

# 【 研 究 会 報 告 】

## 研究会報告

## 〔 目 次 〕

|                                                                                 |     |
|---------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1. シナプス形成とリモデリング-機能発現の分子基盤<br>(代表者: 岡部繁男 2002 年 12 月 5 日～12 月 6 日)              | 173 |
| 2. 抑制性ニューロンの役割<br>(代表者: 小西史朗 2002 年 12 月 4 日～12 月 5 日)                          | 178 |
| 3. 細胞内シグナルの時・空間的制御<br>(代表者: 黒崎知博 2002 年 10 月 10 日～10 月 11 日)                    | 186 |
| 4. バイオ分子センサー<br>(代表者: 稲垣暢也 2002 年 5 月 27 日～2002 年 5 月 28 日)                     | 196 |
| 5. 細胞死の誘導と制御・その分子機構と生理病理機能<br>(代表者: 米原 伸 2002 年 9 月 10 日～ 9 月 11 日)             | 208 |
| 6. 上皮組織 NaCl 輸送制御の分子メカニズム<br>(代表者: 丸中良典 2002 年 12 月 4 日～12 月 5 日)               | 216 |
| 7. イオンチャネルのプロテオミクスと心血管系疾患の病態に関する新たな展開<br>(代表者: 中屋 豊 2002 年 11 月 25 日～11 月 26 日) | 224 |
| 8. グリア細胞と脳機能発現<br>(代表者: 井上芳郎 2002 年 9 月 6 日～ 9 月 7 日)                           | 235 |
| 9. 神経科学の新しい解析法とその応用<br>(代表者: 東田陽博 2002 年 11 月 14 日～11 月 15 日)                   | 242 |
| 10. ATP 受容体の生理機能の解明<br>(代表者: 井上和秀 2002 年 8 月 29 日 8 月～30 日)                     | 252 |
| 11. 興奮性組織のイオン調律性制御メカニズム<br>(代表者: 井本敬二 2002 年 8 月 1 日～ 8 月 2 日)                  | 266 |
| 12. 大脳皮質の神経回路<br>(代表者: 金子武嗣 2002 年 12 月 3 日～12 月 4 日)                           | 276 |
| 13. 機能的 MRI 研究会<br>(代表者: 定藤規弘 2002 年 11 月 28 日～11 月 29 日)                       | 280 |
| 14. シナプス伝達制御の分子機構<br>(代表者: 平野丈夫 2002 年 9 月 27 日～ 9 月 28 日)                      | 286 |
| 15. 第 3 回脳磁場ニューロイメージング<br>(代表者: 栗城眞也 2002 年 12 月 11 日～12 月 12 日)                | 288 |

|                                                              |     |
|--------------------------------------------------------------|-----|
| 16. 痛みの基礎と臨床<br>(代表者：緒方宣邦 2002年9月5日～9月6日) .....              | 304 |
| 17. 消化管機能<br>(代表者：鈴木裕一 2002年8月27日～8月28日) .....               | 318 |
| 18. 電子位相顕微鏡法の医学的・生物学的応用<br>(代表者：臼田信光 2003年3月12日～3月15日) ..... | 329 |
| 19. 生体分子ダイナミクス<br>(代表者：桑田一夫 2003年3月10日～3月12日) .....          | 340 |
| 20. 「シナプス可塑性とまるごとの脳機能」<br>(代表者：井ノ口 馨 2002年5月23日～5月24日) ..... | 351 |

## 1. シナプス形成とリモデリングー 機能発現の分子基盤

2002年12月5日-12月6日

代表・世話人：岡部繁男（東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科）

所内対応者：小幡邦彦

(1) 軸索成長の細胞生物学：神経接着分子と細胞骨格の動的機能

上口裕之（理化学研究所 脳総合研究センター 発生・分化研究グループ）

(2) セマフォリン・プレキシンのリン酸化を介した細胞内情報伝達

中村史雄（横浜市立大学 医学部 薬理学教室）

(3) シナプス小胞のグルタミン酸含量とシナプス伝達

石川太郎（東京大学大学院 医学系研究科 神経生理学教室）

(4) 中枢シナプスの神経伝達物質共放出

鈴木紀光（神戸大学大学院 医学系研究科 脳科学講座）

(5) 神経シナプス active zone 形成の分子メカニズム

大塚稔久（カン研究所）

(6) 体性感覚野マップ精緻化の分子機構：マウス逆遺伝学的解析

岩里琢治（理化学研究所脳科学総合研究センター 行動遺伝学技術開発チーム）

(7) 匂い地図形成におけるセマフォリンの機能

谷口雅彦

（東京大学大学院 医学系研究科 分子細胞生物学専攻 生化学分子生物学講座 細胞情報研究部門）

### 【参加者名】

岡部繁男, 井上明宏, 黒柳秀人, 栗生俊彦, 漆戸智恵, 壺岐純子, 杉山佳子, 久保義弘（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科）, 白尾智明, 関野祐子, 水井俊幸, 笹川快生（群馬大学医学部）, 竹居光太郎（東邦大学医学部）, 上口裕之, 岩里琢治, 今村一之（理化学研究所脳科学総合研究センター）, 中村史雄（横浜市立大学医学部）, 真鍋俊也, 神谷温之, 鈴木紀光（神戸大学大学院医学系研究科）, 石川太郎, 谷口雅彦（東京大学大学院医学系研究科）, 井ノ口馨（三菱化学生命科学総合研究所）, 渡部文子, 志牟田美佐, 熊澤紀子, 三輪秀樹, 有馬史子, 片山憲和（東京大学医科学研究所）, 山田麻紀, 中尾和人, 山田隆二, 河合信宏（東京大学大学院薬学系研究科）, 能瀬聡直（東京大学大学院理学系研究科）, 山本亘彦, 小田

洋一, 小橋常彦, 中山寿子, 丸山拓郎, （大阪大学大学院生命科学研究科）, 上坂直史, 大波壮一郎（大阪大学大学院基礎工学研究科）, 狩野方伸（金沢大学大学院医学系研究科）, 尾藤晴彦, 玉巻伸章（京都大学大学院医学系研究科）, 今泉美佳, 藤原智徳（杏林大学医学部）, 斉藤祐見子, 川村勇樹, 手塚満恵, 李 月（埼玉医科大学）, 片岡正和（信州大学工学部）, 大塚稔久, 井上英二, 高尾絵津子, 俵田真紀（カン研究所）, 海老原達彦, 近藤哲朗（産業技術総合研究所）, 古川智洋（オリンパスプロマーケティング）, 佐藤栄人（順天堂大学医学部）, 鳥海滋（基礎生物学研究所）, 重本隆一, 初山明子, 宮田真理子, 大倉正道, 小幡邦彦, 柳川右千夫, 山肩葉子, 兼子幸一（生理学研究科）

### 【概要】

脳神経系の機能は、神経回路網が構築され、神経細胞間での情報伝達が成熟することで成立する。分裂停止後の神経細胞が予定された領域へ移動し、軸索と樹状突起の伸展・成熟過程を経てシナプスを形成する事で、機能

的な神経回路網が出来上がるが、いったん形成されたシナプスも神経活動により絶えず修飾される事が知られている。したがって、一連の分子機構を詳細に検討するためには、分子生物学、生化学、生理学、解剖学、細胞生

物学, 遺伝学, システム脳科学など異なる分野の人材の協同による multidisciplinary なアプローチとその統合が必要となっている。本研究会では, 「シナプス形成とリモデリング-機能発現の分子基盤」というテーマに焦点を絞り, 3 つのセッションを設けて研究発表および討論を行った。第一セッション「シナプス前終末の前駆体: 成長円錐」においては成長円錐研究における 2 つの重要な側面である, 細胞骨格による成長円錐運動の分子機構と外界からのシグナルによる運動制御について発表があった。第二セッション「プレシナプス研究の新展開」においては, 古典的なシナプス伝達に関する疑問に対して新しい

電気生理学的研究手法を用いて解答を与えようとする意欲的な研究が紹介された。第三セッション「感覚系神経回路の形成と制御」においては, 高次機能を分子レベルでの研究と結びつけて行く上で, 感覚系の神経回路形成の分子機構が突破口となるのではないかという認識のもとに, そのような研究を活発に行っている研究者の最先端の成果を聞く事ができた。研究会においては活発な討議が行われ, シナプス形成と機能発現過程の研究における様々な問題点を洗い出し, 将来的な異分野間での共同研究の萌芽を見いだす機会を提供する事ができた。

## (1) 軸索成長の細胞生物学: 神経接着分子と細胞骨格の動的機能

上口裕之 (理化学研究所 脳科学総合研究センター 発生・分化研究グループ)

神経軸索の形成過程に重要な神経細胞体周囲の膜様部および糸状突起, および軸索伸長過程に重要な成長円錐に存在するアクチン線維は, 周辺部から細胞体方向へ後方移動し牽引力を発生する。神経接着分子の細胞外領域は, 細胞外基質上のリガンドと接着し, タイヤとしての役割を果たす。同時に, 接着分子細胞内領域がアクチン後方移動と結合することにより, 細胞外基質へと牽引力が伝達され軸索成長が誘起される。接着分子細胞内領域とアクチン後方移動の結合は, 何らかの細胞内分子 (クラッチ分子) を介すると考えられている。本演題では, 免疫グロブリンスーパーファミリーに属する神経接着分子 L1 に対して, アンキリン B がクラッチ分子として機

能することを報告する。軸索が効率的に成長するためには, その先端縁が細胞外基質を強固にグリップし安定した足場を形成することが重要である。アクチン後方移動と結合した接着分子は, 軸索成長に伴って形質膜上を相対的に後方へ移動してしまうため, 接着分子の軸索先端縁への輸送により, 先端縁形質膜の接着性を高める必要がある。接着分子の再利用には, 形質膜上を前方輸送する経路と, 細胞内小胞輸送を介する経路とが知られている。本演題では, 軸索成長円錐における神経接着分子 L1 の細胞内輸送機序を概説する。以上, 神経接着分子と細胞骨格の分子動態およびそれらの相互作用に関する最近の知見を紹介し, 軸索成長のメカニズムを考察する。

## (2) セマフォリン・プレキシンのリン酸化を介した細胞内情報伝達

中村史雄 (横浜市立大学 医学部 薬理学)

神経回路形成時に成長円錐はガイド分子によって導かれ標的器官に達する。セマフォリンは反発性のガイド分子として同定され, 脊椎動物では脊髄後根神経節の成長円錐の退縮を引き起こす Sema3A とその受容体である Neuropilin-1/Plexin-A 複合体系が最も詳細に解析されている。今回 Plexin-A 以降の細胞内情報伝達機構について報告する。Cdk5 は Sema3A の退縮反応に関与し, Sema3A

の下流分子である CRMP2 は Cdk5 の基質となる。さらに CRMP2 のリン酸化部位変異体は Sema3A による退縮反応を阻害する。これらの事実は Sema3A の下流で CRMP のリン酸化が重要である事を示唆する。ガイド分子の情報伝達におけるチロシンリン酸化の関与を調べる為, Plexin-A に直接結合してチロシンリン酸化が変動する分子を検索し, 100kDa の分子が Sema3A 刺激後, 数分でチ

ロシンリン酸化され、その後速やかに脱リン酸されることを見いだした。更にチロシンホスファターゼ (PTP) も Sema3A の情報伝達に関わると推測し、LAR 型 PTP がセマフォリンと関連するという仮説を立てた。現在までに LAR 型 PTP の 1 つである PTP  $\delta$  が Sema3A の退縮反

応を部分的に阻害すること、また PTP  $\delta$  に 100kDa の分子が会合し、そのチロシンリン酸化量が Sema3A 刺激後に減弱することを見いだした。これらのことから PTP  $\delta$  は Sema3A 情報伝達系に何らかの作用を及ぼすと考え解析を進めている。

### (3) シナプス小胞のグルタミン酸含量とシナプス伝達

石川太郎<sup>1</sup>, 山下貴之<sup>1</sup>, 佐原資謹<sup>1,2</sup>, 高橋智幸<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 東京大学大学院 医学系研究科 神経生理学, <sup>2</sup> 国立精神神経センター 神経研究所 診断研究部門)

シナプス後膜に存在する AMPA 受容体及び NMDA 受容体が、単一シナプス小胞から放出されるグルタミン酸によって飽和されるという仮説 (飽和仮説) が正しいとすると、シナプス小胞のグルタミン酸含量が増したとしてもシナプス伝達効率は増大しない。この仮説をラット脳幹スライスの巨大シナプス (the calyx of Held) において検証した。シナプス前末端のパッチ電極に 1 mM の L-グルタミン酸を加えたときに MNTB 細胞からホールセル記録される AMPA-微小 (m) EPSC の振幅は、シナプス前末端に記録電極がないときの振幅と同程度であった。これに対し、100 mM の L-グルタミン酸をシナプス前末端の電極に負荷して記録される AMPA-mEPSC の振幅は

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

### (4) 中枢シナプスの神経伝達物質共放出

鈴木紀光 (神戸大学大学院 医学系研究科 脳科学講座 細胞神経生理)

中枢神経系では、1 つの neuron は 1 つの fast neurotransmitter を有するという原則が知られていた。しかしながら近年になりその理解の変更を求められている。小脳ゴルジ細胞は、顆粒細胞とシナプス結合し、その終末から抑制性神経伝達物質の GABA を放出する。一方、ゴルジ細胞は細胞体およびシナプス終末に GABA のみならず、別の抑制性神経伝達物質の glycine を含むことが形態学的に報告されている。今回、ゴルジ細胞のもうひとつの標的細胞と推測される unipolar brush cell (UBC) の抑制性入力に着目した。10-14 日齢のマウス小脳スライスの UBC からホールセル記録を行い、抑制性シナプス後電流 (IPSC) を記録した。刺激誘発性および自発性

IPSC に GABA<sub>A</sub> 受容体媒介性の成分と同時に glycine 受容体媒介性の成分が存在することを確認した。ゴルジ細胞と UBC の paired recording を行なって検討した結果、ゴルジ細胞が UBC に対し抑制性シナプスを形成し、シナプス前終末から GABA と glycine を同時に放出していることを観察した。さらに微小シナプス後電流 (mIPSC) の解析の結果、ゴルジ細胞神経終末のシナプス小胞の一部は GABA, glycine を同時に含有していることが示唆された。本研究会では Dale の法則が提唱されてからの簡単な歴史について形態学あるいは電気生理学の報告を交えながら説明し、最近までの様々な知見を包括的に紹介する。

### (5) 神経シナプス active zone 形成の分子メカニズム

大塚稔久 (カン研究所)

神経シナプスの cytomatrix at the active zone (CAZ)には, RIM1, Munc13-1, piccolo および bassoon などの細胞骨格蛋白質が存在し, active zone の形成, 構造維持および機能発現に重要な役割を果たしている。最近, 私共は, ラット大脳より新規 CAZ 蛋白質 CAST を同定しその機能解析を行った。CAST は 957 のアミノ酸からなり, 複数の coiled-coil 領域と C 末の PDZ ドメイン結合モチーフを有している。CAST は, その C 末で RIM1 に直接結合し, かつ RIM1 を介して Munc13-1 と結合して 3 者複合体を形成する。また, CAST および RIM1 の欠失変異体の解析から, CAST が RIM1 の active zone における anchoring 蛋白質であることが示唆された。さらに,

bassoon もこの 3 者複合体に直接もしくは間接的に結合する事から, 電子密度の高い CAZ は, このような蛋白質-蛋白質相互作用のネットワークをその分子基盤としている事が示唆される。前半は, この CAST のデータを中心に active zone 形成の分子メカニズムについて話題を提供したい。また, 後半では, シナプス小胞の clustering 制御因子として線虫で同定された蛋白質 SAD-1 のヒトホモログの機能解析について報告し, シナプス小胞の active zone への targeting mechanism についても話題を提供したい。さらに, 古典的な生化学と質量分析法を用いて同定した新規の PSD 蛋白質についてもいくつかのデータを紹介する。

### (6) 体性感覚野マップ精緻化の分子機構: マウス逆遺伝学的解析

岩里琢治

(科学技術振興事業団 さきがけ研究 21/

理化学研究所 脳科学総合研究センター行動遺伝学技術開発チーム)

マウス大脳皮質体性感覚野には, 末梢体性感覚器であるヒゲの分布に対応した, 『バレル』と呼ばれる構造が存在する。バレルは, 視床-皮質軸索終末と第 4 層神経細胞から構成され, 活動依存的神経回路発達のモデルとして注目されてきた。私達は最近, Cre/loxP 組換えシステムを利用し, 大脳皮質の興奮性神経細胞に限定して NMDA 受容体を欠損するマウス (CxNR1KO マウス) を作製した。このマウスの大脳皮質では, 第 4 層神経細胞のパターン化が起きず, また視床-皮質軸索のパターン形成も異常になる (Iwasato et al., 2000, Nature 406, 726-731)。NMDA 受容体の活性化からバレル形成に至る分子機構を更に理解するため詳細な形態学的解析を行なった。幼

弱マウスのヒゲ傷害時の視床-皮質軸索の可塑性を解析した所, CxNR1KO マウスと野生型マウスとの間に有意差はなく, この部位の可塑性は NMDA 受容体を介した逆行性シグナルに依存しないと考えられた。更に第 4 層神経細胞の樹状突起の形態をゴルジ染色によって解析した。正常マウスでは樹状突起は一つのバレルに局限し非対称的な形態を示すが, CxNR1KO マウスでは方向性を持たず放射状に伸展し, スパイン密度も有意に高かった。これらの結果は, 大脳皮質の NMDA 受容体の活性化が, 不適切な樹状突起の成長抑制を介して樹状突起の方向性を決定し, それによってヒゲと第 4 層神経細胞の 1 対 1 対応が形成されることを強く示唆する。

## (7) 匂い地図形成におけるセマフォリンの機能

谷口雅彦

(東京大学大学院 医学系研究科 生化学分子生物学講座細胞情報)

嗅上皮に存在する嗅細胞は多数の嗅覚受容体の内 1 種類だけを発現しており、同種の嗅覚受容体を発現する嗅細胞の嗅神経は、嗅球に存在する約 1800 個の糸球体の内わずか 2～数個の糸球体に正確に投射・収束する。このように糸球体の空間配置は嗅球における「匂い地図」を形成する。しかし、正確な匂い地図形成の分子メカニズムはほとんど分かっていない。セマフォリンは神経軸索ガイダンスにおいて重要な分子である。私は以前セマフォリン 3A (Sema3A) のノックアウトマウス (-/-マウス) を作成したが、Sema3A および そのレセプターであるニューロピリン-1 (NP-1) が嗅覚系に発現する、という理由等から匂い地図形成における Sema3A の機能に注目し

て現在研究を進めている。抗 OCAM 抗体と抗 NP-1 抗体を分子マーカーとして使用し、成体 Sema3A<sup>-/-</sup>マウスの匂い地図形成を解析した。野生型マウスでは、NP-1 を発現している嗅神経は特定の糸球体に投射し限局したパターンを形成する。しかし、Sema3A<sup>-/-</sup>マウスにおいては NP-1 陽性の糸球体は嗅球全体に広がっていた。また抗 OCAM 抗体による匂い地図においても、<sup>-/-</sup>マウスにおいて異常が認められた。さらに optical imaging 法を用いて嗅球背側の神経活動を解析した結果、<sup>-/-</sup>マウスにおける異常を明らかにした。以上のことより、Sema3A は嗅球において正確な匂い地図を形成するために必須であることが示された。

## 2. 抑制性ニューロンの役割

2002年12月4日-12月5日

代表・世話人：小西史朗（三菱化学生命科学研究所）

所内対応者：柳川右千夫

(1) 小脳皮質におけるシナプス間の相互作用

小西史朗（三菱化学生命科学研究所）

(2) トランスジェニックマウスによる小脳インターニューロンの機能解析

渡辺 大（京都大学大学院 医学系研究科）

(3) 眼球運動の適応制御と小脳の長期抑圧

永雄総一（自治医科大学）

(4) 眼球運動の最終指令信号の形成における抑制性ニューロンの役割

岩本義輝（筑波大学基礎医学系）

(5) 聴覚伝導路における抑制性ニューロンの機能的意義

古谷野好（京都大学大学院 医学系研究科）

(6) 抑制性伝達物質のスイッチング

鍋倉淳一，溝口義人，柴田修明（九州大学大学院 医学研究院）

(7) 抑制性ニューロンとCl<sup>-</sup>ホメオスタシスのクロストーク

福田敦夫（浜松医科大学）

(8) 新規ホメオボックス遺伝子 *Arx* が語る脳の正常と異常

北村邦夫（三菱化学生命科学研究所）

(9) 視床における GABAergic ニューロンの決定と移動

橋本和枝，嶋村健児（熊本大学 発生医学研究センター）

(10) 上丘 GABA ニューロンの発生

小幡邦彦，常川直子，柳川右千夫（生理学研究所）

### 【参加者名】

小西史朗，北村邦夫（三菱化学生命科学研究所），渡辺 大，古谷野好，小野宗範（京都大学大学院医学系研究科），永雄総一，首藤文洋，大木雅文（自治医科大学），岩本義輝，加藤利佳子，小島奉子（筑波大学基礎医学系），鍋倉淳一，溝口義人（九州大学大学院医学研究院），福田敦夫，上野伸哉，岡部明仁，清水（岡部）千草，山本純緯（浜松医

科大学），山田順子（静岡大学大学院電子科学研究科），橋本和枝（熊本大学発生医学研究センター），伊藤哲史（福井医科大学），中尾和人（東京大学大学院薬学系），水井俊幸（群馬大学医学部），井本敬二，小幡邦彦，柳川右千夫，山肩葉子，兼子幸一（生理学研究所）

### 【概要】

抑制性神経伝達では，(1) 抑制性神経伝達物質を合成し，シナプス小胞へ貯蔵・放出する抑制性ニューロン，(2) 抑制性神経伝達物質受容体を発現し，抑制性ニューロンとシナプスを形成するニューロンが中心的役割を果たしている。

本研究会では，抑制性ニューロンと抑制性神経伝達に

ついての研究者およびこれらの研究に興味を抱いている参加者が，形態学（発生を含む），生理学，薬理学，分子生物学，発生工学等，分野の垣根を越えて一同に会して徹底的に討論することを目的として昨年に続き企画された。12月4日と5日の2日間にわたり，生理学研究所大会議室にて開催された。研究会には生理学研究所外から

発表者を含めて 22 人の研究者が参加し、所内からの研究者も含めて活発な討論が行われた。

発表については、『小脳の抑制性ニューロン』、『脳幹および脊髄の抑制性ニューロン』、『抑制性ニューロンの発生および分子基盤』のテーマ毎に、3 から 4 人の研究者が発表を行い、討論した。一般に、抑制性ニューロンは中枢神経系に散在し、興奮性ニューロンに比較すると少数であることから、*in vivo* において正確に同定して機能を解析することが困難であった。それでも小脳皮質は、その層構造から抑制性ニューロンの同定が他の領域に比較すると容易であることから、解析が進んでおり、本研究会の主題となった。また、脳幹や脊髄では、抑制性ニューロンを標識した遺伝子改変マウスを利用した解析結果についての発表があった。また、眼球運動における抑

制性ニューロンの果たす役割についての発表・討論があり、特定の機能に焦点を絞った抑制性ニューロンの解析は今後の研究の方向性を示唆した。抑制性ニューロンの発生および分子基盤のテーマでは、発達期抑制性神経伝達に関する GABA およびグリシンの役割、細胞内 Cl<sup>-</sup> イオンの役割について、発表、討論があった。GABA ニューロンの発生や移動は小脳皮質で最もよく解析されているが、発生に寄与する分子の発表があった。また、視床や中脳など小脳皮質以外の領域の GABA ニューロンの発生についての発表があり、各領域で発生機構に違いがあることが明らかにされた。

最後に、抑制性ニューロンと抑制性神経伝達についての研究は近年増加しており、本研究会を継続することにより、本研究の発展に寄与することを希望します。

## (1) 小脳皮質におけるシナプス間の相互作用

小西史朗（三菱化学生命科学研究所 分子神経生物）

シナプスにおける神経伝達は、大別して 2 つの様式で行われていると考えられる。第一の様式は、前および後シナプス要素の間の厳密なシナプス結合を介する典型的な伝達であり、これは空間的および時間的に精確なシグナル伝達を達成する。一方、前シナプス終末から放出された神経伝達物質は、シナプス間隙を超えて隣接するシナプス部位へも作用をおよぼすことを示す生理および形態的な証拠が蓄積してきた。このような第二の伝達様式は、神経伝達物質のスピルオーバー仮説とも呼ばれ、シナプスの情報処理機構に空間・時間的ドメインの両面で著しい多様性を与えるものと想定される。

とくに、小脳皮質からの唯一の出力系であるプルキンエ細胞へ入力する異なるシナプス経路の間で、顕著な相互作用が起ることが証明されている。このような異シナプス性 (heterosynaptic) 相互作用は、少なくとも 5 種類が同定されてきている。第一は、これまで良く研究されてきた平行線維 - 登上線維の間にみられる長期抑圧 (LTD) である。第二に、ここ数年の間に明らかにされてきた内在性カンナビノイドで仲介される逆行性シグナル伝達がある。これには、逆行性信号がプルキンエ細胞から平行線維と GABA 作動性介在ニューロンへ伝達される 2 つの過程が知られている。これらのシナプス機構に

くわえて、最近さらに 3 種類の異シナプス性相互作用が明らかになってきた。

脳幹に由来するモノアミン神経終末から放出されたノルアドレナリン (NA) とセロトニン (5-HT) は、アミンの放出程度に依存して小脳皮質の GABA 作動性ニューロンとプルキンエ細胞間の抑制性伝達を短期および長期間にわたってシナプス前性に増強する。この増強効果は、二つの分子機構で仲介されることが提唱された。NA は  $\beta$  受容体を介して細胞内 cAMP レベルを上昇させ、この cAMP が介在ニューロンの過分極活性化カチオンチャネルに直接作用して脱分極を起こし、スパイク発射を上昇する。その結果、介在ニューロンからの GABA 放出の頻度が増加する。また cAMP は protein kinase A を活性化して、GABA 遊離機構も促進するらしい。

さらに登上線維から放出される興奮性伝達物質（おそらくグルタミン酸）は、プルキンエ細胞の興奮と同時に、プルキンエ細胞への GABA 伝達にシナプス前抑制を引き起す。このシナプス前抑制は、AMPA 型グルタミン酸受容体で仲介されることが示された。この前シナプス性 AMPA 受容体を介する脱抑制の過程が詳しく調べられ、通常のイオン透過型グルタミン酸受容体とは異なる性質を示すことが明らかになってきた。

このほかに、小脳皮質で新しい様式のシナプス間相互作用の存在が示された。小脳介在ニューロンから放出された GABA は、おそらくスピルオーバ伝達によって平行線維 - プルキンエ細胞間のグルタミン酸シナプス周辺部の GABAB 受容体に働き、代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR) で仲介される興奮性シナプス反応を増強する。この増強反応は、GABAB 受容体 -mGluR 間のクロストーク

クによって引起されると考えられる。

これらの例から明らかなように、homosynaptic な結合を伴う古典的な興奮性および抑制性伝達の効率は、異シナプス性入力活動によって著明な修飾を受ける。このような異なるシナプス入力間のクロストークは、中枢シナプスの情報処理およびシナプス可塑性において多様な役割を果たしているものと想定される。

## (2) トランスジェニックマウスによる小脳インターニューロンの機能解析

渡辺 大 (京都大学大学院 医学研究科生体情報科学)

中枢神経系の局所神経回路には興奮性シナプス伝達を担うグルタミン酸作動性ニューロンとともに様々なインターニューロンが存在している。ヒト・インターロイキン 2 型受容体アルファサブユニットと GFP の融合タンパク (IL-2R/GFP) を発現するトランスジェニックマウスにより、(1) immunotoxin による cell targeting, (2) GFP の蛍光を利用して single cell レベルの解析を行う手法を組み合わせて、小脳皮質インターニューロンであるゴルジ

細胞の解析を行った。

小脳スライス上で GFP の蛍光を指標にゴルジ細胞を正確に同定し、顆粒細胞の平行線維-ゴルジ細胞間のグルタミン酸作動性シナプスの解析を行った。このシナプスでは、興奮性シナプス伝達物質であるグルタミン酸により、代謝型グルタミン酸受容体 2 型 (mGluR2) を介して抑制性シナプス伝達が生じることが明らかとなった。

## (3) 眼球運動の適応制御と小脳の長期抑圧

永雄総一 (自治医科大学 生理学)

小脳プルキンエ細胞はそのユニークな形態的特徴のみならず、長期抑圧 (LTD) と呼ばれるシナプス伝達可塑性を有しており、抑制性ニューロンの代表として広く研究されている。LTD が脳による運動学習の源であるという仮説が、小脳片葉による眼球反射の適応の実験モデルをもとに提唱されている (片葉仮説: Ito, 1970)。片葉仮説は、ニューロサイエンスの大きなトピックスの 1 つであり、米国の Llinas, Miles や Lisberger と Ito のグループの間で、その評価に関して激しい論争が繰り返された。しかしながら、演者のグループのみならず他のグループを

含めた多くの研究結果は、様々な動物種と異なった方法を用いて得られたにもかかわらず、片葉仮説を支持するものであり、21 世紀を迎えて、長期抑圧と運動学習の因果関係を強化する方向に向かっているようである。演者はこの論争に、前庭動眼反射 (VOR) や視機性眼球反応 (OKR) と呼ばれる眼球反射の適応、滑動性追跡眼球運動 (Smooth Pursuit) やサッケード眼球運動などの随意眼球運動の適応とその神経機構の研究などを通じて関与してきたが、この論争の問題点と、今後の小脳の機能的研究の展望について紹介する。

#### (4) 眼球運動の最終指令信号の形成における抑制性ニューロンの役割

岩本義輝 (筑波大学 基礎医学系生理)

動物が対象を注視するために行う正確で速い視線移動はサッケード(saccade)と呼ばれ、視覚情報の効果的な収集に重要である。水平眼球運動は対をなす2つの外眼筋の協調的活動により起こる。サッケードの際、主動筋運動ニューロンは一過性の高頻度発射(burst)を、拮抗筋運動ニューロンは一過性の発射停止(pause)を示し、このpush-pull innervationにより高速で円滑な眼球運動が実現される。橋延髄網様体には同側へのサッケードに際してバースト発射を示すニューロン(burst neuron, BN)が存在する。興奮性、抑制性の2種類(EBN, IBN)が知られており、EBNは同側の、IBNは対側の外転神経核運動ニューロンに投射する。BNの発射特性とサッケードのパラメータの間には密接な関係がある。BNの瞬間発射頻度の変化は眼球速度の時間経過と酷似し、バーストの持続時間は運動の持続時間にほぼ等しい。BNへの入力としては、橋正中部のomnipause neuron(OPN)からの抑制入力、対側上丘、対側網様体からの興奮入力が知られているが、BNのバースト活動がどのような入力によって形成されるかはよくわかっていない。われわれは単一BNレベルでの抑制入力遮断の効果をcombined

electrophoresis-recordingにより明らかにすることを試みた。覚醒ネコ標本でglycine receptor antagonistであるstrychnineをIBNに電気泳動的に投与しその発射活動への影響を調べた。眼球運動は磁気サーチコイル法により記録し、IBNは眼球運動時の発射パターンと記録部位により同定した。strychnine投与の結果、注視期間にIBNの自発発射が現れ、同側へのサッケードの際バーストに引き続いてtail dischargeが出現し、対側へのサッケード時の活動が著明に増加した。これらの結果は、安定した注視に抑制入力が必要であること、IBNをドライブする興奮入力は運動終了後まで続く持続の長いものであること、サッケードの終了を決めるのはこの興奮入力を打ち消す抑制入力であること、対側サッケード時にはOPN以外からの抑制入力が興奮入力を打ち消していることを示している。本研究により、IBNへの新しい抑制入力と興奮入力の存在が明らかになり、それらがIBN発射パタンの形成に重要であることが示された。これらの入力の源について時間が許せばサルの小脳室頂核のデータも交えて考察してみたい。

#### (5) 聴覚伝導路における抑制性ニューロンの機能的意義

古谷野好 (京都大学大学院 医学系研究科 神経生物)

聴覚伝導路での抑制性神経は極めて特徴的である。中枢神経系全体を見たとき、GABA作動性神経は、その細胞体が存在する核内、あるいは皮質の限局した部位に投射を限定するinterneuronであることがほとんどである。しかし、聴覚伝導路では主路の多くの投射線維がGABA作動性である。抑制性の情報が、興奮性の情報と同様に上位核にもたらされており、音情報の処理に大きな機能的意義を持つと考えられる。

下丘を含む比較的下位の聴覚伝導路では、音の属性(周波数や振幅)を検出するほか、音に付随する様々な情報、いわゆる“音の手掛かり(sound cue)”と呼ばれる特徴を抽出している。例えば、音源の定位に関わる、両耳間時

差(ITD)や音圧差(ILD)の抽出などが例としてあげられる。ITDの検出は鳥類では層状核(NL)で行われる。我々はニワトリNLでのITD計算機構を調べる過程で、NL細胞のGABA<sub>A</sub>受容体の活性化によって、ITD検出の精度が改善される得ることを見いだした。また、Fujita, Konishiは、NLより上位の神経核でのITD計算機構、即ち位相多義性等の曖昧な情報が排除される過程で、GABAが大きな役割を演ずることを、既に報告している。ヒトを含む哺乳類に於いても、聴覚伝導路での抑制性神経はITDやILD検出機構を含むsound cueの抽出に大きな役割を担うと思われる。

GABA作動性神経による抑制回路システムの生理学的

役割をより詳細にしかも体系的に論ずるためには、GABA 作動性神経によって構成される神経回路を明らかにし、その上で電気生理学的な知見を得る必要がある。しかし、これまで用いてきた通常のスライス標本では GABA 作動性神経の識別すら困難であった。これを打開するために、我々は、Yanagawa 等の開発した GAD67-GFP mouse を導入し、スライス標本上で GABA 作動性神経あ

るいは線維を確認しながら、GABA 作動性神経から電気生理学的な記録を行っている。本発表では、これまで我々が行ってきたニワトリ聴覚路での GABA 作動性神経に関する研究をまず紹介したい。次に、GAD67-GFP mouse を用いて最近得られた、下丘の GABA 作動性神経の膜特性に関する知見を報告する。

## (6) 抑制性伝達物質の発達スイッチング

鍋倉淳一，溝口義人，柴田修明（九州大学大学院 医学研究院 細胞システム生理学）

聴覚中継核である外側上オリーブ核における抑制性入力の変遷を調べた。生後 3-4 日目では主要抑制性シナプス入力として GABA 作動性であるが、生後 14 日目にはグリシン作動性に変化する。この変化は 1) GABA 作動性シナプスの elimination+グリシン作動性シナプスの入力 2) 同一神経終末内における伝達物質の GABA からグリシンへのスイッチングなどが考えられる。発達各期における bicuculline による抑制性微小シナプス電流の大きさ、および decay time の変化を検討した結果、移行期においては同一シナプス小胞からの GABA とグリシンの co-release が特徴的であった。更に、gold particle を利用した免疫電顕によって、グリシン神経終末内における GABA 含有量の割合が漸減することが示唆された。これらの結果から、LSO に入力する主要な抑制性伝達物質は GABA から、GABA とグリシンの co-release、最終的にグリシンへと単一シナプス内においてスイッチする可能性が示唆される。

発達同期において、シナプス後 LSO 細胞の変化として、1) 抗 GABA<sub>B</sub> R1 サブユニット抗体による染色性が生後 2 週間で著減するとともに、baclofen 惹起 K<sup>+</sup>電流を示す細

胞の割合、およびその電流の大きさが激減した。2) 細胞内 Cl<sup>-</sup> 漏れ分子である K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter の機能発達に起因して細胞内 Cl<sup>-</sup> 濃度が減少する。それに伴って Cl<sup>-</sup> チャネル開口時の Cl<sup>-</sup> の流れが外向きから内向きになるため、GABA やグリシンに対する応答が興奮性から抑制性に変化することが判明した。つまり、幼若期においては GABA の終末からの放出によって、シナプス後細胞に GABA<sub>A</sub> 受容体を介した decay time の長い脱分極が生じるとともに、GABA<sub>B</sub> 受容体を介した LTD (Sanes 2001) などの細胞応答が生じる。発達期におけるシナプスの可塑性に関係しているのかも知れない。成熟後はグリシンによる decay time の短い過分極応答に変化することが判明した。これらの細胞内 Cl<sup>-</sup> 濃度の発達減少、および伝達物質のスイッチングは聴覚発生（生後 10 日頃）前の両側内耳破壊によって抑制または遅延するため、聴覚依存性の活動依存性変化であることが判明した。

その他、成熟後の傷害後の細胞内 Cl<sup>-</sup> 濃度上昇による GABA の興奮性作用の再出現や、BDNF による抑制性伝達物質応答に対する修飾の発達変化についても検討したい。

## (7) 抑制性ニューロンと Cl<sup>-</sup> ホメオスタシスのクロストーク

福田敦夫（浜松医科大学 医学部 生理学第一講座）

成熟神経回路の最も主要な抑制性神経伝達物質である GABA が、神経細胞発生期にシナプスを介さない paracrine 的な作用で脱分極と Ca<sup>2+</sup> 流入を惹起して神経細

胞への分化や細胞移動を促したり、その後の神経回路形成期には興奮性伝達物質としてシナプスの形成・強化に関与する可能性が近年示唆されている。すなわち、GABA

には発達段階に応じて3つの異なった役割があり、特に発達初期におけるその役割は古典的概念の“抑制性伝達物質”とは大きく異なっている。さらに、成熟脳においても、GABAの抑制作用が減弱・消失したり或いは逆に興奮性に作用したりすることも明らかになりつつある。そのメカニズムとして我々は“能動的”Cl<sup>-</sup>ホメオスタシスを考えている。すなわち、細胞内Cl<sup>-</sup>濃度は従来考えられていたほど“静的”なものでなく、種々のCl<sup>-</sup>トランスポーターの相互作用によりダイナミックに変化し、その結果Cl<sup>-</sup>をチャージキャリアとするGABA<sub>A</sub>受容体やグリシン受容体を介する作用もダイナミックに変化するという仮説である。本研究では、最近の我々のデータをもとに脳の発達や障害・再生の過程で如何にCl<sup>-</sup>ホメオスタシスが能動的に変化し抑制性ニューロンの作用を変化させるかについて分子・細胞・回路の各レベルで紹介する。

発達過程のラット大脳新皮質を用い、脳室帯の神経前駆細胞、皮質板細胞・錐体細胞、辺縁帯のCajal-Retzius細胞の[Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>をグラミシジン穿孔スライスパッチクランプ法、Cl<sup>-</sup>イメージング法で計測し、Cl<sup>-</sup>トランスポーターのKCC2 (Cl<sup>-</sup>排出)、NKCC1 (Cl<sup>-</sup>取込)の発現をsingle-cell multiplex RT-PCR法、in situ hybridization法を用いて解析した。神経前駆細胞はNKCC1のみを発現し最も[Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>が高く、皮質板細胞に分化するとKCC2を発現するが、NKCC1が依然優位で[Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>高値を維持し、さらに分化が進み錐体細胞に成熟するとKCC2が優位となって[Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>が低下した。すなわち神経前駆細胞はニューロン特異的なKCC2を欠き非常に高い[Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>値を示すが、分化・移動による皮質層構造の形成過程でNKCC1/KCC2発現パラ

ンスが変化して[Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>を低下させ、GABA応答を脱分極から過分極に逆転させると考えられた。一方Cajal-Retzius細胞では分化後1週間以上経過してもKCC2の発現が極めて弱く、NKCC1によるCl<sup>-</sup>取込みが優位のため[Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>が高値のままであることが明らかになった。すなわちCajal-Retzius細胞は皮質板細胞とは異なるCl<sup>-</sup>ホメオスタシスの発達を示し、移動・定着後も[Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>高値が持続し、内在性グリシン受容体アゴニストのタウリンが脱分極を惹起することが示唆された。

大脳皮質形成異常は神経細胞の分化・移動の異常によって生じると考えられており、そのモデルとされるfocal freeze-lesionを新生仔ラットに作成し、異常皮質形成過程の[Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>調節とGABA/グリシン作用、細胞移動に着目した。focal freeze-lesion部位でNKCC1増加をみると、lesion部位上部に周囲の皮質板からの細胞移動が認められた。これらの皮質板細胞では、正常部位では見られないGABA/グリシンによるCa<sup>2+</sup>流入が認められ、幼若型グリシン受容体の発現が上昇し電気生理学的膜特性でも未熟な特徴を持っていた。すなわち、[Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>高値とその結果のGABA/グリシン作動性興奮によるCa<sup>2+</sup>流入等の幼若細胞の特性を維持または獲得して損傷部位に移動した可能性がある。また、運動神経細胞の軸索を切断するとKCC2発現が消失して[Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>が倍増し、GABA作用が抑制から興奮に逆転した。その結果、自発性・同期性のCa<sup>2+</sup>オシレーションが誘発された。これらは、層構造・シナプスの再構築や神経再生にむけた“能動的”Cl<sup>-</sup>ホメオスタシスによる抑制性ニューロン作用の脱分化と考えられる。

## (8) 新規ホメオボックス遺伝子Arxが語る脳の正常と異常

北村邦夫（三菱化学 生命科学研究所）

新規の転写制御因子の解析を通して、大脳皮質に代表される前脳形成の新たな局面を見出し、さらにそれと関係する脳疾患の発症機構を考えたいということが、本研究の大きな狙いでありまた願いでもある。

私たちは、X染色体上にあり、胚期においては前脳・床板および精巣に発現するaristaless related homeobox gene (Arx)を見出した。そこで、Arxの機能を明らかにするために、遺伝子ノックアウトを試み成功した。Arxは

前脳の中でも大脳基底部に強く発現することから、GABA作動性抑制性ニューロンの移動と分化の観点から検討した。(a)Arxを破壊したとき、MGEでのみ発現するNkx2.1の発現がLGEでも認められた。(b)LGEからdorsal telencephalonの内側に移動するニューロンのみが認められた。すなわち、MGEからdorsal telencephalonの外側に移動するニューロンは認められなかった。(c)dorsal telencephalonの内側に移動してきたニューロンは、

そのままストレートに大脳皮質層に進入するのではなく、一旦 subplate 付近で滞留した後、大脳皮質層に進入し配位した。これらの観察から、二つの異なったルートを移動する抑制性ニューロンが MGE にあり、それらは Arx の異なった支配を受けているのではないかと考えられる。また、大脳皮質への抑制性ニューロンの配位をめぐる、狭義の tangential migration のあと、pia-directed migration をとるか、ventricle-directed migration をとるかは、GE から dorsal telencephalon に向かってどのルートをとるか

に関わっていると考えられる。さらに、Arx は pia-directed migration そのものに関わっていると考えられる。

今回のノックアウトマウスは、前述した抑制性ニューロンの減少とともに、将来の興奮性ニューロンの減少も伴った。私たちおよび海外の研究者は、Arx がある種の滑脳症・精神遅滞およびてんかんの原因遺伝子であることを明らかにした。このノックアウトマウスの解析が、こうした疾患の発症機構を考える上での一つの切っ掛けになるのではないかと考える。

### (9) 視床における GABAergic ニューロンの決定と移動

橋本和枝, 嶋村健児 (熊本大学 医学部 発生医学研究センター 胚形成部門 形態形成分野)

視床の神経核は大きく 2 種類に分けられる。ひとつは主に Glutamatergic ニューロンから構成される神経核で、視床の大半の神経核を占め、大脳皮質の特定の領野に投射する。もうひとつは GABAergic ニューロンから成る神経核で視床外側に位置し、主に網膜からの情報を受けて視床下部や上丘に投射する。視床が機能を発揮するためにはこのような特定の個性を持つ神経核が正確に配置されることが重要である。

では、どのようにして神経核細胞の個性は規定され、特定の位置に配置されるのだろうか？我々は解析の手がかりを得るために神経核が組織学的に同定できる時期に視床神経核に発現する分子のスクリーニングを行った。その結果、転写因子 *Gbx2* が Glutamatergic 神経核に、*Sox14* が GABAergic 神経核に特異的に発現することがわかった。間脳の予定視床領域でこれらの分子の発現を観察したところ、部位特異的に発現していたことから発生の早い時期からその形質が規定されている可能性が示唆された。そこでこれらの分子マーカーを指標として各神経核細胞の形質決定機構の研究を進めた。その結果、視床原基の腹側組織から分泌される細胞外シグナル分子 Shh を

多く受け取ると *Sox14* が、それより少なく受け取ると *Gbx2* が誘導されることがわかった。

次にこのように形質が決定された各神経核細胞が特定位置に配置される仕組みを検討するために、組織構築過程における各神経核細胞の振る舞いを追跡した。その結果、*Sox14* 発現細胞は特定方向に移動するが、*Gbx2* 発現細胞は単純拡散様式の拡がり方であったことから、各神経核細胞が持つ形質の違いによって、異なる様式で移動することによって特定の位置に配置されることが示唆された。

以上の結果から、視床の GABAergic ニューロンは腹側からの Shh シグナルによって規定を受け、特定方向に移動することで特定領域に配置されることがわかるが、この発生システムは他の脳領域の GABAergic ニューロンの発生でもとられており、GABAergic ニューロンの発生に共通するシステムである可能性が考えられる。本発表ではこのような発生の共通性から考えられる GABAergic ニューロンの脳における共通の役割についても考察したい。

## (10) 上丘 GABA ニューロンの発生

小幡邦彦, 常川直子, 柳川右千夫 (生理学研究所 神経化学研究部門)

近年, 新皮質や脊髄でグルタミン酸ニューロンと GABA ニューロンの形成部位が異なることがわかってきた。すなわち新皮質のニューロンは側脳室壁の ventricular zone で生まれたニューロンが radial glia に沿ってそのまま表面に向かって移動 (radial migration) したものとみなされてきたが, GABA ニューロンはこれと異なり, 側脳室の腹側壁の ganglionic eminens (GE) で生まれて新皮質に入り, さらに新皮質の表面にそって移動して (tangential migration), 全面に分布することがわかった (ただしヒトでは radial migration するものが多いと最近報告された)。

中脳の上丘は大脳皮質と似て層構造をしており, GABA 含量が多い部位である。中脳の GABA ニューロンの発生も新皮質と同様な様式をとるのかどうかを, われわれが作成した GAD67-GFP ノックインマウスを用いてしらべた。このマウスでは GAD67 遺伝子のエクソン 1 に GFP 遺伝子が挿入されており, 発現した GFP の自発蛍光または免疫組織化学により GABA ニューロンを同定できる。用いたのはヘテロ・マウスであり, GABA 含量の低下も軽度で, GABA 性神経機能の障害はないと考えている。

マウス上丘で GFP は 11.5 日目胎児 (E11.5) に出現した。この時期では外側から正中部または反対側に向かう線維束が表層に存在する。E 13.5-15.5 では出現してきた多数

の GFP ニューロンの間に散在していき, 見出すことが困難になる。この GFP 線維が一時的なもので, 変性するのか非 GABA 性になるのか, またその線維の発生期での役割を今後明らかにしたい。

GFP ニューロンの誕生は E12.5 から増加して, E15.5 でほぼ終わる。形状は脳室(中脳水道)から外表に向かった紡錘形であり, 突起を両端からまっすぐ伸ばしている。新皮質の GFP ニューロンは tangential に紡錘形のものが多いが, 上丘では明瞭にこの形をとるものはなかった。未成熟細胞の中間径フィラメントであるビメンチンと未分化ニューロンのマーカーであるネスチンの免疫組織化学を行ったところ, 両者とも脳室側から外表に向かう繊維状の染色パターンを示した。その方向は GFP ニューロンの配列と一致した。ビメンチンは radial glia のマーカーとされており, ネスチンが発現している細胞の多くはグルタミン酸性と考えられ, 上丘では大脳皮質と異なり, GABA ニューロンもグルタミン酸と同様, radial migration によって発生することが示唆される。スライス標本で GFP ニューロンをタイムラプス・ビデオ観察すると, 新皮質では速い tangential migration をするものが多いが, 上丘の予備的な所見では, GFP ニューロンの移動はほとんどが radial 方向に起こり, 速度は遅かった。

### 3. 細胞内シグナルの時・空間的制御

2002年10月10日－10月11日

代表・世話人：黒崎知博（関西医科大学 付属肝臓研究所 分子遺伝学部門）

世話人：河西春郎

(1) 中枢神経細胞の  $\text{IP}_3$ - $\text{Ca}^{2+}$ シグナル機構

飯野正光（東京大学大学院 医学系研究科 細胞分子薬理学教室）

(2) 機械刺激-細胞変形による細胞内/細胞間  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルの伝播

河原克雅，安岡有紀子，鈴木喜郎（北里大学 医学部 生理）

(3) 心筋細胞のストア依存性  $\text{Ca}^{2+}$ 流入

竹島 浩（東北大学大学院 医学系研究科 医化学分野）

(4) 細胞質-核間輸送の1分子イメージングと定量解析

徳永万喜洋（国立遺伝学研究所 理研免疫センター アレルギー科学総合研究センター）

(5) 核内レセプターHNF4 $\alpha$ の空間的制御

淡路健雄<sup>1</sup>，尾形真紀子<sup>2</sup>，宮崎俊一<sup>1</sup>（<sup>1</sup>東京女子医科大学 第二生理学，<sup>2</sup>同 糖尿病センター）

(6) 細胞内情報伝達の時空間的制御

宮脇敦史（理化学研究所 脳科学総合研究センター 細胞機能探索技術開発）

(7) カルシウム流入シグナルによるPKCの活性化機構

最上秀夫<sup>1</sup>，小島 至<sup>2</sup>

（<sup>1</sup>浜松医科大学 第二生理，<sup>2</sup>群馬大学 生体調節研究所 調節機構部門細胞調節分野）

(8) ターゲティングからわかるPKC機能の更なる多様性

斎藤尚亮，酒井規雄，白井康仁（神戸大学 バイオシグナル研究センター 分子薬理）

(9) アダプター分子によるB細胞活性化機構

黒崎知博（関西医科大学 付属肝臓研究所 分子遺伝学部門）

(10) Rap1による細胞接着及び細胞極性の制御

木梨達雄（京都大学 医学部 分子免疫学アレルギー学教室）

(11) 外分泌腺の開孔放出とアクチン動態

根本知己<sup>1,2</sup>，児島辰哉<sup>1</sup>，大嶋章裕<sup>1</sup>，河西春郎<sup>1</sup>

（<sup>1</sup>生理学研究所 生体膜研究部門，<sup>2</sup>科学技術振興事業団 さきがけ）

(12) シナプス伝達物質放出促進細胞内メカニズム

高橋智幸（東京大学大学院 医学系研究科 機能生物学専攻 神経生理学）

(13) 内因性カンナビノイドを介する海馬シナプス伝達の逆行性調節

狩野方伸，小作隆子，前島隆司（金沢大学大学院 医学系研究科 シナプス発達 機能学研究分野）

(14) PGS蛋白によるG蛋白サイクル制御とカリウムチャンネル活性

石井 優，倉智嘉久（大阪大学大学院 医学系研究科 情報薬理学）

(15)  $\text{H}^+$ チャンネルによる破骨細胞  $\text{H}^+$ シグナリングの解析

久野みゆき，森 啓之，森畑宏一，酒井 啓，川脇順子

（大阪市立大学大学院 医学研究科 分子細胞生理学）

(16) TRP関連チャネル群によるカルシウムシグナルの協調的制御

森 泰生，西田基宏，山田和徳

（統合バイオサイエンスセンター 生命環境研究領域）

## 【参加者名】

飯野正光, 山澤徳志子, 山田亜紀, 富田太一郎, 金丸和典, 高橋智幸 (東京大学大学院医学系研究科), 狩野方伸 (金沢大学大学院医学系研究科), 河西春郎, 根本知己, 高橋倫子, 岸本拓哉, 松崎政紀, 劉 Ting-Ting, 早川泰之, 小島辰哉, 大嶋章裕, 安松信明, 野口潤, 木瀬 環, 高橋直樹, 岩崎広英, 宮田麻理子, 大倉正道 (生理学研究科), 河原克雅, 安岡有紀子 (北里大学医学部), 久野みゆき, 森啓之, 川脇順子 (大阪市立大学大学院医学研究科), 倉智嘉久, 石井優 (大阪大学大学院医学系研究科), 黒崎知博 (関西医科大学肝臓研究所), 小島 至 (群馬大

学生体調節研究所), 最上秀夫, 鈴木優子 (浜松医科大学), 竹島浩 (東北大学大学院医学系研究科), 宮崎俊一, 淡路健雄, 尾田正二 (東京女子医科大学医学部), 宮脇敦史, 永井健治, 水野秀昭, 筒井秀和, 唐澤 智司, 宮内崇行, 片山博幸, (理化学研究所脳科学総合センター), 森泰生, 西田基宏, 村田善理, 渡里洋史, 白幡 恵美, 岡村康司 (統合バイオサイエンスセンター), 吉田繁 (近畿大学理工学部), 斎藤尚亮 (神戸大学バイオシグナル研究センター), 小川慎志 (ファイザー製薬株式会社)

## 【概要】

細胞は外界からのシグナルを細胞膜に存在する膜蛋白で受容し, 細胞内部にシグナルを正確に変換・伝達し, さらには的確に処理して応答する機構を備えている。本研究会では細胞膜を介するシグナル伝達, 即ち, 外界刺激が如何なる機構により細胞内シグナルの時・空間制御を担っているかの機構を明らかにすることを目的とした。この研究会の特徴は, たとえば, 免疫系・神経系と

異なったシステムを用いて研究を行っている研究者同志の学際的な知識・技術交換を通じて, 更なる研究の進展を目指している点にあった。研究会の主だった内容は, 1) 細胞内シグナルの分子機序, 2) 感度のよい時・空間解像能力を有する測定法の開発, 3) イオンチャネルの機能制御機構であったが, それぞれについて最新の報告がなされ, 活発な討議が行われた。

(1) 中枢神経細胞の  $IP_3$ -  $Ca^{2+}$  シグナル機構

飯野正光 (東京大学大学院 医学系研究科 細胞分子薬理学教室)

プルキンエ細胞は, 小脳皮質からの唯一の出力細胞として平衡・運動制御などに関与している。一方, プルキンエ細胞には,  $IP_3$  受容体 (特に 1 型) が高密度に発現しており, シナプス可塑性などの神経細胞機能との関連が注目されている。 $IP_3$  受容体を介したカルシウムシグナル機構が中枢神経系でどのような役割を果たすかを理解するため, 我々はプルキンエ細胞を対象として  $IP_3$ -  $Ca^{2+}$  シグナル系の機能解析を行っている。

$IP_3$  は, 平行線維・プルキンエ細胞シナプス後膜に存在する代謝型グルタミン酸受容体の活性化に伴って産生されると考えられていた。我々は,  $IP_3$  インジケーター (GFP-PHD) をシンドビスウイルスベクターを用いてプルキンエ細胞に発現させ, 細胞内  $IP_3$  動態を解析した。その結果, 代謝型グルタミン酸受容体を介する系とは別の新しい  $IP_3$  シグナル系を明らかにした。すなわち, 登

上線維入力に伴う AMPA 受容体の活性化に引き続く脱分極とカルシウム流入に伴っても  $IP_3$  が産生されることが新たに明らかになった。

さらに,  $IP_3$  受容体の機能解析も進めた。培養プルキンエ細胞に対して, カルシウムストア内腔カルシウム濃度測定法を適用し,  $IP_3$  受容体の性質を解析したところ,  $IP_3$  感受性が末梢の組織などにおける  $IP_3$  受容体 1 型のものと比べて約 20 倍低いことが明らかになった。これは,  $IP_3$  シグナルを特定のシナプスに局限させるのに都合よい性質ではないかと考えられる。また, 中枢神経系に大量に発現するカルモジュリンと  $IP_3$  受容体機能の関係を解析したが, 明確な関係は見いだせなかった。自然発生 *opisthotonus* 突然変異マウスでは,  $IP_3$  受容体のエクソンのうち 2 つが欠失しており, 運動失調やてんかん様発作の症状が観測される。このような変異が  $IP_3$  受容体機能

にどのような影響を与えるかについても解析を進めた。  
このような実験結果を積み重ねて、プルキンエ細胞に

おける  $\text{IP}_3$ - $\text{Ca}^{2+}$  シグナル系の生理的意義の包括的理解に  
近づきたいと考えている。

## (2) 機械刺激-細胞変形による細胞内/細胞間 $\text{Ca}^{2+}$ シグナルの伝播

河原克雅, 安岡有紀子, 鈴木喜郎 (北里大学 医学部 生理)

ヒト気道上皮細胞 (16HBE) において機械刺激により誘発される細胞内/細胞間  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の時間的-空間的变化を fluo-3 画像の解析によりもとめた。微小ガラス管で細胞表面を軽く圧すると、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の増加シグナルが細胞間およびコロニーを越えて伝播した (昨年発表)。しかし、細胞膜の変形を  $1\text{--}7\ \mu\text{m}$  の範囲で段階的に増加すると、細胞膜変形が小さい場合、刺激された細胞のみが小さな (一過性の)  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇を示し周囲に伝播しなかった。これに対し、細胞膜の変形がある閾値を超えると、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は大きな上昇を示し周囲に伝播した。段階的の刺激を受けた細胞の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇は、suramin の存在には影響されなかったが、 $0\ \text{Ca}^{2+}$  (+EGTA) により完全に消失した。つぎに、細胞外への ATP 放出経

路を調べるために、 $2/3$  hypotonic cell-swelling に誘発される ATP 放出量をルシフェリン-ルシフェラーゼ法で測った。高浸透圧による細胞変形や低  $\text{Cl}^-$  溶液 (等張液) による駆動力の増大では、ATP の放出量は増加しなかった。低張液誘発 ATP 放出は、BAPTA-AM と  $\text{Gd}^{3+}$  で阻害され forskolin で亢進した。これらの結果は、16HBE 細胞は閾値以上の機械刺激による膜張力の増加に応じて ATP を放出し、周囲の細胞に  $\text{Ca}^{2+}$  シグナル情報を伝えることを示した。さらに、細胞膜変形による  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルの伝播には細胞内への初期  $\text{Ca}^{2+}$  流入が必要な事、細胞膜の ATP 放出路は、cAMP と  $\text{Ca}^{2+}$  による調節を受けていることを示した。

## (3) 心筋細胞のストア依存性 $\text{Ca}^{2+}$ 流入

竹島 浩 (東北大学大学院 医学系研究科 医化学分野)

心臓のリズミックな収縮は心筋細胞の  $\text{Ca}^{2+}$  調律により制御される。心筋細胞の主要な  $\text{Ca}^{2+}$  輸送体としては、細胞表層膜の電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルと  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  交換体や  $\text{Ca}^{2+}$  ポンプ、筋小胞体の  $\text{Ca}^{2+}$  放出チャネル (リアノジン受容体) と  $\text{Ca}^{2+}$  ポンプが知られている。我々のグループでは細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  ストアの構造や機能に注目しており、心筋細胞の小胞体上のリアノジン受容体と細胞表層膜-小胞体膜の架橋蛋白質としてのジャンクトフィリンの機能を主に変異マウスを作成することにより解析している。一方、細胞内ストアの貯蔵  $\text{Ca}^{2+}$  依存的に活性化する  $\text{Ca}^{2+}$  流入機構 (SOC 流入) の存在が非興奮性細胞を中心に多くの細胞系で近年報告されているが、SOC チャネルの分子実体は不明であり、横紋筋細胞での SOC 流入の解析はない。さらに、SOC 流入機構では  $\text{Ca}^{2+}$  放出チャネルの直接結合が SOC チャネルを活性化するというカップリン

グモデルが最近有力であるが、確定されるには今後の検討が必要である。

最近我々は、胎児期の心筋細胞における SOC 流入を確認するとともに、その簡単な薬理学的性質、分化レベルでの活性調節、ノックアウトマウスを用いたカップリングモデルの検証などを遂行した。

### 【文献】

1. Uehara, A., Yasukouchi, M., Imanaga, I., Nishi, M. & Takeshima, H. Store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry irrelevant to  $\text{Ca}^{2+}$  release channel and junctional membrane complex in heart muscle cells. *Cell Calcium* 31, 89-96, 2002.
2. Takeshima, H., Komazaki, S., Nishi, M., Iino, M. & Kangawa, K. Juncophilins: a novel family of junctional membrane complex proteins. *Mol. Cell* 6, 11-22, 2000.

3. Takeshima, H., Komazaki, S., Hirose, K., Nishi, M., Noda, T. & Iino, M. Embryonic lethality and abnormal cardiac

myocytes in mice lacking ryanodine receptor type 2. EMBO J. 17, 3309-3316, 1998.

#### (4) 細胞質-核間輸送の1分子イメージングと定量解析

徳永万喜洋（国立遺伝学研究所 理研免疫センター アレルギー科学総合研究センター）

「どの分子が、いつ、どこで、どんな分子と、どの様に相互作用して、機能しているのか」を明らかにするために、生体分子1分子を直接観て・計測する技術を開発しながら取り組んでいる。対物レンズを使った全反射照明法は、カバーガラス表面近傍の1分子イメージングに最適である。しかし、この方法では細胞内部の観察を行うことができない。そこで、細胞内部を薄い層状の光（厚さ数 $\mu\text{m}$ ）で照明する薄層斜光照明法を開発した。背景光を下げるができるので、高感度に蛍光試料観察をすることが可能となり、細胞内部でも明瞭な蛍光1分子イメージングを行うことができた。ガラス表面上のGFP像と比べても、ほぼ遜色のない1分子像が得られている。

薄層斜光照明法を用いて、細胞質-核間で輸送される分子をGFPで蛍光標識し細胞内で観察したところ、分子1個の蛍光像が核膜上で観察された。蛍光像が光っている時間から、核膜孔上での通過時間が、約3秒であること

がわかった。

蛍光ラベルした分子濃度を増やすと、核膜孔の点像からなる蛍光像が得られた。1分子と核膜孔1個との蛍光強度の比から、1つの核膜孔に結合している分子数を定量した。濃度を変えて定量的画像解析を行うことにより、核膜孔との結合分子数・結合定数といった、分子機構上重要な量を定量的に求めることができた。その結果、核膜孔には弱い結合部位と強い結合部位があることが見つかった。弱い結合部位は最大約100個の分子を結合させて分子を集める役割を果たし、約8個の分子を結合できる強い部位もしくはその近傍で、Gタンパク質との反応がおこって核内に荷物を降ろすのであろうと考えている。

このように、1分子イメージング法は、従来求められなかった細胞内での諸量を定量的に求め、分子機構を解明する新しい手法として有用である。

#### (5) 核内レセプターHNF4 $\alpha$ の空間的制御

淡路健雄<sup>1</sup>，尾形真紀子<sup>2</sup>，宮崎俊一<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>東京女子医科大学 第二生理学，<sup>2</sup>同 糖尿病センター)

Maturity onset diabetes of the young 1 (MODY1)は転写因子HNF4 $\alpha$ 遺伝子のDNA binding domain および Ligand binding domain 上のヘテロ変異により発症することが報告されている。転写因子異常による糖尿病発症の分子機構解明のため、変異HNF4 $\alpha$ の細胞内局在変化を各種培養細胞で検討した。

Wild type HNF4 $\alpha$  および患者において既報の変異HNF4 $\alpha$  蛋白 (Q268X, R127W) の細胞内局在を確認するため、N末端にEpitope-Tag(FLAG)を、C末端にEnhanced Cyan Fluorescent Protein (ECFP) または Enhanced Yellow Fluorescent Protein (EYFP)を融合することにより、標識蛋

白遺伝子を作製した。MIN6, COS-7, CHO の各種培養細胞に導入したところ、すべての細胞でQ268X変異はwild type の核内局在と異なり核小体に主として局在した。Q268Xがnonsense mutation であるため、HNF4 $\alpha$  遺伝子のC末端を順次deletionした遺伝子を作成し、HNF4 $\alpha$  遺伝子における発現蛋白の局在の変化の責任部位の検索を行った結果、332から338のアミノ酸配列が核小体への局在に関与していることが示された。

Q268Xヘテロ遺伝子変異における、細胞内局在への影響をみるため、ECFPまたはEYFPを融合した遺伝子を導入し、FRETにより蛍光顕微鏡にて検討をおこなった。

生細胞中で Q268X 変異は, wild type 蛋白とヘテロ二量体を形成し, wild type 蛋白の細胞内局在を変化させることを見いだした。ヘテロ二量体を形成して HNF4 $\alpha$  の細胞

内局在を変えることが, 糖尿病発症に関与している可能性が考えられた。

## (6) 細胞内情報伝達の時空間的制御

宮脇敦史 (理化学研究所 脳科学総合研究センター 細胞機能探索技術開発)

細胞が局所的な刺激を受けた際に, 発生するシグナルが時空間的にどんな振る舞いをみせるのか。通常の株化細胞やガン化細胞における上皮成長因子のシグナリン

グ, 神経細胞に対するグリア細胞の接着のシグナリングなどについて議論したい。

## (7) カルシウム流入シグナルによる PKC の活性化機構

最上秀夫<sup>1</sup>, 小島 至<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 浜松医科大学 第二生理, <sup>2</sup> 群馬大学 生体調節研究所 調節機構部門細胞調節分野)

興奮性細胞における電位依存性カルシウムチャネル介したカルシウム流入による PKC の活性化メカニズムに

ついて, インスリン産生細胞をモデル細胞としてその基質のリン酸化動態を含めて概説したい。

## (8) ターゲティングからわかる PKC 機能の更なる多様性

斎藤尚亮, 酒井規雄, 白井康仁 (神戸大学 バイオシグナル研究センター 分子薬理)

細胞内情報伝達機構研究は 1990 年代に飛躍的に進み, 多くの情報伝達因子による複雑な情報伝達系路が明らかにされてきた。これらの研究の多くは分子生物学・生化学を応用した行われきたが, 近年の GFP を用いたライブイメージング技術の進歩により, 情報伝達が, どの分子によって, いつ, どこで, 行われるかという時間的・空間的な解析が可能となってきた。我々は, PKC を中心とする情報伝達機構のライブイメージングを行い, 細胞内の情報伝達機構は, ダイナミックな細胞内を移動を伴い, 予想を越えた素早いものであることを明らかにしてきた。

PKC の多彩な機能は 10 種以上のサブタイプが独自の

機能を持っているためだけではなく, それぞれのサブタイプが刺激に応じて異なる細胞内部位に移動し, 違う細胞応答を引き起こすという機能 (ターゲティング機能) を持つことにより, PKC はさらに多彩な機能を持ち得ると考えられる。今回は, PKC の 1) サブタイプ特異的ターゲティング, 2) 刺激依存的ターゲティング, 3) ターゲティング依存的細胞機能制御, 4) 刺激部位特異的ターゲティングについて, 紹介する。

### (9) アダプター分子による B 細胞活性化機構

黒崎知博（関西医科大学 付属肝臓研究所 分子遺伝学部門）

Vav は, Rho family GTPases (Rac, Rho 等)を活性化する酵素活性 (GEF 活性)のみならず, SH2, SH3 等, 蛋白質相互作用ドメインを有する分子である。最近の Vav1<sup>-/-</sup> Vav2<sup>-/-</sup>ノックアウトマウスの解析により, Vav は B 細胞の分化・活性化に重要な役割を担っていることが示されてきた。しかしながら, Vav がいかなる機構で活性化されるのか (上流のレセプターとのカップリング) 又, どのようなエフェクター群 (下流) を活性化し, B 細胞の活性を制御しているかは不明のままであった。

私達は, 種々のノックアウト DT40 細胞を詳細に解析

することにより, 以下の結論を得ることができた。1) Vav は B 細胞レセプター (BCR) 刺激後, 細胞膜上の特殊な分画, 即ちコレステロールが豊富な raft 分画に移動することがその機能発現に必須である。2) この移動には, Grb2, BLNK という 2 種類のアダプター分子が関与している。3) Vav 欠損細胞と PI3K 欠損細胞の機能欠損が類似することにより Vav→Rac→PI3K の経路が働いている。

以上のことより, BCR→Grb2/BLNK→Vav→Rac→PI3K というシグナル経路の存在を明らかにすることができた。

### (10) Rap1 による細胞接着及び細胞極性の制御

木梨達雄（京都大学 医学部 分子免疫学アレルギー学教室）

リンパ球は血管, リンパ組織を循環しながら, 抗原提示細胞上の外来抗原を認識したり異物排除を行う。これらの過程では接着分子を介したリンパ球の動態制御が重要な役割を担っている。特に白血球特異的  $\beta 2$  インテグリン LFA-1 は ICAM-1 に結合して血管内皮細胞や抗原提示細胞との接着を介し, 免疫応答に大きな影響を与える。LFA-1 の ICAM-1 に対する接着性は低く, ケモカインや抗原の刺激があると接着性が亢進する。インテグリンの接着性を亢進させる細胞内シグナルを inside-out シグナルという。この inside-out シグナルを明らかにすることは免疫細胞の動態制御を理解する上で重要なテーマである。

我々は LFA-1 の inside-out シグナル分子を探索する過程で低分子量 G タンパク質 Rap1 が inside-out シグナル分

子としての機能を持っていることを見いだした。

LFA-1/ICAM-1 による抗原提示細胞と T リンパ球との接着が Rap1 によって制御され, T リンパ球の活性化に大きな影響を与えている。また Rap1 はケモカインによる接着と遊走にも大いに関与することが明らかになってきた。Rap1 はリンパ球の接着とともに活発な細胞遊走を促し, リンパ球の経血管内皮移動に大きな役割を果たしている。これらの題材を中心に Rap1 による細胞接着調節を紹介したい。T リンパ球と抗原提示細胞との接着形成 (免疫シナプス) とケモカインによる細胞遊走は免疫系における細胞極性の典型例であり, Rap1 によるインテグリン接着性制御との関連について我々の最近の研究も紹介したい。

### (11) 外分泌腺の開口放出とアクチン動態

根本知己<sup>1,2</sup>, 児島辰哉<sup>1</sup>, 大嶋章裕<sup>1</sup>, 河西春郎<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>生理学研究所 生体膜研究部門, <sup>2</sup>科学技術振興事業団 さきがけ)

外分泌腺の様な上皮性分泌細胞は, 腺腔膜に厚い F アクチン,  $\alpha$  アクチニン, ミオシン, などからなる細胞膜

裏打ち構造を持ち, これに対して分泌小胞の開口放出が起きるが, この裏打ち構造の機能は不明であった。我々

は、膵臓外分泌腺においてカルシウム依存性開口放出の際、開口放出後のオメガ構造が安定で (3 分)、内部に逐次的に開口放出が進行する様子を 2 光子励起顕微鏡で可視化した (文献 1)。そこで今回、この開口放出過程に関する F アクチンの作用を調べ、次のことを明らかにした。1) F アクチン層は開口放出可能な小胞のプールを減らさずに、開口放出速度を遅くする。2) F アクチンは開口放出を起こした小胞を選択的に速やかにコートしオメガ構造を安定化させる。たとえば、F アクチンを細胞膜透過性の脱重合剤 LatrunculinA で除去すると、逐次開口放出は阻害されないものの、オメガ構造が不安定なために vacuole の形成が起きる。この vacuole 形成は急性膵炎の初発過程と考えられている。即ち、腺腔膜の裏打ち構造

は動的に開口放出構造を安定化し保護していると考えられる。この機構にはミオシン及び rho GTPase が関係するらしく、この点でストレスファイバーの形成に類似する。カルシウム依存的に開口放出した小胞に選択的にコートが起きたことは、開口放出した小胞膜に腺腔膜のアンカー蛋白などが側方拡散していることを示唆するが、シグナル路の詳細は現在調査中である。

#### 【文献】

1. Nemoto, T., Kimura, R., Ito, K., Tachikawa, A., Miyashita, Y. Iino, M. & Kasai, H. (2001). Sequential replenishment mechanism of exocytosis in pancreatic acini. *Nature Cell Biology*, 3, 253-258.

## (12) シナプス伝達物質放出促進細胞内メカニズム

高橋智幸 (東京大学大学院 医学系研究科 機能生物学専攻 神経生理学)

ホルボールエステル PDBu は様々なシナプスにおいて伝達物質の放出を促進するが、その細胞内機構は明らかでない。PDBu はラット脳幹の巨大シナプス the calyx of Held においても EPSC の振幅と自発性微小 (m)EPSC の頻度を増強するが mEPSC の振幅には作用しないので、作用点はプレシナプスと同定される。また PDBu は calyx シナプス前末端の電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  電流、 $\text{K}^+$  電流のいずれにも作用しないので、標的は  $\text{Ca}^{2+}$  流入以降の開口放出機構と推定される。PDBu 誘発性 EPSC 増強は PKC 阻害ペプチドまたは Doc2  $\alpha$  N 末端の Munc13-1 結合部位ペプチドの神経終末端内投与によって抑制されることから、PKC と Doc2  $\alpha$  N-Munc13-1 結合が共に関与することが示唆される (Hori et al., 1999)。

Calyx 神経終末端の PKC を同定するために除神経を行ったところ、後シナプス領域における  $\epsilon$  PKC の顕著な減少が認められた。また免疫組織化学染色で calyx 末端全体に  $\epsilon$  PKC 抗体シグナルが観察された。PDBu を投与すると  $\epsilon$  PKC 抗体シグナルは calyx 末端内を開口放出側に移動し、同時に  $\epsilon$  PKC 自己リン酸化抗体シグナルが増大した。PDBu 誘発性 EPSC 増強は calyx 末端に 10 mM EGTA を負荷後にも同程度であった。この結果から、PDBu 誘発性 EPSC 増強を媒介する PKC は  $\text{Ca}^{2+}$  非依存型

$\epsilon$  PKC と同定された (Saitoh et al., 2001)。

反復刺激を行うと calyx 末端の電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの活性化が生じ、短い脱分極性パルスで誘発される  $\text{Ca}^{2+}$  電流の振幅が増大する現象が観察された (Cuttle et al., 1998)。この活動依存性  $\text{Ca}^{2+}$  電流増強は G タンパク質に依存せず、神経終末端内への  $\text{Ca}^{2+}$  流入量に依存する。更に、この  $\text{Ca}^{2+}$  電流増強は  $\text{Ca}^{2+}$  結合タンパク質 NCS-1 の calyx 末端投与によって閉塞 (occlude) され、NCS-1 の C 末端ペプチドによって完全にブロックされた。NCS-1 は神経終末端内残存 (residual)  $\text{Ca}^{2+}$  と結合して  $\text{Ca}^{2+}$  電流を増強し、シナプス増強に寄与するものと推定される (Tsujimoto et al. 2002)。

#### 【文献】

1. Hori T, Takai Y, Takahashi T (1999) *J Neurosci* 19, 7262-7267.
2. Saitoh N, Hori T, Takahashi T (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 14017-14021.
3. Cuttle M, Tsujimoto T, Forsythe I, Takahashi T (1998) *J Physiol Lond* 512, 723-729.
4. Tsujimoto, T, Jeromin A, Saitoh N, Roder JC, Takahashi T (2002) *Science* 295, 2276-2279.

## (13) 内因性カンナビノイドを介する海馬シナプス伝達の逆行性調節

狩野方伸, 小作隆子, 前島隆司

(金沢大学大学院 医学系研究科 シナプス発達 機能学研究分野)

シナプス伝達効率は様々なメカニズムにより調節されている。その一つに、シナプス後ニューロンの活動に依存したシナプス伝達調節があり、その過程に逆行性シグナル（シナプス後ニューロンから前ニューロンへのシグナル）の関与する例が報告されている。ごく最近になり、海馬および小脳において、そのような逆行性シグナルの担い手が内因性カンナビノイドであることが、我々（文献 1, 2）および他のグループの研究により明らかとなった。今回は主に、海馬を中心に、内因性カンナビノイドの逆行性シグナルとしての役割について述べる。

ラットの海馬より単離・培養した神経細胞を用い、興奮性および抑制性シナプス伝達調節におけるカンナビノイド受容体および内因性カンナビノイドの役割について調べた結果、以下のことが判明した。(1) シナプス後ニューロンの脱分極により内因性カンナビノイドが放出され、それが興奮性および抑制性シナプス前終末のカンナビノイド受容体タイプ 1 (CB1 受容体) を活性化し、伝達物質の放出を抑制する（文献 3）。(2) この脱分極により引き起こされるシナプス伝達の抑制は、興奮性シナプスに比べ抑制性シナプスでより顕著に見られ、その差は、シナプス前終末のカンナビノイド感受性の違いに起因する（文献 3）。(3) I 型代謝型グルタミン酸受容体の活性化は、単独で内因性カンナビノイドの放出を引き起こし、さらに、脱分極による内因性カンナビノイドの放出を促

進する（文献 4）。

以上の結果より、シナプス後ニューロンの活動（脱分極および代謝型グルタミン酸受容体活性化）は、海馬においては、そのニューロンへの抑制性入力を選択的に抑制し、ニューロンの興奮性を高める方向に作用すると考えられた。

## 【文献】

1. Ohno-Shosaku T, Maejima T, Kano M (2001) Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neuron* 29: 729-738.
2. Maejima T, Ohno-Shosaku T, Kano M (2001) Endogenous cannabinoid as a retrograde messenger from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neurosci Res* 40:205-210.
3. Ohno-Shosaku T, Tsubokawa H, Mizushima I, Yoneda N, Zimmer A, Kano M (2002) Presynaptic cannabinoid sensitivity is a major determinant of depolarization-induced retrograde suppression at hippocampal synapses. *J Neurosci* 22:3864-3872.
4. Ohno-Shosaku T, Shosaku J, Tsubokawa H, Kano M (2002) Cooperative endocannabinoid production by neuronal depolarization and group I metabotropic glutamate receptor activation. *Eur J Neurosci* 15:953-961.

## (14) PGS 蛋白による G 蛋白サイクル制御とカリウムチャンネル活性

石井 優, 倉智嘉久 (大阪大学大学院 医学系研究科 情報薬理学)

G 蛋白質制御  $K^+$  チャンネル (G protein-gated  $K^+$  channel:  $K_G$ ) は、G 蛋白質の  $\beta\gamma$  サブユニットが直接結合することにより活性化される内向き整流性カリウムチャンネル ( $K_{ir}$ ) である。心臓では洞房結節や心房筋に存在し、アセチルコリン (ACh) の刺激を受けたムスカリン ( $m_2$ ) 受容体から遊離される  $G\beta\gamma$  サブユニットによって活性化され、膜を過分極させることにより徐脈を惹起する。心房

筋上に存在し ACh で誘導される  $K_G$  電流には、relaxation と呼ばれる特徴的なゲート機構が存在することが以前から報告されていた。即ち、膜電位を脱分極状態（例えば +40 mV）で一定時間（1 秒程度）固定しその後急に過分極（例えば -100 mV）させると、脱分極中は内向き整流性により外向き電流はほとんど見られないが、過分極させると瞬間的にある値まで内向き電流の増加が見られ、

その後緩徐な時間経過 (1 秒程度) で電流増加が見られる。この電位-時間依存性の電流変化を relaxation というが、この性質は他の Kir には認められない。電位センサーをもたない  $K_G$  が何故このような電位依存性ゲーティング機構を示すのか全く不明であった。この relaxation の分子機構を明らかにすることが本研究の目的である。

【方法】単離ラット心房筋における native  $K_G$  電流及びアフリカツメガエル卵母細胞において異所性発現させた  $K_G$  電流の測定を行った。

【結果】(1) アフリカツメガエル卵母細胞に  $m_2$  受容体と  $K_G$  チャネルを発現させて再構成された  $K_G$  では relaxation は見られなかったが、GTPase 活性を促進し三量体 G 蛋白質シグナルを負に調節する因子である RGS (Regulators of G protein signalling) を発現させると relaxation を再構成することができた。(2) 心房筋細胞で細胞外  $Ca^{2+}$  除去及び細胞内 BAPTA 投与により膜電位依存性の細胞内  $Ca^{2+}$  上昇を抑制すると relaxation が消失した。(3) RGS は RGS domain において  $Ca^{2+}$  依存性にカルモデュリン (CaM) と結合するが、CaM の阻害剤及び CaM と結合するが GTPase 活性を促進しない変異 RGS も relaxation を抑制した。(4) 精製した RGS 蛋白質は  $K_G$  電流を抑制するが、この RGS の効果は  $PIP_3$  存在下では減弱されるが  $Ca^{2+}$ /CaM

を加えることにより回復した。

【考察】以上のことより relaxation の分子機構を次のように推定した。脱分極による細胞内への  $Ca^{2+}$  流入が RGS と CaM の結合を促し、これにより RGS が  $PIP_3$  による抑制から回復されて活性化し、G 蛋白質サイクルが負に調節され活性型  $K_G$  の数が減少する。過分極時には上記の逆が起こり、活性型  $K_G$  の数は緩徐に増加し relaxation を形作ると考えられる。ここで注目すべき点は、relaxation は  $K_G$  のゲート機構ではなく三量体 G 蛋白質サイクルの電位依存性の変化を反映している現象であったことが明らかになった点である。RGS は  $Ca^{2+}$  依存性であるため、見かけ上電位依存性に G 蛋白質サイクルを調節している。この結果はその他の三量体 G 蛋白質を介する細胞シグナル(アデニル酸シクラーゼやホスホリパーゼ C など)においても同様の現象が存在することを強く示唆する。

#### 【文献】

1. Fujita, S. et al., J. Physiol., 526:341-347, 2000.
2. Inanobe, A. et al., J. Physiol., 535:133-143, 2001.
3. Ishii, M. et al., Circ. Res., 89:1045-1050, 2001.
4. Ishii, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 99:4325-4330, 2002.

### (15) $H^+$ チャンネルによる破骨細胞 $H^+$ シグナリングの解析

久野みゆき, 森 啓之, 森畑宏一, 酒井 啓, 川脇順子  
(大阪市立大学大学院 医学研究科 分子細胞生理学)

脱分極によって開口する voltage-gated  $H^+$  channel は短時間で大量のプロトンイオン ( $H^+$ ) を細胞外から細胞内へと排出する能力を持っており、pH と膜電位の制御に参与すると推測されている。 $H^+$  channel は多くの細胞に発現しているが活性は細胞によって大きく異なる。マクロファージ、ミクログリア、好中球などでは phagocytosis 過程に必須な  $H^+$  排出機構として働くが、他の細胞における役割はまだ良くわかっていない。私達は、 $H^+$  channel がどのように働くかを解明していく上で、破骨細胞を重要なモデルと考えている。その理由は、以下のように、破骨細胞がかなり特異な細胞内外の pH 環境下に存在することによる。まず破骨細胞は  $H^+$ -secreting cell である。次に、骨表面に接着し  $H^+$  と lysosomal enzyme を放出して

骨を吸収する過程で細胞内外 pH 環境の激変に曝露される。更に、骨吸収面の細胞膜には多数の襞が形成され (ruffled border),  $H^+$  分泌の主役として vacuolar type  $H^+$ -ATPase が高密度に存在している。

私達は、マウス骨髄細胞から得た単核の前破骨細胞が融合して多核の破骨細胞が形成される in vitro の系を用いて、 $H^+$  channel が破骨細胞の  $H^+$ シグナリングにどのように関わっているのかを検討した。細胞内環境をできるだけ温存した穿孔パッチ法で  $H^+$  channel の逆転電位から resting pH の推定を試みたところ、多くの細胞で 7.5 以上の高値を示し pH 感受性色素 (BCECF) の蛍光強度より測定した値とよく一致した。また、細胞内から外への外向き  $H^+$  電流だけでなく細胞外からの内向き  $H^+$  流入が検

出された。これは、 $H^+$ チャネルが従来考えられてきた  $H^+$ 排出だけでなく両方向性の  $H^+$  transport に貢献し得ることを示唆している。phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)で破骨細胞を刺激すると、発生した細胞内 acidosis

に応答して  $H^+$  channel 活性が増強することが確認された。これらのデータは  $H^+$ チャネルが、細胞膜を介する pH 勾配の正確なモニターとして働き、破骨細胞の pH ホメオスターシスを担っていることを示している。

## (16) TRP 関連チャネル群によるカルシウムシグナルの協調的制御

森 泰生, 西田基宏, 山田和徳

(統合バイオサイエンスセンター 生命環境研究領域)

$Ca^{2+}$ 透過型カチオンチャネルは、形質膜の膜電位調節及び、細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度調節という生理的に重要な役割を担う。今回、 $Ca^{2+}$ シグナルの時空間パターン決定に重要である、形質膜-小胞体間の機能的相互作用の解明を目的に、遺伝学的操作が容易であるトリ B 細胞 DT40 を用いて、ストア依存性チャネルと考えられる TRPC1 の欠損株を作製した。TRPC1 欠損細胞においては、B 細胞受容体刺激により惹起されるストア依存性  $Ca^{2+}$ 流入だけでなく、小胞体からの  $IP_3$  受容体を介した  $Ca^{2+}$ 放出も減弱していた。また、 $Ca^{2+}$ -oscillation, その下流で起きるはずの転写因子 NF-AT の活性も同様に抑制されていた。このことから、TRPC1 はストア依存性  $Ca^{2+}$ 流入を担うチャネルの一部を形成するだけではなく、 $IP_3$  受容体の活性を制御し、さらには小胞体-形質膜のカップリングを増進する役割を担っているものと考えられる。

一方、フォスホオリパーゼ C (PLC) $\gamma$ 2 欠損細胞においては、細胞内  $Ca^{2+}$ ストア枯渇剤 thapsigargin によるストア依存性  $Ca^{2+}$ 流入が減弱していた。また、最近開発した  $IP_3$  センサータンパク質を用いて細胞内  $IP_3$  濃度を測定したところ、SOC を介した  $Ca^{2+}$ 流入による  $IP_3$  産生が見られた。このような PLC $\gamma$ 2 とストア依存性  $Ca^{2+}$ チャネル (SOC) のカップリングは、TRPC3 を介したものであることが明らかになった。以上の実験より、PI 応答/ $Ca^{2+}$ シ

グナルにおける、PLC と SOC (TRP チャネル) を中心とした協調 (coordination) 機構が明らかになった (図 1)。

「細胞死」の制御に関与する、新しい  $Ca^{2+}$ 透過型カチオンチャネル TRPM2 を同定した。即ち、活性酸素/窒素種による細胞の酸化ストレスをニコチンアミドが感受し、その酸化体が直接結合することにより、TRPM2 が活性化開口することを示した。また、活性化 TRPM2 チャネルを透過した  $Ca^{2+}/Na^+$ が、TNF 等によって誘導されるネクロシスを仲介することが明らかとなった。活性酸素種や  $Ca^{2+}/Na^+$ によるネクロシスは、非特異的な細胞破壊とされていた。が、TRPM2 の発見によって、アポトーシスと同様ネクロシスも、細胞に元々から具わるメカニズムにより、精妙にコントロールされている可能性が示唆された。

一方、TRPC1-7 の活性制御にも、活性酸素種による酸化が重要であることを見出した。このような TRP チャネルと活性酸素種との機能的協関は、 $Ca^{2+}$ シグナル及び膜電位変化が、酸化ストレスに対する生体応答制御の重要な基盤であることを示唆する。さらには、TRP 遺伝子ファミリーによってコードされているカチオンチャネル群は、細胞の恒常性維持、増殖や死/生存に深く関与していることが示された。

## 4. バイオ分子センサー

2002年5月27日－5月28日

代表・世話人：稲垣暢也（秋田大学 医学部）

所内対応者：森 泰生（統合バイオサイエンスセンター）

（1）脊椎動物の味覚・嗅覚センサー機構

倉橋 隆（大阪大学大学院 基礎工学研究科）

（2）生物の光センサー機能はどこまでわかったのか？

神取秀樹（名古屋工業大学 応用化学科）

（3）メカノセンサーの最近の研究

辰巳仁史（名古屋大学大学院 医学研究科）

（4）容積感受性クロライドチャネル

岡田泰伸（生理学研究所）

（5）温度・pHセンサーの分子実体と機能

富永真琴（三重大学 医学部）

（6）ASIC の pH センサーとしての機能

島田昌一（名古屋市立大学 医学部）

（7）膜電位依存性プロトンチャネルの温度・プロトンセンサーとしての機能

久野みゆき（大阪市立大学大学院 医学研究科）

（8）線虫の温度受容機構の分子遺伝学的研究

森 郁恵（名古屋大学大学院 理学研究科）

（9）Redox 感受性チャネル

森 泰生（統合バイオサイエンスセンター）

（10）代謝型グルタミン酸受容体の多価陽イオン感受性に Homer 分子がおよぼす作用

久保義弘（東京医科歯科大学大学院 歯学総合研究科）

（11）GFP を用いたカルシウムセンサー

大倉正道（生理学研究所）

（12）蛍光プローブでセンシングする細胞機能

宮脇敦史（理研脳科学総合研究センター）

（13）糖・脂質代謝センサーとして働く ABC タンパク質のシグナル変換機序

植田和光（京都大学大学院 農学研究科）

（14）ATP センサーとしての ATP 感受性カリウムチャネル

稲垣暢也（秋田大学 医学部）

（15）細胞内 ATP 感受性 ATP チャネル

Sabirov Ravshan（生理学研究所）

（16）cAMP センサーによる細胞機能制御

柴崎忠雄（千葉大学大学院 医学研究院）

## 【参加者名】

倉橋隆, 竹内裕子 (大阪大学大学院生命機能研究科), 神取秀樹 (名古屋工業大学応用化学科), 辰巳仁史 (名古屋大学大学院医学研究科), 富永真琴, 飯田陶子, 沼崎満子, 森山朋子, 浦野浩子, 富樫和也, 東智広, 村山奈美枝, 小西康信, 村瀬元昭 (三重大学医学部生理学第一講座), 島田昌一, 鶴川真也, 山村寿男, 植田高史 (名古屋市立大学医学部), 久野みゆき, 森畑宏一, 森啓之, 酒井啓 (大阪市立大学大学院医学研究科), 森郁恵 (名古屋大学大学

院理学研究科), 久保義弘, 中條浩一, 藤原裕一郎 (東京医科歯科大学大学院), 宮脇敦史 (理研脳科学総合研究センター), 植田和光, 松尾道憲 (京都大学大学院農学研究科), 稲垣暢也 (秋田大学医学部生理学第一講座), 柴崎忠雄 (千葉大学大学院医学研究院), 岡田泰伸, 中井淳一, 大倉正道, Sabirov Ravshan (生理学研究所), 西田基宏, 吉田卓史, 五日市友子, 山田和徳 (統合バイオサイエンスセンター)

## 【概要】

細胞は、細胞内外の種々の環境情報を感知して、その情報を他のシグナルに変換し、細胞内や周囲の細胞に伝達することによって環境変化に対応しながら生きている。最近、レセプター（受容体）のみならず、チャンネルやトランスポーターなどの膜蛋白質も、環境情報センサーの働きをしていることが明らかになりつつある。これらのバイオ分子センサー蛋白はナノスケールにおいて種々の化学的、物理的、生理的情報を受容して、他のシグナル

に速やかに変換する能力を持っている。従って、このようなナノマシンのシグナル変換機序を解明し、環境にやさしい新しい環境情報センサー製品の開発に向けて応用していくことは極めて重要である。本研究会では、バイオ分子センサーの研究分野で国際的に活躍している研究者が情報交換することにより、この分野における我が国の研究をさらに発展させることを目的とした。

## (1) 脊椎動物の味覚・嗅覚センサー機構

倉橋 隆 (大阪大学大学院 基礎工学研究科)

嗅覚の情報変換はcAMPを二次伝達物質とする細胞内機構に制御され、直径 0.2 ミクロンの微細構造体で行われる。このナノスケールの空間分解能、秒オーダーで展開されるの情報変換の分子システムを定量的に理解するために、電気生理記録下の単離嗅細胞にて細胞内 cAMP を自由制御するケージド化合物光分解実験系の確立を試みた。光源には 100W キセノンランプを用い、落斜蛍光装置を通して紫外域光を結像面に集光させた。光量は、2log ユニットの变化幅を持つウェッジフィルターをパルスモータでコンピュータ制御することで 740 段階に自由設定できる。刺激時間は電動シャッターによる光路開閉を用いて調節した。シャッターや調光装置で生ずる振動は、クオート製の光ファイバーで機械的に隔離した。

実際に得られた嗅細胞の光応答の振幅は、光の強度、刺激時間に依存した。強度－応答関係、刺激時間－応答関係はヒルの式で近似することができ、いずれもヒル係数は 4～5 で、匂い応答にみられるのと同様の高い協同

性を示した。実験の総システムはコンピュータによるフル制御支配下にあり、統合プログラム下で一般的なパッチクランプ操作、化学刺激操作を任意に行うことが可能であるので、化学刺激と光刺激を同一細胞で比較検討することが可能となる。嗅細胞で、匂い応答と uncaging 応答とを直接比較、あるいは任意操作することによって、数秒で展開する細胞応答中の酵素、細胞内因子の挙動を推定する新しい方法論を確立した。実験の結果、嗅覚情報変換における以下の 4 点が明らかになった。1. 嗅細胞シリア内における分子ネットワーク内で、情報変換過程の非線形増幅を司る部位がチャンネル部位に起因する。

2. cAMP 合成酵素であるアデニル酸シクラーゼの活性時間経過を実測定することが可能となった。3. 繊毛内で cAMP の細胞内濃度は時間とともに直線的に上昇することが示された。4. 嗅覚応答の脱感作に対する新しい知見：cAMP を介する情報伝達において、短時間刺激では直接チャンネルにフィードバックがかかる (Kurahashi &

Menini, 1997, nature) のに対し, 長時間刺激時では上流部分に修飾部があり, 匂い応答の脱感作機構は時間依存的に異なる部位にフィードバックがかかっていることが示唆された。

本システム, 実験ロジックは, 嗅細胞研究のみならず, ニューロンを含む各種細胞の細胞内情報変換システムの分子的定量化に幅広い応用が期待される。

## (2) 生物の光センサー機能はどこまでわかったのか?

神取秀樹 (名古屋工業大学 応用化学科)

「バイオ分子センサー蛋白」という「ナノマシンのシグナル変換機序を解明」することを目指す場合, 光受容蛋白が与える情報は有用なものがある。このことは, レセプター研究やポンプ研究において視物質ロドプシンやバクテリオロドプシンが果たしてきた役割をみれば自明であろう。最近になってクマリン酸やフラビンをもつ光受容蛋白が PAS domain をもつことが立体構造決定によって明らかになり, PAS を介した蛋白質間相互作用の解明に向けても期待が高まっている。

本講演では, 生物の光センサー機能に関する以下の話題について, 最近のトピックスを中心に網羅的に話題提供する予定でいる。

### 【1】視物質ロドプシン

: 膜表面で三量体 G 蛋白質を活性化するためには?

### 【2】古細菌ロドプシン

: 膜内で伝達蛋白質を活性化するためには?

### 【3】フラビン蛋白質

: 異性化を初期反応としない系のセンサー機構とは?

## (3) メカノセンサーの最近の研究

辰巳仁史 (名古屋大学大学院 医学研究科)

メカノセンサーの最近の研究について報告する。はじめにメカノセンサーの受容機構として知られている機械受容チャネルについてわれわれの行っている研究を中心に紹介する。また, 細胞が機械刺激を受容する機構についても我々の最近の研究を紹介する。

### 1) 機械受容チャネル Mid1 の機能の解析

$\text{Ca}^{2+}$  は, 真核生物において細胞の様々な生命現象に必要な制御因子としてはたらいっている。酵母と植物において  $\text{Ca}^{2+}$  透過チャネルが細胞内カルシウムイオン濃度の変化に関与している。 $\text{Ca}^{2+}$  チャネルたんぱく質分子は, 細胞膜にあって細胞外からのカルシウムイオンの流入を制御している。

出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の MID1 遺伝子産物 (Mid1) は, 真核生物において世界で初めてその遺伝子が特定された伸展活性化  $\text{Ca}^{2+}$  透過チャネルである。Mid1 は 548 アミノ酸残基から成り, 4 つの疎水性領域 (H1, H2, H3 および H4) をもつ。さらに 16 箇所の推定上の

N-グリコシレーション部位が存在し, C-末端側に二つのシステインリッチ領域が存在する。たんぱく質分子がチャネルとして機能するには, 蛋白質の発現だけでなく形質膜に正しくトランスロケーションすることおよび正しい蛋白質フォールディングがなされる必要である。これらのメカニズムを解析することは細胞内における Mid1 の機能制御を知るうえで非常に重要であると考え, Mid1 を形質膜にターゲティングするために必要な領域を同定をおこなっている。そのために種々の変異 Mid1 と GFP との融合たんぱく質を作製し, それらの融合たんぱく質の細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。その結果は, Mid1 の細胞膜局在には H4 の後のシステインリッチ領域が重要な働きをしていること, また興味深い事に H1, H2, H3 領域だけでも膜に局在可能であることであった。また酵母を使ったレスキュー実験は, これら膜局在を示す変異体は, 伸展活性化  $\text{Ca}^{2+}$  透過チャネルとして機能しうることを示唆した。

## 2) 細胞が機械刺激を受容する機構

培養血管内皮細胞に機械刺激を加えると細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇が起こり、それに続いて細胞形態の変化など様々な細胞応答が生じる。フィブロネクチンをコートしたガラスビーズを培養血管内皮細胞の上面に接着させ、ビーズを機械的に移動させることにより細胞に局所的機械刺激を与える系を用いて、機械刺激から  $\text{Ca}^{2+}$  流入にいたる細胞内のプロセスを解析した。ビーズ直下に形成される接着斑と細胞底面の接着斑の間には、それらを連結

するストレスファイバーが形成された。全反射型近接場照明を用いて、細胞底面での  $\text{Ca}^{2+}$  流入を詳しく分析したところ、機械刺激は刺激開始から数ミリ秒の後には底面に伝わり、底面の接着斑近傍から  $\text{Ca}^{2+}$  上昇を引き起こすことがわかった。すなわち機械刺激はアクチン線維を介して細胞底面の接着斑に伝わり、その近傍に分布する  $\text{Ca}^{2+}$  透過性の SA チャネルを活性化して、局所的な  $\text{Ca}^{2+}$  動員を引き起こす。この過程に関わる分子メカニズムについて議論する。

## (4) 容積感受性クロライドチャンネル

岡田泰伸（生理学研究所）

容積感受性外向き整流性  $\text{Cl}^-$  チャンネル (VSOR) は、細胞膨張時に活性化されて容積調節に関与する<sup>1)</sup>。このチャンネルはその他多くの基本的細胞機能にも関与することが明らかにされはじめている<sup>2, 3)</sup>。この分子実体や活性化メカニズムの解明に向けての研究が進行中である。

### 【VSOR の生理的・病態生理的役割】

殆んどの動物細胞がもつ浸透圧性膨張後の容積調節能は Regulatory Volume Decrease (RVD) と呼ばれ、細胞外への  $\text{KCl}$  流出とそれに駆動された水流出で達成される。大部分の細胞種でこの  $\text{Cl}^-$  流出路を与えるのが VSOR である<sup>1)</sup>。容積調節を必然的に伴う細胞分裂・増殖にも VSOR が本質的役割を果たすことは当然である<sup>4)</sup>。最近私達は、アポトーシスの誘導<sup>5)</sup> や、ある種の抗癌剤に対する癌細胞の感受性にも重要な役割を果たしていることを明らかにしている。

### 【VSOR の分子実体】

これまで本チャンネルの分子実体としては次の三つが、いずれも Nature 誌において発表されてきた。共に 1992 年に発表された P 糖蛋白説<sup>6)</sup> と  $\text{pI}_{\text{Clm}}$  説<sup>7)</sup> は、その後いずれも VSOR の内在性レギュレータにすぎないことが明らかにされた<sup>1)</sup>。1997 年にはこれらに代わって CIC-3

説<sup>8)</sup> が提出され、最近まで広く受け入れられてきたが、私達はいくつかの点が明確になるまで留保すべきであると主張していた<sup>9)</sup>。事実、2001 年に CIC-3 ノックアウトマウスにおける肝細胞や膵腺細胞でも VSOR は正常のままであることが示され<sup>10)</sup>、ほぼすべて振出しに戻ったのである。現在、心筋 VSOR は CIC-3 によるという可能性が残されているが、これも私達は検討中である。

### 【VSOR の性質と活性化メカニズム】

本チャンネルは外向き整流性の中間型単一チャンネルコンダクタンスを示し、低フィールド性のアニオン選択性を示す<sup>1)</sup>。細胞内 ATP の存在を必要とするが、必ずしもその加水分解は不可欠ではない<sup>1)</sup>。単一チャンネル活性は膨張後にギガシーलしたパッチでのみ見られるので、その活性化メカニズムは細胞表面膜の invagination の unfolding に関係しているものと推定される<sup>1)</sup>。事実、全細胞電流密度は細胞直径の3乗(容積)には相関せず、二乗(膜表面積)によく相関した<sup>11)</sup>。ちなみに、本チャンネルは浸透圧変化そのものや、膜伸展や膜張力をセンスするものではない<sup>1)</sup>。最近私達は、本チャンネル活性に EGF レセプター・チロシンキナーゼが関与することを明らかにしている。

1) Okada 1997 Am J Physiol 273, C755-C789.

2) Lang et al. 1998 Physiol Rev 78, 247-306.

3) Okada et al. 2001 J Physiol 532, 3-16.

4) Nilius 2001 J Physiol 532, 581

5) Maeno et al. 2000 PNAS 97, 9487-9492.

6) Valverde et al. 1992 Nature 355, 830-833.

7) Paulmichl et al. 1992 Nature 356, 238-241.

8) Duan et al. 1997 Nature 390, 417-421.

9) Okada et al. 1998 J Gen Physiol 112, 365-367.

10) Stobrawa et al. 2001 Neuron 29, 185-196.

11) Morishima et al. 2000 Jpn J Physiol 50, 277-280

## (5) 温度・pH センサーの分子実体と機能

富永真琴 (三重大学 医学部)

痛みは化学的・熱・機械的刺激によってある種の感覚神経が興奮することによって惹起されるが、トウガラシの主成分カプサイシンは辛味とともに痛みを引き起こす。カプサイシンは侵害性刺激受容体を有する感覚神経(nociceptor)を特異的に脱分極させて細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の増大をもたらすことが報告されていたので、カプサイシン投与による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇を指標とした発現クローニング法を用いてカプサイシン受容体遺伝子が単離された。カプサイシン受容体 VR1 (Vanilloid Receptor Subtype 1) はそのアミノ酸配列から、6 回の膜貫通領域を有するイオンチャネルであろうと推定された。パッチクランプ法を用いた電気生理学的な解析によって、VR1 は外向き整流性を有する  $\text{Ca}^{2+}$  透過性の高い非選択性陽イオンチャネルであること、細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  依存性の電流減少を示すこと、 $\text{Na}^+$  に対して陽性電位で約 80 pS の単一チャネルコンダクタンスを持ち細胞内セカンドメッセンジャーを介さずにカプサイシンによって直接活性化されるであろうことが明らかとなった。VR1 はカプサイシンに加えて生体で痛みを惹起する酸(プロトン)、43 度以上の熱によっても活性化することが判明した。異所性発現系で解析されたこれらの VR1 の多刺激痛み受容体としての機能は遺伝子欠損マウスの行動解析から確認された。

このように VR1 は温度・pH センサーとして機能するが、活性化温度閾値は種々の因子によって変動する。活性化刺激であるプロトンは室温でチャネルを活性化しない程度の少量では VR1 の活性化温度閾値を低温度側へシフトさせる、つまり活性化刺激間の相互作用があることが明らかとなった。また、生体で痛みを惹起させたり増強させたりすることが知られている ATP や bradykinin はそれぞれ  $\text{P2Y}_1$  受容体、 $\text{B}_2$  受容体に作用して PKC 活性化を介した VR1 のリン酸化によって VR1 活性化温度閾値を体温以下に低下させることが分かった。これらの代謝型受容体とイオンチャネル型受容体 VR1 の機能連関によって体温での疼痛発生が起こることになる。

VR1 とアミノ酸レベルで 50% の相同性を有し 52 度以上の熱刺激によって活性化される新たな熱刺激受容体 VRL-1 が明らかになった。この 2 つのイオンチャネル型受容体は、TRP イオンチャネルファミリーに属し、それぞれ TRPV1、TRPV2 と分類される。ごく最近、同じ TRP イオンチャネルファミリーに属する TRPM8 (CMR1; Cold Menthol Receptor 1) が冷刺激(8-27 度)を受容する新たな温度受容体として報告された。TRP イオンチャネルが広く温度受容体として機能していることは興味深い。

## (6) ASIC の pH センサーとしての機能

島田昌一 (名古屋市立大学 医学部)

ASIC (acid sensing ion channel) イオンチャネルファミリーは、pH センサー、メカノセンサー等の多様な機能と関係する陽イオンチャネルである。我々は、ASIC チャネルの pH センサーという特徴に着目し、生体内での機能について検討を加えてきた。本演題では、ASIC ファミリーの酸味受容体と痛覚受容体としての機能解析の結果を報告する。我々は、以前、イオンチャネル型味覚受容体を単離する過程で、ASIC2a/MDEG1 が舌の味蕾では酸味受容体として機能していることを見出した。アフリカツメガエル卵母細胞機能発現系で解析した結果、ASIC2a

は、同じ pH でも酢酸の方が塩酸よりもより大きな反応を示すことから、in vivo における酸味受容体の特徴を良く示すものと考えられた。しかし、ASIC2a の amiloride や pH の感受性は in vivo における酸味受容体のデータと一部異なる点があるため、新しいサブユニットをラット有郭乳頭の cDNA ライブラリーよりスクリーニングし、ASIC2a の splicing variant の ASIC2b を得た。ASIC2a と ASIC2b は同一の味蕾細胞に共存しヘテロマーを形成していることを、免疫組織化学法と免疫共沈法により示した。またアフリカツメガエル卵母細胞に ASIC2a と

ASIC2b を共発現させるとアミロライドや pH の感受性が *in vivo* の記録に良く一致する特徴的な結果を得た。これらの結果から、ASIC2a と ASIC2b は味蕾においてヘテロマーを形成し酸味受容体として機能していると考えられた。次に ASIC の酸による痛覚受容体として機能について解析した。炎症や虚血では、局所的なアシドーシスが発生し、pH の低下が痛みの惹起に大きく関係していると考えられている。この pH の低下によって引き起こされる痛みは、末梢神経系で vanilloid receptor subtype-1 (VR1) が関与していると考えられている。しかし最近では、ASIC ファミリーの痛覚受容への関与も示唆されている。そこで我々は pH の低下で惹起される痛みには実際にどの分子がどの程度関与しているのか、ヒトの疼痛誘発試験により検討した。二重盲検により皮下に pH7.4~5.5 の各種溶液を微量注入し、その時に生じる痛みを数値化し比較解析した。その結果 pH を 7.4 から低下させていくと pH7.2 近傍でほとんどの被検者は痛みを感じ始めることが明かとなった。また、pH6.0 で惹起される痛みに

対して ASIC チャネルの阻害剤である amiloride を同時に投与すると痛みはほぼコントロールの pH7.4 レベルまで軽減した。一方、pH6.0 で惹起される痛みに対して VR1 の阻害剤である capsazepine を同時投与した場合は、痛みの抑制効果はほとんど認められなかった。これらの結果から、pH6.0 による疼痛誘発試験の条件下では、ASIC が主要な痛覚受容体 (pH センサー) として機能していると考えられた。さらにこの実験系では capsaicin によって惹起される痛みに対しては amiloride は影響を与えなかったことから、amiloride の鎮痛作用は ASIC に特異的で、痛覚伝達経路に共通する別の分子に amiloride が働いている可能性は少ないと考えられた。また、ASIC ファミリーの脊髄後根神経節における分布を詳細に検討したところ ASIC1a と ASIC3 が小型から中型細胞に発現し、一部は同一細胞に共存していることが分かった。これらの結果から、ASIC1a と ASIC3 は酸による痛みの受容体として機能していると考えられた。

## (7) 膜電位依存性プロトンチャネルの温度・プロトンセンサーとしての機能

久野みゆき (大阪市立大学大学院 医学研究科)

膜電位依存性  $H^+$  チャネルは、 $H^+$  を選択的に透過させるチャネルで、多くの細胞に存在することが明らかにされつつあるが、その分子構造やイオン透過機構は未だ謎である。 $H^+$  ポンプや  $Na^+/H^+$  交換機構などに比べて  $H^+$  輸送速度は約 100 倍高いと言われ、開口すると短時間に大量の  $H^+$  を排出し細胞内外の pH 環境および膜電位を劇的に変えることができる。 $H^+$  チャネルは脱分極によって緩徐な時間経過で開口する voltage-gated channel であるが、活性化閾値および活性化速度を決定する第一要因は細胞膜を介する pH 勾配による  $H^+$  の平衡電位である。細胞内 pH が細胞外 pH に比べて低くなるほど閾値は過分極側にシフトし、活性化速度は速くなる。すなわち、細胞内に強いアシドーシスが生じた場合は  $H^+$  を排出しやすくなり、細胞内アシドーシスが解除されるとチャネルは閉じる。したがって  $H^+$  チャネルは細胞内外の  $H^+$  濃度の増減に即応して活性が決まる非常に正確な  $H^+$  センサーといっても過言ではない。一方、 $H^+$  チャネルの持つユニーク

な特性のひとつに高い温度依存性がある。定常電流の  $Q_{10}$  (>2) は一般のイオンチャネルに比べ高く、活性化速度の  $Q_{10}$  が 3-6 程度あることを考慮すると、わずかな温度変化に際しても  $H^+$  流出量は大きく変化し得る。温度に対する  $H^+$  チャネルの応答は、殆ど遅延が無く、また可逆的かつ反復可能であることからチャネル本体の性質によるものと考えられている。しかし、最近、定常電流の温度依存性には少なくとも 2 つの状態、high  $Q_{10}$  (>2) と low  $Q_{10}$  (<1.3) があることが示唆された。同一細胞でも high  $Q_{10}$  と low  $Q_{10}$  の移行が見られ、細胞が膨化した状態では low  $Q_{10}$  となるなど、 $H^+$  チャネルの温度感受性はチャネルの活性化状態によって変動する可能性がある。このように、膜電位依存性  $H^+$  チャネルは他のイオンチャネルに見られない  $H^+$  や温度の変化に対する特異的な応答性を持っているが、その  $H^+$  や温度のセンサーとしての働きは、細胞の状態や細胞内外の微小環境要因の影響を受けて変化すると推測される。

## (8) 線虫の温度受容機構の分子遺伝学的研究

森 郁恵 (名古屋大学大学院 理学研究科)

我々の研究室では、線虫 *C. elegans* の温度走性行動の分子生物学的な解析から、温度受容のメカニズムを解明したいと考えている。*C. elegans* の温度走性とは、餌 (大腸菌) が豊富に存在する条件下で、15℃から 25℃の範囲で飼育された後に、餌の無い温度勾配上に置かれると、飼育温度に向かって移動し、逆に、餌の無い条件下で飼育された後に、餌の無い温度勾配上に置かれると、餌の無い体験をしていた温度 (飢餓体験温度) を避けるように移動する性質である。この行動は、*C. elegans* において、行動の可塑性が最も直接的に観察できるため、神経可塑性の分子遺伝学的解析にも適した行動パラダイムである。従来までの研究から、1) 温度走性には、頭部先端に左右 1 対存在する感覚器官 *Amphid* に属する感覚ニューロン *AFD* での温度感知が必須であること、2) *AFD* 温度受容ニューロンでは、cGMP 依存性カチオンチャンネルが、おそらく温度刺激の受容に伴って膜電位を変化させていること、3) カルシウム/カルモジュリン依存性脱リン酸化酵素であるカルシニューリンが、*AFD* ニューロンの負の制御因子として、温度刺激入力のゲインコントロールをしていること、などが明らかになった。

*C. elegans* における温度刺激の受容体については、現時点で、ほとんど不明である。哺乳類では、*VR1* カプサイシンリセプターチャンネルが、侵害刺激としての高温に応答する。*C. elegans* の *OSM-9* チャンネルは、*VR1* に最も相同性が高いが、*AFD* 温度受容ニューロンでの発現は見られず、*osm-9* 突然変異体は、温度走性に異常が見ら

れない。また、最近、低温やメントールに応答するチャンネルも哺乳類において発見されたが、この *CMR1* (*TRPM8*) チャンネルも、*VR1* チャンネル同様 *TRP* チャンネルファミリーに属している。我々の研究室で、*Drosophila* の視細胞における光受容に必須な *TRP* チャンネルに最も相同性が高い *C. elegans* の *TRP* 遺伝子のノックアウト系統を作成したところ、温度走性には、異常が見られなかった (未発表)。また、*C. elegans* の高温侵害刺激 (33℃) に対する忌避応答は、カプサイシンの投与によって増強され、この応答そのものには、*AFD* ニューロンおよび *OSM-9* チャンネルは無関係であることが報告されている。以上のように、侵害刺激としての高/低温の受容体についての分子レベルの知見は、まだ得られていない。

それでは、*C. elegans* が自然界で通常感知していると想定される、生理学的に侵害とならない温度の受容体は何であろうか？我々は、この問いに答えるために、温度走性異常突然変異体の解析を進めると共に、*AFD* で発現するレセプター型 *guanylyl cyclase* が温度受容体である可能性を検証するために、それらの遺伝子のノックアウト系統の作成とその温度走性の解析を行っている。また、*AFD* ニューロンでの温度受容シグナル伝達経路が、哺乳類の視細胞における経路と類似している可能性もあるため、*AFD* ニューロンで発現する 7 回膜貫通型タンパクをコードする遺伝子のノックアウト系統の作成も検討している。

## (9) Redox 感受性チャネル

森 泰生 (統合バイオサイエンスセンター)

形質膜越えのカチオン流は、重要な膜電位調節機構の一つであり、細胞内 Ca イオン濃度上昇を担うという生理的意義も有する。TRP 遺伝子スーパーファミリーによってコードされているカチオンチャネル群は、本カチオン流を制御し、細胞の増殖や死／生存に深く関与している。一方、酸化還元状態も細胞の恒常性や死に強く関連しており、それが有する「シグナル性」が注目を集めている。最近、我々は「細胞死」の制御に関与する、新しいタイプのイオンチャネル LTRPC2 を同定した。LTRPC2 の遺伝子はヒトゲノム計画において、家族性躁鬱病の原因遺伝子の探索の過程で、ヒト 21 番染色体に見い出された。構造的には、TRP チャネルタンパク質に類似していることから、その一員として「TRP」がつけられた。しかしながら、その生理的機能や躁鬱病を含む病態との機能的関連は全くわかっていなかった。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 等の活性酸素種や、一酸化窒素 (NO) により細胞が酸化状態になったことを生体エネルギー貯蔵物質ニコチンアミドが感受し、その酸化体が直接結合することにより、TRPM2 チャネル

は活性化開口することがわかった。Ca/Na イオンが活性化 TRPM2 チャネルを通して流入し、細胞死の主要分類のうちの「ネクローシス」をひきおこすことが明らかとなった。さらに、生体内でおこる酸化ストレスや、腫瘍壊死因子 (TNF) 等によって誘導される細胞死を、ひきおこすこともわかった。活性酸素種や Ca/Na イオンによるネクローシスは、非特異的な細胞破壊とされていた。今回、新しいタイプのチャネル TRPM2 の発見によって、細胞に元々から具わっているメカニズムにより、アポトーシスと同様、精妙にコントロールされている可能性が示された。ところで、我々は既に、PI 応答と連関して活性化開口する 7 つの TRPC (canonical TRP) チャネル (TRPC1-7) をあきらかにしている。TRPC1-7 の活性制御にも、活性酸素種による酸化が重要であることを見出した。このような TRP 関連チャネルと活性酸素種との機能的協関は、Ca シグナル及び膜電位変化が、細胞の酸化還元状態による生体応答制御の重要な基盤であることを示唆する。

## (10) 代謝型グルタミン酸受容体の多価陽イオン感受性に Homer 分子がおよぼす作用

久保義弘 (東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科)

代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR1 $\alpha$ ) は、一次構造的に多価陽イオンセンサー CaR と同じ super-family に属する。我々はこれまでに mGluR1 $\alpha$  が CaR と同様に、細胞外 Ca<sup>2+</sup> や Gd<sup>3+</sup> などの多価陽イオン感知能を持つことを見いだした。さらにその後、遺伝子発現系により mGluR1 $\alpha$  の Gd<sup>3+</sup> 応答能に差が見られることを見いだした。すなわち、ツメガエル卵母細胞においては明確に観察された mM order の Gd<sup>3+</sup> に対する応答が、CHO 細胞においては観察されなかった。

このことは、mGluR1 $\alpha$  分子の構成や状態が発現系により異なる可能性を示唆し、その分子基盤を明らかにすることは、mGluR1 $\alpha$  の生理的機能の理解に必須であると考えられる。そこで、機能の差異がクラスター化分子の有無によるという可能性を想定し、mGluR1 $\alpha$  をクラ

スター化させる分子である Homer1c、もしくはその splicing variant でクラスター化能力を欠く Homer1a の共発現が mGluR1 $\alpha$  の受容体機能に及ぼす作用について、HEK293 細胞を一過性発現系として用い、リガンド投与時の細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度の上昇を指標として解析した。

その結果、Homer1c の共発現により (1) グルタミン酸に対する応答のピーク値・立ち上がり速度が増大すること、(2) グルタミン酸に対する用量応答関係が右側に (感受性が下がる向きに) シフトすること、(3) クラスター化能力の無い Homer1a の共発現によっては、グルタミン酸応答のピーク値、応答の立ち上がり速度ともむしろ減少することを観察し、さらに (4) Homer 結合能を欠く mGluR1 $\alpha$  の変異体 P1147E では上記に示した Homer1c 共発現の影響が観察されないという結果から、mGluR1 $\alpha$

と Homer1c との結合がグルタミン酸応答に影響を与えていることを実証した。また、(5) 免疫組織学的解析により、Homer1a の共発現は mGluR1 $\alpha$  の細胞膜上での発現を増大させ、Homer1c は著明に減少させることを観察した。

次に mGluR1 $\alpha$  の多価陽イオン応答に対する Homer 分子共発現の影響の解析を行い、(7) Homer1c 分子は、グルタミン酸応答に対する影響と同様の効果を、細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  に対する応答に関しても示すことを見いだした。さらに、驚いたことに (8) mGluR1 $\alpha$  の  $\text{Gd}^{3+}$  に対する応答が、sub mM order では用量依存的に増大し、mM order では応答が逆に抑制されるという、ベル状の用量応答関係

を示すこと、そして (9) Homer 1c の共発現は mGluR1 $\alpha$  の  $\text{Gd}^{3+}$  応答を示す範囲を高低濃度両方向に拡大させることが明らかになった。

Homer が mGluR1 $\alpha$  のグルタミン酸に対する用量応答関係に与えた作用の一部は上述の Homer による細胞表面における mGluR1 $\alpha$  発現量の制御と、(Worley らによって提唱された)  $\text{Ca}^{2+}$  ストアとの直接リンクにより説明できると思われる。しかし、このメカニズムでは  $\text{Gd}^{3+}$  に対する用量応答関係の変化は説明できず、Homer 分子との結合が mGluR1 $\alpha$  のリガンド受容という機能に何らかの質的变化を起こしていることが示唆された。

## (11) GFP を用いたカルシウムセンサー

大倉正道 (生理学研究所)

G-CaMP は緑色蛍光蛋白(GFP), calmodulin(CaM), および  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM のターゲットペプチドである M13 から成る蛍光カルシウムプローブである。G-CaMP は  $\text{Ca}^{2+}$  の結合( $K_d = 235$  nM, Hill coefficient = 3.3)に伴い比較的大きな ( $F_{\max}/F_{\min} = 4.5$ ) 緑色蛍光強度の増大を示すことが長所だが、蛍光強度が低いことや pH 感受性を示すことが短所であった。そこで今回我々は G-CaMP の改良を行い、G-CaMP1.6 という新しいヴァリエントを開発したので報告したい。

G-CaMP1.6 は、主として量子収率の増大により、G-CaMP に比べて約 40 倍明るく蛍光を発した。また、G-CaMP1.6 は G-CaMP より低い pH 感受性を示した。さらに G-CaMP や G-CaMP1.6 においてカルシウムセンサーの役割を果たす部分である CaM は  $\text{Ca}^{2+}$  以外の 2 価カチオンに対しても感受性があることが知られているが、 $\text{Ca}^{2+}$  と同程度のイオン半径を有する 2 価カチオンの選択性に関しては、G-CaMP1.6 の方が G-CaMP より高かった。これらの結果は、G-CaMP1.6 が G-CaMP よりも優れたプローブであることを示す。一方、G-CaMP1.6 の  $\text{Ca}^{2+}$  感受性( $K_d = 146$  nM, Hill coefficient = 3.8,  $F_{\max}/F_{\min} = 4.9$ )については G-CaMP の場合よりもやや高親和性側へシフトしていたが、 $\mu\text{M}$  レベルでの  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化をモニターする上では問題ないと思われた。

次に G-CaMP1.6 が生細胞において機能するか否かを

HEK 細胞に発現させて検討した。残念ながら G-CaMP の場合と同様に、G-CaMP1.6 も細胞へ導入した後 37°C で培養し続けた場合は蛍光を発しなかった。しかし、G-CaMP1.6 を導入した細胞を 28°C に移したところ、G-CaMP の場合とは異なり、数分以内に著しい蛍光強度の増大を示した。このことから G-CaMP1.6 では G-CaMP の場合よりも発色団が形成されやすくなっていることが示唆された。さらに G-CaMP1.6 発現細胞を用いて蛍光強度の経時変化解析を行ったところ、G-CaMP1.6 が生細胞内でも  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇に伴って速やかに大きな蛍光強度変化を生じることが確認された。

ところで G-CaMP1.6 は G-CaMP より優れたプローブではあるが、CaM をカルシウムセンサー部分として使用しているために 1 プローブあたり 4 個の  $\text{Ca}^{2+}$  を緩衝し、このことが細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  シグナリングを減弱させる可能性がある。そこで我々はより  $\text{Ca}^{2+}$  緩衝能の小さい G-CaMP1.6 のヴァリエントである G-CaMP1.6-CaM(E140K)も今回併せて作成した。

以上総括すると、今回開発した G-CaMP1.6 は G-CaMP より 1) 約 40 倍明るく、2) pH 感受性が低く、3)  $\text{Ca}^{2+}$  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点で、蛍光カルシウムプローブとして改良されていることが示された。

## (12) 蛍光プローブでセンスする細胞機能

宮脇敦史（理研脳科学総合研究センター）

バイオセンサーを作製して細胞生物学に応用するために、蛍光タンパク質を使うことを想定する。蛍光タンパク質の様々な特性をいかに活用するべきか、またその

センサーの performance を十分に引き出すためにはどんな光学系が必要か、などを議論したい。

## (13) 糖・脂質代謝センサーとして働く ABC タンパク質のシグナル変換機序

植田和光（京都大学大学院 農学研究科）

ABC タンパク質は、200 アミノ酸にわたって配列がよく保存された ATP 結合領域と 12-17 の膜貫通  $\alpha$  ヘリックスをもつタンパク質ファミリーである。ABC タンパク質は 1 機能分子あたり ATP 結合領域を 2 つもち、いずれも細胞内 ATP, ADP によって駆動あるいは制御されているが、ポンプ、チャネル、レギュレーターに機能が分化している。

MDR1, MRP1 などが生体異物を細胞外に排出することから、ABC タンパク質の生理的役割として環境中の有害物質に対する防御機構がこれまで強調されてきた。一方、Sulfonylurea Receptor (SUR1) は膵  $\beta$  細胞の ATP 感受性  $K^+$  チャネルのサブユニットであり、細胞内代謝状態を感知してチャネルサブユニットである Kir6.2 の活性を制御するレギュレーターとして機能し、インスリン分泌を調節している。また、ABCA1 が apoA1 にコレステロールとリン脂質を受け渡すことによって HDL コレステロール形成のキー分子として機能していることが明らかになった。脂肪酸、コレステロール、脂溶性ビタミン、胆汁酸などの細胞内濃度は ABC タンパク質によって調節されているだけでなく、逆に ABC タンパク質遺伝子の転写、局在、分解などを調節しており、脂質ホメオスタ

シスは、転写因子、代謝酵素、輸送体などが互いに調節しあう巧妙なネットワークによって統合的に保たれていることが最近明らかになりつつある。

しかし、SUR がどのようにして細胞内の ATP, ADP 濃度を感知しているのか？ トランスポーター型 ABC タンパク質と SUR1 はどのように異なるのか？ ABCA1 はトランスポーターをして機能しているのか？ 実際に何を基質として輸送しているのか？ その活性はどのように調節され細胞内脂質代謝センサーとして機能しているのか？ ABC タンパク質遺伝子の転写、局在、分解がどのように調節されているのか？ 多くの疑問が残されている。

我々は、ABCA1 の動態を細胞生物学的に解析するとともに、MDR1, SUR1, ABCA1 などを昆虫細胞で大量発現、精製、再構成し、ATP 加水分解活性などを測定することによって、分子メカニズムを解明したいと考えている。精製した MDR1, SUR1, ABCA1 はいずれも ATPase 活性をもつが、それらの ATPase 活性は大きく異なった。また、バナジン酸などの阻害剤の効果も異なった。糖・脂質代謝センサーとして働く ABC タンパク質の分子メカニズムについて概説したい。

## (14) ATP センサーとしての ATP 感受性カリウムチャネル

稲垣暢也（秋田大学 医学部）

ATP 感受性  $K^+$  ( $K_{ATP}$ ) チャネルは細胞内 ATP によって開閉が調節されるチャネルであり、従って細胞内代謝レ

ベルを膜電位に反映させる分子である。また、膵  $\beta$  細胞においては、インスリン分泌の鍵を握る分子であると同

時に、経口糖尿病薬スルホニル尿素の作用部位でもある。我々は、これまでに、膵β細胞の $K_{ATP}$ チャネルがABC蛋白質であるスルホニル尿素受容体SUR1と内向き整流性 $K^+$ チャネルのメンバーであるKir6.2の複合体であること、心筋の $K_{ATP}$ チャネルがSUR1のイソフォームSUR2AとKir6.2の複合体であることを明らかにした。

一方、 $K_{ATP}$ チャネルは脳にも広く発現することが知られているが、その分子構造や機能に関しては今なお不明な点が多い。従来より、スルホニル尿素薬であるグリベンクラミドの結合実験から、 $K_{ATP}$ チャネルは黒質網様部(SNr)に多く発現することが知られていた。実際、急性単離SNrニューロンのパッチクランプ法を用いた実験では、SNrニューロンにはSUR1とKir6.2からなる膵β細胞型 $K_{ATP}$ チャネルが発現していた。一方で、SNrは全身けいれんの制御部位としても知られている。そこで、 $K_{ATP}$ チャネルの構成サブユニットであるKir6.2のノックアウト(KO)マウスを用いて、SNrにおける $K_{ATP}$ チャネルの機能的役割について検討した。

KOマウスは短時間(150秒)低酸素条件(5.4%  $O_2$ )下

におくと、著しく全身けいれんを起こしやすく、死に至ったのに対して、野生型マウスはけいれんを起こさなかった。急性単離SNrニューロンの穿孔パッチクランプ法を用いた検討では、野生型ニューロンは低酸素負荷時に $K_{ATP}$ チャネルの開口により過分極したのに対して、KOニューロンではむしろ脱分極した。急性スライスをを用いたSNrの細胞外記録では、野生型ニューロンでは低酸素負荷時に発火頻度が激減したのに対して、KOニューロンではむしろ増大した。

以上の結果より、SNrニューロンは、代謝ストレス時に細胞内ATPレベルが低下すると、 $K_{ATP}$ チャネルが開口することにより過分極し、その結果神経活動が抑制され、全身けいれん発症に対して防御的に働くものと考えられた。一方、膵β細胞では、高血糖時に細胞内ATPレベルが上昇することによって、細胞膜が脱分極しインスリン分泌がおこる。従って、 $K_{ATP}$ チャネルは細胞内ATPのセンサーとして機能し、生体防御に関わっているものと考えられた(Yamada, K., et al. Science 292: 1543, 2001)。

## (15) 細胞内ATP感受性ATPチャネル

Sabirov Ravshan (生理学研究所)

Extracellular ATP is an important autocrine and paracrine regulator of a multitude of physiological functions. It is well recognized that the signal brought about by ATP is transduced into the adequate physiological response via purinergic receptors. However, the nature of ATP-releasing pathway is less understood at present. The existence of an ATP conductive anionic channel has widely been discussed, and an involvement of ABC-transporters such as P-glycoprotein and CFTR has been proposed. We found that in non-CFTR-expressing murine mammary C127 cells, hypotonic stimulation activates two types of anionic conductance. Conventional volume-sensitive outwardly rectifying chloride currents had different sensitivity to ATP-release inhibitors, whereas the novel type of anionic current, which had no outward rectification and exhibited voltage-dependent inactivation at moderate positive and negative potentials, was inhibited by  $Gd^{3+}$ , an inhibitor of

ATP release. Single channels underlying this macroscopic conductance had large unitary conductance (400 pS) and voltage dependency similar to that of whole-cell current. ATP at millimolar concentrations produced a voltage-dependent open-channel block when added either from outside or from inside the excised patches with ATP-binding site located in the middle of the channel pore. Therefore, it appears that the channel is able to accumulate a large  $ATP^{4-}$  anion in its lumen. When all anions of the intracellular side were replaced with ATP, small inward currents carried by  $ATP^{4-}$  have been observed. The pharmacological profile of these single channel events was reminiscent to that of ATP release. These data suggest that the Volume- and voltage-Dependent ATP-permeable Large conductance anion channel (VDACL) can serve as a conductive pathway for swelling-induced ATP release. A high rate of ATP transport through the VDACL channel implies that the cells possess an efficient controlling

system for this pathway. We found that in addition to open-channel block, the intracellular ATP caused a channel shutdown effect at sub-millimolar concentrations. This effect was absent for the ATP added from the outside. We suppose that ATP not only passes through VDACL channel, but also is a key component of a negative feedback controlling system

linking the rate of ATP release to the metabolic state of the cell. The nature of this sophisticated regulatory system is currently under investigation.

1) Sabirov, Dutta & Okada 2001. J. Gen. Physiol. 118, 251-266

## (16) cAMP センサーによる細胞機能制御

柴崎忠雄 (千葉大学大学院 医学研究院)

cAMP はインスリン分泌の増強作用において重要な細胞内シグナルである。経腸管的に摂取された栄養素によって腸管内分泌細胞から分泌される消化管ホルモンである Glucagon-like peptide-1 (GLP-1)や Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP)などのインクレチンは膵β細胞の細胞内 cAMP を上昇させることによってインスリン分泌を増強することが知られている。cAMP によるインスリン分泌は cAMP 依存性プロテインキナーゼ (PKA) が細胞内の種々の調節タンパク質をリン酸化し、開口放出を増強する経路が主要であると考えられてきた。一方、PKA リン酸化によらない cAMP 誘導性の開口放出も提唱されているが、この経路における分子機構は全く不明であった。

最近、我々は新規 cAMP センサー、cAMP-GEFII が、Rab3 標的分子 Rim と結合し、cAMP 依存性であるが PKA 非依存性の開口放出機構に関与することを示した。cAMP-GEFII が生理的にも機能しているかを明らかにする目的で、まずインクレチンによるインスリン分泌増強に対する cAMP-GEFII の役割を検討した。cAMP-GEFII に対するアンチセンスオリゴで単離マウス膵島を処置したところ、インクレチンによるインスリン分泌増強は約 50%抑制された。一方、PKA の特異的阻害剤である H-89 の処置によっても約 50%抑制された。両者を同時に処置

すると約 90%以上、インスリン分泌増強を抑制した。またインクレチンによるインスリン分泌増強においても cAMP-GEFII と Rim2 の結合が必要であった。

次に cAMP-GEFII を介するインスリン分泌増強の分子機構について検討した。Rim2 には N 末端側から Rab3 結合領域 Zn フィンガードメイン、cAMP-GEFII が結合する PDZ ドメイン、Ca<sup>2+</sup>の結合が想定される C2 ドメインが存在する。Rim2 は細胞内でインスリン顆粒と細胞膜に局在する Rab3A との共局在が認められたが、Zn フィンガードメインを欠損する変異 Rim2 を導入したマウスインスリン分泌細胞株では、Rim2 と共局在せず、しかも cAMP によるインスリン分泌増強は顕著に抑制された。

以上の結果から、膵β細胞において、インクレチン刺激などによるインスリン分泌の増強には PKA 依存性、非依存性の機構が存在し、PKA 非依存性機構では cAMP-GEFII/Rim2 経路が関与することが明らかになった。さらに cAMP-GEFII/Rim2 によるインスリン分泌増強には Rab3 を介した開口放出の制御が重要な役割を果たしていることが示唆された。本研究会では cAMP-GEFII/Rim2 経路の制御機構の解析から cAMP センサーによるインスリン分泌増強の分子機構について考察したい。

## 5. 細胞死の誘導と制御・その分子機構と生理病理機能

2002年9月10日－9月11日

代表・世話人：米原 伸（京都大学 生命科学研究科）

所内対応者：岡田泰伸

(1) Fas を介するアポトーシス誘導

米原 伸（京都大学 生命科学研究科）

(2) TNF により誘導される細胞死のメカニズム

中野裕泰（順天堂大学 医学部）

(3) TWEAK による細胞死誘導機序の解析

八木田秀雄（順天堂大学 医学部）

(4) p53 によるアポトーシス誘導機構

田矢洋一（国立がんセンター）

(5) p53 依存性アポトーシスにおける Noxa の役割

渋谷 司，谷口維昭（東京大学 医学系研究科）

(6) アポトーシス誘導と抗がん剤シスプラチン耐性と容積感受性クロライドチャンネル

岡田泰伸（生理学研究所）

(7) アポトーシス細胞の貪食に関する分子

長田重一（大阪大学 生命機能研究科）

(8) 抗原受容体を介する B リンパ球アポトーシスの生理機能と分子機構

鏑田武志（東京医科歯科大学 難治疾患研究所）

(9) ASK1-MAP キナーゼ系による細胞死制御

一條秀憲（東京医科歯科大学 医歯学総合研究科）

(10) リン酸化による細胞死制御

後藤由季子（東京大学 分子細胞生物学研究所）

(11) ストレス応答性 SAPK/JNK の活性化機構とその生理的役割

仁科博史（東京大学 薬学系研究科）

(12) 癌抑制遺伝子 PTEN の生体各種組織における機能解析

鈴木 聡（秋田大学 医学部）

(13) ショウジョウバエを用いた細胞死の分子遺伝学

三浦正幸（理化学研究所 脳科学総合研究センター）

(14) hypoxia により誘導される caspase 非依存的細胞死の解析

新沢康英，辻本賀英（大阪大学 医学系研究科）

(15) 神経変性疾患における異常タンパク質の分解機構

高橋良輔（理化学研究所 脳科学総合研究センター）

(16) 神経変性疾患の共通メディエーターとしての VCP の分子解析

垣塚 彰（京都大学 生命科学研究科）

### 【参加者名】

米原伸（京大生命科学），中野裕泰，八木田秀雄（順天堂大 医），田矢洋一（国立がんセンター研究所），渋谷

司，谷口維昭（東大医学系研究科），岡田泰伸（生理学研究所），長田重一（大阪大生命機能），鏑田武志（東京

医科歯科大難治疾患), 一條秀憲 (東京医科歯科大医歯学総合研究科), 後藤由季子 (東京大分子細胞生物学研究所), 仁科博史 (東京大薬学系研究科), 鈴木聡 (秋田大 医), 三浦正幸 (理化学研究所), 辻本賀英, 新沢康英 (大阪大医学系研究科), 高橋良輔 (理化学研究所), 垣塚彰 (京都大生命科学), 倉永英里奈 (理化学研究所), 小川原陽子 (東大分子細胞生物学研究所), 沢田泰輔 (順天堂大 医), 鈴木泰行, 菅田浩司, 嘉糠洋陸 (理化学研究所), 恵口豊, 清水重臣 (大阪大医学系研究科), 中川

## 【概要】

細胞死の研究は大きく進展し, 細胞死が多細胞生物自身の有する遺伝子によって仕組まれていること, また個体の発生や恒常性の維持に必須の現象であることが明らかとなった。そして, 細胞が備えている細胞死誘導機構が破綻し, 細胞死が阻害されるとがんや自己免疫疾患を発症し, 細胞死が亢進すると神経変性疾患や免疫不全症が発症する。また, 細胞死を誘導する分子機構として, ミトコンドリアを介する進化的に保存された機構や, 高等生物に見られる death receptor を介する機構が明らかとなり, 細胞死にはカスパーゼが中心的な役割を果たすことが示されてきた。その結果, 細胞死誘導分子機構を制御する分子機構とその生理病理作用の解明が新たな問題となる一方, カスパーゼ依存性あるいは非依存性の新し

健太郎, 西舩元, 北川大樹 (東大薬学系研究科), 鶴田文憲, 砂山潤, 森靖典 (東大分子細胞生物学研究所), 大坂直生, 田代啓一郎, 石井絢, 岡本憲明 (東京医科歯科大医歯学総合研究科), 安達貴弘 (東京医科歯科大学), 中桐志保 (京都大生命科学系研究科), 矢島伸之, 坂田真一, 渡辺幸造 (京都大理学研究科), 岡本一男, 真名子幸, 大串雅俊, 米澤慎雄 (京都大生命科学系研究科), 田辺秀, 清水貴浩 (生理学研究所)

い細胞死誘導機構の研究も注目されつつある。このように細胞死の研究は新たな広がりや深みを増している。このような状況のもとで, 広領域にわたる細胞死の研究者が最新の研究結果を発表し, 討論や情報交換を行う場が更なる研究の進展に必須である。そこで, 広領域にわたる第一線の細胞死研究者が集う本研究会を開催し, 細胞死の分子機構と生理病理機能の解明を目指す多様な研究が更に発展する機会を提供し, 研究者間の情報交換や討論を行い, 我が国における細胞死研究の発展に寄与した。それと同時に, 大学院生を含む若い研究者の参加を奨励し, 新しい教育の場としての機能も果たすことができた。

## (1) Fas を介するアポトーシス誘導

米原 伸 (京都大学大学院 生命科学研究科)

我々が発見した Fas (CD95) はアポトーシスを誘導する細胞表面レセプター分子であり, Fas リガンド (主として T 細胞上に発現される) や抗 Fas モノクローナル抗体の作用でアポトーシスを誘導するシグナルを細胞内に導入する。Fas の生理的機能としては, 自己に反応する免疫担当細胞の末梢での除去, 細胞障害性 T 細胞によるがん細胞やウイルス感染細胞などの除去をあげることができる。Fas はがん抑制遺伝子産物と認知されるようになっている。このような Fas の生理機能を生体内で調節するには, Fas リガンドや Fas の発現調節や, Fas を介する細胞内シグナル伝達機構の制御が重要である。このような視点から, Fas が刺激されるとどのような分子機構でアポトーシスが誘導されるのか, またこの分子機構が

細胞内でどのように阻害されるのかを我々は研究している。そして, Fas を介するアポトーシス誘導シグナルを抑制する様々なシグナル (細胞の増殖増強や増殖抑制に関わるものや, 生体の発生に深く関わるものが存在する) を見いだしている。具体的には, FGF (fibroblast growth factor) が Ras/MAPK(ERK)/CREB の活性化を介して, ヒト成人 T 細胞白血病ウイルスのがん遺伝子産物 Tax が三つの異なった分子機構で Fas 誘導アポトーシスのシグナル伝達を阻害することを示した。また, 幹細胞の増殖および生存因子である SCF (stem cell factor) のレセプター Kit からのシグナルで Fas の発現そのものが抑制されることも示した。

## (2) TNF により誘導される細胞死のメカニズム

中野裕泰 (順天堂大学 医学部 免疫学)

我々は昨年, *traf2*<sup>-/-</sup>*traf5*<sup>-/-</sup> (DKO)マウス由来の胎児線維芽細胞(MEF)のTNF誘導性細胞死を抑制することを指標とした機能的なスクリーニングにより, 新たな転写活性化因子 BSAC を同定した。BSACは過剰発現させることにより, *c-fos* や *muscle* 特異的転写因子のプロモーター領域に存在する CArG box と呼ばれるモチーフを介して, これらのプロモーターを強力に活性化することを明らかにした。また興味深いことに BSAC の転写活性化能と抗アポトーシス効果が相関することが明らかとなった。しかしながら BSAC の生体内における機能は不明であった

が, 最近二つのグループにより OTT/RBM15 と呼ばれる遺伝子とヒト BSAC 相同遺伝子である MAL/MKL1 が t(1,22)転座により生じる急性巨核芽球性白血病の原因遺伝子であることが明らかにされた。そこで本研究会では, OTT および OTT-BSAC の機能解析結果を紹介し, 討論したい。また最近我々は DKO 由来 MEF において TNF 刺激により誘導される細胞死は, アポトーシス様の形態ばかりではなく, ネクローシス様の形態を示すことを明らかにしており, その解析結果も合わせて紹介したい。

## (3) TWEAK による細胞死誘導機序の解析

八木田秀雄 (順天堂大学 医学部 免疫学)

TWEAK は 1997 年に EST database から見い出された TNF ファミリーに属する II 型膜蛋白質で, 可溶性の recombinant TWEAK は一部の癌細胞にアポトーシスを誘導することや血管内皮細胞の増殖と血管新生を誘導することが知られているが, その生理的な役割は未だ明らかでない。我々は, ヒト末梢血由来単球に IFN- $\gamma$ 刺激により TWEAK の発現が誘導され, TWEAK 感受性腫瘍細胞に対する標的細胞傷害に働くことを示した。TWEAK による細胞死は細胞株によりその機序が異なり, rhabdomyosarcoma Kym-1 においては TNF- $\alpha$ の誘導を介

した間接的な経路, oral squamous cell carcinoma HSC3 では caspase 依存性のアポトーシス経路, colon adenocarcinoma HT-29 では caspase 依存性のアポトーシス経路と caspase 非依存性のネクローシス経路の存在が示された。最近, 血管内皮細胞上の TWEAK 受容体として Fn14 (FGF-inducible 14)が同定されたが, 我々はこれらの TWEAK による細胞死は全て DR3 ではなく Fn14 を介して起こることを明らかにし, そのアポトーシス及びネクローシス誘導経路の解析を進めている。

## (4) p53 によるアポトーシス誘導機構

田矢洋一 (国立がんセンター研究所 放射線研究部)

細胞が DNA ダメージなどのさまざまなストレスを受けたとき, p53 が活性化されて, ある場合には G1 期停止を誘導するが, 別の場合にはアポトーシスを誘導して細胞を自殺させる。この2つの経路の選択がどのようにしてなされるかということは重要な問題であったが, われわれは, p53 の Ser46 がリン酸化されると p53 のプロモーター結合性が変わり, ミトコンドリアのアポトーシス

誘導蛋白質 p53AIP1 の発現が起こって, アポトーシスが誘導されることを示した。その後, この Ser46 キナーゼの精製と同定を進めた結果, 東大医科研の中村祐輔らのグループによってクローニングされた p53 によって誘導される蛋白質 p53DINP1 を含み, カゼインキナーゼ 2 と他の転写のメディエーターとからなる蛋白質複合体であることがわかった。カゼインキナーゼ 2 は  $\alpha$ あるいは  $\alpha'$

と $\beta 2$  つずつのサブユニットからなる 4 量体であり、細胞内にかなり多く存在するキナーゼであるが、複合体形成

する相手によって細胞内局在や基質特異性が変わるらしい。

## (5) p53 依存性アポトーシスにおける Noxa の役割

洪江 司, 谷口維紹 (東京大学大学院 医学系研究科 免疫学講座)

p53 による標的遺伝子の転写活性化を介したアポトーシスの誘導は発がんの抑制において重要であることが知られる。我々が同定した p53 の標的遺伝子 Noxa は Bcl-2 family 内の BH3-only subfamily に属するものであり、高発現によりアポトーシスを誘導することから、p53 依存性アポトーシスへの関与が示唆された。そこで、Noxa 遺伝子欠損マウスを作成し、同マウス由来の細胞を用いて p53 に依存性であることが知られるいくつかのアポトーシスの系について検討した。X 線照射後の Thymocyte のアポトーシスに関しては、野生型のものとの間に有意

差はなかった。しかし、胎仔線維芽細胞(MEF)にアデノウイルス E1A を発現させ、DNA 損傷を加えた際のアポトーシスについて見たところ、Noxa 遺伝子欠損細胞においては細胞死の割合が有意に低下しており、チトクローム c の放出やミトコンドリア膜電位の低下といった現象も抑制されていた。同じく p53 の標的遺伝子である Bax に関しても MEF の E1A 依存性アポトーシスへの関与が既に報告されており、現在我々は Noxa と Bax の両遺伝子を欠損したマウスを作成し、p53 依存性アポトーシスの経路についてさらに解析を行っている。

## (6) アポトーシス誘導と抗がん剤シスプラチン耐性と容積感受性クロライドチャンネル

岡田泰伸<sup>1</sup>, 前野恵美<sup>1</sup>, 伊勢知子<sup>2</sup>, 清水貴浩<sup>1</sup>, 田辺 秀<sup>1</sup>, 鏑田武志<sup>3</sup>, 河野公俊<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>生理研 機能協関, <sup>2</sup>産業医大 分子生物, <sup>3</sup>東医歯大 難治研<sup>2</sup>)

アポトーシスには細胞容積の減少が伴われる。リンパ系, 上皮系, 神経系培養細胞に Fas リガントや TNF $\alpha$  や staurosporin でアポトーシスを誘導すると, この apoptotic volume decrease (AVD) の発生は 30 分以内に見られ, caspase-8, -9, -3 の活性化や DNA ラダーの発生に先行することが判明した。この AVD は容積調節に関与する Cl<sup>-</sup> チャンネルや K<sup>+</sup> チャンネルのブロッカーによって完全に阻止された。チャンネル阻害剤による AVD の発生阻止は, その後の上記のアポトーシス反応や, ミトコンドリアからのチトクローム c 放出や, 細胞死そのものの発生も阻止することが明らかになった。また, AVD の発生は, Fas リガンド刺激を受けた I 型細胞 SKW6.4 でも, staurosporin 刺激を受けた Bcl-2 強制発現 WEHI 細胞にお

いても見られたので, ミトコンドリアの VDAC チャンネルとは独立した現象であることが明らかとなった。容積感受性 Cl<sup>-</sup> チャンネルのブロッカーの一つであるスチルベン誘導体 DIDS は, staurosporin 刺激された培養心筋細胞や, 抗がん剤シスプラチン投与を受けた類上皮がん KB 細胞のアポトーシス誘導も阻止することが観察された。シスプラチン前処理によって KB 細胞の容積感受性 Cl<sup>-</sup> チャンネル活性の亢進が見出された。これに対し, シスプラチン耐性を獲得した KB-CP4 細胞では容積感受性 Cl<sup>-</sup> チャンネルが機能的に欠失していることが明らかになった。これらの事実から, アポトーシスの誘導に容積感受性 Cl<sup>-</sup> チャンネル活性が重要な役割を果していることが結論された。

## (7) アポトーシス細胞の貪食に関与する分子

長田重一 (大阪大学大学院 生命機能研究科)

アポトーシスは細胞の形態変化, 染色体 DNA の切断を伴う過程であり, その最終段階では食細胞にとりこまれて処理される。私達は, Fas リガンドによるアポトーシスの解析から, この過程はカスパーゼと呼ばれるプロテアーゼ, カスパーゼによって活性化される DNase (CAD, caspase-activated DNase) によって実行されることを示した。一方, マクロファージによるアポトーシス細胞の貪食に関与する分子のひとつとして, MFG-E8 を同定した。この因子はマクロファージから分泌され, アポトーシス細胞に提示されるリン脂質 (phosphatidylserine) を認識し, 死細胞をマクロファージへ橋渡しすると考え

られる。このようにして, 貪食された死細胞の DNA はマクロファージのリソソームに存在する DNase II によってさらに分解される。このような機構はショウジョハエ (*Drosophila*) でも保存されており, CAD, DNase II 両遺伝子を欠損するハエでは卵巣などに大量の未分解核を蓄積した。ところで, 染色体 DNA の分解は赤血球の分化過程でも起こる。DNase II 遺伝子を欠損したマウスは胎生期に貧血により死滅した。その胎児肝臓には未分解の大量の核を持つマクロファージが見いだされ, 赤血球の脱核過程にもアポトーシス細胞の貪食と同様な機構が関与していることが示唆された。

## (8) 抗原受容体を介する B リンパ球アポトーシスの生理機能と分子機構

鰐田武志 (東京医科歯科大学 難治疾患研究所)

B 細胞株 WEHI-231 は抗原受容体を介するシグナルにより細胞周期停止とアポトーシスをおこし, この細胞周期停止およびアポトーシスは CD40 分子を介するシグナルにより阻害される。CD40 シグナルはアポトーシス阻害因子 Bcl-xL や A1 の発現を増強する。これらの過剰発現により細胞周期が停止したままで細胞死を阻害することができるが, CDK インヒビター p27kip1 の過剰発現により細胞周期停止を誘導すると CD40 シグナルによるアポトーシスが部分的に阻害される。この結果は, CD40 シグナルによる B 細胞の効率的な生存には Bcl-xL や A1 の発現のみでは不十分であり, 細胞周期停止の解除が必

要であることを示している。したがって, B 細胞の抗原受容体を介するアポトーシスには細胞周期停止が関与することが明らかである。細胞周期の際の細胞死誘導機構を解明するために, 細胞周期停止によりアポトーシスがおこる系を樹立し, さらに, この系を用いてこの細胞死を制御する遺伝子を同定する発現クローニング系を樹立した。この系を用いて, 我々は, c-Myc のアンチセンスにより細胞周期停止による細胞死が阻害されることを明らかにし, さらに, c-Myc が細胞周期制御によるアポトーシスにおいて重要な役割を果たすことを明らかにした。

## (9) ASK1-MAP キナーゼ系による細胞死制御

一條秀憲 (東京医科歯科大学大学院 歯学総合研究科 分子情報伝達学分野)

Apoptosis Signal-regulating Kinase (ASK)1 は JNK と p38MAP キナーゼの上流に存在する MAPKKK である。これらの MAP キナーゼ系は, ストレス刺激に応答して細胞が自身の生死を決定するためのシグナル伝達として重要である。ASK1 ノックアウトマウスの解析により, ASK1 が TNF や酸化ストレスによるアポトーシスに必須

であることが明らかになった。さらに最近, ハンチントン舞蹈病を含む多くの神経変性疾患の本態であるポリグルタミンの凝集は, ASK1 を介した小胞体ストレスシグナル伝達系を活性化することによって神経細胞死を誘導することが判明した。本研究会では, 様々な物理化学的ストレスによる ASK1 活性化の分子機構ならびに

ASK1-MAP キナーゼ系を介するアポトーシスシグナル

の病態生理について考察したい。

## (10) 神経系前駆細胞の生存シグナル伝達の解析

後藤由季子 (東京大学 分子細胞生物学研究所)

脳の初期発生において、多くの細胞がアポトーシスによって除かれることが知られている。この細胞死を人為的に抑制すると脳が肥大化することから、脳の細胞死が発生過程で重要な役割を果たしていることが示唆されている。我々は、カスパーゼ 9 の遺伝子破壊により人為的に細胞死を抑制したマウスを用い、発生過程で死んでいる細胞の多くが脳室帯の未分化マーカー陽性な神経系前駆細胞であることを示した。従って未分化な神経系前駆細胞の生死制御が発生上重要であると考えられる。そこで、我々は神経系前駆細胞の生存を促進するシグナ

ル伝達経路の解明を試みた。マウス胎生 11 日終脳皮質細胞の初代培養系を用いて解析を行ったところ、増殖因子 FGF2 によって活性化する生存促進経路には、Akt 経路とそれ以外の生存シグナル伝達が重要であることが明らかになった。増殖因子以外にも、細胞密度依存的な生存促進因子の存在が示唆され、細胞間相互作用に関わる分子 Notch の生存促進効果が認められた。また、活性型 Notch の発現により、生存促進型 Bcl-2 ファミリーメンバーの Bcl-2 および Mcl-1 の発現が誘導されることも示された。

## (11) ストレス応答性 SAPK/JNK の活性化機構とその生理的役割

仁科博史 (東京大学大学院 薬学系研究科 生理化学教室)

ストレス応答性 MAP キナーゼである SAPK/JNK は、紫外線照射などの物理化学的ストレスや TNF $\alpha$  などの炎症性サイトカインの刺激によって活性化され、細胞分化、増殖、生存からアポトーシスに至る様々な細胞機能に関与することが示唆されている。同一のシグナル系が如何にしてこれら多様な現象を発現するかが今後の重要な課題の一つであり、その理解には定量的な SAPK/JNK 活性化の測定が必須であると考えられる。我々はこれまでに、SAPK/JNK を直接活性化する因子である SEK1 (別名

MKK4) や MKK7 を欠損した胚性幹 (ES) 細胞やマウスを作出し、その SAPK/JNK 活性化の程度や表現型を解析してきた。本ワークショップでは、SEK1 や MKK7 を欠損した ES 細胞の定量的解析から見出された、SEK1 と MKK7 の固有の生化学的特性に依存した協調的な SAPK/JNK のリン酸化と活性化のメカニズムを紹介する。また、SAPK/JNK 活性化能をほぼ完全に失った SEK1/MKK7 両欠損細胞のアポトーシス誘導能についても検討したので併せて報告する。

## (12) 癌抑制遺伝子 PTEN の生体各種組織における機能解析

鈴木 聡 (秋田大学 医学部 生化学第二)

佐々木雄彦 (都立臨床研薬理)

Josef Penninger, Tak Wah Mak (Ontario Cancer Institute)

仲野 徹 (大阪大学 微生物病研究所)

我々は癌抑制遺伝子 PTEN の機能をノックアウトマウスを作成することによって解析している。これまで PTEN のノックアウトマウスを作成し報告したが、胎生

早期に死亡することから、種々の臓器における PTEN の機能解析は困難であった。そこで PTEN<sup>flox</sup> マウスを作成し、T 細胞、神経細胞、B 細胞特異的に PTEN を欠損させ

た。今回は皮膚における PTEN の機能を解析したので報告する。

皮膚特異的 PTEN 欠損マウスは、角質や上皮が増生し、皮膚の肥厚、硬化、毛髪の変異がみられた。また、皮膚の形態形成（第一毛髪周期）が加速していた。マウスは食道角質層が肥厚し、嚥下障害が原因となり栄養不良に

陥り、90%が離乳前に死亡した。離乳後まで生存したマウスは長期生存するが、生後 8.5 ヶ月までに全例パピローマや扁平上皮癌の発症をみた。皮膚は紫外線や放射線によるアポトーシス抵抗性で、また増殖は亢進していた。生化学的には Akt や MAPK が活性化していた。

### (13) ショウジョウバエを用いた細胞死の分子遺伝学

三浦正幸（理化学研究所 脳科学総合研究センター 細胞修復機構）

神経細胞死実行機構を理解する目的で、細胞死カスケードを構成する遺伝子の遺伝学的スクリーニングを行っている。reaper はカスパーゼ依存的な細胞死を誘導するが、染色体欠失系統を用いた reaper による細胞死経路のドミナントモディファイアースクリーニングによって JNK 活性化に関与する分子 DTRAF1 と DASK1 が同定された。reaper は DIAP1 による DTRAF1 の分解を負に制御することによって DASK1/DJNK 経路を活性化し細胞死

誘導を行うことが明らかになった。

遺伝子異所発現による機能獲得型スクリーニングによって無脊椎動物で初めての TNF superfamily ligand を同定し (Eiger と命名)、さらに Eiger に結合する TNF 受容体 superfamily 分子も同定した (Wengen と命名)。複眼での Eiger 過剰発現は、JNK に依存した、カスパーゼには依存しない新規の細胞死シグナル経路を活性化する事が明らかになった。

### (14) Hypoxia により誘導される caspase 非依存的細胞死の解析

新沢康英、辻本賀英（阪大院 医遺伝子学、CREST of JST）

Caspase 依存的に進行するアポトーシスに加え、caspase 非依存的な細胞死経路の存在も報告されているが、そのメカニズムの詳細は不明である。我々は hypoxia/低グルコース処理により誘導される caspase 非依存的細胞死に着目し、形態的特徴として現れる核の shrinkage を出発点としてそのメカニズムを解析しようと試みた。In vitro アッセイ系を用いて、この核の shrinkage 誘導因子を精製し、phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) ファミリーの一員を同定し

た。細胞系において、hypoxia/低グルコース時に PLA<sub>2</sub> 活性が核で上昇し、PLA<sub>2</sub> の阻害剤によって核の shrinkage、細胞死が抑制されたことから、hypoxia/低グルコースによって誘導される caspase 非依存的な細胞死に PLA<sub>2</sub> 活性が関与していることが示された。さらに、この caspase 非依存的細胞死では caspase 非依存的な laminB1 の切断が見られ、現在、核の shrinkage との関係を検討している。

### (15) 神経変性疾患における異常蛋白質の分解機構

高橋良輔（理化学研究所 脳科学総合研究センター 運動系神経変性研究チーム）

常染色体劣性遺伝性若年性パーキンソン病 (AR-PD) の責任遺伝子パーキン分解される基質蛋白質を選択的に認識し、そのユビキチン化を促進するユビキチンリガーである。パーキンの基質として G 蛋白共役型のパエ

ル受容体を同定した。パエル受容体は折れたたみが難しい蛋白質であり、小胞体での折れたたみに失敗した場合、小胞体関連分解 (ERAD) によって分解される。パーキンが欠損すると分解されず小胞体に異常蓄積したパエル受

容体は小胞体ストレスを引き起こす。パエル受容体は中枢神経では、オリゴデンドロサイトと黒質ドーパミンニューロンに発現し、他のニューロンでの発現は乏しかった。我々は以上の実験事実に基づき、折れたたみ不全パエル受容体の蓄積による小胞体ストレスが AR-PD の病因と考えている。いっぽう最近、分子シャペロン Hsp70 や Hsp90 の基質となる蛋白質の分解に CHIP というユビ

キチンリガーゼ活性を持つコシャペロンの関与を示唆する報告が相次いでいる。我々は CHIP と Hsp70 がパーキンに結合し、パーキンによるパエル受容体の分解を制御していることを見出した。CHIP はパーキンによるパエル受容体のユビキチン化を促進し、酵母で見出されているユビキチン化促進因子 (E4) に似た作用を持つことがわかった。

## (16) 神経変性疾患の共通メディエーターとしての VCP の分子解析

垣塚 彰 (京都大学 生命科学研究科 高次生体統御学分野)

これまで、神経変性疾患は、疾患ごとに特有の障害部位とその結果として特有の症状 (痴呆・運動失調・異常運動・筋力低下等) を示し、多くの疾患に当てはまる統一的な発症機構に関わる概念・分子機構を導き出すことはできないと考えられてきた。しかし、近年、変性しつ

つある神経細胞内に異常蛋白の凝集物や形態的に類似する空胞 (vacuole) がかなり普遍的に存在することが判明し、神経が変性・消失する過程には、似通った分子機構が存在するという考えが受け入れられるようになってきた。

## 6. 上皮組織 NaCl 輸送制御の分子メカニズム

2002年12月4日- 12月5日

代表・世話人：丸中良典（京都府立医科大学 第一生理学教室）

所内対応者：岡田泰伸

- (1) Molecular mechanism for downregulation of volume-sensitive  $\text{Cl}^-$  channel by CFTR  
Ravshan Z. Sabirov (Department of Cell Physiology, National Institute)
- (2) 魚類の浸透圧調節器官におけるイオン輸送に関与する CIC クロライドチャンネル  
宮崎裕明（京都府立医科大学 第一生理学教室）
- (3) パーチンによる CLC-K2クロライドチャンネルの細胞内局在決定機構  
内田信一（東京医科歯科大学大学院 歯医学総合研究科 体内環境調節学）
- (4) 上皮性 Na チャネルを介した両生類皮膚の化学受容作用  
長井孝紀（慶應義塾大学 医学部 生物学教室）
- (5) 上皮の機能分化に対するアルドステロン，プロラクチン，成長ホルモンの役割  
高田真理（埼玉医科大学 生理学教室）
- (6) フラボンによるナトリウム再吸収の制御機構  
新里直美（京都府立医科大学 第一生理学教室）
- (7) 上皮イオン・水輸送系を *Xenopus oocyte* から学ぶ  
挾間章博（統合バイオサイエンスセンター 生命環境研究領域）
- (8) 上皮型  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換輸送体 (NHE3) の細胞表面安定性と細胞骨格について  
林 久由（静岡県立大学 食品栄養 生理）
- (9) トロンボキサン  $\text{A}_2$ 産生が介在する大腸粘膜の塩素イオン分泌機構  
酒井秀紀（富山医科薬科大学 薬学部 薬物生理）
- (10) プロスタシンによる上皮型ナトリウムチャンネル (ENaC) の活性化  
北村健一郎（熊本大学 医学部 第三内科）
- (11) ラット直腸粘膜表層細胞に存在する上皮性 Na チャネル (ENaC) の電気生理学的性質  
石川 透（北海道大学大学院 獣医学研究科 比較形態機能学講座）
- (12) 腸管細菌感染を起こす *Vibrio* 科細菌が産生する溶血毒の下痢誘発機構  
高橋 章（徳島大学 医学部 特殊栄養学講座）
- (13) 大腸上皮  $\text{Cl}^-$  分泌時の容積調節機構における  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$  コトランスポータの役割  
眞鍋健一（生理学研究所 機能協同研究部門）
- (14) NaCl 流入抑制により活性化された気道上皮細胞の cAMP-調節性線毛運動  
中張隆司（大阪医科大学 生理学）

### 【参加者名】

丸中良典（京都府立医大 医），石川透（北海道大獣医），  
佐々木成，内田信一（東京医科歯科大歯医学総合研究  
科），高田真理（埼玉医科大 医），長井孝紀，中沢英夫（慶  
應義塾大 医），鈴木裕一，林久由（静岡県立大食品栄  
養科），酒井秀紀（富山医科薬科大 薬），新里直美，宮崎

裕明（京都府立医大 医），中張隆司，椎間ちさ（大阪医  
科大大学院），高橋章（徳島大 医），北村健一郎（熊本大  
医），岡田泰伸，Sabilov R，挾間章博，清水貴浩，眞鍋健  
一，Lee E（生理研）

## 【概要】

上皮組織は、生体における外部からの刺激に対する種々のバリアーとなり、また体内環境の恒常性を保つ上で、重要な役割を担っている。特に、体血圧や体液量は上皮組織におけるナトリウム吸収により制御され、一方、肺気道などの防御機構はクロライド分泌を通じて制御されている。このような、生命維持に重要な意義を有する上皮組織におけるナトリウム・クロライドイオン輸送の制御機構に関する研究は、最近のイオンチャネルのクローニングをはじめとして、急速な発展を遂げて来た。しかしながら、上皮組織におけるナトリウム・クロライドイオン輸送の制御機構の解明は、上皮組織としての特殊

性、すなわち頂部膜 (apical membrane) と基底側壁膜 (basolateral membrane) という極性を有して、しかもこれらの2種類の膜を介して、イオン輸送が行われるという複雑な機構が存在することから、チャネルのクローニングのみならず、細胞内イオンチャネルトラフィックのメカニズムの解明等が不可欠なものとなって来ている。本研究会において、上皮組織におけるナトリウム・クロライドイオン輸送制御の分子メカニズム解明の第一線に携わっている研究者が講演および意見交換を行なったことにより、本研究会開催が共同研究推進の第一歩となった。

(1) Molecular mechanism for downregulation of volume-sensitive  $\text{Cl}^-$  channel by CFTR

Ravshan Z. Sabirov, Yuhko Ando-Akatsuka, Iskandar F. Abdullaev, Yasunobu Okada  
(Department of Cell Physiology, National Institute for Physiological Sciences)

Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) has been shown to be a multi-functional protein that acts as a  $\text{Cl}^-$  channel as well as a regulator of other ion channels and transporters. In our experiments, transient expression of wild-type human CFTR in HEK293T cells resulted in a profound decrease in the amplitude of volume-sensitive outwardly rectifying  $\text{Cl}^-$  channel (VSOR) current without changing the single-channel amplitude. This effect was not mimicked by expression of  $\Delta\text{F508}$  mutant of CFTR, which did not reach the plasma membrane. The VSOR regulation by CFTR was not affected by the G551D mutation at the first nucleotide-binding domain (NBD1), which is known to impair the CFTR interaction with the outwardly rectifying chloride channel (ORCC), epithelial amiloride-sensitive Na-channel

(ENaC) and renal potassium channel (ROMK2). The CFTR-VSOR interaction was insensitive to the deletion mutation,  $\Delta\text{TRL}$ , which is known to impair CFTR-PDZ domain binding. In contrast, the G1349D mutant, which impairs ATP binding at NBD2, effectively abolished the down-regulatory effect of CFTR. Furthermore, the K1250M mutation at the Walker A motif and the D1370N mutation at the Walker B motif, which are known to impair ATP hydrolysis at NBD2, completely abolished the VSOR regulation by CFTR. Thus, we conclude that an ATP-hydrolysable conformation of NBD2 is essential for the regulation of the volume-sensitive outwardly rectifying  $\text{Cl}^-$  channel by the CFTR protein, and that VSOR is a first channel regulated by CFTR through its NBD2.

(2) 魚類の浸透圧調節器官におけるイオン輸送に関与する  $\text{Cl}^-$  クロライドチャンネル

宮崎裕明 (京都府立医科大学 第一生理学教室)  
金子豊二, 竹井祥郎 (東京大学 海洋研究所)  
内田信一, 佐々木成 (東京医科歯科大学大学院 歯医学総合研究科 体内環境調節学)

魚類は体表を介して環境水と接しているため、浸透圧

差に従って水や塩類が体液と環境水との間で移動する。

しかし魚類は、鰓、腎臓、腸といった浸透圧調節器官を発達させ、水や塩類を適切に輸送することで、体液浸透圧を陸上哺乳類とほぼ等しい約300 mOsm/kg に保っている。つまり、魚類が生命を維持する上で、水や塩類代謝の制御はもっとも重要であると言える。しかし、体表の水・塩類の透過性の調節や、鰓、腎臓、腸での塩類輸送に関与していると考えられる水やイオン輸送体などは、魚類ではほとんど同定されていなかった。そこで、淡水・海水の双方で生息の可能なティラピア (*Oreochromis mossambicus*) の浸透圧調節器官である鰓と腎臓から、ClC クロライドチャンネルをクローニングし、発現や細胞内

局在を検証し、浸透圧調節との関与を調べた。

鰓からクローニングした OmClC-5 は、鰓の塩類輸送細胞である塩類細胞に特異的に発現していた。細胞内局在を調べたところ basolateral 側に発現しており、淡水中でのイオンの取り込みに関与していることが示唆された。また、腎臓からクローニングした OmClC-K は淡水ティラピアの腎臓に特異的に発現していた。さらに詳しく発現部位を調べたところ、遠位尿管の basolateral 側に局在していたことから、遠位尿管でのクロライドイオン再吸収に関与していると考えられる。

### (3) パーチンによる CLC-K2 クロライドチャンネルの細胞内局在決定機構

内田信一, 佐々木成 (東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科 体内環境調節学)

【背景】 パーチンはバーター症候群を引き起こす第4の遺伝子として positional cloning にて単離された蛋白であったが、その変異がバーター症候群をなぜ引き起こすか不明であった。その後、パーチンを CLC-K クロライドチャンネルと共発現させると、CLC-K クロライドチャンネルによるクロライド電流を増加させることが判明し、パーチンが CLC-K クロライドチャンネルのベータサブユニットとして働いている可能性が示された。しかしながら、両者の相互作用の詳細は明らかでなかった。

【目的】 今回、培養細胞にパーチン、CLC-K2 を各々単独、または同時に、一過性、ないし安定発現させ、各々の蛋白の細胞内局在、蛋白蛋白相互作用、蛋白の安定性を検証した。

【結果】 CLC-K2 は単独で発現させると、ゴルジ体にとどまるが、パーチンを共発現させると、細胞膜状に移動した。パーチンの野生型は細胞膜状に局在するのに対し、バーター症候群を引き起こすパーチンの変異体は細胞内器官にとどまった。この変異体パーチンと CLC-K2 を共発現させると、CLC-K2 はパーチンの局在と一致して細胞内にとどまった。パーチン、CLC-K2 を共発現し免疫沈降すると、パーチンと CLC-K2 は共沈した。変異型パーチンも CLC-K2 との結合性は保たれていた。また CLC-K2 蛋白の細胞内での半減期はパーチンを共発現させると著明に延長した。

【結論】 CLC-K2 はパーチンと結合し、その細胞内局在はパーチンに支配されている。

### (4) 上皮性 Na チャネルを介した両生類皮膚の化学受容作用

長井孝紀, 中沢英夫 (慶應義塾大学 医学部 生物学教室)

両生類は水分を口からではなく皮膚から吸収し、皮膚は体液の浸透圧調節機構の一部を担うとされている。実際、カエルの皮膚には腎臓の尿管細胞と同様な上皮性 Na チャネル (ENaC) が存在する。しかし、乾燥地に棲息するヒキガエル (*B. alvarius*) の場合は  $\text{Na}^+$  の吸収機構を生存環境の適合性を検出するために用いていることを、わ

れわれは行動、生理、形態学的に示した。具体的には、① 水分飢餓状態のヒキガエルは水源に腹部皮膚を押し付けて積極的な水分吸収行動を示すが、水源に 200 mM 程度の  $\text{Na}^+$  が含まれているとそれを検出し、水分吸収をやめる；② 皮膚を  $\text{Na}^+$  溶液で灌流すると皮膚を支配している脊髄神経が活動する；③  $\text{Na}^+$  の検出行動と脊髄神経

の活動はともに ENaC の阻害剤であるアミロライドで抑制される；④ 皮膚内の胚芽層には脊髄神経の末端とそれと密接した未知の細胞が分布している，である。神経興奮のメカニズムを明らかにする目的で，皮膚内での  $\text{Na}^+$  の流入経路を調べた。*Xenopus* 腎臓 A6細胞で知られている ENaC の  $\alpha$  サブユニットのアミノ酸配列から作成した抗体 ( $\alpha$ -xENaC 抗体) は *Xenopus* 腎臓のホモジュネイト

のうち70-kDa のペプチドと反応し，さらに尿細管の内腔の細胞膜と特異的に反応し，チャネルの分布を示した。 $\alpha$ -xENaC 抗体は *B. alvarius* の腹部皮膚では，顆粒層（生理的活動のある最外層）細胞の頂端部の膜と特異的に反応した。しかし，アズマヒキガエル，アマガエル，ウシガエルの皮膚とは反応しなかった。

## (5) 上皮の機能分化に対するアルドステロン，プロラクチン，成長ホルモンの役割

高田真理，河西美代子（埼玉医科大学 生理学教室）

成体両生類の皮膚は腎の上皮  $\text{Na}$  輸送の機構解析のモデル上皮として知られている。一方幼生両生類の皮膚ではこの輸送機構は未分化である。幼生両生類の皮膚は輸送機構の分化を解析するために好都合の材料と考えた。輸送機構は変態の過程で出現する。両生類の変態は甲状腺ホルモンで引起されることが知られていたので輸送機構の分化もこのホルモンで引起されるに違いないと考えられていた。しかし変態期に血中濃度の変動するホルモンは甲状腺ホルモンばかりではない，アルドステロン，プロラクチン，成長ホルモンも変動する。どのホルモンが甲状腺ホルモンとともに上皮  $\text{Na}$  輸送の分化にかかわるのであろうかが問題であった。

この疑問に答えるために幼生両生類の皮膚の培養法を開発した。甲状腺ホルモンのみの存在下で培養すると幼生皮膚は崩壊した。幼生皮膚をアルドステロンとともに培養すると輸送機構の分化が起こった。甲状腺ホルモンはアルドステロン作用を促進することも抑制することもなかった。

一方皮膚をアルドステロンとプロラクチン，もしくはアルドステロンと成長ホルモンの共存下で培養すると皮膚は幼生の形質を維持した。すなわちアミロライド，アセチルコリン，ATP で促進される非選択性カチオンチャネル (NSCC) が分化した。

## (6) フラボンによるナトリウム再吸収の制御機構

新里直美，丸中良典（京都府立医科大学 第一生理学教室）

腎遠位尿細管上皮組織での上皮型ナトリウムチャネルを介するナトリウム再吸収は，血圧調節や体液量維持に重要な役割を果たすことが知られており，最近では大豆などに多く含まれている食品成分であるフラボンが血圧を低下させる作用があることが知られるようになってきた。そこで，本研究ではフラボンが血圧を下げるメカニズムを解明する目的で，腎尿細管由来の培養細胞である A6 細胞でのナトリウム再吸収に対する影響について検

討した。実際にフラボンは，非刺激時および低浸透圧刺激で促進されたナトリウム輸送を阻害した。我々はこれまでに，フラボンがその構造に依存してクロライド輸送を促進することを報告している。本研究で示されたフラボンのナトリウム再吸収抑制のメカニズムとして，フラボンが促進するクロライド輸送の関与について検討した結果，フラボンは細胞内クロライド濃度を上昇させて，ナトリウム再吸収を抑制していることが明らかとなった。

## (7) 上皮イオン・水輸送系を *Xenopus oocyte* から学ぶ

挾間章博 (統合バイオサイエンスセンター 生命環境研究領域)

*Xenopus oocyte* は、これまで、様々なイオンチャネル・トランスポーターの発現系として用いられてきた。上皮輸送に関する輸送体も、*Xenopus oocyte* を用いて、その機能が研究されてきたものも多い。*Xenopus oocyte* を発現系として用いた場合の特徴として、通常の動物細胞とは膜タンパクのプロセッシングが異なる場合があることが挙げられる。たとえば、aquaporin の中でも通常では腎尿細管細胞内のベジクルに局在し、その機能が分からなかった aquaporin-6 (AQP6) について *Xenopus oocyte* を発現系として用いると、形質膜まで AQP6 が移行し、その機能を調べることが初めて可能になった。しかし、AQP6 を発現させた *Xenopus oocyte* では、当初水透過性の亢進を示さず、機能が無い水チャネルかと思われた。ところが、

通常は水チャネルの阻害剤として用いられる水銀イオンを投与すると、水透過性の亢進が観察された。さらに、驚くべきことには、これまで水チャネルは、イオンを透過させないものと考えられてきたが、水銀イオンの投与により水の透過性ばかりでなく、イオンの透過性も亢進することが2本刺 Voltage-Clamp 法を用いて明らかとなった。このイオンの透過性については、陽イオン、陰イオンの選択性が低く、さらにパッチクランプ法により、シングルチャネル電流が観察され、aquaporin の microscopic な挙動が初めて明らかにされた。このように、*Xenopus oocyte* を用いた発現系は、上皮細胞内に局在する輸送体の挙動を明らかにするの威力を発揮した。

## (8) 上皮型 $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換輸送体 (NHE3) の細胞表面安定性と細胞骨格について

林 久由 (静岡県立大学 食品栄養 生理)

Sergio Grinstein (トロント小児病院 細胞生物)

NHE3 は、消化管並びに腎臓上皮細胞の頂側膜に発現しており、 $\text{Na}^+$  の (再) 吸収に寄与している。また NHE3 の細胞内 C 末端は NHERF と Ezrin を介して、アクチン細胞骨格と相互作用することが提唱されている。アクチン細胞骨格を破壊した際の NHE3 の活性並びに局在について検討した。アクチン細胞骨格を破壊するために非特異的に低分子量 GTPase を不活化する *Clostridium difficile* toxin B を用いた。腎臓上皮由来の OK 細胞を toxin B で処理すると NHE3 の活性は抑制された。またこの機構は NHE3 に特異的であり、NHE1 では観察されなかった。

Toxin B による NHE3 の抑制機序の検討をエピトープタグをつけた NHE3 を外来的に発現させた細胞を用いて行ったが、toxin B で処理すると NHE3 は細胞内に取り込まれた。さらにどの低分子量 GTPase が関与するかを検討するために Rho の下流にある ROCK を特異的に抑制する Y-27632 を用いた。Y-27632 で処理すると toxin B 同様の効果が観察された。以上より NHE3 の頂側膜上の局在にはインタクトなアクチン細胞骨格が必要であり、それには Rho が関与することが示された。

## (9) トロンボキサン $\text{A}_2$ 産生が介在する大腸粘膜の塩素イオン分泌機構

酒井秀紀, 鈴木智之, 室田美樹, 高橋佑司, 竹口紀晃 (富山医科薬科大学 薬学部 薬物生理)

トロンボキサン  $\text{A}_2$  は、血小板凝集や血管収縮を引き起こすアラキドン酸代謝物であり、血栓や喘息などの病態

に深く関与している。我々は、ラット大腸粘膜を用いた一連の研究で、抗ガン剤の塩酸イリノテカンや血小板活

性化因子 (PAF) が、トロンボキサン  $A_2$  の産生を介して塩素イオン分泌を誘発することを発見した。単離クリプト細胞のホールセル記録では、トロンボキサン  $A_2$  の安定アナログ (STA $_2$ ) が、分泌側膜の塩素イオンチャネルを活性化した。しかし、塩酸イリノテカンや PAF が、大腸においてどのような機構でトロンボキサン  $A_2$  産生を引き起こすのかについては不明であった。

我々は、この機構を明らかにするため、単離ラット大

腸粘膜での実験を行った。その結果、PAF 誘発性の塩素イオン分泌は、一酸化窒素 (NO) - サイクリック GMP (cGMP) 経路を介したトロンボキサン  $A_2$  産生により引き起こされていることがわかった。一方、塩酸イリノテカン誘発性の塩素イオン分泌には、NO-cGMP 経路は介在していなかった。したがって大腸においてトロンボキサン  $A_2$  は、少なくとも2つの異なる機構により産生され、下痢などの病態に関わっているものと考えられる。

## (10) プロスタシンによる上皮型ナトリウムチャネル (ENaC) の活性化

北村健一郎, 富田公夫 (熊本大学 医学部 第三内科)

上皮性ナトリウムチャネル (ENaC) は体液のナトリウム調節に重要なイオンチャネルである。私たちはセリンプロテアーゼのプロスタシンが *Xenopus oocyte* に ENaC と共発現させたときにアミロライド感受性電流を約2倍増加させることを見出した。マウス皮質集合管細胞 (M-1細胞) にアルドステロンを投与するとプロスタシンの発現が2~3倍増加し、ラットにアルドステロンを持続投与すると尿中プロスタシンが増加した。原発性アルドステロン症患者では尿中プロスタシンが増加しており、手術にて腺腫摘出を行うと正常レベルまで低下した。このことはアルドステロンがプロスタシンの発現増強をかいして ENaC を活性化する可能性を示唆するものである。また、セリンプロテアーゼ阻害剤であるメシル酸ナファモ

スタットを M-1細胞に投与するとプロスタシンの発現量がほぼ完全に抑制された。ラットにメシル酸ナファモスタットを持続静注すると尿中プロスタシン排泄量がほぼ完全に抑制され、尿中ナトリウム排泄量が増加した。ヒトにメシル酸ナファモスタットを投与すると、ときに低ナトリウム血症・高カリウム血症などの副作用が生じることが知られているが、この原因としてメシル酸ナファモスタットによるプロスタシンの発現抑制およびそれによる ENaC の活性抑制が関与している可能性が示唆された。これらの知見はプロスタシンの生体内ナトリウムにおける病態生理学的な意義を裏付けるものであると考えた。

## (11) ラット直腸粘膜表層細胞に存在する上皮性 Na チャネル (ENaC) の電気生理学的性質

稲垣明浩, 石川 透 (北海道大学大学院 獣医学研究科 比較形態機能学講座)

アミロライド感受性上皮性 Na チャネル (ENaC) の分子基盤として  $\alpha\beta\gamma$ -rENaC がラット大腸上皮からはじめてクローニングされて以来、heterologous expression 系を用いた  $\alpha\beta\gamma$ -ENaC に関する研究が行われてきているが、大腸粘膜表層細胞に存在する ENaC の電気生理学的性質およびその調節機構の多くは不明のままである。我々はラット大腸表層細胞に存在する ENaC の以下のような電気生理学的性質を明らかにしてきている。(1)通常食で飼育したラット直腸から作製した粘膜標本で得られたアミロ

ライド感受性短絡電流 (Isc) の  $K_i$  値は171 nMであった。この値は  $\alpha\beta\gamma$ -rENaC を発現する MDCK 上皮細胞で得られた Isc の  $K_i$  値とはほぼ一致した。(2)直腸粘膜標本から分離した単一陰窩の表層細胞にホールセルパッチクランプ法を適用することによって得られた Na 電流のアミロライド感受性は Isc 測定実験で得られた結果と一致し、その  $K_i$  値は 129 nM であった。(3)アミロライド感受性ホールセル電流の陽イオン選択性およびアミロライド抑制の電位依存性から推定されるアミロライド結合部位は

$\alpha\beta\gamma$ -rENaC を発現する MDCK 細胞で得られた値と一致した。今後大腸表層細胞および $\alpha\beta\gamma$ -rENaC 発現系を併用

することにより, ENaC の細胞内調節機構にアプローチしたいと考えている。

## (12) 腸管細菌感染を起こす *Vibrio* 科細菌が産生する溶血毒の下痢誘発機構

高橋 章, 田上奈緒美, 角村寧子, 栗田志香, 前田恭子, 中屋 豊  
(徳島大学 医学部 特殊栄養学講座)

腸管細菌感染を起こす *Vibrio* 科細菌は食中毒の原因菌として知られている。そのなかで, *Vibrio Cholerae* (non-O1, non-O139), *Vibrio mimicus* の主要な病原因子として溶血毒 (El Tor hemolysin [ETH], *Vibrio mimicus* hemolysin [VMH]) が考えられている。これらは, 単独で下痢性を有することが報告されているが, その機構は明らかではない。

*Vibrio* 科細菌ではないが *Aeromonas sburia* の分泌する

溶血毒 (ASH) は, 細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ , cAMP を上昇させることにより, 腸管上皮細胞からの  $\text{Cl}^-$  分泌を促進し下痢を引き起こすことを示唆してきた。ETH と VMH は, ASH と相同性が高く構造的に類似している。そこで, それぞれの毒素が腸管上皮細胞の  $\text{Cl}^-$  分泌に与える影響を比較解析した。発表では, それぞれの毒素による反応の異なる点と同様な点について議論する。

## (13) 大腸上皮 $\text{Cl}^-$ 分泌時の容積調節機構における $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ - $2\text{Cl}^-$ コトランスポータの役割

眞鍋健一, 森島 繁, 岡田泰伸 (生理学研究所 機能協関部門)

大腸クリプト上皮が分泌刺激に応答して容積変化を示すことはクリプト総体の観察によって示唆されてきたが, 個々の上皮細胞の容積変化についての報告は, 技術的困難さから皆無であった。我々は, 蛍光色素の退色が少なく組織標本深部の探索も可能な二光子レーザー顕微鏡法を用いることにより, クリプト内部の個々の細胞容積変化を捉える事に成功し, カルバコール刺激すると主としてクリプト基底細胞が縮小し, その後時間経過と共に元の容積にまで回復することが分った。同様の分泌性容積減少(secretory volume decrease: SVD)とそれに続く調節性容積増加(regulatory volume increase: RVI)はヒト大腸上

皮由来の培養細胞 T84においても確認された。RVI におけるイオン輸送メカニズムを探るために, 細胞外液の  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ 及び  $\text{Cl}^-$ をそれぞれ除去し, T84を用いて細胞容積測定をしたところ, いずれの場合においても SVD は見られたがその後の RVI は抑制された。さらに  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ - $2\text{Cl}^-$  コトランスポータ(NKCC)阻害剤であるブメタニド処理によっても RVI は抑制され, モルモット大腸クリプトでも同様の挙動を示した。以上の結果から, 大腸上皮  $\text{Cl}^-$  分泌刺激時の RVI には NKCC が重要な役割を果たす事が結論された。

## (14) NaCl 流入抑制により活性化された気道上皮細胞の cAMP-調節性線毛運動

中張隆司 (大阪医科大学 生理学)

椎間ちさ (大阪医科大学 第一内科)

ラット肺のエラスターゼ処理により細気管支線毛細胞を単離した。細気管支線毛細胞の線毛運動周波数 (CBF) は terbutaline により濃度依存性に増加した。この terbutaline の効果は、細胞内 cAMP を介した反応であった。また、terbutaline は CBF の増加だけではなく細胞容積の減少も引き起こしていた。今回は、細胞容積減少と肺の主たる宿主防御機構である CBF の調節についてビデオ顕微鏡を用いて検討した。

NaCl の細胞内への流入を阻害する amiloride (1  $\mu$ M) と bumetanide (10  $\mu$ M) は線毛細胞容積減少を引き起こした。この細胞容積減少は terbutaline 非刺激時の CBF

には影響を及ぼさなかったが、terbutaline (0.5  $\mu$ M) 刺激により増加した CBF を著明に増強した。Amiloride (1  $\mu$ M) と bumetanide (10  $\mu$ M) 存在下で調べた CBF 増加に対する terbutaline 濃度依存性は、両阻害剤非存在下の濃度依存性に較べて、低濃度側へシフトしていた。また、quinidine (500  $\mu$ M) は線毛細胞容積を増加させ、terbutaline による CBF の増加を抑制した。

これらの結果から、細気管支線毛細胞における cAMP 調節性線毛運動は細胞内 Cl 濃度 (細胞容積) により修飾されている可能性が考えられた。

## 7. イオンチャネルのプロテオミクスと心血管系疾患の病態に関する新たな展開

2002年11月25日－11月26日

代表・世話人：中屋 豊（徳島大学医学部 特殊栄養）

所内対応者：岡田泰伸

(1) 蛋白相互作用によるイオンチャネル調節機構

古川哲史<sup>1</sup>, 鄭 雅娟<sup>1</sup>, 小倉武彦<sup>2</sup>, 中谷晴昭<sup>2</sup>, 稲垣暢也<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>秋田大学 医学部 第1生理, <sup>2</sup>千葉大学大学院 大学薬理学)

(2) 新生仔ラット心室筋細胞 CFTR チャネルの虚血障害防御への役割

浦本裕美, 森島 繁, 赤塚結子, A.K. Dutta, R.Z. Sabirov, 岡田泰伸

(生理学研究所 細胞器官研究系)

(3) 心筋 Ito を担う Kv4 K チャネルの不活性化および KChIP との機能連関に関わる C 末端アミノ酸に関する解析

今泉祐治, 波多野紀行, 大矢 進, 村木克彦

(名古屋市立大学大学院 薬学研究科 細胞分子薬効解析学分野)

(4) KCNJ2-C 末端の遺伝子異常により Kir2.1 の dominant negative 型抑制が認められた Andersen 症候群の 1 例

保坂幸男, 塙 春雄, 鷺塚 隆, 池主雅臣, 古嶋博司, 山浦正幸,

田辺靖貴, 渡部 裕, 小村 悟, 杉浦広隆, 廣野 崇, 相澤義房

(新潟大学大学院 医歯学総合研究科 循環器分野)

(5) Kir2.1 チャネル異常による Andersen 症候群～日本人家系における臨床像の検討～

小堀敦志<sup>1</sup>, 藤原祐一郎<sup>3</sup>, 牧山 武<sup>1</sup>, 大野聖子<sup>1</sup>, 竹中琴重<sup>1</sup>,

二宮智紀<sup>1</sup>, 鷹野 誠<sup>2</sup>, 中村好秀<sup>4</sup>, 久保義弘<sup>3</sup>, 堀江 稔<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>京都大学大学院 循環病態学講座, <sup>2</sup>生理学第二講座, <sup>3</sup>東京医科歯科大学大学院

生理学第二講座, <sup>4</sup>和歌山赤十字医療センター 第二小児科)

(6) 不顕性心筋 Na チャネル変異による二次性 QT 延長症候群の分子病態

蒔田直昌<sup>1</sup>, 藍 智彦<sup>2</sup>, 佐々木孝治<sup>1</sup>, 横井久卓<sup>1</sup>, 北畠 顕<sup>1</sup>, 堀江 稔<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>北海道大学 循環病態内科学, <sup>2</sup>京都大学 循環病態学)

(7) HERG チャネル脱活性化速度の変化による薬物作用の修飾

櫛田俊一<sup>1,2</sup>, 小倉武彦<sup>1</sup>, 小室一成<sup>2</sup>, 中谷晴昭<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>千葉大学大学院 医学研究院 薬理学, <sup>2</sup>循環病態医科学)

(8) HERG チャネルの活性化ゲートについて

石井邦明, 永井美玲, 遠藤政夫 (山形大学 医学部 薬理学講座)

(9) 第 III 群抗不整脈薬による HERG チャネル結合の分子機序

神谷香一郎<sup>1</sup>, Mitcheson JS<sup>2</sup>, Culberson C<sup>2</sup>, Sanguinetti MC<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>名古屋大学 環境医学研究所 液性調節分野, <sup>2</sup>ユタ大学生理学)

(10)  $\beta 2c$  サブユニットを用いて再構成された L 型  $Ca^{2+}$  チャネルの単一チャネル動態

鎌田康宏, 山田陽一, 筒浦理正, 関 純彦, 當瀬規嗣 (札幌医科大学医学部第一生理)

- (11) 電位依存性カルシウムチャンネル  $\beta$ 3 サブユニットの循環器系における重要性の検討  
遺伝子改変マウスを用いて  
村上 学<sup>1</sup>, 山村寿男<sup>2</sup>, 村木克彦<sup>2</sup>, 今泉祐治<sup>2</sup>, 佐藤栄作<sup>1</sup>, 尾野恭一<sup>1</sup>, 柳澤輝行<sup>3</sup>, 飯島俊彦<sup>1</sup>,  
(<sup>1</sup>秋田大学 医学部 薬理学, <sup>2</sup>名古屋市立大学大学院 薬学研究科 細胞分子薬効解析,  
<sup>3</sup>東北大学大学院 医学系研究科 分子薬理)
- (12) 心室筋における過分極およびリゾリン脂質によるエチジウム流入を伴う内向き電流の誘発  
宋 玉梅, 大地陸男 (順天堂大学 医学部 第二生理)
- (13) ホメオボックス型転写因子 Csx/Nkx-2.5 を発現させた心筋分化細胞における活動電位と膜電流の形成  
内納智子<sup>1</sup>, 賀来俊彦<sup>1</sup>, 山下 昇<sup>1</sup>, 梶岡俊一<sup>1</sup>, 門前幸志郎<sup>2</sup>, 小室一成<sup>3</sup>, 小野克重<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>大分医科大学 医学部 循環病態制御講座, <sup>2</sup>東京大学大学院 医学系研究科 器官病態内科学,  
<sup>3</sup>千葉大学大学院 医学研究院 循環病態医科学)
- (14) 心・血管系 ATP 感受性 K チャンネルに対する K チャンネル開口薬の作動分子機構  
山田充彦, 倉智嘉久 (大阪大学大学院 医学研究科 情報薬理学講座)
- (15) Split SUR の機能解析  
鷹野 誠, 倉富 忍 (京都大学 医学研究科 細胞機能制御学)
- (16) ラット心筋細胞の ATP 感受性 K チャンネルに及ぼす propofol の影響-  
Anesthetic preconditioning との関連について  
河野 崇<sup>1</sup>, 堤 保夫<sup>1</sup>, 大下修造<sup>1</sup>, 高橋 章<sup>2</sup>, 中屋 豊<sup>2</sup> (<sup>1</sup>徳島大学 医学部 麻酔科, <sup>2</sup>特殊栄養)
- (17) 細胞膜 PIP<sub>2</sub> による心筋緩徐活性型遅延整流性 K<sup>+</sup>チャンネル IKs の制御  
松浦 博, 丁 維光 (滋賀医科大学生理学第二)
- (18) プロテオミクス研究からのチャンネル蛋白安定化による心房細動のテーラーメイド治療開発研究の試み:  
医工学連携プロジェクトを用いて  
久留一郎, 佐々木紀仁 (鳥取大学循環器内科)

## 【参加者名】

蒔田直昌, 横井久卓 (北海道大院), 富瀬規嗣, 鎌田康宏 (札幌医科大), 村上学, 尾野恭一, 古川哲史 (秋田大 医), 保坂幸男, 鷲塚隆, 小村 悟 (新潟大院), 石井邦明, 永井美玲 (山形大 医), 櫛田俊一 (千葉大院), 萩原誠久 (東京女子医科大), 大地陸男, 宋玉梅 (順天堂大 医), 神谷香一郎 (名古屋大 環研), 今泉 祐治, 波多野紀行, 大矢進, 村木克彦, 坂本多穂, 森村 浩三

(名古屋大), 松浦博, 丁 (林) 維光 (滋賀医科大), 堀江稔 (滋賀医科大), 小堀敦志, 鷹野誠, 倉富 忍 (京都大院), 山田充彦 (大阪大院), 久留一郎, 佐々木紀仁 (鳥取大 医), 小野克重, 内納智子 (大分医科大), 中屋豊, 高橋章, 河野崇, 前田恭子, 栗田志香, 中尾成恵 (徳島大 医), 浦本裕美, 森島繁, 赤塚結子, A.K. Dutta, R.Z. Sabirov, 岡田泰伸 (生理研)

## 【概要】

分子生物学的手法の進歩によりイオンチャンネルの分子構造とその機能相関が解明されつつある。細胞膜上に存在し、細胞へのイオンの透過を制御するイオンチャンネルは、筋収縮、神経伝達物質の放出、インスリンの分泌など重要な生体反応の仕組みの一端を担っており、創薬の有望なターゲットとして注目されている。ポストゲノムシーケンスの時代の中心的テーマは、遺伝子、特に

疾患関連遺伝子の探索による新しい創薬ターゲット、治療ターゲットになる遺伝子の解明である。しかし、最近になって、遺伝子から翻訳後の修飾の多様性と不均一性が複雑であるため、遺伝子解析だけではゲノム医療への応用に限界があることが知られるようになり、タンパク質／プロテオームの解明に基づいた「プロテオミクス」への取り組みの重要性が認識され始めている。パッチクラ

ンブなどの電気生理学的手法による電流測定は微細な細胞機能の変化を定量的に検討できるため、これらの遺伝子の構造機能解析に適している。しかし、イオンチャネルの構造異常に基づく機能障害(疾患)の研究(プロテオミクス)さらには治療法の確立への新しい情報をうることについては、異なった分野の研究技法および知識が要求される。すなわち、電気生理学のみならず、分子生物学、細胞工学、遺伝子工学等の様々な専門分野の基礎研

究者及び臨床研究者が互いに意見を交換し、協力して研究を押し進めていく必要がある。本研究会では、心血管領域の基礎及び臨床研究者が集い、様々の側面からイオンチャネルの機能と構造に関する最新の研究成果を発表して情報を交換する。本研究会はイオンチャネルの生理学および分子生物学的研究の間口を広げ、更にイオンチャネルに起因する心血管病態、治療を理解するための有意義な機会を提供する。

### (1) 蛋白相互作用によるイオンチャネル調節機構

古川哲史<sup>1</sup>, 鄭 雅娟<sup>1</sup>, 小倉武彦<sup>2</sup>, 中谷晴昭<sup>2</sup>, 稲垣暢也<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup> 秋田大学 医学部 第 1 生理, <sup>2</sup> 千葉大学大学院 大学薬理学)

タンパク間相互作用はポストゲノム研究において、機能未知の遺伝子の役割を結合する分子種から類推するという重要な役割を持つ。今回、酵母 2 ハイブリッド法により種々のイオンチャネルに結合するタンパクを同定し、その生理的・病態的役割を検討した。クロライドチャネル CIC-2 は複数の細胞周期・増殖関連分子と結合し、細胞周期 M 期特異的に発現することが判明した。これには M 期特異的サイクリン依存性キナーゼ p34cdc2/cyclin B による CIC-2 チャネルの直接的リン酸化、

これを引き金とするユビキチン化が関与する。クロライドチャネル CIC-3B は上皮 PDZ 含有タンパク EBP50 と結合し、CFTR 存在下に protein kinase A 依存性に活性化され、上皮のクロライドイオンベクトル輸送に関与する可能性が示唆された。カリウムチャネル  $\beta$  サブユニット minK は筋原線維特異的タンパク T-cap と結合し、T 管と Z 盤の分子リンカーであることが判明し、心筋細胞の mechano-electrical feedback 機構に関与する可能性が示唆された。

### (2) 新生仔ラット心室筋細胞 CFTR チャネルと虚血障害

浦本裕美, 森島 繁, 赤塚結子, A.K. Dutta, R.Z. Sabirov, 岡田泰伸  
(生理学研究所 細胞器官研究系)

CFTR の機能は上皮細胞においてよく調べられているが、心室筋細胞に発現している CFTR の機能についてはあまりよく分かっていない。今回、我々は培養ラット新生仔心室筋細胞において虚血モデル実験を行い、この点の検討を始めた。細胞を酸素・グルコース・アミノ酸除去という「虚血」条件に数時間置き、その後に酸素・グルコース・アミノ酸投与する「再灌流」条件に置いて 4 日目に、MTT 測定によって細胞生存率を測定したところ、

CFTR チャネルのブロッカーで同時処理した細胞でのみ著しい生存率の低下が認められた。また、「虚血」処理後にホールセル電流記録を行い、PKA 活性化カクテルで CFTR を刺激したところ、虚血処理をしていない細胞に比べ大きな電流活性化が見られた。これらの結果、新生仔ラット心室筋細胞の CFTR チャネルは虚血障害に関係していることが示唆された。

### (3) 心筋 Ito を担う Kv4 K チャネルの不活性化および KChIP との機能連関に関わる C 末端アミノ酸に関する解析

今泉祐治, 波多野紀行, 大矢 進, 村木克彦

(名古屋市立大学大学院 薬学研究科 細胞分子薬効解析学分野)

心臓の早期不活性化  $K^+$ 電流を担うチャネルである電位依存性  $K^+$ チャネル, Kv4 の活性化・不活性化の電位依存性の分子機構は Kv1 サブファミリーに比べ不明な点が多い。我々はこれまでに脳において細胞内 C 末端領域の配列が異なる Kv4.3 スプライスバリエントが少なくとも 3 種類存在することを明らかにしている。今回 Kv4.3 の活性化・不活性化制御の分子メカニズムにおける細胞内 C 末端領域の役割を詳細に検討した。また Kv4 サブファミリー特異的  $\beta$ サブユニット KChIP2S を共発現させ、細胞内 C 末端領域と KChIP2S との相互作用も併せて検討した。

細胞内 C 末端領域欠損変異体を用いた実験結果より、細胞内 C 末端領域 (421-429) は活性化・不活性化の電位依存性を高度に調節していることが明らかになった。さらに点変異体を用いた実験結果より、421-429 番目のアミノ酸の中で電位依存性調節機構にとって重要な 2 個のアミノ酸を同定した。この 2 個のアミノ酸は Kv4 サブファミリーで保存されていることから、Kv4 サブファミリー内で共通の電位依存性調節機構が存在すると考えられる。また、チャネル孔から離れた細胞内 C 末端領域 (488-636) が、KChIP2S との機能連関に重要であることも初めて明らかにした。

### (4) KCNJ2-C 末端の遺伝子異常により Kir2.1 の dominant negative 型抑制が認められた Andersen 症候群の 1 例

保坂幸男, 塙 春雄, 鷺塚 隆, 池主雅臣, 古嶋博司, 山浦正幸,

田辺靖貴, 渡部 裕, 小村 悟, 杉浦広隆, 廣野 崇, 相澤義房

(新潟大学大学院 医歯学総合研究科 循環器分野)

【背景】周期性四肢麻痺・心室性不整脈・形態異常を三徴とするアンデルセン症候群は遺伝性疾患であり、最近、内向き整流カリウムチャネルをコードする KCNJ2 の遺伝子変異が報告された。

【方法と結果】我々はアンデルセン症候群の 1 症例にて臨床的・分子生物学的解析を試み、KCNJ2 の C 末端に新しい遺伝子変異 (G215D) を認めた。心電図では QT 間隔の延長、突出した U 波、頻発する心室性期外収縮を認め、心臓電気生理検査にて多形性心室頻拍が誘発された。COS7 細胞を用いた全細胞パッチクランプ法にて変異型単独では電流発現を認めず、野生型との共発現では

Dominant negative 効果を認めた。野生型と変異型を蛍光蛋白 (YFP, CFP) で標識した共焦点蛍光顕微鏡の解析では、野生型と変異型の細胞内輸送、局在に差を認めず、細胞膜領域に発現した。また、野生型と変異型を共発現した細胞膜領域での fluorescence resonance energy transfer (FRET) の解析では、カリウムチャネルが野生型と変異型の複合体であることが示唆された。

【結語】変異型は細胞内輸送、局在で野生型と差を認めず、野生型と複合体を形成し、Dominant negative 効果を発揮すると考えられた。本症例の遺伝子変異 (G215D) はアンデルセン症候群の原因と考えられた

## (5) Kir2.1 チャネル異常による Andersen 症候群～日本人家系における臨床像の検討～

小堀敦志<sup>1</sup>, 藤原祐一郎<sup>3</sup>, 牧山 武<sup>1</sup>, 大野聖子<sup>1</sup>, 竹中琴重<sup>1</sup>,  
二宮智紀<sup>1</sup>, 鷹野 誠<sup>2</sup>, 中村好秀<sup>4</sup>, 久保義弘<sup>3</sup>, 堀江 稔<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>京都大学大学院 循環病態学講座, <sup>2</sup>生理学第二講座, <sup>3</sup>東京医科歯科大学大学院 生理学  
第二講座, <sup>4</sup>和歌山赤十字医療センター 第二小児科)

【背景】Andersen 症候群は, (1) 周期性四肢麻痺, (2) 特異な骨格異常, (3) QT 延長と心室性不整脈を3主徴とし, Kir2.1 をコードする KCNJ2 が原因遺伝子として同定されている。

【方法】我々は連続する 73 症例の QT 延長症候群患者に対し, KCNJ2 遺伝子の検索を行い, その機能解析と臨床像の検討を行った。

【結果】3 つの mutation を 3 家系 5 症例にて同定した。G144S (KCNJ2) チャネルは, 無機能で強い Dominant Negative Suppression (DNS) を示した。T192A (KCNJ2) チャネルは無機能・弱い DNS, P351S (KCNJ2) チャネルはほぼ正常機能であった。また G144S (KCNJ2) 症例

に並存していた A341V (KCNQ1) チャネルは, 無機能で DNS は示さず, P351S (KCNJ2) 症例に並存していた G643S (KCNQ1) は, 弱い機能低下を示した。G144S 家系は明確に 3 主徴がそろい, 繰り返す失神と頻発する PVC・二方向性心室頻拍 (VT) がみられた。T192A 家系では失神は無いが, PVC 頻発と VT・軽微な骨格異常・麻痺発作がみられた。P351S 家系は骨格異常と麻痺発作が無く, QT 延長・失神がみられた。

【結論】我々の症例では, KCNQ1 遺伝子異常が KCNJ2 による Andersen 症候群の心臓症状を増悪させたと考えられた。また異常 KCNJ2 チャネルの機能障害の程度は, Andersen 症候群の臨床像によく相関していると思われた。

## (6) 不顕性心筋 Na チャネル変異による二次性 QT 延長症候群の分子病態

蒔田直昌<sup>1</sup>, 藍 智彦<sup>2</sup>, 佐々木孝治<sup>1</sup>, 横井久卓<sup>1</sup>, 北畠 顕<sup>1</sup>, 堀江 稔<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>北海道大学 循環病態内科学, <sup>2</sup>京都大学 循環病態学)

先天性 QT 延長症候群 (LQTS) は心筋 K<sup>+</sup>チャネルや Na<sup>+</sup>チャネルを責任遺伝子とする比較的希な遺伝性不整脈である。一方, 二次性 LQTS は薬物代謝異常・徐脈・低 K 血症など様々な外的誘因によって引き起こされることが多く, 臨床的にも比較的頻度が高い。最近, 薬剤誘発性二次性 LQTS の一部に K<sup>+</sup>チャネルの遺伝子多型や不顕性変異が報告され, 二次性 LQTS の少なくとも一部には, 心筋イオンチャネルの遺伝的分子基盤が存在すると考えられる。

我々は, シサプリドによって torsade de pointes と著明な QT 延長を呈した二次性 LQTS 症例の遺伝子解析を行い, 心筋 Na<sup>+</sup>チャネル SCN5A の C 末端にミスセンス変異 L1825P を同定した。変異 Na<sup>+</sup>チャネル cDNA を哺乳類培養細胞 tsA201 に発現させ, パッチクランプ法で全細胞 Na<sup>+</sup>電流を記録した。L1825P は持続性の遅延電流と電

流減衰の遅延を示した。さらに, これらの LQT3 に特異的な「gain-of-function」に加えて, L1825P は Brugada 症候群に特徴的な「loss-of-function」も併せ持っていることが判明した。活性化・不活性化の膜電位依存性はそれぞれ脱分極側・再分極側に大きく偏移しており, 不活性化からの回復が遅延していた。さらに L1825P は closed-state inactivation が大きく亢進していた。一方, IKr ブロックを有するシサプリドは L1825P に対する直接作用は影響は示さなかった。これらの結果から, L1825P の持つ機能異常はいわゆる「再分極予備能」によって不顕性化していたが, シサプリドに IKr ブロックによって再分極予備能が破綻し, QT 延長と致死性不整脈が誘発されたと推測された。二次性 LQTS の病態にはこのような不顕性チャネル変異が関与していると思われる。

## (7) HERG チャネル脱活性化速度の変化による薬物作用の修飾

櫛田俊一<sup>1,2</sup>, 小倉武彦<sup>1</sup>, 小室一成<sup>2</sup>, 中谷晴昭<sup>1</sup>(<sup>1</sup>千葉大学大学院 医学研究院 薬理学, <sup>2</sup>循環病態医科学)

【目的】HERG の S6C 端に位置するアミノ酸残基の変異がチャネルの gating kinetics にいかなる影響を及ぼすか, また, III 群抗不整脈薬の抑制効果が gating kinetics の変化により影響を受けるか否かを検討すること。

【方法】S6C 端のアミノ酸残基 (Q664-S668) をそれぞれアラニンに置換した変異株を *Xenopus oocytes* に発現させて gating kinetics を解析した。Gating kinetics が変化した変異株の電流に対する nifekalant の抑制効果を, 野生株 (WT) の場合と比較した。

【結果】S6C 端のいずれの変異株においても, gating kinetics に変化が生じた。Nifekalant の抑制効果は, WT に比べ脱活性化速度の遅い R665A では減少し, 脱活性化速度の速い L666A では増強した。

【結論】S6C 端のアミノ酸残基はチャネルの gating kinetics に深く関与していると考えられた。HERG チャネルに対する nifekalant の抑制効果は脱活性化速度の変化により影響を受けることが示唆された。

## (8) HERG チャネルの活性化ゲートについて

石井邦明, 永井美玲, 遠藤政夫 (山形大学 医学部 薬理学講座)

HERG およびその変異体を用いてメタンスルホンアニリド (MS) 化合物のチャネル孔内へのトラッピングを検討したところ, 647 番目のアミノ酸 (S6 に存在する) の点変異体において静止状態のチャネルから E-4031 が解離していることを示唆する結果が得られた。同じ MS 化合物であっても dofetilide の場合は殆ど解離が認められなかった。また, 野生型の HERG チャネルにおいては両薬物とも完全にチャネル孔内にトラップされていた。薬物が静止状態のチャネルから解離する原因として活性化ゲートに異常が起きている可能性を考えたが, steady-state activation curves の結果からすると, その可能

性は低そうであった。また別の可能性として, 変異によってチャネル内に薬物を保持できるだけのスペースが無くなってしまっている可能性を考え, 両薬物の分子サイズを求めた。僅かではあったが E-4031 の方が大きく, そのことが両薬物の解離の違いを説明できるかも知れないと考えられた。また別の内容であるが, S6 の点変異体で野生型とは全く正反対に過分極パルスによって開口するようなものが得られており, 今後の検討によって電位センサーと活性化ゲートのカップリングに関する新たな知見が得られるものと考えている。

## (9) 第 III 群抗不整脈薬による HERG チャネル結合の分子機序

神谷香一郎<sup>1</sup>, Mitcheson JS<sup>2</sup>, Culberson C<sup>2</sup>, Sanguinetti MC<sup>2</sup>(<sup>1</sup>名古屋大学 環境医学研究所 液性調節分野, <sup>2</sup>ユタ大学 生理学)

薬物誘発性の QT 延長症候群は, 広汎な薬剤により心筋 K チャネルの中でも IK<sub>r</sub> (HERG チャネル) を選択的に抑制して引き起こされる。ところがその分子機序は不明であり, 創薬の面から重大な社会問題になっている。我々は, 第 III 群抗不整脈薬による HERG チャネル抑制

の分子機序を解明する目的で, HERG チャネル S6 の 20 個のアミノ酸残基を alanine-scanning 法で置換し, 発現した電流に対する薬物の作用を観察した。さらにこの実験結果にもとづき薬物分子と HERG チャネルの結合に関する 3 次元モデルを構築してその分子機序を推定した。薬

物として, methanesulfoanilide 系第 III 群抗不整脈薬である MK-499, dofetilide, E-4031, non-methanesulfoanilide 系系第 III 群抗不整脈薬の nifekalant, 強心薬 (vesnarinone), 抗不整脈薬 bepridil, を用いた。その結果, 薬物分子はこの空隙を裏打ちする  $\alpha$ ヘリックス構造の空隙側の特定の アミノ酸残基 (Tyr652, Phe656 など) と結合すること,

と薬物分子とアミノ酸残基の結合には  $\pi$  結合が関与すること, などを明らかにした。今後, このような構造-機能関連に関する分析を進展させることにより, 薬物誘発性 QT 延長症候群の機序並びにそれを予防する特定の薬物分子構造が解明され则认为。

#### (10) $\beta 2c$ サブユニットを用いて再構成された L 型 $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルの単一チャンネル動態

鎌田康宏, 山田陽一, 筒浦理正, 関 純彦, 當瀬規嗣 (札幌医科大学 医学部 第一生理)

近年, L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルは分子構造の解明が進み, 特に  $\beta$  サブユニットは  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの不活性化や発現の促進などに重要であると考えられている。これまでラット心筋の  $\beta$  サブユニットは  $\beta 2a$  サブユニットであると報告されていたが, 機能・構造両面からの詳細な検討は行われていない。最近我々は新しい  $\beta$  サブユニットをクローニングし ( $\beta 2c$  サブユニット), これがラットの心筋に発現し機能している  $\beta$  サブユニットであると報告した。今回我々は  $\beta 2c$  サブユニットによって再構成されたチャンネルの single-channel 記録を行い, ラット心筋の L 型  $\text{Ca}^{2+}$

チャンネルにおける  $\beta 2c$  サブユニットの役割について検討し  $\beta 2a$  サブユニットと比較した。ラット心筋由来の  $\alpha 1c$  サブユニット,  $\alpha 2\delta$  サブユニットとともにラット脳由来の  $\beta 2a$  サブユニット, ラット心筋由来の  $\beta 2c$  サブユニットを一過性に発現させた COS-7 細胞の  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルとラットの単離心筋のそれとを比較検討した。 $\beta 2c$  サブユニットを含んだチャンネルは  $\beta 2a$  サブユニットを含んだチャンネルに比し, 開口確率の高いトレースを観察する頻度が小さく, 開状態で速い時定数を示し, これは native な単離心筋細胞で記録されたものと同等であった。

#### (11) 電位依存性カルシウムチャンネル $\beta 3$ サブユニットの循環器系における重要性の検討 (遺伝子改変マウスを用いて)

村上 学<sup>1</sup>, 山村寿男<sup>2</sup>, 村木克彦<sup>2</sup>, 今泉祐治<sup>2</sup>, 佐藤栄作<sup>1</sup>, 尾野恭一<sup>1</sup>, 柳澤輝行<sup>3</sup>, 飯島俊彦<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 秋田大学 医学部 薬理学, <sup>2</sup> 名古屋市立大学大学院 薬学研究科 細胞分子薬効解析,

<sup>3</sup> 東北大学大学院 医学系研究科 分子薬理)

電位依存性カルシウムチャンネル  $\beta$  サブユニットはチャンネルを通過する電流量や細胞膜表面のチャンネル数を調節するなどの役割を担うと考えられている。我々は  $\beta 3$  に注目し, 同サブユニットが血管平滑筋, および心筋に発現が認められ, L 型カルシウムチャンネルを構成すると考えられることから,  $\beta 3$  サブユニット欠損マウスを用いて, 同遺伝子欠損による循環器系への影響を調べた。

$\beta 3$  サブユニット欠損マウスはウエスタン解析, ジヒドロピリジン結合実験, およびパッチクランプ法によるバ

リウム電流量の検討の結果より, 血管平滑筋において有意に L 型カルシウムチャンネル数が低下していた。免疫染色ではチャンネル分布 ( $\alpha 1C$ ) に異常は認められなかったが, 細胞内カルシウムの測定実験において, ジルチアゼムに対する有意な反応性の低下を認めた。平常時血圧には異常がないものの, ジヒドロピリジンによる降圧作用の低下が認められた。さらに, 高塩分食により血圧上昇および血圧上昇に伴うと考えられる血管壁の肥厚など病理学的変化が認められた。

## (12) 心室筋における過分極およびリゾリン脂質によるエチジウム流入を伴う内向き電流の誘発

宋 玉梅, 大地陸男 (順天堂大学 医学部 第二生理)

細胞膜は強い電気的パルスや界面活性剤で穿孔される。穿孔は除細動通電でもおこる。リゾホスファチジルコリン (LPC) は心臓で虚血時に生成され、不整脈や細胞障害をもたらす。ウサギ心室筋をホールセルクランプし、膜電流および膜透過性が低く DNA と結合して蛍光を増大する ethidium bromide (EB) 蛍光を測定した。維持電位を $-20$  mVに設定し、 $40$  sの過分極パルス ( $-80 \sim -180$  mV) を  $2$  分間隔で与えると、およそ $-140$  mV で不規則な内向き電流 (I<sub>hi</sub>) が発生した。また、 $-80$  mV のパルスを反復しつつ LPC ( $10$  mM) を適用すると、急速な上昇と

緩やかな減衰を示す活動電位誘発可能な I<sub>hi</sub> が誘発された。いずれにおいても過分極中の I<sub>hi</sub> 積分と核 EB 蛍光の増大は、時間的にも電位依存性においても平行的に増大した。以上の結果は、過分極および LPC が膜穿孔を誘発し異常興奮および Ca の細胞内過負荷による細胞死をもたらすことを示唆する。ポリエチレングリコール(0.5% W/V)あるいは Poloxamer188 ( $0.5$  mM) を LPC と同時投与すると、核 EB 蛍光の増大のみが著しく低下した。これら親水性ポリマーは大きな穿孔を選択的に修復する可能性が示唆された。

## (13) ホメオボックス型転写因子 Csx/Nkx-2.5 を発現させた心筋分化細胞における活動電位と膜電流の形成

内納智子<sup>1</sup>, 賀来俊彦<sup>1</sup>, 山下 昇<sup>1</sup>, 梶岡俊一<sup>1</sup>, 門前幸志郎<sup>2</sup>, 小室一成<sup>3</sup>, 小野克重<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>大分医科大学 医学部 循環病態制御講座, <sup>2</sup>東京大学大学院 医学系研究科 器官病態内科学, <sup>3</sup>千葉大学大学院 医学研究院 循環病態医科学)

【目的】心筋の分化に伴う膜電流と活動電位の経時的変化における転写因子 Csx/Nkx-2.5 の制御機能について検討した。

【方法】P19CL6 細胞に Csx/Nkx-2.5 の cDNA を transfection して、安定した cell line を得た (以下 Csx 細胞)。P19CL6 細胞と Csx 細胞を 1%DMSO 加培養液により心筋分化誘導し、1) 心筋分化誘導前、2) 誘導 5 日後、3) 拍動開始初期、4) 後期にパッチクランプ法を用いて膜電流と活動電位の測定を行った。

【結果】拍動速度は CL6 細胞では分化に伴い増加したが、Csx 細胞では逆に減少した。電流密度は両細胞とも I<sub>Na</sub> に変化はなく、I<sub>Ca</sub> は分化に伴い増加して、I<sub>Ca,L</sub> の割合が増加した。I<sub>K,term</sub> は CL6 細胞では分化に伴い減少したが、Csx 細胞では増加した。また Ito は両細胞とも分化に従い減少していたが、CL6 細胞で著明であった。

【結語】転写因子 Csx/Nkx-2.5 はイオンチャネルのうち特に K<sup>+</sup>チャネルの発現を制御することが示唆された。

## (14) 心・血管系 ATP 感受性 K チャネルに対する K チャネル開口薬の作動分子機構

山田充彦, 倉智嘉久 (大阪大学大学院 医学研究科 情報薬理学講座)

ATP 感受性 K<sup>+</sup> (K<sub>ATP</sub>) チャネルは、ABC 蛋白質 SUR と K<sup>+</sup>チャネルサブユニット Kir6.2 で構成される。SUR2A と 2B は、それぞれ心筋・血管平滑筋型 K<sub>ATP</sub> チャネルに含まれ、C 末 42 アミノ酸 (C42) だけが異なる。我々は、C42 が、SUR のヌクレオチド結合ドメイン(NBD) 2 とヌ

クレオチドの連関を制御すると報告してきた。ニコランジルは、SUR2B-Kir6.2 チャネルを SUR2A-Kir6.2 チャネルより約 100 倍高いポテンシーで活性化する。今回我々は、ニコランジルのこの弁別的効果における NBD1 と 2 の関与を、各 NBD に点変異 (K707A と K1348A) を加え

検討した。インサイドアウトパッチで、ADP (10  $\mu$ M) はニコランジル(1 mM) の効果を著明に増強した。ADP のこの効果は、SUR2A (K707A) -, SUR2A (K1348A) -, SUR2B (K707A) -Kir6.2 チャンネルで消失、SUR2B (K1348A) -Kir6.2 チャンネルで減弱した。ニコランジルは、ATP (1 mM) と ADP (100  $\mu$ M) 共存下に SUR2A-, SUR2A (K707A) -, SUR2A (K1348A) -Kir6.2 チャンネルを、それぞれ EC50 0.1,  $>>10$ ,  $\sim 10$  mM で、また ATP (1 mM) 存在下に SUR2B-, SUR2B (K707A)-, SUR2B (K1348A) -Kir6.2 チャンネルを、

それぞれ EC50 0.01,  $>>1$ , 0.1 mM で活性化した。以上から、(1) ニコランジルの効果は、ヌクレオチドと NBD との連関、特に NBD1 との連関に依存し、(2)ヌクレオチド／NBD 連関は、ニコランジルの SUR2A-Kir6.2 チャンネル活性化より SUR2B-Kir6.2 チャンネル活性化に強く寄与すること、(3)その結果 SUR2B-Kir6.2 チャンネルが SUR2A-Kir6.2 チャンネルよりニコランジル感受性が高いこと、(4)従って C42 は NBD1 と 2 双方の機能を修飾し、ニコランジルの弁別的効果に関与することが分かった。

### (15) Split SUR の機能解析

鷹野 誠, 倉富 忍 (京都大学 医学研究科 細胞機能制御学)

ATP 感受性 K チャンネル ( $K_{ATP}$ ) は Kir6.2 と ATP binding cassette superfamily (ABC 蛋白) の一種、sulfonylurea receptor (SUR) から構成される。哺乳類の細胞に存在する SUR 等の ABC 蛋白は二つのヌクレオチド結合ドメイン (NBF) を持つが、HisP 等のバクテリアの ABC 蛋白は一つの NBF だけを持ちかつ二量体を形成するため half size ABC 蛋白と呼ばれている。そこで SUR2A の NBF1

の前後において停止コドンおよび開始コドンを挿入することにより二つに分割した Split SUR 分子を作成し、split SUR が half size ABC 蛋白と同様に機能するかを検討した。SUR2A-N640・C643, SUR2A-N940・C941 は Kir6.2 と共発現させると pinacidil によって活性化される  $K_{ATP}$  チャンネルとして機能した。しかし SUR2A-N970・C971 は細胞膜への輸送障害が起こることが判明した。

### (16) ラット心筋細胞の ATP 感受性 K チャンネルに及ぼす propofol の影響 -Anesthetic preconditioning との関連について

河野 崇<sup>1</sup>, 堤 保夫<sup>1</sup>, 大下修造<sup>1</sup>, 高橋 章<sup>2</sup>, 中屋 豊<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>徳島大学 医学部 麻酔科, <sup>2</sup>特殊栄養)

先行する短時間の心筋虚血、あるいは揮発性吸入麻酔薬の前投与が、続いて起こる長時間の心筋虚血に対して保護的に作用することが分かり、それぞれ ischemic preconditioning, anesthetic preconditioning と呼ばれている。これらの心筋保護効果の詳細な機序については解明されていない部分が多いが、ATP 感受性 K チャンネル ( $K_{ATP}$  チャンネル) が重要な役割を果たすと考えられている。

Propofol は麻酔深度の調節性に富む静脈麻酔薬で広く臨床使用されており、心臓外科領域での使用頻度も高い。本研究では、ラット遊離単一心室筋細胞の細胞膜およびミトコンドリア  $K_{ATP}$  チャンネルに及ぼす Propofol (0.4-60.1  $\mu$ g/ml) の影響をパッチクランプ法および蛍光法

を用いて検討した。

Wister (200-250g) の心臓をランゲンドルフ法により灌流し、酵素灌流法により遊離単一心筋細胞を取り出した。心筋虚血モデルとして、パッチクランプ法の cell-attached 法では 2,4-dinitrophenol (ミトコンドリアでの ATP 合成阻害薬) を含んだ溶液で、一方 inside-out 法では ATP を含まない溶液で細胞を還流することにより細胞膜  $K_{ATP}$  チャンネルを活性化させた。cell-attached 法, inside-out 法ともに、Propofol は活性化した細胞膜  $K_{ATP}$  チャンネルを濃度依存性に抑制した (EC50: 14.2  $\mu$ g/ml, 11.4  $\mu$ g/ml)。また、Propofol は  $K_{ATP}$  チャンネルのコンダクタンスに影響を与えず、その効果は可逆的であった。さらに、Propofol は

ミトコンドリア  $K_{ATP}$  チャンネルの開口薬であるジアゾキシドにより誘導された内因性フラボプロテインの自家蛍光

を可逆的かつ濃度依存性に抑制した ( $EC_{50}$ :14.6  $\mu\text{g/ml}$ )。

### (17) 細胞膜 $PIP_2$ による心筋緩徐活性型遅延整流性 $K^+$ チャンネル ( $I_{Ks}$ ) の制御

松浦 博, 丁 維光 (滋賀医科大学 生理学第二)

心筋細胞に広く分布する緩徐活性型遅延整流性  $K^+$  チャンネル ( $I_{Ks}$ ) は活動電位の再分極過程を制御する重要な電流系であり、種々の神経伝達物質やホルモン、もしくは細胞内情報伝達機構の調節を受けている。今回我々は、細胞膜構成リン脂質であるホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 ( $PIP_2$ ) による  $I_{Ks}$  の調節機構について、モルモット洞房結節細胞および心筋細胞に全細胞型パッチクランプ法を適用して検討した。その結果、1) 細胞膜  $PIP_2$  含量を減少させる wortmannin (50  $\mu\text{M}$ ) を投与すると、 $I_{Ks}$  は約 2 倍に増大した。2) 細胞内に抗  $PIP_2$  抗体を投与すると  $I_{Ks}$  は約 1.9 倍に増大した。3) 細胞内に  $PIP_2$  (100  $\mu\text{M}$ ) を負荷すると  $I_{Ks}$  は著明に減少した。4)

$PIP_2$  のもつ陰性荷電を中和することが知られている neomycin (50  $\mu\text{M}$ ) や  $Al^{3+}$  イオン (50  $\mu\text{M}$ ) を細胞内に投与すると  $I_{Ks}$  の増大反応が誘発された。これらの実験から、細胞膜  $PIP_2$  は  $I_{Ks}$  に対して抑制性作用をおよぼし、それには  $PIP_2$  のもつ陰性荷電が関わっていると考えられた。加えて、細胞外 ATP は  $P2Y$  受容体-G 蛋白 (Gq)-ホスホリパーゼ C (PLC) を活性化して  $I_{Ks}$  を増大させることが知られているが、細胞内に  $PIP_2$  (100  $\mu\text{M}$ ) を負荷した細胞においてはこの ATP による増大反応がほとんど消失した。よって、 $P2Y$  受容体刺激による  $I_{Ks}$  の増大機構として PLC 活性化に伴う細胞膜  $PIP_2$  の減少が関わっていると考えられた。

### (18) プロテオミクス研究からのチャンネル蛋白安定化による 心房細動のテーラード治療開発研究の試み：医工学連携プロジェクトを用いて

久留一郎, 佐々木紀仁 (鳥取大学 循環器内科)

心房細動の難治化の原因に心房筋の電気的リモデリングにより抗不整脈薬の分子ターゲットであるチャンネル数が減少することが指摘されている。我々は心房細動患者の心房筋の  $Kv1.5$  チャンネルは洞調律患者に比較して有意にユビキチン化されチャンネル蛋白が不安定化しその発現が減少している事を見出した。この事実に基づいてチャンネルの分解量を制御することで抗不整脈薬の分子ターゲットである  $Kv1.5$  チャンネルを安定化する事で電気的リモデリングを克服できる可能性がある。 $Kv1.5$  の半減期は pulse chase 法で 14.9 時間と短時間で分解される short-lived 蛋白であり、proteasome inhibitor である MG132 の前処置は半減期を 1.7 倍に有意に延長する。 $Kv1.5$  はコントロール状態で ubiquitin 化をされており、MG132 の投与により著しく ubiquitin 化を受ける。lysosomal/endosomal inhibitor である chloroquine の前処置では  $Kv1.5$  の半減期は変化しない。共焦点レーザー顕微

鏡にて  $Kv1.5$  の細胞内局在を検討すると  $Kv1.5$  は小胞体、Golgi 体および microtubules に局在するが、endosome には局在しない。MG132 の前処置群により Golgi, 小胞体、microtubules に局在が増加する。さらに MG132 の前処置は細胞膜での  $IK_{Kur}$  電流の増加をきたす。これらの事実より  $Kv1.5$  は ubiquitin-proteasome 系で速やかに分解される。 $Na^+$  channel blocker は ubiquitin-proteasome 系を抑制し、中でも Pilsicainide は有効血中濃度で ubiquitin-proteasome 系を抑制し  $Kv1.5$  を安定化する事で  $IK_{Kur}$  電流の増加をきたす。これらの結果は培養細胞のみならず心房筋を用いた研究で確認された。この結果を演繹すれば、proteasome 阻害作用を有する pilsicainide が心房リモデリングにより減少した膜の  $Kv1.5$  を増加させ、心房筋に特異的な  $IK_{Kur}$  を増加させる。つまり心房リモデリングにおいて pilsicainide の前投与により  $Kv1.5$  を増加し薬剤の分子ターゲットを再生することで  $IK_{Kur}$  blocker の効果

を増強する新しい薬理的治療法となる可能性を示す。現在工学部と連携してポイントフッ素化した pilsicainide を作成し 20S プロテアソームと Na<sup>+</sup> channel を共通に阻害する反応基を同定しそれぞれの 3 次元構造よりプロテアソームの結合部位の同定を試みている。さらに HSP72 やチャネル結合蛋白が分子シャペロンとしてチャネル

の安定化に寄与する事を見出し、これらのツールを用いての薬理的なチャネル安定化が心房細動の治療として期待できる事を示す。さらには心房細動患者ゲノムのチャネル蛋白の安定性に関連する SNP s を検討する事で疾患感受性遺伝子の探査も行っている。

## 8. グリア細胞と脳機能発現

2002 年 9 月 6 日－9 月 7 日

代表・世話人：井上芳郎（北海道大学大学院 医学研究科）

所内対応教官：池中一裕

### （1）発達脳における放射状グリアの移動 -第3報-

山田恵子（北海道大学大学院 医学研究科 生体構造解析学分野）

### （2）小脳グリア細胞の分化能

篠田陽子（理化学研究所 脳科学総合研究センター）

### （3）発達期マウス体性感覚系におけるグルタミン酸トランスポーターGLT1 の発現スイッチとパレル形成

高崎千尋（北海道大学大学院 医学研究科 生体構造解析学分野）

### （4）モノクローナル抗体を利用したアストロサイトの細胞系譜の解析

小川泰弘（生理学研究所 神経情報研究部門）

### （5）マウス胎仔脳における中性アミノ酸トランスポーターASCT1 の細胞発現

境 和久（北海道大学大学院 医学研究科 生体構造解析学分野）

### （6）「L-Serine 合成酵素 3PGDH 遺伝子(Mouse 3PGDH)の転写調節機構の解析」

清水基宏（静岡県立大学 薬学部/理化学研究所 脳科学総合研究センター）

### （7）basic helix-loop-helix 型転写因子 Olig ファミリーのニューロン，グリア分化における役割

竹林浩秀（生理学研究所 神経情報研究部門）

### （8）培養アストロサイトにおける細胞内カルシウム動態の MAP キナーゼ経路による制御

本 孝則（東京薬科大学 生命科学部 生体高次機能学）

### （9）IP3 / Ca 経路から見たアストロサイトとニューロンの比較

森田光洋（東京薬科大学 生命科学部 生体高次機能学）

### （10）培養アストロサイトにおける NO 産生経路の培養条件に伴った変換機構

小柄 渚（東京薬科大学 生命科学部 生体高次機能学）

### （11）神経系における 4 回膜貫通蛋白質 CD9 および CD81 の相補的分布と機能分担

石橋智子（東京薬科大学 薬学部 機能形態学講座/生理学研究所 神経情報研究部門）

### （12）脱髄モデルマウスへの神経幹細胞の移植

松本路生（生理学研究所 神経情報研究部門）

### （13）FLRG (follistatin-related gene) mRNA とそのタンパク質産物の発現誘導

－ 特に transforming growth factor-β1 と脳障害との関連において

大澤良之（大阪大学大学院 医学系研究科 情報伝達医学専攻機能形態学）

### （14）けいれん重積発作後のミクログリア活性化と神経新生の経時的変化

久村隆二（藤田保健衛生大学 総合医科学研究科 難病治療共同研究部門/名古屋大学大学院 農学部）

### 【参加者名】

生田房弘（新潟脳外科病院），内山安男（大阪大・医），  
大澤良之（大阪大・医），渡辺雅彦（北大・医），山田恵  
子（北大・医），境和久（北大・医），高崎千尋（北大・  
医），森田光洋（東京薬科大・生命科学），本孝則（東京  
薬科大・生命科学），小柄渚（東京薬科大・生命科学），

石橋智子（東京薬科大・薬），古屋茂樹（理研・脳科学研  
究セ），篠田陽子（理研・脳科学研究セ），久村隆二（藤  
田保健衛生大・総医研），萩原英雄（藤田保健衛生大・総  
医研），田中謙二（藤田保健衛生大・総医研），鹿川哲史  
（熊大・発生研），小野勝彦（島根医大・解剖），清水基宏

(静岡県大・薬), 吉田一之 (東工大・連合農学研), 高畑

享 (基生研), 藤本一朗 (生理研), 竹林浩秀 (生理研)

### 【概要】

神経系の発達や機能調節において, グリア細胞が積極的に関与している実体が明らかになりつつある。本研究会では, 形態学, 病理学, 生化学, 生理学, 分子生物学, 発生工学, 臨床医学などの幅広い分野でグリア研究に携わる若手研究者が一同に会し 1) グリアの発生分化, 2)

グリア・ニューロンの構造機能連関, 3) グリアを利用した遺伝子治療などに関する最新の研究成果を持ちより, 情報交換をすることができた。また, グリア研究に造詣の深い研究者も参加し, 若手研究者への助言や交流も図ることができた。

## (1) 発達脳における放射状グリアの移動 -第3報-

山田恵子, 渡辺雅彦 (北海道大学大学院 医学研究科 生体構造解析学分野)

井上芳郎 (北海道大学大学院 医学研究科 分子解剖学分野)

放射状グリア(RG)は, ニューロンの産生と移動に関与し, その後星状膠細胞を産生する神経幹細胞と考えられている。しかし, RG 自身の細胞移動については不明な点が多い。昨年度の本会において, 私達は, RG に豊富な脳型脂質結合蛋白(BLBP)を細胞マーカーとして組織化学法を行った結果, BLBP 発現細胞は活発なニューロン産生に引き続いて外套層に出現することを報告した。今回, この外套層出現が RG の細胞移動を反映している

かを検討する目的で, BrdU 投与 3 時間後と 2 日後に固定して脳室層と外套層における BrdU 陽性/BLBP 陽性細胞数を計測した。BrdU 陽性/BLBP 陽性細胞の数は, ある時期までは脳室層にほぼ限局した分布を示した。しかし, 延髄では E14, 小脳では E15, 大脳皮質では E17-P1 になると二重標識細胞は外套層に優勢な分布となった。以上の結果は, RG の外套層出現がこのグリアの細胞移動を反映していることを強く示唆する。

## (2) 小脳グリア細胞の分化能

篠田陽子, 古屋茂樹, 平林義雄 (理化学研究所 脳科学総合研究センター)

近年, これまでグリア系譜の一部であると考えられてきた放射状グリアやアストロサイトが神経細胞とアストロサイトの両系譜を産生しうることが証明され, 神経前駆細胞としての性質が注目されつつある。

本研究では小脳由来のアストロサイトについて神経細胞への分化能の検討を行った。胎生 21 日ラット小脳から調製したアストロサイトを血清存在下で単層培養し低密度で 2 週間拡張すると, GFAP と GLAST を高頻度で発現

し, 神経細胞マーカーである TuJ1 の発現はほとんど見られなかった。これらを続けて高密度で培養すると TuJ1 陽性細胞数が顕著に増加した。bFGF の添加は TuJ1 陽性細胞の出現に影響を与えなかったが, bFGF 処理後無血清条件で培養すると calbindin 陽性細胞が出現し, その一部に TuJ1 を共発現する細胞が低頻度ながら観察された。これらの結果より, 小脳アストロサイトは神経細胞へ分化する能力を維持している可能性が示された。

### (3) 発達期マウス体性感覚系におけるグルタミン酸トランスポーターGLT1の発現スイッチとバレル形成

高崎千尋, 横山理恵子, 境和久, 渡辺雅彦 (北海道大学大学院医学研究科・生体構造解析学分野)

グルタミン酸トランスポーターGLT1は成長軸索に一過性に発現後、星状膠細胞に発現スイッチすることが知られている。今回我々は、発達マウス脳におけるバレルの発達・形成とGLT1の発現スイッチとの関連性について、酵素組織化学、蛍光抗体法による二重染色、免疫電顕により検討した。その結果、生後第2週の前半で臨界期が終了する三叉神経核のバレルでは、GLT1の発現スイッチは生後7日までに完了した。一方、生後6日には臨界期が終了する大脳皮質のバレルでは、発現ス

witchは生後5日までに完了していた。以上の結果から、体性感覚系においてGLT1のニューロンから星状膠細胞への発現スイッチは脳幹および大脳皮質の両者で生後第1週に起こり、両者それぞれの臨界期終了に先立って、GLT1発現スイッチが完了した。これらの事実を考え合わせると、GLT1の発現スイッチは体性感覚系のシナプスモジュール構築の発達成熟、特に臨界期の終了と密接に連動して起こることが示唆された。

### (4) モノクローナル抗体を利用したアストロサイトの細胞系譜の解析

小川泰弘 (生理学研究所 神経情報研究部門)

哺乳動物の中樞神経系は、大多数を占めるアストロサイトの多様性により、極めて複雑に構築され、より高次の機能を獲得していると考えられる。それ故、アストロサイトの発生・分化及び多様性の存在等、その実体を明らかにすることは大変意義深い。

我々はアストロサイト系譜を認識すると考えられる数種類のモノクローナル抗体から、免疫染色法を用いてより早期よりアストロサイト系譜を認識すると考えられ

る抗体をスクリーニングした。これらの内、放射状グリア細胞からアストロサイト系譜を認識するものが存在し、GLAST, Vimentinとは異なることが免疫染色、ウェスタンブロットリングより示された。さらにこれらの内1つはマウス胎生期12日目の結果よりGLASTの染色パターンと相補的となることから、放射状グリアの多様性を示す可能性がある。

### (5) マウス胎仔脳における中性アミノ酸トランスポーターASCT1の細胞発現

境和久, 清水秀美 (北海道大学大学院 医学研究科 生体構造解析学分野)

古屋茂樹 (理化学研究所 脳科学総合研究センター)

渡辺雅彦 (北海道大学大学院 医学研究科 生体構造解析学分野)

L-セリンは、培養ニューロンに対して顕著な神経栄養効果を有している。L-セリン合成酵素 3-phosphoglycerate dehydrogenase (3PGDH) の発現解析から、ニューロンにはセリン合成能がなく、脳内では専らグリア細胞が合成していることが示されている。マウス成熟脳では、L-セリン輸送能を持つ中性アミノ酸トランスポーターASCT1が3PGDH陽性のグリア細胞で優位な発現を示すことか

ら、グリア産生セリンの輸送体として機能している可能性を前回報告した。今回我々は発達過程でのセリン輸送機構を明らかにする目的で、胎仔期および新生仔期マウス脳におけるASCT1の発現細胞について検討を行った。ASCT1の発現は脳では3PGDH陽性の放射状グリアに発現し、生後発達に伴い星状膠細胞へと受け継がれた。一方、ASCT1の著明な発現は3PGDH陰性の胎仔期血管内

皮細胞にも認められたが、生後 2 週までにその発現は消失した。これらの結果は、血管由来およびグリア細胞由来のセリンが発達期脳の活発な成長を支えており、脳が

成熟するにつれてグリア細胞がセリンの供給源となっていることを示唆する。

#### (6) L-Serine 合成酵素 3PGDH 遺伝子(Mouse 3PGDH)の転写調節機構の解析

清水基宏 (静岡県立大学 薬学部/理化学研究所 脳科学総合研究センター)

古屋茂樹, 篠田陽子 (理化学研究所 脳科学総合研究センター)

吉田一之 (理化学研究所 脳科学総合研究センター/東京農工大・連合農学研究科)

三苫純也 (The Burnham Institute)

平林義雄 (理化学研究所 脳科学総合研究センター)

我々はこれまでにアストロサイト条件培養液中の神経栄養活性因子として L-Serine を同定し、さらに L-Serine 生合成経路の第一段階酵素である 3PGDH (3-phosphoglycerate dehydrogenase) がアストロサイト特異的に発現している事を示してきた。そこで 3PGDH 遺伝子の中樞神経系での発現制御機構を明らかにする事を目的として、マウスの 3PGDH 遺伝子を単離し、その promoter 活性を Reporter gene assay によって解析してきた。これまでに培養アストロサイトにおけるルシフェラーゼの発現は翻訳開始点から上流約 1.8 kb の 5'-flanking sequence によって活性化されることを見いだしており、

そのような活性化は神経細胞やメラノーマ細胞 (MEB4) においては起こらないことを確認している。今回さらに以下のような知見を得た。1) 翻訳開始点から-1792~-1095 間の約 700bp を欠失させるとアストロサイトにおけるルシフェラーゼの発現は大幅に低下する。2) この 700bp の配列はアストロサイトの核蛋白質と特異的に結合する element を含む。以上の結果から、翻訳開始点から-1792~-1095 の配列を認識する転写因子との相互作用によって 3PGDH 遺伝子のアストロサイト特異的な転写活性化が促進されている可能性が強く示唆された。

#### (7) basic helix-loop-helix 型転写因子 Olig ファミリーのニューロン、グリア分化における役割

竹林浩秀, 池田一裕 (生理学研究所 神経情報研究部門)

Olig ファミリーは、最近同定された新しい basic helix-loop-helix 型転写因子ファミリーである。Olig1, Olig2 はオリゴデンドロサイト特異的な分化因子として最初に報告されたが、我々は、Olig2 の発現を詳細に解析することにより、Olig2 は運動ニューロンの分化にも関わっている可能性を指摘した。この仮説は、ニワトリ神経管における Olig2 の異所性発現の実験からも支持された。しかしながら、胎生期脊髄では、Olig1, Olig2 は、ほぼ同

様の発現パターンを示し、異所性発現でも活性を区別することができないので、実際の発生において Olig1, Olig2 のどちらが、より重要な働きをしているのかは、ノックアウトマウスの作製にて検証する必要がある。今回、我々は、Olig2 ノックアウトマウスを作製し、その表現型解析から、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の因子であることを証明した。

## (8) 培養アストロサイトにおける細胞内カルシウム動態の MAP キナーゼ経路による制御

本 孝則, 工藤佳久, 森田光洋 (東京薬科大学 生命科学部 生体高次機能学)

これまでに私達は培養アストロサイトにおけるカルシウム振動が成長因子 (GF; EGF+bFGF) と炎症性サイトカイン (Cytok; IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , LPS 等) によって競合的に制御されていることを示してきた。今回, この現象が MAP キナーゼ経路の最下流に位置する転写制御に対する競合であり, 細胞内カルシウムストアのサイズ調節を介してカルシウム振動を誘発していることを示す。GF は ERK のリン酸化, egr-1 遺伝子の発現誘導など MAP キナーゼ

経路を介した現象を活性化するが, Cytok は GF による ERK のリン酸化に影響を与えない一方で egr-1 遺伝子の転写誘導を阻害した。また, イオノマイシン処理による細胞内ストアからのカルシウム放出量を測定し, 細胞内カルシウムストアのサイズを推定したところ, GF がこれを増加させる一方で MEK 阻害剤 U0126 と Cytok は GF の効果を抑制した。

## (9) IP3 / Ca 経路から見たアストロサイトとニューロンの比較

森田光洋, 吉木文人, 須々木仁一, 土屋礼美, 工藤佳久 (東京薬科大学生命科学部・生体高次機能学)

Phospholipase C (PLC) の活性化に伴う inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3)の産生は IP3 受容体を活性化し, 細胞内ストアからのカルシウム放出を引き起こすと一般には考えられている。しかし PLC $\beta$  に共役する mGluR5 やショウジョウバエ由来のオクトパミン受容体を活性化させた場合, アストロサイトではカルシウムオシレーションを含む多様な細胞内カルシウムの動態が見られるのに対してニューロンのカルシウム応答を検出すること

は困難である。今回われわれはアストロサイト, ニューロン, PC12h, HEK293 などの細胞においてカルシウムイメージング, IP3 イメージング, パッチクランプなどの実験的検討を行い, IP3 / Ca 経路の実際の動態を比較検討した。これにより IP3 産生経路のカルシウム依存性, 細胞の膜電位に与える影響などが細胞ごとに異なることが明らかにになったのでこれを報告する。

## (10) 培養アストロサイトにおける NO 産生経路の培養条件に伴った変換機構

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

アストロサイトは脳傷害時に一酸化窒素 (Nitric Oxide; NO) を産生することが知られている。本研究では培養アストロサイトが NO を産生するために必要な培養条件の検討を行った。その結果, LPS と炎症性サイトカインがそれぞれ異なった培養条件下で NO 産生を誘導することを見出した。LPS は播種時の初期密度を一定以上にした場合のみ NO 産生を誘導した。この条件下のアストロサイトは細胞面積の減少が見られた。一方, 炎症性サイトカインは, 低濃度血清 (1%FCS) 条件下で IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ ,

IFN $\gamma$  を同時に処理することで NO 産生を誘導した。LPS, サイトカインに対する応答性を NF $\kappa$ B などのレポーター遺伝子アッセイにより検討したところ, NO 産生条件に関わらず応答が見られた。これは受容体発現量などには変化がないことを示している。また, NO の産生は iNOS タンパク質の発現上昇を伴っていた。以上のことから培養アストロサイトは培養条件により iNOS 遺伝子の発現制御のメカニズムを変化させることが明らかになった。

## (11) 神経系における4回膜貫通蛋白質 CD9 および CD81 の相補的分布と機能分担

石橋智子 (東京薬科大学 薬学部 機能形態学講座/生理学研究所 神経情報研究部門)

池中一裕 (生理学研究所 神経情報研究部門)

丁 雷, 井上芳郎 (北海道大学大学院 医学研究科 分子解剖学分野)

林 明子 (東京薬科大学 薬学部 機能形態学講座)

目加田英輔 (大阪大学 微生物病研究所)

馬場広子 (東京薬科大学 薬学部 機能形態学講座)

軸索上を伝わる活動電位の発生には電位依存性チャンネルが重要な役割を担っていることがよく知られている。近年, この軸索上のチャンネル分子の局在は軸索周囲を取り囲む髄鞘の存在によりダイナミックに変化し, 特に軸索と髄鞘が直接結合するパラノードと呼ばれる領域形成が重要であることが明らかとなり, パラノード構成分子も次第に解明されつつある。しかしながら, どのようなメカニズムで軸索側および髄鞘形成グリア細胞側の分子がパラノードに正確に運ばれるのか, また両分子がパラノードでどのように相互作用しジャンクション形成しているのか詳細は明らかにされていない。

我々はこれまでに髄鞘最外層に存在する4回膜貫通蛋白質 (TM4SF) CD9 がパラノードにも局在し, CD9 欠損マウス(KO)の解析より CD9 がパラノード形成および軸索上のチャンネル局在に重要な役割があることを示唆する結果を得ている。しかしながら CD9KO におけるこれら異常は個体間および部位により程度が様々であった。一

般的に TM4SF は他の TM4SF を含む様々な分子と複合体を形成し細胞間シグナル伝達において重要な役割を担っていることが知られている。以上のことを考え合わせると, 神経系においても CD9 以外にも他の TM4SF 分子が存在し, 互いに機能し合っている可能性が考えられた。そこで, TM4SF の中で CD9 に最も性質の類似している CD81 の神経系における分布を詳細に検討した。結果, CD81 が髄鞘に存在すること, CD9 が CNS よりも PNS に優位に存在するのに対して, CD81 は PNS よりも CNS に優位に存在することを明らかにした。さらに CNS の中でも CD9 と CD81 の分布は相反する傾向を認めた。また CD81KO の CNS では, CD9KO 同様パラノードに存在する膜蛋白の局在異常が認められた。これらの結果から神経系では CD9, CD81 という2つの異なった TM4SF がそれぞれ部位特異的に重要な役割を果たしていることが示唆された。

## (12) 脱髄モデルマウスへの神経幹細胞の移植

松本路生, 竹林浩秀 (生理学研究所 神経情報研究部門)

鹿川哲史 (熊本大学 発生医学研究センター)

Francois Lachapelle, Anne Baron-Van Evercooren (INSERM U546, France)

池中一裕 (生理学研究所 神経情報研究部門)

多発性硬化症 (MS) をはじめとする脱髄性疾患の治療法として, 神経幹細胞の移植が注目されている。我々はこれまでに PLP 遺伝子を過剰発現させた自発性の脱髄モデルマウス PLP-4eTg マウスを作製した。MS を始めとする脱髄性疾患の治療に役立てる目的で, PLP-4eTg マウスに神経幹細胞を移植し, ミエリンが再生されるかどうかを検討した。移植には全ての体細胞で GFP を発現させたグリーンマウスより調整した細胞を用いた。正常な PLP

遺伝子を持つグリーンマウスの胎生 14 日胚前脳の ganglionic eminence より neurosphere を作製し, それらを脱髄の進行した 8 か月齢の PLP-4eTg マウスの corpus callosum に移植した。移植後 20 日目に, 移植した細胞の一部がオリゴデンドロサイトに分化している事が分かった。また, オリゴデンドロサイトに分化した細胞の中には, ミエリンを形成していると思われるものもあった。

### (13) FLRG (follistatin-related gene) mRNA とそのタンパク質産物の発現誘導— 特に transforming growth factor- $\beta$ 1 と脳障害との関連において

大澤良之, 内山安男 (大阪大学大学院 医学系研究科 情報伝達医学専攻 機能形態学)

TGF $\beta$  スーパーファミリーの一つであるアクチビン, 中胚葉誘導作用や個体発生に関与すると共に, 脳障害時における神経細胞死を抑制する因子として報告されてきた。フォリスタチンはアクチビンと結合してその活性を抑制する分子として知られているが, 近年, フォリスタチンと類似した構造を有する因子として FLRG(follistatin-related gene, Oncogene, 1998)が同定された。フォリスタチンファミリー分子とアクチビンとの結合/非結合のバランスは細胞の分化増殖, そして組織の

修復機構に重要であると考えられている。そこで, 我々は脳組織における FLRG の機能解析を行なうため, 培養神経細胞, アストログリアにおける FLRG 遺伝子およびタンパク質の発現を詳細に解析した。また脳障害モデルを作製し, FLRG の発現様式を検索した。その結果, FLRG は TGF $\beta$ 1 依存性にアストログリアから分泌され, さらに脳障害モデルにおいて FLRG 遺伝子の発現が誘導され, 肥大化したアストログリアに局在することが分かった。

### (14) けいれん重積発作後のミクログリア活性化と神経新生の経時的変化

久村隆二, 萩原英雄 (藤田保健衛生大学 総合医科学研究所 難病治療共同研究部門/名古屋大学大学院 農学部)

中野紀和男 (名古屋大学大学院 農学部)

田中謙二 (藤田保健衛生大学 総合医科学研究所 難病治療共同研究部門/慶應義塾大 医学部)

澤田 誠 (藤田保健衛生大学 総合医科学研究所 難病治療共同研究部門)

けいれん刺激によって海馬歯状回や側脳室脳室帯において細胞新生が増加することが報告されている。本研究では, nestin プロモータ依存性に EGFP を発現するトランスジェニックマウス(nestin-EGFP mouse) 8 週齢を用い, けいれん刺激前後における海馬歯状回の EGFP 陽性細胞数と BrdU 陽性細胞数および, GFAP, Vimentin, F4/80 陽性細胞数の変化を調べた。けいれん刺激は, ピロカルピン(muscarinic acetylcholine receptor agonist)の腹腔内単回投与し, けいれん重積発作を示したものについて解析を行った。けいれん刺激 4 日後では対照に比べて EGFP

陽性細胞数, BrdU 陽性細胞数に有意な差は見られなかったが, 7 日後ではいずれも有意に増加した。一方, GFAP, Vimentin 陽性細胞数にはけいれん刺激による変化はみられなかったが, 活性化ミクログリアのマーカーである F4/80 は刺激後 1 日から強い染色像を示し, これが刺激後 7 日まで持続した。以上のことから, ミクログリアはけいれん刺激後早期から活性化し, けいれん刺激後の細胞新生に対して何らかの役割を担っていることが予想された。

## 9. 神経科学の新しい解析法とその応用

2002年11月14日-11月15日

代表・世話人：東田陽博（金沢大学大学院 医学研究科）

所内対応者：池中一裕

(1) RNAiによる神経発生関連遺伝子の探索-2

東田陽博（金沢大学大学院 医学研究科 脳細胞遺伝子）

(2) 遺伝学を用いた神経細胞死実行機構の解析

三浦正幸（理化学研究所能化学総合研究センター細胞修復機構）

(3) 脳内糖鎖の網羅的解析と神経疾患

池田武史（生理学研究所 神経情報部門）

(4) 糖転移酵素のマクロアレー解析の試み

石井章寛（生理学研究所 神経情報部門）

(5) *Lymnaea* 連合学習の神経回路-平衡胞有毛細胞の光応答

飯塚 朗（東海大学 開発工学部 生物工学科）

(6) in-vitro 条件付けによる神経細胞修飾とそのメカニズム

川合 亮（東海大学 開発工学部 生物工学科）

(7) モーリス水迷路学習、海馬 LTP と海馬脂肪酸分析の相互相関

小谷 進（東海大学大学院 医学研究科）

(8) 成熟ニューロンにおける NDMA 型グルタミン酸受容体の発現制御とシナプス形成

清末和之（産業技術総合研究所 人間系特別研究体）

(9) アストロサイトからの自発的 ATP 放出によるシグナル伝達調節

小泉修一（国立医薬品食品衛生研究所）

(10) 細胞位置自動検出法の開発とそのカルシウムイメージングへの応用

須々木仁一（東京薬科大学 生命科学部 生体高次機能学）

(11) 開口分泌機構の時空的解析

熊倉鴻之助（上智大学 生命科学研究所 神経化学部門）

(12) PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> マイクロドメインと分泌小胞野開口放出部

青柳共太（東京大学大学院 総合文化研究科）

(13) bFGF は開口放出機構に作用し神経伝達物質放出を引き起こす

沼川忠広（産業技術総合研究所 人間系特別研究体）

(14) Muscle-spinal cord co-culture system を用いた neuromuscular transmission の解析法

田口恭治（昭和薬科大学 薬物治療学研究室）

### 【参加者名】

工藤佳久（東京薬大 生命科学）、榊原学（東海大開発工学）、三浦正幸（理研）、清末和之、松本知也（産総研）、川合亮（東海大）、高橋正身（北里大 医）、植村 慶一（慶応大 医）、熊倉鴻之助（上智大 生命研）、井上和秀、小泉修一（国立医薬品食品衛生研）、田口隆久、工藤卓（産総研）、宮本英七（熊本大）、宮武正、田口恭治（昭和薬大）、鈴木邦彦（ノースカロライナ大）、東田陽博、金 鉾、

陳小良（金沢大）、青柳共太（東大院総合）、須々木仁一（東京薬大）、小谷進、鈴木 啓之、飯塚朗（東海大）、藤森一浩、横幕大作、沼川忠広（産総研）、榎戸靖（国立精神神経センター）、岸本拓哉、根本知己（生理学研究所）、笹川展幸、村山典恵（上智大 生命研）、大倉正道、重本隆一（生理学研究所）、佐々木幸恵（総研大）

## 【概要】

近年のめざましい技術開発により能研球は、分子生物学・蛋白質化学的手法による分子レベルでの解析、光学的瘦軀鄭・電気生理学的手法を用いた脂肪レベルでの機能解析、さらにはトランスジェニック動物作成による固体レベルでの解析まで細分化が進んできた。それぞれの分野のエキスパートが共同研究することが常識となっている。しかしながら、専門分野の異なる研究者が互いの技術や知識を交換する場は意外に少ない。

本研究会では多様な角度からアプローチを専門とする研究者が会して情報交換と今後の展開を討議した。昨

年度の参加者は最新の顕微鏡を応用した新しいイメージング法、生きた固体に直接 DNA を導入する *in vivo* エレクトロポレーション法、ゲノムワイド RNAi を用いたショウジョウバエの神経関連遺伝子のスクリーニング法を紹介した。本年度はこれを用いた最新成果が紹介された。更に、それぞれ浮かび上がった問題点を提示し、これに対して異なった角度から研究を行っている研究者との意見の交換を通じたことで一層の研究発展が見込まれる。

## (1) RNAi による神経発生関連遺伝子の探索 2

東田陽博（金沢大学大学院 医学系研究科 脳細胞遺伝子）

ショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)の全遺伝子塩基配列が 2000 年 3 月に解読され、約 13,600 個の遺伝子から成ることがわかった。そのうち約半数についてはすでに同定されていたり、他の動物種でわかっている遺伝子とのホモロジー等から、それらが推測できた。しかし、残りの数多くの遺伝子について、それらの機能は不明である。ポストゲノムシーケンス時代の今、それらの機能未知遺伝子の機能を同定（アノテーション）することが最大の課題となっている。

外来遺伝子による内在性 RNA の発現抑制は、転写後遺伝子サイレンシング（PTGS）と呼ばれている。この特定遺伝子の発現阻害（RNA interference, RNAi）に 2 本鎖 RNA double stranded RNA (dsRNA) が有効であることが、植物、線虫、トリパノゾーマ、ショウジョウバエ、マウス等で報告されだし、RNAi が、生物の持つ普遍的な機構であることがわかってきた。しかも、使用する dsRNA は低濃度長時間作用し、ターゲット遺伝子に対し特異性も高いことが示され、新しい有効な手となりつつある。

従って今回この、RNAi 法を使う逆遺伝子学的手段で、遺伝子一個一個をつぶして、その効果をみてゆくという戦略で、神経ネットワーク（シナプス回路）形成に関与する遺伝子を抽出し、機能未知遺伝子の機能の同定を行うことを計画した。

具体的実験は、EST でラベルされた DNA 断片約 9,000 個の遺伝子を PCR 法により増幅し、その DNA から dsRNA を合成し、ショウジョウバエ受精初期胚に注入することにする。24℃では約 14 時間インキュベートし、胚を充分発育させた後、神経の発生分化に異常があるかないかを、神経系を染めるモノクロ抗体 22C10 で染色し、末梢及び中枢神経の構造を観察することにした。RNAi はこの 2~3 年の間に盛んに行われるようになってきたが、dsRNA を微量注入し、神経系発生に必須な遺伝子の探索を網羅的にみてゆく方法論そのものが全く新しく過去にないものなので、ここではそれら諸条件の確立をめざす基礎的実験を行ったので報告する。

## (2) 細胞死実行シグナルの分子遺伝学的研究

三浦正幸 (理化学研究所 脳科学総合研究センター 細胞修復機構)

細胞死が発生過程で厳密にプログラムされた形で観察されるという線虫を用いた細胞系譜の研究から、この現象が細胞分化と同様に遺伝的にプログラムされたメカニズムを使って行われるという認識がなされるようになった。その後、線虫の遺伝学を駆使して細胞死実行カスケードが明らかにされ、カスパーゼを中心とする進化的に保存された細胞死実行機構が明らかにされてきた。しかし、ほ乳類や他の多細胞動物での細胞死は細胞系譜で決められた線虫のような細胞死の様式をとることはむしろ例外で、多くの細胞死は周りの細胞との相互作用や外的な刺激によって決定され実行されている。そのためほ乳類での細胞死を理解するために線虫の細胞死をモデルとして利用するには限界があるのも事実である。そこで我々は、遺伝学的な研究が可能で、かつほ乳類での細胞死の特徴を備えたモデル動物としてショウジョウバエを研究に用い細胞死実行のシグナルカスケードの研究を行っている。ショウジョウバエのさまざまな組織に内在する任意の遺伝子を過剰に発現させ、その表現型をもとに目的の遺伝子をスクリーニングする方法を用いて、ショウジョウバエの複眼に任意の遺伝子を過剰に発現させ、複眼がつぶれる系統を選別するスクリーニングを行っている。細胞死が誘導されればその組織は失われると考え

られるため、この系統中には、細胞死を誘導する遺伝子を過剰に発現しているものが含まれているはずである。我々はこの大規模なスクリーニングによって、無脊椎動物では初めてのTNFファミリー遺伝子 *Eiger* (アイガー) を同定した。*Eiger* による複眼の縮小はJNK依存的・カスパーゼ非依存的な新規のシグナル経路を使っていることが明らかになった。このスクリーニングは遺伝子の過剰発現による機能獲得型のスクリーニングであるが、遺伝子機能が欠損したときの表現型をもとにおこなうスクリーニングも、細胞死制御機構を遺伝学的に理解する上で有効である。*Eiger* を複眼で発現させると複眼がつぶれるが、その表現型を回復させる染色体欠変異系統をスクリーニングすることによって、*Eiger* によって誘導される細胞死に関与する遺伝子が得られると予想される。このスクリーニングによって *Eiger* の受容体を構成する遺伝子としてTNF受容体ファミリーに属する遺伝子を同定し、*wengen* と命名した。TNFは哺乳類において様々な機能を持つサイトカインであるが近年、神経系での機能が注目されている。*Eiger* は神経系で特異的に発現しており、ショウジョウバエをモデルとして用いることによってTNFファミリーの新たな神経系での機能が明らかになると期待される。

## (3) マウス大脳皮質発達過程及び神経変性疾患におけるN結合型糖蛋白質糖鎖発現の系統的解析

池田武史, 藤本一朗, 石井章寛, 池田一裕 (生理学研究部 神経情報部門)

中北慎一, 長谷純宏 (大阪大学 理学部 化学教室)

高橋 均, 辻 省次 (新潟大学 脳研究所)

細胞表面の大部分は密に糖鎖に覆われており、細胞接着・細胞認識等の細胞間相互作用に重要な役割を果たしていると考えられている。一方で糖鎖は細胞内においては糖蛋白質の品質管理に関与していることが明らかとなっている。近年N結合型糖鎖生合成系に関係する様々な酵素の遺伝子欠損マウスが作製され、N結合型糖鎖が脳の正常な発生に必須であること、ヒト遺伝病との関連があることが明らかとされてきた。一方我々はこれまで

HPLCを用いたN結合型糖蛋白質糖鎖の系統だった解析法を開発し、組織全体における糖鎖発現パターンの解析を進めてきた。特定の糖蛋白質に付加するN結合型糖鎖の構造は不均一であるにも関わらず、脳内の糖鎖発現パターンを時期及び領域を限局して解析を行うと個体差なく極めて良い一致を示した。このことから糖鎖発現は組織全体で厳密に制御されており、一定の糖鎖発現が正常な脳機能発現に必須であることが示唆された。脳内では

他の臓器と比較し、非常に多様かつ特徴的な糖鎖構造が発現していることが知られている。脳の構築には非常に高度な細胞間相互作用を必要とすることから、これら多様な構造をもつ N-結合型糖鎖が重要な情報分子としてその一翼を担っていると考えられる。脳形成過程における糖鎖発現の変動はどのような生理的意義をもつのか、また脳における糖鎖発現の恒常性が崩れた時にどのような疾患となって現れるのか非常に興味深い。

そこで我々は脳形成過程のモデルとしてマウス大脳皮質に着目し、組織全体の糖鎖発現パターンを構造レベルで詳細に検討を行った。また糖鎖発現の異常が疾患を引き起こす可能性に関して、アルツハイマー病 (AD)、皮質基底核変性症 (CBD)、多系統萎縮症 (MSA) の各種神経変

性疾患に着目し糖鎖解析を行った。

マウス大脳皮質発達過程において、胎生初期にはあまり脳に特徴的な糖鎖構造は認められないが、それらは段階的に発現が開始し、次第に多様かつ脳特徴的な糖鎖発現パターンを形成することが観察された。このことからこれら多様な糖鎖構造は発達過程ではなく、むしろ脳形成後の正常な機能維持に関与している可能性があると考えられる。一方で中枢神経変性疾患である AD 及び MSA において Tau や Synuclein 陽性構造物の沈着がなく、組織学的に正常と思われる領域でも糖鎖異常が見出せた。したがって我々は糖鎖発現の異常が神経変性疾患を引き起こす原因となる可能性を示唆する結果が得られた。

#### (4) 糖転移酵素遺伝子発現のマクロアレイ解析の試み

石井章寛, 藤本一朗, 池田武史, 佐久間圭一朗, 出口章広, 池田一裕 (生理学研究所 神経情報部門)

これまでの糖鎖研究は主に生化学および細胞生物学手法を用いて行われ、糖鎖が (1)細胞間相互作用や外来性刺激の認識分子として機能する事, (2)個体の発生・分化, 組織形成とその維持などに必要である事, (3)糖蛋白質の品質管理に機能している事が明らかになった。

糖鎖の生合成経路に関与する糖転移酵素群は多岐にわたり、個々の遺伝子を制御することは非常に困難であると考えられた。しかし、糖鎖構造は組織の部位と時期を限局すると個体差なく非常に厳密に保存されている事、人為的に糖鎖合成系を操作すると生合成系そのものが破綻する事、細胞分化、癌化に伴い劇的に変化する事、初期発生時には糖鎖構造は劇的に変化する事、組織により糖鎖構造は異なり、組織特異的な構造がある事などから糖鎖合成遺伝子の発現と制御機構は非常に緻密かつ複雑である事が推察される。

以上の事から、遺伝子発現と制御機構を明らかにする事は、脳の発生段階で時期および部位特異的に出現する糖鎖の意義を解明する上でも非常に重要である。そこで糖転移酵素遺伝子群の発現変化と制御機構を網羅的に解析する系 -糖転移酵素遺伝子のマクロアレイ- を完成

させ、その実用性を検討した。

GeneBank に登録されている糖鎖合成酵素の 137 遺伝子に対するプライマー対を作製し RT-PCR, TA クローニング法でベクターに組み込んだ。現在 109 遺伝子をクローニング済みである。cDNA マクロアレイ法の条件検討としてはプローブの長さ、ハイブリダイゼーションの反応液・温度、wash 等を行い、至適条件を決定した。この解析系を用いて肝臓、腎臓、胎生 12 日および成体マウス全脳の糖鎖合成系酵素遺伝子の発現を解析した。その結果、糖鎖構造と糖転移酵素遺伝子の発現には相関がある事が判明した。

このように遺伝子群の発現変化を系統的に解析することにより、各種臓器において時期特異的あるいは部位特異的に発現する糖鎖を見だし、細胞移動、機能および細胞種を決定する新たな因子を見つけられる可能性は大きく、発生・分化および形態形成の機構解明につながると考えられる。さらに各種臓器の病態時における糖合成酵素の発現変移と糖鎖パターンを把握することは、疾患と糖鎖発現の相関を明らかにするうえで非常に重要であると考えている。

## (5) *Lymnaea* 連合学習の神経回路—平衡胞有毛細胞の光応答

飯塚 朗, 榎原 学 (東海大学 開発工学部 生物工学部)

軟体動物腹足類のヨーロッパモノアラガイ (*Lymnaea stagnalis*) は光と振動刺激を、それぞれ条件刺激、無条件刺激として連合学習が可能で、(Sakakibara et al.1998)、そのための発達段階、条件刺激に関し最適な条件も明らかにされている (Ono et al.2002)。しかし、この光と振動による連合学習に関与する神経回路は不明で、そのメカニズムもわかっていない。今回、この連合学習に関与する神経回路の同定を試みた。光を受容する視細胞は一對の眼に存在する視細胞と皮膚に存在する光受容細胞があることが知られているが、眼を物理的に破壊すると連合学習が成立しないことから眼からの条件刺激入力が必要で、一方振動刺激は平衡胞有毛細胞により受容される。

そこで学習前のモノアラガイから眼と平衡胞を維持した状態の中樞神経節を摘出し、光の照射による視細胞、平衡胞有毛細胞の電位変化をそれぞれ細胞内記録法により観察した。また、それぞれの細胞へ 0.5Hz, 1nA で電気泳動的に蛍光色素を注入し、それぞれの神経走行を光学顕微鏡下で観察した。その結果、視神経束の近くに分

布する視細胞は軸索を脳神経節へ伸ばし、そこで広がりを持った終末を形成していた。視細胞の 1 種類では静止膜電位  $-62.5 \pm 12 \text{ mV}$  ( $n=12$ ) で、1 秒間の刺激光に対して脱分極応答するが明瞭な off 応答を伴わず、数十秒かけて静止膜電位に復帰した。一方有毛細胞は平衡胞における位置にかかわらず一本の神経束となり、直接脳神経節に入り、視細胞終末とほぼ同じ位置に終末を形成していた。平衡胞有毛細胞の静止電位は  $-56 \pm 10 \text{ mV}$  ( $n=22$ ) で、吻側有毛細胞では光刺激に対して、平衡電位が正の脱分極応答を示した。この光照射によって引き起こされる EPSP は、眼を破壊することにより不可逆的に消失し、また、外液の  $\text{Ca}^{2+}$  イオンを除去した場合、可逆的に消失した。このことから有毛細胞の光応答は、化学シナプスを介した視細胞からの入力を受け、モノあるいはポリシナプティックに連絡することが示された。さらに平衡胞有毛細胞光応答が体现することは、有毛細胞で連合学習情報の最初の統合が起こることを示唆し、同じ軟体動物腹足類のウミウシの連合学習機構とは異なると考えられた。

## (6) in-vitro 条件付けによる神経細胞修飾とそのメカニズム

川合 亮 (東海大学 開発工学部 生物工学科)

海産軟体動物エムラミノウミウシ (以下ウミウシ) は学習・記憶のモデル動物として使用されてきた。ウミウシは走光性を有し、また振動刺激に対して足の筋肉を収縮させる。そこで光を条件刺激、振動を無条件刺激として訓練を行うと走光性の減退が生じる。学習を獲得した動物で生じる細胞特性の変化は主に B 型視細胞で報告され、生理学的には膜抵抗値の増大に代表される興奮性の増大があり、形態学的にはシナプス結合が存在すると考えられている細胞終末部の矮小化がある。これらの細胞特性の変化は、神経節と感覚器 (眼および平衡胞) から成る単離脳標本に光刺激と振動刺激を与えても生じ、これを単離脳条件付けと呼ぶ。単離脳条件付けによる実験系は、これまで生理学的特性変化の機構について示唆を与えてきたが、細胞終末部の形態変化に関わる機構は不

明であった。

昨年度の報告において、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  放出に関与しているリアノジンレセプタのアンタゴニスト Dantrolene の投与後に単離脳条件付けを行うと B 型視細胞の形態変化が生じないことを報告したが、本報告では Dantrolene の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇への影響と単離脳条件付けに伴う軸索末端部形態変化への  $\text{Ca}^{2+}$  キレータの効果について検討した。さらに、膜抵抗値と軸索末端部形態変化の経時観察を試みた。

カルシウム指示薬 Oregon Green 488 BAPTA-1 による  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングを試みたところ、膜電位を  $-60 \text{ mV}$  から  $0 \text{ mV}$  への脱分に対し、対照実験群では刺激前に比べ約 50% 蛍光強度が増加したが、Dantrolene 投与群では 20% の蛍光強度変化にとどまった。一方、 $\text{Ca}^{2+}$  キレータ

BAPTA を細胞内へ注入した後、単離脳条件付けを行うと細胞末端部の収縮は観察できなかった。

膜抵抗値と軸索末端部の形態変化を経時観察したところ、光刺激と振動刺激を重ねるように与えた群の膜抵抗値は条件付け 1 分後に増大したが、軸索末端部の形態変化は条件付け 5 分後から観察された。光刺激と振動刺

激を重ねないように呈示した群では膜抵抗値ならびに軸索末端部の形態変化は観察できなかった。

以上の結果は、生理学的特性と形態学的特性の変化はともに細胞内カルシウム濃度上昇を必要とするが、生理学的特性に比べ形態変化はより遅い反応過程であることを示唆している。

## (7) モーリス水迷路学習、海馬 LTP と海馬脂肪酸分析の相互相関

小谷 進（東海大学大学院 医学研究科）

藤田知宏，榊原 学（東海大学 開発工学部）

秋元健吾，河島 洋，小野佳子，木曾良信（サントリー(株) 健康科学研究所）

岡市廣成（同志社大学 文学部）

老齢ラットでは空間記憶能力と海馬でのシナプス可塑性長期増強(LTP)が若齢ラットと比べて低下することが知られている。さらに老齢ラットでは必須不飽和脂肪酸の一つであるアラキドン酸の脳組織内の量が低下するといわれている。そこで、それらの改善を目的として、老齢ラットにアラキドン酸を積極的に食餌により摂取することで、モーリス水迷路学習、海馬急性切片による LTP について対照食で飼育し老齢ラットと比較したところ、両実験ともアラキドン酸を摂取した老齢群で改善が認められた。LTP については、アラキドン酸摂取群で若齢群と同程度の増強度を示したことを昨年の研究会で報告している。

今回、水迷路学習の成績と LTP 増強度、LTP 増強度と

海馬脂肪酸量のそれぞれの相互相関について比較した。水迷路学習成績（逃避潜時、Hit%，プローブテスト）と LTP 増強度の相関では、逃避潜時-LTP に負の相関が、Hit%-LTP，プローブテスト-LTP に正の相関が見られ、中でも Hit%-LTP の相関が高いという特徴があった。更に、LTP 増強度と海馬脂肪酸組成（AA，PC，PE，PI，PS）の相関では、いずれも正の相関が見られ、そのうち LTP-PI の相関がもっとも高かった。これは海馬中でのアラキドン酸がリン脂質に占める PI（ホスファチジルイノシトール）の割合が最も高いことと一致していた。

これらは海馬内の脂肪酸が加齢により減少するが、これをアラキドン酸補助食摂取が防止することを示唆し、なかでも PI が水迷路学習と LTP に関することを示した。

## (8) 成熟ニューロンにおける NMDA 型グルタミン酸受容体の発現制御とシナプス形成

清末和之，中山貴美子，田口隆久

（産業技術総合研究所 人間系特別研究体ニューロニクス研究グループ）

高度高齢化社会を迎えた中、健全な生活を送るための神経系の機能維持や機能回復の技術の確立は社会的要求の高い課題である。我々は、神経回路の再接続の分子メカニズムを理解することを基盤研究として、これらの課題に取り組んでいる。

NMDA 型グルタミン酸受容体分子は、神経回路網の形成やシナプス可塑性において重要な役割を持つ分子と

考えられおり、NR1 と NR2A-D からなるヘテロオリゴマーである。特に NR2B サブユニットはその発現の時期特異性から、発生時の回路形成に重要であると考えられている。しかしながら、いったん成熟した回路における再編成の機構の可能性については不明な点が多い。この問題に取り組むため、解離培養系において NR2B のサブユニットの発現とシナプス結合について、電気生理学的、免

疫組織化学的検討を行った。

我々の用いた解離培養系においても, NMDA 受容体分子の発生依存性は再現でき, 培養日数に依存して, NR2B を含む受容体分子の発現が低下することを確かめた。さらに詳細な解析により NR2B を含む受容体分子の発現は単純に培養日数に依存するのではなく, その細胞の発火頻度に相関があることが明らかになった。また, それに対応して, 発現は細胞の活動を抑制することにより, NR2B の発現の低下が抑制されることも明らかにした。

成熟した神経細胞として, 培養日数 20 日以降の海馬培養細胞をもちいた。この培養細胞においては, NR2B の発現は十分に低下しているので, これらの細胞をモデルとした。2 日間のテトロドトキシン (TTX) の処理により, 細胞体における NMDA 電流において NR2B を含む NMDA 受容体の再発現が確認された。既存のシナプス伝達への寄与をみるため, AMPA 受容体を含む微小シナプス電流 (minis) を測定したが, NR2B 成分は増加し

ていなかった。しかしながら, 膜電流は増加しており, これが ifenprodil, およびボツリヌス毒素により阻害されることから, 小胞依存的に放出されて NR2B を含む NMDA 受容体を活性化していることが明らかになった。さらに免疫組織化学的手法により, 細胞表面に存在する NR2B サブユニットはシナプスフィジンの直下には無いことが確認された。これらのことは, 増加した NR2B を含む NMDA 受容体が既存のシナプスではなく, 既存のシナプスの横に増えて, サイレントシナプスとして機能していることを示唆している。このことを確認するために, Dual Whole cell recordings を行い, 細胞間のシナプス結合を調べた。隣り合った細胞から記録したところ, サイレントシナプス結合が増えていることが確認された。これらの結果は, 成熟した神経細胞においても, 活動抑制により NR2B が増え, サイレントシナプスの形成が起きていることを示している。

## (9) アストロサイトからの自発的 ATP 放出によるシグナル伝達調節

小泉修一 (国立医薬品食品衛生研究所 薬理部)

井上和秀 (国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部, 九州大学大学院 薬学研究院 化学療法分子制御学)

ATP 受容体の分子の実体・組織分布が明らかとなり, その広範な組織分布と多様な ATP 応答から, ATP は実に多くの生理機能と関連していると考えられている。また様々な生理学的・薬理学的実験により, ATP が中枢および末梢で神経伝達物質として機能していることは, もはや疑いのない事実であるといえる。昨年の本研究会で, ①ATP が機械刺激に応答して海馬アストロサイトから放出されること, またこのアストロサイト由来 ATP が, ②アストロサイト間  $\text{Ca}^{2+}$  wave 伝播を形成し, ③さらに近傍神経細胞のグルタミン酸による興奮性シナプス伝達をもダイナミックに制御していることを報告し, ATP を介する神経-グリア細胞間 “tripartite synapse (pre-, post- 及び astrocyte が作る peri-synapse) 仮説” を提唱した。つまり興奮性シナプス伝達によってシナプス間隙から漏れ出た神経伝達物質が, 周辺アストロサイトに作用し ATP を放出させ, これが神経細胞にフィードバック様制御をかける, という作業仮説である。実際, グルタミン酸はアス

トロサイトから ATP 放出を引き起こす。この仮説では, 神経細胞の活動が一連の応答の引き金となると考えられているが, ラット神経-グリア共培養細胞に tetrodotoxin を処理し神経間連絡を遮断した場合でも, アストロサイトの  $\text{Ca}^{2+}$  wave 伝播は観察された。さらに精製したアストロサイトのみの培養系でも自発的な  $\text{Ca}^{2+}$  wave は観察された。これら自発的  $\text{Ca}^{2+}$  wave 伝播の多くは apyrase 及び suramin で消失した。従ってアストロサイトは神経活動に依存しない, 自発的 ATP 放出機構をも有していることが示唆された。Apyrase は神経-グリア共培養細胞における自発的興奮性シナプス伝達を増強したことから, 自発的に放出される ATP は常にシナプス伝達を抑制的に制御していることが示唆された。以上, アストロサイトは自発的 ATP 放出により, シナプス伝達を恒常的に制御していることが示され, アストロサイトのより積極的・ダイナミックなシナプス伝達制御への関与が示唆された。

## (10) 細胞位置自動検出法の開発とそのカルシウムイメージングへの応用

須々木仁一, 工藤佳久, 森田光洋 (東京薬科大学 生命科学部 生体高次機能学)

カルシウムイメージングを行う際、画像に含まれる細胞を網羅的に解析する目的で、核を選択的に染色する方法、および画像から核の位置を同定するソフトウェアを開発した。Fura2AMによるカルシウムイメージングにおいて、密集した細胞に色素が均一に負荷された場合、個々の細胞を同定することは困難である。細胞集団のカルシウム応答を客観的かつ容易に検討する目的で、細胞の位置を検出し、そのカルシウム動態を自動的に出力、解析する手法を開発した。様々な色素を検討した結果、Fura2によるカルシウムイメージングの後、その蛍光と重複せずに核を視覚化するにはアクリジンオレンジを用いることが優れていた。アクリジンオレンジは核酸に結合して蛍光を発するが、DNAに結合した際の蛍光波長がRNAに結合した場合と異なる。カルシウムイメージ

ング後にアクリジンオレンジを還流して染色し、さらに紫外線を照射することにより顕著な核染色画像が得られた。この画像を解析し、核の位置情報を特定するとともに、この位置におけるカルシウム応答を出力させるソフトウェアを作成した。また、カルシウムイメージングの画像を同様に解析してカルシウム応答が顕著に見られた位置と核の位置を比較するとともに、カルシウム応答の波形解析をあわせて行った。今回、これらの方法を用いて培養アストロサイトのグルタミン酸刺激に対するカルシウム振動を解析し、頻度と振幅のグルタミン酸濃度依存性を定量的に検討した。その結果、頻度はグルタミン酸30 $\mu$ Mで最大になり300 $\mu$ M以上では減少して一過性の反応に近づき、振幅は30 $\mu$ Mで最大となりそれ以上の濃度では変化しないことが明らかになった。

## (11) 開口分泌機構の時空的解析

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

クロマフィン細胞の開口分泌は開口部位への分泌顆粒供給過程とカルシウムイオン依存性膜融合過程の2つの過程から構成されていると考えられている。我々は、開口分泌の時空的調節機構をより詳細に解析するために、アンペロメトリー法による単一細胞からの開口現象の記録解析、及び蛍光ラベルした分泌顆粒運動の実画像解析を行い比較検討を行っている。

アンペロメトリー法では、微小炭素繊維電極を用いて1個の顆粒の開口現象を1つのスパイクとして検出し、高カリウム刺激による分泌スパイクの出現頻度と波形、キネティックパラメータによる分泌動態を解析した。我々は、PKCが分泌顆粒の供給を調節することを既に報告しているのでこの点を解析すると、PKC活性化により開口分泌頻度が有意に増加した。特に持続刺激の2~5分における分泌増強の程度が大きかった。また、アクチン-ミオシン相互作用を介した分泌顆粒の供給について解析した結果、アクチン-ミオシン相互作用に対して阻害作用を持つミカロライドB、ボルトマニンの処理によ

り、濃度依存的にスパイクの出現頻度や顆粒の動きが減少したことから、アクチン-ミオシン相互作用による顆粒の開口部位への移動、供給が示唆された。

実画像解析法では、LysoTrackerGreenDND-26でラベルした顆粒を、冷却型CCDカメラを用いて追跡し、高カリウム刺激後0~2、及び2~4分後の各2分間における顆粒の運動距離と速度について解析した。その結果、顆粒の運動距離と速度に観察されたPKC活性化及びミカロライドB、ボルトマニンの影響は、アンペロメトリー法による解析結果と良く整合した。

実画像解析法では顆粒の動きと開口分泌像の両方が見られる映像は得られなかったことから、測定時の焦点を細胞内から細胞表面にシフトしたところ、開口分泌の瞬間と思われる、顆粒の動きがない蛍光強度の変化のみの画像が取得できた。この結果から、開口分泌を起こす顆粒の位置と、分泌後供給によって補充される顆粒の位置には明らかな深度差があるということ、ならびに、他の分泌細胞で報告されているように開口分泌する顆粒

は、あらかじめ形質膜にドッキングしていることが明らかになった。さらに、高カリウム刺激後2~12分までの顆粒運動を測定した結果、刺激後の10分間は顆粒の移動距離が静止時の約6倍に上昇しており、極めて活発な顆

粒供給が引き起こされていることが明らかとなった。

以上のように、我々が現在進めている解析法は、開口分泌の時空調節機構の研究に大変有効な手段であると考えられる。

## (12) PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> マイクロドメインと分泌小胞の開口放出部

青柳共太 (東京大学大学院 総合文化研究科)

山本清二, 寺川進 (浜松医科大学 光量子医学研究センター)

高橋正身 (北里大学 代謝 蛋白質学)

神経伝達物質はシナプス小胞に貯蔵され、開口放出機構によってシナプス間隙に放出される。開口放出過程において、PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> (PIP<sub>2</sub>) はシナプス小胞の細胞膜へのドッキングやそれに続くプライミング過程などに重要な役割を果たしていると考えられているがその詳細は未だ明らかではない。

我々は開口放出における PIP<sub>2</sub> の役割を明らかにするために、ラット副腎髄質細胞腫由来の株化細胞である PC12 細胞を用い、細胞膜上の PIP<sub>2</sub> の局在について検討を行った。超音波破碎法により細胞質面を露出させた細胞膜を PC12 細胞から調製し、抗 PIP<sub>2</sub> 抗体を用いて染色を行うと PIP<sub>2</sub> はクラスター状の局在を示した。PIP<sub>2</sub> に高

親和性で結合する局在指示タンパク質である PLCδ の PH ドメインと GFP との融合タンパク質 (PH-GFP) を一過的に発現させた PC12 細胞を全反射型近接場蛍光顕微鏡 (Evanescent 顕微鏡) で観察した場合にも同様のクラスター状構造が認められた。カテコールアミンを含む分泌小胞内に局在するヒト成長因子と GFP の融合タンパク質 (hGH-GFP) を発現させた PC12 細胞の細胞膜において、hGH-GFP シグナルの 50% 以上が抗 PIP<sub>2</sub> 抗体で見いだされるクラスター状構造と共存しているか、ごく近傍に見いだされた。これらの結果より PIP<sub>2</sub> のマイクロドメインが開口放出に重要な役割を果たしていると考えられる。

## (13) bFGF は MAPK 経路の活性化を介して神経伝達物質放出を引き起こす。

沼川忠広, 横幕大作

(大阪大学 蛋白質研究所生合成, 産業技術総合研究所関西センター 人間系ニューロニクス RG)

沼川裕美子, 畠中寛 (大阪大学 蛋白質研究所生合成)

田口隆久 (産業技術総合研究所関西センター 人間系ニューロニクス RG)

ニューロトロフィン、特にBDNF (brain-derived neurotrophic factor) などの神経栄養因子はシナプス可塑性に重要であり、神経伝達機能への影響に関して多くの報告がある。我々も既に、BDNF が培養中枢ニューロンより急速に興奮性の神経伝達物質グルタミン酸を放出させることを報告した(Numakawa et al., (2001) J. Neurosci. Res. **66**, 96-108; Numakawa et al., (2002) J. Biol. Chem. **277**, 6520-6529)。そのメカニズムは通常の開口放出機構とは異なり、グルタミン酸トランスポーターが関与している

可能性があった。また、細胞内シグナルとして PLC-γ 経路が重要であった。しかし、他の栄養因子の神経伝達機能への影響について詳しい解析はなされていない。今回、bFGF(Basic Fibroblast Growth Factor)が培養大脳皮質ニューロンにおいて、グルタミン酸放出を引き起こし、開口放出機構が重要である可能性があることを報告する(Numakawa et al., (2002) J Biol Chem. **277**:28861-28869)。bFGF を短時間 (1 分) 投与すると培養ニューロンよりグルタミン酸放出が引き起こされる。様々な薬理学的実験

の結果、この放出は細胞外 Ca が重要であることがわかった。開口放出阻害剤テタヌス毒素処理により、bFGF によるグルタミン酸放出は完全に抑制された。また、Na 感受性色素 SBFI を用いた実験では bFGF は顕著な Na 流入を引き起こし、膜電位を脱分極させる可能性があるこ

とがわかった。以上の結果は、bFGF が開口放出機構に作用し、短期での神経伝達物質放出を引き起こす可能性を示している。さらに MAPK 経路特異的阻害剤 U0126 存在下では bFGF によるグルタミン酸放出が見られなくなることから、MAPK 経路の重要性が示唆される。

#### (14) Muscle-spinal cord co-culture system を用いた neuromuscular transmission の解析法

田口恭治, 宮武 正 (昭和薬科大学 薬物治療学研究室)

【目的】急性運動麻痺を生じる末梢性ニューロパチーや myasthenic syndrome の病態を明らかにするためには、神経・筋接合部における neuromuscular transmission の解析が重要である。今回、ラット培養筋細胞と脊髄運動ニューロンとでシナプスを形成させた muscle-spinal cord co-culture system を作成し、カルシウムチャネルを解析し、運動麻痺を呈する患者血清の影響を検討した。

【実験方法】ラット培養神経・筋接合部モデルは胎児ラットから採取して培養した筋細胞の上に胎児脊髄を置き、67% DMEM, 23% medium 199, 10% fetal calf serum の中で1週間培養した。神経・筋接合部モデルの自発性筋活動電位は3 M KCl を満たした微小ガラス管電極を筋細胞に挿入し、測定した。

【実験結果・考察】1. 自発性筋活動電位に対するカルシウムチャネル拮抗薬の影響

L 型カルシウムチャネル拮抗薬の nicardipine (50, 100 nM), calcicludine (50 nM) 投与により自発性筋活動電位を軽度抑制した。N 型カルシウムチャネル拮抗薬  $\omega$ -conotoxin (30, 50 nM) で抑制作用が認められたが、P/Q 型カルシウムチャネル拮抗薬  $\omega$ -agatoxin は 10, 30 nM の低濃度で抑制作用を示した。一方、R 型カルシウムチャネル拮抗薬の SNX-482 (100 nM) は抑制作用を認めなかった。これらの結果から、ラット培養神経・筋接合部モデルでの神経伝達機構に N 型、P/Q 型のカルシウムチャネルが関与していることが示唆された。

#### 2. 自発性筋活動電位に対する患者血清の影響

正常人血清 (10  $\mu$ l/ml) は自発性筋活動電位には影響を与えなかったが、重症筋無力症患者血清 (10  $\mu$ l/ml) は著明な抑制作用を示した。一方、筋萎縮性側索硬化症患者血清 (10  $\mu$ l/ml) では影響を認めなかった。

## 10. ATP 受容体の生理機能の解明

2002年8月29日8月-30日

代表・世話人：井上和秀（国立医薬品食品衛生研究所）

所内対応者：井本敬二

(1) 基調講演：グリア細胞とATP

高坂新一（国立精神 神経センター神経研究所 代謝研究部）

(2) ミクログリアのTNF産生誘導におけるATP受容体サブタイプの役割とシグナル制御

鈴木智久, 井戸克俊, 秀 和泉, 仲田義啓（広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 薬効解析）

(3) ATPによるグリア細胞でのケモカイン産生誘導

南 雅文, 中村美香, 片山貴博, 伊藤美聖, 佐藤公道（京都大学 薬学研究科 生体機能解析学分野）

(4) ミクログリア P2Y6 受容体の薬理学的解析

重本（最上）由香里<sup>1</sup>, 小泉修一<sup>1</sup>, 溝腰朗人<sup>1,2</sup>, 檜楨大介<sup>1,2</sup>, 井上和秀<sup>2</sup>  
（<sup>1</sup>国立医薬品食品衛生研究所 薬理, <sup>2</sup>九大院 分子制御）

(5) 小腸絨毛上皮下線維芽細胞の機械受容とATP

古家喜四夫<sup>1</sup>, 古家園子<sup>2</sup>, 曾我部正博<sup>1,3</sup>

（<sup>1</sup>科学技術振興事業代 細胞力覚, <sup>2</sup>生理学研究所 形態情報解析, <sup>3</sup>名古屋大学 医学 生理）

(6) グリオーマ細胞からの細胞膨張性グルタミン酸放出と細胞外ATPによる制御

挾間章博（統合バイオサイエンスセンター）

(7) ATP刺激で引起される知覚神経終末シュワン細胞のカルシウム波

岩永ひろみ<sup>1</sup>, 葉原芳昭<sup>2</sup>（<sup>1</sup>北海道大学大学院 医学研究科 生体機能構造学  
<sup>2</sup>北海道大学大学院 獣医学研究科 比較形態機能学）

(8) アストロサイトからの自発的ATP放出とシグナル伝達制御

小泉修一<sup>1</sup>, 藤下加代子<sup>1,2</sup>, 井上和秀<sup>1,2</sup>

（<sup>1</sup>国立医薬品食品衛生研究所 薬理, <sup>2</sup>九州大学大学院 薬 分子制御）

(9) HEK293細胞に発現させたecto-ATPaseおよびecto-apyraseの性質と

P2受容体シグナリングにおよぼす影響

松岡 功, 熊坂忠則, 木村純子（福島県立医科大学 医学部 薬理学講座）

(10) ラット脳におけるアデニン結合サイトの解析

渡辺 俊<sup>1,2</sup>, 池北雅彦<sup>2</sup>, 中田裕康<sup>1</sup>

（<sup>1</sup>都神経研 生体機能分子, <sup>2</sup>東京理科大 理工 応用生物科学）

(11) 孤束核ネットワーク情報処理とP2X受容体

繁富英治, 加藤総夫

（東京慈恵会医科大学 総合医科学研究センター 神経科学研究部 神経生理学研究室）

(12) ATP受容体による脂肪細胞のmembrane ruffling

尾松万里子, 松浦 博（滋賀医大 第二生理）

(13) PC12細胞のATP産生能に及ぼすアデニン化合物の影響

藤森廣幸, 芳生秀光（摂南大学 薬学部 衛生分析化学研究室）

(14) ラット脳スライス標本からのATP放出反応の性質

小野委成, 松岡 功, 木村純子（福島県立医科大学 医学部 薬理学講座）

- (15) ヒト表皮ケラチノサイトの内在性 ATP 誘発細胞間  $\text{Ca}^{2+}$  wave 伝播の解析  
藤下加代子<sup>1,2</sup>, 小泉修一<sup>1</sup>, 最上由香里<sup>1</sup>, 井上かおり<sup>3</sup>, 小濱とも子<sup>1</sup>, 井上和秀<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup> 国立医薬品食品衛生研究所 薬理, <sup>2</sup> 九州大学大学院 薬理 分子制御, <sup>3</sup> 資生堂 Research Center)
- (16) Angiotensin II による ATP 放出へのイノシトール 3-リン酸系シグナルの関与  
Lou Guangyuan, 佐藤千江美, 桂木 猛 (福岡大 医 薬理)  
本多健治 (同 薬 生体機能制御)
- (17) 痛みと後根神経節細胞からのヌクレオシド, ヌクレオチド放出機構  
中谷直美<sup>1,2</sup>, 長井 薫<sup>1</sup>, 西崎知之<sup>1</sup>, 太城力良<sup>2</sup>  
(兵庫医科大学 <sup>1</sup>生理学第二講座, <sup>2</sup>麻酔科学教室)
- (18) P2Y 受容体による心筋緩除活性型遅延整流性  $\text{K}^+$ チャネル(IKs)の制御機構  
- ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 (PIP2)の関与-  
丁 維光, 豊田 太, 尾松万里子, 松浦 博 (滋賀医科大学 第二生理)
- (19) 海馬錐体細胞の興奮性におよぼす ATP の相対的影響  
川村将仁<sup>1</sup>, 田中淳一<sup>2</sup>, 加藤総夫<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup> 慈恵医大 薬理学第 1, <sup>2</sup> 総研大 院, <sup>3</sup> 慈恵医大 神経生理)
- (20) 麻酔下ウサギ迷走神経性呼吸反射におよぼす孤束核 P2X 受容体遮断の影響  
高野一夫<sup>1</sup>, 加藤総夫<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup> 慈恵医大 薬理学第 2, <sup>2</sup> 慈恵医大 総合医科研 神経生理)
- (21) 大腸癌細胞に対する ATP の細胞増殖抑制作用の検討  
西藤 勝<sup>1,2</sup>, 長井 薫<sup>1</sup>, 西崎知之<sup>1</sup>, 中川一彦<sup>2</sup>, 山村武平<sup>2</sup>  
(兵庫医科大学 <sup>1</sup>生理学第二講座, <sup>2</sup>外科学第二講座)
- (22) ラット腎メサングウム細胞における P2X<sub>7</sub>受容体活性化を介する細胞死  
原田 均, 月本光俊, 五十里 彰, 高木邦明, 祐田泰延  
(静岡県立大 薬学部 産業衛生学教室)

## 【参加者名】

井上和秀 (国立医薬品食品衛生研究所), 岩永ひろみ (北大医), 木村純子, 松岡功, 小野秀成, 熊坂忠則 (福島医大医), 田村誠司 (山之内製薬), 加藤総夫, 繁富英治, 川村将仁, 高野一夫, 津氏典子, 池田亮, 山崎弘二 (慈恵医大), 中田裕康, 渡辺俊 (東京都神経研), 池北雅彦 (東京理科大学), 小泉修一, 重本由香里, 溝腰朗人, 藤下加代子, 篠崎陽一, 多田薫, 戸崎秀俊, 檜横大介 (国立医薬品食品衛生研究所), 高坂新一, 佐々木洋 (精神神経センター神経研), 保田慎一郎 (三菱ウェルファーマ), 栗原琴二 (明海大歯), 原田均 (静岡県立薬大薬), 古家

喜四夫, F. Lopez-Redondo (科技団「細胞力覚プロジェクト」), 柴田あずみ (名大医), 富永真琴 (三重大医), 下条雅人 (ファイザー製薬), 吉岡和晃 (金沢大医), 尾松万里子, 丁維光 (滋賀医大), 井上和子 (立命館大理), 藤森廣幸 (摂南大薬), 山下勝幸 (奈良医大医), 南雅文 (京大薬), 西崎知之, 西藤勝, 中谷直美, 長井薫 (兵庫医大), 仲田義啓, 秀和泉, 鈴木智久, 井戸克俊 (広島大医総合薬学), 桂木猛, Lou Guangyuan (福岡大医), 挟間章博 (統合バイオ), 松下かおり, 佐々木幸恵, 井本敬二 (生理研)

## 【概要】

ATP 受容体はイオンチャネル型である P2X 受容体と代謝調節型 (G 蛋白共役型) である P2Y 受容体に分類され, それぞれ 7 種及び 10 種類のサブタイプがすでにクローニングされている。ATP 受容体は多種多様の組織,

細胞系に発現し, 神経伝達, 疼痛発生, 炎症反応, 細胞増殖などの重要な生理機能を担っていることが, ようやく明らかになりつつある。しかし, その受容体機能および組織分布の多様性のために, 研究者は各研究領域に分

散しており、既存の一つの学会では総合的な情報交換ができない。このような現状に鑑み、本研究会の第一の目的は、生理学、薬理学をはじめとする広範な領域から研究者を集め、相互に最新のデータと情報を交換し、研究の進展を図れるような場を提供することであり、第二に、最近特に注目されている分野に集中して議論を深めその研究を促進させることであった。研究会の内容はこ

れらの目的にかなった総合的なものとなるが、最近のホットな話題に関しては特別セッション「グリア細胞における ATP 受容体機能の解明」を設け、ミクログリアやアストロサイトでの ATP 受容体の役割、ならびにグリア細胞・ニューロン間の情報伝達分子としての ATP の役割等について議論を展開した。

## (1) 基調講演：グリア細胞と ATP

高坂新一（国立精神 神経センター神経研究所 代謝研究部）

グリア細胞は脳内において、ニューロンの約 10 倍という数が存在するにも関わらず、長年にわたりニューロンの単なる支持細胞と考えられていた。しかしこの四半世紀における研究の進展により、グリア細胞の機能が次第に明らかにされつつある。ミエリン形成細胞としてのオリゴデンドロサイトはさておき、アストロサイトの機能は多岐にわたっており、恒常性の維持、血液脳関門、物質代謝、神経栄養因子の分泌などニューロンの機能に密接したものである。また第 3 のグリア細胞であるミクログリアも脳内におけるスカベンジャー細胞としての機能に加え、免疫応答や損傷修復作用が注目されている。更に、最近になりグリア細胞に各種神経伝達物質の受容体やトランスポーターが発現していることが明らかにされたり、グルタミン酸など刺激によりアストロサイトにおいてカルシウムオシレーションが観察されるに至り、神経情報処理にもグリア細胞が関与する可能性が示唆され多くの研究者にとって注目を集めている。

我々の研究室に於いてもミクログリアが神経伝達物

質の一つ、あるいはモデュレーターと考えられている ATP に対して様々な反応を示すことを明らかにしてきた。例えば、ATP はミクログリアからのプラスミノージェン (PGn) の分泌を促進したり、ミクログリアに対する走化性を示すことが判明した。さらに ATP はミクログリアからの TNF やインターロイキン 6 (IL-6) の分泌を促進することも報告されている。このように ATP はアストロサイトのみならずミクログリアに対しても多種多様な作用を示すが、この反応の多様性は細胞に発現している ATP 受容体の種類によって一義的に調節されていることが明らかにされつつある。例えば PGn の分泌はイオンチャネル型である P2X7 によって、又、走化性は G 蛋白共役型である P2Y12 によって担われている。TNF や IL-6 の分泌に関しても、それぞれに関与する受容体が判明している。かように神経伝達物質あるいはモデュレーターである ATP はニューロンとグリア細胞との間のクロストークの主な担い手であると言っても過言ではなく、今後の研究の進展が期待される。

## (2) ミクログリアの TNF 産生誘導における ATP 受容体サブタイプの役割とシグナル制御

鈴木智久、井戸克俊、秀 和泉、仲田義啓（広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 薬効解析）

我々はこれまでに、脳ミクログリアの ATP 誘発性 TNF 産生における MAP キナーゼ (ERK および p38) の役割を検討し、ERK は TNF 遺伝子転写を、p38 は TNF 転写後の過程を制御すること、さらに P2X7 受容体は ERK ではなく p38 の活性化のみに関与することを報告してきた。一

方 JNK は ERK、p38 とともに MAP キナーゼの重要なメンバーである。この酵素は ATP によって活性化され P2X7 受容体遮断薬 Brilliant Blue G (BBG) により抑制されることから、p38 と同様 P2X7 受容体の制御を受けると考えられる。そこで、ごく最近開発された JNK 特異的阻

害薬(SP600125)を用いて ATP 誘発性 TNF 産生に対する影響を検討した。その結果, SP600125 は ATP による TNF 遊離および TNF mRNA 発現を部分的に抑制したことから, P2X7 受容体は JNK を介して TNF 遺伝子転写にも関与することが示された。

さらに, P2X7 はイオンチャネル型受容体でありながら, p38 や JNK の活性化は  $\text{Ca}^{2+}$  流入には依存しない。最近イオンチャネル型受容体とチロシンキナーゼ(PTK)の会合が報告されたことから, P2X7 受容体が PTK を介して TNF 産生を制御する可能性を検討した。PTK 阻害薬である genistein は ATP による TNF 遊離を濃度依存的に抑制し, また ATP による ERK の活性化には影響を及ぼすことなく, p38 および JNK の活性化を強く抑制した。

従って, P2X7 受容体から p38 および JNK 活性化に PTK が関与することが示された。さらに, Src ファミリー-PTK 選択的阻害薬 PP2, および Src ファミリー-PTK の制御に関わる分子シャペロン Hsp90 の特異的阻害薬 geldanamycin はいずれも TNF 遊離を抑制した。P2X7 受容体には特異的な長い C 末構造があり, 最近, この部分がイオンチャネル機能とは独立したシグナル伝達の足場となることが明らかにされつつある。さらに Hsp90 がこの C 末に会合する分子の一つであることも報告された。従って, P2X7 受容体は C 末への Hsp90/Src ファミリー-PTK の会合を介して JNK, p38 活性化を引き起こし, TNF 産生を誘導する可能性が示唆された。

### (3) ATP によるグリア細胞でのケモカイン産生誘導

南 雅文, 中村美香, 片山貴博, 伊藤美聖, 佐藤公道 (京都大学 薬学研究科 生体機能解析学分野)

脳内ケモカインの産生調節機構を明らかにするため, ラット培養グリア細胞を用いて, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) および cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 (CINC-1) の mRNA 発現および各蛋白の培養上清への遊離に対する ATP の効果を検討した。ATP 処置により, 培養アストロサイトおよびミクログリアにおいて ATP 濃度依存的な MCP-1 および CINC-1 の mRNA 発現が惹起された。また, アストロサイトにおいて MCP-1 および CINC-1 の培養上清への遊離量が, ミクログリアにおいて CINC-1 の遊離量が増加した。さらに, これら ATP により誘導されるケモカイン mRNA 発現に関与する P2 受容体のサブタイプ同定を目的として, 各種 P2 受容体アゴニストを用いて検討を行った。その結

果, 細胞種およびケモカインの種類により, 異なる組み合わせの受容体サブタイプが mRNA 発現誘導に関与している可能性が示された。

単離・培養したグリア細胞ではすでにある程度の活性化が起こっており, 無処置群においてもケモカインの産生が検出される。そこで, よりインビボに近い培養系として脳切片スライス培養系を用い, ケモカイン産生に対する ATP 受容体刺激の効果を検討した。ラット新生児脳より調製した大脳皮質-線条体を含む培養組織切片に ATP $\gamma$ S (300 $\mu$ M) を処置したところ MCP-1 の産生誘導が認められた。MCP-1 産生細胞はグリア細胞と考えられる形態を有していた。現在, 蛍光免疫二重染色により産生細胞の同定を行っているところである。

### (4) ミクログリア P2Y6 受容体の薬理的解析

重本 (最上) 由香里<sup>1</sup>, 小泉修一<sup>1</sup>, 溝腰朗人<sup>1,2</sup>, 檜楨大介<sup>1,2</sup>, 井上和秀<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup> 国立衛研 薬理, <sup>2</sup> 九大院 分子制御)

ミクログリアは脳の病態時や損傷時に活性化し神経組織の再生修復など, さまざまな役割を果たしている。この活性を制御する主要な伝達系として近年, P2 レセプ

ターが注目されている。これまでに, ミクログリアにはイオンチャネル型の P2X7 と, G-蛋白共役型の P2Y2, Y12 が存在し, ケミカルメディエーターや炎症性サイト

カインの産生, ケモタキシスの誘導を引き起こすことが報告されている。しかしながら, このほかにミクログリアに発現する P2 レセプターおよびその機能については, いまだ明らかになっていない。

本研究では, RT-PCR および, DNA チップ法を用い, ラット初代培養ミクログリアに発現している他の P2 受容体の解析を試みた。ラットミクログリアには, これまでに報告されていたレセプターに加え, P2Y6 受容体 mRNA が大量に発現していることが明らかとなった。P2Y6 は 1995 年にはじめてクローニングされた UDP を

アゴニストとする Gq/11 共役型受容体である。UDP は, 濃度依存的にミクログリアの  $\text{Ca}^{2+}$  上昇および MAPK の活性を引き起こし, これらの反応は P2Y6 antisense oligonucleotide および P2Y6 アンタゴニスト (reactive blue2) によって顕著に抑制された。以上の結果からミクログリアに機能的な P2Y6 が発現していることがはじめて示唆された。現在ミクログリアにおける P2Y6 の生理的役割について検討しているが, そのひとつとして, ミクログリアのファゴサイトーシス活性の増強が確認されたので本研究会にて報告する。

### (5) 小腸絨毛上皮下線維芽細胞の機械受容と ATP

古家喜四夫<sup>1</sup>, 古家園子<sup>2</sup>, 曾我部正博<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup> 科学技術振興事業代 細胞力覚, <sup>2</sup> 生理学研究所 形態情報解析, <sup>3</sup> 名古屋大学 医学 生理)

小腸絨毛上皮下線維芽細胞(Subepithelial Fibroblasts) は, 上皮基底層直下で互いに突起を伸ばしネットワークを形成している。この細胞系は Gap 結合および細胞外の物質を介して互いにコミュニケーションするとともに, 平滑筋や血管にも突起を伸ばしている。私たちはこの細胞の培養に成功し, この細胞がエンドセリン(ET-1,3), ATP, をはじめ, 血管作動性, 神経作動性の多様な生理活性物質に対する受容体を持つとともに, 細胞内 cAMP 濃度に応じて, 扁平な形(扁平状)から星形の形(星状)へ形態を変化させることをすでに明らかにした。これらの性質及び形態は脳のアストロサイトと, 発生の起源は異なるが, 極めてよく類似しており, 脳機能に果たすアストロサイトと同様, この細胞系は, 細胞間情報伝達を制御することにより腸の機能に関わっていると考えられる。この 1 つの細胞を細いガラスピペットで触るといった機械的刺激を与えると, ATP の放出と P2Y 受容体(P2Y1)

の活性化による細胞間  $\text{Ca}^{2+}$  波が発生した。また伸展機械刺激にも応答し, 細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇とともに強度依存的に ATP が放出されることをルシフェレース反応を用いて明らかにした。これら機械的刺激に対する応答性は, dBcAMP 処理によって扁平状から星状へと形態変化させた細胞では抑制されていた。この時, 機械刺激による ATP 放出量の減少ばかりでなく, 個々の細胞での ATP に対する反応性の低下もみられた。この星状の細胞に ET(1-10nM)を投与すると, 扁平状の形態に戻るとともに機械刺激に対する応答性も回復した。このように小腸絨毛下線維芽細胞は各種活性物質によってその形や性質を変えることにより, ネットワークの機械的性質や物質の透過性を制御していると考えられる。また, 伸展刺激による ATP 放出は, 絨毛の動きに応じるメカノセンサーとしての機能が示唆される。

### (6) グリオーマ細胞からの細胞膨張性グルタミン酸放出と細胞外 ATP による制御

挟間章博(統合バイオサイエンスセンター)

低浸透圧刺激により細胞は速やかに膨張するが, その際に種々のアミノ酸の放出が起こることは既に知られている。しかし, それらの分子の膜透過経路については,

明らかにされていない。我々は, グルタミン酸に着目して低浸透圧性膨張に伴うグルタミン酸放出経路の同定を目指している。まず, グルタミン酸脱水素酵素と NAD

に対する発色基質を用いて、 $1\mu\text{M}$ 以上の濃度のグルタミン酸をプレートリーダーを用いて容易かつ迅速に測定できるシステムを確立した。このシステムを用いて、グリオーマ細胞株 C6 からの低浸透圧性グルタミン酸放出を測定した。低浸透圧刺激 ( $200\text{mOsm}$ ) を C6 に与えると、細胞外液のグルタミン酸は刺激前の数  $\mu\text{M}$  から、 $10\mu\text{M}$ 以上にまで増大する。このグルタミン酸放出は、 $16^\circ\text{C}$ から  $36^\circ\text{C}$ までの温度変化による影響をあまり受けなかった。この結果は、グルタミン酸がトランスポーターや開口放出の経路で放出されるのではなく、チャンネルにより放出されることを示唆する。また、グルタミン酸の膜透過路の候補である  $\text{Cl}^-$ チャンネルの阻害剤を加えてもグルタミ

ン酸放出は抑制されなかった。さらに、これまで、低浸透圧性 ATP 放出を抑制することが知られている  $\text{Gd}^{3+}$ を加えてもグルタミン酸放出は抑制されなかった。また、グルタミン酸放出は ATP 受容体阻害薬である suramin,あるいはATP加水分解酵素 apyrase 投与により抑制され、さらに等浸透圧条件下で細胞外に ATP を投与しただけでグルタミン酸放出が起こることを見出した。これらの結果から、C6 より放出されるグルタミン酸は、 $\text{Cl}^-$ チャンネルでもなく ATP 透過路とも別の透過経路より細胞外に放出され、その放出に細胞外 ATP が関与することが示唆された。

## (7) ATP 刺激で引起される知覚神経終末シュワン細胞のカルシウム波

岩永ひろみ<sup>1</sup>, 葉原芳昭<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>北海道大学大学院 医学研究科 生体機能構造学,

<sup>2</sup>北海道大学大学院 獣医学研究科 比較形態機能学)

知覚神経終末のシュワン細胞は、丸い細胞体から複数の突起を異なるニューロンに向かってのばす点、これらの突起で互いにつながり合い、網をなす点で、脳のアストロサイトに似る。私たちは、ラット頬髭の知覚装置である槍型神経終末を、随伴するシュワン細胞の網工とともに膜片標本として分離し、蛍光性カルシウム指示薬を用いた画像解析を行なって、この終末シュワン細胞が、アストロサイトと同様、ATP 刺激に対し代謝型プリン受容体  $\text{P2Y}$  を介した細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の上昇を示すことを見出した。今回は、この応答が細胞内を伝播する様子を観察した。蛍光顕微鏡で 10 秒間隔で記録したカルシウム画像では、終末シュワン細胞の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度は、 $10\mu\text{M}$  から  $1\text{mM}$  の ATP 灌流刺激に反応して一過性上昇を示し、同一細胞での反応開始は、細胞体よりも、軸索終末に伴行する突起で先行する傾向がみられた。共焦点

顕微鏡による 0.5-1.0 秒間隔の記録では、 $100\mu\text{M}$  ATP で刺激した終末シュワン細胞の  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度に、しばしば、約 20 秒周期のスパイクが認められた。このカルシウム振動は、同じ細胞に由来する突起間で、波形が異なり、同期性も認められなかった。また、カルシウム波は、突起の遠位側から細胞体に向かって伝播した。これらの観察結果は、ATP 刺激による終末シュワン細胞のカルシウム振動が、異なる軸索終末に随伴する突起でそれぞれ独自に、多焦点性に生じ、それが細胞体に伝わることを示唆する。中枢神経系では、ATP に対するアストロサイトの興奮性が、細胞自身の突起形成や近接ニューロンの活動調節に関わると予測されている。末梢知覚装置の終末シュワン細胞の興奮性が、同様の意義をもつ可能性について考察する。

## (8) アストロサイトからの自発的 ATP 放出とシグナル伝達制御

小泉修一<sup>1</sup>, 藤下加代子<sup>1,2</sup>, 井上和秀<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>国立衛研薬理, <sup>2</sup>九大院 薬 分子制御)

昨年の本研究会で, astrocytes は機械刺激に応答して, ATP を放出すること, この astrocytes 由来 ATP が, ① astrocytes 間  $\text{Ca}^{2+}$  wave 伝播を形成していること, ②近傍神経細胞の興奮性シナプス伝達をダイナミックに制御していることを報告し, ATP を仲介役とした “tripartite synapse (pre-, post- 及び astrocyte が作る peri-synapse) 仮説” を提唱した。この仮説は, シナプス外に漏れた神経伝達物質が周囲の astrocytes を刺激し, astrocytes が ATP を放出し, 近傍シナプス活動にフィードバック制御をかける, というものである。しかし, ラット海馬神経グリア共培養細胞では, astrocytes は tetrodotoxin で神経活動を遮断した場合でも  $\text{Ca}^{2+}$  wave 伝播が観察され, また

astrocytes のみの培養系でも  $\text{Ca}^{2+}$  wave が観察された。またこれらの自発的  $\text{Ca}^{2+}$  wave 伝播の多くは apyrase 及び suramin で消失した。従って astrocytes は神経活動に依存しない, 自発的 ATP 放出機構を有していることが示唆された。神経グリア共培養細胞における自発的興奮性シナプス伝達は apyrase により増強された。以上, astrocytes は自発的 ATP 放出によりシナプス伝達を恒常的に制御していること, astrocytes のより積極的なシナプス伝達制御機構の存在が示唆された。さらに astrocytes からの constitutive ATP 放出が他の受容体を介する細胞内シグナル伝達に与える影響に関しても報告する。

## (9) HEK293 細胞に発現させた ecto-ATPase および ecto-apyrase の性質と P2 受容体シグナリングにおよぼす影響

松岡 功, 熊坂忠則, 木村純子 (福島県立医科大学 医学部 薬理学講座)

今日, 多くの種類の ecto-nucleotidase が同定されているが, 各酵素の ATP 分解酵素としての特性や, P2 受容体を介する反応におよぼす影響は良く知られていない。そこで, ATP 分解の活性が高く, 各組織に広範に分布している ecto-ATPase および ecto-apyrase の cDNA を HEK293 細胞に発現させ, その性質を調べた。HEK293 細胞では内因性の ATP 分解活性はほとんど見られなかった。Ecto-ATPase および ecto-apyrase を発現させた細胞は, 非常に高い ATP 分解活性を示し (ATP 100  $\mu\text{M}$  を基質とした場合,  $10^5$  細胞存在下の ATP の  $t_{1/2}$  は約 40 秒), 各々 ADP および AMP が産生された。両酵素の  $K_m$  は約 2mM と高く, 広範囲な濃度の ATP を効率良く分解すると考えられた。P2 受容体アゴニストのうち ATP の安定誘導体として用いられる  $\alpha\beta\text{MeATP}$ ,  $\beta\gamma\text{MeATP}$ , AppNHp

および ATP $\gamma\text{S}$  は両酵素によりほとんど分解されなかったが, 2MeSATP は ATP と同様に分解された。P2 受容体阻害薬として用いられるスラミン, PPADS, Cibacron blue は ecto-ATPase 活性を 30-40 % 抑制したが, ecto-apyrase に対する抑制作用は弱かった。P2 受容体の研究に用いられる色素系化合物の中ではエバンスブルーが最も強力な阻害作用を示した。また, ATP 分解阻害剤として市販されている ARL67156 は ecto-ATPase より ecto-apyrase を強く抑制した。HEK293 細胞を ATP で刺激すると内因性の P2Y 受容体を介して細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇が認められるが, ecto-ATPase や ecto-apyrase を発現させた細胞では最大応答の大きさは小さくなるものの, 用量作用曲線が左にシフトし ATP の反復刺激に対しても受容体の脱感作が生じにくいことが示唆された。

## (10) ラット脳におけるアデニン結合サイトの解析

渡辺 俊<sup>1,2</sup>, 池北雅彦<sup>2</sup>, 中田裕康<sup>1</sup> (<sup>1</sup> 都神経研 生体機能分子, <sup>2</sup> 東京理科大 理工 応用生物科学)

プリン化合物の一種であるアデニンのもつ新規な生理作用として、ラット小脳皮質プルキンエ細胞を分散培養に移した際におこる細胞死を強く抑制することを見出した(渡辺ら, 細胞生物学会, 2001, 生化学会, 2001)。この細胞死の抑制機構として、新規なアデニン受容体を介する可能性が考えられるため、今回はラット脳中におけるアデニン結合サイトの存在を<sup>[3H]</sup>アデニンをリガンドとした結合実験で明らかにすることを目的とした。ラット全脳から調整した膜画分を<sup>[3H]</sup>アデニンと反応後、ポリエチレンイミンコートされたガラスフィルターを用いて濾過により膜結合アデニンを分離し、細胞膜への<sup>[3H]</sup>アデニン結合量を測定した。また、過剰の非標識アデニンの添加により非特異的結合を算出した。その結果、ラット脳膜画分には可逆的に結合する<sup>[3H]</sup>アデニン

結合サイトが存在しており、Kd と Bmax はそれぞれ約 156nM, 16.3pmol/mg protein であった。この結合はプリン, 2,6-ジアミノプリン, 4-アミノピラゾロ[3,4-d]ピリミジンにより阻害されたが、グアニン, ヒポキサンチン, キサンチン, ウラシル, シトシン, チミン塩基をもつプリンやピリミジンによっては阻害されなかった。また、アデノシンによっても部分的に阻害を受けたが、アデノシン受容体特異的リガンドである NECA や、ヌクレオチドトランスポーター阻害剤である NBTI によっては阻害を受けなかった。一方でラット脳内分布を調べたところ、このアデニン結合サイトは脳皮質よりむしろ小脳に多く存在していた。以上のことから、ラット脳の膜画分中にアデニン塩基に特異的な可逆的結合サイトが存在することが明らかとなった。

## (11) 孤束核ネットワーク情報処理と P2X 受容体

繁富英治, 加藤総夫 (東京慈恵会医科大学 総合医科学研究センター 神経科学研究部 神経生理学研究室)

求心性自律情報の中継・統合核である孤束核は、グルタミン酸作動性ならびに GABA 作動性の小型介在ニューロン、および、コリン作動性あるいはカテコラミン作動性などの大型出力ニューロンからなる階層的ネットワークから構成されている。我々は、細胞外 ATP ( $10^{-4}$  M) が孤束核小型ニューロンへのグルタミン酸放出頻度を増加する事実を示したが (Kato & Shigetomi, J. Physiol., 2001), 孤束核ネットワークにおける細胞外 ATP の機能的意義を確定するためには、P2X 受容体活性化がグルタミン酸以外の伝達物質、特に GABA の放出にも影響を及ぼすのか否かを検証する必要がある。そのために、幼若ラット脳幹冠状断スライスの孤束核大型ニューロンから kynureic acid, strychnine および 8-cyclopentyl

-1,3-dipropylxanthine 存在下に GABA 作動性抑制性シナプス後電流 (IPSC) を導出して P2X 受容体作動薬の影響を観察した。ATP および  $\alpha, \beta$ -methyleneATP は、小型ニューロン微小 EPSC 頻度を有意に増大する濃度 ( $10^{-4}$  M) において、自発 IPSC の頻度に影響せず、微小 IPSC の頻度にも影響しなかった。高濃度 ATP ( $10^{-3}$  M) は ATP 受容体電流を誘発したが、微小 IPSC 頻度には影響しなかった。以上より、孤束核における細胞外 ATP 濃度上昇は、抑制性シナプス伝達に影響せずに、興奮性シナプス伝達をシナプス前性機構を介して選択的に促進することによって、ネットワークの興奮性を高進させることが示唆された。

## (12) ATP 受容体による脂肪細胞の membrane ruffling

尾松万里子, 松浦 博 (滋賀医大 第二生理)

多くの細胞において細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  ストアからの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離を惹起する最も主要なメッセンジャーは G タンパク連関型受容体などの刺激で産生されたイノシトール 1,4,5-三リン酸 ( $\text{IP}_3$ ) である。 $\text{IP}_3$  によって引き起こされる  $\text{Ca}^{2+}$  放出はストアを枯渇させ、それに伴い容量性  $\text{Ca}^{2+}$  流入機構が活性化されることが知られている。我々は、ラット褐色脂肪細胞において、細胞外 ATP が (1) P2 受容体を介して容量性  $\text{Ca}^{2+}$  流入を抑制すること, (2) 細胞骨格アクチンを細胞膜周辺に厚く再重合させること, (3) アクチンの脱重合剤であるサイトカラシン D で細胞を処理すると ATP によるアクチンの再重合も容量性  $\text{Ca}^{2+}$  流入阻害も起こらないことを見出し、P2 受容体刺激による容

量性  $\text{Ca}^{2+}$  流入阻害は細胞膜近傍におけるアクチンの再重合による可能性が高い事を報告した。

今回、マウス由来の分化誘導型白色脂肪細胞である 3T3-L1 細胞を用いて ATP 受容体刺激による細胞骨格の変化を観察したところ、未分化の 3T3-L1 線維芽細胞においても、分化誘導後の 3T3-L1 脂肪細胞においても細胞外 ATP によってアクチンフィラメントの分布が著しく変化し、細胞膜がラッフリングを起こしていることがわかった。この P2 受容体を介する細胞膜ラッフリングについて、その細胞内情報伝達機構および容量性  $\text{Ca}^{2+}$  流入阻害との関係について検討する。

## (13) PC12 細胞の ATP 産生能に及ぼすアデニン化合物の影響

藤森廣幸, 芳生秀光 (摂南大学 薬学部 衛生分析化学研究室)

【目的】細胞外のアデニン化合物の生理的意義解明の一端として、ラット褐色細胞腫由来 PC12 細胞の細胞内アデニン化合物、特に、ATP 含量変動に及ぼすアデノシン (Ado) 及びその関連化合物の影響を検討した。

【方法】Locke's 液に溶かした Ado 等の化合物を PC12 細胞に加え、一定時間後、細胞内の酸可溶性物質を抽出した。酸可溶性画分中のアデニン類は標識試薬クロロアセトアルデヒドで蛍光化した後、陰イオン交換樹脂を用いる HPLC 法により測定した。

【結果及び考察】PC12 細胞に Ado を加えると細胞内の ATP 量は有意に増加したが、ATP, ADP あるいは AMP を加えても細胞内の ATP 量は変化しなかった。P1 受容体の agonist である CCPA, CGS21680, NECA あるいは CHA を細胞に加えても、細胞内の ATP 量は変化しな

かった。P1 受容体の拮抗薬 theophylline は Ado による細胞内 ATP 含量増加作用を阻害しなかった。Ado の ATP 産生促進効果は Ado 取り込み阻害剤 dipyrindamole 及び Ado deaminase 阻害剤 coformycin 共存下でさらに上昇したが、Ado kinase 阻害剤 iodotubercidin により阻害されなかった。Glucose-free Locke's 液中の PC12 細胞に Ado を加えると、glucose を含む場合と同様に、細胞内の ATP 含量は増加した。PC12 細胞に inosine を加えると、細胞内の ATP 量は増加し、その効果は Ado の場合と、ほぼ同程度であった。

以上の結果より、PC12 細胞の細胞外液に加えた Ado は Ado kinase ではなく hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase による Ado の salvage 系を介して細胞内の ATP の産生を促進することが示唆された。

## (14) ラット脳スライス標本からの ATP 放出反応の性質

小野委成, 松岡 功, 木村純子 (福島県立医科大学 医学部 薬理学講座)

中枢神経系には多くの ATP の受容体サブタイプの分布が認められているが, ATP の放出動態の詳細については不明な点が多い。そこで, ラット脳スライス標本を用いて, ATP の放出反応の特徴を検討した。Wistar 系雄性ラット(3-16 W)の脳から作製した大脳皮質, 線条体, 視床下部および小脳のスライス標本を灌流装置に保持し Krebs-Ringer 液で表面灌流した。薬物は灌流液中に添加し, 2 本の白金電極を介して電気刺激を行った。灌流液中に放出された ATP をルシフェリン・ルシフェラーゼ法で測定した。ラット脳各部位のスライス標本に KCl (60 mM) を作用させると灌流液中の ATP が増加したが, その量は非常に少なかった。一方, 標本に電気刺激 (2-50 Hz, 0.5-2.5 ms)を与えると, 刺激頻度, 刺激強度に依存して著明な ATP 遊離が認められた。刺激条件を 2 Hz, 1 ms, 2 分間とし各部位からの ATP 放出量を比較すると,

視床下部が最も多く, 小脳では少なかった。以下, 視床下部を用いて電気刺激による ATP 放出の性質を検討した。視床下部からの ATP 放出はテトロドトキシン(1  $\mu$ M)の前処置では消失しなかったが, Cl<sup>-</sup>チャンネル阻害薬 (NPPB, 100  $\mu$ M)の前処置で完全に抑制され, 灌流液中の NaCl をメタンスルホン酸に置換すると ATP 放出はほぼ完全に消失した。また, 生理的緩衝液に用いられる HEPPES や Tris は, 電気刺激による ATP 放出を強力に抑制した。さらに, ニコチン(10  $\mu$ M)存在下では電気刺激による ATP 放出は, 大脳皮質において増強が認められたが, 線条体および視床下部では減弱した。以上の結果から, 電気刺激によるラット脳スライス標本からの ATP 放出反応には Cl<sup>-</sup>チャンネルが関与するとともに, 他の神経伝達物質により調節される可能性が示唆された。

(15) ヒト表皮ケラチノサイトの内在性 ATP 誘発細胞間 Ca<sup>2+</sup> wave 伝播の解析藤下加代子<sup>1,2</sup>, 小泉修一<sup>1</sup>, 最上由香里<sup>1</sup>, 井上かおり<sup>3</sup>, 小濱とも子<sup>1</sup>, 井上和秀<sup>1,2</sup>

(1 国立衛研 薬理, 2 九大院 薬理 分子制御, 3 資生堂 Research Center)

近年, 中枢及び末梢における情報伝達物質としての ATP の役割が注目されるようになってきている。表皮細胞であるケラチノサイトにおいても, 以前から ATP により細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度 ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) が一過性に上昇すること (J. Clin. Invest., 90(1),42-51, 1992), 細胞損傷時 (Trends Pharmacol. Sci., 19, 99-107, 1998) だけでなく正常時においてもケラチノサイトから ATP の放出がみられること (Br. J. Pharmacol. 127, 1680-1686, 1999) が示されており, 表皮の恒常性調節に果たす ATP の役割が注目されている。

今回我々はヒト表皮ケラチノサイトに注目し, fura-2 法を用いた [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 測定により, ケラチノサイトには機能的 P2 受容体が発現することを確認した。また, 単一ケラチノサイトを局所的に機械刺激すると, 周囲のケラチノサイト間に Ca<sup>2+</sup> wave の伝播が惹起されること, こ

の伝播がケラチノサイトに由来する ATP の放出および拡散に由来するものであることを見出した。ギャップ結合はケラチノサイト間の情報伝達を担うと言われているが (Carcinogenesis, 15(9), 1859-1865, 1994), 阻害剤を用いた検討から, Ca<sup>2+</sup> wave の伝播に対するギャップ結合の寄与は小さいことが示された。この内在性 ATP に起因する Ca<sup>2+</sup> wave 形成の薬理的, 生理学的性質から, ケラチノサイトにおける Ca<sup>2+</sup> wave 伝播の主たる責任受容体は P2Y2 受容体であることが明らかとなった。ケラチノサイトにおける [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇はその分化および増殖に関与すると言われており (J. Cell. Physiol., 134, 229-237, 1988; Br. J. Dermatol., 132, 892-896, 1995), 機械刺激を始めとする様々な外部刺激に対する, ケラチノサイト間の液性情報伝達物質としての ATP の役割の重要性が示唆された。

## (16) Angiotensin II による ATP 放出へのイノシトール 3-リン酸系シグナルの関与

Lou Guangyuan, 佐藤千江美, 桂木 猛 (福岡大 医 薬理)

本多健治 (同 薬 生体機能制御)

ATP は神経伝達物質の他にオートクリン/パラクリン物質として働き, 広汎な細胞機能の調節因子であると考えられている。本研究では Angiotensin II (Ang II) の培養結腸紐平滑筋細胞からの ATP 放出作用に対してどのような細胞内シグナルが関与しているかについて検討がなされた。

Ang II (0.3–1  $\mu$ M) は著明な ATP 放出を引き起こすが, これは PD123319 (AT<sub>2</sub>-アンタゴニスト) でなく SC52458 (AT<sub>1</sub>-アンタゴニスト) で特異的に拮抗された。この ATP 放出はニフェジピン ( $\text{Ca}^{2+}$ チャネルブロッカー) で影響されず, U-73122 (phospholipase C 阻害薬)

で著しく抑制された。さらに細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ キレート剤である BAPTA/AM および小胞体の  $\text{Ca}^{2+}$ ポンプ阻害薬の thapsigargin により明らかに拮抗された。しかし, 低浸透圧刺激による ATP 放出を抑制するといわれる  $\text{Cl}^-$ チャネルブロッカーの DIDS や glibenclamide によって, Ang II による ATP 放出は全く影響されなかった。Ang II は 10  $\mu$ M でも LDH を細胞外へ漏出させなかった。また Ang II (1  $\mu$ M) は同細胞において SC-52458 で拮抗される Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> の産生増加を引き起こした。従って Ang II による ATP 放出には Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 受容体刺激による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルの関与が考えられる。

## (17) 痛みと後根神経節細胞からのヌクレオシド, ヌクレオチド放出機構

中谷直美<sup>1,2</sup> 長井 薫<sup>1</sup> 西崎知之<sup>1</sup> 太城力良<sup>2</sup> (兵庫医科大学<sup>1</sup>生理学第二講座, <sup>2</sup>麻酔科学教室)

後根神経節に P<sub>2</sub>X 受容体が発現しているが, その受容体を活性化する ATP がどこから放出されているか不明である。末梢神経損傷時に, 交感神経の軸索発芽がみられ軸索終末部が後根神経節内に至ることが報告されている。我々は, 後根神経節内に投射した交感神経が後根神経節細胞に作用して ATP を放出しているのではないかと, という仮説をたてた。この仮説を証明するために, 胎生 17 日目ラット後根神経節細胞を初代培養し, ノルアドレナリン添加後に放出される ATP 量を HPLC を用いて分離定量した。その結果, ノルアドレナリンは後根神

経節細胞からの ATP 放出を刺激する, ことが判明した。さらに, ノルアドレナリンは ADP, AMP, アデノシンの放出も促進していた。このように, 後根神経節 P<sub>2</sub>X 受容体は交感神経刺激により後根神経節細胞から放出されるヌクレオシド/ヌクレオチドによって活性化され, それが疼痛増強に関与しているのかもしれない。現在, 培養後根神経節細胞に whole-cell patch-clamp を施行し, ノルアドレナリン刺激により P<sub>2</sub>X 受容体反応が得られるかどうか検討中である。本研究結果は, 痛みと交感神経の関与を示唆している。

## (18) P<sub>2</sub>Y 受容体による心筋緩除活性型遅延整流性 K<sup>+</sup>チャネル(IKs)の制御機構

### – ホスファチジルイノシトール 4,5-ニリン酸 (PIP<sub>2</sub>)の関与–

丁 維光, 豊田 太, 尾松万里子, 松浦 博 (滋賀医科大学 第二生理)

遅延整流性 K<sup>+</sup>チャネル (IK) は活動電位の再分極過程を制御する重要な電流系であり, 電気生理学的・薬学的特性の異なった 2 つの電流成分, すなわち急速活性型

(IK<sub>r</sub>) と緩除活性型 (IK<sub>s</sub>)から成る。G 蛋白共役型 ATP 受容体 (P<sub>2</sub>Y) 刺激はモルモット洞房結節, 心房筋, 心室筋細胞の IK<sub>s</sub> に増大作用をおよぼすことが知られてい

るが、その細胞内機構は十分には明らかにされていない。本研究ではモルモット洞房結節細胞および心房筋細胞に全細胞型パッチクランプ法を適用して、細胞膜 PIP2 の関与について検討した。1) 細胞外 ATP による IKs の増大作用はホスフォリパーゼ C のブロッカーである U-73122 (1  $\mu$ M)により抑制された。2) 細胞膜 PIP2 含量を減少させる wortmannin (50  $\mu$ M)を電極から細胞内に負荷すると、IKs は徐々に増大していった。3) 細胞内に PIP2 (100  $\mu$ M) を直接負荷すると IKs は著明に減少していった。4) 細胞内に PIP2 (100  $\mu$ M) を負荷した細胞にお

いては、細胞外 ATP (50  $\mu$ M) による IKs の増大作用はほとんど消失した。これらの実験結果から、細胞膜 PIP2 は IKs チャネルに対して抑制性作用をおよぼし、ATP 受容体刺激にともなう細胞膜 PIP2 の減少が IKs の増大に結びついている可能性が示唆された。さらに、PIP2 のもつ陰性荷電をうち消すことが知られている neomycin (50  $\mu$ M) や  $Al^{3+}$  イオン (50  $\mu$ M) を細胞内に負荷しても IKs の増大が観察されたため、PIP2 のもつ陰性荷電が IKs の増大反応に関わっているものと思われる。

### (19) 海馬錐体細胞の興奮性におよぼす ATP の相反的影響

川村将仁<sup>1</sup>, 田中淳一<sup>2</sup>, 加藤総夫<sup>3</sup> (<sup>1</sup>慈恵医大 薬理学第1, <sup>2</sup>総研大 院, <sup>3</sup>慈恵医大 神経生理)

海馬には各種プリン受容体ならびに ATP からアデノシンへの細胞外変換酵素系が豊富に発現している。現在までの多くの知見は培養海馬細胞において得られており、海馬ネットワークの情報処理、特に、シナプス伝達の制御において、これらの細胞外プリン関連機能分子群が果たす役割はまだ確定していない。この問題に答えるために我々は、幼若ラット海馬冠状断スライス標本におけるシナプス電流をパッチクランプ法により記録した。

ネットワーク全体の活動を維持するため、受容体チャネル遮断薬の非存在下に、CA3 錐体細胞から自発性興奮性および抑制性シナプス後電流（それぞれ EPSC および IPSC）を弁別的に同時記録した。ATP (0.1-1 mM) は EPSC 頻度を減少させ、高濃度 (1 mM) では、同時に IPSC 頻度を増加した。前者の効果は DPCPX (1  $\mu$ M) により消失し、後者は PPADS (40  $\mu$ M) により抑制された。アデ

ノシンは、EPSC 頻度の減少のみを、また、 $\alpha,\beta$ -methylene ATP (1 mM)は、IPSC 頻度の増加のみを引き起こした。これらの効果は tetrodotoxin 存在下には観察されなかった。また、ATP とアデノシンは外向き電流を誘発した。CA3 近傍の上昇層介在ニューロンの中に ATP 誘発内向き電流を示す細胞が見い出された。

以上の結果は、ATP が、(1) P2X 受容体の活性化を介して抑制性介在ニューロンを興奮させ、(2) アデノシンへの加水分解後シナプス前 A1 受容体の活性化を介して興奮性入力を減少させ、さらに、(3) A1 受容体の活性化により錐体細胞を過分極させるという3つの異なる機序により錐体細胞の興奮性を低下させる、と解釈される。本機構は虚血や低酸素時における CA3 錐体細胞の過剰興奮を抑制する役割があると考えられる。

### (20) 麻酔下ウサギ迷走神経性呼吸反射におよぼす孤束核 P2X 受容体遮断の影響

高野一夫<sup>1</sup>, 加藤総夫<sup>2</sup> (<sup>1</sup>慈恵医大 薬理学第2, <sup>2</sup>慈恵医大 総合医科研 神経生理)

孤束核 P2X 受容体の活性化はシナプス前性機構によって興奮性シナプス伝達を促進する (Kato and Shigetomi, J Physiol, 2001)。呼吸運動のリズムは、下部脳幹に局在する中枢性呼吸リズム形成機構によって自動的に形成されているが、この呼吸リズムを修飾する最も重要な求

心性入力、迷走神経を求心路として孤束核に至る肺伸張受容器からの入力であり (Takano and Kato, J Physiol, 1999), その1次求心性線維から2次ニューロンへの神経伝達はグルタミン酸を介している。そこで、肺伸張受容器反射の発現における孤束核 P2X 受容体の関与を検討

した。

麻酔下、非動化・人工呼吸管理下に適正呼吸炭酸ガス濃度下に維持したウサギから横隔膜神経遠心性活動を記録し、中枢性呼吸リズムを解析した。左右いずれかの一側性迷走神経低頻度刺激は、いずれも吸息促進反射を誘発した。一側の孤束核尾側への PPADS (50 nmol / rabbit) 微量注入は、注入と同側の迷走神経低頻度刺激による吸息促進反射を 1 時間以上にわたり消失させたが、対側の迷走神経の刺激効果には影響を及ぼさなかった。迷走神経高頻度刺激によって生じる吸息抑制は、同側、

対側によらず影響を受けなかった。等量の PBS 微量注入による吸息促進反射の抑制は一過性であった。また、迷走神経無傷下に no-inflation により誘発される吸息促進反射は、一側の孤束核内への PPADS 微量注入によって影響を受けなかったが、対側孤束核への PPADS 追加注入によって消失した。以上の結果は、孤束核内の P2X 受容体が求心性入力の高頻度に依存して活性化され、興奮性シナプス伝達を修飾することによって呼吸反射の発現に関与している可能性を示している。

## (21) 大腸癌細胞に対する ATP の細胞増殖抑制作用の検討

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

近年、様々な細胞において細胞外ヌクレオチドがプリン受容体を介し細胞増殖調節に関与するという報告がある。本研究は、消化器癌モデルとして大腸癌細胞株 Caco-2 を用いて細胞増殖に対する ATP の効果を判定し、消化器癌治療薬としての ATP の可能性について検討した。培養 Caco-2 細胞に ATP (1 mM) を 48 時間以上処理した時、有意に細胞生存率が減少した。ATP 処理後の細胞は Hoechst33342 染色に反応せず、ATP の効果は Caspase 阻害剤で抑制されなかった。この結果は、ATP による細胞生存率はアポトーシスによるものでないこと、を示している。細胞周期を S 期で止めるアフィディコリン存在

下で ATP の効果は認められなかった。このことから、ATP は Caco-2 細胞の増殖抑制により細胞生存率を減少させることが判明した。P2 受容体アンタゴニストである Suramin は ATP の効果を阻害したが、PPADS は影響を与えなかった。また、 $\alpha\beta$ -methylene ATP は ATP と同様に細胞生存率を減少させたが、 $\beta\gamma$ -methylene ATP あるいは UTP では効果がなかった。以上の結果は、ATP が P2X 受容体シグナルを介して Caco-2 細胞増殖を抑制すること、を示唆している。この ATP の作用は大腸癌の治療に応用できるかもしれない。

## (22) ラット腎メサンギウム細胞における P2X<sub>7</sub> 受容体活性化を介する細胞死

原田 均, 月本光俊, 五十里 彰, 高木邦明, 祐田泰延  
(静岡県立大 薬学部 産業衛生学教室)

腎糸球体内メサンギウム細胞は糸球体毛細血管の構造維持、平滑筋機能による糸球体濾過の調節や食作用、生理活性因子の産生などの役割を担っている。また、アポトーシスによる細胞死が糸球体障害の発症、進展および治癒過程において重要とされている。我々はラット腎由来メサンギウム細胞において P2X<sub>7</sub> 受容体アゴニスト 2'-&3' -O-(4-benzoyl-benzoyl)-ATP (BzATP) が DNA 合

成抑制および細胞死を誘導することを報告している [1]。BzATP は HL-60 細胞やヒト好中球で活性酸素種の産生を誘導する [2]。また、メサンギウム細胞において活性酸素種が TNF- $\alpha$  による細胞死の二次メッセンジャーとして働いているとの報告もある [3]。

そこで、ラットメサンギウム細胞における BzATP による活性酸素種産生について活性酸素種反応性蛍光指

示薬 H2DCF-DA を用いて解析した。BzATP 処置により濃度依存的な活性酸素種の産生が認められた。各種活性酸素産生系阻害薬の中で NADPH オキシダーゼ阻害薬がこの活性酸素種の産生を最も強く抑制した。次いで、活性酸素種およびその供与体の DNA 合成ならびに細胞死に及ぼす影響を調べた結果、スーパーオキシドアニオンに BzATP に似た作用が認められた。

以上の結果から、メサングウム細胞において P2X<sub>7</sub> 受容体活性化による細胞死において産生されるスーパー

オキシドアニオンが二次メッセンジャーとして働いている可能性が示された。

#### 【参考文献】

1. Harada, H., Chan, C.M., Loesch, A., Unwin, R., and Burnstock, G. (2000) *Kidney Int.*, 57, 949-958
2. Suh, B.C., Kim, J.S., Namgung, U., Ha, H., and Kim, T. (2001) *J. Immunol.* 166, 6754-6763
3. Moreno-Manzano, V., Ishikawa, Y., Lucio-Cazana, J., and Kitamura, M. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 12684-12691

## 11. 興奮性組織のイオン調律性制御メカニズム

2002年8月1日－8月2日

代表・世話人：井本敬二

- (1) カルシウム流入からカルシウムシグナリングへ：心筋興奮収縮連関における制御機構

赤羽悟美 (東京大学大学院 薬学系研究科)

- (2) 心筋細胞のストア依存性  $\text{Ca}^{2+}$  流入

竹島 浩 (東北大学大学院 医学系研究科)

- (3) ペースメーカーモデル細胞再構築の試み：リアノジン受容体および  $\text{Ca}^{2+}$  依存性  $\text{K}^+$  チャネル強制発現

HEK293 細胞における自発性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離とイオンチャネル活性制御機構

後藤隆代<sup>1</sup>, 山田亜紀<sup>1</sup>, 我謝徳一<sup>1</sup>, 大矢 進<sup>1</sup>, 村木克彦<sup>1</sup>, Wayne Chen<sup>2</sup>, 今泉祐治<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>名古屋市立大学大学院 薬学研究科 細胞分子薬効解析学分野,

<sup>2</sup>カナダ・カルガリー大学 医学部 生化学・分子生物学教室)

- (4)  $\text{Na,K-ATPase } \alpha 2$  サブユニット遺伝子欠損ヘテロマウスにおける不整脈

川上 潔 (自治医科大学 分子病態治療研究センター)

- (5)  $\text{Na,K-ATPase } \alpha 2$  サブユニット遺伝子は発生と情動行動に関与する

池田啓子 (自治医科大学 分子病態治療研究センター)

- (6) ATP 感受性  $\text{K}^+$  チャネルによる細胞興奮性の制御機構

三木隆司 (千葉大学大学院 医学研究院 細胞分子医学, 千葉大学 遺伝子実験施設)

- (7) 輸送体を取り巻くタンパク質間相互作用の探索

金井好克 (杏林大学 医学部)

- (8) TRP チャネルによるイオン調律機構とその意義

森 泰生 (統合バイオサイエンスセンター)

- (9) TRP 蛋白質ホモログ TRPC6 および TRPC7 の  $\text{Ca}^{2+}$  による制御機構

井上隆司, 史 娟, <sup>1</sup>森 泰生, 伊東祐之

(九州大学大学院 医 生体情報薬理, <sup>1</sup>統合バイオサイエンス 生命環境)

- (10) P 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル変異マウスのシナプス伝達

井本敬二<sup>1,2</sup>, 松下かおり<sup>1</sup> (<sup>1</sup>生理学研究所 液性情報, <sup>2</sup>総合研究大学院 大学生命科学)

- (11) マウスブルキンエ細胞から単離した新規  $\text{Ca}_v2.1$  スプライスバリエントは P 型  $\text{Ca}^{2+}$  電流を生じない。

常深泰司, 三枝弘尚, 石川欽也, 永山 真, 村越隆之, 水澤英洋, 田邊 勉

(東京医科歯科大学 脳神経機能病態学, 東京医科歯科大学 高次機能薬理)

- (12) R 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの機能的多様性—精子における生理機能—

田邊 勉 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科認知行動医学系高次機能薬理学分野)

- (P-1)  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release (CICR) 制御における  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの  $\text{Ca}^{2+}$  依存性不活性化機構の役割

高松 肇, 赤羽悟美 (東京大学大学院 薬学系研究科)

- (P-2) ラット心筋細胞 L 型カルシウムチャネルの PKA リン酸化制御における  $\beta$  サブユニットの役割

名黒 功, 赤羽悟美 (東京大学大学院 薬学系研究科)

### 【参加者名】

竹島浩 (東北大医), 川上潔, 池田啓子 (自治医科大医),  
三木隆司 (千葉大医), 赤羽悟美, 高松肇, 名黒功 (東

大薬), 田邊勉, 水澤英洋, 石川欽也, 常深泰司, 融  
衆太 (東医歯大医), 金井好克 (杏林大医), 山本伸一

郎（昭和大）、今泉祐治、波多野紀行、森村浩三、坂本 多穂、堀田真吾（名市大薬）、中山晋介、柴田貴広（名大医）、井上隆司、史娟（九州大医）、森泰生、岡

村康司、岩崎広英、村田喜理、西田基宏、原雄二、吉田卓史、山田和徳（統合バイオ）、中井淳一、大倉正道、宮田麻理子、井本敬二（生理研）

## 【概要】

神経・筋・分泌組織の興奮性はイオンの動きに基づく。これらの興奮性組織が調和の取れた持続的な活動を保つためには、高度な制御が必要であるが、その分子細胞的基盤に関する知見は乏しい。細胞の集団としての活動を、分子のレベルから統合的に理解することは容易なことではない。本研究会では、骨格筋、平滑筋、心筋、神経細

胞、分泌細胞という多様な興奮性組織の研究者が、調律的活動制御機構に関し、細胞内・細胞間分子メカニズム、発生過程、障害と疾患という観点から各々の研究を紹介し、興奮性組織における一般的な調節制御メカニズムに関しての理解を深めることを目的とした。

## （1）カルシウム流入からカルシウムシグナリングへ：心筋興奮収縮連関における制御機構

赤羽悟美（東京大学大学院 薬学系研究科 薬効安全性学教室）

心筋細胞における電位依存性 L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの細胞内局在は細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  シグナリングの空間的局在を規定し、L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルのゲーティング・キネティクスは細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  シグナリングのタイムコースを規定する。

細胞膜表面の L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルは筋小胞体からの  $\text{Ca}^{2+}$  依存性  $\text{Ca}^{2+}$  放出機構の引き金役と、筋小胞体へ貯蔵される  $\text{Ca}^{2+}$  の流入路としての役割を担う。また、L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルは筋小胞体から放出された  $\text{Ca}^{2+}$  による  $\text{Ca}^{2+}$  依存性不活性化を受ける。これは、活動電位持続時間と L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルからの  $\text{Ca}^{2+}$  流入量を制御して筋小胞体の  $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵量を調節し、 $\text{Ca}^{2+}$  依存性  $\text{Ca}^{2+}$  放出機構の効率をファイン・チューニングする。 $\text{Ca}^{2+}$  依存性不活性化機構には L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル  $\alpha 1\text{C}$  サブユニット ( $\text{Ca}_v 1.2$ ) の細胞内カルボキシル末端部分 IQ モチーフ付近の領域と  $\text{Ca}^{2+}$ ・カルモジュリンの相互作用が関与することが示されている。我々は、 $\alpha 1\text{C}$  サブユニット細胞内カルボキシル末端下流の Proline-rich domain が  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの不活

性化キネティクスの制御に  $\text{Ca}^{2+}$  依存的に関わることを新たに見出した。

心筋細胞の L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルは交感神経刺激により PKA リン酸化を介して機能亢進することが知られている。我々は、PKA リン酸化による L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの開口確率の上昇および電位依存性のシフトには細胞内カルボキシル末端や  $\beta$  サブユニットを含む複数のドメインの相互作用が関与する可能性を示した。一方、我々は、 $\alpha 1\text{C}$  サブユニットの IIIS5-S6 P ループ領域が  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルアゴニストによる開口時間延長作用にクリティカルな役割を担うことを見出し、 $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルのゲーティング制御におけるポア領域の関与を初めて示した。

本研究会では、興奮性細胞の例として心筋細胞について、L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルに焦点を当てて  $\text{Ca}^{2+}$  流入から  $\text{Ca}^{2+}$  シグナリングへの  $\text{Ca}^{2+}$  イオン調律性制御メカニズムに関する我々の作業仮説と今後の課題についてディスカッションしたいと考えている。

## （2）心筋細胞のストア依存性 $\text{Ca}^{2+}$ 流入

竹島 浩（東北大学大学院 医学系研究科）

心臓のリズミックな収縮は心筋細胞の  $\text{Ca}^{2+}$  調律により制御される。心筋細胞の主要な  $\text{Ca}^{2+}$  輸送体としては、細

胞表層膜の電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルと  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  交換体や  $\text{Ca}^{2+}$  ポンプ、筋小胞体の  $\text{Ca}^{2+}$  放出チャンネル（リアノジン

受容体)と $\text{Ca}^{2+}$ ポンプが知られている。我々のグループでは細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ ストアの構造や機能に注目しており、心筋細胞の小胞体上のリアノジン受容体と細胞表層膜-小胞体膜の架橋蛋白質としてのジャンクトフィリンの機能を主に変異マウスを作成することにより解析している。一方、細胞内ストアの貯蔵 $\text{Ca}^{2+}$ 依存的に活性化する $\text{Ca}^{2+}$ 流入機構(SOC 流入)の存在が非興奮性細胞を中心に多くの細胞系で近年報告されているが、SOC チャンネルの分子実体は不明であり、横紋筋細胞でのSOC 流入の解析はない。さらに、SOC 流入機構では $\text{Ca}^{2+}$ 放出チャンネルの直接結合がSOC チャンネルを活性化するというカップリングモデルが最近有力であるが、確定されるには今後の検討が必要である。

最近我々は、胎児期の心筋細胞におけるSOC 流入を確認するとともに、その簡単な薬理学的性質、分化レベル

での活性調節、ノックアウトマウスを用いたカップリングモデルの検証などを遂行したので、その詳細を発表する。

#### 【参考文献】

1. Uehara, A., Yasukouchi, M., Imanaga, I., Nishi, M. & Takeshima, H. Store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry irrelevant to  $\text{Ca}^{2+}$  release channel and junctional membrane complex in heart muscle cells. *Cell Calcium* 31, 89-96, 2002.
2. Takeshima, H., Komazaki, S., Nishi, M., Iino, M. & Kangawa, K. Juncophilins: a novel family of junctional membrane complex proteins. *Mol. Cell* 6, 11-22, 2000.
3. Takeshima, H., Komazaki, S., Hirose, K., Nishi, M., Noda, T. & Iino, M. Embryonic lethality and abnormal cardiac myocytes in mice lacking ryanodine receptor type 2. *EMBO J.* 17, 3309-3316, 1998.

### (3) ペースメーカーモデル細胞再構築の試み：リアノジン受容体および $\text{Ca}^{2+}$ 依存性 $\text{K}^{+}$ チャンネル 強制発現 HEK293 細胞における自発性 $\text{Ca}^{2+}$ 遊離とイオンチャンネル活性制御機構

後藤隆代<sup>1</sup>，山田亜紀<sup>1</sup>，我謝徳一<sup>1</sup>，大矢 進<sup>1</sup>，村木克彦<sup>1</sup>，Wayne Chen<sup>2</sup>，今泉祐治<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>名古屋市立大学大学院 薬学研究科 細胞分子薬効解析学分野，

<sup>2</sup>カナダ・カルガリー大学 医学部 生化学・分子生物学教室)

ペースメーカー電位の発生機序として少なくとも3種のタイプが認識されていると思われる。イオンチャンネル活性バランスに主に起因する心臓タイプ、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ オシレーションとそれに伴うイオンチャンネル活性変化に主に起因すると推測される消化管などのタイプ、神経ネットワークの相互機能連関に主に起因すると考えられている呼吸中枢のようなタイプである。

細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ オシレーションがペースメーカー電位発生  
の基盤となる場合、まず細胞内局所 $\text{Ca}^{2+}$ 貯蔵部位からの自発性 $\text{Ca}^{2+}$ 遊離が $\text{Ca}^{2+}$ ウェーブとして細胞内に伝播され、次いでその $\text{Ca}^{2+}$ 上昇によりイオンチャンネルが活性化されて電位が発生され、さらに周囲の細胞に伝播するという3ステップによると考えられる。自発性 $\text{Ca}^{2+}$ 遊離とその細胞内伝播は小胞体上のイノシトール3リン酸(IP3)受容体あるいはリアノジン(RyR)受容体を介して生じると推測される。また $\text{Ca}^{2+}$ 依存性イオンチャンネルとしては $\text{Ca}^{2+}$ 依存性 $\text{K}^{+}$ あるいは $\text{Cl}^{-}$ チャンネルや、まだ充分に同定されていないその他のチャンネルの寄与が想定されてい

る。消化管・尿道・門脈などからのペースメーカー細胞の単離・培養が難しいこともあって $\text{Ca}^{2+}$ オシレーションの発生機序・チャンネル活性制御機構・細胞群での調律機構の詳細は充分解明されてはいない。そこで我々はペースメーカーモデル細胞を再構築してこれらを検討するため、2あるいは3型RyR受容体をそれらが殆ど機能発現していないHEK293細胞に一過性に強制発現させた。また $\text{Ca}^{2+}$ 依存性 $\text{K}^{+}$ チャンネルを定常発現させたHEK293細胞にもRyRを発現させて検討した。以下に結果の概要を示す。

1. RyR2 および RyR3 受容体発現 HEK293 細胞において自発性局所 $\text{Ca}^{2+}$ 遊離( $\text{Ca}^{2+}$  spark)が生じ、 $\text{Ca}^{2+}$  spark を起点としたウェーブが $\text{Ca}^{2+}$ オシレーションとして周期的に生じることを見出した。RyR3 も発現系で $\text{Ca}^{2+}$ 遊離チャンネルとして機能し得る。
2. この $\text{Ca}^{2+}$ オシレーションの継続は外液 $\text{Ca}^{2+}$ に強く依存し、非選択的陽イオンチャンネルの抑制薬で阻害され、Xestospongin C や 2-APB によっても抑制された。

3. 大あるいは小コンダクタンス  $\text{Ca}^{2+}$ 依存性  $\text{K}^+$ (BK あるいは SK)チャネルを定常発現させた HEK293 細胞に RyR を共発現させると、RyR 発現細胞に  $\text{Ca}^{2+}$ オシレーションに同期した膜電位オシレーションが生じ、後

者は細胞間を伝播した。

以上より、本発現系は自発性  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離でトリガーされるペースメーカー電位発生・調律モデルとして興味深い特性を備えていることが明らかとなった。

#### (4) Na,K-ATPase $\alpha 2$ サブユニット遺伝子欠損ヘテロマウスにおける不整脈

川上 潔 (自治医科大学 分子病態治療研究センター 細胞生物研究グループ)

Na,K-ATPase は細胞内外の  $\text{Na}^+$ および  $\text{K}^+$ の濃度勾配を維持し、イオンや栄養素の輸送、神経興奮の基礎、細胞体積の制御、など細胞の基本的な種々の活動に必須な膜タンパク質である。ATP 水解のエネルギーを用いて、3 分子の  $\text{Na}^+$ を細胞内に輸送し 2 分子のを  $\text{K}^+$ 細胞外へくみ出す。本酵素は  $\alpha$  と  $\beta$  二つのサブユニットからなり各々  $\alpha 1$  から  $\alpha 4$  の 4 種、 $\beta 1$  から  $\beta 3$  の 3 種が知られており、ラットにおいては  $\alpha 1$  は ubiquitous に発現し、 $\alpha 2$  は骨格筋心筋及び脳に、 $\alpha 3$  は脳に特異的に発現するサブユニットである。発生途上の心臓では、 $\alpha 1$  に加えて  $\alpha 3$  の発現が増加するが、途中から  $\alpha 2$  への発現の切り替えが起きることが知られている。脳においては、 $\alpha 1$  はむしろ限局した発現を示し、 $\alpha 2$  や  $\alpha 3$  が広く脳に分布すると考えられる。同酵素の特異的な阻害剤であるウアバインに対する

感受性は  $\alpha 1$  が最も低く、 $\alpha 2$  及び  $\alpha 3$  は感受性が高い。

私たちは、Na,K-ATPase の生体内での生理的な作用を理解するために、 $\alpha 2$  サブユニット遺伝子欠損マウスを作成し解析した。

ホモマウスは生直後に死亡する(池田の発表参照)が、ヘテロマウスは、正常に生まれ、心臓、骨格筋には解剖学的異常がみられない。しかし、成マウス(生後 6 ヶ月)の心電図を調べたところ、麻酔下で上室性の不整脈が高頻度に観察された。この不整脈は痛み刺激で消失した。また、ヘテロマウスは野生型に比し、除脈傾向を示した。24 時間心電図を装着し、覚醒時の心電図モニターにて一日数回の上室性不整脈発作が観察された。現在薬剤を用いて不整脈の原因が、神経性か刺激伝導系異常によるものかを検索中である。

#### (5) Na,K-ATPase $\alpha 2$ サブユニット遺伝子は発生と情動行動に関与する

池田啓子 (自治医科大学 分子病態治療研究センター 細胞生物研究グループ)

我々は Na,K-ATPase  $\alpha 2$  サブユニット遺伝子 (Atp1a2) 欠損マウスを用い、胎児期の神経伝達機構を明らかにし周産期の神経系機能確立機構の解明を目指す。ホモマウス新生仔は、外観上異常を認めず、生直後は心臓も正常に機能しているが、胎生期の胎動・神経反射が全く観察されず、生直後に死亡する。ホモマウスの横隔膜神経筋標本を用いた実験結果より、骨格筋の静止膜電位や、神経刺激に対する収縮には異常が観察されなかったため、中枢神経系の異常の検索に焦点をあてた。出生直前の脳においては、amygdala と piriform cortex において神経細胞のアポトーシスによる縮退が認められた。さらに、脳内伝達物質含有量は有意に増加していた。シナプトソ

ームを用いた伝達物質取込・放出能を調べた結果、種々の伝達物質の取込が障害されていた。さらに野生型で観察される脳における部位特異的 c-Fos 発現がホモマウスではいちじるしく増強していることが明らかとなった。一方、ヘテロマウスにおいては、明暗ボックス、高架十字迷路、オープンフィールド、条件付け恐怖刺激などの行動試験でいずれも行動抑制の傾向がみられた。ヒト ATP1A2 遺伝子は側頭葉てんかんの原因となる遺伝子座に一致しており、また、躁鬱病では Na,K-ATPase  $\alpha 2$  サブユニット遺伝子の発現量が低下していることが報告されている。本遺伝子欠損マウスはこうした病気のモデルマウスとして活用できる可能性がある。

## (6) ATP 感受性 K<sup>+</sup>チャネルによる細胞興奮性の制御機構

三木隆司 (千葉大学大学院 医学研究院 細胞分子医学, 千葉大学 遺伝子実験施設)

ATP 感受性 K<sup>+</sup>チャネル (K<sub>ATP</sub> チャネル)は、心筋、骨格筋、脳、膵β細胞、血管平滑筋などに存在し、ホルモン分泌や細胞保護にかかわっていると考えられているが、各組織における生理的役割については多くが不明である。K<sub>ATP</sub> チャネルはスルホニル尿素受容体 (SUR1 あるいは SUR2)と内向き整流性 K<sup>+</sup>チャネルメンバー (Kir6.2 あるいは Kir6.1) の 2 つのサブユニットから構成されるヘテロ 8 量体である。我々は、K<sub>ATP</sub> チャネルのポアを構成する Kir6.2 および Kir6.1 のノックアウトマウス (Kir6.2<sup>-/-</sup>, Kir6.1<sup>-/-</sup>)を作製し、膵β細胞、視床下部、心臓の K<sub>ATP</sub> チャネルの機能を検討した。

この結果、1) Kir6.2 は膵β細胞の K<sub>ATP</sub> チャネルを構

成し、細胞膜電位や細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度を規定し、膵β細胞からのグルコースによるインスリン分泌を制御していること、2) Kir6.2 はさらに視床下部グルコース応答性ニューロンの K<sub>ATP</sub> チャネルを構成し、細胞外グルコース濃度による細胞発火の頻度を調節していること。3) Kir6.1 は血管平滑筋の K<sub>ATP</sub> チャネルを構成し、血管のトーンスを調節しており、マウス Kir6.1 遺伝子の破壊によりヒトの異型狭心症に酷似した冠動脈スパズムが惹起されることが明らかになった。このことから、K<sub>ATP</sub> チャネルは、広く代謝の変化を感知する代謝センサーとして働いており、細胞膜の興奮性を制御することによって種々の細胞機能を調節していることが示された。

## (7) 輸送体を取り巻くタンパク質間相互作用の探索

金井好克 (杏林大学 医学部 薬理)

細胞が、細胞内外の環境の変化に適応した適切な物質輸送を行い、恒常性を維持するためには、細胞膜を介する物質輸送を担当するトランスポーター (輸送体) の発現と機能が適切に調節される必要がある。我々は、アミノ酸トランスポーターの分子クローニングの過程で、トランスポーターの本体を形成する 12 回膜貫通型の主サブユニット (軽鎖) と、1 回膜貫通型の補助サブユニット (重鎖) から構成されるヘテロ 2 量体型トランスポーターを見い出し、これを契機に、タンパク質間相互作用を介したトランスポーターの機能調節の解明に向けた研究を開始した。このヘテロ 2 量体型トランスポーターにおいては、(1) 2 つのサブユニット間の相互作用により、如何にして機能性トランスポーター分子が形成されるか、(2) 細胞膜移行を含め、ヘテロ 2 量体複合体の機能

活性がどのようにして実現されるか、(3) 細胞内外のシグナル伝達系を含めて、ヘテロ 2 量体複合体がどのようなタンパク質系と連結することにより種々の細胞機能と関わっていくのか、といった課題を解決していく必要がある。我々は、シスチン尿症の患者解析の過程で、ヘテロ 2 量体型トランスポーターの主サブユニット BAT1 の C-末端の P482 の変異を見い出し、これによりヘテロ 2 量体複合体の細胞膜移行が障害されることを見い出した。また、ヘテロ 2 量体型トランスポーター補助サブユニット 4F2hc の細胞内ドメインが細胞内シグナル伝達系と連結することを示唆する結果を得ている。本演題では、これらの結果をもとに、ヘテロ 2 量体型トランスポーターを取り巻くタンパク質間相互作用について議論したい。

## (8) TRP チャネルによるイオン調律機構とその意義

森 泰生 (統合バイオサイエンスセンター)

$\text{Ca}^{2+}$ 透過型カチオンチャネルは、形質膜の膜電位調節及び、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度調節の2つの重要な生理的役割を担う。我々は既に、Phosphatidyl Inositol (PI) 応答と関連して活性化開口する7つの Transient Receptor Potential チャネル (TRPC), TRPC1-7, を見出している。 $\text{Ca}^{2+}$ シグナルの時空間パターン ( $\text{Ca}^{2+}$ 律動) 決定に重要な、形質膜-小胞体間の機能的相互作用の解明を目的に、モデル系として遺伝学的操作の容易な B 細胞 DT40 を用いて、TRPC1 欠損株を作製した。TRPC1 欠損細胞においては、B 細胞受容体刺激により惹起されるストア依存性  $\text{Ca}^{2+}$ 流入だけでなく、小胞体からの  $\text{IP}_3$  受容体を介した  $\text{Ca}^{2+}$ 放出も減弱していた。また、 $\text{Ca}^{2+}$ -oscillation, その下流で起きるはずの転写因子 NF-AT の活性も同様に抑制されていた。このことから、TRPC1 はストア依存性  $\text{Ca}^{2+}$ 流入を担うチャネルの一部を形成するだけでなく、 $\text{IP}_3$  受容体の活性を制御し、さらには小胞体-形質膜のカップリングを増進する役割を担っているものと考えられる。一方、フォスホオリパーゼ C (PLC)  $\gamma 2$  欠損細胞においては、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ ストア枯渇剤 thapsigargin によるストア依存性  $\text{Ca}^{2+}$ 流入が減弱していた。また、最近開発した  $\text{IP}_3$  センサータンパク質を用いて細胞内  $\text{IP}_3$  濃度を測定したところ、SOC を介した  $\text{Ca}^{2+}$ 流入による  $\text{IP}_3$  産生が見られ

た。このような PLC $\gamma 2$  とストア依存性  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル (SOC) のカップリングは、TRPC3 を介したものであることが明らかになった。以上の実験より、PI 応答/ $\text{Ca}^{2+}$ シグナルにおける、PLC と SOC (TRP チャネル) を中心とした、細胞応答の統合協調 (coordination) 機構が明らかになった。

今回、「細胞死」の制御に関与する、新しい  $\text{Ca}^{2+}$ 透過型カチオンチャネル TRPM2 を同定した。即ち、活性酸素/窒素種による細胞の酸化ストレスをニコチンアミドが感受し、その酸化体が直接結合することにより、TRPM2 は活性化開口することを示した。また、活性化 TRPM2 チャネルを透過した  $\text{Ca}^{2+}$ / $\text{Na}^+$ が、TNF 等によって誘導されるグルタチオン感受性の  $\text{Ca}^{2+}$ -oscillation, 更にはネクロシスを仲介することを明らかにした。一方、TRPC1-7 の活性制御にも、活性酸素種による酸化が重要であることを見出した。TRP チャネルと活性酸素種とのこのような機能的協関は、 $\text{Ca}^{2+}$ シグナル及び膜電位変化が、酸化ストレスに対する生体応答制御の重要な基盤であることを示唆する。さらには、TRP 遺伝子ファミリーによってコードされるカチオンチャネル群が、細胞の恒常性維持、増殖や死/生存に深く関与することも示唆する。

## (9) TRP 蛋白質ホモログ TRPC6 および TRPC7 の Ca による制御機構

井上隆司, 史 娟, <sup>1</sup>森泰生, 伊東祐之

(九大 院 医 生体情報薬理, \*統合バイオサイエンス 生命環境)

平滑筋を始めとする様々な組織では、脂質代謝と連動した G 蛋白質共役型受容体が刺激されると、Ca 透過型陽イオンチャネル (ROCCs) の持続的活性化が起こる。これらのチャネル活性は、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) 変化によって効果的に制御されていることが知られているが、その分子機構は殆ど不明である。近年、ROCCs の分子実体の有力な候補として、TRP(transient receptor potential) 蛋白質ファミリーが注目を集めている。その中で TRPC6 は血管組織に遍く分布し、交感神経刺激 ( $\alpha 1$

アドレナリン受容体) や機械的刺激によって活性化される  $\text{Ca}^{2+}$ 流入に密接に関わっていることが示されている。本研究では、TRPC6 を ROCCs の分子モデルとし、 $\text{Ca}^{2+}$ による ROCC 活性制御の分子機構の探索を試みた。

TRPC6 およびこれと高い分子の相同性を示す TRP ホモログ、TRPC7 を HEK293 細胞に強制発現し、パッチクランプ法による電流解析を行った。ROCC 電流は carbachol (100  $\mu\text{M}$ ) で惹起し、液交換には Y-tube を使用した。Ca 欠除液中で活性化した TRPC6 電流に 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$

を細胞外から添加すると、速やかな増強、数十秒オーダーの強力な増強とそれに引き続く抑制が観察された。これに対し、TRPC7による電流は $\text{Ca}^{2+}$ 添加によって速やかな抑制を受け、 $\text{Ca}^{2+}$ の除去後もその抑制の大部分は持続した。速やかな抑制は、電位依存性を示し(脱分極で軽減)、細胞内を10 mM EGTA や BAPTA で灌流しても影響を受けなかったが、TRPC7の膜貫通領域をTRPC6のそれで置換すると消失したことから、イオン透過孔内(or 近傍)の細胞外部位における permeation block であると考えられた。一方、TRPC6の $\text{Ca}^{2+}$ による速やかな増強は、TRPC6型の膜貫通領域に依存し、細胞内を10mM EGTA で灌流しても影響を受けなかったが、10mM BAPTAによって完全に消失したことから、イオン透過孔近傍の細胞内部位を介して生じていると考えられた。Inside-out法で記録したTRPC6およびTRP7の単一電流は、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ に対して全く異なる依存性を示した。すなわち、前者はnM範囲の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ では殆ど影響を受けなかったが、 $\mu\text{M}$ 範囲

の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ で劇的な活性増加を示した。一方後者は、nM範囲の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ で濃度依存的な抑制を受けた。これらの $\text{Ca}^{2+}$ の効果はカルモジュリン拮抗薬 calmidazolium (3  $\mu\text{M}$ )投与によってほぼ完全に消失し、カルモジュリン(10  $\mu\text{M}$ )添加によって部分的に回復した。更に、 $\text{Ca}^{2+}$ 非感受型の変異カルモジュリンをTRPC7と共発現すると、全細胞および単一電流レベルにおいて、電流密度が増加する傾向を示し、nM範囲における $\text{Ca}^{2+}$ 抑制効果は消失した。一方、変異カルモジュリンをTRPC6と共発現した場合は、電流の活性化そのものが顕著に抑制された。同様の結果は、細胞内を<10 nM 以下の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ で灌流したり、TRPC6のC端のカルモジュリン仮想結合部位を欠失させても観察された。以上の結果より、細胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は、カルモジュリンを介して、TRPC7の場合は持続的な抑制を、TRPC6の場合は、活性化初期過程およびその後の活性化維持過程において増強的な役割を果たしていることが示唆された。

#### (10) P型 $\text{Ca}^{2+}$ チャネル変異マウスのシナプス伝達

井本敬二<sup>1,2</sup>, 松下かおり<sup>1</sup> (<sup>1</sup>生理学研究所 液性情報, <sup>2</sup>総合研究大学院大学 生命科学)

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

この問題を解決するために、tottering および rolling の小脳における興奮性シナプスの変化を検討した。まず平行線維-プルキンエ細胞シナプスのEPSC(PF-EPSC)は、rolling マウスで著明に減弱していた。失調症を示さぬ若い tottering マウスでは、PC-EPSCの減少の程度は小さかったが、失調を示す年長の tottering マウスでは、PC-EPSCの減少は著明であった。登上線維-プルキンエ細胞シナプスのEPSC(CF-EPSC)の大きさは、tottering では著変な

く、rolling では増加していた。低親和性 AMPA 受容体を用いたシナプス伝達の障害の程度から、この増加にはグルタミン酸放出の変化はないと考えられた。また、CF-EPSCの機能維持には、N型およびR型 $\text{Ca}^{2+}$ チャネルサブタイプの寄与が関係していると考えられた。同一遺伝子の異常により起こる小脳失調症でも、シナプスにおける変化は変異によりかなり多様であることが明らかとなった。

tottering ではてんかんを示すことが知られているが、その症状に関係すると考えられる大脳皮質の神経回路異常に関しても検討を行った。視床刺激で得られる大脳皮質錐体細胞のEPSCには軽度の減少が見られたが、IPSCには著明な減少が見られた。しかし自発性の微小IPSC(mIPSC)は tottering マウスでも観察され、mIPSCの大きさはむしろ増加傾向にあった。誘発されるIPSCが著減しているがmIPSCは観察されるという結果は、小脳核でも観察されており、現在詳細を解析中である。

# (11) マウスプルキンエ細胞から単離した新規 $\text{Ca}_v2.1$ スプライスバリエントは P 型 $\text{Ca}$ 電流を生じない。

常深泰司, 三枝弘尚, 石川欽也, 永山 真, 村越隆之, 水澤英洋, 田邊 勉  
(東京医科歯科大学 脳神経機能病態学, 東京医科歯科大学 高次機能薬理学)

## 【序論】

P 型と Q 型の  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルはチャネルの不活性化と  $\omega$ -agatoxin-IVA 感受性が異なっているが, メインのサブユニットである  $\alpha_12.1$  サブユニットは共通であり, その相違が作られるメカニズムは解っていない。本研究では P 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルが殆どを占めるマウスプルキンエ細胞から single-cell RT-PCR により P 型の  $\alpha_12.1$  サブユニットをクローニングし, その機能を解析した。

## 【方法】

マウス小脳のスライスから顕微鏡下でプルキンエ細胞を採取した。これから single-cell RT-PCR により 8 箇所に分けて  $\alpha_12.1$  サブユニットをクローニングした。この新規  $\alpha_12.1$  サブユニットを  $\beta$ ,  $\alpha_2\delta$  サブユニット, pEGFP-C2 と HEK293 細胞に共発現させ whole-cell patch-clamp 法により  $\text{Ba}^{2+}$ 電流の記録を行った。電気生理学の実験のコントロールとしてエクソン 46 で終止する  $\alpha_12.1$  サブユニッ

トを作った。

## 【結果】

2 種類の新規  $\alpha_12.1$  サブユニット cDNA (MPI, MPPII) をクローニングした。これらには既知の *in vitro* で Q 型の特性を示す  $\alpha_12.1$  サブユニットに対しエクソン 1 から 41 までで 16 箇所の一塩基置換を認め, 内 6 箇所ではアミノ酸変異が生じていた。またエクソン 46-47 の境界で alternative splicing があり, MPPII ではエクソン 47 において alternative splicing と考えられる 150 塩基の欠失を認め, MPI では 1 箇所 RNA editing が見つかった。電気生理学的, 薬理学的特性はコントロールと差はなかった。

## 【考察】

P 型  $\text{Ca}^{2+}$ 電流を作るためにはプルキンエ細胞の  $\alpha_12.1$  サブユニットのスプライスバリエントだけでは不十分で, 翻訳後修飾やチャネル機能に作用する未知の蛋白の影響等の何らかの環境による影響が必要である。

# (12) R 型 $\text{Ca}$ チャネルの機能的多様性—精子における生理機能—

田邊 勉 (東京医科歯科大学大学院 歯学総合研究科 認知行動医学系 高次機能薬理学分野)

Voltage-dependent calcium channels (VDCCs) are classified into several distinct groups termed L-, N-, P-, Q-, R-, and T-types. These types of VDCCs play important roles in various activities including the control of transmitter release, membrane excitability, and gene expression, but exact roles of each channel type are not necessarily clarified. In particular, functions of the R-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel are least understood. The R-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel was originally defined as a channel 'Resistant' to blockers for L-, N-, P-, and Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels, therefore it is possible that the R-type current is a mixture of several different drug-resistant  $\text{Ca}^{2+}$  currents. Although the R-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel is suggested to play a critical role in the release of neurotransmitters and somatodendritic excitability in a certain set of neurons, the

physiological functions of this channel remain to be clarified. To elucidate physiological roles of R-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel, we have generated a mouse strain lacking  $\alpha_1E$  subunit of the  $\text{Ca}_v2.3$  (R-type)  $\text{Ca}^{2+}$  channel. Analysis of the knockout mouse uncovered a variety of unknown physiological function of R-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel. R-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel knockout mouse showed (1) increased level of fear for some kind of stimuli such as exposure to a novel environment, (2) reduced response to inflammatory pain stimulus, (3) enhanced ischemic neuronal injury, (4) impaired spatial memory, (5) reduced insulin sensitivity and exhibited hyperglycemia resembling symptoms of non-insulin-dependent diabetes mellitus. Although male mice lacking the  $\text{Ca}_v2.3$  channel were found to be fertile, we searched for possible

abnormalities in functions in male germ-line cells from the mutant mice and explored the contribution of this channel to the  $\text{Ca}^{2+}$  current, intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  transient related to acrosome reaction, and sperm motility. Whole-cell current in acutely dissociated pachytene spermatocytes from the wild-type ( $\text{Ca}_v2.3^{+/+}$ ) and  $\text{Ca}_v2.3^{+/+}$  mice displayed a typical profile of low-voltage-activated  $\text{Ca}^{2+}$  currents and kinetics showing no significant differences. The averaged rising rates of  $\text{Ca}^{2+}$  transients induced by  $\alpha$ -D-mannose-bovine serum

albumin in the head region of  $\text{Ca}_v2.3^{+/+}$  sperm were significantly lower than those of  $\text{Ca}_v2.3^{+/+}$  sperm. A computer-assisted sperm motility assay revealed that straight-line velocity and linearity were greater in  $\text{Ca}_v2.3^{+/+}$  sperm than those in  $\text{Ca}_v2.3^{+/+}$  sperm. These results suggest that the  $\text{Ca}_v2.3$  channel, which makes no detectable contribution to the  $\text{Ca}^{2+}$  current in the immature spermatocyte, is functional in mature sperm, playing a role in  $\text{Ca}^{2+}$  transients and controlling sperm flagellar movement.

## (P-1) $\text{Ca}^{2+}$ -induced $\text{Ca}^{2+}$ release (CICR) 制御における $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルの $\text{Ca}^{2+}$ 依存性不活性化機構の役割

高松 肇, 赤羽悟美 (東京大学大学院 薬学系研究科 薬効安全性学教室)

電位依存性 L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルと筋小胞体上のリアノジン受容体の間には, 密接な相互制御が働いている。筋小胞体からの  $\text{Ca}^{2+}$  放出に依存した L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの  $\text{Ca}^{2+}$  依存性の速い不活性化は, 心室筋細胞において活動電位の間にも  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルを不活性化させると考えられる。 $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの  $\text{Ca}^{2+}$  依存性不活性化機構の生理的意義を明らかにする目的で, ラット単離心室筋細胞において活動電位と  $\text{Ca}^{2+}$  流入量の関係を検討した。

Thapsigargin 処置によって筋小胞体の  $\text{Ca}^{2+}$  を枯渇させ,  $\text{Ca}^{2+}$  依存性不活性化機構を除くと, 活動電位のプラトー相が 2 倍に延長した。この活動電位の延長に forward mode  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange activity が含まれるか否かを検討するために, 細胞外液の  $\text{Na}^+$  を  $\text{Li}^+$  に置換することで  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger の forward mode activity を阻害したところ, プラトー相が短縮した。しかしながら, action potential-clamp による  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル電流の解析から, こ

の活動電位持続時間の短縮は,  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger の forward mode activity を阻害すると  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルを介して流入した  $\text{Ca}^{2+}$  により膜直下の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が上昇し  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルを不活性化するためであることが明らかとなった。SR-intact 型と SR-depleted 型の活動電位波形で action potential-clamp を行ったところ, SR-intact の心室筋細胞に比較して SR-depleted の心室筋細胞において,  $\text{Ca}^{2+}$  電流のピーク値は 20% 減少したものの, 総  $\text{Ca}^{2+}$  流入量は 40% 増加していた。

以上のことから, 心室筋細胞において,  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの  $\text{Ca}^{2+}$  依存性不活性化機構は活動電位持続時間を調節し, 活動電位の間の総  $\text{Ca}^{2+}$  流入量を変化させることで, 筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵量を一定に保持し, CICR の効率を維持するための feed back 制御機構としての生理的意義を担うことを明らかにした。

## (P-2) ラット心筋細胞 L 型カルシウムチャンネルの PKA リン酸化制御における $\beta$ サブユニットの役割

名黒 功, 赤羽悟美 (東京大学大学院 薬学系研究科 薬効安全性学教室)

心筋細胞に存在する電位依存性 L 型カルシウムチャンネルは PKA リン酸化による機能修飾を受け, リン酸化によりカルシウムイオンの流入量を大きく増加させる。PKA による L 型カルシウムチャンネルの活性化は  $\beta$  アドレナリン受容体を介する心機能亢進など重要な生理機能に

関与しているが, チャンネルの機能変化に関わる PKA リン酸化部位などその分子メカニズムは未だに正確な理解がなされていない。我々は以前 PKA リン酸化による機能変化において, L 型カルシウムチャンネル  $\alpha 1C$  サブユニット ( $\text{Ca}_v 1.2$ ) のカルボキシル末端に存在するリン酸化

部位の関与とさらに複数のリン酸化部位が関わる可能性を示した。 $\beta$ サブユニットも PKA リン酸化部位を持つことから、本研究では L 型カルシウムチャネルの PKA を介した機能修飾における $\beta$ サブユニットの関与について検討した。

アデノウイルスベクターによる遺伝子導入を用い、ラット心室筋に $\beta$ サブユニットコンストラクトを過剰発現させ解析を行った。コントロール群（GFP のみを発現）では PKA 活性化刺激により L 型カルシウムチャネル電流は約 2 倍に増加した。 $\beta 1a$  サブユニットを心室筋細胞に過剰発現させると、コントロール群に比較して L 型カルシウムチャネル電流が約 2 倍に増加し、PKA 活性化刺激に対する反応は消失した。ゲーティングチャージの総量は $\beta 1a$  過剰発現では増加しておらず、カルシウムチャネル電流増加は PKA 活性化刺激の場合と同様にカルシウムチャネルの開口確率の上昇によるものと考えられた。さらに、 $\beta 1a$  サブユニットのアミノ末端領域の欠損

ミュータントを用いた実験および $\beta 2$  サブユニットアイソフォームの比較から、 $\beta$ サブユニット過剰発現によるカルシウムチャネル電流の増加の程度はアミノ末端領域に依存することを見出した。

これらの結果から、PKA による L 型カルシウムチャネルの機能変化には $\alpha 1$  サブユニットだけでなく $\beta$ サブユニットがアイソフォーム特異的に関与することが明らかになった。また、PKA 刺激による電流増加が $\beta$ サブユニット過剰発現で模倣されたことから L 型カルシウムチャネルの PKA リン酸化による電流増加は $\alpha 1$ 、 $\beta$ 両サブユニットの相互作用を増強することでなされている可能性も考えられる。 $\beta$ サブユニットが L 型カルシウムチャネルの PKA シグナルに対する反応性の決定要因になりうることは、各組織において非常に多くの組み合わせが存在する L 型カルシウムチャネルのサブユニット構成の意味を理解する上でも重要な知見であると考えられる。

## 12. 大脳皮質の神経回路

2002年12月3日-12月4日

代表・世話人：金子武嗣（京都大学大学院 医学研究科）

所内対応者：川口泰雄

(1) 視床-皮質投射と皮質内回路：アセチルコリンによる制御等

木村文隆（大阪大学大学院 医学系研究科 神経統合機能分野）

(2) 体性感覚野における機能的皮質内結合の非対称性

安島綾子（理化学研究所 脳科学総合研究センター 視覚神経回路モデル研究チーム）

(3) 抑制・興奮神経ネットワークにおける発火タイミングの理論的解析

青柳富誌生（京都大学大学院 情報学研究科）

(4) 視覚野における NMDA 受容体依存性の興奮性および抑制性シナプス可塑性

吉村由美子（名古屋大学 環境医学研究所 視覚神経科学）

(5) 大脳皮質の線維連絡と抑制性神経細胞

山下晶子（日本大学 医学部 解剖学）

(6) 聴覚皮質のマイクロおよびマクロネットワーク

小島久幸（理化学研究所 脳科学総合研究センター 脳皮質機能構造チーム）

### 【参加者名】

青柳富誌生（京都大学大学院 情報学研究科）、有國富夫（日本大学 医学部）、一戸紀孝（理化学研究所）、内田豪（理化学研究所）、金子武嗣（京都大学大学院 医学研究科）、姜英男（大阪大学大学院 歯学研究科）、北野勝則（玉川大学 工学部）、木村文隆（大阪大学大学院 医学研究科）、黒谷亨（名古屋大学 環境医学研究所）、小島久幸（理化学研究所）、坂本浩隆（広島大学 総合科学部）、宋文杰（大阪大学大学院 工学研究科）、竹川高志（京都大学大学院 情報学研究科）、坪泰宏（京都大学大学院 理学研究科）、任鳴（名古屋大学 環境医学研究所）、野村真樹（京都大学大学院 情報学研究科）、端川勉（理化学研究所）、服部

聡子（大阪大学）、深井朋樹（玉川大学 工学部）、福田敦夫（浜松医科大学 生理学第一講座）、藤山文乃（京都大学大学院 医学研究科）、古田貴寛（京都大学大学院 医学研究科）、古屋敷智之（京都大学大学院 医学研究科）、村越隆之（日本医科大学 薬理学講座）、森琢磨（京都大学大学院 霊長類研究所）、吉村由美子（名古屋大学 環境医学研究所）、安島綾子（理化学研究所）、山下昌子（日本大学 医学部）、井本敬二、小川正、川口泰雄、荻部冬紀、窪田芳之、根東覚、重本隆一、宮田麻理子、森島美絵子（生理学研究所）、木津川尚史、小松勇介、坂田秀三、高畑亨、渡我部昭哉（基礎生物学研究所）

### 【概要】

中枢神経系の最も重要な機能が大脳皮質に存在しているということについて、おおかたの神経科学研究者の見解は一致していると考えられます。実際、認知・感情・思考・記憶・意識など、科学的な立場からしても未だに神秘的に見える機能を実現している大脳皮質がいったいどのような神経回路を使用しているのか、大きな興味を持たれるところです。本研究会では、大脳皮質のニューロンとそれらが織りなす神経回路についてボトムアップ的に研究している研究者と神経回路のモデルを研究している人々に集まっていただいて、各自の最近の研究結果を発表し討論する機会を提供したいと考えました。加えて参加者が、本研究会の情報交換の中から次の大脳皮質研究のテーマを獲得し、それぞれの研究を発展させるアイデアを掴むことを希いました。

実際には以下の6人の講演者の方々にお願いして、講演による話題提供と議論を行いました。木村氏、安島氏、

吉村氏の3演題では、主に皮質スライスを用いて細胞内記録・ホールセル記録・電位感受性色素を用いた記録などの電気生理学的な方面から話しをしていただきました。青柳氏の講演ではモデルニューロンを数値シミュレーションで解析する方法を、山下氏、小島氏の2講演では大脳皮質ニューロン結合の形態学的な解析を話していただきました。主に30代から40代前半の講演者に現在進行形の話題を提供していただいて、参加者の多くが大脳皮質の神経回路について様々な議論を交わすこ

とが出来ました。議論は白熱して予定時間をかなりオーバーしてしまいましたが、学会などでは出来ないレベルの密度の高い討議が出来たものと感じています。また、システムの神経科学をボトムアップの方向で研究するという意味で志を同じくする研究者が集まって議論を交わすことにより、新たな着想を得る、客観的な批判にさらされるなど大脳皮質研究の発展に役立つ様々な効果があったと考えています。

## (1) 視床-皮質投射と皮質内回路：アセチルコリンによる制御等

木村文隆（大阪大学大学院 医学系研究科 神経統合機能分野）

大脳皮質は前脳基底部より ACh 含有性線維の投射を受けるが、ACh が皮質内神経回路をどのように制御しているかの詳細については未だに不明な点が多い。我々はこれまでに、皮質細胞間シナプスがムスカリニック受容体 (mACh-R) を介して抑制を受けることを示してきた。今回は視床皮質投射に対するニコチン受容体 (nACh-R) の作用を検討している。マウスのバレル皮質より、視床皮質標本を作製し、視床電気刺激に対する皮質での反応を記録した。nACh-R 作動薬である nicotine は、4 層より記録される単シナプス性の EPSC に対し、シナプス前性の促通作用を示した。視床-皮質シナプス伝達が nicotine により増強されるとすると、それが皮質

内興奮伝播にどのような影響を持つか、特にバレル構造との関連において解析することは ACh の作用を、皮質構造、神経回路との関連において把握するために重要と考えられる。そこで、同一の標本を用いて光学的計測法により nicotine 投与の効果を検討した。その結果、nicotine は4層における興奮を増強するだけでなく、浅層、深層においても興奮伝播を強く増強していた。また、4 層においては興奮増強に引き続き、バレル構造特異的に抑制効果も引き起こす結果を得た。このことは、nicotine が皮質内で何らかの抑制性の回路を駆動している可能性があるものとして現在検討中である。

## (2) 体性感覚野における機能的皮質内結合の非対称性

安島綾子（理化学研究所 脳科学総合研究センター 視覚神経回路モデル研究チーム）

触覚認識のメカニズムを理解する事を目指し、個体レベルで、内因性シグナルによる光計測法を用いて頬髭刺激時の皮質活動をモニターし、①2本の隣り合った髭への刺激タイミングによって皮質活動の強さに違いのある事、②①の皮質活動の強さ調節に皮質内抑制性神経回路が関わっている事、③同列内の2本の髭への刺激タイミングの違いによる皮質活動差は、列が異なる2本の髭では見られない事を明らかにした。以上3つの現象に関わる皮質内神経回路を詳細に調べるため、生きた状態でバ

レル構造が可視化できる2種類の脳スライス作成方法を確立した（バレル一列を含む脳スライスとバレル列に垂直な脳スライス）。この2種類の脳スライスを用い、2/3層の錐体細胞から隣接する2/3層刺激に伴ったシナプス電位を記録することによって、バレル列に沿った方向とバレル列に垂直な方向での皮質内水平結合の強さ・長さを比較した。興奮性及び遅い抑制性を介したシナプス結合はバレル列内に局在し、早い抑制を介した結合は列内・列間とも差が見られず等方的であった。記録した錐

体細胞の樹状突起は、バレル列に沿って長く伸びている事を発見した。外界探索時に髭を前後に動かす whisking 行動の方向と同じ方向に髭列が伸びている事を考え合わ

せると、同列内の髭への刺激タイミングが外界触覚認識において重要であり、バレル列内の皮質内神経結合がより発達していると考えられる。

### (3) 抑制・興奮神経ネットワークにおける発火タイミングの理論的解析

青柳富誌生 (京都大学大学院 情報学研究科)

近年、高次機能に神経細胞間の発火タイミングが重要な役割を果たしている可能性が実験・理論両面から示唆され、その検証を行う研究が活発に行われている。一方、大脳皮質の局所回路の構造や入出力、視床とのループ構造など、大脳皮質の理論モデルを構築する上で参考になる生理学的知見に関しても情報が整理されつつある。今回は、そのような背景の上で、神経ネットワークのモデルとそこから得られる理論的結果を同期現象を軸にレビューしたい。まずは解析手法として、複雑な神経細胞のダイナミクスから本質的に有効な自由度までダイナミクスを簡略化する理論的手法の心を簡単に紹介し、そこから得られた幾つかの結果を紹介する。例えば、AHP を引

き起こすカレントは同期スパイクを安定化する傾向がある。また、ある条件下ではバースト発火の一周期あたりのスパイク数が増加するところで、同期・非同期の安定性のシャープな切り替わりが生じることも示される。この場合も同期・非同期の切り替わりの実現におけるバーストという発火様式の有用性が意外な形で見いだされる。最後の例としては、近年注目を集めている抑制性ニューロンとギャップ結合の役割に関して、多様なスパイクタイミングの学習可能性という観点から、なぜ興奮性ニューロンにはギャップ結合があまり見られないかという理由にも言及したい。

### (4) 視覚野における NMDA 受容体依存性の興奮性および抑制性シナプス可塑性

吉村由美子 (名古屋大学 環境医学研究所 視覚神経科学)

視覚野の機能的な神経回路は発達期の視覚経験に依存して形成されるが、その基礎過程として神経活動に依存したシナプス伝達の可塑的変化が考えられる。これまでに視覚野興奮性シナプスの NMDA 受容体依存性長期増強の誘発には、シナプス前線維の高頻度刺激か、その低頻度刺激とシナプス後細胞の脱分極を組み合わせるペアリング刺激が用いられてきた。我々はラット視覚野切片標本の 2/3 層錐体細胞からホールセル記録を行い、2 つの条件刺激による可塑性について詳しく検討した。その結果、ペアリング刺激は EPSP の長期増強を誘発するのに対して、高頻度刺激は EPSP の長期増強ではなく IPSP の長期抑圧を誘発し、電場電位の長期増強を発生させた。両可塑的変化は、錐体細胞への興奮性入力が活動電位を

引き起しやすくするという点では共通であるが、異なる特性を示した。興奮性シナプスの長期増強が発達期に限局して発生するのに対して、抑制性シナプスの長期抑圧は発達期と成熟期のどちらでも起きた。また NMDA 受容体は発達に伴いそのサブユニット構成が変化することが知られているが、EPSP の長期増強には発達期に多い NR2B サブユニットが IPSP の長期抑圧には NR2A サブユニットが主に関与していた。以上により、興奮性のシナプスの長期増強は発達期の経験に依存した神経回路形成に関与し、抑制性シナプスの長期抑圧は成熟した視覚野においても見られる視覚機能の可塑性に関与することが示唆される。

## (5) 大脳皮質の線維連絡と抑制性神経細胞

山下晶子（日本大学 医学部 解剖学）

バイオサイチンを使いサル運動皮質の局所回路を形成する個々の神経線維を詳細に追跡した。カラムサイズに限局した広がりを持つ軸索や特定の層にのみ終末を持つ錐体細胞があり、終末分布が限定される特別な作用を持つ錐体細胞があると予想される。

げっ歯類大脳皮質では抑制性 GABA 神経細胞のマーカであるカルビンジン (CD), カルレチニン (CR), パルブアルブミン (PV) は異なったタイプの細胞に存在する。サル大脳皮質でも 3 種とも細胞体では GABA と共存する。CD 細胞軸索は陰性樹状突起の線維束に近接し終末を形成し, CR 細胞は陰性樹状突起遠位部に終末を持つ他, CR 陽性樹状突起にも終末を持つ。PV 陽性細胞

は陰性樹状突起や陰性軸索, 錐体細胞の細胞体に終末を持つ。サル大脳皮質でも 3 者は異なったタイプの抑制細胞に含まれ, 皮質回路網でも異なった役割を担うものと考えられる。

マウス視覚野で領野間結合である feedback (FB) および forward (FW) 結合と GABA 抑制細胞の関係とその発達を調べると, 生後 15 日では両投射経路に差は見られないが, 成熟期では FW は GABA-PV 細胞の細胞体や樹状突起近位にミトコンドリアを多く含む終末を持つのに対して, FB は樹状突起遠位部にミトコンドリアのほとんど含まない終末を持つ。この解剖学的な差が FW と FB の生理学的な差とも関係していると考えられる。

## (6) 聴覚皮質のミクロおよびマクロネットワーク

小島久幸（理化学研究所 脳科学総合研究センター 脳皮質機能構造チーム）

聴覚皮質で spectrotemporal な活性パターンを推定するには, 単一細胞およびその集団の結合またそれらの関連をみいだすことが重要と思われる。今回単一細胞また細胞集団レベルでこれらのことを調べてきたので報告する。

(1) ネコにおいて単一錐体細胞は水平軸索から数百  $\mu$  m 置きに脳表に向かう終末側枝を形成した (平均 2.6 / 細胞)。また小細胞集団の投射を tracer によって標識すると等周波数帯にそって数々の patch が認められた (平均 4.6/injection)。平均値の比較から単一細胞は patch の全てではなく, 一部にのみ投射していると推測。

(2) 周波数軸に沿い隣接する一次聴覚野 (AI) ドメインに異なるトレーサーを注入して, 領域内, 外への重複 (収

斂) 投射を調べたところ, 注入部位の分離距離特異的な重複パターンが認められた。

(3) 音強度検出に関与すると考えられる発火パターンを一部の細胞は示す。

音強度があがるにつれ初めは発火が増加し, その後減少する nonmonotonic な細胞が知られている。この発火パターンの形成機構について in vivo 細胞内記録法で調べた結果, 2 層と 3 層で違いがあることが判明。

(4) 最近サルで what and where pathway が聴覚系にも見い出され, 2 次領域である belt 野が分岐点と考えられている。両経路の相互関連を 3 次領域である parabelt 野への投射から検討し, 重複投射があることから 2 経路が関連することが判明。

### 13. 機能的MRI研究会

2002年11月28日－11月29日

代表・世話人：定藤規弘

所内対応者：定藤規弘

- (1) The real-time analysis of fMRI data: algorithm and system development

E. Bagarinao, 中井敏晴 (産総研)

- (2) fMRI Studies of Human Brain Functions at Columnar Resolution

Kang Cheng, Allen R. Waggoner, Keiji Tanaka (理研)

- (3) MRI撮像音強度の変化に伴う聴覚野の賦活

岡田知久 (生理研)

- (4) EPI時系列信号における低周波ドリフトの要因について

島田育廣, 藤本一郎, 正木信夫 (ATR脳活動イメージングセンター)

- (5) fMRI/EEG同時計測とBe-fMRI (Brain event-related fMRI)

宮内哲, 三崎将也, 伊丸岡俊秀, 田中靖人 (通総研)

- (6) fMRIとNIR同時計測

柏倉健一, 佐藤哲大, 米倉義晴 (福井医大)

- (7) テンソル画像

佐藤哲大, 柏倉健一, 米倉義晴 (福井医大)

- (8) 認知記憶課題における前頭葉活動

宮下保司, 桔梗英幸, 小西清貴 (東大)

- (9) A Comparison of the Temporal Characteristics of the BOLD Responses in V1, MT, and the Primary Motor Cortex

(M1) to a Variety of Stimuli

R. Allen Waggoner, Kang Cheng, Keiji Tanaka (理研)

- (10) 子供と老人のfMRI

泰羅雅登 (日本大学)

- (11) activation studyにおける個人差についての検討

岩田一樹<sup>1</sup>, 杉浦元亮<sup>1</sup>, 渡邊丈夫<sup>1,2</sup>, Jorge Riera<sup>1</sup>, 三浦直樹<sup>1</sup>, 秋月祐子<sup>1,2,3</sup>, 佐々祐子<sup>1,4</sup>,  
渡部芳彦<sup>5</sup>, 生田奈穂<sup>1,4</sup>, 岡本英行<sup>1,2</sup>, 前田泰弘<sup>5</sup>, 松江克彦<sup>5</sup>, 川島隆太<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>東北大学未来 科学技術共同研究センター, <sup>2</sup>東北大学加齢研, <sup>3</sup>東北大院医, <sup>4</sup>東北大院国際文化, <sup>5</sup>東北福祉大)

- (12) 機能的MRIをもちいた新生児脳代謝活動変化の画像化

定藤規弘 (生理研)

#### 【参加者名】

小川誠二 (小川脳機能研究所), 岩田一樹, 渡邊丈夫, 秋月祐子 (東北大), 泰羅雅登 (日本大), 田中啓治, KangCheng (程 康), R Allen Waggoner, Pei Sun, 上野賢一, 伝優子, Justin Gardner, 堀江亮太, Chou I-han (理研), 中井敏晴, Bagarinao Epifanio Jr., 松尾香弥子, 斎藤もよこ (産総研), 正木信夫, 島田育廣, 藤本一郎 (ATR), 宮内哲 (通総研), 宮下保司 (東大), 米倉義晴, 柏倉健一 (福井医

大), 佐藤哲大 (奈良先端大), 定藤規弘, 本田学, 岡田智久, 齋藤大輔, 荒牧勇, 田中悟志, 原田宗子, 吉村久美子 (生理研・心理生理), 廣江総雄 (生理研・統合生理), 小松英彦 (生理研・高次神経性調節), 秋 伝海 (生理研・統合生理), 小川正, 田辺祐梨, 鯉田孝和 (生理研・高次神経性調節), 久保田哲夫 (生理研・統合生理), 伊藤南 (生理研・高次神経性調節)

## 【概要】

機能的磁気共鳴画像法（以下 fMRI）は近年著しく普及し、ヒトを含む霊長類の脳機能を非侵襲的に探る上で卓越した可能性をもつことが明らかとなってきた。その一方で適切な撮像方法や統計的解析法といった技術面のみならず、記録される信号変化のもつ生理学的意味（即ち局所脳血流あるいは電気的活動との関係など）を理解する上でも検討すべき課題が山積している。本研究会では、fMRI に関する技術的ならびに生理学的な諸課題について活発な議論をおこなうとともに、情報交換の

場を提供することを目的とする。具体的には、現在、fMRI 研究を盛んに実施している研究施設や装置開発など関連領域の研究者並びに技術者から、fMRI の記録・解析における技術的側面、ならびに BOLD 効果などの生理学的側面に関連する研究成果を募集し、発表ならびに討議を2日間にわたり活発に行った。こうした活動を通して、fMRI を神経科学の確固たる道具として使用できるようになることが期待される。

## (1) The real-time analysis of fMRI data: algorithm and system development

E. Bagarinao and T. Nakai

(Life Electronics Laboratory National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)

The real-time analysis of functional magnetic resonance imaging (fMRI) data advances the efficacy of fMRI as a flexible tool for neurological investigations for both basic research purposes and clinical applications. MRI systems with real-time statistical analysis capabilities have been used to provide immediate confirmation of activation, to assess subject performance and data quality, and to locate regions of interest, among others. In this work, we developed a system for the real-time analysis of functional magnetic resonance imaging (fMRI) time series. The system is composed of an MR scanner for data acquisition and paradigm control, a computational server consisting of a cluster of readily available personal computers (PC cluster) for real-time fMRI data analysis, and a storage device for storing data. The highly parallel, voxel-wise processing of fMRI data motivated the use of PC clusters for parallel computation. Advantages of using a PC cluster include a significant increase in

computational speed as well as the provision of the much needed storage requirement for processing fMRI data by pooling the resources, such as physical memory, of the different PCs in the cluster. To support real-time statistical analysis, we developed an algorithm to estimate the coefficients of general linear models (GLM) in real-time. Results of the real-time analysis of fMRI data of a normal subject performing a simple finger-tapping task demonstrate the capabilities of the described system. For a basic analysis without image preprocessing such as realignment, smoothing, or normalization, the time required to estimate the coefficients of a GLM with 15 terms, compute the t-statistics, and update the statistical map for each volume acquisition is about 0.175 s for a 64 x 64 x 30 image data and 0.27 s for a 128 x 128 x 30 image data, which is much less than the TR which was set to 5 s.

## (2) fMRI Studies of Human Brain Functions at Columnar Resolution

Kang Cheng, Allen R. Waggoner, Keiji Tanaka

(Laboratory for Cognitive Brain Mapping, RIKEN Brain Science Institute)

In this presentation, we demonstrate that with optimal imaging parameters and proper experimental procedures,

functional architectures such as ocular dominance columns in human primary visual cortex can be mapped with high-field

fMRI. Possible sources contributing to the functional BOLD contrast at columnar resolution and limiting factors in

conducting such experiments are discussed from both anatomical and imaging perspectives.

### (3) MRI 撮像音強度の変化に伴う聴覚野の賦活

岡田知久, 本田 学, 定藤規弘  
(生理学研究所 心理生理学研究部門)

機能的 MRI は言語課題を含めた多くの実験において用いられるが, 大きな撮像音は聴覚刺激呈示の妨げになる。その主要発生源となる傾斜磁場を一時的に止めることで相対的静音時間を設け, 聴覚刺激呈示を容易にする撮像方法について基礎的な検討を行った。実験 1 では健聴成人 14 人を対象に, 13-17 秒毎に 1 秒間傾斜磁場を止めた (OFF) ところ, 両側聴覚野に OFF に同期した広範な賦活を認めた。うち 11 人を対象に実験 2 を行った。

12-15 秒ごとに 5 秒間傾斜磁場を止めて, 引き続き聴覚野で起こった血流変化を実験 1 での OFF に対する応答曲線を用いて解析した。5 秒間の OFF 期間に伴う血流変化は, ON-OFF と OFF-ON の 2 つの変化時点に同期した応答曲線の線形和によりその 90% 以上が説明された。すなわち一次聴覚野は新たな刺激入力が生じた場合のみでなく, それが減少した場合にも, 定常状態よりも大きな賦活を示すことが判明した。

### (4) EPI 時系列信号における低周波ドリフトの要因について

島田育廣, 藤本一郎, 正木信夫  
(ATR 脳活動イメージングセンター)

長時間の fMRI 実験でしばしば見られる EPI 時系列信号の低周波ドリフトは, 脳活動に起因するものではないと考えられる。分析時にフィルタによる除去処理等を施すが, かえって有害な場合もある。このドリフトの要因を検討した。

(1) ファントムで長時間 EPI セッションを連続して行なうと, 信号変動及び画像シフトは 2 回目のスキャンで減少した。(2) 装置をウォームアップ後の連続セッションでは, 信号変動・画像シフトともに改善された。(3) 装

置のウォームアップなしで脂肪抑制パルスの FA を小さくしてファントムをスキャンすると信号変動は減少したものの, 画像シフト量は 2 回目で減少する。(4) (3) と同様の条件で生体のスキャンを行うと, (3) 同様に信号変動は減少したが, 画像シフトの傾向は 2 回目に減少した。

以上から, 低周波信号変動は傾斜磁場の特性変動による中心周波数変動に起因しており, 脂肪抑制が不完全になるためと考えられる。

### (5) fMRI/EEG 同時計測と Be-fMRI (Brain event-related fMRI)

宮内 哲, 三崎将也, 伊丸岡俊秀, 田中靖人  
(通信総合研究所 関西先端研究センター)

fMRI と EEG の同時計測はこれまでに報告されているが, 有効な応用例は少ない。われわれは以下の二点

を目的として fMRI と EEG の同時計測システムを構築した。

(1) fMRI の実験中は、被験者は仰臥位で全く動けないため、しばしば覚醒水準が低下する。覚醒水準の低下に伴い、反応時間等の行動指標や脳波パターンは顕著に変化するにもかかわらず、これまで覚醒水準の変動に伴う脳活動の変化に関する検討はほとんど行なわれていない。

(2) さらに、従来の特定のタスクに対する fMRI 信号値の

変化を計測する代わりに、EEG 上の phasic event に伴う fMRI 信号値の変化を計測する、Brain event-related fMRI (Be-fMRI) を新たに提唱する。

今回は、fMRI/EEG 同時計測システムの詳細と (2) の Be-fMRI の計測結果例を中心に報告する

## (6) fMRI と NIR 同時計測

柏倉健一, 佐藤哲大, 米倉義晴

(福井医科大学 高エネルギー医学研究センター)

近赤外計測装置 (NIRS) 及び機能的 MRI (fMRI) で得られる情報の統合が可能かどうか検討する目的で同時計測を試みた。光トポグラフィー装置 (日立メディコ) に延長ケーブルを接続し、3T MRI 装置 (GE 横河メディカル) 内で光刺激による脳賦活検査を行った。正確な位置の同定を行うため、光トポグラフィ装置の各プローブには直線マーカーを配置した。被験者は健康成人男女計 12 名である。矩形チェッカーボード刺激を用い 4 種類の網膜地図を作成し空間的比較を行った (n=7)。さらに、放

射状チェッカーボードを用い刺激時間を 2-20 秒と変化させ、時間的比較を行った (n=5)。タイミングの正確性を計るため MRI と刺激提示ソフト及び NIRS 装置間でゲーティングを行った。この結果、各信号 (BOLD 信号及び oxy-, deoxy-Hb) は空間的、時間的に良好な相関を示した。また、時間不変線形システムからの乖離も顕著であった。従って、両モダリティともほぼ同一の生理学的現象を観察していると考えられた。

## (7) テンソル画像

佐藤哲大, 柏倉健一, 米倉義晴

(福井医科大学高エネルギー医学研究センター)

MRI を用いた脳機能研究の発展にしたがって、脳内白質の構造解析は脳内の機能連関をはかる目的から今まで以上に重要となってきた。MRI 装置や撮像技術の進歩にともなって、水分子の拡散様態を容易に画像化できるようになった。拡散様態をとらえた拡散強調画像は、水分子の拡散の程度を輝度によって表現することができ、拡散強調画像を複数枚用いることで、拡散テンソル画像の算出が可能となる。脳内白質は部位によって拡散の程度が大きく変化するという特徴を持ち、拡散の速さや方向は白質内に含まれる神経線維束の方向と、検出のための拡散強調磁場勾配の方向との相互作用による影響を受ける。この現象は拡散の不等方性と呼ばれ、拡散強調磁場勾配の方向に平行な白質内線維束では大きな拡散係数、

垂直な線維束では小さな拡散係数が計測される。本研究では脳内白質神経線維束の結合度を、参照ボクセルと近接ボクセル間の方向に射影された拡散テンソル距離を利用して解析する手法を提案し、3T MRI を用い計測した実データへの適用結果を示す。この拡散テンソル距離は、各方向へのテンソル楕円体の中心から表面までの距離に基づく関数で定義され、この距離にしたがったラベルを用いて脳内白質のセグメンテーションを行なった。また本手法の応用として、スライス内の任意の点から特定線維束を反復して検索する手法とその結果についても述べる。この手法では脳内白質に存在する特定の線維束である、脳梁および内包のセグメンテーションが可能であった。提案手法は従来の固有第一ベクトルの曲率や円錐角

を利用した手法と比較して、テンソルの形状特徴を反映した距離関数の利用によって近傍の探索時に自由度が高い特徴をもつ。本研究は脳内白質神経線維束の結合度を

定量的に解析する研究の一環であり、脳機能との関連解明に寄与できるものである。

#### (8) 認知記憶課題における前頭葉活動

宮下保司, 桔梗英幸, 小西清貴  
(東京大学 医学部 生理学教室)

MRI (fMRI) の発展によって、多くの記憶課題（特にエピソード記憶課題）において、広範な前頭葉部分の神経活動が報告されるようになった。しかし、こうした神経活動がどのような認知的情報処理をおこなう基礎となっているのかは必ずしも明らかではない。神経活動の局在性、異なる課題間の活動領域の重複、課題の神経心理学的背景等を考慮して、最近いくつかの機能画像計測を

行った。技術的には、cognitive subtraction 型でなく、可能な限り parametric modulation 型のデザインを採用するように努めた。そのうち、健常被験者を対象として行った近時記憶 (recency memory) 課題、フィーリング・オブ・ノウイング (feeling-of-knowing) 課題等の知見を中心に報告する。

#### (9) A Comparison of the Temporal Characteristics of the BOLD Responses in V1, MT, and the Primary Motor Cortex (M1) to a Variety of Stimuli

R. Allen Waggoner, Kang Cheng, Keiji Tanaka  
Laboratory for Cognitive Brain Mapping, RIKEN Brain Science Institute

In an effort to look beyond the basics of the BOLD response, and elucidate aspects which are specific to a given stimulus or to a given cortical area, we have compared BOLD responses in V1, MT, and M1 to a variety of stimuli. Stimuli that produce a strong response in either the visual cortex (a flickering checker board and moving dots) or the primary motor cortex (finger tapping) were used. The resulting time

courses were compared, looking for common and unique features. The results in the visual areas show a two-stage rise for both stimuli, which is not seen in M1. Also, the flickering checker board caused the normal 0.1Hz vasomotion oscillations to become more pronounced during the sustained response in the visual areas, compared with the other stimuli both in the visual areas and M1.

#### (10) 子供と老人の fMRI

泰羅雅登  
(日本大学)

機能的 MRI (fMRI) は PET に比べて非侵襲性が高いため、これまでは調べるのが難しかった、健常な子供や老人の脳活動をこれを用いて調べるのが可能になった。

これまでに 6~14 歳の健常な子供を被検者として調べたところ、運動野や視覚野など、髄鞘化の発達が早くおこる領域では、fMRI を用いて脳の賦活を成人と同様に観察

することができることがわかった。しかし、前頭連合野など、発達の遅い領域では、幼少児では脳の賦活がうまく描出できず、fMRI activation の原理である BOLD 効果が、髄鞘化が未発達な領域では観察できない可能性を示

差する結果を得た。一方、老人の fMRI では、前頭葉課題を行わせたときには、前頭葉の形態学的な萎縮が進んでいるにもかかわらず、健常な青年と変わらない活動が得られた。今回はこれらのケースについて考察する。

### (11) activation study における個人差についての検討

岩田一樹<sup>1</sup>，杉浦元亮<sup>1</sup>，渡邊丈夫<sup>1,2</sup>，Jorge Riera<sup>1</sup>，三浦直樹<sup>1</sup>，秋月祐子<sup>1,2,3</sup>，佐々祐子<sup>1,4</sup>，  
渡部芳彦<sup>5</sup>，生田奈穂<sup>1,4</sup>，岡本英行<sup>1,2</sup>，前田泰弘<sup>5</sup>，松江克彦<sup>5</sup>，川島隆太<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 東北大学未来科学技術共同研究センター，<sup>2</sup> 東北大学加齢医学研究所，<sup>3</sup> 東北大学大学院医学研究科，  
<sup>4</sup> 東北大学大学院国際文化研究科，<sup>5</sup> 東北福祉大学感性福祉研究所)

fMRI を用いた脳の賦活研究においては実験条件・課題の違いとそれに伴う MR 信号の変化との間の関連性が議論されるが、個人毎の MR 信号の反応性の差については十分考慮されてこなかった。そこで本研究では、健康成人 49 名を被験者として反応性の被験者間の個人差についての検討を行った。反応性の評価の為に標準課題として 1.5Hz の頻度で反転する白黒チェッカーフラッグを提示し反転のペースに同期して右手掌を開閉させる視覚刺激・運動課題を課し、5 秒毎に EPI 撮像を行った。安

静時を base line とした課題中の一次視覚野 (V1) ・一次運動野 (M1) の賦活を t 値で評価し、その被験者間の差を検討した。その結果、V1 の t 値の範囲は 5.8-22.6 (12.9 ± 4.0 (mean ± SD))，M1 は 3.8-24.4 (15.7 ± 5.0) と大きなばらつきが認められた。この結果から、賦活研究においては課題による賦活の差のみならず MR 信号の反応性の個人差が小さくないことに十分注意を向ける必要があると考えられる。

### (12) 機能的 MRI をもちいた新生児脳代謝活動変化の画像化

定藤規弘<sup>1</sup>，山田弘樹<sup>2</sup>，米倉義晴<sup>3</sup>

(<sup>1</sup> 生理学研究所，<sup>2</sup> 福井医科大学放射線科，<sup>3</sup> 福井医科大学高エネルギー医学研究センター)

BOLD 信号の変化は、脳血流の変化のみならず酸素代謝の変化をも反映し得ると考えられる。ヒト脳はその発生初期において形態機能代謝の各側面から急激な変化をしめすことから、神経活動に関連する代謝活動を指標に、発育過程を画像化することを試みた。機能的 MRI をもちいた視覚刺激課題を施行したところ、胎生期間の補正をおこなった年齢で生後 8 週以前では、視覚刺激に対して BOLD 信号の上昇を認め、これは成人におけるパターンと一致していた。一方、8 週以降では逆に MR 信号の減少が見られた。一次視覚野においては、生後 2 ヶ月からシナプス密度の急増が見られ、その後 3 歳まで緩やかな

シナプス減少が観察された。MR 信号減少の見られる時期はまたブドウ糖代謝の増加する時期とも一致している。ブドウ糖代謝はシナプス活性を反映していることを考慮すると、この時期のシナプス形成が急激に増加することと一致する。これらから、生後 8 週以降は、視覚刺激による過剰シナプス活動の増加が、酸素消費の増大ひいては局所還元型ヘモグロビン量を増加させて BOLD 信号の減少に至るものと考えられた。機能的 MRI は正常脳における発育過程を代謝の変化として画像化でき、髄鞘化とならんで発育過程の milestone となりうることが示された。

## 14. シナプス伝達制御の分子機構

2002年9月27日－9月28日

代表・世話人：平野丈夫（京都大学 理学研究科）

所内対応者：伊佐 正

- (1) 小脳プルキンエ細胞の興奮性シナプス伝達に対するグルタミン酸トランスポーター阻害剤の作用  
飯野昌枝, 高安幸弘, 小澤滯司（群馬大学 医学部）
- (2) 神経細胞死により促進される海馬歯状回の代償的神経新生  
鎌田真希, 八尾 寛（東北大学 生命科学研究科）
- (3) 単一海馬苔状線維終末における  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルサブタイプの多様性  
宮崎憲一, 八尾 寛（東北大学 生命科学研究科）
- (4) 海馬 CA1 シナプスにおけるグルタミン酸放出に関与する電位依存性カルシウムチャネルの機能同定  
真仁田聡, 河村吉信, 井上雅司, 工藤佳久, 宮川博義（東京薬科大学）
- (5) カルシウム蛍光シグナルの経時変動による海馬顆粒細胞の発火回数解析  
村山正宣, 井上雅司, 工藤佳久, 宮川博義（東京薬科大学）
- (6) 成獣マウス海馬神経回路の機能的・構造的非対称性  
伊藤 功（九州大学理学研究科）, 重本隆一（生理学研究所）
- (7) 視覚野における2種類のNMDA受容体依存性シナプス可塑性  
吉村由美子, 小松由紀夫（名古屋大学 環境医学研究所）
- (8) シナプス後部蛋白質の分子種特異的な動態  
岡部繁男（東京医科歯科大学 医歯学総合研究科）
- (9) グルタミン酸受容体 $\delta 2$ サブユニットの細胞レベルではたらき  
矢和多智, 平野丈夫（京都大学 理学研究科）
- (10) グルタミン酸受容体 $\delta 2$ サブユニットの生体におけるはたらき  
吉田盛史, 平野丈夫（京都大学 理学研究科）
- (11) 大脳皮質－脊髄介在ニューロン系の運動制御における役割  
伊佐 正（生理学研究所）
- (12) シナプス前終末におけるミオシンの働き  
持田澄子（東京医科大学）
- (13) Roles of synaptotagmin I in synaptic transmission  
城所良明（群馬大学 医学研究科）
- (14) 新しい神経伝達物質放出制御因子とアクティブゾーン構成因子  
高井義美（大阪大学 医学研究科）
- (15) 2光子励起法を用いたシナプス様小胞の融合細孔とエンドサイトーシスの定量的解析  
河西春郎（生理学研究所）
- (16) タイプ3 リアノジン受容体によるカルシウム遊離と伝達物質放出促進機構  
久場健司, 久保田正和, 成田和彦, 鈴木慎一, 曾我聡子, 秋田天平, 蜂須賀淳一  
（名古屋大学 医学研究科）
- (17) 神経終末においてシナプス伝達を制御するKチャネル  
石川太郎, 李文斌, 岩崎真一, 斎藤直人, 高橋智幸（東京大学 医学研究科）

## (18) 視細胞の代謝型グルタミン酸受容体によるグルタミン酸作動性シナプス伝達の調節

細井延武, 洪 鐘哲, 立花政夫 (東京大学 人文社会系研究科)

## (19) 青斑核ニューロンにおけるメチルフェニデートの作用

赤須 崇, 木谷有里 (久留米大学 医学部)

## (20) 虚血性神経細胞死に寄与する細胞内情報伝達過程

田中永一郎 (久留米大学 医学部)

## 【参加者名】

真仁田聡, 村山正宜, 井上雅司, 宮川博義, 河村吉信 (東京薬科大生体高次), 工藤佳久 (東京薬科大生命科学), 飯野昌枝, 齋藤康彦, 城所良明 (群馬大 医), 平野丈夫, 大槻元, 鶴飼健, 鶴野瞬, 川口真也, 矢和多智, 吉田盛史 (京都大 理), 宮崎憲一 (東北大 生命科学), 持田澄子 (東京医科大), 伊藤功, 川上良介 (九州大院 理), 漆戸智恵, 岡部繁男 (東京医歯大), 小松由紀夫, 吉村由美子 (名古屋大学・環境医学), 細井延武 (東京大院 人文), 金子雅博, 山下貴之, 松山恭子, 中村行宏, 入村早苗, 山下滋郎, 鷹合秀輝, 鈴木大介, 水谷治央, 齋藤直人,

小池真紀, 川上典子, 高橋智幸, 辻本哲宏, 石川太郎 (東京大院 医), 鎌田真希, 八尾寛 (東北大院 生命科学), 安松信明 (東京大 理) 赤須崇, 田中永一郎, 木谷有里 (久留米大 医), 高井義美 (大阪大院 医), 河北友克 (豊橋技科大), 久場健司, 久保田正和, 西嶋泰洋, 鈴木慎一 (名古屋大院医), 井本敬二, 岩崎広英, 萩原明, 馬杉美和子, 宮田麻理子, 河西 春郎, 野口潤, 松崎政紀, 窪田芳之, 篠原良章, 根本知己, 兒島辰哉, 高橋倫子, 重本隆一, 坪川宏, 伊佐正, 関和彦, 坂谷智也, 山下哲司, 勝田秀行, 渡邊雅之, 李 鳳霞 (生理研),

## 【概要】

平成 14 年 9 月 27,28 日に生理学研究所研究会「シナプス伝達制御の分子機構」を行った。本研究会には, 生理学研究所外から約 50 名, 総勢約 70 名が参加して, シナプス伝達制御にかかわるさまざまな研究発表が行われ, 率直かつ活発な議論が展開された。研究発表は, シナプス前終末からの伝達物質放出を制御する分子 (カルシウムチャネル・シナプトタグミン・ミオシン・リアノジン受容体・ラブ等) や, 伝達物質放出過程についての解析, シナプス後部に局在する分子 (NMDA 受容体・グルタミン酸受容体デルタ 2 サブユニット・ホーマー・PSD95 等) のはたらきについての解析, シナプス可塑性機構についての研究, そして個体レベルの研究を含んでいた。発表者は細胞レベルの生理学研究者が中心となっていたが, 分子生物学研究者や形態学研究者も参加して, 2 光子顕

微鏡を使用した伝達物質放出過程に関する解析・ミュタントマウスを用いた培養神経細胞でのシナプス関連蛋白質の長時間のタイムラプス観察など, 最新かつ多様な研究発表がなされた。また, NMDA 型受容体サブユニットの左右での非対称な分布, および異なる NMDA 受容体サブタイプが興奮性と抑制性シナプスの近傍で役割分担していることを示唆する実験結果など, 意外性が高く興味深い研究発表が多くなされた。また本研究会では, 大学院生など若手に口演発表する機会を与えることを奨励したが, 発表した若手研究者はよい経験をしたように思われる。本研究会では, 異分野の研究者が一同に会し, 若手を含めて気軽な雰囲気の中で, 率直かつ建設的な議論を行い, 各人にとり有用で実質的な情報交換を行うことをめざしたが, その目的は達成できたように思う。

## 15. 第3回脳磁場ニューロイメージング

2002年12月11日－12月12日

代表・世話人：栗城眞也（北海道大学）

所内対応者：柿木隆介（統合生理研究施設）

（1）体性感覚情報処理におよぼす注意の影響

遠藤博史（産業技術総合研究所 脳神経情報研究部門）

（2）鍼，指圧，打撃による脳のMEG信号とdipoleの脳内ダイナミクス

川端啓介<sup>1</sup>，中岡高博<sup>1</sup>，M.R.Khan<sup>1</sup>，谷塚 昇<sup>1</sup>，内野勝郎<sup>2</sup>，村田和優<sup>3</sup>，外池光雄<sup>4</sup>

（<sup>1</sup>大阪府立大学，<sup>2</sup>平成医療学園専門学校，<sup>3</sup>明治東洋医学院専門学校，

<sup>4</sup>産技総研ライフエレクトロニクスセンター）

（3）弦楽器奏者の体性感覚誘発脳磁界皮質初期成分の計測

鈴木篤志<sup>1</sup>，木村友昭<sup>2</sup>，田野崎真人<sup>3</sup>，井口義信<sup>3</sup>，関原謙介<sup>4</sup>，橋本 勲<sup>5</sup>

（<sup>1</sup>東京都立科学技術大学大学院 システム基礎工学専攻，<sup>2</sup>筑波技術短期大学鍼灸学科，

<sup>3</sup>東京都精神医学総合研究所 脳機能解析部門，<sup>4</sup>東京都立科学技術大学電子システム工学科，

<sup>5</sup>金沢工業大学 人間情報システム研究所）

（4）擬似自己運動感覚に関連した脳磁界の計測

中川誠司，渡邊 洋，山口雅彦，西池季隆<sup>1</sup>，外池光雄（産業技術総合研究所，<sup>1</sup>大阪大学）

（5）第2次運動知覚機構の生理学的検討

祖父江文子，金桶吉起，柿木隆介（生理学研究所，名古屋大学医学部小児科）

（6）二味溶液の呈示条件における味覚情報処理機構の検討。

森川聖美<sup>1</sup>，山本千珠子<sup>2</sup>，中川誠司<sup>3</sup>，山口雅彦<sup>2</sup>，外池光雄<sup>2</sup>，山本 隆<sup>2</sup>

（大阪大学 人間科学部 行動生理学講座<sup>1</sup>，

産業技術総合研究所 関西センター ライフエレクトロニクス研究ラボ<sup>2</sup>）

（7）食品の色彩別脳磁場応答

繁富梨絵<sup>1</sup>，長尾絵美子<sup>1</sup>，佐藤千絵<sup>1</sup>，吉本知津<sup>1</sup>，奥田弘枝<sup>1</sup>，橋詰顕<sup>2</sup>，

栗栖 薫<sup>2</sup>，瀬山一正<sup>1</sup>，谷澤久之<sup>1</sup>，小園佳美<sup>3</sup>

（<sup>1</sup>広島女学院大学 生活科学部 生活科学科，<sup>2</sup>広島大学医学部 脳神経外科，

<sup>3</sup>広島女学院大学大学院 人間生活学研究科）

（8）味覚誘発脳磁場の周波数解析

吉本知津<sup>1</sup>，長尾絵美子<sup>1</sup>，佐藤千絵<sup>1</sup>，繁富梨絵<sup>1</sup>，奥田弘枝<sup>1</sup>，橋詰顕<sup>2</sup>，

栗栖薫<sup>2</sup>，瀬山一正<sup>1</sup>，谷澤久之<sup>1</sup>，小園佳美<sup>3</sup>

（<sup>1</sup>広島女学院大学 生活科学部 生活科学科，<sup>2</sup>広島大学医学部 脳神経外科，

<sup>3</sup>広島女学院大学大学院 人間生活学研究科）

（9）第一次味覚野の左右半球における非対称性

小早川達<sup>1</sup>，斉藤幸子<sup>1</sup>，後藤なおみ<sup>1</sup>，小川 尚<sup>2</sup>

（<sup>1</sup>産業技術総合研究所 脳神経情報研究部門，<sup>2</sup>熊本大学医学部 第二生理）

（10）平面型グラジオメータで検出された磁界の等高線表示

竹内文也，栗城眞也（北海道大学 電子科学研究所）

## (11) 脳磁図周波数トポグラフィー

橋詰 顕, 栗栖 薫, 有田和徳, 杉山一彦, 江口国輝, 花谷亮典

(広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 創生医科学専攻 先進医療開発科学講座 脳神経外科学教室)

## (12) 非加算誘発脳磁図の試み

川勝真喜, 内川義則, 小谷 誠 (東京電機大学)

## (13) 正中神経繰り返し刺激の MEG と測定変量間の伝達関数の同定

加藤健治<sup>1</sup>, 岸田邦治<sup>1</sup>, 深井英和<sup>1</sup>, 篠崎和弘<sup>2</sup>, 鶴飼 聡<sup>2</sup>, 山本雅清<sup>2</sup>

(1 岐阜大学大学院 工学研究科 応用情報学専攻, 2 大阪大学大学院 医学研究科 神経機能医学講座)

## (14) 刺激間隔における 1/fm ゆらぎの GO/NO-GO 反応によるベータ帯域非同期化

原田暢善<sup>1</sup>, 中川誠司<sup>1</sup>, 岩木 直<sup>1</sup>, Tom Holroyd<sup>2</sup>, 山口雅彦<sup>1</sup>, 外池光雄<sup>1</sup>, 守谷哲郎<sup>1</sup>

(1 産業技術総合研究所 関西研究センター ライフエレクトロニクス研究ラボ,

2 通信総合研究所 関西先端研究センター 柳田結集型特別グループ)

## (15) 視覚・聴覚の同時刺激による聴覚 N1m 潜時の変化

足立信夫, 小野弓絵, 小林宏史, 石山敦士, 葛西直子

(早稲田大学大学院 理工学研究科 電気工学専攻 超電導応用 (石山敦士) 研究室)

## (16) 逆方向マスキングを引き起こす聴覚刺激に対する N1m 反応

渡邊啓太, 川勝真喜, 内川義則, 小谷 誠 (東京電機大学)

## (17) 周波数変化に対する聴覚誘発脳磁界反応

神本さゆり<sup>1</sup>, 今田俊明<sup>2,4</sup>, 関原謙介<sup>3</sup>, 川勝真喜<sup>4</sup>, 小谷 誠<sup>4</sup>

(1 東京都立科学技術大学大学院 システム基礎工学専攻, 2 ワシントン大学 心脳学研究センタ,

3 東京都立科学技術大学 電子システム工学科, 4 東京電機大学)

## (18) 小児絶対音感保持者の N100m

広瀬宏之, 久保田雅也, 木村育美, 湯本真人, 榊原洋一 (東京大学医学部小児科, 同付属病院検査部)

## (19) 楽譜・楽音照合課題施行時の音楽家の脳磁場活動

湯本真人<sup>1</sup>, 松田眞樹<sup>2</sup>, 宇野 彰<sup>3</sup>, 伊藤憲治<sup>4</sup>, 金子 裕<sup>5</sup>, 加我君孝<sup>6</sup>(東大病院検査部<sup>1</sup>, 東京芸大大学院 音楽研究科<sup>2</sup>, 国立精神神経センター 精神保健研究所<sup>3</sup>東大 医学部 認知言語医学<sup>4</sup>, 国立精神神経センター 武蔵病院 脳外科<sup>5</sup>, 東大 医学部 耳鼻咽喉科学<sup>6</sup>)

## (20) Mirror Neuron Systems (MNS) は顎関節症 (Temporomandibular Disorders ; TMD) と関連するか?

澁川義幸<sup>1,2</sup>, 新谷益朗<sup>2</sup>, 熊井敏文<sup>3</sup>, 加藤元一朗<sup>2,4</sup>, 鈴木隆<sup>1,2</sup>,ZHANG Zhen Kang<sup>5</sup>, TING Jiang<sup>5</sup>, 下野正基<sup>2</sup>, 石川達也<sup>2</sup>, 中村嘉男<sup>2,6</sup>

(1 東歯大 口科研 生理, 2 東歯大 口科研, 3 松本歯大 口腔生理,

4 慶大 精神神経, 5 Peking Univ., 6 帝京平成大 福祉情報)

## (21) 大脳基底核運動路のネットワーク解析:加齢およびパーキンソン病(PD)における変化

岡山 晶, 谷脇考恭, 後藤純信, 吉良潤一, 飛松省三 (九州大学大学院 医学研究院 脳研臨床神経生理)

## (22) 三叉神経支配領域 CO2 レーザー刺激による痛覚誘発脳磁場に対する NMDA 受容体抑制薬の効果

<sup>1</sup> 松浦信幸, <sup>2</sup> 澁川義幸, <sup>1</sup> 一戸達也, <sup>2</sup> 鈴木 隆, <sup>1</sup> 金子 譲

(1 東京歯科大学歯科麻酔学講座, 2 東京歯科大学生理学講座)

## (23) MEG によるてんかん発作波の解析

宇留野勝久 渡辺裕貴 (国立療養所 静岡神経医療センター)

## (24) MEG によるスパイクマッピングと頭蓋内脳波所見の比較

金子 裕, 仲間秀幸, 新村 核, 久保田有一, 大槻泰介, 岡崎光俊, 有馬邦正

(国立精神・神経センター武蔵病院 脳神経外科, 臨床検査部, 精神科)

(25) 統合失調症における対刺激パラダイムによる聴覚性MEG応答の検討

加藤 隆<sup>1</sup>, 加藤元一郎<sup>2</sup>, 梅田 聡<sup>3</sup>, 村松太郎<sup>2</sup>, 秋根良英<sup>2</sup>, 新谷益朗<sup>4</sup>  
(<sup>1</sup>井之頭病院, <sup>2</sup>慶應義塾大学 医学部 精神神経科学教室,  
<sup>3</sup>慶應義塾大学 文学部, <sup>4</sup>東京歯科大学 脳科学研究施設)

(26) Stroop 課題による精神分裂病研究—MEGの空間フィルタ法による解析—

川口俊介, 篠崎和弘, 鶴飼 聡, 石井良平, 山本雅清, 小川朝生,  
水野(松本)由子, 吉峰俊樹, 武田雅俊 (大阪大学大学院 医学系研究科 精神医学教室)

(27) 統合失調症患者のしりとり課題時における前頭前野および言語関連領域の活動

山本雅清, 篠崎和弘, 鶴飼 聡, 川口俊介, 石井良平, 小川朝生, 水野(松本)由子, 井上 健  
吉峰俊樹, <sup>1</sup>武田雅俊  
(大阪大学大学院 医学系研究科 精神医学教室, <sup>1</sup>大阪大学大学院 医学系研究科, 脳神経外科)

(28) 小児における顔と視線の認知について—ERP,MEGによる解析

木村育美, 久保田雅也, 広瀬宏之, 湯本真人, 榊原洋一  
(東京大学 医学部 附属病院小児科, 同検査部)

(29) 帯域ノイズの不快感 (アノイアンス) に関する脳磁図計測

添田喜治<sup>1</sup>, 中川誠司<sup>1</sup>, 外池光雄<sup>1</sup>, 安藤四一<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>産業技術総合研究所 ライフエレクトロニクス研究ラボ, <sup>2</sup>神戸大学大学院 自然科学研究科)

(特別講演) 脳におけるシンボル処理過程のモデル化—問題解決における機能部品組合せモデルの検討—

大森隆司, 小川昭利 (北海道大学大学院 工学研究科)

(特別講演) ヒトSI皮質内神経回路の機能的意義: 体性感覚誘発脳磁場による洞察

田野崎真人, 橋本 勲  
(東京都精神医学総合研究所 脳機能解析研究部門, 金沢工業大学 人間情報システム研究所)

【参加者名】

浅田博 (大阪府立大学総合科学部), 足立信夫, 石山敦士 (早稲田大学理工学), 井原綾 (大阪大学神経機能診断学), 宇留野勝久 (国立療養所静岡神経センター), 遠藤博史 (産業技術総合研究所), 大崎康宏 (大阪大学耳鼻咽喉科学講座), 大森隆司 (北海道大学大学院工学研究科), 岡山晶 (九州大学脳研臨床神経生理), 小川朝生 (大阪大学大学ポストゲノム疾患解析学), 小野弓絵 (早稲田大学理工学), 梶原茂樹 (島津製作所), 加藤健治 (岐阜大学工学部応用情報学科), 加藤元一郎 (慶應義塾大学精神神経科), 加藤隆 (井の頭病院), 金子裕 (国立精神・神経センター), 神本さゆり (東京都立科学技術大学大学院), 川勝真喜 (東京電機大学情報環境学部), 川口俊介 (大阪大学精神), 川田昌武 (徳島大学工学部), 川端啓介 (大阪府立大学), 岸田邦治 (岐阜大学工学部応用情報学科), 北飯圭 (NECソフト(株)), 木村育美, 久保田雅也 (東京大学小児科), 栗城眞也 (北海道大学電子科学研究所), 黒川智美 (九州大学脳研臨床神経生理), 小谷賢太郎 (関西大学工学部), 後藤純信 (九州大学脳研臨床神経生理), 後藤寛 (横河電

機株式会社), 小早川達 (産業技術総合研究所), 小林 宏史 (早稲田大学理工学), 小林健二 (広島大学整形外科), 小林義昌 (東京歯科大学衛生学講), 子安利征 (東京電機大学), 坂本真一 (大阪市立大学脳神経外科), 崎原ことえ (大阪大学医学部保健学科), 佐藤千絵 (広島女学院大学生生活科学部), 繁富梨絵 (広島女学院大学生生活科学部), 篠崎和弘 (大阪大学精神科), 柴玲子 (東京電機大学), 澁川義幸 (東京歯科大学生理学講座), 島浩史 (金沢大学脳神経外科学), 鈴木篤志 (東京都立科学技術大学大学院), 鈴木紳 (NTT ドコモマルチメディア研究所), 須谷康一 (近畿大学総合理工学研究科), 千住淳 (東京大学総合文化研究科), 添田喜治 (産業技術総合研究所), 高田あゆみ (エレクトラ株式会社), 多賀野義隆 (大阪府立大学理学研究科数理), 竹内文也 (北海道大学 電子科学研究所), 谷本啓二 (広島大学歯学部歯科放射線学), 田野崎真人 (東京都精神医学総合研究所), 露口尚弘 (大阪市立大学脳神経外科), 鶴澤礼実 (福岡大学医学部小児科), 外池光雄 (産業技術総合研究所), 飛松省三 (九州大学脳研臨床神

経生理), 長尾絵美子 (広島女学院大学生活科学部), 中岡高博 (大阪府立大学理学研究科数理), 中川誠司 (産業技術総合研究所), 長崎信一 (広島大学大学歯科放射線学), 長峯隆 (京大高次脳機能総合研究センター), 忍頂寺毅 (NTT ドコモマルチメディア研究所), 橋詰顕 (広島大学脳神経外科学), 橋本章子 (信州大学大学院医療情報学専攻), 長谷川光広 (金沢大学脳神経外科学), 原 恵子 (国立精神神経センター武蔵病院), 原田暢善 (産業技術総合研究所), 東浦正和 (仁木工芸株式会社), 広瀬 宏之 (東京大学大学小児科学), 別所央城 (東京歯科大学口腔外科), 益子拓徳 (NTT ドコモマルチメディア研究所), 増本康平 (大阪大学人間科学), 松浦信幸 (東京歯科大学歯科麻酔学講座), 松橋眞生 (京都大学高次脳機能総合研究センター), 宮成愛 (東京大学農学生命科学研究科), 森川聖

美 (大阪大学人間科学学部), 山口雅彦 (AIST Life Labo.), 山崎貴男 (九州大学脳研臨床神経生理), 山田孝子 (国立療養所中部病院神経内科), 山本雅清 (大阪大学精神医学), 山本千珠子 (大阪大学大学院人間科学), 湯本真人 (東京大学医学部検査部), 横田公一 (CBC 株式会社), 芳村勝城 (国立療養所静岡神経医療センター), 吉本知津 (広島女学院大学 生活科学部), 渡邊裕 (東京歯科大総合病院口腔), 渡邊啓太 (東京電機大学), 渡辺裕貴 (国立静岡神経医療センター), 柿木隆介, 金桶吉起, 渡辺昌子, 乾幸二, 丸山幸一, 久保田哲夫, Tuan Diep Tran, 三木研作, 王曉宏, 秋云海, 宝珠山稔, 祖父江文子, 尾島司郎, 廣江総雄, 中田大貴, 和坂俊昭, Binh Thi Nguyen, 田村洋平 (生理学研究所)

## 【概要】

昨年度に続く第3回目として、「脳磁場ニューロイメージング」研究会を岡崎コンファランスセンターで平成14年12月11日(12時)から12月12日(17時30分)の日程で開催した。世話人は筆者(北海道大学, 栗城真也)と, 統合生理研究施設の柿木隆介教授である。

研究発表は「体性感覚, 視覚, 聴覚, 味覚, 臨床応用, 高次機能, 信号処理」のセッションに分け, 計29演題の発表が行なわれた。体性感覚では注意による早期MEG反応の減衰が35ms成分に見られるとの報告があり, IPSPとの関連などの討論がなされた。弦楽器奏者の左手手指の体性感覚誘発MEGと脳の可塑的な変化に関する先行研究があり, これに対する追試実験の報告がなされた。手指への電気刺激による反応は先行研究と異なり, 双極子モーメントと手指間の信号源距離には器楽訓練による有意な増加が見られなかった。しかし, 300-900Hzの高周波振動性反応には変化があり, 抑制性介在ニューロンの関与が指摘された。

味覚関連MEG反応では, 多数の被験者にわたる測定

を総合した結果が報告された。それによると最短潜時成分の双極子位置には左右脳半球差があり, 男性において左半球の活動が右より後方に位置するが女性では非対称性は見られないとのことであった。

信号処理関係の発表では独立成分分析を使って信号成分を雑音から弁別する試みが紹介され, 非加算誘発MEGが抽出できるとの報告が興味を集めた。音楽関連の計測では2件の発表があった。小児(7から14歳)の絶対音感保持者のAEF計測を行ないN100m成分の出現を論じたもので多数(10人以上)の小児被験者を測定した初めての例と思われる。また, 音楽専門家が無調音列を聴取しつつ楽譜との照合を行なう実験では, 左脳半球の種々の領野に活動が認められるという報告であった。

その他にも多くの興味ある研究発表があったが, 紙面の関係で割愛する。第1, 第2回研究会と同様に講演時だけではなく休憩時にも活発な討論があり, 貴重な情報交換の場となっていた。この方面の研究の推進に資するところ大なるものがあると感じた次第である。

## (1) 体性感覚情報処理におよぼす注意の影響

遠藤博史 (産業技術総合研究所 脳神経情報研究部門)

刺激に注意を向ける場合, 手の位置や見え方と言ったトップダウン的な要素が注意の効果に影響をおよぼす。そこでこのような効果が体性感覚情報処理の脳活動にど

のような変化をもたらすかを見ることによって, トップダウン的な情報が体性感覚情報処理のどの段階で付加されるかの検討を行った。左右両人さし指ヘランダムな刺

激を与え、被験者は target 刺激が来る一方の指に注意を向け、注意していない刺激に対する反応の変化を計測した。注意は 80ms 以降の活動に影響をおよぼしたが、手の位置や見え方と言ったトップダウン的な要素は、活動強度に変化をもたらさなかった。また刺激後 35ms の成

分は、注意側の刺激に対してその活動強度が有意に減少した。以上のことから、注意の効果には 2 段階あり、まずは体性感覚そのものに対する注意（二次体性感覚野以降の処理に影響）であり、次は刺激の弁別にかかわるような、高次の処理に関した注意であると考えられた。

## (2) 鍼、指圧、打撃による脳の MEG 信号と dipole の脳内ダイナミクス

川端啓介<sup>1</sup>、中岡高博<sup>1</sup>、M.R.Khan<sup>1</sup>、谷塚 昇<sup>1</sup>、内野勝郎<sup>2</sup>、村田和優<sup>3</sup>、外池光雄<sup>4</sup>

(<sup>1</sup>大阪府立大学, <sup>2</sup>平成医療学園専門学校, <sup>3</sup>明治東洋医学院専門学校, <sup>4</sup>産技総研ライフエレクトロニクスセンター)

表題の 3 種類の刺激を鍼灸点の主として合谷について行い脳磁気計で測定し、その結果から dipole 座標などの時間的ダイナミクスを解析した。(実験方法) 刺激方法は指圧と打撃については、直径 4mm の仁丹球を鍼灸点に貼り付け、その上を強く押さえるか木槌で叩く。いずれの場合も仁丹球は深く沈み込む。鍼の場合は通常使われるステンレス鍼を先端を残して短く切り細い木柱にさしこみ、この先端を 5mm 程度刺入し上端を水平方向に振る刺激を行った。トリガーの 0 点としては以上 3 種類の刺激とも光ファイバーより射出される光を遮断するパルスの発生時とした。MEG は産技総研関西センターの 122 チャンネル全頭型 (グラジオメーター) を使用した。(実験結果) 以上の 3 種の深部刺激反応の特徴としては、(1) MEG 信号は非常に多くのチャンネルに現れる、(2) 1 秒程度にも及ぶレスポンス遅れがある、のが特徴で従来報告されてきた体性感覚の場合と非常に異なる。打撃の場合の実験結果は今年の第 2 回研究会で発表したが指

圧、打撃の両者とも大きな信号が現れる。50 回程度積算した信号を解析した dipole の座標の時間変化ダイナミクスを発表する。鍼については、意外にも積算によって打撃や指圧の場合のような大きな信号は現れなかったが、鍼刺激の特徴としては、刺激により側頭優勢な強いアルファ波が全頭的に広がることを見出した。(アルファ波はトリガー信号にたいして位相的にランダムであるから積算信号では相殺される。) アルファ波は普通脳が非常に calm な状態で出現するとされているが、脳が鍼刺激により感度を落としている状態とも考えられ、鍼麻酔とも関連するところがあるのではないかと鍼の場合は積算信号のほかに、RawData よりある時間域の信号を切り出して数個の周波数帯に分けて dipole の座標解析を行った。また、このうちの、アルファ波周波数帯でのこの様な座標解析は、古くからある問題、脳波とは何なのかについても重要な知見を与えるものであろう。

## (3) 弦楽器奏者の体性感覚誘発脳磁界皮質初期成分の計測

鈴木篤志<sup>1</sup>、木村友昭<sup>2</sup>、田野崎真人<sup>3</sup>、井口義信<sup>3</sup>、関原謙介<sup>4</sup>、橋本 勲<sup>5</sup>

(<sup>1</sup>東京都立科学技術大学大学院 システム基礎工学専攻, <sup>2</sup>筑波技術短期大学鍼灸学科,

<sup>3</sup>東京都精神医学総合研究所 脳機能解析部門, <sup>4</sup>東京都立科学技術大学電子システム工学科,

<sup>5</sup>金沢工業大学 人間情報システム研究所)

弦楽器奏者の指に対する体性感覚野からの反応を計測した。8 人の弦楽器奏者について両手の母指 (D1) 示指 (D2) 中指 (D3) と、12 人の比較対照者 (コントロール) の左手に電気刺激を与え、3-300Hz と 300-900Hz のバンドパスフィルタで N20m と高周波振動 (HFOs) を分離し解析

を行った。N20m のピークでダイポール推定を行った結果、弦楽器奏者とコントロールの左手の D1-D5、D2-D5 の皮質上における距離や、D1、D2、D5 に対するダイポールの強度に差はなく、弦楽器奏者の左手の D1 と D5 の反応強度が増すとする先行研究結果 (Elbert et al., 1995) と矛盾し

た結果が得られた。他方、HFOs のピーク数が弦楽器奏者の左手の D1 と D5 で統計的に有意に増大することを見出した。これらの結果は、弦楽器奏者の体性感覚皮質の

訓練による再構築は皮質領域を拡大することではなく、抑制介在ニューロンの活動を高めると解釈することで説明できる。

#### (4) 擬似自己運動感覚に関連した脳磁界の計測

中川誠司, 渡邊 洋, 山口雅彦, 西池季隆<sup>1</sup>, 外池光雄 (産業技術総合研究所, <sup>1</sup>大阪大学)

視覚入力によって誘発される擬似自己運動感覚 (vection) に関連した脳磁界の計測を行った。以下の 4 条件の視覚刺激を被験者に呈示した。(a) 画面中心点に向かって直線加速運動するドット群, (b) 画面上の無作為な点に向かって直線加速運動するドット群, (c) 画面中心点を軸として反時計回りに回転運動するドット群, (d) 画面上の無作為な点を軸として反時計回りに回転運

動するドット群。刺激条件 (a) に対して自らの身体が後退運動する感覚 (backward linear vection), および(b)に対して自らの身体が時計回りに回転運動する感覚 (counterclockwise circular vection) が知覚された被験者の脳磁界計測を行い, それぞれの vection に関わる脳内活動を検討した。

#### (5) 第 2 次運動知覚機構の生理学的検討

祖父江文子, 金桶吉起, 柿木隆介 (生理学研究所, 名古屋大学医学部小児科)

ヒトは明るさで定義される物体の運動 (第一次) のみならず, 模様などの違いで定義される物体の運動 (第二次) も知覚することができる。我々は, ランダムドット運動の速度の違いにより定義された物体の第二次運動に誘発される脳磁場反応と機能的磁気共鳴画像を測定し, 比較検討した。サイン波刺激の第一次運動は脳磁場反応が誘発されたが, 第二次運動の反応は測定できなかった。仮現運動刺激において, 第一次, 第二次運動に対する両

反応とも距離により反応潜時と振幅は有意に変化し, 第一次運動に対する反応は有意に潜時が短く振幅は大きかった。第一次と第二次の情報を同時に持つ運動刺激に対する反応は, それぞれの反応の中間に分布した。機能的磁気共鳴画像では, どの刺激においてもヒト MT+を中心に活動が見られ, 有意な部位差はなかった。これらは両者を検出する神経機構がある程度独立しているが, その初期に情報交換が行なわれることを示している。

#### (6) 二味溶液の呈示条件における味覚情報処理機構の検討

森川聖美<sup>1</sup>, 山本千珠子<sup>2</sup>, 中川誠司<sup>3</sup>, 山口雅彦<sup>2</sup>, 外池光雄<sup>2</sup>, 山本 隆<sup>2</sup>  
(大阪大学人間科学部行動生理学講座<sup>1</sup>,  
産業技術総合研究所 関西センター ライフエレクトロニクス研究ラボ<sup>2</sup>)

ある刺激を規則正しく与えた場合とランダムに与えた場合で, 刺激の呈示条件のよって生体反応に相違が認められるかどうかは興味深い研究課題である。本研究では, 二つの味覚刺激 (Citric Acid 50 mM, Sucrose 500 mM) を

交互に与えた場合 (交互課題) とランダムに与えた場合 (ランダム課題) について検討した。生体反応として, まず指の光センサー開閉方式により, 味刺激に対する反応時間を調べたところ, 味溶液の種類に関係なく交互課題

に比べランダム課題のほうが、反応時間が長くなる傾向が見られた。(5名中3名)これは味覚の認知過程、または味を認知してから実際に反応するまでの脳内情報処理過程において、呈示条件による違いが生じているからだ

と考えられる。そこで、交互課題とランダム課題において、中枢における味覚情報処理様式に違いが見られるかどうかを脳磁界計測装置を用いて解析、検討を行った。

## (7) 食品の色彩別脳磁場応答

繁富梨絵<sup>1</sup>, 長尾絵美子<sup>1</sup>, 佐藤千絵<sup>1</sup>, 吉本知津<sup>1</sup>, 奥田弘枝<sup>1</sup>, 橋詰顕<sup>2</sup>,  
栗栖 薫<sup>2</sup>, 瀬山一正<sup>1</sup>, 谷澤久之<sup>1</sup>, 小園佳美<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>広島女学院大学 生活科学部 生活科学科, <sup>2</sup>広島大学医学部 脳神経外科,  
<sup>3</sup>広島女学院大学大学院 人間生活学研究科)

【目的】過去のアンケート結果から食品の色彩と五味については暖色系に甘味・酸味を感じ、寒色系には塩味を感じることがわかった。そこで着色された試料提示後の脳活動について、研究を行った。

【方法】健康者10名(21・22歳の女性のみ)を対象とし、(1)着色した6種類の飲料・ゼリーの静止画像から受ける視覚刺激により誘発される脳磁場応答をNeuromag社製204ch脳磁計で測定し、周波数解析を行った。(2)測定後に食欲・五味のアンケートを行い、周波

数解析の結果と比較した。

【結果】色彩別にパワー値を比較すると暖色系でパワー値が高い傾向がみられた。またアンケートの結果をもとに五味別にパワー値を比較すると、甘味と苦味では低い傾向がみられた。

【考察】暖色系の色は暖かい感じを与えるため、パワー値が高かったと思われる。また、五味別のパワー値の結果は、被験者を増やす必要があり、現時点では不明である。

## (8) 味覚誘発脳磁場の周波数解析

吉本知津<sup>1</sup>, 長尾絵美子<sup>1</sup>, 佐藤千絵<sup>1</sup>, 繁富梨絵<sup>1</sup>, 奥田弘枝<sup>1</sup>, 橋詰顕<sup>2</sup>,  
栗栖薫<sup>2</sup>, 瀬山一正<sup>1</sup>, 谷澤久之<sup>1</sup>, 小園佳美<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>広島女学院大学 生活科学部 生活科学科, <sup>2</sup>広島大学医学部 脳神経外科,  
<sup>3</sup>広島女学院大学大学院 人間生活学研究科)

【目的】味覚誘発脳磁場応答が、味覚の種類により差があるかどうかを研究する。

【方法】健康者10名(21・22歳の女性のみ)を対象とした。装置はNeuromag社製204ch脳磁計を用いた。(1)5種類の味溶液と蒸留水を用いて、口に含んだ状態と飲み込んだ状態で脳磁場応答を測定し、周波数解析を行った。(2)測定後に味覚の快・不快のアンケートを行い、周波数解析の結果と比較した。

【結果】蒸留水(無味)・ショ糖(甘味)・硫酸キニーネ

(苦味)ではパワー値が高く、塩化ナトリウム(塩味)・酢酸(味)・Lグルタミン酸ナトリウム(旨味)ではパワー値が低い傾向がみられた。また味覚アンケートの結果をもとに快・不快時別にパワー値を比較すると、どの味覚刺激においても快の方が不快よりもパワー値が高い傾向がみられた。

【考察】塩味・酸味・旨味の味溶液では抵抗感が強かったためパワー値が低くなったものと思われた。

### (9) 第一次味覚野の左右半球における非対称性

小早川達<sup>1</sup>, 斉藤幸子<sup>1</sup>, 後藤なおみ<sup>1</sup>, 小川 尚<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>産業技術総合研究所 脳神経情報研究部門, <sup>2</sup>熊本大学医学部 第二生理)

4段階の食塩の濃度段階 (30mM, 100mM, 300mM, 1M) を男性4人, 女性4人の被験者に対して, 提示を行い最初の潜時の活動の計測を行った。1回の実験では40回の味刺激提示を行った。味覚刺激の提示時間は400ms, 刺激間隔は30秒であり, その間は脱イオン水の提示を行っている。最短潜時の活動についてダイポール推定を行ったところ, 濃度段階に応じて活動強度の有意な変化 ( $p=0.000053$ ) がみられた。活動部位について標準脳の座標系に変換後, 濃度による部位の差の検定を行ったが有

意差は見られなかった。濃度段階とは関係なく, 標準脳座標系における y 座標 (前後方向) の値が左半球において有意 ( $p=0.00014$ ) に小さかった。これは味覚第一次野が左半球では右半球と比較して後方へ移動していることを意味する。また被験者を男性, 女性の二群に分けた場合, 男性においては有意 ( $p=0.00023$ ) に左半球において味覚第一次野が後方に位置しているのに対し, 女性ではこのような左右差は有意に見られなかった ( $p=0.25$ )。

### (10) 平面型グラジオメータで検出された磁界の等高線表示

竹内文也, 栗城真也 (北海道大学 電子科学研究所)

脳磁界信号源の推定結果を評価する場合に磁界分布を利用することが多い。しかし, 平面型グラジオメータで検出した磁界を等高線表示させるためには信号源推定などの処理が必要となる。ここでは平面型グラジオメータで計測した磁界を, シンプルな電流分布モデルを用いて等高線表示可能な磁界値に変換する方法を提案する。提案方法は, (1) 特定の MEG システムに対して1回だけ必要となる処理と, (2) 等高線を描画する毎に必要なとなる

処理からなる。(1)では, 被験者頭部を固定する空間にノードを設定し, 各ノードにおける Leadfield をビオ・サバールの式より算出して, その行列を QR 分解する。これによりチャンネル数と等しい数の電流ダイポール (位置と向き) が求められる。(2)では, 計測した磁界を作るような電流ダイポールの大きさを算出する。それらのダイポールが発生し仮想的なマグネトメータで検出した磁界を計算して等高線表示を行う。

### (11) 脳磁図周波数トポグラフィー

橋詰 顕, 栗栖 薫, 有田和徳, 杉山一彦, 江口国輝, 花谷亮典

(広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 創生医科学専攻 先進医療開発科学講座 脳神経外科学教室)

【目的】脳波でなされている周波数解析を脳磁図でも応用できるようにする。

【方法】平面型グラジオメータは直下に電流源が存在するときに最大信号となる特徴がある。この検出コイルを脳波の双極誘導に類似したものと考え, センサー平面 (x-y) に対しての傾斜磁場  $B_x$  と  $B_y$  をフーリエ変換しパワー値の合計を計算し, 平面上または脳表上に投影し, セ

ンサー間を補間した。

【結果】周波数トポグラフィーを作成することで周波数分布がひとめで分かるようになった。健常者では閉眼時の波が後頭葉を中心に広がる傾向があること, てんかん患者では推定された等価電流双極子の位置と  $\alpha$  波の分布域が一致する傾向が見られた。

【考察】我々が開発した脳磁図周波数トポグラフィーで

は 1)電流源の深さを表現できない, 2)磁気雑音に弱い, という欠点がある。得られた周波数帯域の分布の意義は不明であるが, アイドリング状態の基盤となるネットワークの広がりには何らかの関係があるものと思われる。

【結語】脳磁図周波数トポグラフィーは等価電流双極子推定法では解明し得なかった脳機能の解明に役立つ可能性があると思われた。

## (12) 非加算誘発脳磁図の試み

川勝真喜, 内川義則, 小谷 誠 (東京電機大学)

生体からの磁気信号は環境磁気ノイズに比べ, 非常に小さい。代表的なノイズは電源周波数のノイズ, 背景脳波, センサ固有のノイズ, 回路のノイズなどである。これらのノイズは生体磁気計測をする上で厄介な存在であり, 良い生体磁気計測を行うためにはノイズの軽減は不可欠である。最近注目をされている独立成分分析 (ICA: Independent component analysis) は時空間データから統計

的に独立な成分に分離する手法であり, 脳磁図にも応用が期待されている。我々はこの方法を用いて脳磁図データからノイズ成分と信号成分に分けることを試みた。その結果, 計測データから非加算の聴覚誘発脳磁界を抽出することに成功した。抽出された非加算の誘発成分からは, N100m 潜時の時間的ゆらぎがあると考えられる結果が得られた。

## (13) 正中神経繰り返し刺激の MEG と測定変量間の伝達関数の同定

加藤健治<sup>1</sup>, 岸田邦治<sup>1</sup>, 深井英和<sup>1</sup>, 篠崎和弘<sup>2</sup>, 鶴飼 聡<sup>2</sup>, 山本雅清<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 岐阜大学大学院 工学研究科 応用情報学専攻, <sup>2</sup> 大阪大学大学院 医学研究科 神経機能医学講座)

MEG データ解析の研究において, 特定の活動部位の位置を推定する従来の方法の 1 つとして加算平均法があり, 脳の各部位が他の部位に対してどのような影響を与えているかなど, 高次脳における機能関連の解明がされている。しかし MEG データにはあらゆる周波数の動的情報が入り交ざっている。そこで, 5Hz の正中神経繰り返し刺激の MEG データに時間構造に基づいた独立成分解析を用いて 5Hz の周波数に対応する独立成分を選択した。

独立成分解析より得られた行列のある行ベクトルから

得られる頭皮上分布は左脳の体性感覚野あたりにリードフィールドと同じダイポールパターンを確認できた。さらに, 右脳の体性感覚野あたりにダイポールパターンを発生する行ベクトルも見出した。そこで, 両者に対応する独立成分から戻した時系列データを作り, これに前回紹介したフィードバックシステム論的手法を用いることで測定変量間の伝達関数を同定した。そのインパルス応答は左脳部位から右脳へ 10msec 内に伝わっていることを示し, 逆は 100msec 程度であった。

## (14) 刺激間隔における $1/f_n$ ゆらぎの GO/NO-GO 反応によるベータ帯域非同期化

原田暢善<sup>1</sup>, 中川誠司<sup>1</sup>, 岩木 直<sup>1</sup>, Tom Holroyd<sup>2</sup>, 山口雅彦<sup>1</sup>, 外池光雄<sup>1</sup>, 守谷哲郎<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 産業技術総合研究所 関西研究センター ライフエレクトロニクス研究ラボ,

<sup>2</sup> 通信総合研究所 関西先端研究センター 柳田結集型特別グループ)

聴覚刺激間隔を,  $1/f_0$  ゆらぎ,  $1/f_1$  ゆらぎ,  $1/f_2$  ゆらぎ,  $1/f$  ゆらぎ (一定間隔) で変動させたとき, 聴覚刺激により引き起こされる, GO/NO-GO 反応に対する刺激間隔の影響について検討を行った。 $1/f_n$  ゆらぎのべき乗  $n$  の値の増加とともに, MMF の二乗平均値 (RMS 値) ( $F(3/24)=10.94$ :  $p=0.0001$ ), さらに NO-GO 反応における左後頭チャンネル 75/76 のベータ波帯域の非同期化の時間 ( $F(3/24)=6.43$ :  $p=0.0024$ ) が有意に増加することが観測された。メモリートレースの形成が, ベータ波帯域の非同

期の時間 に反映することが明らかになった。さらに後頭チャンネルのベータ波帯域の非同期化の性質を検討するため, タッピング指の右から左への変更の影響を検討した。右から 左へ変更により, 非同期化時間が NO-GO 反応において, 左後頭チャンネル 75/76 で減少, 右後頭チャンネル 105/106 で増加傾向を示した。一方, GO 反応においては, 明瞭な変化は見られなかった。以上から, NO-GO 反応において, ベータ波帯域の非同期化時間が運動指の影響をうけることが明らかになった。

## (15) 視覚・聴覚の同時刺激による聴覚 N1m 潜時の変化

足立信夫, 小野弓絵, 小林宏史, 石山敦士, 葛西直子

(早稲田大学大学院 理工学研究科 電気工学専攻 超電導応用 (石山敦士) 研究室)

脳は感覚器から得られる複数の情報を同時に処理する場合が多く, 中でも視覚と聴覚からの情報を同時に受け, 処理する場合が多い。視覚と聴覚の同時刺激が脳内の情報処理や伝達経路に与える影響を MEG 実験により調べた。視覚または聴覚刺激を個別に与えた場合, 聴覚反応のピーク潜時が視覚反応に比べて長い場合, 視覚と聴覚刺激を同時に与えると, 聴覚反応のピーク潜時は短縮さ

れることが分かった。このとき, 4 信号源の活動位置を推定した結果, 反応部位は個別刺激したときの反応位置から変化しないことがわかった。また, 聴覚刺激開始時間を視覚刺激開始時間に対して徐々に遅くし, ピーク潜時短縮の現れ方を調べた。その結果, 遅延時間が 30ms 程度までは短縮がおきることが分かった。

## (16) 逆方向マスキングを引き起こす聴覚刺激に対する N1m 反応

渡邊啓太, 川勝真喜, 内川義則, 小谷 誠 (東京電機大学)

音響心理学上の聴覚逆方向マスキング現象とは, 音の振幅や呈示時間の異なる二つの音が時間的に連続して存在しているときに, 先行する小さな音の処理を後続する大きな音の処理が妨害する現象である。この現象は最初に小さな音が実在しているにもかかわらず, 聞こえにくくなってしまいうという点で非常に興味深い。今回我々は,

この逆方向マスキング現象を反映するような刺激音を用いて聴覚誘発脳磁界計測を行った。この結果, 被験者には聞こえていないはずの先行する非常に小さな音の処理が, 後続する大きな音の処理を妨害しているかのような反応波形が計測され, 音響心理学上の聴覚逆方向マスキング現象とは矛盾する結果が得られた。

### (17) 周波数変化に対する聴覚誘発脳磁界反応

神本さゆり<sup>1</sup>, 今田俊明<sup>2,4</sup>, 関原謙介<sup>3</sup>, 川勝真喜<sup>4</sup>, 小谷 誠<sup>4</sup>

(<sup>1</sup> 東京都立科学技術大学大学院 システム基礎工学専攻, <sup>2</sup> ワシントン大学 心脳学研究センタ,  
<sup>3</sup> 東京都立科学技術大学 電子システム工学科, <sup>4</sup> 東京電機大学)

純音の周波数変化に対する聴覚誘発脳磁界反応の特性を調べた。立上がり下がり 10ms, 持続時間 600ms, 周波数が呈示開始後 300~310ms の間に線形に変化する刺激音(A : 1000=>750Hz, B : 1000=>1250Hz)を用いた。刺激音 A を 4~6 回 (ランダム), 続いて B を 4~6 回繰返す A-B 系列を繰返し被験者の左耳に与えた (刺激間間隔 350-450ms ランダム)。刺激耳反対側の右側頭上における, 一つの A-B 系列内の第 1, 2, 3, 最終回目の刺激音 A,B

の刺激開始に対する N1m, 及び刺激開始後 300ms で始まる周波数変化に対する N1m のピーク振幅・潜時を計測し比較した。周波数変化 N1m ピーク振幅は, 同一周波数変化の繰返・オにより減少する。A (周波数下降) と B (上昇) に対するピーク振幅に有意差は見られなかった。周波数変化 N1m ピーク振幅は, 刺激開始 N1m ピーク振幅に比べて有意に大きかった。

### (18) 小児絶対音感保持者の N100m

広瀬宏之, 久保田雅也, 木村育美, 湯本真人, 榎原洋一 (東京大学 医学部 小児科, 同付属病院検査部)

小児の絶対音感(AP)保持者 12 名および非保持者 12 名の labeling (音名を当てる) 時の聴覚誘発脳磁場を測定した。(1)AP の保持に関わらず年齢が上がるにつれて N100m の検出率が増加した。年齢依存性の聴覚系の発達と関係した結果といえる。(2)AP 非保持者のみ課題が難しくなるにつれて N100m の検出率が増加した。AP 非保持者では課題が難しくなるにつれて聴覚刺激に対して喚起される注意がより大きくなり, N100m の検出率が増大したものと考えられた。一方, AP 保持者では課題に関わ

らず一定の注意が喚起されているため, 難易度によらず N100m が一定に出現したと考えられた。(3)AP 保持者の方が N100m の出現率が高い傾向があったが, AP 保持の有無と N100m の出現率の間には統計的な有意差はなかった。(4)小児被検者では全員には N100m は計測されなかった。機器の大きさが小児頭蓋に合致しないこと, 小児中枢神経では聴覚系が発達過程にあること, 刺激呈示間隔が約 1 秒と短かったこと等の理由が考えられた。

### (19) 楽譜・楽音照合課題施行時の音楽家の脳磁場活動

湯本真人<sup>1</sup>, 松田眞樹<sup>2</sup>, 宇野 彰<sup>3</sup>, 伊藤憲治<sup>4</sup>, 金子 裕<sup>5</sup>, 加我君孝<sup>6</sup>

(東大病院検査部<sup>1</sup>, 東京芸大大学院音楽研究科<sup>2</sup>, 国立精神神経センター精神保健研究所<sup>3</sup>  
東大医学部認知言語医学<sup>4</sup>, 国立精神神経センター武蔵病院脳外科<sup>5</sup>, 東大医学部耳鼻咽喉科学<sup>6</sup>)

音楽家が楽譜を見ながらその演奏を聴き, 楽譜・楽音の音高照合を課したときの脳活動を明らかにすることを目的とし, 音楽家 6 名を対象として本研究を行った。眼前のスクリーンに楽譜を提示した上で, ほぼ楽譜通りの演奏を両耳に提示し, 演奏が楽譜どおりであるかどうか

に注意しながら視聴することを課題とした。刺激には記憶や情動の影響を避けるため, 未知の単旋律の無調音列を用い, 提示された全 1140 音中, 150 音は音高が楽譜と長 2 度上・下に異なっていた。Neuromag 社製全頭型 204 チャンネル脳磁計を用い, 提示音と楽譜との一致, 不一致

別に誘発磁場を加算平均記録した。解析は 1-20Hz の低周波帯, 25-45Hz の帯ごとにバンドパスフィルタ処理し, 均一導電率球内電流双極子モデル, BEM モデルによる

MCE 法により行った。両帯域の脳活動の様相は異なっており, とともに音楽情報処理における半球間機能分化を示唆する所見を示した。

## (20) Mirror Neuron Systems (MNS) は顎関節症 (Temporomandibular Disorders ; TMD) と関連するか？

澁川義幸<sup>1,2</sup>, 新谷益朗<sup>2</sup>, 熊井敏文<sup>3</sup>, 加藤元一朗<sup>2,4</sup>, 鈴木隆<sup>1,2</sup>,  
ZHANG Zhen Kang<sup>5</sup>, TING Jiang<sup>5</sup>, 下野正基<sup>2</sup>, 石川達也<sup>2</sup>, 中村嘉男<sup>2,6</sup>  
(<sup>1</sup>東歯大 口科研 生理, <sup>2</sup>東歯大 口科研, <sup>3</sup>松本歯大 口腔生理,  
<sup>4</sup>慶大 精神神経, <sup>5</sup>Peking Univ., <sup>6</sup>帝京平成大 福祉情報)

MNS は, 運動行動の遂行時と, 実験者が行った同様な運動行動の観察時の両者に対して活動を示し, 運動行動の遂行と観察のマッチングシステムを構成する。一方, TMD は, 顎関節・咀嚼系筋群の疼痛を主症状とする原因不明の咀嚼系障害であり, 近年になって神経機能失調との関連が示唆されている。今回, 他者の顎運動 (開口運動) を観察することが, ヒト MNS を構成する運動関連皮質領域を活性化するか否かを, 正常成人および顎関節

症患者から脳磁場計測を用いて検索した。正常被験者 (5 名) では, 開口運動の観察後, 視覚領野 (潜時: 135 ms) と一次運動野顎顔面領域 (M1mx) (潜時: 280 ms) が活性化した。顎関節症患者 (3 名) では, 視覚領野の活性化は見られたが, M1mx の活性化は消失していた。この事は, 顎運動に関連する MNS の機能失調と TMD が関連している事を示唆している。これらの詳細について報告する。

## (21) 大脳基底核運動路のネットワーク解析:加齢およびパーキンソン病 (PD)における変化

岡山 晶, 谷脇考恭, 後藤純信, 吉良潤一, 飛松省三 (九州大学大学院 医学研究院 脳研臨床神経生理)

【目的】健常若年者で複雑手指運動課題の fMRI を行い, 基底核回路内の機能連関が自己ペース (SP) と外的ペース (EP) で異なることを昨年度報告した。今回は健常老年者, PD 患者を加えて比較検討した。

【方法】対象は健常老年者 11 名 (53-72 歳) と Yahr 2-3 度の PD 患者 10 名 (53-74 歳)。左手指の複雑連続運動を各ペース 5 段階ずつの速度 (0.5-4Hz) で行い, ブロックデザインで fMRI を記録した。SPM99 を用いて信号変化率,

部位同士の相互相関を算出し, ネットワーク解析を行った。

【結果】SP では両群で被殻-視床の連関はあったが, 回路全体の連関も変化した。さらに PD では補足運動野-被殻の連関が著明に低下していた。EP の運動前野-1 次感覚運動野の連関は若年者と変化なかった。

【結論】加齢や PD による変化は SP 特異的であり, PD でより基底核回路の活動低下が示唆された。

## (22) 三叉神経支配領域 CO<sub>2</sub> レーザー刺激による痛覚誘発脳磁場に対する NMDA 受容体抑制薬の効果

<sup>1</sup>松浦信幸, <sup>2</sup>澁川義幸, <sup>1</sup>一戸達也, <sup>2</sup>鈴木 隆, <sup>1</sup>金子 譲  
(<sup>1</sup> 東京歯科大学歯科麻酔学講座, <sup>2</sup> 東京歯科大学生理学講座)

三叉神経支配領域皮膚 (右側オトガイ部皮膚) に対する痛覚刺激による痛覚誘発脳磁場 (Trigeminal-PEFs) を記録し, 塩酸ケタミンの効果調べた。CO<sub>2</sub> レーザー刺激による Trigeminal-PEFs は, 潜時 100, 200, 300ms にピーク振幅を持っていた。潜時 100ms における等価電流双極

子 (ECDs) は対側二次性感覚野に局在した。その電流源強度と Trigeminal-PEFs の振幅は CO<sub>2</sub> レーザー刺激強度に依存した。鎮痛量の塩酸ケタミン静脈内投与は, 疼痛を消失させ Trigeminal-PEFs を reversible に抑制した。

## (23) MEG によるてんかん発作波の解析

宇留野勝久, 渡辺裕貴 (国立療養所 静岡神経医療センター)

てんかん医療において EEG/MEG の目的は発作焦点或いは発作起始部位の同定/推定であるが, 現在 MEG については発作間欠期のてんかん波 (主に棘波) の焦点をダイポール推定によって求めるのが主流である。一方, MEG 検査中に発作が観察・記録される事があり, 各センサー間の発作波起始の潜時が視察的に明らかな場合は別

として, 発作波を見ても起始部位が明瞭でない場合が多い。このような例で EEG より位置情報が保存されていると思われる MEG で発作起始部位を推定できるのか, FFT, 相関次元, 自己相関などいくつかの方法を試してみた。

## (24) MEG によるスパイクマッピングと頭蓋内脳波所見の比較

金子 裕, 仲間秀幸, 新村 核, 久保田有一, 大槻泰介, 岡崎光俊, 有馬邦正  
(国立精神・神経センター武蔵病院 脳神経外科, 臨床検査部, 精神科)

MEG によるスパイクマッピングを検査し, 頭蓋内電極を広範に留置した薬剤抵抗性の新皮質てんかん 9 例 (男性 2 例, 女性 7 例; 9-37 歳, 平均 19.9 歳)。留置した電極数は 40-126 極 (平均 82.2 極)。発作時硬膜下電極脳波から, 発作起始部・早期伝播部を同定。発作間歇期棘波が出現する領域についても求めた。これらを MEG が求めた発作間歇期スパイクマッピングの結果と比較し, MEG の診断を一致, 重複, 近傍, 遠隔の 4 段階で評価し

た。発作起始部に関する診断については, 一致 2 例, 重複 1 例, 近傍 6 例であった。早期伝播部に関する診断については, 一致 4 例, 重複 5 例であった。発作間歇期棘波域に関する診断については, 一致 5 例, 重複 3 例, 近傍 1 例であった。MEG によるスパイクマッピングは頭蓋内電極によって同定された発作間歇期棘波域・早期伝播部とも良く一致するが, 発作起始部については正確に診断できないことが多い。

## (25) 統合失調症における対刺激パラダイムによる聴覚性 MEG 応答の検討

加藤 隆<sup>1</sup>, 加藤元一郎<sup>2</sup>, 梅田 聡<sup>3</sup>, 村松太郎<sup>2</sup>, 秋根良英<sup>2</sup>, 新谷益朗<sup>4</sup>(<sup>1</sup>井之頭病院, <sup>2</sup>慶應義塾大学 医学部 精神神経科学教室,<sup>3</sup>慶應義塾大学 文学部, <sup>4</sup>東京歯科大学 脳科学研究施設)

【目的】paired tone 音刺激に対する聴覚性 MEG 応答では, 統合失調症例での第一刺激に対する低周波領域 (1-20Hz) での反応の振幅の減少が報告されている。今回, 対音刺激パラダイムを用い, 健常例 5 例と統合失調症 6 例 (うち非定型抗精神病薬服用中 3 例) において周波数別の MEG 応答を検討した。

【方法】1000Hz paired tone (Inter Pair=500ms) に対する AEF を健常群・非定型抗精神病薬服用中の統合失調症

群・未服薬統合失調症群の三群に分け, 周波数領域ごとに比較検討した。Filter はそれぞれ 1-24Hz (LF), 14-43Hz (HF) とした。

【結果】健常群・未服薬統合失調症群では周波数領域ごとの振幅に有意な差を認めなかったが, 非定型抗精神病薬服用中の統合失調症群では LF における刺激第一音に対する振幅の増加が認められた。

## (26) Stroop 課題による精神分裂病研究—MEG の空間フィルタ法による解析—

川口俊介, 篠崎和弘, 鶴飼聡, 石井良平, 山本雅清, 小川朝生, 水野 (松本) 由子, 吉峰俊樹, 武田雅俊  
(大阪大学大学院 医学系研究科 精神医学教室)

【目的】精神分裂病患者の幻聴と前頭葉機能の関連を検討するために, 幻聴をもつ分裂病患者, もたない患者, 健常被験者を用いて Stroop 課題遂行時の事象関連誘発脳磁場を MEG の空間フィルタ法により比較検討した。

【対象・方法】パフォーマンスに有意差のない分裂病患者 (幻聴 (+) 5 名, 幻聴 (-) 3 名), 健常被験者 10 名を用いた。被験者には検査に際し文書で同意を得た。不適合課題提示前後の各 400ms の脳内電流源密度分布を推定し, t 検定を用いて両区間で神経活動に差がある領域を

空間的に可視化した。

【結果】25-60Hz 帯域で, 健常群では 10 名中 8 名で課題遂行時に前頭前野背外側部に脱同期がみられた。幻聴のない分裂病群でも全症例で同部位で脱同期がみられたが, t 値が小さかった。幻聴をもつ患者群では 5 名中 2 名でのみ同部位での脱同期を認め, 残り 3 名では同部位での脱同期を認めなかった。

【考察】分裂病患者では前頭葉機能の異常があり, 特に幻聴をもつ患者ではその程度が強いことが示唆された。

## (27) 統合失調症患者のしりとり課題時における前頭前野および言語関連領野の活動—空間フィルタによる MEG 解析—

山本雅清, 篠崎和弘, 鶴飼 聡, 川口俊介, 石井良平,  
小川朝生, 水野 (松本) 由子, 井上 健, 吉峰俊樹<sup>1</sup>, 武田雅俊  
(大阪大学大学院医学系研究科, 精神医学教室, <sup>1</sup>大阪大学大学院医学系研究科, 脳神経外科)

【目的】統合失調症患者における前頭前野皮質と言語関連皮質との機能的連関を検討するため, 単語生成課題 (しりとり) 施行時の大脳皮質の賦活部位を空間フィルタに

よる MEG 解析を用いて推定した。

【対象・方法】統合失調症患者および健常被験者, 各 14 名を用いた。すべての被験者より書面にてインフォー

ムドコンセントを得た。安静時としりとり課題時の脳内電流源密度分布の差をSPMにて求めた。

【結果】しりとり課題時に8-25Hz帯域で、健常者の多くで左上側頭回後部に脱同期がみられたが、患者群では

みられなかった。また患者群のほとんどに左DLPFCの脱同期がみられたが、健常者群では半数にみられなかった。

【考察】統合失調症では前頭前野皮質と後方の言語関連領域の機能異常が示唆された。

## (28) 小児における顔と視線の認知について—ERP,MEGによる解析

木村育美, 久保田雅也, 広瀬宏之, 湯本真人, 榎原洋一 (東京大学 医学部 附属病院小児科, 同検査部)

小児の視線認知機構の発達、他人の感情を理解してゆくことと関連すると思われる。今回私たちは高機能自閉症スペクトラム小児4名(9y~12y 女児1名, 男児3名)および健常小児6名(8y~11y 女児3名, 男児3名)を対象に、視線方向が1)正面 2)右向き 3)閉眼の3通りの単純化した正面向き絵の顔と花の絵(=Target)を呈示刺激として用い、脳磁場測定と同時に脳波記録(Pz,Oz,T5,T6)を行った。被実験児には花の計数のみ指示した。

結果; 健常小児群ではT5,T6において明らかなP100-N170反応peakを示しN170反応該当潜時における脳磁場のdipoleは後側頭部に位置した。一方自閉症群ではT5,T6におけるP100-N170反応の振幅が健常群よりも小さく、脳磁場N170m反応も不明瞭な傾向が認められた。Dipoleは有意でないあるいは頭頂部側に位置し、彼らの病態との関連が示唆された。

## (29) 帯域ノイズの不快感(アノイアンス)に関する脳磁図計測

添田喜治<sup>1</sup>, 中川誠司<sup>1</sup>, 外池光雄<sup>1</sup>, 安藤四一<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>産業技術総合研究所 ライフエレクトロニクス研究ラボ, <sup>2</sup>神戸大学大学院 自然科学研究科)

我々は環境の好ましさがヒトの脳活動に及ぼす影響を知ることが目的として、点滅刺激の周期、音場の音圧レベルや残響時間に対する心理的プリファレンス(好ましさ)と脳波や脳磁図の関係を検討してきた。本研究では、帯域ノイズの帯域幅を変化させたときの心理的不快感(アノイアンス)に関連する脳磁図解析を行った。まず、1000 Hzの純音と中心周波数1000 Hz、帯域幅0, 40, 80,

160, 320 Hzの帯域ノイズに関して、一対比較法により心理的アノイアンス尺度値を求めた。次に、1000 Hzの純音を基準刺激、その他を比較刺激として一対提示し、脳磁図計測を行った。脳磁図データの自己相関関数解析を行い、特にそのエンベロープの減衰特性に注目し、アノイアンス尺度値との関係を検討した。

## (特別講演) 脳におけるシンボル処理過程のモデル化—問題解決における機能部品組合せモデルの検討—

大森隆司, 小川昭利 (北海道大学大学院 工学研究科)

脳はその瞬間に解こうとしているタスクに応じて、脳のさまざまな部位を活性化させて、問題解決のための処理回路を構成している。その部位がタスクによって異なることから、個々の部位(モジュール)は異なる機能を

持つと想定されている。ではモデルの立場から、タスクに応じて機能モジュールを組み合わせる、さらには新しいタスクに対してモジュールの組合せを発見するということはどういうことなのか? この現象は非常に幅広いタ

スクで共通して観測できることから、そこには高次機能にまでつながる脳の情報処理システムの基本デザインが潜んでいるように思える。

そこで本講演では、脳の機能部品組み合わせモデルがもつ問題解決能力の探索研究について説明し、ロボット

のナビゲーションタスクにおいて「学習という処理」を脳が獲得する過程について論じる。さらに現実の脳で見られる電気生理的な現象や臨床行動の解釈について触れ、それらの背後にあるであろう脳知能の設計原理について論じる。

### （特別講演）ヒト SI 皮質内神経回路の機能的意義：体性感覚誘発脳磁場による洞察

田野崎真人（東京都精神医学総合研究所 脳機能解析研究部門）

橋本 勲（金沢工業大学 人間情報システム研究所）

手指による対象の操作は直立二足歩行や言語と並んでヒトを特徴づける機能である。我々は、手指の運動感覚制御に関わる脳内機構の解明がヒト脳機能の理解に重要であるとの立場から、一連の研究を行ってきた。本講演ではこうした研究の一部を紹介する。ヒト一次体性感覚皮質（primary somatosensory cortex: SI）の 3b 野において、各手指の再現領域は錐体細胞の皮質内軸索によりシナプス結合している。我々は、電気標的的刺激指と触覚干渉刺激指の距離を様々に変化させることで、手指を司る 3b

皮質間の神経回路の機能的意義を検証した。また、SI の興奮性ニューロンは、抑制性ニューロンと局所神経回路を形成し、その活動を相互に制御している。我々は、錐体細胞活動を反映する一次応答（N20m）と抑制性介在ニューロン活動を反映する高周波振動信号（HFOs）を比較検討することで、皮質内神経回路を構成する興奮性・抑制性ニューロンの相互作用を検証した。こうした SI 皮質内神経回路が体性感覚認知に及ぼす影響についても簡単に触れたい。

## 16. 痛みの基礎と臨床

2002年9月5日－9月6日

代表・世話人：緒方宣邦（広島大学大学院 医歯薬総合研究科）

所内対応者：柿木隆介（統合生理研究施設）

(1) 炎症性疼痛の分子メカニズム

富永真琴, 沼崎満子, 富永知子, 飯田陶子, 森山朋子, 富樫和也, 浦野浩子  
(三重大学 医学部 生理学第一講座)

(2) 寒冷に対する痛覚過敏の末梢神経機構の解析

水村和枝, 高橋 賢, 青山雅広, 片野坂公明, 佐藤 純 (名古屋大 環境医研 神経性調節分野)

(3) 後根神経節電位依存性 Na チャネル, NaV1.9 (NaN) の発現とその機能

山本詳子, 丸山泰司, 大石芳彰, 松富智哉, 鄭泰星, 緒方宣邦, 井上敦子<sup>1</sup>, 仲田義啓<sup>1</sup>  
(広島大学大学院 医歯薬総合研究科 神経生理学, <sup>1</sup>同 薬効解析科学)

(4) 脊髄鎮痛機構におけるイオントランスポーターの役割

土肥修司, 曹維安, 織田章義, 棚橋重聡 (岐阜大学 麻酔・蘇生学)

(5) 炎症モデルラット痛覚可塑性と BDNF の作用

吉村 恵, 古江秀昌, 又吉達 (九州大学 医学研究院 統合生理学)

(6) 帯状疱疹後神経痛の鎮痛薬反応性

倉石 泰, 高崎一朗 (富山医科薬科大学 薬学部 薬品作用学研究室)

(7) ラット神経因性疼痛モデルにおける NFκB の役割

阪上 学<sup>1</sup>, 島岡 要, 井上隆弥, 柴田政彦, 真下 節  
(<sup>1</sup>大阪船員保険病院 麻酔科, 大阪大学医学部付属病院 麻酔科)

(8) モルヒネ耐性とモルヒネ非感受性神経因性疼痛

植田弘師 (長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科)

(9) ノシスタチンとノシセプチンによる痛覚調節機構

伊藤誠二, 芦高恵美子, 南 敏明<sup>1</sup> (関西医科大学 医化学教室, <sup>1</sup>大阪医科大学 麻酔科学教室)

(10) 侵害刺激伝達における脊髄 orexin の役割

山本達郎 (千葉大学医学研究院 麻酔学領域)

(11) 痛覚伝導に対する脊髄でのプロスタグランジンの役割

南 敏明, 土居ゆみ, 村谷忠利, 西澤幹雄<sup>1</sup>, 伊藤誠二<sup>1</sup>  
(大阪医科大学 麻酔科学教室, <sup>1</sup>関西医科大学 医化学教室)

(12) 神経因性疼痛モデル動物の脊髄内ミクログリアにおける p38MAPK の活性化

井上和秀, 津田 誠, 重本由香里, 小泉修一, 溝腰朗人<sup>1</sup>, 高坂新一<sup>2</sup>  
(国立医薬品食品衛生研究所 薬理部, <sup>1</sup>九大院 薬 分子制, <sup>2</sup>国立精神神経センター 神経研究所)

(13) 覚醒サルを用いた大脳皮質侵害受容ニューロン活動解析

岩田幸一 (日本大学 歯学部 生理学教室)

(14) 腰椎椎間板ヘルニアによる腰・下肢痛の病態 - 臨床の観点から -

矢吹省司 (福島県立医科大学 医学部 整形外科)

(15) 長期に及ぶ神経因性疼痛は不安様行動, うつ様行動を誘導増強する

鈴木高広, 柴田政彦, 井上隆弥, 真下 節 (大阪大学大学院 医学系研究科 生体機能調節医学講座)

- (16) 針電極を用いた表皮内電気刺激法による痛み関連誘発脳波および脳磁場  
乾 幸二, Tuan Diep Tran, 宝珠山稔, 柿木隆介 (統合生理研究施設)
- (17) 中枢性疼痛 (視床痛) のメカニズム — 神経生理と機能画像からの考察  
平戸政史, 高橋章夫, 渡辺克成, 佐々木富男, 大江千廣<sup>1</sup> (群馬大学 医学部 脳神経外科, <sup>1</sup>日高病院)
- (18) Neuroimaging による神経因性疼痛評価の試み  
牛田享宏 (高知医科大学 整形外科)
- (19) 末梢への侵害刺激と後根神経節における ERK のリン酸化  
野口光一 (兵庫医科大学 解剖学第二講座)
- (20) 遮断による変化 — 現象論とメカニズムに関する考察  
森脇克行<sup>1</sup>, 弓削孟文<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>広島大学 医学部 附属病院 麻酔科蘇生科, <sup>2</sup>広島大学大学院 病態制御医科学講座)
- (21) CRPS の発症メカニズムに関する一考察  
仙波恵美子 (和歌山県立医科大学 第二解剖)
- (22) 脳の次に痛みがきたーアメリカのライフサイエンス 10 ヶ年戦略  
熊澤孝朗 (名古屋大学 名誉教授)

#### 【参加者名】

熊谷幸治郎, 熊澤孝朗 (愛知医大), 伊藤誠二 (関西医大), 織田章義, 棚橋重聡, 土肥修司 (岐阜大・医), 柿村順一 (京都薬大), Ji-Hoon KIM, 吉村恵 (九大・医), 平戸政史 (群馬大・医), 丸山泰司, 三戸憲一郎, 山本詳子, 緒方宣邦, 松富智哉, 森脇克行, 大久保敦子, 堤恵理子, 鄭泰星 (広島大・医), 牛田享宏 (高知医大), 柴田政彦, 真下節, 鈴木高広 (阪大・医), 小西康信, 沼崎満子, 森山朋子, 村山奈美枝, 東智広, 飯田陶子, 富永真琴, 富樫和也 (三重大・医), 山本達郎 (千葉大・医), 南敏明 (大阪医大), 植田弘師 (長崎大・薬), 張日輝 (東京女子医大), 佐藤昌子 (東大・医), 河西稔 (藤田保健衛生大), 岩田幸一 (日大・歯), 阿部郷 (日本歯科大), 高崎一朗, 倉石泰 (富山医科薬科大), 荒井至, 高橋直人,

佐々木伸尚, 矢吹省司 (福島県立医大), 野口光一 (兵庫医大), 肥田朋子, 矢島弘毅 (名大・医), 高橋賢, 佐藤純, 小崎康子, 上野朋行, 水村和枝, 田口徹, 田村良子, 片野坂公明 (名大・環境医学研), 井辺弘樹, 森川吉博, 仙波恵美子, 田村志宣 (和歌山県立医大), 井上和秀 (国立医薬品食品衛生研), 坂上学 (大阪船員保険病院), 南裕恵, 澤田光平 (エーザイ), 伊喜文子, 横山政幸, 新庄勝浩, 川崎和夫, 大城博行, 谷口嘉奈, 中川哲彦, 砥出勝雄, 馬場勝広, 友利公彦, 檜杖昌則 (ファイザー製薬), 森江俊哉, 石井大輔 (大日本製薬), 斎藤顕宜, 鈴木知比古 (東レ), Tran Diep Tuan, 王曉宏, 柿木隆介, 乾幸二, 秋云海, 田村洋平, 廣江総雄 (生理研)

#### 【概要】

分子生物学の急速な進展によってさまざまなタイプの侵害受容器や痛覚伝導に関与するイオンチャネルが同定されているが, このような分析的基礎研究の成果がヒトにおける疼痛反応にどのように関与しているのかという点に関してはいまだ未解明な点が多い。多種多様な病態生理からなる痛みの制御機構や疼痛発現メカニズムの解明は, 最終的にはヒトを対象としたマクロ的研究を含む多角的アプローチが不可欠である。このような観点から, 基礎および臨床の異なった立場から「痛み」の研究に携わる方々に最新の研究成果を紹介いただき,

これらについて討論を重ね, 疼痛機序の解明に向けた新たな展開の基礎を築くことを目的として, 平成 14 年 9 月 5・6 日の両日, 岡崎国立共同研究機構において, 「痛みの基礎と臨床: その接点から新しい展望を探る」と題した研究会を催した。

研究会では 22 題の口演者に約 80 名の一般参加者を加え, 2 日間にわたって活発な討論が行われた。その内容は基礎的研究と臨床的研究の 2 つに大別され, 先ず第 1 日目には, 1) 痛覚受容器やイオンチャネルに関する痛みの基礎的研究, 2) 炎症モデルや神経因性疼痛モデル

などの動物モデルを用いた疼痛発現機序の解析, 3) 生体内疼痛関連物質の痛覚可塑性における役割など, 最新の基礎的研究の成果が紹介された。第 2 日目には, 1) 神経因性疼痛や椎間板ヘルニアなどの病態生理, 2) 脳磁図や fMRI などを用いた痛みのイメージング, 3) 疼痛の発症メカニズムに関する新しい考察など, 主に臨床的立場からの発表・討議がおこなわれた。

以上のごとく, 研究会では「痛み」についてさまざまな立場から, 通常の学会では実現が困難な徹底した討論の場を持つことが出来た。このような研究会の開催によって, 発表・討論・懇親会を通じての研究者同士の理解と交流が深まり, 今後, 互いの利点を提供し合う形での多くの共同研究が実現できるものと期待される。

### (1) 炎症性疼痛の分子メカニズム

富永真琴, 沼崎満子, 富永知子, 飯田陶子, 森山朋子, 富樫和也, 浦野浩子  
(三重大学 医学部 生理学第一講座)

炎症において, 種々の炎症関連メディエーターが感覚神経終末での痛み刺激受容を制御することが知られているが, そのメカニズムの詳細は明らかではない。そこで, 炎症関連メディエーターの 1 つである細胞外 ATP の VR1 活性に対する効果を検討した。VR1 を発現した HEK293 細胞では, 細胞外 ATP はカプサイシン活性化電流及びプロトン活性化電流を増大させた。また, ATP 存在下では VR1 の熱による活性化温度閾値は 42 度から 35 度に低下し, 体温でも VR1 が活性化して痛みを惹起する可能性が示された。ATP 関連物質を用いた解析等から, 細胞外 ATP は代謝型 P2Y1 受容体に作用して, phospholipase C (PLC) 活性化・PKC 活性化を介して VR1 を制御することが明らかとなった。代謝型受容体と VR1 が PKC を介した疼痛発生システムを形成することは, 疼痛発生の新

しいメカニズムである。VR1 を発現した HEK293 細胞で PMA によって 32P の VR1 蛋白質への取り込みの増加がみられ, VR1 が PKC によってリン酸化することが示された。VR1 の細胞内各ドメインの GSTfusion 蛋白質を作製して in vitro kinase assay を行い, 第一細胞内ループとカルボキシル末端細胞内ドメインが PKC $\epsilon$  によってリン酸化されることが明らかとなった。第一細胞内ループとカルボキシル末端細胞内ドメインの 8 個のセリンもしくはスレオニンをアラニンに置換した点変異体を用いた電気生理学的な解析から, 第一細胞内ループの 502 番目のセリンとカルボキシル末端細胞内ドメインの 800 番目のセリンが VR1 の PKC $\epsilon$  によるリン酸化に強く関与することが判明した。抗リン酸化 VR1 抗体を作製中である。

### (2) 寒冷に対する痛覚過敏の末梢神経機構の解析

水村和枝, 高橋 賢, 青山雅広, 片野坂公明, 佐藤 純 (名古屋大 環境医研 神経性調節分野)

寒冷時に慢性の疼痛が増悪する事は良く知られている。その機構は末梢血管の収縮による組織酸素欠乏に帰されていることが多く, 実験的な研究は少ない。本研究ではその末梢神経機構を明らかにするため, 足根関節内アジュバント投与により作成したラット単関節炎モデルにおいて次の実験を行った。1) 冷却により痛覚過敏が生じることを, 1.単関節炎ラットを低温環境 (22℃から 15℃に低下させる) に曝露した時の von Frey 毛に対する逃避

反応の回数の増大, 2.後肢を 25℃の水につけたときの足振り反射回数の増大, により確認した。2) in vivo において C 線維受容器活動を記録し, 皮膚冷却に反応する受容器の反応性を解析した。冷刺激には低閾値機械受容器, 冷受容器, 一部の侵害受容器がそれぞれ特徴的な反応パターンを示した。皮膚温 32℃から 2℃まで 120 秒間で冷却した時, 低閾値機械受容器は 27.8℃で放電を開始し, 最大放電頻度は 28-20℃で観察され, それ以下に温度が

低下すると放電は減弱するという反応パターンを示した。正常動物と炎症動物では反応閾値温度に差はなかったが、冷刺激で生じた総放電数は炎症動物で有意に増大していた。冷受容器の冷反応には有意な差はなかった。侵害受容器（機械侵害受容器、機械-熱侵害受容器、機械-冷侵害受容器、機械-熱-冷侵害受容器）のうち冷却に反応するものの割合が、正常動物では侵害受容器の 14%

(2/14 受容器) に過ぎないのに対し、炎症動物では 50% (9/18 受容器) へと有意に増大していた。閾値は約半数が 10℃以下であった。行動実験で冷痛覚過敏が見られた温度域で冷反応が増大していた低閾値機械受容器は、健常状態では侵害受容へ関与しているとは考えられていない。炎症時にはそれが変化している可能性が示唆された。

### (3) 後根神経節電位依存性 Na チャネル, NaV1.9 (NaN) の発現とその機能

山本詳子, 丸山泰司, 大石芳彰, 松富智哉, 鄭泰星, 緒方宣邦, 井上敦子<sup>1</sup>, 仲田義啓<sup>1</sup>  
(広島大学大学院 医歯薬総合研究科 神経生理学, <sup>1</sup>同 薬効解析科学)

後根神経節 (DRG) 細胞には 7 種類の電位依存性 Na チャネルが発現しており, これらは侵害情報を含む様々な感覚信号の伝搬に役割を分担している。このうち小型 DRG 細胞に特異的に発現する NaV 1.8 (SNS) は, TTX 非感受性で侵害受容に重要な役割を担っている。NaV 1.8 に加えて, 新規 TTX 非感受性 Na チャネルである可能性が示唆される NaV 1.9 遺伝子が同定され, この Na チャネルも痛覚伝搬への関与が考えられている。最近まで NaV 1.9 は機能発現が成功せずその性質は不明であったが, 私達は NaV 1.8 ノックアウトマウスを用いることにより NaV 1.9 電流を分離同定することに成功した。本研究では NaV 1.9 の発現と機能に関連するいくつかの興味ある結果について報告する。記録された NaV 1.9 電流は他の Na チャネルと比較して著しく遅いカインेटクスを持つ“persistent”な電流であり, 活性化閾値が約 20mV 過分極側へシフトしていた。さらに通常のパッチクランプ法では, 時間経過と共に電流量が数十倍に増加し, その後初期の大きさに戻るといった特徴的な現象が観察され

た。この現象は ATP などの細胞内機能分子をパッチ電極内に補うことや細胞内環境に影響を与えないナイスタチン法による記録により抑制された。また電流記録を行った細胞の細胞質を採取し Single-cell RT-PCR 法により単一細胞での NaV 1.9 mRNA 発現を検討した結果, mRNA は発現しているにもかかわらず電流が記録されなかった細胞も多数観察された。以上のことから, 1) NaV 1.9 はそれ自身が直接に活動電位を担うのではなく, 閾値下で細胞の興奮性を制御している, 2) 細胞内情報伝達系の変化が NaV 1.9 電流量の著しい変化を引き起こす, 3) mRNA への転写後, チャネルとして機能するまでの過程に何らかの調節機構が存在する, などの可能性が考えられた。これらの性質は, 神経線維における興奮性の亢進や神経損傷に伴うチャネルの異常発現などを含む痛覚伝導系の可塑的变化に関連しており, NaV 1.9 が神経因性疼痛などの病的な痛みの発現に重要な役割を果たしている可能性を示唆する。

### (4) 脊髄鎮痛機構におけるイオントランスポーターの役割

土肥修司, 曹維安, 織田章義, 棚橋重聡 (岐阜大学 麻酔・蘇生学)

脊髄は疼痛受容機構において重要な役割を担っており, 局所麻酔薬などの Na<sup>+</sup>チャネル作動薬, オピオイド, α2-アドレナリン受容体アゴニストなどが, 鎮痛目的で脊髄クモ膜下腔や硬膜外腔に投与されている。しかし,

Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ATPase などのイオントランスポーターが脊髄鎮痛機構にいかなる影響を与えるか明らかではない。私どもは Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ATPase (Na<sup>+</sup>ポンプ) 阻害薬のウアバインは脊髄レベルでの強い鎮痛作用をもつ (Anesthesiology, 1999) こ

とを見出したので、腰部脊髄くも膜下腔に微小カテーテルを留置したラットモデルで、侵害熱刺激に対する潜時 (Tail flick latency; TFL) から、ウアバインや  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  antiporter と  $\alpha 2$ -アドレナリン受容体アゴニストや局所麻酔薬の相互作用を検討した。 $\text{Na}^+\text{-H}^+$  antiporter のアミロライドは脊髄レベルで著明な鎮痛作用をきたすが、フロセミドによる  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  cotransporter の遮断ではそのような作用はなく、高濃度では hyperalgesia の状態となった。リドカインによる  $\text{Na}^+$  チャンネルのブロックによつては  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  antiporter  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  cotransporter の作用は影響を

受けないことを観察ウアバインはモルヒネ、クロニジン、ネオスチグミンとは相乗効果を示し、これはアトロピンによつて拮抗されることから、アセチルコリンの遊離を介したのもであることが示唆された。 $\text{K}^+$  ATP チャンネルの脊髄鎮痛効果は  $\alpha 2$ -アドレナリン受容体アゴニストで増強し、 $\text{ANa}^+\text{-K}^+$  ATPase 阻害の効果は  $\alpha 2$ -アドレナリン受容体アゴニストや ACh 作動薬カルバコールで増強するので、脊髄疼痛制御機構に於けるイオントランスポーターの役割は、イオンチャンネルや脊髄 ACh 受容体を介した複雑なものであることが示唆された。

## (5) 炎症モデルラット痛覚可塑性と BDNF の作用

吉村 恵, 古江秀昌, 又吉達 (九州大学 医学研究院 統合生理学)

炎症に伴って痛覚過敏とアロディニアが起こることはよく知られているが、その発生には末梢性の感作と脊髄後角での可塑的な変化が考えられる。そこで、CFA 炎症ラットの脊髄スライスおよび in vivo 標本からのパッチクランプ記録法を用い、末梢および脊髄内での感覚情報伝達の変化を検討した。CFA 投与後 7 日～10 日目のラット脊髄スライス標本からパッチクランプ記録を行い、後根誘起のシナプス応答を解析し、膠様質細胞に入力する感覚神経の同定を行った。その結果、正常ラットでは Ad 線維と C 線維からの入力ほとんどで、Ab 線維からの入力は約 5% の細胞でのみみられ、かつ多シナプス性であった。ところが、炎症ラット脊髄では約 40% の細胞が Ab 線維からの単シナプス性の入力を受けており、Ad 線維からの単シナプス性の入力は減少していることが明らかになった。次いで、この可塑的な変化がどのような機序で誘起されるかを、炎症から 1 日～2 日目のラットを用い、in vivo パッチクランプ法によつて解析した。膠様質細胞から記録を行うと、mEPSC に加えて TTX 感受性の振幅の大きな EPSC が観察された。また、この自発性の

EPSC は炎症部位に NSAIDs を塗布する事によつて減弱した。これらの結果から、炎症初期においてはプロスタグランディンによつて神経終末が感作され、自発発火が惹起されていることが示唆された。更に、末梢の炎症に伴って NGF が産生され、DRG に輸送され BDNF の産生を促すことが知られている。産生された BDNF は感覚回路の可塑的な変化と何らかの関連があることが示唆されているため、炎症初期における BDNF の作用を脊髄スライス標本を用いて検討した。BDNF は正常ラットではほとんど作用を示さなかったが、炎症初期では mEPSC の振幅を変えることなしにその頻度を増加した。また、炎症後時間がたつと正常と同様、BDNF による変化は観察されなかった。以上の事から、炎症初期においては末梢神経の感作によつて自発性の発火が増大すると共に、BDNF の産生が起こり末梢神経の中枢端に働き、グルタミン酸の放出を増大させていることが示唆された。これらの炎症初期における変化が軸索発芽とどのような関連があるかは未だ不明であるが、今後この点を明らかにしていく必要がある。

## (6) 帯状疱疹後神経痛の鎮痛薬反応性

倉石 泰, 高崎一朗 (富山医科薬科大学 薬学部 薬品作用学研究室)

アスピリン様薬は、急性期帯状疱疹痛に対しては有効であるとする報告が多いが、帯状疱疹後神経痛に対しては無効である。帯状疱疹後神経痛にオピオイドが使用されることはないが、神経因性疼痛に対しては無効あるいは効力が弱いことが理由の一つである。本研究ではこれらの原因について検討した。単純ヘルペスウイルス1型 (HSV- 1) をマウスに経皮接種すると、接種後5日目から、接種側に帯状疱疹様皮疹と疼痛様反応 (急性帯状疱疹痛) を生じた。約半数のマウスでは皮疹治癒に伴い疼痛様反応も消失したが、残りの約半数では皮疹治癒後も疼痛様反応 (遅延性帯状疱疹後痛) が長期間持続した。Diclofenac sodium (10,30 mg/kg,i.p.) は、接種後6日目の疼痛様反応を用量依存的に抑制した。用量100 mg/kg の抑制作用は30mg/kg とほぼ同程度であった。一方、皮疹治癒後も疼痛様反応が消失しなかったマウスの疼痛様反応に対して diclofenac sodium (30 mg/kg) が全く影響を及

ぼさなかった。HSV- 1 接種後5日目に、後根神経節中の非感染神経に COX-2 が発現誘導され、後根神経中の PGE2 濃度が増加した。一方、皮疹治癒後も疼痛様反応が消失しなかったマウスの後根神経節中では、COX-2 mRNA の増加が観察されなかった。遅延性帯状疱疹後痛に PG 類が重要な役割を演じていないことが、diclofenac が無効であることの一因であろう。Morphine hydrochloride (1~5mg/kg,s.c.) が、HSV- 1 接種後6日目の疼痛様反応を用量依存的に抑制し、5mg/kg でほぼ完全な抑制作用が観察された。Morphine は、遅延性帯状疱疹後痛も抑制したが、効力と作用持続が明らかに減弱した。健常マウスおよび遅延性帯状疱疹後痛を示さなかったマウスに比較して、遅延性帯状疱疹後痛を示したマウスの脊髄後角では、オピオイド  $\mu$ -受容体が明らかに減少した。これが、morphine の効力減弱の一因であろう。

## (7) ラット神経因性疼痛モデルにおける NFkappaB の役割

阪上 学<sup>1</sup>, 島岡 要, 井上隆弥, 柴田政彦, 真下 節

(<sup>1</sup> 大阪船員保険病院 麻酔科, 大阪大学医学部付属病院 麻酔科)

近年、炎症性サイトカインの多くが利用する細胞内情報伝達分子、NFkappaB (nuclearfactor kappaB) が神経因性疼痛の成立、増悪に関与しているという報告が散見される。本研究では神経損傷後の慢性疼痛の動物モデルとして L5 脊髄神経絞扼ラットを用い、NFkappaB 抑制が疼痛行動に与える影響を検討した。NFkappaB の結合部位に特異的な2本鎖DNAを合成し、Decoy型核酸として神経絞扼部位に遺伝子導入することで神経損傷後の局所のNFkappaB抑制を試みた。さらに痛覚過敏に対する効果について検討を加えた。方法: ラット脊髄神経絞扼モデルを Chung らの方法に基づいて作成した。SD系雄

性ラット20匹を次の2つのグループに分類した。(1) NFkappaB Decoy 群, 10匹。(2) Scramble Decoy 群, 10匹。Thermal hyperalgesia は後肢足底への輻射熱刺激に対する逃避潜時で評価した。測定は神経絞扼後1,3,5,7,10,14日に行った。DS (differential score) は絞扼側と非絞扼側の逃避潜時の差で評価した。NFkappaB Decoy, Scramble Decoy は HVJ-liposome 法で神経絞扼直後に神経絞扼部位に導入した。結果: 脊髄神経絞扼後 NFkappaB decoy を神経絞扼部位に遺伝子導入した群では3日目より14日目まで Scramble decoy 群に比べ Thermal hyperalgesia を抑制した。

## (8) モルヒネ耐性とモルヒネ非感受性神経因性疼痛

植田弘師 (長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科)

痛みは様々な病気に伴い生ずる「侵害性の症状」であるが、慢性疼痛はもはや「症状」という範囲を超え「痛みそのものが病気」であると言われるようになった。痛みは新たな病気や痛みを生ずる、いわば悪循環の典型である。「痛みは我慢すべきものでなく適切に治療すべきものである」という最近の考え方はこうしたところから来ているのかも知れない。モルヒネは数千年以上も前から「鎮痛薬」を超え、「心を癒すもの」として用いられてきたが、これは「痛み」が単なる「症状」を超えた存在であることと対比すると興味深いものがある。さて、この万能のモルヒネにも弱点がある。それは耐性形成であり、モルヒネに抵抗性の神経因性疼痛である。前者は経口剤型の開発された現在、適正使用さえ行っていれば臨床的に問題なしと言われているが、癌終末期における多量投与時については決してその限りではない。後者の場合、同じ癌でも神経傷害などを伴う場合にはモルヒネに抵抗性になる。従って、この二つの課題こそ痛み治療の

第二世代とも言うべきものである。モルヒネ耐性の分子基盤を研究する手法として 3 つのものがある。第一には単一細胞レベルで観察される急性の脱感作である。これには最近エンドサイトーシスとの関連で注目されており、我々はさらに C- キナーゼ活性との関連で *in vitro* と *in vivo* との分子基盤の橋渡し研究を展開している。第二には同じ単一細胞レベルでの応答でも CREB や MAP キナーゼの働きを介した遺伝子発現調節などが論議されている。第三には神経回路の可塑性を介するもので、特にアンチオピオイド神経系の働きが注目されている。我々は NMDA やノシセプチン受容体機構の関与との関連で新たな展開を行っている。一方神経因性疼痛との関連では坐骨神経傷害後の疼痛過敏応答はモルヒネに抵抗性であり、そのメカニズムに疼痛伝達侵害神経のモダリティースイッチがあることを見出している。新たな遺伝子発現や神経細胞と脱髄現象との関連を含めた神経生物学的アプローチを目指して研究を展開し始めている。

## (9) ノシスタチンとノシセプチンによる痛覚調節機構

伊藤誠二, 芦高恵美子, 南 敏明<sup>1</sup> (関西医科大学 医化学教室,<sup>1</sup>大阪医科大学 麻酔科学教室)

髄腔内投与したノシセプチン/オーファニン FQ (Noc/OFQ) は痛覚過敏反応とアロディニアを誘発する。我々は、ウシ Noc/OFQ 前駆体蛋白質上に Noc/OFQ の痛覚反応を抑制する生理活性ペプチドを発見し、ノシスタチンと名づけた。Noc/OFQ 前駆体は 2 つの相反する痛覚作用をもつペプチドが存在するユニークな蛋白質である。脊髄において低濃度の Noc/OFQ は痛覚反応を増強させるのに対し、高濃度の Noc/OFQ は鎮痛作用を示す。ノシスタチンは低濃度の Noc/OFQ の作用に拮抗したが、高濃度の鎮痛作用には拮抗しなかった。濃度によって異なる Noc/OFQ の作用がいずれもクローニングされた Noc/OFQ 受容体を介しているかどうかを明らかにするために、選択的 Noc/OFQ 拮抗薬 JTC- 801 を用いて検討

した。ノシスタチンの Noc/OFQ に対する拮抗作用と一致して、JTC- 801 は低濃度の Noc/OFQ の痛覚増強反応を濃度依存的に抑制したが、高濃度の鎮痛作用には効果がなかった。以上の結果は、低濃度の Noc/OFQ の作用は Noc/OFQ 受容体を介する作用であるが、高濃度の Noc/OFQ の作用はクローニングされた受容体を介さない作用と考えられる。JTC-801 はホルマリンの炎症性疼痛や神経因性疼痛にも効果を示したことから、Noc/OFQ が痛覚反応に多様に関与していることが示唆された。Fluorescence resonance energy transfer (FRET) を用いた Noc/OFQ とノシスタチンの産生機構の解析のアプローチについても合わせて発表する。

## (10) 侵害刺激伝達における脊髄 orexin の役割

山本達郎 (千葉大学 医学研究院 麻酔学領域)

Orexin-A, orexin-B は視床下部に存在する睡眠のサイクルや摂食行動を制御するペプチドである。Orexin は orexin-1 と orexin-2 受容体を介してその作用を発揮する。Orexin-A は orexin-1 及び orexin-2 受容体に結合し、Orexin-B は orexin-2 受容体に結合する。最近, orexin は視床下部から脊髄後角細胞の C-fiber へ直接投射しており, しかも脊髄後角細胞にも orexin が発現していることが報告された。また, orexin-A を全身投与すると鎮痛効果があることも報告され, orexin が侵害刺激伝達に重要な役割を担っていることが示唆されてきている。今回は, ラット髄腔内へ orexin を投与し, その鎮痛効果を検討したので報告する。Hot plate test, formalin test, carrageenan test では, orexin-A を投与すると投与量依存性に鎮痛効果が得られたが, orexin-B を投与しても鎮痛効果は得られな

かった。また, hot plate test, formalin test における orexin-A の鎮痛効果は, orexin-1 receptor antagonist である SB-334867 の前処置により完全に拮抗された。従って, orexin-A の鎮痛効果は orexin-1 receptor を介した効果であり, orexin-2 receptor は鎮痛効果発現には関与しないことが示唆された。また, formalin test において orexin-A を投与すると脊髄後角の laminae I-II における Fos 蛋白発現が抑制された。このことより, orexin-A は脊髄後角への侵害刺激入力を抑制することが示唆された。Seltzer model においても, orexin-A により mechanical allodynia の程度が投与量依存性に抑制された。以上述べてきたとおり, 各種疼痛モデルのいずれにおいても, orexin-A が脊髄後角における侵害刺激伝達に重要であることが示された。

## (11) 痛覚伝導に対する脊髄でのプロスタグランジンの役割

南 敏明, 土居ゆみ, 村谷忠利, 西澤幹雄<sup>1</sup>, 伊藤誠二<sup>1</sup>  
(大阪医科大学 麻酔科学教室, <sup>1</sup>関西医科大学 医化学教室)

プロスタグランジン (PG) が末梢の炎症部位での発痛に関与することはよく知られている。今回, 脊髄における PG の痛覚伝導に対する役割について検討した。脊髄腔内投与の PGE2 および PGF2 $\alpha$  は非侵害性触覚刺激に対してアロディニアを惹起し, それぞれ EP1-/- および FP-/- マウスではアロディニアは出現しなかった。侵害性熱刺激に対して, 脊髄腔内投与の PGE2 は広範囲の用量

で痛覚過敏反応を引き起こし, 高用量は EP2 受容体を, 低用量は EP3 受容体を介して痛覚過敏反応を惹起した。プロスタサイクリン受容体 (IP) 作動薬の cicaprost を脊髄腔内投与し, 侵害性熱刺激または非侵害性触覚刺激を加えても効果を示さなかった。一方, カラゲニンによる炎症性刺激に対して, 脊髄の IP mRNA が誘導され, 脊髄腔内投与の cicaprost は痛覚過敏反応を引き起こした。

## (12) 神経因性疼痛モデル動物の脊髄内ミクログリアにおける p38MAPK の活性化

井上和秀, 津田誠, 重本由香里, 小泉修一, 溝腰朗人<sup>1</sup>, 高坂新一<sup>2</sup>  
(国立医薬品食品衛生研究所 薬理部, <sup>1</sup>九大院 薬 分子制, <sup>2</sup>国立精神神経センター 神経研究所)

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) ファミリーは, 細胞増殖・分化のシグナルとして主要なタンパク質キナーゼカスケードであるが, 中枢神経系においても神経お

よびグリア細胞の生理反応に重要な役割を演じている。最近, 一次知覚神経に痛覚刺激を加えることで, 脊髄後角第一層神経細胞特異的に MAPK ファミリーの一つで

ある extracellular signal- regulated kinase (ERK) のリン酸化型が出現し、リン酸化型 ERK の抑制により痛み行動が減弱されることが報告され (Ji et al. Nat.Neurosci.2:1114, 999), 痛みと MAPK ファミリーの関連性が注目されている。そこで今回我々は、MAPK ファミリーの ERK と p38MAPK に注目し、ヒトの難治性疼痛のモデルとされている神経因性疼痛モデルの脊髄後角におけるリン酸化型 ERK および p38MAPK の発現変化とアロディニア発症におけるその役割を検討した。

【結果】ラットの左側 L5 脊髄神経を強くしぼり、末梢端を切断した。その後ラットは著明なメカニカルアロディニアを呈し始め、約 2 週目をピークとした。この時間経過と一致して、術側脊髄後角内の p38MAPK 活性化が著明となった。一方、ERK1/2 MAPK 活性化は認められなかった。p38MAPK 活性化が陽性となった細胞のほと

んどは OX42 (ミクログリアのマーカー) でのみ陽性となり、GFAP (アストロサイトのマーカー) や NeuN (神経細胞のマーカー) では染色されなかった。p38 活性化阻害剤 SB203580 の髄腔内投与によりアロディニアの程度は著明に抑制された。

【結論】以上の事実により、神経因性疼痛の発生に脊髄後角内のミクログリア活性化が非常に重要な役割を示していることが示唆された。我々は既に細胞外 ATP が ATP 受容体を介してミクログリアを活性化し、ケモタキシスやサイトカイン放出を引き起こすことを報告している。今回のミクログリア活性化にも ATP がキー分子として機能しているものと推測しているが、どこからその ATP が放出され、どのように作用するかについては現在鋭意検討中である。

### (13) 覚醒サルを用いた大脳皮質侵害受容ニューロン活動解析

岩田幸一 (日本大学 歯学部 生理学教室)

これまでに、我々は麻酔動物および覚醒動物の前帯状回 (ACCX) および大脳皮質第一次体性感覚野 (SI) の痛覚受容機構について研究を進めて来た。その結果、ACCX から検出される侵害受容ニューロンのほとんどは NS ニューロンで、Noxious-tap ニューロンが少数検出されたのに対し、SI から検出される侵害受容ニューロンのほとんどは WDR ニューロンであるのに対し、NS ニューロンは少数検出されるのみであった。また、両領域に分布する侵害受容ニューロンは受容野の広さなども非常に異なり、様々な点で違った性質を有することが明らかになった。本シンポジウムでは、麻酔動物の前帯状回および第一次体性感覚野の侵害受容ニューロンに関する研究結果を簡単に紹介し、さらに、熱刺激弁別課題を訓練した覚醒サルに関して、両領域に分布する侵害受容ニューロンの反応とサルの行動との関係について述べることにする。図 1 に示したような課題を用いて、顔面皮膚上に設置したプローブを介して与えられた温度刺激強度を弁別することができるようにサルを訓練し、ACCX および SI から神経細胞活動を導出し、両領域に分布する痛覚受容ニューロンの性質について詳細に検討を加えた。その結果、ACCX に分布する痛覚受容ニューロンは受容野が

非常に広く、全身の体幹皮膚に及ぶものも検出されたが、SI の痛覚受容ニューロンは顔面の比較的限局した領域に受容野を持っていた。また、ACCX の痛覚受容ニューロンは痛み刺激強度増加と共に活動性を増すにもかかわらず、痛み刺激強度変化弁別速度とは関係しなかった。これに対し SI の痛覚受容ニューロン活動は刺激強度弁別速度と有意な相関を有していた。さらに、どちらの領域の痛覚受容ニューロンも、サルが注意を痛覚刺激から光り刺激に移動するとその活動性を低下した。また、ACCX に分布する痛覚受容ニューロンはサルが疼痛刺激から逃避するときに非常に高い反応性の増加を示した。以上の結果から、ACCX は痛みの emotional な局面を、SI は discriminative な局面を担っている可能性が示された。また、両領域に分布する多くの侵害受容ニューロンは注意の移動により反応性を変化させたことから、両領域とも痛みの attentinal な局面に関与する可能性が示された。また、最近我々は神経損傷後に起こる異常疼痛の原因を解明するために、これまでと同様の課題を訓練したサルの顔面皮膚にキャプサイシンを塗布し、可逆的な痛覚過敏モデルサルを作成した。最後に、このサルの異常疼痛の神経機構研究に対する有用性についても考察したい。

# (14) 腰椎椎間板ヘルニアによる腰・下肢痛の病態 ―臨床の観点から―

矢吹省司（福島県立医科大学 医学部 整形外科）

【目的】無症候性の椎間板ヘルニアが、40-70%に認められることが報告されている。この事実、椎間板ヘルニアの存在自体が、また椎間板ヘルニアによる神経根圧迫のみが、腰・下肢痛の病態ではないことを示している。われわれは、椎間板髄核のもつ化学的因子に注目し、椎間板ヘルニア・モデルを作成して基礎的研究を行った。また、椎間板ヘルニア臨床例ではMRIを撮像して臨床的検討を行った。以上の結果から椎間板ヘルニアによる腰・下肢痛の病態を明らかにすることを目的とした。

【対象と方法】基礎的研究：雌SDラットを用いた。尾椎椎間板から採取した髄核を第5腰神経根上に投与した群をヘルニア群とし、同量の筋肉片を投与した群を対照群とした。これら2群において、1) DRGのendoneurial fluid pressure (EFP)の測定、2) DRGと足底の血流の測定、および3) 脊髄後角ニューロンにおける異常放電の測定を行った。臨床的研究：片側の下肢痛を有する腰椎

椎間板ヘルニア28例を対象とした。対照群として腰痛症の9例を用いた。これら2群においてMR myelographyを撮像し、第5腰神経根(L5根)と第1仙骨神経根(S1根)のDRGの輝度値と最大横径を計測した。

【結果】基礎的研究：1) DRGのEFPはヘルニア群で有意に高値であった。2) 処置側のDRGと足底の血流は、反対側や対照群に比して有意に低下した。3) ヘルニア群では、足底侵害刺激によって脊髄後角ニューロンにおける異常放電が認められた。この異常放電は抗TNF抗体によって抑制された。臨床的研究：ヘルニア群では、罹患神経根のDRGは反対側や対照群に比して有意に輝度値が高く、最大横径も大きかった。

【結語】腰椎椎間板ヘルニアでは、罹患神経根のDRGにはコンパートメント症候群が惹起され、これによって腰・下肢痛を起こしているものと思われる。

# (15) 長期に及ぶ神経因性疼痛は不安様行動、うつ様行動を誘導増強する

鈴木高広、柴田政彦、井上隆弥、真下 節（大阪大学大学院 医学系研究科 生体機能調節医学講座）

近年、さまざまな痛みを解明するために、種々の疼痛モデルを用いた研究がおこなわれている。しかし、そのほとんどは刺激に対する回避行動をみるものであり、痛みの一部を見ているに過ぎない。そこでわれわれは、神経損傷後マウスを用いて、抗うつ薬の開発に広く用いられている強制水泳試験や明暗箱実験などを行い、神経損傷後の疼痛行動と情動行動を経時的に観察した。疼痛行動は手術3日後よりみられたのに対して、情動行動の変化には数週間を要した。また、抗うつ薬による効果は、その種類によって疼痛行動と情動行動に差が見られた。臨床においては痛みの情動的側面が治療上大きな問題であるので、この研究は、疼痛研究の新たな方向性として重要だと考えている。今回我々は第5腰神経結紮モデルマウスを用いて情動行動の変化を調べた。

【方法】8~10週令、雄、C57Bl/6マウスを用い、ハロセン麻酔下にて6-0シルクを用いて第5腰椎神経結紮を行

った(結紮群)。対照群では神経の露出のみで創を閉じる。痛覚異常確立の確認にはvon Freyテスト、プランターテストを用いた。情動行動の観察はオープンフィールドテスト、明暗実験箱、高架式十字迷路(以上不安・恐怖の指標)、強制水泳試験(絶望の指標)にて行った。

【結果】痛覚過敏反応は術翌日より明らかとなり、以後3ヶ月間は確認できた。神経結紮1ヶ月後、情動行動の異常が明確となり、オープンフィールドテストでは全行動距離に変化は認めないが、結紮群で壁側滞在時間が増加した。明暗実験箱では暗側の滞在時間が増加し、高架式十字迷路ではオープンアームへの進入回数および滞在割合が低下した。強制水泳試験では無動時間が増加した。次に上記反応が薬物投与で変化するかどうかを調べるためにノルアドレナリン再取込阻害薬であるデシプラミン、SSRIであるパロキセチン(いずれも抗うつ薬)を測定開始30分前に腹腔内投与した。パロキセチン投与で痛

覚異常の改善は認められなかったが、情動行動異常は改善した。デシプラミン投与では痛覚異常を中等度改善したが、不安・恐怖行動の改善は認められなかった。強制水泳試験において無動時間は短縮された。

【結語】今回我々は慢性疼痛患者にしばしば認められる情動異常が神経結紮マウスにおいても発症する事を証明した。疼痛以上行動出現に遅れて情動行動の変化が認め

られた。第5腰神経結紮によって活動性は低下しないが、情動行動の変化は認められ、すなわち今回のモデルにより出現する神経因性疼痛は脊髄レベルの変化のみならずさらなる上位中枢へ変化を及ぼすことが強く疑われた。この研究は、疼痛研究の新たな方向性として重要だと考えている。

## (16) 針電極を用いた表皮内電気刺激法による痛み関連誘発脳波および脳磁場

乾 幸二, Tuan Diep Tran, 宝珠山稔, 柿木隆介 (統合生理研究施設)

我々はヒト皮膚 A-delta 線維の選択的刺激法として表皮内電気刺激法 (ES) を開発した。長さ 0.2mm の針電極を表皮内に刺入し 0.1-0.3mA の弱い電流で刺激する方法で、表皮内に位置する自由神経終末を選択的に興奮させることができる。ES 法を用いて、手背刺激による誘発脳電位および脳磁場を記録した。13 名全ての被験者において両側半球から明瞭な磁場初期成分が記録され、その頂点潜時は刺激対側 156ms, 同側 171ms であった。従って両側反応であり刺激同側の反応が約 15ms 遅れる。初期磁場成分の信号源は 8 名で両側 Sylvius 裂上壁もしくは底部 (SII/insula) に推定された。残りの 5 名では SII/insula の活動に加え、これとほぼ平行する刺激対側第一次体性感覚野 (SI) の活動が認められた。SI, SII/insula の頂点潜時はそれぞれ 161ms, 158ms であった。次に Sylvius 裂

周辺に推定される活動が単一信号源ではなく SII と島の活動が混在したものである可能性を検討するために、Sylvius 裂周辺に二つの信号源を想定して多信号源解析を行った。一つの信号源は常に Sylvius 裂最後部上壁に推定され、SII に相当する位置にあった。もう一つの信号源は SII の信号源より前方、内側にあり、前一中部島の上縁付近に位置した。両者の活動には立ち上がり、頂点潜時に差が認められなかった。誘発脳電位では、陰性 (N1) - 陽性 (P1) からなる電位変化が頭頂部で記録された。それぞれの頂点潜時はおよそ 200 と 300ms であり、磁場初期成分より遅れて出現する。以上の結果より痛覚誘発初期反応は時間的にオーバーラップする SI, SII, 島の活動からなると考えられた。一方 N1-P1 の潜時ではこれらとは異なる部位の活動が存在すると考えられた。

## (17) 中枢性疼痛 (視床痛) のメカニズム - 神経生理と機能画像からの考察

平戸政史, 高橋章夫, 渡辺克成, 佐々木富男, 大江千廣<sup>1</sup> (群馬大学 医学部 脳神経外科, <sup>1</sup> 日高病院)

中枢性疼痛 (視床痛) 例において、視床腹中間核、髄板内核群 (正中中心核)、小細胞性腹尾側核を中心とした定位的視床手術を行ない、術中微小電極法により視床神経活動を電気生理学的に直接捉えると共に、術前 PET スキャンによる局所脳代謝、脳血流測定から神経活動を間接的に捉え、中枢性疼痛の病態発生機序、病態生理を検討した。視床の神経活動については、単一スパイク放電を含む背景活動電位、末梢適刺激に対する感覚反応 (反応部位、受容野) 等を電気生理学的に記録解析し、PET

study では、術前に 18FDG 静注法、C15O2 持続吸入法により脳内各構造の安静時局所脳糖代謝率、局所脳血流を測定すると共に、疼痛側正中神経電気刺激、拇指 brushing 時の局所脳血流変化を測定した。視床感覚核神経活動の解析では、同部神経活動保存例において自発発射活動の不均一性、運動感覚反応部位局在の変化、多発、両側反応、不規則なバースト放電頻発などの機能変化が、神経活動低下例において内側視床、視床感覚核底部活動の残存、亢進、不規則なバースト放電頻発などの機能変化が

見いだされた。PET study は、ほぼ全例において安静時局所脳血流、局所脳糖代謝が病変同側（患側）皮質感覚野、視床で低下していたが、疼痛側拇指 brushing 時に患側皮質感覚野で局所脳血流増加を認めた例では、術中、視床において末梢自然刺激に対する反応が直接捉えられ、視床手術も比較的効果的であった。又、正中神経電気刺激により視床感覚核底部で局所的な血流の増加を認めた例

では、同部において電氣的にも活動上昇が認められ、さらに、視床における不規則なバースト放電頻発例で、同側皮質運動野での局所糖代謝の増加、糖代謝と酸素代謝の解離が認められた。中枢性疼痛例では視床感覚核における機能構築の再編成、末梢神経刺激に対する過剰反応や、大脳皮質中心溝部における感覚受容変化などが疼痛出現の大きな要因となっていると考えられる。

## (18) Neuroimaging による神経因性疼痛評価の試み

牛田享宏（高知医科大学整形外科）

【対象および方法】自発痛やアロデニアをもつ神経因性疼痛患者 19 名およびボランティア 22 名を対象とした。SPECT を用いた研究の方法は、脊髄視床路が終末する視床について、症状と反対側の視床の集積を症状側の集積で除した値を uptake index としてその値と痛みの強さ、罹病期間および治療に伴う変化について調査した。また、fMRI による研究はアロデニアの部位に非侵害皮膚刺激を加えて痛みが励起されたときに活動した脳の局在について調査し、ボランティアにおける結果と比較した。

【目的】これまで痛みに対する脳イメージング法による研究は主に PET, SPECT, fMRI が行われ、正常人では末梢に侵害刺激を加えると主として対側の視床、島、前帯状回及び SI の脳血流が増加することから局所の活動性が亢進していると考えられてきた。しかし、神経が病的状態である神経原性疼痛患者において脳のどの部位が痛みに関与しているかということについての研究は未だ端緒

についたばかりである。そこで今回は神経原性疼痛患者において見られる安静時痛やアロデニアのような痛みを SPECT および fMRI を用いて評価を行った。

【結果および考察】SPECT の結果では神経因性疼痛患者の uptake index と痛みの強さについては相関性が見られなかった。一方で uptake index は罹患期間が短い症例で増加が認められたが長い症例では正常化していた。治療により症状が改善した症例では増加していた uptake index の減少が見られ、治療効果を脳イメージングが捉えたのではないかと考えられた。また、fMRI の結果ではアロデニア部位の刺激で SI、運動野、帯状回および小脳などの広範な部位で活動性の上昇を認めた。これらの部位はボランティアに対して侵害刺激を加えたときの部位と類似しており患者が非侵害刺激で侵害性疼痛を経験していることを示唆するものと考えられた。

## (19) 末梢への侵害刺激と後根神経節における ERK のリン酸化

野口光一（兵庫医科大学解剖学第二講座）

一次知覚ニューロンの神経終末における、様々な炎症性メディエーターによる細胞内情報伝達系の変化を介した興奮性の変化のメカニズムが注目を集めている。一方、疼痛刺激など異なる刺激と特定の一次ニューロンとの対応関係は必ずしも明確ではなかった。刺激を受けると、活動電位を発生するとともに細胞内において多種の分子の dynamic な変化が生じるが、細胞内情報伝達に関わる

変化の報告は少ない。我々は細胞内シグナル伝達系の一つである MAP kinase 系に注目して、様々な刺激に対する MAP Kinase ファミリーの一員である ERK (Extracellular signal- Regulated Kinase) リン酸化を、ラット後根神経節 (dorsal root ganglion, DRG) ニューロンにおいて詳細に検討した。(J.Neurosci, 2002, 22 (17)) C- fiber nociceptor を特異的に刺激する capsaicin をラット足底に注射すると、

ERK のリン酸化抗体による免疫反応が、DRG の小型細胞のみで検出できた。一方坐骨神経の A-fiber だけを刺激すると DRG の中型から大型細胞を中心にリン酸化が見られた。各種 natural 刺激に対する DRG ニューロンの反応を検討したところ、寒冷刺激 (0℃) に対する小型ニューロンの関与、温刺激 (42℃) に対する超小型ニューロンの関与、機械刺激及び段階的熱刺激において、刺激強度の上昇に伴う陽性ニューロンサイズの変化などの所見

が明らかとなった。さらに同じ機械刺激に対して、正常状態と慢性炎症状態においては、ERK のリン酸化を示す DRG ニューロンの数、サイズ及び population が異なることが分かった。さらに、慢性炎症時の P2X 受容体の役割について、ERK の活性化から、新しい知見を見いだすことも出来た。以上の結果は、多種の刺激に対して反応する一次感覚ニューロンの活性化を、細胞内シグナル伝達分子の動態より解析できる可能性を示唆している。

## (20) 遮断による変化 — 現象論とメカニズムに関する考察

森脇克行 (広島大学 医学部 附属病院 麻酔科蘇生科)

弓削孟文 (広島大学大学院 病態制御医科学講座)

ニューロパシックペインにおけるアロディニア (正常では痛みを生じないような刺激によって誘発される疼痛) と交感神経系には密接な関係がある。Roberts は 1986 年に Sympathetically - maintained pain (SMP) の概念を提唱し、交感神経遮断によって改善されるアロディニアなどの疼痛のメカニズムに脊髄広作動域ニューロンの感作と交感神経の遠心路の興奮性増加が関与するとした。1991 年 Sato らは末梢神経障害後に交感神経刺激やノルエピネフリン投与により C 線維侵害受容器の反応性が亢進することを報告、McLachlan らは 1993 年、坐骨神経結紮後に後根神経節へ交感神経線維が伸びて軸索を失った大型の知覚神経細胞の周囲を取り囲むようになる交感神経の発芽現象を報告し、末梢神経障害時に交感神経が関与するニューロパシックペインの末梢性の病態の一端を示した。一方、古くから交感神経ブロックが複合性局所疼痛症候群の疼痛を緩和することが報告されてきた。最

近この交感神経ブロックの効果を疑問視する論調もあるが、日常臨床において交感神経遮断は確かにニューロパシックペインを変化させることがある。われわれは星状神経ブロックなどの交感神経ブロックがニューロパシックペイン患者のアロディニアなどの知覚異常の領域を縮小させることを経験し報告してきた。さらに動物実験で  $\alpha 1$ , 2 ブロッカーのフェントラミンを麻酔下に投与すると一過性に低閾値脊髄ニューロンの受容野が縮小すること、この反応は  $\alpha 2$  ブロッカーのヨヒンビン投与によって抑制されることを示した。この実験結果は“交感神経ブロック後に中枢神経の下降性抑制系の賦活が生じる”という仮説により説明が可能である。臨床で認められる交感神経ブロックによるアロディニアの縮小現象には交感神経遮断によるこのような中枢神経系の変化が関与するのかもしれない。

## (21) CRPS の発症メカニズムに関する一考察

仙波恵美子 (和歌山県立医科大学 第二解剖)

CRPS の多くは何らかの損傷に伴って発症するが、損傷の程度から予想されるよりはるかに訴えが強く長く持続するのが特徴であり、脳の関与が強く示唆されている。末梢神経の損傷を伴う四肢の外傷によって起こったものは CRPS type II で、以前 causalgia と呼ばれていた。末梢

神経の損傷を伴わない四肢の外傷でも同様の症状を呈することがあり (CRPS type I), reflex sympathetic dystrophy (RSD) がこれに当たる。同じような損傷を受けても、一部の人だけが CRPS を発症するのは、各人の痛みに対する情動反応が異なるためと思われる。痛みを伝える中枢

経路は大きく分けて、視床の外側部（VB complex）を経由して大脳皮質体性感覚野に終わるものと、視床の内側部（髄板内核群）を経由して前頭葉や前帯状回に至るものがある。前者は痛みの認知・識別に、後者は痛みによる覚醒・逃避、情動の喚起に関与する。後者の経路において青斑核、視床の束傍核（PF）、前帯状回、海馬の CA1 領域などが重要な役割を果たしていることが最近注目されている。我々は、痛みがストレスとして情動系を賦活させることを、c-fos 発現をマーカーとして明らかにした。また、c-fos KO マウスでは疼痛刺激に対し過剰な反応が見られるが、これが上記の情動系の過剰興奮による可能性を示唆する知見を得た。正常のマウスでは出生

前後に、PF や前帯状回、海馬 CA1 などに c-fos が強く発現することが報告されている。我々の検討では、フォルマリンテストの後、c-fos KO マウスでは WT/ヘテロ群に比べて、上記の領域において神経興奮のマーカーである Egr-1 がより強く発現していることがわかった。発達期の脳において c-fos が発現しないと、これらの領域は興奮しやすい状態になるのではないか。情動に関与する神経系の発達や形成が、発達期の環境や種々の遺伝的要因によって影響を受け、痛みや損傷に対する各人の反応の違いとして現れる可能性を示している。C-fos KO マウスはその一つのモデルと考えられる。

## (22) 脳の次に痛みがきたーアメリカのライフサイエンス 10 ヶ年戦略

熊澤孝朗（名古屋大学 名誉教授）

本研究会の予稿集からみた日本の痛み領域研究の充実振りは見事であるが、もう少しましな研究環境が整えば、さらに素晴らしい成果が期待できるに違いないと感じたのは私一人ではないであろう。本年7月に開かれた会で、痛み領域研究の活性化を図るためにはその土壌作りとして、普遍的なるが故に等閑視されている痛みの問題に対する社会全体の関心と理解と期待を得ることも必要であることが指摘され、急遽、痛み研究推進協議会が立ちあげられた。この会の初仕事として、アメリカにおける「痛み 10 ヶ年戦略」宣言を中心にしてアメリカにおける痛みへの取り組みを探ることになり、目下調査中である。本研究会では、全く毛色が変わったものであるが、この問題に関して紹介し、考察を加えたい。アメリカ議会は 2000 年の末に 2001 年からの 10 年を “the Decade of Pain

Control and Research” とすることを宣言した。これは、1990 年代に採択され、その後の世界の脳研究の進歩にエポックをもたらした、日本でも有名な “the Decade of Brain” 宣言に次ぐ第 2 番目のライフサイエンス振興政策である。そこで、何故、今、アメリカで痛みが？（「痛み 10 ヶ年戦略」宣言の背景）について、痛み系の生物学的特性；痛みと安楽死；痛みの社会経済的問題；最近 30 年間の痛み研究の成果としての痛み概念の変革；慢性痛治療法の開発の急務；医療における痛みへの対応の根本的見直し（fifth vital sign としての痛み）などの問題について考察する。次に、アメリカにおける「痛み 10 ヶ年戦略」宣言に関わる活動を紹介し、日本における痛み医療・医学の現状を考え、皆さんに、今、何をすべきかを考え、議論していただきたい。

## 17. 消化管機能

2002年8月27日－8月28日

代表・世話人：鈴木裕一（静岡県立大学食品栄養）

所内対応者：尾崎 毅（動物実験センター）

(1) 消化管自動運動の発生機序

高木 都，米田 諭（奈良県立医科大学 生理2）

(2) 小腸絨毛上皮下線維芽細胞の形態変化と機械受容

古家喜四夫<sup>1</sup>，古家園子<sup>2</sup>，曾我部正博<sup>1,3</sup>（<sup>1</sup> 科技団・細胞力覚，<sup>2</sup> 生理研・形態情報解析，<sup>3</sup> 名大医学部）

(3) モルモット大腸粘膜の振動性クロライド分泌

河原克雅，安岡有紀子，鈴木喜郎，錦谷まりこ<sup>1</sup>，高村泰弘<sup>2</sup>

（<sup>1</sup> 北里大学医学部生理，帝京大学医学部公衆衛生学，<sup>2</sup> 北里大学理学部生物科学）

(4) グレリンによる消化管機能調節について

新島 旭（新潟大学 医学部 名誉教授）

(5) The effect of leptin and ghrelin on the gastrointestinal motility

Michal Ceregrzyn, Wojciech Korczynski, Toru Mochizuki, Atsukazu Kuwahara.

（静岡県立大学 環境科学研究所 環境生理）

(6) Short-chain fatty acids-induced inhibitory response on spontaneous contractions of

longitudinal muscle in the rat colon

小野茂之<sup>1</sup>，唐木晋一郎<sup>2</sup>，桑原厚和<sup>2</sup>

（<sup>1</sup> 花王株式会社スキンケア研究所，<sup>2</sup> 静岡県立大学環境科学研究所環境生理）

(7) CCK-A,B,AB 受容体ノックアウトマウスの消化器機能

宮坂京子（東京都老人研）

(8) カハールの介在細胞の分布と細胞学的異型性

小室輝昌，関 馨介，三井 烈，池田愛美（早稲田大学 人間科学部）

(9) 大腸癌とトロンボキサン

酒井秀紀<sup>1</sup>，鈴木智之<sup>1</sup>，鶴飼政志<sup>1</sup>，田内克典<sup>2</sup>，南村哲司<sup>2</sup>，堀川直樹<sup>2</sup>，塚田一博<sup>2</sup>，竹口紀晃<sup>1</sup>

（<sup>1</sup> 富山医科薬科大学・薬・薬物生理），<sup>2</sup> 富山医科薬科大学・医・第2外科）

(10) ラット耳下腺導管の重炭酸イオン分泌と導管内径制御

柴 芳樹，広野 力，杉田 誠，岩佐佳子（広島大院 医歯薬総合 病態探究医科学 口腔生理）

(11) 消化管における管腔内酸感知機構における vanilloid receptor-1 の役割

秋葉保忠（慶応大学 医学部 内科）

(12) *Aeromonas sobria* が産生する溶血毒が腸管上皮細胞のイオン輸送に与える影響

高橋 章<sup>1</sup>，田ノ上奈緒美<sup>1</sup>，栗田志香<sup>1</sup>，前田恭子<sup>1</sup>，藤井儀夫<sup>2</sup>，岡本敬の介<sup>3</sup>，中屋 豊<sup>1</sup>

（<sup>1</sup> 徳島大 医学部 栄養，<sup>2</sup> 徳島文理大 生薬研，<sup>3</sup> 岡山大 薬）

(13) 大腸上皮細胞のカルバコール刺激に対する容積変化応答における水チャネルの役割

真鍋健一，森島 繁，岡田泰伸（生理研 機能協関）

(14) 消化管におけるキチン分解酵素の発現と今後の研究展開

岩永敏彦（北海道大学 獣医学研究科 解剖）

(15) ウナギをモデルとして飲水行動の調節機構を探る

安藤正昭（広島大学総合科学部）

(16) 胃幽門腺粘液細胞開口放出の  $\text{Ca}^{2+}$  と cAMP による調節

中張隆司 (大阪医大 生理)

## (17) 大腸菌毒素 STb の大腸イオン輸送に及ぼす効果

鈴木裕一<sup>1</sup>, 吉村麻由<sup>1</sup>, 梅田 譲<sup>1</sup>, 川俣幸一<sup>1</sup>, 渡辺ひとみ<sup>1</sup>, 本家孝一<sup>2</sup>, 藤井儀夫<sup>3</sup>, 岡本敬之介<sup>4</sup>,  
 (<sup>1</sup> 静岡県大食品栄養生理, <sup>2</sup> 大阪大学院 医学系研究科 生体制御医学 生化学・分子生物学,  
<sup>3</sup> 徳島文理大 生薬研, <sup>4</sup> 岡山大・薬)

## (18) ほ乳期におけるバクテリアトランスロケーション

矢島高二 (明治乳業 栄養科学研究所)

## (19) モチリンによる胃血流の調節

成瀬 達 (名古屋大学 医学部 内科)

## 【参加者名】

鈴木裕一, 林久由 (静岡県立大), 高木都 (奈良県立医科大学), 安藤正昭 (広島大), 酒井秀紀, 鈴木智之 (富山医大), 宮坂京子, 金井節子, 吉田由紀 (東京都老人研), 河原克雅 (北里大), 高橋章, 中屋豊 (徳島大), 秋葉保忠 (慶応大), 小室輝昌 (早稲田大), 柴芳樹, 広野力 (広島大), 中張隆司 (大阪医大), 桑原厚和, Michal Ceregryn, 唐木晋一郎, 三井烈 (静岡県立大), 成瀬達 (名古屋大),

古家喜四夫 (科学技術振興事業団), 小野茂之 (花王株式会社), 矢島高二, 成島聖子 (明治乳業), 岩永敏彦 (北海道大), 新島旭 (新潟大名誉教授), 岡田泰伸, 真鍋健一, 稲垣詠子 (名古屋学芸大), 越智靖夫, 三上忠世志 (ファイザー製薬), 岡田泰伸, 真鍋健一, 尾崎毅 (生理学研究所)

## 【概要】

消化管は食物を摂取し, 消化し, 栄養物を吸収し, 残りを便として排泄する。それを支えるため, 消化腺等による分泌, 腸管上皮での分泌吸収, 腸管壁の筋による運動, 血液循環, 関連しての自律神経やホルモンの働き等, 多彩な機能的側面がある。さらに, 生後発達, 癌の問題もある。今回の研究会では, 消化管に関する多彩な側面につき発表があった。また, それらを支える細胞の基本

的な性質に関する研究も紹介された。それぞれの研究は独立して存在するのではなく, 互いに関連しあっている。そのことは, 活発に討論がなされたことから明らかである。消化管分野での素晴らしい成果を聞くことができ満足 of いくものであった。また同時に, 今後この分野での若い研究者をさらに育てていく必要があることも大事であると思われた。

## (1) 消化管自動運動の発生機序

高木 都, 米田 諭 (奈良県立医科大学 生理 2)

【序】消化管の自動運動 (振子運動, 分節運動, 正および逆蠕動運動) のペースメーカー細胞として近年カハールの間質 (介在) 細胞 (ICC) が注目を得るに至っている。一方, 福原ら (1968) は, ラット, モルモットの近側結腸と遠側結腸の境界部に “ペースメーカー部位” を発見し, ここから, 規則正しい逆蠕動が起こることを報告した。この部位には ICC が豊富に分布しており, 小林ら (1996) はこの部位で規則的な律動収縮を記録している。

【研究 1】ラット近側結腸では規則的な律動的収縮が起こる。c-kit positive ICC-SM と ICC-MY が欠損する Ws/Ws 変異ラットでも同様の律動収縮が見られた。Ws/Ws 変異ラットでは c-kit negative な ICC-SM が残存しているという報告があり, この c-kit negative ICC-SM と他の c-kit positive ICC-SM と ICC-MY が協調して自発運動の頻数調節をしていると考えられる。

【研究 2】マウス近側結腸では頻数の異なる 2 つの自動

運動が見られた。ICC-SM からはプラトー相をもつ緩電位が、輪走筋からは群発する action potential, 縦走筋からは群発する membrane oscillation が記録できた。輪走筋方向の運動を記録すると ICC-SM の緩電位と一致して起こる収縮が主であり、縦走筋方向の運動を記録すると action potential や membrane oscillation に一致して起こる収縮が記録された。逆蠕動が ICC-SM により制御されていると考えられる。

【研究 3】マウス ES 細胞から分化誘導した腸管では一定

の方向への蠕動運動が発生した。この腸管では ICC がよく発達しているが、腸壁内神経は分化しているもののネットワークを形成するに至っていなかった。

【まとめ】消化管の自動運動の発生機序に ICC が重要な役割を果たしていることは明らかであるが、それぞれの自動運動での役割については今後さらに研究を進めていく必要がある。

## (2) 小腸絨毛上皮下線維芽細胞の形態変化と機械受容

古家喜四夫<sup>1</sup>, 古家園子<sup>2</sup>, 曾我部正博<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup> 科技団・細胞力覚, <sup>2</sup> 生理研・形態情報解析, <sup>3</sup> 名大医学部)

小腸絨毛上皮下線維芽細胞(Subepithelial Fibroblasts)は、上皮基底層直下で互いの突起を介してネットワークを形成するとともに、平滑筋や血管にも突起を伸ばしており、単にコラーゲンを産生するばかりでなく、細胞間の情報伝達を制御することにより、腸の働きに関わっていると考えられる。私たちはこの細胞の培養に成功し、この細胞がエンドセリン(ET-1,3), ATP, Substance-P, 5HT, AngII, Bradykinin 等、血管作動性、神経作動性の多様な生理活性物質に対する受容体を持つとともに、細胞内 cAMP 濃度に応じて、扁平なかえでの葉のような形態(扁平状)から丸い細胞体と長い突起を持った星型の形態(星状)へと形態を変化させることをすでに明らかにした。この 1 つの細胞を細いガラスピペットで触るといった機械的刺激(タッチ)を与えると、ATP の放出と P2Y 受容体の活性化による細胞間  $\text{Ca}^{2+}$  波が発生した。また伸展機

械刺激(ストレッチ)にも応答し、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇とともに強度依存的に ATP が放出されることをルシフェーレス反応を用いて明らかにした。これら機械的刺激に対する応答性は、dBcAMP(1mM) 処理によって扁平状から星状へと形態変化させた細胞では抑制されていた。この時、機械刺激による ATP 放出量の減少ばかりでなく、個々の細胞での ATP に対する反応性の低下もみられた。この星状の細胞に ET(1-10nM)を投与すると形態が扁平に戻るとともに機械刺激に対する応答性は回復した。このように小腸絨毛下線維芽細胞は各種活性物質によってその形や性質を変えることにより、絨毛下のネットワークとして、その機械的性質や物質の透過性を制御していると考えられる。また、伸展刺激による ATP 放出は、絨毛の動きに応ずるメカノセンサーとしての機能が示唆される。

## (3) モルモット大腸粘膜の振動性クロライド分泌

河原克雅, 安岡有紀子, 鈴木喜郎, 錦谷まりこ, 高村泰弘<sup>1</sup>

(北里大学医学部生理, 帝京大学医学部公衆衛生学, <sup>1</sup> 北里大学理学部生物科学)

大腸粘膜の電解質・溶液輸送の神経性調節は、自律神経系と腸管神経叢(おもに粘膜下神経叢)の活動により制御されている。単離したモルモット大腸粘膜を Ussing チャンバーに固定し、静止時と活性化時の上皮短絡電流

を測定することにより、粘膜下神経叢の役割と制御機序を調べた。大腸粘膜の血管側に低濃度(0.2-1 mM)の  $\text{Ba}^{2+}$  を投与すると、ピーク値が 400-500  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  の振動性正電流(2-3 strokes/min)が記録された。この振動電流の振幅

は、2 mM  $Ba^{2+}$ で低下し、5 mM  $Ba^{2+}$ で完全に消失した。一方、テトロドトキシン(TTX)は、濃度依存性に  $Ba^{2+}$ 誘発-振動電流を阻害し、1  $\mu$ M アトロピンも同電流を完全に阻害した。また、チャンバー内液を低 Cl-液(11 mM)に置換したり、管腔側に NPPB(Cl-チャンネル阻害薬)を投与すると、 $Ba^{2+}$ 誘発-振動電流は著しく低下した。さらに、

チャンバー内液を 0Ca<sup>2+</sup>液に置換すると、 $Ba^{2+}$ 誘発-振動電流は抑制された。しかし、高 K<sup>+</sup>液置換(40 mM)においても、 $Ba^{2+}$ 誘発電流の振動性は失われなかった。これらの結果は、モルモット大腸粘膜下神経叢に  $Ba^{2+}$ 感受性のコリナージックニューロンがあり、脱分極刺激に応じて周期的 Cl 分泌を誘発することを示した。

#### (4) グレリンによる消化管機能調節について

新島 旭(新潟大学 医学部 名誉教授)

近年発見された脳腸ペプチド「グレリン」は、主に胃の内分泌細胞と視床下部ニューロンで生産され、成長ホルモン分泌促進作用の他、胃酸分泌、消化管運動および摂食の亢進作用を有すると報告されている。本実験はグレリンが自律神経を介して消化管機能調節に果たす役割を解明することを目的として行われた。

【方法】体重 300 g 程度のウイスター系ラットを使用しウレタン麻酔下で開腹し、迷走神経胃枝、腹腔枝、内臓神経(交感神経)胃枝、の切断中枢側より神経フィラメントを分離し遠心性神経活動を記録した。さらに、副腎、腎臓、肝臓、脾臓、背側褐色脂肪、副睾丸白色脂肪を支配する交感神経活動も同様の方法で記録した。また、迷走神経胃枝の切断末梢側より求心性神経活動を記録した。

【実験結果】グレリン 1~10ng の静脈内投与により迷走

神経胃枝および腹腔枝の遠心性活動は促進し交感神経胃枝および他の内臓器官を支配する交感神経枝の遠心性活動は抑制された。これらの自律神経反応は迷走神経切断ラットでは発現しなかった。さらに、グレリン 1~10ng の静脈内投与は迷走神経胃枝の求心性神経活動を強く抑制する事が観察された。

【考察】これらの実験結果から、グレリン刺激による胃壁グレリンセンサーからの求心性信号の減少は反射的に迷走神経胃枝、腹腔枝の活動を増強し、胃酸分泌、消化管運動の促進さらには摂食の亢進など同化作用の促進を起こす事が示唆される。一方、交感神経活動の減少により代謝の抑制など異化作用の抑制が起こるものと思われる。グレリンはエネルギー蓄積反応を促進する重要なホルモンの一つであろう。

#### (5) The effect of leptin and ghrelin on the gastrointestinal motility

Michal Ceregrzyn, Wojciech Korczynski, Toru Mochizuki, Atsukazu Kuwahara.

(静岡県立大学 環境科学研究所 環境生理)

The aim of the present study was to investigate the influence of newly discovered gastrointestinal hormones: leptin and ghrelin on gastrointestinal motility. The animals (rats or mice) were intraperitoneally injected with leptin (L), ghrelin (G), leptin + ghrelin (LG) at a dose 20 microg/kg BW or saline (C). In in vitro experiments the motility of longitudinal strips of gastric fundus and corpus, segments of the proximal duodenum and distal jejunum was recorded under isotonic conditions 30 minutes after injection. Tissues

were stimulated by electrical field stimulation (EFS), 10-6 M acetylcholine (ACh), 10-6 M 5-hydroxytryptamine (5-HT), and 10-2 M potassium chloride (KCl). In vivo experiments were performed in order to measure gastrointestinal transit and gastric emptying using the activated charcoal method and the phenol red method, respectively.

The amplitude of in vitro spontaneous contractions of duodenum significantly increased after leptin administration. The frequency of jejunal contractions was increased in the LG

group. The induced contraction of duodenum increased in leptin treated animals while in jejunum these contractions were smaller. Ghrelin abolished the effect of leptin in duodenum, while there was no such effect in jejunum. In vivo experiments has shown that ghrelin significantly increases gastrointestinal transit. Additionally, leptin decreased gastric

retention. In conclusion, the present study shows a significant, direct effect of leptin on gastric and intestinal motility. Thus, we suggest that leptin and ghrelin take part in regulation of digestive tract motility and it is possible that ghrelin and leptin interplay regulating duodenal motility.

#### (6) Short-chain fatty acids-induced inhibitory response on spontaneous contractions of longitudinal muscle in the rat colon

小野茂之<sup>1</sup>, 唐木晋一郎<sup>2</sup>, 桑原厚和<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>花王株式会社スキンケア研究所, <sup>2</sup>静岡県立大学環境科学研究所環境生理)

難消化性糖類から大腸内発酵により生成する短鎖脂肪酸類 (short-chain fatty acids: SCFAs) は, 大腸運動に影響することが報告されている。SCFAs は, 主に盲腸および上行結腸で生成される一方, 糞塊が形成されてくる中位結腸後半から遠位結腸ではほとんど生成されない。しかし, 糞塊中には 100 mM 程度の SCFAs が存在するため, 糞塊が蠕動反射を誘発する遠位結腸では, SCFAs は糞塊とともに移動しているものと考えられる。SCFAs は, 糞塊体積による物理的刺激と同様, 大腸壁を局所・化学的に刺激すると考えられるが, 物理的作用ほど蠕動反射時の役割は理解されていない。そこで我々は, ラット遠位大腸縦走筋粘膜付き標本を用い, SCFAs の自発運動に対する影響を検討した (大腸内の pH はほぼ中性条件下にあるので, SCFAs は Na 塩を用いた)。自由摂食下, 遠位大腸内には通常糞塊が認められるが, 一昼夜絶食させることにより, 遠位大腸内の糞塊は存在しなくなるか, あるいは明らかに減少した。絶食動物から摘出した糞塊の

存在しない標本は, 自由摂食動物の糞塊の存在する標本に比し, 自発運動回数が有意に増加していた。さらに, その自発運動回数の増加した標本に 5mM 以上の SCFAs を作用させると, 自発運動回数は自由摂食動物の標本とほぼ同じ回数に減少した。このことから, 絶食による自発運動回数の増加は, 大腸内が SCFAs にさらされていないため, すなわち, SCFAs 不足の状態による影響であることが示唆される。絶食動物の標本における, 自発運動回数を低下させる SCFAs の作用は, NOS-阻害剤の影響を受けることから, 部分的に NO を伝達物質とする作用であることが示唆された。また, この SCFAs の作用は TTX により抑制された。さらに, ニコチン様 ACh 受容体および 5-HT<sub>3</sub> 受容体の関与も示唆された。結論として, ラット遠位大腸縦走筋の自発運動回数は, 大腸内 SCFAs の有無に応答して変化する可逆的な状況下であり, SCFAs は, 蠕動反射にともなう収縮回数を制御することで, 糞塊輸送に関与していることが推察された。

#### (7) CCK-A,B,AB 受容体ノックアウトマウスの消化器機能

宮坂京子 (東京都老人研)

コレシストキニン(CCK) は, 消化管ホルモンでありかつ神経ペプチドである。2 種類の-A, B 受容体は, 消化管の迷走神経求心路末端に存在し, A 受容体は, 胃排出速度を遅延させ, 満腹効果を生じる。しかし B 受容体の胃酸分泌亢進以外の役割は, はっきりしない。CCK-A,B 受

容体遺伝子ノックアウトマウス (KO) と A,B double KO の液体飼料 (non-nutrient) の胃排出速度を検討した。B 受容体を欠損すると, 排出速度が早く, A 受容体欠損は野生型と相違がなかった。CCK-8S (7 nmol/kg sc) の投与は, A 受容体欠損マウスでは, 胃排出速度に影響しないが,

その他のマウスでは、著明に排出速度を遅延させた。アトロピン(0.2, 1, 5 mg/kg)の投与は、いずれも胃排出速度を遅延させたが、B 受容体を欠損するマウスでは、他のマウスと同等の効果をえるには、より大量のアトロピン

が必要であった。オメプラゾールの投与による胃酸分泌抑制は、血中ガストリンを上昇させるが、胃排出速度に影響しなかった。以上の結果から B 受容体は、食間(非刺激時)の胃排出速度を維持していると結論された。

## (8) カハールの介在細胞の分布と細胞学的異型性

小室輝昌, 関 馨介, 三井 烈, 池田愛美(早稲田大学人間科学部)

カハールの介在細胞 (ICC) は、消化管運動ペースメーカーとしての機能が注目される一方、豊富な神経支配と gap junction による細胞網を介して神経筋間の興奮伝達装置として働くことが証明されている。

しかしながら個別にみると、胃、小腸、大腸では、筋層の配列、神経叢の分布にかなりの違いがあり、ICC もそれぞれ特徴的な分布を示すことが知られている。更に胃では、単一の器官内においても領域により ICC の分布や細胞学的特性に相違のあることが観察されており、胃

各部の運動機能と共に、ICC の型の解析が進みつつある。本講演では、種、器官、組織層の違いによって多様性を示す ICC について、マウス、ラット、モルモットを材料とした免疫組織化学的観察、微細構造上の特徴について報告する。特に胃については、自律的蠕動運動の開始部位、各領域における筋層の興奮伝播様式の検討を念頭に、マウス胃における c-Kit 陽性細胞と gap junction 蛋白 Cx43 の分布について述べる。

## (9) 大腸癌とトロンボキサン

酒井秀紀<sup>1</sup>, 鈴木智之<sup>1</sup>, 鶴飼政志<sup>1</sup>, 田内克典<sup>2</sup>, 南村哲司<sup>2</sup>, 堀川直樹<sup>2</sup>, 塚田一博<sup>2</sup>, 竹口紀晃<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 富山医科薬科大学・薬・薬物生理, <sup>2</sup> 富山医科薬科大学・医・第2外科)

大腸癌の進行が、アスピリンなどの非ステロイド系抗炎症薬の投与によって有意に抑制されることが、臨床的に明らかにされている。薬物の作用点は主にアラキドン酸カスケードのシクロオキシゲナーゼであるため、大腸癌の発生・進行はシクロオキシゲナーゼ経路と何らかの関係があると考えられるが、その詳細については不明な点が多い。シクロオキシゲナーゼより下流のトロンボキサン合成酵素によって産生されるトロンボキサン A<sub>2</sub> は動脈収縮、血小板凝集、気管支収縮などといった循環器、呼吸器系の分野でその生理機能が注目されてきた。しかし、最近ではトロンボキサン合成酵素 mRNA が比較的多くの組織に発現していることやトロンボキサン合成酵素遺伝子のプロモーター領域に転写因子が認識可能な配列が多く存在していることなどから循環器・呼吸器系以外でも重要な生理機能を担っていることが示唆されてい

る。我々は、大腸癌患者から摘出した腫瘍組織および近傍の正常組織との間で、トロンボキサン合成酵素、シクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) の発現量変化について検討した。トロンボキサン合成酵素 mRNA および合成酵素タンパク質は、大腸癌組織において、再現性良く発現量の増大が観察された。免疫組織染色において、合成酵素タンパク質の発現量増大が、癌細胞自身に由来していることがわかった。COX-2 mRNA の腫瘍組織における発現量増大の程度はトロンボキサン合成酵素に比べて顕著ではなく、再現性も低かった。トロンボキサン合成酵素 mRNA の発現は、各種ヒト大腸癌培養細胞においても再現性良く観察された。一方、COX-2 mRNA 発現の再現性はトロンボキサン合成酵素の場合よりも乏しかった。以上の結果から、大腸癌とトロンボキサン合成酵素発現量増大の機能的関連性が示唆された。

## (10) ラット耳下腺導管の重炭酸イオン分泌と導管内径制御

柴 芳樹, 広野 力, 杉田 誠, 岩佐佳子 (広島大院 医歯薬総合 病態探究医科学 口腔生理)

唾液腺導管は分泌・吸収による唾液組成の調節とともに腺房から口腔内への分泌物の通り道としての役割を果たしている。特に唾液中の重炭酸イオンは、口腔健康維持に重要で、導管での重炭酸イオン分泌と導管内径制御との関連について調べた。

ラット耳下腺から酵素処理で分離した導管を、共焦点レーザー顕微鏡下で蛍光色素 sulforhodamine B でしばらく灌流すると、導管内腔断面に蛍光が観察された。導管内腔の蛍光染色された顆粒は、carbachol(CCh)刺激や forskolin 刺激で、導管切断端から排出された。同時に導管内腔の蛍光は減少し、導管内径も拡大した。これらの変化は、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-\text{-cotransporter}$  阻害剤 bumetanide や

$\text{Cl}^-\text{-HCO}_3^-$  exchanger 阻害剤 DIDS で影響を受けず、陰イオンチャネル阻害剤 DPC で抑制された。炭酸脱水酵素阻害剤 methazolamide は導管内腔の蛍光減少を抑制したが、導管内径の拡大を抑制しなかった。分離導管細胞をグラミシジン穿孔パッチ法で、解析すると、CCh や forskolin 刺激で陰イオン電流が観察された。この電流は、bumetanide や DIDS では変化せず、methazolamide で抑制された。ラット耳下腺導管では、 $\text{Ca}^{2+}$  依存性の陰イオンチャネルや CFTR  $\text{Cl}^-$  チャネルを介して重炭酸イオンが分泌され、この分泌は導管内の水駆動力として働くとともに、初期の陰イオン分泌は導管細胞収縮を引き起し導管内腔の拡大にも寄与していることが示唆された。

## (11) 消化管における管腔内酸感知機構における vanilloid receptor-1 の役割

秋葉保忠 (慶応大学 医学部 内科)

消化管粘膜は様々な物質と接する外界との境界であり、管腔内の状況変化に応じた粘膜防御機構を有し、消化管本来の機能である消化、吸収、運搬を支えている。なかでも血流調節は重要な粘膜防御機構の一つであり、自律神経系とともに post-epithelial 因子として粘膜の恒常性を保っている。とくに胃十二指腸粘膜は絶えず胃酸に暴露されることから、迅速な酸感知機構と連動した粘膜防御が必要である。粘液分泌、重炭酸分泌および血流増加が防御因子として知られているが、粘膜がいかに管腔内の酸を感知してこれら生理的応答をするかは十分論じられてこなかった。下部消化管においても、管腔内物質を感知し吸収および蠕動を調節する上で、nutrient tasting 機構が必要であり、例えば短鎖脂肪酸の吸収において管腔内 pH の調節が重要であることが知られている。以上より、管腔内 pH を感知して血流増加といった粘膜防御反応や

生理的応答をおこす経路の存在が推察される。近年、capsaicin 感受性知覚神経上の capsaicin receptor として vanilloid receptor-1 (VR-1) が cloning され、VR-1 が proton 自身を感知することが明らかとなった。そこで、ラット十二指腸粘膜での酸による血流増加と capsaicin 感受性知覚神経の関係を検討すると、管腔内 pH の低下-粘膜上皮細胞の酸性化- $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange による proton の汲み出し-VR-1 の活性化-CGRP および NO の放出-血流増加という経路が存在することが判明した。また、大腸粘膜においても、管腔内 pH の低下が VR-1 を介して血流を増加させた。VR-1 の発現は消化管において粘膜固有層から筋層まで陽性神経線維として認められ、さらに myenteric plexus の神経細胞にも認められた。以上のことから、VR-1 が acid sensor として管腔内酸に対する消化管粘膜血流増加に関与することが明らかになった。

(12) *Aeromonas sobria* が産生する溶血毒が腸管上皮細胞のイオン輸送に与える影響

高橋 章<sup>1</sup>, 田ノ上奈緒美<sup>1</sup>, 栗田志香<sup>1</sup>, 前田恭子<sup>1</sup>, 藤井儀夫<sup>1</sup>, 岡本敬の介<sup>3</sup>, 中屋 豊<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>徳島大 医学部 栄養, <sup>2</sup>徳島文理大 生薬研, <sup>3</sup>岡山大・薬)

【目的】*Aeromonas Sobria* は食中毒原因菌として知られている。主要な臨床症状として下痢があげられるが、その下痢誘発機構はいまだ明確ではない。下痢が起こるとき、腸管上皮細胞でイオン輸送が変化することが考えられる。そこで、*Aeromonas Sobria* の主要な病原因子と考えられている溶血毒(aerolysin)を単離精製し、aerolysin が腸管上皮細胞のイオン輸送に与える影響を解析し、*Aeromonas Sobria* の下痢誘発機構を解明することを目的とした。

【方法】ヒト大腸癌株化細胞 Caco-2 細胞をフィルター上に 2~3 週間培養した後に、Ussing chamber 法を用いて腸管上皮細胞を介するイオン輸送を測定した。

【結果・考察】フィルター上培養した Caco-2 細胞の apical 側に aerolysin を添加すると、Caco-2 細胞を介するイオン電流が増加したが、basolateral 側に添加した時は、電流の変化は認めなかった。aerolysin による電流の増加は抗 aerolysin 抗体の添加により阻害された。さらに aerolysin による電流の増加は、glybenclamide により阻害される成分と阻害されない成分があり、glybenclamide 感受性の成分は Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator を介する  $\text{Cl}^-$  電流であると考えられた。以上より aerolysin は腸管上皮細胞の  $\text{Cl}^-$  分泌を促進させ下痢を引き起こす可能性が示唆された。

## (13) 大腸上皮細胞のカルバコール刺激に対する容積変化応答における水チャネルの役割

真鍋健一, 森島 繁, 岡田泰伸 (生理研 機能協関)

大腸クリプト上皮が分泌刺激に応答して容積変化を示すことはクリプト総体の観察によって示唆されてきたが、個々の上皮細胞の容積変化についての報告は、技術的困難さから皆無であった。我々は、蛍光色素の退色が少なく組織標本深部の探索も可能な二光子レーザー顕微鏡法を用いることにより、クリプト内部の個々の細胞容積変化を捉える事に成功した。モルモット大腸からクリプトを単離し、これにカルバコール刺激すると主としてクリプト基底細胞が縮小し、その後時間経過と共に元の容積にまで回復することが分った。同様の分泌性容積減少 (secretory volume decrease: SVD) とそれに続く調節性容積

増加 (regulatory volume increase: RVI) はヒト大腸上皮由来の培養細胞 T84 においてもコールターカウンター法で確認された。RT-PCR 法と免疫染色法で T84 細胞における水チャネル AQP3 の発現を確認したので、AQP3 のアンチセンス処理を行ったところ SVD が抑制された。水チャネルブロッカー MMTS の前投与及び後投与によってそれぞれ SVD と RVI が抑制された。以上の結果から、大腸クリプト上皮細胞の分泌刺激に応答した細胞縮小にも、その後の調節性容積増加にも水チャネルが重要な役割を果たす事が結論された。

## (14) 消化管におけるキチン分解酵素の発現と今後の研究展開

岩永敏彦 (北海道大学 獣医学研究科 解剖)

哺乳類は摂取したキチンの約 40% を消化できるが、この分解活性は腸内細菌由来のキチン分解酵素 (キチナーゼ) によるものと考えられていた。2001 年に、哺乳類自

身がキチナーゼを産生することが初めて報告されたことを受けて、我々は in situ hybridization 法と免疫組織化学により、産生細胞の同定を行った。マウスでは、耳下腺

の腺房細胞と胃の主細胞がキチナーゼを発現していた。いずれの細胞でも分泌顆粒内に存在することから、消化管腔内へ分泌されるはずである。凝乳酵素としても働く胃のペプシノーゲンが胎生期から発現するのに対し、キチナーゼは離乳に間に合うように、生後 15 日令で最初の発現が認められた。反芻動物（ウシ）では肝臓でのみ産生され、それは血中へ移行する。鳥類と両生類は、節足動物の外骨格をつくるキチンを大量に摂取することが予

想されるが、やはり胃で非常に大量のキチナーゼを発現していた。

キチナーゼはファミリーを構成しており、キチナーゼ活性をもたない関連蛋白が多数存在する。これらは特定の糖鎖を認識するレクチンとして機能し、細胞の分化や移動、疾患ではアレルギー・寄生虫疾患・関節炎・動脈硬化などに深く関係しているらしい。

## (15) ウナギをモデルとして飲水行動の調節機構を探る

安藤正昭（広島大学 総合科学部）

陸上脊椎動物や海産魚にとって、飲水行動は生存のために必須の本能行動である。しかし多くの研究者のいる哺乳類でも、まだ飲水行動を調節する神経回路は明らかになってはいない。その理由として、哺乳類での飲水行動が複雑なことが挙げられる。哺乳類は渴感を覚えると水場を探し、水を口に含み、最後に嚥下する。このそれぞれの過程に神経回路が存在し、また飲水行動は体温調節とも関わっている。それに対して水中にいる魚類は、呼吸のために絶えず口中に水を含むので、嚥下だけで水は食道に入る。そのぶん、魚類における神経回路は哺乳類より単純であり、モデル動物としては優れていることが期待できる。海水ウナギの血中に ANG II を打つと飲水は促進され、ANP によって抑えられる。これらのペプチドを脳内に投与しても同様な効果が見られる。血中と脳内で同じ効果が見られることから、これらのペプチドは脳室周囲器官 (CVOs) に作用していることが考えられる。ウナギの脳内で、magnocellular preoptic nucleus (PM) や nucleus anterior tuberis (NAT) および area postrema (AP) にある細胞体は、腹腔内に注射した Evans blue (EB) で染まった。このことはこれらの核群がウナギの CVOs であることを示唆している。一方、嚥下を担う上部食道筋に

EB を注射すると、延髄の grossopharyngeal vagal motor complex (GVC) が逆行性に染まった。これら EB 陽性の GVC neuron はまた、アセチルコリン合成酵素である choline acetyltransferase の抗体でも染まった。このことは、ウナギの上部食道筋はアセチルコリン (ACh) によって調節されていることを示している。事実、ウナギの上部食道括約筋（輪走筋、横紋筋）は cholinergic neuron の支配下にあった。Catecholamine 合成酵素である tyrosine hydroxylase (TH) の抗体を用いてウナギの延髄を染めると、AP の neuron が強く染まり、繊維を GVC に伸ばしているのが観察された。そこで GVC のブロックを灌流し、灌流液にアドレナリンを作用させると GVC neuron の自発発火が強く抑制された。このことは、GVC が catecholamine 性の抑制神経の支配下にあることを示唆している。以上の結果をまとめると、血液に出た飲水促進物質 (ANG II など) や抑制物質 (ANP, ghrelin など) は間脳の PM や NAT、延髄の AP という脳室周囲器官に作用していることが考えられる。特に飲水促進物質は、AP を介して GVC を抑制することにより食道括約筋を緩め、嚥下を起こさせていると思われる。

## (16) 胃幽門腺粘液細胞開口放出の $\text{Ca}^{2+}$ と cAMP による調節

中張隆司（大阪医大 生理）

モルモット胃幽門腺粘液細胞における粘液放出は  $\text{Ca}^{2+}$ -調節性開口放出により維持されている。本研究では、

アセチルコリン (ACh) により活性化された  $\text{Ca}^{2+}$ -調節性開口放出に対する cAMP の効果についてイソプロテレノ

ール (IPR) を用いて検討した。

モルモット胃幽門粘膜より得られた単離腺管中の粘液細胞の開口放出をビデオ顕微鏡を用いて観察した。

モルモット胃幽門腺粘液細胞における  $\text{Ca}^{2+}$ -調節性開口放出の特徴は 2 相性 (一過性で高頻度の初期相とそれに引き続く低頻度の定常相) であることで, IPR による cAMP の集積は  $\text{Ca}^{2+}$ -調節性開口放出の 2 相とも増強した。一般に  $\text{Ca}^{2+}$ -調節性開口放出は生化学的に異なる 2 つのステップ (priming, fusion) があり, 'priming' は ATP, 'fusion' は  $\text{Ca}^{2+}$  により調節されている。ACh,  $\text{Ca}^{2+}$  濃度依存性を調べた結果から, cAMP は  $\text{Ca}^{2+}$ -調節性開口放出の  $\text{Ca}^{2+}$  感受性を増加させることが明らかとなった。一方,

dinitrophenol (DNP) 処理, あるいは, 無酸素負荷することにより ATP を枯渇させたところ  $\text{Ca}^{2+}$ -調節性開口放出の初期相は消失, 定常相のみが観察された。しかし forskolin により cAMP の集積を起こした後に ATP を枯渇させた時は, 初期相と定常相からなる二相性の  $\text{Ca}^{2+}$ -調節性開口放出を引き起こした。

以上の結果から胃幽門腺粘液細胞  $\text{Ca}^{2+}$ -調節性開口放出反応の初期相では priming した顆粒が一度に fusion し, 定常相では priming/fusion が連続しておこっていることが明かとなった。また cAMP は 'fusion', 'priming' を同時に修飾し,  $\text{Ca}^{2+}$ -調節性開口放出の初期相と定常相を増強していることが考えられた。

### (17) 大腸菌毒素 STb の大腸イオン輸送に及ぼす効果

鈴木裕一<sup>1</sup>, 吉村麻由<sup>1</sup>, 梅田 譲<sup>1</sup>, 川俣幸一<sup>1</sup>, 渡辺ひとみ<sup>1</sup>, 本家孝一<sup>2</sup>, 藤井儀夫<sup>3</sup>, 岡本敬の介<sup>4</sup>,

(<sup>1</sup> 静岡県大食品栄養生理, <sup>2</sup> 大阪大学 医学系研究科 生体制御医学 生化学・分子生物学,

<sup>3</sup> 徳島文理大 生薬研, <sup>4</sup> 岡山大・薬)

ある種の毒素原性大腸菌は 48 個のアミノ酸からなる下痢誘発性の毒素 STb を産生放出する。Ussing chamber 法を用い, ウス遠位大腸での STb の効果のイオン機序と受容体に関して検討した。STb は管腔側液投与によってのみ短絡電流 (Isc) と経上皮コンダクタンス (Gt) を上昇させた。この上昇は, 溶液の Cl イオン除去,  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$  除去によりそれぞれ 30% ほど低下した。両者を除去しても 30% ほどの反応は残った。Na 除去は反応を完全に抑制した。STb による Isc 上昇は, 血液側 bumetanide により影響を受けなかった。イオンフラックスを測定したところ,  $^{22}\text{Na}$  フラックスには影響がなく,  $^{36}\text{Cl}$  については吸

収方向のフラックスのみ低下し (Isc 変化と同等量) 分泌フラックスには影響しなかった。

管腔側液に加えた酸性糖脂質スルファチドは濃度依存性に STb による Isc 上昇を部分的に抑えた。スルファチド合成酵素の KO マウスにおいて, STb による Isc 上昇は wild-type と差がなかった。以上より, Cl 分泌活性化ではなく, Cl 吸収抑制が下痢を引き起こすイオン機序と考えられる。Isc 上昇のメカニズムは現在不明である。また, スルファチドは STb の作用に影響を及ぼすものの, 直接の受容体になってはいないと考えられる

### (18) ほ乳期におけるバクテリアトランスロケーション

矢島高二 (明治乳業 栄養科学研究所)

バクテリアトランスロケーション (BT) とは腸管内の細菌が生きたまま腸管上皮を通過し, 粘膜固有層や腸管膜リンパ節, 他の組織にまで侵入する事である。病原菌は宿主との分子レベルでの相互作用を介して巧妙に侵入するが, 腸管に常在している細菌が健康な宿主に侵入

する事は通常なく, 従って BT は見られないとされている。

これまで我々は, 哺乳期のラットにおいて腸管膜リンパ節までの BT が高頻度で起こっていること, 離乳に伴って BT が消失する事を観察した。BT を引き起こす細菌

の出現パターンは腸内細菌叢の構成を反映しておらず、大腸菌が最優勢であった。優勢な腸内細菌では無いスタヒロコッカスは BT を起こしやすい細菌であった。母乳哺育 (MR) の代わりに生後 3 日齢でラット仔の胃にカニューレを装着し人工乳で哺育 (AR) すると腸管膜リンパ節を越えて肝臓や脾臓への BT が惹起された。AR 群の肝臓に BT を起こした細菌は多い順に、大腸菌群、腸球菌、スタヒロコッカスであった。

BT の阻止には上皮バリアーと侵入した細菌を貪食して殺菌する 2 段階が考えられる。そこで、小腸あるいは結腸粘膜に付着した菌叢を群間で比較した結果、AR 群では大腸菌と腸球菌数が MR 群に比べてそれぞれ 100 倍、10 倍と有意に多かった。小腸の絨毛数 (腸管横断切片上)

を比較すると MR 群に比べて AR 群では空腸で 1.3 倍、回腸で 1.7 倍と有意に多いことから、細菌の付着の場が AR 群の方がより多いと考えられた。一方、腹腔浸出性好中球の貪食活性は AR 群の方が MR 群より低い個体が多く散見され、グラム陰性細菌の細胞壁成分であるリポ多糖を MR 群の乳仔に腹腔内投与すると、腹腔浸出性好中球の貪食活性は抑制された。

哺乳期、特に AR 群において BT が高頻度に持続的に起こる背景として、小腸粘膜への大腸菌等付着菌数が高く細菌侵入を起こし易い状況にある。BT により体内に持ち込まれたリポ多糖は細胞性免疫活性を減弱し、BT が持続し易くなっていることが考えられる。

## (19) モチリンによる胃血流の調節

成瀬 達 (名古屋大学 医学部 内科)

空腹期の胃血流は約 100 分間隔で生じる胃の周期運動に同期して変動する 1)。即ち、イヌでは胃運動の休止期 (phase I) には左胃動脈血流  $34.3 \pm 5.0$  ml/min でほぼ一定であるが、収縮期には (phases II & III) には平均値で  $55.8 \pm 9.0$  ml/min、頂値で  $79.3 \pm 11.8$  ml/min と持続に増加する。また、個々の胃収縮に対応して胃血流は減少 ( $-79 \pm 17\%$ ) と収縮後の増加 ( $+170 \pm 42\%$ ) を反復する。上部消化管の空腹期の周期運動はモチリンにより調節されていることが知られている。そこで、本研究では無麻酔状態のイヌにおける空腹期の胃血流調節におけるモチリンの役割を検討した。

【方法】超音波トランジットタイム血流計のプロブを左胃動脈および上腸間膜動脈の根部に装着し、同時に胃瘻、十二指腸瘻を作成した 2)。胃および十二指腸の運動はカテーテル型圧センサーを瘻孔より挿入して記録した。血圧は埋め込み型圧センサーを大腿動脈に留置し、テレメトリーシステムにより記録した。

【成績】モチリンを経静脈的に投与 (12.5, 25, 50, 100 pmol/kg/h) すると、周期運動に随伴すると同様の胃血流の変化を生じたが、小腸血流、血圧には影響を与えなかつ

た。granisetron (5-HT<sub>3</sub> antagonist) はモチリンによる胃運動を完全に抑制したが、モチリンによる胃血流の持続性の増加は抑制されなかった。Atropine は胃運動、分泌ともに抑制したが、胃血流の持続的増加は抑制しなかった。また hexamethonium, phenoxybenzamine, propranolol, cimetidine はモチリンの胃運動と血流の増加を抑制しなかった。一方、GM-109 (motilin antagonist) はモチリンの胃運動、血流、分泌作用を完全に抑制した。モチリンの胃血流増加作用はほぼ VIP に匹敵した。

【結論】モチリンは胃の血管に選択的な拡張作用を有し、空腹期の胃血流調節に重要な役割をはたしている 3)。

1. Naruse S, Takagi T, Kato M, Ozaki T. Interdigestive gastric blood flow: the relation to motor and secretory activities in conscious dogs. *Exp Physiol* 1992;77:701-708.
2. Nakamura T, Naruse S, Ozaki T, Kumada K. Calcitonin gene-related peptide is a potent intestinal, but not gastric, vasodilator in conscious dogs. *Regul Pept* 1996;65:211-217.
3. Jin C, Naruse S, Kitagawa M, et al. Hayakawa T. Motilin regulates interdigestive gastric blood flow in dogs. *Gastroenterology*, in press.

## 18. 電子位相顕微鏡法の医学的・生物学的応用

2003 年 3 月 12 日 - 3 月 15 日

代表・世話人：臼田信光（藤田保健衛生大学医学部）

所内対応者：永山國昭（統合バイオサイエンスセンター）

- (1) Expanding Protein structure World by High Pressure NMR. Characterization of Reactive Conformers of the Prion Protein  
赤坂一之（近畿大学 生物理工学部 生物工学科）
- (2) ULTRASTRUCTURAL ANALYSIS OF THE CEREBRAL  $\beta$  AMYLOID DEPOSITION  
山口晴保（群馬大学 医学部 保健学科）
- (3) Pressure Dissociates Amyloid-fibrillogenic Assembly of Disulfide-deficient Lysozyme Variant  
橘 秀樹（神戸大学 理学部）  
Tara N. Niraula, Hua Li, 山田博昭（神戸大学 自然科学研究科）  
今野 卓（福井医科大学）  
赤坂一之（近畿大学 生物理工学部）
- (4) Perspectives in Alzheimer's disease diagnosis  
荒井啓行（東北大学 医学部 老年・呼吸器病態学講座）
- (5) Molecular Motor, Kinesin Superfamily Proteins (KIFs) : Structure, Dynamics and Functions  
廣川信隆（東京大学大学院 医学系研究科）
- (6) Image Enhancement with Phase Plates in Electron-Phase Microscopy  
永山國昭（統合バイオサイエンスセンター）
- (7) New Phase Plate System Applied to the 120kV TEM  
細川史生, 新井善博（日本電子（株））
- (8) Real-Time Phase Transmission Electron Microscope  
高井義造, 西方健太郎, 川崎忠寛, 木村吉秀（大阪大学大学院 工学研究科）
- (9) Cs-Correction with Complex Observation in TEM  
Radostin Danev, 永山國昭（統合バイオサイエンスセンター）
- (10) THREE-DIMENSIONAL STRUCTURAL ANALYSES OF FREE AND ACTIN-ASSOCIATED MYOSIN HEADS IN FUNCTION  
片山栄作・市瀬紀彦（東京大学医科学研究所 分子構造解析 生体分子イメージング）  
八重口直樹・馬場則男（工学院大学 工学部 電気工学科）  
吉沢強志・丸田晋策（創価大学 工学部 生物工学科）
- (11) Dynamics of Cell Membrane Proteins and Lipids as Revealed by Freeze-Fracture Replica Labeling Electron Microscopy  
藤本 和<sup>1,2,3</sup>, 小川智史<sup>3</sup>, 村手源英<sup>2,3</sup>  
(<sup>1</sup> 福井県立大学, <sup>2</sup> 科学技術振興事業団 CREST, <sup>3</sup> 理化学研究所)
- (12) Torque-speed relationship of the Na<sup>+</sup> driven flagellarmotor  
石島秋彦（名古屋大学大学院 工学研究科）
- (13) Electron Cryomicroscopy of Bacterial Flagellar Structures  
米倉功治  
(大阪大学大学院 生命機能研究科, 科学技術振興事業団 ICORP 超分子ナノマシンプロジェクト)

(14) Switching and self-assembly of the bacterial flagellum

難波啓一 (大阪大学大学院 生命機能研究科 ERATO プロトニックナノマシンプロジェクト)

(15) Correlated Light and Electron Microscopy for Immunohistochemistry and *in situ* Hybridization; with Special Reference to Structure and Function of the Stigmoid Body

篠田 晃 (山口大学 医学部 高次神経科学講座)

(16) Number and Density of AMPA-Type Glutamate Receptors in Synaptic Sites:

Corresponding Studies of Electrophysiology and Freeze-Fracture Replica Labelling

重本隆一 (生理学研究 脳形態解析)

(17) The Claudin Family: A Key Player in the Barrier Function of Epithelium/Endothelium in Multicellular Organisms

月田承一郎 (京都大学大学院 医学研究科 分子細胞情報学)

【参加者名】

Wolfgang Baumeister (Max-Planck-Inst. Biochem), Charles Brooks III (Scripps Research Inst.), Stan Burgess (Univ. of Leeds), Wah Chiu (Baylor College of Medicine), Roger Craig (Univ. of Massachusetts Medical School), Radostin Danev (CIB, ONRI), Ken Downing (Lawrence Berkeley National Lab.), Mark Ellosman (Univ of California San Diego), Dorit Hanein (Burnham Inst.), Max Haider (CEOS GmbH), John Heuser (Washington Univ. School of Medicine), Kenneth Holmes (Max-Planck-Inst. Medical Res.), Chyongere Hsieh (Washington Center), Thomas James (Univ. of California), Mark Kuehnelt (Eur. Mol. Biol. Lab.), Michael Marko (Wadsworth Center), Brad Marsh (Univ. of Colorado), Keith Nugent (Univ. of Melbourne), John Rash (Colorado State Univ.), Michael Reedy (Duke Univ.), Rasmus Schroeder (Max-Planck-Inst. Medical Res.), Takashi Ishikawa (Natl. Inst. Of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases), Holger Wille (Univ. of California at San Francisco), Willy Triggers (Scripps Res. Inst.), Thomas Yasumura (Colorado State Univ.), 青山典世 (宮崎医科大学・医), 赤坂一之 (近畿大 生物理工学), 明坂年隆 (朝日大・歯), 秋山 良 (九州大大院・理), 厚沢季美江 (埼玉大・理), 荒井啓行 (東北大・医), 新井善博 (日本電子 (株)), 新井良八 (滋賀医大・解剖), 飯野晃啓 (鳥取大・医), 石島秋彦 (名古屋大・工), 石塚和夫 ((有) HREM), 伊藤正樹 (佐賀医大・分子生命), 伊藤知彦, 稲葉岳彦 (名古屋大大院・理), 井上明宏 (東京医歯大大院・医歯), 今福泰浩 (九州大大院・理), 岩崎憲治 (理研播磨), 上原清子 (福岡大・医), 白田信光 (藤田保健衛生大・医), 恵良聖一 (岐阜大・医), 及川哲夫 (日本電子 (株)), 大橋 充 (宮崎医大・医), 沖本憲明 (理研), 小椋俊彦 (産総研・脳神

経), 織田昌幸 (東京理科大・生命), 片山栄作 (東京大・医科研), 金子康子 (埼玉大・理), 金子清俊 (国立精神神経センター・神経研), 釜澤尚美 (日本女子大・電顕), 鎌足雄司 (理研播磨), 亀谷清和 (信州大・機器分析センター), 唐原一郎 (富山大・理), 川崎一側 (産総研・生物機能工学), 川端 均 ((株) シーティーアイ), 岸元愛子 (東工大大院), 北尾彰朗 (原子力研・計算科学技術推進センター), 北原 亮 (理研播磨), 木森義隆 (九工大大院・情報工学), 黒柳秀人 (東京医歯大大院・医歯), 桑田一夫 (岐阜大・医), 小久保秀子 (理研), 後藤祐児 (大阪大・蛋白研), 小林聡子 (基生研), 佐藤主税 (産総研・脳神経), 鮫島正純 (東京都臨床医学総研), 重本隆一 (生理研), 篠田 晃 (山口大・医), 下野昌宣 (神戸大・理), 城地保昌 (原子力研・計算科学技術推進センター), 末崎幸生 (佐賀医大・医), 鈴木博文 (科技団・ICOP ダイナミックナノマシンプロジェクト), 鈴木榮一郎 (味の素 (株) ライフサイエンス研), 曾和義幸 (大阪大・基礎工), 高井義造 (大阪大大院・工), 瀧 景子 (理研播磨), 滝口金吾 (名古屋大大院・理), 武田修一 (名古屋大大院・理), 橘 秀樹 (神戸大・理), 田中信夫 (名古屋大大院・工), 田中通義 (東北大学・多元), 田中 愛 (金沢大・医), 谷村明宣 (名古屋大大院・理), 月田承一郎 (京都大大院・医), 東條 正 (早稲田大・理), 永田哲士 (信州大・医), 中西節子 (所属), 参加者名 (日本たばこ (株)・医薬探索研), 難波啓一 (大阪大大院・生命機能), 新美 元 (藤田保健衛生大・電顕), 西田教行 (長崎大大院・医歯), 新田浩二 (埼玉大・理), 野田直紀 (九州大大院・理), 馬場則男 (工学院大・工), 濱 清 (生理研), 濱田大三 (大阪府立母子保健総合医療センター), 伴 匡人 (大阪大蛋白研), 肥田岳彦 (藤田保健衛生大・医), 廣川信隆 (東

京大大学院・医), 廣瀬恵子 (産総研シーシンディスカバリー), 藤本 和 (福井県大・看護), 藤本幸夫 (九州大大学院・理), 藤本豊士 (名古屋大大学院・医), 藤原 隆 (愛媛大・医・動物実験施設), 寶谷紘一 (名古屋大大学院・理), 星野恭子 (神戸大・理), 細川史生 (日本電子(株)), 眞木さおり (科技団・ICORP 超分子ナノマシンプロジェクト), 馬杉美和子 (生理研), 松永康佑 (神戸大・理), 松波秀行 (大阪大大学院・生命機能), 松本友治 (統合バイオ), 真柳浩太 (生物分子工学研), 三尾和弘 (産総研・脳神経), 光岡 薫 (京都大・低温物質研究センター), 峰雪芳宣 (広島大大学院・理), 宮澤淳夫 (理研播磨), 村手源英 (科技団), 村山幸市 (岐阜大・医), 目黒知徳 (鳥取大・医), 元木創平 (日本電子(株)), 森川耿右 (生物分子工学研), 諸根信弘 (楠見膜組織能プロジェクト), 柳井章江 (山口大・医), 山口晴保 (群馬大・医), 山田 穰 (大阪大大学院・医), 米倉功治 (大阪大大学院・生命機能), 若林健之 (帝京大・理工), 李 華 (理研・ゲノム化学総研), Barbara L. Armbruster (日本電子(株)), PERMANA SOFY (名古屋大大学院・理), 盛 子敬 (山口大・医), KARDOS JOZSEFF (大阪大蛋白研), Michael W. Lassalle (富士

レビオ(株)), Wei, Cao (東京大), 趙 長久 (山口大・医), 武 勝昔 (京都大・医), ALI FERJANI (基生研), 金関 恵 (基生研), 佐原 (松本歯科大), 森山 (松本歯科大), 高岸芳子 (名古屋大), 小林厚子 (産総研関西), 松井俊憲 ((株)アルゴ), 野村忠範 (旭化成(株)), 荻野二彦 (日本電子(株)), 渡邊宏明 ((株)日立ハイテクノロジーズ), 網蔵令子 (基生研), 野田健司 (基生研), 水谷謙明 (藤田保健衛生大), 楠見明弘 (名古屋大大学院・理), 橋本貞充 (東京歯科大・病理), 窪田芳之, 有井達夫 (生理研), 臼倉治郎 (名古屋大・医), 松井信彰 (豊田通商), 関嶋政和 (産総研), 定塚昌子 (国立精神神経センター), 平松弘嗣 (統合バイオ), 荻原 明 (生理研), 渡辺良雄 (八神製作所), 尾上靖宏 (統合バイオ), 山田健志 (基生研), 松田 隆 ((財)名産研), 韓 盛 植 (高麗大学校), 李 京 垠 (高麗大学校), 文 智 暎 (高麗大学校), 濱崎万穂 (基生研), 村上政隆 (生理研), 杉谷正三 (統合バイオ), Hucek Stanislav ((株)キャンパス), Minkov Dorian, 伊藤俊幸, 鈴木正崇, 高橋佳子 (統合バイオ), 大河原 浩 (生理研)

## 【概要】

電子顕微鏡はかつて解剖学の雄として隆盛を誇った。しかし近年分子生物学の勃興と光学顕微鏡のルネッサンス (各種蛍光顕微鏡) のため, その勢いは影を潜め, 研究のフロンティアとしてはわずかに electron crystallography や electron tomography で命脈を保っている。こうした現況を背景に生物電子顕微鏡ルネッサンスの立ち上がりをお願い開催された。試料調整の進歩に寄り掛かりすぎた過去の生物電顕の流れを考慮し, この国際会議では2つの実験を試みたい。1つは異なる道を歩

んで来た2つの生物電顕法, 理学部主導の high solution 法 (single particle analysis と crystallography) と医学部主導の組織細胞化学 (cellular histochemistry), の出会いの場を作り, 将来の協力関係の道を探る。もう1つは電子顕微鏡の新しい波, 位相顕微鏡法の現状を紹介し, その長所を生かす道を生物への応用に探る。特に本来電子顕微鏡の最も得意とする所であり, しかも他の方法の追従を許さない超分子 (Supramolecules) 構造の研究に焦点をあてた。

## (1) EXPANDING PROTEIN STRUCTURE WORLD BY HIGH PRESSURE NMR. Characterization of reactive conformers of the prion protein

赤坂一之 (近畿大学 生物理工学部 生物工学科)

A protein in solution is a thermodynamic entity, spanning, in principle, the entire conformational space from the fully folded N to the fully unfolded U. Although some alternately or partially folded higher energy conformers may coexist with

N and U, they are seldom detected spectroscopically because their populations are usually quite low under physiological conditions. I describe here a new type of experiment, a combination of multi-dimensional NMR spectroscopy with

pressure, that is capable of detecting and analyzing structures and thermodynamic stability of these higher energy conformers. The idea is based on the finding that under physiological conditions the conformational order of a globular protein normally decreases in parallel with its partial molar volume (negative  $\Delta V$ ), so that under equilibrium conditions, the population is shifted to a less and less ordered conformer with increasing pressure. With the high space resolution of the multi-dimensional NMR, the method enables one to explore protein structure and stability in atomic detail in the entire conformational space from N to U with pressure and temperature as variables. The method will provide us with

a strong basis for understanding the basic phenomena of proteins; function, folding and misfolding.

Indeed, most globular proteins studied to date showed the presence of higher energy conformers either with an alternate fold or with local unfolding in addition to the unfolded conformer, suggesting that higher energy conformers are part of the design of most globular proteins. It is probable that the presence of these conformers is crucial for their function. An intermediate conformer of hamster prion protein was recently discovered by this technique, which is likely to be an obligatory intermediate to the Scrapie-type prion.

## (2) ULTRASTRUCTURAL ANALYSIS OF THE CEREBRAL AMYLOID DEPOSITION

山口晴保 (群馬大学 医学部 保健学科)

アルツハイマー病に特徴的な病理所見である脳  $\beta$  アミロイド沈着の臨床的意義と、その超微形態について概説した。

脳  $\beta$  アミロイド沈着は、加齢に伴って 40 歳代から正常中高年者の脳に出現する。そして、10~20 年をかけて、 $\beta$  アミロイド沈着量が増加するとともに、神経原線維変化が加わりシナプスが減って痴呆を発症する。

$\beta$  アミロイド沈着初期は、瀰漫性老人斑の形をとり、ごく少量の  $\beta$  タンパクが沈着している。この時期の老人斑は異常な形態を示さない、通常電顕で観察しても見いだすことができない。そこで、隣接切片を免疫染色する方法や、電顕切片を直接免疫染色する方法で、瀰漫性老

人斑内における  $\beta$  アミロイド沈着の超微形態を観察した。すると、初期の  $\beta$  アミロイド沈着は線維の形態を示さず、細胞突起の膜が金標識されただけであった。このことから、 $\beta$  タンパクは膜結合  $\beta$  タンパクとして沈着を開始することを示した。そして、この膜結合  $\beta$  タンパクが種となって多量の  $\beta$  タンパクが重合蓄積すると、細胞突起間にアミロイド線維が出現することを示した。

また、この研究過程で、reflection contrast microscope を用いると、電顕用超薄切片をスライドグラスに載せて直接光顕観察することができ、免疫電顕を効率よく進める上で有用な機材であることを示した。

## (3) Pressure Dissociates Amyloid-fibrillogenic Assembly of Disulfide-deficient Lysozyme Variant

橘 秀樹 (神戸大学 理学部)

Tara N. Niraula, Hua Li, 山田博昭 (神戸大学 自然科学研究科)

今野 卓 (福井医科大学)

赤坂一之 (近畿大学 生物理工学部)

アミロイド様繊維の形成はプリオンなどの病原性蛋白質に限られたことではなく、蛋白質一般の性質ではないかと、近年考えられてきている。アミロイド様繊維構

造形成には、蛋白質の立体構造が部分的にアンフォールドした中間体が関与していると考えられているが、詳細は明らかではない。一方、ジスルフィド結合を持つ蛋白

質の場合、還元変性した分子種は一般に自己凝集する性質を持つが、この反応の詳細もまた十分には明らかにされていない。ここでは、天然状態でほぼアンフォールドしている、すべてのジスルフィド結合を欠損させたリゾチーム変異蛋白質が、17 S の沈降係数の、分子間  $\beta$  構造を含む可溶性会合体を形成することを報告する。この会合体は長期間のインキュベーションによりアミロイド様繊維を自発的に形成した。最近開発され、蛋白質研究に応用されつつある高圧 NMR 測定を行った結果、17 S 会

合体はリゾチームモノマーあたり約  $23 \text{ kJ mol}^{-1}$  の安定性を持ち、 $53 \text{ ml mol}^{-1}$  の体積減少を伴って高圧によって解離することが示された。さらに、この会合反応には複数の疎水性残基が関わっていることが示唆された。これらの結果は、アミロイド様繊維形成に特定の部分構造を持つ中間体が必須ではないこと、加圧による凝集体解離がアミロイド繊維形成を予防すること、蛋白質残基レベルでのアミロイド繊維形成初期過程の研究に高圧 NMR 法が有用であること等を示すものである。

#### (4) Perspectives in Alzheimer' s disease diagnosis

荒井啓行（東北大学 医学部 老年・呼吸器病態学講座）

正常と痴呆の間の知的グレイゾーンは、米国を中心に Mild cognitive impairment と呼ばれアルツハイマー病に進行する可能性の高い危険水域と見なされている。平成 11 年から本邦でも臨床の現場にアルツハイマー病治療薬としてのコリンエステラーゼ阻害薬が登場したことは、患者サイドでは「今は症状が軽くても将来進行する恐れがあるならば、今の内から予防のための薬物治療を始めたりライフスタイルの是正を試みたりして少しでも進行を遅らせたい」という認識を生み出した。物忘れが次第に気になってくる場合、患者はこれまでのような状態像の評価のみならず、現時点での積極的な診断・治療を求め

て医療機関を訪れる。東北大学老年科では、MRI による血管病変の評価および面接による記憶力検査と伴に脳脊髄液タウ測定と神経機能画像などの Biomarker を用い、その結果を患者またはその家族に説明している。100% 言いさることは困難としても、感度の高いこれらの検査成績に異常がないことを聞いて安心する患者も多い。これが Biomarker の第 1 義的な臨床的有用性であろうと考えている。今後、痴呆症を克服していくには、病態に基づいた信頼できる Biomarker を開発し、無症候段階からの予防医学的介入が重要になってくると思われる。

#### (6) Image Enhancement with Phase Plates in Electron-Phase Microscopy

永山國昭（統合バイオサイエンスセンター）

位相差法の開発について過去 3 年間の研究結果を報告した。i) 2 つの位相差法（ゼルニケ位相差法と差分コントラスト法）の開発：ゼルニケ位相差法に用いるカーボン膜は直径  $100 \mu\text{m}$ 、厚さ  $30 \text{ nm}$  で中央に約  $1 \mu\text{m}$  の円孔があいている。 $300 \text{ kV}$  の加速電圧のとき透過電子の位相が  $\pi/2$  後れるように調整されている。一方差分コントラスト法（光学顕微鏡の微分干渉コントラスト法と等価）では厚さ約  $60 \text{ nm}$  の半円カーボン膜が用いられた。膜厚は電子の位相が  $300 \text{ kV}$  加速電圧に対し  $\pi$  後れるように調整されている。両者ともコントラスト伝達関数が  $\cos$  型と

なり、原点付近の空間周波数が通常法に比し回復するので、極めて高い像コントラストを生む。この強いコントラストは生物試料の無染色観察に有利であり、細胞切片や蛋白質への応用例について報告した。ii) 位相板帯電除去法の開発：電子位相差法の大敵は位相板の帯電である。歴史的に見るとこの深刻な障害のために位相差法が実用化されてこなかった。位相板の徹底的なクリーン化と位相板の電子顕微鏡内常時高温保持により問題解決を図ったことを報告した。

【文献】

1. R. Danev and K. Nagayama, Ultramicroscopy 88 (2001) 243-212.

2. R. Danev and K. Nagayama, J. Biol. Phys. 28 (2002) 627-635.

## (7) NEW PHASE PLATE SYSTEM APPLIED TO THE 120KV TEM

細川史生, 新井善博 (日本電子 (株))

透過電子顕微鏡 (TEM) への, 光学顕微鏡と同様な効果をもたらす位相板の応用に関して, 応用の実現を困難たらしめていた種々の問題点の解決手段を備えた 120kV タイプ TEM を開発し, その装置概要と $\pi/2$  位相板がコントラスト改善に明確な効果を示す応用データを紹介した。TEM における位相板が過去において実用化されてこなかったのは, 位相板へのビーム照射中に堆積する汚れ, および, 汚れを原因とした電荷のチャージが最大の原因と考えられる。細心の注意をもって作成した約 15nm の一様な厚みをもつカーボン膜を位相板とし, これを TEM の加熱ホルダーにて TEM 鏡筒内に保持し約 200°C で加熱

しつつ使用することで, 汚れとチャージの問題は無くなった。また, 対物レンズ周りに位相板用に新たに設計した光学系を設置し, 位相板が TEM の基本性能を阻害すること無く, 同時に, 位相板としての効果を最大限発揮できるよう考慮した。アモルファス試料のパワースペクトルの変調を解析することで,  $\pi/2$  位相板を用いた場合, 透過波と散乱波に $\pi/2$  の位相差が付加されることが確認できた。 $\pi/2$  の付加的な位相差により, 通常の TEM では観察困難な (重金属染色のない) 生物切片が十分なコントラストで結像できることを確認した。

## (8) Real-Time Phase Transmission Electron Microscope

高井義造, 西方健太郎, 川崎忠寛, 木村吉秀 (大阪大学大学院 工学研究科)

高分解能透過型電子顕微鏡に浮遊型加速電圧変調システムと高速画像処理機能内蔵型 CCD カメラを組み合わせることで, 実時間位相差透過電子顕微鏡を完成させた。この新しい電子顕微鏡では高速に加速電圧を変調しながら画像を収集し処理することで, 球面収差の影響を補正した位相差像を 1/30 秒の時間分解能で表示することができる。分解能は球面収差の補正効果により, 0. 27nm から 0. 14nm に向上させることができ, 結晶表面や界面の原子構造を収差を含んだオリジナル像より正

確に再現することが可能である。

本研究では, この新しい装置を用いて金結晶表面の原子の Flip-Flop 運動や協調的な集団運動, ならびに原子鎖の形成とその振る舞いを観察した結果を報告する。特に原子鎖の球面収差補正位相差観察とその動的な振る舞い, および格子点間距離の解析により, 切断される直前に観察された原子鎖は単原子で形成された原子鎖であることが確認できた。

## (9) Cs-CORRECTION WITH COMPLEX OBSERVATION IN TEM

Radostin Danev, 永山國昭 (統合バイオサイエンスセンター)

Phase imaging with Conventional Transmission Electron Microscope (CTEM) is characterized by severe image modulation. Contrast Transfer Function (CTF) is usually used for modeling of the image formation. The most important parameters in the CTF are defocus and spherical aberration of the objective lens. For reconstruction of the complete, distortion-free phase information several CTEM photos taken at different defocus values are usually used

The recent developments in the application of Zernike

phase plate to TEM can make possible the application of the proposed Complex Reconstruction scheme. This scheme requires only two photos of the object: one taken with Phase TEM (PTM) utilizing a Zernike phase plate and one taken with CTEM. Complex summation and consequent CTF demodulation give as a result the complete phase and amplitude object information. Experimental results are presented and practical aspects of the technique are discussed.

## (10) THREE-DIMENSIONAL STRUCTURAL ANALYSES OF FREE AND ACTIN-ASSOCIATED MYOSIN HEADS IN FUNCTION

片山栄作, 市瀬紀彦 (東京大学 医科学研究所 分子構造解析 生体分子イメージング)

八重口直樹・馬場則男 (工学院大学 工学部 電気工学科)

吉沢強志・丸田晋策 (創価大学 工学部 生物工学科)

われわれは、急速凍結フリーズレプリカ試料から蛋白質複合体の3次元構造解析するために新たに開発した手法を用いて、*in vitro* 滑り運動中のウサギ・アクトミオシン複合体中でしばしば観察され、アクチンフィラメントを抱き込む形で結合するミオシン頭部の構造解析を行った。ミオシン頭部はATP結合により強く屈曲するが、そのX線結晶構造から予測されるシミュレーション画像は上記のアクチン結合ミオシンの画像とは合致しない。そこで、不安定な中間状態において2価性試薬 (pPDM) で化学架橋を施したミオシン頭部のレプリカ画像を捉えてその3次元構造を解析したところ、滑り運動中のアクチン結合ミオシンの画像と酷似することが判明した。その

構造は上記の屈曲した結晶構造のレバーアーム部分をほぼ逆方向に回転させることにより得られるものであった。一方、pPDMで架橋したホタテ貝ミオシン頭部のX線結晶構造がごく最近発表され、ADP結合ミオシンに近いと結論されているが、その構造はわれわれが見出したものとは全く異なる。ウサギ・ミオシンではpPDMによる架橋はSH-1, SH-2と称される2個のチオール基をつなぐが、ホタテ貝ミオシンではSH-2と近傍のリジンが架橋されることが分かっている、これらのことから、種の異なるミオシンの架橋産物が別の構造を取っているものと考えれば説明可能であろう。軽鎖中のSH基に入れた蛍光標識のスペクトルの特徴も同様のことを示唆している。

## (11) Dynamics of Cell Membrane Proteins and Lipids as Revealed by Freeze-Fracture Replica Labeling Electron Microscopy

藤本 和<sup>1,2,3</sup>, 小川智史<sup>3</sup>, 村手源英<sup>2,3</sup>

(<sup>1</sup> 福井県立大学, <sup>2</sup> 科学技術振興事業団 CREST, <sup>3</sup> 理化学研究所)

従来、膜脂質についての細胞化学的研究は困難であるとされてきた。私たちは凍結割断レプリカ標識法によって、赤血球、肝細胞や膵腺房細胞などの組織細胞におけるフォスファチジルコリン (PC) の局在を検討し、形質膜のみならず、ミトコンドリアや小胞体などの細胞内小器官の膜の EF-面に選択的に免疫金粒子の結合が観察されるが、PF-面には全く金粒子の沈着が見られないか、あってもごく少数が観察されるのみであることを示した。この所見は、PC が膜の外葉に主として存在する、非対称性の分布をしていることを明瞭に示唆した。興味深いことに、このようなPCの非対称性の分布が膜融合の際に、

消失し、対称性の分布になることを見出した。また、スフィンゴミエリン (SM) の免疫標識において、免疫金粒子は細胞膜の EF-面に多く、かつ均一に観察されたが、PF-面では数個から数十個の金粒子が凝集して結合している像が観察される。これらの所見は SM が細胞膜の外葉に主として存在するが、内葉では SM がクラスターを形成して存在していることを示唆した。さらに、T リンパ球の抗原受容体 (TcR) が SM のクラスラ領域とよく一致した分布をしていることが分かった。現在、SM のような脂質分子と種々の膜機能分子の局在の関連性について、検索中である。

## (12) Torque-speed relationship of the Na<sup>+</sup> driven flagellarmotor

石島秋彦 (名古屋大学大学院 工学研究科)

バクテリアべん毛モーターは、生物界において回転機構を有する数少ない生体分子モーターである。我々は、回転メカニズムを解明するために、様々な負荷を与えた状態でのモーターの回転をナノメートルレベルでの計測を行った。

回転の計測には、べん毛部にポリスチレンのビーズを固定し、その位相差像を4分割フォトダイオードに投影することにより行った。様々なサイズのビーズを固定した状態での回転速度を計測することにより、モーターに様々な負荷を与えることができる。その結果、発生トルクは低回転域では一定となり、それ以上の回転域において減少する傾向となった。さらに、外液のナトリウム濃度を変化させたときの回転速度—トルク関係を計測した。トルク、回転速度ともに外液ナトリウム濃度に大きく依

存し、ナトリウム濃度を下げると、トルク、回転速度ともに減少する傾向を示した。

その結果をもとに、単純な4状態モデルで再現することを試みた。まず、電気化学ポテンシャルが回転、トルクに直接関係するというモデルを元に再現を試みたが、外液のナトリウム濃度を変化させたときの結果を再現することはできなかった。そこで、我々はさらにモーター固定子へのイオンの結合、解離をふまえたモデルを検討した。その結果、外液のナトリウム濃度の変化でのトルク—回転速度関係を実現することが可能となった。つまり、モーターの回転メカニズムを考える上で、単純な電気化学ポテンシャルだけでなく、イオンの結合・解離を考慮に入れなくてはならないことが明らかになった。

### (13) Electron Cryomicroscopy of Bacterial Flagellar Structures

米倉功治（大阪大学大学院 生命機能研究科，科学技術振興事業団 ICORP 超分子ナノマシンプロジェクト）

細菌の遊泳のための回転モーターであるべん毛は，約 25 種類の蛋白質からなる超分子複合体である。それは，細胞の外膜と内膜を貫く基幹部，トルク生成に関わるイオンチャンネルや，細胞外では，一種類のタンパク質フラジェリンの重合によって 10 $\mu$ m 以上にも伸張するべん毛繊維，べん毛繊維先端のキャップ蛋白質等から構成される。このような超分子複合体の構造の解明には電子顕微鏡法が適しており，また必須でもある。

最初に，べん毛繊維とキャップの複合体構造の低温電子顕微鏡法による解析から得た，フラジェリンの結合の度にキャップが回転し新たな場所に次の結合部位を形成

するという，べん毛繊維伸張のダイナミックなモデルについて発表した。次に，直線型べん毛繊維のらせん対称性を利用した解析から得た，約 4 Å 分解能の構造について報告した。得られた構造からフラジェリン全長からなるべん毛繊維の原子モデルを構築した。その結果，フィラメント内側の coiled-coil を形成する 2 本の  $\alpha$ -ヘリックスが，他のサブユニットと疎水性相互作用し繊維を安定化させていること，べん毛繊維中央のフラジェリン輸送チャンネル壁の親水的性質が，アンフォールド状態のフラジェリン分子の素早い輸送に重要であること等がわかった。

### (14) Switching and self-assembly of the bacterial flagellum

難波啓一（大阪大学大学院 生命機能研究科 ERATO プロトニックナノマシンプロジェクト）

細菌べん毛は回転機構や形態変換スイッチ機構をもつ蛋白質ナノマシンである。細胞外へ伸びる細長いべん毛繊維はらせん型の回転プロペラで，根元の高速回転モータによって回転することにより推進力を産み出す。この細長いらせん型繊維構造は一種類の蛋白質フラジェリンから構築されたチューブ構造で，11 本の素繊維からできているが，各素繊維の周期構造（周期約 52 Å）をわずか 0.8 Å だけ変化させ，同時に素繊維間の相互作用を 2 Å ほど素繊維に沿ってずらして 2 状態構造を実現し，その 2 状態間をスイッチする事により，様々な形態のらせん構造の曲率とねじれを産み出している。電子顕微鏡，X 線繊維回折，X 線結晶構造解析法を組み合わせ得たべん毛素繊維の構造から，その曲率を産み出す素繊維周期構造のメカニカルな高精度スイッチ機構が明らかにな

った。べん毛繊維の構造を安定化するフラジェリン両末端ドメイン（D0）を取り除いて得られた X 線結晶構造には，周期構造の異なる 2 状態の素繊維構造（L 型 52.7 Å，R 型 51.9 Å）のうち，R 型の構造が含まれていた。そこで，この R 型素繊維モデルの原子座標を用いて計算機による素繊維伸長シミュレーションを行い，この力学的ナノスイッチがコアドメイン（D1）のサブユニット間接触部位にある  $\beta$ -ヘアピンのわずかな構造変化であることを同定した。また，極低温電子顕微鏡による解析を進め，画像解析の様々な工夫によって，わずか 41,000 個の分子像を平均することにより 4 Å 分解能の電子密度図を得た。それを基にべん毛繊維の全構造に対する原子モデルを構築し，繊維構造の形成機構や突然変異による直線型繊維構造形成のしくみを解明した。

(15) Correlated Light and Electron Microscopy for Immunohistochemistry and *in situ* Hybridization;  
with Special Reference to Structure and Function of the Stigmoid Body

篠田 晃 (山口大学医学部高次神経科学講座)

現在我々は、免疫組織化学(IHC)と *in situ* hybridization(ISH)の増感法の開発に加え、組織保持向上のための高濃度グルタルアルデヒド使用、浸透性向上のための界面活性剤使用、エポン内扁平包埋法の採用等により中枢神経等ヘテロな組織での電顕解析に有用な光顕電顕相関型免疫電顕法(IHC-EM)と ISH 電顕法(ISH-EM)の開発に成功している。こうした方法によって、脳内辺縁系-視床下部領域に広く分布するニューロン内細胞質封入体“斑点小体 stigmoid body”が見出され、その構造と機能の解析がなされた。斑点小体は hPAX-P2 抗体によって標識される 1-3 $\mu$ m の顆粒繊維状封入体で、Huntingtin-associated protein 1 (HAP1)が局在することが知られる。ハンチントン病の原因遺伝子である Huntingtin

が神経変性の標的部位である線条体のみならず脳全体に発現する一方、HAP1 は神経変性を免れる視床下部、辺縁系領域に発現する事実と、Huntingtin と HAP1 の同時遺伝子導入法の結果より HAP1・斑点小体の発現が Huntingtin による神経変性に対し抑制効果を示す可能性を我々は示唆している。また、HAP1cDNA を astrocytes や HEK293 に導入することで、培養細胞内小体に斑点を誘導することに成功し、さらに ISH-EM 法による解析で、HAP1mRNA が斑点小体内に局在することの証明に成功した。これらは、HAP1 が斑点小体の形成に重大な関与をすると同時に、斑点小体内で HAP1 の mRNA からの合成が行われることを強く示唆する。

(16) Number and Density of AMPA-Type Glutamate Receptors in Synaptic Sites: Corresponding  
Studies of Electrophysiology and Freeze-Fracture Replica Labelling

重本隆一 (生理学研究所 脳形態解析)

凍結割断レプリカ法は細胞膜断面の2次元的な形態観察に有力な方法として長く用いられてきたが、レプリカ上で蛋白質を同定する方法は限られていた。近年、福岡県立大学の藤本和教授によって、凍結割断レプリカ上で免疫標識を行う新しい方法、SDS-digested freeze-fracture replica labeling (SDS-FRL)法が開発され、多くの膜蛋白質の分布解析がレプリカ上で可能となった。この方法をさらに改良し、中枢神経系において神経細胞の AMPA 受容体分子の分布を高感度で定量的に解析した。

生後 3-4 日令の小脳分子層に存在するシナプスは登上線維—プルキンエ細胞シナプスのみであるので、この領

域の興奮性シナプスをすべて集め、AMPA 受容体による金標識の数と密度を解析した。その結果、登上線維—プルキンエ細胞シナプスには非常に均一な約 1000 particles/ $\mu$ m<sup>2</sup> の標識が認められ、シナプス間の密度のばらつきも非常に少なかった (CV=0.2)。この結果より、これらのシナプスにはほぼ一定の密度で AMPA 受容体が存在していることが明らかとなった。さらに金標識の密度が、電気生理的解析から得られた受容体チャネルの密度 (900 channels/ $\mu$ m<sup>2</sup>) に近いことから、1 個の受容体につきほぼ 1 個の金標識が対応するという、高感度を達成していることが明らかとなった。

# (17) The Claudin Family: A Key Player in the Barrier Function of Epithelium/Endothelium in Multicellular Organisms

月田承一郎（京都大学大学院 医学研究科 分子細胞情報学）

多細胞生物体の生命維持のためには、まず上皮細胞シートにより、外部環境と大きく異なる内部環境を保たなければならない。さらに、それぞれの個体は、環境の大きく異なるいくつもの部屋に分けられている。これらの部屋を仕切る壁、すなわちバリアーとして働くのは、やはり上皮細胞シート、内皮細胞シートである。しかし、これらの細胞シートを構成する細胞の間から水分子やイオンをはじめとする物質が漏れれば、バリアーの役割を果たせない。細胞間からの物質の漏れを防ぐために、タイトジャンクション（TJ）と呼ばれる細胞間接着装置が存在する。ここでは、隣り合う細胞間の距離がほぼゼロになるまで細胞膜が近づいており、細胞間をシールして

いる。さらに、この TJ は上皮細胞の極性の形成・維持にも決定的な役割を果たしていると考えられている。したがって、この TJ で機能する接着分子は、個体形成の上できわめて重要な分子であると考えられ、古くからその実体が追い求められてきた。我々は、数年前に、この TJ の接着分子として 4 回膜貫通蛋白質であるクローディンを見出した。クローディンは大きな遺伝子ファミリーを形成し、TJ のバリアー機能を直接担う蛋白質であることが明らかになってきた。ここでは、クローディンに関する最近の知見、特に、ノックアウトマウスの作製から明らかになってきた知見を紹介し、多細胞生物における上皮のバリアー機能の重要性について論じた。

## 19. 生体分子ダイナミクス

2003年3月10日-3月12日

代表・世話人：桑田一夫（岐阜大学医学部）

所内対応者：永山國昭（統合バイオサイエンスセンター）

- (1) 分子シミュレーションによる生体超分子の機能解析  
北尾彰朗（日本原子力研究所 計算科学技術推進センター）
- (2) 巨大分子の励起状態計算と量子構造生物学  
倭 剛久（名古屋大学大学院 理学研究科）
- (3) 中性子非干渉性散乱からみたタンパク質動力学の不均一性  
片岡幹雄, 中川 洋（奈良先端科学技術大学院大学）
- (4) 分子シミュレーションによる生体高分子の中性子散乱スペクトル解析  
城地保昌（日本原子力研究所）
- (5) 蛋白質の多型成, 遅い揺らぎと機能  
石井由晴（科学技術振興事業団）
- (6) 巨大分子混み合いと分子シャペロンの相互作用の理論  
金城 玲（神戸大学 理学部 化学科）
- (7) 蛋白質の折れたたみ反応速度に対するトリフルオロエタノールの影響  
浜田大三（大阪府立母子保健総合医療センター研究所）
- (8) Dynamical Funnel を目指して  
戸田幹人（奈良女子大学 理学部）
- (9) 蛋白質フォールディングのダイナミクス- 階層的規則性と分子記憶  
小松崎民樹（神戸大学 理学部）
- (10) 動的な座標系のモデルによる蛋白質ダイナミクスの解析  
森次 圭, 木寺詔紀（横浜市立大学大学院 総合理学研究科）
- (11) 赤外振動エコー実験と分子動力学シミュレーションに基づく一酸化炭素結合ミオグロビンの A Substates  
の構造とダイナミクス  
秋山 良（九州大学大学院）
- (12) 鉄-ヒスチジン結合を通して観たヘムタンパク質のダイナミクス  
水谷泰久（神戸大学 分子フォトサイエンス研究センター）
- (13) フラビンを発色団とする光センサー蛋白質の構造変化ダイナミクス  
神取秀樹（名古屋工業大学 応用化学）
- (14) 蛋白質の構造変化：線型応答的描像  
木寺詔紀（横浜市立大学大学院）
- (15) Characterization of protein conformers beyond basic folded ones by high pressure NMR  
赤坂一之（近畿大学）
- (16) 高圧 NMR でみた蛋白質リゾチームのダイナミクス  
鎌足雄司（理化学研究所）
- (17) 多体問題の厳密解について  
栗田英資（名古屋大学大学院 多元数理科学）

## (18) Protein unfolding assay and its application to identifying prion protein conformation changing factor.

金子清俊 (国立精神神経センター)

## (19) プリオン蛋白質の遅い揺らぎと病原性

桑田一夫 (岐阜大学 医学部)

## (20) Ex vivo transmission of prions: analysis of strain, cell-tropism and interference.

西田教行 (長崎大学 医学部)

## (21) プリオンタンパク質の分子動力学シミュレーション

—Ala117→Val アミノ酸変異による蛋白質構造の変化—

沖本憲明 (理化学研究所)

## 【参加者名】

下野昌宣 (神戸大・理), 横田恭宣 (北陸先端大), 工藤基徳 (北陸先端大), 木寺詔紀 (横浜市大大院・総合理学), 横溝 剛 (東京薬科大・生命), 長岡正隆 (名古屋大大院・人間情報), 北尾彰朗 (原子力研関西研・計算推進センター), 城地保昌 (原子力研関西研・計算推進センター), 桑田一夫 (岐阜大・医), 濱田大三 (大阪府立母子保健総合医療センター), 金城玲 (神戸大・理), 三友大輔 (東京薬科大・生命科学), 秋山良 (九州大大院・理), 猿渡 茂 (北里大・理), 森次圭 (横浜市大大院・総合理学), 戸田幹人 (奈良女子大・理), 北原 良 (理研播磨), 剣崎博生 (大阪大), 水上 卓 (北陸先端大・材料), 石井由晴 (科技団・ソフトナノマシンプログジェクト), 古明地勇人 (産総研・分子細胞工学), 関嶋政和 (産総研), 中村周吾 (東京大・農), 曹巍 (東京大・農), 鎌足雄司 (理研播磨), 水谷隆太 (東京大・薬), 中村寛則 (東京大・総合文化), 高橋卓也 (岡崎計算センター), 倭剛久 (名

古屋大・理), 星野恭子 (神戸大・理), 片岡幹雄 (奈良先端大・物質創成), 神取秀樹 (名工大・応用化学), 桑田弘美 (岐阜大・医), 足立みゆき (岐阜大・医), 山口敏男 (福岡大・理), 長野恭朋 (統合バイオ), 小久保裕功 (分子研), 伊藤 暁 (分子研), 平野秀典 (理研), 小松崎民樹 (神戸大・理), 水谷泰久 (神戸大・分子フォトサイエンス研究センター), 角野光則 (東京大), 松永康佑 (神戸大・理), 藤崎弘士 (分子研), 依田隆夫 (分子研), 平松弘嗣 (統合バイオ), 徳富 哲 (大阪府立大・先端研), 赤坂一之 (近畿大生物理工学), 栗田英資 (名古屋大大院・多元), 新 竜一郎 (長崎大大院・医), 沖本憲明 (理研), 金子清俊 (国立精神神経センター), 西田教行 (長崎大大院・医歯薬), 富永圭介 (神戸大・分子フォトサイエンス研究センター), 鈴木栄一郎 (味の素ライフサイエンス研), Cao Wei (東京大大院・生命農), 高野光則 (東京大大院・総合文化)

## 【概要】

細胞の生理機能は, チャンネル, レセプター, 細胞内情報伝達系等の蛋白質によって主に担われている。多くの蛋白質の「静的構造」は X 線回折, NMR, 電子顕微鏡等の技術の発展により, 明らかにされつつある。しかし, 「静的」な平均構造からその機能を推定出来るかどうか必ずしも明らかではない。即ち, 生理機能は時間的な変化とカップルしているものであるから, 自然な状態での蛋白質のダイナミクスを理解しなければ, その機能を理解することは出来ない。ここに蛋白質のダイナミクスを研究する目的がある。

内容としては, 理論計算 (蛋白質動力学計算等) 及び

実験 (NMR, ホール・バーニング (レーザー), CD 連続フロー, 1 分子計測等) の両面から, 蛋白質のダイナミクスに関する各研究者の最新のデータ及び考え方について自由に討議する。単なる発表の場というよりも, 従来の古典力学や量子論を超える新しいパラダイムとしての生体分子ダイナミクスの概念を, どの様に構築してゆくかといった点を, 形式にこだわらず, 自由に討論する場としたい。更に, 蛋白質の機能や病原性に関わるメカニズムを分子の構造や動きから詳細に解き明かし, これらを通じて新しい科学技術分野の創出, 及び予防・治療法の開発を目指す。

## (1) 分子シミュレーションによる生体超分子の機能解析

北尾彰朗 (日本原子力研究所 計算科学技術推進センター)

現在, 生体内反応の中核を担う蛋白質のアミノ酸配列が大量に解明されている。しかし, これらの立体構造や機能は未解明のことが多い。一方, 新しい計算法の開発とコンピュータ計算能力の急速な進歩は, これまでの時空的制約を打破し, 大規模で長時間のシミュレーションを可能にしている。このような状況のもと, 今後は分子シミュレーションを用いた様々な生体系の機能解明が進められていくと考えられている。すなわち大規模な分子動力学計算をおこなうことで, タンパク質などの生体高分子が多数集合して形成されるシステムを可能にしてい

大規模系の分子シミュレーションを実現するために, 並列化効率に優れた生体分子シミュレーション用のソフトウェアを開発している。

我々は最終的には, 既存のプログラムとは異なって, 様々な機能を含んだ統合的プログラムシステムでありながら, 並列化効率のよい大規模分子シミュレーションプログラムの開発を目指している。現在は, そのコアとなる分子動力学計算モジュールの開発を進めている。講演では, 我々がどのようなシステムを目指しているかを述べると共に, 現状のプログラムについて解説し, それを用いておこなう並列分子動力学シミュレーションによる生体超分子研究の進展について発表した。

## (2) 巨大分子の励起状態計算と量子構造生物学

倭 剛久 (名古屋大学院 理学研究科 物質理学専攻)

光受容蛋白質は光エネルギーを生体エネルギーに変換したり, 光情報を高感度で検出する機能をもっている。当研究は光受容蛋白質の光反応に対するアミノ酸残基の影響を調べるものである。我々は光反応を駆動する力を様々な寄与に分割する方法を開発した。イエロープロテインの場合, タンパク質が光反応に対して大きな寄与をしていることがわかった。また, 蛋白質のどの部分が光反応を駆動しているのかをコンピュータグラフィックスで可視化する方法を開発した。この手法はタンパク質の構造機能相関を調べる良い手法になりうる。また, 光受容

蛋白質のような巨大分子の励起状態を精密にかつ高速に計算するため, 新規の方法を開発した。われわれの方法は, 活性部位を CI 法や saCASSCF 法で計算し, それを取り囲むペプチド領域を FMO 法で計算する。両者はクーロン力を通じて相互作用させる。そして, 活性部位の計算とペプチド領域の計算を交互に繰り返すことにより, 蛋白質全体の電子状態を self-Consistent に求めるというものである。この方法をイエロープロテインに適用したテスト計算について報告した。

## (3) 中性子非干渉性散乱からみたタンパク質動力学の不均一性

片岡幹雄, 中川 洋 (奈良先端科学技術大学院大学)

蛋白質からの中性子非干渉性散乱は, 基本的に水素原子の位置の揺らぎを反映している。エネルギー変化が 0 の弾性散乱強度の対数を散乱ベクトルの大きさ ( $q$ ) の自乗に対してプロットすると, 直線で近似できる領域があ

り, この直線の傾きから平均自乗変位 ( $\langle u^2 \rangle$ ) が評価できる。様々な温度で  $\langle u^2 \rangle$  を評価することにより, 動力学転移 (ガラス転移) を調べた。非水和状態では, 天然構造と変性構造とでは動力学転移に差が見られるが, 水和さ

れることにより両者の差は見られなくなった。また 240K で観測される転移は水和による非調和な運動の活性化によることが明らかになった。

散乱角が大きくなると、直線からのずれが生じる。我々はこの非ガウス性に動力学の不均一性が反映されていると考えた。平均自乗変位に簡単な分布関数（ガウス分布及び二値分布）を考え、動力学の不均一性を解析した。温度や水和による分布の変化が求められた。それぞれに、

合理的な結果が得られたが、どちらの分布が蛋白質の動力学をより正確に反映しているか、決定するには至らなかった。いずれにせよ、非ガウス性は平均自乗変位の分布、すなわち蛋白質動力学の不均一性を反映していると結論できる。さらに、異なる蛋白質では、非ガウス性に違いがあることが示された。我々は、非ガウス性を蛋白質のかたさの指標として用いることができると考えている。

#### (4) 分子シミュレーションによる生体高分子の中性子散乱スペクトル解析

城地保昌（日本原子力研究所 計算科学技術推進センター）

蛋白質中性子散乱データは生体高分子の機能を理解するのに重要な立体構造ダイナミクスの情報を含んでいる。その大量で複雑な情報を含む中性子散乱データを解析するのに分子シミュレーションを含めた理論的方法が大きな寄与をすることができる。本研究の目的は分子シミュレーションを利用して蛋白質の機能と関わる立体構造ダイナミクスを観測するのに必要な中性子散乱実験の測定領域・解像度を明らかにすることである。今回、蛋白質の基準振動解析と分子動力学計算を行いその結果を用いて中性子非干渉性非弾性散乱スペクトルを計算した。基準振動解析は蛋白質の調和的なダイナミクスを解析する方法である。しかし実際の蛋白質の機能には水和効果や非

調和的なダイナミクスが深く関わることが知られている。分子動力学計算ではこれらの効果を取り入れることができる。つまり 2 つの方法からえられる中性子散乱スペクトルを比較することにより蛋白質の機能と関わるダイナミクスが  $(Q, \omega)$ -space のどこで観測できるか調べることができる。300K でのシミュレーションからの解析結果では非調和効果や水和効果が約  $40\text{cm}^{-1}$  以下で顕著にあらわれた。この結果は蛋白質の機能と関わるダイナミクスを観測するにはこの領域で高解像の実験が必要であることを示している。また 100K で同様の解析を行い  $25\text{cm}^{-1}$  付近にあらわれるボゾンピークについても議論した。

#### (5) 蛋白質の多型性、遅いゆらぎと機能

石井由晴（科学技術振興事業団）

タンパク質は動的にその構造を変えながら生物のさまざまな機能を担っている。これまでタンパク質の振る舞いを調べるには、非常にたくさんの数の分子を対象として実験をし、その平均値を測定していたが、動的な変化は平均値に隠れて見えない。そこで一つ一つの分子を直接見て平均値では分からないタンパク質の動的挙動を計測した。ここでは蛍光エネルギー移動法と 1 分子イメージング技術を組み合わせ、タンパク質 1 分子の動的構造を計測した。

アクチン分子にドナーとしてテトラメチルローダミン

をアクセプターとして Cy5 特異的に標識化し、この間の FRET を観察した結果、溶液中でこのタンパク質は少なくとも 2 つの構造が共存することが示された。さらにこの複数個の構造の間をサブ秒から秒のオーダーでゆっくりと転移していることがわかった。アクチンは生体中ではモーター分子であるミオシンのレールとして働いているが、ミオシンが滑り運動をしているとき、アクチンの構造は多構造間の平衡をずらすようにして構造変化していることがわかった。アクチンがミオシンの運動に対し単なるレールではなく、積極的に機能に関わっているこ

とが示された。

また Ras は細胞内で信号伝達に関わる GTP 結合タンパク質である。タンパク質内の特定の位置を Cy3 で、GTP を Cy5 で標識化し FRET を計測した。アクチンと同じように複数の構造が示唆された。Ras は信号伝達の分岐点でいくつものタンパク質と相互作用することがわかっており、構造変化をすることで多数の信号伝達を切り替え

ていると考えられる。

このようにタンパク質の構造は自由エネルギーの多数の局所的極小値に対応して、複数の構造が存在し、その間をゆっくりと移転している動的な構造をとっている。機能をするときこの動的な構造をさまざまに変えながら機能していることが示唆された。

## (6) 巨大分子混み合いと分子シャペロンの相互作用の理論

金城 玲 (科学技術振興事業団さがけ, 神戸大学理学部化学科)

細胞内は混みあっている。この混みあった環境は通常の *in vitro* の実験系の環境とはだいぶ異なっており、注目するタンパク質性質に少なからず影響を与えると考えられる。混みあった状況での多種多様な蛋白質やその他の巨大分子は、複雑な相互作用をしているが、とりわけ重要なのは、排除体積相互作用である。なぜなら、その他の相互作用があろうとなかろうと、巨大分子が存在する限りその排除体積も存在するからである。巨大分子混みあいによる蛋白質の安全性、折れたたみ、凝集に対する影響を調べるために、単純な統計力学的模型を作って解析した。分子種は蛋白質 (天然状態・変性状態) および「混みあい因子 (crowder)」を考え、全て球状の形であると仮定する。簡単のため、引力は変性状態の蛋白質間のみ働き、その他は全て排除体積相互作用であるとする。混みあい因子の濃度によって、蛋白質 (とその集まり)

の状態がどう変るかを調べた。結果は以下の通り。

(A) 平衡状態では

- (1) 混み合いによって、変性蛋白質の凝集は促進される。
- (2) しかし、凝集が起らない範囲では、天然蛋白質の安定性が増加する。

(B) 非平衡状態では

- (1) 折れたたみ速度がもともと速い蛋白質は、混みあいによって折れたたみ速度がますます速くなり、凝集は制御される。
- (2) 折れたたみ速度がもともと遅い蛋白質は、混みあいによって、凝集の開始が加速される。

さらに、系に分子シャペロンが存在する場合に、巨大分子混みあいによって凝集とシャペロン活性の相関がどう変化するか、という問題について議論する。

## (7) 蛋白質の折れたたみ反応速度に対するトリフルオロエタノールの影響

浜田大三 (大阪府立母子保健総合医療センター研究所)

「生体内で合成される蛋白質は、そのアミノ酸配列に特有の立体構造へと自発的に折れたたまれる」この概念は現代生物学においては、自明のことと考えられている。しかしながら、自然界において、これほど多様で難解な現象は他に例をみない。

近年、種々の研究手法が開発され、個々の蛋白質の折れたたみ反応過程について、詳細な機構が明らかにされてきた。一方、これらの情報を集約し、折れたたみ反応

の統一的原理を確立する段階までには、我々の理解は達していない。

個々の蛋白質の天然構造は、異なった相互作用の組み合わせにより、安定化されている。個々の蛋白質に関して、これらの相互作用の役割、寄与について理解することは、折れたたみ反応の統一的原理を理解する上で重要である。

トリフルオロエタノール (TFE) は、蛋白質内部の疎水

性相互作用を弱め、近傍の残基間で形成される局所的な水素結合を安定化すると考えられている。そのため、多量の TFE を含む溶媒中でポリペプチド鎖は、 $\alpha$  ヘリックス、 $\beta$  ターン構造を多く含む構造状態を形成する。

ここでは、上記の TFE の性質を利用し、二次構造含量、分子量、折れたたみ反応様式の異なる 13 種類の蛋白質について、蛋白質折れたたみ反応に対する局所的な水素結合の役割について調べた結果について、報告する。

## (8) Dynamical Funnel を目指して

戸田幹人（奈良女子大学 理学部 物理科学科）

本研究では、蛋白質の折り畳み過程に関して、Funnel 描像の基本的な前提は踏まえた上で、より動力学的な様相を取り入れたモデルを考える。この意味で、本研究が扱うモデルを Dynamical Funnel と呼ぶことにする。本研究で扱うモデルは、次の三種類の自由度から構成される。第一はファネル自由度である。本モデルでは、折り畳み過程は、全体としてファネル状になったポテンシャル地形上のダイナミクスと考える。ただし、このファネル地形は、多くの凸凹を伴っており、なだらかな地形とは必ずしも限らない。このファネル地形に沿った自由度がファネル自由度である。第二の自由度は、蛇行の自由度である。折り畳み過程が、全体としてファネル的な傾斜を持っているとしても、その地形を滑り降りる過程が、一次元的な動力学であるはずは無い。むしろ、ファネルに沿った方向は、多くの蛇行を伴っていると予想される。その蛇行のために、ファネルに沿った運動は、曲がり角において振動運動を励起し、ファネルの傾斜によって獲

これらの結果から、個々の蛋白質の折れたたみ過程における律速段階で形成される立体構造（遷移状態）や中間状態の立体構造には、アミノ酸配列（内部因子）に依存したバリエーションが存在するが、個々の蛋白質についてそれらの構造特性は、溶媒条件（外部因子）に依存しないことが示唆された。この結果は、蛋白質のフォールディング・ランドスケープ構造の寛容性を示している。

得した運動エネルギーを失う。あるいは、ファネル地形において、ところどころ存在する遷移状態を超える運動は、次の遷移状態を超える運動に際して、自由度の組換えが必要となろう。第三の自由度が熱浴を構成する一群の振動モードである。

実際の蛋白質の実験データや分子動力学では、ファネル自由度として何を選ぶのがいいか、という問題そのものが問われる。また、上記の Dynamical Funnel のモデルでも、蛇行の自由度との相互作用があるため、ファネル地形を降りてくる過程は、必ずしもファネル自由度に沿っているとは限らない。このような場合、ファネル方向と最も良く相関している、動力学的な（集団的）自由度を、データから抽出するという課題が存在する。本研究では、Broomhead らによって提唱された、局所主成分解析を用いて、ダイナミクスの時系列データを解析する試みを行ったので報告する。

## (9) 蛋白質フォールディングのダイナミクス—階層的規則性と分子記憶

小松崎民樹（神戸大学 理学部 地球惑星科学科）

蛋白質の折れ畳みのダイナミクスにおいて発見された異常拡散、および、リボザイムの 1 分子計測で観測されている状態転移ダイナミクスの長時間分子記憶現象は、生体分子系の構造形成ダイナミクスはファネル型エネルギー地形上を単なる“確率過程”として緩和する描像

では捉えきれないことを提言している。我々はこれまでに、Thirumalai らの 46 バネービーズモデルなどの折れ畳みシミュレーションで得られる時系列に対し埋め込み論を適用し、揺らぎの大きい 10 数自由度の埋め込み次元（運動がランダムであればあるほど、系を構成する全自由

度の総数に漸近する)が相対的に低く、かつ転移温度では他の温度領域のそれに比べて顕著に小さく、転移温度領域のダイナミクスは力学的な規則性を保有する傾向にあることを示した。本講演では熱浴に浸されながらコヒーレンスを持つ遅いダイナミクスの特徴付けを目的とし、そのメカニズムを「解析」するための手法のひとつとして、有限サイズリヤプノフ指数を蛋白質ダイナミクスの解析に用いた。ある軌道  $X(t)$  に対して有限の変

位  $\delta X(0)$  を与えた場合、ズレ  $\delta X(t)$  がある許容範囲  $\Delta$  を越える時間  $T(\delta X(0), \Delta)$  を評価し、有限変位のリヤプノフ指数  $\lambda(\delta X(0), \Delta)$  を定義する。大振幅な主成分モード  $X(t)$  においては、 $\delta X(0)$  を変数として  $\lambda(\delta X(0), \Delta)$  を描くと、 $\delta X(0)$  で  $\lambda(\delta X(0), \Delta)$  に「大」から「小」への階段的転移、すなわち、微視的には強いカオスであるが、メソスケールでは規則性を備えた弱いカオスを呈することなどを見出した。

## (10) 動的な座標系のモデルによる蛋白質ダイナミクスの解析

森次 圭, 木寺詔紀 (横浜市立大学大学院 総合理科学研究科)

強い非線形性を含む蛋白質の運動は、その生物学的機能の発現に密接に関わっている。原子レベルの空間分解能をもつ分子動力学シミュレーションは、蛋白質の非線形ダイナミクスを解析する最も強力な手段のひとつである。本研究では、蛋白質のダイナミックな運動に適用しうる解析法のひとつとして、各時間での運動を調和近似により定義し、その調和運動の時間変化により長時間スケールの運動を記述するモデルを考案した。

調和運動の計算には、短い時間幅での主成分解析を用いた。調和運動の時間変化は、線形なモードで張られる座標系の並進(平均構造の変化)と回転(モード方向の変化)として表現される。時間窓をずらしながら主成分解析の計算を繰り返すことにより、モード

座標系の並進と回転を時間軸に沿って観測した。

まず始めに、ミオグロビンの温度一定の平衡状態に対してこのモデルを適用した。時間変化する座標系に沿った運動の様子をみると、固定軸方向には拡散的であった運動が振動的なものになる点、また、平均構造を取ることにより運動の振動成分が取り除かれる点から、この調和近似モデルにより運動の拡散成分が座標軸の並進・回転として効率的に抽出されることが確かめられた。運動の拡散成分としての座標軸の並進・回転を平衡温度の関数として観測した結果、高温では非線形な運動の寄与により全体的な調和運動の時間変化が大きくなることが明らかになった。

## (11) 赤外振動エコー実験と分子動力学シミュレーションに基づく一酸化炭素結合ミオグロビンの A Substates の構造とダイナミクス

秋山 良 (九州大学 理学部)

CO の結合したミオグロビン (MbCO) の伸縮振動を赤外吸収でみると、3 つのメジャーな substates を見る事が出来る。それらのスペクトルは、 $A_0(\sim 1965\text{cm}^{-1})$ 、 $A_1(\sim 1944\text{cm}^{-1})$ 、 $A_3(\sim 1930\text{cm}^{-1})$  にピークを持つ。溶媒の状態によってそのポピュレーションも変化する。これは蛋白質の微視的構造の違い、とりわけヘムポケットの構造の違いに関係すると期待される。

しかし、これらの substate 間の遷移のタイムスケール

は、ナノ秒以下 ( $A_1 \leftrightarrow A_3$ )、あるいはマイクロ秒以下 ( $A_3 \leftrightarrow A_1$ ,  $A_3$ ) である事が知られており、NMR や X 線回折による構造分析の時間分解能より速い。我々は、この問題を分子動力学計算 (MD) を使って調べた。比較する実験は、非線形赤外分光の一つ、波長分解赤外振動エコー実験である。

我々は、まず 64 番目のヒスチジン (His64) のイオン環の  $\epsilon$  位の窒素がプロトネイトされたタイプの MbCO

の MD を行った。その結果、His64 のイオノン環の tautomer のそれぞれに対応する 2 つの substates が表れた。それらは、以下に示す代表的な構造に帰属される。Red State では、 $N_{\epsilon}$  のプロトンが、CO の方向を向いている。一方、Blue State では、 $N_{\epsilon}$  と  $N_{\sigma}$  が、CO からほぼ同距離にある。それぞれの State のトラジェクトリーから CO の振動周波数が受ける変調の自己相関関数を計算し、

Fayer グループによる振動エコー実験と比較した。その比較から、MD に現れたふたつの substates それぞれに赤外スペクトルの  $A_3$ (Red State),  $A_1$ (Blue State) が対応している事がわかった。

今回は、更に His64 の  $N_{\sigma}$  がプロトネイトされた場合の MbCO の MD 結果も加えてダイナミクスにおける溶媒の役割まで議論したい。

## (12) 鉄—ヒスチジン結合を通して観たヘムタンパク質のダイナミクス

水谷泰久（神戸大学 分子フォトサイエンス研究センター，科技団さがけ研究 21）

ミオグロビンやヘモグロビンでは、ヘムはヒスチジン残基を通して主鎖とつながっている。したがって、鉄—ヒスチジン結合は、ヘムとグロビンにおけるお互いの構造変化を伝達する機能を持つ。ヘムからのリガンドの脱離に伴う、鉄—ヒスチジン結合の変化を、時間分解共鳴ラマン分光法を用いて調べた結果について述べた。ミオグロビンの鉄—ヒスチジン伸縮振動 [ $\nu(\text{Fe-His})$ ] によるラマンバンドは、約 100 ピコ秒の時定数で  $2 \text{ cm}^{-1}$  低波数シフトし、

平衡状態（デオキシ形）の値へと近づいていった。また、ヘモグロビンの  $\nu(\text{Fe-His})$  バンドは、約 300 ピコ秒の時定数で  $2 \text{ cm}^{-1}$  低波数シフトを示した。いずれの振動数シフトもリガンドの脱離に伴う三次構造変化を反映している。また、ヒスチジンと主鎖の共有結合を切ったミオグロビンミュータントや、リガンドの脱離に伴って非常に大きな三次構造変化を起こす変性チトクロム c の結果についても比較した。

## (13) フラビンを発色団とする光センサー蛋白質の構造変化ダイナミクス

神取秀樹（名古屋工業大学 応用化学）

生体分子は機能発現のため、分子の構造を過渡的に変化させる。光受容蛋白質は機能発現を光で制御できることから、構造変化ダイナミクスを研究するのに適している。光受容蛋白質の中で光を情報へと変換するものには、視覚や古細菌の光センサーであるロドプシン、細菌の光センサーであるイエロープロテイン、植物の赤色センサーであるフィトクロムなどが知られている。これらはいずれも発色団の異性化反応によって蛋白質の構造変化が誘起され、蛋白質の表面構造が変化する結果として「情報」が伝達蛋白質へと伝えられる。ところが最近になって、植物の青色センサーとしてフラビンを発色団とする光受容蛋白質が発見された。異性化が考えられない光センサーにおいて、光の情報はどのように伝達蛋白質へと受け渡されるのであろうか？

フォトリポピンは、植物の光屈性や葉緑体光定位運動、気孔開口などに関与する青色光センサーであり、その発見から 5 年ほど経過したばかりであるにも関わらず、さまざまな知見が激しい競争の中で得られている。例えば異性化を利用した光センサー蛋白質が多くの中間体を經由して蛋白質の構造を変化させるのに対して、フォトリポピンにおけるフラビン結合ドメインの光反応過程では光反応中間体が 1 つしか現れない。結晶構造解析の結果によると、反応中間体が生成しても蛋白質表面にほとんど構造変化がみられず、その光情報変換機構が興味を集めている。本講演では、我々の低温分光法を用いた研究を紹介し、この新しい光センサー蛋白質の構造変化ダイナミクスに関して議論した。

# (14) 蛋白質の構造変化：線型応答的描像

木寺詔紀 (横浜市立大学大学院 総合理学研究科)

蛋白質のダイナミクスにおける、基準振動的描像の成功に基づいて、第 1 次近似として、基質結合に伴う応答を線型のレベルで扱うことを考える。静的な線型近似において、摂動に伴う分布関数の応答は(1)式で与えられる。

$$\langle \delta \phi_i(\mathbf{r}) \rangle_1 \approx -\beta \sum_j \int d\mathbf{r}' \langle \delta \phi_i(\mathbf{r}) \delta \phi_j(\mathbf{r}') \rangle_0 V_j(\mathbf{r}') \quad (1)$$

ここで、 $\delta \phi_i$  は原子  $i$  の平衡位置のまわりの分布関数、 $V_j$  は原子  $j$  に対する外場、 $\langle \rangle_0$  と  $\langle \rangle_1$  はそれぞれ非摂動 (非結合) 状態と摂動 (結合) 状態での平均を表す。さらに、外場を 1 次までで近似して平均操作をすると、構造変化の期待値は(2)式で与えられる。

$$\langle \Delta \mathbf{r} \rangle_1 = \beta \sum_j \langle \Delta \mathbf{r} \Delta \mathbf{r}_j \rangle_0 \mathbf{f}_j \quad (2)$$

ここで、 $\langle \Delta \mathbf{r} \rangle_1$  は基質結合に伴う原子  $i$  の移動量、 $\langle \Delta \mathbf{r} \Delta \mathbf{r}_j \rangle_0$  は非摂動状態でのゆらぎの分散共分散行列、 $\mathbf{f}_j$  は原子  $j$  にかかる外力である。このように、線型的な描像では、応答の挙動は非結合状態のゆらぎによって決まることとなる。この静的な表式では、分散共分散行列は quasiharmonic 近似として分子動力学計算の軌跡などから計算することができて、そこに相当程度複雑なダイナミクスを反映させることができる。このことが基準振動解析と同様に、蛋白質への適用で重要な意味を持つものと期待される。

## (15) Characterization of protein conformers beyond basic folded ones by high pressure NMR

赤坂一之 (近畿大学)

A protein in solution is a thermodynamic entity existing in dynamic equilibrium of multiple conformers. Extension of our knowledge to conformers beyond basic folded ones is crucial for understanding mechanisms of protein function, folding and misfolding. However, they have seldom been detected and their structures analyzed under closely physiological conditions. Detailed spectroscopic analysis of structures of kinetic intermediates in folding has also been hampered by their limited life times. A new experimental strategy, utilizing pressure perturbation in conjunction with multi-dimensional NMR spectroscopy, allows direct NMR detection and structural analysis of higher energy conformers of proteins, disclosing the rich world of protein structure

existing between the basic folded conformer and the fully unfolded conformer. A number of peculiar intermediates have been detected and characterized in such proteins as RalGDS-RBD,  $\beta$ -lactoglobulin, dihydrofolate reductase, ubiquitin, apomyoglobin, p13MTCP1 and prion, showing that multiple conformers are general designs of nature for a wide variety of functional proteins. Furthermore, close identity between the pressure-stabilized intermediates and the kinetic intermediates in folding is generally expected. Possibility of extending structural analysis to the entire conformational space of proteins by high pressure NMR is discussed in terms of the "volume theorem of protein" and the energy landscape for folding.

# (16) 高圧 NMR でみた蛋白質リゾチームのダイナミクス

鎌足雄司 (理化学研究所)

タンパク質の構造は、その基底構造 (いわゆる天然構造) から準安定構造や変性構造などの多様な構造との平

衡状態にある。一般的に天然構造以外の構造はその存在割合が低く、通常の生理的条件下では分光学的に検出す

ることが困難である。圧力は、分子体積を軸に、もともと存在する蛋白質の多様構造間の平衡を部分モル体積の小さな方へシフトさせる。これによって、天然状態から逸脱した構造が観測可能となる。蛋白質の準安定構造は、天然構造以上に、機能発現などに重要である可能性もあり、高圧 NMR は原子レベルでその構造解析を可能にする唯一の手法である。

高圧 NMR 法によりニワトリリゾチームの天然構造内での揺らぎの大きい部位を同定した。また、高圧かつ低

温で、準安定構造が安定化されることも見いだした。それら、天然構造内部での揺らぎの大きい部位、および、高圧・低温での変性部位は、いずれもタンパク質内部のキャビティーや水和水近傍に位置し、その一部は活性部位近傍に位置する。このことは、原子のパッキングや水和が、天然構造内部での揺らぎや天然構造から準安定構造への転移、ひいては機能発現をコントロールしている可能性があることを示唆している。

### (17) 多体問題の厳密解について

栗田英資（名古屋大学大学院 多元数理科学）

### (18) Protein unfolding assay and its application to identifying prion protein conformation changing factor

金子清俊（国立精神神経センター）

Prion protein exists in two different isoforms, a normal cellular isoform ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ) and an abnormal infectious isoform ( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ), the latter is a causative agent of prion disease such as mad cow disease and Creutzfeldt-Jakob disease. Amino acid sequences of  $\text{PrP}^{\text{C}}$  and  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  are identical, but their conformations are rather different;  $\text{PrP}^{\text{C}}$  rich in non  $\beta$ -sheet vs.  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  rich in  $\beta$ -sheet isoform.

During its normal metabolism,  $\text{PrP}^{\text{C}}$  is cleaved in the middle of the potential  $\beta$ -sheet region, thereafter it cannot be converted into  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  anymore. Once  $\text{PrP}^{\text{C}}$  escapes this pathway, however,  $\text{PrP}^{\text{C}}$  is converted into  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  templated by  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  itself in assistance with hypothetical yet unidentified

host factor. Since the two isoforms have quite different conformation, this host factor might be a molecular chaperone, which enables to override an energy barrier between  $\text{PrP}^{\text{C}}$  and  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ . This means that these two molecular events,  $\text{PrP}^{\text{C}}$  degradation and  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  formation is mutually exclusive.

Our prion research focuses on further understanding such an unprecedented mechanism by identifying auxiliary factor(s) other than  $\text{PrP}^{\text{C}}$  and  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ . Our current targets are, (1) yet unidentified protease cleaving  $\text{PrP}^{\text{C}}$  during its normal metabolic pathway, and (2) unknown host-specific factor(s) involved in  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  formation.

### (19) プリオン蛋白質の遅い揺らぎと病原性

桑田一夫（岐阜大学 医学部 高次情報統御学講座）

ハムスター・プリオン (ShPrP (90-231)) の遅い揺らぎを  $^{15}\text{N}$  核の緩和時間 (CPMG 分散法) を用いて計測し、高圧 NMR で既に得られている局所的な熱安定性の差、及び経験的に知られている病原性を示す変異部位と比較

した。

その結果、ミリ秒のオーダーの揺らぎを示すアミノ酸残基は、C 端のヘリックス (ヘリックス B,C) を形成している部分に優位に見られ、熱安定性が相対的に低い部

位とよく一致していた。このことは、蛋白質におけるミリ秒の遅い揺らぎは、天然構造を中心としたピコ～ナノ秒の速い揺らぎとは根本的に異なり、プリオン中間体への構造転移も含むグローバルな揺らぎであることを示している、と考えられる。

また、臨床的に知られている病原性を引き起こす変異は、ヘリックス B, C 領域に集中しており、この領域の

ダイナミクスが、プリオンの病原性、特に感染性と深い関連があることを示唆している。N 端の疎水性クラスターには、GSS を引き起こす変異が一ヶ所あるが、感染性は低い。このことは、C 端の構造形成部分と疎水性クラスターとの間の長距離相互作用が、何らかの形で病原性そのものの発現と関連しているのだろう。

## (20) Ex vivo transmission of prions: analysis of strain, cell-tropism and interference

西田教行 (長崎大学 医学部)

プリオン蛋白質の性状とその異状化のメカニズムが近年明らかにされつつあり、プリオン病

の病態は解明されつつあるといえよう。しかし一方で病原体の本体が異常プリオン蛋白質そのものであるとの証明は困難で未だ成功していない。我々は病原体の本体の解明を目標に、培養細胞でのプリオン持続感染系を樹立し、種々の実験を現在行っている。今回以下の3つの異なる興味深い事象について報告する。

(1) 以前よりプリオンには多数の性質の異なる株が存在することが知られているが、もし病原体が遺伝子を持たないならば如何に性質を保持していくのか極めて興味深い。我々は3種類の由来と性状の異なるプリオン(スクレイピー由来の22LとChandler株、GSS由来のFK-1)の持続感染細胞系を樹立した。これらの細胞をマウス脳内に接種するとやはり株特異的症状、潜伏期をもって発症し、病理学的にも株特異的病変を認めた。感染細胞に認める異常プリオン蛋白を同じ株に感染したマウス脳内のものと比較すると、異なる泳動度を示すプロテアーゼ抵抗性バンドパターンを示し、N末の切断点に相違があると思われた。このことがプリオン蛋白の異常構造に変化が生じた結果だと大胆に仮定すると、株特異的性質を

保持する情報物質はプリオン蛋白以外のものである可能性がある。

(2) 株特異的病変が生じることは、株ごとに細胞指向性のパターンが異なるのではないかと推測されているが、その直接証明はなく、また詳細は明らかではない。我々は上記の3種類の株を、neuroblastoma cell (Neuro2-a), mouse hypothalamic neuronal cell (GT1-7), rat hepatoma cell (1C11) に in vitro 感染を試み、22L と Chandler 株が Neuro2-a に比較的良好に感染するのに対し、FK-1 は 1C11 に比較的良好に感染することがあきらかになった。こうした株間の指向性の違いは何が規定するのか現在解析中である。

(3) 異なる株間にウイルス学でいうところの干渉現象が見られることがある。つまり先行する感染が存在した場合、後続の病原体の感染が成立しない。しかし、これまでの多くの研究は in vivo で行われており、生体の免疫系が本当に関与していないのか不明であった。GT1-7 細胞を用い、スクレイピー株を先行感染させ、ヒト由来の FK-1 の重複感染を試みたところ、細胞レベルでの解明はプリオン病の治療方法を見つけることにつながるかもしれない。

## (21) プリオンタンパク質の分子動力学シミュレーション

—Ala117→Val アミノ酸変異による蛋白質構造の変化—

沖本憲明 (理化学研究所)

## 20. 「シナプス可塑性とまるとの脳機能」

2002年5月23日－5月24日

代表・世話人：井ノ口 馨（三菱化学生命科学研究所）

所内対応者：森 泰生（統合バイオサイエンスセンター）

（1）魚の逃避運動を発現するマウスナー回路の可塑性

小田洋一（大阪大学大学院 生命機能研究科）

（2）記憶課題中の情報コーディングとセル・アセンブリの活動

櫻井芳雄（京都大学大学院 文学研究科）

（3）転写調節因子 CREB による記憶の固定化・再固定化の制御

喜田 聡（東京農業大学 応用生物科学部）

（4）マウス嗅覚系における神経回路形成の分子機構

坪井昭夫（東京大学 大学院理学研究科）

（5）発達期の神経活動が視覚野神経回路に与える影響

畠 義郎（鳥取大学 医学部）

（6）扁桃体における随意行動発現の神経機構

西条寿夫（富山医科薬科大学 医学部）

（7）フェロモン記憶を支えるシナプス可塑性

椛 秀人（高知医科大学）

（8）痛みと可塑性

植田弘師（長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科）

（9）マウス瞬目反射条件付けの分子神経機構

桐野 豊（東京大学大学院 薬学系研究科）

（10）イムノトキシン細胞標的法を用いた大脳基底核神経回路の機能研究

小林和人（福島県立医科大学 医学部）

（11）神経インパルスの発火パターンと分子変化

伊藤康一（東京都臨床医学総合研究所）

（12）線虫の化学走性行動とその可塑性

飯野雄一（東京大学 遺伝子実験施設）

（13）ナメクジの匂い中枢における同期振動活動の生理的意義

渡辺 恵（東京大学大学院 薬学系研究科）

### 【参加者名】

井ノ口馨，斎藤喜人，井上浩太郎，上田洋司，沼澤理子（三菱化学生命科学研究所），伊藤康一（東京都臨床医学総合研究所），桐野豊（東京大学大学院薬学系研究科），小林和人（福島県立医科大学医学部），高橋正身（北里大学医学部），椛秀人（高知医科大学），畠義郎（鳥取大学医学部），渡辺恵（東京大学大学院薬学系研究科），櫻井芳雄（京都大学大学院文学研究科），高橋晋（慶應義塾大学大学院理工学研究科），植田弘師（長崎大学大学院医歯

薬学総合研究科），尾藤晴彦（京都大学大学院医学研究科），喜田聡，細田浩司，鈴木章円（東京農業大学応用生物科学部），遠藤健吾，高橋清文（東京農業大学応用生物科学部），西条寿夫（富山医科薬科大学医学部），真鍋俊也，新里和恵（神戸大学大学院医学系研究科），渡部文子（東京大学医科学研究所），城山優治，志牟田美佐，熊澤紀子，片山憲和，有馬史子，松井 稔（東京大学医科学研究所），小田洋一（大阪大学大学院生命機能研究科），坪

井昭夫 (東京大学大学院理学研究科), 飯野雄一, 広津嵩亮, 富岡征大, 池田大祐 (東京大学遺伝子実験施設), 狩野方伸, 山崎美和子, 吉田隆行, 鳴島円, 橋本谷裕輝 (金沢大学大学院医学系研究科), 和田由美子 (理化学研究所), 伊澤栄一 (名古屋大学生命農学科), 堀尾修平 (徳島大学薬学部), 吉田 敏 (岐阜大学工学部生命工学科),

#### 【概要】

シナプス可塑性の研究に立脚しつつ, その視点から丸ごとの脳機能を理解することを目指して研究を進めている研究者が一堂に会して, 脳の高次機能を本当に理解するためにどのようなアプローチが可能かを議論し, 今後の展望を探索した。

最近の脳神経研究の進展によりシナプス部位での情報処理, すなわちシナプス可塑性の分子機構については, 不十分な点はあるにせよ, ある程度全体像が見渡せるようになった。そこで本研究会ではその先の問題である「シ

青木直哉 (名古屋大学生命農学科), 柳原大 (豊橋技術科学大学), 西田基宏, 吉田卓史, 五日市友子, 山田和徳 (統合バイオサイエンスセンター)

ナプス可塑性と神経回路レベルの情報処理」や「シナプス可塑性と脳内の情報コーディング」に焦点を当てた。具体的には, 学習・記憶をはじめ情動や感覚情報処理など幅広い脳機能を対象とし, 情報がどのように処理されているのかを分子レベル・回路網レベルさらには行動レベルまで含めて包括的に考察し, 脳高次機能の全体像を解明するための手がかりが得られた。

### (1) 魚の逃避運動を発現するマウスナー回路の可塑性

小田洋一 (大阪大学大学院 生命機能研究科)

硬骨魚の逃避運動をトリガーするマウスナー (M) 細胞は入出力系が単純明確で, しかも逃避運動と M 細胞の活動が 1:1 に対応するので, 学習における運動変化とシナプス可塑性の因果関係を直接調べる系として注目される。実際に, キンギョの M 細胞上に起こる抑制性シナプスの長期増強 (LTP) と逃避運動の学習とのリンクを

明らかにした(Oda et al., 1998)。さらにゼブラフィッシュ稚魚の M 細胞にレーザ顕微鏡を用いて抑制性シナプス応答を初めてイメージングし(Takahashi et al., 2002), LTP を光学計測した。また, M 細胞の相同ニューロンからなる神経回路からこの運動の並列処理過程に迫りたいと考えている

### (2) 記憶課題中の情報コーディングとセル・アセンブリの活動

櫻井芳雄 (京都大学大学院 文学研究科)

近年の実験心理学が提唱してきた「情報ネットワークとその変化による記憶情報処理」を, 脳内の機能的な神経回路 (セル・アセンブリ) とその動的変化という, 具体的実体として検出することを目指している。研究ストラテジーは, 複数の記憶課題 (マルチタスク) を行っている同一動物の脳内から, 複数のニューロン活動 (マルチニューロン活動) を, 全ての課題を遂行している期間にわたり連続的に同時記録することである。これまでに,

それぞれ異なる刺激情報をコードするマルチタスクを同一のラットが行う際, 海馬体と新皮質において, 互いに重複したニューロンから成るセル・アセンブリが課題の種類をコードしていることを示した。また, 刺激情報を弁別する課題をコードするセル・アセンブリが, その刺激が持つ時間情報を弁別する課題をコードするセル・アセンブリを完全に内包することも明らかにした。しかし, そのような行動と電気生理の組み合わせだけでは不十分

であり、課題中に実際に活動している広範な神経回路網を可視化することも必要である。そこで、ラットがマルチタスクを遂行している際、課題の違いにより遺伝子

(c-Fos) 発現が動的に変化することを示した最近の実験結果についても紹介する。

### (3) 転写調節因子 CREB による記憶の固定化・再固定化の制御

喜田 聡 (東京農業大学 応用生物科学部)

記憶は学習、短期記憶を経て固定化され、固定化後も保持・想起といった様々なプロセスを経て活用される。また、最近、想起された記憶が、再貯蔵される過程でも、固定化と類似した分子機構による再固定化のプロセスが存在することが提唱されている。一方、記憶の固定化に必須である新規遺伝子発現に、転写調節因子 CREB が関与することは、CREB $\alpha$ / $\delta$ 欠損マウスが長期記憶形成に障害を示すことから示唆されている。

我々は、この CREB の学習・記憶の様々なプロセスに

対する役割、CREB による記憶形成の分子機構を明らかにする目的で、前脳において LBD-CREB S133A を発現し、薬剤(タモキシフェン投与により CRE を介した転写を誘導的に阻害可能なトランスジェニックマウスを作製した。現在までの行動学的解析から、CREB が記憶の固定化、さらに、再固定化のプロセスに必須であることが明らかとなった。また、CREB を介する情報伝達を強化したトランスジェニックマウスの作製も行っており、その解析結果も紹介する。

### (4) マウス嗅覚系における神経回路形成の分子機構

坪井昭夫 (東京大学大学院 理学研究科)

動物の嗅覚系では、全遺伝子の約 2~3% を占める一千種類のメンバーから成る嗅覚受容体遺伝子ファミリーにより、数十万種類の匂い分子が識別されている。一般に、嗅上皮上の嗅細胞において、匂い分子はその官能基を介して複数の嗅覚受容体と異なる親和性で結合し、高等それに伴い嗅球において、それら受容体に対応する糸球が、結合の度合いに応じて異なる強さで興奮する。従って、個々の匂い分子は、嗅球における糸球の空間的な興奮パターン (topographic map) の相違として識別され

ると考えられている。私共のグループでは、嗅覚系における匂い分子の識別に関して、次の 2 点に焦点を絞って研究を進めている。第一には、どのような機構によって個々の嗅細胞が、嗅覚受容体遺伝子群の中から一種のみを選択し、然も片方の対立形質のみを発現するのか、第二には、同じ種類の受容体を発現する嗅細胞が、何を手掛かりに軸索を嗅球に伸展し、特定の位置に収斂して topographic map を形成するのかである。本研究会では、これらの分子機構に関する最新の知見を紹介したい。

### (5) 発達期の神経活動が視覚野神経回路に与える影響

畠 義郎 (鳥取大学 医学部)

ヒトやサル、ネコなどの哺乳動物では、大脳皮質一次視覚野の生後発達に正常な視覚体験が必要であり、異常な視覚入力のもとでは視覚野の神経回路網やニューロン

の光反応性が異常になったり、失われたりする。例えば、発達期の動物において、一方の眼をふさぐなどして視覚入力を遮断すると、一次視覚野のニューロンは遮断され

なかった方の健常眼にのみ反応するようになる。この現象は、個体レベルの可塑性のモデルとして数多くの研究がなされており、神経活動に依存したメカニズムを基盤とすることが明らかとなってきた。

さらに、その分子メカニズムを調べる研究から、視覚野の可塑性に各種神経栄養因子が重要な役割を果たす可能

性が提唱されている。中でも、脳由来神経栄養因子は発達期の視覚野において、視床からの入力線維の皮質内分布に影響を与えることが報告され、特に注目されている。以上のような、神経回路網発達における神経活動や神経栄養因子の役割に関する知見を紹介する。

## (6) 扁桃体における随意行動発現の神経機構

西条寿夫 (富山医科薬科大学 医学部)

近年、扁桃体など大脳辺縁系が随意的な行動発現に関与していることが示唆されている。本研究では、ラットを用いて要素感覚刺激(聴覚または視覚刺激)および構成感覚刺激(聴覚および視覚刺激の同時呈示)と報酬刺激の連合課題を学習させ、課題遂行中のラット扁桃体ニューロンの応答性を解析した。さらに、消去学習(感覚刺激と報酬の連合の解消)および再連合学習(感覚刺激と報酬の再連合)に対する扁桃体ニューロンの応答性を解析し、これらの学習中に可塑的に応答するニューロンの応答性と学習行動との相関を解析した。その結果、155個の応答ニューロンのうち、62個が報酬刺激と連合す

る感覚刺激だけに応答した。これら62個の識別応答ニューロンのうち45個に対して消去・再連合学習課題をテストした結果、26個のニューロンは、消去・再連合学習中に応答が可塑的に変化し(可塑的応答ニューロン)、扁桃体基底外側核に局在していた。また、これら可塑的応答ニューロンの応答性とラットの行動との間に有意な相関のあることが明らかになった。これらのことから、基底外側核が感覚刺激と報酬の連合、およびそれにつづく行動発現に重要な役割を果たしていることが示唆される。

## (7) フェロモン記憶を支えるシナプス可塑性

梶 秀人 (高知医科大学)

交尾を契機に雌マウスに形成される雄フェロモンの記憶は、妊娠の成立に重要な役割を果たしている。この記憶を支えるシナプスの可塑的变化は、鋤鼻系の最初の中継部位である副嗅球に起こる。副嗅球の中継ニューロンであるグルタミン酸作動性僧帽細胞は副嗅球に内在するGABA作動性顆粒細胞との間に、樹状突起同士の間

にシナプスを形成している。交尾刺激とフェロモン刺激が副嗅球において連合することによって、種々の情報分子が関わり、相反性シナプスに可塑的变化が生じる。本研究では、最近の知見をもとにフェロモン記憶を支えるシナプス可塑性のメカニズムについて考察する。

## (8) 痛みと可塑性

植田弘師 (長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科)

「切り取られた右腕の親指が痛くて我慢が出来ない」。このような痛みは「幻肢痛」と呼ばれ、痛みが記憶とし

て残ることを明瞭に表している。手術中にのみ有効な麻薬性鎮痛薬を投与すると、いわゆる術後痛という慢性痛

が軽減される（先制鎮痛）という臨床経験は手術中の痛み記憶こそが、その慢性痛の原因たることを示している。帯状疱疹などによる神経傷害が回復した数ヶ月後に痛みが再発する神経因性疼痛では触覚が痛みに切り替

わるという神経回路のスイッチ機構が関与することが知られている。こうしたメカニズムを分子のレベルで解明する手がかりを得、最近では創薬を目指した戦略的な研究も始めています

### （9）マウス瞬目反射条件付けの分子神経機構

桐野 豊（東京大学大学院 薬学系研究科）

瞬目反射条件付けは、音を条件刺激 (CS) とし、眼への電気刺激（又は眼への空気吹きつけ）を無条件刺激 (US) とする古典的条件付けの一つである。これまで、主としてウサギを用いて、遅延条件付け (CS に遅れて US が始まり同時に終了する) の神経機構が研究されてきた。その結果、この学習には、小脑中位核と小脳皮質が必須であり、また、小脳皮質の平行線維→プルキンエ細胞シナプスの LTD がその神経 substrate であるという有力な仮説が提唱されていた。

我々は、いくつかの遺伝子変異マウス、薬物処理により脳の一部を不活性化したマウス等を用いた実験から、小脳 LTD 欠損マウスでは遅延条件付けが強く障害されることを見出し、これまでの小脳 LTD 仮説を支持する結果を得た。しかしながら、小脳 LTD 欠損マウスにおいても、トレース条件付け (CS 終了後に US が開始する) は正常であることを見出した。脳は瞬目反射に関わる神経機構をいくつか潜在的に有しており、パラダイムに依存してそれらを発動させるものと思われる。

### （10）イムノトキシン細胞標的法を用いた大脳基底核神経回路の機能研究

小林和人（福島県立医科大学 医学部）

イムノトキシン細胞標的法は、複雑な神経回路から特定のニューロンタイプを誘導的に除去する分子遺伝学のアプローチである。ドーパミンは大脳基底核の神経回路を介して、運動および運動と関係する学習の制御に重要な役割を持つ。ドーパミンの作用は線条体における複数

の投射ニューロンと介在ニューロンへの促進性あるいは抑制性の応答を誘導する。イムノトキシン細胞標的法を利用して線条体の特定ニューロンタイプを除去することにより、ドーパミンが大脳基底核回路を調節する仕組みが明らかになる。

### （11）神経インパルスの発火パターンと分子変化

伊藤康一（東京都臨床医学総合研究所）

脳の機能は、多数の神経細胞とグリア細胞が複雑に絡み合った回路の活性化が神経インパルスによって発現する。脳の機能の複雑さから神経インパルス発火パターンとそれに関与する分子の分子レベルでの相互関係は未だ不明な点が多い。神経細胞は、他の脳細胞には見られない特殊な機能、電気活動により情報が伝達され更に神経

の可塑性が起こす、がある。つまりこの機能を理解することは脳高次機能の一つである学習と記憶のメカニズムを理解する上で重要な事である。本研究会において、培養神経細胞を用い様々なパターンでの電気刺激により特異的な変化を示す分子について考察したい。

## (12) 線虫の化学走性行動とその可塑性

飯野雄一 (東京大学 遺伝子実験施設)

線虫 *C. エレガンス* は全細胞が約 1000 個しかなく、そのうち 302 個が神経細胞である。これらの神経細胞は 118 種の形態的に異なった神経の集まりであると言われている。電子顕微鏡観察により、その神経系の全ネットワークが明らかになっているという稀有の特徴を持つ。

我々はこの線虫の化学走性行動とその可塑性に関わる遺伝子の解析を進めている。線虫を匂い物質に数分間曝すことにより、その後の匂い物質への化学走性が顕著に低下する。匂い物質の受容とこの化学走性の可塑性に

おける Ras-MAP キナーゼシグナル伝達経路の多彩な働きについて議論したい。

一方、線虫を餌のない状態で水溶性誘引物質に数時間曝すと、その物質への化学走性が正から負へと変化する。この可塑性には新しいタイプの分泌タンパク質である HEN-1 と、インシュリン様シグナル伝達経路が働いていることを見い出しており、これらの解析結果についても紹介する。

## (13) ナメクジの匂い中枢における同期振動活動の生理的意義

渡辺 恵 (東京大学大学院 薬学系研究科)

多くの脊椎動物と無脊椎動物の感覚中枢神経で同期振動が存在している。同期振動を生じるメカニズムは多様であるが、多くの場合抑制性介在神経が重要な働きをしている。チャコウラナメクジの二次嗅覚中枢である前脳は 10 万個程度の微小な神経細胞から構成され、同期振動を生成する抑制性介在神経のバーストニューロンと、匂い情報をコードしていると考えられるノンバーストニューロンが含まれる。前脳は無刺激時には約 0.7 Hz の局所場電位振動を生じている。触角へ匂い刺激を行うと、

局所場電位の振動数や波形が変化するが、特に忌避性の匂い刺激は誘引性の匂いに比べて強く振動数を増大させた。振動数増加はバーストニューロンからノンバーストニューロンへの抑制性入力を増加させる。忌避性の匂いは外套膜収縮などの忌避行動を生じるが、このとき前脳の振動数増加に伴うノンバーストニューロンの抑制により、嗅覚レセプターから運動神経への経路の脱抑制が生じていることが予想される。