

【 研 究 活 動 報 告 】

研究活動報告

〔 目 次 〕

分子生理研究系

神経機能素子研究部門.....	11
-----------------	----

概 要

ATP 受容体チャネル P2X₂ のレコンビナント蛋白の精製と単粒子構造解析

(久保義弘, 山本友美, 三尾和弘, 小椋利彦, 佐藤主税)

代謝型グルタミン酸受容体 E238 点変異を持つ遺伝子改変マウスの作成

(久保義弘, 山本友美, 饗場篤)

代謝型グルタミン酸受容体の多様な機能を制御する機構の解明

(立山充博, 久保義弘)

KCNQ チャネルの C 末端コイルドコイルドメインの機能的意義

(中條浩一, 久保義弘)

内向き整流性 K⁺チャネル (Kir2.1) の細胞内側ポアに存在する電荷を帯びたアミノ酸残基の機能的役割

(藤原祐一郎, 久保義弘)

RGS8 による受容体選択的な Gq 応答抑制の分子機構

(長友克広, 久保義弘, 伊藤政之, 齊藤修)

代謝型アデノシン受容体 (A₁R) と代謝型 ATP 受容体 (P₂Y₁R) の機能的ヘテロ多量体形成

(石井 裕, 久保義弘, 中田裕康)

高分子量 G タンパク質 mOPA1 により引き起こされるミトコンドリア断片化機構の解明

(三坂巧, 村手源英, 久保義弘)

分子神経生理研究部門.....	14
-----------------	----

概 要

bHLH 型転写制御因子 Olig3 の機能と細胞系譜の解析

(丁雷, 小野勝彦, 渡辺啓介, 田中謙二, 池中一裕)

時期特異的遺伝子組み換え法を用いた脊髄の Olig2 細胞の系譜解析

(政平訓貴, 丁雷, 小野勝彦, 池中一裕)

前脳基底部の Olig2 細胞のコリナージックニューロンへの分化

(古性美記, 小野勝彦, 政平訓貴, 池田和代, 池中一裕)

神経構築形成における長距離ガイダンス分子の役割の解明

(渡辺啓介, 小野勝彦, 池中一裕)

モデルマウスを用いた脱髄の病態解明

(田中久貴, 馬堅妹, 山田元, 田中謙二, 池中一裕)

脱髄モデルマウスを用いた再生治療研究

(東幹人, 等誠司, 池中一裕)

成体脳に存在する神経幹細胞の維持のメカニズム解明

(東幹人, 等誠司, 池中一裕)

神経幹細胞の発生の分子機構の解明

(村岡大輔, 等誠司, 池中一裕)

アストロサイトの分化, 発生様式に関する研究

(成瀬雅衣, 小川泰弘, 等誠司, 池中一裕)

Alexander 病モデルマウスの解析

(田中謙二, 池中一裕)

脳の発生と糖鎖
(石井章寛, 等誠司, 鳥居知宏, 池中一裕)

3D-HPLC によるマウス大脳皮質発達におけるシアル酸付加 N-結合糖蛋白質の糖鎖構造解析
(鳥居知宏, 石井章寛, 等誠司, 池中一裕)

細胞内代謝研究部門..... 18

概要

伸展刺激に対する細胞移動機構の研究
(毛利達磨, 曾我部正博)

力学環境に対する接着構造の応答の分子機構
(平田宏聡, 曾我部正博)

神経ステロイドによる海馬シナプス長期増強の誘導機構
(曾我部 正博)

細胞器官研究系

生体膜研究部門..... 21

概要

2 光子励起法による開口放出の研究
(河西 春郎, 根本 知己, 高橋 倫子, 岸本 拓也, 兒島 辰哉, 大嶋 章裕, 劉 婷婷, 島山 裕康)

大脳錐体細胞スパインの研究
(河西 春郎, 松崎 政紀, 早川 泰之, 野口 潤, 安松 信明, 本蔵直樹, 堀池由浩, 萩原輝記)

機能協関研究部門..... 22

概要

大脳皮質神経細胞における容積感受性クロライドチャンネル: その性質と容積調節への関与
(井上 華, 岡田泰伸)

ヒト上皮培養細胞の容積調節性水流入における水チャンネルの役割
(木田 肇, 高橋信之, 清水貴浩, 森島 繁, 岡田泰伸)

心筋細胞アポトーシスにおける VSOR アニオンチャンネルの役割
(Wang Xiaoming, 高橋信之, 田辺 秀, 浦本裕美, 岡田泰伸)

アポトーシス死の達成には細胞内 ATP レベルの正常以上の上昇が必要である
(Zamaraeva Maria, Sabirov Ravshan, 岡田泰伸)

生体情報研究系

感覚認知情報研究部門..... 25

概要

初期視覚系における輪郭線の折れ曲がりの表現
(伊藤 南)

下側頭皮質における色情報表現
(安田正治, 小松英彦)

色カテゴリー識別時の視覚野ニューロン活動
(鯉田孝和, 小松英彦)

多次元視覚探索課題における後頭頂葉ニューロンの活動特性
(小川 正, 小松英彦)

サル視覚野活動の機能的核磁気共鳴画像法 (fMRI) による計測
(郷田直一, 伊藤南, 小川正, 小松英彦, 豊田浩士, 定藤規弘)

神経シグナル研究部門.....	27
概要	
視床投射細胞の異種興奮性シナプスの解析	
(宮田 麻理子, 井本 敬二)	
成熟ニューロンにおける cdk5 の生理的役割の検索: シナプス種依存的機能の可能性	
(佐竹伸一郎, 井本敬二)	
視床ハイブリッド神経回路を用いた同期的神経発火の解析	
(井上 剛, 井本 敬二)	
Ca ²⁺ /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II の神経機能に対する役割 - 不活性型ノックインマウスによる検討	
(山肩葉子, 畑中伸彦, 阪上洋行, 高雄啓三, 宮川 剛, 小幡邦彦, 柳川右千夫, 井本敬二)	
持続性けいれん時における Ca ²⁺ /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II の不活性化のメカニズムに関する検討	
(山肩葉子, 小幡邦彦, 井本敬二)	
視床-大脳皮質ネットワークにおけるてんかん発生に関する研究	
(佐々木 幸恵, 井本 敬二)	
Cav2.1 変異マウス rocker における小脳平行線維-プルキンエ細胞シナプス機能異常の解析	
(児玉貴史, 井本敬二, 重本隆一, 深澤有吾, 森泰生)	
小脳皮質における登上線維伸展範囲の定量的解析	
(加勢大輔, 児玉貴史, 井本敬二)	

統合生理研究系

感覚運動調節研究部門.....	31
概要	
ヒト感覚-運動抑制過程の脳波, 脳磁図研究	
(中田大貴, 乾幸二, 和坂俊昭, 田村洋平, 木田哲夫, 柿木隆介)	
体性感覚 Go/NoGo 電位への刺激間隔及び刺激確率の影響	
(中田大貴, 乾幸二, 和坂俊昭, 赤塚康介, 柿木隆介)	
運動準備期の第一次, 第二次体性感覚野への異なる影響	
(和坂俊昭, 中田大貴, 赤塚康介, 木田哲夫, 乾幸二, 柿木隆介)	
筋収縮力依存性の, 体性感覚誘発電位に対する遠心性 gate 効果の変化	
(和坂俊昭, 中田大貴, 木田哲夫, 柿木隆介)	
足底自発運動準備期にみられる, 反対側同一筋収縮による SEP への gate 効果	
(和坂俊昭, 中田大貴, 木田哲夫, 柿木隆介)	
ヒト第二次体性感覚野での顔の体部位再現	
(Nguyen TB, 乾幸二, 宝珠山稔, 柿木隆介)	
Rolandic oscillation と運動野興奮性の機能的関連-脳磁図研究	
(田村洋平, 宝珠山稔, 中田大貴, 廣江総雄, 乾幸二, 金桶吉起, 井上聖啓, 柿木隆介)	
音再現における時間の圧縮	
(矢部博興, 松岡貴志, 佐藤靖, 晝間臣治, 小山幸子, 軍司敦子, 柿木隆介, 兼子直)	
二次の視覚性運動処理に関わる脳部位の探索	
(野口泰基, 金桶吉起, 柿木隆介, 田邊 宏樹, 定藤 規弘)	
ヒト視覚腹側路における逆行性マスキング効果の時間的動態	
(野口泰基, 柿木隆介)	
脳磁図と脳波を用いた母国語および外国語の脳内処理の研究	
(尾島司郎, 中田大貴, 柿木隆介)	
『目の動き』を見たときの後頭側頭部の活動に対する顔輪郭とパーツ情報の影響	
(三木 研作, 渡辺 昌子, 本多 結城子, 中村 舞子, 柿木 隆介)	

倒立顔情報処理に関わる左右半球間差：事象関連電位を用いた検討
(本多 結城子, 渡辺 昌子, 三木 研作, 中村 舞子, 柿木 隆介)

生体システム研究部門..... 35

概要

淡蒼球への GABA 作動性入力について
(南部 篤, 橘 吉寿, 知見聡美, 喜多 均)

上肢到達運動課題実行中の線条体介在ニューロンの役割
(畑中伸彦, 高良沙幸, 橘 吉寿, 南部 篤)

上肢到達運動課題実行中の線条体投射ニューロンの活動様式
(畑中伸彦, 高良沙幸, 橘 吉寿, 南部 篤)

パーキンソン病モデル動物における異常な淡蒼球ニューロン活動
(橘 吉寿, 岩室宏一, 南部 篤)

ジストニアの病態に関する研究—ジストニアモデル動物におけるニューロン活動の記録
(知見聡美, 田 風, 南部 篤, 高田昌彦)

大脳皮質機能研究系

脳形態解析研究部門..... 38

概要

グルタミン酸受容体の定量的解析
(田中淳一, 足澤悦子, 重本隆一)

小脳運動学習の記憶痕跡
(中館和彦, 馬杉一 時田美和子, 王文, Andrea Lörincz, 深澤有吾, 重本隆一)

神経伝達物質放出関連蛋白質の局在
(萩原 明, 深澤有吾, 重本隆一)

海馬における長期増強現象とグルタミン酸受容体の密度変化
(深澤有吾, 重本隆一)

海馬 NMDA 受容体局在の左右差
(Wu Yue, 篠原良章, 川上良介, 重本隆一)

タグ導入による GABA_A 受容体の電子顕微鏡的定量法
(Mate Sümegi, 深澤有吾, 重本隆一)

GABA_B 受容体とカリウムチャネルの棘突起特異的共存
(Akos Kulik, 深澤有吾, 重本隆一)

前脳基底核と黒質—線条体ドーパミン系の電気生理学および形態学的解析
(靱山俊彦)

大脳神経回路論研究部門..... 41

概要

皮質棘突起への抑制性と興奮性入力の二重支配
(窪田芳之, 畑田小百合, 川口泰雄)

大脳皮質錐体細胞の発火特性の多様性
(大塚岳, 森島美絵子, 川口泰雄)

皮質介在ニューロンサブタイプにおけるスパイン形態分化
(苅部冬紀, 窪田芳之, 川口泰雄)

前頭皮質 5 層における錐体細胞サブタイプとシナプス結合
(森島美絵子, 川口泰雄)

parvalbumin 陽性細胞, calretinin 陽性細胞への抑制性シナプス入力と興奮性シナプス入力の割合
(関川明生, 窪田芳之, 川口泰雄)

脳皮質 GABA 細胞蛍光標識ラットの作成とその免疫組織化学的解析 (平井康治, 川口泰雄, 平林真澄, 上松正和, 柳川右千夫)	
心理生理学研究部門.....	43
概要	
長期の訓練による, 触覚弁別における神経基盤の可塑的な変化 (齋藤大輔, 定藤 規弘)	
対連合学習を成立させるための神経基盤の解析 (田邊 宏樹, 定藤 規弘)	
一次体性感覚野における口腔領域の表象 (宮本順, 定藤 規弘)	
空間情報の脳内操作における運動前野と頭頂葉の機能分担 (大塩りつ, 田中悟志, 本田 学)	
カウンティングの神経基盤 (神作 憲司, Marie-Laure Grillon, 酒井朋子, 定藤 規弘, Ari Johnson, Mark Hallett)	
両手鏡像運動時の右一次運動野の活動低下 (荒牧勇, 本田学, 定藤規弘)	
皮肉課題に関する fMRI 研究 (内山仁志, 小枝達也, 定藤規弘)	
左下前頭回における文法処理機能の分離 (内山祐司, 豊田浩士, 本田学, 吉田晴世, 河内山隆紀, 江部和俊, 定藤規弘)	

発達生理学研究系

認知行動発達機構研究部門.....	47
概要	
随意運動の制御におけるシナプス前抑制の役割 (関 和彦, 武井 智彦)	
第一次視覚野損傷サルの残存視覚機能 (吉田 正俊, 伊佐 正)	
上丘中間層への抑制性入力 (金田勝幸, 伊佐かおる, 伊佐正)	
サル頸髄レベル皮質脊髄路損傷後の手指巧緻性回復について～C2 および C5 レベル損傷後回復の比較～ (Bror Alstemark, Lars-Gunnar Pettersson, 西村幸男, 高橋雅人, 坪井史治, 伊佐正)	
把握運動に関与する脊髄ニューロンの役割 (武井 智彦, 関 和彦)	
Spread of activity in the local circuit of superior colliculus (Penphimon Phongphanphanee, Tadashi Isa)	
生体恒常機能発達機構研究部門.....	49
概要	
発達期における神経伝達物質のスイッチング (鍋倉 淳一, 張 一成, 西巻 卓也)	
細胞内 Cl ⁻ 制御機構 KCC2 による GABA の興奮-抑制スイッチと分子機構の解明 (鍋倉淳一, 渡部美穂, 和気弘明, 堀部尚子)	
カンナビイドによる海馬抑制性伝達調節 (前島隆司, 稲田浩之)	
クリプトン-YAG レーザーを用いた脳虚血障害モデル動物作成技術の開発 (鍋倉淳一, 和気弘明, 堀部尚子, 八尾博史)	

In Vivo 多光子顕微鏡を用いた大脳皮質神経細胞の微細構造の可視化と長期可塑性の変化

(鍋倉淳一, 和気弘明)

生殖・内分泌系発達機構研究部門..... 51

概要

AMP キナーゼによる生体エネルギー代謝の調節機構の解明

(箕越 靖彦, 岡本 士毅, 志内 哲也, 田中 智洋, 益崎 裕章)

レプチン, 神経ペプチドによる糖・脂質代謝調節機構の解明

(箕越 靖彦, 志内 哲也, 斉藤 久美子)

視床下部腹内側核におけるエネルギー代謝調節作用とシグナル伝達機構の解明

(箕越 靖彦, 岡本 士毅, 李 順姫, 嶋 雄一, 諸橋 憲一郎)

脂肪酸酸化を促進するレプチン・シグナル伝達機構の解明

(箕越 靖彦, 鈴木 敦)

脳機能計測センター

形態情報解析室..... 54

概要

小脳生後発達過程におけるパーグマングリア細胞の解析

(古家園子, 山口 登, 有井達夫)

機能情報解析室..... 55

概要

意志に関する脳活動の研究

(遠本 徹)

生体情報解析室..... 55

概要

行動・代謝分子解析センター

遺伝子改変動物作製室..... 57

概要

顕微授精を介したトランスジェニックラットの作製効率に影響を及ぼす要因

(平林 真澄, 加藤 めぐみ, 金子 涼輔)

凍結乾燥したラット精子の顕微授精による産仔の獲得

(平林 真澄, 加藤 めぐみ, 保地 眞一)

ラット卵子の p34^{cdc2} kinase 活性と顕微注入細胞核に誘起される早期染色体凝集との関係

(平林 真澄, 伊藤 潤哉, 加藤 めぐみ, 保地 眞一)

統合バイオサイエンスセンター

時系列生命現象研究領域..... 59

概要

電位感受性ホスファターゼ Ci-VSP の分子作動原理の解析

(村田喜理, 岩崎広英, Mohamed Israil Hossain, 黒川竜紀, 木村有希子, 東島眞一, 岡村康司)

電位依存性プロトンチャネル分子の同定と分子機能の解析

(佐々木真理, 大河内善史, 黒川竜紀, 高木正浩, 岡村康司)

細胞膜裏打ち蛋白アンキリンによる電位依存性ナトリウムチャネル Nav1.6 の性質の制御

(白幡恵美, 早坂 清, 岩崎広英, 高木正浩, 岡村康司)

ゼブラフィッシュを用いた、脊髄神経回路網の解析 (木村有希子, 佐藤千恵, 東島眞一)	
尾索動物オタマジャクシ型幼生の運動機能に関わるイオンチャネル関連分子の総括的解析 (西野敦雄, 御園生裕明, 岡村康司)	
脊髄内歩行リズム神経回路網の発生機構の解析 (中山希世美, 岡村康司)	
イオンチャネルのゲート機構に関する膜-水界面の水環境の影響 (久木田文夫)	
戦略的方法論研究領域.....	62
概要	
位相差電子顕微鏡の改良 (Radostin Danev, 杉谷正三, 永山國昭)	
位相板用炭素薄膜の材料科学的研究 (内田 仁, 伊藤俊幸, 大河原 浩, 永山國昭, 宇理須恆雄)	
DNA/RNA 塩基配列の電子顕微鏡 1 分子計測法の開発 (喜多山 篤, 高橋佳子, 大河原 浩, 永山國昭, 片岡正典)	
膜タンパク質の単粒子解析 (重松秀樹, Radostin Danev, 永山國昭, 清中茂樹, 原 雄二, 森 泰生)	
種々の漢方薬の灌流ラット顎下腺に対する水分分泌促進作用 (村上政隆, 大河原浩, 魏 睦新, Ding Wei)	
浸透圧センサー (AQP) による傍細胞輸送調節機構 (村上政隆, 大河原浩, 細井和雄, KwartariniMurdiastuti, Bruria Sachar-Hill, Adrian E. Hill)	
傍細胞輸送調節の形態学的基盤 (村上政隆, 前橋 寛, 橋本貞充, Alessandro Riva, Felice Loffredo, Francesca Testa-Riva)	
顕微質量分析装置の開発 (瀬藤光利, 新聞秀一)	
単アミノ酸側鎖付加の分子機構の解明 (瀬藤光利, 新聞秀一, 福田義之, 池上 浩司, 松本 峰男, 矢尾育子)	
エンドサイトーシス選別輸送のメカニズムと生理機能 (大橋正人)	
生命環境研究領域.....	67
概要	
カプサイシン受容体のリン酸化機構の解析 (Sravan Mandadi, 村山奈美枝, 富永知子, 富永真琴)	
表皮 TRPV4 の結合蛋白質の解析 (東智広, 富永知子, 富永真琴)	
TRPV4 の体温制御機構への関与の解析 (稲田仁, 柴崎貢志, 鈴木誠, 富永知子, 富永真琴)	
表皮ケラチンサイトから感覚神経への温度情報伝達のメカニズムの解析 (Sravan Mandadi, 鈴木誠, 富永真琴)	
新規温度感受性 TRP チャネルの探索 (富樫和也, 東智広, 富永知子, 森泰生, 富永真琴)	
海馬における TRPV4 の発現と機能解析 (柴崎貢志, 鈴木誠, 富永真琴)	
発達期脊髄領域における温度感受性 TRP チャネルの発現と機能 (村山奈美恵, 柴崎貢志, 富永真琴)	

mDia 結合タンパク質の探索と機能解析

(島貫恵実, 富永知子)

神経回路形成における mDia を介する情報伝達経路の役割

(島貫恵実, 柴崎貢志, 富永知子)

動物実験センター..... 71

概要

計算科学研究センター..... 72

概要

核酸塩基識別子の設計と合成

(片岡正典, 永山國昭)

ユニバーサル核酸の創生

(片岡正典)

カルボン酸を用いる新規オリゴヌクレオチド合成法の開発

(片岡正典)

酸-アゾール複合体を活性化剤とするホスホロチオエート型人工核酸の立体選択的合成法の開拓

(片岡正典)

技術課..... 74

1. 概要

(大庭明生)

2. 施設の運営状況

①統合生理研究系

(1) 生体磁気計測装置室

(永田 治)

②脳機能計測センター

(1) 形態情報解析室

(山口 登)

(2) 機能情報解析室

(佐藤 茂基)

(3) 生体情報解析室

(吉村伸明, 村田安永)

③生理研・基生研共通施設

(1) 電子顕微鏡室

(前橋 寛)

(2) 機器研究試作室

(加藤勝己)

④動物実験センター (岡崎共通研究施設)

(佐治俊幸, 廣江猛, 高橋知子, 窪田美津子)

分子生理研究系

神経機能素子研究部門

【概要】

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

今年度, これまでに引き続き, 神経機能素子の遺伝子の単離, 変異体の作成, tag の付加等を進め, 卵母細胞,

HEK293 細胞等の遺伝子発現系における機能発現の再構成を行った。また, 2 本刺し膜電位固定法, パッチクランプ等の電気生理学的手法, 細胞内 Ca^{2+} イメージング・全反射照明下での FRET 計測等の光生理学的手法, 細胞生物学的研究手法により, その分子機能調節と構造機能連関の解析を行った。また, 外部研究室との連携により, 精製レコンビナント蛋白を用いた単粒子構造解析, 遺伝子改変マウスの作成も進めている。以下に今年度行った具体的な研究課題とその内容の要約を記す。

ATP 受容体チャネル P2X_2 のレコンビナント蛋白の精製と単粒子構造解析

久保義弘, 山本友美

三尾和弘, 小椋利彦, 佐藤主税 (産総研, 脳神経情報)

ATP 受容体チャネル P2X_2 の構造とその状況依存的変化を知るというゴールに向けて, P2X_2 蛋白の精製と単粒子構造解析を行った。

まず, P2X_2 の N-末端に FLAG tag を付加したコンストラクトを作成し, バキュロウイルスベクターに組み込み, 昆虫細胞 Sf9 に感染させた。膜画分を回収し, FLAG 抗体によるアフィニティ精製と, ゲル濾過による精製を行った。その精製産物を用い, グルタルアルデヒドで架橋

後, non-denature ゲルにて電気泳動したところ, 主たるバンドのサイズから P2X_2 蛋白が 3 量体であることが示された。精製産物のピーク分画を用い, 酢酸ウランにより負染色して電顕撮影したところ, 単一蛋白粒子像が観察された。単粒子構造解析の手法により, P2X_2 蛋白が 3 量体であることが確認され, また, 大きな細胞外領域を持つ逆ピラミッド状の構造をしていることが明らかになった。

代謝型グルタミン酸受容体 E238 点変異を持つ遺伝子改変マウスの作成

久保義弘, 山本友美

饗場篤 (神戸大学大学院医学系研究科)

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

ことを見いだした。 Gd^{3+} は脳脊髄液中に含まれていないため, mGluR1 の持つ Gd^{3+} 感受性の個体における生理的意義は明らかでない。この点にアプローチするため, E238Q 変異を持つ遺伝子改変マウスの作成に取り組んで

いる。昨年度、相同組み換え陽性の 129 マウス由来の ES 細胞株を得、これをマウス初期胚に注入し、♂のキメラマウス 2 匹を得た。今年度、キメラマウスと B6 マウスとの交配により、遺伝子改変ヘテロのマウスを得、さら

に、その交配により、遺伝子改変ホモのマウスを得た。現在、予備的な行動解析実験を開始するとともに、遺伝的背景を B6 マウスに置き換えるための交配を進めている。

代謝型グルタミン酸受容体の多様な機能を制御する機構の解明

立山充博, 久保義弘

代謝型グルタミン酸受容体 1 型 (mGluR1) は、記憶や学習に関する「神経回路の可塑性」に重要な役割を担い、複数の G 蛋白質 (Gs, Gq, Gi) と共役して多様な細胞応答をもたらす受容体であることが知られている。一方、mGluR1 を介して見られる細胞応答は発現細胞により異なるため、多様な機能が制御されている可能性が示唆されていた。そこで、mGluR1 が個々の細胞において複数種類の G 蛋白質を活性化する過程を、特異的レポーター

分子を用いて識別的に可視化し、多様な機能を制御する機構について検討した。その結果、多様な機能を制御する機構の一つとして、mGluR1 の活性型構造の差異を見出した。これは、リガンドの種類により mGluR1 の活性型構造が異なるため、共役する G 蛋白質の種類が異なるということを示すものである。さらに、細胞内領域における蛋白質相互作用により、mGluR1 の多様な機能が制御される可能性について検討を進めている。

KCNQ チャネルの C 末端コイルドコイルドメインの機能的意義

中條浩一, 久保義弘

KCNQ チャネルは、細胞内 C 末端領域に 2 つのコイルドコイルドメインを持つ。これらはチャネル分子が 4 量体を構成するために必要であると考えられているが、2 つのドメインの機能の違いについてはよくわかっていない。そこで我々は、KCNQ2 におけるそれぞれのドメインの機能を 2 本刺し膜電位固定法で解析した。1 つめのドメインを欠失させた変異体はチャネルとして機能しなかったが、2 つめのドメインを欠失させた変異体は野生

型の KCNQ2 とほぼ同じ電流量、性質を持つ電流が生じた。しかし野生型 KCNQ2 は KCNQ3 と共発現させると電流が 10 倍増加するのに対し、2 つめのドメインを欠失した変異体は KCNQ3 と共発現させても電流量の増加はみられなかった。2 つめのドメインはチャネルの機能に必須ではないが、KCNQ3 とのヘテロ 4 量体の電流を増加させるために何らかの役割を果たしていると考えられた。

内向き整流性 K⁺チャネル (Kir2.1) の細胞内側ポアに存在する電荷を帯びたアミノ酸残基の機能的役割

藤原祐一郎, 久保義弘

内向き整流性 K⁺チャネル Kir2.1 の細胞内領域ポアの内側表面に負電荷や正電荷を持ったアミノ酸が存在する。我々は、その機能的役割を探ることを目的として、これらのアミノ酸残基の変異体を系統的に作成し、変異体の機能変化を網羅的に解析した。その結果、細胞内領域ポ

アの電荷を帯びたアミノ酸残基群が、全体として負電荷を帯びた環境を構成し、この負電荷をおびた環境が、K⁺イオンとスペルミン等の細胞内ブロッカーの両方の、局所濃度を高めることに寄与していることを明らかにした。この効果が、K⁺イオンのブロッカー非存在下での外向き

電流を促進すると共に、この外向き流の細胞内ブロッカーによるブロックに対する感受性を高め、結果として内向き整流性 K^+ チャンネルに特有な、メリハリの効いた膜電

位依存的な外向き電流のブロックを可能にしていると推察された。

RGS8 による受容体選択的な Gq 応答抑制の分子機構

長友克広, 久保義弘

伊藤政之, 齊藤修 (長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部)

我々は、G 蛋白質共役受容体系の制御因子として、 $G\alpha_i$ ファミリーに選択性の高い RGS8, さらにその N 端部 9 残基のみが異なるスプライスバリエーション RGS8S を対象としてその機能解析を行ってきた。RGS8, RGS8S 共に、 $G\alpha_q$ との結合能は低い、RGS8 は、Gq 系の M1 ムスカリニック受容体のシグナルを抑制すること、一方、RGS8S は RGS8 に比べてその抑制効果が弱いことが観察された。この効果は、RGS と G 蛋白質との結合では説明できないため、RGS と受容体との結合を解析したところ、RGS8

が M1 の第 3 三細胞内ループ (i3) に直接結合すること、また N 端の 8 番目と 9 番目のアルギニンをアラニンに置換 (R8A/R9A) すると、結合能が減弱することが判明した。電気生理学的な解析により、M1 受容体応答の RGS8 による抑制能は、R8A/R9A 変異体で減少することが観察された。以上の結果から、RGS8 の N 端と M1 の i3 の直接的な結合によって M1 受容体体系の応答が抑制されることが明らかとなった。

代謝型アデノシン受容体 (A_1R) と代謝型 ATP 受容体 (P_2Y_1R) の機能的ヘテロ多量体形成

石井 裕, 久保義弘

中田裕康 (東京都神経科学総合研究所・生体機能分子)

アデノシン受容体 $A_1(A_1R)$ は $G_{i/o}$ タンパク質に結合し、ATR 受容体 $P_2Y_1(P_2Y_1R)$ は $G_{q/11}$ タンパク質に結合することが知られている。最近、 A_1R と P_2Y_1R はいくつかの中樞神経系で共局在し、ヘテロ多量体を形成することが免疫共沈降実験により明らかにされた。我々は、アフリカツメガエルの卵母細胞を発現系として用いて、 A_1R と P_2Y_1R が機能的なヘテロ多量体を形成していることを電気生理学的に確認する実験を行った。 A_1R と P_2Y_1R を共

発現させたところ、非加水分解性の ATP アナログ添加により $G_{i/o}$ 反応が見られた。この結果はユニークな表現系をもつ機能的なヘテロ多量体が形成されていることを示している。また、そのヘテロ多量体は、ATP アナログによって $G_{q/11}$ 系が活性化され、アデノシンアナログによって $G_{i/o}$ 系が活性化されるという、それぞれのサブユニットの持つ本来の性質が保たれていることも確認された。

高分子量 G タンパク質 mOPA1 により引き起こされるミトコンドリア断片化機構の解明

三坂巧 (東京大学大学院農学生命科学研究科)

村手源英 (理化学研究所)

久保義弘

高分子量 GTP 結合タンパク質 mOPA1 は、遺伝子導入

した COS-7 細胞においてミトコンドリアの断片化を引

き起こす。断片化されたミトコンドリアを mOPA1 の局在と共に観察したところ、小さなリング状になったマトリックスの一端に mOPA1 および膜間部分が Vesicle 状の局在を示している様子が観察された。すなわち mOPA1 の遺伝子導入によりミトコンドリアが単に断片化するだけでなく、ミトコンドリア内部で膜間部分が凝集して片寄った分布を示すような機能を持つことが推察された。

また mOPA1 の GTP 結合ドメインに点変異を導入した K301A 変異体を発現させた場合には、ミトコンドリアは依然として断片化するものの、膜間部分とマトリックスはともにリング状に観察された。すなわちミトコンドリア断片化に伴う膜間部分の凝集には mOPA1 の GTP 結合能が強く関与することが示唆された。

分子神経生理研究部門

【概要】

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

脳神経系では他の組織とは異なり多様性が大きい。大きさに言えば、神経細胞は一つ一つが個性を持っており、そのそれぞれについて発生・分化様式を研究しなければならない程である。また、均一であると考えられてきたグリア細胞にも性質の異なる集団が数多く存在することも明らかとなってきた。そのため、他組織の分化研究とは異なり、細胞株や脳細胞の分散培養系を用いた研究ではその本質に迫るには限界がある。われわれは in

vitro で得られた結果を絶えず in vivo に戻して解析するだけでなく、神経系の細胞系譜の解析や移動様式の解析をも精力的に行っている。

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

糖蛋白質糖鎖の解析法を開発し、その生理学的意義について検討している。ヒト正常脳においてはその発現パターンが個人間で驚くほど一定に保たれており、現在考えられているより、もっと重要な役割を果たしていると思われる。事実各種神経変性疾患においてその発現パターンが変化していた。病態時における糖鎖異常にも着目して研究している。

bHLH 型転写制御因子 Olig3 の機能と細胞系譜の解析

丁雷, 小野勝彦, 渡辺啓介, 田中謙二, 池田一裕

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

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

時期特異的遺伝子組み換え法を用いた脊髄の Olig2 細胞の系譜解析

政平訓貴, 丁雷, 小野勝彦, 池中的一裕

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

その結果, 胎生早期の Olig2 細胞からは運動ニューロ

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

前脳基底部の Olig2 細胞のコリナージックニューロンへの分化

古性美記, 小野勝彦, 政平訓貴, 池田和代, 池中的一裕

Olig2 は発生期のすべての中枢神経領域で発現しているが, 脊髄と後脳の一部を除いて, 細胞系譜や機能に関してほとんど解析が進んでいない。発生期の終脳領域ではその腹側部で強い Olig2 の発現が見られる。脊髄や後脳後部では Olig2 細胞の一部がコリナージックニューロン (Ch 細胞) に分化することから, 終脳における Olig2 系譜の細胞の Ch 細胞への分化を調べた。その結果, 胎生早中期に Olig2 を発現している細胞の中に, 前脳基底

部における Ch 細胞に分化するもの見い出された。少なくとも一部の Olig2 細胞は前脳基底部でもコリナージックニューロンに分化することが明かとなった。Olig2 欠損マウスでは, 前脳基底部における Ch 細胞の分化調節転写因子 (Nkx2.1, Lhx8 等) の発現に大きな変化が見られないことから, Olig2 はこれらの転写因子とは独立もしくは相補的に機能している可能性が考えられる。

神経構築形成における長距離ガイダンス分子の役割の解明

渡辺啓介, 小野勝彦, 池中的一裕

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

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

モデルマウスを用いた脱髄の病態解明

田中久貴, 馬堅妹, 山田元, 田中謙二, 池成一裕

脱髄モデルマウスであるPLPトランスジェニックマウス (PLPTg)は2ヶ月齢までに一度髄鞘がほぼ正常に形成され, Na^+ チャネル, K^+ チャネルはそれぞれ正常にクラスタリングする。5ヶ月齢頃から脱髄が始まり, K^+ チャネルのクラスタリングが崩れはじめ, 8ヶ月齢までに Na^+ チャネルのクラスタリングも崩壊していく。これらの変化と跳躍伝導の相関を調べるために, 中枢神経系 (後索路, 前庭・網様体脊髄路, 錐体路) の解析を行ったところ,

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

跳躍伝導速度の低下が, 行動にどのような変化として現れるか, 京都大学 宮川剛博士と共同で行動解析を行った。一般の運動能力, 探索行動, 不安行動, 情動反応は野生型と比べて変化が無かった。唯一の有意な変化はパーンズ迷路で参照記憶の障害が見られたことであった。

脱髄モデルマウスを用いた再生治療研究

東幹人, 等誠司, 池成一裕

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

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

成体脳に存在する神経幹細胞の維持のメカニズム解明

東幹人, 等誠司, 池成一裕

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

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

神経幹細胞の発生の分子機構の解明

村岡大輔, 等誠司, 池中的一裕

我々はこれまでに, ES 細胞から神経幹細胞を誘導する技術を確立した。脳に存在する神経幹細胞に比べてより高い多分化能を示すことから, 神経幹細胞の前段階にある未分化神経幹細胞と考えられる。未分化神経幹細胞は発生初期の胚の中にも存在する。早期胚の epiblast を leukemia inhibitory factor 存在下で培養すると, 浮遊細胞塊を形成することで未分化神経幹細胞が検出できる。未分化神経幹細胞は in vitro で神経幹細胞へと分化させる

ことができ, この過程に Notch シグナルの活性化が必須であることも解明した。今後はこの in vitro 分化系を利用し, ES 細胞から未分化神経幹細胞, 未分化神経幹細胞から神経幹細胞への分化過程で発現変化する遺伝子群を同定し, その役割の解明を進めていく。また, ES 細胞から神経幹細胞への分化に従って発現が変化する糖鎖構造の同定およびその機能解明を行なう。

アストロサイトの分化, 発生様式に関する研究

成瀬雅衣, 小川泰弘, 等誠司, 池中的一裕

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

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

Alexander 病モデルマウスの解析

田中謙二, 池中的一裕

Alexander 病の原因遺伝子である変異 GFAP を発現するトランスジェニックマウスを作成した。Alexander 病の病理の特徴である GFAP 凝集体は, 変異 GFAP がわずか 30%過剰発現するだけで形成されることが明らかになった。GFAP 凝集体の存在は, 内在 GFAP の発現を増加させ, 別の中間径フィラメントであるネスチンを誘導したが, 正常な中間径フィラメントを形成することなく, 凝集体にとり込まれていた。モデルマウスのアストロサイ

トは中間径フィラメントによる細胞骨格が破壊されていたが, アストロサイトの微細形態は保たれていた。一方で, 海馬 CA1 の LTP が形成されやすいこと, カイニン酸全身投与でけいれんを起こしやすいことなどの神経回路異常を示唆するデータを得た。細胞骨格の異常が神経回路異常にどのように関与するのか, これが Alexander 病の病態生理にどのように関与するのか検討していく予定である。

脳の発生と糖鎖

石井章寛, 等誠司, 鳥居知宏, 池田一裕

すべての細胞表面は糖鎖で覆われており, 細胞間相互作用やシグナル伝達に深く関わっている。これまでに我々は(1)マウス, ヒト脳内に発現する糖鎖の割合は高い類似性を示すこと, (2)脳内糖鎖発現パターンは個体発生の各時期で劇的に変化することを明らかとした。マクロアレイ解析システムを開発し, 神経変性疾患, 細胞の分化などに伴う糖鎖パターンの変化を遺伝子発現レベルでも理解できるようになった。

本年度は髄鞘における糖鎖の意義を解明するために,

髄鞘形成時, 形成前後の正常マウスからスクロースグラジエント法を用いて髄鞘を抽出し, 糖鎖の発現解析を行った。その結果, 全脳に比べて髄鞘に増加あるいは減少する糖鎖構造がある事が分かり, 髄鞘形成と糖鎖発現の関係性を明らかにできる。さらに, 脳の形成, 発達における糖鎖の意義を解明するために, 発達期マウス脳における糖鎖発現を解析した。その結果, いくつかの糖鎖の発現量が顕著に変化することが明らかとなった。

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

鳥居知宏, 石井章寛, 等誠司, 池田一裕

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

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

細胞内代謝研究部門

【概要】

細胞が刺激に対し適切に応答する細胞シグナリング機構の解明は命の謎と進化を解く鍵である。本部門では, 電気生理学と先端バイオイメージングを用いてイオンチャネルや細胞内シグナル分子の動態を測定し, 細胞応答に至るシグナルネットワークの時空間統御機構の解明を目指している。特に細胞の機械刺激受容/応答機構(細胞

力覚機構)の解明を中心課題に設定して, 細胞運動における機械シグナリングの役割, あるいは機械刺激に対する細胞骨格や接着斑の応答機構を調べている。また, 受精機構について Ca^{2+} 動態を中心に解析している。さらに, シナプス可塑性に対する神経ステロイドの調節作用の分子機序についても研究を始めている。

伸展刺激に対する細胞移動機構の研究

毛利達磨
曾我部正博

伸展可能なシリコンフィルム上に臍帯静脈血管内皮細胞を2次元的に培養し、傷をつけてその治癒過程における細胞の移動過程を研究した。定常的に伸展した場合の創傷部位への細胞の移動をタイムラプスのビデオ顕微鏡で観察記録した。個々の細胞の時空間的解析から細胞の移動速度は定常的伸展時には、伸展方向に対して増加することを確認した。伸展時には細胞内のエネルギーセンサー (AMPK) が活性化しておりそのシグナルを統合する仕組みがあるという仮説をたてた。この仮説を証明すべく

研究を展開している。まず、AMPK が活性化しているかどうかみるために、ウェスタンブロット法で AMPK のリン酸化の増加 (活性化) を調べたところその増加を確認した。また、逆に、AMPK を活性化する試薬 AICAR を投与し、その存在下の細胞移動速度を調べた。移動速度はコントロールに比べて、有意に増加していた。同時に細胞接着斑、細胞内カルシウム、および細胞骨格動態のライブイメージングを開始した。

力学環境に対する接着構造の応答の分子機構

平田宏聡
曾我部正博

接着性細胞における細胞外基質との接着構造(接着斑)は、加わる力に応じてその大きさが変化する。しかし、その分子機序は謎のままである。接着斑ではアクチンの重合が盛んであり、また接着斑の構成要素の多くはアクチン結合タンパク質である。そこで我々は、力の負荷が、アクチン重合の局所的な調節を介して、アクチン結合タンパク質を含む接着斑の大きさを変化させるという仮説をたてた。この仮説に基づき、アクチン重合調節タンパ

ク質であり接着斑に局在する zyxin について、力学刺激に対する応答を調べた。ミオシン II の阻害により細胞の収縮力発生を抑制すると、zyxin は他の接着斑タンパク質に先立って接着斑から消失した。また、収縮力の発生を抑制し接着斑を完全に消失させた細胞を人為的に伸長させると、zyxin の集積が現れた。これらの結果から、zyxin は力学刺激に対する応答性の高い接着斑タンパク質であることが明らかとなった。

神経ステロイドによる海馬シナプス長期増強の誘導機構

曾我部 正博

最近になって、エストロゲン (estrogen) を始め、PREGS (pregnenolone-sulfate) や DHEAS (dehydroepiandrosterone-sulfate) に代表される多くのステロイドは、脳内で合成、分泌され、脳の高次機能を修飾する内因性生理活性物質であることが明確になり、神経ステロイドと総称されている。神経ステロイドの投与は学習記憶を促進し、逆にアルツハイマー病や老化による学習記憶の低下と神経ステロイドの脳内濃度の低下に強い相関が認められている。

我々は、これらの背後にある分子機構を探る目的で、ラット海馬スライスに対する神経ステロイドの作用を電位感受性色素を用いた高速イメージングで詳細に解析した。上述の PREGS は、投与直後に海馬歯状回の貫通線維-顆粒細胞シナプスに LTP を誘起した。この LTP は貫通線維終末の $\alpha 7nAChR$ の促進に起因する STP と顆粒細胞の NMDA 受容体機能の増強による LTP の独立した 2 要素からなることが分かった (Chen&Sokabe,2005)。つまり PREGS はこ

れら 2 種類の受容体機能を同時並行的に nongenomic に促進することが判明した。PREGS は $\alpha 7nAChR$ に直接作用するが、NMDA に対しては直接作用に加えて Src の活性化を介したチロシンリン酸化促進の 2 重作用があるらしく、複雑である。一方で、我々はアルツハイマー病の原因である β アミロイドが顆粒細胞の $\alpha 7nAChR$ 機能を阻害して LTP 誘導を障害することを見いだしているのです (Chen, et

al.,2005), PREGS が β アミロイドの LTP 障害作用を軽減する可能性があり、現在調査中である。また、神経ステロイドは急性にスパインの形態を変化させてシナプスの伝達効率を促進し、その背後には、アクチン細胞骨格や接着分子を含む細胞シグナリングの関与が示唆されており、近い将来細胞力覚との接点が見いだせるのではないかと期待している。

細胞器研究系

生体膜研究部門

【概要】

当部門では、開口放出とシナプス機能を2光子顕微鏡法を活用し、更に分子生物学的方法論、パッチクランプ、ケイジド試薬や電子顕微鏡を組み合わせ可視化定量化する研究を推進してきた。本年度は、脳スライス標本内の中枢神経細胞において、ケイジドグルタミン酸の光活性化法により、単一シナプスレベルで刺激を与えたときのカルシウムシグナルを調べた。また、これまでの2光子励起法による開口放出測定を体系化して、分泌小胞の大きさを顕微鏡の空間解像と無関係にナノメートルスケールで求める方法を確立した。これにより、シナプス様小胞

と大型有芯小胞の開口放出様式の違いを明確にできるようになった。なお、教授の河西春郎は11月1日付けで東京大学大学院医学系に転出し、これに伴い松崎政紀助手が10月1日、高橋倫子助手が平成18年1月1日に東京大学に転出した。また、根本知己助手は生理学研究所脳機能計測センター助教授に平成18年1月1日に異動した。引越は12月末より始まり、平成18年1月に完了した。平成18年3月末までに、動物施設の利用も終了し、河西も兼任解除となった。

2光子励起法による開口放出の研究

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

カルシウム依存性開口放出は神経・分泌細胞の機能の基本であるが、その分子細胞機構の解明は難航を極めている。関係する分子がわかってきても事態は改善されていない。その理由の一つは、開口放出過程は基本的に多数の分子や細胞構造を巻き込む形態過程であり、そのサブミクロンからナノの形態過程を直接的動的に観測する手法が乏しいことによる。我々はこの様な状況の打開に向けて2光子励起法の運用を試みている。本年度は2光子励起法の同時多重染色性を利用した、開口放出小胞直径のナノメートル測定法を開発し、TEPIQ(Two-photon Extracellular Polar-tracer Imaging-based Quantification)法と

命名した。この方法によって、直径が55 nm, 100 nm, 220 nm, 350 nmの小胞の大きさを推定し、これらが電子顕微鏡的な大きさとほぼ対応することを確認した。この方法論を用いて、分泌細胞における開口放出では小胞の事前のドッキングは必要でないこと、事前のドッキングは開口放出の準備状態というより、逐次開口放出の準備状態と考えられることを明らかにし、Kasai H et al. (2005) J. Physiol. 568: 891-903, Kishimoto T et al., (2005) J. Physiol. 568: 905-915, Liu T-T. et al. (2005) J. Physiol. 568: 917-929の三連報に報告した。

大脳錐体細胞スパインの研究

河西 春郎, 松崎 政紀, 早川 泰之, 野口 潤, 安松 信明, 本蔵直樹, 堀池由浩, 萩原輝記

大脳神経細胞の樹状突起のスパインは頭も首もきわめて多様で、同じ形のスパインを見出すことは困難な程である。これまで、筆者らのグループはスパイン頭部の大

きさはシナプス結合強度を決め、その大きさは結合強度の変化に伴って速く変わること明らかにしてきた。今回、2光子励起法でケイジドグルタミン酸を活性化して

単一スパインを刺激しながら、スパインのカルシウム上昇を測定することにより、スパインの首の多様性がグルタミン酸受容体を通して流入したカルシウムの動態に強く影響することを明らかにした。小さなスパインの首は細い傾向があるので、単一スパインに限局した高いカルシウム濃度上昇が作りやすく、このため独立した長期増強 (LTP)、即ち、頭部増大の好発部位となる。一方、大きなスパインは首が太い傾向があるので、カルシウムは

樹状突起に広がりやすく、濃度上昇は小さい。このことが、大きなスパインが長期増強を起こし難く、形態安定であることを説明するかもしれない。この様にスパインの頭と首は、それぞれ、シナプスの結合強度とその安定性を決める重要な因子と考えられる。これらの結果をまとめて Noguchi, J. et. al. (2005) *Neuron* 46: 609-622 に報告した。

機能協関研究部門

【概要】

細胞機能のすべては、細胞膜のチャネルやトランスポータの働きによって担われ、支えられている。機能協関研究部門では、容積調節や吸収・分泌機能や環境情報受容などのように最も一般的で基本的な細胞活動のメカニズムを、チャネル、トランスポータ、センサーなどの機能分子の働きとして細胞生理学的に解明し、それらの異常と疾病や細胞死との関係についても調べている。

(1)「細胞容積調節の分子メカニズムとその生理学的役割」：細胞は容積を正常に維持する能力を持ち、このメカニズムには各種チャネルやトランスポータやレセプターの働きが関与している。これらの容積調節性膜機能分子、特に容積感受性クロライドチャネルやそのシグナルの分子同定を行い、その活性メカニズムと生理学的役割

を解明する。

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

(3)「バイオ分子センサーチャネルの分子メカニズムの解明」：イオンチャネルはイオン輸送や電気信号発生のみならず、環境因子に対するバイオ分子センサーとしての機能を果たす。アニオンチャネルや ATP チャネルの容積センサー機能およびストレスセンサー機能の分子メカニズムを解明する。

大脳皮質神経細胞における容積感受性クロライドチャネル：その性質と容積調節への関与

井上 華, 岡田泰伸

容積感受性外向整流性 (VSOR) アニオンチャネルはほとんど全ての動物細胞に発現し、細胞容積調節に関与しているが、これまでに大脳皮質神経細胞におけるこの発現は不明であった。ホールセルパッチクランプ下で初代培養大脳皮質神経細胞を低浸透圧によって膨脹させるとアニオン電流が活性化した。その電気生理学的性質は、外向整流性、低フィールドアニオン選択性、高陽電位での不活性化、中間型シングルチャネルコンダクタンスで、

その薬理的性質も含めて VSOR チャネルとよく一致した。このように、皮質神経細胞にも VSOR チャネルが発現していることが明らかになり、図 1 のように浸透圧性膨脹後の皮質神経細胞の容積調節に本チャネルが関与していることが明らかになった。これらの結果は次論文に報告：Inoue, Mori, Morishima & Okada 2005 *Eur J Neurosci* 21:1648-1658.

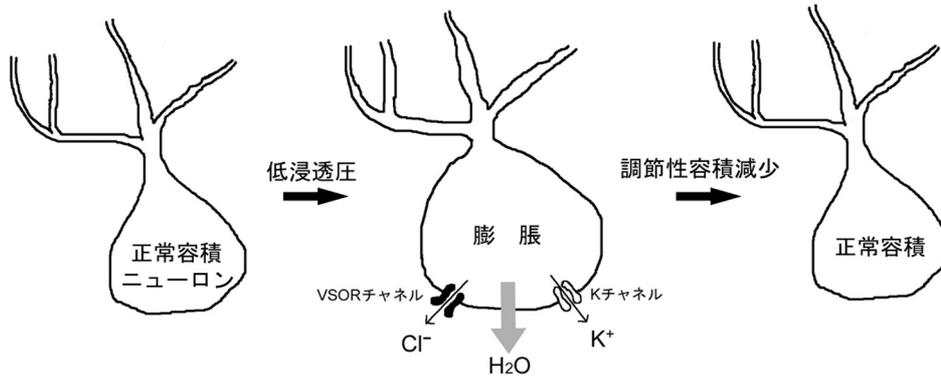


図1：大脳皮質神経細胞の調節性容積減少。膨張した神経細胞ではVSORチャンネルとKチャンネルの並列的活性化によりKClが流出することで水の流出が起こり容積が減少する。

ヒト上皮培養細胞の容積調節性水流入における水チャネルの役割

木田 肇, 高橋信之, 清水貴浩, 森島 繁 (福井大学), 岡田泰伸

ヒト上皮 Intestine 407 細胞において浸透圧性細胞膨張後に起こる調節性容積減少 (RVD) 時の水輸送経路について検討した。水の透過係数の計測から水チャネル (アクアポリン) の関与が推定された。事実, 水チャネル阻害剤が RVD を抑制した。さらに RT-PCR 法と免疫染色法から本細胞にはアクアポリン 3 (AQP3) の発現が明らかとなった。そこで, アンチセンスオリゴヌクレオチド

処理により AQP3 の発現を抑制したところ, RVD が有意に阻害された。それ故, 本細胞の容積調節性水輸送経路として AQP3 が, 図2のように本質的な役割を果たすものと結論された。本研究結果は次論文に発表: Kida, Miyoshi, Manabe, Takahashi, Konno, Ueda, Chiba, Shimizu, Okada & Morishima 2005 J Memb Biol 208: 55-64.

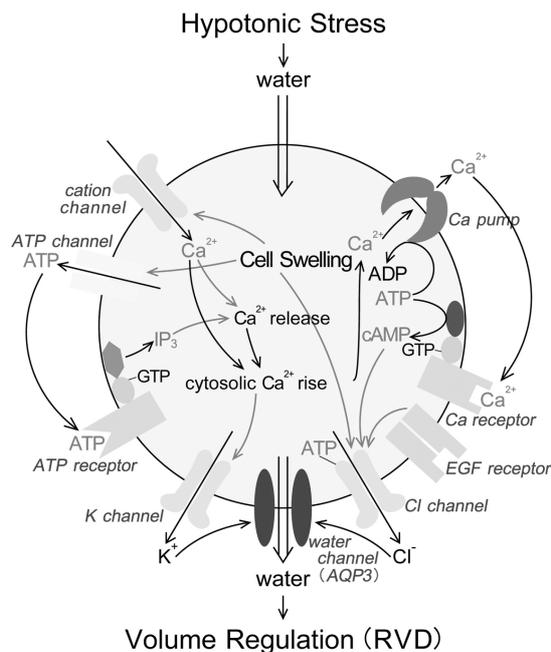


図2：調節性容積減少メカニズムにおけるアクアポリンの役割

心筋細胞アポトーシスにおける VSOR アニオンチャネルの役割

Wang Xiaoming, 高橋信之, 田辺 秀, 浦本裕美, 岡田泰伸

添加された容積感受性外向整流性アニオンチャネル (VSOR) ブロッカーはミトコンドリア仲介性アポトーシス誘導剤によるラット心筋初代培養細胞アポトーシスを有意に抑制した。さらに VSOR ブロッカーは、虚血・再灌流によって引き起こされるアポトーシスも抑制した。この抑制作用は活性酸素種 (ROS) の産生が急増する再灌流時に添加された場合のみに認められた。このように心

筋細胞のアポトーシスには VSOR の活性化が必要であり、虚血・再灌流では再灌流時に産生される ROS が VSOR 活性化に関与する (図 3)。これらの成果は次論文に掲載: Tanabe et al 2005 FEBS Lett 579,517-522; Takahashi et al 2005 Cell Physiol Biochem 15,263-270; Wang et al 2005 Cell Physiol Biochem 16,147-154.

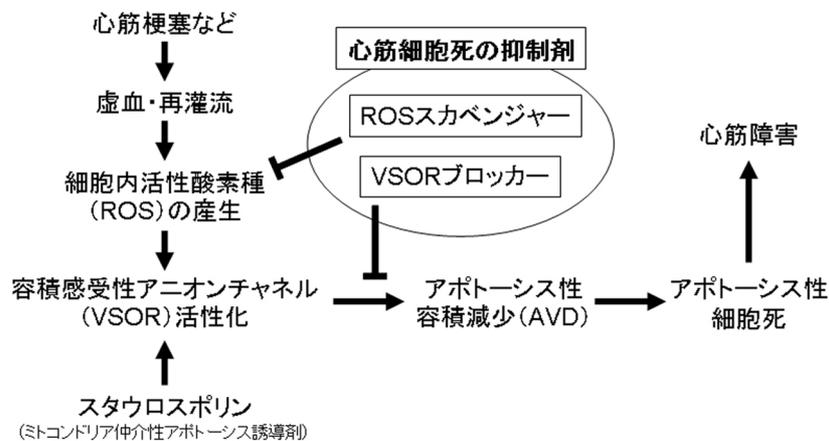


図 3 : 心筋細胞アポトーシスの誘導と VSOR 活性化抑制によるその阻害

アポトーシス死の達成には細胞内 ATP レベルの正常以上の上昇が必要である

Zamaraeva Maria, Sabirov Ravshan, 岡田泰伸

アポトーシス時の細胞内 ATP 濃度 ($[ATP]_i$) 変化のリアルタイム測定を、種々の細胞の細胞質にルシフェラーゼを強制発現させて行った。ミトコンドリア刺激、デスレセプター刺激、核クロマチン刺激のいずれのアポトーシス誘導によっても、 $[ATP]_i$ は 1.25 mM から数 mM に上昇し、この高 $[ATP]_i$ はカスパーゼ 3 活性化時や DNA ラダー形成時にも維持された。この ATP 増は解糖反応を停止

させると消失し、この時には $[ATP]_i$ は正常レベルに保たれているにもかかわらず、カスパーゼ活性化も DNA ラダー形成も阻止された。このように、アポトーシス細胞では $[ATP]_i$ の上昇が見られ、これがアポトーシス死実行に不可欠であることが結論された。これらの結果は次論文に報告: Zamaraeva, Sabirov, Okada et al 2005 Cell Death Different 12: 1390-1397

生体情報研究系

感覚認知情報研究部門

【概要】

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

性や、異なる種類の刺激への反応の分布を調べている。具体的な課題として (1) 初期視覚野における輪郭とその折れ曲がりの表現, (2) 大脳皮質高次視覚野における色情報の表現, (3) 色カテゴリー識別時の視覚野ニューロン活動, (4) 大脳皮質における視覚的注意のメカニズム, (5) サル大脳視覚野活動の fMRI による計測法の開発, などに関する研究を行った。

初期視覚系における輪郭線の折れ曲がりの表現

伊藤 南

我々は物体の形状を認識する過程を明らかにするために、注視課題を遂行中に第二次視覚野より単一細胞記録を行い、図形の輪郭に含まれる折れ曲がり初期視覚野でどのように検出されているのかを調べてきた。これまでに輪郭線の折れ曲がりに対して選択的な反応を示すニューロンが第二次視覚野に多数存在すること、そうした選択性が折れ曲がり刺激に含まれる個々の半直線成分に対する興奮性ないしは抑制性の反応の線形和に強く依存

することを示した。本年度は、第二次視覚野の主要入力源である第一次視覚野で記録し、折れ曲がり刺激に対する選択性を比較した。受容野よりも大きな刺激を含む同じ刺激セットを用いたところ、第一次視覚野のニューロンの反応選択性は直線ないしは直角の表現に限定されていた。これらの結果は第二次視覚野が方位選択的な線情報の組み合わせにより輪郭線の折れ曲がりや分岐を検出する最初のステップであることを示唆する。

下側頭皮質における色情報表現

安田正治, 小松英彦

下側頭皮質は破壊によって色弁別が重篤に障害されることが知られており、これまでの我々の研究により下側頭皮質前部の前中側頭溝 (AMTS) 近傍の皮質に、強い色選択性を持ち形選択性を持たないニューロンが集中して存在することが明らかになった。一方サルのイメージングによる研究は下側頭皮質後部の TEO 野にも色刺激による活動を報告している。そこで注視課題を行っているサルの後中側頭溝 (PMTS) 付近の TEO 野と考えられる部

位からニューロン活動の記録を行った。実験前に撮影した MRI 画像と、各電極の刺入位置の比較により記録部位の同定を行った。刺激には CIE-xy 色度図上でカラーディスプレイの 3 原色 (RGB) が囲む三角形を均等に分割する色を用いた。それぞれの輝度は一定にし、ディスプレイの灰色背景より明るい刺激セットと暗い刺激セットの両方を用いた。刺激の形は異なる特徴をもつ 7 個または 11 個の単純な幾何学図形を用いた。実験の結果、鋭い色選

択性を持つニューロンが後中側頭溝 (PMST) 付近の領域に集中して存在することが分かった。色選択性のみを持つニューロンと色選択性と形選択性の両方をもつニューロンは混在していた。また受容野マッピングの結果、こ

の領域はおおまかな視野表現を持ち、その内容は過去に報告されている TEO 野の詳しい視野表現に関する研究と一致していた。これらの結果から TEO 野が色情報の処理に関わっているものと考えられる。

色カテゴリー識別時の視覚野ニューロン活動

鯉田孝和, 小松英彦

弁別とカテゴリー化は視知覚の二つの異なる側面である。これは色知覚においても顕著に見られる。同じ色刺激を見ても、細かい色の識別を行わないといけない状況と、細かい色の差は無視してカテゴリー判断を行わないといけない状況では動物が表出する反応は異なる。このように同じ色刺激に対して状況によって異なる反応を行う時に、下側頭皮質の色選択ニューロンの活動にどのような差が見られるかを調べるために、色弁別課題と色カテゴリー課題と注視課題の3つの異なる課題を訓練したサル TE 野から単一ニューロン活動の記録を行った。刺激は CIExy 色度図上でカラーディスプレイの R (赤) と G (緑) の間を均等に分割する等輝度の 11 色を用いた。いずれの課題でも最初に一つの刺激 (テスト刺激) が呈示され、弁別課

題ではその後呈示される二つの色刺激からテスト刺激と同じものを選び、カテゴリー課題ではテスト刺激が赤か緑かによって GO 反応または NOGO 反応を選択することが要求される。注視課題では刺激は報酬に無関係でサルは注視を続ける。下側頭皮質前部に存在する色選択ニューロンにおいて、課題に応じて応答強度が有意に変化するニューロンが多く見出された。しかし、課題間で色選択性そのものは非常に類似していた。またカテゴリー課題でニューロンの応答がよりカテゴリー的になる傾向は見られなかった。これらの結果は、現在行っている課題のルールを表す信号によって、下側頭皮質で色情報を表現しているニューロンの活動がコントロールされていることを示している。

多次元視覚探索課題における後頭頂葉ニューロンの活動特性

小川 正, 小松英彦

視覚探索においては、周囲と異なるポップアウト刺激によって受動的に引き起こされるボトムアップ型注意と、知識や意志によって能動的に起動されるトップダウン型注意が重要な役割を果たしている。脳内における 2 つの注意過程の神経メカニズムを明らかにするため、多次元視覚探索課題を行っているサルの頭頂間溝外側部 (LIP, 7a) からニューロン活動を記録した。課題では 2 種類の色と形から構成される 6 個の刺激が呈示され、その中には色と形次元で目立つ刺激が一つずつ含まれる (例えば $\circ \times 1$, $\blacksquare \times 1$, $\square \times 4$)。サルは目立つ刺

激に向かってサッカード眼球運動を行うと報酬が貰えるが、どちらの次元で目立つ刺激を目標とするかは試行ブロックごとに切り替えられる。実験の結果、後頭頂葉には特定の特徴次元で探索する場合にのみ目標刺激に対する活動を増強させるニューロン群が存在することがわかった。この結果は、2 つの注意機構が特定の状態で組み合わせられた場合にのみニューロン活動に変化が生じることを意味し、両者の相互作用が後頭頂葉において生じていることが示唆された。

サル視覚野活動の機能的核磁気共鳴画像法 (fMRI) による計測

郷田直一, 伊藤南, 小川正, 小松英彦 (感覚認知情報)
豊田浩士, 定藤規弘 (心理生理学)

視覚の神経機構を明らかにするためには, ある刺激に対してどのような領域の細胞がどのように活動するかを調べる必要がある。これまで感覚認知情報研究室では視覚刺激によってサル大脳視覚野に生じる活動を単一ニューロン活動記録法により調べてきた。しかし fMRI は一度に大脳皮質の広い領域の活動を計測できる特長があり, 単一ニューロン活動記録法と併用することにより, 相互の利点を活かして視覚の神経機構に多面的にアプ

ローチすることが可能になると考えられる。サルを用いて fMRI 計測を行うため, 本年度は fMRI 装置内で使用可能なサル頭部・身体固定システム, 及び視覚課題と眼球・頭部・身体運動の制御を行うサル fMRI 実験システムの開発を行った。またサル 2 頭について fMRI 装置を模擬した環境下で訓練を行った。内 1 頭については注視課題遂行中の視覚応答を計測する fMRI 実験を行い, V1-V4 を含む初期視覚野の活動が計測できることを確認した。

神経シグナル研究部門

【概要】

従来われわれのグループでは, 分子生物学と細胞レベルの電気生理学を中心とした研究を進めてきたが, 最近スタッフのほとんど全員が入れ替わったのを契機に, 研究テーマをよりシステム側に設定し, 脳スライスを用い

た電気生理学的測定により局所神経回路機能の解析することを主な研究対象としている。研究は比較的順調に進捗し, 予想を上回る興味ある実験結果も得ているが, 大部分の論文発表は 2006 年度となった。

視床投射細胞の異種興奮性シナプスの解析

宮田 麻理子, 井本 敬二

視床投射神経細胞には, 末梢からの感覚情報を受け取る上向性 (内側毛帯) シナプスと大脳皮質からの feedback シナプス (皮質視床シナプス) の二つの主な興奮性シナプスが存在する。我々は, それぞれのシナプスのグルタミン酸受容体成分に着目し, その機能的意義について検討した。標的細胞を同じとするマウス VPL 投射細胞において, 皮質視床シナプスの EPSC はわずかながらカイニン酸受容体成分が存在するが, 内側毛帯シナプスには存在しないことを見出した。また, 皮質視床シナプス EPSC

では NMDA 受容体成分が AMPA 受容体成分に比べて極めて有意に多く存在する一方で, 内側毛帯シナプスでは AMPA 受容体成分が NMDA 受容体に比べて有意に多かった。皮質視床線維を連続刺激すると, EPSP は加算され投射細胞は漸次的に活動電位を発生する late-persistent 発火を示し, それは, NMDA 受容体依存的であった。一方, 内側毛帯シナプスでは始めの 1, 2 回目の刺激で活動電位を出すその後消失する onset-transient 発火を示し, AMPA 受容体依存的であった。

成熟ニューロンにおける cdk5 の生理的役割の検索：シナプス種依存的機能の可能性

佐竹伸一郎，井本敬二

サイクリン依存性キナーゼ (cdk) は、細胞分化・増殖の制御に関わるタンパク質リン酸化酵素として広く知られている。Cdk ファミリーの一つ cdk5 は、成熟ニューロンの軸索や細胞体に強く発現することから、細胞周期制御とは別の機能も担うと推定される。しかし、cdk5 ノックアウトマウスが周産期致死のため、成熟ニューロンにおける cdk5 の生理的役割は現在も明らかでない。これまでの機能検索から、cdk5 特異的阻害薬 roscovitine が①小脳平行線維（顆粒細胞）—プルキンエ細胞間の興奮性シナプス伝達を顕著に増強すること、しかし②登上線維—プルキンエ細胞間興奮性シナプス伝達には無効であること

等を見出してきた。Cdk5 のシナプス種依存的機能を検討する過程で、顆粒細胞—籠細胞間シナプスにおいて、roscovitine が興奮性シナプス後電流 EPSC の振幅のみならず減衰時定数を増大させることを発見した（一方、顆粒細胞—プルキンエ細胞 EPSC の減衰時定数は有意に変化しない）。この減衰時定数増大がグルタミン酸受容体低親和性競合阻害薬 γ -D-glutamylglycine によって減弱したことから、この現象に受容体飽和（後シナプス性要因）や伝達物質拡散、不均一性多重小胞放出（前シナプス性要因）が関与すると推定できる。こうした作業仮説に基づき、引き続き分子基盤の検討を進めている。

視床ハイブリッド神経回路を用いた同期的神経発火の解析

井上 剛，井本 敬二

視床は、感覚信号を大脳皮質へ転送する領域である。視床において顕著に観察される神経回路現象として、神経細胞群の同期的神経発火が知られている。欠伸でんかん発作時には、異常な同期的神経発火が生じることも知られている。これらの同期的神経発火は、視床神経細胞間のシナプス相互作用で発生することが推定されるが、視床神経回路内のそれぞれのシナプス配線が同期的神経発火の発生にどのように寄与しているかについて十分に

は分かっていない。この問題に取り組むため、今年度我々は視床ハイブリッド神経回路の構築を行った。この視床ハイブリッド神経回路では、複数の視床神経細胞からの同時パッチクランプ記録と、ダイナミッククランプ法を用いた人工的シナプス電流を組み合わせた。シナプス配線を任意に操作することができるというこの手法の利点を用い、同期的神経発火の発生とシナプス配線との関連に関し検討した。

Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II の神経機能に対する役割

— 不活性型ノックインマウスによる検討

山肩葉子，畑中伸彦，阪上洋行（東北大学），高雄啓三（京都大学），宮川 剛（京都大学），小幡邦彦（理化学研究所），柳川右千夫（群馬大学），井本敬二

中枢神経系に豊富に存在し、神経活動の制御やシナプス可塑性に深く関与すると考えられている Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMKII) が脳機能に果たす役割を解明するために、前脳における主要なサブユニットである α を不活性型に置換した不活性型ノ

ックインマウスを用いた解析を行っている。このマウス脳では、CaMKII α のプロテインキナーゼ活性のみが選択的に消失するが、蛋白としての発現は維持されており、シナプス可塑性との関連が示唆される mRNA の樹状突起への局在も保たれていた。このマウスの出生率は正常

で、繁殖能力にも問題がなかったが、生後 10～20 週での死亡率が高く、また、一部のマウスに自然発症のけいれんが認められ、薬剤誘発けいれんに対する感受性も高かったことから、神経活動の調節に異常を来している可能性が高いと考えられた。また、マウスの行動解析を行ったところ、多動を初めとする多彩な異常所見が認められ

た。チトクロームオキシダーゼ活性染色により、情動行動の調節をつかさどる大脳辺縁系の一部で、神経活動の低下が認められたことと合わせ考え、行動に関してさらに詳しい解析を行い、その病態の把握に努めているところである。

持続性けいれん時における Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II の不活性化のメカニズムに関する検討

山肩葉子, 小幡邦彦 (理化学研究所), 井本敬二

Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMKII) は、中枢神経系に豊富に存在する蛋白質リン酸化酵素として、神経活動の制御やシナプス可塑性に深く関わる事が知られている。一方、これまでに、種々の持続性のけいれんモデルにおいて、CaMKII の不活性化が報告されているが、そのメカニズムについては不明であった。そこで、ラットのカイニン酸誘発けいれんモデルを用いて、その不活性化メカニズムの検討を行った。けいれん中の脳ホモジネートにおいては、CaMKII の不活性化と共に、沈降する画分への細胞内移行が起こり、その画分では、CaMKII の Thr-286(α)/287(β) の自己リン酸化が大きく上昇する一方で、キナーゼ活性が大きく低

下するという現象が観察された。可溶性画分に残存した CaMKII にはこのような現象は認められなかった。また、けいれんから十分回復させた後には、このような自己リン酸化・不活性化・沈降型の CaMKII はもはや検出されなかった。このことから、けいれん中の CaMKII の不活性化は、単なる変性や分解によるものではなく、自己リン酸化・不活性化・沈降型 CaMKII が新たに形成されるためと考えられる。このような CaMKII は、細胞内への過剰な Ca^{2+} 流入時に、 Ca^{2+} で活性化された大量のカルモジュリンをトラップすると共に、CaMKII の過剰活性化を防ぐ役割を果たしているのかもしれない。

視床-大脳皮質ネットワークにおけるてんかん発生に関する研究

佐々木 幸恵, 井本 敬二

てんかんの一種である欠神発作は、特徴的な脳波が大脳皮質全体に同期して認められる事から、その原因として、大脳皮質と視床を結ぶ神経ネットワークの異常により生じると考えられてる。しかし、その発症メカニズムは現在不明な点が多く存在している。

本研究では、自然発症てんかんモデルマウスを用い、視床-大脳皮質投射におけるシナプス伝達特性をスライスパッチクランプ法により検討を行った。その結果、て

んかんモデルマウスの大脳皮質 4 層細胞において、自発的に連続したシナプス入力を多く受けている事を明らかにした。大脳皮質 4 層細胞は、視床からの入力層として知られており、おそらくてんかんモデルマウスでは、自発発火条件において視床回路が同期的に働き、大脳皮質 4 層細胞で連続したシナプス入力を受けているのではないかと考えられる。

Ca_v2.1 変異マウス rocker における小脳平行線維-プルキンエ細胞シナプス機能異常の解析

児玉貴史, 井本敬二 (神経シグナル部門), 重本隆一, 深澤有吾 (脳形態解析部門)
森泰生 (京都大学大学院工学研究科 合成・生物化学専攻)

rocker マウスは Ca_v2.1 変異マウス的一种であるが, 呈する神経疾患症状 (運動失調等) が Ca_v2.1 変異マウスの中でも最も軽度であるという特徴を持っている。このことから我々は rocker マウスが Ca_v2.1 機能異常の基本的な病態を解析するのに最適なモデルであると考え, rocker マウスにおいて運動失調に深く関わりがあるあると考えられる小脳平行線維-プルキンエ細胞シナプスの解析を行った。その結果, このシナプスにおける情報伝達が

rocker マウスにおいて著しく障害されており, これがシナプス後部の AMPA 受容体の数の減少に由来していることを明らかにした。また, rocker マウスにおいてプルキンエ細胞の樹状突起伸展が有意に悪化していることも明らかになった。以上の結果より, 平行線維-プルキンエ細胞シナプスの機能がプルキンエ細胞上の Ca_v2.1 に特に強く依存していることが示唆された。

小脳皮質における登上線維伸展範囲の定量的解析

加勢大輔, 児玉貴史, 井本敬二

蛍光染色法は共焦点顕微鏡との併用により酵素反応を利用した染色法に対し, 抗原ごとに選択的な画像が得られる, シグナル強度が蛍光強度に反映される, 高い空間解像度を持つ等の利点を持つ。しかし得られた染色画像に対し多くの場合は定性的な差の記述にとどまり, 染色法の持つ利点を利用した定量的なデータの解析による評価は行われていない。

本研究では染色画像の定量的解析の試みとして, 小脳

皮質分子層における登上線維の伸展範囲を蛍光色素により可視化し, 画像データの解析を行い, 週齢ごと及び野生型マウスと Ca_v2.1 カルシウムチャンネル変異マウスとの間で比較を行った。比較の結果, 登上線維伸展範囲の週齢ごとの変化を検出することができた。一方, 野生型マウスと遺伝子変異マウスとの間では違いが見られなかった。

統合生理研究系

感覚運動調節研究部門

【概要】

2005年度は3名の総合研究大学院大学生（5年一貫制2名，後期3年過程1名）と1名の博士研究員（木田哲夫君）が新たに仲間に加わった。逆に，博士研究員として2年間共に研究を続けてきた井原綾さんが情報通信研究機構に，尾島司郎君が首都大学東京に，大学院生の秋云海君が学位を取得後に中国に帰国した。野口泰基君は在学中の業績が顕著であるため，生理学研究所では初めて早期卒業が認められ，9月に学位を取得後10月から学振の特別研究員となった。現在，留学しているのは，藤岡孝子さん（カナダ・トロントのRotman Institute），田村洋平君と和坂俊昭君（米国 NIH），岡本英彦君（ドイツ，ミュンスター大学），中田大貴君と坂本貴和子さん（イタリアのキエッティ大学）の6名である。このように人事はかなり変動しているが，常に20名近くの研究者が共に研究にいそんでいる。医学（神経内科，精神科，小児科など），歯学，工学，心理学，言語学，スポーツ科学など多様な分野の研究者が，体性感覚，痛覚，視覚，

聴覚，高次脳機能（言語等）など広範囲の領域を研究しているのが本研究室の特長であり，各研究者が自分の一番やりたいテーマを研究している。こういう場合，ややもすると研究室がバラバラになってしまう可能性もあるが，皆互いに協力し合い情報を提供しあっており，教室の研究は各々順調に行われている。脳波と脳磁図を用いた研究が本研究室のメインテーマだが，最近はそれに加えて機能的磁気共鳴画像（fMRI）及び経頭蓋磁気刺激（TMS）を用いた研究も行い成果をあげている。

現在，日本宇宙フォーラム（テーマ：様々な環境における脳活動の研究）と科学技術振興機構「社会技術研究：脳科学と教育」（テーマ：顔認知機構）より1000万円以上の研究費をいただいております。他に文部省科研費，厚生労働省，環境省などからの研究費を含めて，競争的的外部資金獲得額は総額で約5000万円に達した。研究員一同，より一層の努力を続けて質の高い研究を目指していきたいと思っています。

ヒト感覚—運動抑制過程の脳波，脳磁図研究

中田大貴，乾幸二，和坂俊昭，田村洋平，木田哲夫，柿木隆介

Go/NoGo課題を用いた事象関連電位は，反応抑制過程を知る上で有用である。通常 NoGo 課題では刺激後140-300 ミリ秒付近に特異的な電位がみられ，nogo potential と呼ばれる。本研究では Go/NoGo 課題における事象関連電位で観察される所謂 NoGo 電位の起源を脳磁図脳波同時記録により検討した。刺激には手指の電気刺激を用い，ボタン押し課題を行った。脳波，脳磁図両者

で，刺激後約160ミリ秒で頂点となる NoGo 特異的活動が記録された。脳磁図データでの信号源推定を行ったところ，この NoGo 関連活動の起源は下前頭回後部付近に推定された。従って，160 ミリ秒付近にみられる NoGo 関連活動の起源は前頭前野であることが明らかとなった。

(Nakata et al. Eur J Neurosci 22: 1784-1792, 2005)

体性感覚 Go/NoGo 電位への刺激間隔及び刺激確率の影響

中田大貴，乾幸二，和坂俊昭，赤塚康介，柿木隆介

体性感覚 Go/NoGo 課題を用いた事象関連電位の特性を検討した。実験1では刺激頻度 (ISI) を，実験2では刺

激確率を変化させ，効果を調べた。実験1では，反応の振幅は変化しなかったが，頂点潜時は ISI の増加に伴っ

て長くなった。反対に実験 2 では、潜時に変化はなかったが、振幅は NoGo 刺激確率の低下とともに増大した。このように ISI と刺激確率は異なる効果を持つことから

我々は、ISI は刺激の評価の潜時に影響し、刺激確率は反応の強さに関連するのではないかと考えた。

(Nakata et al. Exp Brain Res 162:293-299, 2005)

運動準備期の第一次、第二次体性感覚野への異なる影響

和坂俊昭, 中田大貴, 赤塚康介, 木田哲夫, 乾幸二, 柿木隆介

手指運動時の体性感覚野への影響を脳磁図を用いて調べた。被験者が第 2 指を自己ペースで進展させる間に、運動とは関係なく右正中神経に電気刺激を与えた。運動開始(筋電図)を起点として、運動準備期を 5 区間に分け、それぞれの区間に呈示した正中神経刺激をそれぞれ加算した。正中神経刺激により誘発される 20 ミリ秒の成分は運動準備により変化しなかったが、30 ミリ秒の成分

は、-500-0 ミリ秒の区間で有意に減弱した。これらは第一次体性感覚野 (SI) 由来の活動である。第二次体性感覚野 (SII) は、刺激同側の活動は影響を受けなかったが、対側の活動は-500-0 ミリ秒の区間で有意に増強した。SI と SII での反対の挙動は、感覚運動調節におけるこれらの部位の異なる役割を示唆する。

(Wasaka et al. Eur J Neurosci 22: 1239-1247, 2005)

筋収縮力依存性の、体性感覚誘発電位に対する遠心性 gate 効果の変化

和坂俊昭, 中田大貴, 木田哲夫, 柿木隆介

体性感覚誘発電位 (SEP) に対する遠心性 gate 効果のメカニズムを知るために、自発運動中の SEP の変化を検討した。被験者は自己ペースで足関節を背屈するよう指示され、運動強度は最大自発収縮 (MCV) の 20% および 50% の二種類に設定した。運動とは無関係に頸骨神経を刺激し、SEP を記録した。運動準備期間は、運動準備電位に従って 2 区間に分類した (NS および BP 区間)。NS 区

間では、50%MCV の P30 と、両条件の N40 が静止条件と比べて有意に減弱し、かつ 50% の N40 は 20% のそれと比べて有意に減弱していた。BP 区間では、50%MCV の P30 と N40 が、静止条件と比べて有意に減弱した。以上の結果より、SEP に対する遠心性 gate 効果の程度は、運動関連領野の活動に依存すると考えられた。

(Wasaka et al., Exp Brain Res 166: 118-125, 2005)

足底自発運動準備期にみられる、反対側同一筋収縮による SEP への gate 効果

和坂俊昭, 中田大貴, 木田哲夫, 柿木隆介

反対側同一神経支配領域の筋収縮による、体性感覚誘発電位 (SEP) への gate 効果を研究するために、足関節背屈運動準備中の SEP を記録した。左足の運動を自己ペースで 5-7 秒おきに行い、それとは無関係に右頸骨神経を刺激した。運動準備電位に従って、運動準備期は 4 区間に区分した (NS, BP-1, BP-2, Pre-Bp)。NS 区間では、N40

が有意に減弱した。P53 と N70 も、他の区間と比べて NS 区間で低振幅であった。運動準備期間には求心性の効果はないため、これらの結果は非運動側の体性感覚情報が遠心性に運動野からの修飾を受けることを示唆する。

(Wasaka et al., Brain Res Cogn Brain Res 23: 354-360, 2005)

ヒト第二次体性感覚野での顔の体部位再現

Nguyen TB, 乾幸二, 宝珠山稔, 柿木隆介

ヒト第二次体性感覚野 (SII) での顔面皮膚領域の再現を脳磁図を用いて検討した。刺激は足、口唇および顔面 3 カ所 (前額、頬、下顎) に行い、SII での再現を比較した。SII には明瞭な配列が認められた。即ち、口唇が最も外側で、足が最も内側、顔面がその中間にあった。しか

しながら、顔面の 3 領域では有意な差はなかった。SII での顔面の占める領域は小さく、有意な配列の差を検出できなかったためと考えられる。

(Nguyen et al. Clin Neurophysiol 116: 1247-1253, 2005)

Rolandic oscillation と運動野興奮性の機能的関連－脳磁図研究

田村洋平, 宝珠山稔, 中田大貴, 廣江総雄, 乾幸二, 金桶吉起, 井上聖啓, 柿木隆介

脳神経活動の同期、脱同期は運動や意識的認知に重要な役割を果たしている。これまでの研究では、中心前回の 20Hz リズムは運動機能と密接に関連しているが、一方中心後回の 10Hz リズムは感覚機能に関与しているとされている。本研究では、rolandic oscillation が運動野の興奮性と関連しているか否かを知るために、左運動野への 1Hz の連続的経頭蓋磁気刺激 (rTMS) の効果を検討し

た。右第二指の進展運動の際の脳磁図を記録し、rTMS 群とコントロール群で比較した。その結果、rTMS は有意に 20Hz リズムの運動後リバウンドを減弱させることが判明した。即ち、20Hz リズムが運動機能と密接に関連することが確認された。

(Tamura et al., Eur J Neurosci 21: 2555-2562, 2005)

音再現における時間の圧縮

矢部博興, 松岡貴志, 佐藤靖, 晝間臣治, 小山幸子, 軍司敦子, 柿木隆介, 兼子直

感覚情報の自動的判別システムの基礎となる感覚記憶は、ミスマッチ陰性電位 (MMN) に反映される。先行する音の時間的イメージは、160 から 170 ミリ秒のエポックとして感覚記憶に統合される。我々は MMN と、複雑な音の中に組み込まれた省略セグメントに対する反応時

間を測定した。主な結果は、省略セグメントに対する時間は実際のものよりも早い、というもので、音の再現では時間が圧縮されることを示唆する。

(Yabe et al., Neuroreport 16: 95-98, 2005)

二次の視覚性運動処理に関わる脳部位の探索

野口泰基, 金桶吉起, 柿木隆介, 田邊 宏樹, 定藤 規弘

人が物体の運動を知覚する手掛りには少なくとも 2 種類のものがあることが知られている。1 つは物体と背景の明るさの違いであり、この違いに基づいた運動知覚を一次運動処理という。だが一方で物体と背景の明るさが

等しい時にも人は運動を知覚できることが知られており、これを二次運動処理という。本研究では機能的磁気共鳴画像法 (fMRI) を用いて一次と二次の運動刺激に対する脳の活動を比較した。その結果、一次運動の知覚時には

MT 野・中心前回など従来から視覚運動処理に関係が深いとされてきた部位における脳活動が見られたのに対し、二次運動の知覚時にはこれらに加えて頭頂葉上部・上側頭領域の2箇所有意な脳活動が見られた。これらの結

果は、二次運動の知覚には後頭葉視覚野を中心とする大脳皮質領域間の広いネットワークが関わっていることを示す (Noguchi et al. Cereb Cortex 15:1592-1601, 2005)。

ヒト視覚腹側路における逆行性マスキング効果の時間的動態

野口泰基, 柿木隆介

ある視覚刺激の直後に2つ目の視覚刺激を提示したとき、1番目の刺激(target)は単独で提示された時よりも識別されにくくなる。Backward masking (BM) と呼ばれるこの現象は target への視覚反応を弱めることが知られているが、従来の研究は機能的核磁気共鳴画像法 (fMRI) が中心であったため、その変化の詳しい時間的動態については殆ど知られていなかった。今回脳磁計 (MEG) を用いて

ヒトの視覚腹側野の活動を調べたところ、BM における target への視覚性誘発反応は、通常時に比べ有意なピーク振幅の減少・ピーク潜時の短縮という2つの変化を示すことが明らかになった。これらの結果は BM が従来報告されてきた反応強度の低下に加え、時間的な変化をも視覚腹側野の神経活動に引き起こしていることを示す (Noguchi and Kakigi. Neuroimage 27:178-187, 2005)。

脳磁図と脳波を用いた母国語および外国語の脳内処理の研究

尾島司郎, 中田大貴, 柿木隆介

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

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

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

これらの結果は、思春期後の第二言語獲得が思春期前の母語獲得と質的に異なるという、臨界期仮説の予測に相容れない。(Ojima et al., J Cogn Neurosci 17:1212-1278, 2005)

『目の動き』を見たときの後頭側頭部の活動に対する顔輪郭とパーツ情報の影響

三木 研作, 渡辺 昌子, 本多 結城子, 中村 舞子 (東京慈恵医科大学神経内科), 柿木 隆介

これまで「顔の部分の動き」に対するヒトの運動視中枢 (MT/V5 野) の活動について調べてきた。今回「目の動き」が「点の動き」と区別されるための要因と考えられる顔の輪郭とパーツ情報の影響を検討した。仮現運動現象を利用した4種類の刺激を用いた。CDL: 模式的な顔の絵 (circle, dots, line) の中で目の部分 (dot) が動く刺激。

CD: 輪郭 (circle) と目 (dot) のみ。DL: 目 (circle) と口 (line) のみの。D: 目 (dot) のみ。

各動きに対する誘発磁場の活動源は後頭側頭部、MT/V5 野付近に位置推定された。潜時及び推定位置に各条件で違いはなかったが、活動の大きさは右半球で CDL 条件が他の3条件よりも、左半球で CDL 条件が DL, D 条件

よりも有意に大きかった。

動きそのものは違いがないにも関わらず条件によって活動の大きさに差がみられたことから、ヒトの MT/V5 野

で「目の動き」に対する特異的な活動が起こり、その際顔の輪郭とパーツの情報が重要な役割を担っている可能性が示唆された。

倒立顔情報処理に関わる左右半球間差：事象関連電位を用いた検討

本多 結城子, 渡辺 昌子, 三木 研作, 中村 舞子 (東京慈恵医科大学神経内科), 柿木 隆介

一般に正立顔の情報処理は右半球が優位であるとされているが倒立顔に関して左右半球の機能差は明らかでない。顔刺激（正立顔，倒立顔）を左右半視野呈示した際の事象関連電位を記録し顔認知特異的成分 (N170) の左右半球間差を検討した。

その結果，すべての被験者において刺激呈示後 150-250ms に側頭部から後頭部で大きな陰性成分 (N170) が記録された。振幅は両半球とも正立顔と比較し倒立顔で増大していた。右半球では，正立顔と比較し倒立顔で

潜時が延長していたが，左半球では明瞭な延長はみられなかった。半球間伝達時間は，左半視野に倒立顔刺激が呈示された際のみ短縮がみられた。右半球は正立顔の全体的な情報処理を速やかに行い，倒立顔に対する部分的な情報処理は別に行われていることが示唆された。一方，左半球では倒立顔刺激に対し潜時の延長はないことから，正立顔，倒立顔双方に対し部分的情報処理を行っていることが示唆された。

生体システム研究部門

【概要】

私達を含め動物は，日常生活において周りの状況に応じて最適な行動を起こしたり，あるいは自らの意志によって四肢を自由に動かすことにより様々な目的を達成している。このような随意運動を制御している脳の領域は，大脳皮質運動野と，その活動を支えている大脳基底核と小脳である。逆にこれらの領域に異常があると，随意運動が著しく障害される。本研究部門においては，このような随意運動の脳内メカニズムおよびそれらが障害された際の病態を調べることを目的としている。

これまで主に霊長類を用いて研究を行ってきたが，今

年度より新たにげっ歯類を用いた研究プロジェクトが立ち上がった。マウスには，ミュータント，ノックアウトなど様々な機能異常や疾患モデルが存在するので，新たな研究の展開が期待される。霊長類を用いた実験に関しても，研究部門内に実験動物飼育設備が完成したことで，より効率的に遂行出来るようになった。また，喜多 均教授 (米国テネシー大学) も昨年度と同様に平成 17 年 6 月～7 月，平成 18 年 1 月～3 月まで滞在し，精力的に共同研究を行った。

淡蒼球への GABA 作動性入力について

南部 篤, 橘 吉寿, 知見聡美
喜多 均 (テネシー大学医学部)

淡蒼球外節と内節は，大脳基底核の入力部である線条体から GABA 作動性入力を受けている。また，淡蒼球外

節も，淡蒼球内節と軸索側枝を介して淡蒼球外節に GABA 作動性投射をしている。これら 2 種類の GABA 作

動性入力によって、淡蒼球の活動性がコントロールされていると考えられる。今回、覚醒下の霊長類を用いて、これらの GABA 作動性入力による制御様式を、細胞外記録法と局所薬物注入により検討した。主要な興奮性入力源である視床下核をブロックすると、線条体単発刺激で淡蒼球外節には長い抑制と、淡蒼球内節には短い抑制が惹起され、どちらも GABA_A 受容体拮抗薬で消失した。

線条体の連続刺激では、GABA_B 作動性の反応が記録されたが、これは線条体由来ではなく、淡蒼球外節由来であると考えられた。GABA_A 受容体拮抗薬、GABA_B 受容体拮抗薬何れでも淡蒼球外節/内節の自発発射頻度が上昇した。以上の結果は、淡蒼球外節から淡蒼球外節/内節への GABA 作動性投射が、GABA_B 受容体を介して働き、これらの活動性をコントロールしていることを示唆する。

上肢到達運動課題実行中の線条体介在ニューロンの役割

畑中伸彦, 高良沙幸, 橘 吉寿, 南部 篤

線条体は大脳皮質運動野から生じた運動情報を受ける大脳基底核の主な入力核である。淡蒼球に投射する GABA 作動性の投射細胞がそのほとんどを占めるが、線条体内部でシナプスし投射細胞へ影響を与える介在細胞が存在している。これら介在細胞は GABA 作動性細胞とコリン作動性細胞に大別できるが、実際の運動中にそれぞれがどのような役割を担っているのか、いまだ未解明のままである。今回われわれは単一ニューロン記録と薬

物の微量注入を併用し、線条体投射細胞への介在細胞からの GABA 性入力を神経薬理的に遮断し、投射細胞の実際の運動中の活動がどのように変化するか観察した。その結果、線条体投射細胞は GABA 性入力によって空間的、時間的な活動の調節を受けていることが示唆された。今後はコリン作動性介在細胞からの入力を遮断し、その役割について検討してゆく予定である。

上肢到達運動課題実行中の線条体投射ニューロンの活動様式

畑中伸彦, 高良沙幸, 橘 吉寿, 南部 篤

大脳基底核は大脳皮質-基底核連関の一部として、運動の遂行、企図、運動のイメージ、習慣形成などに関わるとされている。これまでの神経トレーサーを用いた解剖学的な、あるいは大脳皮質に埋入された慢性刺激電極からの応答を調べた電気生理学的な研究で、大脳皮質から大脳基底核への主な投射先である線条体では、一次運動野 (MI) や補足運動野 (SMA) からの入力が内外側に分離し、中央部で一部重なり合うことが示されている。しかし実際にサルが運動を行っている時に、MI や SMA だけから入力を受けている線条体の細胞と両者から入力を受けている細胞ではどのような活動の差があるのか確認

したデータは未だ報告されていない。本年度は上肢の遅延期間付き到達課題を学習した霊長類の MI, SMA に慢性刺激電極を埋入し、実際に運動を行っているサルの線条体投射細胞の活動特性と、それぞれが入力を受ける大脳皮質運動野の組み合わせについて実験を行った。その結果、MI から入力を受ける線条体の投射細胞は運動そのものに強く関連し、SMA から入力を受ける細胞は運動前の遅延期間からその活動を開始していることが解った。また、両者から入力を受ける細胞は、運動前、運動中に活動を示し、両者からの入力が線条体の投射細胞で再現されていることが解った。

パーキンソン病モデル動物における異常な淡蒼球ニューロン活動

橘 吉寿, 岩室宏一, 南部 篤

従来, パーキンソン病 (PD) の病態生理として, 淡蒼球外節における過度の発射頻度の減少, 内節での増加が考えられてきた。しかしながら, ニホンザルの PD モデルを用いた我々の研究において, これまで報告されてきたような淡蒼球での顕著な発射頻度の変化は認められなかった。今回, 新たにタイワンザルを用いて, PD モデルサルを複製し, 淡蒼球の発射活動を記録・解析した結果, 正常サルでは観察されない β 帯域の oscillatory burst discharge といった異常な活動パターンが観察された。また, 淡蒼球外節・内節に主要な興奮性入力を送る視床下核においても, 同

様の β 帯域の oscillatory burst discharge が観察された。独自に開発した局所薬物注入法により, 淡蒼球ニューロンから記録を行いながら, 局所にグルタミン酸受容体拮抗薬を作用させ, 視床下核から淡蒼球への興奮性入力を遮断したところ, 淡蒼球ニューロンの oscillatory burst discharge は消失した。これらの結果は, 淡蒼球ニューロンでの oscillatory burst discharge が視床下核からのグルタミン酸作動性入力により生成されている可能性を示唆し, 今後のパーキンソン病治療の生理学的基盤になると考えられる。

ジストニアの病態に関する研究—ジストニアモデル動物におけるニューロン活動の記録

知見聡美, 田 風, 南部 篤

高田昌彦 (東京都神経科学総合研究所)

ジストニアは, 作動筋と拮抗筋に同時に起こる筋収縮により, 体幹, 四肢の異常運動を示す疾患である。臨床例から, 大脳基底核出力核の活動性が減少していると考えられているが, 病態の解析を行うための適当なモデル動物が存在しなかったことから, 正確な病態については未だ明らかにされていない。マウスには, 突然変異体や遺伝子改変動物が豊富に存在し, 近年, 数種類のマウスがジストニアのモデルとして提唱されている。本研究は, これらのマウスにおいて, 運動制御の高次中枢である大脳基底核および小脳のニューロン活動を覚醒条件下で記録することにより, ジストニアの病態を解明することを目指している。本年度は, 全身性にジストニア症状を示すミュータントマウスである Wriggle Mouse Sagami にお

ける解析を行った。大脳基底核の出力核である脚内核および黒質網様部ニューロンについては, 自発発火頻度と様式, および大脳皮質の刺激に対する応答様式において, 正常マウスと比較して有意な差は見られなかった。これに対し, 小脳皮質プルキンエ細胞の平均発火頻度は, 正常マウスに比べて著しく低いことがわかった。このことから, 少なくともこのモデル動物においては, プルキンエ細胞の発火頻度の低下がジストニア症状出現に関与していることが示唆された。今後, 小脳の出力部である小脳核ニューロンの活動記録や, 小脳皮質への薬物投与によってプルキンエ細胞の活動性を増大させたときに症状の改善が見られるかどうかの検討などを行い, ジストニア症状出現の小脳機構を明らかにする予定である。

大脳皮質機能研究系

脳形態解析研究部門

【概要】

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

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

らかにする。2) これらの分子の発達過程や記憶、学習の基礎となる可塑的变化に伴う動きを可視化し、その制御メカニズムと機能的意義を探索する。3) 脳の NMDA 受容体局在の左右差とその生理的意義を探索する。4) 前脳基底核、黒質-線条体ドーパミン系等の情動行動に関与する脳内部位のシナプス伝達機構および生理活性物質によるその修飾機構を電気生理学的手法を用いて解析し、それらの分子的基盤を明らかにする。5) 大脳基底核関連疾患の治療法の確立のため、神経幹細胞移植による細胞の分化、シナプス再構築や神経回路の再建に関する形態学および電気生理学的解析を行なっている。

グルタミン酸受容体の定量的解析

田中淳一, 足澤悦子, 重本隆一

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

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

小脳運動学習の記憶痕跡

中舘和彦, 馬杉一時田美和子, 王文, Andrea Lörincz, 深澤有吾, 重本隆一

ある種の運動の学習が行われる過程で小脳における、平行線維-プルキンエ細胞シナプスの長期抑圧現象が関与することが知られている。しかし、実際に学習した動物において、このシナプスに存在する AMPA 受容体数やシナプスの構造にどのような変化が起こるのかは知られていなかった。我々は、マウスの水平性視機性眼球運動

をモデルとして一時間の学習で引き起こされる短期適応が、小脳片葉の平行線維-プルキンエ細胞シナプスにおける AMPA 受容体密度の減少を伴っていることを、凍結切断レプリカ標識法によって明らかにした。また、5 日間連続の一日一時間の学習によって引き起こされる長期適応は、AMPA 受容体ではなく平行線維-プルキンエ細胞

シナプス自体の減少を伴っていることを明らかにした。これらの結果は、脳内に短期的に刻まれる記憶の痕跡が、長期的に安定化されるに従って、構造的な変化へと変換

されることを示している。さらにこの変換に関わる分子メカニズムを解明することを目指している。

神経伝達物質放出関連蛋白質の局在

萩原 明, 深澤有吾, 重本隆一

脳内における神経伝達物質の放出にはさまざまな機能分子が関与している。我々は凍結割断レプリカ免疫電子顕微鏡法を用いることによって、これらの分子の放出部位における異なる局在パターンを明らかにした。tSNARE 蛋白質は神経終末や軸索に広く分布すると同時に放出部位にも同様の密度で存在することが明らかにな

った。一方、CAST などの CAZ 蛋白質は放出部位 (active zone) に特異的に集積していた。また小胞性グルタミン酸トランスポーターや小胞性 GABA トランスポーターが、それぞれの神経終末から放出される伝達物質を同定するために、非常に有用なマーカーとして使えることを明らかにした。

海馬における長期増強現象とグルタミン酸受容体の密度変化

深澤有吾, 重本隆一

脊椎動物の中樞神経系には、樹状突起スパインと呼ばれる突起状の構造にシナプスを形成する神経細胞が多く見られ、このスパインはアクチン細胞骨格に富む点で特徴的である。既にこのスパイン上に形成されるシナプスと、学習・記憶 (神経可塑性)、或いは神経疾患との機能的関連性を示す知見が多く得られているが、その分子機構は明らかにされていない。そこで私は、このスパイン内アクチン細胞骨格と、実際にシナプス伝達や神経細胞の興奮性の調節機能を担う細胞膜上機能分子の局在を明らかにし、さらにこれらがシナプス機能の変化に伴ってどの様に変化するのかを明らかにすることで、シナプス可塑性のメカニズムを解明しようと研究を行っている。

この樹状突起スパインは長さ1ミクロンほどの構造物

であり、その内部構造や細胞膜表面の分子分布を明らかにするには電子顕微鏡レベルの定量的な分子局在解析技術が必要である。そこで故藤本和教授 (福井県立大学) により開発された凍結割断レプリカ免疫標識法 (SDS-digested freeze-fracture replica labeling) を応用し、シナプス可塑性誘導前後の神経伝達物質受容体、イオンチャンネル、開口放出関連タンパク質等の分子局在を解析している。

これらの解析を通して、生物が進化の過程で獲得した高次脳機能が、どの様に達成されているのかを理解し、学習・記憶障害などの病理や治療法の開発へと繋がることを期待している。

海馬 NMDA 受容体局在の左右差

Wu Yue, 篠原良章, 川上良介, 重本隆一

脳の機能的な左右差はヒトでよく知られているが、その分子基盤はほとんど知られていない。我々は九州大学

の伊藤功助教授らとの共同研究により、マウスの海馬 NMDA 受容体サブユニット NR2B が左右の海馬の対応す

るシナプスで非対称に配置されていることを発見した。この左右差は NR2A ノックアウト動物で増強されており、電子顕微鏡的な解析で錐体細胞シナプス特異的な NR2B 標識密度の左右差を検出した。この左右差は介在神経細胞上のシナプスには存在せず、同種の神経軸索が作るシナプスにおいても、シナプス後部の神経細胞の種類の違いによって非対称性の有無が決まることが明らかとなった。この NMDA 受容体量の左右差に対応して、CA1 放射状層での Schaffer collateral シナプスにおける長期増強現象は、右よりも左で強く起こることが明らかになった。さらにこの非対称性の生理的意義を解明することを目指す。

いによって非対称性の有無が決まることが明らかとなった。この NMDA 受容体量の左右差に対応して、CA1 放射状層での Schaffer collateral シナプスにおける長期増強現象は、右よりも左で強く起こることが明らかになった。さらにこの非対称性の生理的意義を解明することを目指す。

タグ導入による GABA_A 受容体の電子顕微鏡的定量法

Mate Sümegi, 深澤有吾, 重本隆一

脳内における機能分子の局在を電子顕微鏡レベルで可視化し正確に定量する方法論の開発のために、電子顕微鏡用タグの開発を行っている。さまざまなタグを付加した GABA_A 受容体 $\gamma 2$ サブユニットを培養神経細胞や脳に発現させ、タグ付受容体の機能と局在を電気生理学的方法と形態学的方法で調べる。 $\gamma 2$ サブユニットを欠損する遺伝子改変マウスから作成した培養神経細胞においては、GABA_A 受容体がシナプスに集積せず、樹状突起上に散在していた。これにレンチウイルスを用いて $\gamma 2$ サブユニット

トを導入したところ、正常な GABA_A 受容体クラスターの形成が認められた。このシステムを使ってタグ付受容体の機能を調べている。また小脳プルキンエ細胞に発現する GABA_A 受容体チャンネルには一個の $\gamma 2$ サブユニットが含まれていることから、 $\gamma 2$ の数を計測することによってチャンネル数を定量することを試みる。小脳での発現にもレンチウイルスによるタグ付 $\gamma 2$ サブユニットの遺伝子導入を使用している。

GABA_B 受容体とカリウムチャンネルの棘突起特異的共存

Akos Kulik (University of Freiburg), 深澤有吾, 重本隆一

脳内における主要な抑制性伝達物質である GABA には、イオンチャンネル型の GABA_A 受容体と G 蛋白共役型の GABA_B 受容体が存在する。我々は、免疫電子顕微鏡法を用いて小脳、視床、海馬における GABA_B 受容体の異なる局在を報告してきた。GABA_B 受容体は海馬錐体細胞の樹状突起においてカリウムチャンネルと共役し、ゆっくりとした過分極をおこすことが知られていたが、今

回我々は、GABA_BR1 と GIRK2 サブユニットが、海馬錐体細胞の棘突起シナプス周辺で特異的な共局在を示すことを明らかにした。このような共局在は樹状突起のシャフトにおいては認められず、2 つの蛋白質は別々のクラスターに分かれて分布していた。さらに GABA_B 受容体の機能調節機構や脳における役割の解明を目指す。

前脳基底核と黒質一線条体ドーパミン系の電気生理学的および形態学的解析

初山俊彦

前脳基底核は中枢アセチルコリン性ニューロンの起始核であり、記憶、学習、注意とうの生理的機能と密接に関係するとともに、その病的状態としてアルツハイマー

病との関連が示唆されている。現在アセチルコリン性ニューロンへの興奮性および抑制性シナプス伝達機構および修飾機構の生後発達変化につき、ニューロン同定の新

たな手法を導入しつつ、電気生理学的解析、形態学的解析を行なっている。

黒質—線条体ドーパミン系は随意運動調節に関与し、この系の障害とパーキンソン病等の大脳基底核関連疾患とが関係していることが示唆されている。大脳基底核関連疾患の治療法の一つとして神経幹細胞移植法が期待されているが、移植によるシナプス結合や神経回路の再建

に関する基礎的知見はこれまで非常に少なかった。現在、Enhanced GFP 遺伝子導入トランスジェニックラットから胎生 10.5 日目ラットを摘出し、中脳胞部由来神経板組織を成熟ラットの線条体内に移植して、ドナー細胞の分化、シナプス再構築について形態学および電気生理学的解析を行なっている。

大脳神経回路論研究部門

【概要】

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

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

皮質棘突起への抑制性と興奮性入力之二重支配

窪田芳之, 畑田小百合, 川口泰雄

非錐体細胞のターゲットは、細胞体や樹状突起近傍部であると思いがちであるが、実際には樹状突起末端部分にも多い。FS バスケット細胞他、非錐体細胞 9 個のターゲットを電子顕微鏡 3 次元再構築法で検討した結果、全ての細胞で、ターゲットの 25-50% が棘突起である事を突き止めた。さらに、その 60-95% 程度の棘突起は、もう一つのシナプス入力（非対称性）を受けていた（DI 棘突起）。次に、この DI 棘突起を神経支配している興奮

性入力、錐体細胞由来なのか、視床からの入力なのかを明らかにした。皮質では、VGLUT1 は、錐体細胞の神経終末に、一方で VGLUT2 は視床由来の神経終末に発現している。これを利用して、DI 棘突起に、どの VGLUT 陽性神経終末が入力するかを検討した。全ての層から 700 余の棘突起を電子顕微鏡で観察した結果、VGLUT2 陽性神経終末が入力する棘突起の約 10% で抑制性入力を受ける事がわかった。

大脳皮質錐体細胞の発火特性の多様性

大塚岳, 森島美絵子, 川口泰雄

大脳皮質錐体細胞の発火特性は多様であると考えられているが, 大脳皮質が情報を出力する皮質下構造との関係は余り知られていない。そこで今回, 逆行性蛍光トレーサーを対側線条体と橋核に注入することによって, それぞれの脳領域に投射する前頭皮質 5 層錐体細胞サブタイプを同定し, スライス標本においてホールセル記録を行い, 錐体細胞サブタイプの電気生理学的特性の解析を行った。その結果, 対側線条体に投射する細胞の殆どは

定常電流通電に対して通電した最初の期間しか活動電位が発生しなかった。一方, 橋核に投射する錐体細胞サブタイプでは記録した全ての細胞で, 定常電流注入に対して持続的に活動電位が発生した。また, 橋核に投射する一部の細胞では通電による発火の開始においてバースト発火を示す細胞も記録された。これらのことから, 5 層錐体細胞は投射先に依存して機能的に分化していると考えられる。

皮質介在ニューロンサブタイプにおけるスパイン形態分化

荻部冬紀, 窪田芳之, 川口泰雄

前年度までに非錐体細胞の定量的分類, サブタイプごとの軸索分枝・シナプスブトン分布, 樹状突起分枝・スパイン分布の定量的解析を終えたので, 今年度はスパイン形態を定量的に調べた。樹状突起の光顕・電顕像を対応させてスパインを同定すると, 光顕ではおよそ半数のものを数えていることがわかった。介在ニューロンの主要タイプである, FS バスケット細胞, マルティノッティ細胞, ダブルブーケ細胞のスパインを形態比較すると,

その密度だけでなく長さや形も異なることがわかった。マルティノッティ細胞のスパインは長く, マッシュルームタイプの割合が高い。複数のヘッドをもつスパインもマルティノッティ細胞で多くみられた。FS バスケット細胞では逆に長く, マッシュルームタイプは少なく, 複数のヘッドを持つものはみられなかった。スパイン密度・形態と樹状突起分枝パターンが関連することから, サブタイプごとに特有の入力様式があると考えられる。

前頭皮質 5 層における錐体細胞サブタイプとシナプス結合

森島美絵子, 川口泰雄

前頭皮質から線条体へ投射する細胞の機能分化を知るために, その形態と皮質外投射パターンとの相関を明らかにしてきた。今年度は, 二種類の 5 層錐体細胞間のシナプス結合を電気生理学的に調べた。橋核に投射する錐体細胞 (CPn 細胞) と, 対側線条体に投射する錐体細胞 (CCS 細胞) を逆行性標識で同定した。CCS 細胞から CCS または CPn 細胞への結合は約 1 割の確率でみられたのに対して, CPn 細胞から CCS 細胞への結合は殆どみられな

かった。CCS 細胞間の相互結合も同じような確率でみられた。染色した細胞を再構築すると, 軸索・樹状突起コンタクトはシナプス結合していたもの間でしかみられず, その数は電流量と相関し, 変動係数とは逆相関していた。CPn 細胞軸索は CCS 細胞樹状突起に十分近接している場合もみられたが, コンタクトは観察されなかった。前頭皮質 5 層錐体細胞の神経結合には投射サブタイプ間で階層性があると考えられる。

parvalbumin 陽性細胞, calretinin 陽性細胞への抑制性シナプス入力と興奮性シナプス入力の割合

関川明生, 窪田芳之, 川口泰雄

大脳皮質の非錐体細胞のサブタイプである parvalbumin (PV) 陽性細胞, calretinin (CR) 陽性細胞にシナプス入力する興奮性と抑制性の神経終末の割合を求めた。ラット前脳の前切片を, PV 陽性構造と CR 陽性構造を DAB ニッケル法で染色した。EPON に包埋した後, 電子顕微鏡観察用に超薄切片を作製し, 包埋後免疫組織化学法で GABA 染色を施した。電子顕微鏡観察の結果, PV 陽性細胞にシナプス入力している GABA 陽性神経終末は全体の 1 割

程度で, 残りは, 非対称性の興奮性と思われる神経終末であった。しかし, GABA シナプス入力の大半は細胞体を神経支配していた。一部は樹状突起にシナプス入力していたが細くなるにつれ少なくなる事もわかった。一方, CR 陽性細胞にシナプス入力している GABA 陽性神経終末は, 全体の 1/3 程度であった。また, 樹状突起の太さにより, 比率には大きな差はなかった。

大脳皮質 GABA 細胞蛍光標識ラットの作成とその免疫組織化学的解析

平井康治, 川口泰雄

平林真澄 (遺伝子改変動物作製室)

上松正和 (豊橋技術科学大学)

柳川右千夫 (群馬大学)

多様な大脳皮質介在ニューロンの解析を進めるために, それらを蛍光標識したラットの作成を目指した。本年度は, vesicular GABA transporter (VGAT) 遺伝子を含む BAC を用意し, これをもとに Venus 標識ラット作成を試みた。Venus を発現する二系統のトランスジェニックラット (A, B 系統) が得られた。Venus 及び GABA 発現を免疫組織化学で調べたところ, 脳領域によって, 両系統とも GABA 細胞に選択的に Venus を発現している領域, 片方の系統

だけが, 選択的に陽性で, もう一方が非 GABA 性細胞にも出ている領域があった。大脳皮質では A 系統で GABA 陽性細胞と Venus 陽性細胞がほぼ完全に一致しており, B 系統では, GABA 細胞のほぼ 95% 近くが Venus 陽性であった。海馬では A 系統で非錐体細胞が選択的に標識されているのに対して, B 系統ではそれらに加えて CA1 錐体細胞が陽性であった。

心理生理学研究部門

【概要】

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

目的としている。感覚脱失における可塑的变化から派生して, 異種感覚統合の脳内機構の解明を目指すとともに, 言語・数処理, 両手共著運動, 対連合学習など認知機能全般にわたる幅広い研究を行った。

長期の訓練による、触覚弁別における神経基盤の可塑的な変化

齋藤大輔, 定藤 規弘

盲人が点字を読む際に、一次視覚野において神経の可塑的な変化をおこすことが知られている。この変化が、視覚の剥奪でのみおこるのか、それとも長期の触覚訓練によるものかは明らかにされていない。そこで、触覚の長期トレーニングを行った健常被験者において、可塑的な変化が起こるかを調べた。訓練を行った麻雀の牌と、訓練を行っていない点字を用い、触覚での形状照合課題

を行った。その結果、訓練を行った刺激を用いた際に、一次視覚野に有意な脳活動が観察されたが、訓練を行っていない刺激では見られなかった。対照群では、どちらの刺激の場合も、視覚野の活動は見られなかった。可塑的な脳活動の変化は、視覚の剥奪や異種感覚間の対連合学習といったものではなく、長期にわたる訓練により起こることが示唆された。

対連合学習を成立させるための神経基盤の解析

田邊 宏樹, 定藤 規弘

連合学習を成立させる神経基盤について検討するため、遅延型対連合学習 (PA) 課題と対照条件として遅延見本合わせ (DMS) 課題を遂行中の脳活動を機能的 MRI により計測した。イメージング解析の結果、上側頭溝前方部の活動は、PA 課題では学習の初期に活動が高く学習が進むにつれて減衰するのに対し、DMS 課題では最初から活動がないことが明らかとなった。また、難しい PA 課題では学習がなかなか進まないが、それに呼応するように上側頭溝前方部の活動も高いまま維持されることが観察

された。これらのことから上側頭溝前方部の活動が対連合の形成 (building associates) に重要な役割を果たすことが示唆された。また、PA 課題遂行中の遅延期間において前頭前野と頭頂間溝の活動がみられ、この活動の強さは学習中に変化しないことを見いだした。DMS 課題ではこのような活動がみられないことから、この前頭前野-頭頂間溝ネットワークが学習に必要な情報の保持とその構えを表象していることが示唆され、連合学習における上側頭溝前方部との役割の違いも明らかとなった。

一次体性感覚野における口腔領域の表象

宮本順 (東京医科歯科大), 定藤 規弘

歯、唇、舌の、一次体性感覚野における体性局在 (somatotopy) を機能的 MRI を用いて検討した。中心後回頭側においては、歯は舌の上 (medial)、唇の下 (lateral) に位置し、Penfield の結果に適合した。一方中心後回尾

側に向かうにつれ体性局在は減少した。このことは、口腔からの感覚入力是一次体性感覚野において階層的に集約されていくという理論を支持する。

空間情報の脳内操作における運動前野と頭頂葉の機能分担

大塩りつ, 田中悟志, 本田 学

空間情報の脳内操作時に強い活動が観察される運動前野および頭頂葉の機能分担は明らかでない。本研究では、

情報を静的に保持する過程には後部頭頂皮質が、保持した情報を動的に操作する過程には頭頂葉に加えて運動前

野が寄与するという仮説に基づき、機能的磁気共鳴画像法を用いた検討を行った。わが国に古くから伝わる「あみだクジ」を応用した視空間情報操作課題を開発した。被験者は、第1刺激として1秒間呈示されたあみだクジパターンを15秒間保持し、第2刺激として呈示されたクジの起点と記憶されたクジの空間パターンを使って、終点にたどりつく。さらに15秒後に第3刺激として呈示されたクジの終点が、実際にあみだクジを行った終点と一致しているかどうかを判断し、選択ボタン押し反応を行った。

後部頭頂皮質の有意な活動は、あみだクジパターンを保持している第1刺激後と、あみだクジを実際に行う第2刺激後の両者で観察されたが、背外側運動前野の有意な活動は第2刺激後にのみ観察された。これらの結果は、後部頭頂皮質は空間情報の静的な記憶・保持と記憶した空間情報にもとづいて行う動的操作の両者に関与するのに対して、外側運動前野は、記憶情報の動的操作により特異的な役割を果たすことを示唆していると考えられる。

カウンティングの神経基盤

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

数は最も普遍的な概念の一つであり、カウンティングは最も単純な数的情報処理の一つと考えられる。しかしながら、カウンティングの神経基盤は未だ良く分かっていない。我々は、ヒト脳におけるカウンティングの神経基盤を明らかとする研究を行ってきている。2005年はまず、連続した刺激を明示的にカウンティングして知覚する場合と明示的なカウンティングせずに知覚する場合とを比較した。新規被験者を集め、異なる感覚モダリティからなる連続刺激を用意して、直前に呈示された刺激を構成する感覚モダリティを答えさせ、次に同じ刺激を呈示して被験者に明示的なカウンティングを行わせた。こ

の結果、明示的にカウンティングする際の運動前野の活動が、カウンティングせずに入力モダリティを判別しながら知覚する場合に比べ有意に強くなることを示した。さらに、カウンティング中の運動前野の活動が連続刺激のリズムによらないことや、その運動前野の活動が、数字を唱えるだけでは認められないことも示した。現在は、従来数的な情報処理を行うと考えられてきた頭頂葉や前頭前野と、運動前野との役割分担やそれら相互の関係を明らかにするために、連続刺激をカウンティング（積算量1）する場合と、積算量を変えて知覚する場合とを比較する実験を行っている。

両手鏡像運動時の右一次運動野の活動低下

荒牧勇（科学技術振興機構）、本田学、定藤規弘

両手協調運動において、同名筋を同時に動かす運動パターン（鏡像運動）は他のパターンに比べて極めて安定である。この理由として、鏡像運動では優位半球による同側性運動指令が寄与している可能性が考えられる。本研究はこの仮説を検証するために、fMRIを用いて両手鏡像運動と非利き手による片手運動の脳活動を比較した。被験者は3Hzのガイド音にあわせて、両手鏡像運動、両手非鏡像運動、右手運動、左手運動の4つの条件で指タッ

ピングを行なった。その結果、右一次運動野の活動が、両手鏡像運動条件において左片手運動条件よりも有意に低いことが観察された。両手非鏡像運動条件ではこのような低下は観察されなかった。こうした結果は、左手の制御に関して左一次運動野からの同側性運動指令の寄与が高くなることを示唆しており、このことが鏡像運動パターンの安定性の強さに関与していると考えられる。

皮肉課題に関する fMRI 研究

内山仁志 (鳥取大学), 小枝達也 (鳥取大学), 定藤規弘

皮肉の理解には話者の意図を認識するための複雑な心的処理を必要とする。自閉症児では他者の心的状態を付度する能力 (mentalizing) と皮肉を理解する能力に障害が見られ、両者には明確な関係があるといわれている。これは mentalizing が、皮肉のような語用論的・非字義的言語理解において重要であることを示唆している。今回我々は皮肉の検出に関わる神経基盤を機能的核磁気共鳴画像法を用いて検討した。被験者は状況文とそれに続く登場人物のコメントの2文で構成される文章を読み、そのコメントの意味内容が文脈によって皮肉なのか皮肉で

ないかの判断を行なった。その結果、皮肉検出の神経基盤として左側頭極、左上側頭溝、前頭前野内側部、および下前頭回 (Brodmann's Area (BA) 47) の賦活が観察された。これらの領域はそれぞれ mentalizing と言語処理に関わる神経基盤としても知られており、皮肉の検出にはこれらの神経基盤が関与しているものと思われる。特に左の BA47 は状況文提示時よりもコメント提示時でより顕著に賦活しており、この領域が皮肉検出時における mentalizing と言語処理の相互作用のある領域であることも示唆された。

左下前頭回における文法処理機能の分離

内山祐司, 豊田浩士, 本田学 (大阪教育大学), 吉田晴世 (大阪教育大学),
河内山隆紀 (香川大学), 江部和俊 (豊田中央研究所), 定藤規弘

文法処理に特異的な神経基盤を fMRI を用いて同定した。文章理解に関わる神経基盤を同定するために文法判定課題と短期記憶課題の脳活動を比較した。またガーデンパス文と同じ単語で構成されるが異なる並びからなるガーデンパスでない文を使って文法的処理負荷に応じて変化する神経活動を評価し文法処理に関する神経基盤を同定した。ガーデンパス文は構文分析の過程で誤った分析を起こすことで文法的処理負荷を増加できる。

短期記憶課題では両側の頭頂-前頭領域と皮質下構造で非常に広い活動が観察された。これに対して文章理解は左ブロードマンエリア (BA) 45 と 47 を含む下前頭回と

左上側頭回から縁上回にかけての領域が活動した。ガーデンパス文を使って抽出した文法的な処理領域は、左 BA45, BA46, 前補足運動野と右小脳であった。

左下前頭回において背側 BA45 を含む背側下前頭回は短期記憶課題で、より高く活動したのに対し腹側の前部下前頭回 (BA47) は意味的処理でより高く活動しており、背側-腹側間の機能勾配を形成していた。文法的処理に特異的な領域の腹側 BA45 は、これらの領域の間に位置していた。このことは、左腹側 BA45 が短期的言語記憶と他の言語的プロセスをつなぐノードである可能性を示唆する。

発達生理学研究室

認知行動発達機構研究部門

【概要】

2005年度は人の動きの多い年だった。

博士研究員だった坂谷智也君が7月より英国オックスフォード大学に留学，8月末より助手の遠藤利朗君がスウェーデンのカロリンスカ医科大学に留学した。新しく参加したメンバーとしては4月より坪井史治君が総研大博士課程に入学，高田和子と林愛さんが研究補助員として採用され，7月より高橋雅人君が杏林大学の整形外科から博士研究員に，池田琢朗君が玉川大学からCREST研究員に，9月より金田勝幸君が米国テネシー大学より助手に，加藤利佳子さんがフランスのコレージュ・ド・フランスよりCREST研究員に，10月より Penphimon Phongphananee さんがタイ国チュラロンコン大学より

国費留学生として総研大博士課程に入学した。研究としては2年目に入った戦略的創造研究推進事業 (CREST) に関係したサルを用いた皮質脊髄路の損傷後の手指の機能代償に関する研究，そして大脳皮質一次視覚野損傷後のサケード運動の機能代償に関する研究が本格的に加速してきた。さらにカナダ国クイーンズ大学の Munoz 教授，オランダ国アムステルダム自由大学の Jan Theeuwes 教授，米国南カリフォルニア大学の Laurent Itti 博士と共同で受賞した Human Frontier Science Program の共同研究グラントによる「空間的注意の脳内機構」に関する共同研究が開始した。

随意運動の制御におけるシナプス前抑制の役割

関 和彦，武井 智彦

末梢神経への電気刺激によって脊髄一次感覚神経末端に対するシナプス前抑制が引き起こされる事が知られている。自然刺激のような非同期的な刺激においても同様な抑制が誘発されるかについて軽麻酔下のサル頸髄において検討した。まず手背部及び手掌部からの求心神経末端が存在する脊髄内部位を同定した後，同定部位に対して微小電流刺激を行い，それらによって誘発される逆行性電位を皮膚神経に装着したカフ電極において記録し

た。その後，閾値電流で脊髄微小刺激を連続的にを行いながら実験者の一人が手掌部や手背部をブラシで継続に刺激した。そしてブラシ刺激によって逆行性電位の振幅がどのように変化するかを観察した。その結果，手掌部や手背部へのブラシ刺激中に記録された逆行性電位のサイズはその前後のコントロールに比較して有意に大きかった。自然刺激によってサルの皮膚神経末端部にシナプス前抑制が誘発される事が初めて明らかになった。

第一次視覚野損傷サルの残存視覚機能

吉田 正俊，伊佐 正

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

(1) 強制選択型の視覚誘導性眼球運動課題を遂行できることを確認した。損傷半視野で弁別できる標的刺激の

閾値は正常半視野と比べて高くなっていた。また，急速眼球運動の終始位置は損傷半視野においてより大きくばらついており，急速眼球運動が不正確になっていることが明らかになった。(2) 時間的ギャップを(1)の課題に加えることで express saccade と同等の潜時を持つ急速眼

球運動が起こることを見いだした。(3) 記憶誘導性眼球運動課題を遅延時間2秒でも遂行できることを見いだした。(4) Central-cue 型の注意課題において、損傷半視野での残

存視覚情報処理が注意によって促進される証拠を得た。これらのことは残存視覚を処理する経路が認知処理にも関与しうることを示している。

上丘中間層への抑制性入力

金田勝幸, 伊佐かおる, 伊佐正

上丘中間層 (SGI) ニューロンのバースト発火生成には GABA 作動性抑制性入力からの脱抑制が重要である。これまでに SGI のグルタミン酸作動性投射ニューロンには黒質網様部 (SNr) からの GABA 性投射があることが明らかにされている。しかし, SGI には様々のタイプの GABA ニューロンも存在しており, それらのニューロンにも抑制性入力があるのかどうかは不明であった。そこで本研究では, GABA ニューロンが GFP を発現している

GAD67-GFP ノックインマウスを用いてこの点を明らかにすることを試みた。ホールセル記録を GFP 陰性および陽性ニューロンから行い, SNr からの投射線維の電気刺激に対する応答を調べたところ, GABA_A 受容体を介する IPSCs がいずれのニューロンタイプにおいても観察された。さらに記録後の形態観察の結果から, 様々なタイプの SGI の GABA ニューロンが SNr 由来の抑制性入力を受けていることが明らかとなった。

サル頸髄レベル皮質脊髄路損傷後の手指巧緻性回復について ~C2 および C5 レベル損傷後回復の比較~

Bror Alstemark (スウェーデン, ウメオ大学), Lars-Gunnar Pettersson (スウェーデン, イェテボリ大学)
西村幸男, 高橋雅人, 坪井史治, 伊佐正 (認知行動発達機構)

我々は皮質脊髄路 (CST) から脊髄運動ニューロンへ結合する経路の1つとされる C3-C4 に細胞体を持つ脊髄固有ニューロン (C3-C4PN) を介する間接経路が手指巧緻性に関与している可能性について検討した。C4/C5 レベルで CST を切断 (C3-C4PN を介する間接経路を残す) したサルと C1/C2 レベルで CST を切断 (C3-C4PN を介する間接経路を遮断) したサルとの手指巧緻性の回復過程を比較した。

母指と第二指を対立させた精密把持動作について, C4/C5 で CST を切断したサルは切断後2ヶ月以内で切断前の動作に戻った。一方 C1/C2 で CST を切断したサルは切断後4ヶ月でも切断前の動作に戻らなかった。特に, C1/C2 レベルで CST を切断したサルは個々の指の独立した運動が消失した。この結果は, C3-C4PN を介する間接経路が手指の巧緻性に関与している可能性を示唆している。

把握運動に関与する脊髄ニューロンの役割

武井 智彦, 関 和彦

手を用いた把握運動の制御において脊髄神経機構がどのような役割を担っているのか調べるため, 把握運動中のサルから脊髄ニューロン活動を慢性的に記録し, その活動パターンを検討した。サルに, 母指と第二指によっ

てレバーを把握する課題 (精密把握) を行わせ, その際下位頸髄に金属微小電極を刺入して, 単一脊髄ニューロンの活動を記録した。その結果, 多数のニューロンが課題に関連した活動変化を示し, その活動の変化が把握運

動開始以前に始まる例も一部のニューロンにおいて認められた。さらに、記録されたニューロンの上肢筋群への出力を spike-triggered averaging 法を用いて調べた結果、一部のニューロンは運動ニューロンへの直接投射を持つ

ことが明らかになった。これらの結果から、脊髄ニューロンが把握運動における運動実行や運動準備の過程に関わっていることが示唆された。

Spread of activity in the local circuit of superior colliculus

Penphimon Phongphanphancee^{1,2} and Tadashi Isa^{1,2,3}

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

²School of Life Science, The Graduate University for Advanced Studies

³Core Research for the Evolutionary Science and Technology (CREST), Japan Science and Technology Corporation (JST))

To study how the visual signal is processed in the local circuit of superior colliculus (SC) from the superficial layers (sSC) to the deeper layers (dSC), we analyzed the propagation of excitation following the electrical stimulation of the sSC by using 64 channel-field potential recording system (planar electrode, 8 x 8 pattern with interelectrode spacing of 150-300 μm) in SC slices preparations obtained from 16- to 24-d-old mice. Electrical stimulation at sSC induced negative field potential with short latency mainly at the recording sites in sSC adjacent to the stimulating site. After application of bath containing 10 μM Bicuculline (Bic), the same stimulus induced a large negative field response with long duration that spreads first laterally in sSC and then ventrally to dSC. These Bic-induced responses disappeared after application of 50 μM

APV. The electrically evoked responses in individual neurons from sSC and dSC have also been investigated by whole-cell patch-clamp recording simultaneously with the multichannel field potential recordings. Bursting spike responses could be induced in both the sSC and the dSC after application of Bic, the duration of which roughly corresponds to the long lasting field potential. The results from the two recording systems suggest that when GABA_A receptor-mediated inhibition is reduced, visual signal in the sSC propagates to the dSC by induction of burst discharge shown as large response with long duration in field potential recording system and NMDA type glutamate receptors contribute to spatial propagation of the response.

生体恒常機能発達機構研究部門

【概要】

当部門は2004年6月に明大寺地区A棟5回に研究室を立ち上げてから約2年が経過した。現座、発達の過程で一旦形成された神経回路に起こる再編成のメカニズムを回路レベルで解明することを目標に研究をしている。特に、発達期における再編のメカニズムとして、シナプスレベルにおいて、伝達物質のスイッチング、細胞内イオン環境の変化によるGABAの興奮性から抑制性へのスイッチとその制御機構、受容体の細胞内動態やこれらに対する神経栄養因子、環境/回路活動による制御を検討

している。

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

本年度から神経回路の可塑的变化を生体で観察するため、多光子励起法を利用して、マウス大脳皮質細胞の全層にわたる可視化技術を確立した。この技術を利用して、現在神経回路の微細構造の長期変化の観察を試みている。

発達期における神経伝達物質のスイッチング

鍋倉 淳一, 張 一成, 西巻 卓也

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

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

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

鍋倉淳一, 渡部美穂, 和気弘明, 堀部尚子

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

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

カンナビイドによる海馬抑制性伝達調節

前島隆司, 稲田浩之

未熟期海馬においては, リズム活動があり, 海馬回路形成・発達を制御している。このリズム活動は CA3 領域に存在するリズムジェネレーターによって海馬全体に伝播する。このリズム発生の一因として GABA の脱分極作用が関与している。CA3 領域における GABA 回路の制御

機構について, シナプス工細胞の代謝型グルタミン酸作動性受容体の活性化によって逆行性に内因性カンナビノイドが抑制性神経終末に作用し, GABA 放出を抑制していることを明らかにした。

クリプトン-YAG レーザーを用いた脳虚血障害モデル動物作成技術の開発

鍋倉淳一, 和気弘明, 堀部尚子

八尾博史 (国立肥前療養所)

脳障害の回復期における神経回路の可塑性の研究を遂行するにあたり, 生体において, 程度の一定した脳障害モデルを作成する必要がある。任意の脳血管の閉塞・再開通を任意に行なうことができる技術を脳虚血作成技術

に精通している八尾博史博士と共同で開発を行なう。具体的には, ローズベンガル色素を静脈注入後, 任意の脳血管にクリプトンレーザーを極短時間照射し, 血栓形成による閉塞を作成する。任意の時間後に高エネルギーパ

ルスレーザーである YAG レーザーを照射し、血管の再開通を起こさせる。この技術はマウスでは頭蓋骨を駆け

ることなく、非観血的に閉塞・再還流が可能であり、脳虚血・障害の分野では画期的技術となる。

In Vivo 多光子顕微鏡を用いた大脳皮質神経細胞の微細構造の可視化と長期可塑性の変化

鍋倉淳一, 和気弘明

神経回路の発達および脳障害の回復期における神経回路の可塑性の研究を遂行するにあたり、究極的に生体での観察が不可欠である。そのため、生体における神経回路の可視化のため、長波長短パルスレーザーを利用して生体深部の微細構造を観察可能な多光子励起法を種々の神経細胞に蛍光蛋白が発現している遺伝子改変動物に適用し、大脳皮質回路の可視化する方法の立ち上げを行った。光路の開発・調節、頭蓋骨に適用する特殊アダプタ

の開発などを行い、マウスにおいて、大脳皮質表面から 1 ミリの深部まで観察可能な技術を行った。その結果、大脳皮質錐体細胞を全層にわたり、樹状突起、棘突起、軸索などのその微細構造を観察することが可能であり、また、同じ微細構造を数日間にわたり連続観察可能となった。さらに、同レーザーを利用して、生体において微細構造の局所障害をおこす技術の開発に成功している。

生殖・内分泌系発達機構研究部門

【概要】

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

機構を通して生活習慣病など様々な疾患の原因・治療法を明らかにしたいと考えている。現在実施している主たる研究課題は次の通りである。1) AMP キナーゼによる生体エネルギー代謝の調節機構の解明、2) レプチン、神経ペプチドによる糖・脂質代謝調節機構の解明、3) 視床下部腹内側核におけるエネルギー代謝調節機構とシグナル伝達機構の解明。4) 脂肪酸酸化を促進するレプチン・シグナル伝達機構の解明。

AMP キナーゼによる生体エネルギー代謝の調節機構の解明

箕越 靖彦

岡本 士毅

志内 哲也

田中 智洋（京都大学大学院医学研究科）

益崎 裕章（京都大学大学院医学研究科）

我々は、AMP キナーゼがレプチンやアディポネクチンなどホルモンによって活性化して骨格筋における脂肪の利用を促進すること、視床下部 AMP キナーゼが摂食行動を制御することを明らかにしている (Nature 2002,

2004)。本研究課題では、AMP キナーゼによる生体エネルギー代謝の調節機構を明らかにするため、活性型並びに不活性型 AMP キナーゼを視床下部にレンチウイルスを用いて発現させ、摂食行動に及ぼす影響を調べた。そ

の結果、マウス視床下部室傍核に活性型 AMP キナーゼを発現させるとマウスの摂食量が増加、肥満することを見いだした。さらに我々は、レプチンによる AMP キナー

ゼの活性制御機構が高脂肪食によって障害されることを、レプチントランスジェニックマウスを用いて明らかにした (Tanaka T et al. Diabetes, 2005)。

レプチン、神経ペプチドによる糖・脂質代謝調節機構の解明

箕越 靖彦
志内 哲也
斉藤 久美子

我々は、レプチンが摂食行動を抑制するだけでなく、視床下部-交感神経系の働きを介して褐色脂肪組織や骨格筋などエネルギー消費器官でのグルコースおよび脂肪酸の利用を促進することを明らかにしてきた。我々は、この作用がレプチンだけでなく、視床下部に特異的に発現する神経ペプチド・オレキシンによっても惹起されることを見いだした。オレキシンは、睡眠覚醒レベルの調

節、報酬系の調節などに関与する。このことからオレキシンは、覚醒レベルを高めると同時に、骨格筋での代謝を亢進させるなど、食餌獲得行動など行動発現の調節に関与すると考えられる。さらに近年、肥満・糖尿病など生活習慣病と睡眠障害との関連が指摘されており、オレキシンニューロンの異常と生活習慣病との関連についても調べている。

視床下部腹内側核におけるエネルギー代謝調節作用とシグナル伝達機構の解明

箕越 靖彦
岡本 士毅
李 順姫
嶋 雄一 (基礎生物学研究所)
諸橋 憲一郎 (基礎生物学研究所)

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

のシグナル伝達機構を調べている。また、脳の中でVMH特異的に発現する転写因子 SF-1 の遺伝子エンハンサーを用いて様々なトランスジェニックマウスを作製し、生体エネルギー代謝に及ぼすVMHニューロンの調節作用を明らかにする研究を行っている。

脂肪酸酸化を促進するレプチン・シグナル伝達機構の解明

箕越 靖彦
鈴木 敦

本研究では、筋芽細胞株であるC2C12細胞を用いて脂肪酸酸化を促進するレプチンのシグナル伝達機構を調べている。その結果、レプチンが、ATM並びにCaMKKβ

を介してAMPキナーゼを活性化することを見いだした。活性化したAMPキナーゼは、acetyl-CoA carboxylase (ACC)をリン酸化してその活性を抑制し、その結果、ACC

の産物である malonyl-CoA 量を低下させる。malonyl-CoA は脂肪酸をミトコンドリアに取り込む酵素, CPT1 の強いアロステリック阻害剤であるので, malonyl-CoA 量が低下することで CPT1 活性が上昇し, 脂肪酸酸化が促進す

る。さらに我々は, 活性化した AMP キナーゼが核内に移行し, 脂肪酸酸化関連遺伝子の発現に関わる転写調節因子 PPAR α の発現を促進することを見いだした。

脳機能計測センター

形態情報解析室

【概要】

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

超高压電子顕微鏡室では、医学生物学用超高压電子顕微鏡(H-1250M型;常用1,000kV)を、昭和57年3月に導入して同年11月よりこれを用いての共同利用実験が開始されている。平成17年度は共同利用実験計画が24年目に入った。本研究所の超高压電顕の特徴を生かした応用研究の公募に対して全国から応募があり、平成17年度は最終的に10課題が採択され、実施された。これらは、厚い生物試料の立体観察と三次元解析、薄い試料の高分解能観察等である。共同利用実験の成果は、超高压電子顕微鏡共同利用実験報告の章に詳述されている。超高压電子顕微鏡室では、上記の共同利用実験計画を援助するとともに、これらの課題を支える各種装置の維持管理及び開発、医学生物学用超高压電子顕微鏡に関連する各種基礎データの集積および電子顕微鏡画像処理解析法の開

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

本年度の超高压電顕の利用状況の内訳は、共同利用実験等116日、修理調整等64日である(技術課脳機能計測センター形態情報解析室報告参照)。電顕フィルム等使用枚数は6,946枚、フィラメン点灯時間は430.5時間であった。装置は、平均64%の稼働率で利用されており、試料位置で 10^{-6} Pa台の高い真空度のもとに、各部の劣化に伴う修理改造を伴いながらも、高い解像度を保って安定に運転されている。

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

小脳生後発達過程におけるバーグマングリア細胞の解析

古家園子, 山口 登, 有井達夫

プルキンエ細胞の樹状突起のスパインと平行線維間のシナプスを覆っているバーグマングリアは、発生の過程においてはプルキンエ細胞の分化や機能発現に深く関与していることが考えられている。エンドセリン(ET)は血管平滑筋を持続的に収縮させるだけでなく、種々の細胞の増殖や分化に関与しているが、小脳において、バーグマングリアにETB受容体のmRNAが豊富に存在する。我々は、ETB受容体の一部欠損を持つAR系統(sI劣性

遺伝子を持つ)の野生型とsI/sIラットを用いて、小脳のゴルジ染色標本を作製し、3-4 μ mの厚切り切片を超高压電顕で観察し、3次元構築を行った。バーグマングリアがプルキンエ細胞のスパインと平行線維間のシナプスを包んでいる部位と、非シナプス部位に分け、単位体積あたりのバーグマングリアの膜表面積の値を出すことによって、生後発生過程におけるバーグマングリアの分化過程とエンドセリン受容体の役割を明らかにする。

機能情報解析室

【概要】

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

フィールド電位の直接記録や陽電子断層撮影法などを併用して解析している。

意志に関係する脳活動の研究

遠本 徹

「意欲」や「意志」の神経機序は不明な点が多い。これまでに陽電子断層撮影法を用いた研究で、前頭前野・前帯状野・海馬の脳血流量が想定される意欲の変化と一致した変動を示すことを明らかにした。大脳辺縁系と前頭前野の「意欲」への関与を示唆する知見と考えられる。さらに一步進めて、この脳領域でどのような神経活動が行われているのかを解明するために、運動課題を行うサ

ルの前頭前野や前帯状野の大脳皮質フィールド電位を記録した。その結果、この部位のシータ波活動が「意欲」や「注意」に関連していると解釈可能な知見を得た。ヒトの脳波で「注意の集中」に関連して観察される前頭正中シータ波 (Frontal midline theta rhythms) に相当するものと考えられる。両者の対応関係やサルのシータ波の発生状況をさらに詳しく研究中である。

生体情報解析室

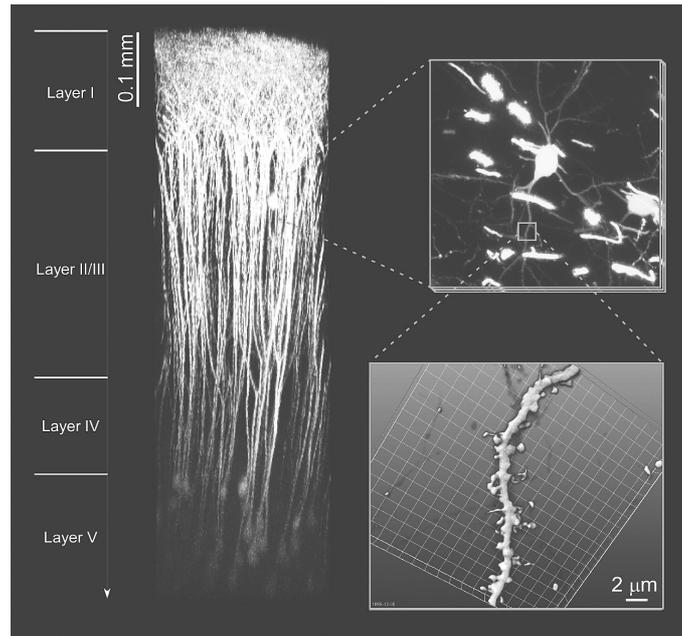
【概要】

2006年1月1日より5年間、根本知己が細胞器官系生体膜研究部門助手から当室助教授に昇任し、当室を担当することとなった。当室は、共通の2光子顕微鏡室と、生体情報解析用コンピュータシステム、所内情報ネットワークの維持管理を担当することが任務である。

2光子顕微鏡室は共通棟地下の電子顕微鏡施設から本棟5F511号室に移動させ、室温湿度制御系や陽圧系などを設営するなど大幅な整備を実施し、近赤外超短光パルスレーザーを用いたシステムに適したクリーンルームとした。さらにバイオ分子センサープロジェクトの支援を受け、広帯域高出力型の超短光パルスレーザーシステム Maitai HP (米国 Spectra Physics 社) を導入し、生体恒常機能発達機構研究部門と共同してオリンパス BX 共焦点

顕微鏡システムの改造し、個体 *in vivo* イメージング用正立型2光子顕微鏡システムを構築した。本システムでは麻酔下のマウス大脳新皮質の表面から0.9mm以上深部においても断層像を得ることが可能であり、世界でトップクラスのスペックを実現することに成功した。また現在、機能協同研究部門の倒立型2光子顕微鏡システムも Maitai HP のレーザー光を導入できるように改良を加え、カルシウムイメージングや、光活性化、長波長蛍光タンパク質の利用といった様々な2光子励起法を活用した細胞機能アッセイが可能となりつつある。

また、生理学研究所、基礎生物学研究所、分子科学研究所を横断した若手研究者の参加を募り定期的なバイオイメージング・セミナーを主催している。



麻酔下のマウスの大脳皮質の GFP 発現神経細胞群の 3 次元再構築。2 光子顕微鏡の優れた深部到達性は、生体深部の微小細胞形態や活動を観察することを可能とする。新たに構築した“in vivo” 2 光子顕微鏡は、大脳表面から 0.9mm 以上の深部を観察することが可能であり、マウス個体を生かしたまま大脳皮質全体を可視化し得る世界トップクラスの顕微鏡である。(鍋倉淳一教授との共同研究)。

行動・代謝分子解析センター

遺伝子改変動物作製室

【概要】

2005年11月、脳機能計測センター 脳機能分子解析室は行動・代謝分子解析センター 遺伝子改変動物作製室に改組された。脳機能に代表されるような複雑な生物反応機構の解明に分子生物学的技術と発生工学的技術を駆使して作製する遺伝子転換動物は必要不可欠で、とくにラットの遺伝子ターゲティング技術の開発は脳神経系遺伝子を含む数万にも及ぶ遺伝子の役割を研究するために切望されている。遺伝子改変動物作製室では遺伝子改変動物（マウス、ラット）の作製技術を提供しつつ、遺伝

子ターゲティングによってノックアウトラットを作製することを目指している。これまでに ES 細胞や精原細胞の株樹立を試みるとともに、核移植や顕微授精など、ラットにおける発生工学的技術の高度化に取り組んできた。研究課題のうち下記の3題について具体的に示す。(1) 顕微授精 (ICSI) 技術を応用したラットへの外来遺伝子の導入、(2) 凍結乾燥したラット精子の ICSI による産仔発生能の証明。(3) ラットの卵子成熟促進因子と体細胞核注入時の早期染色体凝集との関係。

顕微授精を介したトランスジェニックラットの作製効率に影響を及ぼす要因

平林 真澄, 加藤 めぐみ, 金子 涼輔 (大阪大)

精子に外来 DNA を付着させ、卵細胞質内精子注入法 (ICSI) によって作製した胚を移植すればトランスジェニック (Tg) マウスが作製できると報告され、我々はその技術の応用範囲がラットにまで拡大できると確認した。本実験の目的は ICSI を介した Tg ラットの作製効率を改善することで、結果として、超音波による精子膜破壊処理

と凍結融解処理が有効なこと、精子と共培養する DNA 溶液の濃度はマウスで用いられている濃度の 1/50 が適していること、DNA の種類 (プラスミド, BAC) は ICSI を介した Tg ラットの作製効率に影響しないこと、およびクローズドコロニー系における Tg ラット作製効率が比較的高いこと、を明らかにした。

凍結乾燥したラット精子の顕微授精による産仔の獲得

平林 真澄, 加藤 めぐみ, 保地 眞一 (信州大)

精子を凍結乾燥できれば室温あるいは冷蔵庫内で保存することが可能になるので、精子の維持や輸送に関わるコストを大幅に削減できる。本実験では凍結乾燥したラット精子が ICSI によって産仔発生に寄与できることを証明しようとした。精巣上体尾部から調製したラット精子に超音波による精子膜破壊処理を施した後、液体窒素

中に浸漬し、続いて凍結乾燥機で完全に水分を除去した。2日後に蒸留水で溶かし、ICSI後に胚移植した結果、外見的に正常な複数の産仔が誕生した。精子の超音波処理の有無によって産仔率に差が認められたので、精子膜をあらかじめ破壊しておけば核の脱凝縮が速やかに起こり、胚発生能が向上すると示唆された。

ラット卵子の p34^{cdc2} kinase 活性と顕微注入細胞核に誘起される早期染色体凝集との関係

平林 真澄, 伊藤 潤哉, 加藤 めぐみ, 保地 眞一 (信州大)

クローンマウスを作製するには除核卵子に顕微注入した体細胞核に早期染色体凝集 (PCC) が誘起されていることが重要である。しかしラットでは PCC 誘起が非常に困難なことから, 本実験では卵子の加齢化や除核操作が細胞周期維持に及ぼす影響を調べ, p34^{cdc2} kinase の活性値と PCC 誘起能との関係を検討した。マウス卵子の活性は

ラット卵子と比較して約 2 倍高く, ラット卵子の値は体外摘出後の時間増加につれて急減することがわかった。除核によっていずれでも活性低下は認められたが, マウスでは注入核に PCC が起こるのに対し, ラットではまったく起こらなくなった。ラットに特徴的なこれらのことが顕微注入核の PCC 誘起を阻害している要因であろう。

統合バイオサイエンスセンター

時系列生命現象研究領域

【概要】

研究室発足後4年目となり、蛋白研との膜蛋白連携研究による連携フェロー1名、総研大生1名、科研費による非常勤研究員1名が加わり、研究体制が強化された。前年の成果を土台として、イオンチャネル関連分子の解析と、運動機能に関わる神経回路機能の解析を、分子生物学、電気生理学、動物種横断的なアプローチにより進めた。従来電位センサーはイオンチャネル固有の構造で膜電位シグナルは細胞膜を介するイオンの出入りを基盤とすると考えられてきた。ホヤのゲノムの網羅的解析から電位センサーとホスファターゼを一分子内に併せ持つ新規分子(Ci-VSP)を同定し、膜電位シグナルが従来知られてきた以上に幅広い現象に関わる可能性を示唆した。また脊椎動物の生理機能の進化との関係を明らかにするため多様な生物種から相同遺伝子を同定した。また阪大蛋白研との膜蛋白連携研究と連携し電位センサードメイン蛋白について、タンパク質構造解析に関する共同実験を始めた。研究室発足以来行ってきた電位依存性Naチャネルの制御についての解析も進み、チャネル不活性化機構におけるアンキリンとの相互作用の役割を明らかにした。運動機能の神経回路の解析としては、ホヤオタマ

ジャクシ幼生の運動機能をビデオ解析および電気生理学的に解析することに成功しゲノム情報から網羅的なイオンチャネル遺伝子の発現様式を明らかにした。GABAやグリシンを介した発生途上の興奮が歩行運動や脊髄反射などを司る脊髄神経回路の形成にどのような寄与をするかを明らかにするため、 K^+ -Cl⁻ cotransporter isoform 2 (KCC2)を発達過程のマウス脊髄に強制発現させ神経回路形成過程で伝達物質応答を脱分極から過分極に変更することに成功した(日本神経科学会ポスター発表)。東島助教授らは転写因子Chx10ホモログの遺伝子発現により特徴づけられるニューロンを生きた状態で可視化したトランスジェニックゼブラフィッシュを作製することに成功しin vivoパッチクランプを適用することにより逃避行動と遊泳行動に異なる種類の介在ニューロンが駆動されることを見出すとともに哺乳類脊髄介在ニューロンの基本デザインに関する示唆を得ることに成功した。伊根実験室を活用し、脊椎動物に類縁である尾索動物の運動パターンを理解する、ビデオを用いた画像解析と電気生理学解析を行った。

電位感受性ホスファターゼ Ci-VSP の分子作動原理の解析

村田喜理

岩崎広英

Mohamed Israil Hossain

黒川竜紀

木村有希子

東島眞一

岡村康司

ホヤのゲノムから、電位依存性チャネルの電位センサーをもちながらイオンの通過部位(ポア領域)をもたず、かわりにC末側にホスファターゼドメインをもつ分子を同定した。VSPと命名されたこの分子は、イノシトールリン脂質を脱リン酸化する酵素活性を示し、生理学的な膜

電位の範囲内で、酵素活性を変化させる。イオンの移動なしに細胞膜の膜電位変化を細胞内の化学的情報に転換する、膜電位の信号伝達の新しい経路である。これらの分子の存在は、膜電位シグナルが従来考えられてきたように活動電位などの形成に限定されるのではなく、様々

な生物現象に関わる可能性を示唆している。現在、VSP での 1 分子内の電位センサーの動作がどのように酵素活性の変化をもたらすのか、また VSP がどのような生物現

象における膜電位変化に対応して機能しているのか、哺乳類に固有の生理機能の進化とどのような関係があるか、などを明らかにする研究を遂行している。

電位依存性プロトンチャネル分子の同定と分子機能の解析

佐々木真理
大河内善史
黒川竜紀
高木正浩
岡村康司

VSP 以外に電位センサードメインをもつ蛋白が他にもあるのではと考え、WuBlast2 を用いてデータベースを検索したところ、脊椎動物のゲノム情報および Est の情報から、電位センサーをもつ別の分子を同定した。この分子は電位センサードメインのみを有しポア領域をもたないが (VSOP=voltage sensor-only protein1)、驚くべきことに電位依存性プロトンチャネル活性をもつことが明らかになった。VSOP1 はマクロファージなど免疫系の細胞に多く発現し、膜電位を介する活性酸素の産生や細胞内環境の制御に関わっていると考えられる。VSOP は、今後

感染防御機構や膠原病、アレルギー、神経疾患などにおける細胞内 pH や膜電位シグナルの役割を解析する上で重要なターゲット分子と考えられる。更に VSOP のシンプルな構造と機能のユニークさから、この分子動作原理の解析は、今後イオンチャネルの動作原理一般や、様々な生命現象に関わるプロトンの透過機構などを理解する上で、重要な視点を提供すると期待される。

現在、どのような分子機構により膜電位を感知しプロトンの輸送を制御するのかを明らかにしようとしている。また VSOP1 のノックアウトマウスの作成を行っている。

細胞膜裏打ち蛋白アンキリンによる電位依存性ナトリウムチャネル Nav1.6 の性質の制御

白幡恵美 (山形大学小児科学教室)
早坂 清 (山形大学小児科学教室)
岩崎広英
高木正浩
岡村康司

細胞膜での膜電位信号が細胞内の化学情報に変換される分子機構を担うイオンチャネル分子複合体の構成と制御を明らかにすることを目的とし、軸索に局在し興奮の伝搬に関わるイオンチャネル分子である電位依存性 Nav チャネル Nav1.6 の制御機構を解析した。電位依存性 Nav チャネルは、軸索 node of Ranvier に集積するがこの集積には Ankyrin-G 蛋白による細胞内側からの裏打ちが必須であることが知られてきた。Ankyrin-G は様々な膜蛋白を集積させることで、生理的文脈に必要な機能的細胞膜ドメインを形成する役割があると考えられてきた。しか

し、その一方 Ankyrin が直接相互作用する膜蛋白の分子機能を制御するかどうかは明らかでなかった。tsA201 細胞を用いて強制発現実験を行い、Nav1.6 電流を whole cell patch recording により計測し、Nav1.6 に特徴的な持続性電流を定量した。Ankyrin は膜蛋白相互作用ドメインを介して、Nav1.6 の持続性電流を有意に減少させることを見出した。この知見は、これまでもっぱら膜蛋白分子の集積に関わるとされてきた Ankyrin 分子が、膜蛋白機能を直接制御することが示された初めての例である。

ゼブラフィッシュを用いた、脊髓神経回路網の解析

木村有希子
佐藤千恵
東島眞一

近年の脊髓神経発生研究により、いくつかの転写因子の発現に仲介されて、形態学的に異なったタイプの介在神経細胞が分化してくることが示唆されている。しかしながら、これらの介在神経細胞が、最終的に神経回路網の中で機能的にどのようなタイプの神経細胞へ分化していくかは、まだ未解明な点が多い。われわれは、ゼブラフィッシュを用いてこの課題を追求している。いくつかの転写因子に関して解析を進めているが、本年度は特に、Chx10 遺伝子について、詳しい解析を行った。Chx10 に関して、その陽性細胞がどのような神経細胞へ分化していくかを、トランスジェニックフィッシュを作製して解析した。その結果、Chx10 陽性細胞はすべて同側下行性神経細胞であり、またグルタミン酸作動性の興奮性神経細胞であることを明らかにした。Chx10 陽性細胞は、そ

の活動パターンからおおまかに2種類に分けられ、逃避行動等の強い動きで発火するものと、通常の遊泳行動でフェージックに発火するものが存在した。ついで、運動ニューロンとの2細胞同時記録を行い、どちらのタイプも運動ニューロンに直接シナプス結合していることを示した。すなわち、Chx10 陽性細胞は、逃避行動、遊泳行動において、運動ニューロンの活動を制御する神経細胞であることが強く示唆された。また、転写因子以外に、グリシン作動性ニューロン、グルタミン酸作動性ニューロンのマーカー遺伝子（それぞれ、glycine transporter2 と vesicular glutamate transporter）に関してトランスジェニックフィッシュを作製することにも成功した。その結果、掛け合わせのみで神経伝達物質を調べることができる系を確立した。

尾索動物オタマジャクシ型幼生の運動機能に関わるイオンチャネル関連分子の総括的解析

西野敦雄（日本学術振興会特別研究員）
御園生裕明 (UC Davis)
岡村康司

カタユウレイボヤのオタマジャクシ幼生は、神経細胞数が100個程度、筋細胞が40個程度しかないにもかかわらず、洗練された遊泳運動を示す。カタユウレイボヤの幼生の遊泳運動を可能にする神経/筋肉の生理機構の理解を目指して、分子生物学、運動力学、電気生理学的な研究を行っている。これまで、①遊泳中、様々な強さの屈曲が10-20Hzで連続すること、②神経入力に応じて筋肉の興奮度が変化することを示し、さらにその筋肉のgradedな生理機能の主な素因がアセチルコリン受容体(nAChR)の特性にあると考え、③幼生尾部筋肉に発現するサブユニットを定めた。④nAChRの主要なサブユニットの発現が背側筋肉細胞に限局し、さらに、⑤そのタンパク質が神経筋結合部に局在することを示した。よって

機能的なnAChRからの入力には背側筋肉細胞に限られ、腹側の筋肉細胞の収縮は背側細胞からのギャップ結合を介した活動の伝播に依存することが予想された。このような活動の伝播に依存した筋肉帯の収縮機構は、ホヤ幼生の遊泳機能に本質的な意味を担っていると考えられる。また、カタユウレイボヤゲノムに予想されたイオンチャネル遺伝子の中で特に幼生の遊泳行動に関与していると期待されるものについて順次遺伝子の同定と、発現細胞の同定を行っている。特に、GABA(A)受容体、グリシン受容体の発現細胞は、運動神経節中のごく少数の細胞に発現が認められた。それらの発現細胞の遊泳運動に対する本質的な関与が期待され、検討を進めている。

脊髄内歩行リズム神経回路網の発生機構の解析

中山希世美 (日本学術振興会特別研究員)

岡村康司

歩行運動様リズムを形成する脊髄内神経回路網に関して、GABA およびグリシンを介した興奮性のシナプス入力とその発達期に一過性に見られる。このような胎生期の脊髄における GABA およびグリシンの興奮性は、細胞内 Cl⁻ イオンを細胞外に汲み出す K⁺-Cl⁻ cotransporter isoform 2 (KCC2) の発現が発生初期の細胞では少ないために起こることが知られている。本研究では、発達期の GABA およびグリシンによる興奮性を抑え、神経回路の形成におけるこれら興奮性応答の役割を明らかにすることを目的に、分子生物学的手法を用いて脊髄内ニューロンにおける KCC2 の発現レベルを変更し、発達期の神経ニューロンにおける影響を調べた。歩行運動の神経回路網が形成される時期のマウス胎児の脊髄中心管に、KCC2 遺伝子を組み込んだ GFP 発現プラスミドベクターを子宮外から微量ガラス管を用いて注入し、エレクトロポレーションによって、分裂過程にある脊髄ニューロンに KCC2 遺伝子を導入した。遺伝子導入の 2 日後に脊髄を摘出し、免疫染色を行ったところ、GFP を発現してい

る細胞で KCC2 の発現も同時に見られた。さらに、このように KCC2 を強制発現させたニューロンにおいて、グラミシジン穿孔パッチクランプレコーディングを行ったところ、KCC2 を強制発現させたニューロンでは、GFP のみを発現させたニューロンに比べて、GABA 投与時の反転電位が 30mV 過分極側にシフトしていた。しかしながら、これらの KCC2 を強制的に発現させたニューロンと GFP のみを発現させたニューロンについて、細胞体の大きさ、細胞体から出ている神経突起の数および長さを比較したところ、いずれの値にも有意な差は見られなかった。そこで、運動ニューロン特異的な転写因子である Hb9 の下流に KCC2 を配置するプラスミドベクターの作成を行った。このプラスミドベクターを用いることにより、様々な脊髄ニューロンの中から運動ニューロンという特定の種類の細胞にのみ KCC2 を発現させることができ、形態変化などのより詳細な検討ができると考えられる。

イオンチャネルのゲート機構に関する膜-水界面の水環境の影響

久木田文夫

膜タンパク質であるイオンチャネルの機能に膜-水界面の水環境が与える影響については不明な点が多い。この研究では、イカ巨大軸索が高濃度イオンや非電解質の作用を定量的に調べることが出来る点で、現時点での最

良の実験系である。差し当たって粘性と浸透圧を水溶液の性質を規定する物理的パラメータとして解析しているが、Na チャネルと K チャネルで影響の現れ方が質的に異なる。この点に着目し、その構造基盤を検討中である。

戦略的方法論研究領域

【概要】

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

しい電子顕微鏡の開発を背景に細胞の「構造と機能」を研究している。

永山グループは位相差電子顕微鏡の開発と、その応用としての DNA 1 分子の塩基配列直読法の開発、チャネル

蛋白質の電子線構造解析研究、無染色細胞の *in vivo* 高分解能形態観察を行った。

物質輸送に関する研究が主眼である村上グループは、南京医科大学と共同研究で漢方薬の唾液分泌促進効果について、摘出ラット唾液腺を用い調査を開始した。ケンブリッジ大学、カリアリ大学との共同研究も継続発展しカソリック大学ローマ校とは灌流顎下腺を用い分泌唾液

のペプチド/蛋白質の質量分析を開始した。

瀬藤グループは質量分析イメージング法開発応用、単アミノ酸側鎖付加の分子機構の研究、新しい蛍光顕微鏡 Stick 顕微鏡による大脳質内神経細胞のイメージングを行った。

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

位相差電子顕微鏡の改良

Radostin Danev, 杉谷正三, 永山國昭

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

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

位相板用炭素薄膜の材料科学的研究

内田 仁, 伊藤俊幸, 大河原 浩, 永山國昭
宇理須恆雄 (分子研)

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

の帯電を完全に遮蔽する方法「炭素膜サンドイッチ法」が見出され、この問題に決着をつけることができた。また位相板の材料炭素膜の性能向上のためのプラズマ重合膜と蒸着膜とのハイブリッド膜製法を開発した。

DNA/RNA 塩基配列の電子顕微鏡 1 分子計測法の開発

喜多山 篤, 高橋佳子, 大河原 浩, 永山國昭
片岡正典 (計算科学研究センター)

DNA/RNA の塩基配列決定の高速化を図るため、電子顕微鏡技術を基軸に新しい方法論を開発している。この方法は i) DNA/RNA の一本鎖の利用, ii) 完全伸長した多数の一本鎖 DNA/RNA 分子の一方向整列によるアレイ作成, iii) アレイ化した一本鎖 DNA/RNA への単量体 A, T,

G, C の有機溶媒中での特異的水素結合, iv) 単量体塩基にあらかじめラベルしたマーカー分子 (メタルクラスター) の電顕による観察と識別, v) 識別したマーカー分子からの塩基配列の解読, の 5 つの要素技術により成り立っている。マーカーの識別には 0.3nm の空間分解能と定量的

コントラスト測定のため 2 要件を満たす電子顕微鏡が必要である。日本電子と共同で JST の委託開発プログラムを利用し、200kV の位相差電顕を開発した。また金 11 個を含

むクラスター undecagold を用い、ラベル化塩基の電子顕微鏡識別を 200kV 電顕の STEM モードを行い良好な結果を得た。

膜タンパク質の単粒子解析

重松秀樹, Radostin Danev, 永山國昭

清中茂樹, 原 雄二, 森 泰生 (京都大学大学院工学研究科)

位相差電子顕微鏡を用いた蛋白質の単粒子解析を実施し、モデル蛋白質 (GroEL) の立体構造の決定を行った。現在論文執筆中。構造解析ターゲットとして 3 種類 (TRPM2, TRPV4 など) の膜蛋白質の組み換え発言系の構築に成功した。それぞれ界面活性剤可溶化状態での標

品の取得に成功し、発現量などの点から 1 種類のイオンチャンネルについて絞り込んで単粒子解析に取り組んでいる。先のモデル蛋白質の結果をふまえて、早期の構造決定が期待される。

種々の漢方薬の灌流ラット顎下腺に対する水分分泌促進作用

村上政隆, 大河原浩

魏 睦新, Ding Wei (南京医科大学第一附属医院 中医内科)

唾液分泌低下に対して治療効果のある漢方薬が多く知られているが、これらの薬物が直接唾液腺に作用するかどうか？ また直接作用があるとするならば、唾液を誘発するのがあるいは唾液水分分泌速度を増強するのかを摘出ラット顎下腺の血管灌流標本を用い、水分分泌速度を測定し検討した。

雄性成体ラットから顎下腺を摘出、血管灌流標本を製作。分泌導管にカニューレを施し、これを電子天秤上のカップに導き、分泌された唾液重量を時間微分して分泌速度を求めた。漢方薬は、玄参、地黄、沙参、天花粉、葛根など 10 種類を用いた。薬物は灌流液中に推定治療血液濃度で添加、遠沈後上清を 0.45 ミクロンフィルターを通したものを使用した。唾液分泌刺激の対照としてカルバコール 0.2 μ M を用いた。最初 5 分間対照刺激をおこなうと、分泌が誘発され初期 30 秒にピークをもつ初期相とその後緩やかに増加し持続期に入る持続相に分かれた。薬物を灌流系より 5 分間洗い流し、漢方薬単独を加えたがいずれの漢方薬も単独使用では唾液分泌を誘発しな

かった。漢方薬添加後 5 分でこれにカルバコールを重畳すると、10 種類の漢方薬のうち 5 種類で唾液分泌の増強が観察された。いずれも初期相には影響がなく、分泌持続相の分泌速度を増強させた。唾液腺に直接作用をもたらした 5 種の薬物に対する反応は 3 つのパターンに分けることができた。1) 持続期全般を緩やかに増強する。(プラトー値が高い) 2) 持続期にはいり継続して分泌が増加し 5-10 分で最大値になった後急速に低下し、対照刺激のプラトー値より低レベルで分泌が持続する。3) 持続期にはいり継続して分泌が増加し 5-10 分で最大値になった後緩やかに減少する。これらのパターンは漢方薬の 3 種類の薬効機序 (養陰剤, 補気剤, 活血剤) に対応した。増強効果のない 5 種の薬物がヒトで分泌増加を起こすのは神経活動の変化によるものと推定された。今後 西洋医学的手法と中国医学の経験を結びつけ 漢方薬の細胞内信号伝達に及ぼす影響などを調べることにより唾液分泌機序の新しい視点が生まれる可能性がある。

浸透圧センサー (AQP) による傍細胞輸送調節機構

村上政隆, 大河原浩

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

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

瀬川らの共焦点レーザー顕微鏡観察で collagenase 処理唾液腺腺房標本では、管腔（細胞間分泌細管）への蛍光色素の侵入が灌流耳下腺より多いことを測定していた。その後 collagenase 製剤に含まれる enterotoxin が claudin と反応し傍細胞輸送経路を開くことによると理解された。collagenase 処理標本で細胞内 Ca 濃度を上昇させ細胞内からの水分分泌を刺激すると、管腔の蛍光色素を希釈し水の動きを陰画として可視化定量できた。この値を血管灌流耳下腺の全水分分泌差し引き、傍細胞輸送による水分分泌を推定した (2003-2004)。刺激初期には閉鎖している傍細胞経路が 30 秒後開き、1 分には傍細胞経路を通過する水分量が直接管腔に分泌される水分量を凌駕した。すなわち細胞間隙通路の調節が行なわれていた。灌流顎下腺 (SMG) carbachol 刺激時の水分分泌速度を電子天秤にて測定、sucrose 添加により灌流液浸透圧を上昇させ水分分泌減少

程度を測定。浸透圧差のみにより水分分泌が駆動されるモデルの予測値より分泌速度減少度は大きかった。一方、AQP5 を非常に低発現させた SMG では浸透圧差により駆動されるとした場合の予測値と一致した。この SMG は基底側膜 AQP5 を欠き、浸透圧センシングができないことで傍細胞輸送の調節が失われたと考えられた。Hg を導管から逆行性に注入し管腔膜のみの AQP5 を破壊すると Hg 濃度に依存して水分分泌は阻害されたものの、高浸透圧による水分分泌現象は浸透圧差で予測される変化は正常ラットと同様であった。以上 AQP5 と傍細胞輸送を含むフィードバック制御回路の存在が支持された。

次の問題は、傍細胞経路をバルクで溶液を輸送するための駆動力である。浸透圧、静水圧以外の駆動力をモデルとして検討しなければならない。細胞間接着装置の動的変化を微小形態学的に検討することとした。

傍細胞輸送調節の形態学的基盤

村上政隆, 前橋 寛

橋本貞充 (東京歯科大学, 病理学)

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

灌流顎下腺のタイト結合と腺腔側膜直下の細胞骨格の超微構造変化を計測し検討した。血管灌流ラット顎下腺を液体ヘリウムにて急速凍結固定し、フリーズフラクチャー法を施した後、ディープエッチングを行ない、炭素白金の蒸着によりレプリカを得た。レプリカを透過型電子顕微鏡で観察し、得られた写真の計測により、接着部および管腔膜直下の細胞骨格の変化を検討した。その結果、1) タイト結合を構成する膜内粒子は短小な微細線維

を介し深部のアクチン線維束と直接結合していた。2) CCh/IPR 混合刺激では、タイト結合の粒子配列は変化し基底側方向に伸長した。3) CCh/IPR 混合刺激では、タイト結合部および腺腔側膜直下のアクチン線維束はより密となった。これらの観察より、傍細胞輸送経路の透過性が亢進する際、腺腔側細胞膜直下のアクチン細胞骨格の動的な構造変化に伴いタイト結合の膜貫通蛋白の局在が変化する可能性が示された。

顕微質量分析装置の開発

瀬藤光利, 新聞秀一

本開発は(株)島津製作所, 癌研究会, 大阪大学, 理化学研究所の参画機関とともに, 5年計画で2004年より始まった。顕微質量分析装置の原理は, 顕微鏡下の生物試料にレーザーを照射し, イオン化された物質を全て吸引し, 高感度質量分析装置で測定を行う。測定試料上をレーザーで2次元走査し得られた質量スペクトル群から, 分子の生体内分布の可視化と同時に, 多段階質量分析を用いた物質同定も可能である。開発すべき要素技術は5つである。レーザー照準技術と2次元試料走査・環境制御技術, これにより2次元の解像度が決まる。高収率イ

オン搬送技術と高感度質量分析技術, これにより感度を向上させることが可能となる。そして, 得られた情報を処理し, 画像として再構成するIT技術である。我々は特に生体試料より高効率でイオン化を実現するための試料前処理技術の開発を行っており, 既に様々な前処理手法を開発し報告している。現在, 顕微質量分析装置の実験機が完成し稼動しており, 我々が開発した試料前処理技術を実際の臨床試料へ応用し解析を行っているところである。

単アミノ酸側鎖付加の分子機構の解明

瀬藤光利, 新聞秀一, 福田義之

池上 浩司, 松本 峰男, 矢尾育子 (三菱生命研)

単アミノ酸側鎖付加はチュブリンなどに起こる翻訳後修飾である。神経細胞の発達に伴って亢進することが知られているが, その分子実体は明らかではない。我々はグルタミン酸付加を行う新規酵素およびこの酵素活性に必要な補助蛋白を大規模ランダムミュタジェネシスによる変異体マウス解析とイーストハイブリッド法スクリーニング解析を行うことにより補酵素であるPGs1を同定し, PGs1が α チュブリンのグルタミン酸付加にのみ必

要であることを明らかにした。

生きたマウス脳内の神経細胞観察を可能とする蛍光顕微鏡, Stick顕微鏡はオリンパス社との共同で開発を終了しており, 大脳皮質内で神経細胞をイメージングする方法を確立した。現在, この手法を用いてすでに作成してある新規酵素群のノックアウトマウスにおけるグルタミン酸付加を始めとする単アミノ酸側鎖付加と細胞内物質輸送についての解析を行っている。

エンドサイトーシス選別輸送のメカニズムと生理機能

大橋正人

エンドサイトーシス経路の生理機能とメカニズムを解析し, これまでに, 脂肪滴表層ドメインがコレステロール代謝系とエンドサイトーシス経路での細胞シグナル分子選別機能を結びつける制御プラットフォームとして働いているという仮説を提唱した。この仮説を基に, 細胞シグナル入力機構について検討し, コレステロール合成の異常によって, 細胞増殖分化シグナリング分子として重要なソニックヘッジホッグ(Shh)の受容体Ptc1と変換

器Smoの膜系での動態・選別輸送が影響をうけることを示すデータを得た。また, コレステロール生合成の膜系と運動性エンドソーム膜系の直接相互作用を示唆するデータを得た。Shhシグナルの細胞受容に, 正常なコレステロール合成系が必要であることは以前より示唆されており, これらシグナル変換分子の細胞内生合成コレステロールに依存した細胞内膜系での正常な動態が, Shhシグナル変換に重要である可能性がある。

生命環境研究領域

【概要】

細胞は、それを取り巻く環境の大きな変化の中で、その環境情報を他のシグナルに変換し、細胞質・核や周囲の細胞に伝達することによって環境変化にダイナミックに対応しながら生存応答を行っている。細胞が存在する臓器・組織によって細胞が受け取る環境情報は異なり、従って細胞が持っている環境情報を受信する機能も異なる。それらセンサー蛋白質は環境の変化に応じてダイナミックに感受性や発現等を変化させてセンシング機構の変化からよりよい生存応答を導く機能を有している。これらのセルセンサー蛋白質は種々の化学的、物理的情報を受容し、センサー間の相互作用を行い、多くは最終的に核への情報統合を行う。これらの細胞環境情報センサーの分子システム連関を解明していくことは、個体適応の理解のための基本単位である「細胞の生存応答」を解明するうえで極めて重要である。この細胞外環境情報を感知するイオンチャネル型のセンサー蛋白質の構造機能解析、活性化制御機構の解析を通して細胞感覚の分子メカニズムの解明を目指している。特に、侵害刺激、温度刺激、機械刺激の受容機構について解析を進めている。

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

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

カプサイシン受容体のリン酸化機構の解析

Sravan Mandadi, 村山奈美枝, 富永知子, 富永真琴

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

また、PKC によってリン酸化した TRPV1 を特異的に

認識するポリクローナル抗体を作製した。この抗体の特異性を、吸収試験、TRPV1 のリン酸化されるセリン残基を置換した変異体等で確認した。この抗体を用いた解析によって、正常状態において TRPV1 がリン酸化されていることが明らかとなった。PKC を活性化させたときのリン酸化 TRPV1 量の増加は、異所性発現系、ラット感覚神経細胞とともに増加することが観察され、この抗体が痛み研究、炎症研究に非常に有用であることが明らかになった。

表皮 TRPV4 の結合蛋白質の解析

東智広, 富永知子, 富永真琴

温度感受性 TRP チャネルの1つ TRPV4 は、もともと低浸透圧で活性化するチャネルとして報告されたが、我々が温度感受性も有することを報告した。TRPV4 は、感覚神経のみならず表皮ケラチノサイトや視床下部で発現することが知られている。表皮は温度変化に直接曝露

される部位であり、視床下部は体液浸透圧や体温の調節中枢として機能していると考えられている。そこで、TRPV4 の活性制御機構を明らかにする目的で皮膚の cDNA ライブラリーを用いて TRPV4 の細胞内ドメインと結合する蛋白質のスクリーニングを行い、興味深い結

合蛋白質を得た。両蛋白質の結合に重要なドメインを明らかにした。両蛋白質を HEK293 細胞に共発現させるこ

とによって、TRPV4 活性に変化がみられ、この結合が TRPV4 機能に影響を及ぼしていることが推測された。

TRPV4 の体温制御機構への関与の解析

稲田仁, 柴崎貢志, 鈴木誠 (自治医科大学), 富永知子, 富永真琴

温度感受性 TRP チャネルの 1 つ TRPV4 は視床下部に発現しており, 体温調節機能への関与が推察されている。特異的抗体を用いて, 視床下部神経での TRPV4 の発現を確認した。そこで, 野生型マウスと TRPV4 欠損マウスの腹腔内に温度計を埋め込み, 自由行動下に体温の連続記録を行った。無刺激の状態では, 両マウス間で体温の概日周期に大きな変化はみられなかった。暑熱負荷等のストレスを加えたときの体温記録を行い, TRPV4 の体

温制御機構への関与を明らかにしていきたい。視床下部での TRPV4 活性の制御機構の解明を目的として cDNA ライブラリーを用いて TRPV4 の細胞内ドメインと結合する蛋白質のスクリーニングを行い, 興味深い結合蛋白質を得た。両蛋白質の結合に必要なドメインを明らかにした。この結合によって TRPV4 機能が制御され, 体温調節能が変化していることを想定して実験を進めている。

表皮ケラチノサイトから感覚神経への温度情報伝達のメカニズムの解析

Sravan Mandadi, 鈴木誠 (自治医科大学), 富永真琴

温度感受性 TRP チャネルの TRPV4, TRPV3 は表皮ケラチノサイトに強く発現しており, 感覚神経にはほとんど発現していない。この事実は, 温かい温度が表皮ケラチノサイトで受容され, その情報が感覚神経へ伝達される可能性を示唆する。ケラチノサイトは刺激に反応して種々の化学物質を放出することが知られている。そこで, 温度刺激によってケラチノサイトから物質が放出され, 表皮層に伸びた感覚神経終末に発現するその物質の受容体によって温度情報が伝達される, という仮説を立て,

その検証と関与する物質の同定を試みた。ケラチノサイトと感覚神経の共培養系において, 温度刺激に対する応答に時間差があり, 先ずケラチノサイトで反応がみられることを観察した。次に, 知られたイオンチャネル型神経伝達物質受容体を HEK293 細胞に発現させ, ケラチノサイトと共培養して, パッチクランプ法を適用してイオンチャネル型神経伝達物質受容体をバイオ分子センサーとして用いて, 伝達物質の同定を進めている。

新規温度感受性 TRP チャネルの探索

富樫和也, 東智広, 富永知子, 森泰生 (京都大学), 富永真琴

哺乳類ではこれまでに 8 つの温度感受性 TRP チャネルが知られており, それらは TRPV, TRPA, TRPM サブファミリーに属する。新たな温度感受性 TRP チャネルの探索を目的として, 既知の TRP チャネルの温度感受性のスクリーニングを行った。その結果, 冷刺激受容体として知られるメントール受容体 TRPM8 に最も相同性の高い

TRPM2 に温度感受性があることを見出した。この TRPM2 の温度感受性の解析をパッチクランプ法, Ca^{2+} -imaging 法を用いて進めた結果, TRPM2 が約 35 度で熱によって直接活性化されることが明らかとなった。また, 既知の TRPM2 の活性化物質 β -NAD⁺, ADP-ribose による電流を大きく増大させることが判明した。さらに,

体温下では cyclic ADP-ribose が TRPM2 のリガンドとして働くことも見いだした。TRPM2 は膵臓ではランゲル

ハンス島に特異的に発現しており、インスリン分泌に強く関わっていることが明らかとなった。

海馬における TRPV4 の発現と機能解析

柴崎貢志, 鈴木誠 (自治医科大学), 富永真琴

温度感受性 TRP チャンネルは、一般には感覚神経や表皮ケラチノサイトで温度受容に関わっていると考えられているが、TRPV1 等中枢神経系での発現がみられるものがある。そこで、知られている温度感受性 TRP チャンネルの発現を検討したところ、海馬で TRPV4 が強く発現していることを見いだした。海馬錐体細胞に TRPV4 は発現しており、温度刺激のみならず TRPV4 の有効刺激である低浸透圧刺激や 4 α -PDD によって活性化することが分かった。野生型マウスと TRPV4 欠損マウスで海馬神経

細胞の形態やシナプス機能を解析したが、有意な差は認められなかった。しかし、静止膜電位を解析したところ、25 度では約 -61 mV で差は認められなかったが、37 度では、野生型マウスの海馬神経細胞は約 5 mV 有意に脱分極しており、電流注入による活動電位の発生も野生型マウスの海馬神経細胞で有意に多かった。これらの事実は、海馬神経細胞において TRPV4 が体温下で恒常的に活性化して静止膜電位の形成を介して神経興奮性に重要な役割を担っていることを示している。

発達期脊髄領域における温度感受性 TRP チャンネルの発現と機能

村山奈美恵, 柴崎貢志, 富永真琴

温度感受性 TRP チャンネルは、一般には感覚神経や表皮ケラチノサイトで温度受容に関わっていると考えられている。しかしながら、後根神経節 (DRG) 神経細胞の発達過程において温度受容を全く必要としない胎生期においても発現が認められる。このことは、温度感受性 TRP チャンネルが成体における温度受容とは全く異なる、発達期特異的な役割を有していることを強く示唆している。この仮説を検証するために、発達期マウスの脊髄領域における TRPV1, TRPV2, TRPM8, TRPA1 の発現様式を解析し、これらのチャンネルの発現時期、パターンを同定し

た。これらの TRP チャンネルは発達期において、形成直後の DRG 神経細胞や一部の脊髄神経細胞においてのみ発現が確認された。また、カルシウムイメージング法を用い、この発現パターンに一致した機能的チャンネルの存在を確認した。これらの結果より、TRP チャンネルが細胞増殖や細胞移動などのような発生過程に特異的な生理現象に密接に関わっている可能性が強く示唆された。現在、dominant-negative 変異体チャンネルを用いた実験を行い、成体とは異なる発達過程特異的なチャンネル機能の解明を目指している。

mDia 結合タンパク質の探索と機能解析

島貫恵実, 富永知子

Rho の標的蛋白質である mDia の細胞運動における役割の解明を目指している。Yeast-Two Hybrid 法を用いていくつかの mDia 結合蛋白質を見いだしている。その 1 つは actin 結合蛋白質ある。この蛋白質が mDia と協調

することで細胞接着斑の安定化等に関与する可能性もある。また、文献的にこの蛋白質は細胞のがん化能に関与するとの報告もあるので、mDia とこの蛋白質の関連を、生化学的および細胞生物学的に解析している。

さらに、mDia の特性から mDia に結合することが予想される蛋白質は、Rac1, Cdc42 と関連することが予想される。よって両者の結合が確認できれば、Rho ファミリ

一蛋白質間の協調作用および細胞運動における役割をさらに明らかにできる可能性がある。

神経回路形成における mDia を介する情報伝達経路の役割

島貫恵実, 富永知子

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

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

動物実験センター

【概要】

2005年6月より、前任の尾崎 毅先生から動物実験センターの運営管理を引き継ぐことになった。この数年間、職員の異動や退職が相次ぎ、センター長および専任教官のご苦勞は大変なものであったと伝え聞いている。実験動物の日常管理だけで、精一杯の状況が続いていたようである。この一年間で、スタッフの補充およびマンパワーの適正化を図ることに努め、センターのサービス業務は質・量ともに向上したものと判断している。徐々にではあるが、技術職員、推進員および飼育委託外部職員にも“ゆとり”が現れ、**研究機関本来の研究および技術開発**へと力を入れ始めている。

当センターの運営資金は厳しく、施設の工事や機器の修理で四苦八苦している。予算委員長よりご高配を賜り、特別配分費などでかろうじて乗り切っているが、経済面でも“ゆとり”がほしいものである。

＜明大寺地区の本館地下 SPF 化＞

2005年度より3か年計画で、明大寺地区の本館地下SPF化に着手した。今次のSPF化案の特徴は、個別換気システムを導入することである。普通環境の実験動物と同じ建物の中でSPF動物を飼育維持するために個別換気システムを採用し、微生物汚染事故をできるだけ未然に防ぐことを心懸けた。もうひとつの特徴は、飼育室に実験室を隣接させ、細かい実験操作をSPF状態で行えることである。第一期工事：B-16, B-17の改修工事および飼育ラック、ケージ交換ステーション、クリーンベンチの導入、第二期工事：B-9, B-10の改修工事および焼却炉の撤去、第三期工事：B-14, B-15の改修工事および飼育ラックの導入を順次実施する予定である。このSPF化には、生理学研究所、基礎生物学研究所の資金が投入さ

れるが、動物実験センターの資金も一部含まれる。

＜研究・技術開発＞

実験動物の皮膚科学・形成外科学領域の研究および伴侶動物の病態研究

当センターでは、下記の研究を進めているところである。2006年の年明けとともに、学会発表と論文投稿を定期的に行い、施設としてのactivityを高める所存である。

1. 皮膚科学および形成外科学領域を中心とした病態モデルの作出：ヘアレス動物およびニホンザルの皮膚を用いて、表皮あるいは真皮に存在するメラノサイトの機能を調べている。さらに、創傷治癒の転帰を形態学的に検索してヒトへの外挿を目指している。
2. 伴侶動物の腫瘍細胞バンクの創設：動物細胞利用実用化として伴侶動物の腫瘍細胞を生体培養し、機能性腫瘍の特徴を調べている。確立できた腫瘍細胞株は凍結保存し、伴侶動物の腫瘍細胞バンクの創設を試みている。
3. 伴侶動物の肥満症の病態研究：イヌおよびネコの肥満症を臨床病理学的に調べ、治療法の確立を目指している。
4. モルモットを用いた妊娠中毒症の研究：モルモットの妊娠中毒症を臨床病理学および病理組織学的に検査し、この病態解明を実施している。
5. 実験動物飼育管理技術の開発：麻酔方法、エンリッチメントの評価、給水システムの改善、ストレスの評価と軽減などを検討している。

この他、共同研究を2課題スタートさせ、研究テーマの種蒔きを施している。

計算科学研究センター

【概要】

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

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

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

核酸塩基識別子の設計と合成

片岡正典, 永山國昭

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

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

ユニバーサル核酸の創生

片岡正典

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

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

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

カルボン酸を用いる新規オリゴヌクレオチド合成法の開発

片岡正典

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

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

酸-アゾール複合体を活性化剤とするホスホロチオエート型人工核酸の立体選択的合成法の開発

片岡正典

ホスホロチオエート型人工核酸はアンチセンス分子として期待される人工核酸であるが、リン酸のリン原子上に不斉中心を有し、既存の合成法では鎖長に応じた多数のジアステレオマーの混合物として得られ、詳細な実験データを得ることはできない。報告者は光学的に純粋なモノマーを調製し、独自に開発した酸-アゾール複合体を活

性化剤とする鎖長伸張反応によって立体選択的にホスホロチオエート型人工核酸を合成する手法を開拓した。本手法によって、多数のジアステレオマーの中からただ一つのものを選択的に合成することが可能となり、ホスホロチオエート型人工核酸を用いるアンチセンス化学研究の進展に大きく寄与すると期待される。

技術課

大庭明生

1. 概要

今年度の人事は、平成 17 年 7 月に生体情報研究系技術係・福田直美技術係員の育児休業があり、それに伴い契約代替技術職員として飯田陶子を採用した(7月23日-10月31日)。10月には、動物実験技術係に小池崇子が技術係員として東京工業大学より転入した。

課の研究活動への貢献を一層進めるため下記の事業を実施した。

①技術課研修セミナーの開催

研究所の今後の研究および研究体制の動向、研究を支える技術、その技術の今後の方向性と重要性、そのなかで技術職員の負うべき責任を基本テーマに、講演を研究者に依頼し、課のあるべき方向と今後の研究ならびに技術動向を探ることを目的に第7回技術課セミナーを井本敬二教授、立山充博、初山俊彦、木村透、小野勝彦助教授、根本知己助手、核融合科学研究所山内健治技術部長を講師に行った。

②生理科学実験技術トレーニングコースでの技術指導

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

③科学研究費補助金(奨励研究)申請の推進

業務を展開、推進していくための問題意識の養成、その解決のための計画および方法の企画能力の養成、さらにはその表現力と説明力の養成を通じて、業務上の技術力の総合的な向上を図ることを目的に標記の申請を行い、下記の6課題の採択を得た。

- (1) 永田治：脳高次機能研究で MEG 計測を行うための技術サポートデータベースの構築
- (2) 村田安永：セキュアなファイル転送のためのプロトコル変換式暗号化ソフトウェアの開発
- (3) 高橋直樹：2光子励起顕微鏡による *in vivo* 観察のための固定具の開発
- (4) 高木正浩：ポストゲノム膜タンパク質機能解析法の教育用デジタルコンテンツの製作
- (5) 斉藤久美子：非放射性化合物を用いた *in vivo* 脂肪

酸利用速度測定法の開発

- (6) 大河原浩：位相差電子顕微鏡用位相板の材質を変えて性能の向上を計る

④奨励研究採択課題技術シンポジウムの開催

時代要請に対応した技術認識と向上に立った技術職員の業務の社会的開示を推進するために奨励研究採択者による第2回の報告会を15演題で行った。この報告は『生理学技術研究会報告(第28号)』にまとめた。

⑤成茂神経科学研究助成基金の申請の推進

課の自立的運営のためには独自の運営資金の確保が重要な課題である。今回山本友美技術係員を代表者にして奨励研究採択課題技術シンポジウムの開催経費を標記の基金に申請し、採択された。

⑥放送大学利用による専門技術研修の受講

研究の高度化と多様化の進むなかで技術職員の研修は重要な課題である。今回研修科目として『技術者倫理』と『問題解決の発想と表現』を選び、4名が受講した。

⑦生理学技術研究会の開催

全国の大学等の技術職員の技術連携と交流を目的に第28回生理学技術研究会を基礎生物学研究所・技術課と合同で開催した(平成18年2月16日-17日)。会では、口演発表が22題、ポスター発表が41題あり、研修講演として『生物学情報データベースの構築とその利用』(上野直人, 基礎生物学研究所)を行った。これらの報告は『生理学技術研究会報告(第28号)』にまとめた。

⑧東海北陸地区等の技術職員研修

東海北陸地区の大学等の技術職員の技術交流と向上を目的に毎年当番校による技術研修が行われているが、今年度は物理・化学コース(三重大学)、電気・電子コース(静岡大学)、生物・生命コース(岐阜大学)を受講した。また厚生労働省輸入サルの飼育施設指定に関する説明会、文部科学省遺伝子組換え生物等に使用に関する規制による生物の多様性の確保に関する法律等に関する説明会、実験動物の遺伝検査技術講習、高エネルギー加速器研究機構技術職員シンポジウム、神経科学学会、日本顕微鏡学会、日本生理学会、日本生物物理学会に参加し、業務の研究支援力の強化を図った。

⑨労働安全衛生資格取得および技能講習受講

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

(1) 衛生工学衛生管理者（1名）、(2) 酸素欠乏硫化水素危険作業主任者（2名）

また、大学等環境安全協議会技術分科会（徳島大学）、大学等環境安全協議会研修会（名古屋大学）、安全衛生

に関する情報交換会（核融合科学研究所）に参加し、安全衛生に関する知見を深めた。

⑩岡崎3機関技術課長会と機構技術会議の開催

各研究所の動向の意見交換を毎月1回開催している。今回は、特に、自然科学研究機構の技術職員の第1回技術研究会の立ち上げについて議論した。

2. 施設の運営状況

①統合生理研究系

(1) 生体磁気計測装置室

永田 治

【概要】

本年度は、全頭型生体磁気計測装置において各種実験が順調におこなわれており、大きなトラブルは報告されていない。ただし、センサデューワーの真空断熱層において真空度の劣化によると思われる液体ヘリウム蒸発量の増加（通常 4.5 ㍈/day が 6.5 ㍈/day 程度まで増加）が見られた。そのため安全性を考慮し12月期点検時にハードサイクルを実施して、真空層の再真空引きをおこない定常状態に復帰した。そのため通常は2日の定期点検であるが5日を要している。また、液体ヘリウム充填時のトラブルとして、トランスファチューブの共鳴振動による急激な蒸発量増加が2件発生した。具体的な発生原因は明らかになっていないため、現状では安全対策として充填圧力を下げることによって液体ヘリウム流量を減少さ

せ急激な内圧変動を起こさないようにしているが、障害発生後の対応はデューワー側のサイフォンチューブを取り外し、振動を減衰させる以外に方法がないと思われる。

解析システムにおいてはデータ記録用磁気光ディスクに動作不良が数件発生している。現状ではデータの喪失など重大な障害は発生していないが、信頼性の確保とメディア単価が高価であるため、今後は安価な DVD-RW に順次更新していく予定である。その他、MRI 画像解析装置を含めてシステム自体に重大な問題は発生していないが、現在ワークステーションで処理している MRI 画像の三次元再構成等の処理についてランニングコストを考慮し順次 PC 上に移植していく予定である。

平成17年度 生体磁気計測装置共同利用実験の実施状況について

年 月	総日数	休 日	点検日	利用日数	稼働率	外部利用日数	備 考
2005年04月	30	10	0	13	65%		
05月	31	12	2	16	94%	1	
06月	30	8	0	22	100%	1	
07月	31	11	2	17	94%	2	
08月	31	8	0	17	89%	1	トレーニングコース使用4日（2～5日）
09月	30	11	2	17	100%	2	
10月	31	11	0	19	95%	1	
11月	30	10	2	18	100%	2	
12月	31	12	5	14	100%	1	メンテナンス（ハードサイクル）5日
2006年01月	31	12	2	15	88%	1	
02月	28	8	0	15	83%		
03月	31	9	2	20	100%	4	
04月	30	10	0	18	90%		

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

また、トレーニングなど実験以外の用途も含まれていない。

* 稼働率=利用日数／（総日数－（休日＋点検日））×100

②脳機能計測センター

(1) 形態情報解析室

山口 登

【超高压電子顕微鏡利用状況】

今年度における超高压電子顕微鏡共同利用実験は、合計 10 課題が採択され、全ての課題が実施された。これらの共同実験の成果は、超高压電子顕微鏡共同利用実験報告の章に詳述されている。超高压電子顕微鏡の年間の利用状況を表にまとめたので下記に示す。稼働率は、利用日数と使用可能日数より求めている。本年度の主な超高压

電子顕微鏡の改良・修理としては、コンデンサー絞り駆動部の修理、メイン蛍光板駆動部の修理、サイドエントリーホルダーゴニオ部のクリーニング、真空排気用ホースの交換作業、トランスのオイル交換作業などが行われた。

2005 年度 超高压電顕月別稼働率

年 月	総日数	休日	調整日	使用可能日数	所内利用	所外利用	計	稼働率	備 考
2005 年 4 月	30	10	8	12	5	1	6	50%	空調工事
5 月	31	12	4	15	6	1	7	47%	
6 月	30	8	4	18	7	2	9	50%	
7 月	31	11	4	16	4	4	8	50%	
8 月	31	8	3	20	3	13	16	80%	
9 月	30	10	4	16	9	0	9	56%	
10 月	31	11	5	15	4	3	7	47%	
11 月	30	10	11	9	2	1	3	33%	修理 6 日
12 月	31	12	3	16	8	5	13	81%	
2006 年 1 月	31	12	3	16	4	9	13	81%	
2 月	28	8	11	9	0	9	9	100%	修理 11 日
3 月	31	9	4	18	7	9	16	89%	修理 1 日
計	365	121	64	180	59	57	116	64%	

フィラメント点灯時間 430.5 時間
 使用フィルム枚数 6,946 枚

(2) 機能情報解析室

佐藤 茂基

【概要】

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

8 月に RF アンブレ用電源ユニットと装置用冷却 FAN が故障した為、電源ユニットと冷却 FAN を交換し修理を行

った。

12 月と 1 月にリアルタイム装置操作室とマグネット室にある空調機がそれぞれ故障した為、その修理を行った。

平成 17 年度の MR 装置利用実績を別表に記す。

【機器利用率】

平成 17 年度リアルタイム装置月別稼働率

年月	総日数	保守	使用可能日数	所内利用日数	所外利用日数	計	利用率	備考
2005 年 4 月	30	1	29	0	5	5	17%	
5 月	31	1	30	0	3	3	10%	
6 月	30	1	29	0	6	6	21%	
7 月	31	1	30	0	7	7	23%	
8 月	31	2	29	0	6	6	21%	アンプ電源、冷却 FAN 修理
9 月	30	1	29	0	5	5	17%	
10 月	31	3	28	0	5	5	18%	停電
11 月	30	1	29	0	4	4	14%	
12 月	31	1	30	0	6	6	20%	空調機修理
2006 年 1 月	31	1	30	0	6	6	20%	空調機修理
2 月	28	1	27	0	3	3	11%	
3 月	31	2	29	0	5	5	17%	定期点検
計	365	16	349	0	61	61	17%	

*保守以外の祝祭日は、使用可能日に含めた。

(3) 生体情報解析室

吉村伸明，村田安永

【概要】

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

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

ークステーション上での利用のみならず、各部門施設の PC に直接導入し、ライセンスサーバで認証を行うことでの利用も可能である。登録者は 97 名で、研究推進のための積極的な利用がある。

生理学研究所のネットワーク利用状況は、メール登録者が 413 名。WWW 登録者が 56 名。LAN の端末数が 1476 台。所外からのメール受信数は 21,000 通/週。所外へのメール発信数は 2,700 通/週。検出したウィルスメールは 180 通/週。

WWW は 4,400 台/週の端末から 52,000 ページ/週の閲覧があった。所内向けのダイヤルアップサービスは 23 回/週、3 時間/週の利用があった。

③生理研・基生研共通施設

(1) 電子顕微鏡室

前橋 寛

【概要】

今年度は、昨年度同様に、予算削減と利用者数、利用率を考慮して、透過型電子顕微鏡（日本電子 JEM-1200EX）2 台の内、1 台と走査型電子顕微鏡（日立 S-800）の保守契約

を中止し、明大寺地区の JEM-1200EX 1 台と山手地区の透過型電子顕微鏡 JEM-1010 だけ保守契約（年 1 回点検）を継続した。

JEM-1010の利用者から CCD カメラ記録の要望が高いため、脳形態解析部門から提供があった CCD カメラシステム (Soft Imaging System 社, MegaView II) を設置した。なお、取り込みおよび解析用として、PC 互換機 (デル社, Dimension 9150) を新たに 1 台購入した。

保守契約のしていない電子顕微鏡および周辺機器等の修理が 9 件あり例年より修理が多かった。特に凍結ウルトラマイクロトームではセンサーの不良によりチャンパーが過熱し、メーカーによる点検修理となり、時間および費用がかかった。さらに、液体窒素補充用のポンプが経年

劣化のため、補充用ポンプのモータが不良となり、新しいものと交換した。

【研究内容一覧表】

本年度、室を利用してなされた研究の総件数は 41 件であった。機構内では 29 件あり、機構外は、国内で 5 件、国外ではスペイン、ドイツ、中国、オーストリア、イギリス、ハンガリーの研究者による利用が 7 件あった。下記の表はその研究部門・施設、大学、研究所と研究内容の一覧表である。

利用内容一覧表

二研究所

研究所	部門・施設	研究内容
生理研	機能協同	・運動神経細胞の生存機能維持機構の形態学的研究
	神経シグナル	・ラット小脳皮質における AMPA 型グルタミン酸受容体の検索 ・神経疾患モデルマウスを対象とした小脳皮質シナプスの形態観察
	分子神経生理	・脊髄後角に発現するネトリン-1 による一次求心繊維の回路網形成の制御の解析 ・脱髄病変モデルマウスの脊髄における髄鞘形態の解析
	大脳神経回路論	・大脳皮質非錐体細胞の樹状突起への入力解析 ・特定の神経細胞で蛍光を発するように設計したトランスジェニックラットの免疫組織化学的解析
	脳形態解析	・AMPA 型受容体の発現解析の為、SDS-FRL および超薄切片の電顕観察 ・Rat P3 小脳プルキンエ細胞の連続超薄切片による立体再構築 ・SDS-FRL 法によるシナプス内グルタミン酸受容体局在の解析 ・SDS-FRL 法による海馬錐体細胞上 GABA _A 受容体サブユニットの局在解析 ・iv マウス海馬神経回路の非対称性消失の解剖学的解析
	統合バイオサイエンスセンター ナノ形態生理	・タンパク質及び金属クラスターの TEM 観察 ・超分子表面へ導入した電顕マーカーの観察 ・電子顕微鏡位相板の開発と薄膜観察 ・位相差電子顕微鏡用の凍結超薄切片作製 ・唾液分泌における傍細胞輸送の調節機構
	形態情報解析室	・小脳発達過程における消化管におけるエンターセリン受容体の局在に関する形態的研究
	技術課	・コメツキムシの走査像微細構造観察 ・凍結切断両面レプリカ免疫電顕法を用いた小脳グリア細胞の標識
基生研	高次細胞機構	・高等植物のオルガネラ生成機構の解明
	生物進化	・植物細胞の細胞骨格の構築機構、植物細胞の極性の分子機構の解析 ・コケ植物の免疫組織染色 ・閉鎖花における収斂進化の分子機構の解明
	統合バイオサイエンスセンター 植物発生遺伝学	・イネの葉の極性決定機構の解析 ・陽葉・陰葉の発生制御過程と葉肉細胞の軸性の解析
	分子細胞生物	・酵母オートファージの形態学的研究
	形態形成	・細胞極性制御因子改変マウスの表現型の観察
	統合神経生物学	・遺伝子改変動物由来の生体組織の電子顕微鏡解析

所外（国内）

大学・研究所	研究代表者名	研究内容
水産総合研究センター 養殖研究所	小林 亨	生殖腺組織構造過程における体細胞性分化の3次元解析
大阪府立大学	加藤 幹男	DNA 繰り返し配列が形成する特殊高次構造および特殊 DNA 電子顕微鏡観察
東京歯科大学	橋本 貞光	唾液腺傍細胞輸送経路の検討
花市電子顕微鏡技術 研究所	花市 敬正	凍結薄切法による細胞内生体分子の直接観察の研究
ヤマハ発動機(株)	尾田 千草	配列させた金ナノ粒子の観察

所外（国外）

国名, 大学, 研究所	研究者名	研究内容
スペイン Universidad de Cashilla-La Maucha	Rafael Lijan-Miras	GABA _B 受容体とその下流のイオンチャンネルマウス海馬および小脳における局在
ドイツ Freiburg 大学	KULIK, Akos	SDS-FRL 法による膜内分子の局在解析
中国 K.Kleung Brain Research Centre	WEN ,Wang	グルタミン酸受容体の小脳と海馬の分布の解析
オーストリア インスブルック大学	Francesco Ferraguti	グルタミン酸レセプター (mGluR ₁ , mGluR ₇) の電子顕微鏡レベルの SDS-FRL の小脳観察と扁桃体観察
イギリス オックスフォード大学	Peter Somogyi	GABA 作動性シナプスの電子顕微鏡的解析およびレプリカ免疫標識を用いた GABA _A 受容体の定量的解析
イギリス オックスフォード大学	Jojanneke Huck	GABA _A 受容体の脳内局在
ハンガリー Department of Comparative Physiology University of Szeged, Faculty of Science	LÓRINCZ, Andrea	海馬における NMDA と AMPA 受容体の分布の解析

(2) 機器研究試作室

加藤勝己

【概要】

機器研究試作室は多種多様な医学・生物学用実験機器の開発と改良, それに関わる技術指導, 技術相談を室の役割としている。今, 我々の周りには便利な物品があふれ, 自分で工夫して作ったり, 改良する機会が少なくなり, 新しい研究には新しい研究機器を作るという『ものづくり』が希薄になり, 一方で, 最近の研究の多様化は室に新たな役割の模索を迫っている。そうした認識のもと, 『ものづくり』能力の重要性の理解と機械工作ニーズの新たな発掘と展開を目指すために, 室では, 2000年度から, 医学・生物学の実験研究に使用される実験装置や器具を題材にして, 機械工作の基礎的知識を実習主体で行う機械工作基礎講座を開講し, 2006年度は, 2005年度同様, 汎用工作機械の使用方法を主体に実習する初級コースと応用コース(アクリル樹脂製パッチクランプ

用チェンバー, 簡易型一軸式マニプレータ, レンズ及びフィルターホルダーの3テーマから受講希望者が選択)の二コースを開講する準備を進めている。参加希望者は, 二コース合わせ生理研12名, 基生研7名で, 初級コースは半日を1回, 応用コースはガイダンスの後, マンツーマンで3~4回の講習を行う予定である。

また, 生理学研究所では, 山手地区に移転した研究室のために, 2005年4月に工作室を開設し, 利用者のための安全及び利用講習会を, 毎年機器研究試作室が依頼を受けて実施している。

なお, 機器研究試作室の平成17年度の利用状況は, 次頁の通りである。

機器研究試作室利用機器表 (件数)

月	フライス盤	ボール盤	コンターマシン	横切盤	旋盤	切断機	グラインダー	NCフライス盤	その他	計
4	24	21	11	12	4	4	1	0	25	102
5	17	13	10	5	10	4	3	0	21	83
6	19	24	15	20	20	8	4	0	22	132
7	21	17	14	11	8	12	7	0	20	110
8	10	5	6	3	2	2	1	0	7	36
9	25	15	24	11	10	3	8	0	18	114
10	26	12	20	8	8	4	9	4	18	109
11	14	9	8	7	6	5	3	4	17	73
12	18	12	7	7	6	5	1	2	20	78
1	1	5	4	3	3	2	4	0	11	33
2	15	17	13	8	8	1	8	0	16	86
3	4	5	7	4	5	3	4	0	9	41
合計	194	155	139	99	90	53	53	10	204	997

機器研究試作室利用人数表

月	生理研	基生研	その他	合計	延べ時間
4	48	3	0	51	91
5	36	1	0	37	100
6	55	5	0	60	111
7	37	5	0	42	90
8	19	3	0	22	47
9	48	0	0	48	80
10	39	5	0	44	103
11	31	6	0	37	60
12	32	1	0	33	52
1	16	3	0	19	35
2	24	11	0	35	88
3	34	3	0	38	44
合計	419	46	0	465	901

機器研究試作室部門別利用状況

感覚認知情報	86名	認知行動発達機構	65名	心理生理学	48名
生体膜	32名	ナノ形態生理	19名	動物実験センター	18名
形態情報解析室	17名	機能情報解析室	9名	生体システム	9名
感覚運動調節	7名	神経機能素子	7名	生体恒常機能発達機構	7名
神経分化	5名	大脳神経回路論	5名	神経シグナル	4名
電子顕微鏡室	4名	技術課	3名	機能協関	2名

植物発生遺伝学	11名	分子細胞生物学	4名	光情報	3名
統合神経生物学	2名	脳生物学	2名	高次細胞機構	1名
生物進化	1名	細胞器官培養室	1名	RI実験センター	1名
人工気象室	1名	大型スペクトログラフ室	1名	分析室	1名

分子研その他	0名				

④動物実験センター(岡崎共通研究施設)

佐治俊幸, 廣江猛, 窪田美津子, 小池崇子

【概要】

明大寺地区陸生動物室のSPF化の要望があり, 本館地下及び2FのSPF化改修計画の立案と予算要求を行ってきたが, 実現の可能性が低いため, 3年計画で地下部分のSPF化を行うこととした。予算的には, 各年あたり生理学研究所から特別予算として1,000万円及びセンターの自助努力で300万円が計上された。本年度は, 2室のSPF化(1室は飼育室, 他の1室は実験室)と個別換気方式の飼育ラック, ケージ交換ステーション等を準備した。この個別換気ラック及び交換ステーションを使用することで, 飼育室のクリーン度をさほど上げずにSPF環境を維持できる。同様な改装を次年度も実施する予定である。

念願であった運営費交付金以外からの飼育費等の負担金の徴収規定が確定し, 次年度より開始されることとなった。これにより, 外部資金を用いた動物実験を行う際の飼育費等の支払いが容易になる。

感染症予防法の改正により輸入動物(ほ乳類(検疫対象動物を除く。))及び鳥類)等を輸入する者は, 当該動物の種類, 数量その他の事項を厚生労働大臣(検疫所)に届け出なければならず, またその際には, 動物毎に定められた感染症にかかっていない旨等を記載した輸出国政府機関発行の証明書の添付が必要となった。当初は, 若干の混乱もあったが, 研究者及び輸入代行業者の努力もあり大きな問題にならず輸入が出来ることとなった。

また, 外来生物法の制定及び感染症予防法の改正からアカゲザル, カニクイザル, タイワンザルを飼育するための許可が必要となった。このため, 環境省及び厚生労働省へ申請書を提出し許可を受けた。さらに, ニホンザルに関しては, 動物愛護法の改正により飼育許可が必要となるため, 近日中に申請を行う予定である。

【受精卵凍結・クリーンアップ事業】

山手SPF施設移行のためのマウス受精卵凍結, クリーンアップは一昨年度までに終了したため, 凍結件数は減少するものと考えられたが, 主に山手SPF施設内での飼

育動物の事故やトラブルに対するバックアップのためか, 昨年と同等の受精卵凍結依頼があった。また昨年に引き続き, 動物施設間のマウス授受のためのクリーンアップも行った。

実施件数としては, 受精卵凍結保存がのべ35件, クリーンアップが1件, クリーンアップ兼受精卵凍結保存がのべ7件であった。

また過去に当センターで受精卵凍結した系統の融解・移植の依頼があり, のべ3件行った。

【明大寺地区 陸生動物室】

平成17年度の飼育室利用部門数は, 27研究部門(生理研17部門, 基生研6部門, 統合バイオサイエンスセンター4部門)であった。

動物飼育数は減少の傾向を示している。飼育費等の負担金徴収のために, 飼育数を抑える傾向があるのだろうか。しかし, 新しい部門の実験開始により, 飼育数増加の計画も見られる

【山手地区 動物実験センター分室】

平成17年度の飼育室利用部門数は, 14研究部門(生理研7部門, 基生研1部門, 統合バイオサイエンスセンター5部門)であった。

利用者講習会を毎月開催するとともに, 陸生動物利用者には実務講習会を実施している。各受講者はそれぞれ44名, 39名であった。

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

【明大寺及び山手地区 水生動物室】

平成17年度の水生動物室利用状況は, 生理研・基生研両研究所あわせて6部門・施設の利用があった。

加熱冷却ユニットの動作不良が3件あり, 順次修理を行った。

本年までは, 水生動物室の使用料は徴収していなかったが, 来年度より徴収が決まった。

陸生動物 部門別・動物種別搬入数 (平成17年度)

部門	動物種	明大寺地区					山手地区		
		マウス	ラット	ウサギ	ネコ	イヌ	サル	マウス	ラット
神経機能素子		13	10	0	0	0	0	0	0
細胞内代謝		18	0	0	0	0	0	0	0
生体膜		0	0	0	0	0	0	224	203
機能協関		453	139	0	0	0	0	0	0
機能協関 (椋原)		0	30	0	0	0	0	0	0
分子神経生理		173	0	0	0	0	0	1,681	0
神経シグナル		0	0	0	0	0	0	2,013	40
高次神経機構		0	0	0	0	0	0	177	0
感覚認知情報		0	0	0	0	0	2	0	0
生体システム		24	4	0	0	0	1	1	0
認知行動発達機構		115	50	0	0	0	5	0	0
脳形態解析		233	0	0	0	0	0	1,593	129
大脳神経回路論		0	0	0	0	0	0	0	605
形態情報解析室		0	9	0	0	0	0	0	0
機能情報解析室		0	0	0	0	0	1	0	0
生殖内分泌系		756	42	0	0	0	0	5	0
生体恒常機能		128	135	0	0	0	0	0	0
動物実験センター		42	0	0	5	11	1	804	0
高次細胞機構		0	0	2	0	0	0	0	
性差生物学		0	0	0	0	0	0	18	0
統合神経生物学		11	4	0	0	0	0	371	1
行動生物学		0	40	0	0	0	0	0	0
脳生物学		81	94	4	0	0	1	0	0
細胞器官培養		2	0	0	0	0	0	0	0
バイオイメージング		5	0	0	0	0	0	0	0
分子発生		165	0	0	0	0	0	964	0
神経分化		0	0	0	0	0	0	373	0
ナノ形態生理		75	76	0	0	0	0	37	43
分子環境生物学		0	0	0	0	0	0	244	0
細胞生理		105	0	0	0	0	0	798	77
遺伝子改変動物作製室		0	0	0	0	0	0	219	827
合計		2,399	633	6	5	11	11	9,522	1,925

水生動物 月別・動物種別搬入数（平成 17 年度）

種 \ 月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	合計
メダカ			500				500	500	500	500		1,000	3,500
ティラピア			51					8	4			30	93
ベラ	30										56		86
ウナギ			30			20							50
ヒトデ		50			32	160							242
ウニ		40						23	100				
ホヤ			100					800			50		950
ナマコ					2								2
海水(t)			12		8			8	8		8		44