

## 第238回生理学東京談話会

日 時：平成14年10月26日（土）午後1時30分～5時30分  
会 場：順天堂大学老人性疾患の病態・治療研究センター  
当 番：順天堂大学医学部生理学教室  
当番幹事：第2生理 大地陸男

今年の東京談話会は、順天堂大学が当番となって平成14年10月26日（土）午後に開催された。あいにくの雨にたたられた。また、近くの東京ドームで日本シリーズの開幕戦が行われた。しかし出席者は例年とほぼ同じ38名で、シンポジウムの2演題と、一般演題の9演題で、熱心な発表と質疑が行われた。

シンポジウム「Caシグナリング、イオンチャネル」では、呉林ら（順天堂大・薬理）がモルモット乳頭筋においてCa waveを記録し、waveがNa-Ca交換やSERCAにより制御され、隣接する細胞へは非伝播性であることを示し、チャネル異常とは別の機序で、SRからのCa放出の異常によって不整脈発生をもたらすとした。立山ら（コロンビア大・薬理）はNaチャネル変異体モデルを培養系に発現させ、単一チャネル電流記録で不活性化不能のバーストモードを示した。培養系ではPKCによるチャネルのリン酸化がバーストモードを減少するが、LQT3を組み込んだマウスからの心筋ではこのPKC活性化の作用は弱かった。一方、刺激頻度を上げると、バーストモードの減少によってLQT3のQT延長が改善された。

一般講演は三つのセッションに分かれて行われた。セッション1（座長、岡田、第2生理）では細胞レベルの研究が発表された。小西ら（東京医大・第1生理）は、ラット心室筋における細胞内から細胞外への $Mg^{2+}$ の汲みだしを蛍光法による細胞内Mg濃度の変化から見積もり、また穿孔パッチクランプ法を使用して、 $Mg^{2+}$ 輸送が細胞外Naで促進、細胞内Naで抑制されることを明らかにした。宋ら（順天堂大・第2生理）は、心室筋で過分極やリゾホスファチジルコリン適用で発生する内向き電流が、核のエチジウムプロミド蛍光の増大を伴うことから膜穿孔を表すことを示し、膜穿孔が不整脈や細胞死の原因になるとした。比留間ら（北里大生理）は、培養マウス脊髄後根神経節細胞の神経線維中の粒子の輸送をビデオ増感顕微鏡で計測し、感覚神経の軸索輸送は、高浸透圧刺激でアクチンの重合により抑制され、低浸透圧刺激でその脱重合により促進されることを示した。

セッション2（座長、西江、第2生理）ではホルモンや摂食に関する発表が行われた。西谷ら（横浜市大・第2生理）は、ラットでフェロモンが大脳辺縁系-視床下部系を介し生殖や性行動に影響を及ぼす作用機転を調べた。フェロモンとなる雌性ラットの床敷きを暴露すると、雄性ラットの扁桃体と視床下部の中継地点にある分界条床核で、pCREB発現細胞数が減少した。河野ら、矢田ら（自治医大・生理）は、視床下部の摂食中枢のニューロンを免疫学的に同定し反応を詳細に調べた。すなわち単離ニューロンを、オレキシン、NPY、グレリン、レプチン、インスリン、グルコース濃度低下などで刺激し、細胞内Ca濃度変化で反応を検出した。NPYニューロンが摂食亢進の主役のようであり、オレキシンやレプチンも関係していた。

セッション3（座長、中里、第1生理）でも興味ある発表が行われた。金子ら（都老人研）は、にがりおよび黒酢エキスの栄養学的効果を、ラットのエネルギー代謝への効果から検討し、これらのエキスの正常ラットでもNIDDMモデルのラットでも代謝を亢進させる効果を示された。日常的な食生活に関連することであり、エキスに含まれる作用物質について質問があった。鈴木ら（東邦大・第1生理）は、覚醒・あくび反応に室傍核が関わることを講演した。抄録にわかりやすくまとめられているが、ラットの室傍核刺激であくびが誘発されること、室傍核が覚醒・意識水準に深く関わることを示され、はじめていた聴衆は大いに啓発された。城所（群大・医・行

動研)は、ショウジョウバエ神経筋接合におけるシナプス伝達を材料として、伝達物質放出の分子メカニズムにおけるCa受容機構を示した。Caはシナプス小胞膜上にあるシナプトタグミンに結合し、そのシグナルがSNARE複合体に伝わり、膜融合が起こると考えられており、問題としたのはシナプトタグミンに2つある(C<sub>2</sub>A, C<sub>2</sub>B) Ca結合部のどちらがCaセンサーかであった。

それぞれに大変興味深い研究で大いに勉強になった。セッション1のあと、新しい建物の11階のカンファレンスルームで評議員会が行われた。11階からの眺望は、神田川沿いにお茶の水駅を俯瞰してなかなかのものであった。次回当番幹事は、東邦大学の有田秀穂教授(第1生理)、高松研教授(第2生理)にお願いすることとなった。

## セッション1 シンポジウム「Caシグナリング、イオンチャンネル」

### 1. モルモット心筋多細胞標本におけるCa<sup>2+</sup> wave : Ca<sup>2+</sup>は細胞間を伝わるか?

呉林なごみ<sup>1</sup>, 山下晴世<sup>2</sup>, 中里裕二<sup>2</sup>, 代田浩之<sup>2</sup>, 小川靖男<sup>1</sup> (1順天堂大・医・薬理, 2循内)

心筋細胞のCa<sup>2+</sup> waveは細胞内Ca<sup>2+</sup>過剰状態で観測され、心室性不整脈の原因の一つであると考えられている。しかしこれまでのwaveに関する研究は主に単離心筋細胞を用いてなされ、不整脈解析に重要な細胞間伝達が観測可能な標本ではあまり行われなかった。我々はfluo-3を負荷したモルモット心室乳頭筋標本を用い、Ca<sup>2+</sup> waveは細胞間を伝達するか否か、また、その発生は何によって制御されるかについて、共焦点顕微鏡を用いて検討した。正常なモルモット心室筋は静止時にはCa<sup>2+</sup> waveを全く発生しなかったが、高頻度電気刺激停止後にCa<sup>2+</sup> waveが誘発された。このCa<sup>2+</sup> waveのamplitude, velocityはほとんど不変であったが、intervalは刺激停止後、次第に延長し、最後には消失した。このintervalの漸増はNa<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>交換反応の抑制により抑えられ、逆に筋小胞体Ca<sup>2+</sup> pumpの抑制により更に延長した。以上より、これらの細胞におけるCa<sup>2+</sup> wave発生に最も重要な因子は筋小胞体中のCa<sup>2+</sup>レベルと考えられた。一方、傷害された細胞では、静止状態でも自発的なCa<sup>2+</sup> waveが観察された。いずれのCa<sup>2+</sup> waveも細胞を越えて伝わる事はほとんどなかった。

### 2. ナトリウムチャンネル変異体による活動電位持続時間延長機構

立山充博, Colleen Clancy, Robert S. Kass (コロンビア大・医・薬理)

家族性QT延長症候群(LQT)は遺伝子変異に伴うイオンチャンネルの機能異常が主な原因である。LQT variant 3であるナトリウムチャンネル変異体は、脱分極時における持続性電流を増大させることで活動電位の持続時間を延長させるためQT間隔が延長すると考えられている。変異体による持続性電流の増加は、単一チャンネルにおける不活性化不能状態(バーストモード)の亢進によりもたらされる。一方、LQT variant 3では症状が安静・睡眠時に多く見られること、および、βアドレナリン拮抗薬が症状を改善することが知られており、アドレナリン受容体を介するリン酸化反応あるいは心拍数の変化による持続性電流の制御が示唆されていた。われわれは、発現系を用いた実験から、PKCを介するチャンネルのリン酸化が不活性化電流を強く抑制することを見出した。しかしながら、LQT 3変異体を組み込んだトランスジェニックマウスの単離心室筋では、PKCを介する抑制作用は弱く、リン酸化による持続性電流の抑制は心室筋では小さいと考えられた。逆に、刺激間隔を短く(心拍数を高く)することによる持続性電流の顕著な減少は心室筋および発現系とともに認められた。これは、単一チャンネル解析とコンピューターシミュレーションの結果から、チャンネルのモード特性により起こる現象であり、上記の臨床的知見と一致すると考えている。

セッション2:一般講演 1

### 3. ラット心室筋のMg汲みだし輸送は細胞内Naによって抑制される

小西真人, 田代倫子, トルソンプラット, 宮崎武文, 渡辺賢(東京医大・第1生理)

ラット心室筋単離細胞の細胞内Mg濃度([Mg<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)を蛍光Mg指示mag-fura-2で測定することにより、Mgの細胞膜輸送を検討した(25℃, Ca<sup>2+</sup>-free条件下)。高Mg(24~93 mM)溶液で環流して細胞内にMgを負荷した後、細胞外Mg濃度を1 mMに低下させると、Mg汲みだし輸送により[Mg<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>は急速に減少した。このMg汲みだし輸送は細胞外Na除去により完全に抑制された。さらに、Mg汲みだし輸送に対する[Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>の影響を調べた。AMエステルにより蛍光Na指示薬SBFIを導入し、gramicidin Dを用いた細胞内calibrationにより、細胞内Na濃度([Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>)を見積もった。3時間の1 mM ouabain処理により、[Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>は平均12 mMから48 mMに上昇した。一方、

細胞外Na濃度を1.3 mMに低下させると、 $[Na^+]_i$ は3時間ではほぼ0 mMにまで減少した。 $[Mg^{2+}]_i$ 減少速度は平均48 mMの $[Na^+]_i$ により1/3に抑制された。また Amphotericin Bによるせん孔パッチクランプを行い（保持電位-80 mV）、パッチピペット内のNa濃度を0 mMから126 mMに増加すると、 $[Mg^{2+}]_i$ 減少速度は有意に減少した。これらの結果は、Mg汲みだし輸送が細胞内外のNa勾配により駆動されていることが強く示唆する。

#### 4. 心室筋の膜穿孔：エチジウム流入を伴う内向き電流の誘発

宋 玉梅, 大地陸男 (順天堂大・医・第2生理)

細胞膜は強い電氣的パルスで可逆的または不可逆的に破壊される (エレクトロポレーション)。エレクトロポレーションは除細動通電でもおこる。一方、リゾホスファチジルコリン (LPC) は心臓で虚血時に生成され、不整脈や細胞障害をもたらすが、その詳細な機序は未解決であった。ウサギ心室筋をホールセルクランプし過分極すると不規則な内向き電流I<sub>hi</sub>が発生する。今回、I<sub>hi</sub>が膜穿孔を反映することを膜透過性が低く、DNAと結合して蛍光を増大する ethidium bromide (EB) 蛍光を測定して検討した。Ethidium カチオンは僅かながら膜を透過するので、透過を減少するために維持電位を-20mVに設定した。40sの過分極パルス (-80~-180mV)を2分間隔で与えた。-140mVでI<sub>hi</sub>が発生した。過分極中の内向き電流の積分と核EB蛍光の増大は、時間的にも電位依存性においても平行的に増大した。-80mVのパルスを反復しつつLPC (10 μM)を適用すると、6分後には急速な上昇と緩やかな減衰を示し活動電位誘発可能な内向き電流が誘発された。この電流もEB蛍光の増大を伴った。過分極およびLPCは、膜穿孔を誘発し異常興奮およびCaの細胞内過負荷による細胞死をもたらすことが示唆された。

#### 5. 培養感覚神経の軸索輸送に及ぼす浸透圧変化の影響

比留間弘美, 高橋早苗, 川上 倫 (北里大・医・生理)

末梢感覚神経は、血漿あるいは局所浸透圧の変化に暴露される環境下にあり、浸透圧変化に応答するチャネルをもっている。本研究では、培養感覚神経の軸索輸送に及ぼす浸透圧変化の影響について調べた。マウス脊髄後根神経節細胞を培養し、伸展した神経線維中を移動する粒子をビデオ増感顕微鏡下に計測した。高浸透圧溶液はマンニトールを、低浸透圧は水を添加することにより調整した。高浸透圧刺激は軸索輸送を速やかに、可逆的に減少させた。反対に、低浸透圧刺激は軸索輸送を増加させた。細胞骨格アクチンをjasplakinolideによって重合させると、高浸透圧

刺激の効果と同様に軸索輸送は減少した。Latrunculin Bによってアクチンを脱重合させると、低浸透圧刺激の効果と同様に軸索輸送は増加した。Latrunculin Bでアクチンを脱重合させた条件下では、高浸透圧刺激の効果は阻止された。同様に、Jasplakinolideでアクチンを重合させた条件下では、低浸透圧刺激の効果は抑制された。Rhodamine-phalloidinによるアクチンフィラメント染色により、高浸透圧刺激はアクチンを重合させることが確認された。以上の結果から、感覚神経の軸索輸送は、高浸透圧刺激により抑制され、低浸透圧刺激により促進されること、これらの作用は、それぞれ、アクチンの重合、脱重合によって仲介されることが示唆された。

### セッション3：一般講演 2

#### 6. 雌性ラットのフェロモン曝露による雄性ラットの脳内リン酸化 cyclic AMP response element binding protein (pCREB) 発現の変化：分界条床核に焦点をあてて

西谷正太, 船橋利也, 貴邑富久子 (横浜市大・医・第2生理)

哺乳動物のフェロモンは、主に鋤鼻嗅覚系を刺激することにより大脳辺縁系-視床下部系を中心とした領域に他個体の情報を知らせ、生殖や性行動に影響を及ぼすことが報告されている。現在、マウスやラットなどの研究により、分界条床核、視床下部腹内側核、内側視索前野、扁桃体などがフェロモン情報を受け取る脳部位であると考えられている。特に分界条床核は扁桃体と視床下部の中継地点にあり、生殖のみならずストレス反応に関わる神経内分泌機能の調節に関与していると考えられている。しかし、分界条床核に対しフェロモンがどのような情報を送り、これによりこの神経核がどのような働きをするのかについては不明に近い。この解明を目的とした研究の第一段階として、我々は雄性ラットの分界条床核のpCREB発現に、雌性ラットのフェロモンが影響を及ぼすのか否かを検討した。

その結果、コントロール群に比べ、フェロモン曝露群では内側部および外側部におけるpCREB免疫陽性細胞数が著しく減少していることが確認された。この結果は、雌性ラットのフェロモン曝露は、雄性ラットの分界条床核のpCREBの発現を抑制することを示唆している。

#### 7. グレリンによる摂食中枢NPYニューロンの調節機構

河野大輔<sup>1,2</sup>, 菊山 榮<sup>2</sup>, 矢田俊彦<sup>1</sup> (<sup>1</sup>自治医科大学生理学, <sup>2</sup>早稲田大学教育学部生物学)

グレリンは、主として胃で、一部腸や視床下部ニューロンで産生され、摂食亢進とGH分泌促進作用を有する。一

方、視床下部弓状核には摂食亢進に重要な役割を持つ NPY ニューロンが存在し、種々の摂食調節物質により制御されている。本研究では、単離した弓状核ニューロンの細胞内  $Ca^{2+}$  濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) の測定と抗 NPY 抗体を用いた免疫染色を併用し、NPY ニューロンに対するグレリンの直接作用を調べた。グレリン  $10^{-10}M$  は弓状核ニューロンの  $[Ca^{2+}]_i$  を増加させ、応答細胞の 81% が NPY ニューロンであった。グレリンによる  $[Ca^{2+}]_i$  増加は、細胞外  $Ca^{2+}$ -free と N 型  $Ca^{2+}$  チャネル阻害剤、PKA 阻害剤により抑制された。グレリン応答ニューロンの 80% がオレキシン A にも応答し、また、グレリン誘導性  $[Ca^{2+}]_i$  増加はレプチンとインスリンによって高頻度に抑制された。以上より、グレリンは NPY ニューロンに直接作用して  $[Ca^{2+}]_i$  を増加させ、この作用には N 型  $Ca^{2+}$  チャネルと PKA が関与している。NPY ニューロンは、グレリン、オレキシンによる正の制御、レプチン・インスリンによる負の制御を受けており、これらの作用を統合して摂食シグナルを出力する役割が示唆される。

#### 8. NPY, オレキシンニューロンのグルコース感受性と摂食調節における役割

矢田俊彦<sup>1</sup>, 河野大輔<sup>1,2</sup>, 倉持素樹<sup>1,3</sup>, 尾仲達史<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>自治医科大学生理学, <sup>2</sup>精神医学, <sup>3</sup>早稲田大学生物学 )

【目的・方法】摂食中枢には多種類の神経細胞が共存しており、特定の神経細胞を解析することは容易でない。我々は、ラット神経核から神経細胞を単離し、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) を画像解析し、調節因子の直接作用を調べ、神経伝達物質に対する免疫染色により細胞を同定する方法を開発した。これを用いて、エネルギー代謝の低下を反映するグルコース濃度低下の、摂食中枢神経細胞への作用を調べた。今回は、重要な摂食亢進系である視床下部弓状核 (ARC) の Neuropeptide Y (NPY) 及び外側視床下部 (LH) のオレキシン神経細胞に対する作用を報告する。【結果・結論】グルコース濃度の低下は、ARC 神経細胞の 20% に  $[Ca^{2+}]_i$  を増加を起し、このグルコース感受性ニューロンの 90% が NPY ニューロンであり、一方、LH 神経細胞の 23% に  $[Ca^{2+}]_i$  を増加を起し、このグルコース感受性ニューロンの 18% がオレキシンニューロンであった。ARC にはグルコース感受性 NPY ニューロンが、LH にはグルコース感受性オレキシンニューロンが存在し、これらは空腹・飢餓を NPY, オレキシンの放出にリンクさせて摂食を亢進する役割を担っていると考えられる。

#### 9. にながうり、黒酢エキスのエネルギー代謝に及ぼす影響とインスリン非依存性糖尿病に対する予防効果の可能性—糖尿病自然発症モデルラットにおける検討

金子真由美, 酒井美佳, 佐藤宏美<sup>1,2</sup>, 木本幸一<sup>2</sup>, 市川みね子, 太田 稔, 金井節子, 宮坂京子<sup>1</sup>, 高橋 鍛, 上岡健人<sup>3</sup> ( <sup>1</sup>都老人研, <sup>2</sup>東京家政大学, <sup>3</sup>キュービー醸造 )

目的：最近健康食品として注目されているにながうり・黒酢含有の飼料を用いて、その有用性について質的及び量的な飼料組成の違いがどのような効果をもたらすか、正常ラット (LETO) 及び NIDDM モデル OLETF ラットを用いて検討した。

測定項目：体重、摂食量、HbA1c, OGTT, 連続 24 時間のエネルギー代謝 ( $O_2$  及び  $CO_2$  から RQ を測定), 血中トリグリセライド, 総コレステロール, 血中 insulin

結果：にながうり・黒酢含有の飼料は LETO ラットの血中インスリン、中性脂肪を有意に減少させた。LETO ラットにおいて黒酢・にながうり群では 1 日のエネルギー消費量を増加させ、特ににながうり投与群は RQ 値を有意に低下させ脂肪燃焼を増加させた。OLETF ラットではにながうり・黒酢の投与は空腹時血糖を低下し、NIDDM 発症時に見られたエネルギー代謝日内変動の平坦化を正常パターンに近づける事ができた。OLETF ラットでは、黒酢・にながうり群で 1 日のエネルギー消費量も増加させた。しかし、HbA1c の値は正常化するには至らなかった。

#### 10. 室傍核と覚醒・あくび反応

鈴木郁子, 関 由成, 中谷康司, 麓 正樹, 小栗 貢, 有田秀穂 (東邦大・医・第 1 生理)

私たちは覚醒・あくび反応に着目して、ストレス反応の中核である室傍核の役割を解析してきた。麻酔、自発呼吸下のラットの室傍核にグルタミン酸を局所注入すると、皮質脳波の賦活とあくび反応 (一回の深吸気, 開口, 流涙など) が確実に誘発され、室傍核はあくび反応のみならず、覚醒システムの関わる領域として新たに位置づけられた。室傍核にストレス関連物質として、オレキシン (OX) 及びヒスタミン (HA) を局所注入すると、同様に皮質脳波の賦活とあくび反応が誘発され、室傍核には OX 及び HA ニューロンの入力があると考えられた。一方、強力な光刺激というストレス負荷においても覚醒・あくび反応が誘発され、その潜時は照度依存性であり、照度が低くなると潜時が延長する傾向にあった。従って、光刺激により網膜から視交叉上核へ伝達された入力が室傍核に投射する経路が示唆された。以上のことから、室傍核はストレス状況での覚醒システムを仲介している可能性が示唆された。

## 11. ショウジョウバエ神経筋接合におけるシナプス伝達

城所良明 (群大・医・行動研)

シナプスは神経情報をすみやかに伝え、また経験に基づいてその伝達効率をかえることができる。したがって、脳の高次機能を支える基本的な素子であると考えられている。シナプス前終末に到達した活動電位は一過性のCaの流入を引き起こし、シナプス小胞の膜融合、伝達物質の放出をもたらす。流入したCaはシナプス小胞膜上にあるシナプトタグミンに結合し、そのシグナルがSNARE複合体に伝わり、膜融合が起こると考えられている。我々はショウジョウバエ幼虫の体壁筋にあるシナプスを用いて研究を

行っている。シナプトタグミンにはCa結合ドメインが2つあり (C<sub>2</sub>A, C<sub>2</sub>B)、どちらがCa-sensorなのか現在研究者の間で意見が分かれている。突然変異株, syt<sup>AD1</sup>, はシナプトタグミンを全く作らない allele で、神経刺激によるシナプス電流は著しく減弱している。しかし全く出ないわけではなく、外液中のCa濃度を高くするとわずかながらシナプス電流がみられた。このことはシナプトタグミンは唯一のCa-sensorではないことを示している。syt<sup>AD1</sup>はC<sub>2</sub>Aドメインを持つがC<sub>2</sub>Bドメインを完全に欠失している。この allele におけるシナプス伝達は完全欠失 allele syt<sup>AD1</sup>と同じであった。すなわちC<sub>2</sub>AドメインはCa-sensorではないらしい。