

【 研 究 活 動 報 告 】

研究活動報告

〔 目 次 〕

分子生理研究系

神経機能素子研究部門	11
概 要	
バキュロウイルス発現系による ATP 受容体チャネル P2X ₂ 蛋白の精製 (久保義弘, 山本友美, 三尾和弘, 佐藤主税)	
代謝型グルタミン酸受容体 E238Q 変異体を持つ遺伝子改変マウスの作成 (久保義弘, 山本友美, 新石健二, 饗場篤)	
グルタミン酸脱炭酸酵素 67 の条件付ノックアウトマウスの作成 (柳川右千夫, 山本友美, 海老原利枝, 有田早苗, 八木健)	
FRET 法による光生理学的解析による代謝型グルタミン酸受容体の構造・機能相関の研究 (立山充博, 久保義弘)	
高分子量 G タンパク質 mOPA 1 によるミトコンドリア形態変化機構の解明 (三坂巧, 久保義弘)	
M-チャネルのムスカリニック刺激による電流変化の分子機構 (中條浩一, 久保義弘)	
自身の膜上発現密度に依存して変化するイオンチャネルポアの解析 (藤原祐一郎, 久保義弘)	
内向き整流性 K ⁺ チャネル (Kir2.1) のポア内面の電荷を帯びたアミノ酸残基の機能的意義 (藤原祐一郎, 久保義弘)	
全反射顕微鏡による ATP 受容体チャネルのリガンド投与における動的構造変化の解析 (岩井博正, 久保義弘)	
Protein kinase C による G 蛋白質共役型内向き整流性 K ⁺ チャネル抑制の機構 (長友克広, 久保義弘)	
分子神経生理研究部門	14
概 要	
bHLH 型転写制御因子 Olig3 の機能と細胞系譜の解析 (丁雷, 小野勝彦, 渡辺啓介, 田中謙二, 池中一裕)	
時期特異的遺伝子組み換え法を用いた脊髄の Olig2 細胞の系譜解析 (政平訓貴, 丁雷, 小野勝彦, 池中一裕)	
前脳基底部の Olig2 細胞のコリナージックニューロンへの分化 (古性美記, 小野勝彦, 政平訓貴, 池中一裕)	
X-gal 反応産物の電顕観察法の改良 (小野勝彦, 政平訓貴, 丁雷, 池中一裕)	
神経構築形成における長距離ガイダンス分子の役割の解明 (渡辺啓介, 小野勝彦, 池中一裕)	
モデルマウスを用いた脱髄の病態解明 (田中久貴, 馬堅妹, 山田元, 田中謙二, 池中一裕)	
脱髄モデルマウスを用いた再生治療研究 (東幹人, 等誠司, 池中一裕)	

- 成体脳に存在する神経幹細胞の維持のメカニズム解明
(東幹人, 等誠司, 池前一裕)
- 神経幹細胞の発生の分子機構の解明
(等誠司, 池前一裕)
- アストロサイトの分化, 発生様式に関する研究
(成瀬雅衣, 小川泰弘, 等誠司, 池前一裕)
- アストロサイト機能不全モデルマウスの開発
(田中謙二, 池前一裕)
- 脳の発生と糖鎖
(石井章寛, 等誠司, 鳥居知宏, Steven E. Pfeiffer, 池前一裕)
- 3D-HPLC によるマウス大脳皮質発達におけるシアル酸付加 N-結合糖蛋白質の糖鎖構造解析
(鳥居知宏, 石井章寛, 等誠司, 池前一裕)

細胞内代謝研究部門 19

- 概要
- マウス未成熟卵母細胞自発的カルシウム振動に対するエストロゲンおよびビスフェノール A の抑制効果
(毛利達磨, 吉田 繁)
- 伸展刺激に対する細胞移動の研究
(毛利 達磨, 曾我部 正博)
- 機械的力に対する細胞骨格と接着構造の応答の分子機構
(平田 宏聡, 曾我部 正博)

細胞器研究系

生体膜研究部門 21

- 概要
- 2 光子励起法による開口放出の研究
(河西 春郎, 根本 知己, 高橋 倫子, 岸本 拓也, 兒島 辰哉, 大嶋 章裕, 劉 婷婷, 畠山 裕康)
- 海馬錐体細胞スパインの研究
(河西 春郎, 松崎 政紀, 早川 泰之, 野口 潤, 安松 信明, 本蔵直樹)

機能協関研究部門 22

- 概要
- アポトーシス誘導性アニオンチャネル活性化における活性酸素種の役割
(清水貴浩, 沼田朋大, 岡田泰伸)
- 心筋細胞の容積感受性クロライドチャネルの分子実体は ClC-3 ではない
(Gong weiqin, 徐 洪涛, 清水貴浩, 岡田泰伸)
- マキシアアニオンチャネルと容積感受性クロライドチャネルのポアサイズの測定
(サビロブ・ラブシャン, 岡田泰伸)
- 大腸クリプトにおけるイオン分泌時の細胞容積調節機構の解明
(眞鍋健一, 清水貴浩, 森島 繁, 岡田泰伸)

生体情報研究系

感覚認知情報研究部門 26

- 概要
- 初期視覚系における輪郭線の折れ曲がりの表現
(伊藤 南)

下側頭皮質における色選択ニューロンの分布 (小松英彦, 安田正治, 鯉田孝和)	
色カテゴリー識別と色弁別時の下側頭皮質ニューロン活動 (鯉田孝和, 小松英彦)	
外側膝状体における色表現 (郷田直一, 小松英彦)	
V4 野と前頭眼野ニューロンにおける活動履歴の保存性 (小川 正)	
盲点における線分の補完知覚に対応したサル 1 次視覚野神経活動 (松本正幸, 小松英彦)	
神経シグナル研究部門	28
概要	
神経伝達物質のシナプス外拡散によって仲介される異種シナプス間相互作用 (佐竹伸一郎, 井本敬二)	
視床-大脳皮質神経回路の構造: 単一シナプスレベルでの構成 (井上 剛, 井本 敬二)	
不活性型 Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II α 遺伝子改変マウスを用いた脳機能解析 (山肩葉子, 井本敬二, 畑中伸彦, 八木 健, 小幡邦彦, 柳川右千夫)	
視床-大脳皮質ネットワークにおけるてんかん発生に関する研究 (佐々木 幸恵, 井本 敬二)	
視床興奮性シナプスのシナプス特性の解析 (宮田麻理子, 井本敬二)	
高次神経機構研究部門	30
概要	
CNR/プロトカドヘリン α 遺伝子の機能解析 (平林敬浩, 八木 健)	
プロトカドヘリン α 発現制御領域候補欠損マウスの作製 (金子涼輔, 八木 健)	

統合生理研究系

感覚運動調節研究部門	32
概要	
侵害刺激に伴う皮質活動の睡眠中の変化 (王晓宏, 乾幸二, 秋云海, 柿木隆介)	
ヒト第一次体性感覚野での顔の再現 (Nguym BT, Tran TD, 乾幸二, 宝珠山稔, 柿木隆介)	
事象関連電位を用いた二点識別認知過程の研究 (田村洋平, 宝珠山稔, 乾幸二, 中田大貴, 和坂俊昭, 尾島司郎, 井上聖啓, 柿木隆介)	
経皮的磁気刺激による A-delta 線維関連疼痛増強 (田村洋平, 宝珠山稔, 乾幸二, 中田大貴, 秋云海, 宇川義一, 井上聖啓, 柿木隆介)	
ヒト体性感覚野における階層的処理 (乾幸二, 王晓宏, 田村洋平, 金桶吉起, 柿木隆介)	
C 線維刺激に伴う皮質磁場反応に対する distraction の効果 (秋云海, 乾幸二, 王晓宏, Nguyen BT, Tran TD, 柿木隆介)	
体性感覚刺激による事象関連電位に対する Go/NoGo 課題の効果 (中田大貴, 乾幸二, 西平賀昭, 八田有洋, 坂本将基, 木田哲夫, 和坂俊昭, 柿木隆介)	

侵害刺激による皮質活動は運動によって修飾される

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

ランダムドット仮現運動知覚の時間構造

(久保田哲夫, 金桶吉起)

視覚逆行性マスキング現象の脳活動: 後続刺激の提示時間の違いによる影響

(橋本章子, 渡辺昌子, 柿木隆介, 宝珠山稔)

ヒト視覚腹側路における神経順応効果の時間的動態

(野口 泰基, 乾 幸二, 柿木 隆介)

生体システム研究部門 36

概要

脳深部刺激療法の作用機序に関する研究

(南部 篤, 橋 吉寿, 知見聡美, 高田昌彦, 喜多 均)

上肢到達運動課題実行中の線条体ニューロンの活動様式を解明する

(畑中 伸彦, 高良 沙幸, 橋 吉寿, 南部 篤)

顎運動に関わる多シナプス性神経回路の同定

(畑中 伸彦, 橋 吉寿, 南部 篤, 宮地 重弘, 高田 昌彦)

“間接路”を介した淡蒼球内節への運動情報伝達様式の解明

(橋 吉寿, 南部 篤)

大脳皮質機能研究系

脳形態解析研究部門 39

概要

グルタミン酸受容体の定量的解析

(田中淳一, 足澤悦子, 初山明子, 深澤有吾, 馬杉美和子, 重本隆一)

神経伝達物質放出関連蛋白質の局在

(萩原 明, 深澤有吾, 重本隆一)

海馬における長期増強現象とグルタミン酸受容体の密度変化

(深澤有吾, 重本隆一)

海馬 NMDA 受容体局在の左右差

(Wu Yue, 篠原良章, 重本隆一)

GABA_B 受容体やイオンチャネルの脳内局在と機能解析

(Akos Kulik, 萩原明, 深澤有吾, 重本隆一)

前脳基底核と黒質-線条体ドーパミン系の電気生理学のおよび形態学的解析

(初山俊彦)

大脳神経回路論研究部門 41

概要

皮質介在ニューロンの樹状突起分枝の定量的解析

(川口泰雄, 苅部冬紀, 窪田芳之)

VGLUT2 が入力する棘突起への抑制性入力について

(窪田 芳之, 根東 覚, 畑田 小百合, 川口 泰雄)

calretinin 陽性樹状突起への抑制性シナプス入力と興奮性シナプス入力の割合

(関川 明生, 窪田 芳之, 川口 泰雄)

皮質線条体システムにおける錐体細胞の多様性

(森島美絵子, 川口泰雄)

心理生理学研究部門 43

概要

空間パターンへの触覚弁別に関する脳神経基盤の非対称性

(原田 宗子, 定藤 規弘)

話し言葉における視聴覚間の感覚統合に関する神経基盤: fMRI を用いた研究

(斎藤大輔, 定藤 規弘)

ピアノ学習に伴う視覚聴覚統合に関与する神経活動

(長谷川 武弘, 定藤 規弘)

聴覚-視覚刺激対連合学習における脳活動変化

(田邊 宏樹, 定藤 規弘)

発達期における聴覚脱失による可塑的变化の年齢依存性

(定藤 規弘)

ICA による task-related motion artifact の除去

(河内山隆紀, 定藤規弘)

機能的 MRI を用いた脳局所間結合度の解析手法の開発

(山下宙人, 尾崎 統, 定藤 規弘)

触覚による粗さ評定に関する神経基盤の解析

(北田 亮, 定藤 規弘)

視覚刺激に対する NIR, fMRI 同時計測

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

運動学習転移における小脳の役割

(河内山隆紀, 松村道一, 米倉義晴, 定藤規弘)

マッカーロー効果をもちいたヒト色感覚にかかわる神経機構の解明

(守田知代, 松村道一, 米倉義晴, 定藤規弘)

両手協調運動における相転移現象に関わる神経基盤

(荒牧勇, 定藤規弘)

ブロードマン 6 野のもつ部位特異的認知機能とその有意性の検討

(本田 学, 田中 悟志)

超可聴域超高周波成分による行動制御メカニズムの基礎的検討

(本田 学, 中村 聡, 八木玲子, 森本雅子, 前川督雄, 仁科 エミ, 河合徳枝, 大橋 力)

カウンティングにおける運動前野の役割

(神作 憲司, Marie-Laure Grillon, 定藤 規弘, Ari Johnson, Mark Hallett)

単純反応時間課題遂行時の脳内情報処理

(神作 憲司, Mark Hallett)

発達生理学研究系

認知行動発達機構研究部門 49

概要

ラット上丘浅層からの投射ニューロンの樹状突起での活動電位開始の過分極活性化陽イオンチャネルによる調節

(遠藤利朗, 納富拓也, 足澤悦子, 重本隆一, 伊佐正)

上丘中間層 GABA 作動性ニューロンの特性

(Thongchai Sooksawate, 伊佐かおる, 伊佐 正, 小幡邦彦, 柳川右千夫)

遺伝子改変マウスを用いたサッカーボール運動制御機構の解析

(坂谷智也, 伊佐正)

皮質脊髄路損傷後における手の巧緻運動の機能回復
(西村幸男, 伊佐正, 森近洋輔, パーフィリエフ・セルゲイ, 尾上浩隆, 塚田秀夫)

サルを用いた盲視 (blindsight) の神経機構の解明
(吉田 正俊, 伊佐 正)

生体恒常機能発達機構研究部門 51

概要

発達期における神経伝達物質のスイッチング
(鍋倉淳一, 張 一成, 前島隆司, 石橋 仁)

細胞内 Cl⁻制御機構 KCC2 による GABA の興奮-抑制スイッチと分子機構の解明
(鍋倉淳一, 張 一成, 渡部美穂, 福田敦夫)

BDNF による大脳皮質細胞における GABA 受容体の細胞内動態と分子機構
(鍋倉淳一, 溝口義人, 平田雅人, 兼松 隆)

クリプトン-YAG レーザーを用いた脳虚血障害モデル動物作成技術の開発
(鍋倉淳一, 八尾博史)

生殖・内分泌系発達機構研究部門 53

概要

AMP キナーゼによる生体エネルギー代謝の調節機構
(箕越 靖彦, 岡本 士毅, 志内 哲也)

レプチン, 神経ペプチドによる糖・脂質代謝調節機構の解明
(箕越 靖彦, 志内 哲也, 斉藤 久美子)

視床下部腹内側核におけるエネルギー代謝調節作用とシグナル伝達機構
(箕越 靖彦, 岡本 士毅, 諸橋 憲一郎)

脳機能計測センター

形態情報解析室 55

概要

フォルムバル膜の膜厚安定性の検討
(山口 登, 有井達夫)

小腸絨毛上皮下線維芽細胞と吸収上皮細胞間の細胞間コミュニケーション
(古家園子, 古家喜四夫)

機能情報解析室 56

概要

意志に関する脳活動の研究
(達本 徹)

脳機能分子解析室 57

概要

外来 DNA に曝露した精子の顕微授精によるトランスジェニックラットの作製
(加藤 めぐみ, 金子 涼輔, 平林 真澄)

ドナーとレシピエントのラット系統は 1 細胞期卵から体外発育した桑実胚~胚盤胞の産仔発生に影響する
(加藤 めぐみ, 平林 真澄, 保地 眞一)

ラット M 期体細胞の核移植によるクローン個体作製の試み
(平林 真澄, 加藤 めぐみ, 保地 眞一)

統合バイオサイエンスセンター

時系列生命現象研究領域 59

概要

新規電位依存性タンパク VSP の分子機能

(岩崎 広英, 村田 喜理, 岡村 康司, 稲葉 一男)

中枢神経細胞の自発発火特性を規定する電位依存性ナトリウムチャネルの制御機構

(岩崎 広英, 岡村 康司, 高木 正浩, 白幡 恵美, 早坂 清)

ゼブラフィッシュ脊髄神経回路形成機構の解析

(東島 眞一, 木村 有希子)

尾索動物の運動機能を司る構成と原理の解明

(西野 敦雄, 東島 眞一, 岡村 康司, 勝山 裕)

戦略的方法論研究領域 61

概要

位相差電子顕微鏡の改良

(Radostin Danev, 杉谷正三, 永山國昭)

位相板用炭素薄膜の材料科学的研究

(内田 仁, 伊藤俊幸, 大河原 浩, 永山國昭, 宇理須恆雄)

DNA/RNA 塩基配列の電子顕微鏡 1 分子計測法の開発

(Krassimir Tachev, 高橋佳子, 大河原 浩, 永山國昭, 片岡正典, 田坂基行)

膜タンパク質 TRPM2 のフッ化界面活性剤による可溶化

(松本友治, 佐々木悠, 永山國昭, 原 雄二, 森 泰生)

灌流ラット顎下腺における水分調節機構

(村上政隆, 大河原浩, 細井和雄, Kwartarini Murdiastuti, Bruria Sachar-Hill, Adrian E. Hill)

灌流ラット顎下腺の細胞間分泌細管の各種薬剤による形態変化

(村上政隆, 前橋 寛, Alessandro Riva, Felice Loffredo, Francesca Testa-Riva)

質量分析顕微鏡の開発と応用

(瀬藤光利, 新聞秀一, 永山國昭, 吉田圭一, 小河 潔, 古田 大, 市村克彦)

単アミノ酸側鎖付加の分子機構の解明

(瀬藤光利, 新聞秀一, 福田義之, 池上 浩司, 松本 峰男, 矢尾育子)

エンドサイトーシス選別輸送のメカニズムと生理機能

(大橋正人)

生命環境研究領域 65

概要

カプサイシン受容体のリン酸化機構の解析

(Sravan Mandadi, 村山奈美枝, 富永知子, 富永真琴)

プロスタグランジンによる炎症性疼痛発生メカニズムの解析

(森山朋子, 東智広, 富樫和也, 杉本幸彦, 富永知子, 成宮周, 富永真琴)

TRPV4 結合蛋白質の解析

(東智広, 森山朋子, 富永知子, 富永真琴)

TRPV4 の体温制御機構への関与の解析

(三村明史, 森山朋子, 鈴木誠, 富永真琴)

新規温度感受性 TRP チャネルの探索

(富樫和也, 東智広, 富永知子, 森泰生, 富永真琴)

中枢神経系における温度感受性 TRP チャネルの発現と機能解析

(柴崎貢志, 富永真琴)

mDia 結合タンパク質の探索と機能解析

(島貫恵実, 富永知子)

神経回路形成における mDia を介する情報伝達経路の役割

(島貫恵実, 柴崎貢志, 富永知子)

動物実験センター 69
概要

計算科学研究センター 71
概要

核酸塩基識別子の設計と合成

(片岡正典, 永山國昭)

ユニバーサル核酸の創生

(片岡正典)

カルボン酸を用いる新規オリゴヌクレオチド合成法の開発

(片岡正典)

技術課 73

1. 概要

(大庭明生)

2. 施設の運営状況

①統合生理研究系

(1) 生体磁気計測装置室

(永田 治)

②脳機能計測センター

(1) 形態情報解析室

(山口 登)

(2) 機能情報解析室

(佐藤茂基)

(3) 生体情報処理室

(吉村伸明, 村田安永)

③生理研・基生研共通施設

(1) 電子顕微鏡室

(前橋 寛)

(2) 機器研究試作室

(加藤勝己)

④動物実験センター (岡崎共通研究施設)

(佐治俊幸, 廣江猛, 高橋知子, 窪田美津子)

分子生理研究系

神経機能素子研究部門

【概要】

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

今年度, 昨年度に引き続き, 神経機能素子の遺伝子の

単離, 変異体の作成, 光ラベルの付加等を進め, 卵母細胞, HEK293 細胞等の遺伝子発現系における機能発現の再構成を行った。また, 2 本刺し膜電位固定法, パッチクランプ等の電気生理学的手法, 細胞内 Ca^{2+} イメージング・全反射照明下での FRET 計測等の光生理学的手法, 細胞生物学的研究手法により, その分子機能調節と構造機能連関の解析を行った。また, 外部研究室との連携により, 構造生物学的アプローチ, 遺伝子改変マウスの作成も進めた。以下に具体的な研究課題とその内容を記す。

バキュロウイルス発現系による ATP 受容体チャネル P2X_2 蛋白の精製

久保義弘, 山本友美

三尾和弘, 佐藤主税 (産総研, 脳神経情報)

ATP 受容体チャネル P2X_2 は, 状況に依存して著しい構造変化を起こすことが示唆されているが, その3次元構造は明らかにされておらず, ストイキオメトリーについてさえ, 決定的な結論は出ていない。 P2X_2 受容体チャネルの動的構造変化を知るというゴールに向け, 単粒子構造解析によりアプローチすることを目的として P2X_2 受容体チャネル蛋白の精製を行った。まず, P2X_2 の N-もしくは C-末端に FLAG tag を付加したコンストラクトを作成し, 電気生理学的解析により, 正常な機能を

持つことを確認した。その後, cDNA をバキュロウイルスベクターに組み込み, 昆虫細胞 Sf9 に感染させ, 細胞膜上での蛋白発現を確認した。大量スケールでの感染 Sf9 細胞を回収し, FLAG 抗体によりアフィニティ精製した。SDS-PAGE の銀染色により単一の major band を確認した後, ゲル濾過により精製した。そのピーク分画を, 酢酸ウランにより負染色して電顕撮影したところ, 単一蛋白粒子と思われる像が観察された。

代謝型グルタミン酸受容体 E238Q 変異体を持つ遺伝子改変マウスの作成

久保義弘, 山本友美

新石健二, 饗場篤 (神戸大学大学院医学系研究科)

我々は先に, 代謝型グルタミン酸受容体 mGluR1 がグルタミン酸のみならず, 細胞外の Gd^{3+} によっても活性化されることを報告し, さらに, 点変異 E238Q によって, グルタミン酸に対する感受性は変わることなく, Gd^{3+} に

対する感受性が完全に消失することを見いだした。 Gd^{3+} は脳脊髄液に含まれていないため, mGluR1 の持つ Gd^{3+} 感受性の生理的意義は明らかでない。この点にアプローチするため, E238Q 変異を持つ遺伝子改変マウスの作成

に取り組んだ。mGluR1 の exon 2 を含む genomic clone に点変異を導入し、さらに cre-loxP 配列, DT-A 配列を挿入することにより target vector を作成した。これを ES 細胞

に遺伝子導入し、相同組み換え陽性の細胞株を同定した。これをマウス初期胚に注入し、オスのキメラマウス 2 匹を得、現在、交配を進めている。

グルタミン酸脱炭酸酵素 67 の条件付ノックアウトマウスの作成

柳川右千夫, 山本友美, 海老原利枝, 有田早苗, 八木健 (高次神経機構)

グルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD)67 は、グルタミン酸から GABA を合成する酵素である。GAD67 単純型ノックアウトマウスは、口蓋裂を示し、出生日致死となる。出生日以降の脳高次機能における GAD67 の役割を明らかにする目的で、テトラサイクリンシステムを利用した条件付 GAD67 ノックアウトマウス作成を目指した。最初に、GAD67 遺伝子にテトラサイクリンアクティベーター

を挿入したターゲティングベクターを構築した。このターゲティングベクターを ES 細胞に導入し、Southern 法で相同組み換えのおこった ES クローンを同定した。今後、この ES クローンを用いて、条件付 GAD67 ノックアウトマウスを得る。そして、同ノックアウトマウスについて行動解析などを行う。

FRET 法による光生理学的解析による代謝型グルタミン酸受容体の構造・機能相関の研究

立山充博, 久保義弘

代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR) は神経の可塑性に関わる膜機能蛋白質であり、複数の G 蛋白質 (Gq, Gs, Gi) と共役し様々な細胞応答をもたらす。Gq の活性化は細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) を上昇させ、Gs の活性化は細胞内 cAMP 濃度 ($[cAMP]_i$) を増加させる。 Ca^{2+} および cAMP は、それぞれ細胞内でのセカンドメッセンジャーとしてシグナル伝達に重要な働きを示す因子である。我々は、光生理学的手法により $[Ca^{2+}]_i$ と $[cAMP]_i$ を同時に測定す

ることで、mGluR による二つのシグナル伝達経路の活性化が、mGluR に対する作用物質のタイプにより異なることを見出した。また、FRET (Fluorescent resonance energy transfer) を用いることで、蛋白分子の構造変化を捉えることが出来るため、「作用物質のタイプによりもたらされる受容体の立体構造の差異が活性化されるシグナル伝達経路に差異を生じさせる」という可能性について検証を行っている。

高分子量 G タンパク質 mOPA 1 によるミトコンドリア形態変化機構の解明

三坂巧, 久保義弘

ミトコンドリアに局在する高分子量 G タンパク質 (mOPA1) は、遺伝子導入した COS-7 細胞中においてミトコンドリアの形状を粒状へと大きく変化させる働きを持つ。細胞内において mOPA1 タンパク質は 2 種の長さを示す (約 90, 80 kDa) が、本年度はこれら長さの異なる mOPA1 タンパク質の機能的差異について解析を試みた。アミノ酸点変異体を用いた解析より、2 種の長さをもつ

mOPA1 が 2 種類の N 末端のプロセッシングにより生ずること、およびその切断に関与するアミノ酸残基を明らかにした。また COS-7 細胞に遺伝子導入した際に観察されるミトコンドリア形態変化は、90 kDa のみと 80 kDa のみを発現させたときには大きく異なったことより、N 末端プロセッシングによる mOPA1 の機能調節機構の存在が示唆された。

M-チャンネルのムスカリニック刺激による電流変化の分子機構

中條浩一, 久保義弘

M 電流を担う KCNQ チャンネルはムスカリン性アセチルコリン受容体の活性化によって抑制をうけることが知られているが、この抑制機構には、PIP₂の分解によるものであるという説と、PKCによるリン酸化によるものであるという説が存在する。そこで、アフリカツメガエルの卵母細胞に KCNQ チャンネルを発現させ、PKC を活性化した場合と PIP₂ 量を減らした場合で KCNQ チャンネルにどのような変化が生じるかを検討した。PMA によ

て PKC のみを活性化させた場合、KCNQ チャンネル電流の G-V (コンダクタンス-電圧) 関係が脱分極側に+20mV シフトした。一方、PIP₂の量を wortmannin によって減少させると、それに伴って最大電流量が減少したが、G-V 関係には変化が認められなかった。以上の結果、PIP₂、PKC とともに KCNQ チャンネルの抑制に関わるが、それぞれ異なる機構でチャンネルを抑制していることが明らかとなった。

自身の膜上発現密度に依存して変化するイオンチャンネルポアの解析

藤原祐一郎, 久保義弘

P2X₂ 受容体は ATP をリガンドとするイオンチャンネル型受容体で、神経系に広く分布し速いシナプス伝達を司る神経伝達素子として機能する。我々は ATP 投与後の定常状態における P2X₂ 受容体の電流を 2 本刺し膜電位固定下で記録し、その整流性のバラツキを解析したところ、「発現密度の上昇にともない整流性が減弱する」ということを発見した。これを手がかりに P2X₂ 受容体の種々

の性質(リガンド感受性やイオン選択性など)を発現レベルとの関連において解析した。それにより「膜上に存在する「開状態」のチャンネルの密度に依存して P2X₂ 受容体はポアの上において構造変化を引き起こし、ポアの性質やリガンド感受性が動的に変化する」という結果を得た。

内向き整流性 K⁺チャンネル (Kir2.1) のポア内面の電荷を帯びたアミノ酸残基の機能的意義

藤原祐一郎, 久保義弘

近年の構造生物学の進歩によって内向き整流性 K⁺チャンネル (Kir) はその他の K⁺チャンネルと異なり、膜貫通領域だけでなく細胞内領域にもポアを持ち、その内壁には正、あるいは負に帯電したアミノ酸残基が複数存在することが明らかとなった。我々は、解かれた Kir3.1 の構造を鋳型としてホモロジーモデリングを Kir2.1 細胞内領域に対して行い、あわせて網羅的に変異体を作成し電気生理学的手法を用いて、Kir2.1 の細胞内ポア表面に存在する

電荷の役割を解析した。それにより、「細胞内に延びた長いポアの表面が負に帯電していることでたくさんの K⁺が溜まり、ブロックがかかる際に静電場を横切る総電荷数が増えるため強い電位依存性ブロックが生じる」という結果を得た。これは Kir に特徴的な負に帯電した長いポアが心筋活動電位 IK₁ 電流の発生に効果的に寄与していることを示唆する。

全反射顕微鏡による ATP 受容体チャネルのリガンド投与における動的構造変化の解析

岩井博正, 久保義弘

ATP 受容体チャネル P2X は, ATP 投与後の時間経過と共に ion selectivity が著しく変化することが知られている。この ATP 投与後の時間経過に伴う動的構造変化の解析を試みた。P2X₂ サブユニットの N もしくは C 末端の細胞内領域に YFP を融合させた蛋白を発現させる cDNA を作成し, 培養細胞に発現させて検討を行った。その結果, C 末端に YFP を融合させたコンストラクトにおいては, 全反射顕微鏡による膜表面の発現蛋白の蛍光強度が,

ATP 投与後の時間経過に伴って減少し, その減少は可逆的なものであるという知見を得た。一方, N 末端に YFP を付加したコンストラクトでは蛍光強度の変化は見られなかった。以上より, ATP 投与後, 時間経時的に C 末端が膜から遠ざかる方向へ動くことが示唆された。今後 CFP と YFP の両方を付加したコンストラクトを作成し FRET 法による詳細な解析を進める計画である。

Protein kinase C による G 蛋白質共役型内向き整流性 K⁺チャネル抑制の機構

長友克広, 久保義弘

Gq 応答後の G 蛋白質共役型内向き整流性 K⁺チャネル (GIRK) の抑制機構を Protein kinase C リン酸化による側面から検討した。今まで指標とされていた GIRK 電流量の変化だけでなく GIRK への Gβγ の結合度合に注目した。Gi 系作用薬添加による GIRK 電流の増加相から結合速度 (τ_{on}) が, また作用薬除去による GIRK 電流の減少相から解離速度 (τ_{off}) が分かる。前もって Gq 刺激 (前 Gq 処理) を行うことにより, Gi 刺激時の GIRK 電流量が減少し,

τ_{on} が遅くなり, τ_{off} が速くなった。PKC の影響を調べるために, PMA による前処理を行ったところ, 前 Gq 処理と同様の結果が得られた。電流量抑制に重要な PKC リン酸化部位を変異させた点変異体では, 各パラメータに対する前 Gq 処理, PMA 処理による効果は見られなかった。以上の結果から, リン酸化により Gβγ 結合サイトに構造変化が生じ, Gβγ が結合しにくく, 外れやすくなったことが示唆された。

分子神経生理研究部門

【概要】

分子神経生理部門では哺乳類神経系の発生・分化, 特に神経上皮細胞 (神経幹細胞) からどのようにして全く機能の異なる細胞種 (神経細胞, アストロサイト, オリゴデンドロサイトなど) が分化してくるのか, について研究を進めている。また, 得られた新しい概念や技術は臨床研究への応用を視野に入れながら, 病態の解析にも努力している。

脳神経系では他の組織とは異なり多様性が大きい。大きさに言えば, 神経細胞は一つ一つが個性を持っており, そのそれぞれについて発生・分化様式を研究しなければならない程である。また, 均一であると考えられて

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

近年, 成人脳内にも神経幹細胞が存在し, 神経細胞を再生する能力を有することが明らかとなった。この成人における神経幹細胞数の維持機構についても研究している。

糖蛋白質糖鎖の解析法を開発し、その生理学的意義について検討している。ヒト正常脳においてはその発現パターンが個人間で驚くほど一定に保たれており、現在考えられているより、もっと重要な役割を果たしている

と思われる。事実各種神経変性疾患においてその発現パターンが変化していた。病態時における糖鎖異常にも着目して研究している。

bHLH 型転写制御因子 Olig3 の機能と細胞系譜の解析

丁雷, 小野勝彦, 渡辺啓介, 田中謙二, 池の中一裕

発生期の脊髄では、背側部と腹側部からの形源分子により、その濃度依存的に特異的な転写因子を発現するようになり、細胞特異的分化が引き起こされる。Olig3 遺伝子は bHLH 型転写調節因子で、脊髄では背側端部より発現が始まる。その機能や細胞系譜を明らかにするため、Olig3-lacZ ノックインマウスを作製し解析を行ってきた。その結果、脊髄背側部に由来する Olig3 細胞は、胎齢 9.5 日までさらに出現して腹側方向への移動を開始し、24 時

間後には脊髄の腹側部まで到達することが示唆された。これらの細胞は、転写因子の発現パターンから介在神経に分化する可能性が示された。これらに加えて、Olig3 系譜細胞が後正中中隔(アストログリアの一種により構成される)を構成することも示された。したがって脊髄背側部の Olig3 系譜細胞が背側部介在神経およびアストログリアに分化することが明らかになった。

時期特異的遺伝子組み換え法を用いた脊髄の Olig2 細胞の系譜解析

政平訓貴, 丁雷, 小野勝彦, 池の中一裕

Olig2 は bHLH 型の転写因子で、その欠損マウスの脊髄では運動ニューロンとオリゴデンドロサイトの両方を欠くことから、その両者の分化誘導に必須であることが明らかにされた。我々は、タモキシフェン誘導型 Cre リコンビナーゼを Olig2 遺伝子座にノックインされたマウスとレポーターマウスと交配させて時期特異的遺伝子組み換えを誘導し、Olig2 系譜細胞を解析した。

その結果、胎生早期の Olig2 細胞からは運動ニューロ

ンおよびオリゴデンドロサイト、アストロサイト、上衣細胞が分化した。一方、胎生中後期のものからはグリア細胞のみ分化した。Olig2 系譜の細胞がアストロサイトや上衣細胞に分化することは、この実験で初めて明らかにされた。今後は、単一 Olig2 細胞が 3 ないし 4 種のすべての細胞種を産生するのか、または Olig2 細胞が、すでにニューロン系譜、グリア系譜がわかれているかという課題について検討していく。

前脳基底部の Olig2 細胞のコリナージックニューロンへの分化

古性美記, 小野勝彦, 政平訓貴, 池の中一裕

Olig2 は発生期のすべての中枢神経領域で発現しているが、脊髄と後脳の一部を除いて、細胞系譜や機能に関してほとんど解析が進んでいない。発生期の終脳領域ではその腹側部で強い Olig2 の発現が見られる。脊髄や後

脳後部では Olig2 細胞の一部がコリナージックニューロン(Ch 細胞)に分化することから、終脳における Olig2 系譜の細胞の Ch 細胞への分化を調べた。その結果、胎生早中期に Olig2 を発現している細胞の中に、前脳基底部

におけるCh細胞に分化するもの見い出された。少なくとも一部のOlig2細胞は前脳基底部でもコリナージックニューロンに分化することが明かとなった。Olig2欠損マウスでは、前脳基底部におけるCh細胞の分化調節転写因

子(Nkx2.1, Lhx8等)の発現に大きな変化が見られないことから、Olig2はこれらの転写因子とは独立もしくは相補的に機能している可能性が考えられる。

X-gal 反応産物の電顕観察法の改良

小野勝彦, 政平訓貴, 丁雷, 池の中一裕

X-gal 組織化学染色した組織を電子顕微鏡で観察する場合に、通常の手順でエポキシに包埋すると弱い反応産物は消失することが知られていた。メタクリル酸ヒドロキシプロピルは、従来よりプラスチック皿の上で培養された細胞をエポキシ樹脂に包埋する際に用いられてきた透徹置換剤で、プラスチックを溶かすこと無しに細胞を包埋することができる物である。我々は、これをX-gal染色された組織に透徹置換剤として用いることにより、

X-gal 反応産物をほとんど減弱することなく電顕用に処理することができることを見出した。その結果、X-gal陽性を示す脳室面の細胞がいわゆる幼弱な放射状グリアではなく、成熟した上皮細胞であることを微細形態の特徴から明らかにした。この手法は、40年近く前に培養細胞の観察法として報告されていた方法をそのまま適用したものであるが、X-gal染色後の電子顕微鏡観察に広く有効なものであると思われる。

神経構築形成における長距離ガイダンス分子の役割の解明

渡辺啓介, 小野勝彦, 池の中一裕

Netrin-1(Ntn1)は発生期に神経管の腹側正中部(底板)に発現し、軸索を誘因または反発させることで神経回路の形成に深く関わる。我々は、Ntn1欠損マウスを入手し、その詳細な解析を行った。その結果、脊髄背側において一次求心性線維(DRG axon)によって形成される後索が著しく乱れていることを見出した。さらに、この乱れがDRG axonの脊髄後角への投射が野生型より早期におこることによるためであること、Ntn1はDRGからの突起

形成を抑制すること、を明らかにした。この結果から、脊髄後角でみられるNtn1の一過性発現の欠損により線維投射異常が生ずる可能性が強く示唆された。DRG axonの脊髄への投射時期にみられるwaiting periodの分子機構をin vivoで説明できる分子は長い間不明であったが、この結果からNtn1がその候補分子であることが強く示唆された。

モデルマウスを用いた脱髄の病態解明

田中久貴, 馬堅妹, 山田元, 田中謙二, 池の中一裕

脱髄モデルマウスであるPLPトランスジェニックマウス(PLPTg)は2ヶ月齢までに一度髄鞘がほぼ正常に形成され、Na⁺チャンネル、K⁺チャンネルはそれぞれ正常にクラスタリングする。5ヶ月齢頃から脱髄が始まり、K⁺チャネ

ルのクラスタリングが崩れはじめ、8ヶ月齢までにNa⁺チャンネルのクラスタリングも崩壊していく。これらの変化と跳躍伝導の相関を調べるために、中枢神経系(後索路、前庭・網様体脊髄路、錐体路)の解析を行ったところ、

野生型に比べPLPTgでは2ヶ月齢においても著明な伝導速度の低下と相対不応期の延長を認めた。PLPTg2ヶ月齢で、*paranode*の構造異常が認められた。

跳躍伝導速度の低下が、行動にどのような変化として

現れるか、京都大学 宮川剛博士と共同で行動解析を行った。一般の運動能力、探索行動、不安行動、情動反応は野生型と比べて変化が無かった。唯一の有意な変化はバーンズ迷路で参照記憶の障害が見られたことであった。

脱髄モデルマウスを用いた再生治療研究

東幹人, 等誠司, 池田一裕

神経幹細胞は自己複製能と多分化能を持つ未分化な細胞である。脳の発生期だけでなく、正常の成体の脳においても特定の領域に存在し続け、神経新生を行っている。多発性硬化症を代表とするヒトの脱髄性疾患は、神経軸索を覆って保護するとともに跳躍伝導を可能にしている髄鞘が破壊され、迅速な神経伝達が失われる病態である。我々は上述の脱髄モデルマウスを用いて、脱髄病態における神経幹細胞の動態と、神経幹細胞移植による再ミエリン形成のメカニズムの解明を行っている。この際、

5-bromo-2'-deoxyuridine(BrdU)をもちいて病態脳での内在性神経幹細胞を検出し、また移植では成熟したオリゴデンドロサイトで発現するプロモーター配列の下流にLacZレポーター遺伝子をもつマウスから神経幹細胞を調製し、脱髄モデル動物にこのレポーター遺伝子を持つ神経幹細胞の移植を行っている。この結果、移植した神経幹細胞は脳内に生着し、成熟したオリゴデンドロサイトへの分化が認められた。

成体脳に存在する神経幹細胞の維持のメカニズム解明

東幹人, 等誠司, 池田一裕

発達期の脳のみならず、成体の脳にも神経幹細胞は存在し、脳の一部の領域（海馬や嗅球など）に新生神経細胞を供給していることが近年明らかになった。特に、海馬における神経新生は、記憶や学習といった脳の高次機能と関係する可能性が指摘されている。成体脳の側脳室周囲組織に存在する神経幹細胞は、さまざまな条件（変化に富む飼育環境や運動・学習負荷など）によって変動

することが報告されているが、本グループはストレスに注目して神経幹細胞に対する効果を検討している。強制水泳などのストレス負荷マウスモデルを用い、ストレスが神経幹細胞の自己複製能を低下させる可能性や、抗うつ薬や気分安定薬などの向精神薬が神経幹細胞の減少を回復させる可能性を示唆するデータを得ており、そのメカニズムも含めて今後も精力的に解析していく。

神経幹細胞の発生の分子機構の解明

等誠司, 池田一裕

我々はこれまでに、ES細胞から神経幹細胞を誘導する技術を確立した。脳に存在する神経幹細胞に比べてより高い多分化能を示すことから、神経幹細胞の前段階にある未分化神経幹細胞と考えられる。未分化神経幹細胞は

発生初期の胚の中にも存在する。早期胚のepiblastをleukemia inhibitory factor存在下で培養すると、浮遊細胞塊を形成することで未分化神経幹細胞が検出できる。未分化神経幹細胞はin vitroで神経幹細胞へと分化させる

ことができ、この過程に Notch シグナルの活性化が必須であることも解明した。今後はこの *in vitro* 分化系を利用して、ES 細胞から未分化神経幹細胞、未分化神経幹細胞から神経幹細胞への分化過程で発現変化する遺伝子群を同

定し、その役割の解明を進めていく。また、ES 細胞から神経幹細胞への分化に従って発現が変化する糖鎖構造の同定およびその機能解明を行なう。

アストロサイトの分化、発生様式に関する研究

成瀬雅衣, 小川泰弘, 等誠司, 池田一裕

中枢神経系発生過程において、神経幹細胞はまず神経細胞を産生し、その後グリア細胞を産生する。神経幹細胞/神経前駆細胞からアストロサイト・オリゴデンドロサイトへの運命決定の機構に関しては、不明な点が多い。われわれはプロテアーゼインヒビターであるシスタチン C に着目して研究をおこなってきた。シスタチン C は、アストロサイトの発生・分化を制御する因子として当研究室で独自に単離された因子である。シスタチン C は、胎仔期の神経幹細胞の増殖、生存に促進的に作用する機

能を持つこと、アストロサイトの分化を促進し、オリゴデンドロサイトの分化を抑制する機能を有することが培養系において示された。またオリゴデンドロサイトが発生する時期のマウス胎仔脳においてシスタチン C とオリゴデンドロサイトの発生に関係が深い転写因子 *Olig2* の発現が相補的な部位が観察された。以上の点からシスタチン C が *Olig2* の発現を制御することで神経幹細胞/神経前駆細胞からアストロサイト・オリゴデンドロサイトへの運命決定の一部を担っている可能性が示唆された。

アストロサイト機能不全モデルマウスの開発

田中謙二, 池田一裕

アストロサイト特異的疾患として知られている Alexander 病のモデルマウスを作出し、その表現型を解析することによって、アストロサイトの *in vivo* における機能発現を調べることを目的とした。

Alexander 病の原因遺伝子である変異 GFAP をマウス GFAP プロモーター制御下で発現するトランスジェニックマウスを作出した。海馬などの GFAP プロモーターの活性の高い部位において Rosenthal fiber 類似の GFAP 凝集体を形成し、Alexander 病の病理所見を再現するものと

考えられた。GFAP 凝集体の存在が、アストロサイトのどのような機能を障害しているか調べるために、けいれん薬に対する応答を検討した。カイニン酸投与では、より低い投与量でけいれん誘発が有意に観察され、けいれん後の海馬錐体細胞死も有意に認められた。

このような神経伝達調節の異常が、脳機能発現、すなわち行動や情動反応にどのような変化をもたらすのか検討していく予定である。

脳の発生と糖鎖

石井章寛, 等誠司, 鳥居知宏, Steven E. Pfeiffer, 池田一裕

すべての細胞表面は糖鎖で覆われており、細胞間相互作用やシグナル伝達に深く関わっている。これまでに我々は(1) マウス、ヒト脳内に発現する糖鎖の割合は高

い類似性示すこと、(2) 脳内糖鎖発現パターンは個体発生の各時期で劇的に変化することを明らかとした。マクロアレイ解析システムを開発し、神経変性疾患、細胞の分

化などに伴う糖鎖パターンの変化を遺伝子発現レベルでも理解できるようになった。

本年度は髄鞘における糖鎖の意義を解明するために、髄鞘形成時、形成前後の正常マウスからスクロースグラジエント法を用いて髄鞘を抽出し、糖鎖の発現解析を行った。その結果、全脳に比べて髄鞘に増加あるいは減少

する糖鎖構造がある事が分かり、髄鞘形成と糖鎖発現の関係を明らかにできる。さらに、脳の形成、発達における糖鎖の意義を解明するために、発達期マウス脳における糖鎖発現を解析した。その結果、いくつかの糖鎖の発現量が顕著に変化することが明らかとなった。

3D-HPLC によるマウス大脳皮質発達におけるシアル酸付加 N-結合糖蛋白質の糖鎖構造解析

鳥居知宏, 石井章寛, 等誠司, 池田一裕

これまで当研究室では、大脳皮質に発現している糖鎖の解析を 2D-HPLC で網羅的に行い、主要な糖鎖の骨格を同定してきた。しかし糖鎖の末端に付加し細胞間接着や運動などに関与しているシアル酸の重要性から、さらに詳細な解析方法である 3D-HPLC でシアル酸付加糖鎖の構造解析を行った。このシステムにより酸性糖鎖の解析が可能になり大脳皮質の発達過程において劇的シア

ル酸付加する酸性糖鎖を同定した。その糖鎖は胎生期ではシアル酸が付加されているものの成体の大脳皮質では全く付加されていない。この結果よりその糖鎖や付加されている蛋白質の重要性が示唆され、その蛋白質を同定しその機能解析を行い糖鎖の生理的意義を明らかにする。

細胞内代謝研究部門

【概要】

細胞がエネルギーを消費しながら、刺激に対し適切に応答する細胞シグナリング機構を解明することは生命科学の最終目標の一つであり、本部門もそれを目指している。本部門では、電気生理学と先端バイオイメージングを用いてイオンチャネルや細胞内シグナル分子の動態を測定し、細胞応答に至るシグナルネットワークの時空間

統御機構の解明を行う。これまで受精時の Ca^{2+} 増加や Ca^{2+} 振動機構の研究を通して受精機構の研究、卵成熟機構の研究をおこなってきた。特にマウス卵母細胞の自発的 Ca^{2+} 振動機構、内分泌攪乱物質（エストロゲン）の卵母細胞への影響について調べた。さらに、機械刺激に対する細胞シグナリング機構の研究を展開している。

マウス未成熟卵母細胞自発的カルシウム振動に対するエストロゲンおよびビスフェノール A の抑制効果

毛利達磨

吉田 繁（近畿大学・理工学部・生命科学科）

哺乳類の成熟卵は受精時にカルシウム振動をすることが知られているが未成熟卵母細胞（以下単に卵母細胞と呼ぶ）も自発的カルシウム振動を示していることが報告された。しかしそのカルシウム振動の機構については不明である。卵母細胞は受精能を獲得するために様々なホルモンの制御を受けて卵巣内で成熟する。卵母細胞の成

熟や卵胞の発達は卵胞刺激ホルモンや黄体形成ホルモンの制御によりなされるが、詳しい機構についてはまだ不明な点が多い。例えば、エストロゲンの濃度の増加は排卵の引き金である黄体形成ホルモンの一過性分泌を引き起こすが、どのように卵母細胞の発達に関係しているのかははっきりしていない。従って、エストロゲン類似内分

泌かく乱物質の卵母細胞に対する作用を調べることは生殖毒性学の研究としてだけでなく基礎的な生殖生理学にとっても重要な課題である。本研究でエストロゲン以外

に内分泌攪乱物質ビスフェノールAのカルシウム振動に対する抑制効果を確認した。

伸展刺激に対する細胞移動の研究

毛利 達磨
曾我部 正博

細胞の移動は損傷した組織の修復や血管の新生のためだけでなくあらゆる細胞が組織の形態をなすために普遍的な反応である。多細胞生物の組織は、細胞と細胞外マトリックス(コラーゲンなどの線維状タンパク質, 基質)によってできており, それらの接着はインテグリン(接着蛋白質)を中心に細胞膜を貫き細胞外マトリックスと結合して細胞接着斑を形成している。細胞移動(運動)は細胞の連続的な変形なので, 細胞の形やその運動を考える時, 接着斑やストレス線維, 微小管などの細胞骨格タンパク質の分布を知ることは非常に重要である。移動中の細胞ではストレス線維の配向や接着斑の分布変更が起こり, 移動の先端部の薄く延びたラメリポディアでは絶えず膜がラフリングの形態を示している。基質上に

臍帯静脈血管内皮細胞を2次的に培養し, 傷をつけてその治癒過程, 即ち細胞の移動過程を研究した。創傷部位を含む組織全体を創傷の方向と直角に機械的持続的に伸展しておく, 細胞の移動は伸展しない場合に比べて著しく促進することがタイムラプス記録の解析から認められた。この機構については不明であるが, 細胞には外界の力の場を常にモニターするセンサーがあり, そのシグナルを統合して反応する仕組みがあると考えられる(仮説)。この仮説に基づき, 持続的伸展刺激に対する細胞移動時の接着斑と細胞骨格の動態の解析から機構解明を目指している。そのため, 細胞接着斑, 細胞内カルシウム, および細胞骨格動態のライブイメージングを始めた。

機械的力に対する細胞骨格と接着構造の応答の分子機構

平田 宏聡
曾我部 正博

接着性細胞は周囲の力学環境に応じて細胞骨格や接着構造をリモデリングする。例えば, 内皮細胞は一軸周期伸展刺激に対して細胞が伸展軸に垂直に伸張する応答を示すが, この際, 細胞内のストレスファイバーとそれにリンクした接着斑は伸展軸に垂直になるように分布を変える。しかし力学環境の感知機構が不明であり, 力学環境変化に対する細胞骨格・接着構造の応答の分子機構は謎のままである。我々はこれまでに, 細胞膜に穴をあ

け細胞質中の可溶成分を除いたセミインタクト細胞を用いて, アクチンフィラメントとミオシンからなる網目構造が, そこにかかる張力に応じてストレスファイバー様の構造に再編成されることを明らかにした。現在は, 細胞接着を担うインテグリン分子及びその結合タンパク質に着目して, 機械的力を感知する分子機構について明らかにしようと研究を進めている。

細胞器官研究系

生体膜研究部門

【概要】

当部門では、開口放出とシナプス機能を2光子顕微鏡法を活用し、更に分子生物学的方法論、パッチクランプ、ケイジド試薬や電子顕微鏡を組み合わせ可視化定量化する研究を推進している。本年度は、脳スライス標本内の中枢神経細胞において、ケイジドグルタミン酸の光活性化法により、単一シナプスレベルで刺激を与え、形態可

塑性の誘発に成功した。この可塑性には長期増強という機能可塑性が随伴していることが明らかとなった。また、2光子励起法による開口放出測定とGFP標識蛋白質の蛍光観察を組み合わせた結果、膵臓ランゲルハンス島において、SNARE分子が膵臓線細胞においてはアクチンが開口放出に伴い動く様子を初めて捉えることに成功した。

2光子励起法による開口放出の研究

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

2光子励起法による定量的開口放出測定に、GFP標識蛋白質を用いた同時染色により、開口放出関連蛋白質の動態を明らかにする研究を推進した。膵臓ランゲルハンス島標本においては、逐次開口放出現象が稀に見られることを見出した。これを利用して、逐次開口放出と開口放出関連蛋白質SNAP25の関連を調べた結果、小胞が逐次開

口放出を誘発した場合にのみSNAP25が側方拡散により顆粒膜に入ることを可視化するのに成功した。これは、開口放出に伴うSNAREの動きを捉えた初めての研究となった。また、膵臓外分泌腺標本において開口放出に伴うアクチン細胞骨格の新しい再編成機構を解明し、急性膵炎の発症に関係する可能性を明らかにした。

海馬錐体細胞スパインの研究

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

学習刺激に伴うシナプスの形態可塑性については多くの報告があったが、どのような形態変化がシナプスの機能変化を伴うかは不明だった。我々は、2光子励起法による単一スパインへのグルタミン酸による反復刺激と脱分極の同時投与(2光子ペアリング)により、刺激したスパイン選択的に頭部が速く増大し、その後長期間安定化する事実と、その際グルタミン酸感受性の増大を伴うことを見出した。この研究は、単一シナプスレベルで長期増強

(LTP)の誘発に成功した初めての研究であり、長期増強の基盤となる形態変化があること、そしてシナプスの独立可変性を初めて立証したものである。面白いことに、大きいスパインの増大は長期化せず、大きいスパインは安定であり記憶痕跡として働く可能性が示唆された。一方、小さなスパインは長期可塑性の好発部位で不安定であり、学習過程により特化していると考えられる。

機能協関研究部門

【概要】

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

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

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

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

④「消化管上皮細胞の分泌・吸収メカニズム」についても研究する。

アポトーシス誘導性アニオンチャネル活性化における活性酸素種の役割

清水貴浩, 沼田朋大, 岡田泰伸

細胞死と細胞容積調節機構は密接に関連している。アポトーシス初期に観測される細胞縮小化(Apoptotic Volume Decrease: AVD)は、細胞がアポトーシス死するためのきわめて重要な現象であり、主に K^+ と Cl^- コンダクタンスの増加によるイオン流出の結果として生じる。しかしながら、どの種のアニオンチャネルが関与しているのかについてはほとんど知られていなかった。今回我々は、ミトコンドリア系およびデスレセプター系アポトーシス誘導剤が容積感受性外向き整流性 (Volume-Sensitive

Outward Rectifying: VSOR)アニオンチャネルの活性化を生じたことから、VSORチャネルの異常活性化がこのAVDの原因であることを明らかにした。また、ミトコンドリア仲介性アポトーシス誘導の場合のVSORアニオンチャネル活性化シグナルは活性酸素種(ROS)であり、このROSの除去や産生阻害によりAVD及びアポトーシス死が抑制されることが明らかとなった。本研究結果は次の論文に発表された: Shimizu, Numata & Okada 2004 PNAS 101:6770-6773.

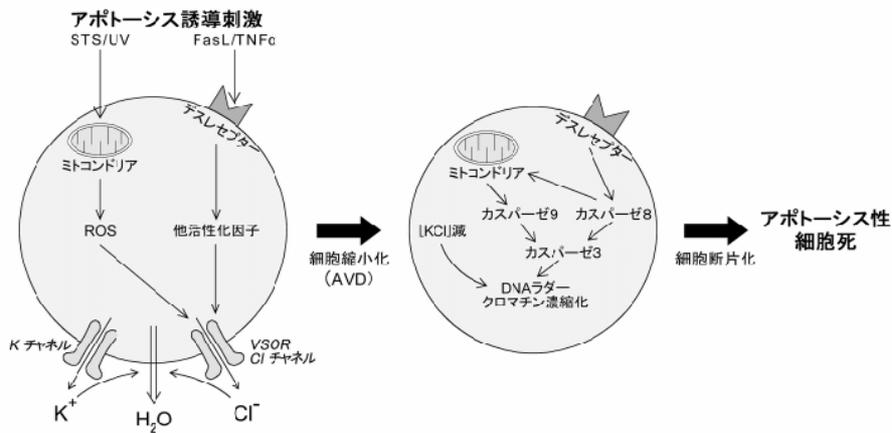


図1：アポトーシス誘導メカニズムにおけるアニオンチャネル及びROSの役割

心筋細胞の容積感受性クロライドチャネルの分子実体はCIC-3ではない

Gong weiqin, 徐 洪涛, 清水貴浩, 岡田泰伸

容積感受性外向整流性 Cl⁻チャネル (VSOR) は心筋細胞を含めて殆んどすべての動物細胞に発現し、浸透圧性膨張後の容積調節や細胞分裂やアポトーシス死にも関与する重要なチャネルであることが知られているが、その分子実体の同定は未だ行われていない。VSOR の分子実体候補としてこれまで3種の蛋白がいずれも Nature 誌で提唱された。即ち、P 糖蛋白 (Valverde et al. 1992 Nature), pI_{Cl} (Paulmichl et al. 1992 Nature), CIC-3 (Duan et al. 1997 Nature) である。前2者ではないことは、本研究の出発点です。すでに私達や Nilius のグループを中心にして明らかにされていた (see Okada 1997 Am J Physiol)。その後、広く信じられるようになったのが CIC-3 説であるが、私達は同定基準のすべてを満たさないで、未だ結論には留保すべきであると主張してきた (Okada et al. 1998 J Gen Physiol)。その後、CIC-3 ノックアウトマウスを用いた研究によって肝細胞や膵腺細胞の VSOR 活性に影響の見られないことが Jentsch のグループによって報告され

(Stobrawa et al. 2001 Neuron), そもそも CIC-3 説の出所であった心筋においてのみ CIC-3 が VSOR である可能性が残っている状況となった。そこで、私達は東医歯大の佐々木・内田のグループとの共同研究によって心筋細胞における VSOR は CIC-3 によって担われるかどうかを、CIC-3 ノックアウトマウスを用いて検討した。その結果、CIC-3 ノックアウトマウスから単離された心室筋細胞 (-/-) も、正常の Wild type マウスから単離された心室筋細胞 (+/+) も、共に浸透圧性細胞膨張によって活性化される Cl⁻チャネル電流を示し、それらは全く同一の電気生理学的性質 (例えば、電圧依存性: 図 2A) と薬理的性質 (例えば、キナーゼ活性化剤 PMA による活性亢進: 図 2B) を示すことが明らかになった。それゆえ、CIC-3 は心筋細胞においても VSOR の分子実体ではないことが確定した。これらの結果は次の論文に報告された: Gong, Xu, Shimizu, Morishima, Tanabe, Tachibe, Uchida, Sasaki & Okada 2004 Cell Physiol Biochem 14:213-224.

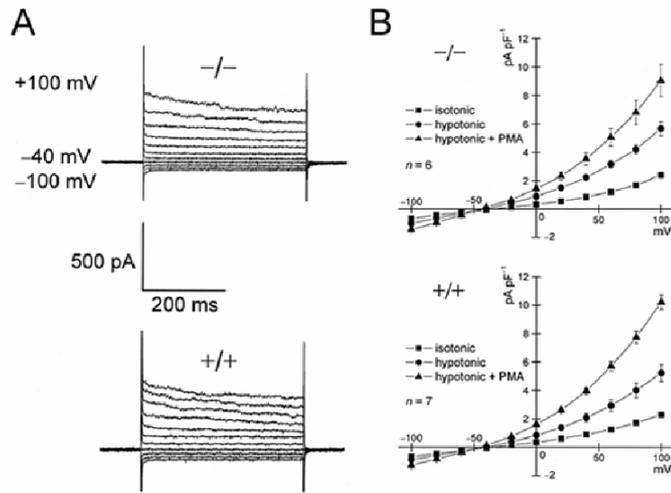


図2：正常マウス(+/+)及びCIC-3ノックアウトマウス(-/-)の心筋細胞における細胞膨張で活性化されるCl⁻チャンネル電流の全細胞記録 A, 電圧ステップパルスに対する電流応答 B, 電流電圧特性とPMA効果

マキシアニオンチャンネルと容積感受性クロライドチャンネルのポアサイズの測定

サビロフ・ラブジャン, 岡田泰伸

ストレス時に細胞内から放出されるATPは細胞間シグナル伝達に重要な役割を果たす。その放出機序はエキソサイトーシスによるものとそうでないものがある。後者の通路としてマキシアニオンチャンネルが多くの場合に関与することを私達は提唱してきた(Sabirov et al. 2001 J Gen Physiol; Sabirov & Okada 2004 Jpn J Physiol)。今回、非電解質有機分子(PEGなど)のポア内侵入によるシングルチャンネルコンダクタンスの減少(図3)を指標にポアサイズを測定したところ、このチャンネルのポアは半径約1.3 nmでありATPのサイズ(半径約0.6 nm)より充分に大きいことが明らかとなった(図4)。これらの結果は次の論

文に報告された：Sabirov & Okada 2004 Biophys J 87:1672-1685。

一方、容積感受性外向整流性Cl⁻チャンネル(VSOR)は、細胞容積の調節のみならず、細胞からのATPの放出にも関与する可能性が以前指摘された(Hisadome et al. 2002 J Gen Physiol)。そこでVSORがATPを通すに充分な大きさのポアを持つかどうかについて同様の方法で調べたところ、半径0.63 nmであることが明らかとなり、ATPのサイズとほぼ同じ大きさであることが判明した。これらの結果は次の論文に報告された：Ternovsky, Okada & Sabirov 2004 FEBS Lett 576:433-436。

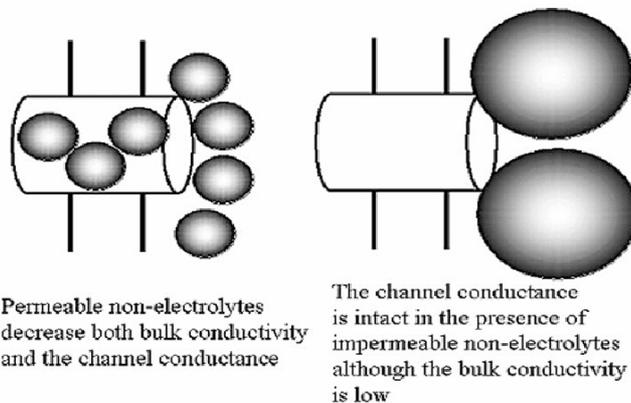


図3：非電解質分配法によるチャンネルポアサイズ測定原理

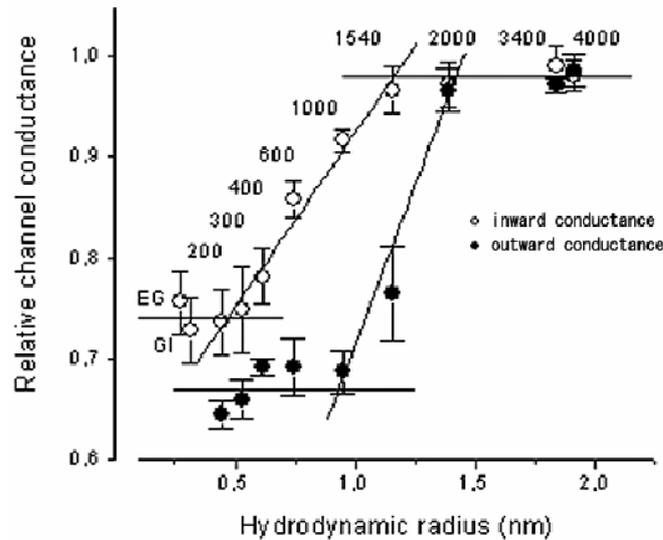


図4：種々の大きさのポリエチレングルコース(PEG)を膜の内側又は外側から与えたときのマキシアニオンチャネルの単一チャネルコンダクタンスの変化

大腸クリプトにおけるイオン分泌時の細胞容積調節機構の解明

眞鍋健一，清水貴浩，森島 繁，岡田泰伸

消化管における粘液分泌は消化物の流動性を保つ役割を果たしており，宿主防御機構の一端も担っている。これまでに大腸における Cl^- 分泌はクリプト(陰窩)で行われ，分泌時にはクリプト全体の収縮(secretory volume decrease: SVD)が生じる事が知られていた。しかしながら，クリプト内部の個々の細胞レベルでの細胞容積調節機構については，ほとんど知られていなかった。我々は二光子レーザー顕微鏡システムを用いることにより，モルモット大腸から単離したクリプト内部の細胞を可視化することに成功し，コリン様刺激によってクリプト基底部の細胞のみが収縮する様子を捉えた。またコリン刺激

時のクリプト細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は，同様に基底部に於いて著しかった。したがって，大腸クリプトにおいては，基底部だけで細胞内 Ca^{2+} 濃度依存的に Cl^- が分泌され，分泌性収縮が生じることが明らかとなった。また我々は，そのクリプト細胞が分泌性収縮後， $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ コトランスポーター (NKCC) 活性を介した調節性容積増加(regulatory volume increase: RVI)機構によって細胞容積を回復できることも明らかにした。本研究結果は次の論文に発表された：Manabe, Shimizu, Morishima & Okada 2004 Pflugers Arch Eur J Physiol 448:596-604.

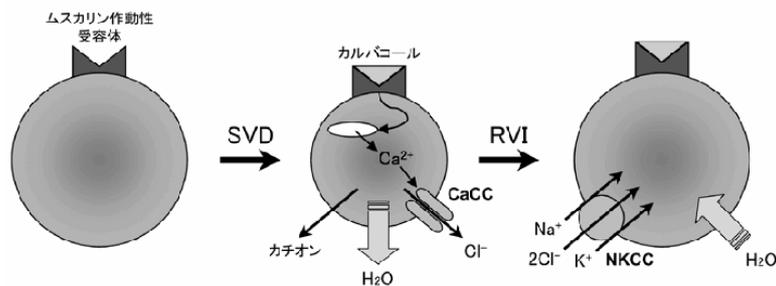


図5：大腸における分泌性細胞容積調節時のイオンメカニズム (CaCC : Ca^{2+} 依存性 Cl^- チャンネル)

生体情報研究系

感覚認知情報研究部門

【概要】

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

性や、異なる種類の刺激への反応の分布を調べている。具体的な課題として(1)初期視覚野における輪郭とその折れ曲がりの表現, (2)大脳皮質高次視覚野における色情報の表現, (3)色情報の変換過程, (4)大脳皮質における情報の時間的蓄積過程, (5)盲点における線分の補完知覚に対応したサル 1 次視覚野神経活動, などに関する研究を行った。

初期視覚系における輪郭線の折れ曲がりの表現

伊藤 南

我々は、輪郭線の折れ曲がりに対して選択的な反応を示す細胞が第二次視覚野に多数存在することを見いだした。そうした選択性が形成されるメカニズムを探るために、本年度は折れ曲がり刺激に対する反応と刺激中の半直線成分を単独で提示した際の反応とを比較検討した。各半直線成分に対する反応の線形モデルに方位選択的な抑制性入力と整流作用による非線形性の要素を導入したところ、折れ曲がり刺激に対する反応選択性がよく説

明された。推定された抑制性反応には最適な半直線成分と同一方向に抑制をかけるものと、異なる方向に抑制をかけるものがみられた。後者は折れ曲り刺激に対するチューニングを鋭くすると考えられる。以上の結果は、第二次視覚野における輪郭線の折れ曲がりの検出が、個々の半直線成分に対する興奮性ないしは抑制性の反応の線形和に強く依存することを示唆する。

下側頭皮質における色選択ニューロンの分布

小松英彦, 安田正治, 鯉田孝和

下側頭皮質は破壊によって色弁別が重篤に障害されることが知られており、この部位で色情報がどのように分布しているかを知ることは、そこでの色処理を理解する上で重要な問題である。このために注視課題を行っているサルの下側頭皮質からニューロン活動の記録を行った。電極は垂直に刺入し、実験前に撮影した MRI 画像と、各電極の刺入時に撮影した X 線画像を比較することにより、記録部位の同定を試みた。刺激には CIE-xy 色度図上

でカラーディスプレイの 3 原色 (RGB) が囲む三角形を均等に分割する色を用いた。それぞれの輝度は一定にし、ディスプレイの灰色背景より明るい刺激セットと暗い刺激セットの両方を用いた。刺激の形は異なる特徴をもつ 7 個または 11 個の単純な幾何学図形を用いた。実験の結果、強い色選択性を持ちあまり形選択性を持たないニューロンが前中側頭溝 (AMTS) のやや外側付近の TE 野に集中して存在することが分かった。

色カテゴリー識別と色弁別時の下側頭皮質ニューロン活動

鯉田孝和, 小松英彦

弁別とカテゴリー化は視知覚の二つの異なる側面である。これは色知覚においても顕著に見られる。色知覚におけるこれらの二つの側面が下側頭皮質の色選択ニューロンの活動にどのような影響を及ぼすかを調べるために、色弁別課題と色カテゴリー課題を訓練したサル TE 野から単一ニューロン活動の記録を行った。刺激は CIE_{xy} 色度図上でカラーディスプレイの R(赤)と G(緑)の間を均等に分割する等輝度の 11 色を用いた。いずれの

課題でも最初に一つの刺激(テスト刺激)が呈示され、弁別課題ではその後呈示される二つの色刺激からテスト刺激と同じものを選び、カテゴリー課題ではテスト刺激が赤か緑かによって NOGO 反応または GO 反応を選択することが要求された。テスト刺激に対するニューロンの応答に対して、さまざまな解析を行ったが、カテゴリー課題の時に選択性がカテゴリーを反映するように変化する傾向は認められなかった。

外側膝状体における色表現

郷田直一, 小松英彦

網膜の錐体によって受容された色情報は、V1 野、V4 野、TEO 野、TE 野を含む大脳視覚領野において変換される。これら各領野における色情報の変換様式の理解を目的とし、本年度においては、網膜から大脳へ至る経路に位置する外側膝状体(LGN)における色表現モデルの構築を行った。様々な色に対する LGN ニューロンの活動を解析し、これらニューロン集団がつくる特徴表現空間(色空間)を求めた。この色空間上での距離は、ニューロ

ン集団応答の差に対応する。求められた LGN の色空間は、錐体レベルにおける色空間と比較して、紫領域の表現が圧縮されており、錐体応答が非線形的に変換されていることを示すものであった。さらに、LGN の色空間と自然画像データベースから得られた自然界の色分布との関係を解析した結果、LGN において、入力分布に最適化された色表現がされていることが示唆された。

V4 野と前頭眼野ニューロンにおける活動履歴の保存性

小川 正

大脳皮質がもつ情報の時間的保持・蓄積機能を調べるため、視覚探索課題における注視期間中の V4 野と前頭眼野(FEF)のニューロン活動を解析した。各ニューロンにおいて情報の時間的保持・蓄積機能の程度を推定するため、注視期間中の前半部で得られた活動状態と後半部のそれを各試行ごとに求め、2 つの期間におけるニューロン活動レベルの相関性を定量化した。その結果、FEF 野の一部のニューロン群は高い相関値を示し、注視期間

中の活動レベルが時間的に保持されていることを示唆した。しかしながら、V4 野においてはそのような高い相関値を示すニューロン群は見出せなかった。2 つの領野における差異は、感覚信号を実時間で表現する必要がある V4 野(short-time storage)と、感覚信号を時間的に蓄積して行動指令を出力しなければならない FEF 野(long-time storage)の機能的な役割の違いを反映していると考えられる。

盲点における線分の補完知覚に対応したサル1次視覚野神経活動

松本正幸, 小松英彦

盲点で補完知覚が生じる時、サル大脳皮質一次視覚野(V1)で盲点に対応する視野を表現している領域(盲点表現領域)のニューロンが活動変化を示すことを既に見出ししている。このような補完に伴う活動変化がどのような回路により生じているかを知るために、反応の時間経過と潜時の解析を行った。盲点を突き抜ける長い線分に対する応答を左右眼で比較すると、盲点側の眼で潜時

が12ms長く、これは皮質上では58mm/sという極めて遅い伝導速度に対応することがわかった。一方、盲点側の眼において短い線分と長い線分に対する潜時には差はなく、補完に対応する活動変化が早い経路で生じていることが分かった。V1内の水平結合とV2を介するフィードフォワード、フィードバック経路の両方を使うと、これらの時間特性を矛盾なく説明できることがわかった。

神経シグナル研究部門

【概要】

部門名と研究内容が不一致とこれまで幾度となく指摘されてきたため、2004年4月、液性情報より部門名を変更し神経シグナルとした。また4月末に明大寺地区より山手地区3号館9階に移転した。従来は分子生物学と細胞レベルの電気生理学を中心とした研究を進めてきたが、ここ約2年間にスタッフのほとんど全員が入れ替わったのを機会に、生体システムにおける分子の役割という観

点から考え、局所神経回路機能の研究を主な研究対象とすることとした。新たに加わったスタッフの研究は順調に進捗している。しかしながら生理研着任後に新しい研究プロジェクトを開始しているため、論文として発表されるまでには至らず、外面的な研究業績は不十分であった。

神経伝達物質のシナプス外拡散によって仲介される異種シナプス間相互作用

佐竹伸一郎, 井本敬二

下オリーブ核から小脳への登上線維を反復刺激すると、籠細胞-プルキンエ細胞間のGABA作動性シナプス伝達が抑制される(即ち、脱抑制)。この異種シナプス抑制は、籠細胞終末のカルシウム非透過性AMPA型グルタミン酸受容体で仲介されるシナプス前抑制の様式で起こることを示唆する結果を得た。脳スライス-パッチクランプ法を用いて、登上線維の伝達物質が籠細胞のAMPA受容体を活性化する過程を検討した。低親和性-グルタミン酸受容体競合阻害薬 γ -DGGは、登上線維-プルキンエ細胞シナプスの興奮性シナプス後電流よりも、登上線維刺激に伴う脱抑制を強く阻害した。低親和性拮抗薬は、高濃度のグルタミン酸で誘発されるシナプス伝達には阻害作用

が弱く、拡散のように低濃度グルタミン酸で仲介される過程に対して強い阻害作用を示したと考えた。また、dextranで灌流液の粘性を高めて物質拡散を阻害すると、脱抑制も有意に減弱した。以上の結果から、登上線維の興奮性伝達物質は、放出部位から拡散して、籠細胞終末のAMPA受容体を活性化すると結論した。一方、グルタミン酸回収タンパク質阻害薬TBOAは、脱抑制を顕著に増強した。登上線維と籠細胞の間で見られる異種シナプス抑制はグルタミン酸回収機構によって常に阻害されているものの、登上線維から大量に放出された伝達物質は回収機構の能力を超えて籠細胞のAMPA受容体を活性化できることが示唆された。

視床-大脳皮質神経回路の構造：単一シナプスレベルでの構成

井上 剛, 井本 敬二

感覚情報は視床を介して、大脳皮質へと転送される。しかし、視床-大脳皮質の神経回路がどのように構成されているのか、単一シナプスレベルでの構成は明らかではない。その解明を目指し、我々はマウス体性感覚野における視床-大脳皮質連結スライス標本を作製し、大脳皮質4層神経細胞からトリプルパッチクランプ記録を行い、その条件下においてさらに単一視床神経細胞刺激を複数の視床細胞に適用することにより、多対多の視床-

大脳皮質神経結合を単一シナプスレベルで調べた。その結果、シナプス結合という構造的側面から見ると、視床から大脳皮質興奮性細胞 (regular spiking [RS] cell) と抑制性細胞 (fast spiking [FS] cell) への視床-大脳皮質連結パターンには違いはほとんど観察されなかった。しかし一方でシナプス強度も考慮した機能的側面から見ると、その視床-大脳皮質連結パターンには RS 細胞と FS 細胞間で大きな違いが観察されるようになった。

不活性型 Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II α 遺伝子改変マウスを用いた脳機能解析

山肩葉子, 井本敬二, 畑中伸彦

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

中枢神経系に豊富に存在し、神経活動の制御やシナプス可塑性に深く関与する代表的な蛋白質リン酸化酵素、 Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMKII) を不活性型に置換したノックイン型遺伝子改変マウス CaMKII α (Lys42Arg) を作成した。このマウス脳では、CaMKII α のプロテインキナーゼ活性のみが選択的に消失するが、蛋白としての発現は維持されていた。出生率は正常で、繁殖能力にも問題がなかったが、死亡

率が高く、内外の侵襲に対する脆弱性が示唆された。一部のマウスに自然発症のけいれんが認められ、また、けいれん惹起物質に対する過剰反応が認められた。さらに、情動行動の調節をつかさどる大脳辺縁系の一部で、神経活動の低下が認められた。これらの結果より、神経活動を正常状態に維持するためには、CaMKII α のプロテインキナーゼ活性が重要な役割を果たすことが示唆された。

視床-大脳皮質ネットワークにおけるてんかん発生に関する研究

佐々木 幸恵, 井本 敬二

てんかんは比較的罹患率の高い神経疾患であり、薬物によるコントロールが進んだ現在も十分なコントロールが出来ない患者が数多く存在し、またてんかんが薬物によりコントロールされても、眠気・ふらつきなど薬剤の副作用に悩まされている患者も多い疾患です。

てんかんの一種である欠神発作は、特徴的な脳波が大脳皮質全体に同期して認められる事から、その原因として、大脳皮質と視床を結ぶ神経ネットワークの異常によ

り生じると考えられています。しかし、その発症メカニズムは現在のところわかっていません。

本研究は、自然発症てんかんモデルマウスを用い、視床-大脳皮質シナプス伝達特性をスライスパッチクランプ法により検討を行いました。その結果、視床から大脳皮質への入力層である大脳皮質4層において抑制性シナプス電流が、欠神発作発症に伴い減少している事を明らかにしました。

視床興奮性シナプスのシナプス特性の解析

宮田麻理子, 井本敬二

感覚情報は末梢から情報は内側毛帯シナプスを介して VB 核投射細胞に入力する一方、皮質からは大量のフィードバック投射(皮質視床シナプス)を受ける。感覚情報は内側毛帯入力と皮質視床シナプス入力との統合により処理され大脳皮質に投射されると考えられる。しかし、これらシナプスの特性を詳細に解析した報告はなく、不明な点が多い。マウス視床 VB 細胞において、皮質視床シナプスの EPSCs に、NMDA 受容体、AMPA 受容体に

加えてカイニン酸受容体成分が存在することを見出した。一方、内側毛帯シナプス EPSC には、カイニン酸受容体成分は存在しなかった。また、皮質視床シナプスには NMDA 受容体を介する EPSC が non-NMDA 受容体を介するものより、2 倍ほど大きい一方で、内側毛帯ではその逆であった。これらのグルタミン酸受容体構成の違いが VB 細胞の発火の時間的特性に深く関わっていることを見出した。

高次神経機構研究部門

【概要】

脳神経系は遺伝情報をもとにつくられ生きる環境の中で発達する。脳神経系は多様化した細胞種からなり、各細胞が多数のシナプス結合を作ることにより、莫大に多様化した神経回路を構成し、複雑性を保ちながら高度に組織化されている。本研究部門では、この神経回路の多様化と組織化をもたらす遺伝情報を探求することにより、記憶と情動と意識、ヒト精神神経疾患の分子的基盤を明らかにすることを目的とし、脳構造形成および神経回路網形成に関わる遺伝子を欠損させたマウスの作製を行ってきた。以前の研究で、Fyn 遺伝子ノックアウトマウスを作製・解析した結果、同遺伝子が神経回路形成、シナプス機能制御、脳機能制御に重要な役割を果たしていることを見いだした。そこで Fyn との結合活性を指標に新

規分子をスクリーニングしたところ、新規カドヘリン様細胞接着分子 CNR (Cadherin-related neuronal receptor)/プロトカドヘリン α を単離する事が出来た。また他のグループの研究で、CNR 遺伝子クラスターとよく似たゲノム構造と相同性を示す近縁分子、プロトカドヘリン β 、 γ ファミリーが見いだされ、これらは CNR とともにさらに大きな遺伝子クラスター構造を取っていることが明らかになった。これまでの研究結果から同分子群はシナプスでの選択的細胞接着と多様化機構を有し、神経回路網形成に重要な役割を演じていることが示唆されている。そこでこれらの分子機能の解析により、神経細胞の多様化機構の分子メカニズムが明らかになるのではないかと考え、現在は同遺伝子欠損マウスの作製を中心に進めている。

CNR/プロトカドヘリン α 遺伝子の機能解析

平林敬浩, 八木 健

本新規カドヘリン様接着分子 CNR/プロトカドヘリン α は染色体上にタンデムに並んだ 13 個の変領域エクソンと 3 つのエクソンからなる共通領域からなるクラスター構造を有し、各 CNR ファミリーはそれぞれひとつの変領域エクソンと共通領域から転写されていることが明らかになっている。この転写様式は T 細胞受容体やイ

ムノグロブリン遺伝子群と類似しており、このことは同分子がシナプスでの選択的細胞接着と多様化機構の両特徴を兼ね備えた分子であり、中枢神経系における多様化と組織化をもたらす分子であることを示唆している。本研究では CNR 分子の多様性の意義を解明することを目的とし、同遺伝子ファミリーのうち 1 分子種のみを発現

する遺伝子ターゲティングマウスの作製を試みている。作製後は、野生型マウスおよびすでに作製されている CNR ファミリー全遺伝子欠損マウスと表現型の差違を

解析することで同分子の機能が明らかになると考えている。

プロトカドヘリン α 発現制御領域候補欠損マウスの作製

金子涼輔, 八木 健

マウスプロトカドヘリンは α 型 14 種類, β 型 22 種類, γ 型 22 種類が 18 番染色体にクラスター構造を取って存在している。 α 型においてはアレル特異的な発現制御がなされている可能性が示されており, その発現制御メカニズムに興味を持たれる。そこで, α 型プロトカドヘリンの発現制御メカニズムを明らかにすることを目的として研究を行った。まず各種生物のプロトカドヘリン領域

ゲノム配列データを異種間での相同性を指標にして精査した。その結果, α 型プロトカドヘリン領域上流の非翻訳領域に異種間で高い相同性を示す領域を発見した。次いで, この領域のプロトカドヘリン発現制御における役割を解析するために欠損マウスの作製を行った。ターゲティングベクターを作製し, ES 細胞へ導入したところ相同組換え ES 細胞が取得された。

統合生理研究系

感覚運動調節研究部門

【概要】

2004年度は6名の大学院生(総合研究大学院大学3名, 他大学大学院からの国内留学3名)と1名の博士研究員(和坂利昭君)が新たに仲間に加わった。医学(神経内科, 精神科, 小児科など), 歯学, 工学, 心理学, 言語学, スポーツ科学など多様な分野の研究者が, 体性感覚, 痛覚, 視覚, 聴覚, 高次脳機能(言語等)など広範囲の領域を研究しているのが本研究室の特長であり, 各研究者が自分の一番やりたいテーマを研究している。こういう場合, ややもすると研究室がバラバラになってしまう可能性もあるが, 皆互いに協力し合い情報を提供しあっており, 教室の研究は各々順調に行われている。脳波と脳磁図を用いた研究が本研究室のメインテーマだが, 最近はその

に加えて機能的磁気共鳴画像(fMRI)及び経頭蓋磁気刺激(TMS)を用いた研究も行い成果をあげている。

計画班員を務めていた特定領域「先端脳」(テーマ: 痛覚認知研究)が2004年度に終了した。しかし, 2004年度から新たに, 日本宇宙フォーラムから3年間の研究費をいただくことになり(テーマ: 様々な環境における脳活動の研究), また科学技術振興機構の「社会技術研究: 脳科学と教育」に採択され(テーマ: 顔認知機構), 研究代表者として3年間勤めることになった。環境省, 厚生労働省の班研究も続けて行っており, 研究員一同, より一層の努力を続けて質の高い研究を目指していきたいと思っている。

侵害刺激に伴う皮質活動の睡眠中の変化

王曉宏, 乾幸二, 秋云海, 柿木隆介

痛みは侵害刺激により誘発される不快な感覚的, 情動的体験であり, 侵害受容系の活性化の結果生じる。本研究では覚醒時と睡眠時で皮質反応を比較することにより, 認知に関わる成分を同定することを試みた。

10名の健康成人男性を対象に実験を行った。左手背への表皮内電気刺激に対する皮質反応を脳磁計を用いて記録し, コントロールとした。刺激の数をカウントさせる注意条件下と睡眠条件下で記録を同様に行い, 比較した。

コントロール条件では第一次および第二次体性感覚野,

島, 内側部側頭葉および前部帯状回に活動が認められた。注意条件下では全ての活動が有意に増強し, 睡眠中には有意に減弱した。この結果はこれらの活動が全て認知に関わることを示す。サルを用いた研究では視床 VPM 核の侵害受容細胞が注意により活動を増強させること, 視床 VPL 核の侵害受容細胞が覚醒レベルに影響を受けることが示されており, 我々が観察した変化が, 視床レベルで生じた可能性を示唆する。

(Wang et al., Neuroscience 2004)

ヒト第一次体性感覚野での顔の再現

Nguyen BT, Tran TD, 乾幸二, 宝珠山稔, 柿木隆介

顔面皮膚の第一次体性感覚野(SI)での再現を脳磁図を用いて検討した。左顔面皮膚領域の6カ所, 下唇および第一指を air puff を用いて機械的に刺激し, 誘発脳磁場を記録した。初期成分について単一信号源推定法による活

動源位置推定を行い, SI内での部位について比較を行った。

第一指のSI内再現部位は最も内側, 上方に, 下唇は最も外側, 下方にあり, 顔面皮膚領域はその中間に位置し

た。従って、一般に知られる体部位再現を確認する結果である。6カ所の顔面領域を三叉神経支配により3群に分けて比較したが、SIでの双極子位置に有意な差はなく一定した配列は見いだせなかった。しかし顔面領域を外側と内側に分けた場合、SI内では外側顔面が内側に、内

側顔面は外側の位置していた。この結果は、顔面皮膚の分節レベルに従う規則的配列がSI内に存在することを示唆する。

(Nguyen et al., Neurosci Res 2004)

事象関連電位を用いた二点識別認知過程の研究

田村洋平, 宝珠山稔, 乾幸二, 中田大貴, 和坂俊昭, 尾島司郎, 井上聖啓, 柿木隆介

皮質での二点識別処理過程を、事象関連電位を用いて検討した。左手背外側部に6個の銀ボール電極を配置し、その中の二つを対にして二点の同時刺激を行った。5種類の刺激があり、電極間の距離はそれぞれ1.0, 1.5, 1.5, 2.0, 2.0mmである。5種類の刺激はランダムに呈示した。実験条件は二点識別タスク(TPD)とカウントタスク(SC)の二種類であり、TPDでは刺激毎にそれが一点であったか二点であったかを述べさせた。SCでは刺激回数を数えるように指示した。

SCと比較し、TPDでは有意に刺激後140ミリ秒の陰性電位(N140)が増強した。さらに、300および500ミリ秒で頂点となる二つの陽性成分(LPC-1とLPS-2)がTPD条件でのみ記録された。LPC-2は被験者の判定の安定度と関連した。いずれの成分も一点か二点かの判断には影響されなかった。N140は注意効果を反映したものと考えられた。後期陽性成分はそれぞれ、P3aとP3bに相当すると考えられた。

(Tamura et al., Clin Neurophysiol 2004)

経皮的磁気刺激によるA-delta線維関連疼痛増強

田村洋平, 宝珠山稔, 乾幸二, 中田大貴, 秋云海, 宇川義一, 井上聖啓, 柿木隆介

運動野への連続的経皮的磁気刺激(rTMS)が急性、慢性疼痛に影響を及ぼすことが知られている。本研究ではレーザー刺激(A-delta線維関連)による誘発電位に対するrTMSの効果を検討した。

刺激には右手背へのYAGレーザー刺激を用い、Czより誘発電位(N2-P2)を記録した。N2-P2の振幅をrTMS前、直後、10、20、30分後で記録した。rTMSは1Hzで10分間行った。対照として、磁気刺激は行わず同じ時間経過で誘発電位を記録する条件(コントロール)と磁気刺激の

代わりに同部位を電気刺激する条件(sham)を設定し、rTMSそのものの効果を検討した。結果は、主観的な痛みの程度とN2-P2振幅の両者がrTMSにより増強することを示した。さらに、振幅と痛みの程度は関連していた。N2-P2の潜時に変化はなかった。この結果よりA-delta線維関連の侵害受容においても運動野への磁気刺激と痛覚受容が関連することが示唆された。

(Tamura et al., Neurology 2004)

ヒト体性感覚野における階層的処理

乾幸二, 王曉宏, 田村洋平, 金桶吉起, 柿木隆介

触覚刺激に伴う皮質活動の時間経過を脳磁図を用いて詳細に検討した。サルを用いた単一細胞記録の研究や各

皮質部位間の連絡を検討した解剖学的研究は情報の階層的処理を示唆しているが、各皮質部位の活動タイミング

はほとんど知られていない。左手背皮膚表面への電気刺激により、刺激反対側半球の3b野、4野、1野、5野および第二次体性感覚野(SII)領域に活動が認められた。それぞれの立ち上がり潜時は、14.4、14.5、18.0、22.4、21.7ミリ秒であった。これらの活動の有意な潜時差は、中心

後回を後方へ向かう階層的情報処理を示唆する(3b野-1野-5野)。また、この経路とは別に、第一次体性感覚野-SII間の連続的処理経路の存在も示唆する。

(Inui et al., Clin Neurophysiol 2004)

C線維刺激に伴う皮質磁場反応に対する distraction の効果

秋云海, 乾幸二, 王曉宏, Nguyen BT, Tran TD, 柿木隆介

C線維関連の疼痛(second pain)に対する distraction の効果を検討した。13名の被験者左手背に炭酸ガスレーザーによるC受容器刺激を行い、誘発脳磁場を記録した(コントロール)。Distraction条件では被験者に暗算課題を課した。

刺激によりおよそ刺激後700-1000ミリ秒に安定した磁場活動が誘発され、責任活動部位として第一次(SI)お

よび第二次(SII)体性感覚野、帯状回および内側部側頭葉が同定された。全ての皮質部位の活動強度は distraction 条件で減弱した。特にSIIと帯状回で減弱が著しかった。この結果より、これらの皮質部位がC線維関連疼痛の受容に関わることを示す。

(Qiu et al., Clin Neurophysiol 2004)

体性感覚刺激による事象関連電位に対する Go/NoGo 課題の効果

中田大貴, 乾幸二, 西平賀昭, 八田有洋, 坂本将基, 木田哲夫, 和坂俊昭, 柿木隆介

Go/NoGo 課題による事象関連電位は通常聴覚や視覚刺激を用いて記録されており体性感覚を用いた報告はない。本研究では簡便な触覚刺激を用いて明瞭な nogo 関連電位を記録できた。

リング電極による電気刺激を第二指と第五指に与えた。前者を go 刺激、後者を nogo 刺激とする課題を行わせ、その際の電位変化を頭皮上に配置した電極より記録した。何もタスクのない条件(コントロール)、go 刺激の数を数える条件(カウント)および go 刺激の際に右手を握る

条件(運動)の3条件を比較した。N140が全ての条件で、P300がカウントと運動条件で記録された。nogo 刺激による140-200ミリ秒の陰性電位とN140の電位は go 刺激に伴うそれらの電位よりも有意により陰性であり、運動条件での nogo 刺激の P300 は有意に go 刺激のそれよりも振幅が大きかった。これらの結果は聴覚や視覚を用いた研究結果と一致し、nogo 関連の皮質活動が使用する感覚系を問わず類似することを示唆する。

(Nakata et al., Clin Neurophysiol 2004)

侵害刺激による皮質活動は運動によって修飾される

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

体性感覚誘発脳電位あるいは脳磁場に対する運動の影響はよく研究されているが、痛覚に関してほとんど知られていない。本研究では侵害刺激による皮質活動に対す

る運動の効果を検討した。

YAG レーザー刺激を左手背に与え誘発磁場反応を記録し、刺激対側 SI および両側 SII の活動を同定した。以

下の4条件での比較を行った。コントロール条件（刺激に注意するのみ）、同側能動条件（左第二、三指の運動を自分のペースで行う）、対側能動条件（対側の運動を同様に行う）、および同側受動条件（実験者が指の運動を行う）の4条件である。1) 同側能動条件では刺激対側のSIとSIIの反応が有意に抑制された。2) 対側能動では刺激対

側SIIが抑制された。3) 同側受動ではSIが抑制された。SIへの抑制はレーザー刺激による信号と運動による（感覚）信号がSIレベルで干渉した結果と考えられる。SIIへの影響は、運動の遂行に関わる脳活動からの影響と考えられる。(Nakata et al., Pain 2004)

ランダムドット仮現運動知覚の時間構造

久保田哲夫, 金桶吉起

仮現運動は、例えば二つの異なる場所にある光が交互に点滅することで知覚される。実際の刺激には運動はないのにどういった神経機構が働いて滑らかな運動を知覚するのであろうか？ また単なる光の点滅の知覚とどのように区別されて知覚されるのであろうか？ 我々はランダムドットパターンを刺激に使い、MEG反応の時間構造を運動知覚するときと点滅知覚するときとで比較、検討した。この刺激では、パターンのずれの大きさが小さいと運動を、大きいと点滅を知覚する。すなわち、物理的（輝度、空間周波数、コントラスト、密度など）にはま

ったく刺激は同一にもかかわらず、異なる知覚が起こる。よって、MEG反応が知覚に伴って変化するとすれば、それはそれぞれの知覚の神経活動の違いを反映している。運動知覚に伴うMEG反応は、110, 140, 210msをピークに、点滅知覚に伴う反応より有意に振幅が大きかった。反応の信号源はヒトMT/V5付近に推定された。これらの結果は、点滅と運動の知覚の神経機構はそれぞれ早期から競合しつつ局所的な運動検出結果をもとに最終的な知覚に至ることを示唆している。(Kubota T., et al. Neurosci. Res. 48, 111-118, 2004)

視覚逆行性マス킹現象の脳活動：後続刺激の提示時間の違いによる影響

橋本章子, 渡辺昌子, 柿木隆介
宝珠山稔 (名古屋大学医学部保健学科)

時間的に連続して二つの視覚刺激が提示されたとき最初の刺激が知覚されない現象を視覚逆行性マス킹現象という。我々は、見え方を判断する行動実験と視覚誘発脳磁図を使い、後続刺激の提示時間を変化させたときのマス킹現象を検討した。その結果、刺激間隔は一定であっても後続刺激の提示時間の長さによってマス킹の起こり方が変化することが示された。さらに、各刺激条件に対する視覚誘発脳磁場の大きさと潜時を検討した。その結果、単一刺激条件とマス킹刺激条件を比較すると、第一刺激の知覚の有無にかかわらず誘発

磁場活動の時間的経過には差がなかった。このことから、意識的に見えていない刺激であってもそれに対して視野は活動していることが示された。また、意識的な知覚の有無に関わらず、第一刺激の存在が第二刺激の処理を促進している可能性が示唆された。刺激が明確に知覚されるためにはある閾値(提示時間)が必要で、その閾値に達しない状況では、最初の刺激は後続刺激の提示によって処理が干渉されやすく、意識的に知覚できないマス킹現象や、2つの刺激を同時に知覚する現象が発生するのではないかと考察した。

ヒト視覚腹側路における神経順応効果の時間的動態

野口 泰基, 乾 幸二, 柿木 隆介

同じ視覚刺激が2回連続で提示される時、2回目の提示に対する脳の視覚反応は1回目におけるそれよりも減衰したものになる。Neural adaptation (以下NA)と呼ばれるこの効果はヒトやサルで頻りに報告される現象の1つであるが、その詳しい時間的動態については従来殆ど知られていなかった。本研究では時間分解能に優れた脳磁図を用い、ヒトの視覚腹側路におけるNAを、視覚反応の①ピーク振幅、②ピーク潜時、③反応の持続時間、という互いに独立な3つの観点から調べた。その結果、NAの効果を受けた視覚反応は、受けていない反応

に比べて有意に小さなピーク振幅・短いピーク潜時を示した。だが一方、反応の持続時間においては、NAの有無による有意な差は見られなかった。以上の結果は、(1)視覚腹側路におけるNAが従来提唱されていた反応強度の低下に加え、時間的速化を伴うこと(2)この時間的速化は視覚反応そのものの時間幅を短縮させるよりは、むしろ反応の立ち上がり時間の短縮というかたちで見られること、などを示している。(Noguchi Y et al. J Neurosci., 2004)

生体システム研究部門

【概要】

私達を含め動物は、日常生活において周りの状況に応じて最適な行動を起こしたり、あるいは自らの意志によって四肢を自由に動かすことにより様々な目的を達成している。このような随意運動を制御している脳の領域は、大脳皮質運動野と、その活動を支えている大脳基底核と小脳である。本研究部門においては、脳をシステムとして捉え、これらの脳領域が互いに協調して働くことによって随意運動を可能にしているかを、とくに大脳基底核

を中心に神経生理学的・神経解剖学的手法を用いて明らかにすることを目指している。

平成16年度は南部 篤が赴任して3年目にあたり、研究環境も整備され、本格的に研究が始動し始めた。平成17年1月からポスドクとして知見聡美が研究グループに加わった。また、喜多 均教授(米国テネシー大学)も昨年度と同様に平成16年7月、平成17年1月～3月まで滞在し、精力的に共同研究を行った。

脳深部刺激療法の作用機序に関する研究

南部 篤, 橘 吉寿, 知見聡美

高田昌彦(東京都神経科学総合研究所)

喜多 均(テネシー大学医学部)

近年、薬剤でコントロールが困難な重症パーキンソン病に対して、視床下核に慢性的に刺激電極を埋め込み高頻度電気刺激を加えるという、視床下核-脳深部刺激療法(STN-DBS)が有効であることがわかってきたが、その作用機序については不明である。本研究においては、正常なサルを用い視床下核(STN)に単発刺激あるいは連続刺激を加え、淡蒼球外節(GPe)・淡蒼球内節(GPi)から単

一ニューロン活動を記録することにより、STN-DBSの作用機序を検討した。STNの単発刺激では、GPeニューロン・GPiニューロンとも興奮する傾向にあった。連続刺激を加えると、GPeニューロンは興奮性が重畳するが、GPiニューロンは抑制される傾向にあった。GPiニューロンは、GPe、STN両者から入力を受けており、その興奮制は、GPe-GPi投射(抑制性)とSTN-GPi投射(興奮性)の

バランスで決まることになる。GPI ニューロンの近傍にグルタミン酸や GABA のブロッカーを局所注入し反応の変化を調べたところ、STN の単発刺激では STN-GPI 投射による影響が GPe-GPI 投射よりも優位であるが、連続刺激においては GPe-GPI 投射による影響が STN-GPI

投射よりも優位になり、その結果、GPI ニューロンが抑制される傾向にあることがわかった。以上の結果から、STN-DBS のメカニズムのひとつとして、STN-GPe-GPI 投射による GPI 抑制が考えられる。

上肢到達運動課題実行中の線条体ニューロンの活動様式を解明する

畑中 伸彦, 高良 沙幸, 橘 吉寿, 南部 篤

大脳基底核は大脳皮質-基底核連関の一部として、運動の遂行、企図、運動のイメージ、習慣形成などに関わるとされている。これまでの神経トレーサーを用いた解剖学的な、あるいは大脳皮質に埋入された慢性刺激電極からの応答を調べた電気生理学的な研究で、大脳皮質から大脳基底核への主な投射先である線条体では、一次運動野 (MI) や補足運動野 (SMA) からの入力に内外側に分離し、中央部で一部重なり合うことが示されている。また、線条体ニューロンには視床正中中心核-束傍核複合体 (CM-PF) からの入力があることが知られており、線条体直接路ニューロンと間接路ニューロンで CM-PF から

の入力様式が異なることも示唆されている。

しかし実際にサルが運動を行っている時に、MI や SMA だけから入力を受けている線条体ニューロンと両者から入力を受けているニューロンではどのような活動の差があるのか確認したデータや、CM-PF からの入力の有無によって活動の差があるのかについての報告は未だなされていない。本年度は上肢の遅延期間付き到達課題を学習したサルの MI, SMA に慢性刺激電極を埋入し、実際に運動を行っているサルの線条体ニューロンの活動特性と、それぞれが入力を受ける大脳皮質運動野の組み合わせについて実験を行っている。

顎運動に関わる多シナプス性神経回路の同定

畑中 伸彦, 橘 吉寿, 南部 篤

宮地 重弘 (東京都神経科学総合研究所)

高田 昌彦 (東京都神経科学総合研究所)

狂犬病ウイルスは神経細胞に感染し、逆行性に感染を広げていくことが知られており、逆行性神経トレーサーとして、神経経路を多シナプス的に同定することが出来ると期待されている。本年度はラットの開口筋である顎二腹筋前腹と閉口筋である咬筋それぞれに狂犬病ウイルスを注入し、逆行性に感染するウイルスを経時的に追跡調査し、開口筋、あるいは閉口筋に投射する神経経路を同定した。その結果、大脳皮質には三叉神経運動核開口筋ニューロンへ直接投射しているニューロンの存在が示され、閉口筋運動ニューロンではそのような直接投射は

見出されなかった。また、大脳皮質-大脳基底核-脳幹へ間接的に投射する系において線条体背外側部に開口筋へ投射する系が見いだされたが、この部位は閉口筋へは投射していなかった。また、免疫染色を組み合わせることによって、開口筋に投射する興奮性インターニューロンが青斑核に投射を送る領域である外側巨大細胞性網様体傍核に多く見られた。今後は上肢や下肢の筋に狂犬病ウイルスを注入し、それぞれを比較検討していく予定である。

“間接路”を介した淡蒼球内節への運動情報伝達様式の解明

橋 吉寿, 南部 篤

大脳皮質運動野から生じた運動情報は、大脳基底核で処理された後、視床を介して再び大脳皮質に戻る。このような神経回路において、大脳基底核の出力部である淡蒼球内節は GABA 作動性ニューロンを介して視床を持続的に抑制している。これに対し、直接路(線条体-淡蒼球内節路)が働くことで淡蒼球内節ニューロンは一時的に抑制され、続いて視床・大脳皮質が脱抑制されることで運動が生じると考えられている。他方、間接路(線条体-淡蒼球外節-視床下核-淡蒼球内節路)が運動発

現に及ぼす影響についての報告は極めて少ない。今回、淡蒼球外節に Muscimol (GABA_A 作動薬)、視床下核に Gabazine (GABA_A 阻害薬)を局所的に作用させることで、皮質刺激に対する淡蒼球内節ニューロンの応答様式が変化するのを記録することに成功し、また不随意運動の発現も観察しえた。これらのことから、間接路は淡蒼球内節ニューロンの時空間的発射パターンをコードし、正確なタイミングでの運動発現に寄与していると考えられる。

大脳皮質機能研究系

脳形態解析研究部門

【概要】

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

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

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

グルタミン酸受容体の定量的解析

田中淳一，足澤悦子，初山明子，深澤有吾，馬杉美和子，重本隆一

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

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

神経伝達物質放出関連蛋白質の局在

萩原 明，深澤有吾，重本隆一

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

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

海馬における長期増強現象とグルタミン酸受容体の密度変化

深澤有吾, 重本隆一

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

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

海馬 NMDA 受容体局在の左右差

Wu Yue, 篠原良章, 重本隆一

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

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

GABA_B 受容体やイオンチャネルの脳内局在と機能解析

Akos Kulik, 萩原明, 深澤有吾, 重本隆一

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

報告した。これらの結果は、GABA_B 受容体が脳の部位により異なる役割を持っていることを示唆している。その後、GABA_B 受容体はその効果器分子であるカリウムチャネル GIRK サブユニットと海馬錐体細胞の棘突起シナプス周辺で共局在を示すことが明らかとなった。さらに GABA_B 受容体の機能調節機構や脳における役割の解明を目指す。

前脳基底核と黒質－線条体ドーパミン系の電気生理学および形態学的解析

初山俊彦

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

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

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

大脳神経回路論研究部門

【概要】

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

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

皮質介在ニューロンの樹状突起分枝の定量的解析

川口泰雄，荻部冬紀，窪田芳之

前年度までに、非錐体細胞の定量的分類、サブタイプごとの軸索分枝・シナプスブトン形成の定量的解析を終えたので、今年度は樹状突起分枝、スパイン形成の定量的解析を、FS バスケット細胞、ニューログリアフォーム細胞、マルティノッティ細胞、CCK 陽性大型バスケット

細胞、小型バスケット細胞について行った。分枝間角度分布は軸索のと同じ関数で近似することができ、サブタイプ間でも分布に大きな差がなかった。分枝・シナプスブトン・スパインの間隔分布どれも指数関数で近似できた。細胞体から出る樹状突起の数、伸長方向、平均分枝

間隔, スパイン密度から, 樹状突起の形態パターンには3種類あることがわかった。突起の屈曲とシナプス形成の関係をみるために, 軸索・樹状突起分枝ごとの屈曲度

と分枝上のブトン・スパイン密度を計測した。ブトン・スパイン分枝密度の平均値はサブタイプごとに異なるが, 分枝長や屈曲度とは相関していなかった。

VGLUT2が入力する棘突起への抑制性入力について

窪田 芳之, 根東 覚, 畑田 小百合, 川口 泰雄

大脳皮質の錐体細胞の棘突起は, 主に興奮性を入力を受ける事が知られている。しかしながら, その5%程度のものは, 興奮性入力と抑制性入力の2つが同時に入力している事(DI spine)を我々は見いだした。DI spineを神経支配している興奮性入力, 他の錐体細胞なのか, それとも視床からの興奮性入力なのかを明らかにする為, 検討を重ねた。皮質では, vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1)は, 皮質の錐体細胞の神経終末に発現してい

る。一方で, VGLUT2は視床由来の興奮性神経終末に発現している事が報告されている。今回, これを利用して, DI spineには, どちらのVGLUT発現神経終末が入力するかを検討した。全ての層から1500余の棘突起を電子顕微鏡で観察した結果, VGLUT2陽性神経終末が入力する棘突起の約10%が抑制性入力を同時に受けている事がわかった。

calretinin 陽性樹状突起への抑制性シナプス入力と興奮性シナプス入力の割合

関川 明生, 窪田 芳之, 川口 泰雄

大脳皮質の非錐体細胞には, 多くの種類があるが, そのサブタイプの一つである calretinin 陽性細胞にシナプス入力する神経終末の密度と, 興奮性のもので抑制性のもとの割合を求めた。まず, 還流固定した脳の切片を使って, preembedding immunohistochemistry法で, calretinin 陽性樹状突起をDAB ニッケル法で染色した。EPONに包埋した

後, 電子顕微鏡観察用に80nm厚で超薄切片を作製し, postembedding immunohistochemistry法で, GABA染色を施した。電子顕微鏡観察の結果, calretinin 陽性樹状突起にシナプス入力しているGABA陽性神経終末は, 全体の3-4割程度で, 残りは, 非対称性の膜の肥厚を示す興奮性の神経終末である事がわかった。

皮質線条体システムにおける錐体細胞の多様性

森島美絵子, 川口泰雄

前頭皮質から線条体に投射する錐体細胞は多様であると考えられているが, その機能的構成やシナプス結合特性についてはほとんどわかっていない。今年度は先ず, 線条体に投射する錐体細胞(皮質線条体ニューロン)の形態的特徴を解析した。前頭皮質の皮質線条体ニューロンは大きく二つのグループからなる。一つは同側の脳幹に下行投射する5層錐体細胞で, 途中で線条体に側枝を出す。もう一つは, 同側の線条体だけでなく, 対側の線条

体に投射する錐体細胞で, 脳幹には投射しない。これらを, それぞれ対側の線条体, 同側の橋核に蛍光トレーサーを注入して逆行性に蛍光標識した。その後, 脳切片標本を作成して, 蛍光標識された錐体細胞を細胞内染色した。先端樹状突起タフトの起始部の位置, 分枝数, 総分枝長, 空間的拡がりから, 両側線条体に投射する錐体細胞は二種類からなっており, どちらの形態も橋核に投射する細胞とは異なることがわかった。

心理生理学研究部門

【概要】

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

して、異種感覚統合の脳内機構の解明を目指すとともに、触覚弁別の非対称性、言語処理、学習、認知機能にわたる幅広い研究を行った。さらに機能的MRIの時系列データ解析手法の開発にも取り組んだ。

空間パターンの触覚弁別に関する脳神経基盤の非対称性

原田 宗子, 定藤 規弘

点字読などの研究から、触覚形状弁別において左手が有利であることが知られており、左右半球における処理の非対称性を示唆するとされてきたが、その神経基盤は明らかでなかった。触覚弁別課題における神経活動の左右非対称性を調べる目的で、19人の被験者を対象に、機能的MRIを行った。受動的触覚弁別の際、右手左手を問

わず、前頭前野、頭側補足運動野、頭頂葉後部にわたり、右半球優位の活動が見られた。一方右手による課題遂行時には、左手の場合に比べ左運動前野尾側部により強い活動がみられた。これは右手による触覚形状弁別において、半球間相互作用に非対称性の存在することを示唆する。

話し言葉における視聴覚間の感覚統合に関する神経基盤: FMRI を用いた研究

斎藤大輔, 定藤 規弘

多くの人の行動には、異なる脳部位からの情報の統合が必要であり、特に、聴覚と視覚における異種感覚の情報処理は、対面での情報伝達に重要である。そこで、聴覚と視覚の異種感覚統合が行われる神経基盤を、同時に提示された話し言葉と発声動作の照合課題を行うことにより検討した。機能的核磁気共鳴画像法 (fMRI) を用いて実験を行った。課題は3条件で、それぞれ、聴覚-聴覚、視覚-視覚、聴覚-視覚間の照合課題を行い、被験者は、

音声刺激と発声動作の刺激の組み合わせが、一致か不一致かの照合を行った。聴覚と視覚の異種感覚統合が行われる神経基盤として、両側腹側運動前野と後部頭頂葉が示唆された。また、この領域には情報を統合するだけでなく、注意の分配にも関与していることが考えられる。そこで、聴覚と視覚刺激の一致、不一致の差を見たところ、両側上頭頂葉と左側頭頂間溝が、聴覚と視覚の情報統合に深く関与していることが示唆された。

ピアノ学習に伴う視聴覚統合に関与する神経活動

長谷川 武弘 (東京女子医大), 定藤 規弘

健聴者においては、読唇により側頭平面の賦活が見られ、視聴覚統合の脳内表現と目されている。読唇にみられるような視聴覚統合が学習によるものである、という仮説のもと、ピアノの keyboard reading 課題を、ピアノ学

習者と未学習者に遂行させたところ、前者で側頭平面の賦活が観察されたが、後者では見られなかった。このことから、ある種の視聴覚統合は長期学習によって形成されることが示唆された。

聴覚-視覚刺激対連合学習における脳活動変化

田邊 宏樹, 定藤 規弘

学習に伴う視聴覚統合には、無関係な2つの情報を結びつける過程が存在しているとの仮説のもと、対連合学習課題を通して、記憶の形成と記憶されたものの表現に関わる可塑的な神経基盤を機能的 MRI を用いて検討した。「結びつけること」に関係している領域は学習の初期に活動が高く学習が進むにつれて活動が下がり、一方「結びついたものの表象」に関わる領域は、学習が進むにつれてその活動を増大されることが予想されるので、そ

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

発達期における聴覚脱失による可塑的変化の年齢依存性

定藤 規弘

前年度までの研究で、聴覚脱失による可塑的変化の少なくとも一部は、聴覚連合野を含む、視聴覚統合をこなす神経回路により担われていることが示唆された。このような変化に年齢依存性があるかを明らかにするために、音声言語習得以降に聴覚障害をきたした群との比較を行った。早期失聴者(2歳未満)6名と手話を理解できる健聴者6名、晚期失聴者(5歳以降)5名を対象に機能的 MRI を試行した。課題は、手話による文章理解課題である。健聴者、聴覚障害者とも全ての課題において後上側頭溝の賦活がみられ、手や顔面の動きに関連するものと考えられた。その一方、上側頭葉の賦活は早期・晚期失

聴者の両者でみられたが、前上側頭溝の賦活は早期失聴者でより著明であった。中上側頭溝はヒトの音声に対して選択的に反応することが知られている。この領域は話者の特徴抽出などの複雑な音情報処理に関与し、そのような情報を異種感覚統合や長期記憶のため他の領域へ送る役目が想定されている。この結果から、言語習得以前の聴覚脱失により中上側頭溝の視覚反応性が増強することは、中上側頭溝本来の音声処理が視覚処理に置き換わったことを示唆している。このことは、逆にヒトの音声を認識する脳内機構形成における、早期(2歳未満)聴覚入力的重要性を示唆する。

ICA による task-related motion artifact の除去

河内山隆紀（香川大学），定藤規弘

機能的 MRI において体動は大きな雑音となり，とくにこれが課題と同期していると除去が困難である。この問題を解決するために，Independent component analysis を利

用したデータ解析法を開発し，実データにおいて体動により生じる雑音を効率的に除去できることを示した。

機能的 MRI を用いた脳局所間結合度の解析手法の開発

山下宙人（統計数理研），尾崎 統（統計数理研），定藤 規弘

機能的 MRI は脳全体にわたる膨大な時系列データを提供する。これを用いた局所間結合度の評価法を，multivariate autoregressive model を骨子として開発した。

本法の利点は影響の方向をあらかじめ設定する必要のない点であり，今後実際の実験データに適用していく予定である。

触覚による粗さ評定に関する神経基盤の解析

北田 亮（京都大学），定藤 規弘

触覚による粗さ弁別の神経基盤は，形状弁別のそれとは異なるとされているが，詳細は不明である。機能的 MRI を用いて，粗さ評定を遂行する際の神経活動を計測

したところ，両側 SII と島ならびに右前頭前野が，粗さと関連した活動を示した。前 2 者は感覚処理に，後者は粗さ評定に関連するものと推論された。

視覚刺激に対する NIR, fMRI 同時計測

豊田浩士，定藤規弘，柏倉健一（群馬県立医療短期大学），笠松眞吾（福井大学）
岡沢秀彦（福井大学），藤林靖久（福井大学），米倉義晴（福井大学）

刺激提示後の神経活動に伴う fMRI 信号変化に関しては未だ正確な機序は不明である。視覚刺激に対して NIRS, fMRI 同時計測を行い，両者の信号の反応曲線から fMRI 信号変化の成因を検討することを本研究の目的とした。
5 名の健常人を被験者とし，チェッカーボードを視覚

刺激として提示した。刺激提示時間を変化させ，それぞれを繰り返した。刺激持続時間と BOLD 信号の間には非線形性があり，その非線形性は NIRS から計算された oxygen extraction fraction に一致することが判明した。

運動学習転移における小脳の役割

河内山隆紀 (香川大学), 松村道一 (京都大学), 米倉義晴 (福井大学), 定藤規弘

2つのボールを掌上で回転させるという運動を学習する際の神経活動をO-15標識水PETをもちいて計測した。学習転移は右手から左手へ起こったが逆は見られなかった。いずれの手で学習する際でも、最初期に左小脳外側に強い賦活がみられた。一方左小脳傍矢状領域では、学

習に伴って徐々に活動が減弱することが観察された。これらの活動は、それ以前の学習がある場合に比べ、無い場合のほうが著明であった。これらのことから、左小脳半球は学習転移に関連していると考えられた。

マッカロー効果をもちいたヒト色感覚にかかわる神経機構の解明

守田知代 (京都大学), 松村道一 (京都大学), 米倉義晴 (福井大学), 定藤規弘

我々は、色彩豊かな世界に暮らしている。目に届くのは、ある波長成分を持つ光であるが、そこから特定の色の内的な経験(色感覚)を生み出しているのは、我々の脳である。実際の色を見ているときに、紡錘上解・舌状回を含む腹側後頭葉領域の賦活を伴うことは良く知られているが、これらの領域が色感覚と直接係るのかどうかはまだ明らかにされていない。本研究では、刺激を一定に保ったまま、異なる色感覚を作り出すために、マッカロー効果と呼ばれる錯覚現象を用いた。マッカロー効果とは、互いに直行する方向成分を持ち、補色関係にある縞模様刺激(誘導刺激)(例:緑色の水平縞,マゼンダ色の垂直縞)を交互に数秒ずつ合計数分間提示すると、その後、白黒の縞が方向によって誘導時の補色に薄く色づいて見える現象である。本実験では、誘導刺激提示の前後に、白黒からなる縞模様のテスト刺激を提示するセッションを設け、そのテスト刺激を見ているときの脳活動を

fMRIで測定した。ここで、2つのグループを用意した。誘導後のセッション中、色に注意を向けるようあらかじめ教示したINFORMEDグループと、特に何も教示しないUNINFORMEDグループの2つである。実験の結果、マッカロー効果が被験者全員にほぼ同程度誘導されていたことは実験終了後に確認できたにも係らず、UNINFORMEDグループの約半数の被験者はfMRI実験の最中に色が付いて見えることに気づいていたが、残り半数は気づいていなかった。実際の色刺激に対して有意な活動を示した両側の腹側後頭葉の中で左側V4 α に相当するV4の前方領域は、MRスキャン中に錯覚の色に気づいていたグループでは活動が見られたものの、気づかなかったグループでは活動がみられなかった。これらの結果より、色特異領域とされていたV4のなかでも、前方領域が特に色感覚に関与していることが示唆された。

両手協調運動における相転移現象に関わる神経基盤

荒牧勇 (科学技術振興機構) 定藤規弘

周期的な両手協調リズム運動においては、同位相モードと反位相モードという2つの安定なモードがある。この2つのモードの安定性は等価ではなく、運動周波数の増加などにより反位相モードから同位相モードへの突然の変化がおきる(相転移現象)。本研究はこうした運動パ

ターンの突然の転移に関連する脳活動を事象関連磁気共鳴画像法を用いて調べた。その結果、相転移現象に関連する領域は、前補足運動野、運動前野吻側、下頭頂葉といった、運動の計画に関与すると考えられている脳部位であった。一方、反位相モードや同位相モードの維持に

関連する領域は固有補足運動野、運動前野尾側、一次運動野といった、運動の実行に関与する脳部位であった。また、相転移に関連する脳活動は右半球優位であったが、この偏在は、行動データにおいて相転移時に左手の運動

が乱れる傾向があることと関係すると考えられ、両手協調運動において半球間の相互作用が非対称である可能性が示唆された。

ブロードマン6野のもつ部位特異的認知機能とその有意性の検討

本田 学

田中 悟志

これまでに独自に開発した厳密に運動制御要素を排除した心内表象操作課題をもちいて、運動の高次制御にかかわるブロードマン6野（運動前野）吻側部の機能が、非運動性の心内表象の操作にも関わっていることをポジトロン断層法、機能的磁気共鳴画像マッピング、事象関連磁気共鳴機能画像法を組み合わせることで明らかにしてきた。そこで観察された活動が、真に心内表象操作に寄与しているのか、それとも単なる随伴活動であるかを検討した。その結果、空間表象を操作するときには外側の運動前野

の活動が、文字列表象を操作するときには内側の運動前野の活動が特異的に高まると同時に、それらの部位の機能を経頭蓋低頻度連続磁気刺激によって一過性に低下させることにより、課題選択的に成績が悪化することを発見した。これらの知見は、運動制御機構の重要な要素である運動前野が認知的操作においても必須の役割を果たしており、運動制御と同様に部位ごとに異なる役割分担をおこなっていることを示すものである。

超可聴域超高周波成分による行動制御メカニズムの基礎的検討

本田 学

中村 聡（科学技術振興機構）

八木玲子（総合研究大学院大学）

森本雅子（十文字学園大学）

前川督雄（四日市大学）

仁科 エミ（メディア教育開発センター）

河合徳枝（国際科学振興財団）

大橋 力（国際科学振興財団）

人間の耳に聞こえない超高周波成分を豊富に含む音は、音知覚を快適にする感性反応を誘導することが知られている。その神経基盤の全体像を探るため、ポジトロン断層撮像法をもちいて非可聴域超高周波成分を豊富に含む音を聴取時、同じ音源から超高周波成分を除去した音を聴取時、暗騒音（ベースライン）時の脳血流を計測し、主成分分析をもちいて互いに相関して活動する神経機能ネットワークの全体像を抽出した。その結果、第一成分として両側聴覚野を含む成分、第二成分として視床、視床下部、脳幹を中心として、前頭前野へと広がる成分が抽

出された。また超高周波成分を含む音の聴取時には、免疫活性を示す血中NK細胞活性が上昇するとともに、唾液中のクロモグラニンA、免疫グロブリンAが有意に上昇することを発見した。さらに公共空間に超広帯域音響呈示システムを設置し、音響信号を背景に流して不特定多数の利用者の質問紙調査を実施したところ、超高周波成分を豊富に含む音の呈示により快適性が向上するのに対して、同じ音源から作成した超高周波成分を除いた音の呈示では、むしろ音呈示がないときよりも快適性が低減することを示した。また音呈示を行っているときに被

験者に自由にボリューム調整させると、超高周波成分を含まない音よりも含む音のほうを、またさらに超高周波成分のみを+6dB 増強した音のほうを、より大音量で聞こ

うとすることを発見した。これらの知見は感性反応による刺激受容行動促進効果を示すものと考えられる。

カウンティングにおける運動前野の役割

神作 憲司, Marie-Laure Grillon, 定藤 規弘
Ari Johnson, Mark Hallett (NINDS)

数は最も普遍的な概念の一つであり、カウンティングは最も単純な数的情報処理の一つと考えられる。しかしながら、カウンティングの神経基盤は未だ良く分かっていない。多くの動物が小さな数を比較的正確に扱えることが分かっているが、大きな数を正確にカウンティングするのは、ヒトに特異的な能力と考えられる。これまで我々は、機能的磁気共鳴画像 (fMRI) を用いて、小さな数 (1-4) をカウンティングするときと比べて、大きな数

(10-22) をカウンティングするときに、ヒト運動前野 (左腹側運動前野上部) が強く活動することを見出し、さらにこの領域を経頭蓋磁気刺激 (TMS) にて刺激すると、大きな数が正確にカウンティング出来なくなることも明らかとした。現在は、カウンティングにおける運動前野の役割をより詳細に調べるために、連続した感覚刺激を明示的なカウンティングを行わずに知覚する場合との比較検討などを行っている。

単純反応時間課題遂行時の脳内情報処理

神作 憲司
Mark Hallett (NINDS)

単純反応時間課題は、単純な感覚運動変換のモデルとして広く用いられてきた。しかしながら、単純反応時間課題遂行をになう神経基盤は未だ良く分かっていない。我々は、単純反応時間課題遂行に必要な神経系は、入力感覚モダリティーや出力効果器によらず活動する、との仮説に基づき、機能的磁気共鳴画像 (fMRI) を用いた実験を行った。その結果、右上側頭回後部、右運動前野、左腹側運動前野、小脳虫部、内側前頭回にこうした脳活動

を見出した。さらに、右後部上側頭回と右運動前野が、運動出力を行わずに感覚刺激を受けるだけでも活動することも見出した。現在は、単純反応時間課題遂行に何らかの役割を持つことが示唆されたこれらの脳領域の機能をより詳細に調べるために、右後部上側頭回や右運動前野が外部環境の変化を一つの事象として検出する際に用いられるのか、などの点に注目した研究を行っている。

発達生理学研究室

認知行動発達機構研究部門

【概要】

2004年度は、タイ国出身で前年5月より1年間の予定で外国人特別研究員として留学していた Thongchai Sooksawate 博士が4月末で帰国した。またロシア国パヴロフ生理学研究所より1年間の予定で共同研究してきた Nikolay Nikitin 博士も7月末で帰国した。また客員教授としてスウェーデン王国・イエテボリ大学から Sergei Perfiliev 博士が6-9月まで3ヶ月間来日し、共同研究を行なった。また京都大学の博士課程大学院生の武井智彦君が受託大学院生として参加することになった。

大きな出来事としては3月に生理学研究所国際シンポジウムを開催したこと、部門の引越しを行なったことがある。前者については3月16-18日に岡崎コンファレンスセンターにおいて“Multidisciplinary Approaches to Sensorimotor Integration”と題する国際シンポジウムを海外からの出席者27名を含む220名の参加者を得て開催した。後者については、6月にそれまで5階と動物実験センター地下に分散していた研究室を統合して6階に移動

することができたことで、これまでの不便さを解消することができたのは大きかったと考えている。研究については、サルを用いて脊髄レベルでの皮質脊髄路の損傷後の機能代償機構を西村幸男君を中心とする研究グループ、大脳皮質一次視覚野損傷後のサルの認知行動機能の研究を吉田正俊君を中心とする研究グループ、中脳上丘の局所神経回路に関するスライス標本を用いた研究を遠藤利朗君と Sooksawate 博士を中心とするグループ、サルの上丘局所神経回路に関する麻酔下での電気生理実験を Nikitin 博士と伊佐が、またマウスのサッケード系に関する研究を坂谷智也君が、またサルの precision grip 遂行時の感覚・運動統合機構について関和彦君を中心とするグループが推進した。また、10月より科学技術振興事業団の戦略的創造研究推進事業 (CREST)の研究費を受領することができ、「神経回路網における損傷後の機能代償機構」のテーマで研究を推進することになった。

ラット上丘浅層からの投射ニューロンの樹状突起での活動電位開始の過分極活性化陽イオンチャンネルによる調節

遠藤利朗, 納富拓也, 足澤悦子, 重本隆一, 伊佐正 (認知行動発達機構, 脳形態解析)

Wide field vertical (WFV) cell は上丘浅層から視床や上丘中間層に投射する主要な出力ニューロンであり、視覚地図上で数十度にも相当する発達した樹状突起をもつ。このような形態はこのニューロンが受容野内を動く光刺激によく反応する性質と関係があると考えられている。我々は入力線維の電気刺激への反応の解析から、このニューロンでは入力に対して活動電位が樹状突起で開始されることを示す結果を得た。一方、我々は WFV cell は過分極活性化陽イオン電流 (I_h) を顕著に示すことを既に明

らかにしていたが、その活性化キネティクスの解析と免疫染色の結果から、WFV cell は I_h チャンネルのうちでも HCN1 を主に樹状突起に発現していると考えられた。 I_h を抑制すると、入力線維刺激に対する活動電位の生成にいたる確率の減少、または活動電位開始の遅れが観察された。このことから WFV cell において HCN1 は樹状突起の静止電位や膜の時定数の調節によって活動電位の開始または細胞体への伝導を促進していると考えられる。

上丘中間層 GABA 作動性ニューロンの特性

Thongchai Sooksawate, 伊佐かおる, 伊佐 正
小幡邦彦 (理化学研究所脳科学総合研究センター)
柳川右千夫 (群馬大学大学院医学系研究科)

上丘中間層ニューロンは高頻度発火によってサッケード運動などの指向運動の開始をトリガーすることが知られている。この高頻度発火の開始にあたって上丘中間層の出力細胞に対する持続的な GABA 作動性の抑制が減弱することが知られていること。従って上丘局所神経回路において GABA 作動性介在ニューロンは大変重要な役割を有していることになるが、これまでその性質はほとんど調べられてこなかった。今回、柳川、小幡らによって開発された GAD67-GFP ノックインマウス (生後 17-22 日齢) を用いて、上丘スライス標本において GFP の蛍光を有している GABA 作動性ニューロンから whole cell patch clamp 法による記録を行い、その電気生理学的

特性の解析とバイオサイチンの細胞内注入による形態学的特性の解析を行なった。その結果、定常電流通電に対する発火特性から、58% (135/231) が fast spiking neuron, 29% (67/231) が burst spiking neuron に分類された。その他は late spiking neuron が 8% (18/231), regular spiking neuron が 2% (4/231), rapid spike inactivation type が 3% (7/231) とごく少数であった。また軸索の投射様式から GABA 作動性ニューロンには (1) intra-laminar local neurons, (2) inter-laminar local neurons, (3) intra-laminar long range horizontal neurons, (4) commissural neurons, (5) projection neurons など、機能が異なると考えられる複数のサブグループが存在することも明らかになった。

遺伝子改変マウスを用いたサッケード運動制御機構の解析

坂谷智也, 伊佐正

興奮性神経伝達物質グルタミン酸の受容体構成因子である NR ϵ 4 (NR2D) サブユニットの生体における役割についてはこれまでのところほとんど知られていない。一方、NR ϵ 4 (NR2D) 遺伝子は上丘において強く発現していることが報告されている。そこで NR ϵ 4 (NR2D) 遺伝子欠損マウスを用いて、上丘の主要な機能であるサッケード眼球運動について解析した。我々が新たに開発したマウスのサッケード測定システムをもちいて自発サッケードについ

て解析したところ、野生型に比べてノックアウトマウスでは同振幅のサッケードにおける最高速度が有意に減少していることがわかった。この結果から NR ϵ 4 は眼球サッケードにおいて運動ダイナミクスの調節に関与していることが示唆された。現在、上記の NR ϵ 4 (NR2D) の機能が主として上丘内部におけるものであるのか、あるいは下流の脳幹系におけるものかを検討している。

皮質脊髄路損傷後における手の巧緻運動の機能回復

西村幸男, 伊佐正, 森近洋輔
パーフィリエフ・セルゲイ (イェテボリ大学)
尾上浩隆 (東京都神経研)
塚田秀夫 (浜松ホトニクス)

皮質脊髄路損傷後における手の巧緻運動の機能回復のメカニズムを検討した結果、(1) 母指と第二指とを対立

させて物体をつまむ運動 (precision grip) は、損傷後一週間で回復し始め、1-3ヶ月でほぼ正常に近いレベルまで回復

すること。(2) 健常なサルでは見られない錐体路由来の2シナプス性 EPSP が上肢筋運動ニューロンの半数で記録されたことを明らかにし、脊髄内の神経回路網の変化が機能回復に貢献している可能性を報告した。最近、より上位中枢の関与を検討するために precision grip 中に Positron Emission Tomography による脳機能イメージングを行った結果、損傷後一ヶ月では両側の一次運動野・体性感覚野において顕著な活動の上昇が見られた。三ヶ月後には依然、両側の一次運動野・体性感覚野の活動上昇

が観られ、更に運動前野腹側部の活動上昇が観られた。さらに、これらの領域が precision grip に関係しているか検討するために両側の一次運動野にムシモルを注入したところ、損傷の反対側(支配)では損傷の2週間後・三ヶ月後に効果が見られたが、同側では損傷の二週間では効果が見られたのに対し、三ヶ月後には効果が見られなかった。これは、回復の時期によって使われる大脳皮質の領域が異なっていることを示唆している。

サルを用いた盲視 (blindsight) の神経機構の解明

吉田 正俊, 伊佐 正

盲視の動物モデルとして片側の第一次視覚野を外科的に切除したニホンザルを二匹作成して、急速眼球運動を指標とした行動実験を行った。

(1) 強制選択型の視覚誘導性眼球運動課題を遂行できることを確認した。欠損半視野で弁別できる標的刺激の閾値は手術前と比べて上昇していた。また、急速眼球運動の終始位置は欠損半視野においてより不正確であり、眼球運動の速度プロファイルも欠損半視野へ向かうもの

と正常半視野へ向かうものとの間で顕著な差が見られた。(2) 時間的ギャップを(1)の課題に加えることで express saccade が起こることを見いだした。(3) yes-no 課題型の視覚誘導性眼球運動課題の成績が(1)の強制選択型課題の成績よりも悪いことを見いだした。(4) 記憶誘導性眼球運動課題を遅延時間2秒でも遂行できることを見いだした。このことは、視覚手掛かりの位置情報を短期記憶として保持できることを示している。

生体恒常機能発達機構研究部門

【概要】

当部門は2003年に新設され、2004年6月に明大寺地区A棟5回に研究室を立ち上げてから約1年が経過した。現座、発達の過程で一旦形成された神経回路に起こる再編成のメカニズムを回路レベルで解明することを目標に研究をしている。特に、発達期における再編のメカニズムとして、シナプスレベルにおいて、伝達物質のスイッチング、細胞内イオン環境の変化による GABA の興奮性

から抑制性へのスイッチとその制御機構、受容体の細胞内動態やこれらに対する神経栄養因子、環境/回路活動による制御を検討している。

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

発達期における神経伝達物質のスイッチング

鍋倉淳一, 張 一成, 前島隆司
石橋 仁 (九州大学)

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

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

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

鍋倉淳一, 張 一成, 渡部美穂
福田敦夫 (浜松医科大学)

未熟期および虚血や傷害後早期に GABA は興奮性伝達物質としての作用を獲得する。これは GABA_A 受容体に内蔵するチャンネルを流れる Cl⁻イオンの向きによって決定されるため, 細胞内 Cl⁻イオン濃度によって GABA は興奮性/抑制性が決定される。この細胞内 Cl⁻イオン濃

度は神経細胞特異的に発現する K⁺-Cl⁻トランスポーターである KCC2 によって主に決定されている。発達期や再生期における KCC2 の発現, およびその機構を検討している。KCC2 の発現制御に関して, 細胞内制御分子の探索を行なっている。

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

鍋倉淳一
溝口義人 (九州大学)
平田雅人 (九州大学)
兼松 隆 (九州大学)

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

は何れも細胞内 PLCgamma, Ca²⁺を介する。この部位差および age 差のメカニズムを検討するために, GABA 受容体のリサイクリングに関するメカニズムの解明のために GABA 受容体βサブユニットに作動する蛋白 (phospholipase C-related inactive protein) に注目し, 遺伝子改変動物などを用いて検討している。

クリプトン-YAG レーザーを用いた脳虚血障害モデル動物作成技術の開発

鍋倉淳一

八尾博史（国立肥前精神医療センター）

脳障害の回復期における神経回路の可塑性の研究を遂行するにあたり、生体において、程度の一定した脳障害モデルを作成する必要がある。任意の脳血管の閉塞・再開通を任意に行なうことができる技術を脳虚血作成技術に精通している八尾博史博士と共同で開発を行なう。具体的には、ローズベンガル色素を静脈注入後、任意の脳

血管にクリプトンレーザーを極短時間照射し、血栓形成による閉塞を作成する。任意の時間後に高エネルギーパルスレーザーである YAG レーザーを照射し、血管の再開通を起こさせる。この技術はマウスでは頭骸骨を駆けることなく、非観血的に閉塞・再還流が可能であり、脳虚血・障害の分野では画期的技術となる。

生殖・内分泌系発達機構研究部門

【概要】

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

体エネルギー代謝の調節機構を分子レベルで解明し、その分子機構を通して生活習慣病など様々な疾患の原因・治療法を明らかにしたいと考えている。現在実施している主たる研究課題は次の通りである。1) AMP キナーゼによる生体エネルギー代謝の調節機構の解明、2) レプチン、神経ペプチドによる糖・脂質代謝調節機構の解明、3) 視床下部腹内側核におけるエネルギー代謝調節機構とシグナル伝達機構の解明。

AMP キナーゼによる生体エネルギー代謝の調節機構

箕越 靖彦
岡本 士毅
志内 哲也

AMP キナーゼは、細胞内のエネルギーレベルが低下する危機的な環境で活性化し、エネルギー基質を動員して細胞内 ATP レベルを回復させる。しかし最近、我々は、AMP キナーゼがレプチンやアディポネクチンなどホルモンによって活性化して骨格筋における脂肪の利用を促進すること、視床下部 AMP キナーゼがレプチンなど摂食調節ホルモン、グルコースによって活性を変え、その作用を通して摂食行動を制御することを明らかにした

(Nature 2002, 2004)。このように AMP キナーゼは、細胞内エネルギーレベルを調節するだけでなく、レプチンなどホルモンの働きを介して生体全体のエネルギー代謝を調節している。本研究課題では、AMP キナーゼによる生体エネルギー代謝の調節機構を明らかにするため、活性型並びに不活性型 AMP キナーゼを視床下部の各種神経細胞や骨格筋にレンチウイルスを用いて特異的に発現させ、摂食行動、栄養代謝に及ぼす影響を調べている。

レプチン、神経ペプチドによる糖・脂質代謝調節機構の解明

箕越 靖彦

志内 哲也

斉藤 久美子

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

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

視床下部腹内側核におけるエネルギー代謝調節作用とシグナル伝達機構

箕越 靖彦

岡本 士毅

諸橋 憲一郎 (基礎生物学研究所)

視床下部腹内側核 (VMH)は古くから満腹中枢として知られるなど、生体エネルギー代謝に重要な調節作用を営むことが知られている。しかし、そのシグナル伝達機構は全く不明である。当部門では、VMHでの作用伝達物質と考えられるBDNF(brain-derived neurotrophic factor)の働きを中心に、VMHにおけるエネルギー代謝調節作用並びにそ

のシグナル伝達機構を調べている。また、脳の中でVMH特異的に発現する転写因子AD4BPの遺伝子エンハンサーを用いて様々なトランスジェニックマウスを作製し、生体エネルギー代謝に及ぼすVMHニューロンの調節作用を明らかにする研究を行っている。

脳機能計測センター

形態情報解析室

【概要】

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

超高圧電子顕微鏡室では、医学生物学用超高圧電子顕微鏡（H-1250M 型；常用 1,000kV）を、昭和 57 年 3 月に導入して同年 11 月よりこれを用いての共同利用実験が開始されている。平成 16 年度は共同利用実験計画が 23 年目に入った。本研究所の超高圧電顕の特徴を生かした応用研究の公募に対して全国から応募があり、平成 16 年度は最終的に 12 課題が採択され、実施された。これらは、厚い生物試料の立体観察と三次元解析、薄い試料の高分解能観察等である。共同利用実験の成果は、超高圧電子顕微鏡共同利用実験報告の章に詳述されている。超高圧電子顕微鏡室では、上記の共同利用実験計画を援助するとともに、これらの課題を支える各種装置の維持管理及び開発、医学生物学用超高圧電子顕微鏡に関連する各種基礎データの集積および電子顕微鏡画像処理解析法の開

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

本年度の超高圧電顕の利用状況の内訳は、共同利用実験等 123 日、修理調整等 52 日である（技術課脳機能計測センター形態情報解析室報告参照）。電顕フィルム等使用枚数は 5,436 枚、フィラメン点灯時間は 399 時間であった。装置は、平均 64% の稼働率で利用されており、試料位置で 10^{-6} Pa 台の高い真空度のもとに、各部の劣化に伴う修理改造を伴いながらも、高い解像度を保って安定に運転されている。

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

フォルムパール膜の膜厚安定性の検討

山口 登, 有井達夫

フォルムパール膜は、電子顕微鏡用の試料支持膜として用いられる高分子膜である。この膜は、作成が容易で、比較的耐電子線にも優れ、また機械的衝撃にも強いことから生物試料の低倍観察用として広く用いられている。フォルムパール膜の作成法には、一般に乾式引き上げ法が用いられる。この方式は、まずスライドガラスをフォルムパール溶液（溶媒：クロロホルム）に浸し、次にそのスライドガラスをモーターなどを用いてゆっくり引き上げることにより、その表面に非常に薄い膜を作成する方法である。ガラス表面の薄膜は、水面剥離法により剥離し、グリッドに張り付けて使用される。作成される膜の厚さは、引き上げる時の速度（高速時→厚い、低速時→薄い）と溶液の濃度（濃い→厚い、薄い→薄い）によって

制御が可能である。今回、作成される膜厚の安定性について検討した。約 20 度の室温で湿度 60% 程度の通常の実験室の条件で、引き上げ速度、溶液濃度とフォルムパール膜厚との関係を求めた。膜厚の測定には、金属顕微鏡を利用した干渉法を用いた。この方法は、膜厚（段差）によって生じる干渉縞のズレ量から厚さを算出する手法である。結果を図 1 に示す。環境（室温、湿度等）にもよるが、引き上げ速度と溶液濃度により、安定に膜厚が制御可能であることがわかった。当室ではできる限り振動を除去し、安定に膜を作成できる「自動膜作成装置」を各部に工夫をこらして製作しており、これを用いてより定量的な測定が可能となった。

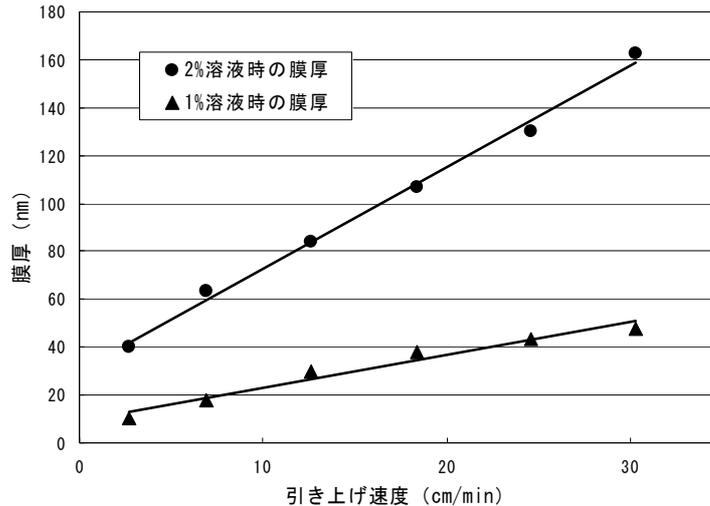


図1. フォルムバル膜厚と引き上げ速度の関係：溶液（溶媒：クロロフォルム）濃度を变化させて示す。

小腸絨毛上皮下線維芽細胞と吸収上皮細胞間の細胞間コミュニケーション

古家園子, 古家喜四夫 (科学技術振興機構 細胞力覚)

小腸絨毛上皮下線維芽細胞は消化管上皮の基底膜の下で細胞網を形成し、lamina propria を包んでいる特殊な線維芽細胞であり、血管や神経終末、絨毛の平滑筋とも隣接しており、絨毛におけるシグナル伝達の要の役割を果たしていると考えられる。我々はこの細胞が食物や水の摂取による機械刺激を感じるメカノセンサーであり、そのシグナルを知覚神経に伝達して摂食反射を引き起こしていることを culture 系で明らかにしてきた。

今回、小腸絨毛下線維芽細胞と上皮細胞由来の T84 細胞を co-culture した。タッチ刺激により発生した Ca^{2+} 波が小腸絨毛下線維芽細胞から T84 細胞に伝播することが明らかになった。

小腸絨毛上皮下線維芽細胞で感知した機械的な刺激や神経細胞からのシグナルは小腸絨毛上皮下線維芽細胞からの ATP 放出による Ca^{2+} 波の伝播という形で上皮細胞に伝播し、その機能を制御していると考えられる。

機能情報解析室

【概要】

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

フィールド電位の直接記録や陽電子断層撮影法などを併用して解析している。

意志に関する脳活動の研究

遠本 徹

「意欲」や「意志」の神経機序は不明な点が多い。これまでに陽電子断層撮影法を用いた研究で、前頭前野・前

帯状野・海馬の脳血流量が想定される意欲の変化と一致した変動を示すことを明らかにした。大脳辺縁系と前頭

前野の「意欲」への関与を示唆する知見と考えられる。さらに一歩進めて、この脳領域でどのような神経活動が行われているのかを解明するために、運動課題を行うサルの前頭前野や前帯状野の大脳皮質フィールド電位を記録した。その結果、この部位のシータ波活動が「意欲」

や「注意」に相関していると解釈可能な知見を得た。ヒトの脳波で「注意の集中」に関連して観察される前頭正中シータ波 (Frontal midline theta rhythms) に相当するものと考えられる。両者の対応関係やサルのシータ波の発生状況をさらに詳しく研究中である。

脳機能分子解析室

【概要】

脳機能に代表されるような複雑な生物反応機構の解明に、遺伝子改変動物の作製は必要不可欠である。とくにラットの遺伝子ターゲティング技術の開発は、脳神経系遺伝子を含む数万にも及ぶ遺伝子の役割を研究するために重要であり、切望されている。脳機能分子解析室では、遺伝子改変動物(マウス, ラット)の作製を進めるとともに、遺伝子ターゲティングによってノックアウトラットを作製することを究極の目的としている。これまでに、ES細胞, 精原細胞の細胞株樹立を目指した研究を

行うとともに、核移植や顕微授精など、ラットにおける発生工学的技術の高度化に取り組んできた。研究課題のうち下記の3題を具体的に示す。(1) トランスジェニック (Tg)ラットの作製効率を改善するため、顕微授精技術を応用した Tg ラットの作製法を開発した。(2) 円形精子細胞の顕微注入によって効率的にラット産仔を作出するため、卵母細胞の活性化誘起方法について検討した。(3) ラットの核移植技術を開発するため、M 期体細胞の核移植によるクローンラットの作製を試みた。

外来 DNA に曝露した精子の顕微授精によるトランスジェニックラットの作製

加藤 めぐみ, 金子 涼輔, 平林 真澄

卵細胞質内精子注入法 (ICSI) を応用してトランスジェニック (Tg)マウスを作製できると報告された。本実験では、DNA 溶液にさらしたラット雄配偶子を顕微注入することにより Tg ラットの作製を試みた。ラット精子を EGFP 遺伝子溶液(0~10ng/μl)に1分間さらした後、未受精卵子に顕微注入した。DNA の至適濃度は 0.5ng/μl で、

曝露精子の ICSI 後の生存率は 76%(327/452)であった。翌日、分割卵 75 個 (23%)を含む 286 個の胚を偽妊娠 1 日目の雌ラットに卵管移植したところ、25 匹 (9%)の産仔が得られ、そのうち 5 匹 (産仔の 20%) が EGFP 陽性の Tg 個体であった。以上、Tg ラットの作製に顕微授精技術が応用できることを証明した。

ドナーとレシピエントのラット系統は

1 細胞期卵から体外発育した桑実胚～胚盤胞の産仔発生に影響する

加藤 めぐみ, 平林 真澄, 保地 眞一 (信州大)

ラット体外培養胚の産仔発生率は 10%前後と低く、発生工学技術の開発遅延の一因となっている。本実験では、Wistar 系または 3 元交雑種 (SD x DA 系 F1 雌 x Wistar 系雄) の前核期卵を 96 時間培養後、偽妊娠 3 日目および

4 日目の Wistar または F1(SD x DA)雌の子宮に移植し、産仔発生能を比較した。前核期卵の桑実胚～胚盤胞への体外発生率は 3 元交雑種胚の方が Wistar 胚に比べて高かった (74 vs 66%)。Wistar 胚の産仔発生率は、Wistar 受卵

雌のとき 13~24%, F1 受卵雌のとき 24%だった。一方, 3元交雑種胚のそれは, Wistar 系受卵雌よりも F1 受卵雌に移植したときの方が高かった (31~34 vs 42~59%)。も

っとも高い産仔発生率 (59%) は5日目の3元交雑種胚を偽妊娠 3 日目の F1 受卵雌の子宮環境に戻したときに得られた。

ラット M 期体細胞の核移植によるクローン個体作製の試み

平林 真澄, 加藤 めぐみ, 保地 眞一 (信州大)

2003 年 9 月, Qi Zhou らは M 期体細胞核を使ったクローンラットの作製を報告した。この原著を可能な限り忠実に再現し, クローンラットが作製できるかを検証した。ドナー細胞には胎齢 12.5 日目の DA 系ラット由来線維芽細胞の細胞周期をデメコルシン処理によって M 期に同調させたもの, レシピエント卵母細胞には SD 系雌ラット由来の MG132 処理した裸化卵子を用いた。ドナー細胞核を注入し, ピペットを引き抜きながら卵母細胞の

MII 核板を吸引除去した。再構築した卵子をブチルラクトン処理によって活性化誘起したところ, 分割はした (56%, 175/313) が, それ以降の体外発育例は得られなかった。67 個の 2 細胞期胚を含む計 166 個の再構築胚を偽妊娠雌ラットに移植したが, クローン産仔はおろか着床痕も確認できなかった。この成績はこれまでの G0/G1 期の体細胞核移植における発生率よりも低かった。

統合バイオサイエンスセンター

時系列生命現象研究領域

【概要】

3年前の研究室発足以来、発生、分化、再生などの時系列生物現象における生理学的変化(膜電位、イオン濃度)の役割を分子細胞レベルで明らかにすることを目指してきた。今年、昨年発見した新規電位センサータンパク VSP について、その分子機能の詳細を明らかにした。また、平成 15 年度後半から加わった東島助教授がゼブラフィッシュを用いた神経回路機能の研究系を立ち上げ、木村非常勤研究員とともにトランスジェニック技術

を用いた解析を軌道に乗せている。また、平成 16 年 4 月から加わった西野研究員(学振特別研究員)が比較生理学的なアプローチで、脊索動物の運動機能についての解析をスタートした。このように動物種としてホヤ、マウス、魚、を扱いながら、アプローチもゲノムインフォマティクス、比較生理学、トランスジェニックなどの複数の手法を横断的に扱える環境になってきた。

新規電位依存性タンパク VSP の分子機能

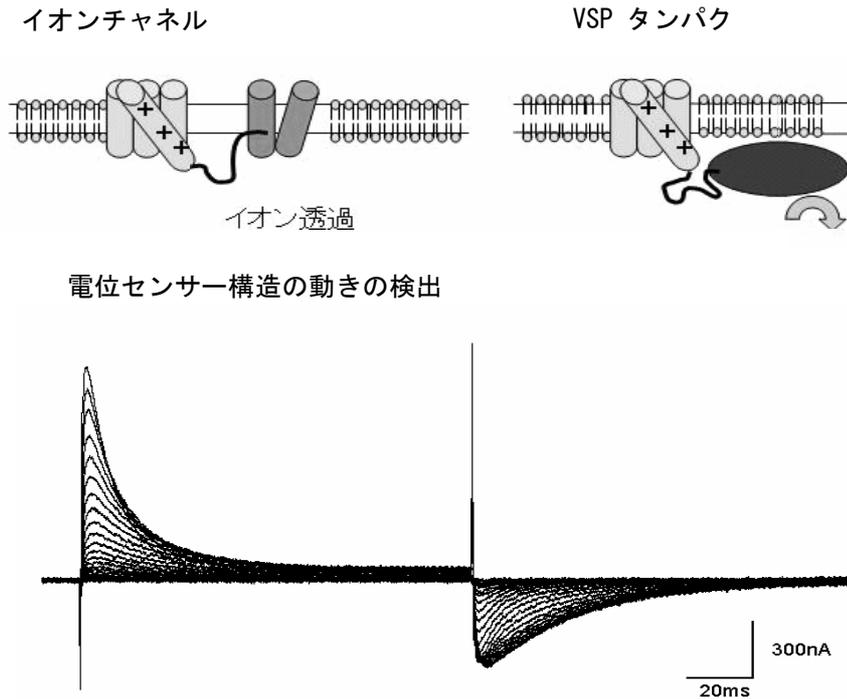
岩崎 広英, 村田 喜理, 岡村 康司
稲葉 一男 (筑波大学 下田臨海実験センター)

前年に我々は京都大学と共同でホヤゲノムからイオンチャンネル関連分子を網羅的にリストアップする作業を行ったところ、電位依存性チャンネルの電位センサーを有しながらイオンが通るポア領域を欠き、その代わりに C 末端側にガン抑制遺伝子として知られる PTEN と相同性の高い酵素ドメインを有する新規分子の発見に到った。今年、同定した電位依存性タンパク VSP について、細胞内ドメインの機能を明らかにするため、大腸菌に GST との融合タンパクとして発現させ、これについてマラカイトグリーンアッセイと TLC によるイノシトールリン脂質の脱リン酸化活性を定量した。その結果、VSP の細胞内ドメインが PIP3 を基質とした脱リン酸化活性を有することが明らかになった。

さらに、膜貫通ドメインの電位センサー機能が C 末端側の酵素機能とどのような連関があるかを明らかにするため、イノシトールリン脂質のうち PIP2 によって活性が変化することが知られている GIRK チャンネルまたは

KCNQ チャンネルを、VSP タンパクとともに、アフリカツメガエル卵母細胞へ強制発現させ、膜電位の測定と、酵素活性の測定を同一の細胞において同時に行う系を開発した。VSP が存在するときのみ、膜電位の変動に応じて GIRK チャンネルまたは KCNQ チャンネルの活性が変化し、電位センサー機能を失った VSP や、酵素活性をうしなつた変異体の VSP では、このようなカリウムチャンネルの活性の変動は見られなかった。これによりイオンチャンネル以外のタンパクで初めて、電位センサーによりタンパク機能が調節されることが明らかになった。

この分子がどのような生理機能に役に立っているかを知るために、VSP に対する抗体を作成して、局在をしらべたところ、精子の尾部の膜に分布することが明らかになった。このことから、精子の運動の制御や、形態の維持などに役に立っているのではないかと推察された。現在、ゼブラフィッシュなど脊椎動物の相同遺伝子についても機能解析を行っている。



中枢神経細胞の自発発火特性を規定する電位依存性ナトリウムチャネルの制御機構

岩崎 広英, 岡村 康司, 高木 正浩
白幡 恵美, 早坂 清 (山形大学医学部小児科学教室)

前年にクローニングしたヒト電位依存性 Na チャネル Nav1.6f は, アフリカツメガエル卵母細胞と tsA201 細胞発原型において顕著な持続性電流を呈した。Nav1.6 がランビエ絞輪部で活動電位の伝搬に働き完全な不活性化を示すことを考えると, ランビエ絞輪部において, 持続性

電流を負に制御する因子が存在するのではないかと考えられた。そこでランビエ絞輪に発現するいくつかのタンパクと Nav1.6 を共発現させ, 不活性化に及ぼす影響を検討した。

ゼブラフィッシュ脊髄神経回路形成機構の解析

東島 眞一, 木村 有希子

近年の脊髄神経発生研究により, いくつかの転写因子の発現に仲介されて, 形態学的に異なったタイプの介在神経細胞が分化してくることが示唆されている。しかしながら, これらの介在神経細胞が, 最終的に神経回路網の中で機能的にどのようなタイプの神経細胞へ分化していくかは, まだほとんど分かっていない。ゼブラフィッシュは, その脊髄神経回路が単純であることに加え, トラ

ンスジェニックフィッシュの手法を用いて, 特定の転写因子を発現する神経細胞を生きのままラベルできるため, 上記の課題を追求するためのよいモデル生物である。こういった背景の元, 我々は, 特定の転写因子の発現する神経細胞の, 発生分化および, 回路中での機能の解析を, ゼブラフィッシュを用いて進めている。

本年度は特に, Alx (哺乳動物 Chx10 のゼブラフィッ

シホモログ)に焦点を当てて解析を行った。Alx 陽性細胞でGFPを発現するトランスジェニックフィッシュを作製し、Alx 陽性細胞を可視化した。その結果、Alx 陽性細胞は、同側下行性の介在ニューロンであることが明らかになった。また、マーカー遺伝子との二重染色により、Alx 陽性細胞の大半(おそらくすべて)はグルタミン酸作動性の興奮性神経細胞であることを明らかにした。これらの結果は、Alx 陽性細胞が、ゼブラフィッシュの遊泳行動において、同側の運動ニューロンのフェージックな活動を直接制御するCPG (central pattern generator) ニューロンである、という可能性を強く示唆している。現在、この仮説を検証するべく、Alx 陽性細胞の電気生理学的な

記録を行っている。

また、Alx、および、他の転写因子に関して、その陽性細胞の神経伝達物質特性を簡便に調べるための系の作製に取り組んだ。すなわち、特定の伝達物質特性をもつ神経細胞をGFPあるいはDsRedで可視化して、トランスジェニックフィッシュの掛け合わせ(それぞれ違う色の蛍光タンパクを発現するものを用いる)で、転写因子陽性細胞の神経伝達物質特性を調べることができる系を確立することを目指している。現在、グリシン作動性神経、グルタミン酸作動性神経が可視化されているラインの確立に成功している。

尾索動物の運動機能を司る構成と原理の解明

西野 敦雄, 東島 眞一, 岡村 康司
勝山 裕 (神戸大学医学系研究科)

尾索動物は背側神経系や脊索を有し脊椎動物と類似した体制を示しながら、脊椎動物よりも遙かに少ない細胞構成(運動ニューロン数個、筋細胞数十個以下)で精妙な運動機能を示す。一方、尾索動物の中でもホヤのオタマジャクシ幼生とオタマボヤ、ウミタルとではその運動機能は大きく異なっている。動物ごとに共通の分子、細胞機能を持ちながら異なる運動システムを実現する原理は何か? また進化的に類縁な脊索動物種の間で、そのシステムが段階的にどのように変容していったか? これを理解することは、われわれ脊椎動物の生理機能獲得に到った進化史を理解することと、運動の基本構成原理を解

明することに繋がる。これまで運動ニューロンの数が最小(6個)のマボヤにおいて個々の運動ニューロンの構成や前駆細胞の運命決定の過程を明らかにしてきた。現在、ユレイボヤのオタマジャクシ幼生とオタマボヤ、ウミタルという運動システムの大きく異なる3つの尾索動物の運動発現の機構を明らかにする研究を行っている。これにはゲノムのアプローチ、分子生物学的解析、キネマティクス解析、電気生理学的解析のそれぞれを行い、まずは運動そのものを担う筋細胞の特性、次に運動を制御する神経回路について比較を行っている。

戦略的方法論研究領域

【概要】

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

永山グループは位相差電子顕微鏡の開発と、その応用

としての1分子DNAの塩基配列直読法の開発、チャネル蛋白質の電子線構造解析、ウィルス、バクテリア、培養細胞の無染色観察を行った。

物質輸送に関する研究が主眼である村上グループは、健常者の唾液糖と血糖の関係を唾液分泌速度と共に測定し、ラット顎下腺における傍細胞輸送の成果を臨床応用に結び付けることが可能になった。ケンブリッジ大学、

カリアリ大学との共同研究も継続発展しカソリック大学ローマ校との共同研究も開始している。

瀬藤グループは質量分析イメージング法開発応用, 単アミノ酸側鎖付加の分子機構の研究, 新しい蛍光顕微鏡

Stick 顕微鏡のテストを行った。

大橋はエンドサイトーシス経路における選別輸送の研究を変異細胞を用いて行った。

位相差電子顕微鏡の改良

Radostin Danev, 杉谷正三, 永山國昭

電子位相顕微鏡の改良, すなわち Zernike 位相差法 ($\pi/2$ 位相板の利用), 微分干渉法相当のヒルベルト微分法 (π 位相板の利用) の改良を行った。特に位相板につき新しい帯電防止法が見つかり, 帯電問題を完全に解決できた。ソフトウェアについては前年に引き続き Virtual TEM の

設計とコーディングを行った。Virtual TEM は電子顕微鏡実験をコンピュータ内でおこなうもので, 対象物質の構造と元素組織がわかれば電顕像を通常法, 位相差法を問わずシミュレーションできる。特に 1 分子 DNA 塩基配列直読法のシミュレーションで有効性を発揮した。

位相板用炭素薄膜の材料科学的研究

内田 仁, 伊藤俊幸, 大河原 浩, 永山國昭
宇理須恆雄 (分子研)

位相板の帯電防止は電子位相顕微鏡にとって死命を制する重要な要素技術である。帯電の原因が位相板に付着した 3 種 (有機物, 酸化金属, マイカ粉) 汚れによることが一昨年度わかったので, その解決法を探求した。位相

板作成工程で不可避免に入るマイカ粉汚れについてはその帯電を完全に遮蔽する方法「炭素膜サンドイッチ法」が見出され, この問題に決着をつけることができた。

DNA/RNA 塩基配列の電子顕微鏡 1 分子計測法の開発

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

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

の電顕による観察と識別, v) 識別したマーカー分子からの塩基配列の解読, の 5 つの要素技術により成り立っている。マーカーの識別には 0.3nm の空間分解能と定量的コントラスト測定 of 2 要件を満たす電子顕微鏡が必要である。日本電子と共同で JST の委託開発プログラムを利用し, 200kV の位相差電顕を開発した。

膜タンパク質 TRPM2 のフッ化界面活性剤による可溶化

松本友治, 佐々木悠, 永山國昭
原 雄二, 森 泰生 (京都大学大学院工学研究科)

カルシウム透過性カチオンチャンネル TRPM2 は細胞内レドックス状態の変化によって引き起こされる細胞死に関連があるものと考えられている。本研究では、バキュロウイルス-カイク系を用いて大量発現させたヒト TRPM2 をフッ化界面活性剤ペンタデカフルオロオクタン酸 (PFO) の添加によって可溶化し、アフィニティカラムならびに微量ゲル濾過により精製した。

精製試料に対する PFO-PAGE ならびにウェスタンブロットの結果、モノマーに対応するバンドの他、高分子量側にも TRPM2 抗体で染まるバンドが確認された。電子顕微鏡下の観察でも複数の粒子が寄り添うように見える

像が得られた。ショウジョウバエの TRP チャンネルとの配列類似性から、TRPM2 も 4 量体を形成するものと予想されているが、PFO によって可溶化された試料において TRPM2 オリゴマーがはじめて実験的に捉えられた。

しかしながら、これまでのところ PFO によって可溶化された TRPM2 では、カルシウムチャンネル活性、ADP リボースピロホスファターゼ活性とも必ずしも明瞭ではなく、可溶化された試料が生体中の TRPM2 と同じ活性、構造をどの程度保持できているかについては慎重な検討が必要と思われる。

灌流ラット顎下腺における水分泌調節機構

村上政隆, 大河原浩
細井和雄, Kwartarini Murdiastuti (徳島大学歯学部)
Bruria Sachar-Hill, Adrian E. Hill (ケンブリッジ大学生理科学部)

原唾液は細胞の中からの分泌と傍細胞経路を通過した成分との混合物であり、血液成分が唾液に移行するのはこのためである。標識デキストランをプローブとしてフィルター特性を分泌持続期に計測すると、水の分子半径 1.5 Å では 1 の値に外挿され、分泌持続期に水は細胞間隙/tight junction を通過できることが示された。また、collagenase 処理腺房における管腔内色素希釈過程と腺水分泌の比較から、刺激初期には水分泌は細胞経路成分が分泌量のほとんどを占め、刺激持続期には傍細胞経路が優位を示すことが明らかになった。ここに主に水分子を通過させると考えられてきた管腔側膜 AQP5 の機能に大きな疑問が生じた。

ショ糖により浸透圧変化を起こしてやるとラット顎下腺 (SMG) の水分泌速度は低下する。しかし浸透流理論から推測される分泌速度よりはるかに低下した。これらは AQP5 が傍細胞輸送を制御する理論 (Hill & Shachar-Hill, JMB, 2005 in preparation) と一致し、既報 (Murakami, 2001, JP 537:899) のデータからのパラメータを用いると AQP5 を浸透圧受容器とする定量モデルは高

浸透変化による分泌速度変化を予測することができた。

徳島大学で遺伝的に選択し開発された AQP5 低発現ラット (Western blotting で正常ラットの 1% 以下, Murdiastuti, 2002, Pflugers Arch, 445:405) を用い検討した結果、浸透圧変化を与えた後の分泌速度、その変化は正常ラットのものとは非常に似ていた。この結果は通常の分泌速度の場合 AQP5 は管腔膜を会する浸透流に寄与することはできないが、AQP5 が働いているフィードバック制御系は働いており細胞信号系のほかの要素が大きな増幅に関わっていることを示唆した。

一方、AQP5 を阻害する水銀を分泌導管より逆行注入し AQP5 を部分的に阻害すると水銀イオン濃度依存性に分泌速度の低下が見られた。さらに高浸透圧ショックの反応は浸透平衡系から予測される結果より大きくふれた。これは傍細胞輸送の AQP5 制御が消失し付加的な浸透圧による水分泌が減少したことを示している。この結果は上皮膜の定常状態での水分産生は浸透的ではなく、AQP5 を浸透圧受容器とするフィードバックモデルが関与していることを示している。

灌流ラット顎下腺の細胞間分泌細管の各種薬剤による形態変化

村上政隆, 前橋 寛

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

種々の薬剤が唾液分泌を起こすことが知られているが、臨床的な結果のみであり、作用点が不明なものが多い。逆に阻害剤を用いた実験で目的とする阻害以外の効果が出現する場合も多い。2004年度はこれらに関連して2つの形態観察/実験を行った。

Clozapine の作用点: 唾液分泌を誘発する臨床薬として精神疾患に用いられる Clozapine についてラット顎下腺の分泌効果と形態変化を観察した。Riva らはヒト顎下腺標本を切り出し、incubate し、各種刺激薬による形態変化を観察してきたが、作用点についての明確な回答は得られなかった (Riva, 2003, EJM, 41: 83)。今回個体からの影響を切り離すためラット顎下腺を摘出、血管還流して clozapine による刺激を行ったが分泌は誘発されず、高分解 SEM により細胞間分泌細管の microvilli pit の数減少、microbuds の数増加もわずかであり、蛋白分泌を示唆する形態変化もわずかであった。その結果、作用点が唾液腺の受容体にあるのではなく、中枢性の作用が神経系を介

し間接的に唾液分泌に連携していることが明らかになった。

水銀の細胞間分泌細管形態変化に及ぼす効果。AQP5 を阻害する水銀を分泌導管より逆行注入し AQP5 を部分的に阻害すると水銀イオン濃度依存性に分泌速度の低下が見られることを報告したが、水銀効果は AQP5 のみに限定されないため、細胞間分泌細管の形態変化を osmium maceration 法により検討した。10, 200, 1000 μ M 水銀イオンを逆行性に注入したラット顎下腺細胞間分泌細管の細胞質側表面は 10 μ M では変化が見られなかったが、200 μ M では細管の細胞質側表面が萎縮したような襞状の構造が出現しはじめ、1000 μ M ではこのひだ状の構造が顕著になった。1000 μ M では水分泌がほとんど阻害されていることから、細胞膜状の襞形成と a) AQP5 機能の消失による経細胞膜輸送の消失、b) Cl イオンチャネル機能喪失による浸透圧勾配の消失と傍細胞輸送の消失の両者が起こっていると考察された。

質量分析顕微鏡の開発と応用

瀬藤光利, 新聞秀一, 永山國昭

吉田圭一, 小河 潔, 古田 大, 市村克彦 (島津製作所)

島津製作所と共同で質量分析顕微鏡の設計および予備実験を開始した。質量分析顕微鏡は、従来の光や電子を用いた顕微鏡と異なり、物質の質量を用いた顕微鏡であり、観察と同定を同時に行うことができる我々の発明である。

2004年 は高解像度化により顕微鏡とし、段階質量分析

シグナルを取ることで内部配列を読み物質同定を行える装置とするための設計を行った。

また、組織切片を用いた MALDI (マトリックスを用いたレーザーによるイオン化) によるイメージングの予備実験を行い、組織切片からの質量データ取得に成功した。

単アミノ酸側鎖付加の分子機構の解明

瀬藤光利, 新聞秀一, 福田義之
池上 浩司, 松本 峰男, 矢尾育子 (三菱生命研)

単アミノ酸側鎖付加はチューブリンなどに起こる翻訳後修飾である。神経細胞の発達に伴って亢進することが知られているが、その分子実体は明らかでない。われわれはグルタミン酸付加を行う新規酵素およびこの酵素活性に必要な補助蛋白を、大規模ランダムミュータジェネシスによる変異体マウスの解析とイーストツーハイブリッド法スクリーニングにより発見した。

驚いたことに α チューブリンのグルタミン酸付加酵素と

β チューブリンのグルタミン酸付加は近縁ではあるがそれぞれ異なる酵素であった。補酵素 PGs1 は α チューブリンのグルタミン酸付加にのみ必要であった。

それら新規酵素群のノックアウトマウスを作成、さらなる解析をすすめている。また、ノックアウトマウスの解析の予備実験として、神経細胞を生きたままのマウス脳内で観察する新しい蛍光顕微鏡 Stick 顕微鏡をオリンパス社と共同でベータサイトテストを行った。

エンドサイトーシス選別輸送のメカニズムと生理機能

大橋正人

エンドサイトーシス経路の生理機能とメカニズムの解明を目指している。これまでに、後期エンドソーム多胞体 (MVB) からゴルジに向かう受容体の、MVB からの選別にコレステロールが必要なこと、そこで必要なコレステロールを供給するコレステロール合成酵素である NAD(P)H ステロイド脱水素酵素様蛋白質 (Nsdhl) が、後期エンドソームでの選別機能蛋白質である TIP47 と細胞内脂肪滴 (LD) 表面で共存すること、胎児発生異常の原因変異 G205S を持つ Nsdhl は LD 上に局在できないこと、Nsdhl が、LD の有無により LD-小胞体間で二相的分布を示し、その局在により、コレステロールの生合成系が調節されることなどを示すデータを得た。以上の知見より、LD 表層ドメインがコレステロール代謝系と細胞内膜系での細胞シグナル分子選別機能を結びつける制御ブラッ

トフォームとして働いているという仮説を提唱した。本年度は、この仮説を柱に、細胞内膜系による細胞増殖分化シグナル制御のメカニズムを解き明かす事を目標とし、細胞増殖分化シグナリング分子として重要なソニックヘッジホッグの細胞へのシグナル入力メカニズムについて検討した。ソニックヘッジホッグの細胞シグナル入力はその受容体である Patched とシグナル変換分子である Smoothened の二つの膜貫通蛋白質の作用で行われる。そして、Patched の機能はコレステロールの機能と密接な関わりがあることが知られている。これまでに、脂肪滴表層に存在する Nsdhl に異常のある変異株を用いた解析により、Patched と Smoothened の細胞内膜系での動態がコレステロール合成系の異常によって影響されることを示すデータを得た。

生命環境研究領域

【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、細胞質・核や周囲の細胞に伝達することによって環境変化にダイナミックに対応しながら生存応答を行っている。細胞が存在する

臓器・組織によって細胞が受け取る環境情報は異なり、従って細胞が持っている環境情報を受信する機能も異なる。それらセンサー蛋白質は環境の変化に応じてダイナミックに感受性や発現等を変化させてセンシング機構の

変化からよりよい生存応答を導く機能を有している。これらのセルセンサー蛋白質は種々の化学的、物理的情報を受容し、センサー間の相互作用を行い、多くは最終的に核への情報統合を行う。これらの細胞環境情報センサーの分子システム連関を解明していくことは、個体適応の理解のための基本単位である「細胞の生存応答」を解明するうえで極めて重要である。この細胞外環境情報を

感知するイオンチャネル型のセンサー蛋白質の構造機能解析、活性化制御機構の解析を通して細胞感覚の分子メカニズムの解明を目指している。特に、侵害刺激、温度刺激、機械刺激の受容機構について解析を進めている。

細胞運動は tail の detach と front の伸展の協調メカニズムによって行われる。この細胞接着・細胞運動の時空間的制御機構の分子メカニズムの解明も目指している。

カプサイシン受容体のリン酸化機構の解析

Sravan Mandadi, 村山奈美枝, 富永知子, 富永真琴

カプサイシン受容体 TRPV1 は, TRP イオンチャネルスーパーファミリーの TRPV サブファミリーに属する侵害刺激受容体であり, カプサイシンのみならず, プロトンや熱によっても活性化する。TRPV1 は種々の蛋白質リン酸化酵素によってリン酸化されるが, 我々はこれまで PKC によるリン酸化機構を解析しており, このリン酸化が TRPV1 の感作のみならず, 脱感作後の再感作にも重

要であることを明らかにした。さらに, PKC ϵ が特に関与することを見出した。

また, PKC によってリン酸化した TRPV1 を特異的に認識するポリクローナル抗体を作製した。この抗体は, リン酸化された Ser800 を特異的に認識し, 痛み研究, 炎症研究に非常に有用であることが明らかになった。

プロスタグランジンによる炎症性疼痛発生メカニズムの解析

森山朋子, 東智広, 富樫和也, 杉本幸彦 (京都大学), 富永知子, 成宮周 (京都大学), 富永真琴

我々はこれまで, 種々の炎症関連メディエーターがそれらの Gq 共役型受容体活性化から PKC 依存的に TRPV1 活性を増強させることを報告してきた。炎症において中心的な役割を果たす炎症関連メディエーターの 1 つであるプロスタグランジン (PGE₂, PGI₂) も, その代謝型受容体 (EP₁, IP) に作用して主に PLC 活性化の下流で TRPV1

を PKC によってリン酸化させることによって TRPV1 の活性増強を引き起こすことを明らかにした。この TRPV1 とプロスタグランジン受容体の機能連関の重要性は, TRPV1 やプロスタグランジン受容体の欠損マウスにおいて熱性痛覚過敏が有意に抑制されるという結果から個体レベルでも確認された。

TRPV4 結合蛋白質の解析

東智広, 森山朋子, 富永知子, 富永真琴

温度感受性 TRP チャネルの 1 つ TRPV4 は, もともと低浸透圧で活性化するチャネルとして報告されたが, 我々が温度感受性も有することを報告した。TRPV4 は,

感覚神経のみならず表皮ケラチノサイトや視床下部で発現することが知られている。表皮は温度変化に直接曝露される部位であり, 視床下部は体液浸透圧や体温の調節

中枢として機能していると考えられている。そこで、TRPV4 の活性制御機構を明らかにする目的で皮膚の cDNA ライブラリー、脳の cDNA ライブラリーを用いて TRPV4 の細胞内ドメインと結合する蛋白質のスクリー

ニングを行い、興味深い結合蛋白質を得た。今後、両蛋白質の結合ドメインの解析、その結合の TRPV4 機能への影響の解析を進めていきたい。

TRPV4 の体温制御機構への関与の解析

三村明史, 森山朋子, 鈴木誠 (自治医科大学), 富永真琴

温度感受性 TRP チャネルの 1 つ TRPV4 は視床下部に発現しており、体温調節機能への関与が推察されている。そこで、野生型マウスと TRPV4 欠損マウスの腹腔内に温度計を埋め込み、自由行動下に体温の連続記録を行っ

た。無刺激の状態では、両マウス間で体温の概日周期に大きな変化はみられなかった。暑熱負荷等のストレスを加えたときの体温記録を行い、TRPV4 の体温制御機構への関与を明らかにしていきたい。

新規温度感受性 TRP チャネルの探索

富樫和也, 東智広, 富永知子, 森泰生 (京都大学), 富永真琴

哺乳類ではこれまでに 6 つの温度感受性 TRP チャネルが知られており、それらは TRPV, TRPA, TRPM サブファミリーに属する。新たな温度感受性 TRP チャネルの探索を目的として、既知の TRP チャネルの温度感受性のスクリーニングを行った。その結果、冷刺激受容体として知

られるメントール受容体 TRPM8 に最も相同性の高い TRPM2 に温度感受性があることを見出した。この TRPM2 の温度感受性の解析をパッチクランプ法、Ca²⁺-imaging 法を用いて進めている。さらに、この TRPM2 の温度感受性の生理学的意義の解明を進めたい。

中枢神経系における温度感受性 TRP チャネルの発現と機能解析

柴崎貢志, 富永真琴

温度感受性 TRP チャネルは、一般には感覚神経や表皮ケラチノサイトで温度受容に関わっていると考えられているが、TRPV1 等中枢神経系での発現がみられるものがある。そこで、知られている温度感受性 TRP チャネルの発現を検討したところ、海馬での強い発現を示す TRP チ

ャネルを見出した。この TRP チャネルの海馬での発現の時間経過、発現様式、生理学的意義の検討を海馬初代培養系に免疫細胞化学法、パッチクランプ法、Ca²⁺-imaging 法を適用して進めている。

mDia 結合タンパク質の探索と機能解析

島貫恵実, 富永知子

Rho の標的蛋白質である mDia の細胞運動における役

割の解明を目指している。Yeast-two Hybrid 法を用いてい

くつかの mDia 結合蛋白質を見いだしている。その 1 つは actin 結合蛋白質である。この蛋白質が mDia と協調することで細胞接着斑の安定化等に関与する可能性もある。また、文献的にこの蛋白質は細胞のがん化能に関与するとの報告もあるので、mDia とこの蛋白質の関連を、生化学的および細胞生物学的に解析している。

さらに、mDia の特性から mDia に結合することが予想される蛋白質は、Rac1, Cdc42 と関連することが予想される。よって両者の結合が確認できれば、Rho ファミリー蛋白質間の協調作用および細胞運動における役割をさらに明らかにできる可能性がある。

神経回路形成における mDia を介する情報伝達経路の役割

島貫恵実, 柴崎貢志, 富永知子

mDia および mDia を介する新たな情報伝達経路の解析によって、細胞運動の時・空間的制御機構を解明し、神経の成長円錐の形態維持・軸索伸長過程への寄与を検討している。新規 mDia 結合蛋白質 DIP が mDia による軸作伸展作用の下流で機能することを見いだした。また、mDia, DIP の中枢神経系での部位特異的な発現を発生初

期から *in situ* hybridization 法, 免疫組織化学法を用いて検討し、両者が中枢神経系の様々な部位で共局在することを確認した。現在、作製した DIP knock out mouse の中枢神経系の組織形成等における役割を個体レベル、および神経細胞初代培養系で検討中である。

動物実験センター

【概要】

平成 16 年度より岡崎国立共同研究機構は独立行政法人自然科学研究機構となり動物実験センターは岡崎 3 機関共通施設として再出発した。厚生省所管の労働安全衛生に関わる各種の規制が適用されることになり、設備機器の保守点検にあたる施設職員は取扱責任者、作業者はそれぞれ相応の資格が必要となった。このため施設の技術職員は各種の講習会、研修会などを受講して資格を取得するなど新体制に備えた。

動物実験センターにおいてはラット、マウスの処分に用いられていたエーテルの取り扱いをどうするかが大きな問題となったが安全を優先するため全面的に炭酸ガス麻酔に切り替えることとした。また小型压力容器、EOG ガスなど施設が保有する機器設備、薬物などの取り扱いについても改めて点検し適正化をはかった。

<実験動物の輸入、飼育規制>

「感染症予防法に基づく輸入届け出制度」が平成 17 年 9 月より厚生労働省から、また「生物多様性の確保にかんするカルタヘナ条約」に基づく措置としてニホンザル以外のマカクザル等の特定外来生物の飼育規制が同 11 月より環境省からそれぞれ施行されることが示された。「輸入届け出制度」は感染症の疑いのある動物の輸入を規制することを目的として導入が検討されている制度であるが、医学生物学研究に用いられる実験動物のラット、マウスにまで適用されることになればその影響は極めて大きく、その取り扱いがどうなるか気がかりなところである。特定外来生物の飼育規制に関しては飼育施設としての許認可手続きを行うべく準備を進めているところである。カルタヘナ条約議定書に関連しては、従来「組み換え DNA 実験指針」として示されていた事項が法令として運用されることになり、関係者の間で遺伝子改変動物の授受における手続きの不備が指摘されるという事例が問題となった。遺伝子改変動物の授受に際しては相手方へ当該動物に関する情報を告知することが義務づけられているが、現在通知方法が個々バラバラに行われているためわかりにくく、早急に統一的な様式の整備が求められている。研究者にとって時に複雑で面倒な各種の法令ではあるが、透明性を保ちながら快適な研究環境を維持す

るためには迅速で的確な情報の提供も動物実験センターに期待される役割の一つであり現在組み換え DNA 実験安全委員会と連携しつつ必要な事務手続きの整備作業を行っているところである。

<飼育室、実験室の整備>

統合バイオサイエンスセンター棟へ移転予定の全部門引越しが完了し、山手地区動物センター棟はいよいよフル稼働状態を迎えた。山手地区動物センター棟がフル稼働になったことに伴い、動物飼育にかかる業務量も著しく増大した。このため委託作業員の配置転換を図ったほか新たに作業員 2 名を増員した。この措置により受精卵移植や胚凍結作業の一部を外注できるようになったほかセンター職員の業務の軽減もはかることが出来、実務の面ではなんとか業務を処理できる体制となったが、山手地区動物センターの管理運営体制は十分とはいえない。山手地区動物センター棟は原則的に SPF 動物のみを飼育するバリアー施設であり、微生物モニタリングや動物の飼育管理など様々な面で利用者の協力が不可欠である。ユーザーの理解と協力を得て幸いにもこれまでのところ感染事故は皆無であるが、国内のブリーダーにおいては平成 15 年度、16 年度とたてつづけに *P. Pneumotropica* 汚染騒ぎが起きている。施設に直接の影響はなかったもののこのような事故はいつ起きるか予測できないもので、事故の予防や適切な対応のためには経験のある実験動物の専門家を核とした恒常的な微生物学的な監視体制の構築と配置が望まれる。

一方、明大寺地区動物センターにおいては、山手地区動物センター棟と機能的に整合性のある運用のためにラット、マウス飼育室の SPF 化が現実的な課題となっており、陸生動物室本館地下 1 階を中心とした SPF 化のための施設改修計画を策定して概算要求をおこなっている。稼働中の他の飼育室の機能を損なうことなく改修を行うため、改修方法、改修対象となる飼育設備等について検討している。

このほか、平成 16 年度は明大寺地区動物センター棟にユーザーから要望のあった新館 4 回の P2 実験室を P2a 実験対応可能にしたほか、新たにトランスジェニックラ

ット飼育室2室を用意した。山手地区および明大寺地区の水生動物室においては室温と照明が調節できる恒温室をそれぞれ1室増設した。また、本館洗浄室の洗濯機を別室に移してクリーンエリアを確保し洗浄済み飼育機器の再汚染防止をはかった。

<主なトラブル>

大事には至らなかったが山手地区において凍結防止装置の作動によって空調用ダンパーが閉鎖するトラブルがあった。空調ダンパーの閉鎖は風量バランスの異常からバリアーの破綻につながる恐れのあることから何らかの対策をとる必要がある。

明大寺地区においては空調用ヒートポンプの冷媒中に水が入ることによる不調が続き、抜本的な対策が見いだせず対応に苦慮している。応急的に水抜きにより対応し

ているが将来に不安を残している。このほか水生動物室の揚水ポンプの劣化、検疫中のサルの死亡事故などがあったが大事に至るものはなかった。

<今後の課題>

統合バイオサイエンスセンターがフル稼働になったことにより、山手地区動物センター棟における飼育室の稼働率が上昇し業務量も増えている。センターでは職員の配置換えを行って対応しているが、異動や退職する職員が相次いだ上、微生物学的コントロールの必要な山手地区とコンベンショナル動物が中心の明大寺地区の業務を同一人が並行して行うことは管理上からも問題があり、まさに綱渡りのように危なっかしい状態が続いている。専任教員を含む組織体制の見直しと構築が望まれる。

計算科学研究センター

【概要】

様々な機能性生体様物質の創生を目指している。なかでも核酸中の塩基対に注目し、4種類の天然塩基を区別することなく塩基対を形成する動的構造変化型ユニバーサル塩基とそれをオリゴヌクレオチドに導入し、配列に拘わらず多重鎖の形成が可能なユニバーサル核酸、高い塩基認識能と塩基対形成能および様々な機能を有する人

工核酸塩基を開発し、それらを利用した核酸類の電子顕微鏡観察への応用について研究を進めている。

人工核酸塩基の設計と評価に計算科学研究センターに設置された大型計算機とプログラムライブラリーを利用している。

核酸塩基識別子の設計と合成

片岡正典, 永山國昭

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

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

ユニバーサル核酸の創生

片岡正典

相対する塩基に呼応して動的に構造変化し、天然型核酸塩基4種すべてと塩基対を形成しうる動的構造変化型ユニバーサル塩基を設計し、合成に成功した。本塩基の物性を吸収スペクトルや核磁気共鳴によって調査したところ、天然塩基のいずれもと塩基対を形成することが示唆された。さらに本塩基をオリゴヌクレオチドへ導入を試みて、ペプチド核酸型8量体の合成にも成功した。現

在8量体の物性について調査中であるが、融解温度を指標とした種々の配列の天然型オリゴデオキシリボヌクレオチドとの複合体間に安定性に相違はほとんど見られない。

配列を全く認識しない人工核酸はこれまでに例はなく、その波及効果は計り知れない。

カルボン酸を用いる新規オリゴヌクレオチド合成法の開発

片岡正典

これまで、オリゴヌクレオチド合成はホスホロアミダイト法と呼ばれる、ヌクレオシドホスホロアミダイト単量体とヌクレオチドの 5'-水酸基の縮合反応を基盤とした方法が広く利用されており、市販のオリゴヌクレオチド合成装置でも採用されている。しかしこの縮合反応では活性化能力が低く高価で危険性の高いテトラゾール系活性化剤が使用されており、問題となっていた。報告者

はこれまでに、反応性のみ注目してイミダゾール-強酸複合体系の活性化剤を開発してきたが、今回高い安全性と低いコストに特化したカルボン酸系の縮合剤を新たに開発した。種々のカルボン酸について調査したところ、いずれもテトラゾール系活性化剤以上の反応性も示した。それらは安価に市販されており、安全性も高いことからテトラゾール系活性化剤に変わるものとして期待される。

技術課

大庭明生

1. 概要

今年度の人事は、平成 16 年度 4 月に分子生理研究系技術係・大河原浩係長を研究施設技術班長に昇任させ、野村博美、高橋知子を技術職員として採用し、生体情報研究系、動物実験センターに配置した。5 月に小木曾昇技術主任の名古屋大学医学部動物実験施設への転出があり、窪田美津子を技術職員として採用し、動物実験センターに配置した。9 月に育児休業にあった神谷絵美技術職員の職場復帰があった。それに伴い代替技術職員鈴木恵の契約終了があった。12 月に高橋知子技術職員の退職があった。

第 3 期技術部会の活動を引き続き行い、非侵襲技術部会の活動報告を『非侵襲計測の基礎－MEG・fMRI・PET－』としてまとめた。

第 4 期技術部会立ち上げの準備として、第 6 回技術課セミナー（趣旨：今後の研究および研究体制の動向、研究を支える技術、その技術の今後の方向性と重要性、そのなかで技術職員の負うべき責任を基本テーマに、講演を研究者に依頼し、課のあるべき方向と今後の研究ならびに技術動向を探る）を井本敬二教授、平林真澄、瀬藤光利助教授、関 和彦、神作憲司助手を講師に行った。

課の研究活動への貢献を一層進めるため下記の事業を本年度も引き続き実施した。

①生理科学実験技術トレーニングコースでの技術指導

電気生理の実験手法の一つであるパッチクランプ実験をテーマに、電気生理実験に有用な「サウンドモニター回路」とサウンドモニター回路動作「直流定電圧電源」、「アクリル製バスチェンバー」の作製コース『生理学実験のための電気回路・機械工作』を担当し、5 人の若手研究者の技術指導に当たった。

②科学研究費補助金（奨励研究）申請の推進

業務を展開、推進していくための問題意識の養成、その解決のための計画および方法の企画能力の養成、さらにはその表現力と説明力の養成を通じて、業務上の技術力の総合的な向上を図ることを目的に標記の申請を行い、下記の 7 課題の採択を得た。

- (1) 加藤勝巳：凍結割断レプリカ作製装置の改良
- (2) 吉友美樹：クリプトン/YMG レーザーを用いた極

局所脳虚血－還流モデル動物の開発

- (3) 野村博美：マウス脳水平断アトラスの作製
- (4) 伊藤嘉邦：大脳皮質神経細胞の三次元構造解析プログラムの試作
- (5) 神谷絵美：GFP 発現トランスジェニックマウスを用いた教育用光学および電子顕微鏡試料作製
- (6) 佐藤茂基：遠隔動物実験用情報インポーズ装置の製作
- (7) 小原正裕：生細胞における容積測定のための全焦点顕微鏡法の確立

③奨励研究採択課題技術シンポジウムの開催

時代要請に対応した技術認識と向上に立った技術職員の業務の社会的開示を推進するために奨励研究採択者による第 5 回の報告会を 14 演題で行った。

④成茂神経科学研究助成基金の申請の推進

課の自立的運営のためには独自の運営資金の確保が重要な課題である。今回戸川森雄技術主任を代表者にして奨励研究採択課題技術シンポジウムの開催経費を標記の基金に申請し、採択を得た。

⑤放送大学利用による専門技術研修の受講

研究の高度化と多様化の進むなかで技術職員の研修は重要な課題である。今回研修科目として『ゲノム生物学』と『光電子技術と IT 社会』を選び、5 名が受講した。

⑥生理学技術研究会の開催

第 27 回を基礎生物学研究所・技術課と合同開催した（平成 17 年 2 月 17 日－18 日）。会では、口演発表が 24 題、ポスター発表が 40 題、研修講演として『in vitro 発現系を用いた代謝型グルタミン酸受容体の機能制御機構と動的構造変化の解析』（久保義弘、生理学研究所）、『植物の微小管－可視化、微細構造、構築機構－』（村田 隆司、礎生物学研究所）、特別講演として『サル頭頂連合野での 20 年と技術課題』（渋谷英敏、東京都神経科学総合研究所）を行った。これらの報告は『生理学技術研究会報告（第 27 号）』にまとめた。

⑦第 5 回機械工作基礎講座の開催

生理学実験に必要な機器を題材に工作技術を研修し、その作製機器が研究現場で活用できることを目的に第 5

回を開催した(共通研究施設・機器研究試作室)。今回は初級コース(6名)、応用コース(9名)で行った。

⑧労働安全衛生資格取得および技能講習受講

法人化に伴う研究所の安全衛生を課業務として遂行するために下記の資格取得と技能受講を行った。

- (1) 衛生工学衛生管理者, (2) 第2種作業環境測定士, (3) 鉛作業主任者, (4) エックス線作業主任者, (5) 有機溶剤作業主任者, (6) 特定化学物質等作業主任者, (7) 普通第1種圧力容器取扱主任者, (8) 第2種酸素欠乏危険作業主任者

2. 施設の運営状況

①統合生理研究系

(1) 生体磁気計測装置室

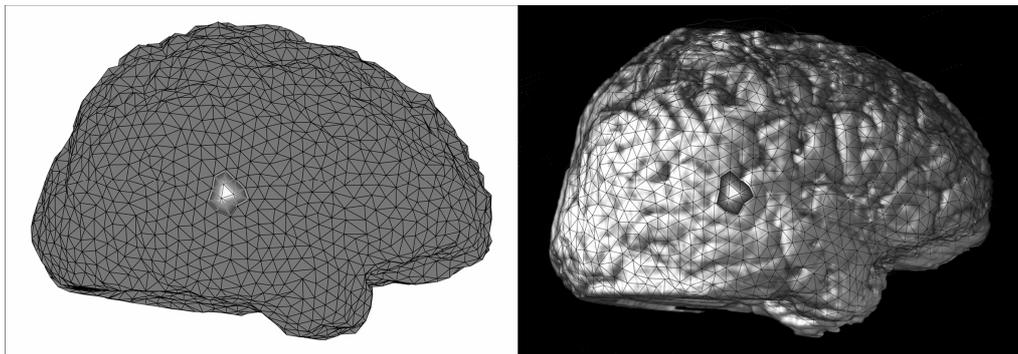
永田 治

【概要】

本年度は、全頭型生体磁気計測装置において各種実験が順調におこなわれており、大きなトラブルは報告されていないが、磁気光ディスクドライブの初期不良等の軽微な問題は数例発生している。維持管理については、一般的にハードサイクルと呼ばれる点検作業を3年周期程度でおこなうことが多いが、当施設では経費削減とセンサの負荷を軽減するため、LHeの蒸発量が適切である限りおこなわない方向で運営している。

解析システムにおいてもMRI画像を含めて環境整備が完了した。基本的には旧BTiシステムと同様の環境であるが、MRIファイルフォーマットがDICOMに統一されたためすべてのデータを更新した。

用意される画像データは、MRI断層画像、三次元再構成画像および再構成画像から作成されるメッシュモデルの3種類である。三次元画像データおよびメッシュモデルは脳部位抽出の後、小脳部を削除処理した画像で構築されている。メッシュモデルはMCE解析に対応するため各被験者固有のデータを1~10mmまで1mm間隔のレイヤーで作成した。三次元画像およびメッシュモデルの座標はすべてMEG座標系に変換されており、MEGデータと同様に画像データサーバにて一元管理され容易に利用できる環境である。ただし、新規の被験者を追加する場合は画像の加工変換作業を含めて1被験者あたり2時間程度の作業時間を要する。



メッシュモデルによるMCE画像とMRI三次元再構成画像の合成

平成16年度 生体磁気計測装置共同利用実験の実施状況について

年 月	総日数	休 日	点検日	利用日数	稼働率	外部利用日数	備 考
2004年04月	30	9	0	19	90%		
05月	31	13	0	18	100%		
06月	30	8	2	18	90%	3	
07月	31	10	0	20	95%		トレーニングコース使用5日(26~30日)
08月	31	9	0	22	100%	2	
09月	30	10	2	18	100%		
10月	31	11	0	17	85%		
11月	30	10	2	17	94%		
12月	31	12	0	17	89%	2	
2005年01月	31	12	2	14	82%		
02月	28	9	0	11	58%	3	
03月	31	9	2	18	90%	3	
04月	30	10	0	13	65%		

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

また、トレーニングなど実験以外の用途も含まれていない。

*稼働率=利用日数/(総日数-(休日+点検日))×100

②脳機能計測センター

(1) 形態情報解析室

山口 登

【超高压電子顕微鏡利用状況】

今年度における超高压電子顕微鏡共同利用実験は、合計12課題が採択され、全ての課題が実施された。これらの共同実験の成果は、超高压電子顕微鏡共同利用実験報告の章に詳述されている。超高压電子顕微鏡の年間の利用状況を表にまとめたので下記に示す。稼働率は、利用日数と使用可能日数より求めている。本年度の主な超高压

電子顕微鏡の改良・修理としては、コンデンサー絞り駆動部の修理、真空バルブ開閉用エアチューブの交換作業、サイドエントリーホルダーゴニオ部のクリーニング作業などが行われた。また、老朽化した空調機の更新を行った。

2004年度 超高压電顕月別稼働率

年 月	総日数	休 日	調整日	使用可能日数	所内利用	所外利用	計	稼働率	備 考
2004年4月	30	9	4	17	4	6	10	59%	
5月	31	13	4	14	3	0	3	21%	
6月	30	8	4	18	7	1	8	44%	
7月	31	10	4	17	8	5	13	76%	
8月	31	9	2	20	6	12	18	90%	
9月	30	10	4	16	5	2	7	44%	
10月	31	11	10	10	3	0	3	30%	修理6日
11月	30	10	5	15	5	2	7	47%	
12月	31	12	4	15	3	3	6	40%	
2005年1月	31	12	1	18	1	17	18	100%	
2月	28	9	4	15	4	10	14	93%	
3月	31	9	6	16	2	14	16	100%	空調工事5日
計	365	122	52	191	51	72	123	64%	

フィラメント点灯時間 398.6時間

使用フィルム枚数 5,436枚

(2) 機能情報解析室

佐藤 茂基

【概要】

今年度の装置整備状況は、主な事項として次の通りである。今年度、装置本体において長期間の修理を要する故障は起きず、比較的安定した稼働状態であった。

5月と8月に2台ある空調機がそれぞれ故障した為、その修理を行った。

9月に共鳴用チューニングユニットが故障した為、ユニットを交換し修理を行った。

共通機器であるフィルム自動現像機の整備点検を行った。

平成16年度のMR装置利用実績を別表に記す。

【機器利用率】

平成16年度リアルタイム装置月別稼働率

年月	総日数	保守	使用可能	所内利用	所外利用	計	利用率	備考
2004年 4月	30	1	29	0	4	4	14%	
5月	31	1	30	0	4	4	13%	空調機故障, 修理
6月	30	1	29	0	8	8	28%	
7月	31	1	30	0	7	7	23%	
8月	31	1	30	0	7	7	23%	空調機故障, 修理
9月	30	1	29	0	6	6	21%	チューニング修理
10月	31	5	26	0	6	6	23%	停電
11月	30	1	29	0	6	6	21%	
12月	31	1	30	0	6	6	20%	
2005年 1月	31	1	30	0	7	7	23%	
2月	28	1	27	0	8	8	30%	
3月	31	2	29	0	7	7	24%	定期点検
計	365	17	348	0	76	76	22%	

*保守以外の祝祭日は、使用可能日に含めた。

(3) 生体情報解析室

吉村伸明, 村田安永

【概要】

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

生体情報解析システムは、データ解析・可視化、信号処理、画像処理、数式演算、統計処理、電子回路設計などの多くのアプリケーションを備え、これらは高機能ワ

ークステーション上での利用のみならず、各部門施設のPCに直接導入し、ライセンスサーバで認証を行うことでの利用も可能である。登録者は95名で、研究推進のための積極的な利用がある。

生理学研究所のネットワーク利用状況は、メール登録者が525名。WWW登録者が52名。LANの端末数が1,356台。所外からのメール受信数は7,900通/週。所外へのメール発信数は2,700通/週。検出したウィルスメールは1,100通/週。

WWWは760台/週の端末から46,000ページ/週の閲覧があった。所内向けのダイヤルアップサービスは43回/週、5時間/週の利用があった。

③生理研・基生研共通施設

(1) 電子顕微鏡室

前橋 寛

【概要】

今年度は、予算削減と利用者数、利用率を考慮して、透過型電子顕微鏡(日本電子 JEM-1200EX) 2台の内、1台と走査型電子顕微鏡(日立 S-800)の保守契約を中止し、明大寺地区の JEM-1200EX 1台と山手地区の透過型電子顕微鏡 JEM-1010 だけ保守契約(年1回点検)を継続した。

昨年度、新設された山手地区電子顕微鏡室には画像出力装置がないため、研究部門および研究施設から供出されたフルカラープリンタ(フジ、ピクトログラフィ 3000, 4000)を2台設置(実験室 B)し、1台には画像処理用の

PC と簡易型の電顕フィルム取り込み用のスキャナを新たに購入し設置した。

【研究内容一覧表】

本年度、室を利用してなされた研究の総件数は43件であった。機構内では30件あり、機構外は、国内で5件、国外ではスペイン、ドイツ、中国、ブルガリア、ハンガリー、チェコの研究者による利用が8件あった。下記の表はその研究部門・施設、大学、研究所と研究内容の一覧表である。

利用内容一覧表

二研究所

研究所	部門・施設	研究内容
生理研	機能協働	・運動神経細胞の生存機能維持機構の形態学的研究
	神経シグナル	・カルシウムチャンネル変異マウスの超微形態解析
	分子神経生理	・Olig2 陽性細胞の細胞系譜の解析の研究 ・背側神経管の細胞運命決定機構の分子生物学的解析 ・アストロサイト細胞系譜の多様性について ・イオンチャンネル染色像の撮影
	大脳神経回路論	・大脳皮質の神経回路の研究 ・非錐体細胞のシナプス連絡の観察 ・トランスジェニックラットへ導入した遺伝子の発現の解析 ・大脳皮質神経結合の解析
	脳形態解析	・ラット小脳における AMPA 受容体の分布の解析 ・小脳ブルキンエ細胞における興奮性シナプスの観察 ・シナプス機能変化に伴うシナプス形態と受容体局在の変化の解析 ・マウス LGN における HCN channel の distribution を preembedding およびレプリカラベリング法を用いて明らかにする。
	統合バイオサイエンスセンター ナノ形態生理	・細胞、DNA タンパク質の電顕観察手法に関する研究 ・超分子表面へ導入した電顕マーカーの観察 ・電子顕微鏡によるカーボン等の膜厚及び膜表面の観察 ・唾液分泌における傍細胞輸送の調節機構
	形態情報解析室	・消化管におけるエンターセリン受容体の局在に関する免疫電顕
	技術課	・コメツキムシの走査像微細構造観察 ・凍結割断両面レプリカ免疫電顕法を用いた小脳グリア細胞の標識

研究所	部門・施設	研究内容
基生研	高次細胞機構	・高等植物のオルガネラ生成機構の解明
	生物進化	・植物細胞の微小管構築機構 ・ヒメツリガネゴケのプロトプラスト再生時における細胞内の極性観察
	分子遺伝学	・アサガオ種子の proanthocyanidin の位置の観察
	統合バイオサイエンスセンター	・3つの軸にそったイネの葉の極性・成長機構の解明
	植物発生遺伝学	・陽葉・陰葉の発生制御過程と葉肉細胞の軸性の解析
	性差生物学	・性腺の性分化に関する研究
	光情報	・植物細胞の葉緑体の観察
	形質転換生物	・Na チャネルの細胞内分布の探索

所外 (国内)

大学・研究所	研究代表者名	研究内容
水産総合研究センター 養殖研究所	小林 亨	魚類生殖腺の分化の分子機構の解明
大阪府立大学	加藤 幹男	DNA 構造解析
東京歯科大学	橋本 貞光	唾液腺傍細胞輸送経路の検討
新潟大学	林 八寿子	植物細胞内物質輸送系に関わる構造体の超微形態学的解析
ヤマハ発動機(株)	尾田 千草	配列させた金ナノ粒子の観察

所外 (国外)

国名, 大学, 研究所	研究者名	研究内容
スペイン Universidad de Cashilla-La Maucha	Rafael Lijan-Miras	GABA _B 受容体の脳内局在
スペイン	Guillermina Lopez-Bendito	GABA _B 受容体の脳内局在
ドイツ University of Freiburg	KULIK, Akos	SDS-FRL 法による膜内分子の局在解析
中国 K.Kleung Brain Research Centre	WEN, Wang	グルタミン酸受容体の小脳と海馬の分布の解析
中国 The Fourth Military Medical University	Yun-Qing Li	The local connections related to nociceptive information transmission and regulation within the superficial laminae of the spinal dorsal horn
ブルガリア University of Shoumen Universitetska	TACHEV, Krassimir, Dimov	DNA 観察
ハンガリー Department of Comparative Physiology University of Szeged, Faculty of Science	LÖRINCZ, Andrea	海馬における NMDA と AMPA 受容体の分布の解析
チェコ Institute of Parasitology Academy of Sciences of Czech Republic Laboratory of Electron Microscopy	HUCEK, Stanislav	タンパク分子の電子顕微鏡観察

(2) 機器研究試作室

加藤勝己

【概要】

機器研究試作室は多種多様な医学・生物学用実験機器の開発と改良, それに関わる技術指導, 技術相談を室の

役割としている。今, 我々の周りには便利な物品があふれ, 自分で工夫して作ったり, 改良する機会が少なくな

り、新しい研究には新しい研究機器を作るという『ものづくり』が希薄になり、一方で、最近の研究の多様化は室に新たな役割の模索を迫っている。そうした認識のもと、『ものづくり』能力の重要性の理解と機械工作ニーズの新たな発掘と展開を目指すために、室では、2000年度から、医学・生物学の実験研究に使用される実験装置や器具を題材にして、機械工作の基礎的知識を実習主体で行う機械工作基礎講座を開講し、2005年度は、汎用工作機械の使用法を主体に実習する初級コースと応用コース（アクリル樹脂製パッチクランプ用チェンバー、簡易型一軸式マニピュレータ、レンズ及びフィルターホル

ダーの3テーマから受講希望者が選択）の二コースを開講する準備を進めている。参加希望者は、二コース合わせ生理研16名、基生研1名で、ガイダンスの後、マンツーマンで3～4回の講習を行う予定である。

また、生理学研究所では、山手地区に移転した研究室のために、工作室を整備することになり、2005年4月に開設し、現在利用者のための安全及び利用講習会を行っている。

なお、機器研究試作室の平成16年度の利用状況は、以下の通りである。

機器研究試作室利用機器表 (件数)

月	フライ盤	ボール盤	横切盤	コンターマシン	旋盤	グラインダー	切断機	NCフライ盤	その他	計
4	5	11	19	5	3	10	1	0	23	77
5	8	7	5	5	7	1	1	0	12	46
6	10	20	9	9	5	4	1	0	13	71
7	25	16	16	13	4	4	7	0	24	109
8	17	7	9	5	2	2	0	0	12	54
9	16	15	17	14	10	6	4	2	26	110
10	21	14	16	11	16	3	3	0	40	124
11	6	3	6	4	6	2	4	0	7	38
12	10	2	3	4	5	2	3	0	12	41
1	14	7	15	9	14	7	4	0	17	87
2	9	12	4	15	8	4	4	0	23	79
3	9	16	8	5	2	5	8	0	16	69
合計	150	130	127	99	82	50	40	2	225	905

機器研究試作室利用人数表

月	生理研	基生研	その他	合計	延べ時間
4	51	0	0	51	77
5	29	1	0	30	47
6	31	8	0	39	40
7	53	1	1	55	107
8	30	0	0	30	50
9	45	3	0	48	104
10	62	2	0	64	120
11	24	0	0	24	28
12	21	2	0	23	41
1	39	2	1	42	109
2	33	1	0	34	53
3	34	3	1	38	44
合計	452	23	3	478	820

機器研究試作室部門別利用状況

感覚認知情報	122 名	認知行動発達機構	80 名	ナノ形態生理	50 名
心理生理学	48 名	動物実験センター	34 名	形態情報解析室	22 名
生体膜	18 名	機能情報解析室	12 名	生体システム	10 名
生体恒常機能発達機構	10 名	神経分化	9 名	感覚運動調節	8 名
神経シグナル	8 名	技術課	6 名	脳形態解析	5 名
機能協関	3 名	大脳神経回路論	3 名	生殖・内分泌系発達機構	2 名
生体情報解析室	1 名				

エネルギー変換	5 名	生殖	5 名	RI 実験センター	3 名
植物発生	2 名	人工気象室	2 名	感覚情報処理	1 名
形態形成	1 名	細胞器官培養室	1 名	種分化機構第一	1 名
種分化機構第二	1 名	分析室	1 名		

分子研その他	3 名				

④動物実験センター(岡崎共通研究施設)

佐治俊幸, 廣江猛, 高橋知子, 窪田美津子

【概要】

山手地区動物実験センター分室が完全稼働し、全飼育室を使用して動物の飼育が開始され、飼育数も順調に増加している。また、感染事故等の大きな問題も発生していない。

明大寺地区陸生動物室のSPF化の要望があり、本館地下及び2FのSPF化構想を実現すべく改修計画の立案と予算要求を行った。

本年の法人化に伴い、労働安全衛生関連の資格取得及び設備改善を行った。資格としては、特定化学物質等作業従事者2名、第一種圧力容器作業従事者3名、有機溶剤作業従事者1名を確保することができ、第一種圧力容器7台の設置届け及び検査証の交付も受けた。

エーテルを用いたマウス・ラットの処分を廃止し、炭酸ガスによる処分方法を導入した。これに伴い、4セットの炭酸ガス処分機を生理研予算により組み上げ、従来より設置済みの機器と併せて、明大寺地区及び山手地区に各3セットを設置した。

P2A実験室の設置要求があり、山手地区に計画したが、場所の確保が困難であったため、明大寺地区新館4FのP2、3実験室内に動物の飼育設備を設置し、P2A実験室とした。利用方法は、P2A実験室利用者会議で決定していく予定である。

センターの拡充に伴う運営経費及び作業員の確保が難しく、新規事業の開始が行えず、ユーザーへのサービス低下が発生している。飼育費及び餌代の運営交付金以外からの徴収に関しては、科研費からの振り替えが可能になるよう、準備を進めている。

【受精卵凍結・クリーンアップ事業】

山手地区分室へ移動させるマウスのクリーンアップ作業は終了し、新規導入のためのクリーンアップ作業へと

移行した。

実施件数としては、クリーンアップ兼凍結が14件、凍結保存が32件、山手地区への移動のためのクリーンアップが2件であった。

【明大寺地区 陸生動物室】

平成16年度の飼育室利用部門数は、26研究部門（生理研16部門、基生研6部門、統合バイオサイエンスセンター4部門）であった。

動物飼育数は減少の傾向を示している。これは、センター利用の減少を示すものではなく、山手地区への移動に伴い一時的に飼育数が減少したためであり、新規部門の実験が軌道に乗り次第、増加へ転ずると予測される。

【山手地区 動物実験センター分室】

平成16年度の飼育室利用部門数は、14研究部門（生理研7部門、基生研1部門、統合バイオサイエンスセンター6部門）であった。

利用者講習会を毎月開催するとともに、陸生動物利用者には実務講習会を実施している。

全SPF飼育室の病原微生物モニタリングが、3ヶ月に1回のペースで実施され、異常は検出されなかった。

【明大寺及び山手地区 水生動物室】

平成16年度の水生動物室利用状況は、生理研・基生研両研究所あわせて11部門・施設、16件の利用があった。

両地区ともに恒温室の改修設置希望が出されたが、センター予算で支出することが出来なかったため、改修希望部門の予算で工事を行った。山手地区の新設恒温室は、TG魚飼育エリアである。

加熱冷却ユニットの動作不良が5件あり、順次修理を行った。

陸生動物 部門別・動物種別搬入数 (平成16年度)

部門	動物種	明大寺地区					山手地区	
		マウス	ラット	モルモット	ウサギ	サル	マウス	ラット
神経機能素子		96	0	0	0	0	0	0
細胞内代謝		27	0	0	0	0	0	0
生体膜		2	5	0	0	0	205	47
機能協関		622	186	0	0	0	0	0
能動輸送		0	0	0	0	0	0	0
分子神経生理		401	0	0	0	0	2,165	0
神経シグナル		25	0	0	0	0	962	26
高次神経機構		10	7	0	0	0	1,787	0
情報記憶		0	0	0	0	0	0	0
感覚認知情報		0	0	0	0	3	0	0
生体システム		0	5	0	0	5	0	0
計算神経科学		0	0	0	0	0	0	0
感覚・運動機能		0	0	0	0	0	0	0
認知行動発達機構		71	53	0	0	6	0	0
自律機能		0	0	0	0	0	0	0
脳機能計測センター		0	0	0	0	0	0	0
脳形態解析		239	22	8	0	0	1,285	223
大脳神経回路論		0	0	0	0	0	5	439
心理生理学		0	0	0	0	0	0	0
形態情報解析室		8	8	0	0	0	0	0
機能情報解析室		0	0	0	0	0	0	0
生体情報解析室		0	0	0	0	0	0	0
脳機能分子解析室		0	0	0	0	0	20	999
生殖内分泌系		348	86	0	0	0	0	0
生体恒常機能		5	132	0	0	0	0	0
動物実験センター		48	0	3	0	0	1,629	18
細胞機構		0	0	0	3	0	0	0
細胞内エネルギー変換		20	0	0	0	0	0	0
細胞増殖		0	0	0	0	0	0	0
細胞情報		0	0	0	0	0	0	0
細胞融合		0	0	0	0	0	0	0
生殖		0	0	0	0	0	0	0
細胞分化		64	0	0	0	0	0	0
形態形成		0	0	0	0	0	0	0
発生生物		0	0	0	0	0	0	0
感覚情報		43	0	0	0	0	832	0
計時機構		0	0	0	0	0	0	0
情報制御		0	0	0	0	0	0	0
行動制御		0	20	0	0	0	0	0
遺伝子第一		0	0	0	0	0	0	0
遺伝子第二		0	0	0	0	0	0	0
種分化第一		150	76	0	6	0	0	0

部門	動物種	明大寺地区				山手地区		
		マウス	ラット	モルモット	ウサギ	サル	マウス	ラット
種分化第二		0	0	0	0	0	0	0
大型スペクトログラフ室		0	0	0	0	0	0	0
細胞器官培養		130	0	0	0	0	0	0
RI 施設		0	0	0	0	0	0	0
形質転換生物		0	0	0	0	0	0	0
分子発生		75	0	0	0	0	842	0
発生遺伝		0	0	0	0	0	0	0
神経分化		0	0	0	0	0	514	3
ナノ形態生理		67	121	0	0	0	3	73
生命環境		0	0	0	0	0	550	0
植物発生		0	0	0	0	0	0	0
細胞生理		165	0	0	0	0	464	64
合計		2,616	721	11	9	14	11,263	1,892

水生動物 月別・動物種別搬入数（平成 16 年度）

種	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	合計
メダカ	1,050	100	500	500		500		500		1,000	500	500	5,150
ティラピア	16	800	503			9	3		12	89			1,432
クマノミ				2			3						5
キュウセン				3									3
スズメダイ				8									8
ハゼ							8						8
ベラ							14		55				69
ウナギ												40	40
ゼノパス	28	5	3							60			96
ヒトデ		150	18	100		62		140					470
ホヤ	50									80			130
海水(t)			8				8	8	4	20			48