

【 研 究 会 報 告 】

研究会報告

〔 目 次 〕

1. Na^+ チャネルと細胞機能 (代表者：緒方宣邦 2001年5月24日～5月25日).....	167
2. シナプス伝達の局所制御と可塑性の分子機構 (代表者：狩野方信 2001年6月13日～6月14日).....	175
3. 抑制性ニューロンの役割 (代表者：小西 史朗 2001年6月14日～15日).....	184
4. 視知覚のメカニズムー 生理, 心理物理, 計算論的アプローチ (代表者：内川恵二 2001年6月14日～6月15日).....	192
5. イオンチャネル・トランスポーター異常による神経疾患の成因と病態に関する研究 (代表者：倉智 嘉久 2001年7月2日～7月3日).....	200
6. 細胞死の分子機構と病態生理 (代表者：一條秀憲 2001年8月7日～8月8日).....	211
7. ATP受容体の生理機能と疼痛のメカニズム (代表者：井上和秀 2001年8月22日～8月23日).....	220
8. 「グリア細胞と脳機能発現」 (代表者：井上芳郎 2001年10月12日).....	235
9. マルチニューロン活動と脳内情報処理 (代表者：櫻井芳雄 2001年10月25日～10月26日).....	242
10. シナプス伝達の細胞分子調節機構 (代表者：高橋智幸 2001年10月26日～10月27日).....	248
11. 神経科学の新しい解析法とその応用 (代表者：東田陽博 2001年11月1日～11月3日).....	261
12. イオンチャネルの構造機能連関と制御機能に学ぶ心血管系疾患の病態生理学 (代表者：小野克重 2001年11月27日～11月28日).....	270

13. 第 2 回脳磁場ニューロイメージング (代表者：栗城真也 2001 年 11 月 28 日～11 月 30 日).....	280
14. 細胞内シグナルの時・空間的制御 (代表者：黒崎知博 2001 年 11 月 29 日～11 月 30 日).....	299
15. 定量的高分解能電子顕微鏡法「三次元電子顕微鏡観察」 (代表者：永山國昭 2001 年 12 月 5 日).....	308
16. シナプス形成・維持のダイナミクスと分子機序 (代表者：尾藤晴彦 2001 年 12 月 5 日～12 月 6 日).....	313
17. 生体分子ダイナミクス及びプリオン機構 (代表者：桑田一夫 2002 年 2 月 6 日～2 月 8 日).....	317

1. Na⁺チャネルと細胞機能

2001 年 5 月 24 日 - 5 月 25 日

代表・世話人：緒方宣邦（広島大・医・生理）・吉田 繁（生理研）

- (1) Na チャネル分子のクローニングと機能解析：17 年間を振り返って
野田 昌晴（基生研・感覚情報処理／基生研・形質転換生物）
- (2) フグのナトリウムチャネル ー フグはどうして毒をもつ？ ー
長島 裕二（東京水産大・食品生産学・生物資源化学）
- (3) 電位依存性 Na⁺チャネルと生物毒 ー グラヤノトキシン結合部位の解析とその展望 ー
木下 英司，結城 常譜，山岡 薫，瀬山 一正（広島大・医・生理）
前島 洋（広島大・医・保健）
- (4) 神経 Na⁺チャネルに特異的なトキシン PMTX の作用部位
ー 光アフィニティラベルによるアプローチ ー
中山 仁，國安 明彦，清水 英介，横手 さわな（熊本大・薬・生体機能）
川合 述史（自治医科大・生理）
村田 和義，永山 國昭（生理研・超微小形態生理）
- (5) 電圧感受性ナトリウムチャネルの 3 次元構造
佐藤 主税，上野 豊（産総研）
藤吉 好則（京都大・生物物理）
- (6) 新規ナトリウムチャネルの単離および単一神経細胞における発現分布の解析
鄭 善容，尾方 克久，高橋 祐二，橋田 秀司，鈴木 高史，後藤 順，金澤 一郎
（東京大院・医・神経内科/科学技術振興事業団・SORST）
- (7) 膜電位依存性イオンチャネルの水・溶媒効果と構造
久木田 文夫（生理研・生体膜）
- (8) 小脳プルキンエ細胞の Na チャネルの性質と生後発達
岡村 康司（統合バイオサイエンスセンター・時系列生命現象／産総研・脳神経情報）
- (9) 痛みとイオンチャネル ー テトロドトキシン非感受性ナトリウムチャネル ー
緒方 宣邦，山本 詳子，丸山 泰司（広島大・医・生理）
- (10) Na_x チャネルは脳弓下器官における塩分濃度のセンサーである
檜山武史（基生研・感覚情報処理／総研大・生命科学）
渡辺英治（基生研・感覚情報処理／基生研・形質転換生物／総研大・生命科学）
吉田繁（長崎大・医・神経感覚医学／生理研・細胞内代謝）
野田昌晴（基生研・感覚情報処理／基生研・形質転換生物／総研大・生命科学）
- (11) アミロライド感受性上皮型ナトリウムチャネル（ENaC）の生理学的意義とその調節機構
丸中 良典，新里 直美（京都府立医科大・生理）
- (12) プロスタシンによる上皮性ナトリウムチャネル（ENaC）の活性化
北村 健一郎（熊本大・医・第三内科）

【参加者名】

緒方 宣邦 (広島大・医・生理), 山本 詳子 (広島大・医), 松富 智哉 (広島大・医), 丸山 泰司 (広島大・医), 大石 芳彰 (広島大・医), 木下 英司 (広島大・医・生理), 丸中 良典 (京都府立医科大・生理), 長島 裕二 (東京水産大・食品生産), 鄭 善容 (東京大院・医/科技団・SORST), 尾方 克久 (東京大院・医), 久木 田 文夫 (生理研), 佐藤 主悦 (産総研), 中山 仁 (熊

本大・薬・生体機能化学), 清水 英介 (熊本大・薬), 横手 さわな (熊本大・薬), 北村 健一郎 (熊本大・医・第三内科), 野田 昌晴 (基生研), 渡辺 英治 (基生研), 檜山 武史 (基生研), 岡村 康司 (統合バイオサイエンスセンター), 宮崎 俊一 (生理研), 吉田 繁 (生理研), 毛利 達磨 (生理研)

【概要】

最近の分子生物学の急速な進展によってさまざまなタイプの Na^+ チャネルが発見されており, その数はさらに増していくものと考えられる。 Na^+ チャネルの中でも神経細胞や筋肉細胞などの興奮性細胞にみられる「電位依存性 Na^+ チャネル」に関しては, 構造のみならず機能に関してもその詳細が明らかにされつつあるが, 上皮や肺などに存在する膜電位に依存しない Na^+ チャネルについては未解明な部分が多い。

多種多様な構造と機能をもつ Na^+ チャネルを総合的に考えなければ, 電位依存性あるいは非依存性 Na^+ チャネルを含めた全体としての Na^+ チャネルの本質が見えないと思われる。このような観点から, 平成13年5月24・25日の両日, 岡崎国立共同研究機構・生理学研究所において, 「 Na^+ チャネルと細胞機能」と題した研究会が催された。さまざまな Na^+ チャネルについて異なった立場から研究している方々に集まっていただき, 通常の学会では実現が困難な徹底した討論の場を持つことが出来た。

研究会は22名の参加者により, 12の演題報告を基に活発な討論が行われた。その内容は 1) 電位依存性ナト

リウムチャネルの構造解析および毒物学, 2) 組織特異的電位依存性ナトリウムチャネルの生理機能, 3) 「濃度感受型」ナトリウムチャネルの構造と生理機能, の三つのサブテーマにより構成された。1) ではテトロドトキシンやグラヤノトキシンなどのナトリウムチャネル特異的トキシンの作用機構, ナトリウムチャネル蛋白の立体構造, などに関する最新の知見が紹介され, 2) では小脳において連発放電を制御しているナトリウムチャネルや末梢神経において痛みの伝導に関与しているナトリウムチャネルなど, 組織特異的に生理機能を担っている各種ナトリウムチャネルについての解析結果が報告された。3) では上皮性ナトリウムチャネル (ENaC) や NaG などの最近注目を集めている「濃度感受型」ナトリウムチャネルの性質についての分子生物学的研究成果が紹介された。

本研究会の開催によって, 発表・討論・懇親会を通じての研究者同士の理解と交流が深まり, 今後, 互いの利点を提供し合う形で多くの共同研究が実現できるものと期待される。

(1) Na チャネル分子のクローニングと機能解析：17 年を振り返って

野田 昌晴（基生研・感覚情報処理／基生研・形質転換生物）

Na チャネル分子の実体を明らかにする研究が、1970 年代半ばからフグ毒やサソリ毒の結合を指標として行われ始めた。その中で最も進んでいたのは、nAChR がシビレエイの発電器官から初めて精製されたように、最も含量の高い電気ウナギの発電器官であった。我々の電気ウナギの Na チャネル cDNA のクローニングは M.A. Raftery からの共同研究の提案をきっかけに始まったが、論文の発表まで、彼はその進捗状況を知ることはなかった。この cDNA をプローブとして Rat 脳から Na チャネル I, II, III の cDNA クローンを得た。これらを用いて *Xenopus oocyte* に機能的 Na チャネルを発現することに初めて成功し、この分子が Na チャネルであることを示すことができた。次に、cDNA に変異を加えて変異蛋白の機能を見るといった、現在では当たり前となった手

法によって、構造-機能相関があらかた明らかになった。その後、筋肉、末梢神経等から続々と異なる Na チャネル遺伝子が報告され、現在では 10 個の遺伝子の存在が明らかになっている。その内、9 つまでは電位依存的開口を示すことから、Na_v1 という 1 つのファミリーに分類され、見つかった順に Na_v1.1 から Na_v1.9 と呼ぶことになった。残り 1 つは開口の様式を含めて性質が不明であることから、現在、Na_x という呼称が与えられている。我々は Na_x の生理機能を明らかにする為、約 6 年前から遺伝子ノックアウトマウスの作製を開始し、昨年、漸くその発現領域と行動解析の論文を発表することができた。Na_x は細胞外の Na⁺ イオン濃度の上昇を感知して開く Na_c と呼ぶべきチャネルであるらしい(檜山武史の項参照)。

(2) フグのナトリウムチャネル — フグはどうして毒をもつ？ —

長島 裕二（東京水産大・食品生産学・生物資源化学）

フグは強力な神経毒であるテトロドトキシン (TTX) を高濃度に蓄積している。フグが自らに対しても毒となる TTX を持つことができる理由の一つとして、TTX に対する神経 (Na チャネル) の不感受性が推測される。各種魚類の骨格筋標本を使って活動電位に及ぼす TTX の影響を調べた結果、フグは他魚種に比べ 1 オーダー以上も感受性が低いことが明らかにされている。最近、山下らによってヒガンフグ骨格筋 Na チャネルのサブタイプ (fMNa1) の全一次構造 (1880 アミノ酸残基) が決定され、既報の Na チャネルとアミノ酸配列を比較したところ、TTX との結合に関与する電荷をもつアミノ酸群 (ドメイン I の Asp と Glu, ドメイン II の 2 つの Glu, ドメ

イン III の Lys, ドメイン IV の Asp) は保存されていた。一方、変異がみられた部分において Asp382 に隣接するアミノ酸 383 が Asn であり、これまでの点変異実験の結果から fMNa1 は TTX 耐性タイプと示唆された。しかし、別のサブタイプ fMNa2 やトラフグ脳の Na チャネルではこのような変異はみられず、他の部分での変異が TTX との感受性に関与していることも推測される。

また、フグから毒性を示さない TTX 類縁化合物が検出され、さらにフグ肝臓ホモジネートの高分子画分からは TTX 関連化合物の存在が確認されているため、フグの毒蓄積に TTX の化学形態あるいは存在形態が寄与している可能性が考えられる。

(3) 電位依存性 Na^+ チャネルと生物毒 ーグラヤノトキシン結合部位の解析とその展望ー

木下 英司, 結城 常譜, 山岡 薫, 瀬山 一正 (広島大・医・生理)
前島 洋 (広島大・医・保健)

植物毒であるグラヤノトキシンは電位依存性 Na^+ チャネルに特異的に結合し、その活性化の電位依存性を過分極方向へシフトさせ、かつ不活性化を取り除く作用を持つ。このため、グラヤノトキシンと Na^+ チャネルとの関係を調べる事でチャネルのゲート機構についての情報を得る事ができる。

本研究では、この毒がラット骨格筋の Na^+ チャネルにおいて強い感受性を示すのに対し、心室筋の Na^+ チャネルにおいてはその感受性が有意に低いことを明らかにした。また、その感受性の差を利用してこれら2種のアイソフォーム間でキメラチャネルを作成することで、グラヤノトキシンの結合部位の探索を試みた。その結果、感

受性の差は Na^+ チャネルのドメイン(D)1セグメント(S)6及びD1S4とS5間を連結する細胞内ループに位置する2つのアミノ酸に起因することがわかった。それら2つの部位は骨格筋 Na^+ チャネルにおける Ile-433 と Ser-251 であり、心室筋では, Val-406 と Ala-252 に相当する。従って、これまでに私達がグラヤノトキシンの結合部位として報告している D1S6 の Ile-433 の他に、D1S4-S5 細胞内ループの Ser-251 が、新たなグラヤノトキシンの結合部位であると結論した。さらに、このループ内の Ala 走査置換による知見を含めたグラヤノトキシン結合部位とこの毒が引き起こすゲート異常のメカニズムの関連について考察する。

(4) 神経 Na^+ チャネルに特異的なトキシン PMTX の作用部位 ー光アフィニティラベルによるアプローチー

中山 仁, 國安 明彦, 清水 英介, 横手 さわな (熊本大・薬・生体機能)
川合 述史 (自治医科大・生理)
村田 和義, 永山 國昭 (生理研・超微小形態生理)

Pomipilidotoxin (PMTX) は、紺野, 川合らによってモンベッコウバチから見いだされた13個のアミノ酸から成る新規ペプチドで、神経 Na^+ チャネルに特異的に作用し、チャネル不活性化を遅延させる。類似の作用を示すサソリ毒やイソギンチャク毒と比較して、作用部位構造にどのような違いがあるのかは興味ある課題である。木下, 瀬山グループの点変異実験と並行して、我々は光アフィニティラベルによるアプローチで解析を進めている。この手法で現在までに得られた結果を紹介する。また最近、

佐藤らによって、電子顕微鏡像解析による電気ウナギ Na^+ チャネルの立体構造が報告された。我々は同様の解析法で、L型 Ca^{2+} チャネルの全サブユニット複合体(ALL)と $\alpha 1-\beta$ 複合体(A1B)の立体構造の比較を行った。その結果、A1Bは12nmの深さをもつ中空の台形状で、中心にイオンポアと推定される穴が認められるのに対し、ALLでは深さ20nmの中空シリンダーをしており、その上部の一端に球形のドメインが着いた非対称形をしていることがわかった。

(5) 電圧感受性ナトリウムチャネルの 3 次元構造

佐藤 主税, 上野 豊 (産総研)

藤吉 好則 (京都大・生物物理)

50年以上前のHodgkinとHuxley等によるイオンチャネルの存在の予言以来、これまで様々の方法が電圧感受性 Na チャネルの構造に関連する情報を得るために用いられてきた。しかし、極めて部分的な短いペプチドの構造しか得られていなかった。我々は、アマゾン河の電気うなぎの Na チャネルを可溶化し、極超低温の He ステージ電子顕微鏡と単粒子解析法を用いて解析した。チャネルは高さ 135Å の鐘に似た形であった。その内部にはいくつかの空洞が観察され、それが細胞外の 4 つの小さな穴と細胞内の 8 つの大きな穴につながっている。今回見つかった Na チャネル分子内の空間や表面の孔は極めて新規で、同時にこの分子に特徴的な構造である^{1) 2)}。そのため、この構造は電圧感受や開閉の機構に関与している可能性が高いと思われる。これとは対照的に、アセチルコリン受容体チャネルは、たった一つのロー

ト状の入り口を細胞外部に有する。また電圧感受性 Ca チャネルや K チャネルは、それぞれ細胞の分泌および膜電位を担っている。その中でも K チャネルは神経可塑性をも担っていることが海産無脊椎動物アメフラシを用いて示された。これらのチャネルは Na チャネルとアミノ酸配列上の非常に高い類似性があるため、今回判明した構造と深く関連した立体構造を持つ可能性が高い。

- 1) The voltage-sensitive Sodium Channel is a bell-shaped molecule with several cavities. Sato, C., Sato, M., Iwasaki, A., Doi, T. & Engel, A. Nature 409, 1047-1051 (2001).
- 2) The Na⁺ channel has four domains surrounding a channel. C. Sato, Y. Ueno, K. Asai, K. Takahashi, M. Sato, A. Engel, and Y. Fujiyoshi. J. Struct. Biol. 121: 314-325 (1998).

(6) 新規ナトリウムチャネルの単離および単一神経細胞における 7 発現分布の解析

鄭 善容, 尾方 克久, 高橋 祐二, 橋田 秀司, 鈴木 高史, 後藤 順, 金澤 一郎

(東京大院・医・神経内科/科学技術振興事業団・SORST)

膜電位依存性ナトリウムチャネルは神経・筋などの興奮性細胞の細胞膜に存在する膜蛋白分子である。膜依存性ナトリウムチャネルは複数のサブユニット (α , $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$) から構成されているが、膜電位感受性とナトリウムイオンの選択的な透過機能は α サブユニットに備わっている。神経系にはとりわけ多種の α サブユニットが発現し、神経細胞の機能の多様性・特異性との関連が推測される。

本研究ではヒトの新規ナトリウムチャネルの単離および神経系において α と β サブユニットの分子種ごとの発現分布と特異性の解析を行った。

ヒトではまだ同定されていない α サブユニットをスクリーニングする目的で PCR を用いた系統的な探索を行ない、ヒトの新規ナトリウムチャネル遺伝子である SCN1A, SCN3A, SCN8A, SCN12A の完全長 cDNA をク

ローニングした。特に SCN12A は既知のナトリウムチャネルとは低いアミノ酸相同性を示し、また発現様式が異なることから、既知のものとは異なった機能を担っている可能性が示唆された。

神経系組織の種々の部位から得た RNA を材料として、RT-PCR を用いて神経系におけるナトリウムチャネルの部位別発現特異性を検討した。また定量 PCR を用いて神経系部位別に mRNA 発現量を定量した。さらに単一神経細胞においてナトリウムチャネルの詳細な発現分布を解析する目的で、レーザーダイセクターを用いて切り出した単一細胞から RNA を抽出・精製し RT-PCR を行った。以上の結果、各々のサブユニットは神経系部位別および単一神経細胞においてかなり特異的な発現パターンを示した。

(7) 膜電位依存性イオンチャネルの水・溶媒効果と構造

久木田 文夫 (生理研・生体膜)

イオンチャネルは脂質二重層膜を足場にして働く、膜タンパク質であるが、その機能には水界面での構造が重要な役割をしている。本研究ではイオンチャネルの周りの水環境での水の濃度 (浸透圧) や粘性がこの分子機械の動作にどのような影響を与えるかについて述べる。膜電位依存性イオンチャネルの代表として、神経の Na チャネルや K チャネル及びミトコンドリアの porin (電位依存性陰イオンチャネル, VDAC) に対する水・溶媒効果の比較を行い、その定性的な違いが、これらのイオンチャネルの三次元構造の違いに基づくことを示す。イカ軸索の Na チャネルは、非電解質 (エチレングリコール, グリセロール, エリスリトール, グルコース, ソルビトール, ショ糖) を加えると、その動作の時間経過が緩やかになる¹⁾ が、電位センサーの変位・構造変化の速度が遅くなることに由来する²⁾。非電解質効果の中で粘性効果はその効果に電位依存性がないので、Kramers の式³⁾ (速度が粘性に逆比例する) に従うような分子機構で、電位センサーの動きが遅くなることを示している²⁾。一方で、浸透圧の効果 (分子の数が重要で、低分量非電解質の方が顕著) は、ポアに典型的に現れる。porin (ポア内径 15 Å 以上) では、分子量 2 万以上の巨大な非電解質 (PEG,

デキストランなど) で、浸透圧効果が観察されたが⁴⁾、電位センサーをポア壁全体に持つので、浸透圧で膜電位依存性がずれて、ポアを開き難くなる。Na チャネルでは電位センサーが動いた後、間があつてポアが開くが、浸透圧により、その速度が遅くなる。しかし、K チャネルでは逆に、浸透圧によりポアの 1 部が開いている。どちらも電位センサー (S4) がポア外にあるため、粘性効果は同程度に現れるが、ポアに対する浸透圧効果は逆である。K チャネル・ポアの内容積が開状態では閉状態よりも小さいことを意味する。PDB から取得できる porin や K チャネル・ポア (KcsA) の 3 次元構造を眺めると、そのようなことが起こっても良いように見える^{5, 6)}。

- 1) Kukita, F. (1997). J.Physiol. (Lond) 498, 109-133. Erratum: 499, 849 (1997)
- 2) Kukita, F. (2000). J.Physiol. (Lond) 522, 357-373.
- 3) Kramers, H.A. (1940). Physica (Utrecht) 7, 284-304.
- 4) Zimmerberg, J. & Parsegian, V.A. (1986). Nature 323, 36-39.
- 5) 久木田文夫 (2000) 生物物理 40 (3), 185-190
- 6) 久木田文夫 (2000) 生物物理 40 supplement 1, s205.

(8) 小脳プルキンエ細胞の Na チャネルの性質と生後発達

岡村 康司 (統合バイオサイエンスセンター・時系列生命現象/産総研・脳神経情報)

小脳プルキンエ細胞は、数十ヘルツの高頻度の発火特性を特徴として示すが、この性質は細胞を単離しても見られることから、細胞膜固有の性質に基づくと考えられる。最近、この特性が、Na チャネルの特殊な性質としての不活性化しにくい成分 = 持続性 Na 電流、および resurgent Na current に依存することが明らかになってきた。また、哺乳類神経系全般に発現する SCN8a 型 Na チャネルの変異マウスの解析から、この Na チャネル蛋白の

機能が注目されるようになってきた。しかし、持続性 Na 電流、および resurgent Na current の成立する分子機構は不明である。我々は小脳のスライス標本で、resurgent Na 電流の性質が細胞体に比較的均一に存在すること、アフリカツメガエル卵母細胞での発現実験から、持続性 Na 電流の電流成分が type1 チャネルよりも多いこと、beta サブユニットはたぶん resurgent Na 電流の成立には関与しないこと、等を明らかにした。

(9) 痛みとイオンチャネル —テトロドトキシン非感受性ナトリウムチャネル—

緒方 宣邦, 山本 詳子, 丸山 泰司 (広島大・医・生理)

知覚神経特異的 Na チャネル(sensory neuron-specific Na channel: SNS, 便宜上, それによって引き起こされる Na 電流も含めて SNS とよぶ)は, 末梢知覚神経節の小型侵害受容ニューロンにのみ特異的に発現しているため, 以前から痛覚情報の伝搬に重要な役割を担っている Na チャネルであると考えられてきた。私たちは SNS 遺伝子をノックアウトしたマウスを作製し, その変異動物における Na チャネル機能や痛覚感受性の変化を検討した。

末梢知覚神経節の神経細胞に発現する Na チャネルのうち, $\text{Na}_v1.8$, $\text{Na}_v1.9$ は侵害刺激情報を伝搬すると考えられる小型細胞に特異的に分布している。 $\text{Na}_v1.8$ により引き起こされる電流は遅いカINETIKスで TTX 非感受性の SNS であるが, $\text{Na}_v1.9$ の機能発現は成功せず機能は不明のままであった。SNS ノックアウトマウスでは, SNS が完全に欠如しており, 加えて新たな TTX 非感受性 Na 電流である $\text{Na}_v1.9$ による NaN が観察された。

NaN の特徴をまとめると, 1) SNS と同様, TTX 非感受性であり, C線維を発する小型知覚神経節ニューロンに特異的に発現する, 2) 活性化閾値が他の Na チャネルより約 20 mV 程度過分極側へシフトしており, SNS よりさらに遅いカINETIKスをもつ“持続型”Na 電流であり, 閾値下の興奮性を制御している, 3) その発現レベルが何らかの栄養因子により影響を受けダイナミックに変化する“誘導型”Na チャネルである, 4) チャネルの活性化が細胞内環境の変化により著しい影響を受ける, などが挙げられる。これらの性質は, SNS と同様に NaN が侵害刺激の伝搬に関与している可能性を示唆するとともに, 神経線維における興奮性の異常亢進や神経損傷に伴うチャネルの発現異常などの神経因性疼痛の病態生理に関連しており, これら TTX 非感受性 Na チャネルが神経因性疼痛をはじめとする各種疼痛の発現において重要な役割を演じていることを裏づけるものである。

(10) Na_x チャネルは脳弓下器官における塩分濃度のセンサーである

檜山武史 (基生研・感覚情報処理／総研大・生命科学)

渡辺英治 (基生研・感覚情報処理／基生研・形質転換生物／総研大・生命科学)

吉田繁 (長崎大・医・神経感覚医学／生理研・細胞内代謝)

野田昌晴 (基生研・感覚情報処理／基生研・形質転換生物／総研大・生命科学)

Na_x チャネルは電位依存性ナトリウムチャネルと構造上低いながら相同性を有する。これまでいくつかの研究室で機能的発現が試みられたが成功せず, その生理的役割もチャネル機能も不明であった。我々は Na_x 遺伝子欠損マウスを作成し, Na_x の発現部位の同定と共に, マウスの行動異常からチャネルの機能を推定することを試みた。その結果, 中枢神経系では, 体内の塩濃度を検出している部位とされている脳室周囲器官に発現がみられた。また二瓶法による食塩水摂取試験の結果, Na_x 遺伝子欠損マウスは, 味覚は正常にも関わらず塩水を過剰摂取することが明らかになり, Na_x が中枢におけるナトリウムイオンレベルの検出に関与する可能性が示唆さ

れた。そこで, Na_x を一様に発現している脊髄後根神経節細胞の初代培養系を用いて, 外部環境のイオン濃度を変化させる実験を行ったところ, 細胞外ナトリウムイオンのわずかに数 mM の上昇に応答して, 細胞内ナトリウムイオン濃度が大幅に上昇することを見出だした。この応答は Na_x 遺伝子欠損マウスでは見られなかった。塩濃度検出中枢である脳弓下器官の神経細胞を用いて同様の実験を行ったところ, Na_x 発現ニューロンにおいて, 選択的に同様の細胞内ナトリウムイオン濃度の上昇が認められた。このことから Na_x は哺乳類の中枢において, 塩分濃度のセンサーとして機能していると考えられる。

(11) アミロライド感受性上皮型ナトリウムチャネル (ENaC) の生理的意義とその調節機構

丸中 良典, 新里 直美 (京都府立医科大・生理)

上皮組織に存在するアミロライド感受性ナトリウム (ナトリウム透過性) チャネル (ENaC) は体内イオン環境調節に重要な働きを有している。例えば、腎遠位尿細管上皮細胞に存在する ENaC は、ナトリウム再吸収量を制御することにより、我々の血圧や体液量を決定する重要な因子である体内ナトリウム量を調節している。また、肺呼吸上皮に存在する ENaC は、ナトリウム輸送制御を介して、呼吸上皮におけるガス交換および肺上皮細胞防御の観点から、肺腔内液量を最適に調節する重要な役割を担っている。

遠位尿細管管腔側膜に存在する ENaC は、4 pS の単一イオンチャネルコンダクタンスを有し、 Na^+ に選択的透過性を示す。抗利尿ホルモンおよび低浸透圧刺激は、こ

の ENaC の細胞内から管腔側膜への移動を促進させ、その結果、管腔側膜上の活性を持った ENaC の数を増大させることにより、遠位尿細管での Na^+ の再吸収を促進させる。

胎児肺呼吸上皮 II 型細胞肺腔側膜上には、28 pS 非選択性陽イオンチャネル (NSCC) と 12 pS Na^+ チャネルの 2 種類のアミロライド感受性ナトリウム (ナトリウム透過性) チャネルが存在する。この内、NSCC はカテコラミンに反応し、そのチャネル活性および肺腔膜上の数の増大を示して、肺腔内から血管側へとナトリウム輸送を増大させることにより、肺腔内からの水分除去に寄与している。

(12) プロスタシンによる上皮性ナトリウムチャネル (ENaC) の活性化

北村 健一郎 (熊本大・医・第三内科)

上皮性ナトリウムチャネル (ENaC) は体液のナトリウムバランスを調節する上で重要なイオンチャネルである。ENaC は α , β , γ の 3 つのサブユニットから構成される 4 量体で、アルドステロン、バゾプレッシン等のホルモンによりその活性が制御され、近年セリンプロテアーゼによる ENaC の活性化が注目されている。私たちはラット腎臓よりセリンプロテアーゼであるプロスタシンをクローニングした。ラットプロスタシンは腎臓、肺、大腸、皮膚、胃、前立腺に発現し、ENaC と類似した組織分布を示す。また尿細管レベルでも ENaC の存在する CCD, OMCD, IMCD に存在する。Xenopus oocyte に ENaC とプロスタシンを共発現させるとアミロライド感

受性 Na^+ 電流は約 2 倍増加した。アプロチニンを前投与するとプロスタシンによる ENaC の活性化が阻害されることより、この活性化機構には proteolytic activity が関与していることが示唆された。このセリンプロテアーゼによる活性化は $\alpha\gamma$ または $\alpha\beta\gamma$ サブユニットを発現させたときのみ観察されることから γ サブユニットの存在が必須であると考えられた。さらに γ サブユニットの細胞外ループにある RKRR (135 - 138) 領域に mutation を入れるとこのセリンプロテアーゼによる活性化は抑制された。以上よりプロスタシンは ENaC γ サブユニットの RKRR 領域に直接的または間接的に作用しチャネルを活性化すると考えられた。

2. シナプス伝達の局所制御と可塑性の分子機構

2001年6月13日－6月14日

代表・世話人：狩野方信（金沢大学大学院医学研究科）

所内対応者：森泰生（統合バイオサイエンスセンター）

(1) 遺伝子操作マウスを用いたグルタメイト受容体の機能解析

崎村 建司（新潟大学脳研究所）

(2) グルタミン酸受容体のゲートと会合のメカニズムの解析

柚崎 通介（St. Jude Hospital）

(3) グルタメイト受容体のシナプスへの targeting

深谷 昌弘, 渡辺 雅彦（北海道大学医学研究科）

(4) 逆行性シグナルを介するシナプス伝達調節

少作 隆子（金沢大学医学系研究科）

(5) 内在性カンナビノイド受容体リガンド

杉浦 隆之（帝京大学薬学部）

(6) カルシウムチャネルミュータントマウスとシナプス伝達

井本 敬二（生理学研究所）

(7) 海馬錐体細胞樹状突起スパインの形態とグルタミン酸感受性

松崎 政紀, 河西 春郎（生理学研究所）

(8) 細胞内シグナル伝達系による back propagating spike の制御

坪川 宏（生理学研究所）

(9) 樹状突起におけるシナプス応答の電位イメージング

宮川 博義（東京薬科大学生命科学部）

(10) 樹状突起の局所カルシウムシグナル/Spatial segregation と interaction

中村 健（東京大学医科学研究所）

【参加者名】

宮川 博義（東京薬科大学生命科学部）、井上 雅司（東京薬科大学生命科学部）、中村 健（東京大学医科学研究所）、来馬 明規（東京大学医科学研究所）、渡辺 雅彦（北海道大学医学研究科）、深谷 昌弘（北海道大学医学研究科）、真鍋 俊也（神戸大学医学系研究科）、神谷 温之（神戸大学医学系研究科）、鈴木 紀光（神戸大学医学系研究科）、駒井 章治（神戸大学医学系研究科）、志 牟田美佐（神戸大学医学系研究科）、新里 和恵（神戸大学医学系研究科）、篠江 徹（神戸大学医学系研究科）、梅田 和昌（神戸大学医学系研究科）、松井 稔（東京大学医科学研究所）、城山 優治（東京大学医科学研究所）、熊沢 紀子（東京大学医科学研究所）、渡部 文子（東京大学医科学研究所）、尾藤 晴彦（京都大学医学研究所）、

井上 直子（三菱化学生命科学研究所）、上田 洋司（三菱化学生命科学研究所）、深沢 有吾（三菱化学生命科学研究所）、高橋 正身（三菱化学生命科学研究所）、狩野 方伸（金沢大学医学系研究科）、橋本 浩一（金沢大学医学系研究科）、岸本 泰司（金沢大学医学系研究科）、福留 優子（金沢大学医学系研究科）、前島 隆司（金沢大学医学系研究科）、吉田 隆行（金沢大学医学系研究科）、三好 智子（金沢大学医学系研究科）、澤田さつき（金沢大学医学系研究科）、小西 史郎（三菱化学生命科学研究所）、久野 宗（科学技術振興事業団）、永業 正美（科学技術振興事業団）、清家 正博（高知医科大学）、井ノ口馨（三菱化学生命科学研究所）

【概要】

シナプス伝達の制御や可塑性、および、関連する記憶・学習などの脳高次機能に興味をもって活発に研究を進めている様々な分野の研究者が一堂に会して、これらを分子レベルで解明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、最近のこの分野のトピックスのうちから、シナプス結合の場である樹状突起の局所シグナル制御機構と、個々のシナプスを越えて拡散するシグナルやシナプ

ス後部から前終末へ逆行性シグナルの分子実体に焦点を当てた。また、興奮性シナプス伝達を担うグルタミン酸受容体についての最新の知見を議論した。これらを出発点として、脳高次機能を分子レベルで解明するための手がかりが得られることを目指した。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開催された。

(1) 遺伝子操作マウスを用いたグルタミン酸受容体の機能解析

崎村建司 (新潟大学脳研究所)

NMDA 型グルタミン酸受容体チャネルは、電位依存性の活性調節と高いカルシウムイオン透過性という生理特性を持ち、脳機能を担う鍵になる分子の一つと考えられている。我々は、この受容体チャネルがグルタミン酸結合部位を持つ GluR ϵ (NR2)とグリシン結合部位を持つ GluR ζ (NR1)サブユニットから構成され、分子的に多様であることを見出した。さらに4種類の GluR ϵ サブユニットの生理機能を解析するために、これら分子を欠損するマウスを作成し解析をおこなってきた。

GluR ϵ 1, GluR ϵ 2 サブユニットそれぞれが構成する NMDA 受容体チャネルは、高い Ca 透過性や強い電位依存性 Mg 閉塞などのチャネル特性が似ており、シナプス伝達の可塑性に重要な働きを果たす。さらに、ある種の記憶・学習において同等な働きをすることが示されてきたが、全く異なった機能を持っていることも明らかになった。GluR ϵ 2 欠損マウスは、音刺激による驚愕反射が亢進していることから、情動に関連することが示唆された。また一過性の虚血により惹起される神経細胞壊死において、GluR ϵ 1 欠損マウスは GluR ϵ 2 欠損マウスに比較し非常に高い抵抗性を示すことから、細胞死のシグナルは GluR ϵ 1 を介して伝達されることが考えられる。一方、GluR ϵ 3 と GluR ϵ 4 の機能はそれほど明確ではないが、発達初期に発現する GluR ϵ 4 は、入力依存的シナプス精緻化のモデルと考えられている顔面洞毛からの入力の中継

点である barrelette の形成と固定化に GluR ϵ 2 と拮抗的に働くことが明らかになった。そこで、GluR ϵ 4 プロモーター制御下で GluR ϵ 2 を発現するマウスを作製し、サブユニットの置換がもたらす影響を解析した。その結果、GluR ϵ 4 の代わりに GluR ϵ 2 サブユニットを発現したマウスは、GluR ϵ 4 欠損マウスより自発運動量が減少していた。このことは、GluR ϵ 2 は GluR ϵ 4 の代償はできないことを意味する。すなわち、NMDA 受容体チャネルの分子的多様性が、多岐にわたる脳機能の分子基盤になっていることが明らかになった。

我々はさらに、特定の神経回路で働く分子が担う生理機能を個体で見えるために、部位・時期特異的に組換えをおこすコンディショナルターゲティング法の開発を進めてきた。薬剤による組換え誘導が可能な CrePR/loxP 組換え系を用いて、小脳プルキンエ細胞と顆粒細胞それぞれに細胞特異的にかつ誘導可能な組換え系を開発することに成功した。これらのマウスは、成体における可塑性に関与する分子の同定と、それらの作用機序解明のために非常に有用なシステムとなる。

参考文献

- 1) Tsujita, M., et al. J. Neuroscience 19, 10318-10323, 1999.
- 2) Kitayama, K. et al. Biochem. Biophys. Res. Comm. 281, 1134-1140, 2001.

(2) グルタミン酸受容体のゲートと会合のメカニズムの解析

柚崎通介 (St. Jude Hospital)

私たちは小脳をモデルシステムとして記憶素子としてのグルタミン酸受容体に注目している。90年代の遺伝子クローニングとノックアウト法の進展により、分子レベルでのグルタミン酸受容体の機能の理解は大幅に進んだ。しかし、小脳プルキンエ細胞にはデルタ型グルタミン酸受容体というアゴニストが不明なオーファン受容体や、アスパラギン酸に反応する未同定のグルタミン酸受容体様分子が特異的に発現していると考えられており、未解決な問題が残されている。これらの問題を解決する方法の一つの方法として、自然発症小脳失調マウスを解析する方法がある。一般にグルタミン酸受容体は非常に大きなゲノムにコードされていることから、突然変異が入る確率が高く、もしグルタミン酸受容体が小脳に特異的であるならば表現型は致死でなく運動失調などの観察しやすい型をとると考えられるからである。実際にデルタ型受容体に帰着すると考えられる運動失調マウスは少なくとも14種類が知られている。

このうち Lurcher と hotfoot 変異マウスを解析することにより私たちはデルタ受容体の機能と構造についての理

解を深めることができた。前者の変異ではデルタ受容体が常時開口するためにプルキンエ細胞がおそらくイオン過負荷のために細胞死に至り、後者の変異ではデルタ受容体の会合が阻害され細胞表面に輸送されない。これらの結果から、デルタ受容体はチャンネルを形成して機能しているらしいこと、そしてそのチャンネルの性質は AMPA/Kainate グルタミン酸受容体のそれに近いこと、更にデルタ受容体は細胞膜表面に発現して初めて機能することなどが分かった。驚くべきことに、他のグルタミン酸受容体の相同部位に同様の突然変異を導入するとデルタ受容体にみられた現象と同様の現象が観察された。これらの現象の解析によりグルタミン酸受容体一般のゲーティングや会合に関わる構造と機能についての新しい知見を得たので紹介したい。

参考文献

- 1) Yuzaki, M., Forrest, D., Curran, T., and Connor, J.A., Selective activation of calcium permeability by aspartate in Purkinje cells, *Science*, 273(1996)1112-1115.

(3) グルタメイト受容体のシナプスへの targeting

深谷 昌弘, 渡辺 雅彦 (北海道大学医学研究科)

NMDA 型グルタミン酸受容体は、神経活動依存性のシナプス可塑性を誘発し、脳のシナプス回路発達や高次機能発現に関与している。この受容体の機能発現には、NR1 (GluR ζ 1) と NR2 (GluR ϵ) の2種のサブユニットからなるヘテロメリック複合体形成が不可欠である。遺伝子発現から、NR1 は脳に広範な発現を示し、一方、4種の NR2A-D (GluR ϵ 1-4) はそれぞれ異なる空間的・時間的発現調節を受けている。その結果、ほとんどのニューロンは NR1 といういずれかの NR2 を発現し、例外的に成熟プルキンエ細胞は NR1 のみを単独に発現する。培養細胞を用いた遺伝子導入実験や蛋白-蛋白相互作用解析などから、NR1 または NR2 に結合する新規分子が相次いで同定され、NMDA 受容体の輸送やシナプス局在を制御する分子

機構が次々と明らかにされている。さらに、NMDA 受容体は種々の細胞骨格系と結ばれ、サブユニットのリン酸化などを介してシナプス局在が活動依存的に調節されていると考えられている。

最近、我々は、NMDA 受容体やその結合蛋白の組織化学的検出を行う上で、蛋白分解処理法が著明な効果を及ぼすことを見出した^{1), 2)}。この方法を用いて、シナプス局在調節機構における NR1 と NR2 の機能的役割を検証することを企画した。この目的で、1) 成熟プルキンエ細胞における NR1 局在³⁾、2) NR1 欠損マウスにおける NR2 の局在、3) NR2 欠損マウスにおける NR1 の局在について、解析を行ってきた。その結果、いずれのケースにおいても、シナプスを含む樹状突起におけるサブユ

ニット局在は免疫組織化学の検出感度以下にまで低下することが判明した。しかも、NR1の非存在下では、NR2は細胞体の粗面小胞体に蓄積している像が観察された。これに対して、NR2の非存在下では、NR1の細胞体集積は観察されなかった。我々の観察結果は、NR1とNR2のサブユニット会合が翻訳後まもなく小胞膜上で起こり、このステップがNR2を含有するヘテロメリックな受容

体が細胞内輸送機構やシナプス発現機構により認識され制御されるために不可欠であることを示している。

- 1) Watanabe et al. (1998) Eur. J. Neurosci. 10:478-487.
- 2) Fukaya and Watanabe, M. (2000) J. Comp. Neurol. 426:572-586.
- 3) Yamada et al. (2001) Eur. J. Neurosci. in press.

(4) 逆行性シグナルを介するシナプス伝達調節

少作 隆子 (金沢大学医学系研究科)

シナプス伝達効率は様々なメカニズムにより調節されている。その一つに、シナプス後ニューロンの活動に依存したシナプス伝達調節があり、その過程に逆行性シグナル(シナプス後ニューロンから前ニューロンへのシグナル)の関与する例が報告されている。ごく最近になり、海馬および小脳において、そのような逆行性シグナルの担い手が内因性カンナビノイドであることが、我々および他のグループの研究により明らかとなった(Ohno-Shosaku et al., 2001; Kreitzer and Regehr, 2001; Wilson and Nicoll, 2001)。今回は主に、海馬の抑制性シナプスを中心に、内因性カンナビノイドの逆行性シグナルとしての役割について述べる。

海馬CA1錐体細胞を脱分極させると、そのニューロンへの抑制性入力が一過性に抑制される現象が1992年にAlgerらにより報告され、DSI(depolarization-induced suppression of inhibition)と名付けられた。その後の研究により、DSIの誘導にシナプス後ニューロンの細胞内Ca濃度上昇が必要であること、最終的にシナプス前ニューロンからの伝達物質の放出が抑制されること、したがって、逆行性シグナルが関与していることが明らかとなった。逆行性シグナルの実体については、グルタミン酸である可能性が示唆されたが、それに否定的な実験結果も得られており、断定されるには至っていなかった。

近年、内因性カンナビノイドの神経調節因子としての

役割を示唆する以下のような実験結果が報告された。1) ニューロンを脱分極させると、内因性カンナビノイドの合成および放出が促進される。2) カンナビノイド受容体がシナプス前終末部に多く存在する。3) その受容体の活性化により伝達物質の放出が抑制される。以上のように、内因性カンナビノイドは、逆行性シグナルを担うための条件を満たしていることが示された。

そこで我々は、DSIにおける内因性カンナビノイドの関与の可能性について検討したところ、カンナビノイド受容体阻害剤によりDSIが消失するなどの結果が得られ、逆行性シグナルの担い手が内因性カンナビノイドであることが判明した。

- 1) Kreitzer, A. C. & Regehr, W. G. (2001) Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. Neuron 29: 717-727.
- 2) Ohno-Shosaku, T., Maejima, T. & Kano, M. (2001) Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. Neuron 29: 729-738.
- 3) Wilson, R. I. & Nicoll, R. A. (2001) Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. Nature 410: 588-592.

(5) 内在性カンナビノイド受容体リガンド

杉浦 隆之 (帝京大学薬学部)

マリファナの活性成分である Δ^9 -テトラヒドロカンナビノール (Δ^9 -THC) は精神緊張の解除, 多幸感, 時間・空間感覚の混乱, 幻覚, 食欲増進, 血管拡張など多彩な生理活性を示す物質である。 Δ^9 -THC の作用機序は長い間謎であったが, 1980 年代の後半になり, Δ^9 -THC は受容体 (カンナビノイド受容体) を介して作用しているらしいということがわかってきた。そして 1992 年の末にはアナンダミド (N-アラキドノイルエタノールアミン) が最初の内在性カンナビノイド受容体リガンドとしてブタの脳から取り出された。我々はアナンダミドの組織中の量と生合成機構を詳しく調べ, 少なくとも新鮮な脳の場合, 含まれているアナンダミドの量は著しく少ないこと, 生合成機構として合理的で効率の良いものが見つからないことなどを明らかにした¹⁾。そして真の内在性リガンドは別の物質であると推定して検討を行い, 脳に比較的多量に存在する 2-アラキドノイルグリセロール(2-AG)という一種のモノアシルグリセロールが, もう一つの内在性カンナビノイド受容体リガンドであるということを見い出した²⁾。なお, 我々の報告とほぼ同時期に Mechoulam のグループもイヌの腸から第二の内在性カンナビノイド受容体リガンドとして 2-AG を取り出している³⁾。我々はカンナビノイド CB1 受容体 (脳などの神経系に存在するカンナビノイド受容体) を発現している NG108-15 細胞を用いて 2-AG の作用をさらに詳しく調べ, nM オーダーの 2-AG が, カンナビノイド CB1 受容体を介して細胞内カルシウムイオン濃度の速やかな一過的な上昇を引き起こすことを見い出した⁴⁾。遊離アラキドン酸には活性が全くないこと, アナンダミドや Δ^9 -THC などのアゴニストとしての活性は 2-AG のそれに比べて著しく弱いこと, 20 種類をこえる構造類縁体の中で 2-AG の活性が最も強いこと, 2-AG のエーテル型のアナログにもやや弱いながら活性が認められることなどから, カンナビノイド CB1 受容体は 2-AG の構造を厳密に認識していると考えられる^{5,6)}。CB2 受容体 (免疫・炎症系の細胞に存在す

るカンナビノイド受容体) を発現している HL-60 細胞を用いた実験でも CB1 受容体の場合とよく似た結果が得られており⁷⁾, カンナビノイド受容体は, CB1 受容体, CB2 受容体ともに本来は 2-AG に対する受容体である可能性が極めて高い。ところで, 2-AG は情報伝達に伴って起こるイノシトールリン脂質代謝亢進の際に生成する物質であることから, カンナビノイド受容体の機能とイノシトールリン脂質代謝は密接にリンクしたものであるという可能性が浮上してきた。神経系におけるカンナビノイド受容体の機能は, 抑制性のものであると考えられているが, その内在性のリガンドが活性化された細胞から速やかに産生され, 放出されるとすれば情報伝達のネガティブフィードバックという点からみて興味深いことと言えよう。我々は中枢神経興奮薬を投与したラットの脳で 2-AG が速やかに産生されることや, シナプトゾームを脱分極させると 2-AG が速やかに産生され, 放出されることなどを確認している。2-AG は神経系において, 一旦起こった神経の興奮にブレーキをかけるという重要な役割をもった物質である可能性が高い。今回の研究会では, 新しいタイプの神経伝達調節因子と考えられる 2-AG の分析・作用・代謝に関する我々のこれまでの研究をご紹介します。

- 1) Sugiura, T. et al., *Eur. J. Biochem.* 240, 53 (1996).
- 2) Sugiura, T. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215, 89 (1995).
- 3) Mechoulam, R. et al., *Biochem. Pharmacol.* 50, 83 (1995).
- 4) Sugiura, T. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 229, 58 (1996).
- 5) Sugiura, T. et al., *J. Biochem.* 122, 890 (1997).
- 6) Sugiura, T. et al., *J. Biol. Chem.* 274, 2794 (1999).
- 7) Sugiura, T. et al., *J. Biol. Chem.* 275, 605 (2000).

(6) カルシウムチャネルミュータントマウスとシナプス伝達

井本 敬二 (生理学研究所)

脳の主要なサブタイプである P/Q 型 Ca^{2+} チャネルの遺伝子異常により、小脳変性症など神経疾患がヒト、マウスで起こることが近年明らかとなっている。マウスでは、*tottering*, *rolling*, *leaner* などの変異が知られており、変異マウスの神経症状も知られている。しかしながら、 Ca^{2+} チャネルの異常が、どのようにして小脳失調症などの神経症状を引き起こすのか、また変異マウスの系統により神経症状の重篤度や発症時期が異なるのは何故なのかという疑問は解決されていない。

この問題を解決するために、*tottering* および *rolling* の小脳における興奮性シナプスの変化を検討した。まず平

行線維-プルキンエ細胞シナプスの EPSC(PF-EPSC)は、*rolling* マウスで著明に減弱していた。失調症を示さぬ若い *tottering* マウスでは、PC-EPSC の減少の程度は小さかったが、失調を示す年長の *tottering* マウスでは、PC-EPSC の減少は著明であった。登上線維-プルキンエ細胞シナプスの EPSC(CF-EPSC)の大きさは、*tottering* では著変なく、*rolling* では増加していた。この増加には、後シナプス膜の AMPA 受容体の特性変化が関与していた。また *tottering* ではてんかんを示すことが知られているが、その症状に関係すると考えられる大脳皮質の神経回路異常に関しても報告したい。

(7) 海馬錐体細胞樹状突起スパインの形態とグルタミン酸感受性

松崎 政紀, 河西 春郎 (生理学研究所)

樹状突起上のスパインは、中枢神経細胞における興奮性シナプス結合の主たる部位である。R. Cajal によるスパインの発見以来、多くの形態学的知見からスパインの機能素子としての役割が主張されてきた。その機能を担う分子として特に、スパインに集積している AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA) は、シナプス前終末から放出されたグルタミン酸と結合し速いシナプス後電位を生じさせるため、シナプス伝達効率の決定因子であるといえる。しかし、スパインの構造は小さく、樹状突起上に密集しているために、従来の電気生理学的・光学的手法を用いては、単一スパインでの AMPAR の反応とその形態を同時に計測することは困難であり、機能と形態の関連性を直接的に検証することができなかった。

そこで我々は、上記の課題にアプローチするために、2 光子励起法によるケイジドグルタミン酸の活性化と蛍光イメージングを組み合わせた方法論を構築してきた。光学系の構築とともに、2 光子吸収断面積が大きく、水溶液中で安定な新規のケイジドグルタミン酸を開発した。ホールセルクランプしたラット培養海馬細胞の樹状突起近傍でケイジドグルタミン酸を 2 光子励起法によって 50 μs の間だけ活性化させると、シナプス前終末からグル

タミン酸が放出されて起こる mEPSC の時間経過と同一である、AMPA による電流反応を誘起することができた。またその反応の空間解像度は水平方向で 0.45 μm 、垂直方向で 1.1 μm であり、2 光子励起法としての理論的な限界値を達成した。この方法を用いて樹状突起上での機能的な AMPAR の 2 次元空間分布を調べると、AMPA は樹状突起に沿ってクラスター状に散在し、その分布は FM1-43 によって染色されたシナプス前終末と良く一致した。従って、2 光子励起法によって、シナプス前終末のシナプス小胞からの開口放出という生理的現象に極めて近いグルタミン酸の放出を、3 次元的な任意の一点で人工的に作り出すことが可能となった。

この方法論をラット海馬のスライス標本に適用し、ホールセルクランプした CA1 錐体細胞の樹状突起に沿って 3 次元的にグルタミン酸感受性のマッピングを行った。グルタミン酸感受性はスパインの体積に強く相関し (相関係数 0.80 ± 0.07 , 9 細胞)、キノコ型の大きな頭部を持つスパインでは強く、細いスパインや細長いフィロポディアでは反応がないか、弱い反応しか得られなかった。この結果はいわゆる「サイレントシナプス」が後者の形態をもったスパインである可能性を示唆してい

る。多くのスパインでは、その頭部の一部に強い AMPAR の反応が見られ、AMPAR がシナプス後部の PSD 領域に局在するという電子顕微鏡による報告とよく一致する。近隣（距離 $10\ \mu\text{m}$ 以内）の個々のスパインを比較するとグルタミン酸感受性には大きな相違 ($CV = 0.45 \pm 0.11$, 9 細胞) が見られ、キノコ型スパインにおいて非定常ノイズ解析を行うと、AMPAR の数は単一スパインあたり最大で約 150 個 (47-143 個, $n = 8$) 存在することが判明した。一方、グルタミン酸感受性及び形態（体積）の空間的な自己相関を求めると、距離にして $1\ \mu\text{m}$ 以下の隣接

したスパイン間においても両者共に相関が無かった。これらの結果は、スパインの形態と機能的 AMPAR の発現は強く相関しており、その機能的発現量は高いダイナミックレンジ（ $\sim 7\text{bits}$ ）を持ちながら、単一スパインレベルで独立に調節されていることを示している。

2 光子励起法によるケイジド試薬の活性化，という新しい光学的手法は今後、シナプス機能の動態を細胞分子生物学的に単一シナプスレベルで明らかにするための非常に強力なツールとなると思われる。

(8) 細胞内シグナル伝達系による back propagating spike の制御

坪川 宏（生理学研究所）

中枢ニューロンの樹状突起が持つ機能は、その構造と同様に複雑で、シナプス入力や細胞内シグナル伝達系により局所的、かつ精妙に調節されていることが次第に明らかになりつつある。我々は、この調節メカニズムに興味を持ち、大脳皮質や海馬の錐体細胞で見られる Na^+ スパイクの backpropagation に着目して、樹状突起の興奮性がどのように調節されているかを調べている。樹状突起への backpropagation には、スパイク頻度に依存して振幅が減衰するという特性がある。これには樹状突起に高密度で存在する slow-inactivated Na^+ チャネルや、静止膜電位付近で活性化している A-type K^+ チャネルなどの関与が示唆されているが、これらのチャネルを活動依存的に調節するメカニズムは、よく分かっていない。これまで、1) ムスカリン性受容体、2) β -アドレナリン受容体、3) PKC および PKA、の薬理学的な活性化によって頻度依存性の振幅減衰が消失すると報告されていることから、cAMP および PLC を介するシグナル伝達系が寄与すると

考えられるが、上記の受容体活性化の効果が PKC や PKA の阻害剤では抑制されないなど単純ではなく、いまだ不明な点が多い。近年我々は、三量体 G タンパク Gq および G11 の α サブユニット欠損マウスを用いて backpropagating spike の制御メカニズムを調べる一連の実験を行ない、その結果から、ムスカリン性受容体への刺激は PKC の活性化を介してチャネル活性を調節するだけでなく、細胞内 Ca^{2+} の増加を必要とする別の系をも活性化しうることが予想された。単一錐体細胞の樹状突起からパッチクランプ記録を行ない、電流注入により樹状突起を大きく脱分極させると、数分後に backpropagating spike の頻度依存性の振幅減衰が長時間消失した。この効果は細胞内 Ca^{2+} 上昇と CaMKII 活性に依存しており、PKC 活性化の効果とは独立して見られた。以上のことから、ムスカリン性受容体の活性化に伴って十分に細胞内 Ca^{2+} が上昇した場合は、 Ca^{2+} -CaM 依存性酵素群へのクロストークが起こるのかもしれない。

(9) 樹状突起におけるシナプス応答の電位イメージング

宮川 博義（東京薬科大学生命科学部）

技術的なこと

神経細胞や局所回路網のシナプス応答は、もっぱら場の電位記録やパッチクランプ記録といった電気生理学的

な手法を用いて解析されている。しかし、これらの手法では限られた部位の応答しか観測することができないという欠点がある。それに対して、光学的イメージングは、

電気生理学的手法では観察できない部位の活動を観察することができる、あるいはまた 2 次元的、3 次元的な情報を得ることができるといった利点がある。高速膜電位イメージング技術を用いてシナプス応答についてどのような情報が得られるのかを紹介する。

色素をもちいた神経活動の光学的膜電位測定は 1968 年に初めて田崎によって報告され、その後コーエンのグループによって測定システムと色素の開発がすすめられ、さまざまな標本に広く用いられてきた。ところがこの技術は、どのような信号を検出しているのかを深く突き詰めでないで用いられているきらいがある。この技術を用いて、海馬スライス標本からシナプス入力によって誘起される信号を解析してみると、シナプス応答に関わる様々な情報を含んでいることが分かる。

海馬は系統発生的に古い皮質部位であり、神経細胞や神経軸索が層をなして並んでいる。そのために特定の部位にシナプス入力を加えたり、特定の部位の電氣的応答を観察することが容易であり、皮質神経細胞のシナプス応答の研究の際に海馬スライス標本が広く用いられる。

測定には 256 個のフォトダイオードを 16×16 のアレイに並べたもの (浜松ホトニクス社製) を用いている。このシステムは 16 ビットの解像度と最高 8kHz の時間分解能を持つ。シナプス応答の観察には、応答の速い merocyanine 系, oxonol 系, styryl 系などの電位感受性色素が用いられている。我々はおもっぱら styryl 系の JPW1114 及び oxonol 系の RH155 を用いている。

電位感受性色素を膜にとりこませた海馬スライス標本内のシャーファー側枝と呼ばれる神経線維を電気刺激すると、CA1 野と呼ばれる領域から電位応答を記録することができる。この応答には様々な成分が含まれている。我々は、これまで数年間にわたって、信号成分を分離し、その性質を解明する事によって、海馬錐体細胞におけるシナプス応答を解析してきた。そうして得られた知見の一部は、過去の生理研研究会においても既に紹介した。今回は海馬錐体細胞の樹状突起スパイクの伝導と、樹状突起におけるシナプス電位の加算について紹介する。

CA1 海馬錐体細胞に発生する樹状突起スパイクの順行性伝導

シャーファー側枝に強めの刺激を与えると CA1 野から大きいスパイク状の応答が記録できる。この成分は細胞体層のみならず樹状突起層においても見られる。ホー

ルセル記録による電位応答と比較してみると、この信号は活動電位の発生と時間的によく相関しており、多数の錐体細胞樹状突起に発生する Na^+ 依存性活動電位の集合電位と考えられる。この成分の潜時は樹状突起部のシナプス入力部において最も短く、細胞層ではより長くなっている。この事は、海馬 CA1 錐体細胞はシナプス入力に応じて樹状突起において活動電位を発生し、それが細胞体へと順方向性に伝導することを示している。

錐体細胞の樹状突起が興奮性を持ち Na^+ 依存性および Ca^{2+} 依存性のスパイクを発生することは以前から知られていた (Stuart et al., 1999)。近年の樹状突起及び細胞体からの同時ホールセル記録法を用いた報告によれば、海馬錐体細胞に発生する Na^+ スパイクはシナプス入力の部位にかかわらず細胞体付近においてははじめに発生し、それが樹状突起へと逆伝播 (Backpropagate) するというのである (Spruston et al., 1995)。しかしながら我々の測定条件では、スパイク成分は細胞体層よりも樹状突起層に先に現れることから、活動電位は樹状突起が起始部位となっていると考えられる。なぜ電位感受性色素を用いた観察では逆伝播にならずに順方向の伝播になるのか、原因はまだ不明である。同時ホールセル記録による最近の研究では、入力線維に対する刺激を強くすると樹状突起が細胞体よりも先に活動電位を発生するようになると報告されている (Golding & Spruston, 1998)。電位感受性色素によって集団的な活動電位が検出されるためには、樹状突起スパイクの発生の同期が必要である。そのような刺激強度は樹状突起部におけるスパイクの開始が見られるほどに十分に強力なものなのかも知れない。他の可能性としてホールセル記録法が樹状突起の膜特性を変化させてしまうために、本来は樹状突起が起始部である樹状突起スパイクの発生が妨げられて細胞体に先に発生するということも考えられる。

CA1 海馬錐体細胞樹状突起におけるシナプス電位の加算

刺激強度を活動電位の閾値以下に調節するとシナプス電位を解析する事ができる。独立した 2 系統のシナプス入力が樹状突起の異なる部位に入力した際に、応答がどのように加算するのかを電位感受性色素を用いて調べた。AMPA 受容体を介する応答が同時に入力すると、単独で入力した際の応答の算術和に比べて応答が 60-70% になる。この非線型性は細胞体から樹状突起の全長にわたってみられ、GABA 受容体を薬理的にブロックすると弱く

なり線型和に近づく。

海馬には多様な抑性ニューロンが存在し、錐体細胞の様々な部位にシナプスしていることが知られている。興奮性入力に伴う feed-forward な抑性入力あるいは、海馬の振動的電気活動時の抑制性ニューロンの同期発火などによって錐体細胞の樹状突起は GABA 作動性の制御を受けていると考えられる。その結果として興奮性入力の加算の様式が変化する可能性を我々の結果は示している。

参考文献

- 1) Inoue, Y.Hashimoto, Y.Kudo, H.Miyakawa, European Journal of Neuroscience, 13 (2001) 1711-1721.
- 2) Dendritic attenuation of synaptic potentials in the CA1

region of rat hippocampal slices detected with an optical method.

- 3) Ryousuke Enoki, Masashi Inoue, Yoshinori Hashimoto, Yoshihisa Kudo, Hiroyoshi Miyakawa, GABAergic control of non-linear synaptic summation in hippocampal CA1 pyramidal neurons. (in press)
- 4) Optical monitoring of synaptic summation along the dendrites of CA1 pyramidal neurons. (in preparation) Ryousuke Enoki, Masayuki Namiki, Masashi Inoue, Yoshihisa Kudo, Hiroyoshi Miyakawa,
- 5) 「高速膜電位イメージングによる CA1 錐体細胞のシナプス応答の解析」神経研究の進歩 45 巻 2 号 (2001) 271-281, 特集：記憶研究最近の進歩

(10) 樹状突起の局所カルシウムシグナル/Spatial segregation と interaction

中村 健 (東京大学医科学研究所)

ラット海馬スライスの単一 CA1 錐体細胞において、電気刺激によるシナプス伝達誘発時の Ca^{2+} 濃度変動を記録した。AMPA, NMDA 受容体阻害下でテタヌス刺激を与えたところ、近位樹状突起上においてその濃度が μM レベルに達するような Ca^{2+} 上昇が生じ、 Ca^{2+} -wave となって樹状突起上を伝播した。 Ca^{2+} -wave が生じないよう刺激を弱めた場合でも、逆行性活動電位を生じさせると同様の Ca^{2+} 上昇が生じた。薬理実験の結果、この現象は Group-I mGluR と IP_3 受容体を介するもの (IICR) であることが判明した。即ち、強いシナプス入力により mGluR が活性化されて樹状突起内で IP_3 が生じ、regenerative な Ca^{2+} 上昇と Ca^{2+} -wave が発生する。また逆

行性活動電位は、それにより流入した Ca^{2+} が IP_3 とともに協同的に IP_3 受容体に働く結果、同様の Ca^{2+} -wave 発生を促進するものと考えられた。 IP_3 を産生させる受容体アゴニスト存在下に活動電位を発生させることでも同様の結果が得られた。IICR は近位樹状突起の main shaft 上の branch point から発生し、細い branch では観察されなかった。細い branch ではシナプス刺激応答としては NMDA 受容体を介する Ca^{2+} 上昇が主要な成分であった。すなわち、異なった Ca^{2+} シグナリングメカニズムが樹状突起上で「住み分け」しており、お互いに相互作用するようである。

3. 抑制性ニューロンの役割

2001年6月14日-15日

提案代表者：小西 史朗 (三菱化学生命科学研究所)

所内世話人：柳川右千夫 (生理学研究所)

- (1) 小脳抑制性シナプス前終末からの GABA, glycine の共放出
鈴木 紀光, 狩野方伸 (金沢大学大学院医学系研究科)
- (2) 小脳皮質 GABA シナプスの β -アドレナリン受容体を介した増強機構
斎藤文仁 (三菱化学生命科学研究所, CREST・JST)
- (3) AMPA 受容体で仲介される小脳 GABA 伝達抑制とその機構
佐竹伸一郎 (三菱化学生命科学研究所, CREST・JST)
- (4) プルキンエ細胞における抑制性シナプス可塑性の制御機構
平野丈夫, 川口真也 (京都大学大学院理学研究科)
- (5) タキキニンによる扁桃体 GABA シナプスの選択的促進
小西史朗 (三菱化学生命科学研究所)
- (6) GAD65 ノックアウトマウス扁桃体外側核局所回路における興奮性と可塑性の変化
兼子幸一, 季 鳳雲, Oliver Stork, 小幡邦彦 (生理学研究所)
- (7) 線条体抑制性インターニューロンネットワークの機能
青崎敏彦, 三浦正巳, 鈴木健雄, 辛龍文 (東京都老人医学総合研究所)
- (8) 大脳皮質白質層内の GABA 作動性神経細胞の分布と投射
富岡良平, 中村公一, 玉巻伸章 (京都大学大学院医学研究科)
- (9) 大脳皮質視覚野抑制性シナプスにおける長期増強の誘発・維持機構
小松由紀夫 (名古屋大学環境医学研究所)
- (10) Gap junction を介して大脳皮質 GABA ニューロンが形成する樹状突起ネットワーク
福田孝一 (九州大学大学院医学研究院)
- (11) 大脳皮質同期活動における GABA 細胞の発火様式
川口泰雄 (生理学研究所)
- (12) GABA シグナリングに関わる新しい分子
兼松 隆, 平田雅人 (九州大学大学院歯学研究院)
- (13) GABA 受容体 ρ サブユニットの局在と機能的発現
新貝鉦蔵 (岩手大学工学部)
- (14) GABA ニューロン特異的遺伝子発現調節機構
柳川右千夫 (生理学研究所)

【参加者名】

狩野 方伸 (金沢大学大学院医学系研究科), 少作 隆子 (金沢大学大学院医学系研究科), 福留 優子 (金沢大学大学院医学系研究科), 前島 隆司 (金沢大学大学院医学系研究科), 吉田 隆行 (金沢大学大学院医学系研究科), 三好 智子 (金沢大学大学院医学系研究科), 澤田 さつき (金沢大学大学院医学系研究科), 小西 史

朗 (三菱化学生命科学研究所), 斎藤 文仁 (三菱化学生命科学研究所), 佐竹 伸一郎 (三菱化学生命科学研究所), 池淵 穰 (北里大学大学院), つる我 英和 (北里大学大学院), 平野 丈夫 (京都大学大学院理学研究科), 加藤 明 (京都大学大学院理学研究科), 川口 真也 (京都大学大学院理学研究科), 玉巻 伸章 (京都大

学大学院医学研究科), 富岡 良平 (京都大学大学院医学研究科), 中村 公一 (京都大学大学院医学研究科), 青崎 敏彦 (東京都老人総合研究所), 三浦 正巳 (東京都老人総合研究所), 辛 龍文 (東京都老人総合研究所), 小松 由紀夫 (名古屋大学環境医学研究所), 福田 孝一 (九州大学大学院医学研究科), 兼松 隆 (九州大学大学院歯学研究院), 新貝 鋤蔵 (岩手大学工学部), 時田 義人 (愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所), 中西 圭子 (愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所), 七崎 之利 (日本医科大学), 中尾 和人 (東京大学大学院薬学系研究科), 笛田 由紀子 (産業医科大学産業保健学部), 久野 宗 (科学技術振興事業団・戦略的基礎研究推進事業), 永業 正美 (科学技術振興事業団・戦略的基礎研究推進事業), 井上 雅司 (東京薬科大学生命科学部), 村山 正宜 (東京薬科大学生命科学部), 榎木 亮介 (東京薬科大学大学院生命科学研究科), 橋本 容範 (東京薬科大学大学院生命科学研究科), 中村 健 (東京大学医科学研究所), 崎村 建司 (新潟大学脳研究所), 明石 馨 (新潟大学脳研究所), 深谷 昌弘 (北海道大学大学院医学研究科), 真鍋 俊也 (神戸大学大学院医学系研究科), 神谷 温之 (神戸大学大学院医学系研究科), 鈴木 紀光 (神戸大学大学院医学系研究科), 駒井 章治 (神戸大学大学院医学系研究科), 志牟田 美佐 (神戸大学大学院医学系研究科), 新里 和恵 (神戸

大学大学院医学系研究科), 篠江 徹 (神戸大学大学院医学系研究科), 梅田 和昌 (神戸大学大学院医学系研究科), 松井 稔 (東京大学医科学研究所), 城山 優治 (東京大学医科学研究所), 熊沢 紀子 (東京大学医科学研究所), 渡部 文子 (東京大学医科学研究所), 井ノ口 馨 (三菱化学生命科学研究所), 岡田 大助 (三菱化学生命科学研究所), 井上 直子 (三菱化学生命科学研究所), 上田 洋司 (三菱化学生命科学研究所), 高橋 正身 (三菱化学生命科学研究所), 深沢 有吾 (三菱化学生命科学研究所), 橋本 勲 (金沢工業大学人間情報システム研究所), 坂内 慎 (味の素株式会社), 檜井 栄一 (金沢大学薬学部), 藤森 さゆ美 (金沢大学薬学部), 竹森 章浩 (金沢大学薬学部), 竹之下 眞 (滋賀医科大学), 清家 正博 (高知医科大学), 宮田 麻理子 (東京女子医科大学), 清末 和之 (産業技術総合研究所関西センター), 新道 智視 (協和醗酵工業医薬総合研究所), 加藤 誠 (自衛隊岐阜病院), 窪田 芳之 (理化学研究所), 渡我部 昭哉 (基礎生物学研究所), 川口 泰雄 (生理学研究所), 根東 寛 (生理学研究所), 河西 春郎 (生理学研究所), 久木田 文夫 (生理学研究所), 粕山 俊彦 (生理学研究所), 馬杉 美和子 (生理学研究所), 春日井 雄 (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】

抑制性神経伝達では, (1) 抑制性神経伝達物質 (GABA) を合成し, シナプスヴェシクルへの貯蔵・放出する抑制性ニューロン, (2) 抑制性神経伝達物質受容体 (GABA レセプター) を発現し, 抑制性ニューロンとシナプスを形成するニューロンが中心的役割を果たしている。最近, 抑制性ニューロンの発生期における移動についての研究, 多種類ある抑制性神経伝達物質受容体の発生過程における特異的発現についての分子生物学的研究, 抑制性神経伝達物質合成酵素のノックアウトマウスを用いた生理学的研究等, 抑制性ニューロンと抑制性神経伝達についての研究が進展してきている。

本研究会では, 抑制性ニューロンと抑制性神経伝達についての研究者およびこれらの研究に興味を抱いている参加者が, 形態学 (発生を含む), 生理学, 薬理学, 分子生物学, 発生工学等, 分野の垣根を越えて一同に会して徹底的に討論することを目的として企画された。6 月

14 日と 15 日の 2 日間にわたり, 生理学研究所大会議室にて開催された。研究会には生理学研究所外から発表者を含めて 74 人の参加があり, 抑制性ニューロンに興味を持っている研究者が多いことを示唆した。

発表については, 『小脳皮質抑制性ニューロン』, 『扁桃体および線条体の抑制性ニューロン』, 『大脳皮質抑制性ニューロン』, 『抑制性ニューロンの分子基盤』の各テーマ毎に, 3 から 4 人の研究者が発表を行い, 討論した。一般に, 抑制性ニューロンは中枢神経系に散在し, 興奮性ニューロンに比較すると少数であることから, *in vivo* において正確に同定して機能を解析することが困難であった。それでも大脳皮質や小脳皮質は, その層構造から抑制性ニューロンの同定が他の領域に比較すると容易であり, 解析が進んでおり, 本研究会の主題となった。今後は, これらの領域における抑制性ニューロンの機能の解明をさらに進める一方で, 視床, 扁桃体, 脊髄等の

抑制性ニューロンの同定が困難な領域においても、抑制性ニューロンの役割を明らかにしていくことが重要と考えられた。抑制性ニューロンの分子基盤のテーマでは、抑制性神経伝達に関する GABA レセプターの役割と GABA レセプター情報伝達経路を担う分子について、発表、討論があった。未だ明らかになっていることが少ない分野なので、これらの分子を突破口として、さらに発展する可能性が大きい。GABA ニューロン特異的遺伝子

発現では、GABA ニューロンの同定が容易な遺伝子改変マウスについて論じられ、これらの遺伝子改変マウスは抑制性ニューロンの役割を明らかにする上で有力な資材となることが期待された。

最後に、抑制性ニューロンと抑制性神経伝達についての研究は近年増加しているが、興奮性神経伝達の研究に比較して少ないこともあり、本研究会を継続することにより、本研究の発展に寄与することを希望します。

(1) 小脳抑制性シナプス前終末からの GABA, glycine の共放出

鈴木紀光^{1,2}, 狩野方伸²

(¹ 神戸大学大学院医学系研究科細胞・神経生理学)

(² 金沢大学大学院医学系研究科シナプス発達・機能学)

小脳皮質ゴルジ細胞から unipolar brush cell の抑制性入力について検討する目的で、10-14 日齢のマウス小脳スライスの unipolar brush cell からホールセル記録を行い、抑制性シナプス後電流 (IPSC) を記録し、その生理、薬理的特性を調べた。その結果、刺激誘発性および自発性 IPSC に GABA_A 受容体媒介性の成分と同時に glycine 受容体媒介性の成分が存在することを確認した。またゴル

ジ細胞と unipolar brush cell の paired recording を行って検討した結果、ゴルジ細胞が unipolar brush cell に対し抑制性シナプスを形成し、シナプス前終末からの GABA と glycine を同時に放出していることが示唆された。さらに微小シナプス電流の解析の結果、一部のシナプス小胞は GABA, glycine を同時に含有していることを明らかにした。

(2) 小脳皮質 GABA シナプスの β -アドレナリン受容体を介した増強機構

齋藤文仁 (三菱化学生命科学研究所, CREST・JST)

ラット小脳プルキンエ細胞 (PC) に入力する GABA シナプスで、ノルアドレナリン (NA) は β -アドレナリン受容体を介して伝達効率を増強するので、この増強に関与する分子機構を明らかにすることを試みた。GABA 作動性介在ニューロンであるバスケット細胞 (BC) と PC から二重パッチクランプ記録を行い、NA および β アゴニストである isoproterenol (ISP) の前シナプス細胞 BC と GABA 伝達に対する効果を検討した。 β 受容体刺激は BC の自発的発火頻度を増やし、BC 発火に伴い PC から記録される自発的 IPSC の頻度を増加させた。さらに

adenylylcyclase 刺激薬 forskolin でも ISP と同様の効果が認められ、細胞内 cAMP 上昇が β -アドレナリン受容体を介した GABA シナプス増強に関与することが示唆された。次に、cAMP 上昇がどのような経路で BC 発火を増加するかを調べ、過分極活性化陽イオンチャネル (H チャネル) が cAMP で直接的に活性化され、その結果 BC が脱分極することが原因であることが示された。以上の結果から、NA は BC 上の β 受容体を介して、少なくとも 2 つの作用機構で GABA シナプスを増強することが示唆された。

(3) AMPA 受容体で仲介される小脳 GABA 伝達抑制とその機構

佐竹伸一郎（三菱化学生命科学研究所・分子神経生物，CREST・JST）

中枢シナプスの情報処理において，異なるシナプス入力間の相互作用が重要な役割を果たすと推定されている。小脳プルキンエ細胞に入力する登上線維由来の興奮性シナプスと籠細胞に由来する抑制性 GABA シナプスの間に見られる異シナプス間相互作用について検討を行った。登上線維に反復刺激を与えると，プルキンエ細胞から記

録される抑制性シナプス電流は刺激頻度と回数に依存して抑制された。さらに，量子解析および薬理学的実験から，この GABA シナプス抑制は登上線維から放出された興奮性伝達物質が籠細胞上の AMPA 型グルタミン酸受容体に作用し，シナプス前終末からの GABA 放出を減らすことによって引き起こされることが示唆された。

(4) プルキンエ細胞における抑制性シナプス可塑性の制御機構

平野丈夫，川口真也（京都大学理学研究科生物物理学教室）

小脳皮質プルキンエ細胞で起るシナプス可塑性として，抑制性介在ニューロン・プルキンエ細胞間のシナプスで見られる GABA 性シナプス伝達の脱分極による増強現象が知られている。この脱分極依存性増強について検討を行い，以下の結果を得た。

(1) プルキンエ細胞脱分極時にシナプス前ニューロンを刺激するか GABA を投与するとシナプス伝達および GABA 応答の増強が抑えられること，この可塑性調節は GABAB 受容体を介することを明らかにした。

(2) プルキンエ細胞の脱分極によって GABAA 応答の増強が引き起こされるが，脱分極時またはその直後（1 秒以内）にシナプス後部の GABAB 受容体を活性化すると，GABAA 応答の脱分極による増強は抑えられた。この GABAB 受容体の活性化による脱分極依存性増強の抑制には，A キナーゼ，カルシニューリン，DARPP32 分子，プロテインフォスファターゼ 1 などの分子が関与していることを明らかにした。

(5) タキキニンによる扁桃体 GABA シナプスの選択的促進

小西史朗（三菱化学生命科学研究所）

タキキニンはサブスタンス P (SP) およびニューロキニン A と B (NKA と NKB) からなる神経ペプチドのファミリーである。不安や恐怖などの情動反応に重要な扁桃体シナプスに対するタキキニンの作用を検討した。

幼若ラット脳の扁桃体基底外側部 (BLA) の主細胞からパッチクランプ法によって BLA 内の局所刺激で誘発される興奮性および抑制性後シナプス電流 (EPSC および IPSC) を記録した。SP および NK-3 受容体アゴニストの senktide は，GABA 作動性の自発的 IPSC の頻度を顕著に増加し，大部分の細胞で EPSC には影響を与えなかった。電気刺激で誘発される IPSC の振幅はタキキニンで

減少した。タキキニンは，微小 IPSC の頻度および振幅を有意に変えなかった。したがって SP および senktide は，GABA ニューロンを脱分極させスパイク発射を増すことにより自発的 GABA シナプス電流の頻度を増加させることが推測された。SP および senktide で誘発される IPSC の立ち上がり時間に明らかな差が認められる場合があり，両ペプチドの作用する GABA ニューロンは異なるシナプス部位によって扁桃体ニューロンに結合していることが示された。以上の結果は，扁桃体におけるタキキニン受容体で仲介される GABA シナプスが情動反応の神経機構に影響を与える可能性が推定される。

(6) GAD65 ノックアウトマウス扁桃体外側核局所回路における興奮性と可塑性の変化

兼子幸一, 季 鳳雲, 小幡邦彦 (生理学研究所神経化学部門)

GABA を合成するグルタミン酸脱炭酸酵素, GAD65 ノックアウトマウスでは, 空間学習, 運動などには粗大な障害を示さず, 恐怖条件付け学習などの情動行動での異常が認められる。情動機能には扁桃体を含む辺縁系が重要な役割を果たしていることから, スライスパッチクランプ法を用いて扁桃体外側核 (LA) 局所回路の興奮性と可塑性の調節におけるGAD65 の役割を調べた。GAD65 ノックアウトマウス(KO)の LA の主細胞で記録した自発性興奮性シナプス後電流(sEPSCs)の頻度は KO 群で有意

に高く, また低濃度の Bicuculline に対する感受性も高かった。さらに, 視床から扁桃体への入力線維束を電気刺激して主細胞に誘発した EPSCs はテタヌス刺激後に長期増強を示すが, 増強率は KO 群で有意に高かった。これらの結果から, GAD65 が神経活動亢進時の GABA 放出の維持に重要な機能を果たしていること, 放出された GABA が興奮性シナプス近傍での脱分極の程度を調節して興奮性と可塑性をコントロールしていることが考えられる。

(7) 線条体抑制性インターニューロンネットワークの機能

青崎敏彦, 三浦正巳, 鈴木健雄, 辛龍文 (東京都老人総合研究所自律神経部門)

線条体は脳基底核における情報処理の入力部に相当する核で, 大脳皮質および視床からグルタミン酸による興奮性入力を, 黒質緻密部からはドーパミン入力を受ける。一方, 線条体からの出力 RD 細胞と呼ばれる GABA 作動性ニューロンが司り, 線条体の 95%以上を占める。残りはインターニューロンで, 主として LA 細胞, FS 細胞, LTS 細胞からなる。線条体の局所回路の性質を調べるために, 247 ペアの同時パッチ記録を行った。その結

果, 明らかなシナプス応答が見られたものは, すべて FS 細胞をめぐる神経連絡のみで, 中でも FS 細胞から RD 細胞への抑制性 GABA 入力が 28 ペア中 14 ペア (50%) 観察された。一方, 皮質で見られる LTS 細胞間の electrical coupling は線条体では全く見られなかった。以上の結果は, 線条体神経回路の構築には FS 細胞が重要な役割を占めていることを示唆している。

(8) 大脳皮質白質層内の GABA 作動性神経細胞の分布と投射

富岡良平, 中村公一, 玉巻伸章 (京都大学大学院医学研究科)

胎児期脳発生過程において, サブプレート, 中間帯 (後の白質) の神経細胞が視床から大脳皮質への投射パターン形成や, 皮質間及び皮質下への投射形成に関与していることが指摘されている。これらの神経細胞は生後まもなくほとんどが死滅するが一部の神経細胞は成熟マウスにおいても残存する。この残存する神経細胞の成熟脳での役割を明らかにする目的で以下の実験を行ない, 結果を得た。1) 逆行性トレーサーである Fast Blue, cholera toxin B-subunit を大脳新皮質に微量注入した結果, 皮質の白質層にも標識された細胞が見つかった。2) 白質内に

おける GABA 作動性神経細胞とグルタミン酸作動性神経細胞の存在比を調べるために GAD67, BNPI (v-GluT1) の in situ hybridization を行った。GAD67 陽性細胞が約70%, BNPI 陽性細胞が30%であり, 白質内の神経細胞は GABA 作動性神経細胞が多数を占めていた。3) cholera toxin B-subunit を大脳新皮質に微量注入し, GAD67 の in situ hybridization と重ねると, 白質内に二重標識される細胞が存在した。これら結果から白質内の GABA 作動性神経細胞は遠く離れた大脳新皮質に軸索を伸ばし, 大脳新皮質の活動に重要な影響を与えられたと考えられた。

(9) 大脳皮質視覚野抑制性シナプスにおける長期増強の誘発・維持機構

小松由紀夫（名古屋大学環境医学研究所視覚神経科学）

ラット視覚野では、興奮性シナプスだけでなく抑制性シナプスにも長期増強と長期抑圧が起こることを、スライス標本を用いて我々は見出した。抑制性シナプスの長期増強は発達期に局限して起こるので、視覚反応可塑性の基礎過程と思われる。

視覚野抑制性シナプスの長期増強と興奮性シナプスの長期増強で以下の相違を観察した。(1) いずれの長期増強の誘発には高頻度刺激によるシナプス後細胞内 Ca^{2+} 濃度の一過性上昇が必要であるが、 Ca^{2+} 濃度上昇は、興奮性シナプスでは細胞外からの流入によるのに対して、抑制性シナプスでは IP_3 受容体を介する細胞内ストアーからの放出によっていた。さらに、抑制性シナプスの長期

増強の誘発には GABA_B 受容体と、PLC を介して IP_3 生成を引き起こすアドレナリン性 α_1 とセロトニン 5-HT_2 受容体の活性化が必要であることを明らかにした。(2) 増強がいったん発生した後は、それを維持するために神経活動により細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させる必要はないと、興奮性シナプス長期増強を含めて一般的に考えられてきたが、視覚野抑制性シナプスの長期増強では、高頻度刺激により誘発した後も、シナプス前細胞の低頻度活動とそれに伴う Ca^{2+} 濃度上昇が維持に必要であることが GABA 受容体と Ca^{2+} チャンネルのブロッカーを用いた実験より明らかにした。

(10) Gap junction を介して大脳皮質 GABA ニューロンが形成する樹状突起ネットワーク

福田孝一（九州大学大学院医学研究院神経形態学）

gap junction は細胞間の特殊な情報伝達部位であり、哺乳類の脳においても特定の神経細胞間に gap junction が存在することが、電子顕微鏡により示されている。しかしながらこれらの神経細胞間 gap junction が生体の中で実際に果たす機能的役割については、不明な点が多かった。そこで、私たちは海馬における gap junction について検討した結果、GABA ニューロンの中で parvalbumin (PV) を含有するグループが、相互の樹状突起間に多数の接触部位を形成し、電子顕微鏡的にそこに gap junction が存在することが観察された。PV ニューロンの樹状突起

は、gap junction をなかだちとする他の PV ニューロンの樹状突起との結合が確認され、樹状突起ネットワークともいべき構造を形成していることを見いだした。さらに、PV ニューロンはお互いの細胞体近傍に GABA シナプス終末を密に形成することも明らかにした。以上の結果から、海馬 PV ニューロンは、(1) 軸索細胞体間の化学シナプスによる相互結合、(2) 樹状突起間の gap junction による相互結合、に由来する二重のネットワークを形成していると考えられた。

(11) 大脳皮質同期活動における GABA 細胞の発火様式

川口泰雄（生理学研究所大脳神経回路論研究部門）

大脳皮質の GABA 作働性介在ニューロンを調べた結果、生理的・形態的・化学的性質の異なるいくつかのグループに分けられ、皮質の中に複数の GABA 作働性システムが組み込まれていることが考えられる。皮質 GABA 細胞は、細胞内通電に対する発火様式が多様であることが知られているが、皮質が同期的な活動をしている時に

どのようにスパイクを出すかは殆ど調べられていない。脳切片標本では自発的な活動は弱いので、外液のマグネシウム濃度を下げ NMDA 受容体を活性化させて強い発作的活動をおこし、その時の非錐体細胞の発火様式を調べ、サブタイプごとに比較した。その結果、皮質に引き起こされた特定の周期的活動時に非錐体細胞のそれぞれ

のサブタイプでは異なる発火様式を示した。以上の結果から、GABA ニューロンのサブタイプがそれぞれ固有の

生理的性質・シナプス結合パターンを使って、皮質の同期的活動の調節に関わると考えられる。

(12) GABA シグナリングに関わる新しい分子

兼松 隆, 平田雅人 (九州大学大学院歯学研究院口腔細胞工学)

我々が精製・遺伝子クローニングした PRIP1 (新規 Ins (1,4,5) P_3 結合蛋白質) は, PLC- $\delta 1$ 類似蛋白質であるが, この分子は PLC 酵素活性を持たない。Yeast two-hybrid screening した結果, PRIP1 と GABARAP (GABA_A receptor gamma-2 subunit associated protein) とが結合することを観察した。GABARAP は PRIP1 の EF-hand 領域に結合し, その結合は GABARAP の GABA_A receptor gamma-2 subunit に対する結合を阻害した。この結果に基づき, PRIP1 のノックアウト (KO) マウスを作製し, GABA_A 受容体情報伝達経路に及ぼす影響を調べた。マウスの海馬細胞を用い whole-cell patch 記録法で GABA 誘発性 Cl⁻電

流の Zn²⁺による効果を調べた結果, KO マウスでは, Zn²⁺による Cl⁻電流の抑制効果が減弱化した。そこで, gamma サブユニットに作用点をもつベンゾジアゼピン系薬剤の影響を調べた。KO マウスの海馬細胞にジバゼパムを作用させたところ GABA 誘発性 Cl⁻電流の増強効果が抑えられた。さらに, 抗不安効果を評価するプラス迷路を用いた KO マウス行動解析実験においてもジバゼパム作用効果が減弱していた。これらの結果は, PRIP1 KO マウスでは GABA_A 受容体の gamma サブユニットを介した情報伝達経路が正常に機能しない事を示唆している。

(13) GABA 受容体 ρ サブユニットの局在と機能的発現

新貝 鉦蔵 (岩手大学工学部福祉システム工学科)

GABA 受容体 ρ サブユニットは GABA, muscimol に応答し, GABA 応答が picrotoxin や zinc イオンにより強く抑制されるなどの GABA 受容体の基本的性質を有するが, 一方, GABA_A受容体の多くの薬理学特徴と異なる特徴 (例えば bicuculline, pentobarbital, neurosteroids に対する感受性が低い) を持っている。これらの事から ρ サブユニットは薬理学的に分類されたいわゆる GABA_C受容体の分子の実体とみなされている。我々はラット神経組織から $\rho 1$, $\rho 2$, $\rho 3$ サブユニット cDNA をクローニングし, これら受容体の生理学的性質や神経系での局在を研究した。 $\rho 3$ サブユニットは全生物を通して最初のクローニングであった。 $\rho 1$, $\rho 3$ サブユニットは, それぞれが機

能的な homomeric receptors を形成した。各サブユニットの発現を RT-PCR 法で検討した結果, $\rho 1$ サブユニットは脳に発現しておらず (網膜には発現), $\rho 2$ サブユニットは中脳, 大脳, 海馬に, $\rho 3$ サブユニットは小脳, 中脳, 海馬, 視床, 基底核で発現することを明らかにした。また, 胎児 (16 日齢), 生後 8 日齢, 成熟ラットの脳を比較すると, $\rho 2$ サブユニットは胎児時から生後にかけて, 発現量が大幅に増えるが, $\rho 3$ サブユニットは発生が進むに従い発現量が低下した。以上の結果は, 海馬 C3 領域で報告されている GABA_C 様の応答を担う受容体の実体の解明等, GABA_C受容体の機能を明らかにする上で有用な情報となる。

(14) GABA ニューロン特異的遺伝子発現調節機構

柳川右千夫（生理学研究所神経化学部門）

(1) GABA ニューロン特異的発現調節機序を解明すること, (2) GABA ニューロンを標識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ことを目的として, mGAD67 遺伝子に相同組み換えを利用した遺伝子標的法を用いて発光オワンクラゲ由来の緑色蛍光蛋白, Green fluorescent protein (GFP) 遺伝子をノックインしたマウス (GAD67 遺伝子 GFP ノックインマウス) の作成を試みている。この遺伝子改変マウスの利用により, GABA ニューロンの電気生理学的解析や発生過程の解析が進捗することが期待される。

4. 視知覚のメカニズムー生理, 心理物理, 計算論的アプローチ

2001年6月14日ー6月15日

代表: 内川恵二 (東京工業大学)

世話人: 小松英彦 (生理学研究所)

- (1) 突然現われた視覚物体の位置判断の時間特性

村上郁也 (NTT コミュニケーション科学基礎研究所)

- (2) Attention modulation through peak and base rate of tuning curve

中原裕之, 甘利 俊一 (理化学研究所脳科学総合研究センター)

- (3) 視覚系の感度変化と色恒常性について

栗木一郎 (NTT コミュニケーション科学基礎研究所)

- (4) マカクザル側頭葉視覚系における下部側頭葉後方部 (TEO 野) の役割

柳沼重弥 (東京都神経科学総合研究所)

- (5) 側頭葉視覚連合野 TE 野における複雑な物体像の分散的表現

谷藤 学, 山根ゆか子, 角田 和繁 (理化学研究所脳科学総合研究センター)

- (6) ファントム錯視と視覚的補完

行場次朗 (東北大学文学部)

- (7) 両眼視のメカニズム: 他の機能との統合について

大澤五住 (大阪大学基礎工学研究科)

- (8) 奥行次元での線運動と視覚情報処理促進の空間異方性

一川誠 (山口大学工学部)

- (9) 霊長類下部側頭葉における記憶想起信号の逆行性伝達

納家 勇治 (生理学研究所)

- (10) 複数神経細胞活動による視覚情報の表現; プーリングの可能性について

田村 弘 (大阪大学基礎工学研究科)

- (11) 「目が合う」という感覚の謎

佐藤隆夫 (東京大学人文社会系研究科)

- (12) 運動視覚情報処理の上位中枢としての上側頭溝前部

三上章允, 海野俊平, 田仲祐介 (京都大学霊長類研究所)

- (13) 3次元動体の運動予測と視覚学習

安藤 広志 (国際電気通信基礎技術研究所/JST PRESTO)

- (14) Visual flow 認知の心理と生理

斎藤秀昭, 樋田栄揮 (玉川大学工学部)

- (15) 視覚-運動変換装置としての身体図式

積山 薫 (はこだて未来大学システム情報科学部)

- (16) 行為のための視覚情報処理 - 把持運動の制御から認知地図の形成まで -

近江政雄 (金沢工業大学人間情報システム研究所)

【参加者名】

内川恵二 (東京工業大学大学院 理工学研究科), 三上章允 (京都大学霊長類研究所), 村上郁也 (NTT コミュニケーション

科学基礎研究所), 中原裕之 (理化学研究所 脳科学総合研究センター), 栗木一郎 (NTT コミュニケーション科学基礎研究所),

柳沼重弥（東京都神経科学総合研究所）、谷藤 学（理化学研究所 脳科学総合研究センター）、山根ゆか子（理化学研究所 脳科学総合研究センター）、行場次朗（東北大学 文学部）、大澤五住（大阪大学大学院 基礎工学研究科）、一川 誠（山口大学 工学部）、納家勇治（生理研）、田村 弘（大阪大学大学院 基礎工学研究科）、佐藤隆夫（東京大学大学院 人文社会系研究科）、海野俊平（京都大学霊長類研究所）、田中祐介（生理研）、安藤広志（国際電気通信基礎技術研究所）、斎藤秀昭（玉川大学 工学部 情報通信工学科）、積山 薫（公立はこだて未来大学 システム情報科学部）、近江政雄（金沢工業大学人間情報システム研究所）、酒井 宏（筑波大学 電子・情報工学系）、本田仁視（新潟大学 人文学部）、中内茂樹（豊橋技術科学大学 情報工学系）、西田佐希子（九州大学大学院 人間環境学府）、三橋徹（凸版印刷㈱ メディア表現センター アーカイブラボ）、江森康弘（東京工業大学大学院）、羽左間 歩（東京工業大学大学院）、河合敬彰（東京工業大学大学院）、松隈美佳（東京工業大学大学院）、敦森洋和（東京工業大学大学院）、木暮雅樹（東京工業大学大学院）、豊岡隆史（東京工業大学大学院）、柳澤美衣子（東京工業大学大学院）、水科晴樹（東京工業大学大学院）、横井健司（東京工業大学大学院）、打田武俊（東京工業大学大学院）、坂野雄一（東京

工業大学大学院）、澤田忠正（東京工業大学大学院）、金子寛彦（東京工業大学大学院）、渡辺 功（東京工業大学大学院）、藤田昌彦（法政大学 工学部）、川崎敬一、本間良太（理化学研究所 脳科学総合センター）、鶴飼一彦（日本福祉大学）、井口尚彦（電通大）、岡田真人（理化学研究所）、宮脇陽一（理化学研究所）、深谷直樹（㈱デンソー）、脇 大悟（㈱メニコン）、永井聖剛（京都大学）、今村真理子（九州大学）、田辺裕梨（名古屋大学）、安澤 光（東京工業大学大学院）、加納克則（豊橋技術科学大学）、永田憲（豊橋技術科学大学）、大西英一（豊橋技術科学大学）、長澤宏治（豊橋技術科学大学）、加藤典之（東京工業大学大学院）、小濱 剛（愛知県立大学）、北舘 祐（筑波大学）、王 津生（横浜市大）、高橋伸子（中京大学）、福田一帆（東京工業大学大学院）、李 承培（千葉大学）、洲崎朝樹（㈱メニコン 臨床研究所）、山本 健（千葉大学大学院 自然科学研究科）、吉田正俊（生理研）、王 麗紅（生理研）、柿木隆介（生理研）、三木研作（生理研）、渡辺昌子（生理研）、久保田哲夫（生理研）、竹田真己（生理研）、坂田秀三（基生研）、小松英彦（生理研）、伊藤 南（生理研）、花澤明俊（生理研）、小川 正（生理研）、鯉田孝和（生理研）、杉原弘記（生理研）、谷 利樹（生理研）、松本正幸（生理研）、横井 功（生理研）

【概要】

本研究会は視覚のメカニズムの解明をめざした生理学、心理物理学、計算論の各分野の研究者が一堂に集まり、最新の情報交換をはかり、討論を通して互いに刺激し合う目的で開催された2日間の研究集会である。いうまでもなく視覚のメカニズムを生理学はミクロな構造から、心理物理学はマクロな特性から、また計算論は両者を結びつける具体的なアルゴリズムからそれぞれ解明する研究であり、方法は異なってもその目的は同一である。各分野は現在ではそれぞれ高度に発達したが、分野間の情報交換はまだ十分とは言えない。これは研究者が望んでいてもそのような機会が少ないためであり、そこに本研究会の開催意義がある。本研究会では、生理学からは8名、心理物理学からは7名、計算論からは1名の計16名の研究者がそれぞれの分野の研究成果を発表した。講演は、まず心理物理学から運動物体が短時間呈示の静止物体よりも進んで知覚されるという、いわゆるフラッシュラグ効果の最新の実験結果とそのいくつかの可能な解釈が報告された。デモンストレーションを随時交えて発表であったので、大変分かりやすい講演であった。そ

の他、心理物理学では色恒常性メカニズム、錯視と視覚的補完、注意と奥行き運動、顔の認識、視覚と行為知覚についての講演があった。どの講演も最新研究結果であり、また心理物理特性を視覚のメカニズムから説明するという立場が明確であったため、生理学の分野の研究者にとっても大変興味ある内容であった。生理学では注意の生理メカニズム、図形認識、特にサルTE野の特性を破壊実験、光計測などの方法で調べる研究、また両眼視、記憶、プーリング、運動視に関する生理実験結果が報告された。生理学研究のスピードは速く、このような講演で生理学研究の最新のテクニックやホットな領域が示されたことから、心理物理研究者も多いに刺激を受けた。さらに計算論では3次元の運動物体予測が適応的なメカニズムでなされているという興味深い報告があった。会場での討論は極めて活発に行われ、またインフォーマルな機会での会話も有意義であった。参加者には大学院生も多く見られ、このような研究会を通して広い視野を持つ研究者が育っていくことが期待できる。

(1) 突然現われた視覚物体の位置判断の時間特性

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)

運動する物体の近傍にフラッシュ刺激を与えると、フラッシュが運動物体に対して後ろにずれて知覚される。このフラッシュ・ラグ効果の説明モデルとして、運動の外挿、位置の平均化、相対潜時などが提案されてきたが、未だ議論の決着を見ていない。最も妥当なモデルを発見するために、本研究では新しい刺激布置を用いた。連続運動ではなく、左右方向にランダムに位置を変える棒を運動刺激として用い、その近傍に突然呈示したフラッ

シュが運動刺激に対して左右どちらに見えるか、二肢選択課題を行った。その結果生じるフラッシュ・ラグの量を、運動刺激を中心に据えた時空間の相関図として視覚化した。上記三例のモデルはどれも、実際に得られた錯視量を十全に説明できなかった。しかし、潜時モデルを拡張して、運動とフラッシュとの間の潜時の差分が定数でなく正規分布状にばらつくと仮定すれば、結果をうまく説明できることがわかった。

(2) Attention modulation through peak and base rate of tuning curve

中原 裕之, 甘利 俊一 (理化学研究所脳科学総合研究センター)

The present study investigates the influence of attention modulation on neural tuning functions. It has been shown in experiments that attention modulation alters neural tuning curves. Attention has been considered, at least, to serve to resolve limiting capacities and to increase the sensitivity to attended stimulus, while the exact functions of attention are still under debate. Inspired by recent experimental results on attention modulation, the present study investigates the influence of changes in the height and base rate of the tuning curve on the encoding accuracy, using the Fisher information.

We derive explicit conditions which determine when the height and base rate should be increased or decreased to improve the encoding accuracy. Notably, a decrease in the tuning height and base rate can improve the encoding accuracy in some cases. Our theoretical results can predict the effective size of attention modulation on the neural population with respect to the encoding accuracy. We discuss how our method can be used to quantitatively evaluate different aspects of attention function.

(3) 視覚系の感度変化と色恒常性について

栗木一郎 (NTT コミュニケーション科学基礎研究所)

色恒常性とは、照明光の分光特性の変化に関わらず物体表面から安定した色を知覚する視覚系の機能である。色恒常性の主要な成立要因の一つとして、視覚系の感度変化（色順応）が挙げられる。色恒常性メカニズムにおける視覚系の感度変化の寄与を明らかにするため、異種照明下での色票の色の見えを合わせる非対称等色実験の結果と、心理物理学的手法を用いて測定した環境照明光

の変化に対する視覚感度変化の結果とを比較した。さらに、感度変化の発生部位の特定を試みる実験を行い、相対錐体荷重という尺度を導入して結果を評価したところ、感度変化は錐体受容器以降の神経回路で行われていることが示唆される結果を得た。これらの実験結果やその他の知見を元に、色恒常性成立のための神経機構について心理物理学の視点から考察する。

(4) マカクザル側頭葉視覚系における下部側頭葉後方部（TEO 野）の役割

柳沼重弥（東京都神経科学総合研究所 認知行動研究部門）

従来、TEO 野は、破壊実験の結果から、2 次元形態知覚に不可欠であり、視覚性記憶には重要な領域ではないとされてきた。しかし、TEO 野の範囲が電気生理学的に詳細に検討され、従来の TEO 野破壊域との大幅なずれがわかった。我々は新 TEO 野の破壊効果を調べ、その障害パターンが従来型 TEO 野破壊によるものとは大きく異なることを明らかにしてきた。即ち、1) 新 TEO 野破壊による図形弁別課題の障害は従来型 TEO 野破壊による障害に比べ軽微であり、逆に、2) 視覚性認知、連合記憶

課題では、新 TEO 野摘除により従来型 TEO 野摘除よりも重篤な障害が生じた。従来型 TEO 野摘除域と新 TEO 野の共通領域である下部側頭葉脳回部分破壊ではいずれの課題でも障害は極めて軽微であるか、全く見られなかった。これらの知見は、下部側頭葉後方部は形態知覚、視覚性記憶双方に重要であるが、背側部は特に前者に、腹側部は後者により密接に関与するという、背、腹側部の機能解離を示唆している。

(5) 側頭葉視覚連合野 TE 野における複雑な物体像の分散的表現

谷藤 学，山根ゆか子，角田 和繁（理化学研究所脳科学総合研究センター）

外界の物体像の知覚認識機構の解明のために、マカク属サル側頭葉視覚連合野 TE における物体像の表現を内因性信号のイメージング法によって研究した。脳表面の 6x8mm の領域を露出し、様々な視覚刺激を提示したときの活動領域を脳表面の光の吸収変化（内因性信号）としてイメージングする。次に、光計測によって見出された活動領域から細胞外記録を行い、個々の細胞の最適刺激を決定した。視覚刺激には複雑な物体像とこれを単純化したものを用いた。

複雑な物体像は複数のスポット（カラム）の活動を引き起こした。物体像の単純化によってこれらのスポット

の一部が消失することから、個々のスポットは複雑な物体像に含まれる図形特徴を表現していると考えられた。物体像の単純化によって新たに出現するスポットも観測された。細胞外記録からこれらのスポットもまた物体像に含まれる図形特徴を表現しているが、他の図形特徴が組み合わせられると抑制される性質があることが示された。これらの結果は、物体像が活性化された図形特徴カラムの組み合わせとして表現されるばかりでなく、活性化されない図形特徴カラムの存在も物体像を特定するための情報として用いられていることを示唆している。

(6) ファントム錯視と視覚的補完 Phantom illusion and visual completion

行場次朗（東北大学文学部）

ファントム錯視は、中央部分を帯状に遮蔽された縞模様を観察すると、縞が帯の前面につながって知覚される現象であり、遮蔽部分が実際に知覚される感性的補完と、遮蔽部分が見えないのに存在が知覚される非感性的補完の両面を検討することができるユニークな特性を備えている。ところが、ファントム錯視は、明るさ対比効果の一種である縞誘導効果の副産物である可能性が指摘され、

補完現象としての妥当性が議論されてきた。しかし、われわれの一連の研究により、ファントムが誘導刺激のグローバル形状に対する高い忠実度をもって生起すること、低コントラストの誘導縞や細い誘導縞では実際に同相の明るさをもつファントムが知覚されること、キャリア縞にコントラスト変調を施した 2 次誘導縞を用いてもファントムが生起することなどが見出された。ファントム

は、1次(輝度)情報だけではなく、テクスチャなどの2次情報やグローバル形状の情報などを利用して面を形成

するプロセスの産物としてとらえられる可能性が高い。

(7) 両眼視のメカニズム：他の機能との統合について

大澤五住 (大阪大学基礎工学研究科)

一次視覚野の複雑型細胞はなだらかに感度に変化する空間受容野を持ち、個々の刺激の位置には選択性が低いが、両眼刺激における視差については急峻な選択性を持つものが多い。近年の研究により、視差エネルギーモデルがネコ、サル、フクロウにおける複雑型細胞の両眼反応特性を、バー刺激、さらにダイナミック・ランダムドット刺激についてもよく説明することが示されている。しかし、以前から複雑型細胞は運動視についても大きな役

割を果たしていることが示唆されており、MT野にも直接入力を与えていることが知られている。本研究では、個々の複雑型細胞が両眼視と運動視の両機能についてどのように情報を統合し、表現しているかを検討した。複雑型細胞の両眼視差と運動速度選択性の間には、密接な関係があり、情報表現としては独立していない。このような、混合された情報表現が持つ意味と知覚への効果について述べる。

(8) 奥行次元での線運動と視覚情報処理促進の空間異方性

一川誠 (山口大学工学部)

線分刺激の提示直前に線分のどちらか一方の端点近くに先行刺激を提示した場合、線分は先行刺激側の端点から描かれたように知覚される。この現象は線運動(Line-motion)と呼ばれ、先行刺激提示の引き起こす視覚情報処理の促進によって生じると考えられている。本研究では、先行刺激提示による視覚情報処理促進の程度が奥行次元上の位置によってどのように異なるのか検討することを目的とした。実験1,2においては、先行刺激の視差量が奥行次元での線運動の方向にどのように影響す

るか検討した。実験3においては、線分の両端にあたる位置に異なるタイミングで点刺激を提示し、先行刺激に近い端点位置の刺激がもう一方の端点位置の刺激と同時に提示されると知覚されるSOAを調べた。3つの実験の結果は、より大きな視差量の先行刺激ほど奥行次元での線運動の方向を決定し易いこと、視覚系が注視位置よりも近い奥行位置の変化に対してより迅速に情報処理を行うことを示唆した。

(9) 霊長類下部側頭葉における記憶想起信号の逆行性伝達

納家勇治 (生理学研究所 高次液性調節部門)

陳述記憶の記銘と想起は新皮質と大脳辺縁系、さらにこれらの間の相互作用に依存する。視覚長期記憶の貯蔵庫と考えられる下部側頭葉は、TE野と傍嗅皮質という細胞構築学的に異なる2つの領域から構成されている。これらのうち視覚腹側路の最終段階であるTE野は、辺縁系の一部である傍嗅野に物体に関する視覚情報を供給する。一方、傍嗅皮質からTE野への逆行性投射の働きに

ついては、これまであまり研究されてこなかった。我々はこの逆行性神経投射の働きを調べるため、視覚性対連合記憶課題遂行中のマカクザルにおいて、傍嗅皮質とTE野で記憶に関係する信号のタイムコースを調べた。その結果、TE野ニューロンは記憶想起信号が傍嗅皮質に現れた後に、要求される選択刺激を次第にコードし始めた。この知見より、傍嗅皮質からTE野への逆行性投射が長

期記憶から想起によって取り出される視覚オブジェクトが示唆される。
を表現するよう、TE 野ニューロンを活性化していること

(10) 複数神経細胞活動による視覚情報の表現；プーリングの可能性について

田村弘（大阪大学基礎工学研究科）

同一の視覚刺激に対する神経細胞の応答は試行ごとに変動する（ノイズ）。コラム構造に代表されるように、ある刺激に反応する細胞は隣接した場所に複数存在する。よって、このような変動は隣接した複数神経細胞の活動の平均をとること（プーリング）で解消できるかもしれない。そこで、下側頭葉皮質の隣接した複数の神経細胞（最大 12 個）から複雑な視覚刺激に対する活動を同時に記録した。隣接細胞のノイズは独立であり、プーリング

によりノイズは減少した。ノイズの減少は、呈示された刺激の神経活動によるデコードを容易にするので、情報量は増加するはずである。しかしながら、反応の変動の減少は視覚刺激の情報量の増加を伴わなかった。隣接細胞の刺激選択性のわずかな違いが、情報量の減少を引き起こした。この結果は、隣接した複数神経細胞の活動の平均をとることが、情報量の観点からは有効ではないことを示唆している。

(11) 「目が合う」という感覚の謎

佐藤隆夫（東京大学人文社会系研究科）

視線、もしくは「目が合った」という感覚は我々のコミュニケーションにおいて重要なファクターである。にもかかわらず、視線知覚に関する実験的な検討の例はほとんど無い。ここでは、我々が、視線知覚のもとになる情報を特定するために行っている研究の概要を紹介する。実物大の写真を様々な距離から提示して実験を行った結果、視線知覚の精度は観察距離に関わらず、視角で表したときにはほぼ一定になることが明らかになった。さら

に、低域濾過画像を用いて検討した結果、画像のボケは視線知覚の精度に対して、ほとんど効果を持たないことも明らかになった。こうした結果は、視線方向の知覚が黒目のエッジなどの高空間周波数にもとづく詳細な情報ではなく、低空間周波数の大局的な情報に依存すること、また、絶対的な位置や空間周波数ではなく、顔の幅や眼の幅に対する相対的な位置、もしくは相対的な空間周波数に依存したものであることを示している。

(12) 運動視情報処理の上位中枢としての上側頭溝前部

三上章允，海野俊平，田仲祐介（京都大学霊長類研究所・行動発現分野）

視覚情報処理は、空間視覚の処理を扱う背側系と、形態視覚の処理を扱う腹側系に分かれるとする見解が一般に受け入れられている。しかし、形態の知覚にも空間視の手がかりが使われ、あるいは空間の理解にも形態視の手がかりが使われる場面がある。

また、1 つの事象の認識や外界への働きかけには分離された情報の統合が必要である。このような視点から、空間視情報である運動視情報と形態視情報の統合過程を

2 つのパラダイムを用いて検討した。その結果、上側頭溝の前部（いわゆる多種感覚野）の細胞が比較的単純な形態に選択的に反応し、かつ、その回転運動に方向選択的に反応することが明らかになった。また、動きの手がかりによって形を識別する Shape from Motion の条件でも 70%以上の細胞が形態選択性を示した。これらのデータは運動視覚の情報がこの領域にもたらされていることを示唆している。

(13) 3 次元動体の運動予測と視覚学習

安藤 広志 (国際電気通信基礎技術研究所/JST PRESTO)

動的な環境下でさまざまな行動課題を迅速に達成するためには、現在の視覚環境を推定するだけでなく、将来の視覚環境を予測して、フィードフォワード的な運動制御を行なう必要があると考えられる。本研究では、特に運動する物体（動体）の視覚予測に関する計算論的な問題を議論するとともに、動体予測の精度を測定した心理物理実験について報告する。この実験では、両眼立体視提示装置を用いて球状物体を CG で生成し、3 次元仮想空間内で遠方より被験者に向けて投射された物体の最

終到達位置を視覚予測させる課題を行なわせた。実験の結果、動体が終点に到達する以前に、被験者は終点の空間位置を一撃的に予測し、その予測精度と確信度は純粋な視覚訓練により向上することが示された。また、学習の汎化特性に関しては、静的な 3 次元物体の学習と類似して、運動方向（視点）依存性を持つことが示唆された。以上の結果は、より適応的な機構に基づいて動体予測が行なわれていることを示している。

(14) Visual flow 認知の心理と生理

斎藤秀昭, 樋田栄揮 (玉川大学工学部情報通信工学科)

二つの方向の異なる visual flow が重畳されている刺激を 1 分間ほど注視した後、静止パターンに対して観察される運動残効を調べた。与えられた二つの flow は二つの異なる flow として認知されたが、残効は運動のベクトル加算で与えられる運動方向と逆向きの一方の運動として認知された。この現象は MST 野細胞の順応に伴う自发放電の方向分布で説明がつくと考えられるので、その点を確認するための実験を考案した。すなわち、単一の MST 野細胞に対して、方向差を同一に保ちながら 2 方向重畳運動刺激の運動方向を回転させ、細胞の反応強度をプロットすると、2 方向運動のベクトル加算方向が、

単一運動刺激に対してその細胞が最大反応を示す方向と一致したときに最大の反応を示した。すなわち、2 方向重畳刺激を長時間与えると、そのベクトル加算方向を最適方向とする細胞が最も強く反応し、刺激停止後の自发放火頻度を下げるのに対し、それと逆方向を最適方向とする細胞は、その 2 方向刺激に対してはほとんど反応しないため、刺激停止後の自发放火頻度は MST 野にある同種の方法選択性細胞の中で最大となり、その結果、2 方向重畳刺激のベクトル加算方向とは逆方向の運動が残効として認知されるものと解釈される。

(15) 視覚-運動変換装置としての身体図式

積山 薫 (公立はこだて未来大学システム情報科学部)

空間視では、視覚情報を自己身体情報に参照することが必要と考えられる。これを実現する視覚-運動変換装置として、私は視覚情報と触運動情報との対応関係の記憶貯蔵である「身体図式」を考えている。これは、正常に作動している時にはほとんど意識にのぼらないが、通常の視覚-運動協応を無効にした視野変換事態では明瞭に意識される。このことに着目して、長期の視野変換事態

で身体図式の変化とその働きについて調べた。4 人の被験者に左右反転めがねを 35 日間ないし 39 日間連続着用してもらい、その間のボディ・イメージと視覚対象の空間定位の変化を調べ、その関係を検討した。その結果、定位課題でみた空間知覚の順応と、逆さめがね着用後の見えに対応した新しいボディ・イメージが形成される過程は、どちらも 4 週間目に大きな変化がみられ、時間的

に同期していた。このことは、空間視と身体図式との密接な関係を示唆する。また、ファンクショナル MRI を用いた脳内計測では、新しいボディ・イメージに特有の

活動は、頭頂間溝、ブローカ野、前頭前野にみられた。頭頂間溝とブローカ野の関与は、ボディ・イメージ想起中に視覚-運動変換の処理が生じていることを示唆する。

(16) 行為のための視覚情報処理- 把持運動の制御から認知地図の形成まで-

近江政雄（金沢工業大学人間情報システム研究所）

物体を知覚するための腹側視覚路における情報処理過程に対して、行為を制御するための背側視覚路における情報処理過程の独立性と重要性を指摘した Milner と Goodale のモデルにおける行為とは、われわれが物体を操作するために、物体に到達し、把持するという行為であった。かれらのモデルは、その後、三次元環境におけるわれわれの行為であるところの自己定位やナビゲー

ションのための視覚情報処理過程を含む、Previc のより一般的なモデルへと発展している。これらのそれぞれの行為のための情報処理過程において、それぞれに異なったレベルの視覚情報が関与していることを、把持運動の制御における色情報の役割と、三次元環境の認知地図の形成における自己運動感覚情報の役割についての心理物理学の実験結果を紹介しながら議論する。

5. イオンチャネル・トランスポーター異常による神経疾患の成因と病態に関する研究

2001年7月2日-7月3日

代表・世話人：倉智 嘉久（大阪大学大学院医学系研究科）

所内対応者：井本 敬二（液性情報）

(1) SCA6変異のP型Caチャネル機能におよぼす影響の解析

田邊 勉（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科）

(2) SCA6における神経細胞死メカニズム- α 1A-Caチャネル遺伝子変異と特異的封入体-

水澤英洋, 石川欽也, 融 衆太, 大和田潔, 常深泰司, 李明順, 久保寺隆行,
三枝弘尚, 田邊勉（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科）

(3) 電位依存性カルシウムチャネル α 1Sの中樞神経系における発現の検討

高橋祐二, 鄭 善容, 尾方克久, 鄭 相民, 橋田秀司, 後藤 順, 金澤一郎
（東京大神経内科）, 井佐原京子, 内山安男（大阪大機能形態学）

(4) IP3受容体異常の小脳プルキンエ細胞におけるカルシウム動態

井上 貴文（東京大学医科学研究所）

(5) グルタミン酸受容体チャネルノックアウトマウス

森 寿（東京大学大学院医学系研究科）

(6) グルタミン酸トランスポーターの関与する神経疾患

田中光一¹, 松上稔子¹, 白馬伸洋², 三谷章³
（¹東京医科歯科大学・難治疾患研究所・分子神経科学, ²愛媛大学・医学部・耳鼻咽喉科,
³京都大学・医療技術短期大学部・総合教育）

(7) 中性アミノ酸トランスポーターの神経系における発現と病態との関わり

金井 好克（杏林大学医学部薬理）

(8) 血液脳関門, 血液脳脊髄液関門における排出輸送系の解析

鈴木洋史（東京大学大学院薬学系研究科）

(9) 骨格筋疾患におけるイオンチャネル異常

高橋 正紀, 木村 卓, 佐古田 三郎（大阪大学大学院医学系研究科）

(10) Reactive oxygen species-mediated activation of TRP related channels.

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）

(11) 内向き整流性K⁺チャネルのAndersen病における変異部位G300近傍のE299は

内向き整流性の決定に寄与する。

久保義弘, 村田喜理, 藤原祐一郎（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科）

(12) G蛋白質制御内向き整流性カリウムチャネルKir3.2のweaver変異を有する膵臓alpha細胞の

電気生理学的解析

稲毛田 清, 倉智 嘉久（大阪大学大学院 医学系研究科）

(13) 抗Kチャネル自己抗体とIsaacs症候群

亀山正樹, 園田至人, 黒野明日嗣, 長堂竜維, 林茂昭, 亀山亜砂子,
有村公良, 納光弘（鹿児島大学 医学部）

【参加者名】

倉智 嘉久 (大阪大学大学院医学系研究科), 水澤 英洋, 田邊 勉, 久保 義弘, 藤原 祐一郎 (東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科) 田中 光一, 岡田 隆, 伊東 三穂 (東京医科歯科大学難治疾患研究所), 鈴木 洋史 (東京大学薬学系研究科) 森 寿, 後藤 順, 高橋 祐二 (東京大学大学院医学系研究科) 井上貴文 (東京大学医科学研究所), 金井好克 (杏林大学医学部), 稲野辺

厚, 石井 優, 稲毛田清, 高橋正紀, 木村 卓 (大阪大学大学院医学系研究科), 亀山正樹, 有村公良 (鹿児島大学医学部), 森 泰生, 山田久信, 山田和徳 (岡崎国立共同研究機構統合バイオ), 重本隆一, 馬杉美和子, 大倉正道, 高木佐知子, 中井淳一, 松下かおり, 佐々木幸恵, 井本敬二 (生理学研究所)

【概要】

近年, 種々のイオンチャネルやトランスポーターなどのイオン輸送蛋白遺伝子の変異が多く, 遺伝性神経系疾患の原因であることが明らかとなり, チャネル・トランスポーター病という概念も確立されてきた。しかしながら, それぞれのイオン輸送蛋白機能異常が如何にして疾病病態を成立させているのか, その分子・生理機構については不明な点が多い。この病態成立機構を検討することにより, それらの疾患の病因に基づいた新しい治療法や治療薬を考えることも可能となる。さらには, それぞれのイオン輸送体が神経系の機能制御にどのような生理的役割を果しているかを明らかにすることもできると考

えられる。従って, チャネル・トランスポーター病の研究は, 応用的な医学研究ばかりでなく基礎生物学的研究においても非常に重要である。しかしながら, 日本においては種々のチャネルやトランスポーターの研究は盛んであるにもかかわらず, 共同作業が必須であるチャネル・トランスポーター病の研究はまったく不十分な状態であると言わざるをえない。本研究会では, 現在日本において活発に研究活動を行っている研究者が一堂に会し, お互いの情報交換を行い, さらに協力体制を整備する機会を持つことで今後のこの領域の発展に資することが目的である。

(1) SCA6 変異の P 型 Ca チャネル機能におよぼす影響の解析

田邊 勉¹, 融 衆太², 村越隆之¹, 石川欽也², 三枝弘尚¹, 水澤英洋²

(¹ 東京医科歯科大学大学院高次機能薬理学, ² 同大学院脳神経機能病態学)

脊髄小脳失調症 6 型 (SCA6) は, 常染色体優性遺伝の脊髄小脳変性症の一つで, 成人発症の緩徐進行性の小脳失調と, 病理学的に小脳プルキンエ細胞優位の変性脱落が特徴の疾患である。Zhuchenko ら (1977) はこの疾患が, 第 19 染色体短腕 19p13.1 に位置する $\alpha 1A$ 電位依存性 Ca チャネル遺伝子 (CACNA1A) 3'側翻訳領域内にある CAG リピートの軽度の異常伸長により発症することを報告した。他の CAG リピート病 (ポリグルタミン病) と比べ, そのリピート数は少なく (変異アレル: 21-33 回, 正常: 4-20 回), 世代間で安定で, 表現促進現象は顕著でないなど相違がみられる。また, CACNA1A 内の他の遺伝子変異により SCA6 と同様の進行性の小脳失調を示すものもあり, CACNA1A が脳内, 特にプルキンエ細胞でも重要な役割を果たしている P/Q 型チャネルを

コードしていることを考え併せると $\alpha 1A$ Ca チャネルの機能変化が SCA6 の発症に関わっていると考えられた。一方, CACNA1A のドメイン IV のアスパラギン-プロリン (NP) の挿入配列の有無が P 型と Q 型の区別に関与していることが最近明らかにされた。そこで我々は NP の挿入配列を持つ, あるいは持たないヒトの全長 CACNA1A を human embryonic kidney (HEK) 293 細胞に発現させ, ポリグルタミン数の違いによるチャネル特性の変化について検討した。

1. ポリグルタミンの異常伸長による $\alpha 1A$ チャネル活性の変化をみるために, 最初に, ラビット-ヒトキメラ $\alpha 1A$ を用いたが, ポリグルタミン数 13 回と 24 回で有意な差は認めなかった。この結果は Matsuyama ら (1999) の報告とも一致する。したがって, チャネル活性の変化

をみるためには、1.7kb の 3'側領域以外のヒトの $\alpha 1A$ チャネルの領域も必要と想定し、ヒト全長 $\alpha 1A$ を使って実験を行った。また、我々のマウスの RT-PCR の結果、および Bourinet ら (1999) のラット $\alpha 1A$ に関する報告より、ヒトにおいても、 $\alpha 1A$ (-NP) はプルキンエ細胞における主な構成成分であると考えられた。そこで、SCA6 にみられるプルキンエ細胞優位の細胞死のメカニズムを調べるために、様々なポリグルタミン数の $\alpha 1A$ (-NP) および $\alpha 1A$ (+NP) についてチャネル活性を調べた。

2. ポリグルタミンの異常伸長した $\alpha 1A$ (-NP) においては、電位依存性不活性化に関して、正常のものに比べ、伸長数に従った不活性化曲線の過分極方向へのシフトがみられた。このことは静止膜電位付近において利用可能な Ca チャネルは減り、ポリグルタミンが伸びるほど、細胞への Ca 流入は減ることを予想させる。さらにプルキンエ細胞において $\alpha 1A$ (-NP) が主に発現していることを合

わせ考えると、この不活性化曲線の過分極方向へのシフトが、プルキンエ細胞の変性脱落に寄与していると仮定できる。また、 $\alpha 1A$ (-NP) および $\alpha 1A$ (+NP) がともに発現している神経細胞においては、 $\alpha 1A$ (+NP) においてみられる不活性化曲線の脱分極方向へのシフトにより代償されるために、細胞死を免れる可能性が示唆される。

3. $\alpha 1A$ チャネル遺伝子変異に起因する疾患マウスとしては、トッターリング (*tg*)、リーナー (*tg^{la}*)、ローリング (*tr^{rol}*) 等が知られている。Mori ら (2000) はこれらマウスを用いた解析から、運動失調の重度さと変異 $\alpha 1A$ チャネルを通してプルキンエ細胞に流入する Ca 量との間には逆相関の関係があることを示唆した。我々のポリグルタミンの伸長数に伴った変化を認めた結果も併せ考えると、Ca 流入の減少が、運動失調という表現型を説明しうると考えられる。

(2) SCA6 における神経細胞死メカニズム- $\alpha 1A$ -Ca チャネル遺伝子変異と特異的封入体-

水澤英洋¹，石川欽也¹，融衆太¹，大和田潔¹，常深泰司¹，李明順¹，久保寺隆行¹，三枝弘尚²，田邊勉²

(¹ 東京医科歯科大学大学院脳神経機能病態学，² 同大学院高次機能薬理学)

脊髄小脳変性症の約 40% は遺伝性でありこれまで多数の原因遺伝子 (座) が同定されてきた。その中で脊髄小脳失調症 6 型 (spinocerebellar ataxia type 6: SCA6) は比較的高齢発症でほぼ純粋な小脳失調症状を呈することで知られているが、わが国では高頻度でその発症機序の解明と治療法の確立は重要な課題である。SCA6 は $\alpha 1A$ -Ca チャネル遺伝子の CAG リピートの異常伸長により生じいわゆる CAG リピート病あるいはポリグルタミン病の一つであるが、正常で 4-19、疾患で 20-33 であり伸長したものでさえ他の CAG リピート病の正常域に入ってしまう程度ときわめて短いことがひとつの特徴である。患者脳からこの遺伝子をクローニングし、特異抗体を製作して脳内でのリピート数、mRNA、蛋白の発現を RT-PCR, in situ hybridization, 免疫染色などで検討した。リピート数はどの部位でもきわめて安定であり末梢白血球とも同じであったが、正常脳での mRNA と蛋白の発現は中枢神経系全体の神経細胞にみられるものの小脳、中でもプルキンエ細胞に格段に多く、SCA6 患者脳では

プルキンエ細胞の細胞質内に塊～粗大顆粒状の特異的封入体が存在した。この封入体は SCA6 のみかつプルキンエ細胞のみに認められ免疫電顕で線維状構造、それらが束状になったような構造さらには顆粒状物質として確認された。さらに長いポリグルタミン鎖を認識する抗体 1C2 にて免疫染色を行ったところ新たに細胞質を中心に一部は核内にもあるとみられる多数の顆粒状封入体がプルキンエ細胞にみられることが判明した。これらの封入体の意義はまだ不明であるが、SCA6 で有意～選択的に障害されるプルキンエ細胞に特異的に出現していることから選択的細胞死に関わっていることが推定される。また、変異ヒト $\alpha 1A$ -Ca チャネル遺伝子を導入し変異蛋白を発現させた培養 HEK 細胞は一定の条件下では対照に比べ有意に顕著な細胞死をもたらすことも確認された。まだ、詳細なメカニズムは不明であるが、変異 $\alpha 1A$ -Ca チャネル蛋白の発現は SCA6 のプルキンエ細胞においては封入体という異常形態をとりその選択的神経細胞死に密接に関与しているものと思われる。

(3) 電位依存性カルシウムチャンネル $\alpha 1S$ の中枢神経系における発現の検討

高橋祐二, 鄭 善容, 尾方克久, 橋田秀司, 後藤 順, 金澤一郎 (東京大神経内科・科技団 SORST)
井佐原京子, 内山安男 (大阪大機能形態学)

【目的】 電位依存性カルシウムチャンネル (VGCC) $\alpha 1$ サブユニットは $\alpha 1A-I, S$ の 10 種類が知られているが, 神経系では $\alpha 1F, S$ を除く 8 種類が発現していることが報告されている。我々は神経系における VGCC $\alpha 1$ サブユニットの新規遺伝子の探索ならびに, 既知の分子種の発現プロファイルを作製することを目的に研究を行っているが, その過程で, これまで筋肉特異的と考えられていた $\alpha 1S$ が, 神経系においても発現していることが明らかになった。そこで, その発現パターンを詳細に調べた。

【方法】 VGCC $\alpha 1$ サブユニットに共通の配列を用いて degenerate primer を作製し, 神経系から抽出した RNA を用いて RT-PCR によるスクリーニングを行った。さらに, 各分子種に特異的なプライマーを作製して, CNS 各部位から抽出した RNA を材料に RT-PCR を行った。 $\alpha 1S$ に関しては, LightCycler を用いた定量的 PCR により, RT-PCR の結果を定量的に評価した。さらに, ヒト, ラッ

ト $\alpha 1S$ に特異的なプローブを作製し, northern blotting, in situ hybridization を行った。また, レーザーダイセクターを用いて神経細胞を切り出し, Single cell RT-PCR を行って単一神経細胞における発現を検討した。

【結果と考察】 今回新規遺伝子は確認し得なかったが, $\alpha 1S$ が神経系で発現していることが明らかになった。特異的プライマーを用いた RT-PCR では, $\alpha 1S$ は大脳基底核, とりわけ尾状核のニューロンに多く発現しているという特徴的な分布を呈していた。さらに, in situ hybridization において, $\alpha 1S$ は尾状核のニューロンに強い発現が認められた。Single cell RT-PCR においても, 尾状核の神経細胞における発現が確認された。これらの発現パターンは他の L タイプのカルシウムチャンネル ($\alpha 1C, D$) と異なっており, $\alpha 1S$ に特徴的は分布パターンであると考えられた。

(4) IP3 受容体異常の小脳プルキンエ細胞におけるカルシウム動態

井上 貴文 (東京大学 医科学研究所 脳神経発生・分化分野)

細胞内カルシウム放出チャンネルである 1 型イノシトール 3 リン酸受容体 (IP3R1) は小脳プルキンエ細胞に非常に豊富に発現しており, ER からのカルシウム放出の主要な機能を担っている。遺伝子ノックアウトマウスを作製し, IP3R1 のプルキンエ細胞における役割を調べた。形態学的, および電気生理学的特徴はノックアウト動物のプルキンエ細胞でも保たれていた。

細胞内カルシウム濃度の増加は, プルキンエ細胞におけるシナプス可塑性のモデルである長期抑圧現象 (LTD) に必須であることが知られていたが, 豊富に発現している IP3R1 の機能が LTD に関与しているか否かは不明であった。IP3R1 遺伝子のノックアウトマウス及び, IP3R1 の機能を特異的に阻害するモノクローナル抗体を用いて, LTD 実験を行ったところ, IP3R1 は LTD に必須であるこ

とがわかった。この知見は, プルキンエ細胞樹状突起に存在する IP3R1 がシナプス刺激により機能していることを示唆するはじめての証拠であった。

1 型脊髄小脳変性症 (SCA1) のモデルマウスではプルキンエ細胞は生後 2 ヶ月以降樹状突起と細胞体の著明な萎縮がみられ, 脱落していく。SCA1 モデルマウス・プルキンエ細胞において IP3R1 の発現量は著しく減少していたが, シナプス刺激によるカルシウム放出はむしろ活性化していることを見いだした。すなわち, 平行線維刺激によるカルシウム放出が野生型プルキンエ細胞よりもより起こりやすくなっているのみならず, 野生型では見られない, 登上線維刺激によるカルシウム放出も観察された。プルキンエ細胞の病態と, この異常なカルシウム動態との関連について考察してみたい。

(5) グルタミン酸受容体チャネルノックアウトマウス

森寿, 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, CREST, JST)

我々はグルタミン酸受容体 (GluR) チャネルサブユニットの生理機能を個体レベルで解析するために遺伝子欠損マウスを作成した。特に前脳におけるシナプス可塑性に重要な NMDA 型 GluR ϵ 1, GluR ϵ 2, 及び小脳プルキンエ細胞特異的に発現しシナプス可塑性とシナプス形成の中心分子である GluR δ 2, それぞれの遺伝子欠損マウスを用いて行動学的解析を行なった。また, マウスの行動解析において遺伝的背景が影響を与える事から, 我々は遺伝的背景の 99.9% 以上を C57BL/6 としたマウスを用いた。

GluR ϵ 1 サブユニットの欠損マウスは, 海馬 CA1 における長期増強 (LTP) 誘導の閾値が上昇しており, 海馬依存的なモリス水迷路学習, 文脈学習, 及び瞬目反射条件付け Trace パラダイムの獲得に障害が検出された。従って, これら 3 種の学習の獲得には, 海馬における GluR ϵ 1 サブユニットが関わる共通の分子機構が示唆された。GluR ϵ 2 欠損マウスはシナプス可塑性と神経回路

形成の精緻に異常を示し出生後致死であった。このことから神経回路形成とシナプス可塑性が共通の分子機構により担われている可能性が示唆された。GluR ϵ 2 ヘテロ欠損マウスは, 他の GluR ϵ ヘテロ欠損マウスでは観察されない音驚愕反応の上昇を示すことから GluR ϵ 2 が音驚愕反射の制御に重要である事が明らかとなった。一方, GluR δ 2 欠損マウスは, プルキンエ細胞の長期抑圧 (LTD) が障害されており瞬目反射条件付けの Delay パラダイムに障害が検出されたが, Trace パラダイムには障害がなかった。従って, 小脳プルキンエ細胞の LTD が特定のパラダイムの運動学習の獲得に関わる事, 及び学習獲得過程には異なる脳システムが学習パラダイム依存的に関与することが示唆された。

以上の結果から, GluR チャネルサブユニットが多様な脳神経機能を担い, 学習行動のパラダイム依存的に異なる脳システムと分子機構が関与することが示唆された。

(6) グルタミン酸トランスポーターの関与する神経疾患

田中光一¹, 松上稔子¹, 白馬伸洋², 三谷章³

(¹ 東京医科歯科大学・難治疾患研究所・分子神経科学,

² 愛媛大学・医学部・耳鼻咽喉科, ³ 京都大学・医療技術短期大学部・総合教育)

グルタミン酸は哺乳類の中樞神経系において両刃の剣であり, 記憶・学習などの脳高次機能を調節する主要な興奮性神経伝達物質として知られているが, 興奮毒性という概念で表されるように, 過剰なグルタミン酸は神経細胞毒性を持つことが知られている。グルタミン酸の興奮毒性による細胞死は, 脳虚血, 脳外傷, てんかんなどの急性神経疾患のみならず, アルツハイマー病, 筋萎縮性側索硬化症 (ALS), 脊髄小脳変性症, ハンチントン病などの慢性神経疾患でみられる神経細胞死の共通メカニズムと考えられている。従って, 細胞外におけるグルタミン酸濃度の制御は, 生理学的・病態生理学的に重要な意味を持つ。グルタミン酸トランスポーターは, シナプス前部から放出されたグルタミン酸を細胞外から取り除

き, 細胞外グルタミン酸濃度を低下させることを主要な役割としている。現在, 脳内には 4 種類のグルタミン酸トランスポーターが存在することが知られおり, GLAST, GLT1, EAAC1, EAAT4 と命名されている。GLAST, GLT1 は主にアストロサイトに, EAAC1, EAAT4 は神経細胞に存在する。本研究では, GLT1, GLAST 欠損マウスの解析を通じ明らかになった各種神経疾患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について話す。GLT1 欠損マウスは生後 3 週齢頃から致死性のてんかん発作を示し, 生後 12 週齢頃までに 80% が死亡してしまう。GLAST 欠損マウスは, 軽度の協調運動障害と網膜のシナプス伝達障害, 騒音性難聴の悪化が観察された。また, GLT1, GLAST の両者を持たないダブルノックアウト

マウス (DK マウス) を作成したところ、胎生 18 日頃に死亡し、中枢神経系の形成異常が観察された。さらに、神経幹細胞・グリア前駆細胞・神経前駆細胞のマーカー

分子としての GLAST の有用性についても話す予定である。

(7) 中性アミノ酸トランスポーターの神経系における発現と病態との関わり

金井好克^{1,6)}，松尾洋孝^{1,3)}，金 徒慶¹⁾，A. Chairoungdua¹⁾，金 珠英¹⁾，小林ゆかり²⁾，
苗代 弘⁴⁾，大谷直樹⁴⁾，福井伸二⁴⁾，四ノ宮成祥⁵⁾，島 克司⁴⁾，遠藤 仁¹⁾
(杏林大学医学部薬理¹⁾，杏林大学医学部第二外科²⁾，防衛医大第一生理³⁾，
防衛医大脳神経外科⁴⁾，防衛医大微生物⁵⁾，科学技術振興事業団さきがけ研究 21⁶⁾)

神経組織におけるアミノ酸トランスポーターは、1) 神経伝達物質トランスポーターとして、放出されたアミノ酸神経伝達物質を回収し、2) 血液・脳関門トランスポーターとして、アミノ酸の関門通過を担当するといった神経組織特有の機能を担う他、細胞一般に共通するものとして、3) 必須栄養素としてのアミノ酸の細胞への供給、さらに、4) シスチンの供給を介して、酸化ストレスから細胞を保護する役割を担っている。神経伝達物質トランスポーターとしての機能は、グルタミン酸、GABA、モノアミン等に関して研究成果が蓄積されてきているが、他の役割に関しては、トランスポーターの分子の実体を踏まえた詳細な研究はなされていない。我々は、1998 年に 12 回膜貫通型タンパク質と、1 回膜貫通型タンパク質のヘテロダイマーによって形成されるアミノ酸トランスポーターを見出し、それを契機に多くの Na⁺非依存性トランスポーターからなる、ヘテロダイマー型アミノ酸トランスポーターファミリーを確立した。そのなかには、血液・脳関門トランスポーターであると同時に、細胞への必須アミノ酸の供給を担当する中性アミノ酸トランスポーター、および 2 種のシスチントランスポーターが含まれる。

ヘテロダイマー型アミノ酸トランスポーターファミリーには、3 種の中性アミノ酸トランスポーター (LAT1, LAT2, Asc-1) が存在する。LAT1 は大型の中性アミノ酸のみを輸送し、LAT2 は中性アミノ酸全般を輸送する広い基質選択性を示し、Asc-1 は小型の中性アミノ酸のみを輸送する。このうち LAT1 と LAT2 は、その結合タンパク質である 4F2hc (4F2 heavy chain) とともに、脳毛細血管内皮細胞の細胞膜に存在し、血液脳関門の中性アミノ酸の透過経路を形成している。これらのトランスポー

ターは、L-DOPA を含む芳香族アミノ酸を輸送基質とし、モノアミン神経伝達物質生成の前駆物質の中枢神経への供給経路となる。LAT1 は、さらに神経細胞に、細胞体と樹状突起の起始部を中心に存在し、Asc-1 は、これと対照的に、樹状突起にその末端に至るまで広く分布する。Asc-1 は、D-Ser を含む D-体も高親和性に輸送する。D-Ser は、NMDA グルタミン酸受容体の内因性機能修飾物質の候補となっており、Asc-1 はその脳内動態の決定に寄与している可能性がある。

LAT1 は、神経系以外では癌胎児性抗原としての発現パターンを示すことが知られているが、最近我々はヒト脳腫瘍においても、LAT1 が高発現することを明らかにした。LAT1 の発現は、腫瘍の悪性度と相関し、有意に生存曲線に負の影響を及ぼしていた。また、C6 ラットグリオーマ細胞を用いた *in vitro* の検討では、LAT1 の抑制は有意に腫瘍体積の縮小効果を示し、同時にラットの生存を延長した。LAT1 は、脳腫瘍の診断、治療の新たな分子標的となる可能性がある。

グルタチオンは、重要な細胞内抗酸化物質であるが、その生合成にはシステインの供給が律速段階の一つとなる。システインは細胞外の酸化的環境下では、シスチンとして存在するため、シスチンのトランスポーターが、酸化ストレスからの細胞保護のために、重要な役割を果たす。ヘテロダイマー型アミノ酸トランスポーターファミリーの 2 種のシスチントランスポーターのうち、xCT は、酸化ストレスにより発現が誘導されることが確認された。BAT1 は、中枢神経においては、特に海馬 CA3 領域に局限した発現が見られた。

ヘテロダイマー型トランスポーターの同定により、中枢神経に発現するアミノ酸トランスポーターの幾つかが

新たに明らかになった。これらは、中枢神経の機能と疾患の理解に有用な情報を与えるのみでなく、疾患治療の

新たな分子標的として、今後の検討が期待される。

(8) 血液脳関門・血液脳脊髄液関門における排出輸送系の解析

鈴木 洋史 (東京大学大学院薬学系研究科)

中枢神経系は、血液脳関門 (BBB)、血液脳脊髄液関門 (BCSFB) の2つの関門により、循環血と隔てられている。これら2つの関門の機能により、中枢内でのイオン組成の維持などがなされ、中枢機能の恒常性が維持されているものと考えられる。これら関門のうち、BBBは脳毛細血管内皮細胞同士が密着結合により、結合されることにより形成される。その結果、他の抹消組織とは異なり、循環血中の化合物が脳内に移行するためには、内皮細胞を介した経細胞輸送を経ねばならず、水溶性の高いあるいは分子量の大きい化合物の脳移行は制限され、関門が形成されている。事実、多くの非電解質に対しては BBB 透過性と分子量で補正した油水分配係数の間には良好な相関が観察される。しかしながら、ビンカアルカロイドなどの化合物の BBB 透過性は物性から予測されたものよりも遥かに小さく、何らかの機構が関与するものと考えられていた。

Borst らは MDR1P-糖蛋白ノックアウトマウスを作成し、これらのマウスがアイベルメクチンを作用させることにより、中枢毒性を呈することを見出した。演者らのグループを含めた、その後の一連の研究により、脳毛細血管内皮細胞血管側膜上に発現される P-糖蛋白により、基質の脳移行性が制限されることが示されてきている。一方、最近になり、MDR1 遺伝子の SNPs が P-糖蛋白の発現量の個人差の一因となることが報告された。従来、P-糖蛋白の基質となるサイクロスポリン A の中枢毒性には個人差が存在することが報告されてきたが、この毒性発現の個人差は P-糖蛋白発現量の個人差によっても説明されうるものであり、重要な検討事項のひとつと考えら

れている。

さらに、P-糖蛋白が良好な基質としない、有機アニオン系化合物も BBB を介した排出を受けることが示されてきている。この機構を解析するために演者らは、目的化合物を非透過性マーカーのイヌリンと共に脳実質内に直接投与し、脳内残存量の経時変化を測定するという実験を行った。その結果、p-アミノ馬尿酸、タウロコール酸、エストラジオールグルクロン酸抱合体などに対する排出活性を検出することができた。単離脳毛細血管内皮細胞には抗 MRP1 抗体と反応する蛋白発現されることも見出し、現在その同定を試みている。

BBB と並び、抹消と中枢との境界となるのが BCSFB である。この関門は、脈絡上皮細胞同士が密着結合で結合されることにより形成される。脈絡上皮細胞は脳脊髄液 (CSF) の産生に関与すると共に、CSF 中の有機アニオン系化合物を血液へと能動的にくみ出す機能を有している。髄膜炎治療に用いられる一連のβ-ラクタム系抗生物質を用いた検討の結果、この排出機能が薬物の CSF 移行を決定する重要な因子であることを示すことができた。現在、OAT3 と称されるトランスポーターがペニシリンの CSF から脈絡叢への取り込みに関与し得ることを見出している。脈絡叢から血液への排出には、この組織に高発現される MRP1 が関与する可能性が考えられ、現在検討を続けている。中枢神経系への薬物移行についてはその薬理効果・副作用発現に、これらの関門に発現されるトランスポーターが大きく関与しており、現在新規のトランスポーターのクローニングを進めている。

(9) 骨格筋疾患におけるイオンチャンネル異常

高橋正紀^{1, 2)}, 木村卓²⁾, 佐古田三郎²⁾, Stephen C. Cannon^{1, 3)}⁽¹⁾ Department of Neurology, Massachusetts General Hospital,²⁾ 大阪大学大学院医学系研究科 神経内科学, ³⁾ Department of Neurobiology, Harvard Medical School)

興奮性異常を呈する遺伝性の骨格筋疾患の多くはイオンチャンネル遺伝子に異常があることが明らかにされてきた。高カリウム性周期性四肢麻痺, 先天性パラミオトニー, カリウム惹起性ミオトニーなどでは骨格筋型 Na チャンネルの α subunit に, 低カリウム性周期性四肢麻痺では主に Ca チャンネルの α subunit に, 先天性ミオトニーは Cl チャンネルに変異が見いだされている。高カリウム性周期性四肢麻痺, 先天性パラミオトニーなどの Na チャンネルの変異の解析の結果, ほとんど全ての例で fast inactivation の異常が見られ, その異常により麻痺やミオトニーといった病態を説明できる。近年 Na channel について, fast inactivation とは別の不活性化, slow inactivation の生理, 病態的意義が注目されてきている。本発表では, slow inactivation について, 心筋型と骨格筋型チャンネルの違い等など生理的意義について考察する。また, 高カリウム性周期性四肢麻痺において, slow

inactivation の障害が麻痺の出現に関与することなど, 病態との関連について述べる。

筋強直性ジストロフィーは筋肉の興奮性異常 (ミオトニー), 萎縮のほかに白内障, 不整脈, 糖尿病などの全身症状を合併する成人で最も多い筋ジストロフィー症である。その遺伝的原因は, イオンチャンネル遺伝子ではなく, DMPK 遺伝子の非翻訳領域での 3 塩基 (CTG) の伸長にあることが明らかにされた。この遺伝子異常がいかなる機構で筋の興奮性異常を呈するかは不明であった。Thornton らは伸長させた CTG のみを骨格筋に発現させたトランスジェニックマウスを作成し, この動物がミオトニアや筋萎縮など筋強直性ジストロフィーに非常に類似した筋病変を呈することを明らかにした (Mankodi et al. Science 289: 1769-1772, 2000)。このマウスの筋興奮性異常のメカニズムを電気生理学的に検討する機会を得たので, その結果についても述べる。

(10) Reactive oxygen species-mediated activation of TRP-related channels

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・生命環境研究領域)

形質膜越えの Ca 流入は, 主要な細胞内 Ca イオン濃度調節機構の一つであると同時に, 膜電位の脱分極を担うという生理的意義を有する。神経細胞においては, 電位依存性 Ca チャンネルとともに, TRP 遺伝子スーパーファミリーによってコードされている, 受容体活性化 Ca チャンネル (Receptor-activated Ca channel) (RACC) 群が注目を集めている。我々は既に, PI 応答と連関して活性化開口する神経系の 7 つの TRP Ca チャンネル (TRP1-7) を見出した。最近, 7 つのいわゆる TRP ホモログに加え, 数 10 μ M の H₂O₂ 等, 活性酸素種 (Reactive Oxygen Species) によって活性化開口する新規 Ca 透過型カチオンチャンネル ROSC1 を同定した。本 ROSC1 チャンネルの直接

の活性化トリガーは, H₂O₂ 等の処理によって増加するニコチンアミドの結合と考えられる。また, 活性酸素種により惹起される細胞死を ROSC1 が仲介することが示唆された。さらに, ROSC1 チャンネルだけでなく, 細胞内外の Ca やセカンドメッセンジャー群によってそれぞれがユニークな活性調節を受ける, TRP1-7 の活性制御にも活性酸素種による酸化が必要であることを見出した。このように, TRP 関連チャンネルは興奮性制御のみならず神経細胞死/生存に深く関与しており, 分子・機能的多様性は, 特定の神経機能の惹起に必要な, Ca シグナル及び膜電位変化の空間的・時間的パターン制御の重要な基盤であると考えられる。

(11) 内向き整流性 K^+ チャネル Kir2.1 の Andersen 症候群における変異部位 Gly300 近傍の Glu299 は内向き整流性の決定に寄与する。

久保義弘, 村田喜理, 藤原祐一郎 (東京医科歯科大学 大学院 機能協関システム医学)

内向き整流性 K^+ チャネル Kir 2.1 (IRK1) の内向き整流性は、主として、細胞内 Mg^{2+} とスベルミンによる外向き電流のブロックによって引き起こされる。これらのブロッカーに対する感受性、すなわち内向き整流性の強さを決定する部位として、膜貫通部位 M2 の中ほどにある Asp 残基 (D172) と、M2 に続く C 端の細胞内領域と考えられてきた部位の Glu 残基 (E224) が、既に知られてきた。しかしながら、我々の単離した非常に弱い内向き整流性を示す sWIRK と強い内向き整流性を示す IRK1 の整流性の程度の違いは、このふたつのアミノ酸残基の違いでは説明できなかったもので、内向き整流性の成立に寄与する分子基盤がさらに存在すると予想した。本研究において我々は、IRK1 と sWIRK のアミノ酸配列の違いに着目して点変異を導入することにより、C 端細胞内領域と考えられてきた部位のさらに遠位部にある Glu 残基 (E299) を、内向き整流性の決定に関与している構造基盤として新たに同定した。

IRK1 wild type (wt) とその点変異体 E224G, E299S, その二重変異体 E224G & E299S の電気生理学的性質を、アフリカツメガエル卵母細胞及び HEK293 細胞に発現させて比較した結果、以下の知見が得られた。(1) E299S は wt と比較して、弱い内向き整流性を示し、細胞内ブロッ

カー、特にスベルミンのブロックに対する感受性が非常に低く、単一チャネルコンダクタンスが小さかった。(2) E224G の性質は、E299S に極めて類似していた。(3) E224G & E299S では、E224G, E299S で観察された上述の変化がさらに増強していた。以上の結果から、E299 が、内向き整流性を決定する新たな構造基盤であること、そして、E224 と E299 がどちらもイオン透過路に面し、互いに近い深さに位置していることが明らかになった。

ところで、最近 Plaster らにより、IRK1 チャネルの D71V, S136F, G144S, R218W, G300V, E303K 等のアミノ酸変異が周期性四肢麻痺、不整脈、dysmorphology 等を主徴とする Andersen 症候群の病因として同定された (Cell 105, 511-9, 2001)。そこで、病態との関連を探る目的で上述の E299 と隣接する G300V 変異体の電気生理学的性質を解析した。G300V の cRNA を単独で発現させたところ電流は観察されなかった。次に、野生型と G300V の cRNA を 1:1 で混合して共発現させたところ、野生型単独と比して 1/2 程度の大きさの電流が記録された。よって、4 量体の中に G300V 変異サブユニットが 1 個程度含まれてもチャネルとして機能するということが示唆された。この電流を野生型電流と質的に比較すると、内向き整流性の強度等について顕著な差異はみられなかった。

(12) weaver マウス腭ラ氏島 α 細胞における GIRK チャネルの電気生理学特性

稲毛田清, 倉智嘉久 (大阪大・医・情報薬理学)

【目的】グルカゴンは腭ラ氏島 α 細胞から分泌される。グルカゴン分泌は δ 細胞から分泌されるソマトスタチンにより抑制される。我々は、腭ラ氏島 α 細胞では GIRK チャネルのファミリーのうち、Kir3.2C と 3.4 が発現しており、ソマトスタチンによるグルカゴン分泌抑制に GIRK チャネルの活性化が関与していることを報告している。Kir3.2 の点変異を持つ weaver マウスでは選択的に黒質ドーパミンニューロンの細胞死、小脳顆粒細胞の遊走異常が起こることが知られているが、腭ラ氏島につい

て検討されていない。そこで、腭ラ氏島の形態および α 細胞の GIRK チャネルの特性について Kir3.2 の点変異による影響があるかどうか検討した。

【方法】(1) 組織化学的に weaver マウスの α 細胞の検討をした。(2) weaver マウスより単離・培養した腭ラ氏島 α 細胞に whole cell clamp 法を用い、10 mM K^+ の外液中で電流を測定した。(3) 測定後、細胞を吸引した電極液を材料として RT-PCR 法により α 細胞の同定を行った。

【結果】(1) weaver マウスの腭ラ氏島では正常、ヘテロ、

ホモマウス、全てはほぼ同数の α 産生細胞が存在した。(2) 正常マウス由来 α 細胞：ソマトスタチン刺激により誘導される電流は GIRK チャネルの特異的阻害剤であるテルチアピンにより抑制された。また、ソマトスタチン刺激により誘導される電流の逆転電位は-60 mV であった。よってソマトスタチン刺激により誘導される電流はテルチアピン感受性 K^+ 電流であった。(3) weaver ヘテロおよびホモマウス由来 α 細胞：ともにソマトスタチン刺激により電流が誘導されたが、その逆転電位は脱分極側にシフトした。ホモマウス α 細胞ではソマトスタチン誘発電流の逆転電位は-20mV となり、イオン選択性が失われていた。さらに、誘発電流は Ba^{2+} では抑制されたが、テルチアピンで抑制されなかった。ヘテロマウス由来 α 細胞では全電流の逆転電位は約 10 mV 脱分極方向へシフト

した。テルチアピン感受性成分の逆転電位は-60 mV で正常マウスと一致し、残りの Ba^{2+} 感受性成分の逆転電位は-20 mV で weaver ホモマウスと一致した。ヘテロマウス由来 α 細胞では正常 GIRK2 チャネルとホモメリックな weaver mutant channel が混合して存在していると推定された。

【結論】Kir3.2 の点変異により膝ラ氏島の形態は影響されなかったが、ソマトスタチン受容体依存性にイオン選択性が低下した weaver mutant GIRK2 チャネルが活性化された。しかし、この点変異により形態上異常を起こす部位とは違って膝ラ氏島 α 細胞では weaver mutant GIRK2 チャネルが構造的に活性化されておらず、このために膝ラ氏島の形態に影響が起こらないと考えられた。

(13) 抗 K チャネル自己抗体と Isaacs 症候群

亀山正樹, 有村公良, 園田至人, 長堂竜維, 黒野明日嗣, 富満久教, 林茂昭, 亀山亜砂子, 納光弘
(鹿児島大学・医学部・第二生理学, 第三内科学)

自己免疫性チャネル病として、重症筋無力症 (myasthenia gravis, MG: 骨格筋の ACh 受容体に対する自己抗体) と Lambert-Eaton 筋無力症候群 (LEMS: 運動神経終末の P/Q, N 型 Ca チャネルに対する自己抗体) がある。我々は、近年、神経終末部の電位依存性 K チャネル (VGKC) に対する自己抗体により Isaacs 症候群が発症することを明らかにした。

Isaacs 症候群は、後天性ニューロミオトニアとも呼ばれ、持続性筋けいれん、運動後の筋弛緩遅延、発汗異常などを主症状とする。臨床電気生理学的検査では、末梢神経伝導は通常正常であるが、針筋電図での反復電位が特徴的である。筋の過興奮は、クラーレで消失するが神経ブロックでは消失しないので、神経終末部で異常な自発興奮が起きていると推定されている。

我々は、Isaacs 症候群が神経終末部の VGKC に対する自己抗体により発症するとの仮説のもと、一連の実験を行った。まず、PC-12 細胞の K 電流は患者血清作用直後には抑制されなかったが、2%患者血清で 2 日間以上培養した細胞においては K 電流密度が減少した。同様の経時的な K 電流抑制は、患者免疫グロブリン (Ig) をヒト神経芽細胞腫由来 NB-1 細胞に作用させた実験でも認めら

れた。K 電流の活性化、不活性化には有意な変化は見られなかった。一方、患者血清は Na 電流に対しては有意な変化を起こさなかった。これらの結果より、患者 Ig は、VGKC の機能的な数を減少させて K 電流を低下させると推察された。Western blot 法による検討では、患者 Ig は α -dendrotoxin で標識されるバンド (KV1.1, KV1.2, KV1.6 と推定) に結合した。また、免疫組織化学では、患者 Ig が筋内神経軸索部に結合することが確認された。さらに、患者 Ig は、KV1.1 と KV1.6 遺伝子を強制発現させた CHO 細胞において K 電流を緩徐に抑制した。Hart らも患者血清が *Xenopus* 卵母細胞に発現させた KV1.1, KV1.2 と KV1.6 を認識することを見ている。これらの結果より、Isaacs 症候群患者の Ig には複数種の VGKC を認識する自己抗体があるものと考えられる。

以上の研究により、Isaacs 症候群の病態は抗 VGKC 抗体の作用により K 電流が減少し神経の過興奮が起こるものと考えられるが、その K 電流の減少 (おそらくチャネル数の減少) の機序は不明である。最近、MG 患者の一部に抗 ACh 受容体抗体陰性の例があり、この中で筋特異性チロシンキナーゼ (MuSK) に対する自己抗体を有する例が報告された。MuSK の抑制により、ACh 受容体の

集積の抑制または代謝の促進が起こり、結果的に受容体効率が低下するものと想定される。Isaacs 症候群の場合においても、K チャネルの発現抑制や代謝亢進という可能性を検討する必要があるだろう。このように、チャネルの抑制には、直接的な作用の他に、遺伝子発現, targeting, anchoring (+集積), 代謝, その他の調節因子などに対する作用もあると考えられ、今後の重要な検討課題になると思われる。

文 献

- 1) Sonoda Y, Arimura K, Kurono A et al., Muscle & Nerve 19:1439-1446, 1996
- 2) Arimura K, Watanabe O, Kitajima I et al., Muscle & Nerve 20:299-305, 1997
- 3) Nagado T, Arimura K, Sonoda Y et al., Brain 122: 2057-2066, 1999

6. 細胞死の分子機構と病態生理

2001年8月7日－8月8日

代 表：一條 秀憲（東京医科歯科大学）

世話人：岡田 泰伸（岡崎国立共同研究機構生理学研究所）

(1) リンパ球アポトーシスの制御機構

鏑田 武志（東京医科歯科大学・難治疾患研究所・免疫部門）

(2) TNFにより誘導される細胞死に対する抑制のメカニズム

中野 裕康（順天堂大学・医学部・免疫・PREST）

(3) 血球分化におけるDNaseIIの役割

福山 英啓（大阪大学・大学院医学研究科・生体制御医学遺伝学）

(4) JNK経路による細胞死の制御

後藤 由季子（東京大学・分子細胞生物学研究所）

(5) Bcl-2ファミリーたんぱく質の機能

辻本 賀英（大阪大学・大学院医学系研究科・遺伝子学）

(6) T細胞の分化・増殖におけるミトコンドリア依存性アポトーシス経路の役割

吉田 裕樹，原 博満（九州大学・生体防御医学研究所・免疫学部門）

(7) ショウジョウバエを用いた神経細胞死の遺伝学的研究

三浦 正幸（理化学研究所・脳科学総合研究センター・細胞修復機構）

(8) アポトーシス誘導における細胞容積調節破綻の役割

前野 恵美，石崎 泰樹，若林 繁夫，鏑田 武志，岡田 泰伸（生理研・機能協関，群馬大・医，
循環病セ，東医歯大・医）

(9) アポトーシス初期過程における細胞内 K^+ ， Cl^- 濃度変化と Ca^{2+} 動員

出崎 克也^{1,2}，前野 恵美¹，岡田 泰伸¹（¹生理学研究所・機能協関部門，²自治医科大学・生理学2）

(10) Fas誘導アポトーシスを制御するシグナル伝達：マップキナーゼ（ERKとJNK）の関与

米原 伸（京都大学・ウイルス研究所・がんウイルス研究部門）

(11) 神経細胞死の新しい分子機構：異常蛋白質から空胞形成・細胞死への分子シグナル

垣塚 彰（京都大学・大学院生命科学系研究科・高次生体統御学分野）

(12) RINGフィンガー蛋白質と細胞死

高橋 良輔（理化学研究所・脳科学総合研究センター・運動系神経変性研究チーム）

(13) Rasにより制御される非アポトーシス性プログラム細胞死

北中 千史，口野 嘉幸（国立がんセンター研究所・生物物理部）

(14) ストレス応答性MAPキナーゼの生理的役割

仁科 博史，中川 健太郎，堅田 利明（東京大学・大学院薬学系研究科・生理化学）

(15) 小胞体ストレス応答の分子機構

河野 憲二（奈良先端科学技術大学院大学・遺伝子教育研究センター）

(16) 小胞体および核機能異常とアルツハイマー病の神経細胞死

今泉 和則（奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・細胞構造学）

(17) ポリQ蛋白質による神経細胞死のメカニズム

西頭 英起，一條 秀憲（東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・分子情報伝達学分野）

【参加者名】

Ravshan Sabirov (生理研), 赤塚 結子 (生理研), 井垣 達吏 (理化学研・脳科学), 一條 秀憲 (東医歯大・院医歯学), 今居 譲 (理化学研・脳科学), 今泉 和則 (奈良先端大・バイオサイエンス), 岩脇 隆夫 (理化学研・脳科学), 浦 誠司 (東大・分生研), 浦本 裕美 (生理研), 岡崎 達馬 (順天堂大・医), 岡田 泰伸 (生理研), 垣塚 彰 (京大・院生命科学), 柿沼 由彦 (理化学研・脳科学), 風間 啓敬 (京大・ウイルス研), 門脇 寿枝 (東医歯大・院医歯学), 北中 千史 (国立がんセンター研・生物物理), 河野 憲二 (奈良先端大・遺伝子研), 後藤 由季子 (東大・分生研), 三枝 かおる (東医歯大・院医歯学), 酒巻 和弘 (京大・ウイルス研), 沢田 泰輔 (順天堂大・医), 菅田 浩司 (理

化学研・脳科学), 砂山 潤 (東大・分生研), 高橋 良輔 (理化学研・脳科学), 谷本 佳奈美 (東医歯大・院医歯学), 辻本 賀英 (阪大・院医学), 鏑田 武志 (東医歯大・難治研), 出崎 克也 (自治医大), 中川 健太郎 (東大・院薬学), 中野 裕康 (順天堂大・医), 中山 勝文 (順天堂大・医), 西頭 英起 (東医歯大・院医歯学), 仁科 博史 (東大・院薬学), 野口 拓也 (東医歯大・院医歯学), 畑井 多喜子 (東医歯大・院医歯学), 原田 紀宏 (順天堂大・医), 平井 博之 (東医歯大・難治研), 福山 英啓 (阪大・院医学), 前野 恵美 (生理研), 三浦 正幸 (理化学研・脳科学), 吉田 裕樹 (九大・生体防御医学研), 米原 伸 (京大・ウイルス研)

【概要】

近年、細胞死のメカニズムが分子レベルで解明されつつある。特にカスパーゼを中心としたアポトーシス実行過程の研究は目覚ましいものがある。一方で、カスパーゼ活性化に至るまでのシグナル伝達機構には不明な部分が多く、また最近ではカスパーゼ非依存性細胞死の存在も明らかにされている。さらに、正常な細胞死メカニズムの破綻が、がん、免疫、神経変性疾患などの疾患の原因となることが示唆される一方で、実際には個別の疾患にどのように細胞死が関わっているかは不明な点が多く、これらの疾患の診断、治療、予防を実際的に考える上で重要な問題となっている。日本におけるこのような現状の要因は、分子レベルでの細胞死研究と病態生理学的見地からの細胞死研究が十分な情報交換がなされないままに進行していることにあると考えられる。本研究会は、

生存と死のシグナル伝達機構を中心に、アポトーシス関連分子群を対象として解析している研究者と、様々な病態における細胞死の役割について研究している研究者が一堂に会し、情報交換を行なうことによって細胞死の分子機構ならびに病態生理を明らかにする機会を提供することを目的として開催され、予想通り極めて活発な討論が行われた。特に生存と死のシグナル伝達を軸に、カスパーゼ、Bcl-2, IAP, NF- κ B, セリン/スレオニンキナーゼ、などのアポトーシス関連分子群の解析結果を中心として、お互いの最新の研究成果が発表された。その結果、特にがん、免疫、神経変性疾患等の疾患と細胞死の分子機構破綻の関連性がさらに強く示唆され、本研究会の指向する研究の重要性が再認識された。

(1) リンパ球アポトーシスの制御機構

鏑田 武志 (東京医科歯科大学・難治疾患研究所・免疫部門)

B細胞抗原受容体(BCR)を介するアポトーシスの分子機構やその免疫システムにおける役割には不明の点が多い。我々は、TNF受容体ファミリーの一員であるCD40分子を介するシグナルがBリンパ球の抗原受容体(BCR)を介するアポトーシスを阻害することを明らかにしたが、CD40リガンドを過剰発現するトランスジェニックマウスを用いた解析により、BCRを介するアポトーシスが自

己反応性B細胞の除去を誘導することにより、免疫システムの成立・維持に重要な役割を果たすことを明らかにした。さらに、我々は、Bリンパ球株WEHI-231を用いて、BCR架橋によるアポトーシスの分子機構について検索した。WEHI-231細胞では、BCR架橋によりc-Mycの発現が亢進し、また、細胞周期阻害分子p27Kip1の発現がおこる。我々は、WEHI-231細胞のc-Myc活性を阻害、

または誘導することのより、BCR 架橋によるアポトーシスが Myc 誘導性アポトーシスの 1 つであり、さらに、B リンパ球では c-Myc が p27Kip1 と協調的にアポトーシスを誘導することを明らかにした。これまで、細胞周期阻害分子によるアポトーシス制御が細胞の種類によって異

なることが示され、コンテキスト依存的であることが明らかになっていたが、我々の結果から c-Myc の発現レベルがこのようなコンテキスト形成に関与することが示唆された。

(2) TNF により誘導される細胞死に対する抑制のメカニズム

中野裕康 (順天堂大学・医学部・免疫・PREST)

我々の作製した TNF receptor-associated factor (TRAF) 2/TRAF5 ダブルノックアウトマウス (DKO) 由来の胎児線維芽細胞 (MEF) は TNF 単独刺激により著明な細胞死が誘導されることが明らかとなった。そこでその分子メカニズムを明らかにするために、wild-type および DKO 由来の MEF を TNF 刺激前後で種々の抗アポトーシス遺伝子の発現誘導を検討した。検討した範囲内においては Bcl2 ファミリーに属する A1/Bfl-1 の誘導が著明に低下していたが、この遺伝子を DKO 由来の MEF に恒常的に発現させても、TNF 誘導性細胞死に対する抑制効果は不十分であった。そこで我々は新規抗アポトーシス分子を同定するために、DKO 由来の MEF にレトロウイルスベクター用い cDNA ライブラリーを導入し、TNF による細胞

死に抵抗性となるクローンを選択し、新たな遺伝子 BMS を同定した。BMS は 964 個のアミノ酸よりなっており、発現レベルは低いながらもすべての組織において認められた。BMS を恒常的に発現させた DKO 由来 MEF は TNF 誘導性の細胞死に部分的に抵抗性となったが、スタウロスポリンや UV 照射などの刺激に対しては抵抗性とならなかった。さらに B 細胞腫である A20.2J に発現させたところ抗 Fas 抗体刺激による細胞死を著明に抑制した。一方 BMS を恒常的に発現させた MEF を TNF 刺激存在下で培養することにより、著明な形態学的変化が誘導された。これらの結果は BMS が抗アポトーシス機能を有すること、さらにはこの遺伝子の過剰発現が細胞の癌化にも関与している可能性を示唆するものである。

(3) 血球分化における DNaseII の役割

福山英啓 (大阪大学・大学院医学研究科・生体制御医学遺伝学)

私達はこれまでに、アポトーシスにおける DNA 断片化を担う分子として、Caspase-Activated DNase (CAD) 及びそのインヒビターである ICAD をクローニングし、これらの分子の生化学的また生理的作用について解析を行ってきた。この CAD を不活化したマウスの研究から、アポトーシス刺激により cell-autonomous な DNA 断片化は起きないが、アポトーシス細胞を貪食したマクロファージ内において DNA 断片化が起こることを明らかにした。このマクロファージによる non-cell autonomous な DNA の断片化を行う候補分子としてリソソーム DNase である DNaseII が考えられる。そこで DNaseII の遺伝子

を欠損させたマウスを作成した。このマウスは胎生期 14 日目頃から貧血の症状を示し、胎生期の最終段階で死滅したことから、赤血球の増殖、分化過程に異常があると考えられた。しかし、DNaseII 欠損マウス胎児肝細胞を他のマウスに移植すると正常の赤血球が形成された。一方、胎児肝臓には数多くの病巣が見られ、電子顕微鏡などの観察から、この病巣は赤血球前駆細胞から除去された多量の核を貪食しているマクロファージと結論された。マクロファージ内の DNaseII は赤血球分化の最終段階の脱核した核の DNA の分解を担っている。

(4) JNK 経路による細胞死の制御

後藤 由季子 (東京大学・分子細胞生物学研究所)

MST1 は JNK/p38 経路を活性化する MAPKKKK である。MST1 は Caspase により切断を受けることで活性が上昇する。この切断によりキナーゼドメインが核外移行シグナルから離れ、核内に移行することが明らかになった。MST1 の発現は、Caspase の活性化を惹起し、DNA の断片化、核の凝集、アポトーシス小体の形成といったアポトーシスに典型的な形態変化を JNK 依存的に引き起こした。MST1 による DNA の断片化は Caspase 活性に依存

していたが、細胞の形態変化や核の凝集、アポトーシス小体の形成は Caspase 阻害剤によって抑制されなかった。従って MST1 の下流には、Caspase 依存的な経路と非依存的な経路が存在する可能性が示唆された。JNK による Caspase 活性化のメカニズムは未だ明らかではないが、我々は最近 JNK の活性化が BAX のミトコンドリアへの移行を引き起こすことを見いだした。これらの結果を踏まえ、細胞死における JNK の役割について考察したい。

(5) Bcl-2 ファミリーたんぱくの機能

辻本 賀英 (大阪大学・大学院医学系研究科・遺伝子学)

アポトーシスの制御因子である Bcl-2 ファミリーたんぱくは、アポトーシス抑制機能を有するメンバー (Bcl-2 や Bcl-x_L など) とアポトーシス促進機能を持つメンバー (Bax, Bak などと BH3-only たんぱくなど) からなっており、主にミトコンドリアで、カススペース活性化因子 (シトクロム c や Smac/Diablo など) の漏出につながる外膜の透過性を制御することにより、アポトーシスを調節している。

我々は Bcl-2 ファミリーたんぱく、特に Bax, Bak および Bcl-2, Bcl-x_L はミトコンドリア膜上の VDAC を機能

ターゲットとして、その開閉を直接コントロールすることによりシトクロム c の漏出や膜電位低下を制御していることを示し、Bcl-2 ファミリー分子のチャネル制御因子としての機能を提唱してきた。ここでは、最近の知見をまとめつつ、BH3-only たんぱくの機能に関する最近の成果にも触れ、Bcl-2 ファミリーによるアポトーシスの制御メカニズムを考察する。また、我々が同定した小胞体局在の Bcl-2 結合たんぱく RTN-xS および RTN1-C のストレス応答性アポトーシスにおける機能についても紹介する。

(6) T 細胞の分化・増殖におけるミトコンドリア依存性アポトーシス経路の役割

吉田 裕樹, 原 博満 (九州大学・生体防御医学研究所・免疫学部門)

胸腺細胞は、CD4⁺CD8⁻ダブルネガティブ (DN) 細胞から、CD4⁺CD8⁺ダブルポジティブ (DP) 細胞ステージを経て CD4⁺CD8⁺シングルポジティブ (SP) 細胞へと分化する。DP 細胞のうち自己 MHC を認識する細胞がポジティブセレクションを受ける一方、自己 MHC を認識できないものは death by neglect により除去される。さらに、自己抗原と反応性を持つクローンはネガティブセレクションにより除去されることにより T 細胞レパトワーが形成される。末梢 T 細胞において、Fas を介したアポト

シスは活性化 T 細胞や自己反応性のクローンの除去に関与する。また末梢 T 細胞の生存には MHC よりの生存刺激が必要とされ、対応する MHC 非存在下では T 細胞は速やかに消失する。

Apaf1 欠損胎仔肝移入キメラマウスを用いた解析により、CED-4 ホモログ Apaf1 はネガティブセレクションに必須ではないことが示されたが、Apaf1 を介するアポトーシス誘導経路は部分的にネガティブセレクションに関与していることが示唆された。本発表では、ネガティブセレクション

を中心に、T細胞の分化・増殖過程における Apaf1 依存性アポトーシス経路の役割について述べる。

(7) ショウジョウバエを用いた神経細胞死の遺伝学的研究

三浦 正幸（理化学研究所・脳科学総合研究センター・細胞修復機構）

神経細胞死の実行経路を遺伝学的に明らかにする目的で、ショウジョウバエを用いたスクリーニングを試みている。染色体欠失系統を用いたカスパーゼ依存的細胞死実行遺伝子 reaper のドミナントモディファイアースクリーニングを行った結果、JNK の活性化が reaper による細胞死実行に深く関わっていることが明らかになった。同様の染色体欠失系統を用いたスクリーニングによって

Drob-1 (proapoptotic bcl-2 ファミリー) によるカスパーゼ非依存的な細胞死実行経路の研究を行っている。複数の染色体欠失系統の交配実験によって Drob-1 による細胞死に必要な染色体領域 (SD1 と命名) を同定した。SD1 欠失系統は GMR-Drob1 による複眼の縮小を有意に回復させるが、reaper, hid, grim によるカスパーゼ依存的な細胞死を抑制する事はできなかった。

(8) アポトーシス誘導における細胞容積調節破綻の役割

前野 恵美, 石崎 泰樹, 若林 繁夫, 鏑田 武志, 岡田 泰伸（生理研・機能協関, 群馬大・医, 循環病セ, 東医歯大・医）

アポトーシスには等浸透圧環境下においても持続的細胞収縮が伴われるので、細胞容積調節メカニズムの異常の関与が考えられる。事実、このアポトーシス性細胞収縮 (Apoptotic Volume Decrease : AVD) を示している細胞を低浸透圧液に置くと、浸透圧性膨張後の調節性収縮 (Regulatory Volume Decrease : RVD) が著しく促進していることを以前報告した。この AVD 発生は、チトクローム c 放出や、カスパーゼ活性化、DNA ラダー化などの生化学的反応に先行し、カスパーゼ阻害剤によっても阻止されない。RVD は K^+ チャンネルと Cl^- チャンネルの活性化によって達成されるので、これら容積調節性チャンネル阻害剤の効果を調べたところ、AVD のみならず上記の生化学的反応も抑制され、細胞死もまた阻止されることが判明した。ミトコンドリアを介さないアポトーシスでもチャ

ネル阻害剤で同様の結果が得られ、そして、アポトーシス抑制タンパク質 Dcl-2 を強制発現させた細胞では、アポトーシス刺激に対して上記の生化学的反応は起こさなかったが、細胞収縮はみられた。一方、高浸透圧負荷下の浸透圧性収縮の後にみられる調節性膨張 (Regulatory Volume Increase : RVI) 能を欠く細胞では、高浸透圧性負荷によってアポトーシスが誘導される。RVI の達成に関与することの知られている Na^+/H^+ アンチポータの NHE1 アイソフォームを強制発現させて RVI 能を持たせた線維芽細胞では、高浸透圧性アポトーシスが見られなくなることを見出した。これらのことから、アポトーシスにおける細胞収縮は、ミトコンドリアとは独立した細胞容積調節破綻と深く関係していることが明らかとなった。

(9) アポトーシス初期過程における細胞内 K^+ , Cl^- 濃度変化と Ca^{2+} 動員

出崎 克也^{1,2}, 前野 恵美¹, 岡田 泰伸¹ (¹生理学研究所・機能協関部門, ²自治医科大学・生理学2)

アポトーシス初期過程において, カスパーゼの活性化に先だって細胞容積の縮小 (AVD; Apoptotic Volume Decrease) が認められる。AVD 時には低浸透圧負荷時の Regulatory Volume Decrease (RVD) の促進が見られることから, AVD もまた容積調節性チャネルを介する細胞外への K^+ および Cl^- の流出に起因したものと考えられる。そこで本研究では, スタウロスポリン誘発アポトーシス初期過程における細胞内 K^+ (PBFI 蛍光), Cl^- (MQAE 蛍光) 動態を測定した。その結果, スタウロスポリン投

与によってカスパーゼ非依存的な細胞内 K^+ および Cl^- 濃度の低下が観察され, それぞれ K^+ および Cl^- チャネルブロッカーによって抑制された。さらに, 細胞内 Ca^{2+} 濃度変化 (Fura-2 蛍光) を測定したところ, 持続的な細胞内 Ca^{2+} の増加が観察された。そこで, 細胞内 K^+ , Cl^- 濃度の低下と Ca^{2+} 濃度の増加との関連について検討を加え, アポトーシスにおけるこれら細胞内イオン動態の役割について考察する。

(10) Fas 誘導アポトーシスを制御するシグナル伝達: マップキナーゼ (ERK と JNK) の関与

米原 伸 (京都大学・ウイルス研究所・がんウィルス研究部門)

我々が発見したアポトーシス誘導細胞表層レセプター分子 Fas は, がん細胞, ウイルス感染細胞や自己反応性リンパ球などの除去に関わっており, 自己免疫疾患の発症の防御や, がん抑制遺伝子としても機能している。そして, がん化した細胞や生体内で機能しなければならないリンパ球では, Fas を介するアポトーシスが抑制される細胞内分子機構が働いている。ここでは, Fas を介するアポトーシス誘導とその抑制の分子機構, また Fas 刺激に耐性となった細胞が感受性をとりもどす分子機構について, 我々が明らかにしてきた最近の研究結果を報告

したい。具体的には, がん遺伝子産物 Ras やヒト成人 T 細胞白血病ウイルスのがん遺伝子産物 p40Tax が, ERK → CREB の活性化や, NF- κ B の強い活性化によって Fas を介するアポトーシス誘導を阻害するメカニズムを報告する。また, Fas 刺激非感受性白血病細胞株では, アダプター分子 FADD の Fas への会合が阻害されているが, この阻害が Fas 刺激によって活性化された JNK を介するアダプター分子 FADD のリン酸化によって解除される分子機構も解説する予定である。

(11) 神経細胞死の新しい分子機構: 異常蛋白質から空胞形成・細胞死への分子シグナル

垣塚 彰 (京都大学・大学院生命科学研究科・高次生体統御学分野)

これまで, 神経変性疾患は, 疾患ごとに特有の障害部位とその結果として特有の症状 (痴呆・運動失調・異常運動・筋力低下等) を示し, 多くの疾患に当てはまる統一的な発症機構に関わる概念・分子機構を導き出すことはできないと考えられてきた。しかし, 近年, 変性しつつある神経細胞内に異常蛋白質の凝集物や形態的に類似する vacuole がかなり普遍的に存在することが判明し, 神経が変性・消失する過程には, 似通った分子機構が存在

するという考えが広まってきた。本講演では, これまで我々が行ってきた遺伝性神経変性疾患の発症メカニズム, すなわちハンチントン舞蹈病・Machado-Joseph 病等の原因となる伸長した CAG リピートが作り出すグルタミンリピートによって引き起こされる神経細胞の死・変性の分子解析を紹介し, これらの変異が生み出す生化学的実体 (シグナル伝達分子) について議論する。

(12) RING フィンガー蛋白質と細胞死

高橋 良輔（理化学研究所・脳科学総合研究センター・運動系神経変性研究チーム）

最近, RING フィンガー蛋白質の多くはユビキチンプロテアソーム蛋白質分解系に関わるユビキチンリガーゼ (E3) であることがわかってきた。E3 は特異的に基質蛋白質と結合し, 基質のユビキチン化を促進させることで分解に導く酵素である。XIAP は N 末側に BIR モチーフ, C 末端に RING フィンガーモチーフを有する抗アポトーシス蛋白である。XIAP は BIR を介してアポトーシスの実行分子であるカスパーゼに結合し, 活性を阻害するうえ, RING を介してカスパーゼ-3 のユビキチン化及び分解を促進する E3 であることが判った。E3 作用を失った

XIAP は抗アポトーシス作用も減弱する。一方, 常染色体劣性遺伝性パーキンソン病 (AR-JP) の病因遺伝子 Parkin も, RING-IBR-RING モチーフを有する E3 である。我々は Parkin の基質として G 蛋白共役型受容体, Pael (*Parkin-associated endothelin receptor-like*) を同定した。Pael 受容体は AR-JP 患者脳に正常の 10-30 倍以上蓄積していた。またこの受容体は培養細胞で蓄積させると細胞死を誘発し, 脳の神経細胞の中ではドパミンニューロンに比較的特異的に発現していた。以上より, Pael 受容体は AR-JP の発症に重要な役割を果たすと考えられる。

(13) Ras により制御される非アポトーシス性プログラム細胞死

北中 千史, 口野 嘉幸（国立がんセンター研究所・生物物理部）

近年カスパーゼに依存せずアポトーシスとは異なった形態を示すプログラム細胞死の存在が明らかになってきたが, このような細胞死の制御に関わる分子やその生体内での役割についてはよくわかっていない。ras は多くのヒト癌で高頻度に変異・活性化が見られる代表的癌遺伝子であるが, グリオーマや神経芽腫などいくつかの癌ではその変異が極めて稀である。この点に着目しこれら癌細胞における Ras 活性化の影響を調べたところ, 活性型 Ras の発現がグリオーマ細胞に対して autophagic degeneration と呼ばれアポトーシスとは異なる生理的細胞死をカスパーゼの活性化を伴わずに誘導することが明

らかとなった。一方神経芽腫では自然退縮を起こしやすく予後良好な腫瘍で Ras の発現が亢進していることが知られている。組織学的検討の結果, 自然退縮傾向の強い神経芽腫において, Ras の高発現を伴いアポトーシスの形態学的・生化学的特徴を示さない細胞死が起きていることが確認された。さらに神経芽腫細胞内で Ras を発現させると腫瘍組織で認められたのと同様の特徴を示す細胞死がカスパーゼ非依存的に誘導された。以上の結果は, Ras により制御される非アポトーシス性細胞死が癌形成に対して抑制的に機能している可能性を示唆している。

(14) ストレス応答性 MAP キナーゼの生理的役割

仁科 博史, 中川 健太郎, 堅田 利明（東京大学・大学院薬学系研究科・生理化学）

SAPK/JNK シグナル伝達系は, 物理化学的ストレスや炎症性サイトカインによって活性化される MAP キナーゼファミリーの一つであり, 細胞の生存や死の制御を含むストレス応答に関与することが明らかにされている。我々はこれまでに, SAPK/JNK の活性化因子である SEK1/MKK4 や SEK2/MKK7 を欠損するマウス ES 細胞や

マウス個体を作製し, 発生や免疫系に必須の生理的役割を果たしていることを明らかにしてきた。本研究では, 1) SEK1 および MKK7 による相乗的な SAPK/JNK の活性化機構, 2) 紫外線照射によって活性化される SAPK/JNK 系および ERK 系の分子機構およびその生理的役割, 3) 生理的役割を理解するための MAP キナーゼ

の基質探索法について紹介する予定である。

参考文献:

- 1) Wada, T., Nakagawa, K. et al. (2001) Impaired Synergistic Activation of Stress-activated Protein Kinase SAPK/JNK in Mouse Embryonic Stem Cells Lacking SEK1/MKK4. *J.*

Biol. Chem. in press

- 2) Sasaki, T., Wada, T. et al. (2001) The stress kinase MKK7 is a negative regulator of antigen receptor and growth factor receptor induced proliferation in hematopoietic cells. *J. Exp. Med. in press*

(15) 小胞体ストレス応答の分子機構

河野 憲二 (奈良先端科学技術大学院大学・遺伝子教育研究センター)

小胞体は、分泌蛋白や膜蛋白質合成を行う場として知られているが、新しく合成された蛋白質の高次構造形成を行う場として、またその立体構造が正しくとられているかどうかをチェックする場としての重要な機能もになっている。細胞が外界から各種のストレス (ウイルス感染, 発熱, 薬剤投与, 重金属摂取など) を受けると、小胞体内での蛋白質の折り畳みに支障を生じ構造異常蛋白質が小胞体内に蓄積する。これは小胞体ストレスとよばれ、細胞はこの小胞体ストレスに対抗して、小胞体シャ

ペロン遺伝子群の転写レベルでの誘導 (Unfolded Protein Response: UPR) とタンパク質の翻訳レベルでの抑制を起こす。この細胞応答を小胞体ストレス応答と呼び、この応答に小胞体膜貫通タンパク質 IRE1 と PERK とが重要な役割をになっている。動物細胞の IRE1 は IRE1 α と IRE1 β の 2 種類あることがわかっており、今回我々は小胞体ストレスに応答して IRE1 β が活性化すると 28S rRNA を特異的に切断し、タンパク質合成の抑制に働くことを明らかにしたのでその分子機構について報告する。

(16) 小胞体および核機能異常とアルツハイマー病の神経細胞死

今泉 和則 (奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・細胞構造学)

アルツハイマー病患者脳でみられる神経細胞死は、アミロイドの蓄積と密接に関連すると信じられているが詳細なメカニズムの解明には到っていない。我々は家族性および孤発性アルツハイマー病の原因遺伝子の機能解析を通し、アルツハイマー病でみられる神経細胞死がオルガネラの機能異常、特に小胞体および核の機能異常が引き金となる可能性を明らかとしてきた。本研究会では、家族性アルツハイマー病の原因遺伝子プレセニリン 1 が

小胞体ストレスセンサーの機能を攪乱して各種ストレスに対し抵抗性を減弱させ神経細胞死を引き起こす可能性と、孤発性アルツハイマー病ではプレセニリン 2 の異常スプライシングがトリガーとなって、そのスプライシング変種由来のたんぱく質が神経細胞にダメージを与える可能性について紹介する。さらに最近、プレセニリン 2 の異常スプライシングを誘導する因子の同定に成功したので、その研究成果についても報告する。

(17) ポリ Q 蛋白質による神経細胞死のメカニズム

西頭 英起, 一條 秀憲 (東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・分子情報伝達学分野)

ポリグルタミン病の原因は、伸長したポリグルタミン鎖を含む原因遺伝子産物の凝固体が、神経細胞内に蓄積することによる。しかし、その神経細胞死の分子機構については未だ不明な点が多い。我々は、1) ポリグルタミ

ン凝固体がユビキチンプロテアソーム機構の破綻によってもたらされる小胞体ストレスを誘導する、2) JNK/p38 経路において MAPKKK として機能する ASK1 が小胞体ストレス誘導性アポトーシスに必須である、3) ASK1-/

ー由来の初代培養神経細胞を用いた解析により，ポリグルタミン誘導性細胞死に ASK1 が必要であることを明らかにした。従って小胞体ストレス-ASK1 系を介したアポ

トーシスシグナルが，ポリグルタミン病発症の分子メカニズムにおいて重要な役割をしていることが示唆された。

7. ATP 受容体の生理機能と疼痛のメカニズム

2001年8月22日－8月23

代表：井上 和秀（国立医薬品食品衛生研究所）

世話人：井本敬二（岡崎国立共同研究機構生理学研究所）

(1) オーバービュー

井上 和秀（国立医薬品食品衛生研究所）

(2) 乳腺細胞の伸展刺激による Ca^{2+} 反応と ATP 放出

古家喜四夫¹，川口久美¹，Fernando Lopez-Redondo¹，成瀬恵治²，曾我部正博^{1,2}

(¹ 科学技術振興事業団，² 名古屋大院・医・第2生理)

(3) P2Y₁ 受容体との複合体形成に伴うアデノシン A₁ 受容体の活性調節機構

吉岡和晃^{1,2}，神谷敏夫¹，斉藤 修¹，中田裕康¹

(¹ 東京都神経研・生体機能分子，² 科学技術振興事業団)

(4) ATP 受容体によるミクログリアの TNF α 産生制御

秀 和泉，鈴木智久，井戸克俊，井上敦子，仲田義啓（広島大・医・総合薬・薬効解析）

(5) ATP 受容体刺激による細胞骨格の再構築

尾松万里子，松浦 博（滋賀医科大生理学第2）

(6) PC12 細胞の ATP 放出に果たすミトコンドリアの役割の検討

太田善浩，吉永恵美子，平木啓子，井上和秀（東京農工大・工・生命工学科，国立衛研・薬理）

(7) CACO-2 細胞に対するヌクレオシドの細胞死誘導作用

西藤勝^{1,2}，長井薫¹，西崎知之¹，中川一彦²，山村武平²

(¹ 兵庫医大・生理学第2，² 外科学第2)

(8) 脊髄における ATP 及び BK の痛覚伝達を制御する電位依存性 Ca^{2+} チャネルサブタイプについて

大久保つや子，加藤明美，北村憲司（福岡歯科大・細胞分子生物学）

(9) ストレプトゾトシン誘発糖尿病マウスにおける神経因性疼痛への P2X 受容体の関与

森山朋子¹，上野伸哉²，山田博美²，本多健治¹，高口雅子¹，古賀浩平¹，高野行夫¹，

神谷大雄¹，桂木猛²

(福岡大¹ 薬・薬理，² 医・薬理)

(10) P2Y 受容体活性化によるミクログリアからの IL-6 産生機構

重本（最上）由香里¹，小泉修一¹，津田 誠¹，大澤圭子²，高坂新一²，井上和秀¹

(¹ 国立衛研・薬理，² 国立精神神経センター)

(11) ラット DRG 神経細胞の P2Y 受容体

小泉修一，津田 誠，重本（最上）由香里，井上和秀（国立衛研・薬理）

(12) ラット摘出心房標本のアデニンヌクレオチドによる収縮抑制応答における ecto-alkaline phosphatase の役割

松岡 功¹，佐藤 薫²，木村 純子¹

(福島医大・医・薬理¹，麻酔科²)

(13) 海馬アストロサイト由来 ATP の神経伝達制御

小泉修一，井上和秀（国立衛研・薬理）

(14) ATP 受容体を介した海馬シナプス伝達抑制作用

戸崎秀俊，菅野武史，相原英夫，長井薫，西崎知之（兵庫医大・生理学第2）

- (15) 中枢内一次求心情報処理とシナプス P2X 受容体
繁富英治, 加藤総夫 (東京慈恵医大・薬理学第2)
- (16) PC12 細胞における ATP による細胞内 Ca 増加反応の持続相について-ミトコンドリアの関与-
伊藤茂男, 丸山浩二, 太田利男 (北大院・獣医・薬理)
- (17) 副腎皮質細胞における ATP 受容体の役割の考察
太田善浩, 青鹿謙司 (東京農工大・工・生命工学科)
- (18) ATP 受容体と疼痛: オーバービュー
吉村 恵
- (19) アロディニア発現と P2X 受容体
津田 誠, 井上和秀 (国立衛研・薬理) (九大院・医・統合生理)
- (20) 坐骨神経結紮モデルにおける後根神経節における P2X 受容体 mRNA 変化
上野伸哉¹, 山田博美¹, 森山朋子², 本多健治², 高野行夫², 神谷大雄², 桂木猛¹
(福岡大¹ 医・薬理, ² 薬・薬理)
- (21) 知覚神経節における ATP 受容体発現
野口光一, 戴毅, 都築健三, 福岡哲男 (兵庫医大・解剖第2)
- (22) 皮膚痛覚受容器の熱反応に対する ATP の効果
矢島弘毅, 佐藤純, 水村和枝 (名古屋大・環境医学研・神経性調節分野)
- (23) 代謝型 ATP 受容体によるカプサイシン受容体の機能制御
富永真琴 (三重大・医・生理学第1)
- (24) ATP および capsaicin 受容体発現感覚線維の投射ニューロンへの収束
吉村 恵, 中塚映政, 古江秀昌, GU Jianguo (九大院・医・統合生理, フロリダ大脳研)
- (25) ATP 受容体を介する末梢性疼痛発現機構
植田弘師, 川島敏子 (長崎大・薬・分子薬理)
- (26) 脳内 ATP 受容体を介した侵害受容反応抑制作用
南 雅文, 福井真人, 中川貴之, 佐藤公道 (京大院・薬・生体機能解析学)

【参加者名】

井上 和秀 (国立医薬品食品衛生研/九州大院薬), 伊藤茂雄 (北大院・獣医), 大久保 聡子 (東北大院薬), 松岡 功 (福島医大医), 小泉 修一, 津田 誠, 重本 由香里 (国立医薬品食品衛生研), 宮竹 真由美 (星薬科大学), 太田 善浩 (東京農工大工), 加藤 総夫, 繁富 英治 (慈恵医大), 中田 裕康, 吉岡 和晃 (東京都神経研), 山口 時男, 田村 誠司, 甲田 雅伸 (山之内製薬), 藤田 真一 (味の素), 井上 善文 (ジャパンエナジー), 井上 かおり (資生堂), 馬越 史歩 (丸石製薬), 古家喜四夫, F. Lopez-Redondo (科学技術振興事業団「細胞力覚プロジェクト」), 佐藤 純, 矢島 弘毅 (名古屋大・環境医学研), 下条 雅人, 新庄 勝浩, 我謝 徳一 (ファイザー製薬), 富永 真琴, 飯田 陶子, 沼崎 満子 (三重大医), 平田 洋子 (岐阜大学・工・生命工学科), 尾

松 万里子, 濱田 可奈子 (滋賀医大), 南 雅文 (京大院薬), 山下 勝幸, 杉岡 美保 (奈良県立医大), 野口 光一, 戸崎 秀俊, 西藤 勝, 戴 毅, 西崎 知之 (兵庫医大), 西村 誠一郎 (日本ベーリンガーインゲルハイム), 小川 慎志 (住友製薬), 秀 和泉, 仲田 義啓 (広島大医総合薬学), 吉村 恵 (九州大院医), 藤下加代子, 溝腰 朗人 (九州大院薬), 桂木 猛, 上野 伸哉 (福岡大医), 森山 朋子 (福岡大薬), 大久保 つや子 (福岡歯科大), 植田 弘師, 川島 敏子 (長崎大薬), 森泰生 (統合バイオ), 早川 泰之, 毛利 達磨, 春日井 雄, 田中 淳一, 佐々木 幸恵, 松下 かおり, 松本 信幸, 大倉 正道, 森 誠之, 岸本 拓哉, 劉 婷婷, 根本 知己, 松下 かおり, 佐々木 幸恵, 井本 敬二 (生理研)

【概要】

ATP 受容体はイオンチャネル型である P2X 受容体と代謝調節型 (G 蛋白共役型) である P2Y 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 受容体は多種多様の組織、細胞系に発現し、神経伝達、カルシウムシグナリング、炎症反応、細胞増殖など重要な生理機能に関与しているが、その全体像はいまだ明らかにはなっていない。受容体機能や発現細胞の多様性のために研究者もそれぞれの分野に分散しており、既存の一つの学会では総合的な情報交換ができない。本研究会の第一の目的は、このよ

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、研究の進展を図れるような場を提供することである。第二に、最近特に注目されている分野に集中して議論を深めその研究を促進させることである。研究会の内容はこれらの目的にかなった総合的なものとなるが、最近のホットな話題に関しては特別セッション「痛みと ATP」を設け、疼痛メカニズムにおける ATP 受容体の役割について議論した。

(1) 乳腺細胞の伸展機械刺激による Ca^{2+} 反応と ATP 放出

古家喜四夫¹, 川口久美¹, Fernando Lopez-Redondo¹, 成瀬恵治², 曾我部正博^{1,2}

(¹ 科学技術振興事業団・細胞力覚プロジェクト, ² 名古屋大院・医・生理)

乳腺上皮細胞は細いガラス棒でタッチするといった機械的刺激に応答し、ATP, UTP, UDP などのヌクレオチドの放出と拡散およびまわりの細胞での P2Y₂ 型 ATP 受容体の活性化による細胞間 Ca^{2+} 波を引き起こす。授乳期の乳腺では、ミルクを合成・分泌する分泌上皮細胞でできた袋状の腺胞が発達しミルクが貯えられている。腺胞のまわりは筋上皮細胞がかごのように取り囲み、脳下垂体後葉から内分泌されたオキシトシンによって収縮し、貯まったミルクが放出される。この筋上皮細胞の収縮が機械的刺激となって Ca^{2+} 波が発生すること、さらに筋上皮細胞上には P2Y₁ 型 ATP 受容体があり Ca^{2+} 波によって再び収縮することなど、ATP がミルク分泌の増強などに寄与していることをすでに明らかにしている。

授乳期の乳腺における別の機械的刺激要因として、ミ

ルクの増加にともなう腺胞の膨張が乳腺上皮細胞に伸展機械刺激を与えることが考えられる。そこで成瀬らの開発した伸展装置を用い、細胞をシリコン薄膜上に培養し、引っ張りによる伸展刺激を与え、細胞内 Ca^{2+} 測光および Luciferin-Luciferase 反応を用いた ATP 測定を行った。その結果、乳腺細胞は伸展刺激にも応答し、 Ca^{2+} 流入および細胞内 Ca^{2+} 遊離による細胞内 Ca^{2+} 上昇を引き起こすと同時に、ATP を放出し Ca^{2+} 波を発生することが明らかとなった。筋上皮細胞のオキシトシンによる収縮が ATP によってシナジスティックに増強されることを考え合わせると、血流を介した同じ濃度のオキシトシンに対し、ミルクの貯まった腺胞のみが収縮し得るという機構の存在が示唆された。

(2) P2Y₁ 受容体との複合体形成に伴うアデノシン A₁ 受容体の活性調節機構

吉岡和晃^{1,2}, 神谷敏夫¹, 齊藤 修¹, 中田裕康¹

(¹ 東京都神経科学総合研究所・生体機能分子研究部門, ² 科学技術振興事業団・科学技術特別研究員)

【目的】昨年度の本研究会において、A₁ アデノシン受容体 (A₁R) と P2Y₁R 受容体 (P2Y₁R) はヘテロ複合体を形成し、A₁R の薬理学的特性が P2Y 受容体様に変化するこ

とを報告した。本研究では、インタクトな細胞における A₁R/P2Y₁R 複合体形成の動態を調べるために Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) 実験に

よる解析を試みた。また更に、ラット脳神経系における A₁R/P2Y₁R 複合体形成の可能性も検討した。

【方法】HEK293T 細胞に共発現させた HA-A₁R-GFP 及び Myc-P2Y₁R-*Renilla luciferase* (Myc-P2Y₁R-Rluc) の複合体形成の有無を免疫共沈実験によって確認した後、複合体形成のアゴニスト依存性を BRET により解析した。また、ラット初代培養神経細胞および脳スライスにおける両受容体の分布を免疫 2 重染色により観察した。更に、ラット脳の膜抽出画分における A₁R/P2Y₁R 複合体の存在を免疫共沈実験により調べた。

【結果・考察】HA-A₁R-GFP 及び Myc-P2Y₁R-Rluc を共発現させた細胞において、それぞれの受容体リガンドである CPA と ADPβS によって同時に刺激した場合のみ

BRET 比は経時的に上昇し、10 分後に約 2 倍に達した。この効果は P2Y₁R アンタゴニスト MRS2179 により完全に消失した。このことは A₁R/P2Y₁R 複合体が両受容体の活性化に依存していることを示唆している。またラット脳の膜抽出画分の抗 A₁R 抗体免疫沈降物中に、抗 P2Y₁R 抗体で検出されるタンパクバンドが観察された。すなわちラット脳神経系においても、A₁R と P2Y₁R はヘテロ複合体として存在することが示された。更に、両受容体は大脳皮質や海馬の多くの同一ニューロンに局在していることが免疫組織化学により観察されたことから、脳神経系において A₁R/P2Y₁R ヘテロ複合体が実際に存在していることが明らかとなった。

(3) ATP 受容体によるミクログリアの TNF- α 産生制御

秀 和泉, 鈴木智久, 井戸克俊, 井上敦子, 仲田義啓
(広島大学・医・総合薬・薬効解析)

【目的】脳に存在するミクログリアは虚血や炎症時に速やかに活性化され、末梢のマクロファージと同様、死細胞の貪食や生理活性物質(活性酸素・サイトカインなど)の放出など多彩な機能を発揮する。私達はこれまで ATP がミクログリアから腫瘍壊死因子(TNF- α)の産生・放出を引き起こすことを明らかにしてきた。ミクログリアには複数の ATP 受容体(少なくとも P2X₇, P2Y₂, P2Y₁₂など)が発現することから、今回さらに、TNF- α 産生に関与する P2 受容体サブタイプと MAP キナーゼ(特に ERK, p38)の役割について解析した。

【方法】ミクログリアはラット新生児大脳から初代培養を行った。TNF- α 遊離量は ELISA により、TNF- α mRNA 発現量はリアルタイム RT-PCR により定量した。MAP キナーゼの活性化はウェスタンブロッティングにより検出した。

【結果】TNF- α 遊離は ATP のほか P2X₇ 刺激薬 BzATP によっても強く引き起こされ、P2X₇ 遮断薬 Brilliant Blue

G (BBG) で抑制されたことから、P2X₇ 受容体が中心的な役割を果たすことが示唆された。一方、ATP/BzATP による細胞内 TNF- α 蛋白発現は MEK 阻害薬(U0126)および p38 阻害薬(SB203580)により抑制され、TNF- α 産生は ERK および p38 の両者に依存することが示された。しかし、TNF- α mRNA 発現に関しては、U0126 が著明な抑制を示したのに対し、SB203580 はほとんど影響を及ぼさなかった。また、ATP/BzATP は速やかに ERK および p38 を活性化するが、BBG は ERK ではなく p38 の活性化のみ抑制した。さらに、P2Y₁₂ 遮断薬(AR-C67085)にも ATP/BzATP による ERK 活性化に対する抑制効果は認められなかった。

【結論】ミクログリアにおいて ATP/BzATP は、おそらく P2Y₁₂ 以外の P2Y 受容体を介した ERK 活性化に依存して TNF- α mRNA を発現させると同時に、P2X₇ 受容体を介して p38 を活性化し発現した mRNA が蛋白へと翻訳されるまでの過程を制御する可能性が示唆された。

(4) ATP 受容体刺激による細胞骨格の再構築

尾松万里子, 松浦 博 (滋賀医大・第二生理)

細胞内 Ca^{2+} は通常極めて低い濃度に保たれており、その上昇は種々の細胞機能発現のトリガーとなっている。細胞内 Ca^{2+} の動員経路には細胞外からの流入と細胞内ストアからの放出の2種類があり、多くの細胞において細胞内 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 遊離を惹起する最も主要なメッセンジャーはGタンパク連関型受容体などの刺激で産生されたイノシトール 1,4,5-三リン酸 (IP_3) である。 IP_3 によって引き起こされる Ca^{2+} 放出はストアを枯渇させ、それに伴い容量性 Ca^{2+} 流入機構が活性化されることが知られている。この機構は、非興奮性細胞における主たる細胞外からの Ca^{2+} 動員経路であり、我々は、ラット褐色脂肪細胞において、細胞外 ATP がこの容量性 Ca^{2+} 流入を

抑制することを見出した。

今回、ラット褐色脂肪細胞において、Gタンパク共役型 ATP 受容体である P2 受容体ファミリーのうち、 P2Y_1 , P2Y_2 , P2Y_4 , P2Y_6 が発現していることを RT-PCR 法により確認した。また、細胞外 ATP による Ca^{2+} 流入阻害と細胞骨格の関連を調べるため、F-アクチンを Alexa 488-フアロイジンによって蛍光ラベルし、共焦点レーザー顕微鏡による観察を行なったところ、P2 受容体刺激によりアクチンが細胞膜近傍に厚く再重合することがわかった。この P2 受容体を介するアクチンの再重合作用について、その細胞内情報伝達機構および容量性 Ca^{2+} 流入阻害との関係について検討する。

(5) PC12 細胞の ATP 放出に果たすミトコンドリアの役割の検討

太田善浩¹, 吉永恵美子¹, 平木啓子¹, 井上和秀²

(¹ 東京農工大・工・生命, ² 国立衛研・薬理)

【目的】 PC12 細胞は、細胞外からの Ca^{2+} 流入により開口放出を行うため、神経細胞のモデルとしてよく用いられる。神経細胞において、ミトコンドリアは Ca^{2+} を取り込むことにより細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を抑える働きをすると従来報告されてきた。一方で、ミトコンドリアは高濃度 Ca^{2+} を取り込むと膜透過性変化 (PT) を起こし、細胞質に Ca^{2+} を放出するという報告もある。そこで本研究では、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を引き金として起こる開口放出へのミトコンドリア PT の関与について調べた。

【方法】 本実験では、PC12 細胞を Ca^{2+} 感受性蛍光色素 Indo-1 での染色後、細胞膜上の電位感受性 Ca^{2+} チャンネルを開口させる KC 1 添加による蛍光顕微鏡を用いた細胞内 Ca^{2+} 濃度測定や、電位感受性蛍光色素 TMRE によるミトコンドリア膜電位測定を行った。さらに、開口放出

の指標となる ATP 放出量を測定した。

【結果】 KC 1 添加により、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇と開口放出が確認された。細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に伴い、NADH 量の増加、フラビンの還元、ミトコンドリアの脱分極が観察されたため、細胞質で増加した Ca^{2+} がミトコンドリアに取り込まれていることがわかった。次に、CCCP とオリゴマイシンを使ってミトコンドリアを部分的に脱分極させて細胞質からの Ca^{2+} 流入を抑えるか、CsA により PT を抑制すると、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇及び開口放出は抑えられた。これらに基づき、PC12 細胞において、高濃度で Ca^{2+} を取り込んだミトコンドリアは PT を起こして細胞内に Ca^{2+} を放出することで開口放出を促進するという仮説を立て、議論する。

(6) CACO-2 細胞に対するヌクレオシドの細胞死誘導作用

西藤 勝^{1,2}, 長井 薫¹, 西崎知之¹, 中川一彦², 山村武平²
 (兵庫医科大学 ¹生理学第二講座, ²外科学第二講座)

アデノシンデアミナーゼ欠損症は先天性の重症免疫不全症であり, 腸管粘膜に異常な炎症反応が起こることが知られている。

近年アデノシンの細胞毒性に関する報告が 2, 3 あったが, アデノシンデアミナーゼ欠損症の場合も, 余剰のアデノシンが腸管上皮細胞死を誘導することによって病態を発現する可能性が考えられる。そこで, 我々は腸上皮細胞のモデルとして大腸癌細胞株 CACO-2 を用い, アデノシンの腸管における細胞死誘導メカニズムについて検討した。まず, アデノシンの毒性について検討した結果, アデノシンは 10mM 48 時間処理で, CACO-2 細胞の約 30% に細胞死を誘導することが分かった。アデノシン毒性のメカニズムについては, アデノシンは細胞内に取り込まれた後リン酸化されることにより毒性を発揮するものと, 細胞外レセプターに結合し誘導するものが考えられる為, 細胞内毒性であるのか, あるいは細胞外からの

刺激であるのか検討した。ヌクレオチドトランスポーター阻害剤である Dipyridamole 存在下, あるいはアデノシンリン酸化阻害剤である 5'-amino-5'-deoxyadenosine 存在下でアデノシンによる細胞死誘導実験を行ったが, どちらの場合も有意な阻害効果は見られず, CACO-2 細胞に対しては細胞外で反応し細胞死を誘導していることが強く示唆された。そこで細胞外で細胞死誘導に関わる受容体について検討した。アデノシン受容体アンタゴニストの Theophylline 又はプリン受容体アンタゴニストの Suramine 存在下で細胞死誘導実験を行い, どちらの経路により細胞死を誘導しているのか検討した。今回の結果は, 腸上皮細胞死が細胞外アデノシン濃度の上昇により誘導され得ることを示唆しており, アデノシンデアミナーゼ欠損症における腸粘膜炎症発現メカニズムに新たな知見を与えるものである。

(7) 脊髄における ATP 及び BK の痛覚伝達を制御する電位依存性 Ca^{2+} チャネルサブタイプについて

大久保つや子, 加藤明美, 北村憲司
 (福岡歯科大学細胞分子生物学講座)

電位依存性 Ca^{2+} チャネル (VDCC) は, 神経系においては脱分極時の Ca^{2+} 流入, それに伴う神経伝達物質の放出や神経膜の興奮性に深く関わっている。免疫染色によって, 高電位活性型の L, N, P/Q 及び R 型のすべてが脊髄後角に存在することが報告されており, 特に, N と P/Q 型については, 脊髄での痛覚伝達において重要な働きをしていることがホルマリン法などを用いた報告で明らかにされつつある。しかしながら, 用いられてきた疼痛モデルは様々な発痛物質が関与するものであり, 得られるデータは解釈を複雑にしている。本研究は, ATP 及びブラジキニン (BK) の二つの末梢性疼痛モデルを用いて, VDCC の各サブタイプの脊髄における痛覚伝達への関与を検討した。

α, β meATP (100 nM) 及び BK (500 pM) を, それぞれマ

ウス後肢足蹠内に投与し, 直後から起きる注入足への licking と biting の反応時間の 5 分間の総計 (いずれも 5 分以内に終息した) を疼痛の指標とした。拮抗薬はすべて脊髄クモ膜下腔内へ投与した。

α, β meATP による疼痛反応は, N 型 VDCC 拮抗薬の ω -conotoxin GVIA (ω -CgTX) と P/Q 型拮抗薬 ω -agatoxin (ω -AgTX) によって有意に抑制された。しかし, L 型拮抗薬 calciseptine (CAL) では変化が見られなかった。一方, BK による疼痛反応は, ω -CgTX と CAL によって有意な抑制が観察されたが, ω -AgTX では変わらなかった。また, α, β meATP による疼痛反応は NMDA 受容体拮抗薬 (D-AP5) によって, BK による疼痛反応は NK1 受容体拮抗薬 (L-703,606) によってそれぞれ有意に抑制された。

以上のことから, 末梢に投与された ATP はグルタミン

酸含有知覚神経の、BK はペプチド含有知覚神経の興奮を引き起こし、脊髄における前者の痛覚伝達は N 型と

P/Q 型の VDCC によって、後者は N 型と L 型の VDCC によって制御されることが示唆された。

(8) ストレプトゾトシン誘発性糖尿病マウスにおける神経因性疼痛への P2X 受容体の関与

森山 朋子¹, 上野 伸哉², 山田 博美², 本多 健治¹,
高口 雅子¹, 古賀 浩平¹, 高野 行夫¹, 桂木 猛², 神谷 大雄¹
(¹福岡大 薬学部 薬理学教室 ²福岡大 医学部 薬理学教室)

【目的】糖尿病の病態において生じる神経障害の一つに痛覚過敏といった感覚異常が起こり、臨床上問題となっている。近年、I 型糖尿病の動物モデルが確立され、その糖尿病性神経因性疼痛の発症メカニズムとして、代謝性因子の異常による神経変性や、神経再生機能低下、神経伝達物質の変化などが考えられているがその詳細なメカニズムについてはいまだ不明な点が多い。そこで今回、我々は、ストレプトゾトシン (STZ) 誘発性糖尿病モデルを用い、神経因性疼痛発症における P2X 受容体の役割について検討を行なった。

【方法】実験動物として、ddY 系雄性マウス (体重 25–30g) を使用した。STZ (200mg/Kg) をマウスの尾静脈内へ投与し、2 週間後、血糖値が 400mg/dL 以上のものを糖尿病と判定した。疼痛の評価は、熱性刺激応答の指標として

プランターテスト、機械性刺激応答の指標として von Frey テストを用いた。更に、脊髄後根神経節 (L4–L6) における P2X 受容体 mRNA 発現量の変化をリアルタイム RT-PCR 法を用いて検討した。

【結果】STZ 誘発性糖尿病マウスにおいて、熱性刺激に対する逃避反応潜時は非糖尿病群と比較し有意な変化は認められなかったが、機械性刺激に対する反応は、糖尿病群において触覚閾値の低下、すなわち、アロディニアの発現が認められた。また、脊髄後根神経節 (L4–L6) の P2X 受容体の mRNA を定量した結果、P2X₂ および P2X₃ 受容体の mRNA 発現量の有意な増加が認められた。したがって、糖尿病発症時における神経因性疼痛発現には、P2X₂ および P2X₃ 受容体が関与している可能性が示唆された。

(9) P2Y 受容体活性化によるミクログリアからの IL-6 産生機構

重本 (最上) 由香里, 小泉修一, 津田 誠, 井上和秀 (国立衛研・薬理)

ミクログリアは脳の病態時や損傷時に活性化し神経組織の再生修復など、さまざまな役割を果たしている。この活性を制御する主要な因子が ATP である。ミクログリアにはイオンチャネル型の P2X₇ と、G-蛋白共役型の P2Y が存在している。近年 P2X₇ を介したケミカルメディエーターや炎症性サイトカインの産生が多数報告され、中枢における P2X₇ の役割が注目されている。一方、P2Y についてはほとんど報告されていない。

本研究では、ミクログリア株細胞 MG-5 を用いて、ATP 刺激により炎症性サイトカインの一つである IL-6 が誘導されるか検討した。ATP は、濃度依存的に IL-6 mRNA 及び蛋白を増加し、これらの反応は P2 アンタゴニストと

して知られる Suramin によって有意に抑制された。さらにその産生メカニズムについて検討した結果、ATP は細胞外からの持続的な Ca²⁺流入を引き起こし、p38 および Ca²⁺依存性 PKC を活性化し、その結果 IL-6 が産生されることが明らかとなった。ATP による IL-6 産生は、P2X₇ のアンタゴニスト (oATP および Brilliant Blue G) では抑制されず、三量体 G-蛋白阻害剤 (N-Ethylmaleimide) および PLC 阻害剤 (U73122) によって強く抑制され、P2X₇ よりもむしろ Gq/11 共役型の P2Y を介していると考えられた。本研究において、初めてミクログリアにおける P2Y を介したサイトカイン産生機構が明らかになった。

(10) ラット DRG 神経細胞の P2Y 受容体

小泉修一, 津田 誠, 重本 (最上) 由香里, 井上和秀 (国立衛研・薬理)

ATP による一次求心性神経の痛覚情報の伝達には, P2X 受容体が重要な役割を果たしている。従って, 後根神経節 (DRG) における各種 P2X 受容体の機能解析が現在も精力的に行われているが, P2Y 受容体に関する情報は少ない。そこで DRG 神経細胞の P2Y 受容体の薬理学・生理学的性質を明らかにする目的から, ATP により惹起されるラット DRG 初代培養神経細胞 (培養 2-3 日) の細胞内 Ca^{2+} 濃度変化 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) を詳細に観察した。ATP は 60% 以上の DRG 神経細胞で, 細胞外 Ca^{2+} 非依存的な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を引き起こし, これは phospholipase C 阻害剤 U73122 及び小胞体 Ca^{2+} ATPase 阻害剤 cyclopiazonic acid により抑制された。各種 ATP アナログでは, UTP が最も多くの細胞で Ca^{2+} 応答を惹起した。UTP による Ca^{2+} 応答は suramin 感受性であることから, P2Y₂ 受容体を介する

応答であると考えられる。RT-PCR により, P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄ 及び P2Y₆ の mRNA が, in situ hybridization では DRG 神経細胞の P2Y₂ mRNA の存在が確認された。UTP 応答細胞の多くは, anti-peripherin 陽性, 小型 (20~30 μm), さらに capsaicin 感受性であった。これまで DRG の P2Y 受容体としては, P2Y₁ 受容体を介した, A β 繊維および C 繊維の, それぞれ触刺激伝達 (Nakamura & Strittmatter, PNAS, 93:10465-10470, 1996) および侵害受容器 VR1 応答の増強 (Tominaga et al., PNAS, 98:6951-6956, 2001) が報告されている。本実験結果は P2Y₂ 受容体も, DRG の痛覚伝達に関与していること, また P2Y 受容体サブクラスに固有の知覚情報の制御様式が存在する可能性を示唆するものである。

(11) ラット摘出心房標本のアデニンヌクレオチドによる収縮抑制応答における ecto-alkaline phosphatase の役割

松岡 功¹, 佐藤 薫², 木村 純子¹
(福島医大・医・薬理¹, 麻酔科²)

摘出心房筋標本においてアデニンヌクレオチド (AdNu) が陰性変力作用を示すことはよく知られている。この反応は AdNu が細胞外で急速にアデノシン (Ade) に代謝され, P1 受容体を介して発現すると考えられている。従来, AdNu からの Ade 産生には ecto-5'-nucleotidase (CD73) が重要な役割を果たすと考えられてきた。最近, 我々は ecto-alkaline phosphatase (eALP) も, CD73 と同様にアデノシン産生に関与することを見出した。そこで, ラット摘出心房筋標本における AdNu の陰性変力作用に eALP が関与するかを検討した。ラット心臓より心房を摘出し, 95%O₂/5%CO₂ を通気した 37°C の Krebs-Ringer 緩衝液中に懸垂した。薬物は Krebs-Ringer 緩衝液中に添加し, FD ピックアップを介して等尺性の自発収縮を記録した。自発収縮を示す心房標本に ATP, ADP, AMP および

Ade を添加すると, ほぼ同じ効力で用量依存的な陰性変力作用が認められ, EC₅₀ は約 20 μM であった。この AdNu および Ade の作用は P1 受容体阻害薬の XAC により完全に阻害されたが, CD73 の阻害薬である $\alpha\beta\text{MeADP}$ では抑制されなかった。一方, CD73 では分解されず, eALP の作用で Ade に変換される 2'-AMP は, AMP や Ade と同様に XAC で阻害される陰性変力作用を示した。また, 2'-AMP の作用は, eALP の阻害薬である levamisole と $\beta\text{-glycerophosphate}$ の添加により消失した。さらに, RT-PCR による解析では, ラット心房筋において CD73 と同等な eALP の発現が認められた。以上の結果から, 摘出心房筋標本における AdNu から Ade への変換には, CD73 のみならず eALP も重要な役割を果たすことが示唆された。

(12) 海馬アストロサイト由来 ATP の神経伝達制御

小泉修一, 井上和秀 (国立衛研・薬理)

従来グリア細胞は、神経細胞骨格の物理的な支持あるいは栄養因子供給など、主に神経細胞の生存・維持のための“裏方”的役割を演じていると考えられていたが、実際には積極的に“**神経伝達の制御**”を行っていることが知られるようになってきた。特にアストロサイトは、glutamate 放出により“神経伝達”をダイナミックに調節し得るが (Araque et al., J. Neurosci., 18, 6822-6829, 1998; Parpura and Haydon, PNAS, 97, 8629-8634, 2000), glutamate では説明の付かない現象は多い。アストロサイト-神経細胞間情報伝達に ATP が関与していること及びその作用機序を明らかにする目的から、海馬初代培養細胞の Ca^{2+} 及び ATP イメージングによる検討を行った。海馬アストロサイトでは、機械刺激により近傍のアストロサイト間へ伝播する Ca^{2+} -wave が観察されるが、これは apyrase や P_2 受容体拮抗薬で抑制されることから、ATP

の放出と拡散に起因していると考えられた。この ATP 放出と拡散は、好感度 VIM カメラとルシフェリナーゼ反応の応用により、画像としても確認された。海馬神経細胞では、glutamate の神経伝達による自発的 Ca^{2+} oscillation が認められるが、ATP は glutamate 放出を抑制することによりこの Ca^{2+} oscillation を消失させた。神経・グリア共培養細胞系で、アストロサイトの機械刺激を行うと、アストロサイト間の Ca^{2+} -wave と共に神経細胞で観察されていた Ca^{2+} oscillation の抑制が認められた。この Ca^{2+} oscillation 抑制作用は、apyrase/adenosine deaminase により消失した。以上、アストロサイト由来の ATP が、海馬の神経伝達をダイナミックに制御していることが明らかとなり、中枢神経-グリア細胞間の液性細胞間情報伝達物質としての ATP の重要性が示唆された。

(13) ATP 受容体を介した海馬シナプス伝達抑制作用

戸崎秀俊, 菅野武史, 相原英夫, 長井薫, 西崎知之
(兵庫医科大学生理学第二講座)

モルモット海馬切片の歯状回から得られたから集合電位 (PS) に対して ATP は、濃度依存性 ($0.1 \mu\text{M}$ - 1mM) かつ可逆的に PS を抑制した。 $100 \mu\text{M}$ 以上の ATP 投与で PS は完全に消失した。ATP の海馬神経伝達抑制作用は GABA_A 受容体阻害剤、ピククリンで抑制された。 P_2 受容体アゴニストは ATP と類似した海馬神経伝達抑制作用を示し、その強さは α, β -methyleneATP > 2-methylthioATP >>> UTP $\approx$ α, β -methyleneATP の順であった。 α, β -methyleneATP の海馬神経伝達抑制作用は P_2 受容体アンタゴニストであるスラミン、PPADS で抑制された。ATP はモルモット海馬切片から GABA 放出を増加させたが、培養ラット海馬神経細胞における GABA_A 受容体反応には影響を与えなかった。以上の結果は、ATP がシナプス前末 P_{2X} 受容体を介して GABA の放出を刺激し海馬神経伝達を抑制する、ことを示唆している。もし、ATP が海馬神経伝達を抑制するのであれば、ATP は脳虚血障害に対

して保護作用を示すと想定できる。このことを証明するために、ATP 存在下、非存在下 (コントロール) で灌流細胞外液を 20 分間、無酸素・無グルコース液 (臨床的には完全虚血状態を意味している) に変換し、その後、正常外液に戻した時の PS の変化を経時的に記録した。20 分間の無酸素・無グルコース処理により PS は完全に消失し、ATP 非投与群では処理後 1 時間で PS の回復は基準値の 30% であったのに対し、ATP 投与群では 80% まで回復した。ADP, AMP でも PS の回復が認められたが、ATP よりその作用は弱く、また、adenosine はコントロールの回復と差がなかった。ATP と同様の効果が α, β -methyleneATP でも認められた。さらに、砂ネズミの両側総頸動脈を 3 分間結紮処理 1 週間後の海馬 CA1 領域遅発性神経細胞死に対する ATP の効果を検討した。ATP 投与群 (結紮 30 分前に側脳室に注入) は非投与群と比較し、海馬 CA1 領域錐体細胞の脱落が少ない傾向にあった。

以上の結果は、ATP がシナプス前終末 P_{2X} 受容体を介した GABA 放出を増強することにより海馬神経伝達を抑

制し、脳虚血障害を軽減する、ことを示唆している。

(14) 中枢内一次求心性情報処理とシナプス P_{2X} 受容体

繁富英治, 加藤総夫 (東京慈恵会医科大学・薬理 2)

脳内の P_{2X}₁₋₇ 受容体サブユニット群が担う生理的役割は実はまだほとんど解明されていない。中枢ニューロン(細胞体を脳・脊髄内に持つニューロン)における現在の報告は、(1) 急性単離もしくは初代培養細胞が示す P_{2X} 受容体電流、(2) シナプス前細胞刺激による P_{2X} 受容体遮断薬感受性シナプス後電流、および、(3) 脳スライス、もしくは急性単離・初代培養ニューロンにおけるシナプス前 P_{2X} 受容体活性化による神経伝達物質放出、に大別されるが、(1) ~ (3) の ATP 反応の薬理学的特性は、互いに、また、発現系の受容体群の特性と必ずしも一致しておらず、その矛盾は解決されていない。延髄孤束核は、P_{2X} 受容体のクローニング以前に急性単離細胞の ATP 誘発内向き電流が報告された部位だが、我々の脳スライスにおける記録の結果、孤束核ニューロンのうち ATP 誘発内向き電流を示す細胞は10%以下であり、その

EC₅₀ は 410 μ M と急性単離細胞で報告されている値よりも1桁大きかった。100 μ M ATP はほとんど内向き電流を起こさず、また、 α, β meATP は 1mM でも内向き電流を起こさなかった。一方、孤束核シナプス前 P_{2X} 受容体からの直接的 Ca²⁺流入による微小興奮性シナプス後電流頻度増加は約 50%のニューロンで観察された。100 μ M ATP は約 2 倍 (EC₅₀ = 330 μ M), 100 μ M α, β meATP (EC₅₀ = 80 μ M) は約 4 倍まで頻度を増加した。これらシナプス前・後の反応はいずれも持続的投与によって脱感作せず、PPADS で遮断された。孤束核シナプス前後の P_{2X} 受容体は、受容体サブユニット構成 (プレ: P_{2X}4/6? ; ポスト: P_{2X}2?) および受容体周囲 ATP 分解酵素系などの諸性質が異なっており、それぞれが異なる生理機能に関与していると考えられる。

(15) PC12 細胞における ATP による細胞内 Ca²⁺増加反応の持続相について

—— ミトコンドリアの関与 ——

伊藤茂男, 丸山浩二, 太田利男 (北大院・獣医・薬理)

ラット褐色細胞腫由来 PC12 細胞において、ATP は主に P_{2x} 受容体と共役した非選択的陽イオンチャネルを介し、細胞内 Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i) を増加させることが知られている。我々は最近、高濃度 ATP (300 μ M) の短時間刺激 (30 秒間) により、一過性の [Ca²⁺]_i 増加に続き、ゆっくりと [Ca²⁺]_i が減少する持続相 (10 分間) が生じることを観察した。今回、この持続相にミトコンドリアが関与していることを見いだしたので報告する。

(方法) [Ca²⁺]_i は fura-2, または mag-fura2, [Na⁺]_i は SBFI を用いて蛍光画像解析装置により測定した。

(結果) 1) ATP は濃度依存性に [Ca²⁺]_i を増加させた。高濃度 ATP により生じた [Ca²⁺]_i 持続相は、一過性の [Ca²⁺]_i 増加が約 0.5 μ M を越える細胞で認められた。2)

外液 Ca²⁺非存在下では ATP による [Ca²⁺]_i 増加反応はほぼ完全に消失した。[Ca²⁺]_i 持続相は電位依存性 Ca²⁺チャネル遮断薬、および P_{2x} 受容体拮抗薬であるスラミンにより影響を受けなかった。3) ミトコンドリア脱共役薬である FCCP は、ATP による [Ca²⁺]_i 増加反応のピークを増大させた。4) ATP は濃度依存性に [Na⁺]_i を増加させ、この反応も高濃度 ATP では持続的であった。外液 Na⁺除去、ミトコンドリア Na⁺/Ca²⁺交換輸送体阻害薬であるクロナゼパム、CGP-37157 は、ATP による [Ca²⁺]_i 増加のピークに影響を与えることなく、持続相を強く抑制した。5) ATP 投与により [Ca²⁺]_i 持続相が生じている時点で FCCP を投与すると、[Ca²⁺]_i は大きく上昇した。FCCP による [Ca²⁺]_i 上昇の大きさは、FCCP 投与直前の [Ca²⁺]_i の大き

さに依存し、更にこの FCCP による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は外液 Na^+ 除去によりミトコンドリア Na^+/Ca^{2+} 交換を抑制した条件では、有意に増大した。

以上のことから、PC12 細胞において、細胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 調節にはミトコンドリアが重要な役割を果たしていることが示された。すなわち、高濃度 ATP 刺激による一過性

の $[Ca^{2+}]_i$ 増加に続き、ゆっくりと $[Ca^{2+}]_i$ が減少する持続相は、刺激により流入した Ca^{2+} がミトコンドリア内に蓄積し、この Ca^{2+} が、 $[Na^+]_i$ に依存した Na^+/Ca^{2+} 交換輸送体を介し、細胞質内へ放出されることにより生じることが示唆された。

(16) 副腎皮質細胞における ATP 受容体の役割の考察

太田善浩, 青鹿謙司 (東京農工大・工・生命)

副腎皮質束状層におけるステロイドホルモン合成を促進させる生理的な刺激物質としては、ペプチドホルモン ACTH が知られている。一方、同細胞には ATP 受容体が存在し ATP 刺激によりステロイドホルモン合成が開始されるものの、その生理的意味ははっきりとしない。本発表では、低濃度の ATP 刺激で僅かに合成されたステロイドホルモンが、副腎皮質細胞の ACTH に対する感受性を高めるという仮説とそれを指示するデータを紹介する。このデータに基づき、ATP の生理的役割とステロイドホルモンが細胞の ACTH 感受性を高めるメカニズムについて議論したい。

副腎皮質束状層細胞は、牛の副腎から採取した。副腎皮質細胞は Ca^{2+} イオンをセカンドメッセンジャーとしてステロイドホルモンを合成しているため、細胞の刺激に対する感受性は、個々の細胞の細胞内カルシウム濃度変

化により検出し、カルシウム濃度変化を示した細胞の割合で表示した。

ACTH10pM で刺激した際の反応率は、細胞を 1nM の ATP と 30 分間インキュベーションすることにより約 60%にまで増加した (インキュベーションしていない細胞では約 40%)。次に、コルチコステロン 100nM または硫酸プレグネノロン 100nM 添加 5 分後程度の細胞を ACTH10pM で刺激した際の反応率はそれぞれ 84.4%、61.4%に増加した。その他のステロイドホルモンで同様の実験を行ったところ、ACTH 刺激に対する反応率は殆ど変化しなかった。以上の結果は、もし ATP がある程度以上の濃度で血中に常に存在するならば、副腎皮質細胞は常にステロイドホルモンを合成しているため、ACTH 濃度が血中で高くなったとき、細胞は ACTH に対して敏感に反応できる状態になっていることを示唆する。

(17) アロディニアの発現と P2X 受容体

津田 誠, 最上由香里, 小泉修一, 井上和秀 (国立医薬品食品衛生研究所薬理部)

我々は、一次求心性神経の末梢投射先であるラット後肢足底部に ATP やそのアナログ ($\alpha\beta meATP$) を投与することで、3 種類の疼痛行動 (自発痛様行動, 熱刺激痛覚過敏, アロディニア) が出現することを報告している。しかし、これらの疼痛反応 (特にアロディニア) に関与する P2X 受容体サブタイプの同定には至っていない。そこで、P2X 受容体に対する特異的アンチセンスオリゴを用いて解析したところ、アロディニアの発現は P2X₂ および P2X₃ アンチセンスで抑制され、自発痛様行動および熱

刺激痛覚過敏は P2X₃ アンチセンスのみで抑制された。この結果から、アロディニアの発現は、一次求心性神経末梢端の P2X_{2/3} 受容体を、他の 2 つは P2X₃ 受容体を介していることが示された。アロディニアと他 2 つの疼痛行動で大きく異なる点として発現持続時間が挙げられる。自発痛様行動や熱刺激痛覚過敏は、 $\alpha\beta meATP$ 投与後 15 分以内に消失するのに対して、アロディニアは 2 時間以上も持続する。しかし、アロディニアの発現は、足底部へ $\alpha\beta meATP$ を投与して 15-20 分後以降に P2X 受容体を

遮断しても抑制されなかった。したがって、アロディニアの長期的発現には、一次求心性神経末梢端の $P2X_{2/3}$ 受容体が活性化された際に発生する興奮性シグナルにより、 $P2X_{2/3}$ 受容体より上位中枢で生じるある種の可塑的变化

が重要であろうと思われる。現在、アロディニアの発現に対する各種受容体拮抗薬の脊髄くも膜下腔内処置の効果を検討しており、その結果も報告する。

(18) 坐骨神経結紮モデルにおける後根神経節における $P2X$ 受容体 mRNA 変化

上野伸哉¹ 山田博美¹ 森山朋子² 本多健治² 高野行夫² 神谷大雄² 桂木猛¹
(¹福岡大学・医 薬理学教室 ²福岡大・薬 薬理)

【目的】 $P2X$ 受容体が後根神経節細胞に発現し痛み伝達に関与することが、しだいに明らかとなっている。しかしながら、 $P2X$ 受容体の、神経因性疼痛などの病的な痛みでの役割に関して詳細な機構は明らかでない。今回は我々は、神経因性疼痛モデルを作製し、 $P2X$ 受容体サブタイプの mRNA 変化の有無をリアルタイム PCR により検討した。 $P2X$ 受容体が、神経因性疼痛により発現変化をきたすかどうかを探索し、変化する受容体と疼痛反応との関連を検討した。

【方法】実験動物として、ddY 系雄性マウス(体重 20–30g)を使用した。Bennet の方法に準じ坐骨神経を 2 箇所で結紮し、神経因性疼痛モデルを作成した。作成したモデル動物は結紮手術後 60 日後まで、熱性および機械性刺激応答をそれぞれプランターテスト、von Frey テストを用い

て疼痛評価を行った。同時に疼痛評価をした動物より後根神経節 (L4–L6) を取り出し、神経節に含まれる $P2X$ 受容体 mRNA 発現量の変化をリアルタイム PCR 法を用いて比較検討した。

【結果】熱性刺激に対する逃避反応潜時は結紮 3 日後より短縮し、疼痛閾値低下がみられたが、30 日後より閾値低下の回復傾向が見られた。一方、機械性刺激に対する反応は、結紮後 3 日前後よりアロディニアの発現が認められ、30 日後も持続傾向にあった。後根神経節 (L4–L6) の $P2X$ 受容体の mRNA の変化を定量した結果、 $P2X_2$ は 7 日前後から増加し 30 日以後も増加がみられたが、 $P2X_3$ 受容体のはむしろ 30 日以後に減少傾向が見られた。疼痛反応の経時変化に $P2X$ 受容体の関与が示唆された。

(19) 知覚神経節における ATP 受容体発現

野口光一、戴 毅、都築健三、福岡哲男
(兵庫医科大学解剖学第二講座)

この 10 年来、CCI や Chung モデルなど、複数のニューロパシック疼痛動物モデルが提唱され、その病因メカニズムが広く研究されているが、その基本的病態メカニズムは部分的軸索損傷である。末梢神経の一部の線維は軸索切断を受け、様々な因子によりその細胞体での自発的興奮性が高まり、その影響が二次ニューロンへ及ぶ。一方、傷害を受けていないニューロンは何らかの原因で末梢のレセプターの感受性が亢進し、増強された侵害情報がこのニューロンを介して中枢へ運ばれる。ニューロパシック疼痛はこのように直接傷害を受けた一次知覚

ニューロンの変化に加えて、傷害を受けずに残ったニューロンの機能亢進という 2 つのメカニズムが混在し、より複雑な病態を形成している。

我々は、部分的軸索損傷モデルにおける非損傷ニューロンにおける多種の分子の動態を検索してきたが、今回、ATP のイオンチャンネル型受容体の一つである $P2X_3$ レセプターの発現を、多種のニューロパシック疼痛モデルにおいて調べた。その結果、坐骨神経の一部の枝を結紮する SNI モデルにおいては、損傷ニューロンにおける $P2X_3$ mRNA の低下、非損傷ニューロンにおける発現増

加が確認された。ところが、損傷ニューロンと非損傷ニューロンが全く混在しない Chung モデルにおいては P2X3 mRNA 及び蛋白の増加は全く観察されなかった。一方、カプサイシン受容体である VR-1 発現は、いずれのモデルの非損傷ニューロンにおいて発現亢進が観察さ

れ、これは他の神経ペプチド、BDNF 等と同じ結果であった。これらの結果は、ニューロパシックペインモデルにおける各種分子の発現制御がモデルにおいて異なっていることを示唆している。他の P2Y 受容体発現に関する Preliminary な結果も報告する。

(20) 皮膚痛覚受容体の熱反応に対する ATP の効果

矢島弘毅, 佐藤純, 水村和枝

(名古屋大学 環境医学研究所 神経性調節分野)

ATP はラットに投与すると自発痛関連行動、アロディニアと熱に対する痛覚過敏反応を引き起こすことが知られている。今回、健常と慢性炎症モデル動物の皮膚ポリモーダル受容器 (CPR) 活動に対する ATP の効果を調べた。慢性炎症モデルとして Lewis 系雄性ラットの尾部皮内にフロイント完全アジュバント (0.6 mg) を投与した関節炎モデルラット (ADJ ラット) を用いた。深麻酔下で ADJ ラットと健常ラットの皮膚- 伏在神経標本を採取し、95% O₂ - 5% CO₂ で飽和した Krebs 溶液中に真皮を上にした状態で固定した。伏在神経の微小線維束から CPR の単一神経放電を導出し、受容野に熱刺激を行った。3-4 回の熱刺激の後、ATP 溶液を 5 分間受容野へ局所灌流しその効果をみた。健常ラットにおいて 10 mM, 100 mM, 1 mM 投与により放電数の上昇をみたユニットはそ

れぞれ 40% (n = 10), 60% (n = 5), 100% (n = 7) であった。また、その放電数は濃度依存性に増大した。ADJ ラットにおいて 10 mM, 1 mM 投与によりそれぞれ 88% (n = 8), 100% (n = 5) のユニットが反応したが、どちらの反応の放電数も健常ラットに比べ大きかった。健常ラットの ATP 投与後の熱反応は 10 mM では 66% に抑制されたのに対し、100 mM, 1 mM ではそれぞれ 130%, 246% に増強された。ADJ ラットの熱反応においても 10 mM では 81% への低下が、1 mM 投与により 161% への増加がみられた。以上の結果から ATP の CPR の熱反応に対する作用は濃度によって異なり、低濃度では皮膚痛覚受容器の興奮性を抑制し、また細胞障害により組織に生じうる高濃度ではその興奮性を高める作用があることが明らかとなった。

(21) 代謝型 ATP 受容体によるカプサイシン受容体の機能制御

富永真琴 (三重大学医学部生理学第一講座)

カプサイシン受容体 VR1 は 6 回膜貫通型の Ca 透過性の高い非選択性陽イオンチャネルであり、二次痛を伝えるとされる無髄の C 線維に特異的に発現する。VR1 は生体で痛みを惹起するカプサイシン・プロトン・熱 (43 度以上) という複数の痛み刺激によって活性化されるが、この多刺激痛み受容体として機能は VR1 欠損マウスにおいても確認された。感覚神経終末においては種々の炎症関連メディエーターが痛み刺激受容を調節していると考えられているが、その炎症関連メディエーターの 1 つの細胞外 ATP の VR1 活性に対する効果を検討した。VR1

の HEK293 細胞への強制発現系では、100 μ M の ATP はカプサイシン活性化電流及びプロトン活性化電流を増大させ、用量依存曲線を最大値を変化させることなく低刺激側へシフトさせた。また、ATP 存在下では VR1 の熱による活性化温度閾値は 42 度から 35 度に低下し、体温でも VR1 が活性化して痛みを惹起する可能性が示された。ATP 関連物質、PMA 等を用いた解析により細胞外 ATP は代謝型 P2Y₁ 受容体に作用していることが明らかとなり、PKC 活性化を介して VR1 を制御することが判明した。この ATP の効果はラットの後根神経節細胞でも観察

され、P2Y₁受容体遺伝子の発現が HEK293 細胞、後根神経節細胞で確認された。これは、細胞外 ATP による疼痛発生の新しいメカニズムであり、P2X₃受容体の欠損マウスで ATP による疼痛行動の減弱が必ずしも十分には観察されなかったことを説明するかもしれない。同じく G_{q/11} と共役する BK2 受容体を VR1 と共発現した細胞で

も、発痛物質として知られるブラジキニンの存在下で同様の VR1 活性の増大が確認され、この PKC を介した VR1 活性の制御は G_{q/11} と共役する受容体に共通の経路であることが示された。現在、VR1 欠損マウスを用いてこの経路の検証を行っている。

(22) ATP および capsaicin 受容体発現感覚線維の投射ニューロンへの収束

吉村 恵, 中塚映政, 古江秀昌, Gu Jianguo

(九州大学大学院医学研究院統合生理学, フロリダ大学脳研)

末梢神経終末における capsaicin VR1 受容体や ATP P2X 受容体は、熱傷や炎症および組織損傷の感知に重要な役割を果たしている。これらの受容体の機能的な解析は DRG を用いて詳細に調べられているが、脊髄内に於けるその機能的な役割については未だ不明な点が多い。そこで、脊髄スライスに後根を付した標本を用い、パッチクランプ法によって後角第 II 層と V 層細胞から記録を行い、capsaicin sensitive と ATP sensitive 線維の脊髄内終末部位とそれらの線維がどのような情報処理をされているかを調べた。Capsaicin sensitive 線維は第 II 層の膠様質に終末しており、その情報は interneuron を介して第 V 層の細胞にも伝えられる。一方、ATP sensitive 線維は第 V 層細胞にその情報を伝えている。視床に色素を注入し逆行性に同定した、いわゆる spinothalamic projection

ニューロンから記録を行うと、記録した細胞すべてで ATP sensitive ニューロンからの直接入力を受け、また、capsaicin sensitive ニューロンからは介在ニューロンを介した間接的な入力を受けていた。第 V 層細胞の応答は ATP と capsaicin を同時に投与すると著明に増強され、頻回の発火が誘起された。これらのことから、末梢からの感覚情報は ATP sensitive 線維と capsaicin sensitive 線維の異なるグループによって脊髄に運ばれる。しかし、それらの情報は最終的には第 V 層細胞に収束し、視床を介して大脳皮質感覚野に運ばれるものと考えられる。この 2 つの異なる回路を経て伝えられる感覚情報がどのような機能を持つのか、また、脊髄内でどのような処理を受けるかは今後の重要な課題となると思われる。

(23) ATP 受容体を介する末梢性疼痛発現機構

植田弘師, 川島敏子 (長崎大学薬学部分子薬理学研究室)

イオンチャネル型 ATP 受容体のうち P2X₃受容体は C 線維知覚神経に局在し、炎症時の疼痛過敏作用に関与するなど、疼痛伝達との関連で注目されている。この受容体の生理的役割の解明は P2X₃受容体欠損マウスを用いた解析から、ホルマリン誘発性の侵害性応答発現や非侵害性熱刺激応答発現に関連することが明らかにされた。著者らは、最近開発した末梢性疼痛試験法を用いて ATP による侵害性応答発生メカニズムと、最近注目されている神経因性疼痛における ATP 受容体メカニズムの役割を解

析した。末梢性疼痛試験法はマウス後肢足蹠皮下に微量の発痛物質を注入し、すみやかに生ずる後肢屈曲反応を見る方法である。ATP 注入による 100fmol から 1nmol までの範囲の用量依存的な屈曲応答はカプサイシン感受性であり、一方で脊髄クモ膜下腔内投与した NMDA 受容体拮抗薬、MK801 により遮断されたが、NK1 受容体拮抗薬 CP99994 により影響を受けなかった。代表的な組織損傷や炎症に関連の深い発痛物質であるブラジキニン、サブスタンス P やヒスタミンによる応答はカプサイシン

感受性ではあるが、脊髄では CP99994 により遮断され、MK801 によっては影響を受けなかった。プロスタグランジン PGI₂ アゴニストではカプサイシン非感受性、MK801 による遮断、CP99994 による無影響という結果が得られ、それぞれを II 型、I 型、III 型と呼んだ。興味あることは坐骨神経の部分結紮によるそれぞれの侵害応答は I 型では消失、II 型無影響、III 型では過敏応答となった。以上

のように慢性疼痛の発生メカニズムにおける ATP 受容体の明確な関与は明らかにされなかったが、侵害性疼痛神経のクラススイッチの分類に大きな指標となることが明らかになった。講演では、慢性疼痛の発生メカニズムにおける ATP 受容体の関与について残された可能性についても議論する予定である。

(24) 脳内 ATP 受容体を介した侵害受容反応抑制作用

南 雅文, 福井真人, 中川貴之, 佐藤公道
(京都大学薬学研究科生体機能解析学分野)

脳内の痛覚情報伝達・制御における ATP の役割を明らかにする手始めとして、各種 ATP 受容体アゴニストをラット側脳室内に投与し、機械的および熱的侵害受容反応に対する影響を検討した。さらに、その作用機序を明らかにするため、各種神経伝達物質受容体アンタゴニストを皮下あるいは側脳室内に前投与し、その影響を検討した。 α, β -methylene-ATP (10, 30 nmol), Bz-ATP (30 nmol) を側脳室内に投与することにより、機械的侵害受容閾値は有意に上昇した。また、その作用は投与後 5 分で最大となり、20-30 分後には消失するという比較的早いものであった。一方、 β, γ -methylene-ATP および UTP では、機械的侵害受容閾値の有意な変化は見られなかった。これらの結果より、本作用は主に脳内の P2X 受容体を介するものであると考えられる。また、 α, β -methylene-ATP (10 nmol) の側脳室内投与により、hot plate test では有意な熱的侵害受容反応抑制が観察されたが、tail flick test では変化は観察されなかったことより、本侵害受容反応抑

制作用への下行性痛覚抑制系の関与は少ないものと考えられる。Propranolol および naloxone 10 mg/kg の皮下への前処置により α, β -methylene-ATP (10 nmol) の侵害受容反応抑制作用は有意に抑制されたが、phenolamine および methysergide によっては影響を受けなかった。さらに、propranolol (100 nmol), butoxamine (100 nmol) および ICI-118,551 (100 nmol) の側脳室内への前処置により、 α, β -methylene-ATP による侵害受容反応抑制作用は有意に抑制されたが、atenolol (100 nmol) では影響を受けなかった。また、naloxone (30 nmol) の側脳室内への前処置によっても、その作用は有意に抑制されたが、naltrindol (30 nmol) および nor-BNI (30 nmol) によっては影響を受けなかった。これらの結果より、 α, β -methylene-ATP による侵害受容反応抑制作用には脳内の $\beta 2$ アドレナリン受容体および μ オピオイド受容体が関与していることが示唆される。

8. 「グリア細胞と脳機能発現」

2001 年 10 月 12 日

代表・世話人：井上 芳郎（北海道大学大学院医学研究科）

所内対応教官：池中 一裕（岡崎国立共同研究機構生理学研究科）

（1）L-Serine 合成酵素 3PGDH のアストロサイト特異的発現を制御する機構

清水 基宏（理化学研究所 脳科学研究センター，静岡県立大学・薬学研究科）

古屋 茂樹，篠田 陽子，平林 義雄（理化学研究所 脳科学研究センター）

吉田 一之（理化学研究所 脳科学研究センター，東京農工大・連合農学研究科）

三苫純也（The Burnham Institute）

（2）3PGDH のヒト脳における発現分布と遺伝子発現制御

古屋 茂樹，篠田 陽子，平林 義雄（理化学研究所・脳科学総合研究センター）

清水 基宏（理化学研究所 脳科学研究センター，静岡県立大学・薬学研究科）

吉田 一之（理化学研究所 脳科学研究センター，東京農工大・連合農学研究科）

三苫純也（The Burnham Institute）

中山 淳（信州大学・大学院医学研究科・臓器移植細胞工学医科学）

（3）末梢神経系における L セリン合成酵素 3PGDH の細胞発現と神経損傷による変化

山下 登，山崎 美和子，渡辺 雅彦（北海道大学大学院 医学研究科 生体構造解析学分野）

古屋 茂樹（理化学研究所脳化学研究センター 神経回路メカニズム研究グループ）

（4）発達脳における中性アミノ酸トランスポーターASCT1 の発現

境 和久，渡辺 雅彦（北海道大学大学院 医学研究科 生体構造解析学分野）

（5）発達脳における放射状グリアの移動 -第 2 報-

山田 恵子，渡辺 雅彦（北海道大学大学院 医学研究科 生体構造解析学）

井上 芳郎（北海道大学大学院医学研究科分子解剖学分野）

（6）終末シュワン細胞の特異な形態と ATP に対する反応

岩永 ひろみ（北海道大学大学院 医学研究科 生体機能構造学講座）

葉原 芳昭（北海道大学大学院 獣医学研究科 生理学）

（7）小脳ベルクマングリアの突起発達におけるカルシウム透過性 AMPA 受容体の役割

後藤 香織（群馬大学 医学部 第二生理学教室）

（8）ラット大脳皮質由来タイプ 1 アストロサイトのカルシウムオシレーションに対する成長因子と

炎症性サイトカインの競合的効果

樋口 千登世，工藤 佳久，森田 光洋（東京薬科大学 生命科学部 生体高次機能学）

（9）ラット大脳皮質由来タイプ 1 アストロサイトの細胞内情報伝達系に対する成長因子と

サイトカインの競合的効果

小柄 渚，樋口 千登世，工藤 佳久，森田 光洋（東京薬科大学 生命科学部 生体高次機能学）

（10）中枢神経系 Axo-glial paranodal junction 形成における CD9 の新たな役割

石橋 智子，池中 一裕（岡崎国立共同研究機構生理学研究科）

山崎 美和子，渡辺 雅彦，丁 雷，井上 芳郎（北海道大学大学院 医学研究科）

目加田 英輔（大阪大学 微研）

馬場 広子（東京薬科大学 薬学部）

（11）オリゴデンドロサイトの分化過程での CREB の発現

志賀 葉月，久保 稔，山根 ゆか子，伊藤 悦朗（北海道大学大学院 理学研究科 生物科学専攻）

桜井 洋子, 阿相 皓晃 (東京都老人総合研究所神経生物学部門)

(12) オリゴデンドロサイトの分化タイミングを決定する外界因子: 甲状腺ホルモンと PDGF

徳元 康人 (国立国際医療センター研究所 感染・熱帯病研究部)

(13) Wnt シグナリングによるオリゴデンドロサイト分化抑制

清水 健史, 和田 圭樹, 鹿川 哲史, 池中 一裕 (岡崎国立共同研究機構生理学研究所)

高田 慎治, 室山 優子 (京都大学 理学部 分子発生生物学研空センター)

【参加者名】

浅井 清文 (名市大・医), 岩永 ひろみ (北海道大大院・医), 内山 正彦 (東薬大・薬), 小柄 渚 (東薬大・生命科学), 後藤 香織 (群馬大・医), 境 和久 (北海道大大院・医), 志賀 葉月 (北海道大大院・理), 篠田 陽子 (理科研・脳科学), 清水 基宏 (理科研・脳科学), 丁 雷 (北海道大大院・医), 徳元 康人 (国立国際医療

センター研究所), 樋口 千登世 (東薬大・生命科学), 古屋 茂樹 (理科研・脳科学), 森田 光洋 (東薬大・生命科学), 山口 宣秀 (東薬大・薬), 山田 恵子 (北海道大大院・医), 吉田 一之 (理科研・脳科学), 渡辺 雅彦 (北海道大大院・医)

【概要】

生理学研究所研究会「グリア細胞と脳機能発現」は、去る平成13年10月12日(金)午後1時より岡崎国立共同研究機構生理学研究所5階講義室において開催された。発表演題数は、13題であった。1題15分間の口頭発表の後、5分間の質疑応答が行われた。活発な討議が行われ、予定終了時刻を大幅に超過する午後7時すぎに閉会した。

脳の発生から分化に至るまで、グリア細胞が脳機能において果たす役割について、最新の研究内容が報告され、熱気にあふれた議論が行われた。参加者数は、研究所内外より多数あり、所外からの17名も含めて、合計約40名であった。

(1) L-Serine 合成酵素 3PGDH のアストロサイト特異的発現を制御する機構

清水 基宏 (理化学研究所・脳科学総合研究センター・神経回路メカニズム)

Astrocyte は神経細胞の生存発達・機能維持だけでなく、修復や再生にも関与している事が明らかになってきている。当研究室ではアストロサイト条件培養液中から、神経栄養活性を有する物質として L-Serine を同定している。L-Serine は未熟な Purkinje 細胞や海馬の錐体細胞の生存だけでなく形態的/機能的発達も強力に促進した。本研究では、Astrocyte による L-Serine を介した神経栄養作用を分子レベルで理解することを目的に、L-Serine 合成に関わる3種の合成酵素 (3PGDH・PSAT・PSP) の発現解析を行った。その結果、PSAT および PSP mRNA は神経細胞、アストロサイトともに発現していたが、第一段階の酵素である 3-PGDH (3-Phosphoglycerate dehydrogenase) mRNA は Astrocyte で高発現している一方で神経細胞での発現は著しく抑制されていた。3-PGDH の発

現分布は抗体による免疫組織化学の結果とよく一致した。そこで 3-PGDH 遺伝子の中枢神経系での発現制御機構を解析するために、マウスの 3PGDH 遺伝子を単離し、そのプロモーター活性を検討した。その結果、マウス遺伝子の翻訳開始点から上流 1.8 kb の 5'-flanking sequence で培養 Astrocyte において強いプロモーター活性が検出された。しかし翻訳開始点から-1792~-1689間の約100bpの配列を欠失させるとその活性は大幅に低下した。この配列には複数の転写因子が結合し得る Element を含んでいた。以上の結果から、L-Serine 合成に関わる酵素系の中で 3-PGDH が Astrocyte 特異的に発現しており、それは遺伝子の転写レベルの活性化によって制御されている可能性が強く示唆された。

(2) 3PGDH のヒト脳における発現分布と遺伝子発現制御

古屋 茂樹（理化学研究所・脳科学総合研究センター・神経回路メカニズム）

動物細胞における L-serine (L-Ser) の de novo 合成は、解糖系の中間体である 3-phosphoglycerate を前駆体として 3 段階の酵素反応によって進行する「リン酸化」経路が主要な役割を果たしていると考えられている。この合成経路の第一段階の反応を触媒する酵素 3-Phosphoglycerate dehydrogenase (3PGDH) のヒト遺伝性欠損症における重度の脳神経発達遅滞症状は、脳の発達と機能維持においてこの合成経路が極めて重要であることを強く示している。我々はこれまでにアストロサイト条件培養液中の神経栄養活性物質としてアミノ酸 L-Ser を同定し、さらに分子生物学的手法を用いた解析から 3PGDH 遺伝子の転写がアストロサイト特異的に活性化されていることを主にマウス、ラットなどの系で示してきた。本研究ではヒト組織における 3PGDH の発現制御機構を理解することを目的に、その発現分布を検討した。

RT-PCR により胎児および成人ヒト脳において 3PGDH mRNA の発現を確認した。免疫組織化学的に発現細胞を検討すると、脈絡叢の脳室上衣細胞に強い 3PGDH 免疫反応性が検出されたが、成人脳アストロサイトの反応性は弱かった。しかし成人脳の脳室上衣細胞腫近傍に出現した反応性アストロサイトでは極めて強い 3PGDH の反応性が観察された。ヒト 3PGDH 遺伝子の 5'-上流配列を単離し、ヒトアストロサイトマ U251 細胞を用いてプロモーター活性を検討したところ、翻訳開始点から約 3.0 kb の断片にヒト GFAP 遺伝子推定プロモーター領域に匹敵する程度のプロモーター活性が検出された。これらの結果から、ヒトにおいても 3PGDH はアストロサイトで発現し、発達に伴い正常時には低レベルで維持され、損傷時に急激に誘導されるような発現制御を受けているものと考えられた。

(3) 末梢神経系における L セリン合成酵素 3PGDH の細胞発現と神経損傷による変化

山下 登（北海道大学大学院医学研究科生体構造解析学分野）

脳において、セリン合成酵素 3-phosphoglycerate dehydrogenase (3PGDH) は放射状グリア／星状膠細胞の細胞系譜と嗅神経被覆グリアに豊富に発現するが、ニューロンはこの酵素の発現を欠如する。今回、末梢神経系における 3PGDH の細胞発現を坐骨神経を用いて解析した。その結果、坐骨神経内のシュワン細胞とその近傍の線維芽細胞に 3PGDH 陽性の免疫反応が観察された。しかし、神経線

維を送りだす後根神経節と腰仙髄前角のニューロンには、3PGDH の発現は認められなかった。坐骨神経に損傷を与えたところ、シュワン細胞における 3PGDH の発現が増強した。これらの事実は、末梢神経系においても非ニューロン系の支持細胞がセリン合成能を有し、その供給を介してニューロンの生存や機能、そして再生などに関与している可能性を示唆する。

(4) 発達脳における中性アミノ酸トランスポーターASCT1 の発現

境 和久（北海道大学大学院医学研究科生体構造解析学分野）

非必須アミノ酸の 1 つである L-セリンは、培養ニューロンに対して神経栄養効果の働きがある。生体内での L-セリン合成酵素 3-phosphoglycerate dehydrogenase (3PGDH) の発現解析からこの酵素がニューロンではなくグリア細胞に発現していることが最近明らかになっ

ている。今回、L-セリンの輸送機構を明らかにするために、L-セリン輸送能を持つ中性アミノ酸トランスポーターASCT1 についてマウス脳での発現細胞を解析した。その結果、免疫反応で胎生期においては放射状グリアおよび血管に強く発現しており、さらに、神経細胞にも存

在していた。発生が進むにつれて血管や神経細胞の発現は減少し、星状膠細胞や嗅神経被覆グリアに強く分布していることがわかった。

この事実から、胎生期には血管内皮における高いアミノ酸輸送能があり、成熟すると星状膠細胞や嗅神経被覆

グリアにアミノ酸輸送能が高く存在すると示唆される。このことから、胎生期には細胞自身で合成するセリンのほかに血液中からも ASCT1 を介して輸送され、成熟期ではグリア細胞由来のアミノ酸が ASCT1 を介して神経細胞へ供給されている可能性が考えられる。

(5) 発達脳における放射状グリアの移動 -第 2 報-

山田 恵子 (北海道大学大学院 医学研究科 生体構造解析学分野)

放射状グリアは、形態学的には脳室層の細胞体から軟膜方向に放射状突起を伸展する特徴を有する細胞群であり、ニューロンの移動をガイドした後、形態変化して星状膠細胞に分化すると考えられている。我々は、"マウス脳の各領域において、放射状グリアは胎生 15 日 (E15) 前後に脳室層から移動して外套層に出現するのではないか"という仮説を想定した。この仮説を検証する第一段階として、発達脳を用いて、in situ hybridization 法および免疫組織化学法により放射状グリアに豊富に

発現する分子の局在変化を検討した。いずれの方法においても、マーカー陽性細胞体が「外套層に出現しはじめる時期-多数散在する時期」は、大脳皮質・海馬では E17-P1, 中脳被蓋では E15-E18, 小脳・嗅球では E14-17, その他の領域では E13-15 であった。また領域内においては、背腹方向や内外方向の gradient がみとめられた。この事実、放射状グリアが、ニューロンの産生や移動の領域差および gradient に合致する時間特性をもって外套層に移動する可能性を示唆する。

(6) 終末シュワン細胞の特異な形態と ATP に対する反応

岩永ひろみ (北海道大学大学院 医学研究科 生体機能構造学)

知覚小体に随伴する終末シュワン細胞は、鞘状の突起で軸索終末を包むほか、多数の過剰突起を周囲にのばして終末と周囲組織を一定の様式で結合させ、機械刺激が軸索の刺激受容部位に伝播するのを助ける。知覚終末の発達と維持に、神経伝達物質を介したニューロン-グリア相互作用が関与する可能性を検討するため、毛の動きを検知する、ラット頬鬚の槍型神経終末を酵素消化によって分離し、知覚線維から放出されるといわれる ATP に対するシュワン細胞の反応を細胞内 Ca^{2+}

の変化を指標として調べた。終末シュワン細胞は、ATP $10 \mu\text{M} - 1 \text{mM}$ の灌流刺激に対して用量依存的に細胞内 Ca^{2+} の上昇を示し、反応は、P2 レセプター阻害剤スラミンによってほぼ遮断された。また、軸索を包むシュワン鞘の反応が、そこから細長い頸をもって突出するシュワン細胞の細胞体よりも、わずかながら常に先行し、前者が ATP の刺激受容部位であることが示唆された。

(7) 小脳ベルクマングリアの突起発達におけるカルシウム透過性 AMPA 受容体の役割

後藤 香織 (群馬大学 医学部 第二生理)

小脳プルキンエ細胞を取り囲むベルクマングリアは、GluR1, GluR4 サブユニットからなる Ca^{2+} 透過性 AMPA

受容体を発現している。この Ca^{2+} 透過性受容体の機能的意義に関しては、プルキンエ細胞の興奮性シナプス

で放出されるグルタミン酸により活性化され、グリア細胞内への Ca^{2+} 流入を促進することにより、グリア突起の先端の構造を維持し、プルキンエ細胞のシナプス伝達を正常に保つことが示唆されている。ベルクマングリアにおける Ca^{2+} 透過性 AMPA 受容体の発達期における役割を見出すために、生後 8 日目のラット小脳皮質

に組換えアデノウイルスベクターを用いて、編集型 GluR2 (GluR2R) を強制発現させて AMPA 受容体の Ca^{2+} 透過性を抑制するか、非編集型 GluR2 (GluR2Q) を強制発現させて Ca^{2+} 透過性 AMPA 受容体を過剰発現させた。これらの処置は、ベルクマングリア突起の形態発達に相反する影響を与えた。

(8) ラット大脳皮質由来タイプ 1 アストロサイトのカルシウムオッシレーションに対する成長因子と炎症性サイトカインの競合的效果

樋口 千登世 (東京薬科大学 生命科学部 生体高次機能学)

ラット大脳皮質由来培養 Type I アストロサイトはグルタミン酸、ATP 等の神経伝達物質に対してカルシウム応答を示すことが知られている。無血清培地条件下において EGF, bFGF, TGF α 等の成長因子がこのカルシウム応答を一過性から振動性 (カルシウムオッシレーション) に変換することを我々はこれまでに報告してきた。今回、この成長因子処理によるカルシウム応答性の変化が IL1 β , TNF α 等の炎症性サイトカインと LPS によっ

て競合的に阻害されることを見出したので報告する。このことはアストロサイトのカルシウム応答がもつ生理的役割を推測する上で意義深い。すなわち、炎症と回復、ストレスと記憶形成など競合的な過程において対照的な振る舞いを見せるこれら液性因子がアストロサイトのカルシウム応答に対して正反対の作用を持つということは、このカルシウム応答が上記の生理現象の細胞レベルでの実体であることを示唆している。

(9) ラット大脳皮質由来タイプ 1 アストロサイトの細胞内情報伝達系に対する成長因子とサイトカインの競合的效果

小柄 渚 (東京薬科大学 生命科学部 生体高次機能)

われわれはアストロサイトのカルシウム応答に対して EGF, bFGF, TGF α 等の成長因子と IL1 β , TNF α 等の炎症性サイトカイン及び LPS が競合的に作用することを見出した。本研究ではアストロサイト内においてこれら液性因子がどのような情報伝達経路を利用して競合的作用を示すかを明らかにすることを試みた。具体的には ERK1/2 型 MAP キナーゼの活性化等によって発現が誘導される zif268 (egr1) 遺伝子のプロモーター領域をルシフェラーゼ遺伝子上流に組み換えたレポー

タージーンベクターを作成し、培養 Type I アストロサイトにおける活性を検討した。その結果、成長因子処理によって見られるレポータージーンの活性化は炎症性サイトカインの前処理によって抑えられた。このことから、これらカルシウム動態に対して対照的な振る舞いを示す液性因子は ERK1/2 を介した経路においても同様の競合性を示すことがわかり、アストロサイトのカルシウムオッシレーションがこれらの経路を介して形成されることが示唆された。

(10) 中枢神経系 Axo-glial paranodal junction 形成における CD9 の新たな役割

石橋 智子 (岡崎国立共同研究機構 生理学研究所 神経情報部門)

有髄神経軸索では活動電位はランヴィエ絞輪から絞輪へと跳躍伝導により伝わる。最近、活動電位発生に関わる電位依存性 Na^+ および K^+ チャンネルが、ミエリン形成に伴いそれぞれランヴィエ絞輪およびjuxtaparanodeに特徴的に局在し、このチャンネル局在化には軸索とミエリンが接する paranodal junction 形成が重要であることが明らかとなった。paranodal junction に局在する軸索およびミエリン側の分子は明らかにされつつあるが、junction 形成機序やその生理的役割については未だ不明な点が多い。

今回、我々はミエリン最外層に存在する CD9 が paranode にも存在し、CD9 を欠損したマウスでは paranode 形成の異常を呈すること、さらに軸索上の膜蛋白質の局在も変化していることを見出した。4 回膜貫通蛋白である CD9 は生体内で広範囲に分布しており、様々な分子と複合体を形成し細胞間シグナル伝達において重要であることが知られている。以上のことから paranodal junction 形成に関与している分子複合体の中においても CD9 が重要な役割を果たしていると考えられた。

(11) オリゴデンドロサイトの分化過程での CREB の発現

志賀 葉月 (北海道大学大学院 理学研究科 生物科学専攻)

本研究では、分化段階におけるオリゴデンドロサイトの CREB の発現とそのリン酸化状態を免疫細胞化学法によって比較した。A2B5 陽性細胞では、CREB もリン酸化 CREB (p-CREB) もほとんど発現していなかった。O4, O1, MBP 陽性細胞では、半数以上の細胞で CREB および p-CREB が発現していた。次に、protein kinase A (PKA) の阻害剤 (H-89) の投与による、p-CREB 陽性細胞の細胞

数の変化を調べた。A2B5, O4, O1 陽性細胞では、H-89 投与で有意に減少したが、MBP 陽性細胞では H-89 の影響を全く受けなかった。これらの結果から、オリゴデンドロサイトにおける CREB のリン酸化は、A2B5, O4, O1 陽性細胞では PKA に依存しているが、MBP 陽性細胞では PKA に依存していないことが示された。

(12) オリゴデンドロサイトの分化タイミングを決定する外界因子：甲状腺ホルモンと PDGF

徳元 康人 (国立国際医療センター研究所 感染・熱帯病研究部)

ラット視神経のオリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC) の大多数がオリゴデンドロ サイトへの分化を開始するのは生後 2 週目からである。この分化タイミングは、OPC の初代培養でも再現できるので、細胞内在性の生物時計の関与が考えられる。OPC の生物時計が正確に働くためには甲状腺ホルモンが必要である。甲状腺ホルモンは CDKI 遺伝子の転写を直接活性化し、かつ p53 ファミ

リー蛋白質を介するシグナル伝達機構を通して、細胞周期からの逸脱と分化の開始を行っている。ラット視神経のオリゴデンドロサイトの分化タイミングは、甲状腺ホルモン依存的な生物時計と OPC の主要増殖因子である PDGF の奪い合いによる枯渇という異なる二つのメカニズムの共同作用によって決定される。

(13) Wnt シグナリングによるオリゴデンドロサイト分化抑制

清水健史（岡崎国立共同研究機構 生理学研究所 神経情報部門）

我々は、脊髄の背側から産生される因子によってオリゴデンドロサイト（以下 OL）の分化が著しく抑制されることを明らかにしてきた。我々は、脊髄背側における *wnt1,3a* の発生時期依存的な発現変化と背側因子の活性変化が一致していることから、この OL 分化抑制因子の候補として *wnt* ファミリーに着目した。

胎生 14 日マウスの脊髄初代分散培養細胞に、Wnt3a を発現させた L cell の培養上清を添加したところ、未分化 OL である O4 陽性細胞の数が減少することが分かっ

た。そこで OL-type2 astrocyte 前駆細胞株である均一な CG4 細胞に Wnt3a 上清を添加したところ O4 陽性細胞の数が減少したことから、Wnt3a 上清による効果は他の細胞を介することなく OL 前駆細胞に直接作用して引き起こされたと考えられる。また、Wnt シグナリングの下流標的である活性化型 β -catenin-LEF-1 を強制的に発現するレトロウイルスを調整し CG4 細胞に感染させたところ、Wnt3a 上清添加時と同様に OL への分化誘導が有意に抑制された。

9. マルチニューロン活動と脳内情報処理 (3)

2001年10月25日－10月26日

代表：櫻井芳雄（京都大学大学院文学研究科心理学研究室）

世話人：小松英彦（国立共同研究機構生理学研究所）

(1) マルチニューロン活動同時記録を用いた神経細胞集団による情報表現の解析

田村弘，金子秀和，藤田一郎（大阪大学 基礎工学研究科，産業技術総合研究所人間福祉医工学研究部門）

(2) 網膜神経節細胞間における相関発火と刺激依存性

石金浩史，雁木美衣，立花政夫（東京大学 人文社会系研究科）

(3) 皮質神経回路モデルのダイナミクスとマルチニューロンレコーディング解析

渡辺正峰（東京大学 工学系研究科）

(4) 運動学習課題遂行中の一次運動野の神経細胞活動

宮下英三（東京工業大学 総合理工学研究科）

(5) 経路選択課題遂行時のサル前頭前野細胞活動の同時多点記録と相互相関解析

坂本一寛，虫明 元（東北大学 電気通信研究所，東北大学 医学研究科）

(6) サルによる時間情報の保持と前頭連合野のマルチニューロン活動

櫻井芳雄，高橋晋，井上雅仁（京都大学 文学研究科，慶応義塾大学 理工研究科，
京都大学 霊長類研究所）

(7) ラットおよびサル海馬体におけるマルチニューロン活動

西条寿夫，田淵英一，堀悦郎，梅野克身，小野武年（富山医科薬科大学 医学部）

(8) ポピュレーション・ベクトル解析法を用いた前頭連合野ニューロン群の空間情報処理の可視化

竹田和良，船橋新太郎（京都大学 人間環境学研究科）

(9) プリズム適応における大脳皮質ニューロンの機能的役割

蔵田 潔（弘前大学 医学部）

(10) マルチニューロン活動からみた大脳皮質基底核機能連関

木村 實（京都府立医科大学 医学部）

【参加者名】

櫻井 芳雄（京都大学 文学研究科），田村 弘（大阪大学 基礎工学研究科），金子 秀和（産業技術総合研究所人間福祉医工学研究部門），石金 浩史（東京大学 人文社会系研究科），立花 政夫（東京大学 人文社会系研究科），渡辺 正峰（東京大学 工学系研究科），宮下 英三（東京工業大学 総合理工学研究科），坂本 一寛（東北大学 電気通信研究所），虫明 元（東北大学 医学研究科），高橋 晋（慶應義塾大学大学院 理工学研究科），西条 寿夫（富山医科薬科大学 医学部），竹田 和良（京都大学 人間環境学研究科），蔵田 潔（弘前大学 医学部），木村 實（京都府立医科大学 医学部），渡辺由美子（京都大学 人間環境学研究科），居垣 紗織（京都大学 人間環境学研究科），一原 里江（京都大学 人間環境学研究科），佐々

木 優（京都大学 文学部 人文学科），中野 真人（京都大学 医学研究科），佐藤多加之（筑波大学 医学研究科），伊藤 浩之（京都産業大学 工学部 情報通信工学科），平田 昭夫（京都産業大学 工学部 情報通信工学科），服部 幹郎（京都産業大学 工学部 情報通信工学科），今村 敦史（京都産業大学 工学部 情報通信工学科），谷 淳（理化学研究所 脳科学総合研究センター），一戸 紀孝（理化学研究所 脳科学総合研究センター），山名美智子（理化学研究所 脳科学総合研究センター），内田 豪（理化学研究所 脳科学総合研究センター），斉藤 朝輝（理化学研究所 脳科学総合研究センター），平田 豊（中部大学 工学部 電子工学科），深井 朋樹（玉川大学 工学部），中村 清彦（東京工業大学 大学院 総合理工学研究科），

稲瀬 正彦（近畿大学 医学部第一生理）、古賀 毅（東京大学大学院 総合文化研究科）、荒木 修（北陸先端科学技術大学院大学 知識科学研究科）、渡辺 秀典（東京大学 工学系研究科）、神田 寛行（㈱ニデック 技術部 ニデック視覚研究所）、郷原 一壽（北海道大学大学院 工学研究科）、高田 昌彦（東京都神経科学総合研究所）、湯本 直杉（東京都神経科学総合研究所）、彦坂 和雄（東京都神経科学総合研究所）、高橋 和巳（福島県立医科大学 医学部）、辻本 悟史（北海道大学 文学研究科）、雨森 賢一（奈良先端科学技術大学 情報科学研究科）、村山 正宜（東京薬科大学 生体高次）、真仁 田聡（東京

薬科大学 生体高次）、小島 久幸（理化学研究所）、小池 大介（東京大学 統合生理）、鈴木 慎也（産業技術総合研究所）、納家 勇治（生理研）、吉田 正俊（生理研）、竹田 真己（生理研）、伊原 毅（生理研）、舩山 俊彦（生理研）、舩山 明子（生理研）、関 あゆみ（生理研）、尾崎 毅（生理研）、大草 知裕（生理研）、田仲 裕介（生理研）、坂田 秀三（基生研）、小松 英彦（生理研）、伊藤 南（生理研）、小川 正（生理研）、鯉田 孝和（生理研）、谷 利樹（生理研）、松本 正幸（生理研）、横井 功（生理研）

【概要】

脳はその超複雑な神経回路の動作により情報を処理している。そのため、脳の情報処理メカニズムを解明するには、個々のニューロン活動を調べるだけでは不十分であり、多数ニューロンすなわちマルチニューロンの活動を同時測定し、その機能的連関をも調べることで、神経回路全体の動態を明らかにしていかなければならない。本研究会の目的は、実際に情報処理を行っている動物からマルチニューロン活動を同時記録し、そのデータを解析している国内の研究者が集まり、技術的な方法論や、背景となる理論的モデルなどについて、広く情報を交換し議論を重ねることである。1997年に第1回を開いたが、大変有意義かつ好評であったため、その後も1年おきに開催し、今回は3回目となった。

2日間にわたる研究会には、11名の講演者以外に、外部と所内を合わせ約80名の、4年前の第1回とほぼ同数の一般参加者があり、大変盛況であった。また、これも今までと同様であるが、質疑や議論がきわめて活発であったため、全体に時間不足であった。第1回では、す

でに実験を開始している者はまだ僅かであり、これからマルチニューロン活動の記録と解析を目指す研究者達の集まりという印象であったが、それから4年経過した今回は、すでに実験を進行させデータを出している研究者も多く、実データに関する議論が特に活発となり、この分野の具体的な進展が明らかとなった。また、講演者や参加者の平均年齢もかなり若返っており、大学院生など若い研究者がこの分野に次々参入し活躍しつつあることが実感できた。しかし、記録方法はともかく、解析方法に関する問題は相変わらずいくつか残っており、それらを克服できるか否かが、マルチニューロン活動の実験の真価を決めるであろうことが予想できた。また、この分野における米国での研究は、最近加速度的に進んでおり、国内の研究との差はなかなか縮まらず、かえって開いている可能性も否定できなかった。そのような現状から、このようなマルチニューロン活動に関する研究会は、今後も何らかの形で継続する必要があるように思われた。

(1) マルチニューロン活動同時記録を用いた神経細胞集団による情報表現の解析

田村 弘、金子 秀和、藤田 一郎（大阪大学 大学院基礎工学研究科、産業技術総合研究所人間福祉医工学研究部門）

複数の神経細胞がどのようにして情報を表現しているのかをあきらかにするためには、これら複数の神経細胞から同時に活動を計測することが必須である。そこでマルチニューロン活動同時記録を、物体認識に不可欠な視覚経路の最終段階に近い下側頭葉皮質 TE 野に適用し、

物体の視覚イメージが複数の神経細胞によりどのように表現されているのかを探った。特に TE 野では、よく似た視覚図形に反応する神経細胞が隣接して存在しコラム構造を形成しているため、これら隣接した神経細胞の活動をどのようにして読み出せば、信頼性の高い情報を得

ることができるのかを検討した。いくつかのデコーディング方法が考えられるが、まず最初に「隣接細胞活動の加算平均（プーリング）により、視覚情報のデコーディング精度が向上するか」を検討した。その結果、プー

リングにより反応は安定になるものの、刺激セットに関する情報は減少することがあきらかになった。TE 野内の隣接した複数神経細胞の活動のプーリングは、デコーディング精度の向上に有効ではないと結論した。

(2) 網膜神経節細胞間における相関発火と刺激依存性

石金 浩史, 雁木 美衣, 立花 政夫 (東京大学 大学院人文社会系研究科心理学研究室)

細胞集団による情報の統合や符号化を解明するために、カエル剥離網膜標本に光パターン刺激を提示し、オフ持続型神経節細胞（ディミング検出器）群のスパイク発火をマルチ電極で記録した。光強度を 0.25Hz の正弦波で変調したスポット光の面積を変化させてスパイク発火の自己相関関数を調べたところ、周期的発火（約 30Hz）の強度は刺激面積の増大に従い増加し、発火頻度で定義される受容野よりも遙かに広い領域から影響を受けているこ

とがわかった。受容野の離れた 2 細胞を時間変調した全面照射光で刺激した時に比べて、細胞間に非変調のギャップ領域を挿入した時には、相互相関関数から求めた同期的発火強度は減弱した。また、全面照射領域を二分して刺激提示の時間的位相をずらすと、ずれの増大にしたがい同期的発火強度が減衰した。これらの実験から、ディミング検出器は空間的・時間的なまとまりをコードしている可能性が示唆された。

(3) 皮質神経回路モデルのダイナミクスとマルチニューロンレコーディング解析

渡辺 正峰 (東京大学 工学系研究科)

脳のコーディングの仮説として、スパイクの頻度を情報のキャリアとする発火率コーディング仮説とスパイクのタイミングそのものに情報があるとするテンポラルコーディング仮説が存在する。近年、特に脳の内的過程（期待、予測等）に、複数のアセンブリの重ね合わせが可能などの利点を持つテンポラルコーディングが使われていることを示唆する実験結果が報告されている。また、テンポラルコーディングにおけるニューロン間の相互作用を考えると、短い膜時定数を仮定し、発火するために

は複数のニューロンからのスパイクの同期が必要となることから、ネットワークダイナミクスに依存して動的なものとなることが知られている。本発表では、脳の結び付け問題と文脈依存性に関する二つのモデルを介し、テンポラルコーディングの可能性とその役割について議論する。さらには、近年の測定技術の進歩により可能となった多ニューロン同時記録データの解析手法を提案したい。

(4) 運動学習課題遂行中の一次運動野の神経細胞活動

宮下 英三 (東京工業大学 総合理工学研究科)

本研究は、運動学習課題遂行中のサル運動野神経細胞活動の時間的発火特性の変化を定量的に解析することを目的とする。二関節マニピュラタムのハンドルを操作することにより、コンピュータ画面上にハンドルの位置として提示されたカーソルを同一画面上に提示される視

標に 1.0 秒以内に到達させる到達課題と、カーソルを提示する際に時計方向 $\pm 45^\circ$ の回転座標変換を施した環境下で行う学習課題を一頭のサルに課し、これらの課題遂行中の手の位置と運動野神経細胞活動を記録した。神経細胞活動の平均発火頻度を、腕とマニピュラタムの

動力学パラメータで線形重回帰を行い、到達課題遂行時と学習課題獲得期の回帰係数を比較した。肘関節あるいは肩関節の受動的な動きに応答するユニットがあった

65 の記録部位から課題に関連する 105 個のユニットを分離した。このうち 67 個のユニットで到達課題遂行時と学習課題獲得期の回帰係数に有意差 ($p=0.01$) が見られた。

(5) 経路選択課題遂行時のサル前頭前野細胞活動の同時多点記録と相互相関解析

坂本一寛 (東北大学 電気通信研究所)

虫明 元 (東北大学 大学院医学研究科生体システム生理分野)

経路選択課題遂行中のサル前頭前野細胞を 2 本から 4 本の電極を用いて、マルチチャンネル記録を行った。課題は、サルに迷路内のスタート地点からのゴールまでカーソルを両手のマニピュレータをもちいて導く課題であった。課題の各期間を 8 つに分けて、さらに、同一電極で記録した細胞のペアと異なる電極で記録したペアを相互相関解析と平均発火頻度による解析を行った。相互

相関解析を行うと、共通入力を示唆するタイプと方向性のある相互関係を示すタイプが存在した。また平均発火頻度による解析と相互相関解析の比較では、互いに独立した傾向が高かった。さらに、同時記録した細胞のペアに関して、各時期の相互相関解析を比較したので報告する。

(6) サルによる時間情報の保持と前頭連合野のマルチニューロン活動

櫻井芳雄 (京都大学大学院・文学研究科・心理学研究室)

高橋 晋 (慶応義塾大学大学院・理工学研究科・計算機科学研究室)

井上雅仁 (京都大学・霊長類研究所・行動神経研究部門)

時間情報のコーディングに関する研究として、アカゲサルが視覚刺激の提示時間と色それぞれを短期間保持する際のマルチニューロン活動を記録した。提示時間の遅延見本合わせ課題 (DMS-D) では、3 秒間の遅延期間を挟んで 2 回表示される視覚刺激 (見本刺激と比較刺激) それぞれの提示時間 (0.5 秒か 2 秒) の異同について Go/No-Go で答えさせた。色の遅延見本合わせ課題 (DMS-C) では、提示時間とは無関係に、見本刺激と比較刺激の色の異同について答えさせた。これら二つの課題を同じサルに遂行させた。

タングステンワイヤー 4 本から成るテトロード電極を 6 本並べたテトロード・アレイ (計 24 本のワイヤー) を

慢性埋め込み用マイクロドライブに取り付け、前頭連合野主溝付近のマルチニューロン活動を、サルが二つの課題を遂行している 2 時間にわたり連続的に記録した。現在までにそのデータの一部を解析しているが、刺激の提示時間を保持する DMS-D 課題を遂行している際、見本として提示された刺激の長短をコードするニューロン (presented-length coding neuron) と、常に長短どちらかの長さをコードしているニューロン (fixed-length coding neuron) が、ほぼ同じ割合で見つかった。それらニューロンの間の機能的結合と、課題中の刺激提示や保持期間に応じたその変化についても報告する。

(7) ラットおよびサル海馬体におけるマルチニューロン活動

西条 寿夫, 田淵 英一, 堀 悦郎, 梅野 克身, 小野 武年 (富山医科薬科大学 医学部生理学)

実際に実験室内を移動する実空間移動課題および液晶パネル上のポインターを移動させる仮想空間移動課題に対するサル海馬体ニューロンの応答性を解析した。4種類の空間移動課題遂行中のサル海馬体から複数のニューロン活動を同時記録し、相互相関解析を行った。その結果、163個のニューロンペアのうち98ペアで有意な相関が認められ、1) 90%が正の相関を示し、2) 59%で相互相関のピークが10~20ms程度シフトし、3) 31%で課題選択的に有意な相関が認められた。以上より、海馬体ニューロン間の動的結合により、課題選択的な文脈情報

が符号化されている可能性が示唆された。また、各課題ごとに海馬体ニューロンの場所識別応答を多次元尺度分析(MDS)により解析した結果、MDS上に再現された各場所は、空間情報処理がより必要とされる実空間移動課題において実際の空間配置をよく反映していることが判明した。以上の結果から、サル海馬体における空間情報の再現機構について考察する。最後に、現在進行中のラットの多脳領域からニューロン活動を同時記録する実験について紹介したい。

(8) ポピュレーション・ベクトル解析法を用いた前頭連合野ニューロン群の空間情報処理の可視化

竹田 和良, 船橋 新太郎 (京都大学 大学院人間・環境学研究科環境情報認知論講座, 総合人間学部環境適応論講座)

2種類の遅延眼球運動課題(遅延後、先に呈示された刺激位置に眼球運動を行うODR課題と、刺激位置に対して90度時計回り方向に眼球運動を行うR-ODR課題)を用いてサルの前頭連合野よりニューロン活動を記録し、Georgopoulosらによって提唱されたポピュレーション・ベクトル解析法を記録したニューロン活動に適用することで、視覚情報から運動情報への変換過程を可視化しようと試みた。両課題で記録した216個のニューロン活動を用いて、刺激呈示から反応期までのポピュ

レーション・ベクトルを250ms間隔で算出した。ODR課題で求めたベクトルの方向はほぼ刺激呈示位置又は眼球運動の方向と一致しており、遅延期間中も維持していたが、R-ODR課題では遅延期間中に刺激呈示位置方向から眼球運動方向へと徐々に変化した。この結果は、感覚情報から運動情報への変換が前頭連合野のニューロン集団によって実行されており、その変換過程はポピュレーション・ベクトルにより可視化できることを示している。

(9) プリズム適応における大脳皮質ニューロンの機能的役割

蔵田 潔 (弘前大学 医学部第二生理)

目標点への到達運動のプリズム適応に大脳皮質運動前野腹側部が重要な役割を果たしていることがムシモル注入による可逆的障害実験から明らかにされている。このことは運動前野腹側部内の神経ネットワークにおける信号伝達の変化がプリズム適応に寄与していることを示唆すると考えられる。この仮説を検討するため、プリズム適応の前後を通じて単一ニューロン活動の多点同時記録を行った。運動前野腹側部・一次運動野・頭頂連合野から運動課題遂行中に記録された個々の

ニューロンにはプリズム適応中に特異的な活動パターンを示すものはほとんどなかった。しかし、同時に記録されたニューロン間の相互相関を解析すると、プリズム適応中に特異的にスパイク後促進を示すニューロン対が運動前野腹側部にもっとも高頻度に存在した。これらは特に運動関連活動を示すニューロン間である場合が多数であった。このことは運動前野腹側部に関する上記の仮説を支持するものと考えられる。

(10) マルチニューロン活動からみた大脳皮質基底核機能連関

木村 實（京都府立医科大学 第二生理学）

大脳補足運動野、前補足運動野や大脳基底核には、複数の運動を組み立てて行う行動のために必要な、順序や系列をコードするニューロンがあることが知られている。これらのニューロンは、行動のゴールに向かって順番に組み立てるしくみに組み込まれることによって、順序運動の発現や行動プランのしくみに役立っていると考えられる。われわれは、大脳皮質基底核ループがこの役割において重要であるという仮説を検証するために、サルに複数のボタンを視覚手がかりに基づいて、また記憶に基づいて押さえる課題を行わせ、線条体から複数のニューロンの活動を同時に記録し、スパイク放電の相互相関を求めることによってニューロン同士の機能的な接続を調べた。その結果、線条体の投射ニューロン間に

は、時間遅れの長い、持続時間の長い、一方向性の興奮接続を示す活動相関が得られた。これらの活動相関は、課題の初期に現れる感覚刺激や運動に関連するニューロンから、課題の後半に現れる事象に関連するニューロンに向かって起こることが多かった。このことは、課題が首尾よく実行された後与えられる報酬に近いニューロンに向かって生じていることを示しており、目的志向的な機能的神経接続の基盤をなすことが示唆された。一方、線条体の介在ニューロンの中、課題の最初に現れる視覚手がかりに応答する一部のニューロンペアの間には、共通入力を示す、時間遅れ 10-30 ms の活動相関が見られた。

10. シナプス伝達の細胞分子調節機構

2001年10月26日－10月27日

代表：高橋智幸（東京大学大学院医学研究科）

世話人：伊佐 正（岡崎国立共同研究機構生理学研究所）

(1) リン酸化を介した神経伝達物質放出のポジティブおよびネガティブ制御

高橋正身^{1*}, 笠井陽子¹, 板倉誠¹, 大西浩史², 青柳共太³, 山森早織¹, 桑原玲子¹

(¹三菱化学生命研, ²群馬大・生体調節研, ³東大院・総合文化)

(2) シナプス小胞プールの endocytic 補充過程における Ca^{2+} の役割

黒見 坦（群馬大学・医）

(3) 開口放出を制御する神経終末蛋白質 SNAP-29

持田澄子（東京医大・第一生理）

(4) シナプス前終末での Ca^{2+} の遊離と処理と伝達物質開口放出

久場健司, 曾我聡子, Fang-Min Lu, 成田和彦*, 鈴木慎一, 秋田天平

(名古屋大学医学部・第一生理, 川崎医科大学・生理*)

(5) 網膜双極細胞におけるシナプス小胞の配置に対するフォルボールエステルの効果

バーグラント 健¹, 塚本吉彦², 緑川光春¹, 立花政夫¹

(¹東京大・大学院人文社会系研究科・心理学, ²兵庫医大・生物学)

(6) グリア型グルタミン酸トランスポーター完全欠損マウスにおける中枢神経系の形態異常

松上稔子, 田中光一（東京医科歯科大）

(7) Estimation of the number and density of non-NMDA receptors bound by a vesicle of glutamate at the climbing fiber-Purkinje cell synapses in immature rats.

Akiko Momiyama

(Division of Cerebral Structure, National Institute for Physiological Sciences, Myodaiji, Okazaki 444-8585 Japan)

(8) 単一シナプス小胞伝達物質によるグルタミン酸受容体の不飽和

石川太郎¹, 佐原資謹^{1,2}, 高橋智幸¹

(¹東京大学大学院 医学系研究科 神経生理学 ²東京医科歯科大学大学院 顎顔面生理)

(9) 蛋白質セラピー法によるシナプス可塑性研究

松井秀樹, 松下正之, 李勝天, 富澤一仁, 森脇晃義

(岡山大学大学院医歯学総合研究科・生体制御科学専攻・脳神経制御科学・細胞生理学)

(10-1) 小脳長期抑圧に対するカルシニューリンの影響

藤井洋彰, 平野丈夫（京都大学大学院理学研究科生物物理学教室, CREST, JST）

(10-2) プルキンエ細胞における homer1a の発現変化と mGluR1 の Ca^{2+} 応答の増強

南 一成, 平野丈夫（京都大学大学院理学研究科生物物理学教室, CREST, JST）

(11) ウィルスベクターによる Ca^{2+} 透過性 AMPA 受容体の海馬錐体細胞への強制発現が長期増強に与える影響

掛川 渉, 山田伸明, 都筑馨介, 小澤滯司（群馬大・医・第二生理）

(12) 海馬興奮性シナプスにおける PSD-Zip45(Homer1C)の動態

栗生俊彦^{1,2}, 岡部繁男^{1,3,4}

(¹産業技術総合研究所 脳神経情報研究部門, ²科学技術振興事業団 科学技術特別研究員,

³東京医科歯科大学大学院 細胞関連機構学, ⁴CREST JST)

(13-1) 海馬長期増強現象に伴うグルタミン酸放出量の変化の検討：

グルタミン酸トランスポーター活性の光学的観測

河村吉信 真仁田聡 榎木亮介 井上雅司 工藤佳久 宮川博義

(東京薬科大学 生体高次機能学研究室)

(13-2) 海馬 CA1 錐体細胞樹状突起における活動電位伝播の光学的解析

春日晃, 榎木亮介, 井上雅司, 工藤佳久, 宮川博義

(東京薬科大学・生命科学部・生体高次機能学)

(14) シナプス前終末の Ca^{2+} チャンネルの多様性

八尾 寛 (東北大学 (院) 生命科学研究科, CREST, JST)

(15) DARPP-32 リン酸化を介するドーパミン情報伝達：グルタミン酸による調節

西 昭徳, 東 英穂 (久留米大・医・第一生理)

(16) 接着分子ネクチンによる神経シナプス形成の制御機構

中西宏之, 高井義美 (阪大院・医・分子生理化学)

(17) 青斑核におけるギャップ結合を介した heterocellular coupling

石松 秀, 赤須 崇 (久留米大・医・第二生理)

(18) 中脳上丘におけるアセチルコリン作動性入力的作用機序

伊佐 正¹, 遠藤利朗¹, 小幡邦彦², 柳川右千夫²(生理学研究所・統合生理研究施設¹, 神経化学²)

【参加者名】

青柳 共太 (東京大院), 赤須 崇 (久留米大・医), 荒木 力太 (東北大院・生命科学), 石川 太郎 (東京大院・医), 石松 君秀 (久留米大・医), 板倉 誠 (三菱化学生命研), 伊東 淳 (京都大院・理), 伊東 三穂 (東京医科歯科大・難), 岩渕 舞子 (東京医科歯科大・難), 榎木 亮介 (東京薬科大・生命科学), 岡田 隆 (東京医科歯科大・難), 岡部 繁男 (東京医科歯科大・医歯学), 小澤 滯司 (群馬大・医), 春日 晃 (東京薬科大・生命科学), 掛川 渉 (群馬大・医), 加藤 総夫 (慈恵会医大), 鎌田 真希 (東北大院・生命科学), 川上 典子 (東京大院・医), 川口 真也 (京都大院・理), 河村 吉信 (東京薬科大・生命科学), 木村 昌弘 (東京大院・医), 久場 健司 (名古屋大院・医), 久保田正和 (名古屋大・医), 栗生 俊彦 (東京医科歯科大・歯), 黒見 坦 (群馬大・医), 斎藤 直人 (東京大院・医), 鈴木 慎一 (名古屋大・医), 鈴木 大介 (東京大院・医), 叢 雅林 (名古屋大・医), 高橋 智幸 (東京大院・医), 高橋 正身 (東京大院・医), 高安 幸弘 (群馬大・医), 立花 政夫 (東京大院・人文), 田中 光一 (東京医科歯科大・難), 辻本 哲宏 (東京大院・医), 都築 馨介 (群馬大・医),

徳納 博幸 (名古屋大・医), 中西 宏之 (大阪大院・医), 西 昭徳 (久留米大・医), 西島 泰洋 (名古屋大・医), パークランド健 (東京大院・人文), 橋本 容範 (東京薬科大・生命科学), 平野 丈夫 (京都大院・理), 藤井 洋彰 (京都大院・理), 細井 延武 (東京大院・人文), 堀哲也 (東京大院・医), 松井 秀樹 (岡山大院・医歯学), 真仁田 聡 (東京薬科大・生命科学), 南 一成 (京大院・理), 宮川 博義 (東京薬科大・生命科学), 宮崎 憲一 (東北大院・生命科学), 村山 正宣 (東京薬科大・生命科学), 森脇 晃義 (岡山大・医), 山下 貴之 (東京大院・医), 矢和多 智 (京大院・理), 若勇 雅昭 (京大院・理), 中野 真人 (京大・医), 井本 敬二 (生理研), 深沢 有吾 (生理研), 馬杉美和子 (生理研), 初山 俊彦 (生理研), 田中 淳一 (生理研), 松下かおり (生理研), 佐々木幸恵 (生理研), 初山 明子 (生理研), 重本 隆一 (生理研), 納富 拓也 (生理研), 岸本 拓也 (生理研), 根本 知己 (生理研), 萩原 明 (生理研), 小松 勇 (基生研), 伊佐 正 (生理研), 遠藤 利朗 (生理研), 山下 哲司 (生理研), 坂谷 智也 (生理研), 李 鳳霞 (生理研), 勝田 秀幸 (生理研), 渡邊 雅之 (生理研)

【概要】

「シナプス伝達の細胞分子調節機構」に関する研究会は、当初シナプス機構を主に電気生理学的手法を用いて解析する研究者を中心とするグループの会として始まったが、研究手法の多様化に伴い、ここ数年は分子生物学や細胞生物学的研究手法を主に用いている研究者を数多く招いて行われている。今回も「シナプス前機構」「シナプス後機構」「システム生理学」のテーマ順に計18の研究グループから20演題の発表が行われた。今年は特にdiscussionの時間をゆっくり取るため、口演は20分、討論に15分の時間配分にした。

特に本年強く感じられたのは従来のノックアウトマウ

スに留まらず、様々なプローブを用いて希望する遺伝子、蛋白の希望する細胞における発現を調節させる技術の進歩である。アミノ酸ドメインからなる導入ドメインを結合させることによる生体内蛋白導入法やウィルスベクターやトランスジェニックマウスを用いて様々な遺伝子、蛋白を希望する細胞に(場合によっては細胞内の特定部位に)発現する技術が大きく進歩し、それがシナプス伝達、可塑性などの神経機構を解析する生理学的実験ツールとして普通に用いられるようになってきている。今後このような刺激を相互に与え合い、この研究会がさらに発展していくことを期待している。

(1) リン酸化を介した神経伝達物質放出のポジティブおよびネガティブ制御

高橋正身^{1*}, 笠井陽子¹, 板倉誠¹, 大西浩史², 青柳共太³, 山森早織¹, 桑原玲子¹
(¹ 三菱化学生命研, ² 群馬大・生体調節研, ³ 東大院・総合文化)

神経伝達物質放出は神経細胞が持つほぼ唯一の出力機構であり、短期的には様々なリン酸化反応によって調節されているが、その詳細な機構は未だ明らかとなっていない。我々はリン酸化を介した神経伝達物質放出の制御機構を明らかにするため、ラット副腎髄質細胞腫由来の株細胞であるPC12細胞や培養小脳顆粒細胞を用いて解析を進めてきた。その結果PC12細胞に活性フォルボールエステルであるPMAを作用させると放出に必須なSNAREタンパク質であるSNAP-25のSer¹⁸⁷がリン酸化され、Ca²⁺依存的なドーパミンやアセチルコリン放出が促進されることが分かった。SNAP-25のリン酸化はPKCの阻害剤であるStaurosporineやbisindolylmaleimide I (BIS)で完全に抑制されたが、PMAによる伝達物質放出は部分的にしか抑制されず、PMAによる放出制御にはPKCを介した機構とリン酸化に依存しない機構の、2つの異なる機構があると考えられた。PKCを介した制御機構を明らかにするため、蛍光タンパク質であるEGFPと小胞膜のモノアミントランスポーターやアセチルコリン

トランスポーターとの融合タンパク質をPC12細胞に発現させ、PMA処理に伴う分泌小胞の局在変化を調べた。その結果PMAを処理すると細胞質全体に分布していた分泌小胞が細胞膜に移行し、その変化はBISで抑制されることが分かり、PKCは分泌小胞を細胞膜への移行させることによって神経伝達物質放出を促進していると考えられた。

一方、PC12細胞や小脳顆粒細胞に非受容体型チロシンキナーゼであるSrcキナーゼの阻害剤を作用させると、神経伝達物質放出が促進され、PC12細胞に活性化型のSrcを発現させると放出は抑制された。PC12細胞にSrcキナーゼの阻害剤を作用させると、パキシリンやPYK2など細胞骨格制御に関わるタンパク質のチロシンリン酸化が抑制され、細胞形態に大きな変化が生じた。PC12細胞や小脳顆粒細胞にF-アクチンの重合阻害剤を作用させると神経伝達物質放出が促進された。以上の結果からSrcキナーゼは細胞骨格系を介して神経伝達物質を抑制的に制御している可能性が考えられた。

(2) シナプス小胞プールの endocytic 補充過程における Ca^{2+} の役割

黒見 坦 (群馬大学医学部行動生理)

シナプス信号伝達を維持するためには、シナプス小胞が exocytosis によって伝達物質を放出した後、シナプス小胞の endocytosis による補充が行われなければならない。このことは、温度感受性 *Drosophila* の変異株, shibire で、endocytosis を起こらなくすると、短期間のうちに、シナプス信号伝達が消失することからも明らかである。

我々は、蛍光色素, FM1-43 (Betz and Bewick, 1992) を用いた光学的方法と電気生理学的方法を利用して、*Drosophila* の神経末端の boutons (膨らみ) に二つのシナプス小胞プール(Exo/endo cycling pool; ECP と reserve pool; RP)が存在することを見つけた。ECP は bouton の末梢部に存在し、伝達物質放出に直接関与している小胞プールであり、RP は bouton のより中心部に存在し、

高頻度刺激時に動員される小胞プールである。ECP の補充は刺激中におこる endocytosis による小胞によっておこなわれ、この過程は外液の Ca^{2+} に存在している。一方、RP の補充は、刺激後におこる endocytosis による小胞によって行われ、この過程は、細胞内ストアーからの Ca^{2+} 放出による。シナプス小胞の endocytosis は exocytosis と共役しているが、カルシウム拮抗薬に対する感受性に相違が見られたことから、異なった Ca^{2+} チャンネルが二つの過程に関与していることが示唆された。また、電気生理学の結果とあわせると、シナプス小胞の endocytosis には、外液 Ca^{2+} に依存した経路と依存しない経路の 2 つの経路が存在することが示唆された。

(3) 開口放出を制御する神経終末蛋白質 SNAP-29

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ンネルから Ca^{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ったが、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 と同じファミリーに属す SNAP-29 は、細胞内膜小胞を用いた物質輸送に関わると報告されてきた¹⁾。しかし、syntaxin と結合する蛋白質として、神経終末にもその発現が免疫沈降・免疫蛍光染色法によって確認された。SNAP-29 は、シナプス小胞に多くその存在が認められる。SNAP-29 は、syntaxin との結合を介して SNARE 蛋白質と結合するが、SNAP-25 の SNARE 複合体への合体を阻害しない。合成 SNAP-29 のシナプス前細胞への導入によって、シナプス活動に依存したシナプス伝達の減少が認められた。この SNAP-29 の効果は、シナプス活動に依存しない合成

SNAP-25 のシナプス伝達抑制作用とは異なる。SNAP-29 は、SNARE 複合体を解体する蛋白質のひとつと考えられている α -SNAP が SNARE 複合体へ結合することを阻害することが *in vitro* での実験から判明したが、合成 SNAP-29 と α -SNAP を同時にシナプス前細胞への導入すると、SNAP-29 のシナプス伝達阻害効果は弱まる。これらの実験結果は、神経終末において SNAP-29 は SNARE 複合体の解体に関与しており、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²⁾。すなわち、SNARE 複合体の解体を制御する SNARE 結合蛋白質によっても、シナプス伝達効率が調節されることが伺われる。

- 1) Steegmaier, M., Yang, B., Yoo, J-S. Huang, B., Shen, M., Yu, S., Luo, Y., and Scheller, R. H. (1998) Three Novel Proteins of the syntaxin/SNAP-25 family. (2) J. Biol. Chem. 278, 34171-34179.
- 2) Su, Q. et al. (2000) SNAP-29: a syntaxin-1A binding protein implicated in synaptic transmission. Soc. Neurosci. 26, 347.

(4) シナプス前終末での Ca^{2+} の遊離と処理と伝達物質開口放出

久場健司, 曾我聡子, Fang-Min Lu, 成田和彦*, 鈴木慎一, 秋田天平
(名古屋大学医学部・第一生理, 川崎医科大学・生理*)

シナプス前終末からのインパルスによる伝達物質の同期的開口放出は, Ca^{2+} チャンネルを通る Ca^{2+} 流入による高濃度の Ca^{2+} が開口放出関与蛋白群に関連した低親和性の Ca^{2+} 結合蛋白に作用し起こる。一方, インパルスの発生なしで自発性に起こる非同期的開口放出は, 静止時あるいは比較的低濃度の Ca^{2+} 上昇で高感受性の Ca^{2+} 結合蛋白が活性化され発生する。この非同期的開口放出に関与する Ca^{2+} 上昇は, 同期的開口放出に関与する Ca^{2+} チャンネルとは異なる報告があり, 非同期的開口放出部位は同期的開口放出部位とは異なる可能性がある。最近, 私たちはカエルの運動神経終末で, Ca^{2+} チャンネルと密接に連動したリアノジン受容体が活性化準備(プライミング)され, その活性化による Ca^{2+} 誘起性 Ca^{2+} 遊離 (CICR) により, 同期性および非同期性の伝達物質開口放出が共に大きく促進されることを見出しており, この機構は他のシナプスでも働いている可能性がある。この報告では, 運動神経終末での CICR のプライミング機構に関する新しい知見を紹介し, 海馬ニューロンのシナプス前終末での同期的及び非同期的開口放出の特性について, Ca^{2+} チャンネルタイプや CICR の関与及び伝達物質プールの観点から述べる。

運動神経終末の CICR のプライミングは, 反覆テタヌスによる神経終末の細胞内 Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の最初の急速な上昇に続く緩徐な上昇として見られる。この緩徐な上昇相はカルモジュリンキナーゼ II の阻害剤で抑制され,

Cyclic ADP ribose (cADPr) の阻害剤である 8-amino cADPr の神経終末内負荷により抑制される。又, 神経終末内に負荷したカゴメ cADPr の活性化により短いテタヌスにより誘起した $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が大きくなる。従って, 運動神経終末の CICR のプライミングは, 反覆した Ca^{2+} 流入によりカルモジュリンキナーゼ II が活性化され, その結果, ADP ribosyl cyclase が活性化され, cADPr が産生されることによることが示唆されるが, この二つの系が並列して起こる関与する可能性も残っている。

オータプス (神経軸索がそのニューロン細胞体や樹状突起に形成したシナプス) を形成した培養海馬ニューロンにパッチクランプし, 持続的な脱分極電位をかけて Cs^+ を注入した状態下では, 閾値以下の細胞外 K^+ 濃度 (<10 mM) のジャンプによりオータプスの終末とその軸索の Ca^{2+} チャンネルのみが活性化され, 同期的及び非同期的伝達物質の開口放出が起こる。 Ca^{2+} チャンネルの阻害剤の作用から, 同期的開口放出には神経終末の N(P/Q) タイプの Ca^{2+} チャンネルが関与し, 非同期的放出には N(P/Q) タイプのみならず L タイプの Ca^{2+} チャンネルが関与することが解り, リアノジンやカフェインやサブシガーギンの作用から細胞内 Ca^{2+} 遊離が両方の開口放出に寄与することが示唆された。また, K^+ 濃度ジャンプの間隔を変えた実験からこれらの開口放出には異なるシナプス小胞のプールが関与することが示唆された。

(5) 膜双極細胞におけるシナプス小胞の配置に対するフォルボール・エステルの効果

バーグラント 健¹, 塚本 吉彦², 緑川 光春¹, 立花 政夫¹
(¹東京大・大学院人文社会系研究科・心理学, ²兵庫医大・生物学)

キンギョ網膜のON型双極細胞にはプロテイン・キナーゼ C (PKC) が存在する。電気生理学的手法を用いた実験から, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) を投与して PKC を活性化すると, 放出可能なシナプス小胞のプール・サイズが増大することを既に報告した。双極細胞の前シナプス部位においては, シナプス・リボンにシナプ

ス小胞が集積している。プール・サイズが増大した場合, 形態学的には, シナプス・リボンやその周辺でシナプス小胞の配置に変化が起きている可能性がある。そこで, キンギョの剥離網膜標本に PMA を作用させた後, 網膜を化学固定して包埋して超薄連続切片標本を作製し, 電子顕微鏡で双極細胞の軸索終末部を観察した。PMA の溶

媒である DMSO のみを投与した条件や、PMA に加えて PKC の特異的阻害剤である bisindolylmaleimide I を投与した条件と比較した結果、PKC の活性化によってリボンの大きさやリボンに集積しているシナプス小胞の密度に

変化は起きていなかったが、細胞膜にドックされている小胞の密度が増大していることがわかった。このような変化は、アクティブ・ゾーンから 500 nm ほど離れたところで顕著であった。

(6) グリア型グルタミン酸トランスポーター完全欠損マウスにおける中枢神経系の形態異常

松上稔子, 田中光一 (東京医科歯科大学)

グルタミン酸は哺乳動物の中枢神経において主要な興奮性神経伝達物質であるが、一方で中枢神経系の発達に必要なシグナル分子としての役割も持っていると考えられている。

グルタミン酸のシグナル分子としての役割はこれまでに培養細胞実験系で、neurite の伸長や neuron の生存の制御、また発達中の脳の神経前駆細胞での DNA 合成阻害という報告がなされている。

生体内での細胞外グルタミン酸濃度はグルタミン酸トランスポーターによって一定に保たれる。これまでにグリア特異的に発現する GLT1, GLAST とニューロン特異的に発現する EAAC1, EAAT4, EAAT5 という 5 つのグルタミン酸トランスポーターのサブタイプが同定されている。

各サブタイプ欠損マウスを用いた最近の解析によりグリア特異的に発現するグルタミン酸トランスポーターが細胞外グルタミン酸濃度の維持に主要な役割を果たすと

いうことが示唆された。グルタミン酸が中枢神経系の発達に及ぼす影響を生体内で観察するために、我々は GLT1, GLAST をそれぞれ欠損させた各ノックアウトマウスと GLT1, GLAST の両方を欠損させたダブルノックアウトマウス (胎生致死) の作成、解析を行った。

組織学的解析の結果、GLT1 ノックアウトマウス、GLAST ノックアウトマウスの脳では明らかな形態異常は見られないのに比べ、ダブルノックアウトマウスでは E17 以降に海馬の 3 層構造、嗅球の僧坊細胞層、小脳のプルキンエ細胞層での層構造不形成、小脳の小葉形成不全といった著しい形態異常が観察された。

これらの結果は発達中の脳において細胞外グルタミン酸濃度の調節にグリア型グルタミン酸トランスポーターが重要な役割を担っている事の遺伝学的な証拠の一つであり、さらにまた GLT1 と GLAST は片方だけの欠損においては互いに代償的な機能をもちうる事を提示している。

(7) Estimation of the number and density of non-NMDA receptors bound by a vesicle of glutamate at the climbing fiber-Purkinje cell synapses in immature rats.

Akiko Momiyama

(Division of Cerebral Structure, National Institute for Physiological Sciences)

Synaptic and extrasynaptic non-NMDARs were examined in rat cerebellar Purkinje cells at early developmental stage (postnatal day 2-4) when they receive synaptic inputs solely from climbing fibers (CF). Evoked CF-EPSCs and whole-cell AMPA-currents displayed a rectification index of ~ 1.0 , consistent with the presence of GluR2 subunits in both synaptic and extrasynaptic non-NMDARs. The mean quantal size of CF inputs estimated from mepscs was ~ 330 pS, and mepscs decay was fitted to a double exponential function: τ_{fast}

$= 1.8$ ms, $\tau_{\text{slow}} = 8.7$ ms. Peak-scaled non-stationary fluctuation analysis of spontaneous or miniature EPSCs gave a weighted-mean synaptic channel conductance of ~ 5 pS. Combining the rapid application of glutamate pulses (5 mM) to outside-out patches and non-stationary fluctuation analysis, we obtained similar estimate of single-channel conductance and $P_{o, \text{max}}$ (0.72) for extrasynaptic non-NMDARs. Directly resolved single-channel openings in the continued presence of glutamate also yielded a similar mean single channel

conductance, with clear multiple-conductance levels. The mean area of the postsynaptic density (PSD) of these synapses, measured by electron microscopy of reconstructed serial sections, was $0.074 \mu\text{m}^2$. From these data we estimate about

100 postsynaptic non-NMDARs are bound by a quantal packet of transmitter at CF synapses on Purkinje cells, and that these receptors are packed at a density of $\sim 1270/\mu\text{m}^2$ in the postsynaptic membrane.

(8) シナプス小胞に含まれるグルタミン酸はシナプス後膜のグルタミン酸受容体の不飽和

石川太郎¹, 佐原資謹^{1,2}, 高橋智幸¹

(¹ 東京大学大学院 医学系研究科 神経生理学 ² 東京医科歯科大学大学院 顎顔面生理)

シナプス後膜に存在する AMPA 受容体及び NMDA 受容体が, 単一シナプス小胞から放出されるグルタミン酸によって飽和される否かは明らかでない。この問題をラット脳幹スライスの巨大シナプス (the calyx of Held) において検討した。シナプス前末端のパッチ電極に 1 mM の L-グルタミン酸を加えたときに MNTB 細胞からホールセル記録される AMPA-微小 (m) EPSC の振幅は, シナプス前末端に記録電極がないときの振幅と同程度であった。これに対し, 100 mM の L-グルタミン酸をシナプス前末端の電極に負荷して記録される AMPA-mEPSC

の振幅は通常の約 1.5 倍であった。シナプス前末端と MNTB 細胞から同時記録を行い, 前末端内の L-グルタミン酸の濃度を電極内灌流法によって 1 mM から 100 mM に増大させたところ, AMPA-EPSC と AMPA-mEPSC の振幅がいずれも著明に増大した。また, 0 mM Mg^{2+} 灌流液中で記録される NMDA-mEPSC と NMDA-EPSC の振幅も著明に増大した。以上の結果から, calyx of Held シナプスの単一シナプス小胞に含まれるグルタミン酸はシナプス後膜の AMPA 受容体及び NMDA 受容体のいずれも飽和させないと結論される。

(9) 蛋白質セラピー法によるシナプス可塑性研究

松井秀樹, 松下正之, 李勝天, 富澤一仁, 森脇晃義

(岡山大学大学院医歯学総合研究科・生体制御科学専攻・脳神経制御科学・細胞生理学)

ゲノム情報を効率よく研究や治療に利用する方法として In vivo Protein Transduction (生体内蛋白質導入法) がある。この方法は 7—20 個のアミノ酸からなる導入ドメインを結合させることにより, 目的の蛋白質やペプチドを細胞内に直接導入する方法である。私達はポリアルギニンからなる高効率導入シグナルを新たに開発し, さらに細胞内局在化シグナルを付加することにより目的の物質を細胞内小器官内に特異的に導入させる方法をつくり, これを「蛋白質セラピー法」として確立させようとしている。この方法を用いたシナプス可塑性研究の結果について報告する。

11 個の連続したポリアルギニン鎖は結合させた GFP を最も効率よく培養細胞内に導入し, すでに報告されている HIV の TAT ペプチドよりはるかに高能率であった。アルギニン鎖を短縮させると効率は低下した。ラット海馬スライスでは, 全層にわたりほぼ均一に神経細胞内に導入された。核内導入シグナル (NLS) を付加すると核

内に選択的に導入した。

この方法を利用して A キナーゼの生理的インヒビターペプチドである PKI を海馬スライス上の CA1 錐体細胞の核内に特異的に導入したところ, CREB のリン酸化は阻害されたが, シナプス部に存在する AMPA 受容体 GluR1 サブユニットのリン酸化は抑制されなかった。この時 CA1 領域の長期増強 (LTP) には何らの影響がなかったが, 超長期増強 (L-LTP) のみが抑制された。この結果は導入したペプチドが生理活性を有すること, さらに L-LTP の成立には A キナーゼによる核内での CREB リン酸化が必須である事を直接証明する結果と考えられる。

さらに, ポリアルギニンと NR2B の PDZ 結合ドメインを融合した人工合成ペプチドは, ポストシナプス部位に特異的に移行する事が確認された。このペプチドを海馬初代培養細胞に導入すると NMDA 電流を抑制した。以上より我々の蛋白質セラピー法がシナプス研究においても有用な手段であることが示された。

(10-1) 小脳長期抑圧に対するカルシニューリンの影響

藤井 洋彰, 平野 丈夫 (京都大学大学院理学研究科生物物理学教室, CREST, JST)

小脳プルキンエ細胞で起こるシナプス長期抑圧 (LTD) には, 転写に依存して発現し, 1 日以上持続する後期相がある。小脳初代分散培養系では, 高カリウム・グルタミン酸溶液処理により, 微小興奮性シナプス後電流 (mEPSC) の大きさの LTD が起こることが報告されている。本研究ではこの系を用いて, 脱リン酸化酵素カルシニューリンの LTD 後期相への影響を検討した。培養へのカルシニューリン阻害剤の投与により, mEPSC の大きさが持続的に小さくなる現象が観測された。このカルシニューリン阻害による mEPSC の大きさの減弱は,

カルシウム/カルモジュリン依存性キナーゼ (CaMK) の阻害剤や mRNA 合成阻害剤によって抑えられたが, これらの阻害剤は高カリウム・グルタミン酸溶液処理による LTD 後期相の発現も抑えるものである。また高カリウム・グルタミン酸溶液処理による LTD 後期相とカルシニューリン阻害による mEPSC の大きさの減弱は加算的には起こらなかった。これらの結果から, カルシニューリンは CaMK を介した転写に影響を与えることで LTD 後期相誘導の調節に関わっていると考えられる。

(10-2) プルキンエ細胞における homer1a の発現変化と mGluR1 の Ca^{2+} 応答の増強

南 一成, 平野 丈夫 (京都大学大学院理学研究科生物物理学教室, CREST, JST)

代謝型グルタミン酸受容体 1 (mGluR1) は, 小脳長期抑圧や運動学習に関わることが知られている。また homer1a は mGluR1 に結合し, 神経細胞において活動依存的にその発現量が増加する最初期遺伝子であることが知られている。私たちは, 培養プルキンエ細胞を高濃度カリウムイオンで脱分極させると, homer1a の mRNA 発現量が MAP キナーゼ活性依存的に増加することを見いだした。また, プルキンエ細胞において mGluR1 の細胞外ドメインに対する抗体を用いて免疫染色を行ったとこ

ろ, mGluR1 の細胞膜表面から細胞内への移動が, プルキンエ細胞を脱分極させることによって, 抑えられることが判明した。またプルキンエ細胞において, mGluR1 の刺激による細胞内 Ca^{2+} 応答が, 脱分極によって増強されることもわかった。そして, この Ca^{2+} 応答の増強は MAP キナーゼ活性に依存していた。これらの結果から, 神経細胞活動依存的な homer1a の mRNA 発現量増加によって, プルキンエ細胞の mGluR1 活性に長期的な変化が起こる可能性が考えられる。

(11) ウィルスベクターによる Ca^{2+} 透過性 AMPA 受容体の海馬錐体細胞への強制発現が長期増強に与える影響

掛川 渉, 山田伸明, 都筑馨介, 小澤澪司

(群馬大学医学部生理学第二講座, 科学技術振興事業団 CREST)

【目的】 ウィルスベクターを用いたニューロンおよびグリアへの遺伝子導入による外来性タンパク質の強制発現は, 当該タンパク質分子のもつ機能的意義を解明する上で有用な手段である。特に, シンドビスウィルスベクターはニューロンへの感染効率が低いことから, シナプス伝達機能の解析への利用が有望視されている。本研究では, シンドビスウィルスベクターを用いて海馬錐体細胞に Ca^{2+} 透過性 AMPA 受容体を強制発現させ, 新規受

容体を介したシナプス後部への Ca^{2+} 流入が記憶・学習の分子的基础過程とされている Schaffer 側枝-CA1 シナプス (CA1 シナプス) および苔状線維-CA3 シナプス (苔状線維シナプス) での長期増強 (LTP) に与える影響を検討した。

【方法】 生後 9-10 日齢のラットより培養海馬スライスを作製した。このスライスの CA1 野および CA3 野錐体細胞に未編集型 GluR2 サブユニット (GluR2Q) を

シンドビスウィルスベクターにより導入し, Ca^{2+} 透過性 AMPA 受容体を強制発現させ, whole-cell patch clamp 記録によりシナプス応答を記録し, 単一細胞レベルで LTP を解析した。

【結果と考察】 ウィルス感染 36–48 時間後, 海馬錐体細胞に発現した GluR2Q は CA1 および苔状線維シナプス後膜に輸送され, 各シナプスにおける興奮性シナプス後電流 (EPSC) は Ca^{2+} 透過性 AMPA 受容体の特徴である内向き整流特性を示した。新規受容体の強制発現により機能変換された CA1 シナプスから LTP 記録を行うと, 非感染標本とは異なり, D-AP5 による NMDA

受容体阻害下においても LTP が誘発された。この結果から Ca^{2+} 透過性 AMPA 受容体を介する Ca^{2+} 流入が, NMDA 受容体非依存的に LTP を誘発させ得ることが明らかになった。これに対し, シナプス前性機序により誘発され则认为られている苔状線維 LTP では, シナプス後部に Ca^{2+} 透過性 AMPA 受容体を強制発現させた場合においても, LTP には顕著な変化が見られなかった。これらの結果は, 苔状線維のシナプス後部には, CA1 シナプスの場合とは異なり, Ca^{2+} 流入による LTP 誘発のための機構が存在しないことを示唆する。

(12) 海馬興奮性シナプスにおける PSD-Zip45 (Homer1C) の動態

栗生俊彦^{1,2}, 岡部繁男^{1,3,4}

(¹産業技術総合研究所 脳神経情報研究部門, ²科学技術振興事業団 科学技術特別研究員,

³東京医科歯科大学大学院 細胞相関機構学, ⁴CREST JST)

近年の研究により, シナプス機能の可塑的変化の基盤にシナプス後部分子の局在変化が関与する可能性が示唆されている。グルタミン酸受容体分子自体の活動依存的な分布変化については多くの知見が得られているが, シナプス後肥厚部を構成する蛋白質群については, その挙動はほとんど調べられていない。今回, 我々は, 代謝型グルタミン酸受容体と結合するシナプス後肥厚部蛋白質である GFP-PSD-Zip45 を用いて, 培養海馬神経細胞における PSD-Zip45 の動態とその神経活動依存的局在制御機構について解析した。NMDA 受容体結合蛋白質 PSD-95 と比較して, PSD-Zip45 の局在変化はよりダイナミックであり, 蛍光消退法により, シナプス後部における分子の交換反応の速度に 2 種類の PSD 蛋白質で, 大きな差があることが示された。次に細胞外液にグルタミン酸・高濃度 K^+ を投与することにより刺激した際の PSD-Zip45 の局在変化を調べたところ, PSD-Zip45 分子は NMDA 受容体の活性化と膜電位感受性 Ca^{2+} チャネルの活性化により異なった分布変化を示した。NMDA 受容体の活性化による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇はクラスターを分散させ, Ca^{2+} チャネルの活性化による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は, Ca^{2+}

流入の kinetics 依存的に, 2 方向性に PSD-Zip45 の局在を変化させた。これらの結果は, 刺激に対する細胞内への Ca^{2+} 流入経路の違い及び細胞内 Ca^{2+} 濃度変化の kinetics の違いが PSD-Zip45 分子の集積・分散という局在変化における 2 方向性をもたらしていることを示唆している。生理的条件下では, 入力線維の発火パターンに応じて, Ca^{2+} の流入経路及び細胞内 Ca^{2+} 濃度変化の kinetics が制御されていると考えられる。そこで, 過去の実験から培養海馬神経細胞でシナプス可塑性を引き起こす事が知られている刺激パターンを用いて入力線維を局所的に電気刺激し, post 側における細胞内 Ca^{2+} 濃度変化と PSD-Zip45 の局在変化との相関について解析した。その結果, 入力線維の刺激に対する post 側での Ca^{2+} 濃度の時間的・空間的变化に対応して, 特異的な PSD-Zip45 の局在変化が観察された。以上の結果は, 生理的な入力刺激に応じて起こるシナプス後部での Ca^{2+} 動態が分子種特異的にその局在を制御することを示唆している。このような PSD-Zip45 の局在制御機構は, シナプス後肥厚部での scaffolding protein の構成を活動依存的・局所的に再構築するために重要な役割を果たしていると考えられる。

(13-1) 海馬長期増強現象に伴うグルタミン酸放出量の変化の検討： グルタミン酸トランスポーター活性の光学的観測

河村吉信，真仁田聡，榎木亮介，井上雅司，工藤佳久，宮川博義（東京薬科大学 生体高次機能学研究室）

海馬 CA1 領域における LTP 発現機構に関して，シナプス前末端から放出されるグルタミン酸放出量の増加，シナプス後膜のグルタミン酸受容体の感受性の増強（もしくは受容体の増加），もしくは両方によるとする仮説が提出され研究されてきた。最近，LTP 発現に伴ってシナプス後膜の AMPA 型グルタミン酸受容体が発現することが発見され，シナプス後膜における LTP 発現機構の研究が主流を占めている。一方，シナプス前末端における LTP 発現機構の研究はシナプス前末端におけるグルタミン酸放出量を定量するよい方法がなく，決定的な結論に至っていない。我々は海馬スライス標本において，膜電位感受性色素を用いた光学測定によって，シナプス

活動に伴って放出されるグルタミン酸の再取り込みに伴う，グリア型グルタミン酸トランスポーターの電位変化を検知することに成功している。本研究では，1) この方法を用いて，シナプスにおけるグルタミン酸放出量の変化を追跡することが可能か否かを検討し，2) CA3-CA1 シナプスにおいて，LTP 発現に伴うグルタミン酸放出量の変化を観察した。結果，グルタミン酸トランスポーター活性がグルタミン酸放出量の変化に伴って変化することを確認したが，LTP 発現に伴う変化は見られなかった。これらの結果は海馬 CA1 領域における LTP 発現がシナプス後細胞側の機序によるものであることを指示している。

(13-2) 海馬 CA1 錐体細胞樹状突起における活動電位伝播の光学的解析

春日晃，榎木亮介，井上雅司，工藤佳久，宮川博義（東京薬科大学・生命科学部・生体高次機能学）

シナプス入力に応じて海馬錐体細胞が活動電位を発生する際に，起始部が細胞体近傍であるとする報告がある一方で，入力部位に発生するとする説もある。本研究では膜電位感受性色素を用いた高速イメージングによって海馬錐体細胞における活動電位の起始部がどこであるかを調べた。ラット海馬スライスを膜電位感受性色素 JPW1114 で染色し，放線層刺激によって誘発される光シグナルをフォトダイオードアレイシステムにより検出した。活動電位由来の速いシグナルと EPSP 由来の遅いシグナルを細胞体および樹状突起から検出した。光学的シ

グナルをホールセル記録と比較することで，速いシグナルが Na^+ 依存性の活動電位由来である事を確かめた。速いシグナルはシナプス入力に応じて，始めに樹状突起の入力部位で観察され，細胞体では一定の遅延時間の後に観察された。細胞体への TTX 局所灌流では細胞体付近の速いシグナルは消失したが，入力部位の樹状突起におけるシグナルは影響を受けなかった。これらの結果より，我々の測定条件では活動電位が樹状突起のシナプス入力部位で発生し，他の部位へと伝導すると結論した。

(14) シナプス前終末の Ca^{2+} チャンネルの多様性

八尾 寛（東北大学（院）生命科学研究所，CREST，JST）

シナプス前終末における伝達物質放出は，電位依存性 Ca^{2+} チャンネルにより制御されている。 Ca^{2+} チャンネルには，分子の多様性があり，シナプス前終末には複数の Ca^{2+} チャンネルサブタイプが共存している。海馬苔状線維終末の伝達物質放出が P/Q-type Ca^{2+} チャンネルと N-type Ca^{2+}

チャンネルに依存していることが報告されている (Castillo et al. 1994)。本研究は，これを発展させ，苔状線維終末に発現している Ca^{2+} チャンネルサブタイプの分布と機能を定量的に解析した。

マウス海馬スライスを作成し，歯状回顆粒細胞層に

Ca²⁺感受性色素を詰めたガラスピペットを挿入した。神経細胞に取り込まれた色素が苔状線維終末を特異的にラベルしたことを TSQ による Zn²⁺分布の可視化と CalbindinD_{28K} の 2 重染色により確認した。細胞外の Ca²⁺を Sr²⁺に置き換えて、活動電位にともなう Sr²⁺濃度上昇を測定した。Sr²⁺は Ca²⁺チャネルを通るが、タンパク質との相互作用が弱いので、Ca²⁺による 2 次的な変化を最小にすることができる。したがって、チャネルの分布の研究に適している。Ca²⁺チャネルサブタイプと伝達物質の関連の強さを表す指標としてコンプライアンスを提案する。

苔状線維シナプスの Sr²⁺濃度上昇は、 ω -CgTx GVIA (10 μ M)により約 20%抑制された。残りの成分は、 ω -AgTx IVA (0.2 μ M)により約 30%抑制された。両者に抵抗性の成分は、ニモジピン (10 μ M)により部分的に抑制された。また、 ω -AgTx、 ω -CgTx 両者に抵抗性の成分は、Bay K 8644 により促進された。したがって、苔状線維シナプスには、N-type、P/Q-type、L-type の少なくとも 3 種類の Ca²⁺

チャネルサブタイプが共存している。また、いずれのトキシシンや薬物にも抑制されない R-type も共存している可能性がある。Ca²⁺チャネルの発現比率は、個々の計測で大きなばらつきを示した。P14-21 の 22 例で、N-type は 7-39 %の範囲でばらついた。また、P/Q-type は 7-45 %の範囲でばらついた。両者の和も大きなばらつきを示し、相補的でないことが示された。したがって、他のサブタイプの発現比率も大きくばらついていることが期待される。N-type Ca²⁺チャネルと伝達物質放出の関連の強さは、P/Q-type Ca²⁺チャネルと同様だった。

海馬苔状線維終末には多彩な Ca²⁺チャネルサブタイプが発現していると同時に個々のシナプス前終末において Ca²⁺チャネルサブタイプの発現比率に大きなばらつきがある。これらのサブタイプがそれぞれ伝達物質放出と関連していることから、Ca²⁺チャネルを介して伝達物質放出が多様に調節されていることが示唆される。その生理的意義について論ずる。

(15) DARPP-32 リン酸化を介するドーパミン情報伝達：グルタミン酸による調節

西 昭徳, 東 英穂 (久留米大学医学部生理学第一講座)

線条体にはドーパミンにより制御されるリン酸化蛋白 DARPP-32 (dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein, M_r 32 kDa) が選択的に発現している。DARPP-32 の Thr34 残基が cAMP-dependent protein kinase (PKA) によりリン酸化されると protein phosphatase-1 (PP-1) 抑制蛋白として作用し、PP-1 基質のリン酸化レベルを調節することで生理的作用を発揮する。最近、DARPP-32 の Thr75 残基は神経型 Cyclin-dependent kinase (Cdk5) によりリン酸化され、リン酸化された DARPP-32 は PKA 抑制蛋白として作用することが明らかとなった。ドーパミンは、D1 レセプターを介して PKA を活性化し Thr34 残基のリン酸化を促進すると同時に、PP-2A を活性化し Thr75 残基の脱リン酸化を促進する。その結果、Thr75 残基リン酸化 DARPP-32 による PKA 抑制が解除されるため、PKA 基質のリン酸化および PKA/phospho-Thr34 DARPP-32/PP-1 シグナルはさらに増強される。この研究では、マウス線条体スライスを用いて、イオンチャネル共役型グルタ

ミン酸受容体 (NMDA/AMPA レセプター) による DARPP-32 リン酸化調節を検討した。NMDA/AMPA レセプター刺激により、DARPP-32 の Thr34 残基および Thr75 残基のリン酸化レベルは低下した。Thr34 残基リン酸化レベルは、カルシニューリンによる脱リン酸化過程の亢進により低下していた。Thr75 残基リン酸化レベルの低下は、Cdk5 活性の抑制によるものではなく、PP-2A 活性化による脱リン酸化過程の亢進によるものであった。以上の結果より、NMDA/AMPA レセプター作用は、PKA サイト (Thr34 残基) ではドーパミン D1 作用に拮抗するが、Cdk5 サイト (Thr75 残基) では Thr75 脱リン酸化を介して PKA に対する抑制を解除しドーパミン D1 作用を増強することが明らかとなった。ドーパミン D1 レセプター情報伝達系と NMDA/AMPA レセプター情報伝達系が、DARPP-32 のリン酸化調節を介して複雑な相互作用を示すことが示唆された。

(16) 接着分子ネクチンによる神経シナプス形成の制御機構

中西宏之, 高井義美 (阪大院・医・分子生理化学)

細胞間接着機構であるネクチン-アフアディン系はカドヘリン-カテニン系と協調的に機能し, 上皮細胞の adherens junctions (AJ) や tight junctions の形成を制御している。ネクチンは, 免疫グロブリン様の接着分子であり, ネクチン-1,-2,-3 の3種のアイソホームが存在する。各ネクチンは, ホモフィリックなトランス2量体を形成するが, ネクチン-3はネクチン-1または-2とヘテロフィリックなトランス2量体を形成し, このヘテロフィリックな2量体はホモフィリックな2量体より強い結合活性を示す。海馬 CA3 領域の mossy fiber と錐体細胞樹状突

起とのシナプスには, 神経伝達が行われている asymmetric な結合部位と, AJ に類似し, puncta adherentia junctions (PA) と呼ばれている symmetric な結合部位が存在している。ネクチン-1, -3 は asymmetric にそれぞれ PA の前, 後シナプス膜に, カドヘリン-カテニン系は symmetric に局在し, 両系が協調してシナプスの形成を制御している。本会では, 神経シナプスの形成におけるネクチン-アフアディン系の機能と作用機構に関して私の最近の知見を紹介して議論したい。

(17) 青斑核におけるギャップ結合を介した heterocellular coupling

石松 秀, 赤須 崇 (久留米大学医学部第2生理)

Neuron-neuron あるいは neuron-glia 間の細胞間情報伝達機構として伝達物質を介した化学的シナプスの研究が目覚ましい進歩を遂げてきた。一方で電気的シナプスも古くより提唱された細胞間情報伝達機構である。中枢神経系におけるその分野の研究は進んでいない。近年, 中枢神経系における calcium waves, spreading depression, synchronous oscillation などが報告されており, その基本メカニズムとしてギャップ結合の存在が知られてきた。これまで我々はラットの青斑核(LC)を含む脳スライス標本を用いて電気生理的あるいは光学的手法を用いてギャップ結合を介する複数の細胞の同期した活動を報告してきた。さらに我々は, 免疫染色ならびに電顕にて connexin の存在を確認し, 電気生理学的手法によりギャップ結合を介した neuron-neuron および neuron-glia coupling の機能的意義を検討したので報告する。ラットの LC neuron は静止膜電位レベルで自発性活動電位を発生しているが, 幼若ラットの活動電位の発射はリズムミッドで周期性があるのに対し, 成熟ラットではそのような周期性は見られない。しかし灌流溶液に TEA, Ba, TTX を加えると成熟ラットの LC neuron でも周期的な活動が現

れ, しかもその周期的な活動は複数の細胞間で同期している。免疫染色や電顕による研究では, 幼若期 (-P7) から成熟期 (P28-) までの LC neuron (Tyrosine hydroxylase positive cell)および glia cell (glialfibrillary acidic protein positive cell)にギャップ結合タンパク (connexin, Cx) Cx26, Cx32, Cx43 が認められた。Neuron では成長するにつれ Cx43 は減るのに対し, Cx26, Cx32 は一定であった。Glia では成長するにつれ Cx32 と Cx43 は増えたが, Cx26 は一定であった。Cx 陽性グリアはその形態から astrocyte と考えられた。単一細胞に neurobiotin を注入すると astrocyte間で多くの dye couplingを観たが, oligodendrocyteでは dye couplingは観られなかった。また多重染色を行うと neuron (TH positive) と astrocyte (GFAP positive) 間にも Cx26, Cx32 が観察された。電気生理学的に glia が脱分極すると neuronの自発性活動電位の発射頻度が高まる事が観察された。以上の結果より, LC では各発達段階を通してギャップ結合を介して繋がっており, neuron-neuron あるいは neuron-glia の電気的ネットワークにより青斑核全体としての activity を規定している可能性が考えられた。

(18) 中脳上丘におけるアセチルコリン作動性入力的作用機序

伊佐 正¹, 遠藤利朗¹, 小幡邦彦², 柳川右千夫²
(生理学研究所・統合生理研究施設¹, 神経化学²)

中脳の上丘は浅層は視覚入力を受け, 中間・深層は視覚以外の感覚入力を受けると共に運動出力を脳幹・脊髄に投射する。浅層は同じ中脳の parabigeminal nucleus (PBN) から, 中間層には pedunculopontine nucleus (PPTN), laterodorsal tegmental nucleus (LDTN) よりコリン作動性の投射を受けるが, それぞれどのような作用を局所回路に及ぼし, どのような機能を有するのか明らかでなかった。

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 (+)ニューロンは脱分極通電に対し, 若干の spike frequency adaptation を示す regular spiking type, 100Hz 以上で安定して発火する fast spiking type, 発火閾値付近で複数のスパイクがバースト状に起きる burst spiking type の他, 一部 chattering type も観察されるなど多様な発火パターンを示した。Biocytin の細胞内注入による染色では, 今回記録されたニューロンはほぼ全て, 水平方向に広い (200 μ m 以上) 範囲にわたる樹状突起をもつ horizontal ないしは wide field multipolar type と呼ばれるもので, その形態的特徴からいわゆる“側方抑制”に関与するものと

推察された。これらのニューロンは ACh 投与に対して一過性の inward current を生じ, それらは mecamylamine 10 μ M 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, bicuculline 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—1 μ M 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総合して考えると 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 PBG 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。

11. 神経科学の新しい解析法とその応用

2001 年 11 月 1 日－11 月 3 日

代表・世話人：東田 陽博（金沢大学大学院医学研究科）

所内対応者：池中 一裕，鹿川 哲史（岡崎国立共同研究機構生理学研究所）

- (1) ゲノムワイド RNAi による神経ネットワーク形成遺伝子の研究
東田 陽博（金沢大学・医学系研究科・脳細胞遺伝子）
- (2) シナプス形成期の小脳顆粒細胞における電依存性 K^+ チャネル-Kv4.2 と
NMDA レセプターの神経活動に依存した相補的局在化機構
柴崎 貢志（国立岡崎共同研究機構・生理学研究所）
- (3) 磁気ビーズを用いた AMPA 受容体含有小胞の単離と精製
板倉 誠（三菱化学生命科学研究所）
- (4) アラキドン酸食餌によって改善される，老齢動物のシナプス可塑性
藤田 知宏（東海大学・開発工学部）
- (5) BDNF による神経可塑性と神経伝達物質放出制御
沼川 忠広（大阪大学・蛋白質研究所）
- (6) エストロゲンは活動依存的な神経伝達に影響を与える
横幕 大作（大阪大学・蛋白質研究所）
- (7) 逆行性標識及び in situ hybridization 二重標識法
藤森 一浩（産業技術総合研究所関西センター人間系特別研究体ニューロニクス研究グループ）
- (8) アストロサイト由来 ATP による海馬のシナプス伝達抑制作用
小泉 修一（国立医薬品食品衛生研究所・薬理）
- (9) ウミウシ単理脳条件付けにおける B 型視細胞特性変化へのリアノジン受容体の関与
川合 亮（東海大学大学院・理学研究科）
- (10) 微小炭素線維電極を用いたアンペロメトリー法による開口分泌の解析
笹川 展幸（上智大学・生命科学研究所・神経化学部門）
- (11) BDNF は，短時間で細胞内 Ca^{2+} ストア由来の Ca^{2+} 上昇に依存した細胞内シグナルにより
開口放出機構を増強する
松本 知也（大阪大学・蛋白質研究所）
- (12) マウス大脳オリゴデンドロサイトの発生の起源
—in utero エレクトロポレーション法を応用した新しい細胞移動標識法の確立—
中平 英子（岡崎国立共同研究機構生理学研究所神経情報部門）
- (13) ユビキチン-プロテアソーム系による Ves1-1S/Homer-1a のタンパク量と分布の制御
上田 洋司（三菱化学生命科学研究所）
- (14) LTP におけるアクチン細胞骨格系の動態と役割
斎藤 喜人（三菱化学生命科学研究所）
- (15) DNA ダメージと神経障害
榎戸 靖（大阪大学・蛋白質研究所）
- (16) 対物レンズ照射式エバネッセンス顕微鏡法の応用
寺川 進（浜松医科大学・光量子医学研究センター）

【参加者名】

板倉 誠 (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), 上田 洋司 (三菱化学生命科学研究所), 榎戸 靖 (大阪大・蛋白研), 川合 亮 (東海大大院・理学研), 日下 永子 (大阪大大院・理学研), 工藤 佳久 (産業技術総合研究所関西センター), 熊倉 鴻之助 (上智大・生命科学研究), 小泉 修一 (国立医薬品食品衛生研究所), 斎藤 喜人 (三菱化学生命科学研究所), 榊原 学 (東海大・開発工), 桜井 孝司 (浜松医科大), 笹川 展幸 (上智大・生命科学研究), 高井 里美 (大阪大大院・理学研), 高橋 正美 (三菱化学生命科学研究所),

田口 隆久 (産業技術総合研究所関西センター), 寺川 進 (浜松医科大), 鳥羽 真理子 (ファイザー製薬・中央研究所・探索科学研究部), 中川 哲彦 (ファイザー製薬・中央研究所・探索科学研究部), 沼川 忠広 (大阪大・蛋白研), 林 光紀 (上智大・生命科学研究), 東田 陽博 (金沢大大院・医), 藤田 知宏 (東海大・開発工), 藤森 一浩 (産業技術総合研究所関西センター), 保坂 早苗 (上智大・生命科学研究), 松本 知也 (大阪大大院・理学研), 山岸 寛 (大阪大大院・理学研), 横幕 大作 (大阪大大院・理学研)

【概要】

近年の技術進歩と研究方法の多様化は, 脳の形成とその機能を飛躍的なスピードで明らかにしてきた。すなわち, 分子生物学・蛋白質化学的手法による分子レベルの解析から, 光学的測定・電気生理的手法を用いた細胞・組織レベルの解析, 動物固体そのものを用いた解析等, 様々なレベルでの新しいアプローチが開発されている。脳神経研究の更なる発展のためには, このような多様な

角度からのアプローチをとる研究者が会して情報交換と今後の発展を討議することが非常に重要である。本研究会では, 参加者がそれぞれの最新成果を発表し, これに対して異なった角度から研究を行っている研究者との意見交換を通じて一層の研究発展を図ることができた。

(1) ゲノムワイド RNAi による神経ネットワーク形成遺伝子の研究

東田陽博 (金沢大学・医学系研究科・脳細胞遺伝子)

我々は, 約 25 年前から, ニューロblastoma 及びそれらの細胞とグリオーマをかけあわせた, 当時としては最新の遺伝子改変技術を駆使した, ハイブリッド細胞を使って神経機能の研究を行ってきた。しかも, この神経機能をすでに有する細胞への遺伝子大量発現を行ってきたが, この研究は, その遺伝子の機能をほぼ推定出来るという限界点を持つこのに気づき, 遺伝子機能解析を動物個体レベルで行うことに変換することにした。

ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) の全遺伝子

塩基配列が 2000 年 3 月に解読され, 約 13600 個のゲノムから成ることがわかった。そのうち約半数についてはすでに同定されていたり, 他の動物種でわかっている遺伝子とのホモロジー等から, それらの機能が推測できた。しかし, 残りの数多くの遺伝子について, それらの機能は不明である。本研究は, ショウジョウバエの機能未知遺伝子の中で, 神経ネットワーク (シナプス回路) 形成に関与する新規遺伝子を RNAi 法により抽出し, それらの機能の同定を行うことを目的にしている。

(2) シナプス形成期の小脳顆粒細胞における電依存性 K⁺チャネル-Kv4.2 と NMDA レセプターの神経活動に依存した相補的局在化機構

柴崎貢志（岡崎国立共同研究機構・生理学研究所・神経情報部門，埼玉医科大学・生理学講座）

中平健祐，渡辺修一（埼玉医科大学・生理学講座）

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）

神経細胞には様々なイオンチャネル，レセプターが発現し，脳機能を司っている。そのため，チャネル分子の局在化のメカニズムを明らかにすることはシナプス可塑性を考えるうえで非常に重要であり，今日までに多くの研究がなされている。しかしながら，それらの多くはシナプスにおけるグルタミン酸受容体に関して調べたものである。グルタミン酸受容体はシナプス伝達を担い，神経細胞を興奮させるための主要な分子である。一方，シナプスには電位依存性 K⁺ (Kv) チャネルも局在し，この分子が神経細胞の興奮性を抑制していることが報告されている。それにも関わらず，この分子のシナプスへの局在化メカニズムはほとんど調べられていない。つまり，シナプスの興奮性獲得過程を知るうえで，Kv チャネルの局在化メカニズム（興奮性の抑制）が解明されていないままでは不十分である。そこで我々は Kv チャネル-Kv4.2 の局在化メカニズムを研究してきた。本研究に先立ち，我々は Kv4.2 が小脳顆粒細胞の発達過程における活動電位の発生を制御する主要な分子であることを見いだした（Shibata ら, J.Neurosci. 2000）。Kv4.2 の樹状突起，シナプスへの局在機構を解析するため，我々は小脳微少組織片培養（CMC）と，mossy fiber の origin である橋核の組織片との共培養系を新たに開発した。この培養系では，顆

粒細胞と mossy fiber の間にシナプスが形成される。一方，CMC の単独培養では顆粒細胞はシナプスを形成しない。この両培養系を用いた解析の結果，Kv4.2 はシナプス形成に伴い，樹状突起，シナプスに移行すること，mossy fiber から放出される glutamate が Kv4.2 のシナプスへの集積を引き起こす主要な分子であることを解明した。一方，NMDA レセプターもシナプス形成に依存して，樹状突起，シナプスへ移行することを見いだした。特に，神経活動が増加するとそれを抑制すべく，Kv4.2 のシナプスへの targeting が増加し，神経活動が低下するとそれを増加させるべく，NMDA レセプターの targeting が増加するという，全く，逆の targeting メカニズムを持つことを明らかとした。このことは，興奮性の因子である NMDA レセプターと抑制性の因子 Kv4.2 のシナプスへの targeting を利用して，シナプス形成期の興奮性の獲得，シナプスの取捨選択が行われている可能性を示唆している（Shibasaki ら，投稿中）。また，強制発現を用いた実験より，この Kv4.2 の targeting には glutamate の下流のシグナルとして Ca²⁺結合蛋白質の Kv4.2 への結合が関与している可能性が高いと考えられる。今後の更なる研究により，シナプス形成期の興奮性獲得メカニズムを明らかにしていきたい。

(3) 磁気ビーズを用いた AMPA 受容体含有小胞の単離と精製

板倉誠（三菱化学生命科学研究所）

AMPA 受容体は神経活動依存的にシナプス後膜に組み込まれ，その数を変化させることで神経可塑性に寄与していると考えられている。そこで AMPA 受容体のシナプス後膜への組み込み機構を明らかにすることを目的として AMPA 受容体含有小胞の単離を試みた。

ラット脳からマイクロゾーマル分画を調製し，Sucrose や Iodixanol による密度勾配 を用いて細胞内のさまざま

な小胞を分離した。結果，Sucrose による分離より Iodixanol による分離能のほうがすぐれていることがわかった。さらに，Iodixanol を用いることで GluR2 を含有する小胞は少なくとも 5 種類存在することがわかった。また，GluR2 の分離パターンとさまざまな蛋白質の分離パターンを比較検討したところ Endoplasmic Reticulum 蛋白質として知られている Calnexin が，GluR2 のパ

ター ンと非常によく似た分離パターンを示すことを見い出した。次に磁気ビーズを用いて ミクロゾーマル分画から特定の分子を含む小胞の免疫沈降を試みた。抗 GluR2, Calnexin 抗体で小胞を免疫沈降すると、お互いの分子が共沈されてくることから GluR2, Calnexin が同じ

小胞に乗っていることがわかった。さらに免疫沈降物のイム ノプロットをさまざまな開口放出関連蛋白質について行ったところ、免疫沈降に用い る分画ごとに結果が異なることから脳内における GluR2 含有小胞はいくつかの種類 が存在することが確認できた。

(4) アラキドン酸食餌によって改善される、老齢動物のシナプス可塑性

藤田知宏, 榊原学 (東海大学・開発工学部)

小谷進 (東海大学大学院医学研究科)

長期増強(LTP)はシナプス可塑性モデルの一種で、学習・記憶の *in vitro* モデルとされている。細胞膜を構成する不飽和脂肪酸の一つにアラキドン酸(AA)があり、逆行性伝達物質とも想定されている。加齢に伴う膜組織の AA 含有量が減少すること、LTP が減少することが明らかにされている。そこで、老齢動物においてもアラキドン酸食餌によりシナプス可塑性が眼寂せず維持できるかを、

AA 摂取老齢ラット(OA), 対照食老齢ラット(OC), 対照食若齢ラット(YC)の 3 群において、海馬での CA3-CA1 間の LTP を比較し、検討した。

その結果、OA の LTP は OC に比べて有意に大きく($240.1 \pm 13.6\%$ vs $168.5 \pm 21.6\%$)、若齢ラットと同程度の値を示すこと($240.3 \pm 17.6\%$)を見出し、AA 食餌は加齢によるシナプス可塑性の低下を防ぐことが示唆された。

(5) BDNF による神経可塑性と神経伝達物質放出制御

沼川忠広 (大阪大学蛋白質研究所, 日本学術振興会特別研究員)

畠中寛 (大阪大学蛋白質研究所)

ニューロトロフィン(NTF)は脳神経系においてニューロンの分化、生存を制御する一群の蛋白質として知られる神経栄養因子である。最近ではニューロトロフィンがシナプスの可塑性においても重要な分子で、特に BDNF (脳由来神経栄養因子) のニューロンの情報伝達機能に対する作用が盛んに解析されている。我々はこれまでに BDNF がラット海馬、大脳皮質、小脳などの培養ニューロンより急速に興奮性神経伝達物質グルタミン酸を放出させることを見出した。この放出メカニズムは通常のエキソサイトシスと異なり、グルタミン酸トランスポーターの逆転輸送の可能性はある。培養大脳皮質ニューロンでは、

そのネットワークの成熟に伴い、自発的で同期的なカルシウムオシレーションが観察される。これはグルタミン酸作動性ニューロンで構築されるネットワークにおいて自発的な神経伝達が行われていることを示しており、BDNF はこのオシレーションを増強することがわかった。この BDNF によるオシレーションの増強作用にもグルタミン酸トランスポーターの逆転輸送が関与している。

中枢ニューロンから神経伝達物質放出を引き起こす栄養因子はニューロトロフィン以外にも存在しており、特に FGF の作用を BDNF の場合と比較して紹介したい。

(6) エストロゲンは活動依存的な神経伝達に影響を与える

横幕大作（大阪大学蛋白質研究所）

シナプス効率の変化は記憶・学習において重要な因子である。近年、エストロゲンがシナプス伝達を強化するという報告がされはじめているが、その詳細なメカニズムはわかっていない。

そこで我々は、生後 2 日齢より分散培養したニューロンを用いて、エストロゲンがプレシナプスの機能を強化する可能性を検討した。その結果、エストラジオールがグルタミン酸の合成酵素であるグルタミンナーゼの発現を上昇させることがわかった。一方で GAD の発現や、

総ニューロン数には変化がない。また、エストラジオールは脱分極刺激に伴うグルタミン酸放出を増強した。エストロゲン受容体のアンタゴニストによってこの効果は阻害されることから、エストロゲン受容体を介した作用である。このような増強効果は大脳皮質、小脳ニューロンにおいても観察された。

以上のことから、エストロゲンは中枢神経系においてグルタミン酸の合成能を上昇させ、活動依存的なグルタミン酸放出を増強する可能性が示唆された。

(7) 逆行性標識及び in situ hybridization 二重標識法

藤森一浩，田口隆久（産業技術総合研究所関西センター人間系特別研究体ニューロニクス研究グループ）

神経回路の形成とそれを支える分子機序の解明には、いままさに神経軸索が伸長し、回路を形成しつつある時期に、特定の神経細胞がどんな分子を発現しているか？ということを知ることが重要である。しかし、高等脊椎動物の脳は多種多様なそして多数の神経細胞から構成さ

れており、従来の神経解剖学的方法ではこれを明らかにするのは困難であった。そこで、我々は in situ hybridization と蛍光色素を用いた逆行性標識の二重染色法を開発した。本法をラット皮質脊髄路錐体交叉形成時の軸索接着因子の発現に応用した例を紹介したいと思う。

(8) アストロサイト由来 ATP による海馬のシナプス伝達抑制作用

小泉 修一，井上 和秀（国立医薬品食品衛生研究所・薬理）

グリア細胞は glutamate など液性因子放出により“シナプス伝達”を制御すると考えられるようになってきた (J. Neurosci., 18, 6822-, 1998)。アストロサイトを機械刺激すると Ca^{2+} wave 伝播が観察されるが、これは apyrase で消失することから、主にアストロサイトからの ATP 放出・拡散に起因していると考えられる。ルシフェラーゼ反応と VIM カメラによるフォトンカウンティング撮像によ

り、この ATP 放出は可視化できた。海馬の初代培養神経細胞に ATP 刺激を加えると、興奮性神経伝達が抑制される (Br.J.Pharmacol., 122, 51-, 1997)。この ATP によるシナプス伝達抑制作用は、アストロサイトの機械刺激によっても再現出来た。以上 ATP を介したアストロサイトの積極的なシナプス伝達制御機構の存在が明らかとなった。

(9) ウミウシ単離脳条件付けにおける B 型視細胞特性変化へのリアノジン受容体の関与

川合 亮 (東海大大学院・理学研究科)

ウミウシを光と振動を組み合わせ条件付けすると B 型視細胞の膜抵抗が増大する。これは神経系と感覚器からなる単離脳標本においても再現される。形態学的には条件付け獲得による B 型視細胞末端部の矮小化が報告されているが、その機能的意義や発生機構については不明である。最近、条件付け獲得にリアノジン受容体を介した細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が関与することが示されたことから、単離脳条件付け標本で生理学的、形態学的関与を

検討した。条件付け後、B 型視細胞の入力抵抗は 80% 増大し視細胞軸索終末は長軸方向に 6% 収縮したが、リアノジン受容体の拮抗薬であるダントロレン (100 μM) 存在下では膜抵抗と形態は変化しなかった。また B 型視細胞—平衡胞有毛細胞間のシナプス結合にもダントロレンによる影響は確認されなかった。以上の実験事実はリアノジン受容体を介する細胞内 Ca^{2+} 上昇が条件付けに伴う生理学的、形態学的変化に必須であることを示唆する。

(10) 微小炭素線維電極を用いたアンペロメトリー法による開口分泌の解析

笹川展幸, 保坂早苗, 林 光紀, 熊倉鴻之助 (上智大学・生命科学研究所・神経化学部門)

牛副腎髄質クロマフィン細胞をカバーガラス上で培養した。カバーガラスを灌流 bath 内に置き、Locke's 溶液で 1 ml/min で灌流した。単一細胞からのカテコラミン分泌測定には、微小炭素線維電極 (直径 5 μm) を作用電極に用い、+650 mV の電圧を印加した。カテコラミンの電解電流は voltammetric-amperometric amplifier で検知し、2 kHz の low-pass-filter をかけ 4 kHz でサンプリングした。MacLa でデジタル化し Chart で解析した。この実験系では、1 つの顆粒の開口分泌が 1 つのスパイクとして検知でき、得られたスパイクの出現頻度と波形、またスパイ

クの kinetics パラメーターから、開口分泌の動態を解析できることが特徴である。高カリウムで 5 分間持続刺激すると連続的なスパイクが認められ、スパイクの出現頻度は時間に依存して減少するが、波形や kinetics パラメーターは変化しなかった。スパイクの出現頻度や各種パラメーターに特徴ある変化を示した、アクチノーミオシン相互作用に影響を及ぼす薬物である mycalolide B, wortmannin などの結果をもとに、この実験系を用いた研究例を紹介する。

(11) BDNF は、短時間で細胞内 Ca^{2+} ストア由来の Ca^{2+} 上昇に依存した細胞内シグナルにより開口放出機構を増強する

松本知也 (大阪大学蛋白質研究所)

我々は、神経伝達物質放出に対する BDNF の作用を解析するために、生後 2 日齢ラットより培養した大脳皮質ニューロンを用いて、脱分極刺激に伴って放出されるグルタミン酸の量を HPLC で測定した。BDNF を 10 分間処理することによってグルタミン酸放出が顕著に増強された。様々な薬理学的実験からこの BDNF による増強は、細胞外 Ca^{2+} に依存した開口放出機構への作用と思われた。そこで細胞内 Ca^{2+} の動態を観察したところ、BDNF によって脱分極刺激に伴う細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が顕著に

増大した。この Ca^{2+} の増大には、細胞内 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 放出が寄与していた。さらにグルタミン酸放出の増強には TrkB-PLC- γ -IP3 レセプターを介したシグナルが重要であることを見出した。以上の結果から、BDNF は、細胞内 Ca^{2+} ストア由来の Ca^{2+} を介したシグナルを活性化させることによって、神経活動依存的なシナプス伝達を短時間で増強する可能性が示唆される。(J.Neurochem., 2001. in press)

(12) マウス大脳オリゴデンドロサイトの発生の起源 —in utero エレクトロポレーション法を応用した新しい細胞移動標識法の確立—

中平英子, 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)

Martyn M. Goulding (The Salk Institute for Biological Studies, CA, USA)

大脳皮質オリゴデンドロサイトは、腹側の予定大脳基底核付近の限局した上皮細胞から発生し、移動によって前脳全体に広がるといわれている。しかし分裂するオリゴデンドロサイト前駆細胞を恒久的に標識する方法がなかったために in vivo で実際に移動しているのか、次々と隣接する領域の細胞が分化する「分化の波」による変化であるかは区別ができなかった。そこで、我々はオリゴデンドロサイト前駆細胞が最初に現れる大脳基底核の神経上皮由来細胞だけを標識するために子宮内マウス胎仔にプラスミド DNA を導入する in utero エレクトロポレーション法を独自に確立した。また我々はすべての体細胞

に普遍的に発現している ROSA26 遺伝子座に[loxP-転写終結シグナル-loxP-GAP43-EGFP]を挿入した reporter マウス (ROSA マウス) を作製した。このマウスに cre 遺伝子を含むプラスミドを in utero エレクトロポレーション法で導入し Cre 蛋白質を発現させることで DNA 組み換えを起こした細胞を恒久的に GFP でマーキングする事に成功し、マウス胎仔期に大脳基底核でマーキングされた細胞が、生後大脳皮質でミエリンをまくオリゴデンドロサイトに分化する事を観察した。このことより、大脳皮質内オリゴデンドロサイトには腹側に起源を持つものが含まれることが in vivo で証明された。

(13) ユビキチン-プロテアソーム系による Vesl-1S/Homer-1a のタンパク量と分布の制御

上田洋司 (九州大学大学院・医学部・分子生命科学, 三菱化学生命科学研究所)

加藤明彦, 杉山博之 (九州大学大学院・医学部・分子生命科学)

畠山鎮次, 中山敬一 (九州大学・生体防御医学研)

磯島康史 (大阪大学・蛋白質研究所)

深澤有吾, 井ノ口馨 (三菱化学生命科学研究所)

L-LTP に伴い誘導される遺伝子として, vesl-1S/homer-1a 遺伝子が単離された。Vesl-1S/Homer-1a には、スプライスヴァリエントして構成的に発現する Vesl-1L が存在する。類縁遺伝子として, vesl-2, 3 遺伝子の存在も明らかとなっている。我々は Vesl-1S, 1L, 2, 3 のタンパク分解制御機構を調べるために、株化細胞にそれぞれの遺伝子導入を行った。Vesl-1S のタンパク量は、プロテアソーム阻害剤の投与で顕著に増大し、そのユビキチン化産物も増大した。そして、Vesl-1L, 2, 3 のタンパク量はいずれも、薬剤の影響はなかった。次に我々は、proteasome 阻害剤

による内在性 Vesl-1S の影響を、海馬培養細胞を用いて検討した。proteasome 阻害剤投与によって、内在性の Vesl-1S のタンパク量も増大し、ニューロン周縁部に点在する Vesl-1S のドット状構造の数も増大した。この構造は synaptophysin のドット状構造と colocalize していた。これらの結果は、Vesl family のうち、LTP で誘導される Vesl-1S だけが ubiquitin-proteasome 系によって、そのタンパク量と postsynaptic 領域への輸送が制御されている事を示している。

(14) LTP におけるアクチン細胞骨格系の動態と役割

斎藤喜人, 小澤史子, 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, 生理学研究所)

太田康彦 (鳥取大学・農学部)

シナプスの可塑的変化の長期的維持機構におけるアクチン細胞骨格系の役割を, 無麻酔非拘束下の歯状回 LTP 実験系で検討した。テタヌス刺激後, 入力特異的に歯状回 中間分子層, 又は外側分子層に F アクチンが集積した。更に LTP が 3 週持続していた例で, F アクチンの集積も持続していた。又, この集積はシナプス後部で生じていることが免疫電顕法で確認された。神経薬理学的検討のために, 麻酔下 LTP 実験系でパイプ電極での EPSP

記録・薬物拡散適用を試みた。生理食塩水条件では, テタヌス後約 20 時間持続する LTP が生じたが, アクチン重合阻害剤のラトランキュリン A 注入群ではテタヌス後約 8 時間でベースライン迄減衰した。この減衰パターンは蛋白合成阻害剤のシクロヘキシミド投与群とほぼ同様であった。アクチン細胞骨格系が可塑的変化の長期的維持において重要な役割を果たしていることが示唆された。

(15) DNA ダメージと神経障害

榎戸 靖 (大阪大学蛋白質研究所)

ゲノム情報の維持にとって不可欠な DNA 修復機構の破綻は, 脳・神経系に深刻な機能障害や神経疾患の原因を引き起こすと考えられる。しかしながら, 具体的な神経症状の発症メカニズムとの関連については未だ明らかでない。これまで我々は癌抑制遺伝子 p53 およびヌクレオチド除去修復異常によって生じる A 群色素性乾皮症 (XP-A) および B 群コケイン症候群 (CS-B) に注目し, これらの原因遺伝子が脳神経系においてどのような役割を

演じているか解析を行ってきた。その結果, これらがニューロンの生存維持に重要な役割を演じていることを示すと同時に, XP や CS の患者で見られる神経症状が従来考えられてきた「経時的な DNA 傷害の蓄積による早期老化の促進によるものである」とする仮説とは異なり, 発達過程における神経前駆体細胞の細胞死や細胞増殖異常による脳形成不全と深く関わることを明らかとした。

(16) 対物レンズ照射式エバネッセンス顕微鏡法の応用

寺川 進 (浜松医科大学・光量子医学研究センター)

Andreas Jeromin (Mount Sinai Hospital, University of Toronto)

超高開口数 (NA=1.65) を持つ対物レンズ (オリンパス HR, アポ, 100X; 寺川と阿部による開発) の後方からレーザー光を入射し, 全反射角でカバーガラスと水の界面を照射する方式でエバネッセント場を形成した。この方式で蛍光を励起し, それを同じレンズを通して集光して観察すると, 大変明るい蛍光像が観察できた。このエバネッセンス顕微鏡により, 種々の蛍光像を観察した。テトラメチルロダミンの一分子蛍光像が極めて容易

に観察できた。 λ フェージの DNA を YOYO-1 で染色して水中で観察すると, 一分子蛍光像が認められ, 糸まり状に縮んで点状になったり伸びてひも状に広がったりするのがわかった。片方がガラスに付着した DNA に電場を掛けると直線状に伸びた像が観察されたが, ブラウン運動によるはためきが著しかった。制限酵素を投与すると, 期待される位置において DNA が切断されるのが見えた。このようなエバネッセンス顕微鏡の力を神経

細胞死の解析に用いた。ラット海馬神経細胞における、グルタミン酸誘起性核内構造変化の実態を解明するために、ビデオ強化型微分干渉顕微鏡下にグルタミン酸反応性を示した3個の培養神経細胞からDNAを取り出し、YOYO-1で染色後、エバネッセンス顕微鏡下に移してDNAの分子状態を観察した。グルタミン酸を投与しなかった対照細胞では、直線状のDNA分子のみが見られた。一方、グルタミン酸の20分間投与によって核内構造変化が観察された細胞のDNAは、点状の分子として観察され、高度に断片化していることが分かった。その他の応用として、PC-12細胞にVAMP-EGFPを発現させて観察すると、多数の顆粒状の構造に蛍光が認められ、それらの顆粒の運動性の評価ができた。しかし、連続的に長期の観察はできず、数分以内で顆粒運動は減少し、光毒性が影響することが分かった。同細胞に、プロテインキナーゼC-GFPを発現させると、フォルボールエ

ステルによる刺激後に、細胞膜の蛍光強度の著しい上昇が観察され、同酵素の活性化に伴う細胞膜へのトランスロケーションを高感度に測定することができた。クロマフィン細胞内にケージドCaを負荷し、これをプリズム入射式の紫外線パルス・エバネッセント光によって解除し、生理的に引き起こされる細胞膜近傍のCa濃度上昇を模倣した。カテコールアミンの放出を細胞の底部と上部の2箇所カーボンファイバー電極をおいて検出すると、エバネッセント光が直接作用する細胞の低部からは多数のスパイク反応が得られ、光の当たらない上部ではスパイクを伴わないゆっくりした上昇反応のみが得られた。前者は開口放出反応であり、後者は開口が起こった底部からの拡散による反応である。細胞膜近傍の指数関数的なCa濃度の上昇は、細胞部分領域の選択的活性化を可能にしていることが示された。

12. イオンチャネルの構造機能連関と制御機能に学ぶ心血管系疾患の病態生理学

2001年11月27日－11月28日

代表・世話人：小野 克重（大分医大・生理第二）

所内対応者：岡田 泰伸（生理研・機能協関部門）

- (1) RGS 蛋白によるムスカリン性カリウムチャネルのゲーティング機構
石井 優, 稲野辺 厚, 倉智 嘉久（大阪大院・医学系研究科・情報薬理）
- (2) 人培養血管内皮細胞の *sulfonylurea receptor* の同定と機能
丸林 あずさ², 高橋 章¹, 中尾 成恵², 前田 恭子¹, 福井 清², 中屋 豊¹
（¹徳島大・医・特殊栄養学科, ²分子酸素学研究センター）
- (3) 心筋における K_{ATP} チャネルサブユニットの存在様式
國安 明彦, 金子和義, 中山 仁（熊本大・薬・生体機能化学）
- (4) パッチ膜における心筋緩徐活性化型遅延整流性 K^+ チャネル(I_{Kr})の制御機構
豊田 太¹, 丁 維光¹, 尾松 万里子¹, 鷹野 誠², 堀江 稔³, 松浦 博¹
（¹滋賀医大・生理第二, ²京都大院・医学研究科・細胞機能制御, ³京都大院・医学研究科・循環病態）
- (5) G 蛋白活性型 K チャネルの Protein kinase C による調節
張 麗艷¹, 李 鍾国¹, 安井 健二¹, 本莊 晴朗², 神谷 香一郎², 児玉 逸雄¹
（名古屋大・環境医学研究所・¹循環器分野, ²液性調節分野）
- (6) 移植心におけるイオンチャネル機能の変調と拒絶によるリモデリング
賀来 俊彦¹, 小野 克重¹, 和田 朋之², 有田 眞³
（¹大分医大・生理第二, ²Univ of Wisconsin, ³湯布院厚生年金病院）
- (7) 心筋 CFTR チャネルの Mg 依存性フォスファターゼによる制御
岡田 泰伸¹, 周 士勝¹, 高井 章²
（¹生理研・機能協関部門, ²名古屋大・医・生理）
- (8) 心筋 L 型 Ca チャネルの細胞内 Mg^{2+} による温度依存性制御機構
山岡 薫, 瀬山一正（広島大・医・生理第一）
- (9) 甲状腺ホルモンによる心筋イオン電流と遺伝子発現の修飾： $I_{Ca,L}$ を中心に
渡部 裕, 馬 梅蕾, 鷲塚 隆, 相澤 義房（新潟大院・循環器分野）
- (10) 培養ヒト大動脈内皮細胞からの OTRPC4 の単離と機能解析
徐 峰, 佐藤 栄作, 飯島 俊彦（秋田大・医・薬理）
- (11) HCN4 チャネル電流に対する各種抗不整脈薬の作用
中谷晴昭¹, 霊園良恵¹, 小倉武彦¹, 植村展子¹, 岸本充², 石倉浩²
（¹千葉大院・医学研究院・薬理, ²病態病理）
- (12) マウススペースメーカー細胞の Ca 電流と, マウス洞房結節からクローニングした D 型 Ca チャネルの機能解析
鷹野 誠¹, 趙 顕星², 辻 啓子³, 石井 孝宏⁴, 堀江 稔³, 野間 昭典¹
（京都大院・医学研究科・¹細胞機能制御, ³循環病態, ⁴神経生物, ²成均館大・医・麻酔科）

- (13) 筋小胞体機能阻害により顕在化する肺静脈起始部心房筋の自動能
本荘 晴朗, 丹羽 良子, 山本 充, 神谷 香一郎, 小玉 逸雄 (名古屋大・環境医学研)
稲田 慎, 三井 和幸 (東京電気大・工)
- (14) ウサギ心室筋細胞におけるエチジウムイオンの電位依存性取り込み
大地 陸男, 宋 玉梅 (順天堂大・医・生理第二)
- (15) 二次性 QT 延長症候群の病態発生メカニズムにおける遺伝的背景について
久保田 友之, 竹中 琴重, 小堀 敦志, 二宮 智紀, 湯本 佳宏, 藍 智彦,
大谷 秀夫, 堀江 稔 (京都大院・医学研究科・循環器病態)
- (16) ラット心筋における KvLQT1 の splice variant に対する検出
山田 陽一¹, 陳 向東², 長島 雅人¹, 関 純彦¹, 山陰 道明²,
當瀬 規嗣¹, 並木 昭義² (札幌医大・¹生理第一, ²麻酔科)
- (17) MinK の心筋内・細胞内局在における蛋白相互作用の役割
古川 哲史¹, 小野 靖子², 土屋 博之³, 片山 芳文³, Maier-Louise Bang⁴,
Dietmar Labeit⁵, Siegfried Labeit⁵, 稲垣暢也^{1,6}, Carol C. Gregorio²
(¹秋田大・医・生理第一, ²Dept of Cell Biol & Anatomy, Univ of Arizona,
³東京医科歯科大・難治疾患研・自律生理, ⁴Eur Mol Biol Lab,
⁵Institut for Anesthesiologie und Operative Intensivmedizin, Universitätsklinikum Mannheim,
⁶CREST, Jpn science and Technology Corp)
- (18) LQT2 で認める HERG S818L 変異はユビキチン-プロテアソーム経路での蛋白分解が促進している
中島 忠, 金古 義明, 大山良雄, 倉林 正彦 (群馬大・医・第二内科)
古川 哲史 (秋田大・医・第一生理)
平岡 昌和 (東京医科歯科大・難治疾患研・循環器病)
永井 良三 (東京大院・医学系研究科・内科学専攻循環器内科)
- (19) 心臓の発生機序と再生治療
小室 一成 (千葉大院・医学研究院・循環病態医科学)

【参加者名】

山田 陽一 (札幌医大), 古川 哲史 (秋田大・医), 尾野 恭一 (秋田大・医), 佐藤 栄作 (秋田大・医), 相澤 義房 (新潟大院), 渡辺 裕 (新潟大院), 鷲塚 隆 (新潟大院), 中島 忠 (群馬大・医), 小室 一成 (千葉大院), 大地 陸男 (順天堂大・医), 平岡 昌和 (東京医歯大・難研), 萩原 誠久 (東京女子医大), 児玉 逸雄 (名古屋大・環研), 李 鍾国 (名古屋大・環研), 張麗艷 (名古屋大・環研), 安井 健二 (名古屋大・環研), 神谷 香一郎 (名古屋大・環研), 本荘 晴朗 (名古屋大・環研), 松浦 博 (滋賀医大), 丁 維光 (滋賀医大), 豊

田 太 (滋賀医大), 鷹野 誠 (京都大院), 堀江 稔 (京都大院), 久保田 友之 (京都大院), 倉智 嘉久 (大阪大院), 石井 優 (大阪大院), 山岡 薫 (広島大・医), 中屋 豊 (徳島大・医), 福井 清 (徳島大・医), 丸林 あずさ (徳島大学・医), 高橋 章 (徳島大・医), 小野 克重 (大分医大), 賀来 俊彦 (大分医大), 國安 明彦 (熊本大・薬), 岡田 泰伸 (生理研), ラブジャン・サビ (生理研), 森島 繁 (生理研), 浦本 裕美 (生理研), 長崎 陽子 (生理研), 田辺 秀 (中外製薬)

【概要】

イオンチャネルは心臓や血管, 骨格筋, 神経等の機能を全うするのに不可欠な活動電位の発生を担っている。筋細胞における活動電位の発生は筋収縮という力学的変

化に変換されるべきものであり, その変調は心筋, 骨格筋, 平滑筋の収縮性の破綻を招くため, 特に循環生理学ではイオンチャネル研究の歴史は古く, 最も重要なテー

マの1つである。しかし、疾患を引き起こす直接原因としてイオンチャネルの構造異常に基づく機能異常が明らかになったのは、僅か10年程前に過ぎない。イオンチャネルの先天性構造欠陥に起因する機能異常は“イオンチャネル病”という概念で認識されるようになり、心血管系領域では「QT延長症候群」「Brugada症候群」「Bartter症候群」等の病因として知られている。一方、心筋肥大、心不全、心筋梗塞等の疾患に伴ってイオンチャネルの発現と機能が調節を受け、リモデリングされて病態を複雑に修飾していることも明らかになってきた。以

上のように多くの心血管系疾患の病因にイオンチャネルそのものが直接関与しており、イオンチャネルの分子機能と調節機構の理解なしではその病態自体を理解することが不可能となっている。本研究会では分子生物学、細胞工学、遺伝子工学、電気生理学等の様々な分野の技術を駆使して、心臓血管系のイオンチャネルの分子構造と生理機能に関する最新の研究成果の発表と情報交換を行い、イオンチャネルの構造異常と制御機構の破綻に起因する循環器疾患をより深く理解することを目的とする。

(1) RGS 蛋白によるムスカリン性カリウムチャネルのゲーティング機構

石井 優, 稲野辺厚, 倉智嘉久 (大阪大院・医学系研究科・情報薬理)

G 蛋白質制御 K^+ チャネル (以下 K_G) は、過分極パルス中に緩徐な時間経過で活性化する relaxation とよばれる特徴的なゲーティングを示す。我々は既に RGS (Regulators of G protein signalling; GTPase 活性を促進しシグナルを負に調節) が K_G の relaxation への関与について報告しているが、その分子機構は不明であった。我々は心房筋細胞を用いて、(1)細胞外 Ca^{2+} 除去及び細胞内 BAPTA 投与で K_G の relaxation が消失する、(2)カルモデュリン (CaM) の阻害剤及び CaM と結合するが GTPase 活

性を促進しない変異 RGS も relaxation を抑制することを明らかにした。これより脱分極により上昇した Ca^{2+} が CaM と協同して RGS の機能を促進し、活性型 G 蛋白を減少させ K_G の活性は抑制されるが、過分極にて Ca^{2+} 濃度が低下するとこの逆が起こり K_G が徐々に活性化されるという動的な G 蛋白サイクル制御過程を K_G の relaxation として捉えていたと考えられた。これにより膜興奮が細胞内シグナル伝達を制御する全く新しい経路の存在が明らかになった。

(2) 人培養血管内皮細胞の sulfonylurea receptor の同定と機能

丸林あずさ², 高橋 章¹, 中尾成恵², 前田恭子¹, 福井 清², 中屋 豊¹
(¹徳島大・医・特殊栄養学科, ²分子酸素学研究センター)

K_{ATP} チャネルは、膵β細胞など生体内に広く存在しているが、ヒト血管内皮細胞における存在はいまだ確認されていない。そこで、ヒト微小血管内皮細胞を対象として、 K_{ATP} チャネルの SUR の同定とその機能について検討した。SUR の subtype に特異的な primer を用い、RT-PCR を行ったところ、SUR1 mRNA 由来と予想される二種類の PCR のバンドを検出した。その塩基配列を決定したところ、膵β細胞型の SUR1 をコードする mRNA と、exon36

が欠失した deletion mutant をコードする mRNA が発現していることが判明した。この mutant がコードする K_{ATP} チャネルとしての特性を電気生理学的に解析した結果、mutant で構成される K_{ATP} チャネルは、 K_{ATP} channel 開口薬である 100 μ M diazoxide を添加した状態においてのみ、チャネルの活性が認められたが、ATP・ADP 感受性は認められなかった。また、wild-type のチャネルより強い内向き整流性を示した。

(3) 心筋における K_{ATP} チャネルサブユニットの存在様式

國安 明彦, 金子 和義, 中山 仁 (熊本大・薬・生体機能化学)

心筋の ATP 感受性 K チャネル (K_{ATP}) は, 虚血再灌流時の心筋保護やプレコンディショニング現象において重要な役割を担っていることが示唆されている。 K_{ATP} は, スルホニルウレア受容体 (SUR) と内向き整流性 K チャネル (Kir) の組合せによって構成されているが, 心筋組織での分子性状については不明な点も多い。

我々は, SUR2A/B および Kir6.1/2 の四つの分子に対して, それぞれを特異的に認識するペプチド抗体を作製し, これを用いてラット心筋組織における K_{ATP} の存在様

式を免疫学的手法によって調べた。その結果, 形質膜を含むミクロソーム画分に SUR2A, Kir6.2, 6.1 の各分子が局在していることがわかった。一方, ミトコンドリア画分では検出されなかった。さらに, 免疫沈降法によってサブユニットの組合せを調べたところ, SUR2A は Kir6.2 のみと複合体を形成することがわかった。また, Kir6.1 は未知の SUR 分子と相互作用している可能性が示された。

(4) パッチ膜における心筋緩徐活性化型遅延整流性 K^+ チャネル (I_{Ks}) の制御機構

豊田 太¹, 丁 維光¹, 尾松 万里子¹, 鷹野 誠², 堀江 稔³, 松浦 博¹

(¹滋賀医大・生理第二, ²京都大院・医学研究科・細胞機能制御,

³京都大院・医学研究科・循環病態)

I_{Ks} は細胞膨張に伴う膜伸展により増大することが知られている。我々は, モルモット心房筋ならびに KCNQ1/KCNE1 を導入した COS7 にインサイドアウトパッチクランプ法を適用して, 剥離したパッチ膜から電流記録を行った。いずれの細胞においても, 剥離パッチ膜に脱分極パルスを与えると時間依存性に活性化される外向き K^+ 電流 (20-80 pA) が誘発され, 保持電位(-30 mV)に戻ると徐々に減衰する tail current (5-20 pA)が観察され

た。Tail current の膜電位依存性 ($K_{1/2} = +19$ mV) ならびに逆転電位 (-75 mV) から脱分極により活性化される電流は I_{Ks} もしくは KCNQ1/KCNE1 チャネルによるものと考えられた。パッチ膜を 140 mM の K-aspartate ($[Ca]_i < 10^{-10}$ M)で灌流しながら電極内に陰圧を加えると I_{Ks} ならびに KCNQ1/KCNE1 チャネル電流の増大がみられた。よって, 増大反応に関与する機構は細胞膜に局限したもので膜の機械的伸展に関わっている可能性が示唆された。

(5) G 蛋白活性型 K チャネルの Protein kinase C による調節

張 麗艷¹, 李 鍾国¹, 安井 健二¹, 本庄 晴朗², 神谷 香一郎², 児玉 逸雄¹

(名古屋大・環境医学研究所・¹循環器分野, ²液性調節分野)

目的: 心臓アセチルコリン感受性 K チャネル ($I_{K_{ACh}}$) は, 機械伸展刺激により電流が減弱することが知られている (Ji *et al.* J Biol Chem, 1997)。一方, 心臓 $I_{K_{ACh}}$ チャネルは GIRK1 および GIRK4 サブユニットのヘテロテトラマーからなることが知られている。本研究の目的は, 心臓 $I_{K_{ACh}}$ チャネルの機械伸展刺激感受性のメカニズム

について調べることである。方法: GIRK1/GIRK4 ヘテロチャネル, GIRK1 または GIRK4 ホモチャネルを, アフリカツメガエル卵母細胞に G_{β}/G_{γ} サブユニットとともに共発現させ, 2 電極電位固定法により whole cell current を記録した。GIRK1 ホモチャネルには, 機能的ホモチャネル (GIRK1 F137S) を用いた。伸展刺激は浸透圧を 50%

減少させた低浸透圧液を灌流させることにより加えた。結果：低浸透圧液を灌流させると GIRK1/GIRK4 ヘテロチャネル電流は 23% ($n=6$, $p<0.05$), GIRK4 ホモチャネル電流は 43%減弱した ($n=8$, $p<0.01$)。一方, GIRK1 ホモチャネルは, 低浸透圧液灌流の cell swelling の影響を受けなかった ($n=7$)。PKC 活性薬の phorbol 12-myristate 14-acetate (PMA 1 μ M) を正常浸透圧灌流液に添加すると, GIRK1/GIRK4 ヘテロおよび GIRK4 ホモチャネル電

流がそれぞれ 45%, 46%減弱した ($n=8$, $p<0.01$)。PKC 阻害薬の staurosporine (1 μ M, $n=8$) および calphostin C (2 μ M, $n=5$) 存在下では, 低浸透圧液灌流による伸展刺激に対する反応性は見られなかった。結論: PKC 依存性の GIRK4 サブユニットの修飾が K_{ACh} チャネルの機械伸展刺激感受性に重要な役割を果たしていることが示された。

(6) 移植心におけるイオンチャネル機能の変調と拒絶によるリモデリング

賀来 俊彦¹, 小野 克重¹, 和田 朋之², 有田 眞³

(¹大分医大・生理第二, ²Univ of Wisconsin, ³湯布院厚生年金病院)

心移植を受けた患者の急性拒絶期の心電図では, QT 時間の延長が認められている。本研究ではラット心移植モデルを用い, 移植後 1 日目より順次移植心を摘出して拒絶の程度を病理組織学的に判定した後, 右室乳頭筋から微小電極法により細胞内活動電位を記録した。その結果, 拒絶心の活動電位持続時間(APD)は非拒絶心のそれより有意な延長を示し, その延長は, 拒絶によって生じる心拍数の減少よりも早期に出現した。また一過性外向き電流(I_{to})の阻害剤(4-AP)の作用による APD の延長は, 非拒絶心に比べ, 拒絶心で有意に僅少であった。細胞全

膜電流記録法によると, 拒絶心室筋細胞における I_{to} は非拒絶心のそれより有意に小さいが, 単一チャネルキネティクスの比較によると拒絶心と非拒絶心における 3 種の I_{to} チャネルの単一チャネルコンダクタンスや平均開時間に差は見られなかった。一方, 拒絶心筋に発現する I_{to} チャネルの mRNA は非拒絶心に比べ $Kv4.2$ が減少し, $Kv1.4$ が有意な増加を示した。移植心の急性拒絶期に見られる心電図 QT 時間や活動電位持続時間の延長は, 拒絶心筋細胞の一過性外向き電流(I_{to})の発現変化によって生じることが示唆された。

(7) 心筋 CFTR チャネルの Mg 依存性フォスファターゼによる制御

岡田 泰伸¹, 周 士勝¹, 高井 章²

(¹生理研・機能協関部門, ²名古屋大・医・生理)

心筋 CFTR Cl^- チャネル活性はオカダ酸感受性フォスファターゼ (PP) と 9-AC 感受性 PP の両者によって制御されている。前者は PP2A であることが判っているが, 後者の詳細は不明である。Mg²⁺感受性 PP の関与を調べる目的で, 細胞内 Mg-ATP をミリモル以上に維持した上で細胞内遊離 Mg²⁺濃度を変化させて, モルモット単離心室筋から全細胞電流記録を行った。その結果, cAMP で

活性化される CFTR 型 Cl^- 電流は遊離 Mg²⁺増によって濃度依存的・可逆的に抑制されること, そしてこの抑制は 9-AC によって阻止されることが判った。更には, 内在性 PP 活性の 9-AC 感受性成分は, ミリモルオーダーの遊離 Mg²⁺によって実際に活性化されることも明らかとなった。

(8) 心筋 L 型 Ca チャネルの細胞内 Mg^{2+} による温度依存性制御機構

山岡 薫, 瀬山一正 (広島大・医・生理第一)

細胞内 Mg^{2+} 濃度は L 型 Ca チャネルをブロックし、生理的 Mg^{2+} 濃度下ではチャネル活動は大部分抑制されており、リン酸化はその Mg^{2+} ブロックを解除することにより電流を増大する事をカエル心筋において我々は示した。ところが哺乳類の心筋ではそのような Mg^{2+} の効果は明らかではない。我々はモルモットの心筋についても低 Mg の効果を検討したところ、温度を $28^{\circ}C$ 以上にて $10\mu M$ 以下の低濃度で著しい Mg^{2+} 依存性の二相性の電流増大

がみられた(それぞれ run-up, late- I_{Ca})。Run-up は細胞内に GTP 投与してもその程度は変らなかったが、late- I_{Ca} は完全にその増大が抑えられた。また Mg^{2+} 依存性のブロックはリン酸化により阻害された。このように late- I_{Ca} はカエルで見られた L 型 Ca チャネルの性質と一致し、哺乳類心筋 L 型 Ca チャネルにもカエルと共通の Mg^{2+} 依存性制御が存在することが判った。

(9) 甲状腺ホルモンによる心筋イオン電流と遺伝子発現の修飾: $I_{Ca,L}$ を中心に

渡部 裕, 馬 梅薔, 鷺塚 隆, 相澤 義房 (新潟大院・循環器分野)

甲状腺ホルモンは心筋細胞の各種蛋白の発現やイオンチャネル活性を調節しており、我々はカリウムチャネルに対する作用について報告してきた。今回 L 型カルシウムチャネルに対する甲状腺ホルモンの作用をリボヌクレアーゼプロテクションアッセイ法と全細胞型パッチクランプ法を用いて検討した。

【方法】8 週齢レイスラットに甲状腺ホルモン(T_3 , $25\mu g/100g$)を 3 日間投与し、無投薬群と比較検討した。 T_3 投与により α_1 サブユニットの発現は対照群の 20%に減少した。L 型カルシウム電流 ($I_{Ca,L}$) は T_3 群で対照群

に比し有意に大きかったが (-18.5 ± 2.4 VS. -15.0 ± 1.6 pA/pF), イソプロテレノール $1\mu M$ 投与下では対照群が T_3 群より大きくなった (-25.4 ± 2.9 VS. -21.6 ± 1.6 pA/pF)。アセチルコリン $1\mu M$ 投与は対照群の $I_{Ca,L}$ を変化させなかったが、 T_3 群の $I_{Ca,L}$ を 19%減少させた。

【結語】短期間の T_3 投与は L 型カルシウムチャネルの発現を減少させる一方でカルシウム電流を増加させた。 T_3 がカルシウム電流を増加させた機序にはアデル酸シグナラーゼカスケードの関与が推察された。

(10) 培養ヒト大動脈内皮細胞からの OTRPC4 の単離と機能解析

徐 峰, 佐藤 栄作, 飯島 俊彦 (秋田大・医・薬理)

血管内皮細胞は、種々の機械刺激に応答し、細胞内 Ca^{2+} 濃度($[Ca^{2+}]_i$)を増加させ、生理機能を果たしているが、その Ca^{2+} 流入経路の分子本体や活性化機構についてはよくわかっていない。最近、低浸透圧刺激によって活性化される非選択的カチオンチャネル(OTRPC4)がクローニングされた。このチャネルがヒト大動脈内皮細胞に存在しているのか否かを RT-PCR 法によって検討し、OTRPC4 と N 末細胞内領域が部分的に欠損した OTRPC4 β を単離

した。これらを HEK-293 細胞に一過性に発現させ、Fura-2 によって $[Ca^{2+}]_i$ の変化を観察すると、OTRPC4 発現細胞では、低浸透圧刺激によって $[Ca^{2+}]_i$ の増加が引き起こされたが、OTRPC4 β では何の変化も示されなかった。OTRPC4 の N 末を除いた場合、同様に低浸透圧刺激に対する作用が認められなくなった。これらの結果より、欠損したアミノ酸領域が低浸透圧感受性に何らかの関与を示していることが示唆された。

(11) HCN4 チャネル電流に対する各種抗不整脈薬の作用

中谷 晴昭¹, 霊園 良恵¹, 小倉 武彦¹, 植村 展子¹, 岸本 充², 石倉 浩²
(¹千葉大院・医学研究院・薬理, ²病態病理)

最近, 発作性心房細動の発生要因として肺静脈入口部周辺からの異所性自動能が引き金となる事が指摘されている。そこでその自動能発生に過分極誘発内向き電流(I_h)が関与する可能性を考慮し, この電流を通過させる HCN4 チャネルに対する抗体で肺静脈左心房境界部の免疫組織染色を行うと共に, HCN4 チャネルを安定的に発現させた HEK293 細胞においてこの電流に対する各種抗不整脈薬の作用を検討した。肺静脈左心房境界部では左

心房筋側に HCN チャネル抗体に反応する細胞が多く認められた。HCN4 チャネル電流に対し多くの抗不整脈薬は程度の差はあるものの抑制作用を示したが, その作用の比較的強いものは zatebradine あるいは amiodarone, bepridil, lidocaine であった。Amiodarone の心房細動予防効果の一部には HCN4 チャネル抑制作用も関与する可能性がある。

(12) マウスペースメーカー細胞の Ca 電流と, マウス洞房結節からクローニングした D 型 Ca チャネルの機能解析

鷹野 誠¹, 趙 顕星², 辻 啓子³, 石井 孝宏⁴, 堀江 稔³, 野間 昭典¹
(京都大院・医学研究科・¹細胞機能制御, ³循環病態, ⁴神経生物,
²成均館大・医・麻酔科)

Ca チャネルを構成する分子のうち, α_{1D} サブユニットをノックアウトしたマウスは先天的な聾とともに心臓洞房結節の機能異常をきたす。この電気生理学的・分子生物学的背景を検討するため, マウス洞房結節からペースメーカー細胞を単離し, 保持電位 -80 mV から脱分極により活性化される内向き電流を記録した。その結果, Na 電流, T 型 Ca 電流, L 型 Ca 電流および持続性内向き電流(I_{ST})が存在することが明らかになった。マウス洞房結節から

RT-PCR 法により α_{1D} をクローニングしたところ, リピート 1・2 間のリンカーの配列が大きく異なる新たな splicing variant が発現していることが判明した。このマウス洞房結節 α_{1D} を β_2 および $\alpha_2\delta$ とともに HEK293 細胞に発現させたところ, これまでの報告とは異なり, -50 mV 付近から活性化され, しかも不活性化の速い Ca 電流を記録することができた。

(13) 筋小胞体機能阻害により顕在化する肺静脈起始部心房筋の自動能

本荘 晴朗, 丹羽 良子, 山本 充, 神谷 香一郎, 児玉 逸雄 (名古屋大・環境医学研)
稲田 慎, 三井 和幸 (東京電気大・工)

近年, 肺静脈起源の異所性刺激生成を機序とする心房細動の存在がカテーテルアブレーション治療の面から注目を集めているが, 肺静脈における刺激生成機構については不明である。本研究では家兎肺静脈起始部心筋から活動電位を記録し, その電気的特性を検討した。コントロールでは電気刺激(0.5-4.0Hz)に応じて典型的な心房筋

タイプの活動電位が生じた。Ryanodine (2 μ M)を添加して筋小胞体機能を阻害すると, 拡張期電位が浅くなりペースメーカー脱分極が生じた。刺激頻度を急に増加させるとこれらの電位変化は増強され, 高頻度トレース刺激(3.3Hz)後にはバースト状の自発活動電位が誘発された(平均持続時間 37.5 $\pm$ 4.5 秒)。この自発興奮は筋小胞体 Ca²⁺

枯渇により減弱し、 β 受容体刺激により増強された。以上より、肺静脈起始部心筋は潜在的な自動能を有し、筋

小胞体機能障害がこれを顕在化させることが示唆された。

(14) ウサギ心室筋細胞におけるエチジウムイオンの電位依存性取り込み

大地 陸男, 宋 玉梅 (順天堂大・医・生理第二)

細胞膜における leak 経路の発生と役割を、ウサギ心室筋にパッチクランプ法および ethidium (Et) カチオン (314Da) をマーカーとした蛍光測光を適用して検討した。Ethidium bromide (EtBr, 10 μ g/ml) を含む K^+ -free 溶液で灌流すると、約 -140mV の過分極が生じついで不規則な脱分極と持続の長い活動電位が発生した。Glibenclamide (5 μ M) は活動電位をさらに延長した。EtBr 存在下 10 分間

の平均膜電位は正常 Tyrode $>K^+$ -free $> +$ glibenclamide であり、10 分後の Et 蛍光は K^+ -free $> +$ glibenclamide $>$ 正常 Tyrode であった。 K^+ -free による Et 蛍光増大は脱分極中少なく再分極で著明であった。過分極によって小さな膜穿孔が生じ小カチオンが静止電位で駆動されて流入したと示唆された。

(15) 二次性 QT 延長症候群の病態発生メカニズムにおける遺伝的背景について

久保田 友之, 竹中 琴重, 小堀 敦志, 二宮 智紀, 湯本 佳宏, 藍 智彦, 大谷 秀夫, 堀江 稔 (京都大院・医学研究科・循環器病態)

我々は、QT 延長症候群患者において、既知の LQTS 関連遺伝子の変異の有無を PCR-SSCP 法を用いて検索し、6 例で KCNQ1 遺伝子の単塩基遺伝子多型を同定した。この 643 番目のアミノ酸をグリシンからセリンへ置換するミスセンス変異は、主に低カリウム血症や房室ブロックに伴う徐脈によって顕在化する症例と関連してい

た。この変異が及ぼす I_{Ks} チャネルへの機能的影響を in vitro で検討するため、COS7 細胞にチャネルを再構築し電気生理学的実験を行ったが、その機能的障害は軽度であった。従って、これらの症例は、 I_{Ks} チャネルの軽度の機能障害を遺伝的素因として持ち、適当な誘発因子を契機として発症したと考えられた。

(16) ラット心筋における KvLQT1 の splice variant に対する検討

山田 陽一¹, 陳 向東², 長島 雅人¹, 関 純彦¹, 山陰 道明², 當瀬 規嗣¹, 並木 昭義²
(札幌医大・¹生理第一, ²麻酔科)

KvLQT1 は心筋において緩徐活性化型遅延整流性 K 電流 (I_{Ks}) を構成する遺伝子であるが、ヒトでは truncated form のスプライスバリエントが生理的に存在しており、Dominant Negative に遺伝子の発現を調節していると報告されている。今回我々はラット心室筋からヒトの truncated isoform とは違うものの、部位としてはほぼ同様の truncated isoform をクローニングしたので報告する。このスプライスバリエントはラット結腸よりクローニン

グされた KvLQT1 と比較すると、予想されるアミノ酸配列では N 末の一部と膜貫通領域 S1 および S2 の一部を含む部位が欠損していた。RT-PCR 法により胎齢 12 日から出生後 10 日目の心筋において KvLQT1 のみならず、truncated KvLQT1 の発現を確認した。この truncated isoform を *Xenopus oocyte* に KvLQT1 と共発現させ K 電流を観察したところ、KvLQT1 のみを発現させた場合と比較し電流量は明らかに小さかった。また、この傾向は

regulatory subunitであるminKを共発現させても変わらなかった。KvLQT1のtruncated isoformはラット心においても胎生期から出生後10日目までは生理的に存在し、

Dominant Negativeに I_{Ks} を調節している可能性が示唆された。

(17) MinKの心筋内・細胞内局在における蛋白相互作用の役割

古川 哲史¹, 小野 靖子², 土屋 博之³, 片山 芳文³, Maier-Louise Bang⁴,
Dietmar Labeit⁵, Siegfried Labeit⁵, 稲垣 暢也^{1,6}, Carol C. Gregorio²

(¹秋田大・医・生理第一, ²Dept of Cell Biol & Anatomy, Univ of Arizona,

³東京医科歯科大・難治疾患研・自律生理, ⁴Eur Mol Biol Lab,

⁵Institut for Anesthesiologie und Operative Intensivmedizin, Universitätsklinikum Mannheim,

⁶CREST, Jpn science and Technology Corp)

MinKは心筋遅延整流性カリウムチャネルIKsチャネルのβサブユニットである。酵母2ハイブリッド法によりminKに結合する蛋白を検索した結果そのC端細胞内領域にsarcomere蛋白T-cap/telethoninが結合することが判明した。MinKはT-capのC端に結合し、同部位にはtitin kinase domainによりリン酸化される157Serが存在する。リン酸化を模倣したS157E・S157D変異ではminK

とT-capの結合は減弱し、脱リン酸化を模倣したS157A変異では両者の結合は増強した。心筋細胞ではminK・T-capはZ-lineに局在し、minKは細胞膜側(=T管)、T-capはsarcomere側に存在した。両者の結合がT管—sarcomereを架橋し、興奮—収縮連関のフィードバック機構として作用することが示唆される。

(18) LQT2で認めるHERG S818L変異はユビキチン—プロテアソーム経路での蛋白分解が促進している

中島 忠, 金古 義明, 大山 良雄, 倉林 正彦 (群馬大・医・第二内科)

古川 哲史 (秋田大・医・第一生理)

平岡 昌和 (東京医科歯科大・難治疾患研・循環器病)

永井 良三 (東京大院・医学系研究科・内科学専攻循環器内科)

目的; LQT2で認めるHERG S818L変異について、蛋白輸送や蛋白分解に異常があるかどうかを調べ、そのメカニズムを明らかにする。方法と結果; 野生型、変異HERG cDNAをHEK293細胞にトランスフェクションし、蛋白の発現をWestern blot法で調べた。野生型は、immature formとmature formの2本バンドがみられたが、変異ではmature formはみられず、変異は蛋白輸送が障害されていると考えられた。また、変異は野生型に比べ蛋白分解

速度が促進していた(野生型Th:13.2h, 変異Th:6.1h)。プロテアソーム阻害剤は変異の蛋白分解を著明に抑制した。変異はポリユビキチン化され、ユビキチンのドミナントネガティブ変異体(K48R)により蛋白分解は軽度抑制された。総括; 本変異の少なくとも一部はユビキチン—プロテアソーム経路での蛋白分解が促進していた。本変異の機能異常は、蛋白輸送の障害と蛋白分解の促進によりもたらされることが考えられた。

(19) 心臓の発生機序と再生治療

小室 一成（千葉大院・医学研究院・循環病態医科学）

心筋細胞は自律拍動といった心筋細胞に特徴的な高度な分化をとげながらも、胎生期は活発に分裂増殖します。しかし出生後はすみやかに分裂能を喪失し、以後二度と分裂能を獲得する事はないとされていました。ところが最近心筋梗塞をおこしたヒトの心臓において、分裂して

いる細胞が高率にあると報告されました。

一方胚性幹細胞（ES 細胞）と体性幹細胞という細胞は心筋細胞に分化することがわかってきました。将来の心臓の再生治療について展望します。

13. 第2回脳磁場ニューロイメージング

2001年11月28日－11月30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（岡崎国立共同研究機構生理学研究所）

（1）グラジオメータとマグネトメータで計測された脳磁界の信号源推定精度

竹内文也, Kimmo Uutela, Lauri Parkkonen, 栗城真也（北海道大学電子科学研究所）

（2）MEG raw data 時系列の遅延時間座標系での振る舞い

中岡高博, Md.M.Rahman Khan, 浅田 博, 谷塚 昇（大阪府立大学・総合科学部）

外池光雄（産技術総合研究所関西センター）

（3）MEGにおける測定変量間の開ループ伝達関数の同定

原崇, 岸田邦治（岐阜大学・工学部・応用情報科学）

篠崎和弘, 鶴飼聡（大阪大学・医学部・神経機能医学講座）

（4）LORETA 法による言語優位脳半球の推定

三島 喬, 竹内文也, 栗城真也（北海道大学電子科学研究所）

鎌田恭輔（北海道大学・医学部・脳神経外科）

（5）脳磁図・MRI 統合ソフトの開発

橋詰 顕, 栗栖 薫, 有田和徳, 飯田幸治, 花谷亮典（広島大学・医学部・脳神経外科）

籾 拓郎（日比野病院）

（6）指の一次体性感覚野の発達的变化に関する検討（第2報）

権藤健二郎, 飛松省三, 原 寿郎（九州大学・医学部附属病院・小児科）

（7）鍼灸のツボ打撃による脳の MEG 信号の検出

川端啓介（大阪府立大学）

内野勝郎（全国柔整師協会）

外池光雄（産技総研ライフエレクトロニクスセンター）

（8）口唇に局所失調症を患う器楽奏者の MEG 反応

平田恵啓（北海道大学電子科学研究所）

マティアス・シュルツ, クリスト・パンテフ

(Institute for Experimental Audiology, University of Muenster, Germany)

エックハート・アルテンミュラー

(Institute of Music Physiology and Performing Arts Medicine, Academy of Music and Drama, Germany)

（9）電気味覚に対する脳磁場計測

武原志帆, 森川聖美, 山本千珠子, 山本 隆（大阪大・人間科学・行動生理）

中川誠司, 山口雅彦, 岩木 直, 外池光雄（産業技術総合研究所）

（10）味覚誘発電位・磁場の同時計測

小早川 達, 溝口 千恵, 斉藤 幸子（産業技術総合研究所）

小川 尚（熊本大学・医学部）

（11）磁界計測を用いた脊髄機能マッピング

小森 博達, 川端 茂徳, 大久保 治修, 福岡 優子, 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）

- (12) 坐骨神経標本を用いた活動磁界測定
福岡 優子, 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・脊椎脊髄神経外科学)
- (13) 針電極を用いた表皮内電気刺激による誘発脳磁場
乾 幸二, Tran Diep Tuan, 秋 云海, 王 曉宏, 宝珠山 稔, 柿木 隆介
(岡崎国立共同研究機構・生理学研究所・統合生理研究施設)
- (14) Cerebral activation by the signals ascending through unmyelinated C-fibers in humans:
a magnetoencephalographic study Tuan Diep Tran, Koji Inui, Minoru Hoshiyama, Khanh Lam, Yunhai Qiu,
Ryusuke Kakigi
(岡崎国立共同研究機構・生理学研究所・統合生理研究施設)
- (15) 絶対音感保持者の脳磁場計測～中潜時以降のダイポール分布について
広瀬 宏之, 久保田 雅也, 木村 育美, 大澤 麻記, 榊原 洋一, 湯本 真人 (東京大学・小児科・検査部)
- (16) 楽譜を見て音を想起する時の脳磁場について
久保田 雅也, 木村 育美, 広瀬 宏之, 榊原 洋一 (東京大学・小児科)
- (17) 音楽性幻聴および幻視 (シャルル・ボネ症候群) の MEG の空間フィルター解析
山本 雅清, 篠崎 和弘, 鶴飼 聡, 川口 俊介, 石井 良平, 小川 朝生, 水野 (松本) 由子,
井上 隼, 武田 雅俊 (大阪大学大学院医学系研究科・精神医学教室)
吉峰 俊樹 (大阪大学大学院医学研究科・脳神経外科学教室)
平吹 度夫 (大阪大学大学院医学研究科・放射線医学教室)
田中 迪生 (田中診療所)
Stephen E. Robinson (CTF Systems Inc.)
- (18) 演算処理に関する脳磁界計測 一数の大小比較についてー
高栄 智, 樋脇 治 (広島市立大学・情報科学部)
橋詰 顕, 栗栖 薫 (広島大学・医学部・脳神経外科)
- (19) てんかんの dipole 推定における導体モデルの影響 ーファントムによる実験の総括ー
金子 裕^{1,2}, 湯本 真人³, 斎藤 治⁴, 大槻 泰介¹, 有馬 邦正²
(¹国立精神・神経センター武蔵病院脳神経外科, ²国立精神・神経センター武蔵病院臨床検査部,
³東京大学医学部附属病院・臨床検査部, ⁴国立精神・神経センター武蔵病院精神科)
- (20) 当院での脳磁図による部分てんかん焦点診断の現状
大石 誠, 亀山 茂樹, 師田 信人, 増田 浩 (国立療養所・西新潟中央病院)
- (21) MEG の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, 山田 淳二, 平野 俊一朗, 谷口 理章, 吉峰 俊樹
(大阪大学・脳神経外科)
今井 克美 (大阪大学・小児科)
- (22) 脳磁図におけるてんかん棘波の持続時間と dipole 集積との関係について
芳村 勝城, 渡辺 裕貴 (国立療養所・静岡神経医療センター)
- (23) 非磁性ゴーグル型光刺激装置を用いた光感受性てんかんの検査について
吉田 綾, 渡辺 裕貴, 芳村 勝城 (国立療養所・静岡神経医療センター)
- (24) 手・足・顎の self-paced 運動に伴う運動準備磁界の検討
遠藤 博史, 成田 紀之, 加藤 雄一郎, 武田 常広
(産業技術総合研究所・脳神経情報部門・感覚認知科学研究グループ)

(25) 随意性顎運動に関連する大脳皮質領域の脳磁場解析

澁川 義幸^{1,2}, 熊井 敏文^{1,2,3}, 新谷 益朗¹, 鈴木 隆^{1,2}, 中村 嘉男^{1,4}
(¹ 東京歯科大学・口腔科学研究センター, ² 東京歯科大学・生理学講座,
³ 松本歯科大学・口腔生理学講座, ⁴ 帝京平成大学・福祉情報学科)

(26) ボタン押し運動における運動強度の制御と運動関連脳磁場の検討

江坂 茂朗, 高木 孝志, 小谷 賢太郎, 堀井 健 (関西大学・工学部・管理工学科)
外池 光雄 (産業技術総合研究所関西センター)

(27) 大脳基底核に対する複雑手指運動の運動頻度の影響

岡山 晶, 谷脇 考恭, 後藤 純信, 飛松 省三 (九州大学大学院医学研究院・脳研臨床神経生理)
吉良 潤一 (九州大学大学院医学研究院・脳研神経内科)
吉浦 敬 (九州大学大学院医学研究院・放射線科)
中村 泰彦 (九州大学大学院医学研究院・放射線科)

(28) Behavioral and MEG measures reveal brain plasticity in training Japanese adults to learn the /l-r/ contrast

Yang Zhang^{1, 2}, Patricia Kuhl^{1, 2}, Toshiaki Imada^{1, 2, 3, 4}, Makoto Kotani⁵, John Pruitt⁶
(¹Center for Mind, Brain and Learning,
²Department of Speech and Hearing Sciences, University of Washington, Seattle, WA 98195, USA;
³NTT Communication Science Laboratory,
⁴Real World Computing Partnership, Nippon Telegraph and Telephone Corporation,
Atsugi-shi, Kanagawa 243-0198, Japan; ⁵Tokyo Denki University, Chiyoda-ku, 101-8457, Japan;
⁶Microsoft Corporation, Redmond, WA 98052, USA)

(29) 周波数変化に対する脳磁界反応

神本 さゆり¹, 浅香 雪夫¹, 今田 俊明^{2,3}, 関原 謙介⁴, 小谷 誠⁵
(¹ 東京都立科学技術大学大学院・システム基礎工学専攻,
² 日本電信電話株式会社・NTT コミュニケーション科学基礎研究所
³ マルチモーダル機能 NTT 研究室 Real World Computing Partnership,
⁴ 東京都立科学技術大学・電子システム工学科, ⁵ 東京電機大学)

(30) 聴覚言語刺激の途切れによる聴覚野の神経活動の脳磁界計測

岩木 直, 浜田 隆史, 外池 光雄 (産業技術総合研究所・ライフエレクトロニクス研究ラボ)
東 義隆 (神戸大学・自然科学研究科)
川野 常夫 (摂南大学・工学部)

(31) 骨導可聴音および骨導超音波の知覚メカニズム: 脳活動計測による検討

中川 誠司, 山口 雅彦, 外池 光雄 (産業技術総合研究所)
細井 裕司 (奈良県立医科大学)
今泉 敏 (広島県立保健福祉大学)
渡辺 好章 (同志社大学)

(32) ペア刺激による聴覚誘発 P50m, N100m の回復曲線

湯本 真人, 伊藤 憲治, 加我 君孝 (東京大学・医学部)
宇野 彰, 金子 裕, 齋藤 治 (国立精神・神経センター)

(33) 刺激間隔における 1/fn ゆらぎの GO/NO-GO 反応に及ぼす影響についての検討

原田 暢善, 中川 誠司, 岩木 直, 山口 雅彦, 外池 光雄, 守谷 哲郎
(産業技術総合研究所・関西研究センター・ライフエレクトロニクス研究ラボ)

(34) アスペルガー症候群小児における顔の表情認知処理機構—脳磁場計測による解析

木村 育美, 久保田 雅也, 広瀬 宏之, 榎原 洋一 (東京大学医学部附属病院・小児科)
湯本 真人 (東京大学医学部附属病院・検査部)

(35) 運動順応の運動検出と V5 反応の効果

谷川 昌司, 外山 敬介, 荒川 彰, 梶原 茂樹, 吉田 圭一, 江島 義道
(京都大学人間・環境学研究科, 島津製作所)

(36) 顔パターン検出過程の脳磁図による検討

加藤 隆, 加藤 元一郎 (東京歯科大学市川総合病院・精神神経科)
村松 太郎 (慶應義塾大学・医学部・精神神経科学教室)
新谷 益朗 (東京歯科大学口腔科学研究施設)

(37) Williams 症候群の神経生理学的研究

中村 みほ^{1,2}, 金桶 吉起¹, 渡邊 一功³, 柿木 隆介¹

(¹ 国立共同研究機構・生理学研究所, ² 愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所,
³ 名古屋大学医学部・小児科)

(特別講演) MEG の新しい方法論: 脳研究への適用

外山 敬介 (島津基盤技術研究所顧問, 京都府立医科大学名誉教授)

【参加者名】

浅田 博 (大阪府立大・総合科学), 足立 信夫 (早稲田
大大院・理工), 井原 綾 (大阪大大院・医学研究), 今
田 俊明 (日本電信電話株式会社コミュニケーション科
学基礎研究所能診断学), 岩木 直 (産業技術総合研究
所ライフエレクトロニクス研究ラボ), 岩本 一秀 (大阪鉄
道病院神経内科), 鶴飼 聡 (大阪大大院・医学研究),
江坂 茂朗 (関西大・工), 遠藤 博史 (産業技術総合研
究所脳神経情報部門), 大石 誠 (国立療養所西新潟中央
病院), 岡山 晶 (九州大大院・医学研究), 小川 朝生
(大阪大大学医学系研究), 小野田 恵子 (日本大・医学
部附属病院), 小野 弓絵 (早稲田大大院・理工), 梶原
茂樹 ((株)島津製作所基盤技術研究所), 加藤 隆 (東京
歯大・市川総合病院精神神経科), 金子 裕 (国立精神・
神経センター武蔵病院 MEG 検査室), 神本 さゆり (東
京都立科学技術大大院・システム基礎工), 川口 俊介 (大
阪大大院・医学系研究), 川端 啓介 (大阪府立大), 神
鳥 明彦 (日立製作所中央研究所メディカルシステム研
究部), 岸田 邦治 (岐阜大・工), 木村 育美 (東京大・
医学部附属病院小児科), 久保田 雅也 (東京大・小児科),
小谷 賢太郎 (関西大・工), 後藤 寛 (横河電機 (株)
航機事業部 MEG センタ), 小早川 達 (産業技術総合研
究所), 小南 敦之 (筑波大大院・運動生化学), 小森 博
達 (東京歯大・脊椎脊髄外科学), 権藤 健二郎 (九州
大・医部附属病院小児科), 斉藤 幸子 (産業技術総合研

究所), 坂本 真一 (大阪市立大大院・脳神経外科), 佐々
木 博俊 (CBC 株式会社), 篠崎 和弘 (大阪大大院・医
学研究), 澁川 義幸 (東京歯科大・生理学講座・口腔科
学研究センター), 新谷 益朗 (東京歯科大・口腔科学研
究センター脳科学研究施設), 須田 頼昌 (CBC 株式会社),
高栄 智 (広島市立大・情報科学), 高木 孝志 (関西大・
工), 高田 あゆみ (エレクトラ株式会社 MEG プロジェク
ト部), 高梨 芳彰 (京都府立洛東病院), 竹内 文也 (北
海道大・電子科学研), 竹下 和秀 (東京大・医), 武原
志帆 (大阪大・人間科学), 谷川 昌司 (京都大・人間),
谷脇 考恭 (九州大大院・医学研究), 千々布 敏弥 (国
立教育政策研), Yang (Center for Mind, Brain and Learning,
University Washington), 露口 尚弘 (大阪市大・脳神経外
科), 外池 光雄 (産業技術総合研究所関西センターライ
フエレクトロニクス研究), 飛松 省三 (九州大大院医学
研究院脳研臨床神経生理), 外山 敬介 (島津基盤技術研
究所, 京都府立医科大), 中岡 高博 (大阪府立大大院・
理学研究), 中川 誠司 (産業技術総合研究所ライフエレ
クトロニクス研究ラボ), 中田 大貴 (筑波大・人間総合
科学), 長峯 正典 (大阪大大院・医学研究), 中村 み
ほ (愛知県コロニー発達障害研究所), 二宮 宏智 (大阪
大・医), 橋詰 顕 (広島大・医), 橋本 章子 (信州大
社会医学系大院), 畑中 啓作 (エレクトラ株式会社), 花
岡 繁 (国立精神・神経センター武蔵病院), 馬場 俊輔

(京都府立医大・歯), 早川 友恵 (通信総合研究所関西先端研究センター脳機能グループ), 原 崇 (岐阜大大院・工学研究科), 原田 暢善 (産業技術総合研究所関西センターライフエレクトロニクス研究), 平田 恵啓 (北海道大・電子科学研), 廣江 総雄 (東京工大大院総合理工学研究), 広瀬 宏之 (東京大・医), 樋脇 治 (広島市立大・情報科学), 福岡 優子 (東京医歯大脊椎脊髄外科学), 藤巻 則夫 (通信総合研究所関西先端研究センター脳機能グループ), 宝珠山 稔 (生理研), 三島 喬 (北海道大・電子科学研), 美馬 達哉 (京都大・医学研究), 宗綱 信治 (九州工大・生命体工学), 森川 聖美

(大阪大・人間科学), 山口 雅彦 (産業技術総合研究所関西センターライブラボ), 山崎 貴男 (九州大大院・医学研究), 山田 信一 (広島大・歯), 山本 千珠子 (独立行政法人産業技術総合研究所脳神経情報研究部門), 山本 雅清 (大阪大大院・医学系研究), 湯本 真人 (東京大・医学部附属病院検査部), 横田 公一 (CBC 株式会社), 吉田 綾 (国立療養所静岡神経医療センター), 芳村 勝城 (国立療養所静岡神経医療センター), 和坂 俊昭 (筑波大・体育科学), 渡辺 裕貴 (国立療養所静岡神経医療センター), 荒川 彰 (島津製作所基盤技術研究所)

【概要】

昨年度に続く第2回目として, 「脳磁場ニューロイメージング」研究会を岡崎コンファランスセンターで平成13年11月28日(13時)から11月30日(12時)の日程で開催した。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。

研究発表は「体性感覚, 味覚」「運動」「聴覚」「視覚」「臨床応用」「高次機能・音楽」「逆問題・信号解析」のセッションに分け, 計37演題の発表が行なわれた。

体性感覚と味覚に関しては, 運動系の局所失調症(dystonia)と感覚中枢の塑性的変化の関係を探索的試みや, c-fiber を経由する遅い痛み感覚の神経基盤の解明, 舌に与える電気刺激による味覚のMEG応答など, 新しい研究の展開が紹介された。また, 運動関連MEGの計測では, 足関節のvoluntary運動において手の運動準備を示す活動が観測された。てんかんの臨床応用では, 従来の棘波を使ったダイポール推定の他に, 速波の発生源を調べる研究が行なわれ, てんかん源性領域との高い関連が指摘された。聴覚, 視覚, 音楽関係では, 学習による子音

(rとl)の弁別能の増加に伴い聴覚野のMEG反応に可塑的な変化が見られること, 骨導超音波の知覚に関する前庭有毛細胞の関与が示唆されること, 遺伝子欠陥(Williams症候群)により空間認知障害をもつ患者では, 視覚情報処理(背側)経路のなかで動きの認知経路がintactであること, 音楽性幻聴と幻視患者において症状にともないそれぞれ聴覚野と視覚野(紡錘状回)が活動するなどの興味ある発表があった。

さらに, 京都府立医科大学名誉教授の外山敬介先生による「MEGの新しい方法論: 脳研究への適用」に関する特別講演では, fMRIで活動が認められた皮質上にダイポールを仮定し, Wiener推定に基づく空間フィルタ法でMEG活動を推定する方法と, 高次視覚野(V2/V3, V4, V5)が刺激の属性に応じて特異的に活動する様子が紹介された。

本年も十分な発表時間のなかで自由なディスカッションが行なわれ, 出席者(109名)間で活発な情報交換が行なわれた。

(1) グラジオメータとマグネトメータで計測された脳磁界の信号源推定精度

竹内文也, Kimmo Uutela, Lauri Parkkonen, 栗城真也 (北海道大学電子科学研究所)

MEG計測では検出コイルとしてグラジオメータ(GM)あるいはマグネトメータ(MM)が使われ, 脳深部にある信号源の検出にはMMがGMよりも有利であると言われてきた。本研究では, それぞれの検出コイルで計測された磁界を背景ノイズとして用いて等価電流双極子推定

を行い, その位置精度について検討した。脳深部に信号源がある場合には, GMで計測した磁界だけを用了推定の位置誤差の平均は3.1mmであり, MMからの磁界では4.3mmであって, MMにおける推定誤差が大きい。MMからの磁界では, 環境ノイズを減らすための信号処

理である SSP が信号成分を著しく減衰させたためと考えられる。また、両方の磁界を用いた場合には推定誤差の平均は 2.8mm であり、GM における推定結果に比べ小さい。

GM+MM における推定精度の改善はチャンネル数の増加によると考えられるがその程度はわずかであった。

(2) MEG raw data 時系列の遅延時間座標系での振る舞い

中岡高博, Md.M.Rahman Khan, 浅田 博, 谷塚 昇 (大阪府立大学・総合科学部)

ここでは MEG 計測による脳磁気波の raw data 時系列を、遅延時間座標系の空間にプロットし、磁気波の非線形力学的な情報構造を見ることに努めた。Takens の埋め込み定理とフラクタル遅延埋め込みプレバレント定理によって、時系列信号から再構成状態空間上に形成されたアトラクタと時系列を生み出す元のシステムを支配する未知力学系の状態空間上のアトラクタとは 1 対 1 対応関係であることから、遅延時間座標系への時系列の変換によって、MEG のあるチャンネルに対応する部分の神経回路網に働くダイナミクスを推定するためである。波を積算(誘発波を見るために行う)する前の raw data の時系

列を対象にした。まず、刺激を与えずリラックスした時に観測される磁気波は三次元状態空間上で、トラス状態空間の内部をカオティック(日常のカオスでなくカオス力学的な意味)に動く軌道を描いた。波のスペクトルは 10Hz 付近に鋭いピークを持つ α 波であった。状態空間上でランダムな軌道でないことから、この raw data は雑音に邪魔された意味の無いものでなく、システムのその部分のその時のその状態を示すものであると考えられる。アトラクタが現れずカオティックな軌道は、システムが特定の仕事をせずリラックスな状態であるためであろう。

(3) MEG における測定変量間の開ループ伝達関数の同定

原 崇, 岸田邦治 (岐阜大学・工学部応用情報学科)

篠崎和弘, 鵜飼聡 (大阪大学・医学部・神経機能医学講座)

(目的) 原子炉雑音解析で開発したフィードバックシステム論的手法を用いて MEG の測定変量間の方向性を持つ伝達関数を同定した。(方法) 相関関数行列を要素とする Hankel 行列の特異値分解を経由して同定されたインバージョンモデルが最小位相性を満たしている場合、フィードバック結合構造を利用して方向性をもつ伝達関数が決定できる。2 名の健康被検者で開眼時と閉眼時を記録した。データ数 9 万点、サンプリング周波数 625Hz。(結果) 被検者 1 では閉眼時、 α 波帯域について左中側頭

部 L51, 右後側頭部 R46 間の伝達関数の振幅損失は左から右に向かうときは 0dB, 逆向きは 10dB で非対称であった。開眼時の損失は各々 10dB, 20dB で、閉眼時と同じく非対称がみられた。被検者 2 では左後側頭部 L46 と右同名部位 R46 間の伝達関数の損失で開眼時左から右へは 10dB, 逆向きは 15dB なる同様の非対称が見られた。尚、被検者 2 の閉眼時、伝達関数の振幅損失は各々 10dB で対称であった。(考察) 方向性をもつ伝達関数によって領域間の機能関連を検討できる可能性が示された。

(4) LORETA 法による言語優位脳半球の推定

三島 喬, 竹内文也, 鎌田恭輔, 栗城眞也 (北海道大学電子科学研究所)

鎌田恭輔 (北海道大学・医学部・脳神経外科)

本研究ではアミタール検査により言語優位半球が既知の被験者 5 名(左半球優位 4 名,右半球優位 1 名)を対象として, 言語課題遂行中の脳磁場応答(MEG)を用いて計測した。言語課題は, 提示された縦書きのかな 3 文字(名詞)が, 具象名詞か抽象名詞かを判断するものとした。計測磁場から脳内の電氣的活動を表す電流分布を LORETA(Low Resolution Electromagnetic Tomography)法で計算し, 言語優位半球と非言語優位半球で電流分布に

差が見られるかを調べた。解析の結果, アミタール検査で左半球優位とされた被験者は左側頭部において, 右半球優位とされた被験者では右側頭部において電流分布の和がより大きくなり左右差が見られた。以上より各被験者において電流分布解析の結果はアミタール検査の結果と一致した。従って, MEG を用いて無侵襲的に言語優位半球を推定できる可能性が示唆された。

(5) 脳磁図・MRI 統合ソフトの開発

橋詰 顕, 栗栖 薫, 有田和徳, 飯田幸治, 花谷亮典 (広島大学・医学部・脳神経外科)

籾 拓郎 (日比野病院)

目的: Neuromag 社脳磁計は planer の gradiometer を有しており, 電流源が gradiometer 直下にあるとき信号が最大となる特性をもつ。現時点では, Neuromag 社の三次元表示ツールは脳表とセンサーの位置関係を表示することができないため, 別途センサー位置, 電流源, 脳表を表示できるプログラムの開発を試みた。方法: プログラミング言語は米国 Inprise 社 Delphi Ver.5 を用い, DICOM 画像読込, 脳表の三次元表示, 脳表の三次元表示 DICOM 座標と HPI 座標間の補正(電流源表示), HPI 座標とセン

サー座標間の補正(センサー表示)などのプログラムを開発した。結果: 脳表の三次元表示画像にセンサー, 電流源の情報を重ね合わせることが可能となった。

結語: 脳表とセンサーの位置関係を表示するプログラムを開発した。Planer gradiometer を有する脳磁計では, 各センサーの波形とセンサー・脳表の位置関係から, 脳の磁気活動の広がりを見推定できる可能性があり, 様々な用途があるものと期待される。

(6) 指の一次体性感覚野の発達的变化に関する検討 (第 2 報)

権藤健二郎, 飛松省三, 原 寿郎 (九州大学・医学部・小児科)

乳児の体部位局在の発達的变化について昨年に引き続き検討した。昨年の対象は健康発達と判定された乳幼児 10 名と健康な成人 5 名であったが, これに幼児 4 名, 学童 3 名(てんかん例)を追加した。対象は全て抱水クロールを用いて鎮静し拇指と薬指の掌側を air-tapping 装置を用いて刺激した。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, 母指と薬指の等価双極子電流源の三次元座標を算出し 2

点間の距離を求めた。乳児群で平均 $3.9 \pm 0.85\text{cm}$ であるのに対し成人群では平均 $2.0 \pm 0.51\text{cm}$ と有意に距離が短かった($P < 0.01$)。電流源の 3 次元的な広がりを冠状面で比較すると大きな順に乳児薬指-乳児母指-成人薬指-成人母指であった。また幼児例と学童例も加えて年齢に伴う電流源分布の変化を観察し, 乳児群より成人群の方が 2 点間距離が短いという結果の意義を考察した。

(7) 鍼灸のツボ打撃による脳の MEG 信号の検出

川端啓介（大阪府立大学）

内野勝郎（全国柔整師協会）

外池光雄（産技総研ライフエレクトロニクスセンター）

鍼灸のツボを打撃したときの脳の MEG 信号をはじめで検出した。方法：ツボの上に皮内鍼、あるいは直径 4mm の仁丹粒をテープで留め、その上を木槌で約 40g/cm² の強さでパルス打撃した。（このとき痛覚はなかった。）トリガーはこのテープの上に光ファイバーの末端に繋いだエンパイア tube を置き、これを同時打撃して得た。15 秒間隔で大体 50 回叩いた。MEG は産技総研関西センターの 122 チャンネル全頭型脳磁計を使用した。鍼を打ったとき遅く鈍い感覚“ひびき”が現れるが同様な信号を予想して計測は打撃後 6 秒までとした。現在迄に約 14 回の実験を約 9 人の被験者（男性、右きき、年齢 16～35）について行い大体同じ傾向を示す信号を得た。

結果：例えば、会谷とよばれる親指と人指指の間にあ

るツボの場合、(1) 打撃後 1000ms も経過してピークに達する大きな信号を観測した。(2) この信号は前額、左前側頭、右前側頭、左後側頭などの広いチャンネルに分布して現れるのが特徴である。(3) このツボの横 10mm ぐらい横の人差指上の骨の上を打撃したときには、この広範囲の信号は現れない。(4) 打撃より数十 ms 後に早い立ち上がりを持つ体性感覚の明瞭な信号があらわれる。この信号は現れるチャンネルが限られており、弱くタッチした場合の信号と一致し、刺激した手と対側の脳に現れる。総括：我々はツボを刺激したときに生ずる本質的な MEG 信号（おそらく鍼と関連する）を初めて検出したと考えている。

(8) 口唇に局所失調症を患う器楽奏者の MEG 反応

平田恵啓（北海道大学電子科学研究所）

マティアス・シュルツ、クリスト・パンテフ

(Institute for Experimental Audiology, University of Muenster, Germany)

エッカート・アルテンミュラー

(Institute of Music Physiology and ²Institute of Music Physiology and

金管楽器奏者は顔面筋肉の緊張と呼吸で唇を振動させ演奏を行う。そして過度の反復練習を行うことにより口唇や頬筋肉部に痙攣などの局所失調症を起こす危険性があることが知られている。一方、局所失調症を患うピアニストでは隣接する罹患指の刺激で観測された磁場応答の等価電流双極子の推定位置間距離が体性感覚野上で健康者に比べて近接していることが報告されている。本報では局所失調症を患っている金管奏者に対して、空気圧

により膜表面が膨らむ刺激装置を用いて左右どちらか一方の上下口唇部および同側の手指腹部に機械的な刺激を呈示し、反対側脳半球からの MEG 反応を BTi 社製 37 チャンネル SQUID 磁束計により記録した。30 分程度の休息後、反対側の口唇と手指腹を刺激して同様の計測を行った。健康者のデータと比較検討を行い、ピアニストの手指で見られるような等価電流双極子の活動に関して可塑性が生じているかどうかを検討した。

(9) 電気味覚に対する脳磁場計測

武原志帆, 森川聖美, 山本千珠子, 山本 隆 (大阪大・人間科学・行動生理)
中川誠司, 山口雅彦, 岩木 直, 外池光雄 (産業技術総合研究所)

これまでの味溶液を刺激としていた実験では, オンセットを正確に捉えることが技術的に容易ではなく, また被験者への負担が大きいという欠点があった。一方, 電気味覚刺激では刺激の立ち上がりがはっきりしており, 実験が簡便になることから実験時間も短縮される。さらに, 舌に対して左右別に刺激を与えることができるという利点もある。そこで今回我々は, 電気味覚計(リオン社 TR-05)を用い, 舌面に電気刺激を与えることにより生じ

る独特な味(人によって異なるが, 酸味と金属味を混ぜたような味)により誘発される脳磁場応答を記録した。本実験では, 電気刺激によるアーチファクトを考慮して刺激の持続時間は 200ms とし, 刺激間隔は 20s と固定した。被験者は全員右利きの過去に味覚異常を訴えたことのない成人で, ①右刺激のみで刺激強度を変える実験, ②刺激強度を固定し左右刺激を与える実験を行った。

(10) 味覚誘発電位・磁場の同時計測

小早川 達, 溝口 千恵, 斉藤 幸子 (産業技術総合研究所)
小川 尚 (熊本大学・医学部)

医療現場における味覚の他覚的検査法の一つとして味覚誘発電位の計測がある。味覚誘発電位計測で得られた波の成分に対して, 意味付けを行うために誘発電位と誘発磁場の同時計測を 5 人の被験者に対して行った。40 回の味刺激提示を 1 セッションとし, 日時を変えて 6 セッション行った。誘発磁場の計測には全頭型を用い, 誘発電位は Cz, Fz, Pz, C1, C2 において計測を行った。0.3M の食塩水を味刺激として被験者に提示した場合, 誘発磁場

の第一次味覚野の活動が推定された潜時 (115ms) において誘発電位では陽性電位 (P1) が計測された。振幅は Cz において最大になった。誘発電位では P1 に続き, N1, P2 が観測され, 各々の潜時において得られた脳磁場から活動部位の推定を行ったところ, 誘発電位で P1 の潜時では従来の Area G と中心溝近傍にダイポールが推定された。

(11) 磁界計測を用いた脊髄機能マッピング

小森博達, 川端茂徳, 大久保治修, 福岡優子, 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)

我々は磁界計測による脊髄機能診断法の確立に向けて研究を進めている。昨年の本研究会において, 我々はネコの脊髄を硬膜外電極で電気刺激し, 上行性脊髄誘発磁界を測定することにより, 従来の電位計測より高精度に脊髄障害部位診断が可能なことを報告したが, 今回は, より低侵襲である坐骨神経刺激-脊髄誘発磁界によって, 脊髄切断による伝導障害が診断できることを確認し

た。また, 胸髄において, 大脳運動野刺激後の下行性脊髄誘発磁界および, 坐骨神経刺激後の上行性脊髄誘発磁界を測定し, それぞれの脊髄内伝導路をマッピングできることを確認した。脊髄誘発磁界測定は, 脊髄障害高位診断のみならず, 脊髄の生理学的知見を低侵襲に知ることができる優れた検査法といえる。

(12) 坐骨神経標本を用いた活動磁界測定

福岡優子, 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・脊椎脊髄神経外科学)

我々は、坐骨神経標本を用いて活動磁界測定を行い、正常モデルと、結紮による急性障害モデルについて検討した。摘出したウサギの坐骨神経をリングル液で満たしたチェンバー内に静置し、神経遠位端を吸引電極を用いて電気刺激した。磁界測定は平面型 8 チャンネル磁束計を用いて液面上の 72 ヶ所で行った。併せて、電位測定を行った。末梢神経活動磁界は四重極子パターンを呈し中枢に向け伝導し、結紮部で消失した。最小二乗法により

dipole 推定を行い、障害部位を推定したところ、実際の結紮部位との誤差は 3mm 以内であった。また、これらの dipole 推定は現在 Z 方向のセンサーのみ用いて行っているが、我々の使用している 3 次元配列のセンサーによって、脱分極に伴う体積電流から生じるとされる磁場も検出することができた。末梢神経の障害部位推定にとって、3 次元的な磁場の解析が今後有用なのではないかと思われる。

(13) 針電極を用いた表皮内電気刺激による誘発脳磁場

乾 幸二, Tran Diep Tuan, 秋云海, 王曉宏, 宝珠山稔, 柿木隆介
(岡崎国立共同研究機構・生理学研究所・統合生理研究施設)

皮膚 Aδ 線維の選択的刺激を目的として表皮内電気刺激用針電極を作成し、この刺激法の有用性を脳磁図を用いて検討した。電極は針の長さが 0.2mm の押しピン型針電極で、皮膚に刺入した後 0.1-0.3mA, 0.5ms の条件で電気刺激した。手背を刺激した際の誘発脳磁場初期成分のピーク潜時は 156ms であり、前腕刺激のピーク潜時(136ms)との時間差は 20ms であった。刺激部位間の皮膚上の距離と潜時差より、本刺激に関わる末梢伝導速度

は約 15m/s と算出され、Aδ線維により伝達されると考えられた。初期成分の信号源は、8 名の被験者で両側第 2 次体性感覚野 (SII) に推定された。残りの 5 名では、SII に加え、これとほぼ平行する第 1 次体性感覚野 (SI) の活動が認められた。SI, SII のピーク潜時はそれぞれ 161ms, 158ms であった。これらの結果はレーザー刺激を用いたこれまでの報告と一致するもので、本刺激法はヒト痛み関連の研究に有用であると思われる。

(14) Cerebral activation by the signals ascending through unmyelinated C-fibers in humans: a magnetoencephalographic study

Tuan Diep Tran, Koji Inui, Minoru Hoshiyama, Khanh Lam, Yunhai Qiu, Ryusuke Kakigi
(岡崎国立共同研究機構・生理学研究所・統合生理研究施設)

Cerebral processing of first pain, associated with Aδ-fibers, has been studied intensively, but the cerebral processing associated with unmyelinated C-fibers, relating to second pain, remains to be investigated. This is the first study to clarify the primary cortical processing of second pain by magnetoencephalography (MEG), through the selective activation of C-fibers, by the stimulation of a tiny area of skin with a CO₂ laser. In the hemisphere contralateral to the side

stimulated, a one-source generator in the upper bank of the Sylvian fissure (secondary somatosensory cortex, SII) or two-source generators in SII and the hand area of the primary somatosensory cortex (SI) were the optimal configurations for the first component. The onset and peak latency of the two sources in SI and SII were not significantly different. In the hemisphere ipsilateral to the stimulation, only one source was estimated in SII, and its peak latency was significantly

(approximately 18 msec on average) longer than that of the SII source in the contralateral hemisphere. Our findings suggest that parallel activation of SI and SII contralateral to

the stimulation represents the first step in the cortical processing of C-fiber-related activities, probably related to second pain.

(15) 絶対音感保持者の脳磁場計測～中潜時以降のダイポール分布について

広瀬宏之, 久保田雅也, 木村育美, 大澤麻記, 榊原洋一, 湯本真人 (東京大学小児科・検査部)

絶対音感とは、任意の音を聞いた時にその音は何の高さの音であるかを何の手掛りもなく言い当てることのできる能力のことである。今回我々は絶対音感保持者の聴覚誘発脳磁場を計測した。対象は成人絶対音感保持者 9 名, 成人絶対音感非保持者 7 名, 小児絶対音感保持者 5 名。課題は 1000Hz の純音を両耳で聞く single tone 課題と 1 オクターブ内の 8 種類の純音(C3-C4)をランダムに聞き

音名を判断する labelling 課題の 2 種類。labelling 課題では、中潜時以降聴覚中枢を含む上側頭回, 角回・縁上回などの頭頂後頭連合野, 楔部・舌状回・視覚中枢を含む後頭葉, 中心溝近傍や Broca 野などの前頭葉, 一次運動・感覚野, 海馬傍回等が活性化された。それぞれの部位の神経生理学的意味について考察する。

(16) 楽譜を見て音を想起する時の脳磁場について

久保田雅也, 木村育美, 広瀬宏之, 榊原洋一 (東京大学・小児科)

楽譜を見て音を想起する行為も広い意味で「読む」過程だと言える。今回, 成人 5 人, 小児 5 人に対し, 楽譜, 非楽譜をランダムに提示し, 楽譜に示された音を想起する課題を与え, 視覚系における初期反応を全頭型脳磁図測定装置にて解析したので報告する。楽譜, 非楽譜に対する反応をそれぞれ加算平均し比較すると楽譜を「読む」

過程で右視覚連合野が強く反応した。左視覚連合野は楽譜, 非楽譜において共通に反応した。中田らが fMRI 用いた解析で楽譜を読む課題で右視覚連合野の反応を特異的に認め, music brain として報告しているが関連する結果だと考えられる。楽譜の示す音の同定には音符の形態よりも五線譜上の位置の解析が優先される可能性がある。

(17) 音楽性幻聴および幻視 (シャルル・ボネ症候群) の MEG の空間フィルター解析

山本雅清, 篠崎和弘, 鶴飼聡, 川口俊介, 石井良平, 小川朝生, 水野 (松本) 由子, 井上隼, 武田雅俊
(大阪大学大学院医学系研究科・精神医学教室)
吉峰俊樹 (大阪大学大学院医学研究科・脳神経外科学教室)
平吹度夫 (大阪大学大学院医学研究科・放射線医学教室)
田中迪生 (田中診療所)
Stephen E.Robinson (CTF Systems Inc.)

音楽性幻聴およびシャルル・ボネ症候群の各 1 例について MEG の空間フィルター解析を行い幻覚に対応する皮質領域を検討した。症例 1: 78 歳女性。数年前より難聴, 約 2 年前より童謡などの音楽性幻聴。幻聴時 (安静

時) と幻聴抑制時 (ニュースのテープを聞かせた) の 2 区間を比較した。結果は幻聴体験時に右聴覚野で θ , α 波帯域の脱同期が見られた。症例 2: 70 歳女性。緑内障, 白内障で視力低下。約 1 年半前より, 様々な模様 (色付

き、直線、曲線など)の幻視が出現。幻視時(明所で開眼時に容易に出現)と幻視抑制時(閉眼時)の2区間を比較した。結果は幻視時に両側紡錘状回において θ 、 α 波

帯域の脱同期が見られた。難聴、視力低下による正常感覚入力の遮断により、対応する皮質領域の過活動を伴い、幻覚を生じたものと推測された。

(18) 演算処理に関する脳磁界計測 -数の大小比較について-

高栄智, 樋脇治 (広島市立大学・情報科学部)

橋詰頭, 栗栖薫 (広島大学・医学部・脳神経外科)

数の大小比較を行う高次脳機能について 204 チャンネル全頭型脳磁計を用いて脳磁界を計測し、単一ダイポールの推定を行った。被験者の前方のスクリーンに1から9までの2つの数字を同時にランダムな順番で提示した。被験者には、提示された2つの数字を比較し、左の数字が大きければ左手中指のボタンを、右の数字が大きければ左手人差し指のボタンを押すようなタスクを行わせた。

課題遂行中の誘発脳磁図について 100 回加算平均を計測した。その結果、左頭頂葉付近において潜時約 250ms に磁場のピークが観察された。この潜時において、単一電流ダイポールの位置の推定を行い、MRI 画像に重畳させた結果、左頭頂葉の上頭頂小葉(superior parietal lobule)に単一電流ダイポールが推定された。

(19) てんかんの dipole 推定における導体モデルの影響 -ファントムによる実験の総括-

金子裕^{1,2}, 湯本真人³, 斎藤治⁴, 大槻泰介¹, 有馬邦正²

(¹ 国立精神・神経センター武蔵病院脳神経外科, ² 国立精神・神経センター武蔵病院臨床検査部,

³ 東京大学医学部附属病院・臨床検査部, ⁴ 国立精神・神経センター武蔵病院精神科)

てんかんの dipole 推定において導体モデルが与える影響を検討した。実形状の導体をもつファントムを作成し、側頭葉底・前頭葉底に配置した人工 dipole に通電し、3種類の球モデルと3種類の実形状モデルを適用して電流源推定を行った。球モデルの中では、頭部全体から近似した球が誤差・再現性とも優れていたが、誤差は少ない。側頭葉底の人工 dipole に対して実形状モデルを適用すると、全体的に誤差は小さくなった。しかし、前頭

葉底の人工 dipole に対しては誤差はあまり変わらなかった。てんかんの症例に対して球モデルと実形状モデルを適用して、スパイク・マッピングを行った。実形状モデルの方が GoF 値は高くなるが、局在推定としては明らかに改善したとは言い難い。てんかんの解析の際には、フィルターなどのノイズ除去の方が重要であって、導体モデルが与える影響は小さいと言える。

(20) 当院での脳磁図による部分てんかん焦点診断の現状

大石 誠, 亀山茂樹, 師田信人, 増田 浩 (国立療養所・西新潟中央病院)

当院では部分てんかんの外科治療において、より限局した焦点切除を目指し、術前脳磁図検査および頭蓋内電極留置による慢性硬膜下記録を行っている。2000年4月の Neuromag 204 導入後てんかん外科を行った24症例27

焦点(内側側頭葉9焦点, 新皮質焦点18焦点)を対象に、てんかん術前診断としての脳磁図の現状を報告する。焦点推定は発作間欠時棘波の電流双極子により行っているが新皮質焦点4例で発作時記録も得られた。発作起始の

解析は4例全例で有用であった。脳磁図と硬膜下記録所見・手術成績の比較検討では、新皮質焦点では15/18焦点(83%)で完全に一致、前頭葉底部例と補足運動野例では推定誤差が大きく帯状回焦点例は推定ができなかった。

一方内側側頭葉では5/9焦点(56%)で脳磁図による診断が得られた。脳磁図のてんかん焦点推定は新皮質焦点において、また発作時所見が極めて有用であった。

(21) MEGの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, 山田淳二, 平野俊一朗, 谷口理章, 吉峰俊樹
(大阪大学・脳神経外科)
今井克美 (大阪大学・小児科)

てんかん患者の皮質脳波 (EcoG) の測定で、連続した速波は、initial seizure onsetやpartial seizureにおいて観察される。また、MEGにおいても同様に速波を測定する機会が少ないながらもある。そこで、MEGの速波の発生源と、てんかん源性領域との関連を検討した。Retrospectiveに過去の測定 data中に7例(内、内側型側頭葉てんかん3例)。4例は発作時に、残り3例は、非発作時に観察さ

れた。これをECD解析、SAM解析を行い、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つた。また、手術の行われた3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、MEGの速波の発生源は、てんかん源性領域との関連が高いことが、示唆された。

(22) 脳磁図におけるてんかん棘波の持続時間とdipole集積との関係について

芳村勝城, 渡辺裕貴 (国立療養所・静岡神経医療センター)

目的: 棘波の振幅や持続時間等の特徴はてんかん焦点の広がり等の性質を反映していることが想像される。そこで、今回は棘波の幅(持続時間)に焦点をあてて、第一に、MEGにおけるてんかん棘波の持続時間がてんかん焦点の特徴を反映しているのか、第二に、選択されたMEG棘波の幅によりdipoleの集積結果に相違があるかについて調べた。
方法: MEGを施行し、dipoleの集積が認められたてんかん

患者について、選択したMEG棘波の幅の平均と、dipoleの空間的分布との関係を調べた。次に同一症例について幅の狭い棘波を選択した場合と、幅の広い棘波を選択した場合のそれぞれでdipoleを計算し、その特徴について比較した。
結果: ①MEG棘波の持続時間とdipoleの広がりの間には正の相関関係が認められた。②同一症例では、狭い棘波を選択した場合の方がdipoleは狭い領域に集積した。

(23) 非磁性ゴーグル型光刺激装置を用いた光感受性てんかんの検査について

吉田 綾, 渡辺裕貴, 芳村勝城 (国立療養所・静岡神経医療センター)

てんかんの脳波検査においては、どこ施設でもストロボを用いた光感受性の検査が行われている。てんかん患者で脳磁図検査をおこなう際にも、当然光刺激による賦活が行われるべきであろうが、通常のストロボでは強い磁気ノイズが入るため、使用できない。今回は我々の

施設で使用しているゴーグル型光刺激装置を紹介し、さらに、それを用いた光刺激検査のさいに臨床発作が誘発されたてんかんの1症例を経験したので、そのデータを呈示する。

(24) 手・足・顎の self-paced 運動に伴う運動準備磁界の検討

遠藤博史, 成田紀之, 加藤雄一郎, 武田常広 (産業技術総合研究所・脳神経情報部門・感覚認知科学研究グループ)

外部からの運動開始司令を必要としない self-paced 運動では, 運動準備磁界が観測され, その活動源は一次運動野において体部位局在を示すことが知られているが, 活動の時間変化についてはあまり議論されていない。本発表では, 我々がこれまでに計測してきた手・足・顎運動の運動準備磁界の時間変化を中心に解析を行った結果について報告する。手指の運動では, 運動開始前から運動指と反対側の運動野でより有意な変化が観測された。

足関節の運動では, 一次運動野の足の領域からだけでなく, 手の領域付近からも運動準備の活動が観測される場合があった。顎関節の運動では, 運動方向に関係なく, 左の運動野でより有意な変化が観測された。手・足・顎運動の運動準備磁界の変化は一樣ではなく, 運動準備活動には, 運動部位の機能的役割の違いが反映されている可能性が考えられた。

(25) 随意性顎運動に関連する大脳皮質領域の脳磁場解析

澁川義幸^{1,2}, 熊井敏文^{1,2,3}, 新谷益朗¹, 鈴木隆^{1,2}, 中村嘉男^{1,4}

(¹東京歯科大学・口腔科学研究センター, ²東京歯科大学・生理学講座,

³松本歯科大学・口腔生理学講座, ⁴帝京平成大学・福祉情報学科)

ヒトの随意性顎運動のプログラミングに関与する脳領域を同定するために, 随意性顎運動に関連する運動準備磁場の分布・時間経過を解析し, その等価電流双極子 (ECD) の位置を MRI に基づいて同定した。健康成人 10 名で, 全頭型 SQUID センサーを用いて, 両側対称性自発性閉口・開口運動あるいは, 左側薬指の自発性タッピング運動に関連する運動準備磁場を記録した。得られた磁場分布から ECD の推定を行い, その位置を MRI 上で決

定した。自発性両側対称性顎運動では咬筋あるいは顎二腹筋筋電図の起始に約 800msec 先行して開始する緩徐磁場が中心前回に両側性に分布していたのに対して, 左側手指運動では右側中心前回に緩徐磁場が出現した。ECD は, 自発性閉口運動では両側中心前回に, 左側手指運動では右側中心前回に, それぞれ推定された。したがって, 両側中心前回は随意性顎運動の中枢性プログラミングに関与すると考えられる。

(26) ボタン押し運動における運動強度の制御と運動関連脳磁場の検討

江坂茂朗, 高木孝志, 小谷賢太郎, 堀井健 (関西大学・工学部・管理工学科)

外池光雄 (産業技術総合研究所・関西センター)

従来, MEG 計測におけるヒトの運動制御の解析には, 運動開始条件を考慮した反応課題が多く用いられ, 運動開始と一次運動野の関係が報告されてきた。しかし, 運動強度を考慮した実験課題の報告は見られず, 運動強度の制御と脳内活動の関係は明らかにされていない。そこで, 我々は脳内の運動制御メカニズムを調べる方法として, 運動強度を考慮した拇指のボタン押し課題を用いた。まず, 運動を制御するための実験環境として, 目標とす

る力の強さと被験者自身が発揮している力の強さを視覚フィードバックで与えるシステムを構築した。被験者には動作開始前に運動準備の視標を呈示し, 次の運動開始の視標と同時にボタン押し動作を開始してもらった。また, 力の視覚フィードバックのあり・なしの条件下で課題を遂行してもらい, 運動制御の有無による実験結果を比較した。本報告では, これらの実験より得られた結果をもとに運動制御と MEG の関係について検討している。

(27) 大脳基底核に対する複雑手指運動の運動頻度の影響

岡山 晶, 谷脇考恭, 後藤純信, 飛松省三 (九州大学大学院医学研究院・脳研臨床神経生理)

吉良潤一 (九州大学大学院医学研究院・脳研神経内科)

吉浦 敬 (九州大学大学院医学研究院・放射線科)

中村泰彦 (九州大学大学院医学研究院・放射線部)

【目的】大脳基底核は、1)運動頻度に関係する、2) 自己ペースと外的ペースとで活性が異なると予想されるが、機能画像で証明されていないので検証した。

【方法】対象は健康人10名。課題は手指の複雑連続運動を自己ペースと外的ペースで各々5段階の速度で行い、fMRIを記録した。SPM99を用いて(各速度の活動時)－(安静時)のマッピングを行い、その部位の信号変化と運動頻度との相関、および運動関連部位同士の相関を調べ、ネットワーク解析を行った。

【成績】両ペースとも対側被殻後部に活性化を認めたが、自己ペース時のみ信号変化が運動頻度と高い相関を示した。ネットワーク解析にて自己ペースでは対側被殻-視床-補足運動野-1次運動野の間に高い関連を認めたが、外的ペースでは関連は弱かった。

【結論】複雑手指運動では、自己ペース時に運動頻度と基底核活性との間に高い相関があり、基底核-視床-補足運動野-1次運動野の回路が作動していることが示唆された。

(28) Behavioral and MEG measures reveal brain plasticity in training Japanese adults to learn the /l-r/ contrast

Yang Zhang^{1, 2}, Patricia Kuhl^{1, 2}, Toshiaki Imada^{1, 2, 3, 4}, Makoto Kotani⁵, John Pruitt⁶

(¹Center for Mind, Brain and Learning,

²Department of Speech and Hearing Sciences, University of Washington, Seattle, WA 98195, USA;

³NTT Communication Science Laboratory, ⁴Real World Computing Partnership, Nippon Telegraph and Telephone Corporation, Atsugi-shi, Kanagawa243-0198, Japan; ⁵Tokyo Denki University, Chiyoda-ku, 101-8457, Japan;

⁶Microsoft Corporation, Redmond, WA 98052, USA)

The present study investigated brain plasticity in Japanese adults learning the English /l-r/ distinction. Both behavioral and brain (MEG) measures were used. Training was designed to mimic the listening experience of infants who are exposed to the exaggerated acoustic events contained in infant-directed speech ("motherese"). The training program consisted of 12 1-hour sessions. Pre- and post-training measures were collected from nine subjects including two controls. The MEG experiments examined training effects in preattentive discrimination vs. categorization in the oddball paradigm. An average improvement of 21.7% was obtained in behavioral

identification. The training effect was significant for all factors of speaker, vowel, and syllabic context. Perceptual learning generalized to three untrained voices. No effects were observed in the two control subjects. Consistent with the behavioral improvement, the trainees showed enhanced mismatch responses in the left hemisphere. The data indicated that the learned phonetic boundary in Japanese subjects did not match that of the American listeners. This pattern of results suggests the existence of substantial neural plasticity in adulthood as well as a potential limit.

(29) 周波数変化に対する脳磁界反応

神本さゆり¹, 浅香雪夫¹, 今田俊明^{2,3}, 関原謙介⁴, 小谷誠⁵

(1) 東京都立科学技術大学大学院・システム基礎工学専攻,

² 日本電信電話株式会社・NTT コミュニケーション科学基礎研究所,³ マルチモーダル機能 NTT 研究室 Real World Computing Partnership,⁴ 東京都立科学技術大学・電子システム工学科, ⁵ 東京電機大学)

刺激前半から後半にかけて周波数がステップ関数的に変化するときの脳磁界反応を計測解析した。まず、周波数が 500 Hz もしくは 2000 Hz から 1000 Hz に変化する刺激を用いて、周波数変化までの時間（刺激前半部呈示時間：150, 300, 600, 1200, 2400 ms）がピーク振幅に影響を与えないことが分かった。そこで、刺激前半部呈示時間を 300 ms 一定とし、今度は、1000 Hz から 500 Hz もしくは 2000 Hz に変化する刺激の一方を 4〜6 回繰返し、次

いで他方を 4〜6 回繰返すというシーケンスを繰返し被験者に与えた。周波数変化時点に対するピーク振幅は、1 回目の方が最後より大きかった。これは、音の立ち上がりに対する N1m ピークと同様の「慣れ」の効果と見られるが、この中には MMF が含まれている可能性もある。また、周波数変化に対するピーク振幅は、下降変化より上昇変化に対する方が大きかった。

(30) 聴覚言語刺激の途切れによる聴覚野の神経活動の脳磁界計測

岩木 直, 浜田 隆史, 外池 光雄（産業技術総合研究所・ライフエレクトロニクス研究ラボ）

東 義隆（神戸大学・自然科学研究科）

川野 常夫（摂南大学・工学部）

本研究では、聴覚 off 反応の脳磁界計測を用いて、音声言語およびノイズに対する、聴覚野における神経活動の差を明らかにすることを目的とした。60 秒に 10 回の頻度で 500ms 途切れるように加工した連続言語音刺激、および上記言語音刺激のエンヴェロープで振幅変調した白色雑音の 2 種類を刺激として用い、音声刺激聴取中の被験者の脳磁界を、全頭型 MEG システムを用いて計測した。計測された信号は音声刺激に途切れをトリガとし

て 50 回以上の加算平均を行った。側頭部を覆う 52 個のセンサで計測された MEG 信号の、各時刻における二乗平均値を求め、N1m 成分に対応する聴覚 offset 反応の最大ピーク振幅を言語音とノイズとで比較した。この結果、言語音に対する off 反応が、ノイズに対する off 反応に比べて有意に大きいことを明らかにした。この結果は、聴覚野における神経活動が、言語音に対して増大することを示している。

(31) 骨導可聴音および骨導超音波の知覚メカニズム：脳活動計測による検討

中川誠司, 山口雅彦, 外池光雄（産業技術総合研究所）

細井裕司（奈良県立医科大学）

今泉 敏（広島県立保健福祉大学）

渡辺好章（同志社大学）

可聴音、超音波に関わらず、骨導音に対する皮質活動計測の報告例はほとんど存在しない。本研究では骨導音

に対する脳磁界を計測し、その知覚メカニズムを検討した。聴覚健常者 11 名に気導音、骨導可聴音、および骨

導超音波を呈示した。すべての刺激に対し、聴覚野内に N1m 活動が推定された。骨導超音波は気導音や骨導可聴音に比べ N1m 潜時が大きく、活動強度が小さく、やや外側かつ後方に活動が推定された。また、すべての刺激において、対側刺激に対しては同側刺激に比べ活動強度が大きく、潜時が小さい活動が得られた。これらの結果

から、骨導可聴音の場合は内耳以降の知覚メカニズムが気導音とほぼ同様なのに対し、骨導超音波ではやや異なることが推測された。骨導超音波に対する活動部位は前庭皮質の一部に含まれる可能性もあり、骨導超音波知覚に対する前庭有毛細胞の関与も示唆される。

(32) ペア刺激による聴覚誘発 P50m, N100m の回復曲線

湯本真人^{1,2}, 伊藤憲治¹, 宇野 彰², 金子 裕², 加我君孝¹, 齋藤 治²
(¹ 東京大学・医学部, ² 国立精神・神経センター)

ペア刺激課題にて聴覚誘発 P50m, N100m を記録, 検討した。対象は聴力正常の健常者 12 名とし, 刺激は周波数 2kHz, 持続時間 10ms のトーンバーストをペア (間隔は 50, 70, 100, 150, 200, 300, 500, 700ms の 8 種類) として等確率ランダムに呈示した。誘発脳磁場は Neuromag 社製の全頭型 204 チャンネル脳磁計を用い, 加算回数は各刺激 100 以上とした。P50m - N100m が最大となるチャネ

ル (全例で右側頭部) において, 第二, 第一刺激による誘発反応の振幅比を P50m, N100m 成分毎に検討し回復曲線を得た。P50m 振幅比がペア間隔 200ms~150ms 間で 70%~40% と急激な低下を示したのに対し, N100m には顕著な変化は見られなかった。ペア間隔 500ms においても P50 電位で報告されている程顕著な “gating” は磁場成分には認められなかった。

(33) 刺激間隔における 1/fn ゆらぎの GO/NO-GO 反応に及ぼす影響についての検討

原田 暢善, 中川誠司, 岩木 直, 山口雅彦, 外池光雄, 守谷哲郎
(産業技術総合研究所・関西研究センター・ライフエレクトロニクス研究ラボ)

これまでの研究で, 環境中の規則性・不規則性が, メモリートレースの形成に影響を与え, 結果としてミスマッチフィールド(MMF)および N100m 成分に影響を与えることが明らかになった。ここでさらに, 環境中の規則性・不規則性によるメモリートレースの形成が, 人間の随意反応に対しどのような影響を与えるのかについて検討を行った。聴覚刺激間隔を, 全くランダムな状態から段階的に規則性を増加させた時, すなわち, 刺激間隔

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) で変動させたとき, 聴覚刺激により引き起こされる, GO/NO-GO 反応に対する刺激間隔の影響について検討を行った。

刺激間隔の規則性の増加とともに, 刺激に伴う, NO-GO 反応におけるベータ波帯域の非同期の時間が増加することが観測された。

(34) アスペルガー症候群小児における顔の表情認知処理機構—脳磁場計測による解析

木村育美, 久保田雅也, 広瀬宏之, 榎原洋一 (東京大学医学部附属病院・小児科)
湯本真人 (東京大学医学部附属病院・検査部)

アスペルガー症候群 (以下 AS) は自閉症スペクトラムの疾患群に含まれ, 対人関係の障害を中心とした基本

的性質は自閉症と共通するが比較的良好な言語発達において古典的自閉症とは臨床的に区別される一群である。

これまでの研究により人の顔の表情を認知する際健常群での腹側視覚経路；特に右紡錘状回(FG)の特異的活性化に対し AS 群では FG 以外の複数の部位の活性化が指摘されている。今回私達は 8 歳の AS 女児を対象に、正立および倒立の顔写真を用いた“笑顔”の選択課題を含むいくつかの Task を与えつつ脳磁場計測を行った。顔写真

を用いた課題でいずれも FG の活性化は認めず、正立の顔写真の課題にて背側視覚経路の活性化を認めた。表情の認知の問題は他人の心を理解する「心の理論」の問題と大きく関わるものであり、他の計測結果もあわせ若干の考察を加えて報告する。

(35) 運動順応の運動検出と V5 反応の効果

谷川昌司，外山敬介，荒川彰，梶原茂樹，吉田圭一，江島義道
(京都大学人間・環境学研究科，島津製作所)

運動検出と運動適応の座を同定するためにコヒーレンスを変数とするランダムドット運動刺激を被験者に呈示し、運動検出の精神物理学と MEG の同時計測を運動順応 (3 分間の順応刺激呈示) の前後に行った。MEG 計測には 201ch 全頭脳磁計(島津 SBI201)を用い、空間フィルタ法によって脳活動を計測した。順応前の対照実験

(n=3) では、運動検出と V5 反応は、運動刺激のコヒーレンスの減少と共に並行して減少 (20-40%) した。順応効果には方向選択性があり、順応刺激と同方向 (0 度) で運動検出と V5 反応の減少が最も強く (20%)、90-270 度で軽度の減少 (5-10%) があった。これらの実験結果は運動順応の座が V5 であることを示している。

(36) 顔パターン検出過程の脳磁図による検討

加藤隆，加藤元一郎 (東京歯科大学市川総合病院・精神神経科)
村松太郎 (慶應義塾大学・医学部)
新谷益朗 (東京歯科大学・口腔科学研究施設)

【目的】顔認識モデルでは、顔の弁別過程 (既知性判断) とそれより早期の処理である顔パターンの検出過程 (顔を顔として分類する) とを想定する仮説がある。今回、顔パターンの検出過程を検討した。

【方法】対象は正常成人 5 例。4 つの楕円と 4 つの長方形が配置された刺激を用いた。この図版では、楕円成分に注目した場合、4 つの楕円が全体として人の顔として見え、長方形成分に注目した場合には顔には見えない。こ

の 2 条件で 1-back task を施行した。Vector view whole head 306ch を用い、刺激提示は 500ms、刺激間隔は 3000ms で、200 回加算平均した。

【結果】楕円を顔としてみる条件で、後頭葉・側頭葉境界領域から右半球優位に潜時 120-140ms で誘発磁場成分が認められた。この反応はこれまで報告された顔弁別による応答より早期の反応であり、顔パターン検出過程を反映していると考えられた。

(37) Williams 症候群の神経生理学的研究

中村みほ^{1,2}，金桶吉起¹，渡邊一功³，柿木隆介¹

(¹ 国立共同研究機構・生理学研究所，² 愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所，³ 名古屋大学医学部・小児科)

Williams 症候群は心血管系の異常，特異な顔貌，精神発達遅滞などの症状を有する症候群で，認知能力のばら

つきが大きいという特徴がある。中でも，視覚認知においては，顔，色，などの認知に対し，視空間認知に劣る

ことから、背側経路の障害の関与が指摘されている。ただし、背側経路の機能のひとつである動きの認知については、一部の Williams 症候群患者においては心理物理実験で健常者と変わらない結果を示すものも報告されている。われわれは、典型的な視空間認知障害を示し、動きの刺激に対する心理物理的反応も健常者と変わらない、13才男性の Williams 症候群患者の協力のもと、

RDK(random dot kinematogram)による動きの刺激に対する反応を脳磁図を用いて検討した。その結果、健常成人とほぼ同様の潜時で、V5/MT 野に相当する部位に反応がえられた。これにより、本症候群における視空間認知障害は、背側経路の中でも動きの認知に関わる部分の障害によるものではなく、その他の部位の障害である可能性が示唆された。

(特別講演) MEG の新しい方法論：脳研究への適用

外山敬介 (島津基盤技術研究所顧問, 京都府立医科大学名誉教授)

PET, fMRI, MEG を用いたヒトの脳研究の進展ぶりには目を見張るばかりである。しかしながら、微小電極の世界から非侵襲的脳計測の世界に転入した新参者の私には、どの手法も脳研究に対する決定力を今ひとつ欠いている感をいぬめない。この問題を克服するための最も有力な手法として、fMRI の高空間分解と MEG の高時間分解能を結びつけることを模索してきたが、Wiener 推定によりそれをほぼ実現することができた。これまでに、fMRI と MEG を結びつける試みはいくつかなされてきたが、そのほとんどは fMRI で推定した脳活動部位の中心にダイポールを仮定して MEG のダイポール推定を行うなど、fMRI-MEG 結合の核心部分は研究者の恣意的処理

に依存していた。我々が開発した Wiener 推定法では、MRI 計測により被験者の脳ポリゴンモデルを作り (ポリゴン3角面に直交するダイポールを仮定)、fMRI により脳活動 (ダイポール活動) の地理的、統計的 (分散・共分散) 性質を知り、それを基礎にして MEG の逆問題 (脳のダイポール活動の時間経過) を解く。したがって、Wiener 推定が fMRI-MEG 結合と逆問題処理の数学的道具となっている。Wiener 推定では刺激前のベースライン活動からノイズを推定し、それをダイポール活動から差し引くので、ノイズが少ない利点もある。この手法を中心として、我々の研究室が開発したいいくつかの脳研究のための新しい非侵襲的計測の方法論についてお話したい。

14. 細胞内シグナルの時・空間的制御

2001 年 11 月 29 日－11 月 30 日

代表：黒崎 知博（関西医科大学・肝臓研究所）

世話人：河西 春郎（岡崎国立共同研究機構・生理学研究所）

（1）PI3K 活性化分子機構

黒崎 知博（関西医科大学・肝臓研究所・分子遺伝学部門）

（2）興奮性細胞におけるプロテインキナーゼ C の活性化機構と基質のリン酸化変動

最上 秀夫²，張 恵¹，小島 至¹

（¹群馬大学生体調節研究所・調節機構部門細胞調節分野 ²浜松医科大学・第2生理）

（3）GTP 結合タンパクによる伝達物質放出制御

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）

（4）シナプスから細胞骨格へのシグナリングの解析

尾藤 晴彦（京都大学大学院医学研究科・高次脳科学講座・神経細胞薬理学教室）

（5）樹状突起の局所カルシウムシグナルとシナプス可塑性

狩野 方伸¹，橋本 浩一¹，前島 隆司¹，吉田 隆行¹，宮田 麻理子²

（¹金沢大学・大学院医学系研究科・シナプス発達・機能学 ²東京女子医科大学・生理学第一講座）

（6）膵ランゲルハンス島のインスリン開口放出の2光子励起法による定量的可視化

高橋 倫子（生理学研究所・生体膜部門）

（7）GFP を利用した新規 ratiometric pH probe の開発

淡路 健雄¹，白川 英樹¹，宮崎 俊一^{1,2}

（¹東京女子医科大学・医学部・第二生理 ²生理学研究所・細胞内代謝）

（8）Multicolor Imaging

宮脇 敦史（理化学研究所・脳科学総合研究センター・細胞機能探索技術開発チーム）

（9）カルシウムシグナルのコーディング・デコーディング機構

飯野 正光（東京大学・大学院医学系研究科・細胞分子薬理学教室）

（10）ヒト培養気道上皮（16HBE）細胞における機械刺激後の細胞内 Ca²⁺シグナルの伝播

錦谷 まりこ¹，竹村 尚志¹，安岡 有紀子¹，鈴木 喜郎²，河原 克雅¹

（¹北里大学・医学部・生理学 ²東京工業大学・生命理工学部）

（11）虚血時における細胞内 Ca 濃度上昇，神経細胞死と Ca チャネル制御

田邊勉¹，鳥山英之^{1,2}，大野喜久郎²

（¹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, CREST ²同 脳神経機能外科学）

（12）プロトン（H⁺）シグナルの制御と細胞機能

久野 みゆき¹，森畑 宏一²，森 啓之³，川脇 順子¹，酒井 啓¹

（¹大阪市立大学・大学院医学研究科・分子細胞生理 ²大阪市立大学・大学院医学研究科・神経内科

³大阪市立大学・大学院医学研究科・分子細胞生理）

（13）PDZ 蛋白によるカリウムチャネルの位置および機能の制御

倉智 嘉久（大阪大学・大学院医学系研究科・情報伝達医学系情報薬理学講座・薬理学第2教室）

(14) 細胞の形づくりにおける時空間制御: SA チャネル, 接着斑, 細胞骨格

曾我部 正博^{1,2}, 早川 公英², 河上 敬介¹, 辰巳 仁史¹, 成瀬 恵治^{1,2}

(¹ 名古屋大学医学部・大学院医学研究科・細胞情報医学細胞科学講座

² 科学技術振興事業団・細胞力覚プロジェクト)

(15) TRP 関連 Ca チャネルのレドックス及び蛋白質輸送機構による活性制御

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・生命環境研究領域)

【参加者名】

飯野 正光, 山澤 徳志子, 山田 亜紀, 富田 太一郎, 水島 亜希子, 藤井 桃, 石井 清郎, 橋戸 政哉 (東京大学・大学院医学系研究科), 狩野 方伸 (金沢大学・大学院医学系研究科), 河西 春郎, 根本 知己, 高橋 倫子, 岸本 拓哉, 松崎 政紀, 劉 Ting-Ting, 早川 泰之, 小島 辰哉, 毛利 達磨, 重本隆一, 初山 明子, 深澤 有吾, 田中 淳一, 馬杉 美和子, 柳川 右千夫, 大倉 正道, 海老原 利枝 (岡崎国立共同研究機構・生理学研究所), 河原 克雅, 安岡 有紀子 (北里大学・医学部), 鈴木 喜郎 (東京工業大学・生命理工学研究科), 久野 みゆき, 森 啓之 (大阪市立大学・大学院医学研究科), 倉智 嘉久 (大阪大学・大学院医学系研究科), 黒崎 知博 (関西医科大学・肝臓研究所), 小島 至 (群

馬大学・生体調節研究所), 最上 秀夫 (浜松医科大学), 曾我部 正博 (名古屋大学・医学部), 高橋 智幸 (東京大学・大学院医学系研究科), 田邊 勉 (東京医科歯科大学・大学院認知行動医学系), 尾藤 晴彦 (京都大学・大学院医学研究科), 宮崎 俊一, 淡路 健雄, 尾田 正二 (東京女子医科大学・医学部), 吉田 繁 (長崎大学・医学部), 宮脇 敦史, 永井 健治, 水野 秀昭, 平野 雅彦, 片山 博幸, 日野 美紀, 小暮 貴子, 唐澤 智司 (理化学研究所・脳科学総合センター), 森 泰生, 西田 基宏, 原 雄二 (岡崎国立共同研究機構・統合バイオサイエンスセンター), 中川 哲彦, 新庄 勝浩, 谷口 嘉奈 (ファイザー製薬株式会社)

(1) PI3K 活性化分子機構

黒崎 知博 (関西医科大学・肝臓研究所 分子遺伝学部門)

B 細胞抗原受容体 (BCR) が抗原によりクロスリンクされると, 先ず最初に 3 種類のチロシンキナーゼ (PTK) ,Lyn,Syk,Btk が活性化され, エフェクター群にシグナルが伝達された後, 最終的に B 細胞の増殖, 分化, 活性化という B 細胞の運命が決定される。私たちは, PI3K-kinase(PI3K)が B 細胞の活性化に必須というデータに基づき BCR がいかなる分子機構で PI3K を活性化するのかという問題に焦点をあて解析を行ってきた。

その結果, PI3K 活性化には B 細胞特異的アダプター分子 BCAP が Syk によりリン酸化されることが必須であることを明らかにした。PI3K は p85 と p110 サブユニットから構成されているが, BCAP はリン酸化されることにより p85

サブユニットの SH2 ドメインと結合し, 結果 PI3K を細胞膜の内コレステロール含量の多い特殊な領域, GEM 分画にリクルートする。即ち BCAP は刺激依存性に, PI3K の基質である PIP2 が豊富に存在する GEM 分画に PI3K を移行させることにより, PI3K の活性化に寄与している。又, Rho family GTPases(Rac, Cdc42 等)をターゲットとする GEF 活性を有する Vav3 も PI3K 活性化に寄与することが明らかになった。Vav3 は BCAP とは異なり, PI3K のリクルートメントではなく, p85/p110 複合体の酵素活性を上昇させることにより, 結果 PI3K の活性化を誘起する。

(2) 興奮性細胞におけるプロテインキナーゼ C の活性化機構と基質のリン酸化変動

最上 秀夫², 張 恵¹, 小島 至¹

(¹群馬大学・生体調節研究所 調節機構部門細胞調節分野 ²浜松医科大学・第2生理)

Protein kinase C (PKC) plays a pivotal role in a myriad of cellular functions. The ten isoforms of PKC that have been identified so far are classified into three categories based on structural differences in the regulatory domain. The activation mechanisms of two distinct classes of PKC, conventional PKC (cPKC; PKC α) and novel PKC (nPKC; PKC θ) among them, have been examined by depolarization-evoked Ca^{2+} influx through voltage dependent Ca^{2+} channels. We monitored translocation of PKC α GFP and PKC θ GFP to the plasma membrane as a marker of PKC activity in INS-1 cells. The Ca^{2+} influx - induced translocations of PKC α GFP and PKC θ GFP differed in their kinetics. The PKC α transloca-

tion, which was synchronous with the Ca^{2+} spike induced by the depolarization, was rapid and reversible, whereas the PKC θ translocation was slow and sustained. We also measured the phosphorylation state of the PKC substrate, myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS), as a marker of PKC activity, by monitoring translocation of MARCKS -GFP with PKC α - DsRed. Translocation of MARCKS-GFP to the cytosol took place as soon as PKC α -DsRed translocated to the plasma membrane upon stimulation of Ca^{2+} influx. We have demonstrated that Ca^{2+} influx alone can activate cPKC as well as nPKC whose activation is structurally independent of Ca^{2+} .

(3) GTP 結合タンパク質による伝達物質放出制御)

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)

脳幹スライスの巨大シナプス the calyx of Held から Ca 電流をホールセル記録して神経終末端の G-protein による Ca 電流修飾作用を解析した。三量体 G-protein の $\beta\gamma$ サブユニットをシナプス前末端に注入すると Ca 電流が抑制され baclofen による Ca 電流抑制作用と衝突した。更に免疫組織化学染色は、この終末端に Go が存在し Gi が存在しないことを示した。神経終末端 GABA_B 受容体は Go $\beta\gamma$ による Ca 電流の抑制を介して伝達物質の放出を抑制すると結論される (Kajikawa Y. et al., 2001, *PNAS*

98, 8054)。

神経終末端 G-protein の主要な役割を知るため前末端に GDP, GTP アナログを注入して伝達効率を検討した。GDP $\beta\gamma$ S の投与によって EPSC の振幅は変化しなかったが、10Hz 刺激によるシナプス抑制が増大し、刺激後の回復時間が遷延した。一方 GTP γ S の投与は連続刺激後の回復をブロックした。神経終末端 G-protein はシナプス小胞の補給に重要と結論される (Takahashi T. et al. 2000, *Science* 289, 460)。

(4) シナプスから細胞骨格へのシグナリングの解析

尾藤晴彦 (京都大学・大学院医学研究科・神経細胞薬理)

脳の可塑性の根幹となるシナプス伝達効率の変化がいかなる分子機構によって長時間固定化されるかという点は謎につつまれている。我々はこ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いる。神経細胞の形態制御は、軸索伸展・ガイダンス、さらにはシナプス形成など、神経発生の種々の過程において必要とされる。また、成熟した神経回路網においても、神経活動依存性にシナプスの形態的特徴が修飾されたり、情報伝達

分子の局在が変化することが報告されている。このような空間的制御に関する事象の背景には、細胞膜や分子局在の非対称性を生み出す細胞骨格再編成が存在すると予想されているが、その詳細は明らかではない。

そこで我々は、中枢神経細胞の細胞骨格動態とそれを支持する情報伝達機構を解析する目的で、GFPとアクチン分子の融合蛋白を作製し、adenovirusを用いて神経細胞に導入し、生きたCA1/CA3海馬神経細胞で神経細胞の形態やアクチン細胞骨格を可視化する手法の開発を行った。

初代培養海馬神経細胞において、樹状突起上のGFP-actinの点状構造は部位によって異なった動きを示し、アクチン制御の多様性が示唆された。さらにGFP-actinは神経活動により速やかな分布の変化を示し、NMDA受容体を介した Ca^{2+} 流入と電位依存性 Ca^{2+} 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。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、細胞骨格再構築の分布が制御されている可能性を示唆している。

(5) 樹状突起の局所カルシウムシグナルとシナプス可塑性

狩野方伸¹, 橋本浩一¹, 前島隆司¹, 吉田隆行¹, 宮田麻理子²

(¹金沢大学・大学院医学系研究科・シナプス発達・機能学 ²東京女子医科大学・生理学第一講座)

シナプス伝達の修飾と可塑性の機構を明らかにするために、小脳プルキンエ細胞をモデルとして、樹状突起における局所カルシウムシグナルとシナプス可塑性誘発との関連について調べた。まず、運動学習の基盤のひとつと考えられている平行線維-プルキンエ細胞シナプスの長期抑圧(LTD)について調べた。遺伝子改変マウスを用いた一連の研究により、代謝型グルタミン酸受容体タイプ1(mGluR1)とその下流のシグナル伝達がプルキンエ細胞内で働くことがLTD誘発に必要なことを明らかにした。すなわち、mGluR1、三量体G蛋白Gqの α サブユニット($G\alpha_q$)、フォスホリパーゼC β 4(PLC β 4)のノックアウトマウスにおいて、LTDが欠如していることを見出した。また、プルキンエ細胞特異的プロモーターであるL7を用いてラットmGluR1 α をmGluR1ノックアウトマウスに導入したマウスでは、LTDがレスキューされた。さらに、私たちは、ミオシンVの異常によりプルキンエ細胞樹状突起スパインに滑面小胞体とIP3受容体が存在しない自然発生ミュータントラットおよびマウスを調べたところLTDが完全に欠如していることが判明した。これらの動物では、形態に異常は認められず、免

疫組織化学的検索からmGluR1の発現も正常であり、また基本的な電気生理学的性質も正常であった。さらに、プルキンエ細胞樹状突起には Ca^{2+} storeが存在し、そこからのIP3-induced Ca^{2+} release (IICR)はおこった。また、caged Ca^{2+} を用いてスパイン内で Ca^{2+} 遊離を起こすとLTDが誘発された。これらの結果は、mGluR1活性化に続き、プルキンエ細胞の樹状突起スパイン内部で局所的におこるIICRがLTD誘発に必須であることを示している。

さらに、私たちはプルキンエ細胞の脱分極による一過性 Ca^{2+} 濃度上昇によって引き起こされる興奮性および抑制性シナプス終末からの伝達物質放出の一過性抑圧を仲介する逆行性シグナルの実体を検索した。この現象は、グルタミン酸やGABAをはじめとするclassical neurotransmitterのブロッカーでは影響されず、カンナビノイドCB1受容体のアンタゴニストで消失した。また、この現象はCB1受容体ノックアウトマウスでは見られなかった。これらより、内因性カンナビノイドが逆行性シグナル伝達物質であると考えられた。

(6) 膵ランゲルハンス島のインスリン開口放出の2光子励起法による定量的可視化

高橋 倫子（岡崎国立共同研究機構 生理学研究所・細胞器官研究系・生体膜部門）

2光子励起顕微鏡法を用いてインスリン顆粒の生理的な開口放出過程を膵島標本で検出し、分泌の時・空間的特性を明らかにすると共に、融合細孔の動態を可視化解析する実験系を確立した。

開口放出を検出するために、マウスより膵島を単離し、水溶性蛍光色素で還流し、2光子励起断層画像を経時的に獲得した。膵島内部に網目状の脈管構造が観察された。高濃度ブドウ糖液で分泌刺激を与えると、細胞内カルシウム濃度の上昇時期に同期して、径 $0.4\mu\text{m}$ の点状蛍光像が多数出現するのを解像した。検出の頻度は細胞内 cAMP 濃度にも依存し、インスリン顆粒の開口放出を示すと考えられた。これらの現象の多くは脈管から離れた間質において観察された。さらに種々の分子量をもつ蛍光標識デキストランや、脂質膜を染色する FM 1-43 を同時に投与して検討した結果、半可逆的な融合細孔が数秒間にわたって形成され、径 1nm から 10nm まで順次開大

する時間経過が明らかになった。そして、融合細孔を構成する主たる成分が脂質であることが示唆された。融合した顆粒は、細孔の大きさが直径約 10nm に達すると顆粒膜は速やかに平坦化する。この平滑化により、細胞間質で優位に起きる分泌物の拡散が促進されると考えられる。

このように融合細孔の動態を明らかにするためには複数の蛍光色素を同時に励起して観察する必要があった。2光子励起法では内部遮蔽効果が回避され、かつ励起スペクトルが広がるため、上に述べたような同時二重染色を要する検討が初めて可能となった。今回の研究により、インスリンの分泌が膜脂質で主に構成された孔を通して起きることが示唆された。マウスのベータ細胞では融合細孔の持続が3秒と長いので、この構造の形成維持に関わる分子や微細形態機構を解明する系に適している。

(7) GFP を利用した新規 ratiometric pH probe の開発

淡路 健雄¹，白川 英樹¹，宮崎 俊一^{1,2}

(¹東京女子医科大学・医学部 第二生理

²岡崎国立共同研究機構・生理学研究所・分子生理研究系・細胞内代謝)

三量体 G 蛋白質共役型受容体はその刺激においてリン酸化を受けることにより細胞内へ移行することがインターナリゼーションとして知られている。この細胞内へ移行した受容体は、分解過程へ進むものと、脱リン酸化して再度細胞質膜へ移行して、再利用されるものの二つの過程が有ることが知られている。細胞内をアルカリ化する事により、細胞膜への再分布が阻害されることより、再分布には酸性脱リン酸化酵素が重要な働きをしているものと考えられている。しかし、三量体 G 蛋白質共役型受容体が本当に酸性環境下で脱リン酸化を受けているのかどうか、また本当に酸性環境下で脱リン酸化を受けているとしてもその時空間的情報は知られていない。

このような移動する蛋白の局在・移動とその存在する微少環境下の pH を測定するには、此までの古典的な細胞内 pH 測定法では不可能であった。この問題点を解決するため、GFP 変異体を細胞に導入し、細胞内 pH を測

定する試みが行われているが、現状では蛍光強度の変化として pH 変化を記録するため定量性に問題があり、局在が変化する場合には適応が困難であった。また受容体はその発現が少ないために明るい GFP 変異体を融合しなければ検出・局在の確認ができなのが現状である。今回我々は、定量性の問題点を解決するため H⁺感受性が異なり、励起波長は異なるが、蛍光波長がほぼ同一の GFP 変異体を組み合わせた蛍光比による pH 定量プローブを作成した。この新規 GFP プローブは、これまでの顕微カルシウム測定機器が利用可能であり、pKa がそれぞれ 6.1 と 6.8 と異なる pH 測定レンジを持つものが作成出来た。このプローブを利用することにより、空間分解能の問題点が解決可能な細胞内小器官選択的 pH 測定と、アドレナリン α_{1b} 受容体融合プローブを作成する事により、リガンド刺激による受容体の細胞内移行と受容体近傍微少環境 pH 同時ができたので報告する。

(8) Multi-color Imaging

宮脇敦史 (理化学研究所・脳科学総合研究センター・細胞機能探索技術開発チーム)

Ca^{2+} 動態の多様な制御機構, および他のシグナル伝達系との相互作用を解析するためには, Ca^{2+} 濃度の時空間的な変化とともに, その上流, 下流および他のカスケード動態とを同時に (同一の細胞で) 測定することが必要

である。そのために, どういう Multi-color Imaging の実験系を組むべきなのか。蛍光タンパク質をはじめとして色素の面から, また顕微鏡など光学的な面から考察を加えた。

(9) カルシウムシグナルのコーディング・デコーディング機構

飯野正光 (東京大学・医学系研究科・細胞分子薬理学教室)

多くの細胞内 Ca^{2+} シグナル機構に, IP_3 および IP_3 受容体が関与している。 IP_3 受容体を介する Ca^{2+} 放出の活性化には, IP_3 だけでは不十分で, 同時に至適濃度 $0.3 \mu\text{M}$ 前後の Ca^{2+} を必要とする。この Ca^{2+} 感受性が, IP_3 受容体の活性化にフィードバック制御をかけ, Ca^{2+} ウェーブ/オシレーションなどの Ca^{2+} シグナルパターン形成に関わると予想されていたが, 明確な証明は得られていなかった。我々は, IP_3 受容体サブタイプの全てを標的遺伝子相同組換えにより欠損させた DT40 細胞株に, 外因性 IP_3 受容体を発現させる発現実験系を確立した。さらにこの細胞に対して, Ca^{2+} ストア内 Ca^{2+} 濃度可視化法を応用することにより, IP_3 受容体の構造・機能相関を解析する方法を確立した。この発現実験系を用い, Ca^{2+} センサー部位を IP_3 受容体 (1 型) 分子上に同定した。 Ca^{2+} センサー機能を低下させたミュータント IP_3 受容体を発現する細胞において Ca^{2+} 動態を調べると, アゴニスト刺激に続く Ca^{2+} 濃

度上昇速度が著しく低下するとともに, その後にみられる Ca^{2+} オシレーションが完全に抑制された。以上の結果から, IP_3 受容体から放出された Ca^{2+} が, Ca^{2+} センサーを介してチャネル活性に正帰還をかける機構が, Ca^{2+} シグナルパターン形成に重要であることが実証された。

さらに, このようなカルシウムオシレーションがどのようにして細胞機能を制御するのか, 言い換えると, カルシウムオシレーションがどのようにデコーディングされるのかという機構も重要な問題である。我々は, カルシウム依存性脱リン酸化酵素カルシウニューリンによって, 核移行が制御される転写因子 NFAT の細胞内動態とカルシウムシグナルの関連を詳細に解析してきた。この結果, NFAT にはカルシウムシグナルを積分する機構が存在し, これがカルシウムオシレーションの頻度を検出して転写を調節していることが示唆された。

(10) ヒト培養気道上皮 (16HBE) 細胞における機械刺激後の細胞内 Ca^{2+} シグナルの伝播

錦谷まりこ¹, 竹村尚志¹, 安岡有紀子¹, 鈴木喜郎², 河原克雅¹

(¹北里大学・医学部・生理学, ²東京工業大学・生命理工学部)

ある細胞への機械的刺激は, 細胞間 (内経路, 外経路) のシグナル伝達によりその属する細胞集団に伝わる。細胞内 Ca^{2+} 濃度の時間的な変化を fluo-3 画像の解析によりもつて, 細胞外に放出される化学物質や gap junction の役割を調べた。ヒト気道上皮細胞 (16HBE) をカラーゲン塗布したカバーガラス上に培養し, 30-40 個の細胞集団

(subconfluent) になったところで (継代培養 2 日目), 細胞表面の pressing 実験に使用した。丸く加工した微小ガラス管の先端部 (径 $7-10 \mu\text{m}$) で細胞表面を軽く圧すると ($1-1.5 \text{ s}$), 細胞内 Ca^{2+} シグナルが細胞間およびコロニーを越えて伝播した。標準溶液での Ca^{2+} シグナル伝播速度と最大伝播距離は, $10.7 \pm 0.3 \mu\text{m/s}$ と $126 \pm 0.6 \mu\text{m}$

であった。細胞外液から Ca^{2+} を除去し (+5 mM EGTA), 同一の刺激を近傍の細胞に与えると, その伝播速度は $8.1 \pm 0.3 \mu\text{m/s}$ に低下し, 最大伝播距離は変化しなかった。細胞外 0Ca^{2+} の条件では, 機械刺激を受けた細胞の Ca^{2+} 濃度は増加しなかったが, 周囲の細胞には Ca^{2+} シグナルが伝播した。gap junction の阻害薬 GAPI (18 α -glycyrrhethinic acid, 10 μM) の存在で, 伝播速度は $8.9 \pm 0.2 \mu\text{m/s}$ に低下した。PLCI(U73122)と suramin は, 伝播速度を低下させなかったが, 最大伝播距離を有意に低下させた。これらの結果は, 16HBE 細胞は, 機械

的刺激に応じて何らかの化学物質を放出し, 単一細胞への刺激が複数細胞に伝えることを示す。しかし, 5 μM ATP 前投与は, 機械刺激後の Ca^{2+} シグナルの伝播を抑制しなかった。一方, 上記の実験結果は, gap junction を別のシグナルが伝播することも示唆した。まとめ, 16HBE 細胞における機械刺激後の細胞内 Ca^{2+} シグナルの伝播には, 独立した 2 経路が存在した。細胞外と内の 2 経路により伝達される 2 種類のシグナル伝播の速度がほぼ同レベルであることは, 同期することが必要な細胞集団のシグナル伝達にとって必須と考えられる。

(11) 虚血時における細胞内 Ca 濃度上昇, 神経細胞死と Ca チャネル制御

田邊勉¹, 鳥山英之^{1,2}, 大野喜久郎²

(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, CREST¹ 同 脳神経機能外科学²)

脳虚血時の神経細胞障害において, 細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が非常に重要な役割を担っていることが知られている。電位依存性 Ca^{2+} チャネルは, Ca^{2+} が細胞内に流入する経路の一つであり, 虚血神経細胞障害の病態に深く関わっていることが予想される。現在までに数種類の電位依存性 Ca^{2+} チャネルのサブタイプが同定されているが, これらの内, R タイプの Ca^{2+} 電流に寄与すると考えられている $\text{Ca}_v2.3$ チャネル (α_{1E} チャネル) の機能は, 特異的拮抗薬が長らく無かったため, 不明であった。今回, 我々は $\text{Ca}_v2.3$ チャネル遺伝子欠損マウスを用いて, 局所脳梗塞モデルと海馬スライスの Ca^{2+} イメージングの手法を適用することで, 虚血神経細胞障害における $\text{Ca}_v2.3$

チャネルの機能の解明を試みた。*in vivo* 局所脳梗塞モデルでは, 中大脳動脈閉塞後 24 時間の梗塞巣の大きさを比較したところ, 遺伝子欠損マウスの梗塞巣は野生型に比べ有意に大きかった。海馬スライスを用いた *in vitro* Ca^{2+} イメージングでは, 虚血様環境 (酸素・グルコース欠乏) により惹起される海馬 CA1 野の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は, 野生型に比べ遺伝子欠損マウスにおいて有意に増強されていた。以上の結果から, 虚血神経細胞障害の病態において, $\text{Ca}_v2.3$ チャネルは何らかの保護的な作用を有していることが推測され, 新たな脳虚血の治療法の可能性が示された。

(12) プロトン (H^+) シグナルの制御と細胞機能

久野みゆき, 森畑宏一, 森啓之, 酒井啓 (大阪市立大学・大学院医学研究科・分子細胞生理)

プロトンイオン(H^+)は, 細胞機能を調節する重要な因子であり, その濃度は通常狭い範囲にコントロールされているが, 膜電位依存性 H^+ チャネルは, 脱分極によって開口すると短時間に大量の H^+ を排出し細胞内外の pH 環境を瞬時に変えることができる。そこで私達は H^+ チャネルが細胞内外へプロトンシグナルを発信する機能を担うのではないかと考えている。 H^+ チャネルに見られる高い温度依存性 (high Q_{10}) はその分子機構に直結する特性と考えられており, 他のイオンチャネルと異なるユニークな

イオン透過機構が提唱される根拠のひとつとなっている。私達は, high Q_{10} が pH 勾配や cell swelling など細胞内外の要因によって影響を受けることから, 温度効果が H^+ チャネルの活性化状態によって左右されることを見出した。 H^+ チャネル活性は短期的・長期的に多様な調節を受けている。1–2 度の温度上昇がチャネル開口の引き金となる場合から, 温度変化が H^+ シグナルに殆ど影響を与えない場合まで, 温度による H^+ シグナルの制御が変動する状況が明らかになった。

(13) PDZ 蛋白による Kir チャネルの位置と機能の制御

倉智 嘉久 (大阪大学・大学院医学系研究科・情報伝達医学系情報薬理学講座)

内向き整流カリウム(Kir) チャネルは、そのサブユニットはが膜 2 回貫通型の構造をもち、イオン選択フィルターとチャネルポアからなるもっとも単純な構造のイオンチャネルの一つである。Kir チャネルは 4 つの subfamily からなり、それぞれの subfamily が(1)静止膜電位の形成 (Kir2.0) (2)膜受容体依存性の興奮抑制 (Kir3.0)(3)細胞内代謝と膜興奮の連関 (Kir6.0) (4)K⁺イ

オンの輸送 (Kir4.0, Kir5.1)という明確な細胞機能を担っている。Kir チャネルがこのような多彩な機能を担うには、他の蛋白による Kir チャネルの位置と機能の制御が役割を果たしている。最近までに我々の研究室であきらかになってきたいくつかのあたらしい蛋白-蛋白相互作用による Kir チャネルの制御に関して紹介したい。

(14) 細胞の形づくりにおける時空間制御：SA チャネル, 接着斑, 細胞骨格

曾我部正博^{1,2}, 早川公英², 河上敬介¹, 辰巳仁史¹, 成瀬恵治^{1,2}

(¹名古屋大学・医学部・大学院医学研究科 ²科学技術振興事業団・細胞力覚プロジェクト)

細胞には、内外の力で生じた変形に適応するように (e.g.応力最小) 形を変える能力がある。言い換えると、細胞は変形を感知してその情報を形に変換する。例えば不定型な培養内皮細胞は、一方向周期伸展刺激に応じて、血管内でみられるような伸展軸に垂直な紡錘形へと能動的に変形する。この仕組みを理解するには、変形感知から形態形成に至る信号の流れを理解しなければいけない。我々はこれまでに、SA チャネルから細胞内 Ca²⁺の上昇、

接着斑蛋白質のチロシン磷酸化を経てインテグリンの再分布に至る経路を明らかにしたが、これだけでは、方向感知と極性形成の仕組みを説明できない。そこで方向センサーの候補として、極性構造を持つ細胞骨格の役割について解析した。その結果、細胞骨格を通して伝わる機械刺激によってインテグリンの動態が修飾されることが分かり、細胞骨格/インテグリン系が方向センサーと極性形成装置になりうることが示唆された。

(15) TRP 関連 Ca チャネルのレドックス及び蛋白質輸送機構による活性制御

森 泰生 (国立共同研究機構・統合バイオサイエンスセンター・生命環境研究領域)

形質膜越えの Ca 流入は、細胞内 Ca イオン濃度の主要な調節機構の一つであると同時に、膜電位の脱分極を担うという生理的意義を有する。最近、Ca 流入経路としては、受容体活性化 Ca チャネル(Receptor-activated Ca channel)(RACC) 群が注目を集めている。RACC は TRP 遺伝子スーパーファミリーによってコードされているが、我々は PI 応答と関連し細胞内外の Ca やセカンドメッセンジャー群によってそれぞれがユニークな活性調節を受ける、7つの TRP Ca チャネル(TRP1-7)を見出した。これらのなかでも脳に豊富に発現している TRP5 は、細胞外 Ca 濃度の増減に対応して活性が制御される。細胞

外 Ca は低レベルながらも自発活性を有する TRP5 を透過し、Ca-calmodulin 依存性の myosin light chain kinase を活性化し、リン酸化により TRP5 を形質膜への挿入を維持すると考えられた。一方、TRP1 欠損 DT40 B 細胞を用いた結果より、TRP1 はストア依存性の Ca チャネル形成のみならず、ER からの IP3 受容体による Ca 放出をも調節し、Ca 振動の発生に寄与することが示された。即ち、TRP は細胞内膜系やタンパク質輸送系と密接に関連し活性が制御され、TRP 自身がそれを維持する分子構築の形成にも寄与すると思われる。

7つのいわゆる TRP ホモログに加え、数 10microM の

H₂O₂ 等, 活性酸素種(Reactive Oxygen Species)によって活性化開口する新規 Ca 透過型カチオンチャネル ROSC1 を同定した。本 ROSC1 チャネルの直接の活性化トリガーは, H₂O₂ 等の処理によって増加するニコチンアミドの結合と考えられる。また, 活性酸素種により惹起される細胞死を ROSC1 が仲介することが示唆された。さらに, ROSC1 チャネルだけでなく, TRP1-7 の活性制御にも活性酸素種による酸化が必要であることを見出した。こ

のように, 活性酸素種は TRP 関連チャネルの正常な活性維持にも深く関与しており, 細胞レドックス状態を感受して Ca シグナルに変換する TRP の生理学的意義が示唆された。TRP チャネル群の分子・機能的多様性は, 特定の神経機能の惹起に必要な, Ca シグナル及び膜電位変化の空間的・時間的パターン制御の重要な基盤であると考えられる。

15. 定量的高分解能電子顕微鏡法「三次元電子顕微鏡観察」

2001 年 12 月 5 日

代表・世話人：永山國昭（統合バイオサイエンスセンター）

所内対応者：永山國昭（統合バイオサイエンスセンター）

(1) 超高圧電子顕微鏡による三次元画像解析

有井達夫（生理研）

(2) 大脳皮質 GABA 細胞のシナプス構造

窪田 芳之，川口泰雄（生理研）

(3) 唾液分泌の 3 次元電子顕微鏡観察

村上政隆（生理研）

Alessandro Riva（Cagliari 大学医学部）

(4) A Novel Phase-contrast Transmission Electron Microscopy Producing High-contrast Topographic Images of Weak Objects

Radostin Danev，永山國昭（統合バイオサイエンスセンター）

(5) 電子線結晶学による高分解能膜蛋白質構造解析

光岡 薫（京都大学理学研究科）

(6) 新たな手法に基づく蛋白質複合体の 3 次元構造解析

片山 栄作，市瀬 紀彦（東京大学医科学研究所）

宮林 信治，高橋 透友，馬場 則男（工学院大学電気工学科）

(7) Electron Tomography for everyone

Auke van Balen（FEI）

(8) CT 法による TEM 像の 3 次元再構成ソフトウェア — アルゴリズムの改良とその応用 —

古河 弘光（日本電子システムテクノロジー（株））

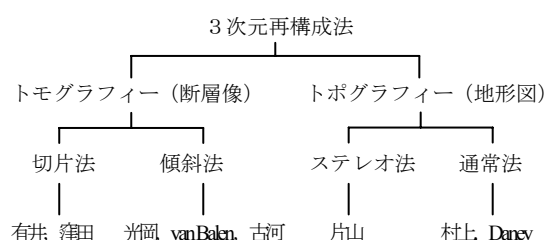
【参加者名】

西沢祐治（名古屋大大学院），林田 竜（名古屋大），林直子（名古屋大），宮津 基（名古屋大），熊切葉子（浜松医大），津山新一郎（鹿児島大），鈴木龍雄（信州大），金子康子（埼玉大），片桐展子（東京女子医大），村上政隆（生理研），蛭薙観順（名古屋大博物館），富田 亮（藤田保健衛生大），有井達夫（生理研），樋田一徳（徳島大），柿林博司（日立中研），西岡秀夫（日本電子），山田直子（カリフォルニア大），村田 隆（基生研），古河弘光（日本電子システムテクノロジー），明坂年隆（朝日大学），田中 収（日立バイテクノロジーズ），清水美代子（日本電子システムテクノロジー），中澤英子（日立サイエンスシステムズ），長沖 功（日立ハイテクノロジーズ），鷹岡昭夫（大阪大超高圧電顕センター），石塚和夫（HREM），平田由紀子（日本 FEI），渡辺泰輝（日本 FEI），佐藤泰彦（日本電子），石原陽介（花市電子顕微鏡技術研究所），矢

武皓一（日立ハイテクノロジーズ），前田英三（名古屋大），高橋透友（名古屋大），宮林信治（名古屋大），藺田知秀（国際基督教大），森島美絵子（大阪大），柳川右千夫（生理研），金子兼一（生理研），及川哲夫（日本電子），金関恵（生理研），鐘ヶ江有宜（大阪大），松田哲明（大阪大），伊藤嘉邦（生理研），丹司敬義（名古屋大），大砂 哲（東北大），寺崎 治（東北大），劉 崢（東北大），根本知己（生理研），酒井雅弘（分子研），岸本拓哉（生理研），松本友治（生理研），新美 元（藤田保健衛生大），田中 稔（名古屋大機器センター），奥谷家充（日立ハイテクノロジーズ），藤田芸彦（日本電子），伊藤正樹（佐賀医科大），臼田信光（藤田保健衛生大），亀谷清和（信州大学），佐原紀行（松本歯科大），重本隆一（生理研），田中信夫（名古屋大），臼倉治郎（名古屋大）

【概要】

電子顕微鏡の画像は2次元画像である。ただし透過型と走査型では得られる画像情報が異なり、前者は対象物の(z方向)投影2次元像、後者は対象物のトポグラフィー(地形図)である。これらの画像から対象物の3次元的情報を得る方法について議論した。8人の演者による講演を顕微鏡における3次元再構成法の一般論から分類すると以下のようになる。



特に日本が世界からおくれをとっている傾斜法トモグラフィー(ラドン変換を用いる手法)について集中的な議論がなされた。医学、生物学への応用において電子顕微鏡3次元再構成法全般にわたっての議論はこれまでほとんど行われなかったため多数の参加があった。参加者にとってこの分野の全体を俯瞰できる良い機会であるとともに将来の方向についての見通し(トモグラフィーとトポグラフィーの使い分け)が得られたと思う。

(1) 超高圧電子顕微鏡による三次元画像解析

有井達夫(生理研)

超高圧電子顕微鏡は、試料に対して電子線の透過能が高く色収差による像のぼけも少なくなるので厚い試料(〜5 μ m)でも比較的高い解像度(〜15nm: 1,000kV)で観察することができ、生体の生理機能を解明する際に有効な手段となる。結像に用いている電子線は開き角が狭いので、適当な倍率では、切片内の構造はほとんどぼけることなく結像している。そこで試料を傾斜させて撮影した2枚の写真($\pm\theta^\circ$)を立体視することにより3次元的な形態を明瞭に識別することができる。この目的には、試料を傾斜しても視野中心が対物レンズに対して変化しないようにすることが可能なZコントロール機構を持つサイドエントリー傾斜台が、不可欠である。

そこで、生理学研究所に1982年3月末に、超高圧電子顕微鏡の医学生物学分野への応用を目的として、 ± 45 度

(現在は ± 60 度)の傾斜機能を持つサイドエントリー傾斜台を備えた超高圧電子顕微鏡(H-1250M型)が、日立製作所の協力を得て導入された。最高印加電圧1,250kV(常用1,000kV)という高エネルギーの電子線を用いて細胞の超微細形態を観察する大型装置(高さ8m, 重さ17t)である。特に、立体像観察が容易に行える点に特徴を持っている。2001年現在においても、3台のイオンポンプと5台のターボモレキュラーポンプを使用してのクリーンでドライな真空(試料位置で $\sim 7 \times 10^{-6}$ Pa)を実現している。この装置により撮影された傾斜像を三次元解析するに当たってのハード面からの特徴を述べるとともに、立体像解析法および電子線トモグラフィー法による厚い生物試料に対する三次元微細構造の解析の応用例を示す。

(2) 大脳皮質 GABA 細胞のシナプス構造

窪田芳之, 川口泰雄(生理研)

大脳皮質は高次脳機能の座として、我々の行動の根幹をなしていることが広く知られている。しかし、大脳皮

質の局所微細神経回路がどのように働いているのかほとんど知られていない。私達は、その機能的構築を理解

するために、非錐体細胞のサブタイプそれぞれのシナプスの構造を検討し解析したので報告する。fast-spiking細胞とダブルブーケ細胞の神経終末のターゲットは、主に樹状突起、わずかに棘突起、細胞体であったが、マルチノッティ細胞と late-spiking -ニューログリアフォーム細胞は、より細い樹状突起と棘突起の頭部、細胞体であっ

た。これらの棘突起頭部には、ほとんどの場合別の非対称性神経終末が入力していた。上記4種類の非錐体細胞の神経終末が形成するシナプス結合部位の面積は、シナプスを受ける樹状突起・棘突起の周径や体積に比例して増加したが、その比例係数はサブグループで異なっていた。

(3) 唾液分泌の3次元電子顕微鏡観察

村上政隆 (生理研)

Alessandro Riva (Cagliari 大学医学部)

腺房細胞における分泌界面は二つの細胞間に存在する分泌細管 IC であり、正確な情報を得るためには、走査型電子顕微鏡観察による三次元観察が必要である。耳下腺の血管灌流標本を用い、透過・走査電子顕微鏡をにて、IC と周辺微細構造を分泌経過にそって観察した。ムスカリン受容体刺激では IC 周辺の rER の拡張, mitochondria 電子密度増加, まばらな開口放出像, microvilli 減少, IC の初期一過性拡大を観察した。βアドレナリン性受容体を同時に刺激すると、IC に多くの開口分泌がみられ、そ

の周辺にさらに分泌顆粒が開口分泌する像が観察された。また microvilli は消失し、IC 周辺の rER の拡張, mitochondria 電子密度増加も同時に観測された。分泌活動時の rER の拡張は細胞内 Ca 代謝と, mitochondria 電子密度増加はエネルギー代謝増加と関連づけられた。また、開口分泌像の増加は管腔膜面積の増大を示すが、同じ刺激条件下で水分分泌の促進は観察できず、管腔への水輸送経路について検討した。

(4) Difference-contrast Transmission Electron Microscopy—A Novel Topographic Imaging with TEM

Radostin Danev, 永山國昭 (統合バイオサイエンスセンター)

Phase object imaging with conventional TEM (CTEM) is severely impaired by the inherent sine phase contrast transfer function (CTF). We present a newly developed type of phase contrast for TEM utilizing a half-plane thin film phase plate - Difference-Contrast (DC). The image formation mechanism is similar to that of the Differential Interference Contrast (DIC) in light microscopy but is achieved through a novel approach. Images acquired using Difference-contrast TEM (DTEM) show pseudo-topographic representation of the object and demonstrate higher overall contrast compared to CTEM. Contrast transfer theory for the DTEM is presented.

The phase information is transferred through a CTF with consine envelope and odd character in direction normal to the edge of the phase plate. Simple reconstruction procedure is proposed removing the odd part of the CTF and giving as a result Phase-contrast TEM (PTEM) type images. Reconstructed DTEM image and CTEM image of the same sample area could be used as input pair for complex reconstruction of the object wave.

Various practical problems and limitations in the application of DC were discussed.

(5) 電子線結晶学による高分解能膜蛋白質構造解析

光岡 薫（京都大学院理学研究科）

いくつかの膜蛋白質は容易に二次元結晶を形成するのが知られており、電子線結晶解析を用いて原子レベルの分解能で構造を決定することができる。そこで、ここでは電子線結晶解析の現状を簡単に紹介する。まず、最初に二次元結晶を作成するが、その結晶の振る舞いは結晶中の膜蛋白質の相互作用により二種類に分けることができる。次に、その二次元結晶から電子回折図形と電子顕微鏡像の解析を行う。電子顕微鏡像は結晶の歪みの補正

が必要であり、そのため比較的複雑な画像解析を行うが、その過程も最近の計算機の進歩により非常に高速になってきている。最後に、解析されたデータを用いて原子モデルの作成と最適化を行うが、そこでは二次元結晶特有の注意が必要である。以上のような過程を経て、良い二次元結晶さえ得られれば、水分子を観測できるような高分解能でX線結晶解析とほとんど同じモデルを得ることができる。

(6) 新たな手法に基づく蛋白質複合体の3次元構造解析

片山 栄作，市瀬 紀彦（東京大学医科学研究所）

宮林 信治，高橋透友，馬場 則男（工学院大学電気工学科）

急速凍結ディープエッチ・レプリカ電子顕微鏡法によれば、溶液中や細胞内で起きるさまざまな生命現象を瞬時に固定し、現象に携わる蛋白質の構造を高分解能で観察できる。われわれは、そのような試料の連続傾斜像からコンピュータ画像処理を用いて対象の3次元構造を解析するための一連の手法を新たに開発し、分子モーター蛋白質の作動メカニズムの解明に応用してきた。本方法の特長は、個々の蛋白質分子表面の凹凸プロファイルを

一切の平均化なしに捉えられることであり、それらの3次元再構成あるいは既存の構造モデルとの比較により、分子内で起きている微細な構造変化を推定する事も可能である。本講演では、アクトミオシン系の構造変化の解析を例として、『1 分子生理学』と『構造生物学』との有機的結合を目指すそれら新手法の概要を示す。また本方法を、細胞内の多種類の蛋白質の構造を一挙に捉える『構造ゲノミクス』の手段とする試みを紹介する。

(7) Electron Tomography for Everyone

Auke van Balen (FEI)

Electron tomography is versatile method for obtaining three-dimensional images with a Transmission Electron Microscope. The principle is relatively simple: take a number of projection images from the sample at various tilt angles, do a 2D Fast Fourier Transform of each image. The transformed images are used to construct a 3D volume in Fourier space, from which the image of the sample can be computed by performing an inverse 3D Fast Fourier Transform. The fact that an object can be reconstructed uniquely from its

projections is known as the Radon's theorem, dating back as far as 1917. In practice, things are usually far less simple than in theory. A painstaking attention to details has to be given to be able to apply this method correctly with actual instruments in order to obtain scientifically significant results. Until very recent, only a handful of top institutes in the world were sufficiently equipped to successfully do this. Modern Transmission Electron Microscopes like FEI's Technical are completely computer controlled, making it possible to

perform all corrections and adjustments automatically. Due to the increase of precision in the specimen stages far less corrections related to mechanical imperfections need to be applied than was the case on older generation of instruments.

It means that electron tomography, once regarded with awe as an art in itself, is nowadays becoming well within the reach of every researcher interested in the 3D structure of his samples.

(8) CT 法による TEM 像の 3 次元再構成ソフトウェア – アルゴリズムの改良とその応用 –

古河 弘光, 清水美代子 (日本電子システムテクノロジー)

本年 春, 我々は市販アプリケーションとして 初の CT 法による電子顕微鏡像の 3 次元再構成システムを製品として発表した。その後, 本システム を使って各分野における試料の 3 次元再構築を試みたところ, 試料の作成法

や撮影に関する多くの知見を得ることができた。また, いくつかの問題を確認するに至り, 本システムの運用技法の確立と最適な 3 次元像を得るための補正アルゴリズムの開発を行ってきた。その報告を行う。

16. シナプス形成・維持のダイナミクスと分子機序

2001 年 12 月 5 日－12 月 6 日

代表・世話人：尾藤晴彦（京都大学大学院医学研究科）

所内対応者：小幡邦彦（生理学研究所）

(1) 2 光子励起顕微鏡を用いたグルタミン酸受容体の機能的マッピング

松崎政紀（生理学研究所）

(2) 海馬シナプスにおける NMDA 受容体のサブユニット構成

伊藤 功（九州大学大学院理学研究院）

(3) 神経細胞膜における 1 分子イメージング：軸索イニシャルセグメント膜の拡散障壁の形成機構

中田千枝子（名古屋大学大学院理学研究科）

(4) SDS-FRL 法によるシナプス膜蛋白の可視化と定量的解析

馬杉美和子（生理学研究所）

(5) Songbird キンカチョウ中枢神経系の分子マッピング

和多和宏（東京医科歯科大学難治疾患研究所）

(6) 光量子を介した標的遺伝子の時空間特異的発現制御と機能解析

安藤秀樹（理化学研究所脳科学総合研究センター）

【参加者名】

尾藤晴彦（京都大学大学院医学研究科）、伊藤 功（九州大学大学院理学研究院）、岡部繁男、萩原正敏、黒柳秀人、栗生俊彦、壺岐純子（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科）、和多和宏（東京医科歯科大学難治疾患研究所）、安藤秀樹、岡本 仁、原野淳子、田中めぐみ（理化学研究所脳科学総合センター）、武内恒成、中田千枝子、渡辺紀信（名古屋大学大学院理学研究科）、白尾智明、伊藤 真（群馬大学医学部）、山本亘彦、小田洋一、中山貴美子、白木千津子、小橋常彦、上阪直史、山崎信介、大波壮一郎（大阪大学大学院基礎工学研究科）、玉巻伸章（京都大学大学院医学研究科）、狩野方伸（金沢大学大学院医学研究科）、丸山 敬、斎藤祐見子、川村勇樹、手塚満恵、李 月（埼玉医科大学）、竹居光太郎（東邦大学医学部）、富樫和也（三重大学医学部）、神谷温之、志牟田美佐（神戸大学大学院医学研究科）、山田麻紀、池谷裕二、小山裕太（東京

大学大学院薬学研究科）、渡部文子、鈴木えみ子（東京大学医科学研究所）、中嶋隆浩（東京大学大学院理学研究科）、清末和之（産業技術総合研究所）、五嶋良郎（横浜市立大学医学部）、鈴木 香、大塩立華（名古屋大学医学部）、小泉美佳（杏林大学医学部）、講内 毅、鈴木大祐（浜松ホトニクス）北川純一（オリンパス光学）、古川智洋、渡辺裕一、井田和徳（オリンパスプロマーケティング）、我謝徳一（ファイザー製薬中央研究所）、俵田真紀（KAN 研究所）、惣谷和広、森島美絵子、小原圭吾（大阪大学医学部）、柳原 大（豊橋技術科学大学）、河西春郎、高橋倫子、根本知巳、岸本拓哉、松崎政紀、重本隆一、初山明子、馬杉美和子、深沢有吾、Wu Yue、岡村康司、高木佐知子、小幡邦彦、柳川右千夫、山肩葉子、兼子幸一、季 鳳雲、山中 創、常川直子、海老原利枝（生理学研究所）

【概要】

脳神経系の機能は、神経回路が構築され、神経細胞間で情報の交換を絶えず繰り返すことにより成立する。近年の研究努力により、神経細胞は分裂停止後、予定された領域へ移動し、軸索ならびに樹状突起の伸展・成熟を

経て、機能的なシナプスを形成し始め、やがて神経回路網が出来上がることが理解されるようになってきた。また、いったん形成されたシナプスも、神経活動により絶えず修飾されながら維持されていることが明らかになっ

ている。一方において、個々のステップは、多彩な情報伝達分子群が、神経細胞内の多数のローカスで同時並行的に引き起こす複数のカスケードにより制御されていることも徐々に理解されてきた。したがって、この一連の分子機構を詳細に検討するためには、分子生物学、生化学、生理学、解剖学、細胞生物学、遺伝学、システム脳科学など異なる分野の人材の協同による multidisciplinary なアプローチとその統合が必要となっている。本研究会では、「シナプス形成・維持のダイナミクスと分子機序」

というテーマに焦点を絞り、広く多分野の研究者を集め、情報交換と交流を図ることを目的とする。すなわち、「シナプスグルタミン酸受容体の最前線」、「神経細胞における膜分子の動態可視化」、「モデル動物における神経回路網形成」の3つの課題において研究発表および討論をする。その討議のプロセスにより、解決可能な新規の問題点を洗い出し、今後の cross-disciplinary な研究のシーズを見いだすことを目指す。

(1) 2 光子励起顕微鏡を用いたグルタミン酸受容体の機能的マッピング

松崎政紀, 河西春郎 (生理学研究所生体膜部門)

樹状突起スパインは、中枢神経細胞における興奮性シナプス結合の主たる入力部位である。我々は、2 光子吸収断面積が大きく、水溶液中で安定な新規のケイジドグルタミン酸を開発し、2 光子励起法を用いグルタメイトの反応を単一スパインレベルで測定するシステムを構築した。これを用い、ラット海馬のスライス標本にて、ホールセルクランプした CA1 錐体細胞の樹状突起に沿って3次元的にグルタミン酸感受性マッピングを行った。グルタミン酸感受性はスパインの体積に強く相関し (相関係数 0.80 ± 0.07 , 9 細胞), キノコ型の大きな頭部を持つスパインでは強く、細いスパインや細長いフィロポディアでは反応がないか、弱い反応しか得られなかった。この

結果はいわゆる「サイレントシナプス」が後者の形態をもったスパインである可能性を示唆している。キノコ型スパインにおいて非定常ノイズ解析を行うと、AMPA の数は単一スパインあたり最大で約 150 個 (46-147 個, $n=8$) 存在することが判明した。一方、グルタミン酸感受性及び形態 (体積) の空間的な自己相関を求めると、距離にして $1 \mu m$ 以下の隣接したスパイン間においても両者共に相関が無かった。これらの結果は、スパインの形態と機能的 AMPAR の発現は強く相関しており、その機能的発現量は高いダイナミックレンジ (7bits) を持ちながら、単一スパインレベルで独立に調節されていることを示している。

(2) 海馬シナプスにおける NMDA 受容体のサブユニット構成

伊藤 功 (九州大学大学院理学院)

最近我々は、海馬交連を脳の正中において切断したマウス (Ventral Hippocampal Commissure Transected mouse; VHCT マウス) から数日後に海馬スライスを作成することにより、反対側海馬からの交連線維 (Commissural fiber; Com) を含まない海馬スライスを得る方法を開発した。VHCT マウスから調整した海馬スライスにおいては、シャファー側副枝 (Sch) を選択的に刺激することが可能で、Sch-CA1 錐体細胞シナプスの NMDA 受容体応答に対する NR2A サブユニットのノックアウト効果、および

NR2B サブユニット選択的阻害剤による抑制効果、等を左右の海馬で比較解析した。その結果、Sch-CA1 シナプスには NR2A/NR2B サブユニットの構成比において異なる2種類の NMDA 受容体が左右非対称に存在していると考えられる結果を得た。また、通常のマウスと VHCT マウスを比較することにより、Com-CA1 シナプスの NMDA 受容体は、サブユニット構成において Sch-CA1 シナプスとは逆の左右非対称性を持つことが推定された。脳の高次機能における Laterality の存在が知られてい

るが、それを生み出す分子機構に関しては全く明らかに
なっていない。我々の結果が、Laterality の形成とその発

達の分子機構に関して、重要な手がかりとなることを期
待したい。

(3) 神経細胞膜における 1 分子イメージング：軸索イニシャルセグメント膜の拡散障壁の形成機構

中田千枝子（名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻）

神経細胞の、細胞体/樹状突起と軸索という領域におけ
る機能的な分化は、極性のある形態や分子の局在によっ
て保たれている。細胞膜において分子の局在を維持する
ためには、軸索起始部（軸索の最も細胞体側、イニシャ
ルセグメント、IS）の細胞膜に、細胞膜分子が拡散によっ
て混合するのを妨げる仕組みが必要不可欠である。この
ような拡散障壁の存在と作動機構を検討するため、我々
は培養海馬細胞を用い、不飽和リン脂質（DOPE）の運
動を、1 分子レベルで調べた。この結果、拡散障壁は(1)
脂質に対しても機能し、(2) IS の細胞膜に発達段階依存
的に、形成されることがわかった。また、拡散障壁の形

成は、膜骨格分子（アンキリン G）と膜骨格結合型の膜
タンパク質（電位依存性 Na⁺チャネル）の IS 膜での密度
増加と並行しておこることがわかった。これは、我々が
拡散の遅延の機構として提案している anchored-protein
picket model を考慮すると、IS の膜骨格上に、発達に伴
い膜タンパク質群が密に集積することにより、細胞膜内
に拡散障壁が築かれることを示唆する。また、diI（C12,
C16）の挙動については、diI は拡散障壁に影響されず、
極めて速い拡散を示すことがわかった。これは diI が細
胞膜内と膜/水溶液の境界間に分配しながら拡散するこ
とを示唆する。

(4) SDS-FRL 法によるシナプス膜蛋白の可視化と定量的解析

馬杉美和子^{1,2}, 藤本 和^{2,3}, 足澤悦子^{1,2}, 重本隆一^{1,2}

(¹ 生理学研究所・脳形態解析 ²CREST ³ 福井県立大学・生体機能構造学)

シナプス受容体とシナプスの位置関係の解析には、連
続超薄切片で膜表面を再構築する必要がある。
SDS-Freeze Fracture Replica Labeling (SDS-FRL)法は、膜上
分子が Replica に固定された状態で SDS 変性を受けるの
で、immunoblot とほぼ同じ抗原抗体反応が起こることが
予想され、適応できる抗体が多く応用範囲が広い。

抗 GluRδ2 抗体を用いてラット小脳の SDS-FRL を行う
と、膜内粒子の凝集と一致して GluRδ2 のラベリングが
観察された。Adult rat では Purkinje 細胞の膜内粒子の凝
集のうち、特に大型のものに一致して GluR1-4 のラベ
リングが見られた。しかし、postnatal day3 ラットの

Purkinje 細胞シナプスでは、ラベリングはやはり膜内粒
子の凝集と一致するものの、非常に均一であり Adult で
見られたような compartmentalization は認められない。さ
らに、免疫系でラフトのマーカーであるコレラトキシン
を用いた GM1 のラベリングは、主に E 面に多いが、顆
粒細胞においては E 面だけでなく P 面にも強い発現が観
察された。

このように SDS-FRL 法は膜上分子の分布状態を二次
元的に可視化でき、固定の難しさから今までアプローチ
が難しかった脂質についても高解像度の観察が出来、ま
た非常に高率で定量性のあるラベリングが可能である。

(5) Songbirds キンカチョウ中枢神経系の分子マッピング

和多和宏 (東京医科歯科大学難治疾患研究所形質発現分野)

坂口博信 (獨協医科大学医学部生理)

Erich D Jarvis (Duke University Department of Neurobiology)

萩原正敏 (東京医科歯科大学難治疾患研究所形質発現分野)

動物行動学の知見から, vocal learning は3種のほ乳類; ヒト, クジラ/イルカ, コウモリと3種の鳥類; songbird 鳴禽類, hummingbird ハチドリ, parrot オウムにのみ認められる学習であると考えられる。鳥類とヒトの言語学習における vocal learning には多くの共通点が存在する。1) 学習臨界期を有する。2) 他個体からの音声鋳型の提示を必要とする。3) 正確な発声のために聴覚 feedback が重要である。4) 社会的環境による影響を受ける。

解剖学的, 電気生理学的に songbirds においては「song system」と呼ばれる vocal learning, production に関わる神

経回路が明らかにされてきた。しかしこれを支える分子基盤については不明である。そこで我々は, ヒトの vocal (言語) learning 理解のため, songbirds の song system を比較神経回路モデルとして用い, 分子レベルでの神経回路基盤を探究できるのではないかと考えた。songbirds brain からクローニングした19の glutamate receptor subunit (NMDA, AMPA, KA, metabotropic types) は, song system を構成する種々の細胞群において各々 特異的な発現パターンを示した。さらに今後の展望も含め, 併せて発表させていただきたい。

(6) 光量子を介した標的遺伝子の時空間特異的発現制御と機能解析

安藤秀樹 (理化学研究所脳科学総合研究センター発生遺伝子制御研究チーム)

我々はゼブラフィッシュ胚で光量子エネルギーを介した時空間特異的な遺伝子発現誘導法を紹介する。本法は新しく, また簡便な技術で標的遺伝子のコンディショナルな発現を可能にした。新規合成ケージド化合物 6-bromo-4-diazomethyl-7-hydroxycoumarin (Bhc-diazo) は RNA や DNA の糖-リン酸基骨格のリン酸基にケージングとよばれるプロセスを経て結合する。Bhc-diazo は RNA 1kb あたり約30箇所のリン酸基に結合し翻訳を阻害する。結合した Bhc は瞬間的な紫外線(350-365nm)照射により効率的に解離し(アンケージング) 翻訳可能なメッセンジャーRNAに戻す。in vitro 翻訳活性を調べた結果, ケー

ジド GFPmRNA は著しく翻訳活性を阻害されていたが, 紫外線照射されたアンケージド RNA は部分的に翻訳を再開した。またケージド RNA は胚内で安定に維持されていた。ケージド mRNA を1細胞期に注入された胚では, 発生のある時期に紫外線照射部位に特異的に標的遺伝子が発現していた。また, 転写因子 Engrailed2a の mRNA を本法により頭部だけに過剰発現させた胚では眼の欠失と終脳・間脳の顕著な形成阻害および中脳の形成促進が顕著であった。このことは Engrailed2a が従来知られていた間脳形成のみならず終脳形成をも抑制することを示した初めての例である。

17. 生体分子ダイナミクス及びプリオン機構

2002 年 2 月 6 日－2 月 8 日

代表・世話人：桑田一夫（岐阜大学医学部生理学）

所内対応者：永山國昭（統合バイオサイエンスセンター）

- (1) 異常型プリオン蛋白質特異的抗体は作製可能か？

堀内 基広（帯広畜産大学原虫病研究センター）

- (2) プリオン病－新しいプレイヤーの同定の試みと治療法開発に向けて－

金子 清俊（国立精神・神経センター神経研究所）

- (3) プリオン病の構造生物学と創薬

桑田 一夫（岐阜大学医学部生理学）

- (4) アミロイド凝集，不定形凝集，及びクロスリンク凝集

今野 卓（福井医科大学・生理学）

- (5) アミロイド線維伸長反応のマクロ及びミクロスコピックな解析

浜田 大三（大阪大学・蛋白質研究所）

- (6) 高圧 NMR による蛋白質の新しいダイナミクス像

赤坂 一之（立命館大学理工学部理研播磨研究所）

- (7) バイオナノテクノロジー

猪飼 篤（東京工業大学生命理工学研究科）

- (8) 相転移を利用した DNA 分子の操作

水野 彰（豊橋技術科学大学）

- (9) 情報伝達蛋白質の細胞内ダイナミクス

佐甲 靖志（大阪大学大学院医学系研究科）

- (10) シャペロニン機能と，mRNA の核内運動の 1 分子蛍光イメージング

船津 高志（早稲田大学理工学部）

- (11) セミインタクト細胞系と GFP 可視化技術を用いた細胞内オルガネラダイナミクスの研究

村田 昌之（統合バイオサイエンスセンター）

- (12) 蛋白質の遅い構造ゆらぎ

石井 由晴（科学技術振興事業団 1 分子過程プロジェクト）

- (13) 天然構造長時間ダイナミクス再現に向けた計算機実験

高野 光則（東京大学総合文化研究科）

- (14) 蛋白質フォールディングのダイナミクス異常拡散と階層的規則性

松永 康佑，小松 民樹（神戸大学理学部）

- (15) Energy landscape of a peptide, cut from a distal β -hairpin of SH3 domain, including random-coil, β -hairpin, and α -helix, and pathways among the conformations

Kazuyoshi Ikeda and Junichi Higo（東京薬科学）

- (16) 水の揺らぎと反応；水は如何に凍るか，反応の方向性と揺らぎを如何に観測できるか？

大峯 巖（名古屋大学）

- (17) タンパク質のダイナミクス・データベースの構築

輪湖 博（早稲田大学社会科学部）

猿渡 茂（北里大学理学部）

(18) 複雑系としての生命論理

金子 邦彦 (東京大学・総合文科研究科)

(19) Electrostatic free energy calculation of solvent ion transfer from outside to inside cavity of wild type and mutant horse L ferritin

Takuya Takahashi (計算科学研究センター, 岡崎)

(20) 分子ポンプの方向性を決めるもの (副題) 蛋白質はやわらかいかかたいか?

神取秀樹 (名古屋工業大学)

(21) 蛋白質の振動エネルギー移動: 蛋白質の非線形ダイナミクス解析への試み

木寺 詔紀 (横浜市立大学大学院総合理科学研究科)

(22) 赤外領域における非線形分光法の展開

富永圭介 (神戸大分子フォトサイエンス研究センター)

(23) CO 結合型ミオグロビンにおけるヘム振動エネルギー緩和

長岡 正隆 (名古屋大学)

(24) 蛋白質の時間分解エネルギー・構造変化

寺嶋 正秀 (京都大学理学研究科)

(25) ヘムタンパク質のリガンド結合部位の構造揺らぎ

水谷泰久 (神戸大学分子フォトサイエンス研究センター)

【参加者名】

鎌足雄司 (理研播磨), 佐伯政俊 (東京理科大), 北原亮 (神戸大), 小松崎民樹 (神戸大), 中村寛則 (名古屋大), 堀内基広 (帯広畜産大), 北尾彰朗 (原子力研), 八谷如美 (精神・神経研), 渡辺光太 (精神・神経研), 逆瀬川裕二 (精神・神経研), 金子清俊 (精神・神経研), 城地保昌 (横浜市大), 木寺詔紀 (横浜市大), 濱田大三 (阪大蛋白研), 桑田一夫 (岐阜大), 森次圭 (横浜市大), 石井由晴 (科技団・1分子プロジェクト), 手島圭三 (広島大), 中村周吾 (東京大), 関嶋政和 (東京大), 松本友治 (生理研), 川上勝 (神戸大), 船津高志 (早稲田大), 水谷泰久 (神戸大), 占部久子 (東京家政大), 肥後順一 (東京薬科大), 池田和由 (東京薬科大), 山本晃司 (神戸大), 恵良聖一 (岐阜大), 赤坂一之 (立命館大), 中岡太之 (阪大蛋白研), 輪湖博 (早稲田大), 佐甲靖志 (阪大), 村田

昌之 (統合バイオ), 加納ふみ (京都大), 田中亜路 (京都大), 今野卓 (福井医大), 内田毅 (分子研), 長岡正隆 (名古屋大院), 北川禎三 (分子研), 高橋卓也 (計算科学センター), 小久保裕功 (分子研), 榮慶丈 (分子研), 池口満徳 (横浜市大), 太田雄大 (統合バイオ), 松永康佑 (神戸大), 猪飼篤 (東京工業大), 岡田興昌 (富士ゼロックス (株)), 松浦俊一 (豊橋技科大), 中野通彦 (豊橋技科大), 古牧卓也 (豊橋技科大), 神取秀樹 (名工大), 桂進司 (豊橋技科大), 永山国昭 (統合バイオ), 水野彰 (豊橋技科大), 佐々木尚 (名古屋大), 金子邦彦 (東京大), 桧山武史 (基生研), 古明地勇人 (産総研), 猿渡茂 (北里大), 高野光則 (東京大), 寺嶋正秀 (京都大), Aneliya Zdravkova (統合バイオ), 大峰巖 (名古屋大), 村田克美 (分子研), 富永圭介 (神戸大)

【概要】

細胞の生理機能は, チャンネル, レセプター, 細胞内情報伝達系等の蛋白質によって主に担われている。多くの蛋白質の「静的構造」は X 線回折, NMR, 電子顕微鏡等の技術の発展により, 明らかにされつつある。しかし, 「静的」な平均構造からその機能を推定出来るかどうか必ずしも明らかではない。即ち, 生理機能は構造の時間的変化とカップルしており, 自然な状態での蛋白質のダイ

ナミクスを理解しなければ, その機能を真に理解することは出来ない。ここに蛋白質のダイナミクスを研究する目的がある。特に, プリオンの病原性機構は, 共有結合 (化学結合) 構造には変化がなく, 3 次元立体構造のみの変化であると考えられているため, その病的機能の理解及び治療法の開発には, 蛋白質ダイナミクス研究が鍵となる。

本研究会においては「プリオン機構」(2月6日午後), 「1分子計測/1細胞計測」(2月7日午前), 「実験及び計算機シミュレーション」(2月7日午後~2月8日午後), と大きく三つのテーマに分けて研究発表がなされ, それぞれの観点から相互に活発な議論が行われた。まず, 抗プリオン抗体の開発状況, プリオン病の予防・治療法開発, Virtual Ligand Screening によるプリオン病治療薬の開発状況について最新の報告があった。さらに, アミロイド凝集のメカニズム, アミロイド凝集過程の1分子測定, 更に最新の高圧 NMR 測定による新しい蛋白質ダイナミクス像に関する報告があり, プリオン機構の観点からも多くの議論が行われた。2日目は, 原子間力顕微鏡を用

いた蛋白質のナノ力学, DNA 操作, 1分子/1細胞測定に関する最新のデータが示され, 活発な議論が行われた。2日目の午後から3日目にかけて, 蛋白質の長時間ダイナミクスや遅い揺らぎに関する理論及び計算機シミュレーションの進展, 多量子分光学の方法論的發展等が紹介された。全体として, 「蛋白質の機能や病原性に関わるメカニズムを分子の構造や動きから詳細に解き明かし, これらを通じて新しい科学技術分野の創出, 及び予防・治療法の開発を目指す」, という目的に沿い最新の研究成果発表とそれに続く活発な議論が3日間に渡って行われた。

(1) 異常型プリオン蛋白質特異的抗体は作製可能か?

堀内 基広 (帯広畜産大学原虫病研究センター)

正常な動物の組織には正常型プリオン蛋白質 PrP^{C} が存在する。 PrP^{C} は特に中枢神経系組織で発現が高い。一方, プリオン病に罹患した動物の中枢神経系組織では PrP^{C} とその病原性構造異性体である PrP^{Sc} が共存する。 PrP^{Sc} は細胞膜上に発現した成熟型 PrP^{C} から構造転換を含む何らかの翻訳後修飾により産生されると考えられている。 PrP^{C} と PrP^{Sc} は宿主遺伝子 PrP にコードされる蛋白質であることから, その一次構造は同じである。現在プリオン病の確定診断に用いられている PrP^{Sc} 検出法は, 1) 被検試料から蛋白質分解酵素処理により PrP^{C} を除去, 2) 変性剤処理による PrP^{Sc} 凝集体の解離および変性, 3) 抗 PrP 抗体(pan- PrP 抗体)による変性 PrP^{Sc} の検出, の3段階から構成される。 PrP^{Sc} 凝集体は pan- PrP 抗体が認識するエピトープを分子表面に露出していないためにエピトープを露出させるための変性剤処理が必要であり, また, pan- PrP 抗体は PrP^{C} と変性 PrP^{Sc} を識別することはできないことから, PrP^{C} 除去操作が必須である。これまでに作

製された抗 PrP 抗体はほとんどが pan- PrP 抗体の範疇に属する。 PrP^{C} と PrP^{Sc} は高次構造に違いがあることから, pan- PrP 抗体とは異なり, PrP^{Sc} 特異的な高次構造を認識する抗体が作製可能ではないかと考えられてきた。 PrP^{Sc} 特異的抗体は新規プリオン病診断技術の開発に応用が期待されており, また, 依然未解明の部分が多い PrP^{Sc} の性状解析にも非常に有用な道具となり得る。1997年に Korth らは大腸菌で発現した組み換え牛 PrP を PrP 欠損マウスに免疫して, PrP^{Sc} 特異的抗体(mAb 15B3)が得られたことを報告し注目を集めた。しかしその後, mAb 15B3を用いた研究の進展は報告されていない。我々は PrP^{Sc} 特異的抗体の作製を目的として, スクレイピー感染マウスから高度に精製した感染性を有する PrP^{Sc} 画分を PrP 欠損マウスに免疫して, PrP^{Sc} 特異的抗体の作製を行っている。そこで, これまでに得られた成績と, PrP^{Sc} 特異的抗体がプリオン病の研究進展にどのように寄与するのかについて議論したい。

(2) プリオン病——新しいプレイヤーの同定の試みと治療法開発に向けて——

金子 清俊 (国立精神神経センター神経研究所)

平成 13 年 9 月 11 日に千葉県で日本初の牛海綿状脳症 (以下 BSE) に罹患した乳牛が発見され, 日本中に BSE に対する懸念が広がっている。その一因は, 英国における変異型 CJD (variant CJD) と呼称される人のプリオン病が, BSE に由来すると考えられている事に起因する。残念ながら, vCJD を含むプリオン病は, 現時点では有効な治療法がなく 100% 致死性の疾患であるといわざるを得ない。本会では, プリオン病の治療の開発の現状を中心にまとめさせていただく。治療法開発の戦略として, 我々は, (1) 感染型プリオンの元となる正常型プリオンを分解する方法, (2) ドミナントネガティブ効果

を有する防御型プリオン蛋白の利用, (3) 抗プリオン抗体の応用, を試みている。これらの戦略には, プリオン蛋白分解酵素や, 分子シャペロン様の機能を有する分子としてその存在が想定されている X 因子の同定が密接に絡む。「プリオン」という造語が誕生して以来 20 年が経過したが, これらを含めたプリオン蛋白関連分子は, 未だ一つも同定されていないといっても過言ではない。「もうそろそろ新しいプレイヤーが同定されなければ」との思いを抱くのは, 私どもだけではないであろう。

(3) プリオン病の構造生物学と創薬

桑田 一夫 (岐阜大学医学部生理学)

正常型プリオンの NMR 立体構造は, ハムスター (shPrP), マウス (mPrP), ウシ (bPrP), ヒト (hPrP) で明らかにされた。これらの立体構造は微妙な差はあるものの, グローバルなフォールドはほぼ共通している。実際これらの構造は, ほとんど重なり合う。従って, このような静的な NMR 立体構造を眺めるだけで, 正常から異常への変換機構や種間障壁を理解できるかどうか, 今のところははっきりしない。プリオン立体構造変化に関する研究

では, 低 pH, 尿素やグアニジン塩酸等の変性剤の存在下を用いた二次構造測定が行われ, 平衡状態での中間体が観測されている。我々は, 高圧 NMR 法を用いて中間体の構造を世界で初めて残基レベルで特徴付けた。更にこのような励起状態をターゲットにして Virtual Ligand Screening を行い, 励起構造にのみ親和性の高い Ligand を探索し, プリオン病治療薬の開発を試みた。

(4) アミロイド凝集, 不定形凝集, 及びクロスリンク凝集

今野 卓 (福井医科大学生理学)

生体内環境における蛋白質分子は, 種々タイプの分子凝集過程を容易に実現する。周知のごとく, この凝集過程が生理・病理現象を構成する基本的要素の一つであるという認識が, 近年の生命科学研究の多くを積極的に動機づけている。本件では特に次の可能性に注目する。すなわち, 複雑な生体溶液系では複数タイプの蛋白質凝集過程が同時進行的に誘起され, それらが互いに促進もし

くは抑制等の過程間相互作用を示しうるという点である。ここでは, 異種タイプの凝集過程間の相互依存に関わる物理化学的特性を一般的視点より明らかにする研究の手がかりとなる具体的ケースを, いくつか例示し, 異種凝集タイプ間の相互作用を描写するスキームのプロトタイプをも, 幾つか示したい。具体的内容は以下の 3 件に分かれる。

- 1) 単一種の蛋白質が実現する複数の異なるタイプの凝集過程の例示
- 2) アミロイド凝集体が不定形凝集過程を誘起する場合の例示
- 3) クロスリンク凝集と不定形凝集過程の間の競合が存在

在する場合の例示

ちなみに、本件で扱うような複合的な凝集現象を全てを包括する体系的視点とその生理・病理的意義を確立することが、今後の課題として想定される。

(5) アミロイド線維伸長反応のマクロ及びミクロスコピックな解析

浜田 大三（大阪大学蛋白質研究所）

いくつかの蛋白質は、変性しアミロイド線維へと自己組織化する。アミロイド線維に関する研究は、医学のみならず、蛋白質（ナノ）工学的にも重要である。マクロ及びミクロスコピックな系において、この反応過程を速度論的に解析することは、その形成メカニズム知るための重要な知見を与える。

アミロイド形成過程には、前駆体形成、核形成、線維伸長、線維切断などの段階があると考えられる。このような複雑なモデルを用いた場合、質・量ともに限られたマクロ条件下で得たデータを、正確に解析することは不可能に近い。

アミロイド形成反応をチオフラビンTなどで観察した場合、その変化は、シグモイド曲線で描かれる。これは拡張指数型関数($y = y_{\infty} + \Delta y \exp(-(k_{sp} t)^{\gamma})$; $\gamma > 1$) によ

り、近似することができる。

ウシ・ β ラクトグロブリンの尿素存在下における線維形成について、上記の式を用いて解析した結果、以下のことが明らかになった。

- 1) 自発的及び、核存在下での伸長速度は、尿素変性の midpoint で最も速い。
- 2) 線維に取り込まれる蛋白質の量は、みかけの伸長速度定数 k_{sp} に比例する。
- 3) 天然状態の安定化により、線維形成が抑制される。

また、ミクロスコピックな解析の取り組みとして、エヴァネッセント場分子蛍光顕微鏡による、線維伸長反応の観察結果を行った。この実験により、個々の線維はそれぞれに固有の速さで伸長することが、示唆された。

(6) 高圧 NMR による蛋白質の新しいダイナミックス像

赤坂 一之（立命館大学理工学部理研播磨研究所）

生理条件下での蛋白質は、本来、多重構造をもっている。それらは、互いにわずかな自由エネルギー差ながら、一方的なポピュレーション差をつくり出すには十分であるため、“非”天然の構造は、常に“天然構造”の後ろに隠れたままである。様々な蛋白質の基底状態構造を蛋白質構造の“横軸”とすれば、それぞれの蛋白質の自由エネルギーの異なる構造は、その“縦軸”である。しかし、細胞内の蛋白質は、常に全構造空間を渡り歩いており、むしろ基底状態である天然構造以外のところから必要な反応が起こる可能性がある。

これまで、蛋白質の構造を、この縦軸に沿って解析する一般的な実験方法がなく、われわれの基底構造以外の

蛋白質構造についての知識は限られているばかりでなく、蛋白質の概念そのものが、非常に間違っものとなっているかも知れない。自由エネルギーの異なる蛋白質の様々な構造を分離観測するのに適した方法は、それらの間の体積差を利用するオンラインセル方式の高圧 NMR 法である。圧力を変えることにより、体積軸で多様な構造を分け、できればそれぞれに対して二次元（多次元）NMR の高い空間分解能による構造解析を行う点が特徴である。

これらの実験は、広い構造空間で揺れ動く、新しいダイナミックな蛋白質像を与えてくれる。

(7) バイオナノテクノロジー

猪飼 篤 (東京工業大学生命理工学研究科)

タンパク質や DNA の単一分子に触って動かす技術が開発されて以来、バイオナノテクノロジーに対する期待が高まっている。DNA を操作することはとりもなおさず生命機能の変換を正確な機械的操作で行うことが可能となることを告げている。DNA 操作により機能を変換された細胞はその後の分裂を通じて新しい機能をもつ子孫を無限に殖やして行くことができる。タンパク質の場合はその力学特性の測定により将来の分子ナノマシン設計への展望を開いてくれる。バネ仕掛け、時計仕掛けの分子

機械が人間の体内で動作するという夢のような話が数十年後には実現する可能性がある。これがバイオナノテクノロジーの一面である。一方、細胞に目を向けるとこれも単一細胞レベルでの疾病診断やタンパク質の機能解析のために、単一細胞の各部位から高い時間分解を持つ方法により mRNA やタンパク質の発現状況を調べるシングルセルプロテオミクス法が開発されつつ現状を報告する。

(8) 相転移を利用した DNA—分子の操作

水野 彰 (豊橋技術科学大学)

ポストゲノムの時代を迎え、遺伝情報による新薬の開発や、個人の遺伝情報を病気診断や予防に使うことが一層進むものと考えられる。このためには今まで以上に高速の解析手段の実用化が期待されている。また、たんぱく質との相互作用の解析を進めることで、生命活動の解明も一層進展するものと期待される。特に DNA 分子に対して、1 分子の操作とサブミクロン領域に化学反応場を局在化する制御が可能となれば、ゲノム DNA 塩基配列の高速解析技術、1 分子レベルでの転写・複製反応の動態解析などの分野で新しいアプリケーションが拓けることが期待できる。また、一分子あるいは極微量のサンプルを用い、微小反応装置で解析を行うことは、反応速度の向上につながる。これは、反応は拡散速度で規定されるため、微小反応装置ではきわめて早く分子同士の会合が起こるためである。

筆者らのグループでは、染色体 DNA1 分子を、グロービュール化相転移を用いて損傷なく輸送し、逆の相転移を用いて基板上に直線状に伸長させるなど、形態や位置を制御する技術開発を静電気力とレーザートラッピングを用いて進めている。また、伸張固定した DNA1 分子に蛍光色素ラベルした制限酵素を結合させ制限酵素地図を作成すること、レーザーなどを用いて局所的に切断し、断片を回収し PCR 増幅するなどの、1 分子を対象とする加工および反応操作技術の開発を行っている。油中に直径 10 ミクロン程度の液滴を作り、この液滴に DNA 分子の断片や PCR に必要な酵素などを入れることで、極めて小さい反応体積で化学反応を行う系を作成し、未知配列の DNA 切断断片を PCR により増幅できることを確認した。これらの 1 分子を対象とした操作法ならびに分子加工・反応操作について紹介をさせていただく。

(9) 情報伝達蛋白質の細胞内ダイナミクス

佐甲 靖志 (大阪大学大学院医学系研究科)

我々は、従来の全反射型の近接場蛍光顕微鏡を用いた水溶液中での蛍光 1 分子観察法を発展させ、生きている細胞で、細胞膜分子を 1 分子可視化する方法を開発した。

1 分子計測では、分子の振る舞いを、集団の時間・空間平均に邪魔されることなく、ひとつひとつ測定できるため、測定結果の解釈はより確実であり、分子機構が考え

易くなるなどの利点がある。

我々はこの方法で、細胞増殖信号を受容する細胞膜の上皮成長因子(EGF)受容体と、その下流で働く情報蛋白質分子 Ras の細胞内挙動を 1 分子計測した。EGF に対する応答は、細胞当たり 100 分子程度の反応で開始される。EGF 受容体は細胞膜上でクラスターを作っており、これが情報伝達反応の開始点として働いている。一方で受容体分子は熱ゆらぎで細胞膜上を拡散運動している。EGF の結合によって少数の受容体分子が活性化されると、分

子はこの組織化と運動性を利用して EGF の結合していない受容体を活性化していくことができ、EGF 分子の情報は増幅される。Ras とその効果器である Raf1 分子との認識反応も動的であり、しかも、細胞内で局所に限定して起こる。局所に集合した活性化分子は、膜上あるいは細胞質と膜の間でたえず入れ替わっている。このように、情報分子の反応はダイナミックであり、しかも細胞内で時間的・空間的に制御されている。

(10) シャペロニン機能と、mRNA の核内運動の 1 分子蛍光イメージング

船津 高志（早稲田大学理工学部）

ゲノムの塩基配列が決められ、次の目標として残ったのは、実際に発現している遺伝子は何か。その遺伝子産物（主にタンパク質）は、何時どの細胞でどのように発現しているのか。そして機能は何かという問題である。1 分子蛍光イメージング法は、これらの問題を明らかにするための基盤技術を提供すると期待されている。本講演では、1 分子蛍光イメージング法による *in vitro* の研究例

として、タンパク質分子間相互作用（シャペロニンによるタンパク質の折り畳み）のイメージングを紹介し、*in vivo* の研究例として、生きた細胞の核内で mRNA がどのように運動しているかを解析した例を紹介する。さらに、1 分子蛍光イメージング法が、どのようにポストゲノム研究に展開するかを展望する。

(11) セミインタクト細胞系と GFP 可視化技術を用いた細胞内オルガネラダイナミクスの研究

村田 昌之（統合バイオサイエンスセンター）

われわれは、細胞の極性及びオルガネラの形態形成とその維持機構を、細胞内小胞輸送ネットワークを介するタンパク質・脂質の細胞内ターゲティングの分子メカニズム研究として捉え、その制御機構の解明を目指している。本シンポジウムでは、特に哺乳動物細胞のゴルジ体及び小胞体（ER）ネットワークの細胞周期依存的な形態変化と両オルガネラ間の小胞輸送過程のダイナミクスとのカップリングの分子メカニズムについてのわれわれの最近の知見を紹介する。われわれは、まず、ゴルジ体及び ER に局在化するタンパク質（ガラクトシルトランスフェラーゼ及び HSP47）の GFP 融合タンパク質を用い、それぞれのオルガネラを可視化した。次に、細胞膜を部

分的に透過性にしたセミインタクト細胞系と GFP 可視化技術をカップルさせた顕微アッセイシステムを用い、間期及びM期のゴルジ体・ER それぞれの形態変化、ER とゴルジ体間輸送過程を顕微鏡下の単一のセミインタクト培養細胞内で再構成し、形態変化や輸送過程に必要な因子の生化学的な解析と輸送キネティクスの定量的解析を行った。その結果、M期には *cdc2* キナーゼによって制御されるゴルジ体の崩壊、ER ネットとワークの部分的切断、ER からゴルジ体への順行輸送過程の選択的停止などが協奏的に起こり、細胞分裂時のオルガネラの娘細胞への均等分配が旨く説明できることを明らかにした。

(12) 蛋白質の遅い構造ゆらぎ

石井 由晴 (科学技術振興事業団 1 分子過程プロジェクト)

タンパク質はアミノ酸配列が決まれば、その挙動は唯一に決まるものと考えられてきた。例えば3次元構造は一つに決まり、その構造をとるフォールディングの仕方も一つに決まっているものと、想像していた。またタンパク質の機能は、そのユニークな構造が変化することにより、機械論的に決まると考えられてきた。しかしタンパク質がナノメートルの大きさを持ち、周囲の水分子から常に熱運動の揺らぎにさらされていることや、熱エネルギーと大差ない入力エネルギーを使って機能していることを考えると、これまでのタンパク質像を見直して見る必要がある。事実、タンパク質の多重構造や機能の多様性が示唆され、その分子機構に興味を持たれている。

タンパク質の多重構造や動的な構造変化を計測するには、従来の非常に多数の分子の集合からの平均値の計測では、平均値に隠れて計測できない。そこで1分子からの信号を直接計測することにより蛋白質分子の動的挙動

を観察した。蛋白質1分子の動的構造変化は、蛋白質の特定の部位に蛍光色素を導入し、その蛍光スペクトルの変化や、蛍光エネルギー移動効率の変化を計測した。

その結果、1分子の構造を直接モニターすることにより、タンパク質には同時に複数の形態をとりうることを、そしてそれら異なった形態の間を、秒あるいはサブ秒というゆっくりした時間オーダーで転移しうることが示された。これはタンパク質が局所平衡に対応するいくつかの準安定な状態を取って、その間のエネルギー障壁を越えて転移していることを反映しているものと思われる。このようなタンパク質の動的な挙動は、機能を考えるときに非常に重要であるように思われる。機能の観察と動的構造変化を結びつけながら計測することが重要であり、1分子計測で直接そのカップリングを決定することを目指している。

(13) 天然構造長時間ダイナミクス再現に向けた計算機実験

高野 光則 (東京大学総合文化研究科)

蛋白質分子の天然構造近傍の構造変化ダイナミクスが分子機能を説明するのに必須である系は多い。構造変化ダイナミクス・分子機能の詳細に探りを入れるのに計算機実験は有効な手段の一つである。しかし、全原子モデルと呼ばれる高精度モデルではマイクロ秒の計算が限界で、ミリ秒オーダーの現象を扱うことは難しい。

高精度全原子モデルの代わりに時空間精度を落とした粗視化モデルを用いることは一つの有望な策である。むしろ忠実性という点では粗視化は不利だが、カバーできる時間空間スケール拡大のメリットは大きい。重要なのは、粗視化で何が失われ何が保存されるかである。本研

究では、BPTI, RNaseT1等の小型蛋白質について、全原子モデルと粗視化モデルそれぞれで計算機実験を行い、観測される分子運動様式の比較を行った。主成分解析によって特徴づけられた運動様式を比較すると、大きな揺らぎを示す主成分軸の「方向」に関して、全原子モデルと粗視化モデルとの間に高い類似性が見出されることが分かった。このことは、天然構造ダイナミクスの重要な指標の一つである協調的分子運動の方向性が、モデルの詳細に依存しないロバストな物性であることを示しており、同時に、それが分子形状でほぼ決まっていることを示唆している。

(14) 蛋白質フォールディングのダイナミクス異常拡散と階層的規則性

松永 康佑, 小松崎 民樹 (神戸大学理学部)

蛋白質の折れ畳みの「ダイナミクス」において発見された異常拡散は、効率良く折れ畳む、蛋白質の折れ畳みダイナミクスは進化過程で獲得されたファネル型エネルギー地形上を単なる“確率過程”として緩和する描像では捉えきれないことを提言している。本講演では、“ランダム”な時系列から規則構造を取り出す埋め込み論、有限サイズリャブノフ解析などの手法を用いて、Thirumalai らの 46 バネービーズモデルなどの折れ畳みシミュレーション (Berendsen による等温 MD) で得られる時系列を解析する。ここでは、主成分解析と埋め込み

論を併用し、揺らぎの大きい 10 数自由度の埋め込み次元 (運動がランダムであればあるほど、系を構成する全自由度の総数に漸近する) が相対的に低く、かつ転移温度では他の温度領域のそれに比べて顕著に小さく、転移温度領域のダイナミクスは力学的な規則性を保有する傾向にあることを示し、それが García と Hummer による酸化チトクローム c の水溶液中の蛋白質ダイナミクスの異常拡散に対する理論的解釈を与えることに相当することを紹介する。

(15) Energy landscape of a peptide, cut from a distal β -hairpin of SH3 domain, including random-coil, β -hairpin, and α -helix, and pathways among the conformations

Kazuyoshi Ikeda and Junichi Higo (東京薬科大学)

We studied the energy landscape of a peptide [Ace-Ala-His-Ser-Leu-Thr-Thr-Gly-Gln-Thr-Nme] with multicanonical MD simulation. This peptide sequence was derived from the 45'th to 53'th residues of the src SH3 domain. The conformation of the sequence in the SH3 domain is a β -hairpin. The peptide was confined to a water sphere.

The obtained energy landscape was separated into some clusters of well-structured conformations as well as random ones. The probabilities of existence for each conformation at

300 K were 8% for the β -hairpin, 18% for the α -helix, and 68% for the random-coil. The current work showed that the peptide has a potential tendency to α -helix conformations, although it takes the β -hairpin in the whole protein. In this study, the pathways for the structural changes among those conformations were discussed. And a possible pathway for the whole protein folding of the SH3 domain was also proposed with investigating the energy landscape.

(16) 水の揺らぎと反応；水は如何に凍るか、反応の方向性と揺らぎを如何に観測できるか？

大峯 巖 (名古屋大学)

我々は、6 年間かけ世界で初めてシミュレーションによる純水の結晶化に成功した。非常に長時間のシミュレーションを行い、長い導入時間の後、結晶核が急速に生じることを見つけた。初期核の生成機構や、氷化にかかわる大域的ポテンシャルエネルギー面が漏斗型をしていることなどを見つけた。また水の氷化に対するポテンシャルエネルギー面の大域的性質が局所的に漏斗型

(Local Funnel Structure) をしていることを見つけた。始めの過冷却の状態、いわゆる氷化の導入部では、長寿命の水素結合の生成消滅が時々刻々繰り返されており、ある時間帯にはそれが大きく成長するが空間的に散った状態であり、すぐに消滅してしまう。このような時間帯は間欠的に現れる。この間欠性はいわゆるフラストレート・システムの特徴である。この様な導入部が続いた後、あ

る瞬間にいくつかの長寿命の水素結合が局所的に集まり初期核を形成する。その初期核は水素結合を交代させながら場所を移動し、その直後から急速に結晶的構造化が

進む。この過程はいわゆる「単純な核成長過程」ではなく、ここでも水の構造変化の基本である集団性が現れる。

(17) タンパク質のダイナミクス・データベースの構築

輪湖 博 (早稲田大学社会科学部)

猿渡 茂 (北里大学理学部)

タンパク質のダイナミクスに関する計算手法には、基準振動解析、分子動力学、モンテカルロ・シミュレーションなどがある。分子動力学やモンテカルロ・シミュレーションは、基準振動解析に比べ、より大きなゆらぎを取り扱うことができるが、その分長時間の計算が必要である。したがって、データベースを作ることを目的として、さまざまなタンパク質について網羅的に計算を行うことは、現時点では実現性に乏しいと言わざるを得ない。一方基準振動解析も、エネルギー極小化の過程で長時間の計算を必要とするが、分子動力学やモンテカルロ・シミュレーションに比較すれば、相当数のタンパク

質について計算を実行し、データベースに結果を蓄積することが可能と思われる。データベースとしての利用価値の一つは、量が質を凌駕する、というように、多くのデータが収集されることによって初めて得られる創発的な知見への期待であり、分子動力学やモンテカルロ・シミュレーションに比べ基準振動解析の近似の程度は悪いという欠点があるにしても、相当数のタンパク質について計算が実行できることの意義は大きいであろう。こうしたことを踏まえ、PDBに登録されたタンパク質について基準振動解析を行い、その結果を順次データベースとして公開していきたいと思っている。

(18) 複雑系としての生命論理

金子 邦彦 (東京大学総合文科研究科)

生命システムを内部のダイナミクスと相互作用が拮抗する増殖系の示す普遍的現象として捉え、発生過程、進化を議論する。理想化した細胞系として、内部での化学反応、細胞間相互作用、そして分裂からなる力学系を考える。その系の普遍的な性質として、多様な細胞のもととなる「幹細胞」から決まったタイプしか作れない細胞

へと至る細胞分化過程があらわれる。この結果をふまえ、発生過程の安定性と不可逆性を熱力学と対比して議論する。ついで、この力学系的分化の考えを進化に適用し、相互作用による表現型の分化が遺伝型へ固定されるといふ、種分化の考えを提示する。最後に、このような複雑系生命科学の立場での細胞生物学の実験について触れる。

(19) Electrostatic free energy calculation of solvent ion transfer from outside to inside cavity of wild type and mutant horse L ferritin

Takuya Takahashi (計算科学研究センター, 岡崎)

A ferritin is an iron storage protein that has an 80 Å diameter cavity inside and is composed of 24 subunits which assembled with cubic symmetry. The electrostatic free energy

changes of transferring divalent and monovalent cations from outside to cavity in wild type and mutant horse L ferritin molecules were calculated at neutral pH region by solving the

Poisson equation in the channel region and the Poisson-Boltzman equation in solvent region with finite difference method. The molecule has two types of channels connecting outside and inside. One is hydrophobic channel at the 4-fold axis and the other is hydrophilic channel at the 3-fold axis. First, the calculated electrostatic potential inside the cavity of the wild type molecule showed the negative net charge. In case of the 4-fold channels, large potential barriers mainly due to self energy were found for both cations and anions. So, it was almost negligible for ions to pass through the hydrophobic 4-fold channel, especially for divalent cations such as Fe, Cd and Ca that have large self energy, ~ 50 kT. On the other hand, the 3-fold channels have cation binding sites where one deep energy well for single ion transfer, ~ 30 kT, was found near the Glu134 and Asp131 50

Å far from the molecular center. Then, multi ion transfer profile was calculated. Both the divalent and monovalent cations can pass through the 3-fold channel with only a few kT barrier. In addition to this finding the experimentally obtained positions of three Cd^{2+} binding sites in the 3-fold channel was well reproduced. Second, the electrostatic potential of the mutant ferritin, which have no cation binding sites (i.e., Glu134 and Asp131) at the 3-fold channel and several inside Glu residues were changed to Lys, was calculated. The potential inside the cavity was positive and transfer of divalent cation was quite unfavorable for both the channels. These calculated results were in good accord with experimental facts that the mutant ferritin molecule showed almost no iron storage.

(20) 分子ポンプの方向性を決めるもの：蛋白質はやわらかいかかたいか？

神取秀樹（名古屋工業大学）

生体分子はその階層構造を活かし、巧みな時空間制御によって機能を作り出すことができる。例えば、膜蛋白質である分子ポンプは濃度勾配に逆らってイオンを輸送する。結果的に系のエントロピーを減少させる能動輸送という不思議な現象は、生体分子内でどのように実現しているのだろうか？ 一般に能動輸送を理解するためには、蛋白質の構造を決定し、イオンや物質の輸送経路を決定した上で、方向性を決定するスイッチ機構を蛋白質の構造変化として明らかにしなければならない。最近になって次々と重要な分子ポンプ蛋白質の立体構造が決定されているにも関わらず、スイッチ機構は全くのブラックボックスである。

高度好塩菌の光駆動プロトンポンプとして光エネルギーを電気化学的エネルギーに変換するバクテリオロドプシンの場合、発色団レチナール分子の光吸収による異

性化反応が蛋白質の構造変化を誘起し、その結果としてプロトンの能動輸送が実現する。すでに立体構造とプロトン移動経路が確定し、分子ポンプ蛋白質としてはじめてスイッチ機構を原子のレベルで考えることが可能になった。このため、最先端の理論的・実験的アプローチを用いた詳細な解析が試みられている。

本講演では、我々の低温赤外分光法を用いた研究を中心として、分子ポンプの方向性を決めるメカニズムについて議論したい。我々の主張は、バクテリオロドプシンにおけるスイッチは局在しており、ごく限られた化学結合が方向性の決定に関与するというものである。特に、演者の属する生物物理学会では、「蛋白質のやわらかさ」が最近強調されているが、決定論的な仕事をするためには「蛋白質のかたさ」が重要であるといった観点からの説明を試みる。

(21) 蛋白質の振動エネルギー移動：蛋白質の非線形ダイナミクス解析への試み

木寺 詔紀 (横浜市立大学総合理学研究科)

蛋白質のダイナミクスの研究は、その構造の分布関数を記述することを主要な目的として、主に線型のモデルで解析されてきた。それに対して本研究は、時間発展を記述する目的で、非線形なダイナミクスのモデル化を試みた。

まず絶対震度の蛋白質において、1つの高振動モードのみに小さな運動エネルギーの摂動を加えることによって、その振動エネルギーがどのように伝播していくかを分子動力学シミュレーションによって観察した。その結果、振動エネルギーは、共鳴条件を満たし、さらに十分に大きな coupling 定数を持つごく少数のモードへ移動した。これは、3, 4 次の低次の非線形項に起因するものであった。また、coupling 係数は、ふたつのモード間の立体構造上の geometrical overlap によって決定されることが分かった。

次に、有限温度において、1つの高振動モード間に摂動を加えたシミュレーションを行った。有限温度では、他のモードがすべて excite しているため、摂動後短時間で、mode-coupling によって摂動エネルギーは速やか他の多くのモードに散逸してしまい、移動に長時間を必要とする共鳴現象は見ることができない。また、他のモードへの散逸は、温度の上昇にともなって高次項の寄与が大きくなること、またガラス転移温度 ($\approx 170\text{K}$) の前後でエネルギー散逸の程度が急激に増大した。これは、ガラス転移温度以上で起こる極小点を越える運動によって、他のモード空間に遷移したためである。

このように、振動エネルギー移動を介して、蛋白質運動の非線形性を見た。これからの課題は、低振動モード空間の時間発展を正しく記述することにあると考えている。

(22) 赤外領域における非線形分光法の展開

富永圭介 (神戸大分子フォトサイエンス研究センター)

赤外領域の高出力短パルスを用いた液体中の非線形分光法の開発・応用について述べる。これは赤外領域の遷移エネルギーに対する時間相関関数を詳しく調べる一つの手法であり、通常の FT-IR などの測定では調べることができない、振動モード間の相関や遷移エネルギー揺ら

ぎの動的挙動に関する情報を引き出すことができる。どのような手法であり、何がわかり、どのような系に応用され何がわかってきたか、ということについて講演を行う。

(23) CO 結合型ミオグロビンにおけるヘム振動エネルギー緩和

長岡 正隆 (名古屋大学)

本講演では一酸化炭素 (CO) 結合型ミオグロビン (MbCO) の CO 光解離で生じるヘムの余剰振動エネルギーの緩和過程に関して、CO 解離過程を取り入れた非平衡分子動力学シミュレーションの手法を用いてエネルギー移動過程の解析して、真空中と水溶液中の二つの場合に対して比較して考察した。真空中においてヘムの振動温度は、0.84ps (66%)と 18.7ps (34%)という二成分の時

定数で緩和し、計算から得られた緩和の時定数が実験をうまく再現することが判った。また、振動モードの時間的強度変化を調べるために活性中心の原子群の速度自己相関関数のフーリエ変換から、時間分解されたヘムの振動モードの強度変化を計算してMbCO内の非定常過程を微視的な原子の動きとして捉えることに成功した。さらに基準振動解析の結果、ヘム側鎖のイソプロピオン酸残

基の振動モードが水分子の振動モードと倍音あるいは半音であることが判った。これらの残基が溶媒である水に直接接していることから、ヘムタンパク質から溶媒へ向

かう速いエネルギー緩和過程のチャネルとして重要な役割をしているはずであることを提案した。

(24) 蛋白質の時間分解エネルギー・構造変化

寺嶋正秀（京都大学理学研究科）

蛋白質の反応に限らず、化学反応一般において、反応前後のエネルギー差や分子体積変化、圧縮率や熱膨張係数などは反応を記述する基本的なデータである。ところが、熱力学量は平衡状態でのみ測定されうるものであり、非平衡的に時間発展する系に対してはこれまでの伝統的手法は適用できなかった。ここでは、最近我々が提案している、反応中間体あるいは時間発展する系で、エンタルピー変化、分子体積変化、熱膨張係数を測定する方法と幾つかの例について発表する。こうした手法を、例えば

ミオグロビンの光リガンド解離反応に適用した結果、リガンドが蛋白から抜け出ていく真の速度や、リガンドが蛋白内に取り込まれた状態についての知見が得られることが分かった。また反応途中における熱膨張係数の変化より、中間体構造の揺らぎやすさについても時間分解した情報が得られることが可能となった。ここでは、こうした結果や、ロドプシンについてエネルギーや体積曲面を実験的に描いた結果などを報告する。

(25) ヘムタンパク質のリガンド結合部位の構造揺らぎ

水谷泰久（神戸大学分子フォトサイエンス研究センター21）

われわれは CO 光解離後 1 ナノ秒までのピコ秒時間分解共鳴ラマンスペクトルを測定し、鉄-ヒスチジン伸縮振動 ($\nu(\text{Fe-His})$) バンドに着目して光解離後のミオグロビンの構造ダイナミクスを調べた。その結果をまとめると以下ようになる。

① $\nu(\text{Fe-His})$ 振動数は、約 100 ピコ秒の時定数で 2 cm^{-1} 低波数シフトし、平衡状態の値へと近づいていった。高粘性の溶媒中では低波数シフトの速度は遅くなり、またタンパク部分のないヘムのモデル化合物では低波数シフトは観測されなかった。したがって、この低波数シフト

は光解離後のタンパク質構造の緩和に対応するものと解釈できる。

② $\nu(\text{Fe-His})$ バンドのバンド幅は、10-20 ピコ秒の時定数で 1 cm^{-1} 程度の広がりを示した。われわれはこれをいまのところ、光解離後にできた CS 間の非平衡な分布が緩和していく過程に対応しているのではないかと考えている。

講演ではさらにミオグロビンにおいて観測された構造揺らぎとヘモグロビンの協同性との関連についても触れる。