

一般演題 血管 2

O-15. プリン作動性神経によるニワトリ前腸間膜動脈縦走平滑筋の抑制性調節

岐阜大学大学院連合獣医学研究科獣医生理学研究室

Alkayed Feras Walyed, 椎名 貴彦, Ammar Boudaka, 武脇 義, 志水 泰武

【背景と目的】腸間膜動脈は消化管への血流を調節する重要な血管である。哺乳動物の動脈とは異なり、ニワトリの前腸間膜動脈（AMA）には、輪走平滑筋の外側に縦走筋層が存在している。これまでに我々は、成熟ニワトリにおいては血管周囲神経から放出される ATP が、P2Y 受容体を介して AMA 縦走平滑筋の脱分極を誘発することを明らかにしてきた。今回、若齢ニワトリを用いたところ、ATP が AMA 縦走筋の脱分極ではなく、過分極反応を誘発することが明らかになったので報告する。【方法】5 週齢のニワトリから AMA 標本を摘出し、微小電極法によって縦走平滑筋細胞膜電位を導出した。オルガバースにプラゾシン、プロプラノロール、アトロピンを適用して、非アドレナリン非コリン条件下の実験環境とした。また、RT-PCR によって AMA に発現しているプリン受容体（P2 受容体）を解析した。【結果】若齢ニワトリ AMA 縦走筋では、成熟ニワトリとは異なり、経壁電気刺激（EFS）によって過分極反応が引き起こされた。その反応は P2X 受容体阻害薬の適用および P2X 受容体作動薬による受容体の脱感作によって抑制された。内皮を除去した標本では、EFS による過分極反応は誘発されなかった。また、一酸化窒素（NO）合成酵素阻害薬およびグアニル酸シクラーゼ阻害薬の投与によっても抑制された。AMA 内皮には P2X 受容体 mRNA が発現していた。【考察】本研究の結果は、若齢ニワトリ AMA 縦走筋はプリン作動性神経による抑制性調節を受けていることを示唆している。その制御様式は、血管周囲神経由来の ATP が内皮細胞の P2X 受容体に作用して NO 合成を促進し、内皮から遊離した NO が縦走筋において過分極反応を引き起こすというものであると考えられる。

O-16. 平滑筋ミオシンは ROK によってカルシウム非存在下で、直接リン酸化され、滑り運動を最大速度で引き起こすことができる

山口大学大学院医学系研究科器官制御医科学講座生体機能分子制御学

川道 穂津美, 王 晨, 岸 博子, 加治屋 勝子, 高田 雄一, 徳森 大輔, 小林 誠

血管攣縮のような血管異常収縮の本態として、Rho キナーゼ（ROK）を介する Ca^{2+} 非依存性のミオシン軽鎖（MLC20）リン酸化→ Ca^{2+} 非依存性収縮が注目されている。その Ca^{2+} 非依存性の MLC20 リン酸化の分子機構として、*in vitro* 系において ROK は、1) MLC20 を直接リン酸化する事、2) ミオシン脱リン酸化酵素を阻害し間接的に MLC20 リン酸化を増加させる事、の 2 経路が報告されているが、明確に前者の可能性を否定することなく、後者の経路が主流/唯一の経路とされている。本研究では、この前者の可能性について検証してみた。検証にあたっては、ミオシンリン酸化や収縮に影響を与え得る他の分子（MLC キナーゼや脱リン酸化酵素等）の微量混入・関与を除外するために、2 種類の質量分析によって検証されたりコンビナント蛋白質のみを用い、純粋な実験系として、アクチン・ミオシン分子の滑り運動を 1 分子 *in vitro* motility 解析した。使用したりコンビナント平滑筋ミオシンは、確かに目的分子のみから構成されている事を MALDI-TOF/MS で同定した。また、MLC20 自体は、確かに非リン酸化型である事を LC-MS/MS で確認した。さらに、 Ca^{2+} 非存在下で、リコンビナント活性型 ROK は MLC20 を直接リン酸化する事を ProQ Diamond 染色と LC-MS/MS により確定した。アクチン・ミオシン分子の *in vitro* motility 解析において、この ROK によって Ca^{2+} 非依存性にリン酸化されたミオシンは、 $0.30 \mu\text{m}/\text{sec}$ という滑り運動を示した。この速度は、 Ca^{2+} 存在下、MLC キナーゼで MLC20 をリン酸化させて測定した時の最大値（ $0.27 \mu\text{m}/\text{sec}$ ）と同程度であった。さらに、活性型 ROK は、実際に、スキンド処理血管において、細胞質 Ca^{2+} ゼロの条件下でも、最大収縮に匹敵する大きな Ca^{2+} 非依存性収縮を引き起こした。現在、この Ca^{2+} 非依存性収縮能を有する MLC20 のリン酸化部位を質量分析で同定中である。