部)

グルココルチコイド (GC) はその副作用として骨粗鬆症を誘発することが知られているが, その詳細な機序は不明である。本研究では, GC 投与に伴う骨脆弱化における線溶系因子 Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) の役割を PAI-1 遺伝子欠損雌マウスを用いて検討した。野生型マウスの GC 投与群では, PAI-1 の脂肪組織での発現量と血中濃度がプラセボ投与群に比較して著明に増加した。定量 CT 解析および組織学的解析の結果, 野生型マウスでは GC 投与により脛骨の骨密度とアルカリフォスファターゼ陽性骨芽細胞数の減少を認めたが, PAI-1 遺伝子欠損マウスではこれらが有意に改善した。また, 野生型マウスで認められた GC 投与による脛骨におけるアポトーシス細胞の増加が PAI-1 遺伝子欠損により有意に抑制された。さらに活性型 PAI-1 処理により雌マウス由来初代培養骨芽細胞においてアポトーシス誘導が認められた。これらの結果より, GC 投与による脂肪組織での PAI-1 産生・分泌の増加が, 骨芽細胞のアポトーシス誘導を介して骨脆弱化を誘発することが示唆された。

22. ヌクレオチド結合タンパクによる細胞内 cAMP 濃度の調整

○中島則行¹, 中島輝恵², 田浦晶子³, 鷹野 誠⁴, 大森治紀¹ (¹京大医生理, ²京大生命, ³京大耳鼻科, ⁴久留米大医生理)

サイクリック AMP (cAMP) は, 細胞内で情報伝達を担うセカンドメッセンジャーとして良く知られる。一方で刺激が無い状態でも, 細胞内の基底 cAMP は生理学的に重要な活性を持つ。我々はこれまでに, マウス嗅細胞において複数の Gs タンパク共役受容体がありリガンド入力によらず活性化し, 受容体ごとに特異的な基底 cAMP 環境を作り出す事を報告してきた。そもそも嗅細胞は, 匂いの応答シグナルとしても cAMP を利用する。この応答 cAMP と基底 cAMP はどのように区別されるのであろうか。我々は, ヌクレオチド結合配列を持つタンパクを嗅細胞で見出した。この配列は cAMP 感受チャネルと同程度の cAMP 結合能を持ちうると, シミュレーションにより示唆された。その cDNA をクローニングし, ルシフェラーゼを融合した変異

体を作成し、蛍光標識 cAMP の存在下に発光スペクトラム解析を行った。cAMP が融合タンパクと結合しうる至近距離に存在する事を示す生物発光共鳴エネルギー転移 (BRET) が観察され、cAMP 濃度によって異なるパターンの結合様式が示唆された。よって、このタンパクは cAMP 定常濃度の維持や、cAMP 急増時の緩衝の両方を調節することが予想される。

23. 自由行動下ラットの視覚刺激検出課題におけるアドレナリン受容体の影響

○水山 遼¹, 相馬祥吾², 末松尚史², 七五三木 聡²
(¹大阪大学大学院生命機能研究科, ²大阪大学大学院医学系研究科)

ノルアドレナリンは、ニューロンレベルでは感覚情報処理におけるシグナルノイズ (S/N) 比を向上させることが分かっている。しかし、自由行動下におけるラットの視覚機能にノルアドレナリンが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、液晶モニターの左右領域のどちらかに視覚刺激 (グレーティング) を呈示し、対応するレバーを操作 (Hit) すると報酬が得られる視覚刺激検出課題をラットに訓練した。Hit する毎に刺激のコントラスト (明暗の輝度差) を段階的に下げてコントラスト感度を測定し、 β -アドレナリン受容体拮抗薬の Propranolol と α 2-アドレナリン受容体拮抗薬の Idazoxan が及ぼす影響を調べた。Propranolol を腹腔内投与したところ、コントラスト感度が有意に低下し、逆に Idazoxan を投与すると、有意に上昇した。これはノルアドレナリンがラットのコントラスト感度に両方向性に寄与していることを示唆している。しかし、今回の行動実験の結果が注意等の認知機能の変化によるものか、視覚野のニューロン活動の変化によるものかは分からない。そこで、麻酔非動化したラットの視覚野からニューロン活動を記録し、上記拮抗薬を局所投与することで、各アドレナリン受容体の機能的役割を現在調べている。

24. 貫通線維及び Schaffer 側枝刺激ペアリングによる海馬 CA1 ニューロンの可塑性

○上田梨加, 中島敏博 (京都工芸繊維大学応用生物)

記憶には海馬が密接に関わっている。海馬 CA1 領域の錐体細胞は嗅内皮質からトリシナプティック経路を経由する入力および直接入力を受けている。トリシナプティック経路は嗅内皮質から貫通線維を介し歯状回へ、苔状線維を介し CA3 へ、そして Schaffer 側枝を介し CA1 放線状層へシナプスしている。直接入力は嗅内皮質から貫通線維を介し CA1 網状分子層へシナプスしている。またトリシナプ

ティック経路のシナプティック遅延により、嗅内皮質からの情報は CA1 放線状層と比べ網状分子層の方が 10-20 ミリ秒速く到着する。直接入力の機能はまだよくわかっていないが、最近の研究で CA1 錐体細胞に対して重要な影響を与えていると示唆されている。本研究ではラットのブレインスライスを用いて CA1 領域における fEPSP に対する貫通線維および Schaffer 側枝入力の相互作用を調べた。CA1 錐体細胞層における集合スパイクの振幅、および放線状層における fEPSP の傾きを同時記録することにより、貫通線維および Schaffer 側枝刺激ペアリングはそれぞれの fEPSP には影響しないが貫通線維刺激に対する集合スパイクの振幅を増大させることがわかった。そして入力-出力曲線をプロットしたところ、ペアリング刺激前と比べてペアリング刺激後に貫通線維刺激に対する集合スパイク振幅のみが変化していることがわかった。

25. Tau の過剰リン酸化は 5XFAD マウスの学習・記憶障害より早期に起こる

○菅野武史, 土屋綾子, 田村 尚, 賀来佳子, 西崎知之 (兵庫医科大学生理学講座生体情報部門)

アルツハイマー病モデルである 5XFAD マウスにおける学習・記憶と Tau のリン酸化との関連性について検討した。6ヶ月齢の 5XFAD マウスでは同齢の対照マウスと比較し、水迷路試験における獲得潜時および保持潜時が延長された。しかしながら、2ヶ月齢の 5XFAD マウスではこれらの潜時には変化はなかった。海馬におけるグリコーゲン合成酵素キナーゼ-3[®] (GSK-3[®]) の Ser9 リン酸化レベルは、4ヶ月齢の 5XFAD マウスにおいて有意に低下した。一方で、GSK-3[®] の Tyr216 リン酸化レベルは、6ヶ月齢の 5XFAD マウス、対照マウスともに顕著に上昇していた。また、Tau の Ser202/Thr205 のリン酸化レベルは、両マウス間に有意差はなかったが、Tau の Ser396 のリン酸化レベルは、2-6ヶ月齢の 5XFAD マウスで有意に上昇していた。以上の結果は、5XFAD における Tau の過剰リン酸化は GSK-3[®] の活性化および学習・記憶障害の出現に先立って起こることを示している。

26. DPPE によるインスリンシグナル抑制機構の解析

○土屋綾子, 菅野武史, 西崎知之 (兵庫医科大学生理学講座生体情報部門)

リン脂質の代謝により生じるホスファチジルエタノールアミン類は、細胞内の様々なシグナル伝達のメディエーターとして重要な役割を担っている。我々はこれまでに 1,2-dipalmitoleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DPPE) がホスファターゼである PTP1B および PP2A の活性を亢

進させることを見出している。これらのホスファターゼはインスリンシグナルを負に調節することから、本研究では、DPPE がインスリンシグナルに及ぼす影響を検討した。マウス脂肪細胞において、DPPE はインスリン添加により誘導される insulin receptor, insulin receptor substrate 1 (IRS-1), Akt1/2, および mammalian target of rapamycin (mTOR) のリン酸化を濃度依存的に抑制した。さらに、DPPE はインスリン添加により誘導される Glucose transporter 4 (GLUT4) の細胞質から細胞膜への移行を阻害し、細胞内へのグルコースの取り込みを抑制した。これらの結果から、DPPE によるインスリンシグナルの抑制は PTP1B および PP2A の活性化によるものであると考えられた。

27. Lithium potentiates GSK-3 β activity by inhibiting phosphoinositide 3-kinase-mediated Akt phosphorylation

○Y. Jin, N. Tian, T. Kanno, T. Nishizaki (Division of Bioinformatics, Department of Physiology, Hyogo College of Medicine)

Accumulating evidence has pointed to the direct inhibitory action of lithium, an anti-depressant, on GSK-3 $^{\text{R}}$. The present study investigated further insight into lithium signaling pathways. In the cell-free assay Li_2CO_3 significantly inhibited phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-mediated phosphorylation of Akt1 at Ser473, but Li_2CO_3 did not affect PI3K-mediated PI (3, 4, 5) P_3 production and 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1)-mediated phosphorylation of Akt1 at Thr308. This indicates that lithium could enhance GSK-3 $^{\text{R}}$ activity by suppressing Akt-mediated Ser9 phosphorylation of GSK-3 $^{\text{R}}$ in association with inhibition of PI3K-mediated Akt activation. There was no direct effect of Li_2CO_3 on Akt1-induced phosphorylation of GSK-3 $^{\text{R}}$ at Ser9, but otherwise Li_2CO_3 significantly reduced GSK-3b-mediated phosphorylation of β -catenin at Ser33/37 and Thr41. This indicates that lithium directly inhibits GSK-3 $^{\text{R}}$ in an Akt-independent manner. In rat hippocampal slices Li_2CO_3 significantly inhibited phosphorylation of Akt1/2 at Ser473/474, GSK-3 $^{\text{R}}$ at Ser9, and β -catenin at Ser33/37 and Thr41. Taken together, these results indicate that lithium exerts its potentiating and inhibiting bidirectional actions on GSK-3 $^{\text{R}}$ activity.

28. 羽原基の真皮細胞がつくる網目構造

○稲葉真史¹, C.M. Chuong², 岡村康司¹ (¹大阪大学大学院医学系研究科統合生理学教室, ²Keck School of Medicine, University of Southern California)

鳥の体表を覆う羽は一定の距離を保って整然と配置される。最近の研究によって、ある種のチャネル分子がこのパターン形成に深く関与することが示唆されたが、詳細なメカニズムは分かっていない。今回我々は、羽形成におけるチャネル分子の機能を解析する過程で、羽原基を生み出す真皮層に興味深い構造を見出したので報告する。胚発生期における鳥の皮膚は表皮と真皮の二層から構成される。発生が進行すると、真皮細胞の凝集が等間隔に起こり、これが羽原基となる。我々は、真皮細胞の挙動を観察するために、真皮細胞の前駆組織である体節に蛍光タンパク質を導入した。その結果、思いがけないことに羽原基の中心部以外の真皮細胞が標識された。羽原基は皮膚上に斑点状に配置するので、蛍光標識された細胞の分布は網目状に観察された。さらに、組織培養の長時間観察によって、標識細胞は将来の羽原基中心部を避けるように移動して網目状に配置することが分かった。談話会では羽原基形成過程における阻害剤によるチャネルの機能抑制やカルシウムイメージングの結果も合わせて紹介したい。

29. 電位依存性プロトンチャネル Hv1/V SOP は好中球の走化性を制御する

○大河内善史, 岡村康司 (大阪大学大学院医学系研究科統合生理学)

好中球は、病原菌の侵入に第一線で活躍する免疫細胞であり、高い遊走性と攻撃性を有する。電位依存性プロトンチャネル Hv1/V SOP は活性酸素の産生を制御する分子として知られているが、それ以外の機能についてはあまり分かっていない。我々は Hv1/V SOP のノックアウトマウス (Hv1/V SOP $^{-/-}$) を作製し、細胞・個体レベルで機能解析を行ってきた。その過程で、Hv1/V SOP が好中球の走化性を制御するという新機能を見出した。Hv1/V SOP の機能が欠損した好中球は、大腸菌が分泌するホルミルペプチド fMLF に対して以下の特徴を示した。小さな穴の開いたフィルターを用いて fMLF に対する反応性を調べたところ、野生型よりも多くの Hv1/V SOP $^{-/-}$ 好中球が fMLF が存在する側へ移動した。移動中の角度、速度、距離には顕著な差はなかった。従って、移動した細胞数が増加した原因は、走化性時の直線性が上がったことによるものではない。移動する細胞数の時間経過は、最初の 20 分間は両者に大きな差はなかったが、20 分以降から Hv1/V SOP $^{-/-}$ 好中球の数が野生型よりも増加していた。すなわち、時間依存的に fMLF に対して感度が上がっていると考えられる。

30. 電位依存性プロトンチャネルの不飽和脂肪酸による活性化

○川鍋 陽, 岡村康司 (大阪大学大学院医学系研究科統合生理学)

電位依存性プロトンチャネル VSOP/Hv1 は、膜電位及び pH を感知してプロトン透過を担うイオンチャネルである。その生理的役割は、免疫細胞の活性化時に膜電位と pH を調節することで、活性酸素産生を担う NADPH オキシダーゼの活性を維持することであると考えられている。また一方では、免疫細胞の活性化時に不飽和脂肪酸の 1 種であるアラキドン酸の濃度が細胞内で上昇することが古くから知られており、これが VSOP/Hv1 の活性を制御していることが示唆されていた。しかし、その詳細な活性化メカニズムは不明のままであった。そこで、今回われわれはマウス由来の VSOP/Hv1 を培養細胞 HEK293T に発現させ、電気生理学的手法でプロトン電流を計測し、不飽和脂肪酸による活性化効果を定量的に解析した。その結果、アラキドン酸の添加時に、プロトン電流が即座に約 25 倍も増大することが明らかとなった。この電流増大は活性化が著しく速くなること（時定数が 2 けた程度小さくなる）と閾値が負電位側へ 10~20mV シフトすることにより引き起こされていることがわかった。講演では、これらの結果と変異体やアラキドン酸誘導体などの解析を組み合わせて、活性化のメカニズムや生理学的役割について議論したい。

31. モデル構築による毛細血管における体液交流と浮腫の再現

○前田陽俊, 守里 望, 姫野友紀子, 野間昭典 (立命館大学生命科学部生命情報学科バイオシミュレーション研究室)

我々の体内には無数の毛細血管が存在し、そこでは絶えず循環血管と組織液の間で体液交流と溶質の交換が行われている。これによって細胞を取り囲む生体内部環境は一定に保たれている。この体液交流には毛細血管における濾過と再吸収、それにリンパ環流が大きく貢献している。濾過と再吸収は毛細血管と組織間でのそれぞれの内圧差とコロイド浸透圧の差によって決定される。我々は、この Starling's principle に加えて、リンパ流速の組織静水圧依存性、組織の静水圧と容積の関係、血管壁の水透過度、タンパク

輸送機点、タンパク濃度と膠質浸透圧の関係を実験式で表し、これらを統合して毛細血管における体液交流の数学モデルを作成したので報告する。さらに、ヒスタミンとセロトニンでは、毛細血管内皮のタンパク質反発係数と水の透過性に対する効果が異なるとの実験的浮腫を再現するためには、タンパク質反発係数の変化と、タンパク透過性の関係を数式化する必要がある。これらの機能要素を追加し、病的浮腫に適用できるモデルを構築する。

32. 周産期における中枢性化学受容の低酸素と TRPA1 チャネルの反応性について

○志賀真理¹, 小林希実子², 下村英毅^{1,3}, 野口光一², 荒田晶子¹ (¹兵庫医科大学生理学学生体機能部門, ²兵庫医科大学解剖学神経科学部門, ³兵庫医科大学小児科学)

低酸素受容は、頸動脈小体にある TRPA1 チャネルの関与が示唆されている。また、我々は周産期における中枢性化学受容の低酸素に対する反応について、摘出脳幹—脊髓標本における中枢性化学受容体の反応性を見ると、胎生後期～生後 1 日までのラットにおいては低酸素応答が興奮性に働き、生後 2 日以降では、抑制性に働くことが分かっている。その中枢性化学受容体の反応において、末梢性化学受容体で低酸素の情報を担う TRPA1 チャネルが関与しているのかは明らかではない。そこで、周産期中枢性化学受容における低酸素負荷と TRPA1 の関与について機能的・組織学的に検討した。その結果、低酸素負荷実験と同様に TRPA1 チャネルアゴニストは、E18~P1 で C4 リズムを促進し、P2 以降では抑制した。その反応は、TRPA1 チャネルアンタゴニストで部分的にブロックされた。さらに、TRPA1 の in situ hybridization 法によって、腹側の呼吸性ニューロン群のある場所とされている延髄腹腹部に TRPA1 チャネルの局在がみられた。また、低酸素に反応する延髄腹外側部の呼吸性ニューロンに対して、TRPA1 チャネルによって反応性を調べたところ、吸気性ニューロンよりも持続性ニューロンと呼息性ニューロンの方がより反応性が高いことが分かり、低酸素による反応性は、持続性ニューロンと呼息性ニューロンが TRPA1 チャネルの関与を受けてコントロールされるのではないかと考えられた。