

【 研 究 活 動 報 告 】

研究活動報告

〔 目 次 〕

分子生理研究系

神経化学研究部門	11
----------------	----

概 要

恐怖記憶によりマウス扁桃体で発現する遺伝子の検索

(Oliver Stork, Simone Stork, 小幡邦彦)

GABA ニューロンを GFP で標識した遺伝子改変マウスの開発

(柳川右千夫, 兼子幸一, 神原叙子, 戸塚昌子, 八木 健, 小幡邦彦)

ヴェシクル型 GABA トランスポーター

(柳川右千夫, 季 鳳雲, 海老原利枝, 蒔苗公利, 山肩葉子, 小幡邦彦)

グリシントランスポーター 2 の遺伝子構造と発現

(柳川右千夫, 小幡邦彦)

遺伝子変異動物による Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II の機能解析

(山肩葉子, 柳川右千夫, 小幡邦彦)

急性神経活動によるシナプシン I のリン酸化調節

(山肩葉子, 小幡邦彦)

GABA 合成酵素 (GAD65) 欠損の扁桃体局所回路への影響

(兼子幸一, 小幡邦彦)

超微小形態生理研究部門	13
-------------------	----

概 要

複素電子顕微鏡の開発

(Radostin Danev, 杉谷正三, 村田和義, 大河原浩, 永山國昭)

融合タンパク質による電子顕微鏡用分子ラベルの開発

(村田和義, 高木正浩, 永山國昭)

電子顕微鏡による筋肉 L 型カルシウムチャネルの構造解析

(村田和義, 小田原成優, 永山國昭, 國安明彦, 中山 仁)

位相差電子顕微鏡によるリアノジン受容体の一分子観察

(松本友治, 村田和義, 大河原浩, 永山國昭, 國安明彦, 中山 仁)

細胞機能の可視化・マニピュレーション技術を用いた細胞・オルガネラの形態形成機構の研究

(村田昌之, 加納ふみ, 永山國昭)

エンドサイトーシス選別輸送のメカニズムの解析

(大橋正人, 石堂美和子, 永山國昭, 山本章嗣)

溶媒環境と蛋白質の安定性, および構造形成問題

(高橋卓也, 永山國昭)

灌流ラット顎下腺における傍細胞輸送経路

(村上政隆, 大河原浩, Bruria Sachar-Hill, Adrian E. Hill)

唾液分泌過程における微細構造の三次元電子顕微鏡観察

(村上政隆, 高木正浩, 前橋寛, Alessandro Riva)

細胞内代謝研究部門	17
-----------------	----

概 要

マウス卵 Ca^{2+} オシレーションにおける Ca^{2+} 流入と Ca^{2+} 遊離の解析およびその数値シミュレーション

(毛利達磨, 宮崎俊一, 白川英樹, 尾田正二)

マウス卵への mRNA 注入による蛋白質発現法の確立

(毛利達磨, 吉友美樹, 宮崎俊一, 淡路健雄, 會田拓也, 尾田正二)

機能不明新型 Na^+ チャネル(Na_x)の生理機能解析

(吉田 繁, 檜山武史, 渡辺栄治, 野田昌晴)

難治てんかんに対する脳梁離断術のラットによる実験学的考察

(吉田 繁, 藤村幸一, 小野智憲)

細胞器官研究系

生体膜研究部門	20
---------------	----

概 要

神経, 分泌細胞のカルシウム依存性開口放出機構の研究

(河西春郎, 根本知己, 高橋倫子, 岸本拓也, 劉 婷婷, 木村良一)

多光子励起法を用いた神経機能の研究

(河西春郎, 松崎政紀, 早川泰之)

Kチャネルの開状態ではポア内容積は減少する

(久木田文夫)

Chelophyes における興奮収縮連関

(筒井泉雄)

機能協関研究部門	21
----------------	----

概 要

細胞容積感受性クロライドチャネルのカルシウムレセプターによる制御

(清水貴浩, 森島 繁, 岡田泰伸)

細胞膨張誘起性 ATP 放出の CFTR による調節

(挟間章博, 范 海天, I. Abdllaev, 前野恵美, 田中彰子, 赤塚結子, 岡田泰伸)

細胞膨張誘起性 ATP 放出による容積調節性 K^+ チャネルの調節

(出崎克也, 津村剛彦, 前野恵美, 岡田泰伸)

アポトーシス誘導における細胞容積調節異常の役割

(前野恵美, 石崎泰樹, 金関 恵, 挟間章博, 岡田泰伸)

生体情報研究系

神経情報研究部門	24
概 要	
小脳顆粒細胞の発達過程における電位依存性 K^+ チャンネルの発現と役割	
(中平健祐, 柴田理一, 柴崎貢志, 池中一裕)	
オリゴデンドロサイト発生制御機構の解析	
(鹿川哲史, 和田圭樹, 中平英子, 清水健史, 池中一裕)	
アストロサイト分化因子としてのシステインプロテアーゼインヒビター	
(岩崎靖乃, 長谷川明子, 池中一裕)	
脳内N-結合型糖蛋白質糖鎖の機能解明	
(池田武史, 伊藤磯子, 池中一裕)	
腫瘍特異抗原 MAGE-E1 のゲノム構造及び機能解析	
(河野洋三, 中平健祐, 片倉浩理, 池中一裕)	
有髄軸索上のイオンチャンネルクラスタリング機構の解析	
(石橋智子, 中平健祐, 池中一裕)	
液性情報研究部門	27
概 要	
受容体活性化 Ca^{2+} 透過性カチオンチャンネルの機能解析	
(若森 実, 山田久信, 原 雄二, 森 泰生)	
カルシウムチャンネル変異マウスの解析	
(森 泰生, 若森 実, 松下かおり, Kadrul Huda, 井本敬二)	
興奮収縮連関のメカニズムの解析およびカルシウムプローブの開発	
(中井淳一)	
電位依存性 Na^+ チャンネルに対する DHEAS の効果	
(森 誠之, 井本敬二, 栗原照幸)	
高次神経機構研究部門	29
概 要	
CNR ファミリー多重欠損マウスの作製	
(先崎浩次, 八木 健)	
CNR ファミリーの細胞接着活性に関する解析	
(武藤哲司, 八木 健)	
CNR mRNA の体細胞変異の解析	
(平山晃斉, 八木 健)	
ゼブラフィッシュ CNR ゲノム構造の解析	
(多田基紀, 八木 健)	
マウス嗅球での周波数帯によって分離される独立な 2 つの経路	
(田仲祐介, 八木 健)	
マウスにおける新規 CNR ファミリーの単離と分子機能の解析	
(竹井 豊, 八木 健)	

情報記憶研究部門	31
----------------	----

概 要

生体調節研究系

高次神経性調節研究部門	32
-------------------	----

概 要

初期視覚系における面の表現—光計測による解析

(谷 利樹, 横井 功, 伊藤 南, 小松英彦, 田中 繁)

初期視覚系における奥行き知覚の解析—単眼性の手掛かりと両眼視差の相互作用

(伊藤 南, 小松英彦)

多次元視覚探索課題を遂行中のサルV4野のニューロン活動

(小川 正, 小松英彦)

マカクザルV4野における陰影からなるテクスチャの表現

(花澤明俊, 小松英彦)

網膜電図 (ERG) による二色性マカクザルの波長感度特性の測定

(花澤明俊, 小松英彦, 三上章允, 竹中 修, 後藤俊二, 加藤啓一郎, 近藤 彩, 小池 智, 大西暁士, 山森哲雄, Puti Sulisty Angelika, Bambang Suryobroto, Achmad Farajallah)

生体システム研究部門	34
------------------	----

概 要

サル視覚誘導性上肢到達運動における一次運動野神経細胞の情報表現

(宮下英三)

歩行運動により賦活される脳領域の同定：サル直立二足歩行モデルを用いた糖代謝 PET による研究

(森 大志, 中階克己, 橘 篤導, 高須千慈子, 達本 徹, 塚田秀夫, 森 茂美)

大脳皮質運動野—体幹・下肢筋群へのシグナル伝達様式：経頭蓋磁気刺激法を用いた研究

(森 大志, 中階克己, 高須千慈子, 森 茂美)

若齢期ニホンサルの身体成長に伴う直立二足歩行運動の獲得機序

(橘 篤導, 森 大志, 高須千慈子, 中階克己, 森 将浩, 森 茂美)

ネコ小脳歩行誘発野の微小破壊と歩行運動時における運動分節の協調障害

(中階克己, 森 大志, 森 将浩, 森 茂美)

ネコ室頂核-視床路終末線維の視床内分布と形態的特徴

(奥村 哲, J. Czarkowska-Bauch, 中階克己, 森 茂美)

ラット腰髄に分布するアセチルコリンエステラーゼ陽性神経細胞の生後発達

(奥村 哲, Arpad Dobolyi, 森 大志, 森 茂美)

ラット線条体カルバコール刺激によって誘発される回旋運動と脳内 c-Fos 発現パターン

(奥村 哲, Janos Palhalmi, Katalin Kekesi, 森 大志, 森 茂美)

ネコ線条体の出力細胞, 介在神経細胞両者に対するセロトニン神経支配様式

(奥村 哲, Arpad Dobolyi, 松山清治, 森 大志, 森 茂美)

高次液性調節研究部門	37
------------------	----

概 要

対連合記憶課題遂行中のサル 36 野と TE 野における記憶関連細胞の空間分布

(納家勇治, 吉田正俊, 伊藤昭光, 柴田愁子, 宮下保司)

ニホンザル下部側頭皮質 TEav 野-36 野間の局所結合と電気生理学的特性

(吉田正俊, 納家勇治, 宮下保司)

サル下部側葉における宣言的記憶形成にともなう BDNF の上昇

(徳山 宣, 奥野浩行, 宮下保司)

サル嗅皮質における脳由来神経栄養因子, ニューロトロフィン 3 とその受容体メッセンジャーRNA の発現

(橋本隆紀, 宮下保司)

大脳皮質機能研究系

脳形態解析研究部門	40
-----------------	----

概 要

GABA_B 受容体の脳内局在と機能解析

(Akos Kulik, 重本隆一)

mGluR3 と AQP4 の共存と生理的意義の解析

(馬杉美和子, 藤本 和, 重本隆一)

HCN channel の脳内局在の解析

(納富拓也, 重本隆一)

シナプス前ドーパミン D2 型受容体と N 型カルシウムチャネルとの選択的共役

(靱山俊彦)

mGluR1 の活性化を阻害する自己抗体による小脳失調症

(木下彩栄, 重本隆一)

ラット脊髄視床路ニューロン活動性の解析

(靱山明子)

大脳神経回路論研究部門	42
-------------------	----

概 要

線条体介在ニューロン軸索終末におけるシナプス接合部の定量的解析

(川口泰雄, 窪田芳之)

アセチルコリン投射系による大脳皮質局所回路の修飾

(根東 覚, 川口泰雄)

心理生理学研究部門	43
-----------------	----

概 要

感覚脱失による脳の可塑的变化

(定藤規弘)

新生児期における脳可塑性の画像化

(定藤規弘)

- パーキンソン病における思考速度の低下
(本田 学, 澤本伸克)
- そろばん熟練者の暗算能力の神経基盤
(本田 学, 花川 隆)
- ヒトの可聴域上限をこえる空気振動に対する感受性についての研究
(本田 学, 大橋 力)
- 多変量自己回帰モデルをもちいた補足運動野—一次運動野間の機能連結評価
(本田 学, 加藤比呂子)
- 一次視覚野における周波数依存性反応：1.5 テスラと 3 テスラでの比較
(岡田知久)

統合生理研究施設

高次脳機能研究プロジェクト	47
概 要	
サッカーを指標としたコリン作動性入力による動機付けの制御の解析 (小林 康, 井上由香, 伊佐 正)	
上丘局所回路の興奮伝播の動的機構 (斎藤康彦, 伊佐 正)	
ラット上丘浅層ニューロンに発現する AMPA 型グルタミン酸受容体サブタイプ (遠藤利朗, 伊佐 正)	
中脳ドーパミンニューロンにおけるニコチン型アセチルコリン受容体の活性化に伴うカルシウム感受性電流成分の活性化 (山下哲司, 伊佐 正)	
感覚・運動機能研究プロジェクト	48
概 要	
後頭部及び肩部刺激による体性感覚誘発脳磁図 (糸見和也, 宝珠山 稔, 柿木隆介)	
耳刺激による体性感覚誘発脳磁図 (二橋尚志, 宝珠山 稔, 柿木隆介)	
Attention and visual interference affect somatosensory processing (Lam Khanh, Kakigi Ryusuke, Mukai Tomohiro, Yamasaki Hiroshi)	
近位筋振動刺激による末梢側神経刺激誘発電位への影響 (宝珠山 稔, 柿木隆介)	
短潜時体性感覚誘発脳磁場成分と脳電位成分との対応 (宝珠山 稔, 柿木隆介)	
電気及び CO ₂ レーザー刺激を用いた新しい方法による A-beta, A-delta, C 線維の伝導速度計測 (Tran Tuan Diep, Lam Khanh, 宝珠山 稔, 柿木隆介)	
CO ₂ レーザーによる C 線維刺激法を用いた脊髄視床路伝導速度 (間接法) (Tran Tuan Diep, 乾 幸二, 宝珠山 稔, 柿木隆介)	
CO ₂ レーザーによる C 線維刺激法で計測した脊髄視床路伝導速度 (直接法) (秋 云海, 乾 幸二, 王 曉宏, Tran Tuan Diep, 柿木隆介)	

表皮内針電極を用いたヒト皮膚 A-delta 線維の選択的刺激

(乾 幸二, Tran Tuan Diep, 宝珠山 稔, 柿木隆介)

表皮内電気刺激法を用いた痛み関連誘発脳磁場

(乾 幸二, Tran Tuan Diep, 秋 云海, 王 曉宏, 宝珠山 稔, 柿木隆介)

中心視野への注意によるパターンリバーサル視覚誘発電位への影響

(宝珠山 稔, 柿木隆介)

A first comparison of the multifocal visual evoked magnetic field and visual evoked potential

(Wang Lihong, Kakigi Ryusuke, Kaneoke Yoshiki, Okusa Tomohiro, Barber Colin)

脳波と脳磁図を用いた「倒立顔認知」の研究

(渡辺昌子, 柿木隆介)

自分の声 (own voice) に関連する聴覚誘発脳磁図

(軍司敦子, 宝珠山 稔, 柿木隆介)

高周波純音による聴覚誘発脳磁場

(藤岡孝子, 柿木隆介, 軍司敦子, 竹島康行)

音の想起に関連する初期の脳反応

(宝珠山 稔, 軍司敦子, 柿木隆介)

Neural activities during Wisconsin Card Sorting Test-MEG observation

(Wang Lihong, Kakigi Ryusuke, Hoshiyama Minoru)

語音に対する誘発脳磁場反応：聞き分けトレーニング効果の検討

(小山幸子, 軍司敦子, 山田玲子, 矢部博興, 久保理恵子, 大岩昌子, 柿木隆介)

脳機能計測センター

形態情報解析室 57

概 要

超高圧電子顕微鏡用広視野高解像度対物レンズの結像特性

(有井達夫)

ラット小脳の生後発達におけるエンドセリン受容体の発現と局在

(古家園子, 尾崎 毅, 堀 清次)

生体情報処理室 58

概 要

樹状突起活動電位の伝播調節メカニズムの解析

(坪川 宏)

細胞内シグナル伝達系の活性とニューロン活動との時間的・空間的關係の解析

(坪川 宏, 高木佐知子)

中枢ニューロンの容積調節と興奮性調節の機能的カップリングの解析

(高木佐知子, 坪川 宏)

機能情報解析室 60

概 要

静電的相互作用で駆動されるアミロイド誘起性蛋白質凝集機構

(今野 卓)

意欲に関する脳活動の研究
(達本 徹)

統合バイオサイエンスセンター 61

概 要

細胞膨張性グルタミン酸放出機構
(挾間章博)

動物実験センター 62

概 要

技術課 64

1. 概要

(大庭明生)

2. 施設の運営状況

①統合生理研究施設

(1)生体磁気計測装置室

(永田 治, 竹島康行)

②脳機能計測センター

(1)形態情報解析室

(山口 登)

(2)機能情報解析室

(佐藤茂基)

(3)生体情報処理室

(吉村伸明, 村田安永)

③動物実験センター

(佐治俊幸, 小木曾 昇, 広江 猛)

④共通施設

(1)電子顕微鏡室

(前橋 寛)

(2)機器研究試作室

(加藤勝巳)

分子生理研究系

神経化学研究部門

【概要】

前年につづいて脳機能の分子レベルでの理解を深めるため、以下のように、情動反応にともなう遺伝子発現、シナプス小胞型抑制性神経伝達物質トランスポータの遺

伝子発現と機能、シナプス蛋白のリン酸化、GABA 合成酵素ノックアウトマウスの機能変化について研究した。

恐怖記憶によりマウス扁桃体で発現する遺伝子の検索

Oliver Stork*, Simone Stork*, 小幡邦彦

マウスに音刺激と電気ショックを組み合わせると（1 分間隔で 3 回）、2 週間後に音だけの刺激に恐怖反応を示す。その 6 時間後に扁桃体基底外側核で発現増加している遺伝子を検索した。対象は最初に音だけで電気ショックを与えないものとした。すなわちパンチアウトした組織から cDNA を作成し、subtraction hybridization して候補の遺伝子をとらえ、さらに reverse Northern blot analysis, virtual Northern blot, in situ hybridization によっ

て解析した。蛋白の sorting/ubiquitination factor である Praja 1 とモノアミン代謝酵素の aldehyde reductase の発現増加が見いだされた（それぞれ 3 倍, 2.2 倍に）。前者の機能として新規合成されたシナプス蛋白のシナプス部への sorting を推測した。この成果を Learning & Memory 8: 209, 2001 に発表した。*現所属：Otto-von-Guericke 大学、ドイツ、マグデブルグ市。

GABA ニューロンを GFP で標識した遺伝子改変マウスの開発

柳川右千夫, 兼子幸一, 神原叙子, 八木 健, 小幡邦彦
戸塚昌子（科学技術振興事業団, C R E S T）

GABA 合成酵素のグルタミン酸脱炭酸酵素（GAD；GAD65 と GAD67 の 2 型存在）は、脳では GABA ニューロン特異的に発現する。生体において GABA ニューロンを標識することを目的として、GAD67 遺伝子に発光オワンクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質（GFP）遺伝子をノックインした遺伝子改変マウスを遺伝子標的法により作成した。このマウスの脳組織標本について、GFP 自家蛍

光の観察および抗 GFP 抗体、抗 GAD67 抗体を用いた免疫組織化学について検討した結果、GFP の蛍光が GABA ニューロンに認められることが明らかになった。この遺伝子改変マウスの利用により、GABA ニューロンの電気生理学的解析や発生過程の解析が進捗することが期待される。

ヴェシクル型 GABA トランスポーター

柳川右千夫, 季 鳳雲, 海老原利枝, 蒔苗公利, 山肩葉子, 小幡邦彦

ヴェシクル型 GABA トランスポーター (VGAT) は, GABA をシナプス小胞へ蓄積させる。GABA 作動性神経伝達における VGAT の役割を明らかにする目的で, VGAT 遺伝子プロモーターの解析, 染色体マッピング, VGAT 結合分子の探索を行った。マウス VGAT 遺伝子プロモーターをルシフェラーゼ遺伝子に連結した融合遺伝子を培養細胞に導入して解析した結果, 転写開始点から 161 bp

の領域が基本転写活性に必要であることを明らかにした。また, マウス VGAT 遺伝子は, 第 2 染色体 H-13 領域に認められた。酵母の two hybrid 法を用いて VGAT 結合分子の探索を行い, 単離した候補分子について, 免疫沈降法を用いて解析を行っている。これらの分子を解析することにより, VGAT 分子が細胞内においてシナプス小胞への移動或いは局在する分子機序を明らかにする。

グリシントランスポーター 2 の遺伝子構造と発現

柳川右千夫, 小幡邦彦

グリシントランスポーター 2 (GlyT2) は, 神経終末から放出された伝達物質, グリシンの再取り込みを行う。その発現は, 中枢神経系ではグリシン作動性ニューロンに認められる。マウス GlyT2 の発現調節機構を明らかにする目的で cDNA を単離し, 塩基配列を決定した結果, マウス GlyT2 蛋白は 798 個のアミノ酸から構成されることが予測された。マウス脳発生過程における GlyT2 遺伝

子発現を RT-PCR 法で解析した結果, 胎生 10.5 日齢で初めて検出され, 発達段階特異的に発現量が増加することを観察した。さらに, マウス GlyT2 遺伝子を BAC ライブラリーから単離し, 構造解析を行った。遺伝子の全長は, 約 55 kb で, 16 個のエクソンから構成されていることを明らかにした。この遺伝子構造は, 遺伝子標的法を用いたノックアウトマウスの作成に有用な情報となる。

遺伝子変異動物による Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II の機能解析

山肩葉子, 柳川右千夫, 小幡邦彦

Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMK II) は, 中枢神経系に豊富に存在する多機能型のプロテインキナーゼで, 神経活動の制御やシナプス可塑性に深く関わりと考えられている。我々はこれまでに, 生体内における神経活動と CaMK II の活性状態との関連を明らかにしてきた。本研究においては, CaMK II の主要なサブユニットである α の遺伝子を不活性型に変異させたマウスの作製を試み, その解析によって, 生体内に

おける CaMK II α の果たす役割について新たな知見の獲得をめざしている。本年度は, 点変異の導入, 薬剤耐性遺伝子, ネガティブ遺伝子を含むターゲティングベクターの ES 細胞への導入を行い, 相同組換え型の ES クローンを複数獲得した。現在, これら陽性クローンを用いて, マウス胚へのマイクロインジェクションを行い, キメラマウスを作製中である。

急性神経活動によるシナプシン I のリン酸化調節

山肩葉子, 小幡邦彦

シナプシン I は神経終末に局在するシナプス小胞結合蛋白として, リン酸化状態依存的に, 神経伝達物質の放出調節や神経終末の形態変化に関与すると考えられている。我々は, 生体内におけるシナプシン I リン酸化の調節機構を明らかにするために, ラットに電撃いれん刺激を与え, 海馬, 大脳皮質ホモジネート中のシナプシン I のリン酸化状態を, リン酸化部位特異抗体を用いて測定した。その結果, 刺激直後にリン酸化の減少が起こっ

た後に, site 4/5 では 5 分にピークを持つ急激なリン酸化の増加が認められ, site 6 では 20 分にピークを持つ緩やかな増加が認められた。MAP キナーゼ (MAPK) の活性化を阻害する SL327 を前投与すると, site 4/5 のリン酸化の増大は抑制されたが, site 6 の増大は有意には抑制されなかった。このことから, シナプシン I の site 4/5 のリン酸化は, 生体内においても MAPK による調節を受けることが明らかとなった。

GABA 合成酵素 (GAD65)欠損の扁桃体局所回路への影響

兼子幸一, 小幡邦彦

GAD65 欠損マウス扁桃体では野生型に比べて GABA 含量が約 40%減少しており, 欠損マウスは扁桃体が関係する情動行動の亢進を示す。GAD65 欠損がシナプス機能に与える影響を検討するため, 扁桃体外側核(LA)の抑制性及び興奮性シナプス伝達をスライスパッチクランプ法で解析した。低頻度刺激で誘発される抑制性シナプス後電流(IPSCs)には野生型と変異型の差がなかったが,

高頻度(100 Hz)刺激の場合には重畳した IPSCs の減衰の時定数は変異型で小さく, GABA 放出の低下が認められた。恐怖条件付け刺激に関連する視床から LA への興奮性入力を高頻度刺激して誘導した NMDA 受容体依存性シナプス可塑性(長期増強)も変異型で亢進し(野生型 33% vs 変異型 70%)しており, 高頻度刺激時の GABA 放出量低下が興奮性シナプスの可塑性を促進することが示された。

超微小形態生理研究部門

【概要】

「構造と機能」という分子生物学のパラダイムは生物の機能が生体高分子, 特に蛋白質の独自の構造によって支えられていることを明かにして来た。一方細胞より上の階層では組織, 器官を見ると構造が機能と直結しているのはむしろ自明である。しかし生体高分子と組織・器官の中間に位置する細胞にはそのレベル独自の「構造と機能」が明確でない。細胞は一見オルガネラと各種小胞のランダムな集まりのように見える。しかし私達はこれら微小器官の集積の背後に, 実は明確に細胞構造を規定する実体があると考え。特に細胞内オルガネラ形成を通して見た「細胞の形と働き」に興味がある。細胞レベルの生理現象の背後には活動維持や, 形態維持のための

巧妙な情報と物質の輸送機構がある。この物質, 情報の拡散および非拡散輸送の結果としてオルガネラ編成と骨格系の編成が行われ, さらに情報伝達経路が確定すると考える。こうした方針のもとに行われた具体的報告を以下に記す。

外分泌腺では分泌刺激により水輸送と開口分泌が両方活性化されるが, それぞれのエネルギー要求性/相互作用は in vitro で蛋白質分泌と水分分泌の同時測定が不可能であるため不明であった。村上是唾液腺血管灌流系を材料に分泌時間経過, 形態観察, 開口放出関連蛋白, 分泌物質の運動性の 4 チームの共同研究グループを組織し, 研究を展開した。その結果は 5 月, 9 月に岡崎カンファレン

スセンターにて開催した研究集会Coupling mechanisms of fluid secretion and exocytosis および 2001 年 2 月ゴードン会議において、発表／議論された。

国内共同研究については一般共同研究報告に記載した。本稿では生理学研究所およびケンブリッジ大学、カリフォルニアにて実施された研究を報告する。

複素電子顕微鏡の開発

Radostin Danev, 杉谷正三, 村田和義, 大河原 浩, 永山國昭

従来の顕微鏡の限界を破る新しい原理として、量子現象の波動関数を直接観察する複素観測法を見出した(Nagayama, 1999)。この方法を電子波を使う電子顕微鏡の分解能とコントラスト向上に応用するため、平成 9～11 年度に導入した極低温分析型電子顕微鏡の一部改良を行った。まず位相差法を確立するため Zernike 位相板の作成をカーボン薄膜を用いて行った。通常の真空蒸着膜を多孔絞り (50 μm) にのせ、各穴をはる薄膜に 1 μm

の穴をフォーカスイオンビームであけて、Zernike 位相板とした。これを用いて位相差電子顕微鏡像が撮られた。この方法と通常電子顕微鏡を組み合わせ、同一試料に対し、2 回の測定を行い、波動関数そのものを振幅と位相の複素像として表示することに成功した。そして電子顕微鏡の収差やピンボケを数値的に取り除くことができた。さらに従来の顕微鏡法との性能の差を見極めるため標準サンプルの測定とシミュレーションを行った。

融合タンパク質による電子顕微鏡用分子ラベルの開発

村田和義, 高木正浩, 永山國昭

タンパク質分子を in vitro または in vivo で電子顕微鏡観察する場合、目的のタンパク質がどこに存在し、またどのように他の分子と相互作用しているかを知るために目的のタンパク質を特異的にラベルする必要がある。本研究では、多数の金属と結合を行うタンパク質を用いて融合タンパク質を発現させ、後から適当な重金属を取り

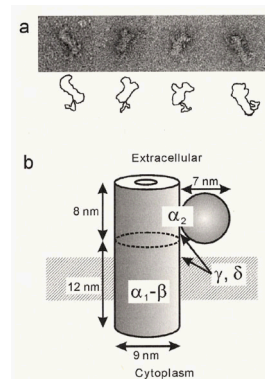
込ませることによってタンパク質のを特異的にラベルする分子ラベルの開発を行う。予備実験の結果一分子当たり 7 つの金属イオンを取りこむ金属結合タンパク質メタロチオネインが適当であるとの結論に至ったので今年度はそのクローニングと大量発現系の確立を図った。

電子顕微鏡による筋肉 L 型カルシウムチャネルの構造解析

村田和義, 小田原成優, 永山國昭
國安明彦, 中山 仁 (熊本大・薬)

本研究ではウサギ骨格筋を精製し、5 つのサブユニット (α_1 , α_2 , β , γ , δ) からなる完全な L 型チャネルを得て電子顕微鏡の 1 分子構造解析を行った。まず α_1 - β のみからなる部分コンプレックスを解析し、12nm 長の中空台形構造を持つことを見出し、4 つの非対称ドメインで囲まれたチャネルポアを確認した。次に完全コンプレックスを解析し、それが 20nm 長の円筒構造を持ち、かつ球形部を修飾付着させていることを確認した。 α_1 - β サブユニットの完全コンプレックス内の位置を見るた

めベータサブユニットの抗体を用いてその同定を行ったところ、修飾部位から離れた所が α_1 - β 部位であると認められた。そして α_1 - β 部位が膜貫通部位と推測された。この結果より L 型カルシウムチャネルの非対称構造を図のように推定した。



位相差電子顕微鏡によるリアノジン受容体の一分子観察

松本友治, 村田和義, 大河原 浩, 永山國昭
國安明彦, 中山 仁 (熊本大学・薬学部・生体機能科学)

本研究ではリアノジン受容体の負染色試料に対し, 位相差像の撮影を試みた。通常の電子顕微鏡像では, なるべく高い空間周波数成分まで拾うようにフォーカスを合わせるとコントラストが低下してしまう。一方, 位相差電子顕微鏡像では, 対物レンズの後焦点面近傍に配置された位相板の中心孔を光軸上に合わせた場合にはコントラストのついた位相差像が得られ, リアノジン受容体粒子の輪郭が際立つようになった。得られた画像のパワースペクトルの動径平均からコントラスト伝達関数を推定したところ, 位相差像では原点近傍で高い値をとる $\cos$ 関数型の変調を受けていることが確かめられた。

細胞機能の可視化・マニピュレーション技術を用いた細胞・オルガネラの形態形成分子機構の研究

村田昌之, 加納ふみ, 永山國昭

光学顕微鏡下の単一細胞内で GFP 融合タンパク質の輸送・ターゲティング及び GFP 標識オルガネラのダイナミクスを定量的に解析し, かつ生化学的に関連因子を探索するため, 「GFP 可視化技術」と形質膜を一部透過性にした「セミインタクト細胞系」をカップルさせた顕微測光アッセイシステム (エバネセント光学系と W-VIEW 検出系を組み合わせ) を作成した。本システムを用い, (i) 細胞分裂期 (M期) における CHO 細胞のゴルジ体, 小胞体 (ER) の形態変化・娘細胞への分配とオルガネラ再構築過程を GFP 可視化し, その分子基盤として cdc2 キナ

ーゼに制御された NSF 及び p97/p47 による細胞周期依存的な膜融合反応があることを世界に先駆けて証明した。
(ii) 単一のセミインタクト細胞内で ER $\rightleftharpoons$ ゴルジ体 $\rightarrow$ 形質膜間小胞輸送の各素過程を可視化・再構成に成功した。間期・M期の細胞質を用い, 細胞周期依存的な各輸送過程のキネティックスを定量的に解析し, M期にはゴルジ体 $\rightarrow$ ER の逆行輸送以外は全て停止する (cdc2 キナーゼ依存的) こと, その結果, ゴルジ体の一部が ER へ吸収され娘細胞に分配されることを明らかにした。

エンドサイトーシス選別輸送のメカニズムの解析

大橋正人, 石堂美和子, 永山國昭
山本章嗣 (関西医大)

エンドサイトーシス経路は, 細胞のさまざまな環境応答の前線となっている膜動輸送系である。我々は, エン

ドサイトーシス経路による細胞の情報伝達の統合とそのメカニズム, またその異常による病態などの解明を目指

し、この経路の哺乳類細胞の変異株をもちいて、細胞生物学的、体細胞遺伝学的アプローチを加えている。フローサイトメトリーによりエンドサイトーシス経路を解析し、その特性に基づいて細胞を分離する方法を開発し、これまでに後期エンドソーム過程に変異を持つ表現型の異なる複数の相補群に分類される独自の CHO 変異株を

得ている。本年度は CHO 細胞において、レトロウイルスベクターによる発現クローニング法を確立し、変異株のこの方法を含む解析により、後期エンドソームに特徴的な構造である多胞体(マルチベシキュラボディー:MVB)からゴルジに向かう受容体の、MVB からの選別・搬出にコレステロールが必要である事を明らかにした。

溶媒環境と蛋白質の安定性、および構造形成問題

高橋卓也, 永山國昭

生体高分子の安定性は溶媒組成を変えることにより変化させることが可能である。そこでアミノ酸の各種溶媒に対する相互作用エネルギーを測定し、それらを基にして蛋白質の安定性を予測できる理論及び計算手法を開発

している。水の安定性への影響を統計力学的理論及び分子動力学シミュレーションで研究した。また蛋白質の構造形成原理や各種溶媒環境における静電相互作用の効果を明らかにした。

灌流ラット顎下腺における傍細胞輸送経路

村上政隆, 大河原 浩

Bruria Sachar-Hill, Adrian E. Hill (ケンブリッジ大学生理科学部)

種々の分子量の標識デキストランをプローブとして唾液腺腺胞部の傍細胞経路の大きさを検討した。血管灌流ラット顎下腺の灌流系に ^3H デキストランを加え、アセチルコリン刺激により分泌した唾液を採取, size exclusion chromatography にて唾液, 灌流液, 細胞間液に分布するデキストラン分子のサイズを決定した。

分子径に対する分泌プローブの唾液／灌流液比は二つの成分にわけることができた。1) 自由拡散 (Stokes-

Einstein) 双曲線成分に一致する大きな通過経路を示す。2) 5Å に切片をもつ直線成分で溶媒牽引による。直線成分は唾液／灌流液比は水の分子径 1.5Å でほぼ1の価に外挿された。このことは水のほとんどが細胞間隙／tight junction を通過することを強く示唆した。

原唾液は細胞の中からの分泌と傍細胞経路を通過した成分との混合物であり、細胞経路の分泌信号系に加え、傍細胞経路の調節機構の研究を展開する必要がある。

唾液分泌過程における微細構造の三次元電子顕微鏡観察

村上政隆, 高木正浩, 前橋 寛

Alessandro Riva (Cagliari 大医, 細胞形態学)

腺房細胞における分泌界面は二つの細胞間に存在する分泌細管 intercellular canaliculi (IC) である。管腔側膜は細胞の頂部のみならず、大部分はこの IC であり、透過電子顕微鏡による二次元的観察に加え、走査型電子顕微鏡観察による三次元観察が必要である。耳下腺の血管灌流

標本を用い、光学・透過電子・走査電子顕微鏡をにて、IC と周辺微細構造を観察した。ムスカリン受容体刺激では IC 周辺の rER の拡張, mitochondria 電子密度増加, まばらな開口放出像, microvilli 減少, IC の初期一過性拡大を観察した。 β アドレナリン性受容体を同時に刺激す

ると、IC に多くの開口分泌がみられ、その周辺にさらに分泌顆粒が開口分泌する像が観察された。また microvilli は消失し、IC 周辺の rER の拡張、mitochondria 電子密度増加も同時に観測された。分泌活動時の、rER の拡張は細胞内 Ca 代謝と、mitochondria 電子密度増加はエネルギー代謝増加と関連づけられた。また、開口分泌像の

増加は管腔膜面積の増大を示すが、同じ刺激条件下で水分泌の促進は観察できなかった。これは、管腔への水輸送経路が、膜面積の増大によるものではなく、アクアポリンなどの水輸送蛋白の活性化あるいは傍細胞輸送経路の開通による可能性を示唆している。

細胞内代謝研究部門

【概要】

細胞内代謝部門では、生物活性物質や細胞-細胞間刺激に対する細胞の刺激受容機構、細胞内情報伝達機構、細胞機能発現機構を対象とし、特に細胞内カルシウムイオン (Ca^{2+}) の動態を画像解析装置でとらえ詳細に解析して、これらのメカニズムの解明を目指している。毛利と宮崎は白川英樹、尾田正二 (東京女子医大) とともに、マウス卵内への精子抽出物注入によって起こる Ca^{2+} オシレーションにおける細胞外からの Ca^{2+} 流入と小胞体からの Ca^{2+} 遊離に関する解析を継続して行い、論文にまとめて発表した。また毛利、吉友、宮崎は淡路健雄 (東京女子医大) らとともに、マウス卵における蛋白質強制発現の方法を確立する実験を行った。吉田は、基礎生物学研究所の檜山武史、渡辺栄治、野田昌晴とともに、長らく不明であった新型 Na^+ チャネル (Na_x) の生理機能を研究し

た。また藤村幸一、小野智恵 (長崎大) とともに、難治てんかんに対する脳梁離断術の効果を解析した。

共同研究については、宮崎は卵活性化因子の同定と作用機序に関する共同実験を行った。また、飯野正光 (東京大大学院医学系研究科教授) らと卵細胞における IP_3 動態の可視化に関する実験を行った。矢田 (前助教授、自治医科大学教授として転出) は塩田清二 (昭和医科大学教授) らと神経ペプチド PACAP の神経細胞分化誘導作用と細胞内とシグナル伝達機構に関する共同実験を行った。また河原克雅 (北里大学医学部教授) を代表者として「 Ca^{2+} シグナルと膜輸送体の発現および機能調節」と題する研究会を開催した。さらに宮崎がオーガナイザーとなって国際シンポジウム "Mechanisms of Cell Signaling in Early Development" を開催した。

マウス卵 Ca^{2+} オシレーションにおける Ca^{2+} 流入と Ca^{2+} 遊離の解析およびその数値シミュレーション

毛利達磨, 宮崎俊一

白川英樹, 尾田正二 (東京女子医大)

マウス卵の受精時あるいは卵内への精子抽出物注入によって、反復性の細胞内 Ca^{2+} 増加反応 (Ca^{2+} オシレーション) が誘発される。個々の Ca^{2+} 増加は小胞体からの Ca^{2+} 遊離によるが、 Ca^{2+} オシレーションの持続には細胞外からの Ca^{2+} 流入が必要である。マウス卵に Ca^{2+} 結合性蛍光色素 Fura-2 を予め取り込ませ、細胞外液に Mn^{2+} を添加したのち精子抽出物を注入し、 Ca^{2+} 流入系を介して細胞内に流入した Mn^{2+} による Fura-2 の蛍光の減少 (quenching) を測定した。 Ca^{2+} 遊離に伴って Mn^{2+} 流入が

起こり、やがて Mn^{2+} オシレーションが起こり始めた。細胞膜を介する流入・排出および小胞体膜を介する遊離・再取り込みの過程で Ca^{2+} と Mn^{2+} が競合的に移動すると仮定して Fura-2 蛍光強度変化の数値シミュレーションを行ったところ、実験結果とよく一致した。持続的に流入した $\text{Mn}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ が小胞体に取り込まれたのち遊離されることを示すもので、 Ca^{2+} 流入と Ca^{2+} 遊離の機能関連が明らかにされた。

マウス卵への mRNA 注入による蛋白質発現法の確立

毛利達磨, 吉友美樹, 宮崎俊一
淡路健雄, 會田拓也, 尾田正二 (東京女子医大)

哺乳動物卵の受精に関連する蛋白質の発現や, 小胞体内 Ca^{2+} 濃度測定プローブ蛋白質を発現させることを目標として, まず実験法を確立する試みを行った。green fluorescent protein (GFP) の変異体 EYFP の mRNA にミトコンドリア移行配列を付加し, さらに約 250 個の 3' polyA tail を付加してマウス未成熟卵に注入し, EYFP の発現を蛍光観察によって追跡した。注入 3 時間後から EYFP の

発現が認められ, 時間とともにほぼ直線的に増加して 12 ~15 時間でプラトーに達した。ミトコンドリアへの移行は MitoTracker によるラベルされたミトコンドリアの分布との一致から確認できた。この強制発現により, 卵の受精能は影響を受けなかった。この方法を利用して, 小胞体への移行配列を付加した Ca^{2+} 測定用プローブ CAMELEON をマウス卵に発現させる実験を行った。

機能不明新型 Na^+ チャネル(Na_x)の生理機能解析

吉田 繁
檜山武史, 渡辺栄治, 野田昌晴 (基生研)

電位感受性を示す Na^+ チャネル(Na_v1)のクローニングの過程で, Na_v とは一次構造相同性は低い(50%弱)ものの同範疇に属すると思われるものが見つかり Na_v と名付けられた。しかし, その後の研究で Na_v2 が膜電位変化では開かないことが判明し, 機能不明チャネル Na_x ($x = \text{unknown}$)という新名称を与えられた。マウスの後根神経節細胞には, この Na_x が多量に存在していることと, 細胞外の Na^+ 濃度上昇によって開くイオンチャネルが報告されていることから, 「 Na_x は Na^+ 濃度感受性 Na^+ チャネ

ルである」との仮説を立てて実験を始めた。 Na^+ 感受性蛍光色素で細胞内 Na^+ 濃度変動を観察すると, 細胞外液の浸透圧ではなく Na^+ 濃度の変化に応じることが判明した。同様の結果は脳弓下器官(subfornical organ)神経細胞でも得られた。しかし, Na_x ノックアウトマウスでは反応が観察されなかった。 Na_x の生理機能が判明したので, 「濃度感受性ナトリウムチャネル Na_c ($c = \text{concentration}$)」と改称することを提唱した。

難治てんかんに対する脳梁離断術のラットによる実験学的考察

吉田 繁
藤村幸一, 小野智恵(長崎大)

薬物治療に抵抗を示すヒトの難治てんかんに対して「脳梁離断術」が試みられており, 術後の脳波所見では発作波の一側化や非同期化だけでなく, 発作波自体の頻度減少ないしは完全消失さえ得られている。この脳梁離断術の効果は, 一側皮質の発作波が対側に伝わる伝導路を断つことにあるとされているが, それ以外に「脳梁が脳

皮質の興奮性を高めているのを遮断する」効果もあるのではないかと我々は考えた。この仮説を検証するために, 全身麻酔下ラットの右脳梁線維および左視床外側腹側核に刺激電極を, 左前頭皮質に記録電極をそれぞれ配置し, 視床皮質反応を大脳皮質の興奮性の指標として, 持続的経脳梁入力(低頻度脳梁反復刺激)の存在下で増強が見

られるかどうかを観察した。その結果、持続的経脳梁入力
の存在下では視床皮質反応の増強が見られ、「脳梁は大

脳皮質の興奮性を高めている」という仮説は正しいと考
えられた。

細胞器官研究系

生体膜研究部門

【概要】

平成 12 年 1 月より前任地東京大学大学院医学系研究科より 2 光子レーザー顕微鏡や電子顕微鏡を含む研究機器群の搬入を行い、3 月までに機器の移動・調整を完了し、次のテーマについての研究を開始した。1) 神経、分泌

細胞のカルシウム依存性開口放出機構の研究、2) 多光子励起法を用いた神経機能の研究。また、久木田文夫助手はイオンチャネルの動力学的研究を、筒井泉雄助手は興奮収縮連関の系統発生的研究を引き続き進めている。

神経、分泌細胞のカルシウム依存性開口放出機構の研究

河西 春郎, 根本 知己, 高橋 倫子, 岸本 拓也, 劉 婷婷, 木村 良一

カルシウム依存性の開口放出を特徴とする培養神経細胞, 膵臓ベータ細胞, 膵臓外分泌腺細胞, 副腎髄質細胞, PC12 細胞などの神経・分泌細胞にケイジドカルシウム試薬を用いて一定のカルシウム上昇与えたときの開口放出の過程を系統的に検索している。外分泌腺及びベータ細胞においては 2 光子励起法を用いる新しい開口放

出の可視化に成功し、現在では *in vivo* に近い状態の標本で開口放出を直接観察できる。副腎髄質細胞や PC12 細胞においては、膜容量測定と独立して膜面積変化を測定する方法を開発し、定量的な比較を行っている。更に、副腎髄質細胞の電子顕微鏡観察に向けての作業を進めた。

多光子励起法を用いた神経機能の研究

河西 春郎, 松崎 政紀, 早川 泰之

活動状態依存的な神経回路の可塑性は多くの脳機能の基盤をなす。神経可塑性の誘発因子としてはシナプス後部の細胞内カルシウム濃度の上昇があり、単一シナプスの重みが、記憶をコードしていると推察されてきた。この記憶機構を定量的に明らかにするために、新たなケイジドグルタミン酸の合成に成功し、シナプス後部の受容体の機能分布を 2 光子励起法を用いて単一シナプスレベルでマップする方法の応用を進めている。これにより、シナプスの重みがどのように空間的に分布しているのか、

また、可塑性誘起時に重みの変化はどのような広がりを持つのかを検討している。また、神経可塑性は比較的高濃度の細胞内カルシウム動態で調節されている可能性が高く、その時間的空間的広がりには神経可塑性誘発の鍵となると考えられる。そこで、カルシウム濃度分布の定量的測定、細胞内カルシウム緩衝能、シナプス後部のミトコンドリアの役割を、2 光子励起法を用いて定量的に調べている。

K チャネルの開状態ではポア内容積は減少する

久木田 文夫

神経の膜電位依存性イオンチャネル・ポアは親水性であり、開状態でイオンを透過することは自明のことである。従って、開状態ではポアの親水性の程度や親水性部分の容積が増大する（但し、ポア内でゲートの扉が移動する場合は容積の変化はない）ことも、当然だと思われる。イカ巨大軸索の実験で、イオン透過性が大きいことが直ちに親水性ポアの容積が増大することを意味しないことが明らかになった。ポアに侵入できない大きな非電解質で、ポア内の水の関与する自由エネルギーを下げる

とすると、親水性ポアの容積は減少する。この浸透圧の効果は Na チャネルでは閉状態を、K チャネルでは開状態を安定化する。イオン透過性はポアの細い部分で決定され、広い意味のゲート機構（ポアの内部構造が変わること）にはポア全体が寄与するので、ポアが複雑な 3 次元構造を持つほど、上記の原則は当てはまらない。イオンチャネルの構造ゲノム的な分類には、ポア内容積変化のデータが不可欠であると思われる。

Chelophyes における興奮収縮連関

筒井泉雄

筋収縮と弛緩は細胞内オルガネラ（SR、ER、T管）での Ca^{2+} 移動によって制御されていて、収縮連関機構に関連した小胞体（SR）と T 管の役割の解明は動物の筋細胞の進化を探る上で重要な意味を持っている。骨格筋において筋収縮に先立ち Ca^{2+} 放出をつかさどる SR の機構がどのようにして派生してきたかについての解明はいまだ成されていない。今回、SR と T 管を併せ持つ海生動物 *sagitta* を用い無脊椎動物に残されている T 管と SR 機構の役割について研究した。*sagitta* においては T 管は

脊椎動物と同様に Na スパイクを発生する。また SR 器官はリアノジン受容体を持っているが、筋収縮に先立つ Ca^{2+} 放出には関与していないことが判明した。脊椎動物骨格筋様の機能を持っていたとしても、連関機構は完成しておらず、脊椎動物型の Ca^{2+} 放出能の発現は、原索動物以降であることが確認された。このことは SR の Ca^{2+} 放出機構が骨格筋の発現と密接に関連していることを示して、現在 SR における Ca^{2+} 放出因子を検討中である。

機能協関研究部門

【概要】

機能協関研究部門では、容積調節や膜輸送や環境情報受容などのように最も一般的で基本的な細胞活動のメカニズムを、チャネル、トランスポーター、レセプターなどの膜機能蛋白分子の働きとして細胞レベルで統合的に解明し、それらの異常と疾病や細胞死との関係についても明らかにしようとしている。また、チャネルやトランスポーターの多機能性や、両者間の構造的・機能的相関についても分子生理学的に研究している。

主たる研究テーマは次の通りである。

①「細胞容積調節機構と細胞死機序」：細胞は正常容積を維持する能力を持ち、その破綻は細胞死（アポトーシスやネクローシス）に深く関与している。これらのメ

カニズムの研究を行い、その破綻防御の方策を探索する。
②「心筋・脳神経アニオンチャネルの虚血応答の分子機構」：虚血の影響が最も重大な心筋と脳においてアニオンチャネルがその障害と防御にいかに関与しているかを解明する。
③「イオンチャネルの多機能性の分子機構」：イオンチャネルはイオン輸送や電気信号発生のみならず、環境因子に対するバイオ分子センサーや、他チャネル／トランスポーター制御にも関与する。この多機能性のメカニズムの解明を行う。
④「消化管上皮細胞の分泌・吸収機能と分子メカニズム」、⑤「腎密集斑細胞 NaCl センサー機能と分子メカニズム」などについても研究している。

細胞容積感受性クロライドチャネルのカルシウムレセプターによる制御

清水貴浩，森島 繁，岡田泰伸

始どの細胞は内外の浸透圧変化に曝されても、膨張や収縮が強いられた後に正常容積へ復帰する Regulatory Volume Decrease (RVD) や Regulatory Volume Increase (RVI) 能力を持つ。RVD は多くの細胞で K^+ 及び Cl^- チャネルの活性化によって達成される。本研究では Intestine 407 株細胞における容積感受性 Cl^- チャネルの調節に、G 蛋白共役型の膜レセプターであるカルシウムレセプター (CaR) が関与することを証明した。浸透圧性膨張時には細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇し、Ca ポンプの働きで細胞外膜近傍の領域でも Ca^{2+} 濃度増が起こり、CaR は RVD をオートクリン的に刺激するものと推定された。これを図 1 右半分に模式的に要約した。本研究成果は次の論文に発表した (Shimizu, Morishima & Okada 2000 J. Physiol. 528, 457-472)。

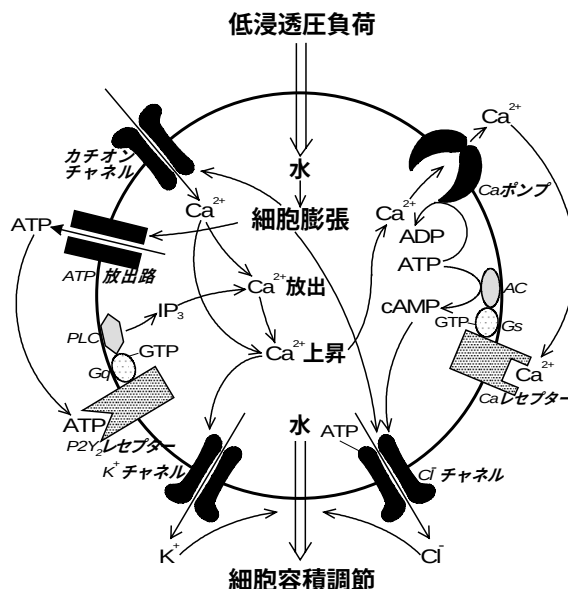


図 1. RVD の分子メカニズムの模式図

細胞膨張誘起性 ATP 放出の CFTR による調節

挾間章博, 范 海天, I. Abdllaev, 前野恵美, 田中彰子, 赤塚結子, 岡田泰伸

浸透圧性膨張時には ATP が細胞外へと放出されるが、CFTR がこの放出に関与する可能性が提起されたので、この点を検討した。CFTR を強制発現させると C127 乳腺株細胞からの浸透圧性膨張時の ATP 放出は著しく亢進した。しかし、cAMP で CFTR Cl⁻チャネルを活性化させても ATP 放出が見られず、CFTR Cl⁻チャネル阻害剤 glibenclamide は細胞膨張誘起性 ATP 放出に何の影響も与

えず、逆に ATP 放出阻害剤 Gd^{3+} は CFTR Cl-チャンネル活性に何らの影響も与えなかった。従って、CFTR は ATP 放出を亢進させはするが、それ自体が ATP 放出路を与えるものではないことが明らかとなった。これらの結果は次の論文に報告した (Hazama, Fan, Abdullaev, Maeno, Tanaka, Ando-Akatsuka & Okada 2000 J. Physiol. 523, 1-11)。

細胞膨張誘起性 ATP 放出による容積調節性 K^+ チャネルの調節

出崎克也、津村剛彦、前野恵美、岡田泰伸

Intestine 407 細胞の RVD は ATP 水解酵素 apyrase や P2 レセプター阻害剤 suramin の細胞外投与によって部分

的に抑制され、 μM レベルの細胞外 ATP の添加によって亢進された。Intestine 407 細胞には P2Y₁ レセプターが発

現していることが確認された。P2Y₂ レセプター刺激によって細胞内 Ca²⁺ 動員がもたらされ、Ca²⁺ 依存性 K⁺ チャネルの活性化が引き起されるが、Cl⁻ チャネルの活性は引き起されなかった。従って、細胞膨張時の Ca²⁺ 動員は放出 ATP による P2Y₂ レセプター刺激で亢進され、Ca²⁺ 依

存性 K⁺ チャネルの著しい活性化をもたらして RVD 達成を促進するものと結論された。これらは図 1 の左半分に模式的にまとめている。本研究結果は次の論文に発表した (Dezaki, Tsumura, Maeno & Okada 2000 Jpn. J. Physiol. 50, 235-241)。

アポトーシス誘導における細胞容積調節異常の役割

前野恵美, 石崎泰樹, 金関 恵, 挟間章博, 岡田泰伸

アポトーシスにおいて細胞断片化前に見られる apoptotic volume decrease (AVD) はカスパーゼ活性化に先行し、カスパーゼ阻害剤で抑制されなかった。AVD 進行中の細胞では低浸透圧下の容積調節 RVD が著しく促進していた。RVD を実現させる容積感受性 Cl⁻ チャネルと K⁺ チャネルに対するブロッカーで前処理すると AVD 発生も RVD 促進も阻止された。また、AVD 阻止によってチトクローム c 放出、カスパーゼ活性化、DNA ラダーや形態的アポトーシス像の発生も消失し、細胞死は阻止された。従って、AVD はアポトーシスに不可欠の初期反応であり、これには容積調節性チャネルの活性化が伴われているものと結論された (図 2)。本研究結果は次の論文に発表した (Maeno, Ishizaki, Kanaseki, Hazama & Okada 2000 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 9487-9492)。

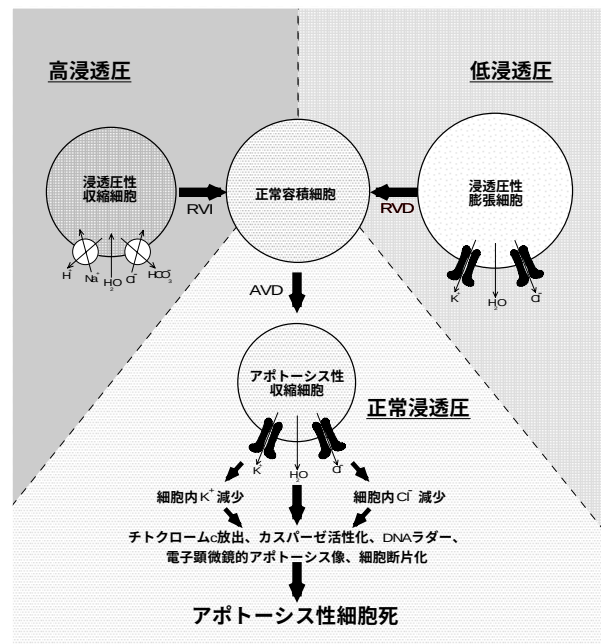


図 2. 細胞容積調節メカニズムと、その破綻によるアポトーシス性細胞死誘導の模式図

生体情報研究系

神経情報研究部門

【概要】

われわれの研究室では哺乳類神経系の発生・分化機構について研究している。特に神経上皮細胞（神経幹細胞）からどのようにして全く機能の異なる細胞種（神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトなど）が分化してくるのか、について興味を持って研究を進めている。また、得られた新しい概念や技術はできるだけ社会の役に立てよう努めており、臨床研究への応用を視野に入れながら、病態の解析にも努力している。

脳神経系の発生・分化を考えると、内因的要因（遺伝子に支配されるもの）および外因的要因（外部からの刺激・情報により分化方向が規定されるもの）に分けて考えるのは当然であるが、脳神経系では他の組織の発生とは異なり特徴的なことがある。それは多様性である。一言に神経細胞と言っても顆粒細胞、錐体細胞などいろいろな形態の細胞があるし、大脳皮質の錐体細胞はどの領野の細胞かによりその機能が異なる。また、神経伝達物質の種類も様々である。大げさに言えば、神経細胞は一つ一つが個性を持っており、そのそれぞれについて発

生・分化様式を研究しなければならない程である。また、均一であると考えられてきたグリア細胞（アストロサイト、オリゴデンドロサイト）にも性質の異なる集団が数多く存在することも明らかとなってきた。そのため、他の多くの細胞種や組織の分化研究とは異なり、細胞株や脳細胞の分散培養系を用いた研究ではその本質に迫るには限界がある。われわれは *in vitro* で得られた結果を絶えず *in vivo* に戻して解析するだけでなく、神経系の細胞系譜の解析をも精力的に行っている。

脳神経系への遺伝子導入系として開発した高力価レトロウイルスベクターは癌の遺伝子治療に最適なベクターであるので、グリオーマや肺癌をターゲットとした応用を考えた研究を進めており、臨床応用も間もなくスタートできそうである。また、癌治療の新たなターゲット分子も見いだしたので、その応用も検討中である。

ヒト血清糖蛋白質糖鎖の解析により肺癌患者で有意に上昇している糖鎖を発見し、臨床検査の有用性も検討している。

小脳顆粒細胞の発達過程における電位依存性 K^+ チャンネルの発現と役割

中平健祐，柴田理一，柴崎貢志，池中一裕

Kv4.2 遺伝子は小脳顆粒細胞の最終分裂後に発現し、樹状突起とシナプス後膜に分布することで入力情報のプロセッシングに関わっていると考えられている。小脳顆粒細胞の培養系では、細胞の形態的な成熟に伴い Kv4.2 の発現が観察されるが、発現した Kv4.2 蛋白質は細胞体にとどまる。この細胞を橋核細胞と共培養すると、両者の間にシナプスが形成され、顆粒細胞において Kv4.2 の樹状突起及びシナプスへの局在が観察された。このシナプ

スへの局在は APV と CNQX により阻害され、また、シナプス前膜側の放出を抑制する試薬により阻害された。また、顆粒細胞のみの培養系においても Glu の添加により Kv4.2 の樹状突起への局在が観察され、この応答は NMDA 受容体と AMPA 受容体を介していた。以上の結果は、シナプス形成期における Kv4.2 の局在が神経活動依存的に制御されている可能性を示唆している。

オリゴデンドロサイト発生制御機構の解析

鹿川哲史, 和田圭樹, 中平英子, 清水健史, 池前一裕

脊椎動物中枢神経系は多様な細胞の協調によって高次神経機能発現を可能としている。これまでに神経細胞の多様性を生み出す機構の一つとして、モルフォジェンの濃度勾配が知られている。本年度、我々は背側からオリゴデンドロサイトの分化を抑制する活性を見いだした。グリア細胞であるオリゴデンドロサイトの前駆細胞も背腹両方からの因子による調節で腹側の限局した領域からのみ発生することが示唆された。このように、神経細胞に限らずグリア細胞も含めた神経系全体の多様性が少数のモルフォジェンによって作り出されていることを提唱した。

モルフォジェンなどによって幹細胞から多様に分化した神経系前駆細胞は適所に細胞移動することが必要であ

る。しかし、神経系前駆細胞は盛んに分裂するため、従来の細胞標識法では希釈され移動をトレースすることは困難であった。本年度、我々は生きた胎仔脳にプラスミド DNA を導入する子宮内エレクトロポレーション法を確立した。胎生 12 日ないしは 14 日目のマウスの側脳室にガラスピペットを用いてプラスミド DNA を注入後、子宮の外側からパルス電圧をかけることによってプラスミド DNA を脳室層の細胞に取り込ませた。さらに、胎仔を再び親マウスの体内に戻し発育させることに成功した。今後はエレクトロポレーション法にターゲティングマウスの手法を組み合わせた独自の恒久的細胞標識法を開発する。これらの新しい技術を用いて細胞移動経路を明らかにし、中枢神経系構築の過程を解明したい。

アストロサイト分化因子としてのシステインプロテアーゼインヒビター

岩崎靖乃, 長谷川明子, 池前一裕

アストロサイトの発生分化機構を探索する目的でそのマーカー蛋白質として知られている GFAP のプロモーターを指標としてファンクショナルクロニングを行った結果単離された Cystatin C (シスタチン C) が、アストロサイトの発生分化にどの様に関わっているかを昨年に引き続いて研究している。昨年までにグリア前駆細胞株を用いた解析によりシスタチン C の持つシステインプロテアーゼインヒビターの活性がアストロサイトの分化を促進することに関わっていることを報告したが、今年度は脳の初代培養系に対してもアストロサイトの分化を促

進するかについて検討を行った。また、シスタチン C は FGF-2 と協調し、神経幹細胞の生存維持を促進するとの報告があったことより、我々の見ているアストロサイトへの分化誘導活性が糖鎖修飾に依存しないものであることを示すため、鶏卵由来のシスタチン(糖鎖修飾のないシスタチン)を用いて解析している。更にシステインプロテアーゼインヒビターの活性に依存した現象であることを示す目的で、システインプロテアーゼインヒビターの活性測定系を確立した。

脳内 N-結合型糖蛋白質糖鎖の機能解明

池田武史, 伊藤磯子, 池前一裕

我々のグループはこれまで N-結合型糖蛋白質糖鎖の系統だった解析法を自動化することに成功し、その発現パターン解析と機能解明を行ってきた。当研究室では主に

脳内に発現する糖鎖に注目し、研究を進めている。脳内の糖鎖発現パターンは時期・領域を限定すると固体差なく常に一定であることから、脳の機能を維持するために

はその厳密な制御が必要であると考えられる。

まず正常マウス脳内の糖鎖発現パターンを検討し、主要糖鎖構造の決定を行った。その情報をもとにヒトの各種神経疾患における糖鎖発現パターンの解析を行い、病態との関連について検討を行っている。

また脳特異的に発現している BA-1, BA-2 と呼ばれる糖鎖の生理機能を解明する目的で、その生合成に関与するガラクトース転移酵素 I を過剰発現させたトランスジェニックマウスを作製し、その解析を行っている。

腫瘍特異抗原 MAGE-E1 のゲノム構造及び機能解析

河野洋三, 中平健祐, 片倉浩理, 池田一裕

我々は、以前 Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) 法を用いて悪性グリオーマに高発現する腫瘍特異抗原 MAGE-E1 をクローニングした。その後 Human BAC clone を用いたゲノム構造解析にて、その構造は MAGE-D に酷似しており、遺伝子座に於いても Xp11 と同一であることを見出した。またそのプロモーター領域のシーケンス解析にて AML-1a や GATA-1 など血球系の分化や形質転換に関与する転写因子結合部位の存在が考えられた。後に白血球における MAGE-E1 の発現が RT-PCR 法にて確認された。

MAGE-E1 に高い相同性を持つ MAGE-D はその機能の一部が報告されている。NRAGE (neurotrophin receptor-interacting MAGE homolog) は MAGE-D の別称であるが、

神経細胞において TrkA と拮抗的に働き、p75NTR (neurotrophin receptor) を介した細胞死を促進する。また IAP (inhibitor of apoptosis protein) と結合しその機能阻害により細胞死を促進すると報告されている。我々は、MAGE-E1 に関しても同様に細胞死や細胞周期調節へ関与していると仮定し、強制発現系やアンチセンスオリゴを用いた発現抑制系を用いた機能解析を行っている。また MAGE-E1 抗体を作成し、悪性腫瘍切除標本を用いた免疫染色や上記 in vitro の系での細胞群における Western blot による蛋白発現量の確認を行っている。MAGE-E1 の細胞死や細胞周期調節への関与を明らかにすることにて、癌治療の臨床において診断に、更に遺伝子治療の分子標的として応用できるものと考えている。

有髄軸索上のイオンチャネルクラスターリング機構の解析

石橋智子, 中平健祐, 池田一裕

有髄神経軸索ではミエリン形成に伴い、軸索上に均一に存在していた電位依存性 Na⁺ および K⁺ チャネルがそれぞれランヴィエ絞輪周辺に特徴的に集積する。この局在化には軸索とミエリンが接する部位 (paranode) における junction 形成が重要であることが分かった。そこで、この junction 形成に関与しているミエリン側分子を明らかにするために、様々なミエリン遺伝子欠損マウスを解析した。その結果、ミエリンの主要脂質の一つであるス

ルファチド、ミエリン最外層に存在する膜蛋白 CD9 のそれぞれ欠損マウスでは、ともにチャネル局在化部位が異常であること、また明らかな junction 形成不全があることを見出した。さらに CD9 は paranode にも局在していることが分かった。したがってスルファチドおよび CD9 が paranodal junction 形成に関与している重要なミエリン側分子であることが明らかになった。

液性情報研究部門

【概要】

液性情報部門では分子生物学的手法と電気生理学的手法を組み合わせ、神経系の情報伝達に大きな役割を果たすイオンチャネルの機能解析とイオンチャネルを通して細胞質内に流入し種々の生理的役割を果たすカルシウムイオンの動態について研究を行っている。今年度も受容体活性化カルシウム透過型チャネルの生物物理的な解析を引き続き行った。また従来研究を行ってきた電位依存性カルシウムチャネルが多く神経疾患に関与している

ことが明らかとなっており、われわれもこの課題に積極的に取り組んだ。rolling Nagoya 小脳失調症マウスはよく知られている遺伝性失調症マウスであるが、本マウスの遺伝子異常を明らかにし、その異常が P/Q 型カルシウムチャネルに対する影響、さらには小脳の神経回路に及ぼす影響を系統的に検討した。

若森 実助手が 3 月 1 日付けで鹿児島大学医学部に助教授として転出した。

受容体活性化 Ca^{2+} 透過性カチオンチャネルの機能解析

若森実, 山田久信, 原雄二, 森泰生

神経伝達物質受容体の刺激にともない、従来知られているイオンチャネル以外に、カルシウムを通すイオンチャネルが活性化されることが、電気生理学の実験より知られていたが、このイオンコンダクタンスを担う分子の実体は不明であった。この種類のチャネルは、進化的にも古くまた非常に多様であり、神経細胞の活動のみならず、いろいろな細胞の活性調節に関与していると考えられてきた。TRP チャネルは受容体活性化型カルシウム透過性チャネルの分子の実体のひとつであり、TRP1-7 のクローニングがわれわれのグループを含めていくつかの研究

室で行われた。

これまでに TRP5 を HEK 細胞に発現させ、ATP, thapsigargin などによるチャネル活性を検討し、TRP5 は従来言われていたカルシウムストア枯渇とは異なる機構によって活性化されることが明らかにしてきた。今年度は、TRP5 チャネルの単一チャンネル記録を行い、チャネルの透過性と開口の電位依存性に関する検討を行った。またイオン透過性に関する詳細な測定とチャネル孔の性質の解析も行い、チャネル孔の大きさ・静電的性質などの推定を行った。

カルシウムチャネル変異マウスの解析

森泰生, 若森実, 松下かおり, Kadrul Huda, 井本敬二

脳には複数の種類の電位依存性カルシウム」チャネルが共存しているが、P/Q タイプは N タイプとともに神経伝達物質放出やカルシウム」スパイク生成にかかわる脳の主要なカルシウム」チャネルであり、小脳で多く発現している。P/Q タイプカルシウムチャネルの変異は、マウスにおいて小脳変性症を来することが報告されている。小脳失調症マウス小脳プルキンエ細胞を急性単離しパッチクランプ法によりカルシウムチャネル電流の特性を検討した結果、失調症マウスのプルキンエ細胞では電流密

度が低下していること、またチャネル開閉のキネティクスが変化しており、その変化を組換え発現系によって再現できることから、カルシウムチャネル $\alpha 1$ サブユニット遺伝子の変異が直接的に失調症マウスの表現形を関係していることが明らかとなった

rolling ナゴヤは、名古屋大学織田先生により発見された小脳失調症マウスであり、これまでに小脳変性症治療薬の検定などに使用されてきたマウスである。遺伝学的解析により遺伝子座は tg と同じで P/Q 型カルシウムチャ

ネルα1A サブユニット遺伝子にあることが知られていたが、変異の正確な部位は知られていなかった。われわれは塩基配列を決定し、変異が電位センサー部位のアルギニンをグリシンに置換することを見出した。Hodgkin-Huxley モデルで予測されるとおり、本変異を持つカルシウムチャンネルは、組換え発現系でも急性分離したプルキンエ細胞においても、活性化の電位依存性が減弱していた。この変異のためにプルキンエ細胞の発火パターンが異常をきたしていた。正常プルキンエ細胞では刺激の強さに応じて頻度が増加するように活動電位を発生することが出来るが、変異細胞では強い入力刺激に対しては活動電位

を発生しないことが示された。変異マウスのプルキンエ細胞は、低頻度の入力に対しては正常に出力できるが、高頻度の入力には対応できないことを示唆している。

tg は小脳失調症のみならず小発作様のてんかん発作を起こすことが知られている。このてんかんの病態を明らかにするために、大脳皮質と視床が含まれる脳スライス標本を用いて視床と大脳皮質の間の神経伝達を検討した。視床から大脳皮質への興奮性の入力ほぼ正常に保たれているが、抑制性の入力著減しているという結果が得られたため、現在その現弱の原因がどの部位にあるかを検索中である。

興奮収縮連関のメカニズムの解析およびカルシウムプローブの開発

中井淳一

カルシウムイオンは細胞内のセカンドメッセンジャーとしてシグナル伝達の一翼を担っている。骨格筋の興奮収縮連関においては、細胞膜の脱分極は細胞膜の電位依存性カルシウムチャンネル (α1s) DHPR を介して小胞体膜上のリアノジン受容体(カルシウム放出チャンネル)RYR に伝えられ、小胞体からカルシウムが放出されることによって筋肉の収縮が誘発される。これら2つの分子は骨格筋においては直接結合していると想像されており、これまでの我々の研究からこれらの間にはDHPRからRYRへの正方向のシグナルとRYRからDHPRへの逆方向のシグナルが存在することが明らかとなっている。筋肉の興奮収縮連関の分子機構をさらに明らかにするため、正方向のシグナルは受け取れないが、逆方向のシグナルを発生することができるRYRのミュータント(R9)を作成

し、RYR1を人工的に破壊した dyepedic muscle cell に発現させ、freeze-fracture 法を用いて電子顕微鏡的に2つの分子の結合状態を観察した。その結果DHPRのtetrad構造が観察できた。tetrad構造は骨格筋に特徴的に認められる構造で、DHPRとRYRの直接的な結合がない心筋ではこのようなtetrad構造はみられない。したがってR9に含まれる逆方向シグナルを構成するために必要なRYR1のアミノ酸領域2659-3720がDHPRとRYRの物理的結合に寄与していることが明らかとなった。またこの実験とは別に、細胞内のカルシウムイオン濃度の変動をin vivoで観察することを目指してGFPとカルシウム結合蛋白質であるカルモジュリンを用いた蛍光カルシウムプローブの開発に着手した。

電位依存性 Na⁺チャンネルに対する DHEAS の効果

森誠之, 井本敬二

栗原照幸 (東邦大学医学部)

血中に生理的に存在するステロイドホルモンである Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) は、骨格筋ナトリウムチャンネルを直接的にブロックする。しかしその作用機序は、ミオトニアに使用される mexiletine の作用機

序とは異なることが示唆されている。このため本研究では、DHEAS と mexiletine のナトリウムチャンネルに対する作用の比較検討を行った。

ナトリウムチャンネル分子は、静止膜電位にある状態、

活性化してチャンネルが開いた状態、不活性化した状態、そしてその他のいくつかのコンフォメーションをとる事が知られている。mexiletine や lidocaine などの局所麻酔剤の場合、不活性化した状態に比較的选择性があるとされているのに対して、DHEAS は不活性化したチャンネルには選択的ブロックを示さないことが示された。また

短時間脱分極させたチャンネルには著明なブロッキングを示したことから、DHEAS が脱分極状態にあるナトリウムチャンネルを認識しブロックすることが推測された。しかしながら、このように短時間にブロック作用起こすには比較的高濃度の DHEAS が必要であり、臨床応用上の問題点である。

高次神経機構研究部門

【概要】

本研究部門ではヒトが含まれる哺乳動物の脳機能がどのような分子メカニズムにより形成、制御されているかを解明する目的で、神経回路網形成、再編成に関する分子を探索するとともに、関連遺伝子を欠損させたマウスを作製することにより解析を行っている。特に Fyn 欠損マウスでは、哺乳行動を含めた行動異常が認められたことより、Fyn の介する情報伝達系に注目している。最近我々は Fyn 結合タンパク質の解析より新規カドヘリンである

CNR ファミリーの単離に成功した。この CNR ファミリーはシナプスに存在する多様化分子であり、ゲノム構造が免疫系での記憶に関する免疫グロブリンの遺伝子クラスターと類似していることが明かとなった。この CNR ファミリーの解析により、脳形成や機能発現の系統進化及び個体発達での多様化機構も明らかになるのではないかと考えている。

CNR ファミリー多重欠損マウスの作製

先崎浩次, 八木 健

CNR ファミリーが Reelin の多重受容体としてマウス大脳皮質層構造形成機構に関与していることが示唆されている。マウス大脳皮質形成機構における CNR ファミリーの分子機能を生体マウスで明らかにすることを目的として CNR 多重欠損マウスの作製を行っている。マウス CNR 遺伝子のゲノム構造解析からマウス CNR は細胞外領域と膜貫通領域及び細胞内領域の一部を含む約 2.5kb の大きな第 1 エクソンと各 CNR に共通に用いられる細

胞内領域 C 末端側部分が 3 つの小さなエクソンとして存在しスプライシングにより CNR 全体がつくられることが明らかにされた。また、CNR 第 1 エクソンはマウスゲノム上に並んで存在しており、この CNR ゲノム構造上の 2 カ所に loxP 配列を導入し Cre-loxP 系により第 1 エクソンを欠損させることにより CNR 多重欠損マウスの作製を行っている。

CNR ファミリーの細胞接着活性に関する解析

武藤哲司, 八木 健

CNR ファミリーはカドヘリンスーパーファミリーに属し、細胞接着活性を有すると考えられる。CNR はマウス生体内においてシナプス膜に存在する。ところが他のカ

ドヘリンファミリーで接着活性測定のために用いられている細胞株に CNR を強制発現すると細胞内膜系に CNR 蛋白質が凝集してしまう。種々の細胞株での CNR 蛋白

質の局在を解析した結果、細胞形質膜に CNR 蛋白質の局在が認められる細胞株を見いだした。この細胞株を用いて CNR の細胞接着活性の測定系の開発を行った。この CNR 細胞接着活性の測定の過程で CNR と結合する膜

分子の存在が見いだされた。現在、この膜分子と CNR との接着性についての解析を進め、CNR の接着分子としての機能解析を行っている。

CNR mRNA の体細胞変異の解析

平山晃斉, 八木 健

CNR のゲノム構造は免疫系での記憶に関する免疫グロブリンや T 細胞受容体の遺伝子クラスターと類似していることが明かにされている。CNR 遺伝子において免疫グロブリンや T 細胞受容体遺伝子に認められる体細胞変異がみられるかについて解析を行った。その結果, CNR mRNA においてアミノ酸置換のおこる CNR 塩基配列変化が認められ、さらに、この塩基配列の変化がマウス発生・発達過程において細胞外領域ドメイン構造により異なるこ

とが見いだされた。特に出生前と後での変化が大きく、CNR の Reelin 結合部位近傍での変化に差が認められ、この結果は Reelin 受容体としての CNR の機能との関連性で大変興味深い現象である。この突然変異のゲノム上での解析を行うとともに、発生・発達過程での CNR の構造変化と機能との関係を明らかにするべく CNR の機能解析を進めている。

ゼブラフィッシュ CNR ゲノム構造の解析

多田基紀, 八木 健

マウスにおいて CNR は Reelin の受容体とし機能し大脳皮質構造形成に関与していることが示唆されているが、マウスと脳構造の異なる脊椎動物であるゼブラフィッシュにおける CNR 遺伝子の全体像を明らかにするためにゼブラフィッシュ CNR ゲノム構造の解析を行った。ゼブラフィッシュゲノム BAC ライブラリーより CNR 遺伝子配列を含む BAC クローンの単離を行い、ショットガンシークエンス法により塩基配列を決定した。マウス CNR ゲノム構造と比較解析の結果、ゼブラフィッシュ CNR ゲノム領域はマウス CNR ゲノム領域の約 3 分の 1 の長

さであったが、CNR 遺伝子の数はマウスとほぼ同数の 13 であった。しかし、マウス CNR ゲノム構造上において共通領域エクソンに最も近位に存在し、他の CNR と比べホモロジーが比較的低い 2 つの CNR (mCNRc1, mCNRc2) がゼブラフィッシュでは 1 つ (zCNRc) しかないことが明かにされた。また、ゼブラフィッシュ CNR は Fyn 結合部位が保存されていたが、Reelin 結合領域の配列は異なっていることが示された。現在、ゼブラフィッシュ CNR の分子機能解析を進めている。

マウス嗅球での周波数帯によって分離される独立な 2 つの経路

田仲祐介, 八木 健

遺伝子と行動との関係を明らかにするために、マウスはターゲティングなどの遺伝的・分子生物学的な手法

を用いて、個体レベルでの表現型としての行動異常の解析が可能である。しかし、行動を制御しているのは中枢

神経であり、処理を行うのはそこでの神経回路網である。この観点から、In vivo でのマウス中枢神経系からの神経活動の記録・解析系を確立させた。この過程の中で、マウス嗅球にて低濃度刺激によって誘発される神経活動 (LFP) を見いだした。この活動は、従来に報告されている嗅覚性誘発活動（誘起波）より低い周波数帯 (7-14Hz) にピークが見られる。さらに垂直多点電極を用いて、こ

の活動が糸球体層と僧帽細胞層の間に由来することを見いだした。また、この低周波活動中でのスパイクの有意な増大は見られなかったが相関を示した。これらの結果は、嗅球において周波数帯によって分離される独立な 2 つの経路が存在することを示し、低周波発振器 (Low Frequency Oscillator) として中枢神経系において機能していることが示唆される。

マウスにおける新規 CNR ファミリーの単離と分子機能の解析

竹井 豊, 八木 健

CNR ファミリー遺伝子は可変領域と定常領域から構成されている。ゲノム上では 5' 側に 15 種類の可変領域がタンデムに並んでおり、3' 側では三個のエクソンに分かれた定常領域が存在する構造を有している。新規 CNRc1 及び CNRc2 の可変領域はゲノム上で定常状態に最も近接した場所に位置する。また、CNRc1 及び CNRc2 分子のアミノ酸一次配列はカドヘリン配列及び CNR 定常領域を完全に保持しているが、細胞外領域は他の CNR に対して、ホモロジーの低い分子だった。CNR が Reelin と結

合する際に、CNREC1 ドメイン中の RGD 配列を含む Reelin Binding Domain (RBD) が重要であることが明らかになっているが、新規 CNRc1 及び CNRc2 の EC1 ドメイン中には RGD 配列が含まれておらず、更に新規 CNRc1 及び CNRc2 の EC1 ドメインを Reelin を免疫沈降しないことが明らかとなった。現在、CNRc1 及び CNRc2 に対する特異抗体の作製、CNRc1 及び CNRc2 の機能解析を in vivo で行うため、遺伝子改変マウスの作製を進めている。。

情報記憶研究部門

【概要】

神経細胞移植による脳機能の再建というテーマで研究を行った。神経幹細胞は、FGF 存在下の無血清培地中で無限に増殖するので、大量に調整することが出来、有力なドナー細胞候補である。胎仔ラットの中脳腹側部から得た神経幹細胞を、FGF 存在下で増殖させ、片側パーキンソン病モデルラットの両側の線条体に移植すると、正常側の線条体より、ドーパミン入力を欠如した側の線条体で、より強く TH 陽性ニューロンへ分化した。これは、ドーパミン入力を欠如した線条体の環境が、中脳神経幹細胞をドーパミンニューロンへ分化・生着させるのに適

していることを示している。この作用物質候補として、IL-1, FGF, GDNF, グリア由来因子等が想定され、現在、細胞培養, ELISA, Blotting, DNA microarray, SAGE 等で解析中である。一方、3-ニトロプロピオン酸投与によるハンチントン病モデル動物とコラゼナーゼ注入による線条体出血モデル動物の開発、その病態及び発症機序を解析した。また、脳梗塞モデル動物の病態とグリア及びニューロン死に対するメラトニンの保護作用を明らかにした。

生体調節研究系

高次神経性調節研究部門

【概要】

高次神経性調節部門は視知覚および視覚認知の神経機構を研究対象としている。我々の視覚神経系は複雑な並列分散システムである。そこでは数多くの脳部位が異なる役割を果たしつつ、全体として統一のとれた視知覚を生じる精巧な仕組みがあると考えられる。また網膜に映る外界の像は二次元であるにもかかわらず、その三次元的な構造を正しく理解するための仕組みもそなわっている。視知覚におけるこれらの問題を解明するために、主に大

脳皮質視覚野ニューロンの刺激選択性や、異なる種類の刺激への反応の分布を調べている。具体的な課題として（１）初期視覚野における奥行き手掛かりの表現、（２）視覚野における陰影テクスチャの表現、（３）選択的注意による視覚野ニューロン活動の変容、（４）ネコ初期視覚野において一様な面の表現に特化した領域があるかどうか、（５）二色性のサルの特異点の同定、などに関する研究を行った。

初期視覚系における面の表現—光計測による解析

谷 利樹, 横井 功, 伊藤 南, 小松 英彦, 田中 繁 (理研)

初期視覚系のニューロンは線や境界部分に選択的に反応し、輪郭線の表現に関係すると考えられている。近年、面の明るさに選択的に反応するニューロンも存在することが報告されている。我々は面情報解析の神経メカニズムを探ることを目的として、面刺激に特異的に反応する領域がネコの初期視覚系に存在するかどうかを内因性信号による光計測により調べた。ディスプレイの画面を一枚の面と考え、その輝度を矩形波状に交互に反転させた。その結果 18 野に面の輝度反転により活動する領域が 17

野と 18 野の境界に沿うようにいくつかに分かれて存在することが分かった。18 野は 17 野と同様に線または縞刺激の傾き（方位）に対して選択的な反応を示す。その選択性の分布と比較すると、面の輝度反転に反応する領域が方位選択性地図の特異点とよく重なることが明らかになった。この結果は面の表現の情報処理が初期視覚系に存在し、かつ輪郭線の処理と何らかの関係を持つことを示唆する。

初期視覚系における奥行き知覚の解析—単眼性の手掛かりと両眼視差の相互作用

伊藤 南, 小松 英彦

物体の三次元的な構造を知覚する際に必要となる奥行きの情報は、両眼視差以外にも輪郭の形状や遮蔽等の単眼性手掛かりによっても得られる。輪郭線の折れ曲がりや分岐はこうした手掛かりを与える重要な刺激要素であるが、従来の初期視覚系研究においては線や縞刺激の傾きに対する選択性が重視されてきた。我々はサルを訓練

して、注視課題遂行中のサルの第一次視覚野および第二次視覚野から細胞外記録を行った。輪郭線の折れ曲がりや接合パターンを受容野の中心に呈示して神経細胞の反応を調べたところ、第一次視覚野の神経細胞は最適方位の直線に対してのみ強い反応を示したが、第二次視覚野の神経細胞は輪郭線の折れ曲がりや分岐に対して緩やか

な反応選択性を示すことを見出した。また、ある特定の角度の折れ曲がりに対して強い抑制を示すものが存在することを見出した。このことは第二次視覚野が輪郭線の

折れ曲がりや分岐を検出する最初のステップであることを示唆する。

多次元視覚探索課題を遂行中のサル V 4 野のニューロン活動

小川正, 小松英彦

色や形などの特定の特徴次元に選択的に注意を向けているときに前頭連合野などから視覚連合野に及ぼされるトップダウン的な作用を調べるため、新たに考案した視覚探索課題を 2 頭のサルに訓練させ、課題に習熟した 1 頭の V 4 野からニューロン活動を記録することを開始した。課題では 2 種類の色と形から成る刺激が 6 個呈示され、その中に色、または形次元で目立つ刺激が 1 つずつ存在し（例えば、1 つの■、1 つの○、4 つの□）、サル

は教示条件に応じて、色（または形）次元で目立つ刺激に向かってサッカードを行わなければならない。目標刺激の色と形は試行ごとに変化するため、特定の色と形の刺激を探す方法では正しく目標を選択することはできない。少数ではあるが視覚応答特性のある V 4 野のニューロン活動を解析した結果、受容野に同じ色と形の刺激が呈示された場合でも、それが目標刺激となる場合は妨害刺激である場合よりも活動が増強される細胞があった。

マカクザル V 4 野における陰影からなるテクスチャの表現

花澤明俊, 小松英彦

石や木などの物体表面がもつ細かい凹凸によって生じるテクスチャは、その表面の材質や摩擦についての重要な情報源であり、マカクザルの V 4 野にはそのようなテクスチャー要素の大きさや密度などの特徴に選択性をもつニューロンが多く見い出される。このようなテクスチャは凹凸によって生じる陰影により作られるので、照明の方向により、テクスチャー要素の輝度勾配の方向は変化

する。テクスチャー刺激に選択的に反応するニューロンにおいて、要素の輝度勾配の方向に対する選択性を調べたところ、単一の方向にのみ選択的に反応する細胞が見い出された。これらの細胞が最も強く反応した輝度方向は水平から 90 度または 270 度、つまり上下方向に優位に多く分布していた。このような特性はヒトの陰影からの構造復元に見られる方位の不均一性とよく一致する。

網膜電図 (ERG) による二色性マカクザルの波長感度特性の測定

花澤明俊, 小松英彦

三上章允, 竹中修, 後藤俊二, 加藤啓一郎, 近藤彩 (京大霊長研)

小池智 (都神経研) 大西暁士 (京大理), 山森哲雄 (基生研)

Puti Sulisty Angelika, Bambang Suryobroto, Achmad Farajallah (ボゴール農大)

分子遺伝学的手法により、網膜の長波長感受性(L)色素をコードする遺伝子を欠損した 2 色型の遺伝子型を持つカニクイザルがインドネシアで発見された。網膜電図

(ERG) によって網膜の赤色光と緑色光に対する相対的感度をフリッカーフォトメトリーにより測定し、2 色型と 3 色型の個体を比較することによって、2 色型の遺伝

子型を持つ個体がその表現型においても2色型、つまり網膜のL錐体を欠損しているか否かを調べた。麻酔下の個体の片眼を525nm(緑色)および644nm(赤色)の発光ダイオード光による30Hzの逆位相フリッカーによって刺激した。各色光の輝度を変化させ、ERG応答の最も小さ

くなる輝度比からERG応答に対する刺激の実効強度を求め、相対感度とした。2色型の遺伝子型を持つ個体の赤色光に対する感度は3色型の4分の1であり、長波光に対する感度が非常に低いことがわかった。

生体システム研究部門

【概要】

生体システム研究部門では、歩行運動の高次制御にかかわる中枢神経機序の解明を目的として多角度からの研究を進めてきた。無拘束な幼若サルを用いた研究においては、直立二足歩行能力の学習獲得機序を、約2年間にわたって運動力学的観点から詳細に解析し、直立姿勢の獲得が二足歩行の実行に必須な要因であることを明らかにした。またその能力を獲得した成サルにおいてはPET法を用いて、グルコースの代謝亢進部位を同定した。そして得られた成績を同一サルの四足歩行時に得られた成績と比較し、直立二足歩行時にその活動を特異的に増強する大脳および小脳領域を同定することができた。そして歩行パターンとの対応において複数の領域がその活動

パターンを変化することを見い出した。ネコを用いた研究においては四足歩行運動の発動にかかわる小脳歩行誘発野に注目し、この部位の選択的微小破壊によって誘発される姿勢・歩行の変化を解析した。得られた研究成績は小脳歩行誘発野が数多くの運動分節の動きを時間的・空間的に協調する際に重要な役割を果たしていることを示唆した。その一方では小脳歩行誘発野の基本的構成要素である室頂核に注目し、室頂核視床路の微細投射様式を組織学的に解析した。この上行路は室頂核から始まる下行路とは異なり、終末ブートを視床核内にブドウの房状に分布した。室頂核は歩行運動発動信号の efference copy を大脳皮質に伝達していることが推定できた。

サル視覚誘導性上肢到達運動における一次運動野神経細胞の情報表現

宮下英三

視覚情報をもとにして手の運動命令を生成する脳内機構を解明するための第一歩として、サル一次運動野神経細胞の発火活動が何を表現しているのかを解明するために手の運動パラメータとの時間相関性を解析した。

二関節マニピュランダムスのハンドルを操作することにより、コンピュータ画面上にハンドルの位置として提示されたカーソルを同一画面上に提示される視標に1.0秒以内に到達させることを一頭のサルに習得させた。この

課題遂行中の神経細胞の発火頻度を、手の加速度・速度・位置の線形和として近似すべく線形重回帰解析を行った。肘関節あるいは肩関節の受動的な動きに応答する161個のユニットのうち118個のユニットの発火頻度が手の運動パラメータの線形和として近似できた。

この結果は、一次運動野神経細胞の発火頻度が手の運動パラメータあるいは手の動力学パラメータを表現している可能性を示唆しており、さらに解析を進めている。

歩行運動により賦活される脳領域の同定：サル直立二足歩行モデルを用いた糖代謝PETによる研究

森 大志, 中階克己, 橘 篤導, 高須千慈子, 達本 徹, 塚田秀夫 (浜松ホトニクス㈱), 森 茂美

報酬条件付け運動学習によりニホンサル (*M. fuscata*) は二足歩行能力を獲得する。本研究ではこの動物モデルを用い、糖代謝 PET 法によりサル高次脳内で二足および四足歩行運動の実行に伴って賦活される脳領域の同定を試みた。トレッドミル上での歩行運動をすでに学習したサルに $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ (fluoro-deoxyglucose)を投与し、トレッドミル上での二足・四足歩行運動課題を実行させた。チェア上での座位の維持を対照課題とした。歩行運動・対照

課題の実行後に糖代謝測定を行い、それぞれの歩行運動課題と対照課題とを比較して糖代謝が亢進している脳領域を同定した。二足・四足歩行課題ともに対照課題に比べ、小脳・大脳皮質視覚関連領域・運動野に優位な糖代謝の亢進が観察された。これらの結果から複数の運動分節の機能統合を要する歩行運動は高次脳内の様々な要素的神経制御機構を動員して実行されていることが示唆された。

大脳皮質運動野-体幹・下肢筋群へのシグナル伝達様式：経頭蓋磁気刺激法を用いた研究

森 大志, 中隋克己, 高須千慈子, 森 茂美

ニホンサル (*M. fuscata*) は報酬条件付け運動学習により二足歩行能力を獲得する。本研究ではこの動物モデルを対象として、大脳皮質運動野から脊髄への下行性シグナルがどのように歩行運動実行器官である体幹・下肢筋群へ伝達されるかを経頭蓋磁気刺激法を用いて非侵襲的に検討した。ケタミン麻酔下でサル頭部（一次運動野）に磁気刺激を加え、刺激により導出される下肢筋活動を記録した。刺激の局所化をはかる目的で本研究では独自

に開発した 8 の字コイルを用いた。得られた誘発筋電図を複数回加算平均し、応答潜時、振幅などの定量解析に用いた。得られた成績から二足歩行運動を学習したサルでは近位筋に対しより早い伝導速度でシグナルを伝達していることが明らかとなった。ヒトを対照とした研究でも同様な結果が観察されることから、サル歩行モデルはヒトと類似した大脳皮質から脊髄への下行性伝導経路を確立していると推察される。

若齢期ニホンサルの身体成長に伴う直立二足歩行運動の獲得機序

橘 篤導, 森 大志, 高須千慈子, 中隋克己, 森 将浩, 森 茂美

本研究では若齢ニホンサル(*M.fuscata*)が報酬条件付け運動学習を行うと流れベルト上で直立二足歩行運動能力をどのように獲得するのか検討を行った。サルの身体成長と対応させ 425-882 日の縦断的な運動力学的解析を行った結果、4 相の学習期が観察された。第 1 にサルは立ち・歩くが体幹と下肢の運動分節の協調ができない準備期（学習期間 1-24 日）、第 2 に二足歩行時における体幹および下肢の運動分節の協調を学習し始める学習初期

(19-78 日)、第 3 に下肢において大腿など近位部運動分節の協調は完成するが下腿と遠位部運動分節の協調はまだ完成していない学習中期 (64-214 日)、第 4 に遠・近位部ともに運動分節の機能的協調が完成し安定した歩行ができる学習後期 (194 日～) が示された。この過程でサルは二足歩行に関わる多運動分節の独立した動きを時間的・空間的に機能統合する中枢神経機序を獲得したことが示唆された。

ネコ小脳歩行誘発野の微小破壊と歩行運動時における運動分節の協調障害

中隋克己, 森 大志, 森 将浩, 森 茂美

左右の小脳室頂核からは同側性および交叉性の室頂核遠心路が始まる。この交叉性遠心性線維は小脳白質正中部で交叉して鉤状束を形成する。鉤状束は室頂核網様体路、室頂核前庭路、室頂核上丘網様体路、室頂核脊髓路と室頂核視床路を含む。除脳ネコにおいてこの鉤状束の正中部（小脳歩行誘発野 cerebellar locomotor region, CLR）を連続微小電気刺激すると流れベルト上で制御歩行が誘発できる。本研究では CLR の機能的意義を解明す

るため正常ネコの CLR を微小破壊した。その結果、ネコが体幹と頭部の位置を低くして注意深く歩くこと、前後肢の協調運動は阻害されることが、ネコが方向転換時にバランスを崩して転倒することが明らかとなった。以上の結果は姿勢および歩行運動の制御に際して室頂核からの交叉性遠心路を介した運動指令情報が頭頸部、体幹および四肢運動分節の動きを時間的、空間的に協調している可能性を示唆する。

ネコ室頂核-視床路終末線維の視床内分布と形態的特徴

奥村 哲, J. Czarkowska-Bauch (Department of Neurophysiology, Nencki Institute of Experimental Biology, Warsaw), 中隋克己, 森茂美

ネコを用いて室頂核-視床路終末線維の視床における分布様式と形態的特徴を解析し、室頂核-網様体路、同-前庭路終末線維の特徴と比較した。1側の室頂核に神経標識物質（BDA）を微小注入し、12日間後にネコを安楽死させ全脳標本を摘出した。この標本の前額断連続切片（50 μm ）を作成し、間脳および脳幹に存在する室頂核に起始する軸策線維を順行性に標識した。室頂核-視床路では軸策線維は両側に存在したが交叉性の投射が優位であり、

主として髄板内核群と腹側核群に分布していた。軸策線維は終末部付近で細かく分枝し、各枝には多数の膨大部（ ϕ : 1.5-2.5 μm ）がブドウの房様に集合して存在した。視床では各膨大部の神経細胞体に対する光顕的近接像（close apposition）は少なかったが、脳幹網様体および前庭神経核では多く膨大部が大型細胞の細胞体と樹状突起の起始部付近に close apposition を形成していた。

ラット腰髄に分布するアセチルコリンエステラーゼ陽性神経細胞の生後発達

奥村 哲, Arpad Dobolyi (Department of Physiology and Neurobiology, Eötvös Lorán University, Budapest, Hungary), 森大志, 森茂美

AChE 組織化学法を用いてラット腰髄の AChE 陽性細胞の生後発達様式を解析した。その結果 AChE 陽性細胞として運動神経細胞(MN)、交感神経細胞に加えて、灰白質中間質の内・外側に存在する2種類の partition neurons (PN)、中間質の中央に存在する大型細胞、後角第I層に存在する小型で扁平な細胞を同定した。それらの生後発達について検討したところ、PNは生後1~8日目から存在し、他の細胞に比べてAChEを強く発現していた。P

NはAChEを強く発現する樹状突起の枝を主として内外側方向に、一部を吻尾側方向に拡げており、MNプールの方向にのびる fiber も観察された。近年、中枢神経系においてAChEが trophic function を持つことが明らかにされてきた。我々の結果は、PNがMNなどの脊髄の神経細胞/回路の生後発達に関連して trophic な機能を持っている可能性を示唆する。

ラット線条体カルバコール刺激によって誘発される回旋運動と脳内 c-Fos 発現パターン

奥村 哲, Janos Palhalmi (Department of Physiology and Neurobiology, Eötvös Lorán University, Budapest, Hungary), Katalin Kekesi (Department of Physiology and Neurobiology, Eötvös Lorán University, Budapest, Hungary), 森 大志, 森 茂美

本研究では線条体コリン作動性介在神経細胞の働きを明らかにする目的でマイクロダイアリシスプローベを両側のラット線条体に埋め込み、右側をアセチルコリンのアゴニストであるカルバコール(10-50 mM)を溶解した生理的人工脳脊髄液で持続的に灌流した。灌流開始から約 30 分後からラットは全身の抗重力筋活動を著しく増強するとともに、刺激側（右側）と反対方向（左側）への回転運動（4～6 回/min）を始めた。線条体のカルバコー

ル灌流開始から 30 分, 60 分, 90 分後にラットを安楽死させ全脳標本を速やかに摘出した。これらの標本から神経細胞活動の程度を反映と考えられている c-fos タンパクの発現様式を全脳の前額断切片（厚さ 50 μ m）上で定量的に解析した。その結果、刺激側（右側）の感覚-運動皮質を含む広範な皮質領域、線条体、淡蒼球、および視床で強い c-fos タンパクの発現を確認した。

ネコ線条体の出力細胞、介在神経細胞両者に対するセロトニン神経支配様式

奥村 哲, Arpad Dobolyi (Department of Physiology and Neurobiology, Eötvös Lorán University, Budapest, Hungary), 松山清治 (札幌医科大学第 2 生理学), 森大志, 森茂美

本研究は、ネコ線条体の出力細胞に対する 5-HT 神経支配様式を明らかにすることを目的した。そのため神経標識物質（BDA）を線条体出力細胞の主たる投射先である淡蒼球、黒質網様部、脚内核にそれぞれ微小注入し出力細胞を逆行性に標識・同定し、さらに 5-HT 線維を 2 重に標識した。出力細胞は 4～6 本の樹状突起をもつ中型で有棘の細胞であった。出力細胞は多くの 5-HT 線維に囲まれており、両者間に多くの光顕的近接像 (close

apposition) を観察した。close apposition は主に出力細胞の樹状突起に観察され、20～30%はその近位に、60～70%は遠位に存在した。この分布の特徴には出力先による差は認められなかった。昨年度までの研究成果と併せて考えると、線条体ではセロトニンは出力細胞、介在神経細胞の両者を神経支配し、大脳基底核全体の正常機能の維持に貢献していると考えられる。

高次液性調節研究部門

【概要】

我々は視覚性認知記憶の大脳メカニズムについて研究を行っている。記憶対象の脳内表現は大脳側頭葉連合野に貯えられ、側頭葉連合野への各々の入力経路が記憶形

成、想起の過程において独自の機能を果たしているとの作業仮説の検証を行っている。

対連合記憶課題遂行中のサル 36 野と TE 野における記憶関連細胞の空間分布

Naya Y, Yoshida M, Ito A, Shibata S, Miyashita Y

In our previous studies, neurons in area 36 (A36) and area TE showed stimulus-selective responses that provided mnemonic linkage between different stimuli during the pair-association task. In this study, we examined the spatial distribution of these neurons within A36 and TE. We recorded neuronal responses from both areas in three macaque monkeys (three hemispheres) and isolated 406 neurons (A36, 100; TE, 306) that showed stimulus-selective responses ($P < 0.01$). After the recording session, we histologically reconstructed the positions of the recorded neurons and projected them to layer IV. The projected positions were plotted on a two-dimensional

unfolded map. We found that the stimulus-selective neurons tended to aggregate into several clusters on the map. We observed a single cluster in A36 and two to four clusters in TE for each map. To characterize mnemonic role of these clusters, we defined the pair-coding index (PCI) for each stimulus-selective neuron and quantified the single-cell code of linkage between the paired stimuli. The PCI values for the neurons in the A36 clusters were significantly greater ($P < 0.05$) than those in the TE clusters that showed the highest PCI values of all the TE clusters in the individual maps.

ニホンザル下部側頭皮質 TEav 野-36 野間の局所結合と電気生理学的特性

吉田正俊 納家勇治 宮下保司

本研究は視覚情報を記憶情報に変換して記録する過程であると考えられている下部側頭葉の機能的構造と解剖学的特性の関連を調べることを目的とした。我々は対連合記憶課題遂行中のニホンザルの下部側頭皮質から単一ニューロン活動を記録し、傍嗅野内の 36 野に刺激選択性を持つニューロンが局在している領域(以下、ホットスポットと呼ぶ)があることを見出した。またさらに、36 野内のホットスポットおよびこれに近接する前後の対照領域の合計 3 箇所へそれぞれ別の種類の逆行性標識色素を注入して、TEav 野において標識されたニューロンの分布

と、刺激選択性を持つニューロンの分布とを比較した。その結果、TEav 野の刺激選択性を持つニューロンは、1) 36 野のホットスポットへ投射する領域で多い、2) またさらにこの領域の中でも、36 野のホットスポットへのみ投射し、他の対照領域へは投射していない領域で多い、ということを見出した。この結果は、TEav 野で刺激選択性を持つニューロンの多い領域は 36 野で刺激選択性を持つニューロンの多い領域へと選択的に投射していることを示唆する。

サル下部側葉における宣言的記憶形成にともなう BDNF の上昇

Tokuyama W, Okuno H, Miyashita Y

In primates, visual long-term memory of objects is presumably stored in the inferior temporal (IT) cortex. Because brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is involved in activity-dependent neural reorganization, we tested the hypothesis that BDNF would be upregulated in IT cortex during formation of visual pair-association memory. To eliminate genetic and cognitive variations between individual animals, we used split-brain monkeys for intra-

animal comparison in PCR-based mRNA quantitation. The monkeys learned a pair-association (PA) task using one hemisphere and a control visual task using the other, to balance the amount of visual input. We found that BDNF was upregulated selectively in area 36 of IT cortex during PA learning, but not in areas involved in earlier stages of visual processing. *In situ* hybridization showed that BDNF-expressing cells were localized in a patchlike cluster. The results suggest

that BDNF contributes to reorganization of neural circuits for

visual long-term memory formation in the primate.

サル嗅皮質における脳由来神経栄養因子,ニューロトロフィン 3 と その受容体メッセンジャーRNA の発現

Hashimoto T, Miyashita Y

The primate rhinal cortex, consisting of areas 36 and 35 of the perirhinal cortex and the entorhinal cortex (area 28), plays a crucial role in perception and memory. We investigated the expression of messenger RNAs for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3, as well as those for their respective tyrosine kinase receptors, TrkB and TrkC, in the monkey rhinal cortex. Results from *in situ* hybridization revealed that each of these messenger RNAs was expressed in neurons with distinct laminar and areal patterns of distribution. Brain-derived neurotrophic factor messenger RNA was principally detected in layers V/VI of area 36, and layers II/III and V of the entorhinal cortex. Some of the messenger RNA-positive cells in the deep layers of the rhinal cortex were confirmed to exhibit a

pyramidal cell-like morphology.

Neurotrophin-3 messenger RNA expression was confined to layers II/III of the entorhinal cortex. In contrast, *trkB* and *trkC* messenger RNAs were expressed rather homogeneously and abundantly throughout the rhinal cortex. The laminar and cellular distributions of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 messenger RNAs indicate the predominant expression of these neurotrophins in projection neurons. These results suggest that brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 regulate neuronal connectivities of forward and backward projections from the rhinal cortex and contribute to functional reorganization underlying the formation and maintenance of long-term memory in primates.

大脳皮質機能研究系

脳形態解析研究部門

【概要】

脳形態解析部門では、神経細胞やダリア細胞の細胞膜上に存在する伝達物質受容体やチャネルなどの機能分子の局在や動態を観察することから、シナプス、神経回路、システム、個体行動の各レベルにおけるこれらの分子の機能、役割を分子生物学的、形態学的および生理学的方法を総合して解析する。特に、各レベルや方法論のギャップを埋めることによって脳の機能の独創的な理解を目指す。

具体的な研究テーマとしては、1) グルタミン酸受容体およびGABA受容体と各種チャネル分子の脳における電子顕微鏡的局在、共存と機能との関係を解析する。2) これらの分子の発達過程や記憶、学習の基礎となる可塑的

変化に伴う動きを可視化し、その制御メカニズムと機能的意義を探索。3) 中脳辺縁系、前脳基底核等の情動行動に関与する脳内部位とこれらから大脳皮質への出力機構についてシナプス伝達機構および生理活性物質によるその修飾機構を電気生理学的手法を用いて解析し、それらの分子的基盤を明らかにする。4) ヒトの脳神経症状を引き起こす自己抗体のうち、受容体やチャネル分子などのに作用するものをスクリーニングし、機能阻害のメカニズムを探索するとともにそれらの分子の脳の高次機能や統合機能における生理的役割を明らかにしていく。5) 脊髄視床路ニューロン活動性の調節とその侵害刺激受容機構における意義を解明する。

GABA_B 受容体の脳内局在と機能解析

Akos Kulik, 重本隆一

脳内における主要な抑制性伝達物質であるGABAには、イオンチャネル型のGABA_A受容体とG蛋白共役型のGABA_B受容体が存在する。GABA_A受容体は、GABA作動性シナプスに主に存在することが知られていた。我々は、免疫電子顕微鏡法によりGABA_B受容体が小脳ではGABA作動性シナプスではなく、興奮性のグルタミン酸作動性シナプスの周囲により集積していることを見いだ

した。また、視床においてはいずれのシナプスとも強い関連なく広範に分布しているが、GABA作動性シナプス周囲により密度が高い。これらの結果は、GABA_B受容体が脳の部位により異なる役割を持っていることを示唆している。今後これらの受容体によって活性化される機能分子の共存や機能調節機構を解析することにより、さらにGABA_B受容体の脳における役割の解明を目指す。

mGluR3 と AQP4 の共存と生理的意義の解析

馬杉美和子, 藤本和 (福島県立大学), 重本隆一

我々は藤本によって開発されたSDS-FRL法をさらに改良し、細胞膜上機能分子の局在や共存を解析するスクリーニングを開始した。SDS-FRL法は、従来細胞膜の構造を観察するために用いられてきたFreeze Fracture Replicaを金標識でラベルする方法で、複数の細胞膜上分

子の分布を2次元的に解析するのに適した利点を持っている。この方法により代謝調節型グルタミン酸受容体mGluR3と水チャネルであるAQP4が、アストロサイトの細胞膜上で共存することを見いだした。そこで、この共存の生理的意義を確かめるためにCHO細胞に両分子

を発現させ、共存を確認している。さらに、この共存は mGluR3 を活性化することで消失する事を明らかにした。

今後、これらの分子の集合離散を引き起こすメカニズムやその機能的な意義について解析をすすめる。

HCN channel の脳内局在の解析

納富拓也, 重本隆一

Hyperpolarization Cyclic Nucleotide-gated (HCN) チャンネルは神経の発火周期に深く関与していると考えられている。現在、HCN1 から 4 までのチャンネル遺伝子がクローニングされている。本研究では HCN チャンネルに特異的な抗体を作製し、光学顕微鏡・電子顕微鏡レベルでの局在分布を検討している。各 HCN チャンネルは、それぞれ特異的な脳内分布を示し、軸索終末、細胞体、樹状突起

などに多様な免疫陽性像が認められた。HCN1 と HCN2 については、大脳皮質および海馬において錐体細胞の特に遠位の樹状突起に強い陽性像が認められ、電気生理学的に報告されている所見に呼応している。今後は、さらに電子顕微鏡的な観察をすすめ、シナプスや各種電位依存性チャンネルとの位置関係を解析し、HCN チャンネルによる神経細胞の活動性調節機構を探る。

シナプス前ドーパミン D2 型受容体と N 型カルシウムチャンネルとの選択的共役

靱山俊彦

線条体のアセチルコリン性介在ニューロンは、運動調節に関与する大脳基底核におけるアセチルコリンの主たる供給源である。このニューロンは、黒質緻密部からのドーパミン性入力を受けているが、線条体におけるドーパミンとアセチルコリンのバランスが、運動機能を制御する上で重要と考えられている。本研究では、線条体アセチルコリン性ニューロンから記録した GABA 性抑制性シナプス後電流が、シナプス前 D2 型受容体を介して抑制されること、その抑制機構はシナプス前終末の N 型カ

ルシウムチャンネルの選択的遮断であることを見出した。さらに、上記線条体シナプスにおいては生後 60 日までに N 型チャンネルの関与が徐々に減少し、D2 タイプ受容体を介する抑制の程度も減少することを見出した。

今後は、シナプス前終末における D2 型受容体と N 型および P/Q 型カルシウムチャンネルの位置関係、受容体活性化に伴うその動態、それらの生後発達について解明をすすめる。

mGluR1 の活性化を阻害する自己抗体による小脳失調症

木下彩栄, 重本隆一

ヒトのホジキン病患者で小脳失調症を併発する例のあったことが知られていた。我々はこのような症例の一部に代謝調節型グルタミン酸受容体 mGluR1 の活性化を阻害する自己抗体が存在する事を突き止めた。この自己抗体をマウスの小脳付近のくも膜下に注入することにより、小脳失調症状を再現することに成功し、受容体阻害抗体

が機能的にヒトの脳神経症状を引き起こすことを初めて証明した。さらに、患者の臨床検査やこの自己抗体を注入した動物を用いた実験から、運動学習や心拍除脈条件付けなどにおける mGluR1 の役割が明らかとなってきた。また、他の受容体やチャンネル分子などの機能分子に作用するものをスクリーニングし、ヒトの病態に関係のある

ものを見つけたとともに、機能障害のメカニズムを探ることを目指している。

ラット脊髄視床路ニューロン活動性の解析

舩山明子

末梢組織から脊髄へ入力された侵害信号出力は脊髄視床路ニューロン軸索から上位中枢である視床の中継核へ送られる。視床の VPL 核に蛍光ラテックスビーズを注入することによって、脊髄視床路ニューロンを逆行性に標識し、腰髄スライス標本においてこれを同定してパッチクランプ記録を行った。脊髄視床路ニューロンの細胞内通電による発火特性は adaptation を伴う規則的な発火パターンを示した。また脊髄視床路ニューロンには HCN

チャンネル活性がみられ、これが EPSP や IPSP の入力に引き続くダイナミックな膜電位変化に貢献していることが示唆された。さらに、EPSP の低頻度繰り返し刺激を行うと、脊髄視床路ニューロンの興奮性が次第に増強し、誘発されるスパイク数が増加する、いわゆる wind-up が観察され、これは NMDA 受容体のブロッカーの投与によって抑制された。wind-up の詳しい発生機構について、現在検討中である。

大脳神経回路論研究部門

【概要】

大脳皮質の機能を理解するためには、皮質のそれぞれの領域に存在している機能単位としての内部回路の構造とその中で行われている情報処理に関する知識が必要となるが、今のところ、あまり解明されていない。たとえば、皮質の神経回路は種々のタイプの神経細胞から構成されていることは知られているが、個々の神経細胞の情報処理方式・空間配置や、また、それらの神経結合の法則性に関してはほとんど理解されていない。さらに、神経細胞は、信号の伝達の手段として軸索終末から化学物質を放出するが、化学物質の種類によりそれらが回路網にどのような影響を与えるかについても明らかにする必要がある。本部門では、大脳皮質の内部回路の構造的・

機能的解析を行ない、その回路の意味を理解することを目的としている。そのために、局所回路における神経細胞の生理的・化学的特徴、機能的単位構造、各神経細胞間のシナプス結合様式などを電気生理学・免疫組織化学・形態学の技術を用いて調べ、皮質のモデル化のための基礎的データを得ることを目指している。現在は、GABA 作働性の介在ニューロンに重点をおいて、サブタイプごとの生理的性質や神経結合を定量的に解析している。本年度は、線条体介在ニューロンのシナプス構造を定量的に解析するとともに、及びアセチルコリン投射系による大脳皮質局所回路の活動修飾を調べた。

線条体介在ニューロン軸索終末におけるシナプス接合部の定量的解析

川口泰雄

窪田 芳之（理化学研究所）

線条体の介在ニューロンのうち、パルブアルブミン陽性の FS 細胞とソマトスタチンを発現する LTS 細胞の終末に GABA が存在することを見つけたので、これら二種

類の GABA 作働性細胞の機能的差を明らかにするために、軸索終末の後シナプス要素を調べた。FS 細胞は樹状突起と細胞体にシナプスを作るのに対して、LTS 細胞は主に

樹状突起にシナプスしていた。少数ながら、スパインにシナプスしている終末も両方にあった。シナプス前ブトンの体積、シナプス接合部の面積、シナプス後部の樹状突起の周径の関係を調べた。FS 細胞の軸索終末のシナプス接合部の面積は、樹状突起が太くなれば、それに比例

して大きくなるのに対して、LTS 細胞のシナプス接合面は、樹状突起の太さにあまり関係なく、比較的一定であった。シナプス接合部の面積は、シナプス後要素の大きさに依存して変わるが、その依存性は GABA 細胞のサブタイプによって異なることがわかった。

アセチルコリン投射系による大脳皮質局所回路の修飾

根東 寛
川口泰雄

大脳皮質の重要な入力、他の皮質と視床からの興奮性投射である。この他に、大脳基底部からのアセチルコリン、青斑核からのノルアドレナリン、縫線核からのセロトニンなどの投射があるが、これらは皮質の活動状態を調節している。これらの伝達物質は錐体細胞に直接作用するだけでなく、GABA 細胞を介して間接的に錐体細胞に影響すると考えられる。カルバコールやムスカリンをある程度持続的に脳切片標本にかけると、抑制性シナプス電流の増大のパターンには、持続的に増えているの

と、0.1 から 0.3 ヘルツの周期でバースト状に上昇するものの二種類があることがわかった。このうち周期的に増大する抑制性電流については、同一切片上の 2 つの細胞から同時に記録された場合には、低周波のバーストリズムは同期していたが、個々の抑制性電流は、同期していないことが多かった。アセチルコリン投射系は、GABA 介在細胞に作用をおよぼし、局所回路の興奮性や周期的活動を調節していると考えられる。

心理生理学研究部門

【概要】

PET や機能的 MRI など人間を対象とした非侵襲的脳機能画像と、電気生理学的手法を組み合わせ、短期および長期の学習に伴う脳の可塑的变化、高次脳機能の加齢変化と脳における代償機構の関連を明らかにすることを目的に、機能画像法の整備から始め、撮影からデータ解析まで一貫した方法論を確立した。本年度は、福井医科大学高エネルギー医学研究センターとの共同研究で高磁場研究用 3 TMR 装置を利用し、高い信号雑音比を

利した脳賦活検査を継続、さらに近赤外線画像装置(NIR)を用いて、乳幼児に適用する前段階として、他の脳血流測定装置との比較を開始した。また、脳領域間の機能連関の程度を客観的かつ適切に評価する方法の開発をはじめとする、機能画像の統計処理に関する研究を行った。なお脳機能計測センターに最新型 3 TMRI が導入されることを受けて、機能的 MRI に対応するための諸準備を行った。

感覚脱失による脳の可塑的变化

定藤 規弘

視覚：触覚から視覚系への可塑性を詳細に調べる目的で、晴眼者および盲人における、探索運動を伴わない点

字触覚弁別に要する神経回路の活動を、3 TMR 装置を用いて計測した(福井医科大学との共同研究)。盲人の点字

読において、一次視覚野の賦活には年齢依存性がある一方、視覚連合野のそれには年齢依存性がないことをしめした。

聴覚：健聴者における読唇により多感覚領野である中上側頭溝の賦活が見られることから、この部位が視聴覚統合に関連していると目されている。聴覚脱失によりこの視聴覚統合をになう神経回路に可塑的变化が起こるか

を検証するために、早期失聴者と健聴者を対象に機能的MRIを試行した。健聴者は、読唇でのみ中上側頭溝の賦活がみられ、一方聴覚障害者では、いずれの課題においても賦活された。早期失聴により両入力拮抗的バランスが視覚入力に傾いたものと推測された。(福井医科大学、福井大学との共同研究)。

新生児期における脳可塑性の画像化

定藤 規弘

新生児期における可塑的变化に関連して、機能的MRIを用いて新生児の一次視覚野及び外側膝状体の光反応性の経時変化を詳細に検討するとともに、MR信号に関するモデルを用いてシュミレーションを行った。さらに白質髄鞘化との比較を行った。これらにより生後2カ月を

境に変化するの是一次視覚野におけるシナプス過形成に伴う酸素代謝であることが示唆された。これに基づき乳幼児における脳賦活を近赤外線計測により計測する試みを開始した(福井医科大学との共同研究)。

パーキンソン病における思考速度の低下

本田 学

澤本伸克(京都大学医学研究科附属高次脳機能総合研究センター)

大脳基底核は、出力標的の一つである視床を介して広範な大脳皮質に情報を発すると同時に、入力部には大脳皮質からの精緻な情報が収斂し、大脳皮質との間にループ回路を形成し、一連のループ回路のなかで統合処理された情報が、完成された運動指令として脳幹や脊髄に伝達される。また大脳基底核は、一次運動野をはじめ、運動前野、補足運動野、前補足運動野、帯状皮質運動野などさまざまな運動関連領野とループ回路を形成するだけでなく、高次脳機能に関連の深い前頭前野をはじめとする大脳皮質連合野とも密接な神経線維連絡をもつことが知られている。こうした解剖学的知見をふまえ、近年、大脳基底核が思考をはじめとするヒトの非運動性機能に

はたす役割が注目されてきている。運動速度の影響を排して思考速度を評価するための行動課題を開発し、パーキンソン病における思考速度の評価をおこなった。その結果、パーキンソン病においては、思考を制御する視覚刺激の呈示速度が遅いときには、健常者群と正答率に差がないものの、刺激呈示速度の上昇にともなって有意に正答率が低下した。こうした傾向は、空間的な表象をもちいた思考課題よりも、より抽象的な言語表象をもちいた思考課題においてより顕著であった。これらの所見は、パーキンソン病で機能低下の見られる大脳基底核が、運動のみならず思考の制御にも重要な役割をはたすことを示唆するものと考えられる。

そろばん熟練者の暗算能力の神経基盤

本田 学

花川 隆 (京都大学医学研究科附属高次脳機能総合研究センター)

暗算によるそろばん (心内そろばん) に関わる脳内基盤を、磁気共鳴機能画像 (fMRI) を用いて検討した。そろばん熟練者 6 名及びそろばんの経験のない対照被験者 8 名が、MRI (1.5 T) にて全脳をカバーするエコープラナー像を撮像中に、視覚刺激に基づく暗算課題 (熟練者 1-6 桁, 対照被験者 1 桁), 空間表象操作課題, 言語表象操作課題を行った。30 秒間の各課題を注視課題と交互に繰り返し、各課題終了時に課題遂行の確認を

行った。解析にはSPM99を用いた。空間表象操作課題と言語表象操作課題に伴う脳賦活はそろばん熟練者群と対象者群で同様であった。暗算課題では、そろばん被験者が、空間表象操作課題遂行時と非常によく似た賦活を示したのに対し、対照群は言語情報操作課題と似た賦活の分布を示した。運動を実行せずとも、心内で忠実にイメージすることができる心内そろばんの能力は空間情報を操作する脳内機構に基づいている。

ヒトの可聴域上限をこえる空気振動に対する感受性についての研究

本田 学

大橋 力 (ATR人間情報通信研究所感性脳機能特別研究室)

ヒトの可聴域上限をこえる空気振動の有無が可聴域音の音知覚におよぼす影響とその神経機構についての検討を行った。音響工学の分野では、デジタル・オーディオのフォーマット策定に関連して、人間の音質知覚に影響をおよぼす空気振動の周波数上限が20kHzをこえるかどうかについて、歴史的な議論が繰り返されてきた。私たちは、可聴域上限を超える音と可聴域音とを互いに干渉することなく呈示可能な信頼性の高い実験系を構築した上で、脳電位記録および脳血流測定を用いて、音質に対する主観的評価とは独立に脳活動をとらえた。その結果、可聴域を超える高周波成分を豊富に含む音を聞いているときには、それを含まない音を聞いている時に比

較して、視床および脳幹の血流が有意に増加し、またその活性と有意に相関して脳波後頭部優位律動のパワーが増大することを発見した。さらにこうした現象の時間特性を十分に考慮して音質評価実験をおこなうと、高い有意性と再現性をもって音質差が知覚されうることを証明した。ハイパーソニック・エフェクトと名付けられたこうした一連の現象についての研究成果は、音響工学分野で現在世界的なトピックスになっているSACDおよびDVDオーディオの市場化をはじめとするハイデフィニッション・オーディオの新規格開発の直接の導火線となった。

多変量自己回帰モデルをもちいた補足運動野—一次運動野間の機能連結評価

本田 学

加藤比呂子 (NTTコミュニケーション科学基礎研究所)

脳が発達や学習にともなって新たな機能を獲得したり、損傷によって失った機能を代償したり回復したりする過程で、脳の異なる領域間の機能的な関連性の強さ (機能

連関) の変化が決定的に重要な役割をはたすと考えられる。異なる脳領域間に双方向性の神経線維連絡が存在しフィードバックシステムが想定される場合には、領域間

機能連関の評価法として現在広く用いられている脳波・脳磁図のコヒーレンス解析は不適切な可能性がある。そこで双方向性神経線維連絡をもつ複数の運動関連皮質から直接記録された脳波を対象として、赤池らによって提唱された多変量自己回帰モデルをもちいたフィードバックシステム解析を行った。てんかんの外科的治療を目的として留置された硬膜下電極をもちいて、右上腕筋の等尺持続収縮中の大脳皮質脳波を運動対側の左一次運動野

および左補足運動野より皮質脳波を記録した。ユールウォーカー法により多変量自己回帰係数をもとめ、それに基づいて領域間のインパルス応答関数ならびに相対ノイズ寄与率を算出した。その結果、一次運動野と補足運動野の間には、相互フィードバック関係が存在し、補足運動野が一次運動野に及ぼす影響は、逆方向の影響に比べて有意に大きいことが明かとなった。

一次視覚野における周波数依存性反応：1.5 テスラと 3 テスラでの比較

岡田 知久

機能的磁気共鳴画像法(fMRI)で用いられる血中酸素濃度依存性(BOLD)コントラストによる信号増加は静磁場強度の1～2乗に比例して増加するとされているが、その増加量は報告により異なる。これらの違いの原因としては撮像条件や比較条件の違いの他に、個々の実験間の再現性がMRIではあまり高くない事があげられる。CohenとDuBois(1999)は予測される信号変化と実際の信号変化の間で回帰直線を描き、その傾きを比較する事でより再現性のある比較が可能である事を示した。そこで一次視覚野では周波数に応じて直線的な信号変化を示す事を利

用して1.5 テスラと3 テスラMRIにおける信号変化量を比較した。

通常の撮像条件で比較した結果、静磁場強度が2倍になっているのに対して、2倍以上にはならず1.79倍の信号増加が得られたのみであった。しかし、統計処理の際には信号増加量を経時的な信号変動量(広義のノイズ)と比較する事で有意水準が導かれる。この点を考慮した場合には、2.39倍という更に大きな相対的信号変化としてみとめられる事が判り、超高磁場MRI装置の有用性が明らかとなった。

統合生理研究施設

高次脳機能研究プロジェクト

【概要】

1996年1月に伊佐が着任して5年目を迎えたが、着実に研究者の数も増加し、プロジェクトの幅も広がっている。伊佐の他、斎藤康彦、小林康の助手2名に加え、遠藤利朗、井上由香が博士研究員、大学院生はD2に坂谷智也、山下哲司、D1に勝田秀行という陣容で技官は鈴木(佐々木)千香、研究技術支援推進員に伊佐かおる、研究補助に平山徳子、瀬尾道、秘書が山本淳子という体制であった。しかし年度後半の2月より斎藤は群馬大学医学部講師に栄転した。これまで注意のシステムによる眼球のサッケード運動の修飾という問題をボトムアップ的に解決するために、サッケード運動遂行中のサルの脳幹におけるニューロン活動記録(小林、井上)とサッケ

ード運動制御の中枢である中脳上丘の局所回路をスライス標本で解析する研究(斎藤、遠藤)を柱に行ってきたが、中脳ドーパミン細胞をめぐる神経回路とシナプス受容体の研究(山下及び旭川医大・高草木、斎藤博士との共同研究)、マウス上丘電気刺激によるサッケード誘発実験(坂谷)、麻酔下のラットにおける上丘局所回路の信号伝播機構(勝田)など次第に研究の幅を広げている。また本年度より伊佐が研究代表者となり、Human Frontier Science Programの共同研究グラントを得て、スウェーデン・ウメオ大学のAlstermark教授と霊長類及びげっ歯類の脊髄介在ニューロンによる運動制御機構に関する共同研究をこれまで以上に展開することになった。

サッカードを指標としたコリン作動性入力による動機付けの制御の解析

小林 康, 井上 由香, 伊佐 正

サルのサッカード反応時間を指標にしてコリン作動性システムによる動機付けのメカニズムを解析した。サルの視覚誘導性サッカード課題において、報酬量を増加させると課題の成功率が上昇すると同時に課題開始時に点灯する注視点に向かうサッカードの反応時間が減少するという行動実験の結果を得た。さらに、報酬量を変化させると注視点へのサッカードの反応時間が変化すると同時に脚橋被蓋核(PPTN)ニューロンの注視点点灯に対

する視覚応答が変化するという実験結果を得た。この反応は注視点に向かうサッカードの反応時間や課題の遂行度合い〔成功率〕という動機付けやglobal attentionを反映する指標と密接に関係していると思われる。また、PPTNにおいて報酬に対する直接の反応と報酬に対する予測反応を得たが、この活動は、黒質緻密部ドーパミン作動性ニューロンの報酬に対する予測的反応の形成に寄与していると考えられる。

上丘局所回路の興奮伝播の動的機構

斎藤康彦, 伊佐 正

上丘の細胞集団における興奮性結合様式を明らかにするため、ラット上丘のスライス標本を用いて、2個の上丘中間層細胞から同時にホールセル記録を行い、自発的膜電位の変化を調べた。中間層細胞のペアにおいて、

Bicucullineを投与し外液のマグネシウムを低くすることにより、同期した脱分極が高頻度で生じた。上丘スライスから中間層のみを含む小片を取り出し、その小片内の2個の細胞からホールセル記録を行ったところ、同期し

た脱分極が見られたが、その頻度は低かった。ところが、浅層も含む小片を取り出し 2 個の中間層細胞から同時記録を行うと、同期した脱分極が高頻度で観察された。このことから、同期した脱分極は中間層内で生じうが、

それを引き起こすためには、中間層の外（例えば浅層）からの入力が必要であることが示唆された。中間層における同期的活性化機構は、眼球運動等の運動指令の生成に重要な役割を持つものと考えられる。

ラット上丘浅層ニューロンに発現する AMPA 型グルタミン酸受容体サブタイプ

遠藤利朗, 伊佐 正

AMPA 型グルタミン酸受容体には Ca^{2+} 透過型と非透過型があり、これらの機能的意義が注目されている。本研究では、ラット上丘のスライス標本において上丘浅層ニューロンからホールセル記録を行い、発現している AMPA 型受容体サブタイプを調べた。 Ca^{2+} 透過型は内向き整流性、非透過型は外向き整流性を示すことから、カイニン酸に対する AMPA 型受容体を介した電流応答の整流特性

を指標とした。その結果、horizontal cell および wide field multipolar cell と呼ばれる、接線方向に広く樹状突起を伸ばす抑制性介在ニューロンにおいて Ca^{2+} 透過型受容体を強く発現する細胞が多いことが明らかになった。このことから、 Ca^{2+} 透過型 AMPA 型受容体が周辺抑制など、視覚地図上での側方抑制作用に関与することが示唆される。

中脳ドーパミンニューロンにおけるニコチン型アセチルコリン受容体の活性化に伴うカルシウム感受性電流成分の活性化

山下哲司, 伊佐 正

中脳のドーパミン細胞は線条体に投射し、強化学習における誤差信号を送る働きが報告されている。

このドーパミン (DA) 細胞は、興奮性入力として脚橋被蓋核よりアセチルコリン (ACh) 作動性線維の投射を受け、ニコチン型アセチルコリン受容体 (nAChRs) を介する速い興奮性伝達が行われている。我々はこれらの DA 細胞において ACh 投与に対して起きる速い内向き電流の

中に fulfenamic acid (FFA) に感受性を示すおそらく calcium-activated-nonspecific cation channel (CAN channel) による電流成分が存在する所見を得た。この電流成分の活性化には nAChRs の subtype のうち $\alpha 7$ 型と非 $\alpha 7$ 型の両方の成分が必要であること、また、その電流-電圧特性は -40 から -80 mV の間で negative slope conductance を示したことが明らかとなった。

感覚・運動機能研究プロジェクト

【概要】

本研究室では大型脳磁計を用いたヒト脳機能の研究を行っている。様々な種類の刺激に対する認知機構の解明と高次脳機能の解明が主要研究テーマである。体性感覚系では、後頸部、後頭部、肩といった homunculus では明らかにされていない部位の体性感覚野における受容野を明らかにした。また干渉条件を用いて、耳の受容野が

顔の領域と後頸部の両方に存在することを確認した。体性感覚認知に対する注意と視覚刺激の影響について報告した。体性感覚誘発脳磁図初期反応の発現機序を、trigger point の変更及び 2 発刺激によるいわゆる recovery curve を解析して明らかにした。痛覚系では、無髄の C 線維を選択的に刺激する方法を確立し、末梢神経と脊髄の伝導

速度がともに 1-3 m/秒であることを明らかにした。また表皮の自由神経終末を選択的に刺激できる針を開発し痛覚関連脳波・脳磁図を記録した。簡便でほとんど痛みも出血も伴わない点が最大の長所である。視覚系では、中心視野と周辺視野に対する格子縞反転刺激視覚誘発脳磁図に対する注意の影響を明らかにした。顔認知において特異的反応とされる「倒立顔効果」が左半球側頭葉下面における特殊作用によって出現する可能性を指摘した。聴覚系では、「自分の声」をリアルタイムで聞く時と録音されたものを聞く場合の聴覚誘発脳磁図を比較し、受容野が有意に異なることを報告した。4000Hz 以上の高周波数の音による聴覚誘発脳磁図は、周波数増大に応じて減少し、潜時には延長傾向があった。15000Hz 以上の

音には反応が見られなかった。ハンマーが金床に振り下ろされるビデオを見せ、音は聞こえないが心の中で音をイメージさせて音の想起に関する活動部位を解析し、前頭葉深部から島に掛けての部位に活動が見られた。言語認知の研究を誘発脳磁場成分ミスマッチフィールド(MMF)を用いて行っている。MMF は 1 秒前後の短い間隔で繰り返し提示される同一の音(標準刺激)の中に、それとは異なる音響的特性を持つ逸脱刺激がまれに挿入された場合に、逸脱刺激に対して特異的に出現する誘発脳磁場成分である。日本語特有の/l/r/の発音区別の困難が、トレーニングによって改善しそれが左半球で行われることを明らかにした。

後頭部及び肩部刺激による体性感覚誘発脳磁図

糸見和也(名古屋大学医学部・小児科), 宝珠山稔(名古屋大学医学部), 柿木隆介

Penfield が発表した第 1 次体性感覚野(SI)の受容野分布、いわゆる homunculus の中で、非常に奇妙な印象を受けるのは、後頭部及び肩部が顔の部位よりも離れて体幹に近い部位に描かれていることである。Homunculus は脳外科手術中の刺激実験によって描かれたものである。後頭部などは制約が大きく確認が困難であったことが予想されるため、体性感覚誘発脳磁図(SEF)を用いて再確認作業を行った。電気刺激を肩、乳様突起(後

頭部)、頬の 3 箇所を与えて活動部位を同定した。すると、肩刺激では homunculus の体幹領域に近い部位に、頬刺激では顔の領域に推定された。しかし、乳様突起(後頭部)刺激では、16 名中 11 名では体幹領域に近い部位に、5 名では顔の領域に推定された。この結果は、後頭部領域の特異性による個人差を反映していることを示唆している。(Itomi et al: Brain Topography, 14: 15-23, 2001)

耳刺激による体性感覚誘発脳磁図

二橋 尚志, 宝珠山稔(名古屋大学医学部), 柿木隆介

Penfield らにより人の第一次体性感覚野(SI)局在が初めて報告され、近年、非侵襲的にヒト脳機能を検査する方法(脳磁図, functional MRI, PET)により研究がすすんでいる。しかし、現在までに一次体性感覚野における耳の受容野に関する報告はない。脳磁図をもちいて第一次体性感覚野(SI)における耳の局在を検討した。

左耳の耳輪、耳垂、耳珠の 3 箇所に電気刺激を加え。この時の脳活動を脳磁図をもちいて計測した。脳磁図は BTi 社製脳磁計(Magnes, 37 channel)を用い、脳磁計の

中心は右側 SI の頸部及び顔の領域の活動を記録する目的で国際 10-20 法の C4 に配置した。解析には単一電流双極子モデル及び複数電流双極子モデルを用いた。13 名中 7 名にのみ刺激対側に短潜時成分(刺激後 20msec, M20 及び 40msec, M40)を認め、この 7 名を解析した。耳輪は全例、電流双極子は SI の頸部領域に推定された。耳垂では、4 名は頸部領域に推定されたが、1 名は顔の領域に、2 名は顔及び頸部領域の両方に推定された。耳珠では、2 名は頸部領域に、5 名は顔及び頸部領域の両

方に推定された。発生学的には外耳は前半部、後半部それぞれ3つずつよりなる隆起より形成される。前者は三叉神経により支配され、後者は頸神経より支配を受けている。発生がすすむに従い後者がより優位になる。した

がって、耳の SI における極在は頸部領域だが、三叉神経の貢献が強くなる前方の部分（耳垂、耳珠）では頸部及び顔領域に存在する例があると考察した。(Nihashi T et al: Neuroimage, 13: 295-304, 2001)

Attention and visual interference affect somatosensory processing

Lam Khanh, Kakigi Ryusuke, Mukai Tomohiro, Yamasaki Hiroshi

Bilateral median nerves were stimulated unilaterally, and subjects were asked to count left median nerve stimulation while visual interference (cartoon) was applied. Five components (1M-5M) were identified in the hemisphere contralateral to the stimulated nerve and only one component (MI) was found in the ipsilateral hemisphere. Summarizing the results of our previous and present studies, (1) visual interference enhanced the 3M and 4M but reduced the MI, (2) attention enhanced the 3M, 4M, 5M and MI. As a result, (3) visual

interference with attention enhanced the 3M and 4M more, and showed no significant change in the 5M and MI. This was compatible with a summation of the effects caused by visual interference alone and attention alone. We considered there were significant interactions of activities relating to somatosensory, visual stimulation and cognitive function, in both the primary (SI) and secondary somatosensory cortex (SII) in humans. (Lam et al: Neuroscience, 104: 689-703, 2001)

近位筋振動刺激による末梢側神経刺激誘発電位への影響

宝珠山稔（名古屋大学医学部）

柿木隆介

一つの運動を行う際には、主動筋の運動に先行した姿勢の決定や保持のために近位筋の運動が認められる場合がある。随意運動と感覚情報処理の関連を解析する上で末梢からの感覚信号がそれより中枢側の筋感覚信号によって影響をうけるかどうかはしばしば問題となる。手指筋、円回内筋、上腕二頭筋、上腕三頭筋、僧帽筋のそれぞれに振動刺激を与えつつ正中神経刺激による体性感覚

誘発脳電位（SEP）を記録した。手指筋以外の全ての筋への刺激は SEP 成分（N20-P25-N33, P20-N30）の振幅、潜時に影響を及ぼさず、少なくとも近位筋の Ia 紡錘筋を主体とする筋感覚入力末梢神経刺激による SEP には影響がないことが示された。（Hoshiyama et al: Clinical Neurophysiology, 111: 1607-1610, 2000）

短潜時体性感覚誘発脳磁場成分と脳電位成分との対応

宝珠山稔（名古屋大学医学部）

柿木隆介

体性感覚の研究では体性感覚誘発脳電位（Somatosensory evoked brain potential, SEP）について多くの知見の蓄積

があるものの、近年進歩しつつある体性感覚誘発脳磁場（Somatosensory evoked cortical magnetic field, SEF）との

対応は明らかではない。正中神経刺激による短潜時 SEF 成分と SEP 成分の対応を、Inter-potential interval (IPI) の Jittar 現象を解析し明らかにした。SEF 成分で刺激語後 20ms と 30ms に認められる 1M と 2M 成分はそれぞれ SEP 成分、N20 (C3, F3, P3, 国際 10-20 法) と P30 (P3) 対

応していた。C3 より記録される P25, N33 に対応する SEF 成分は同定できなかった。また、1M と 2M の間には時間的な相関はなく、1M と 2M は刺激に対して独立な反応であることが推察された。(Hoshiyama et al: Brain Research, 908:140-148, 2001)

電気及び CO₂ レーザー刺激を用いた新しい方法による A-beta, A-delta, C 線維の伝導速度計測

Tran Tuan Diep, Lam Khanh, 宝珠山稔, 柿木隆介

A-beta 線維, A-delta 線維の末梢伝導速度は比較的容易に計測できるが, C 線維の場合神経遮断などの特殊な状況でなければ計測できなかった。近年皮膚の非常に狭い領域に弱いレーザー刺激を行うことで C 線維の選択的刺激が可能となった。そこで本研究では, 通常の電気刺激法, CO₂ レーザー刺激法および皮膚極小野低強度 CO₂ レーザー刺激法の 3 種類の刺激法を用いて, A-beta 線維, A-delta 線維および C 線維の末梢伝導速度を同時に計測し

た。各刺激を 20 名の被験者の手背及び前腕に与え, 記録される誘発脳電位の頂点潜時差より伝導速度を算出した。得られた伝導速度の平均値はそれぞれ, 69.1m/s, 10.6m/s, 1.2 m/s であった。3 種類の線維の伝導速度を同時に計測できる本方法は非侵襲的かつ簡易であるため, 研究領域のみならず臨床的にも有用であると思われる。(Tran et al.: Neurosci Lett, 301: 187-190, 2001)

CO₂ レーザーによる C 線維刺激法を用いた脊髄視床路伝導速度 (間接法)

Tran Tuan Diep, 乾 幸二, 宝珠山稔, 柿木隆介

CO₂ レーザー刺激による痛み関連誘発脳電位は研究目的のみならず臨床的にも応用されている。この方法を用いた A-delta 線維関連の脊髄視床路伝導速度の研究は既に行われているが, C 線維関連の脊髄視床路伝導速度計測は本研究が初めての報告である。既に報告した極小野低強度レーザー刺激法 (Tran et al., 2001) を用いて上下肢それぞれの 2 箇所刺激を与えて誘発電位を記録し,

A-delta 線維について既に報告されている Kakigi (1991) の方法を用いて脊髄伝導速度を計算した。伝導速度の平均値は 2.9m/s であり, 末梢 C 線維の信号は脊髄視床路の C 線維を介して視床に伝達されるものと考えられた。本方法は, 知覚障害を呈する種々の脊髄疾患における臨床応用にも使用できる有用な方法であると思われる。(Tran et al., Pain, 95: 125-131, 2002)

CO₂ レーザーによる C 線維刺激法で計測した脊髄視床路伝導速度 (直接法)

秋 云海, 乾 幸二, 王 曉宏, Tran Tuan Diep, 柿木隆介

従来 C 線維を選択的に刺激する方法がなかったためヒト C 線維関連の研究は困難であったが, Tran ら (2001) は皮膚極小野に低強度 CO₂ レーザー刺激を行う方法で, C 線維の末梢伝導速度計測に成功し, ついで上下肢にこ

の方法で刺激を行うことにより間接的に脊髄伝導速度を算出できることを報告した。本研究では極小野低強度レーザー刺激法を用いて C7 から T12 脊椎の範囲で皮膚正中線上を刺激し, C 線維に関わる脊髄視床路伝導速度を

計測した。伝導速度は、誘発脳電位の陽性頂点の潜時差より算出した。比較のため通常のレーザー刺激を同様にを行い、A-delta 線維に関わる脊髄伝導速度を算出した。極小野刺激での伝導速度は 11 名の平均値で 2.2m/s であり、

通常のレーザー刺激の 10.0m/s より明らかに遅かった。この結果は、末梢 C 線維で伝達される興奮は、脊髄においても C 線維を上行することを示すものである。(Qiu et al., Neurosci Lett, 311: 181-184, 2001)

表皮内針電極を用いたヒト皮膚 A-delta 線維の選択的刺激

乾幸二, Tran Tuan Diep, 宝珠山稔, 柿木隆介

ヒト皮膚 A-delta 線維の選択的刺激を目的に表皮内電気刺激用の針電極を作成し、その有用性を誘発脳電位を用いて検討した。針の長さは 0.2mm であり、皮膚に電極を刺入すると針の先端が表皮内に位置するようになっている。左手背および上腕を 0.1-0.3mA, 0.5ms で刺激し、得られた誘発電位の陽性成分頂点潜時より末梢伝導速度を計算した。比較のため同様の刺激を CO₂ レーザー (LS)、通常の経皮的電気刺激 (TS) でも行った。算出された末

梢伝導速度は表皮内電気刺激 (ES) で 15.3m/s であり、LS による伝導速度 (15.1m/s) と相関した。一方 TS による伝導速度は 44.1m/s であり、有意に早かった。ES および LS の値は両者の興奮伝導が A-delta 線維を介することを示している。本方法は特殊な機器を必要とせず、扱いも極めて簡便である。また出血や熱傷もなく非侵襲的である。従ってヒト痛覚関連の研究に有用であると考えられる。(Inui et al., Pain, 96: 247-252, 2002)

表皮内電気刺激法を用いた痛み関連誘発脳磁場

乾幸二, Tran Tuan Diep, 秋云海, 王曉宏, 宝珠山稔, 柿木隆介

我々は、独自に作成した針電極を用いて表皮内を電気刺激することでヒト皮膚 A-delta 線維を選択的に刺激できることを報告した (Inui et al., 2002)。本研究では、表皮内電気刺激法 (ES) による痛み関連誘発脳磁場を検討した。0.1-0.3mA, 1.0ms の条件で手背および前腕に ES を行い、脳磁場を記録した。13 名の被験者のうち、8 名では単一雙極子モデルでの解析が可能であり、8 名全ての被験者で雙極子は両側第 2 次体性感覚野 (SII) に推定された。残りの 5 名では時間的にオーバーラップする 2

つ以上の電流源があると考えられ、多信号源解析ソフトを用いて解析したところ、両側 SII に加え、それとほぼ平行して活動する第 1 次体性感覚野 (SI) にも電流源が推定された。手背および前腕刺激で得られた磁場成分の潜時差より末梢の伝導速度は 15.6m/s と算出された。これらの結果は、既に報告されている多くの痛み関連脳磁場研究結果と一致するものであり、本方法は痛み関連誘発脳磁場においても有用な刺激方法であると考えられる。(Inui et al., Clinical Neurophysiology, 113: 298-304, 2002)

中心視野への注意によるパターンリバーサル視覚誘発電位への影響

宝珠山稔 (名古屋大学医学部)

柿木隆介

中心視野および周辺視野のパターンリバーサル刺激による視覚誘発電位 (Pattern-reversal visual evoked potential, PRVEP) が中心視野への注視や意識の集中の度

合いによってどのように影響を受けるかを解析した。中心視野への単純な注視、努力的凝視、中心視野への反応信号の提示による注視の 3 条件について中心視野と周辺

視野、全視野刺激による PRVEP を測定した。努力的凝視と課題提示にて中心視野刺激による PEVEP 成分は振幅の増大を示し、周辺視野刺激による PRVEP 成分は減衰を示した。全視野では条件による差は認められなかつ

た。中心視野への注意の程度により中心視野と周辺視野刺激に対する脳反応は reciprocal に facilitation と suppression が生じている可能性が示唆された。(Hoshiyama et al: Brain Topography, 13: 293-298, 2001)

A first comparison of the multifocal visual evoked magnetic field and visual evoked potential

Wang Lihong, Kakigi Ryusuke, Kaneoke Yoshiki, Okusa Tomohiro,
Barber Colin (Medical Physics Department, Queen's Medical Centre, Nottingham, UK)

Our objective was to determine the feasibility of recording reliable multifocal visual evoked magnetic fields (mfVEFs), to investigate the maximum stimulus eccentricity for which the mfVEF responses can be obtained, and to study how this changes with checksize (spatial frequency tuning). Using an initial checksize of 30', we recorded pattern-onset mfVEFs and multifocal visual evoked potentials (mfVEPs) under the same conditions. Eccentricity changes with spatial frequency

were studied using six kinds of different checksizes. We obtained, for the first time, reliable mfVEFs, and found they could be elicited from more peripheral stimulus elements than could mfVEPs. The larger the checksize, the greater the eccentricity reached. The mfVEF can to some extent overcome the limitation of the mVEP and record both foveal and more peripheral responses. (Wang et al: Neuroscience Letters, 315:13-16,2001)

脳波と脳磁図を用いた「倒立顔認知」の研究

渡辺昌子, 柿木隆介

これまで、ヒトの顔認知機構について「正立した顔」や「目の動き」を刺激として研究してきた。引き続き今年は、「倒立顔を見るときには正立顔を見るときと異なる情報処理が脳内で行われる」という説 (face inversion effect) について、脳磁図と脳波を用いて解析した。正立顔、倒立顔及び object の刺激画像をそれぞれ半視野に提示し、刺激提示視野対側半球から脳磁場を記録することで左右半球間の違いを調べた。その結果、左半視野刺激 (右半球) では倒立顔に対して反応の潜時が延長するのに対し、右半視野提示 (左半球) では逆に短くなる傾向があった。このことから、倒立顔に対しては左半球優位、正立顔に対しては右半球優位であることが示唆された。

Object 刺激に対する反応は倒立顔刺激に対する反応とパターンが異なり、「倒立顔は object として情報処理される」という仮説と適合しない結果であった。また、複数双極子モデル (BESA) 及び脳波の結果より、顔認知活動には側頭葉下面と外側の 2 箇所が関与することが示唆された。倒立顔と正立顔に対する反応の活動源位置に有意な違いはなかった。倒立顔に対する反応の、潜時延長は側頭葉下面で有意であり振幅増大は脳波 (主に側頭葉外側の活動を反映) で明瞭だったことから、側頭葉下面は主に個々の顔の同定に、側頭葉外側は顔の様々な要素の検出に深く関与しているのではないかと考察した。

自分の声 (own voice) に関連する聴覚誘発脳磁図

軍司敦子, 宝珠山稔, 柿木隆介

ヒト発声時の脳活動には呼吸や発声器官を制御する運動や、発声後の自己の声による聴性の反応が含まれると考えられている。本研究では、単純な発声時における脳磁場反応から聴覚反応成分を分離し、その発生源を推定した。健常者 10 名を対象に、4-6 秒間隔で単母音 (/u/) を繰り返し発声する課題を実施し、発声関連脳磁場 (vocalization related cortical field: VRCF) を自分の声が聞こえない状態の masking 条件と通常 (control) の条件下で記録した。VRCF は、発声開始後およそ 90 ms でピークを示し。その振幅は masking 条件より control で有意に大きかった ($p < 0.05$)。control-masking 条件間の差分波形を求めたところ、発声開始後 81.3 ± 20.5 ms に頂点を示す 1M 成分が得られた。1M 成分は、音声を聴取した

時に出現する auditory evoked magnetic field (AEF) の M100 成分に対する発生源と同様、聴覚野付近に推定されたことから、この成分が M100 と同様の成分で自分の声に対する反応であると推察された。また、左半球において、1M 成分は M100 成分よりも約 1 cm 中心寄りに解析された ($p < 0.05$)。発声時には、生成しようとした音声と実際に発した音声とを照合するためのプロセスが関与し、単純に外界からの音刺激を聴取する場合とは異なる過程が存在することが考えられる。それは、外界からの音を聴取するときに活動する皮質活動とは異なる過程を呈するのかもしれない。(Gunji A et al: Clin Neurophysiol, 112:514-520, 2001)

高周波純音による聴覚誘発脳磁場

藤岡孝子, 柿木隆介, 軍司敦子, 竹島康行

ヒト聴覚野における聴覚誘発脳磁場反応 (Auditory Evoked Field, AEF) で中域可聴音を用いたトノトピイ (周波数局在性) 存在が報告されている。本研究では、健常成人可聴域上限までの高周波および超音波を用いて聴覚刺激を加え、AEF を計測し、長潜時成分 N1m について検討した。すなわち、周波数として 4000 から段階的に 14000Hz まで、および超音波として 15000Hz, 20,000Hz, 40,000Hz の純音を健常成人 12 名に与えた。この結果、14000Hz まではほぼ全員に N1m 反応が認められたが、15,000Hz 以上の超音波に対する N1m は得られなかった。また、N1m の振幅は周波数増大に応じて減少し、潜時に

は延長傾向があった。左右半球間差として右半球で左半球より振幅が有意に大きく、N1m の信号源位置は有意に前方かつ外側また ECD 向きは、左で頭頂方向に対してより垂直であった。また左半球では周波数増大に応じた比例関係がみとめられた。これらの結果は、N1m 反応の中域可聴音によるこれまでの報告における右半球優位性および周波数依存性とほぼ同様の傾向にしたがっていると考えられた。すなわち、今回の研究により、高周波可聴域においても、ヒト聴覚野のトノトピイが保持されていることが確かめられた。(Fujioka T, et al.: Neuroscience, in press)

音の想起に関連する初期の脳反応

宝珠山稔 (名古屋大学医学部)
軍司敦子, 柿木隆介

音の想起に関する脳反応は機能画像的研究を中心に行なわれ、いくつかの活動部位が報告されているが、反応各部の時間的關係は明らかではない。音を想起する課題により誘発される脳反応を脳磁計を用いて計測すること

により、音の想起に関連する初期の脳反応を同定した。音を生じる場面を視覚的に提示し音を想起させると、課題提示後約 150ms に想起に特異的な反応成分 (R1) を認め、反応は右半球優位であった。R1 に対する信号源は個

人差が認められたものの聴覚野とは明らかに分布が異なり、信号源は Pre-frontal sulcus の深部から Insula にかけての領域に推定された。音の想起に関する早期の成分に

ついては 1 次聴覚野以外の領域の活動が含まれると考えられた。(Hoshiyama et al: NeuroReport,12: 1097-1102,2001)

Neural activities during Wisconsin Card Sorting Test–MEG observation

Wang Lihong, Kakigi Ryusuke, Hoshiyama Minoru

Taking the advantage of high temporal resolution of magnetoencephalography (MEG), we dissociated the neural activities related to shift attention processing and to the working memory and decision making processing involved in the Wisconsin Card Sorting Test (WCST). Significantly larger activities to the wrong signals compared with those to the correct signals were found at 460~640 ms after the presentation of the feedback signals in the dorsolateral prefrontal cortex and the middle frontal cortex. Comparison of the MEG recordings to the card presentations processed by the wrong and by the correct feedbacks revealed that different

activities occurred in the period of 190~220 ms and 300~440 ms mainly at the supramarginal gyrus, the dorsolateral prefrontal, and the middle and inferior frontal gyrus. Our results proved that the WCST task activates a broad frontal area and the parieto-frontal network across time streaming. Both shifting attention to the wrong feedback and enhanced visual working memory to the sorting shifting condition of the card presentation occur in the same areas at different time points. (Wang et al: Brain Research Cognitive Brain Research, 12: 19-31, 2001)

語音に対する誘発脳磁場反応：聞き分けトレーニング効果の検討

小山幸子、軍司敦子、山田玲子（(株)ATR 人間情報科学研究所）、矢部博興（弘前大学医学部）、久保理恵子（(株)ATR 人間情報科学研究所）、大岩昌子（名古屋外国語大学外国語学部）、柿木隆介

語音の構成は言語によって異なるために外国語学習時には、母語に存在しない音素の認識、聞き分けが学習者にとって大きな課題となる。山田らの検討により、成人でも、トレーニングによって米語の /l/r/ など日本語に含まれない音素の聞き分けを学習できることが確認されている。我々は /l/ と /r/ の聞き分けの学習に関与する神経基盤を探るために、学習の前後に誘発脳磁場成分ミスマッチフィールド（MMF）を記録した。MMF は 1 秒前後の短い間隔で繰り返し提示される同一の音（標準刺激）の中に、それとは異なる音響的特性を持つ逸脱刺激がまれに挿入された場合に、逸脱刺激に対して特異的に出現する誘発脳磁場成分である。逸脱刺激と標準刺激の間の心理的な距離が大きくなるのに従って、MMF の振幅は増大し、その潜時は短縮する。我々は右手利きの日本語話者 16 名にトレーニングを行い、トレーニング

の前後に脳磁場を測定した。1 セッション約 30 分のトレーニングを 45 セッション、23-50 日かけて行った。3 名の話者に対する聞き分け率をトレーニングの前後に測定したところ、3 名の話者全員に対して聞き分け率が 15% 以上向上した 9 名の被験者のうち 8 名では左大脳半球から記録された脳磁場に以下の変化が認められた。4 名の被験者では、トレーニング前には出現しなかった MMF 成分が出現した。4 名の被験者では、トレーニング後に MMF 潜時が短縮した。これらの MMF の発生源は聴覚野に推定された。聞き分け率の向上が話者によってばらつきがみられた被験者にはこのような変化が認められなかった。本検討から語音の獲得には左大脳半球が関与していることが示唆された。

Koyama et al., (2000) Neuroreport 11: 3765-3769

Koyama et al., (2000) Brain Research Cognitive Brain

Research 10: 119-124.	12: 39-48
Yabe et al. (2000a) Brain Research Cognitive Brain Research	Yabe et al. (2000b) Brain Research 897: 222-227

脳機能計測センター

形態情報解析室

【概要】

形態情報解析室は、形態に関連する超高圧電子顕微鏡室（別棟）と組織培養標本室（本棟 2F）から構成される。

はじめに超高圧電子顕微鏡室に関連する事項を、記述する。医学生物学用超高圧電子顕微鏡（H-1250M 型）が昭和 57 年 3 月に導入されて、同年 11 月よりこれを用いての共同利用実験が開始された。平成 12 年度は共同利用実験計画が 19 年目に入っている。本研究所の超高圧電顕の特徴を生かした応用研究の公募に対して全国から応募があり、平成 12 年度は最終的に 12 課題が採択され、実施された。これらは、厚い生物試料の立体観察と三次元解析、薄い試料の高分解能観察等である。米国および韓国からの研究者による実験も行われている。共同利用実験の成果は、超高圧電子顕微鏡共同利用実験報告の章に詳述されている。

超高圧電子顕微鏡室では、上記の共同利用実験計画を

援助するとともに、これらの課題を支える各種装置の維持管理及び開発、医学生物学用超高圧電子顕微鏡に関連する各種基礎データの集積および電子顕微鏡画像処理解析法の開発に取り組んでいる。本年度の超高圧電顕の利用状況の内訳は、共同利用実験等 169 日、修理調整等 67 日である（技術課脳機能計測センター形態情報解析室報告参照）。電顕フィルム使用枚数は 7,028 枚、フィラメン点灯時間は 477.1 時間であった。装置は、平均 93 % の稼働率で利用されており、試料位置で 10^{-6} Pa 台の高い真空度のもとに、各部の劣化に伴う修理改造を伴いながらも、高い解像度を保って安定に運転されている。

組織培養標本室は通常用および P 2 用の培養細胞専用の培養機器と、各種の光学顕微鏡標本の作製および観察用機器の整備に勤めている。平成 12 年度の利用者は所内 11 部門 33 名、所外 1 名であった。

超高圧電子顕微鏡用広視野高解像度対物レンズの結像特性

有井達夫

医学生物学用としての超高圧電子顕微鏡（H-1250M）は、出来るだけ低倍（ $\times 1,000$ ）において、広い視野を、高解像度に撮影することが必要である。導入当初は、高分解能を用いた対物レンズとして導入されており、1,000 倍において使用できる対物絞りに限界があり、また観察視野がフィルムの大きさに比較して制限されていた。そこでより広い視野を高コントラストで撮影することが出来るように低倍対策用対物レンズポールピース（ $f_{obj} = 5.0$ mm, $C_c = 3.9$ mm, $C_s = 5.5$ mm）を試作し、1994 年 6 月に設置した。これに合わせて結像系内の光軸上の固定絞りの径を変更している。これらの結果、1,000 倍の倍率において、導入時には、対物絞り直径 $50 \mu\text{m}$ を用いても試料観察視野直径 $\sim 65 \mu\text{m}$ であったが、変更後は、視野直径 $\sim 78 \mu\text{m}$ 内の領域を、対物絞り直径 $10 \mu\text{m}$ を用いても、観察可能と改善された。

このとき、対物レンズの前磁場の前で、ほとんど平行に照射される条件で過不足焦点の量（ Δz ）に応じた倍率（M）変化量を測定すると、

$$\Delta M = 2.2 \times 10^{-4} (\mu\text{m}^{-1}) M \cdot \Delta z$$

であり、像回転の変化量（ $\Delta \theta$ ）は、

$$\Delta \theta = 2.0 \times 10^{-4} (\text{rad} \cdot \mu\text{m}^{-1}) \Delta z$$

である。倍率変化量は約 1/2 となり、像回転は、約 10% 減と、改善された。

また、サイドエントリーホルダーによる試料傾斜駆動範囲を、 ± 45 度から、 ± 60 度まで傾斜できるように改造することができた。これらの結果、厚い生物試料の電子線トモグラフィーにも、有利な仕様となっている。しかし改造に伴い、現在、傾斜軸は、フィルムの長辺に対して約 10 度傾斜している。

ラット小脳の生後発達におけるエンドセリン受容体の発現と局在

古家園子, 尾崎 毅

堀 清次 (大阪バイオサイエンス研究所)

強力な血管作働性物質として発見されたエンドセリンは発生の過程において、種々の細胞の増殖や分化を促進することが知られている。エンドセリン受容体には ETA と ETB が知られており、小脳には ETB が局在していることが in situ hybridization 法にて明らかにされている。そこで、正常ラットおよび ETB 突然変異ラットについて小脳の生後発達過程におけるエンドセリン受容体の発現と局在を、抗 ETB 抗体、抗 ETA 抗体を用いた電顕免疫組織化学法にて観察した。

ETB は正常ラットでは生後 5 日から、バグマングリアおよび顆粒層のアストロサイトに発現した。細胞質全体および形質膜に免疫反応が認められたが、特にゴルジ装置に強い反応性が認められた。生後 14 日では、ETB はバグマングリアのゴルジ装置、および細胞突起の形

質膜へ局在した。生後 3 週以降では、バグマングリアのゴルジ装置にのみ局在した。顆粒層のアストロサイトにおいては、生後 3 週間以内に ETB は認められなくなった。ETA は正常ラットにおいては、生後 9–14 日にバグマングリアや顆粒層のアストロサイトに発現し、3 週齢までに消失した。ETB 突然変異ラット (sl/sl) においては、生後 7–14 日に ETA が発現した。ETA は細胞質全体に一樣に存在したが、正常ラット、sl/sl ラットともに、生後 3 週までに消失した。sl/sl ラットでは、正常ラットより 2 日はやく ETA が発現したことから、ETA が ETB の機能を代償している可能性も考えられる。エンドセリンおよびエンドセリン受容体の役割については、今後の解明が待たれる。

生体情報処理室

【概要】

脳における情報処理には、ネットワークを構成している個々のニューロンの発火パターンが意味を持つデジタル的過程と、非線形素子としてのニューロンの興奮性変化が意味をもつアナログ的過程がある。後者には種々の細胞内情報伝達系の活性化が密接に関与しており、それらの活性の量的な違いやバランスの変化は、ニューロン回路で行われているデジタル的处理にも大きな影響を及ぼしている。それゆえ、特定のニューロン・ネットワークへの入力と同様であっても、ある場合は学習・記憶の生成・保持などが起こり、他の場合は成熟・老化、疾患や細胞死が起こるなど、多彩な結果が生じていると予想される。当室では、外界からの刺激または侵襲に対する、

受容体の変化—細胞内の分子の動き—生化学的变化—興奮性の変化—神経機能の変化—脳機能・脳機能障害の発現、という一連の過程をニューロン・ネットワーク上で総合的に捉え、脳における情報処理の基本的な仕組みを理解することを目指している。現在は、中枢ニューロンの興奮性調節機構に関して、以下の 3 テーマを中心に研究を行っている。

なお当室では、吉村・村田両技官が中心となり、所内共用施設として、SGIOrigin2000 を核とする生体情報解析システム、および、各種所内ネットワークサービスの運用を行っている。これらについての詳細は技術課の項を参照されたい。

樹状突起活動電位の伝播調節メカニズムの解析

坪川 宏

樹状突起は、種々のシナプス入力を統合してニューロンの出力を決定するための AD コンバーターとして、情報処理上の重要な役割を担っている。シナプス統合のメカニズムは脳内のニューロンにより異なるが、大脳皮質や海馬の錐体細胞では、細胞体側より逆行性に伝播してくる樹状突起活動電位の寄与が大きいことが近年明らかになってきている。樹状突起における活動電位の特性は、樹状突起に存在する種々の電位依存性イオンチャネルやトランスポーターの活性により精密に調節され、さらにこれらの機能分子は細胞内のシグナル伝達系により直接・間接にコントロールされていると考えられる。この

調節機構の詳細を明らかにするため、イオン・イメージングをはじめとした光学的手法と、パッチクランプ法等の電気生理学的手法を併用し、海馬スライス標本上の錐体細胞を用いて、樹状突起活動電位の解析を行っている。これまで、この活動電位とそれに伴う細胞内 Ca^{2+} の増加が G タンパクを介する細胞内情報伝達系の活性化により調節されることを報告してきた。今年は、細胞内 Ca^{2+} の増加による CaMKII の活性化が樹状突起活動電位の伝播を長時間促進しうること、またこの効果は 3 量体 G タンパク Gq の α サブユニット欠損マウスでも見られることを報告した(Tsubokawa H et al., J Neurosci, 20 : 4878-84.)。

細胞内シグナル伝達系の活性とニューロン活動との時間的・空間的關係の解析

坪川 宏, 高木佐知子

細胞内シグナル伝達系の活性変化は、シナプス伝達の長期増強や長期抑圧といった可塑的变化に重要な役割を果たし、また一方では細胞死を導く要因にもなりうることが知られている。ニューロン機能におけるシグナル伝達の役割をより明確にして行くために、タンパク質リン酸化酵素をはじめとした酵素群の動態と種々のニューロン活動との時間的・空間的關係を詳細に解析することは必要不可欠と考えられる。本研究は、中枢ニューロンの一つのモデルとして海馬スライス標本上の錐体細胞を用

い、3 量体 G タンパク質 G_q 及び G_{11} のカスケードにつながるタンパク質リン酸化酵素、PKC の活性変化を可視化し、ニューロン活動やそれに伴う細胞内 Ca^{2+} 濃度変化と PKC の活性変化との時間・空間的關係を明らかにすることを目指している。今年は、PKC の薬理学的活性化に伴う細胞内移動を、PKC 結合性蛍光色素を単一ニューロン内へ注入して検出することを試みた(Tsubokawa H, Jpn. J. Physiol. 50: S118, Tsubokawa H, Takagi S, Soc. Neurosci. Abs. 26: 876)。

中枢ニューロンの容積調節と興奮性調節の機能的カップリングの解析

高木佐知子, 坪川 宏

脳細胞では、てんかん発作、虚血侵襲の急性期などに swelling, bleb などと呼ばれる細胞膨張が見られる。また、海馬 CA1 野における遅発性細胞死やアポトーシスの過程では持続的な容積減少 (shrink) が観察される。しかしながら、これらの容積変化が神経障害の過程でどのような意味を持つのか不明である。本研究では、種々のニュー

ロン活動の変化と容積変化との関係を解析し、興奮性調節と容積調節の両メカニズムに関与する分子の機能関連を明らかにすると共に、それらの破綻と病態との関連を明らかにすることを目指している。

海馬など細胞が高密度に存在する脳内部位では、細胞が容積変化を起こすと、一定体積あたりの細胞と細胞間

隙の占有パターンが変わり、それに応じて近赤外光の透過率が変化することが知られている。この性質を利用して、海馬スライス標本のニューロンから電気生理学的記

録を行うと共に、内因性光学シグナルのイメージングを行ない、様々なストレス負荷で起こる興奮性変化と容積異常の時間的・空間的特性を解析している。

機能情報解析室

【概要】

二つの分野で研究が行われた。

1) 分子レベルでの生理・病理機能発現の基礎となる蛋白質構造物性の研究が今野により進められた。研究内容は、a) 溶液環境の変化に応答する蛋白質分子構造変化の解析、b) 細胞内蛋白質分解系に関与する蛋白質群の構造・物性解析、c) アミロイド凝集体の形成機序の解析、等である。これらの研究のために、遺伝子工学・蛋白質

工学・諸分光法・X線散乱法・電子顕微鏡法・その他の物理測定法が総合的に適用されている。

2) 脳の高次機能を司る神経機構の研究が達本により進められた。随意運動や思考に関連する脳活動を、サルとヒトを検査対象にして、大脳皮質電位の直接記録・PET（陽電子断層撮影法）・脳磁図・脳波等を併用して解析している。

静電的相互作用で駆動されるアミロイド誘起性蛋白質凝集機構

今野 卓

アミロイド凝集体と他の蛋白質分子との相互作用は、アミロイド関連病理機構の解明に不可欠である。その相互作用の物理化学的性状の一般的解明に寄与するため、細胞毒性をもつアルツハイマー病関連ペプチドがつくるアミロイドと多種類の可溶性蛋白質との間の相互作用を検討した。その結果、このアミロイドは、広範囲の蛋白質種に対して破壊的に働き、凝集・沈殿を引き起こすこ

とが観察された。さらに、変異体ペプチドを使った実験などから、その現象を引き起こす相互作用が、静電的力で駆動されていることも示された。総括として、アミロイドと蛋白質間の相互作用とそれに続く蛋白質構造の崩壊についての一般的スキームを提案した。（Biochemistry (2001) 40, 2148-2154 に発表）

意欲に関係する脳活動の研究

達本 徹

「意欲」の神経機序は不明な点が多い。報酬を得るために運動課題を遂行するサルの意欲は、客観的には測定不可能であるが、様々な要因で変動することが推察される。例えば課題を継続して行くと、報酬を獲得していくのに伴って、課題遂行への意欲は減退していくと考えられる。また、報酬がより望ましいものに変更されれば、意欲は増加するであろう。認知運動課題遂行中のサルの前頭前

野・海馬・前帯状野の脳血流量が、想定される意欲の変化と一致した変動を示すことが陽電子断層撮影法（PET）を用いた実験で明らかになった。大脳辺縁系と前頭前野の「意欲」への関与を示唆する知見と考えられる。この脳活動の詳細を調べるため、大脳皮質電位記録法とPETによる解析を進めている。

総合バイオサイエンスセンター

【概要】

生体内において細胞は、細胞自身の置かれている環境に対して応答反応を起こしながら環境に適応している。細胞は、平常と異なる浸透圧条件下に置かれた時、膨張や収縮を起こした後に次第に元の体積へと回復していく。この現象も細胞における環境適応現象の 1 つといえる。低浸透圧条件下において、細胞が一旦膨張した後に元の体積へと回復していく細胞体積調節メカニズムについては、細胞膨張時に活性化されるイオンチャネルの研究を中心として明らかにされてきた。また、細胞膨張時にはイオンチャネル開口による K^+ や Cl^- のイオン流が発生するばかりでなく、種々のアミノ酸を始めとして、様々な細胞内分子が細胞外へ放出されることが知られている。

これら放出された分子は、放出した細胞あるいは周囲の細胞に対して、細胞外から作用を及ぼすことになる。細胞膨張時に活性化されるイオンチャネルの研究に比して、他の分子の放出機構については、未だ研究が進んでいない。また、細胞膨張は、細胞外の低浸透圧条件下のみならず、例えば低酸素条件や細胞障害時にも起こることが知られていて、その様な条件下でも種々の細胞内分子は細胞から放出され、周囲の細胞に影響を及ぼす。本部門では、細胞膨張時に放出されるアミノ酸の中でも特にグルタミン酸に着目してグルタミン酸の放出経路の同定を目指している。

細胞膨張性グルタミン酸放出機構

挾間章博

細胞に低浸透圧刺激を加えると速やかに膨張するが、その際に種々のアミノ酸の放出が起こることは既に知られているが、それらの分子の膜透過経路については不明である。現在、低浸透圧性膨張に伴うグルタミン酸放出経路の同定を目指している。まず、グルタミン酸脱水素酵素と NAD に対する発色基質を用いて、グルタミン酸をプレートリーダーを用いて容易かつ迅速に測定できるシステムを確立した。このシステムを用いて、グリオーマ

細胞株 C6 に低浸透圧刺激を与えると、細胞外液のグルタミン酸は刺激前の数 μM から、10 μM 以上にまで増大することが観察された。このグルタミン酸放出は Cl^- チャネルの阻害剤を加えても抑制されず、低浸透圧性 ATP 放出を抑制することが知られている Gd^{3+} を加えても抑制されなかった。これらの結果から、C6 より放出されるグルタミン酸は、 Cl^- チャネルでもなく ATP 透過路とも別の透過経路より細胞外に放出されることが示唆された。

動物実験センター

尾崎 毅

【概要】

生理学研究動物実験施設は平成12年4月より、統合バイオサイエンスセンターの設置に伴って岡崎国立共同研究機構動物実験センターとして再出発した。統合バイオサイエンスセンターにおける研究領域は、生命現象の基本に関わる基礎的研究分野が予定されており、その中には環境因子とその生体応答などの課題も含まれている。動物実験センター棟はこれらの研究のための実験環境を用意する支援施設として建設されるもので、建物は第2期工事を予定していたが、平成13年度補正予算に盛り込まれこととなり、当初の予定を繰り上げて建設することが決まった。建物の建設に当たっては、動物センターの全ユーザーを対象としたアンケート調査に基づいて、現状の把握と将来予測を行い、山手地区動物センター棟建設のための基礎資料とした。また、山手地区周辺住民の理解と協力を得るための資料づくりを行う一方、住民説明会に出向いて大方の理解を得ることにつとめ、無事着工にこぎ着けることができた。建物は延べ床面積2,650 m²、地上4階鉄筋コンクリート造りで、1階に検疫動物、無脊椎動物、水生動物などを収容し、2階に管理事務室と検疫室、3、4階にラット、マウス飼育室、飼育準備室などで構成することとした。また、遺伝子改変動物が多い現状と微生物学的見地から3、4階をSPFエリアとすることとし、搬入動物はクリーンアップを前提とした。建築計画が繰り上がったことに伴い、機器の整備計画も急遽繰り上げて実施することとなり、設備機器の仕様の策定から機種を選定、予算要求文書の作成など膨大な作業の中で着々と準備は進んでいる。

なお、動物実験センターが機構共通施設に組織替えになったことに伴って、センターの運営方法も、これまでの動物室委員会を改組して動物実験センター運営委員会と動物センター利用委員会に分けることになり、それぞれの役割が明快に区分された。

生命科学を研究する場において動物実験センターの果たす役割は多岐にわたるが、近年実験動物の福祉に関連した動きが内外から様々な形で現れるようになっている。平成11年度には「行政機関の保有する情報の公開に関する法律」が制定され、動物愛護団体による動物実験攻撃の動きが一段と活発になることが予想される。自治体

からのイヌ、ネコの払い下げ廃止にみられるように、生命科学の現場で必要とする実験動物を巡る攻防はいよいよ切実なものとなっており、動物センターでは、全国的な連絡網と連携して情報の収集につとめると共に、的確な対応を行うよう関係者に働きかけを行っている。

生理学、基礎生物学両研究所の研究人口の増大と、活発な研究活動を反映して動物センターの利用はますます拡大し、マウス、ラットの飼育室は慢性的な過剰飼育状態が続いている。このためセンター業務の様々な部分でひずみが生じており、山手地区の動物センター棟の稼働するのをひたすら待っているのが現状である。こうした中、偶然見つかったマウスの蟻虫卵から、調査の結果、大多数のマウス飼育室での大規模な蟻虫の汚染のあることが判明した。これは、頻繁に行われている動物施設間における系統動物の授受の際に、見逃されて入ってきたものが、洗浄室の作業を介して拡大したものではないかと推測される。マウス蟻虫に対しては、これまでさしたる被害がみられないことから軽視されてきたことも一因としてあげられ、実態は不明であるものの全国的な規模で相当の施設に汚染があるものと推測される。汚染の除去の方法については現在検討中である。

近年、動物施設間における系統動物の授受が増えたことによって、搬入動物による微生物汚染の危険は以前にも増して高まっている。また、遺伝子改変マウスの利用が実験件数の20パーセントを超え、維持系統の数も減少する気配はない。これらの問題に対処するには、受精卵の移植技術を用いた微生物学的浄化と凍結保存が唯一の方法といえる。動物センターでは、かねてよりこのような事態がくることを予想して胚操作技術の導入に取り組み、ユーザーの協力を得て積極的に受精卵の凍結保存、体外受精、移植などを行ってきた。また、外注委託による系統動物の維持も試み、飼育室の清浄度の維持には効果がみられたものの、飼育スペース不足の緩和に対しては期待したほどの効果がみられていない。このことは飼育中の動物の多くが実験に使用されつつあるもので、予備もしくは実験終了後の動物がほとんど存在しないことを意味している。このため平成12年度の実験委員会は、動物申請のあった動物センターで収容しきれないマウス

の飼育室 1 室と、行動観察のためのマウス飼育実験室 2 室を新たに動物実験区域として認可した。科学的かつ倫理的な動物実験を行うためには設備機器と共に組織体制の整備が必要であり、動物実験区域の指定は動物センター以外の場所における動物の飼育を条件付きで認めるための方策として、これを制度化したものである。動物実験の専用区域として用意された区域に比してこれらの区域は設備の面でも組織の面でも万全とは言い難く過渡的な措置として位置づけるほかはない。今後に残された課題である。

実験用のニホンザルの供給については未だ不安定な状態のままであるが、追い打ちをかけるように平成 12 年 12 月にはマスコミを通じて、有害駆除されたニホンザルの違法取引の問題が取り上げられ、動物実験に対して厳しい目がむけられることとなった。有害駆除されたニホンザルを取り扱う際に所定の法的手続きが必要なことはもちろんであるが、解決の方向性を示さず動物愛護団体の主張をそのまま取り上げるマスコミの安易な姿勢も問題である。それにも増して、再現性の高い動物実験を行うためには、形質のそろった健康な実験動物が安定的に供給される必要があり、研究用ニホンザルの繁殖コロ

ニーの一刻も早い構築が望まれる。現在流通しているニホンザルは動物園や野猿公園など人為的な飼育環境下で繁殖されたものが大部分で、健康状態のチェックも以前に比べて改善されてきてはいるが、栄養状態や個体のばらつきは相変わらず大きいのが実状である。なお、動物実験センターでは、平成 11 年度より行っているサルの健康管理のための血液検査サービスを 12 年度も継続しておこなっているが、よりよい獣医学的ケアのためには臨床獣医師の配置もしくは嘱託契約などを考慮することが望まれる。

設立以来 20 年を経て、設備機器の老朽化によるトラブルも深刻である。平成 12 年度においては、ボイラーのトラブルにより空調機の加湿停止と、飼育資材滅菌用のオートクレーブ 1 台が 1 ヶ月間使用不能になり、関係者をやきもきさせたほか、水生動物室では F R P 製貯水槽の塗装が溶出したり、加熱冷却ユニットの損耗が続発した。いずれも機器の耐用年数を過ぎたことが主な原因であり、計画的な機器の更新が望ましい。今後は現在進行中の山手地区動物センター棟の竣工に照準を追わせて、設備においても組織においても、名実共に新しい動物実験センターをめざして再編強化をすすめていきたい。

技術課

大庭明生

1. 概要

4月に伊藤嘉邦、永田治、山口登各主任の係長への昇任、小木曾昇、戸川森雄各係員の主任への昇任、神谷絵美係員の脳形態解析部門への配置替えを行った。6月に神経情報部門水谷裕美係員の退職があった。

本年度から新たな技術テーマのもと9技術部会（将来検討部会、バイオ技術部会、可視化技術部会、科学英語表現部会、エレクトロニクス工作部会、実験安全部会、WWW技術部会、機械工作部会、実験サル部会）の設置を決め、その活動に入った。また生理学概論、植物学研究、非侵襲研究領域をテーマに、第3回技術課セミナーを開催した。さらに課員の研究活動への貢献を一層進めるために下記の事業も立ち上げた。(1)生理科学実験技術トレーニングコースの担当と技術指導 (2)科学研究費補助金(奨励研究(B))申請の推進 (3)課題報告型技術シンポジウムの開催 (4)機械工作基礎講座の開講 (5)放送大学利用による職員研修の開催

課は研究支援活動の過去5年間の報告を点検評価委員会から求められ、(1)技官の配置と研究支援推進員の活用、(2)生理科学実験技術トレーニングコースにおける技術指導、(3)国内外の学会等への積極的な参加の奨励、(4)技術部会による研修、(5)研究施設系におけるあらたな職務の

創出、(6)課の組織改革の推進の6項目を報告し、今後の課題として、(1)課員の自己研修能力を一層の強化する、(2)課活動を研究推進のための積極的な貢献に発展せる、(3)研究の国際競争下に対応せる課のあり方に変革する、の3点をあげた。

一方、大学・大学共同利用機関独立行政法人化問題に対して自然科学系・大学共同利用機関による『大学共同利用機関における技官の独法化に関する検討会』を設置し、議論を重ね、①技官組織の確立、②教官と技官の相補的、協調的な職務遂行の確立、③技官に相応しい給与体系の整備と技術評価の確立、④研修制度の整備と適切な人事交流制度の導入を提言としてまとめた。生理学技術研究会は第23回を開催し、今回は基礎生物学研究所技術課主催の第12回生物学技術研究会と合同開催し、研究所の枠を外し、技術系職員の技術本位の交流の場としての拡充した。また機構長招聘三技術課合同セミナーの第2回を『ナノ・マイクロテクノロジー』をテーマに開催した。

これらの活動は『生理学技術研究会報告』『生理学研究所技術課報告』『三技術課合同セミナー報告書』としてまとめた。



第24回生理学技術研究会・第12回生物学技術研究会合同開催

2. 施設の運営状況

①統合生理研究施設

(1) 生体磁気計測装置室

永田 治, 竹島 康行

【概 要】

生体磁気計測装置（MEG）の利用率は表 1 に示すようにほぼ 100% の稼働率であり今後も高い需要が見込まれる。装置の維持管理としては導入後 10 年を経過することもあり、機械系および電気装置各部に経年変化による損傷および劣化が見られるため徐々に修理頻度が上昇している。センサにおいては SQUID 素子のノイズレベル増加は見られないので問題ないと思われるが、構造上デュワーの真空度はほぼ 3 年周期で低下するため、本年度においては下部センサの真空引を実施している。また、シールド

ルームは材質劣化の影響が最も懸念されるため、電波・磁場の漏洩性能試験を実施した。結果を図 1・2 に示す。ドア部分に部材の経年変化による歪みが確認されたが、ほぼ竣工時の性能を維持しており良好な結果を得た。ただし、パーマロイ合金の着磁と応力劣化が多少見られるため全体のレベルが上昇しているため、消磁作業を行った方がよいが、センサを撤去しなければならないためしばらくは現状で運用する。

年 月	総日数	休 日	点検調整	所内利用	稼働率	所外利用	備 考
2000 年 04 月	30	10	2	17	100%	1	
05 月	31	11	7	10	100%	3	センサ B 修理 5 日
06 月	30	8	2	14	100%	4	
07 月	31	11	2	16	100%	2	トレーニングコース 1 日
08 月	31	8	2	19	100%	2	トレーニングコース 4 日
09 月	30	10	2	16	100%	2	
10 月	31	10	2	17	100%	2	
11 月	30	10	2	16	100%	2	
12 月	31	11	3	17	100%	0	
2001 年 01 月	31	12	2	16	100%	1	
02 月	28	9	2	14	100%	3	
03 月	31	10	2	17	100%	2	

* 稼働率 = 利用日数 / (総日数 - (休日 + 点検調整日)) × 100

表 1. 生体磁気計測装置稼働率表（平成 12 年度）

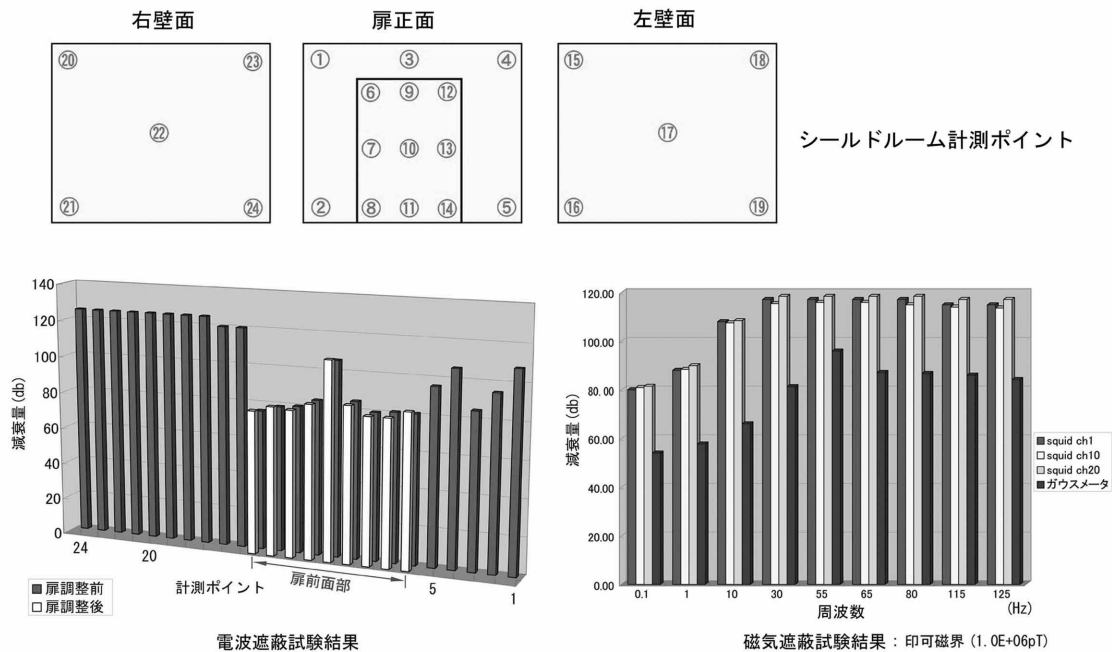
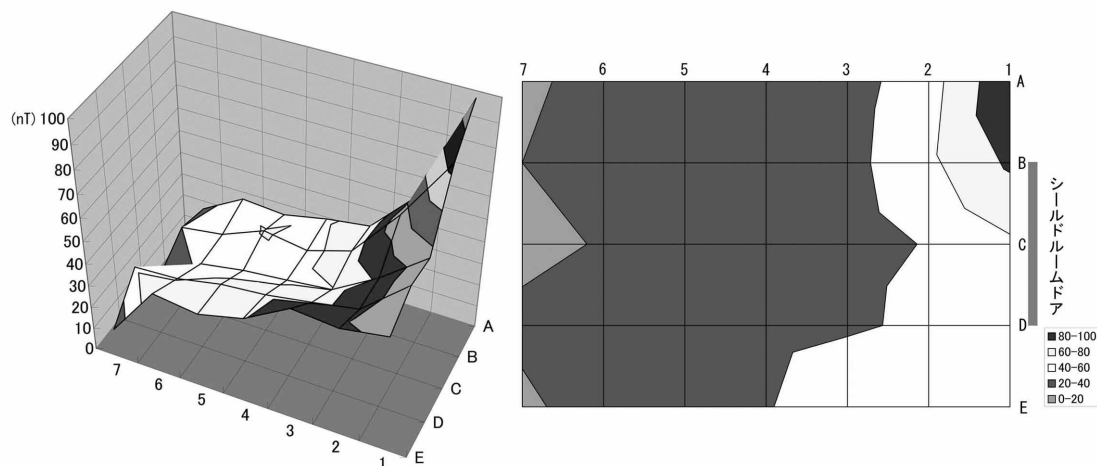


図 1



②脳機能計測センター

(1) 形態情報解析室

山口 登

【概要】

今年度における超高圧電子顕微鏡共同利用実験は、合計 12 課題が採択され、全ての課題が実施された。これらの共同実験の成果は、超高圧電子顕微鏡共同利用実験報告の章に詳述されている。超高圧電子顕微鏡の年間の利用状況を表にまとめたので下記に示す。稼働率は、利

用日数と使用可能日数より求めている。本年度の主な超高圧電子顕微鏡の改良・修理としては、レンズ用電源の修理、モード切り替え用基板の交換、サイドエントリーホルダーの修理が行われた。

2000年度 超高压電顕月別稼働率

年 月	総日数	休 日	調整日	使用可能 日 数	所内利用	所外利用	計	稼働率	備 考
2000 年 4 月	30	10	4	16	9	4	13	81%	
5 月	31	11	11	9	8	1	9	100%	修理 8 日
6 月	30	8	4	18	10	3	13	72%	
7 月	31	11	11	9	10	5	15	167%	修理 8 日
8 月	31	8	5	18	12	6	18	100%	修理 1 日
9 月	30	10	4	16	9	1	10	63%	
10 月	31	10	4	17	7	3	10	59%	
11 月	30	10	4	16	8	2	10	63%	
12 月	31	11	10	10	11	3	14	140%	修理 7 日
2001 年 1 月	31	12	3	16	6	8	14	88%	修理 2 日
2 月	28	9	2	17	3	16	19	112%	
3 月	31	10	2	19	9	15	24	126%	
計	365	120	64	181	102	67	169	93%	

フィラメント点灯時間 477.1 時間

使用フィルム枚数 7,028 枚

(2) 機能情報解析室

佐藤茂基

【概要】

長年利用されてきた、生体画像解析装置が 12 年度を最後に運用を停止し、新しい MR 装置 (fMRI) の導入が決まった為、生体画像解析装置は毎年 1 月に行っている定期点検を今回行わず、新規装置導入まで装置を稼働させる予定であった。しかし、平成 13 年 2 月 9 日に装置か

ら異常音が発生し、13 日に循環冷却器の故障が判明したため、装置利用を停止した。修理に相当な費用と時間が掛かる見込みから修理を断念し、20 日に安全性を考慮し装置の運用を終了させた。

平成 12 年度の MR 装置利用実績を別表に記す。

【各機器利用率】

平成 12 年度生体画像解析装置月別稼働率

年月	総日数	保守	使用可能	所内利用	所外利用	計	利用率	備考
2000 年 4 月	30	0	30	5	0	5	17%	
5 月	31	1	30	2	0	2	7%	
6 月	30	0	30	3	0	3	10%	
7 月	31	3	28	2	0	2	7%	
8 月	31	0	31	3	1	4	13%	
9 月	30	1	29	1	1	2	7%	停電
10 月	31	2	29	6	1	7	24%	停電
11 月	30	0	30	2	0	2	7%	
12 月	31	1	30	3	0	3	10%	窒素補充
2001 年 1 月	31	2	29	6	1	7	24%	
2 月	20	7	13	1	0	1	8%	冷却機故障
3 月	0	0	0	0	0	0		運用終了
計	326	17	309	34	4	38	12%	

*保守以外の祝祭日は、使用可能日に含めた。

平成 12 年度リアルタイム装置月別稼働率

年月	総日数	保守	使用可能	所内利用	所外利用	計	利用率	備考
2000 年 4 月	30	1	29	0	5	5	17%	
5 月	31	1	30	0	0	0	0%	
6 月	30	1	29	0	1	1	3%	
7 月	31	1	30	0	5	5	17%	
8 月	31	1	30	0	5	5	17%	
9 月	30	2	28	0	5	5	18%	停電
10 月	31	3	28	0	5	5	18%	停電
11 月	30	1	29	0	6	6	21%	
12 月	31	2	29	0	11	11	38%	
2001 年 1 月	31	4	27	0	0	0	0%	保守
2 月	28	1	27	1	0	1	4%	
3 月	31	1	30	0	3	3	10%	
計	365	19	346	1	46	47	14%	

*保守以外の祝祭日は、使用可能日に含めた。

(3) 生体情報処理室

吉村伸明，村田安永

生理学研究所における中央コンピュータの利用形態は、生体情報解析システム（高機能ワークステーション＋アプリケーション、高画質フルカラープリンタ等）、情報サービス（e-mail, net-news, WWW 等）、ファイルサービス（ftp 等）、プログラム開発及びメディア変換などに分類することができる。また、これらの利用形態を円滑に運用していくためには、所内 LAN の管理、整備も重要である。このような現状をふまえたうえで、中央コンピュータの整備を進めている。

生体情報解析システムは、平成 11 年 2 月に導入を行い

約 2 年が経過した。利用登録者は 62 名で、各部門施設より研究推進のための積極的な利用がある。高画質フルカラープリンタは 2,661 枚の利用があった。

ネットワーク利用状況は、メール登録者が 337 名。WWW 登録者が 30 名。LAN の端末数が 800 台。所外からのメール受信数は 6,982/週。所外へのメール発信数は 4,127/週。WWW は一年間に 66,093 の端末からアクセスがあり、総アクセス数は 168 万回。所内向けのダイヤルアップサービスは 222 回/週、38 時間/週の利用があった。

③動物実験センター

佐治俊幸，小木曾昇，広江 猛

【概要】

【陸生動物室】平成 12 年度の飼育室利用部門数は、28 研究部門（生理研 18 部門，基生研 10 部門）であった。例年どおり脳研究の材料としたマウスやラット，ネコの飼育数が増加傾向を示した。一方サル，および抗体作製を目的としたウサギの飼育数が減少傾向を示した。所外から導入されるマウス（遺伝子改変動物中心）は件数が増えた反面，微生物モニタリング基準に適合するマウス

系統が少ないため，胚操作技術を利用したクリーン化（病原微生物除去，11 件）および受精卵凍結事業（15 件）を行った。また，ラットを用いた Tg の作製および受精卵凍結を試みている。技術指導では，マウスにおける胚操作関連技術（胚の採取，体外受精等）や系統維持方法が増えつつある。

【水生動物室】

平成 12 年度の水生動物室利用状況は、生理研・基生研両研究所あわせて 6 部門・施設、40 件の利用があった。

加熱冷却ユニットの動作不良が 8 件あったが、代替フロンを用いる小型コンプレッサーの入手の目処が立ち、順次修理を行っている。地下貯水槽の海水水位計の故障及び揚水ポンプ動作不良のため、一時的に海水の使用が出来ない時期があった。現在も、この故障は続いており、2 台設置してある揚水ポンプの内、1 台のみでの片肺運転を続けている。

【E 地区動物実験センター】

E 地区へ動物実験センターを建設することが決定され、基本設計を行った。

概要としては、

5 F：設備機械室

4 F：SPF 飼育室(8)、SPF 実験室、胚操作室

3 F：洗浄室関連、SPF 飼育室(5)

2 F：管理事務室、実験室(4)、検査室、手術室、解剖室

1 F：CV 動物飼育室、水生動物室

となり、平成 14 年 3 月竣工予定である。

陸生動物 部門別・動物種別搬入数(平成 12 年度)

動物種 部門	マウス	TG マウス	ハム スター	ラット	ウサギ	モル モット	ネコ	サル	マーモ セット	合計
神経化学	60	996		17						1,073
超微小形態生理		25		99						124
細胞内代謝	259		3	8						270
生体膜	166			36		4				206
機能協同	123			228	6	108				465
能動輸送				2	6	8				16
神経情報	785	95		2						882
液性情報	83	44		1	12	4				144
高次神経機構	496	3,097		117	3					3,713
高次神経性調節				3			15	5		23
生体システム				34			19	2		55
高次液性調節								1		1
感覚・運動機能				6						6
高次脳機能	41	18		84				4		147
動物実験センター	330	22		293						645
脳形態解析	42	98		74	30	68				312
大脳神経回路論				47						47
形態情報解析室				2						2
細胞機構	2	6			16					24
生殖	10									10
細胞分化	495	1,381		10		3				1,889
感覚情報	289	565		12						866
行動制御	13	4		611						628
種分化第一	119	44		121	14			2	6	306
大型スペクトロ グラフ室	48									48
細胞器官培養	216	7								223
形質転換生物	95	172								267
合 計	3,672	6,574	3	1,807	87	195	34	14	6	12,392

陸生動物 月別・動物種別搬入数(平成 12 年度)

動物種 \ 月	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	合計
マウス	370	312	313	222	275	180	378	346	280	326	276	394	3,672
TGマウス	565	619	765	459	484	403	494	597	358	524	637	669	6,574
ハムスター							3						3
ラット	118	131	159	163	146	112	155	169	135	150	167	202	1,807
ウサギ	5	2	17	9	3	2	15	5	19	8		2	87
モルモット	25	18	18	6	3		6	20	35	40	24		195
ネコ		14	4		6					4	6		34
サル					6	1	3			4			14
マーモセット											6		6
合 計	1,083	1,096	1,276	859	923	698	1,054	1,137	827	1,056	1,116	1,267	12,392

水生動物 月別・動物種別搬入数(平成 12 年度)

動物種 \ 月	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	合計
ゼノバス	35			50			20				10		115
メダカ		1,000											1,000
ウニ												60	60
ヒトデ		238	450					1,220					1,908
キンギョ		410	350										760
アユ		500				530							1,030
タイ				150									150
ウナギ			20		20		20	20		20			100
海水(t)			8		8			12			16		44
合 計	35	2,148	820	200	20	530	40	1,240	0	20	10	60	5,123

④共通施設

(1) 電子顕微鏡室

前橋 寛

【概要】

一昨年度から始まった電子顕微鏡講習会は、3 日コース（凍結超薄切片作製法と電子顕微鏡観察）に 13 名の参加があり盛況であった。その第 1 日目の午前は昨年度東京大学から移転された 100 kV 透過電子顕微鏡（日本電子 JEM-1010）を使っ

たの取扱い講習会を行い、午後から今年度設置（2000 年 6 月）の 120 kV 透過型電子顕微鏡（フィリップス Tecnai-12）の取扱い説明、試料の撮影実習を行った（フィリップスアプリケーションラボラトリー 小林恵美子講師）。第 2、3 日目は、ビデオやミ

クロトーム用ビデオカメラを用いた凍結超薄切片作製講習および実習が行われた（日製産業（株）科学機器セン

（B）研究内容一覧表

本年度、室を利用してなされた研究の総件数は 42 件であった。機構内では 30 件あり、機構外は、国内で 6 件、国外ではイタリア、スペイン、ハンガリー、中国の研究者による利用が 6 件あった。下記の表はその研究部門・施設、大学、研究所と研究内容の一覧表である。

利用内容一覧表 (1)

三研究所

研究所	部門・施設	研究内容
生理研	機能協関	・浸透圧調節に伴う培養細胞容積変化の微細構造的解析 ・分泌刺激に応じた上皮細胞膜の形態変化の観察 ・発生過程における標的細胞依存の運動神経細胞の形態学研究
	超微小形態生理	・DNA 観察 (高分解能観察の予備実験) ・複素電子顕微鏡の位相板の観察 ・灌流唾液腺における傍細胞輸送調節機構
	生体膜	・ケイジドカルシウム試薬を用いた開口放出に伴う微細形態変化の研究
	液性情報	・チャネル蛋白質の細胞内局在の観察 ・カルシウム測定
	神経情報	・組織切片を用いての軸索上の K ⁺ channel clustering の変化の観察 ・システインプロテアーゼの阻害とアストロサイトの分化誘導についての研究
	高次神経機構	・セロトニン 2A 受容体欠損マウスの作成と機能解析
	脳形態解析	・受容体・チャネルの免疫電顕 ・膜上機能分子の動態変化と生理的機構の解析
	組織培養標本室	・小腸絨毛上皮細胞下繊維芽細胞の免疫組織学的研究
	技術課	・コメツキムシの走査像微細構造観察 ・脊髄前角ニューロン細胞体の 3 次元解析
基生研	形態形成	・線虫突然変異体を用いた細胞増殖因子の機能に関する研究 ・アフリカツメガエル胚における種々の抗原タンパク質の発現とその局在の解析
	生殖	・キンギョ卵母細胞核マトリクス内に存在するアクチン繊維の構造解析
	細胞機構	・植物細胞においてストレスにより変化する細胞内小器官の電子顕微鏡観察 ・mutant (Arabidopsis) の形態的観察
	種分化機構第二	・ヒメツリガネゴケの形態形成遺伝子の解析 ・地衣類の無性生殖器官、有性生殖器官の観察
	細胞増殖	・ショウジョウバエ脳における神経細胞の微細形態の観察
	感覚情報処理	・ノックアウトマウスを用いた PTPS の機能の解析 ・神経細胞の axon の trace
	遺伝子発現統御第一	・イネに斑入り模様を引き起こす突然変異体の解析
	細胞内エネルギー変換機構	・酵母の自食作用過程における分子動態の形態学的研究
機 構 共通施設	統合バイオサイエンスセンター	・シロイヌナズナのシュート頂分裂組織および葉の形態の観察

利用内容一覧表 (2)

所外 (国内)

大学・研究所	研究代表者名	研究内容
富山大学	唐原一郎	エンドウ上胚軸のカスバリー線形成の光による調節 —R・FR 領域の解析—
理化学研究所 (播磨)	瀧 景子	赤血球裏打ち細胞骨格構造に含まれるアクチンセグメントの解析
鶴見大学	尾口仁志	ヒト歯間上皮細胞と各種生体材料との細胞生物学的検討
東京歯科大学	橋本貞光	灌流唾液腺における傍細胞輸送調節機構
京都府立大学	瀬尾芳輝	神経細胞変性の形態学的検討
名古屋市立大学	馬場広子	グリア細胞による神経伝達調節機構の解明

所外 (国外)

国名, 大学, 研究所	研究者名	研究内容
イタリア カリアリ大学	Marcello, Peppi	唾液腺における傍細胞輸送機構
スペイン ミゲル・エルナンデス大学	Lujan, Rafael	膜上機能分子の局在解析
ハンガリー デブレツェン医科大学	Akos, Kulik	膜上機能分子の局在解析
ハンガリー ハンガリー科学アカデミー	Nyiri, Gabor	膜上機能分子の局在解析
中国 香港中文大学	Savio Chan	海馬興奮性シナプスの動態と微細形態
中国 大連医科大学	Wu, Yue	海馬興奮性シナプスの動態と微細形態

(2) 機器研究試作室

加藤勝己

【概要】

機器研究試作室は多種多様な医学・生物学用実験機器の開発と改良，それに関わる技術指導，技術相談を室の役割としている。今，我々の周りには便利な物品があふれ，自分で工夫して作ったり，改良する機会が少なくなり，新しい研究には新しい研究機器を作るという『ものづくり』が希薄になり，一方で，最近の研究の多様化は室に新たな役割の模索を迫っている。そうした認識のもと，『ものづくり』能力の重要性の理解と機械工作ニーズの新たな発掘と展開を目指すために，室では，2000年度から，医学・生物学の実験研究に使用される実験装置や器具を題材にして，機械工作の基礎的知識を実習主体で行う機械工作基礎講座を開講した。参加希望者は，生理研8部門21名，基生研11部門27名と多く，ガ

イダンスの後9グループに分けて，1グループ4回で行い，一人のけが人も無く無事に講習を終了した。2001年度は，講習会参加者のアンケートを下に，簡易電気泳動装置の製作を題材に準備検討を行い，実施のための準備が整った。

今年度当施設で製作した実験機器・部品としては，各種動物実験用器具，各種凍結割断機用関連部品，光学顕微鏡用各種ステージ，マニピュレーター近傍部品，各種分光用キュベット，各種プリズム及びフィルターホルダーなどの各種部品などがある。

なお，機器研究試作室の平成12年度の利用状況は，以下の通りである。

機器研究試作室利用機器表（件数）

月	フライス盤	ボール盤	コンターマシン	旋盤	横切盤	グラインダー	切断機	NC フライス盤	その他	計
4	35	34	22	11	17	4	6	1	74	204
5	20	21	15	9	13	0	6	0	61	145
6	30	30	29	21	31	9	5	4	76	235
7	25	25	20	15	16	4	5	1	48	159
8	17	12	19	18	7	4	3	0	32	112
9	28	22	21	15	9	6	7	2	54	164
10	23	22	23	25	16	16	1	0	59	185
11	7	14	7	1	3	1	4	3	21	61
12	6	10	5	5	5	3	2	2	32	70
1	13	13	6	9	6	1	1	2	34	85
2	5	4	2	3	9	2	1	2	16	44
3	10	7	7	16	11	3	3	2	30	89
合計	219	214	176	148	143	53	44	19	537	1553

機器研究試作室利用人数表

月	生理研	基生研	その他	合計	延べ時間
4	93	6	0	99	139
5	68	3	0	71	88
6	105	6	0	111	143
7	61	6	0	67	104
8	39	8	0	47	92
9	57	11	0	68	128
10	42	26	0	68	151
11	21	8	0	29	35
12	35	4	0	39	57
1	43	4	0	47	45
2	24	4	0	28	34
3	44	2	0	46	88
合計	632	88	0	720	1111

機器研究試作室部門別利用状況

高次神経性調節	1 1 1 名	統合生理研究施設	7 5 名	機能情報解析室	7 5 名
生体膜	6 3 名	脳形態解析	6 0 名	生体システム	4 1 名
形態情報解析室	3 9 名	超微小形態生理	3 1 名	統合バイオ	2 5 名
動物実験施設	2 5 名	心理生理学	2 3 名	神経化学	1 7 名
神経情報	1 5 名	機能協関	1 1 名	液性情報	1 0 名
高次液性調節	4 名	生体情報処理室	3 名	技術課	2 名
高次神経機構	2 名				
感覚情報処理	2 0 名	大型スペクトロ	1 1 名	R I 実験施設	8 名
遺伝子発現統御第一	7 名	種分化機構第一	7 名	細胞情報	6 名
細胞機構	5 名	形態形成	4 名	人工気象室	4 名
情報制御	3 名	エネルギー変換	3 名	種分化機構第二	3 名
細胞分化	2 名	細胞増殖	2 名	生殖	1 名
環境耐性植物実験室	1 名	技術課	1 名		
分子研その他	0 名				