

# 【 研 究 会 報 告 】

## 研究会報告

## 〔 目 次 〕

1. シナプス可塑性の分子機構 (代表者: 真鍋俊也 2000年6月15日~6月16日) .....	165
2. イオンチャネルの細胞局在化と機能制御に関する研究 (代表者: 倉智嘉久 2000年8月17日~8月18日) .....	174
3. ATP受容体による生体機能制御とその分子メカニズム (代表者: 古家喜四夫 2000年8月24日~8月25日) .....	184
4. ポストゲノム時代の脳科学 (代表者: 畠中 寛 2000年9月28日) .....	193
5. $Ca^{2+}$ シグナルと膜輸送体の発現および機能調節 (代表者: 河原克雅 2000年9月28日~9月29日) .....	195
6. 神経科学研究の新しいアプローチ (代表者: 畠中 寛 2000年9月29日~9月30日) .....	201
7. シナプス伝達の機能と分子の接点を探る (代表者: 工藤佳久 2000年10月26日~10月27日) .....	208
8. 中枢神経系における局所回路とその機能特性 (代表者: 三上章允 2000年11月21日~11月22日) .....	222
9. 定量的高分解能電子顕微鏡法 (代表者: 藤吉好則 2000年11月21日~11月22日) .....	235
10. 生殖細胞の構造と機能発現 (代表者: 年森清隆 2000年11月24日~11月25日) .....	238
11. 心・血管系イオンチャネルの発生分化とその適応 (代表者: 當瀬規嗣 2000年11月28日~11月29日) .....	244
12. 脳磁場ニューロイメージング (代表者: 栗城眞也 2000年11月29日~12月1日) .....	254

13. シナプスの形成・維持・可塑性 （代表者：武内恒成 2000年12月7日～12月8日） .....	273
14. 消化管機能 （代表者：鈴木裕一 2000年12月14日～12月15日） .....	278
15. 脳の情報統合と行動発現のメカニズム - 感覚知覚から生体反応形成まで - （代表者：泰羅雅登 2001年1月11日～1月12日） .....	285

## 1. シナプス可塑性の分子機構

2000 年 6 月 15 日- 6 月 16 日

代表・世話人：真鍋俊也（神戸大学・医学部）

所内対応者：森泰生（岡崎国立共同研究機構  
統合バイオサイエンスセンター）

- ( 1 ) 小脳顆粒細胞の成熟過程における電位依存性カリウムチャンネル Kv4.2 の発現と役割  
中平健祐（統合バイオサイエンスセンター，生理学研究所）
- ( 2 ) P/Q 型  $Ca^{2+}$  チャンネル異常を伴う小脳変性症マウスの分子神経生理学的解析  
若森 実（生理学研究所）
- ( 3 ) 神経栄養因子によるグルタミン酸受容体発現調節とその分子メカニズム  
斎藤真子（新潟大学脳研究所）
- ( 4 ) 神経栄養因子による神経伝達物質放出の制御  
大西浩史（三菱化学生命科学研究所）
- ( 5 ) シナプス可塑性における脳由来神経栄養因子の役割  
津本忠治（大阪大学医学部）
- ( 6 ) 新しい発生工学技術の開発によるアミノ酸変異導入マウスの作成  
笹岡俊邦（国立精神神経センター）
- ( 7 ) プルキンエ細胞特異的に代謝型グルタミン酸受容体 mGluR1 を発現する  
mGluR1-レスキューマウスの作成および解析  
饗場 篤（東京大学医科学研究所）
- ( 8 ) GABA ニューロンを標識する遺伝子改変マウスの開発  
柳川右千夫（生理学研究所）
- ( 9 ) 中枢神経シナプスの活性化による，シナプス前・後膜接着分子 N-cadherin の存在様式の変化  
田中秀和（大阪大学医学部）
- ( 10 ) カドヘリンスーパーファミリー：ゲノム構造と機能  
八木健（大阪大学細胞生体工学センター，生理学研究所）
- ( 11 ) 終脳特異的細胞接着分子のシナプス可塑性，参照記憶，sensorimotor gating における役割  
中村和裕（順天堂大学医学部）
- ( 12 ) PDZ 領域 1 回とアクチン線維結合領域を持つ足場蛋白 Neurabin および Afadin の局在と機能  
溝口 明（京都大学医学部）

### 【参加者名】

田中秀和（大阪大学・医・情報薬理），藤本崇宏（大阪大学・医・情報薬理），真鍋俊也（神戸大学・医・生理学第一），志牟田美佐（神戸大学・医・生理学第一），駒井章治（神戸大学・医・生理学第一），新里和恵（神戸大学・医・生理学第一），篠江徹（神戸大学・医・生理学第一），北村宏幸（神戸大学・医・生理学第一），饗場篤（東京大学・医科学研究所），中村和裕（順天堂大学・医），狩野方伸（金沢大学・医・生理学第二），新石健二（金沢大学・医・生理学第二），福留優子（金沢大学・医・生理学第二），

吉田隆行（金沢大学・医・生理学第二），笹岡俊邦（国立精神神経センター・神経研究所），松田由喜子（国立精神神経センター・神経研究所），尾藤晴彦（京都大学・医・神経細胞薬理），高橋正身（三菱化学・生命科学研究所），大西浩史（三菱化学・生命科学研究所），古賀毅（三菱化学・生命科学研究所），井ノ口馨（三菱化学・生命科学研究所），深澤有吾（三菱化学・生命科学研究所），斎藤真子（新潟大学・脳研究所），永野聖聖（新潟大学・脳研究所），溝口明（京都大学・医），津本忠治（大阪大学・医・

神経生理), 小原圭吾 (大阪大学・医・神経生理), 北村明彦 (大阪大学・医・神経生理), 惣谷和広 (大阪大学・医・神経生理), 中平健祐 (生理学研究所), 森泰生 (生

理学研究所), 井本敬二 (生理学研究所), 若森実 (生理学研究所)

### 【概要】

シナプス可塑性やそれに関連する記憶・学習といった脳高次機能に興味をもって研究を進めている多くの分野の研究者が一堂に会して, 脳の可塑性を分子レベルで明らかにするためにどのようなアプローチが可能かを議論し, 同分野の今後の展望を探った。具体的には, 最近特に注目されている細胞接着分子や神経栄養因子のシナプス可塑性における機能に焦点を当て, これらの分子を出

発点として, 脳高次機能の全体像を解明するための手がかりが得た。また, 異なる分野の研究者が集まることにより, 次世代に向けた新たな研究法の模索やそれに基づいた新たな共同研究への発展も視野に入れた。方法論という点からは, 最近多くの研究室で新しいタイプの遺伝子改変動物の作製が試みられているが, このような点についても議論した。

## (1) 小脳顆粒細胞の成熟過程における電位依存性カリウムチャンネル Kv4.2 の発現と役割

中平健祐<sup>1,2</sup> (岡崎国立共同研究機構<sup>1</sup> 統合バイオサイエンスセンター,<sup>2</sup> 生理学研究所・神経情報)

小脳顆粒細胞では, 前駆細胞の段階から遅延整流型のカリウムチャンネル遺伝子 Kv3.1 が発現し, 最終分裂後の内顆粒層への移動に伴い A-type チャンネルの Kv4.2 が発現する。培養系では, この A-type 電流成分と同時期にナトリウムチャンネルも発現し, 活動電位が観察されるようになる。A-type カリウムチャンネルは, 低い膜電位で開いて脱分極を抑制し, ひとたび脱分極状態になると不活性化する特徴を持つため, 樹状突起においては入力シグナルの取捨選択に関わるゲートの役割を果たす可能性があり, また, 細胞体からのバックプロパゲーションを制御することでシナプス伝達の可塑性に関わっている可能性が考えられている。

我々は小脳顆粒細胞の培養系を用いて, この A-type 電流成分が実際に Kv4 サブファミリーによって担われていることを示した。また, Kv4.2 ドミナントネガティブ変異体を用いた特異的阻害実験から, この電流成分が活動

電位のスパイク発生を抑制するように働くことを明らかにした。この成分は静止膜電位等には関わっておらず, この成分を阻害した小脳顆粒細胞は培養下で正常な形態変化を示した。

我々の用いている培養細胞系における Kv4.2 蛋白質の発現は細胞体に局在しており, これはちょうど内顆粒層へ移動した直後の顆粒細胞と同様である。in vivo ではこの後, 樹状突起に移行してシナプス形成の場である glomeluri に局在するようになる。培養系で樹状突起への移行が見られない理由としては苔状線維からの入力の欠除, グリア細胞との相互作用がないことなどが可能性として考えられるが, 最近, グルタミン酸による刺激が Kv4.2 蛋白質の樹状突起への移行を促すことを示唆する結果が得られた。まだ予備的なデータではあるがこれについても発表したい。

## (2) P/Q 型 Ca<sup>2+</sup>チャンネル異常を伴う小脳変性症マウスの分子神経生理学的解析

若森 実, 森 泰生, 松下かおり, 井本敬二 (生理学研究所, 液性情報)

電位依存性 Ca<sup>2+</sup>チャンネルのうち, P 型 Ca<sup>2+</sup>チャンネルをコードする  $\text{Ca}_v1A$  サブユニットに変異が入ることにより, ヒトで Episodic ataxia-2, Familiar hemiplegic migraine,

SCA6 等の中枢神経疾患が引き起こされる (Ophoff et al, *TIPS* 19, pp121-127, 1998)。しかし, 変異による P 型 Ca<sup>2+</sup>チャンネルの性質変化や, その変化と疾病との関係は不明

である。これらの点を解明するため、3種類の小脳変性症モデルマウス (*tottering* (*tg*), *leaner* (*tg<sup>la</sup>*), *rolling* (*tg<sup>rol</sup>*)) を入手した。まず、変異が不明であった *tg<sup>rol</sup>* マウスの変異を探索し、リポート III の S4 に位置する 1262 番目のアルギニン(R)がグリシン(G)に置換していることを明らかにした(Mori et al, JNS in press)。次に、急性単離小脳ブルキンエ細胞の  $Ca^{2+}$ チャネル電流を測定するとともに、組換え DNA を用いて発現させた変異  $Ca^{2+}$ チャネルの機能を解析した。マウス小脳 Purkinje 細胞を急性単離しパッチクランプ法で解析したところ、電流密度は Normal > *tg<sup>rol</sup>* (76%) > *tg* (55%) > *tg<sup>la</sup>* (37%)マウスの順であった。薬理的検討から、低下している成分は P 型  $Ca^{2+}$ チャネルであり、他の高閾値活性化型  $Ca^{2+}$ チャネルがこの P 型  $Ca^{2+}$ チャネルの低下分を補償することはなかった。*tg* の活性化曲線は Normal と重なったが、*tg<sup>la</sup>* の活性化曲線は約 9mV 脱分極側に平行移動した。また、*tg<sup>rol</sup>* の活性化曲線

は約 8mV 脱分極側に移動すると伴に傾きが緩くなった。これら電流密度の低下と活性化曲線の変化は baby hamster kidney (BHK)細胞に強制発現させた変異  $Ca^{2+}$ チャネルに於いても認められたことから、 $\alpha_1A$  遺伝子の変化が直接的にチャネルの変化を引き起こしていることが判明した。また、電流密度の低下と活性化曲線の変化を総合したチャネル活性の低下の度合いは症状の重さ (*tg* < *tg<sup>rol</sup>* < *tg<sup>la</sup>*)と相関があった。更に、スライス標本を用いて発火パターンを検討したところ、Normal では  $Na^+$  spike と  $Ca^{2+}$  spike が認められたが、*tg<sup>rol</sup>* では  $Na^+$  spike しか記録できなかった。以上の結果より、 $Ca^{2+}$ チャネル活性の低下が神経疾患を引き起こしている可能性が示唆された。

これらのモデルマウスはシナプス可塑性に対する P/Q 型  $Ca^{2+}$ チャネルの寄与を検討するのに良い標本であり、今後さらなる検討を加えたい。

### (3) 神経栄養因子によるグルタミン酸受容体の発現調整とその分子メカニズム

斎藤真子, 永野忠聖, 那波宏之 (新潟大学脳研究所分子神経生物学分野)

神経栄養因子は神経分化や神経細胞死ばかりでなく、シナプス伝達の可塑性にも関与することが報告されているが、その分子メカニズムは依然として不明である。我々は、神経栄養因子のうち、ニューロトロフィン類の BDNF (脳由来神経栄養因子)を連日、培養大脳皮質神経細胞に添加すると 5 日目の時点で mRNA レベルに影響することなく AMPA 受容体蛋白発現量を上昇させることを発見した (Proc Natl Acad Sci. U.S.A. vol. 96 P2461-2466, 1999)。AMPA 受容体蛋白は、GABA 作動性神経細胞に強く発現されることが免疫染色によって確認された。またパッチクランプ法により GABA 作動性神経細胞における AMPA 電流の上昇を認め、機能的な AMPA 受容体チャネルの発現上昇が確認された。BDNF 遺伝子欠損マウスの大脳皮質の PSD (シナプス後肥厚部)を豊富に含む画分においても AMPA 受容体蛋白発現量が、低下傾向を示していることから、in vivo においても BDNF が AMPA 受容体蛋白の正常な発現に必要であることを確認した (Neuroscience. vol. 88 p1009-1014, 1999)。AMPA 受容体蛋白発現量の上昇は神経細胞に作用する成長因子のうち PDGF (血小板由来成長因子)によっても認められた。

そこで、BDNF, PDGF の下流で共通に活性化されるカスケードについて検討した結果、Src ファミリーチロシンキナーゼが AMPA 受容体蛋白発現量の上昇に関与することを確認した。さらに Fyn 遺伝子欠損マウスの培養大脳皮質神経細胞では BDNF の効果が認められなかったことから、Src ファミリーチロシンキナーゼのうち Fyn キナーゼが重要であることが示唆された。in vivo においても生後 14 日の Fyn 遺伝子欠損マウスの大脳皮質において AMPA 受容体蛋白発現量が低下していることを確認した。また HEK293 細胞に TrkB, GluR1, GluR2 を CMV (cytomegalovirus) プロモーター下で発現させた系でも、BDNF によって GluR2 の受容体蛋白発現量が上昇することが再現された。現在、BDNF がその受容体であるレセプター型チロシンキナーゼ、TrkB に結合した後に起こるシグナルカスケードに注目し、こうしたカスケードが AMPA 受容体および AMPA 受容体関連タンパク質、細胞骨格蛋白等をどのように制御し AMPA 受容体蛋白発現量を上昇させるのか、その分子メカニズムに重点を置いて研究中である。

#### (4) 神経栄養因子による神経伝達物質放出の制御

大西浩史<sup>1,3</sup>, 網野真也<sup>2</sup>, 板倉 誠<sup>1</sup>, 山森早織<sup>1</sup>, 高橋正身<sup>1,2,3</sup> (<sup>1</sup>三菱化学生命科学研究所,  
<sup>2</sup>東京大学大学院, <sup>3</sup>科学技術振興事業団 (CREST))

増殖・分化・生存維持活性をもつ多くの細胞栄養因子・成長因子が神経回路の形成・維持に深く関わっていることはよく知られている。驚いたことに、それらの多くが中枢神経系においてシナプス伝達効率を変化させ、脳の高次機能を調節するという全く新しい活性を有する事が近年明らかになってきた。これら因子によるシナプス調整の分子メカニズムについては、蛋白質リン酸化を介した速い反応、あるいは遺伝子発現を介した遅い反応により、前シナプス、後シナプスの機能が修飾・変化をうけていることが予想される。我々は神経栄養因子による前シナプス制御の可能性に注目し、神経のモデル細胞、PC12細胞を用いた解析を行った。NGFで処理したPC12細胞では、Ca<sup>2+</sup>依存性の神経伝達物質放出が増強し、またこの作用は短時間の処理で急性に誘導されるものであった。神経伝達物質放出はCa<sup>2+</sup>流入とその後の開口放出過程により引き起こされるが、増強作用はイオノマイシンによって強制的にCa<sup>2+</sup>流入を引き起こした場合にも見られたため、NGFの作用点はCa<sup>2+</sup>流入過程ではなく、

開口放出過程にあると考えられた。さらに培養神経細胞に対して神経栄養因子BDNFが同様の神経伝達物質放出増強作用を持つことも明らかとなり、神経栄養因子が実際に神経細胞に作用し、前シナプス機能を急性に調整することが分かった。また同様な増強作用はIGF-1, EGFといった神経栄養因子以外の細胞成長因子でも確認され、これら因子の多くが開口放出過程を制御しうる可能性が示された。次に神経栄養因子がどのようなメカニズムで神経伝達物質放出を制御するのかを解析するため、阻害剤あるいは変異遺伝子を用いた解析を行ったところ、増強作用は神経栄養因子のリセプターであるTrkファミリーチロシンキナーゼのキナーゼ活性に依存しており、また細胞内シグナル伝達経路としてMAPK経路とPI3K経路が重要であることが分かった。これらのシグナル経路がどのように開口放出過程を制御しているのかという問題については現在まだ明らかではない。シンポジウム発表ではいくつかの可能性についてディスカッションしたい。

#### (5) シナプス可塑性における脳由来神経栄養因子の役割

津本忠治 (大阪大学大学院医学系研究科バイオメディカル教育研究センター高次神経医学部門)

神経栄養因子は従来想定されてきた神経細胞の分化、突起伸展、生存維持といった機能の他に、シナプス伝達効率を急速に変える、あるいはシナプス長期増強や長期抑圧に関与するなど、シナプス可塑性における役割が注目されている。我々は、可塑性に関する知見が集積している大脳皮質視覚野においてスライスや培養細胞標本を使用し、神経栄養因子の中でも脳由来神経栄養因子 (Brain-derived neurotrophic factor, BDNF) に的を絞って、その役割や関与メカニズムについて調べている。今回は主に、この研究の背景、実験結果及びその意義について以下の点を中心に述べたい。

1) スライス標本を用いた実験。BDNFのシナプス伝達に対する急性作用を、幼若ラットあるいはマウス視覚野のスライス標本において、IV層刺激に対するII/III層

錐体細胞のシナプス反応を指標として調べた。その結果、200 ng/mlの濃度ではシナプス伝達を急速に増強すること、20 ng/mlの濃度では通常のシナプス伝達には影響を及ぼさないが、低頻度連続刺激によるシナプス長期抑圧の誘発を阻止することを見出した。また、BDNFノックアウトマウスから作製した標本では、正常では長期抑圧を起こさない刺激で長期抑圧を起こすことも見出した。以上の結果から、BDNFは、生後発達期には、連続入力によってシナプスが抑圧されることを防ぐ作用があることが示唆された。さらに、抗BDNF抗体、TrkB-IgG及び受容体型チロシンキナーゼの阻害薬を使った実験からこれらの作用はTrkB受容体を介することが示唆された。

2) 幼若ラットあるいはマウス視覚野から孤立神経細胞培養標本を作製し、誘発シナプス (autapse) 反応

(evoked EPSC), 及び自発性活動 (いわゆる miniature EPSC, mEPSC) を指標として調べた。その結果, BDNF は mEPSC 頻度の増大を起こすが, 振幅は変えないことが判明した。この結果は, BDNF の作用部位はシナプス前であることを示唆していると考えられた。一方, 誘発反応の方は, 培養日数の増加につれて BDNF が無効となる傾向が見られた。この結果は, 神経細胞の成熟につれて誘発シナプス反応を起こすメカニズムと mEPSC を起

こすメカニズムが乖離してくることを示唆している。

3) 上述した BDNF の急性作用が, 従来報告されてきた慢性作用に如何に関係しているかを明かにする一環として, 孤立神経細胞培養標本に BDNF を慢性投与した時のシナプス機能及び形態の変化を電気生理学及びシナプス前部に取り込まれる蛍光色素 (FM1-43) を用いて調べている。この実験結果についても述べる予定である。

## (6) 新しい発生工学技術の開発によるアミノ酸変異導入マウスの作成

笹岡俊邦<sup>1</sup>, 江隅英作<sup>2</sup>, 松田由喜子<sup>1</sup>, 鍋島曜子<sup>3</sup>, 三品昌美<sup>4</sup>, 鍋島陽一<sup>3</sup> (<sup>1</sup>国立精神・神経センター 神経研究所 疾病研究第七部, <sup>2</sup>国立精神・神経センター 神経研究所 遺伝子工学研究部, <sup>3</sup>京都大学大学院 医学研究科 腫瘍生物学, <sup>4</sup>東京大学大学院 医学系研究科 薬理学・分子神経生物学)

(研究目的) ヒトゲノムプロジェクトの進歩により, 遺伝性疾患の原因遺伝子の分離および変異の同定が急速に進みつつあり, 多くの遺伝子疾患では原因遺伝子の特定アミノ酸の変異が観察され, 特定アミノ酸配列の持つ機能の解析が疾患の理解に不可欠であることが明らかになってきた。また多くの遺伝子は複数の場面で重要な機能をもつため, 動物個体の個別の場面で遺伝子機能を解析できる新たな方法の開発が必要である。我々はこれらの問題点の解決のため従来のマウス発生工学技術を一步進めて, 「目的とする組織や発生段階で 対象分子にアミノ酸置換を導入する新たなシステム」の開発を進めてきており, 遺伝子の機能の理解, 疾患の理解に最もふさわしいモデル動物を作成し, 詳細な解析を可能とする実験系を構築している。

(研究方法) NMDA 受容体の Ca イオン透過性を調節するアミノ酸置換を, 特定細胞において導入することを対象とし, 新たな実験系を開発をおこなった。(1) 特定アミノ酸の変異を導入する方法の開発: NMDA 受容体 1 遺伝子の正常配列エクソンと変異配列エクソンを並列に配置し, 正常型エクソンの両側に loxP を配置し, 2 つのエクソン間に人工イントロンを挿入した相同組換えベクターを構築し, マウス胚幹(ES)細胞を用いた相同組換えによりベクターを組み込んだマウス個体 (NMDA/loxP マウス) を作成した。この状態では 2 つのエクソン間のイントロンの性質により, 絶えず正常配列エクソンのみを選択させることが可能であるが, 正常配列エクソンを欠失させると変異配列エクソンが利用され, 転写産物に変

異が導入される。正常配列エクソンを欠失させる方法として Cre-loxP システムを利用する。(2) 特定細胞におけるアミノ酸置換の導入: Nestin プロモーターの発現調節のもとで神経細胞で Cre リコンビネースを発現するトランスジェニックマウス (Cre マウス) と NMDA/loxP マウスを掛け合わせ, NMDA/loxP-Cre マウスを作成し, 神経細胞特異的にアミノ酸置換をおこなった。(3) 電気生理実験による NMDA 受容体の機能解析: スライスパッチクランプ法を用いて海馬錐体細胞における NMDA 受容体の機能を解析した。

(結果と考察) (1) 特定アミノ酸の変異を導入する方法の開発: 上記の方法により作成した NMDA/loxP マウスはホモ接合体であっても, 成長・繁殖は野生型と変わらず, 運動異常などを示さなかった。NMDA/loxP マウス脳の NMDA 受容体 1 サブユニット mRNA はの正常配列エクソンを読み取っていた。Nestin プロモーターにより神経細胞に Cre リコンビネースが発現するトランスジェニックマウス (Cre マウス) と掛け合わせ, NMDA/loxP-Cre マウスを作成し, マウスの各臓器における変異導入の様式を調べたところ, 脳及び脊髄で変異導入がみられた。脳の各部位での組換えを調べると効率の差はあるが, 広い領域で組換えが起っていた。さらに, NMDA 受容体 1 遺伝子 mRNA を調べたところ, Cre-loxP の作用により正常配列エクソンが欠失し, 変異配列エクソンが利用され変異導入が行われていた。この NMDA/loxP-Cre マウスは, 発育不全と運動機能異常を示し, NMDA 受容体に Ca イオン透過性を上昇させるアミノ酸置換の導入によ

る神経細胞活動性異常が示唆された。(2)電気生理実験による NMDA 受容体の機能解析: マウス脳スライスパッチクランプ実験では, 計画通りに海馬 CA1 領域錐体細胞の NMDA 受容体の Mg ブロック機能が変化していた。われわれの NMDA/lox-Cre マウスにより, 特定場面で NMDA

受容体の Mg ブロック機能を個体レベルで詳しく解析することが可能となった。特に NMDA 受容体の Mg ブロックの解除による Ca の過剰な流入は, 神経細胞死の初期過程に関連すると考えられており, 病態の理解にも貢献できると考えられる。

### (7) プルキンエ細胞特異的に代謝型グルタミン酸受容体 mGluR1 を発現する mGluR1-レスキューマウスの作成および解析

饗場 篤 (東京大学医科学研究所ヒト疾患モデル研究センター高次機能研究分野)

我々は代謝型グルタミン酸受容体 mGluR1 を欠損したマウス [mGluR1(-/-)マウス] をジーンターゲット法により作成し, mGluR1(-/-)マウスでは平行線維-プルキンエ細胞シナプスでの長期抑圧が欠失していること, 登上線維によるプルキンエ細胞の多重支配が生じていること, 運動協調ができなくなっていること等を明らかとした。一方では, mGluR1 は小脳プルキンエ細胞以外の細胞でも発現しており, 通常のノックアウトマウスの解析からは上記の表現型が, プルキンエ細胞に発現している mGluR1 の欠損によるものか, もしくは他の領域で発現している mGluR1 の欠損によるものかを区別することはできなかった。そこで我々はプルキンエ細胞特異的なプロモーターを用い, mGluR1 がプルキンエ細胞だけで発現するマウスを作成し, mGluR1 ノックアウトマウスで見られた表現型が復活するかどうかを検討した。L7 遺伝子プロモーター下にラット mGluR1 cDNA を発現する

ような DNA を構築し, mGluR1(+/-) 受精卵にマイクロインジェクションし, mGluR1(+/-)L7-mGluR1 トランスジェニック(Tg)マウスを作成した。さらにこれらのマウスを mGluR1(+/-) マウスと交配し, 内在性のマウス mGluR1 遺伝子の発現がない mGluR1(-/-)L7-mGluR1 Tg マウスを作成した。作成した 8 系統の独立な Tg マウスのうち, 1 系統では mGluR1(-/-) マウスの運動協調能が復活していた。この mGluR1 レスキューマウスでは mGluR1 が小脳プルキンエ細胞だけで発現しており, 長期抑圧, 登上線維のシナプス除去が正常に起こっていた。従って, プルキンエ細胞に存在する mGluR1 が長期抑圧, 登上線維のシナプス除去, 運動協調に必要であることを明らかとすることができた。この講演では通常のノックアウトマウスに加え, 組織特異的なプロモーターによるトランスジーンを組み合わせたマウスの解析の実際について議論したいと思う。

### (8) GABA ニューロンを標識する遺伝子改変マウスの開発

柳川右千夫 (岡崎国立共同研究機構 生理学研究所 神経化学部門)

中枢神経系においては, リズミクな神経活動, 神経が同期して活動する現象, あるいは学習や記憶の素過程と考えられているシナプス可塑性の形成には, GABA ニューロンが抑制性インターニューロンとして行う神経情報処理が重要な役割を果たしていると考えられている。しかしながら, インターニューロンは, 中枢神経系に存在し, 比較的少数であることから, in vivo において正確に同定することは困難であった。

一方, グルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) は, L-グル

タミン酸から GABA を合成する酵素であり, 分子量の違う GAD65, GAD67 の 2 種類のアイソザイムの存在する。これらのアイソザイムは異なる遺伝子にコードされ, 生化学的性質や細胞内局在が異なることが報告されている。GAD の発現様式については, GAD65 及び GAD67 が脳では GABA ニューロン特異的に発現している。

我々は, (1) GABA ニューロンを標識すること, (2) GABA ニューロン特異的な発現調節機序を解明することを目的として, マウス GAD(mGAD65, mGAD67)遺伝子を単

離し、構造と発現について検討した。特に、mGAD65 遺伝子あるいは mGAD67 遺伝子のプロモーターを含む上流域に lacZ レポーター遺伝子を連結した融合遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作成して解析した結果、それぞれのプロモーターが組織及び GABA ニューロン特異的発現に必須な役割を果たしていることを明らかにした。しかしながら、両 GAD 遺伝子ともすべての GABA ニューロンの発現には、遺伝子上流域のみでは不十分であり、さらに他の遺伝子領域が必要と考えられた。

これらの結果を背景にして、in vivo で GABA ニューロンを正確に標識するために mGAD67 遺伝子に遺伝子標的法を用いて発光オワンクラゲ由来の Green fluorescent protein (GFP) 遺伝子をノックインしたマウス(GAD 遺伝子 GFP ノックインマウス)の作成を試み、現在キメラマウスを得ている。今後は、交配することにより GAD 遺伝子 GFP ノックインマウスのヘテロを得ることにより、GABA ニューロンの電気生理学的解析や発生過程の解析に使用できることを期待している。

### (9) 中枢神経シナプスの活性化による、シナプス前・後膜接着分子 N-cadherin の存在様式の変化

田中秀和 (大阪大学医学部情報薬理学 (旧第一薬理))

中枢神経細胞間のコミュニケーションの場であるシナプスは、シナプス前・後膜の接着を中心構造とし、その前後に伝達物質の分泌機構や受容体等の機能ドメインを配置する。そのシナプスの接着構造の形成と維持に、カドヘリン・ファミリーが、重要な役割を担っていることが近年わかってきた (Fannon and Colman, 1996; Uchida et al., 1996; Benson and Tanaka, 1998; Kohmura et al., 1998)。

我々は、シナプスのカドヘリンが、単なる静的な接着性構造分子ではなく、動的でシナプス活動性依存的な調節を受ける機能分子であることを示唆する知見を得た。培養ラット海馬神経細胞において、神経型 (N) カドヘリンは、シナプス部位に高密度に発現し、その結果点状の分布を示す。このシナプスを膜脱分極で刺激すると、5 分以内に N カドヘリンは細胞膜上を拡散し、線状の分布に変わった。また、同様の刺激により、シナプスの N カ

ドヘリンが、単量体から二量体の状態にシフトし、トリプシン等の蛋白質分解酵素に対して強い耐性を獲得することも見いだした。N カドヘリンの機能は、隣あった N カドヘリン分子同士の結合 (シス二量体) と単量体との間の平衡状態により制御されることが知られている (Shan et al., 2000)。従って、このシナプス活動性依存的な N カドヘリンの平衡状態のシフトは、シナプスにおける N カドヘリン機能の変化・修飾を意味し、その結果、シナプス間隙の環境が制御されている可能性が示唆される。

Benson and Tanaka (1998), *J Neurosci* 18, 6892-6804.

Fannon and Colman (1996), *Neuron* 17, 423-434.

Kohmura et al. (1998), *Neuron* 20, 1137-1151.

Shan et al. (2000), *J Cell Biol* 148, 579-590.

Tanaka et al. (2000), *Neuron* 25, 93-107.

Uchida et al. (1996), *J Cell Biol* 135, 767-779.

### (10) カドヘリンスーパーファミリー：ゲノム構造と機能

八木 健 (阪大 細胞生体工学センター・岡崎 生理学研究所)

カドヘリンは選択的細胞接着活性をもたらす分子として竹市雅俊博士等により単離解析され、細胞の自己組織化に関わる細胞接着分子である。我々は哺乳類脳の機能に関わる遺伝情報の解析を行う過程で、新たなカドヘリン (CNR) ファミリーを得た。この CNR ファミリーは、シナプスに存在し、Fyn チロシンリン酸化酵素と共役し、

Reelin タンパク質の受容体として機能していることが明らかとなった。また、ゲノム構造の解析より CNR ファミリーは免疫グロブリンと類似した新たな遺伝子クラスターを形成していることも明らかとなっている。

reference

1. Yagi, T. and Takeichi, M. (2000) Cadherin superfamily

genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity. *Genes & Development* 14, 1169-1180.

2. Sugino, H, Hamada, S., Yasuda, R., Tuji, A., Matsuda, Y., Fujita, M., and Yagi, T. (2000) Genomic organization of the family of CNR cadherin genes in mice and human. *Genomics* 63, 75-87.

3. Senzaki, K., Ogawa, M. and Yagi, T. (1999) Proteins of the CNR family are multiple receptors for Reelin. *Cell* 99, 635-647.

4. Yagi, T. (1999) Molecular mechanisms of Fyn-tyrosine kinase for regulating mammalian behaviors and ethanol sensitivity. *Biochem. Pharmacol.* 57, 845-850.

5. Kohmura, N., Senzaki, K., Hamada, S., Kai, N., Yasuda, R., Watanabe, M., Ishii, H., Yasuda, M., Mishina, M. and Yagi, T. (1998) Diversity revealed by a novel family of

cadherins expressed in neurons at a synaptic complex. *Neuron* 20, 1137-1151.

日本語総説

1. 先崎浩次, 小川正晴, 八木 健 (2000) マウス大脳皮質層構造形成機構における新たな分子メカニズムの解明 - CNR ファミリーは Reelin の多重受容体である - . *実験医学* 18, 784-787.

2. 八木 健 (1999) 免疫系多様化分子群と類似性を示す中枢神経系の新規カドヘリン (CNR) ファミリー. *脳の科学* 21, 923-936.

3. 八木 健 (1998) 脳の機能と遺伝情報. *脳の科学* 20, 555-558.

4. 八木 健 (1997) 脳の進化をもたらした遺伝子の探索 - 情動形成に関わる分子メカニズムによる研究 - . *細胞工学* 16, 1140-1149.

#### (11) 終脳特異的細胞接着分子のシナプス可塑性, 参照記憶, sensorimotor gating における役割

中村和裕 (順天堂大学医学部第2病理)

中枢神経系に発現する細胞接着分子は発達段階においては神経回路形成に, また, 成体においてはシナプス可塑性, 学習などの脳機能に役割を果たすと提唱されている。免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞接着分子テレンセファリン (TLCN) の発現は生後に始まり, 部位は終脳内ニューロンの細胞体, 樹状突起に局限している。そのため TLCN 欠損マウスの機能解析を行い, 終脳特異的細胞接着分子 TLCN が成体の脳機能に果たす役割を解析した。

TLCN 欠損マウスは正常に発育し, 交配も可能であった。Nissl 染色による終脳内領域の形態, 大脳皮質での樹状突起の発達, 電顕による海馬 CA1 のシナプス密度の解析の結果, TLCN 欠損マウスで発生, 形態異常は認められなかった。しかし海馬 CA1 領域でのシナプス伝達長期増強 (LTP) を調べたところ TLCN 欠損マウスで LTP が

上昇していた。更に LTP の飽和レベルの上昇が認められた。しかし低頻度刺激によりひきおこされる興奮性後シナプス電位は変化なかった。また, 行動解析の結果, 有害刺激を使う学習テストである文脈依存的学習テスト, 水迷路テストでは野生型マウスと比較して変化なかったが, 報酬を使った学習テストである放射迷路テストで参照記憶の能力が向上していた。また, 同様に報酬を使うテストである水探索テストにおいてもパフォーマンスが亢進していた。また startle response の prepulse inhibition が亢進していたため, sensorimotor gating が亢進していることが明らかとなった。

従って TLCN は生体内で海馬シナプス可塑性の可変域, 参照記憶, sensorimotor gating の制御に役割を果たしていることが明らかとなった。

#### (12) PDZ 領域 1 回とアクチン線維結合領域を持つ足場蛋白 Neurabin および Afadin の局在と機能

溝口 明 (京都大学医学部)

シナプス形成における標的細胞選択機構や活動依存性

シナプス強度調節機構に関して, Cadherin 系や Integrin

系のような細胞間接着機構が重要な役割を担うことが知られている。これらの細胞間接着機構はいずれも細胞接着分子とアクチン線維が、Catenin や Vinculin などの膜下蛋白質によって連結されるという基本構造を持っている。そこで私共は、アクチン線維と結合活性を持つ新規の膜下蛋白質を発生段階の脳において探索した。その結果、Neurabin I, Neurabin II, および 1-Afadin が同定された。これらの膜下蛋白質は、アクチン結合領域と PDZ 領域を一カ所持つという共通の分子構造を持っていた。

Neurabin I は脳特異的に発現しており、完成したシナプスでは、主としてポスト側のスパインに局在していた。発生期の脳では、成長円錐のうち最先端を走るもの (Pioneer Growth Cones) には軽度の、後方を束となって走るもの (Follower Growth Cones) には、高度の Neurabin I の発現を認めた。また、培養神経細胞において、アンチセンス RNA によって Neurabin I の発現を抑制すると、神経突起の発芽が阻害された。これらの結果から、Neurabin I は神経突起の発芽、束化およびスパインの運動に関与すると考えられる。

1-Afadin は、全身の多くの臓器に存在し、小腸や肝臓などの非神経組織では、主としてアドヘレンスジャンクションに Cadherin 系と共存していた。一方、胎児では、1-Afadin は、E6.5 日から発現しており、外胚葉と内胚葉上皮のアピカル領域に局在していた。さらに、E7.5 日では、

外胚葉の中でも神経外胚葉と中胚葉に発現が高まっていた。Afadin ノックアウトマウスでは、E7.5 日で外胚葉の上皮構造の乱れと外胚葉上皮から中胚葉間葉細胞への遊離が障害されていた。このことから、Afadin は、外胚葉上皮が全体として上皮構造を維持しつつ、しかも原始線条においてのみ細胞が上皮から遊離して中胚葉の間葉細胞へと変化するという形態形成過程に必須であることが示唆された。

脳では、1-Afadin は、海馬 CA3 領域の苔状線維終末-錐体細胞樹状突起間のシナプスの Puncta Adhaerentia Junction に両側対称性に局在していた。そこで 1-Afadin と結合する細胞接着分子をイーストツーハイブリッド法で検索した結果、イムノグロブリンスーパーファミリーに属する Nectin を見出した。Nectin は、細胞外領域に Ca 非依存性細胞接着活性を持ち、細胞内領域の C 末端で 1-Afadin の PDZ 領域と結合する。

Nectin は、1 型、2 型、3 型のアイソフォームからなり、各アイソフォーム同志がホモフィリックに結合するだけでなく、3 型は、1 型および 2 型とヘテロフィリックにも結合できる。Nectin もシナプスの Puncta Adhaerentia Junction に局在していることから、Nectin-1-Afadin 系接着機構は、シナプスの形態形成に重要な役割を果たしていると考えられる。

## 2. イオンチャネルの細胞局在化と機能制御に関する研究

2000年8月17日 - 8月18日

代表・世話人：倉智嘉久（大阪大学医学系研究科情報薬理）

所内対応者：井本 敬二（液性情報）

(1) Paracellular pathway における物質輸送を制御する分子機構：

タイトジャンクションを構成する膜タンパク質クローディングファミリー

古瀬幹夫<sup>1</sup>，片平じゅん<sup>2</sup>，堀口安彦<sup>2</sup>，月田承一郎<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>京都大学大学院医学研究科，<sup>2</sup>大阪大学微生物病研究所)

(2) 内向き整流性 K<sup>+</sup> channel, Kir4.1 の細胞内局在の多様性と細胞機能

藤田秋一<sup>1,2</sup>，東佳代子<sup>1</sup>，種本雅之<sup>1</sup>，稲野辺厚<sup>1</sup>，倉智嘉久<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>大阪大学医学系研究科情報薬理，<sup>2</sup>大阪府立大学農学部獣医薬理)

(3) Ca<sup>2+</sup>チャネル活性化機構における極在化と輸送

森 泰生（生理学研究所）

(4) CIC-3 クロライドチャネルの神経細胞分化の過程における細胞内局在化

河崎雅暢<sup>1</sup>，水谷顕洋<sup>2</sup>，御子柴克彦<sup>2</sup>，山内小津枝<sup>1</sup>，新保 斎<sup>1,3</sup>，佐々木成<sup>1</sup>，丸茂文昭<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>東京医科歯科大学医学部第2内科，<sup>2</sup>医科学研究所化学科，<sup>3</sup>理学研究所神経病理科)

(5) 異物排除における MRP トランスポーターファミリーの役割

杉山雄一（東京大学大学院薬学系研究科・製剤設計）

(6) Na<sup>+</sup>-非依存性アミノ酸トランスポーターファミリー（SLC7）のトランスポーターの

細胞膜移行における1回膜貫通型糖タンパク質の役割

金井好克（杏林大学医学部・薬理学，科学技術振興事業団さきがけ研究21）

(7) NMDA 受容体の集積に関わる神経シナプス裏打ち蛋白質 S-SCAM

畑 裕（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・病態代謝解析学）

(8) 三量体 G 蛋白質(G<sub>βγ</sub>)-感受性 PI3-キナーゼに結合する活性型 Rab5 と小胞のベクトル輸送

黒須 洋，紺谷園二，堅田利明

（東京大学大学院薬学系研究科・生理化学）

(9) mitsugumin29 と骨格筋興奮収縮連関

竹島 浩（久留米大学・分子生命研究所・細胞工学研究部門）

(10) 胃プロトンポンプのサブユニット構造

竹口紀晃，浅野真司，木村 徹，森井孫俊，鈴木秀博

（富山医科薬科大学薬学部）

(11) チャネル蛋白相互作用の分子構造基盤

中村春木（大阪大学蛋白質研究所）

(12) 2光子励起法を用いた新しい細胞機能の可視化

根本知己，河西春郎（生理学研究所）

(13) 核包標本からのイオンチャネルと細胞機能

丸山芳夫，大佐賀敦，佐藤功造，大城社子

（東北大学大学院医学研究科・細胞生理学）

(14) 神経因性疼痛とイオンチャネル発現制御

田邊 勉（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・高次機能薬理学）

## 【参加者名】

倉智嘉久(大阪大医),丸山芳夫(大城社子(東北大医)),  
金井好克(杏林大学医),杉山雄一,堅田利明,紺谷園二,  
黒須洋(東京大薬),畑裕,田邊勉,佐々木成,河崎雅暢  
(東京医歯大),田辺秀(中外製薬),加藤由充(協和発酵),  
増田典之(山之内製薬),松山善次郎(岐阜大医),竹口  
紀晃,浅野真司,酒井秀紀,森井孫俊,田淵圭章,鈴木  
智之(富山医薬大薬),古瀬幹夫(京都大医),堀口安彦,  
片平じゅん(大阪大微研),石井優(大阪大医),中村春

木(大阪大蛋白研),藤田秋一(大阪府大農),茶珍元彦  
(日本ベーリンガーインゲルハイム),森豊樹(大塚製薬),  
竹島浩(久留米大分子生命研),河西春郎,根本知己,赤  
塚結子,出崎克也,森泰生,大橋正人,重本隆一,馬杉  
美和子,石井正和,池中一裕,柴田理一,中平健祐,柴  
崎貢志,中井淳一,原雄二,大倉正道,若森実,森誠之,  
松本信幸,井本敬二(生理研)

## 【概要】

神経細胞や上皮細胞など極性をもった細胞では,イオンチャネルなどの機能分子が各膜ドメインに特異的に局在している。これはシナプスにおける神経伝達や上皮細胞によるイオン・小分子の一方方向性輸送など,重要な細胞・組織機能を支える基本的な機構である。最近,世界的には神経細胞シナプス後膜におけるグルタミン酸受容体の局在やシナプス伝達強度制御における PDZ ドメインを持つアンカー蛋白の役割が,急速に明らかになって

きている。しかしながら,他のイオンチャネルやトランスポーター・膜受容体については,それらの細胞膜ドメインへの局在の分子構築基盤・その制御シグナル機構・細胞機能における役割など,不明な点が多い。本研究会では種々のイオンチャネル・トランスポーター・アンカー蛋白の研究者が集まり,この問題にそれぞれの立場から焦点をあて情報を交換し,この領域が総合的に発展することを目的としている。

(1) Paracellular pathway における物質輸送を制御する分子機構：  
タイトジャンクションを構成する膜タンパク質クローディングファミリー

古瀬幹夫<sup>1</sup>, 片平じゅん<sup>2</sup>, 堀口安彦<sup>2</sup>, 月田承一郎<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>京都大学大学院医学研究科, <sup>2</sup>大阪大学微生物病研究所)

多細胞動物の体は,上皮細胞のシートによって様々なコンパートメントに分けられており,個々のコンパートメントがそれぞれ特有の環境を維持することが,各器官の機能発現には必須である。apical-basal 方向に明瞭な極性をもつ上皮細胞は,細胞上に偏って分布するトランスポーターによって方向性をもった物質輸送を行うことで,細胞シートの両側にそれぞれ特有の環境からなる2つのコンパートメントを形成する。一方で,細胞同士の隙間(paracellular pathway)を介した物質の自由な拡散,いわゆる「漏れ」を制限して,これらの2つの環境が混ざらないように維持することも上皮細胞シートのきわめて重要な役割である。脊椎動物において,この役割を担うのがタイトジャンクション(以下TJ)と呼ばれる細胞間接着装置である。TJは,隣り合う細胞膜が完全に密着したように見える構造で,細胞周囲を取り巻くことによって,上皮細胞シートにおける細胞と細胞の隙間をシ-

ルして paracellular pathway における物質透過を制限している。これまでの形態学および生理学的手法による研究から,TJは完全なバリアではなく,イオン等の小分子を通す開いたり閉じたりする小孔が存在すると考えられること陽イオンを通しやすいこと,TJのバリア機能の特性が上皮の種類に応じて様々であることなどが明らかにされてきた。しかしながら,TJの分子構築,特にバリア構造をつくる膜タンパク質が明らかにされていなかったために,分子レベルでのTJの機能解析はほとんど進んでいなかったと言える。

私たちはこの問題にアプローチするために,TJを構成する分子の同定を試みてきたが,最近,新しい膜タンパク質「クローディング」の同定に成功してその機能解析を行っている。クローディングはTJに局在する分子量約23 kDの4回貫通型膜タンパク質で,遺伝子ファミリーを形成している。1)本来TJをもたない線維芽細胞に

クローデインを強制発現させると、細胞は接着能を獲得し、クローデインは細胞間に濃縮して発達したTJを形成すること、2) 特定のクローデインを受容体とするウェルシュ菌の毒素 Clostridium perfringens enterotoxin を上皮細胞に投与すると、そのTJが壊れてバリア機能が低下することから、クローデインがTJの構造と機能を直接担う分子であることが明らかになった。また、クローデインファミリーの各タイプは、それぞれ特有の組織発現パターンを示し、多くの器官で一つの上皮細胞に複

数のクローデインタイプが発現している。よって各組織の上皮細胞は固有の組み合わせのクローデインファミリーを発現しており、このことが組織の違いによるTJのバリア特性の多様性を生み出す要因となっていると推測される。今後、クローデインの機能解析を進めることによって、paracellular pathwayにおける物質透過の選択性の分子基盤、個体におけるTJバリアの意義が明らかにされてゆくと思われる。

## (2) 内向き整流性 K<sup>+</sup> channel, Kir4.1 の細胞内局在の多様性と細胞機能

藤田秋一<sup>1,2</sup>, 東佳代子<sup>1</sup>, 種本雅之<sup>1</sup>, 稲野辺厚<sup>1</sup>, 倉智嘉久<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>大阪大学医学系研究科情報薬理, <sup>2</sup>大阪府立大学農学部獣医薬理)

膜2回貫通型である内向き整流性 K<sup>+</sup> channel (Kir) family は現在までのところ、7つの subfamily に分類されている。その内 Kir4.1/Kir1.2/K<sub>AB</sub>.2 はグリア細胞および上皮系細胞に分布し、グリア細胞では K<sup>+</sup> siphoning に、上皮細胞では Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase あるいは H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase への K<sup>+</sup> recycling に関与すると考えられている。

各組織での Kir4.1 の細胞内局在を免疫組織染色法(光学および電子顕微鏡的手法)を用いて検討したところ、ラット脳および網膜では、どちらも血管、神経細胞樹上突起およびシナプス周囲を取り囲むグリア細胞(脳: アストロサイト, 網膜: ミュラー細胞)の、またミュラー細胞では水晶体に接する終足に分布していた。いずれも血管周囲および水晶体を取り囲む基底膜または神経細胞膜に接する細胞膜ドメインに限局した局在を示した。これら Kir4.1 の局在は水チャネルの AQP4 の局在とよく一致することから、Kir4.1 が K<sup>+</sup> siphoning に、そして AQP4 がそれに伴う水の移動に関与すると考えられる。また、腎臓尿細管および内耳血管条上皮細胞では Kir4.1 は basolateral 側に局在するのに対し、同じ上皮細胞である網膜色素上皮細胞、胃の壁細胞では apical 側に局在していた。これら上皮細胞における Kir4.1 の局在は腎臓尿細管、内耳血管条上皮細胞および網膜色素上皮細胞での Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase の局在と、胃の壁細胞での H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase の局在に一致する。これらのことから Kir4.1 は Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase および H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase の活性維持に重要

とされる K<sup>+</sup> recycling に関与すると考えられる。

Kir4.1 はその C 末端に PDZ ドメインが結合するモチーフを持ち、実際に SAP97 および PSD-95 がこのモチーフを介して結合することがわかっている。Kir4.1-GFP 融合蛋白質を MDCK 細胞に発現させたところ、Kir4.1 は basolateral 側に局在した。C 末端の PDZ 結合モチーフ(-SNV)を欠損させた Kir4.1(-SNV)-GFP 融合蛋白質は basolateral 側には局在がみられず、核周辺の細胞内器官に集積した。このことから、Kir4.1 の C 末端と PDZ ドメインを持つアンカー蛋白質が結合することは Kir4.1 の basolateral 膜への局在に重要な役割を果たすと考えられる。

上皮細胞での Kir4.1 の局在が細胞種により異なることから、局在決定の機構が各細胞種間で異なることが予想されるが、少なくとも basolateral 側への Kir4.1 の局在決定は、PDZ ドメインとの結合が重要であると考えられる。またグリア細胞での Kir4.1 の局在に関する機構に関しては現在のところ不明であるが、単離ミュラー細胞において SAP97 と Kir4.1 のクラスタの局在が一致することから、グリア細胞においても Kir4.1 の局在決定に PDZ ドメインとの結合が重要と考えられる。今後、各細胞種において Kir4.1 の局在に関するアンカー蛋白を同定し、そして腎臓介在細胞での H<sup>+</sup>ポンプと Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>交換系の局在のスィッチング機構にみられるような上皮細胞における Kir4.1 の局在決定の機構を解明したいと考えている。

(3) Ca<sup>2+</sup>チャネル活性化機構における極在化と輸送

森 泰生 (生理学研究所)

形質膜越えのカルシウム流入は、最も重要な細胞内カルシウムイオン濃度調節機構の一つである。なかでも、受容体刺激により惹起される PI 応答に関連した、Receptor-activated calcium channel (RACC) 群が注目を集めつつあるが、その活性制御機構に関しては未解明な課題が多い。最近我々は、RACC 研究に関するいくつかの興味深い知見を得た。

RACC の分子の実体である 7 つの TRP は、protein kinase C 非依存的に diacylglycerol によって活性化される TRP3, 6, 7, カルシウムによって活性化される TRP5, カルシウムストアの枯渇に関連した容量性カルシウム流入を調節する TRP1 等、に機能分類される。中でもカルシウムによる TRP5 活性制御は、チャネル開口確率の上昇及び、myosin light chain kinase 活性による形質膜への

タンパク質組み込みの 2 つの機序により司られていることがわかってきた。また、TRP1 欠損細胞を用いることにより、TRP1 が容量性カルシウム流入を担う Ca release-activated Ca channel を構成するのみならず、endoplasmic reticulum に存在する IP3 受容体をも機能修飾することが示された。さらには、カプサイシン受容体の他に、アラキドン酸により活性化されるカチオンチャネルも加え、TRP は非常に大きなスーパーファミリーを形成していることも明らかになった。

このように、その活性制御機構が細胞内の位置情報やタンパク質輸送機序と関連していることは、TRP 関連チャネルが特定の生体応答に必要なカルシウムシグナルの空間的・時間的パターンを制御する、重要な基盤をなすことを示唆している。

## (4) CIC-3 クロライドチャネルの神経細胞分化の過程における細胞内局在化

河崎雅暢<sup>1</sup>, 水谷顕洋<sup>2</sup>, 御子柴克彦<sup>2</sup>, 山内小津枝<sup>1</sup>, 新保 斎<sup>1,3</sup>, 佐々木成<sup>1</sup>, 丸茂文昭<sup>1</sup>( <sup>1</sup>東京医科歯科大学医学部第 2 内科, <sup>2</sup>医科学研究所化学科, <sup>3</sup>理学研究所神経病理科)

容量感受性外向き整流性クロライドチャネル(CIC-3)の機能解析を目的として、CIC-3 の細胞内領域 C 末端 178 アミノ酸の GST 融合タンパクを作成し、抗体作成を行った。この抗体により脳においては以前報告した in situ hybridization と同様、CIC-3 は脳内の広い領域にわたり発現していることが明らかになった。最も発現の多い小脳において詳細な観察を行ったところ、CIC-3 は Purkinie 細胞の樹状突起、特に棘突起に局在することから、ラット海馬神経初代培養細胞を用いて分化の過程における CIC-3 の局在変化及び細胞骨格との関連について調べた。

神経細胞が未熟な 2, 3 の突起を出した球状の細胞にあるときは、核周囲に CIC-3 は存在していた。培養開始 1 週間後、軸索や樹状突起が成長する時期には、CIC-3 は細胞体及び樹状突起の膜直下に多く存在するようにな

った。培養 3 週間以上経過し、成熟した神経細胞では細胞体や樹状突起にはほとんど存在せず、棘突起に局在した。シナプス関連蛋白に対する抗体を用いた二重染色では、CIC-3 は synaptophysin と対をなし、drebrin と共存しており、CIC-3 はシナプス後膜に集積していると考えられた。棘突起のアクチンフィラメントをラトルンクリン A で脱重合させると drebrin と同様に CIC-3 は棘突起から消失した。以上より CIC-3 の局在化には棘突起内のアクチンフィラメントが大切であり、シナプス後膜において CIC-3 が重要な役割を果たしていることが示唆された。現在、我々は CIC-3 の棘突起における機能と局在化シグナル領域の検索、アクチンと複合体を形成するであろう CIC-3 結合蛋白の検索及び樹状突起における膜蛋白輸送系を構成する分子群の検索を行っている。

(5) 異物排除における MRP トランスポーターファミリーの役割

杉山雄一 (東京大学大学院薬学系研究科・製剤設計)

生物は、有害な環境物質や薬物などの生体外異物（ゼノバイオティクス）に対し、長い進化の過程で防御機構を備えるに至ったと考えられる。本発表では、医薬品を含む広範な異物に対して生体が、免疫機構とは異なる防御機構として獲得した排除機構を、主に、分子輸送（トランスポーター）による排除機構と分子変換（代謝酵素）による排除機構という観点から考察してみたい。低分子性異物の排除に関わる代謝酵素や輸送担体に見られる特徴として、これら蛋白が一般的に多くのメンバ-より構成されており、適応進化による多様化の側面を持つことが挙げられる。また細胞の生死に直接関与する蛋白ではないが故に、遺伝子変異の penetrance が高く、遺伝子多型が多く見られる。これが薬物動態の個体差に反映し、副作用の原因となっていることが幾つかの代謝酵素、輸送担体（トランスポーター）について証明されつつある。肝、腎における胆汁中、尿中排泄は異物の解毒機構として重要であることが旧くから知られてきたが、この 7 年ほどの間に排泄機構を支配する実体である輸送担体についての解明が急速に進んだ。例えば、第 2 相代謝反応の結果生じる各種抱合代謝物の胆汁排泄に関与するトランスポーターの存在、トランスポーターを欠損する遺伝的

疾患を持ったヒト、実験動物が発見されるという最近の成果を挙げることができる。こうした解毒機構の持つ多様性、大きな種差、遺伝的多型の存在は、医薬品の安全性の確保を極めて困難にしており、信頼あるヒトでの薬物動態予測法の開発が切望されている現状である。肝臓は種々の異物を血液側から取り込み、肝実質細胞内で代謝し、胆汁中に排泄することにより解毒化する重要な臓器である。これまで多くの医薬品の肝胆系移行が担体輸送によることが証明され、現在では輸送蛋白、遺伝子の同定を目指した研究が世界中で展開されている。我々の研究グループでも、最近、胆管側の有機アニオン輸送体、cMOAT/rMRP2 のクローニングを行い、その基質認識特異性を明らかにするとともに、一連の一次性能動輸送担体は、保存性の高い ATP binding cassette (ABC) 領域を有すること、類似のトランスポーターが複数存在することなどを明らかにしている。さらにその後、一連の MRP family 蛋白が、我々を含め国の内外でクローニングされ、その臓器分布、基質特性の解析から、種々の臓器における異物解毒に関与することが実証されつつある。当日は、その現状について整理する。

(6) Na<sup>+</sup>-非依存性アミノ酸トランスポーターファミリー（SLC7）のトランスポーターの細胞膜移行における 1 回膜貫通型糖タンパク質の役割

金井好克 (杏林大学医学部・薬理学, 科学技術振興事業団さきがけ研究 2 1)

細胞への糖やアミノ酸などの親水性栄養物質の輸送は、細胞膜脂質二重層に埋め込まれた膜蛋白質であるトランスポーター（輸送体）を介して行われる。1980 年代半ばから、トランスポーター研究の分野にも分子クローニングの手法が導入され、種々のトランスポーターの分子実体が明らかにされてきたが、アミノ酸輸送系の約半数を形成する Na<sup>+</sup>-非依存性アミノ酸トランスポーターに関する手掛かりは長い間得られていなかった。われわれは、一群のトランスポーターは複数のサブユニットを必要とし、それが単一因子のみを追跡する従来の方法でのクローニングを困難にしている可能性を考え、アミノ酸

トランスポーターの活性化因子（補助サブユニット）と考えられていた細胞表面抗原 4F2hc (4F2 heavy chain: CD98) と cDNA ライブラリーの共発現を行う発現クローニングを試み、機能発現に 4F2hc を必要とする 12 回膜貫通型のトランスポーター（LAT1: L-type amino acid transporter 1）を単離した。LAT1 は、1 回膜貫通型の糖タンパク質である 4F2hc とジスルフィド結合を介して連結する古典的 4F2 light chain に相当するタンパク質であり、4F2hc と共存することにより、Na<sup>+</sup>-非依存性中性アミノ酸輸送系 L の機能活性を示す。

LAT1 の同定に続き相同配列の探索を行い、LAT1 と類

似構造を持ち、輸送基質選択性の異なる一群の Na<sup>+</sup>-非依存性アミノ酸トランスポーターが同定され、Na<sup>+</sup>-非依存性アミノ酸トランスポーター (SLC7) ファミリーが確立された。このうち、LAT1 を含む 6 種が 4F2hc と連結し、残りの 1 種 (BAT1: b0,+ -type amino acid transporter 1) は、4F2hc と類似構造を持つ 1 回膜貫通型タンパク質 rBAT (related to b0,+ -type amino acid transporter) と連結することが明らかになった。

4F2hc と rBAT は、トランスポーターの細胞膜移行を推進するシャペロン機能を有する補助因子であると考えられ、両者は上皮細胞において興味深い役割分担を示す。すなわち、4F2hc は上皮細胞において側底膜に、rBAT は管腔側膜に細胞内輸送され、このため 4F2hc と連結するタンパク質は側底膜に、rBAT と連結するタンパク質は管腔側膜へと輸送されることになる。従って、上皮細胞

におけるアミノ酸トランスポーターの配置は、上皮細胞内の特定の膜ドメイン (管腔側膜あるいは側底膜) にトランスポータータンパク質を輸送するシャペロン機能を持った 1 回膜貫通型補助因子 (rBAT 及び 4F2hc) と、特定の 1 2 回膜貫通型トランスポーターの連結により決定されると考えられる。すなわちこの系は、1 回膜貫通型補助因子が細胞膜移行のシグナルを担い、1 回膜貫通型補助因子との連結が特異的であることにより、12 回膜貫通型トランスポーターが細胞内のどの膜ドメインへ移行するかが運命付けられるという特徴がある。現在われわれは、1 回膜貫通型補助因子 4F2hc と rBAT のキメラ解析を進行させており、その解析により 1 回膜貫通型補助因子の特定のトランスポータータンパク質認識機序、および 1 回膜貫通型補助因子に内在すると考えられる膜移行シグナルを明らかにすることができると期待される。

#### (7) NMDA 受容体の集積に関わる神経シナプス裏打ち蛋白質 S-SCAM

畑 裕 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・病態代謝解析学)

リガンド型カルシウムチャネルである NMDA 受容体は、哺乳類の中樞神経の興奮性シナプスの主要な神経伝達物質受容体である。NMDA 受容体の一部は、前シナプスに局在することが報告されているが、大多数は後シナプスの後シナプス肥厚部 (PSD) に集積している。NMDA 受容体の PSD への集積に重要な役割を果たす分子としては、PSD-95 がよく知られている。PSD-95 は 3 つの PDZ 領域、1 つの SH3 領域、1 つのグアニル酸キナーゼ領域をもち、これらの蛋白質結合領域を介して、一酸化窒素合成酵素や低分子量 G 蛋白質の制御因子などシナプス可塑性に関わる分子や細胞骨格と相互作用している。私共は、神経シナプスの裏打ち蛋白質を探索し、PSD-95 と

類似の分子構造をもつ新規分子 S-SCAM を発見している。S-SCAM は 6 つの PDZ 領域、2 つの WW 領域、1 つのグアニル酸キナーゼ領域をもち、PSD 局在している。S-SCAM は C 末端の PDZ 領域を介して NMDA 受容体のサブユニットに結合し、また、C 末端の 2 つの PDZ 領域を介してホモダイマーを形成する。この他、S-SCAM は、細胞接着因子や、MAP キナーゼのシグナル伝達系に関与する分子を結合し、さらに、PSD-95 とも相互作用している。したがって、S-SCAM は PSD-95 と共に、NMDA 受容体の集積に関わり、NMDA 受容体に細胞骨格の裏打ちを与え、NMDA 受容体を介するシグナル伝達に関与していると想定される。

#### (8) 三量体 G 蛋白質 (G<sub>βγ</sub>)-感受性 PI3-キナーゼに結合する活性型 Rab5 と小胞のベクトル輸送

黒須 洋, 紺谷 園二, 堅田 利明 (東京大学大学院薬学系研究科・生理化学)

イノシトールリン脂質 (PI) の 3 位水酸基をリン酸化する脂質キナーゼである 2 量体型 PI 3-キナーゼ (p110/p85) は、p85 調節サブユニットに存在する SH2 領域を介して、チロシンリン酸化された増殖因子受容体

あるいはアダプター蛋白質と結合し、p110 触媒サブユニットのキナーゼが活性化される。我々は先に、p110 触媒サブユニットがサブタイプからなる 2 量体型 PI 3-キナーゼ p110/p85 が、p110/p85 サブタイプとは異なる

り、チロシンキナーゼ型とG蛋白質共役(GPCR)型の2種の異なる受容体の共刺激によって相乗的に活性化されることを報告した。このユニークな特性を示すp110/p85 PI 3-キナーゼについてさらに検討を加え、以下に示す知見を得た。

1) 非受容体チロシンキナーゼによってリン酸化され、p110/p85と結合する新規アダプター分子として100-kDa蛋白質を見出した。このアダプター蛋白質は、Tyr残基に加えて、GPCR刺激によってさらにSer/Thr残基がリン酸化された。2) p85に存在する2つのSH2ドメインの内部配列をp110のN末端側に付加して、構成的に活性化型のPI 3-キナーゼを作製し、それと相互作用する分子を酵母のtwo-hybrid系を用いて検索した。その結果、低分子量GTP結合蛋白質のRab5をp110結合分子として同定した。p110と低分子量GTP結合蛋白質との結合は、GTP結合型のRab5に特異的であり、GDP結合型のRab5及びRabファミリーの他のメンバーとは結合しなかった。また、p110とRab5との結合は認められなかった。3) PKB/AktはPI 3-キナーゼの産物であるPIP3によって活性化されるが、インスリン刺激で上昇するPKB/Aktの活性化は、活性化型Rab5(S29V, Q79L)の遺伝子導入により増強され、不活性化型Rab5(S34N)によって抑制された。4) 活性化型Rab5と相互作用する分子を、さらにtwo-hybrid系を用いて検索し、SH2ドメインをもつ新規分子を同定した。共焦点レーザー顕微鏡による解析から、このRab5結合蛋白質は細胞内の小胞に局在化しており、クラスリン被覆小胞から初期エンドソームへの輸送において、Rab5のエフェクターとして融合装置に果たす役割が期待される。

#### (9) mitsugumin29 と骨格筋興奮収縮連関

竹島 浩 (久留米大学・分子生命研究所・細胞工学研究部門)

骨格筋においては、細胞表層膜上のジヒドロピリジン受容体と細胞内Ca<sup>2+</sup>ストアである筋小胞体膜上のリアノジン受容体が蛋白-蛋白相互作用による機能的なカップリングを行うことで、脱分極シグナルを筋小胞体Ca<sup>2+</sup>放出による細胞質のCa<sup>2+</sup>濃度上昇変換すると考えられる。この骨格筋のシグナル変換は表層膜と筋小胞体膜が近接構造を形成する三つ組構造中で起こり、両受容体はそこに局在する。我々の以前の実験結果から、ジヒドロピリジン受容体とリアノジン受容体が機能的なカップリングをするためには表層膜と筋小胞体膜の近接

構造が必要であり、両受容体はその形成に寄与しないことが示された。しかしながら、三つ組構造構築の分子機構やその構造のCa<sup>2+</sup>シグナリングへの寄与はまったく不明である。

最近我々は、mitsugumin29と名付けた新規膜蛋白質を骨格筋三つ組構造中に見出した。本発表においては、その構造的特徴、三つ組構造の膜構築に対する役割、その欠損によるCa<sup>2+</sup>シグナリングの異常について紹介する。

#### (10) 胃プロトンポンプのサブユニット構造

竹口紀晃, 浅野真司, 木村 徹, 森井孫俊, 鈴木秀博 (富山医科薬科大学薬学部)

胃酸分泌細胞は、細胞の管腔側に酸(H<sup>+</sup>)を、漿膜側にアルカリ(OH<sup>-</sup> + CO<sub>2</sub> → HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>)を分泌する。酸分泌開始シグナルにより、細胞内オルガネラの再配置がおき、管腔側細胞膜表面積が数倍増加するという細胞形態の変化がおきる。胃プロトンポンプ(H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase)は胃酸分泌を最終的につかさどる。このポンプは分泌停止状

態では、細胞内の細管小胞に存在する。酸分泌刺激により、細管小胞間に細い連結管(neckという)が形成され、その連結された細管小胞の一端は管腔側細胞膜と融合する。ポンプは活性化し、管腔内に酸を分泌する。酸分泌中、細管小胞は絶えず融合・脱融合を繰り返し、働いているポンプと休んでいるポンプの交代がおきる。ポンプ

分子は膜を 10 回貫通する サブユニット(1033 個のアミノ酸からなる)と、膜を 1 回貫通し、細胞外ドメインに糖鎖を有する サブユニットからなる(291 個のアミノ酸)。

我々は、A) プロトンポンプのイオン認識・輸送機序を分子レベルで解明すること、B) 細管小胞の管腔側細胞膜との極性ある融合・脱融合を決定する要因は何かを解明すること、C) 細管小胞内に存在するリン脂質輸送 flippase の分子的实际体とその役割を解明することなどを目指して研究をおこなっている。

分子構造的に極めて類似している  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase と

胃プロトンポンプがなぜそれぞれ漿膜側膜と管腔側膜へと移動するのかを分子内ドメイン解析から明らかにすることは、細胞内機能分子の極性のある移動機構解明に大きく寄与する。そこで、 $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase の サブユニットとの間のキメラ体 cDNA を多数作成し、 $\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase サブユニット cDNA とともに、HEK 細胞に導入した。形成される遺伝子改変ポンプの発現、細胞内移動、ポンプ機能を調べ、サブユニットの細胞内・膜貫通部位・細胞外ドメインのどこがどのような役割を担っているかを明らかにする試みを行っている。本講演では、これらについて我々の研究成果について述べる。

## (11) チャネル蛋白相互作用の分子構造基盤

中村春木 (大阪大学蛋白質研究所)

### 1. 序

これまで、チャネル蛋白質によって維持・制御されている小分子のベクトル輸送に関しては、チャネル蛋白質分子の立体構造が不明であったため、構造的な議論ができず、抽象的なモデルによってしか輸送機構の解析がなされなかった。しかし、近年になって、バクテリアの  $\text{K}^+$  チャネルおよび機械受容性イオンチャネルの膜貫通部位(サブユニット)の X 線結晶解析がなされ、またショウジョウバエ (shaker) の N 末細胞質ドメインの四量体構造、ラットの  $\text{K}^+$  チャネル サブユニット(細胞質側)の四量体構造などが、続々と決定されている。

チャネル蛋白質では、その機能と構造に広い多様性はあるものの、サブユニットのポア部分やサブユニットのコア部分のアミノ酸配列は、バクテリアからほ乳動物にいたるまで良く保存されており、その部分の立体構造もほぼ保存されていると考えられる。立体構造をもとにしたチャネル機能の議論を始めたいと考えている。

講演では、コンピュータによるモデリングの手法とその精度と新しい技術について紹介し、倉智らによる Kir チャネルの機能解析への応用と、イオントロピック・グルタミン酸受容体の構造モデリングについて紹介する。

### 2. Kir チャネルの機能解析と構造モデル

内向き整流型  $\text{K}^+$  チャネル (Kir) は、ほ乳類において、立体構造解析が行われたバクテリア (KcsA)  $\text{K}^+$  チャネルに相当する  $\text{K}^+$  チャネルであり、イオン透過を行うポアを形成する H5 と呼ばれる領域とその前後の

膜貫通ヘリックス (M1, M2) とから構成される。Kir6.1 と Kir6.2 はアミノ酸配列上 70% のホモロジーを有し、同一のサブファミリーのチャネル・タンパク質であるが、Kir6.2 では Kir6.1 の 2 倍以上のコンダクタンスを持ち、高い  $\text{K}^+$  イオンの透過性が観測されている。

倉智らは、Kir6.1 と Kir6.2 とでは、H5 ポア領域のアミノ酸配列は同一であることから、Kir6.2 において、アミノ酸配列の異なる M1-H5 間のリンカー領域 (Lk1) および H5-M2 間のリンカー領域 (Lk2) でのアミノ酸置換を導入し、それら変異体タンパク質を HEK293T 細胞で発現させ、インサイドアウト法によって単一チャネル・コンダクタンスを測定した。その結果、Kir6.2 における Ser113-His115 および Val138 が、高い透過性に直接関与していることを示している (Repunte, V.P. et al. (1999) EMBOJ., 18, 3317-3324)。

KcsA の  $\text{K}^+$  チャネル構造をもとに Kir6.2 の立体構造モデルを作成したところ、(1) Val138 はチャネルの入り口部位に位置し、直接  $\text{K}^+$  イオンの拡散に関わること、(2) Ser113 はチャネル入り口からは離れた場所に存在するが、側鎖の大きなアミノ酸ではコンダクタンスが有意に低下することから、タンパク質内部のパッキングを変化させる可能性があること、が考察された。

### 3. イオントロピック・グルタミン酸受容体の構造モデル

中西らによってクローニングされた NMDA 受容体は、イオンチャネル型のグルタミン受容体であり、主要な

脳機能である記憶や学習の基礎過程と考えられるシナプスの形成・可塑性に関与していると考えられている (Moriyoshi, K. et al. (1991)Nature 354, 31-37)。この NMDA 受容体は、アミノ酸配列解析によって、細胞外ドメインに bacterial periplasmic-binding protein 様の構造を持つことが示唆され、その細胞外ドメインにある 2 つの Lobe 間に挿入されたイオンチャンネル部分には、K<sup>+</sup>チャンネルとの相同性が見いだされていた。

K<sup>+</sup>チャンネルとの比較的高い相同性と 4 量体形成を

示唆する実験とから、バクテリア K<sup>+</sup>チャンネルの構造と水溶性の基質結合部位の結晶構造とを基に、NMDA-R1 受容体の立体構造モデルを作成した。その結果、bacterial periplasmic-binding protein において観測されている基質結合により生じるヒンジ回転が、グルタミン酸やグリシンの結合によってやはり起こるとすると、細胞外ドメインに接続した膜貫通ヘリックスの変位が生じ、チャンネルの開閉が制御されるという機構が推察された。

## (12) 2 光子励起法を用いた新しい細胞機能の可視化

根本知己，河西春郎（生理学研究所）

多光子励起法を用いて、膵臓外分泌腺腺房標本の開口放出を可視化し定量的に測定した。コレシストキニン (CCK) による開口放出は、酵素源顆粒が 3 光子励起紫外蛍光をもつ物質を含みこれが放出されること、及び細胞外の極性トレーサー (SRB, Texas red-dextran, Lucifer Yellow) が 状に細胞内に陥入することで測定した。これらのことは共焦点顕微鏡では観察不可能だった。状の開口放出像は Ca 振動に同期して発生し、CCK 濃度にベル型に依存した。状の開口放出は元よりあった腺腔面のみでなく、既に形成された構造の上に頻繁に形成され、開口放出が連続的に起きる逐次開口放出が主たる開口放出の様式であることがわかった。開口放出の際、単一の顆粒の大きさ以上の構造が形成されたことはなく、顆粒の融合には細胞膜因子が不可欠であり、顆粒間の融合は生理的条件下では禁止されていると考えられた。開口放出に要する時間は一次的な顆粒でも二次的な顆粒

でも約 1 3 秒と一定であり、内層に存在して細胞膜に接していない顆粒も、細胞膜に接した顆粒と同じ準備状態にあると考えられた。開口放出を起こす Ca 振動においては 5 マイクロモル以上の Ca 濃度上昇が顆粒領域内層にまで及び、これが逐次開口放出を誘発していると考えられた。こうして、外層の顆粒が開口放出するとその内側の顆粒が自動的に開口放出完了状態となる逐次充填機構の存在が明らかとなった。この開口放出方式は重積した分泌顆粒の内容を最小の形態変化で、小さな細胞膜の一領域から、顆粒の移動を伴わずに、早く放出するのに適した方式と考えられ、外分泌腺と同様の構造をとる内分泌腺や神経終末においても刺激条件によっては用いられている可能性がある。このように、2 光子励起法の深部到達性は厚みのある生体標本の生理的機能解析には極めて有効である。

## (13) 核包標本からのイオンチャンネルと細胞機能

丸山芳夫，大佐賀敦，佐藤功造，大城社子（東北大学大学院大学医学研究科・細胞生理学）

体細胞の内膜系標本よりイオンチャンネルの同定を試みた。粗面および滑面小胞体膜を対象に、それらの比率が比較的高いとされる膵腺腺房細胞および肝実質細胞を用いた。細胞膜を低浸透圧下に破壊し核包標本を得た。膵腺腺房細胞の核包には、電位と管腔 Ca により制御されイベリオトキシンに感受性のある 220-250 pS の K チャネ

ル (large K チャネル) と 5-10pS 程度の Cl チャネル (Cl<sub>1</sub> チャネル) が存在し、肝実質細胞のそれには電位に依存する 300-600 pS のアニオン選択性チャネル (アニオンチャネル) が存在した。Large K チャネルは唾液腺等の外分泌腺腺房細胞膜、大腸粘膜細胞、尿細管細胞等、分泌上皮細胞に豊富に存在し、溶液分泌機能の主要部を担

っている。しかしこの Large Kチャンネルは、マウスおよびラット膵腺腺房細胞細胞膜上には存在しない。また、アニオンチャンネルの肝実質細胞細胞膜上での存在も考えにくい。これらチャンネルはここでとりあげる個々の細胞においては、内膜系に特有のチャンネルであろうと思われる。膵腺腺房細胞細胞レベルにてKチャンネルおよびClチャンネル（あるいはKイオンおよびClイオン）に操作を施せば、細胞の電氣的反応を様々に変化させうる。細胞内の NaCl, TEA-Cl 溶液での灌流実験, から, また

イペリオトキシンの細胞内注入から, これらチャンネルの存在理由の一部は, 小胞体 Ca の放出と取り込みにおけるカウンターイオン通路として機能することであると推測される。

分泌上皮細胞膜上の large Kチャンネルにつき, 単一電流振幅を Rb イオンの干渉効果の側面から調べた。その電圧・振幅関係はKイオン濃度に依存するが, Rb 干渉効果による不可解な挙動を示した。

#### (14) 神経因性疼痛とイオンチャンネル発現制御

田邊 勉 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・高次機能薬理学)

痛みは臨床上最も頻度の高い訴えであり、患者が病院を訪れる動機の筆頭理由である。全成人の6人に1人が何らかの痛みを苦しんでいると言われ、そのコントロールは極めて重要な医学的研究課題であるとともに、有効な痛みのコントロール法の確立が社会・経済的利益に及ぼす影響は計り知れない。しかし、治療の基礎となる痛みの分子機構については未解明な点が多い。痛みはその原因により侵害受容体性疼痛、神経因性疼痛、心因性疼痛に大きく分けることができる。このうち侵害受容体性疼痛は組織の傷害に伴って発生する痛みで、特に急性の生理的な侵害受容体性疼痛は外部からの侵害性刺激や体内の病変に対する生体防御機構として働き、生命維持に重要な警告反応である。一方、慢性の侵害受容体性疼痛や神経因性疼痛は病的な慢性疼痛であり、治療を必要とするものである。これらの疼痛は機械的および熱的侵害

刺激に対する閾値を下げて痛覚過敏現象を引き起こすばかりでなく、本来痛みを誘発しない触覚刺激が痛みを誘発する異痛現象（アロディニア）をしばしば伴い、疼痛管理に難渋する主要な原因となる。痛覚過敏やアロディニアの発症機構として、末梢侵害受容器の感作、侵害受容線維の機能変化、脊髄後角における可塑性変化及び感覚神経回路網の再構築等が重要であると考えられるが、その基盤に様々なイオンチャンネルの発現変化および機能変化が想定されている。

我々は種々の神経因性疼痛モデル動物を作製し、これらを用いて神経因性疼痛の発現、維持とイオンチャンネル発現との関係の解析、イオンチャンネル活性制御による疼痛制御の可能性を検討している。本研究会においては、電位いぞんせいNaおよびCaチャンネルに関しこれまでに得られた研究成果を報告する。

### 3. ATP 受容体による生体機能制御とその分子メカニズム

2000年8月24日 - 8月25日

代表・世話人：古家 喜四夫（科学技術振興事業団 細胞力覚プロジェクト）

所内対応者：井本 敬二（液性情報）

(1) Over View

井上 和秀（国立衛研・薬理）

(2) ATP 受容体によるカルシウム動員の細胞周期依存性

- 網膜神経上皮での共焦点顕微鏡による解析 -

杉岡 美保, 山下 勝幸（奈良医大・第一生理）

(3) 妊娠ラット子宮筋における P2 receptor の遺伝子発現と収縮反応の変化

鈴木 庸介, 松岡 功\*, 浅野 仁覚, 大川 敏昭, 柳田 薫, 佐藤 章

（福島医大・医・産婦人科, \*薬理学）

(4) G タンパク共役型 ATP 受容体により惹起されるカチオン電流

森 泰生（生理学研究所・液性情報部門）

(5) 低浸透圧刺激によるアストロサイトからの ATP 放出と細胞内  $Ca^{2+}$  動員機構との関連

上野 伸哉, 山田 博美, 佐藤 千江美, 桂木 猛（福岡大学・医・薬理）

(6) アフリカツメガエルの卵胞細胞膜上の ATP 受容体刺激による FSH 受容体応答と

アデノシン受容体応答の抑制

藤田 玲子<sup>1</sup>, 木村 眞吾<sup>2</sup>, 川崎 敏<sup>2</sup>, 高島 浩一郎<sup>2</sup>, 松本光比古<sup>3</sup>, 佐々木 和彦<sup>2</sup>

（<sup>1</sup>岩手医大・教養部, <sup>2</sup>岩手医大・医・一生理, <sup>3</sup>弘前大医短・物理）

(7) アデノシン A1 受容体と P2Y 受容体間のヘテロダイマー形成

吉岡 和晃, 斉藤 修, 中田 裕康（東京都神経研・生体機能分子）

(8) PPADS 感受性 ATP 受容体による容量性  $Ca^{2+}$  流入機構の抑制

尾松 万里子, 松浦 博（滋賀医大・第二生理）

(9) 低浸透圧刺激による血管内皮細胞のカルシウムレベル上昇と ATP 遊離について

篠塚 和正, 川崎 久美子, 田中 直子, 水野 英哉, 窪田 洋子, 中村 一基,

\*橋本道男, 国友 勝（武庫川女子大・薬・薬理, \*島根医大・生理学第一）

(10) ラット尾動脈内皮細胞でのニコランジルによる ATP 遊離作用には細胞内  $Ca^{2+}$  増加を伴う

橋本 道男, 篠塚 和正\*, 田中 直子\*, 窪田 洋子\*, 紫藤 治, 国友 勝\*

（島根医大・医・生理学第一, \*武庫川女子大・薬・薬理学）

(11) ATP 受容体刺激によるミクログリアからの IL-6 放出メカニズム

重本 由香里, 井上 和秀（国立衛研・薬理）

(12) ATP 刺激細胞応答連関における細胞外 ATP 代謝酵素による情報転換

- アフリカツメガエル卵母細胞に発現されたアデノシン A2B 受容体の性質 -

松岡 功, 大久保 聡子\*, 木村 純子

（福島県立医大・医・薬理, \*東北大学院・薬学・細胞情報薬学）

(13) ラット前立腺交感神経終末部のプリン受容体とノルアドレナリン遊離調節機構について

森川 亜美, 篠塚 和正, 田中 直子, 水野 英哉, 窪田 洋子,

中村 一基, 国友 勝（武庫川女子大・薬・薬理）

(14) 脳幹シナプス前プリン受容体によるグルタミン酸放出の制御

加藤 総夫, 繁富 英治（東京慈恵会医大・薬理学第2）

(15) Neuronal Ca<sup>2+</sup>-sensor 1 による P2Y 受容体を介した開口放出増強機序の解明

小泉 修一・井上 和秀 (国衛研・薬理)

## (16) ウシ副腎皮質細胞の adenylate cyclase と関連した ADP 受容体

西 晴久, 堀 誠治, 正木 英二, 川村 将弘 (東京慈恵会医大・薬理学第 1)

## (17) ATP 刺激細胞応答連関における細胞外 ATP 代謝酵素による情報転換

松岡 功, 大久保 聡子\*, 木村 純子

(福島県立医大・医・薬理, \*東北大学院・薬学・細胞情報薬学)

## 【参加者名】

古家 喜四夫( 科学技術振興事業団「細胞力覚プロジェクト」), 藤田 玲子 (岩手医大教養), 木村 純子, 綿野 智一, 緑川 早苗, 小野 秀成, 亀岡 弥生, 佐藤 薫, 熊坂 忠則, 浅野 仁覚, 松岡 功, 鈴木 庸介 (福島医大), 栗原 琴二 (明海大歯), 西 晴久, 加藤 総夫, 川村 将弘, 堀 誠治 (慈恵医大), 井上 和秀, 小泉 修一, 重本 由香里 (医薬品食品衛生研), 中田 裕康, 吉岡 和晃 (東京都神経研) 林 一己 (山之内製薬) 鈴木 裕一 (静岡県立大), 多久和 陽, 薄井 莊一郎 (金沢医大), 村松 郁延 (福井

医科大), Fernando Lopez-Redondo ( 科学技術振興事業団「細胞力覚プロジェクト」), 松浦 博, 尾松 万里子, 豊田 太 (滋賀医大), 山下 勝幸, 杉岡 美保 (奈良医大), 森 際 克子 (大阪大医), 森川 亜美, 篠塚 和正, 川崎 久美子 (武庫川女子大薬), 河野 剛志, 西村 誠一郎, 山中 直樹 (日本ベーリンガーインゲルハイム), 仲田 義啓 (広島大医総合薬学), 橋本 道男 (島根医科大), 桂木 猛, 上野 伸哉, 佐藤 千江美 (福岡大医), 森 泰生, 若森 実, 真鍋 健一, 大倉 正道, 井本 敬二 (生理研)

## 【概要】

ATP 受容体は他の受容体と同様イオンチャネル型である P2X プリン受容体と代謝調節型 (G 蛋白共役型) である P2Y プリン受容体に分類され, それぞれ 7 種及び 8 種類のサブタイプがすでにクローニングされている。ATP 受容体は現在多種多様の組織, 細胞系で発現していることが知られており, その機能的役割については炎症反応, 神経伝達, カルシウムシグナリングの媒介作用, 細胞増殖などきわめて生理的に重要な働きをすることが報告されている。その数は急速に増大しつつあるが, その全体像はまだ明らかにはなっていない。受容体を持った

細胞の多様性, その機能の多様性からその研究者も多様な分野に属し, 通常の学会ではなかなか情報交換する機会がないのが現状である。本研究会はそのような現状に鑑み, 生理学, 薬理学をはじめとする広範な領域からの研究者を集め, 相互に最新のデータと情報を交換し, 研究の進展を図ることを目的とする。研究会の内容は ATP 受容体が果たす機能的な役割を中心に, 受容体の分子構造, 細胞内情報伝達機構及び ATP の放出機構を含んだ総合的なものとなる。

## (1) Over View

井上 和秀 (国立衛研・薬理)

この 1 年間に ATP 受容体研究の中でとくに興味深かった報告について私見を交えて概観してみた。生理機能に関する研究では, ノックアウトマウスを使った報告が散見され, いずれも受容体の発現分布から予測された結果が得られた。例えば, P2X1 ノックアウトマウスでは射精能が極端に低下しており, 子孫を残しづらくなっていた。P2X3 ノックアウトマウスでは痛みに対する感受

性が鈍っており, 痛みと P2X3 受容体の密接な関与を支持している。ATP 受容体と痛みに関する論文は非常に多く, 欧米では一種のトレンドになっているようである。さらに, 神経細胞以外では, アストロサイトやマイクログリアでの機能が注目され, MAPK や転写因子活性へのシグナル伝達に関する報告が目をつけた。さらに, 特異的リガンドの開発に関する論文も散見され今後の充実が期

待される。

### (2) ATP 受容体によるカルシウム動員の細胞周期依存性 - 網膜神経上皮での共焦点顕微鏡による解析 -

杉岡 美保, 山下 勝幸 (奈良医大・第一生理)

網膜神経上皮細胞の増殖・分化にともなう細胞内カルシウムシグナリングの変化を, カルシウム感受性蛍光色素を用いた光学的測定により解析した。増殖期に特異的なカルシウムシグナリング系として, 細胞外のアデノシン三リン酸 (ATP) により活性化される系を見出し, この系は P2 型 ATP 受容体を介することにより細胞増殖を促進することを明らかにした。また, 網膜神経上皮細胞は細胞周期の進行に従って神経上皮内をエレベーター運

動する。即ち, 最外層部で分裂し(M 期), 最内層部で DNA 合成する(S 期)。そこで, 細胞内カルシウム濃度の変化を共焦点レーザー蛍光顕微鏡によって測定し, 網膜神経層の光学的断面像から細胞周期と細胞内カルシウムシグナリングの関係を調べた結果, ATP 受容体の活性化による細胞内カルシウム上昇は S 期の細胞で顕著であり, M 期の細胞, 及び, 最終分裂を終えた細胞では急激に低下することが明らかになった。

### (3) 妊娠ラット子宮筋における P2 receptor の遺伝子発現と収縮反応の変化

鈴木 庸介, 松岡 功\*, 浅野 仁寛, 大川 敏昭, 柳田 薫, 佐藤 章  
(福島医大・医・産婦人科, \*薬理学)

ATP 受容体である P2 受容体(P2-R)の遺伝子発現及び P2-R 刺激剤による子宮筋収縮反応を妊娠時期別に検討した。非妊娠 (NP), 妊娠 10 日 (P10), 14 日 (P14), 17 日 (P17), 21 日 (P21), 分娩後 1 日 (PD1), 4 日 (PD4) のラット子宮筋を用いて, P2-R の mRNA を RT-PCR にて測定した。NP において, P2X1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, P2Y1, 2, 4, 6 の 11 種類の P2-R 遺伝子発現が認められた。妊娠経過に伴う変化は, P2X1 では妊娠経過中及び PD1 で減少し, PD4 で増加した。P2X4 では妊娠経過中は変化せず, P21 及び産褥期に増加した。P2X6 では妊娠経過中は減少し, 産褥期に増加した。また, P2Y1 では妊娠経過と共に増加し, P17 で最大となり, 以後漸減した。NP, P14, P21, PD4 の子宮筋を用いて, 各種 P2-R 刺激剤 (ATP,

ADP, UTP, 2-MeSATP,  $\gamma$ -MeATP)投与により, Magnus 装置にて等尺性の収縮を観察した。収縮の強さは, NP では P2X1-R が, P14 では P2Y1-R が, P21 では P2X4-R が, PD4 では P2X6-R が各々優位に機能していた。以上より, P2-R サブタイプにおける mRNA の発現と収縮反応による機能的優位性は, 妊娠及び分娩後の各時期において共に同様な変化を認めた。このことは, ATP を介した妊娠子宮筋の収縮制御機構に重要な役割を果たしていると考えられる。特に, P2Y1-R は妊娠中期に上昇するため, 子宮収縮を抑制し妊娠維持に, また, P2X4-R は妊娠後期に上昇するため, 分娩発来に深く関与すると示唆された。

### (4) G タンパク共役型 ATP 受容体により惹起されるカチオン電流

森 泰生 (生理学研究所・液性情報部門)

G タンパク共役型受容体刺激により惹起される PI 応

答に関連した, Receptor-activated cation channel (RACC)

の分子の実体である TRP タンパク質群が注目を集めつつある。我々は、組み換え発現系として HEK 細胞を用い、内在性の G タンパク共役型 ATP 受容体を刺激することにより、TRP によるカチオン電流に関するいくつかの興味深い知見を得た。RACC の分子の実体である 7 つの TRP の中でも、細胞外カルシウムによる TRP5 活性制御は、チャネル開口確率の上昇及び、myosin light chain kinase 活性による形質膜へのタンパク質組み込みの 2 つの機序により司られている。ATP 受容体刺激あるいは、G タンパク活性化はカルシウム感受性を増すことにより、TRP 活性を正制御することが明らかになった。また、

TRP3, 6, 7 は、ATP 受容体による PLC-beta 活性化を経て、protein kinase C 非依存的に diacylglycerol によって活性化される。さらには、相同組み換えにより作製した TRP1 欠損細胞を用いることにより、TRP1 が容量性カルシウム流入を担う Ca release-activated Ca channel を構成するのみならず、endoplasmic reticulum に存在する IP3 受容体をも機能修飾することを見出した。活性制御機構が細胞内の位置情報やタンパク質輸送機序と連関していることは、TRP 関連チャネルが特定の生体応答に必要なシグナルの空間的・時間的パターンを制御する、重要な基盤をなすことを示唆している。

#### (5) 低浸透圧刺激によるアストロサイトからの ATP 放出と細胞内 $Ca^{2+}$ 動員機構との関連

上野 伸哉, 山田 博美, 佐藤 千江美, 桂木 猛 (福岡大学・医・薬理)

低浸透圧刺激による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇と ATP 放出の関連を探るため、培養アストロサイトを用いた。培養には生後 1-2 日のラット大脳皮質を取り出し、酵素処理後フラスコに細胞を播いた。培養 24 時間後にフラスコをたたき、接着性の低い細胞群を洗いながし、アストロ細胞を精製した。培養 10-14 日のコンフルエントになった状態の細胞を用いた。 $[Ca^{2+}]_i$  変化をカルシウムインジケーターである fura2 を用いて測定した。細胞への薬物投与はバ

ス液の灌流によっておこなった。灌流液をフラクションコレクターにて集め、液中の ATP をルシフェリン・ルシフェラーゼの化学発光を利用し測定した。この系により  $[Ca^{2+}]_i$  変化と ATP 放出を同時に観察できるようにした。この系をもちいて、細胞内 Ca 動員に関する薬物、細胞骨格系と関与する薬物、Cl<sup>-</sup>チャンネルブロッカー等をもちいて細胞内 Ca 変化と ATP 放出の関連を検討した。

#### (6) アフリカツメガエルの卵胞細胞膜上の ATP 受容体刺激による FSH 受容体応答とアデノシン受容体応答の抑制

藤田 玲子<sup>1</sup>, 木村 眞吾<sup>2</sup>, 川崎 敏<sup>2</sup>, 高島 浩一郎<sup>2</sup>, 松本 光比古<sup>3</sup>, 佐々木 和彦<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>岩手医大・教養部, <sup>2</sup>岩手医大・医・一生理, <sup>3</sup>弘前大医短・物理)

アフリカツメガエルの卵細胞に二本のガラス微小電極を刺入して -60 mV に膜電位固定下、卵胞細胞のもつ種々の受容体の性質とこれらとの相互作用について調べた。1 microM の ATP と UTP を投与すると両者の場合、内向きの ATP 応答は 100 microM suramine 投与で半減したが、UTP 応答はあまり抑制されなかった。一方、5.7 microM の FSH 又は 1 microM の Ade を投与するとゆっくりとした外向きの K<sup>+</sup>電流応答を発生した。この K<sup>+</sup>電流応答は

細胞内に cAMP を注入すると mimic された。1 microM ATP 又は 1 microM UTP を 30 秒間前投与すると上記 FSH 又は Ade 受容体刺激及び cAMP 注入で発生する K<sup>+</sup>電流応答は著しく抑制され、30 分間 wash out すると回復した。ATP 受容体刺激による FSH, Ade 受容体応答の抑制様式は非競合的であった。FSH, Ade 応答に対する抑制の作用部位は細胞内 cAMP の生成後、K<sup>+</sup>channel までのステップであると推論した。

## (7) アデノシン A1 受容体と P2Y 受容体間のヘテロダイマー形成

吉岡 和晃, 斉藤 修, 中田 裕康 (東京都神経研・生体機能分子)

【目的】最近,ある種の G タンパク質共役型受容体では,受容体間でホモあるいはヘテロダイマーを形成することによって,その性質をダイナミックに変化させることが報告されている。そこで本研究では,A1 アデノシン受容体 (A1R) と P2Y1 受容体 (P2Y1R) を共発現させた培養細胞系を構築し,タンパク質レベルおよび受容体活性の解析からプリン受容体間でのダイマー形成の可能性を探った。

【方法】 HA-Tag を付加した A1R (HA-A1R) および myc-Tag を付加した P2Y1R (myc-P2Y1R) の cDNA をそれぞれ単独もしくは一緒に HEK293T 細胞へ導入し,培養 48 時間後の細胞膜画分を分析した。各受容体の発現やヘテロダイマー形成の有無は,抗 HA 抗体および抗 myc 抗体によるウエスタンブロッティングと免疫共沈実

験によって解析した。

【結果・考察】 両受容体を同時に発現させた HEK293T 細胞膜の抽出画分の抗 HA 抗体免疫沈降物中に,抗 myc 抗体で検出されるタンパクバンドがウエスタンブロッティングで観察された。このバンドは myc-P2Y1R のバンドと同じ位置であり,HA-A1R を単独で発現させた細胞では見られなかった。更に,共発現細胞抽出画分の抗 myc 抗体による免疫沈降物中にも HA-A1R と同じサイズの抗 HA 抗体に反応するバンドが検出されたことから,HA-A1R と myc-P2Y1R は発現細胞膜上においてヘテロダイマーを形成することが示唆された。リガンド結合活性及びエフェクター活性の変化について検討した結果も併せて報告する。

## (8) PPADS 感受性 ATP 受容体による容量性 $Ca^{2+}$ 流入機構の抑制

尾松 万里子, 松浦 博 (滋賀医大・第二生理)

ラット褐色脂肪細胞において,細胞外 ATP (10  $\mu$ M) は「一過性の細胞内  $Ca^{2+}$  上昇」と「容量性  $Ca^{2+}$  流入抑制」の 2 つの現象を引き起こす。今回,この容量性  $Ca^{2+}$  流入抑制が ATP 受容体を介するものであるかどうかを P2 受容体阻害剤を用いて検討した。suramin は ATP による細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇と容量性  $Ca^{2+}$  流入を同時に容量依存性に阻害した。一方,PPADS は,低濃度 (1  $\mu$ M) では

容量性  $Ca^{2+}$  流入のみを抑制し,高濃度 (500  $\mu$ M 以上) で初めて細胞内  $Ca^{2+}$  上昇を抑制した。これらのことから,容量性  $Ca^{2+}$  流入抑制に関与する PPADS 感受性 ATP 受容体の存在が示唆された。現在,RT-PCR 法により,褐色脂肪組織における P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 受容体の発現を確認しているが,容量性  $Ca^{2+}$  流入抑制に関与する受容体サブタイプの特性が今後の課題であると思われる。

## (9) 低浸透圧刺激による血管内皮細胞のカルシウムレベル上昇と ATP 遊離について

篠塚 和正, 川崎 久美子, 田中 直子, 水野 英哉, 窪田 洋子, 中村 一基,  
\*橋本 道男, 国友 勝 (武庫川女子大・薬・薬理, \*島根医大・生理学第一)

【目的】我々は,血管内皮細胞が低浸透圧刺激により ATP を遊離することを報告してきた。今回は,この ATP 遊離と細胞内カルシウムレベル ( $[Ca^{2+}]_i$ ) との関係について検討した。

【方法】実験標本としてラット尾動脈の初代培養内皮

細胞を用いた。ATP 量は HPLC 蛍光検出器にて測定し,  $[Ca^{2+}]_i$  は Calcium Green-1-AM を指示薬として共焦点レーザー顕微鏡および画像解析装置を用いて測定した。

【結果】1) ラット尾動脈内皮細胞において,低浸透圧刺激により ATP 遊離に加え著明な  $[Ca^{2+}]_i$  上昇が観察

され、この  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇は P2 受容体拮抗薬の PPADS 及び PLC-inhibitor の U-73122 により一部抑制された。2) P2 受容体作動薬の 2-mSATP によっても  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇が観察され、この上昇は PPADS 及び U-73122 により抑制された。3) 低浸透圧刺激は細胞容積を増大させ、その増大は PPADS により増強され、2-mSATP により抑制され

た。

【考察】 ラット尾動脈内皮細胞において、低浸透圧刺激により遊離される内因性の ATP は P2Y1 受容体を介して  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇に寄与するとともに、細胞容積の調節に関与している可能性が示唆された。

#### (10) ラット尾動脈内皮細胞でのニコランジルによる ATP 遊離作用には細胞内 $Ca^{2+}$ 増加を伴う

橋本 道男, 篠塚 和正\*, 田中 直子\*, 窪田 洋子\*, 紫藤 治, 国友 勝\*  
(島根医大・医・生理学第一, \*武庫川女子大・薬・薬理学)

【目的】 ニコランジル (NIC) は、ATP 感受性  $K^+$  チャネル開口作用と nitrate 様作用とを併せもつ薬剤である。最近我々は、NIC や NO 供与物質によるブタ冠動脈内皮細胞からの ATP 遊離作用を報告した。今回、NIC による血管内皮細胞からの ATP 遊離作用機序を解明する為に、細胞内  $Ca^{2+}$  レベルと ATP 遊離作用との関係について検討を行った。

【方法】 実験材料としてはラット尾動脈の培養内皮細胞を用い、細胞内  $Ca^{2+}$  レベルは、カルシウムグリーンをプローブとして、共焦点レーザー顕微鏡および画像解析装置を用いて測定した。ATP とそのプリン誘導体は HPLC-蛍光検出法で測定した。

【結果】 NIC はラット尾動脈内皮細胞において、細胞内  $Ca^{2+}$  レベルを有意に上昇させ、内皮細胞からの ATP 遊離をも促進した。これらの作用は ATP 感受性  $K^+$  チャネル開口阻害剤である glibenclamide により有意に抑制された。また、この細胞内  $Ca^{2+}$  レベル上昇と細胞内 ATP レベルの間には、有意な負の相関が認められた。

【考察】 ニコランジルによる血管内皮細胞からの ATP 遊離作用には、内皮細胞内  $Ca^{2+}$  の上昇を伴うことが明らかにされた。この細胞内  $Ca^{2+}$  上昇作用には、ATP 感受性  $K^+$  チャネル開口にともなう過分極方向への膜電位変化が、ドライビングフォースとなりうることを示唆された。

#### (11) ATP 受容体刺激によるミクログリアからの IL-6 放出メカニズム

重本 由香里, 井上 和秀 (国立衛研・薬理)

近年、ATP が、脳の貪食細胞、免疫細胞とし知られるミクログリアの活性を制御することが報告されている。これまでに我々は細胞外 ATP がラットミクログリアから多量の plasminogen 遊離をひきおこすことを見出し、ATP が神経保護作用を有する可能性を明らかにした (Inoue et al. 1998)。本研究では、中枢において神経細胞の分化、生存、修復に重要な役割を果たしている IL-6 に注目し、ATP がミクログリアから IL-6 遊離を引き起こす

か否かミクログリア株細胞 MG-5 を用いて検討した。MG-5 において細胞外 ATP は、濃度依存的に IL-6 mRNA 及び蛋白を増加し、P2 レセプターの活性化により IL-6 が de novo 合成されることが示された。さらにその遊離メカニズムについて検討した結果、ATP は PTX 非感受性 P2Y レセプターと P2X7 に作用し、細胞外からの持続的な  $Ca^{2+}$  流入を引き起こし、p38 を活性化し、その結果 IL-6 産生を誘導する可能性が示唆された。

(12) ATP 刺激細胞応答連関における細胞外 ATP 代謝酵素による情報転換  
- アフリカツメガエル卵母細胞に発現されたアデノシン A2B 受容体の性質 -

松岡 功, 大久保 聡子\*, 木村 純子  
(福島県立医大・医・薬理, \*東北大学院・薬学・細胞情報薬学)

我々は NG108-15 および C6Bu-1 細胞において ATP 刺激により cAMP 産生の亢進を認め, その作用機構を解析してきた。最近, この ATP の作用は細胞膜上で産生されたアデノシン (Ade) がアデノシンデアミナーゼ (ADA) 抵抗性に A2A および A2B 受容体を刺激した結果であることが示唆された。この可能性を検証するため, 細胞外 ATP 代謝酵素を有するアフリカツメガエル卵母細胞に A2B 受容体と A キナーゼでリン酸化され活性化する CFTR を共発現させ A2B 受容体を介する cAMP 産生応答

を CFTR 電流を指標に検討した。卵母細胞に発現された A2B 受容体は Ade のみならず ATP や , -methylene-ATP ( MeATP)にも応答し, MeATP の作用は Ade の作用を消失させる量の ADA では抑制されず, 5'-nucleotidase 阻害薬の MeADP で抑制された。以上の結果から, P2 受容体刺激薬は細胞膜上で迅速に代謝され, 局所に蓄積した Ade が ADA 抵抗性に効率良く A2B 受容体を活性化する機構が示唆された。

(13) ラット前立腺交感神経終末部のプリン受容体とノルアドレナリン遊離調節機構について

森川 亜美, 篠塚 和正, 田中 直子, 水野 英哉, 窪田 洋子,  
中村 一基, 国友 勝 (武庫川女子大・薬・薬理)

【目的】 ラット摘出前立腺の交感神経終末部プリン受容体の薬理的性質とその生理的役割について検討した。

【方法】 前立腺標本に 2 Hz の電気刺激 (ES) を加え, 遊離されるノルアドレナリン (NA) 量を HPLC・電気化学検出器により測定した。

【結果】 1) P1 作動薬の CPA と P2 作動薬の 2-mSATP はともに NA 遊離抑制作用を示し, いずれの作用も P1 拮抗薬の DPCPX により減弱した。一方, P2 拮抗薬の suramin は CPA の作用には影響せず, 2-mSATP の作用を

減弱させた。2) DPCPX は 2 Hz の ES による NA 遊離には影響を示さなかったが, 8 Hz の ES による NA 遊離を増強した。また, 8 Hz の ES によってのみ有意なプリン遊離が観察された。

【考察】 1) 前立腺交感神経には P1, P2 作動薬により刺激される抑制性のプリン受容体が存在すること, 2) 高頻度の神経興奮に伴って遊離されるプリン物質はこの受容体を介して神経伝達を調節していることが示唆された。

(14) 脳幹シナプス前プリン受容体によるグルタミン酸放出の制御

加藤 総夫, 繁富 英治 (東京慈恵会医大・薬理学第2)

延髄孤束核 (NTS) は, 生体内環境に関する神経性および液性の一次情報を受容・統合し, 呼吸・循環などの自律機能ネットワークへ出力する自律情報中継核である。NTS には各種プリン受容体タンパク, 同 mRNA, 取込み・代謝・不活性化タンパク群が高密度に発現している。NTS ネットワーク内シナプス伝達制御におけるプリン

受容体の役割を脳幹スライス標本における膜電流記録によって検討した。孤束核 2 次求心性小形ニューロンに収斂するグルタミン酸作動性シナプス入力が, その放出様式および起源に応じて異なるシナプス前プリン受容体によって弁別的に制御されている事実を見出した。これらの制御には, ATP からアデノシンへのダイナミックな

変換や, シナプス前 P2X 受容体による直接的グルタミン酸放出などのさまざまな分子機構が関与していることが確認された。

### (15) Neuronal Ca<sup>2+</sup>-sensor 1 による P2Y 受容体を介した開口放出増強機序の解明

小泉 修一・井上 和秀 (国衛研・薬理)

Neuronal Ca<sup>2+</sup>-sensor 1 (NCS-1) は, ショウジョウバエの神経特異的 Ca<sup>2+</sup>結合蛋白質 frequenin のホモログであり, 神経伝達調節物質として注目されている。NCS-1 を強制発現させた PC12 細胞を用い NCS-1 の開口放出に対する作用とその機序の解明を試みた。NCS-1 の分布は形質膜及びシナプス小胞膜に局在していた。NCS-1 は, UTP 刺激による P2Y2 受容体を介した [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇の閾値及び ED50 値を約 10 倍低下させ, 最大応答の増加を引き起こした。同様の Ca<sup>2+</sup>応答の亢進は, bradykinin B2 受容体を介する応答でも認められたが, caffeine 及び high K<sup>+</sup>による [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇には全く影響を与えなかった。共焦点レーザー顕微鏡による解析では, NCS-1 による

InsP3-R からの局所的な Ca<sup>2+</sup>遊離“puff”発現頻度の顕著な増大が観察された。FM1-43 による開口放出測定では, NCS-1 は UTP により惹起される細胞外 Ca<sup>2+</sup>依存性の開口放出を有意に増加させたが, high K<sup>+</sup>によるそれには影響を与えなかった。さらに NCS-1 は, PI 含量に影響せず, その下流の PIP 及び PIP2 量を増大させ, また UTP 刺激時の InsP3 産生量を 2 倍以上に亢進させた。以上, NCS-1 はおそらく, PI から PIP の経路に働く PI4kinase に作用し, PIP 及び PIP2 レベルの亢進, PLC 共役型受容体刺激による InsP3 産生量を増大させ, その結果 Ca<sup>2+</sup>遊離及び容量性 Ca<sup>2+</sup>流入の増大を惹起し, 開口放出を亢進させることが強く示唆された。

### (16) ウシ副腎皮質細胞の adenylate cyclase と関連した ADP 受容体

西 晴久, 堀 誠治, 正木 英二, 川村 将弘 (東京慈恵会医大・薬理学第 1)

ウシ副腎皮質細胞 (BA 細胞) において ATP および UTP をはじめとした細胞外ヌクレオチドは, PI レスポンスを介してコルチゾールの産生を促進する。この反応は P2Y2 受容体を介していると考えられている。また, 細胞外 ADP は ATP とともに BA 細胞において cyclic AMP (cAMP) の産生を促進したが, UTP は促進しなかった。さらに ADP は PKA 活性作用を有し, H89 によってこの ADP の作用は阻害された。これより同細胞には Gq タンパク共役型の P2Y2 以外に, Gs タンパクと共役した P2Y

受容体も存在することが考えられた。しかしながら, ATP アナログ等による cAMP 産生の活性順位が異なることや mRNA が検知できないことから, ADP および ATP は P2Y11 を介して cAMP を促進するのでは無いと考えられた。また, ATP は P2Y2 にも作用することから, この受容体は ADP 特異的な P2Y 受容体の可能性がある。すなわち BA 細胞には Gs と共役した新しい P2Y 受容体の存在が示唆された。

### (17) ATP 刺激細胞応答連関における細胞外 ATP 代謝酵素による情報転換

松岡 功, 大久保 聡子\*, 木村 純子  
(福島県立医大・医・薬理, \*東北大大学院・薬学・細胞情報薬学)

我々は NG108-15 および C6Bu-1 細胞において ATP 刺激により cAMP 産生の亢進を認め, その作用機構を検討

してきた。この反応は P1 受容体阻害薬で抑制されるものの、アデノシンデアミナーゼ(ADA)処理で影響されず、種々の P2 受容体刺激薬でも同様な作用が発現し、かつ P2 受容体阻害薬で抑制されるという性質を示した。このような ATP の反応は、種々の生体組織でも報告されており P1 受容体阻害薬に感受性を持つ ATP 受容体の存在が想定されている。我々も未知の受容体の存在を仮定し解

析を行ってきたが、最近、細胞外 ATP 代謝の検討結果から、この ATP の作用は細胞膜上で産生されたアデノシンが ADA 抵抗性に A2A および A2B 受容体を刺激した結果であることが示唆された。今回は、細胞外 ATP 代謝様式とこれに関わる酵素群について示し、アデノシン受容体ならびにアデノシン産生に関わる酵素を発現させた細胞で得られた結果を報告したい。

## 4. ポストゲノム時代の脳科学

2000 年 9 月 28 日

代表・世話人：畠中 寛（大阪大学蛋白質研究所・蛋白質生合成部門）

所内対応者：池中 一裕（岡崎国立共同研究機構・生理学研究所・神経情報部門）

- (1) カルシウムチャネル遺伝子変異と神経疾患  
井本 敬二（岡崎国立共同研究機構・生理学研究所・液性情報部門）
- (2) 活性酸素による核酸の酸化障害とその防御機構 - 脳神経変性への関わり -  
中別府 雄作（九州大学・生体防御医学研究所, CREST）
- (3) スフィンゴ糖脂質による神経系の制御  
古川 鋼一（名古屋大学・医学部生化学）
- (4) シナプス可塑性とシナプス前機能  
高橋 正身（三菱化学生命科学研究所）
- (5) 複素電顕，位相差電顕そして微分干渉電顕 - 電子顕微鏡の新しい波 -  
永山 國昭（岡崎国立共同研究機構・生理学研究所・超微小形態生理部門）
- (6) 蛋白質のフォールディング反応と生物学的意義  
後藤 祐児（大阪大学蛋白質研究所・溶液）
- (7) 遺伝子産物のプロセッシングと神経変性疾患  
岩坪 威（東京大学大学院・薬学系研究科臨床薬学）
- (8) APP-カスパーゼ系によるニューロン死の制御  
吉川 和明（大阪大学蛋白質研究所・機能制御）
- (9) 機能生物学，二つの道  
三品 昌美（東京大学大学院・医学系研究科薬理学・分子神経生物学）
- (10) 脳内情報分子の細胞内ダイナミクス  
御子柴 克彦（東京大学・医科学研究所脳神経発生・分化分野）

## 【参加者名】

古川 鋼一（名古屋大・医・生化学第二），石川 保幸（熊本大・医），井上 和秀（国立医薬品食品衛生研），田口 隆久（通産省・工業技術院），石本 哲也（大阪工業技術研），山岸 覚（大阪大・蛋白質研），横幕 大作（大阪大・蛋白質研），榎戸 靖（大阪大・蛋白質研），岸本 拓哉（生理研），吉川 和明（大阪大・蛋白質研），林 靖亨（豊田中央研究所），井本 敬二（生理研），井上 華（生理研），小清水 久嗣（大阪大・蛋白質研），後藤 祐児（大阪大・蛋白質研），氷見 敏行（東京医科歯科大），澤田 浩秀（藤田保健衛生大・総医研），郷津 真代（大阪大・蛋白質研），樋口 誠逸（信州大・医・精神医学），若森 実（生理研），永山 國昭（生理研），佐藤 託実（OBI），藤江 三千男（浜松医科大），臼田 信光（藤田学園），岩坪 威（東京大・薬），永井 克也（大阪大・蛋白質研），古山 富士弥（名古屋市大），三浦 正幸（大阪大・医），日下 永子（大阪大），福永 典子（大阪大・蛋白質研），

谷口 直子（大阪大・蛋白質研），江上 洋平（大阪大・蛋白質研），柏井 宏之（大阪大・蛋白質研），吉田（長寿医療研究センター），御子柴 克彦（東京大学医科学研究所），工藤 卓（大阪工業技術研），保坂 早苗（上智大・生命科学研），沼川 忠広（大阪大・蛋白質研），藤井 聡（山形大・医・第2生理），小幡 邦彦（生理研），畠山 淳（生理研），中別府 雄作（九州大・生体防御医学研究所），洪 東杓（大阪大・蛋白質研），工藤 佳久（東京薬大・生命科学），榊原 厚（東海大・開発工学），清末 和之（大阪工業技術研），畠中 寛（大阪大・蛋白質研），土屋 礼美（東京薬大・生命科学），植田 敦子（大阪工業技術研究所），川合 亮（東海大），白尾 智明（群馬大・医），高橋 正身（三菱化学生命研），植村 慶一（慶応大・医），熊倉 鴻之助（上智大・生命研），山本 秀

桑子 賢一郎(大阪大・蛋白研), 櫻井 一正(大阪大・蛋白研), 三品 昌美(東京大大院・医学系研究科薬理学・分子神経生物学), 馬場 聡(浜松医大・医・病理第二),

藤森 一浩(大阪工業技術研), 林 光紀(上智大・生命科学研), 山中 創(生理研)

【概要】

肝機能発現のためには多くの分子が協調的に機能する必要がある。今回、遺伝子からの転写後にこれら機能分子がどのように修飾されるか、に絞って研究会を開催した。

本研究会は大阪大学蛋白質研究所との合同で開催することで、両研究所の合意を得たものである。

ヒトゲノムプロジェクトが完了すると、我々の1次的

な遺伝情報は完全に明らかとなる。しかしながら、遺伝子産物は更に複雑なプロッシングを受けて本来の機能を果たすようになる。21世紀には1次遺伝情報から如何にして機能分子が生成されるかを理解することが大きなテーマとなる。このよな情勢に鑑み、今回脳機能分子が転写後調節によりどのような修飾を受けるか、良い情報交換の場となった。

## 5. Ca<sup>2+</sup>シグナルと膜輸送体の発現および機能調節

2000 年 9 月 28 日- 9 月 29 日

代表：河原克雅 (北里大・医・生理)

世話人：宮崎俊一 (生理研)

(1) 2光子励起法による外分泌腺開口放出の研究

根本知己\*, 木村良一, 伊藤公一, 立川 光, 宮下保司,  
飯野正光, 河西春郎\* (\*生理研・生体膜, 東京大・医学系研究科・薬理)

(2) アセチルコリンによる膵  $\beta$ -cell の脱分極発生機構: Ca<sup>2+</sup>の Ca<sup>2+</sup>流入に対する positive feedback system

泉井 亮, 菅世智子, 菅野隆浩 (弘前大・医・生理)

(3) 単一膵細胞におけるインスリン分泌の解析

最上秀夫, 張 恵, 山田聡子, 小島 至 (群馬大・生体調節研)

(4) BCR を介するカルシウムシグナルの分子的解析

黒崎知博 (関西医大・肝研・分子遺伝)

(5) マウス卵の Ca<sup>2+</sup> oscillation における Ca<sup>2+</sup>/Mn<sup>2+</sup> influx・release

毛利達磨<sup>1</sup>, 白川英樹<sup>2</sup>, 尾田正二<sup>2</sup>, 宮崎俊一<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>生理研・細胞内代謝, <sup>2</sup>東京女子医大・医・第二生理)

(6) Ca<sup>2+</sup>-ATPase のチャンネル活性

老木成稔, 清水啓史, 豊島 近 (福井医大・生理, 東京大・分子細胞生物研)

(7) カルシウムシグナルのコーディングとデコーディング機構

飯野正光 (東京大・医学系研究科・細胞分子薬理)

(8) 細胞の機能調節におけるプロトンチャンネルの役割

久野みゆき, 森畑宏一, 森 啓之 (大阪市大・院・医・分子細胞生理)

(9) 恐山湖産ウグイの酸性適応機構の解明

平田 拓<sup>1</sup>, 小野俊浩<sup>1</sup>, 仲里猛留<sup>1</sup>, 猿田洋子<sup>1</sup>, 金子豊二<sup>2</sup>, 平野哲也<sup>2</sup>,  
若林繁夫<sup>3</sup>, 重川宗一<sup>3</sup>, 広瀬茂久<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>東京工業大・生命理工学研・生体システム専攻, <sup>2</sup>東京大・海洋研究所, <sup>3</sup>国立循環器病センター・分子生理)

(10) 内向き整流性 K<sup>+</sup>チャンネル Kir7.1 の生理機能解明に向けて

鈴木喜郎, 中村信大, 大方香代子, 藤乗嗣泰, 河原克雅, 広瀬茂久  
(東京工業大・生命理工, 東京大・医・腎臓内分泌内科, 北里大・医・生理)

(11) 血管系に発現するスフィンゴシン-1-リン酸受容体群による細胞運動調節とそのシグナリング

多久和陽, 岡本宏之, 多久和典子, 杉本直俊, 櫻田惣太郎 (金沢大・医・第一生理)

(12) 新規亜鉛バイオイメーキングプローブ

菊地和也, 平野智也, 長野哲雄 (東京大・大学院薬学系研究科)

(13) “TBA”

宮脇敦史 (理化学研究所・脳科学総合研究センター)

【参加者名】

河原克雅 (北里大・医), 宮崎俊一, 尾田正二, 河内全  
(東京女子医大), 泉井亮, 菅世智子 (弘前大・医), 小島  
至, 最上秀夫, 山田聡子, 張恵 (群馬大・生体調節研),

毛利達磨 (生理研・細胞内代謝), 菊地和也 (東京大・大  
学院薬学系研究科), 飯野正光, 橋本彰子, 富田太一郎 (東  
京大・医学系研究科), 広瀬茂久, 平田拓, 鈴木喜郎 (東  
京工大・生命理工学), 河西 春郎, 根本知己, 高橋倫子

(生理研・生体膜), 多久和陽, 龍泰治, 桜井華奈子, 有川佳代(金沢大・医), 老木成稔(福井医科大), 黒崎知博(関西医大), 久野みゆき, 森畑宏一, 森 啓之(大阪

市大・院・医・分子細胞生理), 宮脇敦史, 水野秀昭, 日野美紀, 沢野朝子(理化学研・脳科学総合研究センター・細胞機能), 吉田繁(長崎大・医)

### 【概要】

Ca<sup>2+</sup>シグナル研究会は, 細胞内 Ca<sup>2+</sup>シグナルの持つ多彩な機能調節を上回る, 多様な機能研究者集団である。Ca<sup>2+</sup>の持つ広範な細胞機能の調節能力をいろんな角度から議論し, 有益な情報を交換する。細胞内 Ca<sup>2+</sup>振動と Mn<sup>2+</sup>の役割,あるいは細胞内 Zn<sup>2+</sup>イメージング技術の開発など, Ca<sup>2+</sup>の調節能を側面から調べる重要性を示し,

Ca<sup>2+</sup>研究の新しい展開を予感させた。一方, Ca<sup>2+</sup>シグナルコーディングとデコーディングは, Ca<sup>2+</sup>シグナルの多彩な機能調節の仕組みを読み解く「鍵」を提示し, 示唆に飛んだ内容であった。新しい実験技術の紹介と実験データの解釈を巡った質の高い議論は, 元祖「Ca<sup>2+</sup>シグナル研究会」の魅力である。

## (1) 2光子励起法による外分泌腺開口放出の研究

根本知己\*, 木村良一, 伊藤公一, 立川 光, 宮下保司, 飯野正光, 河西春郎\*

(\*生理研・生体膜, 東京大・医学系研究科・薬理)

膵臓外分泌腺腺房標本の開口放出を多光子励起法を用いて可視化した所, 状態の開口放出は元よりあった腺腔面のみでなく, 既に形成された構造の上に頻りに形成され, 開口放出が連鎖的に起きる逐次開口放出が主たる開口放出の様式であることがわかった。開口放出を起こす Ca<sup>2+</sup>振動においては5マイクロモル以上の Ca<sup>2+</sup>濃度上昇が顆粒領域内層にまで及び, これにより内層への逐次

開口放出が誘発される。一方 培養プルキンエ細胞では, カルビンディンの飽和によりマイクロモル以上の Ca<sup>2+</sup>濃度上昇が非線型に起きる。この様に生理的な範囲の Ca<sup>2+</sup>濃度上昇は fura-2 や fluo-3 を飽和させる程大きいことがあるが, in vivo の Rmax や Fmax は in vitro より小さいのでこの飽和は見逃されやすい。

## (2) アセチルコリンによる膵 $\beta$ -cell の脱分極発生機構: Ca<sup>2+</sup>の Ca<sup>2+</sup>流入に対する positive feedback system

泉井 亮, 菅世智子, 菅野隆浩(弘前大・医・第一生理)

アセチルコリン (ACh) は, ラット膵  $\beta$ -cell のインスリン分泌を促進する。この過程では脱分極に伴って  $\beta$ -cell に流入する Ca<sup>2+</sup>の役割が大きいが, ACh による脱分極発生メカニズムやこれに関係する細胞内情報伝達機構については明らかではない。そこでこの点を電気生理学の手法を中心に検討した。その結果, 1) ACh (0.01-10  $\mu$ M) は whole-cell mode で記録された ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel (K<sub>ATP</sub>) 電流を, 電極液の EGTA が 0.5mM のときは抑制したが, 10mM では抑制しなかった。2) ACh によ

る電流抑制は GDP S, U73122, heparin によって消失した。3) Inside-out mode で膜内側の Ca<sup>2+</sup>を 10nM から 10  $\mu$ M にすると KATP 活性は減少した。これらの結果から, ACh による脱分極は IP<sub>3</sub> によって放出される Ca<sup>2+</sup>が KATP の ATP 感受性を促進することで KATP 活性が低下することによると考えられる。この脱分極は L-type Ca<sup>2+</sup> channel を開口して Ca<sup>2+</sup>流入を促進する。すなわち, ACh によるラット膵  $\beta$ -cell の Ca<sup>2+</sup> signaling では Ca<sup>2+</sup>の Ca<sup>2+</sup>流入に対する正のフィードバック機構が働いている。

## (3) 単一膜 細胞におけるインスリン分泌の解析

最上秀夫, 張 恵, 山田聡子, 小島 至 (群馬大・生体調節研)

目的: 細胞内カルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 濃度の上昇とジアシルグリセロール (DG) により活性化される conventional PKC(cPKC)は, 広範な細胞機能の調節に関与している。今回, 我々はインスリン分泌細胞においてグルコースによるインスリン分泌活性化機構を細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 動態と cPKC 一つである PKC の活性化の観点から検討した。

方法: インスリン分泌細胞 (INS-1) に PKC -GFP を導入して, 細胞質から細胞膜への PKC -GFP の translocation とインスリン分泌を PKC の活性化の指標

にした。同時に fura-2 にて細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 動態をモニターした。

結果: 脱分極刺激による  $\text{Ca}^{2+}$ influx により惹起される  $\text{Ca}^{2+}$ オシレーションによって PKC の活性化が起こった。PKC の活性化には 400nM 以上の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇が必要であった。高濃度グルコース存在下でその活性化はさらに高まった。

結論: インスリン分泌細胞においてグルコースによる PKC の活性化を介したインスリン分泌活性化機構の存在が示唆された

## (4) BCR を介するカルシウムシグナルの分子的解析

黒崎知博 (関西医大・肝研・分子遺伝)

私達は既に, BCR により誘起されるカルシウム動員には PLC- 2 と Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) の二つの経路が活性化されることが必須であることを明らかにしてきた。今回 DT40 B 細胞を用いて遺伝学的・生化学的解析を行うことにより 2 つのことを明らかにしてきた。

1) PLC- 2, PI3K が活性化されるためには刺激依存性に cholesterol-rich な特殊な膜各群である GEM fraction に移行することが重要であり, アダプター分子 BLNK,

BCAP はその移行に必須の役割を担っている。GEM fraction には Trp channel が豊富に存在しているという報告もなされており, GEM fraction がカルシウムシグナル発生に重要な分子群を集積する場として機能していることが予測される。2) DT40 B 細胞に Trp1 channel が発現しており, この欠損細胞は ER からの calcium release も細胞外からの calcium influx も阻害され, 重要な機能を担っていることが示された。

(5) マウス卵の  $\text{Ca}^{2+}$  oscillation における  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$  influx・release毛利達磨<sup>1</sup>, 白川英樹<sup>2</sup>, 尾田正二<sup>2</sup>, 宮崎俊一<sup>1,2</sup>(<sup>1</sup>生理研・細胞内代謝, <sup>2</sup>東京女子医大・第二生理)

ハムスター精子抽出物 (SE) をマウス卵に顕微注入し受精時と同様な  $\text{Ca}^{2+}$ 振動を起させ,  $\text{Mn}^{2+}$ による Fura-2 の蛍光消退を用い  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ 動態を測定した。細胞内  $\text{Mn}^{2+}$ 濃度の増加につれそれぞれの  $\text{Ca}^{2+}$ 増加に伴う  $\text{Mn}^{2+}$ 振動が見られた。この時  $\text{Mn}^{2+}$ 流入は持続的であり静止時に比べ 2-3 倍増大していた。この結果は  $\text{Ca}^{2+}$ と  $\text{Mn}^{2+}$ の競合的阻害条件下で, 流入排出を仮定したモデルで数値的にシミュレーションできた。すなわち, 細胞内に流入し

た  $\text{Mn}^{2+}$ も  $\text{Ca}^{2+}$ と同様に ER に取り込まれさらに遊離されることを示した。イノシトール三リン酸 ( $\text{InsP}_3$ ) の注入による一過的な  $\text{Ca}^{2+}$ 増加は, 一過的な  $\text{Mn}^{2+}$ 流入のみを誘起した。また  $\text{Ca}^{2+}$ ストアの枯渇による顕著な  $\text{Mn}^{2+}$ 流入は容量性  $\text{Ca}^{2+}$ 流入機構の存在を示唆した。結論として, マウス卵の  $\text{Ca}^{2+}$ 振動時には最初の大きな  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離時に, 容量性  $\text{Ca}^{2+}$ 流入機構により,  $\text{Ca}^{2+}$ 流入が引き起こされ, 持続的な  $\text{Ca}^{2+}$ 流入が継続されることがわかった。

## (6) Ca<sup>2+</sup>-ATPase のチャネル活性

老木成稔・清水啓史・豊島 近

(福井医大・生理, 東京大, 分子細胞生物研)

筋小胞体 Ca<sup>2+</sup>-ATPase は, ある条件下では Ca<sup>2+</sup>の受動的な輸送路となることが筋小胞体ベシクルを用いた Ca<sup>2+</sup>流束の実験から示されてきた。Ca<sup>2+</sup>-ATPase の一次構造上, ポンプ活性に関わる負電荷残基が同定され, これらの残基は Ca<sup>2+</sup>チャネルの選択性フィルター部に相同な構造を持つ。Ca<sup>2+</sup>-ATPase の受動輸送機構を明らかにするために精製 Ca<sup>2+</sup>-ATPase を用いて実験を行った。精製 Ca<sup>2+</sup>-ATPase をリポソームに再構成し, pyrene

maleimide (PMI: システイン残基修飾剤)で修飾すると Ca<sup>2+</sup>流束が著明に増大した。脂質平面膜に再構成し電圧固定法でイオン電流を測定した。電位ステップによって時間非依存性電流が測定でき, その電流 - 電圧特性は弱い整流性を示した。この電流は流束実験に一致して, thapsigargin や Ca<sup>2+</sup>で抑制された。Ca<sup>2+</sup>-ATPase の立体構造をもとに Ca<sup>2+</sup>の透過機構について検討する。

## (7) カルシウムシグナルのコーディングとデコーディング機構

飯野正光 (東京大学医学系研究科・細胞分子薬理)

細胞内カルシウムシグナルは, カルシウムウエーブ・オシレーションといった時間的・空間的ダイナミズムを示し細胞機能を制御している。細胞に対する入力に応じてカルシウムシグナルがどのようにコードされるか, またそれが細胞機能へどのようにデコードされるかは, 細胞の生理機能制御を理解するうえで基本的に重要な問題である。多種の細胞応答では, 細胞内イノシトール三リン酸 (IP<sub>3</sub>) に引き続いてカルシウムシグナルが生じる。このコーディング機構においてカルシウムシグナルが,

自身の形成機構にフィードバックをかけることが重要であることを我々は示してきた。すなわち, IP<sub>3</sub>受容体自身及び IP<sub>3</sub>産生機構に対するフィードバック効果である。このメカニズムの分子レベルの解明が進んでいる。さらに, 複雑なカルシウムシグナルをデコードするメカニズムについて, カルシウム依存性転写因子である NF-AT について解析を進めたところ, 特徴的な検出機構があることが明らかになってきた。

## (8) 細胞の機能調節におけるプロトンチャネルの役割

久野みゆき, 森畑宏一, 森啓之 (大阪市大・院・医・分子細胞生理)

膜電位依存性プロトン (H<sup>+</sup>) チャネルは, 脱分極によって開口し短時間に大量の H<sup>+</sup>排出能をもつユニークな pH 調節機構である。中枢神経系の phagocyte であるミクログリア, 骨組織の H<sup>+</sup>分泌細胞である破骨細胞, ヒスタミン分泌細胞であるマスト細胞はいずれも H<sup>+</sup>チャネルを発現している。通常は pH の変動による feedback 機構で制御されているが, いずれの細胞でも H<sup>+</sup>チャネル電

流量は phenotype によって大きく異なり, また記録中に電流量の fluctuation が見られるなど, チャネル活性は細胞内外の環境に鋭敏に反応して変動する。起電性 H<sup>+</sup>-ATPase の H<sup>+</sup>-translocation 能を担う c-subunit と比較すると, H<sup>+</sup>チャネルは細胞内アシドーシスからの迅速な回復に威力を発揮した。

## (9) 恐山湖産ウグイの酸性適応機構の解明

平田 拓<sup>1</sup>, 小野俊浩<sup>1</sup>, 仲里猛留<sup>1</sup>, 猿田洋子<sup>1</sup>, 金子豊二<sup>2</sup>  
 平野哲也<sup>2</sup>, 若林繁夫<sup>3</sup>, 重川宗一<sup>3</sup>, 広瀬茂久<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>東工大・生命理工, <sup>2</sup>東大・海洋研,  
<sup>3</sup>国立循環器病センター・研・分子生理 )

恐山(青森)のカルデラ湖に生息するウグイは pH3.5 という極めて過酷な硫酸酸性に適応する能力を持つ。この恐山ウグイの酸性適応機構解明の手がかりを得るために、外界とのイオン輸送に重要な役割を果たしていると考えられる鰓で、 $H^+$ と  $HCO_3^-$ の輸送がどのように行われているかを、各々のイオン輸送を行っていると考えられる  $Na^+/H^+$  exchanger 3 (NHE3)  $Na^+/HCO_3^-$  cotransporter (NBC) に注目し調べた。ノーザン解析より、酸性適応に

ともない NHE3 と NBC の発現量が顕著に増大しており、また、免疫組織染色より、NHE3 は塩類細胞の頂端部に、NBC は基底膜側に特異的に発現していることを確かめた。鰓の塩類細胞において、NHE3 は外界から  $Na^+$ を取り込むのと交換で  $H^+$ を排出し、NBC は取り込まれた  $Na^+$ と一緒に pH 緩衝剤として働く  $HCO_3^-$ を血中に送り込むことで、効率よく血液及び体液の酸性化を防ぎ、生存を計っているものと推定される。

(10) 内向き整流性  $K^+$ チャネル Kir7.1 の生理機能解明にむけて

鈴木喜郎<sup>1,3)</sup>, 中村信大<sup>1)</sup>, 大方香代子<sup>1)</sup>,  
 藤乗嗣泰<sup>2)</sup>, 河原克雅<sup>3)</sup>, 広瀬茂久<sup>1)</sup>  
 ( <sup>1</sup>東工大・生命理工 <sup>2</sup>東大・医・腎臓内分内分泌科  
<sup>3</sup>北里大・医・生理 )

内向き整流性  $K^+$ チャネル Kir7.1 は、近年 EST データベースより同定され、特徴的なポア配列を持つこと、および甲状腺、小腸粘膜、脈絡叢などに発現していることから、新しい上皮型  $K^+$ チャネルとして注目されている。今回私達は、この  $K^+$ チャネルが細胞のどのような要求によって発現してくるのかを明らかにし、その生理機能を推定するために、ラット Kir7.1 遺伝子とそのプロモーター

領域の解析を行った。その結果、細胞内 cAMP 上昇により転写活性が増加した。さらに、甲状腺由来細胞株 FRTL-5 において、TSH 刺激により内源性 Kir7.1 の mRNA およびタンパク量が増加した。これらのことから Kir7.1 は甲状腺機能そのものに関与することが強く示唆され、ヨード輸送の際の  $K^+$ リサイクルを行っているのではないかと推測された。

## (11) 血管系に発現するスフィンゴシン-1-リン酸(S1P)受容体群による細胞運動調節とそのシグナリング

多久和陽, 岡本宏之, 多久和典子, 杉本直俊, 櫻田惣太郎  
 (金沢大・医・第一生理)

私達が以前に血管平滑筋よりクローニングした Orphan G タンパク共役型受容体 AGR16/EDG5 は、生理活性脂質 S1P に対する受容体であることを見出した。S1P は様々な細胞の増殖・分化・骨格・運動・サバイバ

ル、平滑筋トーンなどに影響する。S1P は血漿中に高濃度で存在し、また様々な活性化細胞によって細胞外に放出される。EDG5 は 8 つのメンバーからなる EDG ファミリーに属するが、EDG1, EDG3, EDG8 は EDG5 と同様

に S1P 受容体であり,これに対して EDG2, EDG4, EDG7 は LPA 受容体であることが明らかとなった。EDG1,3,5 はいずれも  $G_i$  もしくは  $G_q$  を介して PLC/ $Ca^{2+}$ /DAG, MAPK

系に共役するが, Rho ファミリー低分子量 G タンパクへの共役は EDG 受容体サブタイプによって様々に異なり, その結果細胞運動におよぼす作用が全く異なる。

## (12) 新規亜鉛バイオイメーシングプローブ

菊地和也・平野智也・長野哲雄 (東大・院薬)

細胞の内外に存在する遊離の  $Zn^{2+}$  が細胞死や神経伝達に関与していることが報告されてきたが, その動態, 作用機序に関しては仮説の段階である。そこで我々は, 生理的条件下で瞬時に反応する可視光励起型蛍光プローブ分子の開発を行った。 $Zn^{2+}$  のアクセプターとして  $Zn^{2+}$  と瞬時に選択的に結合する TPEN 類を選択し, 蛍光団として fluorescein 類を用いた蛍光プローブ (ZnAF-1, ZnAF-2) をデザイン・合成した。 $Zn^{2+}$  を加えることによ

り, ZnAF-1, ZnAF-2 とともに極大励起波長 (492 nm) 及び極大蛍光波長 (514 nm) は変化せず, 蛍光強度は容量依存的にかつ瞬時に増大した。中性付近の pH では蛍光強度は安定した。 $Ca^{2+}$  等の生体内に存在する金属イオンを加えても, 蛍光強度は変化せず, これらの金属イオンと  $Zn^{2+}$  を共存させてもほとんど影響を与えなかった。細胞応用についても報告する。

## (13) “TBA”

宮脇敦史 (理化研脳科学総合研究センター細胞機能探索技術開発チーム)

GFP をベースに  $Ca^{2+}$  指示薬を作製する際の, 2 つのアプローチを報告する。第 1 に, オワンクラゲ GFP の mutant の一つであるサファイアをドナー, 六放サンゴから得られた RFP をアクセプターにすると非常に効率のよい FRET が実現できることを見出した。サファイア, RFP を組み込んで作製された Red camaleon は, pH 変化が激しく起こる神経細胞での  $Ca^{2+}$  イメーシングに適す

ることが示された。第 2 に GFP の -can 構造にメスを入れたものに,  $Ca^{2+}$  センサーとしてのカルモデュリンとその標的ペプチドを組み込み,  $Ca^{2+}$  濃度に従って蛍光特性を変える GFP ‘pericam’ を創り出した。 $Ca^{2+}$  によって蛍光強度が増大する ‘flash-pericam’, 蛍光強度が減少する ‘inverse-pericam’, 色が変わる 2 波長励起 1 波長測光型の ‘ratiometric-pericam’ がある。

## 6. 神経科学研究の新しいアプローチ

2000 年 9 月 29 日- 9 月 30 日

代表・世話人：畠中 寛 (大阪大学蛋白質研究所)

所内対応者：池中 一裕 (国立岡崎共同研究機構・生理学研究所)

- ( 1 ) NMDA 受容体発現細胞におけるキスカル酸の作用  
工藤 佳久 (東京薬科大学生命科学部)
- ( 2 ) エバネッセンス顕微鏡で見た GFP 標識顆粒の分泌動態  
坪井 貴司 (浜松医科大学光量子医学研究センター)
- ( 3 ) 初代培養神経細胞を用いたスパイン形成の解析  
白尾 智明 (群馬大学医学部行動分析学教室)
- ( 4 ) 痛みと ATP 受容体  
井上和秀 (国立医薬品食品衛生研究所薬理部, 九州大学大学院薬学研究院)
- ( 5 ) LTP, depotentiation, LTD の molecular dissection, substitution -  
"L T P - カクテル" と多重分子カスケードのスイッチング  
黒田 洋一郎 (東京都神経科学総合研究所・分子神経生物)
- ( 6 ) 脊髄背側からのオリゴデンドロサイト分化抑制因子の解析  
和田 圭樹 (国立岡崎共同研究機構・生理学研究所・神経情報部門)
- ( 7 ) 小脳顆粒細胞のアポトーシスにおける p38 の役割  
山岸 寛 (大阪大学蛋白質研究所蛋白質生合成部門)
- ( 8 ) 神経伝達物質放出における PI 3-キナーゼの役割  
板倉 誠 (三菱化学生命科学研究所)
- ( 9 ) 脳内での  $Ca^{2+}$  / カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II の多様性とその生理的意義  
山本 秀幸 (熊本大学医学部第一薬理)
- ( 10 ) In-vitro 条件付けによる神経細胞形態のダイナミックな変化  
川合 亮 (東海大学大学院理学研究科)
- ( 11 ) ニューロトロフィンによる神経伝達調節  
沼川 忠広 (大阪大学蛋白質研究所生合成部門)
- ( 12 ) 開口分泌機構への新しいアプローチ  
熊倉 鴻之助 (上智大学生命科学研究所)
- ( 13 ) グルタミン酸受容体サブユニット GluRB のカルボキシル末端の局在における役割の解析  
清末 和之 (大阪工業技術研究所 脳神経工学ラボラトリー)
- ( 14 ) シナプトソームに濃縮される mRNA の探索とその翻訳解析  
石本 哲也 (通産省・大阪工業技術研究所・脳神経工学ラボラトリー)
- ( 15 ) Differential display 法を用いた神経可塑性関連遺伝子群の探索とカタログ化  
松尾 亮太 (三菱化学生命科学研究所)

### 【参加者名】

松尾 亮太 (三菱化学生命化学研), 工藤 佳久 (東京薬大・生命科学), 坪井 貴司 (浜松医科大・光量子), 榎原 厚 (東海大・開発工学), 三浦 正幸 (大阪大・医), 清末 和之 (大阪工業技術研), 松本 知也 (大阪大・蛋白質研), 畠中 寛 (大阪大・蛋白質研), 土屋 礼美 (東京薬大・生命科学), 植田 敦子 (大阪工業技術研), 川合 亮 (東海大), 白尾 智明 (群馬大・医), 高橋 正身 (三菱化学生命研), 板倉 誠 (三菱化学生命研), 植村 慶

一(慶応大・医),黒田 洋一郎(東京都神経科学総合研・分子生物学),熊倉 鴻之助(上智大・生命研),山本 秀幸(熊本大・医),井上 和秀(国立医薬品食品衛生研),田口 隆久(通産省・工業技術院),関野 祐子(群馬大・医),石本 哲也(大阪工業技術研),工藤 卓(大阪工業技術研),寺川 進(浜松医科大・光量子),山岸 覚

(大阪大・蛋白研),横幕 大作(大阪大・蛋白研),沼川 忠広(大阪大・蛋白研)藤井 聡(山形大・医),榎戸 靖(大阪大・蛋白研),岸本 拓哉(生理研),畠山 淳(生理研),笹川 展幸(上智大・生命研),高橋 倫子(生理研),河西 春郎(生理研)

#### 【概要】

脳の形成とその機能を明らかにする上で、近年の技術の進歩と研究方法の多様化が重要な役割を果たしていることは論を待たない。分子生物学的手法による分子レベルの解析から、光学的手法、電気生理学的手法を用いた細胞レベルの解析、組織培養を用いた組織レベルの解析等、様々なレベルで多様な方法によりアプローチが行われ、新しい展開が行われている。したがって、このよう

な異なった角度からのアプローチをとる研究者が会して情報を交換し、成果の位置づけと今後の展開を討議することが重要である。

本研究会では、このような様々な角度から研究を行っている研究者がそれぞれの最新の成果に基づいて発表討議を行い、一層の発展を計ることを目的として行われた。

### (1) NMDA 受容体発現細胞におけるキスカル酸の作用

工藤 佳久(東京薬科大学・生命科学部)

NMDA 受容体の e1 サブユニットと z1 サブユニットの遺伝子上流に HSP70 を繋いだ遺伝子を導入した CHO 細胞に 43 で約 30 分熱刺激を与えることによって、NMDA 受容体を発現させた。この受容体の発現は NMDA を適用した場合の細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を指標として確認できた。この細胞に、AMPA や Kainate を適用してもまったくカルシウム濃度の変動は生じなかった。しかし、G-タンパク質連動型グルタミン酸受容体作用薬、t-ACPD を適用すると、わずかであるが細胞

内カルシウム濃度が上昇し、さらに、キスカル酸を適用すると明らかなカルシウム濃度の上昇が生じた。この作用は NMDA 受容体拮抗薬、APV で抑制され、また、G-タンパク質連動型グルタミン酸受容体拮抗薬、MCPG でも抑制された。さらに IP3 受容体の抑制薬である 2-APB でも抑制されることを確かめた。これらの結果は、NMDA 受容体は何らかの形で G-タンパク質と連動している可能性を示しており、NMDA 受容体を介した細胞内情報伝達に別の側面があることを示唆するものである。

### (2) エバネッセンズ顕微鏡で見た GFP 標識顆粒の分泌動態

坪井 貴司, 寺川 進(浜松医科大学光量子医学研究センター)

分泌顆粒膜と細胞膜とが融合する時の分泌顆粒の動態を、対物レンズ照明型エバネッセンズ顕微鏡を用いて観察し、解析を行った。ラット膵島細胞腫 INS-1 細胞の分泌顆粒をアクリジンオレンジで蛍光染色し、また、顆粒膜上に存在する蛋白である phogrin に GFP を融合させたベクターを作成し、これによる蛋白の強制発現後に膜近傍の GFP 分子の蛍光像も観察した。電気刺激により開口

放出反応を引き起こさせると、アクリジンオレンジ染色したインスリン顆粒は、突然蛍光強度をゼロにまで減らす反応を示した。この時、33~100 ミリ秒間その蛍光強度が一瞬増加するという反応が先行していた。一方 phogrin-GFP 融合タンパクの蛍光強度は、刺激後約半分に減少し、その後ゆっくりとした減少を続けて、30 秒後にほとんど観察できないレベルになった。以上から単一

顆粒の開口放出ダイナミクスを考察する。

### (3) 初代培養神経細胞を用いたスパイン形成の解析

白尾 智明, 関野 祐子 (群馬大学医学部・行動分析学教室)

樹状突起のフィロポディアからスパインに変換する際のアクチン細胞骨格の変化を初代培養神経細胞を用いて解析した。フィロポディアにおいてはアクチン束化蛋白ファッシンが主要なアクチン結合蛋白であるが、スパイ

ンの発達に伴い神経系に特徴的なアクチン結合蛋白ドレプリンがスパインに局在するようになることがわかった。また、ドレプリンの発現量を変化させることにより、スパインの形態変化が誘導されることもわかった。

### (4) 痛みと ATP 受容体

井上 和秀 (国立医薬品食品衛生研究所薬理部・九州大学大学院薬学研究院)

近年、痛みを伝える神経 (後根神経節 (DRG) ニューロン, 三叉神経節ニューロン) に限局して発現する ATP 受容体サブタイプ P2X3 が発見されて、ATP 受容体と痛みの関係がにわかに注目されるようになった。我々はこれまでに次のことを明らかにした。1. C-線維をもつ小型の DRG ニューロンでは P2X3 がホモマーのイオンチャンネルを形成し、末梢での痛み発現と熱疼痛過敏反応、中

枢端での痛み伝達促進作用に貢献している。2. 中型の DRG ニューロンでは P2X3 と P2X2 がヘテロマーのイオンチャンネルを形成し、異痛症 (アロディニア: 普通は痛みとして感じない触刺激を痛烈な痛みとして感じてしまう病態) を引き起こしてしまう。本会では、P2X3 の痛みに対する関与をさらにオリゴヌクレチド・アンチセンス法を *in vivo* に適用した結果を交えて報告し討論する。

### (5) LTP, depotentiation, LTD の molecular dissection, substitution - "LTP - カクテル" と多重分子カスケードのスイッチング

黒田 洋一郎 (東京都神経科学総合研究所・分子神経生物)

藤井 聡 (山形大学医学部・生理)

海馬切片で観察される LTP, depotentiation, LTD などは記憶の基礎過程と考えられ、その分子・細胞メカニズムについては多くのモデルや研究が発表されているが矛盾・相反・不明な点も多く、21世紀に持ち越されたこれからの分野である。シナプスの可塑的变化は刺激の頻度にも依存するので、刺激によってシナプス間隙に放出される分子群とその代謝物、および刺激頻度に依存するそれらの濃度が、これらの現象の trigger になっている。欧米中心のこれまでの研究では、この trigger 分子としてはグルタミン酸のみが考えられ、同時に放出されている ATP は無視されていた。演者らは ATP のシナプス形

成を含むシナプス可塑性への役割について検討し、ATP は ecto-protein kinase の基質となりシナプス膜機能蛋白の細胞外ドメインを磷酸化することによって、シナプス形成を促進している可能性にまず気付いた (Kuroda, et al., Neurosci. Lett. 135, 255, 1992)。LTP の長期保持に *denovo* のシナプス形成を含むシナプスの形態変化が重要なので、ATP の海馬 CA1 シナプス可塑性への影響を調べた。ATP 添加のみで長期に継続する LTP が誘導できることがわかり、この ATP-induced LTP は ecto-protein kinase 阻害剤添加で起こらなくなり、かつ電気刺激で誘導された LTP も同様に ecto-protein kinase

阻害剤で阻止された。(Fujii, et al. Neurosci. Lett. 187, 130, 133, 1995)。しかし ATP-induced LTP はテスト刺激なしには起こらなかったため、電気刺激による LTP 形成を化学物質添加のみに置き換える "LTP - カクテル" ができるかどうかを試した。ATP と NMDA のみで電気刺激なしに LTP が形成された。ATP のシナプスでの分

解産物であるアデノシンも LTP 形成の調節, ことに E-Disassociation, に各種アデノシン受容体が関与している (Fujii, et al., J. Physiol. 521, 451, 1999) こともわかり, LTP をはじめとする海馬シナプス可塑性の分子・細胞メカニズムは, 時間経過の異なる多重な分子カスケードの巧みなスイッチングによるものと思われる。

#### (6) 脊髄背側からのオリゴデンドロサイト分化抑制因子の解析

和田 圭樹, 鹿川 哲史, 清水 健史, 池中 一裕  
(岡崎国立共同研究機構・生理学研究所・神経情報部門)

オリゴデンドロサイトは, 脳内で非常に限局した領域から発生してくることがこれまでに知られている。我々はオリゴデンドロサイトの領域特異的な発生がどのようにして制御されているのかを調べるために, マウス胎生 12 日目の延髄から頸部脊髄領域を用いる組織片培養を行った。その結果, 脊髄背側領域がオリゴデンドロサイト数を抑える活性を持つことを見いだした。そこで, 脊髄のループレートから分泌される因子として知られる骨形成因子 (BMP) をその一つの候補として調べたところ, 我々の培養系でのオリゴデンドロサイト分化抑制

因子としての活性を見いだすことが出来なかった。現在, 因子の同定を試みている段階である。

以前から, 脊髄でのオリゴデンドロサイト発生は腹側のフロアプレートからのソニックヘッジホッグやニューレギュリンにより促進的に制御されていることが報告されている。今回の発表では, 脊髄腹側からの分化促進因子と背側からのオリゴデンドロサイト分化抑制因子とのバランスによって, グリア細胞の脊髄での背腹軸に沿った分化制御が神経細胞同様に行われていることを提唱する。

#### (7) 小脳顆粒細胞のアポトーシスにおける p38 の役割

山岸 覚 (大阪大学蛋白質研究所・蛋白質合成部門)

培養ラット小脳顆粒細胞は, 脱分極刺激である高カリウム (26 mM) 条件下において長期間培養するに従って成熟する。成熟後, 培地中のカリウム濃度を下げる (5mM) ことにより, 急速なアポトーシスを誘導することができる。我々はアポトーシス誘導後 3 時間において p38 MAPK のリン酸化が顕著に上昇すること, そして p38 MAPK の特異的阻害剤である SB203580 が, 濃度依存的

にアポトーシスを抑制することを見出した。また, このアポトーシスの系において, SB203580 の添加により転写因子 c-Jun のリン酸化上昇が抑制されること, さらに, p38 MAPK が c-Jun をリン酸化し得ることを観察した。以上の結果は, p38 MAPK が小脳顆粒細胞の低カリウムによって生じるアポトーシスにおいて重要な役割を果たしていることを示唆している。

## (8) 神経伝達物質放出における PI 3-キナーゼの役割

板倉 誠, 大西 浩史, 関口 真理子, 山森 早織, 片岡 正和 (三菱化学生命研究所)

網野 真也 (東京大学大学院・総合文化)

高橋 正身 (三菱化学生命研究所, 東京大学大学院・総合文化)

イノシトールリン脂質は, さまざまな情報伝達系においてセカンドメッセンジャーとして働いている。神経伝達物質の放出においても PIP 5-キナーゼが産出する PI (4,5) P<sub>2</sub> がプライミングステップに関わっていると考えられている。そこで, 神経伝達物質放出への PI 3-キナーゼの関与について検討を行った。結果 NGF および IGF-1 処理による PI 3-キナーゼの活性化によって神経伝達物

質放出が促進された。しかしながら, その促進機構は少なくとも 2 つ存在すると考えられた。すなわち NGF による促進では PI 3-キナーゼと MAP キナーゼが協同して働くのに対し, IGF-1 による促進では MAP キナーゼの活性化は必要でなかった。さらに PI 3-kinase は細胞膜ではなく細胞質中, おそらくは分泌小胞膜上で働いていると思われる。

(9) 脳内での Ca<sup>2+</sup> / カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II の多様性とその生理的意義

山本 秀幸, 竹内 有輔, 田淵 博孝, 宮本 英七 (熊本大学・医学部・第一薬理学教室)

Ca<sup>2+</sup> / カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaM キナーゼ II) は脳内に多量に存在し, 神経可塑性や神経伝達物質の放出に関与することが示唆されている。CaM キナーゼ II には, 遺伝子の異なる 4 種類のサブユニットが見いだされている。それぞれのサブユニットについて, 調節領域の後に可変領域が存在し, この部位のスプライシングの違いにより複数のアイソフォームが形成

される。我々はデルタサブユニットの研究を中心として, 可変領域のアミノ酸配列により各アイソフォームの細胞内局在と生理機能が決定されている可能性を検討してきた。今回, アストロサイトや NG108-15 細胞および, インスリン分泌細胞などの培養細胞株で多量に発現しているアイソフォームと核移行シグナルを有するアイソフォームの細胞内局在と生理機能について報告する。

## (10) In-vitro 条件付けによる神経細胞形態のダイナミックな変化

川合 亮 (東海大学大学院・理学研究科)

榊原 学 (東海大学・開発工部・生物工学科)

我々は BDNF が培養小脳顆粒細胞より興奮性の神経伝達物質であるグルタミン酸の放出を引き起こすことを既に報告している。今回, BDNF によるグルタミン酸放出作用がいわゆる開口放出の機構ではなく, グルタミン酸トランスポーターの逆転によるものであることを見出した。グルタミン酸トランスポーターの阻害剤 (t-PDC) で BDNF のグルタミン酸放出効果は完全に抑制された。また, もう一つの阻害剤 DL-TBOA でも放出は完全に抑制された。グルタミン酸トランスポーターは Na とグル

タミン酸を共輸送する。そこで Na の細胞内動態を解析したところ BDNF により顕著な Na の流入が観察され, TTX で阻害された。以上の結果から BDNF は TTX 感受性の Na チャネルを介して Na 濃度を上昇させ, それによるトランスポーターの逆転機構でグルタミン酸放出を引き起こしていると思われる。BDNF は開口放出機構の調節だけでなく, 短期間においてトランスポーターを逆転させることでも興奮性シナプスの制御に関与している可能性がある。

### (11) ニューロトロフィンによる神経伝達調節

沼川 忠広 (東海大学大学院理学研究科)

畠中 寛 (大阪大学蛋白質研究所・生合成部門)

光と振動をそれぞれ条件刺激 (CS), 無条件刺激 (UCS) とするウミウシの連合学習は、摘出した単離脳標本でも、CS と UCS の組刺激により B 型視細胞で持続的な興奮性の増大が観察され、in-vivo と同じ生理学的特徴を示す。我々は、in-vivo で報告のある B 型視細胞軸索終末の focusing が、in-vitro 系でも起こるかどうか、起こるならその時間的な経過はどうか、B 型視細胞とシナプス結合する平衡胞有毛細胞との結合状態などを検討した。動的

な変化を観察するため、B 型視細胞と有毛細胞をそれぞれ Alexa-488, Alexa-594 で細胞内同時染色して、それらの機能的結合を確認した後、レーザー共焦点顕微鏡で形態の立体像を観察した。そのような標本に 5 回の CS-UCS 刺激対で条件付けを行い、その後の形態変化を時間経過に従い観察した。その結果、in-vitro 条件付けによっても focusing が起こること、その形態変化は予想した時間経過より早いものであることが明らかとなった。

### (12) 開口分泌機構への新しいアプローチ

熊倉 鴻之助 (上智大学・生命科学研究所)

我々はこれまで、開口分泌機構の研究手法として、高透過性クロマフィン細胞の内部環境を特異抗体や機能ペプチドの等によって操作し、分泌機能への影響を解析してきた。この手法は、分泌の素過程を解析できる点で効果的であるが、例えば機能障害抗体の作成が難しいこと、高透過性細胞の分泌過程が全く生理的であるか等の問題点もある。これらの問題点を克服して解析をする手法と

して、我々は CALI 法による SNAP-25 の不活性化の適用を試み、25% の機能障害を観察した。一方、分泌機能測定的手法として、単一細胞からの開口分泌をカーボンファイバー電極による電気化学的な測定解析、および蛍光標識分泌顆粒の可視的運動測定による解析を進めている。これらの手法でえられた結果を踏まえて、新しいアプローチについて考察する。

### (13) グルタミン酸受容体サブユニット GluRB のカルボキシル末端の局在における役割の解析

清末 和之, 田口 隆久 (大阪工業技術研究所・脳神経工学ラボラトリー)

受容体分子のシナプスへの局在機構、組み込み機構はシナプス機能発現、特に可塑性発現機構において重要である。近年の研究により、受容体分子と結合する分子が多く発見しているがその役割はほとんど解明されていない。我々は、海馬錐体細胞に GluRB 分子のカルボキシル末端 (C 末端) のリン酸化相同ペプチドを細胞内へ投与することによって長期増強の発現を増強される事を報告した。一つの可能性として、LTP 発現において多くの受容体分子をシナプスへ組み込んだことによることが考

えられ、GluRB の C 末端の受容体分子局在における役割を検討するため、GFP との C 末端の融合蛋白質を作成した。野生型 C 末端をもつ GFP のシグナルは、主に TGN に多く見られ、一方、変異型は、細胞膜に多く分布していた。この結果は、C 末端の 1 残基が受容体分子の細胞内外の局在において重要であることを示しており、リン酸化によって分布を制御するメカニズムの存在が示唆される。

## (14) シナプトソームに濃縮される mRNA の探索とその翻訳解析

石本 哲也, 田口 隆久 (通産省・大阪工業技術研究所・脳神経工学ラボラトリー)

神経細胞内において特定の数種の mRNA が樹状突起に選択的に輸送されることが近年明らかになってきた。これらの mRNA の神経細胞内での局在や翻訳調節機構を解析することは神経細胞の可塑的変化の分子メカニズムを解明するうえで重要である。Differential Display 法を用いて、3 週齢ラット前脳シナプトソーム内 mRNA と前脳全体から得られた mRNA の比較を行った結果、Ferritin H chain mRNA と未知の mRNA 1 種がシナプトソームに

濃縮されていることがわかった。また、培養神経細胞や海馬スライスを用いた in situ hybridization による解析の結果、これらの mRNA が樹状突起に存在していることが確認できた。以上の結果からこれらの mRNA がシナプス部位に輸送され、そこで翻訳されていると考えられる。さらに今回、実際に樹状突起中で翻訳が起きているかを解析するために、培養神経細胞と GFP を用いた実験系を構築した。そこから得られた結果についても報告する。

## (15) Differential display 法を用いた神経可塑性関連遺伝子群の探索とカタログ化

松尾 亮太, 村山 明子, 井ノ口 馨 (三菱化学生命科学研究所)

記憶の長期化には脳での遺伝子発現が必要であり、記憶の細胞レベルでの素過程と考えられている長期増強 (LTP) の維持にも遺伝子発現が必要であることが知られている。我々は長期記憶に必要な遺伝子群を明らかにする目的で麻酔下、および無麻酔自由行動下のラットの海馬に LTP を誘導し、この後に発現変化する遺伝子群を differential display 法によって網羅的に探索した。麻酔下のラット (急性 LTP) においては表示された約 70000 バンドのうち 80 バンドで再現性ある発現変化が認められ、これらはその経時的変化パターンから 7 つのグループに分類することができた。無麻酔自由行動下のラット (慢性 LTP) においては表示された約 72000 バンドのうち 17 バンドで再現性ある発現変化が認められ、クローニングの結果これらは 10 種類の遺伝子から成ることが判明した。これら 10 種の遺伝子は全て LTP 誘導後早い時期に発現上昇を示し、24 時間以内にもとのレベルに戻ってい

た。10 種の遺伝子のうち 5 種についてはこれまでに LTP に伴って発現誘導されることが報告されていなかったものであり、うち 3 種は機能未知の新規遺伝子であった。またこれら 5 種の遺伝子の発現誘導には LTP の誘導だけでなく持続との間にも相関が見られたことからこれらの遺伝子が LTP の持続に寄与している可能性が示唆された。我々はさらにこれら 5 種の遺伝子の発現臓器特異性および脳発生段階での発現特異性などの発現特性も解析した。我々は 3 種の新規遺伝子のうちのひとつとしてクローニングした RING finger タンパクを Potentin と名付け、これについてさらに詳細な解析を進めた。今回その発現 profile についても報告する。我々のスクリーニングによって、さらに多数の遺伝子が LTP により発現誘導を示す可能性が示唆され、遺伝子発現探索のツールとしての differential display の有効性が示された。

## 7. シナプス伝達の機能と分子の接点を探る

2000年10月26日 - 10月27日

代表：工藤 佳久（東京薬科大学生命科学部）

世話人：伊佐 正（岡崎国立共同研究機構生理学研究所）

- (1) マウス網膜内網状層における GABA<sub>C</sub> 受容体によるグルタミン酸の放出制御  
立花 政夫・松井 広（東京大学大学院・人文社会系研究科）
- (2) 開口放出を制御する神経終末蛋白分子  
持田澄子（東京医大・第一生理）
- (3) エバネッセンス顕微鏡法で解析した開口放出関連顆粒タンパクの動態  
坪井 貴司, 寺川 進（浜松医科大・光量子医学研究センター）
- (4) シナプス伝達における SNAP25 の磷酸化の役割  
<sup>1</sup>片岡正和, <sup>2</sup>桑原玲子, <sup>2</sup>高橋 正身（<sup>1</sup>信州大学・工学部, <sup>2</sup>三菱化学生命研）
- (5) 伝達物質放出可塑性の素過程解析  
八尾 寛（東北大学大学院・医学系研究科）
- (6) Sizes of vesicle pools, rate of mobilization and recycling at the larval neuromuscular junction of a temperature-sensitive *Drosophila* mutant, shibire  
Yoshiaki Kidokoro, Ricardo Delgado, Carlos Maureira, Carolina Oliva, Pedro Labarca  
（群馬大学・医）
- (7) 脳幹コリン作動性システムの標的と作用機構  
伊佐 正（生理学研究所）
- (8) 抑制性シナプス伝達の制御機構  
川口 真也, 平野 丈夫（京都大学理学研究科）
- (9) 海馬 CA1 錐体細胞におけるシナプス入力加算のイメージング  
榎木 亮介, 井上 雅司, 工藤 佳久, 宮川 博義（東京薬科大・生命科学）
- (10) グルタミン酸トランスポーターの神経活動に伴うエネルギー代謝促進作用における役割  
田中 光一（東京医科歯科大）
- (11) 哺乳動物巨大聴覚中継シナプス the calyx of Held の生後発達  
高橋 智幸（東京大学大学院医学系・神経生理学）
- (12) シナプス間結合の形成機構  
高井 義美（大阪大学大学院医学系研究科）
- (13) 脳皮質神経細胞移動の制御  
仲嶋 一範（東京慈恵会医科大・DNA 医学研・さきがけ研究 2 1）
- (14) Ca シグナリングによる CREB 依存性遺伝子発現調節とアクチン細胞骨格制御  
尾藤 晴彦（京都大学大学院医学研究科・高次脳科学）
- (15) シナプス可塑性とアクチン細胞骨格系の動態変化  
深澤 有吾, 斎藤 喜人, 山崎 美津江, 小澤 史子, 松尾 亮太, 井ノ口 馨（三菱化学生命科学研）
- (16) 海馬神経細胞への Ca<sup>2+</sup>透過性 AMPA 受容体強発現によるシナプス伝達機能の変化  
岡田 隆<sup>1,2,3</sup>, 山田 伸明<sup>1,2</sup>, 掛川 渉<sup>1</sup>, 都筑 馨介<sup>1</sup>, 飯野 昌枝<sup>1</sup>, 田中 光一<sup>3</sup>, 小澤 澁司<sup>1,2</sup>  
（<sup>1</sup>群馬大・医・第二生理, <sup>2</sup>JST・CREST, <sup>3</sup>東京医科歯科大・難治研・分子神経科学）
- (17) シナプスでの Ca<sup>2+</sup>チャンネル Ca<sup>2+</sup>遊離チャンネル Ca<sup>2+</sup>受容分子連関  
秋田 天平<sup>1</sup>, 成田 和彦<sup>2</sup>, 久場 健司<sup>1</sup>（<sup>1</sup>名古屋大・医・生理, <sup>2</sup>川崎医大・生理）

## (18) パッチクランプ RT-PCR 法を用いた大脳皮質非錐体細胞のグループ化

都筑 馨介 (群馬大・医・第二生理)

## (19) シナプス活動依存的な神経細胞の生存培養 - 養小脳顆粒細胞実験系の一般性と特殊性

小倉 明彦 (大阪大学大学院理学研究科)

## (20) 海馬錐体細胞における spontaneous EPSCs の in vitro 虚血負荷による二相性変化

田中 永一郎 (久留米大・医・第一生理)

## 【参加者名】

工藤 佳久 (東京薬科), 成田 和彦 (川崎医科大), 京大・人文), パークランド健 (東京大・人文), 坪井 貴司 (浜松医科大), 寺川 進 (浜松医科大), 片岡 正和 (信州大), 高井 義美 (大阪大・医), 田中永一郎 (久留米大・医), 平野 丈夫 (京都大・理), 吉田 盛史 (京都大・理), 土田 洋 (京都大・理), 伊藤 淳 (京都大・理), 若勇 雅昭 (京都大・理), 矢和多 智 (京都大・理), 尾藤 晴彦 (京都大・医) 篠田 陽 (大阪大・理), 小倉 明彦 (大阪大・理), 深澤 有吾 (三菱科学生命研), 窪田 芳之 (理化研), 伊佐 正 (生理研), 斎藤 康彦 (生理研), 遠藤 利朗 (生理研), 山下 哲司 (生理研)

久場 健司 (名古屋大・医), 李 鳳霞 (名古屋大・医), 曾我 総子 (名古屋大・医), 鎌田 真希 (東北大・医), 八尾 寛 (東北大・医), 小澤 滯司 (群馬大・医), 城所 良明 (群馬大・医), Pedro Labarca (群馬大・医), 持田 澄子 (東京医科大), 杉原 泉 (東京医科歯科大), 田中 光一 (東京医科歯科大), 岩淵 舞子 (東京医科歯科大), 岡田 隆 (東京医科歯科大), 松上瑠江子 (東京医科歯科大), 宮川 博義 (東京薬科大), 榎木 亮介 (東京薬科大), 立花 政夫 (東京大・人文), 細井 延武 (東

(1) マウス網膜内網状層における GABA<sub>C</sub> 受容体によるグルタミン酸の放出制御

立花 政夫, 松井 広 (東京大学・大学院人文社会系研究科・心理学研究室)

マウス網膜からスライス標本を作製し, whole-cell clamp 条件下で, 光刺激によって誘発されるオンー過性型アマクリン細胞の EPSC を解析した。網膜では, 視細胞の光応答は代謝型グルタミン酸受容体を介してオン型双極細胞に伝達される。オン型双極細胞はグルタミン酸を放出し, オン型アマクリン細胞とシナプス結合している。本実験では, アマクリン細胞へのグルタミン酸作動性シナプス入力以外のシナプス入力を薬理的に阻害し, オン型双極細胞とオンー過性型アマクリン細胞間のシナプス伝達を調べた。

アマクリン細胞のグルタミン酸受容体のサブタイプを同定するためにアゴニストを直接投与した結果, AMPA 型と NMDA 型の共存が確認された。しかし, 全面照射光刺激を与えると, 主に AMPA 型が活性化された。双極細

胞軸索終末部には GABA<sub>C</sub> 型受容体が豊富に局在することが報告されている。そこで, GABA<sub>C</sub> 型受容体に対する特異的阻害剤 TPMPA ((1,2,5,6- tetrahydropyridin-4-yl) methylphosphinic acid) を投与した条件下で光刺激を与えると, アマクリン細胞の光誘発性 EPSC は増大し, AMPA 型のみならず NMDA 型受容体も活性化されることが明らかになった。双極細胞はアマクリン細胞からの GABA 作動性フィードバック信号を受けており, 双極細胞軸索終末部の GABA<sub>C</sub> 型受容体が活性化されるとグルタミン酸の放出量が減少すると考えられる。また, 双極細胞から放出されるグルタミン酸の多寡によって, アマクリン細胞で活性化される AMPA 型受容体と NMDA 型受容体の割合が変化することが示唆された。

## (2) 開口放出を制御する神経終末蛋白分子

持田 澄子 (東京医科大学・生理学第一講座)

神経終末への活動電位の到達に伴って膜電位依存性カルシウムチャネルから Ca (superscript: 2+) が流入するとシナプス小胞膜と神経終末膜の融合が起り、小胞内に蓄えられた化学伝達物質が速やかにシナプス間隙に放出される。神経終末内には、複合体を形成してシナプス小胞の動態を制御する多くの蛋白質が見つかるが、SNARE 蛋白質 (syntaxin, SNAP-25 と synaptobrevin) の複合体形成はシナプス小胞膜と神経終末膜との融合、すなわちシナプス小胞開口放出に必須と考えられている。SNAP-25 と特異的に結合する蛋白質としてシナプス小胞に見つかった snapin は、Ca<sup>2+</sup> 結合蛋白質で開口放出をトリガーすると考えられている synaptotagmin と SNARE 複合体との相互作用を増して、神経伝達物質放出を増強する働きをしていることが示唆される<sup>1)</sup>。また、syntaxin と結合する神経終末膜蛋白質の syntaphilin は、SNAP-25 が syntaxin と結合することを競合して SNARE 複合体形

成を阻害する<sup>2)</sup>。さらに、細胞内膜小胞を用いた物質輸送に関わる SNAP-29 は、神経終末において SNARE 複合体を解体する蛋白質のひとつと考えられている a-SNAP が SNARE 複合体へ結合することを阻害して、神経伝達物質放出を抑制する働きをしていることが示唆される<sup>3)</sup>。このように、SNARE 複合体を制御する SNARE 結合蛋白質によって、シナプス伝達効率が調節されることが伺われる。

- 1) Ilardi, J.M. et al. (1999) Snapin: a SNARE-associated protein implicated in synaptic transmission. *Nature neuroscience* 2, 119-124.
- 2) Lao, G. et al. (2000) Syntaphilin: a syntaxin-1 clamp that control SNARE assembly. *Neuron* 25, 191-201.
- 3) Su, Q. et al. (2000) SNAP-29: a syntaxin-1A binding protein implicated in synaptic transmission. *Soc. Neurosci.* 26, 347.

## (3) エバネッセンス顕微鏡法で解析した開口放出関連顆粒タンパクの動態

坪井 貴司, 寺川 進 (浜松医科大学光量子医学研究センター)

分泌顆粒を蛍光標識し、これを対物レンズ型エバネッセンス顕微鏡を用いて観察することによって、分泌顆粒膜と細胞膜とが融合する時の動態を解析した。ラット褐色細胞腫 PC-12 細胞とラット膵島細胞腫 INS-1 細胞の分泌顆粒膜上に存在する蛋白である VAMP-2 と phogrin に GFP を融合させたベクターを作成し、これによる蛋白の強制発現後に膜近傍の GFP 分子の蛍光像を観察した。電

気刺激により開口放出反応を引き起こさせると、VAMP-2-GFP 融合蛋白発現分泌顆粒は、突然蛍光強度をゼロにまで減らす反応を示した。一方、phogrin-GFP 融合蛋白の蛍光強度は、刺激後約半分に減少し、その後ゆっくりとした減少を続け、刺激 30 秒後にはほとんど観察できないレベルになった。以上から単一顆粒の開口放出ダイナミクスを考察する。

## (4) シナプス伝達における SNAP-25 のリン酸化の役割

片岡 正和<sup>1,2)</sup>, 桑原 玲子<sup>1)</sup>, 高橋 正身<sup>1)</sup> (<sup>1)</sup>三菱化学生命研, <sup>2)</sup>信州大 工)

蛋白質リン酸化は生体の様々な反応を制御している。シナプス活動の基盤の一つ、前シナプスにおける神経伝達物質の放出機構も関連分子のリン酸化によって制御されていることが容易に予想されるが、その詳細な制御機

構はいまだ明らかではない。我々は既に前シナプスのモデル細胞である PC12 細胞にホルボールエステルである PMA を作用させることにより、前シナプス部での開口放出に必須な蛋白質群のうち、SNAP-25 の Ser187 が特異

的にリン酸化を受けることを明らかにした。しかしながら、PMA の作用によるリン酸化は、候補分子の選定には好適であるが、細胞にとって超常状態である。現在、我々が最も知り得たいのは、生きている状態での制御である。本研究では抗リン酸化 SNAP-25 抗体を分子プローブとして、生きている状態、すなわち実際の生体内での SNAP-25 のリン酸化について我々が明らかにしてきた結果を紹介する。

PC12 細胞において、SNAP-25 の Ser187 は定常状態でもリン酸化されていた。このリン酸化は PC12 細胞を神経成長因子(NGF)で刺激することにより、亢進を受けたが、MAPK のリン酸化とは異なり、リン酸化が最大になるまで 36~48 時間を要した。この平衡がリン酸化に最大に傾くまでに要する時間は、NGF 刺激による PC12 細胞の神経突起伸長の盛んな時期と合致していた。また、PC12 細胞において、リン酸化亢進と同様の時間軸で、NGF 刺激依存的に SNAP-25 の細胞膜局在確率が上昇することを見だし、この局在変化に SNAP-25 のリン酸化が関与することを明らかにした。これらは全てモデル細胞での結果であり、脳機能での SNAP-25 のリン酸化の機

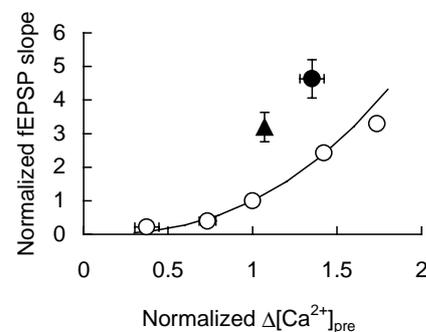
能解明には機能階層的に遠い。この生物機能的階層差を埋めるため、ラット脳における SNAP-25 のリン酸化について調べた。ラット脳においても SNAP-25 の Ser187 は基底状態でリン酸化を受けていた。また、初代培養細胞を PMA で処理すると、大幅なリン酸化の亢進が見られることより、ラット脳においても PC12 細胞と同様のキナーゼシステムが存在すると考えられた。発生に伴う SNAP-25 の発現及びリン酸化変化を調べたところ、両者は時間的に異なる上昇を示し、リン酸化は発生依存的であると考えられた。さらにラット海馬初代培養細胞においても同様の傾向が見られたことより、SNAP-25 のリン酸化は発生に伴う外力入力の上昇よりは、脳組織の場として時間的にプログラムされていると考えられる。また、脳の活性化に伴う SNAP-25 のリン酸化変化について調べたところ、カイニン酸処理によりてんかん症状を示したラット脳において、SNAP-25 の発現量上昇と脱リン酸化が確認できた。この事実はシナプス活動の活性化と SNAP-25 のリン酸化上昇が相反するものであることを示唆する。

### (5) 伝達物質放出可塑性の素過程解析

八尾 寛(東北大(院)・医・生体情報, CREST, JST)

シナプス前終末からの伝達物質放出は、シナプス小胞のドッキング、 $Ca^{2+}$ 流入、小胞と形質膜の融合、エンドサイトーシスなどの素過程の連鎖反応と考えられる。これらの素過程の中で開口放出を律速しているものが修飾されることにより、シナプス前終末の機能的可塑性が引き起こされると考えられる。A-キナーゼ (PKA)、C-キナーゼ (PKC)、G-キナーゼ (PKG) などは開口放出制御蛋白のリン酸化を介して素過程を修飾していることが期待される。マウス海馬スライスを用いて、苔状線維シナプス伝達がフォルボルエステル (PDA) により増強されるメカニズムを解析した。PDA は、ペアドパルス比 (PPR) の抑制をともなってフィールド EPSP (fEPSP) を増強した。PKC アンタゴニストの BIS-I により、PDA の増強効果が減少するが、BIS-I 抵抗性の fEPSP 増強は PPR の抑制をともなわなかった。すなわち、PKC 依存性の増強は、小胞と形質膜の融合確率の促進により説明される。融合確率の促進が  $Ca^{2+}$ 流入の増加により説明されるかを検

討する目的で、苔状線維シナプス前終末に  $Ca^{2+}$ 感受性色素 fura dextran を取り込ませ、シナプス前終末  $[Ca^{2+}]_i$  の活動電位性上昇 ( $\Delta Ca$ ) を測定した。PDA は PKC 依存的に  $\Delta Ca$  を促進したが、fEPSP の増強や PPR の抑制は、 $Ca^{2+}$ 流入の促進から予想される効果を上回った(図)。



Reference: Honda I, Kamiya H, Yawo H, J Physiol (in press).

Ca<sup>2+</sup>チャネルサブタイプ特異的なトキシンを用いて、苔状線維シナプス前終末において、N, P/Q, R-タイプをそれぞれ同定した。トキシンの有無にかかわらず、PDA (10 μM) は、Ca をコントロールの約 1.4 倍に増大した。すなわち、PDA の Ca 増大作用にサブタイプ特異性は

認められなかった。ゆえに、分泌と強く連関しているような Ca<sup>2+</sup>チャネルサブタイプを PDA が選択的に促進する可能性は除外された。PKC は、Ca を増大する以外に、Ca<sup>2+</sup>流入以外の開口放出機序を強化することが示唆された。

## (6) Sizes of vesicle pools, rates of mobilization and recycling at the larval neuromuscular junction of a temperature-sensitive *Drosophila* mutant, *shibire*

Ricardo Delgado, Carlos Maureira, Carolina Oliva, Pedro Labarca, Yoshiaki Kidokoro\*  
(Centro de Estudios Científicos, Chile, \*Gunma University School of Medicine)

Two vesicle pools, exo/endo cycling and reserve pools have been reported to be present at *Drosophila* neuromuscular junctions (Kuromi and Kidokoro, 1998). Using a temperature-sensitive mutant, *shibire<sup>ts</sup>* (*sh<sup>ts</sup>*), we determined these pool sizes and vesicle mobilization rates. In *sh<sup>ts</sup>* due to lack of endocytosis at 32 °C synaptic currents continuously declined during tetanic stimulation and eventually disappeared as the result of vesicle depletion. By then, 83,000 quanta were released. By analyzing the time course of decline of synaptic currents during tetanic stimulation we identified three components, namely, immediately releasable pool, readily releasable pool and

reserve pool. The size of immediately releasable pool was small, about 230 quanta. The vesicle mobilization rate of the reserve pool was measured independently using a dye, FM1-43, and was found to be 1/7 of the readily releasable pool at 10 Hz stimulation. Cytochalasin D inhibited mobilization of vesicles from the reserve pool allowing us to estimate the size of readily releasable pool as ~1/8 of all vesicles, about 10,000 vesicles. In wild-type, vesicle recycling maintained synaptic transmission during repetitive stimulation. The maximum recycling rate was 1000 vesicles/s, ~2 vesicles/release site/s.

## (7) 脳幹コリン作動性システムの標的と作用機構

伊佐 正, 斎藤 康彦, 山下 哲司 (生理学研究所)

中脳の脚橋被蓋核と背外側被蓋核にはコリン作動性ニューロンが多数存在し、視床、小脳、上丘、橋・延髄網様体、黒質緻密部および腹側被蓋野のドーパミン細胞、前脳基底部などにコリン作動性投射を送り、注意、覚醒、動機付けなどに伴う脳の活動レベルの調節に関わっているとされる。これら脳幹のコリン作動性ニューロンが投射先において果たす作用機序を上丘および黒質緻密部・腹側被蓋野のドーパミン細胞においてスライスパッチクランプ法を用いて解析した。上丘におけるターゲットである中間層の出力細胞は *in vivo*, *in vitro* いずれにおいても、GABA 作動性システムからの脱抑制が起きたときに、興奮性入力がある閾値を越えると長い脱分極とバースト状

のスパイク発火活動を示す。この現象は NMDA 受容体を介するシナプス伝達に依存する。上丘中間層に対するコリン作動性入力は非 7 型のニコチン型アセチルコリン受容体を活性化し、中間層出力細胞に脱分極を誘発するとともに EPSP の NMDA 成分を顕著に増強し、バースト的活動の閾値を下げるように作用することが明らかになった。このことはサッケード運動などの外界からの刺激に対する運動応答の開始を促進する作用がある。また、中脳ドーパミン細胞においては 7, 非 7 型両方のニコチン受容体を活性化する。そして内向き電流と脱分極応答を引き起こすが、この内向き電流にはニコチン受容体を介して細胞内に流入する Ca<sup>2+</sup>によって 2 次的に活性化

する fulfenamic acid 感受性のカチオン電流成分が約 30% ほど含まれ、ドパミン細胞における脱分極反応を増強する作用があることが明らかになった。この過程はドパミ

ン細胞による報酬関連活動の振幅の調節過程に関与すると考えられる。

#### (8) 抑制性シナプス伝達の制御機構

川口 真也, 平野 丈夫 (京都大学理学研究科)

小脳皮質の抑制性介在ニューロン (IN) とプルキンエ細胞 (PN) 間の抑制性シナプスにおいて、PN への異シナプス性興奮性入力により誘起される脱分極により、シナプス伝達が長時間増強される事が知られている。我々は、シナプス前 IN からの入力によらずに誘導されるこのシナプス可塑性において、シナプス前細胞活性が何らかの役割を果たしているか否かを検討した。IN と PN 双方から同時にホールセルパッチクランプ記録を行い、そのシナプス伝達を記録した。evoked-IPSC は、PN に脱分極条件刺激 (0 mV for 500 msec, 5 回) を行うと 30 分間以上増強された。しかし、PN 脱分極と同期して IN を 20Hz で刺激する条件刺激を行うと、増強誘導が抑制された。従って、PN の脱分極時に IN が活性化すると、増強が抑制されることがわかった。GABA 或いは GABA<sub>A</sub> 受容体の作用薬である Muscimol の PN 樹状突起への直接投与により起こる応答も、PN の脱分極により増強した。このことから、PN の脱分極により GABA<sub>A</sub> 受容体応答が増強すると考えられる。一方、脱分極時に GABA 投与を行う組み合わせ条件刺激を行うと、PN の GABA<sub>B</sub> 受容体が活性化することにより増強誘導が抑制されることも明らかになった。PN の樹状突起の離れた 2 箇所にも GABA を投与してそれぞれの応答を調べる実験により、増強抑制は

部位特異的に発現することが分かった。また、この増強誘導の抑止は、脱分極中かその一秒後までに GABA 投与を行った場合にのみ認められた。以上より、PN の脱分極時に IN を活性化すると、その終末から放出された GABA が PN の GABA<sub>B</sub> 受容体を活性化することにより、部位特異的に増強誘導が抑制されると考えられる。

PN において GABA<sub>B</sub> 受容体が P 型 Ca<sup>2+</sup> チャネルを抑えることが報告されていたので、fura-2 を用いた Ca イメージングの実験を行った。GABA<sub>B</sub> 受容体による細胞内 Ca 濃度上昇の抑制は僅かであった。また、それと同程度の Ca 濃度上昇の減少が起こる条件 (細胞外 Ca 濃度が半分) でも、脱分極による増強誘導に支障は無かった。一方、Gi/Go protein の阻害や PKA 活性化により、GABA<sub>B</sub> 受容体の増強抑制が阻害され、また、PKA 阻害により増強誘導は抑えられることが分かった。以上から、GABA<sub>B</sub> 受容体は細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度上昇を抑えるのではなく、Gi/Go タンパクを介し、PKA 活性を下げることにより増強誘導を抑えると考えられる。さらに、増強の制御に PKA 以外にも CaMKII や、タンパク脱リン酸化酵素が関与することを示し、如何にして PN 内で増強誘導とその抑制が切り替えられているかを紹介する。

#### (9) 海馬 CA1 錐体細胞におけるシナプス入力加算のイメージング

榎木 亮介, 井上 雅司, 工藤 佳久, 宮川 博義 (東京薬科大学・生命科学)

神経細胞は発達した樹状突起を有し、数千ものシナプス入力を樹状突起のさまざまな部位に受け取る。ニューロンの出力はこれらの入力の加算によって決定されるので、シナプスの加算様式を知ることは、中枢神経系ニューロンにおける計算原理を理解する上で非常に重要である。

これまでの樹状突起の機能の理解は、樹状突起は電氣的に受動的であるという考えのものに成り立っていた。つまり樹状突起上の各シナプス部位に生じた EPSP がケーブル特性に基づいて受動的に細胞体まで伝播され、線形に加算されるというものである (Rall 1964)。しかしながら、近年の研究の結果、神経細胞の樹状突起には電気

的に能動的な性質を持つことが明らかとなってきた。樹状突起上には電位依存性チャンネルやリガンド依存性チャンネルが不均一に存在しており (Johnston et al. 1996), シナプス入力による電位変化がイオンの駆動力の変化やイオンチャンネルの活性化をもたらし, シナプス電流を増大, 減弱させると考えられる。それゆえに, 二つの独立なシナプス入力短い時間間隔で入ったとき, 入力の加算は非線型になると考えられる (Yuste and Tank 1996; Mel 1994)。

我々はすでにラット海馬の CA1 錐体細胞からのホールセル記録から, 二つの興奮性入力 (Perforant and Schaffer Collateral Pathway) が短い時間間隔において入力すると EPSP は単独入力の単純加算と比較して小さくなり, その加算は GABA 作動性入力により制御されるとい

う結果を得ている (R.Enoki.et.al.submitted)。

さらに我々は樹状突起での EPSP 加算様式を調べる為, ラット海馬スライスを膜電位感受性色素 (JPW1114) で染色し, 16×16 フォトダイオードアレイシステムにより EPSP 加算のイメージングを行った。また, コンパートメンタルモデルを用いたシミュレーター・NEURON により, 非線型加算に関与すると考えられるチャンネルの検討と, 実験結果の再現を試みた。その結果, 独立した二つの閾値下シナプス入力の加算は, CA1 錐体細胞全体に渡って sub-linear であり, かつ GABA 作動性入力により制御されていることが分かった。また, シミュレーションにより EPSP 非線型加算には A-type K チャンネルが関与していることが示唆された。

#### (10) グルタミン酸トランスポーターの神経活動に伴うエネルギー代謝促進作用における役割

田中 光一<sup>1</sup>, Pellerin L<sup>2</sup>, Magistretti PJ<sup>2</sup>, Bonvento G<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>東京医科歯科大学・難治研・分子神経科学, <sup>2</sup>Institute of Physiology, University of Lausanne,

<sup>3</sup>CNRS UPR 646, Universite Paris 7)

シナプス活動の増加により, 脳局所のエネルギー代謝が亢進することは古くから知られている。この現象は, 最近多く用いられている脳活動の非侵襲的イメージング法の, 基礎をなすものである。しかし, シナプス活動の増加とエネルギー代謝の促進を共役させる機序は, 不明な点が多い。最近この共役機序に, グリア細胞内に再吸収されたグルタミン酸が重要な役割 (グルコースの吸収促進と乳酸の産生を促す) を果たす可能性が示された。本研究では, 欠損マウスを用い, 神経活動の増加とグルコース消費増加共役におけるグリア型グルタミン酸トランスポーターの役割を検討した。

グリア型グルタミン酸トランスポーター欠損マウス (GLT1, GLAST 欠損マウス) から調整したアストロサイトを用い, グルタミン酸添加による 2-Deoxy-D-[1,2-<sup>3</sup>H] glucose (<sup>3</sup>H]2DG) 取り込み促進作用を解析した。GLT1, GLAST のいずれかを発現しているアストロサイトには, グルタミン酸による <sup>3</sup>H]2DG 取り込み促進が見られたが, 両者を発現していないアストロサイトには見られなかった。

In vivo におけるグリア型グルタミン酸トランスポーターの神経活動—エネルギー代謝共役における役割を明らかにするため, GLAST 欠損マウスの類髯を刺激した時のグルコース取り込み量を, <sup>3</sup>H]2DG を注入し, 大脳皮質体性感覚野の脳スライス切片を用いたオートラジオグラフィで測定した。生後 6 週齢の GLAST 欠損マウスでは, 両側の C1, C2 の髯刺激による <sup>3</sup>H]2DG 取り込み量の増加 (39±2%; n=5) は, 野生型 (38±5%; n=5) と比べて有意差はなかった。しかし, 生後 10 日の GLAST 欠損マウス (n=4) では, 両側の C1, C2 の髯刺激による <sup>3</sup>H]2DG 取り込み量の増加は観察されなかった (生後 10 日の野生型マウスでは, 両側の C1, C2 の髯刺激により, <sup>3</sup>H]2DG 取り込み量が 30±13% (n=4) 増加した)。生後 10 日マウスの大脳皮質体性感覚野アストロサイトには GLT1 に比べ GLAST が有意に発現していることを考えると, GLAST は, 生後 10 日の大脳皮質体性感覚野において神経活動—エネルギー代謝共役に不可欠な分子であることが示唆された。

## (11) 哺乳動物巨大聴覚中継シナプス the calyx of Held の生後発達

高橋 智幸 (東京大学大学院医学系研究科機能生物学専攻・神経生理学教室)

げっ歯類は生後 10 日前後に聴覚系が完成して音を認識できるようになる。音源定位に 関与する the calyx of Held シナプスは生後 6 日にシナプス形成を完成させた後, 第 2 週に大幅なシナプス改造を行う。この間スプーン状の calyx 終末端は指状に変化し, 終末端の Ca チャネルのサブタイプは N<sub>R</sub>型が消失して P 型単独となる(1)。一方, 標的細胞である台形体核 (MNTB) 細胞ではシナプス後膜の NMDA レセプターに著しい減少が認められる。NMDA レセプターが減少することによって EPSP の時間経過が短縮し, その結果, 高頻度刺激下における高信頼性 (HiFi) シナプス伝達が獲得されることが明らかになった。更に興味深いことに, この生後発達変化は聴覚破壊によってブロックされることが分かり, 聴覚入力による生後発達の促進メカニズムが示唆された(2)。シナプス伝達効率に関しては, 生後第 2 週の間, 低頻度 (0.05 Hz) 刺激下の効率は不変で, 素量サイズも一定であったが, これと対照的に高頻度刺激下における伝達効率が著しく上昇した。この変化は伝達物質放出確率の低下と放出可能シナプス小胞プールサイズ (RRP) の増大を伴っていた(3)。無脊椎動物のシナプスでは伝達物質放出部位に近接する Ca チャネル内部の Ca 濃度は狭く分布しており (マイクロドメイン) 結合速度の速い Ca キレーター-BAPTA の注入によってブロックされるが, 遅いキレーター-EGTA ではブロックされないことが知られている(4)。しかしラットの calyx シナプスでは終末端に

注入した EGTA がシナプス伝達をブロックすると報告され, 哺乳類中枢シナプスの広い Ca ドメインを裏付ける証拠として話題となった(5)。しかし, この仕事に用いられたラットは生後 8-10 日であり, 生後発達の途上であることが危惧された。実際, 生後 2 週以降のラットの calyx 終末端にキレーター注入したところ, BAPTA は予想通りシナプス伝達をブロックしたが EGTA はシナプス伝達に全く影響を与えなかった(6)。この結果はマイクロドメインが生後 2 週に形成されることを示唆する。実際, 両棲類の神経筋接合部培養で形成直後のシナプスは Ca 依存性伝達を行うにもかかわらず Ca チャネルを代表する active zone を欠いており, シナプス形成後の改造過程で Ca チャネルの集積が完成すると考えられている(7)。これと同様のメカニズムが calyx シナプスでも働いていると推測される。

## 参考文献

- (1) Iwasaki S & Takahashi T (1998) *J Physiol* 509,419-423.
- (2) Futai K, Okada M & Takahashi T. unpublished observation
- (3) Iwasaki S & Takahashi T unpublished observation
- (4) Augustine GJ et al. (1991) *Ann N Y Acad Sci.* 635,365-81
- (5) Borst JGG & Sakmann B (1996). *Nature* 383, 431-434
- (6) Takahashi T & Iwasaki S. unpublished observation
- (7) Takahashi T et al. (1987). *J Neurosci* 7, 473-481.

## (12) シナプス間結合の形成機構

高井 義美 (大阪大学大学院医学系研究科・生体制御医学 生化学・分子生物学)

私共は, 細胞間接着形成における低分子量 G 蛋白質の制御機構を解明する過程で, カドヘリン・カテニン系とは異なる新しい細胞間接着機構を発見している。この接着機構は, 少なくとも接着分子のネクチンと, ネクチンをアクチン細胞骨格に連結させるアフアディンの 2 つの蛋白質より構成されている。ネクチン・アフアディン系

は種々の細胞に発現し, カドヘリンをベースとするアドヘレンスジャンクションに局在し, カドヘリン・カテニン系による細胞間接着をオーガナイズしている。このネクチン・アフアディン系はシナプス間結合にも存在しており, 本会では, ネクチン・アフアディン系を紹介し, 本系のシナプス間結合形成における役割を論議したい。

### (13) 脳皮質神経細胞移動の制御

仲嶋 一範 (東京慈恵会医科大学 DNA 医学研究所分子神経生物学研究部門科学技術振興事業団さきがけ研究 21)

脳は、1000億個の神経細胞とその10倍の数のグリア細胞からなる非常に複雑な細胞社会を構成している。発生期において、これらの神経細胞は、脳内の限られた特定の部位で誕生し、長い距離を移動して整然と配置される。各細胞は、誕生後、放射状線維などの構造を足がかりにして目指す方向に向かって移動を開始する。最終配置部位に達すると、それまでの細胞の極性を変換して移動を終了し、周囲の細胞との新たな関係を構築し始め、最終的には、見事な層構造を含む神経回路網を形作る。最近の発生神経生物学の進展により、リーリン及びその複数の受容体が、この過程に重要な役割を果たすことが明らかになってきた。リーリン及びそのシグナル伝達に

関わる分子の欠損は、大脳皮質層構造の全体的逆転など、神経細胞の異常な配列を生じ、結果として運動失調等の神経症状を示す。そのシグナル伝達の機構は未解明の部分が多いが、最近、リーリン受容体のみならず、リガンドそのものも実は複数種あること、また、リーリン同士が相互作用して複雑な制御機構を有しているらしいことがわかってきた。発生期脳における神経細胞の移動を可視化する最近の我々の試みを紹介するとともに、神経細胞の移動と停止、更に層構造形成における細胞極性のダイナミックな変化が、いかなる細胞間の相互作用によって制御されているのか、最近の知見をまじえて議論したい。

### (14) Ca シグナリングによる CREB 依存性遺伝子発現調節とアクチン細胞骨格制御

尾藤 晴彦, 古屋敷 智之, 成宮 周 (京大院・医・高次脳科学・神経細胞薬理)

シナプス可塑性に伴い、NMDA 型グルタミン酸受容体チャンネルを介したカルシウム流入がきっかけとなり、シナプス後肥厚部では数多くの情報伝達系が活性化され、多様なシグナルが発生することが報告されている。しかしながら、各シグナルがそれぞれどのような特異的役割を担っているか、詳細は未だ明らかになっていない。また、記憶が長期化する場合、シナプス伝達効率の変化がいかなる分子機構によって固定化されるかという点は謎につつまれている(1)。我々はこれらの問題にアプローチする目的で、シナプス活動によって引き起こされる、シナプスから核へのシグナリングや、シナプスから細胞骨格への情報伝達経路について解析を進めてきた。

その結果、シナプス刺激が転写因子 CREB を CaMKIV を含むリン酸化経路を介して活性化すること(2)、また CREB 活性化は一定の閾値を越えた刺激強度にのみ共役すること(3)、海馬樹状突起上の L 型 Ca<sup>2+</sup>チャンネルと NMDA 受容体に CREB リン酸化を促進する活性が強いこと(4, 5)が明らかになった。最近、神経可塑性への関与に加え、CaMKIV-CREB 系が神経細胞の生存に関与するシグナルを供給している可能性を示唆する知見を得たので報告する(6)。

一方、GFP-actin を用いたイメージングにより、神経活動が海馬錐体細胞のアクチン細胞骨格動態を修飾する様子を可視化することに成功した。この過程で、NMDA 受容体を介した Ca<sup>2+</sup>流入と種々の電位依存性 Ca<sup>2+</sup>チャンネルが、アクチン動態に対して全く異なる作用を及ぼすことが明らかになった(7)。

これらの実験データは、神経活動によって発生するカルシウム流入の組み合わせによって、シナプス可塑性を規定する重要な情報がコードされている可能性を示している。

#### 参考文献

1. Bito H (1998) The role of calcium in activity-dependent neuronal gene regulation. *Cell Calcium*, 23: 143-150.
2. Bito H, Deisseroth K, Tsien RW (1996) CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca<sup>2+</sup>- and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression. *Cell*, 87: 1203-1214.
3. Deisseroth K, Bito H, Tsien RW (1996) Signaling from synapse to nucleus: postsynaptic CREB phosphorylation during multiple hippocampal synaptic plasticity. *Neuron*, 16: 89-101, 1996.

4. Kavalali E, Zhuo M, Bito H, Tsien RW (1997) Dendritic  $Ca^{2+}$ -channels characterized by recordings from isolated hippocampal dendritic segments. *Neuron*, 18: 651-663.
5. Mermelstein PG, Bito H, Deisseroth K, Tsien RW (2000) Critical dependence of CREB phosphorylation on L-type calcium channels supports a selective response to EPSPs rather than action potentials. *J. Neurosci.*, 20: 266-273.
6. See V, Boutiller AL, Bito H, Loeffler JP (2000) Calcium-calmodulin dependent protein kinase type IV (CaMKIV) inhibits apoptosis induced by potassium deprivation in cerebellar granule cells. *FASEB J.*, in press.
7. Furuyashiki T, Bito H, Narumiya S. Submitted

### (15) シナプス入力とアクチン細胞骨格系の動態変化

深澤 有吾, 斎藤 喜人, 山崎 美津江, 小澤 史子, 松尾 亮太, 井ノ口 馨 (三菱化学生命科学研究所)

神経細胞はシナプスを介して互いに連絡しあい、複雑なネットワークを形成している。記憶はこのネットワークの中に蓄えられると考えられ、新たな情報が流れたシナプスで伝達効率に変化し(シナプス可塑性)、ネットワーク中の情報伝達経路が変化することが、記憶形成そのものであり、この変化が長期間維持されることが記憶の長期化に重要であると考えられている。

可塑的变化が見られる脳の領域には、アクチン細胞骨格に富む刺状のシナプス(刺シナプス)が多く存在し、可塑的变化に伴い形態変化することが知られ、棘シナプスの形態変化が記憶形成に重要な役割を持つことが古くから予想されてきた。近年、シナプス内に存在するタンパク質の同定が進み、神経伝達を担うチャネルや受容体のシナプス局在化や細胞内へのシグナル伝達を担う分子が次々に見出され、これらの多くがアクチン細胞骨格と結合能を持つことが明らかになってきた。

記憶の長期化には新たな遺伝子発現が必要であると考えられていることから、我々は長期記憶成立の分子機構を解明する目的で、神経活動や長期可塑性誘導時に発現誘導される遺伝子の単離同定を行った。この過程で同定された ves1/homer や synaptopodin は、アクチン細胞骨格と間接的または直接に結合することから、アクチン細胞骨格系の神経機能への重要性を再認識するに至った。この様な背景からアクチン細胞骨格系の動態変化そのものがシナプス伝達や可塑性に重要な役割を担っていると考え

られるが、その役割や機構については不明である。そこで我々は、シナプス入力や可塑的变化とアクチン細胞骨格の動態変化の関係を明らかにする目的で、電極を慢性的に埋設したラットに無麻酔無拘束下で歯状回 LTP を誘導し、アクチン細胞骨格系の動態変化を組織化学的に検討した。

内側貫通線維に高頻度電気刺激を与え歯状回 LTP を誘導すると、入力を受けた中間分子層に重合アクチン(F-actin)の集積が見られ、外側貫通線維刺激時には外部分子層に集積が見られた。これらの変化は電気的な可塑的变化の持続している 1 週間後でも認められた。Phalloidin-eosin を用いた電子顕微鏡観察により、F-actin の集積は棘シナプスに見られ、シナプス前や樹状突起には見られなかった。高頻度電気刺激による F-actin の集積は、NMDA 受容体の阻害により顕著に抑制され、タンパク翻訳阻害では抑制されなかった。さらに、LTP 誘導依存的に発現誘導される ves1-1S/homer-1a や synaptopodin タンパク質の免疫陽性反応は、F-actin の集積部位で増加した。これらのことより、歯状回顆粒細胞の棘シナプスでは、NMDA 受容体から流入した  $Ca^{2+}$  依存的にアクチン動態が変化し、集積した重合アクチンを利用して長期可塑性関連タンパク質の局在が変化し、可塑的变化の長期化を誘導する可能性が考えられた。また、可塑的变化の持続時間とアクチン重合との関連性や、異シナプス性入力の影響などについても報告する。

### (16) 海馬神経細胞への $Ca^{2+}$ 透過性 AMPA 受容体強制発現によるシナプス伝達機能の変化

岡田 隆<sup>1,2,3</sup>, 山田伸 明<sup>1,2</sup>, 掛川 渉<sup>1</sup>, 都筑 馨介<sup>1</sup>, 飯野 昌枝<sup>1</sup>, 田中 光一<sup>3</sup>, 小澤 滯司<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>群馬大・医・第二生理, <sup>2</sup>JST・CREST, <sup>3</sup>東京医科歯科大・難治研・分子神経科学)

ある特定のタンパク質を細胞に強制発現させる方法として、ウイルスベクターによる遺伝子導入法が近年注目されている。特に Sindbis ウイルス (SIN) ベクターは神経細胞への感染効率が高い点で、その有用性が期待される。本研究では、Ca<sup>2+</sup>透過性 AMPA 受容体を wild type ではもたない神経細胞に強制発現させることが SIN ベクターを用いて可能かどうか、またシナプス後膜に Ca<sup>2+</sup>透過性 AMPA 受容体を強制発現させることによってシナプス伝達機能や動物の行動が変化しうかどうか検討した。

AMPA 受容体サブユニットの一つである未編集型 GluR2 サブユニット (GluR2Q) 遺伝子および GFP 遺伝子を組み込んだ SIN ベクター (SIN-eG-GluR2Q) を作成し、ラット海馬培養スライス標本の CA1 錐体細胞に感染させた。SIN ベクターによる GFP 発現の時間経過を調べたところ、感染後 36 ~ 48 時間でほぼ最大に達した。CA1 錐体細胞をホールセル膜電位固定し、AMPA の電気泳動的投与による応答の電流特性を調べたところ、SIN-eG-GluR2Q 非感染細胞においては Ca<sup>2+</sup>不透過性 AMPA 受容体応答の特徴である外向き整流性であったが、感染細胞の場合は Ca<sup>2+</sup>透過性 AMPA 受容体応答の特徴である内向き整流性を示した。また、Schaffer 側枝の電気刺激による CA1 シナプス応答も SIN-eG-GluR2Q 感染

細胞の場合にのみ内向き整流特性を示した。以上より、SIN ベクターによる GluR2Q サブユニット強制発現の結果、Ca<sup>2+</sup>透過性 AMPA 受容体が CA1 錐体細胞のシナプス後膜に新たに発現したと結論した。

Ca<sup>2+</sup>透過性 AMPA 受容体発現によるシナプス伝達機能変化について検討するため、Schaffer 側枝へのテタヌス刺激後に生じる CA1 シナプスの長期増強 (LTP) について調べた。SIN-eG-GluR2Q 感染標本の場合は非感染標本と異なり、d-APV による NMDA 受容体阻害下でテタヌス刺激をした場合にも LTP が誘導された。つまり、シナプス後膜への Ca<sup>2+</sup>透過性 AMPA 受容体強制発現の結果、CA1 シナプスにおける LTP が NMDA 非依存性にも生じるようになるというシナプス伝達機能変化がみられた。

ラットの空間学習課題遂行に対する Ca<sup>2+</sup>透過性 AMPA 受容体強制発現の効果を検討するため、海馬 CA1 野もしくは歯状回 (DG) に SIN-eG-GluR2Q ベクターを両側性に in vivo 注入し、Morris 水迷路課題の学習過程への影響を調べたところ、Ca<sup>2+</sup>透過性 AMPA 受容体を CA1 野に発現させた場合にのみ学習成績の向上がみられた。AMPA 受容体の Ca<sup>2+</sup>透過性増大がもたらす学習課題成績への影響は CA1 の場合と DG の場合とで異なることが示唆された。

### (17) シナプスでの Ca<sup>2+</sup>チャンネル-Ca<sup>2+</sup>遊離チャンネル-Ca<sup>2+</sup>受容分子連関

秋田 天平・成田 和彦・曾我 聡子・蜂須賀 淳一・叢 雅琳・竹内 晋平・徳納 博幸・久場 健司  
(名古屋大学・医・第1生理)

シナプスで多彩な制御作用をする細胞内 Ca<sup>2+</sup>([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) の上昇は、細胞膜の電位依存性 Ca<sup>2+</sup>チャンネルを通る Ca<sup>2+</sup>流入によることが一般に信じられてきたが、最近、この Ca<sup>2+</sup>流入により細胞内 Ca<sup>2+</sup>貯蔵部位からの Ca<sup>2+</sup>誘起性 Ca<sup>2+</sup>遊離 (CICR) が活性化され、Ca<sup>2+</sup>流入による生理作用を顕著に増大することが解ってきている。このような 2 重に調節された [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇により生理作用が発現されるためには、その機構に関与した Ca<sup>2+</sup>受容分子が [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇の起源近傍に存在する必要がある。

この発表では、シナプス前終末とシナプス後ニューロンで、Ca<sup>2+</sup>チャンネルとリアノジン受容体と Ca<sup>2+</sup>受容分子が密接な三重連関機構 (Functional triad) を形成することを報告する。カエル運動神経終末での開口放出機構を活動依存性 (プライミング依存性) に顕著に増強す

る CICR 機構では、そのプライミング分子 (カルモジュリン) は比較的多くの Ca<sup>2+</sup>チャンネルからの Ca<sup>2+</sup>流入による均一化した [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> に反応するのに対し、Ca<sup>2+</sup>遊離を起こすリアノジン受容体は Ca<sup>2+</sup>チャンネルと開口放出機構に密接に連関することが解った。又、ウシガエル交感神経節ニコチン性シナプスのシナプス前終末では、IP3 受容体を介する CICR により伝達物質放出の長期増強が起こるが、この機構では Ca<sup>2+</sup>チャンネルと IP3 受容体および IP3 産生する代謝依存性受容体との間に密接な連関機構 (IP3-assisted CICR) が存在する可能性がある。ウシガエル交感神経節ニューロンでの Ca<sup>2+</sup>/電位依存性 K<sup>+</sup>チャンネル (BK チャンネル) は活動電位スパイク下降相に関与し、もう一つの Ca<sup>2+</sup>依存性 K<sup>+</sup>チャンネル (SK チャンネル) は後電位発生に関与する。この 2 種の Ca<sup>2+</sup>

依存性  $K^+$ チャンネルは共に  $Ca^{2+}$ チャンネルを通る  $Ca^{2+}$ 流入とライノジン受容体を介する CICR により活性化されるが、その活性化様式と 2 種の  $Ca^{2+}$ 起源に対する依存性は著しく異なり活動依存性である。活動電位スパイク下降相に關与する BK チャンネルは  $Ca^{2+}$ チャンネルとライノジン受容体に近接して存在し (Functional triad),

その活性化は反覆興奮による CICR の活性化の不活性化と共に減少するのに対し、後電位発生に關与する SK チャンネルはこれらの  $[Ca^{2+}]_i$  上昇分子より比較的離れた所に存在し、その活性化は CICR の不活性化にも拘わらず、そのスパイク延長作用による  $Ca^{2+}$ 流入の増大と  $[Ca^{2+}]_i$  の蓄積効果により大きくなる。

### (18) パッチクランプ RT-PCR 法を用いた大脳皮質非錐体細胞のグループ化

都筑 馨介<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>群馬大・医・第二生理, <sup>2</sup>科学技術振興事業団(CREST))

大脳皮質には多種類の抑制性ニューロンが存在するが、その機能的意義は明らかになっていない。そこで大脳皮質紡錘形介在ニューロンの分類をパッチクランプ RT-マルチプレックス PCR 法によって行った。生後 12-34 日齡のラット前頭頭頂葉の 300  $\mu$ m の急性スライスを作成し、まず、電気生理学的なプロファイルを測定した。脱分極性の通電によって活動電位を発生させ、入力抵抗・活動電位の振幅・発火間隔・後過分極の振幅など 14 項目を細胞の電気生理学的なパラメータとして解析した。さて、従来、非錐体細胞の分類はカルシウム結合蛋白や神経ペプチドなどの生化学マーカーの発現を免疫細胞化学法によって調べることによって行われている。そこで、生化学マーカーの mRNA の発現の有無とグルタミン酸受容体 (イオンチャネル共役型・代謝型) のサブユニット mRNA の非錐体細胞における発現パターンを RT-マルチプレックス PCR 法によって調べた。方法としては、電気生理学的実験の終了後、mRNA を含む細胞質をパッチ電極内に回収し、反応チューブに移し、ランダムプライマー (dN6) を用いて単一ニューロンの cDNA を合成した。GABA 合成酵素 GAD65, GAD67・カルシウム結合タンパク質 calbindin, parvalbumin, calretinin・神経ペプチド neuropeptide Y, vasoactive intestinal polypeptide (VIP), somatostatin, cholecystokinin・イオンチャネル共役型グルタミン酸受容体 GluR1-7, KA1-2, NR2A-D・代謝型グルタミン酸受容体 mGluR1-8 の mRNA の発現の有無を単一細胞で同時に観察するため、第一次増幅としてこれら 30 種の cDNA を増幅する 59 本のプライマーを加えてマ

ルチプレックス PCR を行った。そして、マルチプレックス PCR 産物を 30 本のチューブに分け、それぞれのチューブに各種 cDNA を増幅する一対のプライマーを加えて第二次増幅を行い、それぞれの遺伝子の発現の有無を調べた。本研究では、大脳皮質 II, III 層の 60 個の紡錘形介在ニューロンを対象として、14 種の電気生理学的パラメータ、9 種の生化学マーカーのパラメータ、25 種のグルタミン酸受容体のパラメータを元にクラスタ解析を行った。クラスタ解析が正しく行われていることのコントロールには形態的に明瞭に区別される錐体細胞 (9 個) と、特徴的な発火パターンを示す fast spiking cells (16 個) をおいた。クラスタ解析の手順は、まずパラメータの数だけ軸をもつ多次元空間上に個々の細胞のプロットした。次に、多次元空間上の細胞間の距離を測定し、距離の一番近い細胞の組を最初の群にした。次に、この群の中心と他の群の中心との距離と、それぞれの群内の分散とを比較して、これらが同一の群から得られたサンプルと考えられる場合には群を併合して大きくしていった。その結果、大脳皮質紡錘形介在ニューロンは 3 つのグループに分類された。第 1 グループは、発火パターンが順応を示し、somatostatin を発現する細胞で全体の 20% を占めた。第 2 グループは発火パターンは順応を示すが第 1 群とは異なっており、VIP の発現頻度が高い細胞で 53% を占めた。第 3 グループは残りの 27% の細胞で、発火間隔はイレギュラーであった。この細胞でも VIP の発現頻度が高かった。

(19) シナプス活動依存的な神経細胞の生存・培養小脳顆粒細胞実験系の一般性と特殊性

小倉 明彦 (大阪大学大学院理学研究科)

中枢神経細胞は発生期に過剰数生産され、そのうち正しい結合を作って作動したものが生存し、誤ったものや不活動なものが死滅する「淘汰」の過程を経て完成していく、と想定されている。この「淘汰」過程を解析するための実験系として、ラット新生仔から分離・培養した小脳顆粒細胞 (CGN) が好んで用いられる。

ラット培養 CGN は、通常の培養培地では長期に生存せず、KCl やグルタミン酸などを添加して脱分極してやってみてはじめて生存する。この脱分極がシナプス活動の mimicy と見なされるわけだが、私たちは KCl 添加による持続的脱分極がシナプス活動と等価かとの疑問をもち、以下の検討を始めた。CGN は、生体内ではグルタミン酸作動性の苔状繊維入力を受けるが、苔状繊維の源の一つである橋の切片を容器内に並置したところ、切片から伸び出した繊維に接触した CGN は、KCl の添加なしに生存した。橋切片を同容器内に置いて、フィルターで隔離すると生存増進効果は見られなくなる。また、TTX やグルタミン酸阻害剤を添加しても、橋切片の生存増進効果は見られなくなる。したがって、橋繊維は CGN とシナプスを作り、興奮性シナプス活動によって CGN を生存させる、と見ることができる。しかし、同じグルタミン酸作動性神経でも、海馬切片の共存では、伸出した繊維に接触していても、CGN の生存率は上がらなかった。こ

れは、単にグルタミン酸が放出されてシナプス後細胞の脱分極が起これば生存に足る、というわけではない可能性を示唆する。

上はラット CGN の場合であるが、マウスの場合事情が複雑である。C57Bl 系マウス CGN は、ラット CGN と同様に KCl 添加を必要とするが、BalbC 系マウスの CGN は KCl の添加なしに生存できる。これは、BalbC の CGN 同士がシナプスを作って自発的に活動するためかということ、そうとは限らず、BalbC の CGN はフィルターで隔離した C57Bl の CGN の生存をも増進させることができる。したがって、BalbC の CGN からは何らかの液性の生存因子が放出されていると見なされる。フィルターを透析膜に換えて共存培養を行い、この因子のおよその分子量を見積もると、3kD 以下となったが、グルタミン酸受容体阻害薬は無効なので、この因子はグルタミン酸そのものではない。ラット CGN の生存を増進する BDNF、NT3、PTHrP は無効なので、これらの既知因子やその断片でもない。

このように、活動依存的な神経生存機構の解析モデル系として頻用される培養 CGN の系も、さまざまな固有の事情をもっており、一つの系でえられた結論を一般化するには注意が必要である。

(20) 海馬錐体細胞における spontaneous EPSCs の in vitro 虚血負荷による二相性変化

田中 永一郎, 東 英穂 (久留米大学医学部第 1 生理学)

<目的>海馬 CA1 領域は虚血に対して最も脆弱な部位の一つで、虚血による選択的細胞壊死 (necrosis) には虚血時に異常放出された glutamate が関与すると考えられている。そこで、CA1 錐体細胞における evoked EPSC と spontaneous EPSCs に対する in vitro 虚血負荷の影響を調べた。

<方法>ラット海馬スライス標本を作成し、CA1 錐体細胞から 2M K-acetate 充填電極を用いて細胞内記録を、135mM CsSO<sub>4</sub> を主成分とする溶液を充填した電極を用いて Whole-cell patch-clamp を行なった。局所電気刺激は

タングステン電極を放射状層に留置して行ない、膜電位固定法を用いて evoked fast EPSC と spontaneous EPSCs を記録した。In vitro 虚血負荷は酸素・グルコース除去液の灌流投与で行なった。

<結果と結論>In vitro 虚血負荷を 4 分間与えると、CA1 錐体細胞の evoked fast EPSC 振幅はコントロールの 15% に抑制された。一方、glutamate 誘起内向き電流の振幅は in vitro 虚血負荷中に増加した。Evoked fast EPSC の抑制は adenosine 1 (A1) 受容体拮抗薬 (8-CPT, 0.3 - 10 μM) の前処置で拮抗された。これらの結果は、evoked fast

EPSC の抑制が A1 受容体を介するシナプス前性機序であることを示唆した。TTX (1  $\mu$ M) 存在下に spontaneous EPSCs を記録し, in vitro 虚血負荷を行うと, spontaneous EPSCs の振幅は変化しなかったが, 発生頻度は in vitro 虚血負荷後 2 分で減少し, 4 分で増加した。負荷 2 分後の発生頻度減少は A1 受容体拮抗薬の前処置で抑制されたが, 4 分後の発生頻度増加は A1 受容体拮抗薬では変化

せず, 細胞内  $Ca^{2+}$  放出抑制薬 (dantrolene, 20  $\mu$ M),  $Ca^{2+}$  誘起  $Ca^{2+}$  放出抑制薬 (ryanodine, 20  $\mu$ M) の前処置で抑制された。以上の結果は, in vitro 虚血負荷 2 分後の発生頻度減少が glutamate 含有神経終末上の A1 受容体活性化によって起こり, 4 分後の発生頻度増加は, 神経終末内で  $Ca^{2+}$  誘起  $Ca^{2+}$  放出が起こり,  $Ca^{2+}$  濃度が上昇するためと考えられた。

## 8. 中枢神経系における局所回路とその機能特性

2000年11月21日-11月22日

代表・世話人：三上 章允（京都大学霊長類研究所）

所内対応者：森 茂美（生理学研究所）

- ( 1 ) Local circuit in the cerebral cortex  
Takeshi Kaneko (Kyoto Univ., Japan)
- ( 2 ) Fast neuronal population oscillations in cortical networks in vitro  
Eberhard H. Buhl (Univ. of Leeds, UK)
- ( 3 ) Functional subdivisions of cortical neurons: Do interstitial cells in the white matter participate in the cortical circuit?  
Nobuaki Tamamaki (Kyoto Univ., Japan)
- ( 4 ) Anatomy, physiology, molecular and circuit properties of neocortical interneurons  
Henry Markram, Wang Yun, Anirudh Gupta & Maria Toledo (The Weizmann Institute of Science, Israel)
- ( 5 ) Depolarizing afterpotentials involved in rhythmogenesis in cortical pyramidal cells  
Youngnam Kang and Yo Kishi (Kyoto Univ., & Health Sci. Univ. of Hokkaido, Japan)
- ( 6 ) Electrophysiology and morphology of rat claustral neurons  
Hiroshi Shibuya and Tetsuro Yamamoto (Mie Univ., Japan)
- ( 7 ) Synaptic connections and synchronized firing of cortical interneurons  
Yasuo Kawaguchi, Yoshiyuki Kubota and Satoru Kondo (National Inst. for Physiol. Sci., & RIKEN, Japan)
- ( 8 ) Electrical synapses and networks of GABAergic neurons in the neocortex  
Shaul Hestrin and Mario Galarreta (Stanford Univ., USA)
- ( 9 ) Local circuit and representation of sound  
Wen-lie Song and Hideo Kawaguchi (Osaka Univ., & Hitachi, Ltd., Japan)
- ( 10 ) Classification of neuron types based on the firing patterns recorded in behaving monkeys  
Akichika Mikami, Keichiro Kato, Shunpei Unno and Yungnum Kang (Kyoto Univ., Japan)
- ( 11 ) Velocity and position guided orienting in unrestrained cats  
Shigeto Sasaki, Kazuya Yoshimura and Kimisato Natito (Tokyo Metropolitan Inst. for Neurosci., Japan)
- ( 12 ) Dynamic regulation of signal transmission in the local circuit of the superior colliculus  
Yasuhiko Saito and Tadashi Isa (National Inst. for Physiol. Sci., Japan)
- ( 13 ) Mutual inhibition in the premotor circuit controlling saccade  
Kaoru Yoshida, Y. Iwamoto, Sohei Chimoto and Hiroshi Shimazu (Univ. of Tsukuba, Japan)
- ( 14 ) Synchronous oscillatory activity of local field potentials and neurons in MI and SMA during bimanual movements of monkeys  
Takashi Kawashima, Thomas A. Knight and Eberhard E. Fetz (Gifu Univ., & Univ. of Washington, USA)
- ( 15 ) A new bipedally walking monkey model for the study of human bipedal locomotion  
Shigemi Mori, Futoshi Mori, Katsumi Nakajima, Atsumichi Tachibana, Masahiro Mori and Chijiko Takasu (National Inst. for Physiol. Sci., Japan)
- ( 16 ) Selective expression of Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptors in horizontal cells in the superficial layer of rat superior colliculus  
Endo, T. and Isa, T. (National Inst. For Physiol. Sci., Japan)

(17) Burst firing in layer III pyramidal neurons of cat sensorimotor cortex

Nishimura, Y., Shibuya, H., Asahara, T. and Yamamoto, T. (Mie Univ., Japan)

(18) Interaction of horizontal and vertical inputs to pyramidal cells in the superficial layers of the cat visual cortex

Sato, H., Yoshimura, Y., Imamura, K. and Watanabe, Y. (Osaka Univ., Osaka Biosci. Inst. & Nagoya Univ., Japan)

(19) Spatiotemporal interaction of response to multiwhisker stimulation in the barrel cortex neurons of rats

Shimegi, S., Akasaki, T. and Sato, H. (Osaka Univ., Japan)

(20) Functional Development of the Recurrent Inhibitory Network of the Mauthner Cell in Zebrafish larvae

Takahashi, M., Narushima, M., Murayama, Y. and Oda, Y. (Osaka Univ., Japan)

(21) Fluorescence imaging of the protein kinase C translocation in the hippocampal neurons

Tsubokawa, H. and Takagi, S. (National Inst. For Physiol. Sci., Japan)

(22) Calcium-sensitive cation current accompanying activation of nicotinic acetylcholine receptors

in rat mesopontine dopamine neurons

Yamashita, T. and Isa, T. (National Inst. For Physiol. Sci., Japan)

### 【参加者名】

E. Buhl (University of Leeds), H. Markram (University of California San Francisco), S. Hestrin (Stanford University), 森 茂美 (生理学研究所), 金子 武嗣 (京都大学大学院・医学研究科・高次脳科学講座), 玉巻 伸章 (京都大学大学院・医学研究科・高次脳科学講座), 姜 英男 (北海道医療大学), 山本 哲朗 (三重大学・医学部・生理学第二講座), 西村 嘉洋 (三重大学・医学部・生理学第二講座), 渋谷 浩司 (三重大学・医学部・生理学第二講座), 吉田 薫 (筑波大学・基礎医学系・生理), 川口 泰雄 (生理学研究所・大脳神経回路論研究部門), 根東 覚 (生理学研究所・大脳神経回路論研究部門), 窪田 芳之 (理化学研究所), 菊部 冬紀 (理化学研究所), 宋 文杰 (大阪大学・基礎工学部), 川口英夫 (日立基礎研究所), Oo HaiLiang (大阪大学・基礎工学部), 佐々木成人 (財) 東京都神経科学総合研究所・神経生理学部門, 内藤 公郷 (財) 東京都神経科学総合研究所・システム生理, 伊佐正 (生理学研究所・統合生理研究施設高次脳機能研究プロジェクト), 斎藤 康彦 (生理学研究所・統合生理研究施設高次脳機能研究プロジェクト), 遠藤 利朗 (生理学研究所・統合生理研究施設高次脳機能研究プロジェクト), 山下 哲司 (生理学研究所・統合生理研究施設高次脳機能研究プロジェクト), 坪川 宏 (生理学研究所・脳機能計測センター), 高木佐知子 (生理学研究所・脳機能計測センター), 深井 朋樹 (玉川大学・工学部), 川島 卓

(岐阜大学・医学部・反射研究施設), 三上 章允 (京都大学・霊長類研究所・行動神経研究部門), 海野 俊平 (京都大学・霊長類研究所・行動神経研究部門), 猿渡 正則 (京都大学・霊長類研究所・行動神経研究部門), 加藤啓一郎 (京都大学・霊長類研究所・行動神経研究部門), 山口 峻司 (山形大学・理工学研究科), 伊豆田 義人 (山形大学・理工学研究科), 増田 健 (山形大学・理工学研究科), 浜田 生馬 (財) 東京都神経科学総合研究所・神経生理学部門, 中村 泰尚 (東京医科歯科大学大学院・医歯学総合研究科・神経解剖学分野), 村越 隆之 (東京医科歯科大学・医学部・薬理), 田中 昌司 (上智大学), 佐藤宏道 (大阪大学・健康体育部), 七五三木聡 (大阪大学・健康体育部), 赤碓孝文 (大阪大学・健康体育部), 尾関宏文 (大阪大学・健康体育部), 田谷文彦 (大阪大学・健康体育部), 定金 理 (大阪大学・健康体育部), 木田 裕之 (大阪大学・健康体育部), 村越 隆之 (東京医科歯科大学・医学部・薬理学), 高橋 正治 (大阪大学・基礎工学部), 駒井 章治 (神戸大学・生理学第一講座), 武田 湖太郎 (慶應義塾大学・大学院理工学研究科・基礎理工学専攻), 林 民 (三重大学・医学部・生理学第二講座), 中世古幸成 (三重大学・医学部・生理学第二講座), 一戸 (弘前大学), 木村 (大阪大学), 青柳 (京都大学), 伊藤 (京都産業大学), 藤井 (京都産業大学), 伊藤 (愛知学院大学)

### 【概要】

中枢神経系では,異なる機能特性を持つ比較的少数の神経細胞の構成する規則的で局所的な回路が重要な役割

を演じている。局所的な神経回路は機能単位を構成し,この機能単位相互の情報交換と,遠方との神経結合によ

る情報交換が中枢神経系における複雑な情報処理の基礎となっている。このような過程の解明は、一人の研究者、一つの研究室で取り組むには膨大すぎる。本研究会では、分子から個体に至る異なる研究レベル、異なる手法による各研究室の取り組みを持ちより、中枢神経系における局所回路とその機能特性について討議し、こうした視点からの研究の推進を目指した。平成 10 年度から 3 年間の計画で取り組んだ研究会は、平成 12 年度、その最終年度に当たる。そこで今回は、文部省科学研究費特定領域研究 A「脳研究の総合的推進に関する研究」の支援を受け、3 人の海外からの参加者を招聘し、発表と討

論はすべて英語で行った。海外からの参加者が現在活躍中の第一級の研究者であったことも幸いし、多くの参加者を得て活発な討論が行われた。特に Henry Markram の膨大なデータと細胞タイプの詳細な分類には圧倒された。また、口頭発表のほかポスター発表も行い、若い研究者を中心に海外からの参加者や他の研究室の研究者との交流の場となった。本研究会が当初目指していた大型の研究プロジェクトの実現は起動に乗らなかったが、研究会の中から共同研究なども育ち、神経回路に依拠した機能研究の推進に一定の役割を果たすことができた。

### (1) Local circuit in the cerebral cortex

T. Kaneko (Department of Physiology, Faculty of Medicine, Kyoto University)

To reveal the mechanism of information processing in the cerebral cortex, we focused on the morphological analysis of its intrinsic circuitry. Recently, we developed a retrograde neuronal tracing method with Golgi-like somadendritic filling. By combining this method with the intracellular staining technique, local connection from layer III pyramidal cells to corticospinal and corticothalamic projection neurons were examined in the motor cortical slices of the rat.

Forty layer III pyramidal neurons stained intracellularly were of the regular spiking type, showed immunoreactivity for glutaminase, and emitted axon collaterals arborizing locally in layers II/III and/or V. Nine of them were reconstructed for morphological analysis; 15.2% or 3.8% of varicosities of axon collaterals of the reconstructed neurons were apposed to dendrites of corticospinal or corticothalamic neurons, respectively. By con-focal laserscanning and electron microscopy, some of these appositions were revealed to make synapses. These findings indicate that corticospinal neurons

receive information from the superficial cortical layers 4-fold more efficiently than corticothalamic neurons.

The connections were further examined by intracellular recording of excitatory postsynaptic potential (EPSP) that were evoked in layer V and layer VI pyramidal neurons by stimulation of layer II/III. EPSPs evoked in layer V pyramidal neurons showed short and constant onset latencies, suggesting their monosynaptic nature. In contrast, most EPSPs evoked in layer VI pyramidal neurons had long onset latencies and showed double-shock facilitation of onset latency, implying that they were polysynaptic.

The results suggest that information of the superficial cortical layers is transferred directly and efficiently to corticospinal neurons in layer V and thereby exerts an important influence on cortical motor output. Corticothalamic neurons are, in contrast, considered relatively independent of or indirectly related to information processing of the superficial cortical layers.

### (2) Fast neuronal population oscillations in cortical networks in vitro

Eberhard H. Buhl (The School of Biomedical Sciences, University of Leeds, United Kingdom)

Many neurons in the CNS are endowed with oscillatory

properties which allow them to discharge rhythmically

and, thus, entrain their neighbours and distant projection targets alike. However, rhythmic population oscillations may also arise as an emergent property of a neuronal network which is suitably interconnected with electrical and/or chemical synapses. It is feasible to analyse the timing of action potentials and synaptic events in pyramidal cells and interneurons by using the concomitantly recorded extracellular field as a temporal reference. It thus emerges that the discharge probability of pyramidal neurons increases concomitantly with the decay of inhibitory currents /potentials. While there is little doubt with respect to the role of synaptic mechanisms in governing the generation of synchronous activity, equally compelling evidence has been accruing that, in the absence of synaptic communication, gap junction-mediated electrical signalling is effective in gen-

erating network oscillations. Spontaneous, ultrafast (~200 Hz) ripples can, for example, be observed in hippocampal tissue *in vitro*. Moreover, transient depolarizations with high-molarity potassium solutions can trigger fast (~100 Hz) synchronous network activity in either nominally calcium-free solutions or the presence of GABA and glutamate receptor antagonists. Interestingly, when leaving synaptic transmission intact, such fast rhythms appear to be nested (i.e. phase-locked) in a slower gamma frequency population oscillation. These data therefore support the notion of non-synaptic (presumably a mixture of electrical and ephaptic effects) and synaptic mechanisms showing a complex interplay in the generation of complex neuronal rhythms which frequently, both *in vivo* and *in vitro*, span more than a single EEG frequency band.

### (3) Functional subdivisions of cortical neurons:

#### "Do interstitial cells in the white matter participate in the cortical circuit?"

Tamamaki, N. (Department of Morphological Brain Science, Graduate School of Medicine, Kyoto University)

Interstitial cells in the white matter of the neocortex is a remnant population of early generated neurons found in the intermediate zone of the developing neocortex of the rat. Most of these early generated neurons were reported as GABAergic neurons and might work as pioneer neurons projecting subcortically. Most of those early generated neurons were eliminated by cell death after birth. However, some of them remained in the white matter and retained axons and dendrites. We revealed the axon and dendritic

arbors of these interstitial cells by recombinant adenovirus infection followed by modified-GFP expression. We could divide the interstitial cells into two types and one of them were Martinotti cells. The other type was not described so far and regarded a new type of inter neurons of the neocortex. The new type of the interstitial cells had an axon arborized preferentially in the white matter. The terminals may be targeting on edges of basal dendrites or axons in the white matter.

### (4) Anatomy, Physiology, Molecular and Circuit Properties of Neocortical Interneurons

Henry Markram, Wang Yun, Anirudh Gupta & Maria Toledo  
(Department of Neurobiology, The Weizmann Institute of Science, Israel)

Interneurons comprise a small fraction of the total neurons of the neocortex, but are critical for normal function. In this study we examined in detail a large number of interneurons in the somatosensory cortex of rats and developed methods to allow objective classification of

different types of interneurons in terms of their anatomy and physiology. Five major anatomical classes were examined: Large Basket Cells, Nest Basket Cells, Small Basket Cells, Martinotti Cells and Bitufted Cells. We derived a comprehensive morphology code (mCode) that was

used to examine the similarities and differences between LBCs, NBCs and SBCs. Clear anatomical identification of interneurons allowed examination of electrophysiological subtypes and we found that most interneurons expressed 1-5 subtypes of electrophysiological behaviors. We further examined the molecular expression patterns of these anatomical subtypes, and found that most subtypes expressed in 2-5 different ways. We also ventured to estimate the extent of the diversity of interneurons. In total, we predict that at least 15 anatomical classes of interneurons exist in each of layers 2-6, with an average of 3 electrophysiological subtypes each and of these a further

average of 4 molecular subtypes each. This suggests that each neocortical layer could contain around 180 different types of interneurons. The distribution of different types of interneurons varies from 1:1 to 1:20 with an average of around 1:5, indicating that around 675 interneurons are required in a given layer to provide comprehensive diversity of interneurons. The ratio of interneuron numbers across layers also varies on average 2 fold, suggesting that a column of cortex would need to hold around 9,000 interneurons or around 76,000 neurons. This is equivalent to about 7 cortical columns of diameter 300  $\mu\text{m}^2$  or 0.63  $\text{mm}^2$  of cortical surface.

#### (5) Depolarizing afterpotentials involved in rhythmogenesis in cortical pyramidal cells

Youngnam Kang (Department of Physiology, Faculty of Medicine, Kyoto University,  
Department of Oral Physiology, Faculty of Dentistry, Hokkaido Health Science University),  
Yo Kishi (Department of Physiology, Faculty of Medicine, Kyoto University)

Regular spiking cortical pyramidal cells often display an early depolarizing spike afterpotentials (early DAP) immediately following spike repolarization, and an enhancement of the DAP led to a generation of fast rhythmic burst firing (FRB). This FRB is generally thought to underlie gamma-band EEG oscillation. On the other hand, the late DAP is also seen following spike-AHP in regular spiking pyramidal cells when metabotropic glutamate or muscarinic receptors are activated. This late DAP has been suggested to be associated with theta EEG rhythm. We have investi-

gated the ionic mechanisms underlying these early and late DAPs. The data suggest that the enhancement of the early DAP is mediated by an enhancement of the sensitivity of cationic channels to  $\text{Ca}^{2+}$  through the activation of CaMKII. On the other hand, we conclude that in the presence of muscarine, calcium influx through voltage-gated calcium channels triggers IP3 induced calcium release leading to a generation of calcium-dependent late DAP and excessive calcium influx results in a suppression of the late DAP through inactivation of IP3-receptors by the calcium-calmodulin complexes.

#### (6) Electrophysiology and morphology of rat claustral neurons

Hiroshi Shibuya and Tetsuro Yamamoto (Department of Physiology, Faculty of Medicine, Mie University)

The electrophysiological and morphological properties of constituent neurons and fiber connections of the rat rostral claustrum gave some suggestions about its ontogenetic origin and function. All recorded neurons had action potentials with much higher maximum rates of rise than that of fall, and spike-frequency adaptation during long depolarizing pulses that could be classified as slow- and

fast-adapting, similar to the regular type reported in the neocortex. The somata of the claustral neurons resembled those of cortical layer VIb cells characterized by diversity. In addition, some of the dendrites of these extended toward the superficial layers of the ventrolateral and lateral orbital cortex (VLO/LO), and arborized profusely in the claustral partition and the VLO/LO. Furthermore, some single neu-

rons of the claustrum were shown to send their stem axons and collaterals to the VLO/LO, the agranular motor cortex (AgMCx) and other cortical areas by double staining with fluorescent dyes and intracellular staining. These findings strongly suggest that the rostral claustrum is a part of the layer VI of the adjacent cerebral cortex, i.e., VLO/LO, shares

input to the VLO/LO in addition to input to the claustrum itself, and integrates these two inputs. Considering the gelatino-orbital projection and connections among the claustrum, VLO/LO and AgMCx, the rostral claustrum may be an important region that integrates the affective-motivational aspects of pain and behavior.

### (7) Synaptic connections and synchronized firing of cortical interneurons

Yasuo Kawaguchi, Satoru Kondo (National Institute for Physiological Sciences)

Yoshiyuki Kubota (Bio-Mimetic Control Research Center, RIKEN)

GABAergic interneurons in the rat frontal cortex are divided into 2 groups according to the intrinsic firing pattern: FS (fast-spiking) cells and non-FS cells. FS cells show abrupt episodes of nonadapting repetitive discharges of short-duration spikes and are immunoreactive for parvalbumin. Non-FS cells are further classified on the basis of neuropeptide and calretinin content. Somatostatin cells include Martinotti cells with ascending axonal arbors, innervating thin dendritic branches or spines. VIP and/or calretinin cells include double bouquet cells with descending axonal arbors innervating dendrites. Large CCK cells have axonal arbors making multiple boutons on other cell bodies. In addition to intracortical synaptic connections, modulatory subcortical inputs may be

also different among the GABA cell subtypes. Carbachol or muscarine affects the activities of peptide-containing GABAergic cells more than parvalbumin FS cells. Somatostatin or VIP cells are depolarized with spike firing, whereas large CCK basket cells are hyperpolarized. Continuous application of carbachol or muscarine induces two patterns of the increases of inhibitory postsynaptic currents in cortical cells: continuous and periodic ones. The periodical increase induced by carbachol or muscarine was synchronized among cortical cells. A few nonpyramidal cells showed the slow periodical discharges in response to carbachol. Cholinergic afferents from the basal forebrain may affect cortical activities through GABA cell subtypes differentially.

### (8) Electrical Synapses and Networks of GABAergic Neurons in the Neocortex

Shaul Hestrin & Mario Galarreta (Stanford University, USA)

It has been suggested that GABAergic axo/dendritic and axo/somatic interactions among inhibitory neurons are critical in coordinating cortical activity. However, synaptic interactions among GABAergic cells and their relation to coordinated activity are only poorly understood. We have addressed these issues by recording simultaneously from pairs of fast-spiking (FS) cells, a kind of GABAergic neocortical interneurons. The FS cells were immunoreactive to parvalbumin and had local and horizontal axon projections making inhibitory contacts with both pyramidal neurons as well as other inhibitory neurons. We have found that in addition to GABAergic chemical

synapses FS cells were electrically coupled. Electrical synapses appear to be cell-type specific. We have not found evidence of electrical coupling among pairs of neighboring pyramidal neurons. Moreover, we have not found electrical synapses between FS cells and other types of neocortical cells. When both chemical and electrical transmission were present between two FS cells, a presynaptic spike generated a dual component response in the postsynaptic cell. The peak of the electrical synapse mediated response occurred earlier than that of the GABAA-receptor mediated IPSP. We found that the efficacy of signal transmission through

electrical synapse is frequency-dependent. Thus, we have directly demonstrated extensive electrical coupling among neocortical FS cells. The high degree of connectivity could establish a functional network of specific type of neurons

within the neocortex. Given that inhibitory neurons control other neurons these networks could organize cortical activity and promote synchrony.

### (9) Local circuit and representation of sound

Wen-Jie Song (Dept of Electronic Engineering, Osaka University)

Hideo Kawaguchi (Advanced Research Laboratory, Hitachi Ltd.)

Sound is decomposed in the cochlea into different frequency components. Each frequency component is detected by hair cells at a specific point of the basilar membrane. Components of lower frequencies are represented by the basilar membrane region close to the base of the cochlea, and components of higher frequencies are represented at regions close to the apex. Such spatial representation of sound frequency is often referred to as tonotopy. Tonotopy is maintained all through the central auditory pathway up to the

cortex. In the cortex, neurons of the same characteristic frequency tend to stay together, along a dorso-ventral axis, forming an isofrequency stripe. Traditionally, isofrequency stripes in the cortex have been thought to be formed due to topographic projection from the thalamus, along the frequency axis and along the isofrequency dimension. In our report, we show evidence that cortical local circuits contribute significantly to the formation of isofrequency stripes.

### (10) Classification of neuron types based on the firing patterns recorded in behaving monkeys

Akichika Mikami, Keichiro Kato, Shunpei Unno (Primate Research Institute, Kyoto University)

Youngnam Kang (School of Medicine, Kyoto University, Health Sciences University of Hokkaido)

In order to develop a new approach to classify neuron types applicable for the data taken in behaving monkeys, we measured the amplitudes of spikes, the duration of spikes, the inter-spike intervals and number of spikes within the bursting activities recorded in the frontal cortex of behaving monkeys. Following the results of the cluster analysis we could identify fast spiking (FS), fast rhythmic bursting (FRB) and intrinsic bursting (IB) neurons. FS neurons were characterized by shorter and relatively constant ISI (<5ms) and larger number of spikes (>6 spikes, often >10 spikes). FRB neurons were characterized by shorter and relatively

constant ISI (<5ms) and smaller number of spikes (<6 spikes, usually 2 or 3 spikes) within a burst. In addition, FRB neurons often showed 20-80 Hz fast rhythmic burst, which is consistent with the characteristics of FRB neurons reported previous studies. IB neurons were characterized by longer and variable ISI (fluctuating between 4-12 ms) and smaller number of spikes (<6 spikes, usually 2-4 spikes) within a burst. The data suggested the possibility to use this approach to analyses neuronal circuits related the behavior.

### (11) Velocity and Position Guided Orienting in Unrestrained Cats

Sasaki S., Yoshimura, K., Naito, K. (Dept. of Neurophysiology, Tokyo Metropolitan Institute for Neuroscience)

Moving and stationary visual stimulus may lead to elicit different types of orienting, because the moving visual stimulus activates retinal neurons sequentially along the trajectory of the moving stimulus, while the stationary stimulus activate neurons in a restricted area on which the object projected on. We, thus, attempted to characterized the differences of orienting elicited by moving and stationary stimuli. Cats were trained to stand in a small box and to fixate at a light spot projected on a center of the panel and were required to orient to the light spot which jumped from the fixation point to a target or moved with various speed in a ramp-hold manner. When a light spot

jumped from a fixation point to a target, cats first moved their heads slowly toward the target with concomitant controversial eye movements due to the vestibulo-ocular reflex, resulting in a flat gaze traces and then made rapid head movements and saccades toward the target. Latencies of head movements were 100-200 ms. Switching from jumping to moving visual stimuli produced pronounced shortening of latencies of orienting and increases of head and gaze velocities. These results suggesting that there are two types of orienting, i.e., position guided and velocity guided orienting, which utilize position and velocity information of visual stimuli, respectively.

## (12) Dynamic regulation of signal transmission in the local circuit of the superior colliculus

Yasuhiko Saito & Tadashi Isa (Dept. Integrative Physiology, National Institute for Physiological Sciences)

To understand the mechanisms of generation of motor commands in the superior colliculus (SC), we investigated activation properties of neurons in the intermediate layer (SGI) using whole-cell patch clamp technique in the SC slices obtained from 17- to 22-day old rats. In the presence of bicuculline (Bic, 10  $\mu$ M), a single shock stimulation of the optic tract (OT) often induced the long-lasting depolarization with repetitive firings in SGI neurons. Moreover, when a local stimulation was applied in a small rectangle piece of slice isolated from the SGI, the SGI neurons in the rectangle exhibited the repetitive firings, suggesting the existence of

neural elements within the SGI, which yielded bursting properties when GABAergic inhibition was removed. To further investigate the structure of local excitatory connections in the SGI, we performed simultaneous recordings from a pair of SGI neurons. Application of Bic in addition to reducing extracellular  $Mg^{2+}$  induced synchronous spontaneous depolarization (> 20 mV) of neurons in the SGI frequently even when the two SGI neurons did not show the direct synaptic connections. All these results suggest that the local excitatory connections of the SGI neurons may be important in generation of the bursting motor command in the SGI.

## (13) Mutual inhibition in the premotor circuit controlling saccade

Yoshida, K., Iwamoto, Y., Chimoto, S. and Shimazu, H. (Department of Physiology, Institute of Basic Medical Sciences, University of Tsukuba, and CREST of JST)

The brain stem neural circuit that generates saccadic eye movements contains two essential classes of neurons, burst neurons (BNs) and omnipause neurons (OPNs). Since OPNs make direct inhibitory connections with BNs, it is believed that the duration of the BNs discharge is controlled by a pause of OPNs. Intracellular recordings were made from OPNs in

alert cats to elucidate postsynaptic events during saccades and thereby determine what patterns of afferent discharge impinge upon OPNs to cause their pause. The membrane potential of OPNs showed steep hyperpolarization in association with each saccade. The results indicate that the pause of activity in OPNs is initiated by an abrupt inhibition and maintained till

the end of the saccade by afferents encoding eye velocity signals. We suggest that the eye velocity-related afferents originate from BNs and that powerful mutual inhibitory

interactions between BNs and OPNs generate their complementary discharge patterns.

#### (14) Synchronous oscillatory activity of local field potentials and neurons in MI and SMA during bimanual movements of monkeys

Takashi Kawashima (Dept. Neurophysiol. Inst. of Equilibrium Res., Gifu Univ. Sch. of Med & Dept. physiol. and Biophys. and Regional Primate Res. Ctr., Univ. of Washington)

Thomas A. Knight, Eberhard E. Fetz (Dept. physiol. and Biophys. and Regional Primate Res. Ctr., Univ. of Washington)

Simultaneous local field potential (LFP) were recorded in the right and left primary cortex (M1) and supplementary motor cortex (SMA) and parietal cortex (Area7) of two macaca nemestrina performing visually guided bimanual tracking task. All LFPs showed oscillation at 20-40Hz that could become bilaterally synchronous during the bimanual movements. Averaged cross-correlation coefficient (ACCC) between the recording sites were compared in three behavioral states: 1) pre-movement periods, 2) during the bimanual tracking periods and 3)reward periods. Regarding the hemilateral connection, the values of ACCC were arranged in order

SMA-Area7 > SMA-MI > MI-Area7 in both hemispheres in any of these behavioral periods. Regarding the bilateral connection, no significant changes of ACCC were observed in SMA and MI between pre-movement and the bimanual tracking periods. In the reward period the coefficient values were highest in any recording sites. In addition to the ordinary averaging method, time course analysis of cross correlation of LFPs were also executed. Bilateral oscillatory synchronous activities of LFPs were observed in M1 and SMA in accordance with a rapid initiation or cessation of bimanual movements.

#### (15) A new bipedally walking monkey model for the study of human bipedal locomotion

Shigemi Mori, Futoshi Mori, Katsumi Nakajima, Atsumichi Tachibana, Masahiro Mori, and Chijiko Takasu (Department of Biological Control System, National Institute for Physiological Sciences)

To advance understanding of the CNS mechanisms in the human which control and integrate posture and bipedal locomotion, it is desirable to establish a non-human primate model. With such a model, it is possible to apply the state-of-the-art techniques of modern neuroscience to the problem of developing testable hypotheses on relevant CNS control mechanisms. By use of long-term operant conditioning, we have recently trained the normally quadrupedal young Japanese monkey (*M. fuscata*; estimated age; 3 to 4 years old) to stand upright and walk bipedally on a moving treadmill belt. After 3 to 4 months of regular locomotor training, they acquired a novel strategy of walking bipedally. With

continuation of the locomotor learning together with monkey's physical growth over time, the monkeys refined gradually their walking patterns with less fluctuation of body axis. We have already shown that the kinematic features of our model's bipedal treadmill walking resemble those used in human locomotion. We have also found that bipedally walking monkeys can clear the obstacles attached on the moving treadmill belt with the larger flexion of hip and ankle joints than that observed during treadmill locomotion without an obstacle. When the monkey failed to clear the obstacle and stumbled, it adopted a defensive posture with rapid extension of the forelimbs forward and

downward with lowering of the center of body mass to the treadmill surface. Our result indicates that "integrated" interactions of multiple body segments such as head, body, forelimbs and hindlimbs are necessary for preventing "stumbling" from "falling". All these results suggest that the monkey walking bipedally on a moving treadmill belt acquired a hip-knee strategy of recruiting and integrating both anticipatory and reactive neural mechanisms in the CNS to accomo-

date its posture and locomotion to the external perturbations. Our new model monkey seems to employ CNS mechanisms similar to those in human subjects. With the use of non-invasive method such as positron emission tomography (PET), we are now exploring the potential CNS mechanisms and operating principles for the elaboration of monkey's bipedal locomotion with an upright posture.

#### (16) Selective expression of $\text{Ca}^{2+}$ -permeable ampa receptors in horizontal cells in the superficial layer of rat superior colliculus

Toshiaki Endo, Tadashi Isa (Department of Integrative Physiology, National Institute for Physiological Sciences)

Rectification property and  $\text{Ca}^{2+}$ -permeability of AMPA-type glutamate receptors were investigated in six morphologically identified subclasses of neurons in the superficial layer of the superior colliculus (sSC) by whole-cell patch clamp recording technique in slice preparations obtained from rats (PND17-23). Both outwardly rectifying and inwardly rectifying current responses were observed to pressure application of kainate (KA). These currents were completely abolished by 100 mM GYKI 52466, indicating that the KA-induced currents were mediated by AMPA-type glutamate receptors. The inwardly rectifying KA responses

were suppressed by 1 mM spermine. The degree of inward rectification was inversely correlated with the reversal potential of KA responses in the isotonic  $\text{Na}^{+}$ -free, high  $\text{Ca}^{2+}$  solution, indicating  $\text{Ca}^{2+}$ -permeability was higher in inwardly rectifying AMPA receptors. The inwardly rectifying and  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable AMPA receptors were observed in a large proportion of horizontal cells with extensive dendritic arborization in the tangential direction. These results suggest that  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable AMPA receptors have specific role in regulation of lateral interaction in the visual field map in the sSC.

#### (17) Burst firing in layer III pyramidal neurons of cat sensorimotor cortex

Yoshihiro Nishimura, Hiroshi Shibuya, Toshihiro Asahara and Tetsuro Yamamoto (Department of Physiology, Faculty of Medicine, Mie University)

The ionic mechanisms underlying burst firing in layer III neurons from cat sensorimotor cortex were examined by intracellular recording in a brain slice. Regular spiking was observed in 77.4 % of 137 neurons in response to constant intracellular current pulses. The rest of the neurons showed burst firing. An initial burst followed by regular-spike firing was observed in 71.0 % of 31 bursting neurons. The rest of the bursting neurons ( $N=9$ ) showed repetitive bursting. In the bursting neurons, spikes were triggered from the

afterdepolarization (ADP) of the 1st spike of burst. The ADP was enhanced by a blockade  $\text{Ca}^{2+}$  channel. This enhanced ADP by  $\text{Ca}^{2+}$  channel blockade was apparent after blockade of the afterhyperpolarization by apamin or intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  chelation by EGTA. These agents switched the regular spiking pattern into a bursting one, but could not change a burst firing into a regular spiking. Four neurons responding with a single initial burst in control solution responded with repetitive bursting after application of these agents. The

ADP was blocked and the burst firing changed to regular spiking by tetrodotoxin (TTX) or intracellularly applied QX314. We concluded that a TTX- and QX314- sensitive

Na<sup>+</sup> current underlies the ADP and contributes to the burst firing of layer III neurons from the cat cortex.

### (18) Interaction of horizontal and vertical inputs to pyramidal cells in the superficial layers of the cat visual cortex

Hirofumi Sato (School of Health and Sport Sciences, Osaka University)

Yumiko Yoshimura (Department of Neuroscience, Osaka Bioscience Institute & Department of Visual Neuroscience, Research Institute of Environmental Medicine, Nagoya University)

Kazuyuki Imamura and Yasuyoshi Watanabe (Department of Neuroscience, Osaka Bioscience Institute)

The purpose of this study is to elucidate the integrative input mechanisms of pyramidal cells receiving horizontally projecting axon collaterals (horizontal projection) and vertical input from layer IV. We performed whole-cell recordings from pyramidal cells in layer II/III and focally activated other single pyramidal cells monosynaptically connected via long-distance horizontal (LH) projections (the distance between pre- and post-synaptic cells was 350-1200  $\mu$ m) in slice preparations of the kitten primary visual cortex. In addition, presynaptic single fibers in layer IV (vertical input) and/or short-distance horizontal (SH) inputs from neighboring single pyramidal cells (distance within 100  $\mu$ m) in layer II/III were activated. Unitary excitatory postsynaptic

potentials (EPSPs) evoked by the activation of LH and SH connections had smaller amplitude and larger coefficient of variation than those evoked by stimulating the vertical input. Paired-pulse stimulation of the LH and SH inputs caused the depression of the second EPSP, whereas that of vertical inputs caused either facilitation or depression of the second EPSP. The EPSPs evoked by simultaneous activation of LH and vertical inputs summated linearly at the resting membrane potential. However, the EPSPs evoked by stimulation of the two inputs were nonlinearly (supralinearly) summated when the postsynaptic membrane was depolarized to a certain level. Similar EPSP interaction was observed in response to simultaneous activation of the LH and SH inputs.

### (19) Spatiotemporal interaction of response to multiwhisker stimulation in the barrel cortex neurons of rats

Satoshi Shimegi, Takafumi Akasaki, Hirofumi Sato (School of Health and Sport Sciences, Osaka University)

To understand the physiological properties and anatomical organization of the spatiotemporal interaction of the responses to multiwhisker stimulation in neurons of the rat barrel cortex, single-unit recordings of 114 neurons were performed across all layers (layer II/III, n = 39; IV, n = 33; V/VI, n = 42) of the barrel cortex of anesthetized rats. Two neighboring principal and adjacent whiskers (PW and AW, respectively) in the same row were deflected rostrally or caudally at varying interstimulus intervals (ISIs). In 37% of the cells tested, multiwhisker stimulation exhibited response facilitation; the response to the combined stimulus was larger than the sum of the responses

to stimulation of the individual whiskers. Among them, 75% and 60% were selective for the combination of the PW with a particular AW and for a particular direction of whisker deflection, respectively. Most cases of facilitation were observed at short ISIs (<4 msec). Multiwhisker stimulation at longer ISIs (>8 msec) caused a suppression of the response to the second whisker stimulation. Facilitation was evoked predominantly in layer II/III cells (69%) and most of them were located close to the border between two columns, where strong excitatory inputs from the adjacent column were expected. Our results suggest that the spatiotemporal patterns of

multiwhisker stimulation, such as whisker combination, direction of deflection and timing, are expressed as different pattern and magnitudes of response interaction, which

depends on the location of the recorded cell including proximity of cells to home and adjacent barrel columns and lamination.

## (20) Functional Development of the Recurrent Inhibitory Network of the Mauthner Cell in Zebrafish larvae

Masaharu Takahashi (Lab. of BrainScience, Div. of Biophysical Engineering, Grad. Sch. of Engineering Science, Osaka Univ., JSPS Research Fellow)

Madoka Narushima, Yoshinobu Murayama (Lab. of BrainScience, Div. of Biophysical Engineering, Grad. Sch. of Engineering Science, Osaka Univ.)

Yoichi Oda (Lab. of BrainScience, Div. of Biophysical Engineering, Grad. Sch. of Engineering Science, Osaka Univ., and PRESTO 21)

Output of neuronal activity is restrained by the local network. The Mauthner (M-) Cell, a large reticulospinal neuron in the hindbrain, generates a single action potential that initiates the fast escape behavior of teleost fish from a sudden aversive stimulus. Activation of the single action potential of the M-cell in the adult goldfish is controlled, at least in part, by recurrent inhibition of the M-cell mediated through glycinergic interneurons. In the present study, we examined when the feedback circuit is established, with using confocal Ca imaging of the M-cell in the intact zebrafish larvae. The M-cells were retrogradly labeled with a fluorescent calcium indicator, Calcium Green Dextran, injected at the spinal cord of zebrafish 4-16 days post fertilization (dpf).

Stimulation of the spinal cord induced increase in fluorescence intensity in all-or-none manner, indicating antidromic (AD) activation of the M-cell. The intensity of the Ca response was reduced ( $88.6 \pm 3.3\%$ ,  $n=19$ ) when the second AD spike was evoked at 5ms after the first spike during the period of recurrent inhibition. Applying a glycine antagonist, strychnine, blocked the reduction of Ca response. Thus, the reduction of Ca response observed in zebrafish 4-16dpf indicates the shunt of AD spike produced by the inhibitory conductance of the M-cell recurrent network. These results suggest that recurrent inhibition of the M-cell becomes functional in zebrafish larvae before 4dpf.

## (21) Fluorescence imaging of the protein kinase C translocation in the hippocampal neurons

H. Tsubokawa and S. Takagi (National Institute for Physiological Sciences)

In neurons of the CNS, little is known about spatial and temporal profiles of the PKC activation in relation to neuronal activities. In this study, we tried to detect translocation of the PKC, which is followed by binding to the substrates. A combination of intracellular recording and fluorescence imaging was applied to CA1 pyramidal neurons of mouse hippocampal slices. Cells were loaded with 50  $\mu$ M fim-1, PKC-binding dye, through a patch-pipette. Bath application of 100 nM phorbol 12-myristate 13-acetate, an activator of the PKC,

reversibly changed the spatial pattern of the fim-1 fluorescence. The fim-1 fluorescence transiently decreased, then a bright area appeared around the cell membrane regions within 15 min. During this period, the amplitude of EPSCs induced by stimulation of Shaffer collateral / commissural fibers increased, and the paired pulse facilitation of the EPSCs was reduced. Train of action potentials induced similar transient decreases in the fim-1 fluorescence with increases in  $[Ca^{2+}]_i$ . In the presence of PKC inhibitors, pharmacological or electrical

stimulation did not induce significant changes in the spatial patterns of the fim-1 fluorescence without affecting changes in  $[Ca^{2+}]_i$ . These results suggest that optical imaging of

fim-1 fluorescence is useful for detecting activation of the PKC in specified neurons in the brain slice preparation.

## (22) Calcium-sensitive cation current accompanying activation of nicotinic acetylcholine receptors in rat mesopontine dopamine neurons

Tetsuji Yamashita, Tadashi Isa (Department of Integrative Physiology, National Institute for Physiological Sciences)

The mesopontine dopamine neurons receive cholinergic inputs from the pedunculo-pontine nucleus as a main excitatory input. We analyzed the current responses of dopamine neurons to the puff application of acetylcholine (ACh; 1mM) using whole cell patch clamp recording in the midbrain slices obtained from rats (PND 12-17) and clarified three points as follows; 1. The puff application of ACh induced fast inward current which was suppressed by mecamylamine, suggesting that the current was mediated by nicotinic ACh receptors (nAChRs). 2. The ACh-induced current was partially suppressed by flufenamic acid (FFA; 200 mM), an antagonist of  $Ca^{2+}$ -activated nonselective cation channels (CAN channels). However, FFA did not suppress the ACh-induced current in the  $Ca^{2+}$ -free extracellular

solution. These results suggested that we could exclude the possibility FFA suppressed the nAChR-mediated current itself, but instead FFA suppressed the  $Ca^{2+}$ -dependent current secondarily activated by the nAChR-mediated current. 3. Suppression of the ACh-induced current by FFA could be observed under the presence of thapsigargin (1mM), suggesting that the  $Ca^{2+}$  influx through the nAChRs could directly activate the FFA-sensitive current, presumably mediated by CAN channels. We have concluded that the ACh-induced current in the dopamine neurons contains FFA-sensitive  $Ca^{2+}$  dependent current that is subsequently activated by the  $Ca^{2+}$  influx through the nAChRs.

## 9. 定量的高分解能電子顕微鏡法

2000 年 11 月 21 日- 11 月 22 日

代表・世話人：藤吉好則（京都大学大学院理学研究科）

所内対応者：永山國昭（生理学研究所超微小形態生理）

- ( 1 ) Visualizing the strong binding state of myosin S1 to actin: Detecting structural changes in an 18 Å 3D reconstruction of decorated actin from Filter-Cryo-Electron Microscopy  
R.R. Schroeder ( Max Planck Institute for Medical Research)
- ( 2 ) 筋肉の細いフィラメントの Ca 制御の分子機構  
若林健之, 成田哲博, 安永卓生, 石川 尚, 真柳浩太 (東京大 理)
- ( 3 ) 機能中の蛋白質 1 分子の構造を探索  
片山栄作・小山智宏\*・宮林信治\*・市瀬紀彦・馬場則男\*  
( 東京大学医科学研究所・\*工学院大学 電気工学科)
- ( 5 ) 水チャネルアキュポリン 1 の電子線結晶構造解析  
村田和義<sup>1</sup>, 光岡 薫<sup>2</sup>, 平井照久<sup>2</sup>, Thomas Walz<sup>3</sup>, Peter Agre<sup>4</sup>, J. Bernard Heymann<sup>5</sup>, Andreas Engel<sup>5</sup>, 藤吉好則<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>生理研, <sup>2</sup>京大理, <sup>3</sup>Harvard Medical School, <sup>4</sup>Johns Hopkins University, <sup>5</sup>Univ. Basel)
- ( 6 ) ニコチン性アセチルコリンリセプターの構造解析  
宮澤淳夫 (理化学研究所・播磨研究所)
- ( 7 ) Structural Biology と顕微鏡の解像力  
濱 清 (生理学研究所)
- ( 8 ) 単量体分子モーター KIF1A の構造と作動機構  
吉川雅英\*, Elena P. Sablin#, 岡田康志\*, Robert J. Fletterick#, 廣川信隆\*  
( \*東京大・医学・細胞生物/解剖, #カリフォルニア大学サンフランシスコ校, 生化学・生物物理)
- ( 9 ) カベオリンと細胞膜ドメインの形成  
藤本豊士 (名古屋大学大学院医学研究科)
- ( 10 ) 神経成長円錐伸長機構とシナプス接着機構  
溝口 明 (京都大, 大学院, 生体構造医学講座)
- ( 11 ) 電圧感受性 Na チャネルの 3 次元構造の単分子解析法による再構成  
佐藤主税<sup>A</sup>, 上野 豊<sup>A</sup>, 高橋勝利<sup>B</sup>, 浅井 潔<sup>A</sup>, 佐藤雅彦<sup>C</sup>, Andreas Engel<sup>D</sup>, 藤吉好則<sup>E</sup>  
(<sup>A</sup>電総研, <sup>B</sup>北陸先端大, <sup>C</sup>伊藤ハム・中研, <sup>D</sup>univ. Basel, MIH, <sup>E</sup>京大・生物物理)
- ( 12 ) 筋肉の細いフィラメントの Ca 制御の分子機構  
若林健之, 成田哲博, 安永卓生, 石川 尚, 真柳浩太 (東京大・理)
- ( 13 ) Super-resolution microscopy using two color lasers beam - Microscopy for overcoming optical diffraction limit -  
Yoshinori Iketaki, Takashige Omatsu, Osamu Sato, Toshio Suzuki, Masaki Fujii  
(Olympus Optical Co., Ltd, Chiba Univ, Nippon Roper Co., Ltd.,)
- ( 14 ) 細胞膜に見る極性形成と情報伝達の 1 分子解析  
楠見明弘 (名古屋大学大学院・理)
- ( 15 ) 近接場顕微鏡によるインテグリン動態の解析  
曾我部正博, 辰巳仁史 (名古屋大・医)
- ( 16 ) 電子線と X 線による超分子の構造解析 - 細菌べん毛らせんのスイッチ機構 -  
難波啓一 (ERATO, JST & 松下電器先端技研)
- ( 17 ) 位相差電子顕微鏡と複素観測  
永山國昭 (生理研・超微小)

【ポスター発表】

- (1) バクテリアべん毛基体 FliF リング及び FliF-FliG リングの円筒平均構造  
鈴木博文 (ERATO 難波プロジェクト)
- (2) 直線型バクテリアべん毛フィラメントの電子線構造解析  
眞木さおり (ERATO 難波プロジェクト)
- (3) エナジーフィルター電子顕微鏡による蛋白質結晶回折データの評価  
米倉功治 (ERATO 難波プロジェクト)
- (4) 電子線結晶学によるバクテリオロドプシンの構造解析  
光岡 薫 (京都大学大学院・理)
- (5) ロドプシンの電子線結晶構造解析  
刑部伸彦 (京都大学大学院・理)
- (6) Gap Junction の結晶解析を目指したコネキシンの精製  
大嶋篤典 (京都大学大学院・理)
- (7) SDS-FRL による小脳におけるグルタミン酸受容体の発現解析  
馬杉美和子 (生理研・脳形態解析)
- (8) 膜蛋白質の人為的発現による細胞の形態変化  
廣明洋子 (京都大学大学院・理)
- (9) MgluR の集積機構を利用した 2 次元結晶化への試み  
西川幸希 (京都大学大学院・理)
- (10) 細胞の機能局在  
樋口純子 (山形大・医)
- (11) 細胞膜の細胞質側表面における膜骨格と膜貫通型タンパク質のトポグラフィー  
諸根信弘 (ERATO 楠見膜組織能プロジェクト)
- (12) 遠心偏光顕微鏡を用いた細胞内複屈折構造の形成と変化  
合田 真 (京都大学大学院・理科)
- (13) ヒト慢性根尖性歯周炎における HLA-DR 陽性細胞  
金子友厚 (東京医科歯科大学大学院・医歯学総合研究科)
- (14) I 型コラーゲン (アルファ I 鎖) リコンビナント遺伝子産物の電子顕微鏡的確認  
服部 宇 (名古屋大学大学院・医)
- (15) 無脊椎動物 (腹足類) の外套組織にみられる筋線維の超高压電顕観察  
片桐展子 (東京女子医科大・総合研究所)
- (16) 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 (生理研・超微小)
- (17) 複素電子顕微鏡の情報伝達度  
杉谷正三 (東京大学大学院・総合文化)
- (18) Practical aspects in the application of Zernike phase-plate in TEM  
Radostin Danev (生理研・超微小)
- (19) Retrieving 0.1nm resolution from HRTEM using blind deconvolution and Gpnhberg-Saxfov algorithm  
Fu-Rong Chen (National Tsing Hua Univ.)

【参加者名】

R.R. Schroeder (Max Planck Institute for Medical Research), 若林健之 (東京大・理), 片山栄作 (東京大 医科研), 村田和義 (生理研・超微小), 宮澤淳夫 (理化学研究所・播磨), 濱 清 (生理研), 吉川雅英参 (東京

大・医学・細胞生物/解剖), 藤本 豊士(名古屋大学大学院医学研究科), 溝口 明(京都大, 大学院, 生体構造医学講座), 佐藤主税(電総研), 池滝慶記(オリンパス), 楠見明弘(名古屋大学大学院・理), 曾我部正博(名古屋大・医), 難波啓一(ERATO, JST&松下電器先端技研), 鈴木博文(ERATO 難波プロジェクト), 眞木さおり(ERATO 難波プロジェクト), 米倉功治(ERATO 難波プロジェクト), 光岡 薫(京都大学大学院・理), 刑部伸彦(京都大学大学院・理), 大嶋篤典(京都大学大学院・

理), 馬杉美和子(生理研・脳形態解析), 廣明洋子(京都大学大学院・理), 西川幸希(京都大学大学院・理), 樋口純子(山形大・医), 諸根信弘(ERATO 楠見膜組織能プロジェクト), 合田 真(京都大学大学院・理科), 金子友厚(東京医科歯科大学大学院・医歯学総合研究科), 服部 宇(名古屋大学大学院・医), 片桐展子(東京女子医科大・総合研究所), 松本友治(生理研・超微小), 杉谷正三(東京大学大学院・総合文化), Radostin Danev(生理研・超微小), Fu-Rong Chen(National Tsing Hua Univ.)

## 10. 生殖細胞の構造と機能発現

2000年11月24日 - 11月25日

代表・世話人：年森清隆（宮崎医大）

所内対応者：有井達夫（生理研）

(1) マウス GC2 精原細胞株表面に発現している分子の検索

山本雅一，中野 匡，伊藤克彦，藤田 潤（京都大学大学院医学研究科・遺伝医学講座分子病診療学）

(2) ectoplasmic specialization：環境ホルモンおよび遺伝子ノックアウトからの新局面

外山芳郎（千葉大学医学部解剖学第2講座）

(3) 内分泌攪乱物質曝露におけるマウス精巣での遺伝子発現への影響

足達哲也<sup>1,2</sup>，櫻井健一<sup>2,3</sup>，深田秀樹<sup>1</sup>，芝山孝子<sup>1,2</sup>，井口泰泉<sup>1,4</sup>，森 千里<sup>1,2</sup>

（<sup>1</sup>科技団 CREST，<sup>2</sup>千葉大学医学部解剖学第一，<sup>3</sup>千葉大学医学部内科学第二，

<sup>4</sup>岡崎国立共同研究機構統合バイオサイエンスセンター生命環境）

(4) 先体反応前後に起こる精子頭部の膜表面構造の変化 - マウス精子の原子間力顕微鏡による観察

高野広子（北海道大学大学院医学研究科・生体機能構造学講座生態機能形態学分野）

(5) Aborted Cytokinesis and the formation of syncytial spermatids in mice

Manandhar, G.<sup>1</sup>, Toshimori, K.<sup>1</sup> and Schatten, G.<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Dept. of Anatomy, Miyazaki Medical College, <sup>2</sup>Oregon Regional Primate Research Center)

(6) 特別講演：生理的状态および病的状态の精巣間細胞

森 浩志（大阪医科大学医学部病理学第2講座）

(7) 哺乳動物の受精における精子セリンプロテアーゼの役割

山縣一夫（筑波大学応用生物化学系）

(8) 哺乳類初期胚の微細構造 - 高圧凍結置換固定法を用いて -

館 澄江（東京女子医科大学解剖学・発生生物学教室）

(9) 生殖幹細胞の特質

蓬田健太郎（大阪大学微生物病研究所）

(10) 特異的に発現する遺伝子から見た精巣生殖細胞の特徴

野崎正美（大阪大学微生物病研究所）

(11) Molecular interaction leading to sperm-oocyte fusion; role of acrin 3 (MC101) and an equatorin (MN9).

Saxena DK., Oh-oka T., and Toshimori K. (Dept. of Anatomy, Miyazaki Medical College)

### 【参加者名】

年森清隆（宮崎医大），高野広子（北海道大・医），外山芳郎（千葉大・医），高 圭範（千葉大・医），足達哲也（科技団 CREST），山縣一夫（筑波大），館 澄江（東京女子医大），桧山武史（基生研），向井徳男（基生研），山本雅一（京都大・医），蓬田健太郎（大阪大・微研），

西宗義武（大阪大・微研），野崎正美（大阪大・微研），笠原恵美子（大阪市大・医），増田 裕（大阪医大），森浩志（大阪医大），大岡唯祐（宮崎医大）Manandhar, G.（宮崎医大），Saxena D.K.（宮崎医大），有井達夫（生理研）

### 【概要】

本研究会では，精細胞の分化・成熟過程における形態変化，遺伝子/タンパク質レベルでの発現調節や関連する新規遺伝子の探索，内分泌攪乱化学物質の影響そして初

期胚発生に関する研究発表と討論を行った。その主な内容は次の通りであった。精巣生殖細胞に関しては，精細胞移植法を用いて生殖幹細胞の増殖・生存の特質が示さ

れた。精細胞分化に関しては、精原細胞株からの単クローン抗体作製と関連分子の検索、精細胞細胞質の分裂形態と合胞体細胞形成との関係、精巢生殖細胞に特異的に発現する遺伝子の探索とその特徴や内分泌攪乱物質との関係、そして精巢生殖細胞構造分化と内分泌攪乱化学物質との関係が発表された。受精に関しては、原子間力走査顕微鏡法による精子先体反応前後に起こる精子頭部膜表面構造の変化、精子先体内セリンプロテアーゼ（アクロシン）の受精との関係および先体内タンパク質と透明帯通過および受精能獲得との関係の解析例が報告された。哺乳類初期胚については、高圧凍結条件下での凍結置換

固定法を用いて、可能な限り自然な状態に近い状態での形態把握が試みられ、受精卵から胚盤胞期に至るまでの微細構造変化が示された。特別講演では、生理的状态および病的状態の精巢間細胞の構造と機能変化および精子形成への関与と病態変化（腫瘍誘発ホルモン異常による変化やアポトーシス）について詳細に解説された。

このように、本研究会では、精細胞の発生から胚子初期発生までに起こる形態変化や機能発現について、異なるアプローチを行っている研究者が多角的な面から発表・討論し、最近の生殖生物学の研究の動向や結果について有意義な議論がなされた。

### (1) マウス GC2 精原細胞株表面に発現している分子の検索

山本雅一，中野匡，金子嘉志，伊藤克彦，藤田 潤（京都大学大学院医学研究科遺伝医学講座分子病診療学分野）

哺乳類雄性生殖細胞の分化は、体細胞分裂を行う精原細胞が精母細胞へと分化して減数分裂し、更にハプロイドの精子細胞が成熟精子へと形態変化をとげる複雑な過程である。この過程を解析する細胞株としては、Hofmann と Millan の樹立したマウス精原細胞株 GC1, GC2 が有名である。特に GC2 は 32 度培養条件下で減数分裂を起こしハプロイド細胞になると報告され注目を集めた。（もっとも、その後この細胞株は減数分裂を起こさなくなってしまう。）しかし、GC2 がマウスの未分化な精子形成細胞株であることには変わりがなく、増殖因子、分化因子に対するレセプターを発現している可能性があ

る。そこでわれわれは、GC2 細胞膜表面に発現している分子を同定するために GC2 細胞を入手して、32 で培養後、膜分画を免疫原として雌マウスを免疫し、多数の hybridoma を作製。これらの hybridoma の培養上清を用いて、マウス精巢および肝、腎、脳、脾の免疫組織染色やフローサイトメーターによる GC2 細胞の免疫染色などのスクリーニングを行い、12 個のモノクローナル抗体を得た。現在ヌードマウスを用いて大量に抗体を産生させている途中である。今後この大量抗体を用い expression cloning で GC2 精原細胞株膜表面に発現している分子を同定する予定である。

### (2) Ectoplasmic Specialization : 環境ホルモンおよび遺伝子ノックアウトからの新局面

外山芳郎（千葉大学医学部解剖学第二講座）

Ectoplasmic Specialization (以下 ES と略) は 1) セルトリ細胞が精子細胞の頭部を取り巻く部分、2) 隣り合うセルトリ細胞間、の 2カ所に存在する。2) にはさらに密着帯が存在し、これは ES と共に血液・精巢関門を形成する。ES の機能はまだ解っていない。エストラジオールを成熟雄マウスに投与したところ、ステップ 8 以降の精子細胞の先体、核に形態異常が見られた。この精子細胞の頭部を取り巻く ES は不完全な形態をしていたので、この部分の ES は精子頭部の形態を決めるのかもし

れない。隣り合うセルトリ細胞間の ES には異常は見られなかった。また、新生仔雄ラットおよびマウスにジエチルstilbestロールを投与したところ血液・精巢関門の形成がコントロールに比べて約 4 週間遅滞した。この間は精母細胞が減数分裂の環境を得られないために、精子が作られなかった。basigin 蛋白の遺伝子ノックアウトマウスでは造精細胞が減数分裂中期で死ぬために無精子症である。この場合、隣り合うセルトリ細胞間の ES は正常であったが、精子細胞を取り巻くべき ES には精

子細胞が存在しないために種々の異常（異所発生）が見られた。

このように種々の実験条件下で ES を調べることであり、その機能が解ることと思われる。

### (3) 内分泌攪乱物質曝露におけるマウス精巣での遺伝子発現への影響

足達哲也<sup>1,2</sup>，櫻井健一<sup>2</sup>，深田秀樹<sup>3</sup>，芝山孝子<sup>1,2</sup>，井口泰泉<sup>1,4</sup>，森 千里<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup> 科学技術振興事業団戦略的基礎研究推進事業 (CREST) 内分泌攪乱物質研究グループ

<sup>2</sup> 千葉大学医学部解剖学第一，<sup>3</sup> 深田生命科学研究所，

<sup>4</sup> 岡崎国立共同研究機構統合バイオサイエンスセンター生命環境)

【目的】今回我々は内分泌攪乱物質をマウス新生仔期に投与することによって、生殖能を有する時期において精巣で発現が変化する遺伝子を探索した。

【方法】1. 生後1日のICR雄性マウスに Diethylstilbestrol (DES)を 50 µg/mouse/day，Genistein (Gen)を 1 mg/mouse/day，または BisphenolA (BisA)を 0.2 mg/mouse/day を5日間皮下投与を行った。3か月後に精巣を摘出，RNA を調製し，DNA マイクロアレイ法にて対照群に対して発現に差のあるものを検索した。

2. 生後1日のICR雄性マウスに DES を 5 µg/mouse/day で5日間投与した。2か月後に精巣を摘出，RNA を調製し，cDNA サブトラクション法にて対照群に対して発現に差のあるものを検索した。

【結果】1. DNA マイクロアレイ法を用いた検討により、精巣において各化学物質投与によって発現に差が生じた遺伝子として、DES では 635 種、Gen では 388 種、BisA では 455 種が見い出された。2. cDNA サブトラクション法を用いた検討により、精巣で発現上昇を認めた遺伝子が 3 種得られた。

【結論】今回、内分泌攪乱物質曝露によって発現変化を引き起こす遺伝子を2通りの方法で検索した。DNA マイクロアレイ法を用いた検討では発現変化を引き起こす遺伝子を一挙に多数見出すことができた。また cDNA サブトラクション法を用いた検討では精巣において発現誘導される遺伝子の存在が認められた。

### (4) 先体反応前後に起こる精子頭部の膜表面構造の変化 マウス精子の原子間力顕微鏡による観察

高野広子 (北海道大学・大学院医学研究科・生体機能構造学講座・生体機能形態学分野)

授精機構の解明のために、成熟精子の頭部の表面構造の違いを調べ、さらに、これらがキャパシテーションや先体反応に伴ってどのように変化するかを調べた。キャパシテーションした精子はマウス精巣上体尾部の精子(成熟精子)の培養により得た。先体反応を起こした精子は尾部精子の単独培養あるいは透明帯つき卵細胞との共培養によって得た。精子は遠心洗浄してグルタルで固定し、ガラスに貼り付け、臨界点乾燥して原子間力顕微鏡に表面構造を描出させた。成熟精子の頭部は直径 100 nm 以下の粒子で覆われていた。粒子を、直径 20~30 nm の小粒子と直径 40 nm 以上の大粒子に分けると、先体帽には、小粒子が主として分布し大粒子が所々にのって

た。赤道部は、成熟精子では粒子が不明瞭で表面はほぼ平滑であったが、キャパシテーション精子では輪郭が明瞭な小粒子で覆われていた。先体反応後、赤道部の小粒子は前縁から次第に大粒子に置き換わった。一方、先体後部は、先体反応以前は大粒子によって覆われていたが、先体反応後は大粒子が次第に小粒子へと置き換わった。

以上、本研究によって得られた先体反応前後に起こる精子頭部の膜表面構造の変化を示す原子間力顕微鏡像は、キャパシテーションによって精子膜が不安定化することや先体反応が起こった精子だけが卵細胞膜と膜融合するというようなこれまでよく知られた現象にたいして形態学的基盤を与えるものと考えられる。

## (5) Aborted cytokinesis and the formation of syncytial spermatids in mice

G Manandhar<sup>1,2</sup>, K Toshimori<sup>2</sup> and G Schatten<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>ORPRC, <sup>2</sup>Miyazaki Medical College)

Some spermatocytes of mice fail to divide by cytokinesis. They develop sparse and dispersed midzone spindles which however, undergo normal compaction but localize asymmetrically towards one side of the cell cortex. Actin myosin fibers associate with the midzone spindles and midbodies in the normal cytokinetic cells as well as those cells which fail to develop cytokinetic furrow. Anticentrin antibody labels the putative centrioles while anti-g-tubulin labels the minus-

ends of the midzone spindles in the normal and abortive cytokinetic cells. These observations implicate that syncytial bi- and tetranuclear spermatids form during mouse spermatogenesis without major cytological anomaly. Such spermatids displayed apparently normal nuclear morphology, chromatin condensation, manchette microtubules, axoneme and acrosome development during the early stages of spermiogenesis. Some syncytial spermatids degenerate during the late stages.

## (6) 特別講演：生理的状态および病的状态の精巢間細胞

森 浩志 (大阪医科大学病理学教室)

精巢間細胞 (Leydig 細胞: L 細胞) が産生する男性ホルモンは胎生期の内外性器の分化, 脳の男性化, 二次性徴の発現・維持および精子発生に不可欠である。男性ホルモン産生能の動物種属差は L 細胞の数・サイズのみならず, 滑面小胞体やミトコンドリアの量とともに, それらに局在する酵素活性の違いによってもたらされる。

ヒト L 細胞に特徴的な Reinke 結晶は, 中間径フィラメントが蜂窩状構造をとる六角柱であるが, これに機能的意味はなく, 一種の老廃物質と思われる。出生後の L 細胞に細胞分裂像をみることはきわめて稀であるが, 高齢者でも青年期の約 1/3 の数の L 細胞が存在する。Ethanedimethane sulphionate はある種の動物の L 細胞を選択的にアポトー

シスに陥らせるが, 1 月後には L 細胞の数は回復する。この薬剤の反復投与実験から, L 細胞に幹細胞が存在することが示唆された。L 細胞には自然発生的な腫瘍の他, 実験的に精巢の脾内移植, あるいは女性ホルモン持続投与によって発生させることができる。前二者では luteinizing hormone が, 後者では女性ホルモンが誘発因子である。精巢間細胞腫では正常細胞とは異なったホルモン合成状態となり, また腫瘍誘発ホルモンに対するレセプターの変化が生じていること, 一旦発生した腫瘍では誘発ホルモンの持続作用の有無が形態学的な変化を生じさせることが示された。

## (7) 哺乳動物の受精における精子セリンプロテアーゼの役割

山縣一夫, 馬場 忠 (筑波大学応用生物化学系)

われわれは精子の卵透明帯通過の分子機構を理解すべく, 精子アクロソームに存在する各種プロテアーゼに主眼を置いて研究を行ってきた。そのうちの一つ, アクロシンはトリプシン様セリンプロテアーゼであり, これまで卵透明帯の限定分解に関与していると考えられてきた。しかし, その欠損マウスの解析から主たる生体内機能は

アクロソーム反応の際に各種アクロソームタンパク質の放出を促進することであった。さらに, アクロシンとは別にマウス精子アクロソームにはトリプシン様セリンプロテアーゼである 42 キロダルトンプロテアーゼが存在し, それが透明帯通過に関与する可能性が示唆された。これらアクロソームプロテアーゼについて各種げっ歯動

物間で比較したところ、マウスで見られた42キログルトンプロテアーゼに相当するものはラット、ハムスターでは検出されなかった。一方、ラットやハムスターと比較するとマウスアクロシンのゼラチン分解活性は極端に低下していることが明らかとなった。

そこで、その原因について検討を行ったところ、マウ

スアクロシン特異的に存在するCys143が酵素の基質特異性に影響を与え、その結果ゼラチン分解活性の低下を引き起こしていると考えられた。このことはアクロシン欠損マウスの結果は必ずしも他の動物種へは反映できないことを示唆している。

#### (8) 哺乳類初期胚の微細構造 - 高圧凍結置換固定法を用いて -

館 澄江 (東京女子医科大学医学部解剖学・発生生物学教室)

哺乳類初期胚の微細構造をできるだけ人工的な操作を加えず観察することを目的とし、妊娠第1日から4日までのマウス胚(受精卵, 2細胞期, 8細胞期, 胚盤胞期)を高圧凍結(BAL-TEC HPM 010, Balzers AG)により物理的に固定し、2%OsO<sub>4</sub>・アセトン溶液中で凍結置換固定後、樹脂包埋を行ない、超薄切片を作成して微細形態の観察を行なった。その結果、初期胚の細胞質中には、従来の化学的固定法であるOsO<sub>4</sub>溶液単独の浸漬固定ではその構造が存在せず、グルタルアルデヒド溶液で前固定後、OsO<sub>4</sub>溶液で後固定(二重固定)した場合にのみ観察される、特有の格子構造(または線維状構造)(Schlafke & Enders, 1967)が観察されることが解った。この構造が

グルタルアルデヒドによる化学的固定の産物ではないことが明らかである。高圧凍結置換固定法では、Muller & Moor(1984)は表層から200μm、また菅原(1997)は50-80μmまでは氷結晶のできない硝子様凍結(vitrification)が可能と報告しているが、哺乳類胚は約80μm径であるが胚子全体の硝子様凍結は不可能で、核と核小体、及び、割球と割球の隣接部近傍の細胞質に氷結晶が生じやすいこと、また、硝子様凍結が得られても細胞膜が細胞質から離脱しやすいこと、等の傾向がみられた。受精卵の場合は、周囲を厚い放射冠が囲むため、卵子は全て氷結晶が生じ良好な像は得られなかった。高圧凍結用試料キャリアの構造にも工夫が必要であると思われる。

#### (9) 生殖幹細胞の特質

蓬田健太郎 (大阪大学 微生物病研究所)

幹細胞の増殖と分化の制御機構を解析する上で、この生殖幹細胞系はいくつかの利点を有する。すなわち、1) 精細胞の分化段階の判別が組織学的に容易であること、2) さまざまな精細胞分化障害を示す変異マウスが利用可能であること、3) 精細胞移植法の確立により、幹細胞の特質の評価が可能となっていることなどである。さらに、我々はGFPで標識した精細胞を用いることにより、移植後の精細胞の動態を経時的に観察可能とすることに成功している。これにより、生殖幹細胞は、移植生着後、まず増殖してから分化することが示された。これは、幹細胞が非対称分裂をするのではなく、対称性分裂を行っ

ていることを示唆する。そこで、この増殖と分化の過程をさらに解析するために、c-kit/SCF(Stem cell factor)系の変異マウスを利用した。SCFの変異マウスでは、生殖細胞の分化に必須であるSCFに異常があるため、未分化精原細胞から分化できない。このため、ここに精細胞を移植することにより幹細胞の増殖のみを評価することが可能となる。この結果、生殖幹細胞の増殖は、c-kit/SCF系によらないことが明らかとなった。さらに、内在性に精原細胞が存在すると移植効率が低下することから、生殖幹細胞の生着維持にはその存在部位(stem cell niche)が必要であることが示唆された。

## (10) 特異的に発現する遺伝子から見た精巣生殖細胞の特徴

野崎正美 (大阪大学微生物病研究所)

減数分裂以後の精子形成細胞の特徴を分子レベルで明らかにするために、この時期に特異的に発現する遺伝子群のクローニングを行い、80 以上の特異的遺伝子を得た。そのうち、26%は既に報告されているもの、32%は既知遺伝子との相同性を持つ新規遺伝子、残りの42%は相同性を持たない新規遺伝子であった。コードする蛋白質構造からこれらの遺伝子はクロマチン構造、シグナル伝達、精子形態あるいは運動性などに関与することが予想された。この結果は、考えられていた以上に重要な機能を持つ遺伝子が減数分裂以後に新たに発現することを示す。他の遺伝子との比較からこれらは体細胞で発現する遺伝子に対する精巣型アイソフォームと、生殖

細胞特有の構造を持つ遺伝子に大別された。また、遺伝子構造の解析から、半数体精子細胞で特異的に発現する遺伝子の半数はイントロンをもたないレトロポゾンと考えられた。レトロポゾンはイントロンを持つ別の遺伝子 mRNA が逆転写酵素により cDNA となりゲノム上に挿入されて生まれる。通常プロモーターを持たないために発現せず、変異が蓄積して偽遺伝子となる。ところがまれに転写されることがあり機能的遺伝子となることもある。精巣生殖細胞でこのような遺伝子が多く発現することは機能的な必要性もさることながら、特別なプロモーター配列を持たないこれらの遺伝子を高頻度で発現させる特有の発現制御機構の存在を示唆している。

## (11) Molecular interaction leading to sperm-oocyte fusion: Role of acrin3 (MC101) and an equatorin (MN9).

Saxena DK, Oh-oka T and Toshimori K (Department Of Anatomy, Miyazaki Medical College)

The major events of sperm-oocyte fusion are mediated by multiple ligand-receptor interactions. We examined the role of two sperm molecules, acrin 3 (MC101) and an equatorin (MN9) in the processes of gamete fusion using pertinent monoclonal antibodies mMC101 and mMN9. Both antibodies did not affect sperm motility or sperm-zona binding but affected fertilization in vitro. mMC101 inhibited and also delayed fertilization of the zona-intact oocytes, but did not affect the dispersal of acrosomal content during zona induced acrosome reaction. In contrast, fertilization of the zona free oocytes was inhibited significantly when sperm completed acrosome reaction in the presence of

mMC101 inseminated the zona-free oocyte. These findings indicate that acrin 3 may be involved in the zona penetration and might play some role in modifying the sperm plasma membrane during acrosome reaction for the development of fusibility (Saxena et al., 2000). Another antibody mMN9 also inhibited fertilization of both the zona-intact and zona-free oocytes. Further the percentage of oocytes with presence of many supernumerary sperm in perivitelline space was higher in the presence of mMN9. These findings suggest involvement of equatorin in the sperm-oocyte fusion (Toshimori et al., 1998).

## 11. 心・血管系イオンチャネルの発生分化とその適応

2000年11月28日～11月29日

代表者：當瀬規嗣（札幌医科大学・医学部・生理学第一講座）

所内世話人：岡田泰伸（生理学研究所・機能協関部門）

- (1) ATP感受性KチャネルのG蛋白質サブユニットによる調節  
和田義之，山下俊一，國分眞一郎（日本大学医学部・先進医学研究センター）  
浅野富子（愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・生化学）  
三浦玲子，額田敏秀（東京都精神医学総合研究所・神経化学）  
萩原誠久，笠貫 宏（東京女子医科大学附属日本心臓血圧研究所・循環器内科）
- (2) ATP感受性カリウムチャネルの構造的理解について  
倉智嘉久（大阪大学大学院・医・情報薬理学）
- (3) マウス洞房結節ペースメーカー細胞の電流系  
鷹野 誠，野間昭典（京都大学大学院医学研究科・細胞機能制御学）
- (4) 1Eサブユニットを発現させたウサギ培養心室筋のCa電流  
立山充博，大地陸男（順天堂大学・医・第二生理）  
宗 淑琴，田邊 勉（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・医学部・高次機能薬理学）
- (5) 再生心筋細胞におけるイオンチャネルの発現  
富田雄一，小川 聡（慶應義塾大学医学部・呼吸循環器内科）  
福田恵一（慶應義塾大学医学部・心臓病先進治療学）
- (6) マウス胎生初期心室筋のIfチャネル  
安井健二，劉 蔚然，児玉逸雄（名古屋大学・環境医学研究所）
- (7) 発生初期の心臓における自発性活動電位：光学的測定法によるアプローチ  
酒井哲郎（東京医科歯科大学大学院・機能協関システム医学）
- (8) 胎生期ラット心筋の細胞内Ca<sup>2+</sup>動態  
関 純彦，山田陽一，筒浦理正，當瀬規嗣（札幌医科大学・医・生理学第一）
- (9) 胎仔動脈管に存在するイオンチャネル  
沈 菁，中西敏雄（東京女子医科大学附属日本心臓血圧研究所・循環器小児科）  
勝部康弘（日本医科大学小児科）
- (10) 5つのLQT2遺伝子変異の電気生理学的機能解析と変異チャネルの細胞内局在  
吉田秀忠，堀江 稔（京都大学大学院医学研究科・循環病態学）
- (11) マウス心筋のCa<sup>2+</sup>チャネルとCICR  
塩谷孝夫（佐賀医科大学・生理学講座）
- (12) 特発性心室細動（Brugada症候群）Naチャネル変異の機能異常  
蒔田直昌，白井信正，北畠 顕（北海道大学・医・循環器内科）  
赤井 潤，木村彰方，平岡昌和（東京医科歯科大学・難治研・循環器病）
- (13) 虚血心筋再灌流傷害に対するブラジキニンの予防作用  
李 玉龍，佐藤俊明，清未達人，小野克重（大分医科大学・生理学第二生理）
- (14) Ca<sup>2+</sup>スパークで活性化されるCl電流について  
今泉裕治，稲吉 温，村木克彦，渡辺 稔（名古屋市立大学薬学部・薬物治療学）
- (15) サイクリン依存性キナーゼによるクロライドチャネルの調節機構  
古川哲史，鄭 雅娟，稲垣暢也（秋田大学医学部第一生理）

小倉武彦 (千葉大学医学部薬理)

土屋博之, 片山芳文 (東京医科歯科大学難治疾患研究所自律生理)

## (16) 圧負荷肥大心筋におけるストレッチ活性化クロライドチャンネル及び過分極活性化陽イオンチャンネルの発現の変化

平松幹男, 沢登 徹, 平岡昌和 (東京医科歯科大学・難治研・循環器病)

古川哲史 (秋田大学医学部・生理学第一講座)

## (17) ラット脳における TRP4 パリアント

佐藤栄作, 尾野恭一, 飯島俊彦 (秋田大学・医・薬理学)

## (18) 甲状腺ホルモンによる心臓イオンチャンネルの修飾

阿部 晃, 馬 梅膏, 相澤義房 (新潟大学医学部第一内科)

## (19) 心筋症ハムスター心筋細胞の電気生理学的特性変化に対するエンドセリン受容体遮断薬長期投与の影響

松本泰典, 中谷晴昭 (千葉大医学部薬理学講座)

## (20) 活性酸素種による心筋 L 型 Ca チャンネル修飾に影響を与える各種因子

山岡 薫, 瀬山一正 (広島大学医学部生理学第一)

## 【参加者名】

當瀬規嗣 (札幌医大), 山田陽一 (札幌医大), 関 純彦 (札幌医大), 筒浦理正 (札幌医大), 丹羽統子 (名大・環境医研), 神谷香一郎 (名大・環境医研), 児玉逸雄 (名大・環境医研), 日比野壮功 (名大・環境医研), 安井健二 (名大・環境医研), 松木泰典 (千葉大・医), 中谷晴昭 (千葉大・医), 重信弘毅 (東邦大・薬), 田中 光 (東邦大・薬), 古川哲史 (秋田大・医), 小野恭一 (秋田大・医), 佐藤栄作 (秋田大・医), 塩谷孝夫 (佐賀医大), 蒔田直昌 (北大・医), 今泉裕治 (名市大・薬), 村木克彦 (名市大・薬), 李 玉龍 (大分医大), 倉智嘉久 (阪大・

医), 酒井哲郎 (東医歯大・医), 中西敏雄 (東女医大), 沈 菁 (東女医大), 萩原誠久 (東女医大), 鷹野 誠 (京大・医), 堀江 稔 (京大・医), 吉田秀忠 (京大・医), 野間昭典 (京大・医), 渡邊泰秀 (福島医大), 木村純子 (福島医大), 山岡 薫 (広島大学), 勝部康弘 (日大・医), 和田義之 (日大・医), 大地陸男 (順天大・医), 福田恵一 (慶応大・医), 富田雄一 (慶応大・医), 相澤義房 (新潟大・医), 阿部 晃 (新潟大・医), 森 泰生 (生理研), 高橋倫子 (生理研), 森島 繁 (生理研), 浦本裕美 (生理研), 岡田泰伸 (生理研)

## 【概要】

心臓・血管系のイオンチャンネルの発生分化とその適応に関する最新の知見について発表討論が行われた。まず、イオンチャンネルの分子構造に関する最新の研究として ATP 感受性 K チャンネルの構造活性連関やカルシウムチャンネル, ペースメーカー機構に関する研究が発表された。次に, これらの知見をふまえて発生期における心血管系のイオンチャンネル機能の変化について集中的な発表討論が行われ, 蛍光指示薬による画像解析やチャンネル蛋白の発現の分子生物学的アプローチの有効性が示され, 再生心筋細胞の誘導についての興味ある知見も示された。さらに, イオンチャンネルの遺伝子異常による遺伝病に関する研究が示され, この方面のさらなる進展が展望された。

また, 心筋虚血, 心肥大などの病態におけるイオンチャンネル機能の役割や, 病態によるイオンチャンネル機能の修飾に関する研究も示された。最後に, 従来あまり注目されてこなかった心血管系のクロライドチャンネルに関する知見が示され, クロライドチャンネル研究の今後の発展が予感された。全国から多くの基礎・臨床の研究者が集い, 活発な討論が展開された。結果として, 心血管系のイオンチャンネル研究における発生分化の重要性や, 病態などでのイオンチャンネル機能の適応の解析を分子構造や発生分化の知見をふまえて行うことの重要性が示された。心血管系のイオンチャンネル研究は新たな地平に立っている。

### (1) ATP 感受性 K チャネルの G 蛋白質 サブユニットによる調節

和田義之, 山下俊一, 國分眞一郎 (日本大学医学部・先進医学研究センター)  
浅野富子 (愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・生化学)  
三浦玲子, 額田敏秀 (東京都精神医学総合研究所・神経化学)  
萩原誠久, 笠貫 宏 (東京女子医科大学附属日本心臓血管研究所・循環器内科)

リポフェクトアミン法を用いて COS-7 細胞膜上に ATP 感受性カリウムチャンネルを再構成し, チャンネル電流を inside-out patch 法で測定した。G 蛋白質 サブユニット(G $\beta$ )は細胞内 ATP の Kir6.2/SUR2A チャンネルに対する抑制作用を減弱させた。この作用は SUR2A 存在時の高 ATP 感受性チャンネルにおいてのみ認められた。in vitro では G $\beta$  は SUR2A のヌクレオチド結合領域の近傍に結合した。SUR2A 第 656 アミノ酸の Arg を Ala に

置換した点変異チャンネルでは G $\beta$  の作用を認めなかった。Kir6.2/SUR1 チャンネルでも, SUR2A 第 656 アミノ酸に相当する SUR1 第 665 アミノ酸の Arg を Ala に置換すると G $\beta$  の作用が消失した。G $\beta$  は SUR へ直接作用し, 細胞内 ATP の ATP 感受性カリウムチャンネルに対する抑制作用に拮抗することにより活性調節に関与している。

### (2) ATP 感受性カリウムチャンネルの構造的理解について

倉智嘉久 (大阪大学大学院・医・情報薬理学)

K<sub>ATP</sub> チャンネルは SUR と Kir6.2 のヘテロ 8 量体から構成される想定されている。SUR には SUR1, SUR2A, SUR2B の 3 種類が同定されており, この SUR サブタイプ依存性に種々の KCO や阻害薬が異なった作用を示すことが知られている。

(1) 我々は古典的な KCO の pinacidil, DZX 以外に nicolandil, MCC-134 などの種々の SUR/Kir6.2 チャンネルに対する効果を検討し, SUR サブタイプ依存性に KCO がチャンネル活性の増大ばかりでなく抑制を起こすことがあることを見いだした。

(2) さらに nicolandil や DZX が SUR2B/Kir6.2 チャンネルの活性化を起こすが, SUR 2A/Kir6.2 チャンネルの活性化には細胞内に高濃度の ADP が存在する必要があることを明らかにした。これは SUR の NBD2 を介した ADP による K<sub>ATP</sub> チャンネルの活性化が SUR の C 末端 42 個のアミノ酸配列により調節されているからであることを明らかにした。

(3) SUR の NBD2 の homology model を作成し ADP による活性化の SUR42C による制御機構を構造的に理解する試みを行っている。

### (3) マウス洞房結節ペースメーカー細胞の電流系

鷹野 誠, 野間昭典 (京都大学大学院医学研究科・細胞機能制御学)

遺伝子改変動物は主としてマウスに限られており, マウスが分子生物学・生理学実験における標準動物となりつつある。しかしながらマウス心臓の電気生理学性質には不明な点が多い。そこで本研究では 8~10 週齢のマウスから洞房結節を切除し, コラゲナーゼ・プロテアーゼ・

エラスターゼ処理によりペースメーカー細胞を単離する技術を開発した。単離ペースメーカー細胞の自発活動電位の頻度は  $294 \pm 59/\text{min}$ , 最大拡張期電位は  $-61.4 \pm 8.7\text{mV}$ , オーバーシュートは  $18.8 \pm 8.1\text{mV}$  であった。膜電位固定実験では過分極誘発陽イオン電流, 内向き整流 K 電流,

E4031 感受性をもつ遅延整流性 K 電流, 一過性外向き電流がみられたが, 293B 感受性の外向き K 電流はほとんど記録できなかつた。このまた自動能を有する細胞での

ミニカルジピン感受性持続内向き電流 ( $I_{st}$ ) を記録することができた。

#### (4) 1E サブユニットを発現させたウサギ培養心室筋の Ca 電流

立山充博, 大地陸男 (順天堂大学・医・第二生理)

宗 淑琴, 田邊 勉 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・医学部・高次機能築理学)

Ca<sup>2+</sup>チャネル a サブユニットファミリーに属する a1E が心筋の T 型 Ca<sup>2+</sup>チャネルの主サブユニットであるか否かを, a1E, b2b, a2/d サブユニットを, T 型 Ca チャネルが存在せず, Ca<sup>2+</sup>チャネル機能発現の条件の備わっている培養ウサギ心室筋細胞に発現させて検討した。GFP をトランスフェクションのマーカーとした。GFP 単独発現は L 型 Ca<sup>2+</sup>電流を有意に減少した。a1E, b2b, a2/d の共

発現で全体の Ca<sup>2+</sup>電流が増大し, PN-200-110 (PN) は, この Ca<sup>2+</sup>電流を一部のみ抑制した。PN 存在下の Ca<sup>2+</sup>電流の活性化, 不活性化は T 型 Ca<sup>2+</sup>チャネルよりも脱分極側にあり, a1E の T 型電流への寄与は否定された。また, a1E 発現によって L 型 Ca<sup>2+</sup>電流の不活性化の時間経過が遅くなったが, これは b2b 共発現によって阻止された。

a1E と a1C が b2b を争奪することが示唆された。

#### (5) 再生心筋細胞におけるイオンチャネルの発現

富田雄一, 小川 聡 (慶應義塾大学医学部・呼吸循環器内科)

福田恵一 (慶應義塾大学医学部・心臓病先進治療学)

【目的】骨髄間葉系幹細胞由来の心筋芽細胞 (CMG 細胞) を分化誘導し, 心筋細胞に形質転換させた際のイオンチャネルの発現を解析しその機能的意義を明らかにする。【方法】CMG 細胞を 5-アザシチジンにより分化誘導し, 経時的に RNA を抽出する。In vivo 心筋を陽性対照とし, RT-PCR 法により  $I_{CaL}$ ,  $I_{K1}$ ,  $I_f$ ,  $I_{to}$ ,  $I_{kr}$ ,  $I_{ks}$ ,  $I_{K,ATP}$ ,  $I_{K,Ach}$  を構成するチャネルサブユニットの発現を観察した。分化誘導後 2 週より経時的に自己拍動する CMG 細胞の活動電位をガラス微小電極により記録した。【結果】 $I_{CaL}$  を構成する Ca<sub>v</sub>1C は分化誘導後 2 週より発現が観察された。 $I_{K1}$  を構成する IRK1 は分化誘導前より発現が一定で持続していた。IRK2 は 6 週で観察された。 $I_f$

を構成する HCN4 は 2 週で発現し, 4 週で発現が消失した。HCN1 は 6 週で発現が観察された。 $I_{to}$  を構成する Kv1.4 は 2 週, KV2.1 は 4 週, Kv4.2 は 6 週より発現が観察された。KV1.2, KV4.3 の発現は認められなかった。

$I_{kr}$  を構成する MERG の発現は分化誘導前より発現が持続していた。 $I_{ks}$  を構成する KVLQT1, KCNE1 は認められなかった。 $I_{K,Ach}$  を構成する GIRK1, GIRK4 の発現は見られなかった。 $I_{K,ATP}$  を構成する Kir6.1, SUR2A は分化誘導 4 週以後に観察された。分化誘導 2 - 3 週ではすべての細胞で洞結節型の活動電位が記録された。分化誘導 4 週以後一部の細胞で心室筋細胞型の活動電位が記録され, その比率は経時的に増加した。

#### (6) マウス胎生初期心室筋の $I_f$ チャネル

安井健二, 劉 蔚然, 児玉逸雄 (名古屋大学・環境医学研究所)

【目的】胎生初期マウス心室筋は自動能を示すが, その

イオン機序は不明である。我々は, 過分極活性化内向き

電流 (If) とそのイオンチャンネルをコードする HCN gene を検討した。【方法】胎生 9.5 ~ 18 日齢のマウスの培養心室筋からホールセルクランプ法にて膜電流を記録した。RT-PCR 法を用いて HCN mRNA の発現量を調べ、その type を同定した。【結果】胎生 9.5 日齢では大きな If (-130mV,  $7.9 \pm 1.2$  pA/pF) が記録できたが、その後発達に伴って If は減少し胎生 18 日齢では  $1.4 \pm 0.4$  pA/pF となった。胎生 9.5 日齢 If の 50% 最大活性化電位は -81mV,

Slope 係数は 8.9mV であり、18 日齢も同様であった。HCN mRNA 発現は、胎生 9.5 日齢で認められ、発達に伴い減少した。また胎生 9.5 日齢の If をコードする HCN gene は HCN4 がドミナントであり、HCN1 もわずかに発現していた。【総括】胎生初期マウス心室筋には大きな If が存在し自動能の発現に寄与し、HCN4 がドミナントな(少量の HCN1 発現を伴う)発現遺伝子である事が判明した。

## (7) 発生初期の心臓における自発性活動電位:光学的測定法によるアプローチ

酒井哲郎 (東京医科歯科大学大学院・機能協関システム医学)

膜電位感受性色素を用いた活動電位の光学的測定法を用いて、ニワトリおよびラット発生初期胚の自発興奮のイオン依存性を調べた。活動電位の形・大きさ・立ち上がり速度および自発興奮の頻度はテトロドトキシン投与中細胞外  $\text{Na}^+$  の除去で影響を受けないが、細胞外の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度には大きく影響を受ける。また、自発興奮は  $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$  などの重金属イオンや D-600 により抑制される。こ

のことから、発生初期胚の自発興奮は  $\text{Ca}^{2+}$  依存性の活動電位であり、またリズム形成にも細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  が深く関与していることが明らかとなった。すなわち、成体の心臓における “spike and plateau” 型活動電位は、個体発生の過程において、まず plateau 相の機構が機能して自発興奮を開始し、その後 spike 相の機構が加わり成立する。

## (8) 胎生期ラット心筋の細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 動態

関 純彦, 山田陽一, 筒浦理正, 當瀬規嗣 (札幌医科大学・医・生理学第一)

成熟した心筋では、電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルからの  $\text{Ca}^{2+}$  流入が即座に筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  放出チャンネルからの  $\text{Ca}^{2+}$  放出を誘発するため、急峻な  $\text{Ca}^{2+}$  トランジェントが観察される。また、この急峻な  $\text{Ca}^{2+}$  トランジェントの最小単位は、静止時に観察される  $\text{Ca}^{2+}$  スパークと考えられている。一方、胎生期心筋の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態についてはよく知られていない。そこで、我々は  $\text{Ca}^{2+}$  蛍光指示薬と共焦点レーザー顕微鏡を用いて検討した。

方法：胎生 12 日以降の各発達段階のラット心室筋を単離し、カルシウム蛍光指示薬 fluo-3 を負荷した。共焦点レーザー顕微鏡にて蛍光強度変化を観察した。また、膜感受性蛍光色素を負荷し、T 管の発達を観察した。

結果：ラット胎児心筋の  $\text{Ca}^{2+}$  トランジェントは、成体に比べて立ち上がりと消退が非常に遅いのが特徴であった。胎生 12 日の  $\text{Ca}^{2+}$  トランジェントは、タブシガルギンやリアノジンによる筋小胞体機能阻害によって抑制された。しかし、胎生期では  $\text{Ca}^{2+}$  スパークは観察されず、出生後数日で初めて膜直下に出現し、出生 10 日後以降にようやく細胞内でも観察された。この  $\text{Ca}^{2+}$  スパークの発達は、T 管の発達と一致していた。

結論：筋小胞体は胎生期にすでに機能しており、 $\text{Ca}^{2+}$  トランジェントの成因に大きく関与していることが示唆された。 $\text{Ca}^{2+}$  スパークの出現には T 管の発達が大きく関与していると考えられた。

## (9) 胎仔動脈管に存在するイオンチャンネル

沈 菁, 中西敏雄 (東京女子医科大学附属日本心臓血圧研究所・循環器小児科)

勝部康弘 (日本医科大学小児科)

肺動脈とは反対に, 動脈管は酸素で収縮する血管で, 胎生期にのみ開存している。妊娠満期のラットと家兎の胎仔から摘出した動脈管のリング標本は, 酸素, glibenclamide (Glyb), 4-aminopyridine(4-AP)で収縮し, 収縮に伴い細胞内 Ca 濃度は増加した。単離平滑筋細胞を用いた whole-cell patch clamp では, 酸素で増加する Ca 電流, 酸素や 4AP で減少する K 電流を認めた (Kv)。また, pinacilil で増加

し, Glyb で減少する ATP 感受性 K 電流 (KATP) も認められた。一方, 未熟な胎仔から摘出した動脈管は酸素や Glyb で収縮しなかったが, 4AP では収縮した。また単離細胞では Kv, KATP ともに認めたが, KATP は満期胎仔に比して有為に少なかった。動脈管には Ca, K チャンネルが存在し, 胎生期発達によって変化する。

## (10) 5 つの LQT2 遺伝子変異の電気生理学的機能解析と変異チャンネルの細胞内局在

吉田秀忠, 堀江 稔 (京都大学大学院医学研究科・循環病態学)

QT 延長症候群 (LQTS) において約 40% は HERG (LQT2) の変異であり, その病態の分子機序も解明されつつある。前々回 我々は HERG の pore 領域の変異 (N629K) を報告し, それは dominant negative 効果をきたすことを示した。今回, その細胞内局在について GFP を融合させた融合蛋白を用いて検討し, 新たに同定した 4 つの HERG の変異の電気生理学的特徴と細胞内局在について検討し

た。PCR-SSCP 法により先天性 LQTS において新たに Y611D, T613M, S641F の 3 つの HERG 変異を, また徐脈による 2 次性の LQTS において A490T の HERG 変異を同定した。その電気生理学的特徴は A490T は電流密度の減少がみられ, 他は単独の電流発現がみられなかった。また, 変異チャンネルに GFP を融合させ, 培養細胞に導入し共焦点走査顕微鏡にて, 形質膜までの発現を検討した。

(11) マウス心筋の Ca<sup>2+</sup>チャンネルと CICR

塩谷孝夫 (佐賀医科大学・生理学講座)

マウス心筋細胞の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> トランジェントを, それにより誘発される遅い内向き電流 (I<sub>si</sub>) をもちいて定量することを試みた。ホールセルクランプ下に膜電位固定したマウス心室筋細胞から I<sub>si</sub> を記象した。細胞に Use-dependent な Ca<sup>2+</sup>チャンネルブロッカーである D600 (1 μM) を投与して Ca<sup>2+</sup>チャンネルを抑制したところ, 細胞収縮の減弱と同時に, I<sub>si</sub> の振幅が減少した。I<sub>si</sub> の振幅は細胞収縮の大きさに強く依存し, したがって [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> トランジェ

ントの大きさを反映すると考えられた。細胞の Ca<sup>2+</sup>電流は Nifedipine (20 μM) の投与でほぼ完全にブロックできたが, この条件下でも I<sub>si</sub> は記録することができ, Ca<sup>2+</sup>チャンネルを抑制した状態でも [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> トランジェントが発生することが示された。この結果は, マウス心室筋細胞には, Nifedipine 感受性の Ca<sup>2+</sup>チャンネルの他にも CICR を誘発する細胞機構が存在することを示唆した。

## (12) 特発性心室細動 (Brugada 症候群) Na チャネル変異の機能異常

蒔田直昌, 白井信正, 北畠 顕 (北海道大学・医・循環器内科)  
赤井 潤, 木村彰方, 平岡昌和 (東京医科歯科大学・難治研・循環器病)

特発性心室細動のうち V1-3 の ST 上昇・右脚ブロックを特徴とする一群は Brugada 症候群とよばれる。Brugada 症候群の一部に心筋 Na チャネル サブユニット遺伝子 (SCN5A) 変異が同定された。【目的】心筋 Na チャネル病の病態を分子レベルで明らかにするために, Brugada 症候群変異 Na チャネル T1620M と, Brugada 様の ST 上昇が認められなかった特発性心室細動の変異 S1710L の Na チャネル機能異常を解析すること。【方法】正常心筋 Na チャネル(WT)または変異 Na チャネルプラスミドをヒト Na チャネル $\beta_1$  サブユニットとともに HEK にトランスフェクションし, whole-cell パッチクランプで全細胞 Na 電流を測定した。【結果】T1620M はほぼ WT とほぼ同様の電流 decay を示したが, 生理的に近い温度では slow

inactivation の亢進が認められて。S1710L は $\beta_1$  サブユニットの有無にかかわらず WT と比較して有意に速い電流 decay を示した。また活性化の膜電位依存性は WT よりも 18 mV 脱分極側に偏移し, 不活性化の膜電位依存性は逆に過分極側に 25 mV 偏移していた。さらに不活性化からの回復は WT より有意に遅延していた。【結論】Brugada 症候群 T1620M では slow inactivation の亢進が Na 電流を低下させ ST 上昇を引き起していると考えられた。一方 S1710L の機能変化も心筋 Na 電流を抑制する方向に働くと考えられるが, ST 上昇が認められなかった。S1710L では心臓の伝導障害が強く現れ, Brugada 症候群と PCCD の特徴を兼ね備えた特殊な Na チャネル異常である可能性が強い。

## (13) 虚血心筋再灌流傷害に対するブラジキニンの予防作用

李 玉龍, 佐藤俊明, 清未達人, 小野克重 (大分医科大学・生理学第二生理)

Ischemic preconditioning (IPC) は内因性虚血心筋防御機序であり多くの動物種で報告されている。しかし, そのメカニズムはまだ解明されていない。そこで, 我々はモルモット冠動脈灌流右室自由壁標本を用いて, IPC による心筋保護効果および bradykinin の虚血-再灌流に対する効果を検討した。Control 群では 20 分間の虚血後に 60 分間の再灌流すると, 再灌流 60 分後の収縮張力の回復は著しく低下した。1 $\mu$ M の bradykinin 群では再灌流後の収縮張力は著明に改善した。一方, B2 receptor antagonist である HOE 140, PKC inhibitor である chelerythrine,  $K_{ATP}$  channel blocker である glibenclamide 及び mito $K_{ATP}$  channel blocker である 5-HD を用いると, bradykinin の収縮張力改善作用は著明に抑制された。しかし, surface  $K_{ATP}$  channel

blocker である HMR 1098 の使用では, bradykinin の保護作用の抑制は見られなかった。一回の IPC だけでは再灌流早期の収縮張力は僅かに改善したが, 10 分以降の収縮張力は改善しなかった。低濃度 bradykinin (0.5 $\mu$ M) あるいは ACE inhibitor である enalapril 存在下では, 一回の IPC による収縮張力の改善作用が増強した。4 回の IPC では虚血再灌流による収縮機能障害に対する持続的な保護作用が認められた。しかし, HOE 140, chelerythrine 及び 5-HD の使用下では 4 回の IPC の心筋保護作用が著明に抑制された。以上の結果より, bradykinin または 4 回の IPC の心筋保護作用は B2 receptor を介する PKC の活性化が mitochondria の ATP 感受性  $K^+$  チャネル開口を促進したことによると考えられる。

(14)  $\text{Ca}^{2+}$ スパークで活性化される  $\text{Cl}^-$  電流について

今泉裕治, 稲吉 温, 村木克彦, 渡辺 稔 (名古屋市立大学薬学部・薬物治療学)

$\text{Ca}^{2+}$ スパークは筋小胞体と横行小管の接合部で生じる。横行小管系の発達が悪いウサギ心房筋細胞においては、 $\text{Ca}^{2+}$ スパークが細胞膜近傍で生じる確率が高い。ウサギ心房筋単一細胞に電位固定法と共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (ニコン RCM8000) による高速  $\text{Ca}^{2+}$ 画像解析法を適用し同時解析を行った。記録電極には Cs-aspartate 及び fluo-3 等を含む内液を充填した。保持電位 -50mV から -20mV 以上に脱分極させると  $\text{Ca}^{2+}$ スパークが細胞膜直下に多数生じ、さらに細胞内部へも  $\text{Ca}^{2+}$ wave として広が

り、興奮収縮連関が生じた。この時、 $\text{Ca}^{2+}$ 電流に続き一過性の  $\text{Ca}^{2+}$ 依存性  $\text{Cl}^-$  ( $\text{ClCa}$ ) チャネル電流が  $\text{Ca}^{2+}$ スパークと同期して活性化された。1つの  $\text{Ca}^{2+}$ スパークに対応した  $\text{Cl}^-$ 電流活性化は、 $\text{Cl}^-$ 平衡電位を 0mV に設定し -40mV において観測した場合にも記録できなかったが、 $\text{Ca}^{2+}$ wave となって細胞膜に沿って広がった場合には、対応した  $\text{Cl}^-$ 電流が観測された。 $\text{Ca}^{2+}$ スパークが  $\text{ClCa}$  チャネルを直接的に活性化している可能性が示された。

## (15) サイクリン依存性キナーゼによるクロライドチャンネルの調節機構

古川哲史, 鄭 雅娟, 稲垣暢也 (秋田大学医学部第一生理)

小倉武彦 (千葉大学医学部薬理)

土屋博之, 片山芳文 (東京医科歯科大学難治疾患研究所自律生理)

細胞周期はダイナミックな細胞容積変化を伴う生命現象であり、イオン電流変化が重要な役割を果たすと考えられる。容積調節性クロライドチャンネル  $\text{ClC-2}$  チャネルは M 期特異的キナーゼ  $\text{p34}^{\text{cdc2}}/\text{cyclin B}$  により直接リン酸化され、ツメガエル卵母細胞に発現させた  $\text{ClC-2}$  電流は

$\text{p34}^{\text{cdc2}}/\text{cyclin B} \cdot \text{protein phosphatase 1}$  により機能調節をうけた。M 期細胞周期エンジンによる  $\text{ClC-2}$  チャネル制御は M 期の急激な容積変化への適応機構であることが示唆される。

## (16) 圧負荷肥大心筋におけるストレッチ活性化クロライドチャンネル及び過分極活性化陽イオンチャンネルの発現の変化

平松幹男, 沢登 徹, 平岡昌和 (東京医科歯科大学・難治研・循環器病)

古川哲史 (秋田大学医学部・生理学第一講座)

【背景】肥大心で  $\text{Cl}^-$  電流及び過分極活性化陽イオン電流の増加が報告されている。その機序は明らかではないが、チャンネルの mRNA や蛋白の発現の増加が予想される。ラットの心臓のストレッチ活性化  $\text{Cl}^-$  チャネル及びその調節蛋白には  $\text{ClC-2}$ ,  $\text{ClC-3}$ ,  $\text{PICln}$  がある。過分極活性化陽イオンチャンネルは  $\text{HCN2}$  及び  $\text{HCN4}$  にコードされる。【目的】ラット肥大心での  $\text{ClC-3}$ ,  $\text{PICln}$ ,  $\text{HCN2}$ ,  $\text{HCN4}$  の mRNA の発現の変化を検討した。【方法・材料】心肥

大は雄性ラットの腹部大動脈を結紮し作成し、同時にシヤムを作成した。術後 8 週に心臓を摘出し湿重量を測定した。mRNA の発現量は競合的 RT-PCR 法にて測定した。【結果】肥大群の心体重比はシヤムの約 1.7 倍で有意差を認めた。肥大群で  $\text{ClC-3}$ ,  $\text{HCN2}$ ,  $\text{HCN4}$  の mRNA の有意な発現の増加を認めた。 $\text{PICln}$  の mRNA の発現には差を認めなかった。

### (17) ラット脳における TRP4 バリエント

佐藤栄作, 尾野恭一, 飯島俊彦 (秋田大学・医・薬理学)

容量性カルシウム流入 (CCE) 機構は, 非興奮性細胞に広く備わっており, 生理機能の制御に重要な役割を果たしている。TRP 蛋白ファミリーのひとつである TRP4 は, ラット, ウシ, マウスおよびヒトからクローニングされており, ラット (RTRP) やウシ TRP4 を発現させた細胞で CCE を示すことから, CCE チャネルの分子本体の有力な候補と考えられている。RTRP は, 膜貫通領域 S2-S3 をつなぐ細胞内領域に対応するアミノ酸が 23 個欠如しているが, この領域を含めて CCE に関与するアミノ酸領域は, 未だにわかっていない。そこで本実験では, この領域に関わる意味を検討するために RT-PCR 法

を用いてラット脳 cDNA から TRP4 遺伝子のクローニングを試みた。この過程で, RTRP とは異なる 5 つの TRP4 バリエント (a-e) が得られた。TRP4a は, アミノ酸レベルでマウス, ヒト TRP4 に対してそれぞれ 98.5%, 95.7% の相同性を示した。TRP4b は, 膜貫通領域 S2-S3 のリンカー部分を翻訳するヌクレオチドが 53-bp 欠如しており, フレームシフトにより機能的なチャネル蛋白を構成しない可能性が示唆された。また, GFP を N 末端に融合させた TRP4a は, 293 細胞を用いた発現実験において細胞膜に特異的な発現が確認された。他のバリエントについては発現の有無および機能については不明である。

### (18) 甲状腺ホルモンによる心臓イオンチャネルの修飾

阿部 晃, 馬 梅膏, 相澤義房 (新潟大学医学部第一内科)

【目的】甲状腺ホルモンが心臓の電位依存性イオンチャネルの遺伝子発現に影響するのか甲状腺機能亢進と抑制時のイオンチャネル発現を調べる。また心房筋と心室筋での変化を比較し, 甲状腺ホルモンと心房細動発生の関わりについて考察する。【方法】ラットをコントロール群, 甲状腺ホルモン投与群 (T3), Propylthiouracil (PTU) を投与する群の 3 群に分け, 4 週連日経口投与後心房筋と心室筋から RNA を抽出した。Kv1.2, Kv1.4, Kv1.5, Kv2.1, Kv4.2, KvLQT1, r-erg, minK, L-type Ca channel, Sodium channel をプローブとして RNase Protection Assay で mRNA を定量し比較検討した。【結果】心房筋と心室筋

では T3 投与で Kv1.2 は著減, Kv1.5 は増加した。PTU 投与では Kv1.2 と Kv1.4 は増加, Kv1.5 は著減したが, これらの変化は Shaker 関連電位依存性カリウムチャネル (Kv1.2, Kv1.4, Kv1.5) で認められた。心房筋では T3 投与で minK の発現が著増し, r-erg の発現は約 2 倍に増加したが, 心室筋では変化を認めなかった。【結語】甲状腺ホルモンは心臓で Shaker 関連の発現を調節していた。また r-erg と minK は心房筋でのみ有意に発現が増加した。これは活動電位幅を短縮し心房細動を発生し易くするものと思われた。

### (19) 心筋症ハムスター心筋細胞の電気生理学的特性変化に対する エンドセリン受容体遮断薬長期投与の影響

松本泰典, 中谷晴昭 (千葉大医学部薬理学講座)

心筋症ハムスター BIO14.6 における心室筋細胞の  $K^+$  電流変化に対する  $ET_A$  受容体拮抗薬長期投与の影響について検討した。BIO14.6 の心室筋細胞をパッチクランプ法によって膜電流, 活動電位, 膜容量を測定し, 正常ハ

ムスター F1 と比較した。また, 20 週齢から 40 週齢まで BIO14.6 に  $ET_A$  受容体拮抗薬である TA-0201 を長期投与し, その影響について検討した。

40 週齢の BIO14.6 では F1 に比し膜容量は増大し  $I_{to}$ ,

IK1 及び  $I_{Ca}$  が減少し活動電位幅は延長した。BIO14.6 に対する TA-0201 の長期投与は  $I_{to}$ ,  $I_{Ca}$  の減少を回復させ、活動電位幅の延長, 膜容量の増大を軽減させた。TA-0201 の長期投与は BIO14.6 の生存率を改善させた。

心筋症ハムスターにおいて  $ET_A$  受容体遮断薬の長期投与は電気的リモデリングを軽減させ、心不全の生命予後を改善する可能性が示唆された。

## (20) 活性酸素種による心筋 L 型 Ca チャネル修飾に影響を与える各種因子

山岡 薫, 瀬山一正 (広島大学医学部生理学第一)

我々は酸化作用を有する SH 基修飾試薬が L 型 Ca チャネル電流を増大することをカエル心筋細胞において既に報告した。それは細胞内から作用し, cAMP の増大を必要としない。今回, 同様に強力な酸化作用を有し, 生体で産生されうる活性酸素種の一つである過酸化水素の L 型 Ca チャネルに対する効果をみた。過酸化水素 (3mM) は投与時間を 3 分以内とすれば電流の増大作用のみを示した。5~10 分の投与で電流の抑制と, forskolin

刺激に対する反応の抑制がみられた。この抑制効果は Ba 電流ではみられなかった。過酸化水素の電流増大作用は perforation-patch 法を用い電流を記録すると増強した。また whole-cell patch 電極液内の Ca-buffer (BAPTA) を減少させても増加した。したがって過酸化水素の刺激作用, 抑制作用とも Ca 依存性の機構を介することが推察された。

## 12. 脳磁場ニューロイメージング

2000年11月29日～12月1日

代表・世話人：栗城真也（北海道大学電子科学研究所）

所内対応者：柿木隆介（統合生理研究施設）

(1) 聴覚刺激間隔における 1/fn ゆらぎのミスマッチフィールド (MMF) 形成に及ぼす影響

原田暢善<sup>2</sup>, 増田 正<sup>1,2</sup>, 遠藤博史<sup>1,2</sup>, 中村亨弥<sup>1</sup>, 武田常広<sup>3,2</sup>

(<sup>1</sup>通商産業省工業技術院 生命工学工業技術研究所, <sup>2</sup>科学技術振興事業団 戦略的基礎研究推進事業, <sup>3</sup>東京大学大学院 新領域創成科学研究科)

(2) 脳磁図の臨床応用の試み - 側頭葉病変と残存神経機能評価について -

鎌田恭輔<sup>1</sup>, 喬 梵<sup>1</sup>, 竹内文也<sup>2</sup>, 栗城真也<sup>2</sup>, 原田達夫<sup>1</sup>, 北川道生<sup>1</sup>, 宝金清博<sup>1</sup>・岩崎喜信<sup>1</sup>, 三森研自<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>北海道大学 医学部 脳神経外科, <sup>2</sup>北海道大学 電子科学研究所, <sup>3</sup>北海道脳神経外科記念病院)

(3) 指の一次体性感覚野の発達の变化に関する検討:

タッピング刺激を用いた体性感覚誘発脳磁野の乳児例と成人例の比較

権藤健二郎<sup>1</sup>, 飛松省三<sup>2</sup>, 吉良龍太郎<sup>1</sup>, 鳥巢浩幸<sup>1</sup>, 原 寿郎<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>九州大学大学院医学研究院小児科, <sup>2</sup>脳神経病研究施設臨床神経生理)

(4) 感覚応答を伴わないヒトの認識関連磁場応答の観察

吉田秀樹<sup>1,2</sup> and Claudia D. Tesche<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup>Low Temperature Laboratory, Helsinki University of Technology, <sup>2</sup>東和大学工学部電気工学科

<sup>3</sup>Department of Psychology, Logan Hall, University of New Mexico, USA)

(5) 持続部分てんかんの病態生理: 脳磁図による検討

(飛松省三<sup>1</sup>, 大石文芽<sup>2</sup>, 重藤寛史<sup>1,2</sup>, 谷脇考恭<sup>1</sup>, 森岡隆人<sup>3</sup>, 吉良潤一<sup>2</sup>

(九州大学大学院医学研究院脳神経病研究施設臨床神経生理<sup>1</sup>, 神経内科<sup>2</sup>, 脳外科<sup>3</sup>)

(6) ニオイ刺激によるヒトの脳磁図の周波数分析

白石君男, 毛利 毅, 加藤寿彦, 原田博文, 周防屋祐司, 力丸文秀, 柿木隆介

(福岡大学医学部耳鼻咽喉科学教室, 岡崎国立共同研究機構生理学研究所)

(7) 視覚領野における色彩情報処理特性の差異

芝崎俊幸<sup>1</sup>, 大谷芳夫<sup>2</sup>, 岡村昇一<sup>3</sup>, 吉田佳一<sup>3</sup>, 外山敬介<sup>4</sup>, 江島義道<sup>5</sup>

(<sup>1</sup>京都工芸繊維大学大学院 工芸科学研究科, <sup>2</sup>京都工芸繊維大学 工芸学部

<sup>3</sup>島津製作所, 基盤技術研究所, <sup>4</sup>島津製作所, <sup>5</sup>京都大学大学院 人間・環境学研究科)

(8) ウェーブレット変換を用いた MEG ノイズ除去法とその適用

小野弓絵<sup>1</sup>, 石山敦士<sup>1</sup>, 外池光雄<sup>2</sup>, 山口雅彦<sup>2</sup>, 葛西直子<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>早稲田大学, <sup>2</sup>電子技術総合研究所)

(9) 純音刺激における中・長潜時聴覚誘発反応 P50m・N100m 信号源の比較

菅野彰剛<sup>1,2</sup>, 中里信和<sup>1</sup>, 永松謙一<sup>3</sup>, 岩崎真樹<sup>3</sup>, 畑中啓作<sup>4</sup>, 村山伸<sup>2</sup>, 吉本高志<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>広南病院東北療護センター, <sup>2</sup>熊本大学大学院自然科学研究科

<sup>3</sup>東北大学・脳神経外科, <sup>4</sup>(株)エレクトラ)

(10) 単一電流双極子法によるてんかん焦点推定の有用性と問題点

大石 誠, 亀山茂樹 (国立療養所西新潟中央病院てんかんセンター 脳神経外科)

(11) てんかん棘波の dipole 推定結果に及ぼす要因についての検討

芳村勝城, 渡辺裕貴, 白石秀明\*, 八木和一

(国立療養所静岡東病院(てんかんセンター), \*北海道大学医学部小児科)

- (12) 被験者間平均波形計算のための頭部標準位置への変換 頭部位置ズレによる脳磁界計測誤差と  
頭部標準位置への変換による誤差  
今田俊明 (日本電信電話 (株) コミュニケーション科学基礎研究所)
- (13) 日本語の文章理解時における MEG 応答  
中島利崇, 砂盃尚子, 竹内文也, 栗城真也 (北海道大学電子科学研究所)
- (14) 脳磁場計測と機能的核磁気共鳴画像法による味覚関連皮質(2)  
小早川達<sup>1</sup>, 綾部早穂<sup>2</sup>, 山内康司<sup>1</sup>, 溝口千恵<sup>1</sup>, 斉藤幸子<sup>1</sup>, 小川 尚<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>生命工学工業技術研究所, <sup>2</sup>筑波大学心理学系, <sup>3</sup>熊本大学医学部)
- (15) GO/NOGO 反応選択課題実行中に認められた posterior parietal cortex の活動  
柴田 忠彦, Andreas A. Ioannides (理化学研究所 脳科学総合研究センター  
認知脳科学研究グループ 脳機能ダイナミクス研究チーム)
- (16) 刺激強度が異なる味刺激に対する味覚一次野の磁場応答  
斉藤幸子<sup>1</sup>, 小早川達<sup>1</sup>, 後藤なおみ<sup>1</sup>, 小川 尚<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>通産省工業技術院・生命工学工業技術研究所, <sup>2</sup>熊本大学・医学部)
- (17) Mesial temporal lobe epilepsy における MEG と EEG の比較検討  
(露口尚弘<sup>1</sup>, 森野道晴<sup>1</sup>, 服部英司<sup>2</sup>, 蔦田強司<sup>3</sup>, 下川原正博<sup>4</sup>, 原 充弘<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>大阪市立大学脳神経外科, <sup>2</sup>小児科, <sup>3</sup>老年科神経内科, <sup>4</sup>金沢工業大学先端電子技術応用研究所)
- (18) 脳内の離れた部位間での脳磁シグナル協調活動検出の試み 第 2 報  
河津省司<sup>1,2,6</sup>, 中村昭範<sup>1</sup>, 右代谷昇<sup>3</sup>, 濱崎淳洋<sup>4</sup>, 堀部賢太郎<sup>5</sup>, 山田孝子<sup>5</sup>, 加藤隆司<sup>1</sup>, 伊藤健吾<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>長寿医療研究センター 生体機能研究部, <sup>2</sup>名古屋大学医学部放射線科, <sup>3</sup>和歌山工業高等専門学校  
<sup>4</sup>京都学園大学 経済学部, <sup>5</sup>国立療養所中部病院 神経内科, <sup>6</sup>トヨタ記念病院 放射線科)
- (19) 先天性難聴を有する小児の聴覚誘発磁場  
久保田雅也<sup>1</sup>, 広瀬宏之<sup>1</sup>, 榊原洋一<sup>1</sup>, 湯本真人<sup>2</sup> (<sup>1</sup>東京大学小児科, <sup>2</sup>同検査部)
- (20) 嗅覚に対する非侵襲計測と脳内の嗅覚神経路  
外池光雄\*, 山口雅彦\*, 浜田隆史\*, 瀬尾 律\*\*, 嘉悦 勲\*\*\*, 肥塚 泉\*\*\*\*  
(\*電総研大阪 LERC, \*\*瀬尾耳鼻咽喉科院, \*\*\*近畿大理工学部, \*\*\*\*聖マリアンナ医科大学耳鼻咽喉科)
- (21) 脊髄誘発磁界測定の現状と将来展望  
小森博達, 川端茂徳, 大久保治修, 四宮謙一  
(東京医科歯科大学 医歯学総合研究科 脊椎脊髄神経外科学)
- (22) MEG による記憶想起の研究  
嘉悦 勲\*, 須谷康一\*, 内田熊男\*\*, 外池光雄\*\*\*, 山口雅彦\*\*\*, 岩木 直\*\*\*  
(\*近畿大学大学院総合理工学研究科 \*\*近畿大学理工学部原子炉工学科  
\*\*\*電子技術総合研究所 大阪ライフエレクトロニクス研究センター)
- (23) fMRI の結果から位置を固定して MEG ダイポールを解く方法の検討  
藤巻則夫, 早川友恵, Matthew Nielsen, 宮内 哲 (郵政省 通信総合研究所)
- (24) 骨導超音波知覚時の脳活動計測  
中川誠司\*, 阪口剛史\*\*, 西村忠己\*\*\*, 山口雅彦\*, 外池光雄\*, 細井裕司\*\*\*, 今泉 敏\*\*\*\*, 渡辺好章\*\*  
(\*電子技術総合研究所, \*\*同志社大学, \*\*\*奈良県立医科大学, \*\*\*\*東京大学)
- (25) 12 歳の絶対音感保持者の脳磁場計測  
広瀬宏之, 久保田雅也, 榊原洋一 (東京大学医学部小児科), 湯本真人  
(東京大学医学部附属病院検査部), 榊原彩子 (一音会ミュージックスクール講師)

- (26) 後頭葉てんかんにおける発作症状の検討 ~Magnetoencephalographic study~  
山田康一郎<sup>1,2</sup>, 白石秀明<sup>1</sup>, 渡辺裕貴<sup>1</sup>, 八木和一<sup>1</sup>, 滝川守国<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>国立療養所静岡東病院(てんかんセンター) <sup>2</sup>鹿児島大学医学部神経精神科)
- (27) 両眼立体視時の誘発脳磁場に対する注意の影響  
大脇崇史, 武田常広 (東京大学大学院 新領域創成科学研究科 複雑理工学専攻  
科学技術振興事業団 戦略的基礎研究推進事業)
- (28) 口唇部電気刺激誘発磁界の一次皮質反応  
永松謙一, 中里信和\*, 隈部俊宏, 畑中啓作\*\*, 菅野彰剛\*\*\*, 吉本高志  
(\*東北大学脳神経外科, 広南病院脳神経外科, \*\* (株)エレクトラ, \*\*\*広南病院療護センター)
- (29) 脳機能解析統合ソフト開発の試み  
中村昭範<sup>1</sup>, 河津省司<sup>1</sup>, 右代谷昇<sup>2</sup>, 濱崎淳洋<sup>3</sup>, 山田孝子<sup>4</sup>  
堀部賢太郎<sup>4</sup>, 文堂昌彦<sup>1</sup>, 加知輝彦<sup>4</sup>, 加藤隆司<sup>1</sup>, 伊藤健吾<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>長寿医療研究センター生体機能研究部, <sup>2</sup>和歌山工業高等専門学校  
<sup>3</sup>京都学園大学経済学部, <sup>4</sup>国立中部病院神経内科)
- (30) 持続性部分てんかんの症例における脳磁図所見  
出店正隆, 中村文裕 (北海道大学医学部精神医学教室)
- (31) MEG でとらえた発作間欠期突発波の鏡像焦点  
岩崎真樹, 中里信和, 菅野彰剛, 畑中啓作, 吉本高志  
(東北大学脳神経外科, 広南病院脳神経外科, 広南病院療護センター, エレクトラ)
- (32) 光刺激と脳磁図における光突発反応の位相差について  
白石秀明<sup>1</sup>, 芳村勝城<sup>2</sup>, 渡辺裕貴<sup>2</sup>, 八木和一<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>北海道大学医学部小児科, <sup>2</sup>国立療養所静岡東病院(てんかんセンター))
- (33) 体性感覚誘発オン・オフ磁場反応  
湯本真人<sup>1,2</sup>, 齋藤 治<sup>2</sup>, 金子 裕<sup>2</sup>, 中原一彦<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東京大学医学部附属病院, <sup>2</sup>国立精神・神経センター武蔵病院)
- (34) 視覚/聴覚オドボール課題に関連する脳内神経活動の可視化  
岩木 直\*, 平田直也\*\*\*, 外池光雄\*, 山口雅彦\*  
(\*電子技術総合研究所 大阪ライフエレクトロニクス研究センター, \*\*近畿大学 理工学部)
- (35) 全脳型脳磁計を用いたてんかん解析時の工夫  
橋詰 顕, 栗栖 薫, 有田和徳, 花谷亮典, 飯田幸治 (広島大学医学部脳神経外科)
- (36) 日本語ピッチアクセントと音韻認知に関する一検討  
林 良子\*\*\*, 今泉 敏\*, 上野照剛\*, 森 浩一\*\*  
(\*東京大学大学院医学系研究科, \*\*国立身体障害者リハビリテーションセンター研究所)
- (37) 聴覚マスキング条件下の発声関連脳磁場  
軍司敦子, 宝珠山稔, 柿木隆介  
(生理学研究所統合生理研究施設)
- (38) 睡眠中のフラッシュ視覚誘発脳磁場  
大草知裕, 柿木隆介, 宝珠山稔, 王 麗紅 (生理学研究所統合生理研究施設)
- (39) 正中神経刺激による短潜時皮質体性感覚誘発脳磁界成分と体性感覚誘発脳電位成分の対応  
<sup>1,2</sup>宝珠山稔, <sup>2</sup>柿木隆介  
(<sup>1</sup>名古屋大学医学部保健学科, <sup>2</sup>生理学研究所統合生理研究施設)

## (40) SAM 解析による速波発生源とてんかん源性領域との関連の検討

二宮宏智, 加藤天美, 平田雅之, 新居康夫, 久村英嗣, 平野俊一朗, 谷口理章  
今井克美\*, 吉峰俊樹 (大阪大学 脳神経外科, \*小児科)

## 【参加者名】

浅田 博 (大阪府立大学総合科学部自然環境科学科), 石山敦士 (早稲田大学理工学部 電気電子情報工学科), 今田俊明 (日本電信電話 (株) コミュニケーション科学基礎研究所), 岩木 直 (電子技術総合研究所 大阪ライフエレクトロニクス研究センター), 岩崎真樹 (東北大学脳神経外科), 上野照剛 (東京大学大学院医学系研究科生体物理医学専攻医用生体工学講座 生体情報学教室), 鶴飼 聡 (大阪大学大学院医学系研究科神経機能医学講座・精神医学), 江島義道 (京都大学大学院 人間・環境学研究科), 遠藤博史 (生命工学工業技術研究所), 大石誠 国立療養所西新潟中央病院てんかんセンター 脳神経外科), 大草知裕 (生理学研究所統合生理研究施設), 太田 徹 (秋田大学医学部附属病院 脳神経外科), 大谷芳夫 (京都工芸繊維大学 工芸学部心理学研究室), 大脇崇史 (東京大学大学院 新領域創成科学研究科 複雑理工学専攻 生体複雑学研究室(武田研究室)), 岡本洋輔 (神戸大学工学部 安藤研究室所属), 小川朝生 (大阪大学大学院医学系研究科神経機能医学講座・精神医学), 沖屋康一 (高知医科大学 脳神経外科), 小野弓絵 (早稲田大学理工学研究科 超電導応用(石山敦士)研究室), 嘉悦 勲 (近畿大学大学院総合理工学研究科), 金桶吉起 (生理学研究所統合生理研究施設), 鎌田恭輔 (北海道大学医学部脳神経外科), 川口俊介 (大阪大学大学院医学系研究科神経機能医学講座・精神医学), 河津省司 (長寿医療研究センター 生体機能研究部), 川村博文 (広島県立保健福祉大学保健福祉学部理学療法学科), 菅野彰剛 (広南病院東北療護センター - (熊本大学大学院自然科学研究科), 岸田邦治 (岐阜大学工学部応用情報学科), 北川道生 (医療法人社団 静和会 静和記念病院), 喬 梵 (北海道大学医学部 脳神経外科), 久保田雅也 (東京大学小児科), 栗城真也 (北海道大学電子科学研究所), 軍司敦子 (生理学研究所統合生理研究施設), 後藤 寛 (横河電機株式会社航機 MEG センター), 小早川 達 (生命工学工業技術研究所 人間情報部), 小森博達 (東京医科歯科大学 医歯学総合研究科 脊椎脊髄神経外科学), 近藤 亨 (有限会社サム) 権藤健二郎 (九州大学大学院医学研究院小児科), 斉藤幸子 (生命工学工業技術研究所 人間情報部), 芝崎俊幸 (京都工芸繊維大学大学院 工芸科学研究科),

忠彦 (理化学研究所 脳科学総合研究センター 認知脳科学研究グループ 脳機能ダイナミクス研究チーム), 下川原正博 (金沢工業大学先端電子技術応用研究所), 秋云海 (名古屋大学大学院医学研究科生物化学), 白石君男 (福岡大学医学部耳鼻咽喉科学教室), 白石秀明 (北海道大学医学部小児科) 鈴木まや (関西学院大学心理学研究室), 瀬尾 律 (電子技術総合研究所 大阪 L E R C), 添田喜治 (神戸大学大学院 自然科学研究科 地球環境科学専攻安藤研究室), 高田あゆみ (E L E K T A 株式会社), 高梨芳彰 (京都府立洛東病院 神経内科), 高島智則 (香川大学大学院教育学研究科), 竹内文也 (北海道大学電子科学研究所), 武原志帆 (大阪大学 人間科学部), 田中尚朗 (北海道大学医学部精神医学教室), 谷脇孝恭 (九州大学大学院医学研究院脳研臨床神経生理学), 田丸恒実 (信州大学医学部精神医学教室), 千葉和也 (E L E K T A 株式会社), 露口尚弘 (大阪市立大学脳神経外科), 出店正隆 (北海道大学医学部精神医学教室), 外池光雄 (電子技術総合研究所 大阪ライフエレクトロニクス研究センター), 飛松省三 (九州大学大学院医学研究院脳研臨床神経生理学), 中川誠司 (電子技術総合研究所大阪ライフエレクトロニクス研究センター), 中島利崇 (北海道大学電子科学研究所量子計測研究分野), 永松謙一 (東北大学脳神経外科), 中村昭範 (国立長寿医療研究センター 生体機能研究部), 新美 牧 (慶応大学病院 脳神経外科), 二宮宏智 (大阪大学医学部脳神経外科), 橋詰 顕 (広島大学脳神経外科), 畑中啓作 (E L E K T A 株式会社), 林秀彦 (北陸先端科学技術大学院大学), 林 良子 (東京大学大学院医学系研究科認知・言語医学講座), 原田暢善 (科学技術振興事業団生命工学工業技術研究所), 東山巨樹 (秋田大学医学部附属病院 脳神経外科), 広瀬宏之 (東京大学小児科), 深井英和 (岐阜大学工学部 応用情報学科), 藤井本晴 (高知医科大学 脳神経外科), 藤巻則夫 (通信総合研究所 知覚機構研究室 脳機能グループ), 宝珠山稔 (名古屋大学医学部保健学科), 堀部賢太郎 (国立療養所中部病院神経内科), 溝口千恵 (生命工学工業技術研究所 人間情報部), 森 浩一 (立身体障害者リハビリテーションセンター研究所), 八木和一 (国立療養所静岡東病院てんかんセンター), 柳田益造 (同志社大学工学

部 知識工学科), 山田康一郎(鹿兒島大学病院神経精神科), 山田孝子(国立療養所中部病院 神経内科), 山本千珠子(大阪大学大学院人間科学研究科行動生態学講座行動生理学研究分野), 山本雅清(大阪大学大学院医学系研究科神経機能医学講座・精神医学), 湯本真人(東京大

学医学部附属病院), 吉田秀樹(東和大学電気工学科医療電子教室), 芳村勝城(国立療養所静岡東病院てんかんセンター), 力丸文秀(福岡大学医学部耳鼻咽喉科学教室), 渡辺裕貴(国立療養所静岡東病院てんかんセンター)

## 【概要】

本研究会は, 平成12年11月29日(12時)~12月1日(13時)までの足かけ3日間にわたり岡崎コンファレンスセンターで開催された。世話人は筆者と, 統合生理研究施設の柿木隆介教授である。

この研究会の趣旨は, 現在30台以上の大型脳磁場計測装置が国内で稼働しているなかで, 病院を代表とする臨床研究と, 大学や研究所を中心とする基礎研究に携わる研究者が一同に会し, 十分な発表時間をもって自由にディスカッションしながら情報交換を行なうことを目的としている。

研究発表は「臨床応用」「体性感覚」「聴覚」「視覚」「味覚・嗅覚」「高次機能」「逆問題・信号解析」のセッションに分け, 計40演題の発表が行なわれた。さらに, 京都大学・人間・環境学研究所の江島義道教授による「視覚心理学的の立場から展望した脳イメージング装置による脳研究の将来」と, 東京大学・医学研究科の上野照剛教授による「磁気刺激および電氣的磁気共鳴イメージン

グでみる脳機能ダイナミクス」に関する特別講演2件があった。参加者の合計は90名である。

臨床応用では, てんかん応用が盛んであるが棘波とダイポール信号源の解析法について詳細な報告例が続いた。体性感覚では, 発達による指感覚野の変化の解析や脊髄誘発磁場の計測など新しい応用に関する発表が見られた。また, 聴覚や味覚・嗅覚, 視覚などの感覚系の計測では, 幅広い分野にわたって研究報告があった。絶対音感保持者の聴覚野の活動, 骨導超音波知覚, 発声に関連する磁場反応, 日本語のアクセントと音韻認知, fMRIを併用した味覚皮質活動の観察, 色彩情報処理, GO/NOGO活動磁場計測など, 特徴のある研究が数多く見られた。さらに, fMRIによるダイポール位置の限定, 複数信号源推定, 視聴覚高次機能の計測など, 解析法や計測法が着実に進展している様子が感じられた。

通常の学会では得られない突っ込んだ議論や詳細な実験・解析法の報告など, 貴重な内容の研究会であった。

## (1) 聴覚刺激間隔における $1/f_n$ ゆらぎのミスマッチフィールド (MMF) 形成に及ぼす影響

原田暢善<sup>2</sup>, 増田 正<sup>1,2</sup>, 遠藤博史<sup>1,2</sup>, 中村亨弥<sup>1</sup>, 武田常広<sup>3,2</sup>

(<sup>1</sup>通商産業省工業技術院 生命工学工業技術研究所

<sup>2</sup>科学技術振興事業団戦略的基礎研究推進事業, <sup>3</sup>東京大学大学院 新領域創成科学研究科)

ヒトが環境中の変動する刺激の中に存在する規則性を抽出する能力が, 脳内のどのような部位・機能に基盤を持つかについて明らかにしたいと考えた。ランダムに変動させた聴覚刺激間隔の中に規則性を増加させた時, すなわち, 刺激間隔のゆらぎを  $1/f_0$  ゆらぎ,  $1/f_1$  ゆらぎ,  $1/f_2$  ゆらぎ,  $1/f_\infty$  ゆらぎ(一定間隔), の4条件で与えたときに, 聴覚刺激により引き起こされるミスマッチフィールド(MMF)の形成がどのように変化するかについて検

討した。低頻度刺激条件と高頻度刺激条件の差分から得られる波形の振幅の二乗平均の値を, 各被験者, 各条件ごと計算し, ゆらぎのべき乗で比較したところ, ゆらぎのべき乗の増加とともに振幅の二乗平均の値が有意に増加することが明らかになった。このことから, ゆらぎのべき乗が変化すること, すなわち規則性が変化することが, MMFの形成に影響を与えることが明らかになった。

## (2) 脳磁図の臨床応用の試み - 側頭葉病変と残存神経機能評価について -

鎌田恭輔<sup>1</sup>, 喬 梵<sup>1</sup>, 竹内文也<sup>2</sup>, 栗城真也<sup>2</sup>, 原田達夫<sup>1</sup>, 北川道生<sup>1</sup>, 宝金清博<sup>1</sup>・岩崎喜信<sup>1</sup>, 三森 研<sup>3</sup>( <sup>1</sup>北海道大学 医学部 脳神経外科, <sup>2</sup>北海道大学 電子科学研究所, <sup>3</sup>北海道脳神経外科記念病院)

脳磁図は限局した脳皮質活動を解析することが可能であるため、左右側頭葉機能を分離して観察することが可能である。今回我々は側頭葉病変による脳の損傷程度と脳磁図による聴皮質機能の評価について検討したので報告する。対象は側頭葉後半部の脳梗塞患者 13 例である。1000 Hz 純音刺激による聴覚誘発脳磁界 (AEF) を通常より長い 2.5 sec の潜時まで計測した。同様の刺激による

機能 MRI もあわせて施行した。失語の重症例では AEF および fMRI による反応は全く認めなかった。広範な虚血病巣が出現しているにも関わらず、劇的な症状の改善を認めた 2 症例では、左上側頭領域に AEF 信号が局在していた。また、患側では長潜時の (1 sec 以上) の AEF 応答を認め、障害半球に特異的な病的反応と考えられた。

## (3) 指の一次体性感覚野の発達的变化に関する検討：

## タッピング刺激を用いた体性感覚誘発脳磁野の乳児例と成人例の比較

権藤健二郎<sup>1</sup>, 飛松省三<sup>2</sup>, 吉良龍太郎<sup>1</sup>, 鳥巢浩幸<sup>1</sup>, 原 寿郎<sup>1</sup>( <sup>1</sup>九州大学大学院医学研究院小児科, <sup>2</sup>同 脳神経病研究施設臨床神経生理)

乳児の体部位局在の発達的变化を検討した。対象は健康発達と判定された乳幼児 10 名 (6 - 8 生月) と健康なボランティア成人 5 名 (31 - 37 歳) である。成人も乳幼児と同様に抱水クロラール (30-50mg/kg) を用いて睡眠 II-III 段階に鎮静し母指と薬指の掌側を air-tapping 装置を用いて刺激し加算平均した。脳磁界の測定は 37 チャンネル脳磁計を用いた。SEP における N1 に相当する反応 (W1) に注目し、等価双極子電流源の三次元座標を母指、

薬指刺激それぞれにおいて算出し 2 点間の距離を求めた。乳幼児 10 例のうちノイズが少ない 5 例 (6 - 8 生月) と成人例 5 例を解析の対象とした。母指 - 薬指間距離は乳児群で平均  $3.9 \pm 0.85$  cm であるのに対し成人群では平均  $2.0 \pm 0.51$  cm と有意に距離が短かった ( $P < 0.01$ )。これは発達に伴って皮質の機能の局在化・特殊化が生じた可能性があると考えられた。

## (4) 感覚応答を伴わないヒトの認識関連磁場応答の観察

吉田秀樹<sup>1,2</sup> and Claudia D. Tesche<sup>1,3</sup> ( <sup>1</sup>Low Temperature Laboratory, Helsinki University of Technology, FINLAND, <sup>2</sup>東和大学工学部電気工学科, <sup>3</sup>Department of Psychology, Logan Hall, University of New Mexico, USA)

例えば聴性情報処理は、呈示音の特徴抽出処理 (感覚応答) と、高次の認識関連処理に大別される。両情報処理過程は、殆ど同時に処理が実現されると共に、空間的にも一部重なり合っていることが指摘される。多チャンネル化した脳磁計が、単一ダイポールでは説明の難しい、複雑で緻密な磁場空間分布情報を提供する可能性は予想

に難く無い。我々の試みは、心理実験的手法により認識処理を感覚応答から分離し観察することにあつた。着目した部位は、音響識別に関わりが深いとされる右側の側頭葉上面であり、静寂時であっても磁場応答が観察された。

### (5) 持続部分てんかんの病態生理: 脳磁図による検討

飛松省三<sup>1</sup>, 大石文芽<sup>2</sup>, 重藤寛史<sup>1,2</sup>, 谷脇考恭<sup>1</sup>, 森岡隆人<sup>3</sup>, 吉良潤一<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>九州大学大学院医学研究院脳神経病研究施設 臨床神経生理, <sup>2</sup>神経内科, <sup>3</sup>脳外科)

持続部分てんかん (EPC) はてんかん焦点が 1 次運動野にあるとされる稀な疾患である。私共は EPC の病態生理を脳波, 脳磁図 (MEG), jerk-locked back averaging (JBA) 法で検討した。症例 1 は 69 歳, 男。右上肢のけいれんが持続し, 脳波では C3 を中心とする棘波を認めた。棘波の dipole は左運動野から前運動野にある皮質異形成の周辺に散在した。MEG の JBA により筋放電に関連した棘波の dipole を推定すると術中皮質脳波で認めた棘波の焦点とほぼ一致した。症例 2 は 32 歳, 女。右下肢の

律動性けいれんを認めた。脳波は正常であったが, 脳波の JBA により筋放電に先行する棘波を認めた。C2 付近に陰性棘波, C1 付近に陽性棘波があり, 接線方向の dipole の存在が疑われた。MEG の JBA により左下肢運動野に限局する接線方向の dipole が推定され, 脳波所見と一致した。MEG は EPC の棘波の電流源推定に優れているが, JBA 法を行うことによりさらにその精度が向上し, 病態の解明に有用となる。

### (6) ニオイ刺激によるヒトの脳磁図の周波数分析

白石君男, 毛利 毅, 加藤寿彦, 原田博文, 周防屋祐司, 力丸文秀 (福岡大学医学部耳鼻咽喉科学教室)

柿木隆介 (岡崎国立共同研究機構生理学研究所)

ヒトにニオイ刺激と無臭刺激を与えたときの脳磁図を記録し, それらの信号を高速フーリエ変換によって解析して, ヒトの脳活動がどのように変動するかを検討した。対象は右利きの嗅覚正常者 9 例とした。方法はテフロンチューブを右鼻腔に約 1cm 挿入し吸気時に刺激を提示した。臭素にはアミルアセテートを用い, 無臭刺激は窒素ガスを用いた。刺激圧力は 0.05mPa, 刺激時間 1 秒とし, 無臭刺激とニオイ刺激はそれぞれ 50% の頻度でラ

ンダムに, 3~5 呼吸に 1 回の割合で 30 回ずつ与えた。チャンネル毎に刺激開始後 3.93 秒間の脳磁図を解析し, 波, 1 波, 2 波, 波および 1Hz 毎のスペクトル密度をチャンネル別に算出した。その結果, 周波数によって無刺激と無臭刺激, 無刺激とニオイ刺激などの検討で, 反応の様相が異なっていた。これらの変動は, ニオイの認知や, 覚醒レベルの上昇, 注意力の集中, 体性感覚などが関与していると考えられた。

### (7) 視覚領野における色彩情報処理特性の差異

芝崎俊幸<sup>1</sup>, 大谷芳夫<sup>2</sup>, 岡村昇一<sup>3</sup>, 吉田佳一<sup>3</sup>, 外山敬介<sup>4</sup>, 江島義道<sup>5</sup>

(<sup>1</sup>京都工芸繊維大学大学院 工芸科学研究科, <sup>2</sup>京都工芸繊維大学 工芸学部  
<sup>3</sup>島津製作所 基盤技術研究所, <sup>4</sup>島津製作所, <sup>5</sup>京都大学大学院 人間・環境学研究所)

ヒトの脳視覚領野における色彩情報処理過程を明らかにするために, 等輝度赤 - 緑正弦波刺激に対する脳磁応答を, 刺激の色コントラスト, 提示時間, 空間周波数の関数として測定した。その結果, 潜時 100-140ms の初期応答と 140-200ms の後期応答が得られた。初期・後期成分について単一電流源推定法によって得られた電流源は

異なっており, 前者は第一次視覚野近傍に, 後者はその前頭腹側寄りに推定された。各応答の大きさおよび潜時は異なる刺激依存性を示し, 初期応答は後期応答に比べ, 応答の大きさに関して, コントラスト依存性が大きく, 時間加算効率が高く, 空間周波数選択性が強いことが明らかとなった。また潜時に関しては, 初期応答のコント

ラスト・提示時間・周波数依存性がいずれも後期応答よりも小さいことが示された。以上の結果は、各応答に関

与する視覚領野における色彩情報処理特性の差異を示すものである。

### (8) ウェーブレット変換を用いた MEG ノイズ除去法とその適用

小野弓絵<sup>1</sup>, 石山敦士<sup>1</sup>, 外池光雄<sup>2</sup>, 山口雅彦<sup>2</sup>, 葛西直子<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>早稲田大学, <sup>2</sup>電子技術総合研究所)

昨今, MEG 計測は脳のより高次の機能に応用されようとしている。このような高次機能に対する誘発脳磁界反応は, その大きさも一次応答などと比べると小さいために, 高い S/N での測定が難しい。また, 少ない加算平均回数で MEG 測定を行うことは, 被験者の頭の動きの影響を小さくすることができ推定精度の向上につながる。これらの理由から, MEG データの S/N を改善する目的で, ウェーブレット変換を用いた時間-周波数解析による

ノイズ除去法を開発した。従来のフーリエ解析と比べ, ウェーブレット解析は周波数情報と共に時間情報が得られるため, 時間軸に対して局所的な MEG 信号成分を抽出する手段として有利である。本ノイズ除去法を様々な S/N で測定された聴覚 MEG に適用してその有用性を検証し, さらに被験者の慣れの影響が大きくノイズを多く含んでしまう嗅覚 MEG に対してもこれを適用して精度の高い信号源推定をめざした。

### (9) 純音刺激における中・長潜時聴覚誘発反応 P50m・N100m 信号源の比較

菅野彰剛<sup>1,2</sup>, 中里信和<sup>1</sup>, 永松謙一<sup>3</sup>, 岩崎真樹<sup>3</sup>, 畑中啓作<sup>4</sup>, 村山 伸<sup>2</sup>, 吉本高志<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>広南病院東北療護センター, <sup>2</sup>熊本大学大学院自然科学研究科, <sup>3</sup>東北大学 脳神経外科, <sup>4</sup>(株)エレクト)

聴覚誘発反応における中・長潜時成分の信号源に差があるか否かは明確には示されていなかった。われわれはヘルメット型脳磁計を用い, 健常人 24 名を対象に, 純音刺激聴覚誘発磁界を計測した。P50m および N100m の頂点潜時の信号源を電流双極子モデルにより推定した。信号源はいずれも側頭葉上面に推定され, 前後, 左右, 上下の各軸方向すべてにおいて, 有意な位置の差を認め

なかった。従来は, 聴覚皮質の前後軸方向での信号源の差が議論されていたが, 本研究では, 両者の明らかな差を認めなかった。P50m, N100m の信号源には, ともにある程度の拡がりを考慮しなければならず, 両者の起源は同一か, あるいは多くを共有している可能性が示唆された。

### (10) 単一電流双極子法によるてんかん焦点推定の有用性と問題点

大石 誠, 亀山茂樹 (国立療養所西新潟中央病院てんかんセンター 脳神経外科)

MEG による非侵襲的なてんかん焦点の推定が期待されているが, まだ問題点も多い。当院の難治性てんかんに対する外科治療では, 慢性硬膜下記録により同定された焦点に対し, できる限り限局した切除を行って来た。2000 年 4 月の MEG 測定開始後 8 例の難治性てんかん症例 (新皮質焦点 7 例, 内側側頭葉てんかん 1 例) に手術

が施行された。これらの MEG 推定焦点と硬膜下記録・手術関連所見を合わせ, MEG の有用性と問題点を検討した。MEG 測定は Neuromag 204 で行い, 発作間欠時棘波の単一電流双極子により焦点推定した。6 例で MEG 推定焦点と硬膜下記録, 手術関連所見は一致した。前頭葉底部・大脳間裂内の焦点 (SMA) 例は MEG の弱点と

思われた。解析上は back ground と filter 処理が問題となり、GOF 値や dipole moment の評価も重要であった。手

術症例を通して MEG による推定焦点の信頼性を確認したが、解析においては一定の基準を作成すべき点多い。

### (11) てんかん棘波の dipole 推定結果に及ぼす要因についての検討

芳村勝城, 渡辺裕貴, 白石秀明\*, 八木和一

(国立療養所静岡東病院(てんかんセンター), 北海道大学医学部小児科\*)

てんかん患者では、大脳の背景活動の乱れが大きく、てんかん棘波の dipole 解析はその影響を強く受ける。このため、背景活動をどのようにして除去するかが dipole 推定の結果の良し悪しを決めるもっとも重要な要因である。MEG を設置した病院が増えてきたことから、MEG によるてんかん焦点の推定もこれからより多くの施設で行われるようになるであろう。そこで、背景活動の除去、または背景活動と棘波との分離の問題は、われわれの施設のみでなく、全施設での共通の問題として、今後、重要になると考えられる。そこで、今回、われわれは、てんかん棘波の dipole 推定を行う前の適切な前処理法について考察してみた。まず、加算平均法について、側頭葉てんかん患者の海馬内電極から記録した棘波と、側頭部の MEG 棘波についてそれぞれを基準として加算をおこない、改善するかを調べた。その結果、海馬棘波を基準にして得られた MEG 加算波形の dipole 推定結果は良好であるが、頭蓋外の MEG を基準にして加算を行うと、

海馬棘波はつぶれてしまい、推定結果も海馬外となった。二番目に帯域通過フィルターによる背景活動の除去について検討した。その結果、1-100Hz 通過では、波形のゆがみは極めて少ないが、dipole の推定結果は患者により差があり、明らかに徐波の混入が多い患者では dipole のばらつきが大きくなってしまったことがあった。4-100Hz 通過ではやや波形のゆがみがみられるが、概して dipole の推定結果は臨床所見と符合する良好な結果が得られた。ただし、義歯や体動による巨大なアーチファクトが重畳する特殊な場合では dipole はばらばらになり結果はよくなかった。さらに 15-100Hz 通過では、波形はゆがみが大きく棘波も低振幅となってしまったことが顕著であった。最後のフィルターは、大きなアーチファクトに対して、dipole 分布のばらつきは小さくなったものの、一般にモーメントがかなり小さくなり、位置も頭皮下の浅い位置に推定され、臨床的な利用に耐えないと思われた。

### (12) 被験者間平均波形計算のための頭部標準位置への変換 頭部位置ズレによる脳磁界計測誤差と頭部標準位置への変換による誤差

今田俊明 (日本電信電話(株)コミュニケーション科学基礎研究所)

脳磁界計測の各セッションにおける被験者の頭部(脳)と磁界センサとの位置 関係が一定であることは少なく、頭部座標系自体に数 mm, 数度の違いが生じる。まず、これまでの Neuromag-122 を用いた実験から、33 名の被験者の頭部の平均位置  $r$ , 標準偏差  $\sigma$  を求める。頭部が平均位置から  $1\sigma$ ,  $2\sigma$  ずれた時の計測磁界を平均位置の時と比較すると、goodness-of-fit が 75-96%となり、かなり誤差が生じることが分かる。一方、頭部が平均位置

から  $1\sigma$ ,  $2\sigma$  ずれた時の計測磁界を、頭部が平均位置にあるとした時の磁界値に変換した場合、その goodness-of-fit は 99-100%となり、平均位置への変換が効果があることが分かる。この変換を用いて、全被験者の頭部位置を標準位置にすることにより、被験者間の Grand Mean 波形を計算でき、被験者間に渡る全体的な傾向を波形上で比較することがある程度可能となる。

## (13) 日本語の文章理解時における MEG 応答

中島利崇, 砂孟尚子, 竹内文也, 栗城眞也 (北海道大学電子科学研究所)

日本語は、文章の述語のみを変える事によって、文法や意味の整合性を操作できる性質を持つ言語である。文章の文法理解、意味理解時の脳活動の差異を、204ch 全頭型磁束計を用いて観察した。刺激には、この日本語の性質を用い、同一の文章で述語(動詞)のみを替えて、3種類の文章(文法も意味も正しい200文、文法が間違っている100文、意味が間違っている100文)を作成した。

被験者は右利きの健常者で、与えられた刺激の文章が正しいかどうかを判断した。各文章に対して測定した MEG 反応を、種類別に加算平均した。意味が間違っている文章に対し、潜時 380~470ms において特徴的な活動が観察され、N400 の成分と推測された。一方、文法が間違っている文章に対する脳活動には、特徴的な活動が観察されなかった。

## (14) 脳磁場計測と機能的核磁気共鳴画像法による味覚関連皮質(2)

小早川達<sup>1</sup>, 綾部早穂<sup>2</sup>, 山内康司<sup>1</sup>, 溝口千恵<sup>1</sup>, 斉藤幸子<sup>1</sup>, 小川 尚<sup>3</sup>( <sup>1</sup> 生命工学工業技術研究所, <sup>2</sup> 筑波大学心理学系, <sup>3</sup> 熊本大学医学部)

前回の発表においては、順応をさせずに数十秒の味刺激を与え続ける刺激法を開発し、fMRI を用いた味刺激による脳血流の変化の計測を行い、その実験の報告を行った。今回は被験者数を 12 人に増やし、SPM (statistical parametric mapping) を用いて解析を行った。この結果、島皮質、前頭弁蓋部、中心後回、角回、中前頭回などに活動が見られ、従来の MEG の短潜時、長潜時において推定された結果とよく一致していた。脳血流の変化が見られた部位の中で、従来の脳磁計を用いた味覚実験で短

潜時に推定される Area G (頭頂弁蓋部と島皮質の移行部) の活動が観測される頻度は全体の約 20% であった。また、この部位は 1 回の実験で得られる画像データを用いて統計処理を行った場合より、3 回の実験で得られる画像データを用いた場合に、より高い頻度で活動を見ることができた。この実験結果は Area G が他の味覚関連部位と比較した場合、その MR 信号の S/N 比が低いことを示唆していると思われる。

## (15) GO/NOGO 反応選択課題実行中に認められた posterior parietal cortex の活動

柴田忠彦, Andreas A. Ioannides (理化学研究所 脳科学総合研究センター  
認知脳科学研究グループ 脳機能ダイナミクス研究チーム)

近年 posterior parietal cortex (PPC) が高次運動関連中枢のひとつであり、特に空間情報処理との関連が動物実験等から示唆されているが、ヒトでの報告は少ない。空間選択と PPC の関連を調べるために、視覚刺激を用い GO 条件時の反応指を左右から選択する GO/NOGO 反応選択課題実行中の脳磁図を記録し (6 被験者), Minimum Norm Least squares 法 (CURRY4) を用いて解析を行っ

た。その結果、central sulcus 周辺の信号源に加えて、両側の superior parietal lobule (SPL) 付近に信号源が推定され、その強度は同側指の運動反応時よりも対側指の運動反応時に大きな活動を示し、両側指の運動時には両側 SPL が大きな活動を示した。これより、ヒトにおいて PPC が視空間選択課題における空間選択に関与していることが示唆された。

### (16) 刺激強度が異なる味刺激に対する味覚一次野の磁場応答

斉藤幸子<sup>1</sup>, 小早川達<sup>1</sup>, 後藤なおみ<sup>1</sup>, 小川 尚<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>通産省工業技術院 生命工学工業技術研究所, <sup>2</sup>熊本大学 医学部)

筆者らは脳磁場計測によって、人間の第一次味覚野が  
大脳の頭頂弁蓋部の内側と島への移行部 (Area G) であ  
ることを報告した。今回は刺激強度が異なる味刺激によ  
る Area G の活動の違いを調べた。ここでいう刺激強度は、  
物理的濃度と心理的強度を含むものとする。被験者 8 人  
を対象に、0.1, 0.3, 1 M NaCl に対する味覚誘発磁場を  
高速味覚刺激装置と 64ch ホールヘッド脳磁場計を用い  
て計測した。0.03M NaCl についてもこのうち 6 人が参加

した。データ解析の結果、Area G が確認された実験にお  
いて、刺激開始から味覚誘発磁場が生じ始めるまでの潜  
時は濃度によって変わるとはいえなかった。一方 Area G  
に推定されたダイポールの大きさは物理的濃度と有意な  
相関を持ち、濃度と共に増大する傾向を示した。もう一  
つの刺激強度である心理的強度と、物理的濃度およびダ  
イポールの大きさの関係についても検討した。

### (17) Mesial temporal lobe epilepsy における MEG と EEG の比較検討

露口尚弘<sup>1</sup>, 森野道晴<sup>1</sup>, 服部英司<sup>2</sup>, 蔦田強司<sup>3</sup>, 下川原正博<sup>4</sup>, 原 充弘<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>大阪市立大学脳神経外科, <sup>2</sup>小児科, <sup>3</sup>老年科神経内科, <sup>4</sup>金沢工業大学先端電子技術応用研究所)

MEG では内側側頭葉てんかん Mesial temporal lobe  
epilepsy (MTLE) における焦点の同定は困難とする意見  
がある。今回我々は臨床症状、持続脳波モニタリング、  
MR にて MTLE と診断した 7 例にたいし発作間歇期での  
MEG, EEG にててんかん焦点の評価を行った。装置は  
160ch 仰臥位全頭型脳磁計(横河電機)を用い、同時に 12ch  
の脳波と心電図を記録した。脳磁はバンドパスフィルタ  
-3-200Hz, サンプリング周波数 500Hz で測定した。7  
例のうち 5 例で MR の所見と一致して内側側頭葉に焦点

を認めたと、内側だけでなく同側側頭葉全体にも焦点が  
もどまった。また内側側頭葉由来のてんかん波は MEG  
のみに認め EEG では検出できない場合が多かった。逆  
に EEG におけるてんかん波で MEG により ECD を求め  
ると側頭葉内側には同定できない傾向にあった。側頭葉  
内側は脳表から深い位置にあるため頭皮脳波では検出困  
難なことが考えられる。またてんかん波自体の出力が小  
さいと MEG でも検出できない可能性がある。

### (18) 脳内の離れた部位間での脳磁シグナル協調活動検出の試み 第 2 報

河津省司<sup>1,2,6</sup>, 中村昭範<sup>1</sup>, 右代谷昇<sup>3</sup>, 濱崎淳洋<sup>4</sup>, 堀部賢太郎<sup>5</sup>, 山田孝子<sup>5</sup>, 加藤隆司<sup>1</sup>, 伊藤健吾<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>長寿医療研究センター 生体機能研究部, <sup>2</sup>名古屋大学医学部放射線科, <sup>3</sup>和歌山工業高等専門学校

<sup>4</sup>京都学園大学 経済学部, <sup>5</sup>国立療養所中部病院 神経内科, <sup>6</sup>トヨタ記念病院 放射線科)

我々は脳内の離れた部位での協調活動 (Synchronization)  
を MEG を用いて検出する試みを行っているので報告する。  
MEG データに対して脳内の Voxel での仮想的電流 Vector  
を MFT (Magnetic Field Tomography) を用いて時系列デー  
タを構成した。これに対し、最近 EEG を用い Rodriguez (1)  
らが報告しているような、時間周波数解析法を用いた解

析法による処理を行った。注目する周波数成分に関して  
Long distance synchronization と思われる現象を捉えつつ  
あると考えている。MFT による仮想的電流 Vector 構成  
の部分に理論的、意味論的に未知な要素が考えられるも  
の、MEG データでの位置情報の精度は EEG に比べて  
圧倒的に有利であると考えられる。さらに MRI の解剖学

的位置情報との coregistration と normalization を適用したデータベース化と統計学的手法の導入も検討している。

(1) Rodriguez E et al. (1999) Perception's shadow: long-

distance synchronization of human brain activity. Nature 397: 430-433

### (19) 先天性難聴を有する小児の聴覚誘発磁場

久保田雅也<sup>1</sup>, 広瀬宏之<sup>1</sup>, 榎原洋一<sup>1</sup>, 湯本真人<sup>2</sup> (<sup>1</sup> 東京大学小児科, <sup>2</sup> 同検査部)

先天性サイトメガロウイルス感染症による難聴を呈する 7 才兄弟 ( 双子 ) の聴覚誘発磁場を記録したので報告する。症例 1 は両側、症例 2 は右側の高度難聴を認める。ABR(105dB)は症例 1 で両側、症例 2 で右側で無反応であった。両者とも普通学級に通学、症例 1 は言葉は出ないが他者の動作や口唇の動きを読みコミュニケーション可能、症例 2 の言語発達に遅滞はない。全頭型脳磁図測定装置 (Neuromag) にて聴覚誘発磁場を求めると症例 1 で

は 105dB,2kHz 純音で左聴覚野に、105dB,1kHz および 440Hz 純音、白色雑音では聴覚野に活性はなく、左一次感覚野に長潜時で活性を認めた。症例 2 では聴覚野での反応は認められたが、一次感覚野での反応はなかった。高度難聴者において振動刺激で一次感覚野、聴覚野の活性化の報告はあるが、純音で一次感覚野のみに反応を認めた報告はない。聴覚野-一次感覚野の発達上の変化が起こり、純音周波数成分に一次感覚野が反応した可能性がある。

### (20) 嗅覚に対する非侵襲計測と脳内の嗅覚神経路

外池光雄\*, 山口雅彦\*, 浜田隆史\*, 瀬尾 律\*\*, 嘉悦 勲\*\*\*, 肥塚 泉\*\*\*\*

(\*電総研大阪 LERC, \*\*瀬尾耳鼻咽喉科院, \*\*\*近畿大理工学部, \*\*\*\*聖マリアンナ医科大学耳鼻咽喉科)

これまでのヒトの嗅覚に関する中枢研究は、他の感覚神経研究に比べて遅れており、脳内の嗅覚野、並びに嗅覚神経路は未だ、十分に明らかにされていない。そこで、筆者らは、人間に対する種々の非侵襲的計測法に先駆けて取り組み、におい刺激法の開発・検討をはじめ、脳波、脳磁図、fMRI 等、異なる刺激手法や種々の計測法を用い

た研究を多面的に実施してきた。そこで、本発表ではこれらの研究結果を分析して、現在の時点での総括を行うとともに、他の研究者のデータ結果とも比較検討しながら、人間の嗅覚野、並びに脳内嗅覚神経路について考察する。

### (21) 脊髄誘発磁界測定の実況と将来展望

小森博達, 川端茂徳, 大久保治修, 四宮謙一

(東京医科歯科大学 歯学総合研究科 脊椎脊髄神経外科学)

我々は、昨年より磁界計測による脊髄機能診断装置の開発を目標に研究を開始している。現在、動物実験において脊髄刺激脊髄誘発磁界、末梢神経刺激脊髄誘発磁界、脳刺激脊髄誘発磁界を測定し、磁界計測による脊髄障害部位診断の可能性、臨床生理学的な知見について検討を重ねている。また、ヒトの脊髄磁界測定にも着手し、条

件付きではあるが脊髄磁界と考えられる磁界の測定に成功した。今研究会では、現在までのデータをもとに脊髄磁界測定の実況と解決すべき問題点について意見を交換するとともに、我々脊椎外科医の立場からみた脊髄磁界測定の将来性についてお話ししたい。

## (22) MEG による記憶想起の研究

嘉悦 勲\*, 須谷康一\*, 内田熊男\*\*, 外池光雄\*\*\*, 山口雅彦\*\*\*, 岩木 直\*\*\*

(\*近畿大学大学院総合理工学研究科 \*\*近畿大学理工学部原子炉工学科

\*\*\*電子技術総合研究所 大阪ライフエレクトロニクス研究センター)

記憶を探索して異種の記憶を結合する創造活動では、前頭葉と側頭葉の相互作用が重要と思われる。暗算のような意志的想起では前頭葉が側頭葉を賦活して記憶を想起し、ルールと照合して合目的性を判断しつつ、目的を達するまで両者間のフィードバック往復が行われると考えられる。無意志的想起では、コンセプトやアイデアが浮ぶ直感想起が重要であり、前頭葉が過去に賦課した未解決の課題を、無意識下で側頭葉が継続して探索した結果と推察される。本研究では、暗算のようにルールやカテゴリーの規制度が強い照合想起的タスクと、想起の自

由度の高い連想想起タスクを比較して、前者では脳活動に伴うダイポールが皮質内空間の限定された領域に分布するのに対し、後者では広域に不連続に分散して現われることを認めた。連想想起は意志的であるが前頭葉の合目的制御に束縛されないため、カテゴリーの多様さのため様々の中枢を経過する分散分布を示すと解釈される。本研究では波に着目したが、波は前頭葉優位の意志的想起活動の指標となる脳磁波と思われ、無意志的想起については、波のような低周波数脳磁波を解明する必要がある。

## (23) fMRI の結果から位置を固定して MEG ダイポールを解く方法の検討

藤巻則夫, 早川友恵, Matthew Nielsen, 宮内 哲 (郵政省 通信総合研究所)

[はじめに] "ill-posed"である MEG マルチダイポールの逆問題を解くため fMRI の情報を利用することを検討した。[方法] 空間的に広がる fMRI 脳活動領域にどのようにダイポールを配置すべきかについて、シミュレーションで検討した。(1)ダイポール1つを模擬的に作成した脳磁界に対して位置固定の制約下でフィットし、磁場がよく合うための位置許容範囲を求めた。(2) 2つのダイポールをフィットし、互いの影響(crosstalk)が小さくなるための分離許容範囲を求めた。また(1)と(2)の結果を使い、内語課題の実験データ一例を解いた。[結果と考察] 最

小の位置許容範囲は磁場 correlation>85%の条件下で 2 cm, 最大の分離許容範囲は crosstalk<70%の条件下で接線方向に 4 cm であった。特に後者は、磁場のフィッティング特性に由来する空間的な異方性が強かった。これらの許容値を元に実測データを解いたところ、11個の有意なダイポール群が抽出できた。これらは左上側頭後部(潜時 203-210 ms)と左下前頭部(247-272 ms および 416-427 ms)の内語処理部位の活動を含んでおり妥当と思われる。

## (24) 骨導超音波知覚時の脳活動計測

中川誠司\*, 阪口剛史\*\*, 西村忠己\*\*\*, 山口雅彦\*, 外池光雄\*, 細井裕司\*\*\*, 今泉 敏\*\*\*\*, 渡辺好章\*\*

(\*電子技術総合研究所, \*\*同志社大学, \*\*\*奈良県立医科大学, \*\*\*\*東京大学)

超音波であっても骨伝導で知覚できる。さらに、この骨導超音波は高度難聴者であっても知覚できる場合があることが知られている。我々は、骨導超音波を利用した補聴システムの構築を目的として、その知覚特性の研究

を行ってきた。しかしながら、骨導超音波知覚の神経生理学的メカニズムには、依然として不明な点が数多く残されている。我々は、誘発脳磁界計測(聴覚健常者および高度難聴者)および誘発電位(聴性脳幹反応, 聴覚健

常者)計測を行い,骨導超音波知覚のメカニズムの解明を試みた。その結果,聴覚健常者,高度難聴者に関わらず明瞭な N1m 成分の出現が認められその等価電流双極

子は聴覚野内に推定された。また,聴性脳幹反応の II~V 波の出現を認めた。

### (25) 12 歳の絶対音感保持者の脳磁場計測

広瀬宏之,久保田雅也,榊原洋一(東京大学医学部小児科)

湯本真人(東京大学医学部附属病院検査部),榊原彩子(一音会ミュージックスクール講師)

絶対音感保持者に様々なタスクを与え脳磁場計測を行った。被験者は 12 歳男児,3 歳から 9 年間ピアノを習っている。1000Hz の純音を聞かせる課題では,100msec 付近で両側の聴覚中枢近傍に dipole が認められた。右側の方が反応は強く,より前方に位置していた。8 種類の純音(C4-C5)を聞かせて音名を当てさせる labelling 課題では,100msec 付近で両側の聴覚中枢近傍に dipole が認められ,200msec 以降で視覚中枢と頭頂後頭連合野付近に dipole が認められた。P300 に関しては,白色雑音と

純音(A4)のオドボール課題では,純音の標的刺激に対して明らかな P300 を 330msec 付近に認め,両側の視覚中枢近傍に dipole が認められた。二つの純音(C4 と E4)のオドボール課題では,P300 の振幅は低く潜時も延長していた。スクリーンに様々な音符を提示して音を想起させる課題では,視覚中枢の他に頭頂後頭連合野付近に dipole が認められた。絶対音感保持者の音処理過程では視覚中枢も関与している可能性が示唆された。

### (26) 後頭葉てんかんにおける発作症状の検討 ~Magnetoencephalographic study~

山田康一郎<sup>1,2</sup>,白石秀明<sup>1</sup>,渡辺裕貴<sup>1</sup>,八木和一<sup>1</sup>,滝川守国<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>国立療養所静岡東病院(てんかんセンター),<sup>2</sup>鹿児島大学医学部神経精神科)

視覚発作を有する 10 例の症候性後頭葉てんかん患者に対して脳波,脳磁図同時記録を施行し,脳磁図上の発作間歇時発射を解析して得られた単一等価電流双極子(single equivalent current dipole: 以下 ECD)の局在位置について検討した。ECD の局在位置と視覚発作症状との間に相関があり,後頭葉内側に ECD が局在する症例では要素性幻視を,後頭葉外側に局在する症例では複雑性

幻視を呈する傾向があった。この違いは後頭葉各部位の機能と関連していると思われ,後頭葉てんかんの診断上で視覚発作の内容吟味がてんかん焦点の局在位置を推定する際に有用であることが示唆された。また,視覚発作に続いておこる発作症状を調べることで発作波伝播の機序についても若干の考を行った。

### (27) 両眼立体視時の誘発脳磁場に対する注意の影響

大脇崇史,武田常広(東京大学大学院 新領域創成科学研究科 複雑理工学専攻 科学技術振興事業団 戦略的基礎研究推進事業)

random-dot stereogram(RDS)を用いて両眼視差刺激を被験者に提示すると,潜時 150ms から 400ms にピークを持つ誘発脳磁場応答が生じる。しかし,この応答が被

験者の奥行き知覚とどのような関係があるかは明らかではない。そこで本研究では,被験者に対して奥行き知覚に関連した注意課題を課し,被験者の注意状態が脳磁場

応答に及ぼす影響を調べた。提示した RDS は、一様な背景から正方形が手前に浮かんで見えるものとし、提示する位置 2 種類、奥行き 2 種類それぞれを組み合わせると合計 4 種類の RDS を用いた。注意の条件は、(1) 位置に注意する、(2) 奥行きに注意する、(3) 何も注意しない (コ

ントロール) の 3 種類とした。その結果、条件 (1)、(2) では条件 (3) に比べて脳磁場応答の強度が増大する傾向があり、特に視差が小さい場合に増大の度合いが大きかった。条件 (1)、(2) それぞれの脳磁場応答の間には明瞭な差はなかった。

## (28) 口唇部電気刺激誘発磁界の一次皮質反応

永松謙一，中里信和\*，隈部俊宏，畑中啓作\*\*，菅野彰剛\*\*\*，吉本高志  
(東北大学脳神経外科，\*広南病院脳神経外科，\*\* (株) エレクタ，\*\*\*広南病院療護センター)

目的：三叉神経刺激誘発磁界において、正中神経刺激 N20m にあたる、一次皮質反応の報告はなかった。刺激・測定条件を検討し、これを検出したので報告する。方法：対象は健康人 11 例。刺激強度を感覚閾値の 9 倍、刺激頻度を 0.7Hz とし、下口唇に対し電気刺激を行い、全頭型脳磁計を用い誘発反応を記録した。結果：刺激対側 22 半球中 20 半球で、潜時  $14.6 \pm 1.3$  ms に頂点潜時を持つ

反応 (N15m) を認めた。電流双極子は前上方を向き中心溝後壁に推定された。その位置は正中神経刺激誘発磁界の信号源位置と比較し、右半球で  $23.0 \pm 7.2$ mm、左半球で  $18.6 \pm 2.1$ mm 下方に推定された。考察：三叉神経刺激誘発磁界 N15m は、潜時、電流双極子の位置・方向から、正中神経刺激誘発磁界 N20m に相当する一次皮質反応である。

## (29) 脳機能解析統合ソフト開発の試み

中村昭範<sup>1</sup>，河津省司<sup>1</sup>，右代谷昇<sup>2</sup>，濱崎淳洋<sup>3</sup>，山田孝子<sup>4</sup>，堀部賢太郎<sup>4</sup>  
文堂昌彦<sup>1</sup>，加知輝彦<sup>4</sup>，加藤隆司<sup>1</sup>，伊藤健吾<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>長寿医療研究センター生体機能研究部，<sup>2</sup>和歌山工業高等専門学校  
<sup>3</sup>京都学園大学経済学部，<sup>4</sup>国立中部病院神経内科)

高次脳機能活動の解析を従来の双極子モデルのみで行うのは困難が多いが、近年は空間フィルター法や SPM-SAM 等の新しい分析法を用いたり、PET や fMRI 等の他のモダリティを併用したりすることによって道が広がりつつある。これらの方法は魅力的ではあるが、1) 高額なソフトウェアパッケージ、あるいは MEG そのものを購入しないと手に入らない。2) 自前で使って使いこなすには高度の数学的知識を必要とする。3) PET や fMRI が必要。等の問題があり、適用するにあたってはハードルが高い。そこで、PC 上で動き (安価)、Windows ベースの GUI で扱え (簡単)、恣意の入りにくいデータ排出 (客観性) ができるソフトの統合パッケージ開発を試み

ている。開発環境は Mathematica, Matlab, C 言語及び visual basic で、目標は以下の通りである。データ入力は、sensor layout, headshape, MEG data 等を ASCII file として受け取る。分析は、空間フィルター法を用いてメッシュ状に分割された virtual sensor 上で topographical に行われ、FFT, coherence, synchronicity 等の event-related な変化を捉えることができる。結果は個々の MRI 上に overlay できるが、標準脳座標に変換して投影することも可能で、これにより個人間の共通項や相違点を明らかにしたり、PET や fMRI の報告と比較することができる。これらは開発途上であるが、これまでにできている部分について紹介する。

## (30) 持続性部分てんかんの症例における脳磁図所見

出店正隆, 中村文裕 (北海道大学医学部精神医学教室)

左手指の持続性けいれんが連続して数日から 1 週間続く持続性部分てんかん (EPC) の症例に対し, 全頭型 204 チャンネル脳磁図システム (Neuromag 社製) を用い, 発作時脳磁図および脳波を記録した。脳波および脳磁図上, 右前頭・頭頂部付近に棘波が認められ, 推定された

等価電流双極子は右中心後回の一部に比較的高密度に集積した。一般に EPC は前頭葉てんかんの一種と考えられているが, 本症例においては, てんかん源性焦点は頭頂葉に存在する可能性が示唆された。

## (31) MEG でとらえた発作間欠期突発波の鏡像焦点

岩崎真樹, 中里信和, 菅野彰剛, 畑中啓作, 吉本高志  
(東北大学脳神経外科, 広南病院脳神経外科, 広南病院療護センター, エレクタ)

頭皮上脳波と脳磁図の同時計測にて発作間欠期突発活動における両側同期性棘波の半球間伝播をとらえた 2 てんかん症例を報告する。【症例 1】27 才女性の複雑部分発作症例。両側同期性の側頭部棘波を高頻度に認めた。信号源は左右側頭葉後方に推定され, 活動のピークは全て右半球が左に対して平均 15ms 先行していた。【症例 2】21 才女性の全般性けいれん症例。両側独立もしくは同期性の中心側頭部棘波を高頻度に認めた。信号源は左右中

心溝に推定され, 同期性棘波においては左右半球の活動のピークに 15~40ms の時間差を認めた。2 例とも, 左右半球の信号源における局在と電流方向は鏡像関係にあった。【結論】ピークの半球間時間差は発作間欠期突発波の鏡像焦点への伝播を示唆する所見と考えられた。脳磁図は両側同期性の突発波を高い時間および空間分解能で識別する上で有利である。

## (32) 光刺激と脳磁図における光突発反応の位相差について

白石秀明<sup>1</sup>, 芳村勝城<sup>2</sup>, 渡辺裕貴<sup>2</sup>, 八木和一<sup>2</sup>( <sup>1</sup>北海道大学医学部小児科, <sup>2</sup>国立療養所静岡東病院 (てんかんセンター) )

< 目的 > 間欠的光刺激における, 頭皮上脳波の光突発反応 (PPR) と MEG 上の磁場変化を検討した。< 症例・方法 > 11 歳から 25 歳のてんかん症例で, 症例 1 が特発性全般てんかん, 症例 2・3 が症候性全般てんかん, 症例 4 が症候性局在関連てんかんであった。全例において Grass 社製光刺激装置 PS33 plus で脳波上, 両側広汎性棘・徐波, 多棘・徐波複合が出現し刺激終了後も少なくとも 100msec 以上反応が持続する, いわゆる classic PPR が出現していた。脳磁計は BTi 社製の 74ch 一次微分型 SQUID を用い, 頭皮上脳波を同時記録した。IPS は赤色発光ダイオード(LED)より発生したものを光ファイバーを用いて患者の眼前のゴーグル型投光装置に送り刺激を

行った。患者には眼球表面から, この装置の発光面までが約 2 cm となるように装着し検査を施行した。< 結果 > MEG 検査における LED の刺激では症例 2, 3, 4 で classic PPR が出現した。症例 1 では LED の IPS で, 両側広汎性棘・徐波は出現するものの, 光刺激終了後反応は持続しなかった。

各々の光刺激に対して出現した磁気棘の頂点における, 光刺激からの位相差を求めると, 症例 2・3 では種々の刺激頻度において, 光刺激を繰り返すにしたがって位相差は漸増し, やがて刺激周期と全く無関係となっていった。一方, 症例 1 と 4 では位相差はほぼ一定して推移していた。< まとめ > PPR の発現機構は, てんかん類型の

違い、光突発反応の形態の違いによって異なることが示唆された。

### (33) 体性感覚誘発オン・オフ磁場反応

湯本真人<sup>1,2</sup>, 齋藤 治<sup>2</sup>, 金子 裕<sup>2</sup>, 中原一彦<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 東京大学医学部附属病院, <sup>2</sup> 国立精神・神経センター武蔵病院)

6名の健常者を対象とし、右示指末節に8点点字ピン(KGS社製 Braille Cell を改変)が同時に突出(オン)および引入(オフ)する周期500msの反復刺激呈示時の誘発磁場反応を、Neuromag社製204Ch全頭型脳磁計により記録した。実験1:周期500ms中のオン,オフ期間をそれぞれ250msとして3000回加算した。N1on, P1on, N2on, P2on および N1off, P1off, N2off, P2off が得られ、

N1on, N1off 間および P1on, P1off 間に振幅の有意差, N1on, N1off の推定電流双極子の方向に有意差を認めた。実験2:オン,オフ期間をそれぞれ10,20,40,60,80,100,150,250msとして各400回加算し,先行するオン,オフ期間変化によるオフ,オン反応の振幅変化を比較検討した。Surらによるサルを対象とした報告に矛盾しない結果がヒトで得られた。

### (34) 視覚/聴覚オドボール課題に関連する脳内神経活動の可視化

岩木 直\*, 平田直也\*\*\*, 外池光雄\*, 山口雅彦\*

(\*電子技術総合研究所 大阪ライフエレクトロニクス研究センター, \*\*近畿大学 理工学部)

視聴覚における新奇刺激の検出処理に関して、これまでオドボール課題を用いた多くの研究が行われており、刺激呈示後300ms前後でP300と呼ばれる特徴的な成分が観測されることがよく知られている。しかしながら、この成分に対応する脳内活動分布の複雑さから、従来の少数個の電流双極子による解析ではその詳細を明らかにすることは非常に困難で、脳内の神経活動のダイナミクスは未だ明らかにされていない。本研究では、高次機能

に対応する複雑な脳活動を、MEG計測を用いて、一組の測定条件間における活動の差として視覚化する方法を提案し、これを用いて視覚および聴覚各モダリティにおける新奇刺激検出に関わる複雑な脳内神経活動分布の可視化を試みた。この結果、新奇刺激の検出には、潜時300ms前後における、刺激入力モダリティ依存/非依存の複数の脳内部位における神経活動が関与していることを示した。

### (35) 全脳型脳磁計を用いたてんかん解析時の工夫

橋詰 顕, 栗栖 薫, 有田和徳, 花谷亮典, 飯田幸治 (広島大学医学部脳神経外科)

てんかん患者の脳磁測定を行う場合、全脳型脳磁計では脳磁図の情報が膨大であり得られた情報を効率よく解析する方法が望まれる。Neuromag社製204ch脳磁計では204個の波形が得られるが、同時に測定した脳波・心電図・眼電図を参照しながらてんかん波のdipole推定を限られたモニター上で検討していくことは困難である。Neuromag社はEpilepsy Spike Search V2.1という

programを提供しているが、脳波の表示が十分でなく、あきらかな棘波以外の解析は困難である。そこで我々は脳磁計のセンサーを脳波の10-20法に準ずる形で19個に区分し、それぞれのroot mean square, 脳波のroot mean square, 心電図と眼電図を1画面に表示することでてんかん波形を解析することを試みた。この方法では脳波の棘波のみでなく棘波に先行する脳波の変化も反映してお

り、簡便にてんかん波形を捉えることができ有用である と思われた。

### (36) 日本語ピッチアクセントと音韻認知に関する一検討

林 良子\*\*\*・今泉 敏\*・上野照剛\*・森 浩一\*\*

(\*東京大学大学院医学系研究科 \*\*国立身体障害者リハビリテーションセンター研究所)

日本語ピッチアクセントが単語認知に果たす役割について、音韻処理過程と比較することで、脳磁図計測により検討した。プライムとして聴覚呈示されるなぞなぞ文の後に、2 モーラ語の正答、アクセント型が不適切な答、音韻の不適切な答を呈示した場合について、N400 電流双極子の潜時、モーメント、電流源推定部位を解析した。その結果、脳磁波形上では、3 群で異なった波形が左右側頭部で観察された。N400 成分では、音韻の間違った答

でより多くの被験者から電流双極子を推定することができたものの、アクセント型不適切群と潜時、モーメントの有意な差異は見られなかった。電流源は、両群とも右上側頭回、縁上回付近に推定された。これらの結果から、単語の意味的認知という観点では、アクセント型、音韻ともに等価の役割を果たしていると考えられるが、意味処理に至る過程には両者間に差異があることが示唆された。

### (37) 聴覚マスキング条件下の発声関連脳磁場

軍司敦子、宝珠山稔、柿木隆介 (生理学研究所統合生理研究施設)

健常者を対象に、自分の声が聞こえない masking 条件下の発声関連脳磁場 (vocalization related cortical fields: VRCF) と通常 (control) の VRCF を記録し、VRCF を構成する運動成分と聴覚成分について検討した。発声後に出現した成分の振幅は、masking 条件より control で有意に大きく ( $p < 0.05$ )、条件間の差分は発声開始後  $81.3 \pm 20.5$  ms で頂点となる 1M 成分を示した。1M 成分は音声

を聴取した時に認められる auditory evoked magnetic fields (AEF) の M100 成分に対する信号源と同様に聴覚野付近に推定されたことから、1M が自分の声に対する反応であり、M100 と同様の成分であると推察された。発声前の control-masked 条件間に有意差は無く、単純な発声の準備過程には masking の影響は小さいと考えられた。

### (38) 睡眠中のフラッシュ視覚誘発脳磁場

大草知裕、柿木隆介、宝珠山稔、王 麗紅 (生理学研究所統合生理研究施設)

【目的】睡眠中の視覚情報処理活動を明らかにするために、閃光刺激に対する視覚誘発脳磁場 (VEF) を覚醒時および睡眠時に記録し、その特性を比較した。【方法】10 名の健常被験者に 0.5Hz の頻度で閃光刺激を与え、覚醒時と睡眠時の VEF を後頭部から記録した。同時記録の脳波で睡眠深度を確認し、各被験者について覚醒時および睡眠国際分類の stage 1 と stage 2 における VEF を記録した。【結果】覚醒時の波形は個人差が大きかったが、共

通した成分として 1M (50ms)、2M (84ms)、3M (130ms) の 3 成分が認められた。睡眠時 (stage 1 および stage 2) において 1M は振幅減少と潜時遅延、2M は振幅増大と潜時遅延、3M は消失という変化を示した。【考察】これまでに睡眠中の体性感覚や聴覚における誘発脳磁場の変化が報告されている。今回の結果は、視覚においても覚醒時と睡眠時では刺激に対する脳内の反応機構に差異があることを示唆している。

(39) 正中神経刺激による短潜時皮質体性感覚誘発脳磁界成分と体性感覚誘発脳電位成分の対応

宝珠山稔<sup>1,2</sup>, 柿木隆介<sup>2</sup> ( <sup>1</sup>名古屋大学医学部保健学科, <sup>2</sup>生理学研究所統合生理研究施設)

【目的】正中神経刺激による短潜時体性感覚誘発脳磁界 (SEF) と体性感覚脳電位 (SEP) の対応する成分を明らかにした。【方法】正中神経刺激により対側半球より SEF (37 チャンネル) と SEP (Fz-Ai, C3-Ai, P3-Ai, P3-Fz) を同時記録した。1 回毎の刺激により同定される 1 M の頂点, 2 M の頂点をそれぞれ時間 0 として脳波と共に加算平均し, 得られた波形の SEP 各成分の広がり (TD)

を比較した。【結果】1 M での加算では SEP の N20-P20 (P3-Ai, P3-Fz) の TD が小さくなり, 2M での加算では N30 (Fz-Ai, P3-Fz) の TD が小さくなった。【考察及び結論】SEF の 1 M と 2 M は SEP の N20-P20 および N30 にそれぞれ対応する成分と考えられた。SEP の P25-N33 に対応する SEF 成分は認められず, P25-N30 は 1 野起源の radial dipole が発生源と考えられた。

(40) SAM 解析による速波発生源とてんかん源性領域との関連の検討

二宮宏智, 加藤天美, 平田雅之, 新居康夫, 久村英嗣, 平野俊一朗, 谷口理章, 今井克美\*, 吉峰俊樹  
(大阪大学 脳神経外科, \*小児科)

てんかん患者において, 帯域の連続する速波は, 皮質脳波において, seizure onset zone やその周囲に高頻度に観察される。そこで, MEG の 帯域の連続する速波の発生源と, てんかん源性領域との関連を検討した。症例は, 5 例 (海馬硬化をともなう内側型側頭葉てんかん 2 例, 海馬に腫瘍のあった側頭葉てんかん 1 例, 外側型側頭葉てんかん 1 例, 外傷性の前頭葉てんかん 1 例)。そのうちの 3 例では, 帯域の連続する速波は, 発作時に

観察された。これを SAM 解析法にて, その発生源を求めた。器質性変化のある 4 例は, その周囲から発生し, 外側型側頭葉てんかんでは, 側頭葉外側にその発生源がもどった。また, 手術の行われた 2 症例では, 皮質脳波により seizure onset zone と同定された部位に, その発生源はほぼ局在した。MEG の 帯域の速波の発生源は, てんかん源性領域との関連が高いと思われた。

## 13. シナプスの形成・維持・可塑性

2000 年 12 月 7 日- 12 月 8 日

代表・世話人：武内恒成（名古屋大学大学院理学研究科）

所内対応者：小幡邦彦（生理学研究所）

## (1) シナプスの形態変化と機能分子の動態

岡部繁男（東京医科歯科大学医歯学総合研究科）

## (2) シナプス小胞動態の可視化と応用

片岡正和<sup>1,2</sup>, 関口真理子<sup>1</sup>, 高橋正身<sup>1</sup> (<sup>1</sup>三菱化学生命科学研究所, <sup>2</sup>信州大学工学部環境機能工学科)

## (3) シナプス活動によるアクチン細胞骨格再構築過程の可視化

古屋敷智之, 尾藤晴彦, 成宮 周（京都大学大学院医学研究科高次脳科学）

## (4) 神経成長円錐のカルシウムシグナル制御機構

竹居光太郎（東邦大学医学部生理学第二）

## (5) エンドサイトーシスにおける膜脂質の機能と動態

竹居孝二（岡山大学医学部生化学）

## (6) 痛み刺激受容の分子機構：カプサイシン受容体とそのホモログの構造，機能と制御機構

富永真琴（三重大学医学部第一生理）

## (7) 単一嗅神経細胞における嗅覚応答の再構成及び嗅上皮における応答細胞の空間的分布

東原和成（東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学）

## (8) 酸味受容体遺伝子の同定と機能解析

島田昌一, 鶴川真也, 植田高史（名古屋市立大学医学部第二解剖

## 【参加者名】

尾藤晴彦（京都大学大学院医学研究科），岡部繁男（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科），片岡正和（信州大学工学部），古屋敷智之（京都大学医学部），今泉美佳（杏林大学医学部），竹居光太郎（東邦大学医学部）竹居孝二（岡山大学医学部），富永真琴（三重大学医学部），東原和成（東京大学大学院新領域創成科学研究科）島田昌一（名古屋市立大学医学部），鶴川真也（名古屋市立大学医学部），植田高史（名古屋市立大学医学部），白尾智明（群馬大学医学部），関野祐子（群馬大学医学部），田中聡一（群馬大学医学部），山崎博幸（群馬大学医学部），張 捷（群馬大学医学部），高橋秀人（群馬大学医学部），武内恒成（名古屋大学大学院理学研究科），玉田一生（名古屋大学大学院理学研究科），中田千枝子（名古屋大学大学院理学研究科），房岡恵理（名古屋大学大学院理学研究科），渡辺紀信（名古屋大学大学院理学研究科），狩野方伸（金沢大学医学部），辰巳仁史（名古屋大学医学部），宮津 基（名古屋大学医学部），真鍋俊也（神戸大学医学部），神谷温之（神戸大学医学部），志牟田美佐（神戸大学医学部），新里和恵（神戸大学医学部），小田洋一（大阪大学大学院

基礎工学研究科），高橋正治（大阪大学大学院基礎工学研究科），中山寿子（大阪大学大学院基礎工学研究科），鳴島 円（大阪大学大学院基礎工学研究科），森健太郎（大阪大学大学院基礎工学研究科），白木千津子（大阪大学大学院基礎工学研究科），山本亘彦（大阪大学大学院基礎工学研究科），丸山 敬（埼玉医科大学）山口和彦（理化学研究所脳科学総合研究センター），斎藤祐見子（東京都臨床医学総合研究所），畠 義郎（大阪大学大学院医学研究科），内田洋子（東京都老人総合研究所），時田義人（愛知県口口二-発達障害研究所），五味不二也（東京都老人総合研究所），玉巻伸章（京都大学大学院医学研究科），山田麻妃（東京大学大学院薬学研究科），池谷裕二（東京大学大学院医学研究科），小山隆太（東京大学薬学部），森本高子（東京大学大学院理学研究科），高坂洋史（東京大学大学院理学研究科），笛田由紀子（産業医科大学産業保健学部）下村敦司（藤田保健衛生大学医学部），吉田祥子（豊橋技術科学大学）藪中厚生（豊橋技術科学大学），和多和宏（東京医科歯科大学難治疾患研究所），尾崎まみこ（京都工芸繊維大学繊維学部），武井延之（新潟大学脳研究所），御

園生裕明(東京大学大学院医学研究科),佐藤栄人(順天堂大学医学部),金 明鎬(群馬大学医学部),七崎之利(日本医科大学),勝野達也(名古屋大学大学院理学研究科),山際貴雄(名古屋大学大学院理学研究科),畠中由美子(基礎生物学研究所)野田昌暁(基礎生物学研究所),前田信明(基礎生物学研究所),加藤 彰(基礎生物学研究所),河西春郎(生理学研究所),高橋倫子(生理学研

究所),根本知己(生理学研究所),鈴木智之(生理学研究所),真鍋健一(生理学研究所),井本敬二(生理学研究所),森 泰生(生理学研究所),大倉正道(生理学研究所),馬杉美和子(生理学研究所),小幡邦彦(生理学研究所),柳川右千夫(生理学研究所),山肩葉子(生理学研究所),兼子幸一(生理学研究所)

## 【概要】

シナプスの形成と維持,さらにその可塑性はいかにして行われるか,その分子基盤とあたらしい方法論を駆使した最近の研究を網羅することを目指した。また,演者と座長および参加者相互の討論にも大きく時間を割いて,今後の研究における問題点や展望を見いだすこともこの研究会においての目的とされた。

まず,セッション1では,神経科学におけるあたらしいイメージング技術の紹介と展望を検討した。シナプスの形成・維持はいかにして行われるかを,GFPを用い可視化することによって明らかになってきたこととこれからの展望を検討した。岡部繁男氏からシナプス後部骨格構造の時間的特異化・集積過程の解析,片岡正和氏からシナプス前部シナプス伝達分子の小胞放出過程の解析を,古屋敷智之氏からシナプス活動におけるアクチン細胞骨格の制御システムをいずれもシナプス形成・維持における重要課題でこの解析を通して,新しいイメージング解析の有効性と今後の問題点を見つめ直した。セッション

2では,生化学と電子顕微鏡技術を組み合わせたエンドサイトーシスにおけるシナプス小胞の動態観察(竹居孝二氏)と,CALIを用いた細胞内部位での空間的・時間的分子失活による生理機能解析(竹居光太郎氏)の演題を取り上げた。いずれの研究も微細な生理機構をいかに観察するかを先駆的な手法で取り組んでおり,これらの手法から何がどこまで解り,どのような展望があるか,他にいかなる技術と組み合わせれば何が見えてくるか,議論を重ねた。セッション3では,最近の神経科学のトピックである感覚受容の分子基盤を富永真琴氏,東原和成氏,島田昌一氏から,それぞれ,痛覚,嗅覚,味覚の内容での研究の最前線の講演を企画し,神経系の理解においてその基盤となる感覚受容の分子メカニズムの解析アプローチと展望をとらえた。全体にわたって,想像を上回る参加者と活発な討論がなされ,非常に有意義な研究会となった。

## (1) シナプスの形態変化と機能分子の動態

岡部繁男(東京医科歯科大学医歯学総合研究科)

海馬の錐体細胞上での興奮性シナプスは,活動依存性にその機能の変化を起こすことが知られている。シナプス機能の変化の基礎として,その分子構築の変化が存在する可能性が指摘されてきたが,近年,GFP分子をレポーターとして用いて細胞内機能蛋白質のイメージングを行うことが可能になった。培養海馬神経細胞では,培養後10日から20日の間に興奮性シナプスの局在が樹状突起のshaftからspineへと変化する。この間のシナプスの形態形成と機能分子の動態を解析する為に,シナプス後

肥厚部の分布,シナプス小胞の分布,spineの形態をGFPのvariantであるCFP,YFPの蛍光シグナルを用いて可視化する事を試みた。この方法により,シナプス後肥厚部の構成蛋白質が既に伸長したfilopodia/spineの中に集積し,シナプス後部構造の特異化が起こる過程が観察された。また,シナプス後肥厚部の形成とシナプス小胞の集積はお互いに時間的に相関して起こることも明らかになった。

## (2) シナプス小胞動態の可視化と応用

片岡正和<sup>1,2</sup>, 関口真理子<sup>1</sup>, 高橋正身<sup>1</sup> (<sup>1</sup>三菱化学生命科学研究所, <sup>2</sup>信州大学工学部環境機能工学科)

我々が前シナプス機能の基盤である神経伝達物質の開放機構を理解するために実施している, GFP, あるいはその変異体を利用したシナプス小胞動態可視化解析の結果を中心に紹介する。GFP ラベルしたシナプス小胞蛋白質の VAMP-2, 制御性分泌蛋白質のヒト成長ホルモン (hGH) を, PC12 細胞および, ラット海馬初代培養細胞で発現し, それらの生細胞での振る舞いを可視化した。PC12 細胞において, hGH の構成性分泌の瞬間を可視化

したところ, kiss and run モデルに合致する画像が得られ, また, 優先的分泌部位と考えられる領域が存在した。VAMP-2 の小胞膜上の位相, 小胞内の pH 環境, pH 感受性変異 GFP を組み合わせて利用し, 小胞内の pH 環境という視点から分泌現象, ならびに突起伸長と小胞分泌の関連を調べた。この場合においても kiss and run モデルに合致する分泌を確認し, さらに突起伸長時の膜供給にシナプス小胞が利用されていると考えられる結果を得た。

## (3) シナプス活動によるアクチン細胞骨格再構築過程の可視化

古屋敷智之, 尾藤晴彦, 成宮 周 (京都大学大学院医学研究科高次脳科学)

アクチン線維は興奮性シナプスにおける主な細胞骨格である。近年, アクチン線維がシナプスの形態制御やシナプス蛋白の局在, さらにはシナプス伝達効率の修飾に関与することが示唆されてきた。我々は GFP と beta-actin の融合蛋白 GFP-actin を用いて, 生きた海馬神経細胞のアクチン細胞骨格を可視化した。この方法により, シナプス活動によって海馬神経細胞のアクチン分子の分布が速やかに変化し, シナプスや細胞体周囲など機能的に異なる部位に集積することを明らかにした。この集積は数

分でピークに達する速やかな反応であるが, シナプスと細胞体周囲での集積の速度は大きく異なっていた。さらに, シナプスにおけるアクチン制御には NMDA 受容体が, 一方細胞体周囲の集積には電位依存性  $Ca^{2+}$  チャネルが特異的に関与することが示唆された。以上の結果は, 複数の  $Ca^{2+}$  流入源の活性化の組み合わせを介して, シナプス活動が多彩なアクチン分布を誘導する可能性を示唆している。

## (4) 神経成長円錐のカルシウムシグナル制御機構

竹居光太郎 (東邦大学医学部生理学第二)

神経系の発生や再生の過程において, 伸長する神経突起の先端には成長円錐と呼ばれる特殊な構造体が存在し, 成長円錐は周囲の微小な外界環境を感知しながら神経突起を正確に標的細胞に導く。神経細胞の分子基盤の解明は, 複雑緻密な神経回路網の形成機構理解する上で非常に重要な課題である。神経突起の成長発達において, 成長円錐内の細胞内  $Ca^{2+}$  は極めて重要な情報変換分子として働くことが知られている。神経細胞のように極度に発達した極性を持つ細胞における研究では, 細胞の局所

で特定分子を実験的に操作できるような研究技術が要求される。そのニーズに対応して, 我々はレーザー分子不活性化法 (CALI 法) を用いている。CALI 法とは, 抗体やリガンドによる特異的な結合によって標的分子を特定化し, 色素を介してレーザー照射によって生じるフリーラジカルで標的分子を機能的に不活性化させ得る新規の細胞生物学的研究手技で, 突起先端に存在する成長円錐のような細胞の特殊な局所領域での分子機能の解析には特に功を奏する。

### (5) エンドサイトーシスにおける膜脂質の機能と動態

竹居孝二 (岡山大学医学部生化学)

シナプス小胞は、分泌に続いて、エンドサイトーシスによる小胞膜の取込み、シナプス小胞再生のサイクルをくり返している。このためエンドサイトーシスはシナプスが機能するための重要な一過程であり、その過程においては細胞膜からの小胞形成が行われる。エンドサイトーシスの分子機構、特に膜脂質の機能動態を調べるため、膜成分と脳細胞質を反応させることにより、小胞形成を *in vitro* で再構成する実験系を確立した。

大型単層の人工脂質膜 (リポソーム) を膜成分として ATP, GTP, および脳細胞質と *in vitro* で反応させた後、電顕観察により小胞形成 (直径 < 200nm) を認めた。こ

の実験系を用いて、まず、膜のコレステロール含有量 (0-30% (w/w)) と小胞形成の相関を調べた。その結果、膜にコレステロールを含む場合には、全くコレステロールを含まない場合に比べ、形成される小胞の径が大きかったが、小胞形成量には差異はみられなかった。次に phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) 含有量の変化 (0-6% (w/w)) による小胞形成への影響を調べた結果、PIP<sub>2</sub> の増加による小胞形成量の増加が認められた。さらに、小胞形成に伴って PIP<sub>2</sub> は phosphatidylinositol (PI) に分解されることが、脂質組成分析により明らかにされた。

### (6) 痛み刺激受容の分子機構：カプサイシン受容体とそのホモログの構造、機能と制御機構

富永真琴 (三重大学医学部第一生理)

痛みは化学的・熱・機械的刺激によって感覚神経終末が活性化されることによって惹起されるが、こうした侵害性刺激受容体を有する感覚神経 (nociceptor) はトウガラシの主成分カプサイシンに感受性があることによっても特徴づけられるため、カプサイシン投与による細胞発現クローニング法を用いてカプサイシン受容体遺伝子が単離された。そして、カプサイシン受容体 (VR1) が Ca 透過性の高い 6 回膜貫通型の非選択性陽イオンチャネルであり、カプサイシンのみならず同じく痛みを惹起する 43 度以上の熱や酸 (プロトン) によっても活性化される痛み刺激に対する多刺激受容体として機能することが明らかとなった。

炎症関連メディエーターが感覚神経終末での痛み刺激受容体を制御することが知られているが、そのメカニズムは明らかではない。メディエーターの 1 つである細胞外 ATP の作用を検討した結果、代謝型 (P2Y) 受容体にも作用して、PKC を活性化を介して VR1 活性を制御していることが明らかとなった。細胞外 ATP はカプサイシン活性化電流、プロトン活性化電流を増大させるのみならず、熱活性化電流の活性化温度閾値を 42 度から 35 度に減少させた。これは、ATP が存在すれば体温でも VR1 が活性化して痛みを惹起しうることを示し、全く新しい疼痛発生メカニズムとして注目される。

### (7) 単一嗅神経細胞における嗅覚応答の再構成及び嗅上皮における応答細胞の空間的分布

東原和成 (東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学)

マウスで約千種類といわれている嗅覚受容体のクローニング当初は匂い物質と結合する証拠はなかったが、1998 年、ラット orphan 嗅覚受容体 I7 のリガンド決定がなされ、推定上の匂い受容体が匂い物質を認識すること

が証明された。一方我々は嗅覚受容体が匂い物質を認識するという証拠を得るために別のアプローチをとった。Ca<sup>2+</sup> イメージングを使って匂いに応答する嗅細胞を同定したのち各々の応答細胞から発現受容体をクローニング

し、アデノウイルスで受容体遺伝子を嗅細胞に導入して匂い物質に対する特異的応答を再構成することに成功した。また、HEK293 培養細胞を用いて受容体の再構成を行い、嗅覚受容体が Gs タイプの G タンパク質に共役し細胞内 cAMP 濃度を上昇させるという結果も得ている。さらに我々は、新生児マウスから生の前額断切片を作成し、嗅上皮上での匂い物質に対する応答を  $Ca^{2+}$  イメージ

ングによって in situ で測定した。様々な匂い物質をこの生切片に与えたところ、応答細胞が嗅上皮上でどのように分布しているかが明らかになった。さらに、匂い物質の濃度を变化させたところ、濃度依存的に応答細胞数の増加が見られ、同一匂い物質でも濃度によって感じる香調が変わってくるという経験則を支持する結果が得られている。

## (8) 酸味受容体遺伝子の同定と機能解析

島田昌一, 鶴川眞也, 植田高史 (名古屋市立大学医学部第二解剖)

味覚の受容体は塩味, 酸味, 甘味, 苦味, うま味に対してそれぞれ特異的な様々なタイプの受容体が想定されてきた。最近単離された苦味受容体や, うま味受容体は G 蛋白と共役する代謝型受容体であるのに対して, 我々が同定した酸味受容体はイオンチャネル型である。我々は, 味覚の受容体を単離する目的でラット舌有郭乳頭より cDNA ライブラリーを作製し, 相同性によるスクリーニングとアフリカツメガエル卵母細胞による機能発現スクリーニングを組み合わせ, プロトンで開くアミロライド感受性陽イオンチャネルを単離した。そして全塩基配列を明らかにしたところ, 非翻訳領域は多少異なるも

の翻訳領域は最近脳から単離された mammalian degenerin (MDEG1) と一致するものであった。さらにこの受容体の他のサブユニットを同定するために, 相同性を用いたラット有郭乳頭の cDNA ライブラリーのスクリーニングや RT-PCR 法を行った結果, MDEG2 も味蕾に発現していることが分かった。次に MDEG1 と MDEG2 の関係について調べたところ, 免疫組織化学法で MDEG1 と MDEG2 は同一の味蕾細胞に共存して発現していることを明らかにした。また, 電気生理学的な解析で MDEG2 は, MDEG1 と共発現させると, チャネルの脱感作を修飾する働きがあることが分かった。

## 14. 消化管機能

2000年12月14日-12月15日

代表・世話人：鈴木裕一（静岡県立大学食品栄養科学部）

所内対応者：尾崎 毅（生理学研究所）

(1) 大腸プロピオン酸吸収機序

川俣幸一，鈴木裕一（静岡県立大学 食品栄養）

(2) 大腸上皮 T84 細胞の分泌性収縮と調節性容積増加

真鍋健一，出崎克也，森島 繁，岡田泰伸（生理学研究所 機能協関）

(3) 膵導管細胞の水分分泌に対するセロトニンの作用の検討

成瀬 達，石黒 洋（名古屋大学 医学部第2内科）

(4) Modulation of substance P-induced Ion transport by Adenosin

桑原厚和，唐木晋一郎（静岡県立大学 環境科学研究所）

(5) 排便反射障害と腰部交感神経

山内昌哉，高木 都（奈良県立医科大学 第1外科，第二生理）

(6) 胃粘液（胃ムチン）代謝

石原和彦，市川尊文，五艘行信（北里大学 医療衛生学部，医学部生化）

(7) 小腸カルニチン吸収機構

玉井郁巳，辻 彰（金沢大学 薬学部）

(8) ストレプトゾトシン誘発糖尿病動物における胃粘膜易損性の増大 - カプサイシン感受性知覚神経との関連

田嶋公人（京都薬科大学 薬物治療学）

(9) 小腸無機リン酸トランスポーターと高リン血症治療

宮本賢一（徳島大学医学部）

(10) ウナギの飲水行動に関与する筋の神経支配

安藤正昭，椋田崇生，小坂朋大（広島大学 総合科学部 総合生理）

(11) 核内受容体 PPAR を介した脂溶性栄養素吸収関連遺伝子の発現調節

合田敏尚（静岡県立大学食品栄養科学部）

(12) 大腸におけるトロンボキササン A<sub>2</sub> の病態生理機能

酒井秀紀（富山医科薬科大学薬学部）

(13) 腔腸動物ヒドラのぜん動運動について

清水 裕（国立遺伝学研究所，発生遺伝研究部門）

### 【参加者名】

川俣幸一（静岡県立大学），鈴木裕一（静岡県立大学），  
真鍋健一（生理学研究所），出崎克也（生理学研究所），  
森島繁（生理学研究所），岡田泰伸（生理学研究所），成  
瀬達（名古屋大学 医学部第2内科），石黒洋（名古屋大  
学 医学部第2内科），桑原厚和（静岡県立大学 環境科  
学研究所），唐木晋一郎（静岡県立大学 環境科学研究所），  
山内昌哉（奈良県立医科大学 第1外科），高木都（奈良  
県立医科大学 第二生理），石原和彦（北里大学 医療衛

生学部），玉井郁巳（金沢大学 薬学部），田嶋公人（京  
都薬科大学 薬物治療学），宮本賢一（徳島大学医学部），  
安藤正昭（広島大学 総合科学部 総合生理），合田敏尚  
（静岡県立大学食品栄養科学部），酒井秀紀（富山医科薬  
科大学薬学部），尾崎毅（岡崎国立共同研究機構動物実験  
センター），清水裕（国立遺伝学研究所，発生遺伝研究部  
門）

## 【概要】

消化管機能に関し、運動から上皮機能あるいは細胞生理学的側面にわたる幅広い分野からの報告がなされ、また活発な討論がなされた。また方法論も分子生物学から

形態学まで様々であった。これを機会に今後ますます消化管研究が発展する事が期待される。

## (1) 大腸プロピオン酸吸収機序

川俣幸一, 鈴木裕一 (静岡県立大学 食品栄養科学部)

大腸内では、食物繊維が腸内細菌の発酵作用を受け大量の短鎖脂肪酸(酢酸, プロピオン酸, 酪酸)が産生される。産生された短鎖脂肪酸は大腸で代謝されるか、あるいは吸収され体内で代謝される。われわれは、大腸での短鎖脂肪酸吸収のメカニズムを明らかにしようとする一連の研究を行っている。実験は、切り出したラット盲腸を Ussing chamber に装着し、短絡電流、プロピオン酸吸収速度 (HPLC で測定)、管腔側 Total CO<sub>2</sub> 蓄積 (炭酸ガス電極)、管腔側アルカリ化 (pH スタット)、等を測定した。得られた結果は、1) プロピオン酸吸収は短絡電流を伴わない非起電性のものである。2) 管腔側プロピオン酸吸収は重炭酸イオン (漿膜側) に依存する成分と依存しない成分がある。3) 重炭酸イオン依存性のプロピ

オン酸吸収速度におおよそ一致した大きさの、管腔内アルカリ加速度と Total CO<sub>2</sub> 蓄積速度が観察される。以上の結果より、管腔側膜に短鎖脂肪酸/HCO<sub>3</sub> 交換輸送体が存在すると考えられ、短鎖脂肪酸吸収の一部を担っているものと思われる。短鎖脂肪酸産生は大腸内を酸性化するので、短鎖脂肪酸吸収がアルカリ分泌とカップルして起こることは、大腸内酸塩基平衡を考える上でも興味深い。なお、この短鎖脂肪酸/HCO<sub>3</sub> 交換輸送体活性は、DIDS や NPPB でほとんど抑制されないの、Cl/HCO<sub>3</sub> exchanger である AE ファミリーや DRA (先天性 Cl 喪失性下痢症の原因遺伝子) とは異なるものと考えられる。

## (2) 大腸上皮 T84 細胞の分泌性収縮と調節性容積増加

真鍋健一, 出崎克也, 森島 繁, 岡田泰伸 (生理学研究所 機能協関)

モルモット小腸やラット大腸の腺上皮において、VIP による cAMP 仲介性 Cl<sup>-</sup> 分泌による細胞収縮と、それに つづくゆるやかな容積回復が見られることが報告されている (O'Brien et al. 1993; Diener, 1994)。我々は、Ca<sup>2+</sup> を介する分泌刺激物質であるカルパコールに対して、ヒト大腸上皮細胞株 T84 が同様の応答を示すことを報告した (第 47 回中部日本生理学会)。刺激直後に見られる細胞収

縮は、BAPTA による細胞内 Ca<sup>2+</sup> キレートや、Ca<sup>2+</sup> 依存性 Cl<sup>-</sup> チャネルブロッカーであるニフルミン酸によって消失したので、Ca<sup>2+</sup> 依存性 Cl<sup>-</sup> 分泌によるものと考えられた。収縮後の調節性容積増加 (Regulatory Volume Increase: RVI) は、ブメタニドによって抑制されたことから Na-K-2Cl シンポータ(NKCC)の関与が示唆された。

## (3) 膵導管細胞の水分分泌に対するセロトニンの作用の検討

成瀬 達, 鈴木 厚, 石黒 洋 (名古屋大学 医学部 第 2 内科)

モルモットの膵管上皮にはセロトニン (5-HT) 含有細

胞が存在するが、その機能は不明である。そこで、単離

小葉間腺管を用いて 5-HT の腺管細胞からの水分泌に及ぼす作用を検討した。単離腺管（径約 100 μm）を 3 時間培養すると両端が閉じ管腔は閉鎖腔になる。この腺管を 37 °C にて重炭酸緩衝液で表層灌流し、明視野像を 1 分間隔で取得した。管腔の面積の変化から、1 分毎の水分泌量を求め、単位上皮表面積あたりで表した。セクレチン（1 nM）刺激による水分泌（ $2.23 \pm 0.05$  nl min<sup>-1</sup> mm<sup>-2</sup>, mean ± SE, n = 16）は、5-HT（0.1, 1, 10 mM）を灌流液に加えると、それぞれ、 $0.44 \pm 0.08$ ,  $0.42 \pm 0.13$ ,  $0.86 \pm 0.12$ , n = 4 と有意（P < 0.01）に抑制さ

れたが、5-HT（0.01 mM）では抑制されなかった。また、5-HT<sub>3</sub> アゴニストである 2-methyl 5-HT により有意に抑制されたが、5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>4</sub> アゴニストでは抑制されなかった。管腔内に 5-HT（1 mM）を注入した腺管では、セクレチン（1 nM）刺激による水分泌は変わらなかった。アセチルコリン（1 mM）刺激による水分泌（ $1.40 \pm 0.04$ , n = 4）は、5-HT（0.1 mM）を灌流液に加えると有意に抑制された（ $0.37 \pm 0.02$ , P < 0.01）。5-HT は腺管細胞からの cAMP および Ca<sup>2+</sup>依存性の水分泌を基底膜上の 5-HT<sub>3</sub> 受容体を介して抑制する。

#### (4) Modulation of substance P-induced Ion transport by Adenosin

桑原厚和, 唐木晋一郎 (静岡県立大学 環境科学研究所)

モルモット下部大腸において、サブスタンス P の誘発するイオン輸送に対するアデノシン受容体作動薬の効果を短絡電流法によって解析した。下部大腸粘膜・粘膜下組織標本を作成し、膜の両側を Krebs-Ringer で灌流、短絡電流を測定して正味のイオン輸送の指標とした。選択的アデノシン A<sub>1</sub> 受容体作動薬、CCPA は、サブスタンス P の漿膜側投与により誘発される短絡電流の増加を有意に抑制した。選択的アデノシン A<sub>2A</sub> 受容体作動薬、CGS21680 は、サブスタンス P の誘発するイオン輸送を促進する傾向を示したが、有意な差は見られなかった。しかし、サブスタンス P を前投与し、CGS21680 を投与すると、短絡電流は増大し、この反応は、TTX 存在下でほとんど抑制された。非選択性（A<sub>1</sub> + A<sub>2A</sub> + A<sub>2B</sub>）アデノシン受容体作動薬、NECA は、サブスタンス P の反応を有意に促進した。TTX 存在下では、サブスタンス P を

単独投与したときの短絡電流増加はほぼ消失したが、NECA 前処理によって、サブスタンス P は短絡電流を増大させた。さらに、NECA は単独投与においても一次的な短絡電流の増大を示した。この反応は、TTX によって影響を受けなかったが、サブスタンス P 前投与によって、持続的な短絡電流増加を示し、TTX 及びサブスタンス P の両方を前処理すると、NECA の応答は有意に増強された。以上の結果より、1) アデノシン A<sub>1</sub> 受容体の刺激はサブスタンス P の誘発するイオン輸送を抑制し、2) A<sub>2A</sub> 受容体刺激は神経系を介して促進する。3) NECA は上皮細胞のアデノシン A<sub>2B</sub> 受容体を介して短絡電流を増大させ、4) サブスタンス P は上皮細胞レベルでアデノシン A<sub>2B</sub> 受容体刺激と相互作用し、短絡電流の増大を増強させることが示唆された。

#### (5) 排便反射障害と腰部交感神経

山内昌哉, 杉森志穂, 中川 正 (奈良県立医科大学 第一外科)  
高木 都 (第二生理)

高木らは(1980-1987)、モルモット、ネコの排便反射が引き起こされる際には、腰部交感神経を介する腰髄レベルの抑制反射が橋排便反射中枢より完全ではないが、強く抑制されることを明らかにした。今回我々は、より統合的な排便機構の解明をするために、直腸—直腸反射の

みならず、直腸—内肛門括約筋 (IAS) 反射も同時に記録し、両者の反射機構に対する腰部交感神経の役割を検討した。また、臨床において、直腸癌術後の排便機能障害が存在するので、腸管切除にともなう交感神経切除の影響についても検討した。

直腸を加圧伸展すると、骨盤神経を求心路とする直腸-直腸反射と直腸-IAS 反射が起こる。腰部結腸神経は腰髄レベルの抑制反射を引き起こしているが、その活動は橋排便反射中枢より抑制されているために、典型的な直腸反射性収縮と IAS 反射性弛緩を起こす。Th13 横断により上位中枢からの抑制がなくなると腰部結腸神経を介する抑制反射が働き、直腸-直腸反射および直腸-IAS 反射は

消失する。続いて腰部結腸神経を切断すると抑制がとれて再び直腸反射性収縮と IAS 反射性弛緩が出現する。また、intact なモルモットで腰部結腸神経を切断しても同様な効果が認められた。以上の結果から、腰部結腸神経切断が術後排便機能障害の一因となっていること、直腸-IAS 反射にも直腸-直腸反射と同様の排便機構が働いていることが示唆された。

## (6) 胃粘液 (ムチン) 代謝

石原和彦, 市川尊文, 五艘行信 (北里大学医療衛生学部生化学, 同医学部生化学)

胃粘膜には表層粘液細胞 (SMC) と粘膜深部の腺粘液細胞 (GMC) の少なくとも 2 種類の粘液産生細胞があり、これらは異なった性質をもつ粘液を産生・分泌している。また胃体部と胃前庭部にも独特の粘液が存在する。我々は、胃粘液の主要成分であるムチン (粘液糖タンパク質) に着目し、主として生化学的手法による研究を行なっている。

前回の本研究会では、産生細胞の異なるラット胃ムチンを特異的に認識するモノクローナル抗体の開発について報告したが、今回はこの抗体を用いて得られたいくつかの研究結果を報告する。前回の報告で NO がラット胃

体部表層のムチン合成亢進に關与することを示した。今回は胃体部粘膜から SMC の存在する部分を、残った GMC を含む胃粘膜層から物理的に剥離する方法を採用し、2 つの層について検討した。その結果、calcitonin gene-related peptide (CGRP) が NO を介して胃体部表層ムチン合成を亢進していることが明らかとなった。この反応は SMC 層のみを用いた場合でも観察できるが、SMC 層を剥離した深部胃粘膜を用いるとみられなくなることから、CGRP が SMC の NO 合成酵素に作用し、ガストリンで見られたものと同様にムチン合成を亢進していると考えられた。

## (7) 小腸カルニチン吸収機構

玉井郁巳, 辻 彰 (金沢大学薬学部)

カルニチンは脂肪酸代謝に必要な水溶性低分子のビタミンの一つで、その消化管吸収を含めた細胞膜透過にはトランスポーターを介する必要がある。我々は既にカルニチントランスポーターとして OCTN2 遺伝子を単離しその機能解析を行った。OCTN2 は有機カチオントランスポーターファミリーに属しており、有機カチオンをナトリウムイオン非依存的に輸送する一方で、ナトリウムイオン依存的にカルニチンを能動輸送する。我々は OCTN2 を多機能性トランスポーターとして位置づけ、生理的物質はナトリウムイオン依存的な吸収に、カチオン性の生体異物は排出に働くものと考えている。これまでカルニチンの小腸上皮細胞輸送については、担体介在

輸送の示唆はあるが、単純拡散との指摘もあり明確ではない。OCTN2 遺伝子は消化管にもそのシグナルが検出され、小腸でのカルニチン輸送に関わる可能性が考えられた。そこで、小腸上皮細胞刷子縁膜小胞を用いてカルニチン輸送特性を調べた。その結果、カルニチン輸送はナトリウムイオンによる取り込み促進を示した。また、OCTN2 を介したカルニチン輸送阻害剤による取り込み低下が観測された。しかし、完全には OCTN2 の特性とは一致せず、カルニチンの吸収は OCTN2 と類似した特性を持つトランスポーターによって生じていることが示唆された。

(8) ストレプトゾトシン誘発糖尿病動物における胃粘膜易損性の増大  
- カプサイシン感受性知覚神経との関連 -

田嶋公人 (京都薬科大学 薬物治療学教室)

ストレプトゾトシン (STZ) 誘発糖尿病ラットを用い、胃粘膜バリアー破壊に伴う胃粘膜血流 (GMBF) の増大反応および損傷発生に対する糖尿病の影響について、特にカプサイシン感受性知覚神経の関与を中心に検討した。雄性 SD 系ラットに STZ を処置し、血糖値が 350 mg/dl 以上を糖尿病動物とした。オメプラゾール処置後、ウレタン麻酔下に胃をチェンバーに装置し、50 mM 塩酸存在下に 20 mM タウロコレート (TC) を 30 分間適用し、胃粘膜電位差 (PD)、GMBF および酸の逆拡散量の変化を測定した。また、TC 適用後 90 分に胃粘膜上に発生した出血性損傷を観察した。一方、カプサイシン感受性知覚神経の選択的な刺激薬であるカプサイシンに対する GMBF 変化および摘出胃からのカルシトニン遺伝子関

連ペプチド (CGRP) の遊離量も測定した。糖尿病ラットは TC 適用による PD 低下および酸の逆拡散量に影響を与えなかったが、酸の逆拡散によって誘起される GMBF の増大反応は正常ラットに比べ有意に減弱していた。また TC 適用後、正常ラット胃粘膜では殆ど損傷は認められなかったが、糖尿病ラットでは重篤な出血性損傷が胃粘膜上に発生した。一方、カプサイシンによる GMBF 増大反応および摘出胃からの CGRP 遊離量は糖尿病ラットでは明らかに低下していた。STZ 誘発糖尿病ラットは酸に対する胃粘膜感受性を増大させ、易損性を高めることが判明した。このような現象はカプサイシン感受性知覚神経を介する GMBF 増大反応の調節異常に基づくことが推察された。

(9) 小腸無機リン酸トランスポーターと高リン血症治療

宮本賢一 (徳島大学・医学部・栄養化学)

慢性腎不全末期患者は、糖尿性腎症の増加により現在 20 万人を数えている。このほとんどが、血液透析患者であるが、透析技術の進歩に伴い長期生存が可能となった。それと同時に、はじめは問題とされなかった二次性副甲状腺機能亢進症などによりもたらされる骨合併症が新たに出現し、患者の予後を左右する重大な問題となっている。とくに透析技術で除去できない無機リン酸 (リン) 蓄積は、副甲状腺細胞を刺激して副甲状腺ホルモン PTH の分泌を亢進し、その結果二次性副甲状腺機能亢進症の発症をもたらす。慢性血液透析患者では、このような高リン血症が高頻度に観察される。血清リン濃度のコ

ントロールには、食餌によるリン摂取の制限や各種リン吸着薬投与による消化管からのリン吸収抑制が必要となる。しかしながら、いずれの方法も患者の負担が大きく、有効な高リン血症治療薬が望まれている。

小腸からのリン吸収を担うのは、ナトリウム依存性リン輸送トランスポーター (the type IIb Na/Pi transporter) であり、本輸送系を特異的に阻害することは、高リン治療に有効と考えられた。本講演では、私共の研究成果を中心に 1) 小腸リン吸収システムの調節機構、2) リン輸送トランスポーターの阻害剤、3) 透析患者の高リン血症の治療成績について述べる。

(10) ウナギの飲水行動に関する筋の神経支配

安藤正昭, 棕田崇生, 小坂朋大伸 (広島大学・総合科学部・総合生理)

大部分の陸上脊椎動物は、飲水行動によって水を摂取し、血液の恒常性を維持している。しかし陸上脊椎動物

の飲水行動は、「渴き」の後に「水場探索行動」、「水を口に含む行動」、「燕下」と続き、その解析が複雑であるこ

とが予想される。一方水中に棲む魚類は、呼吸のために絶えず水が口中にあるので、「燕下」のみで飲水行動は完結し、その神経回路は哺乳類より単純であることが期待できる。本研究はウナギの飲水行動の調節機構を明らかにし、哺乳類の飲水行動を理解する一助とすることを目的とする。

海水ウナギの静脈中に Angiotensin I (ANG I) を注入すると飲水速度は高まるが、Captopril (CP) で ANG II 合成を阻害すると ANG I の効果は消失する。また脱血によっても飲水は増大するが、この効果も CP 処理によって消失することから、ウナギも哺乳類と同様に、血液量の減少(血圧低下)によって Renin-Angiotensin 系が活性化し、ANG II によって飲水が惹起されると考えられる。しかし血液浸透圧の上昇に対してウナギは飲水量を低下させた。また ANG II 以外にも、種々の因子が飲水行動に関与していることを見つけた。次にこれらの調節因子を第 IV 脳室に投与したが、基本的な作用はよく似ていた。このことは、これらの因子が脳室周囲器官に作用していると考えれば説明できる。ウナギの脳室周囲器官を同定する目的で Evans blue (EB) を血中に射つと、Area postrema

と松果体が濃染された。ウナギの脳は小さく、摘出したままでも灌流液中で神経活動を記録できる。この系で、延髄背側部が ANG II や Atrial natriuretic peptide (ANP) に反応することを見つけた。このことはウナギの脳内に ANG II や ANP の受容体が存在していることを示している。

ウナギの食道輪走筋は Acetylcholine (ACh) によって収縮する。また短い duration の繰り返し電気刺激によっても収縮する。この電気刺激の効果は TTX や Curare によって抑えられることから、食道輪走筋は神経の支配を受けており、その伝達物質は ACh だと考えられる。次に食道筋に EB を注入し、この色素を取り込むニューロンを探したところ、延髄の Dorsal motor nucleus of the vagus (DMN) が染まった。また DMN は Choline acetyl transferase (ChAT) の抗体でも染まった。このことからウナギの DMN は ACh を合成し、食道輪走筋を収縮させることが考えられる。ウナギの食道輪走筋を弛緩させる因子はまだ見つけていないが、Isobutyl-methylxanthine (IBMX) で弛緩することから、弛緩因子はあると思っている。

### (11) 核内受容体 PPAR を介した脂溶性栄養素吸収関連遺伝子の発現調節

合田敏尚, 望月和樹, 駿河和仁 (静岡県立大学食品栄養科学部)

脂質ならびに脂溶性の栄養素はその吸収の過程で吸収細胞内の細胞質に存在する特異的な結合タンパク質による輸送を受ける。小腸には、肝臓型 (L-) と小腸型 (I-) の脂肪酸結合タンパク質 (FABP) が大量に発現しており、脂肪酸の細胞内輸送に関わっている。一方、細胞性レチノール結合タンパク質タイプ II (CRBP II) は吸収細胞内に取り込まれたレチノールを結合することによってビタミン A の吸収に携わるタンパク質であり、小腸に特異的に発現している。これらの脂溶性栄養素吸収関連タンパク質の発現は、いずれも高脂肪食摂取、特に長鎖不飽和脂肪酸の摂取により転写レベルで正に調節されていることをこれまで明らかにしてきた。脂肪酸のシグナルを核における遺伝子の転写へと仲介する核内受容体として、近年ペルオキシゾーム増殖因子活性型受容体 (peroxisome proliferator-activated receptor; PPAR) が注目されている。L-FABP と CRBP II の遺伝子の 5' 上流には PPAR 結合領域のコンセンサス配列と類似した領域が存在したので、ラ

ット小腸における PPAR のサブタイプの発現を調べてみたところ、小腸には PPAR と PPAR が発現していた。このうち PPAR は脂溶性栄養素吸収関連遺伝子の発現量が高まる時期 (離乳期や高脂肪食摂取時) に対応して発現量が増大していた。また、in vitro で転写・翻訳した PPAR と PPAR を用いたゲルシフト法により、長鎖脂肪酸は PPAR とこれらの PPAR 結合領域との結合を増強する作用を示すことが示された。さらに、PPAR または PPAR のリガンド結合ドメインと GAL4 の DNA 結合ドメインのキメラタンパク質発現ベクターを用いる One-hybrid assay 系により、PPAR が PPAR より多くの種類の脂肪酸をリガンドとして結合し、転写の活性化をもたらすとともに、小腸に特に多く発現している転写共役因子 p300 と強く相互作用することが明らかになった。従って、小腸に発現している PPAR の中でも特にサブタイプ が脂肪酸のシグナル伝達因子として脂溶性栄養素吸収関連遺伝子の発現調節に重要な役割を果たしている

と考えられる。

## (12) 大腸におけるトロンボキサン A2 の病態生理機能

酒井秀紀, 鈴木智之, 竹口紀晃 (富山医科薬科大学 薬学部 薬物生理学講座)

大腸において, 下痢の際には, 粘膜の Cl 分泌が異常に亢進していることが良く知られている。我々は, Ussing チェンバー法によるラット単離大腸粘膜標本の短絡電流測定, ホールセルパッチクランプ法による大腸腺クリプト細胞の膜電位測定, エンザイムイムノアッセイによるトロンボキサンの定量などにより, アラキドン酸代謝物のトロンボキサン A2 が, 大腸において Cl 分泌を引き起こす新規生理活性物質であることを発見した。

興味深いことに, トロンボキサン A2 は, プロスタグランジン E2 やアセチルコリンなどの場合と異なり, 正

常な状態では, 大腸のイオン分泌には全く寄与していなかった。しかし, 抗癌剤の塩酸イリノテカンが引き起こす激しい下痢 (Cl 分泌) は, トロンボキサン A2 の産生を介して引き起こされること, 潰瘍性大腸炎の際に病変組織で多量に検出される血小板活性化因子 (PAF) による Cl 異常分泌機構に, トロンボキサン A2 の産生が介在していることを発見した。したがってトロンボキサン A2 は, 大腸の病態生理機能に密接に関連しているものと考えられた。

## (13) 腔腸動物ヒドラのぜん動運動について

清水 裕 (国立遺伝学研究所, 発生遺伝研究部門)

ヒドラは淡水産の腔腸動物で細胞数は約十万個, しかし多細胞体制を有する動物としては最も下等なもののひとつと考えられてきた。発表者は, 高等動物の生理機能の大部分は進化的にヒドラまでさかのぼれるのではないかという観点から様々な基礎研究を行っている。ヒドラの体幹部は円筒形でそのまま消化管となっている。そしてその構造はほ乳類の消化管と非常によく似ている。縦方向と円周方向に互いに直交する平滑筋を持つこと, その内部に散在した神経集網が存在することなどである。ヒドラの消化過程を詳細に調べた例はこれまでなかった。

### 【本研究の概略】

我々はその過程が高等動物と比較してどう違うのかを

調べようと, もっぱらビデオ観察を行ってきた。その結果, 給餌後 30 分ないし一時間後からぜん動と考えられる現象が観察できた。その際, ヒドラの消化管は閉じているために (前口動物のため) 内容物は体腔内を行ったり来たりする往復運動に終始する。このぜん動機構を調べる過程で様々な事実が明らかになっている。そのひとつは神経が完全に欠失した無神経ヒドラでもぜん動が認められた点である。従来のは乳類の腸管を用いた研究から腸管内に散在する神経集網の関与が不可欠と考えられてきたが, 本実験結果はそれと相反する。研究はまだ初期段階であるが, これまでに得られた情報を発表し, 専門の方々の助言を頂戴したい。

15. 脳の情報統合と行動発現のメカニズム - 感覚知覚から生体反応形成まで -

2001 年 1 月 11 日 - 1 月 12 日

代表・世話人：泰羅雅登（日本大学・医学部・第一生理学教室）

森 茂美（生体調節研究系・生体システム部門）

- ( 1 ) 脳幹と小脳による眼球運動制御 - 眼位保持と視覚サッケードの神経機構  
岩本義輝（筑波大学・基礎医学系・生理）
- ( 2 ) 追従眼球運動と追跡眼球運動の神経機構  
小高 泰（電総研・情報科学部）
- ( 3 ) 前頭前皮質における選択的注意について  
射場美智代（北海道大学・医学部・機能分子学）
- ( 4 ) 刺激 - 運動 - 報酬連合に基づいた意思決定の脳内機構  
松元健二（理研・脳センター認知機能表現）
- ( 5 ) サル前頭眼窩野細胞の報酬期待活動  
彦坂和雄（東京都神経研・心理）
- ( 6 ) リスザルにおける脊髄運動細胞への大脳皮質興奮性出力様式  
~ C3 - C4 脊髄固有ニューロンのかかわり ~  
中隲克己（生理研・生体システム）
- ( 7 ) V4 野における陰影テクスチャーの特徴抽出  
花澤明俊（生理研・高次神経性調節）
- ( 8 ) 前部側頭皮質「顔」応答ニューロンによる「顔」空間の表現  
永福智志（富山医科薬科大学・医学部・第二生理）
- ( 9 ) 霊長類下部側頭葉における視覚記憶表現：記銘と想起について  
納家勇治（生理学研究所 高次液性調節部門）

【参加者名】

岩本義輝（筑波大学基礎医学系）、小高 泰（通産省工業技術院電子技術総合研究所 / 情報科学部）、松元健二（脳科学総合研究センター認知脳科学研究グループ認知機能表現研究チーム）、射場美智代（北海道大学大学院医学研究科・脳科学専攻・神経機能学講座・機能分子学分野）、彦坂 和雄（財団法人・東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・心理学研究部門）、永福 智志（富山医科薬科大学 医学部 生理学第二講座）、山田洋（大阪大学医学部医学修士課程 1 年）、渡邊 淳司（東京大学大学院 工学系研究科 計数工学専攻）、林 隆介（東京大学大学院 工学系研究科 計数工学専攻）、磯村宜和（（財）東京都医学研究機構 東京都神経科学総合研究所 統合生理研究部門）、宮地重弘（（財）東京都医学研究機構 東京都神経科学総合研究所 統合生理研究部門）、稲瀬正彦（近畿大学医学部）、高田昌彦（（財）東京都医学

研究機構 東京都神経科学総合研究所 統合生理研究部門）、佐藤多加之（理研・脳センター脳統合機能（筑波大学院））、山野辺貴信（北海道大学大学院医学研究科 生体機能学専攻統合生理学講座 認知行動学分野）、筒井健一郎（日本大学医学部第一生理学教室）、佐藤暢哉（日本大学医学部第一生理学教室）、高橋和巳（福島県立医科大学 医学部 生理学第二講座）、平場久雄（日本大学歯学部生理学教室）、鵬川紘征（日本大学歯学部生理学教室）、村上郁也（NTT コミュニケーション科学基礎研究所人間情報研究部）、泰羅雅登（日本大学医学部第一生理学教室）、村田 哲（近畿大学医学部第一生理）、伊澤栄一（名大院 生命農学 動物比較情報）、中嶋真也（名大院 生命農学 動物比較情報）、青木直哉（名大院 生命農学 動物比較情報）、福島 宏器（東大教養学部広域科学科 開一夫研究室）

## 【概要】

21世紀年最初の研究会として、1月11日、12日の両日、「脳の情報統合と行動発現のメカニズム - 感覚知覚から生体反応形成まで -」が開催され、若い研究者を中心に、全国から40名近い参加者があった。今回は、「眼球運動の制御」、「前頭前野 ワーキングメモリを越えて」、「運動野再訪」、「視覚認知から記憶へ」の

それぞれのセッションで2~3の話題提供をお願いし、討論をおこなった。発表されたテーマはどれも最新の情報であり、非常に内容の濃いものであった。毎年の研究会の反省でディスカッションが十分でないのご指摘を幾人かの方々からいただいたので、今回は特に十分なディスカッションの時間を用意し、活発な討論をおこなった。

### (1) 脳幹と小脳による眼球運動制御 - 眼位保持と視覚サッケードの神経機構

岩本義輝 (筑波大学・基礎医学系・生理)

サッケードと眼位保持は、視覚対象に視線を向けその像を網膜中心窩に固定するために不可欠の機能である。我々は、眼位保持に重要な神経積分器の実体を明らかにするため、覚醒ネコで眼球位置信号を持つニューロン間の結合を調べた。その結果、前庭神経核と中脳カハール間質核の相互結合・交連性結合が速度信号から位置信号への変換に重要であること、脳幹内の多重ループが積分機構を担うことが示唆された。さらに、橋正中部の

paramedian tract (PMT) ニューロンが眼球運動情報を小脳に伝え、小脳による積分機構の調節に寄与することを示した。視覚目標に向かうサッケードのゲイン (saccade size/target distance) は、反復する視覚誤差により可塑的に変化する。我々は、覚醒サルでゲイン適応に伴い小脳室頂核のニューロン活動が変化することを観察した。この予備的結果は、適応に室頂核が関与することを示唆する。

### (2) 追従眼球運動と追跡眼球運動の神経機構

小高 泰 (経済産業省・電子技術総合研究所 情報科学部 脳機能)

ヒトやサルのように網膜に中央に中心窩が発達した霊長類では、動く視標を追跡する時、追跡眼球運動 (smooth pursuit eye movement) が生じます。速度の遅い眼球運動には、もう一つ、追跡眼球運動 (ocular following response: OFR) がある。この眼球運動は、広い視野の動きに対して、網膜上の像が安定するように短潜時で生じる。自然な状態では、追跡眼球運動が生じると、視標以外の背景は、眼球運動によって生じた動きのため、眼の動きとは

逆向きの動きとして捕らえられる。しかし、我々は、日常、追跡眼球運動を行うことができる。サルを用いて、追跡眼球運動中に、背景の動きに対する反応を調べた。行っている眼球運動と同じ向きに動く背景の動きに対して大きな反応が見られたが、逆向きの動きに対しては反応が見られなかった。これは、脳内で、追跡眼球運動を行っている間、追従眼球運動の発現を抑える仕組みがあるためではないかと思われる。

### (3) 前頭前皮質における選択的注意について

射場美智代 (北海道大学大学院医学研究科・脳科学専攻機能分子学分野)

これまでの研究により前頭前皮質は意味のある情報を一時的に保持し、出力するという「ワーキングメモリ過

程」に関与する事が示されてきた。しかし、ワーキングメモリに入力される前段階の「意味のある情報の選択」

に関する研究はほとんどされてこなかった。記憶には容量があるため、雑多な情報の中から意味のある情報を選択する過程が存在すると考えられる。そこで、我々は前頭前皮質がターゲット選択のような選択的注意にいかに関与するかを明らかにするため、眼球運動を用いた視覚探索課題とムシモールによる局所機能脱落法を組み合わせ

せた実験や、単一ニューロン活動記録法を用いてこの問題に取り組んできた。これらの実験により、前頭前皮質が意味のある情報の選択に関与する事、その過程にはノルアドレナリン 2 受容体が関与する事、さらにこの分野には従来報告されてきた記憶システムに加えて選択的注意と結びついた記憶過程が存在する事が示唆された。

#### (4) 刺激 - 運動 - 報酬連合に基づいた意思決定の脳内機構

松元健二 (理研・脳センター認知機能表現)

合目的的行動の意思決定場面において、刺激、運動、報酬それぞれの情報がどのように処理統合されるのかを明らかにするため、刺激 - 運動 - 報酬の連合とその組み替えを必要とする視覚弁別課題遂行中のサル3頭の外側前頭前野および前頭眼窩野から単一細胞活動を記録した。いずれの領域とも視覚刺激呈示に際しては、刺激と報酬の影響を強く受けた。その後外側前頭前野では運動のみの影響を受ける細胞が、運動前の遅延期に一時的に増え

た。前頭眼窩野では、報酬のみの影響を受ける細胞が試行の終わりまで多く見られた。また、外側前頭前野細胞では、運動に向けては運動主効果が、報酬に向けては報酬主効果が安定したが、前頭眼窩野細胞では、いずれの主効果とも試行中安定していた。これらの結果は、視覚刺激に連合された報酬情報によって活性化された後、外側前頭前野は、運動の意思決定場面で運動情報を抽出し、前頭眼窩野は報酬情報を抽出、保持することを示唆する。

#### (5) サル前頭眼窩野細胞の報酬期待活動

彦坂和雄 (東京都神経科学総合研究所・心理)

前頭眼窩野は前頭連合野の腹側部に広がる領野であり、刺激 報酬間の連合機能や情動機能に関与している。サルに異なる報酬を一定の順序で与える課題を行なわせながら、前頭眼窩野細胞の報酬期待活動の性質を調べた。用いた課題は、3つの報酬試行と1つの無報酬試行からなる遅延付き反応時間課題である。4 試行を1つのブロックとして、報酬として(1)オレンジジュース、(2)水、(3)グレープジュース、(4)無報酬という順序で与えた。液体報酬のかわりにエサ報酬も用いた。遅延期

間中に見られる前頭眼窩野細胞の報酬期待活動には3つのタイプが見出された。報酬と無報酬の違いに関係する報酬期待活動 特定の報酬に関係する報酬期待活動 好む報酬と好まない報酬の違いに関係する報酬期待活動である。又、動物が特定の報酬を食べた試行と食べない試行で報酬期待活動が変化した。これらのことから、前頭眼窩野細胞の報酬期待活動は、動物の報酬に対するモチベーションに依存しており、特定の報酬価を期待する機能に関係していると考えられた。

#### (6) リスザルにおける皮質脊髄路興奮性出力の頸髄運動細胞への伝達様式 ~ C3-C4 脊髄固有ニューロンのかわり ~

中階克己 (生理学研究所・生体システム研究部門)

上肢運動制御において大脳皮質興奮性出力が皮質脊髄路

を介して上肢筋支配運動細胞へ到達する経路については、

運動細胞へ直接伝達される直接経路 (cortico-motoneuronal system : CM system) と、第3～第4頸髄レベルに位置する脊髄固有ニューロン C3-C4 propriospinal neuron (PN) を介して伝達される間接経路 (PN system) とが明らかにされている。CM system をもたないネコでは PN system が発達している。一方霊長類では手指運動の精緻度に重要な役割を果たす CM system が発達している。最近手指の精緻運動能力の高いマカクサルにおいて PN system の発達度が低いことが報告された (Maier et al., 1998)。本研究の目的は、マカクサルに比べて手指運動の精緻度に劣りかつ CM system の発達度の低いリスザルにおいて皮質

脊髄路興奮性出力がどの程度まで PN system を介して上肢筋支配運動細胞へ伝達されるかを明らかにすることである。4匹のリスザルにおいて chloralose 麻酔下で延髄対側の皮質脊髄路を刺激し、第6頸髄から第1胸髄レベルに位置する上肢筋支配運動細胞から細胞内記録を行った。その結果、PN system を介して誘発された EPSP を示す運動細胞の割合は86%であり、この値はマカクサル (18%) より高くかつネコ (100%) より低い。以上の結果は PN system の発達度と手指機能の発達度との間には負の相関が成立することが示唆された。

### (7) V4 野における陰影テクスチャーの特徴抽出

花澤明俊 (岩生理研・高次神経性調節)

物体表面のテクスチャーは、その物体を識別したり、表面の材質、摩擦などの属性を判断する上で有用な情報源である。テクスチャー特徴の抽出にマカクサル V4 野が関与するか否かを調べた。コンピュータ画面上に、輝度勾配 (陰影) によって粒子状の細かい凹凸があるように見えるテクスチャー刺激を提示し、要素の密度、大きさおよび陰影の方向を変化させ、神経細胞の応答を調べた。多くの細胞がこれらの刺激属性に選択性を示した。それらの一部は空間周波数選択性では説明のできない振

る舞いをした。まず、要素の陰影の方向に対し1方向性の選択性を示す細胞があった。上または下方向の陰影に選択的な細胞が多く、陰影からの立体知覚にみられる偏りに対応していた。また、粒子状のテクスチャーのみに応答し、正弦波格子やバー刺激に応答しない細胞があった。これらの結果から、V4野が、陰影から復元される3次元構造を含む、テクスチャーの特徴抽出に関与していることが示唆された。

### (8) 前部側頭皮質「顔」応答ニューロンによる「顔」空間の表現

永福智志 (富山医科薬科大学・医学部・第二生理)

個体同定に基づく遅延見本合わせ課題 (I-DMS 課題) 遂行中のサル上側頭溝前部領域と下側頭回前部領域から「顔」応答ニューロンを記録した。I-DMS 課題では、サルが固視点に固視した後、見本「顔」刺激が呈示され、遅延期間の後、テスト「顔」刺激が呈示される。これら「顔」刺激は、サルにとって既知または新奇な人物の顔を7方向から撮影した画像であり、サルは同一人物の画像が呈示された場合、レバ - 押しを行うと報酬が与えられる。「顔」応答ニューロン全体の反応パターンに対する多

次元尺度分析 (Multi-dimensional scaling, MDS) に基づき、上側頭溝前部領域および下側頭回前部領域における「顔」空間を構成したところ、上側頭溝前部領域では「顔」の向きなど、「顔」の知覚情報が、下側頭回前部領域では「顔」の既知性やアイデンティティが、「顔」空間に表現されていることが示された。以上の結果より「顔」情報処理におけるサル上側頭溝前部領域と下側頭回前部領域の機能分化について考察する。

## (9) 霊長類下部側頭葉における視覚記憶表現：記銘と想起について

納家勇治 (生理学研究所 高次液性調節部門)

視覚性対連合記憶課題を遂行中のサルの下部側頭葉から単一ニューロン記録を行い、学習した 12 組 24 枚の各刺激図形を手がかり刺激として提示したときの、刺激提示期間中、並びに遅延期間中における神経活動を TE 野と 36 野で比較し、対連合記憶の記銘と想起に関する 2 つの知見を得た。初めに、個々のニューロンが示す刺激提示期間中の神経応答に対する対連合記憶の影響を評価するため、対連合指標 (PCI) を定義した。その結果、36 野のニューロンが示す PCI の値は TE 野に比べて有為

に高い ( $P < 0.01$ ) ことが示された。このことは対連合記憶の記銘に対し、TE 野から 36 野への順行性シグナル伝達の重要性を示唆する。次に試行中の各時点での神経活動に対する記憶想起の影響を評価するため、対想起指標 (PRI) を定義した。その結果、36 野のニューロンが示す PRI の値は TE 野に比べ有為早く ( $P < 0.01$ ) 上昇し始めることが示された。このことは対連合記憶の想起に関しては、36 野から TE 野への逆行性シグナル伝達が重要であることを示唆する。