

【 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	10
概 要	
マウス上丘における GABA ニューロンの発生	
(小幡邦彦, 常川直子)	
GAD67-GFP マウスを用いた大脳皮質 GABA ニューロンの移動様式の解析	
(柳川右千夫, 小幡邦彦, 村上富士夫)	
ノックインする遺伝子による相同組み換え効率の検討	
(柳川右千夫, 山本友美, 神原叙子, 小幡邦彦, 戸塚昌子, 八木 健)	
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)	
神経活動活性化に伴う沈降型, 過剰リン酸化型, 不活性化型 Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II の形成	
(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のメカニズム	
(兼子幸一, 小幡邦彦)	
Ca^{2+} 感受性非選択性カチオンチャネル活性化による扁桃体基底外側核 GABA ニューロンに対する	
ノルアドレナリンの興奮性作用; GFP ノックインマウスを用いた解析	
(兼子幸一, 小幡邦彦, 柳川右千夫)	
超微小形態生理研究部門	12
概 要	
灌流ラット顎下腺における水分泌調節機構	
(村上政隆, 大河原浩, 細井和雄, Kwartarini Murdiastuti, Bruria Sachar-Hill, Adrian E. Hill)	
灌流ラット顎下腺の細胞間分泌細管の分泌時形態変化	
(村上政隆, 前橋寛, Alessandro Riva, Felice Loffredo, Francesca Testa-Riva)	
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)	
「意識科学の視点」から, 「ヒト・ゲノムの文法解析 (=暗号解読)」の試み	
(東 晃史)	
細胞内代謝研究部門	14
概 要	
カルシウムキレーターのウニ卵受精時への異なる効果	
(毛利達磨, Chambers EL, Landowne D)	
マウス未成熟卵母細胞の自発的 Ca^{2+} 振動に対するエストロゲンの作用	
(毛利達磨, 吉田 繁)	
上衣細胞濃度感受性ナトリウムチャネル	
(毛利達磨, 吉田 繁, 小幡邦彦, 須谷康一, 尾松万里子)	

細胞器研究系

生体膜研究部門.....	17
概 要	
神経, 分泌細胞の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)	
2 光子励起法を用いた大脳シナプスの研究	
(河西春郎, 松崎政紀, 早川泰之, 野口 潤, 安松信明)	
粘性依存性ゲート機構から予測されるイオンチャネルのダイナミックな構造	
(久木田文夫)	
機能協同研究部門.....	18
概 要	
乳酸アンドーシス性の神経及びグリア細胞腫脹の持続は容積感受性アニオンチャネルの傷害による	
(森 信一郎, 鍋倉 隆, 森島 繁, 岡田泰伸)	
CFTR による容積感受性アニオンチャネルの抑制は第 2 スクレオチド結合領域によって仲介される	
(赤塚結子, I.F. Abdullaev, E.L. Lee, 岡田泰伸, R.Z. Sabirov)	
アラキドン酸による ATP 放出性アニオンチャネルの制御	
(A.K. Dutta, 岡田泰伸, R.Z. Sabirov)	

生体情報研究系

神経情報研究部門.....	21
概 要	
オリゴデンドロサイト発生制御機構の解析	
(鹿川哲史 竹林浩秀 中平英子 清水健史 政平訓貴)	
アストロサイトの分化・発生様式に関する研究	
(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, 出口章広, 池中一裕)	
癌遺伝子治療の基礎研究	
(片倉浩理, 福政良枝, 中島弘文, 池中一裕)	
モデルマウスを用いた脱髄の病態解析および治療法の検討	
(松本路生, 田中久貴, 山田 元, 池中一裕)	
液性情報研究部門.....	23
概 要	
Ca ²⁺ チャネル変異マウスにおける神経回路異常の検索	
(松下 かおり, 佐々木 幸恵, 井本 敬二)	
GFP を用いた蛍光カルシウムプローブ G-CaMP の改良体の開発	
(中井 淳一, 大倉 正道)	
炎症性疼痛における視床 mGluR1-PLC β 4 カスケードの制御機構	
(宮田 麻理子)	
成熟ニューロンにおける cdk5 の機能の検索	
(佐竹伸一郎, 井本敬二, 小西 史朗)	
高次神経機構研究部門.....	26
概 要	
CNR カドヘリン分子群多様性の機構解析	
(先崎浩次, 八木 健)	

ゼブラフィッシュ CNR の機能解析 (多田基紀, 八木 健)	
CNR 遺伝子欠損マウスの作製 (平林敬浩, 八木 健)	
ラット ES 細胞の樹立とそれを用いた遺伝子変換ラット作製系の開発 (金子涼輔, 八木 健)	
クローンマウス作製による分化神経細胞核における核情報変換の解析 (牧野初音, 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)	
高次神経性調節研究部門.....	28
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)	
トップダウン性注意がサル V4 野と前頭眼野のニューロン活動に及ぼす影響 (小川 正, 小松英彦)	
盲点における線分の補完知覚に対応したサル 1 次視覚野神経活動 (松本正幸, 小松英彦)	

生体調節研究系

生体システム研究部門.....	31
概 要	
大脳皮質-線条体-淡蒼球外節-視床下核-淡蒼球内節路（いわゆる間接路）について (南部 篤, 喜多 均, 橘 吉寿)	
糖代謝 PET による障害物回避二足歩行運動の実行に関与する脳部位の同定 (森 大志, 中岡克己, 橘 篤導, 高須千慈子, 塚田秀夫, 森 茂美)	
大脳皮質運動野の直立二足歩行運動に関わる機能的意義の同定 (森 大志, 中岡克己, 南部 篤, 稲瀬正彦, 森 茂美)	
ネコ小脳歩行誘発野の機能的意義の同定 (森 大志, 中岡克己, 森 茂美)	
直立歩行若齢ニホンサルに与えた障害物回避歩行課題の学習機序 (橘 篤導, 森 大志, 高須千慈子, 森 茂美)	
高次液性調節研究部門.....	33
概 要	
サル下部側頭葉における連合記憶の順向性情報処理 (Yuji Naya, Masatoshi Yoshida, Soichi Nagao, Yasushi Miyashita)	
サル下部側頭葉における連合記憶形成の形態学的基礎 (YOSHIDA, Masatoshi Yoshida, Yuji Naya, Soichi Nagao, Yasushi Miyashita)	
認知シフト課題遂行中のマカクサル大脳活動の磁気機能画像解析 (Kiyoshi Nakahara, Toshihiro Hayashi, Seiki Konishi, Yasushi Miyashita)	
メタ記憶の神経機構：パラメトリック磁気機能画像解析 (Hideyuki Kikyo, Kenichi Ohki, MIYASHITA, Yasushi)	

近時記憶の神経機構

(Seiki Konishi, Idai Uchida, T OKUAKI, T Machida, Ichiro Shirouzu, Yasushi Miyashita)

認知シフトにおけるヒト前頭前野の半球間非対称性

(Seiki Konishi, Toshihiro Hayashi, Idai Uchida, Hideyuki Kikyo, Emi Takahashi, Yasushi Miyashita)

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

(初山俊彦)

ラット脊髄視床路ニューロン活動性の解析

(初山明子)

大脳神経回路論研究部門..... 38

概 要

大脳皮質のカルレチニンと VIP 陽性神経終末の構造

(窪田芳之, 川口泰雄)

皮質-線条体細胞への抑制性入力 of 解析

(根東 覚, 川口泰雄)

大脳皮質 GABA 細胞の形態的特質の定量化

(荻部冬紀, 川口泰雄)

心理生理学研究部門..... 39

概 要

聴覚脱失による脳の可塑的变化

(定藤規弘)

読唇における視覚・触覚統合の解析

(斎藤大輔, 定藤規弘)

卓越した計算能力の基盤となる非言語性情報処理戦略の神経基盤

(本田 学, 田中悟志, 道又 爾)

異なる運動関連領域が思考におよぼす特異的役割の検討

(本田 学, 花川 隆)

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, 中村 聡, 大橋 力)

非可聴域超高周波成分による聴覚受容モジュレーション機構の検討

(本田 学, 中村 聡, 仁科エミ, 大橋 力)

乗法型変調非線形自己帰帰モデルをもちいた大脳皮質-筋肉間機能連関の検討

(本田 学, 加藤比呂子)

MRI 撮像音強度の変化に伴う聴覚野血流反応時間の加齢性変化

(岡田知久, 本田 学, 定藤規弘)

統合生理研究施設

高次脳機能研究プロジェクト.....	43
概 要	
ラット上丘における浅層-中間層投射の解析 (勝田秀行, 伊佐 正)	
ラットの皮質脊髓路から上肢筋運動ニューロンへの興奮伝達経路 (Bror Alstermark, Jun Ogawa,伊佐 正)	
霊長類大脳皮質-脊髓介在ニューロン投射について (大木 紫, Bror Alstermark,関 和彦, 伊佐 正)	
霊長類の頸髄 C5 レベルにおける皮質脊髓路の切断が手指の運動に与える影響について (Bror Alstermark, Lars-Gunnar Pettersson, 佐々木成人, 関 和彦, 伊佐 正)	
感覚・運動機能研究プロジェクト.....	45
概 要	
視覚性運動速度検出の脳磁場と機能的磁気共鳴画像による研究 (金桶吉起, 川上 治, 丸山幸一, 柿木隆介, 定篠規弘, 岡田智久, 米倉義晴)	
ランダムドット運動に誘発される脳磁場反応 (金桶吉起, 丸山幸一, 柿木隆介)	
The voice-specific process revealed by neuromagnetic responses. (軍司敦子, Daniel Levy, 石井良平, 柿木隆介, Christo Pantev)	
C 線維を上行する信号による大脳活動：脳磁図による研究 (TD Tran, 乾 幸二, 宝珠山 稔, K Lam, 秋云海, 柿木隆介)	
炭酸ガスレーザー刺激誘発 C 線維関連脳電位に対する注意及び睡眠効果 (秋 云海, 乾 幸二, 王 晓宏, Tuan Diep Tran, 柿木隆介)	
「方向の異なる目の動き」を見るとききの脳活動 (渡辺昌子, 三木研作, 柿木隆介, Aina Puce)	
「口の動き」を見るとききの脳活動 (三木研作, 渡辺昌子, 柿木隆介, Aina Puce)	

脳機能計測センター

形態情報解析室.....	49
概 要	
神経細胞樹状突起スパインの CT 解析 (濱 清, 有井 達夫)	
パーグマングリア細胞の CT 解析 (山口 登, 古家 園子, 有井 達夫)	
小腸絨毛上皮下線維芽細胞における Ca^{2+} 波伝播と ATP 放出のメカニズム (古家園子, 古家喜四夫)	
生体情報処理室.....	50
概 要	
樹状突起における活動電位の発生とその制御メカニズム (坪川 宏)	
細胞内シグナル伝達系の活性とニューロン活動との時間的・空間的關係の解析 (坪川 宏, 高木佐知子)	
中枢ニューロンの容積調節と興奮性調節の機能的カップリングの解析 (高木佐知子, 坪川 宏)	

機能情報解析室.....	52
概 要	
意志に関する脳活動の研究	
(達本 徹)	
脳機能分子解析室.....	52
概 要	
トランスジェニック (Tg) 動物作製のためのシステム構築	
(平林真澄, 平林敬浩, 八木 健)	
ラット卵丘細胞核を用いた連続核移植の試み	
(平林真澄, 保地眞一)	

統合バイオサイエンスセンター

戦略的方法論研究領域.....	54
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)	
位相板用炭素薄膜の材料科学的研究	
(Dorian Minkov, Radostin Danev, 宇理須恆雄, 大河原浩, 永山國昭)	
塩基配列決定のための電子顕微鏡用重元素ラベル塩基の合成	
(田坂基行, 長澤賢幸, 永山國昭)	
カルシウムチャンネル hTRPM2 の精製と電子顕微鏡観察	
(松本友治, 原 雄二, 森 泰生, 永山國昭)	
セミンタクト細胞技術を用いた細胞内小胞輸送の可視化・再構成と分子機構の研究	
(村田昌之, 加納ふみ, 田中亜路, 山内忍, 永山国昭)	
時系列生命現象研究領域.....	56
細胞個性に見合った興奮性を実現する機構：中枢ニューロンの発火特性を決定する電位依存性 Na チャネルの性質	
(岡村康司, 岩崎広英)	
発生過程におけるイオンチャンネルの制御および電気的活動の役割	
(岡村康司)	
ゲノム情報に注目したイオンチャンネル分子機能の研究	
(岡村康司, 村田喜理)	
生命環境研究領域.....	57
酸化修飾により活性化する Ca^{2+} 透過性カチオンチャンネルのメカニズム解析	
(吉田卓史, 原 雄二, 西田基宏, 森泰生)	
細胞内酸化還元状態の変化により活性化されるチャンネル TRPM2 の分子機能解析	
(原雄二, 西田基宏, 吉田卓史, 森泰生)	
カルシウムチャン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, 沼賀拓郎, 森泰生)	
遺伝学的アプローチを用いたカルシウムチャンネルの生理学的役割の解明	
(山田和徳, 森泰生)	
細胞内蛋白質の活動の可視化を目指した蛍光性バイオセンサーの構築	
(清中 茂樹, 西田 基宏, 森 泰生)	

動物実験センター	60
概 要	

計算科学研究センター	62
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)	

技術科	63
1. 概 要	
(大庭明生)	
2. 施設の運営状況	
①統合生理研究施設	
(1) 生体磁気計測装置室	
(永田 治, 竹島康行)	
②脳機能計測センター	
(1) 形態情報解析室	
(山口 登)	
(2) 機能情報解析室	
(佐藤茂基)	
(3) 生体情報処理室	
(吉村伸明, 村田安永)	
③動物実験センター	
(佐治俊幸 小木曾 昇, 廣江猛)	
④共通施設	
(1) 電子顕微鏡室	
(前橋 寛)	
(2) 機器研究試作室	
(加藤勝巳)	

分子生理研究系

神経化学研究部門

【概要】

当部門は脳機能を分子レベルで理解することを目指して、GABA 系遺伝子改変マウスの作成・解析、タンパク質リン酸化の研究を行ってきた。本年度はとくに当部門で作成した GAD67-GFP ノックインマウスを用いて、

下記の上丘、大脳皮質における GABA ニューロンの発生の解析と所内所外研究者との共同研究による小脳、上丘等における GABA ニューロンの電気生理学的研究を行った。

マウス上丘における GABA ニューロンの発生

小幡邦彦, 常川直子

最近、大脳皮質や脊髄の発生過程における GABA ニューロンの発生、移動様式が明らかにされてきた。当部門で作成した GFP ノックインマウスは GABA ニューロンが GFP を発現するので、これを用いて大脳皮質に似た層構造を持つ上丘の発生を調べた。上丘のニューロンは GABA 性も含めて胎生 (E)11-14 日にほとんどが誕生した。GABA ニューロンは大脳皮質では *ganglionic eminens* で生まれて *tangential* な移動で皮質に拡がり、脊髄では *v1* と

いう特定部位で生まれるが、上丘では内面の *ventricular zone* で生まれて、表層へ *radial* に移動することが結論された。これは GABA ニューロンの形態観察、細胞マーカーの免疫組織化学、生きたスライス標本の経時的観察、微小切断実験にもとづく。また上丘に GABA 細胞がみられない E10-12 に、中脳外側に発する GABA 線維が上丘表層を束をなして走行していることを見出した。

GAD67-GFP マウスを用いた大脳皮質 GABA ニューロンの移動様式の解析

柳川右千夫, 小幡邦彦

村上富士夫 (大阪大学大学院 生命機能研究科)

GABA ニューロンで特異的に GFP が発現する GAD67-GFP マウスを用いて大脳皮質における GABA 作動性ニューロンの動態を経時的に観察し、その移動速度と運動方向を解析した。その結果、中間層と脳室下層では接線方向の顕著な移動が観察された一方、辺縁層や皮質板、サブプレートに分布する GABA ニューロンの多くはわずかな運動性しか示さなかった。さらにその移動の運動性や移動方向は多様であり、脳表面に対し垂直方向

に移動する細胞や、接線方向ではあるが大部分の細胞とは逆に大脳基底核原基の方向へ戻る細胞も少数ではあるが観察された。また、複数の層とをまたがって移動する細胞も観察された。これら移動細胞の多くが、ストップアンドゴーを繰り返す、跳躍的な動態を示していた。以上の結果より、発生中の大脳皮質において GABA ニューロンはそれぞれの層で特異的な動態を示すことを明らかにした。

ノックインする遺伝子による相同組み換え効率の検討

柳川右千夫, 山本友美, 神原叙子, 小幡邦彦
戸塚昌子 (科学技術振興事業団, CREST)
八木 健 (大阪大学 細胞生体工学センター)

遺伝子標的法を用いて特定の遺伝子をノックインした遺伝子改変マウスは、個体レベルでの機能を解析するのに有効な材料となる。しかしながら、ES 細胞における相同組み換えを利用するため、ノックインする遺伝子により相同組み換え効率が異なる可能性がある。この点を明らかにする目的で、緑色蛍光蛋白質 (GFP, 0.7 kb), テトラサイクリンアクティベーター (tTA2, 0.7 kb), プロゲステロン受容体・クレレコンビナーゼ (CrePR, 1.8 kb),

ルシフェラーゼ (luc, 1.7 kb) の各遺伝子を GAD67 遺伝子にノックインしたコンストラクトをそれぞれ作成し、ES 細胞に導入することにより相同組み換え効率を調べた。その結果、GFP と CrePR で相同組み換え率が高く、tTA2 で低いことが明らかになった。この結果は、相同組み換え効率がノックインする遺伝子の長さよりもその塩基配列に影響される可能性を示唆している。

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

山肩葉子, 柳川右千夫, 小幡邦彦

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

って、生体内における CaMKII α の果たす役割について新たな知見の獲得をめざしている。本年度は、Cre レコンビナーゼによって薬剤耐性遺伝子を除去した相同組換え ES クローンを用いて、マウス胚へのマイクロインジェクションを行い、キメラマウスの作成を行った。キメラ率の高いマウスについて交配を行い、ヘテロマウスを作成中である。

神経活動活性化に伴う沈降型、過剰リン酸化型、不活性化型 Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II の形成

山肩葉子, 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として、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、生体内における神経活動と CaMKII の活性状態との関連を調べる中で、けいれん活動中には、脳ホモジネート中の CaMKII の脱リン酸化、活性化型の減少と共に、細胞内分布の変化と一部不活性化が起こることを観察している。

そこで、この不活性化を伴う細胞内分布の変化の実体について、さらに解析を行った。その結果、可溶性画分に残存する CaMKII では脱リン酸化が起こるが不活性化が認められないのに対し、顆粒画分で増大した CaMKII ではリン酸化の増大と不活性化が認められた。このけいれんに伴う、沈降型、過剰リン酸化型、不活性化型の CaMKII について、その生成機構、生理的役割についてさらに検討を行っている。

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のメカニズム

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 が変異型で大きく, GABA_B 受容体拮抗剤 CGP55845 はとくに野生型の増強率を増す。扁桃体外側核主細胞から全細胞記録を行い, シナプス前, 後何れの GABA_B 受容体が可塑性調節に関わるのかを検討した。G タンパク阻害剤 GDP-β-S (1.5 mM) のパッチ電極内投与で野生型の LTP 増強率は対照条件下よりも大きくなり, 変異型は

増強を示さなかったが, 依然変異型の増強率が高かった。パッチ電極内の Cs でシナプス後 GABA_B 応答を抑制する条件下で単離した NMDA 受容体性 EPSC 振幅は低頻度刺激時には差はなかったが, 高頻度刺激時には変異型で有意に大きくなった。以上の結果から, シナプス間隙に拡散した GABA がシナプス前, 後両方の GABA_B 受容体を活性化し, 可塑性調節に関与していることが示唆された。

Ca²⁺感受性非選択性カチオンチャネル活性化による扁桃体基底外側核 GABA ニューロンに対するノルアドレナリンの興奮性作用 ; GFP ノックインマウスを用いた解析

兼子幸一, 小幡邦彦, 柳川右千夫

ノルアドレナリン (NA) の扁桃体基底外側核 GABA 作動性細胞に対する作用を検討するため, GAD67-GFP ノックインマウス脳から作成した扁桃体スライス標本の GFP 陽性細胞から全細胞記録を行った。電流固定記録で NA は GFP 陽性細胞のうち, 遅い時定数の後過分極を示す RS 細胞の全例に脱分極と持続性発火を起こした。TTX 存在下に -60 mV で電位固定すると NA による内向き電流が生じ, I_{NA} は α₁ 受容体拮抗剤で抑制された。外液 Ca²⁺

の除去及び Cd²⁺の外液への添加, 外液 Na⁺の低下で I_{NA} はそれぞれ対照群の 8%, 37%, 11% に減少した。voltage-ramp から I_{NA} の平衡電位は -20 mV 付近にあり, I_{NA} に伴い RS 細胞の入力抵抗は 15% 低下した。以上の結果から, RS 細胞に対する NA の興奮性作用は α₁ 受容体を介した Ca²⁺感受性カチオン非選択性チャネルの活性化によることが明らかとなった。

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。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, in vitro での蛋白分泌と水分分泌の同時測定が不可能であるため不明であった。また経細胞輸送と傍細胞輸送の相関は不明であった。村上は分泌定量の可能な唾液腺血管

灌流系を材料に分泌時間経過, 形態観察, 開口放出関連蛋白定量, 傍細胞輸送の 4 テーマについて共同研究を組織し, 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。

灌流ラット顎下腺における水分泌調節機構

村上政隆, 大河原浩

細井和雄, Kwartarini Murdiastuti (徳島大学歯学部)

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。標識デキストランをプローブとして唾液、灌流液、細胞間液に分布するデキストラン分子のサイズを決定した。分子径に対する分泌プローブの唾液／灌流液比は二つの成分（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及び半径 5 Å に切片をもつ直線成分で溶媒牽引による成分）に分けられた。フィルター特性は、水の分子半径 1.5 Å では 1 の値に外挿され、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。ここに水分子を主に通過させると考えられてきた管腔側膜に存在する AQP5 がどのような機能を有するかが大きな疑問となった。Hill

は AQP5 が浸透圧受容器として働く仮説を提出した。一方細井らは通常の SD ラットに AQP5 発現と分布が異なる個体が存在することを見出した (Pflugers Archs, 445 (3), 405-412, 2002)。本年度は、細井らの開発した AQP5 低発現ラットを用い、血管灌流ラット顎下腺を作成し、高浸透圧ショックに対する水分泌反応の違いを比較検討した。その結果、通常ラットでは浸透圧変化に応じて水分泌速度が低下した。AQP5 低発現ラットでは分泌速度の変化が小さく、調節機能低下が示唆された。この調節は AQP5 で受容され傍細胞輸送経路が効果器として働くと考えられた。一方、実際に傍細胞輸送経路を通過する水分泌を推定した。これは北里大学 瀬川と共同研究で一般共同研究に記載した。

灌流ラット顎下腺の細胞間分泌細管の分泌時形態変化

村上政隆, 前橋寛

Alessandro Riva, Felice Loffredo, Francesca Testa-Riva (Cagliari 大医, 細胞形態学)

分泌刺激強度により水輸送と開口分泌反応が変化するが、分泌境界面である細胞間分泌細管の形態変化が刺激強度とどのように対応するかをラット顎下腺血管灌流標本を材料に高分解走査電子顕微鏡により観察した。試料は分泌刺激に対応し採取し固定後 Osmium マセレーション法により細胞内容をかき出し細胞質側より細胞間分泌細管を連続して観察することができた。その結果、なにも刺激しない対照系においても、同じ細胞間分泌細管の一部に開口分泌あり、他の部分は開口分泌像がない場合があること（開口分泌の不均一分布）この分布が分泌強度をあげるにより密になること（開口分泌の細管状での均一な分布）が分かった。すなわち、電子顕微鏡

レベルのミクロの変化（分泌顆粒が細胞間分泌細管に接着、接着顆粒にベシクルが付着するエンドサイトーシス、microvilli の消失）の出現頻度が上昇し、腺全体で測定されるマクロな分泌反応は、ミクロな変化の加算として理解できた。平成 12-13 年度に CCh0.1μM の刺激強度では水分泌反応は cAMP により調節されることを示したが、この分泌刺激の強度においては無刺激下で観察される開口分泌反応のミクロな形態変化と童謡の変化のみ観察された。このことは生理的な刺激強度の範囲ではユニットになるミクロな形態変化は同じでその出現頻度が空間的・時間的に上昇することにより、マクロな分泌反応になることが結論付けられた。

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などの生理機能とそのメカニズム、そして、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、さらに、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 (Nsdhl) 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た。本年度は、ヒト胎児発生異常である CHILD 症候群の原因となるミスセンス変異のひとつ、G205S を持つ Nsdhl は、LD 上に局在できなかったことなどを見だし、Nsdhl の脂肪滴への局在が、機能的な重要性を持っている可能性がいっそう強く支持された。脂肪滴表面機能と後期エンドソーム選別輸送制御、コレステロールの生合成、および胎児発生異常の相互の関連が注目される。

「意識科学の視点」から、「ヒト・ゲノムの文法解析 (=暗号解読)」の試み

東 晃史

「分子生物学は、分子によって、生命を理解しようとする科学である」と解説される。これに対して、「意識科学は、ヒトの言語の、生成メカニズムを明確にしようとする科学である」と解説できるであろう。「ヒトの言語生成の、メカニズム解析」のために、数年来、「現代物理学の基礎概念 (=アインシュタイン、ハイゼンベルグ、ファインマン) とは異なる基礎概念、つまり、認識論の伴う、東仮説 (=マクロの量子論)」を体系化してきた。しかし、「東仮説 (=マクロの量子論)」は、一般研究者に、なかなか、理解されなかった。「理解されない最大の理由」は、多分、「時間と空間の概念が、従来

の、物理学や哲学の基礎理論とは異なる」からであろう。そこで、今年度は、「現代物理学の基礎概念と、東仮説の基礎概念との、理解の接点 (=橋渡し=連続的な理解) を創る」目的で、「一般の科学者が、自分で、東仮説を、検証できるような具体的な方法論 (=コンピュータのロジック)」を示し、かつ、「東仮説の具体的な応用例として、ヒト・ゲノムの文法解析 (=暗号解読) のモデル」を示した。モノクロでは実例 (=モデル解析例) を示せないで、「ホームページ (=http://www.nips.ac.jp/~higashi) の、東レポート No.10, No.11」を参照されたい。

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研究対象としている。特に刺激時や細胞活性時の細胞内カルシウムイオン (Ca^{2+}) の動態を画像解析装置を用いて詳細に解析することにより、上記の

メカニズムの解明を目指している。また、受精時の Ca^{2+} 増加や Ca^{2+} 振動機構の研究を通して受精機構、卵成熟機構の研究を行っている。海産動物 (ウニ卵) 受精時のカルシウム変化について代表的なカルシウム蛍光色素 2 種 (Fura-2 と Ca Green) を用いカルシウムキレーターの影響

作用を詳しく検討した。またマウス卵母細胞の自発的 Ca^{2+} 振動機構、内分泌攪乱物質（エストロゲン）の卵母

細胞への影響について研究を行った。

カルシウムキレーターのウニ卵受精時への異なる効果

毛利達磨,

Chambers EL (Univ Miami),

Landowne D (Univ Miami)

ウニ卵にカルシウムキレーターBAPTAを前注入し、受精時の細胞内カルシウム増加と膜電流変化を同時測定した。細胞内 Ca^{2+} 測定には代表的なカルシウム蛍光色素 fura-2 と Ca Green を用いた。0.5-1.0 mM BAPTA は容量依存的に細胞内 Ca^{2+} 増加と Ca^{2+} 依存性 phase 2 電流を抑制した。1 mM やそれ以上の BAPTA と fura-2 の卵では

phase 2 電流と細胞内カルシウム増加はともに抑制された。ところが、同様の BAPTA と Ca Green の卵では phase 2 電流は抑制されるが、はっきりしたカルシウム増加を示した。このことから fura-2 と Ca Green の使用について問題点が提起された。また Fura-2 の InsP_3 受容体に対する抑制作用が示唆された。

マウス未成熟卵母細胞の自発的 Ca^{2+} 振動に対するエストロゲンの作用

毛利達磨

吉田 繁（近畿大 理工）

哺乳類の成熟卵は受精時に細胞内カルシウム濃度が増加する（カルシウム振動）。このカルシウム振動はその後の発生に伴う様々な卵内の反応を引き起こす原因になる現象である。一方、卵巣から取出したマウス未成熟卵母細胞（以下卵母細胞）も自発的カルシウム振動をしていることから、卵巣内でも、カルシウム振動をしており各種ホルモンの制御を受けて成熟すると考えられる。しかし、代表的なホルモンであるエストロゲンと卵母細胞発達との関係は不明である。内分泌かく乱物質のリスクに対する評価方法を確立するためにエストロゲンやエストロゲン様内分泌かく乱物質による卵細胞機能に及ぼ

す作用を調べた。マウス卵巣から採取した卵母細胞をカルシウム蛍光色素 Fura-2 で染色し、顕微鏡下で自発的カルシウム振動測定と同時に明視野での形態変化解析をおこなった。また、単離状態だけでなく卵巣内での機能を確認するためにスライスを作成した。その結果、1) 単離卵母細胞だけでなくスライスした卵巣内でも卵母細胞は自発的カルシウム振動を示していることがわかった。（図 1 a 参照）。（図 2 参照）。2) エストロゲンの代表である E2 (17β -estradiol) はカルシウム振動を抑制するだけでなく、振動パターンも乱すことが判明した（図 1 b 参照）。

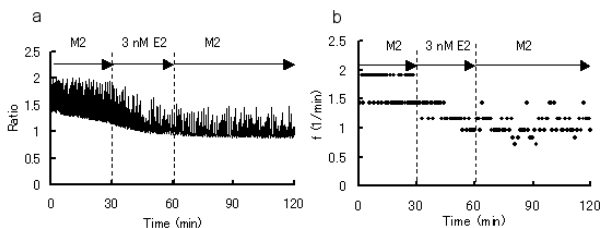


図1、E2によるカルシウム振動の乱れ。a:カルシウム振動 b:振動数変化

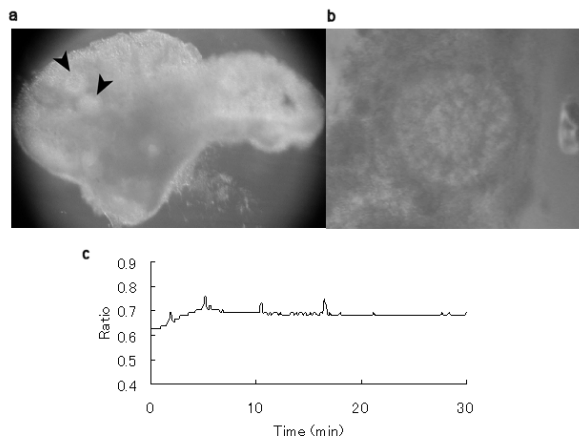


図2、a: スライスした卵巣(矢印は卵胞を示す)、b: aの拡大図、
c: 卵母細胞のカルシウム振動

上皮細胞濃度感受性ナトリウムチャネル

毛利達磨 (細胞内代謝研究部門)

吉田 繁 (近畿大学 理工学部 生命科学科)

小幡邦彦 (神経化学研究部門)

須谷康一 (近畿大学大学院 総合理工学研究科)

尾松万里子 (滋賀医科大学 第二生理学教)

Na^+ 濃度感受性 Na^+ チャネル Na_c ($c=\text{concentration}$)が存在すると考えられる上皮細胞(別称: タニサイト [tanyocyte])の機能を解明するためにマウス (C57BL/6J) 脳の内側隆起を含む部位の 150-250 ミクロン厚スライスを作成して Na^+ 感受性蛍光色素(SBF)で染色し、細胞外 Na^+ 濃度変化に対する第三脳室周囲部の応答を画像解析装置で観察した。140 mM Na^+ 標準細胞外液から高濃度 160-200 mM Na^+ 溶液に替えると、内側隆起各部の細胞内

Na^+ 濃度は持続的かつ可逆的に上昇した。他方、第三脳室側壁部および周辺部は高濃度 Na^+ 溶液に殆どまたは全く反応しなかった。単離したタニサイトをパッチクランプ法で調べたが、刺激後、 K^+ 電流が記録されるのみで興奮性は見られなかった。一方、球形の神経細胞は、自発放電を示し刺激に応じて Na^+ 電流を発生した。このことから脳脊髄液の Na^+ 濃度をモニターするタニサイトの感覚受容器としての役割が示唆された。

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・シナプス機能機構を2光子顕微鏡法を中心として、分子生物学的方法方法論、パッチクランプ、ケイジド試薬や電子顕微鏡を組み合わせ可視化定量化する研究を推進している。本年度はインタクトな膵臓ランゲルハンス島内の単一のインスリン開口放出

を直接可視化する方法論を開発した。また、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し、形態可塑性を誘発することに成功している。

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

調節性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ている。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。この方法は、細胞外の色素の濃度や状態が完全にコントロールできるので、開口放出に関係する融合細孔や小胞の性質を測定することが可能である。また、2光子励起法の同時多重染色性により、この開口放出現象への様々な分子の関与を調べることができるなど、数多くの特徴をもつ。本年は、この方法論をインタクトな膵臓ラ

ンゲルハンス島に適用して、臓器内のインスリン開口放出を検知することに成功した。その結果、臓器内の開口放出の際にも、融合細孔という不安定な小さな穴の形成があることが確認され、その穴を通る脂質の流入が細孔の開口に先行することを明らかにした。これは融合細孔が初期から膜脂質でできていることを示す新たな証拠となった。また、この過程でインスリン小胞の融合細孔は例外的に2秒ほど安定であることがわかってきており、融合細孔形成への分子機構を明らかにするのに格好な標本と考えられた。

2光子励起法を用いた大脳シナプスの研究

河西春郎, 松崎政紀, 早川泰之, 野口 潤, 安松信明

2光子励起法をケイジドグルタミン酸に応用して、大脳皮質錐体細胞の単一の興奮性シナプスを刺激し、更に、そのシナプスの機能を測定する方法を確立している。本年度は、この方法論で、シナプス可塑性が誘発する可能性について検討した。形態可塑性はwhole-cell clampした細胞では誘発しにくかった。そこで、スライスを培養して、gene gunでGFP遺伝子を導入し、whole-cell clampによる蛍光色素の導入無しに、形態可塑性を追跡する系を

立ち上げた。Mg free 溶液中で細いスパインを頻回刺激すると、刺激直後よりスパイン頭部の膨大がしばしば見られることがわかった。この膨大は10-30分で回復する傾向を見せるが、半分の例では、1時間以上に渉って持続した。この現象は非常に安定して見られるので、今後、その分子基盤や、グルタミン酸感受性の変化を調べることが可能である。

粘性依存性ゲート機構から予測されるイオンチャネルのダイナミックな構造

久木田 文夫

イカ Na チャネルや K チャネルは非電解質溶液中でその溶液粘性に比例した速度定数で構造変化を行う。この実験事実は Hodgkin と Huxley の古典的な記載にはない新しい実験事実であるが、最近の分子生物学的手法を用いたゲート機構の研究の成果により、矛盾なく説明できる。重要な点は下記の点である。

1) ゲート機構時間経過を決める重要な構造変化が水溶性部分の構造に存在する。

2) 水溶性部分の構造変化は短く速いステップが無数に連続して起こることに対応し、タンパク質の主鎖や側鎖の連続的な構造変化（フォールディングやデフォールディングなど）がその主体であり、堅い構造の単純な並進・回転ではない。

このような考えは電位センサー(S4)が膜貫通セグメント(S1, S2, S3, S5, S6)で囲まれた筒(S4 チャネル)をピストンのように移動するという考え方とは相容れない。しかし、最近では親水性のラベルが S4 の多くの部

分を修飾できることから、S4 チャネルは完全な筒状ではなく、ごく一部のみが縊れて膜電位を感受できるような構造をとり、S4 の他の部分は水溶液面に露出していると考えられるようになってきた。

2003年の春に MacKinnon らは好熱菌 (*Aeropyrum pernix*) の Shaker 型 K チャネル (KvAP) の X 線による構造解析の結果を発表した。これによると電位センサーは S4 と S3 の 1 部と S3-S4 リンカーで櫂のような構造を持ち、静止時は細胞内水界面でチャネルの周辺部に位置し、脱分極時は櫂で漕ぐ時のように回転し、細胞外の水中に大きく露出することを示した (Paddle Model)。

上記のモデルで粘性依存性のゲート機構を説明するは容易である。この場合も堅い構造の電位センサー Paddle が回転するだけでは不十分で、それ自体特に水中に露出する部分の柔らかさや構造変化、ないしは S4-S5 リンカーなど柔軟さ重要であると推察される。

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）やトランスポーター（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ー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索する。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フィンセンサーや、他のチャネルやトランスポーターの制御にも関与する多機能性タンパク質である。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。

乳酸アシドーシス性の神経及びグリア細胞腫脹の持続は容積感受性アニオンチャネルの傷害による

森 信一郎, 鍋倉 隆, 森島 繁, 岡田泰伸

脳虚血に伴われる乳酸アシドーシスは、ニューロンとグリア細胞に持続的細胞膨張をもたらして、脳腫脹とそれに続く細胞死を引き起こす。通常は一定に維持される細胞の容積が、乳酸アシドーシス環境下では持続的に増加するので、容積調節機能が障害されていることが推定された。そこで私達はこの可能性を神経分化させた NG108-15 細胞と脳グリオーマ由来の C6 細胞を用いて検討した。その結果、両細胞とも酸性乳酸含有液中では、図 1 のようなメカニズムによって膨張を示し、その膨張は長時間持続した。この条件下では、Regulatory Volume Decrease (RVD) と呼ばれる容積調節に関与する容積感受性アニオンチャネルの活性が失われていることが明らかとなった。事実、両細胞で低浸透圧条件に置いたときの浸透圧性膨張後に見られる RVD が乳酸アシドーシス条件下では見られなくなることが判明した。更には、その乳酸アシドーシス性膨張の持続は、グラミシジンによるカチオンチャネルの導入によっては影響を受けないのに対し、ピロリ菌毒素による外来性アニオンチャネルの

導入によって速やかに阻止されて、正常容積に回復することが示された。これらの結果は次の 2 つの論文に報告した (Mori, Morishima, Takasaki & Okada 2002 Brain Res. 957, 1-11; Nabekura, Morishima, Cover, Mori, Kannan, Komune & Okada 2003 Glia 41, 247-259)。

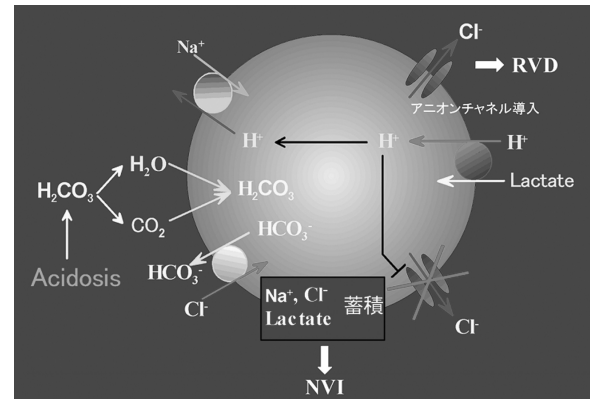


図 1. 乳酸アシドーシスによる細胞膨張メカニズムとアニオンチャネル導入による回復（RVD：調節性容積減少、NVI：ネクロシス性容積増加）。

CFTR による容積感受性アニオンチャネルの抑制は第 2 ヌクレオチド結合領域によって仲介される

赤塚結子, I.F. Abdullaev, E.L. Lee, 岡田泰伸, R.Z. Sabirov

嚢胞性線維症の原因遺伝子の産物である CFTR は、ABC トランスポーターのファミリーに属しながら cAMP 依存性 Cl⁻チャネルとして機能するユニークなタンパク質である。最近、CFTR は他のチャネルのレギュレータとしても働く多機能性タンパク質でもあることで注目されている。多くの細胞に発現していて容積調節に関与する容積感受性・外向整流性アニオンチャネル (VSOR) もまた、CFTR によってダウンレギュレーション（下方制御）される（図 2）。ORCC アニオンチャネルや ENaC ナトリウムチャネルや ROMK2 カリウムチャネルへの

CFTR の制御の場合には、第 1 ヌクレオチド結合領域 (NBD1) が重要な役割を果していることが知られているが、VSOR 制御のメカニズムは不明であった。私達は、CFTR とその種々の変異体を HEK293T 細胞の形質膜に強制発現させ、VSOR チャネル電流への影響を観察した。その結果、NBD1 ではなく、NBD2 の ATP 水解性のコンフォーメーションが、CFTR による VSOR 制御に不可欠であることが明らかになった。これらの結果は次の論文に報告された (Y. Ando-Akatsuka, I.F. Abdullaev, E.L. Lee, Y. Okada & R.Z. Sabirov 2002 Pflügers Arch. 445, 177-186)。

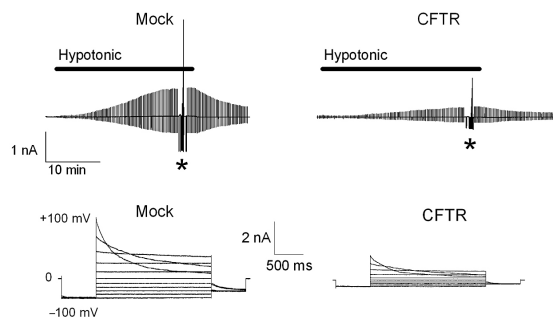


図 2. CFTR 発現による容積感受性アニオンチャネル電流の抑制。A) 保持電位 0 mV から±40 mV の交互パルスをかけて全細胞 Cl⁻電流の時間的変化を記録。B) -100 mV から+100 mV まで 20 mV ずつのステップパルス（A の星印の所で）かけて Cl⁻電流の電圧依存性を観察。

アラキドン酸による ATP 放出性アニオンチャネルの制御

A.K. Dutta, 岡田泰伸, R.Z. Sabirov

マウス乳腺由来の C127 細胞は浸透圧性膨張時に著しい ATP 放出を示すが、この経路は約 400 pS の大型単一チャネルコンダクタンスを持つマキシアアニオンチャネル VDACL であることを私達は示した (Sabirov, Dutta & Okada 2001 J. Gen. Physiol. 118, 251-266)。今回この浸透圧性 ATP 放出も VDACL も共に同じ生理的濃度 (K_d~5 μM) のアラキドン酸で可逆的に抑制されることを示し、VDACL が ATP 放出を担う更なる証拠を提出した。アラ

キドン酸の効果はオキシゲナーゼによる代謝産物（ロイコトリエンやプロスタグランジンなど）によるものではなく、それ自身による直接効果であることが判明した。アラキドン酸は荷電型として VDACL の細胞内側の結合サイトに結合して奏効することが明らかになった。これらの結果は次の論文に報告された (A.K. Dutta, Y. Okada & R.Z. Sabirov 2002 J. Physiol. 542, 803-816)。

生体情報研究系

神経情報研究部門

【概要】

われわれの研究室では哺乳類神経系の発生・分化機構について研究している。特に神経上皮細胞（神経幹細胞）からどのようにして全く機能の異なる細胞種（神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトなど）が分化してくるのか、について興味を持って研究を進めている。また、得られた新しい概念や技術はできるだけ社会の役に立てよう努めており、臨床研究への応用を視野に入れながら、病態の解析にも努力している。脳神経系の発生・分化を考えると、内因的要因（遺伝子に支配されるもの）および外因的要因（外部からの刺激・情報により分化方向が規定されるもの）に分けて考えるのは当然であるが、脳神経系では他の組織の発生とは異なり特徴的なことがある。それは多様性である。一言に神経細胞と言っても顆粒細胞、錐体細胞などいろいろな形態の細胞があるし、大脳皮質の錐体細胞はどの領野の細胞かによりその機能が異なる。また、神経伝達物質の種類も様々である。大げさに言えば、神経細胞は一つ一つが個性を持っており、そのそれぞれについて発生・分化様式を研究しなければならない程である。また、均一であると考えられてきたグリア細胞（アストロサイト、オリゴデンドロサイト）にも性質の異なる集団が数多く存在するこ

とも明らかとなってきた。そのため、他の多くの細胞種や組織の分化研究とは異なり、細胞株や脳細胞の分散培養系を用いた研究ではその本質に迫るには限界がある。われわれは *in vitro* で得られた結果を絶えず *in vivo* に戻して解析するだけでなく、神経系の細胞系譜の解析をも精力的に行っている。脳神経系への遺伝子導入系として開発した高力価レトロウイルスベクターは癌の遺伝子治療に最適なベクターであるので、グリオーマや肺癌をターゲットとした応用を考えた研究を進めており、臨床応用も間もなくスタートできそうである。また、癌治療の新たなターゲット分子も見いだしたので、その応用も検討中である。

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の解析

鹿川哲史 竹林浩秀 中平英子 清水健史 政平訓貴（岡崎国立共同研究機構・生理学研究所）

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、跳躍電動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活性があることを示してきた。この活性を担う分子の候補として、今回、脊髄背側に発現する Wnt ファミリーに着目し、*in vitro* さらには *in vivo* においてこれらがオリゴデンドロサイト分化を負に制御することを示

した。

また、転写因子の Olig2 を同定し、機能発現実験および機能喪失実験により 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示してきた。Olig2 遺伝子座に誘導性 Cre リコンビナーゼをノックインしたマウスを作製し、タモキシフェン投与時に Cre が活性化するシステムを確立した。このシステムに加え、エレクトロポレーション法と 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追跡実験を行った。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、

さらに、移動経路・遺伝子発現の異なる 2 つの分化のターンがあることを見いだした。それぞれファースト・

ウェーブ、セカンド・ウェーブと名付け、さらに詳しく解析している。

アストロサイトの分化・発生様式に関する研究

長谷川明子, 小川泰弘, 竹林浩秀, 池田一裕 (岡崎国立共同研究機構・生理学研究所)

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シスタチン C (CysC) に着目して研究してきた。CysC は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オリゴデンドロサイトの分化が促進されることが明らかとなった。

また、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, 出口章広, 池田一裕
(岡崎国立共同研究機構・生理学研究所)

細胞表面を覆うように存在する膜蛋白質のほとんど全てに糖鎖修飾が存在し、細胞間相互作用を介して脳の発生・分化や細胞変性疾患やガン化の機能発現に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。

この方法は固定後の組織からも解析可能であることから、新潟大学脳研究所との共同研究でヒトの中枢神経変性疾患の脳内糖鎖解析を行った。その結果、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で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。(藤本)

次に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。その結果、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。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 を駆使して同定を行った。この結果、脳特徴的な糖鎖が脳の発生・分化および形態形成に重要であると考えられた。(池田)

一つの糖鎖構造の生合成には数十種類の糖転移酵素が必要であり、糖鎖合成酵素群の網羅的な遺伝子発現の解析が不可欠であった。そこでマウス糖鎖生合成酵素遺伝子 108 個をクローニングし、DNA アレイを完成させた。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、網羅的な解析が可能となり合成酵素の動態と糖鎖構造との関連を明らかにする。(石井)

培養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。ガン転移肺から摘出してきた B16 組織では多くの糖鎖構造が培養時と異なり肺組織の糖鎖発現と類似したパターンを示した。この糖鎖パターンは転移組織を培養系に戻すと崩れてしまうことからガン細胞の生着維持に細胞表面糖鎖が重要であると考えられた。(佐久間)

肝臓は組織的にほぼ均一であり、容易に初代培養や再生肝を作成可能であることから培養時、増殖時に変化するであろう糖鎖構造を解析した。その結果、一部の糖鎖構造の増減が明らかとなり、報告されている肝ガンのも

のとは異なるものであった。このことは正常増殖する際と病体時での増殖とでは全く違う役割が細胞表面糖鎖に存在することを示すものであった。(出口)

癌遺伝子治療の基礎研究

片倉浩理，福政良枝，中島弘文，池田一裕（岡崎国立共同研究機構・生理学研究所）

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。MAGE-E1 に対する3種類のペプチド性抗体を作製し、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発現抑制方法について検討中である。

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。

モデルマウスを用いた脱髄の病態解析および治療法の検討

松本路生，田中久貴，山田 元，池田一裕（岡崎国立共同研究機構・生理学研究所）

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した結果、移植後の神経幹細胞が分化せず、未分化なまま移植部位近辺に留まっていることが明らかとなった。このことから脱髄巣においてはオリゴデンドロサイトの分化が抑制

されていることが考えられた。これらの因子を DNA マイクロアレーを用いて検討している。

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。

液性情報研究部門

【概要】

液性情報研究部門では、これまで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きた。しかし近年の分子的情報の急激で莫大な増加に比較して、分子と個体を結びつける領域の研究が不十分であり、またその領域の研

究がますます重要となって来ていることを考え、研究部門の方向性を変えてきた。本年度はその転換期であり、宮田助教授、佐竹助手が着任した。今後、電気生理的手法を中心として、分子を基盤とした神経回路の機能解析を中心的なテーマとして研究活動を進めていく予定である。

Ca²⁺チャネル変異マウスにおける神経回路異常の検索

松下 かおり, 佐々木 幸恵, 井本 敬二

脳の主要な Ca²⁺チャネルサブタイプである P/Q 型 Ca²⁺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。マウスでは, tottering, rolling, leaner などの変異が知られている。しかし Ca²⁺チャネルの異常が, どのようにして種々の神経症状を引き起こすのかという疑問は解決されていない。

tottering, rolling Nagoya の小脳スライス標本を用いて, 平行線維—プルキンエ細胞 (PF-PC) および登上線維—プルキンエ細胞 (CF-PC) シナプス等での興奮性シナプス後電流を whole-cell patch clamp 法を用いて測定した。また形態学的な検討を加えた。

昨年度 PF-PC シナプスの EPSC が症状に関連して減弱しているのに対して, CF-PC シナプスの EPSC (CF-EPSC) の大きさは, tottering では著変なく, rolling ではむしろ増加していることを報告した。本年度は, CF-EPSC が保たれているかを系統的に検討した。外液カルシウム濃度を変化させた場合, CF-PC シナプスでは Ca²⁺濃度を増加

させても EPSC が飽和の傾向を示のに対して, PF-PC シナプスでは, EPSC が Ca²⁺濃度の 3-4 乗に比例する古典的な関係を示した。シナプス間隙のグルタミン酸濃度の増加は見られないが, シナプス後膜グルタミン酸受容体の感受性の増加が rolling マウスで観察された。またいずれの変異マウスでも N 型 Ca²⁺チャネル依存性が大きいことが認められた。さらに形態学的な検討から, 一次, 二次樹状突起では通常観察されない棘突起が rolling では頻繁に観察された。

これらの結果は, 変異による影響はもともとのシナプスの性質に大きく依存しており, 高放出確率のシナプスは影響を受けにくいことが示された。またグルタミン酸受容体の性質の変化や形態学的な変化など, 観察されたいろいろな変化は, Ca²⁺の働きが不十分であるために, 正常な発達に伴う変化が阻害されて生じてきたものと解釈される。

GFP を用いた蛍光カルシウムプローブ G-CaMP の改良体の開発

中井 淳一, 大倉 正道

G-CaMP は分子内に 1 つの緑色蛍光蛋白 (GFP) をもつ蛍光カルシウムプローブである。G-CaMP は Ca²⁺の結合に伴い比較的大きな蛍光強度の増大を示すことが長所であるが, 蛍光強度が弱いことや pH 感受性を示すことが短所であった。そこで本研究では G-CaMP の改良を試みた。GFP の発色団形成を促進することが報告されている V163A/S175G のアミノ酸変異を G-CaMP に導入したところ, この変異体 (G-CaMP1.6 と命名) は G-CaMP に比較して, (1) 約 40 倍明るく, (2) pH 感受性が低く, (3) Ca²⁺と同程度のイオン半径を有する 2 価カチオンの

選択性が高く, (4) 短時間に発色団を形成することが見いだされた。このことは G-CaMP1.6 が G-CaMP よりも蛍光カルシウムプローブとして優れていることを示す。

一方, G-CaMP の Ca²⁺感受性については, G-CaMP の場合よりもやや高親和性側にシフトしていた。そこでわれわれは G-CaMP1.6 分子中のカルモジュリンの Ca²⁺結合部位にアミノ酸変異を導入し, Ca²⁺親和性の異なる変異体を作製した。

炎症性疼痛における視床 mGluR1-PLC β 4 カスケードの制御機構

宮田 麻理子

近年の研究で、末梢から脊髄レベルにおいて、痛覚を担う分子基盤は明らかになってきたが、視床より上位中枢では、ほとんど明らかになっていない。phospholipase C β 4 (PLC β 4) は、代謝型グルタミン酸受容体 1 型などの三量体 G 蛋白の Gq/11 結合型受容体に共役し、IP₃、PKC を駆動し、シナプス機能に重要な働きをする酵素である。我々はマウス視床 VB では PLC β 4 が唯一の PLC のアイソフォームであることを明らかにした。さらに、この分子が、体性感覚情報とりわけ体性痛覚の情報処理に寄与するか否かを調べるため、PLC β 4 の遺伝子欠損マウスを用いて、疼痛関連行動の解析を行った。ノックアウトマウスは、hot plate test, tail flick test などの急性痛は野生体と比べて有意な差は認められなかった。しかしながら、ホルマリンテストによる炎症疼痛行動は有意に減弱していた。一方、末梢の炎症所見、炎症性疼痛の脊髄後角で神経活動性を反映する c-FOS 発現には差がないことから、PLC β 4 は炎症性疼痛に寄与しその作用部位は、脊髄より上位であることが示唆された。さらに我々は、

マウスでの脳室内投与法、視床内投与法を確立し、野生体に PLC またその上流にグルタミン酸受容体 1 型 (mGluR 1) の阻害剤、拮抗薬を投与すると同様に炎症性疼痛が減弱した。これらの結果から、mGluR1-PLC β 4 のカスケードが視床レベルで炎症性疼痛の修飾に関わっていることが明らかになった。さらに、炎症性疼痛試験時の視床 VPL 単一神経細胞の活動を、麻酔下の PLC β 4 ノックアウトマウス、野生マウスで細胞外記録法を用いて調べた。野生マウスでは疼痛関連行動の時間経過と良く一致して神経活動が見られるのに対し、ノックアウトでは炎症性疼痛に伴う神経活動が有意に減弱していた。これらの結果から、mGluR1-PLC β 4 カスケードが視床 VB の神経活動性を調節することによって、炎症性疼痛をコードしていることが明らかになった。VB の mGluR1 は大脳皮質から視床への feedback シナプスの後膜側のみに存在するため、今後は皮質－視床への feedback シナプスの特性と作動様式さらに、mGluR1 による修飾機構を解析する予定である。

成熟ニューロンにおける cdk5 の機能の検索

佐竹伸一郎，井本敬二

小西 史朗（三菱化学生命科学研究所）

Cyclin-dependent kinases (cdks) は、細胞周期の制御に重要なタンパク質リン酸化酵素である。Cdk ファミリーの一つ cdk5 は、成熟ニューロンに多く発現することから、細胞周期の制御とは別の役割も担うと予想される。シナプス機構における cdk5 の機能を検索するため、2 週齢ラットから作成した小脳スライスでパッチクランプ記録を行い、cdk5 特異的阻害薬 roscovitine がシナプス伝達におよぼす作用を調べた。Roscovitine を灌流投与すると、籠

細胞-プルキンエ細胞間の抑制性シナプス伝達および平行線維-プルキンエ細胞間の興奮性シナプス伝達は顕著に増強された。量子解析から、この阻害薬は神経伝達物質の放出確率を増大させることが示唆された。一方、登上線維-プルキンエ細胞間の興奮性伝達に roscovitine は無効であった。Cdk5 は、シナプスの種類特異的かつ複数の機構により、小脳の神経伝達制御に関わると推定される。

高次神経機構研究部門

【概要】

本研究部門では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・再編成に関わる遺伝子を欠損させたマウスの作製を主に行っている。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ので Fyn チロシンキナーゼとの結合活性を指標に新規分子をスクリーニングしたところ、新規カドヘリン様細胞接着分子である CNR (Cadherin-related neuronal receptor) を単離する事が出来た。この CNR はシナプスに局在し、さらに細胞外ドメインにカドヘリンモチーフを有することから神経細胞接着や認識に関わることが予想される。また、これまでの解析結果より CNR には 14 種のファミ

リー分子が存在し、それらの遺伝子は免疫グロブリンや T 細胞受容体の遺伝子に似たクラスター構造をとること、CNR の転写産物に体細胞変異が見つかったことなどが明らかになった。以上のことより、CNR はシナプスでの選択的細胞接着と免疫系でのイムノグロブリンや T 細胞受容体と類似した多様化機構を兼ね備えた分子であり、中枢神経系における多様化と組織化をもたらす分子であると予想される。この分子機能の解析を進めることにより、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。また、近年では脳機能解析における新しい手法としてクローンマウス用いた系を導入する他、遺伝子変換ラット作製系の開発も試みている。

CNR カドヘリン分子群多様性の機構解析

先崎浩次, 八木 健

マウス CNR 分子群は細胞外領域の異なる 14 種類の遺伝子ファミリーからなり、14 種類全てが中枢神経系において発現している。これまでに、各 CNR mRNA が神経細胞ごとに組み合わせで発現していることを示し、また、作製した複数の CNR 分子種特異抗体による成体マウス脳での免疫染色法の結果から、各 CNR 蛋白質の脳領域による局在性の違いが認められた。以上の結果は各 CNR

の分子機能が異なる可能性を示唆する。各 CNR 分子間のアミノ酸配列比較から細胞外 EC2-3 領域の相同性が低く、この領域に CNR 分子群の分子機能上の違いのある可能性が示唆され、EC2-3 領域に対するマウスモノクローナル抗体を作製を行った。現在、得られた抗 CNR EC2-3 領域抗体を用いて CNR EC2-3 領域の分子機能解析を行っている。

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、神経発生と維持に関わることが知られている。私は Whole mount in-situ hybridization, 及び免疫組織化学を用いて、発生段階におけるゼブラフィッシュ CNR 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・領域と一致して CNR の発現が見られ、特に軸索に CNR タンパクが局在することが分かった。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、神経細胞分化の起こる領域に同調してアポトーシスが観察され、かつ axon の伸長異常と、網膜視蓋経路の形成不全が見られ、神経発生、軸索形成時における CNR の関与が示唆されている。

CNR 遺伝子欠損マウスの作製

平林敬浩, 八木 健

CNR 分子の機能を個体レベルで解析することを目的として, CNR 遺伝子欠損マウスの作製を進めている。クラスター型遺伝子構造をもつ CNR 遺伝子には 14 個の可変領域エクソンと 3 つのエクソンからなる共通領域が存在し, 各 CNR ファミリーはそれぞれひとつの可変領域エクソンと共通領域から転写される。そこで本研究ではまず, 共通領域エクソンを挟む形で 2 カ所に loxP 配列を

遺伝子ターゲティング法により導入し Cre-loxP 系を用いることで全ての CNR ファミリー遺伝子が欠損するマウスの作製を試みている。また, 同時に各 CNR ファミリーの可変領域エクソンを効率よく欠損させるためにトランスポゾンを用いた新しい遺伝子欠損法の開発も行っている。

ラット ES 細胞の樹立とそれを用いた遺伝子変換ラット作製系の開発

金子涼輔, 八木 健

ラットを用いた遺伝子変換動物作製を目指すなかで, ラット ES 細胞株の樹立を試みた。マウス ES 細胞樹立方法にしたがい, ラット胚盤胞をラット繊維芽細胞上で培養を行った結果, 培養 5 日目には大きな細胞塊を形成した。この細胞塊をトリプシンで処理し継代を行ったところ, 4~5 日後に未分化細胞マーカーのアルカリホスファターゼ陽性のコロニーが現れた。しかし, この継代を繰り返すにつれ未分化コロニーが失われてゆき, 4 回目の

継代の後には現れてこなかった。この結果は, ラット ES 細胞は, マウス ES 細胞での培養条件では未分化状態を保てない可能性を示唆している。そこで, ラット LIF をクローニングして発現ベクター中に導入して使用した。しかし結果は同様で, 未分化状態のラット ES 細胞を樹立することはできなかった。コロニー解離方法や血清ロット, 培地成分等の検討を行ったが樹立法の確立には至らなかった。

クローンマウス作製による分化神経細胞核における核情報変換の解析

牧野初音, 八木 健

神経細胞分化過程において核情報の変換が生じることが示唆されていたことから, 単一神経細胞核のゲノム DNA の遺伝情報を明らかにすることを目的として, 生後 0-4 日齢のマウス大脳皮質由来の単一神経細胞核を用いてクローンマウス胚の作製を試みた。その結果, 42 匹の胎生 10.5 日目クローンマウス胎仔が得られ, その内の 40 匹に形態異常（神経管閉鎖不全など）が観察された。この形態異常の出現頻度は, 胎生期の分化神経細胞核よ

りもはるかに高く, また他の体細胞核クローンマウス胎仔では神経管での異常はほとんど認められなかったことから, 分化神経細胞核では, 細胞分化の進行に従って, 核情報変換が不可逆的に生じている可能性が強く示唆された。現在, 分化神経核由来のクローン細胞の細胞分化能力を, 正常胚との集合キメラマウスを用いて解析している。

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

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の誘発活動 (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。

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および眼球運動関連領域ニューロン活動の変容, (4) 大脳皮質における情報の補完の仕組み, 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

従来の初期視覚系研究においては輪郭線の表現における直線成分や縞刺激の傾きに対する選択性の寄与が重視されてきたが、輪郭線の折れ曲がりや分岐もまた輪郭線の三次元的な構造を表現する重要な手掛かりである。注視課題遂行中のサルは第二次視覚野から細胞外記録を行い、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選択性を詳細に調べた。これまで我々は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) に対して特異的な反応選択性を示す細

胞が多数存在することを見いだした。本年度は刺激中の直線成分を単独で提示した際の反応をもとに、折れ曲がり刺激を構成する直線成分に対する反応と折れ曲がり刺激に対する反応との関係を検討した。その結果、最適な直線成分に対する方位選択的な興奮性の入力に加えて、不適当な直線成分に対して働く方位選択的な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。以上の結果は第二次視覚野が輪郭線の折れ曲がりや分岐を検出する最初のステップであることを示唆する。

初期視覚系における面の表現。光計測による解析

谷 利樹, 横井 功, 伊藤 南, 小松英彦
田中 繁 (理研)

近年初期視覚系のニューロンが輪郭線の表現だけではなく面の表現とも関係していることが指摘されるようになったが, そのような面情報解析の神経メカニズムはまだ明らかではない。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, ネコ初期視覚野における神経活動を内因性信号による光計測により調べたところ, 我々は 18 野に面の輝度反転により活動する領域 (面反応領域) が 17/18 野に沿うようにいくつかに分かれて存在することを見いだした。この領域の内外で細胞外記録を行ったところ, 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。本年度はこのような面反応領域と線の

表現との関係を調べる為に, 面反応領域の内外のニューロンの直線ないしはさまざまな空間周波数の縞刺激に対する反応を調べた。その結果, 面刺激に反応するニューロンの多くは 0.5cycle° 以下の低い空間周波数を持つ縞模様に対しても選択的な反応を示すことが明らかになった。面反応領域の内外で最適な空間周波数を比較すると, 同じ 18 野内でも面反応領域内でより低い空間周波数に偏ることが明らかになった。特に 0.08cycle° の縞刺激ないしは面刺激に対してよく反応するニューロンは領域内にのみ多数存在し, 面反応領域を形成していると考えられる。

トップダウン性注意がサル V4 野と前頭眼野のニューロン活動に及ぼす影響

小川 正, 小松英彦

視覚探索では, 刺激の目立ちやすさ (visual saliency) は目標となる対象を探すための重要な要因となる。しかしながら, 日常生活で通常経験する視野には異なる特徴次元で目立つ刺激が複数個あるため, その中から必要な対象を探すためにはトップダウン的注意によって探索に有効な特徴次元を選択する必要がある。特定の特徴次元に向けられた注意が, 視覚探索の神経機構に及ぼす影響を調べるため, 多次元視覚探索課題をサルに行わせて V4 野と前頭眼野からニューロン活動を記録した。課題では 2 種類の色と形から成る刺激が注視点の周りに 6 個呈示され, その中には色及び形次元で異なる刺激が 1 つずつ (目標, 妨害刺激) 含まれる (例えば, 1 つの赤四角, 1 つの緑丸, 4 つの緑四角)。サルは色, または形次元で目立つ刺激に向かってサッカードを行うと報酬がもらえる

が, どちらの次元で目立つ刺激を目標とするかは試行ブロックごとに切り替えられる。得られたニューロン活動を解析した結果, V4 野ニューロンは受容野内の刺激が周囲の刺激に対して色または形のどちらの次元で異なるかに依存して活動が変化した。また, どちらの特徴次元に注意すべきかを切り替ええると, 探索に有効な特徴次元で目立つ刺激へのニューロン活動は増強させたが, 有効でない次元で目立つ刺激へのニューロン活動は減弱させた。これに対し前頭眼野では受容野内の刺激がどちらの特徴次元で目立つ刺激かにはよらず, サッカードの目標刺激となった場合にニューロン活動を増大させた。しかし, 目立つ刺激が受容野内に呈示されてもサッカード目標とならない場合は, 活動の増加はわずかであった。

盲点における線分の補完知覚に対応したサル 1 次視覚野神経活動

松本正幸, 小松英彦

盲点の両側に 2 本の線分が同一直線上に呈示されると、盲点には網膜からの入力がないにも関わらず、一本のつながった線分が知覚される。このような補完知覚が生じるとき、サル大脳皮質一次視覚野 (V1) で盲点に対応する視野を表現している領域 (盲点表現領域) のニューロンが、線分の知覚される長さに関連した活動をするのかどうかを調べた。このために線分刺激を一方の眼の盲点付近の視野に呈示し、線分的一端を盲点外に固定したま

まもう一端を盲点の中心に向かって伸ばしていった時に、V1 ニューロンの活動がどのように変化するかを調べた。非盲点条件において線分が長くなるにつれて徐々に活動を上昇させたニューロンの多くが、盲点条件において補完が生じる線分の長さで非連続な活動の上昇を示した。この結果は、V1 の盲点表現領域に、補完知覚に対応した活動をするニューロンが存在することを示唆する。

生体調節研究系

生体システム研究部門

【概要】

生体システム研究部門は、これまで歩行運動の中枢制御機構について研究を進めてきた。平成14年3月に森茂美教授が定年退官した後も、森 大志、橘 篤導らを中心に継続して研究が行われてきている。11月に南部篤が東京都神経科学総合研究所から着任し、大脳皮質-大脳基底核連関による随意運動の制御機構の解明という、新たな研究テーマを立ち上げた。このことにより、当研究部門は、大脳皮質、大脳基底核、小脳、脳幹などを中

心に、手指を精緻に動かすような随意性の高い運動から、歩行や咀嚼のように半ば自動化されたものまで、幅広い運動の脳内機構について、包括的に明らかにするというテーマで研究することとなった。南部が着任早々、喜多均教授（テネシー大学医学部）が日本学術振興会の外国人招へい研究者として当研究部門での共同研究を開始し、結果的に研究室の立ち上げが加速された。

大脳皮質-線条体-淡蒼球外節-視床下核-淡蒼球内節路（いわゆる間接路）について

南部 篤，喜多 均（テネシー大学医学部）

橘 吉寿（大阪大学大学院歯学研究科，東京都神経科学総合研究所）

大脳皮質を電気刺激して、大脳基底核の出力部である淡蒼球内節から記録を行うと、早い興奮・抑制・遅い興奮という3相性の応答が得られる。これまでの研究により早い興奮は、大脳皮質-視床下核-淡蒼球路（ハイパー直接路）を、抑制は大脳皮質-線条体-淡蒼球路（直接路）を介することがわかっている。本年度は、遅い興奮の由来について調べた。その結果、直接路による抑制のリバウンドによるものと、大脳皮質-線条体-淡蒼球外節-視床下核-淡蒼球内節路（間接路）を経由するものがあり、後者によるものが多いことがわかった。次に、このような

経路が実際に、どのような情報を運んでいるかを解析する手始めとして、ムシモル注入により視床下核をブロックし、その前後で淡蒼球ニューロンの体性感覚応答を調べた。その結果、視床下核をブロックすると、淡蒼球ニューロンの反応性が大きく変化することがわかった。このことは、ハイパー直接路や間接路が、実際の生理的条件下でも働いていることを示唆している。今後は、このような神経経路が実際の運動遂行時に、どのような情報を運んでいるか明らかにしていきたい。

糖代謝 PET による障害物回避二足歩行運動の実行に関与する脳部位の同定

森 大志，中岡克己（近畿大学），橘 篤導，高須千慈子

塚田秀夫（浜松ホトニクス（株）），森 茂美（生理研名誉教授）

サル直立二足歩行モデルは障害物を設置したトレッドミルベルト上歩行（障害物回避歩行課題）で、予測的な下肢関節屈曲ストラテジーの動員により障害物上に十分な空間を作成し、これにつまずくことなく乗り越えることができる。サルモデルは適応・予測制御機序などの高

次な脳機能を動員してこの課題を解決したと考えられる。本研究ではこれまでに確立した無拘束動物-糖代謝 PET 法により、障害物回避歩行課題の実行に伴い、賦活される脳領域の同定を試みた。サル歩行モデルに $[^{18}\text{F}]$ -FDGを投与し、障害物回避歩行課題を実行させた。対照課題

(座位姿勢) に対し、補足運動野、一次運動野、視床、小脳で優位に糖代謝が亢進した。水平トレッドミル二足歩行課題に対しては補足運動野、視床で脳糖代謝の亢進が

観察された。これらの結果からより複雑な歩行課題に対し、サル歩行モデルは高次脳内の様々な要素的神経制御機構を動員してこれを解決していることが示唆された。

大脳皮質運動野の直立二足歩行運動に関わる機能的意義の同定

森 大志, 中岡克己 (近畿大学), 南部 篤, 稲瀬正彦 (近畿大学), 森 茂美 (生理研名誉教授)

脳糖代謝PET法により水平トレッドミルベルト上二足歩行運動の実行に際し、サル歩行モデルは一次運動野(M1) および補足運動野(SMA) での神経活動の増強が示唆された。本研究ではこれらの領域が直立二足歩行運動の実行に際し、どのような機能的意義を有するかを同定することを試みた。実験に先立ち、トレッドミルベルト上での二足歩行運動能力を獲得した成サルの大脳皮質運動野を皮質内微小電気刺激法でマッピングした。機能

的意義の同定はムシモル(GABA_A agonist) の局所注入により歩行運動機能を一時的に脱落させて行った。M1 への注入では注入部に限局した歩行運動障害(関節運動障害) が誘発された。SMA への注入では筋トーンの減弱に伴う姿勢障害が誘発された。これらの結果は大脳皮質運動野を構成する M1 および SMA は直立二足歩行運動の実行に際して異なる機能的側面を担っている可能性を示唆する。

ネコ小脳歩行誘発野の機能的意義の同定

森 大志, 中岡克己 (近畿大学), 森 茂美 (生理研名誉教授)

左右の小脳室頂核からは同側性および交叉性の室頂核遠心路が始まる。この交叉性遠心線維は小脳白質正中線で交叉して鉤状束を形成する。この鉤状束には室頂核視床路などの上行性、室頂核網様体路などの下行性投射路が含まれる。除脳ネコ標本でこの鉤状束正中線(CLR) を連続微小電気刺激するとトレッドミルベルト上で制御歩行が誘発できる。本研究では無拘束・覚醒ネコ標本で姿勢および歩行運動に対する CLR の刺激効果を検討し

た。このため予め麻酔下で慢性微小電気刺激電極を CLR に刺入・留置した。麻酔手術から回復した後に無拘束下でネコの歩容をビデオ撮影した。左右の前後肢から筋活動を導出記録した。CLR に高頻度電気刺激を加えるとネコは歩行運動を開始し刺激を継続する間、歩行運動を持続した。四肢の運動は規則的かつ協調的であった。これらの結果は CLR が歩行運動の開始、基本的な四肢協調運動制御に関与していることを示唆する。

直立歩行若齢ニホンサルに与えた障害物回避歩行課題の学習機序

橘 篤導, 森 大志, 高須千慈子, 森 茂美 (生理研名誉教授)

若齢ニホンサルは長期に報酬付け運動学習により、多運動分節の機能を統合し、トレッドミル上での直立二足歩行能力を獲得する。本研究では二足歩行能力を獲得した若齢サルが障害物を設置したトレッドミル上での新しい歩行課題をどのようなストラテジーを動員して解決す

るのか、その学習過程での歩容の変化を運動力学的に解析した。高さ 3, 5, 7cm のブロック状の障害物 1 つを設置した。第 1, 2, 4, 12 日目の歩容を高速ビデオで撮影した。第 1 日目の試行ではいずれの高さの障害物にもつまずく頻度が高く、姿勢に大きな乱れが生じた。2 日目

になるとつまずく頻度が減少し、姿勢の乱れも小さくなった。4, 12 日目ではつまずく頻度がさらに減少した。2 日目以降では障害物の出現に備え、予測的に股関節を

屈曲させ、足と障害物との間に十分な空間を作ってそれを乗り越えた。障害物の認知の元で新たな下肢関節屈曲戦略を動員してこの歩行課題を解決した。

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連合記憶の順向性情報処理

Yuji Naya, Masatoshi Yoshida

Soichi Nagao, Yasushi Miyashita

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.

サル下部側頭葉における連合記憶形成の形態学的基礎

Masatoshi Yoshida, Yuji Naya

Soichi Nagao, Yasushi Miyashita

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 (selectivity of TEav neurons 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 reduced divergent projection resulted from acquisition of visual long-term memory, possibly through retraction of the projecting axon collaterals.

認知シフト課題遂行中のマカクサル大脳活動の磁気機能画像解析

Kiyoshi Nakahara, Toshihiro Hayashi, Seiki Konishi

(Department of Physiology, The University of Tokyo School of Medicine)

Yasushi Miyashita

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 cytoarchitecturally equivalent regions in the posterior part of ventrolateral prefrontal cortex. This comparative imaging provides insights into the evolution of cognition in primates.

メタ記憶の神経機構：パラメトリック磁気機能画像解析

Hideyuki Kikyo, Kenichi Ohki

(Department of Physiology, The University of Tokyo, School of Medicine)

Yasushi, Miyashita

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.

近時記憶の神経機構

Seiki Konishi, Idai Uchida

(Department of Physiology, The University of Tokyo, School of Medicine)

T Okuaki, T Machida, Ichiro Shirouzu (Radiology, Kanto Medical Center NTT EC)

Yasushi Miyashita

The prefrontal cortex plays a critical role in recollecting the temporal context of past events. The present study employed event-related functional magnetic resonance imaging (fMRI) and explored the neural correlates of temporal-order retrieval during a recency judgment paradigm. In this paradigm, after study of a list of words presented sequentially, subjects were presented with two of the studied words simultaneously and were asked which of the two words was studied more recently. Two types of such retrieval trials with varied (high and low) levels of demand for temporal-order retrieval were intermixed and compared using event-related fMRI. The intra-paradigm

comparison of high versus low demand trials revealed brain regions whose activation was modulated on the basis of demand for temporal-order retrieval. Multiple lateral prefrontal regions including the middle and inferior lateral prefrontal cortex were prominently activated. Activation was also observed in the anterior prefrontal cortex and the medial temporal cortex, regions well documented to be related to memory retrieval in general. The modulation of brain activity in these regions suggests a detailed pathway that is engaged during recency judgment.

認知シフトにおけるヒト前頭前野の半球間非対称性

Seiki Konishi, Toshihiro Hayashi, Idai Uchida, Hideyuki Kikyo, Emi Takahashi

(Department of Physiology, The University of Tokyo, School of Medicine)

Yasushi Miyashita

Functional organization of human cerebral hemispheres is asym-metrically specialized, most typically along a verbal-nonverbal axis. In this event-related functional MRI study, we report another example of the asymmetrical specialization. Set-shifting paradigms derived from the Wisconsin card-sorting test were used, where subjects update one behavior to another on the basis of environmental feedback. The cognitive requirements constituting the paradigms were decomposed into two components according to temporal stages of task events. Double dissociation of the component brain

activity was found in the three bilateral pairs of regions in the lateral frontal cortex, the right regions being activated during exposure to negative feedback and the corresponding left regions being activated during updating of behavior, to suggest that both hemispheres contribute to cognitive set shifting but in different ways. The asymmetrical hemispheric specialization within the same paradigms further implies an inter-hemispheric interaction of these task components that achieve a common goal.

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、神経細胞やグ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变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調べる。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、それらの分子の基盤を明らかにする。4) 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。

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

脳内における主要な抑制性伝達物質である GABA には、イオンチャネル型の GABA_A 受容体と G 蛋白共役型の GABAB 受容体が存在する。我々は、免疫電子顕微鏡法により GABA_B 受容体が小脳では GABA 作動性シナプスではなく、興奮性のグルタミン酸作動性シナプスの周囲により集積していることや、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、GABA_B 受容体が脳の部位により異なる役割を持っていることを示唆している。その後、GABA_B 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 GABA_B 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

舩山俊彦

黒質－線条体系は大脳基底核を構成する代表的な回路であり, 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。舩山は最近, 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, という見出しをした。

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 日目までに 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棘ニューロンへの 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。

ラット脊髄視床路ニューロン活動性の解析

初山明子

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

チャネル活性がみられ、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】

大脳皮質の各領域は、基本的に同じ構成の回路を出入力の違いに応じて変えることで、柔軟で多様な情報処理をしている。皮質はコラムとよばれる基本単位からできていると考えられているが、その内部回路についてはあまり解明されていない。私たちはこれまでに、前頭皮質や、それが投射する線条体のニューロンを、軸索投射・発火・物質発現パターンからいくつかのグループに分類し、それらの生理的性質・神経結合・伝達物質作用などを解析してきた。その結果、局所回路の基本的構成を定性的には明らかにすることができた。今後は、皮質の各

ニューロンタイプ間の神経結合選択性を解剖学的・生理学的手法を組み合わせることで、定量的に調べることで、皮質ニューロンの多様性の意味、各ニューロンタイプの役割、特異的神経結合の必然性を理解することと、皮質から線条体に信号を送る錐体細胞の活動がどのように決められているのかを明らかにすることを目標にしている。本年度は、線条体へ投射する錐体細胞への入力解析、GABA 細胞サブタイプの軸索分布の定量化やカルレチニン陽性終末の形態的同定を進めた。

大脳皮質のカルレチニンと VIP 陽性神経終末の構造

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。これらは、それらが含有する神経化学物質の違いにより分類すると、大きく 3 つのサブグループに分ける事ができる。この中で、VIP もしくはカルレチニンを含有するサブグループが知られている。それらの神経終末の構造を電子顕微鏡を使って検討した。VIP 陽性神経終末は、対称性のシナプス膜の肥厚を示しており、ターゲットは樹状突起、棘突起とわずかに細胞体であった。また、カルレチニン陽性神経終末は大半が

非対象性であり、わずかに対称性の膜の肥厚を示すものがあつた。ターゲットは、樹状突起、棘突起とわずかに細胞体であつた。通常非対称性のシナプスは興奮性であることから、これらのカルレチニン陽性神経終末は、非錐体細胞以外の細胞由来の可能性が高い。従って、glutamate 作働性の神経終末のマーカーである、vesicular glutamate transporter 1, 2 (VGluT1, VgluT2) を使って 2 重染色を試みた。結果、視床由来の glutamate 作働性神経の終末に存在する事が証明されている VgluT2 とカルレチニンの共

存在が認められたことから、大脳皮質に存在する非対象性の膜の肥厚をもつカルレチニン陽性神経終末の由来は、視床であることが示唆された。

皮質-線条体細胞への抑制性入力への解析

根東 覚, 川口泰雄

線条体は、前頭皮質領域から強い興奮性の入力を受けその活動が制御されている。これら皮質から線条体へ出力を送る細胞の活動が皮質内でどのように形成されるかは非常に興味深い。本課題では線条体に逆行性のトレーサーを予め注入したラットから、スライス標本を作製しパッチクランプ法により、投射細胞と抑制性介在細胞の2細胞同時記録を行い神経結合を調べた。脱分極性の通電に対して高頻度の発火を示すタイプの抑制性細胞 (FS

細胞) は、細胞の興奮性に比較的強い影響を与えると考えられるので、まずこれについて調べた。抑制性シナプス電流の振幅には平均 3pA から 100pA までばらつきが見られ、短時間反復刺激に対しては、減退を示した。電気生理の記録の後、細胞内染色を行い記録細胞の再構成を行うと、投射細胞上において、神経結合の部位選択性が見られる傾向があった。シナプス電流の振幅の大きさと神経結合の仕方には距離的な相関が観察された。

大脳皮質 GABA 細胞の形態的特質の定量化

荏部冬紀, 川口泰雄

大脳皮質介在ニューロンは、生理的・形態的・化学的性質からいくつかのグループに分けられると考えている。しかし、これとは異なる考え方も提唱されている。本研究では、まず、軸索ブトンがシナプス結合を作っているのを確認した後で、発火様式とペプチドなどの発現を同定した介在ニューロンの形態的特徴を定量化した。得られた形態的パラメーターと生理的性質から、介在ニューロンをバスケット細胞を含む5つの形態的クラスに分類

した。バスケット細胞はさらに複数のグループに分けることができた。この分類は、免疫組織化学的なものによく対応していた。サブタイプに分ける主な因子は、軸索分枝頻度、細胞体に付く軸索ブトンの割合、白質側にある軸索ブトンの割合であった。今後は、皮質細胞の軸索の伸長・分枝の仕方や、それに沿ってのシナプスブトンの作り方をサブタイプごとに定量的に調べていく予定である。

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、短期および長期の学習に伴う脳の可塑的变化、高次脳機能の加齢変化と脳における代償機構の関連を明らかにすること

を目的としている。感覚脱失における可塑的变化から派生して、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。

聴覚脱失による脳の可塑的变化

定藤規弘 (心理生理学研究部門)

聴覚脱失によりどのような可塑的变化が起こるかを、機能的 MRI を用いて調べた。課題として、手話、読唇、指文字を用いた。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。さらに、中上側頭溝での賦活に年齢依存性があることが判明した。すなわち手話を見ている間、中上側頭溝は、晩期失聴者に比較して早期失聴

においてより強い賦活がみられた。これは聴覚及び視覚入力を受ける多感覚領域である中上側頭溝において、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)。

読唇における視覚・触覚統合の解析

斎藤大輔, 定藤規弘 (心理生理学研究部門)

顔面から発生するさまざまな信号を受け取るために、視聴覚統合は重要な役割を担う。読唇における視覚・聴覚統合の神経回路を同定するため、機能的 MRI を施行した。聴覚課題として母音弁別、視覚課題として母音を発声する際の口の動きの弁別を作成した。聴覚・聴覚、および視覚・視覚の弁別課題においては、それぞれ聴覚領域お

よび視覚領域の賦活が見られた。一方聴覚・視覚間での弁別においては、前二者と比較して、後部頭頂間溝及び背側運動前野が両側性に賦活された。このことから後部頭頂間溝及び背側運動前野が視覚・聴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。

卓越した計算能力の基盤となる非言語性情報処理戦略の神経基盤

本田 学
田中悟志
道又 爾 (上智大学)

そろばんの熟達者では、当初、視覚運動制御によって高度な計算能力を獲得するが、視覚運動制御のプロセスを潜在化させていくことにより、実際にそろばんを用いることなく暗算で高度な計算能力を示すようになる。一般の人間が視覚的に呈示される数字を記憶する時には、言語的なリソースを使用していることを反映して、左半球を中心とする言語野が強く賦活されるのに対して、そろばん熟達者が同様の課題を遂行するときには、そろば

んの空間パターンのイメージとして記憶することを反映して、両半球の運動前野ならびに頭頂葉に対称性の活動が認められることを明らかにした。このことは、実世界に存在する道具を脳内にインストールし、それをもちいた非言語性の情報処理によって抽象的な表象操作を行うことが、卓越した能力の発揮に結びついていることを示唆している。

異なる運動関連領域が思考におよぼす特異的役割の検討

本田 学

花川 隆（京都大学）

高次運動皮質である運動前野の機能が脳半球外側面に存在する外側運動前野と、脳半球間隙に存在する（前）補足運動野とで異なっており、内側運動前野は基本的に一次元情報を逐次的に直列処理するのに対して、外側運動前野は多次元情報を同時に並列処理をするとの仮説に基づき、言語、空間、数という異なる表象について、同一の聴覚刺激を用いて逐次的オペレーションを行ったときの活動を機能的磁気共鳴画像をもちいて検討した。

その結果、逐次的な処理をおこなう三つの課題すべてにおいて、前補足運動野に強い活動を認めたのに対して、空間的な表象の操作を行うときにのみ、両側の外側運動前野が強く反応することを見いだした。この結果は、内側運動前野が逐次的連続的な操作に重要な役割を果たしているのに対して、外側運動前野の活動は、操作の内容よりもむしろ表象の種類に依存することを示唆している。

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）

中村 聡（科学技術振興事業団）

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、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、憑依トランス中に自発脳波の後頭部アルファ帯域成分のパワーの有意な増大が観察された。一方、憑依トランスによってカタレプシー様の様態を呈している最中には、てんかん性放電などは観察されなかった。これらの知見は、ドラスティックな様態を呈する憑依トランスにおいても、その脳波知見は、座禅やメディテーションなどの静的なトランスに近いことが明らかになった。

非可聴域超高周波成分による聴覚受容モジュレーション機構の検討

本田 学

中村 聡（科学技術振興事業団）

仁科エミ（メディア教育開発センター）

大橋 力（千葉工業大学）

ポジトロン断層撮像法をもちいて非可聴域超高周波成

分を豊富に含む音を聴取時、同じ音源から超高周波成分

を除去した音を聴取時、暗騒音（ベースライン）時の脳血流を計測し、そのデータに含まれる互いに相関をもった変動成分を主成分分析により抽出した。その結果、第一成分として両側聴覚野を含む成分、第二成分として視床、視床下部、脳幹を含む成分が抽出された。第二成分の条件による変動パターンは、超高周波成分を含むとき

に高く、含まないときにはベースライン条件よりも低下していた。また超高周波成分を含む音の聴取時には、免疫活性を示す血中 NK 細胞活性が上昇していた。これらの知見は、非可域超高周波成分による相互作用効果が、免疫系への影響を与えうる視床下部を含む脳深部の神経組織を介して発現することを示唆する。

乗法型変調非線形自己回帰モデルをもちいた大脳皮質－筋肉間機能連関の検討

本田 学

加藤比呂子 (NTT コミュニケーション科学基礎研究所)

昨今の医療技術の発達に伴い、様々な生体信号を収録することが可能になった。それらの信号は従来個々に分析されることが多かったが、生体内の組織は互いに相互関係をもつて機能していることから、生体系そのものを閉じた系と考えた場合、異なる生体組織から記録されたデータ間の相互関係を探れば、系のダイナミクスを数理的に示せ、臨床的知見と併せた総括的な生体系の計算理論へ発展し得ることが期待される。時系列モデルによる非線形的なデータ相互間の一解析手法として、外生変数が説明変数の振動特性の部分に直接影響を及ぼすモデ

ル (Multiplicatively modulated exponential (mmExpAR) model) を提案し、大脳皮質－筋肉間の機能連関解析に適用した。その結果、大脳皮質電位を外生変数として筋電位の自己相関係数に対して乗法型変調をかけることにより、筋電位の推定誤差が減少することを明らかにした。また皮質表面の陰性電位が増大するときに、表面筋電図の高周波成分のパワー増加が観察された。この手法は、シナプス後電位と活動電位の間の機能連関を探る手法として今後の応用が期待される。

MRI 撮像音強度の変化に伴う聴覚野血流反応時間の加齢性変化

岡田知久, 本田 学, 定藤規弘

これまで脳賦活による血流増加時間は加齢に伴い、視覚野ではより速くなるのに対して、感覚運動野では有意な変化はないと報告されているが、聴覚野に関しては明らかにされていない。われわれは昨年度の研究で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があることを示した。この手法は常に一定の強さの聴覚刺激を正

確なタイミングで与えることが出来る。これを用いて、53 人の被験者（年齢：18-73 歳）に対して撮像音強度を変化させる刺激を与えて、聴覚野における血流反応の加齢性変化を検討した。血流反応の大きさについては年齢による有意な増大・減少傾向は認められなかったが、血流反応が最大となる時間は加齢とともに延長していることが判明した。

統合生理研究施設

高次脳機能研究プロジェクト

【概要】

2002 年度は部門創設時からのメンバーであった小林康助手が大阪大学生命機能研究科助教授に昇任、転出し、佐々木千香技官も組織改変にともなって動物実験センターに異動した。これで 1996 年に伊佐が赴任した当初のメンバーは全員が入れ替わったことになる。小林助手に代わって遠藤利朗非常勤研究員が助手に着任し、佐々木技官に代わって生体システム研究部門から森将浩技官が加わり、高次液性部門で技術補助をしていた柴田愁子さんに宮下客員教授の任期終了とともに異動していただいた。また 2001 年度に着任していた関和彦助手が本格的に活動を開始するなど、2002 年度は人的に研究室の大きな転換期であったといえる。研究内容の面では、従来の中心的なテーマであった眼球のサッケード運動系の研究について、まずサルを用いた慢性実験は大学院生の渡邊雅之君が小林助手の実験を引き継ぎ、スライスを用いた上丘

局所神経回路の研究は遠藤助手と名古屋大学から受託大学院生として加わった李鳳霞さんが続行した。一方大学院生の実験系も展開をはじめた。坂谷智也君は覚醒マウスの眼球サッケード運動系を定量的に解析するシステムを完成させ、上丘のマップ構造を解析し、勝田秀行君は麻酔下のラットで上丘の局所神経回路を電気生理学的に解析した。さらに 2000 年以来 Human frontier Science Program から助成を受けている、霊長類の脊髄介在ニューロン系の運動制御に対する寄与を明らかにする研究についてはスウェーデン・ウメオ大学の Alstermark 教授が 6-7 月に来日し、サルを用いた急性電気生理実験と慢性脊髄損傷実験を精力的に行なった。その成果の一部を報告するため、7 月の日本神経科学学会大会では「脊髄介在ニューロン系に関する新しい展開」と題するシンポジウムを主催した。

ラット上丘における浅層-中間層投射の解析

勝田秀行, 伊佐 正

イソフルレン麻酔下、非動化した Wistar rat において視神経を電気刺激し、それに対するフィールド電位応答を反対側の上丘において記録した。通常 500 μ A 以下程度の弱い刺激では視神経を構成する線維のうち Y 線維のみが刺激され、それ以上の刺激強度では W 線維も活性化された。これまでの Fukuda ら (1977) の報告どおり、通常 Y 線維は上丘浅層の比較的深い部分にシナプス結合することで陰性フィールド電位を形成し、W 線維は最も浅い部分にシナプス入力する。そしていずれも連発刺激をおこなっても、中間層より深い部分には陰性フィールド電位をほとんど誘発しなかった。そして bicuculline 10mM を 1 μ l 上丘中間層に注入すると、中間層から深層において数百ミリ秒から 1 秒以上持続する顕著な陰性電位が誘発されるようになった。この電位は Y 線維のみが刺激され

る強度でも連発刺激を行なうことで誘発できた。この長時間持続する陰性フィールド電位は同側の大脳皮質を完全に除去しても残ったことから、皮質下の構造、特に上丘浅層を介して中間・深層に伝えられた興奮性入力によって誘発されるものと考えられた。そしてさらに NMDA 型グルタミン酸受容体の拮抗薬である APV 50 mM 1 μ l を注入することで消失した。以上の結果は成熟ラットの個体レベルにおいてもこれまでの幼弱ラットのスライス標本で示されたのと同様に (Isa et al. 1998), 上丘浅層から中間・深層にいたる興奮性伝達経路が存在し、bicuculline によって GABA_A 受容体を介する抑制を解除した状況で NMDA 受容体依存性に強い興奮が中間・深層に誘発されることを示している。

ラットの皮質脊髓路から上肢筋運動ニューロンへの興奮伝達経路

Bror Alstermark, Jun Ogawa (スウェーデン・ウメオ大学生理学)

伊佐 正

α クロラロース麻酔, 非動化した Wistar rat において上肢筋運動ニューロンより細胞内記録を行い, 反対側延髄錐体の電気刺激効果を解析した。その結果, 延髄錐体の電気刺激は潜時 2ms 程度の早い EPSP と潜時 3-5ms 程度のゆっくりした EPSP を誘発させることが明らかになった。そして早い EPSP は 2 シナプス性であって, 一部の報告にあるような単シナプス性の結合は見出されなかったことからラットにおいては皮質脊髓路細胞は上肢筋運動ニューロンと単シナプス性結合はしないことが明らかになった。そしてこの 2 シナプス性の EPSP 及び遅い EPSP 成分が脳幹, 脊髓のどの部分の介在ニューロンを介して誘発されるのかを解析した。すると, 脊髄後索を切

断することで, C2 レベルで皮質脊髓路を切断しても早い EPSP 成分は残ったことからこれらは脳幹の網様体脊髓路細胞を介することが明らかになった。そして網様体脊髓路細胞や脊髄固有細胞の軸索が通過する側索と前索を C2 レベルで切断すると早い EPSP 成分は消失し, 遅い成分のみとなった。この遅い成分はほとんどが 3 シナプス性以上の成分であると考えられた。以上の結果から, 皮質脊髓路から上肢筋運動ニューロンにいたる最短の経路は網様体脊髓路細胞を介する 2 シナプス性の経路であり, それに加えて脊髄介在ニューロンを経路を介する 3 シナプス性以上の経路が遅い EPSP 成分を誘発させることが明らかになった。

霊長類大脳皮質—脊髄介在ニューロン投射について

大木 紫 (杏林大学生理学), Bror Alstermark (スウェーデン, ウメオ大学生理学)

関 和彦, 伊佐 正

α クロラロース麻酔, 非動化したマカクザル (ニホンザル 3 頭, アカゲザル 2 頭) において上肢筋運動ニューロンから細胞内記録を行ない, 反対側の一次運動野, 運動前野, 補足運動野, 帯状回皮質の電気刺激効果を解析した。一次運動野, 運動前野においては銀ボール電極による表面の刺激を行い, 補足運動野, 帯状回皮質はタングステン電極を刺入して刺激を行なったところ, 単シナプス性の EPSP は一次運動野に限局して誘発された。そして静脈内にストリキニン 0.1 mg/kg を注入すると運動前野, 補足運動野, 帯状回皮質などから潜時 5-7 ミリ秒

程度の長い EPSP が誘発されるようになった。次に運動ニューロンに皮質脊髓路からの入力を伝達することが知られている脊髄介在ニューロンの存在する C3-C4 髄節の中間帯の介在ニューロンから記録を行なったところ, 一部のニューロンにおいて腹側運動前野の電気刺激によって単シナプス性の EPSP が誘発された。以上の結果は霊長類において一次運動野以外の皮質から脊髄固有ニューロン系を介して上肢筋運動ニューロンにいたる経路が存在していることを示唆する。

霊長類の頸髄 C5 レベルにおける皮質脊髄路の切断が手指の運動に与える影響について

Bror Alstermark (スウェーデン, ウメオ大学生理学)

Lars-Gunnar Pettersson (スウェーデン, イェテボリ大学)

佐々木成人 (東京都神経研)

関 和彦, 伊佐 正

我々はマカクザルにおいて、皮質脊髄路から直接運動ニューロンに結合する経路に加えて、頸髄 C3-C4 髄節に存在する脊髄固有ニューロンを介する 2 シナプス性の経路が存在することを明らかにしてきた。今回、この脊髄介在ニューロンを介する 2 シナプス性の経路が運動にどのように寄与し得るかを明らかにするため、皮質脊髄路から運動ニューロンにいたる直接経路を脊髄レベルで切断し、介在ニューロンを介する経路のみを残したときの運動を解析した。ニホンザル 2 頭をモンキーチェアに座らせ、サルの正面に設置された直径 3 センチのチューブ

からサツマイモのかけらを繰り返し提示し、それを親指と第二指で把持する運動課題を訓練した。訓練終了後、外科的手術によって C5 レベルで脊髄側索背側部を切断し、切断直後から同様な運動課題を行わせた。その結果手術後 1-3 週間の経過で手指を用いた器用な運動機能の回復が認められた。この事は脊髄介在ニューロンに対して適切な入力が入れば、直接経路が存在しなくても個々の指を別々に動かすような器用な手指の運動が可能であることを示唆している。

感覚・運動機能研究プロジェクト

【概要】

本研究室では、脳波 (EEG) と脳磁図 (MEG) を用いて、人間の脳機能の研究を行なっている。2002 年度の最大のトピックスは、2001 年度の概算要求で認められた新しい脳磁場計測装置 (脳磁計) が稼動を開始したことである。これは頭部全体を覆うタイプ (全頭型) であり、306 個のセンサーを用いて詳細に脳機能を解析する事が可能である。この脳磁計を用いた研究論文が既に数編完成している。

1991 年に導入された脳磁計は、当時としては世界最新鋭のものであったが、既に導入後 10 年以上が経過しており、現在は最も古いタイプの機器となってしまった。技官諸君の注意深い維持により、現在でも現役の機器として活躍しているが、全頭型ではないため、1 回の測定では記録できない部分があり、最近はその理由にして論文が採択されない事が起こってきていた。理不尽とは思いますが近年の非侵襲的脳機能研究の急速な進歩を考慮すれば仕方の無い部分もある。しかし、古い脳磁計のコイルは軸型、新しい脳磁計のコイルは平面型であり、各々一長一短がある。実際、研究対象によっては軸型コイルの方が優れている領域もあり、現在は 2 台の機器を用途に

によって使い分けている。

また、2001 年度に導入された機能的磁気共鳴画像 (fMRI) (心理生理部門の管轄) を用いた研究も徐々に開始しており、今後はさらに MEG と fMRI の両方を用いた研究が増加していくものと考えられる。空間分解能に優れた fMRI と時間分解能に優れた MEG の各々の長所を生かした研究が今後は重要と考えている。

本研究室の特徴である「幅広い領域、分野の研究」は 2002 年度も継続しており、体性感覚、痛覚、聴覚、視覚などの各種感覚刺激に対する誘発反応の研究を行なっている。体性感覚では第 1 次および第 2 次感覚野での反応の詳細な研究を行なっている。痛覚では、従来は記録不可能と考えられていた無髄 C 線維刺激による脳反応の研究を進めている。これは second pain に関連するものと考えられており、将来の研究の発展に期待がかかっている。また乾幸二助手が開発した表皮内電気刺激法は、簡便な方法であり、しかも被験者の負担が少ないという大きな長所を有しており、高い注目を集めている。聴覚系では、カナダのトロントの Pantev 教授との共同研究を推進しており、本研究室から数名の研究者が留学しており徐々に

成果が現れつつある。視覚系では、金桶吉起助教授のグループの「運動視」に関する研究成果が着実に成果を上げており、特に運動のスピードと脳反応との明瞭な相関関係が示された事は特筆すべき成果である。また「顔認

知」の研究では、他者の視線方向の変化による脳反応の相違を明らかにした。また、心理学で以前より知られていた「倒立顔効果」の脳内機序を明確にすることに成功した。

視覚性運動速度検出の脳磁場と機能的磁気共鳴画像による研究

金桶吉起, 川上 治, 丸山幸一, 柿木隆介
定籐規弘, 岡田智久
米倉義晴 (福井医科大学)

ヒトは早く動いている物にはより速く反応することができる。しかしこのメカニズムはかならずしも明確ではない。我々はレーザー光の光点が一定の速度で運動をするときその運動開始に誘発される脳磁場反応を測定し、その反応特性をヒトの反応時間と比較、検討した。また、同じ刺激に対する脳活動の局在を機能的磁気共鳴画像にて検討した。脳磁場反応の潜時は速度に逆比例し、振幅は比例した。これらの変化は刺激提示時間や運動距離によらず運動速度そのものによって起きていることがわか

った。また、このような速度による変化は 10ms の提示時間で十分起きることがわかった。反応の信号源はいつもヒト MT+付近に推定され、機能的磁気共鳴画像との一致を見た。反応時間も速度に逆比例したが、脳磁場反応の潜時変化では説明できなかった。これは脳の情報処理過程が段階的に進むのではなく、視覚系の情報処理速度が認知、運動系の情報処理過程に影響を及ぼしていることを示す。(Human Brain Mapping 16, 104-118, 2002)

ランダムドット運動に誘発される脳磁場反応

金桶吉起, 丸山幸一, 柿木隆介

ランダムに散りばめられたドットが速さは同じだが方向はまったくランダムに動いている状態で、その数%のドットが一方向に動いているとき、ヒトはその方向を検出することができる。これはヒト視覚系が広い視野内で運動方向の情報を集めて統合するメカニズムを持っているからであると考えられる。では、方向がランダムで全体に方向ベクトルがゼロであるときには、このような空間的な統合は行われないのであろうか？ 我々は、100%

同じ方向に動くランダムドットの運動と、全てランダムな方向に動く運動刺激に対する脳磁場反応を測定して、比較検討した。いずれの刺激も、ドットの運動速度に反比例して反応潜時が変化し、その信号源はいつも MT+付近にあった。これは、ヒト視覚系が運動方向のみならず、運動速度の情報も空間的に統合しうることを示唆しており、現在進行している研究においても支持するデータがでている。(Neuroscience Research 44, 195-205, 2002)

The voice-specific process revealed by neuromagnetic responses.

軍司敦子

Daniel Levy (The Hebrew University of Jerusalem, Jerusalem, Israel)

石井良平 (大阪大学大学院医学系研究科)

柿木隆介

Christo Pantev (The Rotman Research Institute for Neuroscience, Toronto, Canada)

ヒトの声受容に関する特異的な脳活動について、MEGを用いて検討した。健康成人 11 名を対象に、基本周波数、持続時間や強度が等しく統制された①ヒトの声や②楽器音を聴取しているときの聴覚誘発脳磁場 (Auditory Evoked magnetic Field: AEF) 反応を記録した。どちらの音に対しても、刺激音呈示後 100 ms で頂点を示す N1m 成分とそれに続く SF (sustained field) 成分とが出現し、そ

れらの発生源は左右半球の Heschl's 回に推定された。N1m 成分の発生源における活動は刺激間に有意差は認められなかったが、SF 成分では楽器音よりもヒトの声に対してより大きな活動が認められた。(Proceedings of the 13th International Conference on Biomagnetism, 2002, pp.68-70.)

C 線維を上行する信号による大脳活動：脳磁図による研究

TD Tran, 乾 幸二, 宝珠山 稔, K Lam, 秋云海, 柿木隆介

我々が考案した極小野低強度レーザー刺激法を用いて皮膚 C 線維を選択的に刺激し、それに伴う大脳活動を脳磁図により検討した。15 名の健康成人で手背に極小野低強度炭酸ガスレーザー刺激を行ったところ、9 名の被験者で明瞭な磁場反応が得られた。初期磁場成分頂点潜時は刺激対側が 746 ミリ秒、同側が 764 ミリ秒であり、同側半球での反応に有意 ($p < 0.005$) な遅れがあった。初期磁場成分の等磁場線図は 5 例では単一信号源パターンを示したが、残りの 4 例では複雑な複数信号源パターンで

あった。単一信号源パターンの 5 例では、信号源は両側第二次体性感覚野 (SII) に推定された。単一信号源では説明できなかった 4 例では、両側 SII に加えて刺激対側第一次体性感覚野 (SI) に活動が認められた。活動の立ち上がりおよび頂点潜時は刺激対側の SI と SII の間で差がなかった。この結果より、C 線維を上行する信号の大脳処理過程の初期段階では SI と SII が並行して活動すると思われる。

(Tran et al.: Neuroscience, 113: 375-386, 2002)

炭酸ガスレーザー刺激誘発 C 線維関連脳電位に対する注意及び睡眠効果

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

低強度のレーザー光を狭い領域に照射する方法を用いて皮膚 C 線維受容器を選択的に刺激し、C 線維関連誘発脳電位を記録した。Control (課題なし), Distraction (暗算課題), Attention (刺激の数を数える), Stage1 睡眠および Stage2 睡眠の 5 条件で誘発電位の陽性成分 (P1) の振幅および潜時を比較した。P1 潜時は 5 条件で差がなかった。P1 振幅は、Control と比べて Attention ではやや増

加する傾向であったが有意な差はなかった ($p = 0.2$)。Distraction では著明に減弱した ($P = 0.01$)。睡眠中 (Stage1, Stage2 とともに) は P1 の反応はほぼ消失した。C 線維関連誘発脳電位を記録する場合、被験者の刺激に対する注意状態や覚醒度の把握が非常に重要である。

(Qiu et al., Clin Neurophysiol 113:1579-1585, 2002)

「方向の異なる目の動き」を見るとききの脳活動

渡辺昌子, 三木研作, 柿木隆介

Aina Puce (Center for Advanced Imaging, Department of Radiology, West Virginia University, USA)

私達はこれまで、「目の動き」を認知するときには「一般的な動き」と同様にヒトの運動視中枢, MT/V5 野が活動するが活動の潜時と活動源の推定位置に違いがあり MT/V5 野の中に機能特異性が存在する可能性が示唆されることを報告してきた。

今回さらに「目が合う」「目がそれる」動き, また「左右への動き」による MT/V5 野の活動の違いを検討した。いずれの目の動きに対しても明瞭な誘発脳磁場が記録され, その活動源は MT/V5 野に位置推定された。「目が合

う動き」に対して推定された活動源の電流双極子モーメントは「目がそれる動き」よりも大きく, 推定位置は目が合う動き」のほうが「目がそれる動き」に対するものより有意に前方であった。目の動きの左右方向で脳活動の違いは認められなかった。このことから, MT/V5 野における早期の視覚情報処理過程において「目が合う・それる」という高次の情報が既に区別されていることが示唆された。

「口の動き」を見るとききの脳活動

三木研作, 渡辺昌子, 柿木隆介

Aina Puce (Center for Advanced Imaging, Department of Radiology, West Virginia University, USA)

私達はヒトの顔認知機構について脳磁図を用いた研究を進めている。これまでに「目の動き」を認知するとききの脳活動を報告してきたが, 今回「口の動き」を認知する場合の脳活動を記録し「目の動き」と比較検討した。仮現運動現象を利用し「口が開く(閉じる)動き」「目の動き」刺激を用いた。「目の動き」と同様に「口の動き」に対して潜時 150-250ms に誘発成分が認められ, その電流双極子は中側頭葉後部, ヒトの MT/V5 野に相当する部

位に位置推定された。「口が開く・閉じる」両者間で誘発脳活動に有意な違いはなかった。「目の動き」と「口の動き」の間で潜時, 活動源の推定位置に違いはなかったが, 活動の大きさは「口の動き」のほうが有意に小さかった。このことから, 「口の動き」も「目の動き」とほぼ同様の経路で情報処理されているものの関与している細胞群は同一ではなく, MT/V5 野の中で両者を区別していることが示唆された。

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 kV）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 14 年度は共同利用実験計画が 21 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 14 年度は最終的に 10 課題が採択され、実施された。これらは、厚い生物試料の立体観察と三次元解析、薄い試料の高分解能観察等である。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

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には、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 133 日、修理調整等 53 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 5,034 枚、フィラメン点灯時間は 361 時間であった。装置は、平均 69 % 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。

神経細胞樹状突起スパインの CT 解析

濱 清，有井 達夫

我々は高い電子線透過能と、 $5\mu\text{m}$ を越える生物試料でも 4 - 5 nm 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、Golgi 染色を行ったラット CNS における海馬の神経細胞樹状突起の複雑な形状を示すスパインのコンピュータートモグラフィー（CT）解析を行っている。

$3\mu\text{m}$ の切片について、 -60 度から $+60$ 度まで 2 度間隔で連続傾斜撮影を行ない解析に用いた。その結果を、1 図に示す。生理研の超高圧電子顕微鏡はこのように複雑なスパインを持つ神経細胞にも有効に応用できることが明らかとなっている。

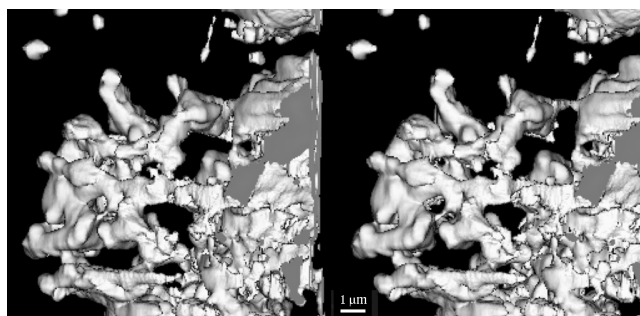


図 1. 神経細胞樹状突起スパイン: CT 解析後のデータを Voxel Gradient Shading 表示 ($\pm 8^\circ$ 傾斜: 交差視)

パーグマングリア細胞のCT解析

山口 登, 古家 園子, 有井 達夫

我々は高い電子線透過能と、5 μ mを越える生物試料でも4-5 nmの解像力が期待できる1,000kV超高压電子顕微鏡の特性を利用して、Golgi染色を行ったラット小脳におけるパーグマングリア細胞の複雑な形状を示す三次元形態のコンピュータトモグラフィ(CT)解析を行っている。

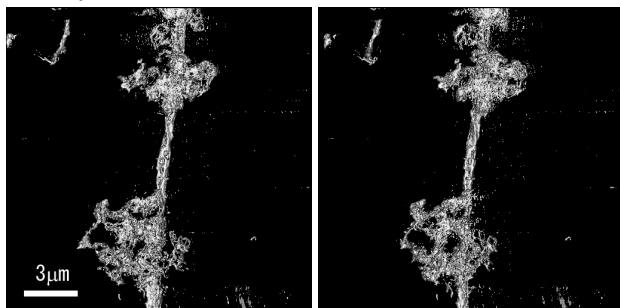


図1. パーグマングリア細胞: CT解析後のデータをVoxel Gradient Shading表示(±8°傾斜:交差視)

3 μ mの切片について、-60度から+60度まで2度間隔で連続傾斜撮影を行ない解析に用いた。その結果を、1図に示す。生理研の超高压電子顕微鏡はこのようにパーグマングリア細胞にも有効に応用できることが明らかとなっている。

小腸絨毛上皮線維芽細胞におけるCa²⁺波伝播とATP放出のメカニズム

古家園子, 古家喜四夫(科学技術振興事業団, 細胞力覚プロジェクト)

小腸絨毛上皮にある線維芽細胞は互いに突起を延ばしネットワークを形成し、小腸絨毛下での情報伝達とその制御を担っていると考えられている。この細胞はATP、エンドセリン等多くの種類の受容体を持ち、cAMP濃度に依存してフラットから星状へ形態変化するなど、アストロサイトと類似した性質を持つ。1つの細胞に細いガラス棒で機械的刺激を与えると、細胞間を伝播するCa²⁺波が発生し、波の伝播と共に細胞が収縮した。Ca²⁺波の伝播にはATPの放出とまわりの細胞でのP2Y1受容

体の活性化が関与していた。また、この細胞は伸展による機械刺激にも応答し、細胞内Ca²⁺の上昇とともに、ATPが放出されることをホタルルシフェレースを用いて明らかにした。これらの機械的刺激に対する応答性は、dBcAMP処理によって星状へ形態変化した細胞では抑制され、ATP放出の抑制ばかりでなく、ATPに対する反応性も減少していた。これらの結果より細胞の形態と機械応答性相関の機序と役割について研究を進めている。

生体情報処理室

【概要】

脳における情報処理には、ネットワークを構成する各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の二つがあると考えられる。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、個々のニューロン機能の変化を通して、回路レベルで行われているデジタル的处理にも大きな影響を及ぼしている。それゆえ、特定のニューロン・ネットワークへの入力と同様であっても、ある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・細胞死が促進されるなど、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－生化学的变化－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。

樹状突起における活動電位の発生とその制御メカニズム

坪川 宏

大脳皮質や海馬の錐体細胞では、細胞体側より樹状突起へ逆行性に伝播してくる Na^+ スパイクや、樹状突起局所的な Na^+ 、 Ca^{2+} スパイクが、情報処理上の重要な役割を担っていることが示唆されている。これらの発生メカニズムと調節機構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

ニューロンを用いて解析を行っている。今年は、カナビノイドを介する抑制性シナプス前終末への逆行性シナプス伝達現象（DSI）において、カナビノイド放出の引き金となるポストシナプスの脱分極は、 Na^+ スパイクの樹状突起への伝播が担っているという仮説をたて、検証を進めた。

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・空間的關係の解析

坪川 宏， 高木佐知子

ニューロン機能における細胞内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活性と種々のニューロン活動との時間的・空間的關係を解析することは必要不可欠と考えられる。本研究では、中枢ニューロンのモデルとして海馬スライス標本上の錐体細胞および小脳スライス標本上のプルキンエ細胞を用い、3量体Gタンパク質 G_q 及び G_{11} のカスケードにつながるタンパク質リン酸化酵素、

PKCの活性変化を可視化し、ニューロン活動やそれに伴う細胞内 Ca^{2+} 濃度変化とPKCの活性変化との時間・空間的關係を明らかにすることを目指している。PKCの可視化のため、PKC結合性蛍光色素の細胞内導入や、GFP結合PKCを部位特異的に発現するトランスジェニック・マウスを用いている。今年は、シナプス入力によって誘発される、代謝型受容体の活性化を介したPKCトランスロケーションの観察に成功した。

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細胞膨張が見られ、海馬 CA1 野における虚血性細胞死の過程では持続的な容積減少が観察される。しかしながら、これらの容積異常が神経障害のどのような側面をあらわしているのか不明である。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。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。さらに 2 光子レーザー顕微鏡や共焦点顕微鏡を活用することにより単一細胞レベルでニューロンの容積変化を定量的に解析するとともに、容積変化を起こしたニューロンで見られるシナプス応答の変化について電気生理学的に解析を進めた。

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。

意志に関係する脳活動の研究

達本 徹

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

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

脳機能分子解析室

【概要】

脳機能分子解析室は、脳機能のような複雑な生物反応機構を解明するための遺伝子転換動物を分子生物学的技術と発生工学的技術を駆使して作製することを目的とし、2002 年に新設された。とくに遺伝子ターゲティングによってノックアウトラットを作製することを究極の

目的としており、これまでに、ES 細胞、始原生殖細胞、神経幹細胞、造血幹細胞、精原細胞の樹立を目指した研究を行うとともに、核移植や顕微授精など、ラットにおける発生工学的技術の高度化に取り組んできた。研究課題のうち具体的に次の 2 題を下記に示す。

(1) 有用トランスジェニック動物の作製，ならびにその維持・保存：システムとして稼働させるため，ラットを用いて β カテニン遺伝子溶液の顕微注入，胚移植，ならびに受精卵の凍結保存を行った。(2) 核移植による体細胞クローンラットの作製：体外に取り出すだけで自発的に

に活性化するラット卵子のM期促進因子(MPF)活性を低下させないように制御することと，2回の連続した核移植を行うことで初期化因子に十分に曝すこと，を重要視したクローン作製実験を試みた。

トランスジェニック (Tg) 動物作製のためのシステム構築

平林真澄，平林敬浩，八木 健

脳の情報伝達を担うニューロンに成長する神経前駆細胞内で β カテニン遺伝子を高発現させ，巨大な脳と皺を持つTgラットの作製を試みた。マウスのネスチン遺伝子プロモーター下に β カテニン遺伝子とGFP遺伝子を繋いだ融合遺伝子を作製し，ラット前核期卵に顕微注入した。生存卵子453個を移植したところ計93匹(21%)の産仔が得られ，うち7匹(8%)がTgラットだった。3匹のTgラットで出産直後の脳にGFP発現が確認され，

残りの4匹のTgラットにはそれぞれ1, 1, 5, 10コピーのトランスジーンがゲノム上に組み込まれていた。これら4系統からG1ラットを作製し，脳での遺伝子発現を確認していく予定である。また，5および10コピーをもつ系統についてはトランスジーンのコピー数を増やるとともに，50～100個の受精卵を凍結保存した。この過程を通して，脳機能分子解析室におけるTg動物作製システムの整備はほぼ完了した。

ラット卵丘細胞核を用いた連続核移植の試み

平林真澄，保地眞一(信州大)

体細胞クローンマウスを作製する過程において，顕微注入したドナー核が早期染色体凝集(PCC)に続いて染色体を形成し，活性化処理を行うと2個の疑似前核に変化することが重要である。しかしラットでは除核卵に顕微注入した卵丘細胞核はまったくPCCを起こさなかった。そこで除核前のラット卵に体細胞核を注入し，PCCを誘導後に除核，またはマウスの除核卵にラットの体細胞核を注入してPCCを誘導させ，それぞれ活性化

処理後に作製した疑似前核をラットの除核前核期卵に再移植し，クローンラット胚を作製した。その結果，除核前のラット卵1,068個を使って115個(2細胞期胚37個を含む)，除核したマウス卵974個を使って340個(2細胞期胚206個を含む)のクローンラット胚を作製した。しかしいずれの方法で作製したクローン胚を移植しても計11個の着床痕が得られただけで，クローン個体の作製には至らなかった。

統合バイオサイエンスセンター

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細胞活動維持のための巧妙な情報生成と構造形成の機構がある。

本部門では細胞内超微小形態を高分解能、高コントラストで観察する新しい電子顕微鏡の開発を背景に細胞の「構造と機能」を研究している。具体的には DNA1 分子の塩基配列直読法の開発、チャネル蛋白質の電子線構造解析、微小管などの超分子構造解析、細胞内小胞輸送の可視化等の研究を行っている。

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

前年度に引き続き電子位相顕微鏡の開発、すなわち Zernike 位相差法 ($\pi/2$ 位相板の利用)、微分干渉法相当のヒルベルト変換法 (π 位相板の利用) の開発を行った。特に位相差法の鍵である炭素膜位相板について無帯電 (antistatic) 化の方法論の開発に注力した。電顕内で試料が出す汚れの位相板付着を防ぐ方法として、位相板を高温に保つヒーティングホルダーの作製とそのテストを行った。結果は 200°C~300°C に位相板を保持すると電顕内での汚れが完全に防止でき、位相板を初期クリーン化できれば帯電問題をほぼ解決できることがわかった。この方法を一般電子顕微鏡に応用するため対物レンズの後焦点面を 10~15cm 下方にずらすトランスファーレンズと

ヒーティングホルダーを組み合わせた新規の電子顕微鏡システムをデザインした。

国内メーカーに新規デザインの電子顕微鏡の試作を注文し 100kV 加速での第 1 号機ができ、その性能を調べた。結果は予想通り無帯電の位相板システムができあがった (図 1, 2 参照)。

位相回復の方法として、新しい方法がオーストラリアの光学研究グループから提案されている。この方法は位相板を使わず強度情報のみを異なる条件で複数回で得て行う。TIE (Transfer of Intensity Equation) と呼ばれるこの方法と我々の提案する位相板を使う複素顕微鏡の方法の理論的比較を行った。

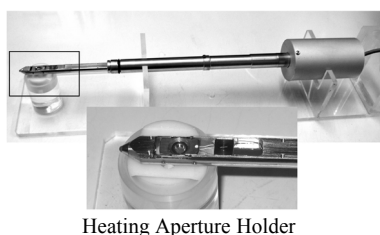


図 1 試作した位相板帯電ぼうしょうヒーティングホルダー

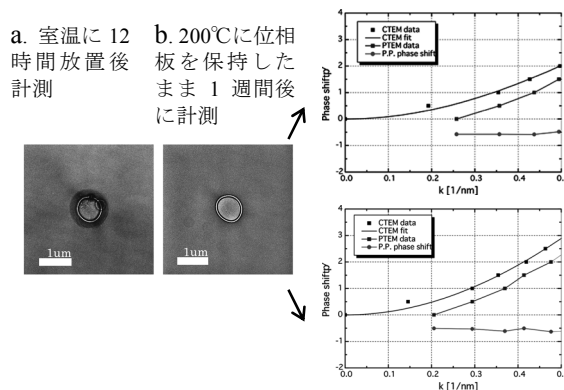


図 2 ヒーティング (200°C) による汚れ防止と無帯電化の実験

位相板用炭素薄膜の材料科学的研究

Dorian Minkov, Radostin Danev, 宇理須恒雄（分子研），大河原浩，永山國昭

位相板の帯電防止策は電子位相顕微鏡にとって死命を制する重要な要素技術である。2000 年からスタートした研究の結果，帯電の原因が位相板に付着した汚れによることがわかった。この汚れが具体的に何に由来するのか，無機物由来か有機物由来なのか等を見極めるため種々のテストを行った。そして最終的に有機物，無機物（マイ

カ粉），酸化金属の 3 種類に由来することがわかった。この内特に有機物の中味を特定するためフーリエ変換赤外分光を用いた付着物の分光測定を行った。その結果炭素膜上に有機物の付着が分光学的に認められたが炭素薄膜という超微量試料計測のため定量的結果は得るまでには至らなかった。

塩基配列決定のための電子顕微鏡用重元素ラベル塩基の合成

田坂基行（東大院・理），長澤賢幸（分子研），永山國昭

電子顕微鏡で DNA 塩基の同定弁別を可能とするため A, T, G, C の塩基について 2 つの手法で多核重元素ラベル剤の開発を行った。1 つは重いハロゲン元素の多核体を塩基の 1 位もしくは 6 位にラベル。もう 1 つは鉄-硫黄キューバン錯体を塩基の 1 位もしくは 6 位にラベル。

後者については 4Fe-4S の立方体を基本骨格とし，その重元素置換体を大きな有機物ケージで酸化保護した錯体について合成を終了した。前者についてはヨウ素の多核体について合成を行った。

カルシウムチャンネル hTRPM2 の精製と電子顕微鏡観察

松本友治，原 雄二，森 泰生，永山國昭

膜タンパク質 TRPM2 はレドックス準位依存性カルシウムチャンネルであり，その活性化因子 β -NAD⁺ の濃度上昇に伴って TRPM2 のチャンネル活性も上昇する。このことから TRPM2 は細胞内のレドックス状態の変化によって引き起こされる細胞死に関連があるものと考えられている。

本研究では，ヒト全脳の cDNA ライブラリーから再構成された全長の hTRPM2 遺伝子をトランスファー・ベクター pYNGHis(C)/hTRPM2 へと組み込み，組換えバキュロウイルス-カイコ系を用いて hTRPM2 を大量発現させた。目的タンパク質はフッ化界面活性剤ペンタデ

カフルオロオクタン酸を用いることで抽出・可溶化でき，ニッケル・キレート・アフィニティカラムならびに微量ゲル濾過によって精製され，アミノ酸組成比が既知の配列情報から予想される値とほとんど一致するサンプルが得られた。

ゲル濾過における主ピーク近傍で予想分子量 160kDa の成分を含む分画から負染色試料を作成して電子顕微鏡下で観察したところ，比較的サイズの揃った多数の粒子像を確認できた。現在，平均化像ならびに初期立体構造モデルを得るため単粒子解析法による電子顕微鏡画像データ処理を行っている。

セミインタクト細胞技術を用いた細胞内小胞輸送の可視化・再構成と分子機構の研究

村田昌之, 加納ふみ, 田中亜路, 山内忍, 永山国昭

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, 単一のセミインタクト細胞内で ER $\rightleftharpoons$ ゴルジ体 $\rightarrow$ 細胞膜, ゴルジ体 $\rightleftharpoons$ エンドソーム間の小胞輸送

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 $\rightarrow$ ER の逆行輸送は停止する(cdc2 キナーゼ依存的)し, 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。

時系列生命現象研究領域

【概要】

神経細胞は, イオンチャネルやトランスポーターに依存して細胞内外のイオンの動きを制御しており, これが, 脳の情報処理の物理的基礎となっている。何百種類もの膜機能分子は, できあがった神経系で働くだけでなく, 発達途中の神経系でも機能しており, 電気的活動を阻害すると, 生後の機能的な神経回路が成熟しないことなどから, 発生過程での電気的活動は正常な脳の発達に必要な

である。電気的活動を担う分子群 (イオンチャネルやトランスポーター) などのレベルでの発達過程で電気的活動の制御や, 細胞内の信号伝達の仕組みを解明する目的で, 神経系の発達過程でのイオンチャネルの発現制御と役割を, 分子生物学, 電気生理学などの手法を駆使して明らかにする研究を行っている。

細胞個性に見合った興奮性を実現する機構:

中枢ニューロンの発火特性を決定する電位依存性 Na チャネルの性質

岡村康司

岩崎広英 (生理学研究所)

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。たとえば小脳プルキンエ細胞は, 速い周波数の規則的な発火を特徴とするが, これには特殊な Na チャネル電流の性質が基盤となっている。哺乳

類 Na チャネル分子の性質を, 発現系細胞およびスライスパッチ法による解析により解析し, スプライシングのバリエーションの発現などの制御機構について明らかにした。

発生過程におけるイオンチャネルの制御および電気的活動の役割

岡村康司

イオンチャネルは発生過程で時期特異的な発現および

機能の制御をうけることで, 後期の電気活動依存的な発

生の調節に重要な役割を果たしている。これらの発生過程でのチャネルの時間依存的制御に関する分子機構として、発生過程での電位依存性 Na チャネルと Ca チャネル

分子の発現の制御機構に注目して発現系細胞での電気生理学的解析を行った。

ゲノム情報に注目したイオンチャネル分子機能の研究

岡村康司, 村田喜理

近年複数の生物でゲノムや cDNA の配列、遺伝子発現様式が明らかにされ、生理機能をゲノム情報を基盤として理解することが急務になりつつある。原索動物ホヤ

から新たなイオンチャネル分子および関連分子を発掘し、発現実験により、チャネル分子の構造機能連関に関する原理解明を行なった。

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。

酸化修飾により活性化する Ca^{2+} 透過性カチオンチャネルのメカニズム解析

吉田卓史, 原 雄二, 西田基宏, 森泰生

細胞外からの Ca^{2+} 流入を促す Ca^{2+} チャネルには電位依存性型、リガンド作動性型、受容体活性化型の3種類に大別される。我々のグループでは受容体活性化 Ca^{2+} チャネルの分子の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。

細胞内酸化還元状態の変化により活性化されるチャネル TRPM2 の分子機能解析

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の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、TNF α 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。

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 α_{1A} 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 α_{1A} 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 α_{1B} 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していることが明らかとなった。胸部大動脈血管マグナス標本を用いた解析で、 α_1 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, 沼賀拓郎, 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核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 (IP₃) 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。PLC γ 2 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 PLC γ 2 活性との関係を調べた。その結果、 Ca^{2+} 流入が PLC γ 2 の C2 ドメインを介して PLC γ 2 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、PLC γ 2 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 PLC γ 2 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性嚢胞腎(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 は高罹患率(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。

細胞内蛋白質の活動の可視化を目指した蛍光性バイオセンサーの構築

清中 茂樹, 西田 基宏, 森 泰生

細胞内の生命現象を明らかにするために、細胞内バイオセンサーに関する研究が精力的に進められている。小分子濃度を感知するセンサー構築においては、 Ca^{2+} に対する Fura2 などいくつか成功を収めているが、小分子が細胞内蛋白質に結合する段階を評価する方法論は皆無に等しい。細胞内カスケード反応を解明するにはこの問題点を克服する必要がある、次世代の細胞内バイオセンサーの課題だと我々は考える。そこで細胞内蛋白質の活動(小分子の結合)を評価可能な蛍光性バイオセンサーの構築を遂行する。その方法論としては、細胞内蛋白質の基

質結合部位をそのまま蛍光性センサーに変換する手法を採用する。この手法だと細胞内で本来担う機能を損なうことなくバイオセンサーへと変換できる。標的蛋白質としてはアセチルコリン受容体(AChR)を選択する。AChR は神経伝達物質であるアセチルコリン(ACh)を認識し、細胞表層から細胞内への情報伝達における第一ステップを担っている。ACh の結合を蛍光の強度で評価可能になれば、細胞内における ACh の濃度分布だけでなく AChR の活動を時間・空間分解的に可視化できる。現在、in vitro でのバイオセンサー構築を遂行している。

動物実験センター

【概要】

＜山手地区動物実験センター棟＞

山手地区に建設が進められていた統合バイオサイエンスセンター棟の1期工事と2期工事は平成14年3月末に予定通り竣工し機構に引き渡された。山手地区動物センター棟はRIセンターと棟続きで鉄骨地上4階建て、延べ床面積 2,312m²で山手地区の建物群の最南端に建設された。建物の竣工と同時にセンターでは、飼育室、実験室の整備を開始した。山手地区動物センター棟の特徴は精度の高い動物実験を行うために、陸生動物の飼育室の主要部分をバリアー区域としてSPFマウスとSPFラット用としつつ、魚類や両生類、昆虫などの多様な動物種の飼育にも対応できるようにしたことである。

山手地区へ移転予定の研究部門の引っ越しは建物の竣工に引き続いて早速開始されることになったが動物センターではこれらの部門の便宜をはかるため、動物センター棟の稼働開始を8月1日と設定した。かくして飼育室の空調、衛生設備、入退室管理システムの点検や大型滅菌器の洗浄室への設置などが稼働開始に向けて急ピッチですすめられることとなった。

6月17日には遠山文部科学大臣、岡崎市長、地域住民その他建物の建設に関わった人々を迎えて竣工披露式が行われた。当初心配された設備については所長会議をはじめとする関係各方面の理解を戴いて、稼働開始に必要な機器の大部分を用意するところまでこぎ着けた。

5月中旬には特注したケージウオッシャーの据え付けも終わり、いよいよ性能をテストする段階に入った。テストは試運転をかねてA地区動物棟で用いられているラット、マウス用ケージを約3週間にわたって毎日山手地区まで運搬して洗浄機にかけて行なった。A地区においては実働中のケージであるため少しでもトラブルがあればA地区における作業全体に支障を来すおそれがあったが、きわめて順調に移行することが出来、このオペレーションは大成功であった。高圧蒸気滅菌器や給水装置その他のチェックを終え、7月22日からいよいよ最終段階のバリアー区域内部のホルマリン薫蒸作業に入った。そして、32名の受講者を得て計画通り7月30日には第1回、9月13日に第2回目の利用者講習会が開催され、施

設は稼働を開始した。

＜マウス初期胚凍結事業＞

平成13年度より開始したマウス初期胚の凍結事業は、山手地区への移転が予定されている部門のものを優先して、のべ53件で実施された。そして山手地区動物センター棟の稼働開始後は移室分のマウス胚の融解、移植作業も開始された。A地区から山手地区への移転計画は平成14年度以降にも予定されているので、マウス初期胚凍結は引き続き移転予定部門のものを優先的に行う必要があり関係者の理解と協力を期待したい。

＜情報公開＞

情報公開に関する法律が施行されて2年目となるが今年度も動物実験計画書の情報公開請求があった。請求は動物愛護団体を名乗る個人からのもので、イヌ、ネコ、サルを用いた実験計画書と納品書など4項目にわたるもので、個人及び法人名など不利益を被るおそれのある第三者に関する部分を除いて全面開示された。これに対して不服申し立てが行われたが、内閣府情報公開審査会に諮問したところ、「機構が一部不開示としたことは妥当」との答申があり、この件については落ち着いた。

動物実験センターでは、実験に使用する動物の入手、搬出に関して従来より動物種ごとに取り扱い要領を定めており何の問題もないところであったが、第三者にもわかりやすくするため、ホームページ上に「実験動物の搬入管理について」を掲載した。

＜洗浄室床の改修＞

A地区動物センター棟は建築以来25年を経過し、各所に傷みが目立ってきたが、洗浄室の床は特にひどく、塗装の剥離部分が年々拡大していた。洗浄室は年間を通じて1日も休むことなく作業が行われるため、これまで手の着けようがなかったが、山手地区動物センター棟が竣工したことにより、洗浄機の据え付けの終わる5月中旬から稼働体制に入る6月中旬までの1ヶ月間だけ、従来の洗浄業務を山手地区の洗浄室で行うことが可能になっ

た。そこでこの期間を利用して洗浄室の床の全面改修を行うこととし、作業者、ユーザーの協力を得て実行に移された。1 歩誤れば大混乱を来すおそれがあったが大きなトラブルもなく予定通り作業を終えることが出来た。

＜独立行政法人化にむけて＞

平成 15 年度に予定されている国立大学の独立行政法人化によりこれまで人事院所轄であった事項の多くに労働安全衛生が適用されることとなり、動物実験施設においても様々な問題点が指摘されている。特に、大型設備の大部分が厚生労働省所轄となるため、届け出に必要な関係書類の整理と設置基準の見直しをすすめている。また平成 14 年度よりエチレンオキシドガスが特定有害化学物質に指定されたことから A 地区動物センター棟のガスの貯蔵場所の変更と配管設備の改修が必要となったため緊急に実施した。

＜今後の課題＞

山手地区動物センター棟の稼働に対して、センター職員の定数に増加はなく、所内措置による技官 1 名と部門と兼任の事務補佐員 1 名の増員にとどまった。このため、センター職員は山手地区と A 地区を掛け持ちせざるを得ないこととなった。しかしながら A 地区においては大部分の動物がコンベンショナル動物であり、微生物学的コントロールの必要な山手地区における業務を同一人が並行して行うことは時間的にも管理上からも実情に合わず、将来的にはそれぞれ専任とすべきであろう。動物センターの専任教官が A 地区 E 地区併せて 1 名という体制にも無理がある。E 地区動物センター棟が本格的な稼働をはじめる平成 16 年度以降には A・E 両地区に専任教官が常駐することが望ましい。科学的かつ倫理的な動物実験のために動物実験センターが果たすべき役割は今後ますます大きくなると思われるが、そのためには組織体制の整備は欠かすことが出来ない。

計算科学研究センター

【概要】

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、イオン透過をチャン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。

イオンチャン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

チャンネル様タンパク質（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、速いイオン透過を可能にする物理的なメカニズムやチャンネル周辺のアミノ酸残基置換の効果を定量的に解明している。

技術課

大庭明生

1. 概要

今年度の人事は、平成 14 年 4 月に高橋直樹係員を細胞器官研究系技術係、森将浩係員を統合生理技術係、鈴木千香係員を動物実験技術係にそれぞれ所属換えを行い、統合バイオサイエンスセンターの本格的な活動に合わせ、生命環境研究領域に齊藤久美子係員、時系列生命現象研究領域に高木正浩係員をそれぞれ派遣した。また分子生理研究系技術係・代替技官長谷川絵梨係員の退職（4 月 30 日付）があった。

第 2 期技術部会の活動の終了とともに、第 3 期技術部会を 8 部会（エレクトロニクス工作部会、機械工作部会、凍結技法部会、バイオインフォマティクス部会、安全管理部会、科学英語会話部会、技術士・特許部会）設置した。また本年度も研究活動への貢献を一層進めるために下記の事業を引き続き実施した。

①生理科学実験技術トレーニングコースでの技術指導

本年度（7 月 22 日－7 月 22 日）も標記のコースの一項目『生理学実験のための電気回路・機械工作』を担当し、若手研究者の技術指導に当たった。今回はコースに 2 テーマ（1. OP アンプによる増幅器とバスチェンバー作製、2. 簡易型電気泳動装置作製）を立てた。

②科学研究費補助金（奨励研究）申請の推進

業務を展開していくための問題意識の養成とその解決のための具体的な展開計画、方法の立案能力の養成およびそのための表現力と説明力の養成を通じ、業務上の技術力の総合的な向上を図ることを目的に行っている標記の申請は、20 課題を申請し、10 課題の採択を得た。

③第 3 回課題報告型技術シンポジウムの開催

研究の高度化と多様化に対応したスキル認識と向上を目指した新しい基盤に立つ研究会の立ち上げによる技術系職員の業務の社会的開示を推し進めるために科学研究費補助金（奨励研究）の採択者による第 3 回の報告会を開催した。

④成茂神経科学研究助成基金申請の推進

課員の研究支援力の強化と向上さらに組織の自立のためには活動資金の確保が今後重要な課題となる。今回標記の基金に発生工学用マニピュレーション技術研究会の開催を

申請し、採択され、民間企業の技術者を含めた新規の研究会を開催した。

⑤放送大学利用による職員研修の開講

本年度も引き続き放送大学利用による専門研修を機構職員研修として行った。研修科目は『知覚心理学』と『分子生物学』である。課の研修室には放送大学受信システムを整備したので、人事課の企画以外にも課の企画による放送大学利用研修企画の整備を計画している。

⑥第 3 回機械工作基礎講座の実施

生理学実験に必要な機器を題材に工作技術を研修し、その研修後の作成機器が実際の研究現場で活用できることを目的に、第 3 回機械工作基礎講座を開講した（共通研究施設・機器研究試作室）。題材はアクリル樹脂製パッチクランプ用チェンバーである。

大学共同利用機関の法人化問題に対する技術職員による検討会は、大学共同利用機関が 4 法人に編成・統合されることを受け、それぞれの所属法人で検討会での合意事項（技術組織、技術職の確立、人事交流、研修）を議論、反映させていくことになった。生理学研究所は、基礎生物学研究所、分子科学研究所、核融合科学研究所、国立天文台とともに自然科学研究機構に統合される。また法人化に伴い非公務員型身分となり、労働基準法、労働組合法、労働安全衛生法下での身分、研究現場となる。そのために機構に創設準備委員会が設けられ、法人化に向けてと諸問題が議論された。特に人事制度分科会には技術職員のオブザーバー参加を認められ、上記の合意事項を『就業規則』に織り込む要請をした。また研究現場が労働安全衛生規則のもとに置かれ、各種資格の修得と技能講習の受講の整備が必要となった。

生理学技術研究会は第 25 回を開催した。会では、口演発表が 22 題、ポスター発表が 41 題、研修講演が 2 題あった。これらの活動は『生理学技術研究会報告』にまとめた。また機構長招聘三技術課合同セミナーの第 4 回を開催した。開催テーマは『ライフサイエンスとナノテクノロジー』で 4 題の研修講演を行い、講演内容は『機構長招聘三技術課合同セミナー報告書』としてまとめた。

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】

本年度は、全頭型生体磁気計測装置の新規設置導入を行った。現在は調整がほぼ終了し稼働状態で、装置の特性調査を含めて予備実験が行われている。

この装置はフィンランド製で、すでに臨床応用を目的として医学部病院などに採用されている装置と基本的にほぼ同型であるがチャンネル数が多く、臨床用装置に装備されているプラナータイプ 204ch に加えてマグネトメータ 102ch のセンサが頭部全体をカバーする状態で配置されており一度の計測で全頭を計測することができる。またシールドルームはアクティブシールドを装備したもので、低周波特性が大幅に改善されており、外来による低

周波振動の影響が少ない。刺激系は、TmYAG レーザーによる痛み刺激や液晶プロジェクタによる視覚刺激、その他音響、空気圧などによる機械的な刺激が利用できる。

同時に三次元画像処理装置もハードソフト両面から更新されており新旧両方の MEG 装置によるデータが解析可能である。また使用できる MRI データは analyze, DAICOM, MSI-format, AVSfield-data などが利用できる fMRI による計測データも解析可能となっている。

これらのシステムはローカルエリアネットワークで有機的に結合されており、旧システムの解析系との情報交換もデータサーバを基幹としてシームレスに行われる。

平成14年度 生体磁気計測装置共同利用実験の実施状況について
米国BTi社製 Magnetic Source Imager (デュアルセンサタイプ)

年 月	総日数	休 日	点検日	利用日数	稼働率	外部利用日数	備 考
2002年04月	30	9	2	19	100%	4	
05月	31	10	2	19	100%	6	
06月	30	10	7	13	100%	4	センサB真空引き5日
07月	31	8	2	17	100%	3	トレーニングコース5日(22~26日)
08月	31	9	2	20	100%	4	
09月	30	11	2	15	88%	3	
10月	31	9	2	17	85%	4	
11月	30	10	2	17	94%	2	
12月	31	12	3	16	100%	2	1年点検(サポートバネ交換)
2003年01月	31	12	2	17	100%		
02月	28	9	2	17	100%	2	
03月	31	11	2	15	83%	4	

フィンランドNeuromag社製Vectorview(ホールヘッドタイプ)

年 月	総日数	休 日	点検日	利用日数	稼働率	外部利用日数	備 考
2002年06月	30	10					計測室工事着工
07月	31	8					
08月	31	9					計測装置設置完了
09月	30	11					装置調整および予備実験
10月	31	9					装置調整および予備実験
11月	30	10					装置調整および予備実験
12月	31	12	0	17	89%	0	予備実験
2003年01月	31	12	1	15	83%	0	予備実験
02月	28	9	2	14	82%	0	予備実験
03月	31	11	2	15	83%	0	

*総日数はセンサを使用した計測実験の総日数であり、解析装置の使用日数は含まれていない。

また、トレーニングなど実験以外の用途も含まれていない。

*稼働率=利用日数/(総日数-(休日+点検日))×100

②脳機能計測センター

(1) 形態情報解析室

山口 登

【超高压電子顕微鏡利用状況】

今年度における超高压電子顕微鏡共同利用実験は、合計 10 課題が採択され、全ての課題が実施された。これらの共同実験の成果は、超高压電子顕微鏡共同利用実験報告の章に詳述されている。超高压電子顕微鏡の年間の利用状況を表にまとめたので下記に示す。稼働率は、利用

日数と使用可能日数より求めている。本年度の主な超高压電子顕微鏡の改良・修理としては、フィルム送り機構、高压電源回路の修理やカメラ室排気用ターボモレキュラーポンプの交換作業などが行われた。

2002 年度 超高压電顕月別稼働率

年 月	総日数	休 日	調整日	使用可能 日 数	所内利用	所外利用	計	稼働率	備 考
2002 年 4 月	30	9	5	16	3	0	3	19%	
5 月	31	10	7	14	3	0	3	21%	修理 3 日
6 月	30	10	2	18	14	3	17	94%	
7 月	31	8	5	18	8	7	15	83%	
8 月	31	9	3	19	8	7	15	79%	
9 月	30	11	4	15	9	2	11	73%	修理 1 日
10 月	31	9	5	17	7	8	15	88%	修理 3 日
11 月	30	10	3	17	3	1	4	24%	修理 1 日
12 月	31	12	3	16	3	9	12	75%	
2003 年 1 月	31	12	8	11	4	5	9	82%	修理 5 日
2 月	28	9	4	15	4	7	11	73%	
3 月	31	11	4	16	1	12	13	81%	
計	365	120	53	192	72	61	133	69%	

フィラメント点灯時間 360.9 時間

使用フィルム枚数 5,034 枚

(2) 機能情報解析室

佐藤茂基

【概要】

今年度におけるリアルタイム装置の利用状況は、採択研究課題数 3 題で、全ての研究課題は実施された。

今年度の装置整備状況は、主な事項として次の通りである。11 月にシムコイル用冷却器が故障した。そのまま装置を使用すると、磁場補正が安定せず画像が乱れる点や、シムコイルの破損が考えられる為、メーカーに修理

を依頼した。その間およそ 3 週間、運用を一時休止した。

2 月末にマグネット室用空調機が故障し、室内の温度調整が出来なくなった。温度調整が出来ないと測定中の実験用動物に悪影響が出ると懸念された為、早急に修理を実施した。その間 1 週間ほど運用を一時休止した。

平成 14 年度の MR 装置利用実績を別表に記す。

【機器利用率】

平成 14 年度リアルタイム装置月別稼働率

年月	総日数	保守	使用可能	所内利用	所外利用	計	利用率	備考
2002 年 4 月	30	1	29	0	3	3	10%	
5 月	31	1	30	0	5	5	17%	
6 月	30	1	29	0	5	5	17%	
7 月	31	1	30	0	5	5	17%	
8 月	31	1	30	0	5	5	17%	
9 月	30	3	27	0	5	5	19%	停電
10 月	31	3	28	0	5	5	18%	停電
11 月	30	10	20	0	6	6	30%	冷却器故障
12 月	31	16	15	0	5	5	33%	冷却器修理
2003 年 1 月	31	2	29	0	5	5	17%	
2 月	28	3	25	0	7	7	28%	空調機故障
3 月	31	8	23	0	5	5	22%	定期点検
計	365	50	315	0	61	61	19%	

*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、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 15 年 2 月に更新を行った。導入したアプリケーションは高機能ワークステーション上での利用のみならず、各部門施設の PC に直接イ

ンストールし、ライセンスサーバで認証を行うことで、PC の CPU を使った利用も可能である。登録者は 63 名で、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 241 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 370 名。WWW 登録者が 38 名。LAN の端末数が 940 台。所外からのメール受信数は 23,000/週。所外へのメール発信数は 7,000/週。WWW は一年間に 13 万台の端末からアクセスがあり、総アクセス数は 414 万回。所内向けのダイヤルアップサービスは 118 回/週、13 時間/週の利用があった。

③動物実験センター

佐治俊幸 小木曾 昇 廣江猛

【概要】

平成 13 年度 3 月末に竣工した E 地区分室も 5 月から稼働を開始した。引き続き研究棟、研究支援棟の建築が進行しており、2・3 期に移動予定部門の飼育機器の準備を進めている。また、独立行政法人化への移行を視野に入れ改修の必要のある機器（蒸気及びガス滅菌装置等）の整備方法の検討に入った。

E 地区分室増築に対しての運営経費増額が認められなかったため、運営経費の不足分を補うために受益者負担の原則にのっとり、飼料代とは別に飼育費の徴収を実施することとなった。

【A 地区 陸生動物室】

平成 14 年度の飼育室利用部門数は、31 研究部門（生理研 15 部門、基生研 8 部門、統合バイオサイエンスセンター5 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、抗体作製の外部委託化が進んでいることから、ウサギの飼育数が減少している。

E 地区分室へ移動する飼育動物の受精卵凍結は順調に進行し、2002/1/25 から始まった E 地区移動用の凍結件数はのべ 53 件であった。

E 地区分室の稼働前に長年の懸案であった、本館洗浄室の床張替工事を実施した。工事期間中は洗浄作業が行えないため、その作業が E 地区洗浄室で肩代わりできる今回しか行うことが出来なかったためである。更に、自動洗浄機を更新し、消毒効果も期待できる効率的な洗浄作業が行えるようになった。また、法規制の強化及び独立行政法人化を視野に入れ、EOG 滅菌器の改修工事も実施した。

【AE 地区 水生動物室】

平成 14 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、36 件の利用があった。

加熱冷却ユニットの動作不良が 4 件、恒温室の制御装

置及び冷媒の補充、水槽の亀裂、活性炭濾過タンクの漏水事故の修理を行った。

E 地区水生動物室には、6 基の恒温循環水槽とゼブラフィッシュ用水槽 2 基を設置し、順調に稼働している。

【E 地区 動物実験センター分室】

今年度は 3 月末の分室完成により、4 月から大型機器（オートクレープ、ケージ洗浄機等）やそれらに関わる飼育機器や器材の導入、A 地区からの実験機器や器具の引っ越しを行った。

さらに 7 月には SPF 区域のクリーアップ（ホルマリンガス殺菌）を実施し、8 月からマウスの飼育を開始した。そこで、A 地区で凍結した受精卵を融解・移植または移植をした件数は、のべ 21 件であり、これらすべてを SPF 化することができた。また、A 地区マウス検疫室のマウスのクリーン化を 9 件行った。

利用部門数は 5 研究部門（機構 1 施設、生理研 1 部門、統合バイオサイエンスセンター3 部門）であり、9 月には利用者全てに利用講習会を、また陸生動物利用者に対して実務講習会を行った。

マウスの SPF 化により系統維持動物の繁殖・実験の使用までに期間を要することから、動物飼育数は緩やかに増加傾向を示している。

SPF 区域で飼育中のマウスについては、10 月、12 月、平成 15 年 2 月と微生物モニタリング定期検査を行い、病原性微生物は発見されなかった。

陸生動物 部門別・動物種別搬入数(平成14年度)								
部門	動物種	マウス	ラット	ウサギ	モルモット	ネコ	サル	フェレット
神経化学		1,984	72	0	0	0	0	0
超微小形態生理		21	146	1	0	0	0	0
細胞内代謝		103	0	0	0	0	0	0
生体膜		305	165	0	0	0	0	0
機能協同		343	302	19	37	0	0	0
神経情報		720	258	0	0	0	0	0
液性情報		43	6	0	0	0	0	0
高次神経機構		3,776	96	0	0	0	0	0
高次神経性調節		0	0	0	0	0	4	0
生体システム		0	0	0	0	3	7	0
高次脳機能		130	82	0	0	0	9	0
脳形態解析		259	142	3	18	0	0	0
大脳神経回路論		0	77	0	0	0	0	0
形態情報解析室		6	3	0	0	0	0	0
生体情報処理室		25	7	0	0	0	0	0
動物実験センター		627	37	0	3	0	0	0
細胞機構		0	0	13	0	0	0	0
細胞内エネルギー変換		109	0	0	0	0	0	0
細胞分化		93	0	0	0	0	0	0
感覚情報		337	0	7	0	0	0	0
行動制御		70	141	0	0	0	0	0
種分化第一		179	33	0	0	0	4	5
細胞器官培養		216	0	0	0	0	0	0
形質転換生物		227	0	0	0	0	0	0
分子発生		233	0	0	0	0	0	0
神経分化		25	0	0	0	0	0	0
ナノ形態生理		16	2	0	0	0	0	0
生命環境		1,272	4	0	0	0	0	0
細胞生理		21	0	0	0	0	0	0
		11,140	1,573	52	58	3	24	5

水生動物 月別・動物種別搬入数(平成14年度)														
種	月	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	合計
メダカ		200						1,100		1,000				2,300
ウニ				41							110		70	221
ヒトデ									3,750		1,480		90	5,320
キンギョ							100	100		250		200		650
ホヤ								80		150				230
海水 (t)				8	12			16		8				44
合 計		200	0	41	0	0	100	1,280	3,750	1,400	1,590	200	160	8,721

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、今まで、日本電子 JEM-1200EX 型 透過型電子顕微鏡 2 台と日立 S-800 型走査型電子顕微鏡の合計 3 台の保守契約を行っていたが、利用者数、利用率が高まった為、日本電子 JEM-1010 型（2000 年 2 月、東京大学医学部より移設）の透過型電子顕微鏡の保守契約も開始し、計 4 台の保守契約を行った。

(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 55 件であった。機構内では 43 件あり、機構外は、国内で 7 件、国外ではイギリス、スペイン、ドイツ、中国、ハンガリーの研究者による利用が 5 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	機能協同	- 細胞容積調節の分子メカニズムとその破綻防御 - 運動神経細胞の生存機能維持機構の形態学的研究 - 免疫染色によるタンパク（CFTR）の細胞（心筋）中の分布確認
	超微小形態生理	- 細胞内膜系の輸送現象の解析 - 複素電子顕微鏡の位相板の観察 - 唾液腺傍細胞輸送経路の検討
	神経化学	マウス上丘における GABA ニューロンの発生
	液性情報	- 運動失調マウスの脳組織構築の観察 - マウス脳内における情報伝達にかかわる蛋白質の局在の同定
	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 - 多能性前駆細胞からグリア細胞への分化メカニズムの解析
	大脳神経回路論	大脳皮質の神経回路の研究
	脳形態解析	- 視覚野可塑性における超微形態学的解析 - Rat P3 cerebellum Purkinje cell climbing fiber synapse に存在する AMPA Receptor 数および密度の SDS-LRL 法による解析。 - SDS-FRL 法による受容体分子の局在観察 - 小脳プルキンエ細胞の三次元再構築
	統合バイオセンター戦略的方法論	- 細胞，DNA タンパク質の電顕観察手法に関する研究 - タンパク質の二次元展開に関する研究 - 複素電子顕微鏡の研究開発 - リアノジンレセプターの高次構造解析
	形態情報解析室	小腸絨毛上皮下線維芽細胞の形態学的研究
	技術課	- コメツキムシの走査像微細構造観察 - 脊髄前角ニューロン細胞体の3次元解析
基生研	生殖	生殖細胞の分化の分子機構の解析
	細胞機構	- 高等植物の細胞内物質輸送を解明するため、外来遺伝子産物もしくは内在性タンパク質の免疫電顕 - 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	- 植物細胞の微小管構築機構 - 地衣類の微細構造観察 - ヒメツリガネゴケのホメオボックス遺伝子機能解析
	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
	計時機構	生体膜，特に藍藻類の光合成膜の発達の微細構造的な研究
	行動制御	- 発生期における大脳皮質ニューロンの移動過程の解析 - 小脳前核神経細胞の移動メカニズム解析 - 視床皮質投射系の形成機構に関する研究
	情報制御	葉緑体と関連タンパク質の細胞内分布観察
	感覚情報処理	- 免疫染色によるタンパク質局在の解析 - ニワトリ網膜 Whole mount 等の観察
	遺伝子発現統御第一	イネにおける易変性変異体の解析
	細胞内エネルギー変換機構	出芽酵母自食作用の研究
	発生物系個別研究	- 鱗翅目の発生過程の観察 - 歯科材料の生物適合性の検索

所外 (国内)

大学・研究所	研究代表者名	研究内容
岐阜大学	松山 善次郎	電位依存性カルシウムチャネル異常による神経細胞死の検討
琉球大学	中村 将	魚の性転換時の組織、細胞の観察
東京大学	岸 光子	カバモサイクウィ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
東北大学	稲葉 一男	精子べん毛タンパク質の網等的解析
東京歯科大学	橋本 貞光	唾液腺傍細胞輸送経路の検討
松本歯科大学	佐原 紀行	唾液腺開口分泌エンドサイトーシスの検討
(株)ダイアックス	松田 隆	電子顕微鏡用位相板の開発

所外 (国外)

国名, 大学, 研究所	研究者名	研究内容
イギリス オックスフォード大学	SOMOGYI, Peter	レプリカの観察
イギリス オックスフォード大学	ROBERTS, David	レプリカの観察
イギリス オックスフォード大学	Guillermina Lopez-Bendito	GABA _B 受容体の局在解析
スペイン Universidad de Cashilla-La Maucha	Rafael Lijan-Miras	GABA _B 受容体の局在解析
ドイツ フライブルク大学	KULIK, Akos	膜上機能分子の局在解析
中国 K.Kleung Brain Research Centre	WEN, Wang	フラクチャーの観察
ハンガリー バイオロジ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

加藤勝巳

【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, 2003 年度は, 一軸式

簡易型マニプレータの製作を題材に行っている。参加希望者は, 生理研 7 名, 基生研 2 名で, ガイダンスの後マンツーマンで 4 回の講習を行っており, 一人のけが人も無く無事に講習が終了する事を願っている。

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ており, 今年度も「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 14 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	ボール盤	フライス盤	コンターマシン	旋盤	横切盤	グラインダー	切断機	N Cフライス盤	その他	計
4	10	5	12	7	9	1	4	2	15	65
5	16	14	17	10	9	6	12	1	25	110
6	8	19	15	11	12	10	6	1	31	113
7	28	37	23	21	14	9	4	7	44	187
8	28	23	18	15	7	8	5	2	36	142
9	24	28	24	14	10	7	5	8	31	151
10	30	32	17	6	19	6	2	12	15	139
11	22	29	23	4	14	8	8	2	12	122
12	4	8	4	3	2	4	1	1	12	39
1	16	7	9	8	12	8	2	0	15	77
2	35	22	24	9	2	15	4	2	18	131
3	21	17	20	15	0	15	6	4	16	114
合計	242	241	206	123	110	97	59	42	270	1390

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	43	4	0	47	76
5	60	9	0	69	82
6	66	7	0	73	103
7	71	5	9	85	265
8	60	1	0	61	117
9	63	8	0	71	162
10	60	3	0	61	128
11	58	1	0	59	131
12	23	3	0	26	44
1	45	3	0	48	71
2	67	2	0	69	150
3	50	1	0	51	127
合計	666	47	9	722	1456

機器研究試作室部門別利用状況

高次神経性調節	110 名	ナノ形態生理	97 名	統合生理研究施設	90 名
脳形態解析	75 名	生体膜	59 名	機能情報解析室	45 名
心理生理学	40 名	動物実験センター	36 名	神経分化	24 名
超微小形態生理	17 名	大脳神経回路論	17 名	形態情報解析室	16 名
液性情報	14 名	神経情報	6 名	生命環境 (狭間研)	6 名
高次神経機構	3 名	生体情報処理室	2 名	神経化学	2 名
細胞生理	2 名	細胞内代謝	1 名	電子顕微鏡室	1 名
生体システム	1 名	技術課	1 名		

時系列（高田研）	11 名	感覚情報処理	8 名	R I 実験センター	5 名
エネルギー変換	3 名	形態形成	3 名	生命環境（塚谷研）	3 名
大型スペクトロ	3 名	技術課	3 名	細胞増殖	1 名
細胞分化	1 名	情報制御	1 名	種分化機構第一	1 名
生殖	1 名	遺伝子発現統御第一	1 名	形質転換生物	1 名
人工気象室	1 名				
分子研その他	9 名				