岡崎国立共同研究機構

生理学研究所年報

第23巻

2002

はじめに

平成 13 年度の生理学研究所年報をお届けします。

平成 14 年 6 月、岡崎国立共同研究機構は、遠山文部科学大臣、柴田岡崎市長はじめ、多くの来賓を迎え、山手地区に新設されました新研究棟の開所式を行いました。本機構の懸案でありました山手地区（元愛知教育大学の運動グランド）に、平成 12 年 4 月に発足した「統合バイオサイエンスセンター」の研究室の第一期工事が終了したものです。引続き、第二期、第三期の工事が進行中であり、さらに統合バイオサイエンスセンターの研究室と、それらを支援する分子科学、基礎生物学、生理学の各研究所の研究室および研究施設が、山手地区に展開する予定です。

生理学研究所では、1991 年に発足しました「統合生理研究施設」を改組し、2003 年度から「発達生理学研究系」へ発展させるべく、概算要求をしていましたが、それが認められる内示がありました。3 専任部門「認知行動発達機構」「生体恒常機能発達機構」「生殖・内分泌発達機構」と 1 客員部門「環境適応機能発達」から構成される予定です。これまで生理学研究所で発展させ蓄積された知見と研究成果を土台に、人を含めた高等動物の胎児から生後の発達過程について、非侵襲的計測法を含めた実験的研究により探究する予定です。社会的に強い関心事である「教育問題」の解明にも役立つ基礎的研究を目指しています。

一方、国立大学の法人化（国立大学法人）と共に、我々の研究所を含む 15 の大学共同利用機関（研究所）の法人化（大学共同利用機関法人）が、平成 16 年度に行われることに決まっており、その準備が進められています。15 の機関が 4 機構（4 法人）になることになり、生理学研究所は岡崎の他の 2 研究所および天文台、核融合科学研究所と一緒に、計 5 研究所で「自然科学研究機構」を構成することになります。この際、「岡崎」の名称は機構名から消えることになります。しかし、現在の岡崎国立研究機構の 3 研究所は、統合バイオサイエンスセンターなどの共通研究施設と共に、岡崎の地でこれまでの研究と大学院教育などを、継続し、一層の発展を期して行くことには変わりありません。

本年報は、生理学研究所の全構成員の平成 13 年度中の努力の成果を示すものです。
今後一層の努力と精進を重ね、更に質量ともに優れた結果を得るよう期待します。

平成 14 年 12 月

生理学研究所長　　佐々木和夫

生理学研究所年報

〔　目　　次　〕

職　員（2001 年度） i

研究活動報告

分子生理研究系 11
細胞器官研究系 18
生体情報研究系 22
生体調節研究系 29
大脳皮質機能研究系 36
統合生理研究施設 43
脳機能計測センター 50
統合バイオサイエンスセンター 54
動物実験センター 58
計算科学研究センター 60
技　術　課 61

研究発表

発　表　論　文 73
学　会　発　表 87

一般共同研究報告 109

計画共同研究報告 129

磁気共鳴装置共同利用実験報告 135

超高圧電子顕微鏡共同利用実験報告 145

生体磁気計測装置共同利用実験報告 157

研究会報告 163

国際シンポジウム

COE 国際シンポジウム 331

セミナー報告 337

大学院特別講義 361

職員（2001 年度）

所　　長　佐々木　和夫

分子生理研究系

神経化学研究部門

教　　授　小　幡　邦　彦
助　教　授　柳　川　右千夫
助　　手　山　肩　葉　子
〃　　兼　子　幸　一
日本学術振興会特別研究員　季　　鳳　雲
大学院学生　山　中　　創
〃　　海老原　利　枝
〃　　常　川　直　子

超微小形態生理研究部門

教　　授　永　山　國　昭
(統合バイオサイエンスセンター)
助　教　授　村　上　政　隆
助　教　授　村　田　昌　之
(統合バイオサイエンスセンター)
助　　手　東　　晃　史
〃　　大　橋　正　人
〃　　高　橋　卓　也
(計算科学研究センター)
非常勤研究員　松　本　友　治
文部省外国人研究員　Gurkov, Theodor Dimitrov
大学院学生　Danev, Radostin
特別共同利用研究員　杉　谷　正　三
〃　　加　納　ふ　み

細胞内代謝研究部門

客員教授　宮　崎　俊　一
客員助教授　吉　田　　繁
助　　手　毛　利　達　磨

細胞器官研究系

生体膜研究部門

教　　授　河　西　春　郎
助　　手　久木田　文　夫
〃　　筒　井　泉　雄
(～2001.9.30)
〃　　根　本　知　己
〃　　高　橋　倫　子
〃　　松　崎　政　紀
(20021.1～)
非常勤研究員　岸　本　拓　哉
〃　　兒　島　辰　哉
(2002.2.1～)
特別共同利用研究員　木　村　良　一
(～2001.9.30)
〃　　早　川　泰　之
〃　　兒　島　辰　哉
(～2002.1.31)
〃　　劉　　婷　婷
特別協力研究員　松　崎　政　紀
(～2002.12.31)

機能協関研究部門

教　　授　岡田泰伸
助教授　Sabirov, Ravshan
助　　手　森島　繁
〃　　樫原康博
〃　　赤塚結子
非常勤研究員　清水貴浩
〃　　森　信一郎
文部省外国人研究員　Wang, Jun（～2001.5.31）
〃　　Bell, Phillip Darwin（～2001.7.15）
〃　　Zamaraeva, Maria（～2001.5.31）
〃　　Xu, Hongtao（2001.7.16～）
〃　　Barros, Luis Felipe（2001.8.1～2001.10.31）
文部省外国人研究員　Tashmkamedov, Bekjan（2001.11.10～2002.2.15）
科学技術振興事業団招聘研究員　Zhang, Xiaodong（2002.2.1～）
〃　　Xie, An（～2001.5.31）
〃　　Peti-Peterdi, Janos（2001.8.1～2001.10.31）
科学技術振興事業団研究員　金関　恵
〃　　前野恵美
大学院学生　Abdullaev, Iskandar
〃　　浦本裕美
〃　　真鍋健一
〃　　井上　華
〃　　Dutta, Amal Kumar
特別共同利用研究員　長崎陽子（2001.10.1～）

生体情報研究系

神経情報研究部門

教　　授　池中一裕
助　　手　鹿川哲史
〃　　岩崎靖乃（～2001.10.14）
助　　手　藤本一朗（統合バイオサイエンスセンター）
非常勤研究員　和田圭樹（～2001.8.31）
リサーチ・アソシエイト　鄭　且均
〃　　柴崎貢志（2001.10.1～）
科学技術振興事業団招聘研究員　竹林浩秀（2001.6.11～）
大学院学生　柴崎貢志（～2001.9.30）
〃　　石橋智子
〃　　長谷川明子
〃　　中平英子
〃　　池田武史
〃　　清水健史
〃　　石井章寛
〃　　小川泰弘
〃　　古性美記
〃　　松本路生
〃　　田中久貴
特別共同利用研究員　片倉浩理
〃　　佐久間圭一（2001.10.1～）

液性情報研究部門

教　　授　井本敬二
助　　手　中井淳一
〃　　森　誠之
〃　　西田基宏
(2001.4.16～)
非常勤研究員　Md. Kadrul Huda
〃　　松下かおり
(2001.10.1～)
日本学術振興会特別研究員　大倉正道
〃　　岡田峯陽
大学院学生　松下かおり
(～2001.9.30)
〃　　佐々木幸恵
特別共同利用研究員　松本信幸

高次神経機構研究部門

客員教授　八木　健
客員助教授　平林真澄
助　　手　先崎浩次
非常勤研究員　金子涼輔
(2001.5.1～)
〃　　田中祐介
日本学術振興会特別研究員　竹井　豊
大学院学生　武藤哲司
〃　　多田基紀
〃　　平山晃斉
〃　　牧野初音
受託研究員　須藤文和
受託技術員　三寶千秋
〃　　山内奈央子

情報記憶研究部門

客員教授　西野仁雄

生体調節研究系

高次神経性調節研究部門

教　　授　小松英彦
助教授　伊藤　南
助　　手　花澤明俊
〃　　小川　正
非常勤研究員　鯉田孝和
大学院学生　杉原弘記
(～2001.9.30)
〃　　谷　利樹

生体システム研究部門

教　　授　森　茂美
客員教授　Boliek, Carol A.
(2001.9.1～2001.12.15)
助　　手　中陣克己
〃　　森　大志
非常勤研究員　奥村　哲
文部省外国人研究員　Czarkowska-Bauch, Julita
(～2001.4.17)
〃　　Verotique, Dubost
(2001.7.3～2001.8.24)
大学院学生　橘　篤導

高次液性調節研究部門

客員教授　宮下保司
客員助教授　永雄総一
助　　手　納家勇治
特別共同利用研究員　伊原　毅
特別協力研究員　吉田正俊
〃　　柴田愁子

大脳皮質機能研究系

脳形態解析研究部門

教　　授　重本隆一
助教授　籾山俊彦
助　　手　木下彩栄
〃　　籾山明子
〃　　深澤有吾
（2001.10.1～）
非常勤研究員　篠原良章
日本学術振興会特別研究員　中館和彦
特別協力研究員　三苫　博
大学院学生　納富拓也
〃　　春日井　雄
〃　　田中淳一
〃　　萩原　明
〃　　Yue.Wu

大脳神経回路論研究部門

教　　授　川口泰雄
助教授　窪田芳之
（2001.10.1～）
助　　手　根東　覚

心理生理学研究部門

教　　授　定藤規弘
助教授　本田　学
助　　手　岡田知久
特別共同利用研究員　関　あゆみ
（2001.9.1～）

統合生理研究施設

高次脳機能研究プロジェクト

教　　授　伊佐　正
助　　手　小林　康
〃　　関　和彦
非常勤研究員　遠藤利朗
日本学術振興会特別研究員　井上由香
大学院学生　坂谷智也
〃　　山下哲司
〃　　勝田秀行
〃　　渡辺雅之

感覚・運動機能研究プロジェクト

教　　授　柿木隆介
助教授　金桶吉起
助　　手　小山幸子
〃　　渡邉昌子
〃　　乾　幸二
（2001.8.1～）
非常勤研究員　大草知裕
日本学術振興会外国人特別研究員　王　麗紅
リサーチ・アソシエイト　Lam, Khanh
〃　　乾　幸二
（～2001.7.31）
日本学術振興会特別研究員　軍司敦子
大学院学生　王　暁宏
（2001.10.1～）
〃　　藤岡孝子
〃　　三木研作
特別共同利用研究員　二橋尚志
〃　　Tran, Diep T
〃　　丸山幸一
〃　　久保田哲夫
〃　　岡本秀彦

自律機能研究プロジェクト

客員教授　柴崎　浩
（2001.8.1～）

脳機能計測センター

形態情報解析室

助教授 有井達夫　　助手 古家園子

生体情報処理室

助教授 坪川　宏　　大学院学生 高木佐知子

機能情報解析室

助教授 逵本　徹

機構共通研究施設
（生理学研究所関連）

統合バイオサイエンスセンター

時系列生命現象研究領域

教授 岡村康司
（2001.5.1～）

戦略的方法論研究領域

教授 永山國昭　　助教授 村田昌之

生命環境研究領域

教授 森　泰生　　助手 西田基宏
（2001.4.16～）

助教授 挾間章博

助手 藤本一郎　　非常勤研究員 山田　久信
（～2001.9.30）

動物実験センター

助教授 尾崎　毅

計算科学研究センター

助手 高橋卓也

技術課　　課　長　大庭明生

研究系技術班

分子生理研究系技術係

係　長　大河原浩　　技　官　吉友美樹
技　官　高木正浩　　〃　山本友美
技　官　久米叙子（～2001.6.30）　　〃　長谷川絵梨（2001.9.25～）

細胞器官研究系技術係

係　長　小原正裕　　技　官　伊集院良祐
技　官　神谷絵美

生体情報研究系技術係

係　長　伊藤嘉邦　　技　官　三寶誠
技　官　齊藤久美子　　〃　山田元
〃　関口直美

生体調節研究系技術係

係　長　伊藤昭光　　技　官　高須千慈子
主　任　戸川森雄　　〃　高橋直樹
技　官　森将浩

大脳皮質機能研究系技術室

（市川　修）　（神谷絵美）
（伊藤嘉邦）

研究施設技術班　　班　長　市川　修

統合生理技術係

係　長　永田治　　技　官　佐々木千香
技　官　竹島康行

脳機能計測技術係

係　長　山口登　　技　官　村田安永
技　官　吉村伸明　　〃　佐藤茂基

動物実験技術係

主　任　佐治俊幸　　技　官　廣江猛
〃　小木曽昇

電子顕微鏡技術係

係　長　前橋寛

工作技術係

係　　長　加藤勝己

研究支援推進員　村瀬伸江
〃　伊藤磯子
〃　深津恵子
〃　土屋勝代
〃　朝倉幸孜
〃　伊佐かおる
〃　萩原　章
(2001.4.16～)
〃　三浦誓子
(2001.4.16～)

技術補佐員　鹿川彰子
(～2001.5.15)
〃　Lee.Elbert Lan
(2001.5.15～)
〃　小林麻澄

事務補佐員　松澤敬子
〃　足立貴美
〃　向　和子
〃　浅井明代
〃　梅林宏江
〃　杉浦郁代
〃　川角啓子
〃　鈴木理恵
(2001.9.1～)

【 研 究 活 動 報 告 】

研究活動報告

〔　目　　次　〕

分子生理研究系

神経化学研究部門 11

概　要

恐怖記憶における GABA の関与の解析

（Oliver Stork，Simone Stork，小幡邦彦）

GAD67-GFP マウスの組織学的解析

（柳川右千夫，小幡邦彦，玉巻伸章）

GAD67-GFP マウスの改良

（柳川右千夫，小幡邦彦，宮崎純一）

GAD67 遺伝子プロモーターの解析

（海老原利枝，柳川右千夫，小幡邦彦）

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

（山肩葉子，柳川右千夫，小幡邦彦）

急性神経活動によるシナプシン I のリン酸化調節

（山肩葉子，小幡邦彦）

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

（兼子幸一，小幡邦彦）

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

モノアミンによる修飾作用の解析

（兼子幸一，小幡邦彦，柳川右千夫）

超微小形態生理研究部門 13

概要

潅流ラット顎下腺における傍細胞輸送経路

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

灌流ラット顎下腺の開口分泌とエネルギー要求性

（村上政隆，高木正浩，前橋寛，Alessandro Riva，瀬尾芳輝）

エンドサイトーシス選別輸送のメカニズムの解析

（大橋正人，永山國昭）

リアノジン受容体の単粒子解析

（松本友治，村田和義，永山國昭，國安明彦，中山仁）

細胞内代謝研究部門 15

概　要

精子抽出物によって誘発される卵細胞内 Ca^{2+}オシレーションの解析

（毛利達磨，宮崎俊一，尾田正二，白川英樹）

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

細胞器官研究系

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

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

生体情報研究系

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

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

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

情報記憶研究部門 28
概　要

生体調節研究系

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

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

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

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

大脳皮質機能研究系

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

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

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

統合生理研究施設

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

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

脳機能計測センター

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

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

機能情報解析室 53
概　要
意欲に関係する脳活動の研究
（遠本　徹）

統合バイオサイエンスセンター

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

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

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

動物実験センター 58
概　要

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

技術課 61
1．概　要
2．施設の運営状況

① 統合生理研究施設

（1）生体磁気計測装置室

（永田　治，竹島康行）

② 脳機能計測センター

（1）形態情報解析室

（山口　登）

（2）機能情報解析室

（佐藤茂基）

（3）生体情報処理室

（吉村伸明，村田安永）

③ 動物実験センター

（佐治俊幸，小木曽昇，廣江　猛，鈴木千香）

④ 共通施設

（1）電子顕微鏡室

（前橋　寛）

（2）機器研究試作室

（加藤勝己）

分子生理研究系

神経化学研究部門

【概要】

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

恐怖記憶における GABA の関与の解析

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

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

GAD67-GFP マウスの組織学的解析

柳川右千夫，小幡邦彦
玉巻伸章（京都大学大学院医学系研究科）

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

GAD67-GFP マウスの改良

柳川右千夫，小幡邦彦
宮崎純一（大阪大学大学院医学系研究科）

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

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

GAD67 遺伝子プロモーターの解析

海老原利枝，柳川右千夫，小幡邦彦

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

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

山肩葉子，柳川右千夫，小幡邦彦

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

急性神経活動によるシナプシン I のリン酸化調節

山肩葉子，小幡邦彦

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

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

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

兼子幸一，小幡邦彦

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

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

兼子幸一，小幡邦彦，柳川右千夫

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

超微小形態生理研究部門

【概要】

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

潅流ラット顎下腺における傍細胞輸送経路

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

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

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

灌流ラット顎下腺の開口分泌とエネルギー要求性

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

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

エンドサイトーシス選別輸送のメカニズムの解析

大橋正人，永山國昭

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

リアノジン受容体の単粒子解析

松本友治，村田和義，永山國昭
國安明彦，中山仁（熊本大学・薬学部）

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

細胞内代謝研究部門

【概要】

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

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

精子抽出物によって誘発される卵細胞内 Ca^{2+}オシレーションの解析

毛利達磨，宮崎俊一
尾田正二，白川英樹（東京女子医）

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

マウス卵への mRNA 注入による蛋白質発現法の確立

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

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

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

濃度依存性 Na^+チャネルと体液浸透圧調節機構

吉田　繁（生理研）
檜山武史，渡辺英治，野田昌晴（基生研）

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

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

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

難治てんかんに対する脳梁離断術効果の動物実験による考察

吉田　繁（生理研）
藤村幸一，小野智憲（長崎大）
小野憲爾（横尾病院）

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

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

細胞器官研究系

生体膜研究部門

【概要】

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

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

神経，分泌細胞のカルシウム依存性開口放出機構の研究

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

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

2 光子励起法を用いた神経機能の研究

河西 春郎，松崎 政紀，早川 泰之

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

イオンチャネル・キネティクスに対する溶媒効果と実験系の問題点

久木田　文夫

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

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

Chelophyes における興奮収縮連関

筒井　泉雄

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

機能協関研究部門

【概要】

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

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

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

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

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

④「消化管上皮細胞の分泌・吸収メカニズム」についても研究する。

容積感受性クロライドチャネルの新しいブロッカー：Phloretin

范　海天，森島　繁，岡田泰伸

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

phloretin はホールセル VSOR 電流を電圧非依存的，濃度依存的（$I^{C}50$ ～30 μM）に抑制することが，ヒト大腸 T84 細胞，ヒト小腸 Intestine 407 細胞，マウス乳腺 C127/CFTR 細胞において確認された。これに対し，cAMP 依存性 CFTR Cl^{-}チャネル電流も，Ca^{2+}依存性 Cl^{-}チャネル電流も，100 μM 以下の phloretin によっては何ら影響を受けなかった。以上より低濃度 phloretin はアニオンチャネルの内で VSOR のみに対して有効なブロッカーであることが明らかとなった。これらの結果は次の論文に報告した（Fan, Morishima, Kida & Okada 2001 Br. J. Pharmacol. 133, 1096-1106）。

細胞外 ATP 放出路としてのマキシアニオンチャネル

R. Z. Sabirov，A. K. Dutta，岡田泰伸

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

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

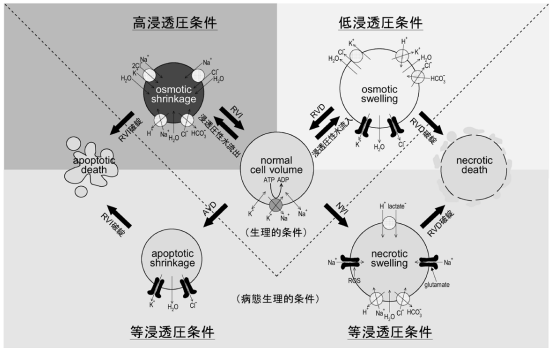


図 1.　浸透圧性膨張時におけるマキシアニオンチャネルの開口とその ATP 透過性

細胞容積調節破綻と細胞死誘導

岡田泰伸，前野恵美，清水貴浩，森島　繁

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

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

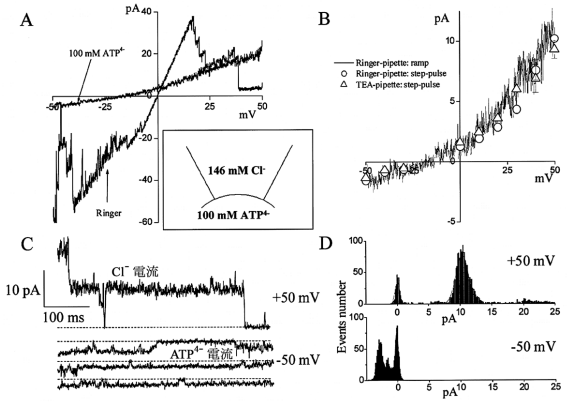


図 2.　生理的条件下における細胞容積調節（RVD, RVI）と病態生理的条件下における容積調節破綻（AVD, NVI）のイオン機序

生体情報研究系

神経情報研究部門

【概要】

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

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

オリゴデンドロサイト発生制御機構と脱髄モデルマウスの解析

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

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

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

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

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

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

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

アストロサイトの分化・発生様式に関する研究

岩崎靖乃，長谷川明子，小川泰弘，竹林浩秀，池中一裕

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

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

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

N 結合型糖タンパク質糖鎖の機能解析

藤本一朗，池田武史，石井章寛，佐久間圭一朗，池中一裕

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

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

癌遺伝子治療の基礎研究

片倉浩理，河野洋三，池中一裕

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

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

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

液性情報研究部門

【概要】

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

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

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

松下　かおり，Kadrul Huda，井本　敬二

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

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

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

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

GFP を用いた蛍光カルシウムプローブ，G-CaMP の開発

中井　淳一，大倉　正道，井本　敬二

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

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

カルモデュリンによる電位依存性イオンチャネルの制御機構

森 誠之，井本 敬二

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

高次神経機構研究部門

【概要】

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

CNR 分子多様性における機構解析

先崎浩次，八木　健

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

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

マウス嗅球での周波数帯によって分離される独立な 2 つの経路

田仲祐介，八木健

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

遺伝子変換ラット作製系の開発

金子涼輔，八木健

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

中枢神経系における *CNR* の体細胞突然変異の解析

平山晃斉，八木　健

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

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

ゼブラフィッシュ CNR の機能解析

多田基紀，八木　健

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

情報記憶研究部門

【概要】

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

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

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

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

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

生体調節研究系

高次神経性調節研究部門

【概要】

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

初期視覚系における輪郭線の折れ曲がりの表現

伊藤　南，小松　英彦

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

初期視覚系における面の表現ー光計測による解析

谷　利樹，横井　功，伊藤　南，小松　英彦，田中　繁（理研）

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

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

多次元視覚探索課題遂行中のサル V4 野におけるニューロン活動

小川　正, 小松　英彦

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

大脳皮質における色情報表現の課題依存性

鯉田　孝和, 小松　英彦

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

生体システム研究部門

【概要】

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

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

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

中陣　克己，森　大志，橘　篤導，森　茂美

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

直立二足歩行運動の実行に関与する脳領域の糖代謝 PET 法による同定

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

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

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

森　大志，中陣克己，高須千慈子，森　茂美

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

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

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

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

ネコ室頂核-視床路終末線維の視床内分布と形態的特徴

J. Czarkowska-Bauch，奥村　哲，中陣克己，森　茂美

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

ラット腰髄に分布するアセチルコリンエステラーゼ陽性神経細胞の生後発達

Arpad Dobolyi，奥村　哲，森　大志，森　茂美

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

ネコ線条体の出力細胞，介在神経細胞両者に対するセロトニン神経支配様式

奥村　哲，Arpad Dobolyi，松山清治，森　大志，森　茂美

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

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

橘　篤導，森　大志，Carol A. Boliek，高須千慈子，森　茂美

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

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

高次液性調節研究部門

【概要】

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

サル下部側頭葉における長期連合記憶の順行性情報処理

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

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

TE のと 36 野視覚記憶ニューロンを結ぶ順行性神経繊維の投射様式

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

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

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

認知的注意シフト課題遂行中のマカクサルにおける機能的 MRI

Nakahara K, Hayashi T, Konishi S, Miyashita Y

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

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

Kikyo H, Ohki K, Miyashita M

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

大脳皮質機能研究系

脳形態解析研究部門

【概要】

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

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

グルタミン酸受容体の定量的解析

馬杉（時田）美和子，萩原明，足澤悦子，深澤有吾，重本隆一

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

GABAB 受容体やイオンチャネルの脳内局在と機能解析

Akos Kulik，萩原明，深澤有吾，重本隆一

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

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

HCN channel の脳内局在の解析

納富拓也，重本隆一

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

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

籾山俊彦

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

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

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

mGluR1 の活性化を阻害する自己抗体による小脳失調症

木下彩栄，重本隆一

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

ラット脊髄視床路ニューロン活動性の解析

籾山明子

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

大脳神経回路論研究部門

【概要】

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

大脳皮質周期的活動時における GABA 細胞サブタイプの発火様式

川口　泰雄

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

大脳皮質非錐体細胞の神経終末が形成するシナプスの 3 次元的構造

窪田　芳之
川口　泰雄

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

大脳皮質投射細胞と高頻度発射型介在神経細胞の神経結合

根東　覚

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

心理生理学研究部門

【概要】

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

聴覚脱失による脳の可塑的変化

定藤　規弘

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

形状認知における視覚・触覚統合の解析

斎藤大輔，定藤　規弘

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

パーキンソン病における思考速度の低下

本田　学
澤本伸克（京都大学医学研究科）

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

認知機能における運動前野の機能的有意性

本田　学

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

健常者における憑依トランスの発現メカニズム

本田　学，河合　徳枝（筑波大学），大橋　力（千葉工業大学）

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

日本語の音韻変換課題における機能的 MRI 研究

関あゆみ，定藤規弘

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

MRI 撮像音強度の変化に伴う聴覚野の賦活

岡田　知久

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

統合生理研究施設

高次脳機能研究プロジェクト

【概要】

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

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

上丘浅層の GABA 作動性，非作動性細胞に対するアセチルコリンの作用

遠藤利朗，伊佐　正
柳川右千夫，小幡邦彦（神経化学部門）

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

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

サルの上肢運動ニューロンを制御する脊髄固有ニューロン系の解析

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

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

上丘局所回路における層内興奮性結合によるバースト生成機構

斎藤康彦，伊佐　正

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

マウスの上丘電気刺激によって誘発される急速眼球運動について

坂谷智也，伊佐　正

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

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

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

山下哲司，伊佐　正

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

感覚・運動機能研究プロジェクト

【概要】

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

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

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

視覚性運動検出に関与する脳活動の脳磁場による測定

金桶吉起，王　麗紅，川上　治，Lam Khanh，丸山幸一，久保田哲夫

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

顔認知初期過程における「視線」の影響

渡辺昌子，三木研作，柿木隆介

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

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

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

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

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

C 線維を上行する信号による大脳活動

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

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

C 線維関連レーザー誘発脳電位への注意，非注意および睡眠の効果

秋云海，乾幸二，王曉宏，Tuan Diep Tran，柿木隆介

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

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

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

痛み関連誘発脳電位に及ぼす睡眠の効果

王曉宏，乾幸二，秋云海，宝珠山稔 Tuan Diep Tran，柿木隆介

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

単語ならびに非単語に誘発された脳磁場に対する刺激反復の効果

関口貴裕（東京学芸大学教育学部心理学科）
小山紗智子，柿木隆介

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

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

矢部博興（弘前大学医学部精神科）
小山紗智子，柿木隆介

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

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

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

矢部博興（弘前大学医学部精神科）
小山紗智子，柿木隆介

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

脳機能計測センター

形態情報解析室

【概要】

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

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

超高圧電子顕微鏡（H-1250M）による立体写真の配置に関して

有井達夫

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

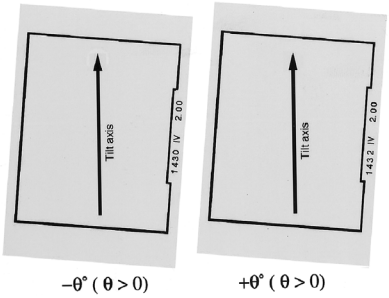


図 1　HVEM(H-1250M) による立体写真（平行視）の配置

ラット膵臓導管における AQP1 の局在

古家　園子
成瀬　達（名古屋大学・医学部・第２内科）

【目的】

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

【方法】

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

【結果】

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

生体情報処理室

【概要】

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

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

樹状突起活動電位の伝播調節メカニズムの解析

坪川　宏

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

細胞内シグナル伝達系の活性とニューロン活動との時間的・空間的関係の解析

坪川　宏，　高木　佐知子

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

中枢ニューロンの容積調節と興奮性調節の機能的カップリングの解析

高木　佐知子，　坪川　宏

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

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

機能情報解析室

【概要】

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

意欲に関係する脳活動の研究

逵本　徹

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

統合バイオサイエンスセンター

時系列生命現象研究領域

【概要】

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

発生過程での神経細胞膜特性の発達の分子機構

岩崎　広英
岡村　康司

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

発生過程での神経細胞電気的活動モニターのための分子ツールの開発

村田　喜理
岡村　康司

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

生命環境研究領域

【概要】

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

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

原雄二，西田基宏，吉田卓史，森泰生

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

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

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

カルシウムチャネル変異マウスの解析

五日市　友子，西田　基宏，森　泰生

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

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

免疫 B 細胞における Ca^{2+} シグナル増幅機構

西田基宏，原雄二，森泰生

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

遺伝学的アプローチを用いたカルシウムチャネルの生理学的役割の解明

山田和徳, 森泰生

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

戦略的方法論研究領域

【概要】

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

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

複素電子顕微鏡および位相差電子顕微鏡の開発

Radostin Danev，杉谷正三，大河原　浩，永山國昭

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

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

融合タンパク質による電子顕微鏡用分子ラベルの開発

高木正浩，春日井　雄，永山國昭，重本隆一

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

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

村田昌之，加納ふみ，田中亜路，永山國昭

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

動物実験センター

【概要】

＜山手地区動物実験センター棟の建設＞

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

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

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

＜動物実験委員会と情報開示請求＞

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

＜研究基盤としての動物実験センターの課題＞

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

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

計算科学研究センター

【概要】

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

イオンチャネル様タンパク質におけるイオン透過過程の理論的研究

高橋卓也，永山國昭

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

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

技術課

1．概要

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

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

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

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

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

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

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

2. 施設の運営状況

① 統合生理研究施設

（1）生体磁気計測装置室

永田　治，竹島康行

【概要】

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

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

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

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

＊稼働率＝利用日数／（総日数－（休日＋点検調整日））×100

生体磁気計測装置稼働率表（平成 13 年度）

② 脳機能計測センター

（1）形態情報解析室

山口　登

【超高圧電子顕微鏡利用状況】

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

2001 年度　超高圧電顕月別稼動率

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

フィラメント点灯時間　388.8 時間
使用フィルム枚数　5,732 枚

（2）機能情報解析室

佐藤茂基

【設備機器整備状況】

リアルタイム（Biospec47/40）装置

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

【機能解析室状況】

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

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

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

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

平成 13 年度の MRI 装置利用実績を別表に記す。

【機器利用率】

平成 13 年度リアルタイム装置月別利用率

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

*保守以外の祝祭日は，使用可能日に含めた。

（3）生体情報処理室

吉村伸明，村田安永

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

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

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

③ 動物実験センター

佐治俊幸，小木曽昇，廣江　猛，鈴木千香

【概要】

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

進めている。

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

【A 地区 陸生動物室】

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

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

【A 地区 水生動物室】

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

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

【E 地区 動物実験センター分室】

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

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

陸生動物　部門別･動物種別搬入数(平成13年度)

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

水生動物　月別･動物種別搬入数(平成13年度)

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

④ 共通施設

（1）電子顕微鏡室

前橋　寛

（A）電子顕微鏡室の状況

今年度は，電子顕微鏡の予約方法が変更となった。近年，利用者数が増加し，電子顕微鏡の予約方法が問題となってきた。運営委員会で議論され，電子顕微鏡の予約方法が平成 14 年 1 月より(平成 13 年 12 月は移行期間として併用)，予約板（1 ヵ月毎のホワイトボードにＡ9:00～13:00，Ｂ13:00～17:00，Ｃ17 : 00 以降，へ記名）から，Web 予約（1 週間前から，1 時間単位）となった。

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

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

（B）研究内容一覧表

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

利用内容一覧表

二研究所

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

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

所外（国内）

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

所外（国外）

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

（2）機器研究試作室

加藤勝己

【概要】

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

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

なお，機器研究試作室の平成 13 年度の利用状況は，以下の通りである。

機器研究試作室利用機器表　（件数）

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

機器研究試作室利用人数表

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

機器研究試作室部門別利用状況

高次神経性調節	114 名	統合生理研究施設	48 名	機能情報解析室	46 名
生体膜	45 名	超微小形態生理	37 名	脳形態解析	32 名
統合バイオ	24 名	神経情報	22 名	心理生理学	18 名
生体システム	18 名	大脳神経回路論	17 名	神経化学	16 名
液性情報	10 名	動物実験施設	10 名	形態情報解析室	9 名
電子顕微鏡室	8 名	機能協関	6 名	技術課	4 名
生体情報処理室	2 名	細胞内代謝	1 名	高次脳機能研究	1 名
高次液性調節	1 名				

感覚情報処理	21 名	細胞増殖	10 名	ＲＩ実験施設	7 名
情報制御	5 名	種分化機構第一	5 名	生殖	3 名
形態形成	2 名	大型スペクトロ	2 名	エネルギー変換	1 名
人工気象室	1 名	計時機構	1 名	技術課	1 名
細胞機構	1 名				

分子研その他	2 名

【 研　究　発　表 】

a. 発表論文

b. 学会発表

a.　発表論文

〔 目　　次 〕

神経化学研究部門 74
超微小形態生理研究部門 74
細胞内代謝研究部門 74
生体膜研究部門 75
機能協関研究部門 75
神経情報研究部門 76
液性情報研究部門 77
高次神経機構研究部門 78
情報記憶研究部門 79
高次神経性調節研究部門 79
生体システム研究部門 79
高次液性調節研究部門 80
脳形態解析研究部門 80
大脳神経回路論研究部門 81
心理生理学研究部門 81
高次脳機能研究プロジェクト 82
感覚・運動機能研究プロジェクト 82
形態情報解析室 84
生体情報処理室 84
戦略的方法論研究領域 84
時系列生命現象研究領域 85
生命環境研究領域 85
動物実験センター 86
計算科学研究センター 86

発　表　論　文

《神経化学研究部門》

1) 英文原著論文

1. Stork O, Stork S, Pape HC, Obata K (2001) Identification of genes expressed in the amygdala during the formation of fear memory. Learn Memory 8:209-219.

2) その他

1. 小幡邦彦，小野幸嗣（2001）　日米科学技術協力事業「脳研究」分野　学術月報　54:100-103.

《超微小形態生理研究部門》

1) 英文原著論文

1. Sogami M, Era S, Murakami M, Seo Y, Watari H, Uyesaka N (2001) Application of the transition state theory to water transport across cell membranes. Biochim Biophys Acta 1511: 42-48.
2. Takamata A, Seo Y, Ogino T, Tanaka K, Tsuchiya Y, Morita H , Murakami M (2001) Effects of pCO_2 on the CSF turnover rate in rats monitored by Gd-DTPA enhanced T1-weighted magnetic resonance imaging. Jpn J Physiol 51 (5): 555-562.
3. Murakami M, Shachar-Hill B, Steward MC, Hill AE (2001) The paracellular component of water flow in the rat submandibular salivary gland. J Physiol 537: 899-906.
4. Miwako I, Yamamoto A, Kitamura T, Nagayama K & Ohashi M (2001) Cholesterol requirement for cation-independent manose 6-phosphate receptor exit from multivesicular late endosomes to the Golgi. J Cell Sci 114: 1765-1776.

2) その他

1. Murakami M, Yoshimura K, Sugiya H, Segawa A & Riva A (2001) Relationship between protein and fluid secretion in the perfused salivary gland. In: Electrolyte Transport across Exocrine Epithelia (eds) A Dinusom, DI Cook: 45-49.
2. 石堂美和子，大橋正人（2001）分子選別ステーションとしての後期エンドソーム.　蛋白質・核酸・酵素 46: 2127-2132.
3. 東　晃史（2001）ヒトゲノム言語解析の概念. KTC 中央出版.

《細胞内代謝研究部門》

1) 英文原著論文

1. Mohri T, Shirakawa H, Oda S, Sato MS, Mikoshiba K & Miyazaki S (2001) Analysis of Mn^{2+}/Ca^{2+} influx and release during Ca^{2+} oscillations in mouse eggs injected with sperm extract. Cell Calcium 29:311-325.
2. Ogonuki N, Sankai T, Yagami K, Shikano T, Oda S, Miyazaki S & Ogura A (2001) Activity of a sperm-borne oocyte-activating factor in spermatozoa and spermatogenic cells from cynomolgus monkeys and its localization after oocyte activation. Biol Reprod 65: 351-357.
3. Aida T, Oda S, Awaji T, Yoshida K & Miyazaki S (2001) Expression of a green fluorescent protein variant in mouse oocytes by injection of RNA with an added long poly(A) tail. Mol Hum Reprod 7:1039-1046.
4. Awaji T, Hirasawa A, Shirakawa H, Tsujimoto G & Miyazaki S (2001) Novel GFP-based ratiometric indicators for monitoring pH in defined intracellular microdomains. Biol Biophys Res Com 289:457-462.
5. Hashiguchi S, Yada T & Arima T (2001) A new hypoglycemic agent, JTT-608, evokes PKA-mediated Ca^{2+} signaling in rat islet β-cells: strict regulation by

glucose, link to release insulin and cooperation with GLP-1 and PACAP. J Pharmacol Exp Therapeut 296:22-30.

6. Uramura K, Funahashi H, Muroya S, Shioda S, Takigawa M & Yada T (2001) Orexin-A activates phospholipase C- and protein kinase C-mediated Ca^{2+} signaling in dopamine neurons of the ventral tegmental area. Neurorep 12:1885-1889.
7. Muroya S, Uramura K, Sakurai T, Takigawa M & Yada T (2001) Lowering glucose concentrations increases cytosolic Ca^{2+} in orexin neurons of the rat lateral hypothalamus. Neurosci Lett 309:165-168.
8. Yoshida S (2001) Re-evaluation of acute neurotoxic effects of Cd^{2+} on mesencephalic trigeminal neurons of the adult rat. Brain Res 892:102-110.
9. Yoshida S (2001) Simple techniques suitable for student use to record action potentials from the frog heart. Adv Physiol Education 25:176-186.
10. Yoshida S, Yoshimura M & Taniyama K (2001) Activation of a potassium conductance by extracellular alkaline pH in oocytes of Xenopus laevis. Jpn J Pharmacol 87: 202-207.

《生体膜研究部門》

1) 英文原著論文

1. Nemoto T, Kimura R, Ito K, Tachikawa A, Miyashita Y, Iino M, Kasai H (2001) Sequential-replenishment mechanism of exocytosis in pancreatic acini. Nature Cell Biol 3:253-258.
2. Kishimoto T, Liu T-T, Ninomiya Y, Takagi H, Yoshioka T, Ellis-Davies GCR, Miyashita Y, Kasai H (2001) Ion selectivities of the Ca^{2+} sensors for exocytosis in rat phaeochromocytoma cells. J Physiol (Lond) 533:627-637.
3. Matsuzaki M, Ellis-Davies GCR, Nemoto T, Miyashita Y, Iino M, Kasai H (2001) Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. Nature Neurosci 4:1086-1092.
4. Tsubamoto Y, Eto K, Noda M, Daniel S, Suga S, Yamashita S, Kasai H, Wakui M, Sharp GW, Kimura S, Kadowaki T (2001) Hexamminecobalt (III) chloride inhibits glucose-induced insulin secretion at the exocytotic process. J Biol Chem 276: 2979-2985.
5. Nakanishi K, Kukita F, Asai K, Kato T (2001) Recurrent subthreshold electrical activities of rat neocortical neurons progress during long-term culture. Neurosci Lett 304:85-88.
6. Tsutsui I, Ohkawa T (2001) Regulation of the H^+ pump activity in the plasma membrane of internally perfused Chara corallina. Plant Cell Physiol 42:531-7.

2) その他

1. 河西春郎 (2001) 細胞蛍光画像・パッチクランプ同時測定.「新パッチクランプ実験技術法」（岡田泰伸編） pp.179-185，吉岡書店
2. 久木田文夫，老木成稔，岡田泰伸 (2001) 序論 イオンチャネル.「新パッチクランプ実験技術法」（岡田泰伸 編） pp.1-13，吉岡書店
3. 高橋倫子，門脇　孝，河西春郎 (2001) A キナーゼとインスリン分泌.「分子糖尿病学の進歩」 pp.20-27，金原出版
4. 鈴木直哉，河西春郎 (2001) 伝達物質放出の Ca^{2+}と Ca^{2+}緩衝能による調節．脳の科学（星和書店）23: 287-296
5. 高橋倫子，門脇　孝 (2001) 尿ケトン 臨床検査ガイド．pp.1013-1014，文光堂

《機能協関研究部門》

1) 英文原著論文

1. Fan H-T, Morishima S, Kida H, Okada Y (2001) Phloretin differentially inhibits volume-sensitive and cAMP-activated, but not Ca-activated, Cl^- channels. Br

J Pharmacol 133:1096-1106.

2. Sabirov RZ, Dutta AK, Okada Y (2001) Volume-dependent ATP-conductive large-conductance anion channel as a pathway for swelling-induced ATP release. J Gen Physiol 118:251-266.

2) その他

1. Okada Y, Maeno E, Shimizu T, Dezaki K, Wang J, Morishima S (2001) Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD). J Physiol (London) 532:3-16 [Topical Review].
2. Okada Y, Maeno E (2001) Apoptosis, cell volume regulation and volume-regulatory chloride channels. Comp Biochem Physiol Part A 130:377-383 [Review].
3. Okada Y, Sabirov RZ, Dezaki K, Hazama A, Fan H-T, Abdullaev I, Shimizu T, Dutta AK, Hayashi S, Ando-Akatsuka Y, Tsumura T, Maeno E (2001) The pathway and roles of ATP release from epithelial cells. "Electrolyte Transport across Exocrine Epithelia." (Eds. Dinudom A, Cook DI), University of Sydney Printing House, Sydney, pp11-13.
4. Sabirov RZ, Dutta AK, Okada Y (2001) Swelling-induced maxi-anion channel in murine C127 cells: ATP-block and ATP-permeation. “Electrolyte Transport across Exocrine Epithelia.” (Eds. Dinudom A, Cook DI), University of Sydney Printing House, Sydney, pp145-146.
5. 岡田泰伸（2001）Cl⁻チャネルの新機能：ATP 放出, 細胞容積制御,アポトーシス制御.Otology Japan 11:148-149.
6. 岡田泰伸(編)(2001)“新パッチクランプ実験技術法” 吉岡書店, 京都.
7. 久木田文夫, 老木成稔, 岡田泰伸（2001）序論 イオンチャネル.“新パッチクランプ実験技術法”（岡田泰伸 編）pp1-13, 吉岡書店, 京都.
8. 岡田泰伸, 挾間章博, 小原正裕（2001）パッチクランプ法総論.“新パッチクランプ実験技術法”（岡田泰伸 編）pp14-30, 吉岡書店, 京都.
9. 林　誠治, 岡田泰伸(2001)パッチクランプバイオセンサー法.“新パッチクランプ実験技術法”(岡田泰伸 編）pp251-259, 吉岡書店, 京都.
10. 森島　繁（2001）コンピュータによるパッチクランプデータ記録法.“新パッチクランプ実験技術法”（岡田泰伸 編）pp280-293, 吉岡書店, 京都.
11. 森島　繁, サビロブ ラブシャン（2001）パッチクランプ法の実験溶液.“新パッチクランプ実験技術法”（岡田泰伸 編）pp294-311, 吉岡書店, 京都.
12. 小原正裕, 森島　繁（2001）パッチクランプのための電気回路・実験装置.“新パッチクランプ実験技術法”(岡田泰伸 編）pp312-339, 吉岡書店, 京都.

《神経情報研究部門》

1) 英文原著論文

1. Yamada M, Jung M, Kagawa K, Ivanova A, Nave K-A & Ikenaka K (2001) Mutant PLP/DM20 cannot be processed to secrete PLP-related oligodendrocyte differentiation/survival factor. Neurochem Res 26:639- 645.
2. Sasaki M, Nakahira K, Kawano Y, Katakura H, Yoshimine Y, Shimizu K, Kim SU & Ikenaka K (2001) MAGE-E1, a new member of Melanoma-associated antigen gene family and its expression in human glioma. Cancer Res 61:4809-4814.
3. Espinosa de los Monteros A, Baba H, Zhao PM, Pan T, Chang R, de Vellis J & Ikenaka K (2001) Remyelination of the adult demyelinated mouse brain by grafted oligodendrocyte progenitors. Neurochem Res 26: 673-682.
4. Otake Y, Fujimoto I, Tanaka F, Nakagawa T, Ikeda T, Menon K K, Hase S, Wada H & Ikenaka K (2001) Isolation and characterization of an N-linked oligodendrocyte that is significantly increased in sera from patients with non-small cell lung cancer. J Biochem 129:537-542.
5. Tamura K, Tamura M, Ikenaka K, Yoshimatsu T, Miyao Y, Nanmoku K & Shimizu K (2001) Eradication of murine brain tumors by direct inoculation of concentrated high titer-recombinant retrovirus harboring the herpes simplex virus thymidine kinase gene. Gene Therapy 8:215-222.

6. Tanaka F, Otake Y, Nakagawa T, Kawano Y, Miyahara R, Li M, Yanagihara K, Inui K, Oyanagi H, Yamada T, Nakayama J, Fujimoto I, Ikenaka K & Wada H (2001) Prognostic significance of polysialic acid expression in resected non-small cell lung cancer. Cancer Research 61:1666-1670.
7. Tsujinoue H, Kuriyama S, Nakatani T, Yoshiji H, Akahane T, Toyokawa Y, Fukui H, Yoshimatsu T & Ikenaka K (2001) Amelioration of retrovirus-mediated gene transfer into hepatocellular carcinoma cells. Intl J Oncology 18: 801-807.
8. Yoshida S, Miyazaki M, Zhang Q-Z, Sakai K, Fujimoto I, Ikenaka K, Ikemoto A, Watanabe S & Okuyama H (2001) Change of Oligosaccharides of rat brain microsomes depending on dietary fatty acids and learining task. J Neurosci Res 63: 185-195.
9. Ikenaka K, Sasaki M, Tamura K, Tamura M, Miyao Y, Nanmoku,K, Kawano Y, Nakahira K, Yoshimine T & Shimizu K (2001) Treatment of glioblastoma by direct inoculation of concentrated high titer-recombinant retrovirus carrying the herpers simplex virus thymidine kinase gene. Human Cell 14: 49-58.
10. Kawano Y, Sasaki M, Nakahira K, Yoshimine T, Shimizu K, Wada H & Ikenaka K (2001) Structural characterization and chromosomal localization of the MAGE-E1 gene. Gene 277: 129-137.

2) その他

1. Kagawa T, Wada T & Ikenaka K (2001) Regulation of oligodendrocyte development. Mic Res Tech 52: 740-745.
2. 和田圭樹，鹿川哲史，山田真久，池中一裕　(2001) 2 グリア幹細胞の分化制御　第 2 章　神経系幹細胞 中辻憲夫編「幹細胞・クローン研究プロトコール」. pp. 72-82，羊土社

《液性情報研究部門》

1) 英文原著論文

1. Nakai J, Ohkura M, Imoto K (2001) A high signal-to-noise Ca^{2+} probe composed of a single green fluorescent protein. Nature Biotechnology 19: 137-141.
2. Ino M, Yoshinaga T, Wakamori M, Miyamoto N, Takahashi E, Sonoda J, Kagaya T, Oki T, Nagasu T, Nishizawa Y, Tanaka I, Imoto K, Aizawa S, Koch S, Schwartz A, Niidome T, Sawada K, Mori Y (2001) Functional disorder of sympathetic nervous system in mice lacking α1B subunit ($Ca_v2.2$) of N-type calcium channel. Proc Natl Acad Sci USA 98:5323-5328.
3. Sugawara T, Tsurubuchi Y, Agarwala KL, Ito M, Fukuma G, Mazaki-Miyazaki E, Nagafuji H, Noda M, Imoto K, Wada K, Mitsudome A, Kaneko S, Montal M, Nagata K, Hirose S, Yamakawa K (2001) A missense mutation of the Na^+ channel alphaII subunit gene $Na_v1.2$ in a patient with febrile and afebrile seizures causes channel dysfunction. Proc Natl Acad Sci USA 98: 6384-6389.
4. Huda K, Salunga TL, Matsunami K (2001) Dopaminergic inhibition of excitatory inputs onto pyramidal tract neurons in cat motor cortex. Neurosci Lett 307:175-178.
5. Hatakeyama S, Wakamori M, Ino M, Miyamoto N, Takahashi E, Yoshinaga T, Sawada K, Imoto K, Tanaka I, Yoshizawa T, Nishizawa Y, Mori Y, Niidome T, Shoji S (2001) Differential nociceptive responses in mice lacking the α1B subunit of N-type Ca^{2+} channels. NeuroReport 12:2423-2427.

《高次神経機構研究部門》

1) 英文原著論文

1. Yamazaki Y, Makino H, Hamaguchi-Hamada K, Hamada S, Sigino H, Kawase E, Miyata T, Ogawa M, Yanagimachi R, Yagi T (2001) Assessment of the developmental totipotency of neural cells in the cerebral cortex of mouse embryo by nuclear transfer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:1402-14026.
2. Shima T, Okumura N, Takao T, Satomi Y, Yagi T, Okada M, Nagai K (2001) Interaction of the SH2 domain of Fyn with a cytoskeletal protein, β-adducin. J. Biol. Chem. 276:42233-42240.
3. Hamada S. Yagi T (2001) The cadherin-related neuronal receptor (CNR) family: a novel diversified cadherin family at the synapse. Neuroscience Res. 41: 207-215.
4. Hattori K, Yagi T, Maekawa M, Sato T, Yuasa S (2001) N-Methyl-d-aspartate-induced c-Fos expression is enhanced in the forebrain structures related to emotion in Fyn-deficient mice. Brain Res. 905:188-198 ..
5. Sugimoto Y, Taniguchi M, Yagi T, Akagi Y, Nojyo Y, Tamamaki N (2001) Guidance of glial precursor cell migration by secreted cues in the developing optic nerve. Development 128:3321-3330.
6. Hoffmqn PL., Yagi T, Tabakoff B, Phillips TJ, Kono H, Messing RO, Choi D-S (2001) Transgenic and gene “knockout” models in alcohol research. Alcohol Clin. Exp. Res. 25:60-66.
7. Miyakawa T, Yagi T, Takao K, Niki H (2001) Differential effect of Fyn tyrosine kinase deletion on offensive and defensive aggression. Behavi. Brain Res. 122:51-56.
8. Takei Y, Hamada S, Senzaki K, Mutoh T, Sugino H, Yagi T (2001) Two novel CNRs from the CNR gene cluster have molecular features distinct from those of CNR1 to 8. Genomics 72:321-330.
9. Nakamura K, Manabe T, Watanabe M, Mamiya T, Ichikawa R, Kiyama Y, Sanbo M, Yagi T, Inoue Y, Nabeshima T, Mori H, Mishina M (2001) Enhancement of hippocampal LTP, reference memory and sensorimotor gating in mutant mice lacking a telencephalon-specific cell adhesion molecule. Eur. J. Neurosci.13:179-189.
10. Nakahara J, Tan-Takeuchi K, Seiwa C, Yagi T, Aiso S, Kawamura K, Asou H (2001) Myelin basic protein is necessary for the regulation of myelin-associated glycoprotein expression in mouse oligodendroglia. Neurosci. Lett. 298:163-166.
11. Hirayama T, Sugino H, Yagi T (2001) Somatic mutations of synaptic cadherin (CNR family) transcripts in the nervous system.　Genes to Cells 6:151-164.

2) その他

1. Yagi T (2001) Signalling cascade of CNR cadherins (Reelin receptors) in the mammalian brain. “Brain Stem Cells”, BIOS Scientific Publishers Ltd:51-58.
2. Yagi T, Yasuda M, Niki H (2001) Ethanol sensitivity and molecular function of Fyn tyrosine kinase. “Ethanol and Intracellular signalling: From Molecules to Behavior”, CSR incorporated:195-202.
3. 八木　健 (2001)高次機能・高次生命現象へのゲノム科学からのアプローチ　脳機能形成メカニズムにかかわる多様化膜分子群. ポストシーケンスのゲノム科学④　ゲノムから個体へ　生命システムの理解に向けて・中山書店:148-163
4. 平山晃斉，杉野英彦，八木　健 (2001) 脳の獲得的性質を支える分子メカニズムの探索　CNR／プロトカドヘリンファミリーの遺伝子構造と機能.蛋白質　核酸　酵素 46:698-705
5. 先崎浩次 (2001) 大脳皮質の層構造形成と関与分子群. 生体の科学 52:200-204.
6. 先崎浩次 (2001) 大脳皮質層構造形成と細胞移動. 細胞工学 20:503-507

《情報記憶研究部門》

1) 英文原著論文

1. Yamada Y, Fukuda A, Tanaka M, Shimano Y, Nishino H, Muramatsu K, Togari H & Wada Y (2001) Optical imaging reveals cation-Cl- cotransporter-mediated rapid decrease in intracellular Cl^- concentration induced by oxygen-glucose deprivation in rat neocortical slices. Neurosci Res 39: 269-280.
2. Iwase T, Ojika K, Matsukawa N, Nishino H, Yamamoto T, Okada H, Fujimori O & Ueda R (2001) Muscarinic cholinergic and glutamatergic reciprocal regulation of expression of hippocampal cholinergic neurostimulating peptide precursor protein gene in rat hippocampus. Neuroscience 102: 341-352.
3. Isobe Y, Torii T & Nishino H (2001) Melatonin inhibits Arg-vosopressin release via MT2 receptor in the suprachiasmatic nucleus-slice culture of rats. Brain Res 889: 214-219.
4. Nakajima K, Hida H, Shimano Y, Fujimoto I, Hashitani T, Kumazaki M, Sakurai T & Nishino H (2001) GDNF is a major component of trophic activity in DA-depleted striatum for survival and neurite extension of DAergic neurons. Brain Res 916: 103-111.
5. Isobe Y & Nishino H (2001) Circadian rhythm of drinking and running-wheel activity in rats with 6-hydroxydopamine lesions of the ventral tegmental area. Brain Res 898: 187-192.
6. Isobe Y, Fujioi J & Nishino H (2001) Circadian rhythm of melatonin release in pineal gland culture: arg-vasopressin inhibits melatonin release. Brain Res 918: 67-73.
7. Aihara N, Imamura N, Kimura T, Yamada K, Hida H, Nishino H, Ueda T & Shimada S (2001) Intracerebral hemorrhage upregulates Na^+ /myo-inositol cotransporer in the rat brain. Neurosci Lett 327: 21-24.

2) その他

1. 石田和人(2001)脳細胞のアポトーシ．　理学療法ジャーナル　35:147-149, 医学書

《高次神経性調節研究部門》

1) 英文原著論文

1. Hanazawa A & Komatsu H（2001）Influence of the direction of elemental luminance gradients on the responses of V4 cells to textured surfaces. J Neurosci 21: 4490-4497.
2. Hanazawa A, Mikami A, Angelika P S, Takenaka O, Goto S, Onishi A, Koike S, Yamamori T, Kato K, Kondo A, Suryobroto B, Farajallah A & Komatsu H（2001）Electroretinogram analysis of relative spectral sensitivity in genetically identified dichromatic macaques. Proc Natl Acad Sci USA 98: 8124-8127.
3. Kinoshita M & Komatsu H（2001）Neural representation of the luminance and brightness of a uniform surface in the macaque primary visual cortex. J Neurophysiol 86:2559-2570.

2) その他

1. 小松英彦（2001）充填知覚と面情報の補間．脳の高次機能（丹治順，吉澤修治編）pp.15-22，朝倉書店，東京

《生体システム研究部門》

1) 英文原著論文

1. Takakusaki K, Kohyama J, Matsuyama K, Mori S (2001) Medullary reticulospinal tract mediating the generalized motor inhibition in cats: parallel inhibitory mechanisms acting on motoneurons and on interneuronal transmission in reflex pathways. Neuroscience, 103: 511-527.
2. Mori F, Tachibana A, Takasu C, Nakajima K, Mori S (2001) Bipedal locomotion by the normally quadrupedal Japanese monkey, *M. Fuscata*: strategies for obstacle

clearance and recovery from stumbling. Acta Physiol Pharmacol Bulg 26:147-150.

2) その他

1. Mori S（2001）Supraspinal sites that induce locomotion in the vertebrate central nervous system. In: "Gait Disorders" (eds Růžička E, Hallett M, Jankovic J), Lippincott Williams & Willkins, Philadelphia, pp 25-40.
2. Nakajima K, Mori F, Takasu C, Okumura T, Mori M, Mori S (2001) Integration of upright posture and bipedal locomotion in non-human primates. In: “Sensorimotor Control” (eds Dengler R, Kossev A R), IOS Press, Amsterdam, pp95-102.
3. 森　茂美(2001)直立二足歩行は何をもたらすか。科学 71:1130-1137.
4. 森　茂美(2001)脳の可塑性と起立・歩行。JOHNS 17: 853-860.
5. 森　茂美（2001）歩行機能の老化。J Geriatric Gastroenterology 13:211-215.
6. 内野善生，佐々木成人，中陣克己，板東武彦，本郷利憲，森　茂美，森　大志(2001)ネコの手術・実験法。日本生理学会誌 63: 271-316.
7. 森　大志，中陣克己，森　茂美(2001)ニホンサル(M. Fuscata）の直立二足歩行運動：運動力学的解析。臨床神経生理学 29:93.

《高次液性調節研究部門》

1) 英文原著論文

1. Naya Y, Yoshida M, Miyashita Y (2001) Backward spreading of memory retrieval signal in the primate temporal cortex.　Science 291: 661-664.
2. Li XY, Hashimoto T, Tokuyama W, Miyashita Y, Okuno H (2001) Spatio-temporal dynamics of BDNF mRNA induction in the vestibulo-olivary network during vestibular compensation. J Neurosci 21: 2738-2748.
3. Sekihara K, Nagarajan S, Poeppel D, Marantz A Miyashita Y (2001) Reconstructing spatio-temporal activities of neural sources using an MEG vector beamformer technique.　IEEE Trans Biomed Eng 48: 760-771.
4. Li XY, Tokuyama W, Okuno H, Miyashita Y, Hashimoto T (2001) Differential induction of brain-derived neurotrophic factor messenger RNA in　rat inferior olive subregions following unilateral labyrinthectomy. Neuroscience 106: 385-394.
5. Miyashita Y, Farah MJ (2001) Cognitive neuroscience at the turn of the millennium. Curr Opin Neurobiol 11: 147-149.

《脳形態解析研究部門》

1) 英文原著論文

1. Mion S, Corti C, Neki A, Shigemoto R, Corsi M, Fumagalli G , Ferraguti F (2001) Bidirectional regulation of neurite elaboration by alternatively spliced metabotropic glutamate receptor 5 (mglur5) isoforms. Mol Cell Neurosci 17:957-972.
2. Geurts FJ, Timmermans J, Shigemoto R , De Schutter E (2001) Morphological and neurochemical differentiation of large granular layer interneurons in the adult rat cerebellum. Neurosci 104:499-512.
3. Martinez-Galan JR, Lopez-Bendito G, Lujan R, Shigemoto R, Fairen A , Valdeolmillos M (2001) Cajal-Retzius cells in early postnatal mouse cortex selectively express functional metabotropic glutamate receptors. Eur J Neurosci 13:1147-54.
4. Ruocco I, Cuello AC, Shigemoto R , Ribeiro-da-Silva A (2001) Light and electron microscopic study of the distribution of substance P-immunoreactive fibers and neurokinin-1 receptors in the skin of the rat lower lip. J Comp Neurol 432:466-480.
5. Tamaru Y, Nomura S, Mizuno N , Shigemoto R (2001) Distribution of metabotropic glutamate receptor mGluR3 in the mouse central nervous system: Differential location relative to pre- and postsynaptic sites. Neurosci

106:481-503.

6. Sansig G, Bushell TJ, Clarke VRJ, Rozov A, Burnashev N, Portet C, Gasparini1 F, Schmutz M, Klebs K, Shigemoto R, Flor PJ, Kuhn R, Knoepfel1 T, Schroeder M, Hampson DR, Collett VJ, Duvoisin RM Collingridge GL, van der Putten H (2001) Increased seizure-susceptibility in mice lacking the metabotropic glutamate receptor mGluR7. J Neurosci 21:8734-45.
7. Li JL, Shigemoto R, Kulik A, Chen P, Nomura S, Kaneko T , Mizuno N (2001) Immunocytochemical localization of GABAB receptors in mesencephalic trigeminal nucleus neurons in the rat. Neurosci Lett 315:93-7.
8. Lopez-Bendito G, Shigemoto R, Lujan R , Juiz JM (2001) Developmental changes in the localisation of the mGluR1alpha subtype of metabotropic glutamate receptors in Purkinje cells. Neurosci 105:413-29.
9. Ruocco I, Cuello AC, Shigemoto R , Ribeiro-da-Silva A (2001) Sympathectomies lead to transient substance P-immunoreactive sensory fiber plasticity in the rat skin. Neurosci 108:157-166.
10. Momiyama T, Koga E (2001) Dopamine D2-like receptors selectively block N-type Ca^{2+} channels to reduce GABA release onto rat striatal cholinergic interneurones. J. Physiol. (Lond.) 533:479-492.

2) その他

1. 籾山俊彦 (2001)「脳の科学」 特集「大脳皮質ー大脳基底核ループと運動制御」8. 大脳基底核におけるシナプス前ドーパミン受容体の機能 Vol.23 -12:1087-1092 星和書店

《大脳神経回路論研究部門》

1) 英文原著論文

1. Kawaguchi Y (2001) Distinct firing patterns of neuronal subtypes in cortical synchronized activities. J Neurosci 21:7261-7272.
2. Kondo S, Kawaguchi Y (2001) Slow synchronized bursts of inhibitory postsynaptic currents (0.1-0.3 Hz) by cholinergic stimulation in the rat frontal cortex *in vitro*. Neurosci 107:551-560.

2) その他

1. 川口泰雄 (2001) ホールセル記録神経細胞の形態学的・組織化学的解析。 吉岡書店「新パッチクランプ実験技術法」（岡田泰伸　編）:118-131.

《心理生理学研究部門》

1) 英文原著論文

1. Waki A, Yano R, Yoshimoto M, Sadato N, Yonekura Y & Fujibayashi Y (2001) Dynamic changes in glucose metabolism accompanying the expression of the neural phenotype after differentiation in PC12 cells. Brain Res 894:88-94.
2. Yoshimoto M, Waki A, Yonekura Y, Sadato N, Murata T, Omata N, Takahashi N, Welch MJ & Fujibayashi Y (2001) Characterization of acetate metabolism in tumor cells in relation to cell proliferation: Acetate metabolism in tumor cells. Nucl Med Biol 28:117-122.
3. Omata N, Murata T, Fujibayashi Y, Waki A, Sadato N, Yoshimoto M, Wada Y & Yonekura Y (2001) Age-related changes in energy production in fresh senescence- accelerated mouse brain slices as revealed by positron autoradiography. Dement Geriatr Cogn Disord 12:78-84.
4. Iidaka T, Sadato N, Yamada H, Murata T, Omori M & Yonekura Y (2001) An fMRI study of the functional neuroanatomy of picture encoding in younger and older adults. Brain Res Cogn Brain Res 11:1-11.
5. Imaizumi S, Hosoi H, Sakaguchi T, Watanabe Y, Sadato N, Nakamura S, Waki A & Yonekura Y (2001) Ultrasound activates the auditory cortex of profoundly deaf subjects. Neuroreport 12:583-586.
6. Takahashi N, Fujibayashi Y, Yonekura Y, Welch MJ,

Waki A, Tsuchida T, Sadato N, Sugimoto K, Nakano A, Lee JD & Itoh H (2001) Copper-62ATSM as a hypoxic tissue tracer in myocardial ischemia. Ann Nucl Med 15:293-296.

7. Hanakawa T, Ikeda A, Sadato N, Okada T, Fukuyama H, Nagamine T, Honda M, Sawamoto N, Yazawa S, Kunieda T, Ohara S, Taki W, Hashimoto N, Yonekura Y, Konishi J & Shibasaki H (2001) Functional mapping of human medial frontal motor areas. The combined use of functional magnetic resonance imaging and cortical stimulation. Exp Brain Res 38:403-409.
8. Weeks RA, Honda M, Catalan MJ & Hallett M (2001) Comparison of auditory, somatosensory, and visually instructed and internally generated finger movements: a PET study. Neuroimage 14:219-230.
9. Kawai N, Honda M, Nakamura S, Samatra P, Sukardika K, Nakatani Y, Shimojo N & Oohashi T (2001) Catecholamines and opioid peptides increase in plasma in humans during possession trances. Neuroreport 12:3419-3423.

2) その他

1. 本田　学, 花川　隆 (2001)ì 脳のイメージ機能 :（乾 敏郎，安西祐一郎　編）　認知科学の新展開 第４巻 ì．pp.127-171，岩波書店
2. 定藤規弘 (2001) 脳の可塑性と発達-非侵襲的脳機能画像法によるアプローチ：（乾　敏郎，安西祐一郎編）　認知科学の新展開 第１巻．pp.133-144，岩波書店
3. Oohashi T, Nishina E, Honda M (2001) Multidisciplinary study on the hypersonic effect. In: Inter-areal coupling of human brain function (Shibasaki H et al., Ed.) Amsterdam: Elsevier Science, pp.27-42.
4. Sadato N, Yonekura Y (2001) The cortico-cortical circuitry of the cross-modal plasticity in the blind. In: Inter-areal coupling of human brain function (Shibasaki H et al., Ed.) Amsterdam: Elsevier Science, pp.159-164.
5. 本田　学 (2001) functional MRI データの探索型解析法：脳の科学 23: 727-734.
6. 本田　学 (2001) 脳機能イメージングでみるパーキンソン病の運動と思考：脳の科学 23: 1093-1098.

《高次脳機能研究プロジェクト》

1) 英文原著論文

1. Endo T, Isa T (2001) Functionally different AMPA-type glutamate receptors in morphologically identified neurons in superficial layer of rat superior colliculus. Neuroscience 108: 129-141.
2. Kobayashi Y, Saito Y, Isa T (2001) Facilitation of saccade initiation by brainstem cholinergic system. Brain Development 23 S24-S27.
3. Isa T, Saito Y (2001) The direct visuo-motor pathway in mammalian superior colliculus; novel perspective on the interlaminar connection. Neuroscience Research 41: 107-113.

《感覚・運動機能研究プロジェクト》

1) 英文原著論文

1. Nihashi T, Kakigi R, Kawakami O, Hoshiyama M, Itomi K, Nakanishi H, Kajita Y, Inao S & Yoshida J s(2001) Representation of the ear in human primary somatosensory cortex. Neuroimage 13:295-304.
2. Watanabe S, Kakigi R & Puce A (2001) Occipitotemporal activity elicited by viewing eye movements: a magnetoencephalographic study. Neuroimage 13:351-363.
3. Gunji A, Hoshiyama M & Kakigi R (2001) Auditory response following vocalization: A magnetoencephalographic study. Clin Neurophysiol 112:514-520.
4. Yabe H, Winkler I, Czigler I, Koyama S, Kakigi R, Sutoh T, Hiruma T & Kaneko S (2001) Organizing sound sequences in the human brain: the interplay of auditory streaming and temporal integration. Brain Res

897:222-227.

5. Tran TD, Lam K, Hoshiyama M & Kakigi R (2001) A new method for measuring conduction velocities of Aβ-, Aσ- and C-fibers in humans following electrical and CO_2 laser stimulation. Neurosci Lett 301:187-190.
6. Sekiguchi T, Koyama S & Kakigi R (2001) The effect of stimulus repetition on cortical magnetic responses evoked by words and nonwords. Neuroimage 14:118-128.
7. Hoshiyama M, Gunji A & Kakigi R (2001) Hearing the sound of silence: a magnetoencephalographic study. NeuroReport 12:1097-1102.
8. Hoshiyama M & Kakigi R (2001) Two evoked responses with different recovery functions in the primary somatosensory cortex in humans. Clin Neurophysiol 112: 1334-1342.
9. Hoshiyama M & Kakigi R (2001) Effects of attention on pattern-reversal visual evoked potentials: Foveal field stimulation versus peripheral field stimulation. Brain Topogr 13: 293-298.
10. Wang L, Kakigi R & Hoshiyama M (2001) Neural activities during Wisconsin card sorting test - MEG study. Brain Res Cogn Brain Res 12:19-31.
11. Yabe H, Koyama S, Kakigi R, Gunji A, Tervaniemi M, Sato Y & Kaneko S (2001) Automatic discriminative sensitivity inside temporal window of sensory memory as a function of time. Brain Res Cogn Brain Res 12:39-48.
12. Lam K, Kakigi R, Mukai T & Yamasaki H (2001) Attention and visual interference affect somatosensory perception: a magnetoencephalographic study. Neuro-science 104:689-703.
13. Hoshiyama M & Kakigi R (2001) Correspondence between short-latency somatosensory evoked brain potentials and cortical magnetic fields following median nerve stimulation. Brain Res 908:140-148.
14. Itomi K, Kakigi R, Hoshiyama M & Watanabe K (2001) A unique area of the homunculus: the topography of the primary somatosensory cortex in humans following posterior scalp and shoulder stimulation. Brain Topogr 14:15-23.
15. Qui Y, Inui K, Wang X, Tran TD & Kakigi, R (2001) Conduction velocity of the spinothalamic tract in humans as assessed by CO_2 laser stimulation of C-fibers. Neurosci Lett 311:181-184.
16. Wang L, Barber C, Kakigi R, Kaneoke Y, Okusa T & Yaqin W (2001) A first comparison of the multifocal visual evoked magnetic field and visual evoked potential Neurosci Lett 315:13-16.

2) その他

1. Kawakami O, Kaneoke Y & Kakigi R (2001) Perception of apparent motion is related to the magnetic response from the human extrastriate cortex. "Proceedings of The 12th International Conference on Biomagnetism", (Eds. Nenonen J, Ilmoniemi RJ & Katila T), Helsinki University of Technology, Espoo, Finland, pp. 161-164.
2. Lam K, Kaneoke Y, Gunji A, Yamasaki H, Matsumoto E, Naito T & Kakigi R (2001) Magnetic response of the human visual motion area to coherent and incoherent motion. "Proceedings of The 12th International Conference on Biomagnetism", (Eds. Nenonen J, Ilmoniemi RJ & Katila T), Helsinki University of Technology, Espoo, Finland, pp.165-168.
3. Watanabe S, Kakigi R & Puce A (2001) Cortical regions responding to eye movement. "Proceedings of The 12th International Conference on Biomagnetism", (Eds. Nenonen J, Ilmoniemi RJ & Katila T), Helsinki University of Technology, Espoo, Finland, pp. 212-215.
4. Kakigi R, Yamasaki S, Watanabe S & Hoshiyama M (2001) Stimulus methods for recording pain-related SEF. "Proceedings of The 12th International Conference on Biomagnetism", (Eds. Nenonen J, Ilmoniemi RJ & Katila T), Helsinki University of Technology, Espoo, Finland, pp. 232-235.
5. Nihashi T, Kakigi R, Kawakami O, Hoshiyama M, Itomi K, Nakanishi H, Kajita Y, Inao S & Yoshida J (2001) Somatosensory evoked magnetic fields following stimulation of the ear in humans. "Proceedings of The 12th International Conference on Biomagnetism", (Eds. Nenonen J, Ilmoniemi RJ & Katila T), Helsinki University of Technology, Espoo, Finland, pp. 251-254.
6. Gunji A, Hoshiyama M & Kakigi R (2001) Vocalization related cortical fields following a simple vowel vocalization. "Proceedings of The 12th International Conference on

Biomagnetism", (Eds. Nenonen J, Ilmoniemi RJ & Katila T), Helsinki University of Technology, Espoo, Finland, pp. 375-378.
7. 山崎　浩，渡邊昌子，柿木隆介 (2001) 痛覚認知に対する注意効果. 臨床脳波 43:23-28
8. 柿木隆介 (2001) 高次脳機能の生理学　脳波と脳磁図を用いた研究. 脳と精神の医学 12:31-34
9. 渡邊昌子，柿木隆介 (2001)「目の動き」認知に関するヒト脳部位局在. 臨床脳波 43:364-368
10. 渡邊昌子，柿木隆介 (2001)「目の動き」認知に関与するヒト後頭側頭葉の活動. Brain Medical 13: 41-46
11. 渡邊昌子，柿木隆介 (2001) 脳磁図(MEG)による脳機能計測. 日磁医誌 21:287-297

《形態情報解析室》

1) 英文原著論文

1. Furuya S, Hiroe T, Ogiso N, Ozaki T, Hori S (2001) Localization of endothelin A and B receptors during the postnatal development of rat cerebellum. Cell & Tissue Res 305:307-324.

2) その他

1. 有井達夫 (2001) 電子回折における臨界電圧効果. 名古屋大学　電子光学研究の歩み 17, 15-18.
2. 片桐展子，重松康秀，有井達夫，片桐康雄　(2001) 腹足類の外套組織にみられる筋繊維の超高圧電顕観察とその立体再構築.　電子顕微鏡 36, Suppl. 1, 236.

《生体情報処理室》

1) 英文原著論文

1. Yokota H, Tsubokawa H, Miyawaki T, Konno K, Nakayama H, Masuzawa T, Kawai N (2001) Modulation of synaptic transmission in hippocampal CA1 neurons by a novel neurotoxin (beta-pompilidotoxin) derived from wasp venom. Neurosci Res 41:365-371.

2) その他

1. Tsubokawa H (2001) Control of Na^+ spike backpropagation by Intracellular Signaling in the Pyramidal Neuron Dendrites. Mol Neurobiol 22: 129-141.

《戦略的方法論研究領域》

1) 英文原著論文

1. Danov K, Danev R, Nagayama K (2001) Electric charging of thin films measured using the contrast transfer function. Ultramicroscopy 87: 45-54.
2. Tanooka D, Adachi E, Nagayama K (2001) Color-imaging ellipsometer: High-Speed characterization of in-plane distribution of film thickness at nano-scale. Jpn J Appl Phys 40: 877-880.
3. Hirota T, Kagiwada S, Kasahara T, Okano T, Murata M, Fukada Y (2001) Effect of brefeldin A on melatonin secretion of chick pineal cells. J Biochem 129: 51-59.
4. Danev R, Nagayama K (2001) Complex Observation in Electron Microscopy. II. Direct Visualization of Phases and Amplitudes of Exit Wave Functions. J Phys Soc Jpn 70: 696-702.
5. Murata K, Odahara N, Kuniyasu A, Sato Y, Nakayama H, Nagayama K (2001) Asymmetric arrangement of auxiliary subunits of skeletal muscle voltage-gated L-type Ca^{2+} channel. Biochim Biophys Res Commun 282: 284-291.
6. Danev R, Nagayama K (2001) Transmission Electron Microsocpy with Zernike Phase Plate. Ultramicroscopy

88: 243-252.

2) その他

1. P. Kralchevsky, K. Nagayama (2001) Particles at Fluid Interfaces and Membranes－Attachment of Colloid Particles and Proteins to Interfaces and Formation of Two-Dimensional Arrays. Stud. Interface Sci. Vol. 10, Elsevier, Amsterdam, 1-645.
2. 永山國昭 (2001) ノーベル賞と分光学 I. 高分解能NMR－エルンストによる高次元への飛躍. 分光研究 50: 28-38.
3. 永山國昭 (2001) タンパク質フォールディングの物理. 生物物理 41: 196-200.
4. 永山國昭 (2001) 新ミレニアムのメッセージ. 自然・科学・人間. 蛋白質・核酸・酵素 46: 1392-1396.
5. 永山國昭 (2001) NMRから電子顕微鏡へ－フーリエ変換に導かれて. 分光研究 50: 219-225.
6. 加納ふみ，村田昌之（2001）細胞内イベントを操作するセミインタクト細胞系－新しいナノテクノロジーの基盤デバイスとして－. 生体の科学 52: 340-346.

《時系列生命現象研究領域》

1) 英文原著論文

1. Ohtsuka Y, Obinata T & Okamura Y (2001) Induction of ascidian peripharal neuron by vegetal blastomeres. Dev Biol 239:107-117.

2) その他

1. Meinertzhagen IA & Okamura Y (2001) The ascidian larval nervous system: the chordate brain from its small beginnings. Trends in Neurosci 24: 401-410

《生命環境研究領域》

1) 英文原著論文

1. Inoue R, Okada T, Onoue H, Hara Y, Shimizu S, Naitoh S, Ito Y & Mori Y (2001) The transient receptor potential protein homologue TRP6 is the essential component of vascular α1-adrenoceptor activated Ca^{2+}-permeable cation channel. Circ Res 88:325-332.
2. Minami K, Raymond C, Martin-Moutot N, Ohtake A, Van Renterghem C, Takahashi M, Seagar MJ, Mori Y & Sato K (2001) Role of Thr11 in the binding of ω-conotoxin MVIIC to N-type Ca^{2+} channels. FEBS Lett 491:127-130.
3. Ino M, Yoshinaga T, Wakamori M, Miyamoto N, Takahashi E, Sonoda J, Kagaya T, Oki T, Nagasu T, Nishizawa Y, Tanaka I, Imoto K, Aizawa S, Koch S, Schwartz A, Niidome T, Sawada K & Mori Y (2001) Functional disorders of the sympathetic nervous system in mice lacking the α1B subunit (Cav 2.2) of N-type calcium channel. Proc Natl Acad Sci USA 98:5323-5328.
4. Kato Y, Sakaguchi M, Mori Y, Saito K, Nakamura T, Bakker EP, Sato Y, Goshima S & Uozumi N (2001) Evidence in support of a four transmembrane-pore-transmembrane topology model for the Arabidopsis thaliana Na^+/K^+ translocating AtHKT1 protein, a member of the superfamily of K^+ transporters. Proc Natl Acad Sci USA 98:6488-6493.
5. Hatakeyama S, Wakamori M, Ino M, Miyamoto N, Takahashi E, Yoshinaga T, Sawada K, Imoto K, Tanaka I, Yoshizawa T, Nishizawa Y, Mori Y, Niidome T & Shoji S (2001) Differential nociceptive responses in mice lacking the α1B subunit of N-type Ca^{2+} channels. Neuroreport 12:2423-2427.
6. Kinoshita M, Nukada T, Asano T, Mori Y, Akaike A, Satoh M & Kaneko S (2001) Binding of Gαo N-terminus is responsible for the voltage-resisitant inhibition of α1B (P/Q-type, Cav 2.1) Ca^{2+} channels. J Biol Chem 276:28731-28738.
7. Kang MG, Chen CC, Felix R, Letts VA, Frankel WN, Mori Y & Campbell KP (2001) Biochemical and biophysical evidence for γ2 subunit association with

neuronal voltage-activated Ca^{2+} channels. J Biol Chem 276:32917-32924.

8. Kanki H, Kinoshita M, Akaike A, Satoh M, Mori Y & Kaneko S (2001) Activation of inisitol 1,4,5-trisphosphate receptor is essential for the opening of mouse TRP5 channels. Mol Pharmacol 60:989-998.
9. Sandoz G, Bichet D, Mori Y, Felix R & De Waard M (2001) Distinct properties and differential β subunit regulation of two C-terminal isoforms of the P/Q-type Ca^{2+} channel α1A subunit. Eur J Neurosci 14:987-997.
10. Iwasaki H, Mori Y, Hara Y, Uchida K, Hong Zhou & Mikoshiba K (2001) 2-Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) inhibits capacitative calcium entry independently of the function of IP_3Rs. Receptors Channels 7: 429-439.

2) その他

1. 森　泰生,原　雄二,石井正和,井上隆司 (2001) "TRP チャネル：受容体活性化される Ca^{2+}流入機構" Clinical Neuroscience 19, pp.116-117, 中外医学社
2. 森　泰生, 井本敬二, 井上隆司 (2001) "カルシウムチャネルの構造と機能" Clinical Calcium 11, pp.9-16, 医薬ジャーナル社
3. Mori Y, Inoue R, Ishii M, Hara Y & Imoto K (2001) Dissecting receptor-mediated Ca^{2+} influx pathways: TRP channels and their native counterparts. Jpn J Pharmacol 87: 245-252.
4. 挾間章博, 大佐賀敦, 丸山芳夫 (2001) パッチクランプ膜容量測定法. 新パッチクランプ実験技術法（岡田泰伸 編）pp.167-178, 吉岡書店, 京都

《動物実験センター》

1) 英文原著論文

1. Nagahama M., Semba R., Tsuzuki M. & Ozaki T. (2001) Distribution of peripheral nerve terminals in the small and large intestine of congenital Aganglionosis rats (Hirschsprungs disease rats). Pathol. International 51:145-157

《計算科学研究センター》

2) その他

高橋卓也（2002.3）フェリチン分子への多イオン透過過程におけるエネルギー障壁の計算. Supercomputer Workshop Report. 岡崎国立共同研究機構 pp 1 頁.

b. 学会発表

〔 目　　次 〕

神経化学研究部門 88
超微小形態生理研究部門 89
細胞内代謝研究部門 89
生体膜研究部門 90
機能協関研究部門 91
神経情報研究部門 92
液性情報研究部門 94
高次神経機構研究部門 94
高次神経性調節研究部門 95
生体システム研究部門 96
高次液性調節研究部門 97
脳形態解析研究部門 98
大脳神経回路論研究部門 98
心理生理学研究部門 99
高次脳機能研究プロジェクト 101
感覚・運動機能研究プロジェクト 102
形態情報解析室 104
生体情報処理室 104
機能情報解析室 104
戦略的方法論研究領域 105
時系列生命現象研究領域 106
生命環境研究領域 106
計算科学研究センター 107

学　会　発　表

《神経化学研究部門》

1. 桑名俊一, 岡田泰昌, 菅原美子, 小幡邦彦（2001.2）SIDS モデル動物としての GABA 合成酵素（GAD67）遺伝子ノックアウトマウスにおける呼吸機能異常。第 7 回日本乳幼児突然死症候群（SIDS）学会（東京）

2. 小幡邦彦, 兼子幸一, Oliver Stork（2001.3）扁桃体機能と GABA。第 78 回日本生理学会大会（京都）

3. 桑名俊一, 岡田泰昌, 菅原美子, 小幡邦彦（2001.3）GAD67 ノックアウトマウスの呼吸出力：in vivo 及び in vitro での解析。第 78 回日本生理学会大会（京都）

4. 岡田泰昌, 桑名俊一, 菅原美子, 小幡邦彦（2001.4）呼吸調節機構の発達における GABA の役割：GAD67 ノックアウト新生マウスの呼吸様式。第 41 回日本呼吸器学会総会（東京）

5. 兼子幸一, 蒔苗公利, 柳川右千夫（2001.4）　発達期におけるヴェシクル型 GABA トランスポーターの発現と機能。「脳を知る」・「脳を守る」合同シンポジウム（京都）

6. 柳川右千夫（2001.6）自発運動量および情動行動におけるカフェインの分子薬理学的研究。全日本コーヒー協会科学情報委員会主催第 4 回助成研究発表会（東京）

7. 槌本佳子, Renger John, 小幡邦彦, Hensch Takao（2001.9）　マウス視覚野における GABAA 受容体クラスタリングの臨界期開始への寄与。第 24 回日本神経科学大会（京都）

8. 柳川右千夫, 兼子幸一, 神原叙子, 戸塚昌子, 八木健, 小幡邦彦（2001.9）GABA ニューロンを GFP で標識した遺伝子改変マウスの開発。第 24 回日本神経科学大会（京都）

9. 兼子幸一, 小幡邦彦, 柳川右千夫（2001.9）GFP ノックインマウスを用いた扁桃体外側核および基底外側核 GABA 作動性ニューロンの電気生理学的特性とモノアミンによる修飾作用の解析。第 24 回日本神経科学大会（京都）

10. 山本友美, 小幡邦彦, 柳川右千夫（2001.9）　マウスグリシントランスポーター2 の遺伝子構造と発現調節機構。第 24 回日本神経科学大会（京都）。

11. 海老原利枝, 小幡邦彦, 柳川右千夫（2001.9）　マウスヴェシクル型 GABA トランスポーター遺伝子プロモーターの解析。第 24 回日本神経科学大会（京都）

12. 遠藤利朗, 伊佐　正, 兼子幸一, 小幡邦彦, 柳川右千夫（2001.9）　GAD67 遺伝子 GFP ノックインマウスを用いた上丘浅層 GABA 作動性ニューロンの電気生理学的特性と形態的特徴の解析。第 24 回日本神経科学大会（京都）

13. 山肩葉子, 小幡邦彦（2001.9）　生体内におけるシナプシン I のリン酸化－MAP キナーゼによる調節。第 24 回日本神経科学大会（京都）

14. 桑名俊一, 岡田泰昌, 菅原美子, 小幡邦彦（2001.9）中枢性呼吸神経回路網の発達における GABA の役割。第 24 回日本神経科学大会（京都）

15. Kaneko K, Obata K (2001.11) Enhanced synaptic plasticity in the thalamoamygdala pathway of adult GAD65 knockout mice. 31th Annual Meeting of Society for Neuroscience (San Diego, USA).

16. Ebihara S, Obata K, Yanagawa Y (2001.11)　Structure, chromosomal localization, and promoter analysis of the mouse vesicular GABA transporter gene. 31th Annual Meeting of Society for Neuroscience (San Diego, USA).

17. Takagi S, Obata K, Tsubokawa H (2001.11) GABAergic inputs contribute to activity-dependent changes in cell volume in the hippocampal CA1 regions. 31th Annual

Meeting of Society for Neuroscience (San Diego, USA).

18. 中舎洋平，田中大介，柳川右千夫，小幡邦彦，村上富士夫（2001.12）マウス胎児における GABA 作動性ニューロンの移動経路。第 24 回日本分子生物学会年会（横浜）

《超微小形態生理研究部門》

1. Murakami M, Yoshimura K, Segawa A（2001, 2）Relationship between amylase secretion and fluid secretion in the isolated perfused parotid gland of the rat. Gordon Research Conference on Salivary glands and Saliva (Ventura, USA).

2. 村上政隆，吉村啓一，杉谷博士（2001, 3）唾液腺における水分泌と蛋白分泌の関係．第 78 回日本生理学会大会（京都）.

3. Seo Y, Shinar S, Morita Y, Ikoma K, Kusaka Y, Murakami M, Navon G（2001. 7）Degeneration of Neurofilament of Rat Sciatic Nerve Detected by ^{2}H Double Quantum Filtered NMR Spectroscopy and Imaging. 6th International Conference on Magnetic Resonance Microscopy（Nottingham, UK）.

4. Seo Y, Morita Y, Ikoma K, Kusaka Y, Murakami M, Keinan K, Shinar H, Navon G (2001. 8) Quantification of neurofilament degeneration of sciatic nerve using ^{2}H double quantum filtered NMR spectroscopy. ISMAR（Rhodes, Greece）.

5. Murakami M, Yoshimura K, Sugiya H, Segawa A, Riva A (2001. 8) Relationship between protein and fluid secretion in the perfused salivary gland. IUPS satellite Symposium on Exocrine Secretion（Leura, Australia）.

6. 瀬尾芳輝，荻野孝史，森田啓之，村上政隆 (2001. 9) ラット CSF 産生への pCO2 の影響：GD-DTPA 造影 T1 強調 MRI 法による測定．第 29 回日本磁気共鳴医学会大会（筑波）

7. 古山富士弥，村上政隆，水野公美，大岩隆則，西野仁雄（2001. 10）遺伝的高温耐性適応ラットは何を遺伝しているか　第 40 回日本生気象学会年会（大阪）.

8. 瀬尾芳輝，鷹股 亮，荻野 孝史，森田 啓之，村上 政隆（2001. 11）ラット脳脊髄液産生への血中炭酸ガス分圧の影響：Gd-DTPA 造影 T1 強調 MRI 法による測定．第 40 回 NMR 討論会（京都）

9. 村上政隆，Riva A (2001. 12) 唾液分泌の三次元電子顕微鏡観察．生理学研究所研究会「三次元電子顕微鏡観察」（岡崎）

10. 大橋正人,石堂美和子,水島昇,吉森　保,永山国昭（2001.10）NAD(P)H ステロイド脱水素酵素様タンパク質の細胞内局在．第 74 回日本生化学会大会（京都）.

11. 大橋 正人（2001. 6）哺乳類変異株細胞を用いたエンドサイトーシス経路の研究．第 54 回日本細胞生物学会大会ワークショップ（岐阜）.

12. 松本友治，村田和義，大河原浩，國安明彦，中山仁，永山國昭（2001. 2）位相差電子顕微鏡によるリアノジン受容体の一粒子観察．第 4 回岡崎機構セミナー「統合バイオサイエンス」（岡崎）.

《細胞内代謝研究部門》

1. Mohri T, Shirakawa H, Oda S & Miyazaki S (2001.3) Ca^{2+}/Mn^{2+} dynamics during Ca^{2+} oscillations in mouse eggs. Jpn J Physiol 51 (Suppl): S122. 第 78 回日本生理学会大会（京都）

2. Aida T, Oda S, Awaji T & Miyazaki S (2001.3) A method for efficient expression of a GFP variant in mouse oocytes. Jpn J Physiol 51 (Suppl) : S112. 第 78 回日本生理学会大会（京都）.

3. Awaji T, Hirasawa A, Shirakawa H, Tsujimoto G & Miyazaki S (2001.3) Novel GFP-based ratiometric indicators for monitoring intracellular pH. Jpn J Physiol 51 (Suppl) : S114. 第 78 回日本生理学会大会（京都）.

4. Shirakawa S & Miyazaki S (2001.3) Dual emission ratiometric measurement of intracellular calcium with visible-light excitation. Jpn J Physiol 51 (Suppl) : S109. 第 78 回日本生理学会大会（京都）.

5. Miyazaki, S (2001.7) Physiological characterization of mammalian sperm factor. Gordon Research Conf., “Fertilization and Activation of Develoment”. Program p. 2, (Plymouth, New Hampshire, USA).

6. Nagase Y, Uezono Y, Kaibara M, Murasaki O, Yoshida S & Taniyama K (2001.3) Interference of propofol on the Gi/o and Gs protein coupled receptors. Jpn J Pharmacol 85 (Suppl) : P-426. 第 74 回日本薬理学会年回　（横浜）.

7. Hiyama TY, Watanabe E, Yoshida S, Noda M (2001.9) Nax is a sodium level-sensing sodium channel. Neurosci Res (Suppl 25) : S70,　第 24 回日本神経科学・第 44 回日本神経化学・合同大会（京都）.

8. Ono T, Fujimura K, Yoshida S, Shibata S (2001.9) Evaluation of corpus callosotomy on intractable epilepsy in rats. Neurosci Res (Suppl 25) : S174. 第 24 回日本神経科学・第 44 回日本神経化学・合同大会（京都）.

9. Hiyama TY, Watanabe E, Yoshida S & Noda M (2001.11) Nax channel is involved in monitoring extracellular sodium concentration. Soc for Neurosci 31st Annual Meeting. Abstr Vol. E-22 (San Diego, USA).

《生体膜研究部門》

1. Takahashi N (2001.1) Two-photon imaging of glucose-induced exocytotic events in pancreatic islet of Langerhans. 4th conference on ABC protein and Ion channels (Kyoto).

2. Ellis-Davies GCR, Matsukazi M, Tachikawa A, Miyashita Y, Iino M, Barsotti RJ, Kasai H (2001.2) Development of caged glutamates for two-photon functional mapping of glutamate receptors in living hippocampal neurons. Biophysical Society (USA).

3. Kasai H (2001.3) The diversity of Ca dependent exocytosis. International Group for Insulin Secretion (IGIS) symposium (Nice).

4. Takahashi N (2001.3) Two-photon exocytosis of insulin exocytotic events in pancreatic islet of Langerhans. International Group for Insulin Secretion (IGIS)-symposium (Nice).

5. 河西春郎，岸本拓哉，劉婷婷，根本知己，高橋倫子，木村良一，住吉克彦 (2001.3) カルシウム依存性開口放出の多様性。第 78 回日本生理学会（京都）

6. 高橋倫子，根本知己，飯野正光，宮下保司，河西春郎 (2001.3) 2 光子励起法を用いた膵島開口放出の可視化解析。第 78 回日本生理学会シンポジウム（京都）。

7. 久木田文夫 (2001.3) 水ストレスで開くＫチャネル 第 78 回日本生理学会（京都）。

8. 高橋倫子，根本知己，河西春郎 (2001.4) 2 光子励起法を用いた膵島標本におけるインスリン開口放出の可視化解析。第 44 回日本糖尿病学会年次学術集会（京都）。

9. 高橋倫子，河西春郎 (2001.6) 2 光子励起断層画像法を用いた膵島インスリン開口放出の可視化解析。第

74 回日本内分泌学会（横浜）。

10. Noriko Takahashi, Tomomi Nemoto, Haruo Kasai (2001.9) Two-photon excitation imaging of insulin exocytosis in intact pancreatic islets of Langerhans. 第 37 回欧州糖尿病学会（グラスゴー）

11. 松崎政紀，Graham C.R. Ellis-Davies，根本知己，宮下保司，飯野正光，河西春郎 (2001.9) 海馬 CA1 錐体細胞における樹状突起スパインの形態とグルタミン酸受容体の機能的発現。第 24 回日本神経科学大会（京都）

12. 高橋倫子，河西春郎 (2001.10) 膵島標本におけるインスリン開口放出の可視化解析。第 74 回日本生化学学会シンポジウム（京都）

《機能協関研究部門》

1. Okada Y, Sabirov RZ, Abdullaev IF, Ando-Akatsuka Y (2001.3) CFTR-mediated regulation of volume-sensitive anion channels and ATP release. 第 78 回 日本生理学会大会シンポジウム「蛋白質間相互作用によるイオンチャネルの制御」（京都）

2. Morishima S, Peti-Peterdi J, Bell PD, Miyoshi T, Okada Y (2001.3) Involvement of aquaporins in osmoregulation in macula densa cells studied by two-photon laser microscopy. 第 78 回 日本生理学会大会シンポジウム「腎尿細管のイオンチャネルおよび輸送担体の発現と機能調節」（京都）

3. Maeno E, Wakabayashi S, Okada Y (2001.3) Role of a Na^+/H^+ exchange in disordered volume regulation associated with apoptosis induced by physical shrinkage. 第 78 回 日本生理学会大会（京都）

4. Manabe K, Morishima S, Dezaki K, Okada Y (2001.3) Secretory volume decrease (SVD) and regulatory volume increase (RVI) in colonic epithelial cells. 第 78 回 日本生理学会大会（京都）

5. Dezaki K, Maeno E, Okada Y (2001.3) Cytosolic K+, Cl^- and Ca^{2+} changes during early stage of cell apoptosis. 第 78 回 日本生理学会大会（京都）

6. Mori S, Morishima S, Dezaki K, Takasaki M, Okada Y (2001.3) Effects of lactacidosis upon cell volume and volume-sensitive Cl^- currents in neuronally differentiated NG108-15 cells. 第 78 回 日本生理学会大会（京都）

7. Nabekura T, Morishima S, Cover TL, Mori S, Kannan H, Komune S, Okada Y (2001.3) Recovery from persistent glial cell swelling under lactacidosis by introduction of anion channels. 第 78 回 日本生理学会大会（京都）

8. Sabirov RZ, Dutta AK, Okada Y (2001.3) A conductive pathway for swelling-induced ATP release: volume-activated large-conductance Cl^- channel in murine mammary C127 cells. 第 78 回 日本生理学会大会（京都）

9. Wang J, Morishima S, Okada Y (2001.3) A volume-regulatory, Ca^{2+}-activated, intermedate-conductance K^+ channel in human epithelial cells. 第 78 回 日本生理学会大会（京都）

10. Abdullaev IF, Sabirov RZ, Ando-Akatsuka Y, Dezaki K, Okada Y (2001.3) Effects of CFTR expression on volume-sensitive Cl^- currents in HEK293T and C127 cells. 第 78 回 日本生理学会大会（京都）

11. Hara Y, Wakamori M, Okada Y, Imoto K, Mori Y (2001.3) A novel β-NAD^+-activated Ca^{2+}-permeable channel confers susceptibility to reactive oxygen species-induced cell death. 第 78 回 日本生理学会大会（京都）

12. Okada Y, Maeno E, Ishizaki Y, Wakabayashi S (2001.5) Disordered cell volume regulation associated with

apoptosis. Cell Struct. Funct. 第 54 回 日本細胞生物学会大会シンポジウム「アポトーシス誘導と阻害の分子細胞生物学的新展開」（岐阜）

13. Maeno E, Tsubata T, Ishizaki Y, Okada Y (2001.5) Apoptotic volume decrease (AVD) process independent of apoptotic mitochondrial events. 第 54 回 日本細胞生物学会大会（岐阜）

14. 岡田泰伸 (2001.6) 細胞の浸透圧の応答と容積調節機構：その生理と病態。第 23 回 日本麻酔・薬理学会学術大会・特別講演（東京）

15. Okada Y, Sabirov RZ, Dezaki K, Hazama A, Fan H-T, Abdullaev I, Shimizu T, Dutta AK, Hayashi S, Ando-Akatsuka Y, Tsumura T, Maeno E (2001.8) The pathway and roles of ATP release from epithelial cells. IUPS 2001 Satellite Symposium: Electrolyte Transport across Exocrine Epithelia (Blue Mountains, Australia).

16. Sabirov RZ, Dutta AK, Okada Y (2001.8) Swelling-induced maxi-anion channel in murine C127 cells: ATP-block and ATP-permeation. IUPS 2001 Satellite Symposium: Electrolyte Transport across Exocrine Epithelia (Blue Mountains, Australia).

17. Okada Y, Maeno E, Wakabayashi S, Ishizaki Y (2001.8) Disordered cell volume regulation in apoptotic cells. IUPS Satellite Symposium: Molecular Mechanisms in Cell Volume Regulation (Queenstown, New Zealand).

18. Morishima S, Kida H, Konno T, Ueda S, Okada Y (2001.8) Role of water channel in cell volume changes and regulation under hypotonic stress. IUPS Satellite Symposium: Molecular Mechanisms in Cell Volume Regulation (Queenstown, New Zealand).

19. Okada Y, Maeno E, Tsubata T, Ishizaki Y (2001.8) Induction mechanism of apoptotic volume decrease (AVD) is independent of mitochondrial events. The 34th International Congress of Physiological Sciences (Christchurch, New Zealand).

20. Sabirov R, Dutta A, Okada Y (2001.8) Volume -activated mechano-sensitive ATP-conductive pathway in murine C127 cells. The 34th International Congress of Physiological Sciences (Christchurch, New Zealand).

21. Morishima S, Kida H, Konno T, Ueda S, Okada Y (2001.8) Water channel as a requisite to cell volume regulation in a human epithelial cell line. The 34th International Congress of Physiological Sciences (Christchurch, New Zealand).

22. Okada Y (2001.9) Pathway and roles of ATP release from CFTR-expressing and lacking cells. International Meeting. CFTR Pathophysiology of Chloride Channels and Channel Regulators (Leuven, Belgium).

23. Okada Y (2001.9) Receptor-mediated control of anion channels involved in cell volume regulation. International Symposium. Molecular Physiology of Chloride Channels: From Molecule to Disease (Leuven, Belgium).

24. Okada Y (2001.10) Rescue from apoptosis by blockers of volume-regulatory ion channels. International Symposium on Cell Signaling (Hong Kong, China).

25. 赤塚結子, Abdullaev IF, Sabirov RZ (2001.10) 容積感受性 Cl^-チャネルとそれを制御する CFTR 蛋白質の相関機構。第 48 回中部日本生理学会（名古屋）

《神経情報研究部門》

1. 鹿川哲史，池中一裕 (2001.5) オリゴデンドロサイト発生メカニズムの解析。第 54 回日本細胞生物学会（岐阜）

2. Tsujinoue H, Nakatani T, Yoshiji H, Akahane T, Fukui H, Ikenaka K, Kuriyama S (2001.7) Improvement of retrovirus-mediated gene transfer into tumor cell. 第 7

回日本遺伝子治療学会（東京）

3. 池中一裕 (2001.8) アルツハイマー/パーキンソン病 第 38 回日本臨床分子医学会学術総会（札幌）

4. Hasegawa A, Iwasaki Y, Yamada M, Ogawa M, Ikenaka K (2001.8) Cystatin C induces astrocyte differentiation by inhibition of cystein proteases. Joint Meeting 18th Biennial Meeting of the ISN and 32nd Annual Meeting of the ASN (Buenos Aires, Argentina).

5. Ishibashi T, Ikenaka K, Hirahara Y, Honke K, Dupree PE, Baba, H. (2001.8) Myelin sulfatide is essential for clustering of ion channels near the Node of Ranvier. Joint Meeting 18th Biennial Meeting of the ISN and 32nd Annual Meeting of the ASN (Buenos Aires, Argentina).

6. 池中一裕 (2001.9) 遺伝子治療。第 2 回日本分子脳神経外科学会（名古屋）

7. Baba H, Ishibashi T, Ikenaka K (2001.9) Molecular components of myelin that restrict channel localization to the nodal region. 第 44 回日本神経化学・第 24 回日本神経科学学会合同年会（京都）

8. 佐々木学，中平健祐，河野洋三，清水惠司，吉峰俊樹，池中一裕 (2001.9) グリオーマに特異的に強く発現していた melanoma-associated antigen gene family にホモロジーのある新規遺伝子 MAGE-E1 のクローニング。第 2 回日本分子脳神経外科学会（名古屋）

9. 和田圭樹，清水健史，鹿川哲史，高田慎治，室山優子，池中一裕 (2001.9) 脊髄背側から放出されるオリゴデンドロサイト分化抑制因子の解析。第 44 回日本神経化学・第 24 回日本神経科学学会合同年会（京都）

10. 清水健史，和田圭樹，鹿川哲史，高田慎治，室山優子，池中一裕 (2001.9) Wnt シグナリングによるオリゴデンドロサイト分化抑制。第 44 回日本神経化学・第 24 回日本神経科学学会合同年会（京都）

11. 中平英子，鹿川哲史，Martyn M. Goulding，池中一裕(2001.9) 大脳発生過程を解析する細胞移動追跡方法の確立。第 44 回日本神経化学・第 24 回日本神経科学学会合同年会（京都）

12. 石橋智子，池中一裕，井上芳郎，目加田英輔，馬場広子 (2001.9) 中枢神経系 Axo-paradonal junciton 形成における CD9 の新たな役割。第 44 回日本神経化学・第 24 回日本神経科学学会合同年会（京都）

13. 中平健祐，柴崎貢志，James S. Trimmer，Kenneth J. Rhodes，池中一裕，渡辺修一 (2001.9) Kv4.2-EGFP 融合蛋白質によるチャネル分子局在制御の可視化。第 44 回日本神経化学・第 24 回日本神経科学学会合同年会（京都）

14. 柴崎貢志，中平健祐，柴田理一，Andreas Jeromin，James Trimmer，Kenneth Rhodes，渡辺修一，池中一裕 (2001.9) 発達小脳顆粒細胞における細胞内結合蛋白質による Kv4.2 の局在制御。第 44 回日本神経化学・第 24 回日本神経科学学会合同年会（京都）

15. Kazuhiro Ikenaka, (2001.10) Regulation of Glial Cell Development，日韓合同セミナー (Sogipo, Korea)

16. 池田武史，藤本一朗，石井章寛，中北慎一，長谷純宏，池中一裕 (2001.10) 系統的 Adult マウス脳内中性 N-結合型糖蛋白糖鎖の HPLC2 次元マップ上の主要糖鎖構造決定。第 74 回日本生化学会大会（京都）

17. 中北慎一，長束俊治，Krishna K. Menon，池中一裕，長谷純宏 (2001.10) マウス“脳型”ガラクトース転移酵素の基質性特異性。第 74 回日本生化学会大会（京都）

18. 佐々木学，池中一裕，河野洋三，中平健祐，丸野元彦，泉本修一，鈴木強，吉峰俊樹 (2001.12) グリオーマに特異的に発現している新規遺伝子 MAGE-E1 の遺伝子構造と蛋白質発現。第 6 回グリア研究会（大阪）

19. 中平英子，鹿川哲史，Martyn M. Goulding，池中一裕(2001.12) 大脳皮質オリゴデンドロサイトの発生起源。第 6 回グリア研究会（大阪）

20. 長谷川明子，岩崎靖乃，池中一裕 (2001.12) シスタチン C のプロテアーゼインヒビター活性による細

胞分化制御。第 6 回グリア研究会（大阪）

21. 藤本一朗，池田武史，石井章寛，山田元，長谷純宏，中北慎一，池中一裕 (2001.12) 脳内 N 結合型糖鎖の網羅的解析。第 24 回日本分子生物学会年会（横浜）

22. 池中一裕（2002.3）グリア細胞分化制御の分子基盤。第 75 回日本薬理学会年会（熊本）

《液性情報研究部門》

1. Mori M, Konno T, Morii T, Nagayama K, Imoto K (2001.2) Interaction between calmodulin and voltage-dependent sodium channel. Biophysical Society 45th Annual Meeting (Boston, USA).

2. Nakai J, Ohkura M, Imoto K (2001.2) A novel high signal-to-noise Ca^{2+} probe composed of a single green fluorescent protein. Biophysical Society 45th Annual Meeting (Boston, USA).

3. Protasi F, Nakai J, Beam KG, Takekura H, Franzini-Armstrong C, Allen PD (2001.2) Two independent regions of RYR1 (1837-2154 and 2659-3720) restore skeletal type E-C coupling and DHPR junctional tetrads. Biophysical Society 45th Annual Meeting (Boston, USA).

4. 井本　敬二（2001.3）イオンチャネルと神経回路。第 78 回日本生理学会大会（京都）

5. 松下かおり，若森 実，森 泰生，井本敬二（2001.3）Rolling Nagoya における P 型 Ca^{2+}チャネル活性の変化。第 78 回日本生理学会大会（京都）

6. 松下かおり，若森　実，織田銑一，森　泰生，井本敬二（2001.9）P/Q 型カルシウムウチャネル変異マウスにおける小脳シナプスの性質の変化。第 24 回日本神経科学・第 44 回日本神経化学合同大会（京都）

7. Matsushita K, Wakamori M, Mori Y, Imoto K (2001. 11）Paradoxical enhancement of cerebellar synaptic transmission in rolling calcium channel mutant mice. The 31st Annual Meeting, Society for Neuroscience (San Diego, USA).

8. Huda K, Imoto K (2001. 11）Defective feedforward inhibition of thalamocortical integration in tottering epileptic mice. The 31st Annual Meeting, Society for Neuroscience (San Diego, USA).

《高次神経機構研究部門》

1. Yagi T (2001.7) Somatic mutations of synaptic cadherins(CNR family) in the brain. GRC on Neural Plasticity (Newport).

2. Yagi T (2001.8) Somatic mutations of synaptic cadherins(CNR family) in the brain. Joint Meeting of the International Society for Neurochemistry and American Society for the Neurochemistry (Buenos Aires).

3. 八木　健 (2001.3) 遺伝子改変動物研究の概要と展開。第 78 回日本生理学会シンポジウム（京都）

4. 先崎浩次 (2001.3) 大脳皮質層構造形成機構における CNR ファミリーの分子機能解析。第 78 回日本生理学会シンポジウム（京都）

5. 八木　健 (2001.9) CNR ファミリーとその脳の機能進化における意味。第 24 回日本神経科学・第 44 回日本神経化学合同大会 (京都)

6. 田仲祐介，八木健 (2001.9) 嗅覚刺激によって誘発されるマウス嗅球の低周波活動。第 24 回日本神経科学・第 44 回日本神経化学合同大会 (京都)

7. 濱田　俊，八木　健 (2001.9) シナプスに存在する多様化カドヘリン分子群： CNR ファミリー。第 24 回日本神経科学･第 44 回日本神経化学合同大会 (京都)

8. 八木　健 (2001.11) 脳神経系で発現する CNR / protocadherin ファミリーの解析。研究領域「脳を知る」シンポジウム“脳神経科学の最先端 2001”（東京）

9. 武藤哲司，八木　健 (2001.11) Cell-Adhesion Activity of Cadherin-Related Neuronal Receptor(CNR) Family. 研究領域「脳を知る」シンポジウム“脳神経科学の最先端 2001”（東京）

10. 平山晃斉，八木　健 (2001.11) シナプスに局在する CNR ファミリー遺伝子の転写産物における体細胞突然変異。研究領域「脳を知る」シンポジウム“脳神経科学の最先端 2001”（東京）

11. 八木　健 (2001.11) シナプスに存在するカドヘリン分子群： CNR ファミリー。第 74 回日本生化学大会（京都）

12. 八木　健 (2001.12) 動物行動とゲノム 第 24 回日本分子生物学会（横浜）

《高次神経性調節研究部門》

1. Komatsu H, Kinoshita M（2001.7）Neural representation of surface luminance and brightness in the macaque primary visual cortex (V1). 第 1 回アジア視覚カンファレンス (湘南)

2. 大西暁士，小池智，井田美樹，今井啓雄，七田芳則，竹中修，花澤明俊，小松英彦，三上章允，後藤俊二，北原健二，Farajallah A, Suryobroto B, 山森哲雄（2001.9）2 色性色覚マカクザルは存在するか？（1）分子遺伝学的手法による同定。第 24 回日本神経科学学会 (京都)

3. 花澤明俊，三上章允, Angelika PS, 竹中修，後藤俊二，大西暁士，小池智，山森哲雄，加藤啓一郎，近藤彩，Suryobroto B, Farajallah A, 小松英彦（2001.9）2 色性色覚マカクザルは存在するか？（2）ERG による網膜の赤／緑感度比測定。第 24 回日本神経科学学会 (京都)

4. 三上章允, Angelika PS, Farajallah A, Suryobroto B, 花澤明俊，小松英彦，鯉田孝和，竹中修，後藤俊二，大西暁士，小池智，山森哲雄，松村秀一，加藤啓一郎，近藤彩（2001.9）2 色性色覚マカクザルは存在するか？（3）混同色図形の弁別課題による判定. 第 24 回日本神経科学学会 (京都)

5. 小川正，小松英彦（2001.9）多次元視覚探索課題を遂行中のサル V4 野のニューロン活動。第 24 回日本神経科学学会 (京都)

6. 谷利樹，横井功，伊藤南，田中繁，小松英彦（2001.9）ネコの初期視覚野における一様な面に対する反応。第 24 回日本神経科学学会 (京都)

7. Komatsu H, Kinoshita M（2001.9）. Neural representation of surface luminance and brightness in the macaque primary visual cortex.　日仏認知神経科学シンポジウム (和光)

《生体システム研究部門》

1. Mori S (2001.3) Fastigial control of multiple body segments for the integration of posture and locomotion. COE International Symposium on Higher Nervous Control of Posture and Locomotion. (Okazaki)

2. Nakajima K, Mori F, Okumura T, Tachibana A, Jankowska E, Mori S (2001.3) Locomotor driving signals to lumbosacral neurons: role of CLR-activated reticulospinal cells. COE International Symposium on Higher Nervous Control of Posture and Locomotion. (Okazaki)

3. Mori F, Nakajima K, Tachibana A, Takasu C, Tsujimoto T, Tsukada H, Mori S (2001.3) Cerebral glucose metabolism during the bipedal locomotion of the Japanese monkey, M. fuscata: a PET study. COE International Symposium on Higher Nervous Control of Posture and Locomotion. (Okazaki)

4. Okumura T, Kekesi K, Palhalmi J, Nakajima K, Mori F, Imamura K, Mori S (2001.3) Microperfusion into the rat striatum: rotation movements and brain c-fos expression induced by carbachol. COE International Symposium on Higher Nervous Control of Posture and Locomotion. (Okazaki)

5. Tachibana A, Mori F, Nakajima K, Takasu C, Mori M, Mori S (2001.3) Longitudinal study of the acquisition of operant-trained upright posture and bipedal locomotion by M. fuscata. COE International Symposium on Higher Nervous Control of Posture and Locomotion. (Okazaki)

6. Dobolyi A, Okumura T, Mori F, Matsuyama K, Mori S (2001.3) Acetylcholinesterase-positive neurons in the lumbar spinal cord of the developing and adult rat. COE International Symposium on Higher Nervous Control of Posture and Locomotion. (Okazaki)

7. 森　茂美（2001.3）歩行運動の高次制御と中枢神経系の可塑性。第 78 回日本生理学会大会（京都）

8. 中陣克己，森　大志，奥村　哲，橘　篤導，森　将浩，高須千慈子，Elzbieta Jankowska，森　茂美（2001.3）ネコ小脳歩行誘発野刺激により両側性に誘発される脊髄下行性信号。第 78 回日本生理学会大会（京都）

9. 森　大志，橘　篤導，中陣克己，高須千慈子，奥村哲，森　茂美（2001.3）トレッドミル上におけるニホンサルの直立二足歩行運動とその高次制御機序．第 78 回日本生理学会大会（京都）

10. 奥村　哲，Arpad Dobolyi，森　大志，森　茂美（2001.3）ラット腰髄の AchE 陽性神経細胞とセロトニン神経支配様式の生後発達。第 78 回日本生理学会大会（京都）

11. 橘　篤導，森　大志，高須千慈子，中陣克己，森　茂美（2001.3）若齢ニホンサルの成長・発達に伴う起立姿勢，直立二足歩行運動獲得・学習過程．第 78 回日本生理学会大会（京都）

12. 森　茂美（2001.9）運動学習によって獲得したトレッドミル上におけるニホンサルの直立二足歩行運動．第 24 回日本神経科学大会（京都）

13. 中陣克己，森　大志，奥村　哲，橘　篤導，森　将浩，高須千慈子，森　茂美（2001.3）ネコ小脳歩行誘発野の微小破壊と歩行運動時における運動分節の協調障害．第 24 回日本神経科学大会（京都）

14. 森　大志，橘　篤導，中陣克巳，高須千慈子，逵本徹，塚田秀夫，森　茂美（2001.9）歩行運動により賦活される脳領域：サル直立二足歩行モデルを用いた糖代謝 PET による研究。第 24 回日本神経科学大会（京都）

15. 奥村　哲，Julita Czarkowska-Bauch，中陣克巳，森　茂美（2001.9）ネコ室頂核－視床路終末線維の視床内分布と形態的特徴。第 24 回日本神経科学大会（京都）

16. 橘　篤導，森　大志，中陣克巳，高須千慈子，森　将浩，森　茂美（2001.9）若齢ニホンサルの身体成長と運動学習に伴う起立姿勢維持と二足歩行運動能

力の獲得過程。第 24 回日本神経科学大会（京都）

17. Nakajima K, Mori F, Okumura T, Tachibana A, Mori M, Takasu C, Mori S (2001.11) What is the functional role of the cat cerebellar locomotor region in postural and locomotor control ? Society for Neuroscience 30th Annual Meeting (San Diego, USA)

18. Mori F, Tachibana A, Nakajima K, Takasu C, Tsujimoto T, Tsukada H, Okumura T, Mori M, Mori S (2001.11) Bipedal locomotion in the Japanese monkey, M. fuscata: high-order CNS control mechanisms. Society for Neuroscience 30th Annual Meeting (San Diego, USA)

19. Okumura T, Czarkowska-Bauch J, Nakajima K, Mori S (2001.11) Fastigiothalamic projection in the cat: an anterograde BDA tracing study. Society for Neuroscience 30th Annual Meeting (San Diego, USA)

20. Tachibana A, Mori F, Nakajima K, Takasu C, Mori M, Mori S (2001.11) Acquisition of operant-trained upright posture and bipedal locomotion in the young Japanese monkey, M. fuscata. Society for Neuroscience 30th Annual Meeting (San Diego, USA)

《高次液性調節研究部門》

1. Li YX, Tokuyama W, Okuno H, Miyashita Y, Hashimoto T (2001.3) Quantitative analysis of BDNF mRNA expression levels in rat inferior olive subregions after unilateral labyrinthectomy. The Physiological Society of Japan (Kyoto, Japan).

2. Ohbayashi M, Miyashita Y (2001.3) Linkage of visuospatial information and saccade preparation in monkey premotor cortex. The Physiological Society of Japan (Kyoto, Japan).

3. Tokuyama W, Naya Y, Miyashita Y (2001.3) BDNF induction during visual long-term memory formation. The Physiological Society of Japan (Kyoto, Japan).

4. Sekihara, K., Nagarajan, S., Poeppel, D, Miyashita, Y (2001.6) A new eigenspace–based MEG beamformer technique effective when correlated sources exist. Annual Meeting of the Organization for Human Brain Mapping (Brighton, UK).

5. Uchida I, Kameyama M, Takenaka S, Konishi S, Miyashita Y (2001.6) Functional organization for top-down and bottom-up face processing in human occipital cortex. Annual Meeting of the Organization for Human Brain Mapping (Brighton, UK).

6. Tokuyama W. Miyashita Y (2001.9) Neurotrophins in cognitive memory formation in the primate. Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Kyoto, Japan).

7. Morita M, Hayashi T, Nakahara K, Koyama M, Hasegawa I, Miyashita Y (2001.9) Nogo dominant activity in monkey prefrontal cortex: an event-related functional MRI study. Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Kyoto, Japan).

8. Hasegawa I, Koyama M, Nakahara K., Morita M, Hayashi T, Fukushima, T. Miyashita,Y (2001.11) Event-related functional magnetic resonance imaging in awake macaque monkeys performing oculomotor tasks. Annual Meeting of Society for Neuroscience (San Diego, USA)

9. Yoshida M, Naya Y, Ito A., Shibata S, Miyashita, Y (2001.11) A combined single-unit and tract-tracing study revealed connectivity between functional domains of area TE and area 36 of macaque temporal lobe. Annual Meeting of Society for Neuroscience (San Diego, USA).

10. Konishi S, Hayashi T, Uchida I, Kikyo H, Takahashi, E. Miyashita,Y (2001.11) Asymmetrical hemispheric distribution of component processes associated with

cognitive set shifting. Annual Meeting of Society for Neuroscience (San Diego, USA).

11. Ohbayashi M, Ohki K, Miyashita Y (2001.11) Transient activities related to linkage of sensory information and saccade preparation in the monkey frontal cortex. Annual Meeting of Society for Neuroscience (San Diego, USA).

12. Hayashi T, Ohki K, Uchida I, Kanazawa I, Miyashita Y (2001.11) Modulation of prefrontal activity by memory load in visual working memory: an fMRI study. Annual Meeting of Society for Neuroscience (San Diego, USA).

《脳形態解析研究部門》

1. 重本隆一（2001.3）Cerebellar ataxia in patients with Hodgkin's disease:role of a metabotropic glutamate receptor 第 27 回生理学研究所国際シンポジウム（岡崎）

2. 重本隆一（2001.3）代謝調節型グルタミン酸受容体 mGluR 1 の機能阻害自己抗体による傍悪性腫瘍性神経症状 第 74 回日本薬理学会年会 (横浜)

3. 重本隆一（2001.3）グルタミン酸受容体の局在：シナプスとの位置関係についての定量的解析 第 78 回日本生理学会大会 (京都)

4. 馬杉美和子, 藤本　和, 渡邊雅彦, 重本隆一（2001.4）SDS-FRL による小脳膜上機能分子の発現解析 第 106 回日本解剖学会総会・全国学術集会（高知）

5. 重本隆一，馬杉美和子，藤本　和（2001.5）水チャネルと G 蛋白質共役型受容体の共局在とその機能 日本電子顕微鏡学会第 57 回学術講演会（福岡）

6. 納富拓也，重本隆一（2001.9）HCN チャネルの脳内局在 第 24 回日本神経科学・第 44 回日本神経化学合同大会 (京都)

7. 籾山俊彦 (2001. 3) 線条体シナプスにおけるシナプス前 D2 型受容体とN型カルシウムチャネルとの共役　第 74 回日本薬理学会年会 (横浜)

8. 籾山俊彦 (2001. 3) シナプス前 D2 型受容体を介する N 型カルシウムチャネルブロックによる線条体シナプス伝達抑制 第 78 回日本生理学会大会 (京都)

9. 籾山俊彦 (2001. 9) 線条体抑制性シナプス伝達を制御するカルシウムチャネルサブタイプの生後発達変化 第 24 回日本神経科学・第 44 回日本神経化学合同大会 (京都)

10. 籾山明子 (2001. 9) ラット脊髄視床路ニューロン発火特性の解析。日本神経科学学会第 24 回大会（京都）

《大脳神経回路論研究部門》

1. 川口泰雄，根東覚 (2001.3) 大脳皮質介在ニューロンの多様性とアセチルコリンの作用。第 78 回日本生理学会大会（京都）

2. Kawaguchi Y (2001.4) Distinct firing patterns of neuronal subtypes in oscillating cortical circuits. 2001 年国際ワークショップ Cellular Interactions in Neuronal Networks.（和光）

3. Kawaguchi Y, Karube F, Kubota Y (2001.5) Axonal arborization patterns of identified subtypes of cortical nonpyramidal cells. Cajal Institute International

Conference（Madrid, Spain）.

4. Kubota Y, Karube F, Kawaguchi.Y (2001.5) Synaptic Connection patterns of identified subtypes of cortical nonpyramidal cells. Cajal Institute International Conference（Madrid, Spain）.

5. 川口泰雄（2001.6）大脳皮質同期活動時の GABA 細胞の発火様式。生理学研究所研究会「抑制性ニューロンの役割」（岡崎）

6. 川口泰雄（2001.10）大脳神経回路網の構成原理を目指して。第 9 回名古屋市・理化学研究所ジョイント講演会（名古屋）

7. Kawaguchi Y (2001.11) Distinct firing patterns of neuronal subtypes in cortical synchronized activities. 31st Annual Meeting of Society for Neuroscience（San Diego, USA）.

8. Kubota Y, Kawaguchi Y (2001.11) Postsynaptic structures characteristic of axon terminals of cortical interneuron subtypes. 31st Annual Meeting of Society for Neuroscience（San Diego, USA）.

9. Karube F, Kubota Y, Kawaguchi Y (2001.11) Quantitative analysis of axon arborization of interneurons in the rat frontal cortex. 31st Annual Meeting of Society for Neuroscience（San Diego, USA）.

《心理生理学研究部門》

1. 定藤規弘, 米倉義晴 (2001.3) 機能的 MRI による高次脳機能の可塑性へのアプローチ : 手話の脳内機構。第 78 回日本生理学会大会（京都）

2. 定藤規弘 (2001.3) 非侵襲的脳機能画像法を用いた手の運動制御へのアプローチ。第 4 回健康科学フォーラム（豊中）

3. Okada T, Sadato N, Yamada H, YonekuraY (2001.6) Frequency dependent response amplitude at the primary visual area: comparison between 1.5Tesla and 3Tesla. 7th Annual Meeting of the Organization for Human Brain Mapping (Brighton, UK).

4. Nagahama Y, Okada T, Yamauchi H, Katsumi Y, Hayashi T, Oyanagi C, Konishi J, Fukuyama H, Shibasaki H (2001.6) Dorsal premotor activation in a visuo-visual conditional task. 7th Annual Meeting of the Organization for Human Brain Mapping (Brighton, UK).

5. Kosaka H, Oomori M, Murata T, Iidaka T, Yamada H, Okada T, Sadato N, Itoh H, Yonekura Y, Wada Y (2001.6) Schizophrenic patients show increased amygdala activation during facial recognition: a fMRI study. 7th Annual Meeting of the Organization for Human Brain Mapping (Brighton, UK).

6. Ohira H, Nomura M, Haneda K, Iidaka T, Sadato N, Okada T, Yonekura Y (2001.6) Subliminal priming of valenced face unconsciously modulates subsequent detection of facial expression: fMRI evidence of affective priming. 7th Annual Meeting of the Organization for Human Brain Mapping (Brighton, UK).

7. Matsuo K, Kato C, Ozawa F, Takehara Y, Isoda H, Isogai S, Moriya T, Sakahara H, Okada T, Nakai T (2001.6) Comparison of Copying Ideographic Characters and Copying Syllabic Characters - An fMRI Study. 7th Annual Meeting of the Organization for Human Brain Mapping (Brighton, UK).

8. Iidaka T, Takeshima S, Yamashita K, Okada T, Sadato N, Yonekura Y (2001.6) Specific neural responses in the left hippocampus and amygdala to the retrieval of facial identity and emotion An event-related fMRI study. 7th Annual Meeting of the Organization for Human Brain Mapping (Brighton, UK).

9. Sadato N, Yamada H, Okada T, Itoh H, Matsuki K, Yonekura Y (2001.4) Brain functional MR imaging during processing of language-related gestures in deaf and hearing subjects. 9th International Society for Magnetic Resonance in Medicine (Glasgow, UK).

10. Muramoto S, Uematsu H, Sadato N, Tsuchida T, Kimura H, Matsuda T, Yonekura Y, Itoh H (2001.4) $H_2{}^{15}O$ PET validation of tumor blood flow determined by double echo dynamic perfusion-weighted MR imaging. 9th International Society for Magnetic Resonance in Medicine (Glasgow, UK).

11. Muramoto S, Kimura H, Uematsu H, Ishimori Y, Kawamura Y, Matsuda T, Sadato N, Yonekura Y (2001.4) Differentiation of prostatic cancer from benign prostatic lesions using dual echo dynamic contrast MRI. 9th International Society for Magnetic Resonance in Medicine (Glasgow, UK).

12. Sawamoto N, Honda M, Hanakawa T, Aso T, Inoue M, Oga T, Fukuyama H, Shibasaki H (2001.4) Patho-pysiology of cognitive slowing in Parkinson's disease: A PET study. The 53rd Annual Meeting of American Academy of Neurology (Philadelphia, USA).

13. Maruoka N, Murata T, Omata N, Fujibayashi Y, Waki A, Sadato N, Yoshimoto M, Wada Y, Yonekura Y (2001.6) Greater resistance and lower contribution of free radicals to hypoxic neurotoxicity in immature rat brain compared to adult as revealed by positron autoradiography technique. 48th Annual Meeting of the Society of Nuclear Medicine (Toronto, Canada).

14. Sadato N (2001.6) PET and MRI, which to use for what. 20th International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function, 5th International Conference on Quantification of Brain Function with PET (Taipei, Taiwan).

15. Sadato N (2001.6) From tactile to visual: Cortico-cortical circuitry of the cross-modal plasticity in the blind during Braille reading. 小児神経科学会 (岡山)。

16. 定藤規弘 (2001.9) 非侵襲的脳機能画像法による高次脳機能へのアプローチ。第 13 回機能回復神経学研究会（東京）

17. Sadato N, Yonekura Y (2001.9) Brain functional MR imaging during processing of language-related gestures in deaf and hearing subjects. Joint France-Japan Symposium on Cognitive Neurosciences (和光).

18. 本田　学, Werhahn KJ, 花川　隆, Cohen LG（2001.9）外側運動前野の認知機能：経頭蓋磁気刺激による検討。第 24 回日本神経科学・第 44 回日本神経化学　合同大会（京都）

19. 河合徳枝，本田　学，中村　聡，Samatra P, 中谷陽二，下條信弘，大橋　力（2001.9）健常者における憑依トランスの神経生理学的検討。第 24 回日本神経科学・第 44 回日本神経化学 合同大会（京都）

20. 定藤規弘 (2001.9) 視聴覚脱失に伴う脳可塑性：機能的 MRI によるアプローチ。第 24 回日本神経科学・第 44 回日本神経化学　合同大会（京都）

21. 北田　亮, 内藤栄一, 河内山隆紀, 中村 聡, 松村道一, 米倉義晴, 定藤規弘 (2001.9) Internally simulated movement sensations activate cortical motor areas and the cerebellum during motor imagery.　第 24 回日本神経科学・第 44 回日本神経化学　合同大会（京都）

22. 河内山隆紀, 中村 聡, 松村道一, 米倉義晴, 岡田知久,定藤規弘 (2001.9) 機能的近赤外線スペクトロスコピー(NIRS)における解析法。第 24 回日本神経科学・第 44 回日本神経化学　合同大会（京都）

23. 野村理朗, 大平英樹, 羽田薫子, 飯高哲也, 定藤規弘,岡田知久, 米倉義晴 (2001.9) 感情プライミングにおける神経ネットワーク。第 24 回日本神経科学・第 44 回日本神経化学　合同大会（京都）

24. 八木下知子, 岡田知久, 定藤規弘, 永島　計, 細野剛良, 米倉義晴, 彼末一之 (2001.9) 機能 MRI を用いた局所温・冷刺激による脳内賦活領域の検討。第 24 回日本神経科学・第 44 回日本神経化学　合同大会（京都）

25. 守田知代, 河内山隆紀, 松村道一, 米倉義晴, 岡田

知久，定藤規弘 (2001.9) マッカロー効果による錯覚色知覚-機能的 MRI による研究-。第 24 回日本神経科学・第 44 回日本神経化学　合同大会（京都）

26. 定藤規弘 (2001.10) 非侵襲的脳機能画像法を用いた脳可塑性へのアプローチ。第 25 回健康指標プロジェクト例会（京都）

27. 定藤規弘 (2001.10) Cortical plasticity: an approach with functional neuroimaging. JST 領域探索プログラム「ヒューマノイドサイエンス」第 2 回研究会（京都）

28. Honda M, Kato H, Ohara S, Ikeda A, Inoue Y, Shibasaki H (2001.11) Stochastic time-series analysis of cortico-muscular coupling during sustained muscle contraction. The 31st Annual Meeting of the Society for Neuroscience (San Diego, USA).

29. Morita T, Kochiyama T, Matsumura M, Yonekura Y, Okada T, Sadato N (2001.11) Interaction of the orientation and color coding: functional anatomy of the McCollough effect. Society for Neuroscience 31th Annual Meeting (San Diego).

30. Saito DN, Okada T, Morita Y, Yonekura Y, Sadato N (2001.11) Cross-modal transfer form visual to tactile representations during shape matching: a functional MRI study. Society for Neuroscience 31th Annual Meeting (San Diego).

《高次脳機能研究プロジェクト》

1. 山下哲司,伊佐正(2001.3)ラット中脳ドパミン細胞におけるニコチン型受容体の活性化に伴うカルシウム感受性電流の特性。第 78 回日本生理学会大会(京都)

2. Isa T (2001.3) Neural control of saccades and its modulatory mechanism. 第 78 回日本生理学会大会(京都)

3. Kobayashi Y, Inoue Y, Isa T (2001.3) The performance of visually guided saccade task in monkeys: contribution of pedunculopontine tegmental nucleus neurons. 第 78 回日本生理学会大会(京都)

4. 山下哲司，伊佐正（2001.10）ラット中脳ドパミン細胞におけるニコチン型受容体の活性化に伴うカルシウム感受性電流の特性。第 48 回中部日本生理学会（京都）

5. 小林康，井上由香,ゴア ジョアンナ,ミュノッツ ダグラス,伊佐正 (2001.9) 脚橋被蓋核ニューロンのサッカード課題遂行への寄与。第 24 回日本神経科学，第 44 回日本神経化学合同大会(京都)

6. 坂谷智也,伊佐正（2001.9）高速ビデオ法によるマウス急速眼球運動計測システムの開発。第 24 回日本神経科学，第 44 回日本神経化学合同大会(京都)

7. 斎藤和也，高草木薫,伊佐正（2001.9）大脳基底核による中脳ドパミン系の修飾機構。第 24 回日本神経科学，第 44 回日本神経化学合同大会(京都)

8. 遠藤利朗，伊佐正,兼子幸一,小幡邦彦，柳川右千夫（2001.9）GAD67 遺伝子 GFP ノックインマウスを用いた上丘浅層 GABA 作動性ニューロンの電気生理学的特性と形態学的特徴の解析第 24 回日本神経科学，第 44 回日本神経化学合同大会(京都)

9. Yamashita T，Isa T (2001.11) Calcium-dependent cation current activated by Ca^{2+} influx through nicotinic acetylcholine receptors n rat mesopontine domapine neurons. 31st Annual Meeting of Society for Neuroscience（San Diego, CA, USA）.

10. Saitoh K, Isa T, Takakusaki K (2001.11) GABAergic inhibition from the substantia nigra pars reticulata (SNr) to the pedunculopontine tegmental nucleus (PPN) neurons in the rat. 31st Annual Meeting of Society for

Neuroscience（San Diego, CA, USA）.

11. Sakatani T, Isa T (2001.11) Spontaneous and electrically induced saccadic eye movements in awake mice measured by high speed video-oculography. 31st Annual Meeting of Society for Neuroscience（San Diego, CA, USA）.

12. Kobayashi Y，Inoue Y, Isa T, Aizawa H（2001.11）The performance of visually guided saccade tasks in monkeys: contribution of pedunculopontine tegmental nucleus neurons. 31st Annual Meeting of Society for Neuroscience（San Diego, CA, USA）.

13. Gore JL，Kobayashi Y, Munoz DP (2001.11) Oculomotor integration in the substantia nigra parsreticulata. 31st Annual Meeting of Society for Neuroscience（San Diego, CA, USA）.

《感覚・運動機能研究プロジェクト》

1. Hoshiyama M, Kakigi R (2001.3) Homuncular representation in sensory cortices revealed by somatosensory evoked magnetic fields. 12th International Society for Brain Electromagnetic Topography (Utsunomiya, Japan).

2. Barber C, Wang L, Kakigi R, Kaneoke Y, Wen Y (2001.3) The vep and vef elicited by multifocal stimulation. 12th International Society for Brain Electromagnetic Topography (Utsunomiya, Japan).

3. Kaneoke Y, Kawakami O, Kakigi R (2001.3) Neural process for the detection of visual motion. 12th International Society for Brain Electromagnetic Topography (Utsunomiya, Japan).

4. Gunji A, Hoshiyama M, Kakigi R (2001.3) Identification of auditory evoked magnetic fields (AEF) of own voice. 12th International Society for Brain Electromagnetic Topography (Utsunomiya, Japan).

5. Tran TD, Lam K, Hoshiyama M, Inui K, Kakigi R (2001.3) Measuring conduction velocity of Aβ-, Aδ- and C-fibers in humans by somatosensory evoked potentials. 12th International Society for Brain Electromagnetic Topography (Utsunomiya, Japan).

6. Lam K, Kaneoke Y, Kakigi R (2001.3) Human visual system can respond to the incoherent motion on the visual scene of coherent motion. 12th International Society for Brain Electromagnetic Topography (Utsunomiya, Japan).

7. Wang L, Barber C, Kakigi R, Kaneoke Y (2001.3) A comparison study of multifocal visual evoked potential and visual evoked magnetic field. 12th International Society for Brain Electromagnetic Topography (Utsunomiya, Japan).

8. Kakigi R, Watanabe S, Puce A (2001.4) Human face perception traced by MEG. 2001 International Symposium on Electromagnetics in Biology and Medicine (Tokyo, Japan).

9. Koyama S, Gunji A, Yamada RA, Oiwa S, Kubo R, Kakigi R (2001.4) Change of mismatch field associated with foreign speech learning. Cognitive Neuroscience Society Annual Meeting (New York, USA).

10. Okusa T, Kakigi R, Hoshiyama M, Wang L (2001.5) Structure of visual evoked field during sleep. VX International Congress of Clinical Neurophysiology (Buenos Aires, Argentina).

11. Kakigi R (2001.5) Neurophysiologic assessment of pain. VX International Congress of Clinical Neurophysiology (Buenos Aires, Argentina).

12. Wang L, Barber C, Kakigi R, Kaneoke Y (2001.5) A-comparison study of multifocal visual evoked potential and visual evoked magnetic field. VX International Congress of Clinical Neurophysiology (Buenos Aires,

Argentina).

13. Koyama S, Yamada RA, Roberts TPL, Gunji A, Yabe H, Kubo R, Ferrari P, Kakigi R (2001.6) Cortical magnetic responses by the contrast between F3 component of /l/ and that of /r/ in Japanese subjects. 7th Annual Meeting of Human Brain Mapping (Brighton, UK).

14. Lam K, Kaneoke Y, Kakigi R. (2001. 6) Human cortex can respond to the incoherent motion on the visual scene of coherent motion. 7th Annual Meeting of Human Brain Mapping (Brighton, UK).

15. Wang L, Kaneoke Y, Kakigi R (2001.11) When and how is human extrastriate cortex activated during bistable motion perception in Ternus display? 31st Annual Meeting of Society for Neuroscience (San Diego, USA).

16. Maruyama, K., Kaneoke, Y., and Kakigi, R. (2001) Speed of the incoherent motion is encoded in the neural activity of the human extrastriate cortex. 31st Annual Meeting of Society for Neuroscience (San Diego, USA).

17. Koyama S, Naito T, Gunji A, Yamada RA, Roberts, TPL, Yabe H, Oiwa S, Kubo R, Kakigi R (2001.11) Asymmetry in speech sound perception revealed by cortical magnetic responses. 31st Annual Meeting of Society for Neuroscience (San Diego, USA).

18. Hoshiyama M, Kakigi R (2001.11) The somatosensory brain responses recorded by MEG. 17th Annual Meeting of Society of Clinical Neurophysiology (Seoul, Korea).

19. Lam K, Kaneoke Y, Kakigi R. (2001. 9) Human cortex can respond to the incoherent motion on the visual scene of coherent motion. Joint France-Japan Symposium on Cognitive Neuroscience (Saitama, Japan).

20. 宝珠山稔, 柿木隆介 (2001.5) 正中神経刺激による体性感覚脳磁界の Recovery function. 第 42 回日本神経学会総会 (東京).

21. 宝珠山稔, 軍司敦子, 柿木隆介 (2001.6) 音想起に関する脳内活動の脳磁場解析. 第 16 回日本生体磁気学会 (東京).

22. 藤岡孝子, 軍司敦子, 竹島康行, 柿木隆介 (2001.6) 高周波数純音による聴覚誘発脳磁場. 第 16 回日本生体磁気学会 (東京).

23. 渡辺昌子, 柿木隆介 (2001.6) 倒立顔認知 : 脳波と脳磁図を用いた研究. 第 16 回日本生体磁気学会 (東京).

24. 柿木隆介 (2001.9) MEG による脳機能計測. 第 29 回日本磁気共鳴医学会大会 (つくば市).

25. 柿木隆介 (2001.9) 脳磁図を用いたヒト脳機能の研究. 第24回日本神経科学学会 第44回日本神経科学合同大会 (京都).

26. 二橋尚志, 柿木隆介, 宝珠山稔, 梶田泰一, 吉田純 (2001.9) 脳磁図を用いた耳電気刺激時における触覚刺激干渉作用の検討. 第 24 回日本神経科学学会 第 44 回日本神経科学合同大会 (京都).

27. 小山なつ, 柿木隆介, 横田敏勝 (2001.9) CO2 レーザー光線刺激と発痛物質メリチン刺激による軸策反射. 第24回日本神経科学学会 第44回日本神経科学合同大会 (京都).

28. 渡辺昌子, 柿木隆介 (2001.9) 脳波と脳磁図を用いた“Face inversion effect”の研究. 第 24 回日本神経科学学会 第 44 回日本神経科学合同大会 (京都).

29. 内藤智之, 小山紗智子, 軍司敦子, 山田玲子, 矢部博興, 大岩昌子, 久保理恵子, 柿木隆介 (2001.9) 言語音によって形成される聴覚的感覚記憶 : 脳磁場を用いた検討. 第24回日本神経科学学会 第44回日本神経科学合同大会 (京都).

30. 渡辺昌子, 柿木隆介 (2001.11) 倒立顔認知 : 脳波と脳磁図を用いた研究. 第 31 回日本臨床神経生理学会 (東京).

31. 宝珠山稔 軍司敦子 柿木隆介 (2001.11) 聴覚系高次脳機能の脳磁図. 第 31 回日本臨床神経生理学会 (東京).

32. 矢部博興, 佐藤泰治, 篠崎直子, 須藤武行, 晝間臣

治, 梨田忠良, 松岡貴志, 石山哲, 兼子直, 小山紗智子, 柿木隆介 (2001.11) 聴覚性感覚記憶内の逸脱検出感度について. 第 31 回日本臨床神経生理学会 (東京).

33. 柿木隆介, 乾幸二, Tran Diep Tuan, 秋云海, 王暁宏 (2001.12) 末梢神経 C 線維を選択的に刺激して得られる大脳誘発電位. 1.方法と末梢伝導. 第 23 回日本疼痛学会 (東京).

34. 乾幸二, 柿木隆介, Tran Diep Tuan, 秋云海, 王暁宏 (2001.12) 末梢神経 C 線維を選択的に刺激して得られる大脳誘発電位. 2.脊髄伝導速度計測. 第 23 回日本疼痛学会 (東京).

《形態情報解析室》

1. 古家園子，古家喜四夫（2001.5）小腸絨毛上皮下線維芽細胞の特性。日本電子顕微鏡学会第 57 回学術講演会（福岡）

2. 片桐展子，重松康秀，有井達夫，片桐康雄（2001.5）腹足類の外套組織にみられる筋繊維の超高圧電顕観察とその立体再構築。日本電子顕微鏡学会第 57 回学術講演会（福岡）

3. 小澤一史，謝　蔵霞，落合育雄，秋山翹一，有井達夫，河田光博（2001.9）超高圧電子顕微鏡を用いた老化ラットの海馬および大脳皮質領域における神経細胞の超微細構造観察。第 24 回日本神経科学および第 44 回日本神経化学合同大会（京都）

4. 古家園子，成瀬　達（2001.10）ラット膵臓導管におけるアクアポリン 1 の分布。日本解剖学会第 61 回中部支部学術集会（豊明）

5. 片桐展子, 重松康秀, 有井達夫, 片桐康雄　(2001.10) イソアワモチ幼動物の皮膚光覚細胞と特異な星形筋細胞の超高圧電顕観察。第 72 回日本動物学会大会（福岡）

6. 有井達夫 (2001.12) 超高圧電子顕微鏡による三次元画像解析。日本電子顕微鏡学会分科会（岡崎）

《生体情報処理室》

1. Takagi S, Obata K, Tsubokawa H (2001. 11) GABAergic inputs contribute to activity-dependent changes in cell volume in the hippocampal CA1 regions. Society for Neuroscience 30th Annual Meeting (San Diego, USA)

2. Takagi S, Obata K, Tsubokawa H (2001. 3) Chloride influxes through $GABA_A$ receptors contribute to activity-dependent changes in intrinsic optical signals in the hippocampal CA1 regions. 日本生理学会　(京都)

《機能情報解析室》

1. 逵本徹（2001.9）PET によるサルの高次脳機能研究 第 24 回日本神経科学大会（京都）

《戦略的方法論研究領域》

1. 永山國昭（2001.2）電子顕微鏡によるゲノム，タンパク質素子，細胞システム解析. 科学技術振興事業団異分野フォーラム「生命科学の新しいメッセージ」（静岡）

2. 永山國昭（2001.3）Electron Microscopic DNA Sequencing. 第 6 回総研大国際シンポジウム「21 世紀のゲノム科学」（葉山）

3. 永山國昭，Danev Radostin，松本友治，大河原浩，村田和義（2001.6）復素電子顕微鏡Ⅲ－分析型極低温顕微鏡との融合と生体分子への応用（大阪）

4. 高橋卓也，永山國昭（2001.6）水溶媒による蛋白質内静電相互作用の遮蔽効果の計算：MD と誘電体モデルの比較（大阪）

5. Theodor D Gurkov, Kuniaki Nagayama（2001.6）Electron Microscopic Observation of Selectively Labeled DNA-Toward EM DNA Sequencing. (Osaka, Japan)

6. 永山國昭（2001.7）NMR から電子顕微鏡へ－ フーリエ変換に導かれて. 日本分光学会 50 周年記念講演（東京）

7. 村田和義，小田原成優，國安明彦，佐藤雄己，中山仁，永山國昭（2001.10）電子顕微鏡による骨格筋 L 型カルシウムチャネルの単分子構造解析. 日本生物物理学会年会（大阪）

8. 永山國昭（2001.11）Wave Function and Complex Observation in Electron Microscopy. 基研ワークショップ“Trends in Infinite Dimensional Analysis and Quantum Probability”（京都）

9. 村田昌之(2001.1) メンブレントラフィックを観て，操作して，知る． 科学研究費公開シンポジウム「細胞内機能分子トラッフィク」(東京)

10. 村田昌之(2001.12) セミインタクト細胞を用いた細胞周期依存的なゴルジ体･小胞体及び小胞体-ゴルジ体間小胞輸送過程の再構成とその解析. 第 24 回日本分子生物学会年会シンポジウム「細胞内メンブレントラフィック－ Organellar Identity and Dynamics － 」(横浜)

11. 村田昌之(2001.10) 哺乳動物細胞ゴルジ体・小胞体の細胞周期依存的ダイナミクス. 第 74 回日本生化学会大会シンポジウム「メンブレントラフィック研究の新展開」(京都)

12. 加納ふみ，近藤久雄，細川暢子，永田和宏，村田昌之(2001.5) セミインタクト細胞を用いた細胞周期依存的な ER ダイナミクスの再構成と解析. 第 54 回日本細胞生物学会大会ワークショップ「シグナル分子のイメージング」(岐阜)

13. 加納ふみ，佐甲靖志，田中亜路，柳田敏雄，村田昌之(2001.12) セミインタクト細胞を用いた ER－ ゴルジ体小胞輸送再構成系の確立とその生化学的な解析．第 24 回日本分子生物学会年会 (横浜)

14. 加納ふみ，近藤久雄，細川暢子，永田和宏，村田昌之(2001.10) 小胞体の細胞周期依存的ダイナミクスの再構成と生化学的解析．第 74 回日本生化学会大会 (京都)

15. 加納ふみ，村田昌之(2001.10) セミインタクト細胞を用いた ER－ ゴルジ体小胞輸送の解析．日本生物物理学会第 39 回年会 (大阪)

《時系列生命現象研究領域》

1. 勝山　裕, 岡村　康司, 2001. 5 月ホヤのシナプトタグミン遺伝子プロモーターの構造 第 32 回日本発生生物学会（神戸）

2. 岡村　康司, 高安幸弘, 飯野昌枝, 小澤　瀞司, 2001. 3 月 SCN8a 型 Na チャネルの不活性化の機構, 第 78 回 日本生理学会大会シンポジウム（京都）

3. 中條　浩一, 岡村　康司, 2001.3 月　ホヤ胚筋細胞における Ca^{2+}放出機構と Ca^{2+}活性化 K+チャネルの発達 第 78 回日本生理学会大会（京都）

4. 赤羽　悟美, 山口　真司, 長尾　拓, 岡村　康司, 2001.3 月 Ca^{2+}チャネルアゴニストは L 型 Ca^{2+}チャネルα1c サブユニット IIIS5-S6 ポア領域との相互作用を介してゲーティングを修飾する 第 78 回日本生理学会大会, （京都）

5. 中條　浩一, 勝山　裕, 岡村　康司, 2001.9 月 ホヤ神経細胞の IA を担う電位依存性 K+チャネル TuKv4 のクローニングと機能解析 第 24 回日本神経科学会大会（京都）

6. 中條浩一, 岡村　康司, 2001.2 月 The enhanced function of SERCA pumps accererates the decay of the Ca^{2+} response in developing ascidian muscle. 第 45 回アメリカ生物物理学会（ボストン）

7. 勝山　裕, 岡村　康司, 2001. 5 月ホヤのシナプトタグミン遺伝子プロモーターの構造 第 32 回日本発生生物学会（神戸）

8. 大塚　幸雄, 松本　潤, 岡村　康司, 2001. 10 月 マボヤ表皮感覚神経の細胞系譜及び bFGF による誘導 第 72 回日本動物学会大会（福岡）

9. 岡村　康司, 海老原　達彦, 泉　寛子, 2001.2 月. A truncated alpha1-subunit suppresses the expression of the full-length Ca^{2+} channel. 第 45 回アメリカ生物物理学会（ボストン）

《生命環境研究領域》

1. 原雄二, 若森実, 井本敬二, 森泰生 (2001.3) TRP タンパク質ホモログ ROS1 の分子機能解析 第 78 回日本生理学会大会 (京都)

2. 松下かおり, 若森実, 織田銑一, 森泰生, 井本敬二 (2001. 9) P/Q 型 Ca^{2+}チャネル変異マウスにおける小脳シナプスの性質の変化 第 24 回日本神経科学 第 44 回日本神経化学合同大会 (京都)

3. 加藤健一, 若森実, 井本敬二, 森泰生, 北村憲司 (2001.3) 中枢型及び末梢型 N 型 Ca^{2+}チャネルの電気生理学的比較 第 78 回日本生理学会大会 (京都)

4. 原雄二, 石井正和, 若森実, 山田久信, 清水俊一, 井本敬二, 森泰生 (2001. 3) 活性酸素種により活性化されるカルシウム透過型チャネル ROSC1 の分子生理学的解析　第 85 回日本薬理学会（横浜）

5. 佐々木大介, 清水俊一, 内藤慎二, 佐藤陽治, 森泰生, 木内祐二 (2001. 3) ラット血管平滑筋における転写因子 ETS-1 発現および細胞遊走の一酸化窒素による抑制 第 85 回日本薬理学会（横浜）

6. 井上隆司, 森泰生, 原雄二, 伊東祐之 (2001.3) 脊椎動物 TRP ホモログキメラ(TRP6/TRP7)による受容体活性化 Ca^{2+}透過型陽イオンチャネル特性の解析 第 第 85 回日本薬理学会（横浜）

7. 樋口里, 神吉秀明, 久米利明, 赤池昭紀, 佐藤公道, 森泰生, 金子周司 (2001.9) ラット胎仔由来初代培養大脳皮質ニューロンにおける Trp の発現と機能に関する検討 第 24 回日本神経科学 第 44 回日本神経化学合同大会 (京都)

8. 岩崎広英, 森泰生, 原雄二, 内田敬子, 周虹, 御子柴

克彦 (2001.9) 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) の capacitative calcium entry に対する効果 第 24 回日本神経科学 第 44 回日本神経化学合同大会 (京都)

9. 松下かおり, 若森実, 織田銑一, 森泰生, 井本敬二 (2001. 9) P/Q 型 Ca^{2+}チャネル変異マウスにおける小脳シナプスの性質の変化 第 24 回日本神経科学 第 44 回日本神経化学合同大会 (京都)

10. 森泰生, 原雄二, 山田久信 (2001.9) 受容体活性化される TRP Ca チャネル群の分子的実体と生理学的意義 第 24 回日本神経科学 第 44 回日本神経化学合同大会 (京都)

11. 額田敏秀, 古川泰司, 並木芳子, 森泰生 (2001.9) Protein Kinase A リン酸化による Ca^{2+}チャンネルの制御 第 24 回日本神経科学 第 44 回日本神経化学合同大会 (京都)

12. 森泰生 (2001.10) 受容体活性化される TRP Ca チャネル群の分子的実体と生理学的意義 第 74 回日本生化学会大会 (京都)

13. 原雄二, 若森実, 石井正和, 前野恵美, 山田久信, 清水俊一, 森恵美子, 岡田泰伸, 井本敬二, 森泰生 (2001) A novel β-NAD+ activated Ca^{2+}-permeable channel confers susceptibility to reactive oxygen species-induced cell death 第 74 回日本生化学会大会 (京都)

14. 杉本健二, 森井孝, 森泰生, 井本敬二, 大塚雅巳, 野圭祐 イノシトール三リン酸に対する分子センサーの構築 第 74 回日本生化学会大会 (京都)

15. 岩崎広英, 森泰生, 原雄二, 内田敬子, 周虹, 御子柴克彦 (2001.10) 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) の capacitative calcium entry に対する阻害効果 第 74 回日本生化学会大会 (京都)

16. Matsushita K, Wakamori M, Mori Y, Imoto K.(2001.11) Paradoxical enhancement of cerebellar synaptic transmission in rolling calcium channel mutant mice. 31st Annual Meeting of Society for Neuroscience (San Diego)

17. Hara Y, Wakamori M, Ishii M, Maeno E, Yamada H, Mori E, Okada Y, Imoto K, Mori Y. (2001.11) A novelβ-NAD+ activated Ca^{2+}-permeable channel confers susceptibility to reactive oxygen species-induced cell death. 31st Annual Meeting of Society for Neuroscience (San Diego)

18. Kinoshita M, Nukada T, Asano Y, Mori Y, Akaike A, Satoh M, Kaneko S. (2001.11) Binding of Gα0 amino terminus is responsible for the voltage-resistant inhibition of α1A (P/Q-type, Cav2.1) calcium channel. 31st Annual Meeting of Society for Neuroscience (San Diego)

19. Yamada H, Okada T, Wakamori M, Imoto K, Mori Y. (2001.11) Monovalent cation and calcium permeability of the neuronal receptor-activated TRP5 channel. 31st Annual Meeting of Society for Neuroscience (San Diego)

《計算科学研究センター》

1. 高橋卓也（2001.6）フェリチン分子の残基置換にともなう内部電位および pH 変化の計算。日本生物物理学会第 39 回年回，日本生物物理学会（大阪）

2. Takahashi T, Nagayama K (2001.10)Comparison of all atom, continuum, and linear fitting models for charge screening effect of aqueous medium surrounding a protein molecule. 日本蛋白質科学会第 1 回年会，日本蛋白質科学会（大阪）

3. Takahashi T, Nagayama K (20001.7) Unfolding MD simulations of small globular protein. 4th International Conference of Biological Physics (Kyoto).

【　一般共同研究報告　】

一般共同研究報告

〔　目　　次　〕

１．複素電子顕微鏡を用いた in situ での蛋白質局在性の証明（臼田信光ほか）..... 112
２．タンパク質構造を安定化する電子顕微鏡用負染色剤の開発（今野　卓ほか）..... 112
３．タンパク質凝集体形成の分子病理に関する基礎研究（惠良聖一ほか）..... 113
４．細胞内 Ca，サイクリック AMP，による傍細胞輸送の制御機構（村上政隆ほか）..... 114
５．卵活性化精子因子の同定と作用機序（宮崎俊一ほか）..... 115
６．新型ナトリウムチャネル(Nav2)の機能解明（吉田　繁ほか）..... 115
７．神経・分泌細胞の開口放出機構の研究（阿部輝雄ほか）..... 116
８．虚血性神経細胞死と容積調節チャネルの機能連関（塩田清二ほか）..... 116
９．膵ランゲルハンス島におけるニコチン受容体と膵内分泌の関連（安田浩一朗ほか）..... 116
10．神経細胞におけるイオンチャンネル局在メカニズムの解明（渡辺修一ほか）..... 117
11．癌に特異的な新規遺伝子の探索と機能解析（吉峰俊樹ほか）..... 118
12．悪性グリオーマ特異的レトロウイルスベクターの
　開発と遺伝子治療の臨床応用に関する基礎的検討（清水惠司ほか）..... 119
13．イモガイ毒成分ωコノトキシン GVI による
　N 型電位依存性 Ca^{2+}チャネルの抑制作用に及ぼすカルモデュリンの効果（市田 成志ほか）..... 120
14．脊椎動物 TRP ホモログと G 蛋白質共役型受容体で
　活性化される Ca^{2+}透過型陽イオンチャネルの分子的相関に関する研究（井上　隆司ほか）..... 120
15．大脳基底核による姿勢と歩行運動の制御（南部　篤ほか）..... 120
16．頭頂連合野出力細胞の脳幹・脊髄運動神経への影響（山本哲朗ほか）..... 121
17．海馬興奮性シナプスの動態と微細形態（岡部繁男ほか）..... 122
18．非可聴域高周波弾性振動情報の生体内伝達メカニズムについての研究（本田　学ほか）..... 122
19．黒質網様体によるドーパミン細胞に対する GABA 作動性抑制（斎藤和也ほか）..... 123
20．PKC-GFP トランスジェニックマウス用いた
　神経可塑性制御に対する PKC の役割の解明（酒井規雄ほか）..... 123
21．イカクロマトフォアパターン形成を指標にした中枢神経可塑性の研究（井上　勲ほか）..... 124
22．植物 Na･K 輸送体 AtHKT1 の電気生理的研究（山上　睦ほか）..... 124
23．正常発達，および病態における糖鎖構造の解析（和田洋巳ほか）..... 125
24．脳内部位特異的ドレブリン A ノックアウトマウスの作製（白尾智明ほか）..... 126
25．Hirschsprung 病コンジェニックラットの作製（安居院高志ほか）..... 126
26．Phosphohippolin のイオンチャネル活性の解析（宋　涛ほか）..... 127

1. 複素電子顕微鏡を用いた in situ での蛋白質局在性の証明

臼田信光，横倉久幸，中沢綾美（藤田保健衛生大学）
横田貞記（山梨医科大学）
伊藤正樹（佐賀医科大学）
亀谷清和（信州大学機器分析センター）
金子康子（埼玉大学）
永山國昭

電子顕微鏡による生物試料の観察は, 従来, 重金属（ウラン・鉛）に対する細胞構造の親和性による電子染色によって行われてきた。このような標本では，細胞構造の観察というよりは重金属に対する親和性を観察してきたおそれがある。生理学研究所に設置されている電子顕微鏡は 300 kV の高圧電顕で, 位相板を利用して高コントラストの位相像を得る位相観察法を行うもので，透明体の画像化を行え，0.4 nm という極めて高い分解能を有する。さらに，ヘリウムステージを備え，元素分析も可能である。これらの特性を生かすことにより，理想に近い生物試料の電顕観察が可能になると期待された。つまり，電子位相顕微鏡（Zernike 位相差法，微分干渉法，複素法）を生物試料に適用することにより，細胞内構造を分子の配置に基いて理解する事が可能となる。

本研究では，電子位相顕微鏡を生物試料に適用する際の問題点と応用の範囲を探ることを目的として，次の 4 項目を観察する。

1）予備的観察 : 動物・植物組織細胞の標本を観察する際に最も適切な標本作成方法と観察方法を検討する。

2）細胞内構造の観察 : 急速凍結を行った細胞骨格・細胞分画を重金属による染色を施さずに観察して，本来の超微構造を見出す。

3）蛋白質局在性の証明 : 組織・培養細胞に，金属含有蛋白質と膜局在型，基質局在型あるいは細胞骨格の蛋白質の融合蛋白質を発現させ，金属の局在を観察して，*in situ* での蛋白質局在を特定する。

4）電子顕微鏡元素分析 : 細胞・細胞小器官を構成する元素を観察する。

初年度である平成 13 年度は，項目 1）について検討を行い，他の項目については予備的な研究を行った。標本作成方法と観察方法 : 試料支持膜の作成方法，切片の大きさと採取方法， 染色方法，観察倍率などについてこの電子顕微鏡に特有な留意点が判明した。特に, 急速凍結・凍結置換法により処理を行った組織において良好な結果が得られた。

植物・動物組織を急速凍結・凍結置換の後に，樹脂包埋し超薄切片を作成した。電子染色を行うことなく，通常法と微分干渉法により観察した。無染色標本が高コントラストに，しかも，横から光を当てたような陰影のある像（トポグラフィー像）として観察された。染色標本における通常法では振幅コントラストに基づく像が観察されるが，本法においては，位相コントラストに基づいた像が観察される。通常の染色標本の観察と比較して，さらに微細な構造の観察が可能となる可能性が考えられる。

2. タンパク質構造を安定化する電子顕微鏡用負染色剤の開発

今野　卓，清水啓史，老木成稔（福井医科大学）
永山國昭

タンパク質分子及び生組織の電子顕微鏡において使用される負染色剤固定は，観察感度をあげる非常に有効な方法であり, 従来多用されている。しかし従来の方法は, 1) 多価重金属を用いるためタンパク質分子構造を破壊する, 2) 分解能を犠牲にする, などの問題点を抱えていた。この問題を解決するために新規の負染色剤の探索を行っ

た。1 価イオン，非金属でかつ原子番号の大きなものをスクリーニングした結果とし，タリウム（Tl：原子番号 81）とセシウム（Cs：原子番号 55）が候補として残った。これらの元素の塩を水溶液（1%～10%）とし，タバコモザイクウイルス（TMV）を生体分子モデルとして負染色し，100kV 電顕での観察を行った。その結果

i）タリウムは微量の塩素イオンですぐに沈澱するため不適格

ii）CsCl，CsBr，CsI の純液もしくは混合液を用いた実験から乾燥過程でナノメートルの微結晶が析出し，一様な染色とならないことがわかった。

以上から従来用いられてきたウラン酢酸やタングステン酸を特に越える負染色剤は見出せなかった。そしてタンパク質の安定性を保持するには，従来の負染色剤水溶液中に生体分子を氷包埋（低温によるタンパク質安定化）する低温負染色法が最適であるとの結論を得た。

3. タンパク質凝集体形成の分子病理に関する基礎研究

惠良聖一，桑田一夫，中村浩二，林　知也，根川常夫，富田美穂子（岐阜大医）
村上政隆

近年タンパク質の異常凝集体形成が原因とされる疾患が注目されている。本研究の目的はそのような異常凝集体形成の発現機構を解明することにあるが，今回はその基礎研究として血清アルブミンの溶液→ゲル変換機構の研究を 1H− NMR 測定により行った。

ウシ血清アルブミン（BSA）の溶液状態として 12.0%, pD 7.1 の試料，ゲル状態として 4.83%, pD 4.0 の BSA*ゲルおよび 14.39%, pD 4.0 の BSA*ゲルの試料を用いた。タンパク質− リガンド間相互作用の程度を知る NMR パラメーターの一つに交差緩和時間（TIS）がある（Akasaka, 1981）。この TIS 測定は f 2 照射部位として−100 ppm から 100 ppm までを γ H2/2 π 単位で 350 Hz の照射強度にて行った。

図 1 に[1−(I∞/I0)] vs f2 (ppm)で表される作用スペクトルを, 図 2 に 1/TIS vs f2 (ppm)で表される交差緩和スペクトルを示す。図 1 の作用スペクトルでは，ゲル状態（○，●）と溶液状態（◇）とではかなり大きな差を示したが，ゲル状態間ではほとんど差がなかった。一方図 2 に示す交差緩和スペクトルでは, 溶液状態（◇), ゲル状態（4.83%, ●），ゲル状態（14.39%，○）の 3 者間に大きな差が観測された。さらに, この交差緩和スペクトルにおいては，いずれの試料においても中央にシャープなピーク成分が観測され，またゲル状態では両者ともにブロードな成分が観測されている。これらの成分に関して，合成高分子ゲルに対する同様の実験結果（ここには示さず）から，中央のシャープな成分はタンパク質周囲の結合水の寄与が，またブロードな成分はゲル内の高分子集合体（凝集体）の寄与が示唆された。以上の結果より，タンパク質の高分子集合体の詳細を解析するのに交差緩和スペクトルが有用であることが分かった。

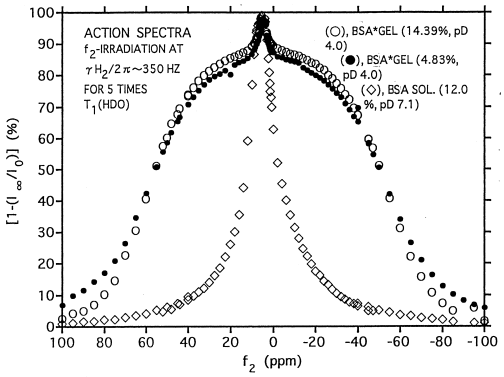


図 1

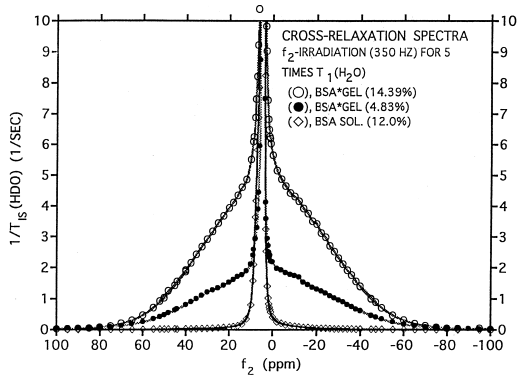


図 2

4. 細胞内 Ca，サイクリック AMP，による傍細胞輸送の制御機構

村上政隆，尾崎　毅（生理研），吉村啓一（北大歯），瀬川彰久（北里大医），橋本貞充（東京歯大）
杉谷博士，吉垣純子，通川広美（日大松戸歯），赤川公朗（杏林大医），瀬尾芳輝（京都府医大）

外分泌腺は，分泌刺激により分泌細胞内からの分泌を活性化するとともに血清成分を管腔に移行させる。後者は傍細胞輸送として血清成分が細胞間隙／tight junction を通過すると考えられてきた。しかし，傍細胞輸送機構が分泌刺激により制御されるか否かは従来の研究では断片的で不明な点が多く，殊に細胞内 Ca，cyclicAMP の信号系を含む細胞内制御機構との関連は未着手である。本研究は，大量の水分泌と開口分泌を観察できる唾液腺に対象を限定し，血管潅流系を用い，分泌液の水分・アミラーゼ・ムチン・非電解質マーカーを計測し，また刺激時の経上皮電気抵抗の変化，tight junction の微小形態の変化との関連を，1）生理研グループ，2）北里大／生理研グループ，3）東京歯科大／生理研グループ）。4）日大松戸歯／生理研グループにより行った。

1）ラット顎下腺血管潅流系を用い，唾液中への蛍光色素の移行及び径上皮電気抵抗を傍細胞輸送マーカーとして測定した。蛍光色素 LuciferYellow はムスカリン受容体刺激では唾液／灌流液濃度比は 0.5%以下であったがこれにβアドレナリン受容体刺激により 1-2%に上昇し，βアドレナリン受容体刺激により傍細胞輸送が開く可能性が示唆された。一方経上皮電気抵抗は分泌刺激により上昇し蛍光色素の結果と相反した。これは導管の NaCl 再吸収活性化により導管内唾液のイオン強度が低下し，傍細胞輸送活性化による経上皮電気抵抗低下の効果をマスクする可能性が示唆された。

2）平成 13 年は主に，共焦点レーザー顕微鏡による水分泌の直視に力点を置いて解析した。解離唾液腺をルシファーイエロー溶液で灌流し，共焦点レーザー顕微鏡で観察すると，管腔および側・基底側が明るく照らし出される。カルバコールで水分泌を刺激すると，管腔の蛍光強度は直ちに低下し，水分泌を反映した変化と思われた。管腔の蛍光強度はいったんほぼゼロになった後，30-45 秒後にはふたたび上昇した。この時，灌流腺の水分泌絶対量は増加しており，分泌の初期相は transcellular pathway，維持相はさらに paracellular pathway をとおして水が輸送されると推定された。本知見はこれまで長い間生理学の議論となっていた水の輸送経路を明らかにしたもので，慎重を期すため学会発表を控え，実験および考察に専念した。(1. J Histochem Cytochem, 49 : 305-311,2001; 2. 細胞，33：484-488, 2001)

3）ラット顎下腺血管潅流系を化学固定あるいは液体ヘリウムで急速凍結固定し，固定試料を凍結割断し，分泌刺激かの tight junction を観察した。化学固定試料では tight junction は静止時には 2-5 本の紐状構造として細胞間分泌細管内腔を囲み，ムスカリン受容体／βアドレナリン受容体同時刺激により基底側で断列し小さい区画に再構成された。急速凍結試料では静止時においても紐を構成する粒子の配列は乱れていたが，分泌刺激によりさらに乱雑になることが観察された。固定により結果が異なるのはアクチン網のような細胞膜下構造の変化による可能性が考察された。(ISMS abstract, 143-144, 2002)

4）唾液腺におけるシグナル伝達と一酸化窒素の産生調節について検討を行った。その結果，耳下腺においてムスカリン性受容体刺激は細胞内の Ca^{2+}濃度の上昇をもたらし，内在性の一酸化窒素合成酵素が Ca^{2+}により活性化され，それに引き続いて一酸化窒素が産生されることが明らかとなった。このシグナルの活性化はβ受容体刺激では惹起されないことから，ムスカリン性受容体活性化による分泌機能と関与している可能性が示唆された。一方，唾液腺での膜ドメイン機能を明らかにする目的で raft 画分について検討を行った。血球系での膜ドメインの分離を確立し，唾液腺に応用することが可能となった。(1. Cell Calcium 30: 107-116, 2001; 2. Biochemistry 40: 888-895, 2001; 3. J Immunol 167: 5814-5823, 2001)

5. 卵活性化精子因子の同定と作用機序

宮崎俊一，尾田正二，白川英樹，河内全，淡路健雄（東京女子医大第二生理）
経塚啓一郎（東北大浅虫臨実）
黒田英世，黒田律（富山大生物）
出口竜作（宮城教育大）
毛利達磨

受精時に卵細胞内の反復性 Ca^{2+}濃度上昇（Ca^{2+}オシレーション）を誘発する精子因子，即ち精子由来の卵活性化蛋白質の同定を目的として共同実験を行った。ハムスター精子あるいはブタ精巣から得た抽出物を，硫安分画，陰イオン交換クロマトグラフィー，陽イオン交換クロマトグラフィー，ゲル濾過，ハイドロシキアパタイト吸着クロマトグラフィー，疎水クロマトグラフィー等にかけ，卵活性化蛋白質を精製した。活性のアッセイは，各画分をマウス卵内に注入し，Ca^{2+}オシレーション誘発を Ca^{2+}画像解析装置を用いて記録した。初段階精製過程で Ca^{2+}オシレーション誘発活性が広い範囲で回収されたこと，精製を進める段階で活性の回収率が低いことなど問題が多く，未だ単一蛋白質の精製には至っていない。動物種間の普遍性を見るため，ハムスターの精子抽出物と原索動物ホヤの精子抽出物をそれぞれホヤ卵，マウス卵に注入して Ca^{2+}オシレーション誘発能を観察した。哺乳類精子抽出物はホヤ卵に Ca^{2+}オシレーションを誘発するが，ホヤ精子抽出物はマウス卵に無効であるらしい。また，ウニ卵での受精の細胞内情報伝達を調べるため，卵内に注入した caged IP_3, caged cADP ribose を紫外線照射により瞬時に活性型に変換した場合の Ca^{2+}増加反応を，高速共焦点レーザー走査顕微鏡を用いて観察した。

6. 新型ナトリウムチャネル（Nav2）の機能解明

吉田　繁（生理研・長崎大学）
檜山武史，渡辺英治，野田昌晴（基生研）

クローニングの過程で電位依存性ナトリウムチャネルの一種として同定され NaV2（別称 Na_x）と名付けられたイオンチャネルは，電位変化に対する明瞭な応答を示さないがために生理機能は不明のままであった。

我々は，NaV2 が多数存在しているマウス後根神経節細胞を使用し，電位ではなく Na^+濃度を感知して開閉するのではないかと想定して，Na^+感受性蛍光色素 SBFI によって細胞内 Na^+濃度動態を観察した。細胞外液の Na^+濃度を変化させると，10 mM 以上の細胞外 Na^+上昇に対して濃度依存性に細胞内 Na^+濃度が上昇した。このような Na^+濃度上昇はフグ毒 TTX では抑制されず，また単なる浸透圧上昇に対する応答ではなく Na^+特異的であることも判明した。また，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同様の細胞内 Na^+濃度の上昇が認められた。一方，基生研で作成した Na_x 遺伝子欠損マウスではこのような Na^+濃度依存性応答は観察できなかった。

以上の結果から，NaV2（Na_x）は動物において塩分濃度のセンサーとして機能していることが想定される新型のナトリウムチャネルであると考えている。

7. 神経・分泌細胞の開口放出機構の研究

河西春郎
阿部輝雄（新潟大学脳研究所）

2 光子励起法と蛍光トレーサーを用いた開口放出測定が膵臓外分泌腺において有望であることが示されたので，この方法論を神経系細胞（PC12 細胞），内分泌細胞（膵臓β細胞，副腎髄質細胞）に適用して，生理的な刺激をしたときのカルシウム依存性開口放出機構の生理的実態を可視化する試みを開始した。これにより，細胞により異なった様式の開口放出が起きることが判明してきた。従って，これらの分泌細胞は自然の変異細胞であり，解明が困難を極めている開口放出の各過程に新たな手がかりを与えると考えられる。そこで，この様な標本を用いた開口放出機構の分子基盤の解明のための方法論について，今後の研究の可能性を検討した。

8. 虚血性神経細胞死と容積調節チャネルの機能連関

塩田清二，大滝博和，舟橋久幸（昭和大学医学部・第一解剖学）
土肥謙二（昭和大学医学部・救急医学科）
坪川宏，岡田泰伸

虚血性神経細胞死は炎症性サイトカイン，グルタミン酸，アラキドン酸，接着分子，フリーラジカルや一酸化窒素（NO）などの様々な因子が関与する。しかし，その詳細な機構については依然不明である。本研究は，虚血性神経細胞死が有意に抑制される炎症性サイトカインのひとつであるインターロイキン 1（IL-1）の遺伝子欠損（KO）マウス用い，局所脳虚血再灌流モデルにより誘導される虚血性神経細胞死を酸化的障害との関係に着目し行なった。IL-1 KO マウスは東京大学医科学研究所　岩倉洋一郎先生より供与された。脳虚血モデルは臨床例で多く見られる局所脳虚血である中大脳動脈閉塞モデル（tMCAO）を用い，NO 系による酸化傷害マーカーである 3-nitrotyrosine を免疫組織化学的に検討した。野生型（wild）と IL-1 KO マウスの 3-nitrotyrosine 陽性細胞を経時的に観察すると IL-1 KO は wild に比べ 3-nitrotyrosine 陽性細胞数が有意に減少した。ニューロンのマーカーである MAP2 と 3-nitrotyrosine の 2 重免疫染色により 3-nitrotyrosine 陽性細胞は主にニューロンに認められた。また，形態学的に血管にも局在することが明らかとなった。この結果，IL-1 の神経細胞死誘導機構に NO 産生を介する酸化障害の関与が示唆された。

今後，容積調節チャネルとこれらのサイトカインがどのように神経細胞死を制御しているか検討していく予定である。

9. 膵ランゲルハンス島におけるニコチン受容体と膵内分泌の関連

安田浩一朗（京都大学総合人間学部）
多門啓子，布居久美子（京都大学人間・環境学研究科）
森島　繁，岡田泰伸

ニコチンの膵内分泌機構への影響およびニコチン受容体以後の細胞内シグナル伝達を明らかにすることを目的に，以下の実験を行った。

単離した膵ランゲルハンス島（ラ島）細胞より調製した Total RNA を用いて RT-PCR を行い，α7 を含む少なくとも 7 種類のニコチン受容体サブユニットが発現してい

ることを確認した。また，バッチインキュベーション法にて単離ラ島を異なる濃度のグルコースとニコチンで刺激したところ，低濃度ニコチン（10^{-7}M）はインスリン分泌を有意に促進し，高濃度ニコチン（10^{-4}M）は分泌を有意に抑制することを見出した（図 1）。さらに，インスリン分泌に対するニコチンの促進作用・抑制作用は共に，ニコチン受容体の選択的阻害剤であるα-bungarotoxin（α-BTX）や methyllycaconitine（MLA）によって有意に阻害され，ニコチン非存在下のレベルにまで回復した（図 2）。以上より，ニコチンのインスリン分泌に対する作用は促進効果と抑制効果を有しており，その作用は主にα7 サブユニットを介していると考えられる。

インスリン分泌が細胞内カルシウムイオン濃度（$[Ca^{2+}]_i$）の変動と深く関連することは以前よりよく知られている。ニコチンのインスリン分泌に与える影響が $[Ca^{2+}]_i$ の変化を介しているか検討するため，Fura2 にてβ細胞の $[Ca^{2+}]_i$ を経時的に測定し，低濃度ニコチン（10^{-7}M）の刺激により $[Ca^{2+}]_i$ が一過性に上昇する細胞を見出した。グルコース刺激によるβ細胞の $[Ca^{2+}]_i$ の反応は様々であり，ニコチン刺激による反応も細胞によって異なると考えられる。

今後は $[Ca^{2+}]_i$ の動態について，細胞ごとに詳細に検討していきたい。

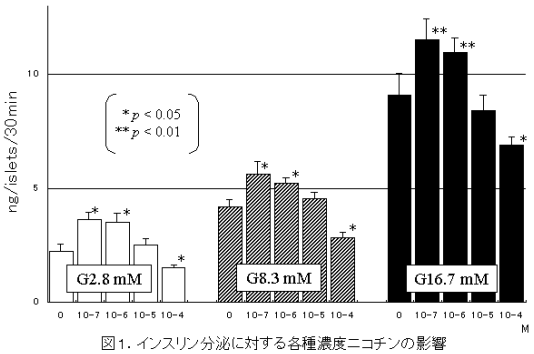


図1. インスリン分泌に対する各種濃度ニコチンの影響

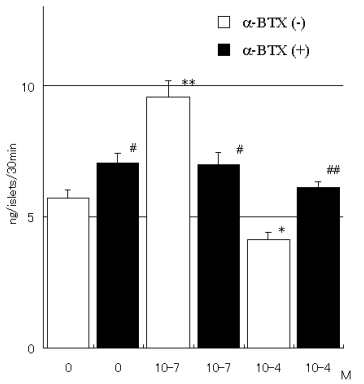


図2. インスリン分泌に対するニコチン・α-BTXの影響

*p < 0.05, **p < 0.01
#p < 0.05, ##p < 0.01 vs. 同じニコチン濃度 α-BTX (-)

10. 神経細胞におけるイオンチャンネル局在メカニズムの解明

渡辺修一，中平健祐（埼玉医科大学）
馬場広子，山口宜秀，山内正彦（東京薬科大学）
柳原格（大阪大学）
山田真久，河野真子（理化学研究所）
出口一志（香川医科大学）

神経細胞の電気的興奮を担うイオンチャネル分子は細胞内局在が厳密に制御されている。これには回路形成やミエリン形成のような細胞外からのシグナルが重要だと考えられる。そこで，樹状突起上と有髄軸索上のチャネル分子についていかなる細胞外因子がチャネル局在に影響するのか解析した。

1. シナプス形成にともなう Kv4.2 局在制御機構の解析

電位依存性カリウムチャネル Kv4.2 は培養小脳顆粒細胞では細胞体表面に発現するが，樹状突起には局在しない。この細胞にシナプスを形成する苔状線維（橋核神経細胞）との共培養をおこなったところ，シナプス様構造の形成に伴い Kv4.2 の樹状突起への分布が観察され，シナプス様構造への集積も認められた。TTX による活動電位の発生阻害実験とグルタミン酸受容体阻害剤を用いた実験から，シナプス伝達がこの集積に必要と考えられた。

そこで，シナプスを形成しない小脳単独培養系にグルタミン酸を加えたところ Kv4.2 の樹状突起への移行がみられた。この応答は NMDA 受容体と AMPA 受容体の両者を介していた。これらの結果から，Kv4.2 の局在が活動依存的に制御されている可能性が示された。

2．有髄軸索におけるチャネル局在の制御因子の探索

有髄軸索のランビエ絞輪における Na チャネル，K チャネルの特徴的な局在化にはミエリン膜からのシグナル，特にパラノードの形成が重要な役割を果たしている。今回は，ミエリン側のシグナル分子を明らかにしていく目的で，CD9 ノックアウトマウス，CST ノックアウトマウスなどのミエリン遺伝子異常マウスを解析することによって，ミエリンの主要糖脂質であり蛋白輸送に関わると考えられるサルファチド，および膜 4 回貫通型タンパク質である CD9 がパラノードの形成に必要不可欠であることを明らかにした。また，この解析から，チャネルの正常な局在と維持にはパラノードにおける junction の形成が重要な役割を果たしていると考えられた。

11. 癌に特異的な新規遺伝子の探索と機能解析

吉峰俊樹，佐々木学（大阪大学医学部神経機能制御外科学）
中根恭司，奥村俊一郎（関西医科大学第二外科）
山田斉（関西医科大学第一外科）

我々は Serial Analysis of Gene Expression 法を用いて正常脳の細胞に比較して悪性グリオーマで発現が上昇している遺伝子のスクリーニングを行った。その中に腫瘍抗原をコードする遺伝子ファミリーである melanoma-associated antigen gene (MAGE) family に属する新規遺伝子 MAGE-E1 を見出し，その cDNA クローニングに成功した。MAGE-E1 の遺伝子発現は未分化な glioblastoma で上昇していたが，分化した astrocytoma では正常脳の細胞と同程度であった。また，MAGE-E1 は細胞をアポトーシスに誘導する機能を持つ MAGE-D1 に蛋白やゲノムの構造が似ており，遺伝子座も Xp 上で隣接していることが分かった。MAGE-E1 は MAGE-D1 と同様に細胞増殖の調節に関係する可能性が高いが，悪性グリオーマで遺伝子発現が上昇していることから細胞の増殖に関与することが示唆された。次に我々は MAGE-E1 蛋白に対する抗体を作成し，MAGE-E1 蛋白の解析を行った。ウェスタンブロットの結果，MAGE-E1 蛋白は 58kDa のバンドとして認識された。U87MG グリオーマ細胞を用いて，蛋白分画を用いたウェスタンブロット，免疫染色を行った結果，MAGE-E1 蛋白は細胞質に局在していた。MAGE-E1 蛋白がグリオーマの増殖に関係していることを示すために，以下の実験を行った。T98G グリオーマ細胞を 1）通常の条件下（10% FBS），2）無血清培地で 72 時間，3）2）の後に 20% FBS の条件にして 20 時間，で培養を行った。過去の報告では，2）により 90% 以上の細胞が G0 期に入り，3）により再度細胞周期に入るとされている。ウェスタンブロットの結果，2）の条件下では MAGE-E1 の蛋白レベルが減少し，3）の条件下で再上昇することが分かった（Fig.1A）。免疫染色の結果，この蛋白レベルの減少は特定の細胞に起因するものではなく，すべての細胞においてレベルが減少していた（Fig.1B）。また，腫瘍組織を用いた免疫染色の結果，遺伝子発現の結果と同様に MAGE-E1 蛋白レベルは未分化な glioblastoma で高く，分化した astrocytoma では低かった(Fig.2)。以上の結果から，MAGE-E1 蛋白はグリオーマ細胞の増殖に関係する機能があることが示唆された。

Fig. 1

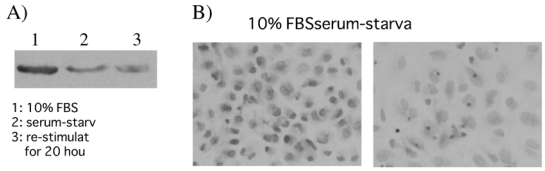
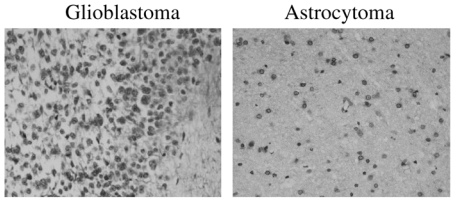


Fig. 2



12. 悪性グリオーマ特異的レトロウイルスベクターの開発と遺伝子治療の臨床応用に関する基礎的検討

清水惠司，福政良枝，政平訓貴，豊永晋一，朴 啓彰（高知医科大学脳神経外科学講座）
佐々木 学（大阪大学大学院 医学系研究科神経機能制御外科学）
池中一裕

原発性脳腫瘍の約10%を占めるグリオブラストーマ患者の平均余命は一年から一年半であり，既存の治療法を繰り返す限り飛躍的な治療効果は期待できない。そこで我々は，脳特異的(MBP)プロモーターで殺細胞遺伝子(HTK)を制御したレトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療の開発をめざしてきた。PA-317 細胞株を改変することで高力価レトロウイルス産生クローンを誘導し，MBP プロモーターで HTK 遺伝子を制御したベクターを組込み，遠心濃縮することで 10^{11}cfu/ml という高力価脳特異的レトロウイルスベクターを開発した。この濃縮した高力価な脳特異的レトロウイルスベクター溶液をマウスグリオーマモデルの脳内に注入し，2 日後より 5 日間 GCV を腹腔内に投与した。この治療を 3 クール繰り返すことでグリオーマモデルが完治した。そこで，治療用ベクターの安全試験をコモンマーモセット（霊長類）を用いて計画し，「科学技術・学術審議会生命倫理・安全部会組換え DNA 技術等専門委員会」で審議され，平成 14 年 12 月 2 日付けで文部科学大臣の承認も得ている。コモンマーモセットを用いた安全試験を実施するにあたり，Fig. 2 のごとくマスター細胞とワーキング細胞を同一ロットにし，臨床実験直前に治療用ベクターの各種安全試験を同時に実施して将来の臨床実験に備えている。

MBP の発現量の少ないグリオーマでは，治療用ベクターの活性が低下してしまうことが予想されたので，最も普遍的にグリオーマ細胞中に発現する特異的遺伝子を SAGE 法を用いて検索した。そして我々は，悪性グリオーマ普遍発現遺伝子の一つとして，melanoma-associated antigen (MAGE) gene family と呼ばれる腫瘍抗原をコードする新しい遺伝子群を同定し，MAGE-E1 と命名した。この新規遺伝子は 3 種類の転写産物を有し，MAGE-E1c 遺伝子は様々な癌種に発現したが，他の MAGE-E1a と E1b 遺伝子はグリオーマにのみ特異的に発現していた。以上の事から，この MAGE-E1 遺伝子が，グリオーマ特異的抗原をコードする遺伝子の一つである可能性が高く，本遺伝子のプロモーターを同定し，新たな悪性グリオーマ特異的遺伝子治療の開発を試みている。

参考文献

1) Tamura K, Tamura M, Ikenaka K, Yoshimatsu T, Miyao Y, Nanmoku K, Shimizu K: Eradication of murine brain tumors by direct inoculation of concentrated high titer-recombinant retrovirus harboring herpes simplex virus thymidine kinase gene. Gene Ther 8: 215-222, 2001
2) Sasaki M, Nakahira K, Kawano Y, Yoshimine T, Shimizu K, Kim SU, Ikenaka K: MAGE-E1, a new member of Melanoma-associated antigen gene family and its expression in human glioma. Cancer Res 61: 4809-4814, 2001
3) Kawano Y, Sasaki M, Nakahira K, Yoshimine T, Shimizu K, Wada H, Ikenaka K: Structural characterization and chromosomal localization of the MAGE-E1 gene. Gene 277: 129-137, 2001

13. イモガイ毒成分ωコノトキシン GVI による N 型電位依存性 Ca^{2+}チャネルの抑制作用に及ぼすカルモデュリンの効果

市田　成志，和田　哲幸（近畿大学薬学部）
森　泰生（統合バイオサイエンスセンター）
森 誠之，井本 敬二

市田らの Ca^{2+}チャネルに対するイモガイ毒の生化学的実験から，Ca^{2+}カルモデュリン依存的なωコノトキシン GVI の N 型カルシウムチャネルへの結合阻害が以前から観察されていた。近年の研究から細胞内カルシウムメディエーターであるカルモデュリンによる電位依存性カルシウムチャネルの機能修飾が明らかとなってきている。これまで報告されているものは L 型及び P/Q 型に限られているが，これらのチャネルに見られる Ca^{2+}カルモデュリンの結合部位と相同な部位が N 型にも存在していることから, カルモデュリンによる修飾が予測された。また，Ca^{2+}カルモデュリンの N 型への作用は，電流特性として捕らえるのは難しいが，ωコノトキシンというブロッカーの作用を介することで表に現れてくるのではないかと考えられた。

N 型 Ca^{2+}チャネルが Ca^{2+}カルモデュリンによって制御されているのか否か電気生理学的に確認するために，N 型 Ca^{2+}チャネルを stable に発現する BHK 細胞を用いて実験を行った。その結果, 細胞内 Ca^{2+}濃度を変化させても，L 型や P/Q 型で見られるような制御は N 型では見られず，また細胞内のカルモデュリン濃度を上昇させてもが，やはり変化は見られなかった。この結果は，以前報告されているものとほとんど変わりがなかったが，ここでコノトキシンの阻害作用を時間変化とともに観察した。現在までのところ，生化学的実験で得られているような，明確な結合の阻害は捉えることができなかった。

この結果は，生化学的実験で見られた現象を正しく反映していない為であると考え，今後，実験系の再構築を考えている。特に，イメージングを中心とした非破壊的方法により，前向きに検討を加えていく予定である。

14. 脊椎動物ＴＲＰホモログとＧ蛋白質共役型受容体で活性化される Ca^{2+}透過型陽イオンチャネルの分子的相関に関する研究

井上　隆司，花野　豊久（九州大学大学院医学系研究院）

TRP ホモログは多様な生理的意義を有する Ca^{2+}透過型陽イオンチャネルである。その活性化機構に関しては未知の部分が多く，解決すべき重要課題の一つとなっている。Ca^{2+}及びその受容タンパク質である calmodulin の役割を明らかにした。calmodulin は活性化及び不活性化に必須であり，これらの作用は異なった部位を介して起こることがわかった。

15. 大脳基底核による姿勢と歩行運動の制御

南部　篤（東京都神経科学総合研究所）
中陦克己，森　大志，森　茂美

大脳基底核は大脳皮質の広い領域から入力を受け，大脳基底核で処理された情報は視床を介して再び大脳皮質へ伝達するループ回路を形成する。すなわち大脳皮質運動野，特に一次運動野，補足運動野，運動前野などに起因する運動司令情報は大脳基底核線条体（被殻，尾状核）に入力され，直接路または淡蒼球外節，視床下核を経由

する間接路を経て大脳基底核出力部（淡蒼球内節，黒質網様部）から視床に投射される。さらに，淡蒼球内節からは脚橋被蓋核にも投射し，脳幹網様体，脊髄に情報伝達される経路が存在する。このように大脳皮質－大脳基底核ループは運動の制御のみならず，高次脳機能や情動などの制御にも関与していることが推察される。

本研究課題では生理学研究所・生体システム研究部門が独自に確立したニホンザル直立二足歩行モデルを用いて，これらの運動制御に関するループが特に歩行や姿勢の制御にどのように関与しているかを考察することを研究目的とした。そのために大脳皮質運動野，特に糖代謝 PET による先行研究で明らかになった直立二足歩行運動の実行に直接的に関与する一次運動野および補足運動野の機能的意義の同定を試みた。実験には長期の運動学習により安定した直立二足歩行能力を獲得した成サルを用いた。ネンブタール深麻酔下で，頭部に神経細胞刺激／記録用の chamber 装着手術を行い，手術回復後にケタラール軽麻酔下で皮質内微小電気刺激法により一次運動野および補足運動野の大脳皮質運動野マッピングを行った。それぞれの領域で歩行運動下肢関連筋支配領域（一次運動野では一側に，補足運動野では両側性に）に $GABA_A$ agonist であるムシモルを微量注入し，注入前後での歩容の変化を観察し，関節運動の変化などについて定量的に解析した。その結果，一次運動野への注入では注入箇所に特異的な極めて限局された屈曲運動障害などの下肢運動障害が出現したが，補足運動野への注入では頭部・体幹の空間内での動揺が強くなるなどの全身的歩行障害を示した。一方，ムシモル注入によって歩行が全く不可能になったわけではなく，注入に伴う歩行障害を代償するような機序が動員された可能性も推察させる。以上の結果から，大脳皮質運動野を構成する一次運動野および補足運動野は直立二足歩行の実行に関して異なる側面を担っている可能性が示唆された。本研究成績の一部についてはすでに国内外の学会，シンポジウムで発表した。

16. 頭頂連合野出力細胞の脳幹・脊髄運動神経への影響

山本哲朗，西村嘉洋，淺原俊弘，澁谷浩司，松浦　徹，林　民，中瀬古幸成（三重大学医学部）
森　茂美，中陳克己，森　大志

頭頂連合野は，一般的には種々の感覚情報の統合が行われる部位として認識されているが，運動性情報として重要な小脳核からの入力も視床前腹側核(VA-VL complex)を介して受けることが知られている。また，我々の研究によりネコの頭頂連合野や体性感覚野の皮質第 5 層錐体細胞には，運動野と同様の速錐体路細胞と遅錐体路細胞が存在することも細胞内染色法により明らかにされた。このような皮質第 5 層錐体細胞の形態学的特徴は頭頂連合野が感覚情報の統御の結果を，連合線維により運動野へ出力し修飾するとともに，直接第 5 層錐体細胞の下行性軸索投射により下位運動中枢に影響する可能性が示唆される。実際，小脳破壊による運動障害が代償された後に頭頂連合野を破壊すると，運動障害が再び出現するとの報告もある。

本研究計画では，ネコ頭頂連合野皮質細胞の下行性投射による運動性制御への関与を調べる目的で，歩行運動制御を解析している生体システム研究部門森教授のグループとの共同研究を提案した。まずネコ頭頂連合野皮質錐体細胞の細胞内染色による形態学的解析に加えて，細胞内通電による発火様式の解析し，続いて脳幹・脊髄の運動神経核に対する影響を明らかにすることを計画した。計画途中でネコの入手が困難になり，目的の完遂には至らなかったが，頭頂連合野錐体細胞のうち皮質第 5 層錐体細胞の発火様式には，運動野で報告されているように regular spiking pattern を示すものと，burst firing を示すものがあり，burst firing のイオン機構としては Ca channel の関与よりも persistent Na current の関与を示唆する結果を得て現在論文を準備中である。また，細胞内染色法による形態学的解析の結果は既に発表した様に，伝導速度 18m/sec を境にして，速錐体路細胞型の先端樹状突起に棘の少ない大型の細胞と棘の豊富な小型の錐体細胞に分類されることを再確認したが，これら 2 種の皮質第 5 層錐体細胞の脳幹・脊髄への支配様式の解析は今後の問題として残った。一方小脳性歩行中枢については小

脳内側核からの出力がその本体であることは既に報告されているが，その軸索投射様式についてビオサイチンの微小電極による通電注入による順行性標識による実験を行った。下行性軸索分子様式の詳細については現在所見を解析中である。

17. 海馬興奮性シナプスの動態と微細形態

岡部繁男（東京医科歯科大・大学院医歯学総合研究科）
久保義弘（東京医科歯科大・大学院医歯学総合研究科）
藤本　和（福井県立大学・看護福祉学部）
重本隆一

A）シナプス前部と後部への機能分子の同期した集積
GFP 分子の波長バリアントである YFP および CFP 分子とシナプス前部，シナプス後部の機能分子の融合蛋白質を作成し，シナプス形成過程における複数の分子のシナプスへの集積順序について解析した。PSD-95-YFP 分子と CFP 分子を同時に発現させることで，シナプス形成過程において，spine 構造の形成の直後にシナプス後肥厚部(PSD)の構成蛋白である PSD-95 の集積がおこる事が明らかになった。また，シナプス前部蛋白質である synaptophysin と CFP 分子の融合蛋白質を用いることで，PSD-95 の集積に先立って，synaptophysin のシナプス前部への集積が起こる事も明らかになった。

B）神経活動依存的なシナプス分子の局在変化

シナプス後部構造に局在し，代謝型グルタミン酸受容体と結合する PSD-Zip45(Homer1c)分子について，GFP との融合蛋白質を作成し，その動態を海馬神経細胞において解析した。PSD-Zip45 は神経活動依存的にその局在を変化させ，NMDA 受容体からの比較的ゆっくりとしたカルシウム流入によりそのクラスターを分散させ，逆にカルシウムチャネルからの急激なカルシウム流入によってそのクラスター形成が促進される事が明らかになった。

C）トランスジェニックマウスを用いたシナプス機能分子の長期動態解析

シナプス後部構造の長期的なリモデリングの過程を明らかにするために，PSD-Zip45-GFP を発現するトランスジェニックマウス胎児から海馬神経細胞を培養して，一週間以上にわたるシナプス構造の変化を追跡した。この系を用いる事で，A）filopodia から spine への形態変化と PSD-Zip45 の集積過程，B）樹状突起が伸長する際の PSD-Zip45 の新しい樹状突起での集積過程，C）細胞全体での同期したシグナルにより起こる PSD-Zip45 クラスターの分布変化，などの現象が可視化できた。これらの観察から，神経細胞におけるシナプスリモデリングは，細胞全体に作用する global なシグナル系によって強く制御されていると考えられた。

18. 非可聴域高周波弾性振動情報の生体内伝達メカニズムについての研究

本田　学
大橋　力（千葉工業大学工学部情報ネットワーク学科教授）
仁科　エミ（メディア教育開発センター研究開発部助教授）

これまでに本研究グループは，非定常な高周波成分が可聴域音と共存することにより，視床および上部脳幹の局所脳血流増加を含む，特有の相互作用をおよぼすことを報告してきた。また近年，音声信号で振幅変調した超過聴閾弾性波を骨導で呈示すると，内耳性難聴者でも音声の認知が可能であると報告されている。本研究は，こうした可聴閾を超える非定常な高周波弾性振動情報が神経系に影響をおよぼすメカニズムについて，その伝達経路の解明を目的とする。本年度においては上記の研究目的達成のため，20kHz を超える弾性振動を皮膚に加える

ために適性の高い振動子の素材について広く検討をおこなった。その結果，スーパーツイータ・スピーカの発音体となるセラミック振動子が，皮膚の弾力に抗して振動を加えるのに適性が高いことを見いだした。その実際の振動特性をレーザードップラー振動計測系で評価した。セラミック振動子を用いて刺激プローブを作成，皮膚に対して効率的に振動を加えるためのシステム開発をおこなった。さらに，機能的磁気共鳴画像装置内において，接触振動情報とともに音響，映像を協調的に呈示するためのシステム構築を行った。今後，機能的磁気共鳴画像装置をもちいた神経機構の解明へと展開していく予定である。

19. 黒質網様体によるドーパミン細胞に対する GABA 作動性抑制

斎藤和也，高草木薫（旭川医科大学生理学）
伊佐　正

基底核疾患において運動障害，姿勢異常，情動変化，認知機能障害，睡眠障害などの様々な症状が引き起こされるのは何故だろうか。この問いに対する手がかりの一つを，我々は中脳ドパミン系による中枢神経活動の修飾機構の障害に求めている。中脳ドパミン系は，三つの細胞群（黒質緻密部，腹側被蓋野，赤核後領域）から成り，各群のドパミン細胞はおのおの異なる領域に投射し，異なった役割（運動，情動など）を持つとされている。そこで，我々は基底核出力と中脳ドパミン系の相互作用が上記の多彩な機能発現に重要であるという仮説をたてた。

この仮説の是非を検証する最初のステップとして我々は基底核出力による中脳ドパミン系の修飾機構を今一度検討した。ラット(PND9-23)の脳幹 in vitro スライス標本を用いて，黒質網様部 (SNr) の電気刺激に対する中脳ドパミン系ニューロンの応答をホールセルパッチクランプ法にて記録した。ドパミン作動性ニューロンの同定は特徴的な電気膜特性（異常内向き電流，一過性外向き電流）により行った。ドパミンニューロンへの興奮性入力を除外するために，グルタミン酸受容体拮抗薬を記録槽内に投与した。SNr の刺激により $GABA_A$ 受容体を介する速い抑制と GABAB 受容体を介する遅い抑制が観察された。このような抑制様式は中脳ドパミン系の三つの細胞群で共通して認められた。また双方の抑制とも，50Hz から 200Hz 位の刺激頻度に対し振幅が最大となる周波数依存性を示した。通常 SNr ニューロンが数十 Hz で持続的活動していることを考えるとドパミン細胞は $GABA_A$, $GABA_B$ 受容体を介する抑制をともに受けつづけていることが示唆された。

上記の成績より，基底核の出力は領域の異なる三つの中脳ドパミン系の活動の制御に関与し，その作用は $GABA_A$ 受容体と $GABA_B$ 受容体の両方を介した抑制作用として誘発される。従って基底核は中脳ドパミン系の広範な投射領域における神経作用を統合的に制御することによって多彩な中枢機能の発現や調節に関与している可能性がある。

20. PKC-GFP トランスジェニックマウス用いた神経可塑性制御に対する PKC の役割の解明

酒井規雄（神戸大学バイオシグナル研究センター）
坪川　宏

γPKC-GFP を線条体，小脳プルキンエ細胞，海馬を含む前脳に発現するトランスジェニックマウスの作製に成功した。これらのマウスから，特に小脳のスライスを作製し，フォルボールエステルあるいは，代謝型グルタミン酸受容体作動薬により，トランスロケーションを起こし，スライスの生細胞で初めて PKC のトランスロケー

ションをリアルタイムに観察することに成功した。今後さらにトランスロケーションの部位の詳細な検討，様々な電気刺激による PKC トランスロケーションの観察を進めていく予定である。

21. イカクロマトフォアパターン形成を指標にした中枢神経可塑性の研究

井上　勲（徳島大学分子酵素学研究センター）
筒井泉雄（一橋大学・生物学研究室）
尾崎毅

イカ，タコなどの頭足類は皮膚組織に色素胞(Chromatophore)をもち，それぞれの色素胞には約 20 の筋細胞が平面状に結合し，筋細胞の収縮により色素胞が拡張し皮膚に色が現れる。これらの筋細胞は脳神経に支配され，数万個の色素胞により体表面にパターンが形成される。これらのパターンにより仲間同士のコミュニケーション，カモフラージュ，あるいは外的への威嚇等が表現される。集団で行動する回遊性のイカにとって仲間同士のコミュニケーションは重要であり，学習により様々なパターンを憶える。

頭足類の多くは 1 年の命であり，ハッチ後 1 年で体重は 50 万-100 万倍増加する。成長に応じて脳の重量も増大し，色素胞の数も増えつづける。学習能力はハッチ後約 10 週で獲得されることが報告されている。

パターン認識の能力はきわめて高い。たとえばヤリイカである，*Loligo Breekeli* と *Loligo eduris* 数匹づつ同じ水槽で飼育した場合，同種同士はある個体がパターンを変えると，ほとんど同時に他の個体も同じパターンを示すが，他の種は全く独立に同種同士のパターンを現す。パターンおよび種は視覚を通じて認識され，視葉で記憶される。

パターン形成の可塑性を調べるため *L. bleekeli* の色素胞筋に至る神経の一部を切断した。切断により色素胞筋細胞が弛緩し，皮膚の一部が透明になる。その後その部分にどのようなパターンが形成されるか 10 日間観察した。切断後 3 日目から色素胞の拡張による斑点が現れた。それぞれランダムに点滅を繰り返した。次第に近接する色素胞同士の点滅に相互作用が現れ，7 日後にはほとんど全ての色素胞が相互作用し，ウェーブ状のパターンが繰り返された。しかしウェーブ形成はランダムであり，正常の部位のパターン形成とは異なる。このランダムなウェーブの伝播は，皮膚上に 1M $CoCl_2$ を浸した糸を接触することにより可逆的に阻害されることから，相互作用は色素胞筋の収縮が（恐らくストレッチリセプターを介して）隣接する色素胞筋の収縮をトリガすることによるものと考えられる。

以上のように，パターン形成の神経支配の可塑性を示唆する結果は得られなかった。

22. 植物 Na･K 輸送体 AtHKT1 の電気生理的研究

山上　睦（環境科学技術研究所）
魚住　信之（名古屋大学生物分子研究センター）
加藤　靖浩（名古屋大学大学院生命農学研究科）
挾間章博（統合バイオサイエンスセンター）

AtHKT1 は Arabidopsis thaliana よりクローニングされた小麦由来トランスポータ HKT のホモログ蛋白である。HKT の場合は，これまで Na^+イオンと K^+イオンを共輸送するトランスポータであるが知れられていた。本研究では，アフリカツメガエル卵母細胞に AtHKT1 を発現させ 2 本刺膜電位固定法を用いて，そのイオン輸送能を調べた。AtHKT1 を発現させた卵母細胞では，細胞外陽イオンを Tris にすると，未発現卵母細胞に比べ電流増加は認

められなかったのに対して，細胞外陽イオンを Na^+に置換すると大きな内向き電流が出現した。また，K^+置換では，著明な電流は認められなかった。この事から，AtHKT1 においては，Na^+イオンと K^+イオンを共輸送するのでは無く，Na^+イオン単独で輸送することが示唆された。また，細胞外陰イオン置換では，電流変化は認められず，AtHKT1 が陽イオンを選択的に透過させるものと考えられた。また，487 番目のアミノ酸残基であるアルギニンをグルタミン酸に置換することにより（R487E), 細胞外 Tris, K^+条件下でも大きな内向き電流が認められ，陽イオンの選択性が消失した。この事から，487 番目のアルギニンが陽イオン選択性に関与していることが明らかになった。今後，AtHKT1 の Na^+イオン輸送様式がチャネルかトランスポータかを明らかにするために，AtHKT1 発現卵母細胞に対してパッチクランプ法を適用することによりシングルチャネルレベルでの電流挙動を調べることが課題である。

23. 正常発達，および病態における糖鎖構造の解析

和田　洋巳，田中　文啓，大竹　洋介，中川　達雄（京都大学大学院医学研究科）
長谷　純宏，中北　慎一，森口　和信，堂本　隆司（大阪大学大学院理学研究科）
長東　俊治（京都工芸繊維大学）
平原　幸恵 (大阪府立母子保健総合医療センター研究所)
本家　孝一（大阪大学医学部）
竹林　浩秀，伊東　真哉，竹中　一正（京都大学医学部）
西　望（香川医科大学）
河野　洋三（京都大学大学院医学研究科）
池中一裕

N-結合型糖鎖は細胞表面の最外層を覆っているため細胞間の接着や情報伝達に大きく関与し，その結果として正常発達や様々な病態において重要な役割を果たしたり特徴的な変化を示していると考えられる。昨年度までの本共同研究において，多検体中の糖鎖構造を短時間に解析可能とする半自動化システムが確立され，それを用いて多くの検体を解析して肺がん患者の血清中に有意に増加する糖鎖構造を決定するなど多くの解析が行われてきた。

我々はがんの転移においてもN-結合型糖鎖は大きな役割を果たすと考えている。臨床において，がんが転移する際に原発部位によって特定の臓器へ高頻度に転移を起こす傾向，いわゆる転移臓器選択性を認めるが，この現象にがん細胞と臓器細胞の糖鎖パターンの類似性が関連しているという仮説をたて，B16 転移モデルマウスを用いてその検証を行っている。

最初に，HPLC を用いて培養 B16 細胞のN-結合型糖鎖の二次元マップ作成と主要糖鎖構造決定を行った。次に，同細胞を C57BL/6 マウスの尾静脈と，門脈あるいは脾臓から注入した。尾静脈からは肺転移，門脈や脾臓からは肝転移を主に認めた。これらの転移臓器から正常部位と転移がん部位をそれぞれ採取し糖鎖構造解析を行った。その結果，転移がんの糖鎖パターンはもとの B16 細胞と比べて転移した臓器の糖鎖パターンにより近いパターンをとっていることがわかった。特に顕著な傾向を示したのは A2G2F と A2G2 で，それぞれの培養 B16，正常肺，肺転移，正常肝，肝転移における割合(%：総N-結合型糖鎖に対する割合)を以下に示す。

	正常肺	肺転移	培養 B16	肝転移	正常肝
A2G2F	17.1	7.8	1.7	5.7	5.1
A2G2	11.1	5.5	1.4	9.6	13.7

この結果は糖鎖が転移臓器の選択に大きく関与している可能性を示唆するもので非常に興味深く，がんの予後診断や転移前の予防的治療など臨床応用の可能性もあるといえる。現在，このような現象が起こる機序や意義を含めさらに検証を行っている。

24. 脳内部位特異的ドレブリン A ノックアウトマウスの作製

白尾智明（群馬大学医学部附属行動医学研究施設行動分析学部門）
児島伸彦（理化学研究所脳科学総合研究センター）
小幡邦彦，柳川右千夫

ドレブリンは神経細胞樹状突起スパインに存在するアクチン結合蛋白であり，スパイン細胞骨格の再編成によるシナプス可塑性の調節因子として働いている可能性が強い。本研究では，ドレブリンAを部位特異的にノックアウトし，in vivo, in vitro で，シナプス機能の変化を解析することにより，シナプス機能における神経伝達物質受容体・細胞骨格連関の重要性が明らかにすることを目指した。

昨年度までの研究により，ドレブリンの発現量を変化させずにドレブリンAアイソフォームの発現のみを脳内全体でノックアウトするために作成したターゲッティングベクター pDA によってはキメラが誕生しないことが判った。本年，ドレブリン A のスプライスバリアントの一つである S－ドレブリン A が発見されたが，pDA はこの S－ドレブリン A の発現も抑制すると考えられる。最近，S－ドレブリン A はドレブリン A が樹状突起スパインに特異的に存在しているのとは異なり，より神経細胞の一般的機能に関与していることが示唆された。さらに，このほかにも複数のスプライスバリアントが存在することも示唆された。これらのスパライスバリアントがキメラの正常発生に影響を及ぼしている可能性が考えられた。そこで，今回新たに，lox P 配列を有するコンディショナルノックアウト用のドレブリン A ターゲッティングヴェクターを作成した。このヴェクターを用いて ES 細胞に相同組み換えを起こさせ，その ES 細胞を使ってミュータントマウス作製を試みている。この試みにとは別に，アンチセンスオリゴヌクレオチド法によりドレブリン A を特異的にノックアウトすることを試みた。ドレブリン A 特異的エクソン 11 に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを 3 種類作成した。これを培養 12 日目の初代培養神経細胞に投与したところ，このうちの一種類はドレブリン A の発現を特異的に抑制することが判った。この系を用いて，樹状突起スパインの形態変化を観察したところ，発生過程におけるドレブリン A の発現抑制はスパインの形成を抑制することが判った。以上の研究と同時に，従来の研究により作成済みであった，ドレブリン遺伝子の第一エクソンを lox P 配列で挟んだ構造のターゲッティングベクターを用いた ES 細胞の相同組み換えも試みた。200 個の ES 細胞をスクリーニングしたが期待する組み替え体を得ることはできなかった。

25. Hirschsprung 病コンジェニックラットの作製

安居院高志（名古屋市立大学医学部）
尾崎　毅

AR ラットはエンドセリンタイプ B レセプター遺伝子（*Ednrb*）を欠損するヒト Hirschsprung 病の動物モデルである。AR ラットは生後 3 週間で全例死亡してしまい，このことが繁殖ならびに実験の遂行の障害となっている。AR ラットと LE ラットの交雑ラインから，$Ednrb^{sl}$（*Ednrb* の欠損タイプ遺伝子型）をホモにもっているにもかかわらず症状が緩和で寿命の長いラットが出現した。このことからラットの背景遺伝子が LE になると症状の緩和が起こり，寿命が延びる可能性が示唆された。そこで AR ラットを LE ラットに 10 世代に渡り戻し交配することで原因遺伝子座 $Ednrb^{sl}$ を導入したコンジェニックラット LE-$Ednrb^{sl}$ ラットの作製を試みた。$Ednrb^{sl}$ の検出は deletion されている部分を挟むように PCR プライマーを設計し，PCR 産物の大きさから判定した。$Ednrb^{sl}$ をホモに持つと繁殖に使えないため，常にヘテロに保有しているラットを遺伝子診断により選び出し交配に用いた。

作製された LE-$Ednrb^{sl}$ ラットは予想に反し，AR ラットと同様に激烈な Hirschsprung 病症状を呈し，生後 3 週

間で全例死亡した。しかしながらこのコンジェニックラット作製途上で分枝したラインの中から，*Ednrb*^{sl} *をホモにもっているにもかかわらず*症状が緩和され寿命が延びるラットが見いだされた。このことは AR と LE 由来の背景遺伝子がある一定の割合で混ざりあうと *Ednrb* 遺伝子欠損を補い，症状の緩和をもたらす可能性を示唆している。現在このラインの兄妹交配を続け近交系の確立を進めている。この系統が確立できれば，AR-*Ednrb*^{sl} または LE-*Ednrb*^{sl} とゲノムを比較することにより，*Ednrb* 欠損を補っている遺伝子を明らかにできることが期待される。

26. Phosphohippolin のイオンチャネル活性の解析

宋　涛，渡邊泰男，徳田雅明（香川医科大学細胞情報生理学）
岡田泰伸，森島　繁

ラット海馬 cDNA よりクローニングした 1 回膜貫通型蛋白質（phosphohipollin 以下 Php）は，FXYD family に属する蛋白質であり神経細胞において多く発現することを in situ hybridization や免疫組織化学法により確認した。Php は他の FXYD family である phospholemman や Mat-8,CHIF などとも homologous であることより，それらの蛋白質と類似した機能，即ち「オリゴマーを形成し陰イオンチャネル活性を有する」ことが推測された。

本研究においては，チャネル活性の有無を明らかにするため，Php の mRNA を inject し強制発現した卵母細胞および Php-cDNA を transfect した哺乳動物細胞を用いて，パッチクランプ法により Cl^- 電流を測定した。

その結果，卵母細胞では Php 抗体で Php の発現は確認されたものの，Cl^- 電流は検出されなかった。また哺乳動物細胞では C6, HEK293T, NIH3T3 などを用いて行ったが，NIH3T3 には内在性の Cl^- 電流がなく Php 発現による phenotypic な影響もほとんどなかったので解析に用いる細胞として最適と判断した。しかしながら十分に Php を発現した NIH3T3 においても Cl^- 電流が検出されなかった。

以上の結果から，Php は phospholemman などチャネル形成蛋白質と類似するものの，Cl^- チャネル活性はないと結論した。

【　計画共同研究報告 】

計画共同研究報告

〔　目　　次　〕

１．コンディショナルジーンターゲティングによる GnRH ニューロンの機能解析
（佐久間康夫ほか）..... 132
２．インスリンレセプターによる膵β細胞機能調節とシグナル伝達機序
（矢田俊彦ほか）..... 132
３．上皮細胞における TRPV1 関連陽イオンチャネルの発現と機能
（富永真琴ほか）..... 132
４．乳酸アシドーシスによる脳グリア細胞の容積調節
（鍋倉　隆ほか）..... 133
５．膜孔形成タンパク質による腸管上皮細胞の体積変化の解析
（冨田敏夫ほか）..... 133
６．新規の神経突起伸長遺伝子 norbin のノックアウトマウス作成による生理機能の解析
（丸山　敬ほか）..... 134

1. コンディショナルジーンターゲティングによる GnRH ニューロンの機能解析

佐久間康夫，加藤昌克，七崎之利（日本医科大学生理学第一講座）
小幡邦彦，八木健

性腺刺激ホルモン放出ホルモン（GnRH）は生殖機能の神経内分泌調節に重要な役割を果たしていると考えられているがそれは直接的証拠ではなく間接的証拠によるものが多い。本研究ではコンディショナルジーンターゲティングの手法により，任意の時期に GnRH 遺伝子のノックアウトを行い，GnRH 分子が中枢で果たす役割の解析を目指すものである。特に思春期や更年期にこのニューロンの演じる役割は重要と考えられる。また，性行動の発現にも GnRH が関与することが示唆されているが，本計画共同研究でその解析もすすめる。

昨年度までに LoxP 配列を GnRH 遺伝子エクソンの両端に導入した約 16Kb の GnRH gene targeting vector を作成し，ES 細胞にエレクトロポレイション法により導入した。PCR とサザンブロットでターゲティング遺伝子の導入された ES 細胞を選抜し，さらに PGK-neo 遺伝子を除去したクローンを選び出した。次にこの ES 細胞を 8 細胞胚に注入しノックアウトマウスの作成を 4 回試みたが，全て失敗しキメラマウスを得られなかった。現在この原因を追及中である。

2. インスリンレセプターによる膵β細胞機能調節とシグナル伝達機序

矢田俊彦，出崎克也（自治医科大学）
橋口鈴子（鹿児島大学）
岡田泰伸，森島　繁

グルコース応答性インスリン分泌は，β細胞内 Ca^{2+}濃度（$[Ca^{2+}]$）の増加により仲介されている。インスリンと Insulin-like growth factor-1（IGF-1）はグルコース応答性 $[Ca^{2+}]$増加の第 2 相オシレーションを第 1 相よりも強力に抑制することを見出した。一方，グレリンは，胃と視床下部に局在するペプチドであり，成長ホルモン-IGF-1 系の新しい刺激ホルモンとして機能することが明らかにされている。我々は，グレリンにもインスリンや IGF-1 同様の抑制作用があることを見出した。グレリンは 10^{-8}M にてグルコースおよびロイシン応答性$[Ca^{2+}]$増加を抑制したが，K_{ATP} チャネル抑制剤による$[Ca^{2+}]$増加には作用しなかった。グレリンはグルコース応答性インスリン分泌も抑制した。以上の結果より，身体の成長を増強する高濃度のインスリン・IGF-1・グレリンはいずれもβ細胞抑制作用をもつこと，グレリンの作用点は K_{ATP} チャネルよりも上流のグルコースシグナル部位であると考えられる。

3. 上皮細胞における TRPV1 関連陽イオンチャネルの発現と機能

富永真琴，飯田陶子（三重大学医学部・生理学第一講座）
岡田泰伸

トウガラシ成分カプサイシンの受容体 TRPV1 は，非選択性陽イオンチャネルである。上皮細胞には浸透圧変化を感知して開く陽イオンチャネルの存在が知られているが，その分子実体は明らかでない。最近，TRPV1 に構造の類似する陽イオンチャネル（TRPV4）が浸透圧受容体候補として報告された。そこで，TRPV4 が上皮細胞に

おける浸透圧変化の感知に関わっているかどうかを調べるため，小腸上皮での TRPV4 の発現を検討した。ヒト小腸上皮由来培養細胞（I407）において RT-PCR を行ったところ，TRPV4 の mRNA は検出されなかった。したがって，小腸上皮では TRPV4 以外の分子が浸透圧変化の感知に関与していることが示唆された。他の上皮組織における TRPV4 の発現については現在検討中である。一方，ヒト胎児腎臓由来の細胞株 HEK で TRPV4 mRNA が検出され，腎臓に TRPV4 が発現しているという以前の報告と一致したが，電気生理学的には HEK でこのチャネルの機能は観察されていないため，さらなる検討が必要である。TRPV4 の mRNA はラットグリオーマ由来の細胞株 C6Bu1 にも発現していることがわかり, TRPV4 が脳機能において何らかの役割を果たす可能性が示された。今後，C6Bu1 における TRPV4 タンパクの機能的な発現を検討していく予定である。

4. 乳酸アシドーシスによる脳グリア細胞の容積調節

鍋倉　隆，小宗静男（宮崎医科大学・耳鼻科）
森島　繁，森信一郎，岡田泰伸

一般に細胞に低浸透圧刺激を与えると細胞は，いったん膨張し，まもなく regulatory volume decrease（RVD）により，元の容積に回復することが知られている。この RVD の際に最も重要なのは，volume-sensitive outwardly rectifying（VSOR）Cl^- channel を介する Cl^-の細胞外への排出であることがわかっている。乳酸アシドーシスとグリア細胞容積との関係を C6 glioma 細胞を用いて調べた研究で,「乳酸アシドーシス（pH 6.8 以下）によってグリア細胞は膨張し，その後 RVD は生じず，膨張した状態が持続する。」と報告されている（Staub ら，1990）。我々は，RVD が，ラクトアシドーシス下で，抑制されている原因は，VSOR Cl^- channel の抑制であろうと仮説を立てた。この仮説を検証するためには，VSOR Cl^- channel 以外の Cl^-排出経路を細胞に新たに供給することが必要である。近年, アニオン特異的イオノフォアとして H. pylori より産生される VacA 蛋白が精製された。我々は，この蛋白を C6 グリオーマ細胞に適用して，アニオン イオノフォアを作成し，RVD 機能が，回復するかどうかを調べた。C6 グリオーマ細胞を用いて乳酸アシドーシス下の RVD が抑制されている事を示した。乳酸アシドーシス下での RVD の抑制は，容積感受性クロライドチャネルの抑制のために生じる事を認めた。

5. 膜孔形成タンパク質による腸管上皮細胞の体積変化の解析

冨田敏夫（東北大学大学院農学研究科）
Rabshan SABIROV

エノキタケ子実体に存在するフラムトキシンは，ヒト白血球など多くの動物細胞に膜孔を形成して細胞崩壊あるいは膨潤をおこす。この 31 kDa のタンパク質は腸管上皮細胞に対して膨潤作用を示し，細胞間のタイトジャンクションの物質透過性を亢進する。我々は，フラムトキシンが細胞膜上で自己集合して外径 10 nm，内径 5 nm のリング状の膜孔複合体を形成することを明らかにした。昨年度のプロジェクトにより，フラムトキシンは脂質平面膜（Planar lipid bilayer）に電位依存的に開閉する大小 2 種類の陽イオン選択的チャネルを形成する事実が明らかになった。大きいチャネルは実効内径 5 nm の親水性の膜孔であり，フラムトキシンが形成するリング状構造体であることが判明した。一方，小さいチャネルの分子的実体はフラムトキシンのダイマーであると考えられた。各種ヒト由来株化細胞に対する作用を調べた結果，フラムトキシンはヒトの腸管上皮細胞（I-407）に対して効率的にチャネルを形成し，やがて細胞膜の盛り上がりによる bleb 形成および細胞膨潤をおこした。フラムトキシンに

よる腸管上皮細胞の体積変化の仕組みを解析するために，フラムトキシンがヒト腸管上皮細胞に形成するチャネルについて解析した。その結果，フラムトキシンが腸管上皮細胞に形成したチャネルは，脂質平面膜においてと同様に，大小 2 種類の電位依存的に開閉するチャネルであり，細胞の内向きに陽イオンを取り込む性質を示した。このチャネルの特筆すべき性質は，生成したチャネル活性のかなりの部分（>50%）が細胞を洗浄することで消失することであった。フラムトキシン処理した細胞の洗浄液を電子顕微鏡で観察すると外径 10 nm のリング状構造体が観察されることから，細胞膜上で自己集合したフラムトキシン複合体が細胞膜に突き刺さる過程が可逆的性質を示すためであると推定された。マウスにおいてはキノコによる接触阻害現象が観察されることから，フラムトキシンの腸管上皮細胞におけるチャネル形成に関してさらに解析するとともに，このタンパク質による腸管機能に対する影響について研究をおこなっている。

6. 新規の神経突起伸長遺伝子 norbin のノックアウトマウス作成による生理機能の解析

丸山　敬（埼玉医科大学薬理学教室）

反復刺激後にシナプスの伝導効率の上昇が持続する LTP（長期増強）に関与する遺伝子の探求を，報告者が生理学研究所に在籍当時から開始した。LTP を誘発する K チャンネル阻害剤 tetraethylammonium によって発現が上昇する遺伝子を検索した。その結果，神経組織に特異的な遺伝子（KW8, norbin）を特定した。KW8（現在は NeuroD2 と命名されている）は，分化関連の転写因子に多く見られる basic helix-loop-helix 領域を持つ新規の遺伝子であった。norbin の核酸配列ならびに蛋白質の推定アミノ酸配列は，データベースのホモロジー検索では新規の遺伝子であった。norbin の cDNA を神経系培養細胞である Neuro 2a に遺伝子導入によって過剰発現したところ，神経突起の伸長が誘引された。以上のことから，神経回路の形成と維持に関与している遺伝子の可能性が考えられる。

本共同研究では，数年来 norbin ノックアウトマウスの作成を目指してきた。使用するノックアウト・ベクターを 5 種類作成し，千個以上の ES 細胞のクローンをスクリーニングしたが，相同組換え体を得ることができなかった。その原因は不明であるが，ゲノムの領域によっては相同組換えがおきにくい場合があるとのことである。2001 年 10 月，ランダムインサーションによりノックアウトマウスを網羅的に作成するプロジェクトを行っているドイツの GSF-Institute of Mammalian Genetics より，norbin ノックアウトマウスが提供された。

このノックアウトマウスは肉眼及び光顕レベルでの観察では大きな異常は見いだされず，また，だいたい正常に繁殖している。現在，どのようなゲノム変異が生じているのかと，形態的および生化学的解析を行っている。

我々の最初の報告から 2 年後，軟骨と神経に発現している因子として neurochondrin（Ishiduka Y ら Biochim Biophys Acta. 1999 1450:92）として norbin が報告された。nobin の細胞外の分泌を再検証したところ，確実なシグナル配列は見いだされないが，ある程度は細胞外に分泌されることを確認した。したがって，栄養因子のような機能の可能性も浮かび上がってきた。

今後は，入手したノックアウトの行動学的解析を行う予定である。

【磁 気 共 鳴 装 置
共同利用実験報告】

磁気共鳴装置共同利用実験報告

〔　目　　次　〕

１．マイクロイメージング法による脳室周囲器官群および関連する視床下部・延髄の研究
（鷹股　亮ほか）..... 138
２．MRI によるパーキンソン病モデルラット線条体の観察
（赤川公朗ほか）..... 138
３．磁気共鳴イメージングによる自律神経中枢の同定
（森田啓之ほか）..... 139
４．中国針による SHR-SP ラット脳梗塞後遺症麻痺回復過程における脳内構造変化の MRI 観察
（井上　勲ほか）..... 140
５．MRI によるサル視床の観察と電極定位への利用
（船橋新太郎ほか）..... 141
６．磁気共鳴画像装置による脳賦活検査を用いたヒトの高次脳機能研究
（飯高哲也ほか）..... 141
７．運動イメージと運動錯覚に関与する脳領域の解析
（松村道一ほか）..... 142
８．磁気共鳴装置による脳賦活検査を用いたヒトの顔認知に関する研究
（成本　迅ほか）..... 143
９．温熱的情動感覚（暑さ・寒さ）発現の脳機構解析
（彼末一之ほか）..... 143
10．磁気共鳴画像を用いた随意運動に関与する大脳運動調節機構の解明
（花川隆ほか）..... 144

1. マイクロイメージング法による脳室周囲器官群および関連する視床下部･延髄の研究

鷹股　亮（奈良女大生活環境）
瀬尾芳輝，生駒和也（京府医大医）
荻野孝史（国立精神・神経センター神経研）
村上政隆，永山國昭

脳室周囲器官群である脳弓下器官 (SFO) および終板器官 (OVLT)は，第三脳室前壁に位置し，体液調節，特に浸透圧調節において重要な役割を果たしていると考えられている。これらの部位は，血液－脳関門が欠損していて，血漿浸透圧をモニターする浸透圧受容器が存在していると考えられているが，実際にこれらの部位の毛細血管水透過性を定量的に in vivo で測定した研究はない。本研究では，ラット脳各部位における毛細血管水透過速度を Gd-DTPA を静脈内に持続投与して，組織の T_1 緩和時間を inversion recovery MRI イメージで測定することにより定量化し，脳室周囲器官（特に SFO）と脳内の他の部位と比較した。Gd-DTPA 静脈内投与による T_1 緩和時間の短縮を T_1 強調画像法で画像化し, SFO においては高信号に検出されたが，OVLT，視床下部には有意な領域は検出されなかった。SFO における緩和時間の短縮が，Gd-DTPA の血管から組織への漏出によるものでないことを BBB 破壊実験，および静脈内 Gd-DTPA 濃度を段階的に変化させて T_1 緩和時間を測定することにより確認した。SFO では, Gd-DTPA 投与により T_1 緩和速度（$1/T_1$）は, 各々0.70 ± 0.02 sec^{-1} から $1.53 \pm 0.11 sec^{-1}$ に上昇した。一方, 大脳皮質や視床においては T_1 の有意な変化は認められなかった。SFO における毛細血管内皮の水透過係数を求めると，3.7×10^{-3} cm s^{-1} となった。この値は，腎臓の直血管における透過係数に匹敵するもので，脳における毛細血管の値としては極めて高く，BBB が存在する皮質における透過性の 10-100 倍大きいことが明らかになった。この結果は，SFO が血漿の浸透圧受容部位として機能するに極めて効果的な構造をしていることを示唆する。今後は，血漿浸透圧上昇時の脳内神経活性部位を明らかにしていく予定である。

2. MRI によるパーキンソン病モデルラット線条体の観察

赤川公朗（杏林大医）　佐治真理（北里大医療衛生）
村上政隆（生理研）瀬尾芳輝（京府医大医）藤原智徳（杏林大医）

HPC-1/syntaxin 1A はシナプスにおける神経伝達物質の開口放出を制御している。HPC-1 の開口放出過程における詳細な生理機能は不明の点が多いが，多くの開口放出関連蛋白質と総称される蛋白質群と相互作用することによりシナプス小胞とシナプス前膜の結合及び融合過程を調節していると考えられている。我々は HPC-1 の mRNA に対する antisense okigonucleotide（AS）を投与することにより蛋白質合成を抑制した場合の神経伝達物質放出に与える影響を検討してきた。In vivo において一側のラット脳黒質に stereotaxic に AS を注入し，黒質神経細胞の蛋白質合成を阻害すると，その投射先である線条体では 24 時間後には, HPC-1 発現量が低下すると共に dopamine の放出量が変化することが免疫組織化学及び in vivo microdialysis により確認された。この際，アンフェタミン（AP）投与により放出を促進させると，およそ半数のラットでは運動異常, 特に回転運動を示すことを見出し，処置側の線条体機能が阻害されることが示された。この効果は数日間持続し，それ以降は回復することから，この系はラットにおける一過性のパーキンソン病のモデルと考えられた。本研究ではこの実験条件下での線条体，大脳皮質の活動の変化を MRI により観察することを試みた。

実験は一側に AS 処置をした動物に AP を与えて回転運動を生じることを予め確認したラットを用いた。ハロセン麻酔下に，気管切開を行い，呼吸を respirator で調節しながら AP を投与し，継時的に MRI でイメージングす

ることにより，阻害側と正常側における機能状態を検討した。その結果，処置動物では処置側と正常側（対側）の線条体における差異を観察することはできなかったが，対側大脳皮質頭頂領域に機能亢進を示唆する変化を認めた。麻酔により運動は抑制されているので，この結果は運動の連合機能との関連を示唆したが，差異は個体差が大きく，また実験前日に AP 処置により行動異常を確認した動物ではより大きな差が認められる傾向があったことから，数日以内の近接した AP 連続投与による影響も否定はできなかった。従って，更に例数を増やして詳細な検討をする必要があり, AP 連続投与による大脳の活動変化の基礎的観測を計画しなければならない。

3. 磁気共鳴イメージングによる自律神経中枢の同定

森田啓之，藤木通弘（岐阜大医）
荻野孝史（国立精神・神経センター研究所）
瀬尾芳輝（京府医大医）
鷹股　亮（奈良女大生活環境）
村上政隆

【目的】昨年度，Mn^{2+}造影 T1-weighted MRI と Fos 発現を比較し，高浸透圧刺激に対する中枢興奮部位同定において，Mn^{2+}造影 T1-weighted MRI はニューロン単位で興奮部位を同定できる空間分解能を有していることを報告した。この方法は神経細胞興奮時に Ca^{2+}チャネルから流入した Mn^{2+}による T1 緩和時間変化によりコントラストを作成する, 血行動態に依存しない MRI 画像法である。本年度の研究では, Mn^{2+}造影 MRI の時間分解能を検討するため，この方法を用い，自律神経系刺激に対する中枢興奮の時間経過を調べた。自律神経系刺激には側脳室内高張 NaCl 投与を用いた。

【方法】全ての実験は Wistar 系雄ラット（320～450 g）を用いて行った。エンフルラン（1 %）, O_2/CO_2　N_2O (1 : 1.5)吸入麻酔下に，左大腿静脈から下大静脈へ $MnCl_2$ 投与用カテーテルを挿入した。右外頸動脈から総頸動脈に向けカテーテルを挿入し，先端部は総頸動脈 - 内頸動脈分岐部に固定した。側脳室に高張 NaCl 溶液投与用カテーテルを挿入し，頭蓋骨に固定した。手術終了後，腹腔内にα - クロラロース（50 mg/kg）＋ウレタン（450 mg/kg）を投与し，エンフルランを中止した。ラットをアクリル製頭部固定装置に固定した後，23 mm の表面コイルを bregma の尾側 4 mm の場所に中心を合わせて設置した。$MnCl_2$（100 mM，2 ml/kg/h）を静脈内に投与しながら，25 %マンニトール溶液（5 ml/kg）を右内頸動脈から投与して右側血液脳関門を破壊した。$MnCl_2$ 投与開始 40 分後に，高浸透圧刺激として 1.5 M NaCl 溶液（10 μl）を側脳室から投与した。磁気共鳴施設の ABX Biospec 47/40（Bruker 社，4.7 T）を用い，刺激前，刺激中，刺激後と連続して T_1-weighted MRI 画像を撮影した（視野：25×25 mm，データ画素数 128×128，スライス厚 1 mm，16 スライス，TR/TE：150/4.2 ms）。刺激前後の信号強度変化スピードを検定し，刺激により有意に信号強度が増加した部位を求めた。

【結果と考察】図 1 に高張 NaCl 溶液側脳室内投与に対して，信号強度が増加した中枢部位を示す。時間経過に従って，側脳室周囲から視床，視床下部，皮質へと興奮が広がっている。図 2 に側脳室周囲の視床，第 3 脳室室傍核，視索上核における信号強度の経時変化を示す。3 つの部位で，応答時間に差があった。

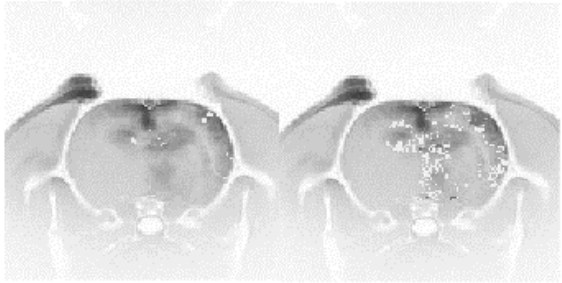
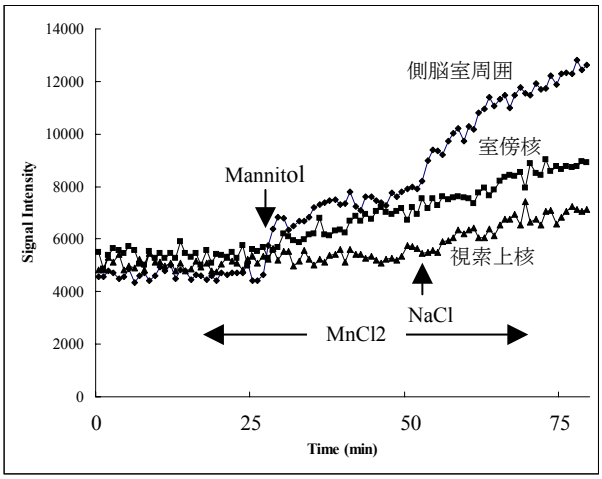


図 1：側脳室内 1.5 M NaCl 溶液投与に対する 1 分後（左），15 分後（右）の中枢応答。



以上の結果から，信号強度の立ち上がりスピードを求めることにより, 興奮の時間経過を求めることができる。視床下部興奮の時間経過は，交感神経活動増加の時間経過とよく一致しており，Mn^{2+}造影 T_1-weighted MRI は良好な空間分解能とともに，良好な時間分解能を持つことが確かめられた。

図 2 : 側脳室周囲の視床，第3脳室室傍核，視索上核における信号強度の時間経過。

4. 中国針による SHR-SP ラット脳梗塞後遺症麻痺回復過程における脳内構造変化の MRI 観察

井上　勲（徳島大学）
荻野孝史（国立精神・神経センター）
村上政隆

頭骨に沿い骨膜と帽状腱膜の間に針を長く刺す頭針（Scalp Acupuncture; SA）による脳卒中麻痺治療法は中国において経験的に確立され, 広く臨床で用いられている。これまでの臨床報告によれば, SA は麻痺と言語障害に対して特に効果があり，卒中の原因（脳出血，脳梗塞）に関わらず, また急性, 回復期, 後遺症にある全患者の 90% 以上に麻痺軽減効果が認められ，患者の 60－80%は完全あるいは「著しく」回復し社会復帰を果たす。この回復率はコントロール（投薬のみによる回復率）の倍である。このように劇的な SA 効果を科学的に解明するためには, 信頼できるコントロールデータが得られること，および心理効果を除く必要がある。卒中易発症ラット (Spontaneous Hypertensive Rats-Stroke Prone; SHR-SP)はヒトの卒中に最も近い発症パターンを現すモデルラットである。我々は SHR－SP 卒中発作後 SA を施し，麻痺に対する SA 効果を調べた。その結果，SA は速やかかつ強力に麻痺を取り除くことが判明した。SA の麻痺除去作用には一過性の速い過程と持続的なゆっくりした過程が存在する。速い効果は SA 後 30 分以内に現れる。この間で麻痺の程度は重度（Grade 3-4）から軽度（Grade 1-2）に著しく軽減する。この速い効果は徐々に薄れるが, SA を繰り返すことにより，麻痺は継続的に軽減し，発症後平均 5 日でほぼ完全に消失する。脳の病理解剖の所見から SA は脳出血，脳梗塞に関わらず麻痺除去作用があることが判明した。これらの SA 効果は臨床報告とよく一致する。したがって, SA はラットにおいてもヒトと同様の脳内作用を誘発するものと考えられる。SA の即効性から，麻痺は神経細胞の損傷によるものとは考えにくい。何か他の原因で, 活動電位の伝播が阻害されたものと考えられる。したがって，その外的要因が取り除かれれば，神経は速やかに元の機能を回復する。

このように短時間で生じる麻痺除去の脳内過程を調べるためには，MRI による非破壊観察は強力な研究手法である。我々は，ラット中大脳動脈付近に高解像度を得るための誘導コイルを作成した。

5. MRI によるサル視床の観察と電極定位への利用

船橋新太郎，竹田和良，渡辺由美子，居垣紗織（京都大学）
一原里江（札幌医科大学）

視床背内側核は，前頭連合野と双方向性の強い線維結合をもち，その損傷により前頭連合野の損傷に類似した行動変化が観察されることから，前頭連合野の機能を理解する上で視床背内側核の機能の理解が不可欠であると考えられる。われわれの研究グループでは，ワーキングメモリを必要とする課題を行なっているサルの視床から単一ニューロン活動の記録を試みているが，背内側核が脳の深部に位置し，位置決定のための基準となる stereotaxic map 上の位置が文献により大きく異なるため，電極の定位が難しい。そこで，MRI により視床を含む脳領域を可視化し，いくつかの脳部位との相対的な位置関係から視床背内側核の位置を正確に定位することを試みた。

2 頭のアカゲザルの脳の MRI 画像を撮影した。麻酔したサルの頭部を MRI 撮影用脳定位固定装置に固定し，MRI 装置により，前額断，矢状断，水平断の脳断面を撮影した。撮影は stereotaxic atlas で想定される視床背内側核を中心に，全脳にわたって行なった。

撮影された MRI 画像は SPM99 を用いて解析した。まず，脳を stereotaxic atlas と同一の座標に配置し，前額断の画像を用いて前交連の位置（前後軸上の座標位置）を決定した。いずれの文献でも，背内側核の前後軸上の位置は，前交連の後方 6-16mm の範囲であることから，先に決定した前交連の位置から背内側核の位置を決定し，そこに電極の先端が行くように電極アダプターの位置を決定した。

現在，これらのサルの視床より単一ニューロン活動を記録し，分析を行なっている。

6. 磁気共鳴画像装置による脳賦活検査を用いたヒトの高次脳機能研究

飯高哲也，羽田薫子，松本敦（名古屋大学　大学院環境学研究科　心理学講座）
野川純平（名古屋大学　情報文化学部）
ジョアン・チャオ（ハーバード大学　心理学講座）

顔は日常生活上で最も高頻度に遭遇する対象であり，その認知機構を研究することは心理学における重要な課題となっている。表情の些細な変化をも区別する我々の脳は，顔の認知処理に関して特有に発達したシステムを持っていることが予想される。このシステムは後頭ー側頭葉領域に存在することが指摘されてきたが，最近は fMRI, ERP などを用いて顔認知に関する脳内機構が積極的に調べられている。

Ⅰ）人種間の表情認知の差異に関わる脳内機構

脳画像研究は社会心理学の領域でも行われ，人種間のコミュニケーションに関わる神経基盤を探る試みも行われている。我々は自分と同一もしくは異なった人種の表情を同定する際の脳活動を fMRI を用いて検討した。12 人の健常な日本人が白人と日本人の顔（それぞれ怒り，恐れ，笑い，無表情の 4 種類）の表情判断を行っている時に脳賦活検査を行った。一次視覚野と両側紡錘状回は人種に関わらず賦活されたが，白人の顔は両側紡錘状回後半部を，日本人の顔は右上側頭溝周辺を有意に賦活した。この傾向は白人の「恐れ」と「無表情」，日本人の「怒り」「笑い」「無表情」で強かった。特に顕著であったのは日本人の「笑い」の認知と右上側頭溝周辺領域の賦活の関係であった。親近性が低い白人の顔は低次な形態的処理が必要であり，日本人の顔は些細な表情の変化をとらえる必要があることからそれぞれ固有な領域が関与したと考えられた。

Ⅱ）同一被験者における顔認知課題中の fMRI・ERP 測定

fMRI と ERP はそれぞれ神経活動に伴う血行動態と電気生理学的変化の反映であり，前者は空間的，後者は時間的情報に富んでいる。この 2 種類の情報を統合してヒ

トの認知活動をとらえていくことが重要である。12 人の健常被験者が顔と家の判別課題を行っている時に，別セッションで fMRI と ERP を測定した。実験は同一の被験者群と同一の課題設定で行われた。その結果 fMRI では紡錘状回，海馬・扁桃体，前部帯状回などに顔で強い賦活が認められた。ERP では両側側頭－後頭葉領域に顔で強い N170 成分が認められた。相関解析の結果，N170 成分の潜時と左右紡錘状回の信号強度に有意な正の相関を認めた。しかし N170 成分の振幅と信号強度には有意な相関は見られなかった。この結果は顔認知に関して ERP で測定された波形の時間的成分が fMRI で測定された血行動態の変化と関連していることを示している。

7. 運動イメージと運動錯覚に関与する脳領域の解析

松村道一，小田伸午，内藤栄一（京都大学総合人間学部）
河内山隆紀，来田宣幸，橋本敏宏，守田知代，富田広美，北田亮（京都大学大学院人間環境学研究科）

人間は実際に運動を行わなくても，身体運動を想像すること(運動イメージ)ができる。この場合，自らの身体に関する内的表象である「身体図式」= body image を自由に操っていると考えられる。運動イメージ中の脳活動の研究は数多く，ある運動のイメージ中には，その運動を実際に制御する場合に賦活する脳部位が関与することがわかっている。この事実より，運動イメージは，運動実行のシミュレーション過程であるとの見解に至っている。しかしながら，運動イメージ中に運動のどの要素がシミュレートされているのか明らかではなかった。物体の視覚像をイメージする場合，あたかもその物体を見ているかのような感覚を経験することができる。したがって視覚イメージ中に脳内でシミュレートされるのは，視覚の感覚経験である。これが運動イメージの場合ならば，ある運動をした場合に期待される運動感覚がシミュレートされているはずである。

もし運動イメージ中に運動感覚がシミュレートされているならば，腱刺激により惹起される四肢の運動錯覚量が，その四肢の運動イメージによって影響を受けるはずであると仮説し，行動学実験を行い，脳血流を測定した。行動学実験では，右手伸筋の腱への振動刺激により生じる右手の屈曲方向への運動錯覚量が，右手の屈曲または伸展方向の運動イメージによってどういう影響を受けるかを心理物理的に評価した。

その結果，運動錯覚方向と同(屈曲)方向の運動イメージは，屈曲運動錯覚経験を増大させ，反対(伸展)方向のイメージはそれを減弱させた。運動イメージが運動錯覚に影響を与えたことから，運動イメージ中にはおそらく運動感覚がシミュレートされている可能性を示した。

この行動学実験より，運動イメージ想起時中には運動感覚がシミュレートされていることが明らかとなった。このような機能をつかさどる脳領域は，おそらく運動イメージ中に賦活される脳部位でかつ運動錯覚経験中にも共通に賦活される部位であると仮説し，被験者が右手の運動錯覚を経験している最中，または右手の運動イメージを行っている最中に脳活動を記録した。その結果，左半球の補足運動野，運動前野，右半球の小脳が両者に共通の脳内システムであることが判明した(図 1)。左半球の頭頂葉は運動イメージのみで賦活した。以上から運動イメージ中にはその運動を行った場合に期待される運動感覚もシミュレートされることが示された。

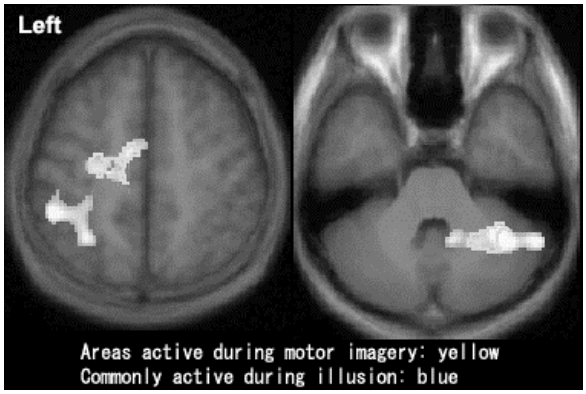


図 1

8. 磁気共鳴装置による脳賦活検査を用いたヒトの顔認知に関する研究

成本　迅，福居顯二（京都府立医科大学　精神医学教室）

顔はさまざまな情報を同時並行で伝えることができる。その認知機構は情報の種類ごとに異なると考えられている。我々は同じ顔から表情を同定する際と個人を同定する際の脳活動を fMRI を用いて検討した。

12 人の健常被検者が顔（恐れ，笑い，悲しみの 3 種類）の枠の形を判別する課題（以下枠課題），表情判断課題（以下表情課題），それから個人の同定を行う課題（個人課題）を遂行している際に脳活動を計測した。それぞれの課題で両側紡錘状回，右上側頭溝周辺，両側頭頂間溝周辺に賦活が見られた。このうち，両側紡錘状回，右上側頭溝周辺，左頭頂間溝周辺では枠課題に比べ，表情課題と個人課題で有意に賦活が強かった。さらに，右上側頭溝周辺では，個人課題に比べ表情課題で有意に強い賦活を認めた。右上側頭溝周辺は，視線方向を同定する際にも賦活されることが報告されており，表情や視線方向などの一時的で変化に富む情報の認知に関与していると考えられた。

9. 温熱的情動感覚（暑さ・寒さ）発現の脳機構解析

彼末一之，永島　計（大阪大学医学部保健学科）

温熱的情動感覚（暑さ・寒さ）は行動性体温調節に関係する主観的なもので, 単に皮膚温度刺激だけではなく, 内部の温熱的条件に強く依存する。この感覚の神経機構に関する知見は少ない。本研究ではこの問題を解析する第一歩として，ヒトの全身冷却刺激をしたときの脳活性部位を fMRI で解析した。

実験は 8 人の成人男性（28±8 才）を被験者として行った。被験者は短いパンツのみ着用して寝袋を改造した温度刺激装置内に入った。寝袋には胸部の口から空気が流入し，足の部分から流出する。循環する空気は温冷風供給装置から供給した。72 分間の撮像中 4 つの温度条件を設定した。①温熱的中性域の 28℃の風を 15 分間，②送風を停止，15 分間，③5℃の冷風を 22 分間，④32℃の温風を 20 分間である。被験者は 1 分毎に 9 段階の全身の温熱的不快感（1, very cold; 2, cold; 3, cool; 4, slightly cool; 5, neutral; 6, slightly warm; 7, warm; 8 hot; and 9, very hot）を寝袋に開けた透明な窓を通して，右手指のサインで申告した。撮像は 1.5 テスラの MR 装置で 6 秒ごとに $T2^*$ 強調，gradient echo EPI 法で行った。1volume は 1mm のギャップで 5mm 厚の 24 断面からなり，各断面 64×64 pixels である。正規化した信号は被験者毎に各 voxel の信号と申告された感覚の関係の回帰直線を計算した。そしてその傾斜が $p<0.05$ 有意水準で 0 と異なる voxel を求めた。被験者 8 名すべてについて有意な voxel につきすべての被験者のデータをまとめてその回帰直線の傾斜がやはり有意に 0 と異なる場合を活性とみなした。

本実験では両側の扁桃体にのみ温熱的快・不快感の申告と局所脳血流量（rCBF）が負の相関を持つ，つまり「寒さ」の感覚が強いほど rCBF の大きな部位が得られた。この部位が温熱的情動感覚発現に重要な役割を果たしていることが示唆される。最近の研究では皮膚温度に関する情報処理は島皮質が重要であることが示唆されている。つまり温熱的不快感は島皮質から扁桃核に信号が伝えられることで生まれると思われるが，本研究ではそこまでは明らかに出来なかった。これは今後明らかにすべき課題である。

10. 磁気共鳴画像を用いた随意運動に関与する大脳運動調節機構の解明

花川隆，矢澤省吾，長峯隆，福山秀直（京都大学医学研究科附属高次脳機能総合研究センター）
池田昭夫（京都大学医学研究科臨床神経学）
国枝武治（京都大学医学研究科脳神経外科学）

非侵襲的脳機能検査の中で，もっとも簡便で，広く利用されている検査法が磁気共鳴機能画像(fMRI)である。fMRI は簡便であるが故に, その知見の根拠となっている blood oxygen level dependency（BOLD）による脳血管の反応と神経活動そのものの間の関連性に関する確実な証拠が必要であるが，これまでのところ，BOLD による所見と神経活動に関して，ヒトで直接比較検討した報告は少ない。

われわれは, 内科的な治療ではコントロールできない, いわゆる難治性部分てんかん患者 3 症例（いずれの症例も前頭葉内側面に腫瘍ないしはグリオーシスを有し，手術的摘出術が必要なもの）において，術前検査の一部として, fMRI と慢性硬膜下電極による電気刺激を行うことができ，それらの相互の結果を比較検討する機会にめぐまれた。本報告ではその結果を報告する。

MRI は，1.5 テスラ GE 社製 Horizon で，BOLD 効果を測定するのに適した，single shot gradient-echo, echo planar 法（TR=3 sec, TE=40 msec, flip angle 90, 64x64, 3.44x3.44x3.5 mm voxel）による撮像をおこなった。課題は，手指と足部の単純運動を被験者に課した。賦活部位の同定には，Statistical parametric mapping 96 を用い，$p<0.001$ を有意水準とした。その後，慢性硬膜下電極からの刺激により，同様の運動が誘発されるか否かを観察した。

慢性硬膜下電極により刺激された前頭葉内側の運動関連部位（前補足運動野，補足運動野，陰性運動野）での運動誘発の結果と, fMRI により得られた四肢の運動に関連して賦活が見られた部位は，ほぼ同じであった。したがって，非信州的脳機能の検査方法として，BOLD を指標とした fMRI の結果は，運動機能の評価に関しては，大きな間違いを含んでいないと結論することができる。かかる，同様の課題を異なった手法で評価して，脳機能のマッピングを比較検討することは，今後，正確な脳機能の分布を解明する上で，極めて重要な考え方であるといえる。

今回の検討は，運動，しかも，前頭葉内側面に限った検討で，必ずしも脳全体に関する検討ではない。したがって，このような検討が広汎な脳領域について行われ，詳細な脳機能局在の研究が行われる必要がある。そのための基礎的な研究として，本研究は，先駆的な意味があると考える。

【超高圧電子顕微鏡共同利用実験報告】

超高圧電子顕微鏡共同利用実験報告

〔 目　　次 〕

１．*Onchidium sp.* 幼動物の外套にみられる眼外光受容（皮膚光覚）細胞の超高圧電顕観察による立体再構築
（片桐展子ほか） 148
２．超高圧電子顕微鏡による有機化合物微粒子の結晶構造解析
（大野　完ほか） 148
３．アクチンの微小クリスタルの電子線回折像
（一海孝光ほか） 149
４．ギャップ結合で連結した網膜ニューロンの樹状突起の構造
（日高　聰ほか） 150
５．Leupeptin 投与後のラット肝細胞における細胞質貪食機構の研究
（野田　亨ほか） 151
６．超高圧電子顕微鏡を用いた神経細胞の三次元的形態解析
（小澤一史ほか） 152
７．嗅球ニューロンの定量的三次元構造解析
（樋田一徳ほか） 152
８．小脳変性症マウスにおける小脳プルキンエ細胞形態変化の超微細 3 次元的観察
（RHYU, Im-Joo ほか） 153
９．星状グリア細胞突起の CT 解析
（M. Ellisman ほか） 154
10．プロトプラストの融合過程におけるネットワーク形成
（谷口美恵子ほか） 154
11．マウスとラットにおける樹状突起スパインの頻度および大きさの比較
（濱　清） 155
12．翼手類唾液腺線条部導管細胞の portasome の構造と分布
（村上政隆ほか） 155

1. *Onchidium sp.* 幼動物の外套にみられる眼外光受容（皮膚光覚）細胞の超高圧電顕観察による立体再構築

片桐展子（東京女子医科大学・総合研究所・研究部）
片桐康雄（東京女子医科大学・看護学部）
重松康秀，小坂誠一（東京女子医科大学・総合研究所・共同利用施設）
有井達夫

イソアワモチ類（軟体動物・腹足類）の外套背面は多数の大小の疣状突起で覆われる。小さな陰影を外套に与えるとその陰影下に局所的な収縮が起こる。陰影反応は外套から切り離した小突起でも生ずることから，外套の皮下組織に分布する眼外光受容器；皮膚光覚(DP)細胞（Katagiri et al 1990）からの光情報が筋細胞（MF）に伝えられ MF の収縮によると考えられる。幼動物の外套は成体より疣状突起が少ないが，多数の MF が小突起を含め結合組織内を諸方向に走行する。これまでに外套の皮下組織に大形で特異な星形の MF を認めその全容を明らかにした。特異な星形 MF から延びる多数の突起に囲まれた領域内に DP 細胞を認めたのでその全容を観察・立体再構築し，星形 MF との関係や陰影反応への関与を探った。

材料と方法：生理研年報（22，2001）参照。

結果と考察：星形 MF から延びる長い突起が囲む領域に 2 個の DP 細胞が存在，両者には成熟度に差異があった。DP 細胞は発達した微絨毛とオスミウム染色で黒染する photic vesicles(PV)が細胞質内に充満するのが特徴である。DP1 細胞はほぼ球形で細胞質に PV を多量に含む。核は成体では複雑な切り込みが見られるのに対して楕円形を呈した。DP2 細胞はまだ未成熟な微細構造を示し，微絨毛は発達途上にあり細胞質が少なく PV も少ない。立体構築像から得られた DP 細胞のサイズと細胞の全容量に対する微絨毛と核の占める割合は，DP1 細胞（474 μm^3）では微絨毛 35%，核 32%で，DP2 細胞（280 μm^3）では微絨毛 16%，核 51%であり，成熟するにつれて微絨毛の占める割合が増加，未熟な細胞では細胞質が少なく核が大きかった。DP1 細胞の軸索は微絨毛の基部から成体におけると同様に延びるが，DP2 細胞の軸索は細胞質の突起のようである。いずれの軸索も DP 細胞に近接して走行する小神経束に入る。小神経束は星形MFの突起の囲む領域内にある太い神経束に合流する。太い神経束内では DP 細胞の軸索と他の神経繊維との識別は難しかった。星形 MF は多数の突起を延ばして他の星形 MF の突起と接し全体として篭状のネットワークを成して DP 細胞や神経束を囲む。星形 MF は光受容細胞である DP 細胞からの情報をもとに他の MF と連携して外套上の疣状突起を局所的に収縮させると推測される。

2. 超高圧電子顕微鏡による有機化合物微粒子の結晶構造解析

大野　完，仙石昌也（愛知医科大学）
有井達夫

ガス中蒸発法によって作成した有機物微粒子を超高圧電子顕微鏡で観察した。試料は芳香族炭化水素のコロネン($C_{24}H_{12}$)微粒子である。昨年度まで主に用いたペリレン（$C_{20}H_{12}$）微粒子[1,2]と同様，結晶構造は単斜晶であるが，晶癖はペリレン微粒子の板状に対し，コロネン微粒子は針状結晶が多く作成される[2]。融点はペリレンの約 270℃に対しコロネンが約 440℃と有機物の中でも非常に安定な物質であり，有機物の構造解析を行うには比較的容易であると考えたが，予想に反して観察は困難であり，当初は格子像が確認できなかった[2]。

今回，観察に成功したコロネン微粒子は不活性ガスを Ar,ガス圧を 10Torr,試料の蒸発温度を 240～260℃の条件で作成した。作成された微粒子のモルフォロジーは，幅が数十 nm，長さが数 μm の針状結晶が多くみられた。図

1 はその代表的な微粒子の格子像である。格子縞は長軸に対して平行な方向しか現れず，その格子間隔は約 1.02～1.04nm であった。結晶構造のデータベースである ASTM カードによると，回折が現れる最も大きな結晶方位の面間隔はコロネンの場合約 0.95nm であり，これまでに知られているものとは異なる結晶構造を持つ微粒子が作成された可能性がある。しかしながら，データ数が不足しているため，他の分析方法でも解析を行い，今後も引き続き実験を行って確認する必要があると思われる。

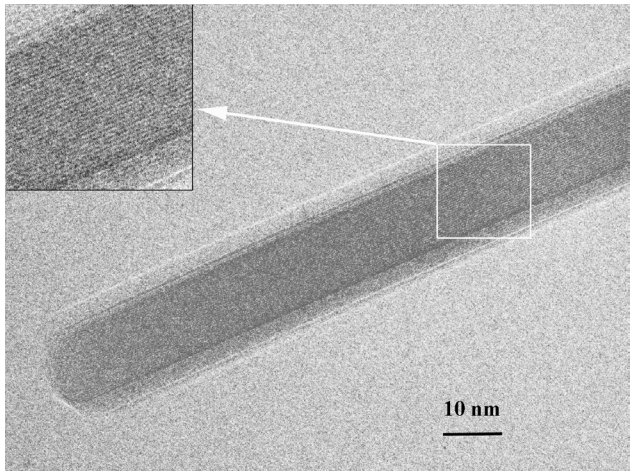


図 1 ガス中蒸発法によるコロネン微粒子の格子像（at 1,000 k V）

参考文献

1. 大野　完，仙石昌也，有井達夫 : 岡崎国立共同研究機構 生理学研究所年報 第 21 巻 pp.150-151
2. 大野　完，仙石昌也，有井達夫 : 岡崎国立共同研究機構 生理学研究所年報 第 22 巻 pp.146-147

3. アクチンの微小クリスタルの電子線回折像

一海孝光（愛知県立芸術大学）
有井達夫

低い塩濃度のアクチン溶液にモル比で過剰な ATP を加えるとアクチンのフィラメントが出来る。このフィラメントは会合して微小なクリスタルを作る。我々は微小クリスタルの構造の特徴を明らかにしようと仕事を進めてきた。厚みのある 3 次元クリスタルの電子線回折には超高圧電子顕微鏡(HVEM)が適している。一般的な低圧の電子顕微鏡では電子線の透過力が十分でない。HVEM の電子線なら透過することができる。高角での反射スポットは 2Å辺りまで観測できるが困難な問題もある。それは低角散乱領域での回折スポットが弱いことである。アクチンの場合にはシート状のクリスタルが層状に重なっている可能性が高いが（1)，HVEM の場合低角散乱の領域で十分なコントラストの回折スポットが出にくいと思われる。そこでごく薄いカタラーゼクリスタルを用いてこの回折像の反射角度への依存の様子を観測しておき，このモデルとアクチンフィラメントのクリスタルの回折像とを比較しながら解析を進めることにした。これにより，観測した回折像が目的のクリスタルからのものかどうかの判断がやり易くなると思う。そこで，市販のカタラーゼを 10%の NaCl に溶かした後に，水に透析して得られるごく薄いクリスタルを用いて HVEM の生じる回折像を観測した。約 6 nm の格子が観察された。回折像においては，狭い領域からの回折像を撮ってみると比較的短い間隔に相当する回折斑点が見られたが，それとともに，その間がストリークでつながっているのも観察された。この結果は，部分的にカタラーゼの構造を反映すると考えられる。低角においては，構造を反映する回折斑点が観察されていないためさらに検討中である。

以上述べたように HVEM では染色しなくてもカタラーゼクリスタルの実像や回折像を得ることができた。従って，この方法によれば染色物質が引き起こす様々のアーティファクトへの心配を除くことができる。次に考慮しなければならないのは照射損傷である。低圧の電子顕微鏡によるタンパクのクリスタルの観察では照射損傷が大きな問題となるが，HVEM の観察においては厚いクリスタルを観測できることから照射損傷が通常の場合よりは少なくなる可能性がある。さらに HVEM ではイメージングプレートが使用でき，照射量を少なくしても感度よく回折像を捉えることができる。このような特性

を持つ HVEM を用いて現在アクチンフィラメントのクリスタルの観察を継続している。

(1) 生物物理 42 巻 S41〔2002〕一海孝光，有井達夫 アクチン微小クリスタルの超高圧電子線回折

4. ギャップ結合で連結した網膜ニューロンの樹状突起の構造

日　高　　聰（藤田保健衛生大・医・生理）

光受容神経組織である網膜のニューロンの二次元的な配列様式は各々のタイプによって異なっており，それらの分布の解明は光情報処理の神経機構の解析にとって重要である。これまでに，双極細胞，アマクリン細胞及び神経節細胞が同一タイプの間で特定のモザイクを呈しながらギャップ結合で連結していることを明らかにした。我々は，電気生理学的手法によってニューロンの活動を解析した後に，神経活動をギャップ結合で連結した神経突起の形態と相関して，各タイプに特徴的なギャップ結合の視覚機能上の意義を調べている。電気生理学的に同定した網膜ニューロンを細胞内標識し，超高圧電子顕微鏡を用いて，厚さ数 μm の樹脂包埋切片を解析することによってギャップ結合で連結した神経突起の三次元形態を解明することが本研究の目的である。

視覚生理学的に調べて来た網膜神経節細胞について，平成 13 年度は引き続き，ラット網膜を用いて解析した。成熟 Wistar 系ラットから剥離した全載網膜標本を用いて核染色色素 DAPI で標識したα-神経節細胞を形態学的に同定し，37℃で O_2/CO_2 を供給した AMES’溶液で潅流しながら微小電極法またはパッチクランプ法によって電流注入に対するスパイク列応答を解析した後に，電極内に充填したルシファー黄とビオチン複合物を用いて細胞内注入法によって細胞を標識した。ビオチン複合物（Neurobiotin, Vector）を注入した標本の電子顕微鏡解析のための処理（日高と橋本,1993）を経て，光学顕微鏡によって注入細胞と周囲の標識細胞との接触突起を同定した後，エポン樹脂包埋した標本から，1-5 μm の厚さの網膜切片を作成し，ギャップ結合で連結した樹状突起の 3 次元構造を超高圧電子顕微鏡で 1,000 kV で解析した。

電気生理学的に解析した神経節細胞の形態をルシファー黄の標識から alpha-神経節細胞として同定した。組織化学反応（日高と橋本,1993）によって注入した Neurobiotin の局在を検出し，注入細胞から回りの同型の細胞へ tracer coupling を示した標本を超高圧電子顕微鏡解析に用いた。光学顕微鏡下での観察から，Neurobiotin で標識された隣接する alpha-神経節細胞の樹状突起の先端同士の間で直接の接触の可能性があると観察された標本を，厚さ 3 μm の網膜水平断の連続切片を用いて超高圧電子顕微鏡で解析し，光学顕微鏡での観察と超高圧電子顕微鏡での解析の対応を試みた。光学顕微鏡で見られた樹状突起の先端同士の間の接触の所に，厚切り切片の超高圧電子顕微鏡での解析から，確かに樹状突起間の結合が認められた (Fig. 1A)。そこには電子密度の高い close membrane apposition が観察され，隣接する網膜神経節細胞の樹状突起間にギャップ結合の存在が考えられた。超薄切片での解析から，Neurobiotin で標識された隣接する alpha-神経節細胞の樹状突起間で形態学的に認められるギャップ結合を同定した（Fig. 1B）。最近，我々は Wistar 系ラット網膜の神経節細胞がギャップ結合チャネル蛋白・コネキシン 36 を発現していることを明らかにした（Hidaka 等, 2002）。今回の超高圧電子顕微鏡解析で同定した隣接する網膜神経節細胞間のギャップ結合の存在は，コネキシン 36 の細胞発現に対応し，また，神経節細胞間のギャップ結合にコネキシン 36 チャネルが局在していることが示唆された。網膜神経節細胞でのコネキシン 36 の発現と細胞間でのギャップ結合の形成の視覚機能を電気生理学的に解析している。

［文献］

日高　聰, 橋本葉子 (1993) ビオチン複合物（biocytin, Neurobiotin）注入による細胞内標識法と神経系解析への応用. 日本生理誌　55: 241-254.

Hidaka, S., Kato, T. and Miyachi, E.-I. (2002) Expression of gap junction protein connexin36 in adult rat retinal ganglion cells. J. Int. Neuroscience, Vol 1, pp 3-22.

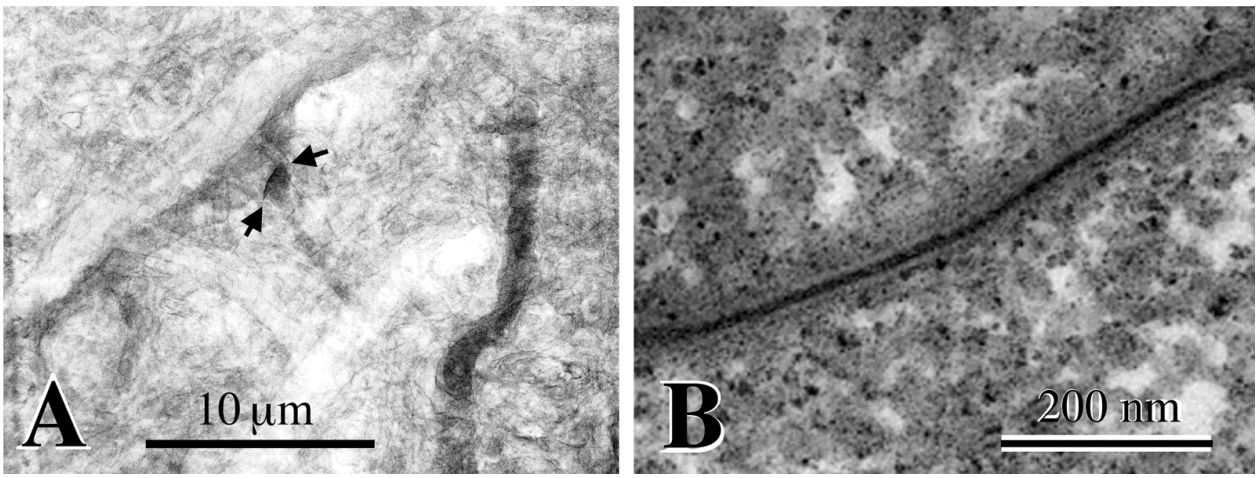


Fig. 1. Direct gap junction connections between retinal ganglion cells, revealed by high voltage (A) and conventional electron microscopy (B). [A], A close membrane apposition (arrowheads) between Neurobiotin-labeled peripheral dendrites of the tracer-coupled rat alpha-retinal ganglion cells, observed at 1,000 kV in a tangential 3 μm section in thickness. Note that gap junctions occur at dendritic tips. [B], A gap junction between labeled peripheral dendritic tips of the coupled alpha-retinal ganglion cells, revealed by conventional electron microscopy at 75 kV in an ultrathin section. Scale bars: 10 μm for A, and 200 nm for B.

5. Leupeptin 投与後のラット肝細胞における細胞質貪食機構の研究

野田　亨（京都大学大学院医学研究科生体構造医学講座）

これまで leupeptin 投与後のラット肝細胞は自己貪食を示す実験モデルとして研究されていた。しかし，厳密な意味でこのモデルが真の自己貪食胞を表わすものであるか，またその形成膜がこれまで提唱されてきた小胞体膜であるか否かを改めて検証した。

ラットに leupeptin を 2mg/100 g の量で投与し，投与後 20 分後に肝を還流固定した。対照群には薬剤を投与しない正常ラットの肝を用いた。それぞれから採取した組織を形態観察用試料とフェリシアン化カリウム・オスミウム法で形質膜を高電子密度に標識した試料の 2 種類を作製し，それぞれを電顕で観察した。

薬剤投与後の肝細胞には自己貪食胞様構造が現れたが，それらの多くは形質膜の近くに比較的多く分布していた。形質膜直下には一部，滑面化した小胞体が存在していた。また自己貪食胞様構造にはしばしば粗面小胞体から延びるリボゾームを欠いた層板が一体化しているものも認められた。稀に形質膜の一部が細胞質内にのび，自らの細胞質を取り囲むものも観察された。

フェリシアン化カリウム・オスミウム法で形質膜を高電子密度に染めだした試料の厚切り切片を作製し，超高圧電顕で形質膜の形状を観察したところ，正常ラットでは一部で指状陥入様の構造ををとるが，その他の部位は直線的な細胞境界を示した。Leupeptin 投与後のものでは形質膜が球状にどちらか一方の細胞の細胞質へ突出するものが正常組織に比較して増加しており，また直接形質膜との連絡が捉えられないが，形質膜に沿って分布する自己貪食胞様構造の限界膜も高電子密度に染めだされた。しかし，形質膜よりやや内部の細胞質に分布する自己貪食胞様構造には高電子密度の反応産物は認めなかった。

以上の結果より，leupeptin に誘起された自己貪食胞とこれまで呼ばれていたものの中には隣接する細胞質を細胞内に取り込み，消化する特殊な異物貪食胞，および形質膜の陥入により形成される自己貪食胞などが含まれている可能性が高まった。これらの貪食胞の限界膜は小胞体ではなく，形質膜である。ところが，小胞体由来の層板が自己貪食胞様構造と一体化しているものも観察されていることから，小胞体由来の限界膜をもつ自己貪食胞の出現も否定できない。しかし，これらの構造の中には

形質膜直下の小胞体が隣接する細胞質の取り込みの際に二次的に一体化したものも含まれている可能性もある。

6. 超高圧電子顕微鏡を用いた神経細胞の三次元的形態解析

小澤一史，謝　藏霞，河田光博（京都府立医科大学第一解剖学教室）

本研究は，超高圧電子顕微鏡の高解像力とステレオ観察効果を利用し，種々環境下，特に老化や血中循環ステロイドホルモン濃度の変化に伴う脳の神経細胞の超微細構造変化について三次元的に描出，形態学的，定量的に計測を行うことを目的とした。通常の透過型電子顕微鏡による観察から，様々な細胞体内の変化やシナプスの変化等が認められたが，特に軸策や樹状突起の変化については二次元的観察の限界があり，充分な情報が得られないでいた。しかし，超高圧電子顕微鏡を用いて，ゴルジ渡銀染色を行った試料をステレオ観察することにより，特に樹状突起及びその棘（spines）の変化をダイナミックに捉えることが出来た。大脳皮質や海馬領域の神経細胞では，若い動物（2 ヶ月齢のラット）では高い密度できちんとしたヘッドとテイルを有する樹状突起の棘が鮮やかに観察されるのに対して，老化動物（24 ヶ月齢のラット）ではこれらの密度が低下し，また棘の形態が萎縮するような像が観察され，老化に伴う変動が顕著に観察された。また，ステロイドホルモン受容体を有する神経細胞では，これらのホルモンの変動に対応すべく，形態変動が起こることが示唆されている。例えば，性周期に伴うエストロゲン変動によって，エストロゲン受容体が発現する神経細胞の樹状突起の形態変化が示唆され，報告されている。これらの現象を，より立体的にかつ詳細に観察する目的で，超高圧電子顕微鏡を用いて，様々なステロイドホルモンの変化，例えば性腺摘出による性ホルモン欠如状態や副腎摘出によるコルチコステロイドの欠如状態，あるいは欠落させたホルモンの補充による神経細胞への影響について，現在，さらに観察を続けている。

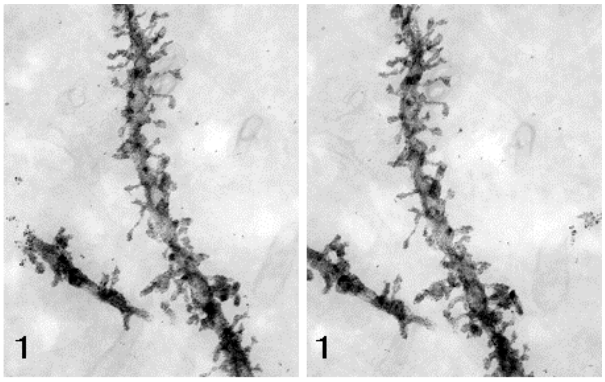


図１　2ヶ月齢ラットの大脳皮質神経細胞樹状突起のステレオ像

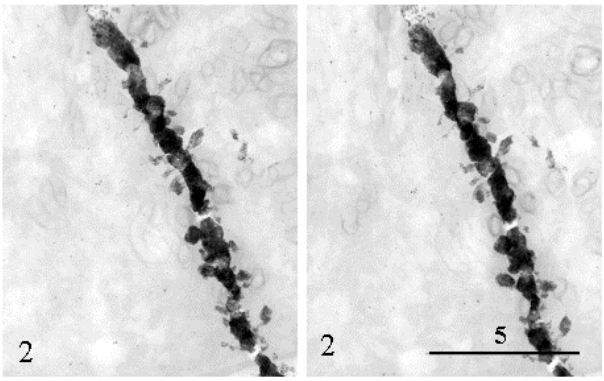


図２　24 ヶ月齢ラットの大脳皮質神経細胞樹状突起のステレオ像

7. 嗅球ニューロンの定量的三次元構造解析

樋田一徳（徳島大学医学部）

嗅覚の一次中枢・嗅球内の糸球体は，特定な匂い刺激に特異的に反応し，嗅覚の機能的構造単位として注目されている。この糸球体には嗅受容細胞（入力）と投射ニューロン（高次中枢への出力）がシナプス結合をするが，これには多様な局所ニューロンが介在しシナプス結合する。

本研究は，超高圧電子顕微鏡 H1250M の 1000kV の加速電圧による高解像力を利用し，嗅球・糸球体層の介在

ニューロンの複雑な樹状突起網の三次元構造を明らかにすることを目的とし，特に今年度は複雑な糸球体内樹状突起網を構成する tyrosine hydroxylase (TH) 免疫陽性介在ニューロンに焦点を絞り解析を行なったものである。

方法は昨年度に引き続き，抗 TH 抗体，ビオチン化 2 次抗体， および蛍光と 1.4nm 金コロイド同時標識 Streptavidin を用い染色し，共焦点レーザー顕微鏡によって観察後，これに銀増感 DAB 発色を応用して TH ニューロンを選択的に標識した。エポン包埋後これを最終的に 5μm 厚の切片に薄切し，超高圧電子顕微鏡にて立体解析を行なった。

TH ニューロンは主にして糸球体に局在する傍糸球体介在ニューロンであるが，一部はより大型の投射ニューロンタイプが糸球体層から外網状層（表層）にかけて存在する（図 1）。超高圧電子顕微鏡により，糸球体内の樹状突起は径 1μm を超える比較的太い樹状突起と，径 1μm 以下の細い突起が互いに絡み合っているのが観察される。このうち太い突起は分枝構造が少なく直線的に走行しているのが特徴的である。一方細い突起は比較的多くの分枝構造を有し，時に数珠玉状に波打った構造を呈しているのが特徴的であった（図 2）。以前観察を行った calbindin 免疫陽性介在ニューロンのように樹状突起が糸球体内の特定の領域に限局して分布することなく，両タイプの突起共より広範な領域に突起を伸長していることが明らかとなった。現在，これらの 2 種類の突起構造が単一のニューロンの異なる部位か，あるいは異なる種類のニューロンによるものかを識別し，更にシナプス結合の解析との対応を試みている。

TH ニューロンのように複雑な樹状突起網の個々の突起構造については共焦点レーザー顕微鏡の解像力の限界を超え，その詳細は明らかになっていない。このため超高圧電子顕微鏡による高解像力が期待され，今後連続切片による立体解析も計画している。

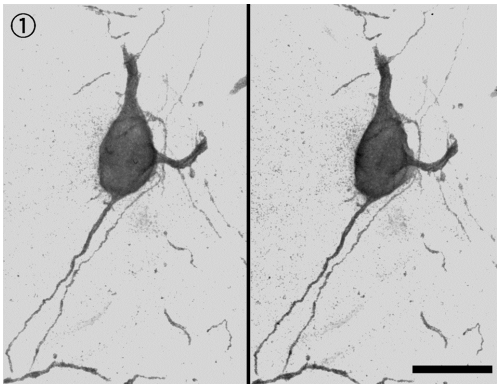


図 1　ラット嗅球の糸球体層よりの外網状層に見られる TH ニューロン。Bar; 20μm。

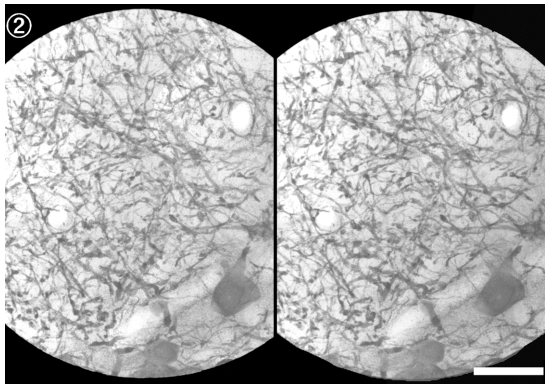


図 2　ラット嗅球糸球体内における TH ニューロンの樹状突起構造。Bar; 20μm。

8. 小脳変性症マウスにおける小脳プルキンエ細胞形態変化の超微細 3 次元的観察

RHYU, Im-Joo（Korea 大学医学部）
有井達夫，井本　敬二

The rolling mouse Nagoya (tgrol/tgrol) is a spontaneous P/Q-type calcium channel mutant, which is suggested as an animal model for human neurologic disease such as autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6), familial hemiplegic migraine, and episodic ataxia type-2. Morphology of the spines is reported to reflect functional status of the neurons. To understand the functional status of Purkinje cell in calcium channel insufficiency, dendritic spines were analyzed quantitatively.

After rapid Golgi preparations of the rolling and wild

cerebellum, the blocks were embedded in Epon-Araldite mixture. 4-μm sections were cut and observed with high voltage electron microscopy operated at 1,000 kV. Dendritic spine density and length of the spine were measured with NIH image.

Many spines emanating from the proximal dendrites in rolling mice were observed. The average spine density was 2.12 ± 0.18/10 μm in wild and 1.78 ± 0.22/10 μm in rolling. The average length of the spines was 1.12 ± 0.21 μm in wild and 0.82 ± 0.21 μm in rolling. The density and height of the spines were significantly decreased in rolling Purkinje cells ($p < 0.01$).

9. 星状グリア細胞突起の CT 解析

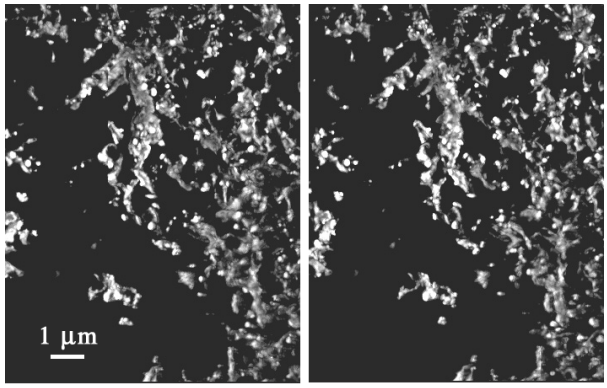
濱　清

M. Ellisman, M. Martone, N. Yamada (Univ. Calif. NCMIR)

我々は高い電子線透過能と，5 ミクロンを越える生物試料でも 4－5 ナノメターの解像力が期待できる 1,000kV 超高圧電子顕微鏡の特性を利用して，主として Golgi 染色を行ったラット CNS における星状グリア細胞突起の 3 次元立体計測を行っている。

海馬及び，大脳皮質で球形の細胞枝ドメインを形成する細胞質性星状グリア細胞の突起を 3 ミクロンの切片を用いて，CT を行った(例えば図 1)。

超高圧電顕を用いて－60 度から＋60 度まで 2 度間隔で連続傾斜撮影を行い，トモグラフイー解析を行っている。CT 三次元再構成には，UCSD, NCMIR によるソフトを用いている。さらに，再構成画像の表示や表面積などの計測には, Mayo 財団による analyze7.5.5 ソフトウェアを，用いた。体積/表面積の値は，19-33/μm と，大きな値を取ることが明らかとなった。



+8°　　-8°

図 1　グリア細胞の CT 解析による像から求めた再構成ステレオ像（交差視）

10. プロトプラストの融合過程におけるネットワーク形成

谷口美恵子，鈴木繁二，広瀬貴士（名古屋大学工学研究科）

植物培養細胞に，パルス電場をかけると細胞融合が，おこる。 AC 電場で，細胞同士が接合し，DC 電場で

融合が，開始する。この過程で，アクチンフィラメントが, ネットワークを形成し, 細胞融合に必要な構造を，構築する。今回は，アクチンフィラメントを結びつけているジョイント分子の構造を，より高分解能でとらえることを目的としている。超高圧電顕の持つ深い焦点深度は，比較的厚い試料に有効に作用する。

ダイズ及びレタスを，明・暗室で，培養し，プロトプラストを，調整する。これに，AC 及び DC 電場をかけて，細胞融合を, 起こさせ固定包埋した切片試料を作成して，超高圧電子顕微鏡を用いて，切片試料を，室温でまたは液体窒素温度まで冷却して，ステレオ観察することにより，アクチンフィラメントに結合しているミオシン様分子の構造を, 明らかにしようと試みているところである。

また，このほかに，ミオシン単分子の運動に関連して

の折れ曲がり位置に関する情報を得るために，酢酸ウランによるネガティブ染色を，試みた。

11. マウスとラットにおける樹状突起スパインの頻度および大きさの比較

濱　清

中枢神経細胞にとって主な興奮性入力の場であるスパインは，興奮伝達効率の調節とシナプス可塑性に重要な関わりを持っている。そこで光顕による形態の解析が行われてきたが，光顕では分解能の限界があり，真の値を求めることが困難である。そこで超高圧電顕を用いて，厚い試料を立体観察し，解析することにより，定量的な値を求める方法を用いて種による変化を明らかにすることを目的にしている。これまでのラットにおける樹上突起スパインの頻度の値は，既に報告しているように，細胞の核に近いところでは，(3.4±0.4)個/μm 核から離れた位置で (2.0±0.3 個)/μm である。このときのスパインの表面積と樹状突起の表面積にも一定の関係がある。マウスにおいては，これらの値が，どのように変化するかを定量的に求める方向で，研究を進めている。

12. 翼手類唾液腺線条部導管細胞の portasome の構造と分布

村上政隆

Bernard Tandler，Carlton J. Phillips（州立テキサステック大学環境健康研究所，理学部生物学）

昆虫幼虫の中腸で栄養物吸収の第一段階を担う膜輸送体蛋白のひとつ H^+ V-ATPase の V1 subunit が microvilli 細胞膜直下に存在する約 10nm の粒子 portasome に局在することが見い出された。この portasome の存在は無脊椎動物あるいはカメで知られているが，哺乳類については知られていなかった。最近果物を餌とする種々の翼手類（コウモリ）の唾液腺線条部導管細胞にこの portasome が多量に見い出された。一般に唾液腺線条部導管細胞は，Na 再吸収 K 分泌機能をもち, ATPase 活性が高く, H^+ポンプをもつといわれてきたが, portasome の形態／分布と機能発現の関連は不明である。平成 13 年度，超高圧電顕を用い，厚い試料を立体観察し，線条部導管細胞における portasome の構造と細胞内分布を立体的に観察し, 輸送機能との関連を解析する目的で, 計画を申請採択されたが, 残念なことに 9 月 11 日の同時多発テロ事件により, 共同研究者の来日が延期され，本研究の実施は不可能となった。

《超高圧電子顕微鏡共同利用実験での業績リスト》

A）　英文原著論文

1) Noda T, Fujimoto K, Ide C (2001) Annulate lamellae are interconnected by three distinct cisternal structures. Acta Histochem. Cytochem. 34, 103-110.
2) Nagata, T (2001) Three-dimensional high voltage electron microscopy of thick biological specimens. Micron 32, 387-404.
3) Murakawa R, Kosaka, T (2001) Structural features of mossy cells in the hamster dentate gyrus, with special references to somatic thorny excrescences. J. Comp. Neurol. 429, 113-126.
4) Kosaka K, Aika Y, Toida K, Kosaka T (2001) Structure of intraglomerular dendritic tufts of mitral cells and their contacts with olfactory nerve terminals and calbindin-immunoreactive type 2 periglomerular neurons.

J. Comp. Neurol. 440, 219-235.

5) Saito Y, Katsumaru H, Wilson C J, Murakami F (2001) Light and electron microscopic study of corticorubral synapses in adult cat: evidence for extensive synaptic remodeling during postnatal development. J. Comp. Neurol. 440, 236-244.

B）学会発表

1) 片桐展子，重松康秀，片桐康雄（2001.2）無脊椎動物（腹足類）の外套組織に分布する筋繊維の三次元形態解析。第 323 回東京女子医科大学学会例会　(東京)

2) 日高　聰，宮地栄一（2001.3）神経系で発現するギャップ結合チャネル蛋白・コネキシンの解析。第 78 回日本生理学会大会（京都）

3) Toida K(2001.4) Cathecolaminergic Neurons in the Olfactory Bulb. The 9th Intern. Catecholamine Symposium (Joint Congress with "The 5th Intern. Conf. Progress in Alzheimer's and Parkinson's Disease") (Kyoto)

4) 小澤一史，謝　蔵霞，落合育雄，河田光博（2001.4）超高圧電子顕微鏡による老齢ラット脳の神経細胞の超微細構造。第 106 回日本解剖学会全国学術集会 (南国)

5) 片桐展子，重松康秀，有井達夫，片桐康雄（2001.5）腹足類の外套組織にみられる筋繊維の超高圧電顕観察とその立体再構築。日本電子顕微鏡学会第 57 回学術講演会（福岡）

6) 樋田一徳 (2001.5) 共焦点レーザー顕微鏡を組みあわせた電子顕微鏡連続切片再構築法による嗅球ニューロン構成の三次元構造解析。日本電子顕微鏡学会第 57 回学術講演会（福岡）

7) Hama K (2001.5) High voltage electron microscope in cell and tissue research. Korea Elect Micros Soc.(Korea)

8) 小澤一史，謝　蔵霞，落合育雄，秋山翹一，有井達夫，河田光博（2001.9）超高圧電子顕微鏡を用いた老化ラットの海馬および大脳皮質領域における神経細胞の超微細構造観察。第 24 回日本神経科学および第 44 回日本神経化学合同大会（京都）

9) 片桐展子, 重松康秀, 有井達夫, 片桐康雄(2001.10) イソアワモチ幼動物の皮膚光覚細胞と特異な星形筋細胞の超高圧電顕観察。第 72 回日本動物学会大会（福岡）

10) Toida K (2001.12) Neuronal organization in the rat olfactory bulb. The 6th Japan-China Joint Meeting on Histochemistry and Cytochemistry（第 42 回日本組織細胞化学会総会・学術集会兼催）(東京)

【生体磁気計測装置
共同利用実験報告】

生体磁気計測装置共同利用実験報告

〔　目　　次　〕

１．脳磁図を用いたヒト感覚機能の研究
（寳珠山稔ほか）……160

２．ウィリアムズ症候群における視覚認知背側経路の機能
（中村みほほか）……160

1. 脳磁図を用いたヒト感覚機能の研究

寳珠山　稔（名古屋大学医学部保健学科）

人の感覚に関連する情報処理過程について生体磁気計測装置（Magnitoencephalography, MEG）により計測される体性感覚誘発脳磁場（Somatosensoy evoked magnetic cortical fields, SEF）を用いた研究を行った。本研究では，雑音の混入が少ない大脳皮質誘発反応を記録できる MEG の特性を生かし，非常に短い刺激間隔（0.5ms～100ms）で SEF 成分の Recovery function （RF）を記録し 2 つの SEF 早期皮質成分に機能的差があることを明らかにした（Hoshiyama and Kakigi, Clin Neurophysiol, 2001）。

早期の皮質反応と考えられる SEF 成分については刺激後 20ms（1M） と 30ms（2M）の潜時で出現する成分が認められる。これらの電流源は MEG により第一次体性感覚野の主に area 3b と考えられる領域に推定される。この 2 つの成分について RF を測定した。正中神経に 1 つの刺激（S1）を与え直後にもう 1 つの刺激（S2）を与えると S2 に対する反応は S1 と S2 の時間間隔（ISI）により変化をし，ISI が 10ms 以下では潜時の早い 1M だけが消失する一方, 2M が消失するのは ISI が 1ms 以下の場合であった。このことから，1M と 2M は皮質内では機能的に独立し，体性感覚野内での感覚信号の並列処理過程を反映しているものと考えられた。

また，本年の研究ではこれまでに多くの知見が蓄積されている体性感覚誘発脳電位（Somatosensory evoked potential, SEP）と SEF との対応を検討した（Hoshiyama and Kakigi, Brain Res, 2001）。SEP 成分と SEF 成分の時間的ばらつきを比較することにより SEP の N20 成分と 1M, P30 成分と 2M が対応することを明らかにした。

2. ウィリアムズ症候群における視覚認知背側経路の機能（運動視知覚と視空間認知障害について）

中村みほ（愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所）
金桶吉起
渡邊一功（名古屋大学医学部小児科）
柿木隆介

Williams 症候群は，7 番染色体に欠失を持つ隣接遺伝子症候群で，精神発達遅滞，心血管系の異常，特異な顔貌を古典的症状とするが，認知能力のばらつきが大きいことで注目を集めている。一般に聴覚に比して視覚認知に劣るとされているが，視覚認知の中でもその能力は不均一で，物の形，色，顔の認知が比較的保たれているのに対し，図形を上手に模写できない，空間配置能力に劣るなど視空間認知障害があることが知られており，これは視覚認知背側経路の障害に起因すると考えられている。

本研究では，13 才の Williams 症候群患児を対象に，背側経路の重要な機能のひとつである運動視に着目し，心理物理学的ならびに神経生理学的検討を行った。はじめに心理物理実験において，ランダムドットキネマトグラムにより作成された運動視刺激にたいする知覚が同年齢の健常者と変わらないことを確認した。また，仮現運動に対する知覚も同年齢の健常コントロールと違いを認めなかった。次に脳磁計を用いて，ランダムドットキネマトグラムにより作成された運動視刺激により誘発される脳磁場反応を計測した。その結果，運動視知覚の中枢とされる V5/MT 野に相当する部位に反応を認め, その反応潜時も健常成人のそれと有意差を認めなかった。以上より，本症候群に典型的な視空間認知障害を示し背側経路の障害が疑われる本患者においても，運動視中枢にいたるまでの反応が健常者と同様に認められることが神経生理学的に明らかになり，これは心理物理実験の結果とも一致するものであった。

坂田らによれば，視覚認知の背側経路はさらに 2 つのサブルートに分かれるとされている。すなわち，運動視

知覚にかかわる経路と三次元知覚，物の位置の知覚にかかわる経路である。本研究の結果から，Williams 症候群における視空間認知障害は，背側経路の中でも運動視中枢およびそれに至る経路以外の部位（すなわち，三次元や位置の知覚にかかわる経路）の障害によることが示唆された。

【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− 生理，心理物理，計算論的アプローチ
（代表者：内川惠二　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：栗城眞也　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 チャン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　－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）

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

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

－光アフィニティラベルによるアプローチ－

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　－ 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）

(10) Na_x チャン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の多くの共同研究が実現できるものと期待される。

（1）Na チャン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）

Na チャン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 チャンネル 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 チャンネル 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 チャンネルを発現することに初めて成功し，この分子が Na チャン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 チャン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 と呼ぶべきチャンネルであるらしい（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
－グラヤノトキシン結合部位の解析とその展望－

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
－光アフィニティラベルによるアプローチ－

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出された 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 α1－β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ン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 チャン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チャンネルを可溶化し，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。チャンネルは高さ 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 チャン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ンネルは，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 チャンネルや K チャンネルは，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 チャン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。これらのチャンネルは Na チャン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，β1，β2，β3）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，間があってポアが開くが，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（Urecht）**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
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）

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，$Na_V1.8$，$Na_V1.9$ 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。$Na_V1.8$ により引き起こされる電流は遅いカイネティクスで TTX 非感受性の SNS であるが，$Na_V1.9$ 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 $Na_V1.9$ 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 よりさらに遅いカイネティクスをもつ“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 チャン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 チャンネルは電位依存性ナトリウムチャン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ン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ン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αγまたはαβγ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 ENaCγ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メイト受容体の機能解析

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 GluRε(NR2)とグリシン結合部位を持つ GluRζ(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 GluRε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。

GluRε1，GluRε2 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。GluRε2 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，GluRε1 欠損マウスは GluRε2 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 GluRε1 を介して伝達されると考えられる。一方，GluRε3 と GluRε4 の機能はそれほど明確ではないが，発達初期に発現する GluRε4 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 GluRε2 と拮抗的に働くことが明らかになった。そこで，GluRε4 プロモーター制御下で GluRε2 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，GluRε4 の代わりに GluRε2 サブユニットを発現したマウスは，GluRε4 欠損マウスより自発運動量が減少していた。このことは，GluRε2 は GluRε4 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で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着目している。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 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（GluRζ1）と NR2（GluRε）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（GluRε1-4）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い出した [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. Neuroci. 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たい。

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（AMPAR）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，AMPAR 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，AMPAR 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 10μm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±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 1μm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 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充分に細胞内 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，特定の部位の電気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方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じめに発生し，それが樹状突起へと逆伝播(Backpropagate)するということである(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 Jouranal of Neurosceince, 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 IP3 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

冨岡良平，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

新貝鉚蔵（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），斉藤　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），池渕　穣（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　覚（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），籾山　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 GABAA 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 EPSC s 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）

線条体は大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

冨岡良平，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 を大脳新皮質に微小量注入した結果，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 を大脳新皮質に微小量注入し,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ると考えられた。

（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限局して起こるので，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) いづ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+}チャネルのブロッカーを用いた実験より明らかにした。

（10）Gap junciton 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 junciton 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の 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う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-δ1 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 Zn^{2+}による効果を調べた結果，KO マウスでは，Zn^{2+}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

新貝鋤蔵（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 $GABA_C$ 受容体の分子的実体とみなされている。我々はラット神経組織からρ1，ρ2，ρ3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。ρ3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。ρ1，ρ3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，ρ1サブユニットは脳に発現しておらず（網膜には発現），ρ2サブユニットは中脳，大脳，海馬に，ρ3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，ρ2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，ρ3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－6 月 15 日
代表：内川惠二（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】

内川惠二（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），田仲祐介（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 ｱｰｶｲﾌﾞﾗﾎﾞ），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），鵜飼一彦（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的視点から考察する。

（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さ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が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たと知覚される 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を表現するよう, TE 野ニューロンを活性化していることが示唆される。

（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「目があった」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。本研究会では，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に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向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発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，刺激停止後の自発発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，刺激停止後の自発発火頻度は MST 野にある同種の方向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的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-α1A-Ca チャン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α1S 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，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ンネル異常
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の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患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，さらには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α1A 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α1ACa 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α1A 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α1A 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α1A チャネルの領域も必要と想定し，ヒト全長α1A 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α1A に関する報告より，ヒトにおいても，α1A（-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α1A（-NP）およびα1A（+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α1A（-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α1A（-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，α1A（-NP）およびα1A（+NP）がともに発現している神経細胞においては，α1A（+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．α1A 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α1A チャネルを通っ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−α1A-Ca チャン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α1A-Ca チャンネル遺伝子の 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，特異抗体を作製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血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α1A-Ca チャン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α1A-Ca チャンネル蛋白の発現は 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ネル α1S 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ネル（VGCC）α1 サブユニットはα1A~I, S の 10 種類が知られているが，神経系ではα1F，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 VGCCα1 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α1S 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 α1 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。α1S 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α1S 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，α1S 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，α1S 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，α1S 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ネル（α1C,D）と異なっており，α1S 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 GluRε1, GluRε2，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 GluRδ2, 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。

GluRε1 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 GluRε1 サブユニットが関わる共通の分子機構が示唆された。GluRε2 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。GluRε2 ヘテロ欠損マウスは，他の GluRε 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 GluRε2 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，GluRδ2 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こと，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枢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。本研究会では，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. Chairoungdua[1]，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 21[6]）

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的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い出し，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のとなる。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 領域に限局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 SNP s 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ており，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ひ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にはなく，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 チャネル（TRP1-7）を見い出した。最近，7 つのいわゆる TRP ホモログに加え，数 10microM の H_2O_2 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，H_2O_2 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，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い出した。このように，TRP 関連チャ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+}とスペ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，特にスペ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* マウス膵ラ氏島 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】グルカゴンは膵ラ氏島 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，膵ラ氏島 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，膵ラ氏島について検討されていない。そこで，膵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・培養した膵ラ氏島 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 マウスの膵ラ氏島では正常，ヘテロ，

ホモマウス，全てほぼ同数の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 の点変異により膵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膵ラ氏島α細胞では weaver mutant GIRK2 チャネルが構成的に活性化されておらず，このために膵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，冨満久教，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）が有名である。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

鍔田 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，鍔田 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･がんウィルス研究部門）

（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・ﾊﾞｲｵｻｲｴﾝｽ），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・ウィルス研），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），鍔田　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・ウィルス研）

【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一因は，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-κB，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

鍔田 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とした。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 を介したアポトーシスは活性化 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，repaer, 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，鍔田 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^+チャネルと Cl^-チャ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-κB 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踏病・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（*P*arkin-*a*ssociated *e*ndothelin receptor-*l*ike）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。本研究会では，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（ウィルス感染，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 IRE1α と IRE1β 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 IRE1β 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撹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ゾ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-Redondo[1]，成瀬恵治[2]，曽我部正博[1,2]

（[1]科学技術振興事業団，[2]名古屋大院・医・第 2 生理）

（3）$P2Y_1$ 受容体との複合体形成に伴うアデノシン A_1 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

繁冨英治，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，繁冨　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），冨永　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（京都大院薬），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　達麿，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-Redondo[1]，成瀬恵治 [2]，曽我部正博 [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ともに，ATP を放出し Ca^{2+} 波を発生することが明かとなった。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）$P2Y_1$ 受容体との複合体形成に伴うアデノシン A_1 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，A_1 アデノシン受容体（A_1R）と $P2Y_1R$ 受容体（$P2Y_1R$）はヘテロ複合体を形成し，A_1R 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 $A_1R/P2Y_1R$ 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 $A_1R/P2Y_1R$ 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-A_1R-GFP 及び Myc-$P2Y_1$R- *Renilla* luciferase（Myc-$P2Y_1$R-Rluc）の複合体形成の有無を免疫共沈実験よって確認した後，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 $A_1R/P2Y_1$ R 複合体の存在を免疫共沈実験により調べた。

【結果・考察】HA-A_1R-GFP 及び Myc-$P2Y_1$R-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 $P2Y_1$R アンタゴニスト MRS2179 により完全に消失した。このことは $A_1R/P2Y_1R$ 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 A_1R 抗体免疫沈降物中に，抗 $P2Y_1$R 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，A_1R と $P2Y_1$R 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も，脳神経系において $A_1R/P2Y_1R$ 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 $P2X_7$, $P2Y_2$, $P2Y_{12}$ 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 $P2X_7$ 刺激薬 BzATP によっても強く引き起こされ，$P2X_7$ 遮断薬 Brilliant Blue G（BBG）で抑制されたことから，$P2X_7$ 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，$P2Y_{12}$ 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 $P2Y_{12}$ 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，$P2X_7$ 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-ファ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,βmeATP（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,βmeATP 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,βmeATP 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，$P2X_2$ および $P2X_3$ 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，$P2X_2$ および $P2X_3$ 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-6mRNA 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 Ca^{2+}流入を引き起こし，p38 および Ca^{2+}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（$[Ca^{2+}]i$）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 $[Ca^{2+}]i$ 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，$P2Y_2$ 受容体を介する応答であると考えられる。RT-PCR により，$P2Y_1$，$P2Y_2$，$P2Y_4$ 及び $P2Y_6$ の mRNA が，in situ hybridization では DRG 神経細胞の $P2Y_2$ 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（20～30μm），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，$P2Y_1$ 受容体を介した，Aβ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 $P2Y_2$ 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い出した。そこで，ラット摘出心房筋標本におけるア 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%O_2/5%CO_2 を通気した 37℃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，EC_{50} は約 20μM 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αβMeADP 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 levamizole と β-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。アストロサイトー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 P2 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ンールシフェラ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+} ocillation 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，中枢神経ー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 μM-1 mM）かつ可逆的に PS を抑制した。100 μM 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，ビ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≒α,β-methyleneATP の順であった。α,β-methylene ATP 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 がシナプス前終末 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，砂ネズミの両側総頚動脈を 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 P2X 受容体

繁冨英治，加藤総夫 （東京慈恵会医科大学・薬理 2）

脳内の $P2X_{1\text{-}7}$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）における現在までの報告は，（1）急性単離もしくは初代培養細胞が示す P2X 受容体電流，（2）シナプス前細胞刺激による P2X 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 P2X 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，P2X 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 410μM 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。100μM ATP はほとんど内向き電流を起こさず，また，α,βmeATP 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 P2X 受容体からの直接的 Ca^{2+}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。100μM ATP は約 2 倍（EC50 = 330μM），100μM α,βmeATP（EC50 = 80μM）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 P2X 受容体は，受容体サブユニット構成（プレ：P2X4/6？；ポスト：P2X2？）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 Ca^{2+}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 P2x 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 Ca^{2+}濃度（$[Ca^{2+}]i$）を増加させることが知られている。我々は最近，高濃度 ATP（300μM）の短時間刺激（30 秒間）により，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（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）$[Ca^{2+}]i$ 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$[Ca^{2+}]i$ を増加させた。高濃度 ATP により生じた$[Ca^{2+}]i$ 持続相は，一過性の$[Ca^{2+}]i$ 増加が約 0.5μM を越える細胞で認められた。2）外液Ca^{2+}非存在下では ATP による$[Ca^{2+}]i$ 増加反応はほぼ完全に消失した。$[Ca^{2+}]i$ 持続相は電位依存性 Ca^{2+}チャネル遮断薬，および P2x 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$[Ca^{2+}]i$ 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^{+}/Ca^{2+}交換輸送体阻害薬であるクロナゼパム，CGP-37157 は，ATP による$[Ca^{2+}]i$ 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$[Ca^{2+}]i$ 持続相が生じている時点で FCCP を投与すると，$[Ca^{2+}]i$ は大きく上昇した。FCCP による$[Ca^{2+}]i$ 上昇の大きさは，FCCP 投与直前の$[Ca^{2+}]i$ 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ので，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ので，ACTH 濃度が血中で高くなったとき，細胞は ACTH 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（αβmeATP）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 $P2X_2$ および $P2X_3$ 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 $P2X_3$ 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 $P2X_3$ 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，αβmeATP 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αβmeATP 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変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ペイン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。ニューロパシックペイン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 P2X3 レセプターの発現を，多種のニューロパチックペイン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 P2X3 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，ニューロパチ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% O_2 - 5% CO_2 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イエイ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，その炎症関連メデイエイターの 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，100μM 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 $P2Y_1$ 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，$P2Y_1$ 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，$P2X_3$ 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 $P2X_3$ 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 $P2X_3$ 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生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 PGI_2 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 naloxone10 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，phentolamine 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 β2 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所）

（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所）
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・生名科学），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。この生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資としてアミノ酸 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ーマ 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。この事実は，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 μM - 1 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，そこから細長い頚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 $Ca2^{+}$ 透過性 AMPA 受容体を発現している。この $Ca2^{+}$ 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 $Ca2^{+}$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 $Ca2^{+}$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 $Ca2^{+}$透過性を抑制するか，非編集型 GluR2（GluR2Q）を強制発現させて $Ca2^{+}$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効果

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，TGFα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 IL1β，TNFα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，炎症と恢復，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効果

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，TGFα等の成長因子と IL1β，TNFα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の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。以上のことより 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），籾山　俊彦（生理研），籾山　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ねばならない。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，今回が 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ので，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量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。二関節マニピュランダ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 ±45° 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，腕とマニピュランダムの

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，田渕　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通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，曽我聡子，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

バーグランド　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，小澤瀞司（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 細胞相関機構学，[4]CREST 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の作用機序
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　瀞司（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（東京医科歯科大院・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），バークランド健（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），籾山　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），籾山　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，様々なプローベ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。今後も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とするため，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 Ser^{187} がリン酸化され，Ca^{2+}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出した。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，電気生理学的結果とあわせると, 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ているが，SNARE 蛋白質（syntaxin, SNAP-25 と synaptobrevin）の複合体形成はシナプス小胞膜と神経終末膜との融合，すなわちシナプス小胞開口放出に必須と考えられている。SNAP-25 と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，曽我聡子，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連関した低親和性の 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+}（$[Ca^{2+}]_i$）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$[Ca^{2+}]_i$ 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プ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

バーグランド　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 と言う 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, τ_{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 $P_{o,\,max}$ (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 μm^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 ~1270 /μm^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潅流法によって 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+}潅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，小澤瀞司
（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高いことから，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・学習の分子的基礎過程とされている 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ると考え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，[4]CREST 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・空間的変化に対応して，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出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 局所潅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+}チャネルの多様性

八尾　寛（東北大学（院）生命科学研究科，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+}チャネルにより制御されている。Ca^{2+}チャネルには，分子的多様性があり，シナプス前終末には複数の Ca^{2+}チャ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+}チャネルと N-type Ca^{2+}チャ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

Ca^{2+}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 Zn^{2+}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 Ca^{2+} を Sr^{2+}に置き換えて，活動電位にともなう Sr^{2+}濃度上昇を測定した。Sr^{2+}は Ca^{2+}チャネルを通るが，タンパク質との相互作用が弱いので，Ca^{2+}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。Ca^{2+}チャネルサブタイプと伝達物質の連関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 Sr^{2+}濃度上昇は, ω-CgTx GVIA (10 μM)により約 20%抑制された。残りの成分は，ω-AgTx IVA (0.2 μM)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 μM)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 Ca^{2+} 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。Ca^{2+}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 Ca^{2+}チャネルと伝達物質放出の連関の強さは，P/Q-type Ca^{2+}チャネルと同様だった。

海馬苔状線維終末には多彩な Ca^{2+}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 Ca^{2+}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連関していることから，Ca^{2+}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，イオンチャン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-アファ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-アファディン系の機能と作用機構に関して私共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ミック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の作用機序

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 μm 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 μM によって抑制された。

それに対して GFP (-)ニューロンには ACh 投与に対して mecamylamine で抑制される一過性の inward current を示すものの他に一過性 inward current に引き続き outward current を示すものが多く見られた。この outward current は Cl^-の反転電位(-88 mV)付近で反転し，bicuclulline によって抑制された。またこれらのニューロンの inward, outward current はいずれも mecamylamine によって抑制された。従ってこの outward current は ACh 投与に対する GABA ニューロンの興奮性応答によって 2 次的に誘発されたものと考えられたが，この outward current は TTX0.25 – 1 μM 存在下でも観察された。従って，これまでの解剖学的知見と綜合して考えると ACh は軸索伝達を介さずに horizontal ないしは wide field multipolar cell から興奮性出力細胞にいたる axo-dendritic または dendro-dendritic synapse からの GABA の放出を促進するように作用すると考えられた。このように 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 RNA i 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 Vesl-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），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），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），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），松本　知也（大阪大大院・理学研），山岸　覚（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 RNA i 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，ニューロブラストーマ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 Ca^{2+}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。

ラット脳からミ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 ノブ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も脳内における 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±13.6% vs 168.5±21.6%)，若齢ラットと同程度の値を示すこと(240.3±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ーシスと異なり，グルタミン酸トランスポーターの逆転輸送の可能性がある。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（東海大大学院・理学研究科）

ウミウシを光と振動を組み合わせて条件付けすると 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(100μμM)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グラス上で培養した。カバーグラスを灌流 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 5μm) 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，アクチン－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，スプライスヴァリア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様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ファージの 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箇所に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_{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）

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

張　麗艶[1]，李　鍾国[1]，安井　健二[1]，本荘　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，[2]Univ 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]成均館大學校・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）

（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 Bang[4]，
Dietmar Labeit[5]，Siegfried Labeit[5]，稲垣暢也[1,6]，Carol C. Gregorio[2]
（[1]秋田大・医・生理第一，[2]Dept of Cell Biol & Anatomy, Univ of Arizona，
[3]東京医科歯科大・難治疾患研・自律生理，[4]Eur Mol Biol Lab，
[5]Institut for Anasthesiologie und Operative Intensivmedizin, Universitatklinikum Mannheim，
[6]CREST, Jpn science and Technology Corp）

（18）LQT2 で認める HERG S818L 変異はユビキチンー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　麗艶（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 μM 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 チャンネル（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 チャンネル（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)に戻すと徐々に減衰する tail current (5-20 pA)が観察された。Tail current の膜電位依存性（K1/2 = +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限局したもので膜の機械的伸展が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　麗艶[1]，李　鍾国[1]，安井　健二[1]，本荘　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，GIRRK1 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 μM) 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 μM，n=8）および calphostin C（2 μM，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，[2]Univ 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。Mg^{2+}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 Mg^{2+}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 Mg^{2+}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 Mg^{2+}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℃以上にて 10μM 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　梅蕾，鷲塚　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 週齢ルイスラットに甲状腺ホルモン(T3，25μg/100g)を 3 日間投与し，無投薬群と比較検討した。T3 投与によりα1 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 T3 群で対照群に比し有意に大きかったが（－18.5±2.4VS.－15.0±1.6pA/pF），イソプロテレノール 1μM 投与下では対照群が T3 群より大きくなった（－25.4±2.9 VS.－21.6±1.6pA/pF）。アセチルコリン 1μM 投与は対照群の $I_{Ca,L}$ を変化させなかったが，T3 群の $I_{Ca,L}$ を 19%減少させた。

【結語】短期間の T3 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。T3 がカルシウム電流を増加させた機序にはアデル酸シク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 OTRPC4β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（Ih）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]成均館大學校・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 (2μM)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，高頻度トレーン刺激(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±4.5 秒)。この自発興奮は筋小胞体 Ca^{2+}

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，筋小胞体機能阻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, 10μg/ml)を含む K^+-free 溶液で潅流すると，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 μM) 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 のスプライスバリア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ア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 trucated 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 Bang[4]，
Dietmar Labeit[5]，Siegfried Labeit[5]，稲垣　暢也[1,6]，Carol C. Gregorio[2]
（[1]秋田大・医・生理第一，[2]Dept of Cell Biol & Anatomy, Univ of Arizona，
[3]東京医科歯科大・難治疾患研・自律生理，[4]Eur Mol Biol Lab，
[5]Institut for Anasthesiologie und Operative Intensivmedizin, Universitatklinikum Mannheim，
[6]CREST, 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と考えられた。

（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：栗城眞也（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，栗城眞也（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（業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，鵜飼聡（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）

（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）

籬　拓郎（日比野病院）

（6）指の一次体性感覚野の発達的変化に関する検討（第 2 報）

權藤健二郎，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）

エッカート・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　暁宏，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，鵜飼 聡，川口 俊介，石井 良平，小川 朝生，水野（松本）　由子，

井上　腱，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　－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　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　－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)

(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・放射線部）

（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 Kotani[5], John Pruitt[6]
([1]Center for Mind, Brain and Learning,
[2]Department of Speech and Hearing Sciences, University of Washington, Seattle, WA 98195, USA;
[3]NTT Communication Science Laboratory,
[4]Real World Computing Partnership, Nippon Telegraph and Telephone Corporation,
Atsugi-shi, Kanagawa 243-0198, Japan; [5]Tokyo Denki University, Chiyoda-ku, 101-8457, Japan;
[6]Microsoft 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，榊原 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），鵜飼　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（東京医歯大・脊椎脊髄外科学），權藤　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（エレクタ株式会社 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（エレクタ株式会社），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フラボ），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る試みや，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, 栗城眞也（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いた推定の位置誤差の平均は 3.1 mm 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対応関係である事から，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ッ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，トーラス状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ノベーシ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 名の健常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，被験者 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気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）
籬　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推測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変化に関する検討（第 2 報）

權藤健二郎，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変化について昨年に引き続き検討した。昨年の対象は健常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ラ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±0.85cm であるのに対し成人群では平均 2.0±0.51cm と有意に距離が短かった($P < 0.01$)。電流源の 3 次元的な拡がりを冠状面で比較すると大きな順に乳児薬指－乳児拇指－成人薬指－成人拇指であった。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 信号をはじめて検出した。方法: ツボの上に皮内鍼, あるいは直径 4m/m 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ネルに分布して現れるのが特徴である。（3）このツボの横 10m/m 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 [2]Institute of Music Physiology and）

金管楽器奏者は顔面筋肉の緊張と呼気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常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。健常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も，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ゲ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思わ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，王暁宏，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た。

（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 CO_2 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が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，鵜飼聡，川口俊介，石井良平，小川朝生，水野（松本）由子，井上腱，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）
橋詰顕，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，誤差は少なくない。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とまった。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，どこの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様ではなく，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，自発性開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】 対象は健常人 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 Kotani[5], John Pruitt[6]
([1]Center for Mind, Brain and Learning,
[2]Department of Speech and Hearing Sciences, University of Washington, Seattle, WA 98195,USA;
[3]NTT Communication Science Laboratory, [4]Real World Computing Partnership, Nippon Telegraph and Telephone Corporation, Atsugi-shi, Kanagawa243-0198, Japan; [5]Tokyo DenkiUniversity, Chiyoda-ku, 101-8457, Japan;
[6]MicrosoftCorporation, 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/f0 ゆらぎ，1/f1 ゆらぎ，1/f2 ゆらぎ，1/f∞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ー脳磁場計測による解析

木村育美，久保田雅也，広瀬宏之，榊原洋一（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められ，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，運動刺激のコヘ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り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りない，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なめない。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。これまでにも，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）P I3K 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 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）

（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

曽我部　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。冨田　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，籾山　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），田邉　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・統合ﾊﾞｲｵｻｲｴﾝｽｾﾝﾀｰ），中川　哲彦，新庄　勝浩，谷口　嘉奈（ﾌｧｲｻﾞｰ製薬株式会社）

（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 により燐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 サブニットから構成されているが, BCAP は燐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すことにより，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 translocation, 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 β 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 誘発に必要である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(Gαq)，フォスフォリパーゼ Cβ4 (PLCβ4)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 mGluR1α 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包体と 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 0.4μm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っ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 μM 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+}ウエーブ／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 $Ca2^{2+}$濃度の時間的変化を fluo-3 画像の解析によりもとめ，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)をコ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 μm)で細胞表面を軽く圧すると(1-1.5 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 ± 0.3 μm/s と 126 ± 0.6 μm

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 ± 0.3 μm/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 (18α-glycylrrhetinic acid, 10 μM)の存在で，伝播速度は 8.9 ± 0.2 μm/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搬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, CREST[1]　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 $Ca_V2.3$ 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 $Ca_V2.3$ 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 $Ca_V2.3$ 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，$Ca_V2.3$ 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い出した。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

曽我部正博[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 Ca^{2+}の上昇, 接着斑蛋白質のチロシン燐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・統合ﾊﾞ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 応答と連関し細胞内外の 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)を見い出した。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連関し活性が制御され，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

H_2O_2 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，H_2O_2 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い出した。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 －

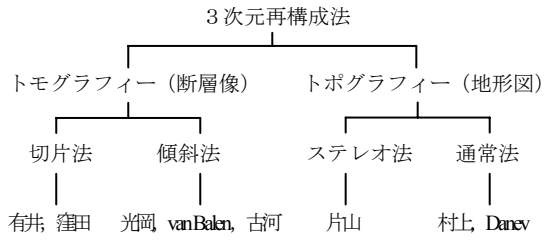
古河　弘光（日本電子システムテクノロジー（株））

【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），薗田知秀（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），金関惠（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（～5μm）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（± θ°）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 1,250 kV（常用 1,000 kV）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～7×10^{-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。耳下腺の血管潅流標本を用い，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, mitochondoria 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，mitochondoria 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，mitochondoria 電子密度増加はエネルギー代謝増加と関連づけられた。また，開口分泌像の増加は管腔膜面積の増大を示すが，同じ刺激条件下で水分泌の促進は観察できず，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 Differentional 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 enevelope and odd character in direction normal to the edge of the phase plate. Simplereconstruction 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一瞬に固定し，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 know as the Radon’s theorm, dating back as far as 1917. In practice, things are usually far less simple than its theory A painstakingly 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，壱岐純子（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），冨樫和也（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，籾山明子，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，AMPAR 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 1μm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研究院）

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なはずである。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　[2]CREST　[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イ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 を本法により頭部のみ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ックス像

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ッ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　巌（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），大峰巌（名古屋大），村田克美（分子研），冨永圭介（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，活発な討論が行われた。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発展等が紹介された。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討論が 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，mAb15B3 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。治療法開発のストラテジーとして，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。これらのストラテジーには，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，尿素変性の中点で最も速い。
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一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いる。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，非常に間違った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 塩基配列の高速度解析技術，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，先ず，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 ⇄ 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ッ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が持たれている。

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個の形態をとりうること，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。むろん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ッ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「ダイナミックス」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ッ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，有限サイズリヤプ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ッ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ッ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　巌（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。この様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合し初期核を形成する。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う，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であろうか？　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 次の低次の非線型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（≃ 170K）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，蛋白質運動の非線型性を見た。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ビ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（ν(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のようになる。

① ν(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 ν(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。

【　国際シンポジウム　】

COE 国際シンポジウム
（第 29 回生理研国際シンポジウム）

本シンポジウムは抑制性神経伝達物質 GABA の神経系における役割を総括することを目的として，小幡邦彦〔神経化学研究部門教授〕，川口泰雄（大脳神経回路論研究部門教授，柳川右千夫（神経化学研究部門助教授）を組織委員として企画され，平成 14 年 2 月 26 日－28 日の 3 日間，岡崎コンファレンスセンターで下記のプログラムにより開催された。米国から 7 名，ヨーロッパから 7 名，国内から 13 名の招聘演者による講演と応募された 27 題のポスター発表とが行われた。参加者は 149 名であった。組織発生の初期過程，神経機能の発達，ネットワークのオシレーション的活動，トランスポーターによる機能分化，レセプター・サブタイプの機能等における最新の知見について報告，討論が行われた。脳研究領域のなかで焦点が絞られていたこともあって，内容の大半が各参加者の興味に沿ったものとなり，海外からの参加者からもきわめて優れたシンポジウムであったとの評価を得た。また国際シンポジウムの主旨である研究者交流が国内国外間だけでなく，米国・ヨーロッパ間でも予想外に活発に行われ，参加者間で多くの共同研究が開始されるきっかけとなった。

COE international symposium: The 29th NIPS International Symposium
“Inhibitory Neural Transmission in the Brain Structure and Function”
February 26-28, 2002
Okazaki Conference Center (OCC), Okazaki National Research Institutes, Okazaki, JAPAN

Tuesday, February 26, 2002

Welcome address: Kazuo Sasaki (Director-General, NIPS)

1. Kunihiko Obata (NIPS)
   Changes in GABA levels and neural functions induced by GAD gene targeting
2. Jeffery L. Barker (NIH)
   Transmitter signaling during early neurogenesis in the embryonic rat cortex
3. Arnold R. Kriegstein (Columbia Univ.)
   GABA and glycine receptors in embryonic cortical development
4. Nobuaki Tamamaki (Kyoto Univ.)

Interstitial white matter neurons project cortico-cortically and participate in the neocortical circuit

5. Fujio Murakami (Osaka Univ.)
   Migration of GABAergic neurons in fetal mouse telencephalon-in vivo and in vitro analysis of GAD67-GFP knock-in mice-
6. Yehezkel Ben-Ari (INSERM)
   Developing networks play a similar melody
7. Takao K. Hensch (RIKEN)
   Inhibitory circuit control of critical period plasticity in developing visual cortex
8. Hiroshi Nishimaru (Tsukuba Univ.)
   Developmental changes of the roles of inhibitory neurotransmitters in the rhythm generating network in the rat spinal cord
9. Junichi Nabekura (Kyushu Univ.)
   Pre- and postsynaptic switching of inhibitory synapses on developing lateral superior olive neurons
10. Atsuo Fukuda (Hamamatsu Univ. Sch. Med.)
    Ca^{2+} oscillations induced in axotomized neurons are attributable to GABAergic excitation caused by K^+-Cl^- cotransporter (KCC2) downregulation
11. Masao Ito (RIKEN)
    Functional roles of inhibitory neurons in the cerebellum - an overview

Wednesday, February 27, 2002

12. Peter M. Jonas (Univ. Freiburg)
    Inhibitory synaptic transmission in hippocampal interneuron networks
13. Gary L. Westbrook (Oregon Health Sci. Univ.)
    GABA dynamics in (and around) the synaptic cleft
14. Shozo Jinno (Kyushu Univ.)
    Cellular composition of chemically defined GABAergic nonprincipal neurons in the mouse hippocampus
15. Noga Vardi (Univ . Philadelphia)
    Two modes of antagonistic actions of glutamate and GABA at the first visual synapse
16. Yasuo Kawaguchi (NIPS)
    Quantitative morphological comparison of cortical GABAergic cell subtypes
17. Zoltan Nusser (Hungarian Acad. Sci.)
    Properties of $GABA_A$ receptors underlying tonic and phasic inhibitions
18. Hannah Monyer (Univ. Hosp. Neurol. Heidelberg)
    Molecular determinants in GABAergic interneurones for network synchrony and oscillatory activity
19. Roger Traub (The State Univ. of New York)
    Gap junctions between the axons of principal neurons, and the generation of fast oscillations in neuronal populations
20. Goabor or Szabo (Hungarian Acad. Sci.)
    The family of GABA-synthesizing emzymes, glutamic acid decarboxylases and their expression during neuronal differentiation
21. Yuchio Yanagawa (NIPS)
    Regulation of GABAergic neuron-specific gene transcription
22. Jang-Yen Wu (Univ. Kansas)
    Mechanism of neurotransmitter synthesis and packaging into synaptic vesicles

Thursday, February 28, 2002

23. Shiro Konishi (Mitsubishi Kagaku Inst.)
    Heterosynaptic regulation of cerebellar synaptic transmission
24. Yukio Komatsu (Nagoya Univ.)
    Activity-dependent maintenance and noradrenergic regulation of long-term potentiation at visual cortical inhibitory synapse
25. Bernhard Bettler (Univ. Basel)
    Molecular insights into $GABA_B$ receptor dimerization and physiology
26. Richard W. Olsen (UCLA Sch. Med.)
    Functions of $GABA_A$receptor subunits deduced from studies on gene-targeted mice
27. Uwe Rudolph (Univ. Zuich)
    $GABA_A$-receptor subtypes: Dissecting their pharmacological functions
    Closing remarks Kunihiko Obata (NIPS)

Poster Sessions 26-27 February, 2002

P-1. Hisaaki Namba (Niigata Univ,)
Positive and negative regulating factors for excitatory synaptic development on the cortical inhibitory neurons

P-2. Amane Koizumi (Keio Univ.)
GABAergic suppression of propagation of action potentials into the dendrites of retinal amacrine cells

P-3. Hidenori Suzuki (Nippon Medical School)
Characterization of proteins and mRNAs in the rat amygdala with increased expression following fear conditioning

P-4. Yoshikazu Isomura (Tokyo Metropol. Inst. Neurosci.)
Synaptically induced theta-like oscillation in the hippocampus in vitro

P-5. Takayuki Murakoshi (Tokyo Medical and Dental Univ.)
Differential serotonergic modulation of inhibitory transmission in the rat visual cortex layer V

P-6. Makoto Bannai (Ajinomoto Co., Inc.)
GABAergic regulation of "Running Neurons" localized in the ventromedial nucleus of hypothalamus

P-7. Miwako Masugi (NIPS)
Two-dimensional distribution of glutamate and GABA receptors in the cerebellum visualized by SDS-FR

P-8. Shun-ichi Kuwana (Teikyo Univ.)
Role of GABA in the development of respiratory neuronal network

P-9. Koichi Kaneko (NIPS)
Enhanced synaptic plasticity of the thalamoamygdala pathway of adult GAD65 knockout mice

P-10. Chigusa Shimizu-Okabe (Hamamatsu Univ. Sch. Med.)
The differential expression patterns of NKCC1 and KCC2 mRNAs in the rat neocortex

P-11. Akihito Okabe (Hamamatsu Univ. Sch. Med.)
Changes in expression of the mRNAs for cation-Cl^- cotransporters and a voltage-dependent Cl^- channel in the rat brain after amygdaloid kindling

P-12. Masahiko Ikeda (Hamamatsu Univ. Sch. Med.)
Differential developmental profile of GABAergic action and Cl^- homeostasis in the rat visual cortex and the dorsal lateral geniculate nucleus

P-13. Michikazu Samejima (Hamamatsu Univ. Sch. Med.)

Mesurement of intracellular Cl^- and monitoring of cellular volume changes using fluorescent dyes

P-14. Junko Yamada (Shizuoka Univ.)

Mechanisms of $GABA_A$ receptor-mediated excitation in the immature neocortical neurons studied by using gramicidin-perforated patch-clamp recordings and single cell RT-PCR

P-15. Hitoshi Aoshima (Yamaguchi Univ.)

Effects of natural compounds on the responses of ionotropic GABA receptors expressed in Xenopus oocyte

P-16. Takako Ohno-Shosaku (Kanazawa Univ.)

Cooperative endocannabinoid production by depolarization and metabotropic glutamate receptor activation

P-17. Shinya Kawaguchi (Kyoto Univ.)

Signaling cascades regulating GABAergic synaptic plasticity in a cerebellar purkinje neuron

P-18. Ryuzo Shingai (Iwate Univ.)

Phenotypes of locomotion in wild type and GABAergic mutants of Caenorhabditis elegans

P-19. Shin-Ichiro Satake (Mitsubishi Kagaku Inst.)

Effects of a glutamate uptake blocker on climbing fiber-induced inhibition at cerebellar GABAergic synapses

P-20. Kiyomi Nakayama (Tsukuba Univ.)

Commissural neurons coordinating left and right rhythmic motor activity in the fetal rat spinal cord

P-21. Toshiaki Endo (NIPS)

Identification of GABAergic neurons and nicotinic receptor-mediated facilitation of GABAergic transmission in the superficial superior colliculus studied by using GAD67-GFP knock-in mice

P-22. Fumihito Saitow (Mitsubishi Kagaku Inst.) β-Adrenergic enhancement of GABA release at cerebellar basket cell -purkinje cell synapses

P-23. Tomoaki Shirao (Gunma Univ.)

Tonic activity of adenosine A1 receptors regulates the signal flow at the CA2 region in rat hippocampus: Optical recording analysis

P-24. Keiko Nakanishi (Aichi Human Service Center)

Role of Cl^- transporters in spontaneous synaptic activities in cultured neocortical neurons

P-25. Takayuki Yoshida (Kanazawa Univ.)

The cannabinoid CB1 receptor mediates retrograde signals for depolarization-induced suppression of inhibition in cerebellar Purkinje cells

P-26. Tsuyoshi Ueno (Kyushu Univ.)

Diversity of IPSP depression and K^+-Cl^- cotransport in rat motor neurons

P-27. Yoshiyuki Kubota (NIPS)

Characteristics of postsynaptic target structures for axon terminals of cortical interneuron subtypes

【 セ ミ ナ ー 報 告 】

セミナー報告

1. The rostral superior colliculus: What does it control ?

Michele Basso.（Wisconsin 大学医学部生理学教室 assistant professor，Wisconsin 地域霊長類センター）

(2001.4.2)

Neurons in the rostral superior colliculus of the monkey have been identified as “fixation” neurons due to their tonic activity during attentive fixation and their decrease in activity associated with the generation of large saccades. These neurons however, also have movement fields typically associated with small saccadic eye movements very close to the fovea. Because the locations close to the fovea are important for the guidance of smooth pursuit eye movements, I’ll describe experiments in which we examined the relationship between the activity of the neurons and smooth pursuit eye movement generation. We found that these neurons correlated with smooth pursuit eye movements independent of saccades and are perhaps best viewed as reflecting a position error signal relevant for, but independent of, ongoing behavior. I will also describe experiments in which the neurons in the rostral superior colliculus were inactivated with the GABA agonist, muscimol and activated with electrical microstimulation and the effects on smooth pursuit behavior were measured. The results of these experiments demonstrate that the signal provided by the rostral superior colliculus, rather than signaling a command to keep the eye still or fixate, signal small, parafoveal target locations that can be used to guide either saccades or smooth pursuit eye movements.

（担当：伊佐 正）

2. A molecular dissection of the node of Ranvier.

Matthew Neil Rasband.（ニューヨーク州立大学・生化学，細胞生物学）

(2001.4.6)

Successful electrical signalling in the nervous system depends on the precise subcellular localization of ion channels. To facilitate rapid action potential conduction while minimizing space requirements, vertebrates have developed both myelin and a heterogeneous ion channel localization along axons. Specifically, the myelin sheath creates a high resistance, low capacitance barrier to transverse currents, and is interrupted at regularly spaced sites called nodes of Ranvier where Na^+ channels are clustered in very high densities. In contrast, K^+ channels are excluded from both the node and the paranode (the region where layers of myelin terminate and form axoglial junctions) but are clustered in adjacent, short 5-15 μm zones called the juxtaparanode. As a result, the node of Ranvier represents one of the most highly specialized sites in the nervous system and is an excellent model for studying how channels and other neuronal and membrane proteins are targeted, clustered, and maintained in their appropriate subcellular domains, and for determining how neurons and glia reciprocally interact in subcellular differentiation. We have undertaken an ambitious project, using state of the art techniques in proteomics, monoclonal antibody development, and membrane protein biochemistry to perform a molecular dissection of the node of Ranvier and identify the complex community of proteins involved in node formation and channel clustering and maintentance. This lecture will describe recent results leading to the molecular dissection of the node of Ranvier.

（担当：池中一裕）

3. Neural basis of attention to object-tokens

Mitchell J. Valdes-Sosa.（Director, Cuban Neuroscience Center）

(2001.5.22)

When one sensory event occupies an observer, accurate perception of a second event is difficult until some time has elapsed. Part of this limitation may reflect the allocation of attention over time, a topic studied through paradigm like the "attentional blink" and "repetition blindness. Here we show that when attention is directed towards an event (a brief change in direction) that transforms one of the illusory surfaces perceived in transparent motion, it is difficult to discriminate a subsequent event affecting the other surface until some time has elapsed This attentional dwell-time lasts about 500 ms. There is no interference between two successive events that transmute the same surface. The two-surface cost was associated with a reduced event related potential, N1 (and in some circumstances P1) component, as well as reduced fMRI activity in early extra-striate visual cortex (near MT/MST and near V4). These results indicate attentional dwell-time corresponds to competitive effects at a pre-perceptual locus in early vision. This difficulty in switching attention rapidly between surfaces is not mediated by spatial mechanisms (2-D or 3-D) or filters based on elementary attributes. The effects are apparently mediated at the level of object-tokens.

（担当：定藤規弘）

4. 霊長類下部側頭葉における視覚記憶表現：「もの」の形を想い出すこと

納家勇治（高次液性調節部門）

(2001.5.23)

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 2 つの隣接する領域は互いに多くの神経繊維を投射しているが, TE 野が視覚腹側路の最終段階であるのに対し，傍嗅野は辺縁系の一部である。TE 野から傍嗅皮質へ順方向に送られる視覚情報は記憶の記銘に作用すると考えられている。実際，我々は最近の研究で記憶の形成期に神経成長因子である BDNF が傍嗅皮質に選択的に発現することを示した。

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 野で知覚に関係する信号と記憶に関係する信号のタイムコースをそれぞれ調べた。その結果，手掛かり刺激の提示により活性化される知覚信号は傍嗅皮質よりも先にTE 野へ到達し，知覚信号が順行性に伝達されることを確認した。一方，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を表現するよう, TE 野ニューロンを活性化していることが示唆される。

（担当：籾山俊彦）

5. 「ＰＫＣターゲティング機構の解析」

酒井規雄　（神戸大学バイオシグナル研究センター　分子薬理分野）

(2001.6.18)

プロテインキナーゼＣ(PKC)は，細胞内情報伝達系において重要な役割を演ずる蛋白質リン酸化酵素で，様々な細胞の機能調節，機能発現に関与していると考えられている。PKC には，12 種類以上のサブタイプが存在する

ことが知られているが，これらサブタイプ間の機能的差異については未だ不明な点が多い。我々は，サブタイプ特異的な機能を検討する目的でPKCのトランスロケーション現象に注目して研究をすすめている。すなわち，PKC-GFP 融合蛋白質を各種培養細胞に発現させ，PKCのトランスロケーションを生細胞でリアルタイムに解析することにより，PKC は細胞内の他のコンパートメントに局在を変化させ，そこで標的の蛋白質を認識しシグナルを伝えるという，ターゲティング機構を有することを見いだした。さらに，PKC のターゲティングは，1）刺激特異的，サブタイプ特異的であること，2）PKC がその標的蛋白質をリン酸化するために必須の現象であること，3）PKC の活性化物質としてよく知られているジアシルグリセロール以外の脂質メデイエーター（セラミド，アラキドン酸など）によっても引き起こされること，が明らかになってきた。我々は，PKC ターゲティング機構の解明が，PKC の細胞内情報伝達系での役割をさらに明らかにする上で重要な鍵を握ると考え，現在，この実験系を初代培養神経細胞や，トランスジェニックマウスにも応用させ，研究をすすめている。本セミナーでは，最近得られたPKCターゲティングに関する知見を紹介する。

（担当：坪川　宏）

6. Recovery of voluntary movement in the cat after selective spinal cord lesions.

Lars-Gunnar Pettersson(Department of Physiology, University of Göteborg, Sweden)

(2001.6.25)

（担当：伊佐　正）

7. NGF OVER-EXPRESSION IN THE SPINAL WHITE MATTER OF TRANSGENIC MICE LEADS TO ECTOPIC PEPTIDERGIC SENSORY FIBRE INNERVATION AND HYPERALGESIA

Ribeiro-da-Silva (Department of Pharmacology & Therapeutics, McGill University, Montreal, Canada)

(2001.6.26.)

A transgenic mouse has been developed which over-expressed nerve growth factor (NGF) during postnatal development under the control of a myelin basic protein promoter. The over-expression occurred in myelinating oligodendrocytes located in the white matter of the CNS, from the date of birth to the age of 2 months. These animals displayed ectopic networks of substance P (SP) containing sensory fibres in the white matter in several locations in the CNS, including the white matter of the spinal cord, from postnatal day 5 onwards. The ectopic SP-immunoreactive (IR) fibres occurred in bundles and persisted indefinitely after the age of 4 months, although NGF levels had returned to normal. At the ultrastructural level, the ectopic SP-IR fibres established n erous synapses in the white matter of the spinal cord, preferentially on dendrites that expressed the SP receptor. Interestingly, no differences from control were detected in the SP innervation of the superficial dorsal horn. In behavioural studies, the transgenic mice displayed hyperalgesia, which was reversed by SP receptor and NMDA receptor antagonists. These results indicate that the ectopic fibres were functional and, despite their ectopic location, stillpreferentially innervated neurons expressing the SP receptor.

（担当：重本隆一）

8. 「目の動き」認知に関与するヒト後頭側頭葉の活動

渡邉昌子（統合生理研究施設感覚・運動機能プロジェクト）

(2001.6.27)

私たちは日常生活の中で，常に他者の動きを読み取りその意味を 理解している。特に顔，目の認知はヒトが他者とコミュニケーションを取る上で重要な機能のひとつである。我々は脳磁図を用いヒトの顔認知機構について研究を続けているが，今回「目の動き」を見ている時の脳活動について検討した。

仮現運動も含めた視覚性運動の認知には中側頭葉（MT）もしくは V5 と呼ばれる部位が関わっている。ヒトを対象としたニューロイメージング的手法（fMRI, PET）を用いた研究によると，動きに感受性のある部位は後頭側頭境界付近に位置しており，ここがヒトの MT/V5 野に相当すると考えられている。

今回の我々の研究では，仮現運動現象を用いることにより「目の動き」に対する誘発脳磁場を記録することができた。「目の動き」に対する誘発脳磁場の活動は「背景の模様の動き」に対する活動と比較し有意に潜時が延長していた。

「目の動き」に対して誘発された成分の活動源は，ヒトの MT/V5 野とされる中側頭葉後部に位置推定された。これは我々の研究室で行っている運動視に関する研究と一致した所見であった。また，「背景の模様の動き」に対する活動源も中側頭葉後部に位置推定できたが，その位置は「目の動き」と比較し有意な違いが認められた。この結果は，ヒトの MT/V5 野の中に刺激特異性の受容野分布があり，特に「目の動き」に特異的な部位が存在する可能性を示唆している。Watanabe S, Kakigi R, Puce A: Neuroimage 13: 351-363, 2001

（担当：籾山俊彦）

9. SNAREs in pancreatic acinar exocytosis

Herbert Y. Gaisano（University of Toronto）

(2001.7.16)

（担当：河西春郎）

10. ファージミド抗体ライブラリーを用いた新しいプロテオーム解析手法開発の試み

金子清俊　（国立精神・神経センター神経研究所 疾病研究第七部）

(2001.7.18)

いよいよプロテオーム解析の世紀を迎えつつある昨今，より効率的な蛋白質解析手法の開発は重要である。中でも標的蛋白質に対する抗体を容易に得ることができ，かつそれを簡単に増幅し精製することができれば，研究効率の飛躍的な増大を実現することが可能であると考え，我々はファージミド抗体ライブラリーに注目した研究を展開している。具体的には，ファージミド抗体ライブラリーを用いて，2 次元電気泳動上に展開された蛋白質スポットから直接抗体を同定する試みや，スライドグラス上の組織切片を標的として，ミクロンオーダーの微細構造物から直接抗体を同定する方法の開発等を行っている。

（担当：重本隆一）

11. 視覚画像の最適符号化としての V4 野におけるテクスチャー感受性

花澤明俊　（高次神経性調節研究部門）

(2001.7.25)

視覚系の各情報処理段階で観察されるニューロンの挙動は，画像情報圧縮技術における直交化，ウェーブレット，ベクトル量子化あるいは相似性解析といったステップとよく対応しており，視覚系が限られた情報処理資源を最大限に活用する効率の高いシステムとしてデザインされていることを示している。木目や布目，あるいは岩の表面や生理研の壁に見られる, 2 次元的模様や細かい 3 次元的凹凸の繰り返し構造は，テクスチャーとよばれる視覚属性に分類され，物体の識別や境界検出などの視覚認知および歩行や掌握といった運動制御に重要な情報である。画像圧縮においては，物体のテクスチャー部分とその境界部分を分けて処理すると圧縮効率が高くなる，あるいは圧縮手法によっては，テクスチャーとその境界は自律的に分かれて処理されることが知られている。このような情報論的必然性から，視覚画像を効率的に表現し，パターン認識や記憶に供する上で，生理学的によく研究されている画像中の境界線分の処理に特化したニューロン群の他に，テクスチャーの符号化に特化したニューロン群が存在する可能性が考えられる。画像中のテクスチャーの符号化をウェーブレット（V1 の単純型細胞，複雑型細胞）レベルの空間周波数による画像の符号化と区別するために，空間周波数構成に影響を与えず，知覚にのみ影響する「陰影」を組み込んだテクスチャーを視覚刺激として用い, テクスチャー符号化に特化したニューロン群の探索を V4 野において行った。

（担当：籾山俊彦）

12. 随意運動に伴う皮膚感覚入力の抑制機構

関　和彦（統合生理研究施設・高次脳機能研究プロジェクト）

(2001.9.13)

（担当：籾山俊彦）

13. The multifunctional role of the vestibular system: from the brain stem to the cortex, and back

Werner Graf, Lab. Physiologie de la Perception et de l'Action, CNRS/College de France, Paris

(2001.9.17)

Self-motion perception in the so-called "dorsal stream" relays has largely been studied with reference to visual inputs arriving via the lateral geniculate-V1 pathway. However, for higher cortical processing in parieto-temporal regions, a single sensory quality by itself, such as vision, can no longer be of perceptual and behavioral importance, since every displacement of the head in space will stimulate labyrinthine receptors detecting either rotational (semicircular canals) or linear accelerations (otoliths) in addition to the visual, auditory and somatosensory peripheries. Furthermore, multisensory input could be used to disambiguate ambivalent monosensory information. Thus, signals carrying meaningful messages are certain to contain multisensory information, and unequivocal interpretation of self-motion by the nervous system requires converging multisensory information that takes into account rotational and translational displacements of eyes, head and body in three-dimensional space. It also necessitates a comparison of congruent and conflicting input originating from different sensors. We have been trying to understand how sensory inputs leading to movement space perception/representation are combined at the level of single neurons in the primate neocortex, in particular the ventral intraparietal area (VIP). This area is located in the fundus of the intraparietal sulcus neighboring the medial and lateral

intraparietal areas (MIP and LIP, respectively). Its neurons respond selectively to the direction and speed of moving visual stimuli, and many of these also have direction-selective tactile sensitivity. VIP has been defined as the principal projection area from the medial temporal area (MT) and the medial superior temporal area (MST), and thus can be considered as intimately related to self-motion detection and analysis. We found indeed, that many neurons in VIP also have vestibular responses. Anatomically and functionally, the motion areas in the parieto-temporal regions are situated at an intermediate stage between lower-level motion analysis and motor output, and are involved in multisensory integration and perceptual and motor decision-stage operations. Vestibular input comes from all cortical areas that are considered "vestibular", notably the parieto-insular vestibular cortex (PIVC), and areas 3a and 2v. VIP also receives input from the frontal eye fields (FEFs), and in turn also projects there, and to the superior colliculus. In addition, there is a direct projection from the FEFs to neurons in the central mesencephalic reticular formation in the neighborhood of the oculomotor nuclei. These neurons, in turn project to oculomotor motor neurons, notably abducens motoneurons. This newly discovered link thus constitutes one additional sensory-motor processing loop involved in spatial orientation, self- motion perception and compensatory eye movements. We propose that the eye movement system may be organized in several layered processing loops, each of which is involved in different functional contexts, such as orientation, goal-directed movements, saccade generation, reflex movements, motor learning, etc.

（担当：森　茂美）

14. Activity-dependent bidirectional plasticity of active synaptic integration in hippocampal pyramidal cells

Dominique Debanne.

(2001.9.17)

Integration of synaptic excitation to generate an action potential (EPSP-Spike coupling or E-S coupling) determines neuronal message. Bi- directional synaptic plasticity is well established in the hippocampus but whether active synaptic integration expresses bidirectional changes remains unclear. We show here that in the area CA1 long-term synaptic depression is associated with a NMDA receptor-dependent depression of E- S coupling. E-S depression is input specific and is still expressed in the presence of GABAA and GABAB receptor antagonists. However, our preliminary data show that E-S depression is not expressed in the presence of T-type Ca2+ channel blockers. In single neurons, E-S depression is observed without change of postsynaptic passive properties. We conclude that a decrease in intrinsic excitability via a down regulation of T-type current underlies E-S depression and is synergic to glutamatergic long-term depressio

（担当：伊佐　正，坪川　宏）

15. Dendritic coincidence detection and the induction of synaptic plasticity

Michael Hausser　（Department of Physiology, University College London）

(2001.9.21)

We describe a mechanism for coincidence detection mediated by the interaction between backpropagating action potentials and EPSPs in neocortical pyramidal neurons. At distal dendritic locations, appropriately timed EPSPs or oscillations could increase the amplitude of backpropagating action potentials by three- to fourfold. This amplification was greatest when action potentials occurred at the peak of EPSPs or dendritic oscillations and could lead to somatic burst firing. The increase in amplitude required sodium channel activation but not potassium channel inactivation. The temporal

characteristics of this amplification are similar to those required for changes in synaptic strength, suggesting that this mechanism may be involved in the induction of synaptic plasticity.

（担当：籾山明子）

16. Mechanisms of distance-dependent synaptic scaling in hippocampal neurons

Dr. Jeffery Magee （Neuroscience Center, Louisiana State University Medical Center, U.S.A）

(2001.9.25)

Synaptic input is widely distributed along complex dendritic trees, which would result in a location dependence of synaptic input unless counterbalanced by some other factors. We have recently observed that a progressive 3-fold increase in the conductance of unitary excitatory synapses with distance from the soma is able to accomplish this counterbalancing. We are now investigating the underlying mechanisms of this novel distance-dependent synaptic scaling. Using rapid glutamate application to outside-out patches we have determined that the amount of AMPA and NMDA receptors present at distant synapses increases two to three fold across the range of input. There does not appear to be any alteration in receptor modulation or subunit expression. We hypothesis that a greater number of larger area synapses as well as synapses with multiple release sites are present in the distant regions of the apical arborization.

Reference: Magee and Cook, Nature Neuroscience 3: 895-903 (2000)

（担当：坪川 宏，川口 泰雄）

17. Firing rates and patterns in hippocampal pyramidal cells in vivo

Gyorgy Buzsaki (Center for Neuroscience, Rutgers, The State University of New Jersey, U.S.A)

(2001.9.29)

Cortical pyramidal cells fire single spikes and complex spike bursts. I will discuss the conditions in the intact brain that 1) may affect the threshold of spikes, 2) regulate firing rates and 3) determine the incidence of complex spikes.

Understanding the conditions that influence the initiation of action potentials in single neurons is an important step in determining the way information is process by neural networks. We have investigated the properties of action potential thresholds suing in vivo intracellular methods. We have found a large variability in the threshold voltage of spontaneously occurring action potentials. We have identified two separate factors that contribute to this variation in threshold: 1) fast rates of membrane potential change prior to the action potential are associated with more hyperpolarized threshold (increased excitability) and 2) the occurrence of other action potentials in the 1 s prior to any given action potential is associated with more depolarized threshold (decreased excitability). We suggest that prior action potentials course sodium channel inactivation that recovers with approximately a 1-s time constant and thus depresses action potential threshold during this period.

Pyramidal neurons fire not only single spikes but also bursts of spikes. However, the conditions necessary for burst induction are not known. CA1 pyramidal cell burst activity was examined in behaving rats. The fraction of bursts was not reliably higher in place field centers, but rather in places where discharge frequency was 6-7 Hz (theta oscillation frequency). Burst probability was lower, and bursts were shorter, after recent spiking activity than after prolonged periods of silence (100ms-1s). Burst initiation probability and burst length were correlated with extracellular spike amplitude and with intracellular action potential rising slope.

We suggest that bursts may function as "conditional synchrony detectors", signaling strong afferent synchrony after neuronal silence, and that single spikes triggered by a weak input may suppress the later induction of a burst by a strong input. This mechanism may provide a stabilizing mechanism and limit the excitability increase brought about by synaptic potentHow are the firing rate changes brought about? In a familiar environment, the discharge frequency of simultaneously recorded individual CA1 pyramidal neurons and the co-activation of cell pairs remain highly correlated across sleep-wake-sleep sequences. However, both measures were affected when new sets of neurons were activated in a novel environment. Nevertheless, the grand mean firing rate of the whole pyramidal cell population remained constant across behavioral states and testing conditions. The findings suggest that long-term firing patterns of single cells can be modified by experience. We hypothesize that increased firing rates of recently used neurons are associated with a concomitant decrease in the discharge activity of the remaining population, leaving the mean excitability of the hippocampal network unaltered.

（担当：坪川 宏 , 川口 泰雄）

18. The role of the olivocerebellar system in the control of timing and amplitude of movements

Dr.Chris I. De Zeeu (Department of Neuroscience, Erasmus University, Rotterdam, The Netherlands)

(2001.10.1)

The olivocerebellar system is organised in separate modules. Each module controls the timing and amplitude of particular movement components about a particular axis in space. Dynamic regulation of electrotonic coupling between inferior olivary neurons, which provide the climbing fibers to Purkinje cells in the cerebellar cortex, has been proposed as one of the major mechanisms underlying the control of the timing of movements, while the induction of long term depression (LTD) at the parallel fiber-Purkinje cell synapse is probably one of the major mechanisms underlying adaptation of the amplitude of movements. We have created and/or tested several mouse mutants in which the induction of cerebellar LTD or the electrotonic coupling between olivary neurons are disturbed. Both cellular mechanisms will be discussed and related to their roles in the control of movement.

（担当：重本隆一）

19. Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors: Why is it a Hot in Neuroscience?

Professor Toshio Narahashi（Department of Molecular Pharmacology
and Biological Chemistry, Northwestern University Medical School, Chicago）

(2001.10.22)

Neuronal nicotinic acetylcholine receptors (nnAChRs) have become an extremely hot subject of investigations in neuroscience during the past several years. This is because their significance in the physiology, pharmacology, toxicology and pathophysiology of the brain is increasingly recognized. They are ubiquitously distributed in the brain, modulate the release of many neurotransmitters, are the target sites of therapeutic drugs and newer insecticides, and are related to several neurological disorders. Our most recent studies of nnAChRs as related to Alzheimer's drugs and alcohol will be presented.

（担当：小幡邦彦）

20. 痛み刺激受容の分子機構

富永真琴（三重大学医学部生理）

(2001.10.24)

近年の分子生物学の進歩によって，感覚神経特異的に発現するいくつかのイオンチャネル型痛み刺激受容体の遺伝子クローニングがなされた。イオンチャネル型受容体は，痛み刺激受容がチャネルの開口から脱分極を引き起こし，神経細胞興奮による侵害刺激信号の伝達を非常によく説明する。この受容体のうち，トウガラシの主成分カプサイシンの受容体 VRI はカプサイシンのみならず痛みを惹起する熱（43 度以上）や酸（プロトン）によっても活性化する多刺激痛み受容体として機能することが明らかとなった。そこで，VR1 を中心とした痛み刺激受容機構について最新の知見を紹介した。

（担当：岡田泰伸）

21. 長期記憶の分子機構の解析：海馬歯状回の LTP をモデルとして

深澤有吾（脳形態解析部門）

(2001.10.30)

長期的な記憶の形成と維持には遺伝子発現が必要であると考えられています。私は，三菱化学生命科学研究所・井ノ口馨研究室の「活動依存的に発現する遺伝子の同定とその産物の動態を解析する事を通して，長期記憶の分子メカニズムを解明する」プロジェクトに約 4 年間参加し，主に 2 つのテーマに取り組みました。

1 つ目は，代謝型グルタミン酸受容体の足場タンパク質である vesl/hom ファミリー遺伝子群の同定と，その遺伝子の一つ,活動依存的遺伝子発現を示す Vesl-1S/homer-1a に着目しての，synaptic tag 現象の分子レベルでの検証でした。Synaptic tag 現象は Frey と Morris (1997)により，海馬スライスの CA1 LTP 実験の電気生理学的解析結果を元に提唱された仮説で，「印象的な出来事と一緒に日常的な出来事までが長い間記憶に残る」といった現象の細胞レベルのモデルと考えられている現象です。この検証の結果，synaptic tag 現象が Vesl-1S の免疫陽性反応の変化としても観察されることを明らかにし，synaptic tag 現象が分子生物学的に解析可能であることを見出しました。

2 つ目のテーマは，シナプス可塑性創出の場である樹状突起スパインには，アクチン細胞骨格が豊富で他の骨格系が殆ど無いこと，また，活動依存的に発現誘導される遺伝子群の中にアクチン結合タンパクを見出したこと等の背景から始めた「アクチン細胞骨格系の長期記憶機構における役割」を解析する仕事でした。ここでは，スパインシナプスに存在するアクチン分子がシナプス入力依存的に重合化する事を明らかにすると同時に，アクチン動態の薬理学的な抑制が長期的な可塑的変化の維持を阻害する事を見出し，長期記憶の維持にアクチン細胞骨格系の制御系が深く関与していることを明らかにしました。

これらの研究は，神経伝達物質受容体や可塑性関連分子のシナプスへの局在調節機構に新たな知見を提供するだけでなく，一つの樹状突起への複数のシナプス入力が何処まで干渉しあい，また，独立性を保っているのか，すなわち樹状突起内の情報処理機構を分子レベルで解析できる実験系と知見を提示したものと考え，今後，さらに発展させていこうと考えています。

セミナーでは，これらの解析結果について紹介させていただきますので，ご意見，ご質問等お待ちしています。

（担当：籾山俊彦）

22. GROWTH FACTOR-INDUCED OLIGODENDROGENESIS FROM THE ADULT MOUSE SVZ:PERSPECTIVES FOR MYELIN REPAIR.

Francois Lachapelle (INSERM)

(2001.11.13)

Multiple sclerosis (MS) is the most common cause of neurological deficit in the young adult in Europe and USA. The cause of this multifactorial inflammatory demyelinating disease is presently unknown. However, the loss of myelin and of healthy axons are believed to be responsible for the irreversible damages. Myelin repair occurs in MS, however, the potential for remyelination decreases with the progression of the disease and the age of the patient. Although the causal agent which triggers the disease has not been identified yet, finding ways to promote remyelination would be benefitial for the patients and would improve their quality of life. Strategies for myelin repair can be based on substitutive engraftment of myelin-forming cells or activation of spontaneous remyelination. Among different candidates for myelin repair, the adult CNS contains stem-like cells localized in discrete areas I.E the subventricular zone. These cells generate neurons and astrocytes in normal conditions and in response to traumativ or neuronal injury.

In order to evaluate their potential to generate myelin-forming oligodendrocytes in vivo, fragments of the structure were dissected out of the brain of 6 months old normal mouse and transplanted into the brain of MBP-defective newborn shiverer mice. Without treatment few cells survived and were able to synthetise MBP+ myelin in the host brain. In order to try to promote oligodendrogenesis from this structure donors received then one unique intraperitoneal injection of 5ng/g of living weight of EGF and FGF-2 two growth factors known to promote proliferation in this area and PDGFAA whose receptors is expressed by the PSA-NAM- positive cells present in the structure . Afterward, their SVZ was dissected and processed for transplantation in the newborn shiverer mouse host brain 24 to 72 h. after treatment. The study evidenced that the 3 factors favored the survival of grafted cells. A 6 fold increase in the number of grafted brains containing MBP+ myelin was observed with EGF and a 16 fold with PDGF and FGF-2 compared to vehicle-injected controls used as donors. Tumorisation was observed with EGF but neither with PDGF nor FGF In addition, the effect of FGF-2 was maximum after 48h. and still present after 72h. Such effect was only observed when rostral part of the SVZ was used for transplantation, but neither with the caudal part of the structure nor with striatal fragments deprived of the wall of the lateral ventricle. Analysis of the dynamic of the cell population was performed by combining BrdU labeling for proliferation with growth factor treatment: When animals received BrdU (1mg/ g) 2h. before growth factor or vehicle injection (tracing study), most of the BrdU positive cells present in the SVZ and the rostral migratory stream were PSA-NCAM+ cells. PDGF and FGF treatment induced a twofold increase of the population of PSA/BrdU cells in both structure. When animals received BrdU 48h. after treatment (proliferation study) and were sacrificed 2 hours latter, PDGF induced a twofold and FGF-2 a threefold increase in the total number of BrdU+ and BrdU+/PSA-NCAM+ proliferating cells in SVZ and RMS. In addition many BrdU+ cells could be observed in the corpus callosum migrating toward the cortex. But in contrasts with the previous conditions, most of the BrdU+ cells were PSA-NCAM ,suggesting that the proliferating effect of both growth factors was linked with an effect on SVZ cells differentiation. Immunocharacterization of the dissociated cell population obtained from SVZ fragments to be grafted evidenced that PDGF and FGF promote a 50% increase of PSA-NCAM+ (40.2% and 45.2% respectively vs 27.3) and PSA- NCAM+/nestin+ cells (16.3% and 15.4% vs 10.5%)over their respective controls. Moreover the growth factors promoted a 3fold increase of the TuJ1+neuroblasts (15.9%for PDGF, 16.2% for FGF vs 5.5%) PDGF had no effect, but FGF-2 lead to a 4.5 fold increase of the GD3+ population (0.9% and 2.17% vs 0.79%). In addition both factors increased the proportion of 04 cells(10.25% and 12.6% vs 6.23%). In contrasts, nestin+ GFAP+ and GalC+ cell populations were not modified. In order to determine whether these cells could also remyelinate, fragments of MBP- LacZ tg mice were engrafted in the SVZ of normal

mice remoted from an LPC-induced demyelination of the corpus callosum. The study evidenced that FGF-2 treatment strongly increased the participation of grafted cells to remyelination. These results suggest that SVZ cells could participate in myelin repair in the adult providing that they could be conveniently primed. In addition, they suggest that a convenient window of cell activation rather than a continuous exposure would favour generation of differentiating cells able to participate in the process of remyelination.

（担当：池中　一裕）

23. レドックスセンサーとしてのＧタンパク質

西田基宏（統合バイオ・生命環境研究領域）

(2001.11.20)

活性酸素種（Reactive Oxygen Species; ROS）は，細胞内の蛋白質，脂質，核酸などを非特異的に酸化し，生理機能の障害を引き起こします。心筋においても，虚血・再灌流や炎症時のサイトカイン刺激によって過剰なROSが生成され，細胞死や心肥大を引き起こすことが知られています。その一方で最近，ROSが特定の蛋白質を酸化し機能修飾を与えることで細胞内情報伝達経路を活性化し，正常時の機能発現にも関与することが明らかにされていきています。私はこれまで東京大学大学院薬学系研究科の長尾拓研究室で黒瀬等助教授の指導の下，酸化ストレスが引き起こす情報伝達の活性化メカニズムおよびその生理的意義について研究してきました。

ROS で活性化される情報伝達経路の一つである MAP kinase (ERK)は，細胞の増殖・分化といった機能応答に重要であることが知られています。私は，ラット新生仔心室筋の初代培養細胞を用いて酸化ストレスによるERK活性化のメカニズムを調べた結果，受容体と共役する三量体 G タンパク質が ROS の標的分子となることを見出しました。受容体と共役する三量体 G タンパク質は Gs, Gi, Gq, G12 の４つのグループに分類されます。このうち Gi ファミリー（Gi, Go）のαサブユニットが直接活性酸素により修飾され，その結果 G タンパク質がαサブユニットとβγサブユニットに解離し，遊離したβγサブユニットが ERK や Akt を活性化することを見出しました。活性酸素による G タンパク質の直接的な活性化とそれに引き続く ERK の活性化は，低酸素・再酸素化刺激においてもみられたことから，心筋の虚血・再灌流などの病態時においてもこの経路が活性化されると示唆されます。また，Akt や ERK は生存因子として知られていることから，このメカニズムは酸化ストレスに適応するための保護シグナルとして働く可能性が今後は，心筋細胞で明らかにした知見が普遍的なメカニズムであるかどうか他の細胞（主に神経細胞）を用いて明らかにしていこうと考えています。また，G タンパク質によって ERK だけでなく形質膜上に存在する channel も活性制御を受けることから，現在は酸化ストレスで活性化される Ca^{2+} channel の活性化機構にGi/oを介した経路が関与するかどうかについて検討を行っています。セミナーでは，これらの解析結果について紹介させていただきますので，ご意見，ご質問等お待ちしています。

（担当：籾山俊彦）

24. サル前頭眼野の電気刺激による滑動性眼球運動のゲイン変化

田中真樹（北海道大学医学研究科）

(2001.12.3)

（担当：伊佐　正）

25. A NEW TRANSGENIC MODEL FOR STUDYING CORTICAL DEVELOPMENT AND NEURAL DEGENERATION.

Anthony T.Campagnoni.(Neuropsychiatric Institute UCLA School of Medicine)

(2001.12.4)

The myelin basic protein gene encodes two sets of products: the classic myelin basic proteins (expressed by myelin forming cells) and another family of proteins, called the golli proteins, which are expressed in neurons, oligodendrocytes and cells in the immune system. We prepared a transgenic mouse using the golli promoter of the myelin basic protein gene to target HSV thymidine kinase to cortical preplate neurons. Dams were injected at E11.5 and E12.5 with gancyclovir to ablate a portion of the subplate neurons. This resulted in the formation of a major post- natal cortical lesion, leading to hydrocephaly and death by P24-27. During embryonic development subplate neurons became relatively more dispersed than normal in the ablated mice. By E18, the cortex was clearly delaminated as assessed by cresyl violet staini immunostaining with a number of markers. By E18 reduced neuronal density within the cortex was evident in the ablated animals. Neurofilament staining indicated some misdirection of fibers by P1, as evidenced by an accumulation of fibers in the cingulated region of the cortex. Also, golli staining revealed substantial loss of fibers within the cortex and cortical-thalamo fibers coursing through the striatum by this age. After birth, animals became hydrocephalic, with ventricles enlarging and the cortex becoming increasingly thinner with age. While TUNEL labeling showed some increased cell death in the cortex at E18.5 and P1, there was substantially increased cell death in the VZ and SVZ, as well as the striatum, which continued after birth. BrdU labeling at E13 and E15 clearly show impaired migration of neurons from the ventricular zone of the ablated mice into the intermediate zone and cortical plate. Immunocytochemical staining for radial glia alone and in combination with BrdU indicate reduced density of radial glia and truncated/disrupted fibers which probably contribute to the impaired migration of neurons out of the VZ. The increased cell death observed in the VZ may be due to the inability of cells to exit the VZ. Thus, the lowered cortical neuronal density and delamination in the ablated mice probably results from impaired neuronal migration from the SVZ & VZ. The data indicate that ablation of a percentage of preplate neurons is sufficient to cause severe developmental abnormalities in the cortex involving the radial glia as well as the subplate.

（担当：池中　一裕）

26. Voltage-gated sodium channelopaties: new molecular mechanisms

Mohamed Chahine(Laval Hospital, Quebec, Canada)

(2001.12.12)

電位依存性 Na チャネルは，細胞膜興奮性の機構の重要なターゲットとして研究されてきたが, 近年ヒトで心臓や神経系に発現する Na チャネルサブタイプが遺伝病の原因となることが明らかとなり, その病態の分子機構が注目されている。

Chahine 博士は，骨格筋型及び心筋型 Na チャネルについて点変異分子発現系を用いた電気生理学的解析を通して，病気成立の原因を解明する研究を行なっている。今回はチャネル分子のターゲッティングに関わる病態など，最新の知見を含めて解説していただく。

（担当： 岡村康司）

27. 膜電位依存性 Na^+チャネル特異性を持つグラヤノトキシン（GTX）を用いて機能− 構造相関問題にどこまで迫れるのか？

瀬山一正（広島大学医学部生理）

(2001.12.12)

グラヤノトキシンGTXの主要な生理・薬理学的特性は1）Na^+チャネルの活性化曲線を過分極（約 50 mV）方向に移動させる，2）不活性化過程が取り除かれることである。この特性を利用しこのチャネルのゲート機構を解明する色々な試みを行った結果について報告した。特に，GTX は Na^+チャネルの開状態のみを認識して結合し，閉状態からのみ解離することが明らかとなった。また，種々の点変異 Na^+チャネルや，骨格筋型 Na^+チャネルと心筋型 Na^+チャネルの種々のキメラを作成し，それらに対する GTX の影響を調べた結果，GTX の結合部位及びその性質も明らかとなりはじめている。

（担当：岡田泰伸）

28. The Power of Electron Microscpy and Crystallography to Solve the Structure of Membrane-bound Factor VIII and the Actin-bound Arp 2/3 Complex.

Svetla Stoilova-McPhie

(2001.12.18)

膜蛋白質（チャネル，リセプター）の 2 次元結晶化法とその電子顕微鏡観察による“構造と機能”解析を専門としている Svetla Stoilova-McPhie 博士に，血小板による血液凝固にかかわる分子機構を構造生物学の見地から解説していただいた。

（担当：永山國昭）

29. Calyx of Held シナプスにおける放出可能なシナプス小胞プールの枯渇と補充

坂場武史（マックス・プランク生物物理化学研究所 膜物理学部門）

(2001.12.27)

放出可能なシナプス小胞プールの枯渇と補充は，短期シナプス可塑性，たとえばシナプス抑圧などに関与すると考えられている。最近，高頻度の刺激によるシナプス前終 末への Ca 流入によって，シナプス抑圧からの回復が早くなるとの報告がなされたが （Dittman and Regehr, 1998; Stevens and Wesseling, 1998; Wang and Kaczmarek, 1998），そのメカニズムに関しては見解が一致していない（Wu and Borst, 1999）。この問題に関して，calyx of Held を標本として用い，シナプス前後部からの同時記録をすることで検討をおこなった。EPSC から脱畳み込み法を用いて伝達物質放出率を推定した結果，伝達物質放出確率は一様ではなく，高確率で放出される（時定数 3 ms）が補充されるのに数秒を要する小胞群と，低確率で放出され(時定数 20 ms)ただちに（200 ms 以内）補充される小胞群に分離されることがわかった。さらに，高確率で放出される小胞の補充に，Ca/calmodulin が関与していることがわかった。Ca/calmodulin 依存性の小胞の補充は，低確率で放出される小胞の補充とともに高頻 度刺激に対する持続的なシナプス伝達を保証しているものと考えられる。

（担当：井本敬二）

30. 大脳皮質非錐体細胞の神経終末のシナプス構造

窪田芳之（大脳神経回路論研究部門）

(2002.1.17)

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ます。しかし，その基本単位である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おりません。大脳皮質の神経回路は投射型の神胞である錐体細胞と介在型の神経細胞である非錐体細胞の 2 種類で構成されていることが広く知られていますが，その機能的構築を理解するために，私達はまず非錐体細胞のサブタイプの解析を進めています。現在は，それぞれのサブタイプの神経終末が形成するシナプスの構造に関して形態的な解析を行っておりますが，今回は，その途中結果を報告します。方法としては, ラットの前頭皮質のスライス標本を作成し，ホールセル記録法で記録した非錐体細胞にバイオサイチンを注入します。組織を固定した後，DAB 反応でその細胞のみを選択的に染色し，電子顕微鏡連続像 3 次元再構築画像解析システム等を使って終末部分を観察，解析しました。その結果，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，細胞体でしたが，non-fastspiking∠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，細胞体でした。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ました。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ましたが, その比例係数はサブグループで異 なっていました。以上の点から，これらのサブグループのシナプス後細胞への抑制作用は異なると推測しています。

（担当：籾山俊彦）

31. 免疫系アダプター分子 DAP12 の欠損マウスの解析：痴呆と骨嚢胞を伴う稀な劣性遺伝病 Nasu-Hakola との関連について

高井俊行（東北大学加齢医学研究所・遺伝子導入研究分野）

(2002.1.22)

Nasu-Hokola 病は 1970 年代初頭に日本とフィンランドで独立に報告された，100 万人に 2 人程度の発症率を示す稀な劣性遺伝病であり，患者は骨嚢胞形成とともに進行性の精神異常を来し，ついには若年性痴呆を必発して死に至る。この原因遺伝子は最近，免疫系で見い出されていたシグナルアダプターDAP(DNAX Activating Protein)12 であることが報告された。しかしながらこれまでDAP12 欠損マウスで中枢神経系の異常は報告されていない。我々は独自に作製した DAP12 欠損マウスの行動解析を行ったところ，精神分裂病患者において観察される感覚運動ゲート異常を見い出した。さらに脳切片の免疫組織染色および電顕解析により，視床中心性にミエリン低形成とシナプスの形態異常が観察された。さらに視床でのミエリン形成にはオリゴデンドロサイトでのDAP12 の発現が必要であることが示唆された。したがってDAP12 欠損マウスは精神分裂病の発症機構，および痴呆に至るプロセスを分子と細胞レベルで解析できる絶好のモデルになると思われる。

（担当：籾山俊彦）

32. 小胞体ストレス特異的なアポトーシス経路

中川敏幸（岐阜大学 医学部 反射研究施設）

(2002.1.24)

カスパーゼは線虫から哺乳類まで相同遺伝子が存在し，アポトーシスを誘導するプロテアーゼとして中心的な役割を果たしている。基本的なアポトーシスの分子機構は生物間でよく保存されているが，哺乳類ではより複雑に調節されていると考えらる。たとえば，カスパーゼの相同遺伝子は哺乳類で少なくとも 14 個存在し, 全てのカスパーゼが同時に活性化されるのではなく，細胞内局在が異なることから予想されるように，細胞死の経路− 細胞膜上の受容体, ミトコンドリア, さらに小胞体を介する一特異的に限定的に活性化される。ノックアウトマウスの解析から，それぞれの細胞死の経路は炎症反応，発生過程における器管形成，また神経変性疾患の発症機構に関与していることが示唆されている。セミナーでは，アルツハイマー病の原因の一つであるプレセニリンの作用する器官であり，さらに，ストレスを感知し細胞死を制御するシグナルの発信器官として注目されている小胞体の役割を，カスパーゼ活性化の分子機構という点から紹介したい。

（担当：池中一裕）

33. MRI Visualization of Neuronal Connections in the Macaque Monkey.

K.S. Saleem. (Washington University School of Medicine, Louis, USA)

(2002.1.28)

To date neuroanatomical connections have been mainly examined by means of degeneration methods and tracing techniques. Such studies require fixed processed tissue for the data analysis, and therefore they cannot be applied on the live animal. In the present study, we examined the neuronal connections in-vivo, particularly the output connections of striatum, and connections of the early visual pathways using MRI visible contrast agent that is transported anterogradely through the axon, and subsequently trans-synaptically. The axonal transport of the contrast agent was monitored using a 4.7T Biospec (Bruker, Inc) NMR scanner. Successful tracking of such in-vivo connection will be of paramount importance for guiding electrophysiological experiments in the alert, trained monkeys. The detailed projection patterns observed in MRI will be discussed.

（担当：小松英彦）

34. 心不全の進展における心筋細胞アポトーシス

金井　恵理（京都大学医学部内科）

(2002.1.28)

ラット心筋培養細胞に cAMP 刺激（48 時間）するとアポトーシス死が促進されることが明らかとなり，その経路には A キナーゼの関与が証明された。これらはβアドレナリン刺激でのアポトーシス誘導のメカニズムの一つを形成しているものと考えられた。一方，心不全モデルラットでは Lectin-like oxidized LDL receptor-1（LOX1）が発現することが明らかとなった。心筋培養細胞でもエンドセリン 1 やノルアドレナリン刺激で LOX1 の発現が見られた。また, LOX1の強制発現によって心筋細胞はアポトーシス死を示すことも示された。この経路には H_2O_2 や p38 の関与する証拠も得られた。これは心不全下でのアポトーシス誘導のメカニズムの一部を証明するものと考えられた。

（担当：岡田泰伸）

35. Recent advances in studies of experience- and learning-induced cortical plasticity

Michael M. Merzenich（Coleman Laboratory, Departments of Otolaryngology
and Physiology, Keck Center for Integrative Neuroscience, University
of California at San Francisco & Scientific Learning Corporation, Berkeley）

(2002.2.1)

Results of recent experiments directed toward understanding learning-induced cortical plasticity shall be summarized. Our research focus has been on a) the documentation of changes in distributed cortical responses induced by experience and learning, b) the modulation of plasticity as a function of behavioral context, c) similarities and differences between pre-critical period and post-critical period plasticity, d) experimental and theoretical studies of the progressive self-organization of forebrain representational systems; e) catastrophic developmental progressions attributable to brain plasticity mechanisms and accounting for catastrophic neurological and psychological "illness", and f) the contributions of plasticity-induced change progressions to variation in human performance abilities. These studies have led to the development of novel strategies for improving human performance capacities, principally applied to impaired child populations.

（担当：伊佐　正，山森哲雄）

36. Characterization of neocortical neuronal types by single RT-PCR.

Bertrand Lambolez (CNRS Laboratoire de Neurobiologie)

(2002.2.7)

We have used single cell RT-PCR after patch-clamp to investigate neocortical cell-type diversity at the electrophysiological, molecular and morphological levels. Among neocortical interneurons, we have extensively characterized a VIPergic population which shows distinctive physiological molecular and morphological features. Their definition as a distinct interneuron subtype is further substantiated by their specific integration of different neurotransmitter pathways. The relevance of defining neuronal types will be discussed with respect to possible specific functions in the neocortical circuitry.

（担当：窪田芳之）

37. Analyse de la Societe Francaise et de son dynamisme, tentee pour une recherche d'une plus grande originalite scientifique Japonaise
(Analysis of French society and its dynamism, attempted for a research of greater scientific originality in Japan)

Shigeru TSUJI（Departement de Cytologie, Institut des Neurosciences, Universite Pierre et Marie Curie,
75005-Paris, France ; Laboratory for Neural Architecture, Brain Science Institute, ）

(2002.2.8)

I) Histoire du contact entre Japon et l'Occident et de la place de la France dans cette histoire
II) Histoire et Geographie de la France
III) Organisation de l'Etat en France
IV) Societe Francaise tournee vers l'exterieur
V) L'esprit francais
VI) Le Siecle des Lumieres (Enlightenment) et la Revolution Francaise
VII) Religion en France
VIII) Individualisme Francais
IX) Travail en France
X) Conflits en France

XI) Education en France message culturel Conclusion

XII) Vision equilibree de laFrance sur le Japon et son

（担当：尾崎　毅）

38. Expression, function and phosphorylation of TRPC proteins in human Platelets

Kalwant S. Authi (Centre for Cardiovascular Biology and Medicine King's College London)

(2002.2.12)

血小板凝集の過程において，細胞内 Ca^{2+}濃度上昇は血小板の活性化に必須である。細胞内 Ca^{2+}濃度上昇は，IP3 受容体を介した小胞からの Ca 放出とこれに連動した細胞外からの Ca^{2+}流入によって引き起こされる。Transient receptor potential channel (TRPC)は，受容体作動性カチオンチャネルとして最近同定され，形質膜越えの Ca^{2+}流入に関わるチャネルの分子実体として考えられている。本セミナーでは，ヒト血小板に発現する TRPC1 および TRPC6 の機能解析を中心に，血小板における Ca^{2+}動員の分子メカニズムについて紹介する。また，これまで不明であった TRPC 活性化の抑制機構についても述べる。

Ca^{2+} elevation is an important component of platelet activation. Conversely elevation of the cyclic nucleotides cAMP and cGMP (by PGI2 and NO, respectively) serves to inhibit cell function with inhibition of Ca^{2+} elevation an identified mechanism. Ca^{2+} entry mechanisms are still not fully understood. Whilst the Ca^{2+} release channel of intracellular stores i.e. the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP3R) is well established, the identity of the entry channel is still unknown. Recently transient receptor potential (TRP) proteins that are known to mostly code for non-selective cation channels have been suggested as candidates. In mammalian systems these have been subdivided into three main families namely the short or TRPC family, the long or TRPM family and the vanilloid receptor like or TRPV family. To date 7 family members of mammalian TRPC genes have been identified with over-expression studies suggesting that most code for non-selective cation channels. This study was designed to examine the expressioSerine/threonine phosphorylation was investigated in [32P] labelled platelets. Protein phosphorylation was analysed by autoradiography. When platelets were stimulated with thrombin (T, 2U/ml) there was an increase in the phosphorylation of pleckstrin but immunoprecipitated TRPC1 or TRPC6 was not phosphorylated. When the cells were incubated with BIMPS (an agent that activates cAMP-PK) platelets did not aggregate and analysis of lysates shows increased phosphorylation of the phosphoprotein VASP. This was also apparent when platelets are stimulated with 8-pCPT-cGMP (a cGMP-PK activator). Immunoprecipitation of TRPC1 after either incubation showed increased phosphorylation of associated proteins of molecular size 250, 120, 85 and 70 kDa. However a 100 kDa phosphoprotein was not observed. This suggested that TRPC1 was associated with substrates of cAMP- and cGMP-PKs of sizes 250, 120, 85 and 70 kDa. When immunoprecipitation was carried out with the anti-TRPC6 antibody, 2 promineThis work is supported by the British Heart Foundation.

（担当：西田基宏，森　泰生）

39. 情動と呼吸

本間生夫（昭和大学医学部第二生理学教室）

(2002.2.18)

恐れなどさまざまな情動に伴って呼吸が不随意的に変化する。この情動に伴い変化する呼吸はヒトそれぞれにより異なるであろうか？ 我々はまず, ヒトそれぞれが持つ特性不安と不快な感覚刺激による呼吸の変化を調べた。ストレスとなる音刺激を与えたとき，呼吸数の増加が認められたが，その増加は特性不安との間に正の相関を示し，特性不安が高いヒトほど呼吸数の増加が顕著であった。第二に特性不安と予期不安との関係を調べた。2 分以内に電気刺激がくる，という予期不安の間，呼吸数は増加し，その増加はやはり特性不安と相関していた。こ

の呼吸と相関を示す情動変化が脳のどこで作られているか，EEG ダイポールトレーシング法（EEG/DT）で調べた。

手術適応検査のため深部電極を留置している側頭葉てんかん患者において，EEG 同時記録により，そのスパイクの位置を比較した。深部電極で扁桃体にスパイクを認めた患者において，EEG/DT 法においても同部位に電源が推定された。予期不安時，呼吸に同期した電位変化が吸息開始 200-300msec に認められ，その電源は EEG/DT 法により側頭極と扁桃体に存在していた。この電位を RAR(呼吸関連不安電位)となづけた。

日本人の伝統的文化の基になっているのは「心の内的表象」であり，「能」は，心の内を外的表象としてはあらわさない芸能である。態度も表情も変わることがない。しかし，唯一変化しているものは呼吸である。「隅田川」の子供を亡くした母親を演じているとき，シテの呼吸は乱れ，予期不安の時と同様吸息に同期して EEG 上に電位変化が認められた。この電位変化もやはり大脳辺縁系で作られていることが EEG/DT 法により明らかとなった。

（担当：小幡邦彦）

40. Topic 1: US Primate Research Centers: Mission and Organization Topic 2: BrainInfo: a Neuroanatomically Based Source of Information about the Brain

Douglas M. Bowden（Psychiatry & BehavioralScience）

(2002.2.19)

Douglas Bowden 博士は神経科学者であると同時に米国シアトルの Washington Regional Primate Research Center において長年 Director を努めてこられた方です。今回，筑波での講演の後，生理研に立ち寄っていただける事になりました。以下 2 つの話題でのお話をお願いしてあります。

Topic 1: US Primate Research Centers: Mission and Organization

米国が霊長類を対象とした研究に国としてどのように取り組んでいるのかを概説していただきます。

Topic 2: BrainInfo: a Neuroanatomically Based Source of Information about the Brain

同博士が進めている"Brain Info"プロジェクトについてお話いただきます。"Brain Info" はサルの脳神経の神経解剖学的に関する総合的な情報を提供する web ベースのシステムです。

(http://www.braininfo.rprc.washington.edu/)。実際のデモも含めてお話いただく予定です。なお, 2/18-19 の間に Bowden 氏と個人的に話をされたい方は時間をアレンジいたしますのでご連絡ください(kazuseki@nips.ac.jp)。

（担当：関　和彦）

41. CNR 分子群の脳における分子機能解析

先崎浩次　（高次神経機構研究部門）

(2002.2.20)

脳には莫大に多様化した細胞が存在し，それぞれの細胞が高度に組織化され神経回路を形成し機能している。シナプスは神経回路のつなぎ目であり, 神経回路の形成・維持・再編成の基盤となる。神経回路を分子レベルで理解するには，シナプスの分子メカニズムを理解することが必要となる。シナプスに存在する非受容体型チロシンリン酸化酵素 Fyn は多様な膜貫通型分子と複合体を形成することによりシナプスで多様な情報伝達を行っていることが想定されている。当研究室において，Fyn と結合する分子の検索から，マウス脳で発現し，シナプスに多様化して存在していることが明らかにされた新規カドヘリン型受容体(CNRs : cadherin-related neuronal receptors)が単離された。CNRs は神経回路の複雑さ，多様さを分子の多様性の観点から理解できる可能性を示している。また，興味深いことに，CNR はゲノム構造の解析より，免疫系での多様化に関わる免疫グロブリンや T 細胞受容体

と類似の構造をとっており，クラススイッチ様の発現産物も同定されている。これらの観点から，CNR 発現にはDNA 組換え等の特殊な発現系が予想されている。さらに，マウス大脳皮質層構造形成過程において，CNRs が Reelin の多重受容体として機能していることが明らかとなり，CNR が神経細胞の配置から神経回路形成に関与していることが示唆された。

以上のことから，CNR の分子多様性の解析は，脳の構築，神経回路形成の分子メカニズムの解明に貢献できるのではないかと期待している。

（担当：籾山俊彦）

42. Visual perception at the time of saccadic eye movements

Choongkil Lee (Seoul National Univ.)

(2002.2.21)

It is widely assumed that successful vision integrates the information regarding eye movements as well as retinal input. In accordance with this, neurophysiological studies have documented modulation of neural activity in the visual cortex by an extraretinal source coupled to saccadic eye movements in the cat, monkey, and human, and psychophysical studies on human have reported modulation of spatial vision at the time of saccades. Understanding the mechanisms and strategies by which this extraretinal input is integratged is critical to a complete understanding of vision beyond understanding how a representation of external world is accurately but passively formed from the retinal input. In this talk, I would like to present a recent finding that visual motion perception is systematically modulated by an extraretinal eye movement signal, and discuss on-going experiments to further study the related mechanisms.

Reference J Park, J Lee, & C Lee. (2001) Non-veridical visual motion perception immediately after saccades. Vision Research, 41:3751-3761.

（担当：小松英彦）

43. 「ドーパミンによる運動機能制御の分子細胞生物学」

小林和人　（福島医大・医・生体機能）

(2002.3.8)

ドーパミン神経伝達は，運動，情動，報酬などの重要な高次脳機能を媒介する。中脳腹側領域に存在するドーパミンニューロンは，線条体，側坐核，前頭葉皮質に投射し，複数の標的ニューロンの活動を促進性あるいは抑制性に制御する。一方，ドーパミンニューロンには，多くの領域から種々の神経伝達物質を含有する線維が入力する。ドーパミンの生理的な役割は周知の事実であるが，この神経伝達物質が一連の行動課題の中でどのように脳機能を調節しているのかについては十分に解明されていない。我々のグループはこの問題に着目し，ドーパミン標的領域における神経回路の機能制御と外来入力に依存するドーパミンニューロンの活動調節について，特にマウス遺伝子操作の技術を用いて分子細胞レベルからの研究を進めている。ドーパミンの標的領域の代表である線条体には，2 種類の中型有棘細胞（線条体− 黒質ニューロンと線条体−　淡蒼球ニューロン）とアセチルコリンあるいは GABA を含有する無有棘介在細胞が存在する。これらの細胞はいずれもドーパミンに反応し，それぞれの活動は 促進性あるいは抑制性に制御される。ドーパミンに依存する運動制御の生理機構を理解するためには，線条体の局所回路におけるドーパミン作用の分子細胞機構の解明が必須である。我々は，イムノトキシン細胞標的法を用いてドーパミン D2 受容体を含有する線条体ニューロンを除去し，種々の行動および解剖学的な解析から，線条体− 淡蒼球ニューロンは自発運動には抑制的に，ドーパミン誘導性の運動には促進的に働き，ドーパミン刺激の程度に依存して大脳基底核機能を二方向性に制御することを見出した。また，このニューロンはドーパミン刺

激時において線条体− 黒質ニューロンの十分な活性化を介して運動促進に関与する可能性を示唆した。ドーパミンニューロンの活動調節の仕組みを明らかにするためには，この機能に重要な役割を持つ因子の同定が必要である。我々は, Cre-loxP システムを用いてドーパミンニューロンに特異的な遺伝子ターゲティング系を確立し, 本 ニューロンに発現する転写因子やシグナル伝達分子の生理機能について検討した。また，ドーパミンニューロンの生理的特性を解析するために，このニューロンをドーパミンによる運動機能制御の分子細胞生物学GFPでラベルしたトランスジェニックマウスを作製し，ドーパミンニューロンの発生過程におけるGFPの特徴的な発現機構を見出した。

新しい分子細胞機能の解析システムは，ドーパミン作用に基づく脳機能の作動機序の理解に有用なアプローチを提供する。また，この機序の理解は，ドーパミン神経系の異常と関係する神経精神疾患の病態の解明や治療薬の開発に新しい方向性を与える。

（担当：柳川右千夫）

44. OREXIN NEURONS ACT AS A LINK BETWEEN PERIPHERAL METABOLISM AND CENTRAL MECHANISMS CORDINATING AROUSAL AND FOOD INTAKE

SAKURAI, Takeshi (Institute of Basic Medical Sciences, Tsukuba University)

(2002.3.8)

Behavior in animals is highly influenced by food availability, but pathways by which the brain regulates behavior in response to homeostatic metabolic input from the periphery have remained unclear. Neurons of the hypothalamus that express the neuropeptide orexin have been hypothesized to respond to changes in peripheral metabolism and regulate behavior in response to homeostatic need. We demonstrated that orexin-containing neurons are able to monitor peripherally generated indicators of nutritional state, and are necessary for normal augmentation of arousal in response to fasting. Electrophysiological studies of isolated orexin neurons, which are specifically labeled by expression of green fluorescent protein in orexin/EGFP transgenic mice, revealed that activity of these neurons is inhibited by extracellular glucose and the adipostat leptin, and stimulated by the recently characterized gastrointestinal peptide ghrelin. Behavioral studies of orexin/ataxin-3 transgenic mice, in which orexin neurons are genetically ablated, demonstrated a failure of transgenic mice to increase wakefulness and motor activity during food deprivation compared to wildtype controls. We suggest a model in which reduced food availability alters circulating levels of glucose, leptin, and ghrelin, together leading to increased firing of orexin neurons. Orexin neurons promote wakefulness and locomotor activity to reinforce and support food-seeking behaviors. Simultaneously, orexin neurons activate hypothalamic feeding mechanisms, such as those mediated by neuropeptide Y neurons. Orexin neurons thus provide a unique and critical link between peripheral metabolism and central mechanisms coordinating arousal and food intake.

（担当：柳川右千夫）

45. GFP を用いたカルシウムプローブ

中井淳一（液性情報部門）

(2002.3.19)

Green Fluorescent Protein(GFP)は蛍光蛋白質で現在ではマーカーとしてまたレポーター遺伝子として細胞生物学的実験に広く利用されている。最近ではGFPは単なるマーカーにとどまらず機能性分子と結合させることにより，分子プローブとして機能するようなものが製作されるようになった。今回 GFP を用いた種々のカルシウムプロー

ブにについて概説するとともに我々が開発したカルシウムプローブ G-CaMP について紹介する。

（担当：籾山俊彦）

46. RESTORATION OF LOCOMOTOR FUNCTION IN A WHEELCHAIR-DEPENDENT SPINAL CORD INJURED

RICHARD HERMAN

(2002.3.20)

Spinal cord injury (SCI) in humans often leads to catastrophic impairment of functional locomotion. Of the approximately 250,000 chronic SCI in the U.S., nearly 50% are considered clinically incomplete i.e., there is some sensory sparing in the lower extremities associated with complete paralysis (ASIA B), non-functional muscle strength (ASIA C) or functional muscle strength (ASIA D) of the lower extremities. ASIA B and C category subjects are usually wheelchair-dependent and if they can ambulate short distances, they do so with considerable sense of effort and fatigue. We recruited a wheelchair-dependent 43 year old ASIA C subject who was 3 years post-cervical SCI, thus a quadriplegic. The intention was to implement a paradigm consisting of Partial Weight Bearing Therapy (PWBT) followed by Epidural Spinal Cord Stimulation (ESCS) of the lumbar enlargement of the spinal cord. During PWBT, the subject walked on a treadmill with his body weight partially supported in a harness. PWBT led to improved stereotypic walking patterns but was insufficient for over- ground walking in terms of safety, energy cost, and fatigue. PWBT with ESCS (sensory stimulation) generated immediate improvement in gait rhythm when appropriate stimulus parameters were used. When compared to the non- stimulated condition, over-ground walking was featured by a reduction in time and energy cost of walking, sense of effort and a feeling of “lightness” of the legs. After a few months of training, performance in speed, endurance and metabolic responses (via indirect calorimetry) gradually converged with/without ESCS at a short distance (e.g., 15 m), suggesting a learned response to these conditions. However, at longer distances (e.g., 50-250 m), performance with ESCS was considerably superior.

Gas exchange data revealed ESCS was associated with an 8-fold-greater exercise-induced fat oxidation rate and reduced dependence of exercising muscle on glycolysis. Most importantly, the subject was able to perform multiple functional tasks within the home and the community with ESCS. We propose that ESCS induced sensory modulation of spinal circuits and augmented the use-dependent plasticity created by PWBT. Further, ESCS apparently elicited greater activation of an oxidative motor unit pool, thereby reducing the subject's sense of effort and energetic cost of walking.

（担当：森　茂美）

※Dr. Richard Herman is the Director of the Clinical Neurobiology and Bioengineering Laboratories at the Good Samaritan Regional Medical Center (GSRMC), Phoenix; Research Professor of Bioengineering, Arizona State University (ASU), Tempe; Research Professor of Pharmacology, Health Sciences Center, University of Arizona, Tuscon. His medical specialty is Rehabilitation Medicine. This research is the result of collaboration between GSRMC and ASU.

47. 「物の形」を見分ける脳の仕組み

谷藤　学（理化学研究所　脳科学総合研究センター　認知脳科学研究グループ）

(2002.3.22)

日常，私達が目にする様々な物体像を，脳はどのようにして捉えているのだろうか。「物を見る」というのは我々にとってありふれた行為のように思われるが，見る角度（視点）や照明方向，部分的な遮蔽などによって様々に様相を変える物体像を他と間違えることなく認識できるためには巧妙な仕組みがあるに違いない。高次視覚の研究の中心は，その仕組みを解き明かすことにある。この問題にアプローチする第一のステップは，物体像が脳の中にどのように表現されているかを明らかにすることであろう。私達のグループは，物体像の脳内表現を明らかにする試みを光計測（Optical Imaging）という新しい手法によって取り組んでいる。

高次視覚の研究には，ヒトと似た視覚系を持つサルがしばしば用いられる。サルを用いた研究から，物体像そのものの知覚とその物体の動きや空間内での位置の知覚は別々の経路で処理されていることが明らかにされている。前者は後頭葉から側頭葉に至る腹側視覚経路であり，後者は後頭葉から頭頂葉に至る背側視覚経路である。そして腹側経路の最終段にあって，物体像の知覚と認識に中心的な役割を担うと考えられているのが側頭葉視覚連合野の TE 野である。この部位には，「顔」などの見なれた物体に応答する神経細胞がある一方で，複雑ではあっても物体像を特定するには不充分な「図形特徴」によく反応する神経細胞が数多くある。サルが日常目にする物体像はこのような神経細胞の反応の組み合わせとして表現されているに違いない。どう組み合わされているかが問題である。

一般に，このような「情報の脳内表現」を明らかにするためには，多くの神経細胞の活動を同時に捉える技術が必要になる。私達が用いている光計測（内因性信号のイメージング）もそのひとつである。一般に神経細胞が活動すると酸素が消費される。酸素消費は組織中のヘモグロビンの還元を促す。還元ヘモグロビンは酸化ヘモグロビンより光をよく吸収するので，神経活動は脳表面の光の吸収の増大を引き起こす。これを内因性信号と呼び，この信号を CCD カメラでイメージングする技術が内因性信号のイメージングである。

私達はこの方法を TE 野における物体像表現の解明に用いている。具体的には，サル頭蓋骨と硬膜を一部除いて TE 野の脳表面を露出し，物体像やそれを単純化した視覚刺激などを提示したときの TE 野の光吸収の変化を空間パターンとしてイメージングするのである。この方法によって，私達は TE 野における様々な複雑な物体像の表現様式を示すのに初めて成功した。複雑な物体像やそれを単純化した図形刺激を用いてTE野の活動をイメージングした結果，私達は，(1)一定の大きさの細胞集団が情報表現の単位になっていること（これをカラムと呼ぶ）。(2)カラムのひとつひとつは物体像に含まれる図形特徴に対応し，それらの組み合わせのパターンとして特定の物体が表現されていること。(3)顔のように我々にとって重要な意味を持つ物体像はそれ自体が，ひとつのカラムの活動として表現されること。などを明らかにしている。

（担当：大庭明生）

【 大学院特別講義 】

大学院特別講義

1．第 35 回（2001.4.11）
演者：生体調節研究系・生体システム部門　森　茂美　教授
演題：運動の制御機序

2．第 36 回（2001.5.9）
演者：統合整理研究施設・高次脳機能研究　伊佐　正　教授　小林　康　助手
演題：哺乳類上丘局所回路の構造と動的特性，眼球運動の学習

3．第 37 回（2001.6.20）
演者：細胞器官研究系・機能協関部門　岡田　泰伸　教授
演題：細胞はなぜ，どのように容積を調節するのか？

4．第 38 回（2001.7.18）
演者：生体調節研究系・脳形態解析部門　小松　秀彦　教授
演題：視覚情報処理のメカニズム

5．第 39 回（2001.10.31）
演者：大脳皮質研究系・脳形態解析部門　重本　隆一　教授
演題：生理科学としての形態学

6．第 40 回（2001.11.21）
演者：細胞器官研究系・生体膜部門　筒井　泉雄　先生
演題：E-C coupling 機構の進化（平滑筋から骨格筋へ）

7．第 41 回（2001.12.12）
演者：統合生理研究施設・自律機能部門　柴崎　浩　先生
演題：ジストニーにおける感覚運動皮質の機能異常

8．第 42 回（2002.1.16）
演者：生理学研究所　濱　清　名誉教授
演題：シナプスとグリアの形態学

9．第 43 回（2002.2.12）
演者：分子生理研究系・細胞内代謝部門　宮崎　俊一　先生
演題：卵（らん）細胞の生理学的研究

10．第 44 回（2002.3.6）
演者：大脳皮質研究系・心理生理学部門　定藤　規弘　教授
演題：局所脳血流測定による人間の高次脳機能の画像化

生理学研究所年報　第２３巻

発　　行　　2003年３月１日
編 集 者　　井　本　敬　二
発 行 者　　岡崎国立共同研究機構
生　理　学　研　究　所
〒444-8585　岡崎市明大寺町字西郷中38
電話〈0564〉55-7700
FAX〈0564〉52-7913
URL:http://www.nips.ac.jp
印 刷 製 本　　株式会社　エニウェイ
〒171-0014　東京都豊島区池袋2-19-3
万葉ビル2F
電話〈03〉3988-5656