【 研 究 活 動 報 告 】

研究活動報告

〔 目　　次 〕

分子生理研究系

神経化学研究部門 11

概　要

恐怖記憶における GABA の関与の解析

（Oliver Stork，Simone Stork，小幡邦彦）

GAD67-GFP マウスの組織学的解析

（柳川右千夫，小幡邦彦，玉巻伸章）

GAD67-GFP マウスの改良

（柳川右千夫，小幡邦彦，宮崎純一）

GAD67 遺伝子プロモーターの解析

（海老原利枝，柳川右千夫，小幡邦彦）

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

（山肩葉子，柳川右千夫，小幡邦彦）

急性神経活動によるシナプシン I のリン酸化調節

（山肩葉子，小幡邦彦）

グルタミン酸脱炭酸酵素欠損マウスにおける視床扁桃体路興奮性シナプス可塑性亢進機構の解析

（兼子幸一，小幡邦彦）

GFP ノックインマウスを用いた扁桃体外側核および基底外側核 GABA 作動性細胞の電気生理学的特性と

モノアミンによる修飾作用の解析

（兼子幸一，小幡邦彦，柳川右千夫）

超微小形態生理研究部門 13

概要

潅流ラット顎下腺における傍細胞輸送経路

（村上政隆，大河原浩，篠塚直樹，中村健治，Bruria Sachar-Hill, Adrian E. Hill）

灌流ラット顎下腺の開口分泌とエネルギー要求性

（村上政隆，高木正浩，前橋寛，Alessandro Riva，瀬尾芳輝）

エンドサイトーシス選別輸送のメカニズムの解析

（大橋正人，永山國昭）

リアノジン受容体の単粒子解析

（松本友治，村田和義，永山國昭，國安明彦，中山仁）

細胞内代謝研究部門 15

概　要

精子抽出物によって誘発される卵細胞内 Ca^{2+}オシレーションの解析

（毛利達磨，宮崎俊一，尾田正二，白川英樹）

マウス卵への mRNA 注入による蛋白質発現法の確立
（毛利達磨，吉友美樹，宮崎俊一，會田拓也，尾田正二，淡路健雄）
濃度依存性 Na^+チャネルと体液浸透圧調節機構
（吉田　繁，檜山武史，渡辺英治，野田昌晴）
難治てんかんに対する脳梁離断術効果の動物実験による考察
（吉田　繁，藤村幸一，小野智憲，小野憲爾）

細胞器官研究系

生体膜研究部門 18
概　要
神経，分泌細胞のカルシウム依存性開口放出機構の研究
（河西　春郎，根本　知己，高橋　倫子，岸本　拓也，児島　辰哉，劉　婷婷，木村　良一）
2 光子励起法を用いた神経機能の研究
（河西　春郎，松崎　政紀，早川　泰之）
イオンチャネル・キネティクスに対する溶媒効果と実験系の問題点
（久木田　文夫）
Chelophyes における興奮収縮連関
（筒井　泉雄）

機能協関研究部門 19
概　要
容積感受性クロライドチャネルの新しいブロッカー：Phloretin
（范　海天，森島　繁，岡田泰伸）
細胞外 ATP 放出路としてのマキシアニオンチャネル
（R. Z. Sabirov，A. K. Dutta，岡田泰伸）
細胞容積調節破綻と細胞死誘導
（岡田泰伸，前野恵美，清水貴浩，森島　繁）

生体情報研究系

神経情報研究部門 22
概　要
オリゴデンドロサイト発生制御機構と脱髄モデルマウスの解析
（鹿川哲史，竹林浩秀，和田圭樹，中平英子，清水健史，松本路生，田中久貴，池中一裕）
アストロサイトの分化・発生様式に関する研究
（岩崎靖乃，長谷川明子，小川泰弘，竹林浩秀，池中一裕）
N 結合型糖タンパク質糖鎖の機能解析
（藤本一朗，池田武史，石井章寛，佐久間圭一朗，池中一裕）
癌遺伝子治療の基礎研究
（片倉浩理，河野洋三，池中一裕）

液性情報研究部門 24
概　要
P/Q 型電位依存性 Ca^{2+}チャネル変異マウスにおけるシナプス伝達の変化
（松下　かおり，Kadrul Huda，井本　敬二）
GFP を用いた蛍光カルシウムプローブ，G-CaMP の開発
（中井　淳一，大倉　正道，井本　敬二）
カルモデュリンによる電位依存性イオンチャネルの制御機構
（森　誠之，井本　敬二）

高次神経機構研究部門 26
概　要
CNR 分子多様性における機構解析
（先崎浩次，八木　健）
マウス嗅球での周波数帯によって分離される独立な 2 つの経路
（田仲祐介，八木健）
遺伝子変換ラット作製系の開発
（金子涼輔，八木健）
中枢神経系における *CNR* の体細胞突然変異の解析
（平山晃斉，八木健）
ゼブラフィッシュ CNR の機能解析
（多田基紀，八木　健）

情報記憶研究部門 28
概　要

生体調節研究系

高次神経性調節研究部門 29
概　要
初期視覚系における輪郭線の折れ曲がりの表現
（伊藤　南，小松　英彦）
初期視覚系における面の表現－光計測による解析
（谷　利樹，横井　功，伊藤　南，小松　英彦，田中　繁）
多次元視覚探索課題遂行中のサル V4 野におけるニューロン活動
（小川　正，小松　英彦）
大脳皮質における色情報表現の課題依存性
（鯉田　孝和，小松　英彦）

生体システム研究部門 30
概　要
中枢無傷・覚醒ネコの姿勢および歩行運動に対する小脳歩行誘発野の選択的刺激および破壊効果
（中溝　克己，森　大志，橘　篤導，森　茂美）

直立二足歩行運動の実行に関与する脳領域の糖代謝 PET 法による同定
（森　大志，橘　篤導，中溝克己，高須千慈子，遠本　徹，塚田秀夫，森　茂美）
成長発達と運動学習による大脳皮質運動野− 歩行関連筋群へのシグナル伝達様式：経頭蓋磁気刺激法を用いた研究
（森　大志，中溝克己，高須千慈子，森　茂美）
ラット線条体カルバコール刺激によって誘発される回旋運動と脳内 c-Fos 発現パターン
（Janos Palhalmi，奥村　哲，Katalin Kekesi，森　大志，森　茂美）
ネコ室頂核-視床路終末線維の視床内分布と形態的特徴
（J. Czarkowska-Bauch，奥村　哲，中溝克己，森　茂美）
ラット腰髄に分布するアセチルコリンエステラーゼ陽性神経細胞の生後発達
（Arpad Dobolyi，奥村　哲，森　大志，森　茂美）
ネコ線条体の出力細胞，介在神経細胞両者に対するセロトニン神経支配様式
（奥村　哲，Arpad Dobolyi，松山清治，森　大志，森　茂美）
直立二足歩行するニホンサル(*M. Fuscata*)に与えた障害物を設置したトレッドミル上での歩行運動課題の学習機序
（橘　篤導，森　大志，Carol A. Boliek，高須千慈子，森　茂美）

高次液性調節研究部門 34
概　要
サル下部側頭葉における長期連合記憶の順行性情報処理
（Naya Y, Yoshida M, Ito A, Shibata S, Miyashita Y）
TE 野と 36 の視覚記憶ニューロンを結ぶ順行性神経繊維の投射様式
（Yoshida M, Naya Y, Ito A, Shibata S, Miyashita M）
認知的注意シフト課題遂行中のマカクサルにおける機能的 MRI
（Nakahara K, Hayashi T, Konishi S, Miyashita Y）
Feeling-of-knowing の神経機構：機能的 MRI によるパラメトリック解析
（Kikyo H, Ohki K, Miyashita M）

大脳皮質機能研究系

脳形態解析研究部門 36
概　要
グルタミン酸受容体の定量的解析
（馬杉（時田）美和子，萩原明，足澤悦子，深澤有吾，重本隆一）
$GABA_B$ 受容体やイオンチャネルの脳内局在と機能解析
（Akos Kulik，萩原明，深澤有吾，重本隆一）
HCN channel の脳内局在の解析
（納富拓也，重本隆一）
シナプス前ドーパミン D2 型受容体とカルシウムチャネルサブタイプとの選択的共役
（籾山俊彦）
mGluR1 の活性化を阻害する自己抗体による小脳失調症
（木下彩栄，重本隆一）
ラット脊髄視床路ニューロン活動性の解析
（籾山明子）

大脳神経回路論研究部門 38
概　要
大脳皮質周期的活動時における GABA 細胞サブタイプの発火様式
（川口　泰雄）
大脳皮質非錐体細胞の神経終末が形成するシナプスの 3 次元的構造
（窪田　芳之，川口　泰雄）
大脳皮質投射細胞と高頻度発射型介在神経細胞の神経結合
（根東　覚）

心理生理学研究部門 40
概　要
聴覚脱失による脳の可塑的変化
（定藤　規弘）
形状認知における視覚・触覚統合の解析
（斎藤大輔，定藤　規弘）
パーキンソン病における思考速度の低下
（本田　学，澤本伸克）
認知機能における運動前野の機能的有意性
（本田　学）
健常者における憑依トランスの発現メカニズム
（本田　学，河合　徳枝）
日本語の音韻変換課題における機能的 MRI 研究
（関あゆみ，定藤規弘）
MRI 撮像音強度の変化に伴う聴覚野の賦活
（岡田　知久）

統合生理研究施設

高次脳機能研究プロジェクト 43
概　要
上丘浅層の GABA 作動性，非作動性細胞に対するアセチルコリンの作用
（遠藤利朗，伊佐　正，柳川右千夫，小幡邦彦）
サルの上肢運動ニューロンを制御する脊髄固有ニューロン系の解析
（Bror Alstermark）
上丘局所回路における層内興奮性結合によるバースト生成機構
（斎藤康彦，伊佐　正）
マウスの上丘電気刺激によって誘発される急速眼球運動について
（坂谷智也，伊佐　正）
中脳ドーパミン細胞においてニコチン受容体活性化に伴って誘発される fulfenamate 感受性電流
（山下哲司，伊佐　正）

感覚・運動機能研究プロジェクト 45
概　要
視覚性運動検出に関与する脳活動の脳磁場による測定
（金桶吉起，王　麗紅，川上　治，Lam Khanh，丸山幸一，久保田哲夫）
顔認知初期過程における「視線」の影響
（渡辺昌子，三木研作，柿木隆介）
Conduction velocity of the spinothalamic tract in humans as assessed by CO_2 laser stimulation of C-fibers
（Yunhai Qiu, Koji Inui, Xiaohong Wang, Tuan Diep Tran, Ryusuke Kakigi）
C 線維を上行する信号による大脳活動
（Tuan Diep Tran，乾幸二，宝珠山稔，Lam K，秋云海，柿木隆介）
C 線維関連レーザー誘発脳電位への注意，非注意および睡眠の効果
（秋云海，乾幸二，王曉宏，Tuan Diep Tran，柿木隆介）
痛み関連誘発脳電位に及ぼす睡眠の効果
（王曉宏，乾幸二，秋云海，宝珠山稔，Tuan Diep Tran，柿木隆介）
単語ならびに非単語に誘発された脳磁場に対する刺激反復の効果
（関口貴裕，小山紗智子，柿木隆介）
Automatic discriminative sensitivity inside temporal window of sensory memory as a function of time
（矢部博興，小山紗智子，柿木隆介）
Organizing sound sequences in the human brain: the interplay of auditory streaming and temporal integration
（矢部博興，小山紗智子，柿木隆介）

脳機能計測センター

形態情報解析室 50
概　要
超高圧電子顕微鏡（H-1250M）による立体写真の配置に関して
（有井達夫）
ラット膵臓導管における AQP1 の局在
（古家　園子，成瀬　達）

生体情報処理室 51
概　要
樹状突起活動電位の伝播調節メカニズムの解析
（坪川　宏）
細胞内シグナル伝達系の活性とニューロン活動との時間的・空間的関係の解析
（坪川　宏，　高木　佐知子）
中枢ニューロンの容積調節と興奮性調節の機能的カップリングの解析
（高木　佐知子，　坪川　宏）

機能情報解析室 53
概　要
意欲に関係する脳活動の研究
（遠本　徹）

統合バイオサイエンスセンター

時系列生命現象研究領域 54
概　要
発生過程での神経細胞膜特性の発達の分子機構
（岩崎　広英，岡村　康司）
発生過程での神経細胞電気的活動モニターのための分子ツールの開発
（村田　喜理，岡村　康司）

生命環境研究領域 54
概　要
細胞内酸化還元状態の変化により活性化される Ca^{2+} 透過性カチオンチャネル TRP の機能解析
（原雄二，西田基宏，吉田卓史，森泰生）
カルシウムチャネル変異マウスの解析
（五日市　友子，西田　基宏，森　泰生）
免疫 B 細胞における Ca^{2+} シグナル増幅機構
（西田基宏，原雄二，森泰生）
遺伝学的アプローチを用いたカルシウムチャネルの生理学的役割の解明
（山田和徳，森泰生）

戦略的方法論研究領域 56
概　要
複素電子顕微鏡および位相差電子顕微鏡の開発
（Radostin Danev，杉谷正三，大河原　浩，永山國昭）
融合タンパク質による電子顕微鏡用分子ラベルの開発
（高木正浩，春日井　雄，永山國昭，重本隆一）
細胞機能の可視化・マニピュレーション技術を用いた細胞・オルガネラの形態形成機構の研究
（村田昌之，加納ふみ，田中亜路，永山國昭）

動物実験センター 58
概　要

計算科学研究センター 60
概　要
イオンチャネル様タンパク質におけるイオン透過過程の理論的研究
（高橋卓也，永山國昭）

技術課 61
1．概　要
2．施設の運営状況

① 統合生理研究施設

（1）生体磁気計測装置室

（永田　治，竹島康行）

② 脳機能計測センター

（1）形態情報解析室

（山口　登）

（2）機能情報解析室

（佐藤茂基）

（3）生体情報処理室

（吉村伸明，村田安永）

③ 動物実験センター

（佐治俊幸，小木曽昇，廣江　猛，鈴木千香）

④ 共通施設

（1）電子顕微鏡室

（前橋　寛）

（2）機器研究試作室

（加藤勝己）

分子生理研究系

神経化学研究部門

【概要】

前年に続いて脳機能を分子レベルで理解することを目指して，遺伝子改変マウスの作成，解析を行った。GAD65，GAD67，CaMKII，シナプシン I の発現，役割，リン酸化について以下の知見を得た。

恐怖記憶における GABA の関与の解析

Oliver Stork，Simone Stork（Otto-von-Guericke 大学，マグデブルグ）
小幡邦彦

恐怖条件付けを行ったマウスについて，扁桃体の細胞外 GABA をマイクロダイアリシス法で経時的に測定した。条件刺激（ブザー音）を与えると，直後より細胞外 GABA が最大 50 %にまで低下し，この低下は 2 時間にわたって持続した(Neurosci Lett 327:138, 2002)。扁桃体の GABA 含量が半減している GAD65 遺伝子ノックアウトマウスを恐怖条件付けしたところ，野生型マウスに比べて，条件刺激に対して恐怖反応の指標とされるすくみ(freezing)は少ないが，逃避行動（走り回りや跳躍）が出現し，恐怖反応は強いと考えられた(Mol Brain Res 105: 126, 2002)。前年までの研究で，各種情動行動テストにおいて，GABA 系が不安，無気力，攻撃性低下等情動へ関与していることが示唆されたが，本年度の研究で恐怖についての知見も加えられた。

GAD67-GFP マウスの組織学的解析

柳川右千夫，小幡邦彦
玉巻伸章（京都大学大学院医学系研究科）

GABA ニューロンを緑色蛍光タンパク質（GFP）で標識することを目的として，グルタミン酸脱炭酸酵素（GAD）67 遺伝子に GFP 遺伝子をノックインした GAD67-GFP マウスを遺伝子標的法により作成した。GFP の自家蛍光および抗体を用いた免疫組織化学の２重染色法で解析した結果，GFP の発現するニューロンと GAD67 および GABA を発現しているニューロンとが時空間的に一致することを観察した。また，中枢神経系以外の組織では，GAD67 が発現する胎児期の髭と歯牙に GFP の発現が観察された。これらの観察結果は，GAD67-GFP マウスが GAD67 や GABA を発現している細胞の解析に役立つことを示唆している。

GAD67-GFP マウスの改良

柳川右千夫，小幡邦彦
宮崎純一（大阪大学大学院医学系研究科）

GAD67-GFP マウスには，ES 細胞でのスクリーニングのために loxP で挟まれたネオマイシン耐性遺伝子（PGK-neo）が挿入されている。Cre recombinase が導入されているトランスジェニックマウスと GAD67-GFP マウ

スとを交配して，GAD67-GFP マウスから PGK-neo 遺伝子を削除したマウス（GAD67-GFP (Δneo)マウス）を作成した。抗 GFP 抗体を用いた Western 法と免疫組織化学法で解析した結果,GAD67-GFP (Δneo)マウスは GAD67-GFP マウスより GFP の発現が高いことを観察した。この結果は，GAD67-GFP (Δneo)マウスが，GABA ニューロンの機能や発生を解析するのにさらに有効な材料であることを示している。

GAD67 遺伝子プロモーターの解析

海老原利枝，柳川右千夫，小幡邦彦

グルタミン酸脱炭酸酵素（GAD ; GAD65 と GAD67 の 2 型存在）は,GABA ニューロン特異的に発現する。GAD67 遺伝子プロモーター活性を調べる目的で, 転写開始点から 3.4 kb 上流から順次決失させた変異体を作り，ルシフェラーゼ・レポーター遺伝子に連結したコンストラクトを作成した。これらのコンストラクトを GAD67 遺伝子が高発現しているレチノイン酸で分化誘導した P19 胚性腫瘍細胞，GAD67 遺伝子が低レベルで発現している未分化の P19 細胞, GAD67 遺伝子の発現が認められない Neuro-2a 神経芽細胞腫の 3 種類の培養細胞に上記コンストラクトを導入した。導入した培養細胞のルシフェラーゼ活性を測定した結果，転写開始点より-98 から +109 までの領域がプロモーター活性に最小限必要であることを明らかにした。

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

山肩葉子，柳川右千夫，小幡邦彦

Ca^{2+}/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II（CaMKII）は，中枢神経系に豊富に存在する多機能型のプロテインキナーゼで，神経活動の制御やシナプス可塑性に深く関わると考えられている。我々はこれまでに，生体内における神経活動と CaMKII の活性状態との関連を明らかにしてきた。本研究においては，CaMKII の主要なサブユニットである α の遺伝子を点変異によって不活性型に変異させたマウスの作製を試み，その解析によって，生体内における CaMKII α の果たす役割について新たな知見の獲得をめざしている。本年度は，相同組換え型の ES クローンのスクリーニングを継続すると共に，Cre レコンビナーゼによって薬剤耐性遺伝子を除去したクローンのスクリーニングを行い，陽性クローンを複数獲得した。

急性神経活動によるシナプシン I のリン酸化調節

山肩葉子，小幡邦彦

シナプシン I は神経終末に局在するシナプス小胞結合蛋白として，リン酸化状態依存的に，神経伝達物質の放出調節や神経終末の形態変化に関与すると考えられている。我々は，ラットを用いて生体内におけるシナプシン I リン酸化の調節機構の解明を進めている。急性神経活動活性化のモデルである電撃けいれんでは，海馬，大脳皮質ホモジネート中のシナプシン I の MAP キナーゼによる site 4/5 のリン酸化は, 刺激直後の急激な減少に引き続いて，数分後に大幅に増大するといった二相性の反応を示すことを観察している。今回，持続性けいれんのモデルであるカイニン酸によるけいれん重積状態で調べてみたところ, MAP キナーゼの活性が上昇しているにもか

かわらず，シナプシン I の site 4/5 のリン酸化は大きく低下していることが明らかとなった。従って，キナーゼの活性を上回るフォスファターゼの活性化が起こるものと考えられた。

グルタミン酸脱炭酸酵素欠損マウスにおける視床扁桃体路興奮性シナプス可塑性亢進機構の解析

兼子幸一，小幡邦彦

グルタミン酸脱炭酸酵素(GAD)65 欠損マウス扁桃体のスライス標本では視床扁桃体路の高頻度刺激による LTP が亢進する。高頻度刺激時の GABA 放出減弱が興奮性シナプス可塑性亢進に関与するメカニズムを解析するために扁桃体外側核主細胞から全細胞記録を行い，$GABA_B$ 受容体による興奮性シナプスの調節作用を検討した。$GABA_B$ 受容体拮抗剤 CGP55845 存在下の野生型主細胞での LTP 増強率はコントロール条件下の変異型と同程度であった。同経路の刺激では $GABA_B$ 受容体性応答が観察されないが，EPSC は同受容体作動薬で抑制された。また，同経路の 10Hz 刺激による活動依存性の EPSCs の抑制は CGP55845 で減弱した。以上の結果から，視床扁桃体路の興奮性入力終末の $GABA_B$ 受容体が異シナプス性にグルタミン酸放出を調節し，GAD65 で合成される GABA がこの調節作用に必要なことが明らかになった。

GFP ノックインマウスを用いた扁桃体外側核および基底外側核 GABA 作動性細胞の電気生理学的特性とモノアミンによる修飾作用の解析

兼子幸一，小幡邦彦，柳川右千夫

GABA 合成酵素グルタミン酸脱炭酸酵素 67 遺伝子に GFP を組込んだマウス脳から扁桃体スライスを作成し，全細胞記録で GABA 作動性細胞の電気生理学的特性とモノアミンによる修飾作用を解析した。外側核(LA)の GFP 陽性細胞は細胞内通電での発火様式から，Fast-spiking (FS) 細胞 (平均 150Hz)Low-threshold-spiking (LTS) 細胞 (平均 100Hz)に分類された。一方，基底核(BLA)にはこの 2 種に加えて Regular-spiking (RS)細胞が認められた(平均 40Hz)。電流固定で 5-HT は FS 及び LTS 細胞の発火頻度を増した。他方，NA は RS 細胞の発火頻度は増したが，他の細胞には効果がなかった。以上の結果より，扁桃体 LA 及び BLA には異なる特性の GABA 作動性細胞が存在し，モノアミンは選択的に GABA 作動性細胞を興奮させることが明らかになった。

超微小形態生理研究部門

【概要】

物質輸送に関する研究が主眼である。村上グループは水輸送と開口分泌の研究を行った。外分泌腺では分泌刺激により水輸送と開口分泌が両方活性化されるが，それぞれのエネルギー要求性／相互作用は in vitro での蛋白分泌と水分泌の同時測定が不可能であるため不明であった。村上は唾液腺血管潅流系を材料に分泌時間経過，形態観察，開口放出関連蛋白，傍細胞輸送の 4 チームの共同研究グループを組織し，研究を展開した。大橋はエンドサイトーシス経路における選別輸送の研究を変異細胞を用いて行った。

潅流ラット顎下腺における傍細胞輸送経路

村上政隆，大河原浩
篠塚直樹，中村健治（札幌 IDL）
Bruria Sachar-Hill, Adrian E. Hill（ケンブリッジ大学生理科学部）

原唾液は細胞の中からの分泌と傍細胞経路を通過した成分との混合物であり，血液成分が唾液に移行するのはこのためである。平成 12 年，標識デキストランをプローブとして唾液, 潅流液, 細胞間液に分布するデキストラン分子のサイズを決定，分子径に対する分泌プローブの唾液／潅流液比は二つの成分にわけることができた。1）自由拡散（Stokes-Einstein）双曲線成分に一致する大きな通過経路を示す成分，2）半径 5Åに切片をもつ直線成分で溶媒牽引による成分で, 水の分子半径 1.5Åでほぼ 1 の価に外挿された。このことは水のほとんどが細胞間隙／tight junction を通過することを強く示唆した。

本年度は，血管灌流ラット顎下腺を用い，刺激の種類強度を変え，血管内より唾液中に移行するブドウ糖，クレアチニン，尿素の動態を観測した。いずれも水分分泌速度が低くなると唾液中濃度は高くなり，灌流液中濃度との相関が低下した。一方，水分分泌速度が高くなると灌流液中濃度との相関が増した。平成 12 年提出モデルから，分泌速度が高い場合には細胞経由成分より傍細胞経路を移行する化学成分が多くなることが推定され，この条件下で唾液中の糖濃度と血糖が高い相関を持つことが示された。これは血液採取を行わず，唾液糖より血糖を推定する非侵襲法の基礎データとして活用できる。

灌流ラット顎下腺の開口分泌とエネルギー要求性

村上政隆，高木正浩，前橋寛
Alessandro Riva（Cagliari 大医，細胞形態学）
瀬尾芳輝（京府医大，生理）

分泌刺激により水輸送と開口分泌が両方活性化されるが，それぞれのエネルギー要求性／相互作用を検討するため, ラット顎下腺血管潅流標本を用い, 水分泌・ムチン分泌・酸素消費の時間経過を測定，βアドレナリン受容体刺激(イソプロテレノール ISP)による水分泌と酸素消費の増強効果が低濃度（0.1μM）のカルバコール(CCh)刺激下で確認することができた。従来の結果とあわせ，増強効果が細胞エネルギー供給系の能力により制限される可能性が示唆された。P-31 NMR を用い ATP と creatine phosphate (PCr) を測定した。ATP，PCr は 1μM CCh と 1μM ISP の混合刺激でいずれも減少した。一方，0.1μM CCh と 0.5μM ISP の混合刺激では ATP のみが減少した。これらの観察は水分泌と酸素消費の増強効果は高濃度のカルバコール刺激下ではエネルギー的に制限されている可能性を示している。さらに NMR の知見は ATP が開口分泌により細胞から脱出することも示している。Osmium マセレーション法により分泌顆粒と細胞間分泌細管の連結部を観察した。高濃度のカルバコール刺激下で開口分泌を起こさせると連結部は太くなり，低濃度では細い頚状を呈した。このことは，高濃度刺激では急速に内容物が放出されることを示唆しており，急激に ATP が減少することと一致した。

エンドサイトーシス選別輸送のメカニズムの解析

大橋正人，永山國昭

エンドサイトーシス経路は，細胞の環境応答の前線となっている膜動輸送系である。我々は，エンドサイトーシス経路によるシグナル伝達制御機構とその異常による病態の解明を目指し，この経路の哺乳類変異細胞株を用いて解析を行っている。これまでに，複数の後期エンドソーム過程のCHO変異株を得，レトロウイルスベクターによる発現クローニング法などにより，後期エンドソームである多胞体（MVB）からゴルジに向かう受容体の，MVBからの選別･搬出にコレステロールが必要である事を明らかにした。本年度は，変異株でのMVBからゴルジへの輸送異常を修正する遺伝子産物であり，コレステロール合成系の後期酵素であるNAD(P)Hステロイド脱水素酵素様蛋白質が，後期エンドソームでの受容体選別機能蛋白質であるTIP47と細胞内の脂肪滴表面で共存することを見いだし，脂肪滴と後期エンドソーム選別機能の関連を示唆した。

リアノジン受容体の単粒子解析

松本友治，村田和義，永山國昭
國安明彦，中山仁（熊本大学・薬学部）

比較的分子量が大きく結晶化の困難なタンパク質，特に膜タンパク質の立体構造解析については，X線結晶構造解析など広く用いられている構造解析の手法を適用するのが困難であり，多くの生理学的に重要なタンパク質の構造解析が手付かずのままとされている。本研究では，新規に導入された電子顕微鏡用トップエントリー式可傾斜型液体ヘリウム温度クライオステージの立ち上げ調整作業と平行して，リアノジン受容体の負染色試料につき電子顕微鏡画像からの単粒子解析による3次元像再構成を試みた。また，無染色氷包埋試料の作成を念頭に置いて単粒子解析に十分な純度でリアノジン受容体を高収量で得る精製法の検討を行ない，常法で用いられているヘパリンカラムを用いたアフィニティー・クロマトグラフィーによる精製段階をゲル濾過で置換することにより良好な結果を得た。目下，氷包埋試料に対する電子顕微鏡画像データ収集を続行中である。

細胞内代謝研究部門

【概要】

細胞内代謝部門では，生物活性物質や細胞− 細胞間刺激に対する細胞の刺激受容機構，細胞内情報伝達機構，細胞機能発現機構を対象とし，特に細胞内カルシウムイオン（Ca^{2+}）の動態を画像解析装置でとらえ詳細に解析して，これらのメカニズムの解明を目指している。毛利と宮崎は尾田正二（東京女子医大）らとともに哺乳類精子抽出物の卵内注入によって誘発されるCa^{2+}オシレーションの解析を行った。毛利，吉友，宮崎は淡路健雄，尾田正二（東京女子医大）らとともに，マウス卵における蛋白質強制発現の方法を確立する実験を行った。吉田は，基礎生物学研究所の檜山武史・渡辺英治・野田昌晴らと共に渡辺らが発見した「濃度依存性Na^{+}チャネル」の機能を画像解析装置を使用して解析した。また，長崎大学医学部の藤村幸一・小野智憲および長崎県諫早市横尾病院の小野憲爾と共同で，難治てんかんに対する脳梁離断術の効果を裏付ける生理学的データをラットを使用した動物実験によって得た。共同研究については，宮崎は精子由来の卵活性化因子の同定と作用機序に関する共同実験を行った。吉田は緒方宣邦（広島大医学部生理学教授）を代表者として「Naチャネルと細胞機能」と題す

る研究会を開催した。　細胞内代謝部門の現スタッフは，平成 8 年 4 月以来 6 年に亘って部門を担当してきたが，平成 14 年 3 月をもって任期終了となった。終了にあたり 6 年間の活動総括報告書を作成した。人事移動，研究活動（研究テーマ），共同研究（計 19 件），研究会開催（計 8 回), 生理研国際シンポジウム開催, 実験技術トレー二ングコース担当（4 回），研究所一般公開分担（2 回），研究発表（生理研で実験がなされたもの：原著論文英文 6 編，学会発表 24 件；共同研究グループにより実験が主に大学でなされたもの : 論文英文 39 編，学会発表 57 件）と総括された。平成 14 年 3 月 9 日に生理研において細胞内代謝部門総括・報告会を開催し，部門に籍を置いた者および共同研究に参加した者が 18 名集まった。部門の総括，共同研究とその後の発展，近況報告を行った。全体として，活発に研究活動がなされ，共同研究が行われ，充分な成果を挙げたと総括された。このあと懇親会を開き，盛会裏に 6 年間の業務を終了した。

精子抽出物によって誘発される卵細胞内 Ca^{2+}オシレーションの解析

毛利達磨，宮崎俊一
尾田正二，白川英樹（東京女子医）

マウス卵の受精時, あるいは卵内への精子 1 個の注入，あるいは精子抽出物の卵内注入によって，反復性の細胞内 Ca^{2+}増加反応（Ca^{2+}オシレーション）が誘発され，卵は活性化される。これら 3 つの条件によって誘発されるそれぞれの Ca^{2+}オシレーションを，高速共焦点レーザー顕微鏡あるいは高速画像解析装置を用いて長時間連続記録し，Ca^{2+}動態を時・空間的に画像解析した。当年度はハムスター精子あるいはブタ精巣から抽出物を得，これから粗精製の Ca^{2+}オシレーション誘発性蛋白質（即ち卵活性化因子）を分離し, マウス卵に注入して Ca^{2+}オシレーションの発生機序を解析した。個々の一過性の Ca^{2+}増加は小胞体からの Ca^{2+}遊離によるが，細胞外からの持続的な Ca^{2+}流入が小胞体に Ca^{2+}を取り込ませ，反復する Ca^{2+}遊離を維持させることを明らかにした。マウスの未成熟精子（べん毛が未だ形成されない円形精子細胞）の注入では Ca^{2+}オシレーションがおこらず，その後の成熟過程において卵活性化因子が発現することが示された。他方，成熟精子を注入して受精させたマウス卵の細胞質の一部をマイクロピペットに吸引し，別の成熟未受精卵に注入してその卵活性化能を観察した。受精直後の卵の細胞質に卵活性化能が存在したが，雌雄前核が形成されると核の部分に卵活性化能が存在した。精子由来の卵活性化因子は卵の核あるいは核周辺に移行して蓄積されると考えられた。

マウス卵への mRNA 注入による蛋白質発現法の確立

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

一般に卵細胞では mRNA の翻訳が抑制されており, 特に哺乳動物卵に mRNA を注入して特定の蛋白質を発現させることは難しい。我々は C 末端に約 250 個の polyA を付加した mRNA を用いてマウス卵に蛋白質を発現させることに成功した。green fluorescent protein (GFP)の変異体 EYFP の mRNA にミトコンドリア移行配列を付加し，さらに long polyA を付加してマウス未成熟卵に注入し，EYFP の発現を蛍光観察によって追跡した。注入 3 時間後から EYFP の発現が認められ，時間とともにほぼ直線的に増加して 12～15 時間でプラトーに達した。MitoTracker によるラベルされたミトコンドリアの分布との一致から，ミトコンドリアへの移行が確認できた。

この方法を利用して，小胞体への移行配列を付加した Ca^{2+}測定用プローブ CAMELEON をマウス卵に発現させる実験を行った。しかしこのプローブは小胞体にうまく移行しなかった。卵細胞表面蛋白質 CD9 は精子-卵融合に関わるとされている。CD9 ノックアウトホモマウスの卵子は受精せず，この CD9 欠損卵に mRNA 注入により CD9 を発現させると，受精が起るようになることを示し，CD9 が精子-卵融合に必須な蛋白質であることが確認された。この強制発現法は非常に有用であることが分かった。

濃度依存性 Na^+チャネルと体液浸透圧調節機構

吉田　繁（生理研）
檜山武史，渡辺英治，野田昌晴（基生研）

体液浸透圧と体液量の調節は，主として体液組成の主成分である NaCl 濃度によって制御されている。しかし，具体的な Na^+濃度検知機構は不明であり，「浸透圧受容器」を持つ細胞が体液浸透圧の検知と制御に関与していると考えられている。

電位感受性を示す Na^+チャネルのクローニングの過程で見つかってはいたものの，電位感受性を持たないために機能不明 Na^+チャネルと名づけられていた Na_X (x = unknown)が，我々の研究によって細胞外の Na^+濃度上昇を特異的に検知することが判明した。よって，濃度感受性ナトリウムチャネル Na_C (c = concentration)という新名称を提唱した。Na_C は脳弓下器官(subfornical organ)などの血液脳関門を欠く場所の細胞などに存在しているので，「Na^+濃度検知モニター」として妥当な機構だと思える。

「浸透圧受容器は Na^+濃度検知の間接機構」であり，「Na_C は Na^+濃度検知の直接機構」であるという「体液浸透圧調節の二重安全機構仮説」を立て，それを検証すべく実験を続けている。

難治てんかんに対する脳梁離断術効果の動物実験による考察

吉田　繁（生理研）
藤村幸一，小野智憲（長崎大）
小野憲爾（横尾病院）

「脳梁離断術」が薬物治療に抵抗を示すヒトの難治てんかんに対して試みられており，発作波の一側化・非同期化・発作波の頻度減少または完全消失が得られている。このような治療効果は「てんかん発作波が対側に伝わるための伝導路である脳梁の遮断」によると考えられているが，脳梁によって高められていた大脳皮質の興奮性が脳梁離断術で低下するためではないかという仮説を立てて動物実験で検証した。

全身麻酔下ラットの脳梁右側と左視床外側腹側核に刺激電極を左前頭皮質に記録電極を配置し，大脳皮質興奮性の指標としての視床皮質反応に対する持続的脳梁刺激(2.5-20 Hz)効果を測定した。その結果，脳梁の 5-10 Hz 刺激によって視床皮質反応が最も増強されることが判明した。脳梁離断術は，大脳皮質の興奮性を高めている transcallosal volley を遮断することによって「てんかん発作を抑制」しているのであり，脳梁の機能が単なる「てんかん発作波の対側への伝導」ではないと考えられる。

細胞器官研究系

生体膜研究部門

【概要】

当部門では開口放出・シナプス機能を電気生理学的方法及び蛍光観察によって定量化する研究を行ってきた。これまでは，主としてパッチクランプ法及びそれによる膜容量測定法やアンペロメトリー法にケイジド試薬による刺激を用いた研究を発表してきたが，新しい可能性として 1996 年よりテストしていた 2 光子励起顕微鏡法の運用が 2001 年に至って 6 年がかりで成功し，この方法論による蛍光観察や刺激が臓器標本において圧倒的に優れた方法論であることが徐々に明らかになってきた。特に，開口放出を定量化する新しい方法論を外分泌腺で開発し，また，脳スライス標本内の中枢神経細胞を単一シナプスレベルで刺激することを初めて可能とする方法論を初めて確立した。

筒井泉雄助手は興奮収縮連関の系統発生的研究を行っており，10 月 1 日付けで一橋大学商学部に助教授で転出した。久木田文夫助手はイオンチャネルの動力学的研究を，引き続き進めている。

神経，分泌細胞のカルシウム依存性開口放出機構の研究

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

カルシウム依存性の開口放出をインタクトな分泌臓器で定量的に可視化する方法論を，2 光子励起法を用いて確立した。従来の方法とは異なり，蛍光色素を細胞外液に加えて，この色素の分泌小胞への流入によって開口放出を検知する。この方法論を外分泌腺に適用した結果，開口放出は表層に留まらず，深部に向かって逐次的に進むことが明らかになった。この際，開口放出に先立って分泌小胞同士が融合することはなく，小胞は細胞膜と連続した膜を認識して，それに対して融合することがわかった。これは，細胞膜の融合因子が融合細孔側壁を通って側方拡散している可能性を強く示唆する。また，開口放出に要する遅延は表層の顆粒も深部の顆粒も同じで，小胞の開口放出準備状態は位置によらず不変で，細胞膜融合因子の供給とともに融合複合体形成が起きるモデルが示唆された。

2 光子励起法を用いた神経機能の研究

河西 春郎，松崎 政紀，早川 泰之

活動状態依存的な神経回路の可塑性は多くの脳機能の基盤をなす。神経可塑性の誘発因子としてはシナプス後部の細胞内カルシウム濃度の上昇があり，単一シナプスの重みが，記憶をコードしていると推察されてきた。この記憶機構を定量的に明らかにするために，2 光子励起可能な新たなケイジドグルタミン酸の合成に成功し，シナプス後部の受容体の機能分布を単一シナプスレベルでマップする方法を開発した。この結果，海馬錐体細胞樹状突起において，グルタミン酸作動性シナプスの後部を成すスパインのグルタミン酸感受性はスパインごとに独立に調節されており，それはスパイン形態に強く依存することを見出した。即ち，頭部の大きいスパインほど感受性が高く，頭部のないフィロポーディアは AMPA 受容体によるグルタミン酸感受性がほとんどない。この結果は，神経回路網の記憶はスパイン形態として蓄えられる可能性を示唆する。

イオンチャネル・キネティクスに対する溶媒効果と実験系の問題点

久木田　文夫

「電位依存性イオンチャネルの開閉時間は溶液の物理的な特性，特に粘性により決定されている」という現象の実験的検証はイカ巨大軸索イオンチャネルおいて成された。一方，生物界には極端な脱水状態や凍結状態で生き延びる生物は数多いが，このような休眠状態で神経活動の実測例はない。現象自体はイオンチャネル蛋白質が真空中ではなく水の中で動作することの必然的帰結でもあるが，脂質二重膜の物理的性質は関与していない点が重要である。

このような一般性の高い基礎的研究ではあるが，イオンチャネル研究の発展に呼応して，数多くのイオンチャネルで検証するには実験系に問題点がある。高浸透圧（100smol/l　程度）溶液下で実験を行うことが最初の関門であり，現時点で可能な実験系は細胞内灌流したイカ巨大軸索のみである。本研究には全く新しい実験系の開発が必要であり，新たな技術的な発展の機転となりうる。

Chelophyes における興奮収縮連関

筒井　泉雄

筋収縮と弛緩は細胞内オルガネラ（SR，ER，T 管）での Ca^{2+}移動によって制御されていて，収縮連関機構に関連した小胞体（SR）と T 管の役割の解明は動物の筋細胞の進化を探る上で重要な意味を持っている。骨格筋において筋収縮に先立ち Ca^{2+}放出をつかさどる SR の機構がどのようにして派生してきたかについての解明はいまだ成されていない。今回，SR と T 管を併せ持つ海生動物 sagitta を用い無脊椎動物に残されているＴ管とＳＲ機構の役割について研究した。sagitta においてはＴ管は脊椎動物と同様に Na スパイクを発生する。また SR 器官はリアノジン受容体を持っているが，筋収縮に先立つ Ca^{2+}放出には関与していないことが判明した。脊椎動物骨格筋様の機関を持っていても，連関機構は完成しておらず，脊椎動物型の Ca^{2+}放出能の発現は，原索動物以降であることが確認された。このことは SR の Ca^{2+}放出機構が骨格筋の発現と密接に関連していることを示してて，現在 SR における Ca^{2+}放出因子を検討中である。

機能協関研究部門

【概要】

細胞機能のすべては，細胞膜におけるチャネル（イオンチャネル，水チャネル）やトランスポータ（キャリア，ポンプ）の働きによって担われ，支えられている。機能協関研究部門では，容積調節や吸収・分泌機能や環境情報受容などのように最も一般的で基本的な細胞活動のメカニズムを，これらの機能分子の働きとして細胞生理学的に解明し，それらの異常と疾病や細胞死との関係についても明らかにしようとしている。主たる研究課題は次の通りである。

①「細胞容積調節の分子メカニズムとその生理学的役割」：細胞は（異常浸透圧環境下においても）その容積を正常に維持する能力を持ち，このメカニズムには各種チャネルやトランスポータやレセプターが関与している。これらの容積調節性膜機能分子，特に容積感受性クロライドチャネル，の分子同定を行い，その活性化メカニズムと生理学的役割を解明する。

②「アポトーシス，ネクローシス及び虚血性細胞死の誘導メカニズム」：容積調節能の破綻は細胞死（アポトーシスやネクローシス）にも深く関与する。これらの細胞死誘導メカニズムを分子レベルで解明し，その破綻防御

の方策を探求する。特に，脳神経細胞や心筋細胞の虚血性細胞死の誘導メカニズムを生理学的に解明する。

③「イオンチャネルの多機能性のメカニズム」：イオンチャネルはイオン輸送や電気信号発生のみならず，環境因子に対するバイオ分子センサーや，他のチャネルやトランスポータの制御にも関与する多機能性蛋白である。特に，CFTR の他チャネル制御メカニズムや ATP チャネルの容積センサーメカニズムや NaCl センサーメカニズムについての研究を行う。

④「消化管上皮細胞の分泌・吸収メカニズム」についても研究する。

容積感受性クロライドチャネルの新しいブロッカー：Phloretin

范　海天，森島　繁，岡田泰伸

容積感受性外向整流性クロライドチャネル（VSOR）は，容積調節や細胞増殖や細胞死に関与する重要なチャネルであるが，これに対する特異的ブロッカーは知られていない。私達は，グルコースユニポータ阻害剤として知られている phloretin が VSOR に対しても比較的高い特異性を示すブロッカーであることを明らかにした。

phloretin はホールセル VSOR 電流を電圧非依存的，濃度依存的（I^C50 ～30 μM）に抑制することが，ヒト大腸 T84 細胞，ヒト小腸 Intestine 407 細胞，マウス乳腺 C127/CFTR 細胞において確認された。これに対し，cAMP 依存性 CFTR Cl^-チャネル電流も，Ca^{2+}依存性 Cl^-チャネル電流も，100 μM 以下の phloretin によっては何ら影響を受けなかった。以上より低濃度 phloretin はアニオンチャネルの内で VSOR のみに対して有効なブロッカーであることが明らかとなった。これらの結果は次の論文に報告した（Fan, Morishima, Kida & Okada 2001 Br. J. Pharmacol. 133, 1096-1106）。

細胞外 ATP 放出路としてのマキシアニオンチャネル

R. Z. Sabirov，A. K. Dutta，岡田泰伸

多くの細胞は種々の刺激によって細胞内から ATP を放出するが，非エキソサイトシス経路は未だ同定されていなかった。生理的条件下においては遊離 ATP はアニオン型（殆んどが ATP^{4-}）で存在するので，アニオンチャネルの関与が考えられてきたが，今回私達は 400 pS の単一チャネルコンダクタンスを持ったマキシアニオンチャネル（VDACL）の可能性を検討した。

マウス乳腺由来 C127 細胞を浸透圧的に膨張させると ATP を放出するが，このときに容積感受性外向整流性 Cl^-チャネル（VSOR）電流のみならず，性質の異なる VDACL Cl^-チャネル電流が観察された。本チャネルはベル型電圧依存性を示すという特徴を示した。細胞内液のアニオンを 100 mM ATP^{4-}のみという条件に移しても VDACL を介する内向き電流は小さいながら観察され，ATP 透過性を持つことが示された（図 1）。このチャネル活性と ATP 放出は同一の薬理学的性質を示した。従って，膨張 C127 細胞からの ATP 放出路は VDACL であることが結論された。本研究結果は次の論文に発表した（Sabirov, Dutta & Okada 2001 J. Gen. Physiol. 118, 251-266）。

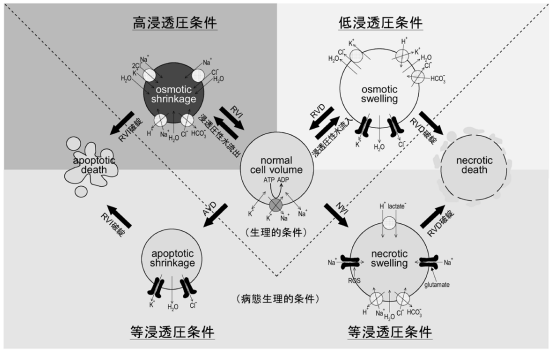

図 1.　浸透圧性膨張時におけるマキシアニオンチャネルの開口とその ATP 透過性

細胞容積調節破綻と細胞死誘導

岡田泰伸，前野恵美，清水貴浩，森島　繁

浸透圧性膨張後及び縮小後の容積調節は，それぞれ Regulatory Volume Decrease（RVD）及び Regulatory Volume Increase（RVI）と呼ばれ，これらのメカニズムには多くのチャネルやトランスポータの働きが関与する（図 2：上半分）。

一方, アポトーシスの初期過程には持続性細胞縮小が, ネクローシスには持続性細胞膨張が伴われるが，私達にはこれらをそれぞれ Apoptotic Volume Decrease（AVD）及び Necrotic Volume Increase（NVI）と名付けた。AVD には K^+及び Cl^-チャネルの異常活性化が，NVI には種々の Na^+透過性チャネルやトランスポータによる Na^+流入が関与する（図 2：下半分）。これらのチャネルやトランスポータをターゲットにして細胞死を防御・救済するという新しい戦略が考えられる。これらの研究成果は次の論文に発表した（Okada, Maeno, Shimizu, Dezaki, Wang & Okada 2001 J. Physiol. 532, 3-16）。

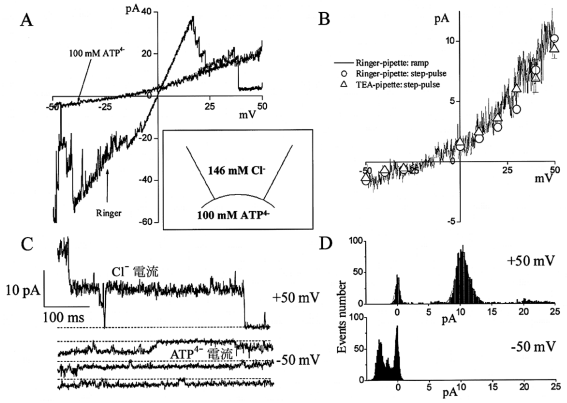

図 2.　生理的条件下における細胞容積調節（RVD, RVI）と病態生理的条件下における容積調節破綻（AVD, NVI）のイオン機序

生体情報研究系

神経情報研究部門

【概要】

われわれの研究室では哺乳類神経系の発生・分化機構について研究している。特に神経上皮細胞（神経幹細胞）からどのようにして全く機能の異なる細胞種（神経細胞，アストロサイト，オリゴデンドロサイトなど）が分化してくるのか，について興味を持って研究を進めている。また，得られた新しい概念や技術はできるだけ社会の役に立てるよう努めており，臨床研究への応用を視野に入れながら，病態の解析にも努力している。脳神経系の発生・分化を考えるとき，内因的要因（遺伝子に支配されるもの）および外因的要因（外部からの刺激・情報により分化方向が規定されるもの）に分けて考えるのは当然であるが，脳神経系では他の組織の発生とは異なり特徴的なことがある。それは多様性である。一言に神経細胞と言っても顆粒細胞，錐体細胞などいろいろな形態の細胞があるし，大脳皮質の錐体細胞はどの領野の細胞かによりその機能が異なる。また，神経伝達物質の種類も様々である。大げさに言えば，神経細胞は一つ一つが個性を持っており，そのそれぞれについて発生・分化様式を研究しなければならない程である。また，均一であると考えられてきたグリア細胞（アストロサイト，オリゴデンドロサイト）にも性質の異なる集団が数多く存在することも明らかとなってきた。そのため，他の多くの細胞種や組織の分化研究とは異なり，細胞株や脳細胞の分散培養系を用いた研究ではその本質に迫るには限界がある。われわれは in vitro で得られた結果を絶えず in vivo に戻して解析するだけでなく，神経系の細胞系譜の解析をも精力的に行っている。脳神経系への遺伝子導入系として開発した高力価レトロウイルスベクターは癌の遺伝子治療に最適なベクターであるので，グリオーマや肺癌をターゲットとした応用を考えた研究を進めており，臨床応用も間もなくスタートできそうである。また，癌治療の新たなターゲット分子も見いだしたので，その応用も検討中である。

糖蛋白質糖鎖の解析法を開発し，その生理学的意義について検討している。ヒト正常脳においてはその発現パターンが個人間で驚くほど一定に保たれており，現在考えられているより，もっと重要な役割を果たしていると思われる。事実各種神経変性疾患においてその発現パターンが変化していた。また，癌の転移にも糖蛋白質糖鎖が関与していることを示唆するデータも得ているので，病態時における糖鎖異常に着目して研究している。

オリゴデンドロサイト発生制御機構と脱髄モデルマウスの解析

鹿川哲史，竹林浩秀，和田圭樹，中平英子，清水健史，松本路生，田中久貴，池中一裕

オリゴデンドロサイトは中枢神経系でミエリンと呼ばれる構造をつくるグリア細胞である。ミエリンは神経細胞の軸索を取り巻くことにより電気的に絶縁し，跳躍伝導という現象を引き起こす構造である。胎生期脊髄ではオリゴデンドロサイト前駆細胞は腹側のごく限られた部位から発生することが知られている。我々のグループは，これまで胎生期脊髄の背側にオリゴデンドロサイト分化を抑制する因子があることを示してきた。今回，脊髄背側に発現する Wnt1, Wnt3a に着目し in vitro においてこれらがオリゴデンドロサイトの分化を負に制御することを示した。

また，転写制御因子の Olig2 ノックアウトマウスを作製し，この脊髄では，運動ニューロン・オリゴデンドロサイトが存在しないことを明らかにした。つまり，Olig2 が運動ニューロン・オリゴデンドロサイトの発生に必須であることを証明した。

前脳のオリゴデンドロサイトも，脊髄同様に腹側から生み出されるかどうかを検討するために， electropora-

tion 法と Cre-loxP システムを組み合わせた恒久的な標識法を用いて細胞系譜解析を行った。これまでの結果から，前脳においてもやはり腹側からオリゴデンドロサイト前駆細胞が生み出されることが示唆された。

本研究室では，既に脱髄モデルマウスである PLP トランスジェニックマウスを作製し報告している。このモデルマウスに神経幹細胞を移植する系を確立し，移植治療により症状の改善がみられるかどうか検討中である。また，移植後の神経幹細胞がどの細胞種に分化しているか検討している。

in vivo の中枢神経系（後索路，脊髄前庭路，錐体路）において神経伝達速度の測定系を確立した。さらに，脱髄をおこしている PLP トランスジェニックマウスにおいて，これらの神経路の神経伝達速度を予備的な実験により測定し，速度の低下を確認した。

アストロサイトの分化・発生様式に関する研究

岩崎靖乃，長谷川明子，小川泰弘，竹林浩秀，池中一裕

アストロサイトの発生は神経細胞の発生と密接に関連しており，神経幹細胞から両細胞の発生は相互に抑制をかけながらどちらかだけ選択的に産生されることが示されてきている。すなわち，アストロサイトの発生・分化調節機構の研究は神経発生全体に大きな意義を有する。

われわれはアストロサイトの分化誘導因子としてマウス glial cell missing (mGCM)とシスタチンＣ（CysC）に着目して研究してきた。GCM はショウジョウバエでグリア細胞の分化誘導因子として見いだされたが，mGCM はそのマウスホモログである。mGCM には mGCMa と mGCMb があるが，両者とも中枢神経系での発現が認められた。特に mGCMa は神経上皮細胞に強制発現させるとアストロサイトへの分化を誘導できることが分かった。しかし，そのものは通常のアストロサイトの発生様式とは異なる所で発現しており，アストロサイトのサブタイプの発生と関係していることが示唆された。CysC は mGCMaとは異なり，アストロサイトの発生する時期に発生する場所から産生が開始されることが分かった。また，マウス胎児脳初代培養細胞系では in vivoの発現パターンと対応して CysC が培養液中に放出されること，さらに抗 CysC 抗体を加えると，アストロサイトの分化が抑制されることが明らかとなった。

以上のようにアストロサイトにも神経細胞と同様に多様性の存在することが示唆された。そこで，米国ニューヨーク州立大学の Matt Rasband と共同研究を行い，アストロサイトを認識する多数の新規モノクローナル抗体を用いてマウス脊髄アストロサイトの発生段階における多様性について検討した。その結果，アストロサイトも神経細胞産生ドメインに対応して多様化していることが示唆された。

N 結合型糖タンパク質糖鎖の機能解析

藤本一朗，池田武史，石井章寛，佐久間圭一朗，池中一裕

脳の発生・分化や細胞変性疾患やガン化の機能発現には隣接する細胞との細胞間相互作用として細胞表面を覆うように存在する糖蛋白質糖鎖が重要な役割を担っていると考えられる。我々はこれまでに系統的に糖タンパク質糖鎖をスクリーニングする方法を開発し，その自動化に成功してきた。この方法を用いて正常マウス大脳皮質の発生の各段階における系統的な糖鎖解析を行った結果，脳に特徴的な糖鎖構造が成熟するに従い優位に増加してくることが観察された。パターンの変化を見ただけではなく全体の70％を越える主要糖鎖の構造決定を酵素消化や MALDI-TOF-MS を駆使して行った。この結果，脳特徴的糖鎖が脳の発生・分化および形態形成に重要である

と考えられた。さらに本解析法は固定後の組織からも解析可能であるから，ヒトの中枢神経変性疾患の脳内糖鎖解析を行い，細胞を取り巻く糖鎖環境と細胞障害に関係がないかを解析した。細胞障害部位の組織のみならず障害が無いと考えられていたアルツハイマー病の白質領域や多系統萎縮症の灰白質領域においても糖鎖の発現パターン異常が認められた。このことは糖鎖の異常が病態のベースに存在する可能性があり，神経変性疾患の発病自体をも引き起こしている可能性を強く示唆するものであった。次にガン細胞の糖鎖とガン転移臓器の特異性を知る目的で，B16 メラノーマの転移実験を行った。マウス尾静脈から注入した B16 細胞は肺および脾臓に高頻度で生着した。培養 B16 細胞と肺から摘出してきた B16 転移組織の糖鎖解析を行った結果，多くの糖鎖構造が培養時と肺生着時においては変化し，その変化は必ず肺組織の糖鎖発現パターンに近づく方向であった。この結果からガン細胞の転移もしくは生着にも細胞表面糖鎖が重要であることが示唆された。一つの糖鎖構造の生合成に数十種類の糖転移酵素が必要であり，今後は酵素群の網羅的遺伝子発現の解析が不可欠と考え DNA アレイの作成を行った。報告されているマウス糖鎖生合成酵素遺伝子の 137 遺伝子中 108 個までクローニングが終了した。実験条件の検討を行い最適条件を見出した。数個の報告されている糖転移酵素遺伝子発現のノーザン解析結果と同じ結果が得られ，網羅的遺伝子発現解析が可能となってきた。

癌遺伝子治療の基礎研究

片倉浩理，河野洋三，池中一裕

我々は，以前 Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) 法を用いて悪性グリオーマに高発現する腫瘍特異抗原 MAGE-E1 をクローニングした。その後 Human BAC clone を用いたゲノム構造解析にて，その構造は MAGE-D に酷似しており，遺伝子座に於いても Xp11 と同一であることを見出した。

MAGE-E1 に対する 3 種類のペプチド性抗体を作製し，MAGE-E1 蛋白質の構造を明らかとした。さらに，免疫組織学的な解析から MAGE-E1 が細胞周期調節へ関与しているとことが予想された。MAGE-E1 の細胞死や細胞周期調節への関与を明らかにすることにて，癌治療の臨床において診断に，更に遺伝子治療の分子標的として応用できるものと考えている。

われわれは高力価レトロウイルスベクターを用いた癌の遺伝子治療法の開発に取り組んでいるが，本年度は PEG-PLL(polyethyleneglycol polyLysine)によるさらなる力価向上に関して検討した。PEG-PLL をレトロウイルスベクターの感染時に共存させるとその力価を高めたが，この効果はレトロウイルスベクターを遠心しても変わらなかった。すなわち，PEG-PLL はウイルス表面を恒久的に修飾していることが明らかとなった。この操作で毒性を増すことなく，感染効率を高めることに成功した。

液性情報研究部門

【概要】

液性情報研究部門では，分子生物学的手法と生理学的手法を用いて，脳神経系における情報の伝達および統合のしくみを，分子・細胞のレベルから理解することを目的として研究を行っている。神経伝達物質受容体・イオンチャネルなどのシナプス間情報伝達に重要な役割を果たす分子，なかでもカルシウムシグナリングに関係する分子群，を主要な研究の対象としている。分子生物学的な技法を用いてこれらの分子の特性を解析するとともに，実際の生きた体の中でこれらの分子が果たす役割を理解することを目指している。その一手段として，自然発症の遺伝子変異もしくは遺伝子改変モデル動物を用い，分子の機能を正常コントロールと比較し，複雑

な生体システムにおける分子の機能を明らかにしてきている。最近では，機能分子の異常により神経変性疾患が起こることが知られてきており，モデル動物の研究は単に分子機能の理解だけではなく，病態の解明にもつながる可能性がある。

P/Q 型電位依存性 Ca^{2+}チャネル変異マウスにおけるシナプス伝達の変化

松下　かおり，Kadrul Huda，井本　敬二

電位依存性 Ca^{2+}チャネルは，細胞膜の脱分極により開いて Ca^{2+}を細胞内に透過させ，細胞内の様々な Ca^{2+}依存性の生理現象を引き起こす。電位依存性 Ca^{2+}チャネルには多くのサブタイプがあるが，疾患には中枢神経系の主な Ca^{2+} チャネルである P/Q 型 Ca^{2+}チャネルが一番深くかかわっており，このチャネルをコードするα1Aサブユニット遺伝子の変異は，ヒトやマウスの小脳失調症や，ある特定の変異においては欠神発作も合わせて引き起こすことが知られている。変異マウスはとりわけヒトのチャネル病疾患の理解あるいは診断や治療に向けた研究をするにあたって貴重なモデルとなりうる。

tottering (tg)及び rolling Nagoya (tg rol)は，P/Q 型 Ca^{2+}チャネルのα1Aサブユニット遺伝子内にそれぞれ異なるアミノ酸変異をもつ自然発症型の変異マウスであるが，症状の程度や発症時期が異なる。このような違いが生じるメカニズムはもとより，遺伝子変異が小脳に多数存在するシナプスにどのような変化を生じさせ，失調症発症に至るのかは不明であった。

小脳皮質プルキンエ細胞に投射する興奮性シナプスである平行線維及び登上線維からのシナプス伝達の変化を，変異マウス小脳のスライス標本を用いてパッチクランプ法で比較検討してきた。その結果，平行線維-プルキンエ細胞シナプスは，小脳失調症発症に伴ってその機能が低下していくことが明らかになったのに対し，登上線維-プルキンエ細胞シナプスでは予想に反してその機能が維持されていただけでなく，小脳失調症がより重篤である tg rol マウスではシナプス伝達が亢進していた。その原因は，プルキンエ細胞の AMPA 感受性の亢進，シナプス伝達に寄与する Ca^{2+}チャネルサブタイプ構成の変化，及びプルキンエ細胞樹状突起の異所性シナプス形成という，遺伝子異常による細胞体に流入する Ca^{2+}減少の 2 次的な影響であるらしいことが明らかになった。

また視床から大脳皮質への投射でもシナプス伝達の異常が明らかになってきており，てんかんなどの神経症状との関係を検討していく予定である。

GFP を用いた蛍光カルシウムプローブ，G-CaMP の開発

中井　淳一，大倉　正道，井本　敬二

GFP はオワンクラゲ由来の緑色蛍光蛋白である。我々は GFP，カルシウム結合蛋白である calmodulin およびその相互作用ペプチドである M13 を遺伝子操作により改変融合し，細胞内のカルシウムイオン濃度をリアルタイムに測定するための蛍光プローブ，G-CaMP を開発した。

これまでにも同種のプローブは開発されていたが，今回我々が開発した G-CaMP は以前のものに比べて約 30 倍もカルシウムイオンに対する感受性が高く，G-CaMP を用いることによって以前のプローブでは観察できなかった現象を容易に観察できるようになった。例えば G-CaMP を培養したマウスの骨格筋細胞に発現させたところ，細胞内のカルシウムイオン濃度変化を蛍光顕微鏡を通して肉眼でもリアルタイムに観察することができた。

カルモデュリンによる電位依存性イオンチャネルの制御機構

森 誠之，井本 敬二

電位依存性イオンチャネルの制御機構のひとつとして，カルモデュリンによる直接的相互作用があきらかになってきた。これまで，一般的にカルモデュリンはカルシウムと結合した後，不特定多数のターゲット分子に働きかけると考えられてきたが，電位依存性イオンチャネルの場合，カルモデュリンが常に直接的にチャネルに相互作用しており，カルシウムと結合することで，即座にそのイオンチャネル自身を制御することが明らかになりつつある。このような電位依存性イオンチャネル特に Ca^{2+}チャネルや Na^{+}チャネルに対するカルモデュリンの作用はこれまで明らかになっている作用メカニズムと一線を画するものであると考えられる。更に Ca^{2+}チャネルの場合このような local な場所での制御機構が, 新たな遺伝子の発現にも関係していることも明らかとなってきた。我々はこの様に神経細胞の local な場におけるカルモデュリンによるイオンチャネルの制御機構の解明を目的に実験を行ってきた。我々は神経型の電位依存性 Na^{+}チャネルのカルモデュリン結合部位（IQ-region）に変異を導入したところ，電位依存性の不活性化に変化を見出した。そこで，相互作用の詳細を捕らえるため，更に構造化学的視点から研究を行った。その結果，カルモデュリンは主に，カルシウムと高い親和性をもつ C-terminal ドメインを介して Na^{+}チャネルと結合し，カルシウムと結合した後, N-terminal と C-terminal の両方に抱きかかえられる構造に変化し, 作用をもたらすことが明らかとなった。また興味深いことに，他の Ca^{2+}カルモデュリンに対するターゲット分子が存在していても, Na^{+}チャネルとカルモデュリンの結合はほとんど影響を受けない local な場での相互作用を生化学的実験で再現することができた。より詳細な結合様式の解明を今後の研究課題としている。

高次神経機構研究部門

【概要】

本研究部門ではヒトが含まれる哺乳動物の脳機能がどのような分子メカニズムにより形成，制御されているかを解明することを目的とし，脳構造形成および神経回路網形成・再編成に関わる分子の探索および解析を行っている。特に脳機能関連遺伝子を欠損させたマウスを作製することによる解析を行っている。非受容体型チロシンリン酸化酵素 Fyn の欠損マウスでは情動行動や哺乳行動において異常が認められた。Fyn を介する情報伝達系に注目し，Fyn 結合分子の解析をおこない新規カドヘリン型受容体である CNR ファミリーを見いだした。この CNR ファミリーはマウス脳に発現する多様化した分子群である。CNR ゲノム構造は免疫系での記憶に関わる免疫グロブリンの遺伝子クラスター構造に類似しており，また，CNR 遺伝子産物は神経細胞により発現の組み合わせがあることが明らかにされている。さらに，CNR ファミリーは大脳皮質層構造形成機構に必須の Reelin 分子の多重受容体として機能していることを明らかにしている。以上のことより CNR ファミリーの発現制御と分子機能の解析により，脳形成や機能発現における個体発達過程での神経細胞の多様化機構および脳の複雑化の分子メカニズムが明らかになるのではないかと考えている。

CNR 分子多様性における機構解析

先崎浩次，八木　健

マウス CNR は 14 種類のサブタイプが存在し，マウスゲノム上に CNR 遺伝子クラスター構造を形成している。

CNR 分子群の分子多様性の機能を明らかにすることを目的として,（1）CNR 遺伝子多重欠損マウスの作製および,（2）各CNR 分子特異抗体作製の 2 つのアプローチによる CNR 分子多様性の機能解析を行っている。CNR 多重欠損マウスの作製にはマウス CNR ゲノム構造を利用し 2 ヶ所に loxP 配列を遺伝子ターゲティング法により導入し Cre-loxP 系を用いて CNR サブタイプを複数欠損させるマウスの作製を行った。また，各 CNR 特異抗体作製においてはラットモノクローナル抗体 8 種とおよびウサギポリクローナル抗体 10 種が作製でき, これらの抗体を用いて免疫染色法によりマウス発生過程での各 CNR 蛋白質の発現・局在解析を行っている。

マウス嗅球での周波数帯によって分離される独立な 2 つの経路

田仲祐介，八木健

遺伝子と行動との関係を明らかにするために，マウスはターゲッティングなどの遺伝的・分子生物学的な手法を用いて，個体レベルでの表現型としての行動異常の解析が可能である。しかし，行動を制御しているのは中枢神経であり, 処理を行うのはそこでの神経回路網である。この観点から，In vivo でのマウス中枢神経系からの神経活動の記録・解析系を確立させた。この過程の中で，マウス嗅球にて低濃度刺激によって誘発される神経活動(LFP)を見いだした。この活動は，従来に報告されている嗅覚性誘発活動（誘起波）より低い周波数帯(7-14Hz)にピークが見られる。さらに垂直多点電極を用いて，この活動が糸球体層と僧帽細胞層の間に由来することを見いだした。また，この低周波活動中でのスパイクの有意な増大は見られなかったが相関を示した。これらの結果は，嗅球において周波数帯によって分離される独立な 2 つの経路が存在することを示し，低周波発振器(Low Frequency Oscillator)として中枢神経系において機能していることが示唆される。

遺伝子変換ラット作製系の開発

金子涼輔，八木健

今後，高次脳機能発現における遺伝子機能を調べていく際に必須となる遺伝子変換ラット作製系の開発を行っている。遺伝子変換動物作製法には大きくわけて 2 つの方法が知られており，一つは遺伝子変換体細胞核を用いたクローン動物作製による方法である。マウスを用いた検討の結果，クローン動物作製のための核ドナー細胞としては神経幹細胞が優れていることがわかった。そこで，ラット神経幹細胞の培養方法を確立し，遺伝子導入方法を検討したところ，電気穿孔法を用いて高効率に遺伝子導入することに成功した。現在は神経幹細胞を用いたクローン動物作製を行っている。一方，もう一つの方法は遺伝子変換 ES 細胞を用いたキメラ動物作製である。現在はラット ES 細胞樹立の検討を進めている。

中枢神経系における *CNR* の体細胞突然変異の解析

平山晃斉，八木　健

CNR ファミリーは中枢神経系に強い発現を示し，遺伝子構造は可変領域と定常領域とからなる免疫グロブリンの遺伝子構造に類似している。この特徴的な遺伝子構造から中枢神経系の多様なネットワークを担う分子の一つ

として注目されている。CNR の発現メカニズムを調べる目的で転写産物の解析をおこなった結果，興味深いことに，CNR の転写産物には通常より高い体細胞突然変異が認められ，変異率が脳の発生が進むにつれて蓄積すること，変異は A から G，U から C への割合が高く塩基置換に偏りがあることが明らかになった。また，塩基置換に伴うアミノ酸置換を調べた結果，CNR の機能に重要であると考えられる EC1 ドメインに高いアミノ酸置換を認めた。以上の結果から，脳の発生に伴って CNR の転写産物に体細胞突然変異が起きている可能性が示された。

ゼブラフィッシュ CNR の機能解析

多田基紀，八木　健

CNR はカドヘリン様受容体遺伝子群で，神経細胞で発現し，マウスでは大脳層構造形成に働いていることが知られている。私は Whole mount in-situ hybridization 法を用いて，発生段階におけるゼブラフィッシュ CNR 遺伝子の時間的，空間的発現パターンを明らかにした。この結果，神経組織の発生時期・領域，神経細胞分化時期・領域と一致して CNR の発現が見られることを明らかにした。また，ゼブラフィッシュにおいて利用可能なことが知られている Morpholino アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて，CNR タンパク質発現阻害を行うことで CNR の機能解析を行った。この結果，受精後 24 時間胚において神経細胞分化の起こる領域に同調してアポトーシスによる細胞死が観察された。

情報記憶研究部門

【概要】

本部門では「神経幹細胞の分化・発達− 再建医学への応用」というテーマで研究を行っています。

高齢化社会となった今日，いろいろな脳機能障害で悩む人が増え，障害脳機能を神経移植によって再建しようとする再生・再建医学が注目されています。

神経幹細胞は，EGF/FGF 存在下の無血清培地中で無限に増殖し，年単位にわたって自己再生能を維持します。大量に調整することが出来るので，神経移植における有力なドナー細胞候補です。しかし分化の段階で，大半の神経幹細胞はニューロンでなくグリア細胞になります。したがって，(1)グリア細胞でなくニューロンに分化させる手だて，さらに（2）ドーパミン，GABA，コリン作動性など，目的とする表現型のニューロンへ分化させる手だて，の研究が必要となります。

われわれは，神経幹細胞の分化に外部環境因子が大きな影響をもつことを明らかにしました。胎仔ラットの中脳腹側部から得た神経幹細胞を，EGF/FGF 存在下で増殖させ，片側パーキンソン病モデルラットの両側の線条体に移植すると，正常側の線条体より，ドーパミン入力を欠如した側の線条体で，より強く TH 陽性ニューロンへ分化しました。これは，ドーパミン入力を欠如した線条体の環境が，中脳神経幹細胞をドーパミンニューロンへ分化させるのに適していることを示します。すなわち，内因性の遺伝子プログラムに，外因性の環境因子が作用し，分化が完成します。

神経幹細胞からニューロンへの分化・発達機構の解明と神経幹細胞の移植による機能の再建を目指しています。

生体調節研究系

高次神経性調節研究部門

【概要】

高次神経性調節部門は視知覚および視覚認知の神経機構を研究対象としている。我々の視覚神経系は複雑な並列分散システムである。そこでは数多くの脳部位が異なる役割を果たしつつ，全体として統一のとれた視知覚を生じる精巧な仕組みがあると考えられる。また二次元の網膜像から世界の三次元構造を正しく理解できる仕組みもそなわっている。視知覚におけるこれらの問題を解明するために，大脳皮質を中心とするニューロンの刺激選択性や，異なる種類の刺激への反応の分布を調べている。具体的な課題として（1）初期視覚野における輪郭の表現，（2）初期視覚野における面の表現，（3）選択的注意による視覚野ニューロン活動の変容，（4）大脳皮質における色情報表現の課題依存性，などに関する研究を行った。

初期視覚系における輪郭線の折れ曲がりの表現

伊藤　南, 小松　英彦

物体の三次元的な構造を知覚する際に必要となる奥行きの情報は，両眼視差以外にも輪郭の形状や遮蔽等の単眼性手掛かりによっても得られる。輪郭線の折れ曲がりや分岐はこうした手掛かりを与える重要な刺激要素であるが，従来の初期視覚系研究においては線や縞刺激の傾きに対する選択性が重視されてきた。我々はサルを訓練し，注視課題遂行中のサルの第二次視覚野から細胞外記録を昨年に引き続き行った。十二方位からの組み合わせにより二本の直線成分をつなぎ合わせて作った輪郭線の折れ曲がりを受容野の中心に呈示して神経細胞の反応を調べた。第二次視覚野には特定の組み合わせ（輪郭線の折れ曲がり）に対して選択的な反応選択性を示す細胞が存在した。その多くは個々の直線成分に対する反応に大きく依存しており，また受容野の周囲に不均一に働く抑制性の作用が選択性を決める上で重要な役割を果たしていることを見出した。このことは第二次視覚野が輪郭線の折れ曲がりや分岐を検出する最初のステップであることを示唆する。

初期視覚系における面の表現－光計測による解析

谷　利樹, 横井　功, 伊藤　南, 小松　英彦, 田中　繁（理研）

初期視覚系のニューロンは線や境界部分に選択的に反応し，輪郭線の表現に関係すると考えられてきたが，近年になり面の表現との関係を指摘する報告がなされている。我々は面情報解析の神経メカニズムを探ることを目的として，面刺激に特異的に反応する領域がネコの初期視覚系に存在するかどうかを内因性信号による光計測により調べてきた。その結果，ディスプレイの画面を一枚の面と考えてその輝度を矩形波状に交互に反転させると，18 野に面の輝度反転により活動する領域が 17/18 野境界に沿うようにいくつかに分かれて存在することが分かった。さらに面の輝度反転に反応する領域が 18 野の方位選択性地図の特異点とよく重なることが明らかになった。本年は光計測の結果をもとに面の輝度反転に反応する領域の内外に微小電極を刺入し細胞外記録を行った。その結果，個々の細胞レベルにおいても上記のような結果と整合するような性質を持つ細胞を多数記録した。さらに

領域外においては一部の方位選択性地図の特異点付近に面の輝度反転に反応する細胞が存在することを見いだした。この結果は面の表現の情報処理が初期視覚系に存在し，かつ輪郭線の処理と何らかの関係を持つことを示唆する。

多次元視覚探索課題遂行中のサル V4 野におけるニューロン活動

小川　正, 小松　英彦

複数の特徴次元で構成された刺激の中から特定の次元に選択的に注意を向けて目標を探す視覚探索課題をサルに行わせ, V4 野からニューロン活動を記録し視覚刺激呈示後の応答を調べた。呈示される 6 つの刺激の中には色および形の特徴次元で目立つ刺激が 1 つずつ含まれ（例えば 1 つの赤四角，1 つの緑丸，4 つの緑四角），どちらかの刺激にサッカードを行うと報酬がもらえる。どちらの次元で目立つ刺激を目標とするかは，注視点の色を変えることにより教示した。V4 ニューロンの活動を解析した結果，(1) 受容野内の刺激が色（または形）次元で目立つか否かを表現する細胞群が存在した。(2) さらに，色次元で目立つ刺激を表現する細胞群は色次元で探索する場合にニューロン活動をより増大させた。同様の傾向は形次元でも見られた。前者の活動はボトムアップ性の注意効果を，後者はトップダウン性の注意効果を表現していると考えられる。

大脳皮質における色情報表現の課題依存性

鯉田　孝和, 小松　英彦

色は数値で記述することが容易なため，知覚のゴールである認知カテゴリー研究にとって色覚は有利なテーマである。色カテゴリーの分布やニューロンの色表現を明らかにするために，色を記述する何らかの座標空間が必要である。しかしこれまで用いられてきた座標空間では，色刺激間の距離と，知覚の上の距離の関係が明確でなかった。我々は，知覚距離として弁別閾値をとりあげ，これを正確に反映する新しい色座標空間を信号検出理論を用いて作成した。まず，サルに色刺激を時間順に二つ呈示し，それらが違うか同じかを GO または NO-GO で答えさせる色弁別実験を行なう。得られた行動結果から算出できる値（d'）は，心理尺度での色差に相当する。d'が一定になるよう等間隔に配置された色セットは，色弁別能力という心理尺度で均等に離れた刺激セットになる。2 頭のサルにおいて，この方法により色座標空間を求めた。この色座標空間を用いることにより，個体間での色カテゴリー，ニューロン特性を同じ心理尺度から比較することができる。

生体システム研究部門

【概要】

生体システム研究部門では姿勢制御および歩行運動の高次制御に関わる中枢神経機序の理解を深めることを研究目標としている。このために以下の課題を行った。(1) 長期の運動学習に伴う若齢ニホンサルの直立二足歩行運動能力の獲得に関する運動力学的研究，(2) 経頭蓋磁気刺激法による大脳皮質運動野－下肢・体幹筋への成長発達に伴うシグナル伝達様式の経時的変化に関する研究，(3) サル直立二足歩行モデルにおける水平トレッドミル二足歩行と四足歩行運動の実行およびより複雑な歩行課題（障害物トレッドミル歩行課題）の実行に関

与する脳領域の同定を試みた非侵襲機能画像法（PET）を用いた研究,（4）PET により同定された各脳領域の機能的意義の同定を試みた脳機能不活化法による研究,（5）選択的微小刺激および破壊法によるネコ小脳歩行誘発野の機能的意義の同定,（6）小脳歩行誘発野の基本的構成要素である室頂核に注目した室頂核視床路の微細投射様式の組織解剖学的研究である。これらの研究は 1 名の研究者単独で実施することは困難であり,技術課森,高須両技官を含めた部門員全員により実施された。得られた研究成果は国内外の学会およびシンポジウムで発表し,一部はすでに論文発表されている。本年度 3 月には森（茂）が Prof. Wiesendanger, Prof. Stuart とともにオーガナイザーとなり国際シンポジウム“Higher Nervous Control of Posture and Locomotion: Parallel and Centralized Control Mechanisms”を開催した。

中枢無傷・覚醒ネコの姿勢および歩行運動に対する小脳歩行誘発野の選択的刺激および破壊効果

中隋　克己，森　大志，橘　篤導，森　茂美

左右の小脳室頂核からは同側性および交叉性の遠心路が始まる。この交叉性遠心性線維は小脳白質正中部で交叉して鈎状束を形成する。除脳ネコにおいてこの鈎状束の正中部（小脳歩行誘発野 cerebellar locomotor region, CLR）を連続微小電気刺激すると流れベルト上で制御歩行が誘発できる。本研究の目的は中枢無傷ネコの姿勢および歩行制御における CLR の機能的意義の解明である。そのため第一に中枢無傷･覚醒ネコの CLR を連続微小電気刺激した。刺激を加えるとネコは協調的な歩行運動を開始した。第二に CLR を電気的に凝固破壊した。CLR を破壊されたネコでは前後肢の協調運動は障害され，ネコは方向転換を試みるとバランスを崩してしばしば転倒した。以上の結果は姿勢および歩行制御において室頂核からの交叉性遠心性運動指令が頭頚部・体幹および四肢運動分節の動きを時間的空間的に強調させる可能性を示唆する。

直立二足歩行運動の実行に関与する脳領域の糖代謝 PET 法による同定

森　大志，橘　篤導，中隋克己，高須千慈子，逵本　徹，塚田秀夫（浜松ホトニクス（株)），森　茂美

長期の報酬条件付け運動学習により二足歩行能力を獲得したニホンサル（*M. fuscata*）は様々な外的環境下で最適な歩行パラテータを選択して安定した二足歩行を実行する。本研究ではこの直立二足歩行モデルを用い，二足および四足歩行運動の実行に直接的に関与する脳領域を糖代謝 PET 法を用いて同定することを研究目的とした。そのために 2 頭の成サル歩行モデルを用いた。放射線透過吸収率測定の後に [18F]FDG (fluoro-2-deoxy-D-glucose) を投与し，トレッドミル上での二足・四足歩行運動課題を実行させた。座位姿勢の維持をコントロール課題とした。歩行・コントロール課題実行後に脳糖代謝測定を行い，それぞれの歩行運動課題とコントロール課題とを比較検定して糖代謝が亢進している脳領域を同定した。2 頭のサルともに二足歩行課題では特に補足運動野・一次運動野・小脳虫部で，一方，四足歩行運動では一次運動野・小脳半球で糖代謝の亢進すなわち神経活動の増強が観察された。これらの結果から二足および四足歩行運動は一部異なる要素的神経制御機構を動員して実行されていることが示唆された。

成長発達と運動学習による大脳皮質運動野− 歩行関連筋群へのシグナル伝達様式：経頭蓋磁気刺激法を用いた研究

森　大志，中溝克己，高須千慈子，森　茂美

長期の報酬条件付け運動学習によりニホンサル（*M. fuscata*）は二足歩行能力を獲得する。本研究ではこれらの動物モデルを対象として，成長発達と運動学習によりサル大脳皮質運動野− 脊髄下行性シグナルの伝達様式が経時的にどのように変化するかを経頭蓋磁気刺激法を用いて非侵襲的に検討した。ケタミン軽麻酔下でサル頭部（主に一次運動野と考えられる領域）に磁気刺激を加え，刺激により導出される筋活動を記録した。刺激の局所化をはかる目的で本研究では独自に開発した小型 8 の字コイルを用いた。得られた誘発筋電図を複数回加算平均し，応答潜時，振幅などの定量解析に用いた。得られた成績から成長発達と運動学習にともない，上肢・体幹・下肢筋郡に順に成熟パターン（早い伝導速度と同一刺激強度に対する筋収縮の増強）の伝達様式が観察された。これらの結果は脊髄下行性伝達経路が吻尾側方向に成熟していることを示唆し，二足歩行未学習サルが安定した二足歩行能力を獲得する際にみられる吻尾側方向への協調運動の確立所見と合致した。

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

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

本研究では線条体コリン作動性介在神経細胞の働きを明らかにする目的でマイクロダイアリシスプローベを両側のラット線条体に埋め込み，右側をアセチルコリンのアゴニストであるカルバコール(10-50 mM)を溶解した生理的人工脳脊髄液で持続的に潅流した。潅流開始から約 30 分後からラットは全身の抗重力筋活動を著しく増強するとともに，刺激側（右側）と反対方向（左側）への回転運動（4〜6 回/min）を始めた。線条体のカルバコール潅流開始から 30 分，60 分，90 分後にラットを安楽死させ全脳標本を速やかに摘出した。これらの標本から神経細胞活動の程度を反映すると考えられている c-fos タンパクの発現様式を全脳の前額断切片（厚さ 50 μm）上で定量的に解析した。その結果，刺激側（右側）の感覚-運動皮質を含む広範な皮質領域, 線条体, 淡蒼球, および視床で強い c-fos タンパクの発現が観察された。

ネコ室頂核-視床路終末線維の視床内分布と形態的特徴

J. Czarkowska-Bauch，奥村　哲，中溝克己，森　茂美

ネコを用いて室頂核-視床路終末線維の視床における分布様式と形態的特徴を解析し，室頂核-網様体路，同-前庭路終末線維の形態学的特徴と比較した。一側の室頂核に神経標識物質（BDA）を定位的に微小注入し，12 日間後にネコを安楽死させ脳標本を摘出した。この標本の前額断連続切片（50 μm）を作成し，間脳および脳幹に存在する室頂核に起始する軸策線維を順行性に標識した。室頂核-視床路では軸策線維は両側に存在したが，交叉性の投射が優位であり，主として髄板内核群と腹側核群に分布していた。軸策線維は終末部付近で細かく分枝し，各枝には多数の膨大部（φ：1.5-2.5 μm）がブドウの房様に集合して存在した。視床では各膨大部の神経細胞体に対する光顕的近接像（close apposition）は少なかったが，脳幹網様体および前庭神経核では多くの膨大部が大型細胞の細胞体と樹状突起の起始部付近に光顕的近接像を形成していることを観察した。

ラット腰髄に分布するアセチルコリンエステラーゼ陽性神経細胞の生後発達

Arpad Dobolyi，奥村　哲，森　大志，森　茂美

AChE 組織化学法を用いてラット腰髄の AChE 陽性細胞の生後発達様式を解析した。その結果 AChE 陽性細胞として運動神経細胞(MN)，交感神経細胞に加えて，灰白質中間質の内・外側に存在する 2 種類の partition neurons (PN)，中間質の中央に存在する大型細胞，後角第 I 層に存在する小型で扁平な細胞を同定した。それらの生後発達について検討したところ, PN は生後 1-8 日目から存在し，他の細胞に比べて AChE を強く発現していた。PN は AChE を強く発現する樹状突起の枝を主として内外側方向に，一部を吻尾側方向に拡げており，MN プールの方向にのびる線維も観察された。近年，中枢神経系において AChE が trophic function を持つことが明らかにされてきた。これらの結果は, PN が MN などの脊髄神経ネットワークの生後発達に関連し, trophic な機能を持有することを示唆した。

ネコ線条体の出力細胞，介在神経細胞両者に対するセロトニン神経支配様式

奥村　哲，Arpad Dobolyi，松山清治，森　大志，森　茂美

本研究はネコ線条体の出力細胞に対するセロトニン神経支配様式を明らかにすることを目的した。そのため神経標識物質（BDA）を線条体出力細胞の主たる投射先である淡蒼球，黒質網様部，脚内核にそれぞれ微小注入し出力細胞を逆行性に標識・同定し，さらにセロトニン線維を 2 重に標識した。出力細胞は 4〜6 本の樹状突起をもつ中型で有棘の細胞であった。出力細胞は多くのセロトニン線維に囲まれており，両者間に多くの光顕的近接像 (close apposition) を観察した。光顕的近接像は主に出力細胞の 樹状突起に観察され，20〜30%はその近位に，60〜70%は遠位に存在した。この分布の特徴には出力先による差は認められなかった。本年はさらにこれらのセロトニン線維と線条体ニューロン間の接続について電子顕微鏡的観察を試みた。その結果，いくつかのシナプス接合を観察することができた。

直立二足歩行するニホンサル(*M. Fuscata*)に与えた障害物を設置したトレッドミル上での歩行運動課題の学習機序

橘　篤導，森　大志，Carol A. Boliek，高須千慈子，森　茂美

若齢ニホンサルは長期の報酬条件付け運動学習により直立二足歩行能力を獲得する。本研究では直立二足歩行能力を獲得した青年期のサルが障害物を設置したトレッドミル上での二足歩行運動課題に対して，その学習過程で，どのような歩行ストラテジーを動員してその課題を解決するのかを明らかにすることを目的とした。そのため高さの異なるブロック状の障害物 1 つをトレッドミル左一側に設置した。第 1 日目の試行（高さ 3cm 障害物）では不十分な視覚情報のために，つまずく頻度が高く，姿勢に大きな乱れが生じた。しかし，サルはつまずいた後に直ちに転倒防御姿勢を取り，以前の安定した二足歩行を継続した（適応制御）。第 2 日目（5cm 障害物）ではサルは十分な視覚情報を入力し障害物の存在を認知することが可能となり，障害物をクリアする際に股・膝関節屈曲ストラテジーを動員し（視覚運動強調），足と障害物の間に充分な空間を作成してつまずくことなく歩行を継続した。さらに予め，下肢運動軌跡を通常より高くし，障害物との遭遇に備えるような歩容も示した（予測制御）。第 3 日目（7cm 障害物）になると，より高い障害物にも対応させた下肢運動軌跡をとることがで

きた。これらの結果はサルは新しい歩行運動課題学習初期過程で，その課題解決に必須な感覚運動情報の統合をこれまでに獲得した二足歩行制御機序に加えて解決したことを示唆した。

高次液性調節研究部門

【概要】

我々は視覚性認知記憶の大脳メカニズムについて研究を行っている。記憶対象の脳内表現は大脳側頭葉連合野に貯えられ，側頭葉連合野への各々の入力経路が記憶形成，想起の過程において独自の機能を果たしているとの作業仮説の検証を行っている。

サル下部側頭葉における長期連合記憶の順行性情報処理

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

The macaque inferotemporal (IT) cortex, which serves as the storehouse of visual long-term memory, consists of two distinct but mutually interconnected areas: area TE (TE) and area 36 (A36). In the present study, we tested whether memory encoding is put forward at this stage, i.e., whether association between the representations of different but semantically-linked objects proceeds forward from TE to A36. To address this question, we trained monkeys in a pair-association memory (PA) task, after which single-unit activities were recorded from TE and A36 during PA trials. Neurons in both areas showed stimulus-selective cue responses (347 in TE, 76 in A36; ‘cue-selective neurons’) that provided, at the population level, mnemonic linkage between the paired associates. The percentage of neurons whose responses to the paired associates were significantly ($P < 0.01$) correlated at the single-neuron level (‘pair-coding neuron’) dramatically increased from TE (4.9% of the cue-selective neurons) to A36 (33%). The pair-coding neurons in A36 were further separable into Type1 (68 %) and Type2 (32%) based on their initial transient responses after cue stimulus presentation. Type1 neurons, but not Type2 neurons, began to encode association between paired stimuli as soon as they exhibited stimulus selectivity. Thus, the representation of long-term memory encoded by Type1 neurons in A36 is likely substantiated without feedback input from other higher centers. Therefore, we conclude that association between the representations of the paired associates proceeds forward at this critical step within IT cortex, suggesting selective convergence onto a single A36 neuron from two TE neurons that encode separate visual objects.

TE のと 36 野視覚記憶ニューロンを結ぶ順行性神経繊維の投射様式

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

A number of studies have shown that the perirhinal (PRh) cortex, which is part of the medial temporal lobe memory system, plays an important role in declarative long-term memory. The PRh cortex contains neurons that represent visual long-term memory. The aim of the present study is to characterize the anatomical organization of forward projections that mediate information flow from visual area TE to memory neurons in the PRh cortex. In monkeys performing

a visual pair-association memory task, we conducted an extensive mapping of neuronal responses in anteroventral area TE (TEav) and area 36 (A36) of the PRh cortex. Then, three retrograde tracers were separately injected into A36 and the distribution of retrograde labels in TEav was analyzed. We focused on the degree of divergent projections from TEav to memory neurons in A36, because the highly divergent nature of these forward fiber projections has been implicated in memory function. We found that the degree of divergent projection to memory neurons in A36 was smaller from the TEav neurons selective to learned pictures than from the nonselective TEav neurons. This result demonstrates that the anatomical difference (the divergence) correlates with the physiological difference (the neuronal selectivity to the learned pictures). Because the physiological difference is attributed to whether or not the projections are involved in information transmission required for memory neurons in A36, it can be speculated that the difference in the divergence may be the result of acquisition of visual long-term memory.

認知的注意シフト課題遂行中のマカクサルにおける機能的 MRI

Nakahara K, Hayashi T, Konishi S, Miyashita Y

Functional brain organization of macaque monkeys and humans was directly compared by functional magnetic resonance imaging. Subjects of both species performed a modified Wisconsin Card Sorting Test that required behavioral flexibility in the form of cognitive set shifting. Equivalent visual stimuli and task sequence were used for the two species. We found transient activation related to cognitive set shifting in focal regions of prefrontal cortex in both monkeys and humans. These functional homologs were located in cytoarchitectonically equivalent regions in the posterior part of ventrolateral prefrontal cortex. This comparative imaging provides insights into the evolution of cognition in primates.

Feeling-of-knowing の神経機構：機能的 MRI によるパラメトリック解析

Kikyo H, Ohki K, Miyashita M

The "feeling-of-knowing" (FOK) is a subjective sense of knowing a word before recalling it, and the FOK provides us clues to understanding the mechanisms of human metamemory systems. We investigated neural correlates for the FOK based on the recall-judgment-recognition paradigm. Event-related functional magnetic resonance imaging with a parametric analysis was used. We found activations in left dorsolateral, left anterior, bilateral inferior, and medial prefrontal cortices that significantly increased as the FOK became greater, and the activations remained significant even when the potentially confounding factor of the response latency was removed. Furthermore, we demonstrated that the FOK region in the right inferior frontal gyrus and a subset of the FOK region in the left inferior frontal gyrus are not recruited for successful recall processes, suggesting their particular role in metamemory processing.

大脳皮質機能研究系

脳形態解析研究部門

【概要】

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

具体的な研究テーマとしては，1) グルタミン酸受容体および GABA 受容体と各種チャネル分子の脳における電子顕微鏡的局在，共存と機能との関係を解析する。2) これらの分子の発達過程や記憶，学習の基礎となる可塑的変化に伴う動きを可視化し，その制御メカニズムと機能的意義を探る。3) 中脳辺縁系，前脳基底核等の情動行動に関与する脳内部位とこれらから大脳皮質への出力機構についてシナプス伝達機構および生理活性物質によるその修飾機構を電気生理学的手法を用いて解析し，それらの分子的基盤を明らかにする。4) ヒトの脳神経症状を引き起こす自己抗体のうち，受容体やチャネル分子などに作用するものをスクリーニングし，機能阻害のメカニズムを探るとともにそれらの分子の脳の高次機能や統合機能における生理的役割を明らかにしていく。5) 脊髄視床路ニューロン活動性の調節とその侵害刺激受容機構における意義を解明する。

グルタミン酸受容体の定量的解析

馬杉（時田）美和子，萩原明，足澤悦子，深澤有吾，重本隆一

脳内における主要な興奮性伝達物質であるグルタミン酸には，イオンチャネル型の AMPA 受容体，NMDA 受容体，Kainate 受容体と G 蛋白共役型の代謝調節型グルタミン酸受容体が存在する。我々は，従来の免疫電子顕微鏡法や新たに開発したレプリカ標識法により，グルタミン酸受容体各サブタイプの局在を高解像度で定量的に解析している。レプリカ標識法を用いた AMPA 受容体の解析では，小脳の登上線維―プルキンエ細胞間シナプスなどにおいて平方ミクロンあたり 1000 個を超える金粒子の標識を達成し，従来法に比べ桁違いの高感度と２次元的な可視化を実現した。今後は，異なるシナプス間や可塑性を発現したシナプスでの受容体の密度変化や分布の変化を解析し，分子形態からの神経伝達調節機構の理解を目指す。

GABAB 受容体やイオンチャネルの脳内局在と機能解析

Akos Kulik，萩原明，深澤有吾，重本隆一

脳内における主要な抑制性伝達物質である GABA には，イオンチャネル型の GABAA 受容体と G 蛋白共役型の GABAB 受容体が存在する。我々は，免疫電子顕微鏡法により GABAB 受容体が小脳では GABA 作動性シナプスではなく，興奮性のグルタミン酸作動性シナプスの周囲により集積していることや，視床においてはいずれのシナプスとも強い関連なく広範に分布しているが，GABA 作動性シナプス周囲により密度が高いことなどを報告した。これらの結果は，GABAB 受容体が脳の部位により異なる役割を持っていることを示唆している。そ

の後，GABAB 受容体とその効果器分子であるカルシウムチャネルやカリウムチャネルとの位置関係を調べており，さらに GABAB 受容体の機能調節機構や脳における役割の解明を目指す。

HCN channel の脳内局在の解析

納富拓也，重本隆一

Hyperpolarization Cyclic Nucleotide-gated (HCN)チャネルは神経の発火周期に深く関与していると考えられている。現在，HCN1 から 4 までのチャネル遺伝子がクローニングされている。本研究では HCN チャネルに特異的な抗体を作製し，光学顕微鏡・電子顕微鏡レベルでの局在分布を検討している。各 HCN チャネルは，それぞれ特異的な脳内分布を示し，軸索終末，細胞体，樹状突起などに多様な免疫陽性像が認められた。HCN1 と HCN2 については，大脳皮質および海馬において錐体細胞の特に遠位の樹状突起に強い陽性像が認められ，電気生理学的に報告されている所見に呼応している。今後は，さらに電子顕微鏡的な観察をすすめ，シナプスや各種電位依存性チャネルとの位置関係を解析し，HCN チャネルによる神経細胞の活動性調節機構を探る。

シナプス前ドーパミン D2 型受容体とカルシウムチャネルサブタイプとの選択的共役

籾山俊彦

黒質－線条体系は大脳基底核を構成する代表的は回路であり，運動調節に関与することが知られている。線条体のアセチルコリン性ニューロンは介在ニューロンであり，大脳基底核におけるアセチルコリンの主たる供給源である。このニューロンは，線条体内の GABA 性中型有棘ニューロンから GABA 性線維入力を受けるとともに，黒質緻密部からのドーパミン性入力を受けている。これまでの臨床医学的研究によれば，線条体におけるドーパミンとアセチルコリンのバランスが，運動機能を制御，維持する上で重要であり，このバランスの崩れとパーキンソン病等の大脳基底核関連疾患が密接に関連していることが示唆されている。線条体のアセチルコリン性ニューロンの D1 タイプドーパミン受容体活性化により，同ニューロンが興奮することが知られているが同ニューロンへのシナプス伝達におけるドーパミンの機能はこれまで不明であった。籾山は最近，線条体アセチルコリン性ニューロンから記録した GABA 性抑制性シナプス後電流(IPSC)が, シナプス前 D2 タイプ受容体を介して抑制されること，そしてその抑制機構は，シナプス前終末の N 型カルシウムチャネルを選択的に遮断することによるカルシウム流入阻害である，ということを見出した。

中枢神経系のシナプス伝達には複数種のカルシウムチャネルが関与しているが，いくつかのシナプスでは，生後 2 週位までに，N 型チャネルの関与が消失して，P/Q 型のみが関与するようになることがラットを用いた研究により報告されている。したがって，たとえば上記疾患と発達・老化との関連を考慮すると，線条体シナプスにおける N 型チャネル関与の生後発達変化およびそれに伴う D2 タイプ受容体の機能変化は重要な問題と考えられる。この点を上記線条体シナプスにおいて検討したところ，生後 60 日位までに N 型チャネルの関与徐々に減少するが，完全には消失しないこと，また，N 型チャネルの関与の減少に伴って, D2 タイプ受容体を介する抑制の程度も減少することを見出した。

次いで，このようなシナプス前 D2 タイプ受容体と N 型チャネルとの選択的共役がアセチルコリン性ニューロンへのシナプス終末に特異的なものなのか，あるいは線条体シナプス終末に普遍的なものなのか，という疑問が生じる。この点を解明する目的で，線条体ニューロンの大多数を占める中型有刺ニューロンへの GABA 性シナプス終末におけるドーパミン受容体とカルシウムチャネルサブタイプとの共役について電気生理学的および形態学的解析を進めている。

mGluR1 の活性化を阻害する自己抗体による小脳失調症

木下彩栄，重本隆一

ヒトのホジキン病患者で小脳失調症を併発する例のあることが知られていた。我々はこのような症例の一部に代謝調節型グルタミン酸受容体 mGluR1 の活性化を阻害する自己抗体が存在する事を突き止めた。この自己抗体をマウスの小脳付近のくも膜下に注入することにより，小脳失調症状を再現することに成功し，受容体阻害抗体が機能的にヒトの脳神経症状を引き起こすことを初めて証明した。さらに，患者の臨床検査やこの自己抗体を注入した動物を用いた実験から，運動学習や心拍除脈条件付けなどにおける mGluR1 の役割が明らかとなってきた。また，他の受容体やチャネル分子などの機能分子に作用するものをスクリーニングし，ヒトの病態に関係のあるものを見つけだすとともに，機能阻害のメカニズムを探ることを目指している。

ラット脊髄視床路ニューロン活動性の解析

籾山明子

末梢組織から脊髄へ入力された侵害信号出力は脊髄視床路ニューロン軸策から上位中枢である視床の中継核へ送られる。視床の VPL 核に蛍光ラテックスビーズを注入することによって，脊髄視床路ニューロンを逆行性に標識し，腰髄スライス標本においてこれを同定してパッチクランプ記録を行った。脊髄視床路ニューロンの細胞内通電による発火特性は adaptation を伴う規則的な発火パターンを示した。また脊髄視床路ニューロンには HCN チャネル活性がみられ，これが EPSP や IPSP の入力に引き続くダイナミックな膜電位変化に貢献していることが示唆された。さらに，EPSP の低頻度繰り返し刺激を行うと，脊髄視床路ニューロンの興奮性が次第に増強し，誘発されるスパイク数が増加する，いわゆる wind-up が観察され，これは NMDA 受容体のブロッカーの投与によって抑制された。wind-up の詳しい発生機構について，現在検討中である。

大脳神経回路論研究部門

【概要】

大脳皮質の機能を理解するためには，皮質のそれぞれの領域に存在している機能単位としての内部回路の構造とその中で行われている情報処理に関しての知識が必要となるが，今のところ，あまり解明されていない。たとえば，皮質の神経回路は種々のタイプの神経細胞から構成されていることは知られているが，個々の神経細胞の情報処理方式・空間配置や，また，それらの神経結合の法則性に関してはほとんど理解されていない。さらに，神経細胞は，信号の伝達の手段として軸索終末から化学物質を放出するが，化学物質の種類によりそれらが回路網にどのような影響を与えるかについても明らかにする必要がある。本部門では，大脳皮質の内部回路の構造的・機能的解析を行ない，その回路の意味を理解することを目的としている。そのために，局所回路における神経細胞の生理的・化学的特徴，機能的単位構造，各神経細胞間のシナプス結合様式などを電気生理学・免疫組織化学・形態学の技術を用いて調べ，皮質のモデル化のための基礎的データを得ることを目指している。現在は，GABA 作働性の介在ニューロンに重点をおいて，サブタイプごとの生理的性質や神経結合を定量的に解析している。本年度は，皮質周期活動時における GABA 細胞サブタイプの発火様式を明らかにするとともに，GABA 細胞から錐体細胞へのシナプス結合様式の形態学的および生理学的な解析を進めた。

大脳皮質周期的活動時における GABA 細胞サブタイプの発火様式

川口　泰雄

皮質内抑制を担う GABA 作働性細胞サブタイプの機能的役割分担を理解するために，皮質の自発的活動中におけるサブタイプの発火様式を定量化することを試みた。大脳皮質スライス標本で，細胞外マグネシウムを減らして NMDA 受容体を活性化させ，0.1 ヘルツ位の自発的な脱分極や，もっと強い同期的興奮（long burst）を引き起こし，これらの同期的活動における，皮質ニューロンの膜電位変動や発火様式を定量的に調べた。その結果，FS 細胞が，各時期で最も高頻度発火し，Long burst の最初では，400Hz 位まで発火頻度を上昇させた。ソマトスタチン細胞，VIP 細胞，大型 CCK 細胞の発火パターンは，FS 細胞とは異なるものであった。大脳皮質ニューロンの発火様式は，興奮性入力の強度・時間パターンだけでなく，化学的・形態的性質の異なるサブタイプに依存して動的に変わることが明らかになった。

大脳皮質非錐体細胞の神経終末が形成するシナプスの 3 次元的構造

窪田　芳之
川口　泰雄

大脳皮質の非錐体細胞は少なくとも十種類以上のサブタイプに分類できる。これは，機能的な役割が異なる為と考えられている。従って各サブタイプ毎に出力部位であるシナプス構造に差異がある事が予想できる為，抑制性シナプスの接着構造を 3 次元的に再構成し検討した。その結果，サブタイプによって出力に若干の違いが認められた。細胞体に対する入力を全く出さないものから，比較的高頻度に入力するものまであった。また，半数以上の神経終末が樹状突起の幹の部分へ入力していた。残りの神経終末は，棘突起に入力していた。面白い事に，これらの棘突起には興奮性と思われる他の入力が頻繁に認められた。一つの興奮性入力のみを選択的に抑制する為の構造であろうと思われる。また，PSD の面積とターゲットの樹状突起の周囲の長さの相関をとったところ，非常に強い正の相関が認められた。効率良く興奮性の信号を抑制する為の構造ではないかと考えている。

大脳皮質投射細胞と高頻度発射型介在神経細胞の神経結合

根東　覚

大脳皮質内回路の構造と機能を明らかにする目的で，投射細胞と介在神経細胞の神経結合について調べた。生後　19 日から 23 日齢のラットより急性スライス標本を作製して，パッチクランプによる 2 細胞同時記録を行った。介在神経細胞には脱分極性通電により高頻度発火するタイプの細胞に注目した。神経伝達は双方向にある場合と片方向のみの場合とが見られた。神経伝達の振幅は安定しており，Paired-pulse 実験では，興奮性，抑制性神経伝達どちらも抑圧タイプのみが観察された。細胞内染色を行い形態学的に神経結合を調べると，電気生理学的に結合が見られた場合だけではなく，見られなかった場合にも，介在神経細胞から興奮性錐体細胞への結合について，光顕レベルでシナプスと考えられる構造が観察された。シナプスと考えられる数は，錐体細胞から介在神経細胞へは数箇所である一方，その逆は十数箇所に上った。詳細については，現在解析中である。

心理生理学研究部門

【概要】

PET や機能的 MRI など人間を対象とした非侵襲的脳機能画像と，電気生理学的手法を組み合わせて，短期および長期の学習に伴う脳の可塑的変化，高次脳機能の加齢変化と脳における代償機構の関連を明らかにすることを目的としている。感覚脱失における可塑的変化から派生して，異種感覚統合の脳内機構の解明を目指とともに，言語処理から認知機能にわたる幅広い研究を行った。なお本年度 7 月，脳機能計測センターに最新型 3TMRI が導入されたことを受けて，機能的 MRI を遂行するための調整および周辺機器の諸準備とともに，その性能評価をあわせ行った。

聴覚脱失による脳の可塑的変化

定藤　規弘

異種感覚統合の神経回路を同定する目的で，発話の視覚入力が発話弁別に対してどのように影響するかを健聴者において検証し，さらに聴覚脱失によりこの視聴覚統合をになう神経回路にどのような可塑的変化が起こるかを，機能的 MRI を用いて調べた。健聴者においては，読唇において両側聴覚連合野と，ブローカ領を含む左前頭前野から運動前野，そして補足運動野に賦活が見られた。これはブローカ領を含む mirror system が，視覚的に入力された調音器官の動きの中に符号化された発話メッセージを取り出すことに関与していることを示唆し，それが側頭葉における音響的聴覚的な弁別を高めるのであろうと推論された。聴覚障害者においては，健聴者において読唇により賦活した両側聴覚連合野が，手話により賦活されることが示された。これは中上側頭溝は聴覚及び視覚入力を受ける多感覚領域であることから，早期失聴により両入力の拮抗的バランスが視覚入力に傾き，健聴者において読唇の際にのみ起こる後および中上側頭溝の協調的活動が，biological motion を伴う手話を理解する際に強調されるものと考えられた（福井医科大学，福井大学との共同研究）。

形状認知における視覚・触覚統合の解析

斎藤大輔，定藤　規弘

形状認知における視覚・触覚統合の神経回路を同定するため，麻雀牌をもちいた形状弁別課題を作成し，機能的 MRI を施行した。触覚･触覚，および視覚・視覚の形状弁別課題においては，それぞれ触覚領域および視覚領域の賦活が見られた。一方触覚･視覚間での形状比較においては，前二者と比較して，後部頭頂間溝が両側性に賦活された。このことから後部頭頂間溝が視覚・触覚統合に何らかの役割を果たしていることが示唆された（福井医科大学との共同研究）。

パーキンソン病における思考速度の低下

本田　学
澤本伸克（京都大学医学研究科）

大脳基底核は，出力標的の一つである視床を介して広範な大脳皮質に情報を発すると同時に，入力部には大脳皮質からの精緻な情報が収斂し，大脳皮質との間にループ回路を形成している。特に近年，高次脳機能に関連の深い前頭前野や吻側の運動前野などの大脳皮質連合野を含む大脳基底核－大脳皮質機能ループが思考をはじめとするヒトの非運動性機能にはたす役割が注目されてきている。運動速度の影響を排して思考速度を評価するための行動課題を開発し，それを遂行するときのパーキンソン病患者の神経活動をポジトロン断層撮像法をもちいて計測し，健常人と比較した。その結果，健常者では思考速度の上昇にともなって尾状核の活性が増大するのに対して，パーキンソン病においては尾状核の活性増大が認められないことを明らかにした。この所見は，パーキンソン病で機能低下の見られる大脳基底核が，運動のみならず思考の制御にも重要な役割をはたすことを直接示すものと考えられる。

認知機能における運動前野の機能的有意性

本田　学

従来運動制御装置の一部と考えられてきた運動前野が運動以外のさまざまな認知的操作の制御をおこなっていることが明らかにされつつある。本研究では，被験者が認知操作をおこなっているときの運動前野の機能を経頭蓋磁気刺激をもちいて一過性に干渉することによって生じる行動学的な変化を統制条件と比べることによって，運動前野の認知活動に関連する役割を明らかにすることを試みた。視覚提示される数字の加算（暗算）をもちいた反応時間課題を設計した。また被験者の解剖学的 MRI 撮像をおこない，それをもちいて個々の被験者の運動前野を頭皮上で同定するためのナビゲーションシステムと方法論を構築した。その結果，大部分の被験者で誤差を5ミリ以内に抑えることが可能になった。以上のシステムをもちいて，計算課題を遂行しているときの被験者の左運動前野をさまざまな潜時と強度で刺激し，反応時間の変化を評価した。その結果，運動前野の刺激により，反応時間が短縮する可能性が示唆された。

健常者における憑依トランスの発現メカニズム

本田　学，河合　徳枝（筑波大学），大橋　力（千葉工業大学）

世界中のさまざまな文化圏に共通して観察される健常者の憑依トランスでは，憑依者の意識，感覚，行動に著しい一時的な変容が観察されるが，その神経生理学的基盤についての検討はほとんど未着手である。その一因として，本来の自然な誘導条件下で惹起される憑依トランスの被験者から，生理的指標を計測することが著しく困難であることがあげられる。私たちは，神経活性物質血中濃度および自発脳波をフィールド条件下で計測する手法を開発し，インドネシア・バリ島の祝祭芸能の中で発生する健常者の憑依トランス状態を対象とした計測に成功した。憑依トランスを呈した被験者では，それを呈さず同様の運動のみを行った被験者に比較して，noradrenaline, dopamine, β-endorphin の血中濃度が有意に上昇していた。これは脳内のカテコラミン神経系およびオピオイド神経系が憑依トランスの発現に関与している可能性を示唆するものと考えられる。

日本語の音韻変換課題における機能的 MRI 研究

関あゆみ，定藤規弘

言語に含まれる音韻的構成要素を同定し，意図的に操作する能力を phonological awareness といい，この障害が発達性読字障害の主たる病態の 1 つであると考えられている。日本語における読字障害の発生率は欧米に比べ顕著に低く，このことから，抽象的な音韻表象を確立し文字との対応関係を習得するという過程において，日本語は有利な特性を持つと考えられてきた。日本語における音韻情報がどのように扱われるか検討するため，健常成人 19 人を対象とし，聴覚的・視覚的に提示による音韻操作課題を用いて，機能的 MRI による研究を行った。その結果，課題提示の様式により，全く異なる領域が寄与することが示された。聴覚提示課題では両側上側頭回が賦活され，抽象的な音韻表象の操作が聴覚関連領域で行なわれていると考えられた。一方，視覚提示課題では両側頭頂間溝に賦活を認めた。このことは仮名の音韻情報が視空間的情報として処理されることを示唆する。仮名はその音韻構成に従い 50 音図に規則的に配列されるため，その位置情報が音韻変換課題に利用されたのではないかと考えた。この結果から，音韻情報が視空間情報として単純化されることが，仮名の習得における有利な特性の 1 つであると考える。

MRI 撮像音強度の変化に伴う聴覚野の賦活

岡田　知久

機能的 MRI は言語課題を含めた多くの実験において用いられるが，大きな撮像音は聴覚刺激呈示の妨げになる。その主要発生源となる傾斜磁場を一時的に止めることで相対的静音時間を設け，聴覚刺激呈示を容易にする撮像方法について基礎的な検討を行った。実験 1 では健聴成人 14 人を対象に，13-17 秒毎に 1 秒間傾斜磁場を止めた(OFF)ところ，両側聴覚野に OFF に同期した広範な賦活を認めた。うち 11 人を対象に実験 2 を行った。12-15 秒ごとに 5 秒間傾斜磁場を止めて，引き続き聴覚野で起こった血流変化を実験 1 での OFF に対する応答曲線を用いて解析した。5 秒間の OFF 期間に伴う血流変化は，ON-OFF と OFF-ON の 2 つの変化時点に同期した応答曲線の線形和によりその 90%以上が説明された。すなわち一次聴覚野は新たな刺激入力が生じた場合のみでなく，それが減少した場合にも，定常状態よりも大きな賦活を示すことが判明した。

統合生理研究施設

高次脳機能研究プロジェクト

【概要】

2001年（平成 13 年）度，2 月に部門創設時以来の中核メンバーであった斎藤康彦助手が群馬大学医学部生理学第二講座講師に転出し，代わって 4 月より米国・シアトルのワシントン大学より帰国した関和彦助手が着任した。

従来の眼球サッケード運動の制御機構を局所回路のレベルから行動レベルまで一貫した理解をする，というプロジェクトはさらに新しい実験系が増えて，展開が開かれた。スライス標本を用いた研究は非常勤研究員の遠藤利朗が神経化学部門の柳川助教授によって開発された，GABA 作動性ニューロンが GFP の蛍光を発する GAD67-GFPマウスを用いてさらに新しい展開を見せた。また総研大大学院生の坂谷智也はマウスの急速眼球運動を高速ビデオカメラを用いて240Hzの時間解像度で記録，解析するシステムを完成させ，新たにマウスの行動モデルが加わった。また総研大大学院生の勝田秀行は，麻酔・非動化したラットで視神経刺激に対する上丘のフィールド電位応答を記録し，薬理学的な実験を行う実験系を完成させ，whole animal での神経回路の解析が可能になった。また小林康助手に学振特別研究員の井上由香と総研大生の渡辺雅之が加わったグループはサルの慢性行動実験をさらに発展させた。また Human Frontier Science Program の国際共同研究でスウェーデンの Alstermark 教授らと行っている共同研究による，サルにおいて錐体路の効果を上肢筋運動ニューロンに伝播する脊髄介在ニューロン系の解析がさらに進展し，脊髄による運動制御を専門とする関助手の加入によって脊髄による上肢運動制御機構の解析も部門の主要研究課題のひとつに加わった。

上丘浅層の GABA 作動性，非作動性細胞に対するアセチルコリンの作用

遠藤利朗，伊佐　正
柳川右千夫，小幡邦彦（神経化学部門）

GAD67遺伝子にEGFPをノックインしたマウスにおいて（生後 4−9 週齢）上丘スライスを作成し，GABA 作動性ニューロンと考えられる GFP(+)ニューロンと興奮性ニューロンと考えられる GFP(-)ニューロンから whole cell 記録を行い，ACh 1mM のパフ投与に対する効果を調べた。

GFP (+)ニューロンは ACh 投与に対して一過性の inward current を生じ，それらは mecamylamine 10 μM によって抑制された。それに対して GFP (-)ニューロンには ACh 投与に対して mecamylamine で抑制される一過性の inward current を示すものの他に一過性 inward current に引き続き outward current を示すものが多く見られた。この outward current は Cl^-の反転電位(-88 mV)付近で反転し，bicuclulline によって抑制された。またこれらのニューロンの inward，outward current はいずれも mecamylamine によって抑制された。従ってこの outward current は ACh 投与に対する GABA ニューロンの興奮性応答によって 2 次的に誘発されたものと考えられたが，この outward current は TTX 0.25 μM 存在下でも観察された。従って，これまでの解剖学的知見と綜合して考えると ACh は軸索伝達を介さずに horizontal ないしは wide field multipolar cell から興奮性出力細胞にいたる axo-dendritic または dendro-dendritic synapse からの GABA の放出を促進するように作用すると考えられた。このように二丘傍体から上丘浅層への投射は興奮性出力細胞を脱分極させるとともに側方抑制も促進するので視覚応答の contrast を増強する働きがあるものと考えられる。

サルの上肢運動ニューロンを制御する脊髄固有ニューロン系の解析

Bror Alstermark (スウェーデン，ウメオ大学)
大木　紫（杏林大・生理）
伊佐　正

皮質脊髄路が運動ニューロンに直接結合しないネコにおいては，頚髄 C3-C4 髄節の脊髄固有ニューロンが皮質からの運動指令を上肢筋運動ニューロンに中継し，上肢到達運動を制御することが知られている。それに対して皮質脊髄路が運動ニューロンに直接結合する霊長類における脊髄固有ニューロン系の存在とその役割は永年にわたり不明だった。近年 Lemon らは麻酔下のマカクザルにおいて上肢筋運動ニューロンから細胞内記録を行い，錐体路刺激の効果を調べ，殆どの細胞において単シナプス性 EPSP と 2 シナプス性 IPSP のみが記録され，2 シナプス性 EPSP が記録されなかったと報告したが，最近我々はストリキニンを静注するとほとんど全ての運動ニューロンで C3-C4 髄節の固有ニューロンを介する 2 シナプス性 EPSP が記録されることを報告した(Alstermark et al. 1999)。そして今回，αクロラロースで麻酔し，非動化したニホンザルにおいて上肢筋運動神経核の電気刺激で逆行性応答する脊髄固有ニューロンからの細胞外，細胞内記録を行った。すると，細胞外記録でみると，これら脊髄固有ニューロンの多くは錐体路電気刺激によって順行性応答しなかったが，ストリキニンの静脈内注射によって発火するようになった。そして細胞内記録を行うと，短シナプス性 EPSP に引き続き，IPSP が観察された。したがって，皮質脊髄路は脊髄固有ニューロンを単シナプス性に活性化すると同時に feedforward inhibition をかけること明らかになった。

上丘局所回路における層内興奮性結合によるバースト生成機構

斎藤康彦，伊佐　正

今回，我々は，哺乳類上丘中間・深総におけるバースト発火生成機構を解明するために，ラット上丘のスライス標本において浅層，中間層ニューロンからホールセル記録を行い，視神経刺激に対する応答を調べた。bicuculline 投与によって GABA 作動性の抑制を除去すると，中間層ニューロンでは刺激強度がある閾値を越えたとたんに単発刺激に対して数百ミリから 1 秒を超える脱分極と 20－30 発の活動電位の発射応答が見られるのに対して，浅層ニューロンは若干応答を増大するだけであるという際立った違いが見られた。このような中間層ニューロンの非線形的な刺激―応答関係は，個々のニューロンの intrinsic な性質ではなく，NMDA 受容体を介するシナプス伝達, 及び神経回路レベルの構造によることが，APV の投与，及び以下の実験結果から示唆された。上丘浅層，中間層における近傍に位置する 2 個のニューロンから同時にホールセル記録を行った。そして bicuculline を投与，さらに細胞外液の Mg 濃度を下げると，中間層のニューロンでは，2 個のニューロンは相互の直接の結合がなくても同期して脱分極を繰り返したが，浅層ニューロン同士ではほとんど起きなかった。また中間層のみのブロック内でもこのような同期的脱分極は起きたが，浅層がつながっているほうがより頻繁に起きた。以上の結果より，基本的には中間層における興奮性結合によって結ばれたニューロン集団の存在とそこにおける NMDA 受容体を介するシナプス伝達が，上丘における非線形的感覚・運動変換ゲートの実体であり，このゲートは，GABA による抑制が解除された状態で浅層から入力するトリガー信号によって開かれることが明らかになった。

マウスの上丘電気刺激によって誘発される急速眼球運動について

坂谷智也，伊佐　正

頭部を固定したマウスの眼球を高速度赤外線ビデオカメラで測定し，240Hz の時間解像度で online で解析するシステムを開発した。このシステムは市販の高速アナログ CCD カメラと IBM-PC 上で走るイメージプロセッサーから構成される。基本的にはマウスの瞳孔を円でフィッティングし，中心の動きを角度に変換するこのシステムを用いたマウスの上丘の深層を連発刺激した効果を調べたところ，反対側に向かうサッケード様の速い運動が誘発されることが明らかになった。この眼球運動の振幅と最大速度の間には霊長類で既に報告されている main sequence に相当するような比例関係が見られた。さらに

誘発されるサッケードのベクトルは刺激位置に関係しており，吻側では小さく，尾側では大きい，また内側では上向き，外側では下向きの成分を持つことが明らかになった。これらは既にサルやネコで報告されているのと同様なマップ構造である。以上のことからマウスにもサルやネコと同様なサッケード生成機構があり，上丘の電気刺激によって眼球のサッケード運動が誘発できることが明らかになった。

中脳ドーパミン細胞においてニコチン受容体活性化に伴って誘発される fulfenamate 感受性電流

山下哲司，伊佐　正

生後 14－17 日齢のラットの中脳スライス標本においてドーパミン細胞から whole cell 記録を行い，膜電位固定下(-60 mV)にて ACh 1 mM を puff 投与すると，ニコチン受容体を介する内向き電流が記録されるが，我々はこれまでの研究でこの内向き電流成分には，ニコチン受容体の活性化に伴って細胞内に流入する Ca によって二次的に活性化される電流成分が含まれていることを明らかにしてきた。この電流成分は fulfenamate (FFA)や phenytoin に感受性を持ち，-40 mV から-80mV の間で negative slope conductance を有することから，ドーパミン細胞の脱分極応答を顕著に増強する作用があることが示唆された。今回，ニコチン受容体を介して流入する Ca がこの FFA 感受性電流を活性化する過程に calmodulin が関与する可能性を検討するため，calmodulin の blocker である W-7, trifluoperazine を投与したところ，FFA 感受性電流は焼失した。そしてこれらの calmodulin blocker によって抑制される電流成分もまた-40 mV と-80mV の間で negative slope conductance を有していた。以上の結果から，ニコチン受容体を介して流入する Ca が FFA 感受性電流を活性化する過程に calmodulin が関与する可能性が示唆された。

感覚・運動機能研究プロジェクト

【概要】

統合生理研究施設　感覚・運動機能研究プロジェクトは，脳波と脳磁図を用いてヒトの脳機能を非侵襲的に研究している。2001 年度の最も重要かつ大きな出来事は，2002 年度予算で新しい全頭型脳磁計の予算申請が認められたことである。現在使用している機器は直径 14cm で頭部の 1 部を測定するタイプである。1991 年に 1 基がそして 1994 年にもう 1 基が導入され，両側半球の同時計測が可能となった。しかし，最近開発されてきた全頭型の機器に比し，ハード，ソフトの両面において老朽化は免れないものとなってきた。特に問題となるのは，脳全体の活動を同時に記録する事ができないため，後頭葉から前頭葉に至る複数の脳部位が活動していると思われる高次脳機能の解析には大きな制限が伴う事である。実際，全頭型を使用していない，という理由で reject された論

文もあり，今回の予算措置は極めてタイミングの良いものであった。また，これは生理学研究所における過去 10 年間の脳磁図研究の成果が認められた事をも示すものであり，佐々木和夫先生（現生理学研究所所長）が創立，育成された統合生理研究施設の 1 つの区切りともなるものである。

2001 年度は，これまで行なってきたテーマを持続しての研究が多く，新しい機器の導入を控えて，現有機器を用いての研究の集大成の時期でもあった。英文原著論文は 16 編を発表し，その内訳は，体性感覚系が 5 編，痛覚系が 2 編，視覚系が 3 編，聴覚系が 2 編，高次脳機能が 4 編であり，広範囲にわたっている事が特徴である。新しい研究として特筆できるのは，末梢神経 C 線維を選択的に刺激する方法を開発し，second pain に関連すると思われる脳活動の解析が可能となったことである。現在諸外国からも多くの問い合わせや訪問見学希望があり，さらに研究を発展させていきたいと考えている。

視覚性運動検出に関与する脳活動の脳磁場による測定

金桶吉起，王　麗紅，川上　治，Lam Khanh，丸山幸一，久保田哲夫

運動している物体の視覚性認知に関わる脳の部位は実験動物でよく研究されており，また最近の機能的磁気共鳴画像によるヒトでの研究も盛んに行なわれている。しかし，両者の研究においても不足している知見は，運動知覚や認知がどのような神経活動の時間過程で起こるかということである。我々は脳磁場測定の高い時間分解能をもって，様々な角度からこの問題に挑戦している。仮現運動は，二つの物体が交互に点滅するとき滑らかな運動知覚を誘発する現象で，運動知覚のための最小限の視覚情報を有する刺激である。これを利用して，その知覚に関与する脳部位と神経活動の時間的変化を測定した。Ternus display を用いて，3 つの横に並んだマルが 3 つとも動いて見えるときと，端の一つのみ動いて見えるときの神経活動の違い，それに関わる脳部位を脳磁場と機能的磁気共鳴画像にて同定した。また，Random dot display にて，仮現運動が誘発されるときとされないときの脳活動の違いから，いつどこで運動知覚が生じるかを検討した。実際運動刺激として，レーザー光の光点を広い範囲の速度で動かし，その運動検出に関わる部位と，神経活動の運動速度との関係について明らかにした。また Random dot kinematogram を用いて，全体として方向を持たないドットの運動速度情報も脳に正確に表現されていることを明らかにした。

顔認知初期過程における「視線」の影響

渡辺昌子，三木研作，柿木隆介

我々はヒトの顔認知機構について脳波と脳磁図を併用した研究を進めている。ヒトにとって「顔」の中でも目，特に「視線」は，見る者の感情に影響を与えまた社会的なコミュニケーションを取る上で重要な役割を果たしており，その心理学的な意味については様々な報告がある。今回我々は，脳波で記録される顔認知の初期誘発反応が「視線」によりどのような影響を受けるか検討した。頭皮上に記録電極をおき，「目が合っている顔」「目がそれている顔」を視覚刺激として用いた。後頭側頭部から顔認知成分とされる N190 が記録され，その振幅は左半球よりも右半球で大きく「顔認知は右半球が優位」というこれまでの報告と合致した所見であった。N190 の潜時，振幅を各刺激条件間で比較検討した結果，反応潜時に有意な違いは認められなかったが，振幅は「目がそれている顔」で誘発される反応のほうが「目が合っている顔」よりも有意に大きかった。これまで動物実験や他のイメージング的手法を用いた研究でも Superior temporal sulcus (STS)が視線の認知に深く関与しているという報告がある。N190

には顔認知中枢とされる側頭葉腹側, Fugiform gyrus の活動のみならず，この STS における視線の認知活動も反映されているものと考えられた。(Watanabe et al., Neurosci. Lett. 325 163-166 2002)

Conduction velocity of the spinothalamic tract in humans as assessed by CO_2 laser stimulation of C-fibers

Yunhai Qiu, Koji Inui, Xiaohong Wang, Tuan Diep Tran, Ryusuke Kakigi

We measured the conduction velocity (CV) of C-fibers in the spinothalamic tract (STT) following stimulation with a CO2 laser using a new method. We delivered non-painful laser pulses to tiny areas of the skin overlying the vertebral spinous processes at different levels from the 7th cervical (C7) to the 12th thoracic (T12), and recorded cerebral evoked potentials in 11 healthy men. We used the term ultra-late laser evoked potentials (ultra-late LEPs), since the peak latency was much longer than that for conventional LEPs related to Ad-fibers following painful laser stimulation (late LEPs). The mean CV of C-fibers in the STT was 2.2±0.6 m/s, which was significantly lower than the CV of the Ad-fibers (10.0±4.5 m/s). This technique is novel and simple, and should be useful as a diagnostic tool for assessing the level of spinal cord lesions. (Qiu et al. Neurosci. Lett. 311:181-184, 2001)

C 線維を上行する信号による大脳活動

Tuan Diep Tran，乾幸二，宝珠山稔，Lam K，秋云海，柿木隆介

痛覚関連の脳内情報処理機構についての研究はほとんどが A-delta 線維を介する first pain を対象としており，C 線維関連の second pain を対象としたものは極めて少ない。本研究は C 線維を介する痛覚情報の初期大脳反応を明らかにした初めての報告である。小さな皮膚領域に炭酸ガスレーザーを照射する方法を用いて C 線維を選択的に刺激し，それによる大脳活動を脳磁図を用いて記録した。最も早く出現する磁場成分 1M について信号源解析を行った。刺激対側半球では第二次体性感覚野（SII）単独，もしくは SII と第一次体性感覚野（SI）2 信号源からの活動が認められた。SI と SII との間で，活動の立ち上がりと頂点潜時に差はなかった。刺激同側では SII 単独の活動が認められ，その頂点潜時は刺激対側と比べ有意に遅かった（18 ミリ秒）。これらの所見より，C 線維関連活動の大脳情報処理の第一段階は，時間的に平行する SI と SII の活動であると考えられた。これらの結果は，first pain の SI，SII での情報処理が平行しており，従ってそれぞれが視床から直接入力を受けているとされる近年の研究報告と類似する。

C 線維関連レーザー誘発脳電位への注意，非注意および睡眠の効果

秋云海，乾幸二，王曉宏，Tuan Diep Tran，柿木隆介

小さな皮膚領域に炭酸ガスレーザーを照射し得られた C 線維関連レーザー誘発電位（LEP）に対する注意，非注意（暗算）および睡眠の及ぼす影響を検討した。対象は 10 名の健康成人。C 線維関連 LEP の電位はコントロールと比べ，注意時にわずかに増加し，非注意時に有意に減少した。Stage1 睡眠では著明に減少し，5 名でほぼ消失した。しかしながら，潜時に有意な変化は認められなかった。Stage2 睡眠では全例で消失した。

これらの結果より，C 線維を介して上行する信号による脳反応は覚醒度に大きく影響を受けることが確認され

た。同様のことは A-delta 線維についても報告されている。この研究は意識レベルに関連した C 線維関連 LEP の初めての報告であり，またこの反応が認知機能を含んでいることを初めて示したものである。C 線維関連 LEP は研究目的のみならず臨床場面でも非常に有用であると考えられるが，これを用いる際には被験者の覚醒度に十分有意を払う必要があると思われる。

痛み関連誘発脳電位に及ぼす睡眠の効果

王曉宏，乾幸二，秋云海，宝珠山稔 Tuan Diep Tran，柿木隆介

痛覚情報処理過程に及ぼす睡眠の影響は研究手段を問わずほとんど報告がない。本研究では，左手指の強い電気刺激による痛み関連誘発脳電位を記録し，睡眠の及ぼす影響を検討した。本刺激法の最大の利点は触覚に関わる A-beta 線維と痛覚に関わる A-delta 線維の両者を刺激することができ，従って睡眠がそれぞれに対して及ぼす影響を知ることができる点である。痛み閾値以下の低強度刺激では早，中期成分である N20，P30，N60（C4）が記録された。高強度刺激ではこれらの成分に加え，痛み特異成分 N130 と P240（Cz）が誘発された。睡眠時には N20，P30 はほとんど変化なく，N130 と P240 は振幅が著明に減少もしくは消失した。N60 はわずかではあるが有意な振幅減少を示した。これらの結果より 1）N20，P30 は A-beta 線維を介する信号の初期 SI 成分である，2）N60 は SI の二次成分でありある程度認知機能を有する，3）N130 と P240 は A-delta 線維を介する痛み特異的成分であり，認知機能と深い関わりを持っていると考えられた。

単語ならびに非単語に誘発された脳磁場に対する刺激反復の効果

関口貴裕（東京学芸大学教育学部心理学科）
小山紗智子，柿木隆介

視覚単語認知に関する研究は，単語の反復提示が単語認知課題のパフォーマンスを向上させることを報告している。本研究では，この単語反復効果が脳のいかなる活動の変化を反映したものであるかを，脳磁図を用いて検討した。そのために，単語，ならびに発音可能な非単語を 8 語の間隔をあけて 2 回提示し，初回提示に対する脳磁場と二回目提示に対する脳磁場の比較を行った。その結果，左半球から記録された脳磁場に，単語の反復による振幅の減衰が認められた（刺激提示後 300-500 ms）。一方，非単語の反復は脳磁場の振幅を変化させなかった。信号源推定の結果，左半球の上側頭部（聴覚野近傍）の活動が単語の反復により減衰することが示された。このことから，左・上側頭部の活動が単語反復効果に関与することが明らかとなった。また，その活動が非単語の反復による影響を受けないことから，同領域が心内辞書へのアクセスに関与することが示唆された。(Sekiguchi, et al. Neuroimage 14:118-128, 2001)

Automatic discriminative sensitivity inside temporal window of sensory memory as a function of time

矢部博興（弘前大学医学部精神科）
小山紗智子，柿木隆介

感覚記憶の時間統合窓の内部の自動弁別感度の時間関数的変化脳に記録された背景音の神経表現は，ミスマッチ陰性電位(MMN)に反映される。この神経表現の長さは，時間統合窓 (TWI)という短時間型の聴覚性感覚記

憶によって 160-170ms の長さに制限されている。本研究では，感覚記憶内部の逸脱検出感度の時間的一様性を調べる為に，TWI 相当の 170ms 時間長の複雑音における欠落セグメントに対する磁気 MMN(MMNm)を脳磁図で計測した。欠落セグメントが刺激の後半部分の時には，MMNm頂点の電位は減衰し潜時は遅延した。つまり逸脱検出感度は，感覚記憶の後半部分に向かって非線形的に減衰する事が明らかにされた。追加実験では，欠落セグメント以降の部分が違う二種の逸脱刺激に対する MMNm を比較したところ，同じ頂点潜時だが異なる振幅を示した。聴覚事象は一定長の 160-170ms の TWI の中の単一事象として取り扱われる事が確認された。（Yabe, et al. Cognitive Brain Research 12:39-48, 2001）

Organizing sound sequences in the human brain: the interplay of auditory streaming and temporal integration

矢部博興（弘前大学医学部精神科）
小山紗智子，柿木隆介

ヒト脳における音系列の組織化：音脈分凝と時間統合の相互作用音の組織化に関する脳情報処理の"音脈分凝"と"時間統合"は，会話認知解明の鍵である。周波数が交互に変わる二つの音は，素早い呈示では高音と低音の分離した音脈として知覚される（音脈分凝）。一方，二つの音が時間統合窓(TWI)の中に呈示されると，単一の聴覚事象として処理される。非注意条件下も音脈分凝と時間統合の両方が誘発される事をミスマッチ陰性電位(MMN)の研究で示してきた。本研究の目的は，音組織化処理の優位性を決定する事である。交互に変わる音の系列に現れる稀な刺激欠落に対する脳磁図が記録された。その結果，交互の音が単一の音脈を形成する時（周波数差が極めて小さい時）には，欠落音に対する磁気 MMN が誘発され，知覚的に高と低の周波数の音脈が出現した時（周波数差が大きい時）には誘発されなかった。この結果は，音脈分凝が，時間統合過程に優先する事を示している。(Brain Research Interactive 897: 222 - 227, 2001)

脳機能計測センター

形態情報解析室

【概要】

形態情報解析室は，形態に関連する超高圧電子顕微鏡室（別棟）と組織培養標本室（本棟 2F）から構成される。超高圧電子顕微鏡室では，医学生物学用超高圧電子顕微鏡（H-1250M 型；常用 1,000 k V）を，昭和 57 年 3 月に導入して同年 11 月よりこれを用いての共同利用実験が開始されている。平成 13 年度は共同利用実験計画が 20 年目に入った。本研究所の超高圧電顕の特徴を生かした応用研究の公募に対して全国から応募があり，平成 13 年度は最終的に 12 課題が採択され，そのうち 11 課題が実施された。これらは，厚い生物試料の立体観察と三次元解析，薄い試料の高分解能観察等である。共同利用実験の成果は，超高圧電子顕微鏡共同利用実験報告の章に詳述されている。超高圧電子顕微鏡室では，上記の共同利用実験計画を援助するとともに，これらの課題を支える各種装置の維持管理及び開発，医学生物学用超高圧電子顕微鏡に関連する各種基礎データの集積および電子顕微鏡画像処理解析法の開発に取り組んでいる。電子線トモグラフィーによる手法では，UCSD, NCMIR による方法及びコロラド大で開発された IMOD プログラムでの方法を用いて解析を進めている。本年度の超高圧電顕の利用状況の内訳は，共同利用実験等 113 日，修理調整等 67 日である（技術課脳機能計測センター形態情報解析室報告参照）。電顕フィルム等使用枚数は 5,732 枚，フィラメン点灯時間は 388.8 時間であった。装置は，平均 63 %の稼働率で利用されており，試料位置で 10^{-6}Pa 台の高い真空度のもとに，各部の劣化に伴う修理改造を伴いながらも，高い解像度を保って安定に運転されている。

組織培養標本室では，通常用および P2 用の培養細胞専用の培養機器と，各種の光学顕微鏡標本の作製および観察用機器の整備に勤めている。平成 13 年度の利用者は所内 7 部門 28 名，所外 2 名であった。

超高圧電子顕微鏡（H-1250M）による立体写真の配置に関して

有井達夫

医学生物学用としての超高圧電子顕微鏡（H-1250M）は，出来るだけ低倍（×1,000）において，厚い試料の広い視野を，高解像度に撮影できることが重要である。1996 年に実施した低倍を重視した対物レンズの改造に伴い，現在，傾斜軸は，フィルムの長辺に対して約 10 度傾斜しているとしたが，今回検討したところ 1k から 45k の低倍において Z 補正の後には約 5 度であった。このときに，超高圧電子顕微鏡（H-1250M）で撮影したフィルムの立体写真を，観察するにあたっては，図 1 のようにフィルムを配置し平行視することによって，電子顕微鏡のサイドエントリー傾斜台の試料位置に設置された試料を，平行視の条件で，直接蛍光板側から試料を観察したときに見える像となる。このとき，右目用の像は，+θ°(θ>0)で撮影したもの，左目用の像は-θ°(θ>0)で撮影したものである。図 1 のように，約 5 度傾斜させて配置すれば，最適な立体視の条件となる。また左右の写真において，中央近くの対応点を重ね合わせ全ての他の対応点の間を結ぶときの（視差を検出する）方向と垂直に傾斜軸が存在することになる。

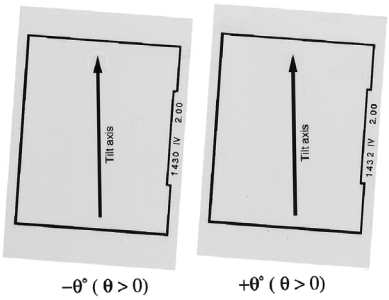

図 1　HVEM(H-1250M) による立体写真（平行視）の配置

ラット膵臓導管における AQP1 の局在

古家　園子
成瀬　達（名古屋大学・医学部・第２内科）

【目的】

血管や腎臓，消化管などにおいては各種類の水チャンネルが局在し，大量の水の移動に重要な役割を果たしている。膵臓の導管では多量の HCO_3 イオンを含む水分泌が行われており，ラット膵臓から単離した小葉間導管では AQP1 の mRNA が RT-PCR 法にて検出されているので，今回，in vivo における AQP1 の局在を光顕および電顕免疫組織化学で検討した。

【方法】

6 週齢の Wister および SD ラットを 4%paraformaldehyde /0.1% glutaraldehyde/0.2% picric acid/0.1M phosphate buffer (pH 7.2) にて潅流固定し，cryoprotect 後，凍結切片を作成した。抗 AQP1 抗体で反応後，ABC 法及びストレプトアビヂンナノゴールドを用い，DAB 反応及び銀増感法にて可視化した。

【結果】

腺房，介在部，細い小葉内導管，主膵管は AQP1 陰性であったが，大きめの小葉内導管の一部の細胞，および，小葉間導管の多くの細胞が AQP1 陽性であった。AQP1 は小葉内導管や細い小葉間導管では管腔側よりも基底側膜側に多く分布し，中程度以上の太さの小葉間導管では管腔側および基底側膜に強く局在していた。細胞膜のみならず，caveole や細胞質内の vesicle の周りも AQP1 陽性であった。AQP1 の分布は膵臓導管の太さと密接な相関があり，小葉間導管にもっとも強く局在していることが明らかになった。

生体情報処理室

【概要】

脳における情報処理には，ネットワークを構成している個々のニューロンの発火パターンが意味を持つデジタル的過程と，非線形素子としてのニューロンの興奮性変化が意味をもつアナログ的過程がある。後者には種々の細胞内シグナル伝達系の活性が密接に関与しており，それらの量的な違いやバランスの変化は，ニューロン回路で行われているデジタル的処理にも大きな影響を及ぼしている。それゆえ特定のニューロン・ネットワークへの入力は同様であっても，ある条件のもとでは学習・記憶の生成・保持が起こり，別の場合には成熟・老化が促進されるなど，多彩な結果が生じていると予想される。当室では，外界からの刺激または侵襲に対する，受容体の変化－細胞内の分子の動き－生化学的変化－興奮性の変化－神経機能の変化－脳機能あるいは脳機能障害の発現，という一連の過程をニューロン・ネットワーク上で総合的に捉え，脳における情報処理の基本的な仕組みを理解することを目指している。現在は，中枢ニューロンの興奮性調節メカニズムに関して，以下の 3 テーマを中心に研究を行っている。

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

樹状突起活動電位の伝播調節メカニズムの解析

坪川　宏

樹状突起は，種々のシナプス入力を統合してニューロンの出力を決定するための AD コンバーターとして，情報処理上の重要な役割を担っている。シナプス統合のメカニズムは脳内のニューロンにより異なるが，大脳皮質や海馬の錐体細胞では，細胞体側より逆行性に伝播してくる樹状突起活動電位の寄与が大きいことが近年明らかになってきている。樹状突起における活動電位の特性は，樹状突起に存在する種々の電位依存性イオンチャネルやトランスポーターの活性により精密に調節され，さらにこれらの機能分子は細胞内のシグナル伝達系により直接・間接にコントロールされていると考えられる。この調節機構の詳細を明らかにするため，イオン・イメージングをはじめとした光学的手法と，パッチクランプ法等の電気生理学的手法を併用し，海馬スライス標本上の錐体細胞を用いて，樹状突起活動電位の解析を行っている。これまで，この活動電位の伝播とそれに伴う樹状突起内 Ca^{2+}の増加が G タンパクや CaMKII を介する細胞内シグナル伝達系の活性化により促進されることを報告してきた。今年は，同様の海馬 CA1 領域において，活動電位の伝播を抑制する方向に働くシグナル伝達系の探索を行った。その結果，ソマトスタチン受容体を介する系が有力な候補の一つである証拠を得た。

細胞内シグナル伝達系の活性とニューロン活動との時間的・空間的関係の解析

坪川　宏，　高木　佐知子

細胞内シグナル伝達系の活性変化は，シナプス伝達の長期増強や長期抑圧といった可塑的変化に重要な役割を果たし，また一方では細胞死を導く要因にもなりうることが知られている。ニューロン機能におけるシグナル伝達の役割をより明確にして行くために，タンパク質リン酸化酵素をはじめとした酵素群の動態と種々のニューロン活動との時間的・空間的関係を詳細に解析することは必要不可欠と考えられる。本研究は，中枢ニューロンの一つのモデルとして海馬スライス標本上の錐体細胞を用い，3 量体 G タンパク質 G_q 及び G_{11} のカスケードにつながるタンパク質リン酸化酵素，PKC の活性変化を可視化し，ニューロン活動やそれに伴う細胞内 Ca^{2+}濃度変化と PKC の活性変化との時間・空間的関係を明らかにすることを目指している。今年は，ニューロン活動に伴う PKC の細胞内移動を PKC 結合性蛍光色素により検出し，その時間経過や移動パターンを定量的に解析した。

中枢ニューロンの容積調節と興奮性調節の機能的カップリングの解析

高木　佐知子，　坪川　宏

脳細胞では，てんかん発作，虚血侵襲の急性期などに swelling, bleb などと呼ばれる細胞膨張が見られる。また，海馬 CA1 野における遅発性細胞死やアポートシスの過程では持続的な容積減少（shrink）が観察される。しかしながら，これらの容積変化が神経障害の過程でどのような意味を持つのか不明である。本研究では，種々のニューロン活動の変化と容積変化との関係を解析し，興奮性調節と容積調節の両メカニズムに関与する分子の機能連関を明らかにすると共に，それらの破綻と病態との関連を明らかにすることを目指している。海馬など細胞が高密度に存在する脳内部位では，細胞が容積変化を起こすと，一定体積あたりの細胞と細胞間隙の占有パターンが変わ

り，それに応じて近赤外光の透過率が変化することが知られている。この性質を利用して，海馬スライス標本のニューロンから電気生理学的記録を行うと共に，内因性光学シグナルのイメージングを行ない，様々なストレス負荷で起こる興奮性変化と容積異常の時間的・空間的特性を解析している。今年は，シナプス活動によって海馬CA1 野ニューロンに一過性の容積増加が生じること，この容積増加には GABA 性の抑制性入力が寄与していることを報告した（Takagi S, Obata K, Tsubokawa H, *Soc. Neurosci Abs* **27**: 714, Takagi S, Obata K, Tsubokawa H, *Jpn J Physiol* **51**: S192）。

機能情報解析室

【概要】

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

意欲に関係する脳活動の研究

達本　徹

「意欲」の神経機序は不明な点が多い。報酬を得るために運動課題を遂行するサルの意欲は，客観的には測定不可能であるが, 様々な要因で変動することが推察される。例えば課題を継続して行うと，報酬を獲得していくのに伴って, 課題遂行への意欲は減退していくと考えられる。また，報酬がより望ましいものに変更されれば，意欲は増加するであろう。認知運動課題遂行中のサルの前頭前野・海馬・前帯状野の脳血流量が，想定される意欲の変化と一致した変動を示すことが陽電子断層撮影法（PET）を用いた実験で明らかになった。大脳辺縁系と前頭前野の「意欲」への関与を示唆する知見と考えられる。この脳活動の詳細を調べるため，大脳皮質フィールド電位記録法と PET による解析を進めている。

統合バイオサイエンスセンター

時系列生命現象研究領域

【概要】

イオンチャネルは複数の遺伝子でコードされるタンパク分子複合体であり，その機能は複数の分子間での連携に依存する。複数種のチャネル群の発現や機能が，時間的に空間的に，細胞内で統合される仕組みを解明することは，神経機能の成熟機構，神経情報処理機構，電気的興奮性の病態の解明，などに急務な課題である。主として電位依存性チャネル分子に着目し，発生，分化，神経回路形成における発現制御機構を明らかにするとともに，発生過程における電気的活動の役割を明らかにする研究を行なっている。

発生過程での神経細胞膜特性の発達の分子機構

岩崎　広英
岡村　康司

中枢神経系ニューロンは，その神経回路内での役割に合った興奮性を示す。細胞種の発火特性を規定する因子として Na チャネル電流の性質を，発現系細胞（アフリカツメガエル卵母細胞，哺乳類 cell line）およびスライスパッチ法による解析により，個性的な発火を形成するイオンチャネルの制御機構を明らかにしようとしている。

発生過程での神経細胞電気的活動モニターのための分子ツールの開発

村田　喜理
岡村　康司

原核生物，真核生物を問わず，近年ゲノム解析などにより膨大な，機能分子の核酸情報が蓄積されつつある。それらの機能分子多様性を活用し，発生過程電気活動をモニター可能にするための分子ツールを in vitro 実験系を用いて開発するための研究を行なっている。

生命環境研究領域

【概要】

イオンチャネルは，細胞内環境を外環境から隔てている形質膜に存在し，イオン流入・流出等を仲介することによって，外環境からの刺激に対する細胞応答を制御している。多様な環境変化に対応すべく，イオンチャネル／トランスポーター群は，活性化開口されるトリガー（或いはアゴニスト）への応答性および輸送物質選択性において，進化的に莫大な多様性を獲得している。本研究室においては，環境への生物応答の本質に迫るべく，様々な物理刺激や生理活性物質をトリガーとするイオンチャネルが，どのように遺伝情報としてコードされているかを探究している。さらに，イオンチャネル／トランスポーターがどのような機構で作動し，実際にどのような生理，細胞機能を担っているかの解明を行っている。

細胞内酸化還元状態の変化により活性化される Ca^{2+}透過性カチオンチャネル TRP の機能解析

原雄二，西田基宏，吉田卓史，森泰生

細胞内の酸化還元状態は定常状態を保っているが，恒常性が破綻すると生理機能の障害を引き起こす。この破綻機序の一つに，細胞内のイオン動態の急激な変化が挙げられるが，直接的な高親和性標的であるイオンチャネルの分子的実体は大きな謎であった。我々は細胞内酸化還元状態により活性化される Ca^{2+}透過型カチオンチャネル TRPM2 を発見した。TRPM2 にはヌクレオチド結合しうる Nudix モチーフが存在する。我々は Nudix モチーフにβ-NAD^+が結合することにより，TRPM2 チャネル活性を引き起こすこと，過酸化水素による活性化にはβ-NAD^+が重要な役割を果たしていることをそれぞれ見い出した。さらに TRPM2 の機能の一つとして，細胞死を誘導することを明らかにした。膵臓β細胞株 RIN5F，単球細胞株 U937 において，TRPM2 特異的アンチセンスオリゴ適用により過酸化水素，TNFα処理による細胞死が有意に抑制された。以上の知見から TRPM2 は生体内において酸化還元状態を感知し，細胞内 Ca^{2+}濃度上昇により細胞死をもたらす経路の中心分子の一つであるものと考えられる。

受容体活性化 Ca^{2+}チャネルの分子的実態として考えられている TRP チャネルのひとつ TRPC5 が活性酸素種である H_2O_2や活性窒素種である NO により活性化することを明らかとした。

この活性化メカニズムを解明するためにシステインの特異的な酸化剤である 5-Nitro-2-PDS を用いたところ TRPC5 の大きな活性化が見られた。また膜透過型のシステイン酸化剤 MTSEA でも TRPC5 は活性化されたが膜非透過型のシステイン酸化剤 MTEST では活性化が見られなかった。このことから TRPC5 の活性化には細胞内に存在するシステインが酸化されることが必要であることが明らかとなった。現在は酸化修飾を受けるシステイン残基の特定を行っている。

カルシウムチャネル変異マウスの解析

五日市　友子，西田　基宏，森　泰生

近年の遺伝子学的，分子生物学的研究から，P/Q 型電位依存性カルシウムチャネルの変異はヒトならびにマウスにおいて小脳失調をはじめとした様々な神経疾患を引き起こすことが示唆されている。その変異マウスのひとつである rocker (rkr)は P/Q 型チャネルα1A サブユニットのポア形成領域付近に点変異（T1310K）があり，運動失調や小脳プルキンエ細胞樹状突起の形態異常が認められる。rkr の小脳プルキンエ細胞を急性単離し，パッチクランプ法によりカルシウムチャネル電流の特性を解析した結果，rkr では正常マウスに比べ，電流密度が低下していること，不活性化の電位依存性が変化していることが明らかとなった。電流密度の低下は組み換え発現系によっても再現されたことから，カルシウムチャネルα1A サブユニット遺伝子の変異が直接的に rkr の表現型に関与している可能性が示唆される。

N 型チャネルα1B は，P/Q 型チャネルとともに神経終末における神経伝達物質の放出やカルシウムスパイク形成に関わる主要なチャネルである。N 型チャネルが持つ生理的役割および病態との関連を解明する目的で，N 型チャネル欠損マウスを作成したところ，中枢神経系の際立った異常は認められなかったものの，血圧・心拍数の恒常的増大および圧反射機能の欠損が認められた。心房筋標本を用いて解析を行った結果，N 型チャネル欠損マウスでは交感神経からのアドレナリン放出能が異常を来たしていることが明らかとなった。胸部大動脈血管マグヌス標本を用いた解析で，α1 アドレナリン受容体刺激による平滑筋収縮応答の感受性が N 型欠損によって増大していることを明らかにした。

免疫 B 細胞における Ca^{2+} シグナル増幅機構

西田基宏，原雄二，森泰生

ホスホリパーゼ C (PLC) は受容体を介した Ca^{2+} 動員やシグナル伝達の中枢的役割を担っている。PLC の活性化は，イノシトール 3 リン酸（IP_3）を産生し，ストアーからの Ca^{2+} 放出や細胞外からの Ca^{2+} 流入を引き起こす。非興奮性細胞において，受容体刺激は 2 相性の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を引き起こす。最初の Ca^{2+} 応答はストアー依存的であるが，持続的な Ca^{2+} 応答の分子メカニズムは未だに良くわかっていない。PLCγ2 を欠損させた免疫 B 細胞株 DT40 と IP_3 センサータンパクを用いて，受容体刺激やストアー枯渇刺激による細胞外からの Ca^{2+} 流入と PLCγ2 活性との関係を調べた。その結果，Ca^{2+} 流入が PLCγ2 の C2 ドメインを介して PLCγ2 を膜近傍マイクロドメインに移行させ，持続的な Ca^{2+} 振動（オシレーション）を引き起こすことを明らかにした。また，PLCγ2 は恒常的に TRPC3 カルシウム透過型チャネルと結合することで，受容体刺激による Ca^{2+} 応答を増大させていることを明らかにした。Ca^{2+} 流入による PLCγ2 活性化は，IP_3 産生を介して Ca^{2+} シグナルを増幅させる一方で，ジアシルグリセロール（DG）を産生し MAP kinase (ERK) を活性化させた。ERK は従来から細胞増殖・分化を誘導するシグナルとして位置付けられていることから，Ca^{2+} 流入によって引き起こされるシグナル増幅機構が細胞周期の進行に関与するのではないかと考えている。また，DT40 細胞における容量性 Ca^{2+} 流入を担う分子実体についても検討し，TRPC1 がその候補の一つとなることを明らかにした。

遺伝学的アプローチを用いたカルシウムチャネルの生理学的役割の解明

山田和徳，森泰生

PKD は常染色体優勢遺伝嚢胞腎(autosomal dominant polycystic kidney disease; ADPKD)の原因遺伝子の一つとして単離された PKD2，PKD2-like (PKDL)，PKD2L2 からなる TRP 類縁体である。 ADPKD は高羅患率（約 0.1 %）を示す疾患であり，腎の皮質，髄質に多数の嚢胞が形成される。我々は，PKDL のチャネルの発現分布，チャネルの特性について検討し，そのおよび活性化機構を明らかにした。現在，チャネルの持つ生理学的役割の解明に向けて，上皮細胞などの異常増殖・死による嚢胞形成機構についても検討している。

戦略的方法論研究領域

【概要】

「構造と機能」という分子生物学のパラダイムは生物の機能が生体高分子，特に蛋白質の独自の構造によって支えられていることを明かにして来た。一方細胞より上の階層では組織，器官を見ると構造が機能と直結しているのはむしろ自明である。しかし生体高分子と組織・器官の中間に位置する細胞にはそのレベル独自の「構造と機能」が明確でない。細胞は一見オルガネラと各種小胞のランダムな集まりのように見える。しかし細胞レベルの生理現象の背後には活動維持や，形態維持のための巧妙な情報と物質の輸送機構がある。この物質，情報の拡散および非拡散輸送の結果としてオルガネラ編成と骨格系の編成が行われ，さらに情報伝達経路が確定すると考える。

本部門では細胞の「構造と機能」研究をオルガネラ形成メカニズムに焦点をあて行っている。また細胞の超微小形態を高分解能で観察する新しい電子顕微鏡の開発を行っている。

複素電子顕微鏡および位相差電子顕微鏡の開発

Radostin Danev，杉谷正三，大河原　浩，永山國昭

前年度に引き続き位相差法を確立するため，Zernike 位相板の作成を行った。通常の真空蒸着カーボン薄膜を多孔絞り（50μm）にのせ，絞り孔にはられたカーボン薄膜に 1μm の孔をフォーカスイオンビーム装置(EIB)で開ける。フォーカスイオンビーム装置を購入し，Zernike 位相板作製効率の向上を図った。この位相板を用いて各種位相差電子顕微鏡像を撮り，コントラストの増大を確認した。位相差法と通常法を組み合わせた複素電子顕微鏡についても引き続き研究を行い，従来の顕微鏡法との性能差をシミュレーションを用いて定量化した。

またもう 1 つの位相差法で，電子顕微鏡では実現されてこなかった微分干渉法も，πの位相変化を与える半円の位相板で実現できることを発見し試験を行った。

融合タンパク質による電子顕微鏡用分子ラベルの開発

高木正浩，春日井　雄，永山國昭，重本隆一

タンパク質分子を in vitro または in vivo で電子顕微鏡観察する場合，目的のタンパク質がどこに存在し，またどのように他の分子と相互作用しているかを知るために目的のタンパク質を特異的にラベルする必要がある。本研究では，多数の金属と結合を行うタンパク質を用いる。予備実験の結果一分子当り 7 つの金属イオンを取りこむ金属結合タンパク質メタロチオネインが適当であるとの結論に至り，そのクローニングを行い試料を得た。

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

村田昌之，加納ふみ，田中亜路，永山國昭

光学顕微鏡下の単一細胞内で GFP 標識オルガネラのダイナミクスを可視化し，かつその制御因子を生化学的に探索するため，「GFP 蛍光デジタルイメージング技術」と形質膜を一部透過性にした「セミインタクト細胞系」をカップルさせた顕微アッセイシステムを構築した。本システムを用い，(i) 細胞分裂期（M 期）における CHO 細胞の小胞体（ER）の形態変化・娘細胞への分配と ER 再構築過程を GFP 可視化した。また，間期・M 期細胞質を用いてセミインタクト細胞内でそれら全過程を形態変化を指標に再構成した。本年度は，特に，細胞分裂時に cdc2 キナーゼ依存的に切断された ER ネットワーク構造が，間期にネットワーク（three−way junction）構造を再構築するために必要なタンパク質因子を生化学的に同定できた。それは，NSF/SNAPs，p97/p47 複合体とその複合体の会合状態を制御する新規タンパク質 VCIP135 であった。ER ネットワークの再構築過程は連続的な 2 段階の膜融合過程よりなり，先ず NSF/SNAPs が切断された ER チューブ間を連結させるための膜融合中間構造体をつくる。続いて，p97/p47/VCIP135 による膜融合反応が ER チューブを完全に連結して ER ネットワークに特徴的な three−way junction 構造を作ることがわかった。また，光学顕微鏡及び電子顕微鏡により膜融合中間構造体を形態学的に同定することにも成功した。（ii）単一のセミインタクト細胞内で ER⇄ゴルジ体間小胞輸送過程を可視化・再構成に成功した。間期・M 期の細胞質を用い，細胞周期依存的な各輸送過程のキネティックスを定量的に解析し，M 期にはゴルジ体→ER の逆行輸送以外は全て停止する（cdc2 キナーゼ依存的）こと，その停止は，ゴルジ体へ向かう輸送小胞が形成される transitiona−ER（tER）構造が，cdc2 キナーゼ依存的に消失することを明らかにし，それを制御する分子基盤を同定した。

動物実験センター

【概要】

＜山手地区動物実験センター棟の建設＞

平成 12 年度に設置が決まった統合バイオサイエンスセンター研究棟の第 1 期工事は，いよいよ平成 14 年 3 月の竣工をめざして山手地区に建設が進められた。動物センターおよびRIセンター棟の建設は,当初第2期工事が予定されていたが,平成13年度補正予算により繰り上げて建設することとなった。動物実験センターでは全ユーザーを対象にしたアンケート調査の結果に基づいて,現在と近い将来を見据えた研究動向の変化に柔軟に対応できる建物の設計に知恵を絞った。また，建設予定地の周辺住民や岡崎市の関係者等の理解を得るための資料作りや，数次にわたる説明会に取り組んだ。建物は最終的に延べ床面積 2,650 ㎡，地上 4 階鉄筋コンクリート造りで，1 階に検疫動物，無脊椎動物，水生動物などを収容し，2 階に管理事務室と検疫室，3，4 階にラット，マウス飼育室，飼育準備室などを配置することが運営委員会で承認された。山手地区動物センター棟の特徴は，飼育動物の大半が遺伝子改変マウスとラットになると予想されるため，3−4 階をバリアー区域とし，搬入動物を SPF 動物もしくは微生物学的クリーンアップを前提としたことである。このためバリアー区域の空調設備のメンテナンスが室外から行えるように3−4階の間に中3階を設けたり，部屋の配置にも作業動線を考慮した工夫が凝らされた。建築計画が繰り上がったことに伴って，飼育動物の移転計画も具体化する必要が生じた。動物センターでは，山手地区への研究部門の移転計画に基づいた飼育中の動物のクリーンアップのスケジュールを作成して全容を移転予定のユーザーに示すと共に，利用者の協力を得て直ちに受精卵の凍結作業を開始した。作業は申請のあった移転予定のマウスのうち，種親の準備ができたものから逐次進行しつつあり,平成14年6月までには全系統の凍結を終える予定である。

山手地区動物センター棟の建設に当たって，動物を飼育するための設備の整備については，予定された配分額が不十分なためどうなることかと心配されたが，3 研究所長会議をはじめとする関係者の格別の配慮により，稼働に必要な機器の大部分を用意できる目途が立ち，安堵すると共に関係者各位のご理解とご努力にたいして深く感謝したい。

かくして，動物実験センター山手地区分室は平成 14 年 3 月 31 日をもって落成，機構に引き渡された。また，4 月からは山手地区棟の運用に備えて生理学研究所からの措置により技官 1 名の増員も得ていよいよ山手地区動物センター棟は稼働に向けてスタートする事となった。動物実験センターでは，1 日も早い山手地区分室の稼働に向けて，設備，機器の整備と共にセンター利用のためのマニュアル，指針等の策定に取り組んでいる。

＜動物実験委員会と情報開示請求＞

近年，実験動物の福祉に関連して内外に様々な動きがみられるが，平成 13 年度より「行政機関の保有する情報の公開に関する法律」が施行されたことにともなって，「情報公開請求」の形を取った動物実験に対する攻撃が一段と活発化している。全国的な自治体に対する研究用イヌ，ネコの払い下げ廃止要求運動に続いて，今年度は全国各地の国立大学に対して動物実験計画書その他の動物実験に関わる行政文書の開示請求が一斉に行われた。岡崎国立共同研究機構に対しては，他県での情報開示請求に端を発して共同研究のために持ち込んだ実験動物があたかも違法な手続きであったかのようなマスコミ報道が行われたが，機構ではこの件に関して法的にも道義的にも全く問題がないことを確認すると共に，実験動物の授受に関するマニュアルを整備してホームページ上に公開することとした。

＜研究基盤としての動物実験センターの課題＞

新たに山手地区に設置された統合バイオサイエンスセンターが実質的に始動を始めるのは平成 14 年度以降である。第 3 期工事が完了する平成 15 年度以降においては，山手地区における研究人口も一気に膨らむことになる。山手地区の動物センターにおいては，飼育動物の多くが遺伝子改変マウスやラットなどですべてSPFとして維持される予定である。これらの飼育室はすべてバリアー区域となっているので，バリアー環境を維持するための定期的な飼育動物の微生物学的モニタリングと搬入動物に対するしっかりとした微生物検査態勢を欠かすことができない。ユーザーに対する実験動物科学に基づい

た的確な指導や恒常的なサポート体制も必要である。そしてそのための要員としては，経験のある実験動物技術者と共に実験動物学を専門とする専任教官の配置が望ましい。山手地区への移転後のA地区動物センター棟ではマウスに代わってサルの飼育需要が増えると予想される。入手が困難になりつつあるニホンザルやネコの人工繁殖も現実的な課題になるであろう。A地区動物センター棟は建設後 20 余年を経過して設備の老朽化が進んでおり，水生動物室の機器の劣化も著しい。遺伝子改変動物が研究のツールとして普通に用いられたり，国内外での系統動物の授受が日常的に行われるなど，センターの利用形態や機能にも建設時には想定されなかったものが現れている。研究の最前線を支えるための様々な要求に応えるためには，動物センター棟の思い切った改造を必要としている。マウス, ラット室の SPF 化と受精卵の凍結保存，融解・移植など胚操作関係準備室や，ニホンザルの人工繁殖計画など，すぐにでも実現したいプランはたくさんあり，これらを実現するためには周到で緻密な計画を今から練っておく必要がある。基礎医学・生物学の研究は今後ますます精細化し, 多様化して行くことであろうが，これまでと同等もしくはそれ以上のサービスを保証するためには，単なる飼育作業員の増員や運営費の増額にとどまらず，動物実験センターの組織体制についても見直しが必要な時である。国の定員事情と財政状況に照らして困難であるとはいえ，動物実験の円滑な実施のために充実した動物実験センターの存在はかかせない。以上，統合バイオサイエンスセンターが始動するに当たって，動物実験センターの現状と取り組むべき課題について私見をまとめてみたが，改革のための礎石となれば幸いである。

計算科学研究センター

【概要】

（要覧から転載）蛋白質の構造安定性の熱力学的基礎は各種溶媒に対するアミノ酸移相自由エネルギーである。それらを基にして安定性を予測できる理論及び計算手法を開発する。これを敷衍することにより膜チャンネル蛋白質の機能メカニズムや受容体生理機能の調節を理解する。現在，チャネルにおける水，イオン透過をチャネル分子構造をもとに熱力学的理論及び分子動力学シミュレーションで研究している。また蛋白質の構造形成原理や各種溶媒環境における誘電応答などの物性を明らかにしている。

イオンチャネル様タンパク質におけるイオン透過過程の理論的研究

高橋卓也，永山國昭

生体機能において，イオンとタンパク質の相互作用は非常に重要であり，特にイオン透過性タンパク質は脳内情報伝達や金属蓄積において本質的に重要な 機能を果たす。

このイオン透過過程を理論的に解明するため，イオンチャネル様タンパク質（フェリチンおよび KIR6.2）のイオン透過に伴うエネルギー計算を行い，急速なイオン透過を可能にする物理的なメカニズムやチャネル周辺のアミノ酸残基置換の効果などを解明した。

技術課

1．概要

4 月に生体情報研究系技術係（神経情報部門）に山田元技術係員を採用，山本友美技術係員を分子生理研究系技術係（神経化学部門）に所属換を行った。6 月に分子生理研究系技術係（神経化学部門）の久米叙子技術係員の退職があった。9 月に吉友美樹技術係員の育児休業に伴い長谷川絵梨技術係員を代替技官として臨時任用した。

昨年度からの 9 技術部会（将来検討部会，バイオ技部会，可視化技術部会，科学英語表現部会，エレクトロニクス工作部会，実験安全部会，WWW 技術部会，機械工作部会，実験サル部会）は引き続き活動を行った。また第 4 回技術課セミナーは組織論，ライフサイエンス，バイオインフォマティクス，ナノテクノロジーをテーマに行った。さらに課員の研究支援力の強化のために下記の事業も引き続き行った。(1)生理学研究所主催の第 12 回生理科学実験技術トレーニングコースで『生理学実験のための電気回路・機械工作』を担当した。(2)科学研究費補助金（奨励研究Ｂ）の申請において 3 課題の採択を受けて，第 2 回課題報告型シンポジウムを開催した。(3)放送大学利用による機構職員研修においては『脳と生体制御』を受講した。(4)機器研究試作室で，『簡易型電気泳動装置作製』をテーマに第 2 回機械工作基礎講座を行った。

自然科学系大学共同利用機関の部課長による『独法化問題検討会』も 4 回開催され，引き続き(1)技術組織，(2)給与と技術評価，(3)技術研修，(4)人事交流をテーマに議論を進めた。

第 24 回生理学技術研究会は第 13 回生物学技術研究会（基礎生物学研究所技術課）と合同で開催した。また第 3 回機構長招聘三技術課合同セミナーは『ポストゲノムテクノロジー』をテーマに開催した。

これらの技術課活動は『生理学研究所技術課報告』，『生理学技術研究会報告』『三技術課合同セミナー報告』としてまとめられている。

生理学研究所主催所長招聘セミナーは，課の教育研修として，『「物の形」を見分ける脳の仕組み』をテーマに初めて開催した。

第 24 回生理学技術研究会・第 13 回生物学技術研究会合同開催（2 月 21，22 日）

2. 施設の運営状況

① 統合生理研究施設

（1）生体磁気計測装置室

永田　治，竹島康行

【概要】

生体磁気計測装置（MEG）の利用率は表 1 に示すように，ほぼ 100%の稼働率であり今後も高い需要が見込まれる。

本装置はヒト高次機能解析用の大型非侵襲計測装置として設置後 10 年以上を経過するがセンサの感度およびシールドルームの遮蔽効率等の状態は，導入当初と比較してもほとんど劣化しておらず運用上何の問題もない。ただし，データ通信用の光ファイバなど各部に経年変化による材質の劣化する部分があり適宜交換することになるが，状況として生産中止になっている部品も多く，ストックを確保するなど早急な対策が必要である。システム全体としては，SPI（三次元デジタイザ）を故障により交換しているが，今後交換機材の調達も困難となることが予想されるため定期的なメンテナンスが必要である。

また，将来的に全頭型 MEG システムや fMRI 等のデータを共有し解析するシステムの必要性もでてきているため情報収集を進めている。ソフトウェアとして MEG ダイポール計算ツールの更新整備や fMRI 解析用ツールを導入した。さらに，今年度はフィンランド製全頭型システムの技術調査等をヘルシンキにおいておこなっている。

年　月	総日数	休　日	点検調整	所内利用	稼働率	所外利用	備　考
2001 年 04 月	30	10	2	14	100%	4	
05 月	31	10	2	13	100%	6	
06 月	30	9	2	14	100%	5	
07 月	31	10	2	15	100%	4	生理科学実験技術トレーニングコース２日
08 月	31	8	2	14	90%	5	生理科学実験技術トレーニングコース３日
09 月	30	11	2	12	100%	5	
10 月	31	9	2	18	100%	2	
11 月	30	9	2	15	100%	4	
12 月	31	12	3	14	100%	2	１年点検（サポートバネ交換等）
2002 年 01 月	31	12	2	15	100%	2	
02 月	28	9	2	15	100%	2	
03 月	31	11	2	16	100%	2	

＊稼働率＝利用日数／（総日数－（休日＋点検調整日））×100

生体磁気計測装置稼働率表（平成 13 年度）

② 脳機能計測センター

(1) 形態情報解析室

山口　登

【超高圧電子顕微鏡利用状況】

今年度における超高圧電子顕微鏡共同利用実験は，合計 12 課題が採択され，実施された。これらの共同実験の成果は，超高圧電子顕微鏡共同利用実験報告の章に詳述されている。超高圧電子顕微鏡の年間の利用状況を表にまとめたので下記に示す。稼動率は，利用日数と使用可能日数より求めている。本年度の主な超高圧電子顕微鏡の改良・修理としては，フィラメントの交換，真空排気系制御基板の修理が行われた。

2001 年度　超高圧電顕月別稼動率

年　月	総日数	休 日	調整日	使用可能日　数	所内利用	所外利用	計	稼働率	備　考
2001 年 4 月	30	10	4	16	4	2	6	38%	
5 月	31	10	8	13	6	0	6	46%	修理　４日
6 月	30	9	6	15	5	12	17	113%	修理　２日
7 月	31	10	5	16	6	4	10	63%	
8 月	31	8	4	19	6	1	7	37%	
9 月	30	11	3	16	7	0	7	44%	
10 月	31	9	4	18	3	4	7	39%	
11 月	30	9	15	6	7	1	8	133%	修理１３日
12 月	31	12	7	12	1	10	11	92%	修理　３日
2002 年 1 月	31	12	3	16	4	7	11	69%	
2 月	28	9	4	15	5	8	13	87%	
3 月	31	11	4	16	2	8	10	63%	
計	365	120	67	178	56	57	113	63%	

フィラメント点灯時間　388.8 時間
使用フィルム枚数　5,732 枚

(2) 機能情報解析室

佐藤茂基

【設備機器整備状況】

リアルタイム（Biospec47/40）装置

(1) マグネットヘリウムボイルオフの増加－調査対処
(2) シム電源故障－修理交換
(3) コンソール用 PC，CD ディスク故障－交換
(4) 定期点検

【機能解析室状況】

本年は昨年同様リアルタイム MRI 装置の保守点検を主な業務として行ってきた。

毎月，リアルタイム MRI 装置マグネットに液化ヘリウム充填作業を行っている。1 月の液化ヘリウム充填作業

後に液化ヘリウムのボイルオフ現象が見られた。液化ヘリウムの消費量は通常時の数十倍に達し，すぐに修理依頼を行い対処した。

推測される原因として，充填時に異物がトランスファーラインに混入した為と思われる。再発防止処置として充填作業の見直しを行い，その後同様の事態は起きていない。装置の故障等による長期間の運用停止は無かった。

平成 13 年度の MRI 装置利用実績を別表に記す。

【機器利用率】

平成 13 年度リアルタイム装置月別利用率

年月	総日数	保守	使用可能	所内利用	所外利用	計	利用率	備考
2001 年　4 月	30	3	27	0	7	7	26%	定期点検
5 月	31	1	30	0	7	7	23%	
6 月	30	3	27	0	6	6	22%	
7 月	31	1	30	0	11	11	37%	
8 月	31	1	30	0	0	0	0%	
9 月	30	4	26	0	5	5	19%	停電
10 月	31	3	28	0	4	4	14%	停電
11 月	30	1	29	0	6	6	21%	
12 月	31	1	30	0	6	6	20%	
2002 年　1 月	31	6	25	0	5	5	20%	定期点検
2 月	28	1	27	0	5	5	19%	
3 月	31	1	30	0	5	5	17%	
計	365	26	339	0	67	67	20%	

***保守以外の祝祭日は，使用可能日に含めた。**

（3）生体情報処理室

吉村伸明，村田安永

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

生体情報解析システムは，平成 11 年 2 月に導入を行い約 3 年が経過した。利用登録者は 65 名で，各部門施設より研究推進のための積極的な利用がある。高画質フルカラープリンタは 1,015 枚の利用があった。

生理学研究所のネットワーク利用状況は，メール登録者が 354 名。WWW 登録者が 34 名。LAN の端末数が 840 台。所外からのメール受信数は 10,473／週。所外へのメール発信数は 5,281／週。WWW は一年間に 96,887 の端末からアクセスがあり，総アクセス数は 266 万回。所内向けのダイヤルアップサービスは 175 回／週，33 時間／週の利用があった。

③ 動物実験センター

佐治俊幸，小木曽昇，廣江　猛，鈴木千香

【概要】

E 地区動物実験センター分室の建設が完了し，平成 13 年度 3 月末に竣工した。分室へ移動させるマウスのクリーンアップ作業のための受精卵凍結が予定通り進行しており，8 月の稼働開始を目指して飼育機材の整備を

進めている。

センターの拡充に伴う運営経費及び作業員の確保が今後の問題点となると予想される。

【A 地区 陸生動物室】

平成 13 年度の飼育室利用部門数は，33 研究部門（生理研 18 部門, 基生研 11 部門, 統合バイオサイエンスセンター4 部門）であった。

動物飼育数の増加傾向が頭打ちの傾向を示している。これは，センター利用の減少を示すものではなく，飼育スペースの制約により，これ以上の飼育数の増加が見込めないためである。E 地区への展開により，飼育スペースの拡充が図られるため，次年度以降は，飼育数増が予想される。また，手術室の利用希望が多く，ユーザーへの調整を依頼している。

【A 地区 水生動物室】

平成 13 年度の水生動物室利用状況は，生理研・基生研両研究所あわせて 6 部門･施設, 42 件の利用があった。

加熱冷却ユニットの動作不良が 7 件あり，順次修理を行った。部門が独自に設置する小型水槽用の電源確保のために，コンセントの増設工事を行った。

【E 地区 動物実験センター分室】

E 地区動物実験センター分室の建設が進み予定通り年度末に竣工した。平成 14 年度 8 月の稼働開始を目指し，当面の利用部門飼育計画に対応する機材の確保は行えた。

今後の計画としては，6 月に飼育室のクリーンアップを実施し，7 月までに移動予定部門のマウス受精卵凍結を完了させ，8 月から SPF エリアでの凍結受精卵の融解・移植を開始する予定である。

陸生動物　部門別･動物種別搬入数(平成13年度)

部門＼動物種	マウス	ラット	ハムスター	スナネズミ	ウサギ	モルモット	ネコ	サル	フェレット	ニワトリ	合計
神経化学	1,397	51									1,448
超微小形態生理	3	223			4						230
細胞内代謝	121		4								125
生体膜	211	46				8					265
機能協関	723	582			26	12					1,343
神経情報	1,348										1,348
液性情報	60										60
高次神経機構	2,703	122									2,825
高次神経性調節	0	10					2	8			20
生体システム	0						12	2			14
高次液性調節	0							2			2
高次脳機能	175	125						13			313
動物実験センター	500	235									735
脳形態解析	397	124			6	40					567
大脳神経回路論	25	51									76
形態情報解析室	13	11									24
機能情報解析室	0							3			3
生体情報処理室	30	12		4							46
細胞機構	77				12						89
細胞情報	0				2						2
細胞内エネルギー変換	43										43
細胞分化	1,611										1,611
感覚情報	940	11			8						959
形態形成	1										1
行動制御	154	671									825
種分化第一	169	54						6	4		233
大型スペクトログラフ室	0									100	100
細胞器官培養	167										167
形質転換生物	195										195
統合バイオ・小林	0				32						32
統合バイオ・井口	1,545										1,545
統合バイオ・森	204	6			2						212
統合バイオ・永山	75										75
合計	12,887	2,334	4	4	92	60	14	34	4	100	15,533

水生動物　月別･動物種別搬入数(平成13年度)

動物種＼月	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	合計
メダカ		1,000											1,000
ウニ					47			2,000					2,047
ヒトデ		238	450			470							1,158
キンギョ		510	350										860
アユ		500				530							1,030
タイ				150									150
海水 (t)					12	8	8					12	40
合計	0	2,248	800	150	47	1,000	0	2,000	0	0	0	0	6,245

④ 共通施設

（1）電子顕微鏡室

前橋　寛

（A）電子顕微鏡室の状況

今年度は，電子顕微鏡の予約方法が変更となった。近年，利用者数が増加し，電子顕微鏡の予約方法が問題となってきた。運営委員会で議論され，電子顕微鏡の予約方法が平成 14 年 1 月より(平成 13 年 12 月は移行期間として併用)，予約板（1 ヵ月毎のホワイトボードにA9:00～13:00，B 13:00～17:00，C 17 : 00 以降，へ記名）から，Web 予約（1 週間前から，1 時間単位）となった。

さらに，10 月に理化学研究所から 125 k Ｖ透過型電子顕微鏡（日立 H-7000）が移転され（Ｂ－12 号室），透過型が計 6 台となり，増設された。

講習会としては，第 4 回電子顕微鏡講習会（1998 年度開始）が，1 日コース：「透過型電子顕微鏡の取扱い」(2002.1.29 実施，2 名参加)，3 日コース：「急速凍結と凍結置換法および超薄切片法，電子顕微鏡観察」(2002.1.30～2.1 実施，13 名参加）と行われ，その第 1 日目は日本電子 JEM-1010，JEM-1200EX を用いて講義，実習を行った。第 2 日目では，午前に超薄切片作製法概要と樹脂包埋法の実際について，ビデオを用いて行い，午後から超ミクロトーム使用説明および超薄切片作製実習(試料ラット小脳）および，交代で液体ヘリウム急速凍結装置 HIF-4K（デモ機）の試料作製見学を行った。第 3 日目は，急速凍結と凍結置換法(ライカ社製　CPC，AFS 使用)で伊藤 喜子講師 (日製産業(株)科学機器センター)を昨年度に引き続いて招き，講義，実習が行われた。

（B）研究内容一覧表

本年度, 室を利用してなされた研究の総件数は 58 件であった。機構内では 43 件あり，機構外は，国内で 9 件，国外ではブルガリア，ハンガリー，チリ，中国の研究者による利用が 6 件あった。下記の表はその研究部門・施設，大学，研究所と研究内容の一覧表である。

利用内容一覧表

二研究所

研究所	部門・施設	研究内容
生理研	機能協関	・浸透圧調節に伴う培養細胞容積変化の微細構造的解析 ・分泌刺激に応じた上皮細胞膜の形態変化の観察 ・発生過程における標的細胞依存の運動神経細胞の形態学研究
	超微小形態生理	・単粒子解析法による蛋白質分子の観察 ・複素電子顕微鏡の位相板の観察 ・灌流唾液腺における傍細胞輸送調節機構
	神経情報	・中枢神経系におけるアストロサイトの発生・分化 ・システインプロティアーゼの阻害とアストロサイトの分化誘導についての研究 ・新規クローニング蛋白の細胞内局在の同定
	大脳神経回路論	・大脳皮質の神経回路の研究
	脳形態解析	・神経可塑性に伴うシナプス内タンパク質の局在変化 ・SDS-FRL 法を用いたシナプスタンパク複合体の解析 ・膜上機能分子の動態変化と生理的機構の解析 ・神経伝達調節機構の解明 ・ラット小脳プリキンエ細胞－登上線維シナプスの PSD の大きさ測定
	統合ﾊﾞｲｵｾﾝﾀｰ戦略的方法論	・DNA 観察法の検討
	統合ﾊﾞｲｵｾﾝﾀｰ生命環境研究領域	・HEK 細胞におけるタンパク質共発現観察実験 ・カルシウム透過型カチオンチャネル LTRPC2 の機能解析 ・電位依存性 Ca チャネルの細胞内における局在
	形態情報解析室	・すい臓導管における AQP の局在に関する免疫電顕 ・超高圧電顕におけるゴルジ染色法と免疫染色法の比較
	技術課	・コメツキムシの走査像微細構造観察 ・脊髄前角ニューロン細胞体の３次元解析

基生研	形態形成	・カエル胚を用いた遺伝子発現解析 ・C.elegans を用いた遺伝子発現解析
	生殖	・キンギョ卵母細胞核マトリクス内に存在するアクチン繊維の構造解析 ・ヒトデをモデルにした卵成熟機構の研究
	細胞機構	・形質転換植物における導入遺伝子産物の局在調査 ・GFP で可視化されたペルオキシソーム観察 ・hsp90 ノックアウト株の形態学的解析
	種分化機構第二	・ヒメツリガネゴケの仮根形成の解析 ・地衣類の無性生殖器，有性生殖器の観察 ・植物細胞（コケ，シダ，タバコ）細胞骨格の構造観察 ・細胞不等分裂に関わる因子の細胞生物学的解析 ・ヒメツリガネゴケにおける細胞骨格系動態解析
	細胞増殖	・ショウジョウバエ脳における神経細胞の微細形態の観察
	行動制御	・移動中の神経細胞の観察
	感覚情報処理	・ニワトリ網膜の観察 ・脳内塩分受容器官の構造解明
	遺伝子発現統御第一	・イネに斑入り模様を引き起こす突然変異体の解析
	細胞内エネルギー変換機構	・ホ乳動物細胞におけるオートファジーの解析
	統合ﾊﾞｲｵｻｲｴﾝｽｾﾝﾀｰ時系列生命現象領域	・ショウジョウバエ生殖細胞質の観察
	統合ﾊﾞｲｵｻｲｴﾝｽｾﾝﾀｰ生命環境領域 I	・ニホンアマガエル皮膚の水分調節機構の解明

所外（国内）

大学・研究所	研究代表者名	研究内容
北海道大学	深谷　昌弘	マウス小脳顆粒細胞のフリーズフラクチャー解析
帝京短期大学	三田　雅敏	ヒトデをモデルにした卵成熟機構の研究
琉球大学	中村　將	魚の性転換時の組織，細胞の観察
東京大学	岸　光子	ﾀﾊﾞｺﾓｻﾞｲｸｳｲﾙｽの移行タンパク質を利用した原形質連絡タンパク質の解析
名古屋大学	水谷　昭文	植物のカリウムイオン輸送体の膜構造決定
名城大学	新居　直祐	果樹葉と果実の表面構造の観察
鶴見大学	尾口仁志	各種生体材料に対するヒト歯間上皮細胞の接着様式についての検討
東京歯科大学	橋本貞光	灌流唾液腺における傍細胞輸送調節機構
京都府立大学	瀬尾芳輝	神経細胞変性の形態学的検討

所外（国外）

国名，大学，研究所	研究者名	研究内容
ブルガリア ソフィア大学	ANELIA,Zdravkova	タンパク質観察法の検討
ハンガリー デブレツェン医科大学	KULIK, Akos	膜上機能分子の局在解析
チリ チリ大学	BARROS,Luis Felipe	培養細胞の走査像観察
中国 香港中文大学	CHAN,SavioC.Y.	海馬興奮性シナプスの動態と微細形態
中国 大連医科大学	Wu,Yue	海馬興奮性シナプスの動態と微細形態
ハンガリー ﾊﾞｲｵﾛｼﾞｶﾙﾘｻｰﾁｾﾝﾀｰ	Mustardy,L.	免疫電顕法を用いた脂質生合成系の局在の研究

（2）機器研究試作室

加藤勝己

【概要】

機器研究試作室は多種多様な医学・生物学用実験機器の開発と改良，それに関わる技術指導，技術相談を室の役割としている。今，我々の周りには便利な物品があふれ，自分で工夫して作ったり，改良する機会が少なくなり，新しい研究には新しい研究機器を作るという『ものづくり』が希薄になり，一方で，最近の研究の多様化は室に新たな役割の模索を迫っている。そうした認識のもと，『ものづくり』能力の重要性の理解と機械工作ニーズの新たな発掘と展開を目指すために，室では，2000 年度から，医学・生物学の実験研究に使用される実験装置や器具を題材にして，機械工作の基礎的知識を実習主体で行う機械工作基礎講座を開講し，2002 年度は，アクリル樹脂製パッチクランプ用チェンバーの製作を題材に行った。参加希望者は，生理研 5 名，基生研 1 名と少なかったが，ガイダンスの後マンツーマンで 4 回の講習を行い，一人のけが人も無く無事に講習を終了した。

また，毎年，生理学研究所で，夏期に生理学分野に関心を持つ大学・大学院生，若手研究者を対象とした実習形式のトレーニングコースを開催しているが，平成 14 年度からは，その一コースを担当し，「生理学実験のための電気回路・機械工作」というテーマで実施した。

なお，機器研究試作室の平成 13 年度の利用状況は，以下の通りである。

機器研究試作室利用機器表　（件数）

月	ﾎﾞｰﾙ盤	ﾌﾗｲｽ盤	ｺﾝﾀｰﾏｼﾝ	横切盤	旋盤	ｸﾞﾗｲﾝﾀﾞｰ	切断機	ＮＣﾌﾗｲｽ盤	その他	計
4	22	19	12	15	9	2	2	4	22	107
5	28	22	21	21	11	3	4	1	31	142
6	15	12	11	4	7	3	6	2	20	80
7	9	12	9	11	6	5	2	1	15	70
8	7	14	7	6	5	2	4	0	20	65
9	17	20	8	5	6	4	2	3	15	80
10	11	13	13	16	4	7	8	0	14	86
11	25	22	17	8	9	5	3	0	29	118
12	16	14	14	6	3	3	2	1	18	77
1	16	16	11	7	7	7	0	0	27	91
2	10	9	9	3	10	2	0	0	19	62
3	11	8	8	8	9	3	2	5	15	69
合計	187	181	140	110	86	46	35	17	245	1047

機器研究試作室利用人数表

月	生理研	基生研	その他	合計	延べ時間
4	48	4	0	52	105
5	75	3	0	78	104
6	34	6	2	42	32
7	36	2	0	38	64
8	32	4	0	36	94
9	32	7	0	39	120
10	37	5	0	42	71
11	48	9	0	57	125
12	31	5	0	36	66
1	47	7	0	54	58
2	33	3	0	36	87
3	36	5	0	41	97
合計	489	60	2	551	1029

機器研究試作室部門別利用状況

高次神経性調節	114 名	統合生理研究施設	48 名	機能情報解析室	46 名
生体膜	45 名	超微小形態生理	37 名	脳形態解析	32 名
統合バイオ	24 名	神経情報	22 名	心理生理学	18 名
生体システム	18 名	大脳神経回路論	17 名	神経化学	16 名
液性情報	10 名	動物実験施設	10 名	形態情報解析室	9 名
電子顕微鏡室	8 名	機能協関	6 名	技術課	4 名
生体情報処理室	2 名	細胞内代謝	1 名	高次脳機能研究	1 名
高次液性調節	1 名				
感覚情報処理	21 名	細胞増殖	10 名	ＲＩ実験施設	7 名
情報制御	5 名	種分化機構第一	5 名	生殖	3 名
形態形成	2 名	大型スペクトロ	2 名	エネルギー変換	1 名
人工気象室	1 名	計時機構	1名	技術課	1 名
細胞機構	1 名				
分子研その他	2名				