

【 研 究 活 動 報 告 】

研究活動報告

〔 目 次 〕

分子生理学研究系

神経化学研究部門.....	11
---------------	----

概 要

グリシン・トランスポーター2 の遺伝子構造と選択的スプライシング

(柳川右千夫, 海老原利枝, 山本友美, 小幡邦彦)

小胞型 GABA トランスポーターのノックアウトマウスの作成

(柳川右千夫, 海老原利枝, 有田早苗, 上松正和)

GAD65 ノックアウトマウスを用いた味覚情報処理における GABA の役割

(柳川右千夫, 志村 剛, 山本隆)

イオンチャネル・受容体の構造機能連関, 機能調節に関する研究

(立山充博, 三坂巧, 中條浩一, 藤原祐一郎, 長友克広, 山本友美, 久保義弘)

ミトコンドリア分裂を引き起こす新規高分子量 G 蛋白質の細胞内動態に関する研究

(三坂巧, 久保義弘)

分子神経生理研究部門.....	13
-----------------	----

概 要

時期特異的遺伝子組み換え法を用いたオリゴデンドロサイトの系譜解析

(竹林浩秀, 政平訓貴, 古性美紀, 渡辺啓介, 小野勝彦, 池前一裕)

オリゴデンドロサイト前駆細胞の移動制御機構の解析

(小野勝彦, 渡辺啓介, 池前一裕)

bHLH 型転写制御因子 Olig3 の機能解析

(丁 雷, 竹林浩秀, 小野勝彦, 池前一裕)

モデルマウスを用いた脱髄の病態解明

(田中久貴, 松本路夫, 東 幹人, 馬堅妹, 山田 元, 田中謙二, 竹林浩秀, 等 誠司, 池前一裕)

アストロサイトの分化, 発生様式に関する研究

(小川泰弘, 成瀬雅衣, 竹林浩秀, 等 誠司, 池前一裕)

アストロサイト機能不全モデルマウスの開発

(田中謙二, 竹林浩秀, 池前一裕)

神経幹細胞の発生

(等 誠司, 東幹人, 成瀬雅衣, 池前一裕)

脳の発生と糖鎖

(石井章寛, 等 誠司, Stephen Pfeiffer, 池前一裕)

糖蛋白質糖鎖解析方法の改良

(田辺和弘, 池前一裕)

新規癌遺伝子の発現様式に関する研究

(中島弘文, 小野勝彦, 池前一裕)

細胞内代謝研究部門.....	18
----------------	----

概 要

未成熟卵母細胞の Ca^{2+} 振動に対するエストロゲンの作用

(毛利 達磨, 吉田 繁)

F-アクチン網目構造からの張力依存的なストレスファイバーの形成

(平田 宏聡, 曾我部 正博)

細胞器官研究系

生体膜研究部門..... 20

概 要

神経, 分泌細胞の開口放出機構の研究

(河西 春郎, 根本 知己, 高橋 倫子, 岸本 拓也, 兒島 辰哉, 大嶋 章裕, 劉 婷婷, 畠山 裕康)

2 光子励起法を用いた大脳シナプスの研究

(河西 春郎, 松崎 政紀, 早川 泰之, 野口 潤, 安松 信明, 本蔵直樹)

機能協関部門..... 21

概 要

尿細管糸球体フィードバックにおける ATP 透過性アニオンチャネルと Ca^{2+} 感受性非選択性カチオンチャネルの関与

(岡田泰伸, サビロブ ラブシャン)

アストロサイトにおける ClC-1 クロライドチャネルの新規アイソフォームの発現

(張曉東, 高橋信之, 井上 華, 清水貴浩, 岡田泰伸, 森島 繁, 赤塚結子, 鍋倉 隆)

高浸透圧刺激により活性化するカチオンチャネルの細胞容積調節における役割

(清水貴浩, サビロブ ラブシャン, 岡田泰伸, Frank Wehner)

虚血による新生仔ラット心室筋細胞形質膜への CFTR の発現亢進

(浦本裕美, 高橋信之, A.K. Dutta, R.Z. Sabirov, 岡田泰伸, 赤塚結子, 森島 繁)

虚血および低酸素条件下での心筋細胞からの ATP 放出における ATP 透過性アニオンチャネルの役割

(A.K. Dutta, R.Z. Sabirov, 浦本裕美, 岡田泰伸)

生体情報研究系

感覚認知情報研究部門..... 25

概 要

初期視覚系における輪郭線の折れ曲がりの表現

(伊藤 南, 小松 英彦)

視覚探索における V4 野と前頭眼野ニューロンの活動ダイナミクス

(小川 正, 小松 英彦)

盲点における線分の補完知覚に対応したサル 1 次視覚野神経活動

(松本 正幸, 小松 英彦)

液性情報研究部門..... 26

概 要

神経活動活性化に伴う Ca^{2+} カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II の新たな活性調節機構

(山肩葉子, 小幡邦彦)

Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II の機能的ノックアウトマウスの作成

(山肩葉子, 井本敬二, 八木 健, 小幡邦彦, 柳川右千夫)

大脳皮質一視床フィードバック投射シナプスの解析

(宮田 麻理子, 井本 敬二)

成熟ニューロンにおける cdk5 の機能の検索: シナプス種特異的制御の分子基盤

(佐竹伸一郎, 井本敬二, 小西史朗)

感覚入力一視床一大脳皮質ネットワークにおける構造と機能

(井上 剛, 井本 敬二)

Brugada 症候群関連心筋 Na チャネル遺伝子変異の電気生理学的特徴 (伊藤英樹, 井本敬二, 清水賢巳, 高田重男, 馬淵宏)	
Ca ²⁺ チャネル変異マウスにおける神経回路異常の検索 (佐々木幸恵, 松下かおり, 児玉 貴史, 井本敬二)	
高次神経機構研究部門.....	29
概 要	
プロトコドヘリン β ファミリー欠損マウスの作製 (金子涼輔, 八木 健)	
クローンマウス胚由来 ES 細胞株を用いた神経細胞分化過程における核機能変換の解明 (牧野初音, 八木 健)	
ゼブラフィッシュ CNR (DrPcdh alpha) の機能解析 (多田基紀, 八木 健)	

生体調節研究系

感覚運動調節研究部門.....	32
概 要	
ヒトの視覚性運動知覚の脳磁図による生理学的研究 (金桶吉起, 祖父江文子, 久保田哲夫)	
侵害性信号の皮質処理 (乾幸二, 王曉宏, 秋云海, Tran TD, 柿木隆介)	
侵害性刺激に伴う皮質活動の睡眠による影響 (王曉宏, 乾幸二, 秋云海, 宝珠山稔, 柿木隆介)	
マイクロニューログラフィーを用いたレーザー刺激による C 受容器選択的刺激的の証明 (秋云海, 王曉宏, 乾幸二, 柿木隆介)	
二点識別の中樞機構 (田村洋平, 宝珠山稔, 乾幸二, 柿木隆介)	
Gating of somatosensory evoked magnetic fields during the preparatory period of self-initiated finger movement (和坂俊昭, 中田大貴, 柿木隆介, 宝珠山稔)	
随意運動に伴う痛覚関連体性感覚誘発脳磁図の変動 (中田大貴, 乾幸二, 和坂俊昭, 田村洋平, Tran TD, 秋云海, 王曉宏, Nguyen BT, 柿木隆介)	
体性感覚刺激 Go/Nogo 課題時に誘発された事象関連電位 (中田大貴, 乾幸二, 和坂俊昭, 柿木隆介, 木田哲夫, 坂本将基)	
音声刺激が情報処理されるとき視覚情報が聴覚野の活動に及ぼす影響：脳磁図による検討 (三木研作, 渡辺昌子, 柿木隆介)	
脳磁図と脳波を用いた母国語および外国語の脳内処理の研究 (尾島司郎, 中田大貴, 柿木隆介)	
生体システム研究部門.....	36
概 要	
脳深部刺激療法の作用機序に関する研究 (南部 篤, 橘 吉寿, 高田昌彦, 喜多 均)	
糖代謝 PET による二足歩行運動に関与する脳部位の同定 (森 大志, 中岡克己, 塚田秀夫, 森 茂美)	
大脳皮質運動野の直立二足歩行運動に関わる機能的意義の同定 (森 大志, 南部 篤, 中岡克己, 稲瀬正彦, 森 茂美)	

上肢到達運動課題実行中の線条体ニューロンの活動様式を解明する

(畑中伸彦, 橘 吉寿, 南部 篤)

顎運動に関わる多シナプス性神経回路の同定

(畑中伸彦, 橘 吉寿, 南部 篤, 宮地重弘, 高田昌彦)

パーキンソン病における淡蒼球代謝調節型グルタミン酸受容体の動作様式

(橘 吉寿, 南部 篤, 金田勝幸, 高田昌彦)

大脳皮質機能研究系

脳形態解析研究部門..... 39

概 要

グルタミン酸受容体の定量的解析

(田中淳一, 足澤悦子, 初山明子, 深澤有吾, 馬杉美和子, 重本隆一)

神経伝達物質放出関連蛋白質の局在

(萩原 明, 深澤有吾, 重本隆一)

海馬における長期増強現象とグルタミン酸受容体の密度変化

(深澤有吾, 重本隆一)

海馬 NMDA 受容体局在の左右差

(篠原良章, Wu Yue, 重本隆一)

GABAB 受容体やイオンチャネルの脳内局在と機能解析

(Akos Kulik, 萩原明, 深澤有吾, 重本隆一)

前脳基底核と黒質-線条体ドーパミン系の電気生理学的および形態学的解析

(初山俊彦)

大脳神経回路論研究部門..... 41

概 要

大脳皮質ダブルブーケ細胞のシナプス出力特性

(窪田 芳之, 川口 泰雄)

ラット前頭皮質における高頻度発火型介在神経細胞と線条体投射錐体細胞の神経結合

(根東 寛, 川口 泰雄)

皮質介在ニューロンの軸索・シナプスブトンの表現型

(荏部冬紀, 川口泰雄)

心理生理学研究部門..... 42

概 要

視覚脱失による脳の可塑的变化

(定藤 規弘)

正常成人における視覚触覚統合（形状弁別）に関与する神経活動の解析

(斎藤大輔, 定藤 規弘)

正常成人における視覚聴覚統合（特に口唇と音声）に関与する神経活動

(定藤 規弘)

発達期における聴覚脱失による可塑的变化

(定藤 規弘)

自閉症の認知機能解明のための研究

(山本幸子, 定藤規弘, 神尾陽子, 平谷美智夫 河村佳保里)

聴覚-視覚刺激対連合学習における脳活動変化

(田邊 宏樹, 定藤 規弘)

視覚刺激に対する NIR-fMRI 同時計測

(豊田浩士, 定藤規弘, 柏倉健一, 笠松眞吾, 岡沢秀彦, 藤林靖久, 米倉義晴)

前補足運動野が言語情報処理に果たす機能的有意性の検討

(本田 学, 田中 悟志)

超可聴域超高周波成分の増強による行動制御の検討

(本田 学, 八木玲子, 仁科 エミ, 大橋 力)

乗法型変調非線形自己回帰モデルをもちいた大脳皮質-筋肉間機能連関の検討

(本田 学, 加藤比呂子)

両手協調運動における相転移現象に関わる神経基盤

(荒牧勇, 定藤規弘)

発達生理学研究系

認知行動発達機構研究部門..... 48

概 要

脊髄レベルでの皮質脊髄路損傷後の手指の巧緻運動の機能代償機構

(西村幸男, 伊佐正, 尾上浩隆, 塚田秀夫)

サル上丘へのニコチン局所注入がサッケードに与える効果の解析

(渡邊雅之, 伊佐正, 小林康)

サルを用いた盲視 (blindsight) の神経機構の解明

(吉田 正俊, 伊佐正)

サルにおける上丘局所神経回路の解析

(Nikolay Nikitin, 加藤利佳子, 伊佐正)

マウスの上丘電気刺激により誘発されるサッケード運動とその制御の分子機構

(坂谷 智也, 伊佐 正)

上丘出力ニューロンの樹状突起での活動電位生成とその Ih による制御

(遠藤利朗, 伊佐 正)

ニコチン型アセチルコリン受容体 (nAChR) による GABA 性神経伝達の修飾

(遠藤利朗, 伊佐 正)

ラット上丘中間層に対するコリン作動性入力 of シナプス後作用

(Thongchai Sooksawate, 伊佐 正)

ラット上丘中間層における GABA 作動性シナプス伝達に対するムスカリン受容体の

活性化によるシナプス前抑制

(李鳳霞, 遠藤利朗, 伊佐 正)

随意運動の制御における脊髄介在ニューロンの役割

(関 和彦, 武井 智彦, 高橋 伸明)

生体恒常機能発達機構研究部門..... 52

概 要

発達期における神経伝達物質のスイッチング

(鍋倉淳一, 石橋仁, 神野尚三, 松原篤)

細胞内 Cl⁻制御機構 KCC2 による GABA の興奮-抑制スイッチと分子機構の解明

(鍋倉淳一, 張 一成, 福田敦夫)

BDNF による大脳皮質細胞における GABA 受容体の 細胞内動態と分子機構

(鍋倉淳一, 溝口義人, 平田雅人, 兼松 隆)

生殖・内分泌系発達機構..... 53

概 要

AMP キナーゼによる生体エネルギー代謝の調節機構

(箕越 靖彦)

レプチン, 神経ペプチドによる糖・脂質代謝調節機構の解明
(箕越 靖彦)

環境適応機能発達研究部門..... 54

概 要

フェロモン記憶の保持に関連した相反性シナプスの再編成

(松岡勝人, 車田正男, 梶 秀人, Richard Costanzo, 守屋敬子, 吉田一松岡淳子, 市川真澄)

フェロモン記憶の電気生理学的相関

(黄 光哲, 梶 秀人)

共培養下における副嗅球ニューロン-鋤鼻ニューロン間の機能的シナプス形成

(村本和世, 黄 光哲, 谷口睦男, 梶 秀人)

幼若ラットにおける匂い学習と LTP との相関

(張 敬姫, 奥谷文乃, 黄 光哲, 梶 秀人)

脳機能計測センター

形態情報解析室..... 57

概 要

小脳プルキニエ細胞のゴルジ染色と免疫染色の比較

(山口 登, 古家 園子, 有井 達夫)

メカノセンサーとしての小腸絨毛上皮下線維芽細胞

(古家園子, 古家喜四夫)

機能情報解析室..... 58

概 要

意志に関係する脳活動の研究

(達本 徹)

生体情報処理室..... 59

概 要

樹状突起における活動電位の発生とその制御メカニズム

(坪川 宏)

細胞内シグナル伝達系の活性とニューロン活動との時間的・空間的關係の解析

(坪川 宏)

中枢ニューロンにおける活動依存的な形態変化のメカニズムの解析

(河村吉信, 高木佐知子, 坪川 宏)

脱分極時における神経細胞内のナトリウムイオン挙動の計測

(酒谷誠一, 毛利達磨, 坪川 宏)

脳機能分子解析室..... 61

概 要

ラットテロメラーゼ遺伝子 (rTERT) を高発現するトランスジェニック (Tg) ラットの作製

(平林真澄, 金子涼輔)

ラット卵母細胞の活性化方法が円形精子細胞注入 (ROSI) 後の産仔率に及ぼす影響

(平林真澄, 保地眞一)

統合バイオサイエンスセンター

時系列生命現象研究領域..... 63

概 要

中枢神経細胞の自発発火を規定する電位依存性 Nav チャンネル Nav1.6 の持続性電流の制御機構 (岩崎広英, 岡村康司, 高木正浩, 白幡恵美, 早坂 清)	
尾索動物ユウレイボヤゲノムからのイオンチャネル関連分子遺伝子の網羅的解析 (岩崎広英, 村田喜理, 森 泰生, 岡田泰伸, 高橋信之, 中條浩一, 佐藤矩行, 佐藤ゆたか)	
哺乳類脊髄リズム形成の神経回路の発達機構 (中山希世美)	
新規電位センサー分子のゲート電流解析 (岩崎広英, 村田喜理, 佐々木真理)	
筋細胞機能発達における電位依存性 Ca チャンネルの役割 (中條浩一, 大塚幸雄)	
電位センサーの支配を離れた電位依存性 K チャンネルの開閉 (久木田文夫)	
戦略的方法論研究領域.....	65
概 要	
位相差電子顕微鏡の改良 (Radostin Danev, 杉谷正三, 永山國昭)	
位相板用炭素薄膜の材料科学的研究 (Dorian Minkov, Radostin Danev, 伊藤俊幸, 大河原 浩, 永山國昭, 宇理須恆雄)	
DNA/RNA 塩基配列の電子顕微鏡 1 分子計測法の開発 (Krassimir Tachev, 高橋佳子, 伊藤俊幸, 大河原 浩, 永山國昭, 片岡正典, 田坂基行)	
灌流ラット顎下腺における傍細胞輸送経路 -唾液糖から血糖を推定する試み- (村上政隆, 篠塚直樹, 中村健治, 桜井 健, 杉谷博士, 古山俊介)	
灌流ラット顎下腺における水分調節機構 (村上政隆, 大河原浩, 細井和雄, KwartariniMurdiastuti, Bruria Sachar-Hill, Adrian E. Hill)	
灌流ラット顎下腺の細胞間分泌細管の分泌時形態変化 (村上政隆, 前橋 寛, Alessandro Riva, Felice Loffredo, Francesca Testa-Riva)	
単粒子解析による膜タンパク質 TRPM2 の立体構造解析 (松本友治, 永山國昭, 原 雄二, 森 泰生)	
エンドサイトーシス選別輸送のメカニズムの解析 (大橋正人)	
生命環境研究領域.....	69
概 要	
酸化修飾により活性化する Ca^{2+} 透過性カチオンチャネルのメカニズム解析 (吉田卓史, 原 雄二, 西田基宏, 森泰生)	
免疫 B 細胞における Ca^{2+} シグナル増幅機構 (西田基宏, 清中茂樹, 沼賀拓郎, 森泰生)	
細胞内蛋白質の活動の可視化を目指した蛍光性バイオセンサーの構築 (清中茂樹, 西田基宏, 森 泰生)	
細胞内酸化還元状態の変化により活性化されるチャネル TRPM2 の分子機能解析 (原 雄二, 森 泰生)	
多点細胞電位記録法を用いたてんかんモデルマウス海馬の神経ネットワーク活動の解析 (三木崇史, 下野 健, 清中茂樹, 森 泰生)	
動物実験センター.....	72
概 要	

計算科学研究センター 74

概 要

核酸塩基識別子の設計と合成

(片岡正典, 永山國昭)

ユニバーサル核酸の創成

(片岡正典)

動的速度論分割によるリン酸トリエステルの立体選択的合成

(片岡正典)

技術科 76

1. 概 要

(大庭 明生)

2. 施設の運営状況

①生体磁気計測装置室

(永田 治, 竹島康行)

②脳機能計測センター

(1) 形態情報解析室

(山口 登)

(2) 機能情報解析室

(佐藤茂基)

(3) 生体情報処理室

(吉村伸明, 村田安永)

③動物実験センター

(佐治俊幸, 小木曾 昇, 廣江猛, 鈴木千香)

④共通研究施設

(1) 電子顕微鏡室

(前橋 寛)

(2) 機器研究試作室

(加藤勝己)

分子生理研究系

神経化学研究部門

【概要】

前年に続いて、脳機能を分子レベルで理解することを目指して、特に抑制性神経回路に着目し、特異的に発現する遺伝子の cDNA クローニング、遺伝子改変マウスの作成、解析を行った。

また、新しいスタッフの着任により、イオンチャネル・受容体等の神経細胞の機能素子の構造と機能に関する研究、ミトコンドリア分裂を引き起こす新規高分子量 G 蛋白質の細胞内動態に関する研究を開始した。

グリシン・トランスポーター2 の遺伝子構造と選択的スプライシング

柳川右千夫，海老原利枝，山本友美，小幡邦彦（理化学研究所）

グリシン・トランスポーター 2 (GLYT2) は、中枢神経系ではグリシン作動性ニューロンに特異的に発現し、グリシン作動性シナプスにおける神経伝達の終了に関与する。マウス GLYT2 の発現調節機構を明らかにする目的で遺伝子解析を行った結果、全長が 55 kb 以上で 18 個のエクソンから構成されていた。また、マウス脳幹と小脳の mRNA を用いて 5'-RACE 法で解析した結果、3 種類の

アイソフォーム (GLYT2a, GLYT2b, GLYT2c) を検出した。いずれも 1 遺伝子からの選択的スプライシングを受けており、マウス GLYT2b とマウス GLYT2c の両分子とも、マウス GLYT2a より N 末端で 8 アミノ酸少ないことが予測された。これらの結果は、(1) GLYT2 ノックアウトマウス作成、(2) グリシン作動性ニューロンを GFP など標識する遺伝子改変マウス作成の上で重要な情報となる。

小胞型 GABA トランスポーターのノックアウトマウスの作成

柳川右千夫，海老原利枝，有田早苗，上松正和

小胞型 GABA トランスポーター (VGAT) は、GABA をシナプス小胞に蓄積させる。脳高次機能における VGAT の役割を明らかにする目的で、誘導型 VGAT ノックアウトマウスの作成を目指した。最初に、VGAT 遺伝子のイントロン 1 およびエクソン 3 の 3' 側に loxP 配列を配置し、Cre Recombinase 活性のある細胞で VGAT 分子の機能を完全に破壊できるようにターゲティングベクターを構築した。このターゲティングベクターを ES 細胞

に導入し、Southern 法で相同組み換えのおこった 11 個の ES クローンを同定した。この ES クローンを blastocyst に導入することでキメラマウスを作成した。今後、交配を重ねることにより、VGAT ノックアウトマウスを得る。そして、VGAT ノックアウトマウスについて、野生型マウスあるいは GAD ノックアウトマウスと行動解析などについて比較解析する。

GAD65 ノックアウトマウスを用いた味覚情報処理における GABA の役割

柳川右千夫, 志村剛 (大阪大学大学院人間科学研究科), 山本隆 (大阪大学大学院人間科学研究科)

味覚情報処理における GABA の役割を明らかにする目的で, GAD65 ノックアウトマウスを解析した。基本味, 混合味に対する嗜好性について, ニビン法により GAD65 ノックアウトマウスと野生型マウスとを比較検討した。四基本味に対する嗜好性では, 両群に有意の差は認められなかった。しかし, ショ糖と塩酸キニーネの混合味に

対する嗜好性では, GAD65 ノックアウトマウスで溶液摂取量の低下が観察された。また, 野生型マウスで観察されるミダゾラム投与後のショ糖摂取量の増加が, GAD65 ノックアウトマウスでみられなかった。これらの結果は, 混合味のような複雑な味の情報処理に GABA が関与していることを示唆した。

イオンチャネル・受容体の構造機能連関, 機能調節に関する研究

立山充博, 三坂巧, 中條浩一, 藤原祐一郎, 長友克広, 山本友美, 久保義弘

イオンチャネル, 受容体, G 蛋白質等の膜関連蛋白は, 神経細胞の興奮性とその調節に重要な役割を果たし, 脳機能を支えている。我々は, これらの神経機能素子を対象として, 生物物理学の興味から「その精妙な分子機能のメカニズムと動的構造機能連関についての研究」に取り組み, また, 神経科学的興味から「各素子の持つ特性の脳神経系における機能的意義を知るための個体・スライスレベルでの研究」を目指している。具体的には, 分

子生物学的手法により, 神経機能素子の遺伝子の単離, 変異体の作成, tag の付加等を行い, 卵母細胞, HEK293 細胞等の遺伝子発現系に再構成し, パッチクランプ等の電気生理学的手法, 細胞内 Ca^{2+} イメージング・全反射照明下での FRET 計測等の光生理学的手法, 細胞生物学的研究手法により, その分子機能を解析している。本年度は, 本格的な研究の開始に向けて, 研究室の整備と立ち上げを行った。

ミトコンドリア分裂を引き起こす新規高分子量 G 蛋白質の細胞内動態に関する研究

三坂巧, 久保義弘

我々は, これまでに, ミトコンドリアに局在する新規高分子量 GTP 蛋白質をコードする cDNA をサケ科魚類脳そして, マウス脳より単離した。後に, 他グループより, ヒトの相同遺伝子の点変異が遺伝性視神経萎縮 (optic atrophy) の病因であることが報告されたため, マウスの遺伝子を mOPA1 と名付けた。mOPA1 蛋白の細胞内局在とその動態について, 作成した特異抗体と種々のミトコンドリアマーカーを用いて解析した。その結果, COS 細胞において, この遺伝子を過剰発現させるとミトコン

ドリアの分裂を引き起こすこと, 分裂したミトコンドリアにおいては, ひだ状の構造が失われ, 内外膜間部分が, 片隅に押しやられている像を示すこと, そして mOPA1 蛋白は偏在した内外膜間に局在することが観察された。さらに, GTP 結合能を失った変異体の機能解析により, ミトコンドリア分裂能自体は GTP 結合に依存しないこと, 膜間部分の偏在には GTP 結合能が関与していることが明らかになった。

分子神経生理研究部門

【概要】

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

えられてきたグリア細胞（アストロサイト、オリゴデンドロサイト）にも性質の異なる集団が数多く存在することも明らかとなってきた。そのため、他の多くの細胞種や組織の分化研究とは異なり、細胞株や脳細胞の分散培養系を用いた研究ではその本質に迫るには限界がある。われわれは *in vitro* で得られた結果を絶えず *in vivo* に戻して解析するだけでなく、神経系の細胞系譜の解析や移動様式の解析をも精力的に行っている。

近年、成人脳内にも神経幹細胞が存在し、神経細胞を再生する能力を有することが明らかとなった。この成人における神経幹細胞数の維持機構についても研究を開始した。糖蛋白質糖鎖の解析法を開発し、その生理学的意義について検討している。ヒト正常脳においてはその発現パターンが個人間で驚くほど一定に保たれており、現在考えられているより、もっと重要な役割を果たしていると思われる。事実各種神経変性疾患においてその発現パターンが変化していた。また、癌の転移にも糖蛋白質糖鎖が関与していることを示唆するデータも得ているので、病態時における糖鎖異常に着目して研究している。

時期特異的遺伝子組み換え法を用いたオリゴデンドロサイトの系譜解析

竹林浩秀, 政平訓貴, 古性美紀, 渡辺啓介, 小野勝彦, 池中一裕

オリゴデンドロサイトは中枢神経系においてミエリンを形成し、跳躍伝導を可能にするグリア細胞である。オリゴデンドロサイトは、胎生期脊髄においてはその腹側部にある pMN ドメインと呼ばれる限局した部位に由来する。この pMN ドメインからは運動ニューロンも発生してくることから、両者の発生には共通の前駆細胞が関与していることが予想されていた。竹林らによりオリゴデンドロサイト特異的な転写因子として *Olig2* が同定され、機能獲得実験および機能喪失実験から、*Olig2* がオリゴデンドロサイトと運動ニューロンの両者の発生に必須の遺伝子であることが明らかにされた。

我々はさらに *Olig2* の機能を詳細に解析するため、時期特異的な遺伝子組み換え法である *CreERTM/loxP* システムを確立した。*CreERTM* はエストロゲン拮抗薬である

タモキシフェンの存在下でのみ活性化し、遺伝子組み換えを起こす。我々は機能喪失実験の際、すでに *Olig2* 遺伝子座に *CreERTM* 遺伝子をノックインしたマウスを作成しており、このマウスを *Cre* 依存的な組み換えにより *lacZ* 遺伝子を発現するマウスと掛け合わせて、ダブルトランスジェニックマウスを作成した。*Olig2* の発現が始まる胎生 9.5 日に、タモキシフェンを投与し胎生期 18.5 日での *lacZ* 陽性細胞の細胞種を調べた。その結果、胎生 9.5 日に *Olig2* を発現している細胞からは、オリゴデンドロサイトと運動ニューロンだけではなく、アストロサイトや上皮下細胞も発生してくる可能性を見出した。我々はさらに、タモキシフェンの投与時期によって発生してくる細胞種が異なるのかどうか、また、成体での長期的な細胞系譜の追跡を行っている。

オリゴデンドロサイト前駆細胞の移動制御機構の解析

小野勝彦, 渡辺啓介, 池中一裕

中枢神経系の機能は、多くの神経細胞やグリア細胞が正確に神経回路を形成することによって成り立っている。そのため複雑な神経回路が形成される発生期において、適切な神経軸索の伸長や細胞の移動はガイダンス分子と呼ばれる拡散性または細胞表面上の分子によって厳密に制御されている。

中枢神経系でミエリンを形成するオリゴデンドロサイトの前駆細胞 (OPC) は腹側に限局した部位に出現し、その後長い距離を移動し神経系全体に広がる。我々はこの移動に関わる分子として、拡散性のガイダンス分子であるネトリンに注目している。ニワトリ胚視神経において、ネトリンが OPC の発生部位である第三脳室腹側部、視神経耳側に強く発現すること、さらにそのレセプター

が OPC の出現部位で OPC と同局在することを示した。この結果はネトリンが OPC の移動に対して反発的に作用することを強く示唆するものである。

この結果に加え、我々のネトリンノックアウトマウスの解析によって、ネトリンが発生期の脊髄での背腹軸のドメイン構造の形成に関わることが明らかとなった。この結果は、ネトリンが軸索や細胞をガイダンスする機能だけではなく、神経細胞とグリア細胞の分化に関わる可能性を示唆するものである。そこで現在は、OPC の移動に対するネトリンのガイダンス作用のみでなく、さらにパターン形成などネトリンの広範な機能について解析を進めている。

bHLH 型転写制御因子 Olig3 の機能解析

丁雷, 竹林浩秀, 小野勝彦, 池中一裕

Olig 遺伝子は bHLH 型転写調節因子で、これまでに 3 種類が同定されている。このうち、Olig1 と Olig2 は、オリゴデンドロサイトや運動ニューロンの分化に重要な作用をすることが明らかにされた。一方、Olig3 は当部門の竹林によって同定され、脊髄や間脳での発現が報告されている。しかし、その機能は全く不明のままである。Olig3 の機能を明らかにするため、Olig3-lacZ ノックインマウスを作製した。しかし、Olig3 欠損マウスは胎生早期に致死を示した。一方、このノックインマウスの組織を X-gal 染色することにより、Olig3 発現細胞を短期的に追跡しそ

の系譜の解析を行なうことが可能となった。脊髄や後脳では、それらの領域の最背側部の細胞から Olig3 の発現が始まることが、in situ hybridization や免疫組織化学染色により示されていた。さらにノックインマウス脊髄を X-gal 染色することにより、最背側部の細胞がニューロンに分化し脊髄の腹側部まで移動することが強く示唆された。脊髄では、このようなダイナミックな細胞の移動はこれまで報告されていなかった。今後は、マーカーの導入やスライス培養により、この細胞移動とその動態をより詳細に解析していく。

モデルマウスを用いた脱髄の病態解明

田中久貴, 松本路夫, 東幹人, 馬堅妹, 山田元, 田中謙二, 竹林浩秀, 等誠司, 池中一裕

当研究室ではすでに脱髄モデルマウスである PLP トランスジェニックマウス (PLPTg) を作製し、報告している。このマウスは 2 ヶ月齢までにすでに一度髄鞘がほぼ正常

に形成され、Na⁺ チャンネルはランビエ絞輪に、K⁺ チャンネルは juxstaparanode にそれぞれクラスタリングする。5 ヶ月齢頃から脱髄が始まり、K⁺ チャンネルのクラスタ

リングが崩れはじめる。そして 8 ヶ月齢までに Na⁺ チャネルのクラスタリングも崩壊していくことを明らかにした。脱髄が生じる理由について検討するために中枢神経系でミエリンを形成する細胞であるオリゴデンドロサイト前駆細胞の存在を調べたところ、野生型マウスの白質よりも数多く前駆細胞が存在していることが明らかとなった。現在、この前駆細胞がなぜ分化しないか検討中である。イオンチャネルクラスタリングの変化と跳躍伝導の相関を調べるために、In vivo での中枢神経系（後索路、前庭・網様体脊髄路、錐体路）の伝導速度及び不応期の解析を行う実験系を確立した。この実験系による解析から、野生型に比べ PLPTg では、髄鞘がほぼ正常な 2 ヶ月齢において、著明な伝導速度の低下と相対不応期の延長を認めた。マイクロアレーを用いて、野生型と PLPTg での遺伝子発現の差を解析し、これらの現象の原因について探索を進めている。神経幹細胞は自己複製能と神経系の多分化能を持つ未分化な細胞である。脳の発生期に神経系の細胞を産出して脳の構築を司るだけでなく、正常の成体の脳においても特定の領域に存在し続け、神経新生を行っている。最近になって、成体の脳内に存在している内在性の神経幹細胞が、適切な誘導によって活性化されて脳の損傷を修復するという報告などから、中枢神経疾患に対する成体神経幹細胞の有用性は極めて高いことが示唆される。また自己複製能と多分化能を有する

この神経幹細胞の選択的培養法として、neurosphere assay が確立されている。この方法は、脳室周囲組織から採取した細胞を、成長因子を含む無血清培地で培養することで、球状の細胞塊 neurosphere として神経幹細胞を培養、増殖させる方法である。Neurosphere は継代する事で再び細胞塊を形成し、また増殖因子を除いた状態で培養皿に接着させると、神経細胞・アストロサイト・オリゴデンドロサイトの 3 種類の細胞を作り出すことが可能である。多発性硬化症を代表とするヒトの脱髄性疾患は、神経軸索を覆って保護するとともに跳躍伝導を可能にしている髄鞘が破壊され、迅速な神経伝達が失われる病態である。我々は、上述の脱髄モデルマウスを用いて、脱髄病態における神経幹細胞の動態と、神経幹細胞移植による再ミエリン形成のメカニズムの解明を行っている。この際、移植した神経幹細胞からオリゴデンドロサイトへの分化の動態を追うために、成熟したオリゴデンドロサイトで発現するプロモーター配列の下流に LacZ レポーター遺伝子をもつマウスから神経幹細胞を調製し、脱髄モデル動物にこのレポーター遺伝子を持つ神経幹細胞の移植を行っている。この結果、移植した神経幹細胞は脳内に生着し、成熟したオリゴデンドロサイトへの分化が認められた。今後、neurosphere assay と移植法をより詳細に検討していき、病態での神経幹細胞の動態を解明していく予定である。

アストロサイトの分化、発生様式に関する研究

小川泰弘，成瀬雅衣，竹林浩秀，等誠司，池中一裕

我々は米国コネチカットヘルスセンター大学の Matt Rasband と共同研究を行い、アストロサイトを認識する多数の新規モノクローナル抗体を用いてアストロサイトの発生段階における多様性について検討を行った。その結果、発生期のマウス脊髄において、アストロサイト前駆細胞においても神経細胞と同様にドメイン構造に対応した多様性が存在することが示唆された。特に胎生期 12.5 日齢マウス脊髄においては、それぞれ腹側／背側の転写因子である Pax6／Pax7 の発現ドメインに対し GLAST および ephrin-B1 が相補的に発現することが示された。これらを発現する細胞はアストロサイト前駆細胞であることから、前駆細胞での多様性が、その後のアス

トロサイトの分化に影響を与えることが示唆される。

中枢神経系発生過程において、神経幹細胞はまず神経細胞を産生し、その後グリア細胞を産生する。神経幹細胞/神経前駆細胞からアストロサイト・オリゴデンドロサイトへの運命決定の機構に関しては、不明な点が多い。われわれはプロテアーゼインヒビターであるシスタチン C に着目して研究をおこなってきた。シスタチン C は、アストロサイトの発生・分化を制御する因子として当研究室で独自に単離された因子である。遺伝子発現解析により、シスタチン C はグリア細胞の発生する時期に脳室層周囲に産生されることが明らかになった。さらに、シスタチン C は、胎児期の神経幹細胞の増殖、生存に促進

的に作用する機能を持つこと、アストロサイトの分化を促進し、オリゴデンドロサイトの分化を抑制する機能を有することが培養系において示された。以上の点からシスタチンCがアストロサイトの発生を制御する因子の一

つである可能性、またアストロサイトの発生は、オリゴデンドロサイトの発生とも密接に関わっている可能性が示唆された。

アストロサイト機能不全モデルマウスの開発

田中謙二, 竹林浩秀, 池前一裕

アストロサイトの新しい機能が *in vitro* で次々に明らかにされている。しかし、発見された機能が、脳活動にどのような貢献をしているのか分かっていない。脳活動の評価は個体を用いた解析、すなわち *in vivo* の解析が必要になる。そこで我々は、Cre-loxP システムを応用した領域特異的なアストロサイト操作可能なモデルマウスの開発に着手した。マウス GFAP プロモーターの制御下で EGFP を発現するが、Cre 組換え酵素が発現する領域のアストロサイトに限ってヒト変異 GFAP (致死性神経疾患

である Alexander 病の原因遺伝子であり、これまで報告されている変異の中で最重症のもの選択した) を発現するコンストラクトを持つトランスジェニックマウスである。対照には Cre による組換え後にヒト野生型 GFAP を発現するマウスを作出した。ファウンダーマウスを変異型、野生型それぞれで 10 ライン以上作出する事が出来た。すべてのラインでアストロサイトに EGFP を発現することが確認できた。

神経幹細胞の発生

等誠司, 東幹人, 成瀬雅衣, 池前一裕

胚性幹細胞 (ES 細胞) は万能細胞とも呼ばれ、我々の体を形成する全ての細胞に分化する能力を秘めると考えられている。近年、病気やケガで損傷した組織を、外から手を加えて再生させるという、再生医学が注目を浴びており、その材料の有力候補として ES 細胞を用いた研究が進められている。神経組織、中でも中枢神経系は神経細胞の多様さや構造の複雑さのゆえ、特に再生が困難な組織と考えられる。これまでに、ES 細胞から神経細胞を分化誘導できることは示されていたが、我々は全く新しい方法を用い、ES 細胞から神経幹細胞 (さらに分化させて神経細胞やグリア細胞も) を作成する技術を確立した。脳に存在する神経幹細胞に比べて、より高い多分

化能を示すことから、未分化神経幹細胞と呼んでいる。

未分化神経幹細胞は、発生初期の胚の中にも存在する。マウス胎生 5.5-7.5 日胚の *epiblast/neurectoderm* を *leukemia inhibitory factor* 存在下で培養することにより、浮遊細胞塊を形成することで未分化神経幹細胞を検出できることを報告した。未分化神経幹細胞は *in vitro* で神経幹細胞へと分化させることができ、この過程に Notch シグナルの活性化が必須であることを解明した。今後は、未分化神経幹細胞から神経幹細胞への *in vitro* 分化系を利用し、神経幹細胞の発生・分化に関わる因子の同定や、それに付随する領域特異性の獲得の分子機構を解明していく予定である。

脳の発生と糖鎖

石井章寛，等誠司，Stephen Pfeiffer，池一中裕

すべての細胞表面はタンパク質あるいは脂質を介して糖鎖で覆われており，これらの細胞表面糖鎖は，細胞間相互作用やシグナル伝達に深く関わっていると考えられている。これまでに我々は2種類の分析系-糖鎖構造解析系，糖鎖修飾遺伝子の網羅的解析系-を構築した。糖鎖構造の解析は，順相カラム・逆相カラムおよび陰イオン交換カラムを用いる3次元 HPLC システムで行い，細胞あるいは組織に発現する糖タンパク質のN-結合型糖鎖をすべて同定できるようになった。この結果，(1)マウス，ヒト脳内に発現する糖鎖の割合は高い類似性示すこと，(2)脳内糖鎖発現パターンは個体発生の各時期で劇的に変化することから，脳の構築と発現糖鎖に密接な関係があると推察された。遺伝子発現解析は，マクロアレイ解析システムを用い，120以上の糖鎖生合成/分解酵素遺伝子群の発現変化を網羅的に解析できるようになった。その結果，神経変性疾患，細胞の分化などに伴う糖鎖パターンの変化を遺伝子発現レベルでも理解できるようにな

った。

我々はこれらの手法を用いてさまざまな研究を行っている。例えば，髄鞘における糖鎖の意義を解明するために，髄鞘形成時および形成前後の正常マウスからスクローグラジエント法を用いて髄鞘を抽出し，糖鎖の発現解析を行った。その結果，全脳に比べて髄鞘に増加あるいは減少する糖鎖構造がある事が分かった。現在，増減のある糖鎖が髄鞘の形成に伴って変化するか検討しており髄鞘形成と糖鎖発現の関係を明らかにできると期待できる。さらに，脱髄と糖鎖発現の関係を明らかにするために脱髄モデルマウスである PLP transgenic マウスから同様の手法を用いて髄鞘を精製し，発現糖鎖の比較を行う事できるか検討している。また，糖鎖を指標とした神経幹細胞の単離法を確立するために，未分化状態あるいは分化させた神経幹細胞の糖鎖パターンを解析し，神経細胞・グリア細胞の運命決定や領域特異性付与に関わる糖鎖の同定を進めている。

糖蛋白質糖鎖解析方法の改良

田辺和弘，池一中裕

ヒドラジン分解法，および2-アミノピリジン標識法は，組織に発現するN結合型糖鎖の定性および定量において有効な分析手段である。しかしながらこれらは煩雑な作業が伴う他，多くの時間を要することが欠点であり，多検体を処理する場合においてこれらは無視できない要因であった。われわれはこれらの問題を解決するために，ヒドラジン分解の後処理工程のハイスループット化と，2次元マッピング法の自動化に着手した。「ICA」と名付けたカラム内でのヒドラジン除去とN-アセチル化の一括

処理を行う方法を用いると，従来の方法に比べて著しく後処理工程を短縮することができ，さらに糖鎖回収率も従来法に比べ改善させることができた。また2次元 LC ではイオン交換カラムを順相 HPLC と逆相 HPLC の間に挿入することにより，試料(糖鎖)を保持したまま，順相から逆相溶媒に置換することができ，これまで困難とされてきた順相 HPLC と逆相 HPLC の接続を可能とした。ICAと2D-HPLC法により，糖鎖解析に要する労力は大幅に軽減され，多検体同時処理が可能とした。

新規癌遺伝子の発現様式に関する研究

中島弘文, 小野勝彦, 池田一裕

我々の研究室は、消化器癌の発生に orphan receptor の一つである G-protein coupled receptor 35 (GPR35) が関与している可能性について報告している。

このGPR35の遺伝子発現形式について、正常消化管粘膜・胃癌・大腸癌を中心に検討してきたところ、正常胃粘膜には発現が弱い細胞分裂帯には発現が認められる

事、胃粘膜の腸上皮化生部に高発現していること、分化型胃癌においても高発現している事より、胃癌発生において何らかの役割を担っている事が類推されている。

現在、この分化型胃癌発生における GPR35 の生理学的機能を解析する準備をすすめている。

細胞内代謝研究部門

【概要】

細胞内代謝部門では従来、生物活性物質や細胞-細胞間刺激に対する細胞の刺激受容機構、細胞内情報伝達機構、細胞機能発現機構を研究対象としてきた。特に受精時の Ca^{2+} 増加や Ca^{2+} 振動機構の研究を通して受精機構、卵成熟機構の研究を行ってきた。毛利、吉田らはマウス卵母細胞の自発的 Ca^{2+} 振動機構、内分泌攪乱物質 (エストロゲン) の卵母細胞への影響について研究を行った。本年 2003 年 4 月より曾我部正博 (名大・大学院・医) が

客員教授として着任し、11 月より平田宏聡研究員が加わったことにより、研究内容も増大した。すなわち、電気生理学や先端バイオイメージングを用いて、イオンチャンネルや細胞内シグナル分子の動態を測定し、細胞応答に至るシグナルネットワークの時空間的統御機構の解明を目指している。特に機械刺激に対する細胞シグナリング機構の研究を展開しはじめた。

未成熟卵母細胞の Ca^{2+} 振動に対するエストロゲンの作用

毛利達磨

吉田 繁 (近畿大学・理工学部・生命科学科)

卵巣から取出したマウス未成熟卵母細胞 (以下卵母細胞) も自発的カルシウム振動をしている。卵母細胞は卵巣内でも、カルシウム振動をしており各種ホルモンの制御を受けて成熟すると考えられる。しかし、代表的なホルモンであるエストロゲンと卵母細胞発達との関係は不明である。エストロゲンやエストロゲン様内分泌攪乱物質によるカルシウム振動に及ぼす作用を調べるために、マウス卵巣から採取した卵母細胞をカルシウム蛍光色素

Fura-2 で染色し、顕微鏡下で自発的カルシウム振動を測定し、明視野での同時形態変化解析を行った。その結果、1) 単離卵母細胞だけでなくスライスした卵巣内でも卵母細胞は自発的カルシウム振動を示した。2) エストロゲンの代表である E_2 (17β -estradiol), 細胞膜を通過しない E_2 -BSA でも、はカルシウム振動を抑制するだけでなく、振動パターンも乱すことがわかった。

F-アクチン網目構造からの張力依存的なストレスファイバーの形成

平田 宏聡

曾我部 正博

内皮細胞や繊維芽細胞ではミオシンを含んだF-アクチンの束であるストレスファイバーが形成される。ストレスファイバーは細胞内外の力学環境の変化に応じて解消・再構成されることから、細胞内における力学トランスデューサーとして機能している可能性がある。しかし、その形成・解消の分子機構は不明である。Rho kinase 阻害剤によりストレスファイバーを解消させた繊維芽細胞から作製したセミインタクト細胞を用い、ストレスファ

イバー形成の分子機構を調べた。その結果、セミインタクト細胞において、編目状のF-アクチンがミオシン II 依存的に細胞中心方向へ移動しながら束化されることが示された。またF-アクチン網目構造を細胞中心方向へ人為的に引張ることによってもF-アクチンが束化することが観察された。F-アクチン網目構造がミオシン II 依存的に引張られ、張力依存的にストレスファイバーに再編されるものと思われる。

細胞器官研究系

生体膜研究部門

【概要】

当部門では開口放出・シナプス機能につき、2 光子顕微鏡法を基軸として、分子生物学的方法論、パッチクランプ、ケイジド試薬や電子顕微鏡を組み合わせで可視化定量化する研究を推進している。膵臓ランゲルハンス島におけるインスリン開口放出様式の定量解析により、逐次開口放出の抑制されている事実が明らかとなり、副腎髓

質クラスター標本や PC12 細胞・膵外分泌標本との著しい差異が同定された。また、脳スライス標本内の中枢神経細胞において、ケイジドグルタミン酸の光活性化法により、単一シナプスレベルで刺激を与え、形態可塑性の誘発に成功している。この可塑性は長期増強と薬理学的性質が同じであることが明らかとなった。

神経、分泌細胞の開口放出機構の研究

河西 春郎, 根本 知己, 高橋 倫子, 岸本 拓也, 兒島 辰哉, 大嶋 章裕, 劉 婷婷, 畠山 裕康

2 光子励起法の深部到達性を利用して、調節性開口放出をインタクトな分泌臓器内部で定量的に可視化する方法論を確立している。従来の方法とは異なり、蛍光色素を細胞外液に添加し、この色素の分泌小胞への流入によって開口放出を検知する。本法により、膵外分泌・副腎髓質組織および PC12 細胞などでは、複数の顆粒が単一

の融合細孔を共有する複合型の開口放出によって、分泌の大半が起きている事実を見出している。他方、インスリンを分泌する膵島においては、この種の複合型開口放出が著しく抑制されている特徴をもつことが判明した。本法の同時多重染色性の併用により、開口放出現象への様々な分子の関与の調査を進めている。

2 光子励起法を用いた大脳シナプスの研究

河西 春郎, 松崎 政紀, 早川 泰之, 野口 潤, 安松 信明, 本蔵直樹

2 光子励起法をケイジドグルタミン酸に応用して、大脳皮質錐体細胞の単一の興奮性シナプス後部(スパイン)を刺激することに成功している。更に、スライスを培養して、gene gun で GFP 遺伝子を導入した標本を用いることにより、反復的なグルタミン酸投与により、スパインの頭部が増大する現象を発見した。この頭部増大現象は電気刺激でも誘発されたが、その場合にはまばらにしか起きず、刺激されたスパインで選択的に起きていることが確認できない。これに対して、2 光子励起グルタミン酸法を用いた場合には、刺激したスパイン選択的に 9 割以

上のスパインで誘発することができる。そこで、この現象の薬理学的な性質を調べた。頭部増大には持続が 20 分程度の短期相と、1 時間常時属する長期相がある。このいずれの相も NMDA 受容体の阻害剤 (APV) 及びカルモデュリンの阻害剤で完全に消失した。また、やや高濃度のアクチン重合阻害剤でも完全に消失した。これに対して、カルモデュリンキナーゼ II の阻害剤は長期相のみを選択的に阻害した。同様な阻害は低濃度のアクチン重合阻害剤でも観察された。従って、スパインの頭部増大は NMDA 受容体を介したカルシウム流入によりカルモ

デュリンが活性化されることにより、アクチン重合が起きることによって考えられた。また、長期相はカルモデュリンキナーゼ II とより精巧なアクチン重合を必要とし

ていると考えられる。この様にスパイン頭部増大の長期相の薬理学的な性質は長期増強のそれと一致した。

機能協関部門

【概要】

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

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

②「アポトーシス、ネクロシス及び虚血性細胞死の誘導メカニズム」：容積調節能の破綻は細胞死（アポトーシスやネクロシス）にも深く関与する。これらの細胞死誘導メカニズムを分子レベルで解明し、その破綻防御の方策を探索する。特に、脳神経細胞や心筋細胞の虚血性細胞死の誘導メカニズムを生理学的に解明する。

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

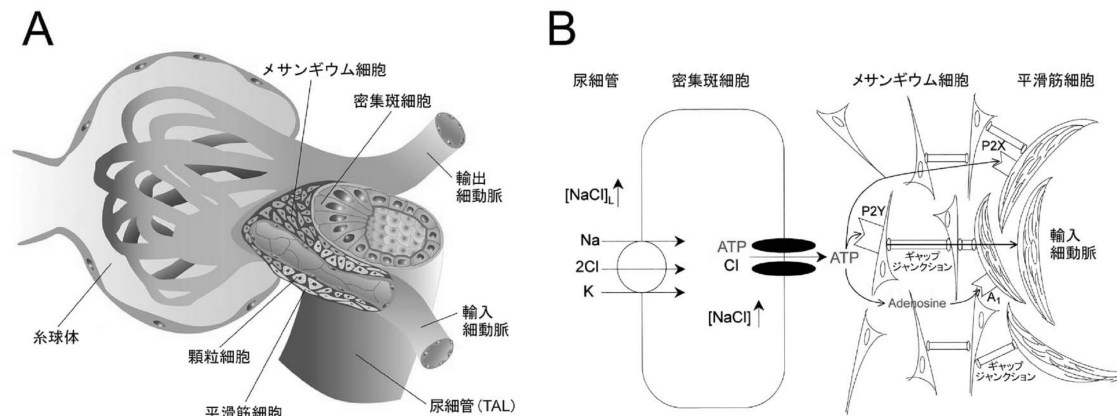
④「消化管上皮細胞の分泌・吸収メカニズム」についても研究する。

尿細管糸球体フィードバックにおける ATP 透過性アニオンチャネルと Ca^{2+} 感受性非選択性カチオンチャネルの関与

岡田泰伸, サビロブ ラブシャン

腎臓の傍糸球体装置では、マクラデンサ細胞が尿細管腔の NaCl 濃度を検知して、その情報を隣接するメザンギウム細胞から平滑筋に伝達し、糸球体に流入する動脈血流量を調節している（尿細管糸球体フィードバック）。しかし NaCl センサーやその下流のシグナルの実体については不明であった。今回、私達は尿細管腔の NaCl 濃度上昇に应答して ATP を放出するマキシアニオンチャネルがマクラデンサ細胞に存在し、放出された ATP がメザンギウム細胞に Ca^{2+} 上昇を引き起こすシグナル分子とし

て働くことを明らかにした。また、マクラデンサ細胞に Ca^{2+} 活性化型の非選択性チャネルが存在することも見出した。 Ca^{2+} 活性化型カチオンチャネルとマキシアニオンチャネルが協調的に働いて、尿細管糸球体フィードバックの中心的役割を果たしているものと考えられる。以上の結果は次の 2 つの論文に発表された (Bell, Lapointe, Sabirov, Hayashi, Peti-Peterdi, Manabe, Kovacs & Okada 2003 PNAS 100: 4322-4327; Lapointe, Bell, Sabirov & Okada 2003 Am. J. Physiol. 285: F275-F280)。



図：傍糸球体装置(A)と NaCl センサー及びシグナル伝達メカニズム(B)

アストロサイトにおける CIC-1 クロライドチャネルの新規アイソフォームの発現

張曉東, 高橋信之, 井上 華, 清水貴浩, 岡田泰伸
 森島 繁 (福井医科大学医学部・薬理学講座)
 赤塚結子 (三重大学医学部・生理学講座)
 鍋倉 隆 (宮崎医科大学医学部・耳鼻咽喉科学講座)

クロライドチャネルはグリア細胞において重要な役割を担っているが、CIC-1 クロライドチャネルの機能解析はまだ行われていない。そこで、ラットアストロサイトグリア培養株である C6 細胞を用いて CIC-1 の機能解析を行った。その結果、5 つのアイソフォームを同定し、そのうち 1 つだけが機能的に発現することを確認した。このグリア特異的アイソフォームは、膜電位ならびに細胞外クロライドイオン濃度に対する依存性が骨格筋 CIC-1 よりも弱い。またホールセル電流記録では C6 細胞に

CIC-1 様電流が観察されないため、このアイソフォームは細胞内オルガネラで機能していることが予想された。またアストロサイト初代培養系では、さらに二つのアイソフォームが発現していることが示された。以上より、アストロサイトグリアでは、複数の CIC-1 アイソフォームが発現しており、細胞機能の制御に関与していると考えられる。本研究は次の論文に発表された(Xiao-dong Zhang, et al., 2004 GLIA 47: 46-57)。

高浸透圧刺激により活性化するカチオンチャネルの細胞容積調節における役割

清水貴浩, サビロブ ラブシャン, 岡田泰伸
 Frank Wehner (Max-Planck-Institute for Molecular Physiology, Dortmund, Germany)

高浸透圧性細胞収縮後の容積回復は調節性容積増加 (RVI) と呼ばれ、細胞外からの NaCl の流入によって成し遂げられる。HeLa 細胞を用いた本研究において、高浸透圧刺激時に活性化するカチオンチャネルを見出したので、そのチャネルの電気生理学的性質と RVI における役割に

ついて検討した。この細胞収縮により活性化するチャネルは整流性や時間依存的なゲーティングを示さず、イオン透過性は $\text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Cs}^+ \gg \text{Ca}^{2+}$ であった。また薬理的には、非選択性カチオンチャネル阻害剤である Gd^{3+} 、フルフェナミン酸、SKF96365 に感受性があった。さらに

このチャネル阻害剤の細胞容積変化への影響を検討したところ、これら阻害剤の存在下では RVI 過程が抑制された。これらの結果から、高浸透圧性細胞収縮後の RVI 過程にこの非選択性カチオンチャネルが関与していること

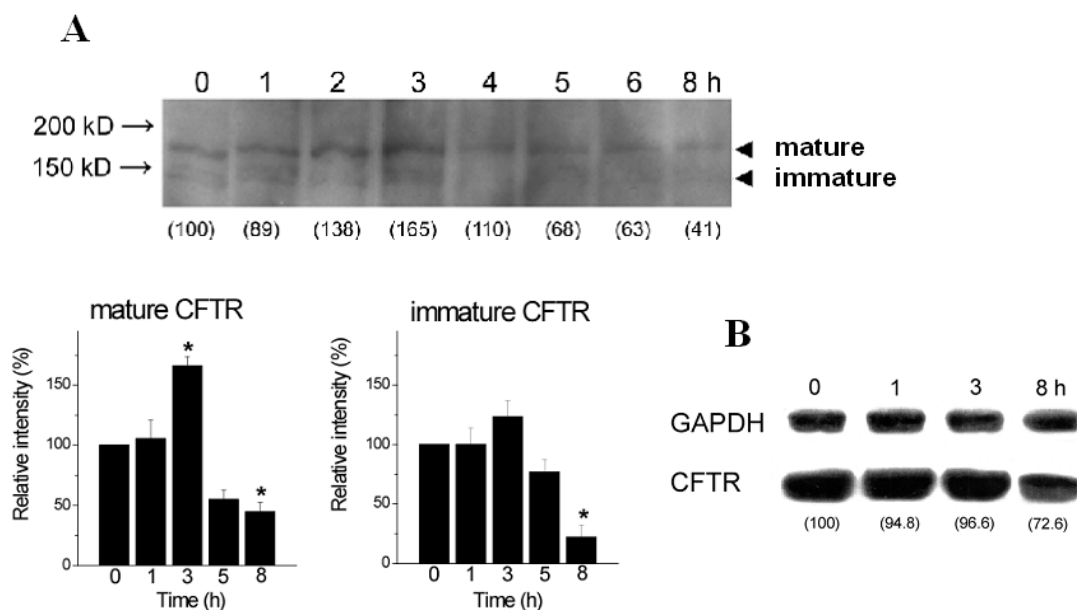
が示唆された。本研究結果は次の論文に発表された (F. Wehner, T. Shimizu, R. Sabirov & Y. Okada 2003 FEBS Lett. 551: 20-24)。

虚血による新生仔ラット心室筋細胞形質膜への CFTR の発現亢進

浦本裕美, 高橋信之, A.K. Dutta, R.Z. Sabirov, 岡田泰伸
赤塚結子 (三重大学医学部・生理学第一講座)
森島 繁 (福井医科大学医学部・薬理学講座)

CFTR は嚢胞性線維症の原因遺伝子の産物であることから、その研究の殆どは上皮細胞で行われている。心筋細胞にも CFTR が発現していることは以前から知られていたがその生理的、病態生理的意義については殆ど解明されていない。そこで私達は、最終的に虚血心室筋細胞での CFTR の機能を探ることを目的とし、新生仔ラット心室筋から培養した細胞を用い虚血 (グルコース除去・無酸素) の CFTR 発現への影響を観察した。その結果、

CFTR の形質膜への発現が虚血 3 時間でピークとなる一過性の亢進を示し、発現した CFTR はチャネルとして機能的であることが判明した。また、この発現亢進は転写後調節によることが明らかとなった。これら結果は次の論文に報告された (H. Uramoto, N. Takahashi, A.K. Dutta, R.Z. Sabirov, Y. Ando-Akatsuka, S. Morishima & Y. Okada 2003 Jpn. J. Physiol. 53: 357-365)。



図：虚血による CFTR タンパク質の一過性の発現亢進；A. 膜画分の western blot, B. northern blot。

() 内の数字はコントロールを 100 とした発現率を示している。

虚血および低酸素条件下での心筋細胞からの ATP 放出における ATP 透過性アニオンチャネルの役割

A.K. Dutta, R.Z. Sabirov, 浦本裕美, 岡田泰伸

虚血や低酸素条件下では心筋細胞や他の細胞からの ATP 放出により心臓の細胞間隙の ATP 濃度が上昇するがその放出機構は分かっていない。本研究では、新生仔ラット初代培養心筋細胞を用い、虚血及び低酸素刺激による ATP 放出における ATP 透過性マキシアニオンチャネルの関与について調べた。虚血(薬剤による代謝阻害)、低酸素刺激により細胞外に ATP が放出され、その細胞表面の局所 ATP 濃度はマイクロモル濃度を越えた。また、

これら刺激が誘導したチャネル活性は約 390pS の単一チャネルコンダクタンスをもち、アニオン選択的で、ATP⁴⁻や MgATP²⁻にも透過性を示し、薬理学的性質は ATP 放出と一致した。以上の結果から、心筋細胞における虚血、低酸素刺激による ATP 放出はマキシアニオンチャネルを介することが明らかとなった。これらの結果は次の論文に報告された (A.K. Dutta, R.Z. Sabirov, H. Uramoto & Y. Okada 2004 J. Physiol. 559: 799-812)。

生体情報研究系

感覚認知情報研究部門

【概要】

感覚認知情報部門は視知覚および視覚認知の神経機構を研究対象としている。我々の視覚神経系は複雑な並列分散システムである。そこでは数多くの脳部位が異なる役割を果たしつつ、全体として統一のとれた視知覚を生じる精巧な仕組みがあると考えられる。また二次元の網膜像から世界の三次元構造を正しく理解できる仕組みもそなわっている。視知覚におけるこれらの問題を解明す

るために、大脳皮質を中心とするニューロンの刺激選択性や、異なる種類の刺激への反応の分布を調べている。具体的な課題として (1) 初期視覚野における輪郭とその折れ曲がりの表現, (2) 選択的注意による視覚および眼球運動関連領野ニューロン活動の変容, (3) 大脳皮質における情報の補完の仕組み, などに関する研究を行った。

初期視覚系における輪郭線の折れ曲がりの表現

伊藤 南, 小松 英彦

輪郭線の表現において折れ曲がりや分岐の表現は非常に重要な要素であるのにも関わらず、直線成分の表現のメカニズムくらべて折れ曲がり表現のメカニズムはあまりよく研究されていない。そこで、我々は注視課題遂行中のサルに第二次視覚野から細胞外記録を行い、十二方位からの組み合わせにより二本の直線成分をつなぎ合わせて作った輪郭線の折れ曲がりを受容野の中心に呈示して神経細胞の反応選択性を詳細に調べ、第二次視覚野には特定の組み合わせ(輪郭線の折れ曲がり)に対して特異的な反応選択性を示す細胞が多数存在することを見いだした。そのような選択性が形成されるメカニズムを明らかにするために、本年度も引き続いて、刺激中の半直線成分を単独で提示した際の反応をもとに、折れ曲がり刺

激を構成する半直線成分に対する反応と折れ曲がり刺激に対する反応との関係を検討した。その結果、最適な半直線成分に対する方位選択的な興奮性の入力に加えて、不適当な半直線成分に対して働く方位選択的な抑制的な作用が選択性を決める上で重要な役割を果たしていることを見出した。また、特定方位への抑制性の欠如が見かけ上の最適な直線成分を生じるケースも存在した。この場合には最適な折れ曲がり刺激と最適な半直線成分との区別が困難であるが、第二次視覚野にはそのようなケースが多々見られた。以上の結果は第二次視覚野が輪郭線の折れ曲がりや分岐を検出する最初のステップであることを示唆する。

視覚探索における V4 野と前頭眼野ニューロンの活動ダイナミクス

小川 正, 小松 英彦

視覚探索では2つの注意機構が働いていると考えられている。一方は周囲と異なるポップアウト刺激によって受動的に引き起こされるボトムアップ性の注意過程であり、他方は知識や意思によって能動的に起動されるトッ

プダウン性の注意過程である。視覚探索における2つの注意過程の役割分担が時間的にどのように変動しているかを明らかにするため、多次元視覚探索課題をサルに行わせてV4野と前頭眼野からニューロン活動を記録した。

課題では 2 種類の色と形から成る刺激が注視点の周りに 6 個呈示され、その中には色及び形次元で異なる刺激が 1 つずつ (目標、妨害刺激) 含まれる (例えば、1 つの赤四角、1 つの緑丸、4 つの緑四角)。サルは色、または形次元で目立つ刺激に向かってサッカードを行うと報酬がもらえるが、どちらの次元で目立つ刺激を目標とするかは試行ブロックごとに切り替えられる。刺激呈示からサッカードが起動されるまでの期間のニューロン活動を解

析した結果、ニューロン活動には 2 種類の情報が異なる時間領域で表現されていることが明らかになった。刺激呈示後の前半期間のニューロン活動では、主として受容野内の刺激がどの次元でポップアウトする刺激であるかの情報 (ボトムアップ性注意) が表現されていた。これに対しサッカード直前の後半期間のニューロン活動では、主として受容野内の刺激が目標であるか否かの情報 (トップダウン性注意) が表現されていた。

盲点における線分の補完知覚に対応したサル 1 次視覚野神経活動

松本 正幸, 小松 英彦

盲点の両側に 2 本の線分が同一直線上に呈示されると、盲点には網膜からの入力がないにも関わらず、一本のつながった線分が知覚される。このような補完知覚が生じるとき、サル大脳皮質一次視覚野 (V1) で盲点に対応する視野を表現している領域 (盲点表現領域) のニューロンが活動変化を示すことを既に見い出している。この実験では線分刺激を一方の眼の盲点付近の視野に呈示し、線分の一端を盲点外に固定したままもう一端を盲点の中心に向かって伸ばしていった時に、線分が盲点を突き抜けて補完が生じる時に非連続な活動の上昇を示すニューロンが見い出されている。この活動の上昇が補完の知覚と

は無関係な文脈依存的修飾によって生じている可能性について検討した。そのために、非盲点条件において一方の眼の盲点に対応する視野の両側に一組の線分刺激を呈示し、片方は受容野内に呈示し、もう片方は受容野外に刺激を呈示するという条件でニューロンの反応を調べた。受容野内に呈示した線分刺激は反応を引き起こしたが、この反応は反対側に呈示された刺激によって修飾を受けなかった。この結果は、V1 の盲点表現領域で線分の補完知覚が生じる時に観察されるニューロン活動の上昇が、補完知覚とは無関係な文脈依存的修飾では説明できないことを示している。

液性情報研究部門

【概要】

液性情報研究部門では、これまで分子生物学的手法と生理学的手法を用いて、脳神経系における情報の伝達および統合のしくみを、分子・細胞のレベルから理解することを目的として研究を行ってきた。しかし近年の分子的情報の急激で莫大な増加と比較して、分子と個体を結びつける領域の研究が不十分であり、またその領域の研究がますます重要となって来ていることを考え、研究部門の方向性を変えてきた。現在の部門としての方向性は、主に電気生理学的な手法を用いてシステムの機能を総合

的に理解することである。

2003 年度は井上助手が着任し、ダイナミッククランプなどの新しい研究手法の開発に取りかかった。また非常勤研究員として伊藤英樹博士が加わり、不整脈疾患の原因となるナトリウムチャネル変異の解析を行うとともに、計算論的アプローチを取り入れた。計算論的アプローチは神経科学の領域にも必須のものとなっており、計算論の応用が進んでいる心臓生理の分野に触れたことは、われわれのグループとして貴重な経験であった。

神経活動活性化に伴う Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II の新たな活性調節機構

山肩葉子, 小幡邦彦 (理化学研究所)

Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMKII) は, 中枢神経系に豊富に存在する蛋白質リン酸化酵素として, 神経活動の制御やシナプス可塑性に深く関わっている。生体における CaMKII の活性制御機構を明らかにするために, 神経活動の活性化のモデルである急性けいれんを用いて, 神経活動の一過性の上昇と回復後の脳ホモジネート中の CaMKII の活性状態を検討した。その結果, けいれん中には, CaMKII の活性化の指標

となる Thr-286 (α)/287 (β) の自己リン酸化が上昇するにも関わらず, キナーゼ活性が低下するという新たな形の CaMKII が, 界面活性剤に不溶性の画分で検出された。けいれんから回復すると, 分単位の早い時間経過で, このような CaMKII はもはや検出できなくなった。このことは, CaMKII の自己リン酸化が可逆的な不活性化を引き起こすという新たな活性調節機構の存在を示唆している。

Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II の機能的ノックアウトマウスの作成

山肩葉子, 井本敬二

八木 健 (大阪大学), 小幡邦彦 (理化学研究所), 柳川右千夫 (群馬大学)

Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMKII) の持つ三つの機能, (1) プロテインキナーゼ活性, (2) カルモジュリン結合能, (3) サブユニット同士の会合による多量体形成能, のうち, いずれが神経機能の調節に重要かを明らかにするためには, 蛋白自体をなくす単純ノックアウトではなく, 特異性の高い機能的ノックアウトマウスの作成と解析が必要であると考え, (1) のプ

ロテインキナーゼ活性のみをなくした不活性型 CaMKII α (K42R) 遺伝子改変マウスを, ノックインの手法を用いて作成した。このマウスでは, 脳内における CaMKII α の蛋白発現は保たれていたが, CaMKII のプロテインキナーゼ活性のみが特異的に抑制されていた。現在, このマウスを用いて様々な脳機能の解析を行っている。

大脳皮質－視床フィードバック投射シナプスの解析

宮田 麻理子, 井本 敬二

皮質－視床 feedback シナプスの伝達特性を明らかにするため, 視床－皮質スライス標本を用いて, バレル皮質を刺激し視床 VPL 核投射神経細胞から EPSC を記録した。この EPSC は純粋な AMPA 受容体の反応より decay time constant が遅く, 薬理学的実験より 15%あまりが kainate 受容体による EPSC の成分であることが分かった。また, 代謝型グルタミン酸受容体一型の agonist 存在下では膜電位は脱分極し, 入力抵抗が大きくなることから, K channel が閉じることによる脱分極であることが明らかになり, 今後, 皮質－視床シナプスの特性をさらに詳しく

解析する方針である。また, 末梢から視床への脊髓視床路シナプスの入力と皮質視床シナプスの両方が同一の投射細胞から記録できるスライス標本を開発し, 両シナプスの解析を行う予定である。特に, これら二つのシナプス伝達特性を詳細に解析し, シナプス特性を規定する分子を明らかにするとともに, お互いのシナプスの干渉作用つまり, どのようなタイミングで二つのシナプス入力が入ると, どのような出力になるかをシナプス可塑性も含めて解析したい。

成熟ニューロンにおける cdk5 の機能の検索：シナプス種特異的制御の分子基盤

佐竹伸一郎，井本敬二

小西史朗（三菱化学生命科学研究所）

Cyclin-dependent kinases (cdks) は、細胞分化・増殖の制御に関わるタンパク質リン酸化酵素として知られている。Cdk ファミリーの一つ cdk5 は、成熟ニューロンの軸索や細胞体に強く発現することから、細胞周期の制御とは別の機能も担うと推定される。しかし、cdk5 ノックアウトマウスは周産期致死のため、成熟ニューロンにおける cdk5 の役割は現在も明らかでない。シナプス機構における cdk5 の機能を検索するため、小脳スライスでパッチクランプ記録を行い、cdk5 特異的阻害薬 roscovitine がシナプス伝達におよぼす作用を調べた。2 週齢ラットから作成した小脳スライスに roscovitine を灌流投与すると、籠細胞-プルキンエ細胞間の抑制性シナプス伝達および平行線維-プルキンエ細胞間の興奮性シナプス伝達が顕著

に増強した。一方、登上線維-プルキンエ細胞間の興奮性シナプス伝達に roscovitine は無効であった。薬理学実験や量子解析から、この阻害薬は、P/Q 型カルシウムチャネルの機能を増強して、神経伝達物質の放出確率を増大させることが示唆された。また、roscovitine は、プルキンエ細胞から記録した抑制性シナプス後電流の減衰時定数(τ)や、tetrodotoxin 非依存性の微小抑制性シナプス後電流の振幅を増大させた。したがって、cdk5 は、抑制性シナプスを後シナプス性に制御する役割も併せ持つと考えられる。Cdk5 は、シナプス種特異的かつ複数の機構により、小脳皮質のシナプス伝達制御に関わることが示唆された。

感覚入力—視床—大脳皮質ネットワークにおける構造と機能

井上 剛，井本 敬二

感覚情報は視床を介して大脳皮質へと運ばれる。しかし感覚信号が大脳皮質に至るまでに変換されていくその全プロセスを、単一細胞・シナプスレベルで解明した報告はこれまでほとんどない。この問題の解明に向け、私はまず感覚入力から視床神経細胞の“集団”へのシナプス配置構造を、電気生理学的手法を用いて明らかにした。単一の上行性興奮繊維は複数の視床リレー細胞へほとんど発散性の結合を持たなかったが、視床網様核細胞から

の単一抑制繊維は複数のリレー細胞に幅広く発散性結合を形成していることを見出した。次に今回明らかにした神経回路構造の上で、どのような感覚信号変換が行われるのかを明らかにするため、ダイナミッククランプ法のシステムを立ち上げた。これは神経回路の一部を人工のものに置き換える手法であり、この手法を利用することによって従来の電気生理学的手法のみでは解明困難であった神経回路機能を明らかにできることが期待される。

Brugada 症候群関連心筋 Na チャネル遺伝子変異の電気生理学的特徴

伊藤英樹，井本敬二

清水賢巳，高田重男，馬淵宏（金沢大学医学部）

Brugada 症候群は器質的心疾患認めないにもかかわらず、心電図異常 (ST 上昇など) を認め、心室細動、突然死を引き起こす。近年の遺伝子解析の結果、Brugada 症

候群の少なくとも一部は、心筋 Na チャネル α サブユニットをコードする遺伝子 SCN5A の遺伝子変異が原因であることが知られている。

今回我々はピルジカイニドの投与にもかかわらず ST 上昇を認めなかった Brugada 症候群に、今までに報告のない新変異 (N406S) を見出し、その電気生理学的特徴を HEK293 細胞を用いた発現系で解析した。

N406S はドメイン I の膜貫通領域であるセグメント 6 に位置し、種を越えて保存されている領域の変異であった。活性化、不活性化の電位依存性はそれぞれ 16 mV, 10 mV 脱分極側へ偏移していた。N406S は速い不活性化からの回復は有意に促進していたが、遅い不活性化からの回復は逆に遅延していた。Ruo-Rudy モデルを用いた心筋細胞シミュレーションでは、活性化の電位依存性の変化と遅い不活性化の亢進が本症例の病態に寄与している

ことが強く示唆された。ピルジカイニドによる tonic block は N406S において変化を認めなかったが、使用頻度依存性は全く消失していた。一方、キニジンによる使用頻度依存性はむしろ亢進していた。

これらの結果から、本変異による Brugada 症候群は活性化の電位依存性の変化と遅い不活性化の亢進が原因であると考えられた。ピルジカイニドによる使用頻度依存性は本変異でほぼ完全に消失しており、provocation test の結果との因果関係を示唆した。一方キニジンに対する反応はむしろ亢進しており、ある特定の 1 種類のみによる抗不整脈薬を用いた provocation test の結果の判定には注意を要することが示唆された。

Ca²⁺チャネル変異マウスにおける神経回路異常の検索

佐々木幸恵, 松下かおり, 児玉 貴史, 井本敬二

脳の主要な Ca²⁺チャネルサブタイプである P/Q 型 Ca²⁺チャネル (Ca_v2.1) の遺伝子異常により、小脳変性症など神経疾患がヒト、マウスで起こる。マウスでは, tottering, rolling, leaner, rocker などの変異が知られている。しかし Ca²⁺チャネルの異常が、どのようにして種々の神経症

状を引き起こすのかという疑問は解決されていないため、われわれは神経症状から考えて異常がありそうなシナプス部位を網羅的に検索してきた。今年度は特に小脳核、海馬、視床―大脳皮質投射に關しての検討を行った。

高次神経機構研究部門

【概要】

本研究部門では哺乳動物の脳機能がどのような分子メカニズムにより形成、制御されているかを解明することを目的とし、脳構造形成および神経回路網形成に関わる遺伝子を欠損させたマウスの作製を行ってきた。

以前の研究で、Fyn 遺伝子ノックアウトマウスを作製・解析した結果、同遺伝子が高次脳機能の制御に関わっていることを見いだした。そこで Fyn との結合活性を指標に新規分子をスクリーニングしたところ、新規カドヘリン様細胞接着分子 CNR (Cadherin-related neuronal receptor) /プロトカドヘリン α を単離する事が出来た。また他のグループの研究で、CNR 遺伝子クラスターとよく

似たゲノム構造と相同性を示す近縁分子、プロトカドヘリン β , γ ファミリーが見いだされ、これらは CNR とともにさらに大きな遺伝子クラスター構造を取っていることが明らかになった。これまでの研究結果から同分子群はシナプスでの選択的細胞接着と多様化機構を有し、神経回路網形成に重要な役割を演じていることが示唆されている。そこでこれらの分子機能の解析により、神経細胞の多様化機構の分子メカニズムが明らかになるのではないかと考え、現在は同遺伝子欠損マウスの作製を中心に進めている。

CNR/プロトカドヘリン α 遺伝子欠損マウスの作製

平林敬浩, 八木 健

CNR 分子の機能を個体レベルで解析することを目的として, CNR 遺伝子欠損マウスの作製を進めている。クラスター型遺伝子構造をもつ CNR 遺伝子には 14 個の可変領域エクソンと 3 つのエクソンからなる共通領域が存在し, 各 CNR ファミリーはそれぞれひとつの可変領域エクソンと共通領域から転写される。本研究ではまず, 全ての CNR ファミリー遺伝子が欠損したマウスの作製を試みた。共通領域エクソンの上流または下流に loxP 配列

を導入したマウスをそれぞれ作製し, これらのマウスを交配させ共通領域の上流と下流に loxP 配列を有するマウスを得た。これを組換え酵素 Cre を発現するトランスジェニックマウスとさらに交配させることで, 共通領域を欠損したマウスを得ることができた。現在, このマウスの表現型について解析を進めている。また, 1 種の CNR 分子のみを発現するマウスも同様に作製している。

プロトカドヘリン β ファミリー欠損マウスの作製

金子涼輔, 八木 健

マウスプロトカドヘリンは α 型 14 種類, β 型 22 種類, γ 型 22 種類が 18 番染色体にクラスター構造を取って存在していることから, これらの協同性や機能分担に興味を持たれる。実際, 当研究部門ではアルファ型とガンマ型の相互作用が膜移行に不可欠であることを明らかにしている。そこで, β 型プロトカドヘリンの生理機能を明らかにする目的でその欠損マウスの作製を行った。 β 型プロトカドヘリンは 22 種類が約 300kb にわたって存在しているため一度のターゲティングでは全欠損が不可能で

あることから, この両側にそれぞれ loxP 配列をノックインしたマウスを作製し, その後に Cre リコンビナーゼによって β 型全領域を欠損させる計画を立てた。本年度は, loxP をノックインするターゲティングベクターを上流側, 下流側それぞれ作製し, ES 細胞へ導入した。上流側では相同組換え ES 細胞が得られていないのだが, 下流側では相同組換え ES 細胞を取得し, そのキメラマウスも得られている。

クローンマウス胚由来 ES 細胞株を用いた神経細胞分化過程における核機能変換の解明

牧野初音, 八木 健

分化した神経細胞核における核内情報変換を解析することを目的として生後 0-3 日齢のマウス大脳皮質由来の神経細胞核クローンマウス胚から ES 細胞株の樹立を試みた。その結果, ES 細胞株 3 株の樹立に成功した。得られた ES 細胞株に GFP 遺伝子を導入し, 正常マウス胚とのキメラマウス作製を試みたところ, ES 細胞寄与率の高いキメラマウスは胎生致死, もしくは出生直後に死亡にする割合が高く, また ES 細胞の寄与率の高い E10.5 キメ

ラマウス胎仔では, 分化した神経細胞核を用いた E10.5 クローンマウス胎仔で観察されたものと同様の神経管閉鎖部における形態異常, および神経管構成細胞の異常が観察された。この結果は, 分化した神経細胞核クローンマウス胚から樹立した ES 細胞株においても, 神経細胞核の遺伝情報が維持, 保存されることを示唆するものであり, 今後は樹立した ES 細胞株を解析することにより, 核内情報変換を解明したい。

ゼブラフィッシュ CNR (DrPcdh alpha) の機能解析

多田基紀, 八木 健

CNR (DrPcdh alpha) は神経細胞で発現するカドヘリン様受容体遺伝子群で、神経発生と維持に関わる。私はホールマウント in-situ hybridization, 免疫組織学を用いて、発生段階におけるゼブラフィッシュ CNR の発現パターンを明らかにした。この結果、神経細胞の分化時期・領域と一致して CNR の発現が見られ、特に軸索に CNR タンパクが局在することが分かった。また、ゼブラフィッ

シュにおいて利用可能なことが知られている Morpholino アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて、CNR タンパク質発現阻害を行うことで CNR の機能解析を行った。この結果、神経細胞分化の起こる領域にアポトーシスが観察され、かつ axon の伸長異常と、網膜視蓋経路の形成不全が見られ、神経発生、軸索形成時における CNR の関与が示唆されている。

生体調節研究系

感覚運動調節研究部門

【概要】

2003 年 4 月に生理学研究所の研究系の大幅な改組があり、2002 年度までは統合生理研究施設に属していた私達の研究室は、2003 年度から生体調節研究系に属することになった。しかし、研究の内容には大きな変更は無く、これまでと同様に「脳波 (EEG)、脳磁図 (MEG)、機能的磁気共鳴画像 (fMRI) などの非侵襲的機能検査法を用いた人間の脳機能の解明」を行っている。

2002 年夏に導入された新しい全頭型脳磁計は順調に稼動しており、2003 年度には 2 編の英文原著論文を発表し、さらに数編の論文が印刷中である。

2003 年は 20 編の英文原著論文、2 編の英文総説、7 編の邦文論文を発表し、大変実りの多い年となった。研究員も 20 名を超え、大いに活気づいている。研究内容は、各種 (視覚、聴覚、体性感覚、痛覚など) 刺激による誘発脳波、脳磁図が中心であるが、徐々に背景脳波、脳磁図の解析や fMRI を用いた研究も増加している。また国内外の施設との共同研究も盛んに行っており、特にカナダ、トロントの Rotman 研究所の Pantev 教授の研究室との聴覚に関する共同研究により既に数編の英文原著論文を発表している。

ヒトの視覚性運動知覚の脳磁図による生理学的研究

金桶吉起, 祖父江文子, 久保田哲夫

2003 年には以下の 3 項目につき一定の成果を挙げ発表することができた。1) ランダムドットによる仮現運動知覚の神経活動の時間経過を、ドットの点滅のみ知覚する刺激条件の反応と比較、検討した。その結果、運動知覚の段階的処理過程と、運動知覚と点滅知覚の神経機構の過程が同時平行して進められていることを示唆する結果を得た。2) 運動知覚は、明るさ情報に基づく第 1 次とそれ以外の情報に基づく第 2 次運動知覚機構があるといわれている。それらは互いに独立した神経機構をもってい

ると考えられているが、一方その処理過程の早い時期から相互に影響しあっていると考えられている。我々は、ランダムドットの乱雑運動により、第一次と第 2 次運動を作成し、それぞれの脳磁図反応を比較、検討した。その結果、第 2 次運動知覚に関わるヒト MT からの反応は非常に遅く、しかしそのごく初期から第 1 次運動知覚の神経機構と相互に連絡があるという明瞭な事実をつかんだ。

侵害性信号の皮質処理

乾幸二, 王曉宏, 秋云海, Tran TD, 柿木隆介

皮膚に与えられた侵害性情報が脳皮質のどの部位でどのようなタイミングで処理されるかを脳磁図を用いて検討した。刺激には表皮内電気刺激法 (ES) を用いた。最初の活動は刺激と反対側の第一次体性感覚野 (SI) にあり、刺激後約 90 ミリ秒で生じた。続いて両側の前・中部島、第二次体性感覚野 (SII), 前部帯状回および内側部側頭葉

(MT) に活動が認められた。SII が SI からの密な投射を受けることから、SI と SII の連続的的活動が考えられた。島の活動の立ち上がりは SII と比べてやや (7 ミリ秒) 早く、視床からの直接の連絡により活動したものと考えられた。MT と ACC は島の活動頂点付近でその活動を開始し、これらの部位間の連続的的活動を示唆するものと考え

られた。従って、侵害性情報は外側部視床－SI－SII の経路と内側部視床－島－辺縁系の経路で独立して処理されたと考えられた。これらは、いわゆる痛覚処理の外側

系および内側系に相当すると思われる。

(Inui et al., Neuroscience 2003; Eur J Neurosci 2003)

侵害性刺激に伴う皮質活動の睡眠による影響

王曉宏, 乾幸二, 秋云海, 宝珠山稔, 柿木隆介

痛覚認知は注意や覚醒度に大きく影響を受けるが、そのメカニズムはほとんど明らかにされていない。本研究では注意課題を課した際と睡眠中の皮質活動の変化を脳磁図と脳波を用いて検討した。上記論文に従ってまず安静覚醒時の各皮質活動を同定し、それぞれの注意・睡眠による影響を検討した。第一次 (SI), 第二次 (SII) 体性感覚野, 島, 帯状回 (ACC), 内側部側頭葉 (MT) 全ての活動が注意課題時に増強し、睡眠中顕著に減弱した。この

ことから、1) 全ての活動が痛覚認知に関わっている、2) 睡眠中の影響は視床もしくは視床から初めの皮質活動への連絡等のかなり早い段階で生じたものである、と考えられた。動物を用いた研究では、脊髄 (延髄) や視床の侵害性細胞の活動が、睡眠－覚醒により変化することが報告されており、今回の所見と一致する。

(Wang et al., Cogn Brain Res 2003; Neurosci Res 2003)

マイクロニューログラフィーを用いたレーザー刺激による C 受容器選択的刺激の証明

秋云海, 王曉宏, 乾幸二, 柿木隆介

当教室では特殊な空間フィルターを用いてレーザー光線を皮膚に照射することにより (極小野低出力刺激), C 受容器を選択的に刺激することに成功し、研究をすすめている。本研究ではこの方法の信頼性を、micro-neurography を用いて検討した。膝窩部で腓骨神経より記録を行った。単一線維を同定した後、その受容野に電気刺激を行い、伝導速度 (CV) を計算した。C あるいは A-delta 線維と判定された線維について、レーザー照射へ

の応答を調べた。5 つの C 線維が同定され (CV, 1.1 m/s), 全てが我々のレーザー刺激法により活動した。一方 A-delta 線維は (2 ユニット, CV, 14.1 m/s), 我々のレーザー刺激法では活動しなかった。このことより、我々の開発した空間フィルターを用いた極小野低出力刺激法は、C 受容器を選択的に興奮させることが確認された。

(Qiu et al., Neurosci Lett, 2003)

二点識別の中枢機構

田村洋平, 宝珠山稔, 乾幸二, 柿木隆介

二点識別 (TPD) は、感覚識別の一種であり、臨床場面においても検査として用いられるが、患者の反応が安定せず、同一刺激を用いても 1 点か 2 点かの判断が刺激毎に異なる、ということがしばしば経験される。通常行われる検査では刺激そのものを同一にすることは困難であ

るため、本研究では電気刺激法を用いて、反応の不安定性に末梢ではなく中枢機序が関与する可能性を検討した。左手背に六つのボール電極を等間隔で配置し、その中の二つをランダムに刺激した。被験者は刺激毎に 1 点か 2 点かを答えた。正答率は電極間の距離が長くなるほど上

昇したが, 先行する刺激にも有意な影響を受けた。即ち, 電極間の距離が前回のそれよりも長い場合により多く 2 点と判断された。この結果より, TPD は末梢要因のみな

らず, 中枢の先行提示距離との比較過程によっても影響を受けることが明らかにされた。

(Tamura et al., Neurosci Lett, 2003)

Gating of somatosensory evoked magnetic fields during the preparatory period of self-initiated finger movement

和坂俊昭, 中田大貴, 柿木隆介
宝珠山稔 (名古屋大学)

本研究は, 随意運動の準備期における一次体性感覚野の時系列的変動を検討した。被験者には右正中神経にランダムに提示される電気刺激を無視しながら 7~10 秒間隔で自己のペースで右第二指の伸展動作を行うよう指示した。随意運動の準備期は, 筋放電前 4000ms まで計 6 区間を設定した。全被験者について N20m, P30m, P60m が確認され, これらの成分のECDは中心溝後壁付近に同定された。随意運動の準備期に変動がみられるのは P30m

のみであり, この成分の ECD moment を安静条件と比較すると, 随意運動の 500ms 前から減少していた。また筋放電前 3000~4000ms の区間における P30m と比較すると, 筋放電前 1500ms 前から減少していた。随意運動の準備期には筋放電がみられないことから, P30m の減少は随意運動の準備に関与する運動関連領域からの遠心性投射が主要な要因であることが示唆された。

随意運動に伴う痛覚関連体性感覚誘発脳磁図の変動

中田大貴, 乾幸二, 和坂俊昭, 田村洋平, Tran TD
秋云海, 王曉宏, Nguyen BT, 柿木隆介

痛覚の程度は動作によって軽減する。例えば, 手をぶつけた時に我々は手を振ることによって痛みを軽減させる。本研究では, 動作による痛み軽減メカニズムの一端を明らかにすべく, MEG を用いて実験を行なった。刺激はレーザー刺激を用いて左手に与え, Control 条件, 左手指の能動動作, 右手指の能動動作, 左手指の受動動作の 4 条件を行なった。同時に主観的な痛み尺度を表す visual analogue scale (VAS) も記録した。結果として, Control 条件と比較し, 左手指の能動動作によって, 刺激対側半球

SI (一次体性感覚野) と SII (二次体性感覚野) の活動が減少した。右手指の能動動作では, 刺激対側半球 SII の活動が減少した。左手指の受動動作では, 刺激対側半球 SI の活動が減少した。VAS は左手指, 右手指の能動動作によって減少した。これらの結果から, 動作によって SI, SII における脳活動の変化が起こったことが示された。VAS の変動は対側 SII の変動と類似しており, 痛覚認知における同部の重要性が示唆された。

(Pain, 107: 91-98)

体性感覚刺激 Go/Nogo 課題時に誘発された事象関連電位

中田大貴，乾幸二，和坂俊昭，柿木隆介
木田哲夫（筑波大学人間総合科学研究科）
坂本将基（東京学芸大学連合大学院）

Nogo 電位は Go/Nogo 課題を行なった際、Nogo 試行に特異的に誘発され、反応抑制に関係した電位であるとされている。これまで視覚刺激を中心とした研究がなされてきたが、この電位が真に反応抑制を反映しているのであれば、刺激のモダリティには依存しないであろうと考えられる。そこで本研究では、体性感覚刺激を用いた Go/Nogo 課題を行なった。実験条件は安静条件、計数条件、動作条件を行なった。計数条件では Go 刺激の数を

数え、動作条件では Go 刺激時に右手のグリップ動作を行なった。刺激は左手の第二指を Go 刺激、第五指を Nogo 刺激とし、呈示確率を 50% : 50% にした。結果、計数・動作条件での N140 振幅は、Nogo 刺激時に Go 刺激時よりも有意に増大した。これらの増大は前頭を中心とした記録部位で認められた。体性感覚刺激 Go/Nogo 課題時においても、Nogo 試行時に特異的な電位が誘発されたことが示唆された。(Clinical Neurophysiol, 115: 361-368)

音声刺激が情報処理されるとき視覚情報が聴覚野の活動に及ぼす影響：脳磁図による検討

三木研作，渡辺昌子，柿木隆介

私達はヒトの顔認知機構について脳磁図を用いた研究を進めてきた。これまでに「顔の部分の動き」を見るときの脳活動を報告してきたが、2003 年は視覚入力と聴覚入力が同時に起きる場合の影響について研究を始めた。今回「口の動きを見ると同時に音声を聴取した」場合と「顔を見ているが口は動かず音声のみを聴取した」場合の聴覚野の活動を検討した。視覚刺激として仮現運動現象を利用した「口の動き」刺激を用い聴覚刺激には「あ

という母音を用いた。どちらの条件とも潜時約 90 ミリ秒に明瞭な誘発成分 (M100) が認められ、その活動源はヘッセル回(ヒトの聴覚野)に位置推定された。両条件間で誘発脳活動の大きさ、活動源の位置に有意な違いはなかった。聴覚情報処理の初期段階では「口の動き」のような視覚刺激による動きの知覚に影響されずに情報が処理されていることが示唆された。

(Miki et al., Neurosci. Lett. 2004)

脳磁図と脳波を用いた母国語および外国語の脳内処理の研究

尾島司郎（生理学研究所，エセックス大学），中田大貴，柿木隆介

言葉の完全な獲得が幼少期を過ぎると不可能になるという「臨界期仮説」は、思春期後の第二言語の獲得が、思春期前の母語の獲得と質的に異なると予測する。本研究では、この仮説を事象関連脳電位 (ERP) を用いて検討した。

思春期頃に英語の習得を開始し、中級または上級の習熟度を示す日本人の 2 グループ、および英語母語話者が、英語の文を黙読したときの脳電位を計測した。その結果、

日本人でも英語母語話者に見られる特徴的な脳反応 (N400, LAN) が惹起でき、習熟度が中級から上級に上がるに連れて、より母語話者に脳反応が近づいていくことが示された。観察された発達パターンは、先行研究で報告されている子供の母語獲得のそれと酷似している。

これらの結果は、思春期後の第二言語獲得が思春期前の母語獲得と質的に異なるという、臨界期仮説の予測に相容れない。

生体システム研究部門

【概要】

平成15年度は、南部 篤が赴任して2年目にあたり、研究体制の整備に主力を置いた。4月に畑中伸彦が助手に着任し、橘 吉寿が非常勤研究員として新たに研究チームに参加した。高須千慈子技官の退職に伴い、伊藤昭光技官が高次液性調節研究部門から加わった。その後、11月に橘 吉寿非常勤研究員が助手に着任し、また平成16年1月に、森 大志助手が山口大学農学部助教授に昇任、転出した。このように平成15年度は、人的にも大きな転換期を迎え、あらたな研究体制で臨むこととなった。一方、実験室の立ち上げ、研究環境整備も平成14年度に

引き続き行い、基本的な研究体制は整ったと言える。また、喜多 均教授(米国テネシー大学)も昨年度と同様に平成15年1月から3ヶ月ほど滞在し、共同研究を行った。このような研究体制のもと、当研究部門は、大脳皮質・大脳基底核・小脳・脳幹などを中心に、手指を精緻に動かすような随意性の高い運動から、歩行や咀嚼のように半ば自動化されたものまで、幅広い運動の脳内機構について、包括的に明らかにするというテーマで研究を行っている。

脳深部刺激療法の作用機序に関する研究

南部 篤, 橘 吉寿

高田昌彦 (東京都神経科学総合研究所)

喜多 均 (テネシー大学医学部)

近年、薬剤でコントロールが困難な重症パーキンソン病に対して、視床下核に慢性的に刺激電極を埋め込み高頻度電気刺激を加えるという、視床下核-脳深部刺激療法(STN-DBS)が有効であることがわかってきたが、その作用機序については不明である。本研究においては、パーキンソン病モデルサル(淡蒼球内節(GPi)から単一ニューロン活動を記録することにより、STN-DBSの作用機序を検討した。STNの単発刺激では、Gpiニューロンは、抑制+興奮のパターンで応答した。刺激頻度を上げても、

このようなパターンは基本的には変わらなかった。次に、運動野単発刺激によるGpiニューロンの反応に対するSTN-DBSの影響を調べた。パーキンソン病の際、運動野刺激によってGpiで誘発される興奮が増強している。これにSTN-DBSを重畳すると、皮質由来の興奮は観察されなくなった。以上の結果から、STN-DBSは皮質からGpiに至る異常伝達をSTNで阻止することにより、治療効果を示すと考えられる。

糖代謝PETによる二足歩行運動に関与する脳部位の同定

森 大志

中階克己 (近畿大学医学部)

塚田秀夫 (浜松ホトニクス(株))

森 茂美 (生理研名誉教授)

サル直立二足歩行モデルは長期の運動学習により、様々な外的環境下で適切に空間的、時間的歩行パラメータを選択して安定した二足歩行運動を実行する。本研究

では各種歩行課題の実行に関与する脳領域の同定を陽電子断層法(PET)により行なった。歩行課題は障害物を設置したトレッドミルベルト面、上りおよび下り傾斜トレ

ッドミルベルト面上での二足歩行とした。運動課題の実行に際しての神経活動の増強は糖代謝の亢進を指標 ($[^{18}\text{F}]\text{-FDG-PET}$) とした。対照課題 (座位姿勢) に対し前者では一次運動野, 補足運動野 (SMA), 運動前野, 小脳の他, 両側の視床にも優位な神経活動の亢進が観察された。さらに通常の水平トレッドミルベルト上二足歩行課

題と比較すると, SMA と視床に強い神経活動がみられた。この結果はより複雑な歩行課題に対してサル歩行モデルは高次脳内の様々な要素的神経制御機構を動員してこれを解決していることが示唆された。後者の歩行課題では, 運動野以外に頭頂葉・側頭葉にも神経活動の亢進がみられており, 現在詳細に解析中である。

大脳皮質運動野の直立二足歩行運動に関わる機能的意義の同定

森 大志, 南部 篤

中岡克己, 稲瀬正彦 (近畿大学医学部)

森 茂美 (生理研名誉教授)

脳糖代謝 PET による研究から, サル歩行モデルは, 一次運動野 (M1), 補足運動野 (SMA), 背側運動前野 (PMd) での神経活動を増強させて水平トレッドミルベルト上二足歩行課題を解決することが明らかとなった。本研究ではこれらの領域が直立二足歩行運動の実行に際し, どのような機能的意義を有するかを同定することを試みた。実験に先立ち, トレッドミルベルト上での二足歩行運動能力を獲得した成サルの大脳皮質運動野を皮質内微小電

気刺激法でマッピングした。機能的意義の同定はムシモル (GABA_A agonist) の局所注入により歩行運動機能を一時的に脱落させて行った。M1 への注入では局所的関節運動障害が, SMA への注入では全身性の姿勢障害が誘発された。一方, PMd への注入では運動の発動が障害された。これらの結果から直立二足歩行運動は大脳皮質運動野各領域の異なる機能を統合した運動であることが示唆された。

上肢到達運動課題実行中の線条体ニューロンの活動様式を解明する

畑中伸彦, 橘 吉寿, 南部 篤

大脳基底核は大脳皮質とループ回路をなし, 運動の遂行, 企画, 運動のイメージ, 習慣形成などに関わるとされている。大脳皮質から大脳基底核への主な投射先である線条体には 90-95% を占める投射ニューロンの他に, コリン作動性の tonically active neuron, nitric oxide synthase 陽性 GABA 作動性ニューロン, parvalbumin 陽性 GABA 作動性ニューロンなどのインターニューロンが知られて

いる。これらのインターニューロンの活動は線条体の投射ニューロンに影響を与えており, 基底核の機能に重要な役割を担っていると考えられているが詳細は不明である。このようなことを調べるため, サルの線条体から記録を行うことを計画し, 本年度は, サルに上肢の到達運動課題のトレーニングを行った。

顎運動に関わる多シナプス性神経回路の同定

畑中伸彦, 橘 吉寿, 南部 篤

宮地重弘, 高田昌彦 (東京都神経科学総合研究所)

さまざまな動物で大脳皮質一次運動野顎領域を皮質内微小刺激すると, 開口運動が優位に生じ閉口運動は殆ど観察されない。このことは, 一次運動野において開口筋と閉口筋を再現する領域が均等に再現されていないことを示唆している。そうだとすれば, 大脳皮質からの情報によって, 脳のどの領域で開口運動と閉口運動に変換されるのだろうか。狂犬病ウイルスが, 神経細胞に逆行性に経シナプスの的に感染する性質を利用することにより, ラットの開口筋, あるいは閉口筋に狂犬病ウイルス注入し, その神経経路を同定した。その結果, 大脳皮質には

開口筋, 閉口筋をそれぞれ特異的に再現している領域は見出されなかった。また, 大脳皮質-大脳基底核-脳幹へ間接的に投射する系においても開口筋, 閉口筋それぞれへ投射するニューロンの分布にも大きな違いは認められなかった。以上のことから開口筋, 閉口筋をコントロールする情報は脳幹で生成されることが予想される。今後は開口筋または閉口筋に投射する脳幹のインターニューロンがどのような特性の細胞なのか, 免疫組織的に調べる予定である

パーキンソン病における淡蒼球代謝調節型グルタミン酸受容体の動作様式

橘 吉寿, 南部 篤

金田勝幸, 高田昌彦 (東京都神経科学総合研究所)

代謝調節型グルタミン酸受容体 (mGluRs) は mGluR1-8 の 8 種類のサブタイプに分かれ, 脳内に広く分布している。淡蒼球において Group I mGluRs (mGluR1 & mGluR5) が数多く発現し, パーキンソン病では, とくに mGluR1 の発現が減少していることが明らかとなっている。本研究では, 正常サルおよび MPTP 誘発パーキンソン病モデルサルを用い, 記録している淡蒼球ニューロンに mGluR1 拮抗薬, Group I mGluRs 作動薬と拮抗薬を局

所的に作用させることで, mGluR1 の動作様式を解析した。その結果, mGluR1 を介したグルタミン酸性入力に淡蒼球ニューロンの自発発射増加に作用し, パーキンソン病モデルではその効果が減弱した。パーキンソン病においては, 視床下核からのグルタミン酸性入力増大による淡蒼球ニューロンの過興奮を, mGluR1 の発現を減少させることで補償しうる可能性が本研究により示された。

大脳皮質機能研究系

脳形態解析研究部門

【概要】

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

具体的な研究テーマとしては、1) グルタミン酸受容体およびGABA受容体と各種チャネル分子の脳における電子顕微鏡的局在を定量的に解析し、機能との関係を明らかにする。

2) これらの分子の発達過程や記憶、学習の基礎となる可塑的变化に伴う動きを可視化し、その制御メカニズムと機能的意義を探索。3) 前脳基底核、黒質一線条体ドーパミン系等の情動行動に関与する脳内部位のシナプス伝達機構および生理活性物質によるその修飾機構を電気生理学的手法を用いて解析し、それらの分子の基盤を明らかにする。4) 大脳基底核関連疾患の治療法の確立のため、神経幹細胞移植による細胞の分化、シナプス再構築や神経回路の再建に関する形態学および電気生理学の解析を行なっている。

グルタミン酸受容体の定量的解析

田中淳一，足澤悦子，初山明子，深澤有吾，馬杉美和子，重本隆一

脳内における主要な興奮性伝達物質であるグルタミン酸には、イオンチャネル型のAMPA受容体、NMDA受容体、Kainate受容体とG蛋白共役型の代謝調節型グルタミン酸受容体が存在する。我々は、従来の免疫電子顕微鏡法や新たに開発したレプリカ標識法により、グルタミン酸受容体各サブタイプの局在を高解像度で定量的に解析している。レプリカ標識法を用いたAMPA受容体の解析

では、小脳の登上線維—プルキンエ細胞間シナプスなどにおいて平方ミクロンあたり1000個を超える金粒子の標識を達成し、従来法に比べ桁違いの高感度と2次元的な可視化を実現した。また、ノイズ解析を用いた電気生理学的計測と組み合わせ、機能的なAMPA受容体数とほぼ同数の金粒子の標識数が得られることを明らかにした。

神経伝達物質放出関連蛋白質の局在

萩原 明，深澤有吾，重本隆一

脳内における神経伝達物質の放出にはさまざまな機能分子が関与している。この中で我々は代謝調節型グルタミン酸受容体や電位依存性カルシウムチャネルなどの放出部位における局在を免疫電子顕微鏡法で明らかにした。またレプリカ標識法を用いることによって、従来法では放出部位に検出することが困難であったtSNARE蛋白質

についても、神経終末や軸索に広く分布すると同時に放出部位にも同様の密度で存在することを明らかにした。またこの研究の過程でレプリカ標識法において、CASTなどのCAZ蛋白質や小胞性グルタミン酸トランスポーターが、放出部位や神経終末を同定するためのマーカーとして非常に有用であることを明らかにした。

海馬における長期増強現象とグルタミン酸受容体の密度変化

深澤有吾, 重本隆一

海馬における長期増強現象には、イオンチャネル型の AMPA 受容体, NMDA 受容体等のグルタミン酸受容体が関与している。我々は、新たに開発したレプリカ標識法により、これらグルタミン酸受容体各サブタイプの局在を高解像度で定量的に解析している。レプリカ標識法を用いた海馬 CA1 や歯状回の AMPA 受容体の解析では、シナプスのみならずシナプス外に高密度の標識が認めら

れた。シナプスの AMPA 受容体密度は大きなバラツキを持って分布していたが、in vivo でテタヌス刺激により長期増強現象を誘導すると、AMPA 受容体密度の低いシナプスの数が減少する。今後受容体サブタイプによる動態の違いや、シナプス外受容体プールとの間の関係などについて、さらに検討する。

海馬 NMDA 受容体局在の左右差

篠原良章, Wu Yue, 重本隆一

脳内における左右差はよく知られているが、その分子基盤はほとんど知られていなかった。我々は九州大学の伊藤功助教授らとの共同研究により、海馬NMDA受容体サブユニット NR2B が左右の海馬の対応するシナプスで非対称に配置されていることを発見した。この左右差は NR2A ノックアウト動物で増強されており、電子顕微鏡

的な解析で錐体細胞シナプスにおける NR2B 標識密度の左右差を検出した。この左右差は介在神経細胞上のシナプスには存在せず、同種の神経軸索が作るシナプスにおいても、神経後細胞の種類の違いによって非対称性の有無が決まることが明らかとなった。今後はこの左右非対称性の生理学的意義を解明することを目指す。

GABAB 受容体やイオンチャネルの脳内局在と機能解析

Akos Kulik, 萩原明, 深澤有吾, 重本隆一

脳内における主要な抑制性伝達物質である GABA には、イオンチャネル型の GABAA 受容体と G 蛋白共役型の GABAB 受容体が存在する。我々は、免疫電子顕微鏡法により GABAB 受容体が小脳では GABA 作動性シナプスではなく、興奮性のグルタミン酸作動性シナプスの周囲により集積していることや、視床においてはいずれのシナプスとも強い関連なく広範に分布しているが、

GABA 作動性シナプス周囲により密度が高いことなどを報告した。これらの結果は、GABAB 受容体が脳の部位により異なる役割を持っていることを示唆している。その後、GABAB 受容体とその効果器分子であるカルシウムチャネルやカリウムチャネルとの位置関係を調べており、さらに GABAB 受容体の機能調節機構や脳における役割の解明を目指す。

前脳基底核と黒質－線条体ドーパミン系の電気生理学的および形態学的解析

初山俊彦

前脳基底核は中枢アセチルコリン性ニューロンの起始核であり、記憶、学習、注意とうの生理的機能と密接に関係するとともに、その病的状態としてアルツハイマー病との関連が示唆されている。現在アセチルコリン性ニューロンへの興奮性および抑制性シナプス伝達機構および修飾機構の生後発達変化につき、ニューロン同定の新たな手法を導入しつつ、電気生理学的解析、形態学的解析を行なっている。

黒質－線条体ドーパミン系は随意運動調節に関与し、この系の障害とパーキンソン病等の大脳基底核関連疾患

とが関係していることが示唆されている。大脳基底核関連疾患の治療法の一つとして神経幹細胞移植法が期待されているが、移植によるシナプス結合や神経回路の再建に関する基礎的知見はこれまで非常に少なかった。現在、Enhanced GFP遺伝子導入トランスジェニックラットから胎生 10.5 日目ラットを摘出し、中脳胞部由来神経板組織を成熟ラットの線条体内に移植して、ドナー細胞の分化、シナプス再構築について形態学的および電気生理学的解析を行なっている。

大脳神経回路論研究部門

【概要】

大脳皮質の各領域は、基本的に同じ構成の回路を出入力の違いに応じて変えることで、柔軟で多様な情報処理をしている。皮質はコラムとよばれる基本単位からできていると考えられているが、その内部回路についてはあまり解明されていない。皮質の中でも前頭皮質は、それが投射する線条体とともに、精神活動や運動・行動にとって重要な場所である。私たちはこれまでに、前頭皮質や線条体ニューロンを、軸索投射・発火・物質発現パターンからいくつかのグループに分類し、それらの生理的性質・神経結合・伝達物質作用などを解析してきた。その結果、局所回路の基本的構成を定性的に明らかにできた。現在は、これらの構成要素から皮質回路がどのよう

な原則で組み上げられているかを明らかにすることを目指して、各ニューロンタイプの軸索・樹状突起上におけるシナプス配置・スパイン分布、錐体細胞サブタイプ間のシナプス結合特性、非錐体細胞サブタイプから錐体細胞への神経結合を生理学的・形態学的に定量的に解析している。これらの過程を積み重ねることで、皮質回路の神経結合選択性、皮質ニューロンの生理的・形態的多様性の意味、各ニューロンタイプの役割を理解したい。そして前頭皮質における回路解析に基づいて、皮質から線条体に信号を送る錐体細胞の活動がどのように決められているのかを明らかにすることを目標にしている。

大脳皮質ダブルブーケ細胞のシナプス出力特性

窪田 芳之, 川口 泰雄

大脳皮質の非錐体細胞の一つのサブタイプであるダブルブーケ (DB) 細胞がどのようなターゲット特性を持つかを形態的に解析した。ラット前頭皮質のスライスを作成し、ホールセル記録法で非錐体細胞を染色した。カルレチニン (CR) を含有する事を免疫組織化学法で同定し

た下降軸索を持つ DB 細胞 3 個と、CRF を発現する 2 個の DB 細胞で 3 次元再構築法を使ってターゲットの種類を比較検討した。その結果、CR 陽性 DB 細胞のターゲットは、約 1/3 のものが非錐体細胞の樹状突起の幹であった。また、約 1/3 はそれ以外の樹状突起の幹であった。残り

の終末は、棘突起の頭部に入力していた。細胞体に対する入力は少数ではあるが存在した。また、CRF 陽性 DB 細胞のターゲットは、上述の種類に加えて、DB 細胞の持

つ垂直方向に伸びる樹状突起が 2-3 割占めていた。以上の点から、DB 細胞はさらに 2 種類のサブタイプに分かれる事が示唆された。

ラット前頭皮質における高頻度発火型介在神経細胞と線条体投射錐体細胞の神経結合

根東 覚, 川口 泰雄

前頭皮質は線条体に投射し線条体神経回路の活動を調節しているが、線条体投射錐体細胞へのシナプス入力についてはよく分かっていない。今回、逆行性標識とラットスライス標本での 2 細胞同時記録を組み合わせ、錐体細胞発火の調節に重要と考えられる FS 細胞と線条体投射錐体細胞の神経結合を生理学的・形態学的に解析した。FS 細胞は連続した発火で抑圧されるタイプの抑制性シナプス電流を生じ、結合部位近傍に限局した抑制を錐

体細胞にかけていた。これらの FS 細胞は細胞体への結合比率からバスケット細胞と考えられた。樹状突起上への結合は主として基底樹状突起に見られ、尖頭樹状突起には少なかった。FS 細胞の軸索は同じタイプの錐体細胞の多様なドメインにコンタクトしていたが、FS・錐体細胞ペアごとに固有のドメイン結合パターンをとった。シナプス電流振幅は結合部位数とは関係がなく、結合部位の細胞体からの最短距離とは高い相関がみられた。

皮質介在ニューロンの軸索・シナプスブトンの表現型

荏部冬紀, 川口泰雄

皮質回路で軸索が分枝しシナプス後要素を選択する規則はほとんどわかっていない。多様な介在ニューロンサブタイプの軸索分枝・シナプスブトン形成を定量化したところ、次のことがわかった。(1)各タイプは、細胞体にシナプスする割合、軸索の分枝頻度、細胞体より白質側にあるブトンの割合などで同定できる。(2)軸索分岐点(ノード)での分枝間角度や軸索の曲がりくねりには、サブタイプ間で差がみられない。(3)ノード間距離は指数分

布し、平均(標準偏差に等しい)は細胞ごとに異なる。(4)ブトン間距離も指数分布し、平均は細胞ごとに異なる。(5)ノード間距離とブトン間距離は独立に決まっており、各タイプはそれらの値の固有の組み合わせをとる。非錐体細胞は、軸索に沿っての分枝・ブトン形成は同じ分布型をとるが、その間隔の組み合わせはサブタイプごとに異なり、局所結合の強さ、後シナプス構造選択に関連していると考えられた。

心理生理学研究部門

【概要】

PET や機能的MRI など人間を対象とした非侵襲的脳機能画像と、電気生理学的手法を組み合わせ、短期および長期の学習に伴う脳の可塑的变化、高次脳機能の加齢変化と脳における代償機構の関連を明らかにすることを

目的としている。感覚脱失における可塑的变化から派生して、異種感覚統合の脳内機構の解明を目指とともに、言語処理から認知機能にわたる幅広い研究を行った。

視覚脱失による脳の可塑的变化

定藤 規弘

視覚障害者の視覚野は、視覚入力を失っているために、その本来の目的のためには用いられていないが、どのような機能をはたしているかは、不明であった。視覚障害者において点字読を遂行する神経回路網を特定するために、機能的MRIを用いた脳賦活検査を行った。盲人と晴眼者に対し、同一の非点字性触覚弁別課題を遂行させたところ、視覚障害者では、一次視覚野を含む後頭葉腹側が賦活化される一方、二次体性感覚野は抑圧されていた。晴眼者では、これとちょうど逆のパターン即ち後頭葉腹側が抑圧、二次体性感覚野が賦活化されていた。このような劇的な機能再構築が、年齢に依存するかをしらべるため、さまざまな失明年齢の点字読に熟達した被験者 15

名を対象として機能的 MRI による脳賦活検査を行った。16歳までに失明した被験者では一次視覚野が触覚弁別課題で賦活したが、それ以降に失明した被験者では賦活が見られなかった。視覚連合野においては年齢依存性が見られなかった。触覚刺激における視覚野の賦活はおそらく視覚連合野を経由するものと推測された。さらに、最近失明し点字トレーニングを始める前の視覚障害者 2 名に同様の触覚弁別課題による機能的 MRI を試行したところ、視覚連合野の賦活がみられた。これらのことから、視覚入力遮断の結果、触覚弁別処理が、その本来の入力をうける領域以外のところ(視覚野)で処理されうることが示された。(福井医科大学、福井大学との共同研究)

正常成人における視覚触覚統合（形状弁別）に関与する神経活動の解析

斎藤大輔, 定藤 規弘

正常成人における視覚触覚統合に関与する神経活動を解析するために、麻雀牌をもちいた形状弁別課題を考案した。麻雀牌にはさまざまなパターンが彫りこまれているため、形状を触覚、視覚のいずれでも判別できる。同種感覚からの形状情報を弁別する場合に比べて、異なる

感覚から入力された形状情報を弁別する際により強く活動する領域は、両側後部頭葉にみられ、この領域が、異種感覚統合に関連していると考えられた。

正常成人における視覚聴覚統合（特に口唇と音声）に関与する神経活動

定藤 規弘

視覚聴覚入力の統合は、対面コミュニケーションにおいて重要な役割を果たす。特に顔の表情や唇の動きは音声による意思疎通を向上させる。対面コミュニケーションにおける唇の動きの視覚情報は、聴覚言語理解を高めることが知られており、唇の動きが、音声入力なしに聴覚連合野を賦活することが機能的 MRI により示された。一方で発話の弁別特性が音響的でないことを示唆する知見があり (McGurk 効果)、人の発話のメッセージは調音器官の動きの中に符号化されている可能性が示唆されて

きた。発話の視覚入力が発話弁別に対してどのように影響するかを検証するために、発話を符号化した口の動きと符号化していない口の動きに対する脳活動の違いを、機能的 MRI を用いて測定した。健聴者 19 名を対象に機能的 MRI を試行した。課題は、500ms ずつ連続的に提示される 4 フレームの顔の動画において、最初と最後のフレームの動きが同じか否か判定するものである。視覚刺激のみ提示した。OPEN コンディションでは、/a/, /i/, /u/, /e/, あるいは/o/と発話している唇の動きを用いており、

CLOSE コンディションでは唇を閉じた状態の動きを用いた。対照として同じ顔面の静止画像を提示したコンディション (STILL) を設定し、以上 3 コンディションの stimulus onset asynchrony を最適化し event related fMRI を行った。OPEN-CLOSE の比較において、両側聴覚連合野の賦活がみられ、以前の報告に適合する所見であった。さらに、ブローカ領を含む左前頭前野から運動前野、そして補足運動野に賦活が見られた。これらの領域は CLOSE-STILL でも賦活が見られた。視覚的に入力された調音器官の動きが、発話に重要な役割を果たすブローカ領を含む左前頭前野から運動前野そして補足運動野を賦

活した。これらの領域は聴覚的に提示された音韻弁別においても賦活されることが知られている。また Broca 領は mirror system を形成することが示唆されており、Broca 領を含む左前頭葉が CLOSE コンディションにおいても賦活されたことはこれを裏付ける。OPEN-CLOSE でさらなる賦活を見た今回の結果は、mirror system が、視覚的に入力された調音器官の動きの中に符号化された発話メッセージを取り出すことに関与していることを示唆する。そして、それが側頭葉における音響的聴覚的な弁別を高めるのであろう。

発達期における聴覚脱失による可塑的变化

定藤 規弘

健聴者においては、読唇により側頭平面の賦活が見られ、視聴覚統合の脳内表現と目されている。聴覚脱失によりこの視聴覚統合をになう神経回路に可塑的变化が起こるかを検証する目的で、聴覚障害者を対象に、機能的 MRI を試行した。早期失聴者 7 名と健聴者 19 名を対象に機能的 MRI を試行した。課題は、口唇の動きの弁別、手話単語弁別、そしてランダムドットの動きの弁別である。早期失聴者においては、健聴者に比較して、口唇の

動きの弁別、手話単語弁別課題遂行により、左側頭平面においてより強い賦活が見られた。さらにランダムドットの動きの弁別により、右側頭平面においてより強い賦活が見られた。これらの領域はいずれも、健聴者において、読唇により賦活された。このことから、聴覚脱失による可塑的变化の少なくとも一部は、視聴覚統合をになう神経回路により担われていることが示唆された。

自閉症の認知機能解明のための研究

山本幸子、定藤規弘

神尾陽子 (九州大学)

平谷美智夫、河村佳保里 (平谷こども発達クリニック)

自閉症は社会性の障害を主訴とする発達障害であり、遺伝的素因による発達初期の脳機能障害が背景にあると考えられる。しかし、具体的にどのようなメカニズムによって自閉症が発現するか明らかでない。本研究では自閉症の社会性障害の背景にあると考えられる、いくつかの非定型な認知機能を明らかにすることを目的としている。社会性の背景にある認知機能を明らかにする課題として、言語と動作の異種感覚統合というコミュニケーションに

関連する機能を見ることができると考えられる課題を用いた。言語記憶に与える動作の効果を調べ、自閉症と定型発達でその結果を比較した。定型発達では動作を行うことで言語的な記憶が促進されたが、自閉症では起こらなかった。自閉症におけるコミュニケーションに必要なと考えられる異種感覚統合過程が定型発達とは異なっていることが示された。さらに、これらの課題の脳内基盤について検討している。

聴覚-視覚刺激対連合学習における脳活動変化

田邊 宏樹（科学技術振興機構）

定藤 規弘

無関係な2つの情報を結びつける対連合学習課題を通して、記憶の形成と記憶されたものの表現に関わる可塑的な神経基盤を機能的MRIを用いて検討した。「結びつけること」に関係している領域は学習の初期に活動が高く学習が進むにつれて活動が下がり、一方「結びついたものの表象」に関わる領域は、学習が進むにつれてその活動を増大されることが予想されるので、そのような学習

に伴い増減する脳活動を全脳において網羅的に捉えるWhole-brain cross-trial regression analysisを開発し、解析を行った。その結果、連合の形成には上側頭溝前方部が、連合学習により形成されたペアの記憶はunimodal領域とpolymodal領域に分散された形で表象され、さらにpolymodal領域がそのネットワークの結び目(node)となっていることが示唆された。

視覚刺激に対するNIR, fMRI同時計測

豊田浩士，定藤規弘，柏倉健一（群馬県立医療短期大学），笠松真吾（福井大学）

岡沢秀彦（福井大学），藤林靖久（福井大学），米倉義晴（福井大学）

刺激提示後の神経活動に伴うfMRI信号変化に関しては未だ正確な機序は不明である。視覚刺激に対してNIRS, fMRI同時計測を行い、両者の信号の反応曲線からfMRI信号変化の成因を検討することを本研究の目的とした。

5名の健常人を被験者とし、チェッカーボードを視覚刺激として提示した。刺激提示時間を変化させ、それぞれを繰り返した。

還元型ヘモグロビンの濃度変化率はfMRI信号とほぼ同時に基線と交差し、overshootを示した。計算により求めた脳血液量の増加変化はfMRI信号が基線と交わる以前に基線レベルに戻ると推定され、それ以降のfMRI信号のundershootを示す部分は酸素代謝の上昇が主成因と推定された。

前補足運動野が言語情報処理に果たす機能的有意性の検討

本田 学，田中 悟志

高次運動皮質である（前）補足運動野の機能は運動制御に限定されるのではなく、言語のような一次元情報を逐次的に直列処理する際に重要な役割を果たす可能性が脳機能イメージングによって示唆されている。しかしその機能的有意性はあきらかではない。そこで機能的磁気共鳴画像法と経頭蓋磁気刺激法をくみあわせてもちいることによりその機能的有意性を検討した。まず言語的表象操作課題を実施しているときの前補足運動野の活性部位

を個人ごとに同定した。次に経頭蓋磁気刺激法をもちいて同部位の脳活動を一過性に干渉することによって、言語的表象操作課題ならびに空間的表象操作課題の成績に及ぼす影響を検討した。その結果、前補足運動野の活動の干渉は言語的表象操作課題の反応時間を選択的に延長することを見出した。この結果は、内側運動前野が逐次的連続的な操作に有意な役割を果たしていることを示唆している。

超可聴域超高周波成分の増強による行動制御の検討

本田 学

八木玲子 (総合研究大学院大学)

仁科 エミ (メディア教育開発センター)

大橋 力 (国際科学振興財団)

これまでの検討により、人間の可聴域上限を超える非定常な成分を豊富に含む音は、情動と感性を介して行動制御にかかわる神経回路(中脳背側部, 前頭前野眼窩部, 前帯状回, 前頭前野内側部)を活性化することが明らかとなっている。またこうした音成分は、人間の遺伝的進化の舞台となった熱帯雨林の自然環境のなかに豊富に含まれていることから、人間の環境情報把握能力ならびにそれに基づいた行動制御に密接に関連されることが予想

される。そこで超高周波成分の増強が刺激受容行動(接近行動)に対して及ぼす影響を検討した。超可聴域成分を原音のまま呈示する条件, 超可聴域成分のみを3dB増強した条件, 6dB増強した条件で、最適聴取レベルを検討したところ、3dB増強条件で最大の最適聴取レベルを示した。このことは超高周波成分の増強は、刺激受容促進効果をもたらすものの、強度-効果の関係は非線形であり、なんらかの最適値を示すことを示唆している。

乗法型変調非線形自己回帰モデルをもちいた大脳皮質-筋肉間機能連関の検討

本田 学

加藤比呂子 (NTT コミュニケーション科学基礎研究所)

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

て、外生変数が説明変数の振動特性の部分に直接影響を及ぼすモデル(Multiplicatively modulated exponential (mmExpAR) model)を提案し、大脳皮質-筋肉間の機能連関解析に適用してきた。さらにその検討をすすめて、外生変数の影響のしかたにradial basis functionを加えることによって、大脳皮質電位を外生変数として筋電位の自己相関係数に対して変調を加えるモデルの推定誤差が減少することを明らかにした。

両手協調運動における相転移現象に関わる神経基盤

荒牧勇 (科学技術振興機構)

定藤規弘

周期的な両手協調リズム運動においては、同位相モードと反位相モードという2つの安定なモードがある。この2つのモードの安定性は等価ではなく、運動周波数の増加などにより反位相モードから同位相モードへの突然

の変化がおきる(相転移現象)。本研究はこうした運動パターン of 突然の転移に関連する脳活動を事象関連磁気共鳴画像法を用いて調べた。その結果、相転移現象に関連する領域は、前補足運動野、運動前野吻側、下頭頂葉と

いった、運動の計画に関与すると考えられている脳部位であった。一方、反位相モードや同位相モードの維持に関連する領域は固有補足運動野、運動前野尾側、一次運動野といった、運動の実行に関与する脳部位であった。また、相転移に関連する脳活動は右半球優位であったが、

この偏在は、行動データにおいて相転移時に左手の運動が乱れる傾向があることと関係すると考えられ、両手協調運動において半球間の相互作用が非対称である可能性が示唆された。

発達生理学研究系

認知行動発達機構研究部門

【概要】

2003年度、6月より吉田正俊君が東京大学大学院(統合生理)より助手として着任し、サルの眼球運動を用いた認知機能の研究プロジェクトが開始された。また4月より加藤利佳子君、西村幸男君が博士研究員として着任した。また5月よりタイ国チュラロンコン大学より Thongchai Sooksawate 博士が1年間の予定で外国人研究員に着任、8月よりロシア国パヴロフ生理学研究所より Nikolay Nikitin 博士が外国人客員教授として赴任した。その後加藤君はフランスのコレージュ・ド・フランスに留学した。研究テーマは、大脳皮質一次視覚野損傷後のサルの認知・行動制御機構の研究(吉田ら)、上丘へのニコ

チン注入が眼球サッケード運動制御に与える効果(渡邊ら)、サルの上肢運動制御の際の感覚入力 of 修飾機構(関ら)、脊髄レベルでの皮質脊髄路損傷後の手指の巧緻運動の機能代償機構(西村ら)、霊長類上丘局所神経回路での信号伝播機構(Nikitin, 加藤ら)、上丘中間層へのコリン作動性入力の作用(Sooksawate ら)、上丘視神経層の wide field vertical cell の樹状突起における H 電流の機能(遠藤ら)、マウスの上丘電気刺激によって誘発されるサッケード運動の解析(坂谷ら)など、スライス標本から麻酔下動物、覚醒サルまで多様なレベルを組み合わせた研究が展開されるようになった。

脊髄レベルでの皮質脊髄路損傷後の手指の巧緻運動の機能代償機構

西村幸男, 伊佐正

尾上浩隆(東京都神経研), 塚田秀夫(浜松ホトニクス中央研究所)

5頭のマカクザル(ニホンザル4頭, アカゲザル1頭)においてC4/C5髄節で側索背側部を切断した。これらのうち切断が皮質脊髄路に限局していた2頭においては precision grip は切断後1週間以内に出現し、運動は1月程度でほぼ正常に近いレベルまで回復した。切断が側索全体に及んでいた2頭では precision grip の出現に3-4週間を要し、3-4ヶ月で運動の回復がほぼ正常レベルに達した。しかしこのような行動の回復後も把持力の弱さと、把持の直前の preshaping の消失と第2指による接触の後第一指を閉じる運動が開始されるという所見は残存した。これらのサルの行動観察が終了した時点で α クロラロースによる麻酔下で上肢筋運動ニューロンから細胞内記録を行い、反対側錐体路を電気刺激したところ、約半数の

運動ニューロンで2シナプス性のEPSPが記録された。健常な動物ではこのような2シナプス性のEPSPはほとんど記録されないことから、機能回復過程において2シナプス性の興奮性経路ないしはそれに対する抑制系に何らかの変化が生じたものと考えられた。

次にこの機能回復過程における大脳皮質など、より上位中枢で再組織化が起きている可能性を検討するため、2頭のサルにおいて上肢の到達一把持運動遂行中のPETによる脳賦活イメージングを行なった。すると1ヵ月後には切断の両側の一次運動野、体性感覚野および補足運動野において顕著な活動の上昇が見られた。3ヵ月後には全体的に活動の減弱が見られたが、両側の一次運動野と運動前野腹側部において活動の増大が持続した。

サル上丘へのニコチン局所注入がサッケードに与える効果の解析

渡邊雅之, 伊佐正

小林康 (大阪大学生命機能研究科)

中脳の上丘はサッケードを制御する中心的な領域である。上丘中間層にはサッケードのベクトルマップが存在し、各サッケードに先行して対応する領域の神経細胞群がバースト発火を示す。上丘中間層には近接する領域間は興奮性、離れた領域間は抑制性の内在性回路が存在する。この内在性回路の機能的意義について検討するため、上丘局所領域にアセチルコリンのアゴニストであるニコチンを微量注入して神経細胞活動を増強し、サッケードへの影響について検討した。注入後、自発サッケードは注入部位の神経細胞群が表現する領域（注入部位表現領域）に頻繁に向かった。この結果は、ニコチンが上丘神経細胞活動を増強するという仮説と一致する。視覚誘導

性サッケードの反応潜時は、標的が注入部位表現領域近傍に呈示された場合に短縮した。しかし、標的が注入部位表現領域から離れていた場合、反応潜時の遅延は生じなかった。サッケードの終点、軌道は注入部位表現領域方向にバイアスした。終点への影響と比較すると、反応潜時への影響はより注入部位表現領域近傍に局限していた。これらの結果は、反応潜時は上丘の局限した領域の活動によって決定され、終点、軌道はより広い範囲の活動によって決定されると想定したモデルと一致する。しかし、反応潜時の遅延が生じなかった結果より、上丘内の抑制性内在性回路は運動準備期間中の活動を制御するほど十分に強くはないと考えられた。

サルを用いた盲視 (blindsight) の神経機構の解明

吉田 正俊, 伊佐 正

盲視の動物モデルとして片側の第一次視覚野を外科的に切除したニホンザルを作成して、急速眼球運動課題を用いた行動実験を行った。

以下の課題を第一次視覚野の除去手術の前に習得させた。(1)強制選択型および(2)yes-no 課題型の視覚誘導性眼球運動課題, (3)記憶誘導性眼球運動課題, (4)視覚手掛かりを提示した注意課題。つづいて第一次視覚野の除去手術を行い、手術後の再トレーニングによって以下の結果を得た。

(1)を遂行できることを確認した。欠損半視野で弁別できる標的刺激の閾値は手術前と比べて上昇していた。また、gap 条件によって express saccade が起こることを見出した。(2)の成績が(1)よりも悪いことを見出した。(3)を遅延時間 2 秒でも遂行できることを見出した。このことは、視覚手掛かりの位置情報を短期記憶として保持できることを示している。さらに(4)において、視覚手掛かりを用いた注意の効果がみられることを見出した。

サルにおける上丘局所神経回路の解析

Nikolay Nikitin, 加藤利佳子, 伊佐正

イソフルレン麻酔下のサルにおいて視交叉の電気刺激ないしはフラッシュ光に対する応答を上丘の異なる層においてフィールド電位として記録した。

すると、上丘の背側表面から深さ 1 ミリまでの浅い層

では電気刺激で潜時 6-8ms, 光刺激で潜時 38-46ms の陰性電位が記録された。これらはより深い層（中間—深層深さ 1-2 ミリ）で反転した。そしてビククリン (10mM, 2 μ l) を近傍に注入すると、中間—深層において電気刺激で潜

時 13 ミリ秒, 光刺激で 45 ミリ秒で 100-150 ミリ秒持続する陰性波が出現した。これらの結果は中間-深層において GABAA 受容体を介する抑制が解除されたときに視

覚入力が浅層を介して中間-深層を活性化すること, すなわち霊長類においても上丘浅層から中間-深層への線維連絡が存在することを示唆している。

マウスの上丘電気刺激により誘発されるサッケード運動とその制御の分子機構

坂谷 智也, 伊佐 正

サッケードの制御における各種神経伝達物質の役割について, これまでのところほとんど不明である。我々が新たに開発したマウスのサッケード測定システム, ならびに上丘電流刺激によるサッケード誘発系を, 抑制性神経伝達物質 GABA の合成酵素である GAD65 のノックアウトマウスに適用し, サッケード制御システムにおける GABA の役割について解析した。その結果 GAD65KO マウスでは (1) 刺激中に眼球の不安定な振動が頻繁にみら

れ (2) サッケードの最大速度が上昇し (3) 振幅の大きなサッケードがみとめられなかった。以上の結果とサッケード制御の理論モデルに基づいた計算機シミュレーションの結果を比較することにより, サッケード制御系において GAD65 由来の GABA が主としてサッケードの振幅を計算するフィードバックの効率調節に関与していることが示唆された。

上丘出力ニューロンの樹状突起での活動電位生成とその I_h による制御

遠藤利朗, 伊佐 正

Wide field vertical (WV) cell は上丘から視床に投射する主要な出力ニューロンの一つであり, 視覚対象の動きの検出に関係すると考えられている。我々は入力線維刺激への反応の解析から, このニューロンでは入力に対して活動電位が樹状突起で開始されることを示す結果を得た。また, WV cell は hyperpolarization-activated cation current (I_h) を顕著に示し, I_h チャネルのうち HCN1 を主に

樹状突起に発現することを明らかにした。 I_h の抑制薬の効果から, HCN1 は樹状突起における活動電位の開始または細胞体への伝導を促進していると考えられる結果を得た。このような特性は WV cell が樹状突起への入力を統合して動く視覚刺激を鋭敏に検出するのに重要であると考えられる。

ニコチン型アセチルコリン受容体 (nAChR) による GABA 性神経伝達の修飾

遠藤利朗, 伊佐 正

二丘傍核から上丘浅層へのコリン作動性投射は GABA 作動性抑制を調節すると考えられていたが, 機構の詳細は分かっていない。一方, 上丘浅層ニューロンは nAChR を発現することが組織学的研究から知られていたが, 機能はまったく不明であった。我々は GAD67-GFP マウス

で上丘浅層ニューロンの ACh に対する電流応答を調べ, GABA 作動性介在ニューロンは nAChR サブタイプのうち, $\alpha 7$ 型と $\alpha 3\beta 2$ 型を発現することを明らかにした。また nAChR は投射ニューロンへの GABA_A 受容体を介した抑制をシナプス前性に強力に促進することを見出した。

ラット上丘中間層に対するコリン作動性入力の子ナプス後作用

Thongchai Sooksawate, 伊佐 正

上丘中間層には中脳脚橋被蓋核、背外側被蓋核からコリン作動性線維が投射することが知られているが、その作用は十分に解析されていない。このコリン作動性入力の作用機序を明らかにするため、生後 17-22 日のラットの上丘中間層ニューロンから whole cell 記録を行い、アセチルコリンのアゴニストであるカルバコール 30 μ M を持続投与して応答を解析した。その結果、大多数のニ

ューロンで $\alpha 4\beta 2$ 型ニコチン受容体の活性化を介する速い内向き電流ないしは M3 型ムスカリン受容体を介する遅い内向き電流が記録された。また一部のニューロンでは M2 型ムスカリン受容体を介する外向き電流が記録された。大多数のニューロンで内向き電流が主体であったことから上丘中間層に対するコリン作動性入力の主たる効果は興奮性であると結論された。

ラット上丘中間層における GABA 作動性シナプス伝達に対するムスカリン受容体の活性化によるシナプス前抑制

李鳳霞, 遠藤利朗, 伊佐 正

上丘中間層に対する中脳脚橋被蓋核、背外側被蓋核からのコリン作動性線維の機能を明らかにするため、生後 17-22 日のマウスの上丘中間層ニューロンから whole cell 記録を行い、グルタミン酸受容体の拮抗薬である CNQX, APV 存在下で近傍を電気刺激して誘発される IPSC に対するムスカリン 10 μ M の持続投与の効果を解析した。その結果、IPSC は 70% にまで減弱した。この抑制に際して IPSC の paired pulse ratio が増加し、coefficient of variation も増加した。また puff 投与した GABA_A 受容体のアゴニスト muscimol によって誘発される電流応答に対して muscarine は抑制効果を持たなかった。また muscarine によって miniature IPSC の頻度は減少したが振

幅に変化はなかった。以上の結果から muscarine による IPSC の抑制作用はシナプス前性であると結論された。そしてこの muscarine による抑制作用は pirenzepine, 4-DAMP によって阻害されたが、methoctramine は作用が見られなかった。これらの結果は muscarine によるシナプス前抑制作用が M1, M3 型ムスカリン受容体によるものであることを示す。このようなムスカリン受容体による GABA 作動性シナプスに対する抑制作用はニコチン型受容体, M3 型受容体によるシナプス後性興奮作用とともに上丘からの出力を促進する方向に作用すると考えられる。

随意運動の制御における脊髄介在ニューロンの役割

関 和彦, 武井 智彦, 高橋 伸明

覚醒サル脊髄介在ニューロンの活動を記録する方法を用いた 2 種類のプロジェクトが現在進行している。

1) 脊髄介在ニューロンによる随意運動時の末梢感覚の制御随意運動時には末梢受容器からの感覚フィードバックが時々刻々と中枢神経系に伝達される。我々の中枢神経系はこれらの情報をどのように処理して運動の遂

行・準備に役立っているのだろうか。この点を知るため、サルに手首の屈曲伸展運動を訓練し、その際の末梢神経刺激に対する反応を、下位頸椎に装着したチェーンバーを介して記録している。これまで、皮膚入力の一部がシナプス前抑制によって抑圧されることが明らかになっている。

手指の繊細な運動の制御における脊髄介在ニューロンの役割

手指の繊細な運動 (例えば precision grip) の制御は主に大脳皮質を中心に行われていると考えられている一方、脊髄介在ニューロンの役割はほとんど知られていない。

そこで我々はサルに precision grip 課題を訓練し、脊髄介在ニューロンの活動を記録している。脊髄と大脳皮質がどのように連携して precision grip の制御を行っているのかを知る事が目標である。

生体恒常機能発達機構研究部門

【概要】

当部門は 2003 年に新設され、同年 11 月に鍋倉淳一が教授として就任した。現座、発達の過程で一旦形成された神経回路に起こる再編成のメカニズムを回路レベルで解明することを目標に研究をしている。特に、発達期における再編のメカニズムとして、シナプスレベルにおいて、伝達物質のスイッチング、細胞内イオン環境の変化による GABA の興奮性から抑制性へのスイッチとその制

御機構、受容体の細胞内動態やこれらに対する神経栄養因子、環境／回路活動による制御を検討している。

また、傷害や虚血などの種々の障害後に一旦未熟期における回路特性が再現し、回復に伴い発達と同様な再編成過程が再現される可能性について、電気生理学的、分子生物学、組織学的手法を用いて研究を行なっている。

発達期における神経伝達物質のスイッチング

鍋倉淳一

石橋仁 (九州大学)

神野尚三 (九州大学)

松原篤 (弘前大学)

ラット聴覚系中経路核である外側上オリーブ核に内側台形体核から入力する伝達物質自体が未熟期の GABA から成熟期のグリシンに単一終末内でスイッチすることを微小シナプス電流の特性の解析などの電気生理学的手法、神経終末内の GABA, GAD やグリシン免疫電顕や免疫組織学的手法を用いて明らかにした。この伝達物質のスイッチングは、発達期における主要な再編成機構である余

剰回路の除去や伝達物質受容体の変化と並ぶ大きなカテゴリーの変化と考えられる。現在、脳の発達に対する GABA の重要性に注目が集められている。このモデル系において何故未熟期には GABA である必要があるのかを、GABA の未熟期における興奮性および GABA_B 受容体の発達変化と関連機能について検討している。

細胞内 Cl⁻ 制御機構 KCC2 による GABA の興奮－抑制スイッチと分子機構の解明

鍋倉淳一

張一成 (九州大学)

福田敦夫 (浜松医科大学)

未熟期および虚血や傷害後早期に GABA は興奮性伝達

物質としての作用を獲得する。これは GABA_A 受容体に

内蔵するチャネルを流れる Cl^- イオンの向きによって決定されるため、細胞内 Cl^- イオン濃度によって GABA は興奮性／抑制性が決定される。この細胞内 Cl^- イオン濃度は神経細胞特異的に発現する K^+-Cl^- トランスポーター

である KCC2 によって主に決定されている。発達期や再生期における KCC2 の発現、およびその機構を検討している。

BDNF による大脳皮質細胞における GABA 受容体の 細胞内動態と分子機構

鍋倉淳一

溝口義人（九州大学）

平田雅人（九州大学）

兼松隆（九州大学）

脳由来神経成長因子である BDNF は未熟期（生後 2 週目）には大脳皮質視覚野錐体細胞では、数分という短時間で細胞膜表面の GABA_A 受容体の増加をとまなう GABA 応答の長期増強を引き起こす。逆に、同時期の海馬 CA1 細胞や成熟期の大脳皮質細胞では膜表面の受容体の減少を伴う GABA 応答長期抑制を起こす。この作用は

何れも細胞内 PLCgamma, Ca^{2+} を介する。この部位差および age 差のメカニズムを検討するために、GABA 受容体のリサイクリングに関するメカニズムの解明のために GABA 受容体 β サブユニットに作動する蛋白 (phospholipase C-related inactive protein) に注目し、遺伝子改変動物などを用いて検討している。

生殖・内分泌系発達機構

【概要】

本研究部門は、視床下部による摂食行動の調節と末梢組織における代謝調節機構の解明を目指して研究を行っている。視床下部は、摂食行動（エネルギー摂取）とエネルギー消費機構（栄養代謝）を巧みに調節することによって生体エネルギーを一定に保つ重要な働きを担っている。しかし近年、この調節機構の異常が肥満、糖尿病、高血圧など、生活習慣病の発症と密接に関連することが明ら

かとなってきた。当部門では、視床下部における生体エネルギー代謝の調節機構を分子レベルで解明し、その分子機構を通して生活習慣病など様々な疾患の原因・治療法を明らかにしたいと考えている。現在実施している主たる研究課題は次の通りである。1) AMP キナーゼによる生体エネルギー代謝の調節機構の解明、2) レプチン、神経ペプチドによる糖・脂質代謝調節機構の解明。

AMP キナーゼによる生体エネルギー代謝の調節機構

箕越 靖彦

AMP キナーゼは、細胞内のエネルギーレベルが低下する危機的な環境で活性化し、エネルギー基質を動員して細胞内 ATP レベルを回復させる。しかし最近、我々は、AMP キナーゼがレプチンやアディポネクチンなどホルモンによって活性化して骨格筋における脂肪の利用を促

進すること、視床下部 AMP キナーゼがレプチンなど摂食調節ホルモン、グルコースによって活性を変え、その作用を通して摂食行動を制御することを明らかにした (Minokoshi Y, et al, Nature 415: 339, 2002)。このように AMP キナーゼは、細胞内エネルギーレベルを調節するだ

けでなく、レプチンなどホルモンの働きを介して生体全体のエネルギー代謝を調節している。本研究課題では、AMP キナーゼによる生体エネルギー代謝の調節機構を明らかにするため、活性型並びに不活性型 AMP キナーゼ

を視床下部の各種神経細胞や骨格筋にレンチウイルスを用いて特異的に発現させ、摂食行動、栄養代謝に及ぼす影響を調べている。

レプチン、神経ペプチドによる糖・脂質代謝調節機構の解明

箕越 靖彦

我々は、脂肪細胞産生ホルモン・レプチンが摂食行動を抑制するだけでなく、視床下部－交感神経系の働きを介して褐色脂肪組織や骨格筋などエネルギー消費器官でのグルコースおよび脂肪酸の利用を促進することを明らかにしてきた。レプチンは、脂肪萎縮症において発症する重篤な糖尿病を改善することが知られており、その作用の少なくとも一部は、上記調節機構が作動している可能性が高い。我々は、この作用がレプチンだけでなく、

視床下部に特異的に発現する神経ペプチド・オレキシンによっても惹起されることを見いだした。現在、骨格筋でのグルコース利用・インスリン感受性を亢進させるオレキシンの生理的意義を解析している。また、その作用機構を明らかにするため、カテコラミンβ受容体の(β1, β2, β3 受容体)ノックアウトマウスを用いて研究を行っている。

環境適応機能発達研究部門

【概要】

われわれは、感受性の高い特定の時期に成立し、生存に不可欠な3種の匂い記憶・学習のメカニズムを分子、細胞、システムレベルで解明することを目指している。3種とは、(1)雌マウスに形成される交配雄の匂い(フェ

ロモン)の記憶、(2)幼若ラットにおける匂い学習、及び(3)母親による子の匂いの記憶であり、行動薬理、電気生理、組織化学、遺伝子工学、パイオイメーキング等の手法を組み合わせで解析している。

フェロモン記憶の保持に関連した相反性シナプスの再編成

松岡勝人、車田正男(新潟大学)

梶 秀人

Richard Costanzo (Virginia Commonwealth University)

守屋敬子、吉田一松岡淳子、市川眞澄(東京都神経科学総合研究所)

電子顕微鏡を用いてシナプスの微細形態を観察することによって、雌マウスに形成されるフェロモン記憶は副嗅球の僧帽細胞と顆粒細胞との間に形成されている相反性相互シナプスの形態学的変化によって支えられている。記憶を形成していない対照群に比較して、記憶形成群では僧帽細胞から顆粒細胞への興奮性シナプスの後膜肥厚

のサイズが増大している。さらに、興奮性シナプスと抑制性シナプスの後膜肥厚のサイズを記憶形成の時点から経時的に解析した。驚いたことに、興奮性シナプスの後膜肥厚サイズの増大は記憶形成から5日間維持されたが、それ以降は記憶前のレベルに戻っていた。代わって、顆粒細胞から僧帽細胞への抑制性シナプスの後膜肥厚のサ

イズが遅れて増大し、その増大は記憶の保持期間の間、維持された。この結果は、記憶の永続性が静的というよ

りはむしろ動的な形態変化によって維持されていることを示唆している。

フェロモン記憶の電気生理学的相関

黄 光哲（高知大学）

梶 秀人

スライス標本を用いて、副嗅球の僧帽細胞から顆粒細胞への興奮性シナプス伝達とその可塑性について解析した。僧帽細胞の軸索（外側嗅索、LOT）を電気刺激すると副嗅球の外叢状層において2峰性の誘発陰性フィールド電位が記録された。第2番目の電位の発生はCNQXによって抑制され、第1番目の電位の発生は、CNQXにもAP5にも影響されず、TTXによって抑制されたことから、第1番目の電位は僧帽細胞の逆行性興奮を、第2番目の電位は顆粒細胞樹状突起に発生した興奮性シナプス後電

位（フィールドEPSP, fEPSP）を表わしている。LOTを比較的低頻度で長時間（10Hz, 20発, 3分間隔で4回）刺激すると、fEPSPの長期増強(long-term potentiation: LTP)が誘導された。LTPはNMDA受容体依存性に成立し、ノルアドレナリン(NA)によってゲートされた。以上のLTPの特徴は、フェロモン記憶の特徴を再現している。このことは、LTPの解析を通してフェロモン記憶のメカニズムが理解されうること示唆している。

共培養下における副嗅球ニューロン-鋤鼻ニューロン間の機能的シナプス形成

村本和世, 黄 光哲, 谷口睦男（高知大学）

梶 秀人

嗅覚は脳の進化のごく初期に獲得された感覚で、脳の神経回路形成や機能を理解するうえで基本的なモデルとなると考えられている。われわれは、フェロモン情報処理に関わる鋤鼻系の試験管内再構築系を用いて、神経回路形成機構や個体識別機構等の解明を目指している。鋤鼻系の感覚受容細胞である鋤鼻ニューロンは培養下で内腔をもつ球塊（鋤鼻細胞塊）を形成するため、副嗅球細

胞との共培養下で容易に識別が可能である。しかし、フェロモンを含む尿に対する鋤鼻感覚細胞の応答は、単独培養下では観察されない。今回、ラットの副嗅球ニューロンと鋤鼻細胞塊との共培養下で副嗅球ニューロン-鋤鼻ニューロン間に機能的なシナプスが形成されていることを認めた。

幼若ラットにおける匂い学習とLTPとの相関

張 敬姫, 奥谷文乃, 黄 光哲（高知大学）

梶 秀人

幼若ラットに匂いと電撃を対提示すると、この匂いに対する嫌悪学習が成立する。この学習は匂いシグナルと

青斑核ノルアドレナリン作動性神経によって伝達される電撃シグナルが主嗅球において連合することによって成

立する。われわれは、この学習を支えるシナプスの可塑的变化が主嗅球の僧帽細胞と顆粒細胞との間に形成されている相反性相互シナプスに起こることを示唆してきた。今回、行動薬理と電気生理の両面から学習のメカニズムを解析した。この嫌悪学習は beta 受容体アンタゴニストによって阻害され、さらに NMDA 受容体アンタゴニスト(AP5)ではなく、L 型カルシウムチャネルブロッカー(nifedipine)で阻害された。スライス標本を用いて、主嗅

球の僧帽細胞から顆粒細胞への興奮性シナプス伝達を解析した。僧帽細胞の軸索に高頻度刺激(100Hz, 100 発, 3 分間隔で 3 回)を与えても、このシナプス伝達に短期増強しか誘導されないが、ノルアドレナリンを添加すると強固な長期増強(LTP)が誘導された。この LTP は beta 受容体アンタゴニストによって阻害され、さらに AP5 ではなく nifedipine で阻害された。以上の結果は LTP と学習との強い相関を示唆している。

脳機能計測センター

形態情報解析室

【概要】

形態情報解析室は、形態に関連する超高圧電子顕微鏡室（別棟）と組織培養標本室（本棟 2F）から構成される。

超高圧電子顕微鏡室では、医学生物学用超高圧電子顕微鏡（H-1250M 型；常用 1,000kV）を、昭和 57 年 3 月に導入して同年 11 月よりこれを用いての共同利用実験が開始されている。平成 15 年度は共同利用実験計画が 22 年目に入った。本研究所の超高圧電顕の特徴を生かした応用研究の公募に対して全国から応募があり、平成 15 年度は最終的に 11 課題が採択され、その内 10 課題が実施された。これらは、厚い生物試料の立体観察と三次元解析、薄い試料の高分解能観察等である。共同利用実験の成果は、超高圧電子顕微鏡共同利用実験報告の章に詳述されている。超高圧電子顕微鏡室では、上記の共同利用実験計画を援助するとともに、これらの課題を支える各種装置の維持管理及び開発、医学生物学用超高圧電子顕微鏡に関連する各種基礎データの集積および電子顕微

鏡画像処理解析法の開発に取り組んでいる。電子線トモグラフィーによる手法には、UCSD, NCMIR による方法及びコロラド大で開発された IMOD プログラムでの方法を用いて解析を進めている。

本年度の超高圧電顕の利用状況の内訳は、共同利用実験等 135 日、修理調整等 55 日である（技術課脳機能計測センター形態情報解析室報告参照）。電顕フィルム等使用枚数は 5,068 枚、フィラメン点灯時間は 417.8 時間であった。装置は、平均 71% の稼働率で利用されており、試料位置で 10^{-6} Pa 台の高い真空度のもとに、各部の劣化に伴う修理改造を伴いながらも、高い解像度を保って安定に運転されている。

組織培養標本室では、通常用および P2 用の培養細胞専用の培養機器と、各種の光学顕微鏡標本の作製および観察用機器の整備に勤めている。

小脳プルキニエ細胞のゴルジ染色と免疫染色の比較

山口 登, 古家 園子, 有井 達夫

我々は高い電子線透過能と、5 μ m を越える生物試料でも 4-5nm の解像力が期待できる 1,000kV 超高圧電子顕微鏡の特性を利用して、ラット小脳におけるプルキニエ細胞のゴルジ染色と免疫染色の三次元形態の比較を行っている。

3 μ m の切片について、-8 度と+8 度でのステレオ写真を撮影し比較に用いた。ゴルジ染色の結果を 1 図に、免疫染色の結果を 2 図に示す。ゴルジ染色の場合には偶

発的に染色されるが一旦染色されるとその細胞全体にわたって均等に染色されていることが分かる。免疫染色の場合には抗体の分布に依存して形状が細くなる場合などゴルジ染色に比較して細胞の形状を正確には反映しないことが分かる。しかし目的とする細胞を確実に同定できるので、コントラスト付加の方法をさらに工夫することにより、応用範囲はさらに拡大することが期待される。

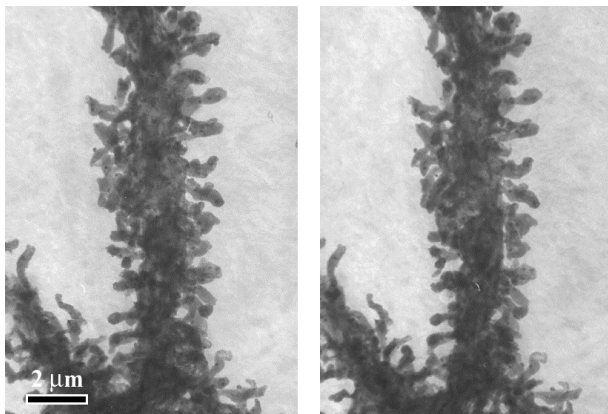


図1. プルキニエ細胞: ゴルジ染色 (±8° 傾斜)

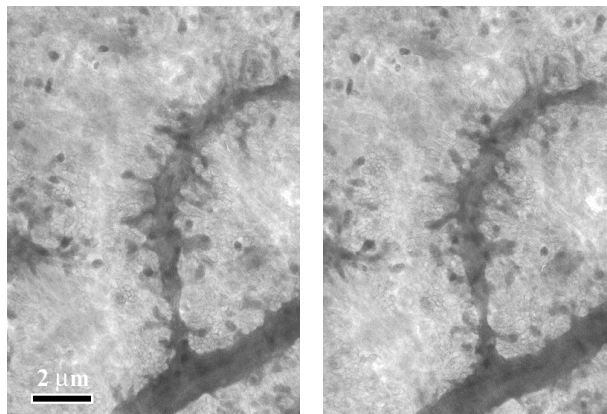


図2. プルキニエ細胞: 免疫染色 (±8° 傾斜)

メカノセンサーとしての小腸絨毛上皮下線維芽細胞

古家園子, 古家喜四夫 (科学技術振興事業団, 細胞力覚プロジェクト)

小腸絨毛上皮下線維芽細胞は消化管上皮の基底膜の下で細胞網を形成し, lamina propria を包んでいる特殊な線維芽細胞である。この1つの細胞にタッチやストレッチの機械的刺激を与えると, ATP を放出し, 細胞間を伝播する Ca^{2+} 波を発生するとともに, 細胞の収縮も波のように細胞間を伝播していく。絨毛上皮下線維芽細胞は血管や神経終末, 絨毛の平滑筋とも隣接しており, 絨毛におけるシグナル伝達の要の役割をはたしていると考えら

れる。

今回, 小腸絨毛下線維芽細胞と神経細胞を co-culture した。タッチ刺激により発生した Ca^{2+} 波が小腸絨毛下線維芽細胞から神経細胞に伝播することが明らかになった。

小腸絨毛上皮下線維芽細胞は食物や水の摂取による機械刺激を感じるメカノセンサーであり, そのシグナルを知覚神経に伝達して摂食反射を引き起こしていると考えられる。

機能情報解析室

【概要】

随意運動や意志・判断などの高次機能を司る神経機構の研究が進められた。サルを検査対象として, 大脳皮質

フィールド電位の直接記録や陽電子断層撮影法などを併用して解析している。

意志に関する脳活動の研究

達本 徹

「意欲」や「意志」の神経機序は不明な点が多い。これまでに陽電子断層撮影法を用いた研究で, 前頭前野・前帯状野・海馬の脳血流量が想定される意欲の変化と一致した変動を示すことを明らかにした。大脳辺縁系と前頭

前野の「意欲」への関与を示唆する知見と考えられる。さらに一步進めて, この脳領域でどのような神経活動が行われているのかを解明するために, 運動課題を行うサルの前頭前野や前帯状野の大脳皮質フィールド電位を記

録した。その結果、この部位のシータ波活動が「意欲」や「注意」に関連していると解釈可能な知見を得た。ヒトの脳波で「注意の集中」に関連して観察される前頭正中

中シータ波 (Frontal midline theta rhythms) に相当するものと考えられる。両者の対応関係やサルのシータ波の発生状況をさらに詳しく研究中である。

生体情報処理室

【概要】

脳における情報処理には、ネットワークを構成する各ニューロンの発火パターンが意味を持つデジタル的過程と、非線形素子としてのニューロンの興奮性変化が意味をもつアナログ的過程の二つがあると考えられる。後者には種々の細胞内シグナル伝達系の活性が密接に関与しており、個々のニューロン機能の変化を通して、回路レベルで行われているデジタル的处理にも大きな影響を及ぼしている。それゆえ、特定のニューロン・ネットワークへの入力と同様であっても、ある条件のもとでは学習・記憶の生成・保持が起こり、別の場合には成熟・老化・細胞死が促進されるなど、多彩な結果が生じていると予想される。

当室では、外界からの刺激または侵襲に対する、受容体の変化—細胞内の分子の動き—生化学的变化—興奮性の変化—神経機能の変化—脳機能あるいは脳機能障害の発現、という一連の過程をニューロン・ネットワーク上

で総合的に捉え、脳における情報処理の基本的な仕組みを理解することを目指している。現在は、中枢ニューロンの興奮性調節における細胞内シグナル伝達系の役割に注目し、脳スライス標本を用いて電気生理学的記録と光学的記録を併用した研究を行っている。

本年度は、総研大博士課程を修了した高木佐知子が特別協力研究員として、河村吉信（東京薬科大学生命科学部）と酒谷誠一（東京大学大学院新領域創生科学研究科）の両名が特別共同利用研究員として研究に参加した。昨年度に引き続き、狩野方伸（金沢大学大学院医学系研究科）、酒井規雄（広島大学大学院医歯薬総合研究科）らと共同研究（生理学研究所一般共同研究）を行った。また、年度半ばより Nina Wettschureck（ハイデルベルグ大学薬理学研究所）と3量体Gタンパクを介するシグナル伝達の役割に関する共同研究を開始した。

樹状突起における活動電位の発生とその制御メカニズム

坪川 宏

大脳皮質や海馬の錐体細胞では、細胞体側より樹状突起へ逆行性に伝播してくる Na^+ スパイクや、樹状突起局所的な Na^+ 、 Ca^{2+} スパイクが、情報処理上の重要な役割を担っていることが示唆されている。これらの発生メカニズムと調節機構を明らかにするため、イオン・イメージングをはじめとした光学的手法と、パッチクランプ法等の電気生理学的手法を併用し、海馬スライス標本上のニューロンを用いて解析を行っている。

今年は、樹状突起局所的な Ca^{2+} スパイクの生理的条件下での発生要因について検討した。海馬スライス標本上にある錐体細胞の尖塔樹状突起よりパッチクランプ記録を行うとともに、 Ca^{2+} 感受性蛍光色素を導入して Ca^{2+} イ

メージングを行った。放線状層に置かれた電極より電気刺激を加えると、興奮性シナプス後電位 (EPSP) と逆行性に伝播された Na^+ 依存性活動電位が記録された。刺激頻度と強度を上げると、 Ca^{2+} スパイクを併発する場合があったが、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は細胞のほぼ全域で見られた。一方、白帯・上昇層に置かれた電極で刺激を加えると、EPSP と逆行性活動電位の後にゆっくりした脱分極が見られ、しばしば Na^+ スパイクや Ca^{2+} スパイクが重畳した。逆行性活動電位の発生に伴う一過性の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は細胞のほぼ全域で見られ、樹状突起ではその後の Ca^{2+} スパイク時にも Ca^{2+} 濃度上昇が認められた。この遅い応答は、アトロピン投与により消失したことか

ら、ムスカリン性アセチルコリン受容体の活性化によるものと考えられた。樹状突起局所的な Ca^{2+} スパイクの発生は、生理的条件下では、錐体細胞への主な興奮性入力と

考えられるシャッフアー側枝・交連線維からの入力だけでなく、アセチルコリン性の入力によるが必要であると考えられた。

細胞内シグナル伝達系の活性とニューロン活動との時間的・空間的關係の解析

坪川 宏

ニューロン機能における細胞内シグナル伝達の役割をより明確にして行くために、タンパク質リン酸化酵素をはじめとした酵素群の活性と種々のニューロン活動との時間的・空間的關係を解析することは必要不可欠と考えられる。本研究では、中枢ニューロンのモデルとして海馬スライス標本上の錐体細胞および小脳スライス標本上のプルキンエ細胞を用い、3 量体 G タンパク質 G_q 及び G_{11} のカスケードにつながるタンパク質リン酸化酵素、PKC の活性変化を可視化し、ニューロン活動やそれに伴う細胞内 Ca^{2+} 濃度変化と PKC の活性変化との時間・空間的關係を明らかにすることを目指している。PKC の可視化のため、PKC 結合性蛍光色素の細胞内導入や、GFP 結合 PKC を部位特異的に発現するトランスジェニッ

ク・マウスを用いている。

今年は、昨年に引き続き、小脳プルキンエ細胞に GFP 結合 γ PKC を発現するトランスジェニック・マウスを用いて、PKC トランスロケーションの特性解析を行った。その結果、プルキンエ細胞の樹状突起では、平行線維からのシナプス入力によってトランスロケーションが樹状突起の幹を伝播するように順次起こってゆく様子がリアルタイムで捉えられた。この伝播は 1) 代謝型グルタミン酸受容体の刺激により誘発され、2) 伝播速度は、 $4\text{--}10\ \mu\text{m}/\text{秒}$ で、タンパク質輸送の速度よりは早くカルシウム波よりは遅く、3) 一度伝播がおこると30分以上の不応期が生じるという性質を持っていた。

中枢ニューロンにおける活動依存的な形態変化のメカニズムの解析

河村 吉信 (東京薬科大学 生命科学部 生体高次機能学)

高木 佐知子, 坪川 宏

脳では、活動に伴って細胞容積の変化が起こっていると予想されており、動物の脳スライス標本を用いた研究では、近赤外光の組織透過率を解析した結果から、神経細胞やグリア細胞が神経活動依存的な容積変化を起こすことが示唆されている。我々は、海馬スライス標本を用いた透過光変化の解析から、高頻度刺激後に見られる CA1 野錐体細胞の膨張には抑制性シナプス入力による GABA 受容体からの Cl^- 流入が関与していること、透過率の変化は細胞体層より樹状突起層において顕著であること等を報告した。そこで本年度は、海馬スライス標本上の神経細胞においてシナプス入力による容積変化を単一細胞レベルで解析し、細胞種による差があるかどうか明らかにすると共に、この容積変化がシナプス伝達に対

して調節因子として働いているかどうか明らかにすることを目指し、以下二つの解析を進めた。

1. 単一海馬 CA1 錐体細胞の容積変化の検出

スライス標本上の神経細胞を予め蛍光色素で染色しておき、二光子レーザー蛍光顕微鏡を用いて、海馬 CA1 領域の単一の錐体細胞の断層撮像を行った。この蛍光画像を基に細胞の立体構築を行い、透過光変化の解析より得られた測定条件を参考に、求心性線維の電気刺激時にそれぞれの細胞で容積がどのように変化するか解析した。また、対象実験として、細胞外液の浸透圧を変化させた前後の錐体細胞の容積変化を解析した。細胞外液の浸透圧を低下させたときの細胞容積は、細胞体から近位樹上突起にかけて均一に増加することが確認できた。しかし

ながら、求心性線維の電気刺激に対しては細胞容積の優位な増加は確認できなかった。シナプス活動に伴う透過光変化は、薬物によりグリア細胞の活動を選択的に抑制してもほとんど差がないことが確認されているので、透過光変化の主な要因は神経細胞によると考えている。今回、2光子レーザー蛍光顕微鏡を用いた断層撮像による容積変化の観察で、シナプス活動依存的な容積変化が見られなかった理由としては、容積を測定した錐体細胞が、比較的スライス表層にあるものに限定されており、実際に細胞の膨張に必要となる興奮性と抑制性の適切なシナプス入力を受けていなかった可能性が挙げられる。今後は、同時にシナプス応答の測定をする必要があると思われる。

2. 神経細胞の容積変化とシナプス伝達との関係の解析

細胞容積変化がシナプス伝達に及ぼす影響を、CA1野錐体細胞のシナプス応答をモデルとして解析した。細胞外液の浸透圧を減少させ、細胞の膨張を促したときのシナプス応答の変化を確認するため、ホールセルパッチクランプ法を用いて、任意のCA1野錐体細胞から興奮性シナプス後電流を記録した。また、蛍光色素を細胞内に注入し、細胞容積変化を蛍光強度の変化として捕らえ、シナプス後電流の測定と同時にその変化を観察した。低調液によって細胞膨張を促したところ、膨張に伴う蛍光強度の低下と、これに伴う興奮性シナプス後電流の増強が見られた。今後は、細胞膨張と抑制性シナプス応答変化の解析、さらに、この細胞膨張に伴うシナプス活動の変化のメカニズムの解明が必要であると考えている。

脱分極時における神経細胞内のナトリウムイオン挙動の計測

酒谷 誠一（東京大学大学院 新領域創成科学研究科 基盤情報学）

毛利 達磨（生理研 細胞内代謝）、坪川 宏

神経細胞の活動電位は、細胞膜の導電性を変えることにより、その電位を瞬間的に変化することで生み出される。しかしながら、活動電位を形成するべく流入したナトリウムイオンの細胞内動態や、電位発生の際に生じる細胞内の微視的な電位勾配が細胞内にもともと存在したナトリウムイオンの動きにどのように影響を与えるか等はいまだ明らかではない。そこで、本研究では、細胞内ナトリウムイオン濃度の時間変化を観測することにより、まず神経細胞を脱分極させたときに細胞内ナトリウムイオンがどのような挙動を示すか解析した。

海馬錐体細胞にナトリウムイオン感受性色素(Sodium Green, Molecular Probes)を注入し、高速撮像の可能な共焦点顕微鏡を用いて、細胞体における色素蛍光強度の時空間分布の画像を取得した。得られた画像データに統計処理を施して、ナトリウムイオンの場所ごとの濃度変化量、

およびその立ち上がり時間に着目して計測した。その結果、SN比が十分ではないものの、活動電位発生時に一致して膜直下(1 μ m以内)でナトリウムイオン濃度が顕著に立ち上がる様子が、多くの例で観測された。一方、細胞中心部では、立ち上がり時間が活動電位発生から約1秒後と極端に遅いことが観測され、これはナトリウムイオンの単純な拡散による遅れと一致することが示された。

細胞内ナトリウムイオンは、脱分極によって細胞内に流入し、濃度勾配に従い細胞膜近傍から細胞中心方向に移動する。細胞内では電位が均一であるため、電位勾配がなく、膜電位の影響も受けない。すなわち、細胞体領域において膜電位がイオンの挙動に影響を与えるのは、イオンチャネル近傍においてのみであると考えられた。

脳機能分子解析室

【概要】

脳機能に代表されるような複雑な生物反応機構の解明

に、分子生物学的技術と発生工学的技術を駆使した遺伝

子転換動物の作製は必要不可欠である。とくにラットの遺伝子ターゲティング技術の開発は、脳神経系遺伝子を含む数万にも及ぶ遺伝子の役割を研究するために重要であり、切望されている。脳機能分子解析室では、遺伝子改変動物(マウス、ラット)の作製を進めるとともに、遺伝子ターゲティングによってノックアウトラットを作製することを究極の目的としている。これまでに、ES細胞、始生殖細胞、神経幹細胞、造血幹細胞、精原細胞

の細胞株樹立を目指した研究を行うとともに、核移植や顕微授精など、ラットにおける発生工学的技術の高度化に取り組んできた。研究課題のうち下記の2題を具体的に示す。(1)ラット未分化細胞株を樹立するため、全身にテロメラーゼを高発現するトランスジェニックラットの作製を行った。(2)円形精子細胞の顕微注入によって効率的にラット産仔を作出するため、卵母細胞の活性化誘起方法について検討した。

ラットテロメラーゼ遺伝子 (rTERT) を高発現するトランスジェニック (Tg) ラットの作製

平林 真澄, 金子 涼輔

TERT を強制発現させれば細胞が増殖停止状態に陥らず、不死化することが知られている。そこで、ラット未分化細胞株を樹立するための rTERT-Tg ラットの作製を試みた。cDNA を全身に強発現させる CAG プロモーターの下流に rTERT cDNA と tauGFP cDNA を ires 配列を挟んで導入した発現ユニット (CAG-rTERT-ires-tauGFP) を構築し、ラット前核期卵に顕微注入した。生存卵子 323

個を移植したところ計 49 匹 (15%) の産仔が得られ、うち 4 匹 (8%) が Tg ラットだった。最初に生まれた Tg ラットでは RT-PCR 法で精巣と大脳皮質に GFP 発現が確認され、8 コピーのトランスジーンがゲノム上に組み込まれていた。この系統についてはトランスジーンのコピー数を増やしている。またこれら4系統からG1ラットを作製し、主要臓器を中心に遺伝子発現を確認していく予定である。

ラット卵母細胞の活性化方法が円形精子細胞注入 (ROSI) 後の産仔率に及ぼす影響

平林 真澄, 保地 眞一 (信州大)

塩化ストロンチウム (Sr^{2+}) で活性化したラット卵母細胞に円形精子細胞を ROSI することで個体作出できるが、その産仔率は 1.4% と低かった。そこでラット ROSI の成功率を改善するために、卵母細胞の活性化方法について検討した。雌ラットから採取した未受精卵子を 1.25 mM の Sr^{2+} で 20 分間 (Sr^{2+} 区), または 100V/mm, 99 μsec , 2 回の直流パルス後に 2 mM 6-DMAP で 20 分間処理 (DC+DMAP 区) し、活性化を誘起した。そして雄ラットの精

細管から調製した円形精子細胞を ROSI し、偽妊娠雌ラットに移植して産仔への発生率を調べた。 Sr^{2+} 区と DC+DMAP 区の間で ROSI 後の生存率、二前核形成率、分割率に有意な差は認められず、産仔率もそれぞれ、6.5% と 7.8% で同等だった。以上、ROSI に先だって行うラット卵母細胞の活性化誘起処理には、 Sr^{2+} 法と DC+DMAP 法のいずれもが有効だった。

統合バイオサイエンスセンター

時系列生命現象研究領域

【概要】

我々の部門は、神経発生過程における電気的活動の役割をそれを担う分子であるイオンチャネルやトランスポーターの発現制御を明らかにすることを第一目標としている。中枢神経細胞の主要な Nav チャネルである Nav1.6 の発現制御機構を解析することを目指した研究の第一段階として、発現系細胞を用いた機能再構成実験に成功し

た。また発生過程における電気的活動に関わる新規分子の探索を行い、イオンチャネル様の電位センサーと酵素を兼ね備えた新規タンパクの発見に到った。更に個体レベルで機能素子分子の発生過程での役割を同定するために、尾索動物で分子機能抑制実験を行った。

中枢神経細胞の自発発火を規定する電位依存性 Nav チャネル Nav1.6 の持続性電流の制御機構

岩崎広英，岡村康司，高木正浩

白幡恵美，早坂清（山形大学医学部小児科学教室）

持続性 Nav 電流は、ニューロンの興奮性の制御に重要であることが知られているがその分子実体は不明である。我々は自発発火特性を規定する重要なイオン機構である持続性 Nav 電流の形成機構を理解するため、中枢神経系ニューロンの主要な Nav チャネル成分の一つである Nav1.6 に注目し発現系細胞を用いて電位固定法による電流解析を行った。ヒト Nav1.6 チャネルの全長 cDNA を

PUC19にクローニングしアフリカツメガエル卵母細胞及び tsA201 細胞へ発現させた。Nav1.6 単独で顕著な持続性電流を生じ、その電流量は同じ神経系に発現する Nav1.2 に比較して有為に大きかった。持続性 Nav 電流の性質は、beta1 サブユニットの共発現によって影響を受けなかった。持続性電流の成立機構を解析するための実験系として有用であると考えられる。

尾索動物ユウレイボヤゲノムからのイオンチャネル関連分子遺伝子の網羅的解析

岩崎広英

村田喜理

森 泰生（京都大学大学院）

岡田泰伸

高橋信之

中條浩一

佐藤矩行（京都大学大学院）

佐藤ゆたか（京都大学大学院）

尾索動物ホヤは、ゲノムサイズが小さく、神経系を構成するニューロン種、ニューロン数が極めて少ないため、チャネル遺伝子から個体レベルの生理機能をつなげるモ

デル生物として有望である。今回、ゲノムプロジェクトがなされたカタユウレイボヤにおいて網羅的にイオンチャネル様遺伝子のリストアップとアノテーション作業を

共同で行い、160 個以上のイオンチャネルについて、ヒト、フグ、線虫、ショウジョウバエにおける類似遺伝子との関係をアミノ酸配列の系統樹の作成によって検討した。その結果、神経シグナル伝達に関わるチャネル群（電位依存性チャネル及び、伝達物質受容体チャネル）は、脊椎動物のプロトタイプの遺伝子が最少数存在するのに対し、イオン輸送などのホメオスタシスに關与するチャ

ネル群は、遺伝子数が哺乳類のそれに匹敵し、分子種もホヤ独自の系列において多様化していることが判明した。更に、チャネル機能に重要なアミノ酸配列、Est 情報による発現時期、発現細胞の同定も行った。これらのデータベースは論文として投稿するとともに、ホームページ上で公開する予定である。

哺乳類脊髄リズム形成の神経回路の発達機構

中山希世美

神経系の発達過程において、GABAA およびグリシン受容体を介した興奮性の入力が一過性かつ広汎に現れることが知られている。このような GABA およびグリシンを介した興奮が歩行運動や脊髄反射などを司る脊髄内神経回路網の形成に重要であるかを明らかにするため、その発現が発生初期の細胞では少ないためにこのような興奮性がおこると考えられている K^+-Cl^- -cotransporter isoform 2 (KCC2) を発達過程の脊髄に強制発現させる系

を確立した。歩行運動様リズムが起り始める時期のマウスの胎児脊髄に IRES-GFP ベクターを使ってエレクトロポレーションを行うことにより、分裂中の脊髄ニューロンに KCC2 遺伝子と GFP 遺伝子を同時に導入した。その結果、遺伝子導入の 1 日後から出生直前のマウスまで、脊髄後角を中心に GFP でラベルされた細胞を確認した。今後この標本を用いて脊髄内神経回路形成における GABA およびグリシンを介した興奮の役割を検討する。

新規電位センサー分子のゲート電流解析

岩崎広英
村田喜理
佐々木真理

発生過程での電気活動や膜電位変化の役割を担う分子メカニズムを探るため、脊椎動物の始原的祖である尾索動物のゲノムから網羅的に電位センサーを有する分子を探索したところ、偶然にもチャネル様電位センサーを有するタンパクをコードするがポアを欠く遺伝子を同定するに到った。この分子は PTEN と相同なホスファターゼドメインを有し、電位センサーと酵素活性の両方を示す

分子であることが予想された。電位センサー部分のみをツメガエル卵母細胞に発現させると大きなゲート電流様の非対称性電流を生じ、その電流は S4 様セグメントの陽チャージをなくした変異分子では見られなかった。この分子の電位センサー領域はチャネルのそれと同様なメカニズムで動作することが示された。

筋細胞機能発達における電位依存性 Ca チャネルの役割

中條浩一（東京医科歯科大学大学院，現在生理学研究所）

大塚幸雄（産業技術総合研究所）

マボヤ発生過程での電位依存性 Cav チャネル活性の役割を明らかにするため，Cav チャネルサブユニット遺伝子の同定をおこなった後，アンチセンスモルファリーノオリゴヌクレオチドを合成し，受精卵に顕微注入した。その結果，囊胚形成の異常，尾部伸張の異常などの形態異常を示した。しかし，形態異常を伴わない場合にも運動機能の異常を示した。この点を更に明らかにするため，ファロイジン染色によるアクチン筋線維走行を検討した

ところ正常の幼生では螺旋状の形態を示すのに対して，アンチセンス注入幼生ではランダムなアクチン線維の走行を示し，また筋細胞間の接続部でアクチンが減少していた。同様な現象は d-ツボクラリン処理胚でも見られ，またアクチンミオシン相互作用を抑制する BTS 処理胚でも見られたので，神経入力による筋収縮活動そのものがアクチン線維の構築形成に重要であることが明らかになった。

電位センサーの支配を離れた電位依存性 K チャネルの開閉

久木田文夫

イカ電位依存性 K チャネルでは，高濃度の非電解質（グリセリン，ソルビトールや蔗糖など）中で，膜電位変化に対して瞬時に応答する電流成分が見られる。それに続く典型的な遅延性整流 K 電流は粘性依存的に立ち上がり

時間が長くなる。最初の成分は電位センサーの支配を離れて開閉する成分であるが，その割合は溶液の浸透圧と共に増大する。この現象の分子機構を解析中である。

戦略的方法論研究領域

【概要】

「構造と機能」という分子生物学のパラダイムは生物の機能が生体高分子，特に蛋白質の独自の構造によって支えられていることを明かにして来た。本部門では細胞内超微小形態を高分解能，高コントラストで観察する新しい電子顕微鏡の開発を背景に細胞の「構造と機能」を研究している。

永山グループは DNA1 分子の塩基配列直読法の開発，チャネル蛋白質の電子線構造解析の研究を行った。

物質輸送に関する研究が主眼である村上グループは，健康者の唾液糖と血糖の関係を唾液分泌速度と共に測定

し，ラット顎下腺における傍細胞輸送の成果を臨床応用に結び付けることが可能になった。また，ケンブリッジ大学，カリアリ大学との共同研究も継続発展している。7 月には第 8 回 NMR マイクロイメージング研究会をカンファレンスセンターで主催し国内外より 70 名が参加した。大橋はエンドサイトーシス経路における選別輸送の研究を変異細胞を用いて行った。また年度中途の 11 月より助教授として瀬藤光利が当部門に赴任した。神経系の代謝研究，特に蛋白質の翻訳後修飾の分子生物学的，生理学的研究を開始した。

位相差電子顕微鏡の改良

Radostin Danev, 杉谷正三, 永山國昭

電子位相顕微鏡の改良, すなわち Zernike 位相差法 ($\pi/2$ 位相板の利用), 微分干渉法相当のヒルベルト微分法 (π 位相板の利用) の改良を行った。ハードウェアについては電子銃を新規電界放射電子銃に交換し, 輝度を確保した。また帯電防止位相板の昇温について最適条件を探索した。ソフトウェアについては新しい Virtual TEM

の設計とコーディングを行った。Virtual TEM は電子顕微鏡実験をコンピュータ内でおこなうもので, 対象物質の構造と元素組織がわかれば電顕像を通常法, 位相差法を問わずシミュレーションするものである。これにより, 事前に実験結果を予測できるようになった。

位相板用炭素薄膜の材料科学的研究

Dorian Minkov, Radostin Danev, 伊藤俊幸, 大河原 浩, 永山國昭
宇理須恆雄 (分子研)

位相板の帯電防止は電子位相顕微鏡にとって死命を制する重要な要素技術である。帯電の原因が位相板に付着した 3 種 (有機物, 酸化金属, マイカ粉) 汚れによることが昨年度わかったので, その解決法を探索した。有機

物汚れについては位相板を常に 200~300 度の高温に保つことで防止できることがわかった。しかし位相板作成工程で不可避免的に入るマイカ粉汚れについては種々の対策を行ったが解決されなかった。

DNA/RNA 塩基配列の電子顕微鏡 1 分子計測法の開発

Krassimir Tachev, 高橋佳子, 伊藤俊幸, 大河原 浩, 永山國昭
片岡正典 (計算科学研究センター)
田坂基行 (東大院・理)

DNA/RNA の塩基配列決定の高速化を図るため, 電子顕微鏡技術を基軸に新しい方法論を開発している。この方法は i) DNA/RNA の一本鎖の利用, ii) 完全伸長した多数の一本鎖 DNA/RNA 分子の一方向整列によるアレイ作成, iii) アレイ化した一本鎖 DNA/RNA への単量体 A, T, G, C の有機溶媒中での特異的水素結合, vi) 単量体塩基にあらかじめラベルしたマーカー分子 (メタルクラ

スター) の電顕による観察と識別, v) 識別したマーカー分子からの塩基配列の解読, の 5 つの要素技術により成り立っている。マーカーの識別には 0.3nm の空間分解能と定量的コントラスト測定の 2 要件を満たす電子顕微鏡が必要だが, これは当部門で開発した位相差電顕を用いることになる。その他の要素技術は多くの未踏技術を含んでおり, 現在開発中である。

灌流ラット顎下腺における傍細胞輸送経路 一唾液糖から血糖を推定する試み一

村上政隆

篠塚直樹, 中村健治 (札幌 IDL)

桜井 健, 杉谷博士, 古山俊介 (日本大学松戸歯学部)

原唾液は細胞の中からの分泌と傍細胞経路を通過した成分との混合物であり、血液成分は唾液に移行しうる。バイオセンサを用いた自己血糖測定器が広く普及しているが、少量の血液を必要とするため、測定するには痛みや苦痛を伴う問題がある。本研究では非侵襲血糖測定法を開発するため、ラット摘出血管灌流顎下腺を用い分泌液糖と灌流液糖の関係について検討した。

分泌液糖はグルコース脱水素酵素, NAD^+ , 1-Methoxy-5-methylphenazinium methylsulfate (1-メトキシPMS)および2-(4-Indophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium (WST-1) から生成されるホルマゼンを比色測定により測定した。灌流液糖濃度が一定でも、分泌液糖濃度は唾液分泌速度の変化に伴い変化し、灌流液糖濃度に対し必ずしも比例しなかった。一方、唾液糖濃度と灌流液糖濃度の比 (S/P-G 比) は唾液分泌速度に対し反比例の関係が得られた。このことは、1)唾液分泌速度が低い時、(S/P-G)比は高くなるとともに大幅にばらつき、2)唾液分泌速度が高い場合(S/P-G)比は

一定値に収束した。唾液分泌速度が高い場合の値は灌流液の糖濃度に比例し変化した。唾液分泌速度が高い場合、唾液糖測定は非侵襲血糖測定法として可能性あることが示された。

日本大学松戸歯学部にて健康者42名(男:28人 女:14人、年令 20~28才)の耳下腺および顎・舌下腺唾液を刺激時および非刺激時に採取し、血糖値と比較検討した。口腔内を殺菌剤および水でよく洗浄した後、余剰水分を拭き取り唾液採取、採取前後の採取具重量を計り分泌速度を求めた。無刺激の耳下腺唾液において、唾液分泌速度と(S/B-G)比は反比例関係が認められた。甘味刺激を加え、唾液分泌速度を増加させると(S/B-G)比は一定となった。舌・顎下腺の方が耳下腺より唾液分泌速度が速く、刺激の有無に関わらず(S/B-G)比は一定になった。その結果、唾液分泌量が最も多い刺激条件下の舌・顎下腺より採取した唾液の糖測定は、非侵襲血糖測定法として用いうる可能性が高いことを見出した。

灌流ラット顎下腺における水分分泌調節機構

村上政隆, 大河原浩

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

Bruria Sachar-Hill, Adrian E. Hill (ケンブリッジ大学生理科学部)

原唾液は細胞の中からの分泌と傍細胞経路を通過した成分との混合物であり、血液成分が唾液に移行するのはこのためである。標識デキストランをプローブとして分子径に対する分泌プローブの唾液／灌流液比を求めると、フィルター特性は、水の分子半径 $1.5 \text{ \AA}$ では1の値に外挿され、水のほとんどが細胞間隙／tight junction を通過することを示唆した。さらに、管腔に導入した蛍光色素の希釈経過から細胞経由の水分分泌を求めると刺激初期一過性分泌と持続期には低レベルとなり、灌流腺での分泌速度と比較すると持続刺激期には傍細胞輸送経路を通過

する水分が腺を経由する水分より多いことが示された。ここに水分子を主に通過させると考えられてきた管腔側膜に存在する AQP5 がどのような機能を有するかが大きな疑問となった。Hill は AQP5 が浸透圧受容器として働き、高浸透圧の唾液が細胞より分泌されると細胞間隙経路を使う水分輸送が増加し原唾液浸透圧を低下させる仮説を提出した。細井らは SD ラット n において AQP5 発現と分布が不均一であることを見だし AQP5 低発現ラットを開発した。我々は 2002 年度に続き、AQP5 低発現ラットの開発を待つて血管灌流顎下腺の高浸透圧ショッ

クに対する水分分泌反応の違いを比較検討した。AQP5 低発現ラットでは通常ラットにくらべ分泌反応には大きな差は観察されないが、高浸透圧ショックに対する水分分泌の低下程度は少なく、調節機能低下が示唆された。ま

た, AQP5を阻害する水銀の効果を比較する予備実験を行った結果、低濃度の水銀で AQP5 低発現ラット顎下腺の反応が再現された。現在、浸透圧ショック時の傍細胞輸送能の変化を測定している。

灌流ラット顎下腺の細胞間分泌細管の分泌時形態変化

村上政隆, 前橋 寛

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

灌流腺実験の利点は水分分泌, 蛋白分泌, 酸素消費などの種々の生理機能を静止時と刺激時を明確に分離して測定できることにある。ラット顎下腺において細胞間分泌細管(IC)での開口分泌と腺レベルのムチン分泌が連結された。しかし $1\mu\text{M}$ のcarbachol (CCh)刺激では水分分泌と酸素消費は刺激中維持されるが $1\mu\text{M}$ のisoproterenol (ISP)添加では予測されたこれらのup-regulationは観察されなかった。一方 $0.1\mu\text{M}$ CCh刺激下での $0.5\mu\text{M}$ ISP添加は水分分泌と酸素消費を増加させた。さらにP-31NMR観測により低濃度のCCh分泌刺激でも $1\mu\text{M}$ ISP添加によりATPが細胞より放出されうることが示された。これらの観察は低濃度 CCh 刺激が唾液分泌調節の研究には望ましいことを示している。 $1\mu\text{M}$ 以上の高濃度 CCh および ISP 刺

激ではICの変形とATP放出が起る。今回低濃度のCCh and/or ISPをもちいて灌流顎下腺の開口分泌反応を高分解能SEMにより形態学的に検討した。その結果、刺激試薬の生理学的濃度範囲では、個々の開口分泌の形態変化には刺激薬の濃度依存性はなかった。しかし腺レベルのムチン分泌は用量依存的に増加するので微視的な開口分泌の時間的頻度が増加すると考えられる。これは開口分泌の顕微鏡レベルの単位分泌が空間的および時間的に加算されて腺レベルの巨視的な分泌を形成することを意味する。すなわち、微視的な開口分泌は分泌の微小単位であり、生理学的刺激範囲では用量依存的な形態変化は示さず、微小単位の加算により巨視的な分泌が形成される可能性が支持された。

単粒子解析による膜タンパク質 TRPM2 の立体構造解析

松本友治, 永山國昭

原 雄二, 森 泰生 (京都大院工)

カルシウム透過性カチオンチャンネル TRPM2 は細胞内レドックス状態の変化によって引き起こされる細胞死に関連があるものと考えられている。本研究では、バキュロウイルス-カイコ系を用いて大量発現させた TRPM2 をアフィニティカラムならびに微量ゲル濾過によって精製し、アミノ酸組成比が配列情報から予想される値とほぼ一致するサンプルをmg オーダーで得た。

陰染色試料を作成して電子顕微鏡下で観察したところ、

粒径 10nm 弱の比較的サイズの揃った多数の粒子像が確認できたので、単粒子解析による立体構造モデルの構築を試みた。単粒子解析では元の粒子像に含まれるノイズにより各粒子像間の角度関係の推定が困難となることが多い。本研究ではトモグラフィー的手法を適用し、一軸傾斜像シリーズから予め相互の角度関係の分かった粒子像を得ることで逆投影操作の精度を高め、比較的少数の粒子像から分解能 3.2nm 程の立体構造モデルを得た。

エンドサイトーシス選別輸送のメカニズムの解析

大橋正人

エンドサイトーシス経路の生理機能とメカニズムの解明を目指している。これまでに、後期エンドソーム多胞体 (MVB) からゴルジに向かう受容体の、MVB からの選別にコレステロールが必要なこと、そこで必要なコレステロールを供給するコレステロール合成酵素である NAD(P)H ステロイド脱水素酵素様蛋白質 (Nsdhl) が、後期エンドソームでの選別機能蛋白質である TIP47 と細胞内脂肪滴 (LD) 表面で共存すること、胎児発生異常の原因

変異 G205S を持つ Nsdhl は LD 上に局在できないことなどを示した。本年度は、Nsdhl が、LD の有無により LD-小胞体間で二相的分布を示し、その局在により、コレステロールの生合成系が調節されることを示すデータを得た。以上の知見より、LD 表層ドメインがコレステロール代謝系と細胞内膜系での細胞シグナル分子選別機能を結びつける制御プラットフォームとして働いているという仮説を提唱した。

生命環境研究領域

【概要】

イオンチャネルは、細胞内環境を外環境から隔てている形質膜に存在し、イオン流入・流出等を仲介することによって、外環境からの刺激に対する細胞応答を制御している。多様な環境変化に対応すべく、イオンチャネル群は、活性化開口させるトリガー(或いはアゴニスト)への応答性及び輸送物質選択性において、進化的に莫大な多様性を獲得している。本研究領域においては、環境への生物応答の本質に迫るべく、様々な物理刺激や生理活

性物質をトリガーとするカルシウムイオンチャネルに焦点を当て、どのように遺伝情報としてコードされているか、さらにその活性化機構や細胞生理機能の解明を行っている。またイオンチャネルを介して流入したカルシウムイオンにより、様々な細胞応答が繰り広げられる。我々は遺伝学的手法や新規分子プローブを駆使し、細胞内カルシウムシグナリングの分子メカニズム解明を目指している。

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

吉田卓史, 原 雄二, 西田基宏, 森泰生

細胞外からの Ca^{2+} 流入を促す Ca^{2+} チャネルには電位依存性型, リガンド作動性型, 受容体活性化型の3種類に大別される。我々のグループでは受容体活性化 Ca^{2+} チャネルの分子の実態として考えられている TRP チャネルのひとつ TRPC5 が、活性酸素種である H_2O_2 や活性窒素種である NO により活性化することを明らかにした。これら酸化剤による TRPC5 活性化にはシステイン残基の特異的

酸化が必須である。我々は分子プローブを用いた検討から、TRPC5 活性化に関与する標的システイン残基の同定に成功した。

また TRPC5 はレチノイン酸誘導により血管内皮細胞での発現が増強することが知られている。我々は現在 TRPC5 の内皮細胞における生理的意義同定を試みている。さらに TRPC5 遺伝子欠損マウスの作製を行っている。

免疫 B 細胞における Ca^{2+} シグナル増幅機構

西田基宏, 清中茂樹, 沼賀拓郎, 森泰生

ホスホリパーゼ C (PLC)は受容体を介した Ca^{2+} 動員やシグナル伝達の中核的役割を担っている。PLC の活性化は、イノシトール 3 リン酸 (IP_3)を産生し、ストアーからの Ca^{2+} 放出や細胞外からの Ca^{2+} 流入を引き起こす。非興奮性細胞において、受容体刺激は 2 相性の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を引き起こす。最初の Ca^{2+} 応答はストアー依存的であるが、持続的な Ca^{2+} 応答の分子メカニズムは未だに良くわかっていない。PLC γ 2 を欠損させた免疫 B 細胞株 DT40 と IP_3 センサータンパクを用いて、受容体刺激やストアー枯渇刺激による細胞外からの Ca^{2+} 流入と PLC γ 2 活性との関係を調べた。その結果、 Ca^{2+} 流入が PLC γ 2 の C2 ドメインを介して PLC γ 2 を膜近傍マイクロドメインに移行させ、持続的な Ca^{2+} 振動 (オシレーション) を引き起

こすことを明らかにした。また、PLC γ 2 は恒常的に TRPC3 カルシウム透過型チャネルと結合することで、受容体刺激による Ca^{2+} 応答を増大させていることを明らかにした。 Ca^{2+} 流入による PLC γ 2 活性化は、 IP_3 産生を介して Ca^{2+} シグナルを増幅させる一方で、ジアシルグリセロール (DG)を産生し MAP kinase (ERK)を活性化させた。ERK は従来から細胞増殖・分化を誘導するシグナルとして位置付けられていることから、TRP チャネルを介した Ca^{2+} 流入によって引き起こされるシグナル増幅機構が B 細胞における細胞応答に必要不可欠であることを証明した。現在、欠損細胞株を用いた TRPC3 チャネル機能解析、新規カルシウム流入阻害剤の開発およびその薬理学的解明を行っている。

細胞内蛋白質の活動の可視化を目指した蛍光性バイオセンサーの構築

清中 茂樹, 西田 基宏, 森 泰生

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

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

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

原雄二, 森泰生

細胞内の酸化還元状態は定常状態を保っているが、恒常性が破綻すると生理機能の障害を引き起こす。この破綻機序の一つに、細胞内のイオン動態の急激な変化が挙

げられるが、直接的な高親和性標的であるイオンチャネルの分子の実体は大きな謎であった。我々は細胞内酸化還元状態により活性化される Ca^{2+} 透過型カチオンチャ

ネル TRPM2 を発見した。TRPM2 にはヌクレオチドが結合しうる Nudix モチーフが存在する。我々は Nudix モチーフに β -NAD⁺などのヌクレオチド類が結合することにより、TRPM2 チャネル活性を引き起こすこと、酸化還元状態変化による活性化には β -NAD⁺含量増加が関与する

ことをそれぞれ見い出した。現在、TRPM2 細胞質領域に結合するタンパク質の同定、TRPM2 遺伝子欠損マウスを用いた、血球系細胞における生理的意義の解明を試みている。

多点細胞電位記録法を用いたてんかんモデルマウス海馬の神経ネットワーク活動の解析

三木崇史（京都大学工学研究科），下野健（アルファメッドサイエンス株式会社），清中茂樹，森泰生

電位依存性 Ca²⁺チャネルにおける自然発生点変異マウスは、神経系での Ca²⁺チャネル生理機能解析に対する重要なツールの一つである。我々は、これまでてんかんのマウスモデルとして知られる P/Q 型 Ca²⁺チャネル α_{1A} サブユニット点変異マウス *tottering* の細胞レベルでの電気生理学的解析を行ってきた。しかしてんかんの発症メカニズムを明らかにするためには、神経ネットワークを保

持した組織レベルでの解析が必要不可欠である。そこで平面型微小電極アレイを有する多点電位計測システム (MED64) を用い、変異マウスにおける海馬スライスでの可塑性及びコリン作動性リズムの変化を追跡したところ、変異型と野生型でコリン作動性オシレーションの有意な変化が見られた。今後抑制性ニューロンなどの寄与などについても検討して行きたい。

動物実験センター

【概要】

＜山手地区動物実験センター棟の稼働＞

運用開始 2 年目を迎えて山手地区山手地区動物センター棟の利用者数は一気に上昇することとなった。このため利用開始早々にして一部の施設の不備を手直しの必要が出てきた。山手地区動物センター棟は精度の高い動物実験を行うために、陸生動物の飼育室の主要部分がバリアー区域となっているため一旦実験室に持ち込んだ動物の飼育が出来ないという問題があり、利用者の要望を容れてバリアー外に処置動物の一時的飼育室を用意することとした。また、水生動物室に遺伝子改変魚類の飼育水槽を設置したいとの希望が出され、水生動物用の物理的封じ込め対策を施した水槽を設置した。

山手地区動物センター棟における設備については初期故障が散発した。山手地区に初めて導入したケージ自動洗浄乾燥機は蒸気配管からの蒸気漏れ、コントローラの焼損が起きた。また、廃蒸気による排気口の変形などのトラブルや、蒸気発生器からの蒸気漏れ、EOG 検知器の誤作動などを経験したが大事に至ることはなかった。

＜明大寺地区動物センター棟＞

独立行政法人化を控えて、明大寺地区動物センター棟においては各種の設備の労働安全衛生法への対応が必要になり、ボイラー、オートクレーブ、EOG 滅菌器等についてそれぞれ点検、整備を行った。また労働安全衛生コンサルタントの指導を受けて標識やドラフトの設置など作業環境の改善を行った。このほか、動物センターにおいてはエーテルや EOG などの特定化学物質や危険物、圧力容器など取扱者に資格の必要な業務が多いため、職員の資格の取得に努めた。ちなみに現在までに取得した資格はのべ 14 件にも上っている。

このほか、陸生動物室においては老朽化により生じたボイラーの故障が 2 件、新設した EOG 滅菌器用電磁弁の動作不良 1 件、空調用チラーのトラブル 1 件、自動ケージ洗浄機の蒸気漏れ 1 件、水生動物室においては加熱冷却ユニット故障が 4 件あった。

＜マウス初期胚凍結事業＞

平成 13 年度より開始したマウス初期胚の凍結事業は、

前年度に引き続いて山手地区への移転が予定されている部門のもの 26 件、クリーンアップを目的とするもの 12 件、保存を目的とするもの 2 件を行った。遺伝子改変マウスの利用も増えており、平成 15 年度は国内からの導入 43 件、海外からの導入 14 件、国内への搬出 39 件、海外への搬出 1 件となっているがこのうち約半数はクリーンアップを必要とするものであった。なお、年 4 回の山手地区 SPF 飼育室における微生物モニタリング検査結果はこれまですべて陰性であり順調に経過している。

＜情報公開＞

情報公開法の施行以来、動物実験計画書の情報公開請求が全国の国立大学に対して行われているが、岡崎国立共同研究機構に対しても 2 件の請求があった。請求はネコに関する実験計画書とその入手先、マカクザルバイオリソースプロジェクトに関するもので、前年度の内閣府情報公開審査会の「機構が一部不開示としたことは妥当」との答申を受けて、不利益を被るおそれのある第三者に関する部分を除いて全面開示された。実験に使用する動物の入手、搬出に関しては従来より動物種ごとに取り扱い要領を定めており問題となるような事例は皆無である。

＜明大寺地区陸生動物室の SPF 化構想＞

明大寺地区動物センター棟は建築以来 25 年を経過し、設備の老朽化とともに飼育動物の種類や利用方法が当初の予想を超えて様々な問題が生じてきている。とりわけ近年有用な実験手段として多用される遺伝子改変動物の施設間における授受に際しては微生物学的な品質が問われる SPF 飼育室の整備が望まれている。現在、統合バイオサイエンスセンター棟の竣工により返還された陸生動物室の地階実験室部分を中心にマウス、ラットの SPF 飼育室へ改修するべく検討しているところである。

＜今後の課題＞

統合バイオサイエンスセンターが稼働をはじめたことにより、山手地区動物センター棟における飼育室の稼働率も上昇し業務量も増えているがセンター職員の定数に増減はみられない。このためセンターでは職員の配置

換えを行って対応しているが次のような問題がある。第1に、コンベンショナル動物が中心の明大寺地区と微生物学的コントロールの必要な山手地区における業務を同一人が並行して行うことは時間的にも管理上からも実情に合わず、将来的にはそれぞれ専任とすべきであり、技術職員の適切な配置が望まれる。第2に、動物実験に対する技術的サポートや施設の微生物学的管理のためには

どうしても複数の実験動物の専門家の配置が必要である。山手地区動物センター棟が本格的な稼働をはじめる平成16年度以降には山手・明大寺両地区それぞれに専任教員が常駐することが望ましい。科学的で倫理的な動物実験と同時にユーザーへのサービスを保証するためには動物実験センターの組織体制の見直しと構築が望まれるところである。

計算科学研究センター

【概要】

天然生体高分子の構造と機能を基盤とした機能性生体様物質の創生を目指している。

なかでも核酸中の塩基対に着目し、配列に拘わらず多重鎖の形成が可能なユニバーサル核酸および天然型よりも強く塩基対を形成する人工核酸塩基を利用した核酸塩

基プローブの電子顕微鏡における応用に関して研究を進めている。人工核酸塩基の設計と評価に計算科学研究センターに設置された大型計算機とプログラムライブラリーを利用している。

核酸塩基識別子の設計と合成

片岡正典, 永山國昭

永山により開発中の透過型電子顕微鏡を用いる DNA 配列直読法は多数の DNA 断片を増幅することなく配列情報を画像化し、高速・低価格で配列解析を実現する方法である。この塩基配列解析法では一本鎖 DNA 断片中のすべての核酸塩基を正確に特定し、電子顕微鏡へ識別情報を提供する"核酸塩基識別子"の開発が鍵となる。核酸塩基識別子は核酸塩基を特定する認識部と識別情報を提供する指示部、それらを繋ぐ接続部から構成される。認識部には高い塩基選択性や識別子同士の会合抑制、各種溶媒に対する高い溶解性といった多くの要求が集中し、天然型核酸塩基の適用が困難であることが示唆された。報告者は上記要求を満たす新たな人工核酸塩基の開発を

計画し、天然型の塩基対構造を基盤として、1,4-デヒドロピラジンを水素供与体、1,4-ジオキシンを水素受容体とする三環性複素環を認識部として設定した。指示部としては透過型電子顕微鏡において4種の塩基の識別に必要な高い明暗差を得るために、電子密度差の大きな周期の異なる4種の重原子会合体を設定した。接続部にメチレン鎖を採用して認識部と指示部を結合することにより核酸塩基識別子の基本設計を完成させた。未だ全合成には至っていないが、核酸塩基識別子は一本鎖 DNA 中の核酸塩基1個を識別する初めての分子であり、電子顕微鏡観察に止まらずその応用範囲は極めて広い。

ユニバーサル核酸の創成

片岡正典

動的に構造変化することにより天然型核酸塩基4種すべてを認識するユニバーサル塩基の創出を計画した。コンピュータモデリングにより、相対する核酸塩基に呼応して動的に構造変化しうる人工核酸塩基を設計し、全合成に成功した。ユニバーサル塩基をオリゴヌクレオチド

に導入することにより、ユニバーサル核酸としての展開を図り、ペプチド核酸型の8量体の合成に成功した。現在8量体の詳細な構造を確認中であるが、配列を認識しない人工核酸はこれまでに例のない全く新規な機能性物質であり、その波及効果は計り知れない。

動的速度論分割によるリン酸トリエステルの立体選択的合成

片岡正典

リン酸トリエステルはリン酸と3つのアルコールが縮合することで合成できるが、3つのアルコールがすべて異なる種類であればリン原子が不斉中心となり、2つの鏡像異性体が存在することになる。既存のリン酸トリエステル合成法はすべてこの鏡像異性体の1:1混合物（ラセミ体）として得られる。オリゴヌクレオチドの合成法として知られるアミダイト法において反応機構を細査すると、反応中間体の鏡像体間で迅速な平衡が観察され、

光学活性な触媒の添加により、中間体の存在比や反応性におおきな差異が生じてリン酸トリエステルを立体選択的に合成可能となることが示唆された。種々の光学活性触媒を調査したところ、ある種のビスピリジン型触媒において立体選択的に光学活性なリン酸トリエステルが得られることが確認された。本反応は医薬品として広く利用されるリン酸トリエステルの立体選択的合成法としてはじめての例であり、広く利用されると期待される。

技術課

大庭明生

1. 概要

今年度の人事は、平成 15 年 3 月に動物実験技術係・鈴木千香係員の退職があった。4 月の研究所の組織再編に伴い永田治係長と森将浩係員を発達生理学研究系、戸川森雄主任を生体情報研究系、竹島康行係員を生体調節研究系、山田元係員を分子生理研究系へ配置換した。7 月に生体調節研究系技術係・高須千慈子係員の退職があった。9 月に大脳皮質機能研究系技術室の神谷絵美係員の育児休業があり、それに伴い鈴木恵を代替契約技官として採用した。12 月には発達生理学研究系の教官着任に伴い斉藤久美子係員と吉友美樹係員を配置換えした。また生体システム研究部門に伊藤昭光係長を配置換えした。育児休業にあった福田直美係員の職場復帰（9 月）があった。

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

①生理科学実験技術トレーニングコースでの技術指導

本年（7 月 26 日－7 月 30 日）も標記の 1 コース『生理学実験のための電気回路・機械工作』を担当し、8 人の若手研究者の技術指導に当たった。

②科学研究費補助金（奨励研究）申請の推進

業務を展開していくための問題意識の養成とその解決のための具体的な展開計画、方法の立案能力の養成およびそのための表現力と説明力の養成を通じ、業務上の技術力の総合的な向上を図ることを目的に行っている標記の申請は、20 課題を申請し、2 課題の採択を得た。採択者と採択課題は下記の通りである。

(1)永田治技術係長：脳高次機能研究のための生体磁気計測における伏臥位用視覚刺激装置の作製

(2)斉藤久美子技術係員：In vivo における各組織のグルコースと脂肪酸取込速度の同時測定法の開発

③課題報告型技術シンポジウムの開催

研究の高度化と多様化は技術職員のスキルに大きな変革を迫っている。時代要請に対応したスキル認識と向

上を目指した新しい基盤に立つ研究会の立ち上げによる技術系職員の業務の社会的開示を推し進めるために科学研究費補助金（奨励研究）の採択者による第 4 回の報告会を開催した。

④成茂神経科学研究助成基金申請の推進

課員の研究支援力の強化と向上さらに組織の自立のためには多様な資金の確保が今後重要な課題となる。今回小木曾昇技術主任が、標記の基金に申請し、海外渡航費が採択され、米国実験動物学会（シアトル）に出張した。今後も課の企画事業を進めるために申請を推進する。

⑤放送大学利用による職員研修の開催

放送大学利用による専門研修を行った。研修科目は『認知科学』と『ベンチャー企業論』を選び、各 5 名が受講した。課の研修室には放送大学受信システムを整備したので、課の企画による専門科目の再学習としても今後は企画したい。

⑥第 4 回機械工作基礎講座の実施

生理学実験に必要な機器を題材に工作技術を研修し、その研修後の作成機器が実際の研究現場で活用できることを目的に、第 4 回機械工作基礎講座を開講した（共通研究施設・機器研究試作室）。参加者数は 9 名、題材は一軸式簡易型マニピュレータである。

⑦生理学技術研究会の開催

第 26 回を基礎生物学研究所技術課と合同開催した（平成 16 年 2 月 19 日－20 日）。会では、口演発表が 30 題、ポスター発表が 42 題、研修講演として『神経細胞急性単離法と各種穿孔パッチクランプ法を利用した抑制性神経回路機能の発達変化の検討』（鍋倉淳一、生理学研究所）と『大規模アグロバクテリウム形質転換法と強力なポジティブ・ネガティブ選抜法を基盤としたイネの遺伝子ターゲティング法の開発』（寺田理枝、基礎生物学研究所）を行った。これらの報告は『生理学技術研究会報告』にまとめた。

⑧機構長招聘三技術課合同セミナーの開催

第 5 回を開催した（平成 15 年 12 月 9 日）。開催テーマは『バイオテクノロジーと産学連携』で、4 題の研修講演を行った。今回も東海地区大学への案内と岡崎商工会

議所を通じての民間企業への案内を行い、会の拡充を進めた。会の講演内容は『機構長招聘三技術課合同セミナー報告書』としてまとめた。

一報告書』としてまとめた。

2. 施設の運営状況

①生体磁気計測装置室

永田 治, 竹島康行

【概要】

本年度は、全頭型生体磁気計測装置の調整が終了し旧BTi システムからの移行作業もほぼ完了した。同時に刺激システムにおいても予備実験その他調整作業が終了し適宜本実験が開始されているが、新規ユーザにおける操作トレーニングも平行して行っている。システム全体としては、すべてのチャンネルはスペック以下のノイズレベルで問題なく稼働しているが、チューニングにおいてはセンサ数が306chと多いため30分から場合によっては1時間ほど必要である。また、LHeの充填は1週間に100リットルの充填が必要となっている。

使用状況は、多くが座位による計測であるため視覚刺激の場合透過スクリーンによる刺激画像表示を使用しているが、伏臥位においてはシールドルーム天上面への投影が必要となるため新たな機材を検討しなければならない。痛覚はレーザを炭酸ガスからYAGレーザに変更したことで、ビームの誘導が光ファイバにより容易に可能となったため、より柔軟な対応ができる。ただし、レベル4クラスのレーザであるため細心の注意を要し、被験者および実験者の安全対策を徹底させる必要がある。電気刺激等においてはセンサに対して大きなノイズの混入は見られず、刺激位置を考慮すれば問題なく使用できている。初期不良も改善され問題なく稼働しているが、UPS装置など旧機材には寿命により更新が必要な部分も出てきており検討が必要である。

平成15年度 生体磁気計測装置共同利用実験の実施状況について
米国BTi社製 Magnetic Source Imager (デュアルセンサタイプ)

年 月	総日数	休 日	点検日	利用日数	稼働率	外部利用日数	備 考
2003年04月	30	9	2	17	90%		
05月	31	10	2	17	90%		
06月	30	9	2	16	84%		
07月	31	9	2	18	90%		
08月	31	10	2	16	84%		
09月	30	10	2	16	89%		
10月	31	9	2	18	90%		
11月	30	12	2	15	93%		
12月	31	12	3	14	88%		一年点検
2004年01月	31	12	2	10	58%		
02月	29	10	2	8	93%		
03月	31	8	2	15	71%		

フィンランドNeuromag社製Vectorview(ホールヘッドタイプ)

年 月	総日数	休 日	点検日	利用日数	稼働率	外部利用日数	備 考
2003年04月	30	9	0	21	100%	4	
05月	31	10	0	18	85%		
06月	30	9	2	19	100%		
07月	31	9	0	21	95%		トレーニングコース使用4日(28～31日)
08月	31	10	0	19	90%	5	トレーニングコース使用1日(1日)
09月	30	10	2	17	94%	1	
10月	31	9	0	22	100%		
11月	30	12	2	16	100%	4	
12月	31	12	0	17	89%	4	
2004年01月	31	12	2	16	94%		
02月	29	10	0	17	89%	2	
03月	31	8	2	21	100%	1	

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

また、トレーニングなど実験以外の用途も含まれていない。

* 稼働率＝利用日数／（総日数－（休日＋点検日））×100

②脳機能計測センター

(1) 形態情報解析室

山口 登

【概要】

今年度における超高压電子顕微鏡共同利用実験は、合計 11 課題が採択され、その内 10 課題が実施された。これらの共同実験の成果は、超高压電子顕微鏡共同利用実験報告の章に詳述されている。超高压電子顕微鏡の年間の利用状況を表にまとめたので下記に示す。稼働率は、

利用日数と使用可能日数より求めている。本年度の主な超高压電子顕微鏡の改良・修理としては、Condenser Stigmator の修理, 真空バルブ開閉用エアーバルブおよびエアーバルブ駆動用コンプレッサーの交換作業などが行われた。

2003 年度 超高压電顕月別稼働率

年 月	総日数	休 日	調整日	使用可能 日 数	所内利用	所外利用	計	稼働率	備 考
2003 年 4 月	30	9	4	17	4	0	4	24%	
5 月	31	10	4	17	2	2	4	24%	
6 月	30	9	11	10	4	0	4	40%	修理 8 日
7 月	31	9	1	21	8	13	21	100%	修理 1 日
8 月	31	10	4	17	9	4	13	76%	
9 月	30	10	5	15	8	2	10	67%	
10 月	31	9	9	13	13	0	13	100%	修理 6 日
11 月	30	12	4	14	9	3	12	86%	
12 月	31	12	4	15	6	6	12	80%	
2004 年 1 月	31	12	4	15	3	11	14	93%	
2 月	29	10	1	18	1	17	18	100%	
3 月	31	8	4	19	8	2	10	53%	
計	366	120	55	191	75	60	135	71%	

フィラメント点灯時間 417.8 時間

使用フィルム枚数 5,068 枚

(2) 機能情報解析室

佐藤茂基

【概要】

今年度におけるリアルタイム装置の利用状況は、採択研究課題数 4 題で、全ての研究課題は実施された。

今年度の装置整備状況は、主な事項として次の通りである。今年度は長期間の修理を要する故障は起きず、比較的安定した稼働状態であった。9 月にデータ解析用コ

ンピュータのハードディスクが故障し修理交換を行った。11 月には画像印刷用カラービデオプリンターが故障した為、修理を行い対応した。

共通機器であるフィルム自動現像機の整備点検を行った。

平成 15 年度の MR 装置利用実績を別表に記す。

【機器利用率】

平成 15 年度リアルタイム装置月別稼働率

年月	総日数	保守	使用可能	所内利用	所外利用	計	利用率	備考
2003 年 4 月	30	1	29	0	11	11	38%	
5 月	31	1	30	0	5	5	17%	
6 月	30	1	29	0	8	8	28%	
7 月	31	1	30	0	4	4	13%	
8 月	31	1	30	0	5	5	17%	
9 月	30	3	27	0	6	6	22%	ハード故障, 停電
10 月	31	3	28	0	5	5	18%	停電
11 月	30	1	29	0	5	5	17%	プリンター故障
12 月	31	1	30	0	5	5	17%	
2004 年 1 月	31	1	30	0	7	7	23%	
2 月	29	1	28	0	7	7	25%	
3 月	31	3	28	0	5	5	18%	定期点検
計	366	18	348	0	73	73	21%	

*保守以外の祝祭日は、使用可能日に含めた。

(3) 生体情報処理室

吉村伸明, 村田安永

【概要】

生理学研究所における当施設の利用形態は、生体情報解析システム（高機能ワークステーション＋アプリケーション、高画質フルカラープリンタ等）、情報サービス（e-mail, WWW 等）、プログラム開発及びメディア変換などに分類することができる。また、これらを円滑に運用していくためには、所内 LAN の管理、整備や情報セキュリティの維持も重要である。このような現状をふまえたうえで、情報ネットワーク管理室とも連携しながら、施設整備を進めている。

生体情報解析システムは、データ解析・可視化、信号処理、画像処理、数式演算、統計処理、電子回路設計などの多くのアプリケーションを備え、これらは高機能ワークステーション上での利用のみならず、各部門施設の PC に直接導入し、ライセンスサーバで認証を行うことで

の利用も可能である。登録者は 78 名で、研究推進のための積極的な利用がある。

本年度は「岡崎国立共同研究機構情報セキュリティポリシー」等が施行され、情報ネットワーク利用者はセキュリティ確保の為に義務を負うこととなった。その啓蒙を行うと共に、ウィルス除去ソフトの供用を開始した。

生理学研究所のネットワーク利用状況は、メール登録者が 414 名。WWW 登録者が 48 名。LAN の端末数が 1264 台。所外からのメール受信数は 12,000 通/週。所外へのメール発信数は 3,300 通/週。検出したウィルスメールは 400 通/週。

WWW は一年間に 17 万台の端末からアクセスがあり、総アクセス数は 750 万回。所内向けのダイヤルアップサービスは 74 回/週、7 時間/週の利用があった。

③動物実験センター

佐治俊幸, 小木曾昇, 廣江猛, 鈴木千香

【概要】

平成 13 年度 3 月末に竣工した山手地区分室も順調に稼働し、全飼育室での実験動物の飼育が開始された。

山手地区分室増築に対しての運営経費増額が認められなかったため、運営経費の不足分を補うために受益者負担の原則にのっとり、飼料代とは別に飼育費の徴収を実施した。しかし、飼料代及び飼育費共に予算振替は校費（現 運営費交付金）からしか行えず、外部より取得した予算（科研費、委任経理金等）からの支出が出来ない。これにより、予算振替が出来ない問題が発生した。今後、外部資金導入が進む研究環境において、解決しなければならない課題である。

【明大寺地区 陸生動物室】

平成 15 年度の飼育室利用部門数は、23 研究部門（生理研 15 部門、基生研 5 部門、統合バイオサイエンスセンター 3 部門）であった。

動物飼育数の増加傾向は頭打ちの傾向を示しているが山手地区 SPF エリアでの飼育が本格化しだしたため、飼育数増が予想される。

山手地区分室へ移動する飼育動物の受精卵凍結は順調に進行し 49 件を完了させた。また、一般の受精卵凍結及びクリーンアップも 35 件を実施した。

動物の授受に関しては、国内相手では、43 件の搬入、39 件の搬出。海外相手では、14 件の搬入、1 件の搬出があった。57 件の搬入動物に関して、当センターの搬入基準に合致し、そのまま飼育室へ搬入出来たのは約半数であり、残りはクリーンアップ等の作業が必要となった。

設備機器の故障が目立ち、EOG 滅菌器の故障では、長期間にわたりガス滅菌が行えない状態が続いた。今後も機器の老朽化による故障は多発すると思われる。

【両地区 水生動物室】

平成 15 年度の水生動物室利用状況は、生理研・基生研両研究所あわせて 6 部門・施設、36 件の利用があった。

主なトラブルとしては、加熱冷却ユニットの動作不良が 4 件あり修理及び更新を行った。

明大寺地区水生動物室内に恒温室及び多架水槽の設置希望があり、使用部門予算にて設置をした。この設置に伴い、5 基の水槽の移設を行った。内 3 基は、山手地区へ移設した。

山手地区水生動物室内に遺伝子操作魚の飼育エリア設

置希望が出され、統合バイオサイエンスセンターの予算にて設置した。

【山手地区 動物実験センター分室】

平成 15 年度の利用部門数は 14 研究部門（機構 1 施設、生理研 6 部門、基生研 2 部門、統合バイオサイエンスセンター 5 部門）で利用者は、利用講習会及び実務講習会を行い、受講者総数は 93 名であった。

マウスの SPF 化には、受精卵の融解・移植、微生物学的検査などの手続きがあり、系統維持動物の繁殖、実験への使用までに期間を要することから、動物飼育数は緩やかな増加傾向となっている。

SPF 区域で飼育中のマウスについては、定期微生物モニタリングを行い、全室で病原性微生物がネガティブであることを確認した。

センターより研究室へ持ち出した動物を再搬入する飼育室として、1F にマウス、ラット用飼育室各 1 室を用意した。

【その他】

平成 16 年度からの法人化が決定され、労働安全衛生に関する所轄が人事院から労働基準監督署へ移行する。このために必要な機器の点検改修等が行われた。

- ・明大寺地区エチレンオキサイド配管の改修
- ・明大寺地区 〃 屋外ボンベ庫の設置
- ・明大寺地区 検査室ドラフトチャンバの設置
- ・オートクレーブ（第一種圧力容器）の点検及び登録
- ・向精神薬試験研究施設設置者登録証の変更
- ・サル 飼養登録票の変更

その他、必要と思われる特定化学物質、第一種圧力容器取扱、有機溶剤作業主任者講習の受講を実施した。

陸生動物 部門別・動物種別搬入数（平成 15 年度）

部門	動物種	マウス	ラット	モルモット	ウサギ	サル
神経化学		363				
超微小形態生理			14			
細胞内代謝		132				
生体膜		240	124	79		
機能協関		745	254	5		
分子神経生理		2,864	2			
液性情報		173	86			
高次神経機構		3,875	14			
感覚認知情報						5
生体システム			2			9
認知行動発達機構		87	66			10
脳形態解析		284	290	44		3
大脳神経回路論		4	59			
形態情報解析室		4	2			
生体情報処理室		39	9			
生殖内分泌系			5			
動物実験センター		1,586		4		
細胞機構		40			3	
細胞内エネルギー変換		140				
細胞分化		84				
感覚情報		881	5		6	
種分化第一		240	31			2
細胞器官培養		93				
形質転換生物		44				
分子発生		1,566				
神経分化		754	23			
ナノ形態生理		20	207			
生命環境		2,276				
細胞生理		343				
脳機能分子解析室		81	831			
		7,742	1,125	132	9	29

水生動物 月別・動物種別搬入数（平成 15 年度）

種	月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	合計
コイ			8	6										14
メダカ		500							1,000		1,000		500	3,000
キンギョ		50		50	100									200
ハゼ												3		3
ゼノバス											40			40
ウニ		57												57
ヒトデ			180						130		60	100		470
ホヤ					150								90	240
														0
海水 (t)			10	12		8	8	8		8			8	62
														0

④共通研究施設

(1) 電子顕微鏡室

前橋 寛

【概要】

平成 15 年末に山手 2 号館の西館が建設され、その 3 階に電子顕微鏡室が増設された。それにともない、透過型電子顕微鏡が 3 台移転され、平成 16 年 1 月末に日立 H-7000 (125kv, 平成 13 年 10 月に理化学研究所から移設) 2 月にフィリップ Tecnai 12(120kV)と日本電子 JEM-1010 (100kV, 平成 12 年 2 月, 東京大学医学部より移設) が移転された。山手地区電子顕微鏡室には、上記 3 台の他に、新たに 3 台の透過型電子顕微鏡(フィリップス EM208S, Tecnai10, 日立 H-7000) が設置された。

今年度、電子顕微鏡講習会は 1 日コース「電子顕微鏡の取り扱い」(平成 16 年 1 月 19 日, 2 名参加) と 3 日コ

ース(平成 16 年 1 月 20~22 日, 3 名参加) が実施され、3 日コースの第 2 日目には永山 國昭 教授から講義として「電子位相顕微鏡の原理と実践」があり、その後に「電子位相顕微鏡の実習」(5 名参加, 講師 Radostin Danev 氏)があった。

【研究内容一覧表】

本年度、当室を利用してなされた研究の総件数は 40 件であった。機構内では 30 件あり、機構外は、国内で 7 件、国外ではイギリス、ドイツ、中国の研究者による利用が 3 件あった。下記の表はその研究部門・施設、大学、研究所と研究内容の一覧表である。

利用内容一覧表

二研究所

研究所	部門・施設	研究内容
生理研	液性情報	・イオンチャネル (Na チャネル) の膜輸送解析
	分子神経生理	・蛍光免疫染色を行ったマウス脊髄の軸索上でのイオンチャネルの分布解析及びマウス脊髄での髄鞘・軸索の形態解析 ・ニワトリ胚の脳における神経前駆細胞の移動の解析 ・ネトリン欠損マウスを用いたオリゴデンドロサイトの発生の解析
	大脳神経回路論	・大脳皮質の神経回路の研究 ・皮質一線状体・視床投射系錐体細胞と抑制性介在神経細胞の皮質内局所回路の解析 ・げっ歯類大脳皮質のシナプス連絡の研究
	脳形態解析	・NMDA 受容体の脳内での分布 左右非対称性 ・AMPA 受容体のフリーズフラクチャー レプリカ ラベリングによる定量的解析 ・NMDA 受容体の海馬における分布の解析 ・小脳片葉のシナプス形態変化の同定
	統合バイオセンター ナノ形態生理	・細胞, DNA タンパク質の電顕観察手法に関する研究 ・タンパク質の二次元展開に関する研究 ・複素電子顕微鏡の研究開発 ・エンドサイトーシス経路の生理機能とメカニズム
	機能協関	・運動神経細胞の生存機能維持機構の形態学的研究
	形態情報解析室	・消化管における水チャネルの分布に関する研究
	技術課	・コメツキムシの走査像微細構造観察 ・脊髄前角ニューロン細胞体の 3 次元解析

研究所	部門・施設	研究内容
基生研	生殖	・生殖細胞の分化の分子機構の解析
	細胞機構	・高等植物の遺伝子産物の細胞内局在性の解析
	種分化機構第二	・植物細胞における表層微小管の構築機構 ・地衣類の微細構造観察 ・ヒメツリガネゴケのプロトプラスト再生時における細胞内の極性観察
	細胞増殖	・ショウジョウバエ脳における神経細胞の微細形態の観察
	計時機構	・生体膜，特に藍藻類の光合成膜の発達の微細構造的解析
	情報制御	・シロイヌナズナにおける葉緑体光定位運動の解析
	感覚情報処理	・遺伝子改変マウスを用いた網膜及び神経系の発生に関する形態学的研究
	細胞内エネルギー変換機構	・酵母オートファジー機構の解明
	発生物系個別研究	・動物組織細胞の超微形態観察

所外（国内）

大学・研究所	研究代表者名	研究内容
琉球大学	中村 将	魚類生殖腺分化過程の観察及びウニ精子の観察
東京大学	棚橋 貴子	ヒメツリガネゴケ FLO/LFY 相同遺伝子 PpLFY1, PpLFY2 の機能解析
東京大学	井川 絢子	ヒメツリガネゴケの PIN タンパク質の局在観察
東北大学	稲葉 一男	精子べん毛タンパク質の網等の解析
大阪府立大学	加藤 幹男	塩基配列依存の DNA 高次構造多様性の可視化
東京歯科大学	橋本 貞光	唾液腺傍細胞輸送経路の検討
獨協医科大学	中館 和彦	小脳片葉における平行線維シナプスの超微形態学的解析

所外（国外）

国名，大学，研究所	研究者名	研究内容
イギリス オックスフォード大学	SOMOGYI, Peter	レプリカの観察
イギリス オックスフォード大学	ROBERTS, David	レプリカの観察
ドイツ フライブルク大学	KULIK, Akos	膜上機能分子の局在解析
中国 K.Kleung Brain Research Centre	WEN, Wang	グルタミン酸受容体の小脳と海馬の分布の解析

（２）機器研究試作室

加藤勝巳

【概要】

機器研究試作室は多種多様な医学・生物学用実験機器の開発と改良，それに関わる技術指導，技術相談を室の役割としている。今，我々の周りには便利な物品があふれ，自分で工夫して作ったり，改良する機会が少なくなり，新しい研究には新しい研究機器を作るという『ものづくり』が希薄になり，一方で，最近の研究の多様化は室に新たな役割の模索を迫っている。そうした認識のもと，『ものづくり』能力の重要性の理解と機械工作ニーズの新たな発掘と展開を目指すために，室では，2000年度から，医学・生物学の実験研究に使用される実験装置

や器具を題材にして，機械工作の基礎的知識を実習主体で行う機械工作基礎講座を開講し，2004年度は，レンズ及びフィルターホルダーの製作を題材にした応用コースと汎用工作機械の使用法を主体に実習する初級コースの二コースを開講した。参加希望者は，二コース合わせ生理研11名，基生研2名で，ガイダンスの後，マンツーマンで3～4回の講習を行い，一人のけが人も無く無事に講習を終了する事が出来た。

なお，機器研究試作室の平成15年度の利用状況は，以下の通りである。

機器研究試作室利用機器表 (件数)

月	ボール盤	フライス盤	コンターマシン	旋盤	横切盤	クラインダー	切断機	NCフライス盤	その他	計
4	22	6	19	4	20	18	12	0	32	133
5	15	13	14	6	8	3	0	0	22	81
6	17	12	14	18	4	2	3	1	29	100
7	31	35	25	16	14	4	16	2	42	185
8	17	12	9	10	6	7	2	1	13	77
9	12	18	16	20	6	8	0	0	25	105
10	20	22	22	9	9	8	3	1	18	112
11	19	25	16	8	4	8	1	0	22	103
12	11	10	10	7	5	3	1	0	13	60
1	14	13	15	4	5	9	0	2	12	74
2	8	5	9	3	7	4	3	0	18	57
3	8	6	4	3	11	3	0	2	9	46
合計	194	177	173	108	99	77	44	9	255	1133

機器研究試作室利用人数表

月	生理研	基生研	その他	合計	延べ時間
4	67	8	0	75	69
5	41	1	0	42	81
6	50	5	0	55	75
7	100	1	4	105	221
8	35	5	3	43	88
9	48	1	3	52	96
10	43	3	0	46	95
11	49	2	1	52	86
12	24	6	2	32	56
1	36	0	0	36	57
2	36	1	1	38	35
3	34	3	0	37	78
合計	563	36	14	613	1037

認知行動発達機構	110 名	感覚認知情報	100 名	ナノ形態生理	83 名
生体システム	51 名	心理生理学	43 名	生体膜	29 名
機能情報解析室	29 名	動物実験センター	28 名	脳形態解析	25 名
大脳神経回路論	15 名	液性情報	14 名	感覚運動調節	10 名
神経分化	10 名	形態情報解析室	9 名	神経化学	5 名
機能協関	2 名	高次液性調節	2 名	名誉教授	2 名
生体情報処理室	1 名	生殖・内分泌系発達機構	1 名	江橋研究室	1 名

感覚情報処理	9 名	技術課	5 名	植物発生	3 名
RI 実験センター	3 名	分析室	3 名	遺伝子発現統御第一	2 名
細胞機構	2 名	生殖	1 名	大型スペクトロ	2 名
所長室付	2 名	エネルギー変換	1 名	形態形成	1 名
計時機構	1 名				
分子研その他	14 名				