

【 研 究 会 報 告 】

研究会報告

〔 目 次 〕

1. 細胞内シグナル伝達機構の多角的・包括的理解 (代表者：宮脇敦史 2003 年 10 月 9 日－10 月 10 日)	190
2. 細胞死の誘導と制御・その分子機構と生理病理機能 (代表者：後藤由季子 H15 年 9 月 29 日－9 月 30 日)	198
3. 心血管イオンチャネルの病態に関する新たな展開 - ゲノミクスからプロテオミクスへ - (代表者：神谷香一郎 2003 年 11 月 25 日－26 日)	205
4. バイオ分子センサー研究会 (代表者：富永真琴 2003 年 5 月 21 日－5 月 22 日)	217
5. 生体防御の最前線：上皮輸送制御因子の構造活性相関 (代表者：丸中良典 2003 年 10 月 2 日－10 月 3 日)	228
6. ATP・アデノシン受容体相互作用の解明 (代表者：井上和秀 2003 年 8 月 28 日－8 月 29 日)	236
7. 生体の恒常性と細胞の生存・増殖・死を制御するイオン機構と細胞機能 (代表者：今泉祐治 2003 年 8 月 11 日－8 月 12 日)	252
8. 「視知覚のメカニズム - 生理, 心理物理, 計算論的アプローチ」-3 (代表者：内川恵二 2003 年 6 月 19 日－6 月 20 日)	260
9. 大脳皮質・視床・基底核の神経回路 (代表者：金子武嗣 2003 年 10 月 9 日－10 月 10 日)	267
10. 神経回路網形成と可塑性機構研究における領域横断的アプローチ (代表者：神谷温之 2003 年 12 月 4 日－12 月 5 日)	271
11. 生理研研究会「機能的 MRI 研究会」 (代表者：定藤規弘 2003 年 11 月 27 日－11 月 28 日)	276
12. シナプス伝達の細胞分子調節機構 (代表者：八尾 寛 2003 年 9 月 19 日－9 月 20 日)	284
13. 第 4 回脳磁場ニューロイメージング (代表者：柿木隆介 2003 年 12 月 11 日－12 月 12 日)	300
14. 痛みの基礎と臨床 (代表者：緒方宣邦 2003 年 9 月 4 日－9 月 5 日)	313
15. 電子位相顕微鏡法の医学的・生物学的応用－超分子・細胞のナノ形態生理 (代表者：臼田信光 2003 年 12 月 8 日－12 月 9 日)	330
16. ロコモーションの統合的研究～分子, 細胞, システム (代表者：岡村 康司 2003 年 10 月 2 日－10 月 3 日)	341
17. 神経可塑性の分子的基盤 (代表者：尾藤晴彦 15 年 5 月 29 日－5 月 30 日)	346

1. 細胞内シグナル伝達機構の多角的・包括的理解

2003 年 10 月 9 日－10 月 10 日

代表・世話人：宮脇 敦史（理化学研究所脳科学総合研究センター）

所内対応者：河西 春郎（岡崎国立共同研究機構・生理学研究）

- (1) 2次元蛍光スペクトル顕微測光による細胞内多因子同時測定

白川 英樹, 宮崎 俊一（東京女子医科大学・第二生理）

- (2) 1分子イメージングによる細胞質-核間輸送の分子機構

徳永 万喜洋（国立遺伝学研究所・構造遺伝学研究センター・生体高分子研究室）

- (3) 2光子励起法を用いた副腎髄質細胞の開口放出の解析

岸本 拓哉, 河西 春郎（岡崎国立共同研究機構生理学研究・生体膜部門）

木村 良一（弘前大学・医学部）

- (4) RGS 蛋白質によるムスカリン性カリウムチャネルの制御 ～その分子機構から生理機能まで～

石井 優, 鈴木 慎悟, 倉智 嘉久（大阪大学大学院医学系研究科・情報薬理学講座）

- (5) TRP 関連チャネルの新奇機能

森 泰生（京都大学大学院工学研究科・合成, 生物化学専攻・分子生物化学分野）

- (6) SA チャネルの活性化機構

曾我部 正博^{1,2}, 吉村 健二郎², 野村 健², 早川 公英², 辰巳 仁史¹ 成瀬 恵治^{1,2}, 唐 涼揺²

(¹名古屋大学院医, ICORP ²細胞力覚プロジェクト, JST)

- (7) Photo-induced peptide cleavage in the green-to-red conversion of a fluorescent protein

水野 秀昭, 宮脇 敦史（理化学研究所・脳科学総合研究センター・細胞機能探索技術開発チーム）

- (8) Development of FRET-based biosensors with expanded dynamic range

永井 健治^{1,2}, 宮脇 敦史¹

(¹理化学研究所・脳科学総合研究センター・細胞機能探索, ²科学技術振興事業団・さきがけ 21)

- (9) 細胞周期と Bcl-2 ファミリーによる細胞死のタイミング

橋本彰子, 廣瀬謙造, 飯野正光（東京大学院医学系研究科・細胞分子薬理学教室）

- (10) B 細胞抗原受容体シグナルにおける Ras 活性化機構

黒崎 知博（関西医科大学・肝臓研究所・分子遺伝学部門・

理化学研究所・横浜研究所・免疫, アレルギー科学総合研究センター・免疫細胞制御研究チーム）

- (11) Calyx of Held における PKC シグナリングとシナプス小胞の動態

斎藤 直人, 山下 慈郎, 水谷 治央, 高橋 智幸

（東京大学大学院医学系研究科・機能生物学専攻・神経生理学教室）

- (12) 活性化とトランスロケーションによる PKC 機能の 2 重制御

斎藤 尚亮（神戸大学バイオシグナル研究センター・分子薬理）

- (13) 膵β細胞における PKC の活性化機構とその作用

最上 秀夫, 鈴木 優子（浜松医科大学・第二生理）

小島 至, 張 恵（群馬大学生体調節研究所・調節機構部門細胞調節分野）

- (14) 逆行性シナプス伝達を担う内因性カンナビノイド同定の試み

狩野 方伸, 少作 隆子, 福留 優子, 前島 隆司

（金沢大学大学院医学系研究科・シナプス発達機能学研究分野）

(15) プロトンシグナルの反応性制御機構

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

(16) 腎尿細管 K^+ 分泌能の発達における側底膜 K^+ チャンネル (Kir7.1) の役割

河原 克雅, 安岡 有紀子, 鈴木 喜郎
(北里大学医学部・生理)

【参加者名】

黒崎 知博 (関西医大付属肝臓研究所), 宮崎 俊一 (東京女子医大), 白川 英樹 (東京女子医大), 尾田 正二 (東大新領域創成科学研究科), 小島 至 (群大生体調節研究所), 長澤 雅裕 (群大生体調節研究所), 最上 秀夫 (浜松医大), 鈴木 優子 (浜松医大), 斎藤 尚亮 (神大バイオシグナル研究センター), 足立 直子 (神大自然科学研究科), 河原 克雅 (北里大・医), 安岡 有紀子 (北里大・医), 久野 みゆき (市大大院医学研究科), 飯野 正光 (東大大院医学系研究科), 橋本 彰子 (東大大院医学系研究科), 大久保 洋平 (東大大院医学系研究科), 中村 直俊 (東大大院医学系研究科), 古谷 和春 (東大大院医学系研究科), 高橋 智幸 (東大大院医学系研究科), 辻本 哲宏 (東大大院医学系研究科), 斎藤 直人 (東大大院医学系研究科), 石川 太郎 (東大大院医学系研究科), 鈴木 大介 (東大大院医学系研究科), 水谷 治央 (東大大院医学系研究科), 渡邊 博康 (東大大院医学系研究科),

金子 雅博 (東大大院医学系研究科), 鈴木 慎悟 (阪大大院医学系研究科), 石井 優 (阪大大院医学系研究科), 曾我部 正博 (名大大院医学研究科), 狩野 方伸 (金沢大大院医学系研究科), 森 泰生 (京大大院工学研究科), 沼賀 拓郎 (総研大), 徳永 万喜洋 (国立遺伝子学研究所), 十川 久美子 (理研免疫センター), 宮脇 敦史 (理研脳科学総合研究センター), 水野 秀昭 (理研脳科学総合研究センター), 永井 健治 (理研脳科学総合研究センター), 下薗 哲 (理研脳科学総合研究センター), 唐沢 智司 (理研脳科学総合研究センター), 宮内 崇之 (理研脳科学総合研究センター), 河西 春郎 (生理研), 岸本 拓哉 (生理研), 根本 知己 (生理研), 高橋 倫子 (生理研), 松崎 政紀 (生理研), 兒島 辰哉 (生理研), 木瀬 環 (生理研), 大嶋 章裕 (生理研), 安松 信明 (生理研), 本蔵 直樹 (生理研), 畠山 裕康 (生理研), 野口 潤 (生理研)

【概要】

特定の外界刺激を受けて, 細胞内では特定のカスケード反応が起こり, 細胞の分化, 移動, 分裂などの現象が具現化される。こうした細胞内シグナル伝達系を多角的かつ包括的に司会するためには, ここに空間の3軸と時間軸を導入しなければならない。各事象が空間的, 時間的に巧妙に制御されているからである。生化学, 遺伝子, バイオイメーキング等の技術を総動員し, さまざまな分野にまたがる知識をもとに議論することが重要である。日本における細胞内シグナル伝達の研究は, 多くの研究者がそれぞれの研究の目的に適した, 異なった細胞 (例えば神経細胞, 上皮細胞, 免疫細胞等) を用いて業績を挙げており, 国際的にも高く評価されている。しかしながら, 各研究者それぞれが異なる細胞を用いて専門的な

研究を行っているがゆえに他の研究システムを用いての研究の成果, 及び異なった視点に立脚することが困難であり, 学際的情報, 及び学際的研究の重要性が強く望まれている。本研究会は細胞内シグナル伝達の研究において, 問題点, 課題点を多様な研究システム・研究視点から討論して解決すべきアプローチを見出していこうとして企画した。

その結果, 抄録にあるように, 分野を異にする多数の研究室から新しい未発表の成果の発表が積極的に行われ, それに対して活発な討論, 意見交換がなされ, 新しい研究の方向性をつかむ絶好の機会となった。また, 各研究室から多くの若手の参加があった。

(1) 2 次元蛍光スペクトル顕微測光による細胞内多因子同時測定

白川 英樹, 宮崎 俊一 (東京女子医科大学・医学部・第二生理)

近年, 様々な細胞内分子や細胞活性に対する蛍光性プローブが開発されてきており, 複数種のプローブを用いれば複数種の因子を同時に光学的に測定することが可能である。しかしプローブ同士のスペクトルが大きく重複している場合には, 両者のシグナルを正確に分離することは容易ではなく, 同時に適用できるプローブ数はしばしばこのスペクトルの重複によって制限される。また細胞の内因性蛍光 (自家蛍光) が有意な場合は, 各プローブ由来の蛍光シグナルを正確に分離測定することはさらに困難になる。今回, 単一細胞からの蛍光の 2 次元スペクトル (励起波長 $\times$ 蛍光波長) から数多くの蛍光成分を分離・測定するシステムを開発したので紹介する。

【構成】励起波長は 9 種類のバンドパスフィルタを用いて高速に切り替えた。蛍光はモノクロメータで分光したのち, 1024 チャンネルの冷却 CCD センサにより全波長域を同時に記録した。得られた 3 次元のデータ (2 次元スペ

クトル $\times$ 時間) に適当な補正を施した後に, Parallel Factor Analysis (PARAFAC) と呼ばれる多成分解析の手法により独立した蛍光成分のスペクトルおよび混在量の変化を同時推定した。

【性能】市販のカルシウム蛍光プローブの混合水溶液を用いて評価したところ, 互いに大きく重複するスペクトルをもつ 11 個の蛍光成分を完全に分離できることが確認された。

【適用例】マウス卵の自家蛍光を単一細胞レベルで測定・解析したところ, NAD (P) H と酸化型フラビン以外にも最低でも 2 種類の成分が確認され, 例えばミトコンドリア呼吸系阻害剤を投与した際のそれぞれの経時変化を分離測定することができた。さらに, 自家蛍光成分と細胞内カルシウムや pH の経時変化を同時に測定することも可能であった。

(3) 2 光子励起法を用いた副腎髄質細胞の開口放出の解析

岸本 拓哉, 河西 春郎 (岡崎国立共同研究機構生理学研究所・生体膜部門)

木村 良一 (弘前大学・医学部)

神経や内分泌細胞におけるカルシウム依存性開口放出機構は, 細胞内深部にある分泌小胞が細胞膜への動員され, 融合準備状態になってはじめて融合することができると考えられている。ところが, 細胞深部にある小胞は従来の方法では可視化できなかった。そこで, 我々は組織標本に近い状態の副腎髄質細胞塊に, 2 光子励起顕微鏡の深部到達性と同時多重染色性を生かした 2 次元蛍光相互相関法を用いることで, 細胞深部における小胞が頻繁に逐次開口放出を起こすことを明らかにした。この逐

次開口放出においては, 融合細孔が 20nm 以下に制御されており, 小胞内のゲルが細胞外に出ることができず, 小胞内でゲルが膨潤することによって増強されていることがわかった。また, 細胞表層部における開口放出と細胞深部における開口放出の融合速度が同じであったことから, 細胞表層部と細胞深部における小胞は共に融合準備状態であると考えられた。このように, 逐次開口放出機構は外分泌細胞のみならず神経内分泌においても主要な分泌機構であることがわかった。

(5) TRP 関連チャネルの新奇機能 — TRPC5 の酸化状態感受性

森 泰生 (京都大学大学院工学研究科・合成,生物化学専攻・分子生物化学分野)

Ca イオンは細胞の生存, 増殖, 分化の様々な局面において必須のシグナル伝達因子として働いている。形質膜越えの Ca イオン流入はカルシウムチャネルタンパク質により制御され, 作動メカニズムにより電位依存性, リガンド作動性, 受容体活性化チャネルに大別される。中でも, 近年注目されている TRP (transient receptor potential) タンパク質は受容体活性化チャネルを形成し, 受容体からホスファチジルイノシトール代謝回転へつながるシグナルカスケードを制御するタンパク質群と, 強い相互作用を示すことが分かってきた。今回, 我々はこの中のひとつである TRPC5 が生理活性物質である活性酸素種

(ROS) や, 活性窒素種 (RNS) によっても活性化・開口することを報告する。HEK293 株に一過的に TRPC5 を発現させた系において過酸化水素, NO 供与剤である SNAP を処置することにより TRPC5 が活性化する事を認めた。特にシステインの特異的酸化剤である 5-Nitro-2-PDS は顕著な活性化作用を示した。ラベル化実験等により PDS は TRPC5 の細胞質内に面した領域のシステインを直接修飾する事が示唆された。このように TRPC5 を含むカルシウムシグナル複合体が細胞の酸化状態センサーとして働きうることが考えられる。その生理的意義に関しても考察したい。

(6) SA チャネルの活性化機構-メカニカルインターフェースとしての細胞骨格-
Activation Mechanisms of Stretch Activated Ion Channels
-cytoskeleton works as a mechanical interface-

曾我部 正博^{1,2}, 吉村 健二郎², 野村 健², 早川 公英², 辰巳 仁史¹, 成瀬 恵治^{1,2}, 唐 涼揺²
(¹名古屋大学院医, ICORP ²細胞力覚プロジェクト, JST)

我々の内耳に分布する有毛細胞や皮膚機械受容器はもとより, 大腸菌や植物細胞も機械刺激に応答する。また, 細胞の成長, 分裂, 形態変化, 運動に伴って細胞の各所に多様な力が発生し, 細胞応答を修飾する。このメカノトランスダクションでは, 細胞に加えられた機械刺激がメカノセンサーに受容され, 細胞内シグナルに変換される。このプロセスには 2 つの謎がある。1 つ目はメカノセンサーの分子実体であり, 2 番目は機械刺激がどのようにしてそのメカノセンサーを活性化するのかという仕組みである。1 つ目の謎は, SA (Stretch Activated) チャネルの発見によって部分的に解かれた。細菌, 酵母, あるいは高等動物の神経, 心筋などから SA チャネル遺伝子がクローニングされ, 細菌 SA チャネルの高次構造も決定された。しかしながら, 細胞への機械刺激がどのよう

にして SA チャネルを活性化するのかという 2 番目の謎はまだ解けていない。大腸菌 SA チャネルでは細胞膜に生じる膜張力が直接 SA チャネル分子を変形させて活性化するという説が有力である。一方, 高等生物ではチャネル間, あるいはチャネルと膜を連結する細胞骨格の張力が SA チャネルの活性化に重要であるという主張が繰り返し提出されてきたが未だに証明されていない。本口演では, 高等動物の細胞 (ヒト血管内皮細胞) においては細胞骨格 (アクチン線維束) に生じたストレスが SA チャネルを活性化するという直接証拠を提出する。

最後に, 最近我々がクローニングした心筋 SA チャネルの分子構造に基づいてその活性化機構と細胞骨格の関連について議論するとともに, 細菌 SA チャネルの膜張力による活性化機構との比較を行う。

(7) Photo-induced peptide cleavage in the green-to-red conversion of a fluorescent protein

水野 秀昭, 宮脇 敦史 (理化学研究所・脳科学総合研究センター・細胞機能探索技術開発チーム)

我々の研究室ではクラゲ GFP と相同性をもつ蛍光タンパク質のクローニングを刺胞動物より行っている。その一つ、ヒュサングよりクローニングされた蛍光タンパク質は、紫 (外) 光を吸収することによって蛍光色が緑から赤に変わるというユニークな性質を持っており、この色の変化からカエデと命名された。しかしどのようなメカニズムで赤色化が起こるのか、という点に関してはこれまで不明であった。

反応機構の解明にあたり、我々はカエデのトリプシン消化産物から発色団を含むペプチド断片を精製し、その構造を ESI-MS 及び NMR にて解析した。カエデの緑色の発色団は、アミノ酸残基 His⁶²-Tyr⁶³-Gly⁶⁴ の部分で形成され、クラゲ GFP の発色団と同様の構造をとっていた。赤色の発色団の解析より、紫 (外) 光の照射に伴い His⁶² の C α -N α の結合が、 β 脱離反応というタンパク質内では

他に例のない反応によって切断されることがわかった。この切断の結果形成される His⁶² の C α -C β 間の二重結合によって発色団の π -共役が His⁶² のイミダゾール環へと広がり、吸収及び蛍光波長の長波長側へのシフトが説明できる。

これまでに知られているタンパク質内のペプチド鎖の切断は、そのほとんどがプロテアーゼや酸処理によるペプチド結合の加水分解であるが、カエデの光依存的なペプチド鎖の切断はこれとは全く異なる β 脱離反応であった。またこの β 脱離反応ではカルボキサミド基が脱離基となっているが、有機化学的な脱離反応でカルボキサミド基が脱離基となる例はない。発色団を包み込むカエデタンパク質の高次構造に由来する自己触媒的な作用によって、初めてこのような特異な反応が成立し、カエデのユニークな性質を生み出していると思われる。

(8) Development of FRET-based biosensors with expanded dynamic range

永井 健治^{1,2}, 宮脇 敦史¹

(¹ 理化学研究所・脳科学総合研究センター・細胞機能探索, ² 科学技術振興事業団・さがけ 21)

Fluorescence resonance energy transfer (FRET) technology has been used to develop genetically-encoded fluorescent indicators for various cellular functions. While most indicators have cyan- and yellow-emitting fluorescent proteins (CFP and YFP) as FRET donor and acceptor, their poor dynamic range often prevents detection of subtle but significant signals. Here, by using new construction method, we developed FRET-based Ca²⁺ and active caspase3

sensors that show dramatic and much bigger change in the ratio of YFP/CFP in accordance with Ca²⁺ concentration and caspase3 activation, respectively. The new sensors enable visualization of subcellular dynamics of Ca²⁺ and active caspase3 with better spatial and temporal resolutions than before. Our study will provide an important guide for development and improvement of indicators using GFP-based FRET.

(9) 細胞周期と Bcl-2 ファミリー (BAD) による細胞死のタイミング

橋本彰子, 廣瀬謙造, 飯野正光 (東京大学院医学系研究科・細胞分子薬理学教室)

サイトカインなど増殖因子の除去による細胞死の機構について, 細胞周期が関与する機構と, Bcl-2 ファミリー分子が関与する機構の二通りの説が従来論じられてきた。しかし, 細胞周期と細胞死シグナルの関連については明らかにされていなかった。本研究では, 細胞周期の担い手である Cdc2 によって Bcl-2 ファミリー分子である BAD の機能が周期的に調節されていることを明らかにした。

BAD は, 通常 14-3-3 蛋白と結合し不活性な状態にあるが, 増殖因子が除去されると 14-3-3 蛋白から解離してミトコンドリアに移行し, 細胞死を誘起すると考えられていた。しかし, ノックアウトマウスの解析から, BAD は細胞死を誘起するのではなく, ミトコンドリア依存性細

胞死の閾値を下げる効果を持つことが分かってきた。我々は蛍光エネルギー移動 (FRET) を用いた観察により, 血球細胞内で BAD と 14-3-3 蛋白が細胞周期ごとに結合・解離することを見出した。BAD と 14-3-3 蛋白の解離は Cdc2 による BAD のリン酸化によって G2/M 期毎に生じており, それ自体が細胞死を招くものではなかった。更に, 増殖因子(IL-3) の除去による細胞死が G1/S 期よりも, BAD と 14-3-3 蛋白が解離している G2/M 期に進行しやすいことを示した。これらの結果は BAD による細胞死促進効果が細胞周期の機構そのものに調節されていることを示しており, 細胞周期と細胞死シグナルの密接な関係が明らかになった。

(10) B 細胞抗原受容体シグナルにおける Ras 活性化機構

黒崎 知博 (関西医科大学・肝臓研究所・分子遺伝学部門・理化学研究所・横浜研究所・免疫, アレルギー科学総合研究センター・免疫細胞制御研究チーム)

Ras の活性化メカニズム, 特にRasの不活性型 (GDP 結合型) を活性型 (GTP 結合型) に変換する酵素 (RasGEFs) は, Sos 群と RasGRP 群の 2 種類存在するが, 多くの異なったレセプターが Ras を活性化するが, 異なるレセプターが, これらRasGEF群を使い分けているのかどうか明らかではなかった。

モデル細胞 DT40 を用い Sos 群欠損, RasGRP 群欠損細

胞を作製することにより, まず B 細胞レセプターは主として RasGRP 群を用い, EGF レセプターは Sos 群を用いて Ras を活性化していることを明らかにした。さらに B 細胞レセプターは, PLC-g2 を活性化することにより生じたジアシルグリセロール (DAG) が, RasGRP を膜分画にリクルートし, 活性化を引き起こすのに重要なメカニズムであることが示唆された。

(11) Calyx of Held における PKC シグナリングとシナプス小胞の動態

齋藤 直人, 山下 慈郎, 水谷 治央, 高橋 智幸 (東京大学大学院医学系研究科・機能生物学専攻・神経生理学教室)

ラット台形体内側核 (MNTB) にある巨大なシナプス前終末 Calyx of Held には, カルシウム非依存性の PKC である ϵ PKC が局在している。Calyx of Held 内の, ϵ PKC は Phorbol dibutyrate (PDBu) によって活性化され, シナプ

ス側の膜へ移行する。また, PDBu 投与により MNTB のシナプス伝達カルシウム非依存的に増強する。

PKC のターゲットの一つと考えられている SNAP25 のリン酸化を, 脳幹スライスを用いて解析した。PDBu 投

与によって濃度依存的に SNAP25 のリン酸化は亢進し、この作用は PKC 阻害剤 Bisindolylmaleimide I によって阻害されたが、カルシウム依存性 PKC に選択的な阻害剤 Go6976 では阻害されなかった。さらに、 ϵ PKC は免疫沈降した SNAP25 を *in vitro* でリン酸化することが出来た。

次に、シナプス小胞の局在を免疫染色法によって、共焦点レーザー顕微鏡下で解析した。シナプス小胞のマーカーとして VAMP2 または Synaptophysin を用い、t-SNARE 分子である Syntaxin または SNAP25 との共局在を解析

した。PDBu 投与によってシナプス小胞マーカーと t-SNARE 分子の共局在の程度は上昇し、この効果は Bisindolylmaleimide I によって阻害された。また、ボツリヌス毒素で SNAP25 を切断すると共局在の減少が認められた。

以上の結果より、Calyx of Held において ϵ PKC は活性化に伴ってシナプス側の膜へ移行し、SNAP25 をリン酸化することによって、シナプス小胞を膜に向かって移動させ、シナプス伝達の増強に関与していると推察される。

(12) 活性化とトランスロケーションによる PKC 機能の 2 重制御

斎藤 尚亮 (神戸大学・バイオシグナル研究センター)

我々は、プロテインキナーゼ C (PKC) が多くの細胞機能の制御に関与するには、様々な刺激に応じて、PKC 各分子が目的とする場所に、特定のタイミングで移動し、標的をリン酸化する機構、つまり、ターゲティング機構が重要であることを提唱してきた。

今回、セラミドによるアポトーシスを例とし、セラミ

ドにより特定の PKC サブタイプが、特定の細胞内部位にトランスロケーションし、特定の活性化機構で活性化されることがアポトーシスの誘導に必要であることを示し、PKC の機能制御におけるターゲティング機構の重要性について述べる。

(15) プロトンシグナルの反応性制御機構

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

プロトン (H^+) は pH を調節し、イオンや種々の生理活性物質の輸送を制御する。 H^+ が殆どの化学現象に根幹的に関わる重要なシグナルイオンであることは言うまでもないが、 H^+ シグナルはいくつもの細胞内情報伝達機と連動するため input-output の関係は単純ではない。更に、細胞には pH を一定の範囲に調節するために強力な調節機構が幾重にも備わっており、 H^+ シグナルの変動とその応答メカニズムを細胞レベルで捉えるのは存外に難しい。この強力な pH ホメオスターシスを打ち破る H^+ シグナル発生器として膜電位依存性 H^+ チャネルは有力な研究手段となる。すなわち、電位パルスプロトコルを工夫することによって H^+ シグナルの大きさと作用時間を任意に制御することができ、同時にチャネル活性自体を細胞内 H^+ シグナルのリアルタイムモニターとして利

用できる。

他のイオンチャネルをブロックしておくとも膜電位は H^+ チャネルによって制御される。このとき膜電位は 10 ms, 100 ms, 数秒以上の様々な周期で絶えず振動しており、 H^+ チャネル活性が細胞状況に即応して微小な増減を繰り返していることが示唆される。 H^+ チャネル活性は pH 変化に基づくフィードバックを第一の制御機構とするが、同時に多くの物理化学的因子や代謝調節因子の作用によって大きく変動する。私達は、 H^+ チャネルの特性を用いて、細胞内 H^+ シグナリングをどのように把握できるか、また膜電位および Ca^{2+} が H^+ と連繋する細胞内シグナルとしてどのように H^+ シグナリングに関わっていくかを探ってみた。

(16) 腎尿細管 K^+ 分泌能の発達における側底膜 K^+ チャンネル (Kir7.1) の役割

河原克雅, 安岡有紀子, 鈴木喜郎 (北里大学医学部・生理)

腎臓は体液の電解質組成を正常域に保持する唯一の臓器であるが, 新生児期は糸球体濾過や尿細管イオン輸送機能などの腎機能が未熟である。このため, 新生児の血清 K^+ 濃度は成人の正常域に比べ高値を示すが, 体および腎臓の成長に伴って低下し正常域に調節される。腎集合管に局在する内向き整流性 K^+ チャンネル (ROMK1, 管腔膜; Kir7.1, 側底膜) の発現量の変化を, この間の新生仔期ラットの尿中 K^+ 分泌能の発達と比較する事でそれぞれの K^+ チャンネルの役割を検討した。RNase protection assay の結果, ROMK1 mRNA は, 新生仔期初期 (1 wk) において中後期 (2-3 wk) の約 50% 量が発現していた。中後期 (2-3

wk) においては, ROMK1 mRNA の発現量は増加しなかったが, Kir7.1 mRNA は有意に増加した。一方, 腎 K^+ 分泌能の発達においては, 経口負荷 K^+ の尿中への排出量 (総量) はこの間 (2-3 wk) 増加しなかったが, 初期値 (初期時間 K^+ 分泌量) は有意に増加した。免疫組織染色の結果, ROMK1 蛋白質は尿細管管腔膜に, Kir7.1 蛋白質は側底膜に局在していた。われわれの実験結果は, ROMK1 (管腔膜) が新生仔期ラット腎集合管 K^+ 分泌路として機能するという従来の仮説を支持する。さらに, Kir7.1 (側底膜) が外来性に負荷された K^+ の時間尿中分泌能の発達に寄与することを示した。

2. 細胞死の誘導と制御・その分子機構と生理病理機能

2003 年 9 月 29 日－9 月 30 日

代表・世話人：後藤由季子（東京大学分子細胞生物学研究所・情報伝達研究分野）

所内対応者：岡田泰伸（生理学研究所・細胞器官研究系）

(1) 細胞死を制御するキナーゼの機能

後藤由季子（東京大学分子細胞生物学研究所・情報伝達研究分野）

(2) ストレス応答としての ASK1 経路

一條秀憲（東京大学大学院薬学系研究科・細胞情報学教室）

(3) γ -セクレターゼの形成と機能

岩坪 威，富田泰輔（東京大学大学院薬学系研究科臨床薬学教室）

(4) 神経変性疾患における VCP 蛋白質の役割

垣塚 彰（京都大学大学院生命科学系研究科・高次生体統御学分野）

(5) 小胞体ストレス応答における相転移

森 和俊（京都大学大学院生命科学系研究科・生体システム学分野）

(6) Bcl-2 の局在を決定するイムノフィリン FKBP38

中山敬一，白根道子（九州大学生体防御医学研究所・分子発現制御学分野）

(7) Bcl-2 によるミトコンドリアを介した細胞死制御

清水重臣，辻本賀英（大阪大学大学院医学系研究科・遺伝子学）

(8) ミトコンドリアプロテアーゼ，Omi/HtrA2 による細胞死誘導

鈴木泰行，高橋良輔（理化学研究所脳科学総合研究センター運動系神経変性研究チーム）

(9) 動物の発生過程における DNA の分解

長田重一（大阪大学大学院生命機能研究科）

(10) ストレス応答性 MAP キナーゼの活性化機構とその役割

仁科博史，中川健太郎，西舩 元，根岸崇大，堅田利明（東京大学大学院薬学系研究科・生理化学教室）

(11) ショウジョウバエを用いたプログラム細胞死の分子遺伝学

三浦正幸（東京大学大学院薬学系研究科・遺伝学教室）

(12) ショウジョウバエをモデルとした非自律的細胞死の研究

安達 卓（神戸大学発達科学部・人間環境自然環境論講座）

(13) NF- κ B によりもたらされる生存シグナルの分子メカニズム

中野裕康（順天堂大学医学部・免疫学）

(14) Cytosolic ATP dynamics during apoptotic cell death: a bioluminescence study

with intracellular luciferase

Ravshan Z. Sabirov, Maria V. Zamaraeva, Emi Maeno, Yuhko Ando-Akatsuka and Yasunobu Okada

（生理学研究所・細胞器官研究系）

(15) 免疫グロブリンアイソタイプ特異的な B リンパ球アポトーシス制御機構

鏑田武志，若林千里，安達貴弘（東京医科歯科大学大学院疾患生命科学部）

(16) 細胞外からの細胞死誘導システムの分子機構と生理機能

米原 伸（京都大学大学院生命科学系研究科）

【参加者名】

安達 卓, 春本敏之 (神戸大・発達科学部), 一條秀憲, 小室美子, 高河原周一, 山口 潔 (東大大学院薬学系研究科), 岩坪 威 (東大大学院薬学系研究科), 岡田泰伸, Ravshan Z. Sabirov (生理研・細胞器官研究系), 垣塚 彰, 前田良太, 野口昌克, 平野朋子 (京大大学院生命科学研究科), 高橋良輔, 鈴木泰行 (理化研・脳科学総合研究センター), 辻本賀英, 清水重臣 (阪大大学院医学系研究科), 鏑田武志, 安達貴弘, 片山有紀 (東医歯大大学院疾患生命科学研), 長田重一 (阪大大学院生命機能研究科), 中

野裕康, 笹月朋成 (順大学医学部), 中山敬一 (九大生体防御医学研究所), 仁科博史, 中川健太郎, 西舩 元, 根岸崇大 (東大大学院薬学系研究科), 三浦正幸, 松田七美, 青沼宏佳, 高橋 潤 (東大大学院薬学系研究科), 森 和俊, 岡田徹也 (京大大学院・生命科学研究科), 米原 伸, 掃部里央, 米澤慎雄, 矢島伸之, 真名子 幸, 中桐志保, 大串雅俊 (京大・ウィルス所), 後藤由季子, 鶴田文憲, 小川原陽子, 砂山 潤, 大橋淳一郎, 青木一郎 (東大・分生研)

【概要】

本研究会は「細胞死の誘導と制御：その分子機構と生理病理機能」をテーマとし、幅広いアプローチから細胞死の機構と機能を明らかにする非常に濃密でレベルの高い研究会である。日本で細胞死研究をリードする研究者が一同に会する機会として過去数年に渡り年一回開催さ

れており、研究者間の情報交換の場として、また共同研究の発展の場として非常に大きな役割を果たしている。本年も最先端の研究の発表と活発な議論が行われ、他に例を見ない有益な研究会となったと考えている。

(1) 細胞死を制御するキナーゼの機能

後藤由季子 (東京大学分子細胞生物学研究所・情報伝達研究分野)

JNK は MAP キナーゼファミリーに属し、紫外線照射・ER ストレスなどの刺激により活性化されアポトーシスを誘導する。これまでに、活性化した JNK は c-Jun などの転写因子のリン酸化を介した遺伝子発現の制御によってアポトーシスを制御していることが報告されている。一方で、JNK によるアポトーシス誘導には転写因子を介さない経路も存在するが、この場合の標的分子に関してはほとんどわかっていない。我々は JNK によるアポトーシス誘導機構を調べるために活性型 JNK を細胞に発現させたところ、JNK が c-Jun・カスパーゼ非依存的に Bax

のミトコンドリア移行およびアポトーシスを誘導することを見出した。最近、Bax は 14-3-3 に結合することによって細胞質に局在することが清水・辻本らによって提唱されていることから、JNK が 14-3-3 を標的にするか検討を行った。その結果、JNK は 14-3-3 を直接リン酸化すること、それによって Bax が 14-3-3 から遊離することが明らかとなった。以上のことは、JNK が 14-3-3 を標的に Bax のミトコンドリア移行を促進し、アポトーシスを誘導している可能性を示唆している。

(2) ストレス応答としての ASK1 経路

一條秀憲 (東京大学大学院薬学系研究科・細胞情報学教室)

ASK1 は JNK と p38MAP キナーゼの上流に存在する MAPKKK である。これらの MAP キナーゼ経路は、様々な環境ストレスに応答して細胞がアポトーシスや生存・

分化をはじめとする多様な生物活性を発現するためのシグナル伝達系として重要な機能を果たしている。ASK1 ノックアウトマウスの解析により、ASK1 が TNF や酸化

ストレスならびに小胞体ストレスによるアポトーシスに必須であることが明らかになり、また ASK1 がポリグルタミン病やアルツハイマー病において認められる神経細胞死のメディエーターとしてこれらの疾患に関わっていることが示唆されている。一方、ASK1 は一部の Toll-like

Receptor の下流で主に p38 の活性化を選択的に担うことによって自然免疫応答に必須の働きをすることが明らかになってきた。本シンポジウムでは、ASK1-MAP キナーゼ経路を介するアポトーシス制御ならびに炎症・免疫系制御の病態生理的役割について報告したい。

(3) γ -セクレターゼの形成と機能

岩坪 威, 富田泰輔 (東京大学大学院薬学系研究科臨床薬学教室)

アルツハイマー病 (AD) 脳で老人斑を形成する A β ペプチドはアミロイド前駆体 (APP) から切り出される。家族性 AD の病因遺伝子産物プレセニリン (PS) は A β の C 末端を切り出す γ セクレターゼの触媒サブユニットを構成するが、PS 単独では切断活性を持たず、PS に結合する複数のコファクター蛋白が必要と判明した。我々は PS と 3 種類のコファクター (NCT, APH-1, PEN-2) が γ セクレターゼを形成する過程について調べた。まず RNA 干渉法により NCT あるいは APH-1 をノックダウンすると、 γ セクレターゼ作用をもつ PS も同時に消失した。ところ

が PEN-2 のノックダウンでは PS, NCT, APH-1 の 3 者が結合した不完全な複合体が蓄積した。逆に PS の存在下で NCT と APH-1 を過剰発現すると、同様に不完全な複合体ができた。ここに PEN-2 を加えると、 γ セクレターゼ活性が生じた。これらの結果から (1) γ セクレターゼの形成過程で、最初に APH-1 と NCT が PS に結合して中間体を形成し、最後に PEN-2 が働いて活性が生じる。(2) γ セクレターゼの基本骨格は PS, NCT, APH-1, PEN-2 という 4 つの蛋白からなることが分かった。

(4) 神経変性疾患における VCP 蛋白質の役割

垣塚 彰 (京都大学大学院生命科学研究科高次生体統御学分野)

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

た。

本発表では、これまで我々が行ってきた遺伝性神経変性疾患の発症メカニズム、すなわちハンチントン舞蹈病・Machado-Joseph 病等の原因となる伸長した CAG リピートが作り出すグルタミンリピートによって引き起こされる神経細胞の死・変性の分子解析を紹介し、VCP とよばれる AAA ATPase が、神経変性疾患に共通する発症の鍵分子である可能性について議論し、新しい治療戦略を考察する。

(5) 小胞体ストレス応答における相転移

森 和俊 (京都大学大学院生命科学研究科生体システム学分野)

分泌タンパク質や膜タンパク質の高次構造形成の場である小胞体に、異常タンパク質が蓄積することは重篤な影響を与えるため、真核細胞は小胞体ストレス応答と呼ばれる防御機構を活性化し、恒常性を維持しようとする。最近の急速な研究の進展によって、哺乳動物では ATF6 経路, IRE1-XBP1 経路, PERK-ATF4 経路という3つの情報伝達機構が重要な役割を果たしていることが明らかになった。小胞体ストレスは ATF6, IRE1, PERK という

小胞体膜貫通型タンパク質によって感知され情報伝達されるが、それぞれの下流で働く転写因子の活性化機構が全く異なるために、感知の開始時間は同じであっても、下流の転写因子が活動を始める時間に差が生じる。興味深いことに、哺乳動物はこの時間差を利用して転写誘導、翻訳抑制、分解という3つのプロセスを仕分けていることが判明した。小胞体ストレス応答における時間依存的相転移について討論する。

(6) Bcl-2 の局在を決定するイムノフィリン FKBP38

中山敬一, 白根道子 (九州大学生体防御医学研究所・分子発現制御学分野)

脳虚血、脳挫傷、脊髄損傷といった神経損傷において損傷神経軸索再生の分子機構を解明することは重要な問題である。神経再生現象には二つの重要なメカニズム、すなわち細胞死からの防御と再生軸索の伸張が必須となる。われわれは脳に高発現しているアポトーシス抑制分子 FKBP38 が, Bcl-2 をミトコンドリアに局在させる重要な因子であることを明らかにした。さらに FKBP38 と相互作用するタンパク質を探索することによって、リン脂質結合ドメインを有する新規タンパク質 Protrudin を発見

した。Protrudin は神経突起に発現しており、細胞内小胞を微小管に沿って細胞表面に輸送し、膜脂質成分を突起先端に供給することによって神経突起を伸長させることを見いだした。神経の突起形成に Protrudin は必須である。また驚くべきことに、Protrudin は非神経細胞に過剰発現させても神経突起様の突起を形成することから、突起形成の中心的な分子であると考えられる。本発表では、神経細胞における FKBP38 と Protrudin の生理機能について考察する。

(7) Bcl-2 によるミトコンドリアを介した細胞死制御

清水重臣, 辻本賀英 (大阪大学大学院医学系研究科・遺伝子学)

アポトーシスのシグナルは、アポトーシス刺激に特異的なシグナル伝達経路を通過した後、主にミトコンドリアに集約され、ミトコンドリア膜の透過性を亢進する。その結果、シトクロム *c* が細胞質に漏出し、Apaf-1, (d)ATP との協同作用でカススペースの活性化を惹起しアポトーシスを引き起こす。

我々は以前より、アポトーシス時の膜透過性亢進機構、ならびに Bcl-2 ファミリー蛋白質によるその調節機構を検討してきた。その結果、アポトーシス促進型の Bax / Bak

は膜透過性を亢進し、一方抑制型の Bcl-2 / Bcl-x_L は膜透過性を抑制していることを見いだした。また、膜透過性亢進の責任分子として、外膜に局在するチャネル蛋白質 voltage-dependent anion channel (VDAC) を同定した。実際、VDAC に対する中和抗体をミトコンドリアや細胞に投与すると、ミトコンドリア膜透過性が著明に抑制され、かつアポトーシスが緩和された。これらの事実は VDAC がアポトーシス誘導に必須であることを示している。今回は VDAC 機能を含めた Bcl-2 ファミリー蛋白質の新たな

機能に関して報告する。また、最近我々は、X 線誘導性アポトーシスにおけるミトコンドリア膜透過性亢進因子

を同定したので、これを併せて報告する。

(8) ミトコンドリアプロテアーゼ, Omi/HtrA2 による細胞死誘導

鈴木泰行, 高橋良輔 (理化学研究所脳科学総合研究センター運動系神経変性研究チーム)

IAP (Inhibitor of apoptosis protein) ファミリータンパク質は、アポトーシスの実行に中心的な役割を果たすカスパーゼ-3,-7,-9 の内因性阻害因子である。IAP はカスパーゼに直接結合しその活性を阻害し、さらにユビキチンリガーゼ (E3) 活性により、カスパーゼをユビキチン-プロテアソーム依存的分解系に導く。一方、IAP の作用は複数の IAP 阻害因子によって負に調節されている。我々は、ヒト IAP のひとつ、XIAP の結合タンパク質の解析によっ

て、Smac/DIABLO に次ぐ第 2 の IAP 阻害因子、Omi/HtrA2 を同定した。HtrA2 はミトコンドリア膜間腔に局在するセリンプロテアーゼで、アポトーシス刺激に応じてチトクロム c や Smac/DIABLO と共に細胞質に漏出する。我々は Omi/HtrA2 が複数の異なった経路で細胞死誘導に働くこと、また Omi の基質として細胞死防御因子を見出したので、紹介したい。

(9) 動物の発生過程における DNA の分解

長田重一 (大阪大学大学院生命機能研究科)

細胞死にとどまらず、様々な生理的な DNA 分解について包括的な議論を行った。DNA 分解酵素 DnaseII-like acid Dnase (DnaseIIbeta) (DLAD) のノックアウトマウスを作製

し、この酵素がレンズにおける脱核に重要な役割を果たすことを初めて明らかにし、これについて報告した。

(10) ストレス応答性 MAP キナーゼの活性化機構とその役割

仁科博史, 中川健太郎, 西鉢 元, 根岸崇大, 堅田利明
(東京大学大学院薬学系研究科・生理化学教室)

我々は、SAPK/JNK 系の生理的な役割を明らかにする目的で、2 種類の活性化因子 SEK1/MKK4 や MKK7 を欠損するマウスや ES 細胞を作出し、SEK1 や MKK7 欠損マウスは肝形成不全を伴う胎生致死となることを明らかにしてきた。本研究では、1) TNF α 受容体 1 型と SEK1 との 2 重変異マウスの解析などから明らかとなった SEK1 や MKK7 を介する SAPK/JN 活性化の肝芽細胞増殖制御へ

の関与 (*Dev. Biol.* **250**, 332-347, 2002), 2) SEK1 と MKK7 による連続的な SAPK/JNK のリン酸化 (*J. Biol. Chem.* **278**, 16595-16601, 2003) とこれを可能とする分子機構, 3) SAPK/JNK の活性化が完全に失われている ES 細胞や線維芽細胞が示す正常なストレス誘導性アポトーシスや IL-1 誘導性 IL-6 遺伝子発現の異常を紹介し、SEK1 や MKK7 を介する SAPK/JNK 活性化の生理的役割を考察する。

(12) ショウジョウバエをモデルとした非自律的細胞死の研究

安達 卓 (神戸大学発達科学部 人間環境自然環境論講座)

発生過程においては、増殖・分化・細胞死は相互に関係を持ちながら制御されると考えられる。本発表ではこれらの関係について、ショウジョウバエを利用した国内外の最近の研究成果から紹介する。

正常な細胞集団の中に翻訳速度が低下した細胞 ($M/+$) が生まれると、その細胞は細胞外にある生存因子 (TGF- β スーパーファミリーのDpp) の受容能が低下し、アポトーシスへと向かう。この際 JNK が自律的に活性化されるこ

とが必要である。一方、Dpp の作用をより直接的に低下させた場合 (tkv/tkv) には、Dpp がモルフォゲンとして働く性質から、細胞に異常な分化運命がもたらされ、それが周りの正常な細胞によって認識された結果、非自律的な JNK の活性化が起きてアポトーシスへ向かう。こうした細胞間相互作用を介した細胞死誘導は、モルフォゲン作用の異常時だけに限られず、がん細胞など様々な異常細胞の検出除去にも貢献すると考えられた。

(13) NF- κ B によりもたらされる生存シグナルの分子メカニズム

中野裕康 (順天堂大学医学部免疫学)

これまでの研究により NF- κ B の活性化は JNK の活性化を抑制することが示されているがその詳細なメカニズムは明らかとなっていない。我々は TRAF2/TRAF5 ダブルノックアウトマウス由来および RelA (p65) ノックアウトマウス由来の胎児線維芽細胞 (MEF) を用いた実験により、TNF 刺激が活性酸素 (ROS) の蓄積を誘導し、その蓄積された ROS が遷延化する MAP キナーゼの活性化および細胞死に関与していることを明らかにした。TNF により誘導される細胞死は興味深いことにアポトーシスだけではなく、ネクローシスの形態も示しており、抗酸化

剤であるBHA処理により、ネクローシスが著明に抑制されたことより、ROS は主に TNF によるネクローシス誘導に関与していることが明らかとなった。さらに野性型の MEFではTNF刺激により ROS の蓄積や遷延化する MAPK の活性化は誘導されなかったことより、NF- κ B の新たな機能として、通常では TNF により誘導される ROS の蓄積を抑制し、ROS によりもたらされる遷延化する MAPK の活性化およびネクローシスを抑制していることが明らかとなった。

(14) Cytosolic ATP dynamics during apoptotic cell death: a bioluminescence study with intracellular luciferase

Ravshan Z. Sabirov, Maria V. Zamaraeva, Emi Maeno, Yuhko Ando-Akatsuka and Yasunobu Okada

(生理学研究所・細胞器官研究系)

Apoptosis is a distinct form of cell death which requires energy. We made real-time continuous measurements of the cytosolic ATP level during necrosis induced by hydrogen peroxide in HeLa cells and throughout the apoptotic process in intact HeLa, PC12 and U937 cells transfected with the firefly luciferase gene. Apoptotic stimuli mediated by

mitochondria (staurosporin), by death receptors (TNF α) and by DNA damage (etoposide) were all found to induce significant elevation of the cytosolic ATP level. The staurosporin-induced ATP response depended largely on glycolytic ATP production. The cytosolic ATP level was maintained at a higher level than in the control for up to 6 h

during staurosporin-induced apoptosis. This time period included the execution stage of apoptosis during which activation of caspase-3 and internucleosomal DNA fragmentation take place. Thereafter, a gradual decrease in the amount of cytosolic ATP to the zero level took place in association with concomitant loss of cell viability. When the staurosporin-induced ATP response was abolished, both

caspase activation and DNA laddering were completely inhibited, even if the cytosolic ATP was kept at a normal level. Thus, it is concluded that cytosolic ATP within apoptotic cells is maintained at a higher level even on the cell's deathbed and that elevation of the cytosolic ATP level is requisite to the apoptotic cell death process.

(15) 免疫グロブリンアイソタイプ特異的な B リンパ球アポトーシス制御機構

鏑田武志, 若林千里, 安達貴弘 (東京医科歯科大学大学院疾患生命科学研究部)

B リンパ球は抗原受容体 (BCR) として膜型免疫グロブリン (Ig) を発現する。BCR の機能はこれまで主に BCR を抗 Ig 抗体で架橋することにより調べられてきた。今回、ナイーブ B 細胞 (IgM, IgD 陽性) を抗原または抗 Ig 抗体で刺激したところ、抗原刺激では B 細胞はアポトーシスをおこしたが、抗 Ig 抗体刺激では B 細胞は生存し、増殖した。抗 Ig 抗体刺激では抗原刺激とは異なり、抑制性 BCR 共受容体 CD22 および CD72 分子の活性化がおこら

なかった。抗 Ig 抗体刺激とともに CD22 や CD72 への抗体を用いてこれらの分子を活性化するとアポトーシスが誘導された。したがって、CD22 と CD72 は抗原刺激の際の B 細胞アポトーシスで重要な役割を果たす。さらに、IgG 陽性細胞では、抗原刺激の際に CD22 の活性化がおこらなかった。このため IgG 陽性細胞は IgM 陽性細胞にくらべ活性化しやすく、免疫応答の際の効率よい IgG 産生の分子基盤を構成するものと考えられる。

(16) 細胞外からの細胞死誘導システムの分子機構と生理機能

米原 伸 (京都大学大学院生命科学研究科)

Fas 経路と Wnt 経路のクロストークが存在することを示し、そのメカニズムと意義について報告した。また

TGFbeta による細胞死のシグナル伝達機構についても報告を行った。

3. 心血管イオンチャネルの病態に関する新たな展開 - ゲノミクスからプロテオミクスへ -

2003 年 11 月 25 日－11 月 26 日

代表： 神谷 香一郎（名古屋大学環境医学研究所）

世話人： 岡田 泰伸（岡崎国立共同研究機構生理学研究科）

- (1) パニロイド受容体型カチオンチャネル：心血管組織における伸展受容器としての可能性
村木克彦, 伊藤智洋, 大矢 進, 今泉祐治（名古屋市立大学大学院細胞分子薬効解析学）
岩田裕子, 片野坂友紀, 重川宗一（国立循環器病センター・分子生理）
- (2) 循環器における電位依存性カルシウムチャネル β サブユニットの機能解析
（トランスジェニックマウスを用いて）
村上 学, 徐 峰, 佐藤栄作, 尾野恭一, 飯島俊彦（秋田大学医学部機能制御医学講座）
- (3) 心筋膜穿孔の La^{3+} および PEG による閉鎖
大地陸男, 宋 玉梅（順天堂大学医学部第二生理学教室）
- (4) 過分極誘発陽イオンチャネルの発現制御機構と病態生理学的意義
桑原宏一郎, 鷹野 誠, 倉富 忍, 堀江 稔, 齊藤能彦
（京都大学大学院細胞機能制御学）
- (5) Kir2.1 の研究から得られた心筋 I_{K1} の外向き電流のメカニズムに関する新知見：
2つのモードのポリアミンブロックによる制御
石原圭子, 頼原嗣尚（佐賀医科大学生理学講座）
- (6) G 蛋白制御カリウムチャネルの機能制御とシミュレーション
倉智嘉久, 鈴木慎悟, 石井 優（大阪大学大学院情報薬理学講座）
- (7) Na-Ca 交換輸送体の mRNA 安定化に対する Rho の関与
木村純子, 前田佐知子, 松岡 功（福島県立医科大学医学部薬理学教室）
- (8) *V. Vulnificus* が産生する毒素の CFTR 活性化機構
高橋 章, 庄野加余子, 角村寧子, 山本千代, 中尾成恵
田上奈緒美, 中屋 豊（徳島大学医学部特殊栄養学講座）
柏本孝茂（北里大学獣医学部公衆衛生）
- (9) P19CL6 分化心筋細胞のイオンチャネル発現の細胞内シグナル制御
鄭明奇, 内納智子, 賀来俊彦, 小野克重（大分大学医学部循環病態制御講座）
門前幸志郎（東京大学大学院循環器内科）
小室一成（千葉大学大学院循環病態医科学）
- (10) 骨格筋芽細胞と筋線維の電気生理学的特性
清水敦哉, 佐合美紀, 丹羽良子, 盧 智波, 本莊晴朗, 神谷香一郎
（名古屋大学環境医学研究所液性調節分野）
堀場 充, 李 鐘国, 安井 健二, 児玉 逸雄
（名古屋大学環境医学研究所循環器分野）
- (11) 甲状腺ホルモンによるラット心房のイオンチャネルの修飾
渡部 裕, 馬 梅蕾, 鷺塚 隆, 杉浦広隆, 小村 悟, 池主雅臣, 渡辺賢一, 相澤義房
（新潟大学大学院循環器学分野）

- (12) β 受容体第2細胞外ループに対する自己抗体によって生じた肥大型心筋症ウサギでの心臓電気生理
三好俊一郎 (慶應義塾大学医学部呼吸循環器内科,
慶應義塾大学医学部生理学教室, 慶應義塾大学医学部心臓先進医療学講座)
福田有希子, 谷本耕司郎, 谷本陽子, 岩田道圭, 吉川勉, 三田村秀雄, 小川 聡
(慶應義塾大学医学部呼吸循環器内科, 慶應義塾大学医学部心臓先進医療学講座)
金子章道 (慶應義塾大学医学部生理学教室)
- (13) メキシレチン感受性とイオン選択性の変化を伴う特発性心室細動変異 Na チャネル
佐々木孝治, 蒔田直昌, 横井久卓 (北海道大学大学院循環病態内科学)
木村彰方, 平岡昌和 (東京医科歯科大学難治疾患研究所)
角南明彦 (グラクソスミスクラインつくば研究所)
- (14) 新生仔ラット心筋細胞の虚血性 ATP 放出と ATP 透過性マキシアニオンチャネル活性化
A.K. Dutta, R.Z. Sabirov, 浦本裕美, 岡田泰伸
(岡崎国立共同研究機構生理学研究所機能協同研究部門)
- (15) ヒト培養平滑筋細胞に発現する電位依存性 Na^+ チャネル (SCN9A) について
中島敏明, 城 太祐, 飯田陽子, 岩沢邦明, 永井良三
(東京大学医学部循環器内科)
- (16) プラトー相初期の電流変化と活動電位持続時間: computer simulation による検討
平野裕司, 平岡昌和 (東京医科歯科大学難治疾患研究所成人疾患研究部門 (循環器病))
- (17) ラット心筋細胞の成長に伴う一過性カリウム電流増加と KChIP2 の役割
小林武志 (札幌医科大学医学部生理学第一講座, 札幌医科大学医学部外科学第二講座)
山田陽一, 長島雅人, 関 純彦, 筒浦理正, 深尾充宏, 當瀬規嗣
(札幌医科大学医学部生理学第一講座)
安倍十三夫 (札幌医科大学医学部外科学第二講座)
伊藤克礼, 濱田洋文 (札幌医科大学医学部分子医学研究部門)
- (18) I_{Kr} に対する抗体が原因と考えられる後天性 QT 延長症候群
原岡佳代, 片山祐介, 谷 義則, 中村一文, 倉智嘉久, 大江 透
(岡山大学大学院循環器内科学)
- (19) リゾリン脂質による心筋 I_{Ks} チャネルの調節
丁 維光, 豊田 太, 松浦 博 (滋賀医科大学生理学第二講座)
- (20) 朝鮮人参の心筋 I_{Ks} チャネル調節機構
古川哲史, 白 長喜, 増宮晴子 (東京医科歯科大学難治疾患研究所生体情報薬理分野)

【参加者名】

村木克彦 (名市大・大院), 今泉祐治 (名市大・大院),
村上 学 (秋田大・医), 尾野恭一 (秋田大・医), 大地
陸男 (順天大・医), 辻川比呂斗 (順天大・医), 鷹野 誠
(京大・大院), 石原圭子 (佐賀医大・生理), 額原嗣尚
(佐賀医大・生理), 倉智嘉久 (阪大・大院), 木村純子
(福島県立医大・医), 高橋 章 (徳島大・医), 庄野加
余子 (徳島大・医), 小野克重 (大分大・医), 鄭 明奇
(大分大・医), 清水敦哉 (名大・環研), 本荘晴朗 (名
大・環研), 神谷香一郎 (名大・環研), 安井健二 (名大・

環研), 堀場 充 (名大・環研), 渡部 裕 (新潟大・大
院), 鷺塚 隆 (新潟大・大院), 三好俊一郎 (慶應大・
医), 佐々木孝治 (北大・大院), 蒔田直昌 (北大・大院),
岡田泰伸 (生理研), 中島敏明 (東大・医), 平野裕司 (東
京医歯大・難治疾患), 小林武志 (札幌医大・医), 原岡
佳代 (岡山大・大院), 谷 義則 (岡山大・大院), 大江
透 (岡山大・大院), 丁 維光 (滋賀医大・生理), 豊田
太 (滋賀医大・生理), 松浦 博 (滋賀医大・生理), 古
川哲史 (東京医歯大・難治疾患)

【概要】

心血管系におけるイオンチャネルは、心筋の興奮の発生や伝導、収縮や弛緩の調節、細胞内外のイオンの輸送、ペプチドの産生や分泌などの生理機能を果たしている。このイオンチャネルに起因する心血管疾患は、最近の10年で遺伝子解析からチャネル蛋白の機能発現に至るまでその病態が具体的に明らかにされだした。イオンチャネルの構造やその発現様式に異常に由来する疾患は「イオンチャネル病」という概念で認識され、例えば家族性QT延長症候群やBrugada症候群は K^+ チャネルや Na^+ チャネルの構造変異による機能欠損あるいは機能異常亢進に基づく心筋興奮性の異常に由来することが判明した。一方、心不全心肥大や心筋梗塞に伴ってイオンチャネルの機能は変調してリモデリングを生じ、再分極電流の総和の相

対的減少が不整脈を誘発しやすい基質になっていることも明らかになった。近年では研究手法が飛躍的に進歩し、ゲノム情報の表現型である蛋白質(プロテオーム)を解析することでゲノム情報の機能面を解析し、蛋白質相互の相互作用を解析してその機能さらに細胞の機能情報ネットワークを明らかにしようとする方向がある。本研究会は、このような状況を鑑み、心臓血管系のイオンチャネルの分子構造と生理機能に関して、分子生物学、遺伝子工学、電気生理学等の手法を用いた最近の研究成果の発表と情報を交換し、イオンチャネルの構造異常と制御機構の破綻に起因する循環器病の解明と新しい治療法の確立をめざすものである。

(1) バニロイド受容体型カチオンチャネル：心血管組織における伸展受容器としての可能性

村木克彦¹⁾、岩田裕子²⁾、片野坂友紀²⁾、伊藤智洋¹⁾、大矢 進¹⁾、
重川宗一²⁾、今泉祐治¹⁾

(¹⁾ 名古屋市立大学大学院薬学研究科)

(²⁾ 国立循環器病センター・分子生理)

血管平滑筋における自発性の筋緊張は血管圧を制御する重要な因子である。本研究ではこの筋緊張におけるバニロイド受容体型カチオンチャネル (TRPV) の関与について検討した*。

低浸透圧刺激 (HS) によりマウス大動脈平滑筋細胞を膨化させたところ、内向き電流 (I_{NSC}) の活性化および細胞内カルシウム濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の上昇が観察され、両反応とも TRPV の阻害薬であるルテニウムレッドにより抑制された。RT-PCR 法により TRPV の遺伝子発現を確認したところ、マウスの血管平滑筋には主に2型 (TRPV2) 及

び4型 TRPV が発現していた。さらに TRPV2 特異的抗体を作成し、TRPV2 のタンパク発現について検討したところ、平滑筋特異的アクチン陽性細胞に TRPV2 タンパクが発現していた。また TRPV2 特異的アンチセンスオリゴヌクレオチドをマウスの血管平滑筋細胞に導入し、TRPV2 タンパクをノックダウンさせたところ、HS 誘発の I_{NSC} 及び $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は有意に抑制された。

血管平滑筋において、TRPV2 は筋緊張を制御する伸展受容に関与する可能性が高いと考えられる。

*Cir. Res. 93:829-838, 2003

(2) 循環器における電位依存性カルシウムチャネル β サブユニットの機能解析
(トランスジェニックマウスを用いて)

村上 学、徐 峰、佐藤栄作、尾野恭一、飯島俊彦
(秋田大学医学部機能制御医学講座)

電位依存性カルシウムチャネルは、心筋収縮など、興奮性細胞におけるシグナル伝達のために重要な役割を有

する。我々はカルシウムチャネルの副サブユニットである β サブユニットに焦点を当て、その生理学的重要性を

遺伝子変異マウスを用いて解析している。

RT-PCR による発現解析では心筋における $\alpha 1C$ と $\beta 2,3$ の発現を確認した。洞房結節における $2,3,4$ の β 、および $\alpha 1C$ と $\alpha 1D$ の発現を確認した。

$\beta 3$ 遺伝子変異マウスは、直接血圧測定において有意に高い平均血圧を示した。さらに頸動脈洞圧迫に対する圧反射の低下が認められた。 $\beta 4$ 変異マウスは小脳失調症状

を示し、生後数週間で死亡することが確認された。 $\beta 2$ 変異マウスは有意な血圧低下を示し、心筋膜標本における総 DHP 結合能が低下していた。

心臓における複数の β サブユニットが発現していること、各 β サブユニット遺伝子変異により、さまざまな表現型が認められたことにより、それぞれ固有の役割を担っていることが示唆された。

(3) 心筋膜穿孔の La^{3+} および PEG による閉鎖

大地陸男, 宋玉 梅 (順天堂大学医学部第二生理学教室)

脂質二重層は大電場や膜傷害性物質によって穿孔する。過分極および lysophosphatidyl-choline (LPC) によるウサギ心室筋細胞の膜穿孔は、不規則な内向き電流 I_{hi} および、核および細胞内質の ethidium (EB) 蛍光増大で同定しうる。本研究では Polyethylene glychol (PEG) および La^{3+} の膜穿孔部閉鎖作用を検討した。 La^{3+} は I_{hi} を濃度依存性に減少したが、EB 蛍光減少は僅かであった。PEG4000 (2 および 5%W/V) は I_{hi} に影響することなく、過分極パ

ルスまたは LPC (10 μ M) で誘発される EB 蛍光増大を著明に抑制した。さらに -160mV, 40s のパルスを反復して、パルス毎の I_{hi} 積分値と EB 蛍光増大を求めて PEG の作用を検討した。5%PEG4000 は直ちに EB 蛍光増大を抑制した。分子量 400, 4000, 20,000 の効果を比較検討した。すべて EB 蛍光増大を有意に抑制したが、PEG4000 の効果が最大であった。PEG は膜損傷部を覆い、比較的大きな分子の通過に対して閉鎖効果をもたらすと考えられた。

(4) 過分極誘発陽イオンチャネルの発現制御機構と病態生理学的意義

桑原宏一郎, 鷹野 誠, 倉富 忍, 堀江 稔, 斉藤能彦
(京都大学大学院細胞機能制御学)

心不全は高血圧・虚血性心疾患等の様々な原因で生じ、その死因の約半数をしめる不整脈死・突然死の機構には不明な点が多い。一般に不全心においては心房利尿ペプチド (ANP) に代表される胎児型心筋遺伝子の再発現が亢進する。不全心筋においては、胎児型イオンチャネルのうち、過分極誘発陽イオンチャネル (HCN2 および HCN4) と、T 型 Ca チャネル (CACNA1H) の発現が上昇することが知られている。我々は、HCN2, HCN4, CACNA1H 遺伝子の発現が NRSF という抑制性転写因子によって制御されており、NRSF の機能を失活させた優性抑制変異体を心筋特異的に過剰発現させた遺伝子改変マウス (dn

NRSF) では、拡張型心筋症を起こすと共に不整脈により突然死することを報告した (Kuwahara, K., Saito, Y., Takano, M. et al. EMBO J. in press)。この dn NRSF マウスの単離心室筋の静止膜電位は -77.8 ± 3.0 mV と、野生型 BL6 マウス (-82.7 ± 2.7 mV) よりも有意に浅い。また活動電位持続時間 (APD90) も野生型マウスの 120.8 ± 7.1 msec に対して 148.5 ± 14.9 msec と有意に延長していた。さらに dn NRSF Tg マウス心室筋細胞はカテコラミン刺激により異常自動能を示すことが多く、細胞内 Ca オーバーロードが生じていることが判明した。

(5) Kir2.1 の研究から得られた心筋 I_{K1} の外向き電流のメカニズムに関する新 知見：2つのモードのポリアミンブロックによる制御

石原圭子, 頼原嗣尚 (佐賀医科大学生理学講座)

心室筋細胞の静止電位付近で大きく流れる I_{K1} の外向き電流振幅は主に細胞内ポリアミンによる電位依存性ブロックにより制御されると考えられている。我々は全細胞記録で I_{K1} と極めて似た性質を示す Kir2.1 チャンネルを 293T 細胞に発現させ, inside-out パッチ膜から記録される巨視的電流に対するポリアミンブロックを調べた。5-10 μ M スペルミンあるいは 10-100 μ M スペルミジン存在下の外向き電流の I-V 関係は I_{K1} の外向き電流の I-V 関係と似ていたが, それ以下の濃度ではプラトーあるいは二峰性を示した。弦コンダクタンス (G) と電圧の関係を解析すると, ボルツマン式によってフィットされない“過剰”コンダクタンスが正電位側に存在し, 5-10 μ M スペル

ルミン/10-100 μ M スペルミジン存在下に流れる外向き電流はこの過剰コンダクタンスによるものであった。これらの G-V 関係は, Kir2.1 チャンネルのポリアミンブロックに親和性が異なる二つのモードがあると仮定したモデルによってよく説明された。高親和性モードでブロックされる割合はスペルミン存在下で 0.9, スペルミジン存在下で 0.75, 共存下ではこの中間値であった。ポリアミンはチャンネルと細胞内領域において結合することによって, ポリアミン感受性の異なる 2 つのチャンネル状態の平衡を調節する働きも持つと考えられた。本研究結果より I_{K1} 外向き電流の大部分は主に低親和性モードでブロックされるチャンネルを流れることが示唆された。

(6) G 蛋白制御カリウムチャンネルの機能制御とシミュレーション

倉智嘉久, 鈴木慎悟, 石井 優 (大阪大学大学院情報薬理学講座)

G 蛋白質サイクル調節 (Regulators of G protein signalling; RGS) 蛋白質は三量体 G 蛋白質の α サブユニット上の GTP を GDP に加水分解する反応を促進する作用をもつ。我々は RGS 蛋白質が非活性化状態ではホスホリン脂質の一種である, ホスファチディルイノシトール 3 リン酸 (PIP₃) が結合することにより抑制されており, カルモデュリン (CaM) がカルシウム刺激依存性に PIP₃ による抑制を脱抑制する調節機構があることを明らかにした。またこれが心筋に存在する G 蛋白質制御カリウムチャンネル (G protein-gated K⁺ channel: K_G) 電流に見られる relaxation と呼ばれるある特徴的な電位依存性特性の背景となっているものであることを解明した。さらに RGS 蛋白質はホス

ホリン脂質のうち PIP₃ と特異的に結合し, CaM が競合的に RGS 蛋白質に結合することにより, PIP₃ と RGS 蛋白質の結合を解離することが分かった。これら PIP₃ および CaM との結合はいずれも RGS ドメイン上の塩基性アミノ酸残基クラスター上で行われ, これはほとんどすべての RGS 蛋白質で保存されていることから, この調節機構は普遍的なものであることが示唆された。このように生細胞では G 蛋白質サイクルが RGS 蛋白質により動的に調節されており, G 蛋白質制御カリウムチャンネルの様々なカインेटクスを詳細に検討することにより, G 蛋白質サイクルの生理的な数理モデルを構築することに現在成功しつつある。

(7) $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体の mRNA 安定化に対する Rho の関与

木村純子, 前田佐知子, 松岡 功
(福島県立医科大学医学部薬理学教室)

心筋の $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体 (NCX) 発現は病態により変化するが機序は不明である。高脂血症薬フルバスタチン (Flv) は HMG-CoA 還元酵素を阻害し、コレステロール合成を抑制するが、低分子量 GTP 結合蛋白活性化も抑制する。低分子量 G 蛋白は、様々な蛋白合成に関与している。そこで我々は NCX1 発現に低分子量 G 蛋白が関与するか Flv を用いて調べた。ラット心筋由来 H9c2 細胞を用い、RT-PCR 法で NCX1 と GAPDH の mRNA 発現量を調べた。Flv は NCX1 mRNA を濃度および時間依存的に低下させた。HMG-CoA 還元酵素で生成されるメバロン酸 (MA)

を Flv と同時に加えると、NCX 発現抑制は解除された。MA 代謝物のゲラニルゲラニルピロリン酸、またはファルネシルピロリン酸を加えると、Flv による NCX mRNA 減少は回復した。この結果は、NCX1 mRNA 発現に低分子量 GTP 蛋白 Rho, Rac, Ras 等の関与を示唆する。Rho を特異的に阻害するボツリヌス毒素 C3 を発現させた細胞では NCX mRNA 発現が対照細胞に比べ有意に減少した。また、mRNA 合成阻害薬 5,6-dichlorobenzimidazole 存在下で、Flv は NCX mRNA 減少を促進した。即ち、Rho は NCX mRNA の安定化に関与していることが示唆された。

(8) *V. Vulnificus* が産生する毒素の CFTR 活性化機構

高橋 章¹⁾, 庄野加余子¹⁾, 角村寧子¹⁾, 山本千代¹⁾, 中尾成恵¹⁾,
田上奈緒美¹⁾, 柏本孝茂²⁾, 中屋 豊¹⁾
(¹⁾ 徳島大学医学部特殊栄養学講座)
(²⁾ 北里大学獣医学部公衆衛生)

Vibrio vulnificus は、汽水域から海水域に生息する低度好塩性のグラム陰性桿菌であり、人食いバクテリアとして恐れられている。本菌の主要な病原因子として金属プロテアーゼと細胞溶解毒 (Vvha) が知られている。溶血毒の作用は、ラット大動脈の収縮を引き起こすという報告と下痢誘導に関与しているとの報告があるが、その機構は解明されていない。本研究では、細胞溶解毒が上皮細胞のイオン輸送に与える影響を中心に解析した。

まず、*Vibrio vulnificus* の Vvha 遺伝子をノックアウトした菌 (ΔVvha) を作成した。臨床分離株の wild type *Vibrio*

vulnificus は上皮細胞の Cl^- 分泌を促進したが、 ΔVvha は促進しなかった。さらに Vvha を精製し、上皮細胞のイオン輸送に与える影響を測定した。すると Vvha が cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) を活性化することをみいだした。Vvha による CFTR の活性化は sutaurosporin や Rp-cAMPs の前投与により阻害されることより Kinas 依存性であると考えられたが、Vvha は細胞内 cAMP や細胞内 cGMP 濃度を変化させなかった。さらに Vvha による CFTR 活性化機構について議論する。

(9) P19CL6 分化心筋細胞のイオンチャネル発現の細胞内シグナル制御

鄭 明奇¹⁾, 内納智子¹⁾, 門前幸志郎²⁾, 小室一成³⁾, 賀来俊彦¹⁾, 小野克重¹⁾⁽¹⁾ 大分大学医学部循環病態制御講座)⁽²⁾ 東京大学大学院循環器内科)⁽³⁾ 千葉大学大学院循環病態医科学)

マウスEC細胞由来 P19CL6 細胞はdimethyl sulfoxide の刺激によって心筋細胞分化誘導を受ける。P19CL6 細胞由来の分化心筋細胞における膜電流形成に関わる細胞内シグナル, とりわけMAP キナーゼを介するイオンチャネル発現の制御様式の解明を行う。P19CL6 細胞は分化誘導後に過分極誘発内向き電流 (I_h) と2種類のCaチャネル電流 (I_{CaL} , I_{CaT}) を発現し自動拍動性を示した。分化誘導後に出現する自動拍動とペースメーカーイオンチャネルは

p38-MAP キナーゼの阻害によって発現が抑制され, 細胞膜電位も未分化 P19CL6 細胞と同程度であった。一方, 古典的 (ERK1,2) MAP キナーゼ及び ERK5 の活性抑制下の分化心筋は自動拍動性を示し, 3 種のペースメーカーイオンチャネルの発現も対照と同程度に観察された。心筋細胞の分化過程におけるペースメーカーイオンチャネルの発現に非古典的 MAP キナーゼ (p38-MAPK) を介するシグナル経路に関わることが示唆された。

(10) 骨格筋芽細胞と筋線維の電気生理学的特性

清水敦哉¹⁾, 佐合美紀¹⁾, 丹羽良子¹⁾, 盧 智波¹⁾, 本莊晴朗¹⁾, 堀場 充²⁾李 鐘国²⁾, 安井健二²⁾, 児玉逸雄²⁾, 神谷香一郎¹⁾⁽¹⁾ 名古屋大学環境医学研究所液性調節分野)⁽²⁾ 名古屋大学環境医学研究所循環器分野)

背景: 骨格筋芽細胞を用いた心筋への細胞移植療法は既にヒトへの臨床検討が実施され, 心機能改善に関する有用性と高頻度に致死性不整脈を合併することが明らかとされている。今回我々は移植後の不整脈性に関する機序を明らかにするために, 培養経過中の骨格筋芽細胞の電気生理学的特性の変化を検討した。

方法: マウス大腿より骨格筋芽細胞を酵素学的に単離・培養した。培養9日目に骨格筋芽細胞の培養液を変更することにより, 筋線維へと分化誘導した。パッチクランプ法を用いて膜電位, 膜電流を記録した。

結果: 1) 分化誘導前骨格筋芽細胞: 静止膜電位は過分極の状態にあった ($-102 \pm 5 \text{ mV}$, $n=6$) が活動電位は発生しなかった。9日目以後の細胞は以下の3群に分類された。

2) 分化誘導型骨格筋芽細胞: 活動電位は発生しないが, 静止膜電位は上昇した ($-49 \pm 2 \text{ mV}$, $n=5$)。3) 非自発興奮型筋管細胞: 活動電位 (巾 20ms) が発生し静止膜電位は -49 mV であった ($49 \pm 2 \text{ mV}$ ($n=5$))。4) 自発興奮型筋管細胞: 最大拡張期膜電位は -35 mV ($-35 \pm 2 \text{ mV}$ ($n=4$)) であった。活動電位持続時間は 20ms であった。なお, I_{Na} , I_{Ca} , I_{K1} , I_{to} , I_{Kur} の5種類のチャネルが筋芽細胞 3), 4) に発現していた。

結語: 1) 骨格筋芽細胞の分化に伴い, 自動能を呈する細胞が出現した。この自動能が不整脈の出現に寄与している可能性が示唆された。2) この自動能が不整脈に直接関与するか否かを検討するために, 現在我々は *In Vivo* モデルを用いて検討中である。

(11) 甲状腺ホルモンによるラット心房のイオンチャネルの修飾

渡部 裕, 馬 梅薔, 鷺塚 隆, 杉浦広隆, 小村 悟, 池主雅臣, 渡辺賢一, 相澤義房
(新潟大学大学院循環器学分野)

甲状腺機能亢進症例において心房細動をしばしば合併するが, その機序に関する電気生理学的な検討は十分でない。

【方法】ラットに甲状腺ホルモン (T3) を7日間投与し, 両心房筋における Kv1.5, Kv4.2, KvLQT1, erg, minK 及び L 型カルシウムチャネル ($\alpha 1c$) の mRNA レベルを RNase protection assay 法により対照群と比較した。また両群において心房の活動電位, 一過性外向き K^+ 電流 (Ito), ultra-rapid K^+ 電流 (Ikur) 及び L 型カルシウム電流 (ICal) を全細胞型パッチクランプ法にて測定した。

【結果】T3 は心拍数を対照群に比し 42%増加させた。T3

投与により Kv1.5 は対照群に比し有意に増加し, KvLQT1 と $\alpha 1c$ は減少した。Kv4.2, erg と minK は不変であった。活動電位持続時間は T3 投与にて 30%短縮した。T3 は IKur を対照群に比し有意に増大させたが Ito を変化させなかった。T3 は ICal を減少させると共にイソプロテレノールに対する反応も低下させた。

【結果】T3 はラット心房筋に Kv1.5 と IKur を増加させ, $\alpha 1c$ と ICal を減少させた。この変化が甲状腺機能亢進症患者における心房細動の合併に関与している可能性が示唆された。

(12) β 受容体第 2 細胞外ループに対する自己抗体によって生じた肥大型心筋症ウサギでの心臓電気生理

三好俊一郎^{1),2),3)}, 福田有希子¹⁾, 谷本耕司郎¹⁾, 谷本陽子¹⁾, 岩田道圭¹⁾
吉川勉¹⁾, 三田村秀雄^{1),3)}, 金子章道²⁾, 小川聡¹⁾
(¹⁾ 慶應義塾大学医学部呼吸循環器内科¹⁾
(²⁾ 慶應義塾大学医学部生理学教室²⁾
(³⁾ 慶應義塾大学医学部心臓先進医療学講座³⁾)

心筋症の約 8 割の患者から何らかの自己抗体が検出される。その中でも比較的高い頻度で, β 受容体刺激作用のある β 受容体第 2 細胞外ループに対する自己抗体が検出される。当該施設での拡張型心筋症患者の約半数に同自己抗体が検出され, 多変量解析を用いた検討でそれらの患者では有意に心室頻拍と突然死が多いことが明らかとなり, 何らかの心臓電気生理学的な異常を生じるもの

と予想された。またこの自己抗体をウサギに産生させると肥大型心筋症を呈することから, この自己抗体自体が心筋症の発症過程に重要な働きをしている可能性が考えられた。今回我々はこの肥大型心筋症ウサギモデルを用いて心臓電気生理学的な異常を, 心電図, 微小電極法による活動電位記録, パッチクランプ法及び Fluo-3 を用いた細胞内 Ca イオン濃度測定にて明らかにした。

(13) メキシレチン感受性とイオン選択性の変化を伴う特発性心室細動変異 Na チャネル

佐々木孝治¹⁾, 蒔田直昌¹⁾, 角南明彦³⁾, 横井久卓¹⁾, 木村彰方²⁾, 平岡昌和²⁾

(1) 北海道大学大学院循環病態内科学)

(2) 東京医科歯科大学難治疾患研究所)

(3) グラクソスミスクラインつくば研究所)

【目的】Brugada 症候群の起因遺伝子の一つである変異 Na チャネル S1710L は, Na チャネル拮抗薬の動態に重要な役割を果たす輪状に配列する選択性フィルター残基のひとつに隣接しているため, 変異によるチャネル構造の変化が薬剤感受性を直接変化させている可能性がある。S1710L に対する Na チャネル阻害薬の薬理学的特性を検討した。【方法】tsA201 培養細胞に正常 (WT) または S1710L チャネルを発現させ, パッチクランプ法で全細胞 Na 電流を記録した。【結果】S1710L は WT にくらべてメキシレチン (50 μ M) のトニックブロックがやや亢進し, 頻度依存性ブロックは逆に減弱した。薬剤非存在下では S1710L の不活性化からの回復は WT より遅かったが, メキシレチンによるブロックからの回復は逆に S1710L が

促進しており, 選択性フィルターを介したメキシレチンの解離亢進が示唆された。膜不透過性リドカイン誘導体 QX314 を細胞内に投与したところ, S1710L の QX314 解離が有意に促進していた (時定数: WT= 1017 s, S1710L= 209 s)。さらに S1710L は K 透過性が有意に亢進することから (pK/pNa: WT= 0.09, S1710L= 0.16), イオン通過孔に面していることも判明した。【結語】Brugada 症候群に共通する「Na チャネルの機能低下」という機能異常を持ちながら, S1710L 患者の ST が Na チャネル阻害薬で上昇しなかった機序は, 選択性フィルター近傍の構造的変化によって薬剤のトラップが不十分になり, イオン通過孔を解した薬剤の解離が促進するためであると考えられた。

(14) 新生仔ラット心筋細胞の虚血性 ATP 放出と ATP 透過性マキシアニオンチャネル活性化

A.K. Dutta, R.Z. Sabirov, 浦本裕美, 岡田泰伸

(岡崎国立共同研究機構生理学研究所機能協同研究部門)

虚血・低酸素条件下では心臓の間質の ATP レベルが上昇することが古くから知られているが, そのメカニズムは不明であった。初代培養した新生仔ラット心室筋細胞を低浸透圧, 低酸素又は化学的虚血条件下におくと, いずれの場合も細胞外に ATP が放出されることが判明した。この ATP 放出はバイオセンサー法によって単一心筋細胞表面でも検出された。また, これらの条件下では約 390 pS の単一チャネルコンダクタンスのマキシアニオン

チャネルが活性化され, このチャネルはアニオン型 ATP に対しても透過性を示すことが明らかとなった。更には, このマキシアニオンチャネルの薬理学的性質は, ATP 放出のそれと同一であることが明らかになった。これらの結果から, 新生仔心筋細胞は虚血・低酸素に対して ATP 放出で応答し, その放出路にマキシアニオンチャネルが関与していることが結論された。

(15) ヒト培養平滑筋（冠動脈，肺動脈，気管支平滑筋）細胞に発現する 電位依存性 Na^+ チャネル（SCN9A）について

中島敏明，城太 祐，飯田陽子，岩沢邦明，永井良三
(東京大学循環器内科)

【目的】電位依存性 Na^+ チャネル (I_{Na}) は，平滑筋では一部の phasic な平滑筋に発現しているのみで，冠動脈などの tonic な平滑筋には通常はみられない。今回，我々は，ヒト冠動脈，肺動脈，気管支平滑筋の培養細胞に出現する I_{Na} の電気生理学および分子生物学的特徴につき検討した。【方法】Patch 電極を用いた whole-cell clamp 法による電気生理学的検討および RT-PCR (SCN1A-11A)，real-time PCR，免疫染色によるチャネル蛋白，mRNA の発現を検討した。【結果】いずれの細胞においても， I_{Na} が見られた。TTX は，用量依存的に抑制し，その 50%抑制濃度は約 7nM であり，veratridine，chloramine T は，その

不活性化を遅延した。この不活性化曲線の V_h は，約 -40mV であり，心筋に発現する I_{Na} より脱分極側にあった（膜電位は，いずれも -40~-50mV）。RT-PCR では，いずれの細胞においても SCN9A の発現を認め，免疫染色にて，その発現が確認された。Retinoid acid 処理は， I_{Na} の発現の減少と α -actin の発現の増強を認めた。ヒトから得られた正常組織の平滑筋組織の免疫組織化学的検討では， I_{Na} の発現は見られなかった。【結語】冠動脈などのヒト培養平滑筋細胞に発現する I_{Na} は，TTX 感受性で，SCN9A から構成されていると考えられた。この発現には，細胞の脱分化などが関与している可能性が示唆された。

(16) プラトー相初期の電流変化と活動電位持続時間: computer simulation による検討

平野裕司，平岡昌和
(東京医科歯科大学難治疾患研究所成人疾患研究部門 (循環器病))

心筋の活動電位持続時間 (APD) はプラトー相における K 電流などの外向き電流と Ca 電流などの内向き電流のバランスによって決定される。一般に外向き電流は APD 短縮，内向き電流は APD 延長に寄与するが，活動電位初期に電流を変化させるとその効果は必ずしもこの原則に従わない (Wehrens et al. 2000)。我々は種々の心室筋活動電位モデルを用い，プラトー相初期の電流変化が APD に及ぼす効果を検討した。古典的な Beeler-Reuter のモデルにおいて活動電位初期50msecに内向き (脱分極) 電流を与えると APD は短縮，外向き電流では延長した。この変化は主に膜電位依存性活性化による I_K の相違に基

づいていた。Luo-Rudy モデルでも電流注入による"逆方向"への APD の変化が認められた。これには I_{Ks} の活性化の違いのみならず，プラトー初期において Ca の流入量と Ca transient が大きく変化し，これが $I_{Ca,L}$ ， I_{Na-Ca} ， I_{Ks} などの電流を様々に修飾していた。我々の Ca 依存性不活性化の新しい定式化を導入したモデル (Biophys.J.2003) では APD の変化はより強く認められた。心筋における細胞内 Ca の dynamics の変化とこれによる電流系の修飾は心臓の電気活動に大きな影響を与え得るが，その詳細にはなお未知な点が多く，さらに様々な実験やモデリングの試みが必要である。

(17) ラット心筋細胞の成長に伴う一過性カリウム電流増加と KChIP2 の役割

小林武志^{1),2)}, 山田陽一¹⁾, 長島雅人¹⁾, 関 純彦¹⁾, 筒浦理正¹⁾
 深尾充宏¹⁾, 伊藤克礼³⁾, 濱田洋文³⁾, 安倍十三夫²⁾, 當瀬規嗣¹⁾

(¹⁾ 札幌医科大学医学部生理学第一講座)

(²⁾ 札幌医科大学医学部外科学第二講座

(³⁾ 札幌医科大学医学部分子医学研究部門

胎生期から出生後の $I_{to,f}$ の変化がKv4.2ではなくKChIP2の変化に依存しているのではないかと考え, 出生前後(胎生 12 日目～出生後 10 日目)におけるラット心室筋細胞の Kv4.2 と KChIP2 の mRNA の発現量の変化を定量 PCR にて測定した。胎生期から新生児期を通じて Kv4.2 は殆ど変化しなかったのに対し, KChIP2 は著明に増大していた。そこで Kv4.2 は発現しているが $I_{to,f}$ はほとんど観察されない胎生 12 日目の心室筋細胞に KChIP2 のみをアデノウイルスベクターを用いて導入・発現させたところ大きな一過性外向き電流が観察された。電流特性の解析よりこの電流は $I_{to,f}$ であると同定した。また蛍光抗体法による解析から, KChIP2 を導入した細胞では導入していな

い細胞と比べ Kv4.2 の蛋白質が細胞膜領域に多く存在していることが確認された。これらの知見から, 出生前後の成長に伴う $I_{to,f}$ の増加は KChIP2 の発現増加に依存していると思われた。

ラット・マウスなどの小動物の心筋細胞では成長に伴う活動電位持続時間の短縮が観察され, その主な原因として, I_{to} の増大が示唆されている。そこで, KChIP2 を導入し, $I_{to}(I_{to,f})$ のみを増大させた胎児心筋での活動電位持続時間を検討したところ, 有意な変化は観察されなかった。その為, 成長に伴う活動電位持続時間の短縮に関しては I_{to} 以外の要素についても検討する必要があると思われた。

(18) I_{Kr} に対する抗体が原因と考えられる後天性 QT 延長症候群

原岡佳代, 片山祐介, 谷 義則, 中村一文, 倉智嘉久, 大江 透
 (岡山大学大学院循環器内科学)

QT 延長症候群 (LQTS) は, 心電図上著明な QT 時間の延長および Torsades de Pointes (TdP) が起こり, 失神発作や心臓突然死となる致死的疾患である。遺伝的背景を認める先天性のものと, 薬剤, 電解質異常などの二次的要因により QT 時間が延長する後天性に分類できる。今回我々は後天性 QT 延長症候群の原因が, I_{Kr} に対する抗体であると考えられた症例を経験したので報告する。

症例は 42 歳女性。後天性 LQTS と考えられ原因検索をするも既存の原因は認められなかった。また家族歴もなく, 以前の心電図も正常であり, 先天性は否定的であった。後天性の新しい原因検索を施行したところ, IgG 高値と抗 SSA / Ro 抗体陽性認められた。これらが QT 延長

の原因であると仮説を立てた。

HEK293 細胞に HERG をトランスフェクションさせたものを用いて, HERG 電流を計測した。この患者の血清と IgG で培養した細胞は HERG 電流の減少が認められた。免疫染色で見るとこの患者の IgG は HERG チャネルを発現している細胞に結合し, それを減少させていた。

この患者の IgG は HERG チャネルに対する自己抗体を含み, それにより心筋の I_{Kr} が減少したと考えられました。これは LQTS の新しい原因であると考えられました。引き続き, どのくらいの頻度であるか検索することが必要である。

(19) リゾリン脂質による心筋 I_{Ks} チャンネルの調節

丁 維光, 豊田 太, 松浦 博 (滋賀医科大学生理学第二講座)

虚血心筋で上昇するリゾホスファチジルコリン (LPC) は細胞外の K^+ 蓄積や活動電位の短縮を引き起こし、これらの作用は虚血時にみられる不整脈の発生に寄与していると考えられている。しかし、LPC の心筋 K^+ チャンネルに対する効果は十分には明らかにされていない。今回我々は、LPC の緩徐活性化型遅延整流性 K^+ チャンネル (I_{Ks}) におよぼす効果についてモルモット単離心房筋細胞に全細胞型パッチクランプ法を適用して検討した。その結果、1) 細胞外 LPC は I_{Ks} を濃度依存性に ($K_{1/2} = 1.19 \mu M$) 増大させ、その最大反応 (増加率, 2.03 ± 0.12 倍) は $5 \mu M$ で得られた。2) LPC による I_{Ks} の増大作用は GDP β S 負荷、もしくは百日咳毒素 (PTX) 処理により有意に抑制され

た。3) LPC による増大作用は compound 48/80 によっても抑制された。これらの実験結果は、細胞外 LPC が PTX 感受性 G 蛋白-ホスホリパーゼ C (PLC) と関連した細胞膜受容体刺激を介して I_{Ks} を増大させたことを示唆する。さらに、LPC による I_{Ks} の増大反応は細胞内に PIP_2 ($100 \mu M$) を負荷すると有意に減少し、また、bisindolylmaleimide I によっても部分的に抑制された。よって、細胞外 LPC による I_{Ks} の増大作用には PLC の活性化に伴う細胞膜 PIP_2 含量の減少ならびに PKC の活性化が関わっていると考えられた。また、この LPC の作用は虚血心筋でみられる細胞外の K^+ 蓄積や活動電位の短縮に寄与していると思われる。

(20) 朝鮮人参の心筋 I_{Ks} チャンネル調節機構

古川哲史, 白 長喜, 増宮晴子

(東京医科歯科大学難治疾患研究所生体情報薬理分野)

【背景・目的】朝鮮人参 *Panax ginseng* は心血管保護作用を有しており、我々は緩徐活性化遅延整流カリウム電流 (I_{Ks}) 活性化が重要となることを明らかにした。今回は *Panax ginseng* の I_{Ks} 増強作用のメカニズムを検討した。

【方法】モルモット単離心室筋細胞から、パッチクランプ全細胞電流記録法を用いて I_{Ks} を記録した。

【結果】(1) *Panax ginseng* のステロイド様成分 ginsenoside Re が I_{Ks} を濃度依存的に増強し、その IC_{50} は $1.3 \pm 0.1 \mu M$ と臨床使用濃度範囲にあった。(2) I_{Ks} 増強は一酸化窒素

(NO) ドナーにより再現され、NO 合成酵素阻害薬や NO スカベンジャーにより抑制された。(3) I_{Ks} 増強は guanylate cyclase 阻害薬では抑制されず、thiol アルキル化剤で抑制された。Ginsenoside Re による I_{Ks} 増強は還元剤 dithiothreitol によりもとに戻った。

【まとめ】*Panax ginseng* の I_{Ks} 増強作用は、そのステロイド様成分 ginsenoside Re が臨床使用濃度範囲でもたらす。これは NO によるチャンネル蛋白の直接のニトロ化による。

4. バイオ分子センサー研究会

2003 年 5 月 21 日－5 月 22 日

代表・世話人：富永真琴（三重大学医学部）

所内対応者：森泰生（統合バイオサイエンスセンター）

(1) 腎マクラデンサ細胞の NaCl センサー ATP チャネル

岡田泰伸, サビロブ・ラブシャン, 林誠治, 森島繁, J-Y Lapointe, PD Bell (生理学研究所・機能協関部門)

(2) アミノ酸センサーの探索

金井好克 (杏林大学・医学部・薬理学教室)

(3) 機械受容チャネル TRPV4 の構造と機能

鈴木誠 (自治医科大学・薬理学講座)

(4) 大脳皮質ニューロンの容積センサー Cl⁻ チャネル

井上華, 岡田泰伸 (生理学研究所・機能協関部門)

(5) 心筋ストレッチセンサーの分子メカニズム

古川哲史 (東京医科歯科大学・難治疾患研究所・生体情報薬理分野)

(6) 血管内皮細胞における機械受容と細胞反応

辰巳仁史, 早川公英, 河上敬介, 清島大資, 曾我部正博 (名古屋大学大学院医学系研究科)

(7) Cell acidosis 環境における膜電位依存性プロトンチャネルの応答様式

久野みゆき, 森畑宏一, 森啓之, 酒井啓, 川脇順子 (大阪市立大学大学院・医学研究科)

(8) プロトン依存性電位作動性チャネル PCL

森泰生 (統合バイオサイエンスセンター・細胞生理部門)

(9) 温度センサーとしての TRP チャネル

富樫和也, 沼崎満子, 森山朋子, 東智広, 村山奈美枝, 富永知子, 富永真琴
(三重大学・医学部・分子細胞生理学分野)

(10) 線虫 *C. elegans* における感覚ニューロン機能の多様性

森郁恵 (名古屋大学大学院・理学研究科)

(11) 細胞内信号伝達を担うヘム関連タンパク質

齋藤正男 (東北大学・多元物質科学研究所)

(12) タンパク質グルタチオン化：酸化ストレスのセンシング機構

内田浩二 (名古屋大学大学院・生命農学研究科)

(13) 共鳴ラマン分光法によるガスセンサー蛋白の特異的センシングメカニズムの解明

北川禎三 (統合バイオサイエンスセンター・生体分子部門)

(14) 嗅覚細胞において cAMP はユニバーサルな情報伝達因子である

竹内裕子, 倉橋隆 (大阪大学大学院・生命機能研究科)

(15) GFP を用いたカルシウムセンサー G-CaMP の改良とその応用

中井淳一 (理化学研究所・脳科学総合研究センター)

(16) クリプトクロームの機能

藤堂剛 (京都大学・放射線生物研究センター)

(17) 核内レセプター VDR によるビタミン D・胆汁酸認識機構の解析

安達竜太郎, 山田幸子, 下村伊一郎, 榎島誠 (大阪大学大学院・生命機能研究科)

(18) 開状態におけるイオンチャネルポアの柔軟性の分子基盤

藤原祐一郎, 久保義弘 (東京医科歯科大学大学院・医歯学総合研究科)

(19) 脳黒質網様部ニューロンのエネルギー基質センシング機構

山田勝也, 袁宏杰, 稲垣暢也 (秋田大学・医学部・生理学第一講座)

(20) 糖・脂質代謝センサーとして働く ABC タンパク質の作用メカニズム

植田和光 (京都大学大学院・農学研究科)

【参加者名】

稲垣暢也, 山田勝也 (秋田大・医), 齋藤正男 (東北大), 金井 好克 (杏林大・医), 古川哲史 (東京医科歯科大), 久保 義弘, 藤原 祐一郎 (東京医科歯科大), 榎島 誠, 安達竜太郎, 森田健太郎, 金子恵美, 中野寛之 (大阪大・生命機能), 鈴木 誠 (自治医大), 中井 淳一 (理研), 森郁恵 (名古屋大・医), 内田浩二 (名古屋大), 藤堂剛 (京大・放生研), 植田和光 (京

都大・農), 久野 みゆき (大阪市大・医), 辰巳 仁史 (名古屋大・医), 倉橋 隆, 竹内 裕子 (大阪大), 富永 真琴, 沼崎満子, 森山 朋子, 富樫 和也, 東 智広, 村山 奈美枝, 三村 明史 (三重大・医), 岡田 泰伸, R.Sabirov, 清水 貴浩, 高橋 信之, 井上 華, 森島繁 (生理研), 北川禎三, 岡村 康司, 岩崎 広英, 久木田 文夫, 森泰生, 原 雄二 (統合バイオ)

【概要】

細胞は、それを取り巻く環境の大きな変化の中で、その環境情報を他のシグナルに変換し、細胞内や周囲の細胞に伝達することによって環境変化に対応しながら生きている。細胞が存在する臓器・組織によって細胞が受ける信号は異なり、従って細胞が持っている信号を受信する機能も異なる。最近、膜の代謝型受容体のみならず、チャネルやトランスポーターなどの膜輸送蛋白質も、さらには細胞質内の受容体も環境情報センサーの働きをしていることが明らかになりつつある。これらの分子センサー蛋白は種々の化学的、物理的、生理的情報を受容して、他のシグナルに速やかに変換する能力を持っている。

バイオ分子センサーは私たちの身体の中の細胞の至る所にあり、それぞれの場所で特異的に発現して、細胞独

自の機能に重要な役割を果たしている。このバイオ分子センサーは、細胞生存の要とも言える重要な存在であり、創薬のターゲットにもなっている。こうした細胞膜・細胞質内・核内に存在するバイオ分子センサータンパク質の構造と機能の解明を、既に遺伝子の明らかになっている分子の研究を中心に新たな分子の探索も含めて、分子生物学、生化学、生理学の融合的研究によって推進するためにこの研究会を開催した。イオン・アミノ酸センサー、容積・メカノセンサー、温度・pH センサー、Redox センサー、光・味・匂いセンサー、代謝センサーの6つのセッションに分かれて行われて 20 の演題発表があった。活発な討論、情報交換がなされ、「バイオ分子センサー」研究の発展に有益な会であった。

(1) 腎マクラデンサ細胞の NaCl センサー ATP チャネル

岡田 泰伸¹, SABIROV Ravshan¹, 林 誠治, 森島 繁, LAPOINTE Jean-Yves, BELL Darwin

(¹生理学研究所, ²モントリオール大学・理学部, ³アラバマ大学・医学部)

腎マクラデンサ(密集斑)細胞は、腎尿細管(太い上行脚:TAL)管腔液のNaCl濃度を検知して、本細胞と共に傍糸球体装置を構成するメサングウム細胞を介して輸入

細胞脈平滑筋細胞や顆粒(レニン分泌)細胞にシグナルを伝達して、体液量や血圧の調節に関与するというユニークかつ重要な細胞である。そのNaClセンサー機序や

シグナル伝達機序を明らかにするためにウサギ腎より密集斑を単離して解析した。その結果、マクラデンサ細胞膜に 380pS の大型単一チャネルコンダクタンスを示すマキシアニオンチャネルの存在が同定され、NaCl 濃度増によって活性化されること、ATP⁴を透過させることなどが明らかとなった。そして実際にマクラデンサ細胞は NaCl 増に応答して ATP を放出することが示された。次に、糸球体と TAL ごと単離した標本において TAL 灌流液中の NaCl 濃度を上昇させると、マクラデンサの基底側から

ATP が放出されることが示された。更にはメサンギウム細胞株に P2Y₂ 型の ATP レセプターの存在を確認し、この細胞をマクラデンサ基底側に密着させると、尿細管腔 NaCl 増に応答して本 ATP レセプターが刺激されることが明らかとなった。これらの結果から、マクラデンサ細胞の NaCl センサーは ATP 透過性マキシアニオンチャネル(ATP チャネル)であり、メサンギウム細胞へのシグナル分子はそこから放出される ATP であることが結論された。

(2) アミノ酸センサーの探索

金井好克 (杏林大学医学部薬理学教室)

細胞は、アミノ酸の供給量に応じて、タンパク質合成を含めた細胞内代謝を調節し、栄養環境に適応する。この代謝調節において、細胞へのアミノ酸供給量をモニターする 2 種のアミノ酸センサーが酵母にはある。第一は、細胞膜アミノ酸センサーであり、アミノ酸トランスポーターと相同な構造を持つ 12 回膜貫通型タンパク質 Ssy1 が細胞内へシグナルを伝達するとされている。第二は、細胞内アミノ酸センサーであり、アミノ酸シグナリングの中心的位置を占める TOR (target of Rapamycin) の上流因子として想定されている。

我々は、悪性腫瘍細胞への必須アミノ酸の供給を担当するトランスポーターLAT1を同定し、その抑制により細

胞増殖抑制効果が得られることを明らかにした。LAT1 抑制による細胞増殖抑制は、TOR シグナル経路を OFF にすることから、細胞内センサーを介する応答であると考えられる。また、LAT1 の結合タンパク質 4F2hc は、膵臓ランゲルハンス島 β - 細胞に強制発現させるとランゲルハンス島を肥大させ、培養細胞に導入すると TOR 経路とともに PI3 Kinase 経路を活性化することが明らかになった。細胞内センサーは、その分子実体は明らかではないが、これがロイシンに選択性を示すことから、アミノ酸応答性を示す HEK293 細胞の細胞可溶化画分のロイシン結合タンパク質として細胞内センサーを探索する方向性で研究を開始している。

(3) 機械受容チャネル TRPV4 の構造と機能

鈴木誠 (自治医大、薬理学分子薬理学部門)

TRPV4 は swell-activated channel として報告されている、機械受容性である Ca 透過性チャネルである。この機械受容性について、3 つの角度から発表する。(1) CHO 細胞に遺伝子を発現した結果は、Multi-sensitive channel で、inflation, low pH, citrate で特異的に反応した。HEK 細胞で発現させると、swell-activated は著明になる。(2) ノックアウトマウスを作成すると、閾値の高い圧反応は低下する。つまり、尻尾の圧域値が上昇し、これには、 $\alpha\beta$, γ 線維に関わっていた。圧受容といわれる C 線維は検出でき

なかった。皮下の受容器、自由終末の問題と考えられる。腹腔内の酢酸投与は陽性、熱回避は陰性の結果である。(3) 圧感受に関して細胞依存性の反応は修飾蛋白の存在を示唆する。TRPV4C 末端の Two-hybrid 解析から、酵素 Ca プロテアーゼと MAP などが得られた。MAP は actin と結合するといわれ、この蛋白と共発現することで、TRPV4 の膜への移行と actin との連絡があることがわかった。

(4) 大脳皮質ニューロンの容積センサー Cl^- チャネル

井上 華, 岡田 泰伸 (生理学研究所・細胞器官研究系・機能協関部門)

容積感受性 Cl^- チャネルは細胞膨張によって活性化され、容積調節、特に調節性容積減少 (regulatory volume decrease: RVD) に重要な役割を果たしている。神経細胞における細胞膨張は、虚血や過興奮時などの病態下のみならず、生理的な神経伝達の際にも観察されており、このチャネルの生理学的・病態生理学的役割の重要性が推定される。今回私たちは容積感受性 Cl^- チャネル電流が大脳皮質ニューロンにも存在することをはじめて見出した。即ち、大脳皮質ニューロンにおいて低浸透圧性細胞膨張によって活性化される Cl^- 電流は、これまで他の細胞で報告されている容積感受性 Cl^- チャネルに類似する性質を

示し、外向き整流性、強脱分極下での時間依存的不活性化、低フィールド的なアニオン選択性、 Cl^- チャネルブロッカー NPPB, DIDS, phloretin への感受性、中間型の単一チャネルコンダクタンス等を示した。また、この Cl^- チャネルはニューロンにおいても他の細胞と同様に RVD に関与していることが明らかになった。更には、神経細胞の膨張が観察される事例としてよく知られる過興奮性の刺激によっても、varicosity formation (dendrite の局所的な膨張) の出現に伴って活性化されるという所見が得られた。このように本チャネルは細胞全体および局所の容積変化を検知して活性化することが明らかになった。

(5) 心筋ストレッチセンサーの分子メカニズム

古川哲史 (東京医科歯科大学・難治疾患研究所・生体情報薬理分野)

心筋細胞には精巧なストレッチセンサー機構が備わっており、その破綻は心不全・心肥大・心筋症などの循環病態をもたらす。ストレッチセンサーの一つに mechano-electrical feedback があり、心筋細胞に張力がかかると再分極が促進され、過度のカルシウム流入および筋収縮から保護する。心筋再分極に重要な遅延整流カリウムチャネルの活性化の遅い成分 (I_{Ks} チャネル) がストレッチ・細胞内カルシウムにより活性化されることが知られているが、その分子メカニズムは不明である。最近我々は minK に結合するタンパクとして T-cap (telethonin) を同定した。T-cap は、Z 盤特異的タンパク titin, MLP と結合

する。すなわち、分子複合体 minK-T-cap-titin / MLP は T 管膜と Z 盤をつなぐ molecular linker として働き、T-cap, titin, MLP 遺伝子の変異は特発性心筋症の原因となる。KvLQT1・minK にはカルシウム結合部位は存在しないが、T-cap が心筋特異的カルシウム結合タンパク (CaBP) に結合することも判明した。以上から、minK-T-cap-titin / MLP および minK-T-cap-CaBP は I_{Ks} チャネルのストレッチ・カルシウムセンサーの有力な候補と考えられ、mechano-electrical feedback の分子基盤として機能する可能性が示唆される。

(6) 血管内皮細胞における機械受容と細胞反応

辰巳 仁史^{1,2}, 早川 公英⁴, 河上 敬介³, 清島 大資³, 曾我部 正博^{1,4}

(¹名古屋大学大学院医学系研究科, ²CREST, JST

³名古屋大学医学部保健学科, ⁴細胞力覚プロジェクト, JST)

培養血管内皮細胞での機械刺激による細胞 Ca^{2+} 動員の分子機構や Ca^{2+} の空間動態はほとんど明らかにされ

ていない。そこで我々は、ヒト臍帯静脈由来の培養内皮細胞の上面に細胞外マトリックス (フィブロネクチン)

をコートしたガラスビーズを接着させて、そのビーズを移動することにより細胞に局所的機械刺激を与え、引き続いて生じる Ca^{2+} 動員の空間動態を Ca^{2+} 指示薬である Fluo-3 の蛍光を用いて解析した。共焦点レーザー顕微鏡を用いてミリ秒オーダーの高時間分解で Ca^{2+} 動態を測定することができた。 Ca^{2+} 濃度は、局所的機械刺激の直後に、まずビーズの接着している細胞上面と、基質と細胞が接着している細胞底面で上昇し、やや遅れて細胞中央部で上昇することがわかった。この Ca^{2+} 動員は SA チャネルの阻害剤であるガドリニウムによって阻害された。

また、ビーズの接着面と細胞底面の間を連結するストレスファイバーが観察され、このアクチンを脱重合させると、機械刺激に対する Ca^{2+} 動員が強く抑制された。全反射型近接場照明を用いて、細胞底面でのカルシウム動員を詳しく観察したところ、 Ca^{2+} 上昇は底面の接着斑近傍から生じることがわかった。以上の結果から、機械刺激はアクチン線維を通して細胞底面の接着斑に伝わり、そこに分布する Ca^{2+} 透過性の SA チャネルを活性化して、局所的な Ca^{2+} 動員を引き起こしたと思われる。

(7) Cell acidosis 環境における膜電位依存性プロトンチャネルの応答様式

久野みゆき¹, 森畑宏一², 森啓之¹, 酒井啓¹, 川脇順子³

(大阪市立大学大学院医学研究科, ¹分子細胞生理学・²神経内科・³中央研究室)

膜電位依存性 H^+ チャネルは、非常に高い H^+ 選択性を特徴とし、開口すると cell acidosis を迅速に解除する。チャネル活性は細胞内外の H^+ 濃度の変化に即応して変動し、基本的には H^+ 濃度差をキャンセルするように働くが、同時に電位の影響を強く受ける。生体内では、pH を狭い範囲内で維持するために、多様な pH 調節機構が存在する。cell acidosis は H^+ チャネル活性化を引き起こす第一要因であるが、cell acidosis 環境で実際に H^+ チャネル活性がどのように制御されているかはよくわかっていない。 H^+ チャネルは、それ自体で pH センサーとして働き、逆転電位を指標に記録中の細胞の pH 変動をリアルタイム

で検出することが可能である。実験的によく用いられる負荷 NH_4Cl の除去は急速な cell acidosis を引き起こし、同時に H^+ チャネルを活性化した。チャネル活性増強の時間経過は acidosis の過程によく相関した。一方、細胞外から HCl を負荷した場合は cell acidosis がゆっくり進行する。この過程では H^+ チャネル電流はむしろ減少していた。これらの H^+ チャネル応答の主因は細胞内外の pH 勾配の変動にあったが、乳酸アシドーシス、ホルボー ルエステル、低浸透圧刺激によって生じる cell acidosis では、 H^+ チャネル活性の増強に pH 以外の要因が大きく関与していた。

(8) プロトン依存性電位作動性チャネル PCL

森泰生, 山田和徳, 西田基宏, 吉田卓史, 沼賀拓郎, 森恵美子

(岡崎国立共同研究機構・統合バイオサイエンスセンター 細胞生理)

常染色体優性遺伝型多発性嚢胞腎の原因遺伝子として、PKD1 と PKD2 が同定され、PKD 関連遺伝子として、PKDL、PKD2L2、PKDREJ、PKD1L1 がクローニングされている。PKDL の遺伝子産物である Polycystin-L (PCL) と PKD2 の遺伝子産物である Polycystin-2 (PC2) は互いによく似た構造をしており、ともに S4 領域に電位センサーと考えられるドメインを持つ。我々は PCL を HEK293 細胞に発現さ

せ、パッチクランプの whole-cell mode を用い、PCL のチャネル機能について解析した。PCL はカルシウム透過型の非選択的陽イオンチャネルであるが、細胞外のカルシウムによって抑制されることが明らかとなった。また電位依存性を示し、脱分極によって大きな電流が生じた。S4 領域が電位センサーとして機能していることが明らかとなった。また PCL はアシドーシスによって活性化

されることが判明した。さらに、電位センサーの変異体では、pH 依存性も減弱または消失が認められ、PCL においては S4 領域の電位センサーは pH センサーとしても機能している可能性が示唆された。これらの結果より PCL

は細胞内でのカルシウムシグナルへの関与、興奮性細胞での再分極の促進、尿細管での酸塩基平衡または他のイオン輸送の調節に関与している可能性が考えられる。

(9) 温度センサーとしての TRP チャネル

富樫和也, 沼崎満子, 森山朋子, 東智広, 村山奈美枝, 富永知子, 富永真琴
(三重大大学ゲノム細胞医科学大講座分子細胞生理学分野 (生理学第一講座))

近年、末梢感覚神経に特異的に発現する温度受容体 TRP チャネルがクローニングされている。

TRPV1 は、6 回の膜貫通型の Ca^{2+} 透過性の高い非選択性陽イオンチャネルであり、カプサイシンの他に生体において痛みを惹起する酸 (プロトン)、熱 (43 度以上) によっても活性化される。弱い酸性化は TRPV1 の活性化温度閾値を体温以下に低下させる。また、炎症関連メディエーターの ATP や bradykinin はそれぞれの Gq 蛋白質共役型受容体に作用して PKC によって TRPV1 をリン酸化して、その活性化温度閾値を体温以下に低下させる。体温が TRPV1 の活性化刺激となって痛みをひき起こす

ことになり、これは新しい急性炎症性疼痛発生メカニズムとして注目されている。

低浸透圧によって活性化されると報告された TRPV4 が、35 度くらいの暖かい熱刺激によっても活性化される新たな温度受容体であることが明らかとなり、皮膚の角質細胞や視床下部神経細胞に発現することが分かった。

TRPV1, TRPV4 の他に、TRPV2 (VRL-1), TRPV3, TRPM8 (CMR1), TRPA1 (ANKTM1) が温度受容体として機能することが明らかとなっており、それぞれ 52 度以上、30-35 度以上、28 度以下、17 度以下で活性化される。

(10) 線虫 *C. elegans* における感覚ニューロン機能の多様性

森 郁恵 (名古屋大学大学院理学研究科)

我々は、以前に温度受容を担う主要な温度受容ニューロン AFD を同定したが、同時に AFD とは独立の温度感覚ニューロンの存在を予想していた。我々が最近単離した *ttx-6* (nj8) 変異体は、飼育温度に関わらず、常に温度勾配上で低温に移動する好冷性異常を示す。nj8 の原因遺伝子をクローニングした結果、既に同定されていた *cat-16* 遺伝子と同一であり、RGS (Regulators of G protein Signaling) ホモログをコードしていた。RGS は、 $G\alpha$ の GTPase 活性を上昇させて活性型 $G\alpha$ から不活性型 $G\alpha$ への移行を促進するため、 $G\alpha$ の負の制御因子として機能

する。最近、温度走性神経回路上の AFD, AIY, あるいは AIZ ニューロンで EAT-16 を発現させても、*cat-16* 変異体の温度走性異常は回復せず、嗅覚ニューロンとして機能することが知られていた AWC で EAT-16 を発現させると、*cat-16* 変異体の温度走性異常が回復するという非常に興味深い結果を得た。すなわち、従来嗅覚ニューロンとして詳細に解析が行われてきた AWC ニューロンに温度受容機能が備わっていることを初めて明らかにした。

(11) 細胞内信号伝達を担うヘム関連タンパク質

齋藤正男（東北大学多元物質科学研究所）

ヘムタンパク質はバクテリアから高等動物にいたるまでのさまざまな生物に存在して、小分子の輸送、電子伝達、酸化還元、などの生命活動にとって必要不可欠な役割を担っている。1990年代に入り一酸化窒素合成酵素 (NOS) と可溶性グアニル酸シクラーゼ (sGC) がヘムタンパク質であることが確立し、細胞内信号伝達においても、ヘムタンパク質が、重要な役割を果たしていることが明らかになった。その後新種センサー型ヘムタンパク質が相次いで発見され、信号伝達に関与するヘム関連タンパク質は最近の生物無機化学、金属タンパク質研究分野で大きな注目を集めている。

センサー型ヘムタンパク質では、ヘムはセンサーとし

て機能しており、タンパク質の機能中心・活性中心ではないという点が Hb, Mb, P-450 等の周知のヘムタンパク質とは基本的な点での大きな相違である。信号分子としては、ガス状 2 原子分子 (O_2 , CO, & NO) がよく知られているが、ヘムそのものを信号として用いるヘムセンサータンパク質も存在する。センサー型タンパク質は *cyclase*, *kinase*, *phosphodiesterase* 等の活性が信号分子によって制御される酵素として機能するものと、核酸との相互作用が信号分子によって制御される転写因子とに分類される。今回はセンサー型ヘムタンパク質研究の現状、問題点、将来への展望について、我々の研究成果を交えて報告する。

(12) タンパク質グルタチオン化：酸化ストレスのセンシング機構

内田浩二（名古屋大学大学院生命農学研究科）

細胞内は、グルタチオンなどの様々な還元物質により還元的状態が保たれている。しかしながら、酸化ストレスにより局所的な酸化状態が生じた場合、タンパク質中のシステイン残基はスルフェン酸に酸化され、さらに酸化が進行した場合、スルフィン酸やスルフォン酸などの不可逆的な最終酸化物が生成され、タンパク質は変性に至る。しかし、初期生成物であるスルフェン酸に対してはグルタチオンが作用することが知られ、グルタチオン化タンパク質が生成する（“タンパク質 S-チオール化反応”）。このようなシステイン残基の可逆的な修飾はセリンやスレオニン、チロシン残基のリン酸化・脱リン酸化に相当し、また酸化ストレスを感知し、酸化ストレスに

対する応答手段を惹起するセンシング機構と考えられる。これまでの研究から、このような S-チオール化反応は細胞内のシグナル伝達に関与しており、細胞の増殖、分化、アポトーシス、ネクローシス、細胞間情報などを制御することが明らかとなっている。タンパク質のグルタチオン化はタンパク質 SH 基を保護する役割を担う。また、酸化ストレス応答を惹起する初期段階の酸化反応として、標的タンパク質の解析研究が期待されている。本研究会では、モノクローナル抗体を用いたグルタチオン化タンパク質検出法の開発と、ビオチン化プローブを用いたグルタチオン化の標的タンパク質の検索に関する研究の一端を紹介する。

(13) 共鳴ラマン分光法によるガスセンサー蛋白の特異的センシングメカニズムの解明

北川禎三（岡崎国立共同研究機構・統合バイオサイエンスセンター生体分子）

NO , CO , O_2 といった 2 原子分子を環境情報として検出し、それに応答する生理作用を生み出すヘム蛋白質が、最

近くつかみつかっている。 O_2 を検出すると His のリン酸化をやめる FixL, ホスホジエステラシ活性を示す Dos,

PDEA1, CO を検出して生体リズムを制御する NPAS2 - BMAL1 等は PAS ファミリーに属するが, O₂ を検出して走化性を誘起する HemAT, NO を検出して GTP→cGMP の反応を促進する可溶性グアニレートシクラーゼ (sGC), CO を検出して DNA に結合する転写制御因子の CooA は PAS ドメインをもたない。CooA は CRP ファミリーに属していて, カタボライト遺伝子活性化蛋白 (CAP) の cAMP の代わりにヘムを置いたような構造をとっている。

可視共鳴ラマン及び紫外共鳴ラマンの実験から得られた最近の成果を報告する。これらのセンサー蛋白は全て, 還元型では His を Fe の配位子として持ち, Fe-His 伸縮振

動数は T 型 deoxyHb のものより低く, 何らかの張力がかかっていると思われる。sGC の場合, NO が結合すると Fe-His 結合が切れ活性は~200 倍高くなるが, CO が結合しても Fe-His 結合は切れず活性もあまり高くない。しかし YC-1 という薬物が存在していると CO でも活性は高くなる。CooA は常にダイマーとして存在していて, ヘムの第 6 配位座側は別のサブユニットの Pro が配位しているが, CO がくるとその Pro が CO と置換する。Dos も還元型で 6 配位である。CO は Met95 を押しのけて Fe に配位する。Dos や HemAT では鉄に結合した O₂ が蛋白と強い水素結合を作ることに特色がある。

(14) 嗅覚細胞において cAMP はユニバーサルな情報伝達因子である

竹内裕子, 倉橋 隆 (大阪大学大学院生命機能研究科)

嗅覚情報変換は全く異なった分子構成を持つ 2 種類の pathway が並行して存在していると長い間信じられていた。匂い物質の種類によって嗅細胞がセカンドメッセンジャーとして cAMP か IP₃ のどちらかを選択的に活性化させると考えられている。cAMP pathway はそのカスケードに関わる構成分子の種類や特性の研究が既に確立しているのに対し, IP₃ Pathway は未だに議論が続いている。今回, 3000 個近い数の単離嗅細胞にホールセル記録を試行して, 応答性のスクリーニングを行い, IP₃ 匂い物質に対する応答解析をおこなった。また, 同時に, 応答する細胞に対してケージド cAMP の細胞内光解離を行っ

た。cAMP 匂い物質に対する応答, IP₃ 匂い物質に対する応答, そして細胞内 cAMP に対する応答はいずれも同一細胞で直接比較検討すると, 応答電流波形の立ち上がり, ピークの値, dose-dependence, 順応過程, 交差順応などのユニークな特性において, ほぼ一致する電気生理学的特性を示し, IP₃ 匂い物質と呼ばれてきたものに対する応答が実際には cAMP で仲介されている可能性を強く支持した。以上より, 匂いの分子には, 何万種類の多様性の分子があるのに, リセプター分子のレベルでは約 1000 種類に絞られて, 嗅細胞内の二次伝達物質のレベルになると物質としては cAMP 一種類になると結論した。

(15) GFP を用いたカルシウムセンサーG-CaMP の改良とその応用

中井淳一 (理化学研究所・脳科学総合研究センター・神経回路ダイナミクス研究チーム)

今回我々は G-CaMP をミオシン重鎖キナーゼプロモーターの下に平滑筋に発現する transgenic mouse を作成し, 神経の電気刺激により膀胱壁の平滑筋で, 平滑筋の収縮に同期して G-CaMP からの蛍光が変化することを観察した。また, G-CaMP1.6 を脳スライス標本に発現させ, Glutamate の添加により神経細胞の spin や shaft で蛍光が変化することを観察した。

G-CaMP および G-CaMP1.6 は温度に感受性があり, 37

度では量子収率が低下して蛍光を発しにくくなる欠点があった。今回我々は 37 度でも安定して蛍光を発する G-CaMP1.6 #X-1 を開発した。G-CaMP1.6 #X-1 はこれまでの G-CaMP, G-CaMP1.6 と同様にカルシウムイオンの有無により最大で約 5 倍蛍光強度が変化する。G-CaMP1.6 #X-1 は pKa が G-CaMP1.6 と比較してやや小さいため, pH7.4 では G-CaMP1.6 よりさらに明るくなることがわかったが, 依然 pH 感受性があり測定には注意する必要がある。

またCFPを基にカルシウムイオンに感受性をもつセンサー(C-CaMP)を開発した。C-CaMPはG-CaMPとは逆に、カルシウムイオンが結合すると蛍光強度が減少する

センサーである。C-CaMPはG-CaMPに比較して蛍光波長が短波長側にシフトしているのでGFPやYFPを用いたセンサーとの同時測定が可能である。

(16) クリプトクロームの機能

藤堂 剛（京都大学・放射線生物研究センター）

クリプトクローム (Cryptochrome; CRY) は、光回復酵素・青色光受容体タンパクファミリーの一員である。クリプトクロームは、この外部刺激入力系の光受容体として機能していると予想された。実際、ショウジョウバエにおいて、この遺伝子に変異を持つ個体は概日リズムの光に対する応答が低下しており、光に応答して他の時計タンパクの分解を促進する事が明らかにされた。また、植物においては、概日時計のみでなく、成長の制御、屈光性、開花時期の制御などの光受容体として機能していることが明らかになった。一方、ゼブラフィッシュ・マウス等の脊椎動物においては、クリプトクロームは全く別の機能を持つことが明らかになった。脊椎動物のクリ

プトクロームは、約24時間周期の遺伝子発現の振動の負の転写制御因子として機能している事が明らかになった。この転写抑制活性には光は全く関与していないが、脊椎動物においてクリプトクロームが、概日リズムを含む何らかの光に応答する生理機能に関与しているかどうかは現在明らかではない。

光回復酵素・青色光受容体タンパクファミリーは、補酵素(クロモフォア)としてFADを持つ。光回復酵素においては、光を受容したFADから基質に電子が付与されることが酵素活性の最重要ステップとなっている。光受容体として機能しているクリプトクロームにおいても同様な反応の関与が考えられるが、現在の所不明である。

(17) 核内レセプターVDRによるビタミンD・胆汁酸認識機構の解析

安達竜太郎¹，山田幸子³，下村伊一郎^{1,2}，槇島誠^{1,2}

(¹大阪大学大学院医学系研究科，²生命機能研究科，³東京医科歯科大学生体材料工学研究所)

近年、核内レセプターが脂質代謝におけるバイオ分子センサーとして機能していることが明らかになった。オキシステロール受容体LXR、脂肪酸受容体PPAR、胆汁酸受容体FXR、PXR及びVDRなどが脂質代謝を調節している。

胆汁の主要な成分である胆汁酸は、脂質の消化吸収において重要な働きをしている。コレステロールを原料に肝臓で合成される一次胆汁酸は、胆汁の成分として腸管に分泌されるが、それらの大部分は腸管から再吸収される。再吸収されなかった一部の胆汁酸は、腸内細菌によって二次胆汁酸に変換される。薬剤に応答する核内レセプターPXRが、二次胆汁酸に応答することが報告された

が、我々は、ビタミンD受容体として知られていた核内レセプターVDRも二次胆汁酸に応答することを発見した。PXRとVDRは、肝障害や大腸がんの発症と関連するといわれているリトコール酸に応答し、リトコール酸解毒酵素CYP3Aの遺伝子発現を誘導している。

我々は、VDRと近縁の核内レセプターPXRとのアミノ酸配列および立体構造の比較を行い、それに基づきVDRのリガンド結合ポケットの各種変異体を作成した。その結果、活性型ビタミンD3選択的VDR変異体及びリトコール酸選択的VDR変異体を見出し、VDRリガンド結合ポケットへの結合様式が活性型ビタミンD3とリトコール酸との間で異なることを明らかにした。

(18) 開状態におけるイオンチャネルポアの柔軟性の分子基盤 -- P2X₂ 型 ATP 受容体チャネルは自身の発現密度をセンスする --

藤原 祐一郎, 久保 義弘 (東京医科歯科大学・大学院・機能協同システム医学, CREST)

イオンチャネル型の ATP 受容体 P2X₂ をアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ, ATP 投与後の定常状態における電流を 2 本刺し膜電位固定下で記録し, 受容体の種々の性質を発現レベルとの関連において解析した。その結果, 以下の知見が得られた。

(1) 内向き整流性の強弱は発現密度と負の相関を示した。内向き電流の大きさの増大に伴ってコンダクタンス電圧関係曲線の $V_{1/2}$ はより脱分極側へシフトした。脱分極パルス直後に観察される外向き電流 (I_{initial}) は, 経時的に減衰し定常レベルに (I_{steady}) に達した。 I_{initial} および I_{steady} の, 内向き電流の大きさに対する割合はどちらもチ

ャネルを高発現にすることによって増加した。(2) [ATP]-応答関係の K_d の値は発現密度と負の相関を示した。Hill 係数は発現密度に相関なく一定値 2 であった。(3) P_{K^+}/P_{Na^+} の発現密度に依存した変化は観察されなかったが, P_{NMDG^+}/P_{Na^+} は発現密度と負の相関を示した。(4) 高濃度の ATP (100 μM) により弱い内向き整流性電流を呈する発現密度の高い細胞に, 低濃度 ATP (3 μM) を投与するとその内向き整流性は増強した。

よって「P2X₂ 受容体の内向き整流性等の性質は, 膜上に存在する「開状態」のチャネルの密度に依存して動的に変化する。」と考察した。

(19) 脳黒質網様部ニューロンのエネルギー基質センシング機構

山田勝也, 袁宏杰, 稲垣暢也 (秋田大学医学部生理学第一講座)

我々は, ATP 感受性カリウムチャネル (K_{ATP} チャネル) を欠失させたマウスを用いた実験から, 黒質網様部 (SNr) のチャネルが低酸素環境で開口して膜電位を過分極方向にシフトすることにより SNr 発火活動を低下させ, それにより代謝障害時の脳の全般発作に対して抑制的に働くことを明らかにした。すなわち SNr の K_{ATP} チャネルは, 脳において一種の酸素センサーとして機能し, 脳保護の役割を果たしている可能性がある。これに対して, 酸素と同様に重要なエネルギー基質であるグルコースと SNr 神経活動との関係は未解明であった。今回我々は脳スライスを用いた実験から, SNr 神経細胞の半数以上がグルコース濃度を低下させると発火頻度を上昇させるグルコ

ース感受性 (glucose-sensitive) ニューロンとしての性質を有することを見いだした。さらに, SNr に 1-6 mM の範囲のグルコース濃度もしくは GABAA 受容体阻害剤存在下で, 発火活動を分オーダーの周期でダイナミックに変動 (オシレーション) させる細胞を見いだした。SNr のオシレーションの周期は極端に遅く, しかも GABA および興奮性アミノ酸性の神経伝達阻害剤により影響されなかった。今後, SNr のグルコース感受性の分子メカニズムおよびオシレーションとの関係を種々のレベルで解析することにより, SNr のエネルギー基質検知機構の生理的役割の解明を目指したい。

(20) 糖・脂質代謝センサーとして働く ABC タンパク質の作用メカニズム

植田和光 (京大院・農・応用生命科学)

ABCA1 は apoA - I にコレステロールとリン脂質を受け渡すことによって HDL コレステロール形成に関与して

いる。細胞のコレステロール量が上昇すると, ABCA1 はオキシステロールをリガンドとする核内受容体 LXR

を介して発現が促進され、細胞膜へ輸送された後、apoAIに受け渡すことで細胞内コレステロール濃度を減少させる。しかし、発現した ABCA1 は半減期 1-2 時間でプロテアーゼによって速やかに分解され、コレステロールの過度の排出が起こらないようになっている。

我々は ABCA1 によるコレステロール排出機構を解明するため、血中 HDL が激減する遺伝病である Tangier 病で見つかっているアミノ酸置換変異のうち、第 1 細胞外ドメインの 587-597 に集中している 3 つの変異を ABCA1 に導入し、ABCA1 の機能に与える影響を検討した。その

結果、R587W と Q597R 変異をもつ ABCA1 は形質膜へ輸送されずに小胞体にトラップされたままになることが明らかになった。一方、W590S 変異は細胞膜への局在には影響せず、ATP との相互作用も野生型と同様であった。W590S 変異体の機能の検討はコレステロール排出機構の解明に重要な知見を与えると期待される。また、ABCA1 の翻訳後活性調節機構を解明するため、相互作用する蛋白質を酵母 two - hybrid 法を用いて探索し、それらの ABCA1 の活性調節への関与を検討している。

5. 生体防御の最前線：上皮輸送制御因子の構造活性相関

2003年10月2日－10月3日

代表・世話人：丸中良典（京都府立医科大学大学院生理機能制御学）

所内対応者：岡田泰伸（細胞器官研究系機能協関部門）

(1) がんの化学予防

西野輔翼（京都府立医科大学大学院医学研究科分子生化学）

(2) 食品成分を用いた癌の分子標的予防に関する基礎的研究

酒井 敏行（京都府立医科大学大学院医学研究科分子標的癌予防医学）

(3) 脳循環障害により起こされるラットの学習記憶障害に対するイソフラボノイドの改善作用

鄒莉波，董愛梅（瀋陽薬科大学薬理学教研室）

馬場正樹，奥山 徹（明治薬科大学天然薬物学研究室）

(4) 高分子薬の消化管膜透過性の促進とその機構

高田寛治（京都薬科大学薬物動態学教室）

古閑健二郎（北陸大学薬学部）

(5) 植物ポリフェノールの脂質二重層に対する親和性とその構造活性相関

中山 勉（静岡県立大学食品栄養科学部）

(6) Caco-2細胞を用いたフラボノイドとイソフラボノイドの腸管吸収代謝比較

室田佳恵子，清水寿美恵，寺尾純二（徳島大学医学部栄養学科食品学講座）

(7) *Helicobacter pylori* VacA 毒素受容体の多様性と毒性発現における lipid raft の重要性

平山壽哉（長崎大学熱帯医学研究所病原因子機能解析分野）

(8) ヘリコバクター・ピロリ菌病原因子 CagA-胃上皮細胞間相互作用

畠山昌則（北海道大学遺伝子病制御研究所分子腫瘍分野）

(9) *H. pylori* の4型分泌機構と病態

東 健（福井医科大学第二内科）

(10) Claudin は偽性低アルドロン症 typeII 原因遺伝子 WNK4 の標的分子である

内田信一，山内小津枝，佐々木 成（東京医科歯科大学医歯学総合大学院体内環境調節学分野）

(11) 尿酸輸送の分子機構と制御

遠藤 仁，安西尚彦，宮崎博喜，細山田 真，金井好克（杏林大学医学部薬理学教室）

(12) 細胞外浸透圧感受機構：チロシン脱リン酸化酵素の活性化と ENaC 遺伝子発現

新里直美，宮崎裕明，丸中良典（京都府立医科大学大学院医学研究科生理機能制御学）

(13) 腎尿細管マクラデンサ細胞の ATP チャネルと NaCl 検知シグナリング

岡田泰伸，Ravshan Z. Sabirov，林 誠治，森島 繁，Janos Peti-Peterdi，Jean-Yves Lapointe，P. Darwin Bell

（生理学研究所機能協関部門）

(14) Modulation of cAMP-regulated ciliary beat frequency by cell volume

in rat bronchiolar ciliary cells during stimulation with an β_2 -adrenergic agonist

Takashi Nakahara (Department of Physiology, Osaka Medical College)

【参加者名】

東 健（福井医科大学内科学第二），大谷昌弘（福井医科大学内科学第二），古閑健二郎（北陸大学薬学部），金沢和樹（神戸大学内科学第二），高田寛治（京都薬科大学薬物動態学教室），遠藤 仁（杏林大学医学部薬理学），金井好克（杏

林大学医学部薬理学), 入部雄司(杏林大学医学部薬理学), 坂本信一(杏林大学医学部薬理学), 藤村正亮(杏林大学医学部薬理学), 畠山昌則(北海道大学遺伝子病制御研究所), 室田佳恵子(徳島大学医学部栄養学科), 寺尾純二(徳島大学医学部栄養学科), 内田信一(東京医科歯科大学体内環境調節学), 佐々木 成(東京医科歯科大学体内環境調節学), 平山壽哉(長崎大学熱帯医学研究所), 中張隆司(大阪医科大学生理学), 中山 勉(静岡県立大学食品栄養科学部), 岡田泰伸(生理学研究所機能協関部門), 鄒莉波(瀋陽薬科大学薬理学教研室), 奥山 徹(明治薬科大学天然薬物学), 酒井敏行(京都府立医科大学大学院

医学研究科分子標的癌予防医学), 西野輔翼(京都府立医科大学大学院医学研究科分子生化学), 丸中良典(京都府立医科大学大学院医学研究科生理機能制御学), 新里直美(京都府立医科大学大学院医学研究科生理機能制御学), 宮崎裕明(京都府立医科大学大学院医学研究科生理機能制御学), 加治屋 勝子(静岡県立大学食品栄養科学専攻), 望月美佳(静岡県立大学食品栄養科学専攻), SABIROV Ravshan(生理学研究所機能協関部門), 清水貴浩(生理学研究所機能協関部門), 真鍋健一(生理学研究所機能協関部門), 沼田朋大(生理学研究所機能協関部門)

【概要】

上皮組織は、生体における外部からの刺激に対する種々のバリアーとなり、また体内環境の恒常性を保つ上で、重要な役割を担っている。特に、体血圧や体液量といった生命維持に不可欠な要素は上皮組織におけるナトリウム吸収により制御されている。また、一方で、肺気道などの防御機構はクロライド分泌を通じて制御されており、クロライド分泌異常により、種々の感染を引き起こし、生体機能の重篤な失調を引き起こす。このように、生体防御という観点においても上皮組織は重要な働きを担っている。上皮輸送は種々の因子により制御されており、多くの精力的な研究がなされてきた。これらの研究の多くは、特に内分泌系および神経系といった内因性の制御という観点から進められて来た。一方で、生体防御

および疾病予防の観点から種々の生理活性・薬理活性を有する物質が発見されつつある。例えば、降圧効果を有するとされる大豆成分、その実体がイソフラボンであることも明らかにされてきている。「イソフラボンが上皮輸送、特に上皮型クロライドチャンネルおよび輸送体を制御することにより、上皮型ナトリウムチャンネル発現を調節している」というイソフラボンの有する降圧効果の分子メカニズムも明らかとなりつつある。これらのことを踏まえ、生体防御に重要な役割を果たしている上皮組織の機能を基軸に、フラボンをはじめとする生理活性物質の構造活性の研究分野の第一線において活躍している研究者に講演を行なって戴いた。

(1) がんの化学予防

西野輔翼(京都府立医科大学大学院医学研究科 分子生化学)

がん化学予防法の開発にあたって、生体防御系の調節を適正化させることを目標とした取り組みは重要である。

発がんを引き起こすに至る調節異常は、多因子性であることが多い。したがってその対策には、複数の予防因子をコンビネーションで活用することが合理的であると考えられる。たとえば、がん予防効果が認められているフラボノイドやカロテノイドは、それぞれ特有の多彩な生物活性を示すため、組み合わせて用いることが有効であろうと予測されている。すなわち、同じ臓器の発がんを結果的には同じように抑制するフラボノイドやカロテ

ノイドであっても、それらの作用機序を解析してみると、種々のフラボノイドが細胞膜機能を修飾し、がん化に伴って引き起こされる栄養素等の細胞膜輸送の亢進を抑制したり、情報伝達を担っている細胞膜上のリセプター群の機能を修飾することなどが特徴として見出される一方で、カロテノイドは、がん抑制遺伝子群の発現を促進させる効力が優れている点に特徴があることなど、それぞれの個性が明らかとなってくる。そこで、これらを組み合わせて活用することにより、生体機能調節を総合的に適正化させることが可能となり、がん化学予防の実用化

が達成できるのではないかと期待されているのである。現在、どのフラボノイドとカロテノイドを組み合わせるのか、また、どのような配合比率で使うのが良いのかを選択・決定していくことに重点をおいて研究が進んでい

る。

以上のようながん化学予防の分野における研究の現状を紹介し、今後の展望について討議したい。

(2) 食品成分を用いた癌の分子標的予防に関する基礎的研究

酒井敏行 (京都府立医科大学・大学院医学研究科・分子標的癌予防医学)

膨大なる疫学的研究から、食事の内容により発癌リスクが大きく左右されることはよく知られている。一方では分子生物学の急激な進歩により、ヒトにおける発癌原因が分子レベルでかなりの部分まで明らかにされてきた。その結果、ほとんどのヒト発癌において、最終的に癌抑制遺伝子である RB 遺伝子が主にタンパクレベルで失活することが明らかになってきた。私達はそこで、種々の発癌抑制に働く食品成分がこの経路を活性化することにより発癌を予防する可能性を考え検討を行ってきた。その結果、食物繊維の代謝産物である酪酸、茸類などに含まれるビタミン D3、野菜に含まれるフラボノイド他、

多くの食品成分がこの経路を活性化させることを見いだしたので、その一部を紹介したい。このような疾病の発症の原因となる分子を標的とした予防法を私達は「分子標的予防」と名付け、その重要性を主張している。この方法を用いることにより、遺伝性でない疾病の予防に極めて有用であるばかりでなく、例えば遺伝性に発癌感受性が高い人に対する特異的予防法に道を開く唯一の手段でもある。体質診断に比重が置かれすぎている現在において、最も重要視されるべき研究分野の一つであると考えている。

(3) 脳循環障害により起こされるラットの学習記憶障害に対するイソフラボノイドの改善作用

奥山 徹 (明治薬科大学天然薬物学研究室)

【目的】イソフラボノイドに抗酸化作用、脳循環改善作用、抗脳虚血作用及び scopolamine により誘発される学習記憶障害に対する改善作用などが報告されている。そこで、葛根イソフラボノイドの脳血管性痴呆モデルに対する学習記憶障害の改善作用を検討した。

【結果及び考察】葛根イソフラボノイド (280-840 mg/kg. po.) は、ラットの 2VO により誘発される八方向性放射状迷路の作業記憶エラーと参照記憶エラー数の増加を用量依存的に減少させた。Morris 水迷路試験では 2VO により起されるラットの escape latency の延長を用量依存的に改善し、プローブ試行において、プラットホーム象限に滞

在する時間を有意に延長した。2VO 処置37日後、ラットの大脳皮質と海馬 CA3 での神経細胞の変性が認められ、神経細胞に対する保護作用が認められた。次に、400-1200 mg/kg. po. ではマウスの両側総頸動脈を虚血・血流再開することにより、学習記憶障害を用量依存的に改善し、脳組織の NOS 活性の増強と NO 含量の増加を有意に改善した。

以上の結果より、葛根イソフラボノイドは脳循環障害により起こされる健忘に対しても有効であり、脳血管性痴呆の治療薬としての可能性が示唆された。

(4) 高分子薬の消化管膜透過性の促進とその機構

高田寛治（京都薬科大学薬物動態学教室）

古閑健二郎（北陸大学薬学部）

遺伝子組換えタンパク質やヘパリンなどの高分子薬の経口吸収を可能とするために種々の吸収促進剤の探索研究が行われてきている。我々は自己微少乳化型界面活性剤 caprylocaproyl macrogol-8 glycerides (Labrasol™) がインスリンや低分子ヘパリンの消化管からの吸収に対して強力な吸収促進作用を発揮することを見いだした。本剤は水に不溶な超脂溶性薬物の溶解性改善の目的に用いられていた。しかし、超水溶性の低分子ヘパリンに対しても強力な吸収促進効果を示すことから、消化管上皮細胞の膜透過性に及ぼす効果について研究を行ってきている。ラット小腸への Labrasol の投与時間をずらすと低分子ヘパリンの吸収促進効果が低下することから、Labrasol

の作用は一過性であると考えられる。また、吸収促進効果は Labrasol の投与量には比例せず、Labrasol と低分子ヘパリンの混合液中における低分子ヘパリン濃度に依存した。ラット回腸における水溶性物質の吸収において、5%以下の Labrasol ではその促進効果を認めなかったことから、2%を超える Labrasol 濃度を維持できる環境において、その膜透過性の促進効果を発揮できると考えた。また *in vitro* 膜透過実験より Labrasol はタイトジャンクション開口作用を示さず膜脂質流動性を顕著に増大させた。以上の結果、ミセルが上皮細胞膜と相互作用を引き起こし、ミセル親水領域に包含する水溶性物質を細胞内経路を介して効率よく膜透過させることが示唆された。

(5) 植物ポリフェノールの脂質二重層に対する親和性とその構造活性相関

中山 勉（静岡県立大学食品栄養科学部）

茶に含まれるカテキン類や、豆に含まれるイソフラボン類などをはじめとした、植物ポリフェノールの生理機能が注目されている。動物細胞を用いた *in vitro* 実験により同じ系統のポリフェノールの生理活性の強弱を比べた結果が多く報告されているが、植物ポリフェノールに特異的なトランスポーターは、現在まで動物細胞中には見つかっていない。そこで我々は、「*in vitro* 実験で報告された様々な活性の強弱は、ポリフェノールの細胞膜への取り込み量のある程度反映しているのではないか」との仮説を立て、それを数値化する方法を開発した。すなわち、モデル生体膜として比重の大きなリポソームを調製

し、ポリフェノールと一定時間インキュベートした後、超遠心分離し、リポソームに取り込まれた量を調べた。その結果、①取り込み量、②脂質二重層中での存在位置、③膜の物性に与える影響などが、当該のポリフェノールの化学構造と密接に関係していることが明らかになった。特に茶カテキン類に関しては、ガロイル基の存在が脂質二重層への親和性の増大に寄与し、これが *in vitro* 系での実験結果に大きく反映していることが明らかになった。それ以外の構造的特徴、脂質二重層中での位置、カテキン類以外のポリフェノールの構造活性相関等についても述べたい。

(6) Caco-2 細胞を用いたフラボノイドとイソフラボノイドの腸管吸収代謝比較

室田佳恵子、清水寿美恵、寺尾純二（徳島大学医学部栄養学科食品学講座）

植物性食品成分であるフラボノイドは、種々の疾病予防に寄与することが強く示唆されている。一方で、反応

性の強いフラボノイドは高濃度存在すると生体高分子に損傷を与えることも *in vitro* で報告されており、生体内で

は解毒代謝を受け主に抱合体として存在することが近年の研究で明らかになっている。本研究では、フラボノイドの bioavailability を明らかにする一環として、消化管における吸収代謝を検討するため主にヒト腸管細胞モデルとして汎用されているCaco-2を用いて食品中の主要なフラボノイドであるケルセチン（フラボノール型フラボノイド）とゲニステイン（イソフラボノイド）の吸収代謝を比較した。

ケルセチンを Caco-2 の apical 側に与えると、basal 側に現れる主要な代謝物はグルクロン酸あるいは硫酸抱合

体であり、少量のメチル化体も検出された。一方で、ゲニステインを与えた場合、basal 側には未代謝のアグリコンが抱合体に比べ有意に多く検出された。そこで、ケルセチンと構造が類似した各種フラボノイドを用いて代謝の違いを検討したところ、イソフラボン以外のフラボノイドでは抱合体が主要な代謝物として検出された。これらのことより、3 位に B 環をもつイソフラボンは Caco-2 における phaseII 酵素の基質になりにくいことが示唆され、ケルセチンを含むフラボノイドと比べて生体内で活性型（アグリコン）として存在しやすいと予想された。

(7) Helicobacter pylori VacA 毒素受容体の多様性と毒性発現における lipid raft の重要性

平山壽哉（長崎大学熱帯医学研究所病原因子機能解析分野）

Helicobacter pylori の産生する空胞化致死毒素 (VacA) は標的細胞の細胞質内に空胞を形成し、死滅させる。我々は VacA の宿主への初期作用を理解するため、胃由来株化細胞から VacA 受容体を免疫沈降法にて同定・精製し、受容体型のチロシンホスファターゼ (RPTP) b であることを報告した (1)。加えて、RPTP b 遺伝子 KO マウスでは正常マウスにみられる VacA の経口投与による胃炎、胃潰瘍が観察されないことなどを示して、VacA の胃粘膜障害には RPTP b の介在を明らかにした (2)。加えて VacA の標的細胞に共通して認められた VacA 結合膜蛋白 p140 が RPTP a であることを明らかにした (3)。この RPTP a はユビキタスに発現していることから、RPTP a 遺伝子 KO マウスで認められた VacA の胃粘膜組織への結合はこの RPTP a が担い、このマウスでの VacA の細胞内侵入と空胞形成に携わっているものと推察している。

VacA の空胞形成には種々の細胞内輸送に関わる蛋白質が関与する。特に、SNARE 蛋白の一つ Syntaxin7 のドミナントネガティブ遺伝子を発現することによりその関与が示された (4)。

VacA による空胞形成には、受容体と結合した VacA の lipid raft への集積が重要であり、methyl-b-cyclodextrin で処理した細胞では VacA による空胞形成が著明に抑制された。

参考文献

- J. Biol. Chem. (2000) 275: 15200-15206
- Nat. Genet. (2003) 33: 375-381
- J. Biol. Chem. (2003) 278: 19183-19189
- J. Biol. Chem. (2003) 278: 25585-25590

(8) ヘリコバクター・ピロリ菌病原因子 CagA-胃上皮細胞間相互作用

畠山昌則（北海道大学遺伝子病制御研究所分子腫瘍分野）

ヘリコバクター・ピロリ菌（ピロリ菌）の胃内持続感染は、慢性胃炎・胃潰瘍さらには胃癌の発症に深く関わる。なかでも、cagA 遺伝子陽性のピロリ菌は強い萎縮性胃炎を惹起し、胃癌との関連が強く疑われている。cagA 遺伝子産物である CagA タンパク質は、ピロリ菌菌体内

から接触した胃上皮細胞内へと直接注入され、細胞内で Src ファミリーキナーゼによりチロシンリン酸化を受ける。我々は、CagA が、細胞の増殖・運動制御に深く関わる SHP-2 ホスファターゼとチロシンリン酸化依存的に結合することを見い出した。この結合を介して CagA は

SHP-2 のホスファターゼ活性を著しく亢進し、その結果、胃上皮細胞は増殖因子刺激を受けた場合と同様の細胞形態変化を引き起こす。さらに、CagA による SHP-2 の過剰な持続的活性化は細胞にアポトーシスを誘導する。一方、チロシンリン酸化 CagA は SHP-2 に加え、Src の抑制分子として知られる Csk と結合しそのキナーゼ活性を促進する。Csk 活性化による CagA リン酸化レベルの低

下は、CagA を介した SHP-2 活性化を減弱させ、胃上皮細胞のアポトーシスを阻止するフィードバック制御系を構成するものと予想される。CagA-SHP-2 相互作用を介する宿主細胞内シグナル伝達系の持続的な攪乱が、ピロリ菌感染を起点とする胃癌発症の分子基盤となることが推察される。

(9) H. pylori の 4 型分泌機構と病態

東 健 (福井医科大学第二内科)

我々は、H.pylori 感染において、H.pylori が胃粘膜上皮細胞に接着すると H.pylori の 4 型分泌機構を介し、病原因子 CagA が胃粘膜上皮細胞内に注入され、上皮細胞内でチロシンリン酸化を受けることを認めた。さらに、チロシンリン酸化された CagA が細胞内シグナル伝達分子 SHP-2 チロシンフォスファターゼと特異的に結合し、細胞増殖因子用効果を引き起こすことを明らかにした。今回、CagA-SHP-2 複合体形成の臨床的意義を解析するため、臨床分離株の cagA 遺伝子の多型性と病態との関連につき検討した。今回、福井株 (胃炎株 36, 胃癌株 29 株) と日本で胃癌の最も少ない沖縄の株 (胃炎株 38, 胃

癌株 8 株) を用い、CagA の多型と胃粘膜萎縮との関係を検討した。CagA のチロシンリン酸化部位は 972 番目のチロシン残基であり、SHP-2 結合部位はリン酸化部位下流に認め、同部位に日本株に特異的な配列を認めた。日本型の CagA は欧米型の CagA に比べ SHP-2 との結合が有意に強かった。胃炎株では、日本型の CagA 感染例において、欧米型の CagA 感染例に比べ胃粘膜萎縮度が有意に高度であった。全ての胃癌株は日本型の CagA であった。従って、日本型 CagA は SHP-2 との強い結合を示し、胃粘膜萎縮及び胃癌に関与することが考えられた。

(10) Claudin は偽性低アルドステロン症 typeII 原因遺伝子 WNK4 の標的分子である

内田信一, 山内小津枝, 佐々木 成 (東京医科歯科大学医歯学総合大学院体内環境調節学分野)

偽性低アルドステロン症 typeII (PHAII) は常染色体優性遺伝形式をとる高 K 血症, 高血圧を呈する疾患である。ポジショナルクローニングによりその原因遺伝子として同定された WNK1, WNK4 は MEKK kinase と相同生の高いキナーゼであるが、その生理的機能、高血圧との関係は明らかでない。PHAII は臨床データより遠位部尿細管でクロライド透過性の亢進がその原因として推定され、サイアザイドで病態が改善されることからサイアザイド感受性 Na-Cl 共輸送体 (TSC) の機能亢進がその原因であろうと推定されてきた。最近 TSC への関与を示唆する報告もあるが、生体内での WNK4 の分布がタイトジャンクションであること、TSC へのリン酸化が明らかでないこ

と、TSC の存在しない皮質集合管にも WNK4 は分布していることなどから、TSC が唯一の WNK4 の標的分子である可能性は低いと考えた。我々はタイトジャンクションに標的分子を求め、近年細胞間輸送を制御しているといわれている claudin が WNK4 の標的分子であるか否か、また変異体 WNK4 強制発現が細胞間のクロライド透過性に与える影響を検証した。結果: 野生型, 変異体 WNK4 強制発現は、MDCK 細胞においてクロライド透過性を増加させた。増加の程度は変異体でより大きかった。また調べた claudin すべて (1-4) が WNK4 と免疫沈降で共沈し、その結合は変異型で著明に増加していた。その結合の増加に従って、claudin はその C 末細胞内領域がリン酸

化された。結論：変異体 WNK4 は細胞間クロライド透過性を増大させる。これは PHAII における高血圧発症と高 K 血症の分子メカニズムであると考えられた。その変化

は, claudin との結合度やリン酸化の程度と並行することから, claudin が WNK4 の標的分子と考えられた。

(11) 尿酸輸送の分子機構と制御

遠藤 仁, 安西尚彦, 宮崎博喜, 細山田 真, 金井好克 (杏林大学医学部薬理学教室)

ヒトとチンパンジーは進化の過程でプリン代謝の最終酵素であるウリカーゼ (uricase) を欠失している為, 他の動物種とは異なり尿酸がプリン代謝の最終代謝産物となる。従って血中尿酸値は高く保たれており, 尿中に多量の水難溶性の尿酸が排泄される時には尿路結石の原因となる。腎での尿酸再吸収が亢進したり, 体内尿酸産生が増大する場合は高尿酸血症となり, 痛風や各種循環器系疾患のリスクファクターになることは周知の事実である。

腎内での尿酸輸送機構としては, 4 要素仮説 (糸球体濾過, 近位尿細管での再吸収, 近位尿細管での分泌, 分泌後の再吸収) が提唱されている。著者らは, この第二要素を構成する近位尿細管での管腔側膜に存在する 12 回膜貫通の尿酸トランスポーター, URAT1 (urate

transporter 1) を in silico cloning により明らかにした。この URAT1 は尿酸と有機及び無機陰イオンとの交換輸送体であり, 血中尿酸値を制御し, この変異による機能異常 (低下) は特発性腎性低尿酸血症の原因となる。URAT1 内には, 推定 PKA リン酸化部位が存在し, A kinase によるリン酸化は尿酸輸送を低下させる。他方, C 末端には PDZ ドメインが存在し, PDZK1 と結合する。URAT1 と PDZK1 の共発現により, 尿酸輸送は増大する。URAT1 は benzbromarone, probenecid, losartan 等の尿酸排泄促進薬の標的分子である事も明らかにされた。尿酸の分泌や分泌後の再吸収のより詳細な分子機序は残された課題である。

(12) 細胞外浸透圧感受機構：チロシン脱リン酸化酵素の活性化と ENaC 遺伝子発現

新里直美, 宮崎裕明, 丸中良典 (京都府立医科大学大学院医学研究科生理機能制御学)

これまで我々は, 腎遠位尿細管上皮細胞のモデルである A6 細胞を用いて低浸透圧刺激がナトリウム再吸収を促進する制御機構について報告してきた。しかし, 細胞が如何に細胞外浸透圧変化を認識し, 細胞内にどのようなシグナルを伝達してナトリウム再吸収を促進するかについてはほとんど知られていない。そこで我々は, 低浸透圧刺激の細胞内シグナルとして, 調節性容積減少 (RVD) を介して減少することが知られている細胞内クロライド濃度 ($[Cl^-]_c$) に注目して研究を行ってきた。その結果, RVD を介して減少した $[Cl^-]_c$ はチロシン脱リン酸化酵素を活性化して基質の脱リン酸化を促進し, ENaC 遺伝子発現を増大することによりナトリウム再吸収を促進

していることが示唆された。さらに, この浸透圧刺激による ENaC 遺伝子発現を介したナトリウム再吸収促進は, $Na^+/K^+/2Cl^-$ cotransporter を人為的に活性化して細胞内クロライド濃度を増大することや RVD をクロライドチャネルブロッカーで阻害することにより顕著に抑制された。以上のことより, 浸透圧刺激感知メカニズムの 1 つとして細胞内クロライドの重要性がクローズアップされたと考えており, 細胞内シグナルとして重要なチロシンリン酸化を制御するチロシン脱リン酸化酵素の活性化や基質への親和性に細胞内クロライドの果たす新たな役割りが示唆された。

(13) 腎尿細管マクラデンサ細胞の ATP チャンネルと NaCl 検知シグナリング

岡田泰伸, Ravshan Z. Sabirov, 林 誠治, 森島 繁, Janos Peti-Peterdi, Jean-Yves Lapointe, P. Darwin Bell

(生理学研究所機能協関部門)

腎尿細管マクラデンサ（密集斑）細胞は、尿細管腔液の NaCl 濃度を検知して、そのシグナルを糸球体輸入細胞動脈平滑筋細胞やレニン分泌細胞に伝達する。ウサギより糸球体ごと単離したマクラデンサにパッチクランプ法を適用し、380pS という巨大な単一チャンネルコンダクタンスのアニオンチャンネルを見出した。このマキシアニオンチャンネルはアニオン型 ATP を透過させること、更には細胞外の NaCl 濃度増によって本チャンネル活性が刺激されることが明らかとなった。尿細管腔液 NaCl 増に反応して、事実マクラデンサ細胞の基底側壁膜から ATP が放

出され、この ATP が隣接するメザンギウム細胞の P2 レセプターを刺激することが、バイオセンサーATP 放出法や Fura2 法などによって明らかになった。2 光子レーザー法による 3 次元イメージング法によって、尿細管灌流液中の NaCl 濃度増に伴って、マクラデンサ細胞の膨張と、それに同期した輸入細胞動脈の収縮が観察されたので、マクラデンサの ATP 放出性マキシアニオンチャンネルの活性化には、マクラデンサ細胞膨張が関与している可能性が示唆された。

(14) Modulation of cAMP-regulated ciliary beat frequency by cell volume in rat bronchiolar ciliary cells during stimulation with an β_2 -adrenergic agonist

Takashi Nakahara (Department of Physiology, Osaka Medical College)

Ciliary beat frequency (CBF) of single rat bronchiolar ciliary cells were measured using video-optical microscopy. The rats were anesthetized by intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (60 - 70 mg/kg). Lungs were removed from animals, and then were treated with elastase at 37°C for 40 min and single bronchiolar ciliary cells were obtained. Terbutaline (a specifically selective β_2 -adrenergic agonist) increased CBF in a dose-dependent manner, and it also decreased volume of the bronchiolar ciliary cells. These terbutaline actions were inhibited by H-89 (10 μ M) and mimicked by forskolin (10 μ M), DBcAMP (500 μ M) or IBMX (1mM). Studies of ion channel blockers demonstrated that quinidine (500 μ M) induces cell swelling and amiloride (1 μ M) and bumetanide (20 μ M) induces cell shrinkage. Although cell volume changes did not affect CBF in unstimulated ciliary cells, cell swelling inhibited the CBF increase and cell shrinkage potentiated the CBF increase in

terbutaline-stimulated cells. The cell shrinkage shifted the terbutaline dose-response curve to the lower-concentration side. Moreover, cell swelling, which was induced by KCl solution containing amiloride (1 μ M) and strophanthidine (100 μ M), inhibited the CBF increase during terbutaline stimulation, however, the subsequent removal of either amiloride or bumetanide, which induced cell shrinkage, increased CBF gradually. Thus, the terbutaline-stimulated CBF increased with decreasing cell volume. These observations suggest that the cell shrinkage increases terbutaline-stimulated CBF, in contrast, the cell swelling decreases it. In conclusion, in rat bronchiolar ciliary cells, terbutaline increases CBF and also decreases cell volume mediated via cAMP accumulation. The cell shrinkage potentiates the CBF increase by increasing the cAMP sensitivity.

6. ATP・アデノシン受容体相互作用の解明

2003年8月28日－8月29日

代表・世話人：井上 和秀（国立医薬品食品衛生研究所）

所内対応者：井本 敬二（液性情報）

（1）脊髄内痛覚伝達系における ATP・アデノシン受容体の相互作用

中塚 映政¹, Gu Jianguo², 芳 力軍³, 藤田 亜美³, 熊本 栄一³, 吉村 恵¹

(¹九州大学大学院統合生理学, ²フロリダ大学脳研究所, ³佐賀医科大学神経生理学)

（2）海馬錐体細胞の興奮性制御における ATP およびアデノシン受容体のインタープレイ

川村 将仁¹, 加藤 総夫² (¹慈恵医大・薬理学第1, ²慈恵医大・神経生理)

（3）リゾリン脂質による ATP 分解酵素の活性化

松岡 功, 佐藤 薫*, 小野 委成, 木村 純子（福島医大・医・薬理, 麻酔*）

（4）P2Y2 受容体と TRPV1 の機能連関による熱性痛覚過敏

富永 真琴¹, 森山 朋子¹, 飯田 陶子¹, 小林 きみ子², 東 智広¹,
村山 奈美枝¹, 福岡 哲男², 井上 和秀^{3,4}, 野口光一²

(¹三重大・医・分子細胞生理, ²兵庫医大・解剖2, ³国立衛研・代謝生化学, ⁴九大院・薬)

（5）P2Y2受容体刺激により惹起されるアロディニア

檜 大介^{1,3}, 小泉 修一², 溝腰 朗人^{1,3}, 津田 誠¹, 重本一最上 由香里¹, 井上 和秀^{1,3}

(¹国立衛研・代謝生化学, ²国立衛研・薬理, ³九大院・薬・分子制御)

（6）ヒト表皮ケラチノサイトで惹起された Ca²⁺ wave は 細胞外 ATP 及び P2Y2 受容体を介して知覚神経に伝達される

藤下 加代子¹, 小泉 修一², 井上 かおり⁴, 最上一重本 ゆかり¹, 井上 和秀^{1,3}

(¹国立衛研・代謝生化学部, ²薬理部, ³九州大学・院・薬・分子制御, ⁴資生堂リサーチセンター)

（7）マウス網膜 P2X 受容体の免疫組織化学的検討

金田 誠¹, 石井 勝好², 森島 陽介³, 赤木 巧², 端川 勉², 中西 重忠³

(¹慶応大生理, ²理研・脳センター・神経構築, ³京大院・生体情報科学)

（8）視索上核における ATP 応答と P2X 受容体発現

上野 伸哉¹, 山田順子², 福田敦夫^{1,2}

(¹浜松医科大学生理第一, ²静岡大学大学院・電子科学研究科・生態情報処理講座)

（9）MNTB ニューロンにおける ATP γS による自発および誘発シナプス後電流に対する異なる制御

綿野智一^{1,2}, Richard J. Evans², Ian D. Forsythe²

(¹福島医大・医・薬理, ²Dept. of Cell Physiology & Pharmacology, Univ. of Leicester)

（10）ATP および ATP γS による monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) 産生調節に関する

脳切片培養系を用いた検討

片山 貴博, 伊藤 美聖, 南 雅文, 佐藤 公道（京大院・薬・生体機能解析学）

（11）培養ラット腸管壁内神経細胞の ATP による細胞内 Ca 増加反応の性質と

関与する受容体サブタイプの同定

太田 利男, 久保田 茜, 村上 真津香, 乙黒 兼一, 伊藤 茂男（北大・院・獣医・薬理）

（12）P2 受容体を介する脂肪細胞分化促進作用

尾松 万里子, 松浦 博（滋賀医大・第2生理）

(13) ATP 放出可視化による放出機構解析

古家 喜四夫¹, 秋田 久美¹, 柴田 あずみ², 曾我部 正博^{1,2} (¹科技団・細胞力覚, ²名大院・医)

(P 1) ユビキチン C 末端水解酵素 (UCH L1) による ATP 受容体の機能制御

真子 好正¹, 節家 理恵子^{1,2}, 櫻井 省花子^{1,2}, 和田 圭司², 野田 百美¹
(¹九大院・薬, ²国立精・神セ・神経研)

(P 2) P2Y 受容体を介した内皮細胞層透過性促進作用

田中 直子¹, 瀬占 奈美江¹, 窪田 洋子¹, 籠田 智美¹, 中村 一基¹,
高橋 幸一², 橋本 道男³, 国友 勝¹, 篠塚 和正¹
(武庫川女子大・薬・¹薬理, ²薬剤, ³島根医大・第一生理)

(P 3) PC12 細胞の ATP 産生能に及ぼすアデニル酸シクラーゼの P-サイト阻害剤の影響

藤森 廣幸, 芳生 秀光 (摂南大学 薬学部 衛生分析化学研究室)

(P 4) P2Y12 受容体を介するミクログリアのケモタキシスとインテグリンβ1 集積

多田 薫¹, 小泉 修一¹, 井上 和秀^{2,3} (国立衛研・¹薬理, ²代謝生化学, ³九大・院・分子制御)

(P 5) ミクログリアにおけるα7 ニコチン性アセチルコリン受容体発現と TLR4 および P2X₇ 受容体機能調節

鈴木 智久¹, 松原 明代¹, 松林 弘明², 酒井 規雄², 秀 和泉¹, 仲田 義啓¹
(広大・医歯薬総合 ¹薬効解析, ²神経・精神薬理)

(P 6) P2X₇ 受容体活性化による細胞死誘導機構の解析

月本 光俊, 原田 均, 五十里 彰, 高木 邦明 (静岡県立大・薬)

(P 7) 孤束核シナプス前 P2X 受容体活性化による高振幅 EPSC の発生

繁富 英治, 加藤 総夫

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

(P 8) シナプス前アデノシン受容体による孤束核シナプス伝達短期可塑性の修飾

津氏 典子, 繁富 英治, 加藤 総夫 (慈恵医大 神経生理)

(P 9) ラット冠循環におけるアデニンヌクレオチド代謝とこれにおよぼす虚血の影響

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

(P10) アストロサイトからの自発的 ATP による細胞内シグナル調節

小泉 修一¹, 宮竹 真由美², 藤下 加代子³, 井上 和秀^{3,4}
(国立衛研・¹薬理, ³代謝生化学, ²星薬科大学, ⁴九州大・院・分子制御)

【参加者名】

井上 和秀 (国立衛研・代謝生化学), 太田 利男 (北大・院・獣医・薬理), 岩永 ひろみ (北大医・解剖), 木村 純子, 松岡 功, 小野 委成, 綿野 智一 (福島医大・医・薬理), 佐藤 薫 (福島医大・医・麻酔), 熊坂 忠則 (福島医大・医・神経精神), 田村 誠司 (山之内製薬・薬理第一), 関澤 俊洋, 前本 琢也 (藤沢薬品), 金田 誠 (慶応大・生理), 川村 将仁 (慈恵医大・薬理1), 加藤 総夫, 津氏 典子, 繁富 英治, 池田 亮, 山崎 弘二 (慈恵医大・神経科学・神経生理), 中村 行宏 (東大神経生理), 小泉 修一, 藤下 加代子, 多田 薫 (国立衛研・代謝生化学), 篠崎 陽一, 戸崎 秀俊, 檜 慎 大介, 国房 恵巳子 (国立衛研・薬理/九大), 中田 裕康 (東京都神経研), 黒田 洋

一郎 (CREST), 野澤 良久, 江村 智博 (大鵬薬品・創薬センター), 中村 秀雄 (帝国臓器), 上野 伸哉 (浜松医科・生理), 月本 光俊, 原田 均 (静岡県立大・薬), 古家 喜四夫 (科技団・細胞力覚), 柴田 あずみ (名大), 須崎 尚 (名古屋学芸大), 小川 慎志, 我謝 徳一, 新庄 勝浩 (ファイザー), 富永 真琴 (三重大・医・分子細胞生理), 山下 勝幸, 杉岡 美保 (奈良医大・第一生理), 尾松 万里子 (滋賀医大・第2生理), 南 雅文, 片山 貴博 (京都大・薬・生体機能解析), 市川 純 (関西医大・第2生理), 藤森 廣幸 (摂南大学・薬学部), 桔梗 充博 (三菱ウェルファーマ), 篠塚 和正, 田中 直子, 瀬占 奈美江 (武庫川女子大・薬・薬理), 仲田 義啓, 秀 和泉, 鈴

木 智久, 松原 明代 (広大・医歯薬・薬効解析), 中塚 映政, 塩川 浩輝 (九州大学大学院統合生理学), 真子 好正, 佐藤 あゆみ (九州大・院・薬), 桂木 猛 (福岡大・医・

薬理), 清水 秀忠 (基生研), 根本 知己, 山肩 葉子, 杉山 俊彦, 井本 敬二 (生理研)

(1) 脊髄内痛覚伝達系における ATP・アデノシン受容体の相互作用

中塚 映政¹, Gu Jianguo², 芳 力軍³, 藤田 亜美³, 熊本 栄一³, 吉村 恵¹

(¹九州大学大学院統合生理学, ²フロリダ大学脳研究所, ³佐賀医科大学神経生理学)

末梢における感覚情報は一次求心性細胞を介して脊髄後角の二次ニューロンに入力され, 更に脊髄内上行路を経て高位中枢に伝達される。脊髄後角レベルでは様々な神経伝達物質によって末梢由来の感覚情報が修飾されることは知られているが, 近年, 脊髄内の ATP P2X 受容体およびアデノシン受容体が感覚情報を修飾することが明らかとなってきた。すなわち, ATP P2X 受容体作動薬の脊髄腔内投与によって行動学的に痛覚過敏が惹起されることや, アデノシンによって逆に鎮痛効果が得られることが報告された。今回, ATP およびアデノシン受容体の脊髄後角内作用機序の詳細を明らかにするため, 脊髄スライス標本を用いて脊髄後角細胞からパッチクランプ記録を行った。脊髄後角細胞は末梢からグルタミン酸作動性入力を受けているので, ATP およびアデノシン受容体のグルタミン酸作動性興奮性シナプス伝達に及ぼす作用を検討した。自発性のグルタミン酸作動性興奮性シナプス後電流に対して ATP(100 μ M) を灌流投与すると, その発生頻度は最初の短期間において増強して, その後に引き続いて比較的長期間に減弱するという二相性の変化を

示した。代謝安定型の P2X 受容体作動薬である α,β -methylene ATP(100 μ M) によって, 微小興奮性シナプス後電流の発生頻度は著明に増強したことから, ATP 投与によって観察された最初の増強効果は ATP P2X 受容体のシナプス前性機構を介するグルタミン酸の遊離促進作用であることが明らかとなった。一方, アデノシン(100 μ M) あるいはアデノシンA1受容体作動薬 CPA(1 μ M) によって, 微小興奮性シナプス後電流の発生頻度は逆に減弱したことから, ATP 投与によって観察された後続の抑制効果は代謝されたアデノシンがシナプス前末端に発現するアデノシン A1受容体に作用し, グルタミン酸の遊離を抑制することに起因していると考えられる。従って, 脊髄内において細胞外ATPは直接的にシナプス前のP2X受容体に作用するだけでなく, アデノシンに代謝されてシナプス前のA1受容体に作用し, P2X受容体と逆の効果をもたらした。以上の結果より, 脊髄痛覚伝達系における ATP の作用は経時的な要素を有する多彩な影響を及ぼすものと推察された。

(2) 海馬錐体細胞の興奮性制御における ATP およびアデノシン受容体のインタープレイ

川村 将仁¹, 加藤 総夫² (¹慈恵医大・薬理学第1, ²慈恵医大・神経生理)

細胞外に放出されたメッセンジャー分子が特異的受容体を活性化させるのみならず, 特異的酵素系によって細胞外で代謝を受けた後, その代謝産物がさらにその特異的受容体を活性化させる, という系は, 現在までに ATP-アデノシン系においてのみしか知られておらず, これは他の系では見られない細胞外 ATP によるシグナリングのユニークな特性であると考えられる (Kato & Shigetomi,

J. Physiol. 530:469-, 2001)。

海馬は各種 ATP 受容体, アデノシン受容体ならびに ATP からアデノシンへの細胞外変換酵素系の豊富な発現を示しているため, このような制御系の生理的意義を検討する上で適した脳領域である。しかし, 現在までの分散培養ならびに急性単離標本を用いたこれら受容体の活性化に関する知見はもっぱら ATP もしくはアデノシン

受容体への効果を記述したものであり、このような ATP-アデノシンのインタープレイを解明するにはニューロンおよびグリア細胞の細胞構築が維持されている急性スライスもしくは *in vivo* 標本を用いて検討することが必須である。事実、海馬において、ATP からアデノシンへの細胞外変換酵素系は大部分グリア細胞に発現しており、また、現在までに報告されている海馬スライスでの ATP の効果はほとんどがアデノシン受容体を介したものである。

このような ATP-アデノシン系のインタープレイの実体を解明するため、幼若ラット海馬冠状断スライス標本 CA3 錐体細胞から、興奮性および抑制性のシナプス入力をパッチクランプ法により同時記録し、ATP およびプリン受容体作動薬の作用を検討した。ATP は IPSC の頻度を増加させ、かつ EPSC の頻度を減少させた。この 2 つ

の相反する作用は、記録された錐体細胞 22 例全例で同時に観察された。薬理的検索によって、IPSC の頻度増加は 2meSATP で強く活性化され PPADS で遮断される P2X 受容体を、また、EPSC の頻度減少は DPCPX で遮断されるアデノシン A₁ 受容体の活性化を介していることが示された。

以上の結果は、細胞外 ATP が (1) P2X 受容体の活性化を介した抑制性入力が増加、および、(2) アデノシンへの加水分解を経たのちのアデノシン A₁ 受容体の活性化を介した興奮性入力の減少という 2 つの異なる効果を同時に引き起こし得ることを示す。興味深いことに、これらの効果はいずれも錐体細胞の興奮性を低下させる。ATP は 1 つの分子でありながら、ATP 受容体とアデノシン受容体をそれぞれ合目的に活性化し、神経ネットワークの興奮性を協働的に制御し得ると考えられる。

(3) リゾリン脂質による ATP 分解酵素の活性化

松岡 功, 佐藤 薫*, 小野 委成, 木村 純子 (福島医大・医・薬理, 麻醉*)

細胞外の ATP 代謝に関わる *ecto-nucleotidase* は、P2 受容体の刺激作用を終結させるだけでなく、細胞膜局所における迅速なアデノシン産生をもたらす、アデノシン受容体を介する作用への情報変換に重要な役割を果たしている。最近、炎症や虚血病変において *ecto-nucleotidase* 活性の変化を示す成績が報告されている。また、血小板や内皮細胞から放出される ATP や ADP の分解が障害されると循環器系障害の原因になることも明らかにされている。しかし、どのような機序で ATP 代謝酵素の機能変化が生じるかは知られていない。我々は、摘出ラット心臓の Langendorff 標本において、虚血にした心臓の再灌流液中に *ecto-nucleotidase* が逸脱することを見出した。虚血心ではリン脂質代謝が異常に亢進し、大量のリゾリン脂質などの脂質メディエーターが産生される。そこで、本研究では *ecto-nucleotidase* 活性におよぼすリゾリン脂質の作用を検討した。培養ヒト血管内皮細胞およびモット単離心筋細胞における ATP 分解活性は、リゾホスファチジルコリン (LPC) により濃度依存的に増大した。この LPC による ATP 分解活性の亢進は、界面活性剤と

して細胞膜透過性を亢進させる LPC の作用より低濃度で認められた。また、ATP の分解活性に比べ、AMP の分解活性への影響は小さかった。LPC の ATP 分解活性亢進作用は *ecto-nucleotide triphosphate diphosphohydrolase 1* (E-NTPDase 1, *ecto-apyrase*) を発現させた HEK293 細胞でも再現された。この細胞を用いて側鎖の脂肪酸が異なる種々の LPC の作用を検討した結果、デカノイン酸 (C10) では作用がなくミリスチン酸 (C14) より長鎖の脂肪酸を持つことが E-NTPDase 1 の活性化に必要であった。また、他のリン脂質ではリゾホスファチジルセリン、リゾホスファチジルイノシトールには作用が認められたが、リゾホスファチジン酸、スフィンゴシン-1-リン酸は無効であった。さらに、LPC を処理した細胞では酵素活性が反応液中に遊離し、LPC を洗浄した後では細胞の *ecto-NTPDase 1* 活性が低下していた。以上の結果から、虚血心で認められた ATP 分解酵素の遊離は心臓内で産生されるリゾリン脂質により媒介される可能性が示唆された。

(4) P2Y2受容体とTRPV1の機能連関による熱性痛覚過敏

富永 真琴¹, 森山 朋子¹, 飯田 陶子¹, 小林 きみ子², 東 智広¹,
村山 奈美枝¹, 福岡 哲男², 井上 和秀^{3,4}, 野 口光一²

(¹三重大・医・分子細胞生理, ²兵庫医大・解剖2, ³国立衛研・代謝生化学, ⁴九大院・薬)

以前, 本研究会で, HEK293細胞に発現したカプサイシン受容体 TRPV1が細胞外 ATP によって P2Y1受容体活性化から PKC を介して機能制御されることを報告した。さらに詳細な検討を行った。まず, 生化学的な手法によって TRPV1が直接 PKC によってリン酸化されることを証明した。点変異体を用いた電気生理学的機能解析から, TRPV1の細胞内ドメインの PKC によってリン酸化される2つのセリン残基を同定した。これらのセリン残基をアラニンに置換した変異体では, ATP による TRPV1のカプサイシン活性化電流の増大がみられないのみならず, 野生型では観察される活性化温度閾値の低下も認められなかった。このメカニズムの重要性を個体レベルで検証するために, ATP 投与による熱性痛覚過敏をマウスで観察した。野生型マウスでは, ATP の足底投与によって著しい熱性痛覚過敏が認められたが, TRPV1欠損マウスでは, そのような痛覚過敏は全くみられなかった。個体レベルにおいて, ATP と TRPV1の機能連関が明らかになった。

驚くべきことに, P2Y1欠損マウスでも野生型と同様の痛覚過敏が観察され, マウスにおいては P2Y1受容体が関与しないことが分かった。そこで, マウスの後根神経節細胞を用いたパッチクランプ法による電流解析を行うと, 薬理学的な検討から, P2Y2受容体が関与することが示唆された。マウス後根神経節における TRPV1, P2Y1, P2Y2 の mRNA 発現を検討したところ, TRPV1と P2Y2の mRNA の共発現が明らかになり, 後根神経節細胞を用いた機能解析を支持する結果が得られた。P2Y2受容体は UTP にも感受性があることが知られている。そこで, UTP を用いて行動実験を行うと, 野生型マウスにおいて ATP と同様の熱性痛覚過敏が惹起されることが明らかになった。以上の検討から, マウスにおいては, 傷害時に細胞外に放出される ATP, UTP によって P2Y2受容体が活性化され, PKC を介した TRPV1のリン酸化が熱性痛覚過敏を引き起こすものと結論された。

(5) P2Y2受容体刺激により惹起されるアロディニア

檜 大介^{1,3}, 小泉 修一², 溝腰 朗人^{1,3}, 津田 誠¹, 重本一最上 由香里¹, 井上 和秀^{1,3}

(¹国立衛研・代謝生化学, ²国立衛研・薬理, ³九大院・薬・分子制御)

ATPは知覚神経においてイオンチャネル内蔵型P2X受容体を介して, 痛覚伝達に関与している。実際, ATPやP2X受容体アゴニスト α,β -methylene ATP ($\alpha\beta$ meATP)をラットの足底部に投与すると, 様々な疼痛反応が観察される。我々は以前, $\alpha\beta$ meATP刺激が, 中型でカプサイシン非感受性DRG神経に存在するP2X2/3受容体を介して, 触刺激に対する過敏応答“機械的アロディニア”を誘発することを明らかにした(J. Neurosci., 20, RC90, 2000)。しかし, 後根神経節(DRG)には様々なサブタイプのGタンパク共役型P2Y受容体も発現・機能しており, これらP2Y受容体が知覚・痛覚伝達系で担う役割の解明が待たれている。本研究で我々は, DRGのP2Y受容体に注目

し, その薬理学的特徴及び痛覚伝達との関係について詳細な研究を行った。まず Ca^{2+} イメージング(fura-2法)により, 多くの小型かつカプサイシン感受性DRG神経にUTP感受性P2Y2受容体が発現している事を明らかにした。P2Y2受容体アゴニストであるUTPを足底部に投与すると, 濃度依存的にアロディニアが誘発され, これはP2受容体の拮抗薬, さらにP2Y2受容体のアンチセンスオリゴヌクレオチドでP2Y2受容体をノックダウンすることにより消失した。UTPにより引き起こされるアロディニアは $\alpha\beta$ meATPにより誘発されるそれよりも長時間持続した。 $\alpha\beta$ meATPと異なり, UTPにより惹起されるアロディニアはカプサイシン感受性神経を破壊したラッ

トでは観察されなかった。またカプサイシン受容体アンタゴニストであるカプサゼピンは、UTP 誘発アロディニアには影響しなかった。以上、小型でカプサイシン感受性の DRG 神経には P2Y2 受容体が発現・機能しているこ

と、またこの P2Y2 受容体刺激によりカプサイシン受容体非依存的なメカニズムでアロディニアが誘発されることが示唆された。

(6) ヒト表皮ケラチノサイトで惹起された Ca^{2+} wave は細胞外 ATP 及び P2Y2 受容体を介して知覚神経に伝達される

藤下 加代子¹, 小泉 修一², 井上 かおり⁴, 最上-重本 ゆかり¹, 井上 和秀^{1,3}

(¹国立衛研・代謝生化学部, ²薬理部, ³九州大学・院・薬・分子制御, ⁴資生堂リサーチセンター)

皮膚は、身体の広い範囲を占めており、乾燥、化学物質、侵害性熱刺激、UV 照射などの有害な環境因子に常に曝されているだけでなく、損傷や炎症性疾患、アレルギー反応などにより ATP, bradykinin, histamine といった様々な物質から影響を受ける組織である。皮膚はそれらの刺激に対する様々なセンサーを発現しており、それを介して細胞内 Ca^{2+} 濃度を変化させる。 Ca^{2+} は皮膚の最外部にあたる表皮の恒常性維持に重要であり、表皮角化細胞の増殖と分化のバランスを制御している。ATP は数多くの細胞において、細胞間情報伝達物質として機能することは良く知られている。今回、我々は正常ヒト表皮角化細胞 (Normal Human Epidermal Keratinocytes: NHEKs) の単一培養系及び、マウス後根神経節 (DRG) 神経細胞との共培養系を用いて、細胞外 ATP により媒介される Ca^{2+} wave の伝播について検討を行なった。薬理的解析の結果、NHEKs は機能的な代謝型 P2Y2 受容体を発現するこ

とが明らかとなった。単一の NHEK をガラスピペットで刺激すると、被刺激細胞で細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の上昇が見られ、続いて細胞外 ATP 依存的に周囲の NHEKs へ Ca^{2+} wave の伝播が確認された。Luciferin-luciferase 法に基づく ATP イメージング解析により、NHEKs から刺激依存的な ATP の放出及び拡散が観察された。DRG 神経細胞は、表皮の基底細胞層にその末端を延ばしていることが知られている。NHEKs と DRG 神経細胞の共培養系においても、NHEKs で機械刺激により惹起された Ca^{2+} wave が、細胞外 ATP 及び P2Y2 受容体依存的に、隣接する DRG 神経細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を上昇させた。このことから、細胞外 ATP は NHEKs において細胞間 Ca^{2+} wave を形成する主要な情報伝達物質となっているだけでなく、皮膚と知覚神経の間でも、ダイナミックなクロストークを形成するシグナル伝達物質として機能している可能性が示唆された。

(7) マウス網膜 P2X 受容体の免疫組織化学的検討

金田 誠¹, 石井 勝好², 森島 陽介³, 赤木 巧², 端川 勉², 中西 重忠³

(¹慶応大生理, ²理研・脳センター・神経構築, ³京大院・生体情報科学)

細胞外 ATP は網膜神経伝達物質の候補と考えられている。網膜内には P2X 受容体遺伝子が発現しており、外来性に投与した ATP が ACh の放出を抑制することが報告されている。ACh の放出の抑制は薬理的実験から P2X 受容体を介して起こると考えられているが、どのサブタイプが関与しているのかは不明である。これは網膜における P2X 受容体の分布について体系的に検討されて

いないことが大きな原因となっている。本研究では、マウス網膜の P2X1, P2X2, P2X4, P2X7 受容体の分布について免疫組織化学的手法を用いて検討した。また同時にコリン作動性ニューロンに存在する P2X 受容体のサブタイプに注目してそのシナプス部位における局在を immunotoxin-mediated cell targeting technology (IMCT) を用いて検討した。P2X1 受容体は内顆粒層と内網状層の境

界部付近に点状に分布する陽性所見が観察された。P2X2受容体は一部のアムクリン細胞の細胞体と内網状層のサブミナ a で強い免疫反応陽性像が観察された。P2X4受容体は、神経節細胞層で強い免疫反応陽性像が観察された。P2X7受容体は内顆粒層と神経節細胞層の細胞体で陽性所見が観察され、内顆粒層の陽性細胞は硝子体側と強膜側に存在していた。P2X2の免疫反応はコリン作動性ニューロンのマーカーである ChAT の免疫反応と一致した。また P2X2の免疫反応はコリン作動性ニューロンに GFP

シグナルを発現する transgenic mouse においても一致した。Transgenic mouse に IMCT を用いてコリン作動性ニューロンを選択的に細胞死させると、GFP シグナルが消失した領域のみで P2X2の免疫反応が消失した。このことから P2X2の免疫反応は starburst アムクリン細胞の樹状突起上に選択的に発現しているものと考えられる。以上の結果から、P2X2受容体はマウス網膜の OFF 経路の信号伝達に関与していることが示唆された。

(8) 視索上核における ATP 応答と P2X 受容体発現

上野 伸哉¹, 山田順子², 福田敦夫^{1,2}

(¹浜松医科大学生理第一, ²静岡大学大学院・電子科学研究科・生態情報処理講座)

視索上核は、オキシトシン、バゾプレッシンを下垂体後葉において分泌する神経分泌細胞である。我々は生後16-23日の雄性ラットを用い、視索上核の神経細胞に、スライスパッチ法を適用し、ATP 投与による反応を記録した。電流固定化において、ATP 投与による脱分極および、活動電位の発生が観察され、投与後には自発発火頻度の低下が観察された。また、電位固定化(保持電位-50mV)において、ATP 投与によって内向き電流のみならず、投与後に外向き電流成分が観察された。この内向き電流成分は PPADS によって抑制された。ATP 1 mM 存在下での電圧-電流曲線は、内向き整流作用が見られた。スライス

パッチで観察された電流はすべて、遅い不活性化過程を持つものであり、機械的単離によって観察された早い不活性化過程を持つものは見られなかった。また、 $\alpha\beta$ methylen ATP 投与によっても内向き電流を惹起したがそのピーク値は ATP 投与による値の10-20%であった。ATP に反応を示した細胞体および、電極内液を回収し、single cell RT-PCR を行い、mRNA レベルでの発現を観察した。P2X2サブタイプが、主に検出された。視索上核神経細胞体において、P2X2サブタイプを主体とする P2X 受容体が機能していることが示唆された。

(9) MNTB ニューロンにおける ATP γ S による自発および誘発シナプス後電流に対する異なる制御

綿野智一^{1,2}, Richard J. Evans², Ian D. Forsythe²

(¹福島医大・医・薬理, ²Dept. of Cell Physiology & Pharmacology, Univ. of Leicester)

Medial nucleus of the trapezoid body (MNTB) は脳幹において音源定位に関わる聴覚中継に重要な働きをしている神経である。我々は MNTB ニューロンにおいて、プリン受容体がどのような働きをしているかを明らかにするため、各種プリン受容体アゴニストの自発シナプス後電流(sPSC), 誘発シナプス後電流(ePSC) に対する作用を検討した。9-14日齢の Lister-hooded ラット脳幹より170-200 μ m のスライスを作成し、ホールセルパッチクランプ法

により電流を記録した。MNTB ニューロンでは興奮性(sEPSC) および抑制性(sIPSC) 自発シナプス後電流が観察されるが、P2受容体アゴニストで比較的分解されにくいとされている ATP γ S および P2X1,3,6受容体の選択的アゴニストである α,β -me-ATP は sEPSC および sIPSC の頻度を増加させ、P2X1,6受容体の選択的アゴニストである l- β,γ -me-ATP は sIPSC のみを増加させた。P1受容体アゴニストの adenosine, P2Y 受容体アゴニストの ADP, UTP,

UDP は電流の頻度を変化させなかった。また sEPSC に対する作用のみが TTX により消失したことより、神経終末および細胞体の異なる P2X 受容体が sPSC を制御していると考えられた。また MNTB ニューロンでは、2極性の白金電極を用いてスライスを刺激すると3種類の ePSC, すなわち calyx of Held という巨大シナプス神経終末を介する giant eEPSC, このシナプスを介さない eEPSC および eIPSC が観察される。ATP γ S はこれらの誘発電流の電流値を抑制した。ATP, ADP も同様に抑制作用を示したが、 α,β -me-ATP および UTP, UDP は電流値を変化さ

せなかった。adenosine が同様の抑制作用を示し、A1受容体アンタゴニストである DPCPX (10 nM) および ecto-ATPase 阻害薬の ARL67156 (50 μ M) が ATP γ S の抑制作用を消失させた。これらのことより、これらの P2アゴニストの誘発シナプス後電流抑制作用は自発的シナプス後電流に対する制御と異なり adenosine A1 受容体を介するものであると考えられた。しかし ATP γ S の作用は、直接 adenosine に分解されるためなのか、グリアあるいは神経などからの ATP の遊離を介するものであるかは明らかになっておらず今後の検討課題である。

(10) ATP および ATP γ S による monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) 産生調節に関する脳切片培養系を用いた検討

片山 貴博, 伊藤 美聖, 南 雅文, 佐藤 公道 (京大院・薬・生体機能解析学)

脳組織切片培養系は、細胞構築や個々の細胞の活性化状態が分散培養系と比較してより in vivo に近い状態にあるため、活性化状態の違いが細胞の反応性を大きく左右するグリア細胞の研究に非常に有用であると考えられる。本研究では、ATP およびその非水解性アナログ ATP γ S の MCP-1 の産生・遊離に対する効果について、この脳切片培養系を用いて検討を行った。

生後 2-3 日齢ラットの大脳皮質一線条体領域から冠状切片 (300 μ M 厚) を作製し、10-11 日間静置界面培養後、実験に用いた。組織切片中の MCP-1 は抗 MCP-1 抗体を用いた免疫染色法を用いて検討し、培地中に遊離した MCP-1 量は ELISA 法により測定した。

ATP あるいは ATP γ S 処置により、濃度依存的な培地中への MCP-1 の遊離が観察された。その産生のタイムコースは、ATP あるいは ATP γ S (ともに 300 μ M) 3 時間処置により、処置開始後 1 時間で既に観察され、処置開始後 3-4 時間をピークとする一過性のものであった。また、その主な産生細胞はアストロサイトであった。この

ATP による MCP-1 産生・遊離は、プリン受容体拮抗薬 suramin あるいは PPADS (ともに 300 μ M) どちらによっても、部分的に抑制された。一方で、ATP γ S による MCP-1 産生・遊離に対しては、suramin は全く影響を与えず、逆に PPADS はほぼ完全な抑制効果を示した。MAP キナーゼ阻害薬の効果を検討したところ、ATP あるいは ATP γ S による MCP-1 の産生・遊離は、ともに MEK 阻害薬 PD 98059 および JNK 阻害薬 SP600125 により部分的に抑制され、反対に p38 MAP キナーゼ阻害薬 SB 230580 によって増強された。

以上の結果より、脳組織切片培養系において ATP あるいは ATP γ S は、アストロサイトでの MCP-1 の産生・遊離を惹起することが明らかにされた。また、この ATP あるいは ATP γ S による MCP-1 産生誘導に関して、少なくとも一部には異なるサブタイプのプリン受容体が関与していること、また両処置ともに ERK および JNK キナーゼは促進的に、逆に p38MAP キナーゼは抑制的にそれぞれ関与していることが示唆される。

(11) 培養ラット腸管壁内神経細胞の ATP による細胞内 Ca 増加反応の性質と 関与する受容体サブタイプの同定

太田 利男, 久保田 茜, 村上 真津香, 乙黒 兼一, 伊藤 茂男 (北大・院・獣医・薬理)

ATP は腸管壁内神経において速い興奮性シナプス後電位を形成する神経伝達物質の一つであることが知られている。本研究では初代培養ラット腸管壁内神経細胞を用いて, ATP による細胞内 Ca 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) を fura-2 レシオ画像解析法により測定し, $[Ca^{2+}]_i$ 増加反応の性質及び関与する受容体サブタイプを P_2 受容体活性化薬や遮断薬による薬理的検討, パッチクランプによる電流測定, RT-PCR による遺伝子検出及び免疫染色による蛋白検出により同定した。Fura-2 を負荷した細胞において高濃度 K 及びニコチンによる $[Ca^{2+}]_i$ 増加は神経特異蛋白 PGP9.5 抗体陽性細胞のみで生じたことから, 本実験では両反応が生じる細胞を神経細胞として機能的に同定した。

ATP は壁内神経細胞において濃度依存性 (0.3 ~ 100 μ M) に $[Ca^{2+}]_i$ 増加反応を引き起こした。この反応は外液 Ca^{2+} 除去により大きく抑制した。ATP による $[Ca^{2+}]_i$ 増加反応は電位依存性 Ca チャネル遮断薬の Nifedipine, ω -Conotoxin GVIA, ω -Agatoxin VIA 存在下で 55% 抑制された。Whole-cell voltage-clamp した細胞において, ATP

は外液 Na 存在下で逆転電位が 0mV の不活化の遅い内向き電流を引き起こした。 P_2 受容体遮断薬の Suramin 及び PPADS は ATP による $[Ca^{2+}]_i$ 増加及び内向き電流反応を可逆的に抑制した。 P_2 受容体活性化薬を同一細胞に適用した結果, $[Ca^{2+}]_i$ 増加の力価順は $ATP \geq ATP\gamma S > CTP \geq 2MeSATP > BzATP$ (α, β -MeATP は無効) であった。ATP による内向き電流は低濃度 (0.2 ~ 200 μ M) の Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} により増強された。また, ATP 電流は pH6.6 では約 3 倍に増大し, 逆に pH8 では約 30% に減少した。RT-PCR によりラット腸管壁内神経細胞に $P2X_2$, $P2X_4$, $P2X_5$ の mRNA が検出された。抗 $P2X_4$ 抗体による免疫染色で陽性細胞が検出され, この細胞での P_2 活性化薬の力価順も上記と一致した。

本実験により培養ラット腸管壁内神経細胞において ATP による $[Ca^{2+}]_i$ 増加反応は主に外液 Ca 依存性の $P2X$ を介して生じていること, 更にそのサブタイプは $P2X_4$ であることが示唆された。

(12) $P2$ 受容体を介する脂肪細胞分化促進作用

尾松 万里子, 松浦 博 (滋賀医大・第2生理)

マウス胎児由来前駆脂肪細胞 3T3-L1 は, 脂肪細胞分化のモデルとして最もよく研究されている培養株細胞の一つである。3T3-L1 細胞が終末分化に移行するためには細胞周期が G_0/G_1 で停止することが必要であり, 通常の培養実験では細胞をコンフルエントになるまで培養し, 接触障害により細胞周期を停止した後, dexamethasone, 1-methyl-3-isoxanthine 及び insulin を分化誘導因子として加えることによって成熟脂肪細胞に分化させる方法が最も標準的な手法として用いられている。コンフルエントに達していない細胞では分化誘導因子を加えても効果がないことは古くから知られていたが, 低密度の状態でも薬剤によって細胞周期を停止させると分化誘導可能であるという報告があることから, 細胞周期が G_0/G_1 で停止

することが重要であると考えられている。

我々は, 未分化 3T3-L1 細胞における細胞骨格と細胞運動について調べたところ, 増殖中の細胞にはアクチンストレスファイバーが発達しているが, コンフルエントに達するとストレスファイバーは消失し, 細胞膜近辺にアクチンが集積すること, 増殖中の細胞において細胞外 ATP はストレスファイバーを壊して細胞膜周辺に特異的にアクチンを再構築し, ラッフリングや糸状仮足による著しい細胞形態の変化を引き起こすこと, 及び, 約 30% の低い細胞密度の細胞に ATP を与えてインキュベーションした後に分化誘導因子を加えると, 増殖を続けながら成熟脂肪細胞に分化すること, を見出した。これらの効果は $P2$ 受容体阻害剤スラミン及び細胞骨格制御に関

与する低分子量 G 蛋白 Rho kinase 阻害剤 Y27632によって阻害された。これらのことから、脂肪細胞における P2

受容体の分化促進作用について検討する。

(13) ATP 放出可視化による放出機構解析

古家 喜四夫¹, 秋田 久美¹, 柴田 あずみ², 曾我部 正博^{1,2} (¹科技団・細胞力覚, ²名大院・医)

普遍的な細胞内情報伝達物質として働く細胞内カルシウムと内外立場は異なるが、細胞外 ATP は普遍的な細胞外情報伝達物質として働いていると考えられる。実際、その受容体は代謝型及びイオンチャネル型とも数多く同定され、ほとんどの細胞で発現しており、様々な機能を果たしていることが明らかになってきた。しかし ATP シグナルの発生源である ATP 放出経路に関してはまだほとんど明らかではなく、現在、開口放出、イオンチャネル、トランスポーターなどの可能性がいくつかの細胞で指摘されている。乳腺細胞は種々の機械刺激による ATP 放出と周りの細胞での ATP 受容体活性化が生理機能に深く関わっていることを私たちは明らかにしてきた。こ

の細胞での ATP 放出機序を明らかにすべく、Luciferin-Luciferase (L-L) を用いた放出 ATP の定量、薬理学的処理などを行った。その結果、ATP 放出は機械刺激による一過性の放出以外に細胞外カルシウム-free 溶液灌流によって持続的な放出がみられ、また刺激を加えなくとも自発的に放出しており、それらに少なくとも2種以上の異なった ATP 放出経路が関与していることが示唆された。L-L を用いた放出 ATP のイメージング等最新の結果からその経路について議論する。ATP 放出経路はいわばカルシウムシグナリングにおけるカルシウムチャンネルに相当しており、その機序は重要であり、多種類の経路の存在は不思議ではないと考えられる。

(P1) ユビキチン C 末端水解酵素 (UCH L1) による ATP 受容体の機能制御

真子 好正¹, 節家 理恵子^{1,2}, 櫻井 省花子^{1,2}, 和田 圭司², 野田 百美¹
(¹九大院・薬, ²国立精・神セ・神経研)

UCH L1はエネルギー依存的なタンパク質分解系であるユビキチン-プロテアソームシステムに含まれる脱ユビキチン化酵素の一つであり、哺乳類においては神経細胞と精巣に特異的に発現する。UCH L1の生理作用としてユビキチン C 末端低分子残基の水解やポリユビキチン鎖切断によるユビキチンモノマーの供給が想定されており、ユビキチンプールサイズを保つ重要な因子であると考えられている。タンパク質の脱ユビキチン化はタンパク質分解の素過程として重要であり、脱ユビキチン化酵素の異常による脳機能障害もいくつか報告されている。我々は世界に先駆けて gad (gracile axonal dystrophy) マウスが UCH L1の機能喪失を有する神経変性モデルであることを示し神経細胞においてユビキチンレベルが低下していることを見いだした。アメフラシにおいては UCH L1と相同性の高い UCH が学習と記憶に重要であることが報

告されているが、哺乳類での神経回路機能における UCH L1の役割はいまだ解明されていない。そこで、本研究では神経伝達における UCH L1の作用について検討することにした。今回、神経伝達物質受容体のうち、神経細胞も含めて幅広く分布した発現を示し神経伝達物質の分泌制御にも関わる ATP 受容体について検討することにした。ATP 受容体のうち P2X 受容体チャンネルの開孔による ATP 誘導性の内向き電流を、mock, UCH L1あるいは mutant UCH L1の cDNA をトランスフェクションした PC12 Tet-Off 細胞を用い、ホールセル・パッチクランプ法で測定したところ、UCH L1は ATP 誘導性の内向き電流を有意に増強することを見いだした。この UCH L1による増強効果は PKA, CaMKII に依存していたが、その他のプロテインキナーゼには依存しなかった。さらに、PC12 Tet-Off 細胞にドーパミンにより制御されるリン酸

化蛋白 DARPP-32が発現していることを定量的 RT-PCR により確認し、DARPP-32のリン酸化と PKA, CDK5の制御がどのようにP2X受容体反応に影響するかを検討した。今回、我々が得た結果は、UCH L1が ATP 受容体に対し

て PKA, CaMKII, DARPP-32を介して調節的な役割を果たしていることを示唆しており、神経伝達における UCH L1の機能解明につながるものと期待される。

(P2) P2Y 受容体を介した内皮細胞層透過性促進作用

田中 直子¹, 棚占 奈美江¹, 窪田 洋子¹, 籠田 智美¹, 中村 一基¹,
高橋 幸一², 橋本 道男³, 国友 勝¹, 篠塚 和正¹
(武庫川女子大・薬・¹薬理, ²薬剤, ³島根医大・第一生理)

【目的】我々は、低浸透圧状態で増大した血管内皮細胞容積の修復機構（調節性体積減少機構：RVD）に対し、内因性の ATP が促進的に関与すること、さらに等浸透圧状態下においても、ATP が P2Y 受容体を介して細胞面積減少作用を有することを報告してきた¹⁾。今回は、ATP の生理的役割を更に明らかにするために、細胞面積減少作用と細胞層透過性との関連性について検討した。

【方法】実験標本にはラット尾動脈初代培養内皮細胞を用い、細胞内カルシウムレベル ($[Ca^{2+}]_i$) は Calcium Green-1-AM を指示薬として共焦点レーザー顕微鏡・画像解析装置を用いて測定、細胞容積は顕微鏡画像より得られた細胞面積を NIH Image で数値化してその指標とした。細胞層の透過性は、内皮細胞層を透過した FITC-labeled dextran (FD-4) 量を指標として検討した。さらに、ラット尾部灌流標本を用いて、尾部表層へ透過した FD-4 を共焦点レーザー顕微鏡にて測定した。

【結果】1) 2meS-ATP と ADP、さらに UTP は細胞面積を

有意に減少させるとともに、 $[Ca^{2+}]_i$ を有意に上昇させた。2) 2meS-ATP による細胞面積の減少および $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は P2Y 受容体拮抗薬である PPADS, PLC 阻害薬の U-73122 および細胞内 Ca^{2+} ストア枯渇薬の thapsigargin により抑制された。3) 2meS-ATP は内皮細胞層を透過する FD-4 量を有意に増加させるとともに、この増加作用は PPADS によって抑制された。4) ラット尾部灌流標本においても同様に、2meS-ATP は尾部表層に透過する FD-4 量を有意に増加させた。またこの増加作用は PPADS によって抑制された。

【考察】血管内皮細胞において、ATP は生理的条件下においても細胞面積調節作用を示し、その作用には P2Y 受容体を介した $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が関与していること、さらにこのような細胞面積減少作用は、内皮細胞層における物質透過性に促進的に関与することが示唆された。

(1) *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 28, 799-803, 2001.

(2) *Life Sci.* 72 1445-1453, 2003

(P3) PC12 細胞の ATP 産生能に及ぼすアデニル酸シクラーゼの P-サイト阻害剤の影響

藤森 廣幸, 芳生 秀光 (摂南大学 薬学部 衛生分析化学研究室)

細胞外の adenine 化合物の生理的意義解明の一端として、ラット褐色細胞腫由来 PC12 細胞に adenosine (Ado) を加えると、Ado kinase ではなく hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase による Ado の salvage 系を介して細胞内の ATP の産生を促進する可能性のあることを報告した。一方、Ado は弱いながらもアデニル酸シクラーゼの細胞質側に存在する P-サイトを介して cAMP の産生

を阻害することが知られている。今回は、アデニル酸シクラーゼの P-サイト阻害剤のうち膜透過性の高いと推定される、deoxyAdo, 2',5'-dideoxyAdo (DDA) 等の PC12 細胞の ATP 産生能に及ぼす影響を検討した。

Locke's 液に溶かした DDA 等の化合物を PC12 細胞に加え、一定時間後、細胞内の酸可溶性物質を抽出した。酸可溶性画分中の adenin 類は標識試薬 chloroacetaldehyde

で蛍光化した後、陰イオン交換樹脂を用いる HPLC 法により測定した。

PC12細胞に deoxyAdo あるいは DDA を加えると、細胞内の ATP 含量は有意に増加した。次に、deoxyAdo あるいは DDA と Ado 同時に加えると、細胞内の ATP 含量

は各々単独の場合より増加した。P-サイト阻害剤ではない MethylAdo を細胞に加えても、このような影響は認められなかった。以上の結果より、deoxyAdo と DDA は Ado の salvage 系以外の pathway を介して PC12細胞の細胞内 ATP 含量に影響を及ぼすことが示唆された。

(P4) P2Y₁₂受容体を介するミクログリアのケモタキシスとインテグリンβ1集積

多田 薫¹, 小泉 修一¹, 井上 和秀^{2,3} (国立衛研・¹薬理, ²代謝生化学, ³九大・院・分子制御)

【目的】ミクログリアは中枢神経系に特化した免疫担当細胞として知られ、その神経保護作用と過剰な活性化による神経ダメージの二面性が注目を浴びている。近年、ATP と ADP が Gi/o-coupled P2Y 受容体を介し、ミクログリアの遊走誘導分子 (chemoattractant) として機能していることが判明した (Honda et.al. 2001)。細胞は移動する際に、インテグリンなど接着分子を制御する。インテグリンはα鎖とβ鎖から成る接着分子ファミリーの一つで、細胞接着のみならずシグナル伝達分子としても機能している。ミクログリアは数種類のインテグリンを発現し、その発現の増減はミクログリアの活性化状態と関わっている。今回我々は、ADP により誘導されるケモタキシスを解析し、インテグリンβ1 の関与及びその調節機序を調べた。【方法】ミクログリア細胞は生後 1-2 日の新生仔ラット大脳から調整し、DMEM 10% FCS medium で 1 週間培養したものを使った。ケモタキシス実験にはファイブロネクチン・コーティングを施したカバーガラスの上にミクログリアを接着させ、Dunn chemotaxis chamber を用いて測定した。インテグリンの分布変化やメンブレン・ラッ

リング形成は免疫染色法を用いた。

【結果と考察】ADP により誘導されるケモタキシスは、P2Y₁₂特異的阻害剤 ARC-69931で消失したことから、責任受容体が P2Y₁₂受容体であることを確認した。ファイブロネクチン上にミクログリアを播種したとき、このケモタキシス発現はインテグリンβ1に依存的であった。さらに、ADP 刺激によりミクログリア上のインテグリンβ1が集積すること、またそれがメンブレン・ラッフリングと colocalize する事を見出した。ADP 刺激によるインテグリンの集積及びケモタキシスはミクログリアを forskolin や dibutyryl cyclic AMP 処置することによって消失した。このインテグリン集積抑制は、PKA 阻害剤である KT-5720により回復したことから、PKA は ADP により誘導されるインテグリンβ1集積の negative regulator であることが予想される。以上、ADP によるケモタキシス発現には、ラッフリングと colocalize するインテグリンβ1の集積が必要であり、これは cAMP/PKA 依存的な抑制性制御を受けていることが明らかとなった。

(P5) ミクログリアにおけるα7ニコチン性アセチルコリン受容体発現と TLR4および P2X₇受容体機能調節

鈴木 智久¹, 松原 明代¹, 松林 弘明², 酒井 規雄², 秀 和泉¹, 仲田 義啓¹
(広大・医歯薬総合 ¹薬効解析, ²神経・精神薬理)

私達はこれまで本研究会において、ミクログリアの P2X₇受容体を介した TNF 放出の細胞内シグナルとその神経保護作用について報告してきた。一方、ニコチン性アセチルコリン受容体の一つであるα7受容体は、神経伝達物質放出制御や神経保護など、さまざまな神経機能に

関与することが知られている。最近、マクロファージやケラチノサイトなどの非神経細胞においてもα7受容体の発現が報告されつつあるが、その機能は十分知られていない。また、ミクログリアにおける発現も不明である。本研究では、ラット脳ミクログリア初代培養細胞にお

る $\alpha 7$ 受容体の発現を検討し、 $P2X_7$ 受容体および TLR4 を介した TNF 放出における $\alpha 7$ 受容体の役割を検討した。まず、ウェスタンブロッティングおよび免疫染色によりミクログリア細胞膜への $\alpha 7$ 受容体発現が確認された。 $\alpha 7$ 受容体は Ca^{2+} 透過性の高いイオンチャネルであることが知られているが、ミクログリアにおいてニコチン (1 mM) は一過性の細胞内 Ca^{2+} 上昇を引き起こし、その作用は $\alpha 7$ 受容体阻害薬 methyllycaconitine (MLA, 10 nM) により強く抑制された。また、リポポリサッカライド (LPS) による TLR4 受容体を介した大量の TNF 放出は低濃度のニコチン (1-100 μ M) により有意に抑制された。一方、ニコチン

は ATP および $P2X_7$ 受容体アゴニスト BzATP による TNF 放出に対して有意な増強効果を示した。しかしながら、ニコチンは ATP および BzATP による TNF mRNA 発現には影響を及ぼさなかった。従って、 $\alpha 7$ 受容体刺激は $P2X_7$ 受容体を介する TNF の産生・放出を遺伝子転写後レベルで増強する可能性が示唆された。

以上の結果より、 $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体はシナプスにおける神経伝達において機能するのみならず、ミクログリアにも発現し、 $P2X_7$ 受容体および TLR4 を介したシグナルをそれぞれ正および負に修飾することにより、脳内免疫を制御する可能性が明らかとなった。

(P6) $P2X_7$ 受容体活性化による細胞死誘導機構の解析

月本 光俊, 原田 均, 五十里 彰, 高木 邦明 (静岡県立大・薬)

【目的】 $P2X_7$ 受容体の活性化は細胞死を誘導することが知られているが、その機構の詳細は未だ明確でない。今回、 $P2X_7$ cDNA をニワトリ B 細胞由来 DT40 株に導入して得られた変異株 (DT40/ $P2X_7$ 細胞) を作成し、細胞死誘導機構について解析した。

【方法】細胞障害性は代謝酵素活性測定により、アポトーシスの誘導は DNA 断片化ならびにホスファチジルセリン (PS) の細胞表面への露出をアネキシン V-FITC を用いて検出することにより調べた。細胞内 Ca^{2+} 濃度変化は特異的蛍光指示薬 fura-2 を用いて測定した。小孔の形成は Hoechst33258 の細胞内への取り込みを測定することにより解析した。カスパーゼの活性は蛍光標識ペプチドを用いて測定した。また、細胞周期の変化はフローサイトメトリーにより各細胞の DNA 含量を測定することにより解析した。

【結果および考察】DT40/ $P2X_7$ 細胞において $P2X_7$ 受容体アゴニスト ATP および 2'&3'-O-benzoyl-benzoyl-ATP

(BzATP) 処置により細胞質内へ Ca^{2+} 流入、小孔の形成ならびに細胞死の誘導が観察され、DT40/ $P2X_7$ 細胞が機能的な $P2X_7$ 受容体安定発現株であることが示された。DT40/ $P2X_7$ 細胞において BzATP 刺激により DNA の断片化ならびに PS の細胞表面への露出が検出され、カスパーゼ 3 の活性化も認められた。カスパーゼ阻害薬 z-VAD-fmk は BzATP による DNA の断片化ならびに PS の細胞表面への露出を抑制したが、細胞死の誘導は阻害できなかった。以上より、 $P2X_7$ 受容体活性化による細胞死誘導にはカスパーゼに依存しない経路も関与するものと考えられた。

さらに、細胞周期の変化について検討した結果、BzATP 刺激後3時間で G1/G0期の細胞の減少が認められた。同時に LDH の放出も認められたことから、G1/G0期の細胞の減少は細胞死に由来するものと考えられた。このことから、 $P2X_7$ 受容体活性化後の比較的早い段階で G1/G0期にある細胞には細胞死が誘導されることが明らかになった。

(P7) 孤束核シナプス前 P2X 受容体活性化による高振幅 EPSC の発生

繁富 英治, 加藤 総夫

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

シナプス伝達の基幹過程は、軸索終末の脱分極が細胞内 Ca シグナルに変換されて生じるシナプス小胞の開口放出である。一般に活動電位→軸索終末 Ca シグナル変換を担う分子は電位依存性 Ca チャンネル (VDCC) である。P2X 受容体はシナプス前にも発現しており、その高い Ca^{2+} 透過性のため、VDCC の関与なくシナプスでの開口放出を誘発しうる事実が脊髄後角および孤束核の native なシナプスにおいて示されており、脳・脊髄における P2X 受容体の重要な機能の一つは細胞外 ATP 濃度→軸索終末 Ca シグナル変換である。

幼若ラット孤束核スライスにおいて記録される活動電位非依存的自発グルタミン酸放出によって生じる微小興奮性シナプス後電流 miniature EPSC (mEPSC) は、 ~ 10 pA の振幅を持ち、毎秒約 5-10 回発生する (basal mini)。P2X 受容体作動薬が、 Cd^{2+} 存在下においても細胞外 Ca^{2+} 依存性に mEPSC 頻度を増加する事実をすでに示した。この時、およそ 80% のニューロンで、高振幅 mEPSC (large-mini) が観察された。高振幅 mEPSC は、 $20 \rightarrow 50$ pA の振幅を持ち、

その分布は basal mini のそれと有意に異なっていた。P2X 受容体作動薬による large-mini の発生中も、AMPA 直接投与によるシナプス後 AMPA 受容体電流の振幅は影響を受けず、膜入力抵抗も変化しなかった。Cyclopiazonic acid, ryanodine あるいは 2-aminoethoxydiphenyl borate 灌流下にも mEPSC は非灌流時と同様に観察された。高頻度・高振幅 mEPSC は高頻度・高振幅微小興奮性シナプス後電位を惹起し、その時間的加重はシナプス後細胞に活動電位を発生させた。孤束核興奮性シナプスにおいて、シナプス前 P2X 受容体を介した軸索終末 Ca^{2+} 濃度上昇は、細胞外 Ca^{2+} 非依存的自発グルタミン酸放出とは異なる機構によって Ca^{2+} 依存的グルタミン酸放出を高効率で惹起し、VDCC を介さない「シナプス伝達」を起こし、二次ニューロン以下の神経回路の興奮を引き起こすことが示唆された。これは、孤束核における細胞外 ATP 濃度上昇が、求心性興奮性シナプス入力増加と等価であるという可能性を示している。

(P8) シナプス前アデノシン受容体による孤束核シナプス伝達短期可塑性の修飾

津氏 典子, 繁富 英治, 加藤 総夫 (慈恵医大 神経生理)

動脈血圧、血液ガス分圧、肺伸張、消化管伸展などの生体内環境に関する内臓感覚情報は、第 IX, X 脳神経を経て延髄孤束核に投射する。1 次求心性線維 (孤束) から孤束核ニューロンへの興奮性シナプスにおけるシナプス伝達効率は頻回刺激による短期抑制を示す。一方、このシナプス伝達は ATP および adenosine によって adenosine A_1 受容体を介して抑制される (Kato and Shigetomi, 2001)。

孤束から孤束核ニューロンへのシナプス伝達の短期可塑性に及ぼす adenosine の影響とその機構の解明を目的として、幼若ラット脳幹冠状断スライスからホールセルパッチクランプ法で興奮性シナプス後電流 (eEPSC) を薬理的に単離記録した。孤束の連続刺激 (50 Hz, 2-10 回) 時に観察される誘発 eEPSC 振幅におよぼす adenosine の

影響を検討した。孤束連続刺激時の 1 回目と 2 回目の eEPSC 振幅比 (paired-pulse ratio, PPR) は、全記録ニューロンにおいて 1 より低値であり、著明な短期抑制を示した。Adenosine (100 μM) は、PPR を 0.33 ± 0.04 から 0.48 ± 0.05 に有意に増加させた ($n=35$)。細胞外 Ca^{2+} 濃度を 2 mM から 0.5 mM に低下させると、PPR は有意に増加しむしろ短期増強が見られた。この時、adenosine による PPR 増加作用は観察されなくなった。一方、20ms 間隔で与えた連続刺激 (5-10 回) 中の eEPSC 振幅の指数関数的減衰は adenosine によって有意に遅延した (時定数: 投与前 1.4 ± 0.5 回, 投与中 1.9 ± 0.7 回; $n=28$)。このとき、adenosine は、孤束連続刺激の第一刺激による eEPSC 振幅を $72.3 \pm 2.7\%$ ($n=46$) まで減少させたが、第二刺激による

eEPSC 振幅には有意な影響を及ぼさず ($113.7 \pm 12.4\%$; $n=45$), 第三刺激によるそれを増大させた ($175.5 \pm 25.9\%$; $n=30$)。これらの adenosine の作用は A_1 受容体拮抗薬 DPCPX ($1 \mu\text{M}$) 存在下にほぼ消失した。Adenosine は自発 EPSC の振幅および頻度には影響を及ぼさなかった。

以上から、孤束終末シナプス前 adenosine A_1 受容体の

活性化は、おそらくはシナプス前電位依存性カルシウムチャネルからの Ca^{2+} 流入を抑制し、シナプス伝達効率の急速な減衰を緩和してシナプス後応答を平坦化させることにより、内臓受容器からの持続的なシナプス入力に対する孤束核ネットワークの応答を安定化させる可能性が示された。

(P9) ラット冠循環におけるアデニンヌクレオチド代謝とこれにおよぼす虚血の影響

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

ATP の急性投与は発作性上室性頻拍を停止させることが知られている。この ATP の作用には ecto-nucleotidase が重要な役割を果たし、体内で速やかにアデノシンに変換され効果を現すと考えられている。一方、心筋の虚血再灌流障害時にはecto-nucleotidase活性の変化が示唆されているが詳細は明らかでない。本研究では冠循環におけるヌクレオチドの代謝におよぼすecto-nucleotidase阻害薬の作用からATP代謝に関わる酵素の性質を調べ、虚血が酵素活性におよぼす影響を検討した。

【方法】実験には Wister rat (150-250g) の摘出心臓標本を用い、混合ガス (95% O_2 , 5% CO_2) で飽和し 37°C に加温した Krebs-Ringer 液を用いて Langendorff 方式で 4-5 $\text{Ml}/\text{分}$ の灌流を行った。灌流を開始してから 20 分間平衡化させた後、5 分間隔に、ATP, ADP, AMP, アデノシンおよび各アデニン化合物のエテノ化誘導体を灌流液中に投与した。投与直後に心臓から滴下する灌流液を回収し、灌流液中の代謝物は HPLC で定量した。虚血心における ATP の代謝活性は、30 分灌流液を停止し引き続き 30 分の再還流後、ヌクレオチドを投与し HPLC にて代謝物を測定をした。また、灌流液中の nucleotidase 活性を測定するために、虚血直前、再灌流直後ならびに実験終了時の

滴下灌流液を採取し、ATP, AMP, アデノシンを基質として 30 分間反応させ HPLC で代謝物を定量した。

【結果・考察】正常心では、ATP, ADP は速やかに、AMP, アデノシンにまで代謝された。nucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase (NPP) 1 と ecto-alkaline phosphatase (ALP) を強く抑制する PPADS ($30 \mu\text{M}$) 存在下では ATP の分解が若干抑制されたが、AMP からのアデノシンの産生は影響されなかった。これに対し、ecto-5'-nucleotidase (CD73) の特異的な阻害薬 α, β -methyleneADP 存在下では、ATP の分解は阻害されなかったが、AMP からアデノシンの産生が強く抑制された。以上の結果から、冠血管床の ATP 分解には主に ATP, ADP を分解する ecto-apyrase (CD39) が関与し、アデノシン産生は CD73 により媒介されと考えられた。また、虚血心では再吸収の低下に起因すると思われるアデノシンの蓄積が認められたが、ATP, AMP の代謝はむしろ低下していた。一方、虚血直後の再灌流液中には ATP, AMP, アデノシンの代謝酵素が存在し、特に ATP, アデノシンの分解活性が高かった。以上の結果から、虚血急性期の冠血管床では CD39 とアデノシンデアミナーゼが血液中に遊離・消失し、ATP 代謝活性が減少している可能性が示唆された。

(P10) アストロサイトからの自発的 ATP による細胞内シグナル調節

小泉 修一¹, 宮竹 真由美², 藤下 加代子³, 井上 和秀^{3,4}
(国立衛研・¹薬理, ²代謝生化学, ³星薬科大学, ⁴九州大・院・分子制御)

アストロサイトはほとんどすべての神経伝達物質受容体を発現しており、シナプス間隙から漏れた伝達物質に

素早く応答する。アストロサイトの $\text{Gq}/11$ 共役型受容体が刺激されると、phospholipase $\text{C}\beta$ ($\text{PLC}\beta$) /inositol

trisphosphate (InsP3) を介し細胞内ストアから Ca^{2+} が遊離されることは良く知られているが, Gi 共役型受容体が刺激を受けた場合の Ca^{2+} 応答に関しては報告の一貫性が無く, 不明な点が多い。Dopamine で培養ラット海馬アストロサイトを刺激すると, Gi 共役型 dopamine D2受容体を介して細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) が上昇した。これは, G 蛋白質 $\beta\gamma$ サブユニットが PLC β /InsP3系を活性化する事に起因していた。この Ca^{2+} 応答は, D2受容体を介する cAMP 産生抑制作用よりも高用量の dopamine を必要としたが, アストロサイトに G α_{15} を強制発現させ, D2受容体と PLC β を直接リンクさせると, 低容量 dopamine に応答す

るようになった。P2受容体拮抗薬 suramin, PPADS, P2Y1受容体拮抗薬 MRS2179及び ATP 分解酵素 apyrase は, dopamine により惹起される $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を消失させた。アストロサイトは, 自発的に ATP を放出しており, これは dopamine 刺激により変化しなかった。以上, 自発的な ATP 放出と恒常的な P2Y1受容体活性化が, Gi 共役型 dopamine D2受容体から PLC β /InsP3系を介する効率的な Ca^{2+} 応答に必須であること, またアストロサイトは ATP 放出を調節することにより, 自身の Gi 共役型受容体を介する Ca^{2+} 応答を制御している可能性が示唆された。

7. 生体の恒常性と細胞の生存・増殖・死を制御するイオン機構と細胞機能

2003年8月11日－8月12日

代表・世話人：今泉 祐治（名古屋市立大学大学院薬学研究科）

所内対応者：井本 敬二（液性情報）

- (1) 痛み刺激後長期にわたって持続する痛覚過敏・痛覚鈍磨とN型Caチャネル

田邊 勉（東京医科歯科大学大学院認知行動医学系高次機能薬理学分野）

- (2) Ca^{2+} シグナル・センサーとしてのL型 Ca^{2+} チャネルおよび Na^+ - Ca^{2+} 交換体を介した Ca^{2+} シグナル時空間制御機構

赤羽 悟美（東京大学大学院薬学系研究科細胞情報学教室）

- (3) 電位依存性 Ca^{2+} チャネル $\beta 3$ サブユニット欠損マウス平滑筋における Ca^{2+} 動態

今泉祐治¹，森村浩三¹，山村寿男¹，村上学²，大矢進¹，村木克彦¹，布木和夫²，柳澤輝行³

(¹名市大院・薬・細胞分子薬効解析，²秋田大・医・薬理，³東北大院・医・分子薬理)

- (4) Ca^{2+} 依存性細胞増殖におけるTRP蛋白質TRPM7の新しい役割について

井上隆司，原雄二*，森恵美子*，森泰生*

（九州大学大学院医学研究院生体情報薬理，*京都大学大学院工学研究科生物化学）

- (5) 脳血管及び発現細胞における機械刺激感受性陽イオンチャネルとしてのTRP蛋白質TRPM4

森田 浩光^{1,2}，本田 啓²，伊東 祐之¹，Joseph E. Brayden²，Mark T. Nelson²

(¹九州大学大学院医学研究院生体情報薬理，

²The University of Vermont, College of Medicine, Department of Pharmacology, VT, USA)

- (6) メカノバイオロジー：一機械受容チャネルを中心にー

成瀬恵治^{1,2,3} (¹名大・院・医・細胞生物物理，²細胞力覚プロジェクト・

国際共同研究・科技団，³メカニカルストレスプロジェクト・NEDO)

- (7) ヘテロ二量体型アミノ酸トランスポーターの細胞膜移行を規定する因子

金井 好克（杏林大学医学部薬理）

- (8) 成熟ニューロンにおけるcdk5の役割：特異的阻害薬 roscovitine の作用から考える

佐竹伸一郎^{1,2,3}，井本敬二³，小西史朗^{1,2}

(¹三菱化学生命科学研究所，²CREST・JST，³生理学研究所)

- (9) 神経活動における Na,K-ATPase の新機能

池田啓子，鬼丸洋，川上 潔

（自治医科大学分子病態治療研究センター細胞生物研究部，

昭和大学医学部生理学）

- (10) $\text{PLC}\gamma 2$ -TRPC3チャネル連関の生理的意義

西田 基宏¹，原 雄二²，森 泰生²

(¹生理研・統合バイオ，²京都大院・工学系・合成生物)

【参加者名】

今泉 祐治（名市大薬），川上 潔（自治医大分子病態治療研究センター），金井 好克（杏林大医），赤羽 悟美，高松 肇，名黒 功（東大薬学），田邊 勉，水澤 英洋（東京医歯大），大矢 進，坂本 多穂，森村 浩三，堀田 真吾，森

本 岳，山崎 大樹（名市大薬），成瀬 恵治，岸尾 正博，杉村 岳俊（名大医），井上 隆司，森田 浩光（九大医），森 泰生，西田 基宏（統合バイオ），檜山 武史（基生研），佐竹 伸一郎，宮田 麻理子，沼田 朋大，井本 敬二（生理研）

(1) 痛み刺激後長期にわたって持続する痛覚過敏・痛覚鈍磨と N 型 Ca チャネル

田邊 勉 (東京医科歯科大学大学院認知行動医学系高次機能薬理学分野)

侵害受容性疼痛は組織の傷害に伴って発生する痛みで、特に急性の生理的な侵害受容性疼痛は外部からの侵害性刺激や体内の病変に対する生体防御機構として働き、生命維持に重要な警告反応である。一方、慢性の侵害受容性疼痛や神経因性疼痛は病的な慢性疼痛であり、治療を必要とするものである。これらの疼痛は機械的および熱的侵害刺激に対する閾値を下げて痛覚過敏現象を引き起こすばかりでなく、本来痛みを誘発しない触覚刺激が痛みを誘発する異痛現象(アロディニア)をしばしば伴い、疼痛管理に難渋する主要原因となる。電位依存性 Ca チャネルは細胞外Caの流入経路を形成する膜蛋白質であり、伝達物質放出や細胞膜興奮性調節、そしてCa依存性の細胞機能調節、遺伝子発現調節など種々の生理機能に必須の働きをしている。従ってその発現変化や機能異常が疼痛感受性に変化を及ぼし、異常痛発現に深く関与する可能性は非常に高いと考えられる。我々は、急性炎症により引き起こされる痛覚過敏と N 型 Ca チャネルの関わりについて検証するために、ラットの足底部に一過性の炎症を引き起こし、炎症および痛みが鎮静化した後、痛覚過敏が起こっているかどうかを炎症性メディエータによって惹起されるアロディニアの程度で評価した。その結果、カラゲニンによる一過性の急性炎症の後、プロスタグランジン E2 誘発性アロディニアの長期にわたる

遷延が認められた。N 型チャネル阻害薬は、この感作に対して抑制作用を示したが、比較的高用量が必要であった。この感作の原因として、後根神経節及び脊髄後角における N 型チャネルの発現の増加が示唆された。

生体は生命維持に重要な警告反応である侵害受容の発達に伴い、内因性疼痛抑制機構も発達させたが、この疼痛受容と抑制のバランスの崩れが慢性疼痛発症の一つの重要な原因になると考えられる。従って痛覚情報伝達機構の研究を進めていく上において、痛覚情報伝達機構そのものの研究と同時に、生体の持つ内因性疼痛抑制機構のメカニズムを明らかにし、自然界が発達させたストラテジーをより深く理解することも重要となる。我々は内因性疼痛抑制機構を賦活させるメカニズムの検討を行う過程で、内臓痛条件刺激により三週間以上の長期間にわたって賦活されるオピオイド非依存性の内因性疼痛抑制機構を見出した。疼痛条件刺激によりこのような長期にわたって持続する疼痛抑制系賦活の報告例はなく非常に興味深い。さらに N 型 Ca チャネル欠損マウスにおいてはこの長期疼痛抑制系賦活機構に異常が生じており、おそらく脊髄より上位のレベル(中脳および延髄)において、下行性疼痛抑制系賦活に関与する可塑的メカニズム発現に N 型 Ca チャネルが重要な寄与をしていることが推察された。

(2) Ca^{2+} シグナル・センサーとしての L 型 Ca^{2+} チャネル および Na^+ - Ca^{2+} 交換体を介した Ca^{2+} シグナル時空間制御機構

赤羽 悟美 (東京大学大学院薬学系研究科細胞情報学教室)

Ca^{2+} チャネルは、 Ca^{2+} シグナルの時間・空間制御の第一ステップである。心筋細胞は、発達に伴い細胞膜の L 型 Ca^{2+} チャネルからの Ca^{2+} 流入に加えて筋小胞体のリアノジン受容体(RyR)からの Ca^{2+} 依存性 Ca^{2+} 放出(CICR)機構を介して Ca^{2+} シグナルを増幅し、より大きな収縮張力を発生するようになる。この Ca^{2+} シグナル増幅系の構築には、接合膜構造における Ca^{2+} シグナル関連分子の密接した空間配置が重要である。心室筋細胞において L 型

Ca^{2+} チャネルは近接した RyR からの CICR を誘発するとともに放出された Ca^{2+} により Ca^{2+} 依存性不活性化を引き起こす。我々は L 型 Ca^{2+} チャネルが Ca^{2+} 依存性不活性化を介して CICR の増幅率を感知し、活動電位持続時間および活動電位中の Ca^{2+} 流入量を調節することにより筋小胞体 Ca^{2+} 貯蔵量を一定に保ち、 Ca^{2+} シグナルの増幅効率を安定化する Ca^{2+} シグナル・センサーの役割を担うことを明らかにした。

L 型 Ca^{2+} チャネルのサブタイプである $\text{Ca}_v1.2$ (α_{1C}) と $\text{Ca}_v1.3$ (α_{1D}) はいずれも心臓や膵臓 β 細胞に共存するが、サブタイプ特異的な役割を担う。これらの差異は、電気生理学的性質や細胞内局所へのターゲッティングに関わる蛋白間相互作用の差異によると考えられる。そこで我々は $\text{Ca}_v1.2$ と $\text{Ca}_v1.3$ のキメラ Ca^{2+} チャネルを作製して解析した。その結果、 $\text{Ca}_v1.3$ に特有の深い膜電位での活性化にはリピート I-IV いずれも関与するが、一方、 $\text{Ca}_v1.3$ に特有の深い膜電位での不活性化にはリピート II が大きく寄与することを見出した。

Na^+ - Ca^{2+} 交換体は 1 分子の Ca^{2+} と 3 分子の Na^+ を交換

する起電性の Ca^{2+} ハンドリング蛋白であり、細胞内 Ca^{2+} 濃度の制御に重要である。しかしながら、虚血中の脱分極と細胞内 Na^+ 濃度上昇は再灌流時に Na^+ - Ca^{2+} 交換体を逆モードに駆動し Ca^{2+} を細胞内へ取り込み虚血再灌流障害を招く。また Na^+ - Ca^{2+} 交換体の機能亢進は催不整脈性の脱分極を引き起こす。我々は、心筋梗塞モデルラット心室筋細胞における Na^+ - Ca^{2+} 交換体の機能亢進を見出した。 Na^+ - Ca^{2+} 交換体の制御機構と破綻のメカニズムを明らかにするべく、現在、angiotensin (AT-1) 受容体刺激による Na^+ - Ca^{2+} 交換体機能亢進のメカニズムを検討中である。

(3) 電位依存性 Ca^{2+} チャネル $\beta 3$ サブユニット欠損マウス平滑筋における Ca^{2+} 動態

今泉祐治¹, 森村浩三¹, 山村寿男¹, 村上学², 大矢進¹, 村木克彦¹, 布木和夫², 柳澤輝行³

(¹名市大院・薬・細胞分子薬効解析, ²秋田大・医・薬理, ³東北大院・医・分子薬理)

膀胱や消化管などの興奮性の高い平滑筋において、電位依存性 Ca^{2+} チャネル (VDCC) 活性化でトリガーされる興奮収縮連関の際に、Ca 誘発性 Ca 遊離機構 (CICR) が機能しているかについては、未だ議論がある。我々はモルモット膀胱平滑筋細胞において、CICR が局所的に生じる細胞膜と筋小胞の体接合部位が比較的少数 (細胞当たり 10-20 箇所程度) 存在し、活動電位発生時にはそれらの部位で緊密な CICR が機能して局所的に急激な Ca 濃度上昇 (Ca ホットスポット) が生じ、その後に細胞全体の Ca 濃度上昇が広がるという機構を提唱している (J. Physiol., 1998; 2001)。

VDCC の β サブユニットはチャネル機能発現量の調節、活性化・不活性化の調節などに関係しており、4 種類のサブタイプが同定されている。平滑筋では $\beta 2$ と $\beta 3$ サブユニットが強く発現しており VDCC 活性に大きく寄与し、細胞内の Ca^{2+} 動態に影響を与えていると考えられるが、その寄与の程度は明らかではない。村上らとともに我々は VDCC $\beta 3$ サブユニット欠損マウス ($\beta 3$ -/-) 大動脈平滑筋細胞において、Ca チャネル電流の密度が 50%程度減少

し、不活性化が遅延していることを見出した (投稿中)。そこでさらに膀胱平滑筋細胞において VDCC の発現量および CICR の機能変化について検討した。

VDCC の発現量は、電流密度でも DHP 結合部位でも $\beta 3$ -/-において約 50%減少していた。VDCC 電流の定常状態における不活性化の電位依存性は正電位側に約 15 mV 移動し、不活性化過程は有意に遅くなっていた。 Ca^{2+} 活性化 K^+ チャネル (BK, IK, SK) は、BK, SK の発現量・電流密度には変化がなく、IK は $\beta 3$ -/-で減少していた。 $\beta 3$ -/-において脱分極刺激直後の Ca^{2+} ホットスポットでの Ca^{2+} 濃度上昇が減少しており、さらにホットスポット発生も減少 (あるいは遅延) していた。さらに同様の脱分極で活性化される Ca^{2+} 活性化 K^+ チャネル電流も $\beta 3$ -/-細胞で減少していることを見出した。以上の結果は $\beta 3$ サブユニット欠損により膀胱平滑筋の CICR が減弱した事を示唆しており、おそらく $\beta 3$ -/-膀胱平滑筋での興奮収縮連関の減弱の主な原因となっていると思われる。 $\beta 3$ -/-での結果も膀胱平滑筋細胞において CICR が緊密に生じる特定の細胞膜—筋小胞体接合部の存在を裏付けると考える。

(4) Ca^{2+} 依存性細胞増殖における TRP 蛋白質 TRPM7 の新しい役割について

井上隆司, 原雄二*, 森恵美子*, 森泰生*

(九州大学大学院医学研究院生体情報薬理, *京都大学大学院工学研究科生物化学)

最近, transient receptor potential (TRP) 蛋白質スーパーファミリーの中に, 細胞の生存や死・異常増殖との関係を示す興味深い遺伝子群 (メラスタチンサブファミリー; TRPM1-8) が見出された。その中で TRPM7 は, 細胞生存に関わる Ca^{2+} , Mg^{2+} 透過型陽イオンチャネルであることが報告され, ついで細胞内 Mg^{2+} ホメオスタシス維持に必須の細胞増殖を制御する Mg^{2+} 流入チャネルであることが示唆されている。本実験では, ヒト網膜芽細胞腫 (human retinoblastoma cell; RB) 細胞を用い, その増殖能制御における持続的な Ca^{2+} 流入経路としての TRPM7 の別の側面について検討した。

RB 細胞は, 血清や細胞外 Ca^{2+} 濃度に依存して増殖する性質を有し, 培地内の血清や Ca^{2+} の除去によってその増殖をほぼ停止した。従って, 血清刺激によって発現する何らかの形質膜経路を介して流入した Ca^{2+} が密接に関与していることが予想された。実際, Ca^{2+} イメージング法を用いて測定した RB 細胞の静止 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ レベル, 細胞外 Ca^{2+} 濃度に依存する $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 成分 ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$) や Ca^{2+} 流入速度 ($d[\text{Ca}^{2+}]_i/dt$) は, 培地からの血清除去 (24-48 時間) によって有意に減少した。また, パッチクランプ法 (ナイスタチン穿孔法) を用いて RB 細胞から電流記録を行うと, Ca^{2+} 透過性を示す自発性内向陽イオン電流 (I_{spont}) が記録でき, この電流も血清除去後速やかに消失した。更に, 増殖速度, $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$, I_{spont} の 3 者に対する, 種々の構造的に異なる陽イオンチャネル阻害薬 (Gd^{3+} , La^{3+} , LOE908, 2-APB など) の阻害効力を比較すると, いずれの場合もほぼ同程度の抑制効果が観察された。以上の結果から, RB 細胞の増殖が, I_{spont} チャネルを介した Ca^{2+} 流入によって (恐らく一定の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ レベルを維持することによって) 効果的に制御されていることが強く示唆された。

パッチクランプ法で検討した I_{spont} の電気生理学的性質は, TRPM7 蛋白質を強制発現させた細胞から記録される陽イオン電流のそれと, 多くの点で類似していた (強い

外向き整流性を示す電流電圧関係や細胞外二価イオンの除去・細胞内 MgATP 除去による著明な電流振幅の増大等)。また, RB 細胞から抽出した RNA からは TRPM7 mRNA の転写産物が増幅され, 更に TRPM7 特異的抗体を用いた免疫細胞化学的手法によって, RB 細胞膜に TRPM7 蛋白質に対する強い免疫蛍光を確認することができた。そこで, TRPM7 に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドや siRNA を作成し, 培地中に添加して RB 細胞を 24 時間培養すると, TRPM7 免疫蛍光の低下に伴う, I_{spont} 電流密度, $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$, $d[\text{Ca}^{2+}]_i/dt$ の有意な低下が観察された。また, TRPM7 のキナーゼ領域や zinc finger motif を点変異させた loss-of-function mutant を発現しても同様の結果が得られた。これらの結果は, RB 細胞における I_{spont} チャネルを介した持続的 Ca^{2+} 流入の発生に, TRPM7 蛋白質がそのチャネル経路を構成する必須の分子 (あるいは制御因子として) として参与している可能性を強く示唆している。

RB 細胞の増殖速度, $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$, I_{spont} を抑制する阻害薬は, これらを抑制するのとはほぼ同等の効力で, RB 細胞への BrdU 取り込みを抑制した。一方, FACS を用いた細胞周期解析では, TRPM7 アンチセンスオリゴヌクレオチド処理や培地中の Ca^{2+} 除去によって, G_0/G_1 期に留まる細胞の割合が増加し S 期にある細胞の割合が減少することが明らかになった。これらの結果は, 細胞周期の G_1 後期から S 期への進行過程が細胞外 Ca^{2+} 濃度に最も高い感受性を示すという以前の報告と良く一致している。しかし他方, アンチセンス処理による TRPM7 発現の抑制や TRPM7 の過剰発現によって細胞が劣化し死に至るという一見矛盾する実験事実がある。この点に関しては, 恐らく, TRPM7 の発現レベルとその結果生じる細胞の '状態' (生存・増殖・死) の間には, それを最終的に規定する何らかの質的・量的関係 (例えば細胞内 Mg^{2+} ホメオスタシスの維持) が存在していると考えられるべきだろう。

(5) 脳血管及び発現細胞における機械刺激感受性陽イオンチャネルとしての TRP 蛋白質 TRPM4

森田 浩光^{1,2}, 本田 啓², 伊東 祐之¹, Joseph E. Brayden², Mark T. Nelson²

(¹九州大学大学院医学研究院生体情報薬理,

² The University of Vermont, College of Medicine, Department of Pharmacology, VT, USA)

血管や膀胱などの管腔を有する臓器を構成する平滑筋細胞には、その内圧変化を感知する何らかのセンサーがあり、これによって張力がコントロールされていると考えられてきた ("myogenic" response)。実際、最近のパッチクランプ法を用いた研究から、張力の変化によって直接活性化されたり、あるいは活性の修飾を受ける非特異的陽イオンチャネル (NSCC) の存在が明らかになっている。しかしながら、これらのチャネルの分子実体に関する手がかりは全く得られていなかった。一方、近年種々の物理化学刺激で活性化される NSCC として注目を集めている TRP 蛋白質スーパーファミリーの中には浸透圧刺激や張力変化に応答して活性化される例 (TRPV4, NOMPC) が見つかった。そこで、我々はその実体を解明すべく、TRP チャネルに焦点を絞り、RT-PCR 法及びパッチクランプ法を用いてラット脳動脈平滑筋細胞と HEK 細胞を比較することにより以下の結果を得た。RT-PCR 法により TRP チャネルの発現を検討した結果、脳血管および HEK 細胞の両者に共通して高頻度に発現している TRP チャネルは TRPC1, C3, C4, M3, M4, M7, V2, V4 であった。また、パッチクランプ法により、ラット脳

動脈平滑筋細胞及び HEK 細胞の両者に共通して、Cell-attached mode で suction tube より 20mmHg 以上の陰圧を加えると、20~25pS のコンダクタンスを有し、主に Na⁺ や Cs⁺ 等の一価陽イオンを透過させる陽イオンチャネルの活性が観察された。この張力感受性チャネルは inside-out mode にすると消失したが、細胞内 Ca²⁺ 濃度を上昇 (>1μM) させることによって再活性化することができた。さらにこのチャネルは、細胞内からの Gd3+ (100μM), DIDS (100μM) の投与により完全に抑制されたが、La³⁺ (100μM), ruthenium red (30μM) または NPPB (50μM) では抑制されなかった。これらの結果から 20~25pS のコンダクタンスを有するチャネルとして TRPV4 及び TRPM4B チャネルが考えられたため、両チャネルを過剰発現しその性質を調べると TRPM4B を過剰発現させたときのみ上記のチャネルと類似した性質を有するチャネルの活性の増加が観察された。以上のことから、脳動脈平滑筋において TRPM4 が機械刺激感受性非特異的陽イオンチャネルとして血管の筋緊張維持に重要な役割を果たしていることを強く示唆された。

(6) メカノバイオロジー：ー機械受容チャネルを中心にー

成瀬恵治^{1,2,3} (¹名大・院・医・細胞生物物理, ²細胞力覚プロジェクト・

国際共同研究・科技団, ³メカニカルストレスプロジェクト・NEDO)

われわれの体は触覚・聴覚・血圧などといった物理的刺激を常に受容し適切に応答しているが、そのメカニズムには不明な点が多い。本講演では心・血管系におけるメカノバイオロジーを機械受容チャネルを中心に展開する。

1. 機械受容の生理学

心・血管系組織には血流から常にメカニカルストレスが加わっている。短期的には血管作動性物質放出による血管トーンの恒常性の維持、中・長期的には細胞増殖

などによる組織のリモデリングが起こる。また高血圧症・動脈硬化などの病態との関連が示唆される。独自に開発した定量的・高再現性ストレッチ装置により、ストレッチ刺激に対する細胞応答 (細胞内情報伝達 (Ca²⁺), 機構の解明, 核転写因子活性化機構, 増殖反応など) に関する研究を行った。その結果、ストレッチ刺激に対しては、機械受容チャネル→カルシウム流入→チロシンリン酸化→細胞骨格・細胞接着斑の再構成→形態変化というカスケードが存在することが判明した。

2. 機械受容チャネルの分子・細胞生理学

Touch に代表されるような機械刺激を受容するリセプターの一つとして機械受容チャネルがある。このチャネルの電気生理学的研究は広く行われてきたが、その分子実体は長い間不明であった。幸運にも我々は真核生物から世界ではじめてカルシウム透過性機械受容チャネル (Mid1) の単離・同定に成功した (Science 1999)。また近

年、心筋より新しいタイプの機械受容チャネル (SAKCA) の単離・同定に成功し、更に、機械感受性責任部位の同定およびそのメカニズム解明に一步近づいた。このチャネルはヒト心筋・血管平滑筋などに分布していることが確認され、血圧調節機構などに関与している可能性がある。

(7) ヘテロ二量体型アミノ酸トランスポーターの細胞膜移行を規定する因子

金井 好克 (杏林大学医学部薬理)

ヘテロ二量体型アミノ酸トランスポーターは、12 回膜貫通型の活性サブユニット (軽鎖) と、糖タンパク質である 1 回膜貫通型の補助サブユニット (重鎖) がジスルフィド結合によって連結することにより構成される。活性サブユニットは、トランスポーターの本体であり SLC7 family に属する 9 種が知られて、補助サブユニットは SLC3 family に属する 2 種 (4F2hc 及び rBAT) が知られている。ヘテロ二量体型アミノ酸トランスポーターにおいては、活性サブユニットは特定の補助サブユニットと連結する。すなわち、6 種が 4F2hc と、1 種が rBAT と連結し、残りの 2 種は未同定の補助サブユニットと連結することが明らかになっている。

活性サブユニットはトランスポーターの物質輸送機能を担っているが、補助サブユニットの役割は、特定の活性サブユニットを認識して連結し、細胞膜へ移行させることである。上皮細胞においては、4F2hc は連結した活性サブユニットを側基底膜に移送し、rBAT は連結した活性サブユニットを頂上膜に移送するため、補助サブユニットがソーティングシグナルを内在していると考え

られている。しかし、最近我々は、シスチン尿症の患者解析の過程で、腎尿細管からのシスチン取り込みを担当するヘテロ二量体型トランスポーター (BAT1-rBAT complex) の活性サブユニット BAT1 の C-末端の Pro 482 の Leu への変異を見出し、これによりヘテロ二量体複合体の細胞膜移行が障害されることを明らかにした。この変異により BAT1 の C-末端へ bulky な側鎖が導入され、この部位でのタンパク質間相互作用が阻害されることが細胞膜移行障害の原因と考えられ、ヘテロ二量体複合体の細胞膜移行にはさらなる第三の因子の存在が必要であることが示唆された。

従って、ヘテロ二量体型トランスポーターの細胞膜移行の理解には、(1)2 つのサブユニット間の相互認識の機序、(2) 補助サブユニットの担うソーティングシグナル、(3) ヘテロ二量体複合体の細胞膜移行を推進する活性サブユニット C-末端に連結する第三の因子を、明らかにする必要がある。本演題では、このような観点から開始した我々の研究について紹介したい。

(8) 成熟ニューロンにおける cdk5 の役割 : 特異的阻害薬 roscovitine の作用から考える

佐竹伸一郎^{1,2,3}, 井本敬二³, 小西史朗^{1,2}

(¹三菱化学生命科学研究所, ²CREST・JST, ³生理学研究所)

cyclin-dependent kinases (cdks) は、細胞の分化・増殖の制御に関わるタンパク質リン酸化酵素である^{1,2}。cdk ファミリーの一つ cdk5 は、成熟ニューロンの軸策に多く発

現することから³、細胞分化・増殖の制御とは別の機能も担うと推定されている。しかし、cdk5 ノックアウトマウスは脳形成に異常を来とし周産期に死んでしまうため

⁴, 成熟ニューロンでの *cdk5* の役割は現在も明らかでない。そこで、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^{5,6} 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は顕著に増強された。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 (ペアパルス比・変動係数の比較) から、この阻害薬は、*P/Q* 型カルシウムチャネルの機能を亢進して、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 (文献 7, 8 参照)。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

に調節する機能も併せ持つと推定される。*cdk5* は、シナプスの種類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。

【文献】

1. Maccioni R. B., Otth C., Concha I. I. & Muñoz J. P. (2001). *Eur. J. Biochem.* **268**, 1518-1527.
2. Smith D. S., Greer P. L. & Tsai L.-H. (2001). *Cell Growth Differ.* **12**, 277-283.
3. Matsushita M. et al. (1995). *Neuroreport* **6**, 1267-1270.
Ohshima T. et al. (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 11173-11178.
4. De Azevedo W. F. et al. (1997). *Eur. J. Biochem.* **243**, 518-526.
5. Bibb J. A. et al. (1999). *Nature* **402**, 669-671.
6. Tomizawa K. et al. (2002). *J. Neurosci.* **22**, 2590-2597.
7. Yan Z., Chi P., Bibb J. A., Ryan T. A. & Greengard P. (2002). *J. Physiol. (Lond.)* **540**, 761-770.

(9) 神経活動における Na,K-ATPase の新機能

池田啓子, 鬼丸洋, 川上 潔 (自治医科大学分子病態治療研究センター細胞生物研究部,
昭和大学医学部生理学)

我々は Na,K-ATPase α 2 サブユニット遺伝子 (*Atp1a2*) 欠損マウスの作成及び解析を行った。ホモマウス新生仔は、外観上異常を認めず、生直後は心臓も正常に機能しているが、胎生期の胎動・神経反射が全く観察されず、生直後に死亡する。出生直前の脳においては、扁桃体と梨状野で神経細胞のアポトーシスによる縮退が認められた。さらに、脳内神経伝達物質含有量は有意に増加していた。シナプトソーム画分を用いて神経伝達物質取込・放出能を調べた結果、種々の神経伝達物質の取込が障害されていた。さらに野生型で観察される脳における部位特異的 c-Fos 発現がホモマウスでは著しく増強していることが明らかとなった。こうした観察から、Na, K-ATPase α 2 サブユニットは神経伝達物質の輸送体と機能的に共役し、遺伝子欠損の結果、細胞間隙の神経伝達物質のクリアランスが阻害され、神経過興奮につながるものと推測された。

帝王切開によって出産させたホモマウスでは、運動が

見られず呼吸不全で生直後に死亡する。この神経機序を明確にするため、脳幹ブロック標本を用いて、グラミシンパッチ法にて顔面神経核ニューロンを解析したところ、野生型とホモマウスとの間に静止膜電位の差はみられないが、GABA による膜抵抗の低下率には有意差が見いだされた。このことはホモマウスでの GABA 受容体の減少を示唆する。また、GABA 投与によって、野生型では一時的な過分極の後脱分極が見られるのに対し、ホモマウスでは脱分極のみが観察された。このことは、ホモマウスの神経細胞内における Cl⁻ イオン濃度の上昇を示唆する。さらに、延髄腹外側部の電気刺激に対する第4頸髄腹側根 (C4) の反射応答は、ブロック標本調製直後のホモマウスではきわめて弱く、灌流液処理にともなって徐々に回復することが観察された。また、E18.5 のホモマウスでは自発呼吸活動は見られないが、1-5 μ M アドレナリンを投与すると、遅いリズムながら安定した吸息性活動が誘発された。このときの呼吸神経活動パターンを

光学的測定により解析した。アドレナリン誘発吸息性活動は野生型では、延髄腹外側部 (most rostral root of XIIth nerve) 付近に発生し、吻側あるいは尾側へと広がる。ホモマウスでも、類似の活動パターンが観察された。ただし、野生型では、吸息開始にやや遅れて、顔面神経核領

域に強い抑制が認められたのに対し、ホモではこのような抑制は見られなかった。これらのことから、考えられる Na, K-ATPase α 2 サブユニット遺伝子の機能を推論する。

(10) PLC γ 2-TRPC3 チャネル連関の生理的意義

西田 基宏¹, 原 雄二², 森 泰生²

(¹生理研・統合バイオ, ²京都大院・工学系・合成生物)

非興奮性免疫 B 細胞において、受容体刺激によって惹起される持続的な Ca²⁺振動 (オシレーション) は, c-Jun, NF-AT などの特定の転写因子を活性化し, 遺伝子発現や細胞増殖を引き起こす。受容体刺激による細胞内 Ca²⁺濃度上昇は, 細胞内 Ca²⁺ストアーからの Ca²⁺放出と形質膜越えの Ca²⁺流入の両経路を介して引き起こされる。しかし, Ca²⁺オシレーションの発生メカニズムについては未だ明らかではない。

新たに開発したイノシトール 1,4,5-三リン酸 (IP3) 検出蛍光プローブを用いて, 受容体刺激による細胞内 Ca²⁺動態と細胞内 IP3 動態を経時的に解析した。その結果, 受容体刺激やストアー枯渇によって惹起される Ca²⁺流入に依存した持続的な IP3 産生が起こることがわかった。また, 受容体刺激やストアー枯渇刺激による形質膜越えの

Ca²⁺流入が, ホスホリパーゼ C γ 2 (PLC γ 2) の膜集積を引き起こすことがわかった。この膜集積は, PLC γ 2 の C2 ドメインによって制御されと考えられる。さらに, Ca²⁺流入を担う受容体活性化チャネルの分子実体である TRPC チャネル群のうち, TRPC3 が, 恒常的に PLC γ 2 と結合することを示した。以上の結果から, TRPC3-PLC γ 2 の機能的結合が, 受容体刺激による Ca²⁺ oscillation pattern を制御することが明らかとなった。

これまで, 受容体刺激で引き起こされる Ca²⁺流入そのものが, 持続的な Ca²⁺オシレーションを発生させると考えられてきた。しかし, 本研究結果により, TRPC3 を介した Ca²⁺流入に依存した IP3 産生が, 細胞内 Ca²⁺ストアーからの Ca²⁺放出を引き起こすことで, Ca²⁺ oscillation を形成する可能性が示された。

8. 「視知覚のメカニズム - 生理, 心理物理, 計算論的アプローチ」-3

2002 年 6 月 19 日 - 6 月 20 日

代表・世話人：内川恵二 (東京工業大学総合理工学研究科)

所内対応者：小松英彦 (生理学研究所感覚認知情報部門)

(1) 人間の奥行き知覚における異方性と個人差

佐藤雅之 (北九州市立大学)

(2) 輪郭線表現の構築-V2 野における折れ曲がりの表現

伊藤 南 (生理学研究所)

(3) 加齢による色覚の変化 ~解剖学的・生理学的変化が色覚特性にあたえる影響~

篠森敬三 (高知工科大学 情報システム工学科)

(4) 視覚運動情報からの自己運動知覚とそのモデリング

花田光彦 (千葉大学文学部)

(5) 弁別難易度の違いがサル下側頭葉皮質細胞反応の刺激選択性に及ぼす長期的影響

鈴木航, 田中啓治 (理化学研究所脳科学総合研究センター)

(6) Adaptive Optics システムを用いた L/M 錐体比の同定と色知覚

山内泰樹 (富士ゼロックス)

(7) ヒト視覚野における空間相互作用とその文脈効果

郷田直一 (ATR 人間情報科学研究所)

(8) 運動視における色メカニズムの役割-心理物理学的観察と生理学的機序の考察

吉澤達也 (金沢工業大学人間情報システム研究所)

(9) 腹側視覚経路の両眼視差感受性細胞の機能的役割

田辺誠司, 藤田一郎 (大阪大学大学院生命機能研究科)

(10) 視環境の統計的性質を手がかりとした色彩恒常性

中内 茂樹 (豊橋技術科学大学 情報工学系)

(11) 手の到達運動制御における視覚運動情報の影響

芦田宏 (京都大学文学研究科)

(12) 一次視覚野における広視野情報の統合処理

佐藤宏道 (大阪大学健康体育部・大学院生命機能研究科)

(13) 時間的視差による奥行きと運動方向の知覚

酒井 宏 (筑波大学 電子・情報工学系)

(14) サル前部側頭皮質における「顔」に基づくアイデンティティ認知のニューロン機構

永福智志 (富山医科薬科大学 医学部第二生理)

【参加者名】

佐藤雅之 (北九州市立大学), 篠森敬三 (高知工科大学), 花田光彦 (千葉大学), 鈴木航 (理化学研究所脳科学総合研究センター), 山内泰樹 (富士ゼロックス), 郷田直一 (ATR 人間情報科学研究所), 吉澤達也 (金沢工業大学), 中内茂樹 (豊橋技術科学大学), 芦田宏 (京都大学文学研究科), 佐藤宏道 (大阪大学), 酒井 宏 (筑波大学), 永

福智志 (富山医科薬科大学), 三上章允 (京大霊長研), 田辺誠司, 舘俊太, 村上浩文, 池添貢司, 稲垣未来男, 定金理, 石川理子, 木田裕之, 内藤智之, 赤崎孝文 (大阪大学), 金子寛彦, 打田武俊, 増田修, 永井岳大, 寺田昌弘, 党兵, 石田勲, 小林大輔, 杉江和彦, 河原勇美, 椎橋哲夫, Sherry Sung, 漆畑健司, 加藤憲史郎, 山口大

志，鶴原亜紀，福田一帆，澤田忠正，坂野雄一，横井健二，松宮一道（東京工業大学），丸谷和史（東京大学），久保田正善，後藤充慶，吉野知也（豊橋技科大），岡嶋克典（防衛大・東工大），山根ゆか子（理研），本間良太（理研 BSI），欄 悠久（九州大学），村上郁也（NTT CS 研），

【概要】

本研究会では視覚生理学，心理物理学，計算論の研究者が一堂に集まり，最新の情報交換と討論を行った。それぞれ方法は異なってもその目的は同一である。各分野は現在ではそれぞれ高度に発達したが，分野間の情報交換はまだ十分とは言えない。これは研究者が望んでいてもそのような機会が少ないためであり，そこに本研究会の開催意義がある。本研究会では，生理学からは5名，心理物理学からは7名，計算論からは2名の計14名の第一線の研究者が研究成果を発表した。心理物理学からは奥行き知覚の対比効果，加齢による色覚の変化，自己運動知覚，網膜上の L/M 錐体比の同定，fMRI を用いた空間相互作用の文脈効果の解明，運動視と色メカニズム，手の到達運動への視覚情報の影響についての講演があった。生理学からはサルの V2 野での折れ曲がり線分刺激に対する応答，サルの下側頭葉皮質細胞応答の刺激選択性の学習効果，腹側視覚経路の両眼視差細胞の役割，一

小濱剛（愛知県立大学），内田淳（慶應義塾大学），橋本章子，渡辺昌子，吉田正俊，三木研作，柴田愁子，足澤悦子，森近洋輔，小松英彦，伊藤南，小川正，鯉田孝和，松本正幸，田辺裕梨，横井功，安田正治（生理学研究所）

次視覚野での文脈効果，サル前部側頭皮質での顔認知機構に関する生理実験結果が報告された。計算論からは色彩恒常性のアルゴリズムは自然画像中の色分布の統計的性質を用いて説明できること，および時間視差による知覚が V1 受容野の時空間的構造に起源しているという興味深い報告があった。いずれも最新の研究結果の報告であり，心理物理の分野からの報告は心理物理特性を視覚のメカニズムから説明するという立場が明確であったため，生理学の分野の研究者にとっても大変興味ある内容であった。生理学研究のスピードは速く他分野からでは研究の追従が難しいが，このような講演で生理学研究の最新のテクニックやホットな領域が示され，心理物理研究者も多いに刺激を受けた。さらに計算論では会場での討論は極めて活発に行われた。参加者には大学院生も多く見られ，このような研究会を通して幅広い分野に通じた若い研究者が育っていくことが期待できる。

（1）「人間の奥行き知覚における異方性と個人差」

佐藤雅之（北九州市立大学）

両眼視差による奥行き知覚には異方性があるといわれている。水平方向の視差勾配（すなわち右に行くほど遠い，あるいは近い）は，垂直方向のそれ（上に行くほど遠い，あるいは近い）に比べて知覚が困難であるとされている。しかし，両眼視差による奥行き知覚には大きな個人差が存在すると考えられ，異方性に関しても，その程度や原因についての詳細は明らかではない。ここでは，奥行き知覚の異方性の程度や個人差の分布を明らかにす

るために，約30名の被験者に対して，奥行きのコーンスウィート錯視と対比効果の大きさを測定した。興味深いことに，ランダムドットパターンを刺激として用いた条件よりも，格子状のパターンを用いたときに効果の大きさと異方性がより顕著になった。これは，これらの錯視現象および効果の異方性において，遠近法による奥行き手がかりが重要な役割を果たしていることを示唆している。

(2) 輪郭線表現の構築—V2野における折れ曲がりの表現

伊藤 南 (岡崎国立共同研究機構 感覚認知情報研究部門)

第一次視覚野のニューロンがある特定の傾きを持つ直線成分に選択的に反応することはよく知られている。ではこうした一次情報からどのような過程を経て物体の形状が認識されるのであろうか？我々は注視課題遂行中のサルは第二次視覚野のⅡ/Ⅲ層より細胞外記録を行い、2直線の組み合わせにより作成した受容野を横断しかつその中心で折れ曲がる輪郭線刺激に対する反応を調べた。刺激セット中のいずれかの刺激に反応する145細胞のう

ち126細胞は折れ曲がりに対する反応選択性を示し、なかには特定の折れ曲がりに選択的に反応する細胞も存在した。94細胞では反応選択性が刺激中の直線成分の方位に依存しており、多くの場合で1~2方向への興奮性反応と特定方向への抑制性反応との組み合わせにより説明することができた。従って第二次視覚野は方位選択的な線情報の組み合わせにより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と考えられる。

(3) 「加齢による色覚の変化 ～解剖学的・生理学的変化が色覚特性に与える影響～」

篠森敬三 (高知工科大学 情報システム工学教室)

加齢による水晶体濃度の増加や老人性縮瞳は、単に網膜照度を減少させるだけではなく、刺激光の分光分布をも変化させる。また生理学的変化によって錐体の形状が変化し、光受容の感度が低下するとともに、神経細胞の減少も生じる。しかし、一般的な視環境のもとでは、人間の視覚系は、生涯を通じて相当程度まで色の恒常性を維持する。この事実、網膜上での錐体感度の低下を、視細胞以降の神経経路において補償していることを示唆

している。その補償量は、刺激条件や強度に依存し、異なる種類の錐体間での感度のバランスを保つ働きがある。一方、波長弁別実験や色弁別実験の結果は、弁別感度低下が生じていることを示した。錐体信号増幅の効果がある一方で、一部の色では神経回路網でのS/N比減少により弁別が悪化したと考えられる。このように加齢に対する神経回路網の色覚補償作用は完全ではないことが明らかとなった。

(4) 視覚運動情報からの自己運動知覚とそのモデリング

花田光彦 (千葉大学文学部)

回転運動がないときには、網膜上のフローの中心が自己進行方向と一致する。しかし、首や体、眼球などの自己回転があるときには、網膜上のフローの中心と自己進行方向は一致しない。自己回転運動がある場合、視覚運動情報だけでは正確に自己運動方向を知覚することができない場合もあるが、通常はフローの中心の方向へバイアスが生じる。自己進行方向知覚の心理物理実験の結果を概観し、自己進行運動の知覚処理モデルを提案する。モ

デルでは、まずフローの中心を求め、次にサンプリング点が視野に一樣に分布していることを仮定し、自己回転運動の成分と一致する期待値により自己回転運動を推定する。最後にフローの中心と推定した自己回転運動から自己進行方向を求める。心理物理実験を行ったところ、提案した自己回転運動の推定方法により視覚システムが自己回転を推定し、自己進行方向を計算していることが示唆された。

(5) 弁別難易度の違いがサル下側頭葉皮質細胞反応の刺激選択性に及ぼす長期的影響

鈴木航（理化学研究所脳科学総合研究センター認知機能表現研究チーム）

下側頭葉皮質細胞の刺激選択性は学習に依存して変化することが示されている。本研究では弁別難易度の異なる条件下での弁別学習が刺激選択性に及ぼす影響を調べた。それぞれ3つの刺激からなる3グループの動物を模した刺激を用いた。最初の数カ月はグループ内の刺激を弁別する高難易度条件下で課題を行わせて細胞活動を記録し、次の数カ月は異なるグループ間の弁別のみを行う低難易度条件下で課題を行わせて記録した。高難易度課

題期間中に記録した細胞の刺激選択性は、低難易度課題期間中に記録した細胞の刺激選択性より有意に鋭かった。しかし高難易度課題期間中に二つの難易度の弁別ブロックを交互に行わせて同じ細胞の反応を記録したところ、刺激選択性は二つのブロックの間で変化しなかった。この結果は下側頭葉皮質細胞の刺激選択性が、その瞬間に行っている弁別難易度に従って変化することはないが、長期的には課題の難易度依存的に変化することを示す。

(6) Adaptive Optics システムを用いた L/M 錐体比の同定と色知覚

山内 泰樹（富士ゼロックス（株））

人間の色覚メカニズムのフロントエンドは3種類の錐体であるが、生体における錐体の網膜上での分布や各錐体の比率等を計測することは、Adaptive Optics と呼ばれる補償光学技術を視覚系に応用して網膜像を撮影することにより初めて可能になった。その結果、これまで 2:1 といわれてきた L/M 錐体の比率は、色覚正常であっても大きく個人差が存在することがわかった。また、同一被験者に対する心理物理実験を行うことにより、色知覚と

錐体構造との相関を求めることが可能になった。赤ー緑反対色の拮抗点である Unique Yellow は L, M 錐体からの出力が拮抗したときに生じると考えられるが、Unique Yellow と知覚される単色光は、全ての被験者でほぼ同一の値となり、L/M 錐体比との相関は見られなかった。このことは、網膜上の錐体比率が色覚を決定する要因ではないことを示している。

(7) ヒト視覚野における空間相互作用とその文脈効果

郷田直一（ATR 脳情報研究所）

ヒト視覚野 V1,V2,V3/VP における神経機構間の空間相互作用を明らかにすることを目的として、ある局所刺激（テスト刺激）に対する fMRI 応答にその周囲が及ぼす効果（周囲刺激のオン/オフや特徴変化時の影響）を検討した。fMRI 応答を各視覚野・視野偏心度領域毎にサンプリング・加算平均する新しい手法を用い、fMRI 応答変動の視野位置依存性を詳細に解析した結果、各視覚野内において、刺激提示部・非提示部間の拮抗的な相互作用、

刺激提示部内の抑制相互作用、及びテスト・周辺間の文脈依存的な抑制相互作用が生じることが示された。テスト刺激領域の応答変動はテスト刺激の見かけのコントラスト変化とも対応することから、コントラスト知覚がこれら空間相互作用の影響を受けていると考えられる。また、相互作用の大きさはテスト刺激の提示位置に依存することから、空間相互作用は全視野領域にわたって等質ではないことが示唆される。

(8) 運動視における色メカニズムの役割-心理物理学的観察と生理学的機序の考察

吉澤達也 (金沢工業大学人間情報システム研究所)

近年、運動視に輝度チャンネルだけでなく、色メカニズムも寄与していることが報告されている。ここでは、色メカニズムが運動視にどのように寄与しているのかを我々の最近の知見をもとに先行知見と比較して議論する。

一般に、最近の色運動知覚に関する実験では色チャンネルを選択的に刺激するための等輝度刺激の輝度アーティファクトが注意深く排除されている。しかし、我々の実験結果は、色度変調で定義される等輝度刺激は、心理物理学的に等輝度でも視覚系内で生成される動的な輝度

アーティファクトを誘発するため、その運動知覚の情報は主に輝度チャンネルにより処理されることを示唆している。一方、刺激が色度のコントラスト変調により定義される場合は、純粋に色チャンネルにより運動知覚が生起されることが明らかとなった。これらは、色運動知覚に 2 つ以上のメカニズムが寄与していることを示唆しており、先行知見間における矛盾点を説明する手がかりとなる。

(9) 腹側視覚経路の両眼視差感受性細胞の機能的役割

田辺誠司 藤田一郎 (大阪大学大学院生命機能研究科)

形・色・模様などの 2 次元図形特徴を処理すると考えられてきた霊長類腹側視覚経路においても、視覚対象の奥行きの手がかりである両眼視差に感受性を持つ細胞が多く存在する。奥行きや形に関する単眼性手がかりを完全に排除したダイナミックランダムドットステレオグラム (RDS) に含まれる両眼視差に対して、V4 野や IT 野の細胞は反応するが、両眼視差を含みながら知覚的には奥行きを感じない輝度反転 RDS に対しては、V4 細胞の多

くは両眼視差感受性を失い、知覚と類似したふるまいを示す。サルが心理学的閾値周辺の細かい奥行きを弁別する課題を遂行中に、IT ニューロンの活動を記録し、同一の刺激に対して単一ニューロンの活動が示す反応の変動と動物が示す奥行き判断の正誤の間の関係を ROC 解析により調べたところ、両者には相関があった。以上の結果は、腹側視覚経路が、両眼視差に基づいた奥行き知覚の形成に関わることを示唆している。

(10) 視環境の統計的性質を手がかりとした色彩恒常性

中内 茂樹 (豊橋技術科学大学 情報工学系)

視覚系が色彩恒常性を実現するため手がかりとして、灰色世界仮説が知られているが、こうした 1 次統計量だけでは実際の現象を説明することは難しい。本研究では、2 次統計量 (輝度と色の相関値) が色恒常性の手がかりとなるか否かについて、数値実験により検証した。分光反射率が既知であるマンセル色票から構成されたシーンに対し、様々な分光分布の照明を照射した状況をシミュレートし、シーンに対する錐体信号の 1 次、2 次統計量を説明変数とする重回帰モデルによって、同シーンに置き

た白色面に対する錐体信号の予測を行った。その結果、こうした統計量を手がかりにすればほぼ良好に照明色を推定できることが確認された。また、推定された重回帰モデルは、Golz & MacLeod (2002) らの実験結果を再現できた。このことは、照明光に関する情報が多数の色から構成されるシーン中に内在していることを意味しており、2 次統計量に対する適応が視覚系に存在する可能性を示唆している。また、色彩透明視現象についても同様の説明が可能であるか検討する。

(11) 手の到達運動制御における視覚運動情報の影響

蘆田宏（京都大学 文学研究科）

視覚情報処理は神経伝達などの遅れを伴うので、私たちは常に少し過去の世界を見ていることになる。そのため、実際に動く物体をつかんだり避けたりするためには予測的プランニングが必要であり、視覚系そのものが予測の一端を担っている可能性が高い。我々は、ガボールパッチの位置が搬送波の運動方向にずれて知覚される錯覚が、即時の開ループ到達運動において顕著であるという実験結果から、視覚系が運動制御に特異的な予測的符号

化を行なっている可能性を示唆した (Yamagishi, Anderson & Ashida, 2001, Proc. R. Soc.Lond., B)。また、その後の実験から、そのような行動特異的な反応は等輝度変調刺激においては見られないことが示された。これらの結果は、到達運動における位置錯誤が大細胞系一背側経路における輝度運動信号によって生起することを示し、Milner と Goodale による、背側経路が無意識的な視覚運動協応に用いられるという説を支持する。

(12) 一次視覚野における広視野情報の統合処理

佐藤宏道（大阪大学健康体育部・大学院生命機能研究科）

視覚野ニューロンの受容野を最適パラメータのグレーティングパッチで刺激しているときに、受容野周囲に呈示したグレーティングは、そのパラメータに依存して主に抑制性の修飾効果を及ぼす。この現象は刺激文脈依存の修飾と呼ばれ、知覚的図地分離の神経機序と考えられている。この現象の入力メカニズムを検討するため、ネコの視覚野でビククリンの局所投与により皮質内 GABA 抑制を遮断しながら刺激パッチのサイズに対する反応の

チューニングを観察した。この実験は受容野周囲まで刺激が拡大したときに抑制が興奮を上回るために反応抑制が生じるという仮説を検討するものである。その結果、皮質内抑制がこの修飾の主たる原因ではなく、刺激サイズに対するチューニングは興奮性応答も抑制性応答も同様のプロフィールを示すことが推定された。この結果は、皮質の神経回路に与えられる視床からの入力刺激特徴選択的な反応修飾特性を有していることを示唆する。

(13) 時間的視差による奥行きと運動方向の知覚

酒井 宏（筑波大学 電子・情報工学系）

遮蔽物の背後から物体が現れてくる場合には、その像が投影される時刻に両眼間で差が生じる。この時間視差は奥行きと運動方向の知覚を与える。従来この現象は、遮蔽と密接な関係があるものと考えられてきた。しかし、V1 細胞受容野の両眼 2 次構造が時空間的に分離できないことは (Anzai et al, 2001)、時間的視差が空間的視差と同様の細胞反応を生起することを示唆する。本研究では、時間的視差を与える奥行き・運動方向と遮蔽の関係について、心理物理学的に検討した。実験では、運動するラ

ンダムドットをスリットをとおして両眼観察した場合と等価の刺激を利用した。スリット幅を 1pixel とし、静止したドットが時間的視差をもって呈示されるものとした。遮蔽方向はスリット方向により独立に与えた。実験の結果、時間的視差を与える知覚が遮蔽方向に対して支配的になり、それは空間視差を与えるものとはほぼ一致することが判った。これは、時間視差による知覚が、V1 受容野の時空間構造に起源していることを示唆する。

(14) サル前部側頭皮質における「顔」に基づくアイデンティティ認知のニューロン機構

永福智志, Wania C. De Souza, 田村了以, 小野武年 (富山医科薬科大学 医学部 第二生理)

「顔」に基づくアイデンティティ認知課題遂行中のサル上側頭溝前部領域(吻側部・尾側部)と下側頭回前部領域から「顔」ニューロン応答を記録した。「顔」ニューロン全体の応答パターンに対する多次元尺度分析を行い、「顔」空間を構成したところ,上側頭溝前部領域では「顔」の向きが,下側頭回前部領域ではアイデンティティが,「顔」空間に表現されていることが示された。また,下側頭回前部領域の一部の「顔」ニューロンでは応答潜時

と行動反応時間に有意な正の相関を認めたが,上側頭溝前部領域の「顔」ニューロンでは有意な相関を認めなかった。さらに,上側頭溝前部領域の吻側部と尾側部の「顔」ニューロンでは,①「顔」の方向に対する選択性,②鏡像的ニューロン応答の頻度,③視線方向による応答の修飾の程度が異なることが示された。以上の知見から,「顔」に基づくアイデンティティ認知に関わるサル前部側頭皮質の機能的分化について考察する。

9. 大脳皮質・視床・基底核の神経回路

2003 年 10 月 9 日－10 月 10 日

代表・世話人：金子 武嗣（京都大学大学院・医学研究科）

所内対応者：川口 泰雄（岡崎国立共同研究機構・生理学研究所）

（1）大脳皮質視覚野 5 層錐体細胞の高頻度発火により誘発される抑制性伝達の可塑的变化

黒谷 亨（名古屋大学・環境医学研究所・視覚神経科学）

（2）新規に発見された皮質－基底核回路における調節機構

古田 貴寛（京都大学大学院・医学研究科・高次脳形態学）

（3）線条体投射細胞の閾値下二状態遷移の検証

北野 勝則（立命館大学・理工学部・情報学科）

（4）大脳皮質ダブルブーケ細胞の形態的解析

窪田 芳之（岡崎国立共同研究機構・生理学研究所・大脳神経回路論研究部門）

（5）大脳皮質錐体細胞の subsystem: zinc-enriched neural system

一戸 紀孝（理化学研究所・脳科学総合研究センター・脳皮質機能構造研究チーム）

【参加者名】

福田孝一（九州大学・医）、姜英男（大阪大学・歯）、宋文杰（大阪大学・工）、木村文隆（大阪大学・医）、金子武嗣（京都大学・医）、古田貴寛（京都大学・医）、藤山文乃（京都大学・医）、古谷野好（京都大学・医）、青柳富誌生（京都大学・情報）、野村真樹（京都大学・情報）、古屋敷智之（京都大学・医）、黒谷亨（名古屋大学・環境医学研究所）、北野勝則（立命館大学・理工）、福田敦夫（浜松医科大学・医）、山下晶子（日本大学・医）、深井朋樹（玉川大学・工）、端川勉（理化学研究所）、谷藤学（理化学研究所）、小島久幸（理化学研究所）、一戸紀孝（理化学研究所）、伊藤哲史（福井医科大学・医）、竹川高志

（京都大学・情報）、森琢磨（京都大学・理）、坪泰宏（京都大学・理）、中村公一（京都大学・医）、日置寛之（京都大学・医）、松田和郎（京都大学・医）、倉本恵梨子（京都大学・医）、趙龍昊（京都大学・医）、周里綱（京都大学・医）、水野昇（生理研）、川口泰雄（生理研）、窪田芳之（生理研）、根東覚（生理研）、荻部冬紀（生理研）、金桶吉起（生理研）、柳川右千夫（生理研）、橋本章子（生理研）、山口幸子（生理研）、森大志（生理研）、橘吉寿（生理研）、海老原利枝（生理研）、小松勇介（基生研）、渡我部昭哉（基生研）

【概要】

平成 15 年 10 月 9～10 日には以下の 5 人の講演者の方々にお願いして、講演による話題提供と議論を行いました。生理研以外から約 30 人、生理研内から 10 数人といった参加者でした。「大脳皮質視覚野 5 層錐体細胞の高頻度発火により誘発される抑制性伝達の可塑的变化」黒谷亨氏はスライス標本を用いた抑制性シナプスの可塑性の講演で昨年の吉村先生の講演に連続的な話題が提供されました。「新規に発見された皮質－基底核回路における調節機構」古田貴寛氏は、Neurokinin B を利用する線条体から無名質への投射と Neurokinin B 受容体を発現する無名質ニューロンから大脳皮質への投射の話しを、「線

条体投射細胞の閾値下二状態遷移の検証」北野勝則氏には皮質線条体入力と線条体ニューロンの Up/Down states のホットな議論を提供していただきました。「大脳皮質ダブルブーケ細胞の形態的解析」窪田芳之氏あるいは「大脳皮質錐体細胞の subsystem: zinc-enriched neural system」一戸紀孝氏の講演は大脳皮質の抑制性あるいは興奮性ニューロンの作る神経回路について主に形態学的な観点からの研究を述べていただきました。

昨年と同じく主に 30 代から 40 代前半の講演者に現在進行形的话题を提供していただいて、参加者の多くが大脳皮質・線条体の神経回路について様々な議論を交わす

ことが出来ました。昨年より講演者を一人減らしてこと
によって予定時間をオーバーすることはありませんでし
たが、議論は白熱して1時間の持ち時間のところを実質
1時間半ずつ議論すると云った学会などでは出来ないレ
ベルの密度の高い討議が出来たものと感じています。ま

た、システムの神経科学をボトムアップの方向で研究す
るという意味で志を同じくする研究者が集まって議論を
交わすことにより、新たな着想を得る、客観的な批判に
さらされるなど大脳皮質・線条体研究の発展に役立つ
様々な効果があったと思います。

(1) 大脳皮質視覚野5層錐体細胞の高頻度発火により誘発される抑制性伝達の可塑的变化

黒谷 亨 (名古屋大学・環境医学研究所・視覚神経科学)

小松由紀夫 (名古屋大学・環境医学研究所・視覚神経科学)

我々は近年、視覚野5層のニューロンを通電により高
頻度発火させると、その細胞に生じるIPSPに長期抑圧
(LTD)が誘発されることを見いだした。このLTDには、
1) シナプス後細胞の高頻度発火により生ずる、2) 誘発に
は少なくともL型電位依存性Caチャネルの活性化によ
る細胞内Ca濃度の上昇が必要である、3) シナプス後細
胞でのGABAコンダクタンスの減少を伴う、などの特徴

がある。今回、その発現メカニズムをIR-DIC観察下で
スライスパッチを行うことにより検討した。その結果、
高頻度発火を模した脱分極パルスにより誘発される
IPSCのLTDには、クラスリン依存性のGABA_A受容体の
内在化が関与していることが明らかになった。またこの
LTDは、シナプス後部における機能的シナプスのサイレ
ント化により発現すると考えられる。

(2) 新規に発見された皮質-基底核回路における調節機構

古田 貴寛 (京都大学・医学研究科・高次脳形態学)

最近我々は新線条体においてニューロキニンBを産生
していることを特徴とするニューロンが第3の線条体ニ
ューロン群として存在していることを見い出した。この
ニューロキニンB産生ニューロン群は線条体で約5%の割
合を占め、従来知られていた2種の新線条体投射ニュー
ロン系とは異なる第3の投射系として特異的に無名質に
投射線維を送ることを示した。

さらに今回、この新たに発見された線条体投射系の機
能をさらに明らかにするために、ニューロキニンBの受
容体であるNK3受容体を発現する無名質のニューロンに
ついて研究を行い、以下のような結果を得た。結果1) 無
名質に分布するNK3受容体発現ニューロンの9割以上が

抑制性のニューロンであった。結果2) 大脳皮質に投射す
るニューロンの一部はNK3受容体を発現していた。結果
3) 大脳皮質に投射するニューロンをwhole-cell clampに
よって記録しながらNK3受容体のアゴニストを適用した
ところ、膜抵抗の低下を伴う脱分極あるいは内向き電流
の増加を示すニューロンがあった。

以上の結果をまとめると、線条体核の特別な神経細胞
群がニューロキニンBを大脳基底部に放出し、それによ
って促進的な影響を受けた大脳皮質に投射するNK3受容
体発現ニューロンが抑制性に大脳皮質の神経細胞の活動
を調節している、という神経回路の存在が明らかにされ
たといえる。

(3) 線条体投射細胞の閾値下二状態遷移の検証

北野 勝則（立命館大学・理工学部・情報学科）

近年 *in vivo* における細胞内記録実験により、膜電位が閾値下において二つの状態間を遷移する現象が異なる領域で報告されている。中でも線条体投射細胞はこの現象が最初に発見された神経細胞であり、大脳皮質—線条体投射路の興奮性入力とその起源とされている。これまでの実験は麻酔下で行われていたが、覚醒時に同様の現象が起こりうるかを調べる為、覚醒時に困難な細胞内記録実験に代わり、細胞外記録実験とモデルによるシミュレーションとの相補的研究により覚醒時における閾値下

状態遷移を検証した。投射細胞モデルのシミュレーションから予測されるように、線条体に投射する皮質への電気刺激により引き起こされる投射細胞スパイクの潜時は2つのピークを示し、それぞれが閾値下の二状態に対応すると考えられる。このことから線条体投射細胞では覚醒時においても閾値下状態遷移を示すものと推察される。

また、同様の現象は大脳皮質でも観測されており、閾値下状態遷移の生成メカニズムに関する、大脳皮質のモデル神経回路を用いた予備的な研究を紹介する。

(4) 大脳皮質ダブルブーケ細胞の形態的解析

窪田 芳之（岡崎国立共同研究機構・生理学研究所・大脳神経回路論研究部門）

大脳新皮質の神経回路がどのような配線で構成されているの詳細は不明である。本研究では、非錐体細胞の一つであるダブルブーケ (DB) 細胞のシナプス結合について私のこれまでの解析結果を報告する。ラットの前頭皮質のスライスを作成し、ホールセル電極でバイオサイチンを注入した。固定後、ABC 液で反応し DAB 染色後エポンに包埋した。その後、軸索部分を電子顕微鏡で観察し、3次元再構築画像解析ソフトで前後シナプス要素の3次元像を再構築し、その構造を形態的に解析した。これ

までにカルレチニンもしくはCRFを含有する4個の細胞を解析した。その結果、DB細胞のターゲットは、約1/3が興奮性終末が多く入力する非錐体細胞の樹状突起の幹であった。また、約1/3は棘突起が多く存在する錐体細胞と思われる樹状突起の幹であった。残りは、棘突起の頭部や柄部に入力していた。その棘突起には興奮性入力を認めたので、特定の入力信号を抑制することが示唆された。細胞体に対する入力は少数存在した。

(5) 大脳皮質錐体細胞の subsystem: zinc-enriched neural system

一戸 紀孝（理化学研究所・脳科学総合研究センター・脳皮質機能構造研究チーム）

亜鉛イオン (Zn^{2+}) は、大脳皮質で一部のグルタミン酸作動性のシナプスに含まれ、活動依存性にシナプス間隙に放出され、神経調節物質として働いていると考えられている。また興奮性細胞死、アルツハイマー病に関与することも示唆されている。我々は Zn^{2+} の分布をサル大脳皮質において調べ、また、sodium selenite (SS) 脳内注入法により Zn^{2+} 陽性終末の起始細胞分布も調べた。(1) Zn^{2+} は記憶、学習、情動に関与すると考えられている辺縁系皮

質に高密度に見られた。他の皮質はこれらの領域から離れるに従い Zn^{2+} 密度は低くなる傾向が見られた。また、抑制性 interneuron 由来と思われる parvalbumin 陽性神経要素の染色密度は Zn^{2+} 密度と逆のグラデーションを示した。領域による情報処理様式の違いを反映している可能性がある。(2) 我々は TE 野に SS を注入した。ラベルされた神経細胞は TE 野自体のみならず、TE 野に feedback 投射を送る辺縁皮質に主として見られた。 Zn^{2+} の終末は

辺縁皮質からの出力において優位に使われている可能性がある。(3) 我々はサル大脳皮質の広い領域において 1,2 層の境界に Zn^{2+} の染色で染め出される patch 状または

honeycomb 状の構造を見いだした。1,2 層にも何らかの機能構造があることを示唆すると思われる。

10. 神経回路網形成と可塑性機構研究における領域横断的アプローチ

2003 年 12 月 4 日－12 月 5 日

代表・世話人：神谷温之（神戸大学大学院医学系研究科）

所内対応者：重本隆一（岡崎国立共同研究機構生理学研究科）

（1）発達期小脳における登上線維シナプスの機能分化

橋本 浩一（金沢大学大学院医学系研究科）

（2）自身の発現密度に依存する ATP 受容体 P2X₂ の性質の変化

藤原 祐一郎（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科）

（3）シナプス脱構築の分子機構の解明に向けて

瀬藤 光利（岡崎国立共同研究機構統合バイオサイエンスセンター）

（4）シナプス後肥厚部 PDZ 蛋白質の立体構造学的研究

朽尾 豪人（横浜市立大学大学院総合理科学研究科）

（5）ニコチン性アセチルコリン受容体の構造生物学的解析

宮澤 淳夫（理化学研究所播磨研究所）

（6）Rapid motility of dendritic spines and axonal filopodia

田代 歩（The Salk Institute for Biological Studies）

（7）EGF 投与認知障害モデルラットの行動解析

水野 誠（新潟大学脳研究所）

（8）行動テストバッテリーを用いた遺伝子改変マウスの表現型解析による遺伝子機能の探索：

カルシニューリンミュータントマウスの例を中心に

宮川 剛（京都大学先端領域融合医学研究機構）

【参加者名】

神谷 温之（神戸大・医），重本 隆一（生理研），久保 義弘（生理研），大塚 稔久（カン研究所），児島 伸彦（理研・脳総研），橋本 浩一（金沢大・医），藤原 祐一郎（東京医歯大・医），瀬藤 光利（統合バイオ），朽尾 豪人（横浜市大・理），宮澤 淳夫（理研播磨），田代 歩（Salk Institute），水野 誠（新潟大・脳研），宮川 剛（京都大・先端領域），玉巻 伸章（京都大・医），山肩 葉子（生理研），伊藤 功（九大・理），斉藤 裕見子（埼玉医大），李 月（埼玉医大），真鍋 俊也（東大・医科研），渡部 文子（東大・医科研），城山 優治（東大・医科研），篠江 徹（東大・医科研），三輪 秀樹（東大・医科研），片山 憲和（東大・医科研），草川 森土（東大・医科研），泉 寛子（東大・医科研），李 勝天（東大・医科研），白尾 智明（群馬大・医），関野 裕子（群馬大・医），

水井 利幸（群馬大・医），岡部 繁男（東京医歯大・医），壺岐 純子（東京医歯大・医），漆戸 智恵（東京医歯大・医），井上 明宏（東京医歯大・医），尾藤 晴彦（東大・医），奥野 浩行（東大・医），狩野 方伸（金沢大・医），吉田 隆行（金沢大・医），今泉 美佳（杏林大・医），片岡 正和（信州大・工），内田 洋子（東京都老人研），畠山 伸二（エーザイ），澤田 光平（エーザイ），山田 麻紀（東大・薬），井ノ口 馨（三菱化学生命研），小田 洋一（大阪大・生命機能），中山 寿子（大阪大・基礎工），小橋 常彦（大阪大・基礎工），井上 英二（カン研究所），井上 真理枝（カン研究所），俵田 真紀（カン研究所），力津 絵津子（カン研究所），西村 陽（京都府立医大・医），高岸 芳子（名古屋大・環境研），大塚 裕之（名古屋大・環境研），辰巳 仁史（名古屋大・医）

【概要】

脳は遺伝子のプログラムに従って複雑な神経回路網を構成するとともに，後天的にも環境や経験に基づいてそ

の機能と構造を改変し，成熟した固有の高次機能を獲得する。この2つの過程，すなわち発達期における神経回

路網形成と成熟脳における活動依存的な可塑性機構を明らかにすることは、現在の神経科学の最重要課題である。これらの問題を追求し、真に国際的なレベルでの研究を推進する上で、分子生物学・細胞生物学・遺伝学・解剖学・生理学・行動科学・システム脳科学など異なる領域の研究者が単独の方法論のみに立脚して研究を行うのではなく、最新の情報と最高水準の研究手法を結集し、積極的な協同により研究を進めることが求められている。本研究会では、発達期の神経回路網形成機構と成熟脳における可塑性機構に焦点を絞り、さまざまな背景を有する第一線の研究者が一堂に会して徹底的な討論を行うことで今後の研究の方向性を洗い出し、また参加者同士の情報交換・交流を図ることで、この領域における有機的

な連携の輪を生み出すことを目的として行われた。電気生理・構造生物・分子イメージング・行動解析を主な研究アプローチとする8名の研究者が1演題あたり1時間程度の十分な時間をかけて話題を提供した。また、個々の研究発表に先立ち、座長の久保（生理研）、大塚（カン研究所）、児島（理研脳総研）が当該分野における現在の到達点と今後の問題点について概説することで、異分野の研究に対しても参加者全体が討論を行いやすくすることが出来た。二日間にわたり活発な討論が行われ、また真に有益な情報交換が出来たことで、今後の共同研究のシーズを生み出すためにも有意義な研究会であった。

(1) 発達期小脳における登上線維シナプスの機能分化

橋本 浩一（金沢大学大学院医学系研究科）

成熟動物の小脳プルキンエ細胞は、ほとんどの細胞が一本の登上線維の支配を受けるが、発達初期には一時的に複数の登上線維による多重支配を受けている。生後発達に伴い、徐々にプルキンエ細胞一個あたりの登上線維の本数が減少し、マウスでは生後21日目までに一本支配に移行する。成熟動物と幼若動物では、登上線維の投射領域や生理学的性質などが著しく異なっており、生後発達の過程で多重支配から単一支配に移行する間に、登上線維シナプスの性質が大きく変化していることが予測される。今回、この点を明らかにするために、同じプルキンエ細胞上に投射している入力線維間の性質の変化について電気生理学的解析を行った。

まず、生後発達に伴う入力線維間のシナプス強度の変

化を調べた。その結果、生直後のマウスのプルキンエ細胞は、各々のシナプス強度が比較的同等な登上線維により多重支配されているが、生後一週目までに個々のプルキンエ細胞を支配する登上線維数の減少に加えて、入力登上線維間のシナプス強度の差が大きくなることがわかった。またこの現象はシナプス前終末からの伝達物質放出様式の変化によることが明らかになった。さらに入力登上線維間の強弱の形成は過剰登上線維の除去に先行して生じることが明らかとなった。

以上の結果は、形態変化（シナプス除去）に先行する機能的変化（入力登上線維間の強弱の形成）が神経回路の成熟過程に重要であることを示している。

(2) 自身の発現密度に依存する ATP 受容体 P2X₂ の性質の変化

藤原 祐一郎（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科）

イオンチャネル型のATP受容体 P2X は、時間依存的にイオン選択性が変化することや、記録ごとにうち向き整流性の強度がばらつくなどの特徴あるポアの性質を持つことが知られている。我々はアフリカツメガエル卵母細胞

発現系において、内向き整流性のばらつきが発現密度に相關することを見いだした。今回、P2X₂ 受容体の整流性の分子機構を明らかにする目的で、受容体の種々の性質を発現レベルとの関連において解析し以下の知見が得

られた。

(1) PNMDG⁺/PNa⁺ は発現密度と負の相関を示した。
 (2) 内向き整流性は発現密度と負の相関を示した。脱分極パルス直後に観察される外向き電流および定常レベル電流はどちらもチャネルを高発現にすることによって増加した。(3) 高濃度 ATP により弱い内向き整流性を呈する高発現細胞に低濃度 ATP を投与すると内向き整流性は増強した。(4)[ATP]- 応答関係の K_d の値は発現密度と負

の相関を示した。Hill 係数は発現密度に相関なく一定であった。(5) ポア上部の点変異 I328C により上記の発現密度に依存した変化がほぼ消失した。

以上の結果から、ATP 投与により開状態に入った、ごく近傍にある P2X₂ 受容体チャネル間の相互作用によりポア上部においてなんらかの構造変化が起こり、ポアの性質やリガンド感受性が変わる可能性が示唆された。

(3) シナプス脱構築の分子機構の解明に向けて

瀬藤 光利 (岡崎国立共同研究機構統合バイオサイエンスセンター)

我々の記憶や学習の素過程の一つにシナプスの再構築があります。我々を含めたグループの発見によってシナプスの構築機構については徐々に明らかになってきました。一方でシナプスの脱構築の分子機構については殆ど解っていません。蛋白の翻訳後修飾機構の一つであるユビキチン化は、プロテアソームと連携し、タンパク質分解に関わる生理的に重要な機構であることが近年次々と

明らかになっており、シナプス蛋白もユビキチン化を受けて分解されると考えられ始めています。しかしそのシナプス再構築に関わるユビキチン系の分子実体はあらゆる動物種において未だ明らかではありません。そこで今回、シナプス蛋白質のユビキチン化に関与する候補分子について若干の最新の知見を交えて議論します。

(4) シナプス後肥厚部 PDZ 蛋白質の立体構造学的研究

朽尾 豪人 (横浜市立大学大学院総合理学研究科)

PDZ ドメインは、約 90 アミノ酸残基からなる蛋白・蛋白相互作用のモジュールで、膜貫通受容体やイオンチャネルの細胞内 COOH 末端のモチーフ配列(3~4 アミノ酸残基)に結合する。一つの蛋白質中に複数の PDZ ドメインが含まれる多重性により、様々な機能性蛋白質が一カ所に集積され、巨大なシグナル伝達複合体が形成され、効率的かつ特異的なシグナル伝達が可能となる。

筆者は nNOS PDZ と PSD-95 PDZ の相互作用の立体構造研究を行ってきた。nNOS は NMDA 受容体流入性の Ca イオンにより活性化されるが、これは nNOS が PSD-95 を介して NMDA 受容体近傍に局在することにより実現

している。PSD-95 は三つの PDZ ドメインを持ち、nNOS も酵素ドメインの他に N 末端側に PDZ を持つ。NMDA 受容体は PSD-95 の PDZ1 に結合し、さらに PSD-95 の PDZ2 に nNOS PDZ が結合することにより、NMDA 受容体-PSD-95-nNOS が複合体を形成する。筆者らは各々の PDZ ドメインの立体構造を決定し、変異体作製、表面プラズモン共鳴法、溶液 NMR を用い、in vitro での PDZ の相互作用を調べ、アミノ酸レベルで明らかにした。また、最近の話題として、複数の PDZ による高次構造の形成に関する構造研究についても紹介した。

(5) ニコチン性アセチルコリン受容体の構造生物学的解析

宮澤 淳夫 (理化学研究所播磨研究所)

ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) は、神経筋接合部のポストシナプス膜上に存在するリガンド開閉型イオンチャネルである。われわれは、シビレエイの電気器官から nAChR を豊富に含んだポストシナプス膜を調製し nAChR のチューブ状結晶を作製、極低温電子顕微鏡を用いて、nAChR のチューブ状結晶のイメージを撮影した。チューブ状結晶の「らせん」対称性を利用した画像処理を行い、静止状態にある nAChR の立体構造を 4 Å の分解能で解析し、これに 1 次構造に従ってポリペプチド鎖をあてはめ、原子レベルでの構造を決定した。

nAChR の膜貫通領域はイオンチャネルを形成し、5 本の α -ヘリックスからなるイオンの通り道となる内側リン

グ (膜貫通ポア) と、その内側リングを周囲の脂質から保護するように取り囲んでいる 15 本の α -ヘリックスからなる外側リングからできている。膜貫通ポアは、静止状態で直径約 6 Å の穴が開いており、アセチルコリンがリガンド結合部位に結合すると、これが直径約 9 Å に広がる。nAChR を透過する Na イオンや K イオンなどのカチオンは水溶液中では水和状態にあり、その第 1 水和殻の直径は 8 Å より大きいと考えられ、これらの水和カチオンは nAChR の静止状態における直径約 6 Å の膜貫通ポアを通過できず、活性化状態において直径約 9 Å に広がったときに初めてチャネルを通過できるようになると考えられた。

(6) Rapid motility of dendritic spines and axonal filopodia

田代 歩 (The Salk Institute for Biological Studies)

発達脳内におけるシナプス形成時には、シナプス前後部の構造が数十秒から分単位という速さで動的形態変化 (motility) を起こしている。我々は、二光子励起およびディスク回転式共焦点顕微鏡を用いて、培養海馬切片内で GFP を発現させた神経細胞上の樹状突起スパインおよび軸策末端を観察することにより、シナプス前後部の動的形態変化のシナプス形成への関与を調べてきた。

シナプス後部構造である樹状突起スパインの形態形成が small GTPase Rho ファミリーによって制御されることが、我々および他のグループにより示されている。そこで Rac1, および RhoA の主要なエフェクターである Rho kinase を阻害することにより、Rac1 と RhoA/Rho kinase の

作用を解析し、これらの二つの伝達経路がスパインの形態、動的形態変化および安定化の異なる側面を制御していることを明らかにした。

また、シナプス前部構造である海馬苔状繊維フィロポディアの動的形態変化と神経活動の関係を調べた。シナプス形成の相手を見つけていない未成熟なフィロポディアはカイニン酸型受容体の活性化により動的形態変化の度合いが増し、シナプス形成の相手を見つけた成熟したフィロポディアはカイニン酸受容体の活性化により動的形態変化の度合いが下がるという、カイニン酸受容体活性化によるシナプス形成の二段階の制御が示唆される。

(7) EGF 投与認知障害モデルラットの行動解析

水野 誠 (新潟大学脳研究所)

我々は、中脳ドパミン作動性神経の生存維持に関与している上皮成長因子 (EGF) の脳発達を調節する活性に

着目して、行動解析を行ってきた。生後すぐのラットに EGF を多量に皮下投与し、その効果を行動実験により評

価した。その結果、EGF を生後直後に投与したラットでは、1ヶ月齢になると運動量の低下傾向を示したが、2ヶ月齢と成長が進むと立ち上がり運動において有意に増加した。知覚認知を測定するプレパルスインヒビション (PPI) 試験がある。EGF 投与ラットでは、1ヶ月齢までは対照群と同様の PPI を示していたが、その後成長が進むにつれ、PPI が顕著に低下した。同様に新奇動物に対する社会性行動試験においても、この EGF 投与動物は興味の低下を示した。また、8 方向型迷路を用いた空間認識

記憶や電気刺激に対するすくみ学習行動において EGF を投与した動物は認知機能や学習能が抑制された。さらに、この EGF 投与動物は、依存性薬物である覚醒剤メタンフェタミンやコカインにより高い感受性を示すことが判明し、ドパミン作動性神経の機能亢進との相関性が示唆された。以上から、ドパミン作動性神経への神経栄養因子と高次脳機能修飾との関連が認められた。今後、EGF の遺伝的あるいは分子生物学的研究が精神疾患の病因や病態解明の一助となることを期待するものである。

(8) 行動テストバッテリーを用いた遺伝子改変マウスの表現型解析による遺伝子機能の探索 ：カルシニューリンミュータントマウスの例を中心に

宮川 剛（京都大学先端領域融合医学研究機構）

演者は、これまで、各種遺伝子改変マウスに対して、幅広い領域をカバーした行動テストバッテリーを行うことにより、各種遺伝子の新規機能を見出してきた。最近、マサチューセッツ工科大学の利根川進博士らとの共同研究によって、この行動テストバッテリー戦略を用いることにより、カルシニューリン (CN) の前脳特異的ノックアウトマウスが顕著な作業記憶の障害、注意の障害、社会的行動の障害などを含む統合失調症様の行動異常を示すことを見だし、さらに、統合失調症患者のゲノム DNA サンプルを用いた相関解析により CN の遺伝子が統合失調症と強く相関していることも報告した。これらの知見に基づき、演者らは CN が関与する情報伝達機構の

異常が統合失調症の発症メカニズムに決定的な役割を果たしているであろうことを初めて提唱した。CN はドパミン受容体や NMDA 受容体の下流に位置しており、統合失調症の CN 仮説は、ドパミン仮説や NMDA 受容体仮説と高い整合性を持つ。CN ミュータントマウスでは、海馬錐体細胞の樹状突起の長さが短く、数も少ないなど、統合失調症の神経発達障害仮説ともよく一致している。さらに、統合失調症患者の免疫系の異常、心臓疾患による高い突然死率、糖尿病の高い罹患率、リュウマチの低い罹患率など従来の仮説では説明がつかなかった現象までうまく説明することもできる。

11. 生理研研究会「機能的 MRI 研究会」

2003 年 11 月 27 日－ 11 月 28 日

代表・世話人：定藤規弘（生理研）

所内対応者：定藤規弘（生理研）

- (1) Simultaneous measurement of hemoglobin concentration change and BOLD signal response during visual stimulation by NIRS and fMRI

豊田浩士（生理研究所，福井大学・高エネルギー医学研究センター）

- (2) 脳賦活時の CBF, CMRO₂, CBV のカップリング

柏倉健一（福井大学・高エネルギー医学研究センター）

- (3) Statistical analysis of functional near infrared spectroscopy time series -adjusting or modeling temporal autocorrelation-

Takanori Kochiyama (Kagawa University)

- (4) An introduction to the time series approach in fmri data analysis

Toru Ozaki (Institute of Statistical mathematics, Tokyo)

- (5) Evaluating effective connectivity: Multivariate time series approach

Okito Yamashita (The graduate university for advanced studies),

Norihiro Sadato (National Institute for Physiological Science),

Tohru Ozaki (Institute of Statistical Mathematics)

- (6) Correction of residual motion effects using ICA

Takanori Kochiyama (Kagawa University)

- (7) Hemodynamic, electrophysiological and structural interaction involved in human face processing. Evidence from a combined fMRI-ERP-VBM study

Tetsuya Iidaka*, Atsushi Matsumoto*, Junpei Nogawa*, Tomohisa Okada**, Norihiro Sadato**

(*Department of Psychology, Nagoya University, Graduate School of Environmental Studies, Nagoya, Japan,

**Department of Cerebral Research, National Institute for Physiological Sciences, Okazaki, Japan)

- (8) MRI 撮像音強度の変化に伴う聴覚野血流反応時間の加齢性変化

岡田知久，本田 学，定藤規弘（生理学研究所）

- (9) Application of MRI movie to kinematic analysis of articulatory and orofacial movements

Shinobu Masaki, Yasuhiro Shimada, Ichiro Fujimoto (ATR Brain Activity Imaging Center)

- (10) FREQUENCY OF REVERSING CHECKERBOARDS AND THE BOLD SIGNAL IN HUMAN PRIMARY VISUAL CORTEX: A HIGH-RESOLUTION FMRI STUDY

Pei Sun, Kenichi Ueno, R. Allen Waggoner, Keiji Tanaka, and Kang Cheng

(Laboratory for Cognitive Brain Mapping, Brain Science Institute, RIKEN)

- (11) Contrast adaptation and the BOLD signal in primary visual cortex

J.L. Gardner, P. Sun, R.A. Waggoner, K. Ueno, K. Tanaka, K. Cheng

(Laboratory for Cognitive Brain Mapping, RIKEN Brain Science Institute)

(12) 機能的光トポグラフィーによる乳児視覚野の反応の経時的変化

中井昭夫, 眞弓光文 (福井大学医学部 小児科)

柏倉健一, 米倉義晴 (福井大学 高エネルギー医学研究センター)

河内山 隆紀 (京都大学大学院 人間・環境学研究科 総合人間学部)

定藤規弘 (岡崎国立共同研究機構生理学研究所大脳皮質機能研究系心理生理学研究部門)

小泉英明 (日立基礎研究所)

(13) Model-free nonlinear regression analysis in fMRI using an artificial neural network

Masaya Misaki, Satoru Miyauchi (独立行政法人 通信総合研究所 関西先端研究センター)

【参加者名】

Kang Cheng (程 康) (理研), R Allen Waggoner (理研),
 Pei Sun (理研), 上野 賢一 (理研), 伝 優子 (理研),
 Justin Gardner (理研), 堀江 亮太 (理研), 竹田 和良
 (理研), 磯尾 綾子 (理研), 平田 智秋 (理研), 水原
 啓暁 (理研), 三分一 史和 (理研), 正木 信夫 (ATR),
 島田 育廣 (ATR), 藤本 一郎 (ATR), 赤土 裕子
 (ATR), 宮内 哲 (通総研), 三崎 将也 (通総研), 飯
 高 哲也 (名大), 中井 昭夫 (福井大), 河内山 隆紀
 (香川大), 山下 宙人 (総研大), 柏倉 健一 (群馬県
 立医療短大), 尾崎 統 (統数研), Jorge Bosch (統数研),

Andreas Galka (統数研), 岡田 知久 (先端医療センター),
 内山 祐司 (豊田中研), 柿木隆介 (生理研・感覚運動調
 節), 小山幸子 (生理研・感覚運動調節), 渡辺昌子 (生
 理研・感覚運動調節), 郷田直一 (生理研・感覚認知情報),
 定藤 規弘 (生理研・心理生理), 本田 学 (生理研・心
 理生理), 岡田 知久 (生理研・心理生理), 齋藤 大輔
 (生理研・心理生理), 荒牧 勇 (生理研・心理生理),
 田中 悟志 (生理研・心理生理), 原田 宗子 (生理研・
 心理生理), 田邊宏樹 (生理研・心理生理), 宮本順 (生
 理研・心理生理), 山本幸子 (生理研・心理生理)

【概要】

本研究会では、機能的磁気共鳴画像法(以下 fMRI) fMRI
 に関する技術的ならびに生理学的な諸課題について活発
 な議論をおこなうとともに、情報交換の場を提供するこ
 とを目的とする。本年度は、BOLD 効果などの生理学的
 側面に関連する研究成果として近赤外線トポグラフィー
 との詳細な比較が発表された。また機能的 MRI の時系列
 データとしての特徴を生かしたデータ解析ならびに、領
 域間結合の評価への適用について、詳細な発表と討論が
 あった。さらにモデルを要さない統計解析方法 (ARA,

ICA, PCA) についても意欲的な取り組みが紹介された。
 一次視覚野の生理学的研究を例に、高磁場 MRI の特性を
 生かした報告がなされた。また fMRI 撮影時に発生する
 ノイズを用いて聴覚野の反応を調べるという試みが報告
 された。MRI による発声の動態解析も紹介され、MRI の
 機能解析への多面的なアプローチがしめされた。最後に
 脳機能発達へのアプローチとして、乳児の脳賦活検査に
 ついての検討も発表された。脳研究の今後の方向を踏ま
 え、技術的検討がなされた研究会であったといえる。

(1) Simultaneous measurement of hemoglobin concentration change and BOLD signal response during visual stimulation by NIRS and fMRI

豊田浩士 (生理研究所, 福井大学・高エネルギー医学研究センター)

健常者を対象に視覚刺激に対する hemodynamic
 response を near infrared spectroscopy (NIRS) と functional
 MRI (fMRI) の信号変化として同時計測し比較すること
 を目的とした。視覚刺激として、8 Hz で反転するチェッ

カーボードパターンを 20 秒間の休止期間をはさんで 1,
 2, 4, 8 秒間提示する session を繰り返した。NIRS 装置の
 optode を後頭部に配置し, oxy-, deoxy-hemoglobin (Hb) 濃
 度を計測し, 同時に 3T-MRI 装置にて BOLD 信号を計測

した。高分解能MRI上でoptodeペアの先端位置からNIRS信号源を推定し、比較するfMRIデータの関心領域とした。subject毎に、最大刺激応答の見られたNIRS信号受信チャンネルからの信号とその信号源推定部位に対応するBOLD信号を、time-lockedで加算平均して比較した。oxy-, deoxy-, total-Hbの各濃度のtime courseにおける最大信号

変化率および曲線下面積は刺激提示時間を1, 2, 4, 8秒と変化させることに伴っていずれも増加するが、total-Hb濃度が比較的linearな増加傾向を示すのに対し、deoxy-Hb濃度の増加ではBOLD信号の場合に似た飽和傾向が見られた。

(2) 脳賦活時のCBF, CMRO2, CBVのカップリング

柏倉健一 (福井大学・高エネルギー医学研究センター)

本研究は、MRI及び近赤外装置を用いて脳賦活時のCBF, CMRO2, CBVの関係を非侵襲的に求める方法論を開発し、評価することを目的とした。

脳血流量と脳酸素代謝量の関係に関しては、以前より、脳血流量と脳酸素代謝量、脳ブドウ糖代謝量との間には、強いカップリング関係にあると考えられていた。これに対して、1980年代半ばにFoxらにより脳賦活時には脳血流量と脳酸素代謝量はuncouplingしているという報告がされた。この問題については現在まで議論が続いている。一方、脳血流量と脳血液量との関係に関しては、古くセントルイスのグループから脳血液量は脳血流量の関数で表されるという報告がされた。ただし、この報告はサルに対して二酸化炭素負荷を行うという手技で行われたものであり、ヒトで脳賦活時の脳血流量と脳血液量との関係を調べた報告はほとんどない。

本論では、CBFとBOLD、CBFとCMRO2、BOLDとCBVとの関係を求めることを目的とし、BOLD信号はMRIで、CBFはMRIのFAIR法で、CMRO2はMRIのFAIR法とBOLD信号との組み合わせから、さらにCBVは近赤外装置で求めることを試みた。

この結果、BOLD信号とFAIR信号の信号変化率の関係は、若干のばらつきはあるが、ほぼリニアに相関した。次に、CMRO2に関して、CBFとCMRO2との関係はほぼ直線関係にあることがわかった。さらに近赤外装置を用いて測定したDeoxy-Hbとoxy-Hb, total-Hbとの関係はきれいな直線関係になり、またBOLDとtotal-Hbとの関係もほぼリニアという結果になった。以上の結果は、脳賦活時の脳血流量、脳酸素代謝量、脳血液量の変化は相互に強いカップリング関係にあることを示唆したものと考ええる。

(3) Statistical analysis of functional near infrared spectroscopy time series -adjusting or modeling temporal autocorrelation-

Takanori Kochiyama (Kagawa University)

Near Infra-Red Spectroscopy (NIRS) has been used in functional activation studies as a non-invasive technique to detect changes in cerebral oxygenation in human adults and infants. By a high sampling rate and simultaneous multi channel measurements, NIRS instruments have the ability of revealing temporal and spatial structure of brain hemodynamic response, as the same as fMRI or PET. However, contrasted to the improvement of the measuring

instrument and the wide application to research, there are not well-organized analytical methods compared with the other imaging technique at present. The purpose of our study is the establishment of a method to detect the functional brain activation with robustness and without losing sensitivity in NIRS measurement.

In this reports, we focus on the topics about the modeling and correcting the temporal autocorrelation in NIRS time

series data. We revealed that the autoregressive (AR) process of NIRS time series exhibited higher order and more complex form than that of fMRI time series. We examined some methods of the statistical signal processing techniques based on the generalized linear model (GLM), which were developed in fMRI time series analysis: (1) General least

square estimation (GLS) of GLM with swamping approach, (2) GLS of GLM with whitening approach, (3) Variational bayesian estimation (VBE) of GLM. We evaluate these methods in terms of the ability to control the type-1 error (false-positive) rate and propose the appropriate methods and their parameter's settings for NIRS time series analysis.

(4) An Introduction to the Time Series Approach in fMRI Data Analysis

Toru Ozaki (Institute of Statistical mathematics, Tokyo)

We would like to present a time series approach for the analysis of fMRI data. We have been working on fMRI data analysis since 2000 when Prof. P. Valdes and I visited Prof. N. Sadato in his lab in Fukui Medical School. The most widely used standard method of fMRI data analysis is the SPM method developed by K. Friston and his group (Friston et al. (1995)). We think the SPM method does not fully exploit the dynamic information involved in fMRI data. In the

present talk, we would like to show how useful spatio-temporal information, such as localization and connectivity, can be extracted from the data using our time series modeling approach with two types of experimental data: one is visual stimulus data from Prof. Sadato's lab of National Institute of Physiological Sciences, and the other is motor task data from Prof. Kawashima's lab in NICHe, Tohoku University.

(5) Evaluating effective connectivity: Multivariate time series approach

Okito Yamashita (The graduate university for advanced studies)

Norihiro Sadato (National Institute for Physiological Science)

Tohru Ozaki (Institute of Statistical Mathematics)

Integration within a distributed system is well understood in terms of 'effective connectivity'. 'Effective connectivity' is defined as "the influence that one neural system exerts over another" by K. Friston. In order to evaluate effective connectivity, several statistical methods have been suggested: structural equation model (McIntosh and Gonzalez 1994), regression based analysis (Friston et al. 1995) and so on. A disadvantage of these methods is that analysts need to prespecify the direction of influence. However this disadvantage can be overcome by causal inference based on multivariate time series approach (Harrison et al. 2003). We have suggested an extension of Harrison's method so that both direction and magnitude of effective connectivity can be evaluated. Akaike's relative power contribution is a key tool

for evaluation. The result for the data of random dot stimulus will be presented.

Reference:

McIntosh A.R. and Gonzalez-Lima F. (1994) Structural equation modeling and its application to network analysis in functional brain imaging. *Hum. Brain Mapp.* 2: 2-22

Friston K. Ungerleider L.G. Jezzard P. and Turner R. (1995) Characterizing modulatory interactions between V1 and V2 in human cortex with fMRI. *Hum. Brain Mapp.* 2: 211-224

Harrison L. Penny W.D. and Friston K. (2003) Multivariate autoregressive modeling of fMRI time series. *NeuroImage* 19: 1477-1491

(6) Correction of residual motion effects using ICA

Takanori Kochiyama (Kagawa University)

In functional MRI, movement-related effects are extant as residual motion effects even after perfect realignment (Friston et al. 1996). As movements of subject's head or tissues are accompanied with task performance, the residual motion effects tend to exhibit the task-correlated features. In such a case, the existing methods, e.g. the voxel-by-voxel ANCOVA including the estimated motion parameters, fail to correct the task-correlated residual motion effects because of the violation of the orthogonality assumption between the task-related effects of interest and the motion-related effects of no interest. To be free from a temporally constraint for univariate time series analysis, we use independent component analysis (ICA). ICA is multivariate statistical technique, which can decompose fMRI data into spatially independent components (ICs) with an associated time course

temporal-blindly. ICA could spatially separate neuronal activity-related and residual motion artifactual process into different ICs regardless of the temporal orthogonality among them if they have a mutually different spatial distribution. In this report, we propose the new procedure to automatically remove the task-correlated residual motion effects using ICA. In particular, to characterize the IC that represents the task-related motion effect, we adopt two criteria: (1) task-correlation, and (2) heteroscedasticity. Heteroscedasticity is the change in residual variance for a regression across serial observations, which is most likely to be induced by task-related motion. We demonstrate the efficiency of our proposed method by correcting the simulated data sets contaminated with task-correlated head motions.

(7) Hemodynamic, electrophysiological and structural interaction involved in human face processing. Evidence from a combined fMRI-ERP-VBM study

Tetsuya Iidaka*, Atsushi Matsumoto*, Junpei Nogawa*, Tomohisa Okada**, Norihiro Sadato**

(*Department of Psychology, Nagoya University, Graduate School of Environmental Studies, Nagoya, Japan,

**Department of Cerebral Research, National Institute for Physiological Sciences, Okazaki, Japan)

fMRI and ERP experiments were conducted in the same group of subjects and with an identical task paradigm to investigate the possible interaction of hemodynamic and electrophysiological responses. During the task the subjects judged whether visually presented stimuli were faces or houses. fMRI identified face- and house-related regions in the lateral and medial part of the fusiform gyrus, respectively, while ERP showed significantly greater N170 negativity in the temporo-occipital electrodes for face than for house. These results were consistent with the previous studies, and add evidence that the difference in N170 amplitude between the conditions is associated with a topographic difference in activation in the inferior temporal lobe. Correlation analysis between the BOLD signal and ERP parameter demonstrated that the subjects with a long N170 latency had greater

activation in the fusiform gyrus than those with a short latency under the face condition. The magnitude of face-related activation in the fusiform gyrus correlated with the increase of N170 negativity. Furthermore, voxel-based morphometry (VBM) revealed that the grey matter density in the right fusiform gyrus had a positive correlation with the N170 latency for face. The widely distributed correlation between the signal and latency appears to be explained by the fact that the demanding cognitive process for face prolongs N170 latency and increases the signal in the fusiform regions. The present study suggests that an integrative analysis of spatial, temporal, and anatomical information regarding the brain and cognition can be achieved by a combined fMRI-ERP-VBM study.

(8) MRI 撮像音強度の変化に伴う聴覚野血流反応時間の加齢性変化

岡田知久, 本田 学, 定藤規弘 (生理学研究所)

これまで脳賦活による血流増加時間は加齢に伴い、視覚野ではより速くなるのに対して、感覚運動野では有意な変化はないと報告されているが、聴覚野に関しては明らかにされていない。昨年度われわれは本研究会で一次聴覚野は新たな刺激入力が生じた場合のみでなく、それが減少した場合にも、定常状態よりも大きな賦活があることを示した。この手法は常に一定の強さの聴覚刺激を

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

(9) Application of MRI movie to kinematic analysis of articulatory and orofacial movements

Shinobu Masaki, Yasuhiro Shimada, Ichiro Fujimoto (ATR Brain Activity Imaging Center)

The purpose of installation of MRI scanner at ATR Brain activity Imaging Center (BAIC) was to explore not only functional brain imaging but also motor behavioral studies. The focus of this talk is to introduce how an MRI movie technique was established and has been applied for motor behavioral studies, especially in speech production researches. The technique used at BAIC is based on the synchronized sampling method which was originally invented to visualize heart movements. In the original method the gating pulse was generated from electrocardiac signal to synchronize MR scan to cardiac movement. In order to apply the method to observing articulatory movements, the pulses for MRI scanner

and tone bursts for a subject were generated using two-channel signal generating software in a personal computer. During a data acquisition experiment, a subject repeats the spoken material so as to synchronize the presented tone bursts. Since the method allows us to reproduce three-dimensional moving images of speech organs, it has been used to accumulate data to investigate human speech production mechanisms. Currently, this technique is being applied to the field of rehabilitation, such as in investigating the mechanisms of pathological speech production and swallowing.

(10) FREQUENCY OF REVERSING CHECKERBOARDS AND THE BOLD SIGNAL IN HUMAN PRIMARY VISUAL CORTEX: A HIGH-RESOLUTION FMRI STUDY

Pei Sun, Kenichi Ueno, R. Allen Waggoner, Keiji Tanaka, and Kang Cheng
(Laboratory for Cognitive Brain Mapping, Brain Science Institute, RIKEN)

Previous PET and fMRI studies have shown that rCBF or BOLD signal in human primary visual cortex (V1) increases with the stimulus rate and peaks at ~8 Hz. To date, most of these studies were conducted using visual patterns with a fixed on-duration and variable intervals, where the averaged

luminance was a function of stimulus rate (but see Fox and Raichle, 1985). We have performed an fMRI study using white/black checkerboards (7.6° in diameter; checker size ~0.8°) with contrast reversal frequency of .05, .75, 2, 4, 8 and 16 Hz, but averaged luminance was kept constant across

frequencies. For each scan, checkerboards reversed at a randomly selected frequency were presented in blocks alternated with baseline conditions (a homogeneous gray background). The checkerboards were placed at 225°/315° orientation (7.6° from a central fixation cross) in the left or right lower visual field through a pair of fiber optic glasses. During fMRI scans, the subject detected the color change of fixation cross (eye positions were monitored). Experiments were conducted on a Varian 4T system with a quadrature surface coil and a segmented EPI pulse sequence (8 segments; volume TR, 4.6s; TE, 25ms). Six continuous slices (thickness, 3mm; in-plane resolution, .94x.94mm), parallel to the calcarine sulcus, were prescribed based on V1/V2 borders determined in a separate experiment, and covered the dorsal V1 of the targeted hemisphere.

In all subjects and across all frequencies, circumscribed

activations were observed in expected retinotopic loci within V1. There were no significant differences in activated voxel number and percent BOLD signal change between different frequencies. These results raise the question regarding the stimulus rate dependency, and suggest that at least in V1, at a population level, neurons preferring varied reversing frequencies are distributed roughly equally.

Recently, in a series of high-resolution (in-plane resolution, .75x.75mm) study, it was revealed that whole-field checkerboards of high (15Hz) and low (.75Hz) reversal frequencies preferentially activated spatially segregated patches in V1. These preliminary results indicate that there may exist a distinct functional architecture in V1, where visual information of different temporal frequencies is represented.

(11) Contrast adaptation and the BOLD signal in primary visual cortex

J.L. Gardner, P. Sun, R.A. Waggoner, K. Ueno, K. Tanaka, K. Cheng

(Laboratory for Cognitive Brain Mapping, RIKEN Brain Science Institute)

Adaptation of neuronal responses is a ubiquitous property of visual cortical neurons. Adaptation of neuronal responses is thought to underlie the astounding ability of the brain to process sensory stimuli over many orders of magnitude of stimulus strength. Understanding adaptation processes is also critical for the proper interpretation of the BOLD signal because non-linearities of temporal summation of the BOLD signal are thought to be at least partially due to underlying adaptation of neuronal responses and not necessarily due to inherent nonlinearities of the coupling of neuronal responses to hemodynamics. With these motivations in mind, we have used BOLD imaging to examine the contrast-response functions of early visual cortical areas for several contrast adaptation states. We used an event-related paradigm in which we presented a 7.5Hz contrast-reversing checkerboard stimulus at a single contrast (base contrast). Every 8-12

seconds we would increase or decrease the contrast of the checkerboard for a brief period (3 seconds). The changes in the BOLD signal in early visual cortical areas to these brief changes in contrast were measured for three different base contrast levels. From these measurements we constructed contrast-response curves for the BOLD signal. We have found evidence that similar to cat primary visual cortex, humans exhibit adaptation of contrast response functions as primarily horizontal shifts of contrast response curves. These horizontal shifts of contrast response curves show that early cortical visual response in humans displays contrast response gain changes with adaptation, a process that is thought to underlie an adaptive mechanism allowing the brain to efficiently encode and process stimuli with various average contrast levels.

(12) 機能的光トポグラフィーによる乳児視覚野の反応の経時的変化

中井昭夫, 眞弓光文 (福井大学医学部 小児科)

柏倉健一, 米倉義晴 (福井大学 高エネルギー医学研究センター)

河内山 隆紀 (京都大学大学院 人間・環境学研究科 総合人間学部)

定藤規弘 (岡崎国立共同研究機構生理学研究所大脳皮質機能研究系心理生理学部門)

小泉英明 (日立基礎研究所)

我々は以前 fMRI にて視覚野の Hb の反応が生後 60 日で逆転することを報告したが, fMRI は BOLD 効果をみているに過ぎない。一方, 近赤外線分光法 (NIRS) は酸化, 還元 Hb を各々測定でき, 時間分解能も高い。今回 NIRS を用いた光トポグラフィーにて乳児視覚野の反応について検討した。対象は保護者から同意を得られた正常満期産児。自然睡眠中 8Hz Flash による 5 秒 ON, 15 秒 OFF の光刺激に対する酸化, 還元 Hb を日立メディカル

ETG-100 にて生後1ヶ月, 3ヶ月, 7-9ヶ月と経時的に測定した。結果, 光刺激に対し酸化 Hb が増加, 還元 Hb が減少し, このパターンは生後 1ヶ月, 3ヶ月, 7-9ヶ月とも同様であった。以前の fMRI 研究は薬物による鎮静下で, そのパラダイムは 30 秒 ON, 30 秒 OFF であった。今後更に例数を増やすとともに, 様々な刺激時間による fMRI との同時測定などの検討が必要と考えられる。

(13) Model-free nonlinear regression analysis in fMRI using an artificial neural network

Masaya Misaki, Satoru Miyauchi (独立行政法人 通信総合研究所 関西先端研究センター)

We developed a new method for analyzing fMRI data using an artificial neural network. In most fMRI studies, searches are made looking for a correlation between certain events/tasks and change in fMRI signal. It is known that change in fMRI signals nonlinearly relates to events. We employed a three-layered back-propagation neural network, given a series of events as inputs and an fMRI signal as an ideal output, for performing a nonlinear regression analysis. Although this method is almost equivalent to the analysis using the Volterra series, it is more flexible and model-free because no assumptions about the shape of kernel function

and its order are needed. The method can detect any correlations between events and fMRI signals even when an unknown response mediates those correlations. The example results indicated that our model-free nonlinear regression analysis has advantages of flexibility and detectability, but has also weakness for false positive errors. Thus, this method is not just right for a substitute of other model-based methods like the general linear model, rather it is suitable for a more exploratory analysis such as to detect unknown brain activities or hemodynamic responses which are not a priori expected.

12. シナプス伝達の細胞分子調節機構

2003年9月19日－9月20日

代表・世話人：八尾 寛（東北大学生命科学研究科）

所内対応者：伊佐 正（岡崎国立共同研究機構生理学研究科）

- (1) “Ca²⁺ wavelet” : Ca²⁺誘起性 Ca²⁺遊離機構を介する Ca²⁺波の最小単位の可能性
秋田 天平, 久場 健司（名古屋学芸大学管理栄養学部管理栄養学科解剖生理学研究室）
- (2) 海馬苔状線維シナプスにおける神経終末内カルシウムストアの機能
神谷 温之（神戸大・院医・細胞・神経生理）
- (3) アデノシン A1 受容体を介するシナプス前抑制のメカニズムと生後発達変化
木村 昌弘, 斎藤 直人, 高橋 智幸（東京大学大学院医学系研究科神経生理）
- (4) *Drosophila* Synaptotagmin I: a Ca²⁺ sensor for synchronized release
and a negative regulator of spontaneous vesicle fusion
Tomonori Okamoto, Kazuhiro Suzuki, Yoshiaki Kidokoro (Gunma University School of Medicine)
- (5) 2光子励起グルタミン酸法によるシナプス動態の解析
河西 春郎（生理学研究科・生体膜部門）
- (6) シナプス小胞サイクリングに関わるミオシン
持田 澄子（東京医科大学）
- (7) 膜融合関連タンパク質トモシンによる神経突起発芽・伸長の制御
匂坂 敏朗, 高井 義美（大阪大学大学院医学系研究科生体制御医学）
- (8) ラット内側前庭神経核ニューロンの神経伝達物質の同定
齋藤 康彦, 高澤 知規, 都筑 馨介, 小澤 滯司（群馬大学大学院, 神経生理）
- (9) マウス網膜外網状層のグルタミン酸トランスポーターによるシナプス伝達調節
長谷川 淳（東京大学・大学院人文社会系研究科）
- (10) PSD の分子構築とその動態の定量的解析
岡部 繁男（東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科）
- (11) B Katz の足跡とシナプス研究の未来
高橋 智幸（東京大学大学院医学系研究科神経生理）
- (12) SDS-FRL 法による歯状回 LTP 誘導に伴う AMPA 型グルタミン酸受容体動態の解析
深澤 有吾, 重本 隆一（生理学研究科脳形態解析）
- (13) 大脳皮質視覚野ニューロンの高頻度発火により誘発される抑制性伝達の長期抑圧発現機構
黒谷 亨（名古屋大学・環境医学研究所）
- (14) インテグリンによる小脳抑制性シナプス可塑性の調節
川口 真也, 平野 丈夫（京都大学大学院理学研究科）
- (15) グルタミン酸受容体 delta2 サブユニット欠損マウスプルキンエ細胞における抑制性シナプス伝達増強の飽和
大槻 元, 平野 丈夫（京都大学大学院理学研究科）
- (16) 代謝型グルタミン酸受容体による神経可塑性修飾の分子機構 —メタ可塑性を中心に—
渡部 文子, 真鍋 俊也（東京大学医科学研究所）
- (17) ニコチンによる線条体ドーパミン/DARPP-32 情報伝達系の調節
西 昭徳, 浜田 美保, 東 英穂（久留米大学医学部生理学第一）

(18) 単一海馬苔状線維終末における Ca^{2+} チャンネルサブタイプ発現の多様性ー同一軸策上終末の Ca^{2+} チャンネルサブタイプ発現ー

宮崎 憲一, 真鍋 友則, 石塚 徹, 八尾 寛 (東北大学大学院生命科学研究科)

(19) 空間学習成立マウス海馬における苔状線維の新しい投射の解析

和地 恵, 奈良 諭, 石塚 徹, 八尾 寛 (東北大学大学院生命科学研究科)

(20) Hyperpolarization-activated cation current and its modification of dendritic spike initiation
in projection neurons of the rat superficial superior colliculus遠藤 利朗¹, 納富 拓也², 重本 隆一², 伊佐 正¹ (生理研¹ 認知行動発達, ² 脳形態解析)

【参加者名】

小澤 滯司, 城所 良明, 齋藤 康彦, 新国 撰 (群馬大・医), 平野 丈夫, 大槻 元, 髭 俊秀, 鶴野 瞬, 川口 真也, 矢和多 智, 吉田 盛史, 津村 健策, 関 優子 (京都大・理), 八尾 寛, 宮崎 憲一, 和地 恵, 真鍋 友則, 奈良 諭 (東北大・生命科学), 持田 澄子 (東京医科大), 岡部 繁男, 栗生 俊彦 (東京医歯大), 小松由紀夫), 黒谷 亨, 高田 直樹 (名古屋大学・環境医学), 立花 政夫, 長谷川 淳 (東京大院・人文), 高橋 智幸, 山下 貴之, 中村 行宏, 石川 太郎, 金子 雅博, 木村 昌弘, 水谷 治央, 齋藤 直人, 谷 真紀 (東京大院・医), 西 昭徳 (久留米大・医), 高井 義美,

匂坂 敏朗 (大阪大院・医), 成田 和彦 (川崎医科大), 久場 健司, 久場 雅子, 秋田 天平, 須崎 尚 (名古屋学芸大), 神谷 温之 (神戸大院・医), 真鍋 俊也, 渡部 文子 (東京大学医科研), 森元 宏樹 (大阪市立大・医), 馬場 威 (大阪大・分子生理), 清水 秀忠 (基生研), 柳川右千夫, 井本 敬二, 河西 春郎, 山肩 葉子, 初山 俊彦, 畠山 裕康, 本蔵 直樹, 沼田 朋大, 萩原 明, 児玉 貴史, 岸本 拓哉, 窪田 芳之, 篠原 良章, 根本 知己, 重本 隆一, 伊佐 正, 関 和彦, 遠藤 利朗, 吉田 正俊, 西村 幸男, 坂谷 智也, 渡邊 雅之 (生理研)

【概要】

生理研研究会「シナプス伝達の細胞分子調節機構」は平成 15 年 9 月 19-20 日の 2 日間おこなわれ, 分子からネットワークに至る幅広いレベルで活発な議論がおこなわれた。セッション「カルシウムと開口放出制御」においては, Ca^{2+} 誘起性 Ca^{2+} 遊離機構 (CICR) や Ca^{2+} チャンネルを介する伝達物質放出制御や Ca^{2+} センサー分子の構造機能連関について議論された。セッション「メンブレンダイナミクス」においては, 開口放出を制御する分子機構について議論された。また, シナプス活動に伴う樹状突起の形態ダイナミクスの研究が紹介された。セッション「伝達物質とその受容体」においては, 伝達物質の同定とトランスポーターによる制御, ならびに受容体局在制御の分子機構について議論された。セッション「シナプス可

塑性」においては, 長期増強 (LTP), 長期抑圧 (LTD) についての新しい知見が次々と報告された。セッション「シナプスネットワークとその可塑性」においては, これまでに議論されてきたシナプスやニューロンの機能をになう分子機構が, ネットワークとしての脳の機能にどのように反映されるのかについての新しい試みが報告された。また, 高橋智幸氏による講演「B Katz の足跡とシナプス研究の未来」は, 研究の進め方ということについての示唆に富んでおり, シニアの研究者に自省を促すとともに, 若手の研究者に強いインパクトを与えたと思われる。シナプス研究の 50 年を総括するにふさわしい研究会であった。

(1) “Ca²⁺Wavelet” : Ca²⁺誘起性 Ca²⁺遊離機構を介する Ca²⁺波の最小単位の可能性

秋田天平, 久場健司 (名古屋学芸大学管理栄養学部管理栄養学科解剖生理学研究室)

今回我々は細胞膜での Ca²⁺流入量に応じて Ca²⁺誘起性 Ca²⁺遊離 (CICR) による細胞内 Ca²⁺放出量が連続的に変化することを説明する機序として, 新たな CICR の最小単位の可能性について検討したので報告する。我々の対象である培養ウシガエル腰部交感神経節細胞では, 細胞膜直下 2-5mm 以内の細胞質領域で引き起こされる細胞内 Ca²⁺濃度上昇 ([Ca²⁺]_i) のほぼ全てが CICR を介する Ca²⁺波によるものであるが, w-conotoxin GVIA (1 mM) 投与中の Ca²⁺電流の段階的な減少に伴う CICR の変化から, CICR による領域全体の Ca²⁺放出の総流束 (flux) は細胞膜 N-type Ca²⁺チャネルの開閉数に比例することが判明した。一方, 細胞膜脱分極の程度を段階的に高くすることにより Ca²⁺電流の駆動力を減少させた場合では, 単位 Ca²⁺チャネルを通る Ca²⁺流入量の減少に対し, CICR の流束は S 字状に減衰した。以上のことは領域内の CICR が最小 CICR 単位の重ねあわせからなり, 各々の最小単位は単位 Ca²⁺チャネルの開閉に伴う開口部近傍の高 [Ca²⁺]_i

領域 (Ca²⁺domains) を通じて活性化されることを示唆する。しかし, このような Ca²⁺流入に応じた領域内の CICR 総流束の変化にもかかわらず, Ca²⁺チャネルの開閉に引き続いて起こる Ca²⁺波については, その領域内伝播の距離に変化が認められなかった。このことは [Ca²⁺]_i 上昇の蛍光信号を空間領域でスペクトル分析することにより確定できた。以上のことは最小 CICR 単位そのものが Ca²⁺波であることを示唆し, そのような単位 Ca²⁺波は CICR を担うリアノジン受容体が, それ自身に隣接する同受容体の活性化により形成される限局した高 [Ca²⁺]_i 領域を通じてのみ活性化される場合に初めて可能となる。この細胞に

おける小胞体の網状構造を考慮すれば, 単位 Ca²⁺波とは網状構造の一部を伝わる高 [Ca²⁺]_i 領域の「束」と考えられる。我々はそのような単位 Ca²⁺波を "Ca²⁺wavelet" と名づけた。

連絡先: tenpak@nuas.ac.jp

(2) 海馬苔状線維シナプスにおける神経終末内カルシウムストアの機能

神谷温之 (神戸大学大学院医学系研究科細胞・神経生理学分野)

シナプス前終末におけるカルシウム動態の制御因子として, 近年, 細胞内カルシウムストアの機能が注目を集めている。このうち, シナプス前終末に多く存在するミトコンドリアが大容量性のカルシウム緩衝系としても機能し, 入力線維の長時間の繰り返し刺激により生じるテタヌ後増強 (post-tetanic potentiation: PTP) と呼ばれる短期可塑性に寄与することが, ザリガニ神経筋接合部などで示されている。これに加えて, 最近になって (1) カエル神経筋接合部, (2) ラット海馬 CA3 野連合性シナプス, (3) ラット小脳抑制性シナプス, などの系でシナプス前終末における小胞体ストアの機能に関する報告が相次いでなされた。(1)(2) ではカルシウム誘発性カルシウム放出 (calcium-induced calcium release: CICR) の機構により短期シナプス可塑性の増幅作用を示し, (3) では自発的カルシウム放出 (カルシウムスパーク) を介して多量量

の同期的放出による自発性シナプス応答 ('maximins') を引き起こすことが報告されている。マウス海馬では, 小胞体ストアからのカルシウム放出を担うリアノジン受容体の mRNA が CA3 野錐体細胞および歯状回顆粒細胞に強く発現する。1 型 (RyR1: 骨格筋型), 2 型 (RyR2: 心筋型), 3 型 (RyR3) のリアノジン受容体のうち, 苔状線維の起始細胞である歯状回顆粒細胞では RyR2 の mRNA 発現が最も強く, RyR1 がこれに続き, RyR3 の発現は少ない。また, CA3 野透明層には放射性標識したリアノジンに対する特異的結合部位が存在し, 苔状線維を切断し変性させるとこれが消失することから, 苔状線維シナプス前部にリアノジン受容体が存在する可能性が示唆される。この苔状線維シナプス前部におけるリアノジン受容体の機能を明らかにするために, マウス海馬スライス標本を用いて検討を行った。リアノジン受容体からのカル

シウム放出を促すカフェインを投与すると、苔状線維シナプス伝達は著明に増大した。このとき、二発刺激促進は減少し、また、苔状線維終末に由来する微小 EPSC の頻度が増加したことから、カフェインの作用はシナプス前終末からの伝達物質放出の促進によると考えられた。また、軸索標識法で苔状線維シナプス前部に選択的に蛍光カルシウム指示薬を負荷した標本において、カフェイ

ン投与により終末内カルシウムレベルの増加を確認した。以上の結果は、苔状線維終末に機能的なリアノジン受容体が存在する可能性を示唆する。今後は、このシナプス前カルシウムストアが CICR の機構を介して苔状線維シナプスにおけるシナプス前性の長期増強・長期抑圧の誘発に寄与する可能性について検討を進めていきたい。

(3) アデノシン A1 受容体を介するシナプス前抑制のメカニズムと生後発達変化

木村昌弘, 斎藤直人, 高橋智幸 (東京大学大学院医学系研究科機能生物学専攻・神経生理学教室)

アデノシンは神経活動や虚血に伴って細胞から放出される ATP の速やかな分解によって生成され、中枢神経系の恒常性に寄与することが知られている。生後 5-7 日のラット脳幹スライス MNTB ニューロンから the calyx of Held シナプスの興奮性シナプス後電流 (EPSC) をホールセル記録してアデノシンによるシナプス修飾作用を検討した。アデノシン (100mM) は自発性微小 EPSC (mEPSC) の振幅を変化させず、刺激誘発性 EPSC の振幅を抑制することから、作用点は神経終末端と同定された。A1 受容体阻害薬 CPT (0.5mM) は 20 秒間隔で誘発した EPSC の振幅には作用しなかったが、10Hz 連続刺激中のシナプス抑制に対して部分的に拮抗した。神経活動によって放出された ATP がアデノシンに変換されて、A1 受容体を活性化し、伝達物質の放出を抑制すると推論される。次に the calyx of Held シナプス前末端から電位依存性 Ca^{2+} 電流 (Ipca) および K^+ 電流をホールセル記録してアデノシンの作用を検討した。アデノシンは Ipca を可逆的に抑制したが、 K^+ 電流には作用しなかった。シナプス前末端と後細胞から同時記録を行い、 Na^+ チャンネル、 K^+ チャンネルをブロックした後に Ipca (1ms の脱分極パルスで誘発) によって EPSC を誘発し、アデノシンの作用を細胞外 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 濃度比の減少作用と比較したところ、両者の入力

(Ipca) 出力 (EPSC) 関係はほぼ完全に一致した。アデノシンによる EPSC の抑制は専らシナプス前末端の Ca^{2+} 電流の抑制によるものと判断される。N 型 Ca^{2+} チャンネル阻害薬 w-conotoxin は生後 5-7 日の EPSC を部分的にブロックしたが、アデノシンによる EPSC 抑制作用には影響を与えなかった。生後 5-7 日のラットにおいてアデノシンによる EPSC の抑制効果は顕著であったが生後発達と共に減少して生後 14 日には約 1/3 となった。これと平行して、western blotting で定量した MNTB 領域の A1 受容体タンパク質の減少が認められた。また、同様に免疫組織化学によって calyx 終末端に検出される A1 受容体の蛍光強度も生後発達と共に減弱した。未成熟動物において the calyx of Held シナプス前末端の A1 受容体は複数種の Ca^{2+} チャンネルを非特異的に抑制することによって伝達物質の放出を制御すると結論される。未成熟動物の多くのシナプスでは伝達物質放出確率が高く、シナプス抑制が強いが、この傾向は生後発達と共に減少することが知られている (e.g. Iwasaki & Takahashi, 2001, J Physiol 534, 861)。内在性アデノシンは未成熟動物の伝達物質放出確率を下げることによって伝達物質の枯渇を防ぐ役割を有すると推論される。

(4) Drosophila Synaptotagmin I: a Ca^{2+} sensor for synchronized release and a negative regulator of spontaneous vesicle fusion

Tomonori Okamoto, Kazuhiro Suzuki and Yoshiaki Kidokoro*

(Gunma University School of Medicine, 3-39-22 Showa-machi, Maebashi 371-8511 Japan)

Synaptotagmin I (Syt I) is widely considered to be a major Ca^{2+} sensor for fast transmitter release and has two putative Ca^{2+} binding domains, C2A and C2B. To elucidate its roles in synaptic transmission in situ, we studied synaptic currents at the neuromuscular junction (NMJ) of *Drosophila* embryos that have mutations in syt I. Synaptic currents were induced by nerve-stimulation in external solutions containing various concentrations of Ca^{2+} or by high K^+ solutions. In a null allele, syt IAD4, synchronized synaptic currents were rarely evoked but not abolished. Its quantal content increased with $[\text{Ca}^{2+}]$ with a slope of 0.7 in double logarithmic plot, in contrast to 2.7 in control. The slope of 0.9 in an allele that lacks entire C2B, syt IAD1, was not different than in syt IAD4, whereas

in another allele, syt IAD3, with one amino-acid substitution in C2B, it was 1.6. In normal saline, the miniature synaptic current (mini) frequency in syt IAD4 was not different than in other syt I alleles or in controls. Considering much smaller hypertonicity and Ca^{2+} -ionophore responses in syt IAD4, this finding suggests that the release probability of docked/primed vesicles for spontaneous release is higher in the absence of Syt I. In high K^+ saline, the dependency of mini frequency on $[\text{Ca}^{2+}]$ in syt IAD4 was less than that in controls, while that in syt IAD3 was even lower than in syt IAD4. We conclude that *Drosophila* Syt I is a Ca^{2+} sensor for synchronized release but inhibits spontaneous quantal release.

(5) 2光子励起グルタミン酸法によるシナプス動態の解析

河西春郎, 松崎政紀, 野口潤, 安松信明 (生理学研究所)

2光子励起法をケイジドグルタミン酸に応用することにより, 大脳皮質錐体細胞の単一の興奮性シナプスの形態, 機能, 可塑性について系統的に調べる作業を行って

いる。今回は, 形態可塑性と機能可塑性の関係, NMDA受容体の分布の測定法などについて最近の知見を紹介したい。

(6) シナプス小胞サイクリングに関わるミオシン

持田 澄子 (東京医科大学・生理学第一講座)

シナプス前終末に神経信号である活動電位が到達すると, シナプス小胞内に充填されていた神経伝達物質がシナプス間隙に開口放出され, シナプス後細胞に化学的に信号が伝えられる。シナプス小胞開口放出後, シナプス前終末内に再取り込み(エンドサイトーシス)された小胞には伝達物質が再充填されて, 備蓄プールに蓄えられ, 開口放出部位(アクティブゾーン)に運ばれる。このように, シナプス小胞は神経終末内でリサイクリングされて

おり, 神経終末に多数発現している蛋白質のいくつかは複合体を形成してそれぞれのシナプス小胞ステージを決定し, 各ステージへのシナプス小胞の移送にはモーター蛋白が働いていると考えられる。モーター蛋白のひとつであるミオシンのうち, IIとVに分類されるミオシンが神経に多く発現しており, アクチン線維との相互作用によって, ミオシンIIは神経細胞や神経突起の動きを担い, ミオシンVは小胞輸送に関わっていることがこれまでに示

唆されている。我々は培養ラット上頸交感神経節細胞間に形成されるコリン作動性シナプスを用いて、ミオシン II がシナプス前終末において伝達物質放出に関わっている分子であることを確認している。

ミオシンIIはIIAとIIB, ミオシンVはVa, VbとVcのアイソフォームが存在する。シナプス前終末での伝達物質放出におけるこれらのミオシンアイソフォームの機能的役割を明らかにするために、培養ラット上頸交感神経節細胞間シナプスを用いて解析を試みたところ、下記の事柄が確認された。

1) ミオシンの免疫蛍光染色は、ミオシン IIB と Va は上頸交感神経節細胞の細胞体と神経突起に発現するが、シナプス前終末にはミオシン IIB のみが発現し、IIA, Vb は上頸交感神経節細胞にはまったく発現しないことを示唆する。

2) 蛍光蛋白 (Green Fluorescence Protein: GFP) を導入したミオシン cDNA の発現は、シナプス前終末にはミオシン IIB のみが発現し、Va は発現しないことを支持する。

3) ミオシン Va 欠損ラットの交感神経節細胞間シナプスの電子顕微鏡像は、シナプス形態が正常であることを示唆する。また、ミオシン Va 欠損ラット上頸交感神経節細胞シナプスの電気生理学的機能解析は、シナプス形成、シナプス小胞開口放出、シナプス伝達の強度と短期可塑性に異常は認められず、ミオシン Va が発現しなくてもシナプス伝達は正常に機能することを示唆する。

4) ミオシン IIB の重鎖フラグメントを培養上頸交感神経節細胞シナプス前終末に導入して、ミオシン IIB 重鎖とそのフラグメントを重合させることによってミオシン IIB 機能を阻害すると、神経伝達物質放出量が減少する。神経伝達物質放出量の減少は、リン酸化されていないミオシン IIB の重鎖フラグメントのシナプス終末導入によってのみ認められ、リン酸化フラグメントや IIA フラグ

メントでは神経伝達物質放出量が不変であったことから、シナプス前終末内での脱リン酸化されたミオシン IIB 重鎖フラグメントの重合がミオシン IIB 機能発現に重要であると考えられる。

5) 脱リン酸化ミオシン IIB 重鎖フラグメントは、高張液 (0.5M 蔗糖) 投与によって測定されるシナプス小胞開口放出部位の貯蔵プール (readily releasable pool) の大きさを変えないが、頻回神経刺激によってシナプス小胞がリサイクリングされている状況ではこの貯蔵プールがフラグメントによって枯渇されてくる。

6) 脱リン酸化ミオシン IIB 重鎖フラグメントは、PPD (Paired-pulse depression) にまったく影響しないことから、100 ミリ秒以内の速いシナプス小胞リサイクリングには作用しない。また、従来から知られている遅いシナプス小胞リサイクリング (古典的リサイクリング) 過程の小胞プールを神経刺激によって枯渇させると、シナプス小胞備蓄プール (reserved pool) のへの小胞移送は脱リン酸化ミオシン IIB 重鎖フラグメントによって影響されないが、シナプス小胞開口放出部位貯蔵プールへの小胞移送が遅くなる。最近では、シナプス前終末におけるシナプス小胞リサイクリングは、神経の興奮に応じて kiss-and-run, 速いリサイクリング, 古典的リサイクリングの3通りの過程が起こると考えられている。これらの小胞リサイクリング過程のうち、ミオシンIIBがシナプス小胞備蓄プールから小胞開口放出部位へのシナプス小胞輸送を担っているが、ミオシン IIA, Va, Vb はシナプス小胞輸送には関わらないことが伺える。

1. Mochida S, Kobayashi H, Matsuda Y, Yuda Y, Muramoto K, Nonomura Y (1994) Myosin II is involved in transmitter release at synapses formed between rat sympathetic neurons in culture. *Neuron* 13:1131-1142.

(7) 膜融合関連蛋白質トモシンによる神経突起発芽・伸長の制御

匂坂敏朗, 田中晋太郎, 馬場威, 泉鉉吉, 安見正人, 高井義美 (阪大院・医・分子生理化学)

Tomosyn, a membrane fusion related protein, regulates neurite outgrowth

Toshiaki Sakisaka, Shintaro Tanaka, Takeshi Baba, Genkichi Izumi, Masato

Yasumi, Yoshimi Takai

(Osaka Univ., Med. Sch., Dept. of Mol. Biol. and Biochem.)

神経細胞における軸索や樹状突起といった神経突起の伸長は、小胞輸送により膜成分が突起の先端端へ運ばれ、そこで小胞と膜が融合することにより起こる。膜融合には、普遍的な膜融合装置である SNARE 系蛋白質が関与している。標的 SNARE 蛋白質 (t-SNARE) であるシンタキシン, SNAP25 は細胞形質膜上に広く存在することが知られている。そのため、膜融合が先端端以外の場所で非特異的に起こる可能性があり、t-SNARE の活性を負に制御する分子メカニズムが必要であると考えられる。私共は、シンタキシンに結合する SNARE 系の活性制御蛋白質として、トモシンを見出している。今回、私共は、神経突起の伸長におけるトモシンの役割について解析した。初代培養海馬神経細胞と神経芽細胞腫由来の NG108

細胞に、トモシンを過剰発現させると神経突起の伸長を抑制した。NG108 細胞において、VSV-G を用いたトランスポートアッセイにより、トモシンが膜蛋白質のエキソサイトosisを抑制することによって、突起伸長が抑制されていることが明らかとなった。また、トモシンは t-SNARE と複合体を形成し、膜融合に必須な 7S SNARE 複合体の形成を抑制していた。さらにトモシンは、膜融合が活発に起こっている成長円錐の後基部に局在していた。以上の結果から、成長円錐の後基部において、トモシンが膜融合に必須な 7S SNARE 複合体の形成を抑制し、細胞形質膜上に境界を作り、非特異的な膜融合を抑制することにより、神経突起の伸長を制御していると考えられた。

(8) ラット内側前庭神経核ニューロンの神経伝達物質の同定

齋藤康彦, 高澤知規, 都筑馨介, 小澤澪司 (群馬大学大学院・医学系研究科・神経生理)

前庭神経核は、視線の方向や姿勢、体の平衡の制御、調節を司る中枢である。前庭神経核ニューロンの活動は動物の行動と密接に関連することから、前庭神経核ニューロンの機能的特徴を明らかにすることは前庭機能を理解する上で重要であると考えられている。近年、前庭神経核の *in vitro* スライス標本を用いた研究方法が確立され、内側前庭神経核において内在的な膜特性の異なるニューロン群が存在することが明らかになった。主なニューロンとして、単一のスパイク後過分極 (AHP) が見られ活動電位の生成が時間的に遅れる Type A ニューロン、時間的に速い AHP と遅い AHP の 2 つの AHP(double AHP) がみられる Type B ニューロン、その中間的な Type C ニューロンの 3 種類に分類されている。しかし、これらのニューロン群が前庭神経核内でどのような役割を持っているのかについては、十分な議論がされていない。その

理由として、分類されたニューロン群のうちどれが興奮性ニューロンでどれが抑制性ニューロンなのかが明らかになっていない点が挙げられる。そこで本研究では、内側前庭神経核ニューロンの内在的な膜特性とそのニューロンがもつ神経伝達物質との関係を明らかにすることを目的とした。生後約 3 週齢のラットから前庭神経核スライス標本作製し、ホールセルパッチクランプ法により内側前庭神経核ニューロンの内在的な膜特性 (AHP, 発火パターン, 過分極応答) を調べ、そのニューロンから細胞質を取り出し、RT-PCR 法により神経伝達物質関連マーカーの探索を行なうことで、そのニューロンが GABA 作動性, グルタミン作動性, コリン作動性, グリシン作動性ニューロンのうちどれであるのかを判別した。ホールセル記録の結果、内側前庭神経核ニューロンは上記の 3 種類以外にも様々な膜特性をもつニューロンが存

在することが明らかになった。GABA 作動性ニューロンは様々な膜特性を示したが、特に、活動電位の生成が時間的に遅れるタイプの発火パターンは他のニューロンではほとんど見られなかったことから、GABA 作動性ニューロンの特徴であると考えられる。一方、グルタミン作動性ニューロンのほとんどは、スパイク間隔がほぼ一定

の発火パターンを示し、double AHP と H 電流による内向き整流性を示すニューロンであった。以上の結果から、内側前庭神経核において、GABA 作動性ニューロンは様々な反応特性を示す heterogeneous なニューロン群であり、グルタミン作動性ニューロンは線形な反応特性を示す限られたニューロン群であることが考えられる。

(9) マウス網膜外網状層のグルタミン酸トランスポーターによるシナプス伝達調節

長谷川淳，立花政夫

(東京大学・大学院人文社会系研究科・心理学研究室)

視細胞は光を受容すると過分極し、グルタミン酸の放出量を減少させる。ON 型双極細胞の樹状突起には代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR6) があり、グルタミン酸の濃度が低いときに陽イオンチャネルが開き、脱分極する。したがって、光刺激によって ON 型双極細胞が遅滞なく脱分極するためには、シナプス間隙のグルタミン酸濃度が急速に減少しなければならない。このようなシナプスにおいては、グルタミン酸トランスポーターによるシナプス間隙からのグルタミン酸の除去が重要な役割を担っていると考えられる。

本実験ではマウス網膜からスライス標本作製し、桿体入力型 (ON 型) 双極細胞に穿孔パッチ記録法を適用した。標本全体を持続的に光照射することで視細胞からの自発的なグルタミン酸放出を減少させておき、視細胞層を局所的に電気刺激したときに生じる双極細胞のシナプス後電流を記録した。双極細胞への抑制性シナプス入力は薬理的に阻害しておいた。

双極細胞の膜電位を約 -60mV に保持した状態では、定常的に内向き電流が観察された。視細胞層にごく短い (0.2ms) 定電流パルスを与えると、一過性にこの内向き電流が減少するかたちで、外向き電流が発生した。mGluR6 のアゴニストである L-AP4 を灌流投与すると、定常的な内向き電流が減少すると共に、電気刺激に対する応答も消失した。このことから、電気刺激によって生じた外向き電流は、視細胞から一過性に放出されたグルタミン酸

が双極細胞の mGluR6 を活性化して陽イオンチャネルの開確率を減少させた結果生じたものであることが確認された。そこで、電気刺激の強度を変化させ、視細胞からのグルタミン酸放出量を操作した。刺激の強度を大きくするにつれて、双極細胞で発生する外向き電流の振幅は増大したが、その持続時間はほぼ一定であった。一方、グルタミン酸トランスポーターの阻害剤である TBOA を灌流投与すると、刺激の強度を大きくするにつれて外向き電流の振幅が増大するのみならず、持続時間が顕著に延長した。

視細胞は光に対して緩電位応答をすることによって、グルタミン酸の放出量をアナログ的に変化させ、受け取る光の強度情報と時間情報とを符号化していると考えられる。しかしながらグルタミン酸トランスポーターを阻害した条件においては、視細胞からのグルタミン酸の放出量が多くなるにつれ、双極細胞の応答は振幅のみならず持続時間まで増大してしまうことがわかった。これでは、光の強度情報が双極細胞に伝えられる際に、時間情報にまで影響を与えてしまうことになる。本研究から、グルタミン酸トランスポーターはこれを防ぐため、視細胞が放出したグルタミン酸を積極的に回収し、双極細胞の応答の持続時間を一定にそろえる働きをしていることが強く示唆された。

* 照会先： 長谷川淳 jun@l.u-tokyo.ac.jp

立花政夫 ltnasao@l.u-tokyo.ac.jp

(10) PSD の分子構築とその動態の定量的解析

岡部繁男 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科)

シナプス後肥厚部 (PSD) に存在する蛋白質群は興奮性シナプスの後部においてグルタミン酸受容体の局在や機能調節に重要な役割を果たしている。PSD 分子のシナプス後部への集積と動態の分子機構を解析する為に、GFP の蛍光量を基にした定量的な解析を試みている。

PSD-95, PSD-Zip45 (Homer 1c), GKAP, cortactin binding protein の 4 種類の GFP 融合 PSD 蛋白質に対して長時間のタイムラプス観察を行った結果、これらの蛋白質の個々のシナプス後部への集積・分散のタイムコースはそれぞれ異なっていた。PSD-95 分子は最もゆっくりとした動態を示し、PSD-Zip45 の動態が最も急速であった。更に蛍光消退法 (FRAP) を用いる事で、このような動態の差異の基礎に、定常状態での PSD への分子の組み込み速度の違いがある事が明かになった。NR1 knockout mouse での PSD-95 の動態解析から、PSD-95 の動態は、NMDA 受容体の有無で大きく変化しないと考えられる。同様に、mGluR5 knockout mouse における PSD-Zip45 の動態解析から、この両者の相互作用も PSD の動態制御には強く関与していないと考えられた。以前我々は cortactin binding protein の PSD への集積には PSD-Zip45 との相互作用が重

要であるという結果を得ている。これに対して PSD-95 の集積を薬理的に阻害しても GKAP, cortactin binding protein, PSD-Zip45 の局在には大きな影響は無かった。樹状突起スパインはアクチン線維が豊富な構造であり、アクチン細胞骨格との相互作用も PSD 分子の集積に関与していると考えられる。薬理的にアクチン線維を脱重合させ、PSD 分子の集積量の変化を定量した。4 種類の PSD 蛋白質のアクチン脱重合に対する反応はそれぞれ異なり、PSD-95 は最もアクチン脱重合に対して抵抗性であった。また、GKAP, cortactin binding protein の FRAP で観察された数分の half life を持つ成分はアクチン依存的な集積機構によるものと考えられた。

以上のデータから PSD 構造の中には (A) PSD-95 を中心とした複合体 (B) cortactin binding protein と PSD-Zip45 を中心とした複合体 (C) アクチン線維依存的な複合体の三つのドメインが少なくとも存在すると考えられる。A および B のドメインはそれぞれ NMDA 受容体, mGluR5 受容体に依存せずに形成され、C のドメインは数分で構成蛋白質が置き換わるダイナミックな構造である。

(12) SDS-FRL 法による歯状回 LTP 誘導に伴う AMPA 型グルタミン酸受容体動態の解析

深澤有吾 (生理学研究所・脳形態解析部門)

近年のゲノム解析により生体の持つタンパク質のほぼ全てが同定されたが、各分子の局在は現在用いられている解剖学的方法の技術的制約のため、不明な点が多く残されている。脳における情報伝達は、神経細胞膜上に存在する伝達物質受容体やチャネル、トランスポーターなどの分子によって担われ制御されており、これら分子の神経細胞膜上の分布や動態を知ることが、神経機能を支える分子機構の理解に必須と考えられる。そこで我々の部門では、凍結割断レプリカ免疫標識法 (SDS-FRL 法) を応用することで同定された神経細胞における膜上機能分子の 2 次元的局在を電子顕微鏡レベルで解析する技術確立し、この方法による小脳内のシナプス (平行線維・プルキンエ細胞、及び、登上繊維・プルキンエ細胞) にお

けるグルタミン酸受容体の局在解析を行った。その結果、これらシナプスのグルタミン酸受容体の分布様式に違いがあることを定量的に明らかにし、本方法がシナプス膜上機能分子の定量的解析に適していることを示した (馬杉ら, 2003 日本神経科学大会)。

本発表では、シナプス機能の変化に伴うグルタミン酸受容体動態を明らかにすることを目的に、SDS-FRL 法を用いて歯状回 LTP 誘導に伴う AMPA 型グルタミン酸受容体の局在変化を解析した結果について以下の項目に沿って報告する。

- 1) SDS-FRL 法の原理と神経科学に応用するために改良した点
- 2) プルキンエ細胞と海馬神経細胞の細胞膜上のグルタ

ミン酸受容体分布の違い

- 3) 歯状回LTP誘導に伴うグルタミン酸受容体の局在変化
発表データは、方法の確立中と言うことも有り、予備

的な結果を多く含みますが、皆様の忌憚無いご意見を頂き今後の参考にしたいと考えています。

(13) 大脳皮質視覚野ニューロンの高頻度発火により誘発される抑制性伝達の長期抑圧発現機構

黒谷亨, 小松由紀夫 (名古屋大学環境医学研究所視覚神経科学)

我々は、視覚野の抑制性シナプス伝達が可塑性現象に果たす役割を調べてきた。その一環として視覚野5層のニューロンを通電により高頻度発火させると、その細胞に生じるIPSPに長期抑圧(LTD)が誘発されることを、我々は見いだした。

このLTDには、1)シナプス後細胞の高頻度発火により生ずる、2)誘発には少なくともL型電位依存性Caチャネルの活性化による細胞内Ca濃度の上昇が必要である、3)シナプス後細胞でのGABAコンダクタンスの減少を伴う、などの特徴がある。今回、その発現メカニズムをIR-DIC観察下でスライスパッチを行うことにより、詳細に検討したので報告する。

実験には生後20から30日齢のSDラットの視覚野から切り出した、厚さ300 μ mの前額断スライス標本を用いた。興奮性伝達をDNQX及びAPVで抑制した後、4層刺激により誘発されるIPSCを、5層の錐体細胞からwhole cell記録した。高頻度発火によるLTDを再現するために、-70mVに膜電位固定した状態から、20msec、70mVの脱分極パルスを20Hzで5秒間与え、これを10秒ごとに30回繰り返すと、IPSCの振幅は脱分極刺激前の75%までに減弱した。LTD誘発前後でのIPSCの逆転電位は変化せず、GABAコンダクタンスが減少した。また、パッチ電極を介して細胞内にBAPTAを負荷すると、LTD誘発は阻害された。さらに、nifedipineを細胞外液に投与してもLTD誘発は阻害された。これらは、上述のIPSPのLTDの特徴によく一致する。

このLTDにはさらに、1)細胞体部に電気泳動的に与えたGABAに対する応答にも、脱分極パルス後にLTDが生じる、2)LTD誘発前後で、IPSCのpaired-pulse ratioは変化しない、3)LTDのmagnitudeに対し、LTD誘発前後のIPSCの変動係数の2乗の逆数比をプロットすると、多くが傾き1の直線の周囲に集まる、などの特徴が見られた。これらの結果は、シナプス前部あるいは後部で、

LTD誘発に伴い、機能的シナプスのサイレント化が生じていると仮定すると、矛盾なく説明できる。

この可能性について検討したところ、以下の結果を得た。1)抑制性介在細胞と思われる非錐体細胞、及び錐体細胞からdouble whole cell記録を行い、介在ニューロンの通電発火により、錐体細胞に生じるunitary IPSCを記録した。錐体細胞に脱分極パルスを与えたところ、ユニタリIPSCのfailure rateが増加した。2)テトロドトキシン存在下で錐体細胞から記録を行い、細胞体部へGABAを電気泳動的に、0.5Mのsucrose溶液をpressure ejectionにより投与し、GABA応答にLTDが生じたときに、sucroseにより誘発されるminiature IPSCの振幅を計測したところ、その振幅ヒストグラムは変化しなかった。これらの結果とGABA応答にもLTDが生じることを考え合わせ、シナプス後部でサイレント化が生じている可能性について、さらに検討した。

GABAA受容体の細胞内への内在化には、clathrin依存性のエンドサイトーシスの関与が報告されているので、パッチピペットを介して種々の阻害剤を錐体細胞に負荷し、その効果を調べた。

1)dynaminとamphiphysinの結合を阻害するペプチドを負荷すると、LTD誘発は阻害されたが、スクランブルしたペプチドには、その効果がなかった。また、GDP- β Sの負荷によっても、LTD誘発は阻害された。2)PKCの阻害剤であるPKC fragment[19-31]、セリソースレオニンキナーゼの阻害剤staurosporineを負荷すると、LTD誘発は阻害された。

以上の結果から、脱分極パルスにより誘発されるIPSCのLTDには、クラスリン依存性のGABAA受容体の内在化に関与していると考えられる。またこのLTDは、シナプス後部における機能的シナプスのサイレント化により発現することも示唆される。

(14) インテグリンによる小脳抑制性シナプス可塑性の調節

川口真也, 平野丈夫 (京都大学大学院理学研究科・生物物理)

小脳皮質の抑制性介在ニューロン (星状・籠状細胞) とプルキンエ細胞間の GABA_B 性シナプスにおいて, プルキンエ細胞の強い脱分極により GABA_A 受容体を介する応答が長時間増強されることが知られている。私たちは以前, プルキンエ細胞の脱分極時にシナプス前細胞が活性化すると, プルキンエ細胞の GABA_B 受容体活性化を介して脱分極依存性増強の誘導が抑制されることを見出した。本研究では, GABA_B 受容体による増強誘導の抑制が細胞接着分子であるインテグリンの機能亢進を介して長時間持続することを報告する。

培養プルキンエ細胞を, GABA_B 受容体作用薬である baclofen (50 mM) を含む高濃度 K⁺ (50 mM) 溶液により刺激し, 脱分極と GABA_B 受容体活性化を起こさせると, その条件刺激後 96 時間以上にわたって脱分極依存性増強が起こらなくなった。このシナプス可塑性の長期間にわたる抑制は, 条件刺激時の mRNA 合成阻害や MAPK カスケード阻害により消失したことから, 脱分極と GABA_B 受容体活性化により, おそらく MAPK カスケードを介して何らかの mRNA が合成され, その結果数日間増強が起こらなくなったと考えられる。

このシナプス可塑性発現の長期にわたる抑制に接着分

子が関与している可能性を検討したところ, 脱分極と GABA_B 受容体活性化の条件刺激を行うと, インテグリン $\alpha 3$ サブユニットタンパク質の量がプルキンエ細胞で増加することが分かった。そして, 増強誘導の長期にわたる抑制効果は, インテグリンとリガンドとの結合を阻害するペプチドや Src ファミリーのタンパク質チロシンキナーゼの阻害剤により消失した。これらの結果は, 脱分極と GABA_B 受容体活性化によりインテグリン/Src カスケードが亢進され, それが増強誘導を長時間にわたり抑制することを示唆する。実際, インテグリンの活性化や c-Src タンパク質のプルキンエ細胞への導入により増強の誘導は阻害されることから, インテグリン/Src カスケードが増強誘導を負に調節していると考えられる。

以上の結果から, プルキンエ細胞で脱分極と GABA_B 受容体活性化が同時に起こると, 細胞接着分子であるインテグリンを介するシグナル伝達系が長期にわたり亢進し, その結果 GABA_A 受容体の増強が抑えられ, 抑制性シナプス伝達が可塑的な状態から安定化されると考えられる。

連絡先: kawaguchi@nb.biophys.kyoto-u.ac.jp

(15) グルタミン受容体 $\delta 2$ サブユニット欠損マウスのプルキンエ細胞における抑制性シナプス伝達増強の飽和

大槻元, 川口真也, 平野丈夫 (京都大学大学院理学研究科・生物物理)

小脳は運動制御に関わり, そこでのシナプス可塑性は運動学習の基盤と考えられている。小脳皮質神経回路内で唯一の出力細胞であるプルキンエ細胞は, 興奮性と抑制性のシナプス入力を受け, 両者を時間-空間的に加算して活動電位発火パターンを決めている。プルキンエ細胞に対する興奮性シナプスでの可塑性としてシナプス伝達の長期に渡る減弱現象である長期抑圧が知られており, また抑制性シナプスでの可塑性としてシナプス伝達の長期に渡る増大現象である脱分極依存性増強が知られている。

$\delta 2$ は, アミノ酸配列の相同性からイオン透過型グルタミン酸受容体のサブユニットに分類され, 中枢神経系の中で小脳プルキンエ細胞特異的に発現し, 興奮性シナプス伝達の長期抑圧誘導に不可欠であることが知られているが, $\delta 2$ サブユニットが細胞内で働くメカニズムはまだ不明である。私たちの研究室では, この $\delta 2$ サブユニットを欠損した遺伝子欠損マウス (以下, $\delta 2$ 欠損マウス) の解析を行ってきている。これまでの研究により, $\delta 2$ 欠損マウスでは, 重度の運動失調がみられ, また 10Hz のリズムを持つ不随意運動が生じていることがわかった。 $\delta 2$

欠損マウス生体内のプルキンエ細胞の活動電位を記録すると、10Hz 周期を示す異常な発火パターンが観察され、この 10Hz の特徴的な発火パターンには登上線維入力に寄与していることを示唆する結果も得られている。一方、 $\delta 2$ 欠損マウスの小脳スライス切片上のプルキンエ細胞は、野生型のプルキンエ細胞より全般的に自発発火の頻度が低かった。そこで、その原因を追求する一連の実験を行った。まず膜電位感受性色素を用いた興奮伝播解析から、小脳プルキンエ細胞に対する抑制性入力に $\delta 2$ 欠損マウスでは野生型よりも強いことがわかった。次に、ホールセルパッチクランプ法によりプルキンエ細胞から抑制性シナプス後電流 (以下, IPSC) を記録したところ、 $\delta 2$ 欠損マウスの方が野生型よりも IPSC が大きいことが

わかった。さらに、スライス切片に GABA 阻害剤を投与すると、 $\delta 2$ 欠損マウスで野生型よりも自発発火頻度の上昇が大きかった。このように、 $\delta 2$ 欠損マウスのプルキンエ細胞では抑制性シナプス入力が強くなっていることが明らかになった。小脳プルキンエ細胞で IPSC を増大させる機構として、抑制性シナプス伝達の脱分極依存性増強が考えられる。そこで野生型及び $\delta 2$ 欠損マウスで脱分極依存性増強を調べたところ、 $\delta 2$ 欠損マウスから取り出した小脳切片では脱分極依存性増強が起こらないことがわかった。これらの実験結果から、 $\delta 2$ 欠損マウス生体内の小脳プルキンエ細胞では脱分極依存性増強が起こってしまっていて、そのためにプルキンエ細胞への抑制性シナプス入力が強くなっていたと考えられる。

(16) 代謝型グルタミン酸受容体による神経可塑性修飾の分子機構—メタ可塑性を中心に—

渡部文子 (東京大学・医科学研究所・神経ネットワーク分野)

記憶・学習に深く関与する海馬では、イオン透過型と代謝型という複数種のグルタミン酸受容体を介してシナプス伝達が行われる。イオン透過型の一つである NMDA 受容体は、シナプス前細胞と後細胞の活動の coincidence detector として、シナプス可塑性や学習行動に重要な役割を担う分子であると考えられている一方、代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR) の役割には未だ不明な点が多い。

これまで我々は、NMDA 受容体複合体に含まれる足場タンパクである PSD-95 変異マウスや、PSD-95 結合タンパクであり MAP キナーゼ系の負の調節因子である SynGAP 変異マウスなどの遺伝子改変マウスを用いて、長期増強 (LTP) や長期抑圧 (LTD) といったシナプス可

塑性の変化、種々のパターン刺激による LTP の誘導閾値の変化、ならびに記憶・学習行動の変化などを調べてきた。また、老齢マウスにおいて、アセチルコリンやノルアドレナリンなどによる LTP 誘導閾値の修飾作用が大きくシフトしていることを示してきた。これらの結果から、LTP の大きさそのものよりもむしろ LTP の誘導閾値の調節が記憶・学習行動と特に良く関連していることが示唆された。そこで今回の発表ではこれら一連の研究を簡単に紹介すると共に、LTP 誘導閾値の活動依存的調節、すなわちメタ可塑性の分子機序解明の第一歩として、代謝型グルタミン酸受容体による LTP 誘導閾値調節機構について最近の知見を紹介したい。

(17) ニコチンによる線条体ドーパミン/DARPP-32 情報伝達系の調節

西昭徳, 浜田美保, 東英穂 (久留米大学医学部生理学第一講座)

ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) は中枢神経系では主として神経終末に発現し、神経伝達物質の放出を調節することが知られている。線条体ではドーパミン作動性神経終末には $\alpha 4\beta 2^*$ nAChR が、グルタミン酸作動性神経終末には $\alpha 7$ nAChR が発現しており、それぞれドーパミン、グルタミン酸の放出を促進している。

nAChR を介するドーパミン放出はパーキンソン病の病態と密接に関わっており、喫煙者ではパーキンソン病の発症率が低く、ニコチンはパーキンソン病に対して治療効果を示すことが知られている。また、統合失調症や注意欠陥多動障害ではニコチンにより認知障害が改善することも報告されている。しかし、nAChR を介した作用が

行動障害, 認知障害を改善する分子機構, ニコチン依存症を来す分子機構は未だ明かではない。

線条体ニューロン (medium spiny neuron) には, ドーパミンにより制御されるリン酸化蛋白 DARPP-32 (dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein, Mr 32 kDa) が選択的に発現している。DARPP-32 は, Thr34 残基が PKA によりリン酸化されると PP-1 抑制蛋白として作用し, PP-1 基質のリン酸化レベルを調節することで線条体神経機能を調節している。多くの神経伝達物質の作用は DARPP-32 リン酸化を介して統合されるため, DARPP-32 は線条体での情報統合機構解析モデルとして優れている。本研究では, ニコチンによる DARPP-32 の Thr34 残基リン酸化調節をマウス線条体スライスをを用いて検討した。

ニコチン (100 mM) は DARPP-32 Thr34 残基リン酸化を一過性に促進した。ニコチン (100 mM) によるリン酸化上昇は, ドーパミン D1 拮抗薬 SCH23390, DHbE (a4b2*

nAChR 拮抗薬), a-bungarotoxin (a7 nAChR 拮抗薬) および NMDA/AMPA 受容体拮抗薬により抑制された。一方, ニコチン (1 mM) は DARPP-32 Thr34 残基リン酸化レベルを低下させた。ニコチン (1 mM) によるリン酸化低下はドーパミン D2 拮抗薬 raclopride および DHbE により抑制されたが, a-bungarotoxin, NMDA/AMPA 受容体拮抗薬では抑制されなかった。

以上より, ニコチン (100 mM) は a4b2* nAChR と a7 nAChR を活性化し, a7 nAChR 刺激により放出されたグルタミン酸がドーパミン神経終末で NMDA/AMPA 受容体を活性化し, a4b2* nAChR と相乗的にドーパミン放出を促進すると考えられた。その結果, ドーパミン D1 signaling を増強する事が示唆された。一方, ニコチン (1 mM) は a4b2* nAChR のみを活性化し, a4b2* nAChR 刺激により放出されたドーパミンは選択的にドーパミン D2 signaling を増強する事が示唆された。

(18) 単一海馬苔状線維終末における Ca^{2+} チャンネルサブタイプ発現の多様性 —同一軸索上終末の Ca^{2+} チャンネルサブタイプ発現—

宮崎憲一, 真鍋友則, 古関 誠, 石塚 徹, 八尾 寛
(東北大学大学院生命科学研究科脳機能解析学分野)

海馬苔状線維シナプス前終末には多彩な Ca^{2+} チャンネルサブタイプが発現している。われわれは, 海馬 CA3 領域透明層において, 苔状線維終末に少なくとも 4 種類の Ca^{2+} チャンネルサブタイプ, N-, P/Q-, L-, R-type が分布していることを報告した。しかし, シナプス前終末個々において Ca^{2+} チャンネルサブタイプがどのように発現しているかについては調べられていない。また, CA3 錐体細胞樹状突起基部に形成される大型のシナプスと GABA 性介在ニューロンに形成される小型のシナプスが機能的に異なっている可能性がある。本研究においては, CA3 錐体細胞を標的とする大型のシナプス前終末に注目し, 単一海馬苔状線維シナプス前終末において Ca^{2+} チャンネルサブタイプがどのように発現しているかを検討した。

マウス海馬スライスを作成し, 歯状回顆粒細胞層に蛍光デキストラン色素を投与し, 順行性に苔状線維を標識した。細胞外 Ca^{2+} を Sr^{2+} に置換し, シナプス前終末における Sr^{2+} 流入を光学的に測定した。共焦点顕微鏡下に,

Ca^{2+} 非感受性の Alexa546-dextran 蛍光で大型のシナプス前終末を形態的に同定し, Ca^{2+} 感受性の Oregon Green 488-BAPTA1-dextran 蛍光で Sr^{2+} 濃度変化を測定した。

単一の苔状線維シナプス前終末においては, 4 種類の Ca^{2+} チャンネルサブタイプがさまざまなパターンで発現しており, 個々のシナプス前終末は Ca^{2+} チャンネルサブタイプの発現率においてヘテロであることを見出した。さらに, 同一軸索の二つの終末を比較したところ, Ca^{2+} チャンネルサブタイプの発現比率においてヘテロであることが示唆された (図 A,B)。

一般に Ca^{2+} チャンネルサブタイプは異なる修飾を受けていると考えられる。したがって, 個々のシナプス前終末が Ca^{2+} チャンネルサブタイプの発現比率においてヘテロであるということから, 伝達物質放出が多様に調節されていることが示唆される。このような多様性が苔状線維シナプスネットワークの柔軟性を生み出していると考えられる。



図 A 同一軸索の二つの終末のフレームスキャン画像

Alexa546-dextran で染色し、共焦点レーザー顕微鏡で撮影したフレームスキャン画像。矢印は光学測定を行ったシナプス前終末

図 B シナプス前終末の N-type カルシウムチャンネルの発現比率

図 A 内のシナプス前終末に CgTx_{GVI}A(10μM)を加えた後の蛍光強度の減衰率。蛍光強度は Oregon Green 488-BAPTA1-dextran の蛍光変化量を測定した。

連絡先: miyazaki@mail.cc.tohoku.ac.jp

(19) 空間学習成立マウス海馬における苔状線維の新しい投射の解析

和地 恵・奈良 諭・石塚 徹・八尾 寛

(東北大学大学院 生命科学研究科 脳機能解析分野)

【背景および目的】

海馬ではシナプスの発芽や退縮といった変化が活発に起きており、この変化が学習・記憶のメカニズムの一端を担っていると考えられる。ここで、新しく形成されたシナプスとすでに成熟して固定化されたシナプスは機能的に異なっている可能性がある。例えば、成熟し固定化されたシナプスは情報をより迅速に伝えることに特化した性質を持ち、逆に新しいシナプスはより探索的な性質を持っているのではないだろうか。そこで、海馬顆粒細胞と CA3 錐体細胞に形成される苔状線維シナプスをモデルにこれを検証する。モリス水迷路学習トレーニングにより空間学習の成立したマウスの海馬においては、異所性の苔状線維投射が認められている。この新たに見られる投射が海馬のどの部位で起こるのか、またこの投射はシナプスとしての構造や機能を所有しているのか、どこの細胞由来であるのか、さらにはシナプスとしての機能を有するのであれば成熟したシナプスとの機能的な差異はあるのかを検証する。

【結果および考察】

モリス水迷路学習による苔状線維の異所性投射

生後3週齢の C57BL/6 マウスにモリス水迷路学習を課し、学習が成立したマウスの海馬スライスを作製した。苔状線維およびその終末には、他の部位と比較して多くの亜鉛が存在しているので、亜鉛染色法を用いて苔状線維を可視化できる。具体的には、亜鉛染色法の1つである Timm 染色で苔状線維を、Nissl 染色で歯状回顆粒細胞、錐体細胞を染色し、未学習マウスと学習成立マウスの苔状線維の投射を比較した。成体の苔状線維終末は CA3 領域においては、おもに stratum lucidum に分布している。しかし、モリス水迷路学習成立後のマウスでは、全体的に苔状線維が太くなっているとともに stratum oriens 側への異所性投射が存在していることが確認された。

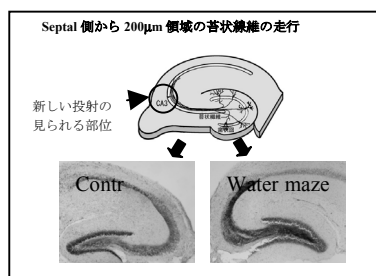
新しい苔状線維投射部位の特定

空間学習成立後の苔状線維の異所性投射が海馬の septo-temporal axis の全領域で起こるのかを検討する目的で、septal から temporal の海馬スライスを順次作製して、学習成立マウスと対照マウスの苔状線維の投射を比較した。苔状線維の投射を数値化し比較する方法として CA3 領域を図のように3つの亜領域 a (学習成立後のマウスでは苔状線維の新しい投射が伸びる部位)、b (学習成立

後のマウスでは苔状線維の投射が見られ線維が太くなる部位), c (両者で変化が見られない部位) に3等分した。海馬の septal 側 400-800 μ m おいて, その面積比 a/c および b/c に有意差が認められたのに対し, temporal 側では学習成立群と対照群に差がみとめられなかった。

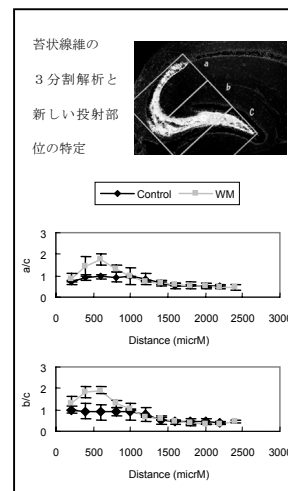
異所性投射をする歯状回顆粒細胞の形態の解析

学習成立後のマウス海馬に見られる新しい苔状線維の異所性投射をしている歯状回顆粒細胞の形態的特徴を検



討した。海馬スライスを, 亜鉛感受性蛍光色素の一種 TSQ で生体染色し, stratum oriens に投射する苔状線維末端を同定した。ここに蛍光デキストランを投与し, 逆行性に歯状回顆粒細胞を標識した。oriens に異所性投射した顆粒細胞は, 歯状回の全領域に分布した。また, その樹状突起主幹の数も幅広い分布を示した。

連絡先: wachicat@mail.cc.tohoku.ac.jp (和地 恵)



(20) Hyperpolarization-activated cation current and its modification of dendritic spike initiation in projection neurons of the rat superficial superior colliculus

遠藤利朗¹, 納富拓也², 重本隆一², 伊佐 正¹

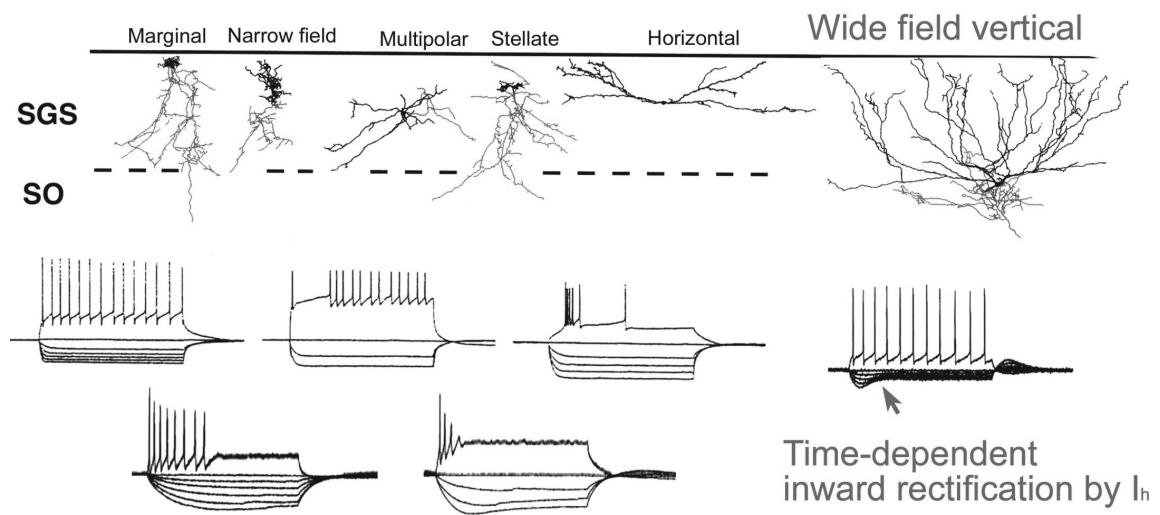
(生理研¹ 認知行動発達, ²脳形態解析)

上丘の浅層は, 視覚定位行動や空間視に関わるとされる, いわゆる膝状体外視覚系の中核である。上丘浅層には形態的, 電気的性質の異なる様々なニューロンが存在している。その中で, 主要な出力ニューロンである Wide field vertical (WV) neuron と呼ばれるニューロンには, 樹状突起が浅層の視覚地図上の非常に広い範囲にわたって広がっており, hyperpolarization-activated cation nonselective (HCN) current (I_h) を顕著に示すという際立った特徴が知られている。

今回我々は, I_h の活性化キネティクスの解析と免疫組織化学的染色を行い, WV neuron においては HCN channel のサブタイプのうち HCN1 が主要な成分を構成し, 主として樹状突起に発現していることを示唆する結果を得た。一方で, WV neuron は入力線維の電気刺激に応答して, 細胞体の膜電位に関係なく活動電位を生成す

ることから, 活動電位は電気緊張的に細胞体から遠い部位, すなわち樹状突起において開始されることが示唆された。 I_h を抑制することによって, 入力線維の電気刺激に対して発火する確率の減少, 発火までの潜時の延長, 発火の閾膜電位の上昇が認められた。このことから, WV neuron の樹状突起に発現している HCN1 は, 樹状突起における活動電位の生成あるいは細胞体への伝導に重要な役割を果たしていることが示唆された。

樹状突起において活動電位が生成され, かつ HCN channel が発現していることにより, WV neuron はそれぞれの樹状突起の遠位部分への視覚入力に対して短潜時で確実に応答することができると考えられる。このような特性は, WV neuron が受容野の中を動く視覚刺激に対して応答しやすいという性質に寄与していると考えられる。



13. 第 4 回脳磁場ニューロイメージング

2003 年 12 月 11 日－12 月 12 日

代表・世話人：柿木隆介（岡崎国立共同研究機構生理学研究所）

所内対応者：柿木隆介（岡崎国立共同研究機構生理学研究所）

（1）帯域ノイズの帯域幅を変化させた時の脳磁界反応

添田喜治，中川誠司，外池光雄，守谷哲郎（産業技術総合研究所ライフエレクトロニクス研究ラボ）

（2）聴覚逆方向マスキングを引き起こすペア音刺激に対する脳磁界反応

阿部雅也，子安利征，川勝真喜，田中慶太，小谷 誠（東京電機大学工学部電子工学科）

（3）聴覚における Lateral inhibition と habituation の比較

岡本秀彦^{1,2}，軍司敦子¹，柿木隆介¹，久保 武²，Christo Pantev³

¹ 岡崎国立共同研究機構生理学研究所，

² 大阪大学大学院耳鼻咽喉科学，

³ Director of the Institute for Biomagnetism und Biosignalanalysis Munster University Hospital)

（4）読譜は音楽家の聴覚野応答を低下させる

湯本真人，伊藤憲治，狩野章太郎，加我君孝（東京大学医学部）

宇野 彰，金子 裕（国立精神神経センター）

松田真樹（東京芸術大学）

（5）第 2 言語音素の脳内知覚

船津誠也（県立広島女子大学）

今泉 敏（広島県立保健福祉大学）

橋詰 顕，栗栖 薫（広島大学医学部）

（6）高頻度反復刺激による transient 型と sustained 型脳磁場反応の解析

前川俊彦，後藤純信，谷脇考恭，飛松省三（九州大学大学院医学研究院脳研臨床神経生理）

（7）小児の視線認知における脳磁場初期反応に関する解析

木村育美，久保田雅也，広瀬宏之，榊原洋一（東京大学医学部附属病院小児科）

湯本真人（東京大学医学部附属病院検査部）

（8）単語判別課題を用いた視覚逆方向マスキング刺激に対する脳磁界応答

子安利征，川勝真喜，田中慶太，小谷 誠（東京電機大学大学院工学研究科電子工学専攻）

（9）開口合成法を用いた MEG による言語関連領野の時空間・周波数解析

平田雅之^{1,2}，加藤天美¹，井原 綾^{2,3}，齊藤洋一¹，谷口理章¹，二宮宏智¹，依藤史郎²，吉峰俊樹¹

¹ 大阪大学大学院医学系研究科神経機能制御外科学講座，

² 大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻機能診断科学講座，

³ 岡崎国立共同研究機構生理学研究所）

（10）聴覚性 P300 に関連した律動的脳磁場活動の SAM 法による解析

石井良平，鵜飼 聡，山本雅清，川口俊介，小川朝生，武田雅俊（大阪大学大学院医学系研究科精神医学教室）

篠崎和弘（和歌山県立医科大学神経精神科学教室）

軍司敦子（岡崎国立共同研究機構生理学研究所）

Wilkin Chau (The Rotman Research Institute, Baycrest Centre for Geriatric Care, University of Toronto)

Christo Pantev (Institute of Biomagnetism and Biosignal Analysis, University of Munster)

- (11) MEG 計測を用いた口蓋粘膜電気刺激による大脳皮質味覚野の応答
別所央城^{1,3,4}, 武田栄三^{1,3}, 田崎雅和^{2,3}, 矢島安朝^{1,3}, 野間弘康^{1,3}, 小早川 達⁴, 斉藤幸子⁴,
(¹東京歯科大学口腔外科学第一講座,
²東京歯科大学生理学講座,
³東京歯科大学口腔科学研究センター,
⁴産業技術総合研究所脳神経情報研究部門)
- (12) 嗅覚刺激のリアルタイム計測による嗅覚事象関連電位及び脳磁場の同時計測
小早川達, 戸田英樹, 後藤なおみ, 斉藤幸子 (独立行政法人産業技術総合研究所脳神経情報研究部門)
- (13) 内側型側頭葉てんかんの障害側を脳図磁の電流双極子分布により予測する
芳村勝城 (国立療養所静岡神経医療センター)
- (14) 発作間歇期棘波直前の γ 帯域の活動の変化
金子 裕 (国立精神・神経センター武蔵病院脳神経外科)
岡崎光俊 (国立精神・神経センター武蔵病院精神科)
久保田有一 (せんぼ東京高輪病院脳神経外科)
湯本真人 (東京大学医学部附属病院臨床検査部)
- (15) 傾斜磁場トポグラフィーの動画化
橋詰 顕 (広島大学大学院医歯薬学総合研究科創生医科学専攻)
- (16) 電流源の広さと dipole 推定法の適否について
渡辺裕貴, 芳村勝城, 宇留野勝久 (国立療養所静岡神経医療センター)
- (17) 正中神経繰り返し刺激における測定変量間の伝達関数の同定
加藤健治, 岸田邦治, 深井英和 (岐阜大学工学部応用情報学科)
篠崎和弘 (和歌山県立医科大学精神医学教室)
鵜飼 聡, 石井良平, 山本雅清, 川口俊介 (大阪大学大学院医学研究科神経機能医学講座)
- (18) アルファ波 Current-Dipole のダイナミックスの脳磁図上での直接観察
川端啓介 (大阪府立大学)
内野勝郎 (平成医療学園専門学校)
村田和優 (藍野学園短大)
外池光雄 (産業技術総合研究所ライフエレクトロニクスセンター)
- (19) MEG 電源の階層変分ベイズ推定
佐藤雅昭^{1,2}, 吉岡 琢¹, 梶原茂樹³, 外山敬介³, 郷田直一¹, 銅谷賢治^{1,2}, 川人光男¹
(¹ATR 脳情報研究所,
²科学技術振興事業団 CREST,
³(株)島津製作所基盤技術研究所)
- (20) 聴覚刺激における伝達関数の同定とその磁界の向きとの関連性について
大井康弘, 岸田邦治 (岐阜大学工学部応用情報学科)
外池光雄, 岩木 直 (産業技術総合研究所)
- (21) 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, 柿木隆介 (岡崎国立共同研究機構生理学研究所)
- (22) 自発運動準備期における体性感覚誘発脳磁場の変動
和坂俊昭 (筑波大学体育科学研究科)
宝珠山稔, 中田大貴, 柿木隆介 (生理学研究所生体調節研究系感覚運動調節研究部門)

(23) 命令嚥下におけるヒト脳賦活領域

長崎信一, 山科 敦, 末井良和, 谷本啓二 (広島大学大学院医歯薬学総合研究科 病態情報医科学講座)

橋詰 顕, 栗栖 薫 (広島大学大学院医歯薬学総合研究科 先進医療開発科学講座)

柴 芳樹 (広島大学大学院医歯薬学総合研究科 病態探求医科学講座)

藤原百合 (広島大学医学部歯学部附属病院言語治療室)

(24) 脳梗塞患者における MCE 法を用いた運動関連脳磁場の解析

木野元裕一, 小谷賢太郎, 堀井 健 (関西大学工学部システムマネジメント工学科)

江坂茂朗 (関西大学大学院工学研究科)

山田 誠, 出口 潤, 宮武伸一, 黒岩敏彦 (大阪医科大学脳神経外科)

外池光雄 (産業技術総合研究所関西センター)

(25) 後頭脳磁図反応と頭頂運動関連脳磁図反応の GO/NOGO 反応における

$1/fn$ ゆらぎのべき乗 n の影響の検討

原田暢善, 中川誠司, 岩木 直, 山口雅彦, 外池光雄, 守谷哲郎

(産業技術総合研究所関西研究センターライフエレクトロニクス研究ラボ)

Tom Holroyd (通信総合研究所関西先端研究センター柳田結集型特別グループ)

【参加者名】

青山 敦 (慶應大・理工), 赤塚康介 (鹿児島大・教育), 足立信夫 (松下電器産業 (株)), 阿部雅也 (東京電機大・工), 阿部十也 (京都大・医), 荒木康智 (慶應大・医), 石井良平 (大阪大・医), 植木美乃 (京都大・医), 江坂茂朗 (関西大・工), 大井康弘 (岐阜大・工), 大崎康宏 (大阪大・医), 大塩立華 (名古屋大・医), 岡崎光俊 (国立精神・神経センター武蔵病院), 岡崎由香 (九州工業大), 荻野祐一 (群馬大附属病院), 小野弓絵 (早稲田大・理工), 小野田恵子 (日本大・医), 加藤健治 (岐阜大・工), 金子 裕 (国立精神・神経センター武蔵病院), 川勝真喜 (東京電機大・情報環境), 川口俊介 (大阪大・医), 川嶋真司 (石川県産業創出支援機構), 川田昌武 (徳島大・工), 川端啓介 (大阪府立大), 岸田邦治 (岐阜大・工), 木野元裕一 (関西大・工), 木村育美 (東京大医学部附属病院), 久留水彩 (東京医科歯科大・医歯学総合), 久保田有一 (せんば東京高輪病院), 栗田澄江 (群馬大・医), 栗山紘明 (早稲田大・理工), 黒川智美 (九州大・医), 高田橋篤史 (藤元早鈴病院), 小谷賢太郎 (関西大・工), 後藤純信 (九州大・医), 小早川達 (産業技術総合研究所), 小林晴子 (大阪大・医), 小林義昌 (東京歯科大・歯), 小見山彩子 (日大駿河台病院), 子安利征 (東京電機大・工), 坂本貴和子 (東京歯科大・臨床検査学), 崎原ことえ (大阪大・医), 佐藤雅昭 (ATR 脳情報研究所), 志々田一宏 (広島大・医歯薬学総合),

設楽直也 (群馬大・医), 柴 芳樹 (広島大・医歯薬学総合), 島浩史 (金沢大・脳機能制御学), 添田喜治 (産業技術総合研究所), 高田あゆみ (エレクトラ (株)), 高田慎也 (鹿児島大・教育), 武井雄一 (群馬大・脳神経行動学), 竹内文也 (北海道大・電子科学研究所), 竹形理佳 (産業技術総合研究所), 竹林成典 (名古屋大・医), 田代研之 (九州大・医), 田中絵実 (奈良女子大・人間文化), 田中博昭 (横河電機 (株)), 谷本啓二 (広島大・医歯薬学総合), 田野辺幸英 (東京電機大・工), 寺田さとみ (東京大・医), 外池光雄 (産業技術総合研究所), 飛松省三 (九州大・医), 富澤将司 (東京医科歯科大・脊椎脊髄神経外科学), 中川誠司 (産業技術総合研究所), 長崎信一 (広島大・医歯薬学総合), 中島大輔 (九州大・医), 長峯 隆 (京都大・医), 橋詰 顕 (広島大・医歯薬学総合), 原田暢善 (産業技術総合研究所), 東 祐二 (藤元早鈴病院), 平田雅之 (大阪大・医), 藤田美都紀 (東京大・工), 船津誠也 (広島女子大), 別所央城 (東京歯科大), 星野大介 (早稲田大・理工), 本多結城子 (愛知淑徳大・コミュニケーション), 本間俊道 (早稲田大・理工), 前川敏彦 (九州大・医), 政家一誠 (東京大・工), 松林 潤 (京都大・医), 丸山敦夫 (鹿児島大・教育), 水落智美 (東京大・医), 宮城島孝昭 (群馬大・脳神経外科), 山川恵子 (東京大・医), 山崎貴男 (九州大・医), 山田孝子 (国立療養所中部病院), 山田誠

(大阪医大・脳外科), 湯本真人 (東京大医学部附属病院), 横田公一 (CBC (株)), 吉井貴光 (東京大大学院・工), 吉岡 琢 (ATR 脳情報研究所・計算神経生物学), 芳村勝城 (国立療養所静岡神経医療センター), 渡辺裕貴 (国立

療養所静岡神経医療センター), 渡邊 裕 (東京歯科大・オーラルメディシン), 郷田直一 (生理研), 関 和彦 (生理研), 田邊 宏樹 (生理研)

【概要】

脳磁図に関する研究会は1997年に開始後,既に7回目を数えるようになった。その間は,世話人,テーマ,特別講演などを毎回変えて趣向をこらしてきた。他の研究会とは異なり,同じメンバーが毎年発表するのではなく演題公募形式にしているため,比較的若い研究者の発表が多いのが大きな特徴である。本年も外部よりの参加者は90名以上であり,研究所内部の参加者も含めれば100名をはるかに越える会であり,おそらく生理研研究会の中では最大規模のものと思われる。

本年度は特別講演は無く,25の一般演題が発表された。口演のみに限定しており,1演題あたり20ないしは30分の持ち時間があるため,じっくりと発表し十分に議論する,という研究会発足時からの方針どおりの実りのある中身の濃い研究会となった。演題は,聴覚に関するものが7題と最も多く,しかもいわゆる高次脳機能に関連する興味深い演題が多く,最近の研究の動向が良く示され

ている。逆に視覚に関連する演題は2題と少なく,聴覚は脳波あるいは脳磁図,視覚は機能的磁気共鳴画像(fMRI)という傾向は今後しばらくは継続するかもしれない。他には,味覚,嗅覚,体性感覚,痛覚に関連する演題が各1題ずつあり,こういう比較的マイナーではあるが興味深い領域の研究が継続して行なわれている事は喜ばしい事である。同時期に他の施設で言語に関する研究会が開催されていたため,言語に関連する演題が1題だけであったのはやや寂しい事であった。他には臨床応用が3題,信号源推定,逆問題に関する演題が5題,運動に関する演題が2題あり,参加者は2日間の間に現在行なわれている脳磁図研究のほとんどの領域を勉強できた事になり,特に若手研究者には良い刺激になったと思われる。今後の研究の発展に何らかの参考になれば開催の意義は十分に果たせたことになると思っている。

(1) 帯域ノイズの帯域幅を変化させた時の脳磁界反応

添田喜治, 中川誠司, 外池光雄, 守谷哲郎 (産業技術総合研究所ライフエレクトロニクス研究ラボ)

音の高さ(ピッチ)は,音声認識や音楽の知覚において重要な要素である。本研究ではピッチの強さに注目し,帯域ノイズの帯域幅を変化させた時の脳磁界計測を行った。実験に用いた帯域ノイズは,中心周波数を500,1000,2000Hz,帯域幅を0,40,80,160,320,640Hzで変化させた。中心周波数が同じであれば,同じピッチが知覚され,帯域幅が狭いほど明確なピッチが知覚される。各

中心周波数において,純音を基準刺激,帯域ノイズを比較刺激として一対提示し,脳磁界計測を行った。刺激の継続時間は0.5s,刺激間隔は2.0sであった。解析の結果,帯域幅が広がるほどN1m振幅は小さくなる傾向が見られた。この傾向は左半球でより顕著に見られた。N1m潜時,信号源推定により求めたダイポールの位置に関しては,帯域幅の変化に対応する反応は見られなかった。

(2) 聴覚逆方向マスキングを引き起こすペア音刺激に対する脳磁界反応

阿部雅也, 子安利征, 川勝真喜, 田中慶太, 小谷 誠 (東京電機大学工学部電子工学科)

先行する小さな音 (信号音) に対して, 数十 ms 後に大きな音 (マスク音) が存在する場合, 小さな音が聞こえにくくなる。これを聴覚逆方向マスキング現象と言う。今回, 我々は信号音とマスク音の間隔を 20ms とし, 信号音の振幅を変化させたペア音に対する刺激後 100ms 付近のピーク振幅 (N1m) の変化を調べた。

実験には 8 種類の信号音と 1 種類のマスク音からなるペア音を用いた。信号音の振幅はマスク音の振幅 100%

に対し 0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100% の 8 種類とした。

得られた脳磁界反応は, いずれのペア音に対しても 1 つの N1m を示した。N1m は, 信号音の大きさが 1% 未満までの範囲では, 信号音の振幅が小さくなるほど大きくなる傾向が見られた。この範囲ではマスク音の処理に対する反応が支配的と考えられる。また 10% より大きな範囲では, 信号音の大きさが大きくなると N1m が大きくなる傾向が見られた。

(3) 聴覚における Lateral inhibition と habituation の比較

岡本秀彦^{1,2}, 軍司敦子¹, 柿木隆介¹, 久保 武², Christo Pantev³

(¹ 岡崎国立共同研究機構生理学研究所,

² 大阪大学大学院耳鼻咽喉科学,

³ Director of the Institute for Biomagnetism und Biosignalanalysis Munster University Hospital)

Lateral inhibition とはある受容野が刺激を受けることにより, その受容野周囲の神経活動を抑制することである。この働きにより境界域のコントラストが増し分解能を高めている。たとえば皮膚における触覚の二点弁別や視覚系における Mach Band の知覚 (輝度の変化率が違う境界部位に線が見える現象) 等がある。ヒト聴覚系における側抑制に関する研究は限られているが, やはり他の受容器と同様に音の周波数分解能の向上にこの側抑制が

役立っているものと思われる。

その他の抑制系として habituation がある。側抑制とは異なり habituation では同じ受容野が連続して刺激を受けることによりその刺激された受容野の反応が抑制される。

今回の実験ではヒト聴覚系におけるこの 2 つの異なる抑制系 (側抑制, habituation) の働きを Forward Masking Paradigm を用いて比較, 検討する。

(4) 読譜は音楽家の聴覚野応答を低下させる

湯本真人, 伊藤憲治, 狩野章太郎, 加我君孝 (東京大学医学部)

宇野 彰, 金子 裕 (国立精神神経センター)

松田真樹 (東京芸術大学)

音の正確な予期の聴覚応答への修飾を調べることを目的とした。音楽家および非音楽家各 8 名を対象とし, 1 オクターブ以内の 12 音の楽音をランダムに毎秒 1 音の速度で両耳に提示した。1 回目は楽譜を提示せず, 楽譜と同輝度のスクリーンを見ながら音を聴き, 2 回目は同ス

クリーンに楽譜を提示し, 低頻度で混入させた楽譜とは音高の異なる音に注意しながら音を聴く課題を課した。両条件では異なるランダム系列を用いた。記録には 204 チャンネル全頭型脳磁計を用い, 1 回目と 2 回目の一致条件における M100 成分を ANOVA により 2 群間, 左右半

球間で比較した。M100 振幅の 1 回目に対する 2 回目の低下は、非音楽家に対し音楽家で有意に顕著であった。音楽家では非音楽家に比べ、視覚提示される楽譜から聴

覚提示される音が正確に予期できるため M100 振幅が顕著に低下するものと考えられるが、その機序は自己の発声に対する聴覚応答の低下と似ている。

(5) 第 2 言語音素の脳内知覚

船津誠也（県立広島女子大学）

今泉 敏（広島県立保健福祉大学）

橋詰 顕，栗栖 薫（広島大学医学部）

脳内で第 2 言語音素を如何に知覚するかを明らかにするために、複数の話者が発話した音素を刺激として用い、MMF を測定した。日本人が英語音素 /la/ と /ra/ を識別する場合について調べた。3 人のアメリカ人男性話者が発話した英語音素 /la/ と /ra/ および 3 人の日本人話者が発話した日本語音素 /a/ と /i/ を刺激としてオドボール課題を行い、MMF を測定した。MMF より等価電流双極子モーメントを求めたところ、英語知覚では右半球のモーメン

トが左半球より大きく、日本語知覚ではその逆であった。得られた双極子モーメントに対し、2 元配置分散分析（言語 vs 半球）を行ったところ、有意な交互作用が認められた ($p < 0.01$)。日本語知覚では左半球優位、英語知覚では右半球優位の傾向がみられた。これらの結果から、母語音素知覚と第 2 言語音素知覚は、異なる半球で主に行なわれている可能性が示唆された。

(6) 高頻度反復刺激による transient 型と sustained 型脳磁場反応の解析

前川俊彦，後藤純信，谷脇考恭，飛松省三（九州大学大学院医学研究院脳研臨床神経生理）

Gutschalk らは聴覚において 500Hz のトーンバースト (TB) 音を一定の刺激頻度で 1 秒与え 1 秒休止すると transient (TR) 型と sustained (SU) 型反応を MEG で測定できると報告した (Neuroimage, 2002)。この刺激法は TR 型反応の主成分の潜時と振幅（時間情報）と sustained (SU) 型反応の位相と振幅（周波数情報）を定量分析できる。今回我々は、健常人 5 名を対象として、視覚（白/黒格子縞反転刺

激、格子サイズ 50'，半側視野刺激、刺激頻度を変化）と聴覚（TB 音、刺激強度 45dB SL，刺激頻度 40Hz，片耳刺激、基本周波数を変化）で刺激持続時間 1 秒、刺激間隔 1.5 秒の高頻度反復刺激を行い、TR 型と SU 型の磁場反応を測定し、臨床応用時の至適条件設定のための予備実験を行った。その結果、視覚では刺激頻度 4Hz，聴覚は基本周波数 1000Hz で安定した反応が記録できた。

(7) 小児の視線認知における脳磁場初期反応に関する解析

木村育美，久保田雅也，広瀬宏之，榊原洋一（東京大学医学部附属病院小児科）

湯本真人（東京大学医学部附属病院検査部）

小児において、受動的な視線認知の初期の後側頭部脳磁場反応に関する検討を試みた。8y~13y の健常小児 15 名、健常成人 6 名を対象に課題 1：視線が正面、左向き 2

通りの正面顔と花 (target) の写真、および課題 2：顔写真をモザイク図形に変換したもの 2 通りと建物 (target) の写真を呈示刺激として脳磁場計測 (Neuromag204) を施行し

た。全ての被験者または保護者に予め十分な説明のち書面での同意をえた。課題 1: 小児では明瞭な P1m 反応 (潜時 120ms~150ms) がえられ、該当 Dipole は下側頭溝領域に位置、さらに右側でのみ、正面向き視線に比べ左向き視線の顔に対する P1m 反応増大を認めた。成人では

P1m は相対的に小さく N170m Dipole が紡錘状回または下~上側頭溝領域に存在した。課題 2 での反応は一定しなかった。小児の P1m には特異的な作業成分が含まれている可能性がある。

(8) 単語判別課題を用いた視覚逆方向マスキング刺激に対する脳磁界応答

子安利征, 川勝真喜, 田中慶太, 小谷 誠 (東京電機大学大学院工学研究科電子工学専攻)

視覚情報処理において、時間的に先行する情報が後から入ってくる情報によって認知を阻害される現象があり、視覚逆方向マスキング現象と言う。本研究では、刺激として漢字 2 文字の単語もしくは非単語を約 30ms 提示後にマスク画像としてチェッカーボードパターン、もしくはハングル文字の 2 種を先行の漢字 2 文字と重なる位置に約 500ms 提示する視覚刺激を用いた。最初に提示された漢字 2 文字が単語であったか、非単語であったかを判断

するタスクを課し、誘発脳磁界応答の計測を行った。

タスクの正答率は、マスクパターンとしてハングル文字を提示した場合の方がチェッカーボードパターンを提示した場合よりも低く、認知阻害の度合いに差異が見られた。この 2 種類の刺激に対する脳磁界応答を比較した結果、左側頭部潜時 300ms 近辺等の応答に差異が見られた。

(9) 開口合成法を用いた MEG による言語関連領域の時空間・周波数解析

平田雅之^{1,2}, 加藤天美¹, 井原 綾^{2,3}, 齊藤洋一¹, 谷口理章¹, 二宮宏智¹, 依藤史郎², 吉峰俊樹¹

(¹大阪大学大学院医学系研究科神経機能制御外科学講座,

²大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻機能診断科学講座,

³岡崎国立共同研究機構生理学研究科)

SAM 解析は、時間分解能が高いという MEG の特性を生かしたまま、開口合成フィルターの導入により高い空間分解能が実現され、複数領域の並列的活動を描出可能である。また加算平均処理を行わないため、長潜時・高周波帯域成分が失われない。さらに周波数帯域別の解析により脳律動の変化を捉えられる。したがって複数領域が長潜時まで活動すると考えられる言語活動において、その脳律動変化の時間的推移を大脳皮質全域にわたり解析できる。

健常者に対する 3 文字平仮名单語視覚提示の黙読課題では、後頭葉、頭頂側頭葉、前頭葉の同時複数領域にお

ける脳律動変化が明らかにされ、逐次処理とともに並列処理の存在が示唆された。同一課題を脳外科患者に対して施行したところ、中下前頭回におけるβからγ帯域の脱同期の側方性が言語優位半球のよい指標となることが明らかになった。

局所脳律動変化に注目することにより、fMRI や PET では従来困難であった新たな脳機能のメカニズム解明が期待される。また臨床的には言語優位半球同定、機能局在をはじめ、高次脳機能の非侵襲的検査に活用できると期待される。

(10) 聴覚性 P300 に関連した律動的脳磁場活動の SAM 法による解析

石井良平, 鵜飼 聡, 山本雅清, 川口俊介, 小川朝生, 武田雅俊 (大阪大学大学院医学系研究科精神医学教室)

篠崎和弘 (和歌山県立医科大学神経精神科学教室)

軍司敦子 (岡崎国立共同研究機構生理学研究所)

Wilkin Chau (The Rotman Research Institute, Baycrest Centre for Geriatric Care, University of Toronto)

Christo Pantev (Institute of Biomagnetism and Biosignal Analysis, University of Munster)

統合失調症の脳内神経ネットワークの異常を明らかにするための準備段階として, 正常被験者 15 人分の聴覚性 P300 の脳磁場を SAM 法で解析し, SPM99 と Permutation 法を用いて標準脳上での集団統計を行い, P300 に関連した律動的脳磁場活動の発生源の領域的な可視化を試みたので報告する。被験者は健常若年者 15 名 (男性 5 名, 女性 10 名, 25-54 歳, 平均年齢 34 歳, 1 名を除き右利き) で, 151ch 全頭型脳磁計を用いて, 聴覚オドボール課題遂行時の脳磁場を記録し, θ (4-8Hz), α (8-15Hz), β (15-30Hz), γ (30-60Hz) 帯域に分けて, 各 40 試行を解析

した。さらに各被験者の脳形態上で局在化された SAM 法の解析結果を, SPM99 を用いて標準脳に変換し, Permutation 法を用いて脳画像のボクセル単位での統計検定を行った。その結果, θ , α 帯域の同期活動が左背外側前頭前野と右内側前頭前野の両側前頭葉の広い領域にみられた。これは Basar らが提唱する機能的 α 波活動を捉えたものと考えられる。また, α , β , γ 帯域の脱同期活動が中心溝をまたいで左感覚運動野にみられたが, これは, 右手指によるボタン押しに伴って抑制された μ リズムとその関連成分であると考えられる。

(11) MEG 計測を用いた口蓋粘膜電気刺激による大脳皮質味覚野の応答

別所央城^{1,3,4}, 武田栄三^{1,3}, 田崎雅和^{2,3}, 矢島安朝^{1,3}, 野間弘康^{1,3}, 小早川達⁴, 斉藤幸子⁴

(¹東京歯科大学口腔外科学第一講座,

²東京歯科大学生理学講座,

³東京歯科大学口腔科学研究センター,

⁴産業技術総合研究所脳神経情報研究部門)

口腔内に義歯を装着すると, “味が変わった”と訴える患者が多く, その原因は明確にされていない。またこれらを客観的に評価する方法もない。そこで我々は, 口蓋部の触刺激が大脳皮質味覚野の応答に関係しているのではないかと仮定し, 大脳皮質における口蓋粘膜の体性感覚再現部位を検討した。体性感覚誘発磁場 (SEF) の計測は 204 - チャンネル全頭型 MEG を使用し, 5 人の健康成人を被験者として, 1 対の電極を埋め込んだ樹脂製シー

ネで口蓋粘膜に電気刺激を行った。その結果, ピーク潜時が, 約 60ms (1M), 150ms (2M) に認められた。さらに, 刺激対側では前頭弁蓋部と島皮質, 同側では 1 次体性感覚野の深部および頭頂弁蓋部にダイポールが推定された。応答部位が一次味覚野近傍にも認められ, 口蓋部の触刺激が味覚に関与しているのではないかと推定される。今後被験者を増やし, さらに検討したい。

(12) 嗅覚刺激のリアルタイム計測による嗅覚事象関連電位及び脳磁場の同時計測

小早川達, 戸田英樹, 後藤なおみ, 齊藤幸子 (独立行政法人産業技術総合研究所脳神経情報研究部門)

1993 年に Evans らは信頼性のある化学受容感覚の誘発応答を獲得するために、いくつかの実験における基準の提唱を行った。その中に「ニオイ刺激を無臭空気 of 定常流の中に挿入すること」「ニオイ刺激の立ち上がりは最大濃度 70%までが 50 ミリ秒以内であること」がある。本報告の中では、これらの基準を満たす刺激装置の性能の計測法の提案もなされている。しかし嗅覚刺激をリアルタイムの計測を可能にするものではなかった。そこで

我々は流速変化、圧力変化を伴わない嗅覚刺激のモニタを行うために、超音波を用い 0.5 ミリ秒の時間分解能を持つ高速気体濃度計の開発を行った。この濃度計を用いて、実際の嗅覚刺激のモニタを被験者の鼻腔の直前で行いながら、ヒトの嗅覚事象関連電位及び脳磁場の同時計測を行った。本センサ出力を基準にして嗅覚事象関連電位、脳磁場応答の加算平均を行った場合、それぞれの成分の潜時が従来の報告よりも短いことが分かった。

(13) 内側型側頭葉てんかんの障害側を脳図磁の電流双極子分布により予測する

芳村勝城 (国立療養所静岡神経医療センター)

内側型側頭葉てんかんの障害側と脳磁図の電流双極子分布の関係を調べる目的で、一側の海馬萎縮が認められた症例または後に一側海馬を切除された症例について電流双極子分布の特徴を調べた。電流双極子が片側にのみ推定された 50 例中、電流双極子の推定部位が海馬の高さに限局するもの (H) は 24 例で、そのうち病側に推定された例は 20 例、対側に推定された例は 3 例であった。海馬の他に弁蓋部にも推定されるもの (H+V) は 26 例で、全

例が病側に推定された。電流双極子が両側に推定された 8 例中、両側共 H は 1 例であった。病側が H+V で対側が H は 6 例で、その逆は認められなかった。両側共 H+V は 1 例で、明らかに病側の方が弁蓋部付近に広範に電流双極子が分布していた。このことから弁蓋部付近に電流双極子が推定された症例は同側が障害側である可能性が高いことが示唆された。

(14) 発作間歇期棘波直前の γ 帯域の活動の変化

金子 裕 (国立精神・神経センター武蔵病院脳神経外科)

岡崎光俊 (国立精神・神経センター武蔵病院精神科)

久保田有一 (せんぼ東京高輪病院脳神経外科)

湯本真人 (東京大学医学部附属病院臨床検査部)

発作間歇期棘波の直前に広い領域の神経が同期して興奮するために何らかの準備がなされていると考え、それを γ 帯域の活動の変化として捉えられないか検討を行った。MEG 波形・等磁界線図からほぼ同一の部位から発作間歇期棘波を頻発していると考えられた 3 例を対象とした。MEG で自発脳磁界を測定し、帯域フィルターで処理

した基礎活動を棘波の立ち上がりトリガーとして加算平均した。棘波の立ち上がり -150msec ~ -50msec にわずかな γ 帯域の減衰を認めた。この減衰は棘波の振幅が強く観察されたセンサーに認められる傾向があった。発作間歇期棘波の直前に γ 帯域の活動の変化があり、それを MEG で捉えることができることが示された。

(15) 傾斜磁場トポグラフィーの動画化

橋詰 顕 (広島大学大学院医歯薬学総合研究科創生医科学専攻)

従来行われてきた等価電流双極子の MRI 画像への重畳のみでは、磁気的てんかん活動の広がりや、経時的な変化を捉えることは困難である。そこで磁気的てんかん活動の視認性を高めるため傾斜磁場トポグラフィーを作成し、動画化を行うこととした。装置は Neuromag 社製脳磁計 Neuromag System を用い、てんかん患者の自発脳磁場活動を計測した。傾斜磁場トポグラフィーを作成し、

脳表に投射し、動画を作成した。傾斜磁場トポグラフィーの動画化により、直感的に磁気的てんかん活動の広がりや経時的変化が捉えられるようになった。動画化された傾斜磁場トポグラフィーは等価電流双極子推定法とは異なる視点で磁気的てんかん活動を捉える方法ではあるが、どの程度、実際のてんかん活動と関連があるか、症例を積み重ね、検討する必要があると思われる。

(16) 電流源の広さと dipole 推定法の適否について

渡辺裕貴, 芳村勝城, 宇留野勝久 (国立療養所静岡神経医療センター)

single dipole 推定は、有限の広さをもつ電流源を一点と仮定して電流源を推定するのであるから、理論的な難点を内蔵していることは周知の事実である。それにもかかわらず臨床的にはそれなりに正しくてんかん焦点を推定することが多いことから、そのまま臨床検査として使用されている。一方、初めから電流源に広がりやを仮定するノルム推定などの電流源推定法は、広い電流源には有用

であるが、逆に点状の電流源に対しては実際よりも広い広がりをもった推定値を与える欠点があるように思える。そこで、臨床的に種々の広さのてんかん焦点をもつ患者の dipole 推定結果の実例を提示し、それらの結果が得られる理由を考察しながら、実際の診療場面で症例ごとに single dipole 推定と面状の電流源推定のどちらを使用していくかの方法論について考えてみたい。

(17) 正中神経繰り返し刺激における測定変量間の伝達関数の同定

加藤健治, 岸田邦治, 深井英和 (岐阜大学工学部応用情報学科)

篠崎和弘 (和歌山県立医科大学精神医学教室)

鵜飼 聡, 石井良平, 山本雅清, 川口俊介 (大阪大学大学院医学研究科神経機能医学講座)

MEG データ解析の研究において、特定の活動部位の位置を推定する従来の方法の 1 つとして加算平均法があり、脳の各部位が他の部位に対してどのような影響を与えているかなど、高次脳における機能関連の解明がされている。しかし、MEG データにはあらゆる周波数の動的情報が入り交ざっているため、適切に必要な情報を取り出し

て解析する必要がある。

前回、独立成分解析とフィードバックシステム論的手法を組み合わせて用いることで、左右脳間の測定変量間の伝達関数を同定することを紹介した。今回は、この伝達関数について、より確かな動特性を掴むための 2 つの方法 (データのスケールリング、データ数の変動) を示す。

(18) アルファ波 Current-Dipole のダイナミックスの脳磁図上での直接観察

川端啓介 (大阪府立大学)

内野勝郎 (平成医療学園専門学校)

村田和優 (藍野学園短大)

外池光雄 (産業技術総合研究所ライフエレクトロニクスセンター)

通常アルファ波は安静閉眼のとき後頭部に生ずるとされている。しかし、この電流ダイポールの脳磁図はすでに非常に複雑であって解析を難しくしている原因になっている。我々はアルファ波が鍼を打つてのち、開眼のとき、側頭に現れることがあることを見出した。

よくみるとこの側頭信号は術前にも頻度は少ないが現

れているのである。この信号の大切なところはアルファ波の電流ダイポールのダイナミックスを実に鮮やかに脳磁図上に直接示すことである。側頭でのアルファ波のダイナミックス、側頭と後頭のアルファ信号が脳磁図上でこのように異なる原因、このモデルで後頭でのアルファ波の MEG 信号がよく解釈できることを述べる。

(19) MEG 電源の階層変分ベイズ推定

佐藤雅昭^{1,2}, 吉岡 琢¹, 梶原茂樹³, 外山敬介³, 郷田直一¹, 銅谷賢治^{1,2}, 川人光男¹

(¹ATR 脳情報研究所,

²科学技術振興事業団 CREST,

³(株)島津製作所基盤技術研究所)

MEG 観測データから脳内電流源を推定するための新しい階層ベイズ推定法を提案する。本手法は階層事前分布を導入することにより、電流の分散も未知パラメータとして推定を行い電流推定精度を向上させる。この際、fMRI 情報は電流分散に対する事前情報として階層事前分布に導入することが出来る。また電流分布が空間的に

連続な分布をしているという連続条件も階層事前分布に入れることが出来る。以上のような階層事前分布と観測データに対して変分ベイズ法を適用し、脳内電流源に対する事後分布を計算する。

さらに本手法の有効性を、実際の視覚刺激反応に近い人工データを用いて確かめた。

(20) 聴覚刺激における伝達関数の同定とその磁界の向きとの関連性について

大井康弘, 岸田邦治 (岐阜大学工学部応用情報学科)

外池光雄, 岩木 直 (産業技術総合研究所)

聴覚刺激によって脳に引き起こされる、計測時系列を説明するような特定の活動ダイナミックスを MEG データから推定したい。そこで、フィードバックシステム論的手法を用いて計測チャンネル間での伝達関数を同定した。

ところで、MEG データの計測において、刺激によって脳に誘起される神経電流の向きは x,y 軸方向の平面微分型コイルの向きと同じだとは限らないので、同定手法が

有効に機能できない可能性がある。

平面微分型の測定器の向きと刺激によって脳に誘起される神経電流の向きには関連があるべきである。そこで、計測点で二次元ベクトルとなる計測データを直下の脳内神経電流を特徴的に表すようなスカラー量にする必要がある。各次元のベクトルの主成分に沿った時系列に変換することにした。

この方法により、フィードバックシステム論的手法で
同定された伝達関数を使って推定される予測値は軸変換

前のものに比べてかなり一致するようになった。

(21) 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, 柿木隆介 (岡崎国立共同研究機構生理学研究所)

主観的な痛みの程度は、動作によって軽減することがある。例えば、手をぶつけた時に我々は無意識的に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のメカニズムの一端を明らかにすべく、MEGを用いて実験を行った。刺激はYAGレーザー刺激を用いて左手の甲に与え、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計4条件を行った。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、刺激対側半球の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、刺激対側半球のSIIの活動が減少した。左手指の受動動作では、刺激対側半球の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ならびにSIIにおける脳活動の変化が起こったことが示された。VASの変化は対側SIIの変化と類似しており、痛覚認知における同部の重要性が示唆された。

(22) 自発運動準備期における体性感覚誘発脳磁場の変動

和坂俊昭 (筑波大学体育科学研究科)

宝珠山稔, 中田大貴, 柿木隆介 (生理学研究所生体調節研究系感覚運動調節研究部門)

体性感覚誘発電位 (SEPs) あるいは体性感覚誘発脳磁場 (SEFs) の振幅は、随意運動の影響を受けて減少する (gating)。このgatingは、随意運動の準備期においてもみられるが、準備期のどの段階からみられるのかについては明らかにされていない。本研究では、被験者が自己ペースで随意運動を開始する自発運動を用いて、その準備期に誘発したSEFsから体性感覚系の変動を検討した。右

手第二指の伸展動作に先行して、正中神経刺激で誘発されたSEFsのP30mのdipole momentは、安静条件と比較して随意運動の500ms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、SEFsの変動は、随意運動の準備に関与する運動関連領域からの遠心性抑制 (centrifugal gating) の影響を受けていることが示唆される。

(23) 命令嚥下におけるヒト脳賦活領域

長崎信一, 山科 敦, 末井良和, 谷本啓二 (広島大学大学院医歯薬学総合研究科 病態情報医科学講座)

橋詰 顕, 栗栖 薫 (広島大学大学院医歯薬学総合研究科 先進医療開発科学講座)

柴 芳樹 (広島大学大学院医歯薬学総合研究科 病態探求医科学講座)

藤原百合 (広島大学医学部歯学部附属病院言語治療室)

目的：命令嚥下におけるヒト脳賦活領域を明らかにすること。

対象：嚥下障害の既往ならびにその症状を持たない、右利きの男性成人7人（25～40歳）。

方法：1mlの蒸留水を口腔に保持し、視覚提示により嚥下を40回から50回行った。Neuromag社製脳磁計204chを用いて、各嚥下における表面筋電図とMEGのデータを同時収集した(sampling rate: 600, 615Hz)。取得したデータの内、嚥下開始前後で類似した頤下表面筋電図波形を示すサンプルを収集し、その立ち上がり時を基にして加

算(選択数32~35回)した。加算したMEGデータから左右大脳半球別々に単一ダイポール推定(GOF70%以上)を行い、MRI脳画像に重ねた。

結果：命令嚥下におけるヒト脳賦活領域は左側運動野に限局してダイポールを認めた。

(24) 脳梗塞患者におけるMCE法を用いた運動関連脳磁場の解析

木野元裕一, 小谷賢太郎, 堀井 健 (関西大学工学部システムマネジメント工学科)

江坂茂朗 (関西大学大学院工学研究科)

山田 誠, 出口 潤, 宮武伸一, 黒岩敏彦 (大阪医科大学脳神経外科)

脳梗塞患者における脳機能の回復メカニズムについて、PETやf-MRIを用いた先行研究が行われており、障害部位周辺の賦活や活動強度の上昇、障害部位に代わって対側にある健常な部位の賦活が見られたという報告がされている。しかし、未だそのメカニズムは明らかでない。そこで、麻痺を認める虚血性脳血管障害患者7例を対象とした脳磁界計測を試みた。実験タスクとして拇指のボタン押し運動を用い、データ解析には従来のシングルダ

イポール法に加え、複数の脳内活動源を推定できるMCE (Minimum Current Estimate) 法を用いた。その結果、補足運動野や動作肢と同側の運動野において活動源が推定された。また、解析方法の差による活動源の推定結果の差は認められなかった。両者を併用することで、脳梗塞回復期における特異的な脳活動の解剖学的な変化を捉え、機能予後との関連性を検討することが可能になると示唆される。

(25) 後頭脳磁図反応と頭頂運動関連脳磁図反応のGO/NOGO反応における1/fn ゆらぎのべき乗nの影響の検討

原田暢善, 中川誠司, 岩木 直, 山口雅彦, 外池光雄, 守谷哲郎

(産業技術総合研究所関西研究センターライフエレクトロニクス研究ラボ)

Tom Holroyd (通信総合研究所関西先端研究センター柳田結集型特別グループ)

聴覚刺激間隔における1/fnのゆらぎのべき乗nのGO/NOGO反応に対する影響を検討した。聴覚刺激は、GOキュー(1000Hz: 80%), NOGOキュー(2000Hz: 20%)を用いた。これまでの研究で、べき乗nの増加に伴い、(1)ミスマッチフィールドの2乗平均値が増加すること、(2)NOGO反応の際、左後頭のチャンネルのペーター波の非同期化

時間増加すること、(3)GO反応の際、左後頭のチャンネルの運動に同期した成分を含む波形の振幅が増大することを報告してきた。

今回、左後頭のチャンネルの運動に同期した成分と頭頂運動関連脳磁図反応のゆらぎのべき乗nに対する変化について報告する。

14. 痛みの基礎と臨床

2003 年 9 月 4 日－9 月 5 日

代表・世話人：緒方宣邦（広島大学大学院医歯薬学総合研究科神経生理）

所内対応者：柿木隆介（岡崎国立共同研究機構生理学研究所）

(1) カプサイシン受容体 TRPV1 の感作・脱感作の分子機構

沼崎満子（三重大学医学部分子細胞生理学）

(2) TRPV1 ノックアウトマウスにおけるブラジキニン応答の行動学および生理学的解析

片野坂 公明¹, Banik Ratan Kumar¹, Grion Moreno Rocio¹, 富永 真琴², 水村 和枝¹

(名古屋大学環境医学研究所¹, 三重大学医学部²)

(3) マウス後根神経節ニューロンにおける TTX 感受性持続型 Na 電流の解析

松富智哉¹, 柿村順一¹, 鄭泰星¹, 大石芳彰¹, 中本千泉¹, 仲田義啓², 緒方宣邦¹

(広島大学大学院医歯薬総合研究科・¹神経生理学, ²薬効解析科学)

(4) ラット後根神経節初代培養細胞における

カプサイシンの反応に対するカンナビノイドの抑制効果について

大下恭子¹, 河本昌志¹, 天野 託², 酒井規雄², 弓削孟文¹, 唐 和斌³, 井上敦子³, 仲田義啓³

(広島大院医歯薬学総合研究科, ¹麻酔蘇生学, ²神経・精神薬理, ³薬効解析学)

(5) 一次知覚神経系における oncostatin M の役割について

田村 志宣・森川 吉博・仙波 恵美子（和歌山県立医科大学第二解剖学）

(6) 三叉神経第 2 枝損傷モデル動物における主知覚核ニューロンの反応性

坪井 美行^{1,2}, 呉 軍¹, 清水 康平³, 久保田 伊柄子⁴, 岩田 幸一^{1,2}

(¹日本大学歯学部生理学教室, ²日本大学歯学部総合歯学研究機能形態部門,
日本大学大学院 (³保存学 II, ⁴歯科麻酔))

(7) 脊髄後角深層細胞におけるサブスタンス P の抑制系神経伝達に対する賦活化作用

中塚映政, 園部秀樹, 古江秀昌, 吉田宗人, 吉村恵

(和歌山県立医科大学整形外科教室, 九州大学大学院統合生理学教室)

(8) 非侵害性刺激によって誘起される脊髄後角表層の抑制性シナプス応答の解析

古江 秀昌・加藤 剛・八坂 敏一・吉村 恵（九州大学大学院 医学研究院 統合生理学）

(9) ラット大脳皮質第一次体性感覚野 (SI) における in vivo patch clamp 法を用いたシナプス応答の解析

水野雅晴, 土井篤, 八坂敏一, 古江秀昌, 栗生修司*, 吉村恵

(九州大学・医学研究院・統合生理学, *九州工業大学・生命体工学・脳情報)

(10) メラノーマ細胞同所移植マウスにおける疼痛反応と発生機序

安東嗣修（富山医科薬科大学薬学部薬品作用学）

(11) ラット脊髄膠様質神経興奮に対するカプサイシンの作用

楠堂 圭（福井大学工学部知能システム工学科）

(12) 脊髄後角 1 層の投射細胞におけるシナプス可塑性

池田 弘（福井大学工学部知能システム工学科）

(13) 炎症性痛覚過敏における Prostaglandin 産生機構

伊吹京秀（京都府立医大・麻酔）

(14) Gタンパク共役型ATP受容体P2Y2によるアロディニア

檜 大介 (九大・薬・化学療法分子制御)

井上 和秀 (国立医薬品食品衛生研)

(15) 血小板活性化因子(PAF)の脊髄腔内投与によるアロディニアの誘発機構の解析

森田 克也, 森岡 徳光, 土肥 敏博 (広島大学大学院医歯薬学総合研究科病態探究医科学講座歯科薬理学)

(16) 新しいN-acetyl-aspartic-glutamate (NAAG) 分解酵素阻害薬の鎮痛効果について

山本 達郎 (千葉大学医学研究院麻酔学領域)

(17) 慢性疼痛における抗うつ薬の作用機序

鈴木 高広, 李 永花, 柴田 政彦, 真下 節 (大阪大学医学部麻酔科)

(18) 末梢神経損傷後の脊髄後角における接着因子の挙動

山中 博樹 野口 光一 (兵庫医科大学解剖学第二講座)

(19) サーモグラフィーを利用した痛みの研究

小山 なつ (滋賀医科大学生理学第一講座)

平田 和彦 (福岡大学医学部麻酔科学講座)

岩下 成人 (滋賀医科大学生理学第一講座)

(20) 術後痛モデルを用いた先取り鎮痛に関する研究

村谷 忠利¹, 南 敏明¹, 西村 渉¹, 伊藤 誠二²

(¹大阪医科大学麻酔科学教室, ²関西医科大学医化学教室)

(21) C線維を上行する信号による末梢、脊髄、大脳での反応: Second pain の認知メカニズム?

秋 云海, 乾 幸二, 王 曉宏, Tuan Diep Tran, 柿木 隆介 (岡崎国立共同研究機構 生理学研究所 統合生理)

(22) ラット腰神経根の圧迫または髄核接触による行動学的・組織学的変化

－ 腰椎椎間板ヘルニアの病態－

佐々木 伸尚, 矢吹 省司, 菊地 臣一 (福島県立医科大学医学部整形外科)

(23) Neuroimaging (fMRI) 法による難治性疼痛に対する脳の機能解析

池本 竜則¹, 牛田 享宏¹, 谷口 慎一郎¹, 谷 俊一¹, 森尾 一夫², 佐々木 俊一², 田中 茂樹³

(¹高知医科大学運動機能学教室, ²高知医科大学放射線科学教室, ³仁愛大学心理学教室)

(24) 中枢性疼痛(視床痛)に対する各種外科治療の治療効果

平戸 政史, 高橋 章夫, 宮城 島孝昭, 斎藤 延人 (群馬大学医学部脳神経外科)

教育講演

その1

9月4日 午後6時～7時

痛みの制御: ターゲットは脳か, 脊髄か

土肥 修司 先生

岐阜大麻酔科

司会: 大阪大麻酔

真下 節 先生

その2

9月5日 午後3時20分～4時20分

痛みの分子メカニズムとペインリサーチ

野口 光一 先生

兵庫医大解剖

司会：和歌山県立医大解剖

仙波 恵美子 先生

【参加者名】

伊吹 京秀 (京都府医大・麻酔), 小山 なつ (滋賀医大・生理), 岩下 成人 (滋賀医大・生理), 吉村 恵 (九州大・医・統合生理), 古江 秀昌 (九州大・医・統合生理), 水野 雅晴 (九州大・医・統合生理), 中塚 映政 (九州大・医・統合生理), 八坂 敏一 (九州大・医・統合生理), 又吉 達 (九州大・医・統合生理), 姜 楠 (九州大・医・統合生理), 園畑 素樹 (九州大・医・統合生理), 加藤 剛 (九州大・医・統合生理), 玉江 昭裕 (九州大・医・統合生理), 古賀 浩平 (九州大・医・統合生理), 富永 真琴 (三重大・医・生理), 沼崎 満子 (三重大・医・生理), 森山 朋子 (三重大・医・生理), 富樫 和也 (三重大・医・生理), 東 智広 (三重大・医・生理), 村山 奈美枝 (三重大・医・生理), 三村 明史 (三重大・医・生理), 小西 康信 (三重大・医・生理), 村谷 忠利 (大阪医大・麻酔), 南 敏明 (大阪医大・麻酔), 伊藤 誠二 (関西医大・医化学), 牛田 享宏 (高知医科大・整形外科), 池本 竜則 (高知医科大・整形外科), 井上 智重子 (高知医科大), 櫻井 博紀 (愛知医科大学), 橋本 辰幸 (愛知医科大学), 井上 和秀 (国立医薬品食品衛生研), 檜 大介 (九州大・薬・化学療法分子制御学), 渡辺 和之 (福島県医大・整形外科), 佐々木 伸尚 (福島県医大・整形外科), 矢吹 省司 (福島県医大・整形外科), 高山 文治 (福島県医大・整形外科), 楠堂 圭 (福井大・工・知能システム工学), 池田 弘 (福井大・工・知能システム工学), 村瀬 一之 (福井大・工・知能システム工学), 石田 将之 (福井大・工・知能システム工学), 黒田 浩平 (福井大・工・知能システム工学), 井上 誠 (長崎大・薬・分子薬理), 上田 知靖 (長崎大・薬・分子薬理), 松尾 杏奈 (長崎大・薬・分子薬理), 松本 みさき (長崎大・薬・分子薬理), 野口 光一 (兵庫医大解剖), 山中 博樹 (兵庫医大解剖), 戴 毅 (兵庫医大解剖),

小畑 浩一 (兵庫医大解剖), 田村 志宣 (和歌山県医大解剖), 仙波 恵美子 (和歌山県医大解剖), 森川 吉博 (和歌山県医大解剖), 平戸 政史 (群馬大脳神経外科), 高橋 章夫 (群馬大脳神経外科), 宮城島 孝昭 (群馬大脳神経外科), 柴田 政彦 (大阪大麻酔科), 山本 達郎 (千葉大麻酔科), 銅冶 英雄 (千葉大麻酔科), 山田 寛明 (千葉大整形外科), 蓮江 文男 (千葉大整形外科), 土肥 修司 (岐阜大麻酔科), 水村 和枝 (名古屋大環境医研), 佐藤 純 (名古屋大環境医研), 片野坂 公明 (名古屋大環境医研), 小崎 康子 (名古屋大環境医研), 田村 良子 (名古屋大環境医研), 高橋 賢 (名古屋大環境医研), 田口 徹 (名古屋大環境医研), 余 錦 (名古屋大環境医研), 西嶋 泰洋 (名古屋大環境医研), 舟久保 恵美 (名古屋大環境医研), 太田 剛史 (名古屋大環境医研), 肥田 朋子 (名古屋大理学療法), 松田 輝 (星城大理学療法学科), 緒方 宣邦 (広島大神経生理), 柿村 順一 (広島大神経生理), 大石 芳彰 (広島大神経生理), 松富 智哉 (広島大神経生理), 鄭 泰星 (広島大神経生理), 中本 千泉 (広島大神経生理), 岩田 幸一 (日本大生理), 坪井 美行 (日本大生理), 久保田 伊柄子 (日本大生理), 柿木 隆介 (生理学研究所), 乾 幸二 (生理学研究所), Tran Diep Tuan (生理学研究所), 王 曉宏 (生理学研究所), 田村 洋平 (生理学研究所), 秋 云海 (生理学研究所), 廣江 総雄 (生理学研究所), Nguyen Thi Binh (生理学研究所), 中田 大貴 (生理学研究所), 土肥 敏博 (広島大・歯・薬理), 森田 克也 (広島大・歯・薬理), 倉石 泰 (富山医大薬大薬品作用学), 安東 嗣修 (富山医大薬大薬品作用学), 仲田 義啓 (広島大・薬・薬理), 井上 敦子 (広島大・薬・薬理), 大下 恭子 (大整形外科), 鈴木 高広 (大阪大麻酔科), 真下 節 (大阪大麻酔科), 李 永花 (大阪大麻酔科)

【概要】

近年、医療の現場では患者の Quality of Life (QOL) が重要視されるようになり、その一つとして、これまで耐えるべきものとして軽視されてきた「痛み」を、積極的にコントロールすべきであるという考え方が強くなってきている。しかしながら、神経因性疼痛などの難治性疼痛は、旧来の鎮痛薬が奏功せず、その発症機序も未だ十分には分かっておらず、患者は長期にわたる痛みにただじっと耐えるしかないのが現状である。このような点から、難治性疼痛の発症機序の解明、ひいては新しいタイプの鎮痛薬の開発が、現在の急務となっている。米国では、「脳の 10 年 (the Decade of Brain)」に続いて、2001 年に「痛みの 10 年 (the Decade of Pain Control and Research)」が宣言され、今後の研究成果が期待されている。

最近の分子生物学の急速な進展によってさまざまなタイプの痛み受容体や痛覚伝導に関与するイオンチャネルが同定されているが、このような分析的基礎研究の成果がヒトにおける疼痛にどのように関与しているのかという点に関しては未解明な部分が多い。多種多様な病態生理からなる痛みの制御機構や疼痛発現メカニズムは、個体レベルあるいはヒトを対象としたよりマクロ的研究を

含む多角的な面からアプローチしなければ、更なる研究のための有効な戦略が確立できない。このような観点から、疼痛機序の解明に向けた新たな展開の基礎を築くことを目的として、平成 14 年 9 月 5・6 日の両日、岡崎国立共同研究機構・生理学研究所において、「痛みの基礎と臨床：その接点から新しい展望を探る」と題した研究会を開催した。本年度はその第 2 回であり、研究会では、昨年に引き続いて基礎・臨床の異なった立場から「痛み」の研究に携わる方々に最新の研究成果を紹介いただいた。

内容的には、痛覚受容体やイオンチャネルに関する基礎的研究、炎症モデルや神経因性疼痛モデルなどの動物モデルを用いた疼痛発現機序の解析、生体内疼痛関連物質の痛覚可塑性における役割、神経因性疼痛や椎間板ヘルニアなどの病態生理、脳磁図や fMRI などを用いた痛みのイメージング、疼痛の発症メカニズムに関する臨床的アプローチなど、基礎および臨床の幅広い領域を網羅したものとなった。最後に、本研究会のために多大な努力を惜しまずご尽力いただいた生理学研究所関係各位に深く御礼を申し上げたい。

(1) カプサイシン受容体 TRPV1 の感作・脱感作の分子機構

沼崎満子 (三重大学医学部分子細胞生理学)

組織損傷や炎症時に放出される様々な炎症関連物質が疼痛発生や痛覚異常に関与することが知られている。私たちは、細胞外 ATP やブラジキニンが、それらの Gq 共役型受容体活性化から PKC によってカプサイシン受容体をリン酸化して TRPV1 の活性増強をもたらすことを報告してきた。さらに、PKC によってリン酸化される TRPV1 の 2 つのセリン残基を同定した。異所性発現系において観察された P2Y 受容体を介した TRPV1 の活性増強が動物の行動レベルに反映されるかどうかをマウスを用いて検討した。野生型マウスでは、ATP の足底への投与によって熱性痛覚過敏が観察された。この熱性痛覚過敏は TRPV1 欠損マウスではみられず、TRPV1 と ATP の機能連関が個体レベルで明らかになった。しかし、P2Y1 欠損マウスでも野生型と同様の熱性痛覚過敏が認められ、マウスにおいては ATP による痛覚過敏には P2Y1 受容体は

関与しないことが分かった。マウス後根神経節細胞において、パッチクランプ法を用いてカプサイシン活性化電流を測定すると、UTP によって ATP と同程度の電流増強が観察され、それがスラミンによって阻害されたことから、P2Y2 受容体に関与するものと推定された。ラット後根神経節細胞で TRPV1, P2Y1, P2Y2 の mRNA 発現を検討すると、TRPV1 mRNA は P2Y1 mRNA ではなく P2Y2 mRNA と共発現しており、膜電流測定で得られた結果を支持した。さらに、P2Y2 受容体の刺激物質である UTP の投与は ATP と同様の熱性痛覚過敏を引き起こした。

発痛物質カプサイシンはまた、鎮痛薬として使われており、細胞外 Ca^{2+} 依存性の脱感作がその細胞レベルのメカニズムの 1 つと考えられている。そこで、多くの Ca^{2+} 透過性チャネルの不活性化に関与する Ca^{2+} 結合蛋白質カルモジュリン (CaM) と TRPV1 の関連を検討した。生化

学的手法によって TRPV1 と CaM の結合が明らかとなり、TRPV1 の C 末端の 35 アミノ酸がその結合に重要であることが判明した。この 35 アミノ酸を欠失した変異体では、

細胞外 Ca^{2+} 依存性の脱感作が減弱しており、CaM/ Ca^{2+} 複合体のこの 35 アミノ酸部位への結合が脱感作をもたらすものと推測された。

(2) TRPV1 ノックアウトマウスにおけるブラジキニン応答の行動学的および生理学的解析

片野坂 公明¹, Banik Ratan Kumar¹, Grion Moreno Rocio¹, 富永 真琴², 水村 和枝¹
(名古屋大学環境医学研究所¹, 三重大学医学部²)

損傷組織に生じる内因性発痛物質ブラジキニン (BK) は、侵害受容器を興奮させることにより痛みを引き起こす。これまでに我々は、侵害受容器に存在する熱トランスデューサーであるカプサイシン受容体 (TRPV1) の活性化温度閾値が、BK により室温レベルにまで低下することを明らかにした。この実験結果および他の報告から、BK が TRPV1 の活性を介して侵害受容器の興奮を引き起こしている可能性が想定されている。この BK の発痛作用に対する TRPV1 の関与についてさらなる検討を加えるため、今回我々は TRPV1 遺伝子を欠損させたノックアウト (KO) マウスにおいて、BK による痛み関連行動、および BK に対する侵害受容器の応答がどのようになっているかを調べた。

まず行動レベルでは、足底皮下への BK (濃度 10-5 M) の注入後に足舐め行動を示す個体の割合は、野生型に比べて KO マウスで有意に低く、また足を舐めている時間も KO マウスの方で短い傾向が見られた。しかしながら、

10 倍高濃度の BK (10-4 M) を注入した場合の足舐め行動では、両者の間に有意な差は見られなかった。この結果から、TRPV1 は BK による発痛に関与しているものの、高濃度の BK に対しては TRPV1 の寄与が小さくなることが示唆された。

次いで、BK に対する単一神経線維レベルの応答を、皮膚一伏在神経単離標本から記録した。投与した BK の濃度域に依らず、BK に対する応答の強さおよび BK 感受性線維の割合のいずれについても、KO マウスと野生型マウスとの間で有意な違いは見いだせなかった。さらに、培養後根神経節細胞において、BK 投与により細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加が観察された細胞の割合は、KO マウスと野生型マウスとの間でほぼ同じであった。

以上の結果、BK による侵害受容器の興奮には部分的に TRPV1 が関与するが、TRPV1 を介さない機構も存在することが示唆された。

(3) マウス後根神経節ニューロンにおける TTX 感受性持続型 Na 電流の解析

松富智哉¹, 柿村順一¹, 鄭泰星¹, 大石芳彰¹, 中本千泉¹, 仲田義啓², 緒方宣邦¹
(広島大学大学院医歯薬総合研究科・¹ 神経生理学, ² 薬効解析科学)

後根神経節 (DRG) には 7 種類の電位依存性 Na チャネルが発現し、侵害情報を含むさまざまな感覚信号の伝搬に役割分担して機能していると考えられる。そのうち TTX 非感受性 Na チャネルである NaV1.9 は主に C 線維を発する小型 DRG 細胞に発現し、持続型の Na 電流を起こすことを既に報告している。今回私たちは主に大型 DRG 細胞においてみられる持続型の Na 電流を記録したので報告する。

大型 DRG 細胞においては、速い一過性の Na 電流に伴って、低振幅で持続性の内向き成分が観察された。この持続性成分は高濃度の Cd^{2+} により影響を受けず、外液 Na 濃度に依存することより、Na 電流であると考えられた。また TTX 投与により消失することやカイネティクスの違いから、小型 DRG 細胞でみられる NaV1.9 による電流とも異なる電流であった。活性化閾値は約 -60mV であり、一過性 Na 電流の閾値 (約 -40mV) より過分極側にシ

フトしていた。さらに一過性 Na 電流が不活性化する条件下でも、持続性内向き成分は不活性化を受けず単独で観察された。これらの結果より、持続性内向き成分は、一過性 Na 電流とは別のチャネルを介するものであると結論された。これまで報告されている TTX 感受性の持続型 Na 電流は、殆どの場合、「一過性 Na 電流の遅い不活性化相」として記録され、関与するチャネルの遺伝子型としては NaV1.6 の可能性が強く示唆されている。一方、大型 DRG 細胞における持続型 Na 電流は、速い一過性の成分を全く含まない電流であった。また、パッチクランプ法と Single cell RT-PCR を組み合わせた検討では、NaV1.6-mRNA を発現していた細胞でも電流が全く記録

されなかった例、逆に NaV1.6-mRNA の発現が観察されなかった細胞でも明瞭に電流が記録された例もあり、NaV1.6 と持続型 Na 電流とのはっきりした相関関係は認められなかった。

以上のごとく、大型 DRG 細胞において観察された持続型 Na 電流は、従来報告されている TTX 非感受性持続型 Na 電流とは機能的にもチャネルタイプとしても異なるものである可能性が高い。この持続型 Na 電流は、その著しく遅い時間経過や小さい電流値のため、活動電位の発生・伝搬自体には関与せず、小型 DRG 細胞における NaV1.9 電流の役割と同様に、大型 DRG 細胞での閾値下での興奮性を制御していると考えられる。

(4) ラット後根神経節初代培養細胞におけるカプサイシンの反応に対する カンナビノイドの抑制効果について

大下恭子¹, 河本昌志¹, 天野 託², 酒井規雄², 弓削孟文¹, 唐 和斌³, 井上敦子³, 仲田義啓³
(広島大院医歯薬学総合研究科, ¹ 麻酔蘇生学, ² 神経・精神薬理, ³ 薬効解析学)

カンナビノイドは神経因性疼痛や炎症性疼痛モデル動物における痛覚過敏を抑制することが報告されている。一次知覚神経には、カンナビノイド受容体 (CB1) とカプサイシンの受容体 (TRPV1) が存在し、また、内因性のカンナビノイドであるアナンダミドは TRPV1 の内因性リガンド候補としても注目されている。そこでカンナビノイドの作用機序を解明する目的で、カンナビノイドが TRPV1 活性を調節している可能性を考え、ラット後根神経節初代培養細胞 (DRG 細胞) を用いて、アナンダミドの効果、及びカプサイシンの反応に対するカンナビノイドの効果を検討した。

Wistar 系雄性成熟ラットより脊髄後根神経節を単離し、酵素処理分散法により DRG 細胞を作成した。培養 5 日目に、細胞内への ^{45}Ca 取り込み、サブスタンス P 遊離量 (ラジオイムノアッセイ法) の定量を行った。

カプサイシンは濃度依存性に ^{45}Ca 取り込みを誘発し

たが、アナンダミドは無影響であった。アナンダミド、2-アラキドノイルグリセロール、HU210 (CB1 アゴニスト) はカプサイシンによる ^{45}Ca 取り込みを濃度依存性に抑制した。CB1 アゴニストによる抑制効果は AM251 (CB1 アンタゴニスト) により拮抗された。一方、カプサイシン、アナンダミドはサブスタンス P 遊離増加を引き起こし、両者の反応はカプサゼピン (TRPV1 アンタゴニスト) により抑制された。しかし、CB1 アゴニストはカプサイシンによるサブスタンス P 遊離増加を抑制しなかった。

以上の結果から、一次知覚神経において、カンナビノイドは TRPV1 による反応を CB1 を介して抑制することが示唆された。また、本研究の DRG 細胞の標本では、CB1 により抑制される TRPV1 の反応と、CB1 により影響を受けない TRPV1 の反応が観察され、これは各受容体の局在の相違による可能性があると考えた。

(5) 一次知覚神経系における oncostatin M の役割について

田村 志宣, 森川 吉博, 仙波 恵美子 (和歌山県立医科大学第二解剖学)

Interleukin-6 メンバーの一員である oncostatin M(OSM) は, 1996 年に, 種々のサイトカインの刺激で活性化される転写因子 STAT5 により制御される遺伝子のひとつとして単離された。そして, 発生過程における大動脈・生殖器・中腎領域での造血, 胎仔肝臓の成熟など OSM 特異的な作用がこれまでに報告されている。しかしながら, 神経系における OSM の役割については, 未だ報告は少ない。そこで, 私たちは, 成獣マウスの神経系における OSM の新たな生物学的作用の検索を試みた。

初めに, 神経系における OSM 受容体の発現を検討するために, 中枢神経系及び末梢神経系において, ノーザンブロット解析を行ったところ, 嗅球においてその発現が認められたことに加え, 三叉神経節と後根神経節において非常に強い OSM 受容体の発現を認めた。ISH 法を用いて検討を行った結果, OSM 受容体は小型一次知覚ニューロンに発現していた。OSM 受容体に対する抗体を用い,

多重免疫組織染色を行ったところ, ほとんどの OSM 受容体陽性のニューロンは TrkA 陽性ではなく, Ret 陽性の小型ニューロンに多く属することがわかった。さらに, この OSM 受容体陽性の小型ニューロンは substance P や CGRP などの neuropeptide は有さず, カプサイシン受容体である TRPV1 と ATP 受容体である P2X3 の両受容体を共に有することが明らかになった。

OSM と同じメンバーである leukemia inhibitory factor (LIF) の受容体も後根神経節に発現しており, 損傷したニューロンに対して神経栄養因子作用を発揮すると考えられている。しかしながら, 多重免疫組織染色により, LIF 受容体の発現パターンは OSM 受容体の発現パターンとは全く異なり, これらのことから, LIF とは異なる OSM 特異的な作用が後根神経節とくに侵害受容器である小型ニューロンに存在することが示唆された。

(6) 三叉神経第 2 枝損傷モデル動物における主知覚核ニューロンの反応性

坪井 美行^{1,2}, 呉 軍¹, 清水 康平³, 久保田 伊柄子⁴, 岩田 幸一^{1,2}

(¹ 日本大学歯学部生理学教室, ² 日本大学歯学部総合歯学研究所機能形態部門, 日本大学大学院 (³ 保存学 II, ⁴ 歯科麻酔))

【目的】三叉神経第 2 枝に CCI を施して作成した neuropathic pain モデルラットと正常ラットの三叉神経主知覚核および三叉神経脊髄路核尾側亜核ニューロンの各種刺激に対する応答特性および自発活動を調べ, 三叉神経第 2 枝領域における異常疼痛発症に対するそれぞれの核の役割について検索した。【方法】実験には SD 系雄性ラットを用いた。機械刺激に対する逃避閾値と熱刺激に対する逃避潜時を測定した後, ネンブタール麻酔下で三叉神経第 2 枝を 2 箇所緩く 4.0 chromic gut で結紮した (CCI)。顔面領域の機械刺激に対して neuropathic pain が確立された動物について電気生理学的実験を行った。【結果】主知覚核ニューロン活動の記録実験から, 以下の結果を得た。1. 機械刺激に対する逃避行動閾値は, CCI 動物の方が sham 動物に比べ, 有意に低かった (CCI: $3.1 \pm$

0.8g , $n=6$; sham: 34.5 ± 8.5 , $n=4$, $p < 0.01$)。2. 自発放電頻度は, sham に比べ有意に高かった (CCI: $9.4 \pm 1.3\text{ Hz}$, $n=30$; sham: $0.2 \pm 0.1\text{ Hz}$, $n=10$, $p < 0.01$)。3. 侵害刺激後放電頻度は, sham に比べ有意に高かった (CCI: $14.1 \pm 2.0\text{ Hz}$, $n=30$; sham: $0.9 \pm 0.6\text{ Hz}$, $n=10$, $p < 0.01$)。4. WDR ニューロンの機械刺激に対する反応は, 非侵害レベルにおいて有意に高かった (CCI: $15.7 \pm 1.1\text{ spikes/s}$, $n=16$; sham: $3.5 \pm 1.1\text{ spikes/s}$, $n=6$, $p < 0.05$)。一方, 脊髄路核尾側亜核ニューロン活動の記録実験からは, 以下の結果を得た。1. 機械刺激に対する逃避行動閾値は, CCI 動物の方が sham 動物に比べ有意に低かった (CCI: $6.7 \pm 1.5\text{g}$, $n=6$; sham: 34.5 ± 8.5 , $n=4$, $p < 0.01$)。侵害性機械刺激に対する逃避頻度は, CCI 動物の方が sham 動物に比べ有意に高かった (CCI: $70.8 \pm 8.7\%$, $n=6$; sham: 12.5 ± 7.2 , $n=4$, $p < 0.05$)。

2.WDR ニューロンの機械刺激に対する反応は非侵害および侵害レベルにおいて有意に高かった ($p < 0.05$)。

【結論】三叉神経第 2 枝障害により顔面領域に発症する異常疼痛において、三叉神経主知覚核は主に非侵害刺激に

おける痛覚異常の発症に関与する可能性が示された。一方、侵害刺激における異常疼痛の発症に対しては、三叉神経脊髄路核尾側亜核が強く関与する可能性が示唆された。

(7) 脊髄後角深層細胞におけるサブスタンス P の抑制系神経伝達に対する賦活化作用

中塚映政, 園部秀樹, 古江秀昌, 吉田宗人, 吉村恵

(和歌山県立医科大学整形外科教室, 九州大学大学院統合生理学教室)

日常の中で遭遇する疼痛に対して様々な治療がなされているが、幻肢痛・脊髄損傷後疼痛・反射性交感神経性ジストロフィーなどの神経因性疼痛や慢性炎症に伴う遷延性疼痛に対する治療は未だ確立されていない。サブスタンス P (以下 SP) はこれら難治性疼痛に関与していると考えられており、痛覚系において最も詳細に研究されている代表的な神経ペプチドである。しかしながら、近年、SP 受容体拮抗薬は鎮痛効果を示さないという報告が散見され、更に NK1 受容体ノックアウトマウスを用いた研究においても、急性疼痛および慢性疼痛に対する鎮痛作用は明らかではなかった。我々はその機序を解明するために、脊髄スライス標本からパッチクランプ記録を行い、脊髄後角深層細胞における SP の作用を検討した。

脊髄後角深層細胞からパッチクランプ記録を行うと、グルタミン酸を介する興奮性シナプス後電流 (以下 EPSC) ならびに GABA またはグリシンを介する抑制性シナプス後電流 (以下 IPSC) が記録された。SP および NK1 受容体作動薬を灌流投与すると、グルタミン酸を介する EPSC が有意に増強するだけでなく、GABA またはグリシンを介する IPSC も著明に増強した。SP 受容体阻害剤の臨床応用は難治性疼痛などの痛み治療に対して長らく期待されてきたが、未だ実用化されていない。今後、SP 受容体阻害剤の臨床応用を考える上で、本研究で明らかになった SP 受容体による抑制性シナプス後電流の賦活化作用を考慮に入れることが必要であると推察された。

(8) 非侵害性刺激によって誘起される脊髄後角表層の抑制性シナプス応答の解析

古江 秀昌・加藤 剛・八坂 敏一・吉村 恵 (九州大学大学院 医学研究院 統合生理学)

脊髄後角第 II 層、いわゆる膠様質は痛みを伝える A δ 線維や C 線維とともに抑制性介在ニューロンの密な投射を受ける。また、種々の疼痛モデル動物において抑制性シナプス入力脱落が観察されるなど、膠様質は痛みの伝達や調節さらに痛覚回路の可塑性発現に重要な役割を演じている。本研究では、脊髄スライス標本および in vivo 標本からのパッチクランプ記録法を用い、膠様質細胞に誘起される抑制性シナプス応答を記録・解析した。スライス標本を用い A δ 線維や C 線維の後根刺激を行うと、GABA およびグリシンを介した抑制性シナプス後電流 (IPSC) が誘起された。これらの細胞の中には単発刺激によってバースト状の IPSC を誘起するものが観察され、

その応答は数秒～数十秒間持続した。次に、in vivo 標本から記録を行い皮膚へ触刺激を加えると、一過性に IPSC の発生頻度と振幅が著明に増大し、その応答は刺激終了後にもバースト状に持続した。機械的痛み刺激では持続性の応答は観察されなかった。一方、A δ 線維や C 線維の後根刺激および皮膚への触や機械的痛み刺激によって誘起される興奮性シナプス応答では、IPSC で刺激終了後にみられたような持続性の EPSC の発生は全く観察されなかった。以上より、非侵害性刺激によって誘起される抑制性のバースト状のシナプス応答は抑制性介在ニューロンの膜特性によるものと推測され、この膜特性が脊髄における痛みの抑制に寄与することが示唆された。

(9) ラット大脳皮質第一次体性感覚野 (SI) における in vivo patch clamp 法を用いたシナプス応答の解析

水野雅晴, 土井篤, 八坂敏一, 古江秀昌, 栗生修司*, 吉村恵
(九州大学・医学研究院・統合生理学・*九州工業大学・生命体工学・脳情報)

【目的】末梢の触・痛覚情報は、視床を介して大脳皮質へ伝えられる。末梢への触・痛刺激に対する第一次体性感覚野神経細胞のシナプス応答の詳細な解析を目的に、皮質細胞から in vivo patch clamp 記録を行ない、鬚毛の触覚刺激および視床電気刺激によって誘起されるシナプス応答を記録解析した。【方法】In vivo 条件下で blind patch clamp 法をラット第一次体性感覚野に適用した。鬚毛への感覚刺激はブラシを用いて加えた。視床核は同芯円双極電極を用いて電気刺激した。記録した細胞の形態観察は、電極内から注入した neurobiotin を用いて行なった。【結果と考察】皮質 IV/V 層の細胞から記録を行なうと、自発性の興奮性シナプス後電流 (EPSC) が観察され、鬚

毛へ触刺激を加えると、この EPSC の振幅と発生頻度が著明に増大した。また周期的なバースト状の EPSC (オシレーション) を示す細胞もみられた。このオシレーションは、CNQX を皮質表面に灌流投与すると抑制された。また、中継核の視床核を単発電気刺激することによっても消失した。これらのことより記録細胞に観察されたオシレーションは視床活動由来であることが示唆された。一方、視床へ比較的弱い電気刺激を与えた場合、皮質の記録細胞では短い潜時 (約2ms) と長い潜時 (約 120ms) の EPSC が得られた。この皮質細胞は視床より単シナプス性および多シナプス性の入力を受けていることが示唆された。

(10) メラノーマ細胞同所移植マウスにおける疼痛反応と発生機序

安東嗣修 (富山医科薬科大学薬学部薬品作用学)

癌患者では、癌の進行に伴って痛みの発生頻度が増加し、QOL の低下をもたらす主因となる。しかしながら、腫瘍細胞が直接の原因となる疼痛の発生機序に関する研究は、動物モデルの欠如からほとんど行われていなかった。そこで、我々は、C57BL 系マウス由来のメラノーマ細胞 B16-BL6 を C57BL/6 系マウス後肢足趾に同所移植することにより動物モデルの作製を試みた。移植後 11 日目より、移植側後肢に有意な腫脹が観察され、その後、指数関数的に増大した。移植後10日目より、von Frey filament による機械刺激に対し著しい痛覚過敏が生じた。腫瘍中心部は、触刺激により疼痛反応を生じなかったが、その周辺領域に触アロディニアを生じた。また、腫瘍部への舐め行動時間が増加し、坐骨神経の自発発火が増加した。腫瘍周辺部の表皮内で protein gene product 9.5 陽性神経線維が増加したが、腫瘍中心部の表皮では神経線維が消失

していた。移植後 20 日目において、morphine (3 及び 5mg/kg) 及び gabapentin (100 及び 300 mg/kg) の経口投与が、痛覚過敏を用量依存的に抑制したが、diclofenac sodium (10 及び 30 mg/kg) の腹腔内投与は抑制しなかった。移植後 16 から 20 日目の移植側後肢からメラノーマ細胞塊を摘出し、水抽出液 (1 及び 2 mg 抽出物/20 ml) を作製した。抽出液 (1 及び 2 mg 抽出物/20 ml) のマウス後肢足趾への注射が、用量依存的に浮腫及び機械刺激に対する痛覚過敏を生じた。これらの反応は、carrageenan (4%) による浮腫及び痛覚過敏を抑制する用量の diclofenac sodium (10 及び 30mg/kg) の腹腔内投与では抑制されなかった。メラノーマによる疼痛様反応は、少なくとも一部、皮膚における神経線維分布の変化およびメラノーマが遊離するプロスタグランジン類以外の発痛物質が原因となっていると考えられる。

(11) ラット脊髄膠様質神経興奮に対するカプサイシンの作用

楠堂 圭 (福井大学工学部知能システム工学科)

電位感受性色素を用いた神経活動の光計測法を用いて、脊髄切片後角Ⅱ層に、後根 C 線維への単発刺激で生じる神経興奮を計測し、カプサイシンの効果を調べた。

カプサイシン (1.5 μ M) は脊髄後角領域で光学的計測法により捉えられた神経興奮の最大振幅を約 20%抑制し、この効果は濃度依存的で $K_d=0.5\mu$ M であった。受容体阻害薬カプサゼピン (10 μ M) はカプサイシンの効果に拮抗した。

外液の pH を 7.8 から 6.6 に下げると神経興奮が抑制されたが、カプサゼピンにより阻害された。興奮性アミノ酸受容体拮抗薬 AP5 (30 μ M) と CNQX (10 μ M) の存在下では神経興奮の緩除成分が消失しシナプス前興奮すなわち入力線維終末の興奮が記録できる。カプサイシン (0.15 -

1.5 μ M) はこの成分も濃度依存的に抑制した。また、カプサイシン (1.5 μ M) を 15 分以上投与し続けると抑制から回復しなかった。グリシン・GABA の阻害薬である BMI・STRY 投与下でカプサイシンを投与しても、抑制作用がみられた。次に細胞外のカルシウムイオンを除去した条件下でカプサイシンを投与したところ、抑制作用が見られなかった。

以上の結果は、カプサイシンが直接シナプス前終末に抑制的に作用していること、カルシウムチャネルが関与していること、パニロイド受容体の脱感作が関与していること、そして pH や温度変化の受容にパニロイド受容体が関与している可能性を示唆している。

(12) 脊髄後角 1 層の投射細胞におけるシナプス可塑性

池田 弘 (福井大学工学部知能システム工学科)

脊髄後角でのシナプス伝達の長期増強は痛覚過敏やアロディニアの惹起に重要な役割を担っていると考えられている。我々は、逆行染色によって識別された投射細胞からパッチクランプを行うことで、脊髄後角 1 層の投射細胞が長期増強を示すことを明らかにした⁽¹⁾。しかし、パッチクランプ法では技術的に長時間の神経活動の記録は困難である。そこで我々は、長時間記録が可能な膜電位感受性色素を用いた光計測法によって脊髄後角 1 層の投射細胞で起こる長期増強の計測とメカニズムの解析を試みた。脳幹へ膜電位感受性色素を注入することによって逆行染色された脊髄後角 1 層の投射細胞は後根への低頻度条件刺激 (2Hz, 2 分間) によって 2 時間以上持続する神経活動の増強が起こった。またこの増強は、選択的

inducible NO (iNO) シンターゼの抑制剤 AMT の投与下では抑制された。また、短時間の低頻度刺激 (2Hz, 30 秒) では起きなかった長期増強が NO ドナーの長時間投与によって促進された。次に我々は、神経線維終末の活動への低頻度刺激の影響を調べるために、神経線維終末のみを後根より順行性に染色して計測した。その結果、低頻度刺激によって終末の活動が長期的に増強された。また、その増強は投射細胞で見られた増強と同様 AMT の投与下で抑制された。これらの結果より、本研究で見られた投射細胞の長期増強は、iNO シンターゼによって長時間 NO が合成され、その NO が終末に作用することによって起こると考えられる。

(1) Ikeda et al., 2003, Science 299; 1237-1240.

(13) 炎症性痛覚過敏における Prostaglandin 産生機構

伊吹京秀（京都府立医大・麻酔）

末梢性炎症に伴う痛覚過敏において、炎症局所および中枢神経系で神経の興奮性増強に関与する Prostaglandin (PG) 産生メカニズムの解明を、Cyclooxygenase-2 (COX-2), Prostaglandin E2 (PGE2) に注目して行った。まず COX-2 および PGE2 産生の最終段階酵素である PGE2 synthase (PGES) の局在を免疫組織化学的に調べたところ、いずれも脳、脊髄の実質、くも膜下腔の血管内皮細胞に局在していた。これらは同一細胞に共存し共存率は 90 % 以上であった。免疫陽性血管内皮細胞は広く中枢神経系に分布し部位差は認められなかった。なお COX-2 免疫陽性神経細胞は無刺激時、脳内の限定された部位に観察されたが、炎症惹起により変化しなかった。PGES 免疫陽性細胞は無刺激時には認められなかった。次にカラゲニン炎症モデルで COX-2 免疫陽性血管内皮細胞の経時的変化を調べたところ、脳、脊髄ともに炎症惹起 3 時間後に観察され 6 時間後にはその数は最大になり以後減少した。脳脊髄液中の PGE2 も同様の経時的変化を示し、6 時間後にお

ける PGE2 の上昇は COX-2 選択的阻害剤である NS398 をカラゲニン局注 10 分前に投与すると有意に抑制されたが、局注 2 時間後投与では有意な効果は見られなかった。カラゲニンモデルでの痛覚過敏は局注直後から見られ 2 時間後に最大に達し以後 6 時間後まで同程度に観察された。カラゲニン局注 2 時間後に NS398 を腹腔内投与すると直ちに痛覚過敏は抑制され、作用部位同定のためにも膜下腔投与したところ著明な抑制効果が見られた。これらより、カラゲニンモデルにおいて炎症後期の痛覚過敏に中枢神経系の COX-2 の関与が示唆された。炎症局所ではマクロファージ様細胞に COX-2, PGES 免疫陽性細胞が観察されたが同一細胞における共存率は低かった。局所では PGE2 以外の PG も興奮性増強に関与している可能性が考えられる。局所から中枢神経系への炎症情報伝達に関与する物質を同定するために、血中各種サイトカインの測定を行ったが、IL-6 が関与する可能性が示唆された。

(14) G タンパク共役型 ATP 受容体 P2Y2 によるアロディニア

檜楨大介（九大・薬・化学療法分子制御）

井上和秀（国立医薬品食品衛生研）

ATP は知覚神経においてイオンチャネル内蔵型 P2X 受容体を介して、痛覚伝達に関与している。我々は既に、P2X 受容体アゴニスト α, β -methylene ATP ($\alpha\beta$ meATP) をラットの足底部に投与する事で、中型でカプサイシン非感受性の脊髄後根神経節 (DRG) 神経に発現する P2X2/3 受容体を介してアロディニアを誘発することを明らかにした (J. Neurosci., 20, RC90, 2000)。一方、DRG には様々なサブタイプの G タンパク共役型 P2Y 受容体が発現しているにも関わらず、その痛覚伝達系における役割は明らかにされていない。

そこで我々は痛み行動における DRG での P2Y 受容体の役割について研究を行った。まず、 Ca^{2+} イメージング (fura-2 法) を用いて、小型でカプサイシン感受性 DRG 神経の多くに UTP 感受性 P2Y2 受容体が発現している事を明らかにした。P2Y2 受容体アゴニストである UTP を足

底部に投与すると濃度依存的にアロディニアが誘発され、これは P2 受容体拮抗薬の投与、および P2Y2 受容体のアンチセンスヌクレオチドで P2Y2 受容体をノックダウンすることにより消失した。UTP により引き起こされるアロディニアは $\alpha\beta$ meATP により誘発されるそれよりも長時間持続した。 $\alpha\beta$ meATP と異なり、UTP により引き起こされるアロディニアはカプサイシン感受性神経を破壊したラットでは誘発されなかった。しかしながら、カプサイシン受容体アンタゴニストであるカプサゼピンは UTP 誘発アロディニアには影響しなかった。これらの結果より、UTP 感受性 P2Y2 受容体を刺激することにより引き起こされるアロディニアは、小型でカプサイシン感受性 DRG 神経に依存するが、カプサイシン受容体には依存しないメカニズムにより誘発されることが示唆された。

(15) 血小板活性化因子 (PAF) の脊髄腔内投与によるアロディニアの誘発機構の解析

森田克也, 森岡徳光, 土肥敏博 (広島大学大学院医歯薬学総合研究科病態探究医科学講座歯科薬理学)

組織損傷や炎症に伴う慢性疼痛などの侵害受容器の持続した活性化は痛覚伝導に関与する末梢および中枢神経の構造的, 機構的变化を引き起こし, 痛覚過敏やアロディニアを誘発することが明らかにされつつある。近年, 痛みの研究には長足の進歩が見られ, グルタミン酸受容体, ATP 受容体, プロスタノイド受容体等が痛覚過敏やアロディニアの発症に重要な役割をはたすことが示唆されてきている。本研究は, 炎症脂質メディエーター血小板活性化因子 (PAF) がアロディニア発症に関与する可能性について検討を加えた。

薬物は ICR 系雄性マウスの第 5, 6 腰椎間に髄腔内投与した。アロディニア反応は筆でマウスの側腹部, 下肢の触覚刺激に対する逃避行動, および von Frey hairs 刺激によるマウス後足引込め反射閾値より評価した。

PAF の髄腔内投与は極めて低濃度より濃度依存的 (3 fg-1 pg) に強力なアロディニア反応および痛覚過敏反応

を誘発することを見い出した。Lyso-PAF は 30 pg まで影響しなかった。脊髄後根神経節細胞に PAF 受容体 mRNA の発現を認めた。PAF のアロディニア誘発は PAF 受容体阻害薬 TCV-309, P2X 受容体阻害薬 PPADS, NMDA 受容体阻害薬 MK806, NO 合成酵素阻害薬 7-nitroindazole (7-NI), NO スカベンジャー carboxy-PTIO, hemoglobin, Soluble guanylate cyclase 阻害薬 ODQ, NS 2028 および PKG 阻害薬 Rp-8-pCPT-cGMPs の前処置で抑制された。PAF 誘発アロディニア反応および痛覚過敏反応はカプサイシン感受性神経破壊マウスにおいて消失した。

以上の結果より, PAF は PAF 受容体に作用してアロディニアを誘発し, その機序に P2X 受容体, NMDA 受容体および NO-cGMP 系を介した機構が含まれること, さらに, PAF 誘発アロディニアおよび痛覚過敏反応は共に C 線維が介在する可能性を示唆した

(16) 新しい N-acetyl-aspartic-glutamate (NAAG) 分解酵素阻害薬の鎮痛効果について

山本達郎 (千葉大学医学研究院麻酔学領域)

NAAG は, 哺乳動物の中枢神経系で最も豊富に存在している神経伝達物質の 1 つであることが報告されている。NAAG は, それ自体 mGluR3 の作動薬であり, 同時に NMDA 受容体の mixed agonist/antagonist として作用することが知られている。また, NAAG は分解されると glutamate を放出するため, glutamate の供給源でもある。NAAG は NAAG peptidase により分解されることが知られている。NAAG peptidase は 2 種類の isozyme が存在する。NAAG peptidase は glia 細胞の細胞膜上に存在する。従って, 刺激により放出された NAAG はシナプス間隙では分解されることなく, シナプス間隙外に出た後から分解されることとなる。NMDA 受容体などのイオンチャネル型受容体はシナプス後膜上に存在するが, 代謝型の受容体はシナプス外に存在することが知られている。このような解剖学的特徴から, NAAG は放出されるとシナプス後膜の NMDA 受容体に作用し, その後シナプス外に出

てから mGluR3 に作用すると考えられる。また, NAAG から放出される glutamate はシナプス外に存在する mGluR に作用することが推定される。このように, NAAG の生体内での機能に関しては複雑であり, 現在十分には検討されていないのが現実である。私は, NAAG peptidase inhibitor である 2-PMPA を髄腔内投与し, その鎮痛効果を報告してきた。しかしながら, 2-PMPA は mGluR3 に対して拮抗作用があることが知られており, このような研究を行うには適当ではない。今回は, mGluR3 に作用しない新しい NAAG peptidase inhibitor を合成し, その鎮痛効果を検討したので報告する。

NAAG peptidase inhibitor としては, ZJ-11 (髄腔内投与・静脈内投与), ZJ-17 (髄腔内投与), ZJ-43 (静脈内投与) を用いた。疼痛モデルとしては, ラットホルマリンテスト (ラット後肢に 5% formalin を 50ml 皮下注) と神経因性疼痛モデルの 1 つである Seltzer モデル (ラット坐

骨神経を 8-0 silk にて半周結紮) を用いた。

ホルマリンテストでは ZJ-11 及び ZJ-17 の髄腔内投与・ZJ-11 及び ZJ-43 の静脈内投与により、第 1 相・第 2 相ともに投与量依存性に鎮痛効果を示した。その効果は、第 2 相でより著明であった。ZJ-11 の髄腔内投与・静脈内投与で同様に、ホルマリンにより誘導される脊髄後角の第 I-II 層の Fos 蛋白の誘導が抑制された。Seltzer モデルでも、ZJ-11 及び ZJ-17 の髄腔内投与・ZJ-11 及び ZJ-43 の静脈内投与により投与量依存性に mechanical allodynia の程度は抑制された。これらの鎮痛作用は、type 2 mGluR (mGluR2 及び mGluR3) の選択的阻害薬を前処置するこ

とにより完全に拮抗された。また、ZJ-11, ZJ-17, ZJ-43 の髄腔内投与・静脈内投与により、副作用は見られなかった。

以上の結果より、NAAG peptidase inhibitor が各種の疼痛モデルにおいて鎮痛効果を示すことがわかった。その作用機序は、NAAG peptidase inhibitor により蓄積された NAAG による mGluR3 の活性化により、脊髄後角浅層への侵害刺激入力を抑制されることが推測された。これらの薬剤は、副作用が見られず、今後臨床応用が期待できる薬物であると考えている。

(17) 慢性疼痛における抗うつ薬の作用機序

鈴木高広, 李永花, 柴田政彦, 真下節 (大阪大学医学部麻酔科)

慢性疼痛の治療には 3 環系抗うつ薬 (TCA) がしばしば用いられていて、痛みに対する治療効果は臨床、動物実験で証明されている。一方慢性疼痛患者ではしばしば抑うつ状態を呈することがあり、治療に難渋することが多い。我々は昨年この会で、マウスの神経結紮モデルにおいて不安様・うつ様行動が出現することを報告した。その中で、ノルアドレナリン再取り込み作用のあるデシプラミンには、抗痛覚過敏反応に加えて、神経結紮によって誘発される、うつ様行動に対しても効果を認めた。これまで TCA の疼痛、うつに対する効果に $\alpha 2$ アドレナリン受容体 ($\alpha 2AR$) の関与が示唆されてきた。今回我々は、 $\alpha 2AR$ ノックアウトマウスを用いて、1) デシプラミンの抗侵害受容作用、2) 神経結紮モデルにおける抗痛覚過敏反応、3) 神経結紮によって誘発されたうつ様行動に対する作用、について $\alpha 2AR$ に注目し検討した。【方法】サブタイプ $\alpha 2A$ と $\alpha 2CAR$ ノックアウトマウスおよびコントロールとして C57BL/6 マウス (8-12 週令雄) に左第 5 腰神経結紮手術またはシャム手術を行った。 $\alpha 2$ アゴニ

ストのデクスメデトミジン (Dex) とデシプラミン (Des) を腹腔内投与または脊髄くも膜下投与を行った。疼痛行動の評価には Tail flick, Radiant heat, von Frey テストを行い、うつ行動の評価には強制水泳試験を行った。【結果, 考察】抗侵害受容作用、痛覚過敏反応において Dex, Des の効果は並行していることから、Des の作用は $\alpha 2AR$ が標的となっていることが示唆された。また, naïve animal において Dex, Des の抗侵害受容作用には $\alpha 2A$ および C が関与したが、神経結紮マウスでは両剤の抗痛覚過敏作用には $\alpha 2C$ が関与した。すなわち神経障害によって標的作用部位の変化が生じることが示唆された。さらに $\alpha 2A$ ノックアウトマウスでは神経結紮によってうつ様行動が誘発されなかったことから、神経障害によって誘発される、うつ行動に $\alpha 2A$ の関与が示唆された。また、デシプラミンは $\alpha 2A$ および C ノックアウトマウスに対してうつ様行動を抑制しなかったことからデシプラミンの抗うつ作用は $\alpha 2$ 以外の作用が関与していることが示唆された。

(18) 末梢神経損傷後の脊髄後角における接着因子の挙動

山中博樹 野口光一 (兵庫医科大学解剖学第二講座)

末梢神経損傷は脊髄後角の神経サーキットの変化を引き起こすと考えられている。細胞間接着因子は細胞と他の細胞、または細胞外マトリックスとを繋げ、神経の突起伸張やシナプス形成に機能することが報告されている。今回我々は末梢神経損傷モデルラットにおいて細胞間接着因子である L1, NCAM, E-cadherin, N-cadherin の発現を検討した。

【方法】SD 雄性 rat (250g) の坐骨神経を切断後の脊髄、後根神経節 (DRG) を用いて免疫組織化学, Western blot, in situ hybridization を行った。

【結果】mRNA の発現では E-cadherin のみが著明な減少を

示した。蛋白の局在は L1 について著しい変化がみられた。DRG においては損傷後 3 日より L1 陽性が小型の neuron を中心に細胞体周囲の細胞膜に集積し、脊髄後角においては L1 の陽性終末が点状に増加してシナプス終末のマーカーと共存像を示すようになった。N-cadherin については変化が見られなかったが、cadherin の接着を調節する細胞内結合因子である alpha catenin, beta catenin が脊髄後角で著大な減少を認めた。

【考察】突起伸展活性を持つ L1 が細胞膜上とシナプスにおいて増加することは形態変化を含めたシナプスの可塑的变化に L1 が関与していることが考えられた。

(19) サーモグラフィーを利用した痛みの研究

小山なつ (滋賀医科大学生理学第一講座)

平田和彦 (福岡大学医学部麻酔科学講座)

岩下成人 (滋賀医科大学生理学第一講座)

ハチに刺されると痛いことは周知の事実であるが、ハチ毒による痛みの研究は多くない。われわれは、ハチ毒主要成分のメリチン注入によって生じる皮膚温の変化をサーモグラフィーで解析している。ヒトとラットの解析から、注入部位局所では軸索反射性の皮膚温の上昇、そして手掌や足蹠では交感神経緊張の減少が生じることを確認した。

メリチンを正常被検者の前腕に注入すると、痛みが誘発され、注入部位の皮膚温は上昇した。リドカインゲルを前塗布すると、皮膚温の上昇は小さかった。アロディニアのある帯状疱疹後神経痛 (PHN) の患者でも、痛みと皮膚温の上昇がみられたが、アロディニアのない PHN の皮膚では、皮膚温の上昇はみられなかった。PHN に伴われるアロディニアは、機能している末梢の C 線維が関与していると考え、リドカインゲル塗布によって痛みを軽減させることができると示唆された。交感神経が密

に分布している手掌の皮膚温は、前腕へのメリチン注入直後に下降した後、注入前よりも上昇した。注入前に皮膚温が低い被検者ほど、上昇度が大きいことから、メリチンは交感神経緊張を低下させると示唆された。

ペントバルビタールで麻酔したラットでは、後肢足蹠の皮膚温は体幹部に比べて低く、交感神経緊張は大きいと考えられる。体幹部にメリチンを注入すると、浮腫は生じたが、皮膚温の上昇はみられなかった。しかし後肢足蹠にメリチンを注入すると、軸索反射が生じ、体幹部と足蹠の皮膚温の差が減少した。1 時間間隔でメリチンを 2 回注入すると、初回注入後は、対側足蹠皮膚温も投与側より遅れて上昇し、交感神経緊張は減少したと示唆される。すでに交感神経緊張が減少している 2 回目投与後には、対側足蹠皮膚温は上昇しなかった。従って、メリチン注入による皮膚温の解析から、C 線維の機能や交感神経緊張の解析が可能であると示唆された。

(20) 術後痛モデルを用いた先取り鎮痛に関する研究

村谷忠利¹, 南 敏明¹, 西村 渉¹, 伊藤誠二²(¹大阪医科大学麻酔科学教室, ²関西医科大学医化学教室)

【目的】手術後、合併症防止のために早期離床が必要であり、そのために術後痛のコントロールは重要である。今回、我々は、マウス術後痛モデルを用い、術後痛に対する種々の薬剤の効果を検討し、以下の知見を得た。

【方法】4週齢、雄性マウス $22\text{ g} \pm 2\text{ g}$ を用い、Brennanらの方法でマウス右後肢の足底部の皮膚、足底筋、筋膜を切開後、ナイロン糸で皮膚を縫合し、マウス術後痛モデルを作成した。von Frey filamentにより機械的刺激を加え、種々の薬剤に対する疼痛閾値の変化を測定した。

【結果】1) 術後痛モデルのコントロール群では、手術2時間後に von Frey filament に対する閾値が低下し、時間経過とともに閾値は軽減し、術後7日目に手術前値に戻った。2) 術後痛モデルに対し、SC-560 (COX-1 阻害薬)、セレコキシブ (COX-2 阻害薬) は、鎮痛効果を示さなかつ

った。3) COX-2 阻害作用とブラジキニン B2 受容体拮抗作用を持つザルトプロフェンは鎮痛効果を示した。4) ブラジキニン B1 受容体拮抗薬 des10-Arg- HOE-140 は、鎮痛効果を示さなかったが、ブラジキニン B2 受容体拮抗薬 HOE-140 は、鎮痛効果を示した。5) ザルトプロフェンは、脊髄腔内投与では鎮痛効果を示さなかった。6) NMDA 受容体サブユニット $\epsilon 1, \epsilon 4$ 欠損マウスと野生型マウスでは、術後痛に関して有意な差は認めなかった。7) NMDA 受容体 $\epsilon 2$ サブユニット拮抗薬 CP-101, 606-27 脊髄腔内投与群は、生理食塩水投与群と比較し有意に鎮痛効果を認めた。

【まとめ】術後痛の発現には、末梢ではブラジキニン B2 受容体と中枢 (脊髄) では NMDA 受容体 $\epsilon 2$ サブユニットが関与している。

(21) C 線維を上行する信号による末梢、脊髄、大脳での反応：Second pain の認知メカニズム？

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

(岡崎国立共同研究機構 生理学研究所 統合生理)

低強度、極小野炭酸ガスレーザー光線照射によるヒト皮膚無髄線維 (C 線維) 選択的刺激法を開発した。誘発脳電位を用いた計測では、本方法による上行信号の末梢伝導速度は $1.2 \pm 0.2\text{ m/s}$ であった。マイクロニューログラフィを用いた実験でも伝導速度は $1.1 \pm 0.4\text{ m/s}$ であり、本方法が C 線維を刺激することが確認された。次いで計測した脊髄視床路伝導速度は $2.2 \pm 0.6\text{ m/s}$ であり、末梢の C 線維信号は脊髄においても無髄線維を上行すると推定された。

次に C 線維関連大脳活動を知るために、本方法による誘発脳磁場を記録した。最初の活動は時間的にほぼ並行

する刺激対側第 1 次体性感覚野 (SI) と両側第 2 次体性感覚野一島の活動であり、次いで前部帯状回と内側部側頭葉に活動が認められた。さらに計算課題中の反応をコントロール条件での反応と比較したところ、計算課題では上記全ての活動が減弱し、同時に記録した誘発脳電位も同様に減弱した。この振幅変化は被験者の自覚的な感覚強度変化とよく一致した。

選択的刺激法に問題があったためこれまでヒト C 線維関連の脳研究はほとんど行われてこなかった。本研究はヒト C 線維信号に関して末梢・脊髄・大脳での反応をまとめて計測したはじめてのものである。

(22) ラット腰神経根の圧迫または髄核接触による行動学的・組織学的変化 － 腰椎椎間板ヘルニアの病態－

佐々木伸尚、矢吹省司、菊地臣一（福島県立医科大学医学部整形外科）

【目的】

神経根に機械的因子（圧迫）と化学的因子（椎間板髄核）を作用させた腰椎椎間板ヘルニア・モデルを作製し、椎間板ヘルニアによる痛みの病態を解析した。

【方法】

実験 1

SD 系雄ラットを用いた。全身麻酔後、左第 5 腰椎椎弓の一部を開窓し、神経根と dorsal root ganglia (以下 DRG) を同定した。開窓部から椎間孔にむけて、stainless steel rod を挿入した。次いで、尾椎から採取した髄核を DRG 上に置いた。これらを圧迫+髄核群とした。同様に rod の挿入のみを行った圧迫群、髄核投与のみを行った髄核群、展開操作のみを行った sham 群を作製した（各群 n=6）。各群に対し、von Frey 針を用いて左足底の 50% 閾値を計測した。

実験 2

実験 1 と同様の圧迫群に対し、術後 6 日目に抗 TNF- α 抗体を静注し、これを抗体投与群とした。対照として、

PBS を静注した群を作製した（各群 n=6）。実験 1 と同様左足底の 50% 閾値を計測した。

【結果】

実験 1

髄核群と圧迫+髄核群において、術後 1 日から 28 日にかけて閾値の低下が認められた ($p < 0.01$)。圧迫群では、術後 3 日から 28 日にかけて閾値の低下が認められた。 ($p < 0.01$)。

実験 2

両群とも術後 5 日まで、機械的刺激閾値の低下が認められた。薬液静注翌日にのみ抗体投与群で有意な閾値の上昇が認められた ($p < 0.01$)。

【総括】

神経根への圧迫、髄核接触のいずれの処置でも、時間的な差異はあるが allodynia が惹起された。神経根の圧迫による allodynia にも、その発現には化学的因子 (TNF- α) の関与が示唆された。

(23) Neuroimaging (fMRI) 法による難治性疼痛に対する脳の機能解析

池本竜則¹、牛田享宏¹、谷口慎一郎¹、谷俊一¹、森尾一夫²、佐々木俊一²、田中茂樹³

(¹高知医科大学運動機能学教室、²高知医科大学放射線科学教室、³仁愛大学心理学教室)

慢性的に痛みが存在するような病態では脊髄や脳の神経細胞の痛みに対する感受性が亢進し「痛みの経験」が繰り返された結果、痛みに対する受容や情動的要素にも影響を及ぼしていると考えられている。我々は functional MRI による脳イメージング法を用いて、難治性慢性疼痛患者における痛み刺激や痛みを想像させる刺激に対する脳神経活動を、健常ボランティアの結果と比較・検討しながら、慢性疼痛患者における痛みの病態解明の研究を行ってきた。1 つ目として簡便に機械的刺激が与えられる Fon frey filamen を用いて検討を行なった。健常者と右上肢にアロデニアを持つ CRPS 患者に対し、健常者に対しては右手に単純な機械的痛み刺激を、CRPS 患者には

アロデニア領域への痛み誘発刺激を与え、その際の神経活動を fMRI にて検出した。健常者への機械的痛み刺激では、体性感覚野、前帯状回、視床、島、小脳に有意な活動性が観察され、被検者の痛みの認識が客観的に表現されていると考えられた。一方、CRPS 患者のアロデニア領域への痛み誘発刺激では、個々にみると、痛みの認識に関与する神経活動パターンは一様でなく、すべてを同一の病態として評価することは困難であると考えられたが、全例で視床の活動性みられず、患者群での視床における可塑的变化の可能性が示唆された。2 つ目として難治性慢性疼痛患者では、痛みが引き起こされる状況を仮想させただけで痛みを経験するのではないかと考え、

視覚的に仮想疼痛刺激を提示することにより、痛みの情動的側面に対する検討を行った。患者群に、アロデニア部位を触られていると認識される映像を提示した場合、前頭葉連合野、前帯状回、体性感覚野に有意な神経活動

が観察された。同じ映像でも痛みを認識しない健常者の活動パターンと明らかに異なっており、これらの領域が痛みの不快感とその認知に深く関与している可能性が示唆された。

(24) 中枢性疼痛（視床痛）に対する各種外科治療の治療効果

平戸政史，高橋章夫，宮城島孝昭，斎藤延人（群馬大学医学部脳神経外科）

【目的】中枢性疼痛（視床痛）例に対し各種の外科治療法を試み、その病態と治療効果について検討した。【対象，方法】10例の視床痛患者を対象とした。手術は3例（上肢，下肢遠位部局所疼痛例）で脊髄硬膜外電気刺激術，7例で微小電極法を用いた定位的視床 Vim-Vcpc 核手術を施行した。さらに，3例で Gamma thalamotomy，3例で大脳皮質中心前回電気刺激術（脊髄硬膜外刺激術後1例，視床手術後2例），1例で内包後脚電気刺激術を追加した。定位的視床手術施行例では，術前 PET scan を用い，安静時局所脳血流，疼痛側拇指 brushing 時の局所脳血流変化を測定した。【結果】脊髄硬膜外電気刺激術例3例では，いずれも良好な除痛を得た。定位的視床手術施行例7例では，安静時局所脳血流が患側視床で平均 46% (35-60%)，皮質感覚野で平均 21% (5-43%) 低下していたが，このう

ち3例で疼痛側拇指 brushing 時患側皮質感覚野で平均 17% (9-30%) の局所脳血流の増加を認めた。この3例では，術中視床において末梢自然刺激に対する反応を認め，手術が効果的であった。Gamma thalamotomy，大脳皮質中心前回電気刺激術追加例各3例では，いずれも一時的には疼痛の軽減が得られたが，長期の明らかな除痛は得られなかった。このうちの1例で内包後脚電気刺激術を追加し疼痛の軽減を得た。【結論】中枢性疼痛例のうち局所疼痛例では脊髄硬膜外電気刺激術が有効である。広範な疼痛例では，感覚視床皮質路機能がある程度残存している例で視床を中心とする手術効果が期待できる。これらの追加治療として内包後脚電気刺激術は選択すべき治療法の一つと考えられる。

(25) 二つの教育講演に関して

今回ご出席の先生方のなかから，基礎医学領域および臨床医学領域からそれぞれお一人ずつの先生に，これからの研究の指針となるべく，これまでの「痛み研究」の歴史的経緯，現在の未解決な問題点，これからの将来計

画に対する提言などを基礎・臨床のそれぞれの立場からまとめていただいた。今回の研究会は，なるべく多くの若い研究者・学生のエントリーを心がけたこともあり，極めて役に立つ講演内容であった。

15. 電子位相顕微鏡法の医学的・生物学的応用—超分子・細胞のナノ形態生理

2003 年 12 月 8 日—12 月 9 日

代表・世話人：臼田信光（藤田保健衛生大学医学部）

所内対応者：永山國昭（ナノ形態生理研究部門）

- (1) 2 光子励起法によるシナプス可塑性の可視化

河西春郎（岡崎国立共同研究機構・生理学研究所）

- (2) 顕微鏡の進化と形態生理学

寺川 進（浜松医科大学・光量子医学研究センター）

- (3) Application of Thin Film Phase Plates in Biological Electron Microscopy

Radostin Danev（岡崎国立共同研究機構・統合バイオサイエンスセンター）

- (4) Biological control of magnetite crystals formation in the magnetotactic bacteria: Electron tomography for cytoskeletal structures of *Magnetospirillum magnetotacticum*(MS-1)

小林厚子（産業技術総合研究所 (AIST) 関西センター）

- (5) 受容体輸送超分子のナノ形態生理

瀬藤光利（岡崎国立共同研究機構・統合バイオサイエンスセンター）

- (6) 急速凍結・ディープエッチ・免疫レプリカの電顕 CT による細胞膜裏打ち構造の定量的解析

諸根信弘（科学技術振興機構・SORST/ERATO 楠見膜組織能プロジェクト）

- (7) 唾液分泌における細胞間分泌細管の形態変化

村上政隆（岡崎国立共同研究機構・統合バイオサイエンスセンター）

- (8) カルシウムチャネル hTRPM2 の発現, 精製と電子顕微鏡観察

松本友治（岡崎国立共同研究機構・統合バイオサイエンスセンター）

- (9) 専用型電子位相顕微鏡の開発

元木創平（日本電子株式会社・電子光学機器技術本部）

- (10) Dynamical Properties of Low-resolution Structure(Cryo-TEM) Studied with Elastic Network Normal Mode Analysis

Florence Tama(The Scripps Res. Inst.)

- (11) NMR で測定される蛋白質構造の局所的情報を積み上げる

山崎俊夫（理化学研究所・ゲノム科学総合研究センター）

- (12) ピコメーター (pm) レベルの動的 1 分子構造情報を得るには？

佐々木裕次（理化学研究所 Spring8）

- (13) 低温電子顕微鏡によるアセチルコリン受容体の構造と機能の解析

宮澤淳夫（理化学研究所播磨研究所 Spring8）

- (14) 低温電子顕微鏡による細菌べん毛繊維の原子モデル

米倉功治（大阪大学大学院・生命機能研究科）

- (15) DNA のナノ形態：特徴的な塩基配列に由来する特殊高次構造形成

加藤幹男（大阪府立大学・総合科学部）

- (16) 電子位相顕微鏡による細胞構造の観察

臼田信光（藤田保健衛生大学・医学部）

- (17) 水生食虫植物ムジナモの消化・吸収過程の微細構造観察

金子康子（埼玉大学・理学部）

(18) ペルオキシソーム酵素移行阻害細胞の解析

伊藤正樹 (佐賀大学・医学部)

(19) Exocytosis of large dense core vesicles and calcium stores

中西節子 (JT 医薬探索研究所)

(20) 分子・細胞生物学におけるプラットフォームとしての電子顕微鏡画像

永山國昭 (岡崎国立共同研究機構・統合バイオサイエンスセンター)

【参加者名】

新井麻友美 (科学技術振興機構), 新井善博 (日本電子(株)), 伊藤正樹 (佐賀大・医), 上原清子 (福岡大・医), 臼田信光 (藤田保健衛生大・医), 河西春郎 (生理研), 片岡正典 (計算科学研), 加藤幹男 (大阪府大・総合科学), 金子康子 (埼玉大・理), Christov Nikolay (統合バイオ), 小林厚子 (産技研・関西), 佐々木裕次 (Spring8), 杉谷正三 (統合バイオ), 瀬藤光利 (統合バイオ), Krassimir Tachev (統合バイオ), Radostin Danev (統合バイオ), Florence TAMA (The Scripps Kes. Inst.), 垂石みどり (科学技術振興機構), 寺川 進 (浜松医大・光量子医学研), 富永由香 (科学技術振興機構), 中西節子 (JT 医薬探索

研), 永山國昭 (統合バイオ), 早坂孝宏 (科学技術振興機構), Stanislav Hucek (統合バイオ), 深澤元晶 (信州大院・工), 松本友治 (統合バイオ), 宮澤淳夫 (理研播磨), Minkov Dorian (統合バイオ), 村上政隆 (統合バイオ), 元木創平 (日本電子(株)), 諸根信弘 (SORST/ERATO 楠見膜組織能 p), 矢尾育子 (科学技術振興機構), 山崎俊夫 (理研横浜ゲノム科学総研), 米倉功治 (阪大院・生命), 前田次郎 (日本電子(株)), 豊田正嗣 (名大院・理), 坂本匡史 ((株)八神製作所), 渡辺良雄 ((株)八神製作所), 水野昇 (生理研), 野口潤 (生理研), 松崎政紀 (生理研), 根本知己 (生理研), 藤田芸彦 (日本電子(株))

【概要】

昨年度より開始した本研究会は平成 12, 13 年度と続いた生理研研究会「定量的高分解能電子顕微鏡法」を発展的に解消したものである。その狙いは, 所内対応者の部門で開発された電子位相顕微鏡法を生物学医学にどう応用するか探索することである。平成 14 年度研究会は国際会議との共催であったため純粋な国内研究会は本年度が最初となる。

今年度の研究会テーマは, 電子顕微鏡分野と他の形態／構造解析分野との出会いである。将来の協奏関係を期

待し, 特に関連の深いミクロ解剖学, 光計測細胞生物学, NMR 構造生物学, X 線構造生物学, 計算生物学分野の研究者を招き, 講演をお願いした。生物電子顕微鏡が長い間の停滞を脱却し, 新時代を切り開くためには方法論の開発などの自助努力もさることながら, 関連分野との密接な協力が必要である。電子顕微鏡の性能, 高感度と高分解能のメリットを生かした関連分野との新しい共生の形を探った。

(1) 2 光子励起法によるシナプス可塑性の可視化

河西春郎, 松崎政紀, 安松信明, 本蔵直樹 (岡崎国立共同研究機構・生理学研究所)

大脳皮質では興奮性シナプスはグルタミン酸作動性で, 錐体細胞においては, 樹状突起スパイン上に入力する。この単一シナプスレベルの機能解析を行うために, 2 光子励起可能なケイジドグルタミン酸を開発し, グルタミン酸の放出を光化学的に行う 2 光子アンケイジング顕微鏡を構築した。この顕微鏡を用いた AMPA 受容体分

布の空間解像は脳スライス標本において側方及び軸方向でそれぞれ 0.65 及び 1.4 ミクロンであった。この顕微鏡を用いて, シナプス可塑性を単一シナプスで誘発することに成功した。この結果, 1) 長期及び短期増強はシナプス後部スパインの頭部体積の増大に伴って起きること, 2) このスパイン頭部増大はアクチン重合を必須として

いること、3) シナプス学習法則はスパイン形態依存的で長期増強は頭部体積の小さなスパインに選択的に起きる

ことが明らかとなった。この様に大脳皮質錐体細胞のシナプス可塑性は微細形態的である。

(2) 顕微鏡の進化と形態生理学

寺川 進 (浜松医科大学・光量子医学研究センター)

形態学の手法を採り入れた生理学は、新しい展開を見せている。これまで困難であった形態と機能の 2 面的な性質をひとつの実態の両面として捉えなおすことが新しい魅力である。光学顕微鏡はこの形態学と機能学を結合させる媒体としての力を発揮しているといえる。講演では、最近試用している新型顕微鏡とその応用を紹介したい。

1) ファイバー結合型共焦点顕微鏡

イメージングファイバーの一端を通常の共焦点顕微鏡によって観察し、他端を標本に向けることによって画像を取得する。実質臓器の内部を観察する可能性を持つ。

2) DLP 型共焦点顕微鏡

デジタルマイクロミラー (DMD or DLP) を光源側に使用し、有形照明による蛍光励起を行う。集めた蛍光を同じ DMD を介して記録し電子走査による共焦点法とする。

3) エバネッセンス顕微鏡

超高開口数対物レンズを使用してエバネッセント光を作り、蛍光標識した細胞膜近傍のナノ構造を捉える。

4) スリット光走査顕微鏡

臨界角近傍の入射角を持つ光線をスリット状に整形し、標本内部に入るような照明とする。これを走査することにより細胞の表面とその近傍を高コントラストで観察する。

5) 近接場露光顕微鏡

光感受性樹脂の上に細胞を培養し、レンズ無しで光照射をし、細胞表面からの近接場光の強度分布を樹脂上に記録する。これを原子間力顕微鏡で読み出す。

6) QPm

明視野透過像 3 枚から光線追跡的な解析によって位相差像を得る手法 (Keith Nugent)。光学素子による光線操作をコンピュータ処理に代替える。

(3) Application of Thin Film Phase Plates in Biological Electron Microscopy

Radostin Danev, 永山國昭 (岡崎国立共同研究機構・統合バイオサイエンスセンター)

臼田信光 (藤田保健衛生大学・医学部)

We discuss two types of thin film phase plates and their corresponding contrast transfer properties in the Transmission Electron Microscope. The Zernike phase plate and the half-plane phase plate.

The Zernike phase plate [1,2] consists of a thin film with a small hole in the center. It is positioned at the back-focal plane of the objective lens. This phase plate introduces half pi phase shift to the scattered electrons leaving the central beam of unscattered electrons intact. We call this new imaging technique-Phase Transmission Electron Microscope (PTEM).

The half-plane phase plate [3] consists of a thin film

covering one half of the diffraction plane. Only electrons scattered in this half will be phase-shifted. We call the resulting imager Difference-contrast Transmission Electron Microscope (DTEM). It produces images with topographic appearance very similar to that produced by Nomarski DIC contrast in light microscopy.

Both PTM and DTEM provide considerable contrast improvement for biological specimens as demonstrated by the presented experimental images. Theoretical and practical aspects in the application of the phase plates will be discussed.

K. Nagayama, J. Phys. Soc. Jpn., 68(1999)811, R. Danev, K. Nagayama, Ultramicroscopy 88(2001)243, R. Danev, H.

Okawara, N. Usuda, K. Kametani, K. Nagayama, J. Biol. Phys. 28(2002)627.

(4) Biological control of magnetite crystals formation in the magnetotactic bacteria: Electron tomography for cytoskeletal structures of *Magnetospirillum magnetotacticum* (MS-1)

Atsuko Kobayashi, Takahisa Taguchi (産業技術総合研究所 (AIST) 関西センター)

L. Elizabeth Bertani, Cody Z. Nash³ (California Institute of Technology (Caltech))

Identification of chain-like structures and their unique crystal showing (111) face made of magnetite (Fe_3O_4) in the carbonate globules of the ALH 84001 meteorite, of the seven magnetite-based criteria currently being used to identify life on Mars, is one of the strongest evidence for the existence of ancient life on Mars. However, there is a debate about whether they can form through other nonbiological processes

In living magnetotactic bacteria, it is known that individual magnetite crystals are formed within a string of vesicles, each of which is composed of a proper lipid-bilayer membrane. At present, the biological process that forms these structures is completely unknown. Biophysical arguments indicate that supporting structures are necessary to prevent the chains from collapsing into a disordered clump of particles. As the newly-sequenced genome of *M. magnetotacticum* (MS-1) contains highly conserved analogues of the cytoskeletal proteins actin and tubulin, these may be involved in the organization of the chains. However, in the past, the presence of buddle polymerized chain structure like actin have never been observed in prokaryote, *in situ*, by the conventional TEM.

In this conference, I would like to demonstrate our recent

electron tomography studies, for the analysis of continuity in the cell, showing clearly the presence of a condensed, intracellular organic layer that spatially follows the chain of magnetosomes in 3-dimensions, forming a TMmagnetosome sheath¹. These structures may explain the persistence of magnetosome chain structures in the fossil record, perhaps including the putative magnetosome chain structures in the ALH84001 Martian carbonate blebs.

Thomas-Keprta, K. L. et al. Truncated hexa-octahedral magnetite crystals in ALH84001: Presumptive biosignatures. *Proceedings of the National Academy of Sciences(USA)* **98**, 2164-2169(2001), Atsuko Kobayashi. Investigation of thermal heated carbonate; Implication for ALH84001, Magnetite on Mars workshop at NASA Astrobiology Institute Meteorite focus group, NASA Ames Research Center, California U.S.A., June 5-6(2002), Kobayashi, A., L. Elizabeth Bertani, Cody Z. Nash and Taguchi, T., Ultrastructure of the magnetite crystal chains in *Magnetospirillum magnetotacticum* (MS-1): Evidence from TEM tomography for cytoskeletal supporting structures: *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, v.67, p.A222-A222(2003)

(5) 受容体輸送超分子のナノ形態生理

瀬藤光利 (岡崎国立共同研究機構・統合バイオサイエンスセンター)

これまでモーター蛋白がアダプター蛋白質複合体を介してその荷物, 具体的な例としては受容体を輸送するメカニズムの存在を神経細胞で示してきた。ごく最近, これら受容体を増加させる正の輸送だけでなく, 減少させ

る負の輸送がどうもあるらしいことがわかってきた。さらにシナプスからの受容体の減少をつかさどる機構に選択性があることが判明し, それら選択性を物質的に保障できる大きな蛋白質輸送複合体が関与しているのではな

いかと考えられ始めてる。

我々の同定した神経活動依存的に転写制御される新し

いユビキチン付加酵素候補遺伝子に関する話題を中心に議論を行う。

(6) 急速凍結・ディープエッチ・免疫レプリカの電顕 CT による細胞膜裏打ち構造の定量的解析

諸根信弘 (科学技術振興機構・SORST/ERATO 楠見膜組織能プロジェクト)

これまでに我々は、培養細胞から剥離した細胞膜を急速凍結/ディープエッチし、そのレプリカを用いて膜骨格の構造を細胞膜全体にわたる広い領域で調べてきた。本研究では、電子線コンピュータトモグラフィー (EM-CT) を適用して、3 次元構造を高解像度で可視化することにより、細胞膜の膜近傍での膜骨格だけを特定して観察できるようになった。一方、藤原らと村瀬らは細胞膜上で 1 分子の運動を追跡し、細胞膜が 30-200nm (細胞種に依存) のコンパートメントに細かく分割されていること、これがアクチンを主成分とする膜骨格 (フェンス) や膜骨格にアンカーされた様々な膜貫通型タンパク

質 (ピケット) によることを見出している。EM-CT で決定された、細胞膜内側表面での膜骨格のメッシュサイズとリン脂質 1 分子の運動から決められたコンパートメントサイズ (中央値) は NRK 細胞ではそれぞれ 200 と 230nm, FRSK 細胞では 52 と 40nm とかなりよく一致した。これは、膜骨格のフェンスやピケットが細胞膜をコンパートメント化していることを支持する。以上の結果は急速凍結・ディープエッチ・免疫レプリカ試料に適用した EM-CT 法が細胞膜裏打ち構造の定量的解析に有用であることを示している。

(7) 唾液分泌における細胞間分泌細管の形態変化

村上政隆 (岡崎国立共同研究機構・統合バイオサイエンスセンター)

唾液腺における細胞間分泌細管 (intercellular canaliculi, IC) は、電解質、水、タンパク質が混ざりあい原唾液をつくり出す最初の混和槽であり、細胞内より分泌される成分と細胞間隙を通過する成分が混和する場所でもある。本研究会では 1) 細胞間隙を通過する標識デキストランから推定した分子フィルターの特性 (Hill, Cambridge)。2) 細胞内から分泌される水分と細胞間隙を

通過する水分の時間変化の推定 (Segawa, Sagamihara)。

3) 顎下腺で HR-SEM にて観察される開口分泌の出現と巨視的な mucin 分泌測定との連結 (Riva, Cagliari)。4) 細胞間隙通路の凍結切断法による形態観察 (tight junction 配列の変化と傍細胞輸送能の関係; Hashimoto, Chiba) について実施した共同研究成果を基に、細胞間分泌細管の微小形態変化と臓器機能との連結を試みる。

(8) カルシウムチャネル hTRPM2 の発現、精製と電子顕微鏡観察

松本友治 (岡崎国立共同研究機構・統合バイオサイエンスセンター)

膜タンパク質 TRPM2 はレドックス準位依存性カルシウムチャネルであり、中枢神経細胞において高レベルに発現される。活性化因子 β -NAD⁺ の濃度上昇に伴ない TRPM2 のチャネル活性も上昇することから、TRPM2 は

細胞内レドックス状態の変化を引き金とする細胞死に関連があると考えられている。

ヒト全脳の cDNA ライブラリーより再構成された全長の hTRPM2 遺伝子をトランスファー・ベクター pYNGHis

(C) /hTRPM2 へと組み込み、組換えバキュロウイルスーカイコ系を用いて hTRPM2 を大量発現させた。目的タンパク質はフッ化界面活性剤ペンタデカフルオロオクタン酸を用いることで抽出・可溶化でき、これをニッケル・キレート・アフィニティカラムクロマトグラフィーならびに微量ゲル濾過によって精製したところ、アミノ酸組成比が既知の配列情報から予想される値とほぼ一致するサンプルが得られた。

ゲル濾過における主ピーク近傍で予想分子量 160kDa

の成分を含む分画から負染色試料を作成して電子顕微鏡下で観察したところ、比較的サイズの揃った多数の粒子像を確認できた。一軸傾斜法により撮影した電子顕微鏡画像から逆投影により TRPM2 分子の立体モデルを起こすことを試みた。現時点で得られているのは分解能が高々3.2 nm 程度の予備的段階のモデルではあるが、分子中心部の低密度領域とそれを取り囲む4~5個のドメインが指摘できる。

(9) 専用型電子位相顕微鏡の開発

元木創平, 細川史生, 新井善博 (日本電子株式会社)

Radostin Danev, 永山國昭 (岡崎国立共同研究機構・統合バイオサイエンスセンター)

透過型電子顕微鏡 (TEM) で位相差像を実現するには対物レンズの回折像面に位相板を挿入する必要があり、大型 TEM で要素実験を行なった。一方で、通常型 TEM (加速電圧 100kV, 200kV) では構造上回折像面がポールピース内にあるため位相板を挿入出来なかったが、次の考案・改造を行う事で 120 k VTEM での実用性を確認した。

二つの mini-lens : (transfer doublet lens) により後焦点面と共役な回折像面を対物レンズと中間レンズの間に形成した。

位相板を汚染とチャージ防止を目的として加熱ホルダーに装着し、専用ステージにより精密駆動した。

本装置の実験結果は以下の通りである。

相板を回折像面に正しく設置でき、カーボングラファイトの 0.34nm の格子像を、位相差像および通常像のそれぞれで観測した。

位相板加熱により汚れが防止され、位相板の長時間使

用可能が確認できた。

現在は加速電圧 200kV の装置開発を進めており仕様は以下の通りである。

加速電圧 : 200kV

分解能 : 0.23nm, 球面収差 1.0nm, 色収差係数 : 1.55mm, 焦点距離 : 2.3mm,

位相板 : 最高加熱温度 700°C, X - Y 移動精度 : 0.01 μ m, Z 移動精度 : 1 μ m,

最大倍率 : 位相差像 約50万倍, 通常 mode : 150万倍

本装置の開発は「科学技術振興機構」からの「新技術開発委託」で行われている。

R. Danev and K. Nagayama, @Transmission electron microscopy with Zernike phase plate@, Ultramicroscopy 88 (2001) 243-252, F. Hosokawa, Y. Arai, R. Danev and K. Nagayama, "Transfer Doublet and an Elaborated Phase Plate Holder for 120kV Electron-Microscope", J. Electron Microscopy, submitted.

(10) Dynamical Properties of Low-resolution Structure (Cryo-TEM) Studied with Elastic Network Normal Mode Analysis

Florence Tama (The Scripps Res. Inst.)

We present a novel method for the quantitative flexible docking of a high-resolution structure into low-resolution

maps of macromolecular complexes from electron microscopy. This method uses a linear combination of low

frequency normal modes from elastic network in an iterative manner to deform the structure optimally to conform to the low-resolution electron density map. We demonstrate that refinement based on normal mode analysis provides an accurate and fast alternative for the flexible fitting of

high-resolution structure into low-resolution density map determined by electron microscopy. Additionally, we show that lower resolution (multi-scale) structural models can also be used for the normal mode searching in lieu of fully atomic models with little loss of overall accuracy.

(11) NMR で測定される蛋白質構造の局所情報を積み上げる

山崎俊夫 (理化学研究所・ゲノム科学総合研究センター)

蛋白質を水溶液状態で構造決定できる NMR 法は、200 アミノ酸程度までの小さな蛋白質については信頼できる方法となった。さらに大きな分子量の蛋白質への挑戦は、試料の安定同位体標識法や緩和を抑える実験法の開発によって続けられている。特に 3 重標識 (^{13}C , ^{15}N , ^2H) した蛋白質を用いて TROSY 法を適用すると、500 アミノ酸を越えるものでも主鎖の NMR 信号の帰属が得られるようになったのは大きな前進である。特に我々が開発した区分標識法を組み合わせると蛋白質を部分的に解析して

いくことができる。NMR から得られる構造情報は局所的である。化学シフトは 2 次構造、NOE は 5 Å 以下の水素の対を与える。大きな蛋白質の全体構造を求めるにはより長距離の構造情報が得ることが必要である。例えば標識によって導入した電子スピンを使った方法は 10-60 Å の距離が測れる (NMR 法と ESR 法)。また、電子顕微鏡の可能性として多点標識に対して距離の依存性なく測れることを期待している。多種類の測定法をうまく組み合わせる可能性を考えている。

(12) ピコメーター (pm) レベルの動的 1 分子構造情報を得るには？

佐々木裕次 (理化学研究所 Spring8)

究極的な精度で、かつ in-vivo 時分割計測によって機能性生体分子の動的構造情報が取得可能になれば、生命科学の多くの謎に解答を得ることができるかもしれない。それが 1 分子で可能となるとなおさらである。ピコメートルという単位は、今流行のナノの 1 ランク下の単位で、今まで電子顕微鏡の世界でのみ使用されてきた。現在多くの研究者が利用するようになった 1 分子計測法は、ほとんどが可視光利用で、その手軽さ故に汎用的な測定手段になりつつある。しかし、機能発現に直結した極めて微小な生体分子内運動を計測するとなると可視光では計測精度が足りないことが分かってきた。その対策の一つとして、私は波長を短くすることを提案し、X 線 1 分子

計測法が登場した。ナノ結晶を目的タンパク質分子に標識するので、標識法一般の欠点、利点は背負ってくる。原理的に In-vivo で計測可能であることは大いに利点となる。現在まで、DNA、ミオシン、アクチン、ミクログロブリン、GroEL/ES、GFP、紫膜内のバクテリオロドプシン等の実時間分子内運動を計測してきた。その結果、X 線 1 分子計測によって、非常にゆっくりした (数 - 数十 Hz) 領域の運動を高精度 ($\sim$ pm レベル) で 1 分子計測することが可能であることが分かった。現在は、平面膜内での KcsA のチャネル開閉に伴う分子内構造変化計測をハッチクランプ法と併用計測する実験を進めている。

(13) 低温電子顕微鏡によるアセチルコリン受容体の構造と機能の解析

宮澤淳夫（理化学研究所播磨研究所 Spring8）

神経筋接合部に存在するニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) は、リガンド (アセチルコリン) との結合により、ポストシナプス膜を脱分極させる。こうした nAChR の分子機能を明らかにするために、低温電子顕微鏡法による nAChR の高分解能構造解析を行ってきた。nAChR を豊富に含んだシビレエイの電気器官から nAChR のチューブ状結晶を作製して、その結晶のイメージを撮影した。チューブ状結晶の「らせん」対称性を利

用した画像解析と結晶性の補正処理を行い、359 枚のイメージ (約 100 万個の分子) を平均化することにより、静止状態にある nAChR の立体構造を 4 Å の分解能で解析した。そして nAChR の 1 次構造情報から原子構造を決定し、アセチルコリンが nAChR のリガンド結合部位に結合した時に、どのようにして膜貫通部位にあるイオンチャネルのゲートを開閉させるのか、そのアロステリックな分子メカニズムを解明した。

(14) 低温電子顕微鏡による細菌べん毛繊維の原子モデル

米倉功治（大阪大学大学院・生命機能研究科）

細菌の運動器官、べん毛は、細胞膜内で高速回転するモータと、細胞外に細長く伸びたプロペラ、べん毛繊維等から成る超分子ナノマシンである。べん毛繊維は一種類の蛋白質フラジェリン、2-3万分子が、らせん状に重合することにより構築され、その長さは菌体長の約 10 倍、10-15 μ m にも達する。今回、低温電子顕微鏡法によりべん毛繊維の立体構造を解析し、原子モデルを構築した。その結果、繊維のコア領域で α -ヘリックスの束が形成され、その疎水性相互作用により繊維構造が安定化されて

いることや、べん毛繊維の形態変換に重要な分子間相互作用等が明らかになった。フラジェリンはべん毛中央を貫通する細いチャネルを通して細胞内から先端へ輸送され、重合は繊維の先端で起こる。このチャネルが直径約 20 Å で、その内表面が主に極性アミノ酸でできていることもわかり、この性質が、細いチャネルを通過するためにほどけた状態のフラジェリンの速やかな輸送に重要であることが示唆された。

(15) DNA のナノ形態：特徴的な塩基配列に由来する特殊高次構造形成

加藤幹男（大阪府立大学・総合科学部）

ゲノムシーケンシングの進展によって、ヒトをはじめとしてさまざまな生物種のゲノム配列決定完了が報告された。これらの配列情報に基づいて、生命を構成する全遺伝子の機能解明を目指す研究へと発展している。一方、ゲノム配列は、遺伝子の情報をもつだけでなく、転写調節、複製制御、組換えなどのゲノム機能をつかさどる基盤情報であり、調節タンパク質は DNA の特異的な構造の上でそれぞれの役割を演じている。ゲノムシーケンシングは、これまでにいろいろなタイプの特徴的な塩基配列

の存在を明らかにした。これらの特徴的な塩基配列は、ランダムな塩基配列集団に予測される頻度よりも有意に高い頻度でゲノムに出現する。その高いゲノム内出現頻度は、ゲノム機能のいずれかの過程でなんらかの役割をはたすこと、あるいは少なくとも副次的な効果の存在を予想させるに十分である。これらの配列が存在する意味を明らかにするためには、まずその構造を理解することが必須である。本報告では、種々の特徴的な塩基配列のうち、1) ポリプリン・ポリピリミジン配列における分子

内三重鎖構造の形成, 2) 回文配列における十字架型構造とその変型の形成, 3) ミニサテライト・マイクロサテライト配列周辺の特異な湾曲構造 (bent DNA) 等を, 生化学

的手法と顕微鏡学的手法を用いて解析した結果を報告する。

(16) 電子位相顕微鏡による細胞構造の観察

臼田信光, 中沢綾美, 水谷謙明 (藤田保健衛生大学・医学部)

Danev Radostin, 永山國昭 (岡崎国立共同研究機構・統合バイオサイエンスセンター)

【目的】細胞は, 電子線の吸収がほとんどなく, 無染色では電顕観察が困難である。従来, 細胞の超微構造は, 重金属を用いた電子染色を行った標本で観察されてきた。得られる像は, 本来の形態というよりむしろ, 重金属の構造への親和性を示す像である。電子位相顕微鏡を用いて, 無染色標本の観察を試みた。

【材料と方法】ラット脳から得た微小管と, 肝臓から得たミトコンドリア分画をカーボン薄膜を張ったグリッドに採取した。カーボン薄膜を張った金グリッドに, HEK293 細胞を培養した。液体エタン中で浸漬急速凍結固定を行い, 液体ヘリウム冷却試料室に移した。無染色のまま, 通常観察 (CTEM)・ゼルニケ位相差法 (PTM)・微分干渉

法 (DTEM) 観察法により電顕観察を行った。

【結果と考察】微小管を CTEM により観察すると, protofilaments も明瞭に観察されたものの, コントラストが低く観察は困難であった。PTM を行うとコントラスト良く, 容易に観察された。ミトコンドリアは, CTEM ではほとんど可視化できなかったが, DTEM によって目立ったコントラストの改善がみられた。培養細胞では, DTEM により, 細胞内構造の高コントラストな観察が行え, ミトコンドリアなどの細胞小器官が同定できた。電子位相顕微鏡により, 細胞の無染色標本の観察が可能であることが示された。

(17) 水生食虫植物ムジナモの消化・吸収過程の微細構造観察

金子康子, 厚沢季美江, 新田浩二, 松島久 (埼玉大学・理学部)

ムジナモは, ミジンコなどの小動物が捕虫葉の表面にある感覚毛に触れると, 迅速に葉を閉じて捕える。その後, 消化腺毛から分泌した消化酵素で分解し, 吸収毛で分解物を吸収すると考えられている。ムジナモは国際的に絶滅危惧種に指定されている希少な植物であり, 維持・栽培も困難であったために, 生活環における微細形態とその機能の詳細は不明であった。本研究では *in vitro* で培養・増殖したムジナモを用い, 特に消化・吸収に関わると考えられている腺毛の微細構造の観察を行った。

切り出した捕虫葉は化学固定法または急速凍結置換法で固定後樹脂包埋し, 超薄切片を透過電子顕微鏡で観察した。消化腺毛ではラビリチン壁, 層状の ER, タンニン液胞が発達していた。セリウムを用いた細胞化学法により, ラビリチン壁と ER に酸性フォスファターゼの局在が確認できた。吸収毛ではゴルジ体が著しく発達していた。さらに人為的にミジンコを捕食させ, 消化・吸収過程の微細構造を観察することを試みた。

(18) ペルオキシソーム酵素移行阻害細胞の解析

伊藤正樹 (佐賀大学・医学部)

オルガネラ移行型 GFP の細胞内局在性を指標として、CHO 細胞由来のペルオキシソーム欠損細胞を簡便に分離することが出来た。それら変異細胞の中で、リボソームで合成された蛋白質をペルオキシソームに運ぶレセプター機能を持つ Pex5p が欠損した SK32 株に注目して、研究を進めた。SK32 細胞は、Pex5p 全長 640 アミノ酸残基内で G343R の置換が起きている (Pex5pG343R)。SK32 での変異型 Pex5p の産生は、ウェスタン法で調べると、野生型の 1/10 以下と推定された。レセプター機能を持つ Pex5p が少ないにもかかわらず、ペルオキシソーム酵素

のチオラーゼ (脂肪酸ベータ酸化の最終酵素)、Aox (脂肪酸ベータ酸化の初発酵素) のオルガネラ移行は正常であった。

各種の方法により、これらの酵素はペルオキシソーム膜内に蓄積していることが示された。また、SK32 では、チオラーゼの前駆体型 (44kDa) から成熟型 (41kDa) の変換が、温度感受性 (TS) であることが明らかとなった。この TS 性を利用して、膜内に蓄積しているチオラーゼが真正の膜透過型前駆体であることを確認し、透過装置 (蛋白質複合体) の同定を試みる。

(19) Exocytosis of large dense core vesicles and calcium stores

中西節子 (JT 医薬探索研究所)

A subclone of PC12 cell, PC12h, expresses the characteristics of adrenergic neuron while those of cholinergic neuron are much reduced. Differentiated PC12h cells have many varicosities, which contain large dense core vesicles but not small synaptic vesicles. Using differentiated PC12h cells, changes in the concentration of cytoplasmic calcium ions were analyzed at individual varicosities upon stimulation with acetylcholine by laser scanning confocal microscope. Transient increases in cytoplasmic calcium ion concentration were localized in the varicosities and recognized in both the

absence and presence of extracellular calcium ions. Immunocytochemical analysis of intracellular calcium ions, the inositol (1,4,5) -trisphosphate receptors and ryanodine receptors, demonstrated that immunoreactive sites were mainly localized on large dense core vesicles in the varicosities and neurites. These results suggest that the exocytosis of large dense core vesicles is regulated by an increase in cytoplasmic free calcium ion concentration from an intracellular calcium store, and large dense core vesicles are the possible candidates.

(20) 分子・細胞生物学におけるプラットフォームとしての電子顕微鏡画像

永山國昭 (岡崎国立共同研究機構・統合バイオサイエンスセンター)

電子顕微鏡が研究推進の駆動力として生物学、医学に多大なインパクトを持った時代があった。現在その駆動力の座は蛍光顕微鏡にとって代われ、往時の活況は昔語りである。私は電子顕微鏡が再び活性化する時代が来ると信じ、方法論の根底的改革を行っている。この改革の旗手は各種の電子位相顕微鏡であるが、ではどのよう

な意味で生物学、医学領域に新たな寄与をなすことになるのか。

生物電顕では従来電顕像へのコントラスト付与は重金属染色でなされた。現況では、研究時間のほとんどが試料調整に割かれている。この試料法を簡略化し、光顕の試料調整法と協調できるものにすれば、電顕に誰しも感

ずる高い壁は軽減され、かつ他分野との本質的協調が可能となるのではないか。そのために最も重要なのは無染色凍結試料の高コントラスト電顕撮像法の確立である。すなわち簡便に *in situ* の細胞像を蛍光顕微鏡の 100 倍程度の分解能で観察する方法論の確立である。この高分解能形態像を分子生物学研究, 分子生理学研究, 細胞生物

学研究, 神経科学研究のプラットフォームとして利用していく。その際, 蛍光顕微鏡の GFP に対応するタンパク質特異的電顕ラベル法と組み合わせ機能研究との密結合を図りたい。

生物学, 医学のプラットフォームとして電顕技術を確立すること, これが先に投げた設問への答である。

16. ロコモーションの統合的研究～分子，細胞，システム

2003 年 10 月 2 日－10 月 3 日

代表・世話人：岡村 康司（統合バイオサイエンスセンター）

所内対応者：岡村 康司（統合バイオサイエンスセンター）

- (1) ミドリムシの光運動反応に関わる青色光センサー，光活性化アデニル酸シクラーゼ
伊関 峰生（科学技術振興事業団 さきがけ研究 21）
- (2) 単細胞藻類クラミドモナスはどうやって光の方向を知り，集まるか？
吉村 建二郎（筑波大学 生物科学系）
- (3) 一分子生理学から学ぶ分子モーターの作動機構
木下 一彦（岡崎国立共同研究機構 統合バイオサイエンスセンター）
- (4) 深海細菌のゲノムに見る情報伝達機能分子
高見 英人（海洋科学技術センター）
- (5) 線虫の感覚情報によるロコモーションの制御
桂 勲（国立遺伝学研究所 構造遺伝学研究センター）
- (6) 線虫のロコモーションの計測と神経系モデル
新貝 鉦蔵（岩手大学工学部）
- (7) ホヤ幼生の遊泳行動と感覚器官
津田 基之（姫路工業大学大学院 理学研究科）
- (8) ホヤ幼生の遊泳リズムとイオンチャネル
岡村 康司（岡崎国立共同研究機構 統合バイオサイエンスセンター）
- (9) ザリガニ尾扇肢運動修飾の神経機構
長山 俊樹（北海道大学大学院 理学研究科）
- (10) 硬骨魚後脳の分節構造にもとづいて構築された逃避運動回路
小田 洋一（大阪大学大学院 生命機能研究科）
- (11) 多足歩行動物の歩行パターンのエネルギー効率に基づく最適性
西井 淳（山口大学理学部）
- (12) 哺乳類歩行リズム神経回路の発生
西丸 広史（カロリンスカ研究所）
- (13) ネコ歩行運動の脳幹－脊髄制御機構
松山 清治（札幌医科大学医学部生理学第二講座）

【参加者名】

伊関 峰生（科技団），渡辺 正勝（基生研），鈴木 武士（科技団），吉川 伸哉（科技団），津田 基之（姫路工大大院），川上 功（姫路工大大院），吉村 建二郎（筑波大学），小田 洋一（大阪大大院），小橋 常彦（大阪大大院），高見 英人（海洋科学技術センター），池 甲珠（海洋科学技術センター），高木 善弘（海洋科学技術センター），西丸 広史（カロリンスカ研），長山 俊樹（北海道大大院），木下 一彦（統合バイオ），松山 清治

（札幌医大），桂 勲（遺伝研），新貝 鉦蔵（岩手大），坂田 和実（岩手大），西井 淳（山口大），日置 智子（山口大），筒井 泉雄（一橋大），西野 敦雄（東京大大院），岡村 康司（統合バイオ），久木田 文夫（統合バイオ），岩崎 広英（統合バイオ），村田 喜理（統合バイオ），中山 希世美（統合バイオ），佐々木 真理（統合バイオ），ISRAIL HOSSAIN（統合バイオ）

【概要】

動物の特質としてのロコモーションは、単細胞生物から多細胞動物にいたるまで、さまざまなパターンをとっているが、それらを構成する細胞、分子のレベルでは生物種間で類似した要素（モーター、骨格、輸送,etc）が用いられる。一方で、これら共通かつ多様な分子群は、個体の機能の文脈において、細胞レベルで集約されており、これらの理解には、遺伝子、分子、細胞レベルの研究に加えて、生物種間の進化的なつながり、また、各要素が統合されるシステムの理解が不可欠である。つまり、各生物のロコモーション機能を分子レベルで理解すること

は、分子の働きを、マクロな生物機能の立場から捕らえなおす新しい試みである。相補的な交流をはかり、「ロコモーション」という根源的であり且つ多様な生理機能に着目し新たな統合バイオサイエンスとしての位置づけを探った。ミドリムシ、クラミドモナスなどの単細胞生物の研究、単一タンパク分子の動きに関する研究、少数の神経系細胞を有するモデル生物を用いた研究、多数の神経細胞を有する脊椎動物における研究にいたるまで、多様な側面での研究内容を含む形となり、広い視点での議論が活発に交わされた。

(1) ミドリムシの光運動反応に関わる青色光センサー、光活性化アデニル酸シクラーゼ

伊関 峰生（科学技術振興機構 さきがけ）

ミドリムシ (*Euglena gracilis*) は光環境の変化に敏感に応答する。光驚動反応の光センサー分子として新奇な負ラビンタンパク質 (PAC) を同定することに成功した。

PAC は発色団として FAD を結合した分子量約 40 万のタンパク質で、互いによく似た α , β 二種類のサブ

ユニットから成るヘテロ四量体と推定される。PAC はアデニル酸シクラーゼ活性を示し、青色光照射により劇的に増大する。RNAi 法により、PAC がステップアップ光驚動反応の光センサーとして機能していることが明らかになった。

(2) 単細胞藻類クラミドモナスはどうやって光の方向を知り、集まるのか？

吉村 建二郎（筑波大学・生物科学）

クラミドモナスは、葉緑体と核が大部分を占める細胞体と、運動装置である鞭毛からなる単細胞動物である。クラミドモナスの光受容体である眼点は、フォトダイオードのようなものであり、それ自体では光の方向は分からない。360 度回転する泳ぎ方を示し、指向性の良いレーダーとして光をスキャンする。眼点の方向と遊泳方向との関係を調べると、眼点に光が入らなくなった時に光

の方向へ急激に方向転換することが明らかになった。また、周期的な光刺激を与えると自転の周波数である 2-5Hz の繰り返し刺激に対して最大の反応を示した。従って、眼点に入る光の中から自転に由来する光強度の変化を抽出することにより正しく方向転換することが明らかになった。

(3) 一分子生理学から学ぶ分子モーターの作動機構

木下 一彦（岡崎国立共同研究機構・統合バイオサイエンスセンター）

タンパク分子一個の動きを観察するだけでなく、光ピ

ンセットや磁気ピンセットを使って分子機械に操作を加

えることにより、タンパク分子の作動原理が理解できる。これらの手法により ATP の加水分解にともなう自由エネルギー放出により一方向の動きと力を生み出す F1 分子モーターを解析したところ、加水分解のときよりも、ATP が結合するときと解離するときにより主要な仕事が行なわれることが明らかになった。結合・解離による回転の仕

組みについてのモデルを得ることができ、このモデルは逆回転による ATP 合成も説明した。リニアー分子モーターであるミオシンが、アクチンフィラメントの上を歩行する機構についても一分子のイメージングを行うことで、興味深い詳細な機構が明らかになりつつある。

(4) 深海細菌のゲノムに見る情報伝達機能分子

高見 英人 (ゲノム解析研究グループ)

様々な環境に生息する *Bacillus* 属関連種について、pH と塩濃度に着目し、高 pH、高塩濃度環境に対する適応メカニズムの解明を目指して、好アルカリ性 *Bacillus halodurans* および高度耐塩性好アルカリ性 *Oceanobacillus iheyensis* の全ゲノム配列を決定した。既に配列が決まっている 3 種の *Bacillus* と合わせてゲノム配列の比較を行った。その結果、354 遺伝子は、*Bacillus* に共通する遺伝子であった。好アルカリ菌二種のみにも共通な遺伝子として、243 保存されていた。243 のうち、約 1/3 の 76 遺伝

子が transport/binding protein のカテゴリーであり、ABC トランスポーター、C4-ジカルボン酸関連トランスポーター、浸透圧に関わるトランスポーター、Na イオンの取り込みに関わるトランスポーターを含んでいた。一方、原核生物としては最初の発見である電位依存性 Na チャネルが共通な遺伝子として見出された。このチャネルは一過的に Na イオンを供給することから、どのように Na イオンサイクルに貢献しているかは、まだ不明である。

(5) 線虫の「感覚情報によるロコモーション」の制御

桂 勲 (国立遺伝学研究所, 総合研究大学院大学)

線虫の行動が様々な調節される機構を、遺伝学的に解析した以下の 3 つの結果について発表した。(1) 腸から行動への影響 (2) 嗅覚の順応 (3) 餌と匂い物質による学習 (4) 感覚信号の選択と統合。

これらの中で、(2) は、感覚ニューロンの中で細胞自立的に行われるが、他の制御は細胞間の信号伝達を含む。これらの遺伝子の機能を、感覚からロコモーションにいたる神経回路の中で議論した。

(6) 線虫のロコモーションの計測と神経系モデル

新貝 鉦蔵 (岩手大学工学部)

線虫の移動をアガープレート上で画像解析し、前進、後退、停止を分け、虫の形態や首振り等から、頭部を識別し、自動判別した。また、餌のあるなし、や laser 照射の影響を解析することにより神経回路の特性を推定した。また、Hodgkin-Huxley 型チャネルモデルとシナプス

結合をパラメーター化して、前進運動を生成する神経回路モデルを作成することを試みた。いくつかの組み合わせにおいて、背腹の筋を交互に興奮させる周期的活動を構成することができた。

(7) ホヤの幼生の行動と感覚器

津田 基之 (姫路工業大学大学院理学研究科生命科学専攻)

脊椎動物の始原的生物である原索動物のカタユレイボヤは、幼生期の前半に上昇運動を、後半は下降運動を示し、海底に着床して成体に変態する。この遊泳運動は脳胞の二つの色素細胞を含む感覚器に制御される。Laser ablation¹ により色素細胞除去の影響を調べたところ、前

方の色素細胞を除去すると平衡機能が阻害され、後方色素細胞を除去すると光反応が消失した。更に、オプシン遺伝子に対する morpholino oligoDNA を導入して遊泳運動を観察すると、光依存的な遊泳運動が阻害された。

(8) ホヤの幼生の遊泳リズムとイオンチャネル

岡村 康司 (岡崎国立共同研究機構 統合バイオサイエンスセンター)

脊椎動物の始原的生物である原索動物のホヤ神経筋に関する以下の 3 つの知見について報告した。(1) ゲノム情報からイオンチャネル遺伝子の網羅的解析を行った。脊椎動物のイオンチャネルの殆ど全ての種類の遺伝子が見られたが、興奮性の微妙な調節に関わる副サブユニットやホヤには形態学的に存在しない痛覚に関与する遺伝子が存在しないことが明らかになった。(2) 筋細胞特性の発達について、電気生理学および分子生物学的手法

により解析し、発生途中での電位依存性 Ca²⁺ チャネルの機能は、筋細胞形態の成熟に重要であることを見出した。(3) ゲノムの解明されたユレイボヤにおいて、ロコモーションとイオンチャネルの関係を解明するには、オタマジャクシ幼生から直接電氣的に記録する方法が必要である。そこで、吸引電極および細胞内電極を用いた記録を行い、左右の遊泳リズムを単一幼生レベルで解析する系を確立した。

(9) ザリガニ尾扇肢運動修飾の神経機構

長山 俊樹 (北海道大学大学院理学系生物科学)

アメリカザリガニは尾部への機械的接触刺激に対し、刺激強度により異なる反応パターンを示す。強烈な刺激により巨大介在ニューロンを介した系により反対方向へ遊泳逃避する。弱い刺激では、尾扇肢を閉じ、前進歩行する dart response を示す。行動修飾、選択の神経スイッ

チを解明するため、電気生理学的手法により解析を行い、ノンスパイキングニューロンの相反性並列型シナプス統合作用によって運動パターンが巧みに選択される仕組みが明らかになった。

(10) 硬骨魚後脳の分節構造にもとづいて構築された逃避運動回路

小田 洋一 (大阪大学大学院生命機能研究科)

zebrafish や金魚の網様体脊髄路 (RS) のニューロン群は、成魚においても分節構造を保ち、前後軸方向に 7 つの分節を形成する。第 4 分節には巨大な M ニューロンが

左右一対存在し、逃避行動をトリガーする。他の分節にも、M ニューロンと形態学的に良く似た相同 RS ニューロンが隣接する分節に繰り返される。これまでに、(1) 逃

避運動中の zebrafish の稚魚の RS ニューロンをカルシウムイメージングにより短潜時の逃避運動には M 細胞の活動を伴うことを明らかにした。(2) 第 4 節の M 細胞と第 5,6 節の RS ニューロンは異なる興奮性を示し, Kv1.2

サブユニット依存性の低閾値 K チャネルと, M 細胞特異的反回抑制性回路の働きによることが示唆された。(3) M 細胞から第 5, 6 分節の RS ニューロンには一方向の結合があり, 結合様式は細胞の形態的分類に従っていた。

(11) 多足歩行運動の歩行パターンのエネルギー効率に基づく最適性

西井 淳 (山口大学 理学部)

歩行が速度によって変化することが知られているが, その理由として消費エネルギーによる最適化の可能性が考えられ, Hoyt と Taylor により実験的に示された。しかし, (1) ウォークが遅い速度で, ギャロップが早い速度でエネルギー消費が低くなる理由は? (2) 歩容が速度により突然変化する理由は? (3) 多足歩行動物に観察され歩容はエネルギー消費に基づく最適解であるか?, などは不明であった。歩行パターンの決定において動物によらない共通の特徴があるが, 実験的に検討することは困難

である。そこで, 生体の運動の力学モデルを用いた数理的方法により消費エネルギーを最小にする歩行パターンを求めてみたところ, 実際の観察と高い類似を示した。また, 歩容の遷移は, 身体を支えるためのトルク発生に伴うエネルギー消費と, 脚を振るための機械的仕事のバランスが速度とともに変化するために生じることや, 最適な歩容の遷移が総転移的に起こりうることも明らかになった。

(12) 哺乳類歩行リズム神経回路の発生

西丸 広史 (カロリンスカ研究所神経科学部門)

哺乳類脊髄の神経活動のリズムは, 歩行様のパターンとして誘発され精力的に研究されてきた。しかし, 介在ニューロンの性質や同定など不明な点が多い。脊髄のパターン形成回路を明らかにする目的で, 胎生期ラットの脊髄摘出標本を用いて 1) 生まれる一週間ほど前に始めて観察されるリズム活動においては左右の運動ニューロ

ン群が左右で同期した活動を示すこと, 2) 後肢の運動に対応する左右交代性のニューロン活動は生まれる前に出現すること, 3) 同期したパターンから交代性のパターンへの変化において, GABA またはグリシン作動性のシナプスの発達が重要であること, を明らかにした。

(13) ネコ歩行運動の脳幹—脊髄制御機構

松山 清治 (札幌医科大学医学部生理学第二講座)

歩行運動は動物の基本的運動のひとつであり, 様々な随意行動や情動行動と密接に関連して発現する。このため, 哺乳動物では歩行運動の発現・制御は脳皮質・基底核・辺縁系などの高次脳の機能と深い関わりを持つ。一方, 歩行運動の制御機構は, 中枢神経系全般に分散配

置された複数のサブシステムにより構築される。ネコを用いて基本神経機構としての脳幹—脊髄系に着目し, 網様体脊髄路, 外側前庭脊髄路, 脊髄交連細胞機構を基礎的構成要素とする歩行運動の構成に関して明らかにした。

17. 神経可塑性の分子的基盤

2003年5月29日－5月30日

代表・世話人：尾藤晴彦（東京大学大学院医学系研究科）

所内対応者：森 泰生（統合バイオサイエンスセンター）

(1) AMPA 受容体のリン酸化と機能制御

亀山仁彦（産業技術総合研究所）

(2) AMPA receptor interacting protein GRIP steers kinesin to dendrites

瀬藤光利（三菱化学生命化学研究所）

(3) PSD-95 のクラスタリング機構の解析

土井知子（京都大学大学院理学研究科）

(4) TARPs(stargazin family)/AMPA receptor 複合体の機能解析

富田進 (UCSF School of Medicine)

(5) AMPA 受容体含有小胞の精製と共存蛋白質の解析

板倉誠（北里大学医学部）

(6) PSD 分子構成の神経可塑性および記憶・学習行動における役割

渡部文子（東京大学医科学研究所）

(7) Estimating errors associated with the peak-scaled non-stationary fluctuation analysis(PS-NSFA)
of climbing fibre-Purkinje cell EPSCs by Monte Carlo simulation

初山明子（生理学研究所）

(8) BDNF による樹状突起での翻訳調節

武井延之（新潟大学脳研究所）

(9) 神経シナプス裏打ち蛋白質 S-SCAM の解析

飯田順子（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科）

(10) 脳における新しい細胞間シグナリングシステム CD47-SHPS-1 系の機能

大西浩史（群馬大学生体調節研究所）

(11) Molecular anatomy of the presynaptic active zone

大塚稔久（カン研究所）

(12) CaM-kinase カスケードを介した情報伝達メカニズムと遺伝子発現制御

徳光浩（香川医科大学大学生体分子医学講座）

(13) 小脳顆粒細胞の二相性細胞移動のダイナミクス

見学美根子（京都大学大学院理学研究科）

(14) 樹状突起のパターン形成：その多様性を生み出す基盤

上村匡（京都大学ウイルス研究所）

【参加者名】

井上英二（カン研究所）、高尾絵津子（カン研究所）、俵田真紀（カン研究所）、井上真理枝（カン研究所）、大塚稔久（カン研究所）、徳光浩（香川医科大学）、大塚博之（香川医科大学）、橋本浩一（金沢大学大学院医学系研究科）、狩野方伸（金沢大学大学院医学系研究科）、高橋正

身（北里大学医学部）、板倉誠（北里大学医学部）、土井知子（京都大学大学院理学研究科）、村田康信（京都大学大学院理学研究科）、見学美根子（京都大学大学院理学研究科）、矢和多智（京都大学大学院理学研究科）、野中美応（京都大学大学院理学研究科）、髭 俊秀（京都大学大

学院理学研究科), 上村匡 (京都大学ウイルス研究所), 竹本さやか (京都大学大学院医学研究科), 大西浩史 (群馬大学生体調節研究所), 的崎 尚 (群馬大学生体調節研究所), 亀山仁彦 (産業技術総合研究所), 尾藤晴彦 (東京大学大学院医学系研究科), 真鍋俊也 (東京大学医科学研究所), 渡部文子 (東京大学医科学研究所), 熊澤紀子 (東京大学医科学研究所), 三輪秀樹 (東京大学医科学研究所), 有馬史子 (東京大学医科学研究所), 片山憲和 (東京大学医科学研究所), 小林静香 (東京大学医科学研究所), 竹村典子 (東京大学医科学研究所), ポンパンプーバック ディー・サクナン (東京大学医科学研究所), 草川森士 (東

京大学医科学研究所), 畑裕 (東京医科歯科大学大学院), 飯田純子 (東京医科歯科大学大学院), 漆戸智恵 (東京医科歯科大学大学院), 壺岐純子 (東京医科歯科大学大学院), 武井延之 (新潟大学脳研究所), 相村春彦 (浜松医科大学病理学), 溝口 明 (三重大学医学部), 木村一志 (三重大学医学部), 藤谷和子 (三重大学医学部), 東 幹人 (三重大学医学部), 井ノ口馨 (三菱化学生命化学研究所), 瀬藤光利 (三菱化学生命化学研究所), 富田進 (UCSF School of Medicine), 下野健 (アルファメッドサイエンス(株)), 森泰生 (統合バイオサイエンスセンター), 初山明子 (生理学研究所)

【概要】

1973 年に Bliss と Lomo らによって神経可塑性のプロトタイプとしての長期増強 (long-term potentiation) が発見されて以来, シナプス伝達効率の可塑的制御は, 成体における神経回路の機能的柔軟性を付与し, 記憶・学習などの高次機能を担う根本原理と考えられてきた。90 年代の分子神経生物学の興隆とともに, この基本原理を支える分子的基盤に関する基礎知識は, 飛躍的に増してきた。だが, 本当の意味で, 神経可塑性の分子的基盤は, 現在解決されつつある問題なのだろうか?

この今日的疑問に答えるため, 本研究会では, 近年重要な知見が数多く蓄積してきた PSD (シナプス後肥厚部) およびその周辺の情報伝達, ならびにその生物学的意義

について, 以下のテーマと演者による発表・討論を行った。1) グルタミン酸受容体, ならびにその活性を調節する分子装置としての PSD における分子間相互作用に関する最新の知見: 亀山公彦, 初山明子, 畑裕, 瀬藤光利, 富田進, 渡部文子ら。2) これらの中核となる分子群を統合的に調節する分子機構としての, 翻訳後修飾, 遺伝子発現, 神経細胞分化調節, 樹状突起パターンニングや新規アダプター蛋白について: 武井延之, 徳光浩, 見学美根子, 上村匡, 大塚稔久ら。これらの発表について, 提案代表者ら数人の神経可塑性のエキスパートを中心に討議を行い, 新たな概念・実験デザインの創成を試みた。

(1) AMPA 受容体のリン酸化と機能制御

亀山仁彦 (産業技術総合研究所脳神経情報研究部門脳機能調節因子研究グループ)

中枢神経系におけるグルタミン酸受容体を介した興奮性シナプス電流は主に AMPA サブタイプにより輸送される。このサブタイプはリン酸化により受容体の機能やシナプス膜における分布が制御されてシナプス伝達効率を変化させると考えられている。

AMPA 受容体の GluR1 サブユニットは細胞内ドメインに 3ヶ所のリン酸化部位が同定されている。PKC および CaMKII によりリン酸化を受ける S831 残基のリン酸化によりチャネルのコンダクタンスが増加してイオン透過性を上昇させる。一方, PKA によりリン酸化される S845 残基のリン酸化により受容体のシナプス膜への発現量が

増加することによりイオンの透過量が増えるとされている。また T840 残基は神経細胞や, 異所性に培養細胞などに発現させた場合にもリン酸化されるが, この部位は刺激などによるリン酸化量の変化はあまり起こらない。LTP を誘導するような高頻度刺激を海馬 CA1 領域錘体細胞に与えることにより GluR1 サブユニットの S831 のリン酸化量は増加する。一方 S845 のリン酸化量は変化しない。一方 LTD を誘導するような低頻度刺激を与えた場合には GluR1 サブユニットの S845 のリン酸化量が減少し, S831 のリン酸化量は変化しない。

一方で予め高頻度刺激を加えておいたサンプルに低頻

度刺激を加えることにより誘導される de-potential の系では S831 のリン酸化量が減少し, S845 のリン酸化量は変化しない。逆にシナプスに予め低頻度刺激を加えた後に高頻度刺激を加える de-depression の系では S845 の

リン酸化が増加し S831 のリン酸化量には変化が見られない。これらの実験結果はシナプスにおける刺激の履歴により受容体のリン酸化の起こる部位の制御が行われていることを示唆している。

(2) AMPA receptor interacting protein GRIP steers kinesin to dendrites

瀬藤光利 (三菱化学生命化学研究所)

極性輸送においてモーター蛋白が結合蛋白の分布を決めるという常識は AMPA 受容体結合蛋白 GRIP の神経細胞での強制発現がキネシンの分布を制御するという報告 (Setou et al., Nature 2002) で根底から覆された。即座に同様の結合蛋白依存モーター分布制御現象が酵母ミオシン

で遺伝学的に検証され支持された (JCB2002Dec, Nature 2003Mar)。この研究会ではこの能動輸送に一般的と現在考えられている一見パラドキシカルな現象の意義とメカニズムから、神経細胞における受容体輸送の極性獲得について考察する。

(3) PSD-95 のクラスターリング機構の解析

土井知子 (京都大学理学研究科)

PSD-95 は、シナプス伝達に必須のイオンチャネルや受容体分子などを興奮性シナプスのシナプス後肥厚 (PSD) に多数集積させる足場蛋白質群の 1 つである。N 末側から順に 3 つの PDZ ドメイン (PDZ1, PDZ2, PDZ3), SH ドメイン, GK ドメインを持ち、各ドメインは蛋白質相互作用に関与している。PSD における分子集積はその神経細胞の生理活性と深く関わり、足場蛋白質群のマルチドメイン構造と制御された分子集積機構の相関は、興味深い。

COS 細胞に PSD-95 と NR2B または Kv1.4 を共発現させると、両者が細胞膜上で集積した斑状の共クラスターが形成される。この性質を利用して、全体構造に大きな影響を与えずに NR2B や Kv1.4 との結合能をなくする部分欠失および置換変異を PDZ1, PDZ2 各々に導入した全長 PSD-95 を作成し分子集積機能を調べた¹⁾。PDZ2 にのみ変異を導入した変異体の Kv1.4 との共クラスター形成効率は、野生型が示した効率の約 3%に激減したのに対して、PDZ1 にのみ変異を導入した PSD-95 では野生型の約 67%の効率を示した。さらに、後者の変異 PDZ1 と PDZ2 との分子内ドメイン配置を反転させると、共クラスター形成は野生型の約 23%に減少した。これらの結果

は、PSD-95 と Kv1.4 との共クラスター形成には PDZ2 が必要で、その分子内配置も重要であることを示している。PSD-95 が担う分子集積機構の 1 つは、PDZ2 のリガンド結合に伴う分子内のドメイン間相互作用の変化によるものかもしれない。

さらに、これらの変異 PSD-95-GFP 融合蛋白質を培養海馬錐体細胞に強制発現させた所、(1)PDZ1, 2 両方のリガンド結合能を失った変異体 (1m.-2m.) のシナプスクラスター効率は、野生型の約 1/3 程度に減少し、PDZ1 または 2 のどちらかの結合能を失った変異体では中間的な性質を示した、(2) PSD-95-GFP のシナプスクラスター効率は、AMPA 受容体 (GluR1) のクラスター効率と相関がある、(3) 変異体を発現しているシナプスではスパインが細長く、1m.-2m.では特に顕著であるなどの特徴が観察された。PSD-95 が、PSD の正常で十分な成熟に重要な役割を果たしていることが示唆される。

(1) Imamura, F., Maeda, S., Doi, T., and Fujiyoshi, Y. Ligand binding of the second PDZ domain regulates clustering of PSD-95 with Kv1.4 potassium channel. J. Biol. Chem. 277, 3640-3646, 2002.

(4) TARPs (stargazin family)/AMPA receptor 複合体の機能解析

富田進 (UCSF School of Medicine)

脳における神経活動依存的なシナプス伝達効率変化において、AMPA 型受容体 (AMPA) 応答の変化は重要な役割を担っている。AMPA 応答変化の主要な分子機構は、AMPA のシナプス後膜上への発現量変化によることが、電気生理学的手法を用いた実験により明らかになっている。そして、小脳顆粒細胞における AMPAR のシナプス後膜発現に関わる分子機構について、痙攣や運動失調を示す自然突然変異マウス stargazer を用いた興味深い結果が報告された。

Stargazer マウスの小脳では、苔状繊維と顆粒細胞の形成するシナプスにおいて特異的に AMPAR 活性が消失している。小脳顆粒細胞の初代培養細胞を用いた研究により、4 回膜貫通構造を持つ蛋白質 stargazin (stargazer マウ

スの原因遺伝子) が小脳顆粒細胞における AMPAR のシナプス後膜発現に必須であることが示された。しかしながら、stargazin の発現していない脳領域における AMPAR シナプス後膜発現の分子機構はいまだ明らかでない。また、神経活動依存的なシナプス後膜上への AMPAR 発現量変化の分子機構も明らかでない。

我々は stargazin 機能相同性蛋白質を同定し、その member を TARPs (Transmembrane AMPA Receptor-binding Protein) と名付けた。それぞれの TARP が担う機能特異性について、また、神経活動依存的な AMPAR 後膜発現量変化の分子機構について、興味深い知見を得たので報告する。

(5) AMPA 受容体含有小胞の単離と共存蛋白質の解析

板倉誠, 高橋正身 (北里大学医学部)

シナプス伝達効率を可塑的に変化させることが脳の高次機能の基盤であると考えられる。シナプスの伝達効率を変化させる機構の一つにポストシナプス膜における神経伝達物質受容体の数の調節がある。Glutamate 受容体である AMPA 受容体は、シナプス活動依存的にシナプスへの組み込みがおき受容体数が増加すると考えられているが、その機構の詳細についてはまだ明らかにされていない。そこで AMPA 受容体がシナプスへ組み込まれる機構を明らかにするために、細胞内に存在する AMPA 受容体含有小胞の単離と共存蛋白質の決定および共存蛋白質の解析を行った。

ラット大脳をホモジネートし、遠心分離によりシナプス小胞を含む膜成分を単離した。Sucrose または Iodixanol 密度勾配法によりさらに小胞を分画化し、イムノブロッティングしたところ AMPA 受容体のサブユニットの一つである GluR2 が、膜一回貫通型の ER 蛋白質である Calnexin と非常によく似た局在パターンを示すことがわかった。次に、anti-GluR2 抗体を結合した磁気ビーズを用いて GluR2 含有小胞の免疫沈降を行った。結果、シナ

プス小胞が濃縮した膜分画中には GluR2 と Calnexin を含む小胞が存在していることがわかった。また一部の GluR2 はプレシナプス小胞蛋白質と共沈し、GluR2 がプレシナプスにも存在することが示唆された。Calnexin を含有している小胞が GluR2 のポストシナプス膜への組み込みに関与しているのであれば、ER 蛋白質 Calnexin もまたシナプス膜に存在しているはずである。そこで海馬および大脳皮質の初代培養神経細胞において、Calnexin が活動依存的に細胞膜へ組み込まれるか検討した。NMDA 受容体 Antagonist, AP-5 存在下で培養したのち、15min 間 AP-5 を除いたところ細胞膜上に存在する Calnexin の量が増加した。このことから Calnexin は、NMDA 受容体依存的に細胞膜へ組み込まれたと考えられる。したがって今回単離した GluR2 および Calnexin を含有した小胞は、AMPA 受容体のシナプスでのリサイクリングに関与すると考えられ、現在、その小胞に共存する蛋白質をイムノブロッティングと TOF-MASS を用いて同定中である。

(6) PSD 分子構成の神経可塑性および記憶・学習行動における役割

渡部文子 (東京大学医科学研究所)

シナプス後肥厚部に存在するNMDA受容体は、シナプス前細胞と後細胞の活動の coincidence detector として、シナプス可塑性や学習行動に重要な役割を担う分子であると考えられている。NMDA 受容体は様々な分子と結合して非常に大きなタンパク複合体を構成し、多様なパターンのシナプス刺激というシグナルを、長期にわたるシナプス伝達効率の変化というシグナルへと変換する。このような長期的シナプス伝達効率の変化すなわち神経可塑性は、記憶・学習の細胞レベルでのモデルとして広く研究されているが、その分子機構並びに生理的意義には未だ議論も多い。

これまで我々は、NMDA 受容体複合体に含まれる足場タンパクである PSD-95 変異マウスや、PSD-95 結合タン

パクであり MAP キナーゼ系の負の調節因子である SynGAP 変異マウスなどの遺伝子改変マウスを用いて、長期増強 (LTP) や長期抑圧 (LTD) といったシナプス可塑性の変化、種々のパターン刺激による LTP の誘導閾値の変化、ならびに記憶・学習行動の変化などを調べてきた。また、老齢マウスにおいて、アセチルコリンやノルアドレナリンなどによる LTP 誘導閾値の修飾作用が大きくシフトしていることを示してきた。これらの結果から、記憶・学習の障害には、LTP の誘導閾値の変化が特に良く相関していることが示唆された。そこで今回の発表ではこれら一連の研究を簡単に紹介すると共に、LTP 誘導閾値の活動依存的調節、すなわちメタ可塑性と記憶・学習行動の関係について考察を加えたい。

(7) Estimating errors associated with the peak-scaled non-stationary fluctuation analysis (PS-NSFA) of climbing fibre-Purkinje cell EPSCs by Monte Carlo simulation

初山明子 (生理学研究所)

Division of Cerebral Structure, National Institute of Physiological Sciences and CREST.

We have recently applied the PS-NSFA to EPSCs at climbing fibre-Purkinje cell synapses, to estimate the weighted mean single-channel conductance of synaptic AMPA receptors. To evaluate errors associated with the analysis, we carried out Monte Carlo simulations using the AMPA receptor model by Hausser & Roth(1997). Deviation from the theoretical parabolic variance-mean relationship was reproduced by the model, as the skew of current-variance

plots. However, fitting such skewed plots to the theoretical equation exhibited only 2% difference from the expected value. Our mean RC filtering attenuated the peak amplitude of EPSCs by 12% and the estimated conductance by 24%, resulting in a 15% overestimation of the number of activated channels at the peak. Furthermore, bootstrap analysis of recorded and simulated EPSCs also indicated that variation in transmitter waveforms did not significantly affect our estimates.

(8) BDNF による樹状突起での翻訳調節

武井延之 (新潟大学・脳研究所・分子神経生物学)

学習・記憶の過程やその基礎となるシナプスの可塑性変化のある種のものには新規の蛋白合成が必要であるこ

とが従来から指摘されてきた。しかしながらほとんどの研究は、蛋白合成阻害剤を用いた現象論的な実験が主で

あり、ニューロンという細胞のなかでどのような分子メカニズムが活性化しているかなどはほとんどわかっていない。

最近、樹状突起内、さらにはシナプス近傍でおこる蛋白合成が比較的早いシナプスの可塑性に関与していることが示唆されるようになってきた。このような蛋白合成はシナプスへの刺激、入力によって引き起こされる調節的なものである可能性が高い。そこで我々はこの調節機構、すなわち翻訳調節のメカニズムについて検討した。中枢神経系における代表的な神経栄養因子である BDNF (brain-derived neurotrophic factor) は、ニューロンの樹状突起部において新規の蛋白合成を増強した。この作用は免疫抑制剤であるラパマイシンによって完全にブロックされた。BDNF はラパマイシンの標的である mTOR

(mammalian target of rapamycin) というキナーゼを活性化し、その下流で cap 依存性翻訳を制御する 4EBP1 のリン酸化及び 5'-TOPmRNA の翻訳を調節する p70S6K / ribosomal S6 蛋白のリン酸化を引き起こした。この作用は synaptoneurosome 画分や単離樹状突起でも確認された。以上の結果はシナプス部への BDNF 刺激が mTOR カスケードを活性化し、翻訳の増強を引き起こし、シナプス部での特定の蛋白の合成を増強している (実際 BDNF の刺激により CaMKII や Arc の新規合成が上昇していた) ことを強く示唆している。

さらに LTP や空間学習などの神経活動パラダイムにおける翻訳活性化の結果を紹介し、ニューロンにおける翻訳調節の役割について論議を深めたい。

(9) 神経シナプス裏打ち蛋白質 S-SCAM の解析

飯田純子, 畑裕 (東京医科歯科大学大学院・医歯学総合研究科・病態代謝解析学)

神経後シナプスには、神経伝達物質受容体と神経細胞接着分子が局在し、神経伝達の場合としてのみならず、神経細胞間の接着の場合として機能し、神経シナプスにおいて、神経伝達と接着は密接に関わっている。神経シナプス活動依存性に接着強度が変化するというモデルは、神経細胞の特定のシナプスに選択的に可塑性が成立する分子機序として魅力的である。PSD-95 と S-SCAM は、共に神経シナプスにおいて、神経伝達物質受容体と接着分子の双方に関与する裏打ち蛋白質である。これらの分子を解析することを通じて、神経シナプス活動依存的に接着が制御される機構を解明しようと試みている。神経シナプス後肥厚の主要な裏打ち蛋白質 PSD-95 は、PDZ 領域を 3 つもち、NMDA 受容体と接着分子ニューロリギンに結合する。S-SCAM は、PSD-95 と同様に PDZ 領域を複数個もち、やはり、NMDA 受容体と接着分子ニューロリギンに結合する。私たちは、最近、S-SCAM が β カテニンに結合し、 β カテニンを介して神経シナプスに局在決定されることを報告している。 β カテニンは、接着分子カドヘリンの裏打ち分子である。従って、S-SCAM は神経シナプスの形成過程において、まずカドヘリンによる接着部位に局在決定されると想定される。さらに、私た

ちは、シナプス形成における分子集積機構を明らかにするため、1) S-SCAM とニューロリギンでは、どちらが先にシナプスに集積するか、2) シナプスへの分子集積において、S-SCAM と PSD-95 の担う役割は、同じか、あるいは異なるのか、3) NMDA 受容体の局在決定に S-SCAM または、PSD-95 は関与するのか、を解析している。これまでに、S-SCAM によって、ニューロリギンがシナプスに集積すること、PSD-95 は、むしろニューロリギンによって局在決定されていることが明らかになっている。しかし、NMDA 受容体の局在決定に関しては、S-SCAM も PSD-95 も決定的な役割を担うことを支持する結果は得られていない。一方、 β カテニンは、カドヘリンの裏打ち分子としてだけでなく、シグナル伝達分子として遺伝子転写制御に関わっている。 β カテニンによるシグナル伝達においては、 β カテニンの分解の制御が重要である。そこで、私たちは S-SCAM が、 β カテニンの分解制御に与える影響を調べている。その結果、S-SCAM が β カテニンの分解を促進することを見出し、さらにその分子機構として、S-SCAM の N 末端に結合する Axin との相互作用が重要であることを明らかにしている。

(10) 脳における新しい細胞間シグナリングシステム CD47-SHPS-1 系の生理機能

大西浩史, 岡澤秀樹, 的崎 尚 (群馬大学生体調節研究所 附属生理活性物質センター)

神経系では様々な膜蛋白質の相互作用により細胞間コミュニケーションが行われ, 発生段階における神経回路網の形成や, 成体におけるシナプス可塑性などの脳機能に重要な役割を果たしている。我々が見出した SHPS-1 は脳に強く発現する新規受容体型膜蛋白質で, イムノグロブリンスーパーファミリー (IgSF) に属する。SHPS-1 は細胞内にチロシンリン酸化モチーフを有し, 細胞接着や細胞増殖因子の刺激に依存してこのモチーフがチロシンリン酸化を受ける。チロシンリン酸化を受けた SHPS-1 は細胞質型チロシンホスファターゼ SHP-2 と相互作用してこれを活性化し, 細胞内チロシンリン酸化シグナルを制御する。一方, SHPS-1 の細胞外ドメインの特異的リガンドとして, SHPS-1 と同じく IgSF に属する 5 回膜貫通型の膜蛋白質 CD47 が同定されている。CD47 の細胞内シグナルについては現在まだ明らかにされていない。CD47 と SHPS-1 は様々な組織で発現が見られるが, 特に神経系で強く発現しており, 神経回路の形成や神経可塑性への関与が考えられる。我々は, これら分子が形成する細胞間相互作用システム, CD47-SHPS-1 系の, 神経系にお

ける機能を明らかにすることを目標に研究を進めている。今回我々は, 培養神経細胞において SHPS-1 が神経軸索側に, CD47 が樹状突起側に局在する傾向があることを新たに見出した。さらに, SHPS-1 の軸索への局在決定については, 少なくとも SHPS-1 の細胞内ドメインが関与していることを明らかにしている。一方で我々は, 培養細胞表面の SHPS-1 がその生理的リガンドである CD47 と相互作用することで細胞の運動性が抑制されることを見出し, さらにこの抑制効果には SHPS-1 の下流における SHP-2 や Rho の活性制御が関与している可能性を明らかにした。また逆に, SHPS-1 を介して細胞表面の CD47 を刺激すると, フィロポディア形成が刺激され, 神経突起伸長が促進されることも新たに見出している。これらの結果から我々は, 神経細胞において CD47-SHPS-1 系は, 極性を持ってそれぞれのシグナルを両方向性に伝達しており, 神経細胞の運動や形態の制御によって神経機能に関与している可能性があると考え, 現在さらに解析を進めている。

(11) Molecular Anatomy of the Presynaptic Active Zone

大塚稔久 (カン研究所)

神経シナプスの active zone (AZ) は, 1960 年代に電子顕微鏡を用いた解析によって同定された比較的電子密度の高い構造体である。神経伝達物質を含んだシナプス小胞は, 神経終末において, この AZ にドッキングし, プレシナプス膜と融合した後, 最終的に神経伝達物質をシナプス間隙に放出する。AZ に密着した細胞骨格は CAZ (Cytomatrix at the AZ) とも呼ばれている。CAZ は, プレシナプスにおいて, AZ の形成, 構造維持および機能発現に重要な役割を果たしていると考えられている。しかしその重要性にもかかわらず, CAZ 特異的な構成分子としてはこれまでに, RIM1, Munc13-1, bassoon および piccolo の 4 つの蛋白質しか明らかにされていなかった。さらに, RIM1 と Munc13-1 が直接結合し, シナプス小胞

がドッキングした後のプライミングを制御することは明らかになっていたものの, これら CAZ 蛋白質間の相互作用についてはほとんど不明であった。最近我々は, 古典的な生化学的手法と質量分析法を組み合わせることで, ラット大脳より新規の CAZ 蛋白質を同定することに成功し, CAST1 (CAZ-associated Structural Protein1) と命名し, その機能解析を行ってきた。CAST1 は少なくとも RIM1 の PDZ ドメインに直接結合し, RIM1 を介して Munc13-1 と 3 者複合体を形成する。ラット海馬初代神経培養細胞を用いたトランスフェクションの実験から, CAST1 が RIM1 の AZ における scaffold 蛋白質として機能していることを明らかにした。さらに, この 3 者複合体には bassoon も結合することから, CAZ において巨大な蛋白

質複合体が形成されていることが示唆される。我々はこの CAZ 蛋白質によって形成される巨大な蛋白質複合体が、比較的電子密度の高い CAZ の分子基盤ではないかと考えている。さらに、CAST1 と相同性の高いメンバーである CAST2・の単離にも成功し、CAST2・もまた CAZ

蛋白質複合体に含まれることを明らかにした。今回は、CAST ファミリーの構造および機能解析を中心に、プレシナプス AZ の形成、構造維持および機能発現の分子メカニズムについて話題を提供したい。

(12) CaM-kinase カスケードを介した情報伝達メカニズムと遺伝子発現制御

徳光 浩（香川医科大学学生体分子医学講座生体情報分子学）

シナプス伝達にともなう細胞内カルシウム濃度の上昇は、様々な細胞内シグナル伝達機構を介することでシナプスの可塑性や長期記憶などの高次神経機能の発現に必須と考えられる。特に長期記憶 (late phase LTP) においては遺伝子の発現上昇とそれに伴うタンパク質合成が必要と思われる。このような細胞内カルシウム濃度上昇の情報を遺伝子の転写活性化へと導く情報伝達分子としてカルシウム／カルモデュリン依存性タンパク質リン酸化酵素群 (CaM-kinase) が知られている。そのなかでも CaM-kinase IV による転写因子 CREB のリン酸化反応を

介した転写活性化については多くの研究よりその重要性が明らかとなってきた。本発表においては、CaM-kinase IV の上流活性化酵素 (CaM-kinase kinase, CaM-KK) によるリン酸化カスケードを介した機能調節の分子メカニズム、また線虫 *C.elegans* における CaM-kinase カスケードの機能解析さらには CaM-kinase カスケードによる発現誘導遺伝子の同定などについて報告する。さらに、この新しいカルシウム情報伝達機構の機能解明に向けて最近開発した分子プローブについても紹介したい。

(13) 小脳顆粒細胞の二相性細胞移動のダイナミクス

見学美根子（京都大学大学院理学研究科，理化学研究所脳科学総合研究センター）

脊椎動物の複雑な中枢神経系回路が正しく機能するためには、個々のニューロンが回路網内の適切な場所に配置し、神経核や層構造を形成して正しい相手とシナプス結合することが不可欠である。発生中のニューロンは脳室面の増殖帯で分裂を終え、神経組織中を細胞移動して目的地に到達する。ニューロンの移動方向は、脳室から脳表面に向かって神経管の放射軸上を動く放射移動と、それと直交する神経管同心円柱面上を動く接線移動に大別される。多くのニューロンはどちらか一方の移動様式をとるが、小脳顆粒細胞は、生後発達中ダイナミックに移動して、直角な方向転換を挟んで接線移動と放射移動

を連続して行う。我々は、小脳顆粒細胞の二相性移動を再構成できる微小片培養系を用い、タイムラプス共焦点顕微鏡を用いて接線移動と放射移動のダイナミクスを比較解析した。その結果、最初に起る接線移動では、成長円錐の移動と核移動が独立に起る translocation を、続いて起る放射移動では、両者が連動する locomotion を示すことが明らかになった。また、接線移動を誘導する先導突起は将来の軸索に、放射移動の先導突起は樹状突起に分化することが分り、先導突起の性質の違いがダイナミクスの違いを生む可能性が示唆された。現在、二相性移動の異なるダイナミクスの分子的基盤を探索している。

(14) 樹状突起のパターン形成：その多様性を生み出す基盤

上村 匡 (ウイルス研究所, CREST・JST)

様々なニューロンがそれぞれに特徴的な樹状突起をどのように形作るかについては、ほとんど明らかにされていない。ショウジョウバエの胚後期で誕生し、胚期から幼虫期にかけて樹状突起を発達させる *dendritic arborization (da) neuron* は、分岐の複雑度の順に応じてクラス I-IV に分類されており、この問題の解析への優れたモデル系を提供する。クラス I または IV を標識するトランスジェニック GFP マーカーを作製し、経時観察とレーザーによる損傷の導入を組み合わせた実験を行った。クラス I のニューロンとは対照的に、クラス IV のニューロンは、幼虫期を通してより高次の分岐を展開し続け、レーザーによる突起切断に対して高い反応性を示した。さらにクラス IV のニューロンの受容野の形成について解析した。その結果、クラス特異的な抑制性の細胞間相互作用が、受容野の境界形成に必要なかつ十分であることを明らかにし、かつそれが突起終末間で働いていることを示す証拠を得た。また、反発性のシグナル伝達が重要な役割を果たすのは、隣接するニューロンの突起が出会い始め、体壁が突起によって完全にほぼ重複なく覆われる

までであることが示唆された。

樹状突起の多様性を生み出す分子機構を解析する目的で、クラス特異的に発現する遺伝子を探索したところ、転写調節因子 *Abrupt* がクラス I 特異的に発現していることを見出した。*Abrupt* を他のクラスのニューロンで異所発現させると、それらはクラス I のニューロンのように分岐の複雑度が低く、かつ受容野の狭い樹状突起を発達させた。この結果は *Abrupt* が、クラス I に特徴的な樹状突起のパターン形成プログラムを発動することを示唆する。

以上の解析と並行して、7 回膜貫通型カドヘリンが哺乳類神経細胞の突起形成に果たす役割も検討している。脳のスライス培養と DNA vector-mediated RNAi を用いたアプローチによる結果も報告する。

文献

Sugimura et al., Distinct developmental modes and lesion-induced reactions of dendrites of two classes of *Drosophila* sensory neurons. *Journal of Neuroscience*, in press.