

【 研 究 会 報 告 】

研究会報告

〔 目 次 〕

1. 糖鎖病態研究会 （代表者：等 誠司 2004 年 7 月 8 日－7 月 9 日）	189
2. 細胞内シグナル伝達機構の多角的・包括的理解 （代表者：宮脇 敦史 2004 年 10 月 7 日－10 月 8 日）	197
3. 細胞死の新たな生理機能とそのシグナル伝達 （代表者：三浦正幸 2004 年 11 月 29 日－11 月 30 日）	206
4. 消化管機能－吸収分泌機能の病態生理 （代表者：鈴木裕一 2004 年 12 月 16 日－17 日）	217
5. 上皮輸送の新たな展開：生体防御の最前線 （代表者：丸中良典 2004 年 11 月 16 日－11 月 17 日）	227
6. 視知覚への多角的アプローチ－生理，心理物理，計算論的アプローチ （代表者：塩入 論 2004 年 6 月 17 日－6 月 18 日）	236
7. シナプス可塑性の分子機構研究と精神神経疾患研究の接点を探る （代表者：畑 裕 2004 年 5 月 27 日－5 月 28 日）	243
8. 痛み情報伝達における ATP およびアデノシンの生理機能 （代表者：井上 和秀 2004 年 8 月 26 日－8 月 27 日）	253
9. カルシウムシグナリング研究の新潮流 （代表者：山内 卓 2004 年 11 月 18 日－11 月 19 日）	278
10. 脳磁場計測によるヒト脳機能マッピング 第 5 回脳磁場ニューロイメージング （代表者：柿木隆介 2004 年 12 月 13 日－12 月 14 日）	290
11. 高次脳機能研究の新展開 （代表者：高田昌彦 2005 年 1 月 17 日－1 月 18 日）	305
12. 神経回路の機能の成り立ちに関する学際的研究 （代表者：久保義弘 2004 年 12 月 2 日－12 月 3 日）	314
13. 第 3 回 大脳皮質・視床・基底核の神経回路 （代表者：金子武嗣 2004 年 10 月 6 日－10 月 7 日）	320
14. 生理研研究会「機能的 MRI 研究会」 （代表者：程 康 2004 年 11 月 25 日－11 月 26 日）	324
15. 電子位相顕微鏡法の医学的・生物学的応用－Tomography への展開をめざして （代表者：臼田信光 2005 年 3 月 24 日－3 月 25 日）	331
16. DNA 構造を基盤とするゲノム生理学の展開 （代表者：加藤幹男 2004 年 11 月 4 日－11 月 5 日）	342
17. 唾液腺研究からの生理機能研究，その戦略的展開 （代表者：杉谷博士，村上政隆 2005 年 2 月 28 日－3 月 1 日）	352
18. バイオ分子センサー研究会 （代表者：富永真琴 2004 年 9 月 9 日－9 月 10 日）	360

19. Na チャネルと細胞機能	
(代表者：緒方 宣邦 2004年6月24日－6月25日)	369
20. シナプス伝達の細胞分子調節機構	
(代表者：小松由紀夫 2004年11月26日－11月27日)	377
21. 心臓血管系イオンチャネルの機能障害に基づく病態発症機構の解明とその治療戦略の構築	
(代表者：松浦 博 2005年3月8日－3月9日)	392

1. 糖鎖病態研究会

2004 年 7 月 8 日－7 月 9 日

代表・世話人：等 誠司（自然科学研究機構・生理学研究所）

所内対応者：等 誠司（自然科学研究機構・生理学研究所）

- (1) サボシン D 変異マウスの作成とその表現型の解析: サボシン D 欠損マウスは腎および小脳にセラミド (HFA/d18:1)が蓄積し、腎尿細管変性と小脳プルキンエ細胞特異的な神経細胞死を呈する

松田純子¹⁾, 木戸真希子¹⁾, 富永久美子¹⁾, 山崎明子¹⁾,
有富桂子²⁾, 石塚稲夫²⁾, 鈴木邦彦³⁾, 黒田泰弘¹⁾

(¹⁾徳島大学医学部発生発達医学講座小児医学分野, ²⁾帝京大学生化学,

³⁾東海大学未来科学技術共同研究センター・糖鎖工学研究施設)

- (2) 小脳性運動障害マウスの中枢神経組織における糖鎖構造の変化

中北慎一^{1,2)}, 長束俊治¹⁾, 岡本潤¹⁾, 池田一裕³⁾, 長谷純宏¹⁾

(¹⁾大阪大学・大学院理科学研究科・化学専攻,

²⁾香川大学総合生命科学実験センター・糖鎖機能解析研究部門,

³⁾自然科学研究機構・生理学研究所・分子神経生理研究部門)

- (3) 脳特異膜貫通型パートタイムプロテオグリカン NGC の構造・発現様式・機能

大平敦彦^{1,2)}, 周尾卓也^{1,2)}, 時田義人¹⁾, 中西圭子¹⁾, 青野幸子¹⁾

(¹⁾愛知県心身障害コロニー・発達障害研究所・周生期学部,

²⁾名古屋大学大学院・医学系研究科・神経生化学)

- (4) Guillain-Barré 症候群と抗糖脂質抗体：診断的および病因的意義について

楠 進, 森田大児, 平川美菜子（近畿大学医学部神経内科）

- (5) 糖鎖修飾異常による先天性筋ジストロフィー

遠藤玉夫（（財）東京都高齢者研究・福祉振興財団・

東京都老人総合研究所・糖蛋白質研究グループ）

- (6) 造血細胞とラクトサミン糖鎖生物学

中村 充（産業技術総合研究所・糖鎖工学研究センター・細胞制御解析チーム）

- (7) インフルエンザの糖鎖生物学

鈴木康夫（静岡県立大学薬学部生化学教室）

- (8) 感染及び免疫をモジュレートする GPI アンカーグリカン

山下克子（佐々木研究所・生化学部）

- (9) 構造・比較・機能グライコプロテオミクスのための装置およびシステム開発

平林 淳（産業技術総合研究所・糖鎖構造解析チーム

（併）香川大学総合生命科学実験センター・糖鎖機能解析 研究部門）

- (10) 2 次元 HPLC および cDNA マクロアレイを用いた glyco-genomics 解析と応用

池田一裕（自然科学研究機構・生理学研究所・分子神経生理研究部門）

- (11) 糖鎖の硫酸化によるがん転移の制御を目指して

本家孝一, 池田直樹（高知大学医学部遺伝子病態制御学教室）

- (12) がん細胞における異常糖鎖の出現の機構

神奈木玲児（愛知県がんセンター研究所・分子病態）

- (13) スフィンゴ糖脂質代謝酵素のノックダウンによって観察されるゼブラフィッシュ初期発生系の異常

伊東 信 (九州大学大学院 農学研究院 生物機能科学部門)

- (14) GAG 合成に関わる糖ヌクレオチド輸送体

西原祥子, 神山伸, 須田健 (創価大学, 工学部, 生命情報工学科)

- (15) ヒトの LacdiNAc 合成酵素, β 1,4GalNAc-T3, -T4 のクローニングと機能解析

佐藤 隆, 後藤雅式, 清原克恵, 成松 久

(産業技術総合研究所・糖鎖工学研究センター・糖鎖遺伝子機能解析チーム)

- (16) コア 3 合成酵素のクローニングと機能解析

岩井俊恵¹, 工藤崇^{1,2}, 川本理沙¹, 久保田智巳¹, 梅谷内晶^{1,2}, 川本徹³, 成松久¹

(¹産総研・糖鎖工学研究セ・糖鎖遺伝子機能解析チーム,

²NEDO, ³筑波大学臨床医学系消化器外科)

【参加者名】

辻 崇一 (お茶の水女子大学 糖鎖科学研究教育センター), 鈴木邦彦 (東海大学 未来科学技術共同研究センター), 長谷純宏, 長束俊治, 石水 毅, 青木孝文, 伊東伸子, 藤原由加里, 橋本周子 (大阪大学大学院理学研究科), 中村 充, 平松 淳, 岩井俊恵, 佐藤 隆, 藤井 崇, 成松由規, 佐藤麻衣子 (産業技術総合研究所 糖鎖工学研究センター), 山下克子 (佐々木研究所生化学部), 神奈木玲児 (愛知県がんセンター研究所), 楠 進, 高田和男 (近畿大学医学部神経内科), 森田大児, 平川美菜子 (東京大学大学院医学系研究科), 本家孝一 (高知医

科大学), 西原祥子, 神山 伸 (創価大学工学部), 大平敦彦 (愛知県コロニー発達障害研究所), 鈴木康夫, 青木千恵 (静岡県立大学薬学部), 遠藤玉夫 (東京都老人総合研究所), 伊東 信 (九州大学大学院 農学研究院), 松田純子 (徳島大学医学部), 梶本哲也 (京都薬科大学), 中北慎一 (香川大学総合生命科学実験センター), 田辺和弘 (三菱化学科学技術研究センター), 西巻拓也, 和気弘明, 溝口義人, 渡部美穂, 鳥居知宏, 東 幹人, 石井章寛, 田中謙二, 小野 勝彦, 池一中裕, 等 誠司 (生理研)

【概要】

ゲノミクス・プロテオミクスに続いて, グライコノミクスの時代と言われている。複合糖質の糖鎖発現は, 一連の糖鎖関連遺伝子発現および糖鎖生成/分解酵素の発現分布に左右されるため, その研究は困難な点を多く抱えている。しかし, 本邦の研究者が中心になって糖鎖関連遺伝子のクローニングが進められた結果, 糖鎖発現やその調節機構を遺伝子発現によって理解することができるようになった。さらに, 遺伝子発現を調節することによって糖鎖の発現調節も可能になり, 糖鎖の生物学的意義が次々に解明されている。実際, 複合糖質の糖鎖が生命現象や病態に関与していることを示す知見は多い。例えば今回の研究会でも, 神経筋疾患や感染症などヒトの病気に密接に関係する糖鎖の機能や病態が示され, また糖鎖関連遺伝子の改変マウスで観察される病態が発表された。正常発生にも糖鎖の働きが必須であることは今

や自明のことであり, マウス・ショウジョウバエ・ゼブラフィッシュなどのモデル動物を駆使した糖鎖研究が盛んになってきている。一方でこのような研究が進むにつれ, 糖鎖に関する情報量は膨大なものになってきている。ハイスループットな糖鎖 (発現) 解析の手法が待望され, それらの結果を理解するためのバイオインフォマティクスも含む最適な方法の研究開発が進められている。糖鎖生物学の全体像を把握することが益々困難なものになってきている中で, 本研究会は, 糖鎖関連遺伝子のクローニングから糖鎖の微量解析まで, 各方面の専門家が一堂に会して活発な議論と情報交換をする場となっている。今回も, 第一線で活躍している研究者・医師が最新の知見を発表すると同時に, その手法が抱える問題点までも呈示して解決法を探る貴重な会であった。

(1) サポシン D 変異マウスの作成とその表現型の解析: サポシン D 欠損マウスは腎および小脳にセラミド (HFA/d18:1) が蓄積し, 腎尿細管変性と小脳プルキンエ細胞特異的な神経細胞死を呈する

松田純子¹⁾, 木戸真希子¹⁾, 富永久美子¹⁾, 山崎明子¹⁾,

有富桂子²⁾, 石塚稲夫²⁾, 鈴木邦彦³⁾, 黒田泰弘¹⁾

(¹⁾徳島大学医学部発生発達医学講座小児医学分野, ²⁾帝京大学生化学,

³⁾東海大学未来科学技術共同研究センター・糖鎖工学研究施設)

スフィンゴ脂質活性化タンパク質 (サポシン A,B,C,D) は共通の前駆体プロサポシンから誘導される相同性の糖タンパク質で, 多くの疎水性スフィンゴ脂質のリソゾームにおける分解に必須である。サポシン D は *in vitro* で酸性セラミダーゼの活性化タンパク質であるという報告があるが, ヒトでの特異的な欠損症の報告はなく, その生体内での機能は不明である。今回我々はサポシン D 特異的な欠損マウス (Sap-D^{-/-}) を作成し, その表現系を解析した。

Sap-D^{-/-} は生後 2 ヶ月ごろより多尿, 生後 4 ヶ月ごろより運動失調を呈し, 病理学的には, 腎臓では腎尿細管変性, 中枢神経系では, 小脳プルキンエ細胞の選択的脱落が特徴的であった。生化学的には, 腎臓と脳 (特に小脳) において脂肪酸に水酸基のついたセラミド (HFA/d18:1) の蓄積が認められた。以上より, サポシン D は生体内でも酸性セラミダーゼの活性化に関与していること, 生体内における HFA セラミドと細胞死の関連が示唆された。

(2) 小脳性運動障害マウスの中枢神経組織における糖鎖構造の変化

中北慎一^{1,2)}, 長束俊治¹⁾, 岡本潤¹⁾, 池田一裕³⁾, 長谷純宏¹⁾

(¹⁾ 大阪大学・大学院理学研究科・化学専攻

²⁾ 現・香川大学総合生命科学実験センター・糖鎖機能解析研究部門

³⁾ 自然科学研究機構・生理学研究所・分子神経生理研究部門)

【目的】小脳性運動障害マウス的大脑および小脳に発現している糖鎖と正常なマウスに発現している糖鎖との相違点について, ピリジルアミノ化法を用いてその糖鎖構造と発現量について調べた。

【方法および結果】3 週齢の ICR マウス (wild type) と 3 種類の小脳性運動障害マウス (*jimpy*, *staggerer*, *shiverer*) から大脑および小脳を摘出し, それぞれを凍結乾燥した。この凍結乾燥粉末を 100°C で 10 時間ヒドラジン分解を行

い, 糖鎖を切り出した。再 *N*-アセチル化後, ピリジルアミノ化法により蛍光標識し, ピリジルアミノ化糖鎖を得た。得られたピリジルアミノ化糖鎖を陰イオン交換 HPLC によって中性糖画分と酸性糖画分に分離した。酸性糖鎖画分はシアリダーゼ消化後, 再度陰イオン交換 HPLC で分離することでアシアロ糖画分を得た。小脳性運動障害マウスにおいて, 糖鎖の発現量および構造変化は主にコンプレックス型糖鎖で見られた。

(3) 脳特異膜貫通型パートタイムプロテオグリカン NGC の構造・発現様式・機能

大平敦彦^{1,2)}, 周尾卓也^{1,2)}, 時田義人¹⁾, 中西圭子¹⁾, 青野幸子¹⁾

(¹⁾ 愛知県心身障害コロニー・発達障害研究所・周生期学部,

²⁾ 名古屋大学大学院・医学系研究科・神経生化学)

プロテオグリカンは脳における主要な細胞表面複合糖

質であり, 近年, 脳の発達や損傷修復に関与する分子と

して注目されている。私達は、脳神経回路の形成機構を研究している過程で、新規な膜貫通型コンドロイチン硫酸プロテオグリカンを発見し、ニューログリカン C (NGC) と名付けた。NGC は、中枢神経特異的に発現しており、細胞外領域に酸性アミノ酸のクラスターと1個のEGF様ドメインを持つ。また、1本のコンドロイチン硫酸糖鎖を共有結合している。興味深いことに、小脳と網膜にお

いては、発達に伴い、プロテオグリカン型からコンドロイチン硫酸糖鎖を持たない非プロテオグリカン型へと構造が変化する。NGCの細胞外領域には神経突起伸長を促進する活性があることもわかった。遺伝子改変により作製したNGC発現低下マウスには行動異常が認められたことから、NGCは脳の機能制御に関わる分子であることが示唆された。

(4) Guillain-Barré 症候群と抗糖脂質抗体：診断的および病因的意義について

楠 進, 森田大児, 平川美菜子 (近畿大学医学部神経内科)

Guillain-Barré 症候群 (GBS) は、急性の運動麻痺をきたす末梢神経障害であり、感染が先行することが多く、急性期を過ぎれば回復に向かう単相性の疾患である。しかし症状のピーク時には寝たきりとなったり、呼吸筋麻痺をきたしてレスピレータ管理が必要になる例もある。治療として、急性期の血漿交換と免疫グロブリン大量静注 (IVIg) が有効であるが、早期診断・早期治療開始がきわ

めて重要である。近年 GBS の急性期に高率 (約 60%) に抗糖脂質抗体が上昇することがわかり、補助診断マーカーとして用いられている。抗体産生の機序として、先行感染因子のもつ糖鎖に対する免疫反応が考えられている。ある種の抗体は、対応する抗原糖脂質の局在部位に特異的に結合して臨床病型を規定する。今後さらに未同定の抗原に対する抗体が見出されると予想される。

(5) 糖鎖修飾異常による先天性筋ジストロフィー

遠藤玉夫

(財団法人東京都高齢者研究・福祉振興財団 東京都老人総合研究所 糖蛋白質研究グループ)

最近特定の糖蛋白質、 α -ジストログリカンの *O*-Man 型糖鎖異常が、ある種の先天性筋ジストロフィーの原因であることが分かったので紹介したい。

我々は、これまでに *O*-Man 型糖鎖の合成に関わる protein *O*-mannose β 1,2 N-acetylglucosaminyltransferase (*POMGnT1*) の遺伝子が、先天性の筋ジストロフィーに眼奇形、神経細胞移動障害を伴う常染色体劣性遺伝病である muscle-eye-brain (MEB) 病の原因遺伝子であることを明らかにした。一方、MEB と類似の病態を示す Walker-Warburg syndrome (WWS) の原因遺伝子 *POMT1*

(protein *O*-mannosyltransferase 1) は、酵母の *O*-Man 転移酵素に相同性があることから糖転移酵素であろうと予想されていたが、詳細は不明であった。最近我々は、*POMT1* 及びもう一つのホモログ *POMT2* は *O*-Man 転移酵素であり、活性発現に *POMT1*-*POMT2* 複合体形成が必要であることを示した。

以上より、WWS と MEB は *O*-Man 型糖鎖不全であり、神経細胞移動障害を伴う筋ジストロフィーの発症機序に *O*-Man 型糖鎖が深く関わると考えられる。

(6) 造血細胞とラクトサミン糖鎖生物学

中村 充（産業技術総合研究所・糖鎖工学研究センター・細胞制御解析チーム）

ヒト造血細胞では、2 型のラクトサミン（繰り返し）構造が発現している。本構造は、糖タンパク質糖鎖・糖脂質糖鎖の骨格構造として生合成され、末端がルイス X・シアリルルイス X・硫酸基など、機能性糖鎖構造で修飾されている。本骨格構造は分岐しやすく、末端機能性糖

鎖構造が多価性（ポリバレンシー）を示す。分岐することによって、対応する受容体との結合が増している。今回は、ラクトサミンに関する我々の最近のトピックを紹介したい。

(7) インフルエンザの糖鎖生物学

鈴木康夫（静岡県立大学薬学部）

インフルエンザは地球上に広く分布する人獣共通感染症であり、病原体であるインフルエンザウイルスの自然宿主はカモなどの野生水鳥である。カモにはインフルエンザウイルスヘマグルチニン亜型 (H1~H15) およびノイラミニダーゼ亜型 (N1~N9) が全て貯留されており、カモのウイルスは、自然界で偶発的に他の動物に入り込む。今までヒトの間で世界的な大流行を起こしたインフルエンザウイルスは、ヒトと他の動物インフルエンザ

ウイルスとの遺伝子再集合体であり、ウイルスに大きな抗原変異がもたらされている。また、ウイルスは遺伝子点変異も常に起こしており、ウイルスが宿主細胞内で増殖すると同時に新しい変異ウイルスが生まれてしまう仕組みがある。私達は、ウイルスの変異や宿主の壁を越える機構が、シアル酸を含む糖鎖と深く関わることを見出して来た。今回、インフルエンザの流行やウイルスの宿主間伝播と糖鎖生物学との深い関わりを述べる。

(8) 感染及び免疫をモジュレートする GPI アンカーグリカン

山下克子（佐々木研究所）

グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカーのグリカンは $\text{EtNH-PO}_3^- \rightarrow 6\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 4\text{GlcN-Inositol-PO}_3^-$ を基本骨格として生物界に広く存在することが知られている。我々は最近、ヒト胎盤アルカリホスファターゼの GPI アンカーグリカンの 2 番目のマンノースに $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow \text{PO}_3^-$ 残基が結合しているこ

とを見出した。この GPI アンカーの側鎖は少なくとも哺乳動物に共通して存在し、ある種の細菌感染のトリガーとなっていることを明らかにした。また、一連のサイトカインの中で、 $\text{TNF-}\alpha$ 及び IL-18 が GPI アンカーのグリカン鎖を認識し、生理活性をモジュレートしていることを紹介する。

(9) 構造・比較・機能グライコプロテオミクスのための装置およびシステム開発

平林 淳

（産業技術総合研究所・糖鎖構造解析チーム（併）香川大学総合生命科学実験センター・糖鎖機能解析研究部門）

構造グライコミクスはタンパク質の翻訳後修飾として

起こる糖鎖修飾に関し基盤的情報を提供する。すなわち、

グライコプロテオミクスのための装置, およびシステム開発によって, ゲノム上にコードされるどの遺伝子の産物が (ゲノム情報), そのアミノ酸配列のどの位置に (位置情報), どのような糖鎖修飾が施されるのかを (構造情報) 精密かつ, ハイスループットに決定することが可能に成りつつある。また, 糖鎖構造を高速, 高感度に同定,

ないしプロファイリングするための方策として, 物理 (MS), 化学 (LC), ないし生化学的手法 (レクチン親和力) を選択できる。これらの手法は相補的であるため, 互いを効率よく組み合わせることが得策である。糖鎖機能を網羅的に解明する機能グライコミクスの本格稼動を睨み, 構造, および比較グライコミクスについて述べる。

(10) 2次元 HPLC および cDNA マクロアレイを用いた glyco-genomics 解析と応用

池中 一裕, 石井 章寛, 等 誠司

(自然科学研究機構・生理学研究所・分子神経生理研究部門)

これまでの糖鎖研究は主に生化学および細胞生物学手法を用いて行われ, 遺伝子のクローニングによって発現臓器, 基質特異性などが, 2次元 HPLC を用いて各種臓器, 糖タンパク質上の糖鎖構造解析が行われてきた。この結果, 糖鎖が (1)細胞間相互作用や外来性刺激の認識分子として機能する事, (2)個体の発生・分化, 組織形成とその維持などに必要である事, (3)N-結合型糖鎖の発現は個体差なく空間的, 時間的に非常に厳密に保たれている事などが明らかとなった。しかしながら, その制御機構, 生理学的意義については解明されてない。当研究室では糖鎖発現制御機構を解明するために 2 次元 HPLC システ

ムを用いた糖鎖構造解析系ならびに cDNA マクロアレイを用いた糖鎖修飾関連遺伝子の網羅的解析系を確立した。これらの解析系を用いる事で, 糖鎖生合成系の酵素遺伝子の発現および発現糖鎖にいくつかの相関関係がある事を見出した。例えば, Glucosidase I, II, ER-mannosidase および Goldi-mannosidase IB といった生合成経路の一連の酵素は同様の発現制御を受けている事が明らかとなった。現在, 我々は種々の検体の糖鎖発現解析ならびに糖鎖修飾関連遺伝子の発現解析を行っており, 本研究会にて紹介したい。

(11) 糖鎖の硫酸化によるがん転移の制御を目指して

本家 孝一, 池田 直樹

(高知大学医学部遺伝子病態制御学教室)

がんの血行性転移の最初のステップであるがん細胞の接着には, 血管内皮細胞上に発現する E-セレクトインとがん細胞上の糖鎖リガンドとの結合が重大な役割を果たす。この糖鎖リガンドとして, シアリルルイス a (CA19-9 抗原, sLe^a) とシアリルルイス x (sLe^x) が知られている。一方, ガラクトースの 3 位にシアリ酸の代わりに硫酸基のついた 3'-sulfoLe^a や 3'-sulfoLe^x が正常の大腸組織や肺組織に存在する。シアリルルイス抗原とスルホルイス抗原を合成

するシアリ酸転移酵素と硫酸転移酵素が競合し, がん化によって相対的な硫酸転移酵素の勢力が弱まることによって, シアリルルイス抗原ができるようになると想像させる。我々は, シアリルルイス抗原を高発現しているがん細胞に, 硫酸転移酵素 GP3ST の遺伝子を導入することにより, がん細胞表面の糖鎖構造を正常化させ, がん転移を制御することを目指している。

(12) がん細胞における異常糖鎖の出現の機構

神奈木玲児（愛知県がんセンター研究所・分子病態）

細胞が悪性化するとさまざまな糖鎖異常が出現することは古くから知られている。悪性細胞に出現する異常糖鎖に機能上の病理的意義があるのかどうか、また、悪性細胞にどのような機構で糖鎖異常がもたらされるのか、が解明されるべき問題点である。悪性細胞の異常糖鎖の機能としては、細胞接着活性を持ち血行性転移に関与する、という一応の解答が出てきている。また最近では、腫瘍巣の血管形成への関与や、免疫監視における機能も

指摘され始めている。一方、悪性細胞に糖鎖異常をもたらすメカニズムについてはまだわからないことが多い。細胞の悪性化に伴う糖鎖変化の機構として古くから「糖鎖不全現象 incomplete synthesis」と「新規糖鎖の合成誘導 neo-synthesis」という二つのメカニズムが知られている。この糖鎖病態研究会の開かれる機会に、箱守博士らによって提唱されたこの古典的なコンセプトのもつ今日的な意味について考えてみたい。

(13) スフィンゴ糖脂質代謝酵素のノックダウンによって観察されるゼブラフィッシュ初期発生系の異常

伊東 信（九州大学大学院 農学研究院 生物機能科学部門）

スフィンゴ糖脂質は、ゴルジ装置において脂質アンカーであるセラミドに単糖が順次転移することで合成された後、主として形質膜に輸送され、最終的にはリソソームに運ばれてエキソグリコシダーゼおよびセラミダーゼにより分解される。形質膜では、コレステロール依存性あるいは非依存的にミクロドメイン (Raft, DIM, DIG, GEM) を形成し、細胞間、細胞内シグナルの伝達、調節に重要

な役割を果たしている。スフィンゴ糖脂質の分解・合成の異常は、生物学的にも重大な機能異常を惹起すると考えられ、実際に幾つかの遺伝的代謝疾患が知られている。今回、スフィンゴ糖脂質の合成、分解酵素を特異的にノックダウンした時のゼブラフィッシュ初期発生の異常について報告する。

(14) GAG 合成に関わる糖ヌクレオチド輸送体

西原祥子, 神山伸, 須田健（創価大学, 工学部, 生命情報工学科）

合成されたタンパク質はゴルジ装置で、様々な糖転移酵素による糖鎖修飾を受ける。プロテオグリカンも例外ではなく、ゴルジ装置で、グリコサミノグリカン鎖が付加される。しかし、糖転移酵素の基質となる多くの糖ヌクレオチドや硫酸転移酵素の基質である PAPS は細胞質で合成され、それらが、糖鎖付加の場であるゴルジ装置内腔に供給されるためには、糖ヌクレオチド輸送体が必要となる。これらも、また、糖鎖合成を制御していると考えられる。

我々は、GAG 付加の各々のステップに関与する 2 種の輸送体を同定した。一つは、ショウジョウバエ *frc* のヒトホモログとして同定した *hfrcl* であり、UDP-GlcNAc 輸送活性を示し、ヘパラン硫酸鎖伸長へ関与が認められた。他は、硫酸転移酵素の基質である PAPS の輸送活性を示し、PAPS 輸送体と同定された。これらの 2 種の輸送体について、病態と関連する可能性をも含めて議論する。

(15) ヒトの LacdiNAc 合成酵素, β 1,4GalNAc-T3, -T4のクローニングと機能解析

佐藤 隆, 後藤雅式, 清原克恵, 成松 久

(産業技術総合研究所・糖鎖工学研究センター・糖鎖遺伝子機能解析チーム)

LacdiNAc 構造 (GalNAc β 1,4GlcNAc-) は黄体形成ホルモン (LH) や甲状腺刺激ホルモン (TSH)などの糖タンパク質ホルモンの N-結合型糖鎖に特異的に報告されている糖鎖構造であり, ホルモンの代謝において重要な役割を果たしている。

我々は β 1,4-結合モチーフをクエリー配列にデータベースを検索し, LacdiNAc 構造を合成する2つの糖転移酵素を見いだした。これらの酵素は, それぞれ999アミノ酸, 1039アミノ酸から構成されていたが, コンドロイチン硫酸合成酵素のように複数の糖転移酵素ドメインを持つてはいなかった。糖転移酵素の触媒部位と予想されるのはC末端側3分の1の領域で, β 1,4-結合モチーフとDXDと同じ機能を持つと予想されるDLHモチーフが存

在したが, N末端側3分の1の領域は既知のあらゆるアミノ酸配列と相同性を示さなかった。

これらのリコンビナント酵素をHEK293細胞で発現させ, 基質特異性を解析した結果, とともに β 1,4結合でGalNAcを転移し, GalNAc β 1,4GlcNAc-構造を合成する酵素であることがわかった。さらに様々な基質に関して活性を検討したところ, 2本鎖のN-結合型糖鎖やCore3やCore6などのO-結合型糖鎖も基質とした。これらの酵素は発現組織が大きく異なり, β 4GalNAc-T3は胃や大腸で遺伝子発現が見られたのに対し, β 4GalNAc-T4は脳や卵巣で高い発現が見られた。このことからLHやTSHに報告されているLacdiNAc構造は β 4GalNAc-T4が作っている可能性が考えられた。

(16) コア3合成酵素のクローニングと機能解析

岩井俊恵¹, 工藤崇^{1,2}, 川本理沙¹, 久保田智巳¹, 梅谷内晶^{1,2}, 川本徹³, 成松久¹

(¹産総研・糖鎖工学研究セ・糖鎖遺伝子機能解析チーム, ²NEDO, ³筑波大学臨床医学系消化器外科)

UDP-N-acetylglucosamine : GalNAc-peptide β 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase (β 3Gn-T)によって合成されるO-グリカンのcore3構造 (GlcNAc β 1-3GalNAc α 1-serine/threonine) は, ムチン生合成において重要な前駆物質である。我々がクローニングした β 3Gn-T6は, その基質特異性, 反応生成物の結合様式, 組織発現分布から, core3合成酵素であると結論した。次いで, 抗 β 3Gn-T6モノクローナル抗体 (G8-144 Mab) を作製し, 胃腸における β 3Gn-T6の発現を免疫組織染色法により調べたところ, 正常組織において β 3Gn-T6は上皮細胞のゴルジ領域に強い染色が見られたが, 癌組織での発現は顕著に低下して

いた。さらに家族性大腸ポリポーシス (FAP) における発現解析の結果, β 3Gn-T6が良性と悪性の境界病変を識別するマーカーとなりうる可能性が示された。また, Caco-2細胞の分化誘導時における β 3Gn-T6の発現量を調べた結果, β 3Gn-T6の発現は分化・脱分化の過程で厳密に調節されていることが示唆された。今後は, core3構造をキャリアーする蛋白の同定および糖タンパク質としての機能解析が課題である。本研究は, 経済産業省の産業科学技術研究開発制度の一環として, 新エネルギー・産業技術総合開発機構より委託を受けて実施したものである。

2. 細胞内シグナル伝達機構の多角的・包括的理解

2004 年 10 月 7 日－10 月 8 日

代表・世話人：宮脇 敦史（理化学研究所脳科学総合研究センター）

所内対応者：河西 春郎（生体膜部門）

- (1) B リンパ球における Ras-Erk 活性化メカニズム
黒崎 知博（理化学研究所・免疫・アレルギー科学総合研究センター）
- (2) nNOS-GFP transgenic マウスの作製による腎マクラデンサ細胞機能の研究
安岡 有紀子，鈴木 喜郎，河原 克雅（北里大学医学部）
- (3) 生きている細胞内の 1 分子イメージングと分子定量解析
徳永 万喜洋（理化学研究所・免疫・アレルギー科学総合研究センター）
- (4) 2 光子グルタミン酸法を用いた単一巢バインカルシウムシグナルのスパイン形態依存性の解析
野口 潤，松崎 政紀，河西 春郎（生理学研究所）
- (5) 一酸化窒素 (NO) シグナルによる神経活動でコーディングとシナプス可塑性：NO 可視化を用いたアプローチ
柿澤 昌，並木 繁行，廣瀬 謙造，飯野 正光（東京大学大学院医学系研究科・細胞分子薬理）
- (6) 神経ステロイドによるシナプス可塑性の誘導：膜電位イメージングによる解析
曾我部 正博，陳 玲（名古屋大学大学院医学系研究科）
- (7) 破骨細胞プロトンシグナルの電位依存性調節機構
久野 みゆき，酒井 啓，川脇 順子，森 啓之，森畑 宏一，翁 昌子
- (8) 心筋細胞における生理的な 3 量体 G 蛋白質サイクルモデルの構築
～ G 蛋白質制御カリウムチャネルの電流特性より～
石井 優，鈴木 慎悟，倉智 嘉久（大阪大学大学院医学系研究科）
- (9) 小脳登上線維 - プルキンエ細胞シナプスの生後発達における電位依存性カルシウムチャネルの役割
橋本 浩一，狩野 方伸（金沢大学大学院医学系研究科）
- (10) TRPM2 チャネルによるシグナル・生理応答制御
原 雄二，山本 伸一郎，片野 正展，木内 祐二，清水 俊一，森 泰生
(京都大学大学院工学研究科)
- (11) マクロファージに発現する TRPV2 チャネル
長澤 雅裕，小島 至（群馬大学生体調節研究所）
- (12) in vivo 血小板活性化機構のリアルタイム解析
最上 秀夫，林 忠毅，村上 祐介，浦野 哲盟（浜松医科大学）
- (13) DGK と PKC の分子機能協働の解析
齋藤 尚亮，白井 康仁，山口 泰人，松原 岳大
(神戸大学バイオシグナル研究センター)
- (14) PLCzeta と Ca^{2+} オシレーション
宮崎 俊一，河内 全，尾田 正二，依田 綾子，白川 英樹，淡路 健雄
(東京女子医科大学)
- (15) Calyx of Held におけるシナプス小胞エンドサイトーシスの分子機構
山下 貴之，髭 俊秀，高橋 智幸（東京大学大学院医学系研究科）
- (16) 細胞内シグナル伝達機構の多角的・包括的理解
宮脇 敦史（理化学研究所脳科学総合研究センター）

【参加者名】

黒崎 知博 (理研・免疫アレルギー科学総合研究センター), 宮崎 俊一 (東京女子医大), 伊藤 昌彦 (東京女子医大), 小島 至 (群大生体調節研究所), 長澤 雅裕 (群大生体調節研究所), 最上 秀夫 (浜松医大), 鈴木 優子 (浜松医大), 斎藤 尚亮 (神大バイオシグナル研究センター), 足立 直子 (神大自然科学研究科), 笥 朋子 (神大自然科学研究科), 河原 克雅 (北里大・医), 安岡 有紀子 (北里大・医), 久野 みゆき (市大大院医学研究科), 飯野 正光 (東大大院医学系研究科), 柿澤 昌 (東大大院医学系研究科), 林 健二 (東大大院医学系研究科), 高橋 智幸 (東大大院医学系研究科), 髭 俊秀 (京大大院理学研究科) 齋藤 直人 (東大大院医学系研究科), 堀 哲也 (東大大院医学系研究科), 山下 貴之 (東大大院医学系研究科) 渡邊 博康 (東大大院医学系研究科), 倉智 嘉久 (阪大大院医学系研究科), 石井 優 (阪大大院医学系研究科), 曾我部 正博 (名大大院医学研究科), 狩野 方伸 (金沢大大院医学系研究科), 橋本 浩一 (金沢大大院医学系研究科), 原 雄二 (京大大院工学研究科), 清中 茂樹 (京大大院工学

研究科), 三木 崇史 (京大大院工学研究科), 片野 正展 (京大大院工学研究科), 加藤 賢太 (京大大院工学研究科), 徳永 万喜洋 (理研・免疫アレルギー総合研究センター), 廣島 通夫 (理研・免疫アレルギー総合研究センター), 吉田 希美枝 (理研・免疫アレルギー総合研究センター), 宮脇 敦史 (理研脳科学総合研究センター), 水野 秀昭 (理研脳科学総合研究センター), 永井 健治 (理研脳科学総合研究センター), 宮内 崇之 (理研脳科学総合研究センター), 河西 春郎 (生理研), 岸本 拓哉 (生理研), 根本 知己 (生理研), 高橋 倫子 (生理研), 松崎 政紀 (生理研), 兒島 辰哉 (生理研), 木瀬 環 (生理研), 安松 信明 (生理研), 本蔵 直樹 (生理研), 畠山 裕康 (生理研), 野口 潤 (生理研), 緒方 衝 (生理研), 東島 眞一 (統合バイオ), 山田 早織 (東京薬科大), 梶谷 仁志 (東京薬科大), 加勢 大輔 (生理研), 川口 泰雄 (生理研), 山下 晶子 (日大), 一戸 紀孝 (理研), 宮田 麻理子 (生理研), 富永 真琴 (生理研), 富樫 和也 (生理研), 西野 敦雄 (生理研), 前島 隆司 (生理研)

【概要】

細胞内では, 外界刺激を受けて, 様々のカスケード反応が起こり, 細胞の分化, 移動, 分裂などの現象が実現される。こうした細胞内シグナル伝達系を多角的かつ包括的に理解するためには, ここに空間と時間軸を導入しなければならない。各事象が空間的, 時間的に巧妙に制御されているからである。また, 生化学, 遺伝子, バイオイメージングなどの技術を総動員し, さまざまな分野にまたがる知識をもとに議論することが重要である。

日本における細胞内シグナル伝達の研究は, 多くの研究者がそれぞれの研究の目的に適した, 異なった細胞 (例えば神経細胞, 上皮細胞, 免疫細胞等) を用いて業績を挙げており, 国際的にも高く評価されている。しかしな

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

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

(1) B リンパ球における Ras-Erk 活性化メカニズム

黒崎 知博 (理化学研究所・免疫・アレルギー科学総合研究センター・分化制御研究グループ)

ホスホリパーゼ (PLC)- γ 2 は PIP2 を水解して IP3 と DAG を産生する酵素であり, この酵素のノックアウトマ

ウスの解析より PLC- γ 2 が B リンパ球の分化・免疫応答に重要な役割を担っていることが明らかにされてきた。従っ

て BCR シグナルにおいて PLC- γ 2 の下流で、どのようなシグナル経路が形成され、その経路の総和として、どのような細胞反応が生じるかの研究の重要性はいうまでもない。

モデル B リンパ球 DT40 を用いて、まず、私たちは、Ras の活性化に從來考えられていた GEF ファミリーである Sos

とは異なり、主として RasGRP3 が用いられていることをあきらかにした。また、・結合することにより、細胞膜へリクルートされ、リクルートされた RasGRP3 は PKC により、133 番目の Thr 残基がリン酸化されることにより、はじめて活性化されるというメカニズムを明らかにした。

(2) nNOS-GFP transgenic マウスの作製による腎マクラデンサ細胞機能の研究

安岡 有紀子, 鈴木 喜郎, 河原 克雅 (北里大学医学部・生理)

腎ネフロンは、ヘンレループを経て元の糸球体に戻ってくる。この糸球体に接する部分の尿細管上皮（遠位直尿細管の血管極に面する部分）の細胞は、背が高く核が密集して見えるため緻密班と呼ばれている。緻密班は通過する濾液の流量を Cl⁻ 濃度により感知し、輸入細動脈を収縮/拡張させることにより糸球体濾過量をコントロールしている。緻密班細胞には COX-2, neuronal NOS (nNOS) の特異的発現も知られているが、腎尿細管細胞に占める細胞数が極端に少なく単離法が確立していないた

め、シグナル伝達の機序に未解明の部分が多い。緻密班の生理機能を隣接する他の細胞との相互関係を維持しながら調べるためには、腎スライスあるいは単離ネフロン状態で緻密班を同定する必要がある。本研究では、緻密班が nNOS を特異的に強発現していることに着目し、nNOS promoter+EGFP+IRES+Cre を含む vector (pNEIN) を構築し、培養細胞およびトランスジェニックマウス作製により、緻密班細胞を GFP で標識することを試みた。

(3) 生きている細胞内の 1 分子イメージングと分子定量解析 ー 1 分子イメージングによる細胞質 - 核間輸送の分子機構ー

徳永 万喜洋 (国立遺伝学研究所, 総研大, 理化学研究所・免疫センター)

生きている細胞での蛍光 1 分子イメージングおよび分子定量解析に必要な顕微鏡技術を開発している。例えば、マイクロインジェクションで、現在観察している細胞を狙い打ちして蛍光標識タンパク質を導入し、そのまま 1 分子イメージングすることもできている。

今本尚子博士 (遺伝研, 現: 理研・細胞核機能) との共同研究により、細胞質ー核間輸送の 1 分子イメージングと定量解析を行ってきた。細胞質ー核間輸送に関しては、これまでセミインタクト細胞を用い、1 分子イメージングによる分子機構の定量解析、1 細胞レベルでの輸送速度定量により分子機構を明らかにしてきた。これらの知見をもとに、細胞質ー核間輸送の分子機構に関するモデルが考えられた。弱い結合部位は約 100 個の分子を集め、局所的に分子濃度を高めることにより、選択的な通過でありながら十分に速い速度が必要であるという、一見相反する機

能を実現している。約 8 個の分子を結合できる強い部位は、G タンパク質 Ran-GTP や輸送基質の有無により反応性が変化するとともに、Ran-GTP により反応がおこって核内に荷物を降ろす。

細胞レベルの定量解析により、細胞内での分子濃度を nM から uM のレンジで計測することができる。核内移行の輸送活性を蛍光像から直接計測したところ、以上の 1 分子計測で求めた値から計算される活性値とよく一致した。

さらに、基質濃度の変化による解析を進め、生細胞での 1 分子イメージングとの比較を行い、分子機構を解明している。

これらの、生細胞における分子イメージング・定量解析技術を用い、例えば細胞膜における情報伝達場の可視化、刺激による動的な変化など、シグナルの動的な変化を分子レベルで定量的に明らかにしてゆきたい。

(4) 2光子グルタミン酸法を用いた単一スパインカルシウムシグナルのスパイン形態依存性の解析

野口 潤, 松崎 政紀, 河西 春郎 (生理学研究所・生体膜部門)

大脳錐体細胞スパインの NMDA 受容体 (NMDAR) の発現及び NMDAR による Ca^{2+} シグナルのスパイン形態依存性を2光子グルタミン酸法及び2光子 Ca^{2+} 画像解析により海馬急性スライス標本の CA1 錐体細胞で調べた。NMDAR の発現は大きいスパインほど大きいですが、AMPA 受容体とは異なり小さいスパインにも発現が見られ、小さいスパインは所謂サイレントシナプスにほぼ該当することがわかった。大きいスパインでは NMDAR 発現量は大きいにも関わらず、 Ca^{2+} 上昇は小さかった。これはスパイン頭部体積による Ca^{2+} の希釈効果によるのではない。何故ならば、スパインの Ca^{2+} 上昇に際しては Ca^{2+} がネックを介して本幹に流出するのが観察され、樹状突起のスパイン基部でも Ca^{2+} 上昇が見られたが、この本幹の Ca^{2+} 上昇は逆にスパイン頭部が大きい程大きかった。即

ち、スパインネックの形態によって決まる「ネックの Ca^{2+} コンダクタンス」は頭部が大きくなるにつれて（その二乗に比例して）増大し、この流出の増大により、頭部の Ca^{2+} 上昇が減少し、基部の Ca^{2+} 上昇が増加すると考えられた。ネックの形態は頭部よりも更に多様性に富み、ネック形態はスパインの Ca^{2+} シグナルを定量的に調節している決定的な因子である。更に、スパイン Ca^{2+} コンダクタンスは長期増強に伴うスパイン頭部長期増大に際して増大し、ネックも可塑的であることがわかった。また、スパイン頭部増大の長期化はネックが初期に小さいものに多く観察され、スパインネックはシナプス長期可塑性の発現や定着の調節因子である可能性もでてきた。この様にスパインの頭部やネックの形態はスパイン機能や可塑性の重要な決定因子であることが示唆された。

(5) 一酸化窒素 (NO) シグナル系による神経活動のデコーディングとシナプス可塑性： NO 可視化プローブを用いたアプローチ

柿澤 昌, 並木 繁行, 廣瀬 謙造, 飯野 正光 (東京大学大学院医学系研究科・細胞分子薬理)

一酸化窒素 (NO) はガス性の細胞間シグナル伝達因子で、様々な生命現象への関与が示唆されている。中枢神経系においては、シナプス可塑性などの神経機能調節への NO の関与が示唆されているが、神経活動依存的な NO 放出の時空間的挙動については、多くの点で不明である。そこで我々は、NO と特異的に結合する可溶性グアニル酸シクラーゼのヘム結合領域 (Heme-Binding Region) と GFP を融合させた蛍光性 NO 可視化プローブ、HBR-GFP を作成し、神経系における NO シグナル系のダイナミクスの解明を目指した。生後3週齢のマウス小脳プルキンエ細胞に、Sindbis virus を用いて HBR-GFP 遺伝子を導入し、急性スライス標本上で、HBR-GFP の発現が見られるプルキンエ細胞に入力する平行線維にバースト刺激 (BS: 5 pulses at 50 Hz) を繰り返し与えたところ (60 BS at 1 Hz), HBR-GFP 蛍光強度の上昇が見られた。このシ

グナル上昇は、NO 合成酵素阻害薬、L-NAME により阻害されることから、平行線維刺激による NO 放出によるものと考えられる。蛍光強度上昇が見られた領域は、細胞内 Ca^{2+} シグナル上昇から推測されるシナプス入力領域とほぼ一致しており、NO はシナプス限局的にシグナルを伝達することが示唆された。また、この NO 放出刺激により、平行線維-プルキンエ細胞シナプスにおいて、刺激されたシナプス特異的に LTP が誘導された。さらに、BS 間の間隔を変えて刺激したところ、NO 放出量には、1Hz をピークとした二相性の周波数依存性が見られ、NO 放出が見られない周波数の刺激では、平行線維シナプス LTP も誘導されなかった。以上の結果から、二相性の周波数依存的な NO 放出制御機構を通じて、NO シグナル系は神経活動をデコードし、シナプス可塑性を入力特異的に制御していることが示された。

(6) 神経ステロイドによるシナプス可塑性の誘導：膜電位イメージングによる解析

曾我部 正博^{1,2,3}, 陳 玲² (¹名古屋大学大学院医学系研究科・細胞生物物理, ²科技振・国際共同・細胞力覚プロジェクト, ³生理学研究所・分子生理系・細胞内代謝)

いくつかの神経ステロイドは、核内受容体を經由せず、細胞膜受容体に急性に作用して、シナプス伝達を修飾することが明らかになりつつある。海馬での合成が知られている硫酸プレグネノロン (PREGS) を海馬に注入すると、若齢ラットの学習能力の促進、加齢マウス、ラットの記憶学習の改善、あるいはβアミロイド負荷ラットでみられる学習能力低下の防止効果などが報告されている。しかしながら、そのシナプス機構は不明で、PREGS の標的受容体も定まっていない。最近我々は、ラット脳海馬スライスに PREGS を急性投与すると、歯状回のシナプス伝達に用量依存的な長期増強 (LTP) が誘導されることを発見した。本研究では、膜電位感受性色素 (RH482, RH155) を負荷した 4 週齢ラット海馬スライスを用いて、歯状回顆粒細胞のシナプス後電位 (EPSP) と、その周囲に分布するグリア細胞の膜電位 (SIGD, 前終末からのグルタミン酸放出量を反映する)

をイメージングし、PREGS によるシナプス長期増強の誘導機構を薬理学的に解析した。その結果、PREGS による長期増強は、少なくとも短期と中長期の 2 段階からなることが判明した。EPSP の短期増強は NMDA 受容体阻害剤 (AP5) の影響を受けず、低 Ca^{2+} の環境では抑制され、グリア細胞の膜電位増強を伴うことが判明した。また、この短期増強は Ca^{2+} 透過性 $\alpha 7$ ニコチン受容体の選択的阻害剤 (α -BTX) によって抑制された。PREGS は前終末の $\alpha 7$ ニコチン受容体の活性化と終末内 Ca^{2+} 上昇を介して、グルタミン酸放出機構の感作を導き、シナプス伝達の短期増強を誘導する可能性が強く示唆された。一方、中長期増強は、前述の短期増強に完全に依存するとともに、シナプス後膜の NMDA 受容体チャネル活性の亢進と、引き続く細胞内 Ca^{2+} の上昇-PKC-ERK というシグナルカスケードの活性化を必要とすることが分かった。

(7) 破骨細胞プロトンシグナルの電位依存性調節機構

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

破骨細胞は proton の動きが main function に直結する細胞のひとつで、大量の酸 (H^+) を骨吸収窩に放出して骨を溶解し、骨リモデリングや生体 Ca ホメオスタシスに貢献している。 H^+ 分泌の主体は細胞膜に高密度に発現した Vacuolar type H^+ -ATPase (V-ATPase) と考えられているが、膜電位依存性 H^+ チャネル (H_v channel) も迅速に大量の酸を分泌し得る機構として共存している。 H_v channel の駆動は細胞内外の pH 勾配と電位によって決定される。一方、V-ATPase はエネルギーを消費して H^+ の up-hill transport を行うポンプとして働くが、その作用を調節する細胞要因についてはあまり知られていない。私達は、破骨細胞の H^+ 分泌測定結果から、 H_v channel のみならず V-ATPase を介する H^+ 分泌も電位によって調節され

ると推測した。そこで、破骨細胞 V-ATPase の膜サブユニットを COS 細胞に発現させて、 H^+ 分泌の電位依存性を検討した。Subunit-c 発現細胞では、脱分極下でのみ H^+ 分泌が起こったが、V-ATPase のブロッカー (DCCD) で抑制された。Subunit-c 発現細胞からは、細胞内 ATP 非存在下で電位依存性の DCCD-sensitive current が検出された。逆転電位より過分極電位で、僅かではあるが内向き電流が認められ、細胞外から細胞内へ H^+ を取り込む経路としても働く可能性が示唆された。これらの結果から破骨細胞では、 H_v チャネルだけでなく V-ATPase を介する H^+ シグナリングにおいても電位が調節因子として働いていることが明らかになった。

(8) 心筋細胞における生理的な3量体 G 蛋白質サイクルモデルの構築 ～G 蛋白質制御カリウムチャネルの電流特性より～

石井 優, 鈴木 慎悟, 倉智 嘉久 (大阪大学大学院医学系研究科・情報薬理学,
文部科学省リーディングプロジェクト「細胞・生体機能シミュレーション」)

3 量体 G 蛋白質サイクルはホルモン・神経伝達物質などの膜受容体とイオンチャネルやアデニル酸シクラーゼ, ホスホリパーゼなど種々の効果器を連関し, 細胞外からの情報を細胞内へ伝達する最も基本的かつ重要な機構である。これまで G 蛋白質サイクルに関しては様々な数理モデルが立てられてきたが, いずれも不完全なものであった。その理由の多くは, G 蛋白質サイクルは多段階反応であり, 従来の生化学的な手法では, それぞれのステップの時定数が十分な精度で測定することが困難であり, 恣意的な仮定に基づいていることにあった。心筋や神経に発現する G 蛋白質制御カリウム (K_G) チャネルは, 3 量体 G 蛋白質の $\beta\gamma$ サブユニットが結合することにより直接活性化する内向き整流性カリウムチャネルである。 K_G チャネルは, それ自体電位・時間依存性ゲート機構を持たないため, この電流をモニターすることにより, 3 量体 G 蛋白質サイク

ルの状態を極めて高い時間分解能で捉えることができる。特に, 最近我々は Regulators of G protein signaling (RGS) 蛋白質と呼ばれる G 蛋白質サイクル制御分子が, 時間依存性にサイクルを調節し, これが K_G チャネルに以前から報告されていたある特徴的な現象を形作っていることを明らかにしてきた。この我々の結果に基づきパラメータフィッティングを行い, 3 量体 G 蛋白質サイクルの新しい数理モデルを構築した。その結果, これまでの数理モデルでは再現できなかった現象 (K_G チャネルの急速な活性化や見かけ上の電位依存性性質) などが再構成できた。今後はこの数理モデルを活動電位モデルに組み込み, 心筋活動電位の生理的な副交感神経制御モデルの構築を目指す。またこの数理モデルをアデニル酸シクラーゼやホスホリパーゼなどの他の G 蛋白質システムについても応用していくことも現在検討中である。

(9) 小脳登上線維-プルキンエ細胞シナプスの生後発達における 電位依存性カルシウムチャネルの役割

橋本 浩一, 狩野 方伸 (金沢大学大学院医学系研究科・シナプス発達・機能学分野)

成熟動物の小脳プルキンエ細胞は, ほとんどの細胞が一本の登上線維によってのみ支配を受けるが, 発達初期には一時的に複数の登上線維による支配を受けている。生後発達に伴い, 徐々に登上線維の本数が減少し, マウスでは生後 21 日目までに一本支配に移行する。

これまでの我々の研究から, 生後 2~3 日のプルキンエ細胞は, シナプス強度が比較的同等な複数の登上線維により多重支配されているが, 生後 7 日目までに, 一本の強い登上線維入力とそれ以外の弱い登上線維入力の一つのプルキンエ細胞上で混在するようになることが明らかになった。これは, 最終的に残存してプルキンエ細胞を単一支配する登上線維と, 除去される登上線維の機能的選別の結果であると考えられる。

この過程の詳細な機構は現在のところ不明である。私

たちは, プルキンエ細胞の主要な電位依存性カルシウムチャネルである, P/Q 型カルシウムチャネルが重要であると仮定し, P/Q チャネルを構成する $\alpha 1A$ サブユニットノックアウトマウスを調べた。

$\alpha 1A$ ノックアウトマウスにおいては, プルキンエ細胞における高閾値型電位依存性カルシウム電流は大幅に減少しているが, 興奮性シナプス伝達は比較的正常であった。生後 18-29 日において, 80% 以上のプルキンエ細胞で登上線維の多重支配が残存していた。登上線維の生後発達過程を解析したところ, 生後 10 日目までに起こる登上線維除去過程が障害されていた。さらに, 多重登上線維間の強弱形成過程を解析した。その結果, 通常生後 1 週目に集中して起こるべき多重登上線維間の強弱形成が $\alpha 1A$ ノックアウトマウスで障害されており, 生後 20

日ころまでに徐々に強弱が形成されることが判明した。これらの結果は、生後発達初期に起こる登上線維の機能

分化に、P/Q型電位依存性カルシウムチャンネルが必要であることを示している。

(10) TRPM2チャンネルによるシグナル・生理応答制御

原 雄二¹, 山本 伸一郎¹, 森 恵美子¹, 片野 正展¹, 山村 みどり¹,
石井 正和², 木内 祐二², 清水 俊一², 森 泰生¹
(¹ 京都大学大学院工学研究科, ² 昭和大学薬学部)

TRP (Transient receptor potential) は細胞外の環境変化を感知し、それに対する適応を統合する陽イオンチャンネル群として注目を集めている。TRPM サブファミリーの一員である TRPM2 チャンネルは、細胞内レドックス状態変化により活性化される非選択的陽イオンチャンネルである。TRPM2C 末端には Nudix モチーフと呼ばれる ADP-ribose 水解ドメインが存在するが、Nudix モチーフの役割について詳細は不明であった。そこで我々は TRPM2 チャンネル活性化と Nudix モチーフとの連関について検討を行った。Nudix モチーフ点変異体、キメラタンパク質等の解析により、レドックス状態の変化により生成された ADP-ribose が直接 Nudix モチーフに作用して、TRPM2 チャンネルが活性化されることを明らかにした。また ADP-ribose 水解活性はチャンネル活性に必須ではないことから、ADP-ribose はエネルギー供与体ではなく、細胞内リガンドとしてチャ

ネル構造を変化させる分子であると考えられる。

さらに我々は TRPM2 チャンネルの生理的役割について検討を行った。炎症時、免疫系細胞では細胞内レドックス状態変化により、形質膜越えの Ca^{2+} 流入依存的なシグナリング経路が活性化される。そこで免疫系細胞における TRPM2 チャンネルの役割について着目した。単球細胞株 U937 では TRPM2 チャンネルは高発現しており、過酸化水素刺激により形質膜越えの Ca^{2+} 流入が見られた。興味深いことに、 Ca^{2+} 流入により NF- κ B を介した IL-8 産生が顕著に誘導されること、これらの効果は TRPM2 特異的 siRNA 導入により有意に抑制されることが明らかになった。IL-8 は免疫細胞の遊走誘導因子であることから、TRPM2 は感染に対する免疫応答に必須なイオンチャンネルであると考えられる。

(11) マクロファージに発現する TRPV2チャンネル

長澤 雅裕, 小島 至 (群馬大学生体調節研究所)

TRPV2 チャンネルは Purkinje 細胞などの神経細胞、肝臓・腎臓の上皮細胞、膵ランゲルハンス島の内分泌細胞や消化管の神経内分泌細胞、さらに肺・脾臓などに高発現している。肺・脾臓では主にマクロファージに局限して発現している。そこでマクロファージに発現する TRPV2 の機能とその調節機構を下垂体由来のマクロファージ細胞株である TtTM87 細胞を用いて検討した。まず TtTM87 細胞における TRPV2 の発現を RT-PCR により確認した。TRPV ファミリーに属する他のチャンネルの発現は極めて低かった。またパッチクランプ法により Ruthenium red 感受性の Cs^+ 電流を確認した。この電流は dominant-negative

型の変異 TRPV2 遺伝子導入により消失した。Tt87 細胞を fMLP で刺激すると一過性の細胞内カルシウム濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の増加とそれに続くオシレーションが観察された。GFP 標識した TRPV2 をモニターすると、fMLP の投与により TRPV2 は細胞膜にトランスローケーションした。Ruthenium red 投与あるいは dominant-negative 型変異 TRPV2 遺伝子導入により TRPV2 チャンネルを抑制すると、fMLP により惹起される $[\text{Ca}^{2+}]_i$ のオシレーションは抑制された。fMLP による TRPV2 チャンネルのトランスローケーションは PI3 キナーゼを抑制する LY294002 の投与により抑制され、また百日咳毒素の前処置によって消失した。以上

の結果から、マクロファージ細胞株 TtTM87 細胞には TRPV2 チャネルが発現し、fMLP により PI3 キナーゼ依存的機構によって細胞膜にトランスローケーションする。

これが fMLP による $[Ca^{2+}]_c$ のオシレーションに関与していると考えられる。

(12) in vivo 血小板活性化機構のリアルタイム解析

林 忠毅, 村上 裕介, 最上 秀夫, 浦野 哲盟 (浜松医科大学・生理学第二)

血管内血栓形成過程は血管内皮細胞の障害部位における内皮下組織への血小板の粘着により開始される。粘着血小板は形態変化とともに細胞内カルシウム濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の上昇がトリガーとなりフィブリノーゲンを分子糊として血小板凝集塊を形成する (血小板血栓)。この血小板凝集塊を足場として血液凝固反応が惹起されフィブリノーゲンはフィブリンとなり、血小板血栓はより強固な凝固血栓に至る。凝固反応の開始には、血小板内 $[Ca^{2+}]_i$ の持続的上昇による phosphatidylserine (PS) の細胞内膜から外膜への exposure が必須である。我々は、in vivo 血流環

境下における血栓形成過程を検討するために、マウス腸間膜静脈を用いて細胞外膜への PS の exposure を血小板活性化の指標としてリアルタイム解析を行った。マウス腸間膜静脈においてレーザー照射により血管内皮細胞を傷害し GFP 標識血小板と PS の特異的なリセプターである alexa568 標識 annexin V 用いて血小板凝集及び血液凝固開始シグナルとして PS を可視化し、共焦点レーザー-蛍光顕微鏡にてそれぞれの蛍光強度の時間的・空間的变化をモニターした。これらの結果を in vitro の結果と合わせてお話しします。

(13) DGK と PKC の分子機能協関の解析

齋藤 尚亮, 白井 康仁, 山口 泰人, 松原 岳大 (神戸大学・バイオシグナル研究センター)

ジアシルグリセロール (DAG) は、細胞膜から産生される脂質メッセンジャーであり、様々な標的タンパク質に作用して、細胞内の情報伝達を調節する因子である。DAG の標的タンパク質の中でも、最もよく知られるものは PKC であり、DAG の産生は PKC の活性化を引き起こし、PKC によるリン酸化を介して、増殖・分化、遺伝子発現などの多くの細胞応答を調節している。細胞膜で産生された DAG はジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) によりリン酸化を受け、フォスファティジン酸 (PA) に変換され、その PKC の活性化物質としての機能を失う。つまり、DGK は間接的に PKC による伝達経路を終了させる酵素である。

我々はすでに DGK が PKC とともに、受容体刺激により、細胞膜に一過性にトランスローケーションすること、また、

そのトランスローケーションは、PKC のトランスローケーションとは時間的にわずかに異なっていることを明らかにし、この時間的ずれによって DGK が PKC の活性を巧妙に調節していることを示唆してきた。今回、この DGK による PKC の機能調節機構を明らかにすることを目的として、PKC と DGK の直接的な相互作用、機能調節機構について、検討した。その結果、DGK は PKC の活性に依存して、PKC に結合し、PKC によるリン酸化を受けること、また、PKC によるリン酸化部位は DGK の Accessory Domain に存在し、リン酸化によって、DGK 活性が上昇すること、が明らかになった。この相互作用により、DGK による時間的・空間的な PKC 活性化の巧妙な調節が行われていると考えられる。

(14) PLC zeta と Ca^{2+} オシレーション宮崎 俊一¹⁾・河内 全¹⁾・尾田 正二²⁾・依田 綾子³⁾・白川 英樹¹⁾・淡路 健雄¹⁾¹⁾東京女子医科大学・第二生理, ²⁾東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学,³⁾順天堂大学医学部産婦人科)

様々な細胞において、持続的な刺激に対し、 IP_3 レセプターを介する小胞体からの反復性の Ca^{2+} 遊離に起因する Ca^{2+} オシレーションがあり、 Ca^{2+} 依存性の活性を維持する機構が作動する。受精から初期発生においても、反復性の Ca^{2+} spike が細胞周期依存性におこる。哺乳類では、精子—卵融合に際して卵に移行し Ca^{2+} オシレーションを誘起する精子因子があるとされ、その有力候補として phospholipase C の新規イソフォーム zeta (PLC ζ) が発見された。PLC ζ (蛍光蛋白質'Venus'と連結) の RNA をマウス卵に注入して PLC ζ を強制発現させた場合でも、recombinant PLC ζ 蛋白そのものをマウス卵に注

入した場合でも、精子 1 個～数個分の微量で Ca^{2+} オシレーションが誘起できる。recombinant PLC ζ の *in vitro* での PLC 活性 (PIP_2 分解活性) は、 Ca^{2+} が存在しないとゼロであり、100nM という低い濃度 (静止時の細胞内 Ca^{2+} レベル) でも最大活性の 70% を示す。即ち PLC ζ は極めて高い Ca^{2+} 依存性を有する。細胞内発現させた PLC ζ の経時的分布変化を Venus の蛍光で観察すると、前核形成とともに核内に蓄積されることが示された。即ち PLC ζ は核移行能を有する。これらの PLC ζ の特異的性質に関連づけて、 Ca^{2+} オシレーションの開始および停止機構を論ずる。

(15) Calyx of Held におけるシナプス小胞エンドサイトーシスの分子機構

山下 貴之, 髭 俊秀, 高橋 智幸 (東京大学大学院医学系研究科・神経生理学教室)

神経終末端における小胞エンドサイトーシスには、速さと分子機構が異なる複数のメカニズムが存在することが知られている。今回我々は、脳幹スライス標本を用いて Calyx of Held ターミナルにおける小胞エンドサイトーシスの速さと分子機構を膜容量測定によって調べた。ボツリヌス E 毒素を神経終末端に注入することにより、キス・アンド・ラン様の一過性膜容量変化は伝達物質放出と無関係であることが明らかとなった。伝達物質放出に關係する膜容量変化から測定される小胞エンドサイトーシスは、エキソサイトーシスの量が多くなるほど遅くな

り、時定数は 10~25 秒であった。神経終末端に非加水分解 GTP アナログやダイナミン・プロリン・リッチ・ドメイン・ペプチドを注入すると、エキソサイトーシスの量に關係なくエンドサイトーシスのほとんどがブロックされた。これらアナログおよびペプチドは、エキソサイトーシスに即座に影響を与えなかったが、使用依存的な抑圧を引き起こした。これらの結果から、Calyx of Held ターミナルにおける小胞エンドサイトーシスには、ダイナミンによる GTP 加水分解が不可欠であると結論された。

(16) 細胞内シグナル伝達機構の多角的・包括的理解

宮脇 敦史 (理化学研究所・脳科学総合研究センター)

細胞内シグナル伝達の時空間的制御の包括的理解を目指して、我々が蛍光イメージング技術を使ってできるこ

とを議論したい。

3. 細胞死の新たな生理機能とそのシグナル伝達

2004年11月29日－11月30日

代表・世話人：三浦正幸（東京大学大学院薬学系研究科）

所内対応者：岡田泰伸

(1) 細胞死シグナル分子と増殖・分化シグナル間ネットワーク

米原 伸（京都大学大学院生命科学研究科 高次遺伝情報学分野）

(2) TGF- β のBim/caspase-9を介する細胞死誘導シグナルは同時に異なったシグナルにより阻害されている

大串雅俊, 米原 伸（京都大学大学院生命科学研究科 高次遺伝情報学分野）

(3) Apaf-1様分子群を介したアポトーシスとNF- κ B活性化のメカニズム

須田貴司（金沢大学がん研究所 分子標的薬剤開発センター）

(4) 抑制性Apaf-1様分子群

木下 健, 須田貴司（金沢大学がん研究所 分子標的薬剤開発センター）

(5) CD40シグナルによるBリンパ球アポトーシス制御と自己免疫

鰐田武志（東京医科歯科大学大学院 疾患生命科学研究部）

(6) キナーゼによる細胞死制御

後藤由季子（東京大学分子細胞生物学研究所 情報伝達研究分野）

(7) AKTによる生存促進機構の解析

青木一郎, 後藤由季子（東京大学分子細胞生物学研究所 情報伝達研究分野）

(8) 神経回路再編成時におけるグリア細胞による軸索分岐の除去機構

栗崎 健（東京大学分子細胞生物学研究所 高次構造研究分野）

(9) ショウジョウバエカスパーゼの活性化と生理機能

近藤 周, 三浦正幸（東京大学大学院薬学系研究科 遺伝学教室）

(10) 無尾両生類の変態で退縮している尾の筋細胞死の分子機構

矢尾板芳郎（広島大学大学院理学研究科 附属両生類研究施設 発生遺伝学研究部門）

(11) アポトーシス細胞の食食

長田重一（大阪大学生命機能研究科 時空生物学専攻遺伝学）

(12) ショウジョウバエにおけるアポトーシス細胞食食反応の解析：線虫CED-1ホモログDroperの役割

中西義信（金沢大学大学院医学系研究科 生体防御反応学）

(13) 精巣セルトリ細胞によるアポトーシス精子形成細胞食食除去の機構と意義

白土明子, 中西義信（金沢大学大学院医学系研究科 生体防御反応学）

(14) 変異SOD1による運動ニューロン変性のメカニズム

高橋良輔（理化学研究所脳科学総合研究センター 運動系神経変性研究チーム）

(15) 神経変性疾患におけるVCPの役割の解析

垣塚 彰（京都大学大学院生命科学研究科 高次生体統御学分野）

(16) 神経軸索消失機構とポリグルタミン病

柳 茂（神戸大学大学院医学系研究科 機能ゲノム学分野）

(17) 細胞死・変性シグナルの遺伝学的解析

三浦正幸（東京大学大学院薬学系研究科 遺伝学教室）

- (18) ミトコンドリア仲介性アポトーシスと虚血・再還流性心筋細胞死における ROS 感受性クロライド
チャンネルの役割

岡田泰伸 (生理学研究所 機能協関部門)

- (19) Bcl-2 たんぱくによる non-apoptotic プログラム細胞死の制御

清水重臣, 辻本賀英 (大阪大学大学院医学系研究科 遺伝子学)

- (20) ストレス応答性 SAPK/JNK の細胞死, 増殖, 老化制御における役割

仁科博史 (東京大学大学院薬学系研究科 生理化学教室)

- (21) TNF α により誘導されるシグナル伝達経路

中野裕康 (順天堂大学医学部 免疫学教室)

- (22) ASK ファミリーによるストレス応答機構

一條秀憲 (東京大学大学院薬学系研究科 細胞情報学教室)

【参加者名】

栗崎 健 (東大・分生研), 一條秀憲 (東大・院薬), 三輪崇志 (東大・院薬), 永井宏彰 (東大・院薬), 櫻井友子 (東大・院薬), 下菌利恵子 (東大・院薬), 岡田泰伸 (生理研), 清水貴浩 (生理研), 王 曉明 (生理研), 高橋信之 (生理研), 垣塚 彰 (京大・院生命), 大沼洋平 (京大・院生命), 小池雅昭 (京大・院生命), 嶋田深志 (京大・院生命), 後藤由季子 (東大・分生研), 青木一郎 (東大・分生研), 森永光一郎 (東大・分生研), 岩井謙一 (東大・分生研), 大橋淳一郎 (東大・分生研), 須田貴司 (金沢大・がん研), 木下 健 (金沢大・がん研), 長谷川瑞穂 (金沢大・がん研), 高橋良輔 (理研・脳セ), 辻本賀英 (阪大・院医), 清水重臣 (阪大・院医), 恵口豊 (阪大・院医), 鏑田武志 (東京医科歯科大・院疾患), 渡辺孝造 (東京医科歯科大・院疾患), 中西義信 (金沢大・院医), 白土明子 (金沢大・院医), 長田洋一 (金沢大・

院医), 倉石貴透 (金沢大・院医), 中野裕康 (順天堂大・医), 中島章人 (順天堂大・医), 長田重一 (阪大・院生命), 仁科博史 (東大・院薬), 北川大樹 (東大・院薬), 根岸崇大 (東大・院薬), 菅原美郷 (東大・院薬), 矢尾板芳郎 (広島大・両生類研), 中島圭介 (広島大・両生類研), 藤本健太 (広島大・両生類研), 柳 茂 (神戸大・院医), 米原 伸 (京大・院生命), 大串雅俊 (京大・院生命), 小林洋平 (京大・院生命), 中津海洋一 (京大・院生命), 黒木俊介 (京大・院生命), 三浦正幸 (東大・院薬), 嘉糠洋陸 (東大・院薬), 倉永英里奈 (東大・院薬), 竹本 研 (東大・院薬), 近藤 周 (東大・院薬), 菅田浩司 (東大・院薬), 殿城亜矢子 (東大・院薬), 近藤 隆 (富山医科薬科大・医), 趙 慶利 (富山医科薬科大・医)

【概要】

アポトーシスの基本的な実行因子が明らかにされると, 研究の方向性はこれまでに得られた研究成果をいかに個体発生や疾患という生体で見られる細胞死の理解や応用に結びつけて行くかに移ってくる。このような流れの中で, 素過程の研究から明らかにされた分子に関しては遺伝子ノックアウトや変異体を得て解析するという遺伝学的な手法を積極的に取り入れた研究がなされ, 培養細胞系では得られなかった新たな分子機能が示されてきた。このような現象は, アポトーシスの生理機能を考える上で重要であり, アポトーシス研究は死の生物学という枠を越えて広がりを見せている。アポトーシス研究で

先端に行く我が国の研究者が, それぞれの専門領域を越えて一同に会し研究発表や密度の濃い討論を行った。キナーゼや活性酸素を介した細胞死シグナルに関する研究の進展, 非アポトーシス細胞死の分子機構についての新たな研究が発表された。マウス, カエル, ハエといったモデル動物を用いた生体での細胞死研究の話題, 特に食事の生理機能に関して興味深い研究成果が発表された。今後, 生体を用いたアポトーシスシグナルの研究の進展によって細胞死の新たな生理機能が明らかにされると期待される。

(1) 細胞死シグナル分子と増殖・分化シグナル間ネットワーク

米原 伸 (京都大学大学院生命科学研究科 高次遺伝情報学分野)

caspase-8の活性化を抑制するFLIPの様々な機能について報告する。ヒト成人T細胞白血病ウイルスのがん遺伝子産物TaxはT細胞においてNF κ BとCREBの協調作用によってc-FLIPの発現を誘導した。また、bFGFの作用や活性化Rasの発現は、繊維芽細胞においてRas/ERK/AP-1の活性化を介してc-FLIPの発現を誘導した。これらのFas刺激に耐性を獲得した細胞はDISC形成がc-FLIPの働きで阻害されており、RNAi法でc-FLIPの発現を抑制することによってFas刺激に再感受性化した。がん遺伝子の働きによって発現誘導されるc-FLIPがFas刺激に耐性を付与する分子機構は、がん化した細胞の

生存維持に重要な意味を持つと考えられた。また、FLIPがWntシグナルと密接に関連することも明らかとなった。最近c-FLIP-Lが β -cateninの安定化を誘導すると報告された(293T細胞においてのみ我々も活性が検出できた)が、この系とは異なり、v-FLIP E8やK13は多くの細胞種において β -catenin安定化の下流に作用してWntシグナルを強く増強することが示された。v-FLIP E8の発現によってWntシグナルを増強すると、腫瘍由来細胞と3T3細胞において、Wnt刺激によって細胞増殖増強作用と抑制作用をそれぞれ導入する興味深い現象を見いだしたので紹介したい。

(2) TGF- β のBim/Caspase-9を介する細胞死誘導シグナルは同時に異なったシグナルにより阻害されている

大串雅俊, 米原 伸 (京都大学大学院生命科学研究科 高次遺伝情報学分野)

TGF- β は細胞増殖抑制をはじめとする多彩な生理活性を有するサイトカインとして知られており、細胞種に応じて様々な応答を誘起する。我々はTGF- β が胃上皮細胞に対しSmad $\rightarrow$ Bim $\rightarrow$ caspase-9という経路を介して細胞死を誘導することをこれまでに明らかとしてきたが、TGF- β 刺激に対する応答性を維持しながらも生存し続ける細胞も多く存在する。そのような細胞では細胞死抑制シグナルをTGF- β が同時に導入している可能性を考え、TGF- β が導入するSmad以外の活性を阻害する解析を行った。その結果、TGF- β 刺激より活性化が

誘導されるJNKを阻害した場合、TGF- β 刺激によってDNA断片化やカスパーゼ活性化を伴うアポトーシスが誘導されることを見いだした。このJNK阻害条件下におけるTGF- β 誘導アポトーシスは、Bimを介するミトコンドリア経路を経て実行されていた。これらの結果から、TGF- β がTNF- α と同様に、アポトーシス誘導シグナルと平行してそれを阻害する生存シグナルを活性化することが示唆された。TGF- β はJNK活性化を契機とする細胞死抑制シグナルを導入することにより、自らの選択的なアポトーシス誘導活性を制御していると考えられる。

(3) Apaf-1様分子群を介したアポトーシスとNF κ B活性化のメカニズム

須田貴司, 長谷川瑞穂, 松本則彦, 今村 龍 (金沢大学がん研究所・分子標的薬剤開発センター)

増本純也, 猪原直弘 (Department of Pathology, University of Michigan Medical School)

最近、Apaf-1に類似の構造をもつ蛋白をコードすると考えられる20種を超える遺伝子群が発見された。これらの遺伝子の一部は、アポトーシスや炎症のシグナル伝達

に働く分子と考えられている。Apaf-1様分子群に属すNOD1およびNOD2の両分子は細菌ペプチドグリカンの部分構造を認識して、転写因子NF κ Bを活性化すること

が判明している。他の Apaf-1 様分子はどのような上流シグナルに応答するのか不明であるが、複数の Apaf-1 様分子が ASC と呼ばれアダプター分子を介して下流ヘシグナルを伝達していることが判明している。我々は最近、Apaf-1 様分子と ASC を介したシグナル伝達の上流と下

流を解明することを目的とした研究を行っている。面白いことに Apaf-1 様分子と ASC を介したアポトーシスと NFκB 活性化の両方に caspase-8 が関与していることが判明した。

(4) 抑制性 Apaf-1様分子群

木下 健, 王 冶陶, 須田貴司 (金沢大学がん研究所 分子標的薬剤開発センター)

PYPAF ファミリーは N 末端に PYRIN ドメインを有する, Apaf-1 様分子である。PYPAF1, 5, 7 はアダプター分子 ASC を介して NFκB の活性化や caspase-1 依存性の IL-1β 活性化を誘導する。我々は新規 PYPAF ファミリーメンバー PYNOD を発見し, この分子が ASC 依存性 NFκB 活性化および caspase-1 依存性 IL-1β 活性化を抑制することを見いだした。また機能未知の PYPAF2, 3 についても検討したところ, PYPAF2 は NFκB 活性化を, PYPAF3 は IL-1β 産生をそれぞれ抑制した。免疫沈降試験では PYPAF3 は procaspase-1, proIL-1β 双方に結合し得た。

THP-1 単球系細胞株に PYPAF3 を安定発現させたところ, LPS 誘導 IL-1β 産生が顕著に抑制された。PYPAF2, 3 の mRNA は正常組織及び培養細胞で広範に発現していた。興味深いことに LPS や IL-1β で刺激した THP-1 細胞では PYPAF3 の発現が増加した。以上の結果は PYNOD, PYPAF2, 3 が抑制的 PYPAF サブファミリーを構成することを示唆する。また, 単球系細胞において PYPAF3 による IL-1β 産生のネガティブフィードバック機構が存在すると考えられる。

(5) CD40シグナルによる B リンパ球アポトーシス制御と自己免疫

鏑田武志 (東京医科歯科大学大学院疾患生命科学部)

CD40 は B リンパ球 (B 細胞) や抗原提示細胞に発現する TNF 受容体ファミリーのメンバーで, そのリガンド CD40L (CD154) は主に活性化 T リンパ球 (T 細胞) に発現する。B リンパ球は抗原刺激によりアポトーシスをおこすが, 抗原刺激によるアポトーシスは CD40 を介するシグナルにより抑制され, 抗原刺激と CD40 を介する刺激の共存により B 細胞は活性化増殖する。このような T 細胞ヘルプ非存在下でおこる抗原を介するアポトーシスは, 自己反応性 B 細胞の除去に関わると考えられる。また, 全身性エリテマトーデス (SLE) 患者やそのモデルマウスのリンパ球で CD40L の過剰発現や異所性発現が

報告されている。そこで, 我々は, B 細胞で CD40L を構成的に発現する CD40L トランスジェニックマウスを樹立し, このマウスが SLE 様の自己免疫疾患を発症すること, さらに, 自己抗体トランスジェニックマウスを交配することにより, 実際に生体内において自己反応性 B 細胞のアポトーシスを阻害していることを明らかにした。これらの結果は, 抗原刺激によるアポトーシスが自己反応性 B 細胞の除去に関与し, CD40L の過剰発現が, 抗原刺激によるアポトーシスを阻害することにより自己免疫を誘導することを強く示唆する。

(6) キナーゼによる細胞死制御

砂山 潤, 後藤由季子 (東京大学分子細胞生物学研究所 情報伝達研究分野)

JNKはMAPキナーゼファミリーに属し、紫外線照射・ERストレスなどの刺激により活性化されアポトーシスを誘導する。前年の本研究会にて、JNKは14-3-3を直接リン酸化すること、それによって細胞死促進型Bcl-2ファミリーメンバーであるBaxが14-3-3から遊離することを報告した。一方、Bad, Nur77, FOXO3などの細胞死促進因子は、Aktでリン酸化されると14-3-3と結合し、その細胞死促進活性を失うことが知られている。最近我々

は、14-3-3がJNKによってリン酸化されると、14-3-3とBadあるいは14-3-3とFOXO3の結合も低下することを明らかにした。JNKの活性化により、Badは細胞内で14-3-3から解離し、ミトコンドリア移行してBcl-2, Bcl-XLに結合し細胞死誘導に貢献することが示唆された。従ってAktの生存シグナルとJNKの細胞死シグナルは14-3-3を介して拮抗することが示唆された。

(7) AKTによる生存促進機構の解析

青木一郎, 小川原陽子, 後藤由季子 (東京大学分子細胞生物学研究所 情報伝達研究分野)

PI3K-Akt経路は様々な系で細胞の生存を促進することが知られている。例えば γ 線やエトポシドなどのDNA損傷により引き起こされるアポトーシスはAktの活性化により抑制される。我々はAktがDNA損傷によるアポトーシスを抑制する際のターゲットを検討し、以前にp53ユビキチンリガーゼであるMdm2をAktが直接にリン酸化し活性化することを報告した。すなわちAktによってリン酸化されたMdm2はp53をユビキチン化・分解し、

p53依存的なアポトーシス誘導を抑制する。癌抑制遺伝子p53を不活性化するというこの機能は、Aktによる癌化誘導作用の一部を説明すると考えられる。DNA損傷によるアポトーシス誘導はp53依存的経路だけでなく、p53非依存的な経路も存在するが、我々はAktが後者も抑制する事を見いだした。さらにp53非依存的経路のAktのターゲット候補も見いだしたので、本研究会ではこれについて報告したい。

(8) 神経回路再編成時におけるグリア細胞による軸索分岐の除去機構

栗崎 健 (東京大学分子細胞生物学研究所 高次構造研究分野)

発生過程において形成された神経回路網を個体制御のために適した機能的な状態に完成させるためには、回路の一部の局所的な作り替えが不可欠である。この過程では、すでに伸長した軸索分岐や樹状突起を特異的に除去したり再伸長させるプロセスが必要である。神経線維の一部が特異的に除去される現象は、神経回路を再編成する時だけでなく障害や発病などによっても生じることが知られている。しかしながらこうした神経線維除去の制御機構についてはほとんど分かっていない。私たちは変態期において再編成することが知られているショウジョウバエの幼虫キノコ体神経回路を実験系に用いて、神経

回路再編成時にいかにして不要になった軸索分岐が除去されるのか？この制御機構を明らかにすることを目的として研究を行っている。これまでに、(1) 軸索分岐の除去には周辺から浸潤するグリア細胞の貪食作用が必要であること、(2) スカベンジャー受容体をコードするdrpr遺伝子ならびにそのC末端部位と相互作用すると考えられるアダプター分子ced-6遺伝子がグリア細胞の浸潤・貪食作用に必要であること、(3) グリア細胞の貪食細胞としての分化ならびに軸索分岐の貪食標的としての分化はエクダイソンにより協調的に制御されていることを明らかにしたのでこれらについて紹介する。

(9) ショウジョウバエカスパーゼの活性化と生理機能

近藤 周, 三浦正幸 (東京大学大学院薬学系研究科 遺伝学教室)

広海 健 (国立遺伝学研究所 総合研究大学院大学 遺伝学専攻)

ショウジョウバエの胚をTUNEL法などで染色すると、多くの細胞がアポトーシスを起こしていることが観察される。しかしそれらの細胞の大部分に関しては、いったいそれがどの細胞なのか、その細胞死が組織構築にどのような意義を持っているのか全く分かっていない。ショウジョウバエの胚発生における細胞死の理解を目的として、現在我々は二つのアプローチで研究を行っている。一つ目は新たな細胞死の可視化手法の確立である。既存の細胞死検出方法はいずれも胚発生において細胞を同定するには時空間的解像度が不十分であった。単一細胞レベルにおいてアポトーシスの早い段階を検出するシステムとして、今回新たにカスパーゼの活性を検出する蛍光

タンパク質を作成した。当発表ではトランスジェニックバエを用いた観察結果を報告する。二つ目のアプローチは細胞死が起こらない変異体の解析である。ショウジョウバエにおいても全てのアポトーシスはカスパーゼに依存すると考えられているが、これまで細胞死に関わるカスパーゼの機能欠損変異体は得られていなかった。我々はショウジョウバエゲノム中に7個存在するカスパーゼのうち、新たに3個について機能欠損変異体を作成し、その内の2つがアポトーシスの実行に不可欠であることを見出した。現在までに行った表現型解析の結果について報告する。

(10) 無尾両生類の変態で退縮している尾の筋細胞死の分子機構

矢尾板芳郎, 中島圭介 (広島大学大学院理学研究科附属両生類研究施設 発生遺伝学研究部門)

無尾両生類幼生の変態において血中甲状腺ホルモン濃度が上昇することにより、ほぼ全身の再構成が生じる。体幹の2倍以上の長さの尾が1週間程で消失する。蛋白、RNA合成阻害剤により尾の退縮が抑制されることや甲状腺ホルモン受容体が転写因子であることから、新しい遺伝子発現により尾の細胞死が誘導されていると考えられている。しかし、尾の退縮に関係する遺伝子はまだ、同定されておらず、その分子機構さえも明らかにされていなかった。私たちは、まず、幼生尾由来の筋芽細胞株を樹立し、それが甲状腺ホルモンの存在下でアポトーシスをおこすことを見出し、細胞自律的な死(自殺)が誘

導されることを示した。両生類幼生の尾にドミナントネガティブ甲状腺ホルモン受容体(DNTR)発現型ベクターDNAを注入して甲状腺ホルモンシグナルを個々の筋細胞レベルで抑制して、それらの筋細胞を自然変態の前後で観察した。その実験結果に基づいて、甲状腺ホルモンは尾の退縮する前のNF stage 57-62の間では尾の筋細胞の自殺を誘導し、尾が急速に退縮するNF stage 62-64では筋細胞を早く完全に取り除くために他殺と自殺の両方の機序を介して筋細胞死を執行するという仮説を提唱した。

(11) アポトーシス細胞の貪食

長田重一 (大阪大学生命機能研究科 時空生物学専攻遺伝学)

アポトーシス細胞のDNAは死細胞内で活性化されるCADによるばかりでなく、マクロファージに存在する

DNase IIによっても分解される。DNase II遺伝子欠損マウスの胎仔は胎生後期に死滅するが、このマウス胎仔の

種々の組織には死細胞由来の未分解DNAを蓄積したマクロファージが認められ、また胎仔肝の blood island を構成するマクロファージにも赤芽球由来の核DNAが未消化の状態で大量に残存する。DNase II 遺伝子欠損マウスが死滅する原因を明らかにするため、DNA マイクロアレイにより遺伝子発現の変化を調べたところ、DNase II-/- 胎仔ではインターフェロン (IFN) 誘導遺伝子群の発現が特異的に増強していた。実際、IFN β および IFN γ の発現が確認された。特に IFN β 遺伝子は DNA を蓄積したマ

クロファージが特異的に発現していた。そこで IFN α , β のシグナルを媒介するタイプ I IFN レセプターと DNase II 遺伝子を共に欠損するマウスを作製したところ、このマウスはメンデルの法則に従い誕生した。以上の結果はアポトーシス細胞の DNA や赤血球前駆細胞から脱核した DNA が適切に分解されなければ、未分解 DNA を蓄積したマクロファージが IFN β を産生し、この因子が胎仔に対して致死的に作用することを示している。

(12) ショウジョウバエにおけるアポトーシス細胞貪食反応の解析： 線虫 CED-1ホモログ Draper の役割

真中純子，白土明子，東田陽博，中西義信（金沢大学医学系研究科）

倉石貴透，中井雄治（金沢大学自然科学研究科）

Peter Henson (National Jewish Medical and Research Center)

アポトーシス細胞貪食反応の機構と意義はおもに線虫と哺乳類で解析されているが、まだ統一的な理解はなされていない。線虫での遺伝学的解析では、貪食受容体とその下流の情報伝達経路が二通り存在することが示されている。しかし線虫には貪食を専門とする細胞は存在せず、マクロファージなどの専門食細胞を持つ哺乳類に線虫での様式があてはまることは自明ではない。私たちは、専門食細胞を持ち組織構築が哺乳類ほど複雑ではない昆虫を使って、線虫の貪食受容体 CED-1 のホモログである Draper の役割を検証した。

ショウジョウバエ幼虫食細胞由来の細胞株によるアポ

トーシス細胞貪食反応では、RNAi で Draper の発現を阻害すると貪食程度が半分以下に低下した。次に、新たに確立したショウジョウバエ胚丸ごとで貪食を検出する実験系を使った解析を行うと、RNAi での Draper 発現の阻害によって貪食が4割程度減少することが分かった。さらに、胚中の細胞を取り出して調べると、RNAi の適用でマクロファージ及びグリアによる貪食とも阻害されていた。これらの結果より、線虫 CED-1 のホモログがショウジョウバエの食細胞においてもアポトーシス細胞貪食受容体として働くことが明らかとなった。

(13) 精巣セルトリ細胞によるアポトーシス精子形成細胞貪食除去の機構と意義

白土明子，中西義信（金沢大学大学院医学系研究科 生体防御反応学）

個体の一生を通じて、体内で生じたアポトーシス細胞の貪食排除は組織恒常性や機能維持に必須であり、これは生殖細胞の形成時にも当てはまる。哺乳類の精巣で起こる精子形成過程では、精子形成細胞は哺育細胞であるセルトリ細胞からの分化情報を得て精子へと分化する。この途中で大多数の精子形成細胞がアポトーシスにより死ぬことが知られていたが、死の意義やその後の運命に

関する情報はこれまで十分ではなかった。演者は共同研究者とともに、ラットとマウスを用いて、精巣初代培養細胞による *in vitro* アッセイ系および生きた動物を使った *in vivo* アッセイ系を構築し、死んだ精子形成細胞の運命と死の意義とを解析した。その結果、精子形成細胞はセルトリ細胞にアポトーシス選択的に貪食され、この反応はアポトーシス精子形成細胞表層に出現する膜リン脂

質ホスファチジルセリンとセルトリ細胞表層のクラス B スカベンジャー受容体タイプ I との結合を介して行われると判明した。さらに、精子形成細胞の食食を阻害すると精子形成の遅延が観察され、アポトーシス精子形成細胞

の食食除去が精子形成過程の進行に必要なと考えられた。これは、アポトーシス依存的な細胞食食反応が生理的現象に必要であることを示す初めての研究成果となった。

(14) 変異 SOD1による運動ニューロン変性のメカニズム

高橋良輔, 館野美成子, 井上治久, 漆谷 真, 金 然正

(理化学研究所脳科学総合研究センター 運動系神経変性研究チーム)

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は選択的な全身の運動ニューロンの変性脱落を特徴とする難病であるが、約 10 年前に常染色体優性遺伝性の家族性 ALS (FALS) の病因遺伝子としてスーパーオキシドディスムターゼ 1 (SOD1) が同定されたことにより、分子機構の解明が進んでいる。SOD1 は ubiquitous に発現しているが、FALS において変性するのは運動ニューロン系を中心とした一部の神経系のみである。これまで同定された 100 種類以上の変異がほとんど点変異であり、タンパクを欠損する例はない。SOD1 は酸素ラジカルであるスーパーオキシドを解毒する酵素であるが、酵素活性がほぼ正常な変異ヒト SOD1 のトランスジェニックマウス (変異 SOD1 マウ

ス) でも ALS 類似の症状と病理所見を呈することなどから、変異によって酵素の機能低下でなく SOD1 に新たに細胞毒性が付与される (gain of toxic function) ことが運動ニューロン変性の原因になると考えられている。最近になって、変性部位でのみ変異 SOD1 がミスフォールド化し凝集形成する驚くべき現象が見出され、gain of function の実体と目されている。しかし部位特異的な構造変化を促進させる因子についてはよくわかっていない。本講演では我々が見出した SOD1 の構造変化を促進させる因子を紹介し、その ALS の病態への関連について議論する。

(15) 神経変性疾患における VCP の役割の解析

垣塚 彰 (京都大学大学院生命科学研究所 高次生体統御学分野)

ハンチントン病, Machado-Joseph 病 (MJD) 等の遺伝性神経変性疾患は原因遺伝子内の伸長した CAG リピートが作り出すグルタミンリピート (ポリグルタミン) の凝集によって発症すると考えられるため、「ポリグルタミン病」と呼ばれる。しかし、何故ポリグルタミンが神経細胞変性や細胞死を引き起こすかは十分に解明されていない。我々は当初より異常タンパク質の蓄積・凝集が神経変性・神経細胞死を引き起こす本体であると考え、ポリグルタミンをモデルに用いて神経変性疾患の発症メカニズムの解析を行ってきた。その結果、AAA ATPase 蛋白質の一つ p97/VCP が神経変性疾患において重要な役割を果たす可能性を見出した。本発表では、1) ATPase

活性の消失した VCP は、細胞に空胞変性と細胞死を誘導すること、2) VCP がいろいろな蛋白質修飾を受けること、3) 神経変性疾患で共通する VCP の蛋白質修飾が起きている可能性があること、4) 蛋白質修飾によって VCP の ATPase 活性が制御されること、5) ショウジョウバエのポリグルタミン病モデルにおいて蛋白質修飾をうける VCP のアミノ酸を変異させた VCP を強制発現させた場合におこるショウジョウバエの複眼の変性に対する影響を紹介し、VCP が関わる神経変性疾患に共通する発症機構と神経変性疾患の治療ターゲットとしての VCP の可能性を議論する。

(16) 神経軸索消失機構とポリグルタミン病

柳 茂 (神戸大学大学院医学系研究科 機能ゲノム学分野)

神経回路形成の反発因子セマホリンは軸索の反発と不要な軸索を除去する。今回、セマホリンのシグナル伝達に関与する CRMP の結合蛋白質として新規 GTPase CRAG (CRMP-Associated GTPase) を同定した。CRAG は UV などの活性酸素種 (ROS) を発生するストレスによって核移行し、ユビキチンを伴う封入体を形成する。そして核内において PML と結合し、PML body の形態変化 (Large ring-like structure) と PML のユビキチンリガーゼを活性化することが見いだされた。その結果、核内転写調節によるストレス応答を伝達することにより、細胞の生存に有利に作用しているものと推測される。一方、CRAG

は ROS 依存性にポリグルタミン変性蛋白質の核封入体形成とユビキチン・プロテアソーム経路による分解を促進することにより、ポリグルタミン病の病態に関与していることが示された。また、セマホリンによる ROS 発生依存性に、CRAG は CRMP とともに封入体を形成し、細胞外へと放出されるという軸索消失機構と関連する現象を観察した。今回の CRAG の発見により、軸索消失機構とポリグルタミン病において ROS シグナルという共通の分子メカニズムと新しいシグナル伝達機構の存在が示された。

(17) 細胞死・変性シグナルの遺伝学的解析

三浦正幸 (東京大学大学院薬学系研究科 遺伝学教室)

我々は, Reaper の作用機序に含まれる細胞死制御因子を同定する目的で, Reaper の細胞死誘導活性に基づく表現型を指標に, ゲノムの 80% 以上をカバーする染色体欠失系統のスクリーニングを行った。その結果それぞれ JNK 経路を活性化する能力を有する *Drosophila* ASK1 (DASK1) と *Drosophila* TRAF1 (DTRAF1) が Reaper の細胞死誘導活性に関与するものとして同定された。さらに, DTRAF1, DASK1 を介した JNK の活性化がどのようにして Reaper に制御されているのか知るために, 遺伝学的・生化学的な解析を行ったところ, (1) DTRAF1 による細胞死誘導と JNK の活性化は DIAP1 により制御され, その

抑制は E3 ユビキチン ligase 活性を持つ DIAP1 による DTRAF1 の分解に依存していること, (2) Reaper の発現で DIAP1 はユビキチン化が亢進されて分解されるため, DTRAF1 が安定化して JNK カスケードの活性化が見られる事が明らかとなった。我々のスクリーニングにより新たに同定された APTX7 は, キナーゼドメインを持ち JNK 活性化能を有していた。さらに APTX7 タンパク質は DIAP1 の分解を促進し Reaper と同程度に細胞死を誘導する事が明らかになった。今回, 個体レベルでの研究により遺伝学的に明らかとなった, IAP 分解機構と細胞死実行カスケードに関与する JNK の活性化機構について報告したい。

(18) ミトコンドリア仲介性アポトーシスと虚血・再還流性心筋細胞死における ROS 感受性クロライドチャネルの役割

清水貴浩, 高橋信之, 前野恵美, 王 曉明, 田辺 秀, 浦本裕美, 沼田朋大, 岡田泰伸
(生理学研究科 機能協同部門)

スタウロsporin (STS) によるミトコンドリア刺激の場合も, Fas リガンドや TNF α によるデスレセプター

刺激の場合にも, カスパーゼ活性化に先んじて細胞丸ごとの縮小化 (apoptotic volume decrease: AVD) が多くの細

胞で発生する。この AVD は Cl^- チャネルブロッカーによって阻止され、このときにはその後のアポトーシス諸反応も消失する。培養心筋細胞に STS を投与したときも同様の結果が得られた。DIDS の効果は外液からの HCO_3^- 除去によっても全く影響を受けず、アニオンエキスチェンジャーに作用しているものではないことが結論された。HeLa 細胞に STS や Fas リガンドや $\text{TNF}\alpha$ を投与すると AVD 発生時期に対応して Cl^- 電流の活性化が認めら

れた。STS の場合には ROS 産生がこれに共役しており、スカベンジャーで Cl^- 電流活性化も AVD 発生も阻止された。Fas リガンドや $\text{TNF}\alpha$ の場合にはそのような早期 ROS 産生もスカベンジャーの Cl^- 電流阻止効果も認められなかった。心筋細胞の虚血・再灌流性アポトーシス死の場合にも、ROS 産生とスカベンジャー感受性が認められた。

(19) Bcl-2たんぱくによる non-apoptotic プログラム細胞死の制御

清水重臣, 辻本賀英 (大阪大学大学院医学系研究科 遺伝子学)

アポトーシスのシグナル伝達機構にはミトコンドリアの膜透過性変化が関与しており, Bcl-2 ファミリー蛋白質はこれを調節することにより細胞死を制御している。Bcl-2 ファミリー蛋白質のうち, Bax/Bak はアポトーシスに不可欠であることが, ダブルノックアウトマウスの解析より明らかにされている。我々は, これを確認するために Bax/Bak ダブルノックアウトマウスを作製し, embryonic fibroblast や胸腺細胞の解析を詳細に行った。その結果, ①これらの細胞にアポトーシス刺激を加えて

も, アポトーシスは観察されないが, non-apoptotic な細胞死は観察されること, ②この細胞死には, オートファジー様の形態変化を伴うこと, ③オートファジーを抑制することにより緩和されること, を見いだした。これらの結果より, Bcl-2 ファミリー蛋白質はアポトーシスのみならず, non-apoptotic な細胞死をも制御している可能性が示された。この細胞死に関する詳細な解析結果, ならびにミトコンドリアの膜透過性亢進機構に関する最新の知見を報告する。

(20) ストレス応答性 SAPK/JNK の細胞死, 増殖, 老化制御における役割

仁科博史 (東京大学大学院薬学系研究科・生理化学教室)

我々は, ストレス応答性 SAPK/JNK 系シグナル伝達系の生理的な役割を解明する目的で, 2 種類の活性化因子 SEK1/MKK4 や MKK7 を欠損するマウスや細胞を作出してきた。その結果, 1) SEK1 や MKK7 欠損マウスは肝形成不全を伴う胎生致死となること, 2) SEK1, MKK7 → SAPK/JNK → c-Jun シグナル伝達系が細胞周期制御因子 CDC2 の遺伝子発現を誘導して肝芽細胞の増殖を制御すること, 3) SEK1, MKK7 → SAPK/JNK → c-Jun シグナル伝

達系は繊維芽細胞の増殖を促進し, また細胞老化を抑制すること, 4) ES 細胞では SAPK/JNK 活性化はストレス誘導性のアポトーシスに必須ではないこと, 5) SEK1 や MKK7 を欠損し SAPK/JNK 活性化が著しく低下している繊維芽細胞を継代するとストレス誘導性アポトーシスに耐性の細胞株が出現することを見い出した。これらの結果は, SAPK/JNK シグナル伝達系が細胞の増殖, 老化, 生死の制御に深く関与していることを示している。

(21) TNF α により誘導されるシグナル伝達経路

中野裕康 (順天堂大学医学部・免疫学教室)

これまでの研究により ER ストレスと酸化ストレスとのクロストークが示唆されているものの、その詳細なメカニズムは明らかとなっていない。そこで、本研究では TNF α 刺激により ROS 依存性にネクロシスの誘導される L929 細胞を用いて、TNF α 刺激がこの細胞に ROS 依存性に ER ストレスを誘導するかを検討した。TNF α 刺激により ER ストレス時に活性化される 3 つの経路 (すなわち PERK, ATF6 および IRE1/XBP1 経路) のすべてが活性化されることが明らかとなった。この活性化は TNF α 刺激によって ROS 産生の認められない野性型の胎児線

維芽細胞 (MEF) では誘導されず、さらに抗酸化剤である BHA でほぼ完全に抑制されたことより、TNF α 刺激により L929 細胞に誘導される ER ストレス応答は ROS 依存性であることが明らかとなった。一方、興味深いことに、ER ストレスを誘導することの知られている tunicamycin で細胞を前処理することにより、その後の TNF α 刺激により誘導される ROS 産生が著明に抑制されることがより、ER ストレス時に誘導される遺伝子群の中に TNF α 刺激により誘導され、ROS 産生を抑制する遺伝子が存在することが明らかとなった。

(22) ASK ファミリーによるストレス応答機構

一條秀憲 (東京大学大学院薬学系研究科 細胞情報学教室)

Apoptosis Signal-regulating Kinase (ASK)1 は JNK と p38MAP キナーゼの上流に存在する MAPKKK である。これらの MAP キナーゼ経路は、様々な環境ストレスに応答して細胞の生死や分化をはじめとする多様な生物活性をコントロールするためのシグナル伝達系として機能している。ASK1 ノックアウトマウスの解析により、ASK1 が酸化ストレスや小胞体ストレスによるアポトーシスに必要なシグナルであることが明らかになり、また ASK1 がポリグルタミン病やアルツハイマー病にお

いて認められる神経細胞死のメディエーターとしてこれらの疾患に関わっていることも示唆されている。一方、ASK1 は一部の Toll-like Receptor の下流で主に p38 の活性化を選択的に担うことによって自然免疫応答に必須の働きをすることも明らかになってきた。本講演では、活性酸素 (ROS) による ASK1 の新たな活性制御機構について紹介するとともに、ASK ファミリー経路を介するストレス応答機構ならびにその病態生理的役割について討論したい。

4. 消化管機能一吸収分泌機能の病態生理

2004 年 12 月 16 日－17 日

代表・世話人：鈴木裕一（静岡県立大学 食品栄養科学部）

所内対応者：岡田泰伸

- (1) 胃酸分泌機構に関与する塩素イオン輸送蛋白質
酒井秀紀, 高橋佑司, 大平裕太, 藤井拓人, 森井孫俊, 竹口紀晃
(富山医科薬科大学 薬学部 薬物生理学)
- (2) *Vibrio mimicus* の溶血毒が腸管上皮細胞イオン輸送に与える影響
高橋 章 (徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部
生体システム栄養科学部門 医療栄養科学講座 代謝栄養学分野)
- (3) 海水ウナギの上部食道括約筋の収縮調節：飲水行動の調節
安藤正昭 (広島大学 総合科学部 総合生理学研究室)
- (4) 飲酒行動に関与するコレシストキニン受容体
宮坂京子, 細矢博子, 関目綾子, 高野紗恵子, 太田稔, 金井節子
(東京都老人総合研究所 生体機能調節と加齢研究グループ)
- (5) 消化管におけるβカロテン開裂酵素遺伝子の発現とその調節
合田敏尚, 駿河和仁 (静岡県立大学 食品栄養科学部 栄養生理学研究室)
- (6) 小腸絨毛上皮下線維芽細胞ネットワークは小腸のメカノセンサーか
古家喜四夫¹, 古家園子², 曾我部正博^{1,3,4}
(¹ 科学技術振興機構 細胞力覚プロジェクト, ² 生理学研究所 脳機能計測センター,
³ 名古屋大学大学院医学研究科, ⁴ 生理学研究所 細胞内代謝部門)
- (7) 消化管上皮の細胞代謝を制御する membrane-type serine protease 1
都築 巧 (京都大学大学院農学研究科)
- (8) マウス胚性幹細胞から分化誘導した腸管様細胞塊
高木 都, 中山晋介*, 三澤裕美, 中川 正
(奈良県立医科大学医学科 第二生理学, *名古屋大学大学院医学研究科 医学部細胞科学)
- (9) ペプチドミルク哺育ラットにおける膵消化機能発達の遅延
木ノ内 俊, 矢島 高二 (明治乳業 (株) 食機能科学研究所)
- (10) 生体エネルギー代謝に及ぼす AMP キナーゼの調節作用
箕越靖彦 (生理学研究所 生殖・内分泌系発達機構研究部門)
- (11) 若齢および老齢ラットにみられる NPY, orexin, ghrelin の摂食促進効果の相違
高野紗恵子^{1,2}, 金井節子¹, 細矢博子¹, 太田 稔¹, 植松 宏², 宮坂京子¹
(¹ 東京都老人総合研究所 生体機能調節と加齢研究グループ,
² 東京医科歯科大学 高齢者歯科学)
- (12) 胃幽門線粘液開口放出の調節機構
中張隆司 (大阪医科大学 第一生理)
- (13) 上皮膜における CFTR クロライドチャネルと SLC26 クロライド重炭酸イオン交換輸送体の機能連関
洪 繁, 石黒 洋*, 成瀬 達
(名古屋大学大学院 病態修復内科学, *名古屋大学大学院 健康栄養医学)

(14) 膵導管細胞の管腔膜を介する重炭酸イオン輸送

石黒 洋¹, 洪 繁², 近藤孝晴¹, 成瀬 達²

(¹名古屋大学大学院医学系研究科 健康栄養医学 (総合保健体育科学センター),

²名古屋大学大学院医学系研究科 病態修復内科学)

(15) 耳下腺での重炭酸イオン分泌機構 (逆転電位測定グラミシジン穿孔パッチ法による解析)

廣野 力, 柴 芳樹, 杉田 誠, 岩佐 佳子

(広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 病態探究医科学講座 口腔生理学研究室)

(16) 複合培養細胞系を用いた腸管上皮細胞と免疫系細胞の相互作用解析

薩 秀夫, 清水 誠

(東京大学大学院農学生命科学研究科 応用生命化学専攻食糧化学研究室)

(17) ラット小腸杯細胞が産生する酸性ムチンの変動—寄生虫感染とカテキン投与

石原和彦^{1,2}, 伊東祐子², 高野裕子², 中村 健³

(¹北里大学 医療衛生学部 病態生化学, ²北里大学大学院医療系研究科 生体制御生化学,

³北里大学 医学部 寄生虫学)

(18) マウス盲腸における HCO₃⁻分泌とプロピオン酸吸収

鈴木裕一, 林 久由, 川俣幸一 (静岡県立大学 食品栄養科学部)

【参加者名】

古家喜四夫(科学技術振興機構 細胞力覚プロジェクト), 薩 秀夫 (東京大学大学院 農学生命科学研究科), 宮坂京子, 太田 稔, 細矢博子, 関目綾子, 高野紗恵子 (東京都老人総合研究所 生体機能調節と加齢研究グループ) 成瀬 達, 洪 繁 (名古屋大学大学院 医学系研究科), 石黒 洋 (名古屋大学 総合保健体育科学センター), 柴芳樹, 廣野 力 (広島大学大学院 医歯薬総合研究科口腔生理学), 宮本賢一 (徳島大学大学院 ヘルスバイオ研究部分子栄養分野), 石原和彦 (北里大学医療衛生学部 同大学院医療系研究科), 桑原厚和, 三井 烈 (静岡県立大

学 環境科学研究所), 山本 武 (富山医科薬科大学 和漢薬研究所), 高木 都 (奈良県立医科大学 第二生理), 都築 巧 (京都大学大学院 農学研究科), 安藤正昭 (広島大学 総合科学部), 高橋 章 (徳島大学大学院 ヘルスバイオ研究部代謝栄養学), 鈴木裕一, 合田敏尚, 林 久由, 内山尚和 (静岡県立大学 食品栄養科学部), 中張隆司, 藤原祥子, 加藤益美 (大阪医科大学 生理学), 酒井秀紀, 藤井拓人 (富山医薬大 薬学部薬物生理), 矢島高二, 木内 俊 (明治乳業 食機能化学研究所), 箕越靖彦, 岡田泰伸 (生理学研究所)

【概要】

研究会は12月16日と17日の2日間行われ, 34名の参加を得た。1日目の午後に10演題の発表, 2日目の午前に8演題の発表が行われた。その内容として, 腸管栄養素吸収, 分泌腺からの分泌, 上皮下線維芽細胞等に関する基礎的な研究の発表が行われた。発生分化や比較生理学的な側面の発表もあった。寄生虫感染, 細菌感染, 炎症モデル系の開発に関する発表もあった。また, 食欲や代謝調節といった, 消化管と極めて密接に関連した内

容の発表も行われた。ほぼ総ての発表において, 多かれ少なかれ病態生理との関連が議論された。病態生理的側面の研究は, 治療に結びつく応用面での効果のみならず, 学問発展の上で極めて有効なアプローチの一つであることが明らかになった。また, 総ての発表に関してきわめて活発で suggestive な議論が行われた。今後の消化管の研究の発展につながる有意義な研究会であった。

(1) 胃酸分泌機構に關与する塩素イオン輸送蛋白質

酒井秀紀, 高橋佑司, 大平裕太, 藤井拓人, 森井孫俊, 竹口紀晃

(富山医科薬科大学 薬学部 薬物生理学)

胃酸 (HCl) のプロトンは H^+ , K^+ -ATPase により分泌されることがわかっているが, 塩素イオンの分泌機構については未確定である。これまで, 米国のグループにより塩素イオン分泌の分子実体としては CIC-2 塩素イオンチャネルが提唱されている。我々は CIC-2 の胃における発現と分布を調べ, 胃酸分泌への関与を検討した。また, CIC-5 の発現についても検討した。CIC-2 導入細胞の膜タンパク質をポジティブコントロールとしたウェスタンブロットの結果, ウサギとラットの胃粘膜には CIC-2 は検

出できなかった。ラット胃粘膜における免疫組織染色においても CIC-2 のシグナルは検出できなかった。これらの結果から, CIC-2 が塩素イオン分泌の分子実体ではないと考えられた。一方, 我々は H^+ , K^+ -ATPase に富むブタ胃ベシクルに CIC-5 が多く発現していることを見出した。ブタ胃粘膜において CIC-5 と H^+ , K^+ -ATPase との細胞内局在部位が一致した。また, 胃ベシクルを用いた免疫沈降により, CIC-5 と H^+ , K^+ -ATPase が分子会合していることが示唆された。

(2) *Vibrio mimicus* の溶血毒が腸管上皮細胞イオン輸送に与える影響

高橋 章 (徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部)

生体システム栄養科学部門医療栄養科学講座 代謝栄養学分野)

細菌性食中毒の主要な臨床症状の一つとして下痢が挙げられる。下痢が起こるとき, 腸管での物質分泌吸収に変化が起こると考えられる。このとき腸管でのイオン分泌吸収も変化すると考えられる。本研究では, *vibrio mimicus* の産生分泌する溶血毒 (VMH) が, 腸管上皮細胞のイオン輸送に与える影響について解析を行った。フィルター上に単層培養したヒト培養腸管上皮細胞 (Caco-2 細胞) に 1 μ g/ml の VMH を添加すると, 短絡電流の増加を認

め, また Caco-2 細胞からの ^{125}I の流出を促進した。これは Caco-2 細胞からの Cl^- 分泌を促進するためであると考えられた。VMH は細胞内 Ca^{2+} 濃度と細胞内 cAMP 量を増加させた。さらに VMH による短絡電流の増加や ^{125}I の流出促進は, 細胞内 Ca^{2+} 濃度増加阻害や Rp-cAMP の前投与により阻害された。これらのことより, VMH は細胞内 Ca^{2+} 濃度増加や cAMP 量増加に依存的に腸管上皮細胞からの Cl^- 分泌を促進させると考えられた。

(3) 海水ウナギの上部食道括約筋の収縮調節：飲水行動の調節

安藤正昭 (広島大学 総合科学部 総合生理学研究室)

飲水行動は大部分の陸上脊椎動物や海産魚にとって, 生命維持のための必須の行動である。海水ウナギは水中に棲むので, 上部食道括約筋 (UES) が弛緩すれば水は消化管に入る。そのぶん神経回路も単純で, モデルとしては哺乳類より優れていると思われる。UES は延髄の Glossopharyngeal vagal motor complex (GVC) によって Cholinergic innervation を受けている。迷走神経は延

髄を出た後 10 本の分枝に別れるが, そのうち 5 番目の分枝 (X5) のみが UES を支配していた。X5 の至適周波数は 20 Hz 付近で, 同様の至適周波数は除神経した UES 筋でも見られ, それは温度や Ca^{2+} -ATPase 阻害剤の影響を受けた。延髄の GVC ニューロンの自発発火も 20 Hz 付近であった。このことはウナギの UES は通常強く収縮し, 水が消化管に入らないようになっていることを示唆

する。一方 UES 筋は Isotocin (IST) によって濃度依存的に弛緩する。この効果は Oxytocin 受容体の Antagonist である (d(CH₂)₅¹, Tyr(Me)², Thr⁴, Orn⁸, Tyr-NH₂⁹) Vasotocin によって完全に抑えられた。また 8Br-cAMP, Forskolin, IBMX も IST と同様な効果を示すことから, IST は cAMP

を介して弛緩を惹起していると考えられる。IST はまた神経刺激による UES の収縮を増強させた。以上の結果から, IST は迷走神経の効果にコントラストをつけていることが考えられる。

(4) 飲酒行動に関与するコレシストキニン受容体

宮坂京子, 細矢博子, 関目綾子, 高野紗恵子, 太田 稔, 金井節子
(東京都老人総合研究所 生体機能調節と加齢研究グループ)

慢性膵炎のうち特に男性ではアルコールに起因する頻度が高く, 70% 近くを占めている。しかしアルコール多飲(依存症)者の 90% 以上が肝臓障害を伴うのに比較し, 慢性膵炎と診断される割合は~5% に留まっている。このギャップの原因は, 遺伝的要因の相違が関係することが予測されているが明らかでない。アルコールや薬物に対する嗜好性は, 脳における mesolimbic dopamine neuron が重要である。この経路には約 40~50% に CCK が混在し, 側坐核では CCK-A 受容体(R)が dopamine release を調節している。そこで CCK-AR 遺伝子多型 (A-81G, G-128T) の分布をしらべたところ, -81G アリルの頻度がアルコール依存症で有意に高く, -81G アリルを持つ依存症の個体は, より難治性であった。しかし, 慢性膵炎では

対照群と差を認めなかった。Cell line 化された CCK-AR を発現するヒト細胞が存在しないため, マウス由来 STC-1 細胞で検討したが, 変異は転写活性をわずかに減少させたのみで有意ではなかった。そこで, CCK-AR (-/-) マウスを用いて解析した。CCK-AR (-/-) マウスは, 飲酒量, 飲水量が共に増加していた。また, CCK-AR (-/-) マウスは夜間の行動量が高い傾向を示した。側坐核の dopamine2R を Western blot で測定すると, CCK-AR (-/-) マウスでは, dopamine2R 発現量が有意に増加していた。ドーパミン 2R (-/-) マウスは, 行動量や意欲が低下し, 酒を嫌うという報告があることから, CCK-AR 欠損がドーパミン系の機能を変化させたことが関係していると考えられる。

(5) 消化管におけるβカロテン開裂酵素遺伝子の発現とその調節

合田敏尚, 駿河和仁 (静岡県立大学 食品栄養科学部 栄養生理学研究室)

βカロテン開裂酵素 (以下 BCMO) は, β-カロテン 1 分子から 2 分子のレチナールを産生する 15, 15'-BCMO と 1 分子のβ-アポカロテナールを産生する 9', 10'-BCMO が存在し, 最近, ヒトやラットなどからそれぞれの cDNA がクローニングされた。本研究では, ラットの各組織および腸管各部位における 2 種類の BCMO 遺伝子についてその発現量をリアルタイム RT-PCR 法により定量的に解析した。7週齢のSD系雄ラットの各組織の 15, 15'-BCMO mRNA 量は, 肝臓に比べて小腸では高く, その中でも空腸上部で最も高かった。9', 10'-BCMO mRNA 量は, 小腸上部と肝臓で同じ程度の発現量を示したが, 空腸上部の

9', 10'-BCMO mRNA 量は 15, 15'-BCMO の 10% に過ぎなかった。ラットに 19% コーン油食を経口投与し, 投与 6 時間後に空腸におけるこれら 2 種類の BCMO の mRNA 量を調べたところ, 15, 15'-BCMO mRNA 量が脂肪投与により減少していた。ヒトとラットの 15, 15'-BCMO 遺伝子の 5' 上流域には TATAbox 近傍に DR-1 型の核内レセプター応答領域があり, HNF4 が顕著に結合していた。摂取したβカロテンは, 小腸では主に 15, 15'-型の BCMO によってレチナールに転換していると考えられるが, 脂肪の摂取はその転換を抑制する可能性が考えられた。

(6) 小腸絨毛上皮下線維芽細胞ネットワークは小腸のメカノセンサーか

古家喜四夫¹, 古家園子², 曾我部正博^{1,3,4}

(¹ 科学技術振興機構 細胞力覚プロジェクト, ² 生理学研究所 脳機能計測センター,
³ 名古屋大学大学院医学研究科, ⁴ 生理学研究所 細胞内代謝部門)

小腸絨毛上皮下線維芽細胞 (Subepithelial Fibroblasts) は、上皮基底層直下でネットワークを形成しており、平滑筋や血管にもその突起を伸ばし、エンドセリン、ATP、Sub-P など多様な受容体を持ち、細胞内 cAMP 濃度に応じて細胞の形態を変化させる等の特徴を持つ。さらにこの細胞はタッチやストレッチといった機械刺激に反応し、細胞内 Ca^{2+} 上昇と ATP の放出そして周りの細胞の P2Y1 受容体活性化による細胞間 Ca^{2+} 波を誘起する。この機械的刺激に対する応答性は細胞の形態に依存しており星状になった細胞では抑制された。このような性質から小腸絨毛下線維

芽細胞は絨毛の機械的性質や物質の透過性を制御していると考えられる。また、小腸は水や食物による機械刺激を感知し蠕動運動を開始するなど感覚器とも考えられているが、このメカノセンサーはまだ明らかではない。小腸絨毛の知覚神経終末は絨毛下線維芽細胞のネットワーク直下まで入り込んでおり P2X イオンチャネル型の ATP 受容体を持っている。小腸絨毛下線維芽細胞は、絨毛の動きを感受し ATP を放出しこの神経の P2X を活性化することによって、小腸におけるメカノセンサーとして機能していることが示唆される。

(7) 消化管上皮の細胞代謝を制御する membrane-type serine protease 1

都築 巧 (京都大学大学院農学研究科)

Membrane-type serine protease 1 (MT-SP1) は上皮細胞で発現する膜結合性のセリンプロテアーゼである。本酵素は悪性腫瘍の浸潤・転移に関与すると考えられているが、正常組織における生理的役割については十分に明らかでない。著者らは正常ラットを用いた検討により MT-SP1 の mRNA が小腸絨毛の先端部で最も強く発現していることをみいだした。In vitro においてリコンビナント MT-SP1 はフィブロネクチンやラミニンといった基底膜を構成する蛋白質を分解することや、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーターを活性化することもわかった。正

常組織における本酵素の細胞内局在は完全にはわかっていないが、Caco-2 細胞を用いた検討から、本酵素は基底膜側 (バソラテラル側) にソートされるということがわかった。活性化後は ectodomain shedding により膜から遊離するので、本酵素は基底膜に接触することが可能であることが示唆された。著者らは本酵素が上皮細胞と基底膜の接着を制御し、このことによって上皮細胞の増殖・分化または細胞死 (細胞代謝) に大きな役割を果たしているものと推察している。

(8) マウス胚性幹細胞から分化誘導した腸管様細胞塊

高木 都, 中山晋介*, 三澤裕美, 中川 正

(奈良県立医科大学医学科 第二生理学, *名古屋大学大学院医学研究科 医学部細胞科学)

私たちはこれまでマウス胚性幹 (ES) 細胞から分化誘導した腸管様細胞塊 (ES 腸管) が、1) 蠕動様の自発運動を起こすこと、2) 形態学的には粘膜、ペースメーカー

細胞 (ICC)、平滑筋層、ギャップジャンクション等が誘導されていること、3) 電気生理学的にはプラトー電位や電氣的な徐波 (slow wave) を発生させること、4) Ca イメー

ジング法により Ca オッシレーションを起こしていること等を報告してきた (Stem Cells 2004; 20: 41-149, Am J Physiol Cell Physiol 2004; 286: C1344-1352)。しかし、蠕動様の運動の発生に必須と思われる壁内神経系 (壁内神経節からなるネットワーク) は見いだすことができなかった。そこで、ES 腸管における蠕動様の自動運動における壁内神経系の関与を解析するために、ES 腸管に壁内神

経系を構築する方法を ES の培養方法を工夫することによって分化誘導する方法を見つけたことができた (詳細は特許出願予定のため省略)。ついで、壁内神経系を分化誘導できた ES 腸管において、蠕動様の運動のビデオ記録を始めとして ES 腸管の壁内神経系が生理的な機能を果たしているかどうかの解析を試みたので、その予備的な結果を報告する。

(9) ペプチドミルク哺育ラットにおける膵消化機能発達の遅延

木ノ内 俊, 矢島高二 (明治乳業 (株) 食機能科学研究所)

乳児用ミルクの中には、乳タンパク質の代わりの原料として低アレルゲン性のペプチドを利用したものがある。そこで、ペプチドミルクの膵消化機能発達に対する影響について検討した。その結果、1) 乳タンパク質分解ペプチドの膵酵素分泌促進作用は未分解の乳タンパク質に比べて顕著に弱いことが確認された。2) 膵臓重量はいずれの日齢においてもペプチドミルク群が有意に低く、膵ア

ミラーゼ量、膵トリプシン量はペプチドミルク群が顕著に低いことが確認された。3) ペプチドミルク群は摂取タンパク質に応答して膵消化酵素分泌量を増加させる機能が明らかに弱いことが示された。以上の結果から、ペプチドミルクでの哺育は膵消化機能発達の遅延の原因となる可能性があることが示唆された。

(10) 生体エネルギー代謝に及ぼす AMP キナーゼの調節作用

箕越靖彦 (生理学研究所 生殖・内分泌系発達機構研究部門)

AMP キナーゼ (AMP-activated protein kinase) は、5'-AMP によって活性化する serine/threonine kinase である。AMP キナーゼは、細胞内のエネルギーレベルが低下 (AMP/ATP 比が上昇) によって活性化し、代謝、イオンチャネル活性、遺伝子発現を変化させて細胞内 ATP レベルを回復させる。しかし最近の研究により、AMP キナーゼは、メトホルミンやチアゾリジン系誘導体などの糖尿病治療薬、運動、レプチンやアディポネクチンなどのホルモン、さらには自律神経系によって活性化することが報告され、細胞内エネルギー代謝だけでなく、個体全体

の糖・脂質代謝調節ならびにエネルギー消費の調節に関与することが明らかとなった。さらにごく最近、視床下部 AMP キナーゼが摂食行動に対して制御作用を営むことが判明し、AMP キナーゼは摂食行動とエネルギー消費機構の両調節に関わるシグナル分子として注目されている。本発表では、脂肪細胞産生ホルモン・レプチンの調節作用に関する私どもの研究成果を中心に、生体エネルギー代謝調節における AMP キナーゼの働きについて紹介する。

(11) 若齢および老齢ラットにみられる NPY, orexin, ghrelin の摂食促進効果の相違

高野紗恵子^{1,2}, 金井節子¹, 細矢博子¹, 太田 稔¹, 植松 宏², 宮坂京子¹(¹ 東京都老人総合研究所 生体機能調節と加齢研究グループ,² 東京医科歯科大学, 高齢者歯科学)

加齢に伴う食欲低下は健康な高齢者においてもしばしば認められ、食物摂取に関する液性あるいは神経性調節の加齢変化による生理的現象として出現する。

そのメカニズムを探るため、摂食促進因子である orexin-A, -B, NPY, および ghrelin の脳室内投与による効果を若齢, 老齢ラット間で比較検討した。Orexin-A と NPY は若齢ラットにおいて用量依存的に食物摂取を増加させたが, 老齢ラットでは全く効果がみられなかった。Ghrelin はどのラットにおいても用量依存的に摂食行動を亢進させた。Orexin-B はどのラットでも有意な摂食量

の増加を認めなかった。

老齢ラットで orexin-A の摂食促進効果が欠如した原因を調べるため、視床下部における orexin 受容体 (OX1R, OX2R) のタンパク発現量を Western blotting により測定した。OX1R は若齢ラットと比べて老齢ラットでは有意に減少しており, OX2R は若老間で有意な変化は見られなかった。

老齢ラットにおける orexin-A の摂食促進効果の欠如には視床下部の OX1R の減少が関与していることが示唆される。NPY, ghrelin についても今後実験を進める予定である。

(12) 胃幽門腺粘液開口放出の調節機構

中張隆司 (大阪医科大学 第一生理)

胃幽門腺粘液細胞開口放出は一過性の高い開口放出頻度を持った初期相と持続的な低い頻度の定常相からなる Ca^{2+} -調節性開口放出により主に調節されている。一方 cAMP-調節性開口放出の頻度は Ca^{2+} -調節性開口放出の 5-10% 低いが, Ca^{2+} -調節性開口放出の二つのステップを修飾することにより著明に増強している。さらに, アセチルコリンによる細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇はプロスタグランジン E_2 (PGE_2) 産生, 放出を増加させていた。細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は Ca^{2+} 調節性開口放出のみならず, PGE_2

を介した autocrine mechanism により, 開口放出を増強していることが明らかとなった。この autocrine mechanism は, PGE_2 合成阻害薬である indomethacin (IDM), 或は aspirin (ASA) により抑制される一方で, IDM 単独では開口放出を僅かではあるが活性化した。また AA は胃幽門腺において開口放出を活性化した。以上より, 胃幽門腺粘液細胞では, ACh 刺激時には PGE_2 による autocrine mechanism により維持されていることが明らかとなったが, さらに AA により修飾されていることが示唆された。

(13) 上皮膜における CFTR クロライドチャネルと SLC26 クロライド重炭酸イオン交換輸送体の機能連関

洪 繁, 石黒 洋*, 成瀬 達

(名古屋大学大学院 病態修復内科学, *名古屋大学大学院 健康栄養医学)

外分泌上皮膜はクロライドイオン (Cl^-) と重炭酸イオン (HCO_3^-) を分泌する。最近この Cl^- と HCO_3^- 輸送に CFTR Cl^- チャネルと SLC26 陰イオン輸送体が重要な役割を果たしていると考えられている。以前我々は SLC26 に属す

る DRA の陰イオン輸送活性が CFTR により著明に活性化されることを報告したが, これらの蛋白間相互作用部位についてはわかっていない。そこで今回は SLC26 輸送体のうち DRA と CFTR の蛋白間相互作用部位および

SLC26 が CFTR に及ぼす影響について検討した。HEK293 細胞に CFTR 及び SLC26 輸送体を遺伝子導入により発現させ、その機能を細胞内 pH 測定法およびパッチクランプ法にて測定すると DRA の陰イオン交換活性は約 6 倍に、CFTR Cl⁻ 電流は約 2.5 倍に増加した。DRA

の細胞内ドメインである STAS のみを CFTR と共に細胞に発現させても CFTR Cl⁻電流は約 3 倍に増加した。遺伝子変異 (I668ins) を導入した STAS は逆に CFTR Cl⁻電流を抑制した。以上より SLC26 輸送体は CFTR とその STAS を介して結合し、機能的に関連していると考えられた。

(14) 膵導管細胞の管腔膜を介する重炭酸イオン輸送

石黒 洋¹, 洪 繁², 近藤孝晴¹, 成瀬 達²

(¹名古屋大学大学院医学系研究科 健康栄養医学 (総合保健体育科学センター),

²名古屋大学大学院医学系研究科 病態修復内科学)

モルモットの膵臓から単離した小葉間膵管は、管腔内を高濃度 (125 mM) の HCO₃⁻溶液で満たした状態でも、secretin で刺激すると HCO₃⁻を管腔内に分泌する。この時、細胞内 HCO₃⁻濃度 (BCECF による pH 測定) は約 20 mM、細胞内電位 (微小電極による) は約 -60 mV であり、管腔膜を介する HCO₃⁻の電気化学勾配は細胞内から管腔に向かう。今回は、細胞内 pH 測定による管腔膜 HCO₃⁻ conductance の概算を試みた。単離膵管の表層を

HCO₃⁻-free 溶液で、管腔を 125 mM HCO₃⁻溶液で灌流し、表層灌流液には H₂DIDS と methyl-isobutyl-amiloride を加えて基底側膜を介する HCO₃⁻輸送を阻害した。この状態で、表層灌流液の K⁺濃度を 70 mM に上げて脱分極 (-40 mV) させると、細胞内 pH は上昇した。この管腔膜を介する起電性の HCO₃⁻流入速度から HCO₃⁻ conductance を概算した。

(15) 耳下腺での重炭酸イオン分泌機構 (逆転電位測定グラミシジン穿孔パッチ法による解析)

廣野 力, 柴 芳樹, 杉田 誠, 岩佐佳子

(広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 病態探究医科学講座 口腔生理学研究室)

ラット耳下腺でのカルバコール (CCh) による陰イオン分泌をグラミシジン穿孔パッチ法で解析したところ、腺房細胞では Cl⁻が分泌され HCO₃⁻の分泌は少ないこと、導管細胞では主に HCO₃⁻が分泌されることが示唆された。導管での HCO₃⁻分泌における Cl⁻チャネル透過性と HCO₃⁻濃度の関与を明らかにするため、-80 mV に電位固定した条件下で陰イオン電流とコンダクタンスを測定し、陰イオン電流の逆転電位を計算した。CCh により陰イオン電流の誘導とコンダクタンスの増加が起こり、陰イオン電流の逆転電位が -80 mV から数 mV 正の方向に上昇した。炭酸脱水酵素阻害剤メタゾラミドはコンダク

タンスを抑制せず CCh による逆転電位の上昇と陰イオン電流を抑制したことから、この逆転電位の上昇は細胞内 HCO₃⁻濃度の上昇を反映していることが示唆される。CCh 刺激により HCO₃⁻産生亢進による HCO₃⁻濃度の上昇とイオンチャネル透過性の亢進のもとで HCO₃⁻分泌が維持されていると推定した。HCO₃⁻電流の逆転電位を求めたところ -80 mV 付近から約 -60 mV に変化した。以上より -80 mV で静止時の細胞内 HCO₃⁻濃度はほぼ平衡 (1.2 mM) になっているが、刺激時には HCO₃⁻産生系の活性化で HCO₃⁻濃度が 2 倍に上昇する結果 HCO₃⁻が分泌されることが示唆された。

(16) 複合培養細胞系を用いた腸管上皮細胞と免疫系細胞の相互作用解析

薩 秀夫, 清水 誠

(東京大学大学院農学生命科学研究科, 応用生命化学専攻食糧化学研究室)

腸管上皮細胞とその直下に存在する免疫系細胞との間では、サイトカインなど液性因子を介した相互作用が起きていることが考えられる。そこで我々は腸管上皮細胞とマクロファージ様細胞の複合培養細胞系を構築し、このモデル系において両者の間でどのような相互作用が起きているか解析することとした。腸管上皮細胞のモデルとしてヒト結腸癌由来株化細胞 Caco-2 を用い透過性膜上で単層培養して小腸上皮様に分化させた。またマクロファージ様細胞のモデルとして THP-1 を用い、PMA 処理によりマクロファージ様に分化させた。THP-1 の接着したプレート上に Caco-2 を分化させた透過性膜を移す

ことで、複合培養を開始した。その結果 THP-1 細胞と複合培養した Caco-2 細胞について、LDH 毒性試験及び経上皮電気抵抗 (TER) を測定したところ、複合培養 48 時間以降で LDH 放出率の増加及び TER 値の低下が認められた。そこで、複合培養時に THP-1 が分泌することが確認されたサイトカイン類の中和抗体を加えたところ、抗 TNF- α 抗体によって Caco-2 細胞の LDH 放出率の増加及び TER 値の低下が有意に抑制された。これより THP-1 との複合培養による Caco-2 の細胞障害は、THP-1 が分泌した TNF- α に起因することが示唆された。

(17) ラット小腸杯細胞が産生する酸性ムチンの変動—寄生虫感染とカテキン投与

石原和彦^{1,2}, 伊東祐子², 高野裕子², 中村 健³ (¹北里大学 医療衛生学部 病態生化学,²北里大学大学院医療系研究科 生体制御生化学,³北里大学 医学部 寄生虫学)

消化管の病態生理とムチンの量的・質的変動との関係を研究するため、我々は抗ムチンモノクローナル抗体 (mAb) を開発して来た。今回は、酸性ムチンの特定の糖鎖を認識する mAb である PGM34 (スルホムチンと反応) と、HCM31 (シアロムチンと反応) を主として用いた。齧歯類腸管寄生線虫 *Nippostrongylus braziliensis* (N.b) は感染成立後、宿主小腸粘膜の粘膜抵抗性によって排除され、再感染を試みても最終寄生部位に定着することはない。N.b の排虫現象には宿主小腸粘液の量的・質的変動が関与するといわれている。方法: Wistar 系ラットに N.b 第 III 期幼虫を感染させ経時的に宿主消化管を採取した。mAb を用いた免疫組織化学染色で消化管を観察すると

共に、消化管の各部位からムチンを抽出・分離し、その量的変動および ELISA を用いた mAb との反応性の変化を調べた。結果: 最終寄生部位である小腸上部の重量、ムチン量は N.b 感染後増加し、虫体排除が完成する感染 15 日目まで最大となり、その後減少した。組織染色および ELISA の結果から、杯細胞における HCM31 陽性ムチンの産生が 15 日前後で顕著となったのに対して、PGM34 陽性ムチンの変動は乏しかった。また虫体排除後に再感染を試みた場合、投与 6 日目前後に同様の変動が見られた。まとめ: 腸管寄生虫の感染に伴って、特定の化学的性質をもつ酸性ムチンが宿主小腸の特定の部位で大きく変動することがわかった。

(18) マウス盲腸における HCO₃⁻分泌とプロピオン酸吸収

鈴木裕一, 林 久由, 川俣幸一 (静岡県立大学 食品栄養科学部)

未消化の糖質は大腸で腸内細菌の発酵作用により短

鎖脂肪酸 (酢酸, プロピオン酸, 酪酸) となる。その

一部は大腸で代謝され残りの大部分は吸収される。今回 Ussing chamber でマウス盲腸プロピオン酸吸収を検討した。管腔側液プロピオン酸 25 mM 存在下での ^{14}C -プロピオン酸吸収速度は（漿膜側液はプロピオン酸を含まない），漿膜側液が HEPES 緩衝系 (100% O_2) のときに比較し， $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ 緩衝系 (95% O_2 /5% CO_2) のほうが大きく，またこの増大は炭酸脱水酵素阻害剤で抑制された。同様に，漿膜側液 $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ 依存性の管腔側アルカリ分泌速度と管腔側 total CO_2 分泌速度が観察され，いずれも

炭酸脱水酵素阻害剤で抑制された。 $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ 依存性・炭酸脱水酵素感受性のプロピオン酸吸収速度，管腔側アルカリ分泌速度，および管腔側 total CO_2 分泌速度の 3 者はほぼ等しい値であった。漿膜側液 $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ 依存性・炭酸脱水酵素感受性のプロピオン酸吸収は短絡電流変化を引き起こさなかった。結論：マウス盲腸でのプロピオン酸吸収の少なくとも一部は，非起電性のプロピオン酸/ HCO_3^- 交換輸送により起こる。

5. 上皮輸送の新たな展開：生体防御の最前線

2004 年 11 月 16 日－11 月 17 日

代表・世話人：丸中良典（京都府立医科大学 生理機能制御学）

所内対応者：岡田泰伸（細胞器官研究系機能協関部門）

- (1) Meniere's disease（内リンパ水腫）の病態生理と新しい治療法の開発
河原 克雅, 川田 英明（北里大学医学部・生理）
長沼 英明, 岡本 牧人（北里大学医学部・耳鼻科）
- (2) 高浸透圧刺激による活性化するカチオンチャネルの上皮細胞容積調節における役割
清水 貴浩, 岡田 泰伸, サビロブ ラブシャン（生理研・機能協関）
ベーター フランク（生理研・機能協関, マックスプランク・分子生理）
- (3) アミノ酸トランスポーターの上皮細胞における極性集積と細胞膜移行を規定する因子の探索
金井 好克（杏林大学医学部・薬理学）
- (4) 骨シアロタンパク質の転写に対するフラボノイドの影響
小方 頼昌（日本大学松戸歯学部・歯周病学講座）
- (5) ヘリコバクター・ピロリ菌病原因子 CagA による SHP-2 シグナルの脱制御
畠山 昌則（北海道大学遺伝子病制御研究所・分子腫瘍分野）
- (6) 血圧調節における腎遠位尿細管細胞でのナトリウム再吸収の制御機構
新里 直美, 青井 渉, 宮崎 裕明, 丸中 良典
（京都府立医科大学大学院・生理機能制御学）
- (7) 胃幽門線粘液 Ca^{2+} 調節性開口放出のインドメサシンによる修飾；アラキドン酸による活性化
中張 隆司（大阪医科大学・第一生理）
- (8) 変異解析とホモロジーモデリングによる胃酸分泌プロトンポンプの構造機能相関の解明
浅野 真司（立命館大学・情報理工学部）
森井 孫俊（富山医科薬科大学・薬学部）
- (9) 大腸イオン輸送と Protease-activated receptor
鈴木 裕一, 池原 修（静岡県立大学・食品栄養科学部）
- (10) 抗酸化性食品成分による消化管粘膜ホモジネート酸化抑制作用
室田 佳恵子, 寺尾 純二
（徳島大学大学院・ヘルスバイオサイエンス研究部食品機能学分野）
- (11) 生体内で有効なポリフェノール・フラボノイド
金沢 和樹（神戸大学農学部・生物機能化学科・食品・栄養化学教室）
- (12) ヘリコバクター・ピロリの空胞化致死毒素の作用機序
和田 昭裕（長崎大学・熱帯医学研究所・病原因子機能解析分野）
- (13) 偽性低アルドステロン症 II 型原因遺伝子 WNK4 キナーゼの膜輸送体局在機構に対する影響
内田 信一, 楊 松 昇, 山内 小津枝, 佐々木 成
（東京医科歯科大学・腎臓内科）
- (14) Isoliquiritigenin の大腸がん予防効果に向けて—ILTG の COX-2 依存性アポトーシス誘発効果—
高橋 徹行, 馬場 正樹, 奥山 徹（明治薬科大学・天然薬物学）
西野 輔翼（京都府立医科大学・分子生化学）

【参加者名】

河原 克雅 (北里大学医学部・生理), 川田 英明 (北里大学医学部・生理), 長沼 英明 (北里大学医学部・耳鼻科), 岡本 牧人 (北里大学医学部・耳鼻科), 清水 貴浩 (生理研・機能協関), サビロブ ラブシャン (生理研・機能協関), 岡田 泰伸 (生理研・機能協関), ベーナー フランク (生理研・機能協関, マックスプランク・分子生理), 金井 好克 (杏林大学医学部・薬理学教室), 小方 頼昌 (日本大学・松戸歯学部・歯周病学講座), 畠山 昌則 (北海道大学・遺伝子病制御研究所・分子腫瘍分野), 新里 直美 (京都府立医科大学大学院・生理機能制御学), 青井 渉 (京都府立医科大学大学院・生理機能制御学), 宮崎 裕明 (京都府立医科大学大学院・生理機能制御学), 丸中 良典 (京都府立医科大学大学院・生理機能制御学), 中張 隆司 (大阪医科大学・第一生理), 浅野 真司 (立命館大学・情報理工学部), 森井 孫俊 (富

山医科薬科大学・薬学部), 鈴木 裕一 (静岡県立大学・食品栄養科学部), 池原 修 (静岡県立大学・食品栄養科学部), 室田 佳恵子 (徳島大学大学院・ヘルスバイオサイエンス研究部・食品機能学分野), 寺尾 純二 (徳島大学大学院・ヘルスバイオサイエンス研究部・食品機能学分野), 金沢 和樹 (神戸大学農学部・生物機能化学科・食品・栄養化学教室), 和田 昭裕 (長崎大学・熱帯医学研究所・病原因子機能解析分野), 内田 信一 (東京医科歯科大学・腎臓内科), 楊松 昇 (東京医科歯科大学・腎臓内科), 山内 小津枝 (東京医科歯科大学・腎臓内科), 佐々木 成 (東京医科歯科大学・腎臓内科), 高橋 徹行 (明治薬科大学・天然薬物学), 馬場 正樹 (明治薬科大学・天然薬物学), 奥山 徹 (明治薬科大学・天然薬物学), 西野 輔翼 (京都府立医科大学・分子生化学)

【概要】

上皮組織は, 生体における外部からの刺激に対する種々のバリアーとなり, また体内環境の恒常性を保つ上で, 重要な役割を担っている。体血圧や体液量といった生命維持に不可欠な要素は上皮組織におけるナトリウム吸収により制御されている。さらに, 呼吸器における防御機構はクロライド分泌を通じた水分分泌により制御されており, クロライド分泌異常により, 種々の感染が引き起こされ, 生体機能の重篤な失調を引き起こす。体内環境恒常性維持および生体防御という観点において, 上皮組織は, その経上皮輸送を介して, 重要な働きを担っている。

上皮輸送に関する多くの研究は, 内分泌系および神経系といった内因性の制御という観点からなされてきた。しかしながら, 外因的な制御物質探索という観点からの研究成果はほとんどない。生体防御および疾病予防の観点から種々の生理活性・薬理活性を有する物質の発見が望まれている。種々の生理活性を有した物質の探索を含め, 種々の研究分野で発見されつつある物質の生理活性に関する研究を, 生体防御および疾病予防の観点からの研究へと発展させること, および参加者間の共同研究推進を目的として, 本研究会の開催した。

(1) Meniere's disease (内リンパ水腫) の病態生理と新しい治療法の開発

河原 克雅, 川田 英明 (北里大学医学部・生理)
長沼 英明, 岡本 牧人 (北里大学医学部・耳鼻科)

メニエール病 (Dr P Meniere, 1799-1862) は, めまい, 難聴, 耳閉塞感を伴う内耳の病気である。病理組織学的には, 内リンパ水腫-膜迷路内圧の増加による Reissner 膜の伸展や破断が観察される。ホルモンと水電解質バランスの異常およびさまざまな身体的ストレス (疲労, 感染, 精神的圧迫) が発症要因と考えられるが, その詳細は不明である。最近の動物実験 (Kumagami et al, 1998) や臨床

的研究 (Takeda et al, 1995) によれば, 血中 ADH (抗利尿ホルモン) 濃度の増加が, 内リンパ水腫をひきおこしていることを示唆している。われわれは, ABR (聴性脳幹反射) と微小電極法を用い, (自発呼吸) 麻酔下ラット腹腔に ADH を投与後, 聴力と内リンパ電位 (EP) の一過性低下と, さらに, EP の電位振幅増大 (一過性) を観察した。今回用いた ADH 用量は, 実験的 (病理組織学的) 内リンパ

水腫の発症に必要な ADH 用量の 1/10 以下であった。これらの結果は、血中 ADH の生理的増加が、内リンパ水腫と Reissner 膜の破断を引き起こさないで、内耳血管条などの内リンパ産生に必要なイオン輸送機構において病

的状态をひきおこし、EP 低下と聴力低下を引き起こしたことを示す。われわれは、動物実験の結果を元に、メニエール病の新しい治療法の開発を推進している。

(2) 高浸透圧刺激による活性化するカチオンチャネルの上皮細胞容積調節における役割

清水 貴浩, 岡田 泰伸, サビロブ ラブシャン (生理研・機能協関)
バーナー フランク (生理研・機能協関, マックスプランク・分子生理)

ほとんどの上皮細胞において、高浸透圧刺激により生じる細胞収縮後でも、細胞容積は元に戻る。このメカニズムは、調節性容積増加 (RVI) と呼ばれ、NaCl の取り込みに伴う水の流入によって成し遂げられる。この過程には、様々なイオン輸送経路が関与していることが知られている。今回我々は、ヒト上皮 HeLa 細胞において高浸透圧刺激時に活性化するイオンチャネルを見出したので、その電気生理学的性質と RVI への寄与について検討した。この高浸透圧刺激により活性化されるチャネル活性は電位と時間に非依存的であり、イオン選択性

は $\text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Cs}^+ \gg \text{Ca}^{2+}$ であった。また非選択性カチオンチャネルブロッカーである amiloride, Gd^{3+} , flufenamate, SKF96365 を投与してみたところ、amiloride には感受性がなかったが、その他のブロッカーにより阻害された。RVI 過程もこれらブロッカーによって抑制された。これらの結果から、HeLa 細胞の RVI 過程には、高浸透圧刺激後の細胞収縮により活性化される Ca^{2+} 非透過性非選択性カチオンチャネルが重要な役割を果たしていることが示唆された。

(3) アミノ酸トランスポーターの上皮細胞における極性集積と細胞膜移行を規定する因子の探索

金井 好克 (杏林大学医学部・薬理学)

SLC7 (solute carrier 7) ファミリーに属する 12 回膜貫通型タンパク質は、その細胞膜移行に 1 回膜貫通型糖タンパク質を必要とする。この 1 回膜貫通型タンパク質としては、4F2hc (4F2 heavy chain) と rBAT (related to b⁰, + -type amino acid transporter) の 2 つが知られ、両者はそれぞれ特定の 12 回膜貫通型トランスポーターとジスルフィド結合を介して連結し、ヘテロ二量体型アミノ酸トランスポーターを形成する。腎尿細管及び小腸の上皮細胞においては、4F2hc は側基底側に分布し、rBAT は管腔側に分布する。4F2hc, rBAT による 12 回膜貫通型トランスポーターの認識は、膜貫通領域周辺により行われ、管腔側/側基底側ソーティングが 1 回膜貫通型タンパク質の細胞内ドメインにより決定されることが、4F2hc と rBAT のキメラ解析により示唆された。

1 回膜貫通型タンパク質 rBAT は、12 回膜貫通型トラ

ンスター BAT1 と連結し、腎近位尿細管管腔側膜のシスチントランスポーターを形成する。その遺伝的欠損であるシスチン尿症の症例から、BAT1 の C-末端細胞内ドメインの変異が見い出された。BAT1 の C-末端には電位依存性 Ca チャネル Cav1.2 の "targeting domain" と相同な配列があり、この部分の deletion によりパートナーである rBAT の糖付加が阻害され、膜移行が障害されることが明らかとなった。BAT1 の C-末端には複数のタンパク質間相互作用に関わるドメインがあり、これを介して多様な調節を受ける可能性が示唆された。

ほとんどの上皮細胞において、高浸透圧刺激により生じる細胞収縮後でも、細胞容積は元に戻る。このメカニズムは、調節性容積増加 (RVI) と呼ばれ、NaCl の取り込みに伴う水の流入によって成し遂げられる。この過程には、様々なイオン輸送経路が関与していることが知ら

れている。今回我々は、ヒト上皮 HeLa 細胞において高浸透圧刺激時に活性化するイオンチャンネルを見出したので、その電気生理学的性質と RVI への寄与について検討した。この高浸透圧刺激により活性化されるチャンネル活性は電位と時間に非依存的であり、イオン選択性は $\text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Cs}^+ \gg \text{Ca}^{2+}$ であった。また非選択性カチオンチャンネルブロッカーである amiloride, Gd^{3+} , flufenamate, SKF96365 を

投与してみたところ, amiloride には感受性がなかったが, その他のブロッカーにより阻害された。RVI 過程もこれらブロッカーによって抑制された。これらの結果から, HeLa 細胞の RVI 過程には, 高浸透圧刺激後の細胞収縮により活性化される Ca^{2+} 非透過性非選択性カチオンチャンネルが重要な役割を果たしていることが示唆された。

(4) 骨シアロタンパク質の転写に対するフラボノイドの影響

小方 頼昌 (日本大学松戸歯学部・歯周病学講座)

骨シアロタンパク質 (BSP) は, 石灰化初期に石灰化結合組織特異的に発現し, アパタイト結晶形成能を有することから石灰化における役割が注目されている。さらに BSP は, 乳ガン, 前立腺ガン病巣で異所性に発現し, 骨転移に関与することが報告されている。本研究では, BSP の転写に対するフラボノイドの影響を検索した。

骨芽細胞様細胞 (ROS17/2.8 細胞) をフラボノイドで刺激し, ノーザンブロット解析を行った結果, BSP mRNA 量はイソフラボンである genistein, daidzein および flavone (50 μM , 12h) 刺激により上昇した。次に, BSP 遺伝子プロモーターの長さを調節して作成したルシフェラーゼプラスミドおよび塩基配列を一部変化した変異ルシフェラーゼプラスミド使用して, フラボノイドの BSP の転

写に対する効果を検索した結果, genistein 刺激で転写開始位置より -116 塩基対上流までの BSP プロモーターを含むコンストラクト (pLUC3) とそれよりも長い配列を含むコンストラクトで転写活性が上昇した。同様に daidzein, flavone および flavanone 刺激で pLUC3 の転写活性が上昇した。pLUC3 の変異ルシフェラーゼプラスミドを用いてフラボノイドの影響を検索した結果, 逆方向の CCAAT 配列が関与すると考えられた。CCAAT 配列に結合する転写因子は NF-Y であることがすでに同定されているが, 逆方向の CCAAT 配列に対する NF-Y 転写因子の結合は, フラボノイド刺激前後で変化しなかった。以上の結果から, フラボノイドは BSP の転写を促進し, その効果は, 逆方向の CCAAT 配列を介していると考えられた。

(5) ヘリコバクター・ピロリ菌病原因子 CagA による SHP-2シグナルの脱制御

畠山 昌則 (北海道大学遺伝子病制御研究所・分子腫瘍分野)

胃癌発症に重要な役割を果たすピロリ菌病原因子 CagA は, IV 型分泌機構を介して菌体内から接触した胃上皮細胞内に直接注入され, Src ファミリーキナーゼによりチロシンリン酸化を受ける。チロシンリン酸化 CagA は SH2 ドメインを介して SHP-2 チロシンホスファターゼと特異的に結合し, その酵素活性を著しく増強する。CagA による SHP-2 の脱制御は, 胃上皮細胞の運動性の亢進と細胞質の著しい伸長を引き起こす。CagA のチロシンリン酸化部位は Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA) サイトの存在で特徴づけられる。一般に CagA は保存された EPIYA-A サイ

トならびに EPIYA-B サイトを有し, その COOH 末側に欧米型ピロリ菌由来 CagA 特異的な EPIYA-C サイトないし東アジア型ピロリ菌由来 CagA 特異的な EPIYA-D サイトが出現する。チロシンリン酸化 EPIYA-C サイトは低親和性 SHP-2 結合部位を, またチロシンリン酸化 EPIYA-D サイトは高親和性 SHP-2 結合部位を形成する。CagA の SHP-2 結合能は病原因子としての CagA 活性を反映するものと考えられる。本発表では, CagA により活性化された SHP-2 の基質分子に関する最近の研究成果を報告する。

(6) 血圧調節における腎遠位尿細管細胞でのナトリウム再吸収の制御機構

新里 直美, 青井 渉, 宮崎 裕明, 丸中 良典 (京都府立医科大学大学院・生理機能制御学)

腎遠位尿細管におけるナトリウム再吸収は、体液量や血圧調節にとって重要な役割を担っていることが知られており、ホルモンや血漿浸透圧により緻密に制御されている。一方、フラボン（ケルセチン）は、高血圧を正常血圧に戻す働きがあることが知られているが、その詳細なメカニズムは明らかにされていない。本研究では、食塩感受性高血圧症ラット（Dahl salt-sensitive rat; DS ラット）をモデルとした個体レベルでの血圧調節に対するケルセチンの作用機序、及び遠位尿細管上皮細胞（A6 細胞）をモデルとした細胞レベルでのナトリウム再吸収に対するケルセチンの作用機序についての研究結果を踏まえ、血圧調節における上皮型ナトリウムチャネル（epithelial Na^+ channel; ENaC）の生理的意義と制御機構について報告する。DS ラットでは、高食塩食による血圧上昇をケルセチンが抑制し、その際、腎臓における ENaC の転写レベルでの減少が認められた。そこで、血圧調節に重要な役割を果たしている遠位尿細管でのナトリウム再吸収が、ケルセチンによる血圧降下に寄与しているかを A6 細胞において検討した。その結果、ケルセチンは

alpha-ENaC を転写レベルで抑制し、経上皮のナトリウム再吸収を ENaC の活性低下を伴って減少させることが明らかとなった。我々は、A6 細胞において、ケルセチンは $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter を活性化してクロライド分泌を亢進することを見い出しており、この cotransporter 活性化による細胞内クロライド濃度の上昇がナトリウム再吸収抑制機序に関与している可能性について検討するため、ケルセチンとクロライドチャネル阻害剤を用いた。その結果、alpha-ENaC mRNA は、ケルセチンとクロライドチャネル阻害剤を単独で作用させたときより、同時に作用させたときに最も抑制されることが示された。これらの結果から、ケルセチンによる血圧降下作用は、細胞内クロライド濃度の上昇を介した ENaC の転写抑制による遠位尿細管でのナトリウム再吸収抑制がその一因として考えられた。

This work was supported by Grants-in-Aids from Japan Society of the Promotion and Science (15590189), the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (15659052, 15790120).

(7) 胃幽門腺粘液 Ca^{2+} 調節性開口放出のインドメサシンによる修飾；アラキドン酸による活性化

中張 隆司 (大阪医科大学・第一生理)

アセチルコリン (ACh) は、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を介し、幽門腺粘液細胞開口放出を活性化すると同時に、プロスタグランジン E_2 (PGE_2) 産生を増加させる。 PGE_2 は cAMP の集積を介して Ca^{2+} 調節性開口放出を増強している。 PGE_2 合成阻害薬である indomethacin (IDM) は ACh による開口放出を抑制したが、IDM 単独では開口放出を活性化しなかった。本研究では、IDM の開口放出に対する効果について、コラゲナーゼ処理により得られた幽門腺粘液細胞の開口放出をビデオ顕微鏡を用い検討した。

IDM ($10 \mu\text{M}$ or $100 \mu\text{M}$) は、開口放出を活性化しなかった。一方で、IDM は ACh による開口放出を 30% 抑制した。cAMP の阻害剤 ($20 \mu\text{M}$ H89), PGE_2 receptor 阻害剤 ($100 \mu\text{M}$ ONO8713) は ACh による開口放出を 50% 抑制

した。また、H89 ($20 \mu\text{M}$) に IDM を加えることにより、開口放出は増加し IDM と同じレベルになった。COX は arachidonic acid (AA) から PGH と 15(R)-HETE を合成する。IDM は PGH と 15(R)-HETE の二つの合成を阻害する。このことは IDM では AA が蓄積することを示唆している。一方で、aspirin (ASA) は PGH 合成を阻害するが 15(R)-HETE を合成は保たれることが知られている。ASA は ACh による開口放出を 50% 抑制したが、 $20 \mu\text{M}$ AA or IDM を ASA に加えると ACh による開口放出は増加し IDM と同じレベルになった。

【結論】 IDM はモルモット胃幽門腺粘液細胞の ACh による開口放出に対し PGE_2 合成阻害による開口放出抑制だけで、AA 蓄積を介して開口放出を活性化していた。

(8) 変異解析とホモロジーモデリングによる胃酸分泌プロトンポンプの構造機能相関の解明

浅野 真司 (立命館大学・情報理工学部)

森井 孫俊 (富山医科薬科大学・薬学部)

胃は消化管における生体防御の最前線にあり、胃酸分泌酵素であるプロトンポンプによって酸分泌が行われ、一次消化や殺菌が行われる。私達は胃酸分泌酵素の作動、調節機構を研究すると共に、これに対する可逆的な阻害剤 (Acid Pump Antagonists:APA) の結合部位の探索を行った。

プロトンポンプの α 、 β 鎖の cDNA を HEK-293 細胞に導入すると、膜画分に H^+ 、 K^+ -ATPase 活性が検出でき、安定発現細胞はプロトンポンプ阻害剤に対して感受性の Rb イオンの取り込み、プロトンの細胞外への輸送を示した。

ポンプの膜貫通領域を中心に変異導入を行い、上記の系に発現させたところ、M4、M6 領域の酸性アミノ酸な

どがカリウムイオンの親和性を決定することが明らかになった。また、APA 感受性を検討したところ、M5 領域に存在する Tyr-801、Leu-811 などの側鎖が APA との反応に関与することが明らかになった。

これらのアミノ酸残基の立体的な配置を明らかにするために、骨格筋のカルシウムポンプの立体構造を元にホモロジーモデリングを行ってプロトンポンプの立体構造モデルを構築した。その結果、イオン親和性を決定するアミノ酸残基は膜中でクラスターを作り、イオン結合部位を構成すること、APA 感受性に関与するアミノ酸残基は、管腔側の表面に位置して APA がフィットする cavity 構造を形成することが確認された。

(9) 大腸イオン輸送と Protease-activated receptor

鈴木 裕一、池原 修 (静岡県立大学・食品栄養科学部)

Protease はヒトでは五百数十種類もあり、細胞内外で様々な生理的役割を果たしている。この中で最近、thrombin や trypsin などの細胞外 protease 活性化される G タンパク共役型の受容体 (PAR1~4) の働きが注目されている。われわれは、切り出したマウス盲腸を用い Ussing chamber 実験系で、trypsin の短絡電流 (Isc) に及ぼす効果と、さらに PAR の関与を検討した。得られた結果：漿膜側に投与した trypsin は粘膜下神経活性化を介して粘膜上皮 Cl イオン分泌を活性化した。この反応は、ムスカリン受容体阻害剤の atropin や NK1 受容体阻害剤で抑制された。また、P450 の阻害剤で抑制された。trypsin の効果は

PAR を介するか否かを次に検討した。PAR1-AP (PAR1 受容体活性化ペプチド) は、trypsin 同様粘膜下神経を解して上皮 Cl イオン分泌を活性化した。また PAR1-AP によるこの反応は、atropin、NK1 受容体阻害剤、および P450 の阻害剤で抑制された。さらに、trypsin と PAR-AP による Cl イオン分泌活性化は、相互に少なくとも一部 cross desensitization が見られた。結論：粘膜下神経に PAR1 が存在し、その活性化により、粘膜防御作用を持つと信じられている Cl イオン分泌が惹き起こされることが明らかになった。生理的にどのような protease が関与しているのかについては今後検討する必要がある。

(10) 抗酸化性食品成分による消化管粘膜ホモジネート酸化抑制作用

室田 佳恵子、寺尾 純二 (徳島大学大学院・ヘルスバイオサイエンス研究部食品機能学分野)

消化管粘膜は常に食品由来のプロオキシダントに暴露された状態にある。食事由来のものを含めさまざまな要

因により蓄積する脂質過酸化物質から生ずるより有害な二次生成物は、消化管粘膜において炎症やガン化に関与す

るとの報告がある。食物中に含まれる代表的な抗酸化成分であるフラボノイドは、一部は吸収されるものの大部分はそのまま消化管下部へと移行するため、消化管腔に高濃度で存在していると推定される。すなわち、消化管粘膜は食事性フラボノイドが抗酸化性を発揮する生理的標的であると考えられる。本研究では、ラット消化管粘膜ホジネートをモデルとして用い、鉄イオン誘導酸化ストレスに対するフラボノイドの防御作用について検討した。

植物性食品中のフラボノイドは主に配糖体として存在

するが、代表的なフラボノイドであるケルセチンにおいて配糖体はアグリコンよりは弱いものの鉄イオンによる脂質過酸化を抑制した。特に、4'位配糖体 (Q4'G) は3位配糖体 (Q3G) に比べて抗酸化性が強かった。反応後の溶液の分析結果より、Q4'G は Q3G に比べアグリコンに変換されやすいことが明らかとなった。配糖体はアグリコンに比べてラジカル捕捉活性が弱く、また金属イオンキレート能も弱いことから、ケルセチン配糖体が消化管粘膜に存在するグルコシダーゼ活性によりアグリコンへと変換され抗酸化性を発揮したことが示唆された。

(11) 生体内で有効なポリフェノール・フラボノイド

金沢 和樹 (神戸大学農学部・生物機能化学科・食品・栄養化学教室)

食品に含まれるポリフェノールは百万種類以上と言われ、多様な機能が知られている。種類が多いのは、アグリコンと呼ばれる骨格構造に糖が結合した配糖体として存在し、糖の種類と結合様式が多様だからである。しかし、生理活性はアグリコン部位にある。抗酸化能とタンパク質機能調節作用に分けられるが、アグリコンの構造で整理すると活性は理解しやすい。生体内でも有効な抗酸化能を示すのはカテコール構造を持つものだけである。体内吸収時に希釈されるので低濃度でも強い活性のものが有効であり、また吸収時に活性部位の水酸基が抱合を受けるからである。タンパク質機能調節とは、受容体にアンタゴニズムを示す、あるいは酵素活性を調節する作用

である。タンパク質のポケットに作用するので、そのサイズに合う立体構造が要求される。フラボンとフラボノール類はアリアル炭化水素受容体や CYP 酵素類に顕著な作用を示す。イソフラボン類はエストロゲン受容体に、カテキン類はグルコース輸送担体に作用が顕著である。しかし、ポリフェノールは生体にとっては異物であり、吸収時に小腸細胞で速やかにグルクロン酸あるいは硫酸抱合される。その体内半減期は 2-9 時間であり、ほとんどのポリフェノールがヒト体内では生理活性を示さない。しかし、有効なものもある。今回の発表では、有効なものの例をいくつかあげて議論する。

(12) ヘリコバクター・ピロリの空胞化致死毒素の作用機序

和田 昭裕 (長崎大学・熱帯医学研究所・病原因子機能解析分野)

ヒトの胃に棲息するグラム陰性桿菌であるヘリコバクター・ピロリは胃炎、消化性潰瘍、MALT リンパ腫などの各種消化器疾患に関与し、胃癌との関連も指摘されている。本菌の病原因子のうち、空胞化致死毒素 (VacA) は標的細胞の細胞質内に空胞を形成させ、細胞を死滅させる毒素であり、本菌の病原性との関わりが指摘されている。現在までに、VacA の宿主細胞への初期作用を理解するため、ヒト腎臓癌由来株化細胞 G401 細胞あるいは

ヒト胃癌由来株化細胞 AZ-521 細胞より VacA 受容体を精製して、VacA 受容体が 2 種の受容体型チロシンフォスファターゼ (RPTP), RPTP α と RPTP β であることを明らかにした。さらに、これら 2 種の RPTP のうち RPTP β を KO したマウスでは VacA 投与によって認められる胃炎や潰瘍を発症しないことを明らかにした。一方、VacA の細胞障害のシグナル伝達の流れを分子レベルで明らかにすることを目的に、VacA の空胞化形成にダイナミン

とシンタキシン7が関与していることを、VacAがミトコンドリア障害を引き起こすことを報告した。

VacAがその受容体であるRPTPβとの結合にいかなる構造が重要であるのか明らかにするために、RPTPβの細胞外領域を削った種々のデリージョン変異体を作製した。RPTPβ-Bのデリージョン変異体とVacAとの結合は、VacAおよび抗VacA抗体を用いた免疫沈降法にて

VacA結合活性の解析をおこなった。その結果、746残基めのセリン残基までを欠損させたRPTPβ変異体(Δ747)はVacA結合活性が認められたが、752残基めのプロリンまでを欠損させたRPTPβ変異体(Δ747)はVacA結合活性が認められなくなり、747-752残基のアミノ酸配列(QTTQP)が、VacA結合に重要であることがわかった。

(13) 偽性低アルドステロン症Ⅱ型原因遺伝子WNK4キナーゼの膜輸送体局在機構に対する影響

内田 信一, 楊松 昇, 山内 小津枝, 佐々木 成 (東京医科歯科大学・腎臓内科)

偽性低アルドステロン症Ⅱ型は高血圧, 高K血症, アシドーシスをきたし優性遺伝形式で発症する疾患である。原因としてWNK4のコイルドメイン付近に集中した3つのミスセンス変異ならびにWNK1のイントロン部分の欠損により引き起こされることが判明しているものの, その病態メカニズムは明らかでない。昨年, 我々はWNK4キナーゼの標的因子の一つとしてclaudinを同定し, さらに変異型WNK4はMDCK細胞において細胞間クロライド透過性を上昇させることを報告した。一方, oocyte発現系においては, サイアザイド感受性Na-Cl co-transporter (NCC) やROMK channelの膜表面への移行をWNK4が阻害することを示した報告もあり, 輸送体を直接制御する可能性も示唆されている。今回我々は, これら輸送体への作用を極性をもつ上皮細胞内で検証するため, 1) MDCK細胞にNCCとWNK4キナーゼの共発現安定細胞株を作成し, NCCの局在への影響を観察した。

2) CLCNKB遺伝子プロモーターを用いて, 変異型WNK4を腎臓遠位側尿細管に発現するトランスジェニックマウスを作成し, 生体内での変異型WNK4発現の影響を検討した。

結果として, MDCK細胞ではNCCおよびROMKのapical側への局在が, 野生型, 変異型いずれのWNK4発現によっても阻害された。このことは変異型WNK4にはNCCの膜局在阻害作用がないというoocyteでの報告と異なっていた。トランスジェニックマウス腎臓内でのNCCおよびROMK細胞内発現部位は, 変異型WNK4発現に関わらず, apical側への局在に変化はなかった。

以上の結果よりWNK4の輸送体細胞内局在に対する影響は, 発現する細胞の種類による異なる可能性がある。真の影響を検討するためには, ヒトと同じ変異を持つノックインマウスの作成が必須と思われた。

(14) Isoliquiritigeninの大腸がん予防効果に向けて-ILTGのCOX-2依存性アポトーシス誘発効果-

高橋 徹行, 馬場 正樹, 奥山 徹 (明治薬科大学・天然薬物学)
西野 輔翼 (京都府立医科大学・分子生化学)

【目的】 Isoliquiritigenin (ILTG)は甘草, アルファルファ, ラッキョウ等に含有されている黄色のフラボノイドである。Genistein, Apigenin等のフラボノイドが*in vitro*及び*in vivo*の様々な化学発がんを抑制する報告がされている事から, 今回我々はILTGの大腸がん予防物質としてのポテンシャルについて, 各種検討を行った。

【方法】 1. 大腸発がんにおける重要な因子としてCyclooxygenase-2 (COX-2)の過剰発現が提唱されている。これに基づき, Lipopolysaccharide (LPS) 処理によるCOX-2過剰発現誘導系を用い, ILTG共処理が及ぼす影響をRT-PCR, Western Blot, ELISA (Prostaglandin E2, PGE2)により検討した。

2. マウス大腸癌細胞 Colon 26 (COX-2 恒常発現株) に対する直接的な増殖抑制作用を MTT 法にて検討し、更に FACS 解析によりアポトーシス細胞の増加を検討した。

3. 限外希釈法により、Colon 26 をクローニングし、COX-2 高発現株を得た。これを用いて ILTG 誘発アポトーシスに対する感受性を親株との比較を行う事により検討した。比較する項目は、FACS 解析によるアポトーシス細胞の増加、Western Blot による PARP, Caspase-3 の開裂を選択した。

4. Azoxymethane (AOM) 誘発大腸粘膜異常腺窩巢 (ACF) に対する ILTG 混餌投与による抑制作用を ddY マウス及び F344 ラットを用いて行った。ILTG は試験期間中自由摂取させた。

【結果】1. ILTG 共処理は COX-2 mRNA 発現には影響を及ぼさなかったが、COX-2 タンパクの発現誘導を用量依存的に抑制した。また、産生される PGE2 量も有意に減少させた ($IC_{50}=1.17\mu M$)。

2. ILTG 処理により用量依存的な増殖抑制の傾向が認められた。更にアポトーシス細胞の顕著な増加が認められた (約 40%)。

3. クローニングにより得られた COX-2 高発現株 (Co26-18) は Colon 26 に比して約 2.2 倍 COX-2 発現レベ

ルが亢進していた。ILTG 処理によるアポトーシス細胞の割合は親株が 46.97%, Co26-18 は 30.14%とアポトーシス誘発に抵抗性が認められ、開裂型 PARP 及び Caspase-3 も親株に比して減少傾向が認められた。また、ILTG のアポトーシス誘導は lipoxigenase inhibitor 処理下では増強され、PGE2, Prostaglandin I2 (PGI2), Thromboxane B2 (TXB2) の共処理によってその増強は打ち消された。しかし、Co26-18 のアポトーシス誘発抵抗性は保持されていた。

4. ddY マウスにおいては、総 ACF 数が対照群 72.4 ± 30.0 個に対し ILTG 投与群が 45.4 ± 16.8 個であった。F344 ラットにおいては対照群 172.3 ± 54.9 個に対し ILTG 投与群が 108.8 ± 30.1 個であった。

【まとめ】ILTG は COX-2 発現誘導によるプロスタノイド産生系を COX-2 タンパクレベルで抑制し、また COX-2 タンパク発現レベルが ILTG 誘導アポトーシスを抑制的に調節している事が示された。これより、ILTG 誘発アポトーシスの作用点の一つにアラキドン酸代謝経路が関与する事が示唆された。また、ILTG 混餌投与が AOM 誘発大腸 ACF 形成をマウス、ラット両種において抑制した事より、ILTG が大腸がん予防に有効である可能性が示唆された。

6. 視知覚への多角的アプローチ - 生理, 心理物理, 計算論的アプローチ

2004年6月17日 - 6月18日

代表・世話人: 塩入 諭 (千葉大学工学部)

所内対応者: 小松英彦 (生理学研究所)

(1) 視知覚と皮質局所神経回路の構造

田村 弘 (大阪大学大学院生命機能研究科)

(2) 視覚的注意の空間分布

塩入 諭 (千葉大学工学部メディカルシステム工学科)

(3) 選択的注意課題における, 非注意次元情報の処理

坂上 雅道 (玉川大学学術研究所脳科学研究施設)

(4) 両眼対応とエピソード拘束一垂直視差の機能的役割

朝倉 暢彦 (金沢工業大学人間情報システム研究所)

(5) 多次元視覚探索課題における V4 野のニューロン活動

ーボトムアップ性とトップダウン性注意による相互作用ー

小川 正 (生理学研究所)

(6) イベントの視覚認知における知覚と記憶の相互作用

斎木 潤 (京都大学大学院情報学研究科)

(7) モジュールを超えた時空間統合

西田 眞也 (NTT コミュニケーション科学基礎研究所)

(8) 視覚系細胞の高次刺激に対する反応と受容野構造について

大澤 五住 (大阪大学大学院生命機能研究科脳神経工学講座)

(9) 両眼視差を用いた奥行き弁別のメカニズム

宇賀 貴紀 (順天堂大学医学部生理学第一講座)

(10) 図方向決定の皮質メカニズムー計算論的アプローチ

酒井 宏 (筑波大学電子・情報工学系)

(11) 読書の心理物理と網膜疾患

小田 浩一 (東京女子大学現代文化学部)

(12) 下側頭葉視覚連合野における図形特徴の組み合わせを使った物体像の表現

谷藤 学 (理化学研究所脳科学統合研究センター 脳総合機能研究チーム)

(13) 視覚的注意特性と安全性

三浦 利章 (大阪大学大学院人間科学研究科)

【参加者名】

塩入 諭 (千葉大・工), 宇賀 貴紀 (順天堂大・医),
大澤 五住 (阪大院), 田村 弘 (阪大院), 酒井 宏 (筑
波大・電子・情報工学), 谷藤 学 (理研), 坂上 雅道
(玉川大), 小川 正 (生理研), 西田 眞也 (NTT 科学
基礎研), 斎木 潤 (京大院), 朝倉 暢彦 (金沢工大),
小田 浩一 (東京女子大), 三浦 利章 (阪大院), 佐藤
雅之 (北九州市大), 松原和也 (千葉大院), 内川恵二 (東

京工大院), 永井岳大 (東京工大院), 椎橋哲夫 (東京工
大院), 福屋貴之 (東京工大院), 我妻信彦 (筑波大),
勝又詩織 (筑波大), 辻 義尚 (筑波大), 眞田尚久 (阪
大院), 大谷智子 (聖心女子大), 瀬川かおり (産業技
術総研), 藤井正樹 (中京大院), 十河宏行 (京大院),
竹井成和 (東大院), 宮川尚久 (東京医科歯科大), 丸谷
和史 (東大), 天野薫 (東大), 小濱 剛 (愛知県立大),

篠島良太（愛知県立大）、豊田敏裕（豊橋技科大）、杉之原英嗣（阪大院）、堺 浩之（RIKEN-BS I）、菊池真之（東京工科大）、則武樹郎（東京工科大）、田中祥平（東京工科大）、増田智洋（産業技術総研）、細田謙二（東大）、末光厚夫（筑波大）、柴田和久（奈良先端大）、下谷篤史（奈良先端大）、藤原祐介（奈良先端大）、廣川純也（基生研）、松崎政紀（生理研）、田中絵実（生理研）、中村舞子（生理研）、本多結城子（生理研）、葭田貴子（JSPS・千葉大）、古春雅郎（デンソーアイティラボラトリ）、赤崎孝文（阪大）、木原 健（京大・文・心）、高橋伸子（愛知淑徳大）、行松慎之（中京大）、大杉尚之（中京大）、河本健一郎（中京大）、鈴木一隆（浜松ホトニクス）、西村聡生（東大）、金谷英俊（東大）、妹尾武治（東大）、中内茂樹（豊橋技科大）、観音隆幸（豊橋技科大）、西 由

紀子（豊橋技科大）、西本伸志（阪大）、木村豊（阪大）、鬘櫛一夫（中京大）、高瀬慎二（中京大）、前田青広（京都大）、下ノ村和弘（阪大）、斉藤孝（松下電工株）、福島邦彦（東工大）、松本有央（産総研）、西崎誠（松下電器）、遠山和也（東京工科大）、八木哲也（阪大）、深井英和（岐阜大）、近藤光展（中京大）、安松信明（生理研）、河合徹弥（中部大）、高木康一（中部大）、平田豊（中部大）、古田充平（中部大）、山本麗子（中部大）、中村慎佑（中部大）、伊藤嘉秀（愛知学院）、志村敦（デンソー）、川嶋英嗣（愛知淑徳大）、小松英彦（生理研）、伊藤南（生理研）、郷田直一（生理研）、鯉田孝和（生理研）、松本正幸（生理研）、横井功（生理研）、安田正治（生理研）、松茂良岳広（生理研）

【概要】

生理学研究所研究会，視知覚への多角的アプローチ-生理，心理物理，計算論」は，平成16年6月17日，18日に岡崎コンファレンスセンターにおいて開催された。参加者は予想を上回り100名近くに達したため，会場は少々手狭な感があったが関係諸氏の対応により問題なく進行できた。参加者は大学院生を含む若手の研究者が多く見受けられたが，若い研究者の多くの参加は，この分野への関心の高さと学際的講演会の重要性，さらに将来性を示すものであろう。17日には8件の講演と懇親会，18日は5件の講演があり，活発な議論が行われた。講演は，生理学，心理物理学，計算論の立場の気鋭の研究者を中心とした興味深い内容で占められ，各研究領域の熱気が伝わるものばかりであった。講演内容は幅広い視機能に渡り，多様なアプローチの研究を含み，通常の学会や研究会では得ることが難しい多くの新鮮な話題に満ちていた。生理学的研究では，隣接する皮質神経細胞間情報のやり取りといった構造に主眼をおいた研究から課題依存の選択的注意に関わる高次，低次の視覚処理系の神経活動，2次特徴量（テクスチャーなど）や相対視差また図形特徴の組み合わせに対する感度を持つ神経

細胞の特性などについての研究があり，ますます複雑な機能計測が実現していることが理解された。心理物理学研究では，注意の空間分布，垂直視差の機能，オブジェクトの保持機能，視覚情報の時空間統合など従来手法では簡単には扱えないテーマについて新規の手法を提案しての研究や自動車運転時など直接安全性に関わる注意機能の評価や視野欠損のある患者の読書の方略とその裏付けという視覚研究の応用的展開に繋がるものまで視覚研究の新しい切り口のものが多かった。また計算論の研究としては，周辺刺激による応答の修飾から輪郭の所属の問題を解くモデル，スパースコーディングによるテクスチャー情報の圧縮，また両眼対応のエピポーラ拘束と垂直視差の関係など生理実験，心理物理実験のみからでは予測が難しい問題をうまく扱い，生理実験や心理物理実験との対応を示しているものがあり，研究の方向性を考える上でも重要であった。全体を通してみて，視覚研究者の学際的な意見交換の場として非常に有益な研究会であり，今後の視覚研究分野の発展に貢献するものと信じている。

(1) 視知覚と皮質局所神経回路の構造

田村弘 (大阪大学大学院・生命機能研究科・認知脳科学研究室)

皮質神経細胞への入力約 50% は近傍の細胞に由来する。よって、視知覚の神経基盤の解明には、近傍細胞を結ぶ局所神経回路の様子を明らかにする必要がある。そこで、サル V1 野と TE 野において、局所神経回路の構造を複数神経細胞活動同時計測技術と相互相関解析法で調べた。コラム構造から予想されるように、V1 野、TE 野ともに、局所によく似た刺激に反応する細胞が集まっていた。しかし、かなりの割合で異なる刺激に反応する

細胞も存在した。V1 野、TE 野において興奮性結合は似た刺激に反応する細胞間に、抑制性結合は異なる刺激に反応する細胞間によく観察され、これらの神経結合は刺激選択性の鋭敏化に貢献すると考えられる。また、少数ではあるが、V1 野、TE 野で最適刺激が異なる細胞間に共通入力または興奮性結合が存在した。これらの結合は、多様な性質の細胞を結びつけ、より複雑な視覚刺激に対する反応の獲得に貢献すると考えられる。

(2) 視覚的注意の空間分布

塩入 諭 (千葉大学)

視覚の空間的注意に関する研究は、注意を向けた位置の視覚処理の促進を示すのみではなく、促進効果がある空間範囲があることも示している。我々は、コントラスト感度、仮現運動時の見かけ位置、注意の捕捉効果、サッカーボールなどへの注意の影響から、注意位置の測定方法を開発してきた。本講演では、それらの測定方法は注意の位置のみならず、注意の範囲の推定にも利用できることを示し、その結果から明らかになった点について

述べる。そのひとつは、運動刺激の追跡課題を課した実験条件において、複数の手法で求められた注意の範囲は類似した特性を示すことである。

これは、これらの測定方法が共通のメカニズムを捉えていることを支持する。もうひとつは、注意の範囲は、追跡刺激のみではなく検査刺激の提示範囲の影響も受けることである。これは、視覚系は課題に応じた注意の範囲を設定していることを示唆する結果である。

(3) 選択的注意課題における、非注意次元情報の処理

Summer Sheremata, 渡邊武郎 (ボストン大学心理学科)

坂上雅道 (科学技術振興機構「さきがけ21」)

(玉川大学学術研究所脳科学研究施設)

反応決定のプロセスは、完全にシリアルではない。複数の刺激-反応処理が並列的に働き、最も適切なものが選ばれる。そのため、しばしば Stroop 現象のような刺激-反応コード間の干渉がおこる。どのような刺激が干渉を起こしやすいのであろうか？ ヒトを被験者とし、色付のランダムドットを用いた選択的注意課題における刺激の salience の干渉効果への影響を解析した。動き課題ではランダムドットの動く方向によって、色課題では色によっ

て左あるいは右のボタンを押すことを要求された。色課題では非注意次元であるドットの動く方向が判断に干渉を起こした。salience はランダムドットの coherency で制御された。この干渉は、coherency が閾値を越えたとたんに発生し、驚くことに coherency が上がるほど少なくなった。このことは、salient な刺激ほど注意による抑制が働きやすいことを示唆する。

(4) 両眼対応とエピソード拘束—垂直視差の機能的役割

朝倉暢彦（金沢工業大学 人間情報システム研究所）

両眼対応問題の計算論的研究においては、両眼対応の多義性を解消する方略として、エピソード拘束がしばしば用いられる。エピソード拘束を適用することにより、対応候補の探索を1次元のエピソード線上に制限することが可能となり、大幅な計算量の削減と偽対応の回避が実現される。エピソード拘束の適用には、両眼位置情報が必要であるが、この情報は眼球位置に関する視覚の手がかりである垂直視差から得ることができる。本研究では、

視野周辺に呈示した垂直視差により、視野中心の多義的な両眼対応が解消されることを心理物理学的に示すとともに、その過程が、垂直視差からの両眼位置情報に基づいたエピソード拘束の適用として理解できることを示す。この結果は、両眼対応決定後の水平視差の較正の段階で機能すると考えられてきた垂直視差が、対応問題を解決する段階においてもエピソード拘束として機能することを示唆している。

(5) 多次元視覚探索課題におけるV4野のニューロン活動—ボトムアップ性とトップダウン性注意による相互作用—

小川 正（生理学研究所）

ある刺激が周囲の刺激と異なる色や形を持っている場合、その刺激は目立ち、注意が自動的に惹きつけられる（ボトムアップ性）。日常の視覚環境下では、そのような刺激が複数存在し異なる次元で目立つ。しかしながら、目標となる刺激がどの次元で目立つかを知っていれば、その次元に対して注意を向ける（トップダウン性）ことにより目標刺激を選択することができる。これら2つの注意がV4野のニューロン活動に与える影響を視覚探索課題を用いて調べた。実験では6つの刺激が同時に呈示され、その中

には色及び形次元で異なる刺激が1つずつ含まれる。サルは教示された次元（色または形）で目立つ刺激に向かってサッカードを行うと報酬がもらえる。受容野内の刺激が目標となる場合、V4野ニューロンの活動が増大したが、この増強は特定の次元（色または形次元）で目立つ刺激が目標となる場合のみに生じた。この結果は、ボトムアップ性とトップダウン性注意の相互作用がV4野で生じていることを示唆する。

(6) イベントの視覚認知における知覚と記憶の相互作用

齋木 潤（京都大学大学院情報学研究科）

物体やシーンの理解の研究において、我々は4個程度の視覚的オブジェクトを短期的に保持できるとされている。しかし、オブジェクトの重要な特性である属性のバインディングと、（運動を含む）変化に伴う表象の更新の過程は厳密に検討されていない。この点を明確にするため、複数の運動物体を用いて属性のバインディングと運動に伴う表象の更新を同時に検討する多物体恒常性追跡法を用いたところ、我々が保持できる視覚的オブジェ

クトは2に満たないことがわかった。限られたオブジェクトの記憶で外界を効率的に認知するために我々は選択的注意のメカニズムを効率的に活用していると考えられる。多物体恒常性追跡法を用いて視覚記憶と視覚的注意の相互作用を検討した心理物理実験、属性情報と位置情報が統合されたオブジェクト表象の神経基盤を検討したfMRI実験を紹介し、これらの知見と視覚認知機構におけるバインディング問題との関連を議論する。

(7) モジュールを超えた時空間統合

西田真也 (NTT コミュニケーション科学基礎研究所)

モジュール性は脳の処理の大きな特徴の一つであり、異なる感覚モダリティ (視覚・聴覚など) や、各モダリティにおける異なる感覚属性 (視覚における形や動きなど) は別個の神経メカニズムで処理されると考えられている。しかし、モジュール間の境界は曖昧であり、モジュール間の相互作用の仕組みには多くの謎が残されている。物理世界において、また感覚世界において、異種情報が統合的に表現される場が時空間である。ここでは、

時空間の情報統合という視点から、モジュール構造の意味を考え直した最近の我々の研究をいくつか紹介する。一つは、マルチスリット視の特性を分析し、形態知覚に運動情報の処理が密接に関わり合っていることを示した研究である。もう一つは、異なるモジュール間で処理されたイベントの時間判断のメカニズムに関する研究である。後者には、視聴覚の同時性の判断が順応によって変化するという新しい現象の発見も含まれる。

(8) 視覚系細胞の高次刺激に対する反応と受容野構造について

大澤五住 (大阪大学大学院生命機能研究科脳神経工学講座)

テクスチャー強度を空間上で変化させた刺激は 2 次の刺激、エンベロープ刺激などと呼ばれる。このような刺激を利用することにより、視覚神経系での高次の受容野構造を探ることができる。2 次視覚野ではエンベロープ刺激に反応する細胞があることは従来から知られているが、その両眼特性については生理学的には検討されていない。ネコの 18 野において、高空間周波数 carrier を正弦波エンベロープで振幅変調した刺激と通常の輝度正弦

波グレーティング刺激を両眼に各種の組合わせで提示し、両眼間の刺激位相差に対する細胞の反応を測定した。エンベロープ刺激に反応する細胞のうち輝度刺激の位相差に選択性を持つ細胞は、エンベロープ刺激についても同じ位相差選択性を持っていた。このことは、細胞がテクスチャーと輝度について同じ両眼視差選択性を持つことを示す。

(9) 両眼視差を用いた奥行き弁別のメカニズム

宇賀貴紀 (順天堂大学医学部生理学第一講座)

立体視とは両眼視差、すなわち物体が両眼に落とす網膜像の位置のズレから生じる奥行き知覚のことである。立体視は従来、大脳皮質視覚野の背側 (空間視) 経路の機能であると言われてきた。しかしごく最近、腹側 (物体視) 経路にも立体視機能があることがわかった。本研究では、2 つの視覚経路での立体視機能の違いを理解するため、サルに情報処理過程が異なる 2 つの奥行き弁別課題 (絶対視差および相対視差弁別課題) を課し、背側

経路 MT 野での微小電気刺激がそれぞれの弁別課題の遂行にどのような影響を与えるか検討した。その結果、絶対視差弁別課題では知覚判断に影響が見られたのに対し、相対視差弁別課題では影響は見られなかった。以上の結果から、MT 野は絶対視差を用いた奥行き弁別には関与するが、相対視差を用いた奥行き弁別には関与しないと考えられ、絶対視差と相対視差の情報処理が、2 つの大脳皮質視覚経路で並列に行われていると考えられる。

(10) 図方向決定の皮質メカニズム—計算論的アプローチ

酒井 宏・西村 悠（筑波大学 大学院 システム情報工学研究科）

視野中のどの部分に対象とする物体（図）があるかを決め、背景（地）から分離することは、物体認識などの高次プロセスの基礎となる重要な問題である。最近の生理学的研究により、V2・V4に図方向（DOF）に選択性を持つ神経細胞が存在することが報告された（e.g. Zhou et al., J. Neurosci, 2000）。本研究では、境界線分の周囲のコントラスト情報から図方向を決定する皮質メカニズムを提

案する。初期視覚領野の神経細胞に見られる、古典的受容野の外側からの周辺抑制・促進は、多くの場合に空間的な非対称性を示す（e.g. Jones, et al, J. Neurophysiol, 2002）。計算論的研究から、このコントラスト情報の文脈依存性が、図方向決定に主要な役割を果たしている事が示唆された。このメカニズムに基づく回路網モデルは、Zhou らの報告した DOF 選択性細胞の特徴を定量的によく再現した。

(11) 読書の心理物理と網膜疾患

小田浩一（東京女子大学）

読書は高次認知活動と一般にはみなされるが、視覚の次元に生じた障害によって大きな影響を受けることもまた知られている。ロービジョンと読書困難の研究である。そこに視覚次元で読書を心理物理的に扱う可能性があり、読書行動に必要な視覚の刺激次元が明らかになってきた。ここでは、その中で、比較的最近注目されている網膜疾患と読書の関係について取り上げる。先進国で失明原因のトップになっている加齢黄斑変性という疾患

では網膜中心部に感度低下が起こり、読書が著しく阻害される。このことは、網膜中心部と周辺部の処理の違いを疑わせている。また、Scanning Laser Ophthalmoscopeを用いて視覚刺激が網膜のどの部位を刺激しているのかを in vivo でモニタしながら読書をさせる方法からは、障害された網膜の使い方によって読書の成績が変わってくるのが分かってきた。

(12) 下側頭葉視覚連合野における図形特徴の組み合わせを使った物体像の表現

谷藤 学，内田豪，角田和繁，山根ゆか子（理化学研究所脳科学総合研究センター）

サル下側頭葉 TE 野は物体像の知覚とそれに基づく認識に関わる連合皮質である。この領野の細胞が中程度に複雑な図形特徴によく反応することは知られているが、それらの組み合わせとして物体像がこの領野でどのように表現されているかについてはわかっていない。我々は内因性信号のイメージング法を用いることによって、物体像のイメージがその物体像を構成する図形特徴に選択的な TE 野のカラムの組み合わせとして表現されていることを明らかにした。

この研究は一部の細胞が物体像のイメージの局所的な図形特徴—空間的に局在している特徴—を表現して

いることも示唆している。IT 野の細胞の中に部分的な特徴を表現するものがあるとすると、それらの空間的な位置関係を特定するメカニズムが必要になる。我々は IT 野の細胞の一部が空間的な関係を表現するための図形特徴を表現しているという可能性をイメージング法によって検討した。その結果、部分と部分の空間的な配置に対して選択性を持つが、それぞれの部分を特徴付けるために必要な様々な視覚属性（たとえば、色、形、きめ）に対してはそれほど選択性の高くない細胞群がカラムを作っていることが明らかになった。この結果は、TE 野の細胞が空間的に局所的な図形特徴ばかりでなく、部分の空間

的な配置のような物体像のもつ全体的な特徴も表現できることを示している。この結果から即座に, **Structural Description** すなわち「パーツとパーツの空間的な配置」によって物体像が表現されることを結論することができないが, 少なくとも部分的にはこのような表現方法を使っていると考えられる。

自然な条件の下では, 多くの物体像が同時に視野に入る。これらの物体像が同時に上に述べたようなカラムの組み合わせとして分散的に表現されているとすると, 何らかの方法で, 活動しているカラムの内どれがどの物体像の部分特徴に関係しているかを明らかにしなければな

らない。我々はそのひとつのメカニズムとして細胞同士の同期的発火に着目した。その結果, (1) 自発的な発火活動について同期の見られなかった2箇所細胞について, 両者を興奮させる視覚刺激を提示すると同期的な発火が生じること, (2) 自発的な発火活動について同期発火の見られる2箇所細胞について, 片方についてのみ興奮を引き起こす視覚刺激を提示すると, 同期的な発火が失われることを見出した。本講演ではこのような同期的な発火の出現と消失の背景にある神経メカニズムについても考察する。

(13) 視覚的注意特性と安全性

三浦 利章 (大阪大学・人間科学研究科・適応認知行動学研究分野)

視覚的注意の三側面について, 自動車運転時の視覚的注意に関する実験結果から述べる。1) 視覚的注意の二次元特性, すなわち眼球運動と有効視野について。課題要件 (注意の必要性) の高い場合に有効視野が狭窄すること, 有効視野での処理の広さと深さのトレード・オフが示された。2) 視覚的注意の三次元特性, すなわち奥行き方向での注意の移動特性について。注意移動の遠近での異方性 (rubber band metaphor) が見いだされた。3) 視覚

的注意の時間的特性について。具体的にはカーナビゲーションの使用前後で視線が前方に向けられていても注意が劣化することが見いだされた。

これら行動場面における視覚的注意研究より, 注意機構の新しい知見と研究手掛かり, および一般的な安全性問題の解決手掛かりが得られる。視覚的注意に関するこのような行動場面での基礎研究が待たれている。

7. シナプス可塑性の分子機構研究と精神神経疾患研究の接点を探る

2004年5月27日－5月28日

代表・世話人：畑 裕（東京医科歯科大学）

所内対応者：井本 敬二（神経シグナル）

- （1）SNAP-25 変異マウスの解析－情動異常の分子基盤の解明に向けて－
高橋 正身（北里大学医学部・代謝蛋白学）
- （2）デルタ2受容体によるシナプスの維持と可塑性の新しい分子機構
柚崎 通介（慶應義塾大学医学部生理学）
- （3）樹状突起スパイン形成におけるアクチン細胞骨格の役割
－ドレブリン依存的シナプス分子の集積とその神経活動依存性－
高橋 秀人（群馬大学医学研究科・高次細胞機能学）
- （4）神経伝達を調節する Ca^{2+} 依存性の蛋白質間相互作用
五十嵐 道弘（新潟大学・医歯学系・分子細胞機能学（医学部生化学第二））
- （5）シナプス刺激依存的な局所的翻訳における新規タンパク質 RNG105 の機能解析
椎名 伸之（国立遺伝学研究所・構造遺伝学センター）
- （6）NMDA 受容体のヘテロオリゴメリゼーションとシナプス局在制御
深谷 昌弘，渡辺雅彦（北海道大学大学院医学研究科解剖発生学分野）
- （7）プロスタノイド受容体によるストレス行動制御
古屋敷 智之¹，松岡 陽子¹，溝口 明²，鍋島 俊隆³，成宮 周¹
（¹ 京都大医神経・細胞薬理，² 三重大医第一解剖，³ 名古屋大薬剤部）
- （8）統合失調症責任候補遺伝子 DISC1 と神経発達
尾関 祐二（滋賀医科大学精神医学講座）
- （9）シグナル伝達と統合失調症
宮川 剛（京都大学医学研究科 先端領域融合医学研究機構）
- （10）幻覚・妄想状態の発症・再発モデルとしての長期持続性行動感作現象の分子機構
西川 徹（東京医科歯科大学）
- （11）脆弱 X 遺伝子 FMR1 は RNAi/miRNA 分子経路に関与する？
岡村 勝友（徳島大学ゲノム機能研究センター）

【参加者名】

畑 裕（東医歯大・院・医歯学総合），深谷 昌弘，渡邊雅彦（北大・院・医），白尾 智明，高橋 秀人（群大医），柏 淳，金子 雄二郎，桜井 新一郎，島津 奈，竹林 裕直，谷口 豪，西川 徹，山本 直樹（東医歯大・院・医歯学総合），有馬 史子，泉 寛子，尾藤 晴彦，小林 静香，中村美智子，新里 和恵，真鍋 俊也，李 勝天，渡部 文子，竹本 さやか，奥野 浩行（東大・院・医），柚崎 通介（慶大・医），板倉 誠，片岡 正和，高橋 正身（北里大・医），井ノ口 馨，岡田 大助，斎藤 喜人（三菱化学生命科学研），椎名 伸之（遺伝研），五十嵐 道弘（新大・院・医歯学

総合），狩野 方伸，鳴島 円，橋本 浩一，橋本谷 祐輝（金沢大・院・医），高岸 芳子（名大・環研），溝口 明（三重大医），大貫 宏一朗，中野 真人，古屋敷 智之，宮川 剛（京大・院・医），三木 崇史，森 泰生，若森 実，山崎 浩史（京大・院・工），尾関祐二，藤井 久彌子（滋賀医大），八木 健（阪大・院・生命），岡村 勝友，塩見 春彦（徳島大・ゲノム機能研究センター），宮田 麻理子，東 幹人，成瀬 雅衣，橋爪龍磨，西巻 拓也，溝口 義人，渡部 美穂，本蔵 直樹，重本 隆一，田中 謙二，萩原 明，鍋倉 淳一，深澤 有吾，等 誠司，河西 春郎，井本 敬二（生理研）

【概要】

近年, 分子生物学・細胞生物学・遺伝学的手法を用いた基礎研究により, シナプス可塑性に関わる分子機構について飛躍的に情報が増大し, なお新たな発見が続いている。臨床的側面からは, 統合失調症や自閉症が, シナプス可塑性に関わる分子の機能異常と関連する可能性が指摘されている。また, Fragile X syndrome に代表される種々の精神発達遅滞において, シナプス可塑性の成立する場である樹状突起の構造異常が共通して認められることも注目されている。これらの知見は, シナプス可塑性

の障害が神経回路の fine tuning を攪乱し, 脳の高次機能の異常をもたらすことを示唆している。

この現況を踏まえて, 本研究会では, シナプス可塑性に関わる最近の意欲的な基礎研究を紹介すると同時に, その成果を脳の高次機能異常の理解に結びつける方途を幅広く議論することを目的とした。

上記の目的に添って, 発表をもとに, 解剖学・生化学・生理学・細胞生物学領域の多彩な研究者を集めて議論を展開した。

(1) SNAP-25変異マウスの解析—情動異常の分子基盤の解明に向けて—

高橋正身 (北里大学医学部・代謝蛋白学)

シナプス伝達は, 神経前終末から開口放出機構によって放出される, 神経伝達物質によって担われている。神経伝達物質の放出は, 短期的には様々なリン酸化酵素により促進的あるいは抑制的に制御されており, この様な制御がシナプス可塑性の重要な機構の一つであると考えられている。

これまでに我々は, 株化されたラット副腎髄質細胞腫細胞である PC12 細胞を用い, プロテインキナーゼ C (PKC) の活性化によって神経伝達物質放出が促進される際に, 神経伝達物質放出に必須なタンパク質である SNAP-25 の Ser187 が特異的にリン酸化されること, PKC によるリン酸化依存的に細胞膜への分泌小胞の移行が促進されることなどを明らかにしてきた。PKC 依存的な SNAP-25 のリン酸化が, どの様な脳機能の制御に関わっているかを明らかにするため, リン酸化部位である Ser187 を Ala に置換したノックインマウスを作成し解析を行った。

ヘテロマウスを掛け合わせてホモマウスの作成を行うと, 出生したホモ個体の数はメンデル則で予想される数の約 7 割でしかなく, 部分的な胎生致死が起こっていると考えられた。さらに出生したホモ個体も, 生後 2 週目から 3 週目の 1 週間に約 30% が死亡した。しかしこれらの時期を過ぎると順調に生育した。

ホモマウスは非常に怖がりやすく, 少しの環境変化でフリージング行動を引き起こす特徴を示した。オープンフィールドでの自由行動試験を行うと, 野生型やヘテロマウスは顕著な探索行動を行いフィールド全体をくまなく歩き回るのに対し, ホモマウスは 2 種類の特異な行動様式を示した。半数以上のホモマウスは, 殆どの時間を壁際で過ごすばかりではなく, 実験開始後しばらくすると行動を停止した。しかし, 一部のホモマウスは全く異なる行動様式を示し, 実験期間中, 常に壁際に沿って動き回るという多動性を示した。この様な行動様式の違いは, 同腹のホモ個体間でも見られることがあった。不安感の行動試験である明暗選択テストを行うと, 野生型やヘテロマウスは暗室のみならず明室でも盛んな探索行動を示したが, ホモマウスは殆どの時間を暗室で過ごしていた。これらの実験以外でも, 恐怖条件付け実験や, 高架式迷路実験などでもホモマウスでは不安感が亢進していることを示唆する結果が得られている。

我々が作成した SNAP-25 のノックインマウスは, 遺伝的変異とそれによって生じる行動様式の変化が明確であり, 今後不安感などの情動行動を分子レベルで解析していく上での非常によい実験系になると考えられる。

(2) デルタ2受容体によるシナプスの維持と可塑性の新しい分子機構

柚崎通介 (慶應義塾大学医学部生理学)

グルタミン酸受容体 (GluR) は、脳神経系の発達や、成熟脳における記憶・学習、更に様々な病態における神経細胞死に大きく関与していることが知られている。従って GluR を介する信号伝達系の調節機構の解明は、シナプス可塑性や、さまざまな精神神経疾患の病態の理解のために必須である。近年、GluR 信号伝達系の調節機構として、シナプス後膜における GluR の選択的輸送系が注目を集めている。例えば、神経活動亢進後に、AMPA 型グルタミン酸受容体サブユニット GluR1 が選択的にシナプス後膜に輸送されることが、海馬におけるシナプス伝達効率の長期増強現象 (LTP) の成立の本体であると考えられている。一方、GluR2 サブユニットがシナプス後部から選択的にエンドサイトーシスされることにより、海馬や小脳におけるシナプスの長期抑圧現象 (LTD) が成立するとされている。このような受容体の選択的トラフィッキングの調節過程については未解明な点が多い。

デルタ 2 型グルタミン酸受容体 (GluR δ 2) は、小脳において平行線維—プルキンエ細胞シナプス後膜にほぼ選択的に発現している。GluR δ 2 欠損マウスでは、著名な小脳失調と、小脳に依存した学習障害や LTD の障害が見られることから、GluR δ 2 はこれらの過程に重要な役割を果たしているものと考えられる。しかし、GluR δ 2 のリガンドが未だに不明であることから、その細胞内信号伝達機構については全く分かっていなかった。最近、私たちは、GluR δ 2 のリガンド結合予想部位に対する抗体が、プルキンエ細胞における GluR2 の選択的エンドサイトーシスを引き起こすことにより、LTD の誘発を阻害することを発

見した。また、この抗体を成熟マウスの小脳に投与すると一過性の小脳失調を引き起こすことから、GluR δ 2 は成熟した小脳においても機能していることを明らかにした。このように、GluR δ 2 はシナプス後膜において GluR2 のエンドサイトーシス過程を制御することにより、シナプス可塑性を調節するユニークな分子である。

GluR や、その進化的な祖先である細菌のアミノ酸結合蛋白質においては、リガンド結合部位は非常によく保存されており、この部位は GluR δ 2 にも存在する。驚くべきことに、このリガンド結合予想配列を変異させた GluR δ 2 を、GluR δ 2 を欠損したプルキンエ細胞に導入したところ、GluR δ 2 欠損マウスの表現型が回復することを、私たちは最近明らかにした。これらのことから、GluR δ 2 の内因性リガンドは典型的なアミノ酸ではないことが明らかとなった。

GluR δ 2 は、プルキンエ細胞の遠位樹状突起のシナプス後膜に、非常に効率的に輸送される。このような効率的な輸送は、GluR δ 2 の C 末端部に、様々な分子が結合することにより成立していることを私たちは明らかにした。このような選択的輸送機構は GluR δ 2 に特異的なものではなく、他の伝達物質受容体においても機能している可能性がある。即ち、GluR δ 2 信号伝達経路や、その選択的輸送経路を解明することにより、他の GluR の細胞内トラフィッキングやシナプス可塑性機構の理解を大幅に進めることができるものと期待される。更に、小脳以外の脳においても、特に幼若時には GluR δ 2 の類似分子である GluR δ 1 が発現していることから、私たちの得た知見は更に普遍化できる可能性がある。

(3) 樹状突起スパイン形成におけるアクチン細胞骨格の役割 —ドレブリン依存的シナプス分子の集積とその神経活動依存性—

高橋 秀人 (群馬大学医学研究科・高次細胞機能学)

樹状突起スパインは、中枢神経系の興奮性シナプスの入力受容器であり、発生初期に多くみられる細長い樹状突起フィロポディアから形成されることがわかって

きた。さらに、スパインの形態がシナプス機能と関連していることも明らかになってきた。よって、発生過程におけるスパイン形成のメカニズムは、シナプス機能の発

現や可塑性に重要であると考えられる。スパインは、シナプス後肥厚部 (PSD) とアクチン細胞骨格の二つの主要な構造体でできている。最近、PSD-95 などの PSD 関連蛋白がスパイン形成に関与しているという報告が数多くなされた。その一方で、スパインの形態形成は PSD-95 のシナプス集積よりも早いという報告や、PSD-95 欠損マウスのスパイン構造は正常であるといった報告もあり、アクチン細胞骨格が優位にスパイン形成を支配している可能性が考えられる。

これまでに我々は、スパイン頭部の主要なアクチン結合蛋白であるドレブリンに関して、スパインのアクチンに作用しスパインの形態を制御していることや、シナプス形成期にアイソフォーム変換 (ドレブリン E→ドレブリン A) が生じることなどを明らかにしてきた。今回、ドレブリンによるスパインアクチン細胞骨格形成が、スパイン形成のメカニズムにおいて主導的立場にあること、さらに、ドレブリンのスパイン集積が神経活動依存的であることを明らかにしたので報告する。

1) ドレブリンは、樹状突起フィロポディアで F-アクチンとともに集積する。

低密度分散培養の海馬神経細胞を培養 7, 14, 21 日目で免疫染色し解析した結果、ドレブリンの集積は、シナプス前終末と接触したフィロポディア内で生じており、その部位には F-アクチンが必ず集積していた。アンチセンス法でドレブリン A(DA) の発現を抑えると、ドレブリンと F-アクチン両方のシナプス集積が抑制された。

2) PSD-95 のシナプス集積は、先行するドレブリンのシナプス集積により制御される。

培養 14 日目において、ドレブリンはシナプス結合を有するフィロポディアの 88% で集積していたのに対し、PSD-95 は 57% しか集積していなかった。一方、

シナプス結合を有するスパインでは、ドレブリン・PSD-95 とそれぞれ、87%, 90% と同等に高い率で集積していた。アンチセンス法で DA の発現を抑えると、PSD-95 のシナプス集積は阻害された。さらに、DA の発現を抑えたのち、GFP-DA の発現ベクターを導入して発現量を回復させたところ、GFP-DA の集積部位に一致して、PSD-95 のシナプス集積が再現された。

3) ドレブリンのスパイン集積は、AMPA および NMDA 受容体による二方向性制御を受ける。

GYKI52466 で AMPA 受容体活性を培養 7 日から 14 日目まで阻害すると、単位樹状突起長あたりのドレブリン集積数は減少した (control の 75%)。また、ドレブリンが瀰漫性に分布する未成熟なフィロポディア (diffuse-type filopodia) の割合が増加 (control: 23%→GYKI: 47%) し、スパインの割合が減少した (control: 52%→GYKI: 31%)。一方、APV で NMDA 受容体活性を同期間阻害すると、diffuse-type filopodia の割合が減り (control: 23%→APV: 17%), スパインの割合が増加した (control: 52%→APV: 72%)。ドレブリン集積を介したフィロポディアからスパインへの形態変化は、AMPA 受容体活性により促進し、NMDA 受容体活性により抑制されることがわかった。

これらの結果から、ドレブリンは、PSD 構造の形成に先立ち、シナプス後部の基盤構造であるスパインアクチン細胞骨格を形成すること、さらに、この過程が AMPA 及び NMDA 受容体により二方向に制御されていることが明らかとなった。このように、スパイン形態は、神経活動依存的に制御されるドレブリンの集積を介して可塑的に変化すると考えられる。ドレブリンによるスパイン形成機構は、スパインの形態異常が知られている精神疾患 (ダウン症、精神遅滞など) の病態解明にも結びつくと考えられる。

(4) 神経伝達を調節する Ca^{2+} 依存性の蛋白質間相互作用

五十嵐 道弘 (新潟大学・医歯学系・分子細胞機能学 (医学部生化学第二))

神経伝達の基盤は SNARE 機構によるシナプス小胞と形質膜の間の蛋白質間相互作用 (SNARE 複合体形成) である。この機構はそれ自体が細胞内小胞輸送の特殊形態であるため、伝達物質の放出が Ca^{2+} 依存性であるためには、さらに Ca^{2+} 濃度を検知する機構が必要となる。この

ような Ca^{2+} センサーのうち、もっともよく調べられているのは synaptotagmin ファミリーであるが、これらは十分高濃度の Ca^{2+} に対応し、膜融合の過程に直接関わる可能性が示唆される。一方、シナプス小胞のリサイクリングに関する Ca^{2+} 依存性の機構においては、少なくとも複数

の異なる Ca^{2+} 濃度要求性の過程があることが示唆されている。

われわれはこの点を明らかにするために、SNARE 機構の中核分子 syntaxin 1A に 10^{-6} M 程度の Ca^{2+} 依存性に結合する蛋白質を見出し、その結合の特性を解析した^{1),2)}。1 つは Ca^{2+} /カルモジュリン依存性蛋白質キナーゼ II (CaMKII) で、この結合は自己リン酸化した CaMKII のみに起こり、脱リン酸化と Ca^{2+} 濃度の低下によって結合は解離する可逆的な反応であった。この結合は、syntaxin の立体構造を閉状態から開状態に変換させ、SNARE 複合体を形成させる linker domain で起こり、CaMKII は syntaxin を開状態に固定する役割を有すると考えられる結果を得た。この結合を阻害すると開口放出の確率は半減したことから、syntaxin-CaMKII 複合体の形成が神経伝達の調節に寄与すると考えられる。

もう 1 つの結合蛋白質は小胞のアクチン依存性モーター分子 myosin-V であった。ミオシン V は $\text{pCa} \leq 6.6$ で syntaxin の H3 domain (SNARE 蛋白質の結合部位) に結合した。この結合はミオシン V が通常、膜蛋白質と相互作用をする globular tail domain はまったく関与せず、軽鎖 (大部分が CaM) が結合して運動性を調節する neck

部分で生ずることを、分子生物学的手法ならびに AFM (原子間力顕微鏡) 等による可視化で明らかにした。ミオシン V は Ca^{2+} 依存性にカルモジュリンを解離する性質を持っているが、われわれはこの解離にリンクして、syntaxin が neck 部分に結合することを突き止めた。この結合はミオシン V の運動性には影響しないが、ATPase の Ca^{2+} 依存性増大を抑制した。この結合を neck 部分に対する抗体や競合阻害ペプチドで阻害すると、伝達物質放出が阻害されたことから、内因性のミオシン V-syntaxin 複合体の寄与が明らかとなった。小胞と膜に SNARE 複合体が形成される前に tethering という段階が想定されており、ミオシン V と syntaxin の結合はこの過程に関与するものと考えている。

以上の結果に基づき、CaMKII とミオシン V は、それぞれ CaM 結合蛋白質である (CaM 結合部位は異なる) ことから、神経伝達に関与する小胞リサイクリングにおいて CaM の Ca^{2+} 感受性が何がしかの寄与を果たしている可能性が考えられる。

(文献)

1) Ohyama A et al. (2002) *J Neurosci* **22**: 3342-3351

2) Watanabe M et al., submitte

(5) シナプス刺激依存的な局所的翻訳における新規タンパク質 RNG105 の機能解析

椎名 伸之 (国立遺伝学研究所・構造遺伝学センター)

中枢神経細胞において、mRNA が樹状突起へ輸送されることが知られている。これら mRNA はシナプス可塑性に関与するタンパク質をコードしており、これらがシナプス刺激依存的に局所的に翻訳されることが、個々のシナプスの長期増強に必要であり、また記憶や学習に必須のメカニズムであることが明らかになってきた。mRNA の樹状突起への輸送と局所的タンパク合成の制御には、RNA granule と呼ばれる macromolecular な複合体が中心的な役割を担っている。

我々は、海馬および大脳新皮質神経細胞における RNA granule の新規構成タンパク質として RNG105 (RNA granule protein 105) を同定した。RNG105 は RNA 結合モチーフをもち、直接 mRNA に結合する活性をもつことを明らかにした。RNG105 が局在する RNA granule には、シナプス可塑性に必須の役割を果たす CaM キナ

ーゼ II α , BDNF, TrkB などの mRNA が局在していることも明らかにした。また、培養細胞での大量発現実験により、RNG105 が *in vivo* で翻訳を抑制する活性をもつことを見いだした。この活性は、RNA granule がシナプス刺激のない条件下で翻訳静止状態であるという結果とよく一致した。さらに、シナプス刺激 (BDNF 刺激) によって RNG105 が mRNA および RNA granule から解離することを見いだした。この解離は、RNA granule 近傍での局所的タンパク合成の活性化と密接に関連していた。以上の結果から、RNG105 は樹状突起内を輸送中の RNA granule においてタンパク合成を抑制し、シナプス付近に到達すると刺激依存的に mRNA および RNA granule から解離し、その結果個々のシナプスにおける局所的タンパク合成が起こる、というモデルを考えている。

現在、マウスの脳から、RNG105 に直接結合する mRNA

の同定をマイクロアレイ解析により網羅的にこなっている。また、RNG105 のノックアウトマウスを作成中

である。これらの解析の経過についても紹介したい。

(6) NMDA 受容体のヘテロオリゴメリゼーションとシナプス局在制御

深谷 昌弘, 渡辺 雅彦

(北海道大学大学院医学研究科解剖発生学分野)

NMDA 型グルタミン酸受容体 (NMDA 受容体) は、中枢神経系におけるシナプス可塑性を基盤としたシナプス回路発達や高次脳機能発現において中心的な役割を果たしている。この受容体の機能発現には、必須サブユニットの NR1 (GluR ζ 1) と調節サブユニットの NR2A-D (GluR ϵ 1-4) からなるヘテロメリック複合体形成が不可欠である。本研究では、NMDA 受容体のチャネル形成からシナプス発現に至る過程におけるそれぞれのサブユニットの役割に焦点をあて、それぞれのサブユニット欠損下での他方のサブユニットの細胞発現と細胞内局在を分子組織化学的、生化学的に解析した。

その結果、海馬 CA1 特異的 NR1 ノックアウトマウスの解析から、NR1 欠損錐体細胞では、NR2A, 2B サブユニット mRNA の発現量は影響を受けないが、NR2A, 2B サブユニットともにシナプスから消失し、錐体細胞の細胞体に集積することが明らかとなった。細胞体に集積した NR2 サブユニットは、膜タンパクの翻訳装置である粗面小胞体内腔の顆粒 (intracisternal granule) として集積していた。この結果は、NR2 単独では樹状突起へ輸送されず、NR1 サブユニットとの小胞膜上での複合体形成

が必要であることを示している。次に、NR2A/2C ダブルノックアウトの小脳顆粒細胞での解析から、NR2 サブユニット欠損顆粒細胞では、NR1 サブユニットの細胞体貯留は認められなかったが、NR1 サブユニットの C 末端のスプライシングカセット (C2, C2') に関係なくシナプス発現が消失していることが明らかとなった。また、NR2 サブユニット欠損下での NR1 サブユニットの各スプライシングカセット (C1, C2, C2') の定量的な生化学的解析を行ったところ、PSD 分画での減少量をもっとも顕著であり、細胞内膜系に存在することが示された。この結果は、NR1 サブユニット単独でも樹状突起へ輸送されるが、シナプス局在には NR2 サブユニットが必要であることを示している。

以上の結果より、NMDA 受容体にとって NR1 サブユニットの存在は小胞膜・ゴルジ装置・樹状突起の輸送段階に必須であり、NR2 サブユニットの存在はシナプス局在の段階に必須であることが明らかとなった。このように、NMDA 受容体は異なる局在制御能を持ったサブユニットがヘテロメリック複合体を形成することで精緻にシナプスへ輸送され、機能発現できるのである。

(7) プロスタノイド受容体によるストレス行動制御

古屋敷 智之¹, 松岡 陽子¹, 溝口 明², 鍋島 俊隆³, 成宮 周¹

(¹ 京都大医神経・細胞薬理, ² 三重大医第一解剖, ³ 名古屋大薬剤部)

恒常性の破綻は動物にストレスを惹起する。ストレスは内分泌反応や交感神経系の活性化といった生理的变化とともに攻撃性の亢進や逃避行動など行動変化も引き起し、これをストレス反応と呼ぶ。ストレス反応は損傷や疾病などの物理的な要因によっても新しい社会や環境への暴露など心理的な要因によっても誘導される。ストレ

ス反応は適応的なメカニズムであり、その制御の破綻はストレス障害を引き起こす。これまでストレス反応やストレス障害にモノアミンや神経ペプチド、ステロイドといった複数の脳内物質の関与が示唆されてきたが、それらの物質の変化を統合するメカニズムはまだ知られていない。

我々はプロスタノイド受容体のストレス反応における

役割を研究してきた。プロスタノイドはアラキドン酸より産生される脂質メディエーターであり、その一つであるプロスタグランジン (PG)E₂ は疾病に伴う発熱や内分泌反応における関与が示唆されてきた。我々は PGE₂ の4種の受容体である EP1-EP4 の各種欠損マウスを作成し、それら受容体のストレス反応における役割を解析してきた。その結果、細菌内毒素である LPS による発熱反応に EP3 が、ACTH 分泌には EP1 と EP3 の両方が関与していることが示された。これらの生理的なストレス反応に加え、EP1 欠損マウスでは社会ストレス・環境ストレスといった心理的ストレスに対する行動にも異常が観察された。すなわち EP1 欠損マウスでは社会行動が減弱し攻撃性が亢進する。また音に対する驚愕反応の亢進や断崖回避反応の異常など環境変化に対する行動にも異常が観察された。神経生化学的な解析では EP1 欠損マウスの前脳・線条体においてドパミン代謝が亢進し、脳微小還流法により EP1 欠損マウスの線条体において細胞外ドパミン濃度が上昇していることが示唆された。さらに、ド

パミン受容体の阻害薬により EP1 欠損マウスの攻撃性や音に対する驚愕反応の亢進が改善した。これらの結果は、EP1 欠損マウスのストレス行動異常がドパミン系の活性亢進によることを示唆している。

以上の知見は、PGE₂ が発熱・内分泌反応といった生理的反応に加え、心理的ストレスに対する行動変化にも重要であることを示している。それでは PGE₂ はどのように多彩なストレス反応を制御するのであろうか。免疫染色を行ったところ、EP1 は視床下部・扁桃体・中脳黒質のシナプスに存在し、特に視床下部の CRH 陽性細胞や黒質のドパミン細胞上のシナプス終末にも発現が確認された。これらの結果から、PGE₂ が EP1 を介してさまざまな脳部位のシナプス伝達を制御し、複数のストレス反応を統合している可能性が示唆される。面白いことに、ACTH 分泌異常や行動異常はストレス障害の一つである PTSD の患者にも共通して認められる。プロスタノイド受容体がストレス障害克服の新たなターゲットとなる可能性について議論する。

(8) 統合失調症責任候補遺伝子 DISC1 と神経発達

尾関 祐二 (滋賀医科大学 精神医学講座)

統合失調症の遺伝学的研究 (連鎖研究, 相関研究) により、最近ようやくいくつかの統合失調症感受性候補遺伝子が挙げられるようになってきた。しかしそれらの多くの遺伝子に対する直接的障害、すなわち genetic variation と疾患の発症に明確な関連性は見出されていない。一方、DISC1 (Disrupted-In-Schizophrenia-1) は遺伝子内の直接的な障害が精神疾患の発症と連鎖することが示されている遺伝子であり、現在の精神疾患研究においては、変異遺伝子、変異蛋白から病態研究に結びつきうる唯一といってもよい貴重な窓口である。

DISC1 は、スコットランドにおける精神疾患多発家系で世代を経て受け継がれていた t(1;11) (q42.1;q14.3) 直接的に障害を受ける1番染色体上の未知の遺伝子として報告された。DISC1 タンパクは、その染色体転座によって全854アミノ酸のうちC末端側257アミノ酸を失う。この転座を持つ37人中29人で統合失調症や躁うつ病といった精神疾患 (major mental illnesses) が発病しているのに対し、転座を持たない38人中では精神疾患を1例も認め

ない。その後、独立した複数の研究グループが、連鎖解析と相関研究により、スコットランド家系以外の統合失調症においても DISC1 が重要であることを示してきている。

我々は DISC1 の機能を明らかにすることが、統合失調症の分子レベルでの病態生理を知る大きな手がかりになると考え、その解析を行った。以下に我々の研究を御紹介する。

DISC1 蛋白は、中枢神経系、特に神経発達時期に強く発現している。DISC1 は発見時には機能未知とされていたが、我々は、神経細胞の遊走に重要な NUDEL, LIS1 や、後シナプスにあつてその形態やグルタミンレセプターの働きと関連する CITRON と相互作用することが主に yeast two-hybrid 法などで見いだされた。我々のデータは、DISC1 が NUDEL, LIS1 などと共にダイニン系を通した微小管構築の調節に重要であることを示している。

【スコットランド家系で見いだされた変異 DISC1】DISC1 同士は直接結合し、特に変異 DISC1 も正常 DISC1 に結合できる。この結果として、変異 DISC1 は正常 DISC1 の細胞

内局在を変化させてしまい、それは正常 DISC1 の機能の喪失につながる。すなわち、変異 DISC1 は dominant negative として働きうることがわかった。

【培養細胞を用いた機能解析】 ダイニン系を通した微小管構築の調節を細胞レベルで評価するために、我々は PC12 細胞における突起伸長を用いた。内在性 DISC1 の発現はその突起伸長時に増強する。正常 DISC1 をさらに発現させるとダイニンが MTOC にさらに集中し、DISC1 が突起伸長傾向に微小管のダイナミクスを調節することが示唆される。これを RNAi で抑制すると突起伸長はおさえられる。一方、スコットランド変異 DISC1 の強制発現もこの突起伸長をおさえる。これらの結果は、DISC1 のダイニン系を通した微小管構築の調節にかかわり、かつ変異 DISC1 が dominant negative としての形質を作りうることを示している。

【動物モデルを用いた機能解析】 統合失調症で最も重要な病理は、大脳皮質構築の小さいが確実に起こっている乱れであり、これは神経発達期におこった結果を反映するものだろう、と考えられている。しかしこうした神経病理のコンセンサスがあるのもかわらず、その分子機構はこれまで全く明かでなかった。

一方、ダイニン系を通した微小管構築の調節は、大脳皮質構築、特に神経細胞の遊走、基礎的なシナプス構築時に必須の役割をはたす。従って、我々は統合失調症の遺伝的モデルである DISC1 の機能を大脳皮質構築に注目

して、in utero gene transfer 法を用いて検討した。

RNAi をうちこむことで DISC1 レベルを抑制すると、神経細胞遊走、配置に異常が認められた。DISC1 を抑制できる多種類の RNAi を使う事で、DISC1 抑制レベルと病理との関連を検討したところ、dose dependent な影響が認められた。スコットランド変異 DISC1 の強制発現は、DISC1 が大変マイルドに抑制された場合に一致する病理であり、それは、これまで統合失調症の神経病理で報告されてきた剖検脳の異常の本質に合致するものであった。

すなわち、DISC1 のダイニン系を通した微小管構築の調節、変異 DISC1 の dominant negative としての機能を支持する結果を、さらにはそれらが統合失調症の神経病理を説明しうる示唆的結果も得た。

【結論】 統合失調症の遺伝的モデルである DISC1 の機能解析は、この異常が神経病理のコンセンサスに合致する結果をもたらしうる事を支持した。さらにはスコットランド変異 DISC1 が dominant negative として機能することがわかったことにより、DISC1 の loss of function につながりうる種々の異常（多くは SNP などによるマイルドな影響だろう）が、ユニークな家系での統合失調症だけでなく、一般の統合失調症の危険因子として働きうることを示唆している。

なお本研究はジョンスホプキンス大学精神医学部門・神経科学部門、澤明をメインに、ロックフェラー大学 Hatten 研究室、慶応大学 仲嶋研究室の共同で行われている。

(9) シグナル伝達と統合失調症

宮川 剛 (京都大学医学研究科 先端領域融合医学研究機構)

要旨：演者は、これまで、各種遺伝子改変マウスに対して、幅広い領域をカバーした行動テストバッテリーを行うことにより、各種遺伝子の新規機能を見出してきた。最近、マサチューセッツ工科大学の利根川進博士らとの共同研究によって、この行動テストバッテリー戦略を用いることにより、カルシニューリン (CN) の前脳特異的ノックアウトマウスが顕著な作業記憶の障害、注意の障害、社会的行動の障害などを含む統合失調症様の行動異常を示すことを見だし (Zeng et al.,2001; Miyakawa et al., 2003), さらに、統合失調症患者のゲノム DNA サンプルを用いた相関解析により CN の遺伝子が統合失調症

と強く相関していることも報告した (Gerber et al., 2003)。これらの知見に基づき、演者らは CN が関与するシグナル伝達機構の異常が統合失調症の発症メカニズムに決定的な役割を果たしているであろうことを初めて提唱した。CN はドーパミン受容体や NMDA 受容体の下流に位置しており、統合失調症の CN 仮説は、ドーパミン仮説や NMDA 受容体仮説と高い整合性を持つ。CN ミュータントマウスでは、海馬錐体細胞の樹状突起の長さが短く、数も少ないなど、統合失調症の神経発達障害仮説ともよく一致している。さらに、統合失調症患者の免疫系の異常、心臓疾患による高い突然死率、糖尿病の高い罹患

率, リウマチの低い罹患率など従来の仮説では説明がつかなかった現象までうまく説明することもできる。シグナル伝達分子であるカルシニューリンについては, 既に多くの知見が蓄積されている。これらの知見と統合失調症をシグナル伝達機構の異常ととらえる作業仮説にもとづき, 遺伝子改変マウスと行動テストバッテリーを利用することによって, 今後どのようにして統合失調症の発症メカニズムを解明していくかについての演者の研究戦略も紹介する。

参考文献

Zeng, H., Chattarji, S., Barbarosie, M., Rondi-Reig, L., Philpot, B.D., Miyakawa, T., Bear, M.F. Tonegawa, S., Forebrain-specific calcineurin knockout selectively impairs bidirectional synaptic plasticity and working/episodic-like memory, *Cell* **107** (2001) 617-629.

Miyakawa, T., Leiter, L., Seeger, T., Gerber, D.J., Gainetdinov,

R.R., Sotnikova, T.D., Zeng, H., Caron, M.G., Tonegawa, S., Conditional Calcineurin Knockout Mice Exhibit multiple abnormal behaviors related to schizophrenia, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100** (2003) 8987-92.

Gerber, D. J., Hall, D., Miyakawa, T., Demars, S., Gogos, J. A., Karayiorgou, M. Tonegawa, S., Support for association of schizophrenia with genetic variation in the 8p21.3 gene, PPP2CC, encoding the calcineurin gamma subunit *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100** (2003) 8993-8.

Adler E.M., A signal deficit in schizophrenia? *Science* 301(2003) 737 (in Editors' Choice: Highlights of the recent literature)

Manji, H.K., Gottesman, I.I., Gould, T.D., Signal transduction and genes-to-behaviors pathways in psychiatric diseases, *Science's STKE* **207** (2003) pe49

(10) 幻覚・妄想状態の発症・再発モデルとしての長期持続性行動感作現象の分子機構

西川 徹 (東京医科歯科大学)

行動感作現象 (behavioral sensitization: 逆耐性現象 (reverse tolerance))は, アンフェタミン類 (覚醒剤)・コカインに代表される中枢刺激薬を単回または反復使用した後に, 長期間にわたって, これらの薬物に対する感受性が亢進し, 行動の異常や統合失調症様の幻覚・妄想状態が生じやすくなる変化をさす。行動感作が成立した動物およびヒトは, 使用した薬物以外の中枢刺激薬やストレスに対しても過敏になることや, 断薬後における薬物またはその代謝産物の長期持続する脳内蓄積を示さないことなどから, この現象は脳の可塑的变化と関係があると推測されている。また, 一群の統合失調症では中枢刺激薬やストレスによって幻覚・妄想状態が容易に再燃することから, 行動感作現象の分子機構の解明により, 統合失調症の発症や再燃の神経機序の解明や予防・治療法開発につながる可能性がある。

私たちは, 1) 中枢刺激薬による統合失調症様の症状は児童期には出現し難い, 2) 実験動物でも行動感作現象は一定の発達時期以降に成立する, などの現象に注目し, ラット脳において行動感作現象に関連する神経回路および遺伝子を探索している。すなわち, ラット脳において生後発達に伴って中枢刺激薬に対する反応が変化する脳

部位を調べ, そこで発達依存的応答変化を示す遺伝子を検索した。

生後 8~56 日令のラットに覚醒剤 (methamphetamine (MAP)) を投与し, 神経活動の指標である c-fos 遺伝子産物 (c-Fos) の前脳部における発現を調べたところ, 発達に伴う分布パターンの変化が認められた。この変化は, 大脳新皮質と線条体で著しく, 他の部位では目立たなかった。また, 行動感作が成立するようになる生後 3 週頃に成熟期のパターンに移行することがわかった。また, 可塑性関連遺伝子のひとつである tissue type plasminogen activator mRNA の発現を検討し, MAP その他の行動感作を誘導する薬物の急性投与後に, 帯状回から線条体内側部に投射するニューロンの一群の細胞体に発現誘導が生ずることが観察された。これらの所見は, 大脳新皮質や線条体が行動感作に関連した神経回路を含むことを示唆している。そこで, 大脳新皮質において MAP に対する応答が生後 8 日令では見られないが生後 56 日令では発現が変化する遺伝子をスクリーニングし, 新規転写産物 mrt1 (MAP responsive transcript 1) を検出した。mrt1 について, 1) Mrt1 蛋白は PDZ および PX ドメインをもつ, 2) MAP によって発現が増加するバリエーションはシナプ

トゾーム画分に存在する Mrt1 イソフォームをコードしている, 3) 生後 3 週以降に MAP への応答が出現する, 4) 成熟期では, コカインにも応答し, MAP 投与後の発現誘導は行動感作形成を阻害する D1 ドーパミン受容体

遮断薬で抑制される, などの特徴が明らかになった。以上の結果から, mrt1 は行動感作の形成に関与する神経回路内の分子カスケードを構成している可能性が示唆された。

(11) 脆弱 X 遺伝子 FMR1 は RNAi/miRNA 分子経路に関与する？

岡村 勝友 (徳島大学ゲノム機能研究センター)

脆弱 X 症候群は精神遅滞を伴う遺伝病であり, その発症は FMR1 遺伝子の機能喪失による。FMR1 蛋白質は, RNA 結合蛋白質であり, ある一群の mRNA の発現を翻訳レベルで調節していると考えられているが, その詳細な機能は不明である。我々はショウジョウバエをモデル生物として用い, FMR1 蛋白質の機能の解明を試みている。

我々はこれまでにショウジョウバエ FMR1 (dFMR1) 欠損ショウジョウバエを作成し, dFMR1 変異体で概日リズムの異常を見いだしており, ショウジョウバエにおいても dFMR1 が脳神経系の機能に重要な働きを持っていると考えられる。さらに dFMR1 蛋白質の生化学的な解析により, dFMR1 蛋白質が RNA interference (RNAi) 関連因

子と共沈降することを明らかにしてきた。このことから dFMR1 が, RNAi 経路やその類似機構として最近発見された microRNA (miRNA) 経路に代表される小分子 RNA による遺伝子発現制御機構に関わっているのではないかと考え, 解析を行っている。現在までに dFMR1 蛋白質と共沈降する RNAi 必須因子の一つである Argonaute2 (AGO2) 欠損ショウジョウバエを作成し, RNAi 経路における機能, 脳神経系での機能, dFMR1 との相互作用について検討を行っている。小分子 RNA による遺伝子発現制御機構が脳神経系においてどのように機能しているか, またこれらの系に FMR1 蛋白質がどのように関わっているのか, これまでの解析結果を中心に報告したい。

8. 痛み情報伝達における ATP およびアデノシンの生理機能

2004 年 8 月 26 日－8 月 27 日

代表・世話人：井上 和秀（国立医薬品食品衛生研究所，九大・院・薬学）

所内対応者：井本 敬二（神経シグナル）

- (1) 青斑核 P2X₃ 受容体を介した痛覚抑制機構
南雅文，福井真人，中川貴之，金子周司，佐藤公道（京大院・薬・生体機能解析学）
- (2) 神経因性慢性疼痛による扁桃体シナプスの可塑的变化
池田亮^{1,2}，藤井克之¹，加藤総夫²（慈恵医大・¹整形外科，²神経生理）
- (3) 神経因性疼痛モデルにおけるグリア細胞の活性化様式
津田誠¹，国房恵美子¹，小泉修一²，井上和秀^{1,3}
（国立衛研・¹代謝生化学，²薬理，³九大・院・薬・分子制御）
- (4) 脊髄後角シナプス後細胞に発現する P2X 受容体の機能意義
塩川浩輝¹，中塚映政²，古江秀昌¹，吉村恵¹
（¹九州大・医・統合生理学，²佐賀大・医・神経生理）
- (5) ラット脊髄後角の痛覚情報伝達に及ぼすアデノシンのシナプス前性および後性作用
柳涛，楊鯤，勞力軍，藤田亜美，中塚映政，熊本栄一（佐賀大・医・神経生理）
- (6) 実験的脊髄損傷後疼痛に対するアデノシンの効果
尾形直則，森野忠夫，堀内秀樹，濱本雄一郎，山本晴康（愛媛大・医・整形外科）
- (7) ラットアジュバンド関節炎モデルにおける Adenosine Deaminase (ADA) インヒビターの効果
中町祐司¹，小柴賢洋¹，小坂英和¹，辻剛¹，関信男²，黒坂昌弘³，熊谷俊一¹
（神戸大・院医・¹臨床病態免疫，³運動機能，²藤沢薬品探索研究所）
- (8) ATP release and activation of maxi-anion channel in rat cardiomyocytes in hypotonic, ischemic or hypoxic conditions
Amal K. Dutta, Ravshan Z. Sabirov, Hiromi Uramoto and Yasunobu Okada（生理研・機能協関）
- (9) 膀胱上皮における ATP 放出機構について－TRPV1 欠損マウスを用いた検討－
中村靖夫¹，Lori A. Birder²，Michael J. Caterina³，河谷正仁¹，William C. de Groat²
（¹秋田大・医・機能制御医学，²Dept. of Pharmacol., Univ. of Pittsburgh Sch. of Med.,
³Dept. of Biological Chemistry and Neuroscience, Johns Hopkins Univ. Sch. of Med.）
- (10) 自身の発現密度に依存する ATP 受容体 P2X₂ の性質の変化
藤原祐一郎，久保義弘（生理研・神経機能素子）
- (11) マウス網膜コリン作動性アマクリン細胞の P2X₂ 受容体応答
金田誠¹，石井勝好²，森島陽介³，赤木巧²，山崎泰広²，中西重忠³，端川勉²
（¹慶應大・医・生理，²理研・脳センター・神経構築，³京大・院医・生体情報科学）
- (12) 海馬ネットワーク興奮性制御における介在ニューロン P2Y₁ 受容体の役割とその機構
川村将仁¹，加藤総夫²（¹慈恵医大・薬理 1，²神経生理）
- (13) 表皮の P2X 受容体と皮膚バリアー再生の関係
傳田光洋，藤原重良，井上かおり（資生堂ライフサイエンス研究センター）
- (14) 脂肪細胞における P2Y 受容体の機能
尾松万里子，松浦博（滋賀医大・第 2 生理）
- (15) α,β -methyleneATP はウサギ脳底動脈の UTP 収縮を増強する
宮城靖¹，佐々木富男¹，John Zhang²（¹九大・医・脳外，²ミシシッピ大学・脳外）

- (16) ラット培養マイクログリアからのフリーラジカル・サイトカイン放出に対する ATP の効果
森野忠夫, 尾形直則, 堀内秀樹, 濱本雄一郎, 山本晴康 (愛媛大・医・整形外科)
- (17) 脳スライス培養系での ATP_γS による MCP-1 産生誘導機構に関する検討
片山貴博, 伊藤美聖, 神谷明裕, 山崎裕子, 金子周司, 佐藤公道, 南雅文
(京都大・薬・生体機能解析)
- (18) アデノシンは濃度依存性にヒト単球由来樹状細胞の分化を抑制する
小柴賢洋, 中町祐司, 中澤隆, 辻剛, 熊谷俊一 (神戸大学臨床病態・免疫学)
- (19) ATP によるアストロサイトの酸化ストレスからの細胞保護作用
篠崎陽一^{1,3}, 小泉修一², 井上和秀^{1,3}
(国立衛研・¹代謝生化学, ²薬理, ³九大・院・薬・分子制御)
- (P 1) 頭痛と脳血管径調節能
山田真久 (理研・脳科学・山田ユニット)
- (P 2) 末梢神経傷害モデルラットにおける DRG 神経細胞の P2X 受容体に対する noradrenaline の作用
圓尾圭史², 足立克², 山本悟史¹, 立石博臣², 西崎知之¹
(¹兵庫医大・医・生理学第2, ²整形外科学)
- (P 3) ラット脊髄・後根神経節・交感神経節における Adenosine 受容体 mRNA の発現と坐骨神経切断後の変化
小林希実子, 福岡哲男, 山中博樹, 野口光一 (兵庫医科大学・解剖2)
- (P 4) P2X₇ 受容体活性化による細胞死の誘導に小孔の形成は必要か?
月本光俊, 原田均, 五十里彰, 高木邦明 (静岡県立大・薬)
- (P 5) 孤束核シナプス伝達制御におけるアデノシン受容体の下流機構: Ca channel is all?
繁富英治¹, 山崎弘二¹, 西田基宏², 森泰生³, 加藤総夫¹
(¹慈恵医大・神経生理, ²九州大院・薬・薬物中毒, ³京都大院・工・合成・生物化学・分子生物化学)
- (P 6) MNTB ニューロンにおける内因性の ATP による抑制性シナプス後電流の制御
綿野智一, 松岡功, 木村純子 (福島医大・医・薬理)
- (P 7) ATP による血管周皮細胞ペリサイトーアストロサイト連関
小泉修一¹, 藤下加代子², 井上和秀^{2,3}
(国立衛研・¹薬理, ²代謝生化学, ³九大・院・薬・分子制御)
- (P 8) 脳スライス細胞外 ATP の可視化
加藤総夫, 川村将仁, 繁富英治 (慈恵医大・神経生理)
- (P 9) アデノシンによる MDCK 細胞からの ATP 放出とそのシグナリング
右田啓介, 趙玉梅, 桂木猛 (福岡大・医・薬理)
- (P10) ラット脳視床下部スライス標本の細胞外 ATP におよぼす UTP の作用
小野委成, 松岡功 (福島医大・医・薬理)
- (P11) 細胞外マトリックスとマイクログリアの P2 受容体
国房恵巳子¹, 多田薫², 小泉修一², 津田誠¹, 井上和秀^{1,3}
(国立衛研・¹代謝生化学, ²薬理, ³九大・院・薬・分子制御)
- (P12) ATP 受容体および新規 α7 ニコチン性アセチルコリン受容体によるマイクログリアの活性制御
鈴木智久, 松原明代, 秀和泉, 仲田義啓 (広島大・院・薬効解析)
- (P13) β1 インテグリンを介するマイクログリアの増殖・ケモタキシスと P2Y₁₂ 受容体
多田薫¹, 小泉修一¹, 井上和秀^{2,3}
(国立衛研・¹薬理, ²代謝生化学, ³九大・院・薬・分子制御)

(P14) P2Y₆受容体活性化によるミクログリア細胞のファゴサイトーシス能の増大重本-最上由香里¹, 小泉修一², 多田薫², 津田誠¹, 井上和秀^{1,3}(国立衛研・¹代謝生化学, ²薬理, ³九大・院・薬・分子制御)(P15) アデノシン A_{2A}受容体と P2Y 受容体のヘテロダイマー形成

小柳洸志, 津賀浩史, 神谷敏夫, 中田裕康 (東京都神経研・生態機能分子)

(P16) アデニル酸シクラーゼの内因性阻害物質 3'-AMP の産生酵素の生体内分布

藤森廣幸, 芳生秀光 (摂南大・薬・衛生分析化学)

(P17) マウス味蕾細胞基底膜の ATP 受容体分布

早戸亮太郎, 吉井清哲 (九州工大・院・生命体・脳情報)

(P18) レチノイン酸による皮膚 P2Y₂受容体の発現制御藤下加代子¹, 小泉修一², 井上和秀^{1,3}(国立衛研・¹代謝生化学, ²薬理, ³九大・院・薬・分子制御)

(P19) ATP による大腸癌細胞の増殖抑制作用の検討

西藤勝, 山本悟史, 西崎知之 (兵庫医科大学・医・生理学第2)

【参加者名】

井上 和秀 (国立衛研, 九大・院・薬), 中村 靖夫 (秋田大・医), 松岡 功, 小野 委成, 綿野 智一 (福島医大), 加藤 総夫, 池田 亮, 繁富 英治, 川村 将仁, 河野 優, 山本 清文, 安井 豊 (慈恵医大), 津田 誠, 最上 由香里, 藤下 加代子, 篠崎 陽一, 戸崎 秀俊, 國房 恵巳子, 長谷川 茂雄, 小泉 修一, 多田 薫 (国立衛研), 小柳 洸志, 津賀 浩史, 中田 裕康 (東京都神経研), 山田 真久 (理研・脳科学), 金田 誠 (慶応大・医), 傳田 光洋 (資生堂ライフサイエンス研), 早乙女 秀雄 (Wyeth Discovery Research), 鈴木 隆一郎 (医療福祉システム研究所), 月本 光俊, 原田 均 (静岡県立大・薬), 篠田雅路, 水村和枝, 肥田朋子, 田口徹 (名大・環研), 平田 洋子 (岐阜大), 山下 勝幸 (奈良医大), 松浦 博, 尾松 万里子 (滋

賀医大), 南 雅文, 片山 貴博 (京大・薬), 市川 純 (関西医大), 藤森 廣幸 (摂南大・薬), 小柴 賢洋, 中町 祐司 (神戸大学・医), 野口 光一, 西崎 知之, 山本 悟史, 西藤 勝, 圓尾 圭史 (兵庫医大・医), 仲田 義啓, 秀 和泉, 鈴木 智久 (広島大・院・薬), 尾形 直則, 森野 忠夫 (愛媛大・医), 吉村 恵, 塩川 浩輝, 宮城 靖 (九大・医), 早戸 亮太郎 (九工大・院・生命体), 桂木 猛, 右田 啓介 (福岡大・医), 熊本 栄一, 中塚 映政, 藤田 亜美 (佐賀大・医), 富永 真琴 (岡崎統合バイオ), 岡田 泰伸, Ravshan SABIROV, Amal Kumar DUTTA, 温井 美帆, 藤原祐一郎, 立山 充, 久保義弘, 西巻 拓也, 和気 弘明, 岩井 博正, 加勢 大輔, 佐竹 伸一郎, 東 智弘, 井本敬二 (生理研)

【概要】

近年著しい発展が認められる ATP およびアデノシン受容体を介する痛み情報伝達解明に関連して, 我が国でも国際的なリーダーシップをとれる質を備えた研究がなされており, 2003 年でも Nature (Tsuda et al.), PNAS (Koizumi et al.) あるいは J. Neuroscience (Moriyama et al.) などの一流国際誌に優れた報告が数多く認められ, その隆盛ぶりがうかがい知れる。また, アデノシン (ATP 製剤として) を鎮痛薬として臨床使用するグループも現れた。そこで,

このような優れた研究成果をあげられている研究グループを一堂に会して, 情報交換を密にし, 一気に研究レベルを高めることができれば, 我が国のこの分野への国際貢献に資することができると考えた。

具体的には, 中枢・末梢での痛み情報伝達に関する基礎研究, および関連する臨床知見, そして情報伝達メカニズム解明に寄与しうる基礎研究の発表と討論で構成した。

(1) 青斑核 P2X₃受容体を介した痛覚抑制機構

南雅文, 福井真人, 中川貴之, 金子周司, 佐藤公道
(京大・院・薬・生体機能解析学)

我々はこれまでに, ATP および α,β -meATP (1 - 30 nmol), Bz-ATP (1 - 30 nmol) の側脳室内投与により, 一過性の機械的侵害受容閾値の上昇が惹起されること, この α,β -meATP による侵害受容閾値上昇は, β アドレナリン受容体拮抗薬 propranolol (10 mg / kg) の皮下への前処置, さらに β 2アドレナリン受容体拮抗薬 butoxamine (100 nmol) および ICI-118551 (100 nmol) の側脳室への前投与により有意に抑制されることを報告し, 脳内 P2X 受容体を介してアドレナリン (NA) 神経系を活性化させることによる中枢性痛覚抑制機構が存在する可能性を示してきた。今回は, α,β -meATP の作用点および作用機構を明らかにすることを目的として研究を行った。

青斑核由来の NA 神経を比較的選択的に破壊する神経毒 DSP-4 を腹腔内に前処置すると, α,β -meATP による鎮痛作用は有意に減弱された。さらに, α,β -meATP の両側青斑核への微量投与は, i.c.v. 投与の場合よりも低用量 (0.2, 2 nmol) において, 有意かつ顕著な鎮痛作用を惹起した。またその鎮痛作用は, P2X 受容体拮抗薬 PPADS (1 nmol) の青斑核内への同時投与により有意に拮抗された。

次に, 青斑核内での作用機構を明らかにするために, 青斑核におけるグルタミン酸およびその受容体の関与を検討した。In vivo マイクロダイアリス法により測定した青斑核における細胞外グルタミン酸量は, 灌流液中への α,β -meATP (500 μ M) 適用によって有意に増加した。また, α,β -meATP (2 nmol) の両側青斑核への微量投与による鎮痛作用は, NMDA 受容体拮抗薬 MK-801 (2, 20 nmol) の同時投与により有意に抑制されたが, AMPA/kainate 受容体拮抗薬 CNQX (20 nmol) によつては影響を受けなかった。これらの結果から, 脳内 P2X 受容体を介した鎮痛作用には, 青斑核内における P2X 受容体刺激を介したグルタミン酸遊離とそれによる NMDA 受容体の活性化が関与していることが示唆された。さらに, P2X₃ 受容体拮抗薬 A-317491 (1 nmol) の側脳室内投与により, ホルマリンのラット足底内注射により惹起される疼痛行動, および酢酸の腹腔内注射により惹起されるライジング行動が共に有意に増加したことから, 内在性の ATP が脳内において, 侵害受容に対して抑制的に機能している可能性が示された。

(2) 神経因性慢性疼痛による扁桃体シナプスの可塑的变化

池田 亮^{1,2}, 藤井 克之¹, 加藤 総夫²

(¹ 東京慈恵会医科大学 整形外科学講座, ² 神経生理学研究室)

神経因性疼痛は, 灼熱痛, 発汗異常, 血管運動障害とともに, 非侵害性刺激によって誘発される痛覚過敏状態 (異痛症) を生じる。このような疼痛に対する有効な治療法はなく, 理学療法, 投薬, 精神科的治療などの対症療法が中心となっている。治療に難渋する原因として, 損傷部位での組織的变化と主訴としての痛覚症状の発現に隔たりがあるなどの複雑な疼痛感覚形成機構の関与があげられる。他の感覚性入力と異なり, 疼痛は特異的な「不快感・嫌悪感」を個体に生じさせるため, その成立には中枢神経系内の情動関連神経機構が関与していると考えられる。神経因性慢性疼痛成立時に, 情動に関与する上

位中枢ネットワークにおけるシナプス伝達の可塑的な変化が生じている可能性を検討した。

扁桃体中心核外側亜核および外包核は, 橋外側結合腕傍核からの興奮性入力を受けており, この投射経路は脊髄由来の侵害受容性情報を選択的に伝達する。我々はこの扁桃体中心核に投射する疼痛関連シナプス入力に注目した。異痛症の成立と扁桃体シナプス伝達との間の関係を検討するため, Wistar rat において左側 L5 脊髄神経結紮慢性疼痛モデルを作成し, 術後 6-7 日目に, von Frey filament 刺激による異痛症発現評価を行い, 直後に麻醉下に断頭して, 扁桃体脳スライスを作成し, 扁桃体中心

核外包核 (CeA) ニューロンから外側結合腕傍核からの入力線維刺激によって誘発される興奮性シナプス後電流 (誘発 EPSC) を記録した。結紮モデルの結紮対側 CeA から記録された誘発 EPSC 振幅は、健側対側、および、Sham 手術群におけるそれよりも有意に高値であった。Paired-pulse 刺激による「paired-pulse ratio (PPR)」には、左右の差が認められなかったため、結紮対側における誘発 EPSC 振幅増大は主にシナプス後性機構の変化によるものと推定される。さらに、健側対側 CeA における誘発 EPSC 振幅に対する結紮対側 CeA の誘発 EPSC 振幅の比は、von Frey 法で計測した異痛症性応答閾値の低下と相関を示した (Spearman's rank correlation, -0.79)。ATP (100 μ M) および adenosine (100 μ M) は、誘発 EPSC 振幅を約

40% 減少させたがこの効果には著明な左右差は認められなかった。

これらの結果は、神経因性慢性疼痛の成立が、情動応答に関与する上位中枢神経核におけるシナプス伝達の変化を伴う事実を初めて示したものである。また、慢性疼痛動物モデルにおける「仮性疼痛反応」の亢進が、単に侵害入力性脊髄反射の亢進を反映しているのではなく、脳内の情動に関与する神経構造の活動の変化を伴う、主観的な慢性的「痛み」と類似した生体反応である可能性も示している。このようなシナプス伝達の可塑的变化の成立に関与する分子機構の解明は、神経因性慢性疼痛の治療法の開発につながるものと期待される。

(3) 神経因性疼痛モデルにおけるグリア細胞の活性化様式

津田誠¹, 国房恵美子¹, 小泉修一², 井上和秀¹

(国立衛生研究所・¹代謝生化学, ²薬理)

神経損傷により発症する神経因性疼痛は、損傷後に起こる一次求心性感覚神経や脊髄後角さらには脳で神経化学的な再構築が原因と推定されている。従来までは、それらの部位における神経細胞での変化のみに焦点が当てられてきたが、最近では脊髄後角におけるグリア細胞に注目が集まっている。我々は、ATP 受容体サブタイプの P2X4 受容体の発現が神経損傷後に活性化したミクログリアで増加し、P2X4 受容体の活性を阻害することにより、アロディニアを抑制できることを見出し、神経因性疼痛におけるミクログリアの必要性を明確にした。そこで今回は、末梢神経損傷後の脊髄後角ミクログリアの活性化様式について紹介する。ミクログリアの活性化は、そのマーカーである OX42 の染色レベルと形態学的変化

をもとに解析した。正常ラットの脊髄後角において OX42 レベルは低く維持されているが、L5 脊髄神経を損傷すると、その発現レベルは著しく増加した。その増加の経時変化は、損傷 1 日後より観察され、7 日から 14 日後にピークとなった。また、損傷 1 日後で細胞体の肥大化や突起の退縮など、活性化型へ移行する形態上典型的な変化が観察され、2~3 日後には細胞分裂を起こした。脊髄後角の活性化ミクログリアは、表層部 (第 I 層や第 IIo 層) にはあまり見られず、むしろ深層部 (第 III 層や第 IV 層) で著明だった。以上の結果より、ミクログリアの活性化は、脊髄全体に一樣に誘発するものではなく、空間・時間的に非常に制御された反応であることが示唆される。

(4) 脊髄後角シナプス後細胞に発現する P2X 受容体の機能意義

塩川 浩輝¹, 中塚 映政², 古江 秀昌¹, 吉村 恵¹

(¹九州大学医学部大学院統合生理学, ²佐賀大学医学部医学科生体構造機能学講座)

ATP P2X 受容体は末梢における痛覚受容に関与するだけでなく、脊髄後角においても侵害感覚情報を増強する

ことが明らかとなり、大変注目されている。P2X 受容体は脊髄後角細胞のシナプス前に発現しており、その活性

化に伴ってグルタミン酸の遊離増強が生じ、その結果、痛覚過敏を惹起する。脊髄後角細胞のシナプス前のみならず、P2X 受容体は脊髄後角表層のシナプス後細胞においても発現していることを示唆されている。しかしながら、その機能的意義は明らかでなく、特に脊髄後角深層細胞に関して、P2X 受容体のシナプス後細胞における役割は全く知られていない。

今回、ラット脊髄スライス標本を用いたパッチクランプ記録を行い、脊髄後角深層細胞のシナプス後細胞における ATP 受容体の役割を検討した。代謝安定型の ATP 受容体広作動域作動薬である ATP- γ S (100 μ M) を灌流投与すると、約 40%の脊髄後角深層細胞において内向き電流と興奮性シナプス後電流の発生頻度の増強効果が観察された。一方、 α,β -methylene ATP (100 μ M) の灌流投与を行うと内向き電流は観察されず、興奮性シナプス後電流の発生頻度の増強効果のみが観察された。ATP- γ S によ

り生じた内向き電流は、各種 P2Y 受容体作動薬の灌流投与によって再現されなかった。また、細胞膜 G 蛋白質阻害薬存在下において、ATP- γ S 灌流投与による内向き電流は抑制されなかった。さらに、ATP- γ S 灌流投与によって生じた内向き電流ならびに興奮性シナプス後電流の発生頻度の増強効果は、P2X 受容体拮抗薬である PPADS (10 μ M) の存在下において完全に阻害されたが、TNP-ATP (20 μ M) の存在下において影響されなかった。

以上の結果から、ATP P2X 受容体は脊髄後角深層細胞のシナプス前のみならず、シナプス後細胞においても発現しており、シナプス前とシナプス後細胞に発現している P2X 受容体は異なるサブタイプであることが明らかとなった。さらに、脊髄後角深層細胞のシナプス後細胞に発現する P2X 受容体は、薬理学的特性から P2X₅あるいは P2X_{2/6}のいずれかであることが示唆された。

(5) ラット脊髄後角の痛覚情報伝達に及ぼすアデノシンのシナプス前性および後性作用

柳涛, 楊鯤, 勞力軍, 藤田亜美, 中塚映政, 熊本栄一
(佐賀大学医学部生体構造機能学講座神経生理学分野)

アデノシンは中枢シナプス伝達の修飾物質として様々な生理作用に重要な役割を果たしているが、その作用の一つに痛み情報伝達の抑制がある。アデノシンの作用部位の一つとして、侵害刺激の情報伝達制御の要である脊髄後角の膠様質が知られている。我々は脊髄スライスの膠様質細胞にパッチクランプ法を適用してシナプス伝達に及ぼすアデノシン作用を調べ、次のことを明らかにした。(1) アデノシンは濃度依存性 ($EC_{50}=177 \mu$ M) に TEA 非感受性で Ba^{2+} や 4-AP により抑制される K^{+} チャネルを活性化した。この膜電流は整流性を示さなかった。(2) アデノシンは後根刺激により誘起される単シナプス性のグルタミン酸作動性 EPSC 振幅をシナプス前性に減少させ、その程度は A δ 線維と C 線維を介する EPSC の間で差はなかった。A δ 線維 EPSC 振幅抑制の EC_{50} は 217 μ M であった。自発性 EPSC について、その振幅の変化なしに発生頻度が減少した ($EC_{50}=277 \mu$ M)。(3) 脊髄後角の

局所電気刺激により誘起される GABA およびグリシン作動性 IPSC もシナプス前性にアデノシンにより濃度依存性に抑制された。これらの EC_{50} はそれぞれ 14.5 μ M と 19.1 μ M で、いずれの値も(1)と(2)の作用より小さかった。自発性 IPSC についても、その振幅の変化なしに発生頻度が減少した。以上の(1)~(3)と同様な作用は CPA によりみられ、また、これらのアデノシン作用は DPCPX により抑制されたことより、いずれの作用もアデノシン A₁ 受容体の活性化を介するものであることが示された。以上の結果より、脊髄膠様質においてアデノシンはシナプス前性に興奮性や抑制性のシナプス伝達を抑制する一方、シナプス後性に膜を過分極させると結論された。アデノシンによる膠様質細胞の膜興奮性すなわち痛み伝達の制御はその濃度に依存することが示唆された。

(6) 実験的脊髄損傷後疼痛に対するアデノシンの効果

尾形直則, 森野忠夫, 堀内秀樹, 濱本雄一郎, 山本晴康
(愛媛大・医・整形外科)

【目的】脊髄損傷後の痛覚異常は有効な治療法も乏しく、治療に難渋する病態である。この病態に対し、我々は脊髄圧迫にて下肢に hyperalgesia を引き起こすモデルを開発し、一昨年の本学会において報告した。今回はアデノシンという物質に着目した。アデノシンは中枢神経系における内因性神経調節物質であり、神経細胞を過分極させることにより、細胞興奮を抑制する機能がある。本研究ではこのモデルを用いて脊髄損傷による痛覚過敏に対するアデノシンの効果を検討した。

【方法】Wistar 系雌ラットを用い、第 11 胸椎レベルで椎弓を切除し、20g の重錘を硬膜上に 20 分間置くことによって脊髄に障害を加えた。痛覚閾値の測定は脊髄損傷 3 日後に足底部の熱刺激による withdrawal latency の変動をモニターすることにより行った。アデノシンの効果を検討するため non selective adenosine receptor agonist である Cl-adenosine, および、adenosine A1 receptor の selective な agonist, antagonist を痛覚測定の前 1 時間前に硬膜内投与した。

【結果】normal ラットに adenosine A1receptor antagonist

(DPCPX10 μ g) を投与すると、疼痛閾値の低下が認められた。脊髄圧迫モデルは、圧迫後 2-5 日目まで両足底部に有意な hyperalgesia が発生する。脊髄圧迫 3 日後に Cl-adenosine 10 nmol を投与した群では、hyperalgesia が有意に抑制されていた。adenosine A1receptor antagonist (DPCPX10 μ g) は Cl-adenosine の痛覚過敏抑制効果を阻害した。また、脊髄圧迫モデルに adenosine A1receptor agonist (R-PIA10nmol) を投与すると、疼痛閾値改善がみられた。

【考察】本研究では圧迫を行っていないラットにおける adenosine A1receptor antagonist 投与により痛覚過敏が出現したことから、アデノシンは生理的状態において抑制系物質として作用しているのではないかと考えられた。また、脊髄損傷モデルにおいて Cl-adenosine 投与より痛覚過敏が抑制されたことから、脊髄損傷後疼痛においてアデノシンの抑制効果が低下している可能性が考えられた。これらの結果より adenosine receptor agonists は疼痛緩和のための治療薬として有効である可能性が示唆された。

(7) ラットアジュバンド関節炎モデルにおける Adenosine Deaminase (ADA) インヒビターの効果

中町祐司¹, 小柴賢洋¹, 小坂英和¹, 辻剛¹, 関信男², 黒坂昌弘³, 熊谷俊一¹
(神戸大・院医・¹臨床病態免疫, ²藤沢薬品探索研究所, 神戸大・院医・³運動機能学)

【目的】関節リウマチ (RA) は滑膜の異常増殖、炎症細胞の関節への浸潤および関節破壊をともなう病因不明の慢性疾患である。RA に有効な抗リウマチ薬であるメトトレキサート (MTX) は、炎症局所の細胞外アデノシン濃度を上昇させ浸潤細胞数を減少させること、またラットアジュバンド関節炎では、アデノシン受容体アンタゴニストであるテオフィリンやカフェインが MTX による抗炎症作用を抑制することが知られており、細胞外アデノシンが MTX の抗リウマチ作用のエフェクタ-分子であると考えられる。

われわれは、アデノシンを不活性のイノシンに分解するアデノシンデアミナーゼ (ADA) が RA の関節液および

滑膜細胞で高活性であることを見出した。このことは炎症局所における ADA の増加が内因性アデノシンの作用を減弱させ、RA の病態に促進的に作用していると考えられる。

そこで、今回われわれはラットアジュバンド関節炎モデルに ADA インヒビターを投与し、その効果を検討した。

【方法】関節炎は、7 週齢の雄 Lewis ラットの尾根部に Mycobacterium tuberculosis 含有不完全 Freund アジュバンドを皮下投与し誘導した (発症率 100%)。ADA インヒビターは FR242685 (FR; 藤沢薬品) をラット右後踵部に連日投与した。

関節炎は、発赤および関節腫脹の程度により、1 足当

たり、1 から 4 の 4 段階 (最大 16) で判定した。また、抗関節炎効果の指標として全身状態を反映する体重を測定した。関節炎を誘導後 30 日目に屠殺し、骨破壊の程度をレントゲン写真で検討し、病理組織学的評価を HE 染色標本で行った。

【結果】1) FR 投与群は、非投与群に比べ関節の腫脹が抑制された。2) FR 投与群は、非投与群に比べ体重の増加

が見られた。3) FR 投与群は、非投与群に比較し骨破壊の抑制を認めた。4) FR 投与群は、非投与群と比較し関節腔の狭窄が軽度であった。5) FR 投与群は、非投与群と比較し滑膜の増殖および炎症細胞の浸潤が軽度であった。

【考察】ラットアジュバンド関節炎モデルでは、ADA インヒビター投与により細胞外アデノシン濃度が上昇することにより、関節炎を抑制することが示唆された。

(8) ATP release and activation of maxi-anion channel in rat cardiomyocytes in hypotonic, ischemic or hypoxic conditions

Amal K. Dutta^{1,2}, Ravshan Z. Sabirov^{1,2}, Hiromi Uramoto^{1,2}, and Yasunobu Okada^{1,2}

(¹Department of Cell Physiology, National Institute for Physiological Sciences,

and ²School of Life Science, The Graduate University for Advanced Studies (SOKENDAI))

The level of ATP in the interstitial space within the heart during ischemia or hypoxia is elevated due to its release from a number of cell types, including cardiomyocytes. However, the mechanism by which ATP is released from these myocytes is not known. In the present study, we examined a possible involvement of the ATP-conductive maxi-anion channel in ATP release from neonatal rat cardiomyocytes in primary culture upon hypotonic, ischemic or hypoxic stimulation. Using a luciferin-luciferase assay, we found that ATP was released to the bulk solution when the cells were subjected to chemical ischemia, hypoxia or hypotonic stress. The swelling-induced ATP release was inhibited by carboxylate- and stilbene-derivative anion channel blockers, arachidonic acid and Gd^{3+} , but not by glibenclamide. The local concentration

of ATP released near the cell surface of a single cardiomyocyte, measured by a biosensor technique, was found to exceed the micromolar level. Patch-clamp studies showed that ischemia, hypoxia or hypotonic stimulation induced activation of single-channel events with a large unitary conductance (~ 390 pS). The channel was selective to anions and showed significant permeability to ATP^{4-} ($P_{ATP}/P_{Cl} \sim 0.1$) and $MgATP^{2-}$ ($P_{ATP}/P_{Cl} \sim 0.16$). The channel activity exhibited pharmacological properties essentially similar to those of ATP release. These results indicate that neonatal rat cardiomyocytes respond to ischemia, hypoxia or hypotonic stimulation with ATP release and that the ATP-conductive maxi-anion channel serves as the conductive pathway for ATP release.

(9) 膀胱上皮における ATP 放出機構について — TRPV1 欠損マウスを用いた検討 —

中村靖夫¹, Lori A. Birder², Michael J. Caterina³, 河谷正仁¹, William C. de Groat²

(¹秋田大・医・機能制御医学, ²Dept. of Pharmacology, Univ. of Pittsburgh Sch. of Med.,

³Dept. of Biological Chemistry and Neuroscience, Johns Hopkins Univ. Sch. of Med.)

【背景】正常膀胱においては伸展により、ATP が放出され、それが尿路上皮や求心性神経における mechanosensory mechanism に関与しているであろうと報告されている。TRPV1 がその ATP 放出機構に関与していることを示唆

する知見を得られたので、報告する。

【目的】TRPV1 は膀胱に存在することが知られている。カプサイシンはその受容体である TRPV1 を刺激し、脱感作を引き起こすため、脊髓損傷患者の排尿筋過反射に

対する治療に使われている。しかし TRPV1 が正常な膀胱機能に果たす役割はまだはっきりわかっていない。そのため、我々は TRPV1 null mutant mice の膀胱機能および膀胱からの ATP 放出量を評価した。

【方法】TRPV1 null および wild type mice にウレタン麻酔下で膀胱瘻を作成し、そのカテーテルより生理的食塩水を一定速度 (0.5 ml/hr) で順に注入しながら、膀胱内圧を測定した。また、膀胱を伸展させた時の脊髄における c-fos の発現も測定した。さらに、摘出膀胱標本を伸展させた時および培養尿路上皮細胞に低浸透圧刺激を与

えた時の ATP の放出量を luciferin-luciferase 法で測定した。

【結果】膀胱内圧測定において、wild type mice と比較して、TRPV1 null mice の膀胱容量は有意に高値を示したが、膀胱充満による脊髄における c-fos の発現は低値であった。摘出膀胱標本を伸展させた時および培養尿路上皮細胞に低浸透圧刺激を与えた時の ATP の放出量はいずれも TRPV1 null mice の方が有意に低値であった。

【結語】これらの所見より、TRPV1 が膀胱伸展の感知、おそらく尿路上皮や求心性神経における mechanosensory mechanism に関与していることが示唆された。

(10) 自身の発現密度に依存する ATP 受容体 P2X₂の性質の変化

藤原 祐一郎, 久保 義弘

(生理学研究所・神経機能素子研究部門)

イオンチャネル型の ATP 受容体 P2X は、時間依存的にイオン選択性が変化することや、記録ごとにうち向き整流性の強度がばらつくなどの特徴あるポアの性質を持つことが知られている。我々は P2X₂ 受容体の整流性の分子機構を明らかにする目的で、アフリカツメガエル卵母細胞に P2X₂ を発現させ 2 本刺し膜電位固定下で ATP 投与後の電流を記録した結果、内向き整流性のばらつきが発現密度に相関することを見いだした。これを手がかりとして今回、受容体の種々の性質を発現レベルとの関連において解析し以下の知見が得られた。

(1) P_{K^+}/P_{Na^+} の発現密度に依存した変化は観察されなかったが、 P_{NMDG^+}/P_{Na^+} は発現密度と負の相関を示した。(2) 内向き整流性の強弱は発現密度と負の相関を示した。脱分極パルス直後に観察される外向き電流 ($I_{initial}$) は、経時的に減衰し定常レベルに (I_{steady}) に達した。 $I_{initial}$ および I_{steady} の、内向き電流の大きさに対する割合はどちらも

チャネルを高発現にすることによって増加した。(3) 高濃度の ATP (100 μ M) により弱い内向き整流性電流を呈する発現密度の高い細胞に、低濃度 ATP (3 μ M) を投与するとその内向き整流性は増強した。(4) [ATP] - 応答関係の K_d の値は発現密度と負の相関を示した。Hill 係数は発現密度に相関なく一定値 2 であった。(5) ポア上部の点変異 I328C により上記の発現密度に依存したポアの性質の変化がほぼ消失した。

以上の結果をまとめると、「P2X₂ 受容体の内向き整流性等の性質は、膜上に存在する「開状態」のチャネルの密度に依存して動的に変化する。」と表現できる。我々は「ATP 投与により開状態に入った、ごく近傍にある P2X₂ 受容体チャネル間の相互作用によりポア上部においてなんらかの構造変化が起こり、ポアの性質やリガンド感受性が変わる。」というイメージが、最も自然にかつ矛盾なくデータを説明できると考えている。

(11) マウス網膜コリン作動性アムクリン細胞の P2X₂受容体応答

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

(¹慶應大・医・生理, 理研・²脳センター・神経構築, ³京大・院医・生体情報科学)

網膜では外来性に投与した ATP が ACh の放出を抑制することが報告されている。ACh の放出は薬理学的実験

から P2X 受容体を介する抑制機構に関与すると考えられているが、どのサブタイプが関与しているのかは明らか

となっていない。これは網膜における P2X 受容体の分布について体系的に検討されていないことが大きな原因となっている。本研究では、マウス網膜の P2X₁, P2X₂, P2X₄, P2X₇ 受容体の分布について免疫組織化学的手法を用いて検討し、コリン作動性ニューロンに存在する P2X 受容体のサブタイプに注目してそのシナプス部位における局在を immunotoxin-mediated cell targeting technology (IMCT) 法を用いて検討した。またコリン作動性アマクリン細胞が選択的に GFP 陽性像を示す transgenic mouse を用いて、コリン作動性アマクリン細胞にパッチクランプ法を適用し、そのプリン受容体応答について検討した。

免疫組織化学的には、P2X₁ 受容体は内顆粒層と内網状層の境界部付近に点状に分布する陽性所見が観察された。P2X₂ 受容体は一部のアマクリン細胞の細胞体と内網状層のサブミナ a で強い免疫反応陽性像が観察された。P2X₄ 受容体は、神経節細胞層で強い免疫反応陽性像が観察された。P2X₇ 受容体は内顆粒層と神経節細胞層の細胞体で陽性所見が観察され、内顆粒層の陽性細胞は硝子体側と強膜側に存在していた。P2X₂ の免疫反応はコリン作動性ニューロンのマーカーである ChAT の免疫反応と一

致した。また P2X₂ の免疫反応はコリン作動性ニューロンに GFP シグナルを発現する transgenic mouse においても一致した。Transgenic mouse に IMCT 法を適用してコリン作動性ニューロンを選択的に細胞死させると、GFP シグナルが消失した領域のみで P2X₂ の免疫反応が消失した。このことから P2X₂ の免疫反応は starburst アマクリン細胞の樹状突起上に選択的に発現しているものと考えられる。

ホールセルクランプ下に ATP をコリン作動性アマクリン細胞に投与し、発生した ATP 応答を GABA 応答で正規化して、OFF 型コリン作動性アマクリン細胞と ON 型コリン作動性アマクリン細胞の ATP 応答の大きさを比較した。OFF 型コリン作動性アマクリン細胞で観察される ATP 応答は ON 型コリン作動性アマクリン細胞で観察される ATP 応答より大きかった。また α,β -methyleneATP では ATP 応答が惹起されず、PPADS 存在下で ATP を投与したときにも応答は生じなかった。

以上の結果から、マウス網膜において ATP は網膜内網状層では P2X₂ 受容体を介して OFF 経路のアセチルコリン信号伝達に関与するが、ON 経路のアセチルコリン信号伝達には関与しない可能性が示唆された。

(12) 海馬ネットワーク興奮性制御における介在ニューロン P2Y₁受容体の役割とその機構

川村将仁¹, 加藤総夫²

(¹ 慈恵医大・薬理学第 1, ² 慈恵医大・神経生理)

海馬には各種 ATP 受容体, アデノシン受容体, および, ATP からアデノシンへの細胞外変換酵素系が豊富に発現している。細胞外プリンによる海馬ネットワークの興奮性制御におけるこれらの機能分子群の役割を解明するためには、これらの分子を発現するニューロンおよびグリア細胞の空間的細胞構造が in situ に近い状態で維持されている急性スライス標本を用いた検討が必須である。現在までに、海馬急性スライス標本における細胞外 ATP の効果とその機序を薬理学的手法および遺伝子ノックダウン法を用いて検討した報告が多くなされているが、その大部分は、海馬初代培養細胞を用いた研究の結論とは異なり、海馬スライスにおいて ATP はアデノシンに加水分解された後にアデノシン受容体活性化を介してシナプス伝達を修飾する、と結論している。

我々はこれらの海馬スライス標本を用いた研究の大部

分が錐体細胞への興奮性シナプス入力のみを検討していることに着目した。海馬錐体細胞の興奮性は、興奮性シナプス入力のみならず、周囲の介在ニューロンからの抑制性シナプス入力によっても制御されている。昨年、本研究会で細胞外 ATP がアデノシンに代謝された後、アデノシン A₁ 受容体の活性化を介して CA3 錐体細胞の EPSC 頻度を減少させる事実を報告した。この時、同時に観察された IPSC の頻度は ATP により有意に増加した。今回は、ATP によるこの IPSC 頻度増大効果の分子機構の解明を試みた。以下の 4 つの実験成績に基づき、ATP による IPSC 頻度増加は、介在ニューロンに発現する P2Y₁ 受容体を介した介在ニューロンの直接的興奮によると結論された。(1) IPSC 頻度増加は 2meSATP により最も強く引き起こされ、MRS2179 によりほぼ完全に抑制された。(2) P2Y₁ 受容体のノックアウトマウスでは、2meSATP

による IPSC 頻度の増加が観察されなかった。(3) 2meSATP は介在ニューロンに内向き電流を生じさせ、これは MRS2179 により抑制された。またこの内向き電流は、介在ニューロンを脱分極させ、錐体細胞の IPSC 頻度増加と時間的に一致して活動電位を発生させた。および、(4) 海馬スライスにおける細胞内カルシウム濃度イメージングを行ったところ、2meSATP は錐体細胞層外に局在する一部の介在ニューロンの $[Ca^{2+}]_i$ を細胞外 Ca^{2+} 依存的に増加させた。2meSATP はアストロサイトの $[Ca^{2+}]_i$ も増加させたが、これは細胞外カルシウム非存在下にも生じた。いずれも MRS2179 により抑制された。2meSATP は

錐体細胞の $[Ca^{2+}]_i$ に変化を及ぼさなかった。

以上の結果は、ATP が介在ニューロンの P2Y₁ 受容体の活性化を介して介在ニューロンを直接的に興奮させ、錐体細胞への抑制性入力を増加させることを証明したものである。この効果は、同時に起こるアデノシン受容体の活性化と協働的にはたらき、海馬ネットワークの興奮性を低下させると結論された。また、本研究は、中枢神経系の神経細胞において P2Y₁ 受容体の活性化が直接的にイオンチャネルを活性化させ、ニューロンの興奮を引き起こす事実を示した初めての報告である。

(13) 表皮の P2X 受容体と皮膚バリアー再生の関係

傳田光洋, 藤原重良, 井上かおり

(資生堂ライフサイエンス研究センター)

陸上の生命にとって皮膚は生体と環境の境界であるだけではない。皮膚は、太古海で生まれ、今なおその海と同様流れる水に満ちた組織を、環境から保護するバリアーでもある。これが火傷などで損傷すると生体は水を喪いたちまち死に至る。このバリアーは皮膚表面に形成されているわずかに 10-20 ミクロンの層状構造、角質層によって担われている。角質層は表皮細胞が分化して死んだ細胞とその間隙を埋める脂質によって構成される複合素材である。それは他のあらゆる生体膜より 1000 倍も水を透過し難い、同じ厚さのプラスチック膜に匹敵するバリアー機能を持っている。このバリアー機能はセロテープや有機溶媒による処理によって容易に破壊されるが、健康な皮膚では、その後、一連のホメオスタティックな修復システムが加速され、速やかにもとのバリアー機能の回復が起こる。しかしアトピー性皮膚炎などの多くの皮膚疾患ではこのバリアー機能の恒常的な低下が認められる。今回、我々はこのバリアー機能の修復過程と ATP との関連について検討した。

ヘアレスマウスの皮膚角質層をセロテープで剥がして皮膚バリアー機能を破壊すると、直ちに表皮から ATP が放出された。またバリアー機能破壊後、皮膚表面に ATP を塗布するとバリアー回復が遅延した。P2X 系のアゴニスト α, β -methylene ATP の塗布も回復を遅延させた。一方、Suramin, および P2X 特異的アンタゴニスト PPADS, TNP-ATP の塗布はバリアー回復を促進させた。P2X 受容

体アンタゴニストの Reactive Blue2 の塗布はバリアー回復速度に影響しなかった。

ヒトケラチノサイト培養系では α, β -methylene ATP がケラチノサイト内のカルシウム濃度を上昇させ、その変化が TNP-ATP によってブロックされることが確認された。これらの結果は表皮を形成するケラチノサイトに P2X 受容体が存在することを示唆している。表皮の免疫染色および RT-PCR による観察では P2X₃ が存在することを示唆する結果が得られた。

我々は以前、乾燥環境下で軽微なバリアー破壊を起こした場合、アトピー性皮膚炎や乾癬、接触性皮膚炎などに共通して観察される表皮増殖性異常を惹起することを見出している。今回、この系でバリアー破壊後、TNP-ATP を塗布したところ、表皮増殖性異常が抑制されることが見出された。

以上の結果は表皮のバリアー機能の恒常性や表皮ケラチノサイト増殖に ATP および P2X 受容体が関与していることを示している。そして ATP による情報伝達系の制御が皮膚疾患の臨床において新しい治療法を創出する可能性を示している。

参考文献

J Invest Dermatol 119:1034-1040, 2002

J Invest Dermatol 111:873-878, 1998

(14) 脂肪細胞における P2Y 受容体の機能

尾松万里子, 松浦 博
(滋賀医大・第2生理)

マウス胎児由来前駆脂肪細胞 3T3-L1 細胞は、脂肪細胞分化のモデルとして最もよく研究されている株細胞である。この細胞を成熟脂肪細胞に分化させるためには、コンフルエントになるまで培養して接触障害により細胞周期を停止した後、dexamethasone, 1-methyl-3-isoxanthine 及び insulin を分化誘導因子として加える手法が最も一般的に行われている。

我々は、3T3-L1 前駆脂肪細胞における細胞外 ATP の作用を調べたところ、ATP (10~100 μ M) が約 30%の低い細胞密度において分化誘導因子による成熟脂肪細胞への分化を促進することを見出した。この脂肪細胞分化促進作用が ATP の他に ADP 及び UTP によっても引き起こされること、P2 受容体阻害剤スラミンならびに PPADS に

よって阻害されること、及び phospholipase C 阻害剤 U73122 によって阻害されることから、P2Y 受容体を介すると考えられた。一方、駆脂肪細胞において、細胞運動が活発になり、離れた場所にある脂肪細胞クラスターへの移動が盛んになることで脂肪組織の増大が起こることは古くから報告されているため、ATP, ADP ならびに UTP の効果について調べてみたところ、濃度依存性に細胞遊走を促進することがわかった。今回、P2Y 受容体による脂肪細胞分化促進作用に関与する細胞内情報伝達機構を調べるために、脂質ラフト分画を抽出し、プロテオミクスの手法を用いて細胞内シグナル分子の同定を開始したので、その経過について報告する。

(15) α,β -methyleneATP はウサギ脳底動脈の UTP 収縮を増強する

宮城 靖¹, 佐々木富男¹, John Zhang²
(¹九州大・医・脳外, ²ミシシッピ大学・脳外)

くも膜下出血では、くも膜下腔に放出された血液成分が頭蓋内主幹動脈を刺激し、遅発性に異常収縮を惹起し、重篤な脳循環障害を発生させる(脳血管攣縮)。血腫中の ATP や UTP は脳血管の P2 受容体を非選択的に刺激すると考えられる。ウサギ脳底動脈において ATP 収縮は非常に弱く一過性で、UTP 収縮は強力であるが持続性に乏しい。我々は UTP 収縮に関与する P2 受容体の特性を薬理学的に検討した。その結果、 α,β -methyleneATP そのものはウサギ脳底動脈に対して全く収縮作用がないが、 α,β -methyleneATP の同時刺激が UTP 収縮を約 1.5 倍に増強

することを発見した。その機序として、 α,β -methyleneATP による細胞外 ecto-nucleotidase 阻害の作用が考えられたが、 Ni^{2+} 添加や Ca^{2+} 除去、Evans blue 前処置はいずれも、 α,β -methyleneATP による UTP 収縮増強作用を消失させ得なかった。また、 α,β -methyleneATP は ecto-nucleotidase 抵抗性の $\text{ATP}\gamma\text{S}$ 収縮に対しても増強効果があった。以上の結果から、脳動脈では UTP 受容体(おそらく P2Y₄)をヌクレオチドによる過剰刺激から防御するための、 α,β -methyleneATP 感受性の機構が存在することが示唆された。

(16) ラット培養マイクログリアからのフリーラジカル・サイトカイン放出に対する ATP の効果

森野忠夫, 尾形直則, 堀内秀樹, 濱本雄一郎, 山本晴康

(愛媛大, 医, 整形外科)

【目的】脊髄が傷害を受けたときには、軸索の断裂や組織の浮腫等の急性期のダメージに引き続いて、傷害後数時間以後に起こってくる遅発性の神経障害過程があり、この一つとして傷害された組織内でのマイクログリアの増殖、活性化が注目されてきている。本研究ではこのマイクログリアの機能を抑制することによって神経を保護する方法を開発する目的で、マイクログリアから放出されるフリーラジカル・サイトカインの量を測定し、機能抑制の候補物質の効果を評価した。

【方法】ラット胎仔の脊髄より採取した培養マイクログリアを Lipopolisaccharide (LPS) で刺激したときにマイクログリアから放出されるサイトカインである TNF- α 及び IL-6 の量を ELISA 法で、NO 放出量を Griess 法で測定した。

【結果】培養マイクログリアは 24 時間の LPS(100ng/ml) 暴露により、培養液中に多量の TNF- α 及び IL-6 を放出するが、この量は LPS 暴露時に ATP を同時投与することにより ATP の濃度依存性に抑制された。一方、LPS 暴露

による NO 放出量は ATP を加えても明らかな変化は見られなかった。P2y レセプターのアゴニストである 2-Methylthio-ATP は、ATP と同様に LPS により誘導されるマイクログリアからの TNF- α 及び IL-6 放出を濃度依存性に抑制した。

【考察】ATP は細胞のエネルギー源となることの他に、P2 receptor を介して、様々な生理活性を持っている。我々はこの物質が神経障害の軽減に有用ではないかと考えた。マイクログリアは神経組織内の免疫を司る細胞であるが、虚血などの際に病的に活性化され、傷害性の強いサイトカインや NO などのフリーラジカルを放出し、神経障害を増悪させると考えられている。本研究では、ATP 及び P2y レセプターアゴニストが炎症性サイトカインである TNF- α 及び IL-6 の産生を抑制することがわかった。一方、NO については効果が観られなかった。P2y レセプターアゴニストは炎症を伴う急性の神経障害の治療薬として有効である可能性が示された。

(17) 脳スライス培養系での ATP γ S による MCP-1 産生誘導機構に関する検討

片山貴博, 伊藤美聖, 神谷明裕, 山崎裕子, 金子周司, 佐藤公道, 南雅文

(京大・院・薬・生体機能解析学)

Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1, CCL2) は脳虚血や多発性硬化症、頭部外傷など、様々な病理的条件下の脳内で産生誘導され、細胞傷害の増悪への関与が示唆されているケモカインの 1 つである。一方で、脳組織切片培養系は、細胞構築や個々の細胞の活性化状態が分散培養系と比較して、より in vivo に近い状態にあるため、活性化状態の違いが細胞の反応性を大きく左右するグリア細胞の研究に非常に有用であると考えられる。本研究では、MCP-1 産生誘導に対する ATP γ S の効果について、この脳切片培養系を用いて検討を行った。

生後 2-3 日齢 Wistar/ST ラットの脳皮質-線条体領域から冠状切片 (300 μ M 厚) を作製し、10-11 日間静置界面培養後、実験に用いた。

ATP γ S 処置により、mRNA レベル、タンパクレベルともに濃度依存的な MCP-1 発現誘導が観察された。そのタイムコースは、処置開始後 1 時間で既に観察され、3-4 時間をピークとする一過性のものであった。また、その主な産生細胞はアストロサイトであった。一度 NMDA 処置により、切片内の神経細胞を特異的に傷害、除去した切片においても、同様に MCP-1 産生誘導が惹起された。この ATP γ S による MCP-1 産生・遊離に対する P2 受容体拮抗薬の効果を検討したところ、PPADS はほぼ完全な抑制効果を示したのに対し、Reactive Blue 2 は部分的な抑制を示し、suramin に関しては全く影響を与えなかった。最後に MAP キナーゼ阻害薬の効果を検討したところ、ATP γ S による MCP-1 の培地中への遊離は、MEK 阻

害薬 PD98059 および JNK 阻害薬 SP600125 により部分的に抑制され、反対に p38 MAP キナーゼ阻害薬 SB203580 によって増強された。また、PD98059, SP600125 は MCP-1 mRNA 発現に関しても同様に抑制効果を示した。

以上の結果より、脳組織切片培養系において ATP γ S は、アストロサイトに直接作用し、アストロサイトでの

MCP-1 産生・遊離を惹起することが明らかとなった。また、この ATP γ S による MCP-1 産生誘導に関して、複数のサブタイプのプリン受容体が関与していること、また ERK および JNK キナーゼは促進的に、逆に p38MAP キナーゼは抑制的にそれぞれ関与していることが示された。

(18) アデノシンは濃度依存性にヒト単球由来樹状細胞の分化を抑制する

小柴賢洋, 中町祐司, 中澤隆, 辻剛, 熊谷俊一

(神戸大・院医・臨床病態免疫学)

【目的】関節リウマチ (RA) の病因は不明であるが、自己免疫機序による関節滑膜の炎症性増殖とそれに引き続く関節構造の破壊が、その病理組織学的特徴とされている。現在最も頻用されている抗リウマチ薬の一つ、メトトレキサート (MTX) は炎症局所の細胞外アデノシン濃度を上昇させ浸潤細胞数を減少させる。またラット関節炎モデルにおいてアデノシン受容体アンタゴニストであるテオフィリン、カフェインが MTX の抗リウマチ作用を抑制する。以上のことから、細胞外アデノシンが MTX の抗リウマチ作用のエフェクター分子であると考えられている。しかしながらアデノシンが作用する細胞や受容体に関しての詳細は不明である。

樹状細胞 (DC) は関節リウマチ (RA) の病態形成に重要な役割を果たしていると考えられているので、ヒト末梢血単球から DC の分化に与えるアデノシンの影響を *in vitro* で検討した。

【方法】健康人末梢血中の CD14 陽性細胞を、磁気ビーズを用いて分離精製した。この細胞を GM-CSF と IL-4 の存在下に 5 日間培養し、未熟 DC (iDC) へと分化誘導した。さらに TNF- α 存在下で iDC を 48 時間培養し、成熟 DC (mDC) へ分化させた。この分化誘導の際に ADA 抵抗性のアデノシンアナログである NECA を同時に投与し、その影響を主に細胞表面マーカーの発現により解析した。

【結果と考察】(1) 単球からの分化過程に NECA が存在すると CD1a, CD80, CD83 の発現が iDC, mDC とともに抑制された。(2) この発現抑制は NECA の濃度に依存性であった。(3) iDC から mDC への分化段階においては NECA はほとんど影響しなかった。以上の結果から、アデノシンの抗リウマチ作用機序の一つとして、単球から DC への分化を抑制的に制御することにより RA における免疫応答を抑制することが考えられた。

(19) ATP によるアストロサイトの酸化ストレスからの細胞保護作用

篠崎陽一^{1,3}, 小泉修一², 井上和秀^{1,3}

(国立衛研・¹代謝生化学, ²薬理, ³九大・院・分子制御)

細胞外 ATP は中枢神経系の gliotransmitter 及び glia-neuron transmitter として、グリア細胞間及びグリア-ニューロン間の情報伝達を担う重要な因子である。しかし ATP 及び P2 受容体を介するこれら情報伝達の生理的意義については不明な部分が多い。本実験では gliotransmitter としての ATP に注目し、特にアストロサイトの細胞死・機能維

持の観点から、その生理的役割を追求した。

過酸化水素 (H_2O_2) は様々な脳の疾患時における酸化ストレスの原因物質の一種である。 H_2O_2 は濃度依存的にラット初代培養アストロサイトの細胞死を引き起こした。ATP (1~1000 μ M) は濃度及び処理時間依存的にこのアストロサイトの細胞死を抑制した。薬理的な検討に

より、この細胞保護作用の責任受容体は、P2Y₁受容体であることが明らかとなった。GeneChipを用いた解析の結果、P2Y₁受容体活性化による抗酸化ストレス関連遺伝子の発現亢進が明らかとなった。また神経細胞死に対して強力な保護効果を有する adenosine はアストロサイトの細胞死には全く影響しなかった。更にアストロサイトの gliotransmitter としても知られる興奮性伝達物質グルタミン酸には、細胞保護効果は認められなかった。一方、H₂O₂により誘発されるアストロサイトの細胞死には、MAP キナーゼ ERK1/2 の持

続的な活性化が強く関与していた。ATP/P2Y₁受容体の活性化によるアストロサイト保護効果は、この ERK1/2 リン酸化を抑制することに起因していた。

以上 ATP は、アストロサイトに対する強力な細胞保護因子であり、この保護作用は神経細胞保護因子 adenosine や他の gliotransmitter グルタミン酸では再現されなかった。ATP はアストロサイトの保護及び機能を維持することにより、中枢神経系のグリア-ニューロン連関を保持している可能性が考えられる。

(P1) 頭痛と脳血管径調節能

山田真久 (理化学研究所 脳科学総合研センター 山田研究ユニット)

頭痛発症において、血管の炎症とともに血小板から放出されるセロトニンが脳内血管を収縮させることから始まり。この血管収縮が血管周囲の炎症を引き起こし、脳血管の拡張とともに放出される発痛物質が三叉神経を刺激して痛みを伝達すると考えられている。このように血管の拡張収縮能は、頭痛の発症機序に深く関与している。従って、脳血管の拡張収縮能をコントロールすることは、頭痛予防に重要であると考えられる。予防薬の開発においては、慢性投与による脳機能の変化を予測する必要がある。この研究では、慢性的に脳血管の拡張能を失った遺伝子組換えマウスを用いて、脳血流量の低下による脳機能への影響を検討した。

アセチルコリンは ATP と同様に血管内皮細胞に作用して、一酸化窒素 (NO) を放出し、脳血管を拡張させる働きを持っている。我々は、ムスカリン性アセチルコリン受容体の M5 受容体遺伝子欠損マウスを作成したところ、このマウスは脳梗塞を伴わない慢性的脳血管拡張障害マウスであることを示した (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98 (2001) 14096-14101)。このマウスは、脳循環の自動調節能の破綻や神経突起の萎縮などの特徴を示した。さらに、神経突起の萎縮に相関し、海馬依存記憶学習機能に異常を示した。本研究によって、脳循環は、脳機能を保持する為に重要な役割を担っていることが示唆された。

(P2) 末梢神経傷害モデルラットにおける DRG 神経細胞の P2X 受容体に対する noradrenaline の作用

圓尾圭史², 足立 克², 山本悟史¹, 立石博臣², 西崎知之¹
(兵庫医科大・医・¹生理学第2, ²整形外科学)

末梢神経傷害後に発生する allodynia をはじめとする神経因性疼痛は、組織の創傷治癒後も持続する難治性の病態である。この疼痛の発生機序は未だ不明であるが、末梢神経傷害が交感神経節後ニューロンの発芽を誘起し、その軸索が脊髄後根神経節 (dorsal root ganglion; DRG) に到達しているという事がわかっている。また、DRG 神経細胞には疼痛発生への関与が示唆されている。ATP 受容体が発現していることも知られている。これら

の事実より、交感神経終末から放出された noradrenaline (NA) が DRG 神経細胞のカテコールアミン受容体を介して、ATP 受容体機能を変化させて疼痛制御に関わっている可能性があると考えられる。そこで今回の研究では、末梢神経傷害モデルラットを作製し、神経傷害後 DRG 神経細胞の ATP 受容体 (P2X 受容体) 機能に対する NA の作用について電気生理学的に検討したので報告する。

(P3) ラット脊髄・後根神経節・交感神経節における Adenosine 受容体 mRNA の発現と坐骨神経切断後の変化

小林希実子, 福岡哲男, 山中博樹, 野口光一
(兵庫医科大学・解剖学第2講座)

痛み情報伝達における ATP・Adenosine の役割を解明するための基礎的情報として、我々はこれまでに ATP 受容体 (P2X, Y) のラット脊髄・後根神経節 (DRG) における詳細な発現パターンの解析を施行し、各サブタイプ別の特異的な発現パターン、神経障害に対する動態などを報告してきた。

Adenosine は ATP の代謝産物としてエネルギー代謝に関与するだけでなく、種々の組織・細胞の機能制御に関わることが知られている。Adenosine 受容体はラットでは A1, A2a, A2b, A3 の4種類がクローニングされており、Gタンパク共役型受容体で、A1, A3 受容体が Gi と、A2a, A2b 受容体が Gs と共役している。

末梢神経から脊髄後角に至る痛み情報伝達が Adenosine により抑制されることが報告されているが、Adenosine 受容体の詳細な分布についての報告は少ない。そこでラットの脊髄、DRG、交感神経節での Adenosine 受容体の発現を in situ hybridization 法を用いて詳細に検討した。

その結果、DRG ニューロンでは A1, A2a, A2b 受容体が

発現しており、A3 受容体は発現していなかった。A1 受容体は約 7 割のニューロンでみられ、多くは小型・中型 neuron であった。A2a 受容体は約 3 割のニューロンに発現し主に小型から中型に発現しており、A2b 受容体は小型 neuron 中心に約 2 割の neuron に発現していた。交感神経節では A1 受容体のみがほぼ全ての neuron に発現しており、そのほかの A 受容体は発現していなかった。脊髄では A1 受容体が灰白質のほぼ全ての neuron に発現し、A2a 受容体が motoneuron に発現していた。A2b, A3 受容体は脊髄では発現が見られなかった。

また、坐骨神経切断モデル 7 日後では、DRG では A1, A2a, A2b 受容体すべて、発現細胞数が減少した。脊髄では A1, A2a, A2b の発現は変化が見られなかったが、A3 受容体が術側の glia で発現が見られるようになった。

以上のことから、坐骨神経損傷後の脊髄において A1 や A3 受容体が Adenosine を介した neuron-glia 細胞間又は glia-glia 細胞間の情報を制御する役割を果たしていることが示唆される。

(P4) P2X₇受容体活性化による細胞死の誘導に小孔の形成は必要か？

月本光俊, 原田均, 五十里彰, 高木邦明
(静岡県立大・薬)

【目的】P2X₇ 受容体の活性化は陽イオンの流入を誘導するとともに分子量約 900 Da 程度までの分子を通す小孔を形成する。また、多くの細胞系において細胞死を誘導する。しかしながら、細胞死誘導の詳細な機構は明らかでない。今回我々はラット P2X₇ cDNA をニワトリ B 細胞由来 DT40 株に導入して得られた P2X₇ 受容体強制発現株 (DT40/P2X₇ 細胞) を用い小孔の形成と細胞死誘導との関連について解析した。

【方法】細胞の大きさの変化はフローサイトメーターを用いて前方散乱光および側方散乱光を測定することにより

解析した。小孔の形成は臭化エチデウムの取り込みを指標とした。また、細胞障害性は細胞外に漏出した乳酸脱水素酵素 (LDH) の活性を測定することにより調べた。

【結果および考察】生理的イオン存在下 DT40/P2X₇ 細胞の細胞径に対する P2X₇ 受容体選択的アゴニスト 2'-&3-O-(4-benzoyl-benzoyl)-ATP (BzATP) 処置の影響を調べたところ、処置濃度ならびに時間に依存したアポトーシスの初期の特徴である細胞の縮小が観察された。この細胞の縮小に対する細胞外イオンの影響を検討したところ、Na⁺ を除去すると受容体刺激後 10 分程度の早い段

階で Na^+ 存在下では見られなかった一過性の細胞の膨張が観察された。P2X₇ 受容体活性化による小孔の形成に細胞外の Na^+ が関与するとの報告がある。そこで小孔の形成について検討したところ、 Na^+ 非存在下で膨張した細胞において特に小孔の形成が増強していた。また、著しく小孔を形成するスクロース緩衝液中では受容体刺激による細胞膨張はより顕著であった。しかしながら、細胞外に Na^+ が存在する生理的条件下では小孔の形成はそれほど顕著でないにもかかわらず細胞の縮小は上述の通り進行する。また、細胞外液中から Ca^{2+} あるいは Mg^{2+} を除去することにより受容体をより活性化しやすくした場合には細胞の縮小が顕著に認められたのに対して小孔の形成には大きな変化はなかった。一方、興味深いこと

に細胞外液中から Cl^- を除去すると細胞の縮小が抑制された。さらに、細胞障害性に及ぼす影響を調べたところ、細胞外 Cl^- 非存在下で受容体活性化による細胞障害性の上昇は抑制され、 Na^+ 非存在下では増強された。

以上の結果より、1) P2X₇ 受容体による細胞死は生理的条件下では細胞の縮小を伴うアポトーシス様のものが主で細胞外の Cl^- によって制御される、2) 細胞の縮小には強い小孔の形成が必須ではない、3) 細胞外の Na^+ 濃度が低い小孔が形成しやすい条件下ではネクロトーシス様の細胞膨張も生じ細胞死を増強する、ならびに 4) 細胞外の Na^+ による小孔の形成抑制の作用点は受容体活性化より下流にあることが明らかになった。

(P5) 孤束核シナプス伝達制御におけるアデノシン受容体の下流機構：Ca channel is all?

繁富 英治¹, 山崎 弘二¹, 西田 基宏², 森 泰生³, 加藤 総夫¹

(¹ 慈恵医大・神経生理, ² 九州大院・薬・薬物中毒学, ³ 京都大院・工・合成・生物化学・分子生物化学)

中枢神経系に広範に発現するアデノシン A₁ 受容体の多くはシナプス前に局在し、神経伝達物質、特にグルタミン酸の放出の制御に関与している。海馬 CA1、小脳、内側台形体核、舌下神経核を含む多くの神経核において、神経終末の電位依存性カルシウムチャネル (VDCC)、特に N 型 VDCC の抑制が A₁ 受容体活性化による伝達物質放出抑制の主たる細胞内メカニズムである事実が示されている。

内臓知覚情報の中継・統合核である延髄孤束核における 1 次求心線維→孤束核 2 次ニューロン間の興奮性シナプス伝達（以下、孤束核シナプス）も、細胞外アデノシンによるシナプス前 A₁ 受容体活性化によって抑制される (Kato & Shigetomi, J Physiol, 2001; Tsuji & Kato, 2003)。一方、この孤束核シナプスにおけるグルタミン酸放出の約半分の成分がシナプス前 N 型 VDCC からの Ca^{2+} 流入に依存している (Yamazaki, Shigetomi & Kato, 2003)。孤束核シナプス前 A₁ 受容体によるグルタミン酸放出の制御における VDCC の関与を同定するため、N 型 VDCC ノックアウトマウス ($\alpha 1\text{B}^-/-$ マウス) の孤束核スライスにおいて、1 次求心線維電気刺激によって誘発される興奮性シナプス後電流 (eEPSC) を記録し、アデノシンによる抑

制に及ぼす各種 VDCC 遮断の影響を検討した。

$\alpha 1\text{B}^+/+$ マウスにおいてアデノシン (100 μM) は eEPSC 振幅を $30.4 \pm 3.5\%$ 抑制した。この抑制は、omega-conotoxin GVIA (CgTx) によって $12.5 \pm 4.0\%$ まで有意に減少した。 $\alpha 1\text{B}^-/-$ マウスにおいて、CgTx は eEPSC 振幅を変化させなかったが、アデノシンは wild type とほぼ同程度まで ($35.6 \pm 2.5\%$) eEPSC 振幅を減少した。この抑制効果は CgTx によって影響されなかった (CgTx 存在下 $32.3 \pm 3.7\%$)。この結果は、 $\alpha 1\text{B}^-/-$ マウスにおけるシナプス前 A₁ 受容体による eEPSC 振幅の減少が、N 型 VDCC 抑制以外のメカニズムを介していることを示唆する。そこで、中枢神経系の伝達物質放出に関与する他のタイプの VDCC 遮断の影響を検討した。 $\alpha 1\text{B}^-/-$ マウスにおけるアデノシンによる eEPSC 振幅抑制は、omega-agatoxin GIVA, NiCl₂ および nifedipine によって影響を受けなかった。したがって $\alpha 1\text{B}^-/-$ マウスにおける A₁ 受容体活性化の下流機構として、P/Q, R, および L 型 VDCC が関与する可能性は低いと結論した。これらの結果は、シナプス伝達抑制に関与する A₁ 受容体活性化の標的となる標的分子機構が、シナプス前 VDCC のタイプおよびタンパク質発現量により、flexible に変化する可能性を示している。

(P6) MNTB ニューロンにおける内因性の ATP による抑制性シナプス後電流の制御

綿野 智一, 松岡 功, 木村 純子
(福島医大・医・薬理)

Medial nucleus of the trapezoid body (MNTB) は脳幹において音源定位に関わる聴覚中継に重要な働きをしている神経である。我々は MNTB ニューロンにおいて、プリン受容体を介するシナプス後電流の制御について検討し、外から添加した ATP や ATP γ S が adenosine に分解されることにより、抑制性誘発シナプス後電流 (eIPSC) を抑制することを見出し昨年の本研究会で発表した。しかし、内因性の ATP あるいはその分解産物である adenosine がこのような制御を行っているかどうかは明らかにされていない。今回我々は内因性の ATP による制御の有無を明らかにするため、eIPSC に対する ecto-ATPase 阻害薬の ARL67156 および adenosine A1 受容体アンタゴニストの DPCPX の作用を検討した。9-14 日齢の Wistar 系ラット脳幹より 180-200 μ m のスライスを作成し、ホールセルパッチクランプ法により電流を記録した。昨年度報告したように、二極性の白金刺激電極を MNTB ニューロンから離れた正中線において刺激すると eIPSC の電流値は小さく、ばらつきも大きい電流値の増強を見る

のは困難であった。しかし、刺激電極を MNTB ニューロンの近傍に置くことにより安定した eIPSC を記録することができ、評価が可能になった。刺激により同時に発生する興奮性誘発シナプス後電流 (eEPSC) は kynurenic acid で抑制し eIPSC のみを記録した。ARL67156 (50 μ M) は eIPSC を増強し、DPCPX (10 および 100 nM) も濃度依存的に eIPSC を増強した。これらの増強作用は薬物添加後直ちに観察されたことから、正常状態で常に ATP が遊離し ecto-ATPase および他の分解酵素により adenosine にまで分解され A1 受容体を介して eIPSC を抑制していると考えられた。また、外から加えた GABA により誘発される電流は ARL67156 および DPCPX で影響されなかったことより、これらの制御部位はプレシナプスであることが明らかとなった。しかし、その制御を行っている ATP が神経終末から放出されたものか、グリア細胞から遊離したものか、あるいはそれ以外の機序によるのかは明らかでなく今後の検討課題である。

(P7) ATP による血管周皮細胞ペリサイトーアストロサイト関連

小泉修一¹, 藤下加代子², 井上和秀²
(国立衛研・¹薬理, ²代謝生化学)

グリア細胞、特にアストロサイトが、中枢神経系のシナプス伝達に積極的に関与していることが明らかとなり、グリア-ニューロン関連の研究は近年大変盛んになってきている。アストロサイトはシナプスとのコミュニケーションを司る一方、他方で血管系にも手足を伸ばしている。アストロサイトは、血管内皮細胞、血管周皮細胞 (ペリサイト) と共に BBB 形成能に強い影響を与える。また、近年の報告では、ニューロンの活動がアストロサイト由来の細胞外液性因子の情報に置き換わり、これが脳血管の血流を制御するとの報告もなされている (Zonta et al., Nat Neurosci., 6, 43-50, 2003)。我々はこれまでに、アストロサイトが細胞外 ATP を介し、近傍ニューロンのシ

ナプス伝達をダイナミックに制御していることを報告してきた。今回、このアストロサイトと血管系の関係を、特にペリサイトとの関連で明らかとしたので報告する。

ヒトペリサイトは各種 P2 受容体を発現しており、P2X₄, P2X₇, P2Y₂ 及び P2Y₆ 受容体が主たる受容体であった。ペリサイトは自身も収縮能を有するが、常に血管の収縮・弛緩による機械刺激にさらされている。ペリサイトに機械刺激を与えると、ペリサイト間に Ca²⁺ wave が伝播し、これは apyrase 及び P2 受容体拮抗薬により消失した。また、ペリサイトは機械刺激に応答して ATP を放出した。従って、ペリサイトは血管の物理的な形態変化に応答して ATP を放出し、周辺細胞とコミュニケーションを取っ

ている可能性が示唆された。さらに、海馬の初代培養系の免疫組織学的検討により、この培養系にはニューロン、アストロサイトに加え、ペリサイトが存在していることが明らかとなった。ペリサイトに刺激を与えると、その情報は、ATP 依存的にアストロサイトに伝わった。Zontaらは、シナプス伝達が、glutamate→アストロサイト→NOの経路で血管系に伝わって血管の弛緩を引き起こすことを報告したが、我々は、逆に血管周皮細胞ペリサイトの

機械刺激（伸展刺激）がアストロサイトに伝わること、またこのとき ATP が重要な役割を果たしていることを示した。さらに本実験結果は、血管系に端を発するペリサイト→アストロサイト→シナプスへのフィードバックシグナルが存在する可能性、またそのフィードバック経路における細胞外 ATP の重要性を示唆する興味深い結果であると考えられる。

(P8) 脳スライス細胞外 ATP の可視化

加藤総夫, 川村将仁, 繁富英治

(東京慈恵会医科大学神経生理学研究室)

中枢神経系における細胞外 ATP シグナリングの意義を理解する上で、ATP の細胞外放出機構を解明することは避けられない重要課題である。特に、in situ あるいは脳スライスなどの ex vivo 標本における細胞外 ATP 動態は、ATP がどのような状況下において細胞間シグナルとして機能するのかを解明する上で重要な情報をもたらす。現在までに、1) スライス灌流液中の ATP 含量の luciferine-luciferase 法による定量 (very bad time resolution - no spatial information), 2) スライス内に刺入した 2 層酵素バイオセンサーを用いた細胞外 ATP もしくはアデノシンのリアルタイム定量 (not yet commercially available), 3) 電気刺激および薬理的単離によるシナプス後 P2X 受容体電流の計測 (not found everywhere), 4) 連続的高頻度刺激後に観察される ATP 投与と類似した反応の観察 (unidentified source of release), あるいは、5) photomultiplier 管を用いた ATP 依存性生物発光の計測 (no spatial information), などの手法によって脳スライス内での ATP 放出を観察したとする報告がある。我々は、超高感度フォトン・カウンティング CCD カメラを用いて、luciferin-luciferase 反応によって生じる ATP 依存性生物発光を検出することによって脳スライスにおける ATP 放出の画像化を試みた。ラット孤束核、海馬、大脳皮質スライスを作成し、luciferin-luciferase を含む人工脳脊髄液中に浸して電気刺激を行った。生物発光をイメージインテンシファイアーで増感し VIM カメラで撮像した (露出時間, 2.5 - 30 s; 空

間分解能, 0.48 micron/pixel; 640 by 480 pixels)。下記の結果を得た。(1) 0.5 - 1 mA, 10 Hz, 10-30 s の電気刺激で、細胞外 ATP 濃度の上昇を表す発光検出密度 (以下[ATP]o) の増大が刺激電極設置部位の近傍で認められた。(2) 最高 2.5 s の時間分解能で [ATP]o の増大およびその減衰の経時的変化を検出し得た。(3) 求心性線維の刺激によって、線維の終末部ではなく刺激部の近傍において [ATP]o の上昇が認められた。(4) 刺激電極近傍の [ATP]o 上昇は、TTX 1μM あるいは細胞外 Ca²⁺ 除去によって消失しなかった。(5) 20 mM KCl 投与によって [ATP]o は上昇しなかった。ならびに、(6) [ATP]o 上昇は海馬において、部分的に 5-nitro 2-(3-phenylpropylamine) benzoic acid (NPPB) で減弱したが、皮質ではその影響はなかった。以上の結果から、1) シナプスにおいて放出される ATP は、本法の検出限界以下である、および、2) 連続的電気刺激は非シナプス性に神経興奮を介さない ATP 放出を惹起する、可能性が示された。現在までの研究において用いられてきた脳スライスにおける連続電気刺激 (例、海馬 LTP) は、刺激部位近傍において放出された ATP の効果を含んでいる可能性がある。

参考文献

Hamann M & Attwell D (1996). Non-synaptic release of ATP by electrical stimulation in slices of rat hippocampus, cerebellum and habenula. *Eur J Neurosci* **8**, 1510-1515

(P9) アデノシンによる MDCK 細胞からの ATP 放出とそのシグナリング

右田啓介, 趙玉梅, 桂木猛
(福岡大・医・薬理)

【背景】多くの非神経細胞から, ATP の細胞外放出が確認されている。放出された ATP は細胞外の ATP 代謝に関わる ecto-nucleotidase により, ADP, AMP, アデノシンへと代謝される。最終産物のアデノシンは, 細胞外での重要な情報伝達の役割を果たしている。今回, 我々はアデノシンにより ATP が細胞外へ放出されることを MDCK 細胞で見出した。そこで, 本研究では, アデノシン刺激による ATP 放出における細胞内シグナルについて検討した。

【方法】実験には MDCK 細胞を用いて, 灌流実験を行った。アデノシン刺激により灌流液中に放出された ATP 量は, ルシフェリン・ルシフェラーゼを用いて測定した。また, 灌流実験により, Fluo-4 /AM を用いて細胞内カルシウムの測定を行った。

【結果および考察】10 μ M アデノシンを灌流すると, MDCK 細胞から ATP の遊離がみられた。この遊離は, 10 μ M CPT (アデノシン A1 受容体拮抗薬) により抑制され, 10 μ M

DMPX (A2 受容体拮抗薬) では抑制されなかった。また, ATP の放出は, 10 μ M U-73122 (ホスホリパーゼ C 拮抗薬), 50 μ M 2-APB (IP3 受容体拮抗薬), 1 μ M thapsigargin (Ca²⁺-ATPase 阻害剤) および 50 μ M BAPTA/AM (細胞内 Ca²⁺キレート剤) で優位な抑制がみられた。また, 細胞内カルシウム測定実験から, 10 μ M アデノシンにより細胞内カルシウムの上昇がみられ, その反応は 10 μ M CPT により抑制され, 10 μ M DMPX および 10 μ M MRS-1191 (A3 受容体拮抗薬) では抑制されなかった。さらに, アデノシンによる細胞内カルシウムの上昇は 10 μ M U-73122, 50 μ M 2-APB, 1 μ M thapsigargin で優位に抑制されたが, 10 μ M nifedipine (L 型カルシウムチャネル拮抗薬) では抑制されなかった。これらの結果から, アデノシン刺激により引き起こされる A1 受容体を介した ATP の細胞外放出は, IP3 受容体を介した細胞内カルシウムの上昇が必須であること, および ATP 放出におけるその代謝産物による positive feedback 機構の存在が示唆された。

(P10) ラット脳視床下部スライス標本の細胞外 ATP におよぼす UTP の作用

小野 委成, 松岡 功
(福島県立医科大学・医学部・薬理学講座)

中枢神経系には多くの ATP 受容体サブタイプが分布し, 神経伝達の制御に関与することは明らかであるが, ATP がどのように放出されるかについては未だ不明である。これまで私達は, 電気刺激によるラット脳スライス標本からの ATP 放出反応は, 末梢神経系と異なりテロドトキシン抵抗性で, Cl⁻チャネル阻害薬で抑制されることを報告した。本研究では, ラット脳視床下部スライス標本を用いて, 細胞外 ATP 動態におよぼす種々の生理活性物質の作用を検討し, UTP が細胞外 ATP を上昇させることを見出したのでその作用機序について検討した。Wistar 系雄性ラット(3-16 W)の脳から視床下部スライス標本作製し, 灌流装置のグラスファイバーフィルター上に保持し Krebs-Ringer 液で表面灌流した。薬物は, 灌

流液中に添加し, 2 本のリング状白金電極を介して電気刺激を行った。灌流液中の ATP 量は, ルシフェリン・ルシフェラーゼ法で測定した。視床下部スライス標本をノルアドレナリン, ドパミン, カルバコール, ニコチン, グルタミン酸, GABA, ブラジキニンで刺激しても細胞外 ATP 量の上昇は認められなかった。これに対し, UTP(10 μ M)は, それ自身で灌流液中の ATP 量を増加させるとともに電気刺激による ATP 放出量を増強した。しかし, UDP (10 μ M)ではこれらの作用は認められなかった。一方, ADP (10 μ M)もそれ自身で著明に灌流液中の ATP 量を増加させたが, ADP 特異的な受容体にはアゴニストとして作用する ADP β S(10 μ M)では ATP 量は変化しなかった。さらに, 他のヌクレオチド三リン酸(CTP, GTP)でも灌流液中の

ATP量の増加が認められたことから、UTPの作用はP2Y受容体を介したものではないと考えられた。低濃度のADP(10 nM)存在下にUTPを作用させるとATP量の上昇は著しく増強された。このADPの効果はADPβSでは認められなかった。[3H]Adenineで標識したスライス標本を用いて内因性のアデニンヌクレオチドの放出を測定し

た結果、UTP(10 μM)は、それ自身でわずかな放射活性の放出を生じたが、ADP(10 nM)による放射活性放出の増強は認められなかった。以上の結果から、UTPは細胞外に存在するヌクレオチド変換酵素の基質となり、スライス標本に微量に存在するADPをATPに変換し、細胞外ATP量を上昇させることが示唆された。

(P11) 細胞外マトリックスとミクログリアのP2受容体

国房恵巳子¹, 多田薫², 小泉修一², 津田誠¹, 井上和秀^{1,3}
(国立衛研・¹代謝生化学, ²薬理, ³九大・院・薬・分子制御)

【緒言】ミクログリアは中枢神経系に特化した細胞で、様々な障害に応答することで脳内の恒常性維持に重要な役割を果たしている。ミクログリアの活性化因子の一つに細胞外ATPが挙げられる。ATPは、ミクログリアに発現しているP2XやP2Y受容体を活性化し、ミクログリアのATPの濃度勾配に従った走化性やサイトカインの産生及び放出を引き起こす。中枢神経系の障害部位では、ATPの他にも細胞外マトリックスのフィブロネクチンやラミニンが増加し、また、活性化型ミクログリアはそれらの受容体であるインテグリン分子も多く発現している。しかし、細胞外マトリックスのインテグリンを介したシグナルが、P2XやP2Y受容体発現に与える影響は不明である。そこで今回、初代培養ミクログリアを用いて、ATP受容体の遺伝子発現に対するフィブロネクチンの効果について検討した。

【方法】実験にはウィスター系新生仔ラットの前脳から初代培養したミクログリアを用いた。ATP受容体mRNA発現量は、リアルタイムRT-PCR法により定量化した。P2X₄

受容体タンパク質は、ウェスタンブロッティングにより検出した。ATPによるミクログリアの細胞内カルシウム応答は、Fura-2蛍光法によりカルシウムイメージングにより観察した。

【結果】ミクログリア細胞をフィブロネクチン上で培養することにより、ミクログリアのP2X₄受容体mRNAの発現が増加し、一方、P2Y₆受容体の発現は低下した。また、P2X₄受容体は発現タンパク質レベルも増加した。さらに、ATP50μMに対する細胞内カルシウム応答も増大し、そのカルシウム応答は細胞外カルシウムイオンを除外することでその殆どが消失した。

【結論】ミクログリアにおいて、フィブロネクチンは、おそらく細胞接着分子インテグリンを介したシグナルにより、P2X₄受容体およびP2Y₆受容体の発現を制御していることが示唆され、フィブロネクチンがそれらP2受容体の発現変化を介してミクログリア機能を制御している可能性が予想される。

(P12) ATP受容体および新規α7ニコチン性アセチルコリン受容体によるミクログリアの活性制御

鈴木智久 松原明代 秀 和泉 仲田義啓
(広島大・院・医歯薬総合・薬効解析)

グラム陰性菌の細胞膜構成成分であるリポポリサッカライド(LPS)はその特異的受容体TLR4を介してミクログリアを強力に活性化し、大量のTNFを放出させることにより炎症性組織破壊を誘導する。それに対し、ATP

はミクログリアのP2X₇受容体を介して適度なTNF放出を引き起こし、グルタミン酸神経毒性に対し保護作用を発揮する。私達は昨年の当研究会において、おもに神経細胞に発現し神経保護などの機能制御を担うα7ニコチン

ン性アセチルコリン受容体 ($\alpha 7$ 受容体) がラット脳ミクログリアにも発現し, LPS 誘発 TNF を抑制する一方, ATP 誘発 TNF を促進することを報告した。今回さらに, ミクログリアの $\alpha 7$ 受容体は神経に発現するイオンチャネル型 $\alpha 7$ 受容体とは異なり, 細胞外 Ca^{2+} に依存せず phospholipase C の活性化を介し IP_3 感受性 Ca^{2+} 貯蔵部位から Ca^{2+} 遊離を引き起こすことを明らかにした。また, ニコチンはこの新規 $\alpha 7$ 受容体を介して, LPS 刺激による JNK および p38 活性化を抑制し, TNF 産生の転写後調節の段階を抑制することが示された。一方, ATP および P_2X_7 受容体アゴニスト BzATP はニコチンと同様, あらかじめミク

グリアを活性化することにより LPS 誘発 TNF 遊離を著しく抑制し, この効果は P_2X_7 受容体遮断薬 Brilliant Blue G で抑制された。

以上の結果から, P_2X_7 受容体は神経保護作用を発揮する TNF の放出を引き起こすが, $\alpha 7$ 受容体はこの P_2X_7 受容体の機能を高めること, さらに P_2X_7 受容体と $\alpha 7$ 受容体はいずれも LPS による有害な TNF 放出を抑制することにより炎症を抑える可能性が明らかとなった。従って, P_2X_7 受容体と $\alpha 7$ 受容体はともにこれら複数のメカニズムを介してミクログリアの性質を神経保護に向け制御することが示唆された。

(P13) $\beta 1$ インテグリンを介するミクログリアの増殖・ケモタキシスと P_2Y_{12} 受容体

多田 薫¹, 小泉修一¹, 井上和秀^{2,3}

(国立衛研・¹薬理, ²代謝生化学, ³九大・院・分子制御)

ミクログリアは中枢神経系における免疫担当細胞として知られ, その神経保護作用と過剰な活性化による神経ダメージの二面性が注目を浴びている。インテグリンは α 鎖と β 鎖から成るヘテロダイマーの接着分子であるが, ミクログリアは $\beta 1$ インテグリンを介してフィブロネクチンに接着し活性化を受ける事が知られている。フィブロネクチンは細胞外基質分子の一つで, 生体での役割は細胞の接着, 移動, 分化など多岐にわたる。CNS 内ではその発現は限られており, フィブロネクチンやその他の細胞外基質分子は CNS 形成時に特にアストロサイトによって産生され, その後は特に CNS の傷害・病態時に発現されることがわかっている。細胞外ヌクレオチドは信号伝達物質としての作用を有するが, 近年 ATP と ADP が Gi/o-coupled P_2Y を介し, ミクログリアの遊走誘導因子 (chemoattractant) として機能していることが判明した (Honda. et.al. J. Neurosci. 2001)。 P_2Y_{12} 受容体は P_2Y ファミリーに属する Gi 共役型の受容体で, 血小板やミクログリア上で多く発現されている。前回の報告では, ADP により誘導されるケモタキシスの責任受容体が P_2Y_{12} 受容体である事を確認し, このケモタキシスはフィブロネク

チン存在下では $\beta 1$ インテグリンに依存的である事, ADP 刺激により $\beta 1$ インテグリンはメンブレン・ラフリングへ translocation を起こし, これは cAMP/PKA 依存的な抑制制御を受けている事を示した。

今回我々は, フィブロネクチンや $\beta 1$ インテグリンのクロスリンクがミクログリアの増殖を促進する事を見出した。ADP を $\beta 1$ インテグリンのクロスリンク培養系に加えるとその増殖が失われる事より, ADP はミクログリアの増殖に対して抑制的であることがわかった。この ADP の抑制作用は ARC-69931 で阻害される事より, ミクログリア増殖の抑制には P_2Y_{12} 受容体からのシグナルが関与していることが示唆された。更に, $\beta 1$ インテグリンによるミクログリア増殖は KT-5720 を加えると失われる事より, PKA が増殖促進に関与している事が示された。

ミクログリアのケモタキシスと増殖は CNS 内の様々な障害, 病態と深く関わっている。そのメカニズムや制御機構の解析は重要であり, この 2 つの細胞機能における PKA を介しての P_2Y_{12} 受容体の関わりは非常に興味深い。

(P14) P2Y₆受容体活性化によるミクログリア細胞のファゴサイトーシス能の増大重本-最上由香里¹, 小泉修一², 多田薫², 津田誠¹, 井上和秀^{1,3}(国立衛研・¹代謝, ²薬理, ³九大院・分子制御)

ミクログリアは脳の病態時や損傷時に活性化し神経組織の再生修復など, さまざまな役割を果たしている。この活性を制御する主要な伝達系として近年, P2 受容体が注目されている。前回我々はラットミクログリアにおいて, これまでに報告されていた P2 受容体に加え, 機能的な P2Y₆受容体が発現していることを報告した。また, P2Y₆受容体アゴニスト UDP は, 濃度依存的にミクログリアの Ca²⁺上昇および MAPK の活性化, 細胞膜のラフリングを引き起こした。さらに P2Y₆受容体活性化にともなう細胞膜の変形によりビーズの細胞膜への接着が増大し, 結果として, ミクログリアのファゴサイトーシス能が増大している可能性を報告した。

今回我々は, フローサイトメトリーを用いて, ミクログリアのファゴサイトーシス能を定量的に測定することを試みた。その結果, UDP は 5μM と低濃度から, 濃度依存的にミクログリアのファゴサイトーシスを増大した。さらにこの反応は P2Y₆受容体アンタゴニストおよび,

PLC 阻害剤 U73122, ストアの Ca を枯渇する thapsigargin, PKC 阻害剤 staurosporin によって有意に抑制された。一方, PI3Kinase 阻害剤である wortmannin 及び Ly294002 は, ほとんど影響を与えなかった。以上の結果から, ミクログリアにおいて, P2Y₆受容体活性化により PLC 活性化, [Ca²⁺]_i 上昇, PKC 活性化といったシグナルを介して, ファゴサイトーシス能が増大していることが示唆された。さらに, Fc 受容体の凝集によって生じるファゴサイトーシスに重要なシグナルである PI3Kinase は, この反応には関与していなかった。以上, ミクログリアのファゴサイトーシス能と P2Y₆受容体及びその細胞内シグナル経路の一端が明らかとなった。現在, 脳の病態・損傷時におけるミクログリアのファゴサイトーシスと P2Y₆受容体の関与についての検討が進行中であり, 病態と P2Y₆受容体の直接的な連関についても考察する予定である。

(P15) アデノシン A_{2A}受容体と P2Y 受容体のヘテロダイマー形成

小柳洸志, 津賀浩史, 神谷敏夫, 中田裕康

(東京都神経研・生態機能分子)

【目的】血小板中には, 種々のプリン受容体 (P2Y₁受容体, P2Y₁₂受容体, P2X₁受容体, アデノシン A_{2A}受容体) が存在して, 血液凝固系をコントロールしていると考えられているが, その詳細, とりわけプリン受容体間の相互作用は不明なところが多い。そこで, これらのプリン受容体系のモデルとして, 今回は P2Y₁受容体とアデノシン A_{2A}受容体を共発現させた HEK293T 細胞を用い, 免疫沈降法, Binding assay を利用し, 受容体間の直接的な相互作用の解析を行った。

【操作】myc-P2Y₁受容体と HA-A_{2A}受容体の cDNA をそれぞれ単独もしくは一緒に HEK293T 細胞に導入し, 培養 48 時間後の細胞膜画分を分析した。各受容体の発現やヘテロダイマー形成の有無は, 抗 myc 抗体及び抗 HA 抗

体などによる Western blotting と免疫共沈降法によって解析した。

【結果・考察】両受容体を同時に発現させた HEK293T 細胞膜の抽出画分の免疫沈降を行い, Western blotting で分析したところ, P2Y₁受容体と A_{2A}受容体が共沈降することが確認できた。また, P2Y₂受容体と A_{2A}受容体を共発現させた系でも両受容体が共沈降することが確認できた。これらの結果, 培養細胞系においては, P2Y₁受容体と A_{2A}受容体, および P2Y₂受容体と A_{2A}受容体のヘテロダイマー形成の可能性が示唆された。あわせて受容体共発現によるリガンド結合活性及びエフェクター活性の変化についても報告する。

(P16) アデニル酸シクラーゼの内因性阻害物質3'-AMPの産生酵素の生体内分布

藤森 廣幸, 芳生 秀光
(摂南大・薬・衛生分析化学)

ATPの代謝産物の一種である adenosine (Ado) は細胞外から Ado 受容体を介して adenylate cyclase 活性を調節しているが, adenylate cyclase 本体の”P”サイトを介して cAMPの産生を抑制することも薬理的には知られている。Adoの3'位の水酸基にリン酸が結合した3'-AMPは内因性の”P”サイト阻害物質に分類されており, その adenylate cyclase 阻害活性は Ado より強いことが知られている。しかし, 3'-AMPの生体内運命あるいは生体内意義は未だ不明である。

細胞内の3'-AMPは, 基質となりえる各種のリボ核酸からリボ核酸分解酵素 (RNase) により産生されることが推定される。最近, 我々は偶然に肝ミトコンドリア内で exo 型の RNase により 3'-AMP が産生されることを見だし, この RNase を 3'-AMP 産生酵素と呼ぶことにした。今回は, 3'-AMP 産生酵素の生体内意義解明の一端として, まず 3'-AMP 分析系を確立した後, マウスの臓器中の

3'-AMP 産生酵素の生体内分布について検討した。

組織中の 3'-AMP 等を含む酸可溶性物質を過塩素酸で抽出した。3'-AMP 産生酵素活性は基質 poly(A)を用いて測定した。3'-AMP 等の adenine 類は標識試薬 chloroacetaldehyde で蛍光化した後, HPLC 法により分離・定量した。

脾臓, 胸腺, 肝臓, 脳, 心臓, 脾臓等のマウス臓器中の遊離 3'-AMP は 5'-AMP 含量より低い, 比較的少量に存在していることが明らかとなった。脳中の 3'-AMP 含量は生後1週間後に最大となり3週齢まで持続したが, 5週齢では約1/5に減少した。3'-AMP 産生酵素活性は 3'-AMP を含む諸臓器中には存在することが明らかとなった。以上の結果より, 3'-AMP は ATP 等の 5'-AMP 系とは異なった代謝経路で産生され, その産生酵素は脳を含む諸臓器の機能に影響を及ぼしていることが示唆された。

(P17) マウス味蕾細胞基底膜の ATP 受容体分布

早戸亮太郎 吉井清哲
(九州工業大学大学院・生命体工学研究科・脳情報専攻)

味蕾は, 味情報を受容し生体信号に変換して脳に情報を伝達する。哺乳類の味蕾は, 約50個の味蕾細胞から構成されている。我々の研究により, 味刺激に対し, 約50%の味蕾細胞が脱分極性あるいは過分極性応答を示すこと, 応答を示した細胞はその受容器電位の極性に従ってグルーブを形成すること, がわかった。この結果は, 味蕾細胞間にネットワークが存在する事を示唆する。

ATP受容体が味蕾細胞内に存在する事はすでに報告されている。そこで我々は, 細胞内カルシウム濃度変化を

指標として, マウス味蕾細胞基底膜の ATP 受容体分布を光学的に測定した。その結果, 8味蕾中4味蕾で ATP による細胞内カルシウム濃度増加が生じること, ATP に応答を示した細胞数は応答した1味蕾あたり 4.5 ± 1.7 (mean $\pm$ SD) 個であること, ATP に応答を示す細胞は味蕾内中心部に多く分布していることがわかった。これらの結果は, ATP を用いた味情報修飾が, 味蕾内で行われていることを示唆する。

(P18) レチノイン酸による皮膚 P2Y₂ 受容体の発現制御藤下 加代子¹, 小泉 修一², 井上 和秀^{1,3}(国立衛研・¹代謝生化学部, ²薬理部, ³九州大学・院・薬・分子制御)

皮膚は、分化に伴い、基底細胞層から角質層までの層構造を形成している。現在のところ、各分化段階に特異的な P2 受容体の発現が知られており、各々が異なるシグナルを伝達することにより、細胞の分化や増殖を制御する可能性が示唆されている (J. Invest. Dermatol., 2002, 120(3): 440-447; J. Invest. Dermatol., 2003, 120(6): 1007-1015)。皮膚は乾燥や紫外線などの外部刺激に直接曝されることから、ダメージを受けやすい組織であるが、その対処法の1つとして、ビタミンAの活性代謝物であるレチノイン酸 (RA) を使用した化粧品や医薬品が臨床で実際に応用されている。そこで、ヒト正常表皮角化細胞 (NHEKs) を RA 及びその類似化合物で処置した時、P2 受容体の遺伝子発現や蛋白質の機能にどのような変化が誘導されるのか、検討を行なった。

RA 処置後、NHEKs における mRNAs の発現量変化を DNA chip 及びリアルタイム RT-PCR を用いて検討

した。RA は基底細胞層の増殖と強く関連している P2Y₂ 受容体 (J. Invest. Dermatol., 2003, 120(6): 1007-1015) mRNA の発現量を濃度及び処置時間依存的に著しく増加させた。また、fura-2 法に基づく Ca²⁺ imaging 法により細胞内 Ca²⁺ 濃度を測定すると、RA 処置後の NHEKs では、P2Y₂ 受容体アゴニストに対する Ca²⁺ 応答が増大することが明らかとなった。この作用は、RAR (retinoic acid receptor) 合成アゴニスト Am80 でも再現された。NHEKs は機械刺激依存的にも自発的にも ATP を放出し、NHEKs 細胞間に Ca²⁺ wave を発生させる。RA は機械刺激依存的な ATP 放出能には影響しなかったが、刺激非依存的な ATP 放出量を低下させた。本研究より、RA が機能的な P2Y₂ 受容体を増加させる一方で細胞外 ATP 放出量を制御し、表皮の増殖/分化を巧妙に調節していること、またこれら P2Y₂ 受容体増加及び ATP 放出量の制御が RA の臨床効果と関係している可能性が示唆された。

(P19) ATP による大腸癌細胞の増殖抑制作用の検討

西藤 勝, 山本悟史, 西崎知之

(兵庫医科大・医・生理学第2)

本研究は Caco-2 ヒト大腸癌細胞株の細胞増殖に対する ATP の効果を検討した。ATP は Caco-2 細胞生存率を濃度および処理時間依存性に、有意に減少させた。この ATP 効果は非アポトーシス性であり、細胞増殖を S 期でとめる作用によるものであることが明らかとなった。ATP と同様の効果が 2-methylthio ATP, UTP で認められたが、 α,β -methylene ATP, β,γ -methylene ATP では認められなかった。また、ATP の効果は suramin で抑制されたが、PPADS では影響されなかった。これらの結果は、ATP が P2Y 受容体を介して Caco-2 細胞増殖を抑制すること

を示唆している。現在クローニングされているほとんどの P2Y 受容体は Gq 蛋白質と共役しており、PKC の活性化に関与している。しかしながら、ATP の効果は PKC 阻害剤で増強され、逆に PKC 活性化剤で抑制された。さらに、ATP は Caco-2 細胞における PKC 活性ならびに MAP キナーゼ活性を抑制していた。このように、ATP は新しい P2Y 受容体を介して PKC 活性を低下させ、その結果、PKC の下流標的の一つである MAP キナーゼ活性を低下させることにより Caco-2 細胞増殖を抑制しているかもしれない。

9. カルシウムシグナリング研究の新潮流

2004年11月18日-11月19日

代表・世話人：山内 卓（徳島大・薬）

所内対応者：井本 敬二（神経シグナル）

(1) カルモデュリンの構造と機能

矢沢 道生（北大）

(2) カルモデュリン結合認識の多様性

松原 守（カルナバイオサイエンス(株)）

(3) penta-EF ハンドカルシウム蛋白質 ALG-2 の相互作用因子とメンブレントラフィック制御

牧 正敏（名大院）

(4) S100 の新しい機能 -シャペロン活性-

小林 良二（香川大・医）

(5) トロポニンの結晶構造と筋収縮調節メカニズム

武田 壮一（国立循環器病センター）

(6) カルパインの新しい Ca^{2+} -結合モチーフと構造・機能相関

反町 洋之（東京都臨床医学総合研究所）

(7) シナプス機能調節における CaM kinase II の役割

山内 卓（徳島大）

(8) 不活性型 CaM kinase II α 遺伝子改変マウスを用いた脳機能の解析

山肩 葉子（生理研）

(9) 神経系における CaM kinase I の発現と機能

阪上 洋行, 近藤 尚武（東北大）

(10) CaM kinase カスケードのシグナル伝達と生理機能

徳光 浩, 小林 良二（香川大）

(11) CaM kinase ファミリーを中心としたプロテインキナーゼの網羅的検出と解析

亀下 勇, 末吉 紀行（香川大）

(12) 神経型 NO 合成酵素のリン酸化による調節

渡邊 泰男, 徳田 雅明（香川大）

(13) 14-3-3 による CaM KK の調節

市村 徹（都立大）

(14) シナプス後肥厚部におけるタンパク質相互作用のリン酸化による調節

鈴木 龍雄, 田 慶宝, 宮沢 昌子（信州大）

(15) Homer-3 の CaM kinase II によるリン酸化

水谷 顕洋, 御子柴 克彦（JST・カルシウム振動）, 古市 貞一（理研・脳研）

(16) タウの CaM キナーゼ II によるリン酸化反応のアルツハイマー病への関与

山本 秀幸（熊本大）

【参加者名】

山内 卓（徳島大・院・ヘルスバイオサイエンス研究部）, 阪上 洋行（東北大・院・医）, 鈴木 七緒（埼玉大・理）,
矢沢 道生, 中澤 晶子, 高橋 さおり（北大・院・理）, 水谷 顕洋（東大・医科研）, 市村 徹, 阿部 高秋,

垣内 一恵 (東京都立大・理), 湯本 史明 (慈恵医大), 反町 洋之 (東京都臨床研), 鈴木 龍雄 (信州大・院・医), 牧 正敏, 柴田 秀樹, 大河内 進, 和田 文孝, 寄川 千晴, 市岡 史高, 堀井 美緒 (名大・院・生命農学), 武田 壮一, 五十嵐 智子 (循環器病センター研), 松原 守 (カルナバイオサイエンス), 吉村 好之, 一瀬 竜也, 塚根 まり子, 有永 和代, 村田 宣昭, 森田 秀樹, 櫻田 巧,

友廣 真也, 畑 政孝 (徳島大・薬), 徳田 雅明, 渡辺 泰男, 山口 文徳, 杉本 勝良, 波多野 直哉, 宋 濤, 門脇 加枝, 久米 広大, 小林 良二, 徳光 浩 (香川大・医), 亀下 勇, 末吉 紀行 (香川大・農), 山本 秀幸 (熊本大・院・医), 山肩 葉子, 西巻 拓也, 加勢 大輔, 佐竹 伸一郎, 温井 美帆, 井上 剛, 北村 明彦, 井本 敬二 (生理研)

【概要】

ヒトゲノムの解読も終了し、遺伝子の構造も判明した今、細胞機能をタンパク質機能の総合的制御という観点から知ることが重要になっている。我々はこの試みを、カルシウムシグナリング研究において当てはめ展開する。

カルシウムシグナリングにおいては、カルシウム結合蛋白質がシグナルを受容し、それを次の蛋白質・酵素との相互作用により実現することが一般的である。1980年代から1990年代にかけては、シグナル伝達的一大潮流として世界中で多くの研究がなされたが、1990年代後半からは研究者の数も減り、「カルシウムシグナリング」という名において体系的な整理が十分になされていない状態である。しかしながら現在においても、カルシウムシグナルは非常に多くの生理機能において重要な役割を果たしていることに変わりはない。そして研究課題の解析法・アプローチ法の一部として、カルシウム濃度を測定したり、カムキナーゼによるリン酸化による効果解析などを用いることは一般的であり、カルシウムシグナル系

を扱っている研究者数は、潜在的には決して少なくない。

本セミナーでは、そのように重要な機能を有しているカルシウムシグナリングにおいて、ダイナミックな情報処理基礎過程を担う重要な分子の制御機構と働きに注目して、最新の知見の発表と議論を行う。そしてこのセミナー全体をとおして、再びカルシウムシグナリングを中心に据えた形での体系化を試みたい。こうしてかつてのブームから10余年経った今、我々の手で、カルシウムシグナリング研究の新しい潮流を築くことを目的としている。

第一部では『EF ハンドカルシウム結合蛋白質の新たな展開』として、(1)～(6) 課題で、カルモデュリンをはじめ最近注目されている EF ハンドカルシウム結合蛋白質のカルシウム受容機構とその後のシグナル伝達様式および新しい機能を紹介する。それを受けて、第二部では『カルモデュリン依存性酵素の新しい展開』として、(7)～(15)の課題で、カムキナーゼを中心としたカルモデュリン依存性酵素の機能およびそのシグナリング機構を、神経組織ばかりでなく様々な組織において全容の解明に迫る。

(1) カルモデュリンの構造と機能

矢沢 道生, 中富 晶子 (北大・院・理)

カルシウムシグナリングの歴史を考えると、まずカルシウムイオンの細胞内シグナル伝達物質としての役割の生化学的な認識があり、それは江橋らの骨格筋筋肉収縮制御蛋白質トロポニンの発見に始まる。Kretsinger によるコイ筋肉パルブアルブミンの立体構造の解析結果は、この蛋白質がカルシウムイオンを結合していることを明らかにしたばかりではなく、カルシウムイオンを特異的に結合する構造モチーフ—EF ハンド構造—を提唱し、それが広く受け入れられる結果となった。その後、トロポ

ニン複合体のカルシウムイオン結合成分であるトロポニン C の一次構造中にも EF ハンドモチーフが 4 カ所で確認された。これと相前後して、筋収縮以外の細胞生理機能の調節にカルシウムイオンが鍵を握るという事実が生化学的に示され、トロポニンとは異なるカルシウムイオン結合蛋白質としてカルモデュリンが発見された。カルモデュリンの一次構造中にも 4 カ所で EF ハンドモチーフが確認された。トロポニン C は横紋筋の収縮制御に特化しているが、カルモデュリンは真核細胞の多様な生理

機能のカルシウムシグナル制御因子として機能しており、EF ハンドカルシウム結合蛋白質の典型、またはプロトタイプとしてとらえることができる。この講演では、まず、カルモデュリンの分子構造の組み立てについて、カルシウムイオン結合構造、および生理機能発現に至る標的酵素の認識・活性化の構造的要因といった面から、我々の得た酵母カルモデュリンについての結果も紹介しながら復習する。後半では、カルモデュリン依存性プロテインホスファターゼ カルシニューリンを例にとって他のシグナル伝達機構とのクロストークについて紹介し、細胞の生理機能の調節過程をより体系的に理解する流れについてふれる。T 細胞の活性化過程で起きる転写因子 NF-AT の核内移行は、カルシウムシグナルによりカルシニューリンが活性化し NF-AT が脱リン酸化されることで進行する。一方で、NF-AT のリン酸化レベルを維持・増強して細胞質内に留めたり戻したりする過程は、カルシウムシグナルとは別の経路で制御されるという。

このように、カルシウムシグナルは他のシグナル伝達過程と協調して調節過程を作りあげている。精子形成過程では、カルシニューリンは減数分裂直後に精細胞核内に顕著に観察できる。我々は、カルシニューリンの機能を明らかにしようとする過程で新規カルシニューリン結合蛋白質(CaNB75)を発見した。CaNB75 はカルシニューリンと特異的に結合するばかりではなく、その C 末端ドメインで核内外輸送制御タンパクとして知られる低分子量 G 蛋白質 Ran と結合し、さらに核膜孔複合体に見いだされる FXFG モチーフを3つもつことが明らかになった。この蛋白質の機能を解明する過程で、精子形成過程でのカルモデュリンを介したカルシウムシグナルと、これとクロストークする Ran を介するシグナル伝達過程の新たな協調が明らかになると考える。カルシウムシグナリング研究の新潮流の1例としてこれらの結果について紹介したい。

(2) カルモデュリン結合認識の多様性

松原 守 (カルナバイオサイエンス株式会社)

カルモデュリン (CaM) は、細胞内シグナル伝達に不可欠なカルシウム結合蛋白質で、100 種類以上にもおよぶ蛋白質と結合することにより様々な細胞機能を調節している。CaM がどのようにして標的蛋白質を認識するのかについては、CaM と標的蛋白質複合体の様々な立体構造から、非常に多様性のあることが明らかになっている。一般的には、ミオシン軽鎖キナーゼ、CaM キナーゼ II や CaM キナーゼキナーゼの CaM 結合ドメインペプチドで見られるように、 α -ヘリックス構造をとって CaM と結合し、10 残基以上離れた特定の2箇所が存在する疎水性残基が、CaM の N 末端ドメインと C 末端ドメインに存在する疎水性ポケットにはまり込むようになっている。2箇所の疎水性残基の位置から 1-10, 1-14, 1-16 モチーフと呼ばれており、似たようなモチーフをもつ領域は CaM 結合ドメインであると予想されている。一方、近年、このような結合認識とは異なった新しいタイプの CaM 結合蛋白質も見つかってきた。Ca²⁺-activated K⁺ channel, Edema factor, glutamate decarboxylase と CaM との複合体の構造は非常にユニークなものである。本発表では、更

に新しい結合認識を持つ CaM 結合蛋白質として、我々がこれまで解析してきた MARCKS と CAP-23/NAP-22 を取り上げて議論する。

MARCKS は protein kinase C (PKC) の主要な基質の一つで、胎児期の中枢神経系の発達に不可欠な蛋白質である。分子のほぼ中央部に CaM 結合ドメインがあり、CaM 以外にも細胞膜やアクチンなどとも結合できる。これらの結合は PKC のリン酸化で抑制される。CaM 結合ドメインの機能構造を理解するために、このドメインと CaM 複合体の X 線結晶構造解析を行った。2Å で解かれた構造から、一部に α -ヘリックス構造は含むものの、大部分に2次構造が存在しなかった。これまでの CaM 結合ドメインが α -ヘリックスを形成して結合するという認識機構と全く異なるものであった (1-3)。

CAP-23/NAP-22 も脳神経系で特異的に発現している PKC の基質蛋白質であり、CaM と結合する。CaM との結合にはN末端のミリスチル基が必須である (4)。どのようにして CAP-23/NAP-22 のミリスチル基が CaM を認識しているのかを明らかにするために、N 末端ミリスチル

基を含む 9 残基のペプチドと CaM の複合体を 2.3 Å の分解能で構造決定した。その結果、ミリスチル基は CaM の N 末端ドメインと C 末端ドメインから形成される疎水性ポケットの真ん中を貫通するという全く新しい蛋白質間認識であった (5)。このように、今回得られた 2 つの複合体の構造から、CaM と標的蛋白質の認識機構は、従来考

えられてきた以上に複雑であることが明らかとなった。

1. Matsubara, M. et al. (1998) *FEBS Lett.* **421**, 203-207
2. Yamauchi, E. et al. (2003) *Nature Struct. Biol.* **10**, 226-231
3. Matsubara, M. Et al. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 48898-48902
4. Takasaki, A. et al. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 11848-11853
5. Matsubara, M. et al. (2004) *EMBO J.* **23**, 712-718

(3) penta-EF ハンドカルシウム蛋白質 ALG-2 の相互作用因子とメンブレントラフィック制御

牧 正敏 (名大・院・生命農学)

当初、カルパインは、C 末端側にカルモジュリン様の連続した 4 つの EF ハンドをもつと考えられていたが、そのすぐ上流にさらにもう一つの EF ハンドが存在することが判明した。現在、このような 5 つの連続した EF ハンドモチーフは、penta-EF ハンド (以下、PEF と略す) と呼ばれている¹⁾。ALG-2 は apoptosis-linked gene 2 として発見されたが²⁾、演者らは、ALG-2 も PEF 蛋白質であることを見出し¹⁾、以来、この蛋白質の生理機能とその相互作用因子に注目して研究している。

PEF 蛋白質は、構造的特徴によりグループ I (ALG-2, peflin) とグループ II (カルパイン大小サブユニット, sorcin, grancalcin) に分類され、ALG-2 は進化的に最も古く真核生物に広く存在する PEF 蛋白質である³⁾。ALG-2 はホモダイマーおよび peflin とのヘテロダイマーとして存在し⁴⁾、EF5 がダイマー形成部位となっている^{5,6)}。ALG-2 の生理機能は不明な点が多いが、カルシウム存在下で膜画分に移行することから、メンブレンを介した何らかの制御に関与していると思われる。

ALG-2 のカルシウム依存的相互作用因子として、Alix (別名 AIP1)、アネキシン VII、アネキシン XI が同定され、PPII ヘリックス構造が予想される PxY の繰り返し配列が

ALG-2 の認識モチーフの一つとなっている⁷⁾。最近、このようなモチーフをもつリン脂質スクランブラーゼとも結合することが明らかになった⁸⁾。一方、Alix の相互作用因子として、エンドサイトーシスおよびエンドソームにおける選別輸送に関与する因子群が見つかった⁹⁾。また、細胞性粘菌は多細胞構築のモデル下等真核生物であるが、Alix ホモログの遺伝子を破壊すると、低カルシウム環境下での分化・発生に異常が認められた¹⁰⁾。最近の知見も含め、ALG-2 とその相互作用因子について話題を提供したい。

- 1) Maki et al. (1997) *Biochem. J.* **328**, 718.
- 2) Vito et al. (1996) *Science* **271**, 521.
- 3) Maki et al. (2002) *Biochim. Biophys. Acta* **1600**, 51.
- 4) Kitaura et al. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 14053.
- 5) Jia et al. (2001) *Structure* **9**, 267.
- 6) Kitaura et al. (2002) *Arch. Biochem. Biophys.* **399**, 12.
- 7) Shibata et al. (2004) *J. Biochem.* **135**, 117.
- 8) 柴田ら 2004 年度日本生化学会大会。
- 9) Katoh et al. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 39104.
- 10) Ohkouchi et al. (2004) *Gene* **337**, 131.

(4) S100の新しい機能 -シャペロン活性-

小林 良二 (香川大・医)

現在までに約 20 種の S100 タンパク質 (S100, 低分子 EF-hand タンパク質) が同定されているが、S100 の細胞内シグナル伝達における役割については明確な答は得ら

れていない。少なくとも 20-30 種の S100 の標的分子が想定されているが、S100 受容体 (RAGE) の発見および S100A1 による twitchin kinase の活性化が確度の高い研究

として挙げられるのみである。私達は、(1) S100 の標的分子を同定し、S100 による機能調節の仕組みを解明する。(2) S100 の選択的拮抗薬 (S100 antagonist)を見だし、これを利用することにより S100 の生理的役割を明らかにすることを目的に研究を進めている。

最近の研究⁽¹⁾において、S100A1 が細胞内の分子シャペロン複合体の新たな構成分子であり、同時に S100A1 そのものが強力な分子シャペロン機能を有することを見いだしたので話題として提供したい。分子シャペロン複合体は、HSP70, HSP90 に加え、co-chaperone と呼ばれる一群のタンパク質 (Hop, FKBP52, Cyclophilin40, p23 など) によって構成され、細胞内タンパク質の folding, refolding, translocation などに関与している。S100A1 は Hsp70, FKBP52, Cyclophilin40 とカルシウム非依存的に複合体を形成し、Hsp90 とはカルシウム依存性に結合する。In vitro (GST-pull down, BIAcore) での結合のみならず、組織抽出物の IP によっても結合が認められ S100 A1 とシャペロン分子は生理的条件下でも複合体を形成するものと思われる。Citrate synthase または rhodanese を基質とするシャペロン活性測定系において、S100A1, S100A2, S100B は強いシャペロン活性を示す。Cos7 細胞への S100A1 と β -galactosidase または luciferase の共発現系においても S100A1 は強いシャペロン活性を示し、intact cell 内でも

S100A1 が分子シャペロンとして作動している可能性が高い。また、S100A12 はその結合タンパク質である aldolase, GDPDH, isocitrate dehydrogenase などの熱安定性を制御している⁽²⁾などから、少なくとも数種の S100 は分子シャペロンとして機能している可能性が高い。Calmodulin や neuronal calcium sensor protein にはシャペロンとの結合性は認められず、シャペロン活性も無い。従って、S100 のシャペロン機能は、この family に特有なシグナル経路と考えられる。一方、Calmodulin などとは相互作用を持たず S100 family に選択性の高い拮抗薬の探索においては、抗アレルギー薬 (DSCG, amlexanox, olopatadine) が S100 antagonist である可能性を見いだした^(3,4,5,6)。この中で、DSCG, amlexanox は Hsp90 や 14-3-3 との拮抗作用を持つ⁽⁷⁾ため、intact cell には応用しにくい、olopatadine の選択性は高く、S100 antagonist のリード化合物となりうると思われる。

- (1) Okada et al (2004) *J Biol Chem* **279**, 4221
- (2) Hatkeyma et al (2004) *Eur J Biochem* **271**,3765
- (3) Shishibori et al (1999) *Biochem J* **338**,583
- (4) Oyama et al (1997) *Biochem Biophys Res Commun* **240**,341
- (5) Okada et al (2002) *Biochem Biophys Res Commun* **292**,1023
- (6) Okada et al (2003) *Biochem J* **375**,87
- (7) Okada et al (2003) *Biochem J* **374**,433

(5) トロポニンの結晶構造と筋収縮調節メカニズム

武田壮一 (循環器病センター研, 理化研・播磨)

【発表要旨】1970 年代に筋繊維の X 線回折の結果を基に「立体障害仮説」が提案され、現在まで筋収縮制御機構の基本モデルとしてしばしば引用されている。この提案では、カルシウムイオンの結合に伴いトロポニン (Tn) が繊維状分子トロポミオシン (Tm) のアクチン上での位置を変化させモーター分子ミオシン頭部のアクチンへの相互作用を立体障害的に調節するとしているが、X 線回折データの解釈に Tn/Tm がアクチンらせん上に等しく質量分布することを仮定している点で矛盾を抱えている。筋収縮制御機構の本質的な理解のために制御分子 Tn/Tm についての高分解能の立体構造情報が必須となっている。一方、若年者の突然死の主原因の一つである肥大型心筋症 (Hypertrophic cardiomyopathy, HCM) や心

臓移植を必要とする拡張型心筋症 (Dilated cardiomyopathy, DCM) における原因遺伝子の解析から筋節 (サルコメア) を構成するタンパク質群の異常が見つかってきている。これらトロポニンを含む心筋タンパク質群の異常はいずれも心筋張力発生のカルシウム感受性の変化、即ち TnC の第二カルシウム結合部位の親和性の変化として表現されることがスキンドファイバーを用いた実験等で示され、心筋症の発症過程にカルシウム感受性の変化に応答した張力発生の異常が関与していることが示唆されている。したがって Tm/Tn によるカルシウム調節機構の解明は、心筋症発症のメカニズムの理解や将来の創薬への応用展開という点でも重要な意味を持つ。

我々は Tn/Tm 複合体の X 線結晶構造解析に取り組み、

制御機構の要となるヒト心筋 Tn コアドメインのカルシウム結合型の結晶構造を明らかにすることに成功した (Takeda et. al. Nature 424, 35-41 (2003))。その結果, Tn コアドメインはさら数のサブドメインから成ること, に複それぞれのサブドメインがフレキシブルなリンカー構造で結ばれていることが明らかになった。TnT/TnI 間に形成される coiled-coil 構造を核とした長い (-80 Å) サブドメイン, IT-arm はその長軸の両端部に Tm 結合部位を有し, 調節頭部 (RH, TnC の N 末端ドメイン) を「細い繊維」に繋ぎ止めている。RH へのカルシウム結合は

TnI/TnC 間の相互作用を変え, TnI の調節領域 (TnIreg) とアクチンとの結合をスイッチングすると考えられる。これらの結果から Tn へのカルシウム結合は Tn とアクチン及び Tm 間の結合を 3 点から 2 点結合へと変化させ, IT-arm を介して Tm 分子の構造および性質 (柔らかさ, あるいは動きやすさ) を変えてアクチン・ミオシン相互作用を調節している可能性が見出された。

本講演ではヒト心筋トロポニンコアドメインの結晶構造と考えられるカルシウム調節機構を中心に最近のトロポニン研究について紹介する予定である。

(6) カルパインの新しい Ca^{2+} - 結合モチーフと構造・機能相関

反町洋之, 小野弥子, 秦勝志, 小山傑, 尾嶋孝一 (東京都臨床医学総合研究所)

【発表要旨】カルパインは細胞質内に存在して, 細胞機能を, そしてその集合体である生体機能を制御する「モジュレータ・プロテアーゼ」の代表である。即ち, カルパインは Ca^{2+} にレスポンスして, 細胞骨格系, 情報伝達系, 膜輸送系などに関与する基質タンパク質の構造・機能・活性を調節・変換するために, 極めて限定的な「切断 (プロセッシング)」を行う。その機能の重要性は, カルパイン遺伝子の変異により胎性致死や筋ジストロフィーが生じることなどで明白であるにもかかわらず, カルパインの作用機序については現状ではほぼ不明である。カルパインはヒトで 14 種存在し, その中で組織普遍的に発現して量的にも多いものが μ -及び m-カルパインである。これらは, 4 つのドメイン (I~IV) からなる活性サブユニットと 2 つのドメイン (V 及び VI) からなる調節サブユニットのヘテロダイマーで構成される。ドメイン IV 及び VI は, 各々 5 つの EF-ハンドモチーフを有する Ca^{2+} -結合ドメイン (PEF ドメイン) であり, カルパインの Ca^{2+} 依存性を担うと考えられてきた。その後, m-カルパインの Ca^{2+} -非存在下の立体構造が解明され, (1) プロテアーゼ活性ドメイン (II) は, 2 つのサブドメイン (IIa 及び IIb) に分割され, Ca^{2+} -非存在下では活性中心が形成されていない, (2) 一次構造上全く相同性の見いだせなかったドメイン III が Ca^{2+} -結合型 C2 ドメインの立体構造に極めて類似していた, (3) ドメイン IV 及び VI はダイマー形成を担い, 活性ドメインからは最も離れた位置に存在した, 等が明らかとなった。

さらに, 生化学実験によりドメイン III が Ca^{2+} を結合することが示され, このドメインが, カルパインの Ca^{2+} 依存的な膜移行を含め, Ca^{2+} による制御の中心的役割をすることが強く示唆された。また, 活性サブユニットの N 末端のドメイン I は, 調節サブユニットの 2 つの EF-ハンドとの塩橋形成によりヘテロダイマー安定化に寄与し, かつ, Ca^{2+} の EF-ハンドへの結合による塩橋破壊に起因するサブユニット解離に重要な役割を果たすことが示された。この事実は, カルパインのドメイン I における自己消化の生理的意義を明確にし, 自己消化がサブユニット解離や基質特異性の変化を引き起こすことを明らかにした。さらに, カルパインのプロテアーゼドメインを組換えタンパク質として発現させたものを解析した結果, 予想に反して Ca^{2+} 依存的な活性が観察された。その後, プロテアーゼドメインの Ca^{2+} 結合型 (活性型) の立体構造も報告され, 実際にサブドメイン IIa 及び IIb に 1 分子ずつ結合していることが明らかとなった。このプロテアーゼドメインに見出された Ca^{2+} 結合モチーフは, 今までに例のない構造であり, カルパインファミリーが進化的に新規に獲得したものと考えられた。

このように, カルパインは分子全体として 10 分子以上の Ca^{2+} を結合し, 高度に調節を受けていることが明らかとなった。カルパインは, 上述のように生理的に重要な機能を担っているため, その基質認識や活性制御の分子メカニズムの解明が大きく期待されている。その重要な因子である Ca^{2+} を基にしてこれらの点も議論したい。

(7) シナプス機能調節における CaM kinase II の役割

山内 卓 (徳島大学大学院・薬学部)

Ca²⁺/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaM kinase II) は、大脳や海馬に多く存在し、記憶分子として注目されている。私達は CaM kinase II がシナプス伝達の中心部位であるシナプス後肥厚 (PSD) の主要構成分子であることに注目して、シナプス機能調節を解析した。

(1) PSD における CaM kinase II とシグナル伝達分子

CaM kinase II と PSD の関係を調べ、CaM kinase II は自己リン酸化に依存して PSD に移行すること、PSD に移行した酵素は多くの PSD タンパク質をリン酸化することを明らかにした。さらに、PSD における CaM kinase II の基質タンパク質 28 種類を同定した。一方、プロテオミクス解析により、PSD に存在するタンパク質 492 種類を同定した。PSD で報告されていたタンパク質の 75% 以上を同定するとともに、新たに約 350 種類のタンパク質を同定し、PSD の全体の構成成分の多くが明らかになった。PSD の主要な構成分子は、シグナル伝達に関わる分子と構造タンパク質であった。今後、シナプス可塑性における PSD の役割が解明に役立つと考えられる。

(2) 神経突起伸展の CaM kinase II のによる調節

CaM kinase II cDNA を導入した神経芽細胞をシナプス可塑性のモデルと考えて CaM kinase II の役割を解析した結果、CaM kinase II を過剰発現することにより突起伸展が促進されること、CaM kinase II の自己リン酸化型が

関与することが明らかとなった。さらに、培地から血清を除去することにより突起伸展を起こす CAD 細胞では、血清除去により CaM kinase II も誘導され、内在性のリン酸化が増加した。しかし、内在性 CaM kinase II を siRNA によりノックダウンすると、突起伸展が阻害され、そこに CaM kinase II を導入することにより、突起伸展能が回復することが明らかになった。これらの結果から、CaM kinase II は突起伸展に重要な役割を果たすことが明らかとなった。

(3) PSD タンパク質による CaM kinase II 作用の調節

PSD タンパク質が CaM kinase II の作用に影響与えるか調べるために、前初期遺伝子産物 Arc (activity-regulated cytoskeleton-associated protein) に注目した。Arc は、mRNA が CaM kinase II と同様に樹状突起に存在すること、神経活動依存的に誘導されることから、CaM kinase II との相互作用があると考え解析した。その結果 Arc は PSD に局在すること、細胞内で CaM kinase II と相互作用し、CaM kinase II の突起伸展作用を増強することが明らかとなった。

以上の結果から、CaM kinase II が、記憶・学習の一連の過程、すなわち、シナプス形成、シナプス後細胞における機能調節等、においてが中心的な役割を果たすと考えられる。

(8) 不活性型 CaM Kinase II α 遺伝子改変マウスを用いた脳機能の解析

山肩葉子, 井本敬二, 八木 健, 小幡邦彦, 柳川右千夫
(生理研, 総研大, CREST, 阪大, 理研, 群大)

【発表要旨】 Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMKII) は、中枢神経系に豊富に存在するプロテインキナーゼとして、神経活動の制御やシナプス可塑性、特に、学習・記憶を始めとする高次脳機能に、また、てんかん発作の発現の抑制、脳虚血の際の脳障害の抑制に重要な働きをすると考えられている。CaMKII 蛋白には、大きく分けて、(1) 他の蛋白質をリン酸化するプロテインキナーゼとしての機能、(2) Ca²⁺ 結合蛋白である

カルモジュリンを結合する機能、(3) CaMKII サブユニット同士が結合して、あるいは他の蛋白質と結合して構造蛋白として働く機能、という三つの異なる作用機序が存在する。このうち特に重要と考えられるプロテインキナーゼとしての生体内での作用を解明し、脳機能への関与を明らかにするために、キナーゼ活性を失活させた機能的ノックアウトマウスの作成を行った。

具体的には、CaMKII の前脳での主要なサブユニット

である α （アルファ）をターゲットとして、ATP 結合に必要な 42 番目のアミノ酸残基、リジン (Lys-42) をアルギニン (Arg-42) に置き換えた点変異型のノックインマウスを作成した。ホモ接合型の変異マウスの前脳ホモジネートにおける CaMKII 活性は、野生型に比べて約 60% 減少していたが、CaMKII α ならびに CaMKII β の蛋白レベルには、顕著な変化は認められなかった。CaMKII の残

存活性は正常な CaMKII β によるものと考えられた。一方、 α に比べて β が優位である小脳ホモジネートにおいては、CaMKII 活性はほぼ正常に保たれていた。従って、作成したノックインマウスにおいては、CaMKII α の蛋白としての発現は保たれているものの、その活性のみが選択的に失活しているものと考えられた。現在このマウスを用いた様々な脳機能の解析を行っている。

(9) 神経系における CaM kinase I の発現と機能

阪上 洋行（東北大・院・医）

【発表要旨】 CaM kinase I は、1980 年代にシナプシン I に対するリン酸化能により脳から精製されたにも関わらず、その機能解析は、他の多機能型 CaM kinaseII 及び IV に比べて驚く程遅れている。しかしながら、近年、CaM kinase I が、少なくとも 4 つの分子種(α , β , γ , δ)よりなる分子ファミリーを形成し、CaM kinase IV とともに CaM kinase kinase による特異なリン酸化カスケードによる活性化調節機構が存在することが明らかとなり、その分子多様性と生理機能の解析がようやく始まった感がある。本発表では、これまで行ってきた神経系における発現解析のうち、CaM kinase I γ と δ 分子に関する最近の所見を中心に発表する。

CaM kinase I γ は、横倉らの部分的な cDNA が単離され、その存在が明らかになったものであるが、我々は、PCR クローニングにより、2 つの alternative splicing variant を見だし、 $\gamma 1$, $\gamma 2$ 分子と名付けた。 $\gamma 1$ 分子は、477 アミノ酸残基よりなる推定分子量約 53 kDa よりなり、 α , $\beta 1$, $\beta 2$ 分子とそれぞれ 63%, 64%, 61% の相同性を示したのに対して、 $\gamma 2$ 分子は、カルモデュリン結合部位を含む C 末領域が欠損し、477 アミノ酸残基、推定分子量 43kDa よりなることが明らかになった。次に、成熟期ラット神経系における γ 分子の遺伝子発現局在を検討した結果、視床腹内側核と松果体に際立った強い発現が検出された。この γ 分子の遺伝子発現様式は、神経細胞に広く分布す

る α 分子や脳幹領域に比較的限局する $\beta 2$ 分子のそれと大きく異なるもので、特異な神経機能に関与する可能性が示唆された。

一方、CaM kinase I δ は、顆粒球に特異的に発現する CaM kinase I-like kinase (CKLiK) の splicing variant として、Hela 細胞から、石川らにより単離されたものである。遺伝子発現分布を検討した結果、CaM kinase I δ は、特に海馬錐体神経細胞に際立った強い発現を示した。初代海馬神経培養細胞に遺伝子導入した CaM kinase I δ は、大部分の神経細胞 (80%) において、細胞質と神経突起に局在し、残りの 20%の神経細胞では、核と細胞質に均一に分布した。次に、グルタミン酸及び脱分極によるカルシウム刺激を与え、その細胞内局在の変化を検討した結果、核に局在を示す神経細胞の割合が刺激前の 20% から刺激 1 分後に 40% と増加した。この核への局在は、刺激後 30 分以内にすみやかに basal level に戻った。また、CaM kinase I δ を過剰発現した PC12 細胞において、脱分極刺激により CRE luciferase 活性が増加すること、また、CREB のリン酸化が増強していることより、CaM kinase I δ は、神経活動依存性に核内に移行し、核に恒常的に局在している CaM kinase IV とともに、CREB などの転写因子のリン酸化を介した遺伝子発現の調節に関与している可能性が考えられた。

(10) CaM kinase カスケードのシグナル伝達と生理機能

徳光 浩, 小林 良二 (香川大・医)

多様な細胞応答においてタンパク質リン酸化酵素によるカスケード反応は重要な細胞内情報伝達機構として機能する。本研究会のテーマである細胞内カルシウム情報伝達経路においても CaM-KK/CaM-KI, CaM-KK/CaM-KIV の独立した 2 つの CaM キナーゼカスケードの存在が明らかとなっている。本発表では、これまでに得られている解析結果から導き出された CaM キナーゼカスケード

のシグナル伝達の分子メカニズムについて報告するとともに、その生理機能のひとつである遺伝子発現制御機構についても最近の知見を紹介する。また独自に開発した CaM-KK 阻害剤 (STO-609) を用いた CaM キナーゼカスケードの生理機能解析法について、阻害剤研究の問題点である特異性評価や、その解析結果も含めて議論したい。

(11) CaM kinase ファミリーを中心としたプロテインキナーゼの網羅的検出と解析

亀下 勇, 末吉 紀行 (香川大学・農学部)

タンパク質リン酸化反応は様々な生命現象と深い関わりを持っており、その反応に関与するプロテインキナーゼ (PK) の数は数百種類以上も存在することが知られている。生命現象のメカニズムを明らかにするためには、様々な状況下の細胞内で発現している PK の全貌を知ることが重要である。そこで我々は、細胞内に存在する PK を広く検出するための網羅的解析法について検討してきた。本研究では細胞内に存在する多様な PK を同時に検出するための抗体を作製し、その利用法について検討した。

PK の触媒ドメインには、アミノ酸配列が保存された 12 ヶ所のサブドメインが存在し、その中でも特にサブドメイン VIB 配列が高度に保存されている。そこで CaMKII のサブドメイン VIB のアミノ酸配列に基づく様々なペプチドを抗原として合成し、マウスを用いて抗体の作製を試みた。得られた抗血清を用いてウェスタンブロットを

行ったところ、長さが 10 個以下のアミノ酸からなるペプチドを抗原として免疫したマウスでは、抗体産生がみられなかったが、14 から 16 アミノ酸のペプチドを抗原として用いた場合に広い反応性を示す抗体が得られることがわかった。作製したモノクローナル抗体 (Multi-PK 抗体) は、ウェスタンブロットで CaMKI, II, IV, CaMKK, PKA, MAPK, MAPKK をはじめとして様々な PK を検出できるだけでなく、細胞抽出液中に含まれる種々の PK の免疫沈降にも利用できることが確認された。さらに様々な生物から調製した cDNA 発現ライブラリーを Multi-PK 抗体でスクリーニングしたところ、CaMK ファミリーを含む様々な既知の PK だけでなく、新規の PK の遺伝子を単離することができた。

本研究会では、Multi-PK 抗体の性質について紹介するとともにその利用例についても併せて報告する予定である。

(12) 神経型 NO 合成酵素のリン酸化による調節

渡邊泰男, 徳田雅明 (香川大・医)

【発表要旨】多彩な生理作用を有する一酸化窒素 (NO) シグナルは NO 産生を触媒する NO 合成酵素 (NOS) の活性制御はカルモデュリン (CaM) 結合とリン酸化によって調節されている。これまで nNOS の Ser741, Ser847 が

それぞれ CaM キナーゼ I (CaM-KI), CaM-KII によってリン酸化される部位として同定され、共に CaM との親和性の低下によって NOS 活性が阻害されることが判明している (1, 2, 3)。Thr1296 も CaM-KII によってリン酸化を

受け、その結果活性が阻害された。リン酸化擬似体 nNOS (Thr1296 を Asp に置換した変異型: Thr1296Asp) の酵素学的解析や、Thr1296 リン酸化 nNOS の生化学的性質より活性阻害は補酵素の 1 つである NADPH に対する親和性の低下 (K_m 値が 20 倍) によるものであった。Ser1412 も CaM-KII によるリン酸化部位であったが、現時点で酵素学的意義は見いだせていない。脱リン酸化酵素による可逆的調節も観察され、少なくとも protein phosphatase 2A の関与が示唆されている (4)。生理学的意義の解析では、ラット脳一過性虚血モデルを用いて、虚血シグナルで海馬神経の介在神経において Ser847 リン酸化が一過性に CaM-KII により触媒されていた。この現象が皮質ではみられないことより海馬神経での虚血耐性における nNOS の Ser847 リン酸化の関与が示唆された (5)。神経細

胞のカルシウムシグナルによるリン酸化応答現象をシナプスに存在するクラスターリング分子との相互作用に着目して解析した結果、中枢神経系では直接結合を介して nNOS のシナプス後膜での局在化機構の中心的役割を担っている post synaptic density 95 が Ser 847 リン酸化の調節因子として細胞内で機能していることが判明した (6)。In vitro ならびに分子薬理的な解析により、以上のリン酸化反応はカルシウムシグナル以外のキナーゼによっても部位選択的に触媒されていることが分かってきた。以上のように、nNOS は同じ CaM を活性化因子として利用する CaM-K のリン酸化によりその活性をダイナミックにコントロールされていることに加え、複数のキナーゼによってより複雑に制御されているものと考えられる。

(13) 14-3-3 による CaMKK の調節

市村 徹, 松永 耕一, 笹本 要, 磯辺 俊明 (東京都立大)

CaM キナーゼキナーゼ (CaMKK) は、CaM キナーゼカスケードの最上流に位置する蛋白質キナーゼであり、カルシウムを 2 次メッセンジャーとする細胞内シグナル伝達、とりわけ神経細胞におけるカルシウムシグナリングに重要な役割を担っている。また、CaMKK はカルシウム以外のシグナリング (例えば cAMP シグナリング) の標的分子としても知られており、シグナル伝達のクロストーク、フィードバックといった観点からも注目されている。一方、14-3-3 蛋白質も特に神経細胞に豊富に存在する蛋白質であり、キナーゼが調節するリン酸化反応に依存して多彩な蛋白質と複合体を形成することで、細胞内シグナル伝達経路の反応に深く関わることが知られている。本講演では、14-3-3 を bait として用いた機能プロテオミクス解析によって新規に見出した“14-3-3-CaMKK α 複合体”の性質を検討したので報告する。

大腸菌で発現した CaMKK α とグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) との融合蛋白質として発現した 14-3-3 η を用いたプルダウン実験により、PKA でリン酸化した CaMKK α が 14-3-3 η と直接結合することが明らかとなった。一方、この相互作用はリン酸化しなかった CaMKK α や CaM を加えることで自己リン酸化した CaMKK α では起こらなかったことから、PKA によるリン

酸化に特異的であることが示唆された。次に、CaMKK α と GST-14-3-3 η を発現するヒト腎臓由来の培養細胞を PKA の活性化剤で処理したところ、PKA の活性化に依存して GST- η -CaMKK α 複合体が細胞内でも形成されることが分かった。またこの相互作用は CaMKK β アイソフォームでも同様に検出された。

CaMKK α は CaMKI または CaMKIV を効率良くリン酸化し活性化することが知られている。一方、こうした CaMKK α の活性は PKA によるリン酸化で低下することが報告されている。そこで、14-3-3 η との複合体形成が CaMKK α のキナーゼ活性に影響を及ぼすのかを GST-CaMKI (1-293) K49E を基質として用いた in vitro リン酸化実験で検討した。その結果、14-3-3 η と複合体を形成した CaMKK α のキナーゼ活性は単体のものと比べてさらに低下することが分かった。さらに、この 14-3-3 による効果は、高濃度の CaM を反応系に加えることで抑制されたことから、CaM との競合阻害効果である可能性が示唆された。

以上の結果より、14-3-3-CaMKK α 複合体は PKA による CaMKK α のリン酸化に依存して形成されること、さらに CaM の CaMKK α への結合を阻害することでそのキナーゼ活性を負に制御していると推測した。

(14) シナプス後肥厚部におけるタンパク質相互作用のリン酸化による調節

鈴木 龍雄, 田 慶宝, 宮沢 昌子 (信大・院・医)

著者らは5年以上前から、新規のシナプス後部タンパク質およびそれらをコードする遺伝子を発見・同定するプロジェクトを行っている。シナプス後部に存在するタンパク質種の全貌についてはまだ明らかになっておらず、未発見のものもかなりあると予想される。シナプス伝達の制御や可塑性、また、シナプス機能に起因する脳や精神の疾患の理解する上で、これら未知の分子を発見し、機能を明らかにすることが大きな役割を果たすと考えられる。本シンポジウムでは、このプロジェクトの中で新たに同定したシナプス後肥厚部 (postsynaptic density, PSD) タンパク質について、タンパク質-タンパク質相互作用の観点から現在までの知見を総括する。

本講演では以下のタンパク質について述べる。1) p55 protein, 2) TANC (protein containing TPR domain, ankyrin repeat and coiled-coil region), 3) LRP4 (LDL receptor-related protein 4), 4) synArfGEF (synaptic GEF for Arf), 5) NIDD (nNOS-interacting DHHC-containing protein with dendritic mRNA) 6) BAALC 1-6-8 (brain and acute leukemia, cytoplasmic).

p55 protein は Membrane-associated guanylate kinase (MAGuK) family の一員である。このタンパク質は赤血球

においては membrane と細胞骨格-膜裏打ちタンパク質をクロスリンクする役割を果たしていることがよく知られているが、シナプス後部においても同様の機能を果たしていることが示唆された。TANC は新規 protein で、p55 protein とともに PSD において scaffold protein (足場タンパク質) の役割を果たしていることが示唆された。LRP4, synArfGEF および NIDD は、C 末端部分に PDZ domain 結合配列を有することが特徴である。これらタンパク質のうち、LRP4, synArfGEF はその C 末配列を介して PSD-95, SAP97 などと結合したが、NIDD protein はこれらとは結合せず、nNOS に特異的に結合した。また、LRP4 については、カルモジュリンキナーゼ II によってリン酸化を受け、C 末 PDZ domain-binding motif 近傍の Ser 残基のリン酸化により、PSD-95 や SAP97 との相互作用が制御される可能性が示された。BAALC 1-6-8 protein はある種の急性白血病と正常では脳に特異的に発現されているタンパク質であるが、カルモジュリンキナーゼ II と特異的に結合することが明らかになった。

以上の新規のシナプス後部タンパク質の PSD protein との相互作用とその制御について述べる。

(15) Homer-3 の CaM kinase II によるリン酸化

水谷 顕洋, 御子柴 克彦 (JST・カルシウム振動), 古市 貞一 (理研・脳研)

Homer 蛋白質ファミリーは3種類の遺伝子からコードされ、いずれも中枢神経系 (神経細胞) に高度に発現し、主に、興奮性シナプスのポストシナプスに局在している。N-末の EVH1 domain には、種々の分子 (mGluRs, IP3Rs, RyRs, TRPC, drebrin, SHANK) が結合し、C-末部分で multimer を形成することで、ポストシナプス領域に於いて上記結合分子群を物理的にカップルさせていると考えられている。

我々は、小脳 Purkinje 細胞の spine に極めて豊富に発現・局在する Homer-3 蛋白質の、顆粒細胞平行繊維-Purkinje 細胞間のシナプス可塑性における機能について研究を進めているが、最近、Homer-3 にはリン酸化フォ

ームが存在し、このリン酸化フォームは、非リン酸化フォームに比して、可溶性画分に回収されやすいことを見出した。in vitro リン酸化実験によって CaM kinase II が Homer-3 の3箇所の Ser 残基をリン酸化し、これによって結合分子との親和性を低下させることを発見した。また、リン酸化部位特異的抗体を用いることで、これらのリン酸化が Purkinje 細胞内で神経活動依存的に起きることを見出した。これらの事実は、Homer-3 のリン酸化によって、spine 内の分子間相互作用が調節され、顆粒細胞平行繊維-Purkinje 細胞間シナプスの構造的可塑性を調節している可能性を示唆している。

(16) タウの CaM キナーゼ II によるリン酸化反応のアルツハイマー病への関与

山本 秀幸 (熊本大・院・医薬)

Ca^{2+} /カルモデュリン依存性蛋白質リン酸化酵素 II (CaM キナーゼ II) は、脳の神経細胞に多量に存在し、神経細胞の活性化によって引き起こされる様々な神経細胞機能に関与している^(1,2)。本酵素の異常が、種々の精神神経疾患の病態生理に関与している例も報告されてきた。我々は、本酵素が微小管附随蛋白質の中のタウをリン酸化してその機能を阻害することを見出した。最近、質量分析法によりリン酸化部位を同定した。その結果、チューブリン結合部位にある 262 番目と 356 番目のセリンがリン酸化されることが明らかになった⁽³⁾。さらにタウのリン酸化によりチューブリンとの結合が阻害された。また、416 番目のセリン (S416) も CaM キナーゼ II によりリン酸化されることが報告されている。我々の検討から、本部位を含む合成ペプチドは調べた酵素の中では CaM キナーゼ II によってのみリン酸化されることが明らかになった。そこで、S416 がリン酸化されたペプチドを合成し、家兎に免疫して、リン酸化特異抗体を作製し精製した。蛋白質脱リン酸化酵素阻害剤を含まない条件でラット脳から調製した粗抽出液を用いた免疫ブロットでは、*in vitro* で CaM キナーゼ II でリン酸化した時にのみ、タウが抗体と反応した。これに対し、蛋白質脱リン酸化酵素阻害剤を含む条件では、粗抽出液中のタウが抗体と反応した。すなわち、*in vivo* で S416 がリン酸化されることが確認された。本部位のリン酸化は、生後 10 日以

内の脳で著明に認められた。また、出生前のラット脳から培養した神経細胞での免疫染色により、タウが細胞体でリン酸化されていることが明らかになった。なお、アルツハイマー病脳では、過剰にリン酸化されたタウが paired helical filaments (PHF) を形成して神経細胞体と神経突起内に蓄積していることが知られている。リン酸化特異抗体を用いた検討から、アルツハイマー病脳から調製した PHF タウでは S262 と S356 に加えて S416 もリン酸化されていることが明らかになった。さらにアルツハイマー病脳の免疫組織学的検討により、細胞体に存在する PHF タウで S416 のリン酸化が認められた。これに対し、神経突起内の PHF タウではリン酸化は認められなかった。これらの結果から、胎児期及び出生直後の脳では、神経細胞体でタウが CaM キナーゼ II によりリン酸化されていることが示唆された。また、アルツハイマー病脳では、神経細胞体での CaM キナーゼ II によるタウのリン酸化が過剰に起こっている可能性が示唆された。現在、培養神経細胞を用いて CaM キナーゼ II によるタウのリン酸化反応の調節機構と生理的意義を検討している。

1. Matsumoto, K. et al. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 2053-2059
2. Takeuchi, Y. et al. (2000) *J. Neurochem.* **74**, 1913-1922
3. Yamamoto, H. et al. (2002) *Arch. Biochem. Biophys.* **408**, 255-262

10. 脳磁場計測によるヒト脳機能マッピング 第5回脳磁場ニューロイメージング

2004年12月13日－12月14日

代表・世話人：柿木隆介（自然科学研究機構生理学研究所）

所内対応者：柿木隆介（自然科学研究機構生理学研究所）

（1）海馬硬化症例におけるてんかん波の電流モーメントと、WAIS-R 所見との関係

芳村勝城，渡辺裕貴（独立行政法人国立病院機構療養所静岡てんかん・神経医療センター）

（2）光刺激による命令嚥下時の事象関連磁場について

長崎信一¹，橋詰 顕²，柴 芳樹³，山科 敦¹，藤原百合¹，末井良和⁴，栗栖 薫²，谷本啓二¹

（¹広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 病態情報医科学（歯科放射線学），

²先進医療開発科学（脳神経外科学），³病態探求医科学（口腔生理学），

⁴広島大学病院（歯科放射線科）

（3）体性感覚刺激時の事象関連脱同期

橋詰 顕，栗栖 薫，志々田一宏

（広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 創生医科学専攻先進医療開発科学講座）

（4）Angelman 症候群における体性感覚誘発磁場所見

江川 潔¹，朝比奈直子¹，白石秀明¹，須藤 章¹，香坂 忍¹，斉藤伸治¹，中根進児²，有働康代²

（¹北海道大学大学院 小児科，²北海道大学病院 臨床検査部）

（5）マウス用脳磁図・心磁図計測システムの開発

小野弓絵¹，白井健吾¹，中村 祐¹，葛西直子²，石山敦士¹

（¹早稲田大学大学院 理工学研究科 電気・情報生命工学専攻，²産業技術総合研究所）

（6）統計的基準による MEG 順モデル選択

吉岡 琢¹，佐藤雅昭^{1,3}，梶原茂樹²，外山敬介²

（¹ATR 脳情報研究所，²島津製作所 基盤技術研究所，³科学技術振興機構 CREST）

（7）複数信号源の時間相関に対してロバストな Beamformer 法の開発

栗山紘明¹，星野大介¹，中村 祐¹，白井健吾¹，小野弓絵¹，石山敦士¹，葛西直子²

（¹早稲田大学大学院 理工学研究科 電気・情報生命工学専攻，²産業技術総合研究所）

（8）脳磁図の空間時間的クラスタリングを用いたモデル次数推定

星野大介¹，栗山紘明¹，白井健吾¹，中村 祐¹，小野弓絵¹，石山敦士¹，葛西直子²

（¹早稲田大学大学院 理工学研究科 電気・情報生命工学専攻，²産業技術総合研究所）

（9）母音刺激による誘発磁場 N1m の検討

尾形エリカ，湯本真人，伊藤憲治，関本荘太郎，狩野章太郎，伊藤 健，加我君孝

（東京大学大学院 医学系研究科 脳神経医学専攻 感覚・運動神経科学講座）

（10）音声ミスマッチング課題の MEG のフラクタル次元解析

金子 裕，岡崎光俊，湯本真人

（国立精神・神経センター武蔵病院 脳神経外科・臨床検査部，

国立精神・神経センター武蔵病院 精神科，

東京大学医学部附属病院検査部）

- (11) 音の高さ(ピッチ)の明瞭性に関わる脳磁界反応
添田喜治, 中川誠司, 外池光雄
(独立行政法人 産業技術総合研究所 人間福祉医工学研究部門 くらし情報工学グループ)
- (12) 聴性 40Hz 応答がもたらす位相同期の検討
田中慶太, 川勝真喜, 阿部雅也 (東京電機大学)
- (13) 気体刺激のリアルタイムモニタリングによる嗅覚誘発電位・磁場の同時計測
秋山幸代^{1,2}, 斉藤幸子¹, 後藤なおみ¹, 小林剛史^{1,3}, 小早川達¹
(¹産業技術総合研究所 脳神経情報科学部門, ²日本体育大学, ³文京学院大学)
- (14) 高濃度食塩水による三叉神経応答の有無
小見山彩子^{1,2}, 池田 稔², 斉藤幸子¹, 後藤なおみ¹, 小早川達¹
(¹産業技術総合研究所 脳神経情報科学部門, ²日本大学医学部 耳鼻咽喉科学教室)
- (15) 脊髄誘発磁界測定の実状報告
富澤将司 (東京医科歯科大学 整形外科)
- (16) 指先電気刺激による体性感覚の感覚的強度と MEG 信号強度の比較
川西雄一郎, 井口義信, 多喜乃亮平, 根本正史, 木村友昭, 関原謙介, 橋本 勲
(東京都立科学技術大学大学院 工学研究科 システム基礎工学専攻)
- (17) 体性感覚野での階層的情報処理
乾 幸二, 柿木隆介 (生理学研究所)
- (18) 縦書き, 横書きの文字および視覚刺激に関する脳磁場研究
山川恵子¹, 伊藤憲治¹, 湯本真人², 狩野章太郎³, 加我君孝^{1,3}
(¹東京大学 医学部 認知・言語医学, ²東京大学医学部附属病院 検査部, ³東京大学医学部附属病院 耳鼻咽喉科)
- (19) 音高と音韻の視聴覚間照合の脳磁場: 音楽家 vs 非音楽家
湯本真人¹, 伊藤憲治², 宇野 彰³, 狩野章太郎⁴, 斉藤 治⁵, 金子 裕⁶, 松田真樹⁷, 加我君孝⁴
(¹東大病院検査部, ²東大医学部認知・言語医学, ³筑波大学人間総合科学,
⁴東大病院耳鼻咽喉科, ⁵国立精神神経センター武蔵病院精神科,
⁶国立精神神経センター武蔵病院脳外科, ⁷東京芸大大学院音楽研究科)
- (20) 言語流暢性課題遂行時のβ帯域活動の相互相関
志々田一宏¹, 橋詰 顕², 上田一貴¹, 山下英尚¹, 岡本泰昌¹, 栗栖 薫², 山脇成人¹
(¹広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 精神神経医科学,
²広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 脳神経外科学)
- (21) 視覚認知における先行刺激の影響: 周波数解析を用いた検討
岡崎光俊 (国立精神・神経センター武蔵病院 精神科)
- (22) 刺激間隔における 1/fm ゆらぎの視覚誘発脳磁図反応に対する影響の検討
原田暢善, 中川誠司, 岩木 直, 山口雅彦, 外池光雄 (産業技術総合研究所 人間福祉医工学部門)
- (23) アルファ波電流ダイポールの左右半球間の位相差
川端啓介¹, 内野勝郎², 村田和優³, 外池光雄⁴
(¹大阪府立大学, ²平成医療学園, ³藍野学園短大, ⁴産総研関西センター)
- (24) フィードバックシステム論的解析と正中神経刺激による誘発磁場について
岸田邦治¹, 篠崎和弘², 深井英和¹, 鶴飼 聡³, 石井良平³
(¹岐阜大学工学部 応用情報学科, ²和歌山県立医科大学 精神医学教室,
³大阪大学大学院 医学研究科 神経機能医学講座)

(25) Magnetoencephalography (MEG) -Beamformer 法をもちいた解析

—主に側頭葉てんかんを中心とした臨床症例の検討—

露口尚弘¹, 田中博昭², 下川原正博², 関原謙介³

(¹大阪市立大学大学院医学研究科脳神経外科学, ²横河電機 MEG センター,

³東京都立科学技術大学電子システム工学科)

(26) 聴性誘発磁場 N100m に対するスペクトル包絡の影響

水落智美¹, 湯本真人², 狩野章太郎³, 伊藤憲治⁴, 山川恵子⁴, 加我君孝^{1,3}

(¹東京大学大学院 医学系研究科 感覚運動神経科学, ²東京大学医学部附属病院 検査部,

³東京大学医学部附属病院 耳鼻咽喉科, ⁴東京大学大学院 医学系研究科 認知・言語医学)

(27) 脳磁界応答から見た聴覚逆方向マスキング現象

阿部雅也, 川勝真喜, 田中慶太, 小谷 誠 (東京電機大学大学院 工学研究科)

(28) ミスマッチフィールドの計測による骨導超音波知覚特性の検討

中川誠司¹, 竹形理佳^{1,2}, 外池光雄¹

(¹産業技術総合研究所 人間福祉医工学研究部門, ²Department of Psychology, University of Helsinki)

【参加者名】

吉岡琢 (ATR 脳情報研究所), 高田あゆみ (エレクトラ株式会社), 杉山尚 (かなえ・めでいす), 下川原正博 (横河電機株式会社), 田中博昭 (横河電機株式会社), 萬谷惇 (関西大・工), 木野元裕一 (関西大大院・工), 岸田邦治 (岐阜大・工), 浦川智和 (宮崎大・工), 松林潤 (京都大大院・医), 川西雄一郎 (都立科学技術大大院・工), 後藤純信 (九州大大院・医), 田代研之 (九州大大院・医), 飛松省三 (九州大大院・医), 前川敏彦 (九州大大院・医), 山崎貴男 (九州大大院・医), 緒方勝也 (九州大大院・医), 黒田智美 (九州大大院・医), 中島大輔 (九州大大院・医), 設楽直也 (群馬大大院・医), 荻野祐一 (群馬大大院・医), 荒木康智 (慶應義塾大・医), 青山敦 (慶應義塾大大院・理工), 中村茉莉 (慶應義塾大学・理工), 船津誠也 (広島女子大・生活科学), 志々田一宏 (広島大大院・医歯薬学総合), 長崎信一 (広島大大院・医歯薬学総合), 橋詰頭 (広島大大院・医歯薬学総合), 岡崎光俊 (国立精神・神経センター武蔵病院), 金子裕 (国立精神・神経センター武蔵病院), 藤本礼尚 (西新潟中央病院てんかんセンター), 芳村勝城 (静岡てんかん・神経医療センター), 渡辺裕貴 (静岡てんかん・神経医療センター), 岩木直 (産総研・人間福祉医工学), 添田喜治 (産総研・人間福祉医工学), 外池光雄 (産総研・人間福祉医工学), 中川誠司 (産総研・人間福祉医工学), 原田暢善 (産総研・人間福祉医工学), 秋山幸代 (産総研・脳神経情報科学), 小見山彩子 (産総研・脳神経情報科学), 小早川達 (産総研・脳神経情報科学), 斉藤幸子 (産総研・脳神経情報科学),

村山真紀 (鹿児島大大院・医歯学総合), 高田橋篤史 (八日会藤元早鈴病院), 藤田賢太郎 (八日会藤元早鈴病院), 藤巻則夫 (情報通信研究機構), 中村祐 (早稲田大大院・理工学), 福田大輔 (早稲田大大院・理工学), 本間俊道 (早稲田大大院・理工学), 小野弓絵 (早稲田大大院・理工学), 栗山紘明 (早稲田大大院・理工学), 星野大介 (早稲田大大院・理工学), 白井健吾 (早稲田大大院・理工学), 露口尚弘 (大阪市立大大院・医), 川端啓介 (大阪府立大学), 吉田恵 (筑波大大院・体育), 木田哲夫 (筑波大大院・体育), 高林俊幸 (筑波大大院・体育), 富澤將司 (東京医科歯科大), 小森博達 (東京医科歯科大), 別所央城 (東京歯科大), 渡邊裕 (東京歯科大), 大櫛哲史 (東京歯科大・市川総合病院), 久保浩太郎 (東京歯科大), 坂本貴和子 (東京歯科大), 仲村圭太 (東京大大院・総合文化), 山川恵子 (東京大学・医), 尾形エリカ (東京大大院・医), 水落智美 (東京大大院・医), 田中慶太 (東京電機大・先端工学研究所), 阿部雅也 (東京電機大大院・工), 湯本真人 (東京大・病院検査部), 川田昌武 (徳島大・工), 鶴澤礼実 (福岡大・医), 江川潔 (北海道大大院・医), 白石秀明 (北海道大大院・医), 山田由美 (北陸先端科学技術大学院大・知識科学), 柿木隆介 (生理研), 金桶吉城 (生理研), 渡辺昌子 (生理研), 乾幸二 (生理研), 井原綾 (生理研), 王曉宏 (生理研), 秋雲海 (生理研), 三木研作 (生理研), 和坂俊昭 (生理研), 廣江総雄 (生理研), 中田大貴 (生理研), 野口泰基 (生理研), 赤塚康介 (生理研), 田中絵美 (生理研), 本多結城子 (生理研),

Nguyen Thi Binh (生理研), 辻健史 (生理研), 尾島司郎 (生理研), 橋本章子 (生理研), 中村舞子 (生理研), 宮成愛 (生

理研), 宝珠山稔 (生理研), 中村みほ (生理研), 関和彦 (生理研), 郷田直一 (生理研)

【概要】

本年度は、所外から 77 名、所内から 26 名、計 103 名の研究者が参加し、例年にも増して盛況であった。

発表演題数は 28 題であり、計算理論的な発表から、各種感覚刺激（体性感覚、痛覚、視覚、聴覚など）に対する脳反応の解析、言語機能などの高次脳機能に関する研究、さらには「てんかん」を初めとする臨床疾患への応用など、広範囲に及んだ。

本研究会の特徴として、大学院生の参加が多く若手研究者の意見交換の場としての役割を果たしている事、20 分ないしは 30 分の口演であり、余裕を持った発表ができ、しかも十分な討議の時間があること、コーヒープレークの時間を十分にとってフロアでの活発な討議を可能にしていること、などがあげられ、通常の学会では考えられないような、濃密で person-to-person の意見交換が可能である事があげられる。この特色（長所）は本年度も十分に生かされていた。

幸い日本では脳磁図研究が盛んであり、稼動する脳磁計の数は世界一を維持している。しかし、世界的にみれば、ニューロイメージング研究分野では、機能的磁気共鳴画像 (fMRI) の空前のブームは未だ衰えを知らず、脳磁図研究はかなり押されている事は間違いない。また、最近では近赤外線スペクトロスコピー (NIRS) を使った研究が盛んになってきており、今後、脳磁図研究をどのように進めるかは大きな課題として残っている。

脳磁図の持つ高い時間分解能を十分に生かした研究が今後の主流となるべきであろうし、また Brain rhythm と称される周波数分析による研究も、脳磁図独自の手法として今後の発展が期待される場所である。幸い、本年度の研究会では今後の展開が期待される演題も多く発表されており、柔軟な発想を持つ若手研究者の頑張りに期待している。

(1) 海馬硬化症例におけるてんかん波の電流モーメントと、WAIS-R 所見との関係

芳村勝城, 渡辺裕貴 (独立行政法人国立病院機構療養所静岡てんかん・神経医療センター)

言語優位側に海馬萎縮があるてんかん患者 23 例について、脳磁図によって等価電流双極子が側頭葉に推定されたてんかん波の電流モーメントと Wechsler Adult Intelligence Score-Revised 所見との関係について調べた。

その結果、病変側側頭葉に等価電流双極子が推定されたてんかん波の電流モーメントの平均と、全知能指数および言語性知能指数との間に正の相関が認められた（相関係数それぞれ 0.51, 0.60）。また言語性知能指数が 80

未満で、両側にてんかん波の等価電流双極子が推定された 5 例では、健常側側頭葉におけるてんかん波の電流モーメントの平均値が病変側側頭葉に比較して有意に高かった ($p < 0.05$)。

これらの結果から、電流モーメントの低下は海馬硬化を伴った側頭葉における発作間欠時てんかん放電の減少を反映していると考えられ、言語性知能指数の低下との関連が示唆される。

(2) 光刺激による命令嚥下時の事象関連磁場について

長崎信一¹, 橋詰 顕², 柴 芳樹³, 山科 敦¹,
藤原百合¹, 末井良和⁴, 栗栖 薫², 谷本啓二¹

(¹ 広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 病態情報医科学 (歯科放射線学),

² 先進医療開発科学 (脳神経外科学), ³ 病態探求医科学 (口腔生理学),

⁴ 広島大学病院 (歯科放射線科))

【目的】命令嚥下運動時の各周波数帯域における事象関連磁場を明らかにする。

【対象と方法】嚥下障害の既往ならびにその症状を認めない, 成人男性12人 (右利き9人)。1mlの蒸留水を口腔に保持し, 光刺激により嚥下を50回行った。全頭型204chの脳磁計を用いて, 各嚥下における表面筋電図とMEGのデータを同時収集した。嚥下開始を頤下表面筋電図の立ち上がり時とした。脳磁計の各センサーで, Band-pass

filterを用いて2Hzずつ, 0-40HzのTime frequency chartを作製した。脱同期および同期の基準は嚥下開始前-3500ms ~ -1000msの各センサーの各周波数の平均とした。

【結果】嚥下運動開始前は, 中心前回付近と頭頂小葉付近において, 右側が左側より広範囲でβ帯域の脱同期を認めた。

【結論】嚥下運動の脳活動に左右差がある可能性が示唆された。

(3) 体性感覚刺激時の事象関連脱同期

橋詰 顕, 栗栖 薫, 志々田一宏

(広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 創生医科学専攻先進医療開発科学講座)

【目的】体性感覚刺激時の背景脳磁場活動の変化を調べる。

【対象と方法】成人男性5人に右正中神経を8~10秒間隔で約50回電気刺激し, 脳磁場活動を測定した。覚醒レベルを保つため, 検査中被験者はビデオを見るよう指示された。オフラインで0~50Hz, 2Hz刻みで周波数解析を行い, 解析結果をセンサー単位で被験者の脳表に投射した。

【結果】5人全員でS1およびS2を認める明瞭な体性間隔誘発磁界が認められた。5人中3人で右半球を中心にベータ波帯域で刺激後約2秒持続する脱同期が認められた。ガンマ波帯域の変化は明らかでなかった。

【結論】電気刺激が対側の背景脳磁場活動に及ぼす影響はわずかである。

(4) Angelman 症候群における体性感覚誘発磁場所見

江川 潔¹, 朝比奈直子¹, 白石秀明¹, 須藤 章¹,
香坂 忍¹, 斉藤伸治¹, 中根進児², 有働康代²

(¹ 北海道大学大学院 小児科, ² 北海道大学病院 臨床検査部)

【目的】Angelman 症候群 (AS) は精神遅滞, てんかん等を来す遺伝性疾患で, 15q11-q13の母性発現遺伝子UBE3Aが原因遺伝子である。発現機序には15q11-q13欠失, 父性片親ダイソミー, 刷り込み変異, UBE3A変異がある。15q11-q13にはGABRB3が存在し, 欠失例では中枢神経

におけるGABA受容体の発現に異常を認める。遺伝学的に診断されたAS症例において, SEF所見を検討した。

【方法】AS患者9例 (6~27歳: 欠失例7例, 刷り込み変異例1例, UBE3A変異例1例) で, 正中神経刺激によるSEFを204ch全頭型脳磁計にて測定した。

【結果】：欠失例では全例 N1m 頂点潜時が平均 32.1ms と遅延し、その onset は約 20ms で中潜時までならかな 1 峰性の波形を呈した。刷り込み変異例では、N1m は軽度遅延し、後期成分は増大していた。UBE3A 変異例では正

常反応を認めた。結論：AS における SEF は特に欠失例で特徴的な異常を認め、中枢神経活動の病態を示しているとし唆された。

(5) マウス用脳磁図・心磁図計測システムの開発

小野弓絵¹，白井健吾¹，中村 祐¹，葛西直子²，石山敦士¹

(¹ 早稲田大学大学院 理工学研究科 電気・情報生命工学専攻，² 産業技術総合研究所)

近年，脳神経・循環器疾患の機序解明や早期予防法の確立を目的として，遺伝子改変技術を応用した種々の疾患モデルマウスが作製されている。これらの疾患モデルマウスに対する脳磁図・心磁図等の生体磁気計測は，ヒトと同じモダリティに表れる疾患情報の知見を与えるものとして重要だと考えられる。我々は，高感度，高空間分解能を備えたマウス用生体磁気計測システムを開発した。体躯の小さいマウスの脳や心臓から発する電気生理

学的信号を高空間分解能で計測するため，有効直径 0.3mm のマグネットメータを用いた。また，デュワー底部と検出コイルとのリフトオフ距離を 0.7mm とすることで，空間分解能と磁気感度の向上を図った。本システムの最小空間分解能は 0.5mm であり，ノイズレベルは $1.3\text{pT}/\sqrt{\text{Hz}}$ (10Hz～10kHz) であった。実際にマウスの心磁図・脳磁図計測実験を行い，本システムの有用性を検討した結果について発表する。

(6) 統計的基準による MEG 順モデル選択

吉岡 琢¹，佐藤雅昭^{1,3}，梶原茂樹²，外山敬介²

(¹ ATR 脳情報研究所，² 島津製作所 基盤技術研究所，³ 科学技術振興機構 CREST)

MEG 逆問題は一般に解が一意に定まらない不良設定問題であり，何らかの事前知識を導入することに解を定めている。事前知識の一つとして，MRI 画像から抽出した皮質上に電流双極子を配置する方法がある。このとき SQUID センサの位置と頭の位置の関係が計測誤差などにより正しく計測されていない場合，誤った順モデルを用いて逆問題を解くことになり，その結果推定した脳活

動部位もずれてしまう。我々は変分ベイズ推定を用いて MEG 逆問題を解く方法を提案している。変分ベイズ推定では自由エネルギーにより順モデルを統計的に評価することができる。自由エネルギーを用いることにより，センサと頭の位置関係のずれを補正できることをシミュレーションによって示す。

(7) 複数信号源の時間相関に対してロバストな Beamformer 法の開発

栗山紘明¹，星野大介¹，中村 祐¹，白井健吾¹，小野弓絵¹，石山敦士¹，葛西直子²

(¹ 早稲田大学大学院 理工学研究科 電気・情報生命工学専攻，² 産業技術総合研究所)

聴覚反応や視覚反応などが混合している MEG データにおいて，全ての反応が同時刻にピークを迎えることは

まれであり，Multi-Dipole Fitting やノルム最小化推定などの Non-Adaptive な推定手法では時間的に安定した解を得

ることが難しい。そこで我々は、データの時間変化を推定に考慮する Adaptive な空間フィルタ法である Beamformer 法について研究している。Beamformer 法は、時間的に安定した解を得ることができ、またノイズにも強いというメリットを持つので非常に有用な方法である。しかし、信号源間に時間相関が存在すると推定解が干渉してしまい、歪んだ時間変化が求まってしまうというデメリット

がある。そこで、データ共分散行列の信号空間固有ベクトルを個々の成分に分解することにより、時間相関成分を除去する手法を試みた。この手法により、MEG データに含まれる複数の反応がいかなるピーク時刻を持っていたとしても、Beamformer 法を用いて信号源を推定することが可能となり、時間的に安定した解を得られることを示せた。

(8) 脳磁図の空間時間的クラスタリングを用いたモデル次数推定

星野大介¹, 栗山紘明¹, 白井健吾¹, 中村 祐¹, 小野弓絵¹, 石山敦士¹, 葛西直子²

(¹ 早稲田大学大学院 理工学研究科 電気・情報生命工学専攻, ² 産業技術総合研究所)

これまでに多くの脳磁図の複数信号源推定手法が提案されている。複数信号源推定手法は優決定的手法と劣決定的手法に大まかに分類でき、このうち計算磁場と測定磁場の間に誤差を許容する優決定的手法はノイズの影響を受けにくく、S/N の低い脳磁図の信号源推定に適すると考えられる。しかし、優決定的手法では信号源の数を事前に仮定する必要がある。そこで、我々は優決定的信号源推定手法の適切な使用を可能にするために、空間時

間情報を利用したクラスタ分析と主成分分析を組み合わせた信号源数推定手法を開発した。提案手法は二つのステップに分かれており、第1ステップではクラスタ分析により空間時間的に近い波形をグループ化し、第2ステップにおいて各グループでの信号数を求めることにより、最終的に全体の信号源数を求める。今回は、提案手法をシミュレーションデータ及び聴覚刺激実データに適用したので、その結果について検討する。

(9) 母音刺激による誘発磁場 N1m の検討

尾形エリカ, 湯本真人, 伊藤憲治, 関本荘太郎, 狩野章太郎, 伊藤 健, 加我君孝

(東京大学大学院 医学系研究科 脳神経医学専攻 感覚・運動神経科学講座)

健聴者8名を対象とし、母音刺激による誘発磁場を204チャンネル全頭型脳磁計を用いて計測した。女性話者の発話による日本語5母音を擬似ランダムに両耳提示し、/e/でボタン押しをするよう教示し、各母音250回以上加算した。/e/を除く各母音に対する誘発磁場 N1m の局在推定を行い、局在推定座標に対し半球毎に分散分析を行った所、各母音間で有意な差は認められなかった。更に、母音間の局在推定座標の乖離が大きかった1名の被験者に

対し、同様の計測を反復して6回施行した。その結果、左半球では、/o/は/u/より約2mm前方、/a/, /o/は/i/, /u/より約5mm上方にあった。右半球では、/i/は/a/, /o/より約5mm内側、/i/, /o/は/u/より約5mm前方、/a/, /o/は/u/より約8mm上方にあった。局在推定座標は個人間では一定の傾向は見られなかったものの、個人内での再現性が示唆された。

(10) 音声ミスマッチング課題の MEG のフラクタル次元解析

金子 裕, 岡崎光俊, 湯本真人

(国立精神・神経センター武蔵病院 脳神経外科・臨床検査部,
国立精神・神経センター武蔵病院 精神科, 東京大学医学部附属病院検査部)

ひらがなを先行して視覚呈示し, これを読み上げる際に 15% の確率で間違えて読み上げるという音声ミスマッチング課題を行った。Neuromag 社製 204 チャンネル脳磁計を用いて MEG を測定し, MATLAB を用いて解析した。周波数解析を行う一方, フラクタル次元の解析を行った。フラクタル次元は波形の複雑性を表すパラメータである。

右利きの 9 名の健常ボランティアを被検者に実験を行

った。周波数解析で聴覚野近傍で左右差が得られたのは 2 名のみであった。一方, フラクタル次元解析では 5 名で聴覚野近傍で左右差が得られ, その内容は 300-500msec 付近で incongruent のフラクタル次元が低下 (単純化) するというものであった。周波数解析で明らかにしない変化でもフラクタル次元解析で明らかにできる可能性が示され, また, 言語機能の左右差を求める一つの方法となることも示唆された。

(11) 音の高さ (ピッチ) の明瞭性に関わる脳磁界反応

添田喜治, 中川誠司, 外池光雄

(独立行政法人 産業技術総合研究所 人間福祉医工学研究部門 くらし情報工学グループ)

音の高さ (ピッチ) は, 音声認識や音楽の知覚において重要な要素である。本研究ではピッチの明瞭性に注目し, 繰り返しリプル雑音を用いて脳磁界計測を行った。繰り返しリプル雑音とは, 雑音信号を遅延し, もとの信号と加算する過程を N 回繰り返すことによって作る信号である。遅延時間に対応したピッチが知覚され, その明瞭性は繰り返し数 N に伴い増加する。本研究では繰り返し数 N を 0, 1, 4, 16 で変化させた。刺激は, 継続時間 0.5 s,

刺激間間隔 1.5 s でランダムな順序で呈示し, 各刺激について 50 回以上の加算平均を行った。被験者は, 聴覚健常者 10 名で, 計測中は映画 (音声なし, 字幕付き) を見るように教示した。解析の結果, 繰り返し数 N が増加するほど $N1m$ 振幅は大きくなる傾向が見られた。 $N1m$ 潜時, 信号源推定により求めたダイボールの位置に関しては, 繰り返し数 N の変化に対応する反応は見られなかった。

(12) 聴性 40Hz 応答がもたらす位相同期の検討

田中慶太, 川勝真喜, 阿部雅也 (東京電機大学)

連続的あるいは定常的な聴覚刺激により, γ 帯域 (約 40Hz) 応答を出現することが確認されている。それには一時的な 40Hz 応答と steady-state 応答に分類され, 一時的な 40Hz 応答は注意に対して関連する。しかし, Auditory Steady-State Response (以下 ASSR) の機能的意味は明確になっていない。そこで本研究ではヒトが聴覚刺激に注意しているとき, そうでないときの ASSR の聴

覚刺激に対する位相同期を調べることで ASSR の注意に対する影響を検討した。その結果, ASSR は刺激時に非注意条件に比べ注意条件において, 刺激波形に位相同期することが確認された。このことから ASSR は, 聴覚刺激周波数 (40Hz) への位相同期が注意に関連することを示唆する。

(13) 気体刺激のリアルタイムモニタリングによる嗅覚誘発電位・磁場の同時計測

秋山幸代^{1,2}, 斉藤幸子¹, 後藤なおみ¹, 小林剛史^{1,3}, 小早川達¹

(¹産業技術総合研究所 脳神経情報科学部門, ²日本体育大学, ³文京学院大学)

本研究は、我々のグループで開発した超音波ガスセンサーを用い、気体刺激をリアルタイムにモニターすることによって誘発された嗅覚誘発電位と脳磁場を同時に計測し、検討することを目的とした。ニオイ刺激は Kobal 式の嗅覚刺激装置を用い、被験者の右側の鼻孔に提示した。ニオイ物質にはバニリンを用い、刺激提示時間は 200 ms, 刺激間隔は 40s として 30 回提示した。得られた誘発電位から従来の嗅覚刺激装置の電磁弁が開いた時点

および、超音波ガスセンサーの出力が最大の 70% を超えた時点をオンセットとし、それぞれ加算し比較した結果、後者において各成分のピーク潜時が早かった。また、誘発電位の各成分に対応する潜時において脳磁場でも応答が認められた。活動部位の推定を行った結果、島皮質や上側頭溝に活動が観察された。以上から、これまでに報告されている嗅覚誘発電位の各成分の潜時は、再考する必要がある事が示唆された。

(14) 高濃度食塩水による三叉神経応答の有無

小見山彩子^{1,2}, 池田 稔², 斉藤幸子¹, 後藤なおみ¹, 小早川達¹

(¹産業技術総合研究所 脳神経情報科学部門, ²日本大学医学部 耳鼻咽喉科学教室)

味覚障害の中には医療用の味覚検査キット（テストディスク）の 4.32M の食塩水を知覚できないケースがある。その場合でも患者がピリピリ感や温覚などを訴えない。一方でラットを用いた実験では 0.4M 以上の食塩が鼓索神経の他に三叉神経も活動させることが報告されている。食塩がどの濃度でヒトの三叉神経を刺激するかについては不明であり、この解明には鼓索神経と三叉神経の活動の分離を行う必要がある。健常者を用いた実験では鼓索神経経路の応答と三叉神経経路の応答の区別は困

難である。そこで我々は真珠腫性中耳炎の手術のため両側鼓索神経を切断された被験者を用いた。本被験者の舌の先端に刺激を行った場合、刺激に対する応答が鼓索神経経路で伝えられないことが保証され、純粋な三叉神経の応答計測が可能である。

この被験者に対し高濃度 (3M) の食塩水を舌の先端に提示を行い、三叉神経刺激による応答が出現するか脳磁場計測を行うことで検討した。

(15) 脊髄誘発磁界測定の実状報告

富澤将司 (東京医科歯科大学 整形外科)

我々は磁界計測による脊髄機能診断法の確立に向けて研究を進めている。2001 年度の本研究会において、ネコの上行性脊髄誘発磁界を測定することで脊髄障害部位診断が可能なこと、脊髄内伝導路をマッピングすることができたことを報告したが、今回はウサギ末梢神経を刺激しその髄節高位でのシナプス活動をとらえることができ

たこと、ウサギ脊髄の 3 次元成分の磁界を測定し、神経周囲に生じる体積電流による磁界を含め電流源の時間的・空間的経過を 3 次元的に把握することが可能であったので報告する。

また、臨床応用としてヒト頸髄での誘発磁界測定に成功したのであわせて報告する。

(16) 指先電気刺激による体性感覚の感覚的強度と MEG 信号強度の比較

川西雄一郎, 井口義信, 多喜乃亮平, 根本正史, 木村友昭, 関原謙介, 橋本 勲
(東京都立科学技術大学大学院 工学研究科 システム基礎工学専攻)

本研究では, 感覚閾値上の指先電気刺激 (示指, 示指と中指の 2 本指同時刺激, 示指・中指・薬指の 2 本同時刺激) によって誘発された体性感覚誘発脳磁界を計測し, 体性感覚の感覚的強度と MEG 信号強度の対応を調べた。MEG の信号強度には, 得られた磁気信号のピーク時における各センサ値の二乗平均若しくは信号源推定による推定信号強度を用い, 感覚的強度には, ヒトの主観的な感覚量を表すマグニチュード推定値を用い, 2 本同時刺激

の際に感じる強度を標準刺激として, この刺激に対する感覚量を 10 とした時の主観的な感覚量を任意の数字で報告させた。そして, 指の本数を標本の大きさ n , MEG の信号強度を標本 X_n , 感覚的強度を標本 Y_n とし, 被験者 (健康な男女 7 名 (年齢 18-42 歳)) ごとの 2 次元標本分布を求め, 相関を取って比較・検討を行った結果, $N50$ において平均で標本相関係数 $r_{xy}=0.988$ という高い値を得ることができた。

(17) 体性感覚野での階層的情報処理

乾 幸二, 柿木隆介 (生理学研究所)

【目的】サルを用いた単一細胞記録や解剖学的連絡の研究は体性感覚野での階層的処理様式を示唆しているが, 各皮質活動の時間的關係を検討した研究は少ない。本研究ではヒト触覚情報の皮質内処理様式を検討した。

【方法】健康成人男性 13 名の左手背皮膚表面に電気刺激 (感覚閾値の 3 倍) を与え, 右半球から 37 チャンネル脳磁計 (Bti) を用いて誘発磁場を記録した。記録磁場は多信号源解析ソフト, BESA を用いて解析した。

【結果】右半球の 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, 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。

【考察】3b 野と 4 野の活動潜時に差はなく, 両者が視床からの投射により活動したものと考えられた。3b 野-1 野間, 1 野-5 野間の潜時差はそれぞれ 3.7 ミリ秒, 4.4 ミリ秒であり, これらの部位の連続的活動を示唆した。SII の活動は 3b 野よりも 7.3 ミリ秒, 1 野よりも 3.7 ミリ秒遅く, 第一次体性感覚野 (SI) - SII 間の連続的活動を示唆した。

【結論】ヒト触覚情報処理の早期過程では, 中心後回を後方へ向かう経路と SI から SII へ向かう経路の少なくとも二つの階層的処理経路が存在する。

(18) 縦書き, 横書きの文字および視覚刺激に関する脳磁場研究

山川恵子¹, 伊藤憲治¹, 湯本真人², 狩野章太郎³, 加我君孝^{1,3}

(¹ 東京大学 医学部 認知・言語医学, ² 東京大学医学部附属病院 検査部,

³ 東京大学医学部附属病院 耳鼻咽喉科)

縦書き, 横書き表記された単語, シンボル, ラインを中心視野に提示し, 視覚誘発脳磁場の比較を行った。全頭および左右側頭部の被験者全員の RMS (Root Mean Square) を算出し, およそ 5ms 毎に縦・横×刺激の種類 (2×3) の分散分析を行い, 条件ごとの反応における有意

差を検討した。その結果, 刺激提示後約 140ms から 400ms までの間に単語の処理において出現する刺激提示後 150ms あたり, 180-190ms あたり, 250ms あたり, 380ms あたりをピークとする 4 つの成分が観察された。中でも 180-190ms の反応については, 縦書きの方が信号強度が

強く、潜時も遅かった。また電源推定の結果では、この成分の反応は左右紡錘状回に求められた。縦書き文字の処理が横書きに比べ困難なこと、また縦書きと横書きの

書式の弁別にはこの時間帯の紡錘状回が関わるのが、これらの結果から示唆された。

(19) 音高と音韻の視聴覚間照合の脳磁場：音楽家 vs 非音楽家

湯本真人¹，伊藤憲治²，宇野 彰³，狩野章太郎⁴，斉藤 治⁵，金子 裕⁶，松田真樹⁷，加我君孝⁴

(¹ 東大病院検査部，² 東大医学部認知・言語医学，³ 筑波大学人間総合科学，

⁴ 東大病院耳鼻咽喉科，⁵ 国立精神神経センター武蔵病院精神科，

⁶ 国立精神神経センター武蔵病院脳外科，⁷ 東京芸大大学院音楽研究科)

音楽家，非音楽家各 8 名を対象とし，視聴覚間音高・音韻照合を課した際の MEG を 204ch 全頭型脳磁計により記録した。音高課題は 1 オクターブ内 12 音のランダム音列（音韻課題はカナ 9 字のランダム文字列）を用い，楽譜（文字列）を視覚提示した上で音高（音韻）逸脱（約 13%）を含む聴覚刺激を每秒 1 音の速度で提示し，被験者に視聴覚間不一致に注意して聴くよう教示した。聴覚刺激の立ち上がりトリガに，視聴覚間の一致音，不一

致音別に誘発脳磁場を加算平均した。楽譜（文字列）を視覚提示せず，聴覚刺激のみに対する反応を予め記録した。MCE (Minimum Current Estimates) 法および電流双極子法を用いて電源解析した結果を MRI に投影し評価した。音楽家に対する音高課題のみ，聴覚誘発 N1m の振幅が視覚提示により顕著に低下し，逸脱課題により頭頂に誘発される活動の音高，音韻課題間の局在の相違が確認された。

(20) 言語流暢性課題遂行時のβ帯域活動の相互相関

志々田一宏¹，橋詰 顕²，上田一貴¹，山下英尚¹，岡本泰昌¹，栗栖 薫²，山脇成人¹

(¹ 広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 精神神経医科学，

² 広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 脳神経外科学)

【目的】：言語流暢性課題施行中に，Broca 野などにおいて BOLD 信号上昇，β帯域活動の脱同期が見られる。Broca 野が他の領域とどのような関連性を有しているのかを相互相関を用いて調べた。

【方法】被験者にひらがな 1 文字を呈示し，その文字で始まる名詞を想起させ，そのときの脳磁場を 204ch 脳磁計にて記録した。個人毎に合わせたβ帯域でバンドパスし，グラジオメータの 1 対ごとに絶対値を平均し，さらに移動平均を行った。刺激呈示前後の 1 秒間を抽出し，約 30

回の試行を連ねてセンサーごとにベクトルとした。3-D 構築した MRI にて Broca 野に最も近いセンサーを選択し，他のセンサーとの間の相関係数を計算した。

【結果】刺激提示後，Broca 野近傍のセンサーとの相関係数は一旦低下し，その後，個人差が見られたが，500ms～2000ms において近傍のセンサーとの相関係数が高まる例があった。

【考察】言語流暢性課題における Broca 野の役割を示唆すると思われた。

(21) 視覚認知における先行刺激の影響；周波数解析を用いた検討

岡崎光俊（国立精神・神経センター武蔵病院 精神科）

だまし絵（2通りの絵に見えるあいまいな絵）をより具体化した2種類の絵を先行刺激として呈示したときに得られる2条件において、Neuromag社製204チャンネル全頭型脳磁計を用いて、それぞれ周波数・統計解析を行った。スペクトログラム上健常被験者12名中11名で潜時300-350ミリ秒・後頭-頭頂領域をピークとする20-40Hzのガンマパワー値の上昇を認めた。さらに潜時250-500ミリ秒で統計的有意差の得られたチャンネルを空間的にマッピングしたところ、 α , β , γ の各周波数帯

域で後頭-頭頂-後側頭領域に有意差が認められた。一方、同じ潜時における誘発磁場では2つの刺激間に明らかな差を認めなかった。潜時300ミリ秒付近の後頭領域に出現するガンマバンド活性は知覚の統合や表現および記憶における情報の維持に関係していると考えられており、今回の我々の結果は、形態的に同一の視覚刺激が先行刺激の影響を受けて後続する刺激が脳内で異なる処理を受ける可能性があることを示唆している。

(22) 刺激間隔における1/fn ゆらぎの視覚誘発脳磁図反応に対する影響の検討

原田暢善, 中川誠司, 岩木 直, 山口雅彦, 外池光雄
(産業技術総合研究所 人間福祉医工学部門)

視覚刺激間隔における1/fn ゆらぎの視覚誘発脳磁図反応に対する影響について検討を行った。刺激間隔に、1/f₀, 1/f₁, 1/f₂, および1/f_∞（一定間隔）のゆらぎを導入し、平均刺激間隔を600msとし、視覚誘発脳磁図反応の加算平均波形に対するゆらぎのべき乗nの影響について検討を行った。後頭領域において、加算平均波形の約100msの成分の振幅が標準刺激および比較刺激において、1/fn ゆらぎのべき乗nの増加とともに増加する傾向

が観察された。これまで刺激間隔における1/fn ゆらぎの影響を聴覚刺激で検討した結果においては、約100msの成分の振幅は、1/fn ゆらぎのべき乗nの増加とともに減少する傾向が観察されており、視覚刺激においては1/fn ゆらぎのべき乗nの効果が丁度逆になっていることが観察された。

結果を報告するとともに、これら現象について議論を行いたい。

(23) アルファ波電流ダイポールの左右半球間の位相差

川端啓介¹, 内野勝郎², 村田和優³, 外池光雄⁴

(1)大阪府立大学, (2)平成医療学園, (3)藍野学園短大, (4)産総研関西センター)

昨年この研究会で演者らはpatriel部分にlocalなアルファ波を発見しその挙動を報告した。その要点は、(1)電流dipoleは左右の両半球に一個づつありアルファ波の周波数で振動する、(2)この振動には90度の位相差がある、(3)これらは等磁場ループマップ上に直接に且つ明確に示される、(4)このマップ上の優勢な方のdipoleの位置はsingle-dipole-modelにより求めたものと一致する、で

ある。2個のdipoleでありながら、single-dipole-modelが良く合うということは、90度の位相差があるので、一方が最大るとき他方は最小になる時間が存在することに依る。このようなdynamicsの直接観察はlocalなアルファ波の存在により初めて可能となった。よく知られている閉眼時に後頭部に現れるアルファ波については図から直接には判断できないが、single-dipole-modelにより上と同じ

ような左右交替が現れることを報告した。今回は、これが直接観察でも可能であることを報告する。側頭、後頭で上述のような従来報告されなかった dynamics が存在

することは、直接観察により確信を持って言える様になった。さて、この結果は脳がなぜ90度の位相差を選ぶかという興味ある問題を提出する。

(24) フィードバックシステム論的解析と正中神経刺激による誘発磁場について

岸田邦治¹, 篠崎和弘², 深井英和¹, 鶴飼 聡³, 石井良平³

(¹ 岐阜大学工学部 応用情報学科, ² 和歌山県立医科大学 精神医学教室,
³ 大阪大学大学院 医学研究科 神経機能医学講座)

【方法・目的】正中神経繰り返し刺激の誘発磁場データには繰り返し周期なる時間構造があるので、それを手掛かりにして誘発磁場を分離した。そのデータをフィードバックシステム論的手法で解析し、結果はこれまで2度報告した。今回は被験者数を増やした結果をまとめて報告し、その過程で気づいた以下の点について主に発表する。
【考察・結果】加算平均波形の応答が機械的か否かに興味がある。数学辞典にもあるように Wold の分解定理とし

て定常過程が決定的か否かは大切な分類である。前者が確定性をもつことで加算平均波形として取り扱われて、後者が確率的であり、統計的にそのダイナミクスは相関関数で扱われる。フィードバックシステム論的手法は後者を取り扱っている。誘発磁場データから確定周期分を除去するとデータのガウス性が向上し、同定モデルの最小位相性も増し、報告済みの結果が補強された。

(25) Magnetoencephalography(MEG)-Beamformer 法をもちいた解析 ー主に側頭葉てんかんを中心とした臨床症例の検討ー

露口尚弘¹, 田中博昭², 下川原正博², 関原謙介³

(¹ 大阪市立大学大学院医学研究科脳神経外科学,
² 横河電機 MEG センター,
³ 東京都立科学技術大学電子システム工学科)

臨床の場合においては、脳機能マッピングやてんかん焦点の同定にたいし dipole model による解析が主に用いられる。誘発脳磁場のように局所に強い電流源が単一に集積しているような場合は信頼性が高いが、てんかんのように広範囲での磁場活動があるような場合は dipole で判断するには困難な場合がある。今回の発表では側頭葉てんかんを対象を絞り dipole 解析と空間フィルタを用いた解析ーadaptive beamformer 法ーを比較した。症例は内側

側頭葉てんかんと診断された15例で、160チャンネルMEGにて頭蓋内脳波を同時記録し、二つの方法を用いて解析した。また一部の症例でSEFを施行し同様の解析をおこなった。その結果 beamformer 法を利用することにより dipole 法では解析できなかった異常磁場を検出することができたが、それが臨床的にどのような意味があるのかをSEFと比較しながら考察したい。

(26) 聴性誘発磁場 N100m に対するスペクトル包絡の影響

水落智美¹, 湯本真人², 狩野章太郎³, 伊藤憲治⁴, 山川恵子⁴, 加我君孝^{1,3}

(¹ 東京大学大学院 医学系研究科 感覚運動神経科学, ² 東京大学医学部附属病院 検査部,

³ 東京大学医学部附属病院 耳鼻咽喉科, ⁴ 東京大学大学院 医学系研究科 認知・言語医学)

音色の定常的な要素を構成し、音の重要な情報を伝えるスペクトル包絡の音処理への影響を明確にするために、3つのカテゴリー (vocal, instrumental, linear) のスペクトル包絡と、2つの基本周波数 (110, 220Hz) 以外は要素が全て一致した24種類の複合音を、無視条件下で両耳提示した時のN100mを記録した。各半球、各基本周波数、各スペクトル包絡に対するN100mのピーク潜時、

振幅、等価双極子の局在を分析した結果、潜時は220Hzより110Hzの方が長かった。振幅はvocal及びinstrumentalの方がlinearより大きく、この差は左半球で明白にみられた。双極子は両半球のHeschl回周辺に現れ、vocal及びinstrumentalの方がlinearより前方だった。以上よりスペクトル包絡の複雑さが、N100mに反映する音処理を特に左半球で増強する事が示唆された。

(27) 脳磁界応答から見た聴覚逆方向マスキング現象

阿部雅也, 川勝真喜, 田中慶太, 小谷 誠 (東京電機大学大学院 工学研究科)

先行する小さな音 (信号音: maskee) のすぐ後に大きな音 (マスク音: masker) が呈示された場合、小さな音が聞こえにくくなる。これを、聴覚逆方向マスキング現象という。今回、この逆方向マスキングに着目してペア音、マスク単独音の聴覚刺激に対する脳磁界反応を計測した。マスク音の大きさを変化させたときのペア音、マスク単独音の、刺激呈示後100ms付近のN1mピーク振

幅の影響を調べた。得られた脳磁界波形からペア音とマスク単独音を比較した結果、マスク音の大きさを大きくさせていくにつれてペア音とマスク単独音の波形相関は高くなるという結果がみられた。またマスク音を大きくさせていくにつれて潜時が短くなったことから、後続するマスク音の反応が徐々に支配的になっていくと考えられる。

(28) ミスマッチフィールドの計測による骨導超音波知覚特性の検討

中川誠司¹, 竹形理佳^{1,2}, 外池光雄¹

(¹ 産業技術総合研究所 人間福祉医工学研究部門,

² Department of Psychology, University of Helsinki)

骨導で呈示された20kHz以上の高周波 (骨導超音波) は重度感音性難聴者にも知覚される。また、骨導超音波を振幅変調することで、言語音や環境音の伝達までもが可能であることが報告されており、この現象を応用した重度難聴者用の補聴器開発が試みられている。本研究では、このような骨導超音波知覚の時間分解能の検証を目的として、刺激音持続時間の変化に対するミスマッチフィールド (Mismatch Field: MMF) の計測を行った。以下

の4種類のバーストを異なるセッションで呈示した:1kHz気導音 (AC), 30 kHz骨導超音波 (BCU), 1kHz正弦波で振幅変調された30kHz骨導超音波 (AM-BCU), 1kHzおよび12kHzを混合した気導音 (Complex-AC)。なお、刺激AM-BCUと刺激Complex-ACはほぼ等価なピッチを有している。各セッション内では、標準刺激 (持続時間75 ms, 出現確率85%) と3種類の逸脱刺激 (持続時間52.5 ms, 37.5 ms, および22.5 ms, 各刺激の出現確

率 5%) がランダムに呈示された。各逸脱刺激に対する MMF ピークにおいて、等価電流双極子 (ECD) を推定した。

MMF 強度 (ECD モーメント) にはセッション間の有意差が観察された (AC: BCU: AM-BCU: Complex-AC = 1.0: 0.53: 0.91: 0.92)。ピッチがほぼ等しい AM-BCU および

Complex-AC に対しては、ほぼ等しい大きさの MMF が観察されたことから、MMF は刺激の知覚メカニズムというより、聞こえの違いを反映していると考えられる。また、AM-BCU の MMF 強度は気導音の 90% 程度に達していることから、骨導超音波補聴器による聞こえが、実用的な時間分解能を有することが示唆される。

11. 高次脳機能研究の新展開

2005 年 1 月 17 日－1 月 18 日

提案代表者：高田昌彦（東京都神経科学総合研究所）

所内対応者：南部 篤（生理学研究所）

- (1) サル前頭前皮質における反応結果の再現 ―過去の行動文脈と将来の時間予測―
辻本悟史（北海道大学）
- (2) 時間弁別課題遂行中のサル前頭前野の神経活動
生塩研一（近畿大学）
- (3) 連続眼球運動課題遂行中の前頭前野と基底核からの神経細胞活動
及びローカルフィールドポテンシャルの同時記録
藤井直敬（理化学研究所）
- (4) 報酬と嫌悪に基づく行動計画の線条体表現
山田 洋（京都府立医科大学）
- (5) サル頭頂連合野の CIP 野ニューロンによる、三次元曲面の表象
勝山成美（日本大学）
- (6) 視覚系における周期的同期発火の機能的意義の検討
雁木美衣（東京大学）
- (7) 運動性視床によるサッカード発現の時間調節
田中真樹（北海道大学）
- (8) MST ニューロンは空間内の動きをコードしている
稲場直子（産業技術総合研究所）
- (9) 皮質脊髄路損傷後における手指の巧緻運動の機能回復と脳の再組織化
西村幸男（生理学研究所）
- (10) 前頭前野から一次運動野への多シナプス性入力様式
宮地重弘（東京都神経科学総合研究所）
- (11) 顎運動に関わる神経回路の解析
畑中伸彦（生理学研究所）

【参加者名】

高田昌彦（東京都神経科学総合研究所）、稲瀬正彦（近畿大学）、泰羅雅登（日本大学）、塚田 稔（玉川大学）、丹治 順（東北大学）、雁木美衣（東京大学）、宮地重弘（東京都神経科学総合研究所）、稲場直子（産業技術総合研究所）、辻本悟史（北海道大学）、生塩研一（近畿大学）、山田 洋（京都府立医科大学）、田中真樹（北海道大学）、勝山成美（日本大学）、藤井直敬（理化学研究所）、海野俊平（日本大学）、土師知己（日本大学）、湯本直杉（東

京都神経科学総合研究所）、榎本一紀（京都府立医科大学）、奈良重俊（岡山大学）、倉持真人（山口大学）、一戸紀孝（理化学研究所）、喜多 均（テネシー大学）、山森哲雄（基礎生物学研究所）、（以下、生理学研究所）伊佐 正、関和彦、吉田正俊、遠藤利朗、坂谷智也、熊谷愁子、西村幸男、武井智彦、南部 篤、畑中伸彦、橘 吉寿、知見聡美、窪田芳之、平井康治、小川 正、小松英彦、鯉田孝和、松本正幸、伊藤 南、松茂良岳良、橋本章子

【概要】

われわれは行動する際、視覚・聴覚・体性感覚などの外部（感覚）情報や学習・記憶・情緒などの内部（自己）情報に基づいて、もっとも適切な運動あるいは動作様式

を選択、決定、実行する。日常的に設定されたさまざまな行動目標を達成するため、脳はこれら多種多様の情報を状況に応じて有機的に統合し、運動情報として運動野

に出力しなければならない。また、物を掴む、腕を伸ばすなど、われわれが日常的に行う個々の動作は、長年にわたる経験や習慣に基づき脳内で形成された運動プログラムに従って、ほとんど無意識のうちに実行されている。状況に応じて意識的かつ合目的にある特定の行動を企画、遂行しようとする際、脳はそれまでに学習、獲得してきた無数の運動プログラムや認知・思考パターンの中から状況に最も適合したものを選び出し、それらを時系列的に順序よく組み合わせて、まとまりのある一連の行動として出力しなければならない。しかし、このような行動の組織化の神経機構については未だ明らかになっていない。

すなわち、脳科学は本来、脳機能をシステムとして理解し、究極的には“個体の組織化された行動発現のメカニズム”の解明をめざす学問領域である。しかし、現在の脳科学は、研究の進展とともに、研究テーマがそれぞれの専門分野ごとに細分化されるようになった結果、個々の分野の研究者がカバーあるいはフォローできる学

問領域も狭小化し、各専門分野を横断的かつ統合的に捉え、相互理解を深めることがきわめて困難な状況になってきた。個々の研究領域にのみ注目していると、個体としての脳機能の全体像を見失う恐れがあり、生命現象を統合的に理解しようとする脳科学の基本的立場に基づいた研究姿勢が必要不可欠である。したがって、“個体レベルでの高次脳機能をシステムの的に理解する”ためには、要素としての個々の神経機構を詳細に解析するだけでなく、それらを統合的に機能させる神経システムの解明が重要であり、そのような視点から研究が展開されなければならない。

「高次脳機能研究の新展開」と題した本研究会では、神経解剖学、神経生理学、分子生物学、情報工学など、多岐にわたる専門分野の若手あるいは中堅の研究者が、運動、感覚、認知、及び情動の各分野に関する最新の知見を紹介し、各分野における研究の趨勢、問題点、及び今後の展開に関して討論を行った。

(1) サル前頭前皮質における反応結果の再現 —過去の行動文脈と将来の時間予測—

辻本 悟史 (北海道大学大学院医学研究科 高次脳機能学分野)

私たちは、あらかじめ決められた行動を繰り返すだけでなく、状況に応じて柔軟に行動を制御することができ。前頭前皮質の背外側部 (DLPFC) は、このような認知能力に必須であると考えられてきた。しかしながら、そのシステムの理解はあまり進んでいない。本研究では、この問題にアプローチするために、報酬情報に注目して一連の実験を行った。

まず、報酬獲得までの行動文脈が獲得後の活動によって如何に再現されるかを調べるために、記憶誘導性と視覚誘導性のサッカード課題を遂行中のサル DLPFC からニューロン活動を記録した。これらの課題では、サッカードの後すぐ (0.5 秒後) に報酬が与えられる条件と遅れて (2 秒後) 与えられる条件が 50% の確率でランダムであり、サルは報酬のタイミングを予測できなかった。その結果、多くのニューロンのサッカード後の活動がサッカードの方向と報酬有無の両方に影響を受けた。また、これらの多くは、そのような活動を記憶誘導性あるいは視覚誘導性のいずれか一方の課題のみで示した。すなわ

ち、これらのニューロンの活動は、直近の過去の 3 つの要因、(1) 反応に用いた情報 (記憶 or 視覚)、(2) 反応の方向、(3) 反応結果 (即時 or 遅延報酬) に影響を受けた。これらの結果は、DLPFC のニューロン群が反応結果を行動文脈依存的に再現することを示唆する。

続いて、将来の報酬が‘いつ’獲得できるかという時間的予測のニューロン機構を調べるため、記憶誘導性サッカード課題をさらに改変し、視覚刺激によって報酬のタイミングを予測できるようにした。そうすると多くのニューロンが、視覚刺激提示中および遅延期間中に、報酬の予測時間に依存して異なる活動を示した。これらのニューロンの中には、一方よりも‘早い’または‘遅い’といった相対的な時間を反映するものと、‘0.5 秒’や‘2 秒’といった絶対的な時間を反映するものが存在した。これらにより DLPFC のニューロン群が将来の報酬の相対的および絶対的な時間予測を再現することが示唆される。

過去の反応結果の文脈依存的再現は、状況に応じた適切な行動を発現するために役割を果たすと考えられる。

また、将来の報酬の時間的予測は、反応の選択のみならず、反応結果（報酬）を行動文脈と結びつけるためにも役割を持つかもしれない。このように DLPFC は、動的に変

化する環境に柔軟に適応するための神経基盤を有するようである。

(2) 時間弁別課題遂行中のサル前頭前野の神経活動

生塩 研一、千葉 惇、稲瀬 正彦（近畿大学医学部第一生理）

時間認知の神経機構は、いま注目を集めているテーマである。これまで、心理学的行動実験やヒトのイメージング実験などにより、認知モデルの提案や時間情報処理に関わる領野の推測もなされてきた。しかし、十分な理解に至らず、ユニット記録実験が切望されていた。最近、そのユニット記録実験として、サルの頭頂葉や前頭前野から神経活動を記録した実験がいくつか報告され始めた。我々は、独自の時間弁別タスクでサル前頭葉のユニット記録実験を進めており、実験で得られた結果のいくつかを紹介する。

2 頭の雄のニホンザルを用いた。サルには呈示時間が異なる 2 つの視覚刺激 C1 と C2（青か赤の四角形）を引き続いて呈示した後、長い時間呈示された方を選択するように訓練した。それぞれの視覚刺激の後には遅延期間 D1 と D2 を設けた。サルの成績が十分に良くなった時点で、前頭葉からユニット記録実験を行った各ニューロンの各期間（C1, D1, C2, D2）について、C1 が長い試行群と

C2 が長い試行群との間での神経活動を比較した。その結果、あるニューロンは C1 と C2 のいずれが長いかに関わらず C1 の開始から一定の時間後に phasic に発火した（基準時間をコード）。他のニューロンは C1 が長い試行の D1 のみで有意な活動を示し（C1 が長いことをコード）、また別のニューロンは C1 が長い試行の C1 と C2 が長い試行の C2 で有意な活動を示した（長い刺激をコード）など、時間情報処理に関わる複数のタイプのニューロングループを見出した。

ユニット記録実験から、前頭前野には基準の時間をコードするニューロンやその基準と比較した結果をコードするニューロンがあり、それらが時間弁別課題の遂行に関わっていると考えられる。サルはトレーニングの過程で視覚刺激呈示時間の長短を区別する基準の時間を設け、まず C1 が長いかどうかを判断する戦略を獲得したと推測される。

(3) 連続眼球運動課題遂行中の前頭前野と基底核からの神経細胞活動及びローカルフィールドポテンシャルの同時記録

藤井 直敬（理化学研究所・象徴概念発達研究チーム）

脳は外界から受け取る情報の様々な側面を、多数同時に抽出し、それを統合することで、高度な認知機能を実現している。その情報処理機構は、解剖学的結合からみると、非常に複雑な情報処理ネットワークをベースに行われていることは明らかである。しかしながら、脳の最も重要かつ、不可欠な、そのネットワーク機能という側面から、脳機能を明らかにしようという試みは未だあまり成功していない。一つには、解剖学的に結合している複数の領野を同定し、その特定の領野から記録すること

が、著しく難しいこと。また、たとえその記録に成功しても、記録できる神経細胞活動の数が少ないため、記録されたデータにサンプリングバイアスが強くかかる可能性があるためである。今回の報告では、脳のネットワーク機能の一部として、前頭前野—基底核ループを取り上げ、神経細胞活動の記録と合わせて、ローカルフィールドポテンシャル (LFP) の記録を同時に行い、前頭前野、基底核の課題遂行中の機能的結合様式を明らかにする。

(4) 報酬と嫌悪に基づく行動計画の線条体表現

山田 洋, 松本直幸, 木村 實 (京都府立医科大学)

線条体は従来より動機づけから行動の計画・発現へと到る過程に重要な役割を果たすことが示唆されているがそのメカニズムは十分明らかではない。報酬と嫌悪に基づく行動発現課題を遂行中のサルは線条体から電気生理学的に同定される PANs (投射細胞) と TANs (コリン作動性介在細胞と推定) の活動を記録し、動機づけから行動計画とその発現過程における PANs と TANs の役割を検討した。サルは手元のレバーを自発的に押して課題を開始し、GO 刺激を合図に素早くレバーを放すことが要求された。あらかじめ、レバー放しの後に報酬の水、ビーブ音が与えられるのか、またはレバー放しが遅れると顔面へ空気が吹きつけられる (嫌悪刺激) ことを視覚刺激によって教示した。報酬条件でのレバー放しは反応時間が短く、エラーが少ないのに対して、嫌悪条件では GO 刺激が現れる前にレバーを離してしまうエラーが多かったことにより、サルは教示刺激によって動機づけ文脈を検出・識別して、文脈に対応した行動計画を行っていたことを確認した。

PANs は課題遂行中に現れるそれぞれの感覚運動事象に特異的に応答する様々なタイプのものが観察されたのに対して、TANs は動機づけの教示と GO 刺激に対してのみ応答した。TANs と PANs は共に報酬や嫌悪などの教示刺激の違いを区別して応答し、それに続く運動の実行直前には報酬が得られるかどうかを選択的に応答を示した。したがって、TANs と PANs は動機づけ刺激の検

出と識別を行い、それに続く動機づけに基づく行動計画と発現の初期の過程に重要な、固有の役割を果たすことが明らかにされた。一方、過去約 6 試行での報酬履歴から高い確率で報酬の教示が期待される試行では、サルは極めて素早く試行を開始して教示刺激の出現を待った。このことは、サルが各試行の開始から動機づけの教示までの間、過去の履歴に基づく報酬期待をもって臨み、教示刺激が実際に現れると教示された動機づけ文脈で行動計画を行っていたことを示す。課題開始のためのレバー押しと教示刺激の出現と関連する PANs の持続的な放電の増大は報酬履歴から予測される報酬確率と有意に相関した。一方、動物の行動も PANs の活動も嫌悪の履歴にはほとんど依存しなかった。教示刺激の提示以後のレバー放し、報酬やビーブ音に関連する活動は履歴依存的ではなかった。

これらの実験から線条体の介在細胞である TANs は現在の環境から得られる感覚刺激のもつ動機づけ情報を検出・識別し、その情報を投射細胞である PANs に伝えることで、動機づけに基づく行動の計画から発現に貢献すると考えられる。一方、PANs は現在の環境から得られる情報に加えて、過去の経験から得られる情報、特に報酬履歴に基づいて行動の計画から発現に重要な役割を果たすと考えられる。

(5) サル頭頂連合野の CIP 野ニューロンによる、三次元曲面の表象

勝山成美¹, 長沼朋佳¹, 酒田英夫², 泰羅雅登³

(¹ 日本大・院・医・応用システム神経科学, ² 聖徳栄養短期大, ³ 日本大・総合科学研究所)

サル大脳皮質の CIP (caudal intraparietal) のは頭頂間溝の外側壁後部に位置する視覚領野の一つである。これまでの研究によって、この領野のニューロンは空間内における軸や平面の傾きに特異的に反応することが示されており、また平面の傾きに特異に反応するニューロンの中には、ランダムドットステレオグラム (RDS) に加えて、スポットや線分などからなるテクスチャの勾配によって表現された平面の傾きにも反応するものが存在すること

が明らかとなっている。このようなことから、CIP 野は三次元物体の知覚にとって重要な領野であることが示唆されている。今回我々は、この領野のニューロンが軸や平面の傾きに加えて、三次元曲面の形状にも特異的に反応することを見出したので、報告する。

コンピュータグラフィックスにより、ランダムドットステレオグラムで表現した三次元曲面刺激を画面上に呈示し、曲面刺激を注視しているサルの CIP 野に微小電極

を刺入して、単一ニューロン活動を記録した。視覚刺激には、オランダの心理学者 J. J. Koenderink が提案した方程式によって表現される曲面を用いた。この方程式は、曲面の形状を規定する Shape index と、その最大視差を決定する Curvedness という 2 つのパラメータを用いて、さまざまな形状および凹凸の度合いをもつ三次元の曲面を表現するもので、Shape index が -1.0 から 1.0 の間を動く間に、刺激の形状が凹の球面→凹の円柱→鞍馬型→凸の円柱→凸の球面と連続的に変化する。今回の実験においては、9 つの Shape index と 3 種類の Curvedness による合計 27 種の曲面刺激を呈示した。

まず Shape index に対する反応では、9 つの Shape index に対する反応を Gabor 関数で近似したところ、多くのニューロンが高い相関係数を示した。Gabor 関数のピークを各ニューロンの最適 Shape index としたところ、それらが負の値（凹面を含む曲面）、0 の周辺（鞍馬型）および正の値（凸面を含む）をもつニューロンがそれぞれ得られた。しかし、最適 Shape index の分布は一様ではなく、0 から正の値に偏った分布を示した。複数の Curvedness

を呈示したニューロンにおいて、最適の Shape index を Curvedness ごとに求めて比較したところ、その値はよく一致していた。これらのことは、CIP 野のニューロンが三次元曲面刺激の形状に対して選択的に反応していることを示している。次に、それぞれの刺激を front parallel 面内で回転させた際の反応を調べたところ、約半数の Shape index 選択性 (SIS) ニューロンでは回転の角度によって反応が変化した。残りの半分のニューロンでは刺激が回転しても Shape index に対する選択性が変化しなかった。このことは、CIP 野の SIS ニューロンが刺激の局所的な視差に反応しているのではなく、三次元曲面の形状そのものに応答していることを示唆している。最後に、一部の SIS ニューロンは、ランダムドットステレオグラムと同じ曲面形状を、二次元的なスポットの密度勾配で表現した刺激にも反応することが見出された。以上の結果は、サル CIP 野には視覚の手がかりによらない三次元曲面の表象が存在し、この領野が三次元物体の知覚に重要な役割を果たしていることを示唆している。

(6) 視覚系における周期的同期発火の機能的意義の検討

雁木美衣, 石金浩史, 本田祥子, 立花政夫

(東京大学大学院・人文社会系研究科・心理学研究室)

様々な神経系において、複数細胞が γ 帯域 (20-80 Hz) の周期的なリズムを伴って同時に発火する現象（周期的同期発火）が報告され、その機能についての議論がなされている。視覚系においては、これらの同期発火がゲシュタルト的な知覚統合に関与するのではないかという仮説が提唱されているが、実際に視覚情報処理において機能的な役割を果たしているのかどうかは今なお明らかになっていない。

カエル網膜の OFF 持続型神経節細胞であるディミング検出器 (dimming detector) においても、複数細胞間の周期的同期発火が観察される。また、カエルは視覚誘発性の逃避行動を示すことが知られており、ディミング検出器は大きな影に対してよく応答することから、逃避行動との関連が示唆されている。そこで、ディミング検出器の応答を薬理的に操作し、逃避行動の変化を検討することで、周期的同期発火の機能的意義を検討した。

逃避行動は黒スポットが拡大する刺激をモニター上に呈示することで誘発できた。GABA_A 受容体の阻害剤である Bicuculline をカエルの眼球内に注入すると、逃避行動が強く抑制され、逆に GABA_C 受容体の阻害剤である TPMPA を注入すると逃避行動は促進された。またこれらの阻害剤を注入したとき、逃避行動以外の視覚誘発性行動である、矩形波縞に対する追従運動には影響がなかった。次に、剥離網膜標本を作製し、マルチ電極を用いてディミング検出器の応答を記録した。Bicuculline を灌流投与するとディミング検出器の周期的同期発火が抑制され、逆に TPMPA を灌流投与すると周期的同期発火が増強された。また、発火数、および同期発火数はいずれの阻害剤においても増加した。したがって、逃避行動と対応するのは周期的同期発火であり、周期的同期発火が逃避行動の誘発に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

(7) 運動性視床によるサッカード発現の時間調節

田中真樹 (北海道大学・医学研究科・認知行動学分野)

自発的に運動を行うためには、①どのような運動を、②いつ行いか、を決定する必要がある。運動の発現に関わるこれらふたつのパラメータが、ある程度異なった神経機構によって制御されている可能性が、最近の機能画像を用いた研究により示唆されている。特に後者の時間的調節には大脳皮質のみならず、大脳基底核や小脳が関与することが明らかになりつつあり、これは神経学的によく知られた Parkinson 病や小脳障害患者における運動開始異常の所見と一致する。運動の決定そのものが大脳皮質、とくに前頭葉皮質でなされることを考えると、これら皮質下中枢は自発的な運動のタイミングを調節するための情報を大脳皮質に供給していると考えられる。運動性視床は皮質下の情報を前頭葉皮質につたえる上行性経路として重要であり、本研究では同部がサッカード眼球運動発現の時間調節に関与しているかどうか、単一ニューロン記録と局所の破壊実験によって調べた。

従来の記憶誘導性サッカード課題では、運動の空間的な情報は記憶から読み出される必要があるが、運動のタイミングは固視点が消えることによって外部から与えられる (externally triggered 課題)。そこで、手がかり刺激が消えてから 800-1600 ミリ秒の期間内に自発的にサッカ

ードを行わせる internally triggered 課題を導入し、サルの視床から記録された時間経過のことなる 2 種類の神経活動について検討した。

Externally triggered 課題の 1 秒間の遅延期間中にみられた buildup activity は固視点が消えた直後でピークに達した。この活動は遅延期間を 1.5 秒に延長してもそれ以上増加せず、固視点が消えると予測される時間にあわせて活動を上昇させていることがわかった。さらに同じニューロンが internally triggered 課題で運動に先立って活動を変化させた。一方、サッカードに関連した burst activity は視覚誘導性サッカードよりも記憶誘導性サッカードで大きな活動を示したが、多くのニューロンでは externally triggered 課題と internally triggered 課題で活動の大きさに差がなかった。

記録部位周囲に微量のムシモールを注入したところ、反対側に向かう記憶誘導性サッカードの潜時が延長し、その効果は internally triggered 課題で顕著であった。これらのことから視床は自発的に起こるサッカードの発現に関与することが示され、遅延期間中の buildup activity が運動のタイミングの調節に寄与する可能性が示唆された。

(8) MST ニューロンは空間内の動きをコードしている

稲場直子^{1,2,3}, 山根茂^{1,2}, 竹村文¹, 河野憲二^{1,4}

(¹産業技術総合研究所, ²筑波大学大学院, ³日本学術振興会, ⁴京都大学医学研究科)

我々の眼が視標を追いかけて動いているとき、背景で静止している物体であってもその網膜上の像は動いている。しかしながら、我々は、網膜像の動きが目の動きにより受動的に生じたものであるか、実際に物体が空間内で動いていることによるものかを区別して知覚することができる。このメカニズムを理解するために、我々は眼球運動遂行中のサルに動き刺激を呈示し、頭頂葉 MT 野 (middle temporal area) および MST 野 (medial superior temporal area) から単一ニューロン活動を記録した。眼球運動課題には、固視、記録したニューロンの適刺激方向

またはその反対方向への追跡眼球運動 (20deg/s) を用いた。サルの前면에置いたスクリーンにランダムドットパターンを投影し、-40~60deg/s (ニューロンの適刺激方向を正とする) の速度で動かすことにより、眼球運動遂行中のサルに動き刺激を与えた。MT ニューロンおよび MST ニューロンの動き刺激への反応を解析することにより、眼球運動中に生じた網膜像の動きに対し、どのような反応を示すかを調べた。その結果、ほとんどの MT ニューロンが網膜像の動きに応答するのにに対し、MST ニューロンでは、網膜上では適刺激方向への動きがない条

件でも応答する，または網膜像が適刺激方向に動いていても，スクリーン上で動いていない場合には応答しないものが多く存在することが明らかになった。すなわち，MST ニューロンはスクリーン上での動き刺激の速度に

応答することが明らかとなった。この結果により，MST ニューロンは網膜座標上の速度をコードしているのではなく，空間内での速度をコードしているということが示唆された。

(9) 皮質脊髄路損傷後における手指の巧緻運動の機能回復と脳の再組織化

西村幸男¹，伊佐 正¹，Sergei Perfiliev²，大石高生³，肥後範行⁴，村田弓⁴，尾上浩隆⁵，塚田秀夫⁶

(¹生理研・認知行動発達，²イエテボリ大学・生理，³京都大・霊長研・器官調節，

⁴産総研・脳神経情報，⁵東京都神経研・心理学，⁶浜松ホトニクス)

皮質脊髄路は霊長類において顕著に発達し，単シナプス性の Corticomotoneuronal Connection が見られるようになる。従来より，この単シナプス性の Corticomotoneuronal Connection の確立が霊長類において，precision grip などの個々の手指を独立に動かすことのできる「巧緻性」が発達した原因であると考えられてきた。この説はサルにおいて錐体路の切断が precision grip を恒久的に消失させるという実験結果 (Lawrence and Kuypers 1968 など) や多くのヒトでの臨床所見による。しかしこれらの皮質脊髄路の切断・損傷はいずれも延髄より高位で起きた事例である。近年，霊長類においても皮質脊髄路からの信号を 2 シナプス性に手指筋運動ニューロンに伝達する脊髄介在ニューロン (PN) が C3-C4 髄節に存在が報告された (Altermark et al. 1999)。従って，皮質脊髄路から運動ニューロンへの直接結合を断った際に，これらの PN 系によって手指の巧緻運動の機能代償が行なわれる可能性がある。そこで，我々は上肢による到達一把持 (precision grip) を訓練したサルにおいて脊髄 C4/C5 髄節で側索背側部を切断することで皮質脊髄路を完全に遮断し，かつ PN を介する伝達経路を残した場合に手指の巧緻運動がどの程度回復するのか，またその機能回復にはどのような中枢神経機構が作用しているか検討した。

6 頭のマカクザル (ニホンザル 4 頭，アカゲザル 1 頭) において C4/C5 髄節で側索背側部を切断した。これらのうち切断が皮質脊髄路に局限していた 2 頭においては precision grip は切断後 1 週間以内に出現し，運動は 1 ヶ月程度でほぼ正常に近いレベルまで回復した。切断が側索全体に及んでいた 2 頭では precision grip の出現に 3-4 週間を要し，3-4 ヶ月で運動の回復がほぼ正常レベルに

達した。回復過程の初期において，把持の直前の preshaping が消失，第 2 指による接触の後第一指と二指の間隔を開けその後把持開始されるという所見が観察された。これらのサルの行動観察が終了後， α クロロロースによる麻酔下で上肢筋運動ニューロンから細胞内記録を行い，反対側錐体路を電気刺激したところ，約半数の運動ニューロンで 2 シナプス性の EPSP が記録された。健全な動物では先行する IPSP のためにこのような 2 シナプス性の EPSP はほとんど記録されないことから，機能回復過程において 2 シナプス性の興奮性経路ないしはそれに対する抑制系に何らかの変化が生じたものと考えられた。

次にこの機能回復過程における大脳皮質など，より上位中枢で再組織化が起きている可能性を検討するため，3 頭のサルにおいて上肢の到達一把持運動遂行中の Positron Emission Tomography による脳賦活イメージングを行なった。すると 1 ヶ月後には両側の一次運動野，体性感覚野，補足運動野，および切断の同側の小脳において顕著な活動の上昇が見られた。3 ヶ月後には両側の一次運動野と運動前野腹側部において活動の増大が残存した。また 1 頭のサルにおいて切断後 3 ヶ月に脳を灌流固定し，成長関連タンパク質の遺伝子発現を in-situ hybridization 法によって調べたところ，切断の反対側の一次運動野の手指領域および運動前野において切断の同側に比して GAP-43 の mRNA の発現量が 2 倍程度に増加していた。上記の結果から，皮質脊髄路切断後の機能代償過程において両側の一次運動野や運動前野など上位中枢において大規模な再組織化が起きている可能性が示唆された。

(10) 前頭前野から一次運動野への多シナプス性入力様式

宮地重弘 (東京都神経科学総合研究所・統合生理研究部門)

我々の日々の活動,特に外界の対象への操作において,上肢の運動はきわめて重要である。これはヒト以外の霊長類についても同様で,たとえばサル、の毛づくろい、餌の採集など巧緻な運動を必要とする操作は、すべて上肢を用いて行われる。このような巧緻な運動には、多くの認知情報が必要であると考えられる。このことは、大脳皮質の解剖学的構造にも反映されており、例えば一次運動野の体部位再現地図では上肢が他の体部位に比べて非常に広い領域を占める。補足運動野、前補足運動野など、より高次の運動関連領域では、この傾向はより顕著になる。では、行動制御の最高次中枢とされる前頭前野から運動野への入力はどうなっているのだろうか。運動野の上肢領域は、他の領域に比べて特に多くの入力を前頭前野から受けているのだろうか。また、上肢の中でも特に到達運動を行う近位部(肘、肩)と、到達運動のみならず、対象への操作に重要な遠位部(手、指)では、関連する前頭前野の領域が異なるであろうか。これらの点を明らかにするため、我々は、狂犬病ウイルスを逆行性経シナプス神経トレーサーとして用い、サル前頭前野から一次運動野への多シナプス性入力様式を調べた。

マカクザル一次運動野を電気生理学的にマッピングし、下肢領域、上肢領域全体、上肢近位部領域、あるいは上肢遠位部領域に狂犬病ウイルスを微量注入し、注入

後4日目に灌流固定、脳を摘出し、作成した薄切切片において免疫組織化学的にラベルの分布を解析した。その結果、上肢領域への注入では、下肢領域への注入に比べて非常に多く(約10倍)のニューロンが前頭前野各領域においてラベルされた。下肢領域からのラベルは主に内側前頭前野(内側9野、24/32野)に集中していたが、上肢領域への注入では内側部に加えて背外側前頭前野に強いラベルが見られた。近位上肢領域(肘肩領域)と遠位上肢領域(手指領域)への注入を比較すると、遠位領域への注入の方が多くの前頭前野ニューロンがラベルされた。また、近位領域への注入では背外側前頭前野背側部(外側9野および46野の主溝内部)のラベルが比較的多かったが、遠位領域への注入では背外側前頭前野腹側部(ventral convexity)に非常に強いラベルが見られた。

以上の結果は、前頭前野からの認知情報が、一次運動野の異なる体部位を再現する領域に、必要に応じて配分される構造的基盤があることを示唆するものである。すなわち、一次運動野上肢領域は下肢領域に比べ、視覚情報に基づく行動決定に重要とされる背外側前頭前野からの入力を強く受け、中でも物体の操作を行う遠位上肢領域は物の形態の情報を持つ背外側前頭前野腹側部から非常に強い入力を受ける。

(11) 顎運動に関わる神経回路の解析

畑中伸彦¹ 徳野博信² 宮地重弘³ 南部篤¹ 高田昌彦³

(¹生理学研究所 生体システム研究部門, ²東京都神経科学総合研究所 脳構造研究部門,

³東京都神経科学総合研究所 統合生理研究部門)

顎運動を制御する神経回路を調べるために、(A)マカクサル前頭葉に存在する4つの顎運動関連領域の入出力様式の解明と、(B)狂犬病ウイルスを用いたラット咀嚼筋へ投射する神経回路の多シナプス性解析を行った。

(A)さまざまな報告によって、マカクサルの前頭皮質に、一次運動野顎領域(MI)、補足運動野顎領域(SMA)、皮質咀嚼野主部(CMaAp)、皮質咀嚼野深部(CMaAd)の4

つの顎運動関連領域が存在することが知られている。これらの領域を皮質内微小刺激法により電気生理学的に同定し、逆行性、順行性標識物質を用いてその入出力様式を解明した。その結果、(1)皮質一線条体投射の終末は被殻の腹側部、尾側2/3レベルに投射しており、4つの顎運動関連領域はそれぞれ独立した投射部位を持っていた。MIは外側部に、SMAは内側を中心に投射しており、

中央部で投射領域の重なりが観察された。CMAp は内側に限局して投射しており、SMA との重なりが大きかった。CMAAd は最腹側部に投射しており、その他の領域と完全に分離していた。(2)皮質－脳幹投射において、MI, SMA, CMAp からの終末は主に、三叉神経運動核へ投射する介在細胞が多く存在する外側被蓋野に認められた。ただし MI と CMAp は反対側性投射が主であったが、SMA は両側性投射を示した。CMAAd からの終末は内側結合腕傍核と Kölliker-Fuse 核に多く、他の領域と異なっていた。(3)視床－皮質投射において、MI, CMAp へ投射している細胞は VLo と VPLo に多く、SMA へ投射している細胞は VApc と VLo に多かった。CMAAd に投射している細胞は VPMpc に多く認められた。(4)皮質間連絡において、MI と CMAp は他のすべての領域から入力を受けていたが、SMA－MI, CMAAd－MI は一方向性で MI からの投射は認められなかった。SMA と CMAAd の間には線維連絡がほとんどなかった。また MI は SI から、SMA は CMAr から、CMAp は 7 野から、CMAAd は味覚野や島皮質からの投射を、それぞれ強く受けていた。以上の結果より、大脳皮質顎運動関連領域は体性感覚、臓器感覚、味覚、視覚など、さまざまな神経情報を受け取り、大脳皮質－脳幹の直接的な経路と、大脳皮質－大脳基底核－脳幹の間接的な経路を介して顎運動を制御していることが示唆された。

(B)さまざまな動物で顎運動を制御する神経回路が研究されてきたが、開口あるいは閉口をそれぞれ制御する

神経回路についての報告は少ない。また、これまで大脳皮質顎運動領域を皮質内微小刺激すると、開口運動が優位に生じ閉口運動は殆ど観察されないことが報告されている。このことは、一次運動野において開口筋と閉口筋の領域が均等に再現されていないことを示唆している。そうだとすれば、大脳皮質からの情報は、脳のどの領域で開口運動と閉口運動に変換されるのだろうか。経シナプ的に神経細胞を逆行性に感染する狂犬病ウイルスを利用して、ラットの開口筋、あるいは閉口筋へ投射する神経経路を同定した。その結果、(1)大脳皮質－脳幹投射において、外側被蓋野にある介在細胞を経由せず、三叉神経運動核から開口筋に投射している皮質細胞は、量的に少ないものの認められたが、閉口筋に投射する大脳皮質細胞は観察されなかった。一方、外側被蓋野の介在細胞を経由して開口筋、閉口筋を支配する大脳皮質細胞に関しては、両者の分布に明らかな差はなかった。(2)大脳皮質－大脳基底核－脳幹投射に関しては、開口筋、閉口筋とも線条体腹外側部－黒質背外側部－外側被蓋野が主な投射経路であったが、特に開口筋においては、線条体背側部－黒質腹外側部を経由する回路の存在が確認された。以上の結果から、大脳皮質顎運動領域刺激で開口運動が多く誘発されるのは、皮質から三叉神経運動核に対する直接投射によることや、大脳皮質運動野における顎運動情報は、脳幹で開口、閉口運動に変換される可能性が示唆された。

12. 神経回路の機能の成り立ちに関する学際的研究

2004年12月2日-12月3日

代表：久保義弘（自然科学研究機構 生理学研究所 神経機能素子）

所内対応者：重本隆一（自然科学研究機構 生理学研究所 脳形態解析）

（1）Cajal-Retzius 細胞と大脳皮質形成機構

田辺 康人（三菱化学生命科学研究所・神経構築研究チーム）

（2）脳皮質形成における Cdk5 の役割について

大島 登志男（理化学研究所・脳科学総合研究センター・発生神経生物研究チーム）

（3）プルキンエ細胞の誕生・移動・配置の謎

宮田 卓樹（名古屋大学・院医・細胞生物学）

（4）アクチビンによるスパイン形態とシナプス可塑性の制御

井ノ口 馨（三菱化学生命科学研究所）

（5） α N-カテニン によるシナプス結合安定性の制御

安部 健太郎，竹市雅俊（理化学研究所・発生再生科学総合研究センター）

（6）シナプス形成と可塑性を制御する古くて新しい分子 ―デルタ受容体とシナプトトロフィン―

柚崎 通介，松田 恵子，飯島 崇利，幸田 和久，
松田 信爾，小川 康（慶応大学・医学部・生理学1）

（7）線虫 *C. elegans* における感覚情報処理の分子機構

石原 健（九州大学大学院・理学院・生物科学）

（8）ショウジョウバエによる加齢性記憶障害の分子機構の解析

齊藤 実（東京都神経科学総合研究所・神経機能分子治療）

（9）脳機能解析を目的とした遺伝子改変マウスの作成とその使い方

柳川 右千夫（群馬大学大学院・医学系研究科・遺伝発達行動学）

【参加者名】

小田 洋一，小橋 常彦（大阪大学大学院生命機能研究科），吉田 祐美（岡山大学大学院医歯学総合研究科），狩野 方伸，橋本 浩一，鳴島 円（金沢大学医学系研究科），大塚 稔久，井上 英二，俵田 真紀，武内 恒成（カン研究所），石原 健，伊藤 功（九州大学大学院理学研究院），西村 陽，稲葉 美枝（京都府立医科大学大学院医学研究科），柳川 右千夫，白尾 智明，関野 祐子，花村 健次，山崎 博幸，高橋 秀人，小林 千穂，笹川 快生（群馬大学大学院医学系研究科），柚崎 通介，松田 恵子，松田 信爾，飯島 崇利，小川 靖裕（慶應義塾大学医学部），斎藤 祐見子（埼玉医科大学薬理学教室），岡部 繁男，井上 明宏，根東 寛，梅田 達也，壺岐 純子，西田 秀子（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科），真鍋 俊也，渡部 文子，泉 寛子（東京大学医科学研究所），尾藤 晴彦，

布施 俊光，山田 麻紀（東京大学大学院薬学系研究科），齊藤 実（東京都神経科学総合研究所），田淵 明子（富山医科薬科大学薬学部），高岸 芳子（名古屋大学環境医学研究所），宮田 卓樹，村山 綾子，西沢 祐治，齋藤 加奈子（名古屋大学大学院医学系研究科），神谷 温之（北海道大学大学院医学研究科），田辺 康人，井ノ口 馨（三菱化学生命科学研究所），五嶋 良郎（横浜市立大学医学部），大島 登志男（理化学研究所脳科学総合研究センター），安部 健太郎，上村 允人，曾根 正光，門脇 正和（理化学研究所発生再生科学総合研究センター），鍋倉 純一，北村 明彦，平井 康治，山肩 葉子，久保 義弘，立山 充博，三坂 巧，中條 浩一，藤原 祐一郎，岩井 博正，長友 克広，重本 隆一，深澤 有吾，篠原 良章，萩原 明，王 文，春日井 雄（生理学研究所），瀬藤 光利（統合バイオサイエンスセンター）

【概要】

脳神経系の機能は、神経回路が構築され、神経細胞間での情報の伝達が繰り返されることにより成立する。分裂停止後の神経細胞が予定された領域へ移動し、軸索と樹状突起の伸展・成熟過程を経てシナプスを形成する事で機能的な神経回路網が出来上がる。また、いったん形成されたシナプスも神経活動により絶えず修飾されていること、更に、神経回路形成の個々のステップは、多彩な情報伝達分子群が神経細胞内の多数のローカスで同時並行的に引き起こす複数のカスケードにより制御されていることが近年の研究により明らかにされてきた。したがって、この一連の分子機構を詳細に検討するためには、分子生物学、生化学、生理学、解剖学、細胞生物学、遺伝学、システム脳科学など異なる分野の人材の協同による学際的なアプローチとその統合が必要となっている。「神経回路の機能の成り立ちに関する学際的研究」と題した本研究会では、多分野の研究者を集め、情報交

換と交流を図ることを目的として、色合いの異なる3セッションを企画した。セッション「大脳と小脳における皮質形成」では、シナプス形成の第1段階である脳の領域特異性、層特異性、また神経細胞の誕生と移動について、討論を行った。セッション「神経活動による神経棘の形態制御とシナプス可塑性の制御」においては、シナプスの形態と機能を制御する立役者である分子に焦点をあてて、その制御の新側面について討論した。セッション「モデル動物の特徴を生かした遺伝子・遺伝子経路の機能解析」では、線虫、ショウジョウバエをそれぞれ用いた、感覚情報処理と加齢性記憶障害に関する研究、脳機能解析のための遺伝子改変マウスの作成についての研究の発表のあと、討論を行った。討議のプロセスにより、解決可能な新規の問題点を洗い出し、今後の領域横断的な研究のシーズを見いだすことができたと考えている。

(1) Cajal-Retzius 細胞と大脳皮質形成機構

田辺 康人 (三菱化学生命科学研究所・神経構築研究チーム)

Cajal-Retzius 細胞は、大脳皮質の発生過程において marginal zone を構成する主要な神経細胞であり皮質形成機構に重要な働きを示す事が示唆されているが、Cajal-Retzius 細胞の発生様式を解析することは長い間問に付されてきた。我々は、Cajal-Retzius 細胞が GFP により蛍光標識されているトランスジェニックマウスを解析系に用い、電気的穿孔法を用いてマーカー遺伝子をマウス胎仔脳の様々な領域内へ導入していくことで、Cajal-Retzius 細胞の発生起源及びその発達の軌跡を詳細に解析した。その結果、この神経細胞群は、終脳の内側・尾側部に存在する cortical hem において発生し、そこから

皮質半球に対して接線方向に細胞移動していき、最終的に新皮質を含む大脳皮質全体に広く分布することを明らかにした。この結果は、皮質 GABA 作動性介在ニューロンと同様に、Cajal-Retzius 細胞の主要なものが新皮質にとり外来性の細胞である事を示す。また、Cajal-Retzius 細胞が皮質パターン形成のオーガナライジングセンターである Cortical hem から発生し皮質パターン形成の一つの軸である内・尾側-外・吻側軸に沿って細胞分布勾配を示すことは、皮質層形成機構のみならず皮質領域形成機構を考える上でも新しい視点を与える。

(2) 脳皮質形成における Cdk5 の役割について

大島 登志男 (理研・脳科学総合研究センター・発生神経生物研究チーム)

大脳などの層の形成には、厳密にコントロールされた細胞増殖と移動・位置決定が必要で、ヒト滑脳症や変異

マウスの解析から、関与する分子がいくつか同定されている。我々はこうした分子のうち Cyclin-dependent kinase

5 (Cdk5) を中心に研究を進めている。Cdk5 はその活性化サブユニット p35, p39 が神経細胞特異的に発現し、神経細胞の特異的な機能に関与している。Cdk5 欠損マウスは胎生致死で、大脳皮質、小脳、海馬などの層構造が形成されず、脳幹部でも顔面神経核や下オリーブ核の形成が異常である。また軸索走行の異常があり、Cdk5 欠損 DRG ニューロンでは神経軸索ガイダンス分子 Sema3A に対

する成長円錐退縮反応が低下している。

Cdk5 欠損マウスが胎生致死であるため機能解析に制限があったが、コンディショナル KO マウスを作製・解析する事で、生後における脳の発達・機能発現に至る段階での Cdk5 の役割を解明する事が可能となった。現在複数の時期・領域特異的な cre マウスを用いて、Cdk5 の機能解析を進めている。

(3) プルキンエ細胞の誕生・移動・配置の謎

宮田卓樹 (名古屋大・院医・細胞生物学分野)

プルキンエ細胞は小脳皮質を構成する主要ニューロンであるが、前駆細胞に関する知見が無く、移動中のプルキンエ細胞の形態に関する情報も欠けている。大脳皮質ニューロンに対しては今世紀に入ってスライス培養下での解析や GFP 標識による生体内での解析が進み、発生時期および移動局面に応じてニューロンがさまざまな形態をとることが分ってきた。その形態的情報が、分子レベルでのニューロン移動機構の解析を裏打ちしている。プルキンエ細胞移動の研究もぜひ做うべきである。プルキンエ細胞の配置にはリーリンが重要であることが知られているが、リーリンの具体的作用については「誘引」「移

動停止信号」「いずれでもない」などの説があるものの、依然不明である。この問題の解決にも幼若プルキンエ細胞の形態を理解することが不可欠である。一方、私はプルキンエ細胞の移動～配置に線維（とシナプス形成？）が関与するかもしれないと夢想している。現在、(1)胎生 11-13 日マウス小脳原基のスライス培養において前駆細胞および幼若プルキンエ細胞の挙動を観察、(2)GFP ウイルスによる標識で生体内の細胞挙動を把握、(3)前庭神経節や脊髄などからの繊維の順行性標識など、プルキンエ細胞の移動・配置のメカニズムに挑むべく取り組んでいる。

(4) アクチビンによるスパイン形態とシナプス可塑性の制御

井ノロ 馨 (三菱化学生命科学研究所 (MITILS))

LTP などのシナプス可塑性に伴い樹状突起スパインの形態がダイナミックに変化し、それが LTP の誘導や持続に重要な役割を果たしていることなどが近年明らかになりつつある。我々のグループもスパインアクチンの動態やスパイン形態が LTP の後期相(L-LTP)に重要な役割を果たしていることを示してきた。

また、L-LTP や長期記憶の成立には遺伝子の発現が必要であることから、我々は海馬の L-LTP に伴い発現が調節される多数の遺伝子群を単離しそれらの機能を明らかにしてきた。それらのうちのアクチビンは TGF- β フ

ァミリーに属するリガンド蛋白質であり、LTP 誘発後 1 時間以上経過してから発現が誘導される。本研究会では、アクチビンがスパイン形態の制御を通じて L-LTP の保持に重要な役割を果たしていることをお話しするとともに、「LTP の誘導---アクチビン遺伝子の発現---スパインアクチン動態の変化---シナプス形態の変化---L-LTP の持続」という経路が L-LTP の一つのメカニズムであることを提唱して、「シナプス可塑性」と「シナプス形態の可塑性」に関する議論の種としたい。

(5) α N-カテニンによるシナプス結合安定性の制御

安部 健太郎, 竹市 雅俊

(京都大学・院・生命科学研究科, 理化学研究所発生・再生科学総合研究センター)

シナプスは新生・消失, 構造変化などを示すことが知られており, この構造的可塑性にともない, シナプスの結合構造はダイナミックに制御されと考えられるがその制御機構に関してはあまり知られていない。

α N-カテニンはカドヘリンとアクチン骨格と接続することによってカドヘリンの接着活性を制御する分子である。我々は, α N-カテニンのノックアウトマウスを作成し, 海馬初代神経細胞分散培養系を用いてシナプスへの影響を観察した。

α N-カテニンを欠損する神経細胞はスパインの形態に異常が見られた。また, 経時的観察により, スパイン

の動きを観察した結果, α N-カテニン欠損細胞ではシナプス結合が不安定であること, 逆に, α N-カテニンを過剰発現させるとより安定なシナプス結合を形成し, その結果として, スパインとシナプスの過剰形成が起きることを見出した。また, シナプスに集積する α N-カテニンの量は神経活動によって制御することを見出した。

これらの結果から, α N-カテニンにはスパインおよびシナプス結合を安定化する働きがあり, 神経活動に応じたスパインの形態変化を制御してシナプス可塑性になんらかの影響を及ぼしている可能性が示唆された。

(6) シナプス形成と可塑性を制御する古くて新しい分子 ーデルタ受容体とシナプトトロフィンー

柚崎 通介, 松田 恵子, 飯島 崇利, 幸田 和久,

松田 信爾, 小川 康

(慶應義塾大学医学部・生理学 I)

$\delta 2$ 型グルタミン酸受容体とシナプトトロフィン(StpnI)は, 10-20 年前に発見された分子であり, 小脳プルキンエ細胞の遠位樹状突起部と, そこにシナプスを形成する平行線維を送る顆粒細胞にそれぞれ特異的に発現する。遺伝子欠損マウスの解析から, $\delta 2$ 受容体は平行線維ープルキンエ細胞シナプスの正常な発達に必要不可欠であることがこれまでに分かっていたが, この受容体がどのようにして活性化され, どう機能するのかについてはよく分かっていなかった。私たちは, 機能阻害性抗体とトランスジェンによる $\delta 2$ 受容体欠損マウスの表現型回復能を解析することにより, $\delta 2$ 受容体は, 1) 発達段階のみでなく, 成熟動物においても活性をもつ, 2) シナプス後膜の AMPA 受容体の数を調節する, 3) 細胞外からの信号により活性が制御される, 4) 他のグルタミン酸受容体とかな

り異なった形で活性化される, ことを明らかにした(Nature Neurosci '03; EMBO R, in press)。一方, StpnI の機能や信号経路も謎のままであったが。私たちは, 渡辺や Morgan らと共同して StpnI 遺伝子欠損マウスを解析したところ, 1) シナプス可塑性 (LTD) の欠損, 2) プルキンエ細胞の登上線維による多重かつ遠位型支配, 3) 平行線維の結合しない「裸の棘突起」の出現, といった $\delta 2$ 受容体欠損マウスと酷似した所見を得た(Nature Neurosci, in revision)。このように平行線維ープルキンエ細胞シナプスにおいて, シナプス前部と後部に発現しているこれらの 2 つの古くて新しい分子は, シナプス可塑性と形成に関与する新しいユニークな信号系を構成すると考えられる。

(7) 線虫 *C.elegans* における感覚情報処理の分子機構

石原 健 (九州大学大学院・理学研究院・生物科学)

動物は、環境から様々な情報を感覚神経を通じて受容し、神経回路上で情報処理を行い適切な応答をする。我々は、このような感覚情報処理に関わる新しい分子機構を明らかにすることを目的として、*C. elegans* をモデルとした遺伝学的解析を行っている。

我々が同定した *hen-1* 変異体は、二つの感覚情報の統合と一種の連合学習に異常を示す変異体である。この変異体の原因遺伝子産物 HEN-1 は、LDL 受容体モチーフを持つ分泌タンパク質であり、成熟した神経系において細胞非自律的に機能している。

C. elegans の受容体型チロシンキナーゼ SCD-2 は、ヒト ALK の相同タンパク質である。最近、ショウジョウバエ

の ALK 相同分子 Dalk は、ショウジョウバエの HEN-1 類似分子 *Jeb* の受容体として機能するが明らかになったことから、SCD-2 が HEN-1 の受容体である可能性がある。GFP 融合遺伝子の解析から、*scd-2* 遺伝子は多くの感覚神経と介在神経で発現していることが示唆された。また、*scd-2* 変異体は、感覚情報統合の行動測定系と、連合学習の行動測定系において、*hen-1* 変異体と類似の表現型を示す。さらに、SCD-2 は HEN-1 とは異なる介在神経で機能していることが推定された。これらのことより、SCD-2 は、HEN-1 の受容体として介在神経間の情報処理を制御しているのではないかと考えている。

(8) ショウジョウバエによる加齢性記憶障害の分子機構の解析

齊藤 実 (東京都神経科学総合研究所・神経機能分子治療)

いかなるヒトも老化に伴って起こる学習・記憶力の低下から逃れることは出来ない。このような加齢性記憶障害 (Age-related Memory Impairment, AMI) はどのような遺伝子の働き、失調により起こるのであろうか？ AMI は学習による記憶情報の獲得から、その統合・安定化に至る複雑な学習記憶過程 (分子機構) の非特異的な障害と考えられてきた。しかし、従来の哺乳類モデルでは、例えばマウスでもその寿命が 2~3 年に及ぶことが障害となり、AMI の分子機構の解明は殆ど進んでこなかった。ショウジョウバエの遺伝子はその約 8 割が哺乳類と共通であり、哺乳類と極めてよく似た学習記憶の分子機構を持

つ。さらにショウジョウバエは寿命が約 1 ヶ月と短い。我々は寿命が短いショウジョウバエを新たなモデル動物として、AMI の行動遺伝学的解析を行ってきた。その結果、加齢により *amnesiac (amn)* という遺伝子に依存する記憶成分 (中期記憶) が、極めて特異的に障害されることを明らかにした。さらに興味深いことに *amn* 変異体は寿命が野生型と比べ約 40% も延びており、逆に長命変異体の中には *amn* 遺伝子依存性の中期記憶に障害を示すものがあつた。これらのことから脳の高次機能と老化とに共役した何らかの分子機構が示唆された。

(9) 脳機能解析を目的とした遺伝子改変マウスの作成とその使い方

柳川右千夫 (群馬大・大学院医学系研究科・遺伝発達行動学)

脊椎動物の脳には多種類の神経細胞が存在するが、特定の細胞を標的として遺伝子を発現させるのは簡単ではない。そこで、機能プローブを特定の細胞に容易に発現

させることを目的として、以下の 2 種類のシステムについて、検討した。

(1) (Cre-loxP システムを利用したトランスジェニックマ

ウス) シナプトフルオリン (SpH ; シナプス小胞内の pH 動態をモニターする) 遺伝子を組み込んだ loxP ターゲティングマウス (loxP-SpH マウス) を作成した。loxP-SpH マウス一方, 海馬の顆粒細胞に Cre recombinase が発現する CaMKII-Cre マウスと交配して生まれた仔では, 海馬の苔状線維に SpH の発現が観察された。以上の結果は, Cre-loxP システムに基づいて 2 種類のトランスジェニックマウスを使用することにより, 機能プローブを特定の

細胞に発現できることを示している。

(2) (Thy-1 プロモーターを利用したトランスジェニックマウス) Thy-1 プロモーターの下流に SpH 遺伝子を配置したトランスジェニックマウスを作成した。6 ライン樹立して解析した結果, それぞれ異なる発現パターンを観察した。中でも, 海馬錐体細胞, 小脳顆粒細胞に SpH が発現することから, これらの細胞に機能プローブを発現させたい場合には有効なシステムであることが示唆された。

13. 第3回 大脳皮質・視床・基底核の神経回路

2004年10月6日－10月7日

代表・世話人：金子武嗣（京都大学大学院・医学研究科・高次脳形態学）

所内対応者：川口泰雄（大脳神経回路論研究部門）

（1）大脳皮質発達過程における GABA 応答性の変化と制御機構

山田順子

（静岡大学大学院・電子科学研究科・生体情報処理講座）

（2）Depolarization wave による中枢神経系の機能発達制御

佐藤 勝重

（東京医科歯科大学大学院 細胞生理学分野）

（3）GABA 性シナプス入力と Glutamate 性シナプス入力の相互作用の非線形ダイナミクスとその数理モデル

森田 賢治

（東京大学大学院 新領域創成科学研究科 複雑理工学専攻）

（4）From neural stem cell to the human neocortex: A potential mechanism to produce the human thick neocortex

玉巻伸章

（熊本大学大学院 医学薬学研究部先端生命医療科学 脳神経科学講座 脳回路構造学）

（5）視床微小神経回路における情報処理機構

井上 剛

（生理学研究所・神経シグナル研究部門）

【参加者名】

玉巻伸章（熊本大学院・医），小林真之（大阪大学院・歯），
宋文杰（大阪大学院・工），金子武嗣，藤山文乃，中村
公一，日置寛之，倉本恵梨子，田中康代（京都大学院・
医）青柳富誌生，野村真樹（京都大学院・情報），黒谷亨，
吉村由美子（名古屋大学・環境医学研），福田敦夫，窪
田寿彦，古川智範，井上浩一（浜松医科大学・医），山
田順子（静岡大学院・電子科学），森琢磨（京都大学・

霊長類研），山下晶子（日本大学・医），内田豪，小島久
幸，一戸紀孝（理化学研究所），伊藤哲史（福井大学・
医），坪泰宏（玉川大学・工），森田賢治（東京大学院），
津元国親（ERATO 合原），井本敬二，鍋倉淳一，張一成，
等誠司，川口泰雄，窪田芳之，大塚岳，荏部冬紀（生理
学研究所）

【概要】

今年は浜松医大福田先生にオーガナイズをお願いし
て平成16年10月6～7日には以下の5人の方々による話
題提供と議論を行いました。「大脳皮質発達過程における
GABA 応答性の変化と制御機構」山田順子氏は，ラット
生後間もない時期には大脳皮質細胞内のCl濃度が高く，
GABA が脱分極性の反応を引き起こすこと，その原因と
してNaKCC1 というCl取り込みのトランスポーターが
一過性に強く発現していることを示し，これと関連して
「GABA 性シナプス入力と Glutamate 性シナプス入力の相
互作用の非線形ダイナミクスとその数理モデル」森田賢

治氏は脱分極性の GABA 反応がもつシナプス伝達に対
する影響を数理的に解析した議論を提供しました。
「Depolarization wave による中枢神経系の機能発達制御機
構」佐藤勝重氏は胎児期に脳幹全体に広がるゆっくりと
した脱分極波が存在することを示し，その役割について
の議論を誘い，「From neural stem cell to the human neocortex」
玉巻伸章氏は大脳皮質のニューロンの発生の総括的な話
しを自分の仮説を中心に提供しました。「視床微小神経
回路における情報処理機構」井上剛氏は minimal 刺激 +
double whole-cell clamp 法を用いて，視床あるいは大脳皮

質の局所神経回路の解析結果を報告しました。

昨年・一昨年と同じく主に比較的若い講演者に現在進行形的话题を提供していただき、参加者の多くが脳皮質・視床・線条体の神経回路について様々な議論を交わすことが出来ました。議論は白熱して1時間の持ち時間のところを実質1時間半ずつ議論すると云った学会な

どでは出来ないレベルの密度の高い討議が出来たものと感じています。また、システムの神経科学をボトムアップの方向で研究するという意味で志を同じくする研究者が集まって議論を交わすことにより、新たな着想を得る、客観的な批判にさらされるなど脳皮質・視床・線条体研究の発展に役立つ様々な効果があったと思います。

(1) 脳皮質発達過程における GABA 応答性の変化と制御機構

山田順子（静岡大学大学院・電子科学研究科・生体情報処理講座）

中枢神経系において、主要な抑制性伝達物質であるはずの GABA が、脳の発達初期にはむしろ興奮性伝達を担っている可能性がある。我々はこの原因として、内向き Cl⁻トランスポーター NKCC1 と外向き Cl⁻トランスポーター KCC2 の作用が発達に伴い変わるため [Cl⁻]_i が変化し GABA_A 受容体を介する GABA 応答を変えているためではないかと考えた。そこで、Cl⁻トランスポーターの発達に伴う発現変化と GABA 応答性を調べる為、脳皮質形成期のラット脳スライス標本を用いて、グラミシジン穿孔パッチクランプ法により GABA 応答を記録し、[Cl⁻]_i を計測した。また、記録終了後細胞質を抽出し、単一細胞

における Cl⁻ 共輸送体 mRNA のタイプ別発現量の差を single-cell multiplex RT-PCR 法により解析した。Ca²⁺イメージング法を用い GABA 投与に対する [Ca²⁺]_i の変化も観察した。その結果、幼若細胞では [Cl⁻]_i は成熟細胞に比べ有意に高く、GABA による脱分極と [Ca²⁺]_i 上昇がみられた。また、[Cl⁻]_i と NKCC1 には正の相関が見られ [Cl⁻]_i と KCC2 には負の相関があることがわかった。以上の結果より、幼若期のニューロンでは NKCC1 が主に働き高い [Cl⁻]_i を維持し、発達に伴い KCC2 が優位に働くようになるため、GABA の応答性が変化するという可能性が示唆された。

(2) Depolarization wave による中枢神経系の機能発達制御

佐藤 勝重（東京医科歯科大学大学院細胞生理学分野）

中枢神経系の個体発生過程は大きく2つの phase に分けられている。1 つは遺伝情報に基づく activity-independent phase であり、他方はニューロン群の時空間的活動パターンに依存する activity-dependent phase である。後者に関して、視覚系で行われた研究で、critical period が存在することが示され、個体発生のある特異的な一時期に、ある特定のニューロン群が同期して発火することが、神経回路網形成の制御因子として重要であることが明らかにされた。

我々は、これまでニューロン電位活動の光学的イメージング法を用いて、中枢神経系の機能発生・機能形成・

機能構築過程について解析を行ってきた。その過程で、脳・脊髄神経を介した外来性入力、あるいは中枢神経系の自発興奮活動によって、大脳から脊髄まで中枢神経系のほぼ全領域にわたって広範に伝播する脱分極波 (depolarization wave) が誘発されることを発見した。この脱分極波は、発生のある一時期に特異的に出現し、これまで報告がない数々の特性を備えており、限局した領域の特定のニューロン群/シナプスに関して想定されていた従来の activity-dependent developmental regulation とは異なる、新しい機能的役割を担っているものと考えられる。

(3) GABA 性シナプス入力と Glutamate 性シナプス入力の相互作用の 非線形ダイナミクスとその数理モデル

森田 賢治 (東京大学大学院 新領域創成科学研究科 複雑理工学専攻)

近年、陰イオン濃度の攪乱を抑えた Gramicidin-perforated patch-clamp 法によって、成熟した大脳皮質錐体細胞の GABA_A 受容体チャネルの反転電位は静止電位よりも 10mV 程度高いことが報告された (Gulledge & Stuart 2003)。本研究では神経細胞の数理モデルを用いて、この事実の持つ機能的意義を推察する。まず二次元数理モデルによって Gulledge らの実験結果を定量的に再現できることを示す。その上で、脱分極性の GABA_A 入力が単一神経細胞の入出力関係(興奮性入力ー出力発火率の関係)

に及ぼす影響を調べた。その結果、入力が tonic な場合には、脱分極性でない(反転電位が静止電位と等しい) GABA_A 入力が subtractive な効果を持つものに対して、脱分極性の GABA_A 入力は all-or-none 的な効果を持つことが示唆された。また大きな揺らぎのある入力の場合には、脱分極性の GABA_A 入力は、それが興奮性入力と高い時間相関を持つ場合にのみ入出力関係に対して subtractive な効果を持つことが示唆された。

(4) From neural stem cell to the human neocortex: A potential mechanism to produce the human thick neocortex

玉巻伸章 (熊本大学大学院 医学薬学研究部先端生命医療科学
脳神経科学講座 脳回路構造学)

これまでの既成概念を少しの間忘れて語るならば、大脳皮質の形成は、神経上皮の肥厚化と特殊化により形成されたと考えることができる。神経上皮細胞は非常に長く伸びて放射状グリアと呼ばれるようになり、神経細胞は、神経上皮細胞体層と基底膜の間に、生まれた順番に堆積する。

これまでに、マウス大脳皮質で興奮性神経細胞と抑制性神経細胞がどのように分化してくるかを、ウイルスによる細胞標識を利用して調べてきた。結果、神経幹細胞が分裂して大脳皮質神経細胞が作られることは永くは続かず、多くの場合、中間の分裂能を保持した神経前駆細胞が作られることが明らかとなった。前駆細胞は分裂能

を保持しているが、興奮性神経細胞のみを産生したり、抑制性神経細胞を産生したりする。つまり、分裂能を保持しつつ一段階分化の階段を降り、分化の範囲が狭まった細胞が脳実質内に多く存在することを示唆していた。このような分裂能を保持した神経前駆細胞の性質を調べるためには、確認する標識が必要となるが、興奮性神経前駆細胞は、NEX (Math2) bHLH 分子を発現している細胞集団に含まれ、抑制性神経細胞は、GABA 合成酵素の GAD67 陽性細胞の集団に含まれていた。これらの標識分子の発現に伴って細胞運命は規定され、さらに分裂を繰り返す間に細胞運命の範囲が狭められるとする仮説を提唱する。

(5) 視床微小神経回路における情報処理機構

井上 剛 (生理学研究所・神経シグナル研究部門)

脳(神経回路)形成を理解するためには、神経細胞同士の1対1のシナプス結合(point-to-point connections)理解に加

え、多対多のシナプス結合(divergent/convergent connections)の理解が必須である。しかし後者を電気生理学的に調べ

るには最低でもトリプルパッチクランプ記録を必要とし、その技術的困難故に報告例は非常に少ない。ここで我々は、この発散性結合 (divergent connections) を容易に測定することが可能となる新しい実験手法を紹介する。我々は2つのポストシナプス細胞からのパッチクランプ同時記録と、単一のプレシナプス細胞由来繊維を刺激する“minimal stimulation”法を併用することにより、この問題を解決した。この手法を用いることにより、

nucleus reticularis 由来の単一抑制性繊維は体性感覚野における複数の視床神経細胞群 (thalamic relay cells) に投射していることがわかった。しかし対照的に、上行性の単一興奮性繊維 (lemniscal fiber) は複数の視床神経細胞群に投射していないことが明らかになった。これらの結果は、なぜ視床が感覚情報を大脳皮質に“リレー”し、またなぜ視床がその視床細胞群の神経活動を“同期”させるのか、そのシナプス結合様式を実証している。

14. 生理研研究会「機能的MRI研究会」

2004年11月25日－11月26日

代表・世話人：程 康（理研）

所内対応者：定藤規弘（生理研）

(1) Experimental design of event-related fMRI

河内山隆紀（香川大学工学部）

(2) Innovation Approach to detecting connectivity in multivariate time series

Galka Andreas（統計数理研究所）

(3) Fusing EEG and fMRI based on a bottom-up model: Inferring activation and effective connectivity in neural masses

Riera J., Aubert E., Iwata K., Kawashima R., Wan X., Ozaki T. (NICHe, Tohoku University)

(4) Linear vs nonlinear influences of EEG rhythms on the fMRI

Fumikazu Miwakeichi¹⁾, Pedro A. Valdes-Sosa²⁾, Jorge Bosch²⁾, Hiroaki Mizuhara¹⁾, Yoko Yamaguchi¹⁾

(¹⁾RIKEN Brain Science Institute, Lab. For Dynamics of Emergent Intelligence ²⁾Cuban Neuroscience Center)

(5) Rhythm networks for cognitive processing revealed by a simultaneous fMRI and EEG

Hiroaki Mizuhara¹⁾, Li-Qun Wang²⁾, Koichiro Kobayashi^{3),1),4)}, Yoko Yamaguchi^{1),4)}

(¹⁾RIKEN Brain Science Institute, ²⁾Tokyo Denki University, ³⁾Iwate University, ⁴⁾CREST, JST)

(6) MRIにおける中心周波数(f_0)の役割とその変動のfMRIへの影響

島田育廣¹⁾, 藤本一郎¹⁾, 赤土裕子¹⁾, カラン明子¹⁾, 正木信夫¹⁾, 村瀬研也²⁾

(¹⁾(株)国際電気通信基礎技術研究所 脳活動イメージングセンタ

²⁾大阪大学大学院 医学系研究科 医用物理工学講座)

(7) 機能的MRIを用いた小児中枢性聴覚障害スクリーニング法の開発

中井昭夫, 川谷正男, 眞弓光文¹⁾, 柏倉健一²⁾, 藤原康博, 石森佳幸³⁾, 米倉義晴⁴⁾, 定藤規弘⁵⁾

(¹⁾福井大学 ²⁾群馬県立医療短期大学 ³⁾福井大学医学部付属病院放射線科

⁴⁾福井大学高エネルギー医学研究センター ⁵⁾生理学研究所)

(8) Decoding the perceptual and subjective contents of the human brain

Yukiyasu Kamitani (Computational Neuroscience Laboratories)

(9) Seeing a dreaming brain -Brain activation preceded rapid eye movements during REM sleep

Satoru Miyauchi, Masaya Misaki, Takahide Fukunaga, Shigeyuki Kan

(Brain Information Group, Kansai Advanced Research Center,

National Institute of Information and Communications Technology)

(10) fMRI内における指部への空気圧刺激を用いた系列運動課題実験

堀江亮太¹⁾, 平田智秋, R. Allen Waggoner²⁾, 上野賢一²⁾, 田中啓治²⁾, 程康²⁾, 谷淳¹⁾

(独立行政法人理化学研究所, 脳科学総合研究センター,¹⁾動的認知行動研究チーム,

²⁾認知機能表現研究チーム)

(11) Capillary level imaging of local cerebral blood flow in epileptic foci

Hajime Hirase (RIKEN Brain Science Institute Hirase Reserch Unit)

【参加者名】

Kang Cheng (程 康) (理研), R Allen Waggoner (理 研), 田中 優子 (理研), 水原 啓暁 (理研), 堀江 亮
研), Pei Sun (理研), 上野 賢一 (理研), 松田 佳尚 (理 太 (理研), 三分一 史和 (理研), Mauro Costagli (理研),

竹田 和良(理研), 平瀬 肇(理研), 平田 智秋(理研), 磯尾 綾子(理研・東京大学大学院), Jorge Riera(東北大), 渡邊 丈夫(東北大), 岩田 一樹(東北大), 中井 昭夫(福井大), 河内山 隆紀(香川大), 神谷 之康(ATR), 正木 信夫(ATR), 嶋田 育廣(ATR), カラン 明子(ATR), 藤本 一郎(ATR), 赤土 裕子(ATR), 柴田 和久(奈良先端大), 宮内 哲(情報通信研究機構), 三崎 将也(情報通信研究機構), 尾崎 統(統数研), Andreas Galka(統数研), 王 健欽(統数研), 定藤 規弘(生理研・心理生理), 本田 学(生理研・心理生理), 神作 憲司(生理研・心理生理), 荒牧 勇(生理研・心理生理), 田邊 宏樹(生

理研・心理生理), 豊田 浩士(生理研・心理生理), 田中 悟志(生理研・心理生理), 原田 宗子(生理研・心理生理), 宮本 順(生理研・心理生理), 中下 悟(生理研・心理生理), 牧 陽子(生理研・心理生理), 村瀬 未花(生理研・心理生理), 内山 祐司(生理研・心理生理), 大塩 立華(生理研・心理生理), 野口 泰基(生理研・感覚運動調節), 郷田 直一(生理研・感覚認知情報), 西巻 拓也(生理研・生体恒常機能発達機構), 溝口 義人(生理研・生体恒常機能発達機構), 井原 綾(生理研・感覚運動調節)

【概要】

This year's Seiriken Kenkyu Kai: fMRI: A Tool for Neuroscience Research was smoothly and successfully conducted on Nov. 25 and 26, 2004 at Seiriken. The meeting attracted more than 50 attendees from universities and research institutions. Eleven speakers, most of them junior researchers, presented their recent works on methodological aspects of functional magnetic resonance imaging (fMRI), including imaging techniques and statistical analysis methods, and physiological aspects of fMRI, including source localization of blood oxygenation level dependent (BOLD) signal and direct observation of changes in cerebral blood flow (CBF) as a consequence of focal neuronal activity.

Following the tradition of the previous meetings, Dr. Takanori Kochiyama and Dr. Andreas Galka extended their works on optimal experimental design of event-related fMRI and innovation approach to detecting connectivity in multivariate time series. These novel ideas have pragmatic implications in the optimisation of experimental designs and spatiotemporal modelling and interpretation of fMRI data.

Simultaneous measurements of EEG and fMRI has attracted special attention at the meeting. Three presentations, by Drs. Jorge Riera, Hiroaki Mizuhara and Fumikazu Miwakeichi, addressed issues concerning fusing of EEG and fMRI data, rhythm networks for cognitive processing, and linear/nonlinear

influences of EEG rhythms on fMRI.

Other presentations covered topics ranging from assessing the influence of f0 fluctuation during data acquisition and its correction (Dr. Ikuhiro Shimada), fMRI data acquisition during rapid eye movement (REM) sleep (Dr. Satoru Miyauchi), development of an stimulation apparatus for simultaneous delivery of somatosensory stimuli and motor responses (Dr. Ryota Horie) to development of an fMRI protocol for screening hearing defects in infants (Dr. Akio Nakai).

We were also able to invite Dr. Yukiyasu Kamitani who introduced his elegant work showing that the modulation of a functional architecture can be revealed even though the architecture itself cannot be resolved with current spatial resolution of fMRI and Dr. Hajime Hirose who demonstrated, using 2-photon microscopy, that changes in CBF in the capillary bed can be directly observed and that the regulation of CBF changes is localized spatially following focal epileptic events.

In summary, this annual meeting has provided a useful forum for young investigators in the field of functional imaging in Japan to exchange and discuss new ideas. It is strongly felt that the meeting should be continued and a broader range of topics, including neurobiology-related issues, to be covered in the future meetings.

(1) Experimental design of event-related fMRI

河内山隆紀
(香川大学工学部)

近年, fMRI 実験における event-related design の利用が増えている。Event-related design は, 刺激に対する血流動態の応答関数を推定できるだけでなく, 刺激のシーケンスを自在に組むことができるので, 特に高次認知機能に関する実験において慣れや予測の影響を抑えた実験が可能である。Event-related design は, 脳機能画像法において非常に有用な実験計画法であるが, 設計や解析に関して多くの注意点も存在する。中でも課題・刺激提示のシーケンスは, その選択によって, 興味ある脳活動に対

する計画行列の検出能力が大きく変わるため, 実験前に何らかのシーケンス最適化の作業を行うことが推奨されている。先行研究では, あるコントラストに対して最適化された計画行列は, 別のコントラストに対しては必ずしも最適ではないことが報告された。本研究では, (1) 複数のコントラストに関心がある場合の計画行列最適化に関する新しい評価関数と (2) 最適化された計画行列が, 統計的第一種と第二種過誤をどの程度制御できるかを検証した。

(2) Innovation Approach to detecting connectivity in multivariate time series

Andreas Galk
(Institute of Statistical Mathematics Department of Prediction and Control)

This talk presents a new approach to inferring the connectivity structure of spatially extended dynamical systems (such as brain) by estimating mutual information between pairs of sites, based on spatiotemporal data sets (such as fMRI). This approach is based on explicit temporal and spatial modelling steps which aim at removing approximately all spatial and temporal correlations, at whitening the data, such that it is replaced by spatiotemporal innovations; thereby a link to the maximum-likelihood method is

provided and, for appropriately chosen models, the problem of having to estimate probability distributions of unknown shape is removed. Consequently mutual information can be reinterpreted in the framework of dynamical model comparison, since it is shown to be equivalent to the difference of the log-likelihoods of coupled and uncoupled models for a pair of sites. The practical application of this methodology is demonstrated by employing a simulated data set generated by a stochastic coupled-map lattice.

(3) Fusing EEG and fMRI based on a bottom-up model: Inferring activation and effective connectivity in neural masses

Riera J., Aubert E., Iwata K., Kawashima R., Wan X., Ozaki T.
(NICHe, Tohoku University)

The elucidation of the complex machinery used by the human brain to segregate and integrate information while performing high cognitive functions constitutes a subject of imminent future consequences. The most significant contributions in this field, named cognitive neuroscience, have been achieved up

today by using innovative neuroimaging techniques (such as EEG and fMRI), which measure variations in both time and space of some interpretable physical magnitudes. Extraordinary maps of the cerebral activation involving function-restricted brain areas and their graphs of functional connectivity have

been obtained from EEG and fMRI data by solving some sort of spatio-temporal inverse problems, in which constitutes a top-down approach. However, in many cases, a natural bridge between these maps/graphs and the causal physiological processes is lack, originating some misunderstandings in their interpretation. The recent advances in the comprehension of the underlying physiological mechanisms associated to different cerebral scales have provided to researchers with an excellent scenario to develop sophisticated biophysical models that permit an integration of these neuroimage modalities, which must share a common etiology. In this paper, a bottom-up approach,

involving physiological parameters in specific mesoscopic dynamical equations, is proposed. Further observation equations encapsulating the relationship between the meso-states and the EEG/fMRI data are obtained on the basis of the physical foundations of these techniques. A methodology for the estimation of parameters from fused EEG/fMRI data is also presented. In this context, the concepts of activation and effective connectivity are carefully revised. This new approach permitted us to examine some future prospects for the integration of multimodal neuroimages.

(4) Linear vs nonlinear influences of EEG rhythms on the fMRI

Fumikazu Miwakeichi¹⁾, Pedro A. Valdes-Sosa²⁾, Jorge Bosch²⁾, Hiroaki Mizuhara¹⁾, Yoko Yamaguchi¹⁾

(¹⁾RIKEN Brain Science Institute, Lab. For Dynamics of Emergent Intelligence ²⁾Cuban Neuroscience Center)

Concurrent EEG/fMRI offers the potential for achieving information about brain function with simultaneous high spatial and temporal resolution. One approach takes advantage of the temporal fluctuations of the EEG frequency spectrum by using its envelope as a reference signal in order to identify that portion of the BOLD signal related to oscillatory networks [Goldman et al. (NeuroReport 2002); Laufs et al. (NeuroImage 2003)]. We have recently shown that multi-linear statistical methods allow a fruitful exploration of these EEG/fMRI relations. Miwakeichi et al. [NeuroImage 2004] showed that Parallel Factor Analysis (PARAFAC) can perform a time/frequency/spatial (T/F/S) atomic decomposition that identifies fundamental modes of oscillatory EEG activity. Martinez et al. [NeuroImage 2004] then went on to relate these modes to spatial components of BOLD signal changes. A limitation of all these studies is the assumption of a linear relation of the EEG with a “standard”

hemodynamic response function (HRF) modeled as a sum of gamma functions. This study will examine these assumptions. The EEG of a subject was obtained for every 30 seconds during two conditions: resting and mental arithmetic task; and then transformed into a three dimensional T/F/S data set by a Morlet wavelet transform. The temporal signatures of the alpha and theta atoms were used to predict the BOLD signal. The model used for prediction was a semi-parametric auto-regression [Speckman (J. Roy Stat. Soc. B 1988)]. This allows the separation of the HRF into purely linear and nonlinear portions and to test which parts are present in the data. Additionally the nonlinear part is estimated non-parametrically, which allows examination of the type of nonlinearity that underlies the HRF. A segmentation of the brain into regions in which the HRF is linear and nonlinear will be shown.

(5) Rhythm networks for cognitive processing revealed by a simultaneous fMRI and EEG

Hiroaki Mizuhara¹⁾, Li-Qun Wang²⁾, Koichiro Kobayashi^{3),1),4)}, Yoko Yamaguchi^{1),4)}

(¹⁾RIKEN Brain Science Institute, ²⁾Tokyo Denki University, ³⁾Iwate University, ⁴⁾CREST, JST)

A number of electrophysiological and noninvasive brain

measurement studies in rodents and humans have suggested

the importance of phase synchronization in theta rhythm, local field potential oscillation in 4- to 8-Hz, in cognition, behavior and memory. Theta rhythm activities known to distribute over various cortices might integrate distant regions into a task-dependent coherent ensemble. In this paper, we hypothesize that phase synchronization of scalp electroencephalography (EEG) theta rhythm can index distant regional activities integrated with theta oscillations measured by functional magnetic resonance imaging (fMRI). By using simultaneous EEG and fMRI, we developed a method to abstract blood oxygen level dependent (BOLD) signals associated with the EEG phase synchronization. Firstly we identified phase synchronization indexes (PSI) of each pairs of EEG electrode by computing the angular dispersions of the phase differences, and tested the task-dependent increase of

phase synchronizations during a mental arithmetic task relative to that during the eye close resting. Based on the EEG PSI, we estimated the BOLD responses (expected BOLD) by convoluting the hemodynamic response function (HRF) to the time series of the EEG PSI. Thus, here we assumed that the long-range phase synchronization accompanied the local neuronal activities in the distant cortical regions, and the BOLD responses occurred after the proper neuronal activities with a time delay, which was decided by HRF. The regression values were computed between the measured BOLD and the expected BOLD. The results showed that long-range theta synchronization concerns with integration of a distant cortical network for cognitive task processing where positive and negative BOLD responses cooperate together.

(6) MRIにおける中心周波数 (f_0) の役割とその変動の fMRI への影響

島田育廣¹⁾, 藤本一郎¹⁾, 赤土裕子¹⁾, カラン明子¹⁾, 正木信夫¹⁾, 村瀬研也²⁾

(¹) (株) 国際電気通信基礎技術研究所 脳活動イメージングセンタ

²⁾ 大阪大学大学院 医学系研究科 医用物理工学講座)

中心周波数 (f_0) は MRI 画像の基本となる情報である。この変動が画像の位置ズレを生じることは良く知られているが、信号ドリフトとの関係についてはほとんど論じられてこなかった。fMRI データでしばしば報告される低周波の信号ドリフトは、この中心周波数の変動によって引き起こされると考えられる。試作 Phantom を用いた時

系列信号変動の再現実験を行ったところ、信号ドリフトはスキャンボリュームの全スライスで同一パターンを示さなかった。この結果は、fMRI 解析において、中心周波数変動の影響を補正するためには、位置ズレ補正のみでは不十分であり、脂肪抑制パルスの波形特性の影響を考慮する必要があることを示唆する。

(7) 機能的 MRI を用いた小児中枢性聴覚障害スクリーニング法の開発

中井昭夫, 川谷正男, 眞弓光文¹⁾, 柏倉健一²⁾, 藤原康博, 石森佳幸³⁾, 米倉義晴⁴⁾, 定藤規弘⁵⁾

(¹) 福井大学 ²⁾ 群馬県立医療短期大学 ³⁾ 福井大学医学部附属病院放射線科

⁴⁾ 福井大学高エネルギー医学研究センター ⁵⁾ 生理学研究所)

【はじめに】先天性難聴に対し新生児スクリーニングが行われているが、一次聴覚中枢障害は ABR でも見落とされ、後にコミュニケーション・知能障害につながる。fMRI は強力な脳機能画像法だが、聴覚については機器からのノイズが問題となる。我々はこのノイズを利用し聴覚野の反応を画像化する方法を開発、中枢性聴覚障害の

スクリーニング法として有用か検討した。

【方法】本研究は倫理委員会の承認を得、文書による同意の得られたもののみを対象とした。健常成人による基礎的検討の後、ハイリスク新生児の頭部 MRI の際 fMRI を施行した。磁場コイルへの電流を一時的に停止し音圧を変化させ、これを聴覚刺激とした。

【結果】健常成人では一次聴覚野を含む両側聴覚野に賦活が観察され、同様の賦活は乳児でも認められた。

【考案】本法は従来困難であった中枢性聴覚機能を簡便に

検出可能でスクリーニング法として有用であると思われる。

(8) Decoding the perceptual and subjective contents of the human brain

Yukiyasu Kamitani

(ATR Computational Neuroscience Laboratories)

The conventional approach of neuroimaging examines how the brain encodes stimuli or cognitive states by mapping brain activity induced by experimental conditions. Here, I present a "decoding" approach where neuroimaging signals are used to predict, or decode, internal states of the subject. Unlike the conventional mapping approach, which localizes brain functions in an anatomically meaningful way using univariate statistics, our approach aims to extract information from apparently meaningless patterns of signals from multiple channels using statistical learning algorithms. I show that functional magnetic resonance imaging (fMRI) can measure reliable patterns of visual cortical activity that accurately predict the orientation of stimulus gratings, even though the representation of

orientation in the human visual cortex (in monkeys, < 1 mm interval between iso-orientation columns) is thought to be beyond the resolution of fMRI voxels (~ 3 mm cube). Next, I demonstrate an example of "mind-reading" where the fMRI activity patterns learned with single gratings can be used to predict the orientation to which the subject is paying attention in two overlapping gratings. These results indicate that fMRI signals in the human visual cortex allow for accurate prediction of detailed perceptual and subjective contents of our visual experience. I will also discuss possible sources of orientation information, and applications of this approach to other domains.

(9) Seeing a dreaming brain -Brain activation preceded rapid eye movements during REM sleep

Satoru Miyauchi, Masaya Misaki, Takahide Fukunaga, Shigeyuki Kan

(Brain Information Group, Kansai Advanced Research Center,

National Institute of Information and Communications Technology)

At the first meeting held two years ago at NIPS, we introduced "Be-fMRI (Brain event-related fMRI)" as a new method of fMRI experiments. In a Be-fMRI experiment, no stimuli are presented, and subjects are required to perform no specific tasks. Instead, other physiological indices (e.g. EEG, eye movements and so on) are simultaneously recorded with fMRI data. Also explored is brain activation that accompanies

spontaneous events defined by the physiological indices. A key point in Be-fMRI is that events are not experimentally defined stimuli or tasks, but spontaneously occurring events in the brain. It implies that the fMRI activation does not necessarily follow but may precede the event. As an example of such activation, we introduce brain activation that starts before the onset of rapid eye movements during REM sleep.

(10) fMRI 内における指部への空気圧刺激を用いた系列運動課題実験

堀江亮太⁽¹⁾, 平田智秋¹⁾, R. Allen Waggoner²⁾, 上野賢一²⁾, 田中啓治²⁾, 程康²⁾, 谷淳¹⁾

(独立行政法人理化学研究所, 脳科学総合研究センター,¹⁾ 動的認知行動研究チーム,²⁾ 認知機能表現研究チーム)

Serial reaction time (SRT) tasks, in which subjects respond to sequential stimuli by pressing corresponding buttons as fast and accurately as possible, are widely used in psychophysics experiments and imaging studies for investigating motor learning. It is known from previous psychophysics experiments that motor sequence learning is partially represented by the positions of responding digits. To exclude the cognitive processes involved in the visuo-motor transformation in the SRT task, we use tactile stimuli and deliver them to the corresponding digits directly. One difficulty in implementation is to deliver the stimulus to a digit and detect the response from that digit simultaneously. Additional difficulties in fMRI studies arise from the fact that metal and electrical devices cannot generally be used inside the magnet. To solve these problems,

we have developed a non-metal and non-electrical apparatus with air-puffs as stimuli. The apparatus has four cylinders (corresponding to the four digits of the right hand) attached to spring-like silicon rubbers. Air-puffs are delivered to a digit through a hole in the corresponding cylinder. When the cylinder is pressed in responding to an air-puff, it moves to block the light-path so the response timing can be recorded. Subjects were trained in an SRT task, in which sequences of stimuli were generated by a simple artificial grammar, for an extended period (15 to 29 days). Subjects were scanned before and after the training. In this presentation, we will report the design and configuration of the apparatus, along with some preliminary behavioral and fMRI results.

(11) Capillary level imaging of local cerebral blood flow in epileptic foci

Hajime Hirase (RIKEN Brain Science Institute Hirase Reserch Unit)

Vascular and neuronal activity coupling was predicted more than a century ago and is the basis of modern functional imaging techniques such as positron emission tomography (PET) and functional magnetic resonance imaging (fMRI). Despite the importance of local regulation of the blood flow, capillary level quantification of cerebral blood flow has been limited by the spatial resolution of functional imaging techniques and the depth penetration of conventional optical microscopy. Two-photon laser scanning microscope (2PLSM) has the necessary spatial resolution to image capillary red blood cell (RBC) flow in the depth of the cerebral cortex, when the serum is loaded with a dextran conjugated fluorescent dye (FITC). Using this technique, RBC flow in capillaries in layer 2/3 of

the mouse somatosensory cortex was examined in vivo. Basal capillary flux was quantified as ~ 30 RBCs/sec. When focal interictal (epileptiform) activity was induced by local infusion of bicuculline methchloride, the average RBC flux in the epileptic foci increased by approximately 50%. The increase of RBC flux decayed monotonically with the distance from the epileptic focus and reached the control level at ~ 300 micrometer from the center of the epileptic focus. These results indicate that hyper-synchronized neural activity is associated with increased capillary perfusion in a localized cortical area. Notably, the spatial spread of the RBC increase associated with the focal epileptic events is smaller than currently available spatial resolution of fMRI.

15. 電子位相顕微鏡法の医学的・生物学的応用—Tomography への展開をめざして

2005 年 3 月 24 日—3 月 25 日

代表・世話人：臼田信光（藤田保健衛生大学・医学部）

所内対応者：永山國昭（自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター）

- (1) 位相差電子顕微鏡の今昔
永山國昭（自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター）
- (2) 200 kV 透過電子位相顕微鏡の開発
新井善博（日本電子株式会社）
- (3) Applicability of Phase Contrast TEM to Biological Specimens
Radostin Danev（自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター）
- (4) 電子位相顕微鏡による細胞内構造の観察
厚沢季美江（藤田保健衛生大学・医学部）
- (5) 位相差像トモグラフィーの可能性
元木創平（日本電子株式会社）
- (6) 電子線トモグラフィの最新アプリケーション
青山一弘（日本エフイー・アイ株式会社・アプリケーションラボラトリー）
- (7) TEM トモグラフによる 3 次元計測 3-Dimensional observations and measurements by TEM-Tomography
及川哲夫（日本電子株式会社）
- (8) 機能中のアクトミオシン複合体の 3 次元構造解析
片山栄作（東京大学・医科学研究所）
- (9) 電子顕微鏡による単粒子解析法の開発と IP3 受容体チャンネルの構造決定
佐藤主税（産業技術総合研究所）
- (10) クライオ電子顕微鏡法の可能性 — 位相顕微鏡からトモグラフィーまで —
木村能章（生物分子工学研究所）
- (11) 高配向高分子薄膜上へのナノスケールパターン形成
登阪雅聡（京都大学・化学研究所）
- (12) Structure of Carbon Nanotubes and Their Bio-medical application.
遠藤守信（信州大学・工学部）
- (13) HDC-TEM によるシアノバクテリア *Synechococcus* sp. PCC 7942 の微細構造観察
金子康子（埼玉大学・理学部）
- (14) 超高压電顕による細胞小器官の立体観察
野田 亨（藍野大学・医療保健学部）
- (15) 嗅球神経回路の三次元構造解析
樋田一徳（徳島大学大学院・ヘルスバイオサイエンス研究部）
- (16) 電子顕微鏡で染色体を見る
前島一博（独立行政法人理化学研究所）
- (17) プラスミドの運動を制御する螺旋状構造体
仁木宏典（国立遺伝学研究所・放射線・アイソトープセンター）
- (18) 微小管の枝分かれによる形成
村田 隆（自然科学研究機構・基礎生物学研究所）

(19) 膜電位センサーをもつ酵素

岡村康司 (自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター)

【参加者名】

青山一弘 (日本エフイー・アイ株式会社), 厚沢季美江 (藤田保健衛生大・医), 新井善博 (日本電子株式会社), 臼田信光 (藤田保健衛生大・医), 内田仁 (岡崎統合バイオ), 遠藤守信 (信州大学・工), 及川哲夫 (日本電子株式会社), 大河原浩 (生理研), 岡村康司 (岡崎統合バイオ), 片岡正典 (計算科学研究センター), 片山栄作 (東大・医科学研究), 加藤貴之 (科技構 ICORP 超分子ナノマシンプロジェクト (阪大)), 加藤幹男 (大阪府立大・総合科学), 金子康子 (埼玉大・理), 喜多山篤 (基生研), 木村能章 (生物分子工学研), 佐藤主税 (産総研), 重松秀樹 (岡崎統合バイオ), 瀬藤光利 (岡崎統合バイオ), 田中雅嗣 (東京都老人総合研), 樋田一徳 (徳島大院・ヘルスバイオサイエンス), 登阪雅聡 (京大・化学研), 仁木宏典 (遺伝研・放射線アイソトープセンター), 新田浩二 (埼玉大・

理), 野田亨 (藍野大・医療保健医学), 花市敬正 (株式会社花市電子顕微鏡技術研), 花市佳明 (株式会社花市電子顕微鏡技術研), 早坂孝宏 (岡崎統合バイオ), 福田善之 (総研大), 前島一博 (理化学研), 真柳浩太 (生物分子工学研), 水田龍信 (東京理科大・生命科学研究), 村田隆 (基生研), 元木創平 (日本電子株式会社), 諸根信弘 (国立精神神経センター・神経研), 安田浩史 (岡崎統合バイオ), Radostin Danev (岡崎統合バイオ), 中沢綾美 (藤田保健衛生大・医), 深澤元晶 (藤田保健衛生大・医), 中杉光宏 (藤田保健衛生大・医), 水谷謙明 (藤田保健衛生大・医), 廣川秀夫 (上智大学名誉教授), 渡辺良雄 (株式会社八神製作所), 沖代美保 (科技構), 新聞秀一 (岡崎統合バイオ), 鈴木邦律 (基生研), 有田佳代 (岡崎統合バイオ), 伊東康支 (名大・医), 宮田裕貴 (日大)

【概要】

5年目を迎える今年の会合は節目の研究会となった。研究会と軌を一にして開発した300kVの位相差電子顕微鏡が順調に稼働し、2004年春から先進的な生物電顕のデータが撮れ始めたからである。これらの最新データをもとに位相差法の生物応用への将来性について、構造生物学、細胞生物系、分子生物学、生理学、基礎医学など多様な分野において議論が行われた。

研究会は24日の午後から始まり、まず位相差法の方法論的側面について歴史と200kV最新鋭機の紹介があった。次に既設の300kV位相差電顕を用いた種々の応用例が紹介された。位相差法により生物試料の無染色観察が可能になったため、同一試料について“生”状態での光顕・電顕ハイブリッド観察が現実的なものとなり、将来の大きな発

展を予見させた。次に、位相差電顕の最大ターゲットとしてのトモグラフィー法の現状紹介が続いた。無染色生物試料を5nmの分解能で立体観察できれば全く新しい生物学がスタートすると言ってよい。その方向での議論が行われた。

2日目(25日)は方法の異なる3つの高分解能生物電顕の発表があり、その先端性が披露された。また生物の近辺分野である高分子材料への位相差電顕の応用例も紹介され、その威力が示された。午後は高次の生物系について位相差法の応用および生理研1,000kV電顕を用いた立体像観察の紹介があり、両者の結合も有効と予見させた。最後は位相差法がこれから応用されるであろう様々な分野のトピックスが集められ、各講演者からの位相差法への期待が寄せられ2日間の研究会の幕を閉じた。

(1) 位相差電子顕微鏡の今昔

永山國昭 (自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター)

位相差電子顕微鏡のアイデアは既に1940年代、電顕発明の当初から存在していたと思われる。不朽のCTF(コントラスト伝達関数)理論を打ち立てたScherzerの論文

(J. Appl. Phys. 20 (1949) 21)は、Zernikeの位相差法と完全に相補的であるし、またBoerschが電場制御による位相板のアイデアを提出したのが1947年である(Z.

Naturforschg. **2a**, 615)。その後 Kanaya らの実験報告が 1958 年に発表され, Farget ら(1962), Badde ら(1970), Unwin(1970), Johnson ら(1973), Willasch(1975), Krakow ら(1975)と続いた。しかし 1970 年代を最後に約 30 年間位相差電子顕微鏡は完全に沈黙した。

その背景には, 材料分野における, defocus phase

contrast 法とシミュレーション法の結合による定量解析の成功および生物分野における種々の染色法の成功があったと思われる。しかし位相物体を相手にする電子顕微鏡の正しい測定法は今も昔も位相板を使う位相差法であることに変わりはない。いくつかの具体例を岡崎で開発した位相差電子顕微鏡で示した。

(2) 200 kV 透過電子位相顕微鏡の開発

元木創平, 細川史生, 新井善博 (日本電子株式会社)

Radostin Danev, 永山國昭 (自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター)

200 kV TEM (JEM-2011) を基に, 専用型透過電子位相顕微鏡を開発した。

特徴は;

2つのミニレンズ (transfer doublet lens) を対物レンズ内に設け, 対物レンズの回折像と共役な回折像を中間レンズの前方位置に移動形成した。

①で形成した回折像面に位相板専用ステージ/ホルダーを設け, 位相板の精密駆動を可能とした。

位相板の汚染とチャージ防止のために, 位相板を試料加熱ホルダーに装着した。

通常の TEM 機能を全く損なわずに, 従来像と位相差像の両方を観察可能とした。

仕様は;

加速電圧: 200 kV 分解能: 0.23 nm

レンズ諸定数: f_o : 2.3 mm, C_s : 1.0 mm, C_c : 1.55 mm

位相板: 最高加熱温度: 700°C, X - Y 移動精度: 0.01 μ m,

Z 移動精度: 1 μ m

最大倍率: 位相差像 約 50 万倍, 通常 mode 150 万倍

実験結果

位相差像として, カーボングラファイトの 0.34 nm 格子像, Au 箔膜の 0.204 nm 格子像, アモルファス Ge 試料で分解能 0.23 nm が確認できた。

* 本装置の開発は「科学技術振興機構」からの「新技術委託開発事業」の一環として行っている。

(3) Applicability of Phase Contrast TEM to Biological Specimens

Radostin Danev, Kuniaki Nagayama (自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター)

Traditionally the observation of biological specimens by Transmission Electron Microscope (TEM) is done by using the defocus phase contrast technique. Recently a few new phase contrast techniques for TEM have been developed. In particular interest among these are the Zernike Phase Contrast TEM (ZPC-TEM) [1-3] and the Hilbert Differential Contrast TEM (HDC-TEM) [4-6]. Both have been successfully applied for the observation of various biological specimens.

In this work we compare the Conventional TEM (CTEM) utilizing defocus phase contrast with the ZPC and HDC TEMs. The advantages and disadvantages in the application

of each technique to various types of specimens are discussed. Theoretical simulations and experimental results illustrate the presented ideas.

1. K. Nagayama, *J. Phys. Soc. Jpn.*, **68** (1999) 811.
2. R. Danev, K. Nagayama, *Ultramicroscopy*, **88** (2001) 243.
3. R. Danev, K. Nagayama, *J. Phys. Soc. Jpn.*, **70** (2001) 696.
4. R. Danev, H. Okawara, N. Usuda, K. Kametani, K. Nagayama: *J. Bio. Phys.*, **28** (2002) 627.
5. R. Danev, K. Nagayama, *J. Phys. Soc. Jpn.*, **73** (2004) 2718.
6. Y. Kaneko, R. Danev, K. Nitta, K. Nagayama, *J. Electron Microsc.*, **54** (2005) 79.

(4) 電子位相顕微鏡による細胞内構造の観察

厚沢季美江, 中沢綾美, 臼田信光 (藤田保健衛生大学・医学部)

Danev Radostin, 永山國昭 (自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター)

細胞の構造は, 電子線の吸収がほとんどない。位相情報を可視化する電子位相顕微鏡を用いて真核細胞を観察した。

細胞は, カーボン薄膜を張ったグリッド上に培養した。ヒト血液より血小板を分離してグリッド上に採取した。比較のためには, twice-cycled microtubule (微小管) と, 蔗糖密度勾配超速心法により得られた細胞小器官を用いた。これらに浸漬急速凍結固定を行い, 液体ヘリウム冷却試料室に移した。ゼルニケ位相板および半円 π 位相板を装着した

JEM-3100FFC 電子顕微鏡により加速電圧 300kV で無染色で観察した。

培養細胞・血小板の細胞質中に細胞小器官が明瞭に観察された。微小管においては protofilament, 細胞小器官においてはその内部構造という小さな構造まで可視化された。細胞内構造の位相コントラストによる観察が可能であると示された。この方法により, 染色を行っていない細胞の真の姿を可視化できると考える。

(5) 位相差像トモグラフィーの可能性

元木創平, 新井善博 (日本電子株式会社)

Radostin Danev, 永山國昭 (自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター)

透過電子顕微鏡 (TEM) を用いたトモグラフィー (TEMT) は, 三次元形態観察の有力な方法として様々な研究分野で利用されている。トモグラフィーは, 試料の二次元投影像 (TEM 像) を様々な方向から取得し, これらを逆ラドン変換することで三次元構造を取得する。TEM 投影像のコントラストは試料深さ方向の情報を含

んでおり, コントラストが小さな TEM 像から得られた 3D 再構成像からは, 多くの情報を引き出すことは望めない。透過電子位相顕微鏡の位相差による高コントラスト像は, トモグラフィーの精度向上へ大きな役割を担える可能性がある。位相差像を用いたトモグラフィーの解釈および今後の可能性について議論した。

(6) 電子線トモグラフィの最新アプリケーション

青山一弘 (日本エフイー・アイ株式会社・アプリケーションラボラトリー)

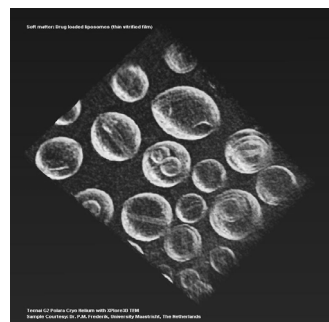
TEM を用いた電子線トモグラフィは電子顕微鏡法関連の手法の中でも比較的新しい手法であり, 近年非常に注目され, 大きな展開を見せている。これは, 元々は生物試料向けに開発された手法ではあるが, 半導体など無機材料などにも応用され, 高分解能 3 次元構造情報が得られている。今回は, 通常のトモグラフィに加え, 最新のアプリケーションを紹介する。

STEM トモグラフィ STEM モードにおいてもトモグラフィの実行は可能であり, 基本的なトモグラフィ取

得のシステムは通常の TEM モードと共通である。STEM トモグラフィは TEM と比較し 2 つの点において優れた特徴をもっている。第一に試料の結晶性による回折波が引き起こすコントラスト変化がおきないこと。第二に傾斜による同一像内のフォーカス不均一を回避できることである。

クライオトモグラフィ FEI では新しいコンセプトの液体ヘリウム冷却ステージを持つ極低温電子顕微鏡 TECNAI-Polara を開発した。Polara の一番重要な特徴は

ヘリウムステージでありながら 70 度という高傾斜のユーセントリックステージを実現していることである。Polara を用いれば生体細胞もしくは組織の凍結切片を用いたクライオトモグラフィが可能となる。さらに、クライオトランスファー機構をもつので、急速凍結→クライオセクションにより作成された氷包埋試料の観察も可能である。



Thin vitrified film of drug-loaded liposome vesicles

(7) TEM トモグラフィによる 3 次元計測 3-Dimensional observations and measurements by TEM-Tomography

及川 哲夫, 元木 創平 (日本電子株式会社)

清水 美代子, 古河 弘光 (日本電子システムテクノロジー)

透過電子顕微鏡 (TEM) は、ナノスケール・オーダーでの材料研究において最も有力な観察・分析装置として広く利用されており、その空間分解能は 0.1 nm 前後と極めて高いにもかかわらず、試料の厚み方向の情報を精度よく求めることは困難であった。そこでこの欠点を補うために、CT (Computed Tomography) 法の原理を応用した TEM-CT 法¹⁾ が最近一般化し、高分子材料²⁾ や生物試料などで応用が広まりつつある。この方法では試料内部の 3 次元構造の観察や計測ができるが、実際の応用では、いくつかの観察テクニックが必要である³⁾。本講演では、これらの技法を中心にその応用例を紹介した。

引用文献

Furukawa, H., Shimizu, M., Suzuki, Y. and Nishioka, H.; *JEOL News* **36** (2001) 12.

Yamaguchi, K., Takahashi, K., Hasegawa, H., Iatrou, H., Hadjichristidis, N., Kaneko, T., Nishikawa, Y., Jinnai, H., Matsui, T., Nishioka, H., Shimizu, M. and Furukawa, H.; *Macromolecules* **36** (2003) 6962.

S. Motoki, M. Naruse, T. Oikawa, N. Endo, K. Kawamoto, M. Shimizu, and H. Furukawa; *Proc. European Microscopy Congress* (2004). (Antwerp).

(8) 機能中のアクトミオシン複合体の 3 次元構造解析

片山栄作, 木森義隆 (東京大学・医科学研究所)

小口洋介, 野中和哉, 馬場則男 (工学院大学 電気工学科)

機能状態のアクトミオシンの立体構造解析は滑り運動分子機構の理解に必須であるが、複合体の結晶化は望み難く電子顕微鏡解析が中心となる。硬直複合体ではらせん対称性を利用できるが、ATP を加えると親和性が大きく低下し、細かい刻み、広範囲の傾斜角度で撮影した多数の画像を逆投影するトモグラフィ法以外には術がない。しかし、試料傾斜角度の制限のため高さ方向の分解能は著しく劣化し、滑り運動中ミオシン頭部の高分解能構造解析は事

実上不可能であった。われわれは *in vitro* 滑り運動アッセイ系を急速凍結ディープエッチレプリカ法と組み合わせ、機能中のアクトミオシンの表面構造を捉え、その立体構造解析を進めてきたが、その過程で、従来の逆投影法とは全く異なる新しい原理の 3 次元再構成法の開発に至った。最近のアルゴリズムの改良により、その手法はレプリカ画像以外の奥行きのある構造物にも応用できる。原子モデルからシミュレーションした画像と蛋白質表面像のパター

ン比較による構造解析法を紹介した。

(9) 電子顕微鏡による単粒子解析法の開発と IP3 受容体チャネルの構造決定

小椋俊彦, 三尾和弘, 佐藤主税 (産業技術総合研究所・脳神経情報研究部門&生物情報解析センター)

IP3 受容体チャネルや電圧感受性 Na チャネルは 6 回膜貫通ドメインを基本単位とする 4 回対称の膜タンパク質である。このグループのタンパク質は結晶作成が難しく、電子顕微鏡を基にした単粒子解析によって構造が決定された。その構造は外殻と中心構造の 2 つの部分により構成されるベル型であった。これらの構造決定のため開発した方法と、それらを用いて行った IP3 受容体の構造解析について述べた。

結晶を用いずにタンパク質構造を決定する単粒子解析において、分解能を規定する最も重要な条件の一つは、粒子画像の枚数である。我々は人間が画像を拾い上げなくても良い完全自動拾い上げプログラムの作成に挑むために、情報工学的手法の一つである焼きなまし法 (SA 法) を応用した自動集積化法 (auto-accumulation 法) を開発した¹⁾。さらに、この方法により拾い上げた画像を、これまでに開発してきたニューラル・ネットワーク (NN)法の学習データとすることで、さらなる高精度化と高速化を達成した^{2,3)}。また、結晶を作成して構造を解析する従来法は、非常に高度な蛋白試料の精製を必要とす

るという問題点を含んでいた。その克服のため、我々が電顕画像用に改良・開発してきた NN 法の一つである GNG (Growing Neural Gas) を用いた分類プログラムをさらに改良した。その結果 3 次元的な向きの違いを分類・平均化できるだけでなく、精製が不十分で多少の混入タンパク質が存在する場合でも、それは別の分子として排除できるシステムを構築できた⁴⁾。

IP3 受容体は細胞内小胞に存在する Ca チャネルで、細胞内での情報伝達に重要な役割を果たしている。開発された新たな手法を用いて、その構造を決定した⁵⁾。本 IP3 受容体の構造は、藤吉研究室と御子柴研究室との共同研究である。

1. Ogura, T., Sato, C.: *J. Struct. Biol.*, **146**, 344-358 (2004).
2. Ogura, T., Sato, C.: *J. Struct. Biol.*, **136**, 227-238 (2001).
3. Ogura, T., Sato, C.: *J. Struct. Biol.*, **145**, 63-75 (2004).
4. Ogura, T., Iwasaki, K., Sato, C.: *J. Struct. Biol.*, **143**, 185-200 (2003).
5. Sato, C. et al: *J. Mol. Biol.*, **336**, 155-164 (2004).

(10) クライオ電子顕微鏡法の可能性一位相顕微鏡からトモグラフィーまで

木村能章 (生物分子工学研究所・構造解析研究部)

生命科学の諸現象は、蛋白質などの生物由来の高分子の構造解析により、機能解明が急速に進んでいる。しかし、X 線結晶解析や多次元 NMR の解析には、結晶作成や高濃度均一溶液などの諸条件が必要だが、1990 年代を通じて急速に発展しているクライオ電子顕微鏡は、生理的条件下に近い状態の試料を急速凍結して測定し、複雑な蛋白や核酸などの共同作用の観測が可能である。しかし、クライオ法で観測する位相コントラスト像は、コントラストが非常に低いことから、応用も、分解能も限られて

いた。この問題は、結晶試料を用いることにより単一格子当たりの電子線 (従ってコントラスト) が限られていても、容易に積算ができ、様々な補正・修正が可能となり結果として現在は 2.4 オングストロームで X 線結晶解析と全く遜色のない構造解析が可能となっている。このことから、さらに結晶試料でない観察への道標ができ、位相顕微鏡からトモグラフィーまでのクライオ電子顕微鏡の可能性を紹介した。

(11) 高配向高分子薄膜上へのナノスケールパターン形成

登阪雅聡 (京都大学・化学研究所)

我々は配向の制御された100nm以下の周期をもつ格子状パターンを、広範な物質から比較的簡単な方法で作成できることを見出した。スライドガラス等の平滑な基板を加熱し、その表面に poly (tetrafluoroethylene) (PTFE) の棒を擦りつける事により、一軸配向した PTFE 薄膜が形成される。この PTFE 薄膜上に、高分子や低分子有機化合物など種々の物質から作成した希薄溶液をキャストす

ると、溶媒の蒸発後、格子状のパターンが観察された。パターンを形成する棒状構造の幅は 60nm 程度であり、格子の周期は 100nm 程度であった。Zernike 位相板を用いた TEM により撮影されたポリスチレンによるパターンの像から、格子状パターンは数本の分子が凝集して出来た粒子により形成されたと考えられた。この様な構造が形成されるメカニズムについて現在検討中である。

(12) Structure of Carbon Nanotubes and Their Bio-medical application.

Morinobu Endo (Faculty of Engineering, Shinshu University)

Carbon nanotubes, which consist of rolled graphene layers built from sp^2 carbon units, have attracted the attention of scientists, not only from a fundamental point of view but also from technological grounds [1, 2]. In addition to numerous physicochemical properties of carbon nanotubes, such as their electronic, mechanical, optical and chemical characteristics, newly proved property, that is, high bio-compatibility of carbon nanotubes, make us possible to use carbon nanotubes in this promising field. Recently, we have fabricated micro-catheter prepared from carbon nanotube/nylon based composite [3]. In this presentation, carbon nanotubes will be described from the point of synthesis and structure. And then, I will evaluate the performance of nanotube-reinforced nanocomposite as microcatheter in terms of thrombogenicity and blood coagulation. The novel micro-catheter, fabricated by incorporating carbon nanotube into nylon-12, thereby improving the mechanical properties and reducing the thrombogenicity and coagulability, is very promising for use in medical applications, such as hemodialysis, cardiopulmonary bypass, intra-vascular catheters,

left ventricular support and vascular dilating devices. On top of that, the increased mechanical strength derived from the intrinsic nature of the carbon nanotubes resulted in a high resistance to fracture and highly improved handleability in operation. As well as the smoother intraluminal surface, the fact that no carbon nanotubes are exposed on the outer surface of the catheters means that the possibility of direct reaction of the carbon nanotubes with blood is small.

Reference

- A. Oberlin, M. Endo and T. Koyama, Filamentous Growth of Carbon through Benzene Decomposition, *Journal of Crystal Growth*, **32**, 335-349, (1976).
- M. Endo, Grow Carbon Fibers in the Vapor Phase, *CHEMTECH*, American Chemical Society, September, 568-576, (1988).
- M. Endo, S. Koyama, Y. Matsuda, T. Hayashi, Y. A. Kim, Thrombogenicity and Blood Coagulation of a Micro-Catheter Prepared from Carbon Nanotube-Nylon Based Composite, *Nano Letters*, **5**, 101-106 (2005).

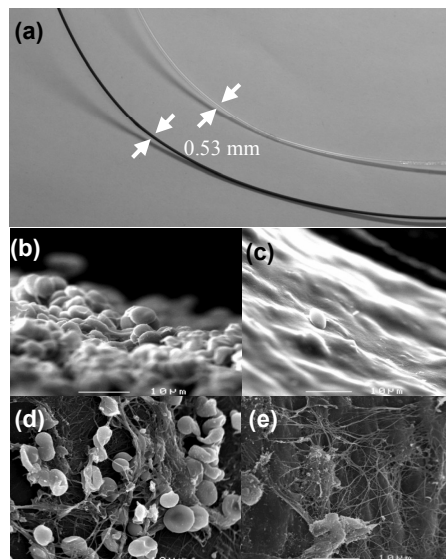


Figure 1 (a) Photographs of control catheter (transparent) and nanotube-incorporated catheter (black), SEM observations of outer (b), inner (d) surfaces of control and outer (c), inner (e) of nanotube-based catheter, respectively. It is noteworthy that novel catheter exhibit lower reactivity to blood.

(13) HDC-TEM によるシアノバクテリア *Synechococcus* sp. PCC 7942 の微細構造観察

金子康子 (埼玉大学理学部生体制御学科)

ヒルベルト微分電子顕微鏡法 (HDC-TEM) により、氷包埋したシアノバクテリア (*Synechococcus* sp. strain PCC 7942) を細胞ごと観察したところ、様々な細胞内微細構造を確認することができた。これにより、生物電子顕微鏡分野における積年の夢であった、実際に細胞内で活動している分子や微細構造をそのままの状態で捉えることが可能となった。しかし、ヒルベルト微分法により得られる像は従来法による透過電子顕微鏡像とは極めて異質

であるため、細胞内構造・分子の同定には慎重な検討を要する。シアノバクテリアのヒルベルト微分像を解読するために次の試みを行った。1)従来法である化学固定・樹脂包埋・超薄切片・電子染色像との詳細な比較、2) 蛍光顕微鏡像との比較、3)単離・精製分子のネガティブ染色像との比較、4)細胞内で大量発現させた分子の追跡。これらの検討結果をもとに、ヒルベルト微分法の可能性と今後の課題について考察した。

(14) 超高压電顕による細胞小器官の立体観察

野田 亨 (藍野大学医療保健学部理学療法学科)

超高压電顕を用いて、細胞の厚切り切片を観察することは、細胞を立体と捉え、その立体の投影像を得るということとほぼ同義である。そのためには観察する対象と背景との間に明瞭なコントラストをつける必要がある。その代表的方法が酵素組織化学とオスミウム等を用いた組織化学的な方法である。酵素組織化学には鉛やオスミ

ウムブラックを最終的な反応産物とするものがあるが、ややコントラストが低く、これらが描出する小器官の立体像はやや不明瞭であったが、それに比べて、直接、還元オスミウムの沈着で描出される構造はより明瞭であった。また実際の試料を観察し、その中から意味のある細胞小器官の立体的な情報を得るためには、像のコントラ

ストのみならず、観察対象とする構造のサイズ、その構造の観察に適した切片の厚さ、そして適切な組織化学的

手法の選択等、いくつかの方法論の観点から総合的に検討し、目的に合った観察方法を選択すべきである。

(15) 嗅球神経回路の三次元構造解析

樋田一徳（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部）

分子レベルの解析により嗅球は嗅覚の一次中枢として匂い識別に関する高度な情報処理を行っていることがわかってきた。嗅球への入力と高次中枢への出力の間には多様な局所ニューロンが存在し、嗅覚情報処理に係る嗅球神経回路を形成している。この神経回路機能の基礎となるシナプスは現時点においても電子顕微鏡（電顕）による同定が最も確実な手段であるが、電顕は解析領域が限られ、ニューロンの複雑な全体像のどの部分を解析

しているのかを知るのはしばしば困難となることから、光学顕微鏡（光顕）によるニューロン像と電顕シナプス像の直接的な対応は神経回路の正確な理解には不可欠である。我々はこれまで、化学的性質と形態的特徴を光顕で同定した嗅球ニューロンのシナプス結合を電顕連続切片再構築法により直接解析することを試みてきた。今回はこれまで解析を進めてきたラット嗅球神経回路に関する知見を紹介し、電顕の有用性について論じた。

(16) 電子顕微鏡で染色体を見る

前島一博（理化学研究所・細胞核機能研究室）

染色体は細胞が分裂する際、複製された遺伝情報（DNA）を2つの娘細胞に正確に分配するために必須な構造体である。長さが合計2mにも及ぶヒトゲノムDNAをわずか数 μm の40数本の染色体に短時間に束ねるメカニズムは、まさに驚異的である。この染色体がどのようにして1本の長いDNAの糸から形成されるのか？という問題は長年に渡って生物学者たちの興味を集めてきた。この10年間、染色体が作られるのに必須な蛋白質複合体であるCondensinの単離など、染色体研究に著しい進歩があった。DNAがヒストンという塩基性蛋白質に巻かれてクロマチンとよばれる繊維になるのは周知の事実である。それではCondensinはどのようにクロマチンを折り畳んでいるのだろうか？この問いに答えるために、電子顕微鏡などを用いて、染色体中のクロマチンを実際に「見る」ことは非常に重要である。しかしながら、

通常電顕はもとのイメージのprojectionを見ているので、空間的な情報は得られない。このため、私たちは比較的厚い切片を電子顕微鏡で角度を変えて撮影し、コンピュータで三次元再構築をおこなうtomographyというテクニックを使って、染色体構造の解明をおこなっている。厚さ200nmの染色体の「輪切り」を1度ずつ角度を変えて撮影し、再構築をおこなうと、個々のクロマチン繊維（直径30nm）がはっきりと見え、解析に十分な解像度を持つことがわかった。1本のクロマチン繊維に注目すると、1 μm 程度辿っていくことが可能である。染色体の末端では多くのループが中心部から放射線状にのびていることが観察され、中心部では2本のクロマチンの融合が見られた。これら得られた知見から考えられる染色体の構造について提案した。

(17) プラスミドの運動を制御する螺旋状構造体

仁木宏典 (国立遺伝学研究所)

今まで存在しないと思われていた細胞骨格系タンパク質が、原核細胞にも存在していることが次々と分かって来ている。まず細胞分裂の収縮環として知られていた FtsZ タンパク質がバクテリアチューブリンであること、さらに桿状の細胞形体形成に必須である MreB タンパク質がアクチンであることが明らかにされた。これらタンパク質は細胞内で重合し、繊維状の構造体を形成し、さらに螺旋状になる。これらの発見以降、螺旋状に分布す

るバクテリアタンパク質が今も新たに見つかっている。今回、紹介する SopA タンパク質も螺旋状構造を形成する。しかも、動的に重合・脱重合がおこり細胞内での極性を変えるものと思われる。SopA タンパク質は、大腸菌の F プラスミドの均等分配を司り、F プラスミドの移動のための、モータータンパク質と考えられている。SopA タンパク質の構造とその動態変化をさらに細かく見ることの意義について紹介した。

(18) 微小管の枝分かれによる形成

村田 隆 (自然科学研究機構・基礎生物学研究所)

高等植物の細胞は中心体を持たず、間期の微小管は細胞膜に沿って並ぶ。この微小管構造 (表層微小管) は細胞の伸長方向を制御すると考えられている。我々は細胞質中の γ -チューブリンが既存の表層微小管に結合し、微小管に結合した γ -チューブリンから新たな表層微小管が枝分かれして作られることを明らかにした。GFP-チューブリンを発現させたタバコ培養細胞を用いて微小管の挙動を観察したところ、新たに生じた微小管の全ては微小管上、もしくは直前まで微小管の存在していた場所から生じた。細胞膜-微小管複合体を単離し、細胞質抽出液

とインキュベートすると細胞膜上の微小管から微小管が生じた。複合体に精製チューブリンを加えても微小管分枝は起こらないが、微小管重合阻害剤を含む細胞質抽出液で前処理すると抽出液中の γ -チューブリンが微小管に結合し、その後の精製チューブリン処理で微小管分枝が起きた。抗 γ -チューブリン抗体ビーズを用いて抽出液中の γ -チューブリンを除くと、微小管分枝は阻害された。今後は、微小管分枝の微細構造の解析と関与する因子の同定を行い、分子機構に迫る予定である。

(19) 膜電位センサーをもつ酵素

岡村康司, 村田喜理, 岩崎広英, 佐々木真理 (自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター)

従来、電位センサー構造はチャネル分子に固有のものであり、細胞の膜電位変化によるシグナル伝達は、すべてイオンチャネルの開口によって Ca イオンなどが出入りすることにより起こると考えられてきた。今回、電位依存性チャネルの膜貫通領域と類似する領域を有するが、チャネルのポアの構造の代わりに酵素のドメインを有するタンパク (VSP: voltage sensor-containing protein) について報告した。

酵素ドメインのみからなる GST 融合タンパク質は、Malachite green assay 法による吸光度測定、及び TLC による解析により、リン脂質の脱リン酸化活性を有することが確認された。また、ツメガエル卵母細胞に cRNA を強制発現させたところ、数マイクロアンペアにも到る顕著な「ゲート電流」を認めた。この「ゲート電流」は、電位センサーの陽電荷を減らすようなアミノ酸置換により消失し、従って VSP は膜電位を感知する分子である。更

に、膜電位を変化させつつ酵素活性を検出する電気生理学的実験により、酵素活性が電位センサーの働きによって膜電位依存的に変化するという証拠を得た。VSP はホヤおよびマウスでは精巣に著明に発現が認められることから、VSP は膜電位変化を通じて精子の機能や形態形成の調節に関与することが推測された。

この分子は、膜電位変化により機能を変化させる膜タ

ンパクとして、イオンチャネル以外の経路の初めての例であり、従来イオンチャネルに限定した特質であると考えられてきた電位センサーが、より広い生理機能に使われている可能性が示された。また、現在チャネルの構造生物学分野で大論争になっている電位センサーの作動原理について新たな視点を提供した。

16. DNA 構造を基盤とするゲノム生理学の展開

2004 年 11 月 4 日－11 月 5 日

代表・世話人：加藤幹男（大阪府立大学総合科学部）

所内対応者：永山國昭（自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター）

- (1) 核酸塩基識別子の設計と合成
片岡正典（自然科学研究機構計算科学研究センター）
- (2) DNA インターカレーターを利用した核酸分析
竹中繁織（九州大学大学院工学研究院応用化学部門）
- (3) 特異な DNA 構造と相互作用因子
鳥越秀峰（東京理科大学理学部第一部応用化学科）
- (4) テロメア 1 本鎖 DNA 領域結合蛋白質とテロメア DNA との相互作用
古川亜矢子（東京理科大学理学部第一部応用化学科）
- (5) テロメア DNA 結合タンパク質の構造決定と核酸シャペロン活性
片平正人（横浜国立大学大学院環境情報研究院）
- (6) 繰り返し配列からなる一本鎖 DNA の立体構造特性
加藤幹男（大阪府立大学総合科学部自然環境科学科）
- (7) 転写による DNA 高次構造の変化と組換え
水田龍信（東京理科大学生命科学研究科分子生物学部門）
- (8) 光応答性遺伝子発現を制御するシス配列とトランス因子
朝山宗彦（茨城大学農学部分子遺伝学研究室）
- (9) DNA から見たヌクレオソームの相互作用と協調現象
木山亮一（独立行政法人産業技術総合研究所生物機能工学研究部門）
- (10) DNA 構造によるクロマチンの改変と転写制御
清水光弘（明星大学理工学部化学科）
- (11) コンフォメーションコードの解読に向けて
大山 隆（甲南大学理工学部生物学科）
- (12) 22 番染色体の全塩基配列解明と全遺伝子同定を目指した網羅的緻密解析
養島伸生（浜松医科大学光量子医学研究センター光環境医学研究分野）
- (13) ヒトゲノム解読から学ぶヒト遺伝子構造の特徴
浅川修一（慶応義塾大学医学部分子生物学教室）
- (14) polypurine/polypyrimidine 配列の比較ゲノム配列解析
田中宏幸（奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科）
- (15) 遺伝子重複によるゲノムの進化
黒川 顕（奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科）
- (16) ヒトセントロメアクロマチンファイバー上での動原体タンパク質 CENP-A 結合部位のマッピング
杉本憲治（大阪府立大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻）
- (17) 走査型光プローブ顕微鏡の開発と遺伝子検出への応用
吉野智之（独立行政法人食品総合研究所計測工学研究室）
- (18) 走査型光プローブ顕微鏡の染色体解析への適用
杉山 滋（独立行政法人食品総合研究所計測工学研究室）

(19) ゲノム生理学研究会 総括と展望

永山國昭（自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター）

【参加者名】

加藤幹男（大阪府立大学総合科学部），永山國昭（自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター），片岡正典（自然科学研究機構計算科学研究センター），竹中繁織（九州大学大学院工学研究院），鳥越秀峰（東京理科大学理学部），古川亜矢子（東京理科大学理学部），片平正人（横浜国立大学大学院環境情報研究院），水田龍信（東京理科大学生命科学研究所），朝山宗彦（茨城大学農学部），木山亮一（独立行政法人産業技術総合研究所生物機能工学研究部門），清水光弘（明星大学理工学部），大山隆（甲南大学理工学部），養島伸生（浜松医科大学光量子医学研究センター），浅川修一（慶応義塾

大学医学部），田中宏幸（奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科），黒川頭（奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科），杉本憲治（大阪府立大学大学院農学生命科学研究科），吉野智之（独立行政法人食品総合研究所），杉山滋（独立行政法人食品総合研究所），岡部隆宏（甲南大学理工学部），西川純一（甲南大学理工学部），福江善朗（甲南大学理工学部），岩切良素（甲南大学理工学部），片山拓馬（東京理科大学理学部），内田仁（統合バイオ），早坂孝宏（統合バイオ），Krassimir Tachev（統合バイオ），Alexandre Loukanov（統合バイオ），Elbert Lee（総研大），金子涼輔（生理研）

【概要】

2003年4月になされたヒトゲノムシーケンス解析の実質的完了宣言をはじめとして，各種生物ゲノムの塩基配列解読が完成し，転写・複製・組換え等に代表されるゲノム機能の解析のための基盤情報が整備されてきている。その一方で，塩基配列に由来する構造シグナルの働きを真に理解するためには，現時点ではこれらの基盤情報が有効に利用されていないといえよう。本研究会では，DNA一次配列情報から高次構造情報へ，さらにその機能発現にいたる過程について活発に研究している研究者たちによる「DNA構造に基づくゲノム機能制御」を主題とする研究から，計19演題が報告された。DNA構造分析の新しい手法の開発，ゲノム配列に頻出する単純リピートの高次構造特性とその遺伝的不安定性への関連付け，

テロメアやセントロメア構築におけるDNA高次構造とそこに働くタンパク質因子，クロマチン構造を規定するDNA構造特性と転写活性，染色体局所におけるゲノム情報の偏りの生物学的意義，ゲノムクロマチン構造への遺伝子マッピング等の研究課題について，それぞれの研究グループが得意とする解析法を駆使して問題解決を目指している。これらの成果によって，膨大なゲノム配列情報からゲノム機能領域を抽出し，ゲノム機能の実態を構造動態として理解するための道筋が見えつつある。本研究会は，様々な解析手法による研究成果をもとに，ゲノム機能を制御調節する構造基盤に関して刺激的な議論を持つ良い機会となり，それぞれの研究の新たな展開の可能性を感じることができた。

(1) 核酸塩基識別子の設計と合成

片岡正典（自然科学研究機構計算科学研究センター）

永山により開発中の透過型電子顕微鏡を用いるDNA配列直読法は多数のDNA断片を増幅することなく配列情報を画像化し，高速・低価格で配列解析を実現する方法である。この塩基配列解析法では一本鎖DNA断片中のすべての核酸塩基を正確に特定し，電子顕微鏡へ識別情報を提供する“核酸塩基識別子”の開発が鍵となる。

核酸塩基識別子は核酸塩基を特定する認識部と識別情報を提供する指示部，それらを繋ぐ接続部から構成される。認識部には高い塩基選択性や識別子同士の会合抑制，各種溶媒に対する高い溶解性といった多くの要求が集中し，天然型核酸塩基の適用が困難であることが示唆された。報告者は上記要求を満たす新たな人工核酸塩基の開

発を計画し、天然型の塩基対構造を基盤として、1,4-デヒドロピラジンを水素供与体、1,4-ジオキシンを水素受容体とする三環性複素環を認識部として設定した。指示部としては透過型電子顕微鏡において 4 種の塩基の識別に必要な高い明暗差を得るために、電子密度差の大きな周期の異なる 4 種の重原子会合体を設定した。接続部に

メチレン鎖を採用して認識部と指示部を結合することにより核酸塩基識別子の基本設計を完成させた。未だ全合成には至っていないが、核酸塩基識別子は一本鎖 DNA 中の核酸塩基 1 個を識別する初めての分子であり、電子顕微鏡観察に止まらずその応用範囲は極めて広い。

(2) DNA インターカレーターを利用した核酸分析

竹中繁織 (九州大学大学院工学研究院応用化学部門)

DNA は、水溶液中ダイナミックにその構造を変化させている。この変化は、塩基対の opening, breathing などの小さな変化から三本鎖や四本鎖 DNA 形成にいたる大きな構造変化までさまざまである。このような DNA の構造変化は、DNA 配列に強く依存するが、DNA と相互作用するたんぱく質のみならずイオンや薬剤などにより誘起されることも知られている。演者は、これまで合成縫込み型インターカレーターについて研究を行ってきた。合成縫込み型インターカレーターは、ノガラマイシンに代表される天然の縫込み型インターカレーターと同様に DNA 二重らせんの塩基対の opening や breathing に強く依存し

ていることが明らかとなった。すなわち、縫込み型インターカレーターは塩基対開裂の隙間をぬって DNA 塩基対に平衡挿入 (インターカレーション) するものであった。また、これにより形成された複合体は二本鎖 DNA を強く安定化させることも明らかとなった。この考えに基づいて二本鎖 DNA ラベル化試薬としてのフェロセン化ナフタレンジイミドを設計・合成し、これを利用した DNA の電気化学的検出法を達成した。また、この分子は、テロメア四本鎖 DNA への結合できることも最近明らかとなり、この分子を利用することによりテロメラーゼ活性の電気化学的アッセイ法を達成した。

(3) 特異な DNA 構造と相互作用因子

鳥越秀峰 (東京理科大学理学部応用化学科)

外部から加えた 1 本鎖核酸が標的遺伝子の発現制御領域の 2 本鎖 DNA に特異的に結合して分子間 3 本鎖核酸を形成すると、立体障害で発現調節因子が当該領域に結合できず、下流の遺伝子発現が人工的に制御される。この原理に基づくアンチジーン法が注目されているが、生理条件では 3 本鎖核酸形成能が低いため、生体内の人工的遺伝子発現制御法としてこの方法は実用化されていない。我々はこの手法の実用化を目指し、生理条件において分子間 3 本鎖核酸形成能を上昇させるための研究を進めているので紹介する。

また、遺伝子発現制御領域の 2 本鎖 DNA の一部がほどこけて生じた 1 本鎖核酸が、他の 2 本鎖 DNA 領域に結

合することにより分子内 3 本鎖核酸を形成する可能性が指摘されている。分子内 3 本鎖核酸の生物学的意義を明らかにするために、3 本鎖核酸に特異的に結合する STM1 蛋白質についても、我々は研究を進めているので紹介する。

一方、ヒトの遺伝子の一塩基多型 (SNP) が生活習慣病との関連などにおいて注目され、オーダーメイド医療の実現に向けて SNP に関する研究が精力的に展開されている。ミスマッチ塩基対と金属イオンとの特異的結合をはじめて見つけ、これを利用した SNP タイピングの新しい方法について、我々は研究を進めているので紹介した。

(4) テロメア1本鎖 DNA 領域結合蛋白質とテロメア DNA との相互作用

古川亜矢子, 鳥越秀峰 (東京理科大学理学部応用化学科)

真核生物の染色体末端のテロメアはG塩基に富む反復配列からなり, テロメアの3'末端は突出した1本鎖DNA構造である。テロメアの長さの変化は細胞の老化や癌化と密接な関係にあると考えられ, 注目されている。テロメアの長さの調節には, テロメア伸長酵素であるテロメラーゼと共に, テロメアの2本鎖DNA領域及び3'末端の1本鎖DNA領域に特異的に結合する蛋白質が関与する。

我々は, 解析が遅れている分裂酵母のテロメア1本鎖DNA領域の構造とこの領域に特異的に結合する蛋白質Pot1について解析を進めている。G塩基に富む1本鎖核

酸は, 一般的に Na^+ や K^+ イオンの存在下で折れ畳まり, G塩基4個が同一平面上に並んだ4本鎖核酸構造を形成することが知られている。分裂酵母のテロメアのG塩基に富む1本鎖DNA領域は, G塩基が3個以上連続すると, Na^+ イオンの存在下で折れ畳まり, 4本鎖核酸構造を形成し得ることを我々は見つけている。また, 分裂酵母のテロメアが形成する4本鎖核酸構造にPot1蛋白質を添加すると, 4本鎖核酸構造がほどける可能性を我々は見つけている。

(5) テロメア DNA 結合タンパク質の構造決定と核酸シャペロン活性

片平正人 (横浜国立大学大学院環境情報研究院)

hnRNP D は, テロメア配列のDNA及びRNAに特異的に結合するタンパク質であり, テロメアDNAの維持やRNAの寿命の制御等への関与が示唆もしくは確立されている。我々はhnRNP DとテロメアDNAの複合体の立体構造をNMR法によって決定した。これによりhnRNP Dがテロメア配列のDNAを認識するメカニズムが明らかになった。

テロメアDNAは複製のたびに短くなるが, 生殖細胞等においてはテロメラーゼがテロメア配列DNAを付加する事によって, 元の長さが維持されている。テロメアDNAは生理的なイオン条件下で4重鎖を形成するが, 4重鎖の形成はテロメラーゼによる付加反応を阻害する。

我々はhnRNP Dが, テロメアDNAの4重鎖構造を1本鎖構造に“ほどく”活性を有している事を見出した。この際hnRNP Dは, あたかもDNAに対するシャペロン分子(DNAシャペロン)として機能している。hnRNP Dは, テロメラーゼによるテロメア伸長反応を, この活性により保障している可能性がある。また類縁のhnRNP A1タンパク質が, DNAの複製においてDNAシャペロンとして機能している事を見出したので, それについても報告する。

さらに真核生物のゲノムに広く見られるGGAトリプレットリピートが, 生理的なイオン条件下で, 特異な4重鎖構造を形成する事を見出した。この特異な4重鎖構造の, 複製, 組み換え等における意義を考察した。

(6) 繰り返し配列からなる一本鎖DNAの立体構造特性

加藤幹男 (大阪府立大学総合科学部自然環境科学科)

ミニサテライト, マイクロサテライトDNAに代表される単純繰り返し配列領域は, 生物ゲノム内に多数散在しており, それぞれの遺伝子座における縦列の回数は個体によって大きな多型を示す。このような多型をもたら

す要因として, 不等交叉や, 複製時の相補鎖スリップによる伸長や欠失が考えられている。本研究会では, 海水魚キチヌより単離したミニサテライト配列について, その一本鎖分子が形成する高次構造についての解析を報告

する。

材料としたミニサテライト DNA 配列は、30 塩基対を単位鎖長とし、ポリプリン/ポリピリミジン配列からなる 18 塩基領域と、75% (A+T) の 12 塩基領域に分けられる。ゲノムから単離した 6 縦列反復 (180 塩基対) を持つ DNA 断片 AL79 は、その両外側の配列をプライマーとして PCR 増幅を試みると、鋳型に由来する正しい鎖長の産物

に加えて、プラスマイナス (30 の整数倍) の鎖長を持つ、伸長分子と欠失分子の生成が観察された。この伸長・欠失の原因となると想定される鋳型一本鎖 DNA の特殊高次構造形成について、電気泳動移動度、電子顕微鏡、CD スペクトル、示差走査熱量測定、核酸塩基特異的化学修飾の手法によって解析した。

(7) 転写による DNA 高次構造の変化と組換え

水田龍信 (東京理科大学生命科学研究分子生物学部門)

免疫グロブリン遺伝子クラススイッチ組換えは、各 C 領域上流イントロン内の、繰り返し塩基配列を特徴とする S (switch) 領域で起こる。遺伝子組換えに先立ち、S 領域 non-coding RNA の転写と、この転写産物の基質 DNA への結合が必要だとされている。我々は、この特殊な転写産物の機能を解析するために、S 領域塩基配列を組み込んだプラスミド DNA を基質に、様々な条件下、試験管内で転写させ、その産物を原子間力顕微鏡により分子レベルで可視化した。その結果、S 領域 non-coding RNA が基質 DNA と複合体を形成すること、この RNA-DNA

複合体は不安定で、その構造維持のためには陽イオンが必要であること、この複合体形成により、スーパーコイルプラスミド DNA が弛緩し、オープンサークル構造を呈すること、S 領域 non-coding RNA は凝集しやすく、グアニンに富んだ塩基配列が、その凝集のしやすさを決定していることが明らかとなった。以上、原子間力顕微鏡による一分子可視化技術により、S 領域 non-coding RNA と DNA の結合による染色体高次構造の特異的变化がクラススイッチ組換えの誘導に深く関与していることが示唆された。

(8) 光応答性遺伝子発現を制御するシス配列とトランス因子

朝山宗彦 (茨城大学農学部資源生物科学科分子遺伝学研究室)

地球上の生物の営みは、太陽光と光合成生物によって生産される酸素や有機物に依存している。藍藻の祖先は、地球上に酸素をもたらした最初の光合成生物とされ、また高等植物葉緑体の起源と考えられている。原核生物である藍藻は、培養も容易であり、遺伝学的・生化学的な解析も行えることから、光合成遺伝子などの発現調節機構を解明するための優れたモデル生物になっている。こうした観点から我々の研究グループは、光合成遺伝子 *psbA* 遺伝子の光応答性発現に注目し、その制御機構の仕組みを解析している。現在までに、転写レベルで働く「正」のシスエレメントとして、ベント DNA 構造 (NAR, 2002, 30:4658-4666) や UPE 配列 (BBB, 2003, 67:1382-1390) または転写装置である RNA ポリメラーゼ (シグマ因子)

が関与するプロモーター配列の同定に成功している (JMB, 2003, 325:857-872; GTC, 2004, in press)。また、シスエレメントに働くトランス因子として、光誘導性のシグマ因子を光合成生物において初めて発見した (FEBS Lett., 2003, 554:357-362)。一方、転写後レベルでの「負」の制御因子に関しては、暗黒条件下で mRNA の不安定性を引き起こす AU-box 配列 (NAR, 2001, 29:1835-1843) と、それを標的配列にして働くエンド型 RNase の同定と機能解析に取り組んでいる。今回は、これら光応答性遺伝子発現調節機構における転写・転写後レベルでの 2 段階制御モデルを報告すると共に、最近明らかになってきた藍藻の寿命に関与するシグマ因子の働きを、ゲノム構造の維持や代謝の面と絡めて論じた。

(9) DNA から見たヌクレオソームの相互作用と協調現象

木山亮一（産業技術総合研究所生物機能工学研究部門）

クロマチン研究の難しさは、1 細胞中に存在するヌクレオソームの数が約 10^7 個あり、それらが隣り同士や離れた者同士の間で相互作用をしていることにある。クロマチンの形成は、DNA 複製や染色体形成の際だけでなく、転写反応の際に遺伝子の発現を活性化したり不活性化したりする場合や活性化クロマチンの境界を形成する際にも重要と考えられる¹。このような複雑なクロマチンの状態を解析するには、その基本となるヌクレオソームをある基準をもって分類することが重要な鍵になる²。特に、多くのヌクレオソームに関してある一定の基準があてはまるかを調べるためには、ゲノム構造を網羅的に調べて、コンピュータを用いた構造解析を利用する必要がある。我々は、今回、約 30 個以上のグロビン遺伝子プロモータ領域を解析することにより、進化的に保存された新たな制御領域を見いだした。この領域は、それぞれ

の遺伝子の転写開始点から 200~400bp 上流の領域で、A+T-rich で AA-あるいは TT-ジヌクレオチドの高い出現頻度を特徴とする。また、この領域は、ベント DNA 構造を示すだけでなく、実際にヌクレオソームの位相決定にも関与している³。このような領域が進化的に良く保存されていることは、ヌクレオソームの配置の情報が既にゲノム DNA に記されていることを意味すると考えられ、グロビン遺伝子の転写反応にとって重要な意味を持つことが示唆される。また、このようなヌクレオソームがゲノム DNA 上に存在することによりクロマチン全体の挙動を制御しているのではないかと考えられる。

1. Onishi & Kiyama. *Recent Devel. Nucl. Acids Res.* **1**, 131-150, 2004.
2. Kato et al. *J. Mol. Biol.* **332**, 111-125, 2003.
3. Wanapirak et al. *J. Mol. Evol.* **56**, 649-657, 2003.

(10) DNA 構造によるクロマチンの改変と転写制御

清水光弘（明星大学理工学部化学科）

クロマチンの基本単位であるヌクレオソームは、遺伝子発現を制御する機能構造体としての役割を持っている。プロモーターなどの領域では、ヌクレオソームがしばしば正確な位置に形成されて、遺伝子の発現制御に関与していることが報告されている。一方、ヒトゲノムには、反復単位 11 塩基以下のマイクロサテライト配列が 65 万コピーも存在するが、その機能は不明である。このような単純な反復配列はヘアピン構造、左巻き Z-DNA, slipped structure, 三重鎖、四重鎖などの特殊な non-B 型 DNA 構造を形成できる。我々は、出芽酵母ミニ染色体を

用いて、*in vivo* で単純反復配列がヌクレオソーム形成を阻害したり、また逆にヌクレオソーム形成を促進することを示した。すなわち、DNA の構造はゲノムにおけるクロマチンの構築の重要な因子の一つである。このような DNA の構造的性質を利用して、出芽酵母ゲノム a-細胞特異的遺伝子 *BAR1* のプロモーター領域のクロマチンを改変し、 $\alpha 2$ /Mcm1p による転写抑制におけるヌクレオソームの機能について解析した。その結果、ヌクレオソームポジショニングは、細胞型決定に関与する遺伝子の転写制御に重要な役割を果たしていることが示された。

(11) コンフォメーションコードの解読に向けて

大山隆, 福江善朗, 隅田周志, 西川純一, 井上正太郎
(甲南大学理工学部生物学科, 甲南大学知的情報通信研究所)

DNA には, Watson と Crick の二重らせん構造の他にも, Z 型 DNA, ベント DNA, 三重鎖・四重鎖 DNA など, 十数種類にも及ぶ多様な高次構造が存在する。加えて, DNA には柔軟な領域や硬い領域, それに“曲げ”に対する異方性をもつ領域が数多く存在する。最近になって, これらの高次構造や特性が遺伝情報の一つとなっていて, 世代を越えてクロマチン構造を再現するために機能したり, 遺伝子発現の制御に関与していることが明らかになってきた。また, 染色体の構築や, エピジェネティクスの制御にも関与している可能性が議論されはじめた。

我々はこれまでの研究で, 転写活性化因子などのアク

セスを保証するためのクロマチン構造の維持に負の超らせんを擬態したベント DNA 構造が寄与していることを明らかにしてきた。さらに最近, ヒトのプロモーター配列 1871 種とマウスの同配列 196 種を解析した結果, TATA ボックスとイニシエーターが, ゲノム上の他の領域には見られない共通の機械的特性を有していることを発見した。これらの特性は, TBP や TAF_{II}250, TAF_{II}150 の target-site selection に寄与している可能性がある。本研究会では, これらの知見を中心に我々の研究における最近のトピックスについて紹介した。

(12) 22番染色体の全塩基配列解明と全遺伝子同定を目指した網羅的緻密解析

養島伸生^{1,2}, 佐々木貴史², 塩濱愛子², 細野克博², 楊浩², 泉山朋大², 清水信義²

(¹浜松医科大学光量子医学研究センター光環境医学研究分野, ²慶應義塾大学医学部分子生物学教室)

22 番染色体の全塩基配列決定は慶應義塾大学と英米の共同研究で完遂し, ヒト染色体として初めて 1999 年 12 月に発表した。その際, 予測遺伝子も含めて 545 遺伝子の存在を報告した。その後, 同染色体上の全遺伝子の同定と機能解析を目指して, 手作業による塩基配列の「網羅的緻密解析」と実験による cDNA の単離を行っている。その結果, 現在までに長腕の約 50% に相当する 22cen-q12.2(16Mb) の解析を終了し, 新たに 16 個の遺伝子の存在を確認した。本演題では, 全塩基配列決定の詳細と「網羅的緻密解析」について報告するとともに, 上記 16 遺伝子の中から 2 遺伝子 (DGCR8, YPEL1) に関して発表する。DGCR8 は, 22q11.2 欠失症候群の最小共通欠失領域 1.5Mb の中から発見し, ヒト, マウスともに cDNA をクローニング

した。DGCR8 タンパクは WW モチーフ, 二重鎖 RNA 結合モチーフ (dsrm) を有する。マウス胚に対する *in situ* ハイブリダイゼーション実験で, 上記疾患の症状発生組織, 器官 (胸腺, 口蓋原基など) で特異的発現が見られ, 疾患との関連が注目される。一方, 同じく 22q11.2 上の YPEL1 は, 昆虫のタンパク質 Yippee に相同性を有し, ヒトゲノム上に他に 4 コピーのパラログ (YPEL2~YPEL4) を持つので, この群の遺伝子を YPEL ファミリーと命名した。データベース検索により, YPEL ファミリー遺伝子はほとんどの真核生物 (動物, 植物, 真菌類) に存在することもわかった。培養細胞に対する免疫蛍光染色で, YPEL ファミリー遺伝子は細胞分裂に関連する機能を有する可能性が示された。

(13) ヒトゲノム解読から学ぶヒト遺伝子構造の特徴

浅川修一，清水信義（慶應義塾大学医学部分子生物学教室）

我々は国際共同研究の一員として、ヒト2番、6番、8番、21番、22番染色体の特定領域を対象にゲノムシーケンシングを推進し、合計45Mbの塩基配列を解読した。その過程で発見した家族性パーキンソン病原因遺伝子Parkinが約1.4Mbという超巨大遺伝子であることや、8番染色体から見いだしたCSMD3がCSMD1、CSMD2と遺伝子ファミリーを構成し、その平均サイズが1.3Mbという遺伝子ファミリーとして最大級のサイズであることなどを見いだした。一方、我々が21番染色体から見いだしたKAPファミリーは毛髪の主成分であるが、そのコード

領域が最小クラスの遺伝子ファミリーであった。本研究ではまずヒト遺伝子のゲノムサイズに注目して、その特徴を論じた。

また我々はヒトゲノムのタンパク質をコードする遺伝子全てについて、その転写領域、すなわちエキソンおよびイントロン部分の塩基組成を調べたところ、明らかなストランドバイアスがあることを見いだした。これらの遺伝子領域に見られるストランドバイアスについて、その生成のメカニズムや生物学的意義について論じた。

(14) polypurine/polypyrimidine 配列の比較ゲノム配列解析

田中宏幸，黒川顕，金谷重彦（奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科比較ゲノム学講座）

polypurine/polypyrimidine 配列は、3重鎖構造 (triplex)、十字架型構造 (cruciform)、さらには4重鎖構造などの特殊な立体構造(本研究ではこのような特殊なDNAを非B型DNAと呼ぶ。)を構築と関係し、転写制御、クロマチンのリモデリングなどの複製機構を例とした分子生物学的機能との関連が示唆されている。ゲノムプロジェクトの進展に伴って、約160種のバクテリア、2種の酵母、5種の多細胞生物(線虫、キイロショウジョウバエ、シロイヌナズナ、ヒト)のゲノム配列が決定された。非B型DNA構造のゲノム多様性を把握する目的で、これらのゲノム配列データを基に polypurine/polypyrimidine 配列の出現特徴を解析した。それぞれのゲノム鎖に対して90%以上のAG%あるいは10%以下のTC%を有する300bp以上の領域(pur/pyr-stretchと呼ぶ)の頻度を検討したところ、バクテリア(96種)については pur/pyr-stretch がゲノム上に存在しないという結果が得られた。一方、シロイヌナズナでは4個、線虫では18個、キイロショウジョウバエでは2個の pur/pyr-stretch が得られた。さらに、ヒト染色体では全体で約5,500個、マウスでは約14,000個、

イヌでは約5,900個、ゼブラフィッシュでは約900個の pur/pyr-stretch が得られた。このように脊椎動物ゲノムにおいて特に pur/pyr-stretch が非常に多数存在するため、脊椎動物に特異的に見られるゲノムの立体構造に関わる因子であると推測される。それぞれの pur/pyr-stretch を3-6連続塩基の出現頻度に分解し、相關解析によりこのような pur/pyr-stretch の類似性を検討した。ヒト染色体において相関係数0.99を閾値として pur/pyr-stretch を分類したところ130個のグループに分類された。最も大きなグループは9個の pur/pyr-stretch から構成された。これらの pur/pyr-stretch はChr1-ID116, Chr3-ID110, Chr3R-ID130, Chr4R-ID121, Chr9-ID31, Chr12-ID116, Chr12-ID76, Chr18-ID34, Chr19R-ID99であり、ヒト染色体では異なった染色体に非常に類似性が高い pur/pyr-stretch が得られた。また、非常に類似性の高い pur/pyr-stretch が同一の染色体で多数存在するという結果も同時に得られた。脊椎動物では pur/pyr-stretch が非常に多く存在し、染色体内あるいは染色体間に関連付ける立体構造因子であると推測された。

(15) 遺伝子重複によるゲノムの進化

山崎清¹, 金谷重彦², 黒川 顕² (¹大阪大学遺伝情報実験センターゲノム情報解析分野,
²奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科比較ゲノム学分野)

生命はバクテリアからヒトに至るまで、ポイントミューテーションだけにとどまらず、IS, Tn, プラスミド, ファージ, ウイルスなどによる遺伝子水平伝播, または遺伝子重複, 遺伝的交配などのさまざまな方法で進化を繰り返してきた。1995 年, *Haemophilus influenzae*, インフルエンザ菌, 約 1.8Mbps のゲノム全配列が明らかにされて以来, 現在までに 160 を超える生命のゲノム全配列が解析されている。さらに, 2005 年までには約 300 種にもおよぶ原核生物および真核生物のゲノム全配列が公開されようとしている。これらゲノム全配列が明らかとなっ

ている種の中で, 最も遺伝子数が少ないものは *Mycoplasma genitalium* で約 500 遺伝子である。しかしながら, ヒトにおける全遺伝子数はおよそ 2~2 万 5 千遺伝子とされており, *M. genitalium* の約 60 倍もの遺伝子をコードしている。生命が地球上に誕生してからヒトに至る約 40 億年におよぶ進化の途上で, どのようにしてこれだけの遺伝子のバリエーションを確保してきたのであろうか。本研究では, 遺伝子のバリエーション獲得の方法として遺伝子重複に着目し, ゲノム全配列が公開されている各生物種内における遺伝子重複の頻度を解析した。

(16) ヒトセントロメアクロマチンファイバー上での動原体タンパク質 CENP-A 結合部位のマッピング

杉本憲治 (大阪府立大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻)

ヒトアルホイド DNA は約 170bp の繰り返し単位からなり, 染色体ごとに特異的な配列と繰り返し単位を持つ。しかも, 幾つかの染色体では同一染色体においてもこの繰り返しには違いが見られ, セントロメアタンパク質 CENP-B が結合する配列に富むものとそうでないものが存在することが知られる。あらかじめ動原体タンパク質 CENP-A を GFP 融合型タンパク質として発現させたヒト細胞株 MDA-AF8-A2 を作成し, 静止期核を界面活性剤を用いて穏やかに処理することでクロマチンファイバー標本を作成した。1 番, 7 番染色体についてそれぞれの 2 種のアルホイド DNA サブファミリー (A3-2, pSD1-1, D7Z1, D7Z2) をプローブに in situ ハイブリダイゼーションを行

いセントロメア DNA を検出するとともに, CENP-A を抗 GFP 抗体を用いて同時に検出し, これら 3 者の位置関係を解析した。1 番染色体において CENP-A 結合部位は CENP-B 結合配列に富む A3-2 ファミリー上で, CENP-B 結合配列がまれな pSD1-1 ファミリーの末端付近にマップされ, 7 番染色体では 2 ケ所検出されたものの, 一つは D7Z1 上で D7Z2 と重なる部分の D7Z1 に近い位置にマップされた。さらに超音波処理したクロマチンを抗 GFP 抗体を用いて免疫沈降し, この画分を用いて染色体 7 番の 2 種のアルホイド DNA について PCR 増幅を行ったところ, D7Z2 配列が約 2 倍多く含まれていた。

(17) 走査型光プローブ顕微鏡の開発と遺伝子検出への応用

吉野智之 (独立行政法人食品総合研究所食品工学部計測工学研究室)

我々は, 走査型プローブ顕微鏡 (SPM) のひとつである走査型光プローブ顕微鏡 (SNOM または NSOM : Scanning near-field optical microscope) を生物学分野に応

用できるように改良した。SNOM は光ファイバを鋭く尖らせた探針 (光プローブ) を SPM と同じ原理で制御することで, 形状と同時に蛍光強度が計測できる。また, DNA-

nanoFISH 法は、FISH (Fluorescence in situ hybridization) 標識した DNA を直線的に基板に固定し、SNOM で直接的に DNA 上の遺伝子を解析する技術である。ここでは λ ファージ *ea47* 遺伝子の 15 塩基配列の PNA (peptide nucleic acid) と λ ファージ DNA の全長をそれぞれ Alexa532, YOYO-1 で染色した。この DNA を Methyltrimethoxysilane 処理したマイカ上に吸上げ法により配向させた後、大気

中、室温で SNOM 計測を行った。蛍光は APD (avalanche photodiode) で検出した。それぞれの蛍光像を重ねた結果、特定の DNA 部位に蛍光標識信号が検出できた。このように、蛍光標識信号の計測が可能なことは、従来の光学顕微鏡や電子顕微鏡では考えられなかった新たな情報の収集が可能になるものと期待できる。

(18) 走査型光プローブ顕微鏡の染色体解析への適用

杉山 滋 (独立行政法人食品総合研究所食品工学部計測工学研究室)

染色体は DNA とタンパク質が複雑に組み合わされた複合体であり、その機能と構造の相関にはまだ不明な点が多く残っている。染色体の構造の理解を深めるには、ナノレベルの分解能での高次構造解析を進めることが重要である。我々の研究室では、走査型光プローブ顕微鏡 (SNOM/AFM, scanning near-field optical/atomic force microscope) の生物学分野への適用を進めており、これまでに DNA, 染色体, 細胞などの生体試料の SNOM/AFM 観察を実現してきた。ここでは、SNOM/AFM を染色体構造解析に適用する試みについて紹介した。

これまでに、SNOM/AFM による FISH シグナル (テロメ

ア及び 45SrDNA) を行ない、通常の蛍光顕微鏡では一点としてしか観察されない FISH シグナルを約 250nm 離れた 2 つの領域として検出することに成功している。また、蛍光像と同時取得した形状像を比較することにより、蛍光強度の分布と染色体のクロマチンファイバー配置との関係についてのデータを得ることも可能である。これらに加えて、現在、単一遺伝子の FISH シグナル検出によるマッピングや免疫蛍光染色との組み合わせによる染色体タンパク質の局在解析も試みている。SNOM/AFM による高分解能観察には、試料の前処理法等の検討すべき点も多いが、将来的に染色体高次構造解析の有用なツールになりうると考えている。

(19) ゲノム生理学会 総括と展望

永山國昭 (自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター)

DNA の構造は今 2 つの言葉で語られている。1 つ目は「化学構造≡塩基配列」、もう 1 つは「物理構造≡トポロジー」である。両者は A-T, G-C という塩基間の特異結合を用いて翻訳される。いやむしろ、塩基配列を知ってトポロジーを推測するという翻訳法が主流だと言ってよい。しかし両言語を媒介する特異結合は自然言語と同じように多義的である。すなわち A-A, G-G, A-G 等々の minor 結合も常に存在する。従って翻訳によるトポロジー推測は物理計測により実証されなければならない。その方法として DNA 研究で久しく忘れ去られていた電子顕微鏡を採用したい。こうした理念をかかげ、4 年前に府立大の加藤助教授が私の研究室に訪れた。本研究会はその

ときから始まった共同研究がきっかけとなり誕生した。

私の土俵である生物物理の立場からみると実はもう 1 つ構造の言葉がほしい。「物理構造≡立体構造」である。そして塩基配列⇔トポロジーという 2 大言語対応を塩基配列⇔立体構造の新言語対応に一気に昇華させたい思いがある。*in vitro* でのこうした研究は必ずやゲノム生理学の本丸である *in vivo* でのクロマチン立体構造/動態と遺伝子特異発現/機能の対応解明に導くと信ずる。

新規開発した電子位相顕微鏡が果たしてどの程度この研究会に寄与できるか、位相法の原理を解説し、位相法の応用 (蛋白質, ウイルス, バクテリア, 細胞, オルガネラ) を紹介した。

17. 唾液腺研究からの生理機能研究, その戦略的展開

2005年2月28日ー3月1日

代表・世話人: 杉谷博士 (日大松戸歯) 村上政隆 (生理研・統合バイオ)

所内対応者: 村上政隆 (生理研・統合バイオ)

(1) のどの渇きと唾液分泌

稲永清敏 (九州歯科大学 健康促進科学専攻・生命科学講座生理学分野)

(2) ラット上唾液核細胞に対する下行性の興奮性および抑制性入力に関する電気生理学的研究

美藤純弘 (岡山大学大学院医歯学総合研究科 口腔生理学分野)

(3) ラット顎下腺からの求心性神経の経路と電気生理学的特性

松尾龍二 (岡山大学大学院医歯学総合研究科 口腔生理学分野)

(4) イメージングによる唾液腺細胞の機能解析・現状と将来展望・

谷村明彦 (北海道医療大学・歯学部 歯科薬理学)

(5) ラット顎下腺導管細胞におけるカルシウムシグナルの解析

東城庸介 (北海道医療大学・歯学部 薬理学)

(6) 耳下腺開口分泌における低分子量 GTP 結合タンパク質の役割

道家洋子 (日本大学・松戸歯学部 生理学)

(7) 耳下腺腺房細胞の分泌顆粒形成における syntaxin 6 の役割

吉垣純子 (日本大学・松戸歯学部 生理学)

(8) 耳下腺腺房細胞における cAMP 分解調節

杉谷博士 (日本大学・松戸歯学部 生理学)

(9) 外分泌腺導管の機能分化に必要な転写因子 CP2-like1

山口良文 (京都大学大学院生命科学研究科, 岡崎統合バイオ分子発生)

(10) 顎下腺の発生・分化・成熟と機能発現

赤松徹也 (徳島大学大学院 HBS 研究部摂食機能制御学口腔分子生理)

(11) 腎臓のアクアポリン水チャネルの分布・動態

高田邦昭 (群馬大学大学院医学系研究科生体構造解析学)

(12) 耳下腺分泌顆粒におけるアクアポリンの存在と浸透圧調節への寄与

松木美和子 (東京歯科大学 病理学)

(13) 耳下腺導管細胞における HCO_3^- 分泌機構—現在のモデルと今後の課題

広野 力 (広島大学大学院医歯薬総合研究所)

(14) クローディンファミリーによる細胞間隙の透過性の制御

古瀬幹夫 (京都大学 医研究科 分子細胞情報学)

(15) 細胞間隙の唾液分泌への寄与

村上政隆 (生理学研究所・統合バイオ)

(16) 急速凍結レプリカ法による唾液腺傍細胞輸送調節機構の検討

橋本貞充 (東京歯科大学 病理学)

【参加者名】

稲永清敏 (九州歯科大), 美藤純弘 (岡山大大学院医歯), 歯), 東城庸介 (北海道医療大歯), 道家洋子 (日本大松戸歯), 松尾龍二 (岡山大大学院医歯), 谷村明彦 (北海道医療大 戸歯), 吉垣純子 (日本大松戸歯), 杉谷博士 (日本大松

戸歯), 桜井 健 (日本大松戸歯), 古山俊介 (日本大松戸歯), 山口良文 (京都大大院, 岡崎統合バイオ), 赤松徹也 (徳島大大院), 高田邦昭 (群馬大大院医), 松木美

和子 (東京歯大), 橋本貞充 (東京歯大), 広野 力 (広島大大院医歯薬), 古瀬幹夫 (京都大大院), 村上政隆 (生理研・統合バイオ)

【概要】

唾液分泌機能の発現にかかわる部品および解剖学的経路の大半は一部分を除き存在が確定された。しかしこれら微視的材料研究の成果は再構成され, 分子レベルの知見は巨視的な機能に具体的に繋がらなければならない。これは唾液分泌研究に留まらず分子生理学研究の大きな目的である。本研究会は唾液腺を縦系に, 1) 身機能と唾液分泌と連関を自律神経/内分泌機能から観測, 2) 唾液腺

神経支配と細胞/細胞間隙機能の活性化, 3) 分泌顆粒内タンパク質の存在様式と維持/放出, 4) 遺伝子による分泌機能の維持と補修のテーマを討論することにより横系として紡ぎ, 巨視的唾液腺機能を従来別個に研究されてきた分子/細胞/神経機能の研究成果を具体的に統合することを目的とし開催された。

(1) のどの渇きと唾液分泌

稲永清敏¹, 佐藤奈緒^{1,2}, 小野堅太郎¹, 本田栄子¹, 芳賀健輔², 横田誠²

(¹九州歯科大学・生命科学講座・生理学分野, ²九州歯科大学・口腔治療学分野・歯周病制御再建学分野)

唾液腺には M3 受容体が存在し, 催唾剤であるピロカルピンが作用することにより唾液分泌が促進される。一方, 脳室周囲器官や視床下部にある口渇中枢にも M1/M3 受容体が存在し, 活性化されることにより口渇感を引き起こす。ラットの腹腔内にピロカルピンを注入すると唾液分泌ばかりでなく, 飲水行動が誘発されることが報告されている。誘発された唾液分泌促進効果は, 脳室への高濃度のアトロピン投与や脳室周囲器官の破壊により減弱されることから, ピロカルピンは中枢に作用し, 唾液

分泌を促進していると考えられていた。つまり, ラットでは, ピロカルピンが一方では, 口腔内の湿潤性を高め, もう一方では, 同じような経路を介して口渇感を誘発している可能性が指摘されていた。われわれは, 無麻酔・無拘束下で, ラットの腹腔内・脳室内ピロカルピン投与に対する飲水量および唾液分泌量を測定し, ピロカルピンの作用部位と生理的意義について検討した。スライス標本を用いた電気生理学的実験の結果と併せて報告する。

(2) ラット上唾液核細胞に対する下行性の興奮性および抑制性入力に関する電気生理学的研究

美藤純弘 (岡山大学大学院医歯学総合研究科 口腔生理学分野)

ラットが食物摂取をしているときには多量の唾液分泌が生じる。この唾液分泌には, 口腔領域からの感覚入力と摂食中枢などの上位中枢からの下行性入力の影響が考えられる。本研究では, 顎下腺に分布する副交感神経の一次中枢である上唾液核に対する下行性入力を電気生理学的に検討した。Wistar 系の幼若ラットの上唾液核細胞を逆行性に蛍光標識した。更に一部の動物は上位脳からの入力を遮断する為に記録側の除脳手術を行った。矢状断スライス標本を作成し, 標識細胞からホールセルパッ

チクランプ法により, 電気刺激による誘発性シナプス電流を記録した。除脳動物における多くの上唾液核細胞では, 興奮性および抑制性シナプス後電流の大きさが増加していた。この現象は, 除脳により上位中枢からの下行性神経が変性した為に神経伝達物質の放出が減少し, シナプス後膜受容体の感度が上昇したことが原因と考えられる。上唾液核細胞は上位中枢から下行性の興奮性および抑制性入力を受けていることが示唆された。

(3) ラット顎下腺からの求心性神経の経路と電気生理学的特性

松尾龍二 (岡山大学大学院医歯学総合研究科 口腔生理学分野)

唾液腺炎や唾石症のときに疼痛が発生することから、唾液腺には感覚神経が分布すると考えられている。本研究では、まずラット顎下腺を対象にして感覚神経の中樞への入力経路をWGA-HRPを用いて組織化学的に検索した。つぎに、感覚神経の活動様式を電気生理学的に分析した。その結果、1) 感覚神経は遠心路である交感神経と副交感神経の経路中を走行しており、交感神経の経路中の感覚神経は主に脊髄後根神経節を通過し、副交感神経の経路中の感覚神経は主に三叉神経節を通過することが分かった。2) これらの感覚神経にはともに自発活動は無く、顎下腺体を圧迫すると応答した。また顎下腺導管に

カニユーレを装着し、逆圧を負荷すると圧に比例して放電頻度が増加した。3) 放電の閾値は最大分泌圧よりやや小さいものの、導管系にとっては大きな負荷であると考えられる。4) カニユーレからBradykininなどの発痛物質を注入すると、高頻度で発火した。以前の組織化学的研究では、substance PとCGRPを含む線維(感覚神経)は腺体内の導管と血管の周囲に存在する。今回の結果から、唾液腺の感覚神経は圧や痛みの情報を伝達しており、導管内圧や血圧の過度な上昇を反射的に調節している可能性がある。

(4) イメージングによる唾液腺細胞の機能解析・現状と将来展望・

谷村明彦 (北海道医療大学・歯学部・歯科薬理学教室)

生きた細胞のダイナミックな変化をリアルタイムで可視化できるイメージングによって、 Ca^{2+} シグナルの詳細が明らかにされてきた。さらに近年、GFPなどの蛍光タンパク質を利用して、受容体、リン酸化酵素、転写因子など様々なタンパク質の分子動態の解析が可能になった。特に、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を利用した新しい分子センサーの開発やタンパク質相互作用の解析法によって、研究の可能性が広がっている。こうした蛍光タンパク質を用いた研究から、様々な細胞内分子の動態

が、時間・空間的に調節されている事がわかってきた。

これまで我々は、培養細胞や分離唾液腺細胞を用いたイメージングによって、細胞内情報伝達物質やそれらに関係するタンパク質の分子動態を調べてきた。現在、より生体に近い条件で機能解析を行うために、耳下腺スライスを用いたイメージングを試みている。これらの結果とあわせて、イメージングの現状や生きた動物を用いた「in vivo イメージング」への展望と課題について議論したい。

(5) ラット顎下腺導管細胞におけるカルシウムシグナルの解析

東城庸介 (北海道医療大学・歯学部・歯科薬理学教室)

カルシウムシグナルは唾液腺導管部の電解質輸送の調節に重要な役割を果たしていると考えられるが、導管細胞の単離調製が難しいことなどから導管部のカルシウム情報伝達機構の研究は腺房部の研究に比べて遅れている。我々は、Percoll遠心分離法によってラット顎下腺の単離導管細胞を調製し、受容体刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃

度($[\text{Ca}^{2+}]_i$)の変化を解析した。その結果、導管細胞には腺房細胞にはない β -受容体を介した Ca^{2+} 動員機構が存在することが示された。さらに、 Ca^{2+} イメージングシステムを用いてアゴニスト刺激による導管細胞と腺房細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 応答を同時に測定した。腺房細胞はサブスタンスPやムスカリン受容体アゴニストに対して高い反応性を

示したのに対し、導管細胞はエピネフリンに対して高い反応性を示すことが明らかになった。また、導管細胞と腺房細胞の受容体 mRNA 発現を RT-PCR 法により解析

し、 $[Ca^{2+}]_i$ 応答と mRNA 発現との相関性を比較したので、併せて報告する。

(6) 耳下腺開口分泌における低分子量 GTP 結合タンパク質の役割

道家洋子（日本大学 松戸歯学部 生理学）

耳下腺腺房細胞では、 β アドレナリン受容体刺激によりサイクリック AMP (cAMP) が上昇し、アミラーゼの開口放出が引き起こされる。しかしその詳細なメカニズムは、まだ明らかではない。われわれは cAMP 依存性のアミラーゼ開口放出における低分子量 GTP 結合タンパク質(SMG)の役割に注目し、検討を進めている。今回はラ

ット耳下腺腺房細胞における SMG について紹介し、特に細胞内小胞輸送に関わっていることが知られている Arf1 の開口放出への関与と、細胞骨格系の制御に関わっていることが報告されている Rho の活性化が cAMP 依存性開口放出に関わることを報告する。

(7) 耳下腺腺房細胞の分泌顆粒形成における syntaxin6の役割

吉垣純子（日本大学松戸歯学部生理学教室）

耳下腺腺房細胞において、アミラーゼは分泌顆粒に貯留され刺激依存的に分泌される。分泌顆粒は最初未成熟な物が形成され、徐々にアミラーゼが濃縮され成熟していくと考えられている。我々は分泌顆粒の形成過程の解析を試みた。ラット耳下腺分泌顆粒を、パーコール密度勾配遠心法により、低密度および高密度画分に分離した。低密度画分を未成熟な分泌顆粒、高密度画分を成熟分泌顆粒と予想し、解析を行った。膜タンパク質の分布を調べたところ, syntaxin6 および VAMP4 は低密度画分の方に

多く検出された。それに対して、VAMP2 および SNAP-23 は高密度画分に濃縮されていた。次に分泌顆粒形成における syntaxin6 の役割を調べるために, syntaxin6 遺伝子の欠失変異体を作成し、耳下腺腺房細胞の初代培養系に遺伝子導入を行った。その結果、変異遺伝子を導入した細胞では、他の細胞に比べ分泌顆粒の数が減少していた。したがって、分泌顆粒がゴルジ体から形成される際に、syntaxin6 が必要であると考えられる。

(8) 耳下腺腺房細胞における cAMP 分解調節

杉谷博士¹、西連寺央康²、古山俊介¹（日本大学松戸歯学部¹生理学教室、²歯科麻酔学講座）

耳下腺腺房細胞においては β アドレナリン受容体の活性化は細胞内サイクリック AMP (cAMP) 上昇を介し、糖質分解酵素であるアミラーゼの開口放出を引き起こす。細胞内 cAMP 濃度は、合成酵素であるアデニル酸シクラーゼと分解酵素であるサイクリックヌクレオチドホスホジエステラーゼ (PDE) により調節される。ウサギ耳下腺腺房細胞を用いて β 受容体刺激によるアミラーゼ分

泌は PDE 阻害剤であるロリプラム存在下で促進された。また、 β 受容体刺激による cAMP 濃度上昇もロリプラムにより促進された。ウサギ耳下腺腺房細胞より部分精製した cAMP-PDE 活性はロリプラムにより阻害された。これらのことから、ウサギ耳下腺腺房細胞において cAMP 依存性の開口放出にはロリプラム感受性の PDE アイソフォーム (PDE4) が関わっていることが示唆された。

(9) 外分泌腺導管の機能分化に必要な転写因子 CP2-like1

山口良文^{1,2}, 高田慎治²

(¹ 京都大学大学院生命科学研究科, ² 岡崎統合バイオサイエンスセンター分子発生研究室)

外分泌腺の導管部は、腺房部で生成された分泌液から水や電解質の再吸収を行い分泌液の組成を調節するという共通の機能を持つ。従って外分泌腺導管部の機能分化には共通した遺伝子発現プログラムがあると推察されるが、その実体は不明である。私は ES 細胞を用いた遺伝子トラップ法により胚発生に関与する遺伝子を探索する過程で、唾液腺、涙腺などの外分泌腺の導管部と腎遠位側尿細管で特異的に発現する CP2L1(Transcription Factor CP2-like1)遺伝子座に遺伝子トラップベクターが挿入された変異マウスを得た。CP2L1 の生体内での機能を調べ

るため、我々はこの挿入変異をホモに持つ個体を作製した。生理学的解析からホモ個体では腎機能低下及び唾液腺導管部機能異常が示唆された。CP2L1 は唾液腺導管と腎集合管・遠位尿細管で発現する。挿入変異ホモ個体ではこれらの組織自体は認められたが、これらの部位で共通に発現するケラチン 7 の発現が消失していた。同様に CP2L1 の発現するその他の外分泌腺 (涙腺、鼻腺) でもケラチン 7 の発現が消失していた。以上の結果から、CP2L1 は様々な外分泌腺導管部に共通の遺伝子発現を成立させるために必要な転写因子であると考えられる。

(10) 顎下腺の発生・分化・成熟と機能発現

赤松徹也, 細井和雄 (徳島大学大学院 HBS 研究部摂食機能制御学講座口腔分子生理学分野)

唾液腺は上皮-間葉相互作用により形成される。この過程では TGF β ファミリー等の増殖因子群が重要な役割を果たしている。我々は増殖因子等の不活性型前駆体蛋白質の活性化に関わるプロセシング酵素 SPC と唾液腺の重要な生理機能である唾液分泌に関わる水チャネル AQP5 に着目し、ラット胎仔顎下腺器官培養系により顎下腺の発生・分化・成熟と機能発現の制御機構について解析している。胎生 15 日 SD ラット胎仔顎下腺を各種阻害剤等の存在下で培養し、形態変化、および AQP5 等の発現を RT-PCR により解析した。SPC に共通の阻害剤 Dec-RVKR-CMK 存在下で分枝形成と AQP5 発現が抑制されたが、他のトリプシン様セリンプロテアーゼ阻害剤

では抑制されなかった。この時、SPC ファミリーの PACE4 の発現も減少したが、同ファミリーの furin の発現は減少しなかった。PACE4 は furin と異なりヘパリン結合配列を有し細胞外マトリクスに局在することから、分枝形成へのヘパリンの影響を解析した結果、分枝形成と AQP5 発現は共に抑制された。また、PACE4 触媒領域に対する特異抗体でも分枝形成と AQP5 発現は共に抑制され、Dec-RVKR-CMK による分枝形成と AQP5 発現の抑制はレコンビナント BMP2 を加えることで回復した。以上より顎下腺の分枝形成は PACE4 により活性化される増殖因子等のシグナル伝達の結果促進され、AQP5 発現が誘導されることが示唆された。

(11) 腎臓のアクアポリン水チャネルの分布・動態

高田邦昭, 松崎利行, 多鹿友喜 (群馬大学大学院医学系研究科生体構造解析学)

腎臓には AQP1-4 をはじめとして複数の水チャネルアクアポリンが部位特異的に発現している。なかでも集合管主細胞に発現する AQP2 は、尿濃縮において決定的に

重要な役割を果たしていて、AQP2 の変異は尿崩症の原因のひとつにもなっている。AQP2 は細胞内の小胞に貯蔵されていて、抗利尿ホルモン刺激により頂部細胞膜へと移

行し、その水透過性を上げる。AQP2を発現させたMDCK細胞を用いて、AQP2の細胞内動態を観察することができる。非刺激時にはAQP2は、頂部細胞膜直下に位置するRab11陽性の頂部リサイクリングエンドソームに主として分布する。フォスコリン刺激によりこれらは頂部細胞膜へ移行するが、フォスコリンを除くとAQP2はエンド

サイトシスにより、まず核上部に位置するEEA1陽性の初期エンドソームに取り込まれ、ついで頂部リサイクリングエンドソームへと復帰する。このようなAQP2のトラフィックは、PI3キナーゼ、アクチン、微小管、Rab11などにより調節されている。

(12) 耳下腺分泌顆粒におけるアクアポリンの存在と浸透圧調節への寄与

松木美和子^{1,2}, 橋本貞充¹, 下野正基¹, 吉垣純子², 道家洋子², 古山俊介², 杉谷博士², 村上政隆³
(¹東京歯科大学 病理学・口腔科学研究センター, ²日本大学松戸歯学部 生理学, ³生理研・ナノ形態)

Aquaporin (AQP) は、様々な組織の細胞形質膜に存在する水チャネルで、唾液腺ではAQP1, 4, 5, 8の存在が報告されている。近年、AQPは細胞内小器官にも存在することが明らかとなりつつあることから、唾液腺腺房細胞の腺腔側膜に局在することが知られているAQP5について詳細な検討を行った。形態学的観察とwestern blottingにより、ラット耳下腺の分泌顆粒膜上にAQP5が存在することが明らかとなった。そこで、分泌顆粒におけるAQP5の機能を解明するため、Thevenodらの方法を用い、分泌顆粒の溶解を吸光度540 nmにて測定し、抗AQP5抗体の影響を検討した。その結果、抗AQP5抗体は濃度依

存性および時間依存性に分泌顆粒の溶解を促進した。さらに、溶媒よりCl⁻イオンを取り除いたところ、抗AQP5抗体による分泌顆粒の溶解は完全に阻害された。同じ現象は、陰イオンチャネル阻害剤を用いても確認された。これらのことからAQP5は、分泌顆粒の浸透圧調節に関与することが明らかとなった。さらにその他のAQPアイソフォームについても同様の方法で検討したところ、AQP6が耳下腺に存在することが明らかとなった。そして、抗AQP6抗体により分泌顆粒の溶解が促進されることから、AQP6もまた、分泌顆粒の浸透圧調節に関与することが示唆された。

(13) 耳下腺導管細胞におけるHCO₃⁻分泌機構—現在のモデルと今後の課題

広野 力, 柴 芳樹, 杉田 誠, 岩佐 佳子
(広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 病態探究医科学講座 口腔生理学研究室)

ラット耳下腺導管はHCO₃⁻を分泌するが、その分泌機構には不明な点が多い。我々は、従来のホールセルパッチクランプ法に比べ格段に生理的条件に近い陰イオン環境でHCO₃⁻分泌を電流として測定できるグラミシジン穿孔パッチ法を用いて分泌機構を解析してきた。現在までに、グラミシジン穿孔パッチ法による膜電位固定下のラット耳下腺導管細胞ではCa²⁺系やcAMP系の刺激でHCO₃⁻は交換体ではなくイオンチャネルを介して分泌されること、経細胞的な輸送ではなく主に細胞内で産生されたHCO₃⁻が分泌されること、分泌刺激時に細胞内のHCO₃⁻

濃度が上昇し駆動力を増大させ積極的に分泌を促進していることが示唆された。さらにグラミシジン穿孔パッチ法により得られた細胞レベルのHCO₃⁻分泌量から耳下腺全体での分泌量を推定し、実際の唾液分泌量やイオン濃度の測定値と比較した結果や電気的中性を保つためにHCO₃⁻分泌と同時に細胞外に放出される陽イオンあるいはHCO₃⁻の代わりに細胞内に流入する陰イオンの候補および水分分泌駆動の可能性についての考察を行い、より生理的な分泌機構に迫りたい。

(14) クローディンファミリーによる細胞間隙の透過性の制御

古瀬幹夫 (京都大学大学院医学研究科分子細胞情報学講座)

上皮シートを横切る物質輸送経路のうち、細胞間隙を介する paracellular pathway では、タイトジャンクション (TJ) と呼ばれる細胞間接着構造が溶質の自由拡散を制限している。興味深いことに、この TJ の「バリア」は、上皮のタイプによって電気生理学的に測定できるコンダクタンスや電荷選択性が異なり、その違いが各々の上皮の生理機能に重要な役割を果たしているといわれる。TJ を構築する主要な接着分子であるクローディンは 20 以上

のタイプからなる遺伝子ファミリーを構成しており、TJ のバリア機能にも直接関与する。各組織は特有の組み合わせのクローディン分子を発現することによって paracellular pathway の輸送特性を調節していると予想され、実際に、特定のクローディンを強制発現させた上皮細胞株やクローディンの遺伝子欠失マウスの解析からこの考えが証明されつつある。

(15) 細胞間隙の唾液分泌への寄与

村上政隆

(自然科学研究機構生理学研究所 統合バイオ・ナノ形態生理学)

原唾液は細胞の中からの分泌と傍細胞経路を通過した成分との混合物であり、血液成分は唾液に移行するのはこのためである。ラット摘出血管灌流顎下腺を用い、標識デキストランをプローブとして分子径に対する分泌プローブの唾液/灌流液比を、muscarine 受容体刺激中に求めると、Stokes-Einstein の拡散式に従う通路と半径 5 Å 以下の分子を通すフィルター特性を持つ通路が見い出された。後者は、水の分子半径 1.5 Å で 1 の値に外挿され、水のほとんどが細胞間隙/tight junction を通過することを示唆した。一方、管腔に導入した蛍光色素の希釈経過から細胞経由の水分泌を求め、灌流腺の分泌量と比較すると、刺激初期一過性に細胞内よりの水分放出が優位であ

り、持続刺激期には傍細胞輸送経路を通過する水分が腺を経由する水分より多いことが示された。これは分泌刺激経過に応じ水通過に対する細胞間隙の開閉が行なわれていることを示している。muscarine 受容体刺激に β -adrenergic 受容体刺激を重畳させると灌流液から移行する基質の唾液濃度が上昇することが知られていたが、分泌速度との比較が不十分であり細胞間隙の開閉の直接的な証拠にはならなかった。今回蛍光色素 Lucifer Yellow の唾液/灌流液の蛍光強度比が分泌速度に依存しわずかに上昇することが認められ、細胞間隙の開閉が開口分泌誘発時に起こることが支持された。

(16) 急速凍結レプリカ法による唾液腺傍細胞輸送調節機構の検討

橋本貞充, 村上政隆

(東京歯科大学病理, 自然科学研究機構生理学研究所・統合バイオ・ナノ形態生理)

ラット唾液腺における tight junction (TJ) を介した傍細胞輸送経路 (para-cellular pathway) による水および蛋白質の選択的透過の機構に焦点を当てその超微細構造の変化を検討した。実験には Wistar 系雄ラットより摘出した

顎下腺を用い、pH 7.4 の 10 mM HEPES 緩衝液にて灌流し、isoproterenol (1 μ M) と carbachol (1 μ M) 刺激時の TJ の構造変化について、新鮮組織の液体ヘリウム急速凍結試料を用いた freeze-fracture replica 法により検討した。

分泌刺激後では、分泌顆粒の細胞間分泌細管部の腺腔側膜への癒合にともなって **microvilli** が消失し、膜内粒子で構成される TJ の網目構造が基底側に広がるとともに、**free end** や **terminal loop** が増加した。さらに断面像では、TJ を構成する膜内粒子と細胞膜を裏打ちするごく短かい微細線維を介して、分泌刺激後も直下の **actin** 線維

と直接結合しているのが認められた。これらのことから、分泌時の急速な細胞骨格系の改変にともない、TJ を構成する内在性膜蛋白と細胞膜裏打ち蛋白が、腺腔側膜直下の **actin** 線維との密接な関連を持ちながら局在を変化させることにより、傍細胞輸送経路の透過性が亢進している可能性が示された。

18. バイオ分子センサー研究会

2004年9月9日－9月10日

代表：富永真琴（岡崎統合バイオサイエンスセンター）

所内対応者：岡村康司（岡崎統合バイオサイエンスセンター）

(1) 新規の電位感受性酵素 VSP の構造と機能

岡村 康司, 村田 喜理, 佐々木 真理, 岩崎 広英
(岡崎統合バイオサイエンスセンター・神経分化)

(2) 新規温度感受性チャネル TRPM2 によるインスリン放出機構

富樫和也, 東智広, 富永知子, 富永真琴 (岡崎統合バイオサイエンスセンター・細胞生理部門)
原雄二, 森泰生 (京都大学大学院・工学研究科)
小西康信 (三重大学・医学部・生理学第一講座)

(3) 細胞の機械刺激受容の分子機構と形態変化

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

(4) TRPV4 は尿流量を感知する

鈴木誠, 谷口淳一, 鶴岡秀一, 水野敦子 (自治医科大学・薬理学講座)

(5) 心筋カバオラ局在イオンチャネルのバイオセンシング機構

古川哲史 (東京医科歯科大学・難治疾患研究所・生体情報薬理分野)

(6) アミノ酸トランスポーターを取り巻くタンパク質間相互作用

金井好克 (杏林大学・医学部・薬理学講座)

(7) 植物ステロール誘導体に反応するコレステロール代謝センサー LXR

槇島誠 (日本大学・医学部・生化学講座)

(8) 内因性一酸化窒素の直接酸化によるカルシウムチャネル TRPC5 の活性化

吉田卓史, 森泰生 (京都大学大学院・工学研究科)

(9) 共鳴ラマン分光法によるセンサーヘム蛋白質の構造化学的研究：可溶性グアニレートシクラーゼの最近の話題

北川禎三 (岡崎統合バイオサイエンスセンター・生体分子研究部門)

(10) ROS センサーアニオンチャネルとアポトーシス誘導

清水貴浩, 沼田朋大, 岡田泰伸 (生理学研究所・機能協関部門)

(11) 活動電位を発生するマウス味細胞の応答と発現分子の解析

吉田竜介, 重村憲徳, 安松啓子, 二ノ宮裕三 (九州大学大学院・歯学研究院)

(12) 逆推定法による微細構造体内 cAMP 変動の実時間測定

竹内裕子, 倉橋隆 (大阪大学大学院・生命機能研究科)

(13) 脳内 Na^+ センサー： Na_x チャネルの生理的役割

檜山武史 渡辺英治 野田昌晴 (基礎生物学研究所・感覚情報処理部門)

(14) GFP を用いたカルシウムプローブ G-CaMP による平滑筋カルシウムの解析

中井淳一 (理化学研究所・脳科学総合研究センター・記憶学習機構研究チーム)

(15) プロトンチャネルの recruitment と活性振動

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

(16) Rab3 エフェクターNoc2 の開口分泌における役割

三木隆司, 清野進 (神戸大学大学院・医学系研究科)

松本正成 (千葉大学大学院・医学研究院)

(17) リガンド投与による代謝型グルタミン酸受容体細胞内領域の二量体構造の動的変化

立山充博, 久保義弘 (生理学研究所・神経機能素子部門)

【参加者名】

森 泰生, 原 雄二, 清中 茂樹, 吉田 卓史, 飯沼 ゆり子, 三木 崇史, 吉留 徹, 瓜生 幸嗣 (京都大大院・工), 金井 好克 (杏林大・医), 松尾洋孝 (防衛医大), 吉田 竜介 (九州大大院・歯), 古川哲史 (東京医科歯科大), 榎島 誠, 川名 克芳 (日本大・医), 鈴木 誠, 須崎 正隆 (自治医大), 中井 淳一 (理研), 三木 隆司 (神戸大大院・医), 久野 みゆき (大阪市大大院), 川脇 順子 (大阪市大), 辰巳 仁史, 町山 裕亮 (名古屋大大院・医), 水村 和枝, 片野坂 公明 (名古屋大), 倉橋 隆, 竹内 裕子 (大阪大大院), 小田-望月 紀子, 楠野 智幸 (立命館大), 久保 伸

夫, 大谷 真喜子, 沈 静 (関西医大), 野田 昌晴, 渡辺 英治, 檜山 武史 (基生研), 岡田 泰伸, R.Sabirov, 清水 貴浩, 高橋 信之, 井上 華, 沼田 朋大, 久保 義弘, 立山 充博, 藤原 祐一郎, 長友克広, 鍋倉 淳一, 西巻 拓也, 温井 美帆, 加勢 大輔, 本蔵 直樹, 箕越 靖彦, 緒方 衡 (生理研), 北川 禎三, 永山 國昭, 松本 友治, 木村 有希子, 岡村 康司, 岩崎 広英, 久木田 文夫, 村田 喜理, 佐々木 真理, 富永 真琴, 富永 知子, 柴崎 貢志, 森山 朋子, 富樫 和也, 東 智広, 村山 奈美枝, 三村 明史 (統合バイオ)

【概要】

生体内の全ての細胞は, 細胞内外環境の大きな変化の中でその環境情報を他のシグナルに変換し, 細胞内や周囲の細胞に伝達することによって環境変化に対応しながら生存している。細胞が存在する臓器・組織によって細胞が受け取る情報信号は異なり, 従って細胞が備えている情報信号を受信する機能も異なる。最近, 形質膜の代謝型受容体のみならず, チャネルやトランスポーターなどの膜輸送蛋白質も, さらに細胞質内タンパク質も情報センサーの働きをしていることが明らかになりつつある。これらのバイオ分子センサータンパク質は種々の化学的, 物理的, 生理的情報を受容して他のシグナルに速やかに変換する能力を持っている。バイオ分子センサータンパク質の構造と機能やそのシグナル変換機序を解明していくことは, 生命科学の本質である「細胞の生存」を解明するうえで極めて重要である。バイオ分子センサ

ーの欠損・機能不全は細胞の機能不全を招来し, ひいては生体恒常性維持機構の破綻から疾患につながる。また, バイオ分子センサータンパク質の機能制御は細胞の生死を左右することから, 機能制御機構の解明は種々の疾患の治療薬創成の礎となる。こうしたバイオ分子センサータンパク質の構造と機能の解明を, 既に遺伝子の明らかになっている分子の研究を中心に新たな分子の探索も含めて, 分子生物学, 生化学, 生理学, 細胞生物学の融合的研究によって推進するためにこの研究会を開催した。17の演題発表があり, 電位センサー, 温度センサー, 機械刺激センサー, アミノ酸センサー, 脂質センサー, 活性酸素種センサー, ガスセンサー, 味物質センサー, 匂いセンサー, Na^+ センサー, Ca^{2+} センサー, H^+ センサーなど多岐にわたった。活発な討論, 情報交換がなされ, 「バイオ分子センサー」研究の発展に有益な会であった。

(1) 新規の電位感受性酵素 VSP の構造と機能

岡村 康司^{1,2,3}, 村田 喜理¹, 佐々木 真理^{1,3}, 岩崎 広英^{1,2,3}

(1) 岡崎統合バイオサイエンスセンター, (2) 生理学研究所, (3) 総合研究大学院大学)

ユウレイボヤゲノムから, 電位依存性チャネルの膜貫通領域と類似する領域を有するが, チャネルのポアの構造が見当たらず, 代わりに酵素のドメインを有するタンパク (VSP: voltage sensor-containing protein) をコードす

るとされる遺伝子を得た。

酵素ドメインのみからなる GST 融合タンパク質を大腸菌で発現させて精製した。Malachite green assay 法による吸光度測定によって脱リン酸化反応の測定を行ったと

ころ、時間依存的な脱リン酸化活性が確認された。この活性は、活性中心と思われる部位を置換した分子や GST のみのタンパクでは認められなかった。

この分子の一次構造から予測される電位感受性を証明するため、ツメガエル卵母細胞に cRNA を強制発現させた。数 μA に到る顕著な「ゲート電流」を認めた。この「ゲート電流」は、電位センサーの陽電荷を減らすようなアミノ酸置換により消失した。従って、VSP は電位依存

性チャンネルに見られるのと同様な電位センサーを有することが明らかになった。

VSP が電位を感知して、かつ酵素活性を有することから、酵素活性が膜電位によって制御されるのではないかと考え、更にツメガエル卵母細胞において、膜電位を変化させつつ酵素活性を検出する電気生理学的実験を行った。これにより、酵素活性が電位センサーの働きによって膜電位依存的に変化するという証拠を得た。

(2) 新規温度感受性チャンネル TRPM2によるインスリン放出機構

富樫和也¹, 原雄二², 東智広¹, 小西康信¹, 富永知子³, 森泰生², 富永真琴³

(¹ 三重大学医学部, ² 京都大学大学院工学研究科, ³ 岡崎統合バイオサイエンスセンター・細胞生理)

TRPM2 を強制発現させた HEK293 細胞では、パッチクランプ法による解析により、熱刺激によって陰性電位において内向き電流が観察された。これまで明らかにされていた有効刺激 $\beta\text{-NAD}^+$, ADP-ribose (ADPR) によって活性化した電流は熱刺激によって著しく増強された。さらに、室温では TRPM2 を活性化しない cyclic ADPR (cADPR) は、熱刺激存在下にのみ大きな活性化電流をもたらす有効刺激であることが明らかとなった。この熱活性化 TRPM2 チャンネルはその活性化温度閾値がおおよそ 36 度近傍であり、直線的な電流電圧関係を示す 2 価の陽イオンの透過性が大きい非選択性陽イオンチャンネルとして機能するこ

とも判明した。単一チャンネル電流記録から、熱によって直接 gate されること、 Na^+ に対して約 60pS のコンダクタンスを有することも分かった。cADPR による活性化が見られることから膵臓における発現を検討したところ、膵 β 細胞特異的な発現が観察された。そこで、TRPM2 を発現するラットインスリノーマ由来の RIN-5F 細胞に熱刺激を加えたところ、同じ特性を持つ熱活性化電流が観察された。また、ラット単離膵 β 細胞でも同様な熱活性化細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が観察され、熱刺激によるインスリン分泌が確認された。

(3) 細胞の機械刺激受容の分子機構と形態変化

辰巳仁史^{1,4}, 清島大資², 河上敬介^{2,3}, 井上真寿美^{2,3}, 早川公英⁵, 曾我部正博^{1,5}

(¹ 名古屋大院・医学系・細胞情報医学, ² 名古屋大院・医学系・リハビリテーション, ³ 名古屋大・医・保健, ⁴ CREST・JST, ⁵ ICORP・「細胞力覚」・JST)

細胞に機械刺激を加えると数秒内にアクチン繊維でできたストレスファイバーが切断または消失し細胞底面の接着斑に加わる力が減少する。そして、細胞底面の integrin が機械刺激後 clathrin 依存的な endocytosis によって細胞内に取り込まれ、接着斑が消失する。また、この現象には細胞外から細胞内への Ca^{2+} の流入が関与している。しかし、細胞底面の接着斑への機械刺激から integrin 取り込みまでの細胞内 signal 伝達是不明である。

血管内皮細胞を $\beta 1$ integrin の細胞外ドメインを認識する抗体で染色し、血管内皮細胞の上面に fibronectin を coat した直径 10 μm の glass bead を接着させる。この bead を数 μm 移動することにより細胞底面の接着斑へ局所的に機械刺激を加える。bead 移動後の integrin-cluster の動態や、細胞と細胞外基質との間の接着状態の変化は、近接場光顕微鏡や反射干渉顕微鏡を用いて細胞のライブ観察する。

この実験系から、bead 移動により機械刺激が負荷された接着斑の integrin-cluster は、数秒以内に細胞底面から消失を開始する。これは接着斑の integrin の clathrin 依存

的な endocytosis による細胞内への取り込みによるもので、この反応には接着斑構成蛋白質のチロシン脱リン酸化が関係していると考えられた。

(4) TRPV4は尿流量を感知する

鈴木誠，谷口淳一，鶴岡秀一，水野敦子（自治医大・薬理学）

TRPV4 は Ca 透過性メカノセンサーチャネルである。細胞内 Ca を測定し、swell-activated Ca increase が DCT で消失していることを確認した。

1. バランスケージで電解質測定を行った。定常状態では尿中 Na 濃度が低かった。Na 制限食，負荷によってもこの変化は変わらなかった。
2. サイアザイド，フロセマイドを負荷して，尿流量の増加を図り，特に流量に依存して，Na 濃度が変化する機構に異常がある可能性が考えられた。
3. 麻酔下点滴管理によりホルモンの修飾を取り除いた状態で計測した。フロセマイド+2%NaCl 投与で，Na 濃度，TcH₂O に差があり，K には差が無いことが明らかに

なった。

4. CCT を単離還流し，flow 圧を 5cm H₂O から 15cm H₂O に変化させた。JNa はこの flow の変化により，上昇し，VT も深くなる。しかし，TRPV4 ノックアウトマウスではこの変化はまったく観察されなかった。TRPV4 の刺激薬である 4αPDD10 μM は，15cm H₂O 下のワイルドマウスでのみ効果が明らかであった。

【結論】TRPV4 は flow-dependent Na flux に関与している。従来の考えと異なり，flow-dependent 機序は少なくともマウスにおいて，尿中電解質の大きな変化はもたらさないといえる。

(5) 心筋カベオラ局在イオンチャネルのバイオセンシング機構

古川哲史（東京医科歯科大学・難治疾患研究所・生体情報薬理分野）

我々は，カベオラにおける“チロシンキナーゼ型受容体刺激—PI3-kinase—Akt(PKB)—eNOS—イオンチャネル”という心血管系の新たなイオンチャネル制御のシグナル伝達経路を明らかにしたが，このシグナル伝達経路は以下のバイオセンシング機構に関与する。

1. 心筋細胞では，収縮を感知して活動電位にフィードバックすることにより収縮の強度を微調節する negative feedback 機構“mechano-electrical feedback”が存在する。このメカニズムとして細胞外マトリックス・インテグリンを介する eNOS 活性化による心筋カリウム電流 I_{Ks} の活性化が関与する。

2. 心筋細胞では，細胞内 Ca²⁺ 濃度を感知して活動電位にフィードバックすることにより Ca²⁺ 流入量を微調節するフィードバック機構が存在する。eNOS は Akt あるいは calmodulin 依存性に活性化されるが，Ca²⁺によるイオンチャネル制御には calmodulin 依存性 eNOS 活性化が関与する。

3. 心血管系細胞では，性ホルモン受容体はカベオラに局在しており，遺伝子転写を介さず Akt 依存性に eNOS を活性化すること，すなわち non-nuclear (non-genomic) pathway がイオンチャネル制御に関与している。

(6) アミノ酸トランスポーターを取り巻くタンパク質間相互作用

金井好克 (杏林大学医学部・薬理学教室)

ヘテロ二量体型アミノ酸トランスポーターは、12回膜貫通型の活性サブユニットと、1回膜貫通型の補助サブユニットがジスルフィド結合により連結して形成される。補助サブユニットの1つである 4F2hc (4F2 heavy chain; CD98) は、N-末端細胞内ドメインを介してインテグリンの β -鎖と相互作用し、アミノ酸トランスポーター、インテグリン、4F2hc からなる複合体を形成する。インテグリンのリガンドによりアミノ酸取り込み能が上昇し、この上昇はインテグリンの機能抑制や 4F2hc の細胞内ドメインの過剰発現により阻止された。この効果は速やかに生じ、インテグリンシグナルを伝える FAK (focal

adhesion kinase) のノックダウンにより影響されなかったことから FAK を介さない経路によることが示唆された。また、ヘテロ二量体型アミノ酸トランスポーターの活性サブユニットの C-末端には電位依存性 Ca チャネル Cav1.2 の "targeting domain" と相同な配列があり、この部分の deletion により補助サブユニットとの連結が障害され、膜移行が障害されることが明らかとなった。活性サブユニットの C-末端の deletion による解析の結果、C-末端は複数のタンパク質間相互作用に関わるドメインがあり、これを介して多岐に渡る調節を受ける可能性が示唆された。

(7) 植物ステロール誘導体に反応するコレステロール代謝センサーLXR

榎島誠 (日本大学医学部生化学)

植物ステロールまたは代謝産物が LXR のリガンドとして機能しているとの仮説をたて、植物ステロール及びそれらの誘導体の LXR に対する効果を検討した。その結果、エルゴステロール誘導体 (22E)-ergost-22-ene-1 α ,3 β -diol (YT-32) に LXR α 及び LXR β を活性化作用があることを見出した。マウスを用いて、非ステロイド性合成 LXR アゴニスト T0901317 とエルゴステロール誘導体 YT-32 の効果を比較検討した。T0901317 の経口投与は、肝臓でのステロール排出ポンプ ABCG5/G8 や脂肪酸代

謝調節因子 SREBP-1c、小腸での ABCA1, ABCG5/G8 などの LXR 標的遺伝子の発現を誘導した。コレステロールの吸収は抑制されたが、血漿中性脂肪は上昇した。一方 YT-32 の投与は、小腸においてステロール排出ポンプ ABCA1, ABCG5/G8 の発現を誘導したが、肝臓での標的遺伝子はほとんど誘導しなかった。そして高中性脂肪血症を誘導することなく、コレステロールの吸収を抑制した。これらの結果は、LXR が植物ステロールのセンサーとして、小腸選択的な機能をしていることを示唆している。

(8) 内因性一酸化窒素の直接酸化によるカルシウムチャネル TRPC5の活性化

吉田卓史, 森泰生 (京都大学大学院・工学研究科)

TRPC5 チャネル蛋白質を HEK293 細胞およびウシ大動脈内皮細胞 (BAEC) に一過的に発現させて電気生理学的手法、Ca²⁺インジケータ fura-2 を用いた細胞内 Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i) 測定を用いて TRPC5 の活性を調べた。その結果、TRPC5 発現 HEK293 細胞において一酸化窒素 (NO) 供与剤 SNAP (100 μ M), H₂O₂ (100 μ M), さらにシ

ステイン特異的酸化剤 5-Nitro-2-PDS (30 μ M) の適用により細胞外 Ca²⁺依存性の [Ca²⁺]_i 上昇が見られた。この活性化は酸化物質による TRPC5 蛋白質内の特定システイン残基の直接酸化により引き起こされていることを明らかにした。また TRPC5 を一過性に発現させた BAEC において ATP (1 μ M) の刺激による endothelial nitric oxide

synthase (eNOS) の活性化により産生した NO により $[Ca^{2+}]_i$ が TRPC5 を強制発現していないコントロールに対して有意に上昇することを見出した。この $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は eNOS の阻害剤である L-NAME によりコントロールレ

ベルまで抑えられる。以上の結果より内皮細胞において TRPC5 が NO により直接酸化されることにより活性化することを明らかとした。

(9) 共鳴ラマン分光法によるセンサーヘム蛋白質の構造化学的研究： 可溶性グアニレートシクラーゼの最近の話題

北川禎三（岡崎統合バイオサイエンスセンター）

分子の振動は分子立体構造に非常に敏感であるので、『そのスペクトル測定により分子構造変化を検出していく』というアプローチをとる。分子振動の測定法としてラマン散乱法を用いて可溶性グアニレートシクラーゼ (sGC) を調べた。

ウシの肺から単離・精製した cGMP は $\alpha\beta$ ダイマーで分子量 143,000, 分子当り 1 個のプロトヘムをもち、それは $\beta 105$ -His に結合している。この分子に NO が結合すると活性は 200~400 倍高くなる。NO は生体中では L-アルギニンから NO 合成酵素により作られるが、ニトログリセリンのような薬剤として外から与えられることもある。

NO が Fe (II) ヘムに結合すると、Fe (II)-His ($\beta 105$) が切断される事が共鳴ラマン分光の研究より明らかになっている。しかし、CO がその位置に結合しても、Fe(II)-His ($\beta 105$)結合は切断されず、活性は 5 倍程度しか上がらない。したがって、Fe-His 結合の切断によるコンフォメーション変化が C 末端部にある触媒部位での GTP→cGMP 反応を促進するものと考えられる。

ところが、ある種のエフェクター分子(YC-1[3-(5'-hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzylindazole])が存在すると、CO も NO と同様の活性増大の効果を生むことがわかってきた。

(10) ROS センサーアニオンチャネルとアポトーシス誘導

清水貴浩, 沼田朋大, 岡田泰伸（生理研・機能協関）

アポトーシス性容積減少 (apoptotic volume decrease: AVD)は、細胞にアポトーシスを誘導する極めて重要な現象であり、主に K^+ チャネルと Cl^- チャネルの活性化によるイオン流出による。この AVD 誘導性 Cl^- チャネルについて検討した。HeLa 細胞を用いた全細胞記録において、ミトコンドリア系アポトーシス誘導剤 (staurosporine: STS)が Cl^- 電流を活性化した。その性質は、外向き整流性、脱分極電位での不活性化、容積感受性、細胞内 ATP 依存性、薬理学的性質などの点で、これまで報告されている容積感受性 Cl^- チャネルと同一であった。また、STS が急速に細胞内活性酸素種 (reactive oxygen species:

ROS) を産生したことから、容積感受性 Cl^- チャネルのアポトーシス性活性化に ROS が関与している可能性について検討した。ROS スカベンジャーや NADPH オキシダーゼ阻害剤による ROS 産生抑制が、この STS による容積感受性 Cl^- 電流の活性化を抑制した。また、細胞外に投与した過酸化水素も、細胞膨張がないにもかかわらず容積感受性 Cl^- チャネルを活性化した。これらの結果から、アポトーシス時に活性化する Cl^- 電流が容積感受性 Cl^- 電流であること、また STS による Cl^- チャネル活性化は ROS 産生を介していることが明らかとなった。

(11) 活動電位を発生するマウス味細胞の応答と発現分子の解析

吉田竜介, 重村憲徳, 安松啓子, ニノ宮裕三 (九州大学大学院・歯学研究院・口腔機能)

活動電位を発生させる味細胞の味刺激への応答性を調べ、鼓索神経線維の応答性と比較した。マウス鼓索神経線維と同様に、NaCl に応答する細胞はアミロライド感受性・非感受性のグループに分けられた。幾つかの MSG に応答する細胞では、IMP の添加により相乗効果が確認された。刺激により生じる活動電流頻度は刺激濃度依存的であった。味刺激に対する応答を記録できた 78 個の味細胞のうち、45 個 (58%) は 4 種の刺激 (NaCl, サッカリン, HCl, キニーネ) のうち 1 種に、28 個 (36%) は 2 種に、5 個 (6%) は 3 種に応答した。エン트로ピー値を計算すると平均 0.207 ± 0.253 (SD) となり、この値はマウ

ス鼓索神経の値に近かった。また、個々の細胞の応答性の近似を示すデンドログラムや 4 基本味のうち特定の味刺激に応答する細胞の割合も味細胞と神経の間で類似していた。これらの結果は、活動電位を発生する味細胞が神経に味情報を伝えていることを示唆する。また、甘味応答を示すマウス味細胞の T1r3 (甘味受容体), gustducin の発現パターンを調べた。甘味応答細胞における T1r3 と gustducin の発現パターンは多様で、T1r3 と gustducin を共発現する細胞と T1r3 あるいは gustducin のみを単独に発現する細胞がそれぞれ存在した。この結果は、マウスの甘味受容・情報伝達機構が複数存在することを示唆する。

(12) 逆推定法による微細構造体内 cAMP 変動の実時間測定

竹内裕子・倉橋隆 (大阪大学大学院 生命機能研究科)

cAMP は神経細胞や内分泌細胞で広く Signal Transduction の二次伝達物質として利用されているが、Signal Transduction の特性を定量的に知るためには、細胞内 cAMP 濃度変化を実時間測定する実験が必要となる。

そこで、従来より用いてきたパッチクランプ記録とケージ化合物の光解離のコンビネーションによって、サブミクロン組織空間内の cAMP 濃度推定を行う系を確立した。この方法を用いて、嗅細胞絨毛内での匂い応答時の cAMP 濃度推定を行ったところ、ステップ状刺激に対して、線形に細胞内 cAMP 濃度が上昇するという結果を得た。細胞内 PDE 活性が一定であるなら、この結果は、

cAMP 産生にかかわるアデニル酸シクラーゼ活性が定常活性を示すことを意味する。このことは、実際に、ケージド cAMP を用いた実験によって推定されている。ところで、従来、G 蛋白介在性の情報伝達系として最も定量的な研究が進んでいるもののひとつに視細胞がある。視細胞では、effector 酵素としての PDE の活性は時間とともに線形的に増加すると予測されており、したがって細胞内 cGMP 濃度変化は指数関数的に変化すると予測されている。今回の嗅細胞における実測結果は、このような従来の予測と異なっており、その不整合性について考察する。

(13) 脳内 Na⁺センサー : Na_x チャンネルの生理的役割

檜山武史 渡辺英治 野田昌晴 (基礎生物学研究所 感覚情報処理)

Na_x チャンネルは中枢神経系においては主に脳室周囲器官 (CVOs) に発現していた。CVOs は個体の塩分摂取や水分摂取の制御に関わるとされる。脱水状態において、野生型マウスは水を大量に摂取し食塩水を回避するが、

ノックアウトマウスは味覚に異常が無いにも関わらず両者を区別無く摂取した。さらに、高張食塩水を脳室内に注入し CVOs を直接的に高 Na 液で刺激すると、野生型では食塩水忌避行動が出現するのに対し、ノックアウト

マウスではこれがみられなかった。

アデノウイルスを用いてノックアウトマウスの脳内に Na_x 遺伝子を再導入したところ、一部のマウスにおいて、脱水時における食塩水回避行動が回復した。回復したマウス全てにおいて CVOs の一つである脳弓下器官へのウイルス感染が確認された。また、 Na_x を発現している部位の初代培養細胞では 10 mM 程度の細胞外ナトリウム

イオンの上昇に応答して、細胞内ナトリウムイオン濃度が大幅に上昇した。この応答はノックアウトマウス由来の細胞では観察されなかったが、 Na_x プラスミドベクターの導入により応答が出現した。よって、 Na_x は体液塩濃度を検出するナトリウムレベルセンサーとして働いており、脳弓下器官が個体の塩分摂取行動制御の一次中枢として機能していると結論した。

(14) GFP を用いたカルシウムプローブ G-CaMP による平滑筋カルシウムの解析

中井淳一（理化学研究所 脳科学総合研究センター 記憶学習機構研究チーム）

数年前に GFP を元にした Ca プローブである G-CaMP を開発した。G-CaMP は 1 波長励起 1 波長測定のプロープで GFP とほぼ同様の蛍光波長特性を持つ。そこで、平滑筋に特異的に G-CaMP を発現するマウスを作成した。このマウスには特別な異常は認められず、正常に発育した。冠動脈を含む血管の平滑筋、膀胱平滑筋、腸管平滑筋、気管支平滑筋に GFP の発現が認められた。膀胱平滑筋をサポニンにて処理した後、外液の Ca 濃度を変えて用量-反応依存曲線を取ったところ、 K_d は 328 nM (Hill 係数 2.8) で *in vitro* の測定結果とほぼ一致した。そこで単離した平滑筋細胞にアセチルコリンおよびカフェインを

投与したところ蛍光の増加が観察された。次に膀胱を単離し神経を電気刺激して平滑筋の Ca 変動を観察したところ、Flash と Wave と呼ぶ 2 種類の Ca の変動が捕らえられた。Flash ではまず、P2X 受容体が活性化され細胞が脱分極することによってジヒドロピリジン感受性電位依存性 Ca チャネルが活性化され、細胞内に Ca が流入する。さらに流入した Ca によりリアノジン受容体が活性化され Ca-induced Ca release により Ca の上昇が引き起こされる。また Wave はムスカリン性アセチルコリン受容体を介した IP₃ の生成とその後の IP₃ 受容体の活性化によって Ca の上昇が起こることが明らかとなった。

(15) プロトンチャネルの recruitment と活性振動

久野みゆき、酒井啓、川脇順子、森畑宏一、翁昌子、森啓之
(大阪市立大学大学院医学研究科分子細胞生理学)

膜電位依存性 H^+ チャネルは、開口すると大量の H^+ を短時間で細胞外に放出する H^+ 選択性チャネルである。このチャネルは、細胞内外 pH のわずかな変動に即応して活性を変える極めて鋭敏な H^+ センサーであると同時に、 H^+ シグナルの強力な発信器としての役割も兼ね備えている。チャネル開口制御の第一要因は pH であるが、pH 環境を一定に維持しても、チャネル活性は様々な要因でダイナミックに変動する。こうした短時間で起こる可逆的な変動の中に、活性化チャネル数の変化、すなわちチャネルの recruitment 機構に基づくものが含まれている可能性を、チャネル活性の温度応答性から検討してみた。

H^+ チャネルコンダクタンスには温度依存性の高い相 (high Q_{10} phase) があり、ユニークな性質のひとつとして知られている。ところが、cell swelling を起こさせ H^+ チャネル電流を強く活性化させると、この high Q_{10} phase が消失する。またアクチン細胞骨格に作用し swelling を抑える働きのある cytochalasin や phalloidin によっても high Q_{10} phase が抑制されることから、high Q_{10} phase で H^+ チャネルの recruitment が生じていることが推測された。 H^+ チャネルの大きな活性振動には recruitment が大きな役割を果たしていると考えている。

(16) Rab3エフェクター Noc2の開口分泌における役割

三木隆司¹, 松本正成², 清野 進¹

(¹ 神戸大学医学系研究科・細胞分子医学, ² 千葉大学医学研究院・細胞分子医学)

Noc2 は Rab3 のエフェクター分子として膵β細胞から同定され、膵内分泌をはじめ、内分泌組織・神経内分泌組織に強く発現しているがその生理的役割は不明であった。Noc2 KO マウスは外見上大きな異常は認めず随時血糖値も正常であったが、KO マウスはストレス下でのみ耐糖能障害を示した。KO マウスより単離した膵島からの Ca^{2+} 誘導性のインスリン分泌は明らかに障害されていたが、三量体 G 蛋白質 Gi/o の阻害剤である百日咳毒素による処置で正常化した。Noc2 は Gi/o によるインスリン分泌抑制機構に拮抗的に働く分子であることが示された。野生型 Noc2 をアデノウイルスにより KO マウス

の膵島に導入すると Ca^{2+} 誘導性のインスリン分泌が改善するものの、Rab3 と結合しない変異型 Noc2 を導入しても分泌が改善しなかったことから、Noc2 は Rab3 との結合を介して機能していると考えられた。さらに、KO マウスの膵外分泌腺房細胞に分泌顆粒が極度に貯留していることが判明し、単離膵腺房細胞からのアミラーゼの調節性分泌は著明に障害されていた。調節性分泌が惹起される他の腸管細胞でも同様の分泌顆粒の貯留が認められた。以上のことから、Noc2 は Rab3 と相互作用することにより、内分泌・外分泌両者の調節性の開口分泌に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

(17) リガンド投与による代謝型グルタミン酸受容体細胞内領域の二量体構造の動的変化

立山充博, 久保義弘 (自然科学研究機構・生理学研究所・神経機能素子研究部門)

代謝型グルタミン酸受容体 mGluR1 の細胞外領域の結晶構造解析によって Gd^{3+} の結合部位が 2 量体サブユニット境界面の E238 を中心とする負電荷を持ったアミノ酸に富む部域に同定されたのを受け、この部域が Gd^{3+} による mGluR1 の活性化に実際に関与しているかどうかについての解析を行った。(1) E238Q 変異により、 Gd^{3+} 感受性は完全に消失したが、グルタミン酸、 Ca^{2+} に対する感受性は変化しなかった。(2) 前もって低濃度の Gd^{3+} を投与しておくことにより、野生型ではグルタミン酸に対する感受性が上昇するが、E238Q 変異により、この増強作用も消失した。シナプス間隙に存在する何らかの物

質 X が Gd^{3+} の代わりに E238 に作用して mGluR1 の機能を修飾するという仮説の下に研究を継続している。

膜表面に発現している受容体の、リガンド投与による動的構造変化をリアルタイムで解析することを目的として、mGluR1 の細胞内領域を 2 色の蛍光蛋白でラベルし、全反射照明下において、蛍光物質間の距離の変化を評価する FRET 解析を行った。その結果、2 量体で構成される mGluR1 の、サブユニット内の構造変化ではなく、2 つのサブユニットの配置の変化が起きていることを明らかにした。

19. Na チャネルと細胞機能

2004 年 6 月 24 日－6 月 25 日

代表・世話人：緒方 宣邦（広島大学大学院）

所内対応者：岡村 康司（岡崎統合バイオサイエンスセンター）

(1) Na^+ チャネルと生物進化の仮説提唱

吉田 繁（近畿大学・理工学部・生命科学科）

(2) 電位センサーの動作原理

久木田 文夫（自然科学研究機構・統合バイオサイエンスセンター）

(3) Slow removal of Na^+ channel inactivation underlies the temporal filtering property in the teleost thalamic neurons

岡 良隆（東京大学大学院・理学系研究科）

(4) マウス後根神経節ニューロンにおける電位依存性 Na チャネルの機能的分類

緒方 宣邦（広島大学大学院・医歯薬学総合研究科）

(5) Na_x チャネルの生理機能

檜山 武史（自然科学研究機構・基礎生物学研究所）

(6) 上皮型 Na チャネル (ENaC) 活性化因子プロスタシンによる腎臓での Na 再吸収調節

北村 健一郎（熊本大学大学院・医学薬学研究部・腎臓内科学）

(7) 上皮型 Na チャネル (ENaC) の浸透圧による制御機構

丸中 良典（京都府立医科大学大学院・医学研究科）

(8) Nav1.6 チャネルの持続性 Na 電流の制御機構

白幡 恵美（山形大学医学部発達生体防御学講座小児科医科学分野）

(9) 軸索起始部とランビエ節に特異的なスペクトリン細胞膜骨格の機能

駒田 雅之（東京工業大学・大学院・生命理工学研究科）

(10) 心筋 Na チャネル病の分子病態

蒔田 直昌（北海道大学大学院・医学研究科）

(11) 心筋 Na チャネル遺伝子変異による致死性不整脈疾患の電気生理学とコンピューターシミュレーション

井本 敬二（自然科学研究機構・生理学研究所）

(12) てんかんとナトリウムチャネル遺伝子変異

山川 和弘（理化学研究所・脳科学総合研究センター）

(13) 寒冷誘発性低 K^+ 性周期性四肢麻痺における変異 Na^+ チャネルの温度依存性

杉浦 嘉泰（福島県立医科大学・医学部・神経内科学講座）

(14) 骨格筋疾患と Na チャネル異常

高橋 正紀（大阪大学大学院・医学系研究科・神経機能医学講座）

【参加者名】

吉田 繁（近畿大・理工学）、山川 和弘（理化学研）、高橋 正紀（大阪大大院・医）、青池 太志（大阪大大院・医）、緒方 宣邦（広島大大院・医歯薬）、柿村 順一（広島大大院・医歯薬）、鄭 泰星（広島大大院・医歯薬）、松富 智哉（広島大大院・医歯薬）、中本 千泉（広島大

大院・医歯薬）、檜山 武史（基生研）、清水 秀忠（基生研）、渡辺 英治（基生研）、野田 昌晴（基生研）、蒔田 直昌（北海道大学大学院・医）、杉浦 嘉泰（福島県立医科大・医）、柴野 健（福島県立医大・医）、岡 良隆（東京大大院・理）、田中 裕之（東京大大院・理）、羽田 幸祐（東

京大大院・理), 駒田 雅之 (東京工業大大院・生命理工), 鈴木 総一郎 (東京工業大大院・生命理工), 丸中 良典 (京都府立医科大大院・生理機能制御), 新里 直美 (京都府立医科大大院・生理機能制御), 宮崎 裕明 (京都府立医科大大院・生理機能制御), 倉富 忍 (京都府立医科大

大大院・生理機能制御), 北村 健一郎 (熊本大大院・医学薬), 安達 正隆 (熊本大大院・医学薬), 實吉 拓 (熊本大大院・医), 井本 敬二 (生理研), 白幡 惠美 (山形大・医), 久木田 文夫 (岡崎統合バイオサイエンスセンター), 岡村 康司 (岡崎統合バイオサイエンスセンター)

【概要】

電位依存性 Na チャネルは, 多細胞動物に普遍的に存在し, 神経筋の興奮性を決定する重要な素子分子である。近年の研究により Na チャネルの生理機能や分子種は, 従来考えられてきた以上に多様であり, 古典的な神経軸索での興奮伝導以外に中枢神経細胞での情報統合, リズム形成, 神経可塑性, 塩濃度調節などの役割が明らかにされてきた。その一方, 電位依存性 Na チャネルの機能異常は, てんかんなどの神経疾患, 心疾患, 筋疾患, 異常な痛覚の形成に深く関わり, また不整脈治療薬, てんかん治療薬や, 痛みの制御を始めとする創薬のターゲットとしても研究が盛んである。従来の電気生理学的, 分

子生物学的研究の蓄積は, 今後益々個体レベルでの生理機能や病態の理解へ向けて統合されることが期待されとおり, ゲノム情報, 生物物理学的解析, 発現制御機構, モデリング, 遺伝子改変動物, 遺伝病, 分子創薬など, 様々な観点からの研究が重要性を増している。今回の研究会は, 二日間に渡り開催するもので基本的には平成13年度に行なわれた生理研研究会「Na チャネルの構造と機能」に引き続く試みであるが, Na チャネルの生物物理特性だけでなく, 生理機構から病態までを含む研究内容を盛り込み, 統合生命科学としての将来への展望を探る。

(1) Na⁺チャネルと生物進化の仮説提唱

吉田 繁 (近畿大学・理工学部・生命科学科)

脳底部の形を複雑にしCSFの中に沈んでいる脳を頭蓋骨に嵌め込んで固定している。硬膜テントで仕切ることにより大脳・小脳等を固定している。脳の見かけの重量をCSFによって激減させ衝撃から守っている。第三脳室の底部を成すMEの上衣細胞層は, concentration-sensitive Na⁺ channel (Na_c; c = concentration) を含む tanocytes より成る。マウス脳スライスをNa⁺感受性蛍光色素SBFIで染色し [Na⁺]_o変化に対する [Na⁺]_i変動を観察した。Na_cは[Na⁺]_o上昇に反応するが, [Na⁺]_o下降・浸透圧変化・TTX投与には無反応。上衣細胞層はNa⁺センサーであり脈絡叢の産生するCSFのNa⁺

濃度をモニターしている。外層は浸透圧センサーでありCSFの浸透圧をモニターしている。Na_cには2種類あり逆反応を示すNa_cは普段は開いているが [Na⁺]_o上昇で閉じる。脈絡叢の近くに存在する circumventricular organs (MEの上衣細胞層を含む) はNa_cを持ちCSFのNa濃度をモニターして脈絡叢のCSF産生制御に関係していると考えられる。脈絡叢から遠いMEの外層は脳室からクモ膜下腔に出たCSFの比重をモニターして脳の浮遊状態コントロールに関係していると考えられる。Na_cは動物進化に伴う脳の肥大化を推進した要因のひとつではないか?

(2) 電位センサーの動作原理

久木田 文夫 (自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター・神経分化部門)

溶液の粘性はゲート機構を遅くする。電位センサーの動きを決めるのは溶液の「粘性」であり脂質は重要な

い。Paddleモデルに対する多くの反論は水溶液からの親水性試薬のS4へのaccessibilityが重要な鍵になっている。

S4 の大部分は水界面に露出している。柔らかい構造モデルでは、溶液粘性を感じるためにタンパク質はサブナノ秒レベルの速い細かな運動が数百万回連続して起こりサブミリ秒のゲート機構を担っていることを主張している。S4 は自身の重心が電荷と共に膜電場を横切りながら、周辺の構造は不規則な構造から規則的な構造の間を変化することを示唆している。電位センサーに対する効果は粘性依存的に Hodgkin-Huxley Kinetics が遅くなることであるが Na チャネルでも K チャネルでも観察される。特に K チャネルでは時間経過を決める過程の中で粘性依

存性の部分が大半を占めている。ポア内の構造変化ないしはゲート電流が流れ終わってからポアが開く過程には浸透圧が関与しているが Na チャネルと K チャネルでは方向は逆である。浸透圧はポア内の水とないしは水を含む空隙の体積が変化する際の自由エネルギー変化があれば有効であるが Na チャネルでは自由エネルギーは僅かに増大し K チャネルでは大きく減少する。最終転移に対して浸透圧の増大は Na チャネルでポアを開きにくく K チャネルでは開きやすくすることが明らかになった。

(3) Slow removal of Na^+ channel inactivation underlies the temporal filtering property in the teleost thalamic neurons

岡 良隆 (東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻)

筒井 秀和 (東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻)

大石 謙介 (協力者) (東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻)

魚類などの脊椎動物脳の神経核は基本的な構築原理は保たれているが構成ニューロン種が少なく単純な実験系である。カワハギの「第3型糸球体核」は視覚性の入力を受け視床下部下葉に投射する神経核で、細胞種が少なく(2種)明瞭な層状細胞構築を持ち巨大なシナプス後樹状突起を含み神経核機能の解析のモデル系になる。皮質核から糸球体核への入力線維の刺激に対する樹状突起先端部でのシナプス応答について解析したところ細胞体でのシナプス応答特性は両細胞で異なり大型細胞はシナプス入力に対して単発発火のみを示し小型細胞は入力依存的に tonic な発火を示した。時間間隔を変化させながらペアの入力を与え入力の時間的な様式に対する応答は、

大型細胞が長い時定数 (~100ms) の low-pass フィルター特性を持つのに対して小型細胞は速い入力パターンにも追従して発火した。大型細胞の細胞体の low-pass フィルター特性の基礎となるイオンチャネルとして Na チャネルが極めて遅い不活性化からの回復過程を示した (-80mV で >100ms)。各パラメーターを求め Boltzmann 関数指数関数で fit 及び連続化しプログラム NEURON 上で Na^+ チャネル機能の再構成を行ったところ Na^+ チャネルと Hodgkin-Huxley 型の K^+ チャネルの組み合わせで、大型細胞の基本的な単発発火特性及び low-pass filter 特性が再現できた。

(4) マウス後根神経節ニューロンにおける電位依存性 Na チャネルの機能的分類

緒方 宣邦 (広島大学大学院・医歯薬学総合研究科・神経生理学)

柿村 順一 (広島大学大学院・医歯薬学総合研究科・神経生理学)

松富 智哉 (広島大学大学院・医歯薬学総合研究科・神経生理学)

鄭 泰星 (広島大学大学院・医歯薬学総合研究科・神経生理学)

中本 千泉 (広島大学大学院・医歯薬学総合研究科・神経生理学)

後根神経節 (Dorsal root ganglion: DRG) などの一次知覚

ニューロンに存在する Na チャネルは細胞種特異性やカ

イネティクスの異なる7種のサブタイプから構成されている。そのうち NaV1.8 や NaV1.9 は、小型侵害受容ニューロンに特異的に発現することより、病的疼痛の発現に重要な役割を担っていると考えられている。しかし実際には、これらのサブタイプのみでは説明しがたい面も多く、病態の進展には、そのほかのサブタイプも含めた Na チャネル全体のホメオスタシスの変調による求心インパルスの質的および量的変化が重要であると思われる。また中心的役割を受け持つ Na チャネルサブタイプも慢

性疼痛の病期により変遷していくと予想される。Na チャネルの疼痛発現における役割は、実際のところ、まだまだ解明されていない状況であり、痛覚求心路における Na チャネルの生理機能を総合的に解明することが先決である。DRG における Na チャネル機能に関して、1) テトロドトキシン非感受性 Na チャネル、NaV1.9 の機能、2) 新規テトロドトキシン感受性持続型 Na 電流の生理学的性質、3) DRG における活動電位の発現メカニズムなどについての私たちの最近の研究結果を報告する。

(5) Na_x チャネルの生理機能

檜山 武史 (自然科学研究機構・基礎生物学研究所)

Na_x チャネルは電位感受性や不活性化に必須の配列が失われており機能が不明であった。そこで lacZ 遺伝子の挿入によるノックアウトマウスの解析を行った。Na_x チャネルは主に脳室周囲器官 (CVOs) に発現し、水と高張食塩水の摂取選択性を調べる行動実験を行った。脱水状態においては野生型マウスは水を大量に摂取し食塩水を回避するが、ノックアウトマウスは味覚に異常が無いにも関わらず食塩水を回避せず両者を区別無く摂取することがわかった。高張食塩水を脳室内に注入し CVOs を直接的に高 Na 液で刺激した時にも、野生型では食塩水忌避行動が出現するのに対しノックアウトマウスではみられなかった。アデノウィルスを用いてノックアウトマウ

スの脳内に Na_x 遺伝子を再導入したところ、一部のマウスにおいて、脱水時における食塩水回避行動が回復したことが確認された。また、Na_x を発現している部位の初代培養細胞を用いて細胞外液のイオン濃度を变化させたところ Na_x 発現細胞は 10 mM 程度の細胞外 Na の上昇に応答して、細胞内ナトリウムイオン濃度が大幅に上昇することを見出した。この応答はノックアウトマウス由来の細胞においては観察されなかったが、Na_x プラスミドの導入により応答が出現した。Na_x は体液塩濃度を検出する Na センサーとして働いており、脳弓下器官が個体の塩分摂取行動制御の一次中枢として機能していると結論した。

(6) 上皮型 Na チャネル (ENaC) 活性化因子プロスタシンによる腎臓での Na 再吸収調節

北村 健一郎 (熊本大学大学院医学薬学研究部腎臓内科学)

富田 公夫 (熊本大学大学院医学薬学研究部腎臓内科学)

上皮型 Na チャネル (ENaC) は腎臓での Na 再吸収量を調節し、体液の恒常性や血圧の維持に重要な役割を果たしている。セリンプロテアーゼのプロスタシンをラット腎臓よりクローニングし、アフリカツメガエル卵母細胞にプロスタシンと ENaC を共発現させるとアミロライド感受性 Na 電流を著明に活性化する。免疫組織学的検討ではプロスタシンは近位尿細管および皮質集合尿細管の管腔側膜に強く発現し、皮質集合尿細管では主細胞の管

腔側膜において ENaC と共局在する。アルドステロンが ENaC およびプロスタシンの発現を増強し、相互作用によって Na 再吸収が増加し、原発性アルドステロン症患者の尿中に多量のプロスタシンが排泄され、副腎腺腫摘出によりプロスタシン排泄量が減少する。TGF-β1 は尿細管細胞においてアルドステロンによる Na 再吸収を阻害する作用があり、ENaC の発現抑制を伴っているという報告がある。TGF-β1 はプロスタシンの発現も抑制するこ

とが判明し, TGF- β 1 は ENaC およびプロスタシンの発現抑制を介して Na 利尿へ働く可能性が考えられた。セリンプロテアーゼ阻害剤であるメシル酸ナファモスタットがプロスタシンの発現抑制を介し Na 再吸収を抑制する

ことを *in vitro* および *in vivo* で明らかにし臨床におけるメシル酸ナファモスタットの副作用である低 Na 血症および高 K 血症の発症にプロスタシンが関与するかもしれない。

(7) 上皮型 Na チャネル (EnaC) の浸透圧による制御機構

新里 直美 (京都府立医科大学大学院・医学研究科・生理機能制御学)

丸中 良典 (京都府立医科大学大学院・医学研究科・生理機能制御学)

腎遠位尿細管上皮組織での上皮型 Na チャネルを介する Na 再吸収は、血圧調節や体液量維持に重要な役割を果たすことが知られており、アルドステロン、抗利尿ホルモンや血漿浸透圧により緻密に制御されている。我々はこれまでに遠位尿細管での Na 再吸収が低浸透圧（血漿浸透圧低下）刺激により促進されることを報告してきたが、そのメカニズムは十分に理解されていない。そこで、本研究では、低浸透圧刺激による Na 再吸収の制御機構を明らかにするために、低浸透圧刺激により Na 再吸収に寄与する上皮型 Na チャネル (ENaC) の遺伝子発現を介するメカニズムについて検討した。我々は、腎遠

位尿細管由来の培養細胞である A6 細胞に長時間の低浸透圧刺激を与えると、ENaC α -subunit (α ENaC) の mRNA が増大し、Na 再吸収が促進されることを見出した。さらに、この α ENaC の転写レベルでの増大は、 $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter の活性化剤としてのフラボンや Cl チャネル阻害剤により著しく抑制され、更にナトリウム再吸収も減少していた。これらの結果は、低浸透圧刺激による Na 再吸収の制御機構に、クロライド輸送を介する細胞内クロライド濃度変化が関与していることを強く示唆している。

(8) Nav1.6チャネルの持続性 Na 電流の制御機構

白幡 恵美 (山形大学・医学部・発達生体防御学講座・小児医科学分野)

ヒト Nav1.6 遺伝子をクローニングし培養細胞系 (tsA201) に発現させパッチクランプ法を用いて検討した。Nav1.6 遺伝子単独発現により顕著な持続性内向き電流を認めた。持続性電流の成立は Nav1.6 チャネルによるデフォルトの性質であり軸索など持続性電流が認められない部位では何らかの因子により抑制されるのではないかと考え、ランビエ絞輪の Ankyrin G に着目した。Nav1.6 と Ankyrin G とを共発現させたところ、持続性電流は著減した不活性化曲線は顕著なシフトを認めた。Ankyrin G により不活性化のゲーティングが変化することが示された。この変化は Ankyrin B や Ankyrin B/G キメラのうち

膜蛋白結合部位が Ankyrin B のものではみられなかった。 β 1 サブユニットの共発現でも認められなかった。Nav1.6 チャネルの細胞内リンカー部位にあるアンキリン結合ドメインを欠失させると Ankyrin G による持続性電流の減少効果は減弱していた。Nav1.6 が Ankyrin G の膜蛋白結合部位と直接作用してチャネルを膜表面に集族化させ不活性化ゲートを変化させると考えられた。Ankyrin G による持続性電流の抑制は成熟したランビエ絞輪での電流を反映し興奮を忠実に速く伝導するために必要な機構として理解できる。さらに脱髄による興奮性の変化にこの機構が関連している可能性がある。

(9) 軸索起始部とランビエ節に特異的なスペクトリン細胞膜骨格の機能

駒田 雅之 (東京工業大学大学院・生命理工学研究科)

ジーントラップと呼ばれる方法を用いてマウス ES 細胞にランダムな挿入変異を導入したところ、ホモ接合体が全身の細かな震えと後肢骨格筋の硬直を呈する変異体を得、 β -スペクトリンの新規メンバーである β IV-スペクトリンが欠損していること、その遺伝子発現が神経細胞にほぼ特異的であること、さらに β IV-スペクトリンが神経細胞の軸索起始部とランビエ節に特異的に局在することを見出した。 β IV-スペクトリン欠損マウスの神経細胞における電位依存性 Na チャネルとアンキリン G の局在

を調べた結果、その局在レベルが野生型マウスと比べて大きく低下していることが明らかとなった。 β IV-スペクトリンを含む膜骨格構造がアンキリン G との結合を介して軸索起始部とランビエ節における電位依存性 Na チャネルの局在安定化に必須の役割を果たしていること、そしてその欠損マウスでは活動電位の発生と維持における異常が震えや骨格筋硬直といった症状を引き起こしていることが示唆された。

(10) 心筋 Na チャネル病の分子病態

蒔田 直昌 (北海道大学大学院・医学研究科・循環病態内科学)

先天性 LQT3 変異: α KPQ, R1623Q: *Xenopus oocyte* に LQT3 変異 α KPQ チャネルを発現させると持続性遅延電位が観察された。遅延電流に一致した burst 状のチャネル再開口が観察された。分子機構として modal gating が考えられた。LQT3 変異 R1623Q は、 α KPQ と同様の機能異常のほかに、電流 decay の遅延と活性化の膜電位依存性の低下が認められた。2, Brugada 症候群 T1620M: Brugada 症候群の病態として SCN5A の loss-of-function によって活動電位の初期成分において相対的に Ito が優位になり心内膜・外膜の電気勾配が増加する。T1620M を培養細胞 tsA-201 に α 1 サブユニットと共発現させ 32°C でパッチクランプをおこなうと, fast inactivation と slow inactivation

の中間の不活性化 (I_M) が亢進していた。3, 後天性 QT 延長症候群変異 L1825P: 普段は正常の心電図を示し薬剤などにより QT が延長し不整脈を発症するものを後天性 LQTS と呼ぶ。IKr ブロック作用を有するシサプリドによって発症した後天性 LQTS 症例に SCN5A 変異 L1825P を同定した。L1825P は、LQT3 に特徴的な遅延電流を示すと同時に不活性化の膜電位依存性の過分極方向へのシフト活性化の脱分極方向へのシフト I_M の亢進という loss-of-function を示した。「再分極予備能」によって代償され顕性化しなかったがシサプリドの IKr ブロック作用によって破綻し L1825P の機能異常が顕性化する。

(11) 心筋 Na チャネル遺伝子変異による致死性不整脈疾患の電気生理学とコンピューターシュミレーション

伊藤 英樹 (生理学研究所・神経シグナル部門)

井本 敬二 (生理学研究所・神経シグナル部門)

抗不整脈薬は Na 電流を低下させ増悪させるがピルジカイニドの投与で ST 上昇を認めなかった Brugada 症候群に新変異 (N406S) を見出し、電気生理学的特徴を発現

系で解析した。活性化、不活性化の電位依存性は 16mV, 10mV 脱分極側へ偏っていた。N406S は速い不活性化からの回復は有意に促進していたが遅い不活性化からの回

復は遅延していた。シュミレーションで活性化の電位依存性の変化と遅い不活性化の亢進が本症例の病態に寄与していた。ピルジカイニドによる tonic block は N406S において変化を認めなかったが use-dependent block は消失していた。キニジンによる tonic block は増大しており use-dependent block も WT, 1797insD と比較して亢進していた。活性化の電位依存性の変化と遅い不活性化の亢進が原因であると考えられた。ピルジカイニドによる

use-dependent block は本変異で消失しており provocation test の結果との因果関係を示唆した。一方キニジンに対する薬剤反応は WT, 1797insD と比較して亢進していた。ある特定の 1 種類のみによる抗不整脈薬の反応が陰性であっても他の薬剤の反応は同様とは限らず本変異のように薬剤結合部位に関係する遺伝子異常では provocation test の判定には注意を要することが示唆された。

(12) てんかんとナトリウムチャネル遺伝子変異

山川 和弘（理化学研究所・脳科学総合研究センター・神経遺伝研究チーム）

SCN1A:熱性痙攣プラス (GEFS+) は、SCN1A の変異が報告された。重症乳児ミオクロニーてんかん (SMEI) でも SCN1A の変異が報告された。GEFS+患者で見られる SCN1A の疾患変異は全て優性遺伝するミスセンス変異であるのに対し、SMEI 患者ではほとんどが 2/3 がナンセンスもしくはフレームシフト変異であり、1/3 がミスセンス変異である。GEFS+で見出された SCN1A 変異の電気生理学的解析は複数のグループにより行われている。SMEI 変異についてナンセンス変異で分断されたチャネルで電流が流れなくなること、SMEI でみられたミスセンス変異を持つチャネルでも電流が落ちることを確認した。SCN2A:

ナトリウムチャネル $\text{Na}_v1.2$ をコードする遺伝子 SCN2A につき GEFS+患者で不活化の遅れ定常時不活化曲線の過分極側へのずれなどの異常を示す変異 R188W を見いだした。SCN2A のミスセンス変異は良性家族性新生児乳児けいれん (BFNIS) でも報告された。難治性てんかんを有する患者で SCN2A の de novo ナンセンス変異を見出し dominant-negative な効果を持つことを明らかにした。SCN1A の SMEI 変異では domi-nega 効果の報告は無いが、組織内分布・細胞内局在に違いはあっても両者の遺伝子変異の間に、共通する疾患メカニズムが存在することを示唆する。

(13) 寒冷誘発性低 K^+ 性周期性四肢麻痺における変異 Na^+ チャネルの温度依存性

杉浦 嘉泰（福島県立医科大学・医学部・神経内科学講座）

eyelid myotonia, grip myotonia が認められ寒冷曝露により血清 K^+ の低下と四肢筋力低下を呈する家系において $\text{Na}_v1.4$ の P1158S 点変異を報告した。気温と K^+ 濃度の相関が明らかで低温曝露により低カリウム血症と緩性麻痺を来し P1158S 変異チャネルの温度依存性が示唆された。一方ミオトニアは反復運動で改善し気温との相関は明らかではなかった。P1158S $\text{Na}_v1.4$ cDNA を作製し変異 Na^+ チャネルの温度と電気生理学的特性の関連を検討した。P1158S 変異では activation curve, inactivation curve が、22°C では wild type に比して過分極側へシフトしたが 32°C では WT との有意差は認められず、P1158S 変異では

温度依存的な電位依存性の変化が明らかとなった。P1158S のゲート特性をコンピュータモデルに挿入し温度と神経症状の関係を検討した。P1158S 変異では細胞外 K^+ 濃度が低く膜の K^+ 透過性が低い場合 22°C では脱分極が持続し麻痺の状態となった。細胞外 K^+ 濃度が正常の場合反復放電が認められた。32°C では細胞外 K^+ 濃度に拘わらず P1158S では反復放電が認められた。症状をよく再現しており症状発現には変異の温度依存性と細胞外 K^+ 濃度が重要と考えられた。治療として経口カリウム製剤により低カリウム血症を補正すると麻痺発作の改善が認められた。

(14) 骨格筋疾患と Na チャネル異常

高橋 正紀 (大阪大学大学院・医学系研究科・神経機能医学 (神経内科))

骨格筋型 Na チャネル α サブユニット (SCN4A) の変異は筋強直 (ミオトニー) や一過性の麻痺を主徴とする疾患 (高カリウム性周期性四肢麻痺, 先天性パラミオトニー, カリウム惹起性ミオトニーなど) の原因である。fast inactivation とは別の不活性化 slow inactivation の生理病態的意義が注目されている。骨格筋型チャネルでは高カリウム性周期性四肢麻痺において slow inactivation の障害が麻痺の出現に関与することなどが明らかとなってきた。ミオトニー症状の緩和のためには抗不整脈薬・抗てんかん薬などが有効であり投与のしやすさなどから臨床ではメキシレチン (mexiletine) が使用される。メキシ

レチンなどの抗不整脈薬は Na チャネルのドメイン IV などの膜貫通セグメント 6 を中心とする部位に結合しブロックすると推定されている。上述のミオトニーを呈する疾患の中にはこの部位に変異を有するものもある。これらの疾患変異チャネルにおけるメキシレチン親和性を検討した。不活化 (fast inactivation) 状態に対する親和性が 2 倍程度増強ないし減弱している変異が認められた。実験で求められたパラメーターを用いて use-dependent block をシミュレーションし結果をよく一致することも確認された。

20. シナプス伝達の細胞分子調節機構

2004 年 11 月 26 日－11 月 27 日

代表：小松由紀夫（名古屋大学環境医学研究所）

所内対応者：伊佐 正（生理学研究所・認知行動発達機構）

(1) Roles of Synaptotagmin-1 C2B domain for synaptic transmission

Kidokoro, Y. and Tamura, T. (群馬大・医)

(2) トモシンによる神経伝達物質放出の制御

匂坂敏朗, 馬場威, 田中晋太郎, 泉鉉吉, 安見正人, 高井義美 (阪大・医・分子生理化学)

(3) G 蛋白を介した神経伝達物質放出制御

持田澄子 (東京医科大・生理第一)

(4) シナプス可塑性と高次脳機能における NMDA 受容体チロシンリン酸化の役割

真鍋俊也 (東大・医科研・神経ネットワーク)

(5) アクチン依存的な PSD 蛋白質の動態

岡部繁男 (東京医科歯科大・医歯学総合・細胞関連機構学)

(6) 逆行性シナプス伝達調節における phospholipase C β の役割

橋本谷祐輝, 少作隆子, 狩野方伸 (金沢大・医・脳医科学・シナプス発達・機能学)

(7) 小脳プルキンエ細胞における活動依存性 PKC 制御

鶴野瞬, 平野丈夫 (京大・理・生物物理)

(8) 抑制性シナプス可塑性の mGluR1 活性による PKA を介した制御

関優子, 川口真也, 平野丈夫 (京大・理・生物物理)

(9) 視覚野抑制性シナプス伝達の長期抑圧, 及び長期増強は異なる Ca チャネルサブタイプに依存する

黒谷亨, 小松由紀夫 (名大・環研・視覚神経)

(10) ミトコンドリアと滑面小胞体による容量性 Ca²⁺流入の制御とノルアドレナリンによる二面性制御

久場健司, 久場雅子, 須崎尚 (名古屋学芸大学・管理栄養学部解剖生理)

(11) 海馬苔状線維シナプスにおけるカイニン酸受容体の機能

神谷温之 (北大・医・脳科学・神経機能学・分子解剖)

(12) 小脳プルキンエ細胞の興奮性シナプス伝達におけるグルタミン酸トランスポーターの役割

小澤澪司 (群馬大・医・神経生理)

(13) 中隔核シナプス伝達におけるドーパミンの働き

赤須崇^{1,2}, 蓮尾博¹, 浅海安雄¹ (¹久留米大学医学部生理第二講座, ²久留米大学高次脳疾患研究所)

(14) シナプス前 Ca²⁺チャネルとしての P2X 受容体

加藤総夫 (慈恵医大・神経生理)

(15) トランスジェニックマウスを用いたシナプトフルオロリン開口放出計測システム

八尾寛^{1,2}, 荒木力太^{1,2}, 石塚徹^{1,2}, 柳川右千夫^{2,3}, 阪上洋行^{2,4},

明石馨⁵, 平林敬浩⁶, 宮崎純一⁷, 崎村建司⁵

(¹東北大院・生命科学, ²CREST・JST, ³群馬大院・医, ⁴東北大院・医,

⁵新潟大・脳研, ⁶SORST・JST, ⁷自然科学研究機構・生理研, ⁷大阪大院・医)

(16) 海馬苔状線維終末からの BDNF 開口放出の測定

須山成朝, 小橋雄一, 石塚徹, 八尾寛 (東北大・生命科学・脳機能解析)

(17) 生後発達に伴う前シナプス活動電位変化のメカニズム

中村行宏, 高橋智幸 (東大・医・機能生物学・神経生理)

(18) キンギョ Mb1 型双極細胞における Ca^{2+} マイクロドメイン・シナプスリボン・開口放出部位の分布

緑川光春, 立花政夫 (東大・院人社・心理)

(19) リドカイン誘起てんかん様発射の発生機序

田中永一郎, 東英穂 (久留米大・医・生理学第一)

(20) マウスを用いた眼球サッケード運動系の解析

坂谷智也, 伊佐正 (生理研・認知行動発達機構)

(21) Changes of AMPA Receptor and Synapse Density in the Flocculus after Short-term and Long-term Adaptation of Horizontal Optokinetic Response

王文, 重本隆一 (生理研・脳形態解析)

【参加者名】

城所良明, 小澤滯司, 齋藤康彦, 吉田由香里, 高鶴裕介 (群馬大・医), 平野丈夫, 田川義晃, 大槻 元, 髭 俊秀, 鶴野 瞬, 川口真也, 矢和多智, 吉田盛史, 津村健策, 関 優子, 北川雄一, 宮脇寛行, 水野秀信, 渡辺聡史 (京大・理), 八尾 寛, 宮崎憲一, 須山成朝 (東北院・生命科学), 持田澄子 (東京医科大), 岡部繁男, 栗生俊彦 (東京医科歯科大), 小松由紀夫, 黒谷 亨, 高田直樹, 吉村由美子, 稲垣 壮, 任鳴, 舟橋梨江, 稲葉三枝 (名大・環境), 立花政夫, 緑川光春 (東大・院人社), 高橋智幸, 山下貴之, 中村行宏, 金子雅博, 堀 哲也, 山下慈郎, 水谷治央 (東大・医), 高井義美, 匂坂敏朗 (阪

大院・医), 成田和彦 (川崎医科大), 久場 健司, 久場雅子, 須崎 尚 (名古屋学芸大), 神谷温之 (北大・医), 真鍋俊也 (東大・医科研), 伊藤 功 (九州大・理), 加藤聡夫 (慈恵医大), 赤須 崇, 田中永一郎 (久留米大・医), 日暮陽子 (川崎医療短), 狩野 方伸, 少作隆子, 橋本谷祐輝 (金沢大・医), 山本泰憲 (基生研), 重本隆一, 王文, 井本敬二, 窪田芳之, 前島隆司, 張 一成, 岸本拓哉, 瀬藤光利, 宮田麻理子, 本蔵直樹, 深澤有吾, 萩原 明, 西巻拓也, 伊佐 正, 遠藤利朗, 坂谷智也 (生理研)

【概要】

平成 16 年 11 月 26-27 日の 2 日間にわたり自然科学研究機構・岡崎カンファレンスセンターにおいて「シナプス伝達の細胞分子調節機構」に関する研究会を開催した。この研究会は平成 9 年から毎年開かれており, 今回は約 60 名が参加し, 21 の演題が発表された。伝達物質の放出とその制御機構, シナプス可塑性, シナプスと行動の関連等に関する新しい実験結果が報告された。伝達物質の放出とその制御については, シナプトタグミンとトモシンの開口放出における役割, 伝達物質放出を引き起こす Ca^{2+} チャネル電流とその調節, グルタメイト・トランスポーターや G 蛋白共役型受容体を介する制御に関する発表があった。また, 開口放出の新しい光学的計測法や P2X 受容体を介する Ca^{2+} 流入による新しいタイプの放出機構についても報告された。シナプス可塑性については, NMDA 受容体のチロシンリン酸化とエンドカンナビノイドの役割, 抑制性シナプスの可塑性, アクチン依存的

PSD 蛋白の動態に関する発表があった。また, 眼球運動制御における抑制性伝達の役割や, 小脳 AMPA 受容体の可塑的变化が報告された。この研究会には, 分子生物学者, 電気生理学者, 形態学者が参加しており, 様々な観点から, これらの発表に対する活発な討論が交わされ, 今後の共同研究の契機となる模様であった。発表者は, 大学院生から長い研究歴をもつ者まで様々であったが, 若手がかかなりの割合を占めていた。昨今, 神経科学や生理学会において, 一般演題がほとんどポスターになり若手が講演をする機会に恵まれていない。過去 4 回の研究会で一研究室あたり 2 題までの発表を認めたこともあり, 若手研究者の発表が増加した。若手の発表者が, 様々な質問に対して的確に答えており, この会が次代を担う研究者の育成にも貢献していると感じた。来年度は岡部繁男教授が提案代表者となり, 引き続きこの研究会の開催を計画することになった。

(1) Roles of Synaptotagmin-1 C2B domain for synaptic transmission

Kidokoro, Y. and Tamura, T.

(群馬大学医学部)

Between two Ca^{2+} -binding domains of Synaptotagmin I, the distal one, C2B, has two Ca^{2+} -binding sites, Ca1 and Ca2. We examined the effect of deletion of each binding site on synchronous nerve-evoked synaptic transmission and spontaneous quantal events in the *Drosophila* embryonic neuromuscular junction. Deletion of Ca1 completely abolished nerve-evoked synaptic transmission while spontaneous quantal events, miniature synaptic currents (minis), were still observed. On the other hand, elimination of the Ca2 binding site dramatically reduced the amplitude of synchronous synaptic currents but did not abolish synaptic transmission. The relation between the quantal content and external Ca^{2+} concentration $[\text{Ca}^{2+}]_e$ had a slope of 2.0 in the double logarithmic plot, while that of the control was 3.1. We next examined the Ca^{2+} dependency of mini frequency in high K^+

solutions. Deletion of the Ca2 binding site reduced the mini frequency compared with the control, but the frequency increased with $[\text{Ca}^{2+}]_e$. In contrast, deletion of the Ca1 binding site decreased the mini frequency with $[\text{Ca}^{2+}]_e$, suggesting that the negative regulation of spontaneous vesicle release occurs Ca^{2+} -dependently. When Sr^{2+} substituted Ca^{2+} in the high K^+ external solution, the mini frequency was higher than in Ca^{2+} solutions and increased with $[\text{Sr}^{2+}]_e$ in the control as well as in both transformants. No negative regulatory effect was observed even in the transformant lacking Ca1. We concluded that two Ca^{2+} binding sites in the C2B domain are crucially involved in synchronous transmitter release. Spontaneous release of transmitter is negatively regulated in a Ca^{2+} -dependent manner. Sr^{2+} does not substitute for Ca^{2+} in this negative regulatory function.

(2) トモシンによる神経伝達物質放出の制御

匂坂敏朗, 馬場 威, 田中晋太郎, 泉 鉦吉, 安見正人, 高井義美 (阪大院・医・分子生理化学)

神経伝達物質の放出において, まずシナプス小胞は, 軸索輸送によりシナプス前膜 (ターゲットとなる膜) に運ばれる (ターゲッティング)。シナプス小胞は, アクティブゾーンにおいて, シナプス前膜の Ca^{2+} チャンネルの近傍にドッキングした状態になり, さらに Ca^{2+} 濃度の上昇に応答できる状態に成熟する (プライミング)。 Ca^{2+} が流入した際, Ca^{2+} チャンネル周辺の局所的に上昇した Ca^{2+} 濃度に依存して, シナプス前膜とシナプス小胞の融合が起こり, シナプス小胞内の神経伝達物質が放出される。これまで, ターゲッティングには Rab3A 系の蛋白質, ドッキングと融合には普遍的膜融合装置を構成する SNARE 系の蛋白質, そしてプライミングにはアクティブゾーン構成蛋白質が関与していることが明らかにされている。これまで, 私共は, 神経伝達物質の放出に SNARE 系の活性制御タンパク質であるトモシンが抑制的に働くことを明らかにしている。トモシンが t-SNARE とトモシン複合体を形成し, 小胞融合に必須な 7S SNARE 複合体

の形成を抑制することにより, 神経伝達物質の放出を制御している。最近, トモシンがプライミングに関与していることが明らかにされつつある。一方, PKA が, ドッキングとプライミングを制御していることが知られている。ドッキングにおいては, SNAP-25 を PKA がリン酸化することにより調節することが知られているが, プライミングにおいての PKA のリン酸化基質は, 未だ同定されていない。そこで, 今回, PKA によるトモシンの活性調節を検討したところ, PKA がトモシンをリン酸化することにより, シンタキシン-1 との結合親和性を減弱させることがわかった。また, トモシンのリン酸化により, PC12 細胞における Growth hormone の分泌が制御されていることがわかった。他方, 神経細胞における軸索や樹状突起といった神経突起の伸長は, 小胞輸送により膜成分が突起の先端端へ運ばれて, そこで膜が融合することにより起こる。膜融合には, 普遍的な膜融合装置である SNARE 系タンパク質が関与している。最近, 私共は, ト

モシンが Rho-ROCK 系により活性調節を受け、非特異的な膜融合を抑制することによりアクチン細胞骨格の再構築と協調して神経突起の伸長を制御していることを明らかにしている。

以上の結果から、トモシンは PKA と Rho-ROCK 系により活性調節を受けることにより、SNARE 系を介して小胞融合を制御していることが考えられた。

(3) G 蛋白を介した神経伝達物質放出制御

Gary Stephens (Dept. of Pharmacology, University College London)

持田澄子 (東京医科大・生理第一)

シナプス前終末からの伝達物質放出を調節する機構として、神経終末の G 蛋白共役型受容体の活性化を介した、 Ca^{2+} チャネルの抑制、 K^+ チャネルの活性化、あるいは、開口放出の阻害による伝達物質放出阻害が示唆されている。このような作用は、 $\text{G}\alpha\beta\gamma$ から解離した $\text{G}\beta\gamma$ によると考えられている。しかし、シナプス前終末での解析は calyx Held¹ と lamprey reticulospinal/motoneuron synapses²での報告があるのみである。ノルアドレナリンが上頸交感神経節のシナプス伝達を阻害することが古くから知られており、シナプス前終末の G 蛋白共役型受容体を介して伝達物質放出を阻害することが考えられる。そこで、培養上頸交感神経節細胞シナプスを用いて、シナプス前終末のノルアドレナリン受容体活性化に伴う $\text{G}\beta\gamma$ を介するシナプス伝達調節の機能解析を試みた。

①ノルアドレナリン (0.2-10 μM) は、活動電位の duration、後過分極を減少させるとともに上頸交感神経節細胞シナプス伝達を濃度依存性に阻害した。②ノルアドレナリンの効果はヨヒンビン (2 μM) で抑制され、クロニジン (10 μM) はノルアドレナリンと同様の効果を引き起こした。③ PTX (500ng/ml) 前処理した上頸交感神経節細胞シナプスでは、ノルアドレナリンはシナプス伝達を抑制しなかった。④ $\text{G}\alpha$ transducin を過剰発現させた

シナプスでは、ノルアドレナリンによるシナプス伝達抑制が減弱した。⑤ $\text{G}\beta\gamma$ をシナプス前終末へ導入したところ、活動電位後過分極の減少、シナプス伝達の阻害が認められた。さらに、 $\text{G}\beta\gamma$ を導入したシナプスでは、ノルアドレナリンによるシナプス伝達抑制が認められなかった。⑥ノルアドレナリン、 $\text{G}\beta\gamma$ は、それぞれ細胞体から記録される Ca^{2+} 電流を抑制した。⑦ノルアドレナリンは、活動電位を介さない蔗糖による伝達物質放出を阻害しなかった。

上記の結果から、 $\text{G}\beta\gamma$ は上頸交感神経節細胞シナプス前終末の α_2 アドレナリン受容体活性化を介して Ca^{2+} チャネルを抑制することによってシナプス伝達を調節することが示唆される。

参考文献

- Kajikawa Y, Saitoh N & Takahashi T (2001). GTP-binding protein $\beta\gamma$ subunits mediate presynaptic calcium current inhibition by GABA_B receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 8054-8058.
- Blackmer T, Larsen EC, Takahashi M, Martin TFJ, Alford S & Hamm H (2001). G protein $\beta\gamma$ subunit-mediated presynaptic inhibition: regulation of exocytosis fusion downstream of Ca^{2+} entry. *Science* **292**, 293-297.

(4) シナプス可塑性と高次脳機能における NMDA 受容体チロシンリン酸化の役割

真鍋俊也 (東京大学 医科学研究所 神経ネットワーク分野)

中枢神経系における長期増強をはじめとするシナプス可塑性は、記憶・学習や情動などの高次脳機能の細胞レベルでの基礎過程であると考えられ、その分子機構の解明が盛んに進められている。グルタミン酸受容体の一種

である NMDA 受容体は、多くのシナプスにおいて、その可塑性の誘導に重要な役割を果たす。たとえば、海馬 CA1 領域における長期増強の誘導には、NMDA 受容体の活性化が必須であることが知られている。したがって、

NMDA 受容体の機能調節は、シナプス可塑性、ひいては、個体レベルでの脳機能の制御に直接関与するものと考えられる。中でも、NMDA 受容体 NR2 (GluRe) サブユニットのチロシンリン酸化は、シナプスにおける NMDA 受容体のチャネル活性を調節することから、NMDA 受容体の機能調節機構における最も重要な要素のひとつである。本講演では、NMDA 受容体のチロシンリン酸化が、海馬や扁桃体でのシナプス可塑性や個体レベルでの高次脳機能にどのように関与するかについての、私たちの最近の研究成果を紹介したい。

参考文献

- (1) T. Manabe, A. Aiba, A. Yamada, T. Ichise, H. Sakagami, H. Kondo, and M. Katsuki. Regulation of long-term potentiation by H-Ras through NMDA receptor phosphorylation. *J. Neurosci.* **20**:2504-2511, 2000.
- (2) T. Nakazawa, S. Komai, T. Tezuka, C. Hisatsune, H. Umemori, K. Semba, M. Mishina, T. Manabe, and T. Yamamoto. Characterization of Fyn-mediated phosphorylation sites on GluRe2 (NR2B) subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor. *J. Biol. Chem.* **276**:693-699, 2001.

(5) アクチン依存的な PSD 蛋白質の動態

岡部繁男 (東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科)

イメージング技術の進歩により、シナプス形成・維持・リモデリングの過程において、複数のシナプス機能分子がその局在を変化させる事が明らかになった。PSD の足場蛋白質およびアクチン分子に関して活動依存的な局在制御機構が存在する事が報告されている。複数のシナプス後部蛋白質の分子動態を総合的に評価するため、4 種類の足場蛋白質の動態を同一の実験条件で定量し、その安定化に関与する因子を検索した。定量的な動態観察を行った結果、足場蛋白質は少なくとも三つの異なった動態を持つ分画から構成されると考えられた。すなわちターンオーバーの速度からほぼ自由拡散によると考えられる分画、数分の寿命を持つ分画、そして数分では置換されない分画であり、異なった種類の足場蛋白質では、三つの分画の存在比率が異なっている。膜蛋白質である NMDA 受容体や代謝型グルタミン酸受容体、更にパルミチル化によりシナプス後膜

に付着する PSD-95 分子を除去した標本においても、他の足場蛋白質の動態は変化せず、これらの分子は他の足場蛋白質の集積に大きな影響を与えない。一方 PSD の細胞質側に存在する動的な構造であるアクチン線維の脱重合により、数分の寿命を持つ動的な足場蛋白質分画が選択的にシナプスから除去された。更に活動依存的な PSD 分子の局在変化がアクチン線維の安定化により阻害されることから、アクチン線維が PSD 分子の構成変化にも必須である事が明らかになった。アクチン線維自体のシナプス後部でのターンオーバーは非常に速く、数分間でほとんど全ての分子がシナプス後部において置換される。またアクチン線維自体も活動依存的にシナプスにおける分布が変化する。従ってアクチン線維によるシナプス機能制御の分子機構の一つとして、PSD 分子の再構成を誘導する事が重要であると考えられる。

(6) 逆行性シナプス伝達調節における phospholipase C β の役割

橋本谷祐輝, 少作隆子, 狩野方伸 (金沢大学大学院医学系研究科 シナプス発達・機能学)

最近の研究により、脳の様々な領域において内因性カンナビノイド (eCB) が逆行性シグナルとして働き、シナプス伝達を調節していることが明らかとなった。eCB はシナプス後ニューロンから合成・放出され、それがシナプス前終末に存在するカンナビノイド受容体を活性化

し、神経伝達物質の放出を抑制する。eCB の合成・放出は、(1) 脱分極による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇、(2) グループ I 代謝型グルタミン酸受容体や M_1/M_3 ムスカリニック受容体などの Gq 共役型受容体の活性化、により引き起こされる。また、脱分極と受容体活性化が同時に起こる

と eCB の合成・放出は著しく促進される。この相乗効果のメカニズムはこれまで不明であった。Gq 共役型受容体はホスホリパーゼ C β (PLC β) を活性化し、一方、生化学的な過去の実験から、PLC β 活性は Ca²⁺ 依存적であることが知られている。そこで我々は、脱分極と受容体活性化の相乗効果を PLC の Ca²⁺ 依存性で説明できるかどうか検討した。

培養海馬ニューロン・ペアより IPSC を記録し、受容体活性化による eCB の放出を IPSC の振幅を指標にして調べた。IPSC にはカンナビノイド感受性のものと非感受性のものがあるが、本実験ではカンナビノイド感受性 IPSC のみを使用した。ムスカリニック受容体アゴニスト (oxo-M) 投与により引き起こされる eCB の放出は細胞内 Ca²⁺ 濃度に強く依存し、脱分極による一過性の Ca²⁺ 濃度上昇により著しく増強された。また、同じ条件下での eCB の放出は PLC β 1 欠損マウスでは消失しており、この結果から eCB の放出に PLC β 1 が必須であることが判明した。

次に生きた細胞内の PLC の Ca²⁺ 依存性を調べるために、その代謝産物であるジアシルグリセロール (DAG) 産生量を、DAG 感受性の TRPC6 チャネルを用いてリアルタイムで測定した。まず培養海馬ニューロンに強制発現させた TRPC6 チャネルが DAG 感受性であり、且つ PLC β 1 依存적であることを確認した。TRPC6 チャネル電流を指標として、PLC β 1 活性を調べたところ、oxo-M 投与による PLC β 1 の活性化が細胞内 Ca²⁺濃度に強く依存し、また、脱分極による Ca²⁺濃度上昇により著しく増強されることが示された。

以上の結果より、eCB 合成・放出の律速酵素と考えられる PLC β 1 が Ca²⁺ 依存性であるため、細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇と受容体活性化が同時に起こることにより強く活性化され、それが相乗効果の原因であることが明らかとなった。受容体-PLC β シグナル伝達はさまざまな神経活動において重要な役割を担っており、本研究の結果から、それが生理的範囲の Ca²⁺ 濃度変化の影響を受ける可能性が示唆された。

(7) 小脳プルキンエ細胞における活動依存性 PKC 制御

鶴野 瞬, 平野 丈夫 (京都大学理学研究科生物物理学教室)

小脳プルキンエ細胞が平行線維と登上線維から同時に入力を受けると、平行線維—プルキンエ細胞間のシナプスにおける伝達が長時間減弱する小脳長期抑圧 (LTD) という現象が知られている。そして、LTD はシナプス後部の AMPA 型グルタミン酸受容体が C-キナーゼ (PKC) によりリン酸化されることによって引き起こされるとされている。また PKC は Ca イオンとジアシルグリセロール(DAG)によって活性化されることが知られており、登上線維入力に依存した脱分極により引き起こされる Ca イオン流入と、平行線維入力による mGluR1—G タンパク質—PLC の経路を介した DAG の生産が PKC で統合することによって LTD が発現する可能性が考えられている。そこで、私たちはプルキンエ細胞内における PKC の制御機構を調べるために以下の実験を行った。

PKC は活性化する際に細胞質から細胞膜へと移動する性質を持つため、その局在を観測することによって活性を推定することができる。培養プルキンエ細胞に GFP と PKC α の融合タンパク質を強制発現させ、共焦点顕微

鏡を用いて様々な刺激に対する PKC の局在変化をリアルタイムで観測した。PKC α は脱分極刺激によって樹状突起全体で一過的に細胞膜へ移動し、その後 30 秒程度で細胞質へ戻った。この移動は、Ca イオン結合能力を失った変異 PKC α では観察されなかった。また DAG を分解する DAG Lipase の阻害剤や膜透過性の DAG を投与した条件下で脱分極刺激を与えると PKC α は細胞膜に長く留まるようになり、DAG が活性の長期化に関与することが示唆された。しかし、mGluR1 のアゴニストである DHPG を投与しても PKC α の移動は見られなかった。さらに、脱分極時にグルタミン酸を投与しても、脱分極刺激のみを与えた場合と比較して PKC α の移動の程度に違いは認められなかった。また、細胞内に GTP γ S を投与して G タンパク質を活性化させた条件下で脱分極刺激を与えても違いは認められなかった。以上の結果から、培養プルキンエ細胞内において PKC α は主に脱分極による Ca イオンの流入によって制御され、mGluR1 ならびにその下流経路は PKC α の移動に影響を与えないと考えられる。

(8) 抑制性シナプス可塑性の mGluR1 活性による PKA を介した制御

関 優子, 川口真也, 平野丈夫 (京都大学理学研究科生物物理学教室)

小脳皮質の抑制性介在ニューロン (IN) はプルキンエ細胞 (PN) 上に GABA 性のシナプスを形成している。このシナプスにおける GABA_AR 応答は, PN の脱分極により生じる細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 上昇によって長期間増大する (Rebound Potentiation (RP))。一方, 脱分極と同時に代謝型受容体である GABA_BR が活性化した場合, RP は負に調節されることが知られている。

mGluR1 活性化は, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇や PKA 活性上昇を介して RP 制御に関わる可能性がある。そこで私達は, RP 誘導の調節において mGluR1 が果たす役割を解析することを試みた。PN における GABA 応答の変化を whole-cell patch clamp によって記録し, RP をモニターした。mGluR1 の拮抗薬である CPCCOEt の存在下で脱分極を行ったところ, RP が抑えられた。一方, DHPG により mGluR1 を活性化すると, GABA_BR による RP 抑制が起こらなくなった。以上の結果から mGluR1 の活性が RP 誘導に必要であり, GABA_BR の作用を相殺するような調節を行う事が明らかとなった。

なお, 上記の mGluR1 活性化による RP 誘導促進は, PKC

や PLC を阻害しても影響を受けなかった。ところで, GABA_BR は Gi/Go を介して PKA 活性を抑制することで RP を調節する。そこで, PKA を阻害したところ, mGluR1 活性化による RP 誘導の促進効果が消失した。以上から, mGluR1 による RP 調節のシグナル伝達には Gs を介した PKA の活性化が関与する事が示唆された。

この可能性をさらに検証するために, mGluR1 或いは GABA_BR の活性化による PKA 活性変化をリアルタイムで測定することを試みた。細胞内 cAMP 濃度を測定するために, 変異 CNG2 チャネルの cDNA を用いた。変異 CNG チャネルは細胞内 cAMP によって開き Ca^{2+} を含む陽イオンを通すので, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ や電流を記録する事により細胞内 cAMP 濃度変化を推定できる。変異 CNG チャネルを発現させたニューロプラストーマ細胞において, Forskolin と IBMX により細胞内 cAMP 濃度を増大させると, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇及び内向き電流が観察された。そこで, CNG チャネルを発現させたプルキンエ細胞において, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 及び電流の変化を記録することで mGluR1 或いは GABA_BR 活性化によって生じる PKA 活性変化の測定を試みた。

(9) 視覚野抑制性シナプス伝達の長期抑圧, 及び長期増強は異なる Ca チャネルサブタイプに依存する

黒谷亨, 小松由紀夫 (名古屋大学環境医学研究所 視覚神経科学)

我々は近年, 視覚野 5 層のニューロンを通電により高頻度発火させると, その細胞に生じる IPSP に長期抑圧 (LTD) が誘発されることを見いだした。また IR-DIC 観察下で, 視覚野 5 層の錐体細胞から whole-cell voltage clamp 記録を行い, 高頻度発火を模した脱分極パルスを与えることにより, IPSC の LTD が誘発されることも報告した。興味深いことに, 同一の脱分極パルスにより, 一部では IPSC の長期増強 (LTP) が生じることが判明した。IPSC の LTD 誘発には, L 型高閾値電位依存性 Ca チャネルの活性化が必要であることがわかっているが, LTP 誘発に関しては不明である。そこで今回は, L 型以外の電位依存性 Ca チャネルの, LTP 誘発への関与を調べた。錐体細胞における高閾値電位依存性 Ca チャネルの分布は, 細胞体と樹状突起では異なることが報告され

ている。例えば, 細胞体部では L 型及び R 型が主に分布するのに対し, 樹状突起では L 型に加え P/Q 型, N 型が存在する。この部位的相違を考慮し, 細胞体と樹状突起のシナプスを刺激し分ける手法, 及び電気泳動的に投与した GABA に対する電流応答を解析する手法などを用いた結果, 細胞体部の LTP 誘発には R 型が, 樹状突起の LTP には P/Q 型が寄与することが判明した。

高閾値電位依存性 Ca チャネルは, サブタイプにより活性化, 不活性化の電位依存プロファイルが異なる。これらを考え合わせると, 錐体細胞においては静止膜電位とそこからの脱分極の程度により, その細胞へ入力する抑制性シナプス伝達効率がダイナミックに制御されている可能性も考えられる。

(10) ミトコンドリアと滑面小胞体による容量性 Ca^{2+} 流入の制御とノルアドレナリンによる二面性制御

名古屋学芸大学管理栄養学部解剖生理 (久場健司, 久場雅子, 須崎 尚)

熱産生器官である褐色脂肪細胞は、交感神経線維の支配を密に受け、 β_1 受容体の活性化を介して、脂質の β 酸化からミトコンドリアでの電子伝達の促進と同時に、脱共役蛋白 (UCP) を活性化し、ATP を合成することなく熱を発生する。一方、 α_1 受容体の活性化は、 IP_3 による Ca^{2+} 遊離と容量性 Ca^{2+} 流入により細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) を一過性に上昇する。しかしながら、 β_3 受容体を介する UCP の活性化により、ミトコンドリアの H^+ 勾配の短絡による膜電位の減少により、 Ca^{2+} 遊離が起こることが期待されるが、これによる $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の動態変化、 β_3 受容体と α_1 受容体の活性化による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 応答の相互作用については全く未知である。

培養したラット褐色脂肪細胞に Ca^{2+} イメージング法と蛍光によるミトコンドリア膜電位測定法を応用した。 β 受容体の活性化により、2 相性の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が起こり、第 1 相はミトコンドリアの脱共役剤である FCCP により抑制され、ミトコンドリアの膜電位減少を伴い、第 2 相は外液の Ca^{2+} 除去により消失した。FCCP は 2 相性の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を起こし、第 1 相はミトコンドリアの膜電位減少を伴い、第 2 相は無 Ca^{2+} 液により消失した。 β 活性化剤と FCCP による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇の第 2 相中では、サブシガーギンは無効か逆に $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を減少する。これらの結果は、ミトコンドリアからの Ca^{2+} 遊離により、滑面小胞体の Ca^{2+} が減少し、容量性 Ca^{2+} 流入が活性化されること

を示唆する。一方、 α 及び β 活性化剤やサブシガーギンの作用により容量性 Ca^{2+} 流入が活性化された状態で、 α 及び β 活性化剤や FCCP を投与すると、容量性 Ca^{2+} 流入の活性化が抑制され、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は逆に減少する。このことから、容量性 Ca^{2+} 流入は滑面小胞体の Ca^{2+} 濃度に 2 面性 (ベル型: 中程度の Ca^{2+} 減少で活性化, 強い減少で抑制) に依存することが示唆される。また、夏に培養した褐色脂肪細胞では、容量性 Ca^{2+} 流入が常時活性化され、静止時の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ レベルが高く、ノルアドレナリンの α 及び β 作用は $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 減少効果のみであり、サイロキシンは、秋・冬・春型の細胞でのノルアドレナリンの作用を夏型の応答へ変換することも解った。

以上の結果は、ミトコンドリアと滑面小胞体が機能的に連関し、容量性 Ca^{2+} 流入を制御し、ATP の生成とエネルギー散逸のバランスを巧妙に制御する機構の存在を示唆し、この機構が α 及び β 受容体の制御下にあること、更に、季節により褐色脂肪細胞の静止時の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ レベルを調節する遺伝子の発現が変化し、これが甲状腺ホルモンにより制御されている可能性を示唆する。また、UCP が骨格筋細胞やその他の細胞に存在することから、褐色脂肪細胞で見られるミトコンドリアと滑面小胞体の機能的連関機構と容量性 Ca^{2+} 流入の制御は細胞一般に共通する機序である可能性がある。

(11) 海馬苔状線維シナプスにおけるカイニン酸受容体の機能

神谷温之 (北海道大学大学院医学研究科 神経機能学講座 分子解剖学分野)

イオンチャンネル型グルタミン酸受容体のうち、AMPA 受容体は興奮性シナプス伝達に、NMDA 受容体はシナプス可塑性に必須の分子であることが知られているが、カイニン酸受容体の機能については不明な点が多い。私たちはこれまで、脳内で最も高密度にカイニン酸受容体を発現する海馬 CA3 野苔状線維シナプスを対象として、その生理的機能を追及してきた。この中で、カイニン酸受容体は特異的に苔状線維シナプス伝達を制御する機能を

有し、(1) ポストシナプスでの作用として、低振幅で緩徐なシナプス後電位を生じ興奮性シナプス伝達の一部を担うこと、(2) プレシナプスでの作用として、短期可塑性の増幅に寄与すること、などを示してきた。このうち、(2) のプレシナプス作用についてはこれまで直接的な証明がなされておらず、苔状線維シナプスのプレシナプスにカイニン酸受容体が局在するか否かについて議論が分かれている。本研究会では、私たちのデータを中心に、

プレシナプスでのカイニン酸受容体の機能を示唆するこれまでの実験結果を紹介し、これらの結果を説明するさ

まざまな可能性を整理することで、カイニン酸受容体の生理的意義を検証するための方向性を明らかにしたい。

(12) 小脳プルキンエ細胞の興奮性シナプス伝達におけるグルタミン酸トランスポーターの役割

小澤澪司 (群馬大学・神経生理学)

中枢神経系のグルタミン酸作動性シナプスでは、シナプス前細胞の興奮によって軸索終末からシナプス間隙に放出されるグルタミン酸は、放出後直ちに除去される。このグルタミン酸の処理には、グルタミン酸トランスポーターが重要な役割を果たす。脳のグルタミン酸トランスポーターには、GLAST (excitatory amino acid transporter 1; EAAT1), GLT-1 (EAAT2), EAAC1 (EAAT3), EAAT4 の4種類があり、興奮性シナプス伝達はこれらのグルタミン酸トランスポーターの活動によって大きな影響を受ける。

小脳のプルキンエ細胞 (Purkinje cell; PC) は登上線維 (climbing fiber; CF) 及び平行線維 (parallel fiber; PF) と樹状突起上に興奮性シナプスを形成し、これらのシナプスはベルクマングリア (Bergmann glia; BG) の突起により取り囲まれている。BG には、GLAST が濃密に発現しているが、GLT-1 もタンパク量にして GLAST の約 1/6 量程度存

在する。また、プルキンエ細胞のシナプス後部には、EAAT4 が豊富に存在する。一方、EAAC1 はニューロン性トランスポーターとして PC に発現するとされてきたが、最近 PC には存在しないとする研究結果も提出されている。

筆者らは、PC の興奮性シナプス伝達における、これらのグルタミン酸トランスポーターの役割分担の解明を目指して研究を進めている。今回は、主要なグリア性トランスポーターである GLAST 及び主要なニューロン性トランスポーターである EAAT4 それぞれのノックアウトマウスを対象として、CF 及び PF シナプスで興奮性シナプス後電流 (Excitatory postsynaptic current; EPSC) を記録し、それらの kinetics を野生型マウスと比較することにより、GLAST と EAAT4 の役割分担について考察した。なお、本研究で用いた GLAST, EAAT4 ノックアウトマウスは、東京医科歯科大学の田中光一教授から提供を受けた。

(13) 中隔核シナプス伝達におけるドーパミンの働き

赤須 崇^{1,2}, 蓮尾 博¹, 浅海安雄¹ (¹久留米大学医学部生理第二講座, ²久留米大学高次脳疾患研究所)

大脳辺縁系の一員として中隔核はさまざまな認知機能、怒りや不安などの情動機能さらには自律機能にも深く関与している。中隔核への主な入力線維は海馬の CA3 ニューロンの軸索であり、興奮性アミノ酸を伝達物質として EPSP を発生する。中隔核は主に GABA ニューロンから構成され、投射ニューロンは主に視床下部や脳幹の諸神経核を支配する。このうち介在神経は海馬からの興奮性ニューロンの投射を受け、中隔核ニューロン自体にも神経を送ることで、多シナプス性に fast IPSP と slow IPSP を発生する。Fast IPSP は GABA_A 受容体を介しており、slow IPSP は GABA_B 受容体を介して発生する。また中隔核は、中脳の腹側被蓋から投射されるドーパミン (DA) ニューロンを受ける。DA は攻撃的な行動を抑制

し、報酬系として働くことが知られており、海馬-中隔核-視床下部回路の重要な調節ニューロンである可能性が高い。しかし中隔核ニューロンに対する DA の働きについては、電気生理学的にこれまでほとんど検討されていない。われわれは海馬からの入力線維を保存したラット脳スライス標本を作成し、EPSP や fast IPSP と slow IPSP に対する DA の作用を検討した。低濃度 (1-30 μ M) の DA を 5-15 分間灌流投与すると、中隔核ニューロンの膜電位には 1-2 mV 程度の過分極電位しか発生せず、膜抵抗もほとんど変化しないが、100 μ M の濃度になると、著明な入力抵抗の減少を伴う約 8 mV の過分極電位が発生した。そこで、今回の実験では 30 μ M 以下の濃度の DA の作用を検討した。通常的人工脳脊髄液中では、比

較的短時間 (5-15 分間) の DA 灌流によって EPSP が増大し, fast IPSP と slow IPSP は著明に抑制された。この EPSP の振幅の増大は fast IPSP をビククリンで完全に抑制するとみられなくなることから, fast IPSP の抑制による二次的な亢進といえる。DA は単シナプス性に発生させた fast IPSP を同程度に抑制したことから, 先行する興奮性シナプス伝達の抑制ではなく, 抑制性シナプス伝達を直接減弱させたといえる。DA 受容体は D1 と D2 ファミリーに分かれ, さらに D1 ファミリーは D1 と D5 受容体からなる。一方, D2 ファミリーは D2, D3, D4 受容体に分類される。種々の選択的アゴニストとアンタゴニストを用いた研究から, DA による IPSP の抑制は主に D4 受容体を介して発生することがわかった。DA は外部

から GABA を与えることによって発生させた電流 (I_{GABA}) や微小抑制性シナプス後電位 (miniature IPSP: mIPSP) の振幅には影響を与えないことから, シナプス後膜の $GABA_A$ 受容体には影響を与えないことがわかる。おそらくシナプス前終末の D4 受容体に働き, GABA の放出を抑制することで IPSP を抑制すると思われる。一般的に, D4 受容体は *adenylate cyclase* とネガティブに関連するといわれている。しかし, DA による IPSP の抑制は *forskolin* 投与によって抑制されず, PKA 阻害剤である H-89 は DA による IPSP の抑制作用をブロックしなかった。また PKC の関与も実験的に確認されず, 細胞内情報伝達系は現在のところ不明である。

(14) シナプス前 Ca^{2+} チャネルとしての P2X 受容体

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

アストロサイトやニューロンが様々な分子機構を介して ATP を細胞外に放出する事実が数多く報告されている。細胞外に放出された ATP は, (1) ニューロンおよびアストロサイトに発現する ATP 受容体を活性化し, さらに, (2) *ecto-nucleotidase* によって *adenosine* に変換された後, *adenosine* 受容体を活性化する, という二つの機構を介してシナプス伝達を多重に修飾する (Kato & Shigetomi, 2001; Kato et al., 2003; Kawamura et al., 2004)。ATP 受容体は, ATP-gated channel である P2X 受容体チャネルと代謝型の P2Y 受容体に大別されるが, なかでも P2X 受容体チャネルは, 中枢神経系に発現する受容体チャネルの中で静止膜電位レベルにおける最も高い Ca^{2+} 透過性を示すため (Egan & Khakh, *J Neurosci* 24:3413-, 2004), 中枢神経系における Ca^{2+} 流入源としての機能が予想されている。

内臓性求心情報が収斂し統合される延髄孤束核には, P2X 受容体タンパクが高密度に発現しているとともに, その局所的活性化が様々な呼吸循環応答を誘発する事実が *in vivo* 標本において報告されており, 中枢神経系における P2X 受容体チャネル活性化の意義を検討する上で優れた系である。

我々は, 幼若ラット脳幹スライス孤束核から誘発および自発 EPSC を記録し, 細胞外 ATP 濃度の上昇が, *adenosine*

受容体を介した誘発 EPSC 振幅の減少と, P2X 受容体を介した自発 EPSC 頻度の増加を引き起こす事実を報告した (Kato & Shigetomi, 2001)。TTX 存在下, 孤束核スライス 2 次ニューロンからは, 平均振幅約 10 pA, 頻度約 5-10 回/秒の微小 EPSC が観察される (basal mini)。その頻度は, P2X 受容体作動薬によって約 20-30 回/秒まで有意かつ著明に増加した。この増加は, Cd^{2+} によって影響されず, 細胞外 Ca^{2+} に依存していた。この時, 約 80% のニューロンで, 頻度増加に伴って, 高振幅微小 EPSC (large mini; 20-60 pA) が観察された。その振幅分布は basal mini のそれと有意に異なっていたが, kinetic には差がなかった。P2X 受容体作動薬による large mini の発生中も, AMPA 直接投与による電流の振幅は変化を示さなかった。Cyclopiazonic acid, ryanodine あるいは 2-aminoethoxydiphenyl borate 灌流下にも large mini は非灌流時と同様に観察された。一方, basal mini は, 電位依存性 Ca チャネル (VDCC) 遮断や細胞外 Ca^{2+} 除去によっても有意な影響なく観察された。P2X 受容体作動薬は, Cd^{2+} によって誘発 EPSP が完全に抑制された状態においても高頻度・高振幅微小 EPSP を惹起し, その時間的加重はシナプス後細胞に活動電位を発生させた。以上より, 孤束核興奮性シナプスにおけるシナプス前 P2X 受容体を介した軸索終末 Ca^{2+} 濃度上昇は, 高効率の同期的 Ca^{2+} 依存的グルタミン酸放出を

惹起し、シナプス前細胞の興奮（すなわち終末 VDCC からの Ca^{2+} 流入）を介さない「シナプス伝達」を起こして二次ニューロン以下の神経回路の興奮を引き起こす事実が示された。この事実は、孤束核ネットワークにおける細胞外 ATP 濃度上昇が、求心性興奮性シナプス入力と機能的に等価の情報となりうる可能性を示している (Shigetomi & Kato, 2004)。

参考文献：

Kato F, Shigetomi E, Distinct modulation of evoked and spontaneous EPSCs by purinoceptors in the nucleus tractus solitarius of the rat. *J Physiol (Lond)* **530**: 469-486 (2001).

Kato F, Kawamura M, Shigetomi E, Tanaka J, Inoue K, Synaptic purinoceptors: the stage for ATP to play its “dual-role”. *J Pharmacol Sci* **94**, 107 – 111 (2004).

Kawamura M, Gachet C, Inoue K, Kato F, Direct excitation of inhibitory interneurons by extracellular ATP mediated by P2Y_1 receptors in the hippocampal slice. *J Neurosci* **24**: 2004.

Shigetomi E, Kato F, Action potential-independent release of glutamate by Ca^{2+} entry through presynaptic P2X receptors elicits postsynaptic firing in the brainstem autonomic network. *J Neurosci* **24**: 3125-3135 (2004).

(15) トランスジェニックマウスを用いたシナプトフルオリン開口放出計測システム

八尾 寛^{1,2}, 荒木力太^{1,2}, 石塚 徹^{1,2}, 柳川右千夫^{2,3}, 阪上洋行^{2,4},
明石 馨⁵, 平林敬浩⁶, 宮崎純一⁷, 崎村建司⁵

(¹ 東北大院・生命科学, ²CREST・JST, ³群馬大院・医, ⁴東北大院・医,

⁵新潟大・脳研, SORST・JST, ⁶自然科学研究機構・生理研, ⁷大阪大院・医)

シナプス前終末において、伝達物質は小胞中に蓄えられ、開口放出により細胞外に放出される。開口放出は細胞の基本的な機能だが、直接的な計測が難しく、研究の進展が阻まれていた。われわれは、シナプス前終末からの伝達物質開口放出を解析する目的で、コンディショナラルエクプレッション法を応用して、pH 感受性機能プローブを部位特異的に発現する遺伝子改変マウスを作製した。このマウスを用いた研究法を紹介し、その将来性を展望する。

小胞膜タンパクのひとつである VAMP-2 の C 末に pH 感受性 GFP 誘導体のフルオリンを結合させた融合タンパク（シナプトフルオリン）を神経細胞に強制発現させることにより、シナプス前終末のアウトプットである開口放出を定量化することができることが報告されている^{1,2}。シナプトフルオリンを脳において部位特異的に発現させる目的で、シナプトフルオリン遺伝子を組み込んだ loxP トランスジェニックマウスを作製した。部位特異的なプロモータ制御下に Cre リコンビナーゼを発現するマウスと loxP マウスとの交配により産まれたリコンビナントマウスの脳組織において、期待された部位にシナプトフ

ルオリンの発現を認めた。シナプトフルオリンの分布から、シナプス前終末に局在していると考えられる。また、発現部位における蛍光変化を測定し、 NH_4Cl やバフィロマイシンに対する感受性から、この蛍光変化が開口放出に由来するものであることを検証した。

われわれが開発した開口放出測定法は、非侵襲的であり、生きた動物を用いて再現性良く繰り返し測定できる可能性がある。また、部位特異的・時期特異的・薬剤誘導特異的に Cre リコンビナーゼを発現するマウスと交配すれば、部位特異的・時期特異的・薬剤誘導特異的にシナプトフルオリンを発現させることも可能である。このような遺伝子改変動物を用いた生体機能計測法は、従来の測定法と比較して再現性、利便性、特異性、検出感度において格段に優れており、有用な解析手段になることが期待される。

1. Miesenböck G, De Angelis DA & Rothman JE (1998) *Nature* **394**:192-195
2. Sankaranarayanan S, De Angelis DA, Rothman JE & Ryan TA (2000) *Biophys J* **79**: 2199-2208

(16) 海馬苔状線維終末からの BDNF 開口放出の測定

須山成朝, 小橋雄一, 石塚 徹, 八尾 寛 (東北大学 生命科学研究科 脳機能解析分野)

中枢神経系において, 脳由来神経栄養因子 (BDNF) は神経細胞の発生, 分化, 成長等を調節する分子として同定されたが, 近年, 神経伝達物質放出の促進, LTP の発生, ナトリウムチャンネルを介した活動電位の発生等シナプス可塑性を調節する機能を有することが報告されている。BDNF などの神経ペプチドは, 神経細胞体で合成され, 有芯小胞 (LDCV) に充填される。LDCV は, 軸索終末において活動依存的に開口放出される。LDCV の開口放出を制御しているメカニズムの研究は, シナプス可塑性との関連において重要であるにもかかわらず, 未解明の部分が多く残されている。

本研究は BDNF の放出制御機構を解明することを目的とし, このために開口放出測定法の開発を行った。BDNF と黄色蛍光タンパク質変異体 (Venus) の融合タンパク質を海馬神経細胞に強制発現させ, シナプス前終末において LDCV の開口放出にともなう BDNF の拡散による蛍光強度の減少から, BDNF の開口放出を光学的に測定した。

BDNF-Venus は神経細胞特異性を有するシンドビスウィルスベクターを介して強制発現させた。実験には SD 系ラット E18-P1 の海馬の初代培養系及び海馬急性スライス系を用い, ウィルスベクター感染後 2-3 日で測定を行った。

BDNF-Venus シンドビスウィルスベクターに感染した海馬初代培養においては, ニューロン特異的に発現が確認された。蛍光は, 神経細胞体, 樹状突起, シナプス前終末に認められた。細胞体-樹状突起部位においては, 高カリウム刺激に応答して顕著な蛍光強度の減弱が観察された。この応答は細胞外液カルシウムに依存し, 細胞外カルシウムの除去によりほぼ完全に消失した。したがって, BDNF の開口放出によるものと考えられる。分散培養系では, シナプス前終末を同定することが困難なので, 海馬急性スライスで苔状線維終末を同定し, BDNF 開口放出を光学的に定量化することを試みた。脳定位固定法により海馬歯状回にウィルスベクターを注入し, 3 日後に歯状回顆粒細胞の軸索である苔状線維の終末に BDNF-Venus を同定した。高頻度の電気刺激によって単一の苔状線維終末において, BDNF-Venus の蛍光強度が活動依存的に減少すること, および, この応答が *N*-ethylmaleimide (NEM) により抑制されることを認めた。すなわち, 海馬のネットワークを形成しているシナプス前終末において BDNF が活動依存的に開口放出されることが示唆される。このようなフィードフォワードの BDNF の分泌はこれまでに知られている細胞体樹状突起部位からの分泌と異なる役割を担うと考えられる。

(17) 生後発達に伴う前シナプス活動電位変化のメカニズム

中村行宏, 高橋智幸 (東京大学大学院医学系研究科神経生理)

ラット脳幹の音源定位聴覚中継シナプス calyx of Held では, 聴覚が獲得される生後 1-2 週にかけシナプス特性に変化が生じ, 高頻度入力信号に対して忠実に対応する高信頼性 (HiFi) のシナプス伝達が獲得される。このシナプス伝達特性の変化は, 後シナプス細胞における NMDA 受容体発現量の減少 (Futai et al, 2001) を初めとする複数の要因によってもたらされることが考えられている。生後 1-2 週にかけて生じる神経終末端の活動電位幅の短縮 (Taschenberger & vonGersdorff, 2000) もその一因である

が, 活動電位を制御するメカニズムは明らかでない。K チャンネル, Na チャンネルの生後発達変化が活動電位に変化をもたらす可能性を検討するために, 生後 7 日 (P7) および 14 日 (P14) の神経終末端より電位依存性 K^+ 電流, Na^+ 電流をパッチクランプ法によって記録し, それぞれの生後発達変化を解析した。

P7 に比べ P14 の前シナプス K^+ 電流は, 速い活性化キネティクスと, 単位膜容量当たり大きな振幅を示した。しかし電位依存性に変化はなく, それぞれ 1 mM TEA,

10 nM margatoxin によって阻害される成分として求めた高閾値活性化型 (Kv3) 電流, 低閾値型 (Kv1) 電流の全 K^+ 電流に対する比率 (Ishikawa et al, 2003) にも差は認められなかった。

一方, 前シナプス Na^+ 電流は, 電流密度, 電位依存性, 活性化キネティクスのいずれの点においても発達変化を示さなかったが, P7 に比べて P14 における Na^+ 電流の不活性化キネティクスは速く, その差は統計的に有意であった。

以上の結果から, K^+ 電流密度の増加, K^+ 電流活性化時間の短縮, および Na^+ 電流不活性化時間の短縮がすべて, 生後発達に伴う前シナプス活動電位幅の短縮に寄与するものと結論される。

参考文献

Futai et al, (2001) *J.Neurosci.* **21**:3342-49

Taschenberger & vonGersdorff, (2000) *J.Neurosci.* **20**:9162-73.

Ishikawa et al, (2003) *J.Neurosci.* **23**:10445-53.

(18) キンギョ Mb1型双極細胞における Ca^{2+} マイクロドメイン・シナプスリボン・開口放出部位の分布

緑川光春, 立花政夫 (東大・院人社・心理)

キンギョ網膜の Mb1 型双極細胞の軸索終末部には, シナプスリボンと呼ばれる微細構造がある。シナプスリボンの周囲には多数のシナプス小胞が係留されており, その直下の細胞膜に Ca^{2+} チャネルが局在していると考えられている。双極細胞の開口放出には早い成分と遅い成分がある。本研究の目的は, Ca^{2+} 流入部位と開口放出部位を特定し, 2 相性開口放出の原因を探ることである。

本研究では, 単離した Mb1 型双極細胞を膜電位固定し, Ca^{2+} 流入部位と開口放出部位を近接場光顕微鏡で観察すると共に, 網膜の超薄連続切片を電子顕微鏡で観察し, 双極細胞軸索終末部のシナプスリボンとシナプス小胞の分布を調べた。

Mb1 型双極細胞に High K^+ 溶液に溶かした FM 色素を細胞外から投与してシナプス小胞に FM 色素を取り込ませた。この双極細胞にパッチ電極から蛍光性 Ca^{2+} 指示薬 (Fluo-5F, 200 μM) を導入し, 膜電位固定下で Ca^{2+} 電流を計測すると共に, 近接場光顕微鏡で軸索終末部における Ca^{2+} 流入部位と開口放出部位を観察した。 Ca^{2+} 電流を活性化させると複数の部位で蛍光性 Ca^{2+} 指示薬の蛍光強度が局所的に急上昇し, Ca^{2+} 電流の持続時間を長くする

と蛍光は各部位を中心に同心円状に拡がった。したがって, これらは Ca^{2+} マイクロドメインであると考えられる。脱分極パルスで Ca^{2+} 電流を活性化させた時に生じる FM 色素の蛍光強度変化から, 開口放出のタイミングと場所を推定することができた。長い脱分極パルスで Ca^{2+} 電流を持続的に活性化させると, 早い成分に対応する開口放出は Ca^{2+} マイクロドメインの近傍で生じ, 遅い成分に対応する開口放出は Ca^{2+} マイクロドメインの近傍のみならず, そこから離れた場所でも生じた。

兵庫医科大学の塚本吉彦教授との共同研究により, キンギョ網膜の超薄連続切片を作成し, Mb1 型双極細胞軸索終末部を電子顕微鏡で観察した。形態的に計測したシナプスリボンの分布と近接場光顕微鏡で得られた Ca^{2+} マイクロドメインの分布を比較したところ, 両者は非常に類似していた。この結果は, Ca^{2+} チャネルがシナプスリボンの直下に局在しているとの仮説を支持している。

以上の結果から, 網膜 Mb1 型双極細胞においてシナプス小胞と Ca^{2+} チャネル集積部位 (シナプスリボン部位) 間の距離が 2 相性の開口放出を生じさせる重要な要因として示唆された。

(19) リドカイン誘起てんかん様発射の発生機序

田中永一郎, 東 英徳 (久留米大・医・生理学第一講座)

成熟ラット海馬スライス標本を作成し, CA3, および CA1

領域から細胞外記録を行い, 種々の濃度 (1~100 μM) の局

所麻酔薬, リドカインを灌流投与すると, field PSPs (fPSPs) および field EPSPs (fEPSPs) の一過性抑制に引き続き持続性増強に伴うてんかん様発作放電がみられた。Presynaptic volley はリドカイン濃度 ($>3 \mu\text{M}$) 依存性に抑制された。fPSPs および fEPSPs (f(E) PSPs) の一過性抑制は A_1 受容体拮抗薬, DPCPX ($1 \mu\text{M}$) 存在下で消失した。CA1 錐体細胞から細胞内記録を行い, fast EPSPs および fast IPSP に対するリドカインの効果を検討すると, 両者ともリドカイン濃度依存性に持続的に抑制されたが, その平均 IC_{50} はそれぞれ $68 \mu\text{M}$ および $7 \mu\text{M}$ で, fast IPSP の方が感受性が高かった。Fast EPSPs と fast IPSPs を含む PSPs ではリドカイン低濃度 ($30 \mu\text{M}$) 投与により fast and

late IPSPs 抑制に起因する fast EPSPs 増強がみられた。一方, Glutamate 誘起脱分極電位および GABA 誘起過分極電位はリドカインにより変化しなかった。さらに, fEPSPs のリドカイン誘起持続性増強は CA3 切除と CA2 領域 stratum oriens 切断によって著しく抑制された。これらの結果は, リドカインによる f(E) PSPs 一過性抑制は A_1 受容体活性化が関与すること, f(E) PSPs 持続性増強は GABA 性 feedforward および feedback inhibition の脱抑制によること, を示唆した。また, CA2, CA3 両領域から CA1 領域へのシナプス入力と CA3 領域内の反回興奮伝搬回路が fEPSPs の一過性抑制と引き続く持続性増強の発生に必須であるという結論を得た。

(20) マウスを用いた眼球サッケード運動系の解析

坂谷智也, 伊佐正 (自然科学研究機構・生理学研究所・発達生理学研究室・認知行動発達機構研究部門)

視線移動時にみられる高速の眼球運動 (サッケード) は, 脳により正確に制御される随意運動である。ヒトではサッケードの動的特性に注意・動機付けなどの精神状態が反映するとされている。この眼球運動を制御する神経システムの構造とその修飾機構を解明するにあたり, 個体での遺伝子操作が可能なマウスをモデル動物として扱うことはきわめて有用である。我々はこれまでに高速ビデオと汎用 PC, 独自の動画画像解析ソフトを組み合わせでマウスの眼球運動測定システムを開発し, マウスのサッケードを定量的に測定・解析することに成功した (Sakatani & Isa 2004 Neurosci Res)。

【マウスにおける中脳上丘のサッケード運動地図の解析】

サッケード測定システムと併せて, 覚醒状態で頭部を固定したマウスの脳内を微小電流刺激する実験系を構築し, マウスにおいてもサルやネコと同様に, 中脳にある上丘を高頻度電気刺激することでサッケードが人工的に誘発されることを見いだした。この誘発サッケードについて以下のことを明らかにした。(1) サッケードの誘発と刺激強度の間に顕著な閾値効果がみられ, この閾値は上丘浅層では高く中間層・深層で低くなる (2) 誘発されるサッケードのベクトルは上丘の刺激位置に依存しており, 上丘吻側から尾側にかけて振幅が増大し, また内側から外側にかけて上方から下方へとサッケードの方向が

変化するといった運動地図が上丘に存在する (3) サッケードの振幅と最大角速度との間に正の強い相関関係がある。これらの結果はネコやサルで報告されているサッケードの誘発機構と酷似しており, 側眼動物であるマウスに関しても, 少なくとも上丘下流の神経回路について前眼動物であるネコやサルと基本的に類似のサッケード生成機構が備わっていることが示唆された。

【ノックアウトマウスを用いたサッケード制御系における GABA の機能解析】

サッケードの制御における各種神経伝達物質の役割については, これまでのところほとんど不明である。そこで上丘電流刺激によるサッケード誘発系を, 抑制性神経伝達物質 GABA の合成酵素である GAD65 のノックアウトマウスに適用し, サッケード制御システムにおける GABA の役割について解析した。その結果 GAD65KO マウスでは (1) 刺激中に眼球の不安定な振動が頻繁にみられ (2) サッケードの最大速度が上昇し (3) 振幅の大きなサッケードがみとめられなかった。以上の結果とサッケード制御の理論モデルに基づいた計算機シミュレーションの結果を比較することにより, サッケード制御系において GAD65 由来の GABA が主としてサッケードの振幅を計算するフィードバックの効率調節に関与していることが示唆された。

(21) Changes of AMPA Receptor and Synapse Density in the Flocculus after Short-term and Long-term Adaptation of Horizontal Optokinetic Response

Wen Wang and Ryuichi Shigemoto

(自然科学研究機構生理学研究所 脳形態解析, 総研大, 科学技術振興機構 CREST)

AMPA receptor (AMPA) is an essential component in long-term depression of parallel fiber (PF)-Purkinje cell (PC) synaptic transmission underlying cerebellar motor learning. However, it has not been well demonstrated if physiological learning is accompanied with reduction of AMPA receptor content or synapse density in these synapses *in vivo*. Using SDS-digested freeze-fracture replica labeling, we quantitatively analyzed AMPAR and synapse density in PF-PC synapses before and after adaptation of the horizontal optokinetic response (HOKR) eye movement in adult C57BL/6J mice. PF-PC synapses were identified in the replica samples by double labeling for the GluR $\delta 2$ subunit. Immunogold particles for GluR1-4 and delta2 were concentrated on clusters of intramembrane particles, which indicate postsynaptic areas, on E-face of Purkinje cell dendritic membrane. In the middle one third of the flocculus, which is involved in this motor

learning, we found a significant reduction of AMPAR density at PF-PC synapses after one hour of HOKR training, accompanied with a significant gain increase of HOKR indicating short-term adaptation. No such difference in AMPAR density was detected in the flocculus of untrained animals or in the paraflocculus of the trained animals. Density and size of PF-PC synapses in the flocculus of the trained animals did not change significantly after the one-hour training. In contrast, after five-day consecutive daily training, which caused significant increase of basal gain values (long-term adaptation), density but not size of PF-PC synapses was significantly reduced. These results suggest that reduction of synaptic AMPAR and synapse number in the flocculus is involved in short-term and long-term HOKR adaptation, respectively.

21. 心臓血管系イオンチャネルの機能障害に基づく 病態発症機構の解明とその治療戦略の構築

2005年3月8日－3月9日

代表・世話人：松浦 博（滋賀医科大学生理学第二講座）

所内対応者：岡田 泰伸（自然科学研究機構・生理学研究所）

（1）ノックアウトマウスを用いた心房筋および心室筋細胞における K_{ATP} チャネルの役割の解析

中谷 晴昭¹⁾, 三枝 紀子^{1),2)}, 斎藤 智亮¹⁾, 佐藤 俊明¹⁾, 三木 隆司³⁾, 清野 進³⁾, 小室 一成²⁾
(千葉大学大学院・医学研究院・薬理学¹⁾,
千葉大学大学院・医学研究院・循環病態医科学²⁾,
神戸大学大学院・医学研究科・細胞分子医学³⁾)

（2）インスリンの ATP 感受性 K^+ チャネル活性化における細胞骨格の役割

河野 崇¹⁾, 庄野 加余子²⁾, ナザリーホセイ²⁾, 中屋 豊²⁾
(徳島大学・医学部・麻酔学教室¹⁾, 徳島大学・医学部・特殊栄養学講座²⁾)

（3）モルモット心房筋と心室筋の I_{K1} の差異における Kir2.x サブユニットと細胞内ポリアミンの関与

Yan Ding-Hong, 穎原 嗣尚, 石原 圭子
(佐賀大学・医学部・生体構造機能学・器官細胞生理分野)

（4）Ca 電流不活性化の β スイッチ仮説と心筋活動電位モデル

平野 裕司（東京医科歯科大学・難治疾患研究所・循環器）

（5）Modified sympathetic response of cardiac muscle in mice lacking the voltage-dependent Ca^{2+} channel $\beta 3$ subunit

尾野 恭一, 村上 学, 藤澤 進, 徐 峰, 飯島 俊彦
(秋田大学・医学部・機能制御医学講座)

（6）心筋 L 型 Ca チャネル活性に対する Jab1/CSN5 の関与

當瀬 規嗣¹⁾, 亀田 和利²⁾, 深尾 充宏¹⁾, 長島 雅人¹⁾,
小林 武志¹⁾, 筒浦 理正¹⁾, 山田 陽一¹⁾, 山下 敏彦²⁾
(札幌医科大学・医学部・生理学第一¹⁾, 札幌医科大学・医学部・整形外科²⁾)

（7）心筋細胞アポトーシスにおけるクロライドイオンチャネルの役割

高橋 信之¹⁾, 田辺 秀^{1),2)}, 王 曉明¹⁾, 浦本 裕美¹⁾,
寺社下 浩一²⁾, 内田 信一³⁾, 佐々木 成³⁾, 岡田 泰伸¹⁾
(自然科学研究機構・生理学研究所・機能協関部門¹⁾,
中外薬品・富士御殿場研究所²⁾,
東京医科歯科大学大学院・腎臓内科³⁾)

（8）薬物による HERG チャネル電流抑制機構について

保坂 幸男¹⁾, 木下 賢吾²⁾, 中村 春木²⁾, 倉智 嘉久¹⁾
(大阪大学大学院・医学系研究科・薬理学講座・分子・細胞薬理学¹⁾, 大阪大学・蛋白質研究所²⁾)

（9）イヌ右室心筋切片を用いた Brugada 症候群モデルにおける心室細動発生機序の解明：高解像度光マッピングによる検討

相庭 武司¹⁾, 清水 渉²⁾, 日高 一郎¹⁾, 上村 和紀¹⁾, 稲垣 正司¹⁾, 杉町 勝¹⁾, 砂川 賢二³⁾
(国立循環器病センター研究所・循環動態機能部¹⁾,
国立循環器病センター・心臓血管内科²⁾,
九州大学大学院・医学研究院・循環器内科³⁾)

(10) QT 延長症候群とブルガダ症候群症例における遺伝子変異検出率とチャネル変異の特徴

吉田 秀忠¹⁾, 竹中 琴重¹⁾, 牧山 武¹⁾, 大野 聖子¹⁾, 土井 孝浩¹⁾, 辻 啓子¹⁾, 堀江 稔²⁾
 (京都大学大学院・医学研究科・循環病態学¹⁾, 滋賀医科大学・呼吸循環器科²⁾)

(11) ヒト肺動脈平滑筋のイオンチャネルの分子生物学的及び電気生理学的検討

中島 敏明¹⁾, 飯田 陽子²⁾, 大沼 仁¹⁾, 岩沢 邦明²⁾, 城 大祐²⁾, 永井 良三²⁾
 (東京大学医学部大学院・虚血循環生理¹⁾, 東京大学医学部大学院・循環器内科²⁾)

(12) ウサギ肺静脈起源の異常興奮とイオンチャネル発現

山本 充¹⁾, 本荘 晴朗²⁾, 清水 敦哉²⁾, 堀場 充³⁾,
 李 鍾国³⁾, 安井 健二⁴⁾, 神谷 香一郎²⁾, 児玉 逸雄³⁾
 (名古屋大学大学院・医学系研究科・細胞生物物理学¹⁾,
 名古屋大学・環境医学研究所・液性調節分野²⁾,
 名古屋大学・環境医学研究所・循環器分野³⁾,
 名古屋大学・環境医学研究所・生体情報計測・解析(スズケン)寄附研究部門⁴⁾)

(13) 心筋ミトコンドリア Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネルの性質・機能と作用薬

今泉 祐治, 大矢 進, 坂本 多穂, 桑田 有紀子, 村木 克彦
 (名古屋市立大学大学院・薬学研究科・細胞分子薬効解析学分野)

(14) 植物ステロール由来サポニンによる心血管系性ホルモン受容体の non-genomic 経路の特異的活性化

古川 哲史, 黒川 洵子, 白 長喜 (東京医科歯科大学・難治疾患研究所)

(15) 心筋 I_{Ks} と KCNQ1/KCNE1 チャネルのメフェナム酸感受性の違い

豊田 太, 丁 維光, 松浦 博 (滋賀医科大学・生理学第二講座)

【参加者名】

松浦 博 (滋賀医大), 岡田 泰伸 (生理研), 中谷 晴
 昭 (千葉大院・医), 河野 崇 (徳島大・医), 中屋 豊
 (徳島大・医), Yan Ding-Hong (佐賀大・医), 額原 嗣
 尚 (佐賀大・医), 石原 圭子 (佐賀大・医), 平野 裕
 司 (東京医歯大・難治研), 尾野 恭一 (秋田大・医),
 當瀬 規嗣 (札幌医科大・医), 高橋 信之 (生理研),
 浦本 裕美 (生理研), 保坂 幸男 (大阪大院・医), 倉
 智 嘉久 (大阪大院・医), 相庭 武司 (国立循環器病
 センター), 吉田 秀忠 (京都大院・医), 牧山 武 (京
 都大院・医), 堀江 稔 (滋賀医大), 中島 敏明 (東京
 大院・医), 山本 充 (名古屋大院・医), 本荘 晴朗 (名

古屋大・環研), 神谷 香一郎 (名古屋大・環研), 児玉
 逸雄 (名古屋大・環研), 今泉 祐治 (名古屋市大院・
 薬), 坂本 多穂 (名古屋市大院・薬), 波田野 紀之 (名
 古屋市大院・薬), 森村 浩三 (名古屋市大院・薬), 堀
 田 真吾 (名古屋市大院・薬), 森本 岳 (名古屋市大
 院・薬), 山崎 大樹 (名古屋市大院・薬), 山村 寿男
 (名古屋市大院・薬), 大野 晃稔 (名古屋市大院・薬),
 古川 哲史 (東京医歯大・難治研), 萩原 誠久 (東京
 女子医大), 沼田 明大 (生理研), 丁 維光 (滋賀医大),
 豊田 太 (滋賀医大)

【概要】

心臓血管系の細胞膜に存在するイオンチャネルは、細胞膜の興奮性の制御を介してさまざまな心血管機能の発現やそれらの神経体液性の調節に関わっている。近年、多くのイオンチャネル遺伝子が単離・同定され、遺伝性 QT 延長症候群や Brugada 症候群などイオンチャネル遺伝子の変異に起因するイオンチャネル病の存在も明らか

にされている。チャネル遺伝子の変異による構造異常とそれにより招来されたチャネル蛋白の機能異常との関連についての解析が進み、チャネル蛋白の構造機能関連も明らかにされつつある。さらには、イオンチャネル病においてチャネル遺伝子異常と疾患表現系との関連 (genotype-phenotype correlation) やその症状発現機構につ

いての検討も進み、遺伝子変異に基づいた治療法の開発も行われはじめている。このように、分子生物学、遺伝子工学、電気生理学および薬理学などの手法を用いた学際的研究により、イオンチャネル蛋白の生理的さらには病態生理的意義について知見が集積しつつある。そこで、我が国の心血管系のイオンチャネル研究を更に発展させ、イオンチャネル蛋白の生理的意義の解明に加えその破綻に基づく病態発症機構の解明とその治療戦略の構築を目

指すとき、分子生物学、分子遺伝学、電気生理学、薬理学などのさまざまな専門分野の研究者が意見を交換し互いに協力して学際的に研究を押し進めていく必要がある。

本研究会には心血管領域の基礎および臨床研究者が多数集まり、さまざまな異なった研究手法を用いて得られた最新の成果が発表され、また活発な討論が行われた。本研究会で得られたこれらの成果を基盤として、今後新たな学際的共同研究が構築されることが大いに期待される。

(1) ノックアウトマウスを用いた心房筋および心室筋細胞における K_{ATP} チャネルの役割の解析

中谷 晴昭¹⁾, 三枝 紀子^{1,2)}, 斎藤 智亮¹⁾, 佐藤 俊明¹⁾, 三木 隆司³⁾, 清野 進³⁾, 小室 一成²⁾
(千葉大学大学院・医学研究院・薬理学¹⁾,
千葉大学大学院・医学研究院・循環病態医科学²⁾,
神戸大学大学院・医学研究科・細胞分子医学³⁾)

心筋細胞膜の ATP 感受性 K^+ (K_{ATP}) チャネルは、ポア成分の Kir6.2 とスルホニル尿素受容体の SUR2A から構成される。Kir6.2 遺伝子欠損 (KO) マウスを用い、心室における虚血時電気生理学的異常発現および心房における心房性利尿ホルモン (ANP) 分泌での K_{ATP} チャネルの役割を解析した。KO マウスの摘出灌流心室筋標本において灌流を停止し虚血とすると、野生型 (WT) 標本と異なり、活動電位幅は短縮しなかったが、細胞外 K^+ 濃度は WT 標本と同様に上昇し、静止膜電位が減少した。虚

血時の K_{ATP} チャネルの活性化は活動電位幅短縮に重要だが、細胞外 K^+ 蓄積の主たる要因ではない事が示唆された。KO マウスの心房筋細胞でも K_{ATP} チャネル活動は記録されず、細胞の膨化によっても活性化されなかった。KO マウスにおいて容量負荷を与えた時の ANP 分泌は WT マウスに比し高度であり、摘出心房筋標本に張力負荷を与えた時の ANP 分泌も KO マウス標本で大きく、 K_{ATP} チャネル活動が心房からの ANP 分泌を制御する事が明らかとなった。

(2) インスリンの ATP 感受性 K^+ チャネル活性化における細胞骨格の役割

河野 崇¹⁾, 庄野 加余子²⁾, ナザリー・ホセイニ²⁾, 中屋 豊²⁾
(徳島大学・医学部・麻酔学教室¹⁾, 徳島大学・医学部・特殊栄養学講座²⁾)

膵臓 β 細胞での K_{ATP} チャネル活性はインスリン分泌に重要な役割を果たす。また、インスリン自体が種々の組織の K_{ATP} チャネル活性に影響を与えることも報告されている。今回われわれは、インスリンによる培養血管平滑筋細胞の K_{ATP} チャネル活性に及ぼすアクチン細胞骨格再編の影響を検討した。

【結果】パッチクランプ Cell-attached 法において、インスリンにより K_{ATP} チャネルの活性化が認められたが、この K_{ATP} チャネル活性化は 5-10 分後に急速に低下した (不活性化)。インスリンの K_{ATP} チャネルの活性化は、

Wortmannin (PI-3 kinases 阻害剤) の前処置で消失した。一方で、 K_{ATP} チャネル不活性化は、Cytochalasin D (アクチン重合阻害剤) の前処置で消失した。さらに、Cortactin (アクチン結合蛋白) mutant は、インスリンによる急速なアクチン骨格再編を抑制し、さらにインスリンによる K_{ATP} チャネル不活性化を抑制した。

【結論】インスリンは培養血管平滑筋細胞において、PI-3 kinases を介して K_{ATP} チャネルを活性化するが、その後の急速なアクチン細胞骨格の再編によって結果的に K_{ATP} チャネルを不活性化する可能性が示唆された。

(3) モルモット心房筋と心室筋の I_{K1} の差異における Kir2.x サブユニットと細胞内ポリアミンの関与

Yan Ding-Hong, 穎原 嗣尚, 石原 圭子

(佐賀大学・医学部・生体構造機能学・器官細胞生理分野)

内向き整流 K 電流 I_{K1} の外向き電流は心筋活動電位の再分極 (3 相) を担い, その振幅は細胞内ポリアミンや Mg^{2+} によるチャネルの電位依存性ブロックにより制御される。 I_{K1} 外向き電流は心室筋より心房筋で小さいが機序は不明である。我々はモルモット心房筋と心室筋の I_{K1} の差異における Kir2.x チャネルサブユニットと細胞内ポリアミン濃度の関与を検討した。穿孔パッチクランプ法で記録した I_{K1} の内向き整流性は心室筋より心房筋で強く, I_{K1} の再分極誘発外向きトランジェントは心室筋のみに認められた。Kir2.3 電流と I_{K1} は細胞外 pH 感受

性と内向き電流活性化速度の点で性質が異なっていた。Kir2.1 電流と Kir2.2 電流は細胞内側に 0.6-1.1 mM Mg^{2+} と 5-10 μ M スペルミン共存下に外向きトランジェントを示したが, より高濃度のスペルミン又はスペルミジン共存下では振幅が小さくなった。モルモット心筋組織のポリアミン及びこれと結合する高分子や ATP 濃度を測定した結果, 細胞内遊離ポリアミン濃度は心房の方が高いという結果を得た。従って心房筋と心室筋の I_{K1} の違いに細胞内ポリアミン濃度の違いが寄与する事が示唆された。

(4) Ca 電流不活性化の β スイッチ仮説と心筋活動電位モデル

平野 裕司 (東京医科歯科大学・難治疾患研究所・循環器)

Findlay の β スイッチ仮説によれば, 心筋の L 型 Ca 電流は 生理的条件下 (コントロール) では膜電位依存性不活性化が主であり, 交感神経 β 受容体刺激によって Ca 依存性不活性化が主要な役割を果たす状態に切り替わることになる (J.Physiol. 2002,2004)。これまでに発表されてきた心筋活動電位シミュレーションモデルにおいて, この仮説をどのように導入し得るか, また どのような役割を担い得るかを検討した。コントロールと β 受容体刺激下の L 型 Ca 電流膜電位依存性不活性化を Findlay のデータに基づいて設定し (例コントロール: +50mV において finf

0.2, 時定数 25msec, β 受容体刺激下: finf 0.55, 時定数 25msec), Luo-Rudy モデルに導入すると β 受容体刺激条件下での活動電位の再分極は極めて困難となった。一方, 我々の Ca 依存性不活性化の新しい定式化を導入したモデル (Biophys.J.2003) では膜電位依存性不活性化の変化は Ca 依存性不活性化の増強に相殺され, APD の変化はより reasonable であったが, 膜電位固定実験の再現などは不十分であった。これまでのモデルに細胞内 Ca 動態や CICR の新しい定式化を導入し, さらに検討を続ける必要がある。

(5) Modified sympathetic response of cardiac muscle in mice lacking the voltage-dependent Ca^{2+} channel β_3 subunit

尾野 恭一, 村上 学, 藤澤 進, 徐 峰, 飯島 俊彦 (秋田大学・医学部・機能制御医学講座)

電位依存性 Ca^{2+} チャネルは 5 つのサブユニットにより構成される複合体であり, 薬理学的には 5 種類に分類される。このうち β サブユニット, 特に β_3 サブユニットは N 型 Ca^{2+} チャネル, 平滑筋の L 型 Ca^{2+} チャネルの構成サ

ブユニットとしてチャネルの機能発現に重要な働きを担っていると考えられている。今回, 交感神経終末における β_3 サブユニットの機能的役割を明らかにする目的で, 野生型 (WT 群), β_3 サブユニット欠損 ($\beta_3^{-/-}$) 及び過剰

発現マウス (Tg) を用い、Field 刺激に対する心室筋の収縮変化を測定した。その結果、Field 刺激により心室筋の収縮は 3 群とも刺激強度に依存して増強し、 β アドレナリン受容体遮断薬あるいはレゼルピンの前処理により消失した。Field 刺激に対する反応は β_3 -/-で WT に比べて有意に減弱し、Tg マウスでは有意に増強していた。単離心室筋細胞の Ca^{2+} 電流については、電流密度およびキネテ

イクスとも 3 群間で有意差は認められなかった。以上のことから、 β_3 -/-では交感神経末端からのノルアドレナリン放出が減弱し、逆に Tg では増強していることが示唆された。 β_3 サブユニットが交感神経末端における Ca^{2+} チャネルの機能的サブユニットを構成していることが示唆された。

(6) 心筋 L 型 Ca チャネル活性に対する Jab1/CSN5 の関与

當瀬 規嗣¹⁾, 亀田 和利²⁾, 深尾 充宏¹⁾, 長島 雅人¹⁾,
小林 武志¹⁾, 筒浦 理正¹⁾, 山田 陽一¹⁾, 山下 敏彦²⁾

(札幌医科大学・医学部・生理学第一¹⁾, 札幌医科大学・医学部・整形外科²⁾)

L 型 Ca チャネルは、様々な細胞内タンパク分子と相互作用し、それによって生理反応を惹起している。例えば、G タンパクの一部は L 型 Ca チャネルを直接活性化すると、骨格筋では L 型 Ca チャネルとリアノジン受容体との相互作用が興奮収縮連関の鍵である。心筋 L 型 Ca チャネルの細胞内に露出している部分で、特定のタンパク分子の結合が報告されていない、II-III リンカーに相互作用を示す分子種の探索を行った。Yeast-two-hybrid 法により、II-III リンカーに結合するタンパク分子をヒト心筋ライブラリーで探索すると、細胞増殖にかかわる Jab1/CSN5 がスクリーニングされた。ウエスタンブロットにより Jab1/CSN5 がラット心筋細胞に実際に存在することを確

認した上で、免疫沈降法を行い、II-III リンカーを含む alpha1C サブユニットと Jab1/CSN5 が共沈することを確認した。さらにラット心室筋細胞を用いて免疫蛍光染色をすると、両分子が筋節にしたがって共存していた。次に心筋 L 型 Ca チャネルの全サブユニットを発現させた cos7 細胞でパッチクランプ法を行い、Ca 電流を測定した。この細胞で、siRNA 法により Jab1/CSN5 の遺伝子発現を抑制すると、Ca 電流は無処置あるいはスクランブル siRNA 処置の細胞に比較して約 2 倍大きくなっていた。Jab1/CSN5 は心筋 L 型 Ca チャネルに直接結合して、チャネル活動を抑制することにより、Ca 流入量を調節していると考えられる。

(7) 心筋細胞アポトーシスにおけるクロライドイオンチャネルの役割

高橋 信之¹⁾, 田辺 秀^{1),2)}, 王 曉明¹⁾, 浦本 裕美¹⁾,
寺社下 浩一²⁾, 内田 信一³⁾, 佐々木 成³⁾, 岡田 泰伸¹⁾

(自然科学研究機構・生理学研究所・機能協関部門¹⁾,
中外薬品・富士御殿場研究所²⁾,
東京医科歯科大学大学院・腎臓内科³⁾)

スチルベン誘導体である DIDS は、心筋細胞をはじめ様々な細胞系でスタウロスポリン (STS) 誘導性アポトーシスを抑制する。しかし DIDS は、 Cl^- チャネルと $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交換輸送体 (AE) のいずれにも作用する阻害剤である。そこでマウス心筋細胞を用いて、STS 誘導性

心筋細胞アポトーシスにおける DIDS の標的の同定を試みた。STS 誘導性心筋細胞アポトーシスは、AE が機能しない HCO_3^- 非存在下でも観察され、DIDS の添加により抑制された。さらに AE には作用しない Cl^- チャネル阻害剤である NPPB の添加でも、心筋細胞アポトーシスが

抑制された。また他の細胞系と同様に、心筋細胞でも STS 添加でアポトーシス性細胞容積減少 (AVD) が起こり、これが Cl^- チャンネル阻害剤によって抑制された。以上よ

り、心筋細胞のアポトーシスは、DIDS が Cl^- チャンネルに作用することで抑制できること、 Cl^- チャンネルが関与する AVD が重要な初期イベントであることが示唆される。

(8) 薬物による HERG チャンネル電流抑制機構について

保坂 幸男¹⁾, 木下 賢吾²⁾, 中村 春木²⁾, 倉智 嘉久¹⁾

(大阪大学大学院・医学系研究科・薬理学講座・分子・細胞薬理学¹⁾, 大阪大学・蛋白質研究所²⁾)

I_{Kr} 遮断薬であるニフェカランは HERG 電流に対し block 効果だけでなく、低電位脱分極パルスにて facilitation 効果も有することが報告されている。また、III 群抗不整脈薬であるアジミライドにおいて、HERG 電流に対する facilitation 効果が、強い脱分極パルスによって起こる activation curve の左方偏位により引き起こされることが報告されている。今回、HERG チャンネルに対するニフェカランの block 効果と facilitation 効果に関して、pore 領域のアミノ酸残基との関連を Alanine-scanning を用いて検討した。Y652 と F656 は block 効果と facilitation 効

果の両方に不可欠であった。また、Y652 と F656 以外の mutant の多くは、facilitation 効果を増強または減弱した。homology model において、これらのアミノ酸残基のうち、S624 と S649 のみが inner cavity に面し、channel pore の上方に pocket を形成していることが推測された。さらに、docking model において、ニフェカランがその pocket にはまり込んでいることが推測された。以上より、ニフェカランとの直接作用または open 構造の増強によりセリン残基が facilitation 効果を修飾している可能性が示唆された。

(9) イヌ右室心筋切片を用いた Brugada 症候群モデルにおける心室細動発生機序の解明：高解像度光マッピングによる検討

相庭 武司¹⁾, 清水 渉²⁾, 日高 一郎¹⁾, 上村 和紀¹⁾, 稲垣 正司¹⁾, 杉町 勝¹⁾, 砂川 賢二³⁾

(国立循環器病センター研究所・循環動態機能部¹⁾,

国立循環器病センター・心臓血管内科²⁾,

九州大学大学院・医学研究院・循環器内科³⁾)

【背景】Brugada 症候群は心電図右側胸部誘導の ST 上昇と心室細動 (VF) を主徴とする疾患であり、その ST 上昇と VF 発生の機序については、右室流出路心外膜側の活動電位変化 (dome の消失) とそれに伴う phase 2 リエンントリー (P2R) が考えられている。しかし、どの程度の心外膜側活動電位の不均一性が VF の誘因となるのか、さらに P2R から VF への移行過程など未解明な点が多い。【方法】我々はイヌ右室心筋切片を用いた薬理学的 Brugada 症候群モデルを作成し、膜電位感受性色素 (di-4-ANEPPS) を用いた空間・時間分解能に優れた光マッピングシステムにより、Brugada 型 ST 上昇時および P2R 発生過程における右室心外膜および心内膜側の活動

電位の不均一性と VF への移行過程を詳細に観察した。

【結果】右室心外膜側の機能的な活動電位の変化 (dome の消失と回復) が空間的な再分極時間のばらつきの増大を招き心電図上 ST 上昇を生じた。更に近接した細胞間での dome の有無による活動電位持続時間の差がある値 (閾値) を超えた場合、VF の起点となる P2R が発生することが確認された。さらに P2R から VF に移行するためには伝導の異常が関与すると考えられた。

【結語】Brugada 症候群の ST 上昇から VF 発生には、右室心筋の再分極異常と脱分極異常の双方が密接に関係することが示唆された。

(10) QT 延長症候群とブルガダ症候群症例における遺伝子変異検出率とチャネル変異の特徴

吉田 秀忠¹⁾, 竹中 琴重¹⁾, 牧山 武¹⁾, 大野 聖子¹⁾, 土井 孝浩¹⁾, 辻 啓子¹⁾, 堀江 稔²⁾
(京都大学大学院・医学研究科・循環病態学¹⁾, 滋賀医科大学・呼吸循環器科²⁾)

致死性心室性不整脈および突然死をもたらす心臓イオンチャネル病は、イオンチャネルとその関連遺伝子の突然変異が関与する。我々は、先天性 [Romano-Ward 症候群 (RW) と Jervelle-Lange-Nielsen 症候群 (JLN)] および後天性 QT 延長症候群、アンダーセン症候群 (AS)、ブルガダ症候群 (BS) における遺伝子突然変異のスクリーニング検査をおこない遺伝子変異の頻度および遺伝子変異の部位について検討し、さらに変異チャネルの電気生理学的特徴を検討した。

【方法】患者末梢血白血球よりゲノム DNA を抽出し、PCR-SSCP あるいは PCR-WAVE 法にて遺伝子変異スクリーニング、変異を同定した。さらに全細胞型パッチクランプ法にて電気生理学的特徴を検討した。

【結果】先天性および後天性 LQTS において 147 症例中 LQT1;31 例 LQT2;16 例 LQT3;9 例 LQT5;2 例, LQT7;1 例に遺伝子変異を認めた。2 家系の JLN において LQT1;1 例 (50%), AS では KCNJ11 変異を:7/7 (100%) の変異を検出した。BS において SCN5A;4/34 例に変異を認めた。LQTS 症例のなかに Compound 型変異を 4 例にみとめた。BS で同定された変異 SCN5A は パッチクランプ法にて電流の発現がみられなかった。

【結語】LQTS での変異検出率は約 40%であり、他の遺伝子変異の関与が考えられ、特に BS では変異検出率は低く他の遺伝子変異が関与している可能性がある。一方 AS については単一遺伝子の異常による症候群であると考えられた。

(11) ヒト肺動脈平滑筋のイオンチャネルの分子生物学的及び電気生理学的検討

中島 敏明¹⁾, 飯田 陽子²⁾, 大沼 仁¹⁾, 岩沢 邦明²⁾, 城 大祐²⁾, 永井 良三²⁾
(東京大学医学部大学院・虚血循環生理¹⁾, 東京大学医学部大学院・循環器内科²⁾)

肺高血圧の成因として電位依存性 K^+ チャネル (K_V) の異常が報告されているが、ヒト肺動脈平滑筋の K_V についてはいまだ不明である。そこで、ヒト肺動脈平滑筋細胞の K_V につき、電気生理学的、薬理学的、分子生物学的に検討した。細胞は、ヒトの主肺動脈より培養した肺動脈平滑筋細胞を用い、パッチクランプ法、reverse transcriptase/polymerase chain reaction (RT-PCR)、定量的 real-time RT-PCR 及び免疫染色法により検討した。電極内に 10 mM EGTA, 3 mM ATP を充填した状態で、保持電位 -80 mV より脱分極パルスを与えると一過性 (A 型) の K^+ 電流に続き、遅延性外向き電流 (I_K) が活性化された。 I_A 電流は、4-AP で用量依存的に抑制され、TEA に対する感受性により 2 つの成分に分けられた。TEA 感受性成分は、blood depressing substrate (BDS)-II により抑制され、非感受性成分は phrixotoxin-II により阻害された。これら

の成分は、電気生理学的 (不活性化曲線及び不活性化からの回復) にも、まったく異なる性質を示した。Flecainide は、TEA 非感受性成分を強く抑制した。RT-PCR では、 I_K をコードする遺伝子 $K_V1.1$, $K_V1.5$, $K_V2.1$ とともに、 I_A をコードする遺伝子 $K_V3.4$, $K_V4.1$, $K_V4.2$, $K_V4.3$ が検出された。定量的 RT-PCR 法では、 $K_V4.2 > K_V3.4 > K_V4.3$ (long) $> K_V4.1$ であり、 K_V4 の修飾蛋白である K^+ channel interacting- protein は、主に KChIP3 が検出された。 $K_V4.3$ (short), KChIP1, KChIP4 は、検出されなかった。 $K_V3.4$, $K_V4.2$, $K_V4.3$ 蛋白の発現は、細胞免疫染色でも認められ、さらに、正常ヒト肺動脈切片標本の免疫組織化学により確認された。以上より、培養ヒト肺動脈平滑筋細胞の A 型電位依存性 K^+ チャネルは、2 つの成分から構成され、これには、 $K_V3.4$ 及び K_V4 -KChIP3 が関与していると考えられた。

(12) ウサギ肺静脈起源の異常興奮とイオンチャネル発現

山本 充¹⁾, 本荘 晴朗²⁾, 清水 敦哉²⁾, 堀場 充³⁾,
 李 鍾国³⁾, 安井 健二⁴⁾, 神谷 香一郎²⁾, 児玉 逸雄³⁾
 (名古屋大学大学院・医学系研究科・細胞生物物理学¹⁾,
 名古屋大学・環境医学研究所・液性調節分野²⁾,
 名古屋大学・環境医学研究所・循環器分野³⁾,
 名古屋大学・環境医学研究所・生体情報計測・解析(スズケン)寄附研究部門⁴⁾)

心房細動の発生・維持には肺静脈の異常興奮が重要な役割を果たしているが、その詳細な機序は明らかではない。本研究では肺静脈異常興奮の分子生物学的背景につき検討を行った。家兎心筋を用いて肺静脈 (PV), 洞房結節 (SAN), 右心房 (RA) における HCN1, HCN4, Kir2.1, Kir2.2, Nav1.5, Cav1.2, Cav1.3, RyR2, SERCA2a, ANP の mRNA 定量を行った。RA との比較で、PV では Kir2.2, Nav1.5, RyR2, SERCA2a, ANP の mRNA 発現の減少を認めたが、

HCN1, HCN4, Cav1.2, Cav1.3 は同程度の mRNA 発現を認めた。SAN では HCN1, HCN4, Cav1.3 の mRNA 発現増加と Nav1.5, Cav1.2, RyR2, ANP の mRNA 減少を認めた。肺静脈における異常興奮には Kir2.2, RyR2, SERCA2a 発現の減少が関与していると考えられるが、HCN1,4 や Cav1.3 の発現は低く、SAN のような自動能の関与は否定的であった。また、Nav1.5 の発現減少は興奮伝導の不均一性増加に関与していると考えられた。

(13) 心筋ミトコンドリア Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネルの性質・機能と作用薬

今泉 祐治, 大矢 進, 坂本 多穂, 桑田 有紀子, 村木 克彦
 (名古屋市立大学大学院・薬学研究科・細胞分子薬効解析学分野)

最近、心筋ミトコンドリア内膜における大コンダクタンス Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネル (BK チャネル) 様 K^+ チャネル (mitoK_{Ca} チャネル) の機能発現と BK チャネル開口薬による心筋保護作用が話題となっている。本研究では、哺乳類心筋に発現する BK チャネル $\beta 1$ サブユニット (BK $\beta 1$) に着目し、yeast two-hybrid 法によりヒト心筋由来 cDNA ライブラリーから BK $\beta 1$ 結合タンパク質としてミトコンドリア呼吸鎖酵素シトクロム c 酸化酵素サブユニット I (Cco1) を同定した。また、蛍光タンパクやタグで標識した BK $\beta 1$, Cco1 を用いた可視化解析や免疫沈

降法により、両者が心筋ミトコンドリア内膜に共存することを見出した。さらに、ラット単離心室筋細胞を用いて、BK $\beta 1$ 特異的 BK チャネル開口薬 17 β -エストラジオールや東大院薬の大和田教授と共同開発した BK チャネル開口薬、12,14-dichlorodehydroabietic acid のミトコンドリア膜電位、フラボプロテイン酸化、実験的虚血心筋細胞の保護に対する作用を検討し、mitoK_{Ca} チャネル活性化によりミトコンドリア脱分極、呼吸増大及び心筋保護作用が発揮されることを見出した。

(14) 植物ステロール由来サポニンによる心血管系性ホルモン受容体の non-genomic 経路の特異的活性化

古川 哲史, 黒川 洵子, 白 長喜 (東京医科歯科大学・難治疾患研究所)

薬用人参 *Panax ginseng* は万能薬・長寿薬として最も人気がある herb medicines の 1 つであり、心血管系では虚

血一再還流障害に対して保護的に働くことが知られている。その主成分は植物ステロール由来サポニン

ginsenosides であり、ステロール環に2つの糖が結合している。Ginsenosides は細胞膜局在性ホルモン受容体に結合し、受容体→c-Src→PI3 キナーゼ→Akt→NOS3 の non-genomic pathway で NO を産生する。産生された NO は cGMP 依存性リン酸化により I_{CaL} を抑制し、cGMP 非依存性タンパクニトロ化により I_{Ks} を活性化し、これらが活動電位短縮・ Ca^{2+} 過負荷予防に貢献する。糖を持たな

い植物ステロール β -sitosterol も同様の作用を示すが、 β -sitosterol は genomic pathway も活性化するが、ginsenosides は genomic pathway は活性化しない。これは糖の存在が核内移行を不可能にするためと推測される。以上より、ginsenosides は性ホルモンの膜型受容体特異的リガンド SERMs の天然素材として有望である。

(15) 心筋 I_{Ks} と KCNQ1/KCNE1 チャンネルのメフェナム酸感受性の違い

豊田 太, 丁 維光, 松浦 博 (滋賀医科大学・生理学第二講座)

モルモット心筋 I_{Ks} ならびに COS-7 に導入した KCNQ1/KCNE1 チャンネル電流におよぼすメフェナム酸の効果を全細胞パッチクランプ法により検討した。メフェナム酸 (0.1 mM) を細胞外から投与すると KCNQ1/KCNE1 電流は脱活性化キネティクスが著しく遅延し、刺激頻度依存性に脱分極パルスにともなう瞬時電流が増大し、時間依存性の電流成分が減少した。一方、メフェナム酸は心筋 I_{Ks} の脱活性化を少し遅延させたものの、脱分極パルス中の電流にはほとんど影響しなかったことから、心筋 I_{Ks} と KCNQ1/KCNE1 チャンネルはメフェナム酸の感受性が大きく異なることがわかった。KCNE1 の関連蛋白であ

る KCNE2 を KCNQ1 と共発現させると常時活性型の時間非依存性電流が記録され、これに対しメフェナム酸は明瞭な効果を示さなかった。KCNE1 と KCNE2 の両方を KCNQ1 と共発現させると KCNQ1/KCNE1 電流と同様に I_{Ks} に類似したキネティクスを示す時間依存性の電流が得られたが、メフェナム酸による脱活性化の遅延程度は KCNQ1/KCNE1 電流に比べ有意に低下した。このことは心筋 I_{Ks} と KCNQ1/KCNE1 チャンネルにおけるメフェナム酸感受性の違いの背景に KCNE2 が関与する可能性を示唆する。