【研　究　会　報　告】

研究会報告

〔 目　　次 〕

１．細胞シグナリングの時空間統御機構解明への方略検索
（代表者：曽我部　正博　2005年10月6日－10月7日）..... 205
２．脳神経科学・精神医学の主要ツールとしての遺伝子改変マウスの表現型解析
（代表者：宮川剛　2005年6月30日－7月1日）..... 214
３．神経科学の新しい解析法とその応用
（代表者：鹿川　哲史　2005年9月15日－9月17日）..... 221
４．心臓血管系におけるイオンチャンネル学の新たな展開
（代表者：鷹野　誠　2006年1月24日－1月25日）..... 229
５．筋収縮の調節蛋白質－構造，機能および疾患－
（代表者：栗原　敏　2005年10月25日－10月28日）..... 238
６．細胞死の新たな生理機能と病態における意義
（代表者：垣塚　彰　2005年10月17日－10月18日）..... 253
７．宿主防御機構としての上皮膜機能の調節因子
（代表者：中張隆司　2006年1月30日－1月31日）..... 265
８．視知覚への多角的アプローチ－生理，心理物理，計算論２
（代表者：塩入　諭　2005年6月23日－6月24日）..... 273
９．生体膜輸送分子複合体の分子構築と生理機能
（代表者：金井 好克　2005年7月19日－7月20日）..... 280
10．生理機能制御および病態におけるプリン作動性シグナリングの役割とその分子機構
（代表者：井上 和秀　2005年9月1日－9月2日）..... 289
11．分子複合体と神経・シナプス機能
（代表者：森 泰生　2005年6月23日－6月24日）..... 311
12．脳磁場計測によるヒト脳機能マッピング
（代表者：柿木 隆介　2005年11月2日－11月4日）..... 319
13．高次脳機能研究の新展開
（代表者：高田昌彦　2006年1月16日－1月17日）..... 339
14．シナプスの一生：誕生・維持・除去過程の統合的理解に向けて
（代表者：柚﨑通介　2005年12月1日－12月2日）..... 347
15．大脳皮質機能単位の神経機構
（代表者：姜 英男　2005年10月20日－10月21日）..... 353
16．シナプス伝達の細胞分子調節機構
（代表者：岡部繁男　2005年12月8日－12月9日）..... 357
17．超高圧電子顕微鏡の医学生物学分野への応用
（代表者：有井達夫　2006年2月4日－2月5日）..... 369
18．位相差断層電子顕微鏡の医学的・生物学的応用
（代表者：金子康子　2006年1月26日－1月27日）..... 380

19. DNA 構造を基盤とするゲノム生理学の展開
（代表者：鳥越秀峰　2005 年 11 月 17 日－11 月 18 日）..... 392
20. 唾液腺研究からの生理機能研究，その戦略的展開
（代表者：杉谷博士，村上政隆　2006 年 2 月 24 日－2 月 25 日）..... 400
21. 生物ロコモーションの統合的研究
（代表者：東島眞一　2005 年 11 月 24 日－11 月 25 日）..... 407
22. バイオ分子センサー研究会
（代表者：富永真琴　2006 年 6 月 9 日－6 月 10 日）..... 413
23. 体温調節，温度受容研究会
（代表者：永島 計　2006 年 9 月 27 日－9 月 28 日）..... 421
24. 痛みの分子機構と治療戦略研究会
（代表者：仙波　恵美子　2005 年 12 月 15 日－12 月 16 日）..... 431
25. TRP チャネル研究会
（代表者：井上隆司　2006 年 7 月 13 日－7 月 14 日）..... 449
26. 神経科学の道具としての fMRI 研究会
（代表者：Kang Cheng　2005 年 11 月 24 日－11 月 25 日）..... 461

1. 細胞シグナリングの時空間統御機構解明への方略検索

2005 年 10 月 6 日－10 月 7 日

代表・世話人：曽我部　正博（名古屋大学　大学院医学系研究科）
所内対応者：久保　義弘（自然科学研究機構　生理学研究所　神経機能素子）

（1）ファゴサイトーシスにおける Rac サブタイプの局在と機能
齋藤　尚亮，上山　健彦，辰野　敏彦，住本　英樹，Michelle Lennartz
（神戸大学バイオシグナル研究センター）

（2）腎マクラデンサ細胞一酸化窒素合成酵素 nNOS の発現と活性制御機構
川田　英明，安岡　有紀子，小久保　謙一，小林　弘祐，
福田　英一，広瀬　茂久，河原　克雅（北里大学医学部）

（3）シナプス小胞へのグルタミン酸取り込み速度
金子　雅博，堀　哲也，高橋　智幸（東京大学大学院医学系研究科）

（4）海馬シナプスにおける神経ステロイドによるメタ可塑性の調節：膜電位イメージングによる解析
曽我部　正博，陳　玲（名古屋大学大学院医学系研究科）

（5）NMDA 受容体 NR1 における部分アゴニストの作用機序
稲野辺　厚（大阪大学大学院医学系研究科）

（6）中枢ニューロンにおける代謝型 GABA・グルタミン酸受容体の複合体化と機能的相互作用
田端　俊英，狩野　方伸（大阪大学大学院医学系研究科）

（7）樹状突起スパインの可塑性と安定性
河西　春郎，本蔵　直樹，安松　信明，松崎　政紀，野口　潤（生理学研究所）

（8）破骨細胞における Vacuolar-type H^+-ATPase の多様な酸分泌メカニズム
久野　みゆき，酒井　啓，川脇　順子，森浦　芳枝，
森畑　宏一，森　啓之（大阪市立大学大学院医学研究科）

（9）脳脊髄液の pH 調節における脈絡叢の重炭酸イオン輸送機構
福田　英一，河原　克雅，広瀬　茂久（東京工業大学大学院生命理工学研究科）

(10) 蛍光 1 分子イメージングによるシグナル伝達と核内輸送のダイナミクス
十川　久美子，徳永　万喜洋（理化学研究所・免疫・アレルギー科学総合研究センター）

(11) KCNQ/M チャネルの抑制における PIP_2 と PKC の異なる役割
中條　浩一，久保　義弘（生理学研究所）

(12) HERG カリウムチャネルの流動電位測定によるイオン透過機構の解析
老木　成稔，安藤　博之，清水　啓史，岩本　真幸，久野　みゆき（福井大学医学部）

(13) 免疫応答細胞における酸化的ストレス感受性 Ca^{2+} チャネル TRPM2 の活性化機構および生理的役割
山本　伸一郎，原　雄二，森　泰生（京都大学大学院工学研究科）

(14) マクロファージにおける TRPV2 チャネルの制御機構
長澤　雅裕，小島　至（群馬大学生体調節研究所）

(15) PLC-zeta の分子構造と Ca^{2+} オシレーション誘発能および核移行能
宮崎　俊一，伊藤　昌彦，黒田　恵司（東京女子医科大学医学部）

(16) Ca^{2+} オシレーションの細胞分子機構
飯野　正光（東京大学大学院医学系研究科）

(17) プリズム式全反射蛍光顕微鏡を用いた細胞内タンパク輸送の可視化法の開発
最上　秀夫，嘉副　裕，佐藤　洋平（浜松医科大学）

【参加者名】

小島　至，長澤雅裕（群馬大学生体調節研究所属），齋藤尚亮，柏木香保里，高橋英之（神戸大学バイオシグナル研究センター），三畝宏一（神戸大学自然科学研究科），足立直子（神戸大学医学系研究科），田端俊英，川上大輔（大阪大学大学院医学系研究科細胞神経科学分野），高橋智幸，齋藤直人，堀　哲也，鈴木大介，渡邉博康，金子雅博，山下慈郎，松山恭子（東京大学大学院医学系研究科神経生理学教室），稲野辺厚（大阪大学大学院医学系研究科薬理学），久野みゆき（大阪市立大学大学院医学研究科分子細胞生理学），川脇順子（大阪市立大学大学院医学研究科中央研究室），河原克雅，川田英明（北里大学医学部生理），福田英一（東京工業大学大学院生命理工学研究科），最上秀夫（浜松医科大学生理学），飯野正光，大久保洋平，関谷　敬，舩越大資（東京大学大学院医学系研究科細胞分子薬理学），宮崎俊一，伊藤昌彦（東京女子医科大学医学部第二生理学），森　泰生，山本伸一郎（京都大学大学院工学研究科合成・生物化学専攻分子生物化学分野），徳永万喜洋（国立遺伝学研究所），十川久美子（理研　免疫・アレルギー科学総合研究センター），曽我部正博（名古屋大学大学院医学系研究科細胞生物物理学），老木成稔（福井大学医学部形態機能医科学講座分子生理学），河西春郎（生理学研究所生体膜研究部門），毛利達磨，瀬藤光利，北村明彦，根本知己，野口　潤，沼田朋大，エルバート・リー，温井美帆，久保義弘，立山充博，中條浩一，藤原祐一郎，長友克広，石井　裕（生理学研究所）

【概要】

細胞が刺激に対して適切に応答することこそ“生きていること”の証である。このプロセスは，刺激の受容と変換→細胞内情報処理→細胞応答のステップからなり，これを細胞シグナリングと呼ぶ。これらのステップは受容体や情報伝達分子が細胞骨格や膜などの空間構造を持つ反応場において様々な時間スケールで相互作用することで実現される。その仕組みを知ることは，“命とはなにか”という謎に迫るだけではなく，医学・工学応用への大きな可能性を秘めた生命科学の中心課題である。しかしながら，その時間軸や空間軸での統御機構の大半は謎である。一方で，分子生物学とバイオイメージングの飛躍的発展によって，シグナリングを担う主要な分子の構造が次々に明らかになり，その構造機能連関や細胞内での動態が明らかになりつつある。このような現実を踏まえ，本研究会では，この分野に携わる様々な件研究者の意見交換を通して細胞シグナリングの時間軸統御機構（早い反応から遅い反応への展開機構）と空間軸統御機構（ミクロからマクロへの構造展開機構）の原理を探るための有効な研究方略を探ることを目的とした。

本年度は 17 題の講演と 40 名以上の参加者を得て，受容体・チャネルからオルガネラ・細胞・組織のシグナル伝達へ展開する質の高い発表と活発な討論が行われた。我が国における細胞内シグナリング研究は，生物物理学，生化学，生理学など広範な分野で世界をリードする活発な研究が行われているが，学会の壁などにより十分な意見交換が成されているとは言い難い。その意味で本研究会は，分野を超えた多様な研究者が適切なサイズで集まり，集中できる環境の中で未発表を含む最新の成果やアイデアを披瀝し，忌憚のない議論を戦わせることのできた楽しく貴重な集まりであった。この成果を元に，細胞シグナリングにおける時空間統御機構の理解に向けたより具体的な研究方略の構築を目指したい。

（1）ファゴサイトーシスにおける Rac サブタイプの局在と機能

齋藤尚亮（神戸大学・バイオシグナル研究センター）

貪食細胞は，進入物の殺菌のために NADPH oxidase を用いて活性酸素を産生するが，その活性化には 6 つの成分による膜上での機能的複合体の形成が必須である。しかしながら，活性酸素産生に関わる Rac の分子種特異性やその作用機序については不明である。今回我々は，GFP 標識 Rac (1, 2, 3) およびその変異体を用いて，マクロファージ細胞株での FcgR を介した貪食時の Rac の分子種特異的膜ターゲッティング機構の解明を試みた。

その結果，貪食時に，GFP 標識 Rac は Rac1＞Rac3＞Rac2 の順に強く食胞膜に集積し，その集積の強さ，活性酸素産生能はC末端側の polybasic region (PB) の正電荷アミノ酸残基数に依存することがわかった。脂質結合能を protein lipid overlay assay を用いて行ったところ，Rac1 の PB は PIP，PIP3，PA に強く結合したが，Rac2 の PB は特異的結合を示さなかった。また，Rac2 の活性型変異体の集積を観察すると，小胞体のなど細胞内器官の膜に局在し，貪食時に線状に食胞膜へ癒合するのが観察された。これらのことから，Rac1 は貪食時に PB の高い正電荷とその脂質結合能を利用し食胞膜に集積するが，Rac2 は，細胞内器官膜にターゲットし，この膜が食胞膜に融合することを利用した PB の正電荷に依存しない集積機序を持つことが示唆された。

（2）腎マクラデンサ細胞一酸化窒素合成酵素 nNOS の発現と活性制御機構

川田英明（北里大・医・生理）

腎マクラデンサ (MD) 細胞が産生する一酸化窒素(NO)は，尿細管糸球体フィードバック (TGF) 機構を抑制する血管拡張因子である。MD 細胞は，管腔内液 NaCl 濃度 ($[NaCl]_l$) の変化を感知し，神経型 NO 合成酵素 (nNOS) の発現量を増減させているが，その細胞内調節因子は不明である。我々は，新規に樹立したマウス MD 細胞 (NE-MD) において，細胞外液[NaCl]変化，furosemide（Na^+-K^+-$2Cl^-$ 輸送体阻害薬）や amiloride（Na^+/H^+逆輸送体阻害薬）投与による，nNOS 発現量 (Western blotting) と NO 産生（NO 電極法）への影響を調べた。結果：nNOS 発現量と L-Arginine (1mM) 添加による NO 産生量は，furosemide 投与後時間依存性に増加した。この NO 産生は，BAPTA-AM (Ca^{2+} chelator) や 50μM 7-nitroindazole（nNOS 阻害薬）で完全に阻害された。nNOS 発現誘導後，細胞外液の $[Na^+]$ 低下による NO 産生量は小さかった。結論：MD 細胞の nNOS 発現量は，furosemide 投与や$[Cl^-]_l$ の低下で誘導され，NO 産生量は細胞内 Ca^{2+} と pH に影響されることがわかった。

（3）シナプス小胞へのグルタミン酸取り込み速度

金子　雅博（東京大学大学院医学系研究科　神経生理学教室）

シナプス伝達は，シナプス小胞が伝達物質を開口放出後，再利用されることで維持される。この再利用過程において，シナプス小胞への伝達物質取り込みは必須のステップであり，これに要する時間は，シナプス小胞が再利用されるまでの時間を制限する。シナプス小胞は回収後，数十秒以内に再利用可能となるが，生化学的に単離したシナプス小胞への伝達物質の取り込み時間は数分-10 分におよんでいる。我々は脳幹スライスの calyx of Held シナプスにおいてこの問題を検討した。シナプス小胞内のグルタミン酸を枯渇させた後にシナプス前末端にケージドグルタミン酸を注入し，UV 照射で瞬間的にグルタミン酸濃度を上昇させ，シナプス後細胞から同時記録される EPSC の振幅の時間経過を指標に，グルタミン酸の小胞への取り込み時間を測定した。UV 照射後，EPSC は直ちに増大し，その時定数は室温で 5.1 秒であった。この反応は，小胞型グルタミン酸トランスポーター (VGLUT) ブロッカーTrypan blue，及び VGLUT の駆動力である H^+の電気化学ポテンシャルをつくる液胞型 H^+-ATPase (V-ATPase) のブロッカー bafilomycin A1 により完全に抑えられた。これらの結果から，シナプス小胞への VGLUT を介するグルタミン酸取り込み速度は従来の報告より 2 桁近く速いと結論された。

（4）海馬シナプスにおける神経ステロイドによるメタ可塑性の調節：膜電位イメージングによる解析

曽我部正博（名古屋大学大学院・医学系研究科・細胞生物物理）

神経ステロイドの一部は，核内受容体を経由せずに，細胞膜受容体に急性に作用して，シナプス伝達を修飾することが明らかになりつつある。代表的な神経ステロイドである硫酸プレグネノロン (PREGS) を海馬に注入すると，若齢ラットの学習能力の促進，加齢マウス，ラットの記憶学習の改善，あるいはβアミロイド負荷ラットでみられる学習能力低下の防止効果などが報告されているが，そのシナプス機構も標的受容体も不明である。最近，我々は，ラット脳海馬スライスへの PREGS の急性投与が，歯状回のシナプス伝達に長期増強 (LTP) を誘導することを発見した。この長期増強は，短期と中長期の 2 段階からなり，前者はニコチン受容体を介した前終末からのグルタミン酸放出の増強，後者は，シナプス後膜の NMDA 受容体チャネル活性の亢進と，引き続く細胞内シグナリングの活性化を必要とする。一方，海馬では条件刺激の周波数に依存して長期抑圧 (LTD) や長期増強 (LTP) が生じ，EPSP の振幅変化は，刺激周波数の対数に対して S 字状曲線を呈する。この周波数依存性は現在や過去の状況によって変化し，メタ可塑性と呼ばれている。PREGS は，この曲線を大きく左シフトさせることが分かった。即ち，PREGS はそれ自体がシナプス伝達を増強するだけではなく，活動度依存的なシナプス可塑性の周波数依存性を修飾するメタ可塑性調節因子であることが判明した。

（5）NMDA 受容体 NR1における部分アゴニストの作用機序

稲野辺　厚（大阪大学大学院医学系研究科薬理学講座）

リガンド開口型イオンチャネルはアゴニストの結合情報をチャネルの開閉に変換する膜蛋白質である。完全アゴニストはチャネルを最大に活性化し，部分アゴニストは不完全に活性化する。NMDA 受容体の NR1 サブユニットのグリシン結合部位における部分アゴニストの作用を検討するために，炭素環リングの異なる 3 つのグリシンホモログ (ACPC，ACBC，cycloleucine) を用いて，結晶学的，電気生理学的解析を行った。ACPC，ACBC は完全アゴニストであるグリシンと比して，NR1，NR2B からなる NMDA 受容体をそれぞれ約 80%，42%活性化した。しかし，それら部分アゴニストと NR1 のリガンド結合領域との複合体の結晶構造は，グリシンとの複合体と同程度のドメイン開閉を示した。一方，cycloleucine はアンタゴニストとして働き，リガンド結合領域の開状態を安定化していた。以上の知見は，NR1 のリガンド結合領域は完全，部分アゴニストに関らず，一つの閉状態として存在することを示しており，部分アゴニストの作用が，進化的に類似する AMPA 受容体の GluR2 と異なること示している。

（6）中枢ニューロンにおける代謝型 GABA・グルタミン酸受容体の複合体化と機能的相互作用

田端俊英（大阪大学大学院医学系研究科細胞神経科学）

1 型代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR1) は中枢シナプス可塑性に関わる G タンパク共役性受容体 (GPCR) である。我々はマウス小脳プルキンエ細胞において，細胞外カルシウム (Ca^{2+}_o) が mGluR1 を活性化するとともに，mGluR1 のグルタミン酸感受性を劇的に増強することを明らかにした。近年，プルキンエ細胞上で Ca^{2+}_o 感受性を有する B 型 GABA 受容体 ($GABA_BR$) が mGluR1 と近接して存在することが報告された。そこで Ca^{2+}_o の $GABA_BR$

に対する作用を薬理阻害した場合や $GABA_BR$ を遺伝学的にノックアウトした場合について調べたところ，Ca^{2+}_o による mGluR1 のグルタミン酸感受性増強が起こらないことが判明した。これらの結果は $GABA_BR$ が Ca^{2+}_o の効果を仲介していることを示しているが，従来の $GABA_BR$ 介在反応と異なり $G_{i/o}$ タンパクを必要としない。免疫共沈でマウス小脳から $GABA_BR$－mGluR1 複合体が検出された事実を考え合わせると，$GABA_BR$ と mGluR1 の直接相互作用が増強を起こしている可能性がある。以上の結果は，中枢ニューロンにおいて GPCR が他の GPCR の co-factor として働くことを示唆している。

（7）樹状突起スパインの可塑性と安定性

河西春郎（生理学研究所）

海馬 CA1 錐体細胞の樹状突起スパインの性質をスライス培養標本を用いて調べている。ケイジドグルタミン酸の 2 光子アンケイジングにより，単一スパインに pairing 刺激を与えると著しいスパイン頭部増大が見られるが，これは頭部の形態依存性があり，大きなスパインではほとんど長期的な増大はない。同様な違いは，自発発火環境境で数日に渡る観察でも見られ，大きなスパインは書き込み禁止状態にあると考えられた。この原因の一つとして，大きなスパインのネックは太いことが多く，NMDA 受容体依存性カルシウムシグナルが小さいことがある（昨年報告済み）。更に，スパインの主たる細胞骨格である F-actin の構築を 2 光子光変換が可能な PA-GFP-actin を用いて調べた結果，大きなスパインと小さなスパインは F-actin の構築に重要な違いがあることがわかってきた。

（8）破骨細胞における Vacuolar-type H^+-ATPase の多様な酸分泌メカニズム

久野みゆき（大阪市立大学大学院医学研究科・分子細胞生理学・中央研究室）

破骨細胞は酸・蛋白分解酵素を分泌して骨吸収を行う。骨表面に接する破骨細胞の細胞膜は ruffled border と呼ばれるひだ状の構造を形成し，ここには酸分泌の主力と考えられている vacuolar-type H^+-ATPase (V-ATPase) が高密度で存在している。V-ATPase は，H^+ トランスポートを担う membrane sector (V_o) と ATPase 活性をもつ catalytic sector (V_1) から成り，更にそれぞれが複数のサブユニットの集合体である。私達は，破骨細胞から V-ATPase による H^+ 電流を記録し，サブユニット構成に基づく酸分泌の制御機構を検討した。V_1 は actin に結合することが知られている。サイトカラシンで前処理すると H^+ 電流の ATP 依存性が失われ，actin filament との相互作用がポンプ機能の維持に重要な役割を果たしていると考えられた。しかし，サイトカラシン処理あるいは細胞内 ATP 除去後もバフィロマイシン及び DCCD 感受性 H^+ 電流が残存した。これらの結果は，破骨細胞では V-ATPase が holoenzyme として働くだけでなく，ATP の枯渇や V_o/V_1 diassembly などでポンプ機能が阻害された際には V_o の H^+ トランスポート機構によって酸分泌機能が保たれることを示唆している。

（9）脳脊髄液の pH 調節における脈絡叢の重炭酸イオン輸送機構

福田英一（東工大・生命理工）

脳脊髄液は中枢神経系を衝撃から守るクッションの役割をするだけでなく，老廃物を排出し，神経伝達における環境を提供するなど重要な機能を担っている。この脳脊髄液の大部分は脈絡叢と呼ばれる組織から分泌されることが知られており，その主要成分の輸送機構も大部分は分子レベルで同定されているが，pH 緩衝剤として重要な重炭

酸イオンについては明らかにされていない。我々は重炭酸イオン輸送体の有力な候補分子として，ラット脈絡叢より Na^+/HCO_3^- 共輸送体 4 の新規バリアント (NBC4g)を単離し，それが脈絡叢上皮細胞の頂端膜に局在することを発見した。NBC4g は既報の NBC4c と異なり，cAMP 依存的な電気生理的活性をもつことを示すと共に，ラット脈絡叢上皮の初代培養細胞において，RNA 干渉による NBC4 発現抑制を用い，NBC4 が頂端膜で重炭酸イオン輸送に関わっていることを明らかにした。

（10）蛍光１分子イメージングによるシグナル伝達と核内輸送のダイナミクス

十川久美子（理研・免疫センター）

lipid raft は，シグナル分子が集合し，外からの刺激を効率よく細胞内に伝達する細胞膜のマイクロドメインとして重要であると考えられている。種々のプローブを用いたイメージングにより存在は確認されているものの，その動態については，不明な点が多い。

我々は，理研免疫センターの山崎博士・斉藤博士との共同研究により，正常細胞における lipid raft の動態可視化のために，lipid raft 局在タンパク質と GFP との融合タンパク質 $LAT^{\Delta CP}$/GFP を用いた。Transgenic マウス由来のマスト細胞を用いた全反射顕微鏡による蛍光イメージングにより，直径約 1μm 範囲での速い動きをする，数～数十分子の集合体として観察され，lipid raft の 1 クラスターの動きが示唆される。1 分子イメージングの解析から，$LAT^{\Delta CP}$/GFP1 分子は，クラスターと同様に速い動きを示したが，MβCD による cholesterol 除去や，raft 局在シグナルを欠失した $LAT^{\Delta CP}$ 変異体では，動く範囲が大きく制限された。この結果は，lipid raft に局在することでタンパク質が広い範囲を動くことができることを示しており，シグナルタンパク質の移動の観点から lipid raft の重要な役割が示唆される。さらに，受容体刺激後の lipid raft と受容体との相互作用観察の解析結果も合わせて考察する。

（11）KCNQ/M チャネルの抑制における PIP_2 と PKC の異なる役割

中條浩一（生理学研究所）

電位依存性カリウムチャネルの KCNQ/M チャネルは，神経細胞などに発現し細胞の興奮性を抑える役割を果たしている。G_q カップルの受容体が活性化するとこのチャネルは抑制されることが知られているが，近年この抑制機構が主に PIP_2 の分解によるものであることが報告された。その一方で，PKC の活性化がチャネルの抑制に関わっていることも示唆されているが，PKC が PIP_2 減少による抑制の補助的な役割を担っているのか，あるいは PIP_2 とは異なった方法で KCNQ/M チャネルを抑制しているかは明らかではない。今回，我々は KCNQ チャネルと M1 受容体を共発現させることでアフリカツメガエル卵母細胞に M 電流を再構成した。10μM の oxo-M によって M1 受容体を活性化させると，KCNQ チャネルのコンダクタンス-電圧関係（G-V カーブ）が脱分極側にシフトした。また PKC のアクチベーターである PMA を投与したところ，KCNQ2 チャネルの G-V カーブは約 20mV シフトした。一方，10μM の wortmannin によって PIP_2 を減少させても G-V カーブにはほとんど影響を与えなかった。M 電流抑制時において，PIP_2 の減少がチャネルの最大電流量を減少させるのに対し，PKC はチャネルの電位依存性を変化させることでチャネルを抑制すると考えられる。

（12）HERG カリウムチャネルの流動電位測定によるイオン透過機構の解析

老木 成稔（福井大学医学部・分子生理）

本研究では 1) イオン透過機構を解明するための新しいアプローチとして流動電位を基にした解析法を考案し, 2) 流動電位の新しい測定法を開発し, 3) これを HERG チャネルに適用しその透過機構を検討した。流動電位とは，浸透圧差によってポアを流れる水が透過イオンを押し流し，透過イオンの平衡電位でもイオンが流れることにより生じる。“水で満たされたポア”内のイオンと水の相互作用を反映する。今回私たちは全細胞電流記録法による流動電位測定に成功し（浸透圧パルス法），HERG チャネル発現 HEK293 細胞に適用した。細胞内外 10 mM $[K^+]$ において，浸透圧差 (500 mOsm～1500 mOsm) に対する流動電位値は線形変化を示し，その勾配から–0.7 mV/ΔOsm を得た。この値から水ーイオンカップル比（n：水流束/K^+流束）が 1.6 と求められた。細胞内外 100 mM $[K^+]$ では n が 0.9 に減少した。透過イオン濃度増大による n 値の減少は，ポア内イオン占有確率の増大による水分子占有確率の減少を意味する。一方，100 mM $[K^+]$ での n 値が約 1 ということはポア内イオンが最小の水和状態で透過することを示し，KcsA の透過モデル（シフト-透過モデル）の特徴的な透過様式に対応する。これらの結果はシフト-透過モデルが HERG チャネルに適用できることを示した (Ando *et al.*, J. Gen. Physiol., *in press*)

（13）免疫応答細胞における酸化的ストレス感受性 Ca^{2+} チャネル TRPM2 の活性化機構および生理的役割

山本伸一郎（京都大学大学院工学研究科）

TRPM2 は過酸化水素 (H_2O_2) などの酸化的ストレスにより活性化される Ca^{2+} 透過性チャネルである。しかし，酸化的ストレスによる TRPM2 の活性化の詳細はまだ明らかにされていない。TRPM2 は単球，好中球，およびリンパ球などの免疫応答細胞で高い発現が認められている。しかしこれらの細胞における TRPM2 の生理的役割は明らかにされていない。そこで本研究では酸化的ストレスによる TRPM2 の活性化機構の詳細および生理的役割を明らかにすることを目的とし検討を行った。TRPM2 活性化機構解明にあたり，我々は extracellular signal-regulated kinase が TRPM2 活性化に重要な役割を果たしていることをつきとめた。また生理的役割については TRPM2 発現が認められている単球細胞株 U937 を用いたところ H_2O_2 による IL-8 産生誘導に TRPM2 を介した Ca^{2+} 流入が関与することを明らかにした。また当研究室では TRPM2 KO マウスの作製に成功している。そこで，TRPM2 KO マウスを用いて免疫応答細胞における TRPM2 の生理的役割についても現在検討を行っているので報告する。

（14）マクロファージにおける TRPV2チャネルの制御機構

長澤雅裕（群馬大学生体調節研究所）

マクロファージには TRPV2 チャネルが発現し，非刺激時には主に細胞内に局在する。fMLP の投与により細胞膜への移行が促進される。パッチクランプ法により Cs^+をチャージキャリアーとしたチャネル電流が観察され，ruthenium red，変異型 TRPV2 遺伝子導入，siRNA の投与により抑制される。この Cs^+電流は fMLP 投与によって増加する。また fMLP 投与により急速でかつ持続的な細胞内 Ca^{2+}濃度の増加が惹起されるが，細胞外液 Ca^{2+} の除去，ruthenium red 投与，変異型 TRPV2 遺伝子導入，siRNA 投与などにより持続相の Ca^{2+}上昇が消失する。

fMLP により惹起される TRPV2 の細胞膜への移行は PI-3 キナーゼを抑制するワートマニンや百日咳毒素によりブロックされる。fMLP により誘発されるマクロファージの遊走は ruthenium red 投与，変異 TRPV2 遺伝子導入により抑制される。マクロファージにおいて，TRPV2 は主にポドゾームに局在している。ポドゾームは細胞の遊走に重要な構造で，TRPV2 はこのドメインへの Ca^{2+}流入を制御して遊走に関与していると考えられる。

（15）PLC-zeta の分子構造と Ca^{2+}オシレーション誘発能および核移行能

宮崎俊一（東京女子医大・医・第二生理）

phospholipase C-zeta (PLCz) は近年マウス精子に発現する PLC として発見され，卵に Ca^{2+}オシレーションを誘発する卵活性化精子因子の有力候補である。PLCz－蛍光蛋白 Venus 連結蛋白の cRNA をマウス卵に注入して発現させると，30 分後から Ca^{2+} オシレーションを誘発し卵は活性化された。発現した PLCz は，RNA 注入後約 5 時間で形成される前核に蓄積した。その後第 1 卵割直前の核膜崩壊時に核から細胞質に拡散し，2 細胞期の核に再び集積した。PLCz の細胞質/核間移動が Ca^{2+} オシレーションの on/off に関係するかも知れない。

PLCz は N 端側の 4 つの EF-hand domain，中央部の X と Y の catalytic domain，C 端側の C2 domain から成る。X と Y 間には分子が折れ曲がる hinge portion が想定され，この付近に核移行配列候補がある。ここに point mutation を加えると核移行能を喪失した。他方 EF-hand domain の N 端から 10 個目のアミノ酸以降どの部分を削除しても，Ca^{2+} オシレーション誘発能も核移行能も喪失した（前核形成した受精卵に RNA を注入して発現させ核移行能を観察）。EF-hand domain 部分は，Ca^{2+}-binding site としてよりも機能的立体構造をとるために必須であると考えられる。

（16）Ca^{2+}オシレーションの細胞分子機構

飯野正光（東京大・医学系研究科・細胞分子薬理）

アゴニスト刺激に伴って細胞内 Ca^{2+} 濃度が周期的に増減する Ca^{2+} オシレーションは，多種の細胞で見られ，細胞機能制御に深く関わっている。Ca^{2+}オシレーション理論のエッセンスは，Ca^{2+}ストアに「Ca^{2+} による Ca^{2+} 放出機構」が存在し，Ca^{2+}ストアから放出された Ca^{2+} は一旦別のコンパートメントに移った後 Ca^{2+}ストアへ再び取り込まれる条件がそろうことである。実際，IP3 受容体の Ca^{2+} 感受性低下型変異体を発現する細胞では Ca^{2+}オシレーションが生じないことを我々は示した。オシレーションのペースメーカー機構を追究するため，我々は，小胞体内腔に局在させた分離型カメレオンを用い，Ca^{2+} オシレーションに伴う Ca^{2+}ストア内 Ca^{2+}濃度を経時的にモニターした。その結果，アゴニスト刺激開始後最初の Ca^{2+}濃度上昇に際しては，ストアからの Ca^{2+} 放出と細胞質 Ca^{2+} 濃度上昇がほぼ同期して起こるが，2 回目以降の Ca^{2+} オシレーションでは，まず細胞質の Ca^{2+} 濃度が上昇し始めてから Ca^{2+} 放出が起こることが明らかになった。これは，何らかの細胞内小器官からまずペースメーカー Ca^{2+} が供給され，それに引き続いて Ca^{2+} による Ca^{2+} 放出が起きて Ca^{2+} オシレーションが形成されることを示している。このペースメーカー Ca^{2+} がミトコンドリアから由来することについて述べる。

（17）プリズム式全反射蛍光顕微鏡を用いた細胞内タンパク輸送の可視化法の開発

最上秀夫（浜松医科大学生理学）

近年の遺伝子工学や光学技術の発展により,開口放出や酵素の活性化などの細胞膜近傍での生体反応を全反射型蛍光顕微鏡法 (Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy: TIRFM) を用いてシグナル感度よく観察することが可能となってきた。本手法の最大の特徴は，蛍光観察の際に励起光源として，屈折率の異なる 2 物質界面での光の全反射に伴い発生するエバネッセント波を用いる点にある。エバネッセント波は全反射界面から数十〜数百 nm 程度の領域に僅かに染み出す光である。高開口数対物レンズを用いて蛍光試料とスライドガラスの界面でエバネッセント波を発生させることで，試料の極一部即ち細胞膜近傍に限定した高 SN 比の蛍光観察が可能となる。しかしながら，これまでの TIRFM は対物レンズを通してエバネッセンス波を作り出すために細胞膜近傍の高倍率観察に限られており，焦点距離を変えることなく同時に細胞膜近傍より深い核周辺の情報は得ることが出来なかった。そこで，我々はこの点を解決するため，スライドグラス型オープンチャンバーを用いた低倍率対物レンズプリズム式 TIRFM を開発することを試みた。多数の細胞の酵素やタンパク輸送など，タンパク局在変化の細胞内と細胞膜との現象を同時観察することにより蛋白質輸送メカニズムや蛋白質の局在変化の多角的検討が可能となった。

2. 脳神経科学・精神医学の主要ツールとしての遺伝子改変マウスの表現型解析

2005 年 6 月 30 日－7 月 1 日

代表・世話人：宮川剛（京都大学医学研究科　先端領域融合医学研究機構）
所内対応者：池中一裕（分子神経生理部門）

（1）マウスリエゾンについて
饗場篤（神戸大学大学院医学系研究科　分子細胞生物学講座　細胞生物学分野）

（2）国際的な動向・背景と提案
宮川剛（京都大学医学研究科　先端領域融合医学研究機構）

（3）ENU 誘発大規模マウス突然変異体開発プロジェクト：ラージスケールプロジェクトの利点と問題点
若菜 茂晴（理化学研究所ゲノム科学総合研究センター　ゲノム機能情報研究グループ）

（4）行動学的スクリーニングによって見い出された，セプチン欠損マウスにおける
線条体ドパミンニューロンの異常
木下専（京都大学大学院医学研究科　先端領域融合医学研究機構）

（5）エピジェネティクス研究と脳神経科学の接点
石野史敏（東京医科歯科大学　難治疾患研究所　エピジェネックス分野）

（6）スパインの異常から精神行動異常へ
内匠透（（財）大阪バイオサイエンス研究所）

（7）drebrin 過剰発現と発現阻害の効果の解析　細胞レベルから個体レベルへ
児島伸彦（群馬大学大学院医学系研究科医科学専攻　高次細胞機能学教室）

（8）ビオプテリンによる脳内ドーパミン・セロトニン生合成の調節機構
一瀬宏（東京工業大学大学院生命理工学研究科　分子生命科学専攻）

（9）DARPP-32 リン酸化を指標としたドーパミン情報伝達系の解析
西昭徳（久留米大学医学部　薬理学講座）

(10) 海馬・扁桃体スライス標本を用いた電気生理学的表現型解析
真鍋俊也（東京大学 医科学研究所　基礎医科学部門　神経ネットワーク分野）

(11) 小脳電気生理解析のプロトコル標準化と問題点
平井宏和（金沢大学　学際科学実験センター　革新脳科学プロジェクト研究領域）

(12) マウスによる精神疾患の研究の問題点
功刀浩（国立精神・神経センター神経研究所　疾病研究第 3 部）

(13) 精神疾患脳バンクの現状と展望
池本桂子（福島県立医科大学神経精神医学講座）

(14) 動物モデルとヒトの研究から精神疾患創薬へ：遺伝子改変マウスへの期待
梶井靖（三菱ウェルファーマ）

【参加者名】

宮川剛（京都大大院），太田達郎（京都大大院），尾藤晴彦（東京大大院），和田圭司（国立精神神経センター），八木健（大阪大大院），若菜茂晴（理研），和田由美子（理研），饗場篤（神戸大大院），木下専（京都大大院），萩原明（京都大大院），萩原明（京都大大院），猪原匠史（日本学術振興会），石野史敏（東京医科歯科大），一瀬宏（東工大大院），浦野扶美（東工大大院），西昭徳（久留米大・医），平井宏和（金沢大），児島伸彦（群馬大大院），真鍋俊也（東大・医科学研），内匠透（大阪バイオサイエンス研究所），功刀浩（国立精神神経センター）池本桂子

（福島県立医大），和田明（福島県立医大），梶井靖（三菱ウェルファーマ），森寿（富山医科薬科大大院），糸原重美（理研），小林和人（福島県立医科大），小林克典（日本医科大），白尾智明（群馬大大院），福永浩司（東北大大院），森口茂樹（東北大大院），深海薫（理研），吉木淳（理研），崎村建司（新潟大），曽良一郎（東北大大院），岩田仲生（藤田保健衛生大・医），高橋正身（北里大・医），片岡正和（信州大），向井秀幸（神戸大），前田拓也（神戸大），林文彦（三菱生命研），井上直子（三菱生命研），上田洋司（三菱生命研），石田靖雅（奈良先端科学技術大），瀬原淳子（京都大），一瀬千穂（藤田保健衛生大），瀬藤光利（統合バイオ），小山隆太（東京大・薬），渡辺肇（基生研），木村透（生理研），笹川快生（群馬大大院），江口淳一（三菱ウェルファーマ）大西哲生（理研），渡辺明子（理研），大羽尚子（理研），桐生幸歩（京都大大院），堀池由浩（生理研），佐治俊幸（生理研），美濃部さやか（三重大），廣江猛（生理研），喜多山篤（生理研），山口良文（統合バイオ），根本知己（生理研），北村明彦（生理研），渡辺英治（基生研），笹岡俊邦（基生研），山肩葉子（生理研）

【概要】

マウスの遺伝子の 99%は人間でホモログが存在する。またマウスでは遺伝子を自在に操作することのできる遺伝子ターゲティング技術の適用が可能であり，被験体を多数使用することが可能であるため，マウスはモデル動物としては極めて有用である。このため，米国・欧州を中心としてマウスのすべての遺伝子をノックアウトするという大規模プロジェクトの構想が進んでいる。22,000 程度あると言われる遺伝子の半分以上は脳で発現しており，脳神経科学・精神医学研究においても，次々と作成される遺伝子改変マウスの活用により研究が加速されると考えられる。本研究会では，脳研究の異なるフィールドの研究者を集め，今後利用可能になるであろう豊富な遺伝子改変マウスというリソースについて，どのような研究戦略・活用の仕方があるのか，各フィールドの研究者がどのように連携していくのが研究の推進に必要であるか，大規模・系統的な連携（例えば，「ラージスケールのマウス表現型解析センター/コンソーシアム」のようなもの）は有用か，ヒト精神・神経疾患研究との融合には何が求められているのかなどについて意見交換を行い，最後に参加者を交えて総合討論を行った。

特に，標準化されたプロトコールに則った遺伝子改変マウスの表現型解析を行うことの必要性と重要性，および問題点について活発な討論が行われ，遺伝子改変マウスの表現型解析手法に対する関心の高さと今後の方向性があらためて見直された有意義な研究会であった。

（1）マウスリエゾンについて

饗場篤（神戸大学大学院医学系研究科　分子細胞生物学講座　細胞生物学分野）

（2）国際的な動向・背景と提案

宮川剛（京都大学医学研究科　先端領域融合医学研究機構）

（3）ENU 誘発大規模マウス突然変異体開発プロジェクト －ラージスケールプロジェクトの利点と問題点－

若菜茂晴（（独）理化学研究所ゲノム科学総合研究センター (GSC) ゲノム機能情報研究グループ）

理研 GSC 動物ゲノム機能情報研究グループでは，個体レベルにおける大量の遺伝子の生物機能を効率的に解明するための ENU 誘発による体系的マウス突然変異の開発（マウス ENU ミュータジェネシスプロジェクト）を 1999 年にスタートした。

まず，網羅的マウス表現型解析のプラットフォームの

確立を目指し, およそ 400 項目に及ぶ検査システムを整備した。これらの項目について基準系統となる C57BL/6J, DBA/2J, C3H/HeJ の表現型解析を実施し，基準値の作成, はずれ値の範囲の選定をおこなった。スクリーニングで見いだされた突然変異マウスにおいては, ハイスループットマッピングシステムの確立, 情報処理や知識ベースを活用する「*in silico* ポジショナルクローニングシステム」を情報チームと共同で開発し原因遺伝子の探索を行った。また，プロジェクトにおけるデータ全般を管理するコンピュータネットワークを整備し，マウス育成管理ソフトウェア（動物搬入，個体カード管理，系統管理），ミュータジェネシス管理ソフトウェア（投与情報，体重測定，G1 個体記録，テスト交配管理），詳細表現型解析のソフトウェアなどの開発を行った。このようにラージスケールプロジェクトにおいては機能解析に直接もしくは間接にかかわる多くの基盤技術の整備が重要であり，さらにアウトプットを有機的に利用してもらうため多くの外部機関との連携が必要である。

（4）行動学的スクリーニングによって見い出された，セプチン欠損マウスにおけるドパミンニューロンの異常

猪原匡史，萩原明，木下専（京都大学大学院医学研究科先端領域融合医学研究機構生化学・細胞生物学グループ）

セプチンは酵母からヒトまで保存された細胞骨格系 GTPase ファミリーであり，細胞分裂に必須である。マウスのセプチン遺伝子ファミリー*Sept1-14* の全てが脳において固有の時間的・空間的パターンで発現する。細胞膜近傍の構造維持，開口放出，拡散障壁として膜蛋白の局在化などに関与するセプチン細胞骨格が破綻すると神経回路構築や高次脳機能にどのような異常が起こるだろうか？　細胞分裂への干渉を避けつつこの問いに答えるため，postnatal brain 特異的に発現する *Sept4* 遺伝子を破壊した。*Sept4* 欠損マウスの Bergmann glia の構造はほぼ正常に保たれるが，小脳皮質構築異常と運動学習障害を認めた。

Sept4 は脳の他の領域でも発現するため, 小脳以外の異常を幅広く検索する必要がある。そこで宮川研究室の支援を受けて一連の行動学的スクリーニングを行ったところ，Prepulse Inhibition のパラダイムにおいて特異的に増強が見られた。PPI の中枢の 1 つである側坐核を組織化学的に検索すると，腹側被蓋野 A10 に由来するドパミン神経終末の低形成が認められた。また，野生型マウスに D1/D2 受容体作動薬を低濃度投与して前シナプス終末からのドパミン放出を抑制すると PPI の増強が再現された。以上から，Sept4 の欠損による前シナプス終末の構造異常ないしシナプス小胞放出機構の機能障害が示唆された。

（5）エピジェネティクス研究と脳神経科学の接点

石野史敏（東京医科歯科大学　難治疾患研究所　エピジェネックス分野）

インプリンティング遺伝子は，染色体の十カ所程度のところにクラスターを成して存在しており，このような領域が片親性 2 倍体になると個体発生，成長，行動等，様々な異常が見られることが知られています。このような表現型は，インプリンティング遺伝子クラスターに存在するある特定の遺伝子の発現欠失（または過剰発現）によることもありますし，複数の遺伝子の発現欠失および過剰発現が合わさった複合的な影響を見ていることもあります。ヒトにおいても相同領域では同様な機序でゲノムインプリンティング型遺伝病が発症するため，マウスに見られる表現型は，実際のヒトの発症モデルとして有効です。

私達は以前，父親性発現遺伝子である *Peg1*/*Mest* および *Peg3* のノックアウトマウスの解析から, この変異を父

親由来で持つ雌が子育てをしないという哺育行動異常を観察しました。しかし，このような研究をさらに進めようとした場合，そもそも哺乳動物の生殖の基本である妊娠，出産，子育てという一連の生命現象の基本的な理解が進んでいないことに気が付きます。私たちは，この哺乳類特異的な現象・行動を司る遺伝子群に興味を持っていますが，その解析のためにはこれらの現象・行動についての本格的な研究体制と歩調を合わせる必要があると考えています。

（6）スパインの異常から精神行動異常へ

内匠透 （（財）大阪バイオサイエンス研究所）

統合失調症の薬理学的モデルマウスの網羅的解析により「精神疾患はスパインの異常である」という仮説をえた。Reverse genetics アプローチとして，候補遺伝子の一つである RNA 結合蛋白 TLS の細胞生物学的解析を行った結果，TLS は，成熟期の海馬錐体神経細胞の細胞体のみならず樹状突起に局在していた。TLS は微小管のみならずアクチンフィラメントを介して樹状突起に移行する。成熟期の海馬錐体神経細胞において，TLS は mGluR5 の活性化により興奮性後シナプスのスパインに移行し，樹状突起の RNA 量が増加する。これらの in vitro 研究に一致して，TLS 欠損の海馬錐体神経細胞には異常なスパインの形態及びスパイン密度の低下が見られた。TLS ノックアウトマウスは，残念ながら生後まもなく死亡するが，そのコンディショナルノックアウトマウスの解析には，幅広い行動解析が必要となってくる。

（7）drebrin 発現過剰および発現阻害の効果・細胞レベルから個体レベルへ

児島伸彦，白尾智明（群馬大学大学院医学系研究科医科学専攻　高次細胞機能学教室）

スパインは樹状突起上の興奮性シナプス後部の特化した構造である。近年スパインの形態はダイナミックに変化している事がわかってきた。この変化の制御にはアクチン細胞骨格系が関係しているがその詳細な分子機構や機能的意義についてはまだあまり知られていない。神経特異的な drebrin アイソフォーム (drebrin A) は樹状突起に存在し，シナプス部ではシナプス後部に局在している。drebrin A を神経細胞に過剰発現させると長い異形スパインが増える。また，逆に drebrin A の発現量をアンチセンス RNA によって減少させるとスパインの形態形成が抑制される。これら初代培養細胞系を使った研究から drebrin A の発現量の増減はスパインの形態形成に深く関わっている事がわかる。

われわれは drebrin A の発現量を増減させた効果を個体レベルで調べるために，トランスジェニックマウスとノックアウトマウスを作成した。現在これらのマウスの表現型を多角的に解析する研究を開始している。現時点で drebrin A の過剰発現あるいは欠失はシナプス可塑性や学習記憶に影響するとの preliminary な研究データを得ている。

（8）ビオプテリンによる脳内ドーパミン・セロトニンの調節機構

一瀬宏 （東京工業大学大学院生命理工学研究科）

ドーパミン･ノルアドレナリン・セロトニンなどのモノアミン神経伝達物質は，情動，運動，睡眠，記憶などの脳の高次機能に深く関わっていることが知られている。これらのモノアミン化合物は前駆体アミノ酸の芳香

環の水酸化と，引き続いて起こる脱炭酸反応により生合成される。テトラヒドロビオプテリン (BH4) は，ドーパミン･ノルアドレナリンの生合成を司るチロシン水酸化酵素 (TH)，および，セロトニン･メラトニンの生合成を司るトリプトファン水酸化酵素 (TPH) の補酵素としてこれらのモノアミン神経伝達物質の合成に関与している。

我々は，BH4 生合成第 2 段階に働くピルボイルテトラヒドロプテリン合成酵素 (PTS) をノックアウトすることにより BH4 欠乏マウスを作成した。PTS 欠損マウスは生後まもなく全身性のモノアミン欠乏（おそらく交感神経系の機能不全）により死亡した。新生児マウスの生化学的解析を行ったところ，BH4 欠乏から予測されるドーパミン･セロトニンの低下ばかりでなく，TH 活性・タンパク質量が野生型に比べて 10%以下に低下していることが判明した。また，PTS 欠損マウスに BH4 を腹腔内から投与すると，脳内セロトニン量は投与後 1 時間で野生型の約 70%にまで回復したが，脳内ドーパミン量は vehicle 投与群に比べてわずかに増加したのみであった。これらの結果は，BH4 欠乏や BH4 の量的変動に対する応答性が，ドーパミン系とセロトニン系とで大きく異なっていること，BH4 が脳高次機能の調節に重要であることを示唆した。

（9）DARPP-32リン酸化を指標としたドーパミン情報伝達系の解析

西昭徳（久留米大学　医学部　薬理学講座）

線条体の medium spiny neuron には，ドーパミンの効率的情報伝達に必須なリン酸化蛋白 DARPP-32 (dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein, Mr 32 kDa) が選択的に発現している。DARPP-32 リン酸化調節に関わるプロテインキナーゼ，プロテインホスファターゼは様々な神経伝達物質受容体と共役した活性調節を受けており，多くの神経伝達物質作用は DARPP-32 リン酸化レベルの変化として反映される。このため DARPP-32 は線条体でのシグナル統合機構および細胞内情報伝達系の解析モデルとして極めて優れている。

DARPP-32 リン酸化を指標として，マウス線条体スライスでのニコチン作用，グルタミン酸作用を解析した。ニコチン作用の解析では，(1) 高濃度ニコチン (100 μM) はドーパミン D1 シグナリングを増強すること，(2) 低濃度ニコチン (1 μM) はドーパミン D2 シグナリグを増強することを明らかにした。また，グルタミン酸作用の解析では，グルタミン酸は NMDA 受容体，AMPA 受容体，代謝型グルタミン酸受容体を介して複数の情報伝達系を活性化し，ドーパミン/DARPP-32 情報伝達系と複雑な相互作用を示すことを明らかにした。この研究をさらに発展し，神経細胞間の機能的ネットワークおよび細胞内情報伝達系を含む線条体領域ドーパミン情報伝達マップの作製を目指している。このドーパミン情報伝達マップを利用することにより，ドーパミン作用の異常が示唆される病態モデルや遺伝子改変マウスでのドーパミン情報伝達系の解析を効率的に行うことができる。

（10）海馬・扁桃体スライス標本を用いた電気生理学的表現型解析

真鍋俊也（東京大学 医科学研究所 基礎医科学部門 神経ネットワーク分野）

遺伝子改変マウスの最大の利点は，分子レベルから，細胞･ネットワークレベル，さらには個体レベルでの解析が同時に進められることであろう。これまでの神経生理学的解析において，in vitro では，ニューロンの特性や，イオンチャネル，受容体，シナプス伝達やその可塑性などの分子機構が詳しく調べられ，多くの重要な知見が得られている。一方，in vivo での解析では，高次脳機能の責任脳部位の同定や，薬理学的手法による高次脳機能における受容体の役割の解明などが行われてきたが，in vitro と in vivo の成果をつなげることがかなり難しかった。しかし，遺伝子改変マウスの導入により，そのギャップの一部が埋められつつある。これまでも脳スライス標本を用いた解析は盛

んに行われてきたが，遺伝子改変マウスの登場により，その成果を個体レベルでの行動実験の結果と比較することができるようになり，シナプスレベルでの異常が，個体でどのように反映されるかを直接的に検討できるようになった点は，きわめて大きな進歩であると言える。

私たちの最近の研究成果を例にして，海馬および扁桃体のスライス標本を用いた解析を中心にした遺伝子改変マウスの総合的解析について説明し，脳スライス標本の有用性や解析法の実際について述べた。具体的には，NMDA受容体の NR2B (GluRε2) サブユニットのチロシン残基に点変異を導入したノックインマウスにおける扁桃体シナプス伝達の異常と扁桃体が関与する情動異常の解析結果について詳しく説明した。

（11）小脳電気生理解析のプロトコル標準化と問題点

平井宏和（金沢大学学際科学実験センター革新脳科学研究領域/PRESTO，JST）

小脳機能に障害がある場合，体幹の振るえや歩行異常などの運動失調として表れるため，目で見ただけで異常があることを見つけられることが多い。本発表ではまず，小脳機能異常が疑われるマウスを解析する場合に我々が標準的に行っているプロトコルを，実際の解析例を示しながら紹介した。

次にコアラボとして小脳機能解析を行う場合に起こり得る問題について，現時点で考えられることを述べた。小脳の電気生理学解析のプロトコルを一通り行うにはそのマウスに見られる運動障害が本当に小脳異常に起因しているのかを明らかにしてからでなければ効率が悪い。また運動障害が小脳性であった場合でも，形態的に小脳に大きな障害があればわざわざ詳細な電気生理解析が必要であるのかも疑問になってくる。このようなことから，理想的には小脳電気生理解析の前に運動障害の原因がどこにあるのかを解析するコアラボが必要で，小脳障害がある場合でも，どの程度の運動失調があり，どの程度の小脳の形態異常であれば電気生理解析を行う価値があるのかについて基準を作る必要があると思われる。

（12）マウスによる精神疾患の研究の問題点

功刀浩（国立精神・神経センター神経研究所　疾病研究第三部）

多くの精神疾患は，複数のリスク遺伝子と環境要因との相加作用/相互作用によって発症すると想定されている。近年，精神疾患の遺伝子解析研究によって，種々のリスク遺伝子が報告されており，そうした遺伝子がどのようなメカニズムで病態発生に関与するか，遺伝子改変マウスを用いた解析結果が蓄積されつつある。

行動実験によって，マウスがヒトの精神疾患の症状を呈しているかどうかをみることができるかどうかという疑問は常につきまとう。例えば，統合失調症は幻覚，妄想などの精神病症状（陽性症状）に加えて，社会的機能の低下や社会的行動の異常（自閉），感情の鈍磨などの陰性症状，認知障害などが生じるが，そうした症状をどのような行動解析方法でみていくか，今後さらなる発展が必要である。例えば，プレパルス抑制テストの異常は，マウスにおいて統合失調症様症状の指標として最もよく使われるが，われわれのヒトにおける検討では，テスト条件の設定が難しいことや，テスト所見は統合失調症の症状のうち陽性症状と相関するものの，陰性症状とは相関しない，などの点が明らかになった。行動解析法を洗練させることは，マウスによる精神疾患の解明を行う上で鍵となろう。

（13）精神疾患脳バンクの現状と展望

池本桂子[1]，和田明[1]，國井泰人[2]，楊巧会[1]，丹羽真一[1]
（[1]福島県立医大神経精神医学講座，[2]同病理学講座）

精神疾患の研究を発展させるためには死後脳研究は不可欠である。死後脳バンクの設立においては，厳しい倫理的基準をクリアすることに加え，当事者・家族が積極的に参加するという発想が大切であると考えられる。福島県立医大神経精神医学講座では，1997 年から福島県立医大倫理委員会の承認を得て，精神疾患死後脳研究運営委員会を発足させ，統合失調症を中心とした本邦初の系統的精神疾患死後脳バンクを構築してきた。福島脳バンクの特徴としては，当事者・家族の積極的参画による運営，任意団体（つばめ会）による支援，インフォームド・コンセントによる当事者・健常者の生前登録，開かれた研究活動といった事柄が挙げられる。病理解剖は原則として，大学病理部において行なう。現時点では，剖検例は 24 例であり，左半側を凍結保存，右半側をホルマリン固定している。今後の課題としては，日本国内，さらにはアジア地域へ向けて，脳バンクのネットワークを構築することや，学内外の研究機関との共同研究の推進，当バンクの保存脳を用いて研究の推進に加え，不足しがちな健常脳を病理部の協力を得て確保すること，事務員，技術員，研究員などのスタッフの増員が挙げられる。

（14）動物モデルとヒトの研究から精神疾患創薬へ：遺伝子改変マウスへの期待

梶井　靖（三菱ウェルファーマ　創薬第一研究所）

精神疾患創薬研究において，病因論の展開と治療薬候補物質の高確度臨床予測を実現する動物モデルの確立は大きな課題である。近年様々な遺伝子改変動物の表現型解析が実施され，情動や作業記憶の異常など，精神疾患障害との関連が示唆される行動特性が報告されている。こうした遺伝子改変動物の行動特性を生理学的，薬理学的なデータと共に集積し，臨床症状の多様なスペクトルにより良く対応した動物モデルパネルを実現することができれば，従来とは異なる新しい切り口で精神疾患の病因論を展開し，創薬までつなげていくことも期待される。我々は，将来的にパネルを活用する方法論の 1 つとして，データベース化された GeneChip データを用いて遺伝子改変動物の特徴とヒトのデータを対応付ける試みを行っている。長期持続的な行動変化に伴う脳内遺伝子発現レベルの変動は，小さな変動幅で多くの遺伝子が関与するという特徴を持つが，不安行動とその不安行動を指標とした場合の fluoxetin 応答性に特徴を持つ遺伝子改変マウスの海馬遺伝子発現を Affymetrix 社の GeneChip システムを用いて解析した結果，遺伝子操作と薬物処理という 2 つのパラメータを特徴付けるマウス・プローブセットが見出された。プローブセットは 38 ないし 149 個のプローブ群から構成されており，これらを対応するヒト・プローブセットに変換し，データベースシステムに登録されている 166 枚のヒト海馬 GeneChip データを解析した結果，生前の病歴や服薬履歴に特徴を持つクラスターの形成が確認された。

3. 神経科学の新しい解析法とその応用

2005 年 9 月 15 日－9 月 17 日

代表・世話人：鹿川　哲史（熊本大学　発生医学研究センター）
所内対応者：池中　一裕（生理学研究所　分子神経生理部門）

（1）神経幹細胞単層培養法を用いた細胞外来性因子によるシグナル伝達研究

清水　健史（熊本大学　発生医学研究センター　転写制御分野）

（2）電子顕微鏡を用いたシナプス関連たんぱく質の二次元的，三次元的分布観察

萩原　明（京都大学大学院医学研究科先端領域融合医学研究機構）

（3）脱髄疾患治療法開発へ向けた髄鞘形成機構の解明

中原　仁（慶応義塾大学医学部解剖学教室）

（4）ウイルス様ナノ分子を用いた遺伝子送達技術

山田　真久（理化学研究所脳科学総合研究センター山田研究ユニット）

（5）アストロサイト機能不全マウスの作出と解析

田中　謙二（生理学研究所　分子神経生理部門）

（6）生体分子イメージングによる病態解明と創薬の飛躍的推進

渡辺　恭良（大阪市立大学大学院医学研究科システム神経科学）

（7）背側由来 Netrin-1 による一次求心性繊維の軸索投射制御

渡辺　啓介（生理学研究所　分子神経生理部門）

（8）音源定位における両耳間同時検出機構の解析

久場　博司（京都大学大学院医学研究科　神経生物）

（9）加齢により低下する海馬錐体細胞の膜流動性

榊原　学（東海大学開発工学部生物工学科）

(10) 嗅覚研究における多角的アプローチ：ものとりから機能解析まで

東原　和成（東京大学大学院新領域創成科学研究科）

(11) 気分安定薬は，神経幹細胞の Notch シグナルを介して生体脳の神経新生を亢進させる

東　幹人（生理学研究所　分子神経生理部門）

(12) 培養切片系と分散培養系の工夫による海馬歯状回顆粒細胞の研究

小山　隆太（東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室）

(13) Krypton laser-Yag laser system による脳梗塞 － 再灌流モデルマウスの作製

和気　弘明（生理学研究所　恒常機能発達機構研究部門）

(14) 開口分泌の時空的調節機構へのアプローチ

熊倉　鴻之助（上智大学生命科学研究所）

(15) ベンゾジゼピンによる大脳皮質第Ⅴ層の GABA 作動性シナプスにおけるα7 ニコチン受容体の insertion とそのメカニズム

山本　純偉（浜松医科大学生理学第一講座）

(16) 自発性 Ca^{2+}transient の消化が小脳顆粒細胞の移動の終了を惹起する

熊田　竜郎（浜松医科大学生理学第一講座）

(17) TARPs (transmembrane AMPA receptor regulatory proteins) の多様性

板倉　誠（北里大学医学部）

【参加者名】

清水健史（熊本大），萩原明（京都大），東原和成（東京大大院），渡辺恭良（大阪市大大院・医），福田敦夫（浜松医大・医），熊田達郎（浜松医大・医），山本純偉（浜松医大・医），寺川進（浜松医大・医），熊倉鴻之助（上智大・理工），小山隆太（東京大大院・薬），高橋正身（北里大・医），板倉誠（北里大・医），榊原学（東海大・開発工），久場博司（京都大大院・医），中原仁（慶応大大院・医），東田陽博（金沢大大院・医），山田真久（理化研），中嶋一博（京都大大院・理），犬束歩（京都大大院・理），鍋倉淳一（生理研），和気弘明（生理研），北村明彦（生理研），牧野佳用子（生理研），田中淳一（生理研），檜山武史（基生研），米原圭祐（基生研），鈴木亮子（基生研），石原俊明（基生研），藤川顕寛（基生研），早坂孝宏（統合バイオ），岸本拓哉（生理研），井上剛（生理研），西巻拓也（生理研），鯨井加代子（生理研）田中嘉人（住友化学），酒井朋子（生理研），渡辺美穂（生理研），堀部尚子（生理研），深沢有吾（生理研）

【概要】

神経科学は，脳神経系が高次機能を実現するメカニズムを理解するために動物個体・細胞・分子レベルの研究が統合された研究領域である。近年の各レベルにおける技術開発の進歩は凄まじく，それぞれのレベルにおいて目覚ましい研究成果を上げる一方で，急速な研究技術革新は，領域の細分化や専門化に拍車をかけ，神経科学の基たる複合領域研究を一研究者や一研究室単位で実現することが困難となってきている。現在から将来的視野においては，各分野のエキスパートによる共同研究がその中核となる。そして，専門分野を異とする研究者が出会い，互いの技術や知識を交換する「場」が切望されている。本研究会は，異なる解析レベルやシステムを専門とする研究者が集い，互いの技術や知識を交換し，統合的な神経科学の研究発展を図る「場」となった。特に，各研究発表に対し十分な討論時間を用意することができたため，今後の神経科学研究を担う若手研究者による発表に対し経験豊富な研究者を中心として活発な質問が出され積極的な意見交換がなされた。各発表は最新技術の紹介に留まらず，非常に高い成果が紹介され，神経科学研究の最前線の情報を研究者間で共有するに非常に有意義な研究会となった。

（1）神経幹細胞単層培養法を用いた細胞外来性因子によるシグナル伝達研究

清水　健史（熊本大学発生医学研究センター転写制御分野）

培養神経幹細胞や神経前駆細胞は，Wnt や FGF などの細胞増殖シグナルに応答して盛んに細胞分裂するが，培養液から増殖シグナルを除去すると分裂を停止し，ニューロンなどに分化することが知られている。すなわち，FGF や Wnt シグナルが細胞増殖促進と同時に細胞の未分化性維持にも寄与していることが予想された。そこで，我々は神経幹細胞/神経前駆細胞を in vitro で維持，拡張する方法として neurosphere 形成法と神経上皮細胞単層培養法を採用し，それぞれの培養法の長所を組み合わせてシグナル伝達の分子機構を解析した。まず，神経上皮細胞単層培養系に FGF2 を添加すると PI_3-kinase-Akt 経路を介して，Wnt シグナルの下流標的として知られている GSK3βの活性が抑制されることを見出した。その結果，神経上皮細胞の核内にβ-catenin が蓄積し，細胞周期制御因子である cyclin D1 の発現が促進され，細胞増殖が促進されることが分かった。我々はさらに，ニューロン分化を抑制し幹細胞の未分化性維持に関与する Notch シグナルが FGF2 シグナルとクロストークすることも見出した。この未分化性維持能の解析には neurosphere 形成法も用いたので合わせて報告する。

（2）電子顕微鏡を用いたシナプス関連たんぱく質の二次元的，三次元的分布観察

萩原　明（京都大学大学院医学研究科先端領域融合医学研究機構）

シナプス周辺に分布するたんぱく質を透過型電子顕微鏡で観察する方法として，2 種類の方法を紹介する。

凍結割断レプリカ免疫標識法（SDS-FRL 法）は，細胞膜面のレプリカ像を観察する従来の方法に免疫標識を応用することにより，レプリカ膜上で物質の同定や分布状態を二次元的に観察できるようにした方法である (Fujimoto, K; 1995)。この方法ではたんぱく質が密に存在する場所でも受容体などが高感度に観察できたことから，シナプス前終末 AZ に存在する小胞分泌関連たんぱく質の分布解析を行った (Hagiwara A; 2005)。

一方，一般的な超薄切片を用いた免疫標識法 (preembedding 法）で行う三次元再構築は，膜面だけでなく細胞内の構成要素と合わせて分布を観察できるという点で非常に有効な手段である。この三次元再構築によって，小脳 Bergmann glia に発現する細胞骨格系たんぱく質 Sept4 がシナプス周辺に分布していることがわかってきた。

（3）脱髄疾患治療法開発へ向けた髄鞘形成機構の解明

中原　仁（慶応義塾大学医学部解剖学教室）

昨今の研究成果からこれまで想像していた以上に髄鞘の障害が関係する疾患が多いことが分かってきている。多発性硬化症のみならず，統合失調症や躁鬱病等の精神疾患までもに髄鞘障害が指摘されるようになっている。

髄鞘の主たる役割は軸索の伝導において跳躍伝導を可能にする絶縁体としての機能にあると考えられ，従って原因の如何を問わず，脱髄によって引き起こされた障害は，軸索がある程度健全に維持されている前提であれば，髄鞘再生によって治癒しうると期待される。

その最も非侵襲的なアプローチとして考えられるのは，脱髄病変にも残存し得ると考えられる内因性オリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC) の外来刺激による活性化を介した髄鞘再生である。これを可能にする為には髄鞘形成（再生）機構を解明し，その応用を目指す必要がある。我々らは 1998 年より上記に関する研究を開始し，2003 年に OPC の分化誘導機構を発見し報告した。本研究発表においては，それらを概観すると共に，更に多発性硬化症の死後脳の解析結果を報告し今後の展望について議論させて頂きたい。

（4）ウイルス様ナノ分子を用いた遺伝子送達技術

山田　真久（理化学研究所脳科学総合研究センター山田ユニット）

ウイルスベクターを用いた遺伝子送達技術は，毒性などが指摘され，より安全性の高い遺伝子送達技術が求められている。この様な従来の遺伝子送達技術の問題点を乗り越える技術として，我々が開発を行っているウイルス様ナノ粒子は，遺伝子とリポソームの複合体を人工脂質 2 重膜で包み，さらにその表面に膜透過性ペプチド Octaarginine を修飾した人工粒子である。現時点で，我々は，アデノウイルスより低い毒性を示すこと，粒子内に挿入した遺伝子をマウス皮膚に塗抹することにより体毛で遺伝子発現させることに成功している。この技術は単に皮膚のみでなく多様な組織への遺伝子送達に役立つと考えている。現在，我々は神経損傷時に神経再生を促すグリア瘢痕形成阻害薬の開発を検討している。

（5）アストロサイト機能不全マウスの作出と解析

田中　謙二（生理学研究所　分子神経生理部門）

アストロサイトは，神経伝達の調節，エネルギー代謝の調節，脳血管関門の形成などの脳恒常性維持に重要な役割を担う。このように多岐にわたる機能を有するアストロサイトであるが，その異常によってどのような高次脳機能障害が起こるのか殆ど分かっていない。発表者はアレキサンダー病というアストロサイト細胞内に凝集体を形成するアストロサイト特異的疾患の原因遺伝子をマウスアストロサイトで発現するマウスを作出した。作出したモデルマウスは，Cre マウスとの交配によって脳内の関心領域のみでアレキサンダー病の病理を再現出来る。このマウスの病理・表現型を解析することによって，帰納的にアストロサイトの機能を明らかにすることを試みた。モデルマウスでは，カイニン酸投与に対するけいれん感受性が有意に高いこと，この結果は海馬を含む背側終脳の凝集体の有無に依存することが明らかになった。

（6）生体分子イメージングによる病態解明と創薬の飛躍的推進

渡辺　恭良（大阪市立大学大学院医学研究科システム神経科学）

ポジトロンエミッショントモグラフィー (PET)などの生体分子イメージングの手法を用いて，病態の分子医学的把握とその情報を有効に用いた薬効評価，また，血中のみならず標的細胞・分子への薬物動態を捉えることができる。“Seeing is believing”，“ヒトでの創薬”という当たり前のことを淡々と成していくことは，還元的手法に重きを置いてきた 20 世紀後半からのライフサイエンスの流れを「真のライフサイエンス」へと孵化させる必然的過程である。先進的な分子イメージングの拠点構想，研究体制，世界的動向について，研究の実例とともに解説したい。

（7）背側由来 Netrin-1による一次求心性線維の軸索投射制御

渡辺　啓介[1,2]，玉巻　伸章[3,4]，古田　貴寛[4]，Susan L. Ackerman[5]，池中一裕[1,2]，小野　勝彦[1,2]
（[1]生理研・分子神経生理，[2]総研大・生命科学，[3]熊本大院・医薬・脳回路構造学，
[4]京都大院・医・高次脳形態学，[5]The Jackson Lab., Bar Harbor, ME, USA）

背根神経節(DRG)に存在する神経細胞は軸索を皮膚などの末梢組織（末梢枝）と脊髄（中枢枝）両方に伸ばし，中枢へ感覚情報を中継する。発生初期において，DRG axon は脊髄侵入後，まず脊髄背側部に後索を形成する。その後，軸索側枝を外套層の標的細胞に伸ばす。この 2 つの過程の間には“waiting period”と呼ばれる時差があり，緻密な神経回路網の形成の一端を担っていると考えられている。しかしながら，waiting period 形成の分子機構についての知見は乏しい。

Netrin-1 は神経管腹側由来の軸索誘導分子である。我々はこの分子に注目し，背側部で一過性に発現する Netrin-1 が DRG axon に対する waiting period をつくり出し，その軸索投射に深く関わることを明らかにした。本研究会では，Netrin-1 の機能の新たな一面について紹介したい。

（8）音源定位における両耳間同時検出機構の解析

久場　博司（京都大学大学院医学研究科神経生物）

層状核 (NL) 神経細胞は両耳からのシナプス入力の同時検出器として働くことにより音源定位に関わる。今回，この NL 細胞の同時検出機構を，電気生理学的及び組織学的手法を用いて解析した。NL 細胞の同時検出精度は非常に高く，この高い精度は，低閾値で活性化する DTX 感受性 K 電流が EPSP の時間経過を加速することにより実現された。一方，NL 細胞は，特徴周波数 (CF) に応じてその機能と形態が異なる。特に，同時検出の精度は mid-high CF 領域の細胞で高く，これはこの領域の細胞が K チャネル，特に Kv1.2 を多く発現することによった。さらに，mid-high CF 細胞では，軸索起始部がミエリンで覆われ，かつ細胞体は受動的であった。活動電位の発生部位が細胞体から電気的に離れていることは，高頻度の入力を受ける mid-high CF 細胞が，正確に情報を統合，出力する上で重要であると考えられた。

（9）海馬錐体細胞の膜流動性は加齢により低下する

榊原　学（東海大学開発工学部生物工学科）

加齢に伴って，海馬神経細胞の受容体が減少し，細胞膜の粘性が増加するとの報告がある。この脳神経細胞の膜における変化は，老化に伴う学習・記憶能力の減退と関係付けられることが多い。本報告では若齢動物と老齢動物の海馬神経細胞の膜流動性を共焦点顕微鏡システムで蛍光退色回復法により検討した。海馬スライス標本を DiI－C で染色し，錐体細胞細胞体の一部を直径 1.2μm の小光点で退色させ，その後の蛍光強度の回復過程を解析した。回復過程は，1 次の拡散過程で近似され，回復率，拡散係数，輸送係数，時定数などで特徴づけられる。加齢動物の海馬錐体細胞の膜流動性は，時定数において若齢動物に比較して有意に大きく，一方，拡散係数，回復率はいずれも有意に小さかった。これらの結果は，これまでの報告を裏付けるもので，加齢に伴って膜の流動性が低下することを示すとともに，水迷路試験で評価される動物の空間認知機能の減弱と平行している。

（10）嗅覚研究における多角的アプローチ：ものとりから機能解析まで

東原　和成（東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻分子認識化学分野）

網羅的解析が容易にできるゲノム時代において，現象を見据えた古典的王道的戦略，例えば，活性天然物同定から受容体遺伝子決定と機能解析というアプローチは労力とリスク性ゆえに避けられがちだ。我々は，嗅覚受容体の機能解析を，単一匂い応答嗅神経細胞からの機能的クローニングという逆転の発想で成功させた。また，昆虫の性フェロモンの機能解析には，分子生物学的手法と電気生理学的手法を融合させて成功した。最近は，マウスの性フェロモンを探索・精製していく課程で，ゲノムに埋もれていた分泌タンパク質をコードする新規遺伝子ファミリーを発見した。これらすべての成果は，網羅的スクリーニングでは得られなく，様々な手法を融合させて現象と機能を見据えた多角的アプローチではじめて可能となったものである。本セミナーでは，匂いとフェロモンを感知する仕組みに迫るために我々のとった戦略の背景・意義を概説し，ポストゲノム時代における網羅的機能解析戦略に対峙する。

（11）気分安定薬は，神経幹細胞の Notch シグナルを介して成体脳の神経新生を亢進させる。

東　幹人，池中　一裕，等　誠司（総合研究大学院大学，生理学研究所分子神経生理部門）

神経幹細胞は発生期にだけでなく，成体脳にも限られた領域に存在し続け，生涯を通して神経新生を行っている。また成体脳に存在する神経幹細胞の数は正確に制御されている。しかし近年，ストレスなどの精神的要因によって成体脳で維持されている神経幹細胞の数が変化する事が示唆され始めてきている。

我々は精神疾患の一つである双極性障害の治療に用いられている気分安定薬を用いて，気分安定薬の作用効果と神経幹細胞が成体脳で維持されているメカニズムを明らかにする事を試みている。

双極性障害は，躁状態とうつ状態を繰り返す精神疾患である。治療に用いられる気分安定薬としてはリチウムなどがある。これまでにリチウムの作用点を調べている研究は多く成されてきたが，気分安定薬としての共通のメカニズムはほとんど分かっていない。

In vivo と In vitro での神経幹細胞と気分安定薬を用いた実験結果から，我々は成体脳において気分安定薬の共通の薬理作用が，神経幹細胞の Notch シグナルを活性化させ神経幹細胞の自己複製能を亢進することにある事を明らかとした。

（12）培養切片系と分散培養系の工夫による海馬歯状回顆粒細胞の研究

小山　隆太（東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室 博士課程 3 年）

海馬歯状回顆粒細胞は，嗅内野皮質からの入力を海馬内へと伝達する。同細胞は発火閾値が高く，バースト状発火も維持され難い為，歯状回は興奮性入力を最初に制御する関門となる。しかし，海馬を発作焦点とする側頭葉てんかん患者の歯状回では顆粒細胞の軸索である苔状繊維が異常発芽し，反回性興奮回路を再編成する為にこのシステムが乱され，発作の悪化に繋がる。

この異常発芽機構解明の為に，海馬切片の共培養系及び，切片上に顆粒細胞を分散培養する系を発案して，まず正常時の苔状繊維の軸索誘導機構を検討した。その結果，異常発芽には歯状回門における何らかの因子の急峻な上昇が必要であるとの仮説に至り，側頭葉てんかんにおいて同部位で発現が上昇する BDNF に着目した。現在までに，同分子を含有した微小ビーズを海馬切片上に配置した培養系及び，顆粒細胞の分散培養系を用いて，BDNF が異常発芽を誘起し得る事を示した。また，現在は培養切片系を利用して，乳幼児期の海馬における細胞新生機構を検証している。

（13）Krypton laser - Yag laser system による脳梗塞－再灌流モデルマウスの作製

和気 弘明[1]，八尾 博史[2]，鍋倉 淳一[1]（[1]生理研恒常機能発達機構研究部門 [2]国立肥前療養所）

光感受性色素であるローズベンガル液に568nmの波長の Kr laser を照射することにより酸化作用を発生させることができる。血液中にローズベンガルを注入し，Kr laser を照射することにより血管内皮細胞に反応性に酸化障害を与え，血小板の凝集を引き起こし，血栓が形成される。さらに形成された血管閉塞部にパルスレーザーである Yag laser を照射することにより，閉塞部の再貫通させることが可能である。

この方法を利用し，マウスでは開頭せずに任意の脳表面の血管を塞栓閉塞することができ，任意の時間後に再灌流させることが可能となった。この技術を利用すると，これまでの脳虚血モデル作成法では作成できなかった，脳虚血後の細胞生存/死の境界領域であるペナンブラ領域の非侵襲的作成が可能となり，各種解析に用いることができる。

（14）開口分泌の時空的調節機構へのアプローチ

熊倉　鴻之助（上智大学生命科学研究科）

神経細胞あるいは内分泌細胞からの開口分泌機構では，分泌部位への顆粒供給，あるいは細胞内形質膜直下の顆粒運動が複数の因子による時空的調節を受けていると思われる。我々は，形質膜直下への分泌顆粒の供給および局在の時空的調節を理解する目的で，クロマフィン細胞を用いて，蛍光標識をした分泌顆粒の細胞内運動のイメージ解析を行っている。細胞内の分泌顆粒の運動は，高速，中速，低速の 3 群に分類でき，静止時の単一細胞あたり，60%は速い速度で，30%は中速で運動し，残りの 10%は低速もしくは停止状態にある。低速もしくは停止顆粒の分布は，脱分極刺激下で 60%に増加する一方，脱分極刺激を取り除くと再び 10〜15%に戻る。一方，脱分極刺激を取り除いた後に，中速で運動する顆粒成分は 50%に増加する。これらの顆粒成分の特徴を解析した結果，我々の実験系で観察している顆粒動態は形質膜から 90〜900 nm の距離範囲の動態であることから，この空間での顆粒供給や動態の時空的調節が開口分泌に至る直前の重要な過程であり，PKC や運動蛋白系による調節の標的の一部であることが示唆された。

（15）ベンゾジアゼピンによる大脳皮質第 V 層の GABA 作動性シナプスにおける α7ニコチン受容体の insertion とそのメカニズム

山本 純偉，福田 敦夫（浜松医科大学　生理学第一講座）

ベンゾジアゼピン (BZP) 系鎮静薬のミダゾラム (MDZ) の presynaptic GABAergic neuron への作用を生後 2 週のラットの脳スライス標本を用いて調べたところ大脳皮質体性感覚野第 V 層の錐体細胞の微小シナプス後電流 (mIPSC) の頻度を増加させることがわかった。他の BZP 系薬物では増加作用がなかったことから，$GABA_A$ 受容体以外を介した機序であることが示唆された。我々は MDZ が GABA 作動性介在ニューロンの presynaptic α7nAChR 受容体を介して mIPSC の頻度を増加させることにより抑制性シナプス伝達を増強していることを明らかにした。さらに，機械的急性単離した錐体細胞を用い光学的に MDZ がシナプスで 7nAChR 受容体の細胞膜表面への insertion を起こし，それには PKC が関与していることを明らかにした。また，この作用は第 V 層に特異的に観察された。

（16）自発性 Ca^{2+} transient の消失が小脳顆粒細胞の移動の終了を惹起する

熊田 竜郎[1,2]，小室 仁[2]，福田 敦夫[1]（[1]浜松医科大学・生理学第一，[2]Dept. of Neurosciences, The Cleveland Clinic）

外顆粒層で最終分裂を終えた小脳顆粒細胞は，皮質層特異的に細胞移動の速度や様式，細胞形態を変化させながら移動し，最終目的地である内顆粒層に到達する。今回，我々はこの皮質層特異的な細胞移動の制御に Ca^{2+} シグナリングが関与する可能性を検討するために，新生児期のマウス小脳スライス標本を用いて，移動中の顆粒細胞のリアルタイム観察と同時に細胞内 Ca^{2+} イメージングを行った。その結果，1) 移動中の顆粒細胞は，各皮質層にある移動経路において特異的な自発性細胞内 Ca^{2+} レベルの変動を示す。2) Ca^{2+} transients の発生頻度は顆粒細胞の移動速度に正に相関する。3) 顆粒細胞が移動を終了する内顆粒層深部では，細胞移動の終了に先行して Ca^{2+} transient の消失が起こる。4) 薬理的に Ca^{2+} シグナリングを変化させることにより細胞移動の停止のタイミングを

変化させることができる，ことが明らかになった。以上の事から，自発性 Ca^{2+} transient が小脳顆粒細胞の移動を制御し，その消失により細胞移動の終了を惹起すること示唆された。

（17）TARPs(transmembrane AMPA receptor regulatory proteins)の多様性

板倉　誠，高橋　正身（北里大学　医学部）

AMPA receptor は中枢神経系において主要な神経伝達物質グルタミン酸の受容体である。近年, stargazin/γ-2 が AMPA receptor のシナプスへの局在化やチャンネル機能制御に重要な働きをしていることが明らかになりつつある。Stargazin/γ-2 には AMPA receptor に結合するファミリー分子(γ-3，γ-4，γ-8)が存在し，これらは TARPs (transmembrane AMPA receptor regulatory proteins)と名づけられている。しかしながら，stargazin/γ-2 以外の TARPs ファミリー分子についてはほとんど研究がなされていない。本発表では海馬に多く発現しているγ-8 と stargazin/γ-2 を比較することによって TARPs ファミリーの局在や機能の多様性を報告する。

4. 心臓血管系におけるイオンチャンネル学の新たな展開

2006 年 1 月 24 日－1 月 25 日

代表・世話人：鷹野　誠（自治医科大学医学部）
所内対応者：岡田　泰伸（生理学研究所）

（1）KCNQ1 遺伝子スプライス異常により QT 延長症候群を発症する分子機序の解明
赤尾　昌治（京都大学大学院医学研究科）

（2）Brugada 症候群関連遺伝子異常 (SCN5A, N406S) の不活性化に対するリドカインの効果
伊藤　英樹（生理学研究所）

（3）HERG チャンネルにおける抗不整脈薬ニフェカラントの結合と facilirtation 効果に関する検討
岩田　美紀（大阪大学大学院医学系研究科）

（4）Na^+/Ca^{2+}交換体と心血管系疾患
岩本　隆宏（福岡大学医学部）

（5）交感神経機能と Ca^{2+}チャンネルβ_3 サブユニット
尾野　恭一（秋田大学医学部）

（6）リゾホスファチジルコリンによる Na^+/Ca^{2+} 交換体 mRNA 量増加作用には低分子量 G タンパク RhoB のゲラニルゲラニル化が関与する
木村　純子（福島県立医科大学医学部）

（7）HCN4 遺伝子の制御領域の解析
倉富　忍（自治医科大学医学部）

（8）心筋 I_{KS} チャネルリン酸化による機能修飾に対する KCNA ファミリーの影響
黒川　洵子（東京医科歯科大学難治疾患研究所）

（9）Na^+/K^+ pump 阻害時における心筋細胞容積変化のイオンメカニズムの解明～包括的心筋細胞モデルによるシュミレーション解析～
竹内　綾子（京都大学大学院医学研究科）

(10) 平滑筋型 ATP 感受性 K^+チャネルにおけるチャネルポア領域の分子薬理学的解析
寺本　憲功（九州大学大学院医学研究院）

(11) KCNE1 ならびに KCNE2 による KCNQ1 チャネルの相互的機能調節
豊田　太（滋賀医科大学医学部）

(12) カルシウムプローブ (G-CaMP) を用いた平滑筋カルシウム動態の解析
中井　淳一　（理化学研究所）

(13) 遺伝性不整脈患者における心臓 Na チャネル病の遺伝子解析
牧山　武（京都大学大学院医学研究科）

(14) 心筋筋小胞体カルシウム ATPase 活性制御と心機能
南沢　享（横浜市立大学大学院医学研究科）

(15) 心筋Ｌ型 Ca チャンネルの活性維持機構
蓑部　悦子（鹿児島大学大学院医歯学総合研究科）

(16) ES 細胞由来心筋細胞を用いた心臓伝導傷害修復の試み
李　鍾國（名古屋大学環境医学研究所）

(17) モルモット心室筋細胞の膜電流に対する新規 NCX 阻害薬 SN-6 の特徴について
渡邊　泰秀（浜松医科大学医学部）

【参加者名】

尾野　恭一（秋田大学医学部），木村　純子（福島県立医科大学医学部），倉富　忍（自治医科大学医学部），鷹野誠（自治医科大学医学部），古川　哲史（東京医科歯科大学難治疾患研究所），黒川　洵子（東京医科歯科大学難治疾患研究所），中井　淳一（理化学研究所），南沢亨（横浜市立大学大学院医学研究科），李　鍾國（名古屋大学環境医学研究所），渡邊　泰秀（浜松医科大学医学部），堀江　稔（滋賀医科大学医学部），伊藤　英樹（生理学研究所），豊田　太（滋賀医科大学医学部），松浦　博（滋賀医科大学医学部），赤尾　昌治（京都大学大学院医学研究科），牧山　武（京都大学大学院医学研究科），松岡　達（京都大学大学院医学研究科），竹内　綾子（京都大学大学院医学研究科），倉智　嘉久（大阪大学大学院医学系研究科），岩田　美紀（大阪大学大学院医学系研究科），寺本　憲功（九州大学大学院医学研究院），朱海雷（九州大学大学院医学研究科），岩本　隆宏（福岡大学医学部），蓑部　悦子（鹿児島大学大学院医歯学総合研究科），韓　冬雲（鹿児島大学大学院医歯学総合研究科），亀山　正樹（鹿児島大学大学院医歯学総合研究科）

（1）KCNQ1遺伝子スプライス異常により QT 延長症候群を発症する分子機序の解明

赤尾　昌治，辻　啓子，牧山　武，大野　聖子，土井　孝浩，吉田　秀忠，北　徹
（京都大学大学院医学研究科循環器内科）
石井　孝広（京都大学大学院医学研究科神経生物学）
堀江　稔（滋賀医科大学呼吸循環器内科）

【目的】*KCNQ1* 遺伝子は心筋細胞において遅延整流性 K チャネルをコードし，その遺伝子異常は QT 延長症候群(LQTS)の原因となる。我々は，*KCNQ1* 遺伝子のエクソン 7 の最後の塩基が G から A に変化 (g1032a) していた LQTS の 3 家系を同定し，詳細な検討を行った。この変異は以前にイントロン 7 のスプライス異常を来すことがすでに報告されている。

【方法と結果】リアルタイム RT-PCR を用いた定量的解析により，遺伝子変異を有する人ではエクソン欠損 mRNA (Δ7, Δ7-8, Δ8)が著明に増加していた。アフリカツメガエル卵細胞にエクソンを欠かない全長 *KCNQ1* (FL)またはエクソン欠損ミュータント(MT)を発現させ，Voltage-Clamp 記録を行ったところ，いずれの MT も K 電流を認めず，また FL と共発現させると，FL 電流に対し dominant-negative 効果を認めた。次に，蛍光タンパクにより標識した FL，MT タンパクの局在を共焦点顕微鏡を用いて解析したところ，FL は細胞膜に発現するが，MT と共発現させると MT とともに細胞内に蓄積していた。最後に，FL と MT の直接相互作用を観察するため，蛍光共鳴エネルギー転移法(FRET)を用いると，いずれの MT も FL と細胞内にて結合していた。以上より，MT は細胞内で FL と結合して FL の細胞膜への移動を妨げ，これにより FL 電流に対し dominant-negative 効果を発揮していると考えられる。

【結論】*KCNQ1* 遺伝子のスプライス異常により LQTS を発症する分子的機序を解明した。

（2）Brugada 症候群関連遺伝子異常 (SCN5A, N406S) の不活性化に対するリドカインの効果

伊藤英樹 [1,2]，井本敬二 [1]，堀江稔 [2]
（自然科学研究機構　生理学研究所　神経シグナル研究部門 [1]
滋賀医科大学　呼吸循環器内科 [2]）

【目的】心筋 Na チャネルαサブユニット遺伝子の遺伝子異常による intermediate inactivation(IM)の亢進は Brugada

症候群の一因である。N406S 変異は 1795insD と同様に Brugada 症候群に見出された IM の亢進を認める遺伝子異常である。これらの Brugada 症候群に見出される IM の亢進を含めた Na チャネルの不活性化に対するリドカインの効果に関しては十分な報告はない。

【方法】HEK293 細胞に WT，1795insD あるいは N406S をβ1 サブユニットと共発現させ，パッチクランプ法にてリドカインの変異 Na チャネルの不活性化に対する影響について検討した。

【成績】N406S のリドカイン 100μM 下での速い不活性化 (20ms pulse) からの回復は WT, 1795insD と類似していた。一方，リドカインは WT，1795insD の IM (1000ms pulse) からの回復を有意に遅延させるが，N406S の IM からの回復は逆に促進した (WT vs. WT+lido，219±57 vs. 559±150ms; 1795insD vs. 1795insD +lido，300±37 vs. 579±120ms; N406S vs. N406S+lido，361±47 vs. 167±34ms)。またリドカイン投与下の 1Hz，500ms の連続 pulse で，N406S の不活性化はむしろ抑制された (channel avai 1 ability，WT vs. WT+lido，82±4 vs. 71±2 %; 1795insD vs. 1795insD +lido, 67±27 vs. 60±20 %; N406S vs. N406S+lido, 55±5 vs. 81±4 %)。

【結論】リドカインは N406S 変異の IM の亢進を抑制した。N406S 変異を有する Brugada 症候群における薬物治療の可能性を示唆した。

（3）HERG チャネルにおける抗不整脈薬ニフェカラントの結合と facilitation 効果に関する検討

岩田　美紀[1]　保坂　幸男[2]　木下　賢吾[3]　中村　春木[4]　倉智　嘉久[1]
（[1]大阪大学大学院医学系研究科　薬理学 [2]新潟市民病院・循環器科
[3]東京大学医科学研究所 [4]大阪大学蛋白質研究所）

ヒト erg 関連遺伝子 HERG 遺伝子でコードされる心臓の I_{Kr} チャネルの阻害薬ニフェカラントは，致死的心室不整脈薬として臨床使用されている。この阻害薬による HERG チャネルの作用機序の詳細を調べることによって，ニフェカラントや他の抗不整脈薬による効果や副作用の予測が可能になると考え研究を行っている。アフリカツメガエル卵母細胞に HERG チャネルを発現させニフェカラント投与し 2 電極膜電位固定法を用いて透過イオンによる巨視的な電流を測定し解析した。その結果，HERG チャネルにプレパルスとして強い脱分極パルスを与えると，低電圧で電流が増加するファシリテーション効果が惹き起こされた。一方，E-4031，ドフェチリドではその効果はみられなかった。HERG チャネルの変異解析実験より，Y652 と F656 がニフェカラントによるチャネル開口阻害に関与するアミノ酸残基であることが明らかになった。またホモロジーモデリングを利用したドッキングシュミレーションにより，HERG の S624 と S649 残基もニフェカラントと相互作用している可能性が示唆され，続いてこの残基のさまざまなアミノ酸変異体のニフェカラントによるブロックとファシリテーション効果を調べたところ，S649 残基がファシリテーションに関与していることが明らかになった。

（4）Na^+/Ca^{2+}交換体と心血管系疾患

岩本隆宏（福岡大学医学部薬理学教室）

Na^+/Ca^{2+}交換体 (NCX) は，その名のごとく Na^+と Ca^{2+}を交換輸送する細胞膜イオントランスポーターである。この輸送体は，心筋，血管平滑筋，神経，腎尿細管などに多く発現し，様々な細胞内 Ca^{2+}シグナルに密接にかかわっている。この輸送体の機能異常は，様々な病態を引き起こすことが予測されるが，その実態については未だ明確ではない。我々は，NCX 阻害薬および NCX 遺伝子改変マウスを研究ツールに用い，種々疾患，特に心血管系疾患における NCX の役割を明らかにし，この輸送体を標的とした新たな治療法を確立したいと考えている。これまでに，血管平

滑筋に発現する NCX1 の Ca^{2+}流入が食塩依存性高血圧の発症に重要な役割を果たすことを明らかにした。また最近, 野生型 NCX1 および活性型変異体の心筋特異的なトランスジェニックマウスを作製したところ, それぞれ肥大型および拡張型の心筋症を呈することを見出した。近年，心筋 Ca^{2+}シグナルの異常が心筋症の発現に関連することが想定されているが, 心筋 NCX1 の関与については不明確である。今回作製した心筋症マウスは，NCX1 の機能異常と心筋症の関係を解析するための有用なモデル動物になると考えられる。本研究会では，これらの内容を中心に心血管系疾患における NCX1 の役割について議論したい。

（5）交感神経機能と Ca^{2+} チャネルβ_3サブユニット

尾野恭一，呉燦文，藤沢進，村上学，飯島俊彦（秋田大学医学部機能制御医学講座）

交感神経終末からのノルアドレナリン放出には N 型 Ca チャネルが重要な役割を果たしている。Ca チャネルの副サブユニットであるβ_3 サブユニットはα_{1B} サブユニットと共に N 型チャネルを構成することから，交感神経を介する心拍および収縮力調節に関与していることが推察される。本研究においては，野生型（WT 群），β_3 サブユニット欠損 (β_3-/-) 及び過剰発現マウス (Tg) を用い，in vivo での心拍スペクトル解析を行うと共に Field 刺激に対する摘出心の収縮変化を測定し，β_3 サブユニットの機能的役割について検討した。その結果，安静時心拍数および RR 間隔のばらつきは Tg マウスでは有意に増加しており，β_3-/-で減少していた。βアドレナリン受容体抑制薬はマウスの心拍数を減少させ，その抑制作用は Tg マウスにおいて顕著であった。Filed 刺激に対する摘出心の収縮反応はβ_3-/-で WT に比べて有意に減弱し，Tg マウスでは有意に増強していた。以上のことから，β_3 サブユニットが交感神経終末からのノルアドレナリン放出に機能的役割を果たしていることが示唆された。

（6）リゾホスファチジルコリンによる Na^+/Ca^{2+}交換体 mRNA 量増加作用には低分子量 G タンパク RhoB のゲラニルゲラニル化が関与する

前田佐知子，松岡功，木村純子（福島医大・医・薬理）

我々はこれまで, ラット心筋由来 H9c2 細胞で, Na^+/Ca^{2+} 交換輸送体 (NCX1) の mRNA の発現が HMG-CoA 還元酵素阻害薬フルバスタチン (Flv) で抑制され，リゾホスファチジルコリン(LPC) で亢進することを見出し報告してきた (Mol Pharmacol. 2005)。また，その機序に，低分子量 GTP 結合蛋白質 RhoB の抑制または活性化がそれぞれ関与することも明らかにした (Mol Pharmacol. 2005)。RhoB はコレステロール合成経路におけるメバロン酸の代謝産物であるファルネシルピロリン酸 (FPP) またはゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) によりイソプレニル化を受けて活性化されることが知られている。この性質は，ファルネシル化は受けず，ゲラニルゲラニル化のみで活性化される RhoA や RhoC と異なる。そこで今回我々は，LPC による NCX1mRNA 増加作用に GGPP と FPP のうちどちらが優勢に関与するかを調べた。

H9c2 細胞を Flv で 24 時間処理して NCX1 mRNA 量を減少させ，その後，Flv 存在下に LPC を添加しても NCX1 mRNA 量は減少したままだった。しかし，Flv 存在下で GGPP または FPP を作用させると, 減少した NCX1 mRNA 量は，それぞれ Flv 処理をしないコントロールレベルまで回復した。一方，Flv 存在下で LPC＋GGPP を作用させると, NCX1 mRNA 量はコントロールレベルよりもさらに有意に増加した。LPC+FPP の添加では有意な増加は見られなかった。これらの結果から，LPC による NCX1mRNA 発現量の増加作用には，RhoB のゲラニルゲラニル化による活性化が関与しており，ファルネシル化は関与していないことが示唆された。

（7）HCN4遺伝子の制御領域の解析

倉富忍，鷹野誠（自治医科大学　医学部　生理学講座生物物理学部門）

心臓ペースメーカーチャネル HCN4 は，胎生期は心臓全体に発現しているが発生が進むと洞房結節など刺激伝導系に限局する。だが肥大心では心室筋に再発現し不整脈への関与が示唆されている。しかしその発現制御は不明である。

これまでの研究で抑制性転写因子 NRSF の変異体を心臓に発現する遺伝子改変マウスでは HCN4 の発現が上昇することがわかっている。またデータベース検索により HCN4 遺伝子のイントロンに NRSF の結合モチーフ(NRSE) の存在を見いだした。そこで本研究では，HCN4 遺伝子発現における転写制御領域の解析を行った。

まず, HCN4 遺伝子上流領域の様々な長さの DNA 配列を単離し，胎仔及び新生仔ラットの初代培養心筋を用いたルシフェラーゼレポーター解析を行った。結果，上流 847 bp の領域が最小プロモーターであった。このプロモーターは新生仔より胎仔心筋で高い活性が見られ，発生における発現様式を再現していた。しかし薬物による心肥大刺激には反応しなかった。そこでプロモーターに NRSE を含むイントロンをつなぎ同様の解析を行った結果，心肥大刺激で NRSF による転写抑制が解除されることが判明した。以上より上流プロモーターとイントロンの双方の作用によって HCN4 の発現が再現されることがわかった。

（8）心筋 I_{Ks} チャネルリン酸化による機能修飾に対する KCNE ファミリーの影響

黒川洵子，古川哲史（東京医科歯科大学難治疾患研究所生体情報薬理学分野）

KCNQ1 と KCNE1 から構成される心筋 I_{Ks} チャネルは，交感神経刺激下において，プロテインキナーゼ A によりリン酸化されることにより，外向きカリウム電流を増大させ，心筋活動電位を短縮させる。この機能修飾機構には，A-キナーゼアンカー蛋白 (Yotiao) を含むチャネル分子複合体が関与しており，βサブユニットである KCNE1 の共役も必要とされる。KCNE1 のカルボキシル(C) 末端の変異体を用いた電気生理学的実験と分子生物学的実験により, 76 番目のアスパラギン酸とそれを含む C 末端上流部分と KCNQ1 との相互作用が機能修飾に必要であることを示した。さらに，他の KCNE ファミリーのリン酸化による機能修飾への影響を調べたところ, KCNE3 ではなく KCNE2 のみが機能修飾に必要であることが機能解析から示された。KCNE ファミリーはサブタイプ間で C 末端の相同性が低いことから，KCNE ファミリーの C 末端が KCNQ1 のリン酸化による機能修飾に重要であると推測される。以上の結果より，分子複合体を介した I_{Ks} チャネルのリン酸化による機能修飾には，KCNE ファミリーの C 末端が KCNQ1 チャネルと機能的に相互作用することが必要であることが示唆された。

（9）Na^+/K^+ pump 阻害時における心筋細胞容積変化のイオンメカニズムの解明 ～包括的心筋細胞モデルによるシミュレーション解析～

竹内綾子，辰巳秀爾，松岡達，野間昭典
（京都大学大学院医学研究科 細胞機能制御学）

モルモット心筋細胞容積に対する Na^+/K^+ pump 阻害並びに各イオンコンダクタンス変化の影響を調べた。ouabain によって Na^+/K^+ pump を完全に阻害したが，細胞容積（細胞幅を測定）は 3 時間経っても殆ど変化しな

かった（実験 1）。この原因として細胞膜 Na^+及び Cl^-コンダクタンス (P_{Na}, P_{Cl})が極めて小さいことが予想されたため, isoproterenol 処理によって P_{Cl} を増大させて Na^+/K^+ pump を阻害したところ, 意外にも 50 分程度の遅れの後, 急速に細胞膨化が観察された（実験 2）。包括的心筋細胞モデル，Kyoto model で実験 1 を再現するためには，sarcolemmal Ca^{2+} pump(PMCA)をモデルに追加する必要があった。PMCA は ouabain 作用下 Ca^{2+}の蓄積を抑制し，それによって Na^+/Ca^{2+}交換機転は Ca^{2+} 濃度勾配で駆動され，Na^+を細胞外へ排出する。これによって細胞膨化が遅延する。実験 2 の遅延を伴った細胞膨化は，細胞膜の脱分極，Ca^{2+}チャネルを介する Ca^{2+} 流入，Ca^{2+}の蓄積による P_{Na}の上昇, Cl^-イオンの蓄積が相補的に作用しあい，急速に細胞容積の増大をもたらすことがモデルから示された。複数の因子が関与する細胞容積調節を理解するには実験のみでなく，シミュレーションによる解析が不可欠である。

（10）平滑筋型 ATP 感受性 K^+チャネルにおけるチャネルポア領域の分子薬理学的解析

寺本　憲功（九州大学大学院医学研究院生体情報薬理学）

近年の分子生物学的研究結果により ATP 感受性カリウムチャネル（K_{ATP}チャネル）は 2 つの独立した蛋白質，すなわちスルフォネルウレア受容体 (SUR) と内向き整流性 K^+チャネル (Kir6.x) のサブユニットのそれぞれヘテロ構造になっていると考えられている。しかし血管平滑筋以外の平滑筋型 K_{ATP} チャネルについてはその分子構造の組み合わせが未だ不明のままである。本研究では下部尿路系平滑筋型 K_{ATP} チャネルの内向き整流性特性に関して特にチャネルポア領域についての分子生物学的構造の解析を行った。

ブタ尿道平滑筋細胞において 140 mM の K^+ 濃度下(140 mM/140 mM K^+)では levcromakalim は濃度依存的に内向き電流を増強させ同様に脱分極側では内向き整流性を示した。また cell-attach 法でも同様に levcromakalim 投与により惹起された glibenclamide 感受性 K_{ATP}チャネルは脱分極側で内向き整流性を示した。inside-out 法では polyamine 投与で 140 mM の K^+ 濃度下の脱分極側において UDP 活性化 K_{ATP} チャネルの電流の内向き整流性がさらに増強された。cell-attach 法下で PdBu 投与により K_{ATP}チャネルは活性化されたが phorbol エステルの不活性化体である 4α-PDD 投与では活性化されなかった。またブタ尿道平滑筋を用いた RT-PCR 法で Kir6.1 と Kir6.2 の両 mRNA のフラグメントが観察された。また recombinant K_{ATP} チャネルの hetero-concatemeric の Kir6 チャネルを強制発現させた系においても cell-attach 法下で PdBu 投与によりチャネルは活性化されたが phorbol エステルの不活性化体である 4α-PDD 投与では活性化されなかった。内向き整流性に関わるブタ尿道平滑筋 K_{ATP} チャネルのチャネルポア領域は分子薬理学的に Kir6.1 と Kir6.2 のヘテロ構造を呈している可能性が示唆された。またヒト膀胱平滑筋型 K_{ATP}チャネルの内向き整流性特性に関しても最近の知見をご紹介していきたい。

（11）KCNE1ならびに KCNE2による KCNQ1チャネルの相互的機能調節

豊田　太[1]・上山久雄[2]・丁　維光[1]・松浦　博[1]
（滋賀医科大学[1]細胞機能生理学，[2]分子病態生化学）

KCNQ1 は Shaker 型電位依存性 K^+チャネルサブユニットであり，生理的には KCNE1 と会合することで心筋 I_{Ks} チャネルを構成すると考えられている。一方で，心臓には KCNE1 以外の KCNE 蛋白（すなわち KCNE2-KCNE5）も発現しており，近年これらのいずれもが KCNQ1 と機能的に会合しうることも *in vitro* 発現系で示されてきている。本研究では KCNE2 による KCNQ1 チャネルの機能調節についてパッチクランプ法を用いて検討した。

KCNQ1 を KCNE2 と COS7 細胞に共発現させると E_K 付近で逆転する常時活性型の時間非依存性電流が誘発された。一方，KCNQ1 を KCNE1 ならびに KCNE2 の両方と共発現させると心筋 I_{Ks} に類似した時間依存性電流のみが記録された。しかしながら，KCNQ1 と KCNE1 のみで構成される電流に比べ活性化の膜電位依存性が約 10 mV 脱分極側にシフトしており，また脱活性化キネティクスも促進していた。さらに，メフェナム酸により脱活性化が遅延する程度も KCNQ1/KCNE1 チャネルに比べ有意に減弱しており，心筋 I_{Ks} チャネルに近い感受性を示した。KCNE2 が KCNE1 と共に KCNQ1 チャネル機能を修飾し，心筋 I_{Ks} の性質を制御する可能性について考察したい。

（12）カルシウムプローブ(G-CaMP)を用いた平滑筋カルシウム動態の解析

中井淳一（理化学研究所・脳科学総合研究センター・記憶学習機構研究チーム）

G-CaMP は Green Fluorescent Protein (GFP) にカルモジュリンとミオシン軽鎖キナーゼの M13 配列を結合したカルシウム感受性蛋白質で，DNA によりコードされているので，適当なプロモーターを用いることにより G-CaMP を組織特異的に発現させることが可能である。

我々は平滑筋特異的なミオシン重鎖プロモーターを用いて G-CaMP を平滑筋に特異的に発現するトランスジェニックマウスを作製し，そのカルシウム動態を解析した。平滑筋をアゴニストにより刺激することにより蛍光の増加が観察された。また膀胱平滑筋において末梢神経を刺激することにより flash と wave の 2 種類の細胞内カルシウム増加現象が観察された。これらは 1 つの平滑筋細胞内で見られることがあり，flash は低頻度刺激で主に見られ，wave は高頻度刺激により主に見られた。さらに神経刺激を低頻度から高頻度を変えると，flash から wave へと Mode が変化する現象が観察された。

また，G-CaMP を Na ポンプと結合させることにより細胞内の局所のカルシウム動態の測定を試みた。その結果，筋小胞体 (SR) 近傍でのカルシウム動態がその他の細胞質部位のカルシウム動態と異なることが明らかとなった。

（13）遺伝性不整脈患者における心臓 Na チャネル病の遺伝子解析

牧山　武，赤尾　昌治，辻　啓子，土井　孝浩，大野　聖子，春名　良純，吉田　秀忠，北　徹
（京都大学大学院医学研究科循環器内科）
蒔田　直昌（北海道大学大学院循環器内科）
堀江　稔（滋賀医科大学呼吸循環器内科）

【目的】*SCN5A* 遺伝子は心臓 Na チャネルのαサブユニットをコードし，その遺伝子異常は様々な不整脈を引き起こす。我々は日本における遺伝性不整脈患者において心臓 Na チャネル病の分布・頻度を調べるために *SCN5A* の遺伝子解析を行った。

【方法】194 人の遺伝性不整脈患者（先天性 QT 延長症候群 123 人，ブルガダ症候群 62 人（症候性は 34 人），家族性洞不全症候群 8 人，家族性心房細動 1 人）において末梢血白血球細胞より DNA を抽出。高速液体クロマトグフィー (WAVE)，DNA シークエンシングを用い *SCN5A* の遺伝子異常，一塩基多型のスクリーニングを施行した。

【結果】18 人の遺伝性不整脈患者において 15 の *SCN5A* 異常を検出した。（先天性 QT 延長症候群 11/123，8.9%，ブルガダ症候群 症候性 4/34 11.8%，無症候性 1/28 3.6%，家族性洞不全症候群 2/8 25.0%）8 つの遺伝子異常(V113I，R179X，F532C，H1200T，A1746T，N1774D，K1859E，G1935D)は新規なものであった。また，*SCN5A* の一塩基多型，H558R は，modifierとして知られ，Na

の電流密度を低下させると報告されている。我々は 25 人の患者においてヘテロな H558R を検出した。その頻度 (25/194，12.9%) は，正常コントロール(13/110，11.8%) と比べほぼ同じであった。しかしながら，ホモの H558R を 1 例認め，失神発作のある徐脈患者であった。

【結論】日本における遺伝性不整脈患者において最も大きな *SCN5A* の解析報告であり，*SCN5A* は様々な不整脈において認められた。遺伝子異常と病態との関係については更なる機能解析による検討が必要である。

（14）心筋筋小胞体カルシウム ATPase 活性制御と心機能

南沢　享[1]，志村　美英[2]，竹島　浩[3]
（[1]横浜市立大学　大学院医学研究科　循環制御医学
[2]横浜市立大学　大学院医学研究科　病態制御内科学
[3]東北大学　大学院医学系研究科　医化学分野）

【要旨】心筋細胞内 Ca^{2+}は心筋細胞が収縮弛緩を繰り返すために必須であるとともに，細胞内シグナル伝達系のセカンドメッセンジャーとして重要である。心筋細胞内では，Ca^{2+}は筋小胞体に貯蔵されており，その放出においてはライアノジン受容体，再吸収においては，筋小胞体 Ca^{2+}ATPase(SERCA2a)による能動輸送が中心的な役割を果す。心筋筋小胞体機能の低下，特に SERCA2a 活性低下は，心疾患の発症・病態悪化に重要であり，SERCA2a 活性を回復させることで，各種心疾患の治療が可能となる。従来，SERCA2a 活性を制御する蛋白として，phospholamban の機能がよく調べられてきたが, われわれは新たな SERCA2a の機能制御因子として，1)phospholamban 相同性をもつ筋小胞体膜蛋白 sarcolipin, 2) 筋小胞体内カルシウム結合蛋白 sarcalumenin に注目し，遺伝子改変動物を利用して，SERCA2a 活性調節の役割を検討してきた。sarcolipin は心筋に過剰発現させると，phospholamban 同様に，心機能の低下を生じる。sarcolipin は心房筋に特異的に発現しており，心房筋における SERCA2a 活性調節の中心的働きをしている可能性がある。sarcalumenin 欠損マウスでは心機能, 筋小胞体へのカルシウム再取り込みが低下しており，圧負荷により，より心機能が低下し，死亡率が有意に高くなる。sarcalumenin は筋小胞体内で SERCA2a と蛋白相互作用により, その活性と蛋白発現を制御している可能性がある。本研究会ではこれらの分子を中心に，SERCA2a 活性調節機構について，発表する。

（15）心筋 L 型 Ca チャネルの活性維持機構

蓑部悦子，韓 冬雲，王　午陽，Zahangir A. Saud，聶 宏光，徐 建軍，はお麗英，亀山正樹
（鹿児島大学大学院医歯学総合研究科　神経筋情報生理学分野）

L型Caチャネル (Cav1.2) の活性には細胞内因子が必要で，cell-free パッチ等の条件下では開口しない（run-down 現象）。このチャネル活性維持機構を解明する目的で，モルモット単離心室筋細胞を用いた実験を行い，心筋 cytoplasm＋ATP(3mM)，カルパスタチン (CS) ＋ATP，カルモジュリン (CaM) ＋ATP によりチャネル活性が維持されることを見出した。CS の効果は CaM より弱いが，カルパイン阻害部位でない N 末部の L-domain に対チャネル効果が限定され，特異的な作用であると考える。一方，CaM は inside-out パッチ条件下で，生理的濃度（0.3～1μM）で強い対チャネル効果を示し，on-cell パッチ下と同レベルの開口確率 (～100%) を生じさせる。更に，より高濃度 (2-4μM) では，200-300%の効果を示す。これより，CaM は最も重要なチャネル活性維持因子であると結論される。更に，run-down の緩徐相に A キナーゼや CaMKII により阻止されるので，リン酸化もチャネル活性維持に関わることが示唆される。

（16）ES 細胞由来心筋細胞を用いた心臓伝導障害修復の試み

李 鍾国[1]，日高京子[2]，湯淺大祐[1]，三輪佳子[1]，角三和子[1]，安藤萌名美[1]，森崎隆幸[2]，児玉逸雄[1]
([1]名古屋大学環境医学研究所循環器分野
[2]国立循環器病センター研究所バイオサイエンス部)

胚性幹 (ES) 細胞由来心筋を用いた細胞移植が，完全房室ブロックなどの心臓伝導障害に対する新しい治療となりうるかーその可能性について調べた。マウス Nkx2.5-GFP ノックイン ES 細胞から分化した胚様体から，Fluorescence Activated Cell Sorter を用いて心筋細胞に分化した細胞 (ES cell derived cardiac myocyte:ESCM)を分離した。外科的手技により作成した完全房室ブロックマウスの房室結節部に ESCM を約 20 万個移植し，心電図モニタリングを行った。10 日後に心臓を摘出し，免疫組織染色により gap ジャンクション (connexin40, 43)の発現を調べた。その結果，PBS を注入した Sham 群においては，全経過中房室ブロックが持続したが，ESCM 移植群においては 5 例中 4 例で洞調律への変換が見られた。免疫組織染色では，Sham 群においては，房室結節部に線維化が見られ，connexine43 発現の不連続性が見られた。一方，ESCM 移植群においては房室結節領域に ESCM が存在し，connexine40，connexine43 を発現して周囲の host 心筋細胞との間に gap 結合を形成していた。これは，ES 細胞由来心筋細胞移植が徐脈性調律異常に対する新しい治療的アプローチとなる可能性を示唆する。

（17）モルモット心室筋細胞の膜電流に対する新規 NCX 阻害薬 SN-6の特徴について

渡邊泰秀[1]，岩本隆宏[2]，木村純子[3]
([1]浜松医科大学医学部基礎看護学講座疾病科学,
[2]福岡大学医学部薬理学，[3]福島医科大学医学部薬理学)

我々は，モルモットの単離心筋細胞を用いてホールセルクランプ法により I_{NCX} とそれ以外の膜電流を記録し，それら電流に対する SN-6 の作用を検討したので報告する。両方向型 I_{NCX}，片方向型外向き I_{NCX}，片方向型内向き I_{NCX} はランプ波で記録した。それぞれの条件は細胞内液と細胞外液の組成を変えることによって整えた。SN-6 は濃度依存性に両方向型電流を抑制した。両方向型外向き電流と内向き電流に対する SN-6 の IC_{50} 値はそれぞれ 2.3μM ，1.9μM であった。片方向型外向き電流の IC_{50} 値は 0.6 μM であった。片方向型内向き電流に対する作用は 10 μM の高濃度でも 22.4%の抑制を示すに過ぎなかった。また，両方向型外向き電流に対して細胞内 Na^+ 濃度依存性に SN-6 の抑制は強くなった。ピペット内にトリプシンを投与すると，SN-6 の NCX 電流に対する抑制作用は変化しなかった。このことは，SN-6 の NCX 電流に対する抑制作用は細胞内側からではないことが示唆される。以上から，SN-6 は，同じ誘導体である KB-R7943 類似の NCX 抑制作用と抑制形式を示した。

さらに，心室筋細胞で，活動電位をカレントクランプ法，電位依存性膜電流である Na 電流，Ca 電流，K 電流をホールセルクランプ法で記録し，それぞれに対する SN-6 の作用を調べた。10μM の SN-6 は Na 電流，Ca 電流，K 電流を抑制し，活動電位幅を短縮させた。同じベンジルオキシフェニル誘導体と比較すると，SN-6 は，SEA0400 よりも I_{NCX} を抑制する濃度は高く選択性も低いが，KB-R7943 と同程度の効力を持つ NCX 抑制薬であることが示唆された。

5. 筋収縮の調節蛋白質ー構造，機能および疾患ー

2005 年 10 月 25 日－10 月 28 日

代表・世話人：栗原　敏（東京慈恵会医科大学生理学講座第 2）
所内対応者：岡田泰伸（生理学研究所）

（1）トロポニンの構造と機能および疾患

大槻磐男（東京慈恵会医科大学）

（2）筋収縮のカルシウム調節メカニズムの構造的基礎

前田雄一郎（理化学研究所播磨 Spring-8 センター，ERATO アクチンフィラメント動態プロジェクト，
名古屋大学大学院理学研究科）

（3）筋収縮制御タンパク質トロポニンとアクチンの結合の構造基盤

若林健之（帝京大学・理工系・バイオサイエンス）

（4）蛍光測定からみた再構成骨格筋細いフィラメントの構造変化

三木正雄（福井大学工学部生物応用化学科）

（5）スピンラベル EPR によるトロポニンのアクチンフィラメントにおけるカルシウム構造転移の研究

荒田俊昭（大阪大学大学院理学研究科）

（6）アカザラガイ閉殻筋トロポニン I ペプチドを結合したトロポニン C C 端ドメインの溶液構造

田之倉優（東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻）

（7）ウサギ骨格筋α-トロポミオシンの結晶構造解析：柔軟な coiled-coil

似内　靖（理化学研究所播磨 SPring-8 センター構造生物化学研究室・
ERATO アクチンフィラメント動態プロジェクト）

（8）線虫 C. エレガンスを用いたトロポニンの筋発生と動物行動の解析

香川弘昭（岡山大学大学院自然科学研究科）

（9）ΔK210 心筋トロポニン T 突然変異による拡張型心筋症マウス・ノックインモデル

森本幸生（九州大学大学院医学研究院臨床薬理学分野）

(10) 心筋トロポニン(cTn)の臨床応用について

豊岡照彦（東北大学・先進医工学研究機構・生命機能分野）

(11) フィザルムミオシンに見られるカルシウム阻害

小濱一弘（群馬大学大学院医学系研究科 臓器病態薬理学）

(12) 筋小胞体からのカルシウムによるカルシウム放出

遠藤　實（埼玉医科大学）

(13) リアノジン受容体 1 型(RyR1)の Ca^{2+}誘発性 Ca^{2+}遊離 CICR の増幅率調節異常
——悪性高体温症発症機序

小川靖男（順天堂大学医学部薬理学教室）

(14) Ca^{2+} オシレーションによる細胞機能制御

飯野正光（東京大学大学院医学系研究科・細胞分子薬理学教室）

(15) 筋小胞体カルシウム ATPase によるイオンポンピング

豊島　近（東京大学分子細胞生物学研究所）

(16) 筋収縮における細いアクチンフィラメントの構造変化の役割

若林克三（大阪大学大学院基礎工学研究科生物工学）

(17) 自励振動現象 (SPOC) におけるアクトミオシン分子モーターの協同的機能

石渡信一（早稲田大学理工学術院物理学科理工系大学院生命理工学専攻）

(18) アクチンフィラメントの動的多形

柳田敏雄（大阪大学大学院・基礎工学研究科・システム人間系）

(19) 電子顕微鏡と X 線回折を用いた F アクチンの構造モデリング

小田俊郎（理化学研究所　播磨研究所　放射光総合利用センター，科学技術振興機構，ERATO アクチンフィラメント動態プロジェクト）

(20) 二本足のリニアー分子モーターが「歩く」仕組み

木下一彦（早稲田大学理工学部物理学科）

(21) 急速凍結フリーズ・レプリカ電子顕微鏡法により明らかになった in vitro 滑り運動中のミオシンクロスブリッジの動き

片山栄作（東京大学医科学研究所 分子構造解析分野）

【参加者名】

平田雅人（九州大学大学院歯学研究院），吉岡利忠（弘前学院大学），石崎泰樹（群馬大学大学院医学系研究科分子細胞機能学），丸山敬（埼玉医科大学），岡田拓也（大阪大学大学院　基礎工学研究科　システム人間系），山田章（情報通信研究機構・関西先端研究センター），前田佳代（ERATO,　前田アクチンフィラメント動態プロジェクト），木村澄子（千葉大学理学部生物学科），藤目杉江（個人参加），石川良樹（群馬大学医学系研究科臓器病態薬理），岡垣壮（三重大学生物資源学部），井上明男（大阪大学大学院理学部），田中悦子（横浜国立大学保健管理センター），西井清雅（東京医科歯科大学大学院），大塚由美子（東京慈恵会医科大学），渡辺賢（東京医科大学・生理学第一講座），Liou Ying-Ming (National Chung-Hsing University, Department of Life Science)，呉林なごみ（順天堂大学医学部薬理学教室），中村彰男（群馬大学大学院医学系研究科分子細胞機能学），植田啓介（大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻), 相原朋樹（大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻），木邑智恵子（福井大学工学部），八木直人（財団法人高輝度光科学研究センター），村山尚（順天堂大学医学部薬理学教室），佐々木大輔（早稲田大学大学院理工学研究科生命理工学専攻），小澤鍈二郎（国立精神神経センター神経研究所），吉川武男（理化学研究所　脳科学総合研究センター），矢沢洋一（北海道教育大学・旭川校　健康福祉コース），尾島孝男（北海道大学大学院水産科学研究院海洋生物工学講座），田中啓之（北海道大学大学院水産科学研究院海洋生物工学講座），鈴木潜（北海道大学大学院水産科学院），浅井博（早稲田大学理工学部総合研究所顧問研究員），北澤俊 (Boston Biomedical Research Institute)，杉本泰伸（大阪大学大学院基礎工学研究科），湯本史明（東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻），叶麗虹（南開大学），只野尚登（全薬工業（株）中央研究所　薬理研究部），大日方昴（千葉大学理学部生物学科），岡本洋（室蘭工業大学），本多元（長岡技術科学大学・生物系），水野裕昭（長岡技術科学大学・生物系），石島秋彦（名古屋大学工学研究科応用物理学専攻），佐藤治 (University of Massachusetts Medical School, Physiology)，中郡昭人（順天堂大学医学部薬理学教室），樫山拓（順天堂大学医学部薬理学教室），小西真人（東京医科大学・生理学第一講座），山田武範（東京理科大学理学部物理学科），石井由晴 (JST)，黒田正明（島根大学生物資源科学部生物科学科），本郷賢一（東京慈恵会医科大学・循環器内科），坂登光夫（全薬工業（株)），谷口美恵子（名古屋大学大学院工学部），河田溥（福岡大学医学部第二生理学），山口真紀（東京慈恵会医科大学・生理学講座第 1), 大野哲生（東京慈恵会医科大学・生理学講座第 1)，木村郁夫（東京慈恵会医科大学），葛西道生（大阪大学大学院），北浦孝（金沢大学保健管理センター），山根明（鶴見大学歯学部薬理学教室），宮崎淳一（山梨大学教育人間科学部），江藤真澄 (Organization of Virginia School of Medicine)，豊田直二（熊本学園大学　社会福祉学部福祉環境学科），木村雅子（東京慈恵会医科大学・生理学講座第 1)，御橋広眞（日本福祉大学情報社会科学部），松岡由和（大阪大学大学院理学研究科），緒方道彦（九州大学), 松尾龍人（大阪大学大学院基礎工学研究科), 野々村禎昭（（財）微生物化学研究会），山下茂（東邦大学医

学部生化学教室），植木正二（大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻），盧群偉（九州大学大学院医学研究臨床薬理学），王媛媛（九州大学大学院医学研究臨床薬理学），草刈洋一郎（東京慈恵会医科大学・生理学講座第 2），大内仁（東京慈恵会医科大学・生理学講座第 2），森本智（東京慈恵会医科大学・生理学講座第 2），福田紀男（東京慈恵会医科大学・生理学講座第 2），宇髙潤（東京慈恵会医科大学・生理学講座第 2），須田憲男（東京慈恵会医科大学・生理学講座第 2），松葉道知（東京慈恵会医科大学・生理学講座第 2），栗原敏（東京慈恵会医科大学・生理学講座第 2），水野昇（生理学研究所），岡田泰伸（生理学研究所），小幡邦彦（理化学研究所），江橋節郎（生理学研究所），大沢文夫（愛知工業大学），大塚正徳（東京医科歯科大学大学院），Gergely, J.（Boston Biomedical Research Institute），Szent-Gyorgyi, A. G.（Brandeis 大学），Hitchcock-DeGregori, S（Robert Wood Johnson 医科大学），Solaro, R. J.（Chicago 大学 Illinois 校），Moss, R. J.（Wisconsin 医科大学），Sykes, B. D.（Alberta 大学），Geeves, M.A.（Kent 大学），Mogensen, J.（Skejby 大学病院），Tobacman, L. S.（Chicago 大学 Illinois 校），Huxley H. E.（Brandeis 大学），Fletterick,R.（California 大学 San Francisco 校）

【概要】

生理的な筋収縮のカルシウム調節タンパク質トロポニンが，我国で発見されてから丁度 40 年を迎える。これまで世界の各国でこの代表的な機能タンパク質の構造と機能の研究が進められてきたが，最近，我国において遺伝性障害の系統的な機能解析が行われて新たに医学につながる展望が開かれたところである。結晶構造解析の結果も報告されて構造生物学的な基盤が構築され，ポストゲノムの機能タンパク質研究の典型例となることが予想される状況になってきた。長い間不明のまま残されてきた医学的な側面についても，心臓難病の各種遺伝性疾患を引き起こすトロポニン遺伝子異常が相次いで見出されて系統的な機能解析が行われ，病因の鍵を握る調節機構の異常が明らかになってきた。その他の調節タンパク質についても最近では生理機能を指向した研究が盛んに行われている。本研究会ではこれらの筋収縮調節タンパク質の構造，機能および遺伝性障害について第一線の研究者が参集して多角的な討論を行い，今後の発展の方向を探ることを目的としている。3 日間にわたって約 30 人が講演し，一般参加者約 100 人を交えて討論を行った。主要な内容は，1) トロポニン-トロポミオシン調節機構（大槻，前田，若林〈健〉，三木，荒田，田之倉，似内，香川），2) 心筋収縮調節と疾患（森本，豊岡），3) ミオシン連関調節機構（小浜），4) 興奮収縮連関と疾患（遠藤，小川，飯野，豊島），5) 収縮蛋白質（生筋 X 線回折）（若林〈克〉），6) モーター蛋白質（石渡，柳田，小田，木下，片山），である。

なおこの研究会は，トロポニン発見 40 周年記念国際シンポジウムおよび第 33 回生理研カンファレンス（オーガナイザー；大槻，岡田：講演者；国外 11 人，国内 21 人）と同時に行われた。

（1）トロポニンの構造と機能および疾患

大槻磐男（東京慈恵会医科大学）

我国においてトロポニンが発見されてから今年でちょうど 40 年を迎える。トロポニンは生理的なカルシウム収縮調節のカルシウム受容タンパク質であり，生きた筋肉内でアクチンフィラメント上に周期的に分布している。このタンパク質はトロポミオシンとともに働いて，生理的な条件下でミオシンとアクチンの収縮反応にカルシウム感受性を付与する。1960 年代後半の一連の研究によりトロポニン-トロポミオシンによる横紋筋収縮弛緩の抑制―脱抑制型調節機構が確立された。

トロポニンは，現在では 3 つの異なる成分（サブユニット；トロポニン C, I, T）から構成される複合タンパク質であることが確定している。トロポニン I による抑制をトロポニン C が脱抑制が制御のキーステップと考えられるが，この 2 成分だけでは脱抑制はカルシウムに依存せず，さらに第 3 の成分としてトロポニン T が加わってはじめてカルシウム感受性収縮調節能が発現する。トロ

ポニンT分子はアクチンフィラメント軸に沿って配向する二つのドメイン（T1およびT2）から構成され，カルシウム感受作用は分子のC端側を占めるT2ドメインに局在することが判明している。

トロポニンの医学における意義は長い間不明のまま残されてきたが，近年各種家族性心筋症の遺伝子解析が行われて，トロポニンを含むサルコメアタンパク質に起因することが明らかとなってきた。肥大型心筋症 (HCM) ではトロポニンの変異が他の変異と比べて経過が悪性なことも報告されているが，わが国でその網羅的な機能解析が行われカルシウム感受性増大が発症の鍵を握る機能変化であることが突き止められている。臨床的に肥大型とは対照的な拡張型心筋症 (DCM) を引き起こすトロポニン変異では逆にカルシウム感受性の低下が起こることも判明した。拘束型心筋症 (RCM) に関与するトロポニンI変異ではカルシウム感受性の大きな増加作用を示す結果が得られている。

（2）筋収縮のカルシウム調節メカニズムの構造的基礎

前田雄一郎（理化学研究所播磨 SPring-8 センター，ERATO アクチンフィラメント動態プロジェクト，
名大大学院理学研究科）

江橋らによるアクチンフィラメント複合体（アクチン，トロポミオシン Tm，トロポニン Tn より成る）の分子模型は調節のカルシウム説の確立に際して重要な役割を果たした。これから調節のメカニズムを解明するためには，分子模型を原子構造に置き換える必要がある。1998 年に我々は TnC と TnI の N 端断片 (1-47) の小さな複合体の結晶構造を解明した。ここに含まれる蛋白質の相互作用の構造と科学的推論により，ここに含まれないもう一つの TnC-TnI 相互作用部位の構造を提案することができた。この第二の相互作用は，TnC へのカルシウム結合によって誘起されること，TnI とアクチンの間の相互作用と拮抗するとの理由から，カルシウムによって駆動される分子スイッチの本体である。これは，低カルシウム濃度でアクチン・ミオシンの相互作用を阻害し，高カルシウム濃度でその阻害を解除する。

2003 年にはヒト心筋のコア・ドメイン (TnC-TnI-TnT_2) の結晶構造を解明した。これによって分子スイッチについての上記推論が正しかったことがはっきりした。また，Tn の全体の構造もわかったが，分子スイッチの情報がさらに Tm とアクチンに伝搬されるかについては未解明である。

生理学によると，Tn-Tm の機能は，カルシウム濃度によってアクチン・ミオシンの相互作用が阻害―解除されるというスイッチ・メカニズムと，Tn の存在そのものがアクチン・ミオシン相互作用を活性化するという 2 つの要素メカニズムに分解できることを示してきた。前者のスイッチ・メカニズムの輪郭はわかってきたと思われるが，後者の活性化メカニズムの理解は今後の課題である。

これらメカニズムを理解するには分子の結晶構造だけでは不十分で，分子の動態を理解することが必要であろう。特に，心筋症を引き起こす Tn の変異とそれに起因する機能変調が解明されているので，これら変異蛋白質での動態の異常が発見されれば，アミノ酸変異―動態の異常―機能変調の相関を解明することがでよう。

Tn コアドメインの骨格には TnI-TnT の間に形成される coiled-coil 構造がある。この中点近辺に Glu-244-Asp(TnT) と Lys-247-Arg(TnT) の 2 つの心筋症発症変異が見つかっている。Coiled-coil のこの部分は曲がりやすくなっているが，他方 coiled-coil の TnT 側では第三のヘリックスが隣接して空間に余裕がない。Glu-244-Asp の変異はこの部分に隙間を生じ coiled-coil を更に曲がりやすくすると考えられる。

以上のような考察が妥当であるかどうか実験的に検証する必要がある。分子の動態を計測する方法が必要とされている。

（3）筋収縮制御タンパク質トロポニンとアクチンの結合の構造基盤

若林健之（帝京大学・理工系・バイオサイエンス）

筋収縮は細いフィラメントと太いフィラメントとの“滑り運動”によって生じている。骨格筋，心筋では，この“滑り運動”は細いフィラメントの構造変化によって制御されている。最も受け入れられている細いフィラメントの制御モデルは，カルシウムによってトロポニンが構造変化を起こし，トロポミオシンの位置をシフトさせるというものである。そしてシフトしたトロポミオシンはアクチン上のミオシン結合領域を覆い，ミオシン結合を阻害すると考えられている。現在，アクチン，トロポニン，トロポミオシンの個々の原子構造はほぼ解かれているものの，お互いどのように相互作用し，“滑り運動”を制御しているかは不詳である。お互いの相互作用を明らかにするために，まず NMR 分光法によって分子量 52K のトロポニン T_2CI 複合体のなかに 6.1kDa のモバイルドメインがあることが分かりその原子構造を決定した。このモバイルドメインはクライオ電子顕微鏡で観察されていたトロポニンアームと大きさと外形が一致した。トロポニンアームはトロポニンのアクチン結合部位として同定されてきたが，その原子構造やアミノ酸残基は不明であったが，今回の NMR 分光によって，それらが明らかとなった。モバイルドメインのみを大腸菌で発現し，精製後アクチンフィラメントに結合させ，クライオ電子顕微鏡解析によってアクチンフィラメント上での結合位置がトロポニンアームと同じであることを確認した。モバイルドメインとアクチンは 11 個の塩橋を介して静電的に結合しており，そのうち 6 残基の変異は家族性心筋症をもたらすことが知られている。これらの知見に基づいて，細いフィラメントの電子顕微鏡密度マップ (Narita et al., 2001) にトロポニン，トロポミオシンの原子構造をドッキングし，低 Ca 濃度での細いフィラメントの原子モデルを構築した。このモデルでは，TnI の C 端領域はアクチンの外側ドメインにカルシウム依存的に結合し，これに引っ張られたトロポニンのコイルドコイル領域は高 Ca 濃度でのトロポミオシンの位置とはクラッシュする。その結果，トロポミオシンを低 Ca 濃度での位置へと押すことが推測された。実際，低 Ca 濃度でのトロポミオシンとトロポニンのコイルドコイル領域は互いに接している。トロポニンコイルドコイル領域によって引き起こされたトロポミオシンシフトの結果として，7 分子のアクチンの内で少なくとも 4 分子のアクチンのミオシン結合部位を覆うことになる。この結果は低 Ca 濃度では 70% のアクチンのみが，ミオシンと結合できない状態になるという三状態モデルとも良く一致する。筋肉弛緩の分子機構を提唱した (Murakami et al., 2005)。

（4）蛍光測定からみた再構成骨格筋細いフィラメントの構造変化

三木正雄（福井大学工学部生物応用化学科）

アクチンフィラメント上のトロポミオシン–トロポニンは細胞内のカルシウム濃度によりアクチン–ミオシン相互作用を制御している。私達は骨格筋細い繊維は収縮と弛緩状態に応じてどのような構造変化をするのかを検出する目的で蛍光共鳴エネルギー移動法を用いて研究してきた。共鳴エネルギー移動供与体のプローブをトロポニン (Tn) サブユニットの TnI，TnT やトロポミオシンの特異的な部位に結合し，一方共鳴エネルギー受容体のプローブをアクチンの特異的部位に結合させた。これらプローブ間の蛍光エネルギー移動測定は TnI や TnT が細い繊維の 3 状態 (relaxed, closed, open states) に対応して，細い繊維上で位置を変えることを示した。プローブを Tm の全長にわたって，特異的な位置につけてアクチンにつけたプローブとの間の蛍光エネルギー移動を測定したが，カルシウム濃度変化による蛍光エネルギー移動効率の顕著な変化は検出できなかった。このことは，トロポミオシンが細い繊維上で位置を変えないことを示唆している。トロポミオシンは 7 つの相同領域をもつが，この 2-4 の領域を削除した D234Tm はカルシウムの有無によらずミオシンの ATP 加水分解活性を阻害することが知

られている。この機能的に障碍のあるトロポミオシンを使って再構成した細い繊維上でトロポニンの位置変化は損なわれていることが分かった。このことは，トロポニンの動きが細い繊維の生理的機能状態に密接に関連していることを示唆している。ストップトフロー法と組み合わせた TnI や TnT とアクチン間の蛍光エネルギー移動測定により，細い繊維の 3 状態間でのトロポニンのスイッチとしての動きの速度定数を決めた。TnI や TnT の動きの速度定数を測定は，トロポニン複合体に生じるカルシウムスイッチ機能として一連の構造変化は同期して生じることを示した。3 状態間のトロポニンの動きの速度は，これら動きが筋収縮の制御に密接に関わっていることを示すに十分早いものであった。トロポミオシンが動くというのは，筋収縮制御の立体障害説においては不可欠の事象であるが，蛍光エネルギー移動はトロポミオシンのいかなる動きも示さなかった。そこで，私達はトロポミオシンはアクチン−ミオシン相互作用を立体障害することによってではなく，トロポミオシン−トロポニン複合体が，アクチン繊維の分子間や分子内の柔軟性を，細い繊維の 3 状態に対応して制御することにより筋収縮を制御しているのではないかという新しい制御モデルを提唱している。

（5）スピンラベル EPR によるトロポニンのアクチンフィラメントにおけるカルシウム構造転移の研究

荒田俊昭（大阪大学大学院理学研究科）

部位特異的スピンラベル EPR によりトロポニン及びトロポミオシンの構造について研究している。心筋トロポニン(Tn)C の N-ドメイン G42C (B helix)と C84 (D helix)をスピンラベルしその間の距離 を EPR スペクトルより計測したところ，18.4 Å (-Ca)であり，Q58C (C helix)と C84 (D helix)の距離は，18.3 Å であった。カルシウムにより〜3 Å 長くなり N-ドメインが closed-open 転移がおきることがわかった。TnI との複合体形成によっても，Q58C (C helix)と C84 (D helix)の距離は変化しないが，G42C (B helix)と C84(D helix)の距離は半分程度変化するので，B helix の動きが，カルシウム結合の親和性を上げることに寄与している可能性を示唆した。さらに，パルス ELDOR 法によって，スキンド筋肉内に交換導入した心筋 TnC の C35 と C84 のスピン間距離を測定した。カルシウム非存在下では，26.0 （TnC 単独）と 27.2 Å（筋肉）となった。カルシウム存在下では 筋肉では 23.2 Å に減少したが，TnC 単独では殆ど変化がなかった。

たんぱく質ドメインの回転動態や配向試料における角度を EPR で測定するためには 2 価性スピンラベルをたんぱく質表面へ固く結合させる必要がある。我々は光学異性体 C2 キラルの 2 価性 5 員環スピンラベル(S,S)-1 と (R,R)-1 を合成・精製し，骨格筋 TnC のダブルシステイン置換変異体（セントラル・ヘリックス 94C と 101C）と反応させた。スピンラベルした TnC をスキンド筋肉に交換により導入して再構成した。交換された筋肉の Ca 制御機能は維持されたままであった。硬直状態の筋肉標本を線維軸と磁場とを平行にセットしたときの EPR スペクトルは，ランダム試料のそれと殆ど同じであった。このことは，TnC のセントラル・ヘリックスはアクチンフィラメント軸に対して広い角度分布をとっている可能性を示唆した。

骨格筋 TnI の switch segment 付近の C133 にスピンラベルしたところ，TnC-I-T 複合体単独では，カルシウム除去によりラベルの運動性が増大し，C133 領域が TnC から解離したことを示唆した。再構成した細いフィラメントではカルシウム存在下のラベル運動性は TnC-I-T 複合体単独の場合と同じであるが，カルシウム除去により固定化がおこった。この固定化はスピンラベル TnI とアクチンだけで形成したフィラメントにおける運動性と同じであった。このことはカルシウム除去により TnC から解離した C133 領域がアクチンと結合することを示唆する。C133 と TnC の C44 のスピンラベル間距離をパルス ELDOR で測定したところ 30 ± 0.5 Å (+Ca)となり，結晶モデルに近い値となった。また小さい半値幅から C133 領域が TnC の N-ドメインにかたく固定されていることを示唆している。

（6）アカザラガイ閉殻筋トロポニン I ペプチドを結合したトロポニン CC 端ドメインの溶液構造

田之倉優（東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻）

無脊椎動物トロポニン C は 4 つの EF ハンドモチーフをもつものの，脊椎動物トロポニン C よりも Ca^{2+}結合数が少ない。無脊椎動物であるアカザラガイの閉殻筋トロポニン C は，4 つの EF ハンドモチーフの内，最も C 末端側の Site IV にのみ Ca^{2+}を結合する。このアカザラガイトロポニン C の構造変化と機能制御について明らかにするために，トロポニン $I_{129-183}$ を結合したトロポニン C の C 端ローブについて，多核多次元 NMR を用いた溶液構造解析を行った。$TnI_{129-183}$ は，脊椎動物骨格筋速筋トロポニン I の N 末端領域に相当するペプチドであり，トロポニン C の C 端ローブに結合する。NOE および角度情報により決定されたトロポニン C の C 端ローブは，4 つのα-ヘリックスと 2 つのβ-ストランドから成っていた。また，2 つのβ-ストランドは，短い逆平行β-シートを構成していた。この構造は，EF ハンド型 Ca^{2+}結合タンパク質として開いたコンフォメーションをとっていた。このことから，アカザラガイトロポニン C の C 端ローブに始まる筋収縮制御シグナルが存在することが示唆された。

（7）ウサギ骨格筋 α-トロポミオシンの結晶構造解析：柔軟な coiled-coil

似内　靖（理化学研究所播磨 SPring-8 センター構造生物化学研究室・
ERATO アクチンフィラメント動態プロジェクト）

トロポミオシン(Tm)は，284 残基 400Å の長さの coiled-coil 蛋白質であり，骨格筋，および，心筋において，トロポニンとともにカルシウム濃度による筋肉の張力調節に関わっている。

全長 Tm の結晶構造解析に関しては，多くの試みにも関わらず 7Å 分解能の結果が登録されているのみである。これは，Tm 分子特有の柔軟性が良質の結晶成長の妨げになっているためであると考えられるが，他方，この柔軟性自体が Tm の本質的な機能，および，カルシウム調節に関与しているとも考えられれる。

近年，断片化したトロポミオシンが良好な結晶を作り得ることがわかり，Tm の原子分解能結晶構造解析の糸口が見つかったものの，Tm がトロポニンコアと相互作用すると言われている機能的に重要な部位，すなわち，Tm の Cys 190 周辺はいまだ解析されておらず，依然として詳細は不明であった。

本研究室では，N 末端側に GCN4 配列を付加したトロポミオシンの C 末端側断片を 6 種類作り，そのうち，176-284 残基を含む断片についての結晶構造解析に成功した。その結果，Heptad repeat が保たれている coiled-coil 構造が明確に曲がっており，また，局所的にみると coiled-coil 構造のパラメータが変化している等，構造的に興味深い点が多々存在するので，ここにその結果を紹介したい。

（8）線虫 C. エレガンスを用いたトロポニンの筋発生と動物行動の解析

香川弘昭（岡山大学大学院自然科学研究科）

線虫は 2002 年ノーベル賞生理学医学賞の S. Brenner, J. Sulston, R. H. Horvitz らが「器官発生と計画的細胞死の遺伝学的解析」の研究に用いた動物で今や人の研究にも欠かせないモデル生物である。遺伝子の全塩基配列と受精卵から成虫に至るまで約千の全細胞系譜が明らかにされ，いろいろな性質に対するたくさんの変異線虫が単離されており，誰にでも利用出来るようなサービス網が確立されている。私はミオシン重鎖遺伝子の全塩基配列を

全生物で初めて決定した J. Karn のもとでパラミオシン遺伝子の構造決定をした後，しばらく筋肉形成過程の研究をしていたが，筋収縮で面白いカルシウム制御系の，トロポニンの遺伝子解析を手がけた。幸いにも動物で初めてトロポニン C 変異体の解析を行い論文に発表した。この解析が可能になったのは線虫では致死変異体 (m/m) もヘテロな状態 (m/+)で飼う事が出来るからであった。江橋先生に「トロポニン C の無い動物はどうなりますか」と尋ねたところ，帰ってきた返事は「死ぬでしょう」であった。今回この答えに対する科学的解析結果を報告する。

線虫のトロポニン C には他の無脊椎動物のようにカルシウム結合部位が 2 つあり，それぞれの部位に変異を起した遺伝子を持つ線虫を作成してその発生過程と虫の行動を調べた。サイト 2 に変異を持つ線虫は途中まで野生型と殆ど変わらないが成虫になると動きが遅くなり，排卵や排泄が出来なくなった。おそらくサイト 2 へカルシウムが結合しない為に筋収縮の制御ができなくなったのだろう。興味あることに筋繊維の形態は野生型と変わらないのに周りの細胞の伸展異常も観察された。サイト 4 の変異したトロポニン C はカルシウム結合しないばかりかトロポニン I とも結合せず，筋繊維形成も起こらず線虫は致死になった。トロポニン C の末端のヘリックス部分はトロポニン I との結合に必須であるが，アミノ酸置換で末端ヘリックスの方向が変えると機能しなくなった。

線虫を使うとこれまでのような蛋白質レベルの分子間相互作用に加えて，試験管内の結果が動物でどのようになるかを解析出来る。人の蛋白質には幾つかのアイソフォームが存在して解析が困難であるが，線虫モデルを使うと形態から生理まで，何がどのように起こるかを動物の成長過程を通して観察出来る。科学実験が素晴らしいのは，結果を基に次の解析が誰にでも出来ることである。

（9）ΔK210 心筋トロポニン T 突然変異による拡張型心筋症マウス・ノックインモデル

森本幸生（九州大学大学院医学研究院臨床薬理学分野）

拡張型心筋症を引き起こす心筋トロポニン T 遺伝子 ΔK210 突然変異を導入したノックインマウスを作製した。このマウスは同じ変異をもつヒトに非常に類似した病態を示し，両心室内腔の拡張とともに心臓の明らかな拡大を示した。ヘテロ接合体ミュータントマウスの半数が 7 ヶ月令までに突然死し，ホモ接合体ミュータントマウスではより顕著な心拡大と両心室内腔拡張を生じ，すべてのマウスが 6 ヶ月以内に心不全に陥ることなく突然死した。インビトロおよびインビボの解析から，この拡張型心筋症モデルマウスではカルシウム感受性の低下による心筋収縮力低下に対する代償機構として心拡大と心室内腔拡張が生じ，心臓ポンプ機能自体はそれによって代償され正常に保たれていることが強く示唆された。心電図長期モニタリングにより，突然死は心室細動によるものであることが明らかになった。DNA マイクロアレイ解析により，このマウスの心臓ではホスホジエステラーゼ遺伝子発現量が有意に低下しており，それによる cAMP 増加を通して細胞内カルシウムトランジェント・アンプリチュード増加が生じていることが示唆された。以上の結果から，カルシウム感受性の低下による心筋収縮力低下に対する機能的代償機構として細胞内カルシウムの増加が生じているが，同時におそらく細胞内カルシウム過負荷による不整脈発生の危険性を高めることによって心室細動による突然死を導くと考えられる。

（10）心筋トロポニン (cTn) の臨床応用について

豊岡照彦（東北大学・先進医工学研究機構・生命機能分野）

急性心筋梗塞の生化学的診断として血中クレアチンキナーゼ活性が有用であることは，杉田，江橋と沖中によって報告された。クレアチンキナーゼ (CPK) の中でも心筋細胞内に選択的に含まれる MB 型は現在でも心筋細胞

膜が障害されて細胞内から，リンパ液として流出し，胸管から大循環に入り，最終的に循環血液中で検出される CPK 活性は，心筋障害を示す有力な証左となる。血中の経時変化として虚血発症 2 時間後から検出され始め，6 時間後にピークに達し，後は漸減して 48 時間後には検出されなくなる。従って，臨床的に発症後 3 日以上経過した症例では診断が困難になる欠点が有った。最近は活性でなく，免疫学的に ELISA やラジオイムノアッセイとして CPK タンパクを検出する方法は感度が増すため，一部に用いられて来たが，特異性の点で脳内に存在する BB 型クレアチンキナーゼと交差反応を示す難点が有った。

こうした隘路を越える手段として心筋細胞に特異的に存在する蛋白が血中に漏出したレベルにより心筋細胞膜障害の診断材料として，近年心筋のトロポニン-I(cTn-I)，またはトロポニン-T(cTn-T)が注目されている。cTn-I と cTn-T は心筋細胞内で 80-90%が thin filament 上のトロポミオシンと結合しているが，残りは細胞質内に浮遊して，前者と動的平衡状態に有ると考えられている。細胞膜の傷害により心筋虚血発症後，約 4 時間後から血中で検出され始め，18 時間後にピークに達した後，減少するが 24 時間後に再度増加して 2 相性を示す。前者は細胞質に浮遊していた成分を，後者は thin filament からの離脱を反映すると考えられる。実際，イヌの冠動脈結紮により心筋梗塞モデルを作成して，虚血部から天然アクトミオシン (NAM) を作成して江橋らの方法で超沈殿測定を行うと，NAM の超沈殿現象は起こるが Ca^{2+}感受性のみ低下する。これはミオシンとアクチンの機能は虚血部でも長時間保たれるが，収縮調節系のタンパクが選択的に失活して行くプロセスを示唆する。この現象は結紮 4 時間後に心内膜側から始まり，6 時間目には心内膜，心外膜両者で認められ，24-48 時間後には Ca^{2+}感受性が完全に消失する。SDS ゲル電気泳動の結果，cTn-I と cTn-T が選択的に減少したことから説明される。

以前は抗体の特異性が低く，骨格筋由来のタンパクと識別できなかったため，骨格筋損傷も含む胸部外傷や腎機能低下状態では診断に支障を来たした。これは epitope を厳選して，高力価の抗体により解決された。また，cTn-I と cTn-T の間には検出感度に大差が無く，むしろ抗体の力価が有用性を決定すると思われ，世界的には両方が用いられている。

更に cTn の有用性は最近，大きな広がりを見せ，急性心筋梗塞，各種の心筋炎や心臓外傷の診断の他に，患者の予後判定にも用いられる事から，緊急手術適応から治療不要の症例に至るまで，患者の治療に際して層別化する際の有力な判断根拠として最も信頼される指標となっている。

（11）フィザルムミオシンに見られるカルシウム阻害

小濱一弘（群馬大学大学院医学系研究科 臓器病態薬理学）

フィザルムミオシン II アイソフォームには特異な性質があり，この Ca^{2+}結合した場合，ATPase とモーター活性が阻害される。ミオシンの構造，機能そして制御をさらに解析するためミオシンの活性部位，即ちヘビーメロミオシン (HMM) を発現蛋白質化した。即ち，HMM 部分を作るミオシン重鎖，Ca 結合軽鎖及びリン酸化軽鎖の cDNA をすべてクローニングし，これらを組み込んだバキュロウィルスを作成した。Sf-9 細胞を感染させ，HMM を発現蛋白質として得た。そして His-Tag を手がかりに HMM を精製した。同時に Ca 結合軽鎖については EF-ハンド Ca 結合ループを作る 3 種のアミノ酸をアラニンに換えて，Ca^{2+}の結合性を完全に失わせたミュータントを作り，HMM に組み込んだ。正常及びミュータント HMM は ATPase 活性を持ち，アクチンにより活性化された。カルモジュリン依存性蛋白質キナーゼの cDNA を新たにフィザルムより得て，大腸菌で発現させた。このキナーゼによりリン酸化軽鎖リン酸化させるとこの ATPase 活性はさらに上昇した。HMM のモーター活性は，インビトロオーティリティー・アッセイにより検出した。リン酸化により，活性は上昇し，Ca^{2+}を欠損する時に速く，Ca^{2+}の存在する時に遅くなった。しかしミュータント HMM では Ca^{2+}の有無にかかわらず速いままでカルシウム阻害が見られなかった。

（12）筋小胞体からのカルシウムによるカルシウム放出

遠藤　實（埼玉医科大学）

我々は，低濃度のカフェインが骨格筋のスキンド・ファイバーに一過性の大きな収縮を起こし，さらにそれが数分以上に及ぶ間隔で自発的に反復して起きる事実を発見し，そのメカニズムを追及して，カルシウム・イオン(Ca^{2+})自身が筋小胞体からの Ca^{2+}放出起こすことを見出した。この事実を我々は1968年の国際生理科学連合の会議で発表したが，同会議で Ford と Podolsky もやや異なる実験事実から同じ結論を得て報告している。

その後，我々は Ca^{2+}による Ca^{2+}放出(calsium-induced calcium release[CICR])の諸性質を調べ，Ca^{2+}放出作用のCa^{2+}濃度依存性を明らかにし，高濃度の Ca^{2+}は逆に Ca^{2+}放出に抑制的に働くこと，Mg^{2+}は Ca^{2+}の Ca^{2+}放出作用には競合的に拮抗するが，高濃度の抑制作用は共有すること，procaine は CICR の Ca^{2+}感受性を変えずに Ca^{2+}を放出すること，caffeine は CICR の Ca^{2+} 感受性を高め，かつ最大 Ca^{2+}放出速度を増大すること，adenine 化合物は CICR の Ca^{2+}感受性を変えずに Ca^{2+}放出を促進すること，等を次々に明らかにした。

1980年代後半に，骨格筋小胞体の Ca^{2+}放出チャネル蛋白が生化学者たちによって単離，精製され，その一時構造も決められた。その単離は ryanodine の特異的結合を利用して行われたので，得られたチャネル蛋白は ryanodine 受容体 (RyR) と呼ばれる。現在 RyR には骨格筋型 (RyR1)，心筋型 (RyR2)，脳型 (RyR3) の 3 種が知られている。これら RyR は，脂質 2 重膜に埋め込むとすべて CICR の性質を示すことが明らかにされている。

RyR1 をノックアウトすると興奮収縮連関が遮断されるので，RyR1 は生理的な Ca^{2+}放出チャネルである。しかし，骨格筋の生理的 Ca^{2+}放出は CICR を介するものではない。このことは，CICR の抑制薬が生理的 Ca^{2+}放出を全く抑制しないことから明らかである。すなわち，RyR1 は生理的な刺激と Ca^{2+}による刺激に対してそれぞれ異なる開口モードで反応する。従来から知られている RyR1 開口物質は全て CICR モードで開口するものであったが，我々は最近 clofibric acid 等が生理的モード類似の開口を起こすことを明らかにした。

RyR1 の CICR モード開口の異常は，吸入麻酔時に稀に起きる悪性高熱を引き起こす。Halothane その他の吸入麻酔薬は全て CICR を促進するが，正常人ではそれによって何事も起こらない。しかし，悪性高熱患者はほぼ全ての骨格筋の CICR が亢進していて，その人たちの CICR が吸入麻酔によりさらに促進されると，Ca^{2+}放出が Ca^{2+}ポンプの取り込み能を上回ってしまい，高濃度のカフェインを投与した時と同様な状況になって筋収縮が起こり，その結果，異常熱産生による高熱を発するに至る。悪性高熱に著効を示す dantrolene は実際 CICR を抑制することも証明した。

一方，哺乳動物の心筋では，骨格筋と違って CICR が生理的興奮収縮連関のメカニズムであると考えられている。すなわち，興奮時に膜電位依存性 Ca^{2+}チャネルを通じて細胞外から流入した Ca^{2+}が RyR2 を開口して Ca^{2+}放出を起こし，心筋収縮を惹起する。その際，CICR の比較的低 Ca^{2+}感受性と膜電位依存性 Ca^{2+}チャネルおよび RyR2 の対向配置の結果，CICR の性質上起こりがちな all-or-none 的 Ca^{2+}放出は起こらず，生理的要請に応じた Ca^{2+}放出量，したがって収縮力の調節が可能になっている。

（13）リアノジン受容体1型 (RyR1) の Ca^{2+}誘発性 Ca^{2+}遊離 CICR の増幅率調節異常 ——悪性高体温症発症機序

小川靖男（順天堂大学医学部薬理学教室）

悪性高体温症 (MH) は吸入性全身麻酔薬使用時に生じる頻脈，呼吸性及び代謝性アチドーシス，急激な体温上昇と持続的高体温，筋拘縮等の症状を伴う遺伝的疾患である。種々の遺伝子変異が報告されているが，主要なも

のは骨格筋 Ca^{2+}遊離チャネルである RyR1 のミスセンス変異である。報告されている変異部位は region 1-3 の 3 つの部分に集中している。しかしなぜ CICR が亢進しているかについては未だ定説が無い。

我々は精製した RyR1 の活性は別のアイソフォームである RyR3 活性とほぼ同等であるが，筋小胞体(SR)での RyR1 は著しく活性が低い状態にあること，RyR 精製に用いる表面活性剤である CHAPS によりこの抑制が選択的に解除されることを見出した。

Ikemoto らは RyR1 の L2442－P2477 に対応する DP4 ペプチドが RyR1 の CICR 活性を選択的に促進するが，R2458C 変異に相当する DP4-mut ペプチドには作用が無いことを見出した。これらの結果を基に region 1（RyR1 の 35-615 に相当する部分）と region 2（RyR1 の 2000-3000 に相当する部分）とが相互作用することにより CICR 活性が低い状態にあるが，DP4 や region 2 の R2458C の変異はこの interdomain interaction を弱め CICR 活性を高めると結論し，interdomain interaction 仮説を提唱した。

我々は CHAPS の CICR 促進は DP4 の作用と共通な機序によることを示した。つぎにヒト MH の動物モデルとしてよく知られている RyR1 の R615C 変異を持つブタストレス症候群を示すブタ骨格筋の SR 小胞を用いて検討した。正常型，変異型共に RyR1 の含有量，SDS-PAGE 上の移動度に差は無かった。正常型 RyR1 の活性は抑制されているのに対し，変異型 RyR1 の活性が 8-9 倍高かった。Ca^{2+}依存性，Mg^{2+}感受性，ATP 感受性，ダントロレン感受性，FKBP12 感受性に両者に差が無いこともわかった。大量の Pi 存在下に ATP で Ca^{2+}を取り込ませた SR 小胞からのカフェインによる Ca^{2+}遊離を調べたところ，変異型の方がカフェイン感受性が見かけ上 5 倍程度高い事がわかった。

以上のことは少なくとも region 1, 2 に変異を起こす MH では両 region 間の interdomain interaction が重要であることを支持する。

（14）Ca^{2+}オシレーションによる細胞機能制御

飯野正光（東京大学大学院医学系研究科・細胞分子薬理学教室）

細胞内 Ca^{2+}濃度が周期的に増減する Ca^{2+}オシレーションは，細胞機能制御に深く関わっている。我々は，Ca^{2+}オシレーションの生理的意義と発生メカニズムについて研究を進めてきた。まず，Ca^{2+}依存性転写因子 NFAT の核移行と細胞内 Ca^{2+}濃度変化の関係を解析して，Ca^{2+}オシレーションの意義を追究した。その結果，NFAT は一過性の Ca^{2+}濃度上昇を脱リン酸化状態として 7 分間程度記憶するため，記憶保持時間よりも短い間隔で Ca^{2+}オシレーションが起こると核移行が生じる。これによって Ca^{2+}オシレーションの頻度による核移行制御が行われる。また，持続して Ca^{2+}濃度を上昇させる必要がないので，Ca^{2+}オシレーションにはシグナル伝達の効率を高める意義があることが明確になった。次いで，オシレーションの発生機構を解析した。まず，Ca^{2+}感受性ミュータント IP_3 受容体を用いた実験により，IP_3 受容体の Ca^{2+}感受性を介する自己再生産的 Ca^{2+}放出が Ca^{2+}オシレーション形成に必要であることを明らかにした。さらに，周期性を決定するメカニズムを明らかにするため Ca^{2+}ストア内 Ca^{2+}濃度を経時的にモニターした。その結果，小胞体とミトコンドリア間の Ca^{2+}のやり取りが周期を決定することが明らかになった。このような成果により，Ca^{2+}オシレーションの意義と機構が明らかになってきた。

（15）筋小胞体カルシウム ATPase によるイオンポンピング

豊島　近（東京大学分子細胞生物学研究所）

骨格筋の筋小胞体カルシウム ATPase(SERCA1a)は P 型イオン輸送 ATPase を代表するカルシウムポンプであり，994 残基の単一ポリペプチド鎖からなる膜蛋白質である。3 つの細胞質ドメインと 10 本の膜貫通ヘリックス

からなる。筋小胞体にあっては，筋収縮時に筋細胞中に放出されたカルシウムを筋小胞体中に取り込み，弛緩をもたらす。そのために ATP の化学エネルギーを利用する。我々はこのイオンポンプの X 線結晶構造解析とその結果に基づく分子動力学計算に取り組んできた。現在，反応サイクル全体をカバーする 6 つの中間状態の構造を決定することができ，能動輸送の分子機構の概略は理解できたといってよい。また，ATP や燐酸化が何をしているのか，100%近いエネルギー変換効率が何故可能なのか，一見無駄にしか見えないプロトンの対抗輸送の役割は何なのか，といった本質的疑問にも答えられるようになってきた。本講演では，詳細に踏み込める時間的余裕はとてもないが，カルシウム ATPase によるイオンの能動輸送機構を原子構造から概観する。

（16）筋収縮における細いアクチンフィラメントの構造変化の役割

若林克三（大阪大学大学院基礎工学研究科生物工学）

筋収縮における力発生過程において，太いフィラメントから突き出たミオシンクロスブリッジと細いフィラメントの F-アクチンが ATP 加水分解の自由エネルギーを使って相互作用するときコンフォメーションを変え，それが力発生に関係すると云われている。しかしながら，力発生と関係するコンフォメーションの変化についての研究の多くはミオシンクロスブリッジに関するもので，それらはレバーアーム仮説をサポートするものである。力の発生はミオシンとアクチンフィラメントとの相互作用で起こるので，アクチンフィラメントはミオシンと等しく力発生のメカニズムに重要な役割を果たしているはずである。さらに，骨格筋の収縮はアクチンフィラメント上のトロポミオシンに結合したトロポニンへのカルシウムイオンの結合によってスイッチされ，アクトミオシン相互作用を調節することによって実現している。最近，細いアクチンフィラメントが収縮の全過程で構造変化を起しているという明確な実験結果が蓄積されている。本講演では我々の X 線回折の研究で明らかにしてきた骨格筋の筋収縮の制御過程や力発生過程で起きている細いアクチンフィラメントの構造変化を示し，アクチンフィラメントの構造変化が筋収縮の制御やミオシンとの相互作用による力発生のメカニズムに直接的に関与していることを議論する。

次に示す結果はこの議論に強く関係する実験事実である。(1)カルシウムイオンのトロポニンへの結合はアクチンフィラメントの左巻きらせんを緩めて短縮させる。続く，ミオシンと相互作用して力を発生する過程ではアクチンフィラメントは左巻きらせんを捻って伸長する。この伸長量はサルコメアの弾性要素の伸びの 60%を占める。伸びの変化は張力発生と並行して起こる。(2)力発生中には細いフィラメントは，アクチンサブユニットのドメイン構造と制御タンパク TM の配置を変えることで 4 回回転対称性を強めるような構造変化を起している。(3)ミオシン頭部は ATP 加水分解中にレバーアームを大きく変化させる。この運動モードにはレバーアームのねじれと傾きの成分が主要なものとして含まれている。(4)ミオシンフィラメントもアクチンフィラメントと同様な捻れと伸びの変化を起している。筋収縮はこのような両フィラメントの弾性的な構造変化が共役することで実現されている。

また，制御タンパク由来の反射の時分割測定から制御タンパク質の構造変化が 2 段階過程で起こることが示された。最近明らかにされたトロポニン分子のコアドメインの細いフィラメント上での配置が X 線と FRET データを基に解析され，コアドメインの長軸がトロポミオシンストランドと直交していることが示された。さらにトロポニン T の構造を考慮した解析が進められいると制御のおけるトロポミオシンシフト説に関する疑問が解かれるかも知れない。

（17）自励振動現象 (SPOC) におけるアクトミオシン分子モーターの協同的機能

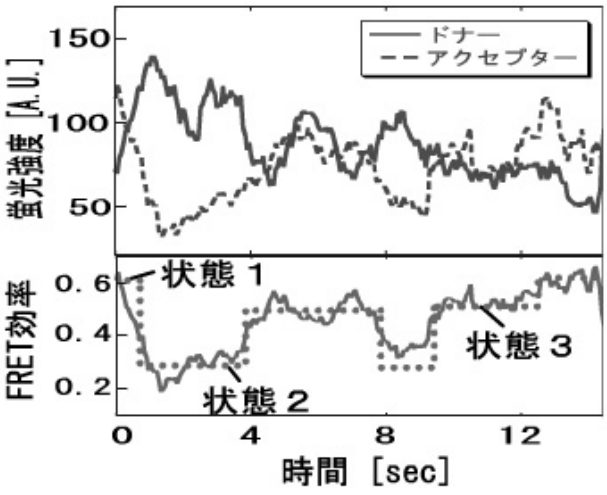
石渡信一（早稲田大学理工学術院物理学科理工系大学院生命理工学専攻）

1970 年代初頭に行ったアクチンフィラメントの柔らかさの研究，とくにアクチン・トロポミオシン・トロポニン複合体の柔らかさが Ca^{2+} 添加によって可逆的に上昇するという研究 (Fujime & Ishiwata, 1971-1974)を思い起こし，この研究が江橋先生（文子先生）のもとでトロポニンの精製方法（若林変法）を教えていただいたことによることを述べる。その後，アクチンの柔らかさと，その Ca^{2+} による制御やミオシンとの相互作用による変化が，筋収縮・制御機構に深く関与していることを期待しつつ研究を続けてきたが，決定打を出すまでに至っていない。今回は，筋収縮系に見られる自励振動現象 (SPOC) のメカニズムと，この筋収縮系固有の性質が，心拍機能の基盤となっている可能性を述べる。すなわち我々は，ラット，ウサギ，（イヌ），ブタ，ウシの心臓から調製した細い心筋線維束が，ある濃度以上の Ca^{2+} 濃度という生理的な環境下で，自発的に振動すること，しかもその振動周期が，それぞれの動物の静止心拍と直線関係にあることを見出したのである。発生力の振動は長続きしないが，光学顕微鏡でみると筋節の振動は長時間にわたって持続する。この事実をもとに，ペースメーカー細胞に始まる，Ca^{2+} を仲立ちとする上位の制御機構は，この筋節固有の自励振動を同調させる役割を担っているという，全く新しい概念を提出する。

（18）アクチンフィラメントの動的多形

柳田敏雄（大阪大学大学院・基礎工学研究科・システム人間系，
科学技術振興機構・ソフトナノマシンプロジェクト，
大阪大学大学院・生命機能・ナノ生体）

タンパク質の構造は自由エネルギー最小値の近傍で安定化していると考えられている一方で，準安定な構造を多数持ち，熱エネルギーによってそれらの間をゆっくり揺らいでいるとも考えられている。近年，タンパク質内のヒステリシスの存在が実験的に示唆され(Lu 1998, Ishijima 1998)，タンパク質の遅い構造揺らぎがタンパク質の機能に重要な役割を果たしていると考えられるようになってきた。これまで我々は，アクチン分子は構造的な多状態を持ち，ミオシンとの相互作用によりその分布が変化する事を示してきた。我々は，従来の 1 分子蛍光エネルギー移動 (FRET) 顕微鏡を改良し，これまでより長い時間（～分）アクチン 1 分子内 FRET を計測することでアクチンには秒オーダーの遅い構造揺らぎがあることを見いだした（光学的なシャッターを用いてドナーとアクセプターを交互に励起し，蛍光像をモニターすることでブリンキングと FRET を明確に区別した）。下図では，アクチンの構造が少なくとも 3 つの状態を秒オーダーの時間間隔で遷移していることを直接確認できる。FRET 効率の時系列解析からアクチンの構造揺らぎの時間特性も調べた。観察された構造ゆらぎは，F アクチンの回転に由来している可能性が高い。F アクチンの回転を考慮した筋収縮の分子メカニズムを提唱する。



（19）電子顕微鏡とX線回折を用いたFアクチンの構造モデリング

小田俊郎（理化学研究所　播磨研究所　放射光総合利用センター，
科学技術振興機構，ERATOアクチンフィラメント動態プロジェクト）

アクチン重合体の構造モデルは高い精度で明らかになっていない。最近，2つの重要な結晶構造解析―forim-actinの複合体とcrosslink2量体―が行われた。これらの結晶中でアクチンは直線状重合体を形成していた。では，F-アクチンの螺旋構造形成に必要なものは何であろうか？　この問いに答えるために，Fアクチンの構造モデル作成を行った。まず，F-アクチンゾルを調製し，X線繊維回折パターンを記録した。次に，直線状重合体のサブユニットの向きにアクチンの結晶構造を置き，弾性体近似したアクチン分子の基準振動の方向に構造変化させ回折パターンとあわせ，最後に，回折とモデルの残差をエネルギー項に入れた分子動力学シミュレーションを行った。得られた構造変化は，ヌクレオチド結合クレフトの底面を支点とした2つのドメインの交差運動である。これにより，長いピッチのストランド内の第4サブドメインと第3サブドメイン，また，ストランド間の第4ドメインと第1ドメイン，が相互作用できる。この2つの相互作用は螺旋形成に必須で，この第4ドメインがそのkeyとなっている。

（20）二本足のリニアー分子モーターが「歩く」仕組み

木下一彦（早稲田大学理工学部物理学科）

ミオシンやキネシンなど，2本足のリニアーモーターは，2本の足に左右の区別がなく，しかも2本の脚（coiled-coilの分かれ目とmotor domainの間の部分を脚と呼ぶことにする）の付け根は2回対称の形でより合わさっている。Processiveな分子モーターがヒト並みに「歩く」とすると，2つの爪先を両方前方に向けて着地する瞬間があるはずだが，そのためには脚がよほど捻れやすくないといけない。実際，ミオシンの脚の付け根部分やキネシンの脚全体は，自在継ぎ手のように自由回転を許すように見える。

自在継ぎ手の存在を認めると，持ち上げた脚を積極的に前方に振り出す仕掛けは存在し得ないから，ブラウン運動に頼らざるを得ない。ブラウン運動自身は前後を区別しないから，前方への着地を保証する仕掛けが必要である。多くの研究者は，ミオシンでは着地した足首の曲げによる脚の前方への回転，キネシンなら脚(neck linker)のドッキングにより，持ち上げた脚の付け根（ブラウン運動の支点）が前方に移動して，ブラウン運動が前方にバイアスされると考えている。

本当にこれでよいのか。胴体部分に（光ピンセットなどで）後ろ向きに力をかけたら，前方バイアスどころか支点が後ろに引き戻されかねない。ミオシンVですら脚は堅くないし，キネシンのドッキングエネルギーは小さい。

前方着地を保証するには，ヒトと同様，持ち上げた足の爪先を下に下げればよい。こうすると，脚が前方に振り出されたときは足裏がちゃんとレールに向くが，後方だとそっぽを向いてしまう。爪先上下（持ち上げた足首の曲げ伸ばし）は，結晶構造からも示唆される。

後は，両足着地から後足を選択的に持ち上げる仕組み（石渡らが示した歪み依存の反応制御）を加えれば，2足歩行が可能に思える。

（21）急速凍結フリーズ・レプリカ電子顕微鏡法により明らかになった in vitro 滑り運動中のミオシンクロスブリッジの動き

片山栄作（東京大学医科学研究所 分子構造解析分野）

ミオシン頭部 S1 に ATP が結合するとレバーアーム部分が強く屈曲することが結晶回折により明らかになり，そのように屈曲したクロスブリッジがアクチンに結合したまま伸展して硬直複合体に移行することが滑り運動の張力発生の源であろうと想定する「レバーアーム首振り説」が提唱されている。われわれはその真偽を検証するために，空間分解能とコントラストの高い急速凍結フリーズ・レプリカ電子顕微鏡像を用いてアクトミオシンの in vitro 滑り運動に伴うミオシン頭部の構造変化を解析してきた。原子モデル表面の凹凸からコンピュータ・シミュレーションにより作成したレプリカ画像を実際の観察により得られた電子顕微鏡像と比較することにより，滑り運動中には，これまで結晶回折では報告されていない ATP 型とは逆向きに屈曲したクロスブリッジが大半を占め，その構造は，ADP 存在下，SH1 と SH2 を化学架橋したミオシン（pPDM 型）に酷似していることが判明した。この時，上位 50K 下位 50K サブドメインを含む面はアクチンにほぼ平行であるが，硬直複合体では同じ面はアクチンに垂直に近く，その間に頭部の長軸周囲の回転が起きる可能性が推定された。実際，pPDM 型の構造を有する頭部がアクチン上で回転して結合方向を変え，硬直複合体に至る直前であろうと思われる画像も検出されたことから，レバーアームの伸展は確かに起きるが，構造変化の様式は従来の説とは異なりわれわれの見出した構造こそが，首振り直前に実現することが示された。以上の解析の結果，アクチン結合ミオシンは，アクチン軸に沿った，「揺れ」と見られる運動と，首振りに対応する前記の伸展運動の 2 種類の動きを行う可能性が示唆された。後の過程がミオシン-V の「歩行」と称されるプロセッシブな運動に対応する可能性を推測し，歩行中のミオシン-V の電子顕微鏡像を解析した。結果は想像された通りであり，ミオシン-V の歩行運動においても，首振り直前の構造は ATP 結合型ではなく，われわれの見出した逆方向の屈曲構造を取る可能性が高い。柳田らは，ミオシンが 1 分子の ATP を加水分解によりアクチンの進む距離は負荷の大きさにより可変であるとする化学・力学エネルギーの「ルース・カプリング」の概念を提唱しているが，上記の「揺れ」と「首振り運動」とを適切に組み合わせれば，そのような概念を合理的に説明することも可能かも知れない。

6. 細胞死の新たな生理機能と病態における意義

2005 年 10 月 17 日－10 月 18 日

代表・世話人：垣塚　彰（京都大学大学院・生命科学研究科）
所内対応者：岡田　泰伸（自然科学研究機構・生理学研究所）

（1）Fas/FADD/FLIP と細胞の増殖・分化

米原　伸（京都大学大学院・生命科学研究科・高次遺伝情報学分野）

（2）M 期染色体凝縮の異常によって，eEF1A1/EF-1αの発現低下を介する新しい細胞死が誘導される

小林　洋平（京都大学大学院・生命科学研究科・高次遺伝情報学分野）

（3）Fas リガンドによるアポトーシスと炎症とがん

須田　貴司（金沢大学がん研究所・分子標的薬剤開発センター）

（4）抗原による B リンパ球アポトーシス制御の機構と免疫応答

鍔田　武志（東京医科歯科大学大学院・疾患生命科学研究部・高次生命制御部門・高次生体制御学）

（5）Akt 経路による新たな細胞死抑制機構

後藤　由季子，岩井　謙一（東京大学・分子細胞生物学研究所・情報伝達研究室）

（6）ショウジョウバエ成虫脳における細胞死と神経傷害に依存的なグリア細胞の増殖

加藤健太郎[1,2]，粟崎　健[1,3]，伊藤　啓[1,2]
（[1]東京大学・分子細胞生物学研究所，[2]科学技術振興機構・BIRD，[3]科学技術振興機構・PRESTO）

（7）変態中に退縮している尾で発現している matrix metalloproteinase-9 遺伝子の解析

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

（8）傷害ミトコンドリアの排除機構

柳　　茂（東京薬科大学・生命科学部・分子生命科学科・分子生化学研究室）

（9）ショウジョウバエ食細胞によるアポトーシス細胞の認識機構

中西　義信（金沢大学・医学系研究科，薬学部・生体防御応答学分野）

(10) マクロファージによるインフルエンザウイルス感染細胞のアポトーシス依存貪食機構と意義

白土　明子（金沢大学大学院・医学系研究科，薬学部・生体防御応答学分野）

(11) フォスファチヂルセリン依存の貪食

長田　重一（大阪大学大学院・生命機能研究科・時空生物学講座・遺伝子研究室）

(12) 小胞体ストレス応答の多様性

今泉　和則（宮崎大学・医学部・解剖学講座・分子細胞生物学分野）

(13) ドーパミンニューロンの機能発現と病態における Pael 受容体/GPR37 の役割

高橋　良輔（京都大学大学院・医学研究科・脳病態生理学講座・臨床神経学）

(14) 神経変性疾患における VCP の役割の解析

垣塚　彰（京都大学大学院・生命科学研究科・高次生体統御学分野）

(15) VCP の活性調節機構の解析

野口　昌克（京都大学大学院・生命科学研究科・高次生体統御学分野）

(16) NF-κB による活性酸素産生の抑制のメカニズム

中野　裕康（順天堂大学・医学部・免疫学）

(17) カスパーゼの生体機能：アポトーシス非依存的な役割

三浦 正幸，嘉糠 洋陸，倉永英里奈（東京大学大学院・薬学系研究科・遺伝学教室）

（18）雄性外生殖器形成における細胞死シグナルの関与

倉永英里奈，三浦 正幸（東京大学大学院・薬学系研究科・遺伝学教室）

（19）細胞縮小はアポトーシスに必要・十分条件か？

岡田　泰伸（生理学研究所・機能協関部門）

（20）Bcl-2 による種々の細胞死機構の制御

辻本　賀英（大阪大学大学院・医学系研究科・遺伝子学教室, 科学技術振興機構）

（21）拮抗して細胞の運命を決定するストレス応答キナーゼ JNK，p38-MAPK

和田 悌司，仁科 博史（東京医科歯科大学・難治疾患研究所・発生再生生物学分野）

（22）DNA 損傷によって誘導される SAPK/JNK 活性化の分子機構性

仁科 博史[1]，北川 大樹[2]，浦 誠司[2]，根岸 崇大[2]，和田 悌司[1]，堅田 利明[2]

（[1]東京医科歯科大学・難治疾患研究所・発生再生生物学分野，

[2]東京大学大学院・薬学系研究科・生理化学教室）

（23）ASK ファミリーによる細胞死とストレス応答の制御

一條　秀憲（東京大学大学院・薬学系研究科・細胞情報学教室，CREST）

【参加者名】

垣塚　彰（京都大学　大学院生命科学研究科），安田　邦彦（京都大学　大学院生命科学研究科），野口　昌克（京都大学　大学院生命科学研究科），加藤　成芳（京都大学　大学院生命科学研究科），紺谷　千穂（京都大学　大学院生命科学研究科），福士　順平（京都大学　大学院生命科学研究科），中西　義信（金沢大学　医学系研究科），白土　明子（金沢大学　医学系研究科），渡邉　郁子（金沢大学　医学系研究科），橋本　優実（金沢大学自然科学研究科），柳　　茂（東京薬科大学　生命科学部），仁科　博史（東京医科歯科大学　難治疾患研究所），和田　悌司（東京医科歯科大学　難治疾患研究所），浦 誠司（東京大学　大学院薬学系研究科），根岸　崇大（東京大学　大学院薬学系研究科），長田　重一（大阪大学生命機能研究科），鍔田　武志（東京医科歯科大学 疾患生命科学研究部），渡辺　幸造（東京医科歯科大学　難治疾患研究所），三浦　正幸（東京大学　大学院薬学系研究科），嘉糠　洋陸（東京大学　大学院薬学系研究科），倉永　英里奈（東京大学　大学院薬学系研究科），粟崎　健（東京大学　分子細胞生物学研究所），加藤　健太郎（東京大学　分子細胞生物学研究所），米原　伸（京都大学　大学院生命科学研究科），大串　雅俊（京都大学　大学院生命科学研究科），小林　洋平（京都大学　大学院生命科学研究科），中津海　洋一（京都大学　大学院生命科学研究科），高橋　涼香（京都大学　大学院生命科学研究科），中野　裕康（順天堂大学　医学部），中島　章人（順天堂大学　医学部），一條　秀憲（東京大学　大学院薬学系研究科），梅田　剛（東京大学　大学院薬学系研究科），河野　泰秀（東京大学　大学院薬学系研究科），関根　悠介（東京大学　大学院薬学系研究科），早河　輝幸（東京大学　大学院薬学系研究科），後藤　由季子（東京大学　分子細胞生物学研究所），岩井　謙一（東京大学　分子細胞生物学研究所），森永　光一郎（東京大学　分子細胞生物学研究所），長谷川　強（東京大学　分子細胞生物学研究所），清水　重臣（大阪大学　大学院医学系研究科），高橋　良輔（京都大学　大学院医学研究科），王　華芹（京都大学　大学院医学研究科），小林　芳人（京都大学　大学院医学研究科），矢尾板　芳郎（広島大学　理学部），今泉　和則（宮崎大学　医学部），須田　貴司（金沢大学　分子標的薬剤開発センター），川瀬　浩司（金沢大学　大学院自然科学研究科），松本　則彦（金沢大学　大学院医学系研究科），西頭　英起（東京医科歯科大学），岡田　泰伸（生理学研究所　機能協関），高橋　信之（生理学研究所　機能協関），サビロブ ラヴシャン（生理学研究所　機能協関），井上　華（生理学研究所　機能協関），浦本　裕美（生理学研究所機能協関），エルバート リー（生理学研究所　機能協関），沼田　朋大（生理学研究所　機能協関），赤塚　結子（三重大学　医学部），大滝　博和（昭和大学　医学部），養父　佐知子（昭和大学　医学部），中町　智哉（昭和大学　医学部）

【概要】

細胞死の分子メカニズムが詳しく研究され，その素過程に関わる分子が徐々に明らかにされてきた。現在はそれぞれの分子がどのように生理機能に関わるかということに加え，ガンや神経変性疾患のような病態での役割が注目されるようになってきた。我が国の細胞死研究はその初期から高いレベルにあり，細胞死実行過程の研究では世界をリードする成果が多く出されてきた。一方，神経変性疾患における細胞死の分子解析でも世界をリードする研究者を多数輩出するにいたっている。このような状況で，精力的に細胞死研究を行っている研究者が一同に会し，その分子機構と生理学的意義に関して研究交流の場をもつことは非常に意義のあることと考え，本研究会を行った。

（1）Fas/FADD/FLIP と細胞の増殖・分化

米原　伸（京都大学大学・生命科学研究科・高次遺伝情報学分野）

Fas などの death receptor は，アダプター蛋白質 FADD を介して pro-caspase-8 と death-inducing signaling complex (DISC) と呼ばれる複合体を形成し，DISC の中で pro-caspase-8 が近接化による自己切断によって活性化し，アポトーシス誘導シグナルを発生させることが知られている。また, FLIP は caspase-8 と FADD の会合を阻害し，また caspase-8 の自己切断を阻害してアポトーシスの誘導を阻害する。一方，caspase-8 はアポトーシス誘導だけでなく，NFκB 活性化等の多様なシグナルを誘導する。今回我々は，Fas や FADD が caspase-8 のプロテアーゼ活性に依存せずに，これらの分子に存在する death domain を介して神経細胞の神経突起伸長を増強させることを見いだしたので，報告した。また，ウイルス由来 FLIP E8 が Wnt シグナルをβ-catenin 安定化の下流で著しく増強することを見いだしていたが, この系を用いることにより，Wnt シグナルがヒト腫瘍由来細胞株 KB では細胞増殖の増強を，またマウス胎児由来繊維芽細胞株や 3T3 細胞等の正常に近い細胞株には細胞死や増殖抑制を誘導することを見いだしたので報告した。

（2）M 期染色体凝縮の異常によって，eEF1A1/EF-1αの発現低下を介する新しい細胞死が誘導される

小林　洋平，米原　伸（京都大学大学院・生命科学研究科・高次遺伝情報学分野）

M 期における染色体凝縮は正常な染色体分配に欠かせない過程であり, 不完全な凝縮により生じた異常細胞は生体から除去される必要があると考えられる。しかし，その除去機構については明らかにされていない。我々は，CHO 細胞において CREB の活性化を強く誘導すると, CREB の転写活性非依存的に M 期の染色体凝縮異常が誘導されることを見いだし, この系を用いて染色体凝縮異常に対する細胞応答を解析した。

染色体凝縮異常を誘導した細胞において Time-lapse imaging 解析を行ったところ，M 期において染色体分離を完了できないまま細胞は多核化し，その後に細胞死が誘導されて死滅する様子が観察された。この細胞死について詳細に解析した結果，この細胞死は caspase 非依存的な経路で主に誘導されており，この細胞死が誘導される際に eEF1A1/EF-1αの発現量が mRNA の転写後調節によって劇的に減少していることが明らかとなった。さらに，外来性 eEF1A1 を発現させることによりこの細胞死が顕著に抑制されたことから，この細胞死には eEF1A1 の発現低下が深く関与していることが示された。以上の結果から，M 期染色体凝縮不全により生じた異常細胞は eEF1A1 の発現低下が深く関与する新しい細胞死経路を介して除去されることを我々は報告した。

（3）Fas リガンド (FasL) によるアポトーシスと炎症とがん

須田　貴司（金沢大学がん研究所・分子標的薬剤開発センター）

FasL はデス因子として有名であるが，生体内では炎症誘導作用も示す。また，肝炎など種々の炎症性疾患の動物モデルでは，FasL を阻害すると治療効果が得られる。さらに, 慢性肝炎から肝がんを発症する動物モデルでは, 抗 FasL 抗体の投与で肝がんの発生も抑制された。抗 FasL 抗体のこれらの効果は，FasL の炎症誘導作用を抑制するためと考えられる。FasL 発現細胞をマウス腹腔に移植すると，激しい好中球の浸潤が誘導される。この時腹腔内には IL-1β，IL-6，IL-17，IL-18，IL-23 などが検出される。IL-1βは FasL でアポトーシスを起した好中球等の炎症細胞から分泌され，血管内皮細胞などに作用して KC や MIP-2 の産生を誘導し，炎症細胞の更なる浸潤を誘導する。IL-17 も KC 産生を誘導し, 好中球浸潤に寄与するが, IL-17 は FasL の直接作用ではなく，IL-1βと IL-23 の相乗作用で腹腔 T 細胞より産生される。これに対し，IL-23 は FasL の直接作用で樹状細胞から産生される。また，FasL はヒト胎児腎細胞株 HEK293 に NF-κB 活性化を介して IL-8 の産生を誘導する。FasL はアポトーシスの場合と同様，FADD や caspase-8 を介して NF-κB の活性化を誘導する。

（4）抗原による B リンパ球アポトーシス制御の機構と免疫応答

渡辺　幸造，佐藤　元彦，小野寺大志，外園　泰久，若林　千里，安達　貴弘，鍔田　武志
（東京医科歯科大学大学院疾患生命科学研究部・難治疾患研究所）

CD22 および CD72 分子は B リンパ球抗原受容体 (B cell antigen receptor; BCR) を介するシグナル伝達を負に制御することにより，B リンパ球のアポトーシスを制御する抑制性 BCR 共受容体である。我々は以前，CD22 による BCR シグナル制御が, BCR を構成する免疫グロブリンのクラスにより異なり，IgM-BCR や IgD-BCR を介するシグナル伝達は負に制御するが，IgG-BCR を介するシグナル伝達は制御しないことを示した。今回，我々は，CD22 が IgA-BCR を介するシグナル伝達を負に制御するが，IgE-BCR を介するシグナル伝達は制御しないことを明らかにした。これらの結果は，IgG-BCR および IgE-BCR を介するシグナル伝達が，IgM-BCR や IgD-BCR を介するシグナル伝達に比べ亢進していることを示しているが，実際にそうであることを in vitro および in vivo で明らかした。これらの結果は，IgG や IgE を産生する記憶 B 細胞が，IgM-BCR および IgD-BCR を発現するナイーブ B 細胞に比べ抗原刺激により活性化されやすいことを示している。このようなメカニズムが，記憶免疫応答における迅速で大量の抗体産生に関与することが強く示唆された。また，我々は，CD22 のシグナル制御解除に関わる IgG および IgE の領域の同定を行った。

（5）Akt 経路による新たな細胞死抑制機構

岩井　謙一，後藤　由季子（東京大学・分子細胞生物学研究所・情報伝達研究室）

約 40%のガン細胞において異常な活性化が見られる代表的な癌遺伝子のひとつである Akt は多くの系で細胞生存促進に中心的な役割を果たす。これまで Akt の細胞生存促進におけるターゲットのほとんどは，アポトーシスシグナル経路におけるミトコンドリアの膜透過性の上昇（シトクロム C などの放出）より上流の因子であった。しかしながら Akt 経路が活性化している細胞ではシトクロム C がミトコンドリアから放出された後の状態であっ

ても生存が維持されるという状況証拠が示されており，シトクロムCから下流のAktのターゲットの存在が示唆されていた。ミトコンドリアから放出されたシトクロムCはApaf-1のコンフォーメーション変化を引き起こすことによりApaf-1とCaspase-9の活性型複合体Apoptosomeの形成を誘導し下流のCaspaseカスケードを活性化する。本研究において我々は，Akt がシトクロム C による Apoptosome の活性化を阻害することを示し，また，Akt の直接のターゲットの候補を同定したのでこれについて報告した。

（6）ショウジョウバエ成虫脳における細胞死と神経傷害に依存的なグリア細胞の増殖

加藤健太郎[1]，栗崎　健[2]，伊藤　啓[3]
（[1]東京大学分子細胞生物学研究所，[2]科学技術振興機構・BIRD，[3]科学技術振興機構・PRESTO）

神経回路形成の最後の段階では，過剰な神経細胞がプログラム細胞死を起こす。細胞死が引き起こされる要因については数多くの研究がある一方で，細胞死と周囲の組織との関わりに着目した研究はほとんどなされていない。我々はショウジョウバエ成虫脳を実験対象として，神経細胞のプログラム細胞死がグリア細胞の増殖を引き起こすこと，神経損傷に対してもグリア細胞が増殖すること，ほ乳類において炎症反応に深く関与することが知られている TNFαと同じファミリーの一員である Eiger がこの両方のグリア細胞の増殖に関わっていることを見いだした。このことから回路形成の一過程である神経細胞のプログラム細胞死は，神経損傷と共通の機構によってグリア細胞の増殖を引き起こしていることが示唆される。また，Eiger 変異体では過剰な神経細胞の細胞死が観察され，発生の一過程であるプログラム細胞死が周囲の組織に二次的な細胞死を引き起こしうることが明らかになった。このことから Eiger あるいは増殖したグリア細胞がこのような二次的な影響を抑えることで適切な神経回路形成に貢献していると考えられる。

（7）変態中に退縮している尾で発現している matrix metalloproteinase-9遺伝子の解析

藤本　健太，中島　圭介，矢尾板　芳郎
（広島大学大学院・理学研究科附属両生類研究施設）

無尾両生類の変態は，ほぼ全身の形態・機能変化をもたらすもので劇的である。特に尾の退縮は，体長の 2 倍以上の長さがあったものが数日のうちに無くなってしまう。この両生類の変態は甲状腺ホルモン (TH) の血中増加によって引き起こされることが知られているが，その分子機構の多くは明らかになっていない。尾の退縮過程には，細胞外基質分解酵素 (Matrix metalloproteinases; MMPs) が増加し，構造破壊，足場を壊すことによる細胞死誘導に重要な役割を果たすと考えられている。我々は，differential hybridization により，従来報告されていた MMP-9 と異なる，退縮する尾で特異的に誘導される MMP-9TH cDNA を同定した。*Xenopus tropicalis* のゲノム解析により，MMP-9 と MMP-9TH は直列に遺伝子重複していることが示された。MMP-9 は初期発生で発現しているが，MMP-9TH は退縮している尾，鰓，再構成している腸，神経系，TH 処理で細胞死を起こしている，尾由来の筋芽細胞株 (XLT-15) で mRNA が検出された。それらの発現にはプロモーターにある甲状腺応答配列が関係していた。MMP-9 の遺伝子重複は 6000 万年より以前に起きていたと予想され，これが *Xenoupus* 属以外の無尾類全体に存在するのかどうかは興味深い。

（8）傷害ミトコンドリアの排除機構

柳　　茂（東京薬科大学・生命科学部・分子生命科学科・分子生化学研究室）

ミトコンドリアはエネルギーを産生する重要な細胞内小器官であり，進化論的には好気的バクテリア細胞が真核細胞に共生することによって獲得されたと考えられている。しかしながら，機能低下もしくは傷害を受けたミトコンドリアは活性酸素を漏出することにより細胞に障害を与えることが知られている。最近，私たちは傷害を受けたミトコンドリアの排除機構に関わる蛋白質（ミトコンドリアセプチン）を見いだした。ミトコンドリアセプチンは傷害ミトコンドリアを特異的に認識し，独特の封入体を形成し細胞外へと放出，あるいはリソソームとの融合を促進する活性が認められた。現在，ミトコンドリアセプチン欠損マウスを解析中であるが，予備的な実験結果において，ある種の自己免疫疾患との類似性が示唆されたている。一方，ミトコンドリア側にも宿主の監視を免れようとするメカニズムに関与する新規のミトコンドリアユビキチンリガーゼが同定された。今後，ミトコンドリアをバクテリアの一種と捉えなおすことにより，新しいミトコンドリア生物学の展開が期待できるかもしれない。

（9）ショウジョウバエ食細胞によるアポトーシス細胞の認識機構

真中　純子，倉石　貴透，白土　明子，東田　陽博，中西　義信
（金沢大学大学院・医学系研究科）
Istvan Ando (Hungarian Academy of Sciences)，Bok-Luel Lee (Pusan National University)

食細胞はアポトーシス細胞表層の目印分子を認識して貪食を行う。線虫の遺伝学的解析で，貪食を誘導する情報伝達経路が二通り存在することが示された。しかし，これら経路の最上流に位置するはずの 2 組の貪食受容体と目印分子のうち，見つかっているものは CED-1 と呼ばれる受容体のみである。発表者らは，ショウジョウバエを使って残りの分子の同定をめざしている。昨年度の本集会では，CED-1 のショウジョウバエホモログである Draper が貪食受容体として働くことを報告した。今年度は，Draper が認識する目印分子及び Draper 以外の受容体と目印分子の候補を得たことを紹介する。

貪食標的細胞の抽出液中に，Draper 細胞外領域に結合するタンパク質を見出した。この分子は，アポトーシスに依存して細胞表層に出現すると示唆された。また，体液細胞表層に結合するモノクローナル抗体群の中に，貪食反応を阻害するクローン#16 が見つかった。#16 抗原の阻害と Draper の阻害とは相加的であり，両者は独立した貪食受容体として機能すると推測された。さらに，哺乳類で貪食に関わるとされている小胞体分子シャペロンのカルレティキュリン (CRT) の関与を調べた。標的細胞について抗 CRT 抗体での前処理や CRT の RNAi を施すと，貪食程度が低下した。よって，CRT は貪食目印分子として働くと考えられた。

（10）マクロファージによるインフルエンザウイルス感染細胞のアポトーシス依存貪食機構と意義

白土　明子，中西　義信（金沢大学大学院・医学系研究科，薬学部・生体防御応答学分野）

インフルエンザウイルスの感染により，細胞はアポトーシスを起こす。この現象は，感染細胞が死ぬことによりウイルス増殖を抑制するという，感染症から生体を守るための防御反応であると推測される。しかし，in vitro

の実験ではインフルエンザウイルスは感染細胞がアポトーシスによって機能を失う前に増殖してしまい，生体防御機構としての意義が示されていなかった。私たちの研究により，これは食細胞が共存していなかったためであることが判明した。

マクロファージを共存させると感染細胞は細胞内のウイルスごと貪食され，これによりウイルス増殖がほぼ完全に停止した。この貪食反応の選択性は，アポトーシスに伴って感染細胞表層に出現する膜リン脂質ホスファチジルセリンがマクロファージに認識されることで規定されていた。また，効率よく貪食されるためには，感染細胞の表層に発現するインフルエンザウイルスのエンベロープタンパク質であるノイラミニダーゼの活性が必要とされた。ノイラミニダーゼはマクロファージ表層のシアル酸を切除することで，マクロファージの貪食活性を促進すると分かった。さらに，インフルエンザウイルスを感染させたマウスに貪食阻害剤を投与すると，肺での炎症の程度が大きくなり生存率が顕著に低下した。

以上の結果から，インフルエンザウイルス感染によるアポトーシスは感染細胞に貪食のための目印を付ける反応であり，ウイルス感染細胞の貪食除去はインフルエンザから生体を守るための機構だと考えられた。

（11）フォスファチヂルセリン依存の貪食

長田　重一（大阪大学大学院・生命機能研究科・時空生物学講座・遺伝子研究室）

私達は，マクロファージによるアポトーシス細胞の貪食に関与する分子として，MFG-E8 を同定した。MFG-E8 はアポトーシスを引き起こした細胞に提示されるリン脂質 phosphatidylserine(PS)を認識し，死細胞をマクロファージへ橋渡しする。MFG-E8 を欠損するマウスの脾臓・胚中心には貪食されない死細胞が残存し，マウスは自己抗体の産生を伴った自己免疫疾患を罹患する。一方，マクロファージに貪食された死細胞の DNA はリソソームに存在する DNase II によってさらに分解される。DNase II 遺伝子を欠損するマウスでは胎児肝臓をはじめとして，種々の臓器に未分解の DNA を蓄積したマクロファージが認められる。ところで，マウスの胎児肝臓に存在する Blood island のマクロファージは赤血球前駆細胞から脱核した核を貪食する。最近，私達は，赤血球前駆細胞から遊離した核の表面に PS が暴露され，マクロファージはこれを認識することにより核を貪食することを明らかにした。

発表論文: Yoshida H. *et al*. *Nat. Immunol.* **6**: 49, 2005; Yoshida H. *et al. Nature* **437**:754, 2005

（12）小胞体ストレス応答の多様性

今泉　和則（宮崎大学・医学部・解剖学講座・分子細胞生物学分野）

小胞体ストレスは神経変性疾患をはじめとする様々な疾患の発症に密接関わる。このような疾患の治療薬開発のためにも小胞体ストレス応答の全貌解明が望まれている。我々は小胞体ストレスに対し強い抵抗性を示すアストロサイトで特異的に発現する新規小胞体ストレスセンサーOASIS の同定に成功した。OASIS は，1) 小胞体ストレスに応答して膜内切断を受ける，2) 切断された断片は核内に移行する，3) CRE および ERSE 配列に結合して分子シャペロン GRP78/BiP の転写を誘導する，4) 小胞体ストレス誘導性細胞死を抑制することなどの機能を有することを明らかにした。

小胞体ストレスの際にプロテアゾームが活性化(ERAD) し，異常タンパク質の分解に寄与することは良く知られている。この ERAD に加え，異常タンパク質を分解するシステムとしてオートファジーが活性化している可能性を見出した。小胞体ストレスを負荷した細胞ではオートファゴゾームが細胞質内に多数観察され，オートファジーのマーカー分子も活性化していた。オートフ

ファジーが起こらない ATG5 欠損細胞では，小胞体ストレス誘導性細胞死を増強したことから，オートファジーによるタンパク質分解系は小胞体ストレスから回避するために必須の役割を担っていることが示唆された。

（13）ドーパミンニューロンの機能発現と病態における Pael 受容体/GPR37の役割

高橋　良輔（京都大学大学院・医学研究科・脳病態生理学講座・臨床神経学）

パーキンソン病 (PD) は黒質ドーパミンニューロンの比較的選択的な変性脱落によって，進行性で深刻な運動障害をきたす，高齢者に多い神経変性疾患である。PD は通常孤発性であるが，5-10%の症例で家族性発症をみる。常染色体劣性遺伝性パーキンソニズム (AR-JP) の病因遺伝子として同定されたパーキンはユビキチンプロテアソーム蛋白質分解系で重要な役割を果たすユビキチンリガーゼという酵素であり，蛋白質分解系の破綻が PD の発症に関わることを示す強い証拠を提供している。我々はパーキンの基質蛋白質として構造異常を起こしたパエル受容体を単離し，パーキンの変異によって分解されなくなったパエル受容体が蓄積し，小胞体ストレスを引き起こして神経変性が生じるという仮説を提唱している。パエル受容体を脳で発現するショウジョウバエではドーパミンニューロンの選択的細胞死が起こるうえ，ウイルスベクターでパエル受容体を導入したラットの黒質は細胞死に陥り，この細胞死は小胞体ストレスによるものであるらしいことも明らかになっている。さらにパエル受容体を脳で過剰発現するトランスジェニックマウスで加齢とともにドーパミン神経の変性脱落が起こることもわかり，AR-JP のモデルになるかどうか解析中である。

（14）神経変性疾患における VCP の役割の解析

垣塚　彰（京都大学大学院・生命科学研究科・高次生体統御学）

神経変性疾患は，疾患ごとに特定の中枢神経領域が障害を受け，その結果，特有の症状（痴呆・運動失調・異常運動・筋力低下等）を示すため，多くの疾患に当てはまる統一的な発症機構を明らかにすることはできないと考えられてきた。しかし，近年になり，多くの神経変性疾患に共通して，異常蛋白質の蓄積と細胞質の空胞化を伴う神経細胞死が認められることが再認識されるようになり，神経が変性・消失する過程には，似通った分子機構が存在するという考えが広まってきた。我々は当初より異常タンパク質の蓄積・凝集が神経変性・神経細胞死を引き起こす本体であると考え，ポリグルタミンをモデルに用いて神経変性疾患の発症メカニズムの解析を行ってきた。その結果，AAA ATPase 蛋白質の一つ p97/VCP が神経変性疾患において重要な役割を果たす可能性を見出した。本発表では，1) ATPase 活性の消失した VCP は，細胞に空胞変性と細胞死を誘導すること，2) VCP がいろいろな蛋白質修飾を受けること，3) 神経変性疾患で共通する VCP の蛋白質修飾が起きている可能性があること，4) 蛋白質修飾によって VCP の ATPase 活性が制御されること，を紹介し，VCP が関わる神経変性疾患に共通する発症機構と神経変性疾患の治療ターゲットとしての VCP の可能性を議論した。

（15）VCP の活性調節機構の解析

野口 昌克[1]，高田尚寛[1]，木村 洋子[2]，萬野 篤[1]，村上 克洋[1]，
小池 雅昭[1]，大泉 宏[1]，堀 清次[1]，垣塚 彰[1]
（[1]京都大学大学院・生命科学研究科・高次生体統御学分野，
[2]東京都臨床医学総合研究所・腫瘍細胞研究部門）

活性酸素 (ROS) の過剰な発生は，様々な疾病を引き起こすと考えられている。VCP は，AAA ファミリーに属する蛋白質で，細胞周期，膜融合そして蛋白質分解など多様な細胞機能に関与している。これまで我々は，ATPase 活性を失った変異体 VCP が異常蛋白質の蓄積や空胞形成を誘導し，最終的に細胞死を引き起こすことを示してきた。しかしながら，VCP の ATPase 活性を制御する分子機構は明らかとされていなかった。今回我々は，ROS が VCP の ATPase 活性を低下させることを見いだした。さらに，ROS による ATPase 活性の制御に必須な 1 つのシステイン残基を特定し，別の酸化を受けないアミノ酸に置換することで ROS 耐性型 VCP を得ることが出来た。また，ROS による VCP のレドックス制御が，蛋白質分解の制御機構に関与する可能性を示した。さらに，酵母を用いて，*in vivo* で細胞死の誘導に関与することを示した。以上の結果から，VCP が ROS の重要なターゲットの一つであり，ROS による VCP の ATPase 活性の低下が，細胞障害および死に関与していることが示唆された。過剰な ROS による VCP の機能障害が，神経変性疾患やがんなどの発症機構に関与していることが推測される。

（16）NF-κB による活性酸素産生の抑制のメカニズム

中野　裕康（順天堂大学・医学部・免疫学）

NF-κB の活性化の障害された細胞では，活性酸素 (ROS) の蓄積が生じ，遷延化する c-Jun N-terminal kinase (JNK) の活性化が誘導されることを，我々はこれまでに明らかにしてきたが，その分子メカニズムの詳細は不明であった。今回，我々は NF-κB 欠損細胞では，アポトーシス抑制タンパクである c-FLIP が TNFα刺激により速やかに分解されることを見いだした。逆に c-FLIP を発現させることにより，NF-κB 欠損細胞で生じる ROS 産生や JNK の活性化が抑制されることが明らかとなった。さらに興味深い事に，HeLa 細胞や HCT116 細胞で siRNA 法により c-FLIP をノックダウンさせるだけで TNFαや抗 Fas 抗体刺激により遷延化する JNK の活性化および ROS 産生が誘導されることが初めて明らかとなった。この時生じる ROS や JNK の活性化はカスパーゼ阻害剤である z-VAD-fmk により完全に抑制されることより，c-FLIP が caspase 系の抑制を介してこれらを抑制していることが示された。以上より，NF-κB は c-FLIP のタンパクレベルを維持することにより ROS 産生や JNK の活性化を抑制していることが示された。

（17）カスパーゼの生体機能：アポトーシス非依存的な役割

嘉糠 洋陸，倉永 英里奈，三浦 正幸（東京大学大学院・薬学系研究科・遺伝学教室）

カスパーゼ活性が細胞死ではなく細胞分化過程に関わるとの知見が蓄積してきている。カスパーゼ活性化因子 Apaf-1(Dapaf-1) の変異体において，ショウジョウバエ背部剛毛（外感覚器）の増加が観察され，この領域のカス

パーゼ活性が剛毛の発生に関与することが考えられた。剛毛前駆細胞でカスパーゼ活性化インジケーター SCAT3 を発現させたところ，羽成虫原基での Scabrous 陽性細胞クラスターで弱いながらカスパーゼの活性化が検出された。羽成虫原基における死細胞を TUNEL 法で観察すると Scabrous 陽性細胞クラスターには殆どシグナルが観察されず，Scabrous 陽性細胞クラスター内でのカスパーゼ活性化は細胞死以外の機能を持つことが予想された。遺伝学的なスクリーニングによって剛毛の増加に Wg シグナルの関与が示唆され，ほ乳類 GSK3βホモログである Shaggy アイソフォーム Sgg46 がカスパーゼによって切断・活性化することにより，外感覚器前駆細胞の数の調節に関与することが示された。カスパーゼは基質特異性の高いエンドペプチダーゼであり，活性化の度合いによって細胞死以外のシグナルを伝える分子の活性調節を行うことで，様々な生理機能に関わることが考えられる。

（18）雄性外生殖器形成における細胞死シグナルの関与

倉永英里奈，三浦正幸（東京大学大学院・薬学系研究科・遺伝学教室）

我々はショウジョウバエをモデルとして細胞死のシグナル経路を解析してきたが，我々を含む複数のグループによって細胞死実行プロテアーゼであるカスパーゼ活性と雄性外生殖器の形態形成との相関が見出されてきた。ショウジョウバエの雄性外生殖器は，雄の体内で観察される直腸を 360 度取り囲むように配置される射精管の形態から，その形成時に回転することが発生の重要なステップとされているが，カスパーゼ阻害による雄性外生殖器の形成不全はこの段階においての回転が不完全となってしまうと考えられた。本研究において我々は，蛹期における雄性生殖器の回転を *en-GAL4/UAS-mCD8-GFP* 系統のハエを観察することでイメージングすることに成功した。生殖器の回転は，カスパーゼ阻害剤の p35 を発現させた系統 (*en-GAL4/UAS-mCD8-GFP UAS-p35*) で途中停止したことから，細胞死シグナルが雄性生殖器と内部後腸の正常配置の制御に関与している可能性が考えられた。今回，FRET を利用して作製したカスパーゼ活性化のインディケーター (SCAT) を雄性外生殖器形成のライブイメージングに導入し，回転時またはその前後において「いつ，どこで」細胞死シグナルの関与が見られるか解析したので報告したい。

（19）細胞縮小はアポトーシスに必要・十分条件か？

前野 恵美[1]，温井 美帆[1]，高橋 信之[1]，清水 貴浩[1]，沼田 朋大[1]，若林 繁夫[2]，岡田 泰伸[1]
（[1]生理学研究所・機能協関部門，[2]循環器病センター研究所・循環分子生理部）

アポトーシス性容積減少 AVD は，チトクローム c 放出やカスパーゼ活性化，DNA ラダー，アポトーシス小体形成などに先立って発生し，KCl 流出によってもたらされる。K^+チャネルや Cl^-チャネルのブロッカー投与によって AVD の発生を阻止すると，アポトーシス刺激を与えても，アポトーシス性諸反応が全く見られなくなる。ところで，多くの細胞は高浸透圧細胞外液中に置かれて容積減少が物理的に強いられても，やがて元の容積近くにまで戻っていくという容積調節能 RVI を持っている。RVI を示す細胞においては高浸透圧負荷のみによってアポトーシスが誘導されることはないが，RVI 能を欠く細胞においては高浸透圧負荷のみによってアポトーシス死が誘導される。RVI に関与する Na^+/H^+アンチポータ NHE1 を欠く変異線維芽細胞は RVI 能を失っており，高浸透圧負荷によってアポトーシスがもたらされた。しかしながらこの細胞に NHE1 を強制発現させて RVI 能を復活させると，高浸透圧負荷によるアポトーシスは見られなくなった。細胞外を Na^+-free 液や低 Cl^- 液にすると，等浸透圧条件であるにも

かかわらず細胞縮小が持続的に認められ，これによってアポトーシスも誘導されることが明らかとなった。従って，細胞容積の減少の持続がアポトーシス誘導の必要・十分条件であることが示唆された。

（20）Bcl-2による種々の細胞死機構の制御

清水　重臣，辻本　賀英（大阪大学大学院・医学系研究科・遺伝子学教室, 科学技術振興機構）

オートファジー様(type II)細胞死は，アポトーシス（type I 細胞死）とは異なる範疇のプログラム細胞死である。アポトーシス制御分子である Bcl-2 ファミリー蛋白質のうち, Bax/Bak はミトコンドリアを経由するアポトーシスに不可欠であることが，Bax/Bak ダブルノックアウト(DKO)マウスの解析より明らかにされている。我々は，この Bax/Bak DKO マウス由来の embryonic fibloblast (MEF) を用いて，①エトポシドなどのアポトーシス誘導薬を投与すると，アポトーシスが観察されない代わりに，オートファジー様細胞死が誘導されること，②この細胞死は Bcl-x_L により制御されていること，を見いだした。

今回，我々はこの細胞死の分子機構の詳細を解析し，(1) DKO MEF にエトポシドを投与しオートファジー様細胞死を誘導した際には, JNK の活性化が観察されること，(2) JNK 阻害剤や JNK ドミナントネガティブ遺伝子の導入により，この細胞死が緩和されること，(3) アミノ酸飢餓など，通常のオートファジーの際には JNK の活性化は見られないこと，を見出した。これらの事実より，オートファジー様細胞死の誘導には JNK の活性化が重要な因子であると考えている。

（21）拮抗して細胞の運命を決定するストレス応答キナーゼ JNK，p38- MAPK

和田 悌司，仁科 博史（東京医科歯科大学・難治疾患研究所・発生再生生物学分野）

細胞は目まぐるしく変遷する環境変化（ストレス）の中でバランスをとりあい，増殖，分化，再生など多様な生理現象に対応している。バランスの破綻はときに，がん化，過剰な細胞死，早期老化を導くきっかけとなりうる。我々はストレス応答キナーゼ JNK 経路が，アポトーシスとは独立した機能として，細胞増殖亢進，がん化，老化抑止に寄与し，ストレス存在下における細胞のバランスを制御している可能性を明らかにした。一方，p38MAPK 経路は，JNK 経路と同じファミリーメンバー，遺伝子進化系譜に属することから，JNK 経路と類似した機能を持つことが考えられた。しかし，意外にも，p38MAPK 経路は，JNK 経路とバランスを取り合う相手として細胞増殖停止，がん化抑制，老化促進に働き，さらに，JNK 経路抑制において見られた表現系をレスキューすることが明らかとなった。このことから，新たなる知見として，起源を同じくするストレスキナーゼ JNK，p38-MAPK は進化の過程で拮抗する機能を獲得し，お互いにバランスを取り合い，細胞増殖，がん化，細胞老化などの細胞の「運命」を決定するようになったと考えられる。本セミナーではさらに両者のバランスのメカニズムについても論議する。

（22）DNA 損傷によって誘導される SAPK/JNK 活性化の分子機構

仁科 博史[1]，北川 大樹[2]，浦 誠司[2]，根岸 崇大[2]，和田 悌司[1]，堅田 利明[2]
（[1]東京医科歯科大学・難治疾患研究所・発生再生生物学分野，
[2]東京大学大学院・薬学系研究科・生理化学教室）

SAPK/JNK シグナル伝達系は様々なストレスに応答し，細胞死，細胞増殖，細胞老化などの細胞の運命を制御する。受容体刺激など細胞膜を介する SAPK/JNK 活性化の分子機構に比べて，DNA 損傷によって誘導される核からのシグナル経路については未だ不明の点が多い。本研究会では，DNA 損傷によって誘導される HeLa 細胞の SAPK/JNK 活性化に Daxx と癌抑制遺伝子産物 Ras Ras association domain family 1C (RASSF1C)が関与することを見出したので報告する。1)Daxx は promyelocytic leukaemia-nuclear bodies(PML-NBs)に局在し，DNA 損傷によってユビキチン化され分解された。2) RASSF1C は Daxx と結合し，PML-NBs に共局在していた。3) RASSF1C は Daxx 分解に依存して，核から細胞質に移行した。4) 核から放出された RASSF1C は細胞質の微小管と結合し，SAPK/JNK 活性化誘導やアポトーシス誘導に関与した。すなわち，核内 PML-NBs に存在する Daxx-RASSF1C 複合体が DNA 損傷のセンサーとしてとして機能し，RASSF1C の細胞質への放出を介して，SAPK/JNK 活性化誘導するという興味深い分子機構を見出した。

（23）ASK ファミリーによる細胞死とストレス応答の制御

一條　秀憲（東京大学大学院・薬学系研究科・細胞情報学教室，CREST）

Apoptosis Signal-regulating Kinase(ASK)1 は JNK と p38MAP キナーゼの上流に存在する MAPKKK である。これらの MAP キナーゼ経路は，様々な環境ストレスに応答して細胞の生死や分化をはじめとする多様な生物活性をコントロールするためのシグナル伝達系として機能している。ASK1 ノックアウトマウスの解析により，ASK1 が酸化ストレスや小胞体ストレスによるアポトーシスに必要なシグナルであることが明らかになり，また ASK1 がポリグルタミン病やアルツハイマー病において認められる神経細胞死のメディエーターとしてこれらの疾患に関わっていることも示唆されている。一方，ASK1 は一部の Toll-like Receptor の下流で主に p38 の活性化を選択的に担うことによって自然免疫応答に必須の働きをすることも明らかになってきた。本研究会では，活性酸素 (ROS)による ASK1 の新たな活性制御機構について紹介するとともに，ASK ファミリー経路を介するストレス応答機構ならびにその病態生理学的役割について報告する。

7. 宿主防御機構としての上皮膜機能の調節因子

2006 年 1 月 30 日－1 月 31 日

代表・世話人：中張隆司（大阪医科大学　生理学）
所内対応者：岡田泰伸（自然科学研究機構　生理学研究所　機能協関部門）

（1）蝸牛内直流電位の発生に対する Ca^{2+}の役割

森禎章[1]，二村吉継[2]，乾崇樹[2]，竹中洋[2]，窪田隆裕[1]
([1]大阪医科大学生理学教室，[2]同耳鼻咽喉科学教室)

（2）胃粘膜修復におけるイオントランスポーターの役割

中村英志[1,2,3]，林周作[1]，遠藤拓也[1]，久保儀和[1]，Susan J Hagen[3]，竹内孝治
(京都薬科大学薬物治療学教室[1]，横浜市大大学院医学研究科臓器再生医学[2]
Dept. of Surgery, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School[3])

（3）顎下腺腺房細胞における振動性 Cl^-分泌の律速過程を支配する NKCC 活性

杉田　誠，広野　力，柴　芳樹（広島大学大学院医歯薬学総合研究科・
創生医科学専攻・病態探究医科学講座（口腔生理学））

（4）高浸透圧条件下における上皮細胞の調節性細胞容積増大機構の解析

高橋信之，M.V.V. Subramanyam，岡田泰伸（自然科学研究機構　生理学研究所　機能協関部門）

（5）熱ショック応答と上皮系感覚器の維持

高木栄一，藤本充章，林田直樹，井上幸江，中井　彰
（山口大学大学院医学系研究科生体シグナル解析医学講座）

（6）食塩感受性高血圧症とアルドステロンによる上皮型ナトリウムチャネル発現の異常制御

新里直美，青井渉，丸中良典（京都府立医科大学大学院　生理機能制御学）

（7）腎尿細管上皮細胞管腔側における有機アニオントランスポーターOATs 機能発現の分子基盤：
PDZ タンパク質の役割

安西尚彦[1]，遠藤　仁[1,2]（[1]杏林大学医学部薬理学教室，[2]㈱富士バイオメディックス）

（8）Proteinase-activated receptor-1 活性化ペプチドのマウス盲腸壁内神経活性化

鈴木裕一，池原修（静岡県立大学大学院生活健康科学研究科）

（9）*Helicobacter pylori* 菌体毒素 CagA による胃粘膜上皮内活性酸素産生

半田修[1]，内藤裕二[2]，石井剛志[3]，高木智久[1]，古倉聡[1]，吉田憲正[4]，吉川敏一[3]
（京都府立医科大学生体安全医学講座[1]，生体機能分析医学講座[2]，
京都府立医科大学大学院生体機能制御学[3]，大学院消化器病態制御学[4]）

(10) モルモット胃幽門腺粘膜における COX-1 と COX-2 の役割：プロスタグランジン E_2 (PGE_2) 放出

中張隆司（大阪医科大学　生理学教室）

(11) アラキドン酸カスケードの制御によるがん予防

西野輔翼（京都府立医科大学大学院・医学研究科・分子生化学）

(12) 炎症組織特異的な脱抱合酵素誘導について

大井直美，橋本堂史，後藤美保，金沢和樹（神戸大学大学院・自然科学研究科）

(13) 骨シアロタンパク質遺伝子の発現に対するケルセチンの影響

金　東淳，小方　頼昌（日本大学松戸歯学部歯周治療学講座）

(14) ヒト小腸 Caco-2 細胞への吸収代謝におけるフラボノイドの構造特異性

室田佳恵子，吉田修治，清水寿美恵，寺尾純二
（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部食品機能学分野）

【参加者名】

岡田　泰伸（生理学研究所　機能協関），清水　貴浩（生理学研究所　機能協関），浦本　裕美（生理学研究所　機能協関），高橋　信之（生理学研究所　機能協関），井上　華（生理学研究所　機能協関），Dutta Amal Kumar（生理学研究所　機能協関），Elbert Lan Lee（生理学研究所　機能協関），沼田　朋大（生理学研究所　機能協関），温井美帆（生理学研究所　機能協関），Abduqodir Toychiev（生理学研究所　機能協関），劉　洪涛（生理学研究所　機能協関），王　海燕（生理学研究所　機能協関），孫　新（生理学研究所　機能協関），丸中　良典（京都府立医科大学），新里　直美（京都府立医科大学），宮崎　裕明（京都府立医科大学），西野　輔翼（京都府立医科大学），半田　修（京都府立医科大学），金沢　和樹（神戸大学 農学部），大井　直美（神戸大学 大学院自然科学研究科），後藤　美保（神戸大学 大学院自然科学研究科），中井彰（山口大学医学部），中村 英志（横浜市大大学院医学研究科臓器再生医学），小方 頼昌（日本大学松戸歯学部歯周治療学），金　東淳（日本大学松戸歯学部歯周治療学），杉田 誠（広島大学医学部　口腔生理学），室田佳恵子（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部），鈴木　裕一（静岡県立大学），林　久由（静岡県立大学），遠藤　仁（杏林大学　医学部），安西　尚彦（杏林大学医学部），窪田　隆裕（大阪医科大学　医学部），森禎章（大阪医科大学　医学部），中張　隆司（大阪医科大学　医学部）

【概要】

上皮膜輸送と生理活性物質の研究者間の研究成果交換の場として，平成 18 年 1 月 30－31 日に研究会「宿主防御機構としての上皮膜機能の調節因子」を開催した。最初のセッションで，蝸牛内リンパ腔の電位(+80 mV)維持に Ca^{2+} channels 活性が関わること，胃粘膜修復が monocarboxylate transporter (DIDS–sensitive) の活性により制御されていること，顎下腺線房細胞における Cl^-分泌の律速課程が NKCC の活性にあること，高浸透圧下における調節性細胞容積増大機構の解析から細胞容積減少により Akt の活性化が明らかとなり，アポトシースと細胞容積の関係の解明につながることなどが明らかにされた。第二のセッッションでは，熱ショック応答に関わる転写因子(HSF1)の活性が鼻粘膜嗅覚上皮の維持に必須であること，アルドステロンによる ENaC の発現異常が食塩感受性高血圧症の発症原因の一つであること，腎臓尿細管における有機アニオントランスポーターの分子複合体が一つの機能ユニットとして働いていること等が明らかとなった。第三ののセッションでは，上皮膜機能に関わるプロテアーゼリセプター，ヘリコバクターピロリ菌の CagA，プロスタグランジン産生酵素 COX1，COX2 の役割などが議論された。最後のセッションでは天然イソフラボンの一種であるイソリクイリチゲンの発ガン予防効果，抗酸化能，抗炎症活性を持つフラボノイドが炎症部位において特異的に活性化され抗酸化能，抗炎症活性を発揮する可能性があること，ケルセチンが骨シアロタンパク質の発現を制御していること，フラボノイド吸収における構造特異性があること等が明らかにされた。生体防御の最前線に位置する上皮膜の機能とそれを制御する内因性，外因性生理活性物質についての有意義な議論がなされた。

（1）蝸牛内直流電位の発生に対する Ca^{2+}の役割

森　禎章[1]，二村吉継[2]，乾　崇樹[2]，竹中　洋[2]，窪田隆裕[1]
（[1]大阪医科大学生理学教室，[2]同耳鼻咽喉科学教室）

【目的】蝸牛内リンパ腔の約+80mV の電位 (EP) は血管条上皮細胞で作られており，音の振動を電気変換する際に重要な役割を果たしている。本研究では Ca^{2+}キレート剤，Ca^{2+}チャネル阻害剤および賦活剤を用いて，EP の発生に対する Ca^{2+}の役割を検討した。

【方法】動物はモルモットを使用した。イオン選択性電極と KCl 電極を用いて，内リンパ腔または外リンパ腔に薬剤を投与した時の EP と内リンパ液 Ca^{2+}濃度 ($[Ca]_e$) を測

定した。
【結果】一過性の無呼吸負荷や CO_2-free 溶液の外リンパ潅流にて，EP 低下と($[Ca]_e$)の上昇が認められた。EGTA-AM (300 μM) 溶液や Ca^{2+}チャネル阻害剤のニフェジピン (10μg/ml) を内リンパ腔に投与すると EP は軽度上昇し，一過性無呼吸負荷による EP の低下は 40-60%抑制された。逆に，高濃度の EGTA-AM (~1 mM) 投与では EP は低下した。さらに，Ca^{2+}チャネル賦活剤の Bay K 8644 (10μM) を内リンパ腔に投与すると緩やかに EP が低下した。一方，EGTA-AM やニフェジピンの外リンパ腔投与では，一過性無呼吸負荷による EP 低下は抑制されなかった。
【結論】EP の形成と維持には，内リンパ腔に面した細胞の細胞内 Ca^{2+}濃度を適切に保つことが重要である。

（2）胃粘膜修復におけるイオントランスポーターの役割

中村英志[1,2,3]，林　周作[1]，遠藤拓也[1]，久保儀和[1]，Susan J Hagen[3]，竹内孝治
（京都薬科大学薬物治療学教室[1]
横浜市大大学院医学研究科臓器再生医学[2]
Dept. of Surgery, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School[3]）

【目的】胃粘膜傷害の修復過程において，上皮細胞の遊走は重要であるが，この遊走を制御するイオントランスポーターの詳細については不明である。そこで関与するイオントランスポーターについて薬理学的に解析した。
【方法】ラット胃上皮細胞株 RGM1 をプレートにシードし，コンフルエントになった各 well の中央に円形の損傷を作製し，0，4 および 8 時間後における損傷面積の変化を測定した。また，RT-PCR 法により，イオントランスポーターの mRNA 発現を検討した。
【結果】生理的バッファー条件下において，RGM1 に惹起した損傷面積は経時的に縮小した。Monocarboxylate transporter (MCT) の阻害薬である phloretin (30-100μM), 並びに DIDS (10-300μM) は損傷面積の縮小を濃度依存的に抑制した。RGM1 は MCT サブタイプの中でも MCT1 を強く発現していた。
【結論】損傷の修復過程における胃粘膜上皮細胞の遊走には MCT1 が大きく関与していることが示唆された。

（3）顎下腺腺房細胞における振動性 Cl^-分泌の律速過程を支配する NKCC 活性

杉田　誠，　広野　力，　柴　芳樹
（広島大学大学院医歯薬学総合研究科・創生医科学専攻・病態探究医科学講座）

顎下腺腺房細胞では副交感神経刺激により細胞内 Ca^{2+}濃度が上昇し，水分泌が引き起こされる。基底側方膜に存在する Na^+-K^+-2Cl^-共輸送体や Cl^--HCO_3^-交換体により，細胞内に輸送された Cl^-が Ca^{2+}依存性 Cl^-チャネルを介して腺腔側に分泌されることがその水分泌の引き金となる。しかし，Cl^-分泌量を決定するものは腺腔側の Cl^-チャネル活性であるのか，Na^+-K^+-2Cl^-共輸送体や Cl^--HCO_3^-交換体の活性であるか不明である。本研究ではグラミシジン穿孔パッチクランプ法を適用し，Ca^{2+}依存性の Cl^-分泌の律速過程を支配する分子活性を明らかにすることを目的とする。グラミシジン穿孔パッチクランプ法では，細胞内の Cl^-を含むアニオン濃度は，細胞膜に発現するチャネルおよび輸送体により調節され，生理的組成に近い状態で維持される。顎下腺腺房細胞において，グラミシジン穿孔パッチクランプ法により観察される Ca^{2+}依存性の振動性 Cl^-電流は，Na^+-K^+-2Cl^-共輸送体の阻害剤である Bumetanide により顕著に抑制された。また Na^+-K^+-2Cl^-共輸送体活性を増強する Genistein は Ca^{2+}依存性 Cl^-電流量を増大させた。顎下腺腺房細胞では，Na^+-K^+-2Cl^-共輸送体活性が副交感神経性刺激による Ca^{2+}依存性の振動性 Cl^-分泌の律速過程を支配することが示唆された。

（4）高浸透圧条件下における上皮細胞の調節性細胞容積増大機構の解析

高橋信之，M.V.V. Subramanyam，岡田泰伸（自然科学研究機構　生理学研究所　機能協関部門）

上皮細胞は，様々な細胞外高浸透圧ストレスにさらされている。それにも関わらず，それらは常にほぼ一定の細胞容積を維持している。これは，細胞外高浸透圧条件下での容積縮小後に，NaCl 取込とそれに伴う水の流入による調節性細胞容積増大 (regulatory volume increase : RVI) と呼ばれる容積調節能を上皮細胞が持っていることによる。そこで「細胞外高浸透圧刺激がどのようにして RVI が起こるのか」を明らかにする目的で次のような実験を行った。ヒト上皮 HeLa 細胞には様々なイオントランスポータが発現しているが，高浸透圧条件下における RVI は，Na^+/H^+ exchanger (NHE) の阻害剤および Cl^-/HCO_3^- exchanger (anion exchanger: AE) の阻害剤によって阻害された。他のトランスポータ阻害剤では抑制が見られなかったため, HeLa 細胞の RVI は NHE と AE が関与する NaCl の取込によるものであると考えられた。Amiloride と DIDS の共添加で HeLa 細胞の RVI はほぼ完全に抑制され，その結果，細胞縮小が長時間持続されれば，さらにカスパーゼ 3 の活性化が検出され，アポトーシスが誘導された。RVI 誘導のシグナル伝達系を解析する目的で各種リン酸化酵素阻害剤を添加したところ, Akt (PKB) の阻害剤で RVI が抑制された。高浸透圧条件下で Akt はリン酸化されており，活性化されていることから，HeLa 細胞での RVI は，高浸透圧条件により活性化された Akt が NHE/AE を介した NaCl 取込を促進させて達成されることが示唆された。

（5）熱ショック応答と上皮系感覚器の維持

高木栄一，藤本充章，林田直樹，井上幸江，中井　彰
（山口大学大学院医学系研究科生体シグナル解析医学講座）

熱ショック転写因子群 (HSFs) は，一群の熱ショック蛋白質の発現を制御する転写因子群である。動物細胞は HSF1，HSF2，そして HSF4 の少なくとも 3 つの HSF 遺伝子産物を発現している。これまでに，熱ショック応答に必須の HSF1, そして HSF2 がともに生殖臓器の形成や脳形成に必須であることが明らかにされているが，その分子機構がストレスと関連したものであるのかにつてまったく明らかにされていない。我々は，HSF1 と HSF4 の遺伝子欠損マウスを作成し，それらの個体レベルでの生理機能を明らかにしてきた。HSF4 遺伝子欠損マウスの解析から，HSF4 はレンズの維持に必須であり，発生時期特異的に分子シャペロンの発現誘導と維持，ならびにレンズ上皮細胞の増殖と分化を制御することが明らかになった。さらに，上皮系感覚臓器を調べたところ，HSF1 が嗅神経上皮の維持に必須であることがわかった。やはり，HSF1 は発生時期特異的に分子シャペロンの発現を誘導し，同時に細胞の増殖分化因子を制御していた。感覚器のなかでもレンズと嗅上皮は発生学的に密接に関連している。これらの研究により，熱ショック転写因子群が，上皮細胞から形成されるプラコードに由来する 2 つの感覚器の形成に関与していること，そしてそれらの器官の維持がストレスと関連したものであることが明らかとなった。

（6）食塩感受性高血圧症とアルドステロンによる上皮型ナトリウムチャネル発現の異常制御

新里直美，青井渉，丸中良典（京都府立医科大学大学院　生理機能制御学）

正常人では，高食塩食を摂取してもアルドステロンの分泌を抑制してナトリウムを排泄し，高血圧症を引き起こさないよう恒常性が維持されている。この恒常性維持には, 腎臓の遠位尿細管/皮質集合管での上皮型ナトリウ

ムチャネル(ENaC) を介するナトリウム再吸収が重要な役割を担っていることが知られている。しかし，食塩感受性高血圧症患者では，このような恒常性維持が破綻し，血圧が上昇すると考えられる。このメカニズムを解明するために，食塩感受性高血圧症モデル動物の Dahl salt-sensitive (DS)と Dahl salt-resistant (DR)ラットを用いてアルドステロンによる ENaC の発現制御について検討した。ラットは副腎を摘出した後に，アルドステロンを腹腔内に注入し，6 時間後に腎臓を摘出して ENaC の発現やその発現制御に関わる因子の活性を測定した。その結果，DS ラットにおいて ENaC の alpha サブユニットはアルドステロンの増大に伴って発現が増大したが，beta と gamma サブユニットは発現が減少し，血漿アルドステロン濃度と逆相関した。以上のことから，アルドステロンによる ENaC の発現制御異常が食塩感受性高血圧症発症の一因であることが示唆された。

（7）腎尿細管上皮細胞管腔側における有機アニオントランスポーターOATs 機能発現の分子基盤：PDZ タンパク質の役割

安西尚彦[1]，遠藤　仁[1,2]（[1]杏林大学医学部薬理学教室，[2]㈱富士バイオメディックス）

SLC22 に分類される有機アニオントランスポーター OATs は主として腎尿細管に存在し，薬物や毒素などの生体異物の解毒・排泄に関与するだけでなく，ラジカルスカベンジャー作用を持つ尿酸などの内因性物質の再吸収等を介して生体の防御に重要な役割を果たしている。近年腎尿細管上皮細胞頂上膜（管腔側）に存在するトランスポーターは，その細胞内 C 末端の PDZ モチーフを介し，NHERF family と呼ばれるタンパク質と結合して，PDZ ネットワーク上に存在し，機能を発現させることが報告されている(Anzai et al., *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2005)。我々の同定した OATs である尿酸トランスポーターURAT1 及び有機アニオントランスポーターOAT4 も，酵母ツーハイブリッド法を用いた解析により，PDZ タンパク質と結合することが明らかになり，その結合が細胞膜上発現を安定化・増加させ，輸送活性の増加につながることを報告した(Anzai et al., *J Biol Chem*, 2004: Miyazaki et al., *J Am Soc Nephrol*, 2005)。その後有機アニオン輸送に関与する他の分子も PDZ タンパク質と結合することが明らかになり，PDZ ネットワークを介して形成された分子複合体が一機能ユニットとして腎臓における有機アニオン輸送に関与するという可能性が示唆された。

（8）Proteinase-activated receptor-1 活性化ペプチドのマウス盲腸壁内神経活性化

鈴木裕一，池原修（静岡県立大学大学院生活健康科学研究科）

Proteinase-activated receptor(PAR)は生体に広く分布し，様々な protease により活性化され，炎症反応を始め多くの生体調節にかかわっている。PAR はタイプ 1 から 4 まで知られているが，本研究はタイプ 1 の PAR を活性化するペプチド，PAR1-AP を用い，マウス盲腸粘膜下神経に対する効果を検討した。Ussing chamber を用い短絡電流(Isc)測定を行ったところ，PAR1-AP の漿膜側投与は TTX 感受性の Isc の上昇を引き起こした。この上昇に対する阻害剤の効果を検討した結果，粘膜下神経に PAR1 受容体が存在し，その活性化により主として tachykinergic neuron を介した Cl 分泌が引き起こされること，また cholinergic neuron も一部関与すること，さらに，ヒスタミン，アラキドン酸カスケードの活性化も起こすこと，が示唆された。PAR1 は thrombin で活性化されることが知られているので，この効果は腸組織の炎症反応（血漿成分の浸出）に伴う腸液分泌亢進反応に関与していると考えられる。

（9）*Helicobacter pylori* 菌体毒素 CagA による胃粘膜上皮内活性酸素産生

半田　修[1]，内藤裕二[2]，石井剛志[3]，高木智久[1]，古倉　聡[1]，吉田憲正[4]，吉川敏一[3]
（京都府立医科大学生体安全医学講座[1]，生体機能分析医学講座[2]，
京都府立医科大学大学院生体機能制御学[3]，大学院消化器病態制御学[4]）

Helicobacter pylori(*H. pylori*) 特に CagA 陽性菌株の感染は萎縮性胃炎や胃癌の危険因子である。しかし CagA による胃粘膜上皮細胞応答に関しては未だ不明な点が多い。今回我々は CagA が胃上皮細胞の活性酸素産生に及ぼす影響について *in vitro* で検討をおこなった。ラット胃粘膜上皮由来の RGM1 細胞に cagA 遺伝子をテトラサイクリン制御下 (Tet-off system) に発現させ，細胞内 CagA 発現，活性酸素産生，NFκB 活性化などにつき検討を行った。Non-transfected RGM1 と Mock では Tetracyclin の有無にかかわらず CagA 発現は認めず，活性酸素産生，NFκB 活性化も認めなかった。CagA transfected RGM1 では Tet-off により CagA 発現を認め，活性酸素産生，NFκB 活性化を認めた。蛍光色素を用いた検討では CagA の発現により主にミトコンドリアから活性酸素産生がおこっていることが推測された。

（10）モルモット胃幽門腺粘膜における COX-1と COX-2の役割：プロスタグランジン E_2(PGE_2)放出

中張隆司（大阪医科大学　生理学教室）

モルモット胃幽門粘膜におけるプロスタグランジン E_2(PGE_2) 放出について検討した。胃幽門粘膜は非刺激時に PGE_2 を放出していた（基礎放出）。Acetylcholine (ACh) はこの PGE_2 放出を $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を介して約 3 倍に増加させた（ACh 刺激性放出）。PGE_2 放出はアラキドン酸により増加し，PLA_2 阻害剤，COX 阻害剤(aspirin and indomethacin) により抑制された。COX-1 阻害剤 (SC560, 100nM)は基礎 PGE_2 放出は抑制しなかったが，ACh 刺激性 PGE_2 放出は抑制した。反対に COX-2 阻害剤 (NS398, 20 μM)は基礎 PGE_2 放出を抑制したが，ACh 刺激性 PGE_2 放出は抑制しなかった。さらに単離幽門上皮細胞では COX-1 阻害剤のみが PGE_2 放出を阻害し，COX-2 阻害剤による抑制は認められなかった。これらの結果は基礎 PGE_2 放出は間質細胞の COX-2 により維持されており，ACh 刺激性PGE_2放出は粘膜上皮細胞の COX-1 により維持されていることを示している。本研究の結果から，胃幽門粘膜では，間質細胞の COX-2 により産生された PGE_2 により粘膜の恒常性が維持され，上皮細胞の COX-1 により産生された PGE_2 により粘膜分泌の autocrine mechanism が維持されていることが明らかになった。

（11）アラキドン酸カスケードの制御によるがん予防

西野輔翼（京都府立医科大学大学院・医学研究科・分子生化学）

宿主防御機構として上皮膜のリン脂質から供給されるアラキドン酸の代謝産物が重要な役割を果たしているが，その過剰産生は逆にがん等の疾患の原因となることが明らかとなっている。そこで，アラキドン酸カスケードを進行させるホスホリパーゼ A2 (PlaseA2)，シクロオキシゲナーゼ (COX)，リポキシゲナーゼ (LOX) 等の過剰亢進を抑制することによってがん予防を行う戦略が提案され，多彩な研究が進められてきた。

たとえば，大腸発がん過程においては，COX が重要な役割を果たしていることが知られている。そして COX

阻害作用を示すアスピリン投与によって大腸がんの発生が抑制されることを示唆する結果がヒトを対象とした研究によって得られたことをきっかけとして，実用化へ向けた試みが展開されるようになった。現時点では合成薬剤を用いた研究が先行しているが，天然化合物の応用も今後の課題である。そこで，甘草やラッキョウなどに含まれている天然フラボノイドの一種であるイソリクイリチゲニン（抗炎症作用を示し，皮膚発がんを抑制することが以前に報告されていることに加えて，最近になって前立腺がんの増殖抑制効果を示すことも明らかとなっている）を取り上げて検討した。その結果，アゾキシメタン(AOM)で誘導される大腸前がん病変および大腸がんの発生が抑制され，また誘導型COX(COX-2)の発現亢進が抑制されることも明らかとなった。

イソリクイリチゲニンは肺発がんを抑制することも確認しているので，がん予防に極めて有望な天然化合物と考えられる。

（12）炎症組織特異的な脱抱合酵素誘導について

大井直美，橋本堂史，後藤美保，金沢和樹（神戸大学大学院・自然科学研究科）

フラボノイドは抗酸化能や抗炎症活性などを有すると報告されているが，生体内ではその水酸基の一部がグルクロン酸あるいは硫酸抱合された形態で血流を循環している。抱合体は体細胞内には取込まれず，タンパク質にも作用しないので，生理活性はない。しかし下位らの報告によると，リポポリサッカライドなどで炎症を誘発した場合に，脱抱合酵素のβ－グルクロニダーゼ活性が上昇する。したがって，生体異物であるフラボノイドは，生体が健常な場合は生理活性を示さない抱合体として循環して尿に排泄されるが，炎症組織が存在すると脱抱合されてその炎症修復に機能する可能性が高いと考えられる。本報告では，これを証明するために，ラットにジエチルニトロソアミンとフェノバルビタールで肝臓特異的に前がん病変を誘導し，β－グルクロニダーゼ活性と，フラボノイドの脱抱合を測定した。β－グルクロニダーゼ活性は，前がん病変を誘導した肝臓で特異的に，対照群の452.3±31.7 nmol/mg protein/hから624.3±97.0 nmolに有意に上昇していた。この活性上昇は，腎，心，脾臓，胸腺，血漿など他の臓組織では観察されなかった。また，肝臓では，ケルセチンの抱合体量が減少し，アグリコン量が対照群の69.9±8.1 nmols/gから，前がん病変群149.5±60.5 nmols/g に有意に増加していた。一方，前がん病変誘導と同時にケルセチンを連続経口投与したときには，GST-P陽性細胞巣の発生数が75%に抑制された。前がん病変形成組織は特異的にβ－グルクロニダーゼ活性を上昇させ，血中のケルセチン抱合体を脱抱合して病変組織にアグリコンとして取込んでいると考えられた。

（13）骨シアロタンパク質遺伝子の発現に対するケルセチンの影響

金　東淳，小方　頼昌（日本大学松戸歯学部歯周治療学講座）

骨シアロタンパク質(BSP)は石灰化組織特異的に発現し，アパタイト結晶形成能を有することから，初期の石灰化における役割が注目されている。ケルセチンはフラボノイドの1種で，骨代謝に対する効果が報告されているが，その機序は明らかではない。そこで今回我々は，BSPの転写に対するケルセチンの効果に関して検索を行った。

ラット骨芽細胞様細胞(ROS17/2．8)に5 μMのケルセチンを作用させ，BSP mRNA発現に対する影響をノーザンブロット法にて検索を行った結果，12 時間刺激後にBSP mRNA量は増加した。BSPプロモーターを挿入したルシフェラーゼプラスミドを上記細胞に導入し，BSPの転写活性に対するケルセチンの効果を検索した結果，転写開始点よりも-116塩基対上流までのBSPプロモーター

配列を含むコンストラクトにおいて，転写活性の上昇が認められた。プロモーター配列と核内タンパク質との結合をゲルシフトアッセイにて検索した結果，cAMP 応答配列，FGF2 応答配列およびホメオボックス応答配列への核内タンパク質の結合量がケルセチン刺激後に上昇した。以上の結果は，以前に我々が報告したイソフラボンの結果と異なることから，その差異に関して今後検討の予定である。

（14）ヒト小腸 Caco-2細胞への吸収代謝におけるフラボノイドの構造特異性

室田佳恵子，吉田修治，清水寿美恵，寺尾純二
（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部食品機能学分野）

植物性食品中に広く存在するフラボノイドは主に小腸において吸収され，腸管細胞内で解毒代謝を受けグルクロン酸/硫酸抱合体として体内へと輸送される。本研究では，ヒト結腸ガン由来ながら小腸吸収細胞のモデルとして汎用されている Caco-2 細胞を用いて，異なる構造をもつフラボノイドの腸管吸収と代謝を比較し，その構造の違いによる特性について検討した。

代表的なフラボノール型フラボノイドであるケルセチンは，Caco-2 細胞内でグルクロン酸/硫酸抱合化やメチル化を受けた代謝物として刷子縁側から排出される一方で，基底膜側への輸送，すなわち吸収がおこる。この特徴はフラボン/フラボノール型の分子種に共通してみられたが，イソフラボノイドでは細胞内代謝を受けていないアグリコンが基底膜側へ輸送される割合が高かった。そこで，フラボノイド類とイソフラボノイド類を同時に細胞に添加し，吸収代謝に与える影響を調べたところ，フラボノイドの共存によりイソフラボノイドアグリコンの吸収量が増加した。またフラボノイド同士の同時添加は総吸収量を増加させる一方，イソフラボノイド同士の同時添加は代謝物生成を抑制しアグリコンの吸収量を増加させることが示唆された。

以上の結果より，Caco-2 細胞内の第二相解毒酵素群はイソフラボノイド型分子よりフラボノイド型分子を好んで代謝することが推定された。

8. 視知覚への多角的アプローチ－生理，心理物理，計算論 2

2005 年 6 月 23 日－6 月 24 日
代表・世話人：塩入　諭（東北大学）
所内対応者：小松　英彦（生理学研究所）

（1）視覚長期記憶の神経機構：大脳側頭葉における双方向情報処理
納家　勇治（東京大学医学系研究科）

（2）視覚野における網膜位置依存的表現と視覚的運動
蘆田　宏（京都大学大学院文学研究科）

（3）サッカードによる対象の運動知覚
伊藤　裕之（九州大学大学院芸術工学研究院）

（4）色の恒常性の臨界期
杉田　陽一（産業技術総合研究所脳神経情報研究部門）

（5）周期的同期発火による視覚情報のコーディング
立花　政夫（東京大学大学院人文社会系研究科心理学研究室）

（6）周辺視における色の見えとその応用
阿山　みよし（宇都宮大学大学院工学研究科）

（7）テクスチャ知覚の心理物理学：弁別機構から質感知覚まで
本吉　勇（NTT コミュニケーション基礎研究所

（8）A conundrum of stereoscopic mechanism
藤田　一郎（大阪大学大学院生命機能研究科）

（9）知覚的フィリングインが示すさまざまな性質
阪口　豊（電気通信大学大学院情報システム学研究科）

(10) 色カテゴリー課題と色弁別課題遂行中のサル TE 野細胞の色応答比較
鯉田　孝和（生理学研究所感覚認知情報研究部門）

(11) 脳損傷に伴う視覚選択のトップダウン・コントロールの障害
熊田　孝恒（産業技術総合研究所人間福祉医工学研究部門）

(12) 初期視覚系における刺激特徴依存的な反応特性の変化：視床－皮質間結合の見直し
佐藤　宏道（大阪大学大学院医学系研究科認知行動科学）

(13) 網膜疾患に起因する大脳視覚野の再構築は起こりうるか
仲泊　聡（神奈川リハビリテーション病院・東京慈恵会医科大学眼科学講座）

(14) 道順のコーディング：内側頭頂葉ニューロンの機能
泰羅　雅登（日本大学　大学院総合科学研究科・医学部先端医学）

【参加者名】

塩入　諭（東北大電気通信研究所），納家　勇治（東大医学系研究科），蘆田　宏（京大院），伊藤　裕之（九大院），杉田　陽一（産総研），立花　政夫（東大院），阿山　みよし（宇都宮大院），本吉　勇（NTT - CS 研），藤田　一郎（阪大院），阪口　豊（電通大院），鯉田　孝和（生理研），熊田　孝恒（産総研），佐藤　宏道（阪大院），仲泊　聡（神奈川リハビリテーション病院・東京慈恵医大），泰羅　雅登（日大院），鵜飼　一彦（早稲田大），鄭　美紅（早稲田大），久世　淳子（日本福祉大），内川　惠二（東工大院），谷藤　学（理研），酒井　宏（筑波大院），松宮　一道（東北大），高橋　良香（千葉大），遠山　和也（東京工科大），則武（東京工科大），佐藤　雅

之（北九州市立大），庄司　将章（東工大院），永井　岳大（東工大院），福屋　貴之（東京工業大学大学院），河原　勇美（東工大院），篠森　敬三（高知工科大），平山正治（高知工科大），則武　厚（玉川大），田中　靖人（情報通信研究機構），尾崎　統（統計数理研究所），石黒 真木夫（統数研），福島　邦彦（東京工科大），田村　義保（統数研），天野　薫（東大院），西田　真也（NTT‐CS 研），秋光　淳生（東大院），青山　俊弘（鈴鹿高専），小泉　京平（豊橋技科大），深田　斉秀（基生研），田村弘（阪大），西村　悠（筑波大），渡辺　辰巳（松下電器産業），小竹　康代（阪大），館　俊太（阪大），中野　美和（阪大），藤井　正樹（中京大院），堺　浩之（理研-BSI），大森　敏明（JST・理研），竹松　慎之（中京大），武田二郎（東工大），森井　政仁（東工大），西澤　孝史（東工大），池田　琢朗（玉川大），伊佐　正（生理研），野口　泰基（生理研），橘　吉寿（生理研），浦川　智和（生理研），村越　一支（豊橋技科大），鈴木　一隆（浜松ホトニクス），観音　隆幸（豊橋技科大），豊田　敏裕（豊橋技科大），打尾　健太（豊橋技科大），谷川　久（理研），赤塚　浩二（本田技術研究所），鈴木　亮子（基生研），佐藤　俊治（東北福祉大），藤澤　圭祐（宇都宮大院），池添　貢司（阪大），ウーハオジャン（阪大），鬢櫛　一夫（中京大），高瀬　慎二（中京大院），岡田　真人（東大），高橋　伸子（愛知淑徳大），瀬川　かおり（東工大），鳴海　翔太（東工大），吉田　正俊（生理研），高平　小百合（玉川大），宮崎　貴浩（群馬病院），森戸　勇介（総研大），田邊　宏樹（生理研），稲垣　幸一郎（中部大），吉川　明昌（中部大），田中　絵実（生理研），田内　雅規（岡山県立大），木村　智斉（中京大），神作　憲司（生理研），鳥山　直幹（中部大），吉山　顕次（国立長寿医療センター），和坂　俊昭（生理研），内山　仁志（生理研），八木　哲也（阪大），齋藤　大輔（生理研），平山幸人（中部大），吉田　光平（中部大），太田　顕広（中部大），石垣　賢司（中部大），稲熊　徳明（中部大），犬飼　明恵（中京大），一平　紀孝（理研），本田　哲夫（生理研），酒井　朋子（統数研），小松　英彦（生理研），伊藤　南（生理研），小川　正（生理研），郷田　直一（生理研），松本　正幸（生理研），横井　功（生理研），安田　正治（生理研），松茂良　岳広（生理研），原田　卓弥（生理研）

【概要】

生理学研究所研究会，「視知覚への多角的アプローチ－生理，心理物理，計算論 2」は，平成 17 年 6 月 23 日，24 日に岡崎コンファレンスセンターにおいて開催された。参加者は前回を 20 名程度上回る 120 名近くに達したが，前回より広い会場での実施であり，参加者に不便をかける事なく進行することができた。参加者は多分野にわたる大学院生を含む若手の研究者が多く，学際領域としての将来性が期待できる。23 日には 8 件の講演と懇親会，24 日は 6 件の講演があり，活発な議論が行われた。講演は，生理学，心理物理学，計算論の立場の気鋭の研究者を中心とした興味深い内容で占められ，電気生理，脳活動記録，心理物理，計算論などで複数の領域に関連するものが多く，学際性の豊かなものがほとんどであった。全体を通してみて，視覚研究者の学際的な意見交換の場として非常に有益な研究会であり，今後の視覚研究分野の発展に貢献することに疑いはない。

（1）視覚長期記憶の神経機構：大脳側頭葉における双方向情報処理

納家　勇治（東京大学医学系研究科）

視覚長期記憶の貯蔵庫と考えられるサル下部側頭葉皮質は TE 野と傍嗅皮質の細胞構築学的に異なる 2 つの領域から構成されている。これらのうち，視覚新皮質に属する TE 野は物体視覚を処理する視覚腹側路の最終段階に位置し，一方，辺縁皮質に属する傍嗅皮質は内側側頭葉記憶システムの構成要素とされてきた。我々は対連合記憶課題遂行中のサル下部側頭葉からこれら 2 つのサブ領域を区別して単一ニューロンの活動を記録し，手がかり刺激に対する視覚応答と遅延期間活動について領域間での比較を行った。その結果，TE 野から傍嗅皮質へ前向きにシグナルが伝達される際，手がかり刺激の組み合わせに関する情報が急激に増大する一方，傍嗅皮質から TE 野への逆向きシグナル伝達は想起された情報の伝播に関与していることが示唆された。

（2）視覚野における網膜位置依存的表現と視覚的運動

蘆田　宏（京都大学大学院文学研究科）

一般に視覚対象は動きの方向にずれて見える。これは視覚情報処理などにおける時間的遅れを補うためかもしれない。ヒトの fMRI 実験では，一次視覚野において賦活位置が動きと逆方向にずれるという不可解な報告がある(Whitney et al, 2003, Science)が，この研究には実験デザインや間接的な解析などの問題があり，解釈に疑問が残る。本研究では，fMRI を用いて，動きを伴う視覚刺激の視覚野における表現を再検討した。ドリフトする同心円状正弦波への応答を偏心度マップと重ねることにより，活動量を偏心度の関数として表現したところ, V3 まででは運動による位置のずれはほとんど見られず，後ろの縁で活動量が増す傾向のみが示された。つまり，Whitney らの測定結果は支持しうるが，逆方向へのずれという解釈は支持できない。なお，網膜位置マップが不明瞭な高次視覚野では他の方法が必要となる。現在，V5 で正方向へのずれを示唆する予備的な結果が得られている。

（3）サッカードによる対象の運動知覚

伊藤　裕之（九州大学大学院芸術工学研究院）

サッカード時には網膜像が急速に移動するにもかかわらず，通常外界の運動は知覚されない。しかし，暗い場所で発光する対象などは，高コントラストでしかもサッカード後にマスクする像が欠如しており，容易にサッカードを対象の動きとして認識できる。今回は，逆に低輝度コントラストにおいて対象の動きが知覚される例を報告し，そのメカニズムを考察する。等輝度の色定義パタンは，サッカード時に動いて見えるが，輝度差があるパタンでは動きが見えない。輝度コントラストをもつ輪郭を同色相で重ねると色定義パタンの動きは見えなくなるが，無相関なパタンを重ねても色定義パタンの動きは見える。これらのことから，高速な色定義運動はサッカード時に抑制されずに知覚されるが，輝度と色でエッジの相関がある場合は，色の運動知覚まで抑制されることがわかる。

（4）色の恒常性の臨界期

杉田　陽一（産業技術総合研究所脳神経情報研究部門）

生後間もないサルを 1 年間単色光照明だけで飼育した後に，色彩感覚を検査した。単色光照明で育ったサルは，見本の色と同じ色の対象物を選ぶという見本合わせの課題では，長い訓練によって正常なサルと同じ成績が得られるようになったが，見本の色によく似た対象物を選ぶという類似性判断の課題では，正常なサルとは極めて異なった結果が得られた。この結果は，単色光サルが，正常サルとは異質な方法で色を分類していることを示している。さらに，いくつかの色の中から一つの色を選択するという課題の結果は, 照明条件によって大きく変化し，単色光サルに「色の恒常性」が備わっていないことが明らかになった。

（5）周期的同期発火による視覚情報のコーディング

立花　政夫（東京大学・大学院人文社会系研究科・心理学研究室）

光情報は，網膜内で緩電位によって処理された後，神経節細胞の軸索（視神経）を伝導するスパイクによって視覚中枢に運ばれる。しかし，スパイク列には発火頻度・発火数・発火のタイミング・同期的発火や周期的発火など様々なパラメータが考えられるため，どれが視覚情報を符号化するのに使われているのかは必ずしも明らかではない。私達は，拡大する黒スポット光刺激に対するカエルの逃避行動に着目し，眼球内に GABA 受容体の阻害剤を注入したときの逃避行動の変化を調べると共に，これらの阻害剤が網膜神経節細胞のスパイク発火にどのような影響を与えるかについて剥離網膜標本にマルチ電極法を適用して検討した。その結果，オフ持続型神経節細胞（ディミング検出器）群の周期的同期発火が逃避行動に関連する視覚情報を視覚中枢に送っていることが明らかになった。

（6）周辺視における色の見えとその応用

阿山　みよし（宇都宮大学大学院工学研究科）

視野全域における色の見えを 10 名の被験者において定量的に測定し，その結果をユニーク色（混じりけのない赤，黄，緑，青という色知覚）の知覚的強さの等高線図（カラーゾーンマップ）で示した。

赤，黄，緑，青のどの刺激においても，カラーゾーンマップは視野の右及び下方向に広い特性を示した。その水平及び垂直方向の非対称性の様相を，網膜視細胞，神経節細胞，空間解像度，副尺視力の非対称性と比較したところ，網膜の生理学的特性との方で高い整合性が得られた。

赤，黄，緑，青の中では，青のカラーゾーンマップが最も広く中心での色み成分を 100 とした場合，50%を示す領域は緑が最も狭く，青が最も広い結果と成った。カラーゾーンマップと関係する応用研究として，視野広範囲での LED 刺激の色の見えや，走行画面上での有効視野など応用的研究の結果も青刺激が広い特性となり，基礎研究と応用の深い関連が示された。

（7）テクスチャ知覚の心理物理学: 弁別機構から質感知覚まで

本吉　勇（NTT コミュニケーション科学基礎研究所）

地面，森，食べ物の表面など，自然の光景はテクスチャに満ちている。人間はこうしたテクスチャの違いを容易に弁別し，その情報を図地の分離や形状の復元，さらには質感の推定において有効に用いている。ヒトの視覚系はどのようにしてテクスチャを分析し，高次の視覚課題において利用しているのだろうか？　本講演では，われわれの心理物理学的研究を中心に，テクスチャ弁別の基礎過程に関する理論的・実験的知見を概観するとともに，表面質感の知覚（明度，光沢感，透明感など）におけるテクスチャ情報のインパクトに関する最新の知見を紹介する。

（8）A conundrum of stereoscopic mechanism

藤田　一郎（大阪大学大学院生命機能研究科）

両眼視差はV1で検出される。しかし，V1細胞の性質はいくつかの点で両眼奥行き知覚の性質と食い違っており，両眼奥行き知覚の成立にはV1以後の視覚領野の活動が必要と考えられる。では，どの視覚領野が両眼奥行き知覚の形成に関与しているのだろうか。choice probability 解析や電気刺激実験による強力な証拠がそろっているMTが最有力候補だが，別の実験は，MT細胞が両眼対応点問題を解決していないことを示している。V4やITが両眼対応点問題を解決しているという証拠が出るに伴い，MT 細胞のこのふるまいは大きな謎となってきた（「両眼対応点問題を解かずに両眼立体視に関与するということはあり得るのか？」）。われわれは最近，心理物理実験と拡張視差エネルギーモデルの解析から，V1 細胞による両眼視差エネルギー計算の出力が粗い奥行き知覚を担うものの，奥行き面の知覚を伴わないことを示唆する結果を得た。この結果に基づいて，多くの生理学的知見を整合的に説明する両眼立体視メカニズムに関するわれわれの仮説を紹介する。

（9）知覚的フィリングインが示すさまざまな性質

阪口　豊（電気通信大学大学院・情報システム学研究科）

知覚的フィリングイン(perceptual filling-in/fading)とは，視覚刺激を数秒間固視し続けると，周辺視野に提示された刺激があたかも消失するかのように感じられる錯視現象である。この現象は初期視覚における神経活動の適応や伝播によって引き起こされていると考えられているが，その詳細はいまだ明らかでない。演者は，フィリングイン現象のメカニズムを探りつつ，初期視覚における情報表現様式や相互作用の機序を知る手がかりが得られることを期待して，この現象の性質を調べる心理実験を暗中模索的に行なってきた。本講演では,「差分効果」「図地非対称性」「視野の非一様性」「瞬時充填」「複数領域間の相互作用」など，これらの実験を通じて見いだされたさまざまな性質についてお話ししたい。これらの現象論的データに対して，生理学的視点，情報論的視点からご意見をいただけると幸いである。

（10）色カテゴリー課題と色弁別課題遂行中のサルTE野細胞の色応答比較

鯉田　孝和（生理学研究所）
小松　英彦（生理学研究所）

視覚刺激が同じであっても，われわれはタスクやルールに応じて異なる行動ができる。このとき視覚野の神経活動はタスクによって影響されるだろうか。色弁別タスクと色カテゴリータスクの両方をサルに訓練し，色覚の高次領野と考えられる下側頭皮質（TE野）からニューロン活動を記録した。色刺激はCIE-xy色度図上で赤から緑に等間隔で並ぶ11色を用いた。カテゴリータスクではテスト色刺激が赤ければ固視を続け，緑であればサッケードを行う。弁別タスクではテスト色刺激の消失と同時に呈示される2つの色刺激のうち，テスト色刺激と同じ色に向かってサッケードする。その結果，タスクにより活動の強さが変化した細胞が見つかった。極端なケースでは一方のタスク実行中に神経応答がほとんど消失した。ただし，活動が変化しても多くの場合色選択性は保たれていた。このことから，タスク間の差は神経応答のゲイン変化で説明でき，タスクを示すトップダウン信号による色信号のゲーティングが起こっていることを示唆している。

（11）脳損傷に伴う視覚選択のトップダウン・コントロールの障害

熊田　孝恒（産業技術総合研究所人間福祉医工学研究部門）

前頭葉損傷患者に視覚選択課題を実施した研究を報告する。第 1 の研究では，特徴探索課題を用い，特定の種類の標的にのみ反応をする条件と，あらゆる標的に反応をする条件を設けた。右前頭葉損傷者 (YW) は，特定の標的に反応をする条件のみで顕著な障害を示した。あらゆる標的に反応をする条件では障害が認められなかったことから，ボトムアップの情報処理過程は障害されておらず，特定の特徴に加重するトップダウン過程の障害と解釈された。第 2 の研究では，左前頭葉損傷者 (DS) に反応すべき視覚属性選択を指示に従って切り替える課題（例えば，色つきの文字を提示し，色に反応する課題と文字に反応する課題を切り替える）を課したところ，大きな切り替えコストを示した。この結果から，直前の視覚属性に対する重み付けを破棄して，新たな属性に重み付けをセットする過程に障害があると考えられた。これらのデータに基づき，前頭葉機能と視覚選択の関連について議論する。

（12）初期視覚系における刺激特徴依存的な反応特性の変化：視床一皮質間結合の見直し

佐藤　宏道（大阪大学大学院医学系研究科認知行動科学）

一次視覚野 (V1) ニューロンに見られる刺激特徴抽出性や，刺激文脈依存的反応修飾 (CRM) は，大脳皮質内の機能構築様式を解明するための格好のモデルとして研究されている。しかし我々がネコの LGN においてニューロン活動を記録して V1 と比較したところ，LGN や V1 の刺激特徴選択性が，刺激のサイズや空間周波数に依存して変化することを見出した。特に，1) LGN ニューロンにおいて受容野よりも大きな刺激を用いた場合には明瞭な方位チューニングが生じた。2) LGN ニューロンにおいても CRM に方位コントラスト依存性が見られた。3) 低空間周波数にチューニングし，CRM の見られない LGN ニューロンにおいて高空間周波数の刺激を用いた場合には，明瞭な CRM が観察された。4) V1 ニューロンの方位チューニングは刺激サイズが大きくなるとシャープになった。これらの結果は LGN レベルの方位選択性および CRM の方位コントラスト依存性が，V1 ニューロンのそれの根拠となっている可能性を示唆する。

（13）網膜疾患に起因する大脳視覚野の再構築は起こりうるか

仲泊　聡（神奈川リハビリテーション病院・東京慈恵会医科大学）
北原　健二，浅川　晋宏（東京慈恵会医科大学）
Brian A. Wandell，Junjie Liu（スタンフォード大学）

視野の同一部位から入力を受ける左右眼の網膜ニューロンは，それぞれ大脳の V1 で隣接したコラムに投射することが知られる。この左右眼の網膜対応部位がともに傷害されると，両部位から投射を受ける V1 のニューロンの活性が不活化する。しかし，それは一時的であり，数ヶ月後には傷害部位の周囲網膜からの信号を受けるようになることがネコを用いて示されている。ところが，サルを用いた同様の実験の追試では，この再構築がまったく生じていないと最近報告された。ヒトにおいても，両眼の対応部位に病巣を有する患者で同様の事が生じると予想される。このような患者における fMRI 実験が複数の施設で行なわれている。我々も若年性黄斑変性 1 名，加

齢性黄斑変性 2 名，網膜色素変性 2 名の視覚野マッピングを fMRI を用いて行ない，網膜疾患に起因する大脳視覚野の再構築の有無について検討したので報告する。

（14）道順のコーディング：内側頭頂葉ニューロンの機能

泰羅　雅登（日本大学　大学院総合科学研究科・医学部先端医学講座）
佐藤　暢哉 (Department of Neurology, University of Rochester Medical Center)

近年，脳梁膨大部後部から内側頭頂葉に限局した損傷で「道順障害」と呼ばれる特異な見当識障害が生じることが報告されている。このような患者は，見ている風景や建物から，自分のいる場所がどこであるかということは認識できるが，特定の目的地に向かおうとすると，どちらの方向に進んでよいのかわからず，道に迷ってしまう。この症状のもとにある神経メカニズムを探るため，我々は，バーチャルリアリティによって，2 階建てのビルディングを構築し，その内部をジョイスティック操作によって移動するナビゲーション課題をサルにトレーニングした。課題遂行中に，サルの内側頭頂葉から単一ニューロン活動を記録し解析したところ，この領域の神経細胞の多くが場所の情報と，行動の情報を統合しているデータを得た。この結果は，内側頭頂葉の神経細胞が，いわゆる「道順」を構成する事に関与している可能性を示唆している。

9. 生体膜輸送分子複合体の分子構築と生理機能

2005 年 7 月 19 日－7 月 20 日

代表・世話人：金井 好克（杏林大学医学部）
所内対応者：井本 敬二（神経シグナル）

（1）グリア細胞の K^+・水輸送を担うチャネルの局在制御とその分子基盤

日比野浩，石井優，倉智嘉久
（大阪大学大学院医学系研究科・薬理学講座・分子細胞薬理学）

（2）AQP2 水チャネル変異による優性遺伝形式腎性尿崩症モデルノックインマウスの作成とその解析

内田信一，蘇原映誠，頼建光，桑原道雄，佐々木成
（東京医科歯科大学　大学院医歯学総合研究科　腎臓内科学）

（3）ヘテロ二量体型アミノ酸トランスポーターの局在を決定する因子

金井好克，安西尚彦，平田拓，Arthit Chairougdua（杏林大学医学部薬理学）

（4）無機リン酸トランスポートソームの機能制御とその破綻

宮本　賢一[1]，竹谷　豊[2]，伊藤　美紀子[1]，瀬川　博子[1]
（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部　分子栄養[1]，臨床栄養[2]）

（5）肝細胞胆管側膜上に発現される ABC トランスポーターの機能と局在変動

伊藤晃成，鈴木洋史（東京大学医学部附属病院薬剤部）

（6）脳内エネルギーと脂質恒常性における脳関門輸送関連蛋白の役割と連携

寺崎哲也，大槻純男
（東北大学未来科学技術共同研究センター，同大学院薬学研究科）

（7）免疫応答細胞における酸化的ストレス感受性 Ca^{2+}チャネル TRPM2 の活性化機構および生理的役割

山本伸一郎，原雄二，森泰生
（京都大学大学院　工学研究科　合成・生物化学専攻　分子生物化学分野）

（8）一酸化窒素による心筋イオンチャネル制御機構

古川哲史，白長喜，黒川洵子（東京医科歯科大学難治疾患研究所）

（9）腎臓糸球体スリット膜を支える分子複合体の解析

平林　享，神作　愛，畑　裕（東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科）

（10）新しい微小管結合蛋白質による細胞の機能と構造の制御

中西　宏之（熊本大学大学院医学薬学研究部細胞情報薬理学）

（11）IRSp53 の RCB ドメインによる細胞膜の変形機構

末次　志郎（東京大学医科学研究所腫瘍分子医学研究分野）

（12）小胞輸送系に介在する低分子量 G 蛋白質 Rab5 とその制御因子 RIN ファミリー

梶保　博昭[1]，堅田　利明[1]，仁科　博史[2]
（[1]東京大学大学院薬学系研究科・生理化学教室，
[2]東京医科歯科大学難治疾患研究所・発生再生生物学分野）

（13）多光子励起過程を用いた開口放出・溶液輸送機構の解析

根本知己[1]，岸本拓哉[1,2]，緒方衡[1,3]，兒島辰哉[1]，大嶋章裕[1]，河西春郎[1,2]
（[1]生理研・生体膜，[2]東大院・医，[3]防衛医大・病理）

（14）1 分子ナノバイオロジーが明らかにする細胞膜のデジタル式信号変換機構

楠見 明弘（京都大学再生医科学研究所/工学研究科マイクロエンジニアリング専攻，
科学技術振興事業団 ICORP 膜機構プロジェクト）

（15）表面形状と物性から見た蛋白質間相互作用様式の予測法の開発

木下　賢吾（東大医科研・ヒトゲノム解析センター）

【参加者名】

金井 好克（杏林大学医学部），寺崎 哲也（東北大学未来科学技術共同研究センター），鈴木 洋史（東京大学医学部附属病院），井上 昌俊（東京大学），梶保 博昭（東京大学大学院薬学系研究科），末次 志郎，木下 賢吾（東京大学医科学研究所），古川 哲史，仁科 博史（東京医科歯科大学難治疾患研究所），内田 信一，平林 享，畑 裕（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科），安西 尚彦，平田 拓，上野 剛，福冨 俊之（杏林大学医学部），森 泰生，若森 実，片野 正展，山本 伸一郎（京都大学大学院工学研究科），楠見 明弘（京都大学再生医科学研究所），倉智 嘉久，日比野 浩（大阪大学大学院医学系研究科），宮本 賢一，竹谷 豊，瀬川 博子，伊藤 美紀子（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部），中西 宏之（熊本大学大学院医学薬学研究部），檜山 武史（基生研），富樫 和也，富永 知子，西井 博子（統合バイオ），根本 知己，藤原 祐一郎，石井 裕，加勢 大輔，中条 浩一，井本 敬二（生理研）

（1）グリア細胞の K^+・水輸送を担うチャネルの局在制御とその分子基盤

日比野浩，石井優，倉智嘉久
（大阪大学大学院医学系研究科・薬理学講座・分子細胞薬理学）

個々の組織におけるイオン・水の極性輸送（ベクトル輸送）は，体液の適切なイオン環境の保持に不可欠である。脳アストロサイトなどのグリア細胞では，シナプスの活性化により放出された細胞外の過剰な K^+を取込み，血管の方向へ放出する機能を持つ。K^+-buffering 作用と呼ばれるこのベクトル輸送は，Cl^-を同時に運ぶため浸透圧勾配を生み，水輸送を伴う。K^+・水の輸送の共役は，神経機能の恒常性維持に重要である。以前よりアストロサイトでは，電気生理学的に豊富に観察される内向き整流性 K^+(Kir)チャネルが K^+-buffering 作用を担うと指摘されていた。最近，我々はその Kir チャネルが，Kir4.1 と Kir5.1 で構成されること，1 つの細胞に Kir4.1 ホモ複合体と Kir4.1/5.1 ヘテロ複合体の 2 種類のチャネルが存在し各々特定の膜ドメインに局在することを明らかにした。血管周囲突起には Kir4.1/5.1 ヘテロ複合体が発現しており K^+の放出に関与し，一方シナプス周囲ではヘテロ複合体と共に Kir4.1 ホモ複合体が各々異なった突起に局在し K^+の取り込みに携わると考えられた。ヘテロ複合体のチャネル活性は生理的範囲内の細胞内 pH で大きく制御されるため，アストロサイトでは K^+の放出と部分的な K^+の取込みが細胞内 pH により調節されていることが示唆された。また，血管周囲突起における Kir チャネルの局在は，ディストロフィン関連蛋白群という複合体により，少なくとも一部が決定されている可能性を見出した。これら 2 種類の Kir チャネルは，アストロサイトに唯一発現する水チャネルである AQP4 と同じ膜上で共存していた。更に生化学的解析によって，Kir4.1，Kir5.1 と AQP4 はグリア型 Cl-チャネルなどの機能分子と“ラフト”と呼ばれる微小膜ドメインで集積していることが明らかとなった。アストロサイトにおける K^+・水のベクトル輸送の機能的共役に，この微少膜ドメインが重要な役割を果たしていることが強く示唆された。

（2）AQP2水チャネル変異による優性遺伝形式腎性尿崩症モデルノックインマウスの作成とその解析

内田信一，蘇原映誠，賴建光，桑原道雄，佐々木成
（東京医科歯科大学　大学院医歯学総合研究科　腎臓内科学）

常染色体優性遺伝形式の腎性尿崩症(Autosomal Dominant type Nephrogenic Diabetes Insipidus: ADNDI)の原因として，Aquaporin 2 (AQP2) 水チャネルのC末端側の frame-shift 変異が知られている。以前我々は，10 塩基の deletion mutant である mutant AQP2 (763-772 del) が，MDCK 細胞において apical membrane ではなく basolateral membrane へ sorting されることを示した。この sorting 異常が腎性尿崩症にどのように関わっているかを調べるために，wild-type mouse AQP2 の C 末端を dominant negative effect を有する human AQP2 (763-772 del) に組み替えた knock-in mouse を作成し，解析を行った。

Heterozygous knock-in mice は自由飲水下で多尿(5.5±1.8 vs. 0.85±0.6 ml/day, n=4, p<0.03) と尿浸透圧低下 (240±54 vs. 2470±530 mOsm, n=4, p<0.001) を認めた。24 時間の脱水による体重減少率も，heterozygous mice のほうが有意に高く(24.2±2.4 % vs. 13.9±1.3 % n=4, p<0.01), heterozygous knock-in mice は尿濃縮力障害が明らかであった。この ADNDI の発症メカニズムを解明するため，腎集合管での wild AQP2 と mutant AQP2 の免疫 2 重染色を行った。Mutant AQP2 の殆どは basolateral membrane へ sorting され, apical membrane には sorting を認めなかった。同様に wild AQP2 も basolateral membrane へ sorting され，これは dominant negative effect を有する mutant AQP2 との 4 量体形成によっておこると考えられた。しかし，wild AQP2 のみの apical membrane への targeting もわずかに認め，Wild AQP2 のみの 4 量体は正常な sorting が阻害されないことが示唆された。この所見は ADNDI 患者の比較的 mild な尿濃縮力障害の特徴を説明しうると考えられた。同時にこの尿崩症マウスモデルは腎性尿崩症の治療を試みるのに有用なモデルと考えられ，現在検討を行っている。

（3）ヘテロ二量体型アミノ酸トランスポーターの局在を決定する因子

金井好克，安西尚彦，平田拓，Arthit Chairougdua
（杏林大学医学部薬理学）

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

1 回膜貫通型タンパク質 rBAT は，12 回膜貫通型トランスポーターBAT1 と連結し，腎近位尿細管管腔側膜のシスチントランスポーターを形成する。その遺伝的欠損であるシスチン尿症の症例から，BAT1 の C-末端細胞内ドメインの変異が見い出された。BAT1 の C-末端には電位依存性 Ca チャネル Cav1.2 の"targeting domain"と相同な配列があり，この部分の deletion により，パートナーである rBAT への糖付加が阻害され，細胞膜膜移行が障害された。これは，ヘテロ二量体複合体の小胞体からゴルジ体への移行が障害されたためであることが明らかとなった。酵母ツーハイブリッド法により，この部位には多価の足場タンパク質 RACK1 が結合することが明らかとなり，ヘテロ二量体複合体の小胞体からゴルジ体への移行における RACK1 の関与が示唆された。BAT1 の C-末端には複数のタンパク質間相互作用に関わるドメインがあり，これを介して多様な調節を受けると考えられる。

（4）無機リン酸トランスポートソームの機能制御とその破綻

宮本　賢一[1]，竹谷　豊[2]，伊藤　美紀子[1]，瀬川　博子[1]
（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部　分子栄養[1]，臨床栄養[2]）

腎近位尿細管におけるリン再吸収機構は，生体におけるリン代謝調節機構の中心的役割を担っている。近位尿細管上皮細胞刷子縁膜にはII型ナトリウム依存性リン酸トランスポーター（NaPi-IIa および NaPi-Iic）がそれぞれ存在し，様々な因子により迅速な調節を受けている。とくに，副甲状腺ホルモン(PTH)は血中リン濃度調節の重要な因子であり，type IIa および type IIc のエンドサイトーシスを作用することで迅速に血中リン濃度を調節している。多くの遺伝性低リン血症では，それらのトランスポーターの調節異常が見られる。

これまでに，我々は OK 細胞を用い，NaPi-IIa が apical 膜の脂質マイクロドメインに局在すること，PTH 依存的にマイクロドメイン上でリン酸化される 80kDa の分子を見出し，この分子が ERM (ezrin-radixin-moesin)タンパクファミリーの一つである ezrin であることを明らかにした。次に PTH による NaPi-IIa のエンドサイトーシスにおける ezrin の役割について検討したところ，ezrin は，PKA および PKC のいずれにおいても PTH 依存的にリン酸化された。さらに，ezrin のドミナントネガティブ体（N 末端側半分）を発現させたところ，NaPi-IIa の膜への局在が減少した他，PTH による NaPi-IIa のエンドサイトーシスが消失した。Ezrin は，NHERF-1 を介して NaPi-IIa と結合する一方，細胞骨格 actin とも結合し，トランスポーター分子複合体の形成に関与し，apical 膜へ局在化させるために重要と考えられた。よって，PTH は，ezrin のリン酸化を行い，トランスポーター分子複合体を変化させ，NaPi-IIa のエンドサイトーシスを促進しているものと考えられた。

一方，遺伝性低リン血症(XLH,ADHR,HHRH)や腫瘍性骨軟化症などでは，血中 FGF-23 の濃度上昇により，リン再吸収機構の抑制が見られる。FGF-23 は NaPi-IIa および NaPi-IIc のエンドサイトーシスを促進することで，そのリン利尿作用を発揮するが，リントランスポートソームを構成するどの分子が標的なのか明らかではない。

本講演ではリントランスポートソームを構成する分子の役割と PTH による調節機構を概説するとともに，その破綻と病態についても考察する。

（5）肝細胞胆管側膜上に発現される ABC トランスポーターの機能と局在変動

伊藤晃成，鈴木洋史（東京大学医学部附属病院薬剤部）

肝細胞胆管側膜上には，種々の ABC トランスポーターが発現され，細胞内から細胞外への物質輸送に関与している。そのうち，multidrug resistance associated protein 2 (MRP2/ABCC2) は，ビリルビングルクロン基酸抱合体を基質とし，その欠損は高ビリルビン血症を特徴とする Dubin-Johnson 症候群の発症につながる。さらに，広範な有機アニオン系薬物をも基質とし，薬物体内動態に影響を与えることが知られていることから，演者らは，単層培養した MDCK II 細胞の basolateral 膜側に，取り込みに関与するトランスポーター (Organic anion transporing polypeptides) を，また apical 側膜に MRP2 を発現させ，経細胞輸送を測定する実験系を確立してきた。この実験系は，in vivo 胆汁排泄を予測する上で有用な系と考えられ，話題提供したい。一方，MRP2 を介した還元型グルタチオンの胆汁排泄は，胆汁生成に関与しており，MRP2 機能の変動により，胆汁流量の変動や胆汁うっ滞の一因となるものと考えられている。そこで，MRP2 の酸化的ストレス下での内在化に特に着目し，その機構について解析を開始した。ラット遊離肝細胞を 3 時間接着培養し，胆管様構造を形成させた後，GSH 枯渇剤としてエタクリン酸 (EA) を添加した。EA 添加直後より細胞内 GSH は低下し，これに伴い MRP2 の胆管局在率は低下した。一方，EA 添加によって細胞内 Ca^{2+}の上昇と NO 産生上昇が観察され，EGTA の事前添加により NO 産生および MRP2

の内在化が阻害された。また，MRP2 の内在化は cPKC/nPKC 阻害剤 (Gö6850) によって阻害されたが，cPKC 阻害剤 (Gö6976) によっては阻害されなかった。更に EA 添加によって，nPKC(PKCδ，PKCε)の活性化（細胞質から膜分画への移行）が観察されたが，cPKC(PKCα) の局在に変化は見られなかった。これらの結果から，GSH 低下を引き金とする MRP2 内在化過程においては，細胞内 Ca^{2+}上昇，NO 産生上昇，nPKC の膜への移行と活性化が起こっていることが示唆された。今後さらにトランスポートソームの構成成分との結合・解離という観点から，MRP2 内在化機構について解析を進めたい。

（6）脳内エネルギーと脂質恒常性における脳関門輸送関連蛋白の役割と連携

寺崎哲也，大槻純男
（東北大学未来科学技術共同研究センター，同大学院薬学研究科）

血液脳関門と血液脳脊髄液関門は，脳と血液の物質交換を制御することで脳内恒常性維持に重要な役割を果しているが，その輸送機構は不明な点が多い。各関門を構成する脳毛細血管内皮細胞と脈絡叢上皮細胞における各種輸送担体の発現，局在，機能，調節，相互の連携を解明することは，生理的役割や病態の理解だけでなく，中枢作用薬の開発において重要である。脳内クレアチンは血液の 200 倍も高濃度であり，エネルギー緩衝系として役割を果し，主な供給は脳内酵素による合成であると言われてきた。しかし，血液脳関門に creatine transporter (CRT)が発現し，血液から脳内への輸送過程が主な供給経路であった。脳は全身の 25%の cholesterol (chol)を保持するが，chol の脳内合成と消失は非常に遅い。脳内 chol の主代謝体 24S-hydroxycholesterol (24S-OH)は，血液脳関門に発現する organic anion transporting polypeptide (oatp2) によって半減期 100 分で脳から排出された。Sterol 輸送に関与する ATP-binding cassette (ABC) transporter family の ABCA1，ABCG1，核内受容体 LXRα，LXRβが，脈絡叢と条件的不死化脈絡叢上皮細胞株(TR-CSFB)で発現していた。LXR ligand である 24S-OH 処理によって TR-CSFB 細胞の ABCA1，ABCG1 は誘導され，Apical 方向の chol 排出輸送に関して，ApoA1 依存的輸送は 2.55 倍，HDL 依存的輸送は 1.38 倍，ApoE3 依存的輸送は ApoE4 依存的輸送より 1.30 倍誘導された。神経変性疾患などで 24S-OH は変動することから，脳内 chol の恒常性維持におけるこれらの輸送関連蛋白の連携は重要である。

（7）免疫応答細胞における酸化的ストレス感受性 Ca^{2+}チャネル TRPM2の活性化機構および生理的役割

山本伸一郎，原雄二，森泰生
（京都大学大学院　工学研究科　合成・生物化学専攻　分子生物化学分野）

TRPM2 は過酸化水素(H_2O_2)などの酸化的ストレスにより活性化される Ca^{2+} 透過性チャネルである。酸化的ストレスによる TRPM2 の活性化は細胞内で産生された NAD^+ および ADP-ribose が TRPM2 の C 末端に存在する Nudix motif に作用して引き起こされていると考えられているが，その詳細はまだ明らかにされていない。TRPM2 は単球，好中球，およびリンパ球などで高い発現が認められている。しかしこれらの免疫細胞での生理的役割は明らかにされていない。そこで本研究では単球細胞株 U937 を用いて酸化ストレスによる TRPM2 の活性化機構および生理的役割を明らかにすることを目的とし検討を行った。TRPM2 活性化機構解明にあたり様々なストレス応答シグナルに着目した。我々は extracellular signal-regulated kinase(ERK)が TRPM2 活性化に重要な役割を果たしていることをつきとめた。H_2O_2 により惹起された $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は TRPM2 特異的 siRNA および ERK 経路の阻害剤 PD98059 を処置することで抑制された。さらに，ERK によるリン酸化サイト(S/T-P motif)に変異をもつ TRPM2 で

は H_2O_2 による$[Ca^{2+}]_i$ 上昇が著しく減弱したことから，H_2O_2 による TRPM2 の活性化は ERK に制御されている可能性が示唆された。また，H_2O_2 により細胞外 Ca^{2+}依存的な ERK のリン酸化がみられ，この ERK のリン酸化は TRPM2 特異的 siRNA 適用により抑制された。よって，TRPM2 を介した Ca^{2+}流入は ERK シグナリングのポジティブフィードバックを形成していることが明らかとなった。

次に TRPM2 の生理的意義においてサイトカイン産生に着目した。U937 において H_2O_2 により ERK/NF-κB を介した interleukin-8 (IL-8) 発現誘導されることが報告されており，またその IL-8 発現誘導に Ca^{2+}が関与することが明らかにされているからである。H_2O_2 による IL-8 産生誘導は TRPM2 特異的 siRNA，PD98059 および NF-κB 阻害剤を処置することで抑制された。さらに，H_2O_2 による NF-κB の核内移行は TRPM2 特異的 siRNA や PD98059 処置によって抑制された。よって，TRPM2 を介した Ca^{2+}流入によって活性化された ERK は NF-κB の核内移行を惹起し，IL-8 産生誘導を引き起こしていることが明らかになった。

（8）一酸化窒素による心筋イオンチャネル制御機構

古川哲史，白長喜，黒川洵子（東京医科歯科大学難治疾患研究所）

【目的】心血管系では一酸化窒素 NO は，心筋保護・血管拡張・動脈効果予防などに働く重要なシグナル伝達分子である。本研究は，心筋細胞における NO のターゲットとなるイオンチャネルの同定，NO によるイオンチャネル制御の生理的意義，その分子メカニズムの解明を目的に行なった。

【方法】モルモット単離心室筋細胞を用いて，パッチクランプ法穿孔パッチモードによる電流記録，および免疫沈降法・Western blot 法などの分子生物学的実験を行なった。

【結果】(1) NO ドナー，SNP，により ICa,L は抑制され，IKs は活性化されたが，INa・IKr には明らかな作用を認めなかった。ICa,L 抑制は cGMP 依存性リン酸化により，IKs 活性化は cGMP 非依存性であり，タンパクニトロ化によることが示唆された。

(2) NO による心筋イオンチャネル制御は，少なくとも 2 つの心臓生理現象に関与する。1 つは Ca^{2+}によるイオンチャネル制御機構であり，もう 1 つは性ホルモンによる non-transcriptional なイオンチャネル調節である。前者は，calmodulin 依存性 NOS3 活性化により，後者は PI3-kinase/Akt 依存性 NOS3 活性化によりもたらされる。

(3) calmodulin 依存性 NOS3 活性化には caveolin-3・calmodulin・NOS33 分子間のダイナミックなタンパク間相互作用が関与し，PI3-kinase/Akt 依存性 NOS3 活性化には性ホルモン受容体・c-Src・PI3-kinase・Akt を含む複数分子のタンパク間相互作用が関与する。これらにはある種の足場タンパクの関与が示唆される。

【結論】心筋細胞での NO は動的タンパク間相互作用の変化により各種イオンチャネルを制御しすることが，心筋保護作用をもたらす。

（9）腎臓糸球体スリット膜を支える分子複合体の解析能

平林　享，神作　愛，畑　裕　（東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科）

腎臓糸球体のポドサイト間にはスリット膜と呼ばれる特殊な細胞間結合が存在し蛋白漏出のバリアーとして機能している。遺伝性ネフローゼの原因遺伝子産物 nephrin がスリット膜を構成する接着分子であることが同定されたのに続き，スリット膜の周辺に存在する種々の分子の異常がネフローゼの原因となることが明らかにされている。従って，スリット膜の分子構築の解析は，蛋白尿を呈する疾患の分子病態の理解に重要である。

スリット膜は上皮細胞のタイトジャンクション (TJ) に由来し分子構築の点でも共通点が多い。例えば，TJ の足場蛋白である ZO-1 はスリット膜にも存在する。同じく TJ の足場蛋白 MAGI-1 がスリット膜に存在することを，

私たちは順天堂大学の栗原らとの共同研究で明らかにした。MAGI-1 に結合する接着分子 JAM4 はスリット膜だけでなくポドサイトの頂端面にも分布し，その局在は MAGI-1 と完全には一致しない。そこで MAGI-1 の結合分子を更に探索し，nephrin が MAGI-1 に結合することを明らかにした。従来知られている nephrin 結合分子の多くは，puromycin aminonucleoside 処理による実験ネフローゼ腎で，スリット膜の頂端面方向へのシフトに伴い，nephrin から乖離するが，MAGI-1 はこの状態でも nephrin との結合を維持している。このことから nephrin・MAGI-1 の相互作用はスリット膜の基本的な枠組みを提供すると推測される。JAM4 と nephrin はスリット膜で MAGI-1 を介して三者複合体を形成するが，JAM4 は常にスリット膜より頂端面側に留まり，スリット膜が TJ と同様に頂端面と基底側面の境を形成することも示唆される。

ポドサイトには nephrin・JAM4 の他にも Neph1・FAT・CAR・ポドカリキシンなどの PDZ 結合モチーフをもつ膜蛋白があり，ZO-1・MAGI-1 以外にも NHERF2・CASK・LNX1 などの PDZ 蛋白が存在する。これらの膜蛋白と足場蛋白の特異的組合せからなる分子複合体がポドサイトに機能的な細胞膜ドメインを形作ることが想定される。

（10）新しい微小管結合蛋白質による細胞の機能と構造の制御

中西　宏之（熊本大学大学院医学薬学研究部細胞情報薬理学）

微小管は，オルガネラ輸送，細胞運動，細胞極性などの細胞機能に必須の役割を果たすと共に，中心体，繊毛などの細胞構造の基本を構築している。微小管のオーガナイゼーションは種々の微小管結合蛋白質によって制御されている。私共は，微小管が関わる細胞の機能と構造の制御機構を解析するために，新しい微小管結合蛋白質の同定を試みた。まず私共は，微小管結合蛋白質を検出する新しいアッセイ法（チュブリン・ブロット・オーバーレイ法）を開発し，この方法によってラット脳組織より新しい分子（p100 と一時的に命名）を同定した。この p100 は Rac 低分子量 G 蛋白質が引き起こすラッフル膜に局在した。さらに新しい微小管結合蛋白質を同定するために，ラット脳組織から微小管と共沈する蛋白質群を収集し，それらを質量分析によって網羅的に解析して，これまで 30 以上の新しい分子を同定した。これらのうち，ある分子は微小管に沿って局在し，一方，ある分子は中心体や繊毛に局在した。本シンポジウムでは，これら新しい分子や微小管と生体膜輸送分子複合体との関連について議論したい。

（11）IRSp53の RCB ドメインによる細胞膜の変形機構

末次　志郎（東京大学医科学研究所腫瘍分子医学研究分野）

代謝過程に起こる細胞膜の変化と細胞骨格は密接に結びついている。エンドサイトーシスによる膜輸送では，まず amphiphysin，dynamin，clathrin など脂質結合タンパク質が誘導する細胞膜の内側に向かった変形により小胞が形成される。次に，N-WASP によって細胞骨格の再構成がおこって小胞の移動がおこる。これに対し，細胞の移動先端やファゴサイトーシス，マクロピノサイトーシスなどの他の輸送系では，細胞膜が大きく外側に変形し，仮足構造が作られる。仮足形成では膜結合タンパク質による細胞膜の変形は知られておらず，細胞骨格の再構成が細胞膜の外側に向かった変形を誘導すると考えられてきた。私は，IRSp53 の構造解析の結果から，エンドサイトーシスに関わる amphiphysin の BAR ドメインと IRSp53 の RCB ドメインが類似の構造を持つことを見いだした。さらに IRSp53 の RCB ドメインは細胞膜を変形させることができることを見いだした。IRSp53 は仮足構造形成に関わるタンパク質であるので，膜結合タンパク質による細胞膜の変形が，エンドサイトーシスのみならず外側に向かった細胞膜変形を含むさまざまな過程に関わる普遍的なメカニズムであることを示唆している。

（12）小胞輸送系に介在する低分子量G蛋白質 Rab5とその制御因子 RIN ファミリー

梶保　博昭[1]，堅田　利明[1]，仁科　博史[2]
（[1]東京大学大学院薬学系研究科・生理化学教室，
[2]東京医科歯科大学難治疾患研究所・発生再生生物学分野）

細胞はエンドサイトーシスやエキソサイトーシスを介して外界との物質交換を行っており，低分子量G蛋白質であるRabファミリーがこれらを制御していることが明らかにされている。中でも Rab5 はエンドサイトーシスの初期段階（細胞表層から初期エンドソームまでの輸送経路）で必須の役割を果たしている。我々は Rab5 の新規相互作用因子として RIN2，RIN3 を単離・同定してきた。RIN2，RIN3 は H-Ras と相互作用することが知られている RIN1 と高い相同性を有し，SH2 ドメイン，Pro に富む SH3 ドメイン結合領域，Rab5 の GEF に保存された Vps9 ドメイン，Ras に結合し得るドメインなど様々なシグナル関連ドメインを有するユニークな蛋白質群である。我々は RIN ファミリーの機能解析を進め，その結果 1) RIN2，3 が Rab5 に対する GEF 活性を有し，さらに通常の Rab5-GEF と異なり GDP 型，GTP 型 Rab5 の両方に結合すること，2) RIN2，3 が HeLa 細胞内で小胞状の局在を示し，各種 Rab ファミリーと共発現させたところ Rab5 特異的に共局在したこと，3) RIN3 が形成する小胞を蛍光トランスフェリンが通過していく様子が観察されたこと，4)RIN ファミリー相互作用因子としてクラスリン被覆小胞の形成に関与するアンフィファイシン II を同定し C 末端の SH3 ドメインを介して RIN2，3 のプロリンに富む領域と結合することを明らかにした。以上の結果より，RIN2，3 が Rab5 の GEF かつ GTP 型を安定化する因子として機能し，アンフィファイシン II と相互作用して初期エンドサイトーシスの輸送過程を制御する因子であると考えられる。

（13）多光子励起過程を用いた開口放出・溶液輸送機構の解析

根本知己[1]，岸本拓哉[1,2]，緒方衡[1,3]，兒島辰哉[1]，大嶋章裕[1]，河西春郎[1,2]
（[1]生理研・生体膜，[2]東大院・医，[3]防衛医大・病理）

多光子励起過程を用いた細胞機能の可視化解析（2 光子顕微鏡）は，中枢神経系を中心に様々な組織の細胞生理学的研究に広がってきた。ここでは本手法の特徴と今後の展開について，膵臓外分泌腺細胞の開口放出，溶液輸送現象を例に報告する。この 2 光子顕微鏡の近年の広がりは，励起光が近赤外領域であるため生体標本に対し低吸収低散乱性であること原因する組織的標本深部断層像の高い空間分解からもたらされている。この低吸収性は生体試料に対する侵襲性が低いことをも意味し，長時間に渡って安定的なライブイメージングを可能たらしめている。さらに多光子励起の場合，1 光子励起波長の離れた複数の蛍光色素も同時に励起できることが多い。これらの特徴を生かし，我々は外分泌腺房の生理的な Ca^{2+}濃度上昇の定量的測定と単一の融合細孔形成の可視化を初めて同時に可能とした。さらに我々は逐次開口放出という新しい様式が用いられていることを初めて見い出した。この様式は様々な分泌細胞で確認されつつあり，我々も副腎髄質クロマフィン細胞，膵臓β細胞でも使われていることを実証する共に，膜融合の SNARE 仮説に基づくモデルを提出し検証している。さて，実際の 2 光子顕微鏡で多光子励起が生じるのは，焦点近傍の 1 フェムトリットル以下の領域である。この局所性をケージドカルシウムの活性化に用いれば，任意のタイミングで人工的に細胞内に極微小な Ca^{2+}ドメインを出現させることが可能となる。これを用いて，我々は膵臓外分泌腺細胞膜上の Ca^{2+}依存性塩素チャネルの機能マッピングに成功し，水・電解質輸送の push-pull モデルの実証を行った。また鼻粘膜上皮腺で輸送現象の断層イメージングに成功した。このように多光子励起過程は膜系の動態やイオンチャンル機能の生理的解析に有効な方法論であり，トランポートソーム機能発現を支える分子機構の解明に有効であると考える。

（14）1分子ナノバイオロジーが明らかにする細胞膜のデジタル式信号変換機構

楠見明弘（京都大学再生医科学研究所/工学研究科マイクロエンジニアリング専攻，
科学技術振興事業団 ICORP 膜機構プロジェクト）

最近，さまざまなシグナル伝達分子の挙動や相互作用・活性化などを，生きている細胞において 1 分子レベルで見ることに成功しつつある。このために，1 蛍光分子観察，1 分子 FRET，1 粒子追跡，1 分子捕捉と操作などの方法を，生細胞中で使えるように工夫してきた。1 分子ごとに見ると，多数分子の平均の観察ではわからない機構や現象も見つかるであろう，と思いながら研究していたのであるが，本当に面白いことが出るのかどうか不安でもあった。実際にやってみると，予想以上に面白いことが次々とわかってきた。

最も重要な発見の一つは，実に多くのシグナル伝達の素過程に，活性化された分子とエフェクターとの結合を促進したり安定化させる scaffolding protein または，足場として働くような細胞内のマイクロドメイン（例えばラフト）がかかわっていることである。それらのタンパク質や足場ドメインが形成する短寿命シグナル複合体（1 秒以下の寿命であることが多い）が，このようなシグナルの受け渡しの素過程を担っているように思われる。細胞全体としてみると分のオーダーのシグナル変換が見えていても，それらは，1 分子のレベルではパルス状の活性化パターンをもっており，そのようなきわめて短時間のシグナル伝達の素過程の重ね合わせが，分単位のアナログな変化の基礎をなしているようなのである。これは，シグナルシステムとしては，1 分子のレベルでは，分子は殆ど常に OFF の状態に保たれており，1 瞬だけ ON になるという方式が進化の過程で選ばれたことを示している。

（15）表面形状と物性から見た蛋白質間相互作用様式の予測法の開発

木下　賢吾（東大医科研・ヒトゲノム解析センター）

近年さまざまな実験的手法により，どのタンパク質ペアが相互作用するかの情報は蓄積されてきた。それに伴い，それらがどのように相互作用するのかを予測する方法の開発が求められている。

そこで我々は(1)ホモオリゴマータンパク質の相互作用部位の網羅的な比較分類と解析から相互作用部の特徴抽出を行い，(2)アミノ酸配列の進化的保存度と分子表面の相補性に着目したドッキング法の開発を行った。

(1)に関しては，SCOP データベースを使って用意した重複のない 374 のホモオリゴマーを同定し，比較分類を行った。まず大まかな分類として dimer 型, cyclic-oligomer 型，巻き付き型の 3 種類に分類し，dimer 型に関してはさらに，dimer の対称軸方向への広がり具合から平行型，垂直型，均等型の 3 種類，合計 5 種類の型への分類をおこなった。その結果，これらの分類と，静電ポテンシャル及び疎水性度の分布の間に相関を見いだすことができた。また，この解析を利用して，生物学的に意味のある相互作用と，結晶学的な接触とを区別する手法の開発を行った。

(2)に関しては，冗長性を取り除いた 265 のヘテロオリゴマーに関して，相互作用の種類と機能で大まかに分類し，その分類毎に相互作用部位の進化的な保存度の解析を行った。その結果，シグナル伝達系での相互作用部位の高い保存度を確認することができた。この知見を利用して，蛋白質相互作用部位の予測法を開発するために，表面の形状の相補性と進化的な保存度を評価基準とした表面での複合体予測法の開発をおこなった。この方法をシグナル伝達系の複合体の構造（7 複合体）に適用したところ，1 例は複数の保存部位を持つタンパク質で必ずしもうまく行かなかったが，残り 6 例で結晶構造とほぼ同一の解を得ることができた。

10. 生理機能制御および病態におけるプリン作動性シグナリングの役割とその分子機構

2005年9月1日－9月2日

代表・世話人：井上 和秀（九州大学 大学院 薬学研究院）
所内対応者：井本 敬二（神経シグナル）

（1）発生期海馬神経回路形成と細胞外ATP

加藤 総夫[1]，山岡 正慶[1,2]，川村 将仁[1,3]
([1]慈恵医大・神経生理，[2]同・医学部6年，[3]現所属：同・薬理第1)

（2）パーキンソン病治療薬としてのアデノシン A_{2A} アンタゴニスト

森　明久（協和発酵工業（株)・医薬研究開発本部）

（3）脊髄痛覚伝導における血小板活性化因子(PAF)の役割－ATP，グルタミン酸，cGMPの関与－

土肥 敏博，森田 克也，森岡 徳光，北山 友也
（広島大学 大学院 医歯薬学総合研究科 病態探究医科学講座歯科薬理学）

（4）細胞外ATPによるミクログリア遊走能の調節機構

大澤 圭子，本田 静世，佐々木 洋[1]，入野 康宏，中村 泰子，井上 和秀[2]，高坂 新一
（国立精神・神経センター 神経研究所 代謝研究部
[1]Department of Pathology and Immunology, Washington University School of Medicine
[2]九州大学大学院 薬学研究院 薬効解析学分野）

（5）Comparative analysis of physical dimensions of the pore of maxi-anion, VSOR and CFTR chloride channels as putative ATP-channels

Ravshan Sabirov[1,2] and Yasunobu Okada[2]
([1]Dept. of Biophysics, National University of Uzbekistan, [2]Dept. of Cell Physiology, NIPS)

（6）毛髪生理におけるアデノシンの作用機構

岩渕 徳郎[1]，中沢 陽介[1]，飯野 雅人[1]，江浜 律子[1]，尾郷 正志[1]，田島 正裕[1]，荒瀬 誠治[2]
([1]資生堂リサーチセンター，[2]徳島大医）

（7）マウス網膜P2Xプリン受容体を介する情報処理はON経路とOFF経路で異なる

金田 誠，石井 俊行*，重松 康秀**，細谷 俊彦*，霜田 幸雄**
（慶應大・医・生理，理研・脳センター・細谷研究ユニット*，東京女子医大・総研**）

（8）内皮細胞のATPレセプター$P2X_4$を介した血流センシング

山本 希美子，曽我部 隆彰，安藤 譲二
（東京大学 大学院 医学系研究科 医用生体工学講座 システム生理学）

（9）P2Y受容体刺激による前駆脂肪細胞のadipogenic hormonesに対する感受性増大

尾松 万里子，松浦 博（滋賀医科大学・生理学講座・細胞機能生理学部門）

（10）脳血管内皮細胞におけるATPによる新規 Ca^{2+} 増幅機構の解明

山崎 大樹[1]，大矢 進[1]，村木 克彦[2]，浅井 清文[3]，今泉 祐治[1]
([1]名古屋市大院・薬・細胞分子薬効解析，
[2]愛知学院大・薬・細胞薬効，[3]名古屋市大院・医・分子神経生物）

（11）レチノイン酸による初代培養ミクログリアの $P2X_4$ 受容体発現増強

戸崎 秀俊[1,2]，津田 誠[1]，小泉 修一[2]，井上 和秀[1]
([1]九州大学 大学院 薬学府，[2]国立衛研薬理部）

（12）後根神経節細胞における細胞質型ホスホリパーゼ A_2 のATPによる活性化

長谷川 茂雄，津田 誠，井上 和秀（九州大学 大学院 薬学府 薬効解析学分野）

（Ｐ１）免疫担当細胞における $P2X_7$ 受容体機構の解析

月本 光俊，原田 均，五十里 彰，高木 邦明，出川 雅邦（静岡県立大・薬）

（Ｐ２）Bradykinin による ATP 放出への多剤耐性 MRP の関与の可能性

趙 玉梅，佐藤 千江美，右田 啓介，桂木 猛（福岡大・医・薬理）

（Ｐ３）P2X 受容体反応に及ぼすパーキンソン病原因遺伝子 parkin および alpha-synuclein の影響

有村 由貴子[1]，佐藤 あゆみ[1]，西川 香里[2]，青木 公三子[2]，和田 恵津子[2]，
青木 俊介[2]，和田 圭司[2]，野田 百美[1]（[1]九州大・院・薬・病態生理，
[2]国立精神・神経センター・神経研・疾病研究第 4 部）

（Ｐ４）コレステロール代謝変動に起因するミトコンドリア機能障害と神経細胞変性過程

道川 誠（国立長寿医療センター研究所 アルツハイマー病研究部）

（Ｐ５）Shear Stress Induced Ionic Current and FM1-43 Influx via $P2X_4$ ATP-receptor as a Mechano-transduction Pathway

Fernando Lopez-Redondo[1], Kimiko Yamamoto[2], Joji Ando[2], Kishio Furuya[1],
Kumi Akita[1], Keiji Naruse[1,3], Masahiro Sokabe[1,3,4]
([1]Cell Mechanosensing, SORST, JST; [2]Dept Biomed Engin, Grad Sch Med, Univ Tokyo;
[3]Dept Cell Biophysics, Grad Sch Med, Nagoya Univ; [4]Dept Mol Physiol, Natl Inst Physiol Sci)

（Ｐ６）マウス脳内のアデニン類含量およびアデニル酸シクラーゼの内因性阻害物質 3’-AMP 産生酵素系に及ぼす加齢の影響

藤森 廣幸，宮本 晃洋，堀内 隆宏，芳生 秀光（摂南大・薬・衛生分析化学）

（Ｐ７）アシドーシスによる新生ラット摘出脊髄反射電位の抑制作用におけるアデノシンの関与

乙黒 兼一，山地 良彦，伴 昌明，太田 利男，伊藤 茂男
（北海道大学 大学院獣医学研究科 薬理学教室）

（Ｐ８）アストロサイトにおける酸化ストレスによる細胞死誘導シグナリングに対する $P2Y_1$ 受容体活性化の拮抗作用

篠崎 陽一[1]，小泉 修一[1]，井上 和秀[2]（[1]国立衛研・薬，[2]九州大・薬・薬効解析）

（Ｐ９）脊髄後角の興奮性シナプス伝達に及ぼすアデノシン作用におけるヌクレオシド輸送体の役割

柳 涛，藤田 亜美，中塚 映政，熊本 栄一
（佐賀大学医学部生体構造機能学講座神経生理学分野）

（Ｐ10）P2Y 受容体刺激による細胞膜 PtdIns(4,5)P2 の一過性の減少

藤居 祐介，尾松 万里子，松浦 博（滋賀医科大学・生理学講座・細胞機能生理学部門）

（Ｐ11）感覚神経終末グリア網におけるカルシウム波伝播の二重様式とプリン受容体の関与について

岩永 ひろみ（北海道大学 大学院 医学研究科 組織・細胞学分野）

（Ｐ12）アデノシン刺激による MDCK 細胞からの ATP 放出に対するシグナリングおよび放出部位の検討

右田 啓介，趙 玉梅，桂木 猛（福岡大・医・薬理）

（Ｐ13）骨髄間質細胞の $P2Y_2$ 受容体を介したカルシウムシグナリングは細胞密度に依存して変化する

市川 純，玄番 央恵（関西医科大学・第 2 生理）

（Ｐ14）末梢神経損傷後における P2X 受容体の後根神経節での変化

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

（Ｐ15）血管周皮細胞ペリサイトに発現する P2 受容体とその機能

藤下 加代子[1]，末石 浩二[1,2]，井上 和秀[3]，小泉 修一[1]
([1]国立衛研・薬理部，[2]福岡大学・薬・薬学疾患管理，[3]九州大学・院・薬・薬効解析）

（P16）アストロサイトの pinocytosis における $P2Y_6$ 受容体の関わり

多田 薫[1]，戸崎 秀俊[1]，井上 和秀[2]，小泉 修一[1]
（[1]国立医薬品食品衛生研究所 薬理部，[2]九州大学 大学院 薬学研究院 薬効解析学分野）

（P17）Regulation of purinergic $P2X_2$ receptor activity by phosphoinositides

藤原 祐一郎，久保 義弘（生理研 神経機能素子）

（P18）ATPγS によるアストロサイトでの MCP-1 産生誘導における MAP キナーゼカスケードの役割

片山 貴博，南 雅文（北大院・薬・薬理学分野）

【参加者名】

井上 和秀（九州大学），片山 貴博，岩永 ひろみ，乙黒 兼一（北海道大学），松岡 功（福島県立医科大学），山本 希美子（東京大学），霜田 幸雄（東京女子医科大学），繁冨 英治，安井 豊，山本 清文，池田 亮，井村 泰子，河野 優，加藤 総夫，川村 将仁（東京慈恵会医科大学），須藤 久美（昭和大学），大澤 圭子（国立精神・神経センター 神経研究所），末石 浩二，大久保 聡子，小泉 修一，酒見 和枝，篠崎 陽一，多田 薫，藤下 加代子（国立医薬品食品衛生研究所），山田 千晶（共立薬科大学），金田 誠（慶應義塾大学），森 明久（協和発酵工業（株）），岩渕 徳郎（資生堂リサーチセンター），安田 昌弘（エーザイ株式会社），三原 拓真（アステラス製薬株式会社），平手 謙二，今井 利安，佐久間 詔悟（日本ケミファ（株）研究所），月本 光俊（静岡県立大学），原田 均，志内 伸光，尾﨑 紀之，篠田 雅路，杉浦 康夫（名古屋大学），古家 喜四夫（科学技術振興機構），Lopez-Redondo Fernando（科学技術振興機構），道川 誠（国立長寿医療センター研究所），山崎 大樹（名古屋市立大学），山田 善也（ファイザー），尾松 万里子，藤居 祐介（滋賀医科大学），山下 勝幸（奈良県立医科大学），藤森 廣幸，堀内 隆宏，宮本 晃洋（摂南大学），市川 純（関西医科大学），小林 希実子，野口 光一（兵庫医科大学），土肥 敏博（広島大学），有村 由貴子，上野 光，津田 誠，戸崎 秀俊，豊満 笑加，永田 健一郎，中村 康次，野田 百美，長谷川 茂雄，藤田 拓美，山村 悠介（九州大学），趙 玉梅，桂木 猛，右田 啓介（福岡大学），熊本 栄一，中塚 映政，藤田 亜美，柳 涛（佐賀大学），秋葉 光雄，中村 宣司（浅井ゲルマニウム研），Sabirov Ravshan（タシュケント大学（ウズベキスタン）），島 麻子（統合バイオ），岡田 泰伸，久保 義弘，藤原 祐一郎，北村 明宏，Amal K.Dutta，Hongtao Liu，曽我部 隆彰，井本 敬二（生理研）

（1）発生期海馬神経回路形成と細胞外 ATP

加藤 総夫[1]，山岡 正慶[1,2]，川村 将仁[1,3]
（[1]慈恵医大・神経生理，[2]同・医学部 6 年，[3]現所属：同・薬理第 1）

中枢神経系の重要な機能原理は「自己組織化」である。特に，神経回路の形成過程において，適切なニューロン間の適切なシナプス結合の形成には，内因性に形成される自動的かつ自発的な神経活動によって活性化される諸分子群の相互作用が重要な役割を担うことが知られている。このような組織化された自発性な活動の存在は，発生期のみならず成熟後の動物の極めて広範な中枢神経系局所回路において報告されている。

海馬からは，theta-wave，delta-wave，ripple wave，sharp wave などのさまざまな種類の自発的周期的活動パターンが記録される。これらの組織化された活動はそれぞれ固有の機構によって発生し，独自の生理学役割を担うと考えられている。特に，胎生～周生期における CA3 領域の神経回路は，(1)興奮性主細胞間の反回性（反響性）興奮結合，および，(2)高細胞内 Cl^- 濃度に起因する GABA 作動性介在ニューロンを介した自己興奮性シナプス，の両機構によって，自発的かつ周期的に生じるニューロン群の同期的興奮性活動（一般に giant depolarizing potential, GDP と呼ばれる周期的膜電位変動パターンとして観察される）を示す。この GDP は，興奮性活動として海馬全

域に伝播し，海馬のシナプス・ネットワークの形成において中核的役割を担う可能性が示されている (Nat Rev Neurosci 3:728-, 2002; J Physiol 559:129-, 2004)。

現在までに，中枢神経系の広範な領野において P2 受容体の発現が報告され，それらの多くにおいて，外因性の ATP の投与によって誘発される特異的な生理的応答が証明されてきた（例 : J Physiol 530: 469-, 2001; J Neurosci 24: 3125-, 2004）。また，実験的な刺激や，薬物の投与によって生じる内因性 ATP の放出と，それによって誘発される P2 受容体活性化を介した生理的応答も報告されてきた(J Neurosci 23: 7426-, 2003)。しかし，native な脳組織の中で自発的かつ自動的に形成されるダイナミックな活動の形成に内因性の ATP とそれによる P2 受容体の活性化が関与している事実を証明した報告はほとんどない。

我々は，海馬 CA3 領域の GABA 作動性介在ニューロンが興奮性コンダクタンスと共役した P2Y1 受容体を発現し，外因性に投与した ATP もしくは ADP がこの受容体の活性化を介して抑制性ニューロンの興奮性を亢進させ，その結果，錐体細胞への GABA 作動性入力が増加するという事実を，生後 7-15 日のラットおよびマウスを用いて報告した (J Neurosci 24: 10835-, 2004)。この事実に基づき，新生期海馬 CA3 ネットワークにおいて特異的に観察される GDP の形成に，内因性の ATP/ADP とそれらによる P2Y1 受容体の活性化が関与するという仮説を立て検証した。

2-8 日齢の Wistar rat の急性海馬スライス CA3 錐体細胞からパッチクランプ法ならびに共焦点顕微鏡による Fluo-4 蛍光 imaging 法を用いて，自発，および，苔状線維刺激誘発 GDP を記録した。一部の例では ATP biosensor を用いた局所的細胞外 ATP 濃度の測定を行った。特異的 P2Y1 受容体遮断薬，脱感差性 P2Y1 受容体作動薬，apyrase などの投与，および，潅流速度の変化などによる GDP の発生頻度および活動パターンの著明な変化から，自発的・周期的 GDP 活動の形成に内因性の ATP/ADP が関与すると結論した。

（2）パーキンソン病治療薬としてのアデノシン A_{2A} アンタゴニスト

森　明久（協和発酵工業（株）・医薬研究開発本部）

これまでにアデノシン受容体には，A_1，A_{2A}，A_{2B}，A_3 の 4 種類のサブタイプが存在することが報告されている。このうち，アデノシン A_1，A_{2B}，A_3 受容体が脳全域に広範に分布するのに対し，アデノシン A_{2A} 受容体は大脳基底核を中心として，線条体，淡蒼球，側坐核，嗅結節に高密度に局在することが明らかになってきた。このことから，大脳基底核を介する機能，例えば運動や精神機能の調節に，アデノシン A_{2A} 受容体が重要な役割を果たすのではないかと考えられている。特に興味深いことは，アデノシン A_{2A} 受容体が，線条体からの出力路の一つ，線条体-淡蒼球経路（間接路）を構成する GABA 作動性中型有棘神経細胞 (Medium spiny neuron(MSN)) に特異的に発現していることである [1]。

本発表では，協和発酵工業株式会社にて創製された選択的アデノシン A_{2A} アンタゴニスト KW-6002 の抗パーキンソン病作用などの薬効薬理 [2] を中心に，アデノシン A_{2A} アンタゴニストが，代表的な大脳基底核疾患の一つであるパーキンソン病の治療薬になる可能性を紹介する。加えて MSN におけるアデノシン A_{2A} 受容体の生理的役割と大脳基底核回路を介した運動制御への寄与について，これまでに得られている電気生理学，神経化学的成績などを基に，アデノシン A_{2A} アンタゴニストの抗パーキンソン病作用の作用機序 [3] についても紹介する。

1. Schiffmann SN, Jacobs O., Vanderhaeghen JJ. Striatal restricted adenosine A2 receptor (RDC8) is expressed by enkephalin but not by substance P neurons: an in situ hybridization histochemistry study. J Neurochemstry 1991;57:1062-7.
2. Jenner P. A2a antagonists as novel non-dopaminergic therapy for motor dysfunction in PD. Neurology 2003;61(11 Suppl 6):S32-8.
3. Mori A, Shindou T. Modulation of GABAergic transmission in the striatopallidal system by adenosine A2A receptors: a potential mechanism for the antiparkinsonian effects of A2A antagonists. Neurology 2003;61(11 Suppl 6):S44-8.

（3）脊髄痛覚伝導における血小板活性化因子(PAF)の役割
－ATP，グルタミン酸，cGMP の関与－

土肥 敏博，森田 克也，森岡 徳光，北山 友也
（広島大学 大学院 医歯薬学総合研究科 病態探究医科学講座歯科薬理学）

血小板活性化因子(Platelet-Activating Factor: PAF)は，ウサギ好塩基球由来の血小板凝集因子および腎髄質由来の降圧物質として発見されたリン脂質である。現在まで，PAF は多くの組織で産生され，炎症・免疫系細胞の活性化，強い血管透過性亢進作用や気管支収縮作用を有し，さらに妊娠・分娩，循環，虚血等による組織障害への係わりなど，実に多彩な生理・病態生理のリン脂質性メディエーターであることが明らかにされてきている。

繰り返される疼痛刺激や神経損傷時に痛覚感作が生じる。これには，侵害刺激に対する痛覚の増大，すなわち，痛覚過敏 (hyperalgesia)，と正常では非侵害性の機械的刺激に対して痛み反応を生じるアロディニア（メカニカル・アロディニア）がある。プロスタグランジン類 (PGs) は末梢における重要な炎症・疼痛反応のメディエーターである。一方，PAF は PGE_2 よりも強い浮腫を引き起こすのに対し，末梢組織における痛覚感作は極めて弱い。近年，PGE_2 は末梢のみならず，脊髄での痛覚過敏ならびにアロディニア発現において重要な役割をはたしていること，またそのメカニズムは末梢とは異なることが示されている。脊髄 PAF 濃度は脊髄損傷時に上昇し，脊髄炎症性二次障害のメディエーターではないかと推察されている。しかし，脊髄における痛覚伝導における PAF の役割は明らかではない。本研究では，脊髄における PAF の疼痛制御における役割について検討し，PAF は脊髄腔内投与によりアロディニアと熱刺激に対する痛覚過敏を引き起こす事を認めた。

α, β-methylene ATP の脊髄腔内投与はアロディニアを誘発した。PAF 誘発アロディニアは ATP 受容体拮抗薬 PPADS，TNP-ATP により抑制された。PAF は培養後根神経節細胞から ATP 遊離を促進した。各種阻害薬を用いた結果から，PAF 受容体刺激による ATP，グルタミン酸の遊離, NO 産生- cGMP-PKG カスケードがアロディニア発現に関与することが示された。 PAF 誘発アロディニアや痛覚過敏にカプサイシン感受性神経が介在する可能性が示唆された。PAF の脊髄腔内投与により脊髄後角表層に活性化ミクログリアの集積が認められた。ミクログリアの抑制作用を有するミノサイクリンは PAF によるアロディニアの誘発を抑制した。siRNA によりグリシン受容体サブタイプ GlyRα3 ノックダウンマウスにおいて PAF 誘発アロディニアの，特に持続相が抑制され，cGMP アナログ 8-p-CPT-cGMP の脊髄腔内投与によるアロディニアは初期から抑制されたことより，PAF 誘発アロディニアの持続相に cGMP/PKG によるグリシン受容体機能の抑制が関与する可能性が示唆された。グリシントランスポーター阻害作用を有する薬物に抗アロディニアならびに鎮痛作用が認められた。

以上のことより，PAF 誘発アロディニアに，PAF 受容体刺激による ATP, グルタミン酸の遊離, NO 産生-cGMP-PKG カスケードが関与し，cGMP はグリシン受容体機能を抑制して抑制系を脱抑制し，このことがアロディニア発現に関与する可能性が示唆された。また，この過程に活性化ミクログリアが重要な係わりを有することが示唆された。更に，グリシントランスポーター阻害作用を有する薬物に抗アロディニアならびに鎮痛作用が認められた。今後 ATP-グリシン系の解析，またグリシントランスポーター阻害薬の鎮痛薬としての有用性について更なる検討の予定である。

（4）細胞外 ATP によるミクログリア遊走能の調節機構

大澤 圭子，本田 静世，佐々木 洋[1]，入野 康宏，中村 泰子，井上 和秀[2]，高坂 新一
（国立精神・神経センター 神経研究所 代謝研究部
[1]Department of Pathology and Immunology, Washington University School of Medicine
[2]九州大学大学院 薬学研究院 薬効解析学分野）

ミクログリアは神経変性疾患や神経損傷時に反応性に活性化され，様々な生理活性物質の産生・放出や貪食などを行うことから，組織修復に積極的に関与する細胞であると考えられている。正常脳のミクログリアは長く多数に分岐した突起を持つラミファイド型であるが，障害時に速やかに反応して形態変化し，障害部位へ移動・集積する。従って，形態変化や遊走能の制御機構を研究することは，ミクログリアの活性化機構を理解し脳内機能を明らかにするために極めて重要である。

近年，ATP 刺激によりミクログリアの様々な生理活性因子（プラスミノーゲン，IL-1β，TNF-α，IL-6，NO など）の産生，放出能が促進されることが報告され，ATP がミクログリアの機能を調節する分子であることが明らかにされつつある。我々は ATP がミクログリアの走化誘導因子になることを見出し，ATP によるミクログリア運動能の調節機構について研究してきた。本研究会では，ATP がミクログリアに発現する ATP 受容体 P2Y12 を介して遊走能を亢進すること，また，ATP 刺激によるミクログリア遊走の調節に関わる細胞内情報伝達系を最近得られた知見とともに紹介したい。

ラット初代培養ミクログリアは，ATP や ADP の刺激により膜ラッフルを形成し，ダンチャンバー内で ATP 濃度勾配に依存した細胞遊走を示した。膜ラッフル形成と細胞遊走は百日咳毒素や P2Y12 特異的阻害剤 AR-C69931MX により阻害された。これらの結果から，ATP は P2Y12 を介して遊走能を亢進することが明らかになった。そこで，ラット脳における P2Y12 の発現を in-situ hybridization で調べたところ，P2Y12 の発現は，ミクログリア特異的タンパク質である Iba1 発現細胞に認められ，脳実質内ミクログリアに局在していた。一方，三量体 G タンパク質(Gi/o)共役型受容体の下流では，ホスホリパーゼ C(PLC)とホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ(PI3K)が活性化されることが知られている。そこで，ATP 刺激による膜ラッフル形成と細胞遊走に対する各シグナル分子特異的な阻害剤の影響を調べたところ，PLC 阻害剤は膜ラッフル形成及び細胞遊走の両者を抑制した。一方，PI3K 阻害剤は膜ラッフル形成を抑制しないが細胞遊走を阻害した。これらの結果から，ATP 刺激直後に生じる膜ラッフル形成とその後の細胞遊走を調節するシグナル経路が異なり，PI3K シグナル系は細胞移動の持続性や方向性の調節に関わると考えられる。さらに，PI3K シグナル系の活性化を Akt のリン酸化を指標として調べたところ，リン酸化 Akt の増加は細胞外カルシウムの除去により抑制された。ミクログリアにはイオンチャネル型 ATP 受容体 P2X サブタイプも発現していることから，P2Y12 に加え P2X が PI3K/Akt シグナル系を調節し細胞遊走に関与する可能性が示唆され，現在，検討中である。

（5）Comparative analysis of physical dimensions of the pore of maxi-anion, VSOR and CFTR chloride channels as putative ATP-channels

Ravshan Sabirov[1,2] and Yasunobu Okada[2]
([1]Dept. of Biophysics, National University of Uzbekistan, [2]Dept. of Cell Physiology, NIPS)

Maxi-anion channel, volume-sensitive outwardly rectifying (VSOR) anion channel and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) channel have been suggested to mediate an electrogenic transport of ATP by different groups. This function requires a pore wide enough for passing a bulky ATP molecule. In the present study, we attempted to evaluate the physical

dimensions of the pores of the three putative ATP-channels.

(1) Single maxi-anion channels were recorded from membrane patches excised from mouse mammary C127 cells. We first analyzed the permeability of the channel to a series of organic anions of different size. We found a linear relationship between relative permeability of organic anions of different size and their relative ionic mobility (measured as the ratio of ionic conductance) with a slope close to 1, suggesting that organic anions tested with radii up to 0.49 nm (lactobionate) move inside the channel by free diffusion. In the second approach, we tested the pore of maxi-anion channel by the nonelectrolyte exclusion method in single-channel patch-clamp experiments. The cut-off radii of PEG molecules that could access the channel from intracellular (~1.16 nm) and extracellular (~1.42 nm) sides indicated an asymmetry of the two entrances to the channel pore. Measurements by symmetrical two-sided application of PEG molecules yielded an average functional pore radius of ~1.3 nm.

(2) Single VSOR channels were recorded from the cell-attached patches of human epithelial Intestine 407 cells pre-swollen in hypotonic Hi-K^+ solutions. PEG 200-300 (R_h=0.27-0.53 nm) effectively suppressed the single-channel currents, whereas PEG 400-4000 (R_h=0.62-1.91 nm) had little or no effect. The cut-off radius of the VSOR channel pore was assessed to be 0.63 nm.

(3) Single CFTR channels were recorded from cell-attached and excised membrane patches from HEK293T cells transiently transfected with CFTR gene using a bi-cistronic vector with GFP gene as a reporter. The effect of polyethylene glycols on the single-channel CFTR currents was different depending on whether they were added from extracellular or intracellular side. The cut-off radius of PEG molecules that could access the channel from the intracellular side (~1.0 nm) was larger than that from the extracellular side (~0.6 nm) indicating an asymmetry of the two channel entrances.

The radius of ATP^{4-} and $MgATP^{2-}$ (about 0.6-0.7 nm) is close to the limiting size of the VSOR channel pore and narrowest part of CFTR channel. The size of maxi-anion channel (~1.3 nm) is largest among these three channels, therefore we suggest that it is best suited to its function as an ATP channel and, where present, serves as the preferred pathway for the release of ATP^{4-} and/or $MgATP^{2-}$.

（6）毛髪生理におけるアデノシンの作用機構

岩渕 徳郎[1]，中沢 陽介[1]，飯野 雅人[1]，江浜 律子[1]，尾郷 正志[1]，田島 正裕[1]，荒瀬 誠治[2]
([1]資生堂リサーチセンター，[2]徳島大医)

核酸関連生体物質であるアデノシンがヒトの毛成長を促進することが明らかとなり，アデノシンが持つ幅広い生理作用があらためて認識されつつある。今回はアデノシンの毛成長促進機構について概説したい。

育毛薬剤として良く知られているミノキシジルは毛包でミキシジルサルフェートに変換され，アデノシン量を増加させることにより育毛効果を示すと考えられている(1)。また，アデノシン配合製剤を用いた 6 カ月間のヒト有効性試験でも育毛効果が確認され，特に太毛化効果が見られた(2)。

ヒト毛乳頭細胞に対するアデノシンの影響をマイクロアレイ解析したところ，毛成長促進因子である FGF-7 (KGF; keratinocyte growth factor) 発現を亢進することが明らかとなった。すなわち，アデノシンは毛乳頭細胞に直接作用し，FGF-7 発現を亢進することにより毛成長を促進すると考えられた。免疫染色の結果，ヒト毛乳頭では type A2b のアデノシン受容体が発現していることが確認された。

アデノシンのアンタゴニスト併用実験より，ヒト毛乳頭細胞においてアデノシンは受容体 A2b に作用し，細胞内 cAMP 濃度上昇を引き起こすことにより FGF-7 の発現を亢進すると考えられた。FGF-7 は毛幹を成す上皮系細胞の増殖・分化を促進し，ひいては毛成長を促進する因子である。また，男性型脱毛由来の毛乳頭細胞では FGF-7 発現の低下が観察され，アデノシンが当該細胞において低下した FGF-7 発現を回復させることも明らかとなり，ヒト有効性試験で確認された効果の一端を説明できる結果が得られた。さらに，アデノシン類縁体であるグアノシンやイノシン等の影響についても言及したい。

(1) Li et al. (2001) J Invest Dermatol 117:1594-1600
(2) Tajima et al. (2004) Abstract of the 4th Intercontinental Meeting of Hair Research.

（7）マウス網膜 P2X プリン受容体を介する情報処理は ON 経路と OFF 経路で異なる

金田 誠，石井 俊行*，重松 康秀**，細谷 俊彦*，霜田 幸雄**
（慶應大・医・生理，理研・脳センター・細谷研究ユニット*，東京女子医大・総研**）

マウス網膜コリン作動性アマクリン細胞には ON 型と OFF 型の二種類が存在する。われわれは免疫組織化学的検討から，P2X2 受容体が OFF 型コリン作動性アマクリン細胞に選択的に発現していることを見出した。そこで GFP シグナルがコリン作動性アマクリン細胞のみに選択的に発現している transgenic mouse を用い，GFP シグナルをマーカーとしてコリン作動性アマクリン細胞にパッチクランプ法を適用し，ATP に対するコリン作動性アマクリン細胞応答について検討した。

ホールセルクランプ下に ATP をコリン作動性アマクリン細胞に投与し，発生した ATP 応答を GABA 応答で正規化して，OFF 型コリン作動性アマクリン細胞と ON 型コリン作動性アマクリン細胞の ATP 応答の大きさを比較した。OFF 型コリン作動性アマクリン細胞で観察される ATP 応答は ON 型コリン作動性アマクリン細胞で観察される ATP 応答より大きかった。またα，β-methyleneATP では ATP 応答が惹起されず，PPADS 存在下で ATP を投与したときにも応答は生じなかった。また ATP 応答は細胞外液への亜鉛添加で増強されたが，細胞外液のカルシウムを増加させると抑制された。ATP のコリン作動性アマクリン細胞への投与はシナプス前膜側からの GABA 放出も同時に増強した。GABA 放出の増強は ON 型と OFF 型の両方で観察された。GABA 放出の増強はα，β-methyleneATP では惹起されなかったが，PPADS 存在下で ATP を投与しても観察された。また benzoylbenzoylATP の投与でも惹起された。

以上の結果から，OFF 型コリン作動性アマクリン細胞はシナプス後膜側の P2X2 受容体による制御とシナプス前膜側の GABA 作動性神経終末による二重の制御を受けるが，ON 型コリン作動性アマクリン細胞はシナプス前膜側の GABA 作動性神経終末による制御のみを受けると考えられた。薬理学的性質と免疫組織化学染色の結果から，シナプス前膜側に存在するプリン受容体は P2X4 と P2X7 の二つが可能性として考えられた。

以上の結果を元にマルチ電極法を用いて網膜神経節細胞の光応答を記録し，光刺激で生じる網膜神経節細胞の光応答が ATP でどのように修飾されるか検討した。神経節細胞の光応答は ATP を投与すると ON 型 OFF 型ともに抑制された。ON 型と OFF 型で見られる光応答の抑制様式の相違については現在検討中である。

（8）内皮細胞の ATP レセプター$P2X_4$を介した血流センシング

山本 希美子，曽我部 隆彰，安藤 譲二
（東京大学 大学院 医学系研究科 医用生体工学講座 システム生理学）

【緒言】血管内面を覆う内皮細胞は血流と接することから，血流に起因する力学的刺激である剪断応力を受けている。内皮細胞は血流の変化を剪断応力の変化として認識し，その情報を細胞内部に伝えることで形態や機能や遺伝子発現を変化させる能力を有している。血流に対する内皮細胞の反応は生体で起こる血流依存性の現象である血管新生やリモデリング，あるいは動脈瘤や粥状動脈硬化などの血管病の発生に深く関わっている。しかしながら，内皮細胞が血流をどの様にセンシングしているのか，その分子機構は未だ明らかになっていない。そこで，我々は細胞内情報伝達系の主要なセカンドメッセンジャーとして働く Ca^{2+} の動態の面から，内皮細胞の血流センシング機構を検討した。

【実験方法】ヒト肺動脈内皮細胞 (HPAEC) に Ca^{2+} 感受性色素 Indo-1 を取り込ませ，平行平板型の流れ負荷装置により剪断応力 (1-20 dynes/cm^2) を負荷した時の細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を共焦点レーザ顕微鏡で測定した。内皮細胞における ATP 作動性カチオンチャネル P2X のサブタイプの遺伝子発現レベルを競合 PCR 法で比較した。HEK293 細胞に $P2X_4$ の cDNA を強発現させた細胞株を樹立した。また，$P2X_4$ KO マウスを作製し，肺の微小血管から培養した内皮細胞の剪断応力に対する Ca^{2+} 反応を解析した。また，内皮

細胞にNO指示薬であるDAF2を取り込ませ，剪断応力によるNO産生の変化を評価した。さらに生体顕微鏡下にマウスの骨格筋の細動脈を観察し，血流増加に対する血管拡張反応を解析した。

【結果】HPAECにハンクス平衡塩類溶液の灌流による流れ刺激を与えると，剪断応力の強さに依存した細胞内Ca^{2+}濃度の上昇反応が現れた。流れを止めるとCa^{2+}濃度は初めのレベルに復帰した。EGTAで細胞外Ca^{2+}をキレートすると流れによる反応が完全に消失したことから，Ca^{2+}の動員経路は細胞外からの流入と考えられた。また，ATPを分解するapyraseを灌流液に加えると，流れによるCa^{2+}流入反応が完全に抑制された。このことから，ATP作動性カチオンチャネルであるP2Xの関与が示唆された。HPAECのP2X発現を競合PCRで解析したところサブタイプの$P2X_4$が優勢的に発現していることが示された。$P2X_4$のアンチセンスオリゴを細胞に導入し$P2X_4$の発現を約20%にまで低下させると流れ刺激によるCa^{2+}流入反応がほとんど消失した。また，P2X4の遺伝子欠損マウスの肺微小血管内皮細胞においても流れ誘発性Ca^{2+}流入反応は起こらなかった。流れ刺激に対してCa^{2+}反応を示さないHEK293に$P2X_4$の遺伝子を発現する細胞株を樹立し，流れ刺激によるCa^{2+}反応を測定したところ，コントロールの細胞ではCa^{2+}応答は確認されなかったが，$P2X_4$を発現している細胞では剪断応力依存性のCa^{2+}濃度上昇反応が確認された。内皮細胞の流れ刺激によるNO産生反応を$P2X_4$ KOマウスと野生型(WT)マウスで比較した。WTの肺の微小血管内皮細胞では剪断応力に依存したNO産生が見られたが，KOマウスではNO産生が起こらなかった。骨格筋の微小血管観察により，WTマウスで見られた血流増加に対する細動脈の拡張反応がKOマウスで著明に抑制されていた。血圧もKOマウスではWTマウスに比較して有意に上昇していた。

【考察】今回の検討により，内皮細胞において剪断応力の強さの情報が細胞外Ca^{2+}の流入量に変換されることが示された。その機構として細胞膜に発現するイオンチャネルである$P2X_4$が重要な役割を果たしていることが明らかになった。本来，流れ刺激に反応しないHEK細胞に遺伝子導入で$P2X_4$を発現させると流れ刺激に対してCa^{2+}反応を示すようになったことから$P2X_4$が血流センサー分子として働く可能性が示された。実際，生体で$P2X_4$を介する血流センシングがどの様な生理的意義を有しているのかについて，$P2X_4$のKOマウスで検討した。その結果，$P2X_4$は血流刺激による血管のNO産生に関わっていること，血流増加に対する細動脈の拡張反応や血管のトーヌスの調節にも重要な役割を果たしていることが示された。

（9）P2Y受容体刺激による前駆脂肪細胞のadipogenic hormonesに対する感受性増大

尾松 万里子，松浦 博（滋賀医科大学・生理学講座・細胞機能生理学部門）

マウス胎児由来前駆脂肪細胞3T3-L1細胞は，成熟脂肪細胞に分化するためには細胞周期がG_0/G_1で停止することが必要である。通常の培養実験では細胞をコンフルエントになるまで培養し，接触障害により細胞周期を停止した後，adipogenic hormonesであるdexamethasone，1-methyl-3-isoxanthine及びinsulinを分化誘導因子として加えることによって成熟脂肪細胞に分化させる方法が最も標準的な手法として用いられている。また，細胞密度の低い増殖中の細胞にadipogenic hormonesを加えても分化は起こらないことが古くから知られている。我々は，50%以下の低い細胞密度の前駆脂肪細胞にATPを与えてインキュベーションした後にadipogenic hormonesを加えると，増殖を続けながら成熟脂肪細胞に分化することを見いだした。これらの効果はP2受容体阻害剤スラミン及びphospholipase C阻害剤であるU-73122によって阻害されたことからP2Y受容体を介すると考えられた。ATPで前処理した後にadipogenic hormonesを加えた細胞とコンフルエントに達してからadipogenic hormonesを加えた細胞を比較すると，細胞の増殖や分化後の中性脂肪の量には差がなかった。しかし，成熟脂肪細胞のマーカー蛋白であるadipose protein 2のmRNAの発現量を調べてみると，ATPで前処理した細胞の方が通常の方法で処理した細胞よりも3日早く増大し，ピークに達していることがわかった。これらのことから，未分化細胞においてP2Y受容体刺激はadipogenic hormonesに対する感受性を増大させ，増殖中にも関わらず脂肪細胞への分化が起こると考えられた。

（10）脳血管内皮細胞における ATP による新規 Ca^{2+}増幅機構の解明

山崎 大樹[1]，大矢 進[1]，村木 克彦[2]，浅井 清文[3]，今泉 祐治[1]
（[1]名古屋市大院・薬・細胞分子薬効解析，
[2]愛知学院大・薬・細胞薬効，[3]名古屋市大院・医・分子神経生物）

血液脳関門は脳内に広く分布し，一層の脳血管内皮細胞から成る。周囲はタイトジャンクションの形成に重要な役割を担うアストロサイトに覆われている。現在までに末梢血管内皮細胞においては各種イオンチャネルの発現分布とその機能解析が進展している。一方で，脳血管内皮細胞におけるイオンチャネル及び受容体に関しては不明な点が多い。ATP はアストロサイトや神経より遊離または漏出し脳血管内皮細胞に作用すると考えられるが，その作用機構の詳細は明らかでない。本研究では，ウシ脳血管内皮不死化細胞 (t-BBEC 117) を用いて，細胞外 ATP による脳血管内皮細胞におけるプリン作動性受容体及びイオンチャネル活性制御機構とその生理的意義を明らかにすることを目的とした。

まず，RT-PCR により t-BBEC 117 において mRNA が高発現しているプリン作動性受容体サブタイプを解析した。また細胞内 Ca^{2+}濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 測定において，小胞体の Ca^{2+}-ATPase 阻害薬であるタプシガルギン適用後には，ATP による$[Ca^{2+}]_i$ 上昇は生じないことを見出した。これらの結果および薬理学的解析から，ATP による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇には主に $P2Y_1$，$P2Y_2$ 受容体を介した Ca^{2+}遊離が関与していると示唆された。一方，イオンチャネルとしては Ca^{2+}活性化 K^+チャネルである SK2，TRPC1/3，内向き整流性 K^+チャネルである $K_{ir}2.x$ などが機能的に発現していることが明らかとなった。

次に，これら受容体およびイオンチャネルの機能連関を検討した。ATP による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は SK2 チャネルを活性化させ，細胞を過分極させることにより TRPC1/3 を介した Ca^{2+}流入を増幅させることを見出した。すなわち $[Ca^{2+}]_i$ 制御における正帰還機構の存在が示唆された。ATP 刺激による $[Ca^{2+}]_i$制御の正帰還機構が細胞増殖に関与している可能性を検討した。MTT 法を用いて増殖に対する影響を検討したところ，100 μM ATPγS は 48 時間後において増殖を有意に促進させ，SK チャネル阻害薬である UCL1684 及び TRPC1/3 阻害薬である La^{3+}はそれぞれ ATPγS による増殖促進を抑制した。以上より脳血管内皮細胞において細胞外 ATP は$[Ca^{2+}]_i$制御の正帰還機構を介して細胞増殖に寄与していることが示唆された。

さらに約 20%の t-BBEC 117 細胞において，ATP により K^+の平衡電位付近までの過分極が生じることを見出した。これらの細胞では Ba^{2+}による反応から $K_{ir}2.x$ チャネルの発現量が高くなっていると推測され，ATP による SK2 チャネルの活性化が $K_{ir}2.x$ チャネルの活性化の起因となって，更なる過分極を起こすスイッチング機構の存在することが示唆された。このスイッチング機構作動は過大な Ca^{2+}流入を生じさせ，細胞死の方向へ導くと考えられる。すなわち，$K_{ir}2.x$ 発現量が細胞死を制御している可能性が推測された。

以上より ATP は脳血管内皮細胞において$[Ca^{2+}]_i$ 調節にかかわる SK2 および $K_{ir}2.x$ チャネルという 2 つの K^+チャネルおよび TRPC1/3 チャネルの活性制御を介して，細胞増殖と細胞死という正反対の作用を示す可能性が示された。

（11）レチノイン酸による初代培養ミクログリアの $P2X_4$受容体発現増強

戸崎 秀俊[1,2]，津田 誠[1]，小泉 修一[2]，井上 和秀[1]
（[1]九州大学 大学院 薬学府，[2]国立衛研薬理部）

細胞外 ATP は中枢において，ATP 受容体を介した情報伝達を担う重要なシグナル分子である。$P2X_4$ 受容体はイオンチャネル型の ATP 受容体の一つで，本研究室は神経傷害時の疼痛モデルラットの脊髄内でミクログリアが活性化し，その細胞膜表面での $P2X_4$ 受容体の発現増強が見られ，この受容体が直接疼痛に関わっていることを見出した。しかしミクログリアの $P2X_4$ 受容体の急激な発現調節については未だほとんどわかっていないのが現状であ

る。そこでラット $P2X_4$ 遺伝子の上流領域約 2 kbp をクローニングし転写因子結合サイトを検索したところ，核内受容体の認識配列に相同性のある配列がみつかった。

レチノイン酸はビタミン A の誘導体であり, retinoic acid receptor (RAR)，retinoid X receptor (RXR)といった核内受容体に結合し，応答配列をもった遺伝子の転写活性を制御することができる。特に RXR は様々な核内受容体とヘテロダイマーを形成し標的遺伝子の転写活性を制御する重要な核内受容体である。クローニングした $P2X_4$ 遺伝子上流領域のプロモータ活性を dual luciferase assay を行い定量したところ，この配列内にレチノイン酸に応答するサイトの存在が示唆された。Quantitative RT-PCR 法を用いた解析から RXR，RAR のアゴニストである 9-cis retinoic acid (9-cisRA)，RAR のアゴニストである all-trans retinoic acid (atRA)処置により初代培養ミクログリアに発現している $P2X_4$ 受容体 mRNA は，濃度，時間依存的に有意な mRNA 量の増加を示すことが観察された。同様の増大作用は RAR 及び RXR の合成アゴニスト処置によっても認められた。Western blotting 法を用いた解析により 9-cisRA 処置によって有意な $P2X_4$ 受容体タンパク量の増大が観察され，また細胞内 Ca^{2+} 応答を指標とした検討によりミクログリア $P2X_4$ 受容体の機能亢進も観察された。以上より，$P2X_4$ 遺伝子上流領域にレチノイン酸応答配列が存在していること，RAR および RXR アゴニスト処置により $P2X_4$ 受容体の mRNA，タンパクの発現量が増大すること，$P2X_4$ を介したミクログリアの機能が亢進することが確かめられた。脊髄や後根神経節では，神経傷害時における組織内でのレチノイン酸合成酵素の発現量が急激に増大している。つまり，脊髄ミクログリア $P2X_4$ の発現増大から引き起こされる神経因性疼痛にはレチノイン酸による転写調節が重要な発現経路の一つであることが示唆される。

（12）後根神経節細胞における細胞質型ホスホリパーゼ A_2 の ATP による活性化

長谷川 茂雄，津田 誠，井上 和秀（九州大学 大学院 薬学府 薬効解析学分野）

ATP は末梢の一次求心性神経に存在する $P2X_3$, $P2X_{2/3}$, $P2Y_1$ および $P2Y_2$ 受容体を介して，痛みの発生およびその調節機構に重要な役割を有している。しかし，その詳細なメカニズムについては依然未解決な部分が多い。一方で, プロスタグランジン類等の脂質メディエーターも，ATP と同様に痛覚過敏やアロディニアを誘発することから，ATP 受容体刺激後のシグナルとして何らかの関連性が予想される。プロスタグランジンやロイコトリエンなどの脂質メディエーターは，細胞質型ホスホリパーゼ A_2 (cytosolic phospholipase A_2; $cPLA_2$) により膜脂質から切り出されたアラキドン酸によって生合成されることから，$cPLA_2$ の活性状態は痛覚伝達系の制御に重要な役割を演じている可能性がある。$cPLA_2$ の活性化には，C2 ドメインへの Ca^{2+}の結合及びセリン残基のリン酸化が必要であることが知られている。そこで本研究では，一次求心性神経（後根神経節細胞 dorsal root ganglion; DRG）における $cPLA_2$ の活性化に対する ATP の効果について検討した。

$cPLA_2$ の活性化は，活性化型である Ser^{505} リン酸化型 $cPLA_2$(Phosphorylated $cPLA_2$; p-$cPLA_2$)タンパク質を, その特異的抗体を用いたウエスタンブロッティング法により検出し，その発現レベルから評価した。ラット初代培養 DRG ニューロンを ATP で処置すると, p-$cPLA_2$ 発現レベルは ATP 1μM から 10μM の範囲で濃度依存性に増加し，また, ATP 10μM 処置後 5 分でピークに達した。この ATP による p-$cPLA_2$ の発現増加は選択的 $P2X_3$ 及び $P2X_{2/3}$ 受容体アンタゴニストである A-317491 の前処置により抑制された。また，$P2X_{1,\ 3,\ 2/3}$ 受容体アゴニストであるα, β-methylene ATP により p-$cPLA_2$ レベルが増加した。一方，$P2Y_1$ および $P2Y_2$ 受容体アゴニストである 2MeSADP および UTP の処置によっても，p-$cPLA_2$ タンパク質の発現増加が見られた。現在知られている 4 つの $cPLA_2$ サブタイプ(α, β, γ, δ)の中で，$cPLA_2\alpha$はアラキドン酸を含むリン脂質に選択性を示す。そこで，培養 DRG ニューロンに $cPLA_2\alpha$inhibitor を前処置した結果，ATP による p-$cPLA_2$ タンパク質の発現増加は阻害剤で抑制された。

以上の結果は，一次求心性感覚神経において，ATP が $P2X_3$，$P2X_{2/3}$，$P2Y_1$ および $P2Y_2$ 受容体を介して $cPLA_2$, 特に $cPLA_2\alpha$を活性化することを示唆しており，この $cPLA_2\alpha$の活性化が ATP による痛みの発生・調節機構に何らかの役割を有している可能性が考えられる。

（P1）免疫担当細胞における $P2X_7$受容体機構の解析

月本 光俊，原田 均，五十里 彰，高木 邦明，出川 雅邦 （静岡県立大・薬）

【目的】$P2X_7$受容体は ATP との結合により活性化すると陽イオンの流入・分子量約 900 Da 程度までの分子を通す小孔の形成・サイトカインの放出・細胞死の誘導などを引き起こすことが報告されている。最近，我々はこれらに加えて細胞外液中の Cl^-に依存した細胞径の縮小（細胞縮小：アポトーシス初期の特徴）が誘導されることを見出している。今回はマウスリンパ球における $P2X_7$受容体活性化による細胞縮小について報告する。

【方法】4-6 週齢 Balb/c 系マウスの胸腺および脾臓から分離した細胞を用いて実験を行った。$P2X_7$受容体蛋白質の発現は特異的抗体を用いたウエスタンブロット解析により，細胞障害性は細胞外に漏出した乳酸脱水素酵素の活性を測定することにより調べた。細胞径の変化はフローサイトメーターを用いて前方散乱光および側方散乱光を測定することにより解析した。また，膜抗原の染色には蛍光標識抗マウス CD4, CD8 および B220 モノクローナル抗体を用いた。

【結果および考察】$P2X_7$ 受容体蛋白質の発現量は胸腺細胞に比べて脾臓細胞に多く，ATP 処置による細胞死の誘導は胸腺細胞に比べて脾臓細胞においてより早く検出された。細胞径の変化について解析した結果，脾臓細胞においては ATP 処置後数分で速やかに縮小細胞の割合が増加した。一方，胸腺細胞では処置後 90 分まで緩やかに縮小細胞の割合が増加した。両細胞群とも $P2X_7$受容体アゴニストである 2'-&3-*O*-(4-benzoyl-benzoyl)-ATP 処置でも細胞縮小の誘導が認められ，$P2X_7$受容体アンタゴニストである oxidized ATP 前処置により阻害されたことから，$P2X_7$受容体を介して細胞縮小が誘導されていると考えられた。

次いで T 細胞の分化状態との関係について検討した結果，胸腺細胞中約 8 割を占める未分化な $CD4^+8^+$胸腺細胞は ATP にほとんど反応せず，$CD4^-8^+$胸腺細胞 ＜ $CD4^+8^-$胸腺細胞 ＜ $CD8^+$脾臓細胞 ＜ $CD4^+$脾臓細胞の順に強い細胞縮小の誘導が認められた。このことは分化・成熟した T 細胞において細胞縮小活性が強いことを示している。一方，脾臓中の B 細胞は細胞縮小が誘導されなかった。これまで $P2X_7$受容体誘導性細胞死は，胸腺における T 細胞分化過程に関与しているとされてきた。しかしながら，本研究により分化・成熟した T 細胞の方が高感度に細胞死が誘導されることが明らかとなり，胸腺中での分化過程のみならず末梢での T 細胞機能においても $P2X_7$ 受容体が重要な役割を担っているものと考えられる。

（P2）Bradykinin による ATP 放出への多剤耐性 MRP の関与の可能性

趙 玉梅，佐藤 千江美，右田 啓介，桂木 猛（福岡大・医・薬理）

ATP はオートクリン/パラクリン分子として P2X および P2Y 受容体を介して，広汎で多彩な細胞機能調節作用を示すことは良く知られているが，その細胞外への放出機構，また，どのような細胞内部位から放出されるかについてはほとんど不明のままである。本研究は，これらの点を明らかにする目的で，モルモット結腸紐の培養平滑筋細胞を用いて bradykinin による ATP 放出実験を行った。

その結果，bradykinin は B_2-受容体刺激により，濃度依存性に ATP を放出した。この ATP 放出は phospholipase C - Ins(1,4,5)P_3 シグナル系の一連の阻害薬（U-73122 や thapsigargin など）や NEM，staurosporin により著しく抑制された。さらにこれは MK-571, benzbromarone などの MRP 阻害薬で拮抗されたが，CFTR-Cl^- channel ブロッカー（glybenclamide，Gd^{3+}など）や hemi channel ブロッカー（gap23 など）ではほとんど影響されなかった。この ATP 放出はミトコンドリアの機能を阻害する oligomycin や CGP37157 などで，またゴルジ体からの小胞輸送を阻害する brefeldin A によっても抑制されなかった。ウェスタンブロッティングによる実験で，同細胞には，MRP2 や MRP3

ではなく MRP1 の蛋白質の発現が認められた。

これらのことより，bradykinin は B_2-受容体刺激により $Ins(1,4,5)P_3$ シグナルを介して，恐らく ER からの ATP 遊離を引き起こし，この ATP が膜の多剤耐性蛋白質(MRP1)の nucleotide binding domain に結合し，これを活性化して ATP 自身が細胞外へ放出されるものと考えられる。

（P3）P2X 受容体反応に及ぼすパーキンソン病原因遺伝子 parkin および alpha-synuclein の影響

有村 由貴子[1]，佐藤 あゆみ[1]，西川 香里[2]，青木 公三子[2]，和田 恵津子[2]，
青木 俊介[2]，和田 圭司[2]，野田 百美[1]（[1]九州大・院・薬・病態生理，
[2]国立精神・神経センター・神経研・疾病研究第 4 部）

parkin 遺伝子は，若年性常染色体劣性遺伝型の家族性パーキンソン病(AR-JP)の原因遺伝子として 1998 年に発見された。その遺伝子産物である Parkin は，ユビキチンリガーゼの一種であると考えられ大脳黒質に豊富に存在することが知られている。さまざまな神経変性疾患では，ユビキチン･プロテアソーム系の破綻が提唱されており，実際 AR-JP 患者の parkin 遺伝子が変異して，Parkin の活性が喪失していることが分かっている。また，Parkin の基質タンパクである alpha-synuclein の凝集体がパーキンソン病患者から多数見つかっていることから，Parkin の機能異常による alpha-synuclein の蓄積がパーキンソン病に関与していることが示唆されている。その一方で，神経回路機能における Parkin や alpha-synuclein の役割についてはいまだに解明されていない。

本研究では，神経系に広く分布し，様々な神経伝達物質の放出に関与している ATP 受容体に着目し，Parkin や alpha-synuclein がその活性にどのように関与しているのかを電気生理学的に検討した。

その結果，Parkin は，PKA の活性化を介して ATP 誘発電流を増大させることが明らかになった。また，この PKA 活性の制御に DARPP-32 (dopamin and cAMP-regulated phosphoprotein with molecular weight of about 32000)が関与する可能性も示唆された。しかし一方で，ユビキチン水解酵素や Parkin と同様に lysine 63 を介してユビキチン鎖を形成することが報告されている alpha-synuclein は ATP 誘発電流に顕著な影響を及ぼさなかった。これらの結果より，Parkin は ATP 受容体に対して PKA，DARPP-32 を介して調節的な役割を果たしていることが考えられ，今後，Parkin が P2X 受容体を介して神経伝達物質の放出に関与しているかについても明らかにしたい。

（P4）コレステロール代謝変動に起因するミトコンドリア機能障害と神経細胞変性過程

道川 誠（国立長寿医療センター研究所 アルツハイマー病研究部）

【目的】*ApoE*，*ABCA1*，*CYP46* 等のコレステロール代謝関連遺伝子多型とアルツハイマー病発症との相関が指摘されている。しかし，如何なる分子機構によってコレステロール代謝変動が神経細胞変性を誘導するかについてはよく解っていない。この分子機構の解明を目的に，コレステロール代謝障害に起因する神経変性疾患（アルツハイマー病と極めて類似するタウオパチーを来たす）である Niemann-Pick C1 (NPC1) 病マウスをモデルに選び，その脳および神経細胞を生化学的に解析した。

【方法】NPC1 マウス脳およびそれらから準備した培養神経系細胞（神経細胞とグリア細胞）に対して，電子顕微鏡による観察およびミトコンドリア機能評価（JC-1 染色によるミトコンドリア膜電位の評価），ATP 定量，ATP 合成酵素活性を定量した。更にミトコンドリアを精製し，ミトコンドリア膜における脂質解析，ミトコンドリア膜コレステロールの増減による ATP 合成酵素活性への影響を検討した。

【結果】(1) NPC1 型マウス脳のミトコンドリアは小さく内部構造に乱れが見られた。

(2) NPC1 型の神経細胞/アストロサイトにおけるミトコンドリア膜電位は低下していた。

(3) NPC1 型マウス脳の ATP 量は，野生型に比し約 60-70%

程度に低下していた。

(4) NPC1 型マウス脳の ATP 合成酵素活性は，野生型に比し約 60%程度に低下していた。

(5) NPC1 型ミトコンドリア膜コレステロール濃度は野生型に比し有意に高値であり，コレステロール濃度を薬剤により低下させると ATP 合成酵素活性は野生型と同程度まで回復した。

(6) 野生型ミトコンドリア膜コレステロール濃度は上昇しても低下しても ATP 合成酵素活性は低下した（ミトコンドリア膜コレステロール濃度には至適濃度がある）。

【考察】(1) コレステロール代謝変動がミトコンドリア膜のコレステロール濃度変化を介して神経細胞変性を郵送する可能性が示された。(2) アルツハイマー病では，Aβ に起因する神経細胞内コレステロール代謝変動がタウ蛋白のリン酸化亢進を伴う神経細胞変性（タウオパチー）を誘導するが，NPC1 病では，NPC1 欠損に起因する神経細胞内コレステロール代謝変動がタウオパチーを誘導すると考えられる。興味深いことにアルツハイマー病脳でもミトコンドリア機能障害がみられることから，この両疾患では神経変性過程の一部を共有すると考えられる。(3) 両疾患とも apoE4 型では病理進展が増強することから，apoE-HDL によるコレステロール輸送・供給機構がこの神経変性過程に関与（修復・恒常性維持等）していると推測される。

（P5）Shear Stress Induced Ionic Current and FM1-43 Influx via $P2X_4$ ATP-receptor as a Mechano-transduction Pathway

Fernando Lopez-Redondo[1], Kimiko Yamamoto[2], Joji Ando[2], Kishio Furuya[1],
Kumi Akita[1], Keiji Naruse[1,3], Masahiro Sokabe[1,3,4]
([1]Cell Mechanosensing, SORST, JST; [2]Dept Biomed Engin, Grad Sch Med, Univ Tokyo;
[3]Dept Cell Biophysics, Grad Sch Med, Nagoya Univ; [4]Dept Mol Physiol, Natl Inst Physiol Sci)

Endothelial cells (ECs) sense hemodynamic forces (pressure and shear stress) from the flowing blood. $P2X_4$ is constitutively expressed at a high level in ECs. Yamamoto et al found a shear stress-dependent Ca^{2+} influx mediated by the $P2X_4$ purinergic receptor as confirmed by sense and anti-sense oligonucleotide techniques. Human embryonic kidney (HEK293) cells that have no Ca^{2+} response to flow, were able to show a cytosolic Ca^{2+} increase when they transfected with $P2X_4$. In order to determine if $P2X_4$ can sense the shear force, we investigated whether direct mechanical stimulation of P2X4-containing outside-out patches were activated by flow. Patch-clamp recordings from HEK293 cells stably expressing $P2X_4$ showed single channel activity following the flow stimulation with Hank's solution. The permeation property of the styryl dye FM1-43 through mechano-transduction channels was also assessed in our case. Epifluorescence and confocal microscopy showed FM1-43 (5 μM) uptake in $P2X_4$-transfected HEK293 cells after ATP (10 μM) or flow stimulations. These findings indicate functional activities of $P2X_4$ and suggest that $P2X_4$ could likely be a primary shear-stress sensor in endothelial cells.

（P6）マウス脳内のアデニン類含量およびアデニル酸シクラーゼの内因性阻害物質3'-AMP 産生酵素系に及ぼす加齢の影響

藤森 廣幸，宮本 晃洋，堀内 隆宏，芳生 秀光 （摂南大・薬・衛生分析化学）

組織内のアデニン類のうち ATP，ADP，5'-AMP および cAMP 等は高エネルギー担体やエネルギー代謝中間物質であり，種々の酵素活性調節因子あるいは細胞内外の情報伝達物質としての作用を有する物質である。また，アデニン類は RNA や DNA などの核酸の構成成分であり，遺伝情報の保存あるいは伝達に寄与していることは

周知の事実である。RNA 中のアデニン残基は RNA 分解酵素により最終的には, 5'-AMP あるいは adenosine (Ado) の 3'位の水酸基にリン酸が結合した 3'-AMP に分解代謝される。3'-AMP は薬理学的にはアデニル酸シクラーゼの内因性阻害物質として分類されているが，3'-AMP および 3'-AMP 産生酵素の生体内意義は未だ不明である。

出生直後のマウス脳は増殖性を有しており，漸次分化し記憶・学習等の高次機能を有する脳を形成していく。増殖性の細胞は RNA 代謝能が亢進するので，脳内の 3'-AMP 含量および 3'-AMP 産生酵素活性が変動する可能性がある。また，脳の構成細胞の増殖・分化に伴って脳内のアデニン類の含量も変動することが推察される。

非常に素人的発想に基づき本研究では，マウス脳内のアデニン類含量および 3-AMP 産生酵素活性系に及ぼす出生前後からの加齢の影響を検討した。

ICR 系マウス脳からアデニン類を含む酸可溶性物質を過塩素酸で抽出した。3'-AMP 産生酵素活性は基質 poly(A) を用いて測定した。アデニン類は標識試薬の chloroacetaldehyde で蛍光化した後, HPLC 法により分離・定量した。

胎児全脳および出生 1，3 日齢の総アデニン量(ATP+ADP+AMP) および ATP 含量は約 0.5 および 0.2 nmol/mg 湿重量で，ほぼ同程度であった。1 から 8 週齢の脳の ATP 含量はみかけ急激に減少した。これは，エーテル麻酔下で脳を摘出してアデニン類を抽出するまでに，脳内の ATP が急速に 5'-AMP へと分解されることが推察された。胎児全脳の 3'-AMP 含量は低値であったが，生後 1 週間後に最大となり 3 週齢まで持続した。一方，胎児全脳中の 3'-AMP 産生酵素活性は高く，その活性は生後 1 週齢まで徐々に減少したが 2 週齢で最大となった。1 週齢マウスの大脳，小脳および脳幹の 3'-AMP 産生酵素活性は同程度であった。しかし，2 週齢になると大脳の産生酵素活性は約 10 倍にも上昇したが, 小脳および脳幹の活性は変動しなかった。以上の結果より，胎児期では総アデニン量および 3'-AMP 産生酵素系は各々ほぼ一定値を示したが，出生後 1-2 週齢を境に脳内の ATP 分解系および 3'-AMP 産生酵素系が変動し，特に，大脳の 3'-AMP 産生酵素活性は急激に上昇し，大脳の何らかの機能を調節している可能性が示唆された。

（P7）アシドーシスによる新生ラット摘出脊髄反射電位の抑制作用におけるアデノシンの関与

乙黒 兼一，山地 良彦，伴 昌明，太田 利男，伊藤 茂男
（北海道大学 大学院獣医学研究科 薬理学教室）

アシドーシスは中枢神経系に重篤な機能不全を引き起こすことが知られており，低酸素とともに虚血性疾患における重要な病態のひとつである。近年，アシドーシスによってアデノシンが放出され冠血流量を増加させることが摘出心標本を用いた実験で報告されたが，中枢神経系におけるアシドーシスの影響とそれに対するアデノシンの関与については明らかにされていない。そこで本研究では新生ラット（0-3日齢）から摘出した脊髄半裁標本を用いて，電気刺激によって生じる脊髄反射電位に対する高炭酸惹起アシドーシスの作用と，その作用におけるアデノシンの関与について検討した。摘出脊髄標本を人工脳脊髄液 (ACSF，5% CO_2，pH 7.3) で灌流し，脊髄後根(L3-L5)を電気刺激し対応する前根から monosynaptic reflex potential (MSR) と slow ventral root potential (sVRP) を記録した。高炭酸低 pH ACSF(20% CO_2，pH 6.7) は，MSR と sVRP を可逆的に抑制した。A_1 受容体拮抗薬 CPT はこの抑制反応を部分的に回復させたが，A_{2A} 受容体拮抗薬 ZM241385 は影響を与えなかった。低 pH ACSF (5% CO_2，pH 6.7) 又は高炭酸 ACSF (20% CO_2，pH 7.3) によっても MSR と sVRP は抑制されたが，CPT は低 pH ACSF による抑制反応のみを部分的に回復させ，高炭酸 ACSF による抑制には影響を与えなかった。高炭酸低 pH ACSF による抑制効果は 5'-エクトヌクレオチダーゼ阻害剤 AOPCP の影響を受けなかった。アデノシンキナーゼ阻害剤 NH_2dAD は高炭酸低 pH ACSF と同様に MSR と sVRP を抑制し，この抑制効果は CPT で回復した。一方アデノシンデアミナーゼ阻害剤 EHNA は MSR には影響を与えず sVRP のみを抑制し，この抑制効果は CPT で回復しなかった。高炭酸低 pH ACSF は細胞外アデノシン量を増加させた。以上の結果から高炭酸惹起アシドーシスによる

pH の低下がアデノシン放出を引き起こし，A_1 受容体を介して脊髄反射電位を抑制していると考えられる。アデノシン放出にはアデノシンキナーゼ活性の抑制が関与していることが示唆された。

（P8）アストロサイトにおける酸化ストレスによる細胞死誘導シグナリングに対する $P2Y_1$受容体活性化の拮抗作用

篠崎 陽一[1]，小泉 修一[1]，井上 和秀[2]（[1]国立衛研・薬，[2]九州大・薬・薬効解析）

ATP は中枢神経系 (CNS) において ATP 受容体（P2 受容体）を介してグリア間 (gliotransmission) 及びグリア-神経間 (glia-neuron transmission) の情報伝達を行う最も重要な分子の一つである。私は前年の研究会において ATP が $P2Y_1$ 受容体を介してアストロサイトの H_2O_2 誘導性細胞死に対して保護作用を発揮する事を報告した。本研究ではアストロサイトにおける H_2O_2 誘導性細胞死を引き起こす細胞内シグナリングの同定とそれに対する ATP/$P2Y_1$ 受容体の作用メカニズムの解明を目的とした。過去の報告からアストロサイトでは H_2O_2 刺激により mitogen-activated protein kinases (MAPK) が活性化する事が知られている。薬理学的解析，ウェスタンブロッティング及び免疫組織化学による解析から extracellular signal-regulated kinase 1 and 2(ERK1/2) の強い活性化とリン酸化 ERK1/2 (P-ERK1/2) の持続的な核への集積が H_2O_2 誘導性細胞死に関わると考えられた。MEK1/2 阻害剤及び ATP は H_2O_2 誘導性 ERK1/2 活性化，P-ERK1/2 の核集積，細胞死を抑制した。GeneChip による解析の結果，ATP は ERK1/2 など MAPK の不活性化に関わる MAPK phosphatase の発現増加は誘導しなかったものの，protein tyrosine phosphatase (PTP) の発現増加が誘導されており，さらに酵素活性の増加も確認された。ATP による保護作用および ERK1/2 活性化抑制作用は PTP 阻害剤 Na_3VO_4 によって消失した事から，ATP による PTP の発現及び活性増強がその保護作用に関わると考えられた。一方，H_2O_2 によって種々の protein tyrosine kinase (PTK) が活性化する事から，PTK の H_2O_2 誘導性細胞死への関与を調べた。H_2O_2 はタンパクチロシンリン酸化を引き起こし，ATP は H_2O_2 によるチロシンリン酸化を抑制した。更に，H_2O_2 誘導性細胞死が src family 選択的阻害剤 PP1 によって濃度依存的 (10～250 nM) に抑制される事，PP1 が H_2O_2 誘導性タンパクチロシンリン酸化を抑制する事から H_2O_2 によって PTK，特に src family が活性化する事によって細胞死が引き起こされる事が明らかとなった。PP1 処置によって H_2O_2 誘導性 ERK1/2 活性化が抑制された事から，アストロサイトにおける H_2O_2 誘導性細胞死は src family とそれに続く ERK1/2 活性化によって引き起こされる事が明らかとなった。ATP は H_2O_2 によって活性化される細胞内シグナルを抑制する事によって細胞死からアストロサイトを保護すると考えられた。

（P9）脊髄後角の興奮性シナプス伝達に及ぼすアデノシン作用における ヌクレオシド輸送体の役割

柳 涛，藤田 亜美，中塚 映政，熊本 栄一
（佐賀大学医学部生体構造機能学講座神経生理学分野）

皮膚末梢から脊髄後角に至る痛み情報は，後角第 II 層（膠様質）においてアデノシンを含む様々な内因性鎮痛物質の働きにより制御を受けることはよく知られている。昨年の生理学研究所研究会において，アデノシンが膠様質の A_1 型アデノシン受容体を活性化することにより (1) 膜を過分極すること，(2) 神経終末から起こるグルタミン酸放出を抑制することが，アデノシンの鎮痛作用に寄与することを報告した。脊髄後角シナプスにおけるアデノシンは，ニューロンやグリア細胞から放出されたアデノシンや ATP に由来すると考えられている。今回，(1)アデノシンを細胞内外に輸送する equilibrative nucleoside-transport (ENT)，(2) アデノシンをイノシンとアンモニアに分解す

る adenosine deaminase (ADA)，そして(3) アデノシンを 5’-AMP にリン酸化する adenosine kinase (AK) の働きに注目し，それらの阻害剤がアデノシンによる膠様質興奮性シナプス伝達修飾作用にどんな作用を及ぼすかを調べた。

実験は，成熟ラットから作製した脊髄横断スライス標本の膠様質ニューロンに通常のブラインド・ホールセル・パッチクランプ法を適用して行った。保持電位 -70 mV でアデノシン (200 μM) の 2 分間灌流投与により誘起される外向き膜電流は，ENT 阻害剤 (S-(4-nitrobenzyl)-6-thioinosine, NBTI; 1 μM)や ADA 阻害剤 (erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl) adenine, EHNA; 1 μM) により，その持続時間を延長された。一方，AK 阻害剤 (iodotubercidine, IOT; 1 μM) はその膜電流の下降相を緩徐にした。アデノシン (10 μM) による自発性興奮性シナプス後電流の発生頻度の抑制は，その程度や経時変化について NBTI (1 μM)，EHNA (1 μM)，そして IOT (1 μM)により顕著な影響を及ぼされなかった。以上より，アデノシンの輸送体や代謝の働きの変化はそのシナプス後性作用に効果を及ぼすことが明らかになった。アデノシンのシナプス前性作用については，今後，更に検討する必要がある。

（P10）P2Y 受容体刺激による細胞膜 PtdIns(4,5)P2の一過性の減少

藤居 祐介，尾松 万里子，松浦 博 （滋賀医科大学・生理学講座・細胞機能生理学部門）

ホスホリパーゼ C (PLC) 連関型 P2Y 受容体は，リガンドが結合すると細胞膜リン脂質の一員であるホスファチジルイノシトール-4,5-二リン酸 (PIP2) を分解し，ホスファチジルイノシトール-三リン酸 (IP_3) 及びジアシルグリセロール (DAG) を生成すると考えられている。PIP2 の動態は PIP2 に対して高い親和性を持つプレクストリンホモロジー (PH) ドメインと融合させた蛍光タンパク GFP を培養細胞に発現させることによって観察されてきたが，単離細胞において観察することは困難であった。今回，我々は抗 PIP2 抗体を用いて受容体刺激による細胞膜 PIP2 の減少を経時的に測定する方法を確立した。褐色脂肪細胞を ATP で刺激して細胞膜 PIP2 の変化を測定したところ，細胞膜における減少のピークは ATP では刺激後 10 秒であり，その後は徐々に再合成され，2 分後には刺激前と同レベルまで回復することがわかった。ホスファチジルイノシトール-4-キナーゼ阻害剤であるウオルトマンニン存在下では，ATP によって細胞膜 PIP2 は分解されたが再合成は見られなかった。また，別の Gq/PLC 連関型受容体であるα受容体をノルアドレナリンで刺激しても同様の結果が得られた。これらのことから，P2Y 受容体刺激による細胞膜 PIP2 の一過性の減少について検討した。

（P11）感覚神経終末グリア網におけるカルシウム波伝播の二重様式とプリン受容体の関与について

岩永 ひろみ（北海道大学 大学院 医学研究科 組織・細胞学分野）

毛の動き受容器，槍型神経終末のグリア細胞は，分岐する突起でつながり合い，異なる軸索終末間を連絡する網をつくる。一般に，受容体を介する細胞内 Ca^{2+} 濃度の一過性上昇は，細胞網工や上皮シートに沿って波として伝わり，協調的な細胞活動を惹き起こすことが知られる。この細胞境界を越えた Ca 波の伝播機構に関し，今までに対立する 2 説が提出された。ひとつは，ATP などの生理活性物質の細胞外拡散に基づく考え，もうひとつは，細胞内信号物質のギャップ結合を介した移動を重視する考えである。2 つの信号伝播因子の関与を検討する目的で，ラット洞毛周囲槍型終末を膜片標本として分離し，微小ガラス針でグリア網局所に接触刺激を与えときにみられる Ca 信号の生成・伝播過程を，共焦点顕微鏡で解析した。

ガラス針で一つの槍型終末に軽く触れると，直後に，その終末を包むグリア突起の Ca^{2+} 濃度が単峰性に上昇

し，15-150 秒で回復した。比較的持続時間の長い Ca 応答のあとには，刺激点付近の 2-5 本の槍型終末で，伴行するグリア突起の Ca^{2+} 濃度が，遅れて上昇するのが観察された。この 2 次的 Ca 信号には，各グリア突起の決まった場所から独自に生成するものと，突起の近位部から外来性に入ってくるものとが区別され，前者は，刺激後 1-5 秒の潜時をもって刺激点から 25μm 以内の槍型終末に次々と波及し，応答グリア細胞は，必ずしも機械刺激を受けたグリア細胞と突起のつながりをもたなかった。一方，後者の信号は，刺激点からの距離に関わりなく，機械刺激されたグリア細胞の突起に観察され，その突起と直接結合する他の細胞の突起に伝播することもあった。このグリア応答の潜時は，刺激局所から細胞体を経てその突起に至るまでの細胞質の道程に依存して長くなり，ときに数十秒に達した。終末グリア ATP 受容体 $P2Y_2$ の遮断剤 suramin は，前者のタイプの信号伝播だけを阻害した。槍型感覚終末間をつなぐグリア網の Ca 信号は，ATP の細胞外拡散に基づく比較的早い伝播と細胞内信号物質の移動による遅い伝播の 2 重様式を示し，両者はそれぞれ，異なる細胞活動の調節に役立つと推測される。

（P12）アデノシン刺激による MDCK 細胞からの ATP 放出に対するシグナリングおよび放出部位の検討

右田 啓介，趙 玉梅，桂木 猛（福岡大・医・薬理）

【背景】ATP は様々な刺激により細胞外に放出される。我々はアデノシン刺激により MDCK 細胞から ATP が放出されることを報告した。アデノシン刺激は，A_1 受容体を介してホスホリパーゼ C を活性化し，細胞内 IP_3 を介して細胞内カルシウム (Ca^{2+}) ストアーから Ca^{2+} が放出され，細胞外に ATP が放出される。しかしながら，細胞内 Ca^{2+} 上昇後のメカニズムについては明らかではない。そこで，本研究ではアデノシン刺激による細胞内 Ca^{2+} 上昇後の ATP 放出経路および放出部位について検討した。【方法】アデノシン刺激により灌流液中に放出された ATP 量は，ルシフェリン・ルシフェラーゼを用いて測定した。また，灌流実験により，ミトコンドリア Ca^{2+} 指示薬の Rhod2/AM およびミトコンドリアマーカーの MitoTracker Green FM を用いて，ミトコンドリア内 Ca^{2+} 変化を測定した。【結果および考察】MDCK 細胞への 10μM アデノシン刺激は，ATP の細胞外放出を引き起こした。この放出は，ミトコンドリアの ADP/ATP トランスポーター拮抗薬 (10μM carboxyatractyroside，10μM bongkrekic acid，50μM N-Ethylmaleimide)，Na^+/Ca^{2+} 交換輸送体拮抗薬 (20μM CGP 37157) あるいは酸化的リン酸化拮抗薬 (10μM CCCP，10μM oligomycin) の前処置により強く抑制された。また，抗癌剤の細胞外放出に関与している Multidrug resistant protein (MRP) の拮抗薬 (5 μM MK571，100μM glibenclamide，10μM benzbromarone，100μM probenecid，10μM cyclosporine A) の前処置により，アデノシンによる ATP の細胞外放出はほぼ完全に抑制された。これらの結果から，MDCK 細胞へのアデノシン刺激は，A_1 受容体を介し細胞内 Ca^{2+} 上昇の後，ミトコンドリアにシグナルが伝えられ，細胞膜の MRP を介して ATP が細胞外に放出されることが示唆された。

（P13）骨髄間質細胞の $P2Y_2$ 受容体を介したカルシウムシグナリングは細胞密度に依存して変化する

市川 純，玄番 央恵（関西医科大学・第 2 生理）

【要旨】ラット骨髄間質細胞は $P2Y_2$ 受容体を発現し，UTP に反応して細胞内カルシウム上昇を起こす。F344 雄ラット大腿骨骨髄より採取した骨髄間質細胞を培養し，Fura-2 を用いて細胞内カルシウム濃度測定を行った結果，細胞密度によってカルシウム応答の様子が異なることがわかった。細胞密度を低・中・高と 3 段階にわけて観察すると，高密度であるほど UTP に反応しやすい。一方，低密度では UTP に対する反応は鈍いが，カルシウム

ストアの枯渇により起こる容量性のカルシウム流入は大きい。そしてその中間の密度では，UTP 投与によりカルシウムオシレーションがみられた。このオシレーションは細胞外カルシウム除去により減衰し，また外液 UTP を washout するとただちに消失した。オシレーションの頻度は容量性カルシウム流入チャネルのブロッカーおよびギャップジャンクションのブロッカーにより変動した。この UTP によるカルシウムオシレーションは低密度および高密度の状態ではみられないことから，骨髄間質細胞が細胞間コミュニケーションを形成する際，一過性に起こる現象であると考えられる。

（P14）末梢神経損傷後における P2X 受容体の後根神経節での変化

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

ATP 受容体としてイオンチャネル型受容体の P2X receptor (P2X1-7)と G タンパク共役型受容体の P2Y receptor が存在しており，これらの受容体が痛みに関与していることが近年報告されている。

我々は，これまでに P2X receptor, P2Y receptor の naive ラット後根神経節(DRG)における詳細な発現の解析を行い，各サブタイプ別の特異的な発現パターンを報告してきた。DRG neuron には P2X2-6 が発現しており，P2X2，P2X3 receptor は小型・中型 neuron に，P2X5，P2X6 receptor は中型・大型 neuron に，P2X4 receptor はほとんど全ての neuron に発現しており，さらに non-neuronal cell には P2X4，P2X6，P2X7 receptor の発現が見られた(Kobayashi et. al. J. Comp. Neurol. 2005)。

末梢神経損傷後の痛みに P2X 受容体がどのように関わっているかを調べるために，坐骨神経切断モデルを用いて DRG における P2X receptor の発現の変化を in situ hybridization 法を用いて詳細に検討した。

その結果，末梢神経損傷後の DRG では P2X 受容体の発現に変化が見られた。最も発現の多い P2X3 receptor は発現細胞数，シグナル強度がやや減少していた。中型・大型 neuron で発現している P2X5，P2X6 は減少していた。P2X4 は neuron での発現は減少していたが satellite cell において増加が見られた。P2X7 は坐骨神経切断後も neuron にはほとんど存在しないが satellite cell での発現がやや増加していた。P2X2 は坐骨神経切断後 1 日から増加し始め 7 日でピークに達し，60 日まで増加したままであった。また，P2X2 は健側では小型・中型に発現しているが，術側で発現の増加が見られた neuron は主に中型細胞であった。

以上のことから，末梢神経損傷後の DRG neuron においては主に P2X2，P2X3 receptor が存在していることが分かった。健側の DRG では P2X2 と P2X3 の共存は比較的少なく，一方術側においてこの 2 つのサブタイプが共存を示す可能性が示唆されたことで，神経損傷後のヘテロ受容体による痛覚過敏のメカニズムとして興味深い。

（P15）血管周皮細胞ペリサイトに発現する P2受容体とその機能

藤下 加代子[1]，末石 浩二[1,2]，井上 和秀[3]，小泉 修一[1]
([1]国立衛研・薬理部，[2]福岡大学・薬・薬学疾患管理，[3]九州大学・院・薬・薬効解析)

脳内におけるアストロサイトの生理学的, かつダイナミックな役割に注目が集まっている。特にニューロンを取り巻くアストロサイトは三者間シナプスを形成し, シナプスから漏れ出た伝達物質を受け取るだけでなく, 自らも液性因子を放出し, シナプス伝達を制御することが知られてきている。他方でアストロサイトは，その足 (endfoot) を血管系に伸ばし，血管壁の周りを取り巻くことが知られている。血管系のうち，毛細血管や微小血管の血管壁外周にはペリサイト（周皮細胞）と呼ばれる細胞が存在しているが，その脳内における機能や役割についてはまだ明

らかになっていない。

私達は今回，このアストロサイト− ペリサイト− 血管系連関に注目し，ペリサイトにおける ATP/P2 受容体を介したシグナルの生理学的な役割及びアストロサイト−ペリサイト間における ATP/P2 受容体を介したコミュニケーションについて検討を行なった。

ラット初代培養ペリサイトを用いた薬理学的な検討から，ペリサイトには P2Y1，P2Y2，P2Y4 受容体が発現しており，中でも主として機能している P2 受容体は P2Y2 受容体であると考えられた。そこで，ペリサイトを種々のアゴニストで灌流刺激し，細胞の収縮/弛緩を測定したところ，UTP 及び 2MeSADP でペリサイトの収縮が観察された。続いて，収縮/弛緩の実験モデルとして，単一のペリサイトにガラスピペットを用いて機械刺激を与えたところ，まず被刺激細胞で細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 上昇が起こり，それが周囲のペリサイトへ，Ca^{2+} wave となって伝播した。この Ca^{2+} wave 伝播は，apyrase 及び P2 受容体アンタゴニストによりほぼ抑制された。また，luciferin-luciferase 法に基づくフォトンカウントを行なった結果，ペリサイトから，機械刺激に応じて ATP が放出されることが明らかとなった。

脳表の比較的太い血管と異なり，脳深部の微小血管・毛細血管はアストロサイトの強い支配を受けており，このアストロサイトも強い ATP 放出能を有する。従って，血管周囲のペリサイトは，自ら放出した ATP 及びその周囲を取り囲むアストロサイト由来 ATP を受容することによりその収縮・弛緩，さらに局所血流量を調節している可能性示唆された。また，アストロサイト− ペリサイト共培養系を用いた検討から，ペリサイトで発生した Ca^{2+} wave が細胞外 ATP 及び P2 受容体依存的に，近隣のアストロサイトへも伝播することを明らかとした。従って，血管系の収縮・弛緩といった物理的なシグナルが ATP の化学シグナルに変換されてアストロサイトへフィードバックされる可能性も示唆された。

（P16）アストロサイトの pinocytosis における $P2Y_6$受容体の関わり

多田 薫[1]，戸崎 秀俊[1]，井上 和秀[2]，小泉 修一[1]
（[1]国立医薬品食品衛生研究所 薬理部，[2]九州大学 大学院 薬学研究院 薬効解析学分野）

Pinocytosis は，細胞外液やそこに溶解する分子を細胞膜により取り囲み，小胞として細胞内に取り込む飲作用であり，全ての細胞において無刺激状態でも絶えず行われている（恒常的 pinocytosis）。Pinocytosis の生理的役割として，栄養分子やイオンなどの取り込み，有害物質の除去，細胞膜面積の調整など多くの可能性が示唆されているが，その機構について詳細はまだ明らかになっていない。一方，$P2Y_6$ 受容体は UDP 選択的 pyrimidinoceptor であり，その発現は免疫系細胞，脳，肺，心臓，血管など多くの部位に認められ，アストロサイト上での発現も報告されているが，その生理的役割は未だによく解っていない。そこで今回我々は，アストロサイトの pinocytosis における $P2Y_6$ 受容体の関与について検討した。

ラット初代培養アストロサイトの細胞外に蛍光標識ビーズを添加すると，時間依存的に蛍光が細胞内へ取り込まれることが flow cytometry や蛍光顕微鏡により観察されたことから，アストロサイトにおいて恒常的 pinocytosis が起こっていることが明らかになった。一方，この反応は，reactive blue-2 前処置により部分的に抑制されたことから，一部プリン受容体（特に P2Y）の作用を介している可能性が考えられた。そこで，pinocytosis に対する各種 P2 受容体アゴニストの作用を検討したところ，UDP によって pinocytosis の促進が観察されたことから，$P2Y_6$ 受容体が関与することが示唆された。実際，アストロサイトには機能的な $P2Y_6$ 受容体が発現することを Ca^{2+} レスポンス及び Western blotting により確認した。次に恒常的 pinocytosis に対する $P2Y_6$ 受容体の関与について，$P2Y_6$ 受容体に対するアンチセンスヌクレオチド及び $P2Y_6$ 受容体アンタゴニスト MRS2578 を用いて検討した。その結果，アストロサイトにおける恒常的 pinocytosis は，それらの処置により部分的ながら(20〜25%)阻害された。一般的に，受容体はアゴニスト刺激により細胞内へ内在化を起こすことが知られている。そこで，UDP 刺激により生じる pinocytosis が $P2Y_6$ 受容体の内在化によるものか否かについて検討した。まず，N 末に FLAG 標識した FLAG-$P2Y_6$ 受容体をヒトアストロサイトーマ 1321N1 細

胞上に発現させ，UDP で刺激すると pinocytosis が促進した。次に，UDP 刺激後の FLAG-P2Y$_6$ 受容体の内在化について，抗 FLAG 抗体を用いた live-labelling 法で検討した結果, UDP 刺激で pinocytosis が促進されている 1321N1 細胞においても，FLAG-P2Y$_6$ 受容体の内在化の程度は無刺激の状態と殆ど変わらなかった。以上より，P2Y$_6$ 受容体を介する pinocytosis は P2Y$_6$ 受容体の内在化に起因するものではないことが明らかになった。

本研究により，アストロサイトにおいて恒常的な pinocytosis が起こっていること，更にこの反応には部分的ながら P2Y$_6$ 受容体が関与することが示唆された。これは，アストロサイトが自発的にヌクレオチドを放出する事実と合わせて考察すると興味深い。

（P17）Regulation of purinergic P2X$_2$ receptor activity by phosphoinositides

藤原 祐一郎，久保 義弘（生理研 神経機能素子）

Activity regulation by phosphoinositides (PIP$_n$s) are known for various ion channels. In this study we aimed to examine whether the ATP-gated P2X$_2$ receptor channel is also regulated by PIP$_n$s or not, and analyzed the electrophysiological properties of P2X$_2$ wild type expressed in *Xenopus* oocytes under two-electrode voltage clamp. We observed that the preincubation in wortmannin or LY294002, PI3K inhibitors, accelerated the channel desensitization, while the preincubation in PAO, a PI4K inhibitor, decelerated it. As all PIP$_n$s are anionic lipids, we focused as the structural determinant on the proximal region of the C-terminus cytoplasmic domain where positively charged amino acids are clustered. We analyzed properties of several mutant P2X$_2$ channels, and observed that K360Q, K365Q, K369Q, R371Q or K374Q mutation accelerated the desensitization, while K365R or K369R mutation did not. These results suggest that these positively charged amino acid residues play critical roles in preventing the channel desensitization. As a next step we purified a GST-tagged recombinant protein from L353 to S377 expressed in E. coli., and analyzed their binding to anionic lipids using a PIP$_n$s-coated nitrocellulose membrane. We observed that the recombinant protein including the positively charged region was bound to PIPs and PIP$_2$s, and that the bindings were eliminated by the K365Q or K369Q mutation. We also confirmed that a fusion protein between EGFP and the proximal C-terminus cytoplasmic domain of P2X$_2$ closely associated with the plasma membrane using a fluorescence assay. Taken together, we speculate that an electrostatic binding of the membrane PIP$_2$ to the proximal C-terminus cytoplasmic domain plays a critical role in maintaining the open channel activity.

（P18）ATPγS によるアストロサイトでの MCP-1産生誘導における MAP キナーゼカスケードの役割

片山 貴博，南 雅文（北大院・薬・薬理学分野）

ケモカインは白血球に対して走化活性化作用を有する一群のサイトカインの総称であり，現在までに 50 種近くが同定されている。Monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1, CCL2)は代表的なケモカインの 1 つであり，脳虚血や多発性硬化症，ウイルス感染など，様々な病理的条件下の脳内で産生誘導され，脳細胞傷害増悪への関与が示唆されている。一方，脳切片培養系は細胞構築や個々の細胞の活性化状態が単離分散培養系や共培養系と比較してより *in vivo* に近い状態にあるため，活性化状態の違いによって様々な挙動を示すグリア細胞の研究に有用であると考えられる。我々はこの脳切片培養系を用いて，ATPγS 処置によりアストロサイトにおいて一過性に MCP-1 産生誘導が惹起されることを見いだしている。MCP-1 産生誘導に関する細胞内情報伝達については，MAP キナーゼの関与を示す多くの研究がなされているが，刺激および細胞種によって，その寄与の方向性や度合いは様々である。

そこで本研究では，ATPγS による MCP-1 産生誘導における MAP キナーゼの関与について脳切片培養系を用いて検討を行った。

生後 2-3 日齢 Wistar/ST ラットより，大脳皮質− 線条体領域からなる冠状切片（300μm 厚）を作製し，10-11 日間培養後，実験に用いた。ATPγS 処置 24 時間後の培地中への MCP-1 遊離量は，MEK 阻害薬 PD98059 および JNK 阻害薬 SP600125 により有意に減少し, 逆に p38 MAP kinase 阻害薬 SB203580 によって増加した。一方，3 時間の ATPγS 処置直後の mRNA 発現に関して検討したところ, PD98059 および SP600125 は発現抑制効果を示したが, SB203580 は mRNA 発現に影響を与えなかった。そこで SB203580 の MCP-1 mRNA 発現およびタンパク産生に対する効果を経時的に検討したところ，ともに SB203580 存在下では非存在下に比べ，mRNA 発現やタンパク産生の持続時間が延長された。

以上の結果より，脳切片培養系において ATPγS による MCP-1 産生誘導に関して，ERK および JNK は転写レベルで促進的に調節していると考えられた。また, p38 MAP キナーゼを介した抑制的な調節機構の存在も示された。

11. 分子複合体と神経・シナプス機能

2005 年 6 月 23 日－6 月 24 日

代表・世話人：森 泰生（京都大学大学院工学研究科）

所内対応者：井本 敬二（神経シグナル）

（1）足場蛋白 S-SCAM によるシナプス分子複合体の形成

飯田 純子，川田 現，佐藤 勇次，畑 裕（東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科）

（2）神経活動依存的シナプス蛋白 Arc と PSD 蛋白とのスパインにおける相互作用解析

奥野 浩行[1]，藤井 哉[1]，成瀬 紘也[1]，Shoaib Chowdhury[2]，Paul Worley[2]，尾藤 晴彦[1]

([1] 東京大学大学院 医学系研究科 神経生化学，[2] Johns Hopkins University School of Medicine）

（3）調節性分泌におけるシナプトタグミンファミリーの機能と多様性

福田 光則（独立行政法人理化学研究所・福田独立主幹研究ユニット）

（4）水とイオンチャネルの構造と機能

藤吉 好則（京都大学大学院理学研究科生物物理学教室）

（5）電顕画像の単粒子解析法の開発とイオンチャンネルの構造

小椋 俊彦，三尾 和弘，佐藤 主税（産業技術総合研究所 脳神経情報研究部門）

（6）タンパク質相互作用ネットワークの大規模解析

夏目 徹（産業技術総合研究所 生物情報解析研究センター

機能ゲノムグループ・タンパク質ネットワーク解析チーム）

（7）膜蛋白複合体プロテアーゼγセクレターゼの解析

富田 泰輔（東京大学 大学院薬学系研究科 臨床薬学教室）

（8）代謝型グルタミン酸受容体の機能制御機構と動的構造変化

立山充博，久保義弘（生理学研究所 神経機能素子研究部門）

（9）内因性カンビノイドによる線条体シナプス伝達の調節

鳴島 円[1]，内ヶ島 基政[2]，松井 稔[3]，真鍋 俊也[3]，渡辺 雅彦[2]，狩野 方伸[1]

([1] 金沢大院・医・シナプス発達・機能学，[2] 北海道大院・医・解剖発生，

[3] 東京大・医科研・基礎医科学・神経ネットワーク分野）

（10）シナプス前 Gi/o 共役型受容体を介する微小シナプス電流の調節

山崎 美和子，橋本 浩一，狩野 方伸（金沢大学 医学系研究科 シナプス発達・機能学）

（11）電位依存性 Ca^{2+}チャネルβサブユニットの生理機能的複合体生成

森 泰生（京都大学大学院工学研究科）

【参加者名】

森 泰生（京都大学工学研究科），畑 裕，飯田 純子（東京医科歯科大学），尾藤 晴彦，奥野 浩行（東京大学大学院医学系研究科），富田 泰輔，宮下 紘幸（東京大学大学院薬学系研究科），真鍋 俊也，関野 祐子，李 楽天，三輪 秀樹（東京大学医科学研究所），福田 光則（理化学研究所），佐藤 主税，夏目 徹（産業技術総合研究所），高橋 正身，板倉 誠（北里大学医学部），井ノ口 馨（三菱化学生命科学研究所），阿部 輝雄（新潟大学脳研），片岡 正和（信州大学工学部），若森 実，原 雄二，清中 茂樹，三木 崇史，瓜生 幸嗣，加藤 賢太，山崎 浩史（京都大学工学研究科），藤吉 好則，西澤 知宏，野間 健太郎，倉持 陽平（京都大学理学研究科），鳴島 円，山崎 美和子（金沢大学医学研究科），葉山 成樹（ファイザー），富永 真琴，柴崎 貢志，飯田 陶子，富永 知子，早坂 孝宏，岩崎 広英，村田 喜理，岡村 康司，久木田 文夫，島 麻子，三村 明史，村山 奈美枝（統合バイオ），野田 昌晴（基生研），久保 義弘，立山 充博，中條 浩一，藤原 祐一郎，長友 克広，石井 裕，大塚 岳，本蔵 直樹，井上 剛，根本 知己，岸本 拓哉，佐竹 伸一郎，加瀬 大，井本 敬二（生理研）

（1）足場蛋白 S-SCAM によるシナプス分子複合体の形成

飯田 純子，川田 現，佐藤 勇次，畑 裕 （東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科）

足場蛋白質 S-SCAM はシナプスにおいて，接着分子 neuroligin，Dasm1 と直接，cadherin と間接に結合している。また，NMDA 受容体サブユニットと結合し，activin 受容体や delta 2 グルタミン酸受容体とも結合するといわれている。また catenin，RapGEP，kalirin-7，PTEN などのシグナル伝達分子と相互作用し，接着構造の周辺に受容体とそのシグナル伝達系からなる分子複合体を集積する役割を担っていると考えられている。さらに，PSD-95，MAGUIN，GKAP/SAPAP，axin などの他の足場蛋白とも相互作用しているところから，樹状突起スパインを支える大きな蛋白ネットワークの一部を構成する可能性も想定されている。これらの知見から，S-SCAM のような複数の蛋白相互作用領域をもつ足場蛋白は，分子同士の一対一の結合を通じて，分子複合体を細胞の特定の場所に集積し，分子複合体内でのクロストークによりシグナル伝達の効率化を図るという従来から提示されていた役割にとどまらず，分子複合体そのものが機能する場を調節する役割も担う可能性が高いことが示唆される。実際，私達は最近，ノックアウトマウスの解析を含むいくつかの実験から，S-SCAM が樹状突起スパイン全体の形態制御に関わることを見出し，その分子機構を解析している。本研究会では，その結果を中心に S-SCAM に関する最近の知見を発表する。

（2）神経活動依存的シナプス蛋白 Arc と PSD 蛋白とのスパインにおける相互作用解析

奥野　浩行[1]，藤井　哉[1]，成瀬　紘也[1]，Shoaib Chowdhury[2]，Paul Worley[2]，尾藤　晴彦[1]
（[1]東京大学大学院　医学系研究科　神経生化学，[2] Johns Hopkins University School of Medicine）

神経特異的前初期遺伝子の一つ Arc 遺伝子は刺激に対して極めて高い発現誘導性を示し，シナプスの長期可塑性に重要な役割を果たしていることが示唆されている。また，近年，遺伝子改変マウスや遺伝子発現抑制法を用いた個体解析により，記憶・学習等の脳高次機能のおける Arc 遺伝子の関与を示唆する知見が蓄積されてきた。しかしながら，シナプス活動による Arc mRNA の発現誘導制御メカニズムや Arc 蛋白の樹状突起やスパインへの輸送メカニズム，そしてシナプスでの役割という本質的な点に関しては未だ不明である。

本研究においては，Arc の機能を生化学的・細胞生物学的手法を用いて解析することを目的とし，Yeast 2-hybrid assay 等を用いて Arc 結合蛋白の候補を検索した。その結果，Arc はさまざまなシナプス関連タンパクと結合する可能性が示唆された。このタンパクータンパク相互作用の生物学的・生理学的意義を解析するため，我々は蛍光エネルギー転移 (FRET) を応用した生細胞における相互作用の可視化を試みた。本研究では，任意の結合蛋白ペアから GFP 由来蛋白でラベルされた FRET ペアを単離する新しい方法を開発した。スクリーニングの結果得られた FRET ペアを海馬神経細胞に導入したところ，FRET が樹状突起およびスパインで認められ，生きている神経細胞において Arc と PSD 蛋白の相互作用を可視化することに成功した。これらの結果を，神経活動依存的な Arc の細胞内局在変化とともに議論したい。

（3）調節性分泌におけるシナプトタグミンファミリーの機能と多様性

福田 光則 （独立行政法人理化学研究所・福田独立主幹研究ユニット）

神経伝達物質の放出やホルモンの分泌に代表される「調節性分泌」は膜輸送の一形態で，細胞内を移動してき

た小胞が外界からの刺激依存的に細胞膜と融合し小胞の内容物を細胞外へと放出する現象である。分泌を起こすには2種類の膜の結合が不可欠なため，分泌の制御に関わる分子には細胞膜の構成成分であるリン脂質の結合モチーフ（C2ドメインなど）を持つものが多い。中でも，シナプトタグミンに代表される「カルボキシル末端©型タンデムC2タンパク質」は主に分泌小胞上に存在し，C末端側に存在する二つのC2ドメインを介してカルシウムイオンやリン脂質を結合することから，調節性分泌の際の「カルシウムセンサー」として機能するものと考えられている。本研究ではまず，シナプス小胞輸送におけるシナプトタグミンI分子の機能，特にシナプトタグミン1分子には何故2個のC2ドメインが必要なのか，また膜輸送の制御におけるそれらの機能的な差違とは一体何なのかに焦点を当てる。

シナプトタグミンは哺乳動物において15種類ものアイソフォーム(I〜XV)が存在し，様々な調節性分泌の制御に関与するものと考えられている。内分泌細胞にはシナプス小胞よりもサイズの大きい有芯顆粒が存在し，ここからカルシウム依存的にホルモンなどが分泌される。副腎髄質クロマフィン細胞由来のPC12細胞においては少なくとも4種類のシナプトタグミンアイソフォーム(I, IV，VII，IX)が発現することが報告されている。そこで次に，これらのアイソフォームのうちどのシナプトタグミンが有芯顆粒開口放出の際の主要なカルシウムセンサーとして機能するのかをRNA干渉法及び機能阻害抗体を用いて検討した。その結果，シナプトタグミンIXがシナプトタグミンIと共に有芯顆粒上に存在し（シナプトタグミンIVは主にゴルジ体に存在），ホルモン分泌を制御することが明らかとなった。また，細胞膜上のカルシウムセンサーとして報告されたシナプトタグミンVIIは蛋白質レベルでは検出できず，外来性に遺伝子導入したシナプトタグミンVIIもPC12細胞の細胞膜ではなく主に有芯顆粒上に存在することが明らかとなった。

［参考文献］

1. J. Biol. Chem. (2004) 279, 52677-52684
2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2004) 101, 9441-9446
3. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2004) 101, 17855-17860
4. 蛋白質 核酸 酵素, (2004) 49, 2186-2197

（4）水とイオンチャネルの構造と機能

藤吉 好則（京都大学大学院理学研究科生物物理学教室）

地球上のほとんどすべての生命は脂質2重膜で包まれた細胞から出来ており，それは水で満たされている。また，神経細胞をはじめ多くの細胞の重要な情報伝達は，受容体やイオンチャネルが存在する膜を介して行われているが，最近イオンチャネルの機能を構造から議論できるような構造生理学とも言うべき研究分野が発展を見せている。水を60%も含む我々の身体や細胞にとって，イオンチャネルが機能を発揮するには，イオンやプロトンと水の透過を選択的に調節できる仕組みが必要である。水だけを透過させて，イオンや低分子化合物さらにはプロトンをも通さない様な機能を有するアクアポリン-1(AQP1)と名付けられた分子量28kDの膜タンパク質が実際に発見され[1]，それ以後いろいろな生物種から多様な水チャネルが同定された。我々の身体にも13種類もの水チャネルが存在する。しかも，これらは水だけを選択する単なる“穴”ではなくて，個性豊かな多様な機能を備えたチャネルであることが分かってきている。

電子顕微鏡を用いると，生体高分子やその複合体の立体構造を直接観察することができるが，実際には，電子の物質との強い相互作用のために電子照射による試料損傷という深刻な問題が存在する。また，試料を真空中に持ち込むので，乾燥して変性してしまう問題が存在するが，試料を薄い非晶質の氷の中に閉じこめて観察する急速凍結法が開発されている[2]。どちらの問題を解決するにも低温ステージを持った電子顕微鏡が必要になる[3]。我々が独自に開発した極低温電子顕微鏡[4]を用いて，ヒト由来の膜タンパク質，AQP1の原子モデルが初めて明らかにされた[5]。AQP4も構造解析が容易ではない2層膜からなる2次元結晶であったが構造解析に成功した。それゆえ，AQP1だけでなく脳に発現している水チャネル(AQP4)等の機能が構造学的視点から理解できるようになってきた。これらの水チャネルは，アセチルコリン

受容体等と比較すると興味深い特徴も明らかになってきた。

極低温電子顕微鏡を用いたアセチルコリン受容体の構造解析により，このイオンチャネルのゲーティング機構が解明された [6]。アセチルコリン受容体は，アセチルコリン結合ドメインと膜貫通ドメインがあるが，前者のドメインは，β-シートから出来ており，後者は 4 本のα-ヘリックスから出来ている。膜貫通部分で一番狭いところは，穴の径が 6Å であり非常に大きい。水チャネルでは穴径が 3Å と小さいにもかかわらず 20 億分子もの水を 1 秒間に透過するが，イオンが直径 8Å という水和の殻を形成するので，このチャネルの 6Å の径を透過できない。アセチルコリンがアセチルコリン結合ドメインに結合すると内側のβバレル構造が 10 度右に回転する。その動きが, 膜貫通ヘリックスの中の M2 ヘリックスを 10 度右回転させる。結果として，チャネルの最も狭い部分が 9Å に拡がるので，イオンは水和したままで透過できるようになる。

水やイオンチャネルを極低温電子顕微鏡を用いて“みた”結果，自然が作り上げた巧妙な分子機構が解明されたので，これらについて簡単に解説したい。

文献

1) Preston, G.M., Carrol, T.P. Guggino, W.B., Agre, P.: Science 256, 385-387 (1992)
2) Adrian, M, Dubochet, J. Lepault, J. and McDowall, A. W.: Nature 308, 32-36 (1984)
3) Fujiyoshi Y.: Adv. Biophys. 35, 25-80 (1998)
4) Fujiyoshi, Y. et al.: Ultramicroscopy 38, 241-251 (1991)
5) Murata, K.et al.: Nature 407, 599-605 (2000)
6) Miyazawa, A., Fujiyoshi, Y. Unwin, N.: Nature 423, 949-955 (2003)

（5）電顕画像の単粒子解析法の開発とイオンチャンネルの構造

小椋 俊彦，三尾 和弘，佐藤 主税（産業技術総合研究所 脳神経情報研究部門）

一般に我々の神経細胞のイオンチャンネルは制御タンパク質と分子複合体を形成して，制御されている。この複合体の構造解析を容易にする技術が電子顕微鏡画像による単粒子構造解析と考えている。本解析技術とその開発過程を下記のチャンネルの解析を例に説明したい。

車の急ブレーキを踏むときなどは，我々は視覚情報に対して数ミリ秒単位の時間経過で反応することができる。この素速い反応を可能にしているのが，神経細胞に存在する電圧感受性 Na チャンネルである。Na チャンネルは隣接したチャンネルが開くと自分自身も開く性質がある。電圧感受性チャンネルは 6 回の膜貫通部位を有するドメインが 4 つ結合することで機能蛋白質を形成する。

神経細胞の小胞膜には IP3 受容体とよばれるイオンチャンネルが存在する。その役割は小胞内に存在する Ca イオンの放出を制御することである。我々の細胞内では Ca イオン濃度は通常，厳密に低い濃度に抑えられており，この小胞から放出される Ca イオンは細胞の様々な活動を制御し，その影響は我々の高次機能にも及んでいる。そのため，IP3 受容体チャンネルは生体の活動にとって重要である。IP3 受容体も同じく 6 回膜貫通型のイオンチャンネルであり, その細胞質側に IP3 と Ca 両方が結合すると，開いて Ca を通す。しかしながら，これらのほ乳類の 6 回膜貫通型蛋白質は結晶を作成しないため，その構造と機構はこれまで謎であった。

我々は京大藤吉教授，東大御子柴教授等との共同研究により, He ステージクライオ電子顕微鏡による数万枚の粒子像を基にこれらの構造を解明した。これら 2 種類のチャンネルは基本的に共通した 2 層よりなる構造をしていることがわかる。しかし，IP3 受容体の内層の中心には Na チャンネルと異なり明確な長い孔が見られる。この内部パイプはイオンの通路と思われ, パイプの中間にもイオンが放出される切れ目が存在していた。そのためパイプから放出された Ca イオンは気球構造表面の多くの穴から四方八方へ放出されると思われる。これは細胞膜直下で細胞膜と平行に向いたイオン放出孔が存在し, イオンを平行方向に流し出す Na チャンネルの構造と対照的である。IP3 受容体は表面に多くの孔を持つ気球状である。これは Ca イオンを広く様々な方向に散らばらせる仕組みを持つと思われ, そのことにより細胞質の様々な部位に情報を伝

搬させるのに好都合なのであろう。

C. Sato, Y. Ueno, K Asai, K. Takahashi, M. Sato, A. Engel and Y. Fujiyoshi: Nature, 409, 1047-1051, (2001).

C. Sato, K. Hamada, T. Ogura, A. Miyazawa, K. Iwasaki, Y. Hiroaki, K. Tani, A. Terauchi, Y. Fujiyoshi, K. Mikoshiba : J. Mol. Biol., 336, 155-164 (2004).

（6）タンパク質相互作用ネットワークの大規模解析

夏目 徹（産業技術総合研究所 生物情報解析研究センター
機能ゲノムグループ・タンパク質ネットワーク解析チーム）

ポスト・シークエンス時代を迎え，プロテミクスによる大規模・包括的なタンパク機能解析が急務とされている。しかし，その進捗はかばかしくない。その理由は，タンパク質が化学的に多様で不安定性だからであり，質量分析を代表とするハイテク機器を駆使しようとも，核酸のように大規模・ススステマティックに扱うことが本質的に困難だからである。我々は，ダイナミックレンジが広く，且つ微量なタンパク質サンプルの解析を可能とするため，測定前処理の生化学的プロセス全てを改革・全体最適化を行い，超ナノ LC をオンライン化したタンデム質量分析システムを独自に開発した。本システムは，サブ・フェムトモルレベルの感度で，150 以上のコンポーネントからなる複雑なタンパク質複合体を，電気泳動などすることなく，1 時間ほどで決定することを可能とする。この解析プラットフォームと，ヒト完全長 cDNA を用いたタンパク質相互作用解析の大規模解析が現在進行中である [1)]。

本講演では，1,500cDNA を使った feasibility study の概要と細胞内シグナル伝達に関わる分子の Whole pathway 解析(Wnt/beta-Catenin, Classical MAP kinase, TNF-alpha pathway)概要と，Ubiqutination/Proteasome 系の大規模解析から明らかとなった新規な蛋白質修飾・分解システムの発見について紹介する [2-11)]。

1) 夏目徹. (2004). “完全長ヒト cDNA を用いた大規模蛋白質ネットワーク解析”(2004). 蛋白質 核酸 酵素 PNE 49(14): 2222-29
2) Yanagida, M (2004). J Biol Chem 279, 1607-1614.
3) Bannai, H.,. (2004). J Biol Chem 279, 53427-34.
4) Ishigaki, S.,. (2004). J Biol Chem 279, 51376-85.
5) Komatsu, M.,. (2004). Embo J 23, 1977-1986.
6) Nakayama, K., (2004). Dev Cell 6, 661-672.
7) Oyama, M., (2004). Genome Res 14, 2048-2052.
8) Higo, T.,. (2004). Cell 120, 85-98
9) Kojima, H.,. (2005). PNAS 102, 4524-4529.
10) Yoshida, K., (2005). Nat Cell Biol 7, 278-285.
11) Matsuda, N.,. (2005). DNA Repair in press.

（7）膜蛋白複合体プロテアーゼγセクレターゼの解析

富田 泰輔（東京大学 大学院薬学系研究科 臨床薬学教室）

家族性アルツハイマー病の原因遺伝子としてプレセニリン(PS)遺伝子が同定されている。PS は，βアミロイドペプチドの凝集性を決定する C 末端側を切断するγセクレターゼ活性に必須な分子であることが明らかにされている。またγセクレターゼによって Notch, ErbB4 など様々な膜蛋白がその膜内配列中で切断をうけることが示されており，PS 依存性膜内配列切断を介した新しいシグナル伝達経路が想定されている。PS は分子内切断を受け，さらに Nicastrin(Nct)，Aph-1，Pen-2 と相互作用して 2 MDa 以上の巨大な複合体を形成しており，現在ではこの膜蛋白複合体がγセクレターゼそのものであると考えられている。われわれはこのγセクレターゼ複合体について，特にそれぞれの分子の機能を明らかにすることを目的に，培養細胞を用いた過剰発現ないし RNAi によるノックダウン法を用いて検討した。その結果，γセクレターゼ複合体形成過程において，Nct/Aph-1 は PS 複合体の安定化因

子として機能していること，Pen-2 は安定化された高分子量複合体の活性化因子として働いていることを明らかにした。さらにバキュロウイルス系を用いたγセクレターゼ複合体を再構成系と，低分子量化合物を分子プローブとしたアプローチにより，その特異な切断過程の分子レベルでの理解・各構成因子の構造活性相関を明らかにすることを目的に検討を進めている。AD に対し原因療法的に神経細胞の変性・脱落を阻止できる可能性のあるセクレターゼ阻害剤が治療に一刻も早く実用可能となることが望まれる。またγセクレターゼは，「疎水性環境にあるペプチド鎖を加水分解する」という，これまでにない蛋白分解の概念を提示するとともに，「リガンド依存的な連続したタンパク分解」による新たなシグナル伝達経路の可能性，そして様々な「一回膜貫通型蛋白の膜内配列の分解」などの新たな研究分野を生み出しつつある。今後γセクレターゼによる切断機構の分子的解明により，AD 発症機構の理解，治療・予防薬の開発のみならず，新しい酵素学･生物学が開けていくものと確信している。

（8）代謝型グルタミン酸受容体の機能制御機構と動的構造変化

立山充博，久保義弘（生理学研究所 神経機能素子研究部門）

代謝型グルタミン酸受容体(mGluR1)の細胞外領域の結晶構造解析により，mGluR1 がホモ二量体として構成されていること，グルタミン酸結合により細胞外領域の構造が変化することが報告されている。その結果に基づき，G 蛋白質の活性化に直結する mGluR1 の細胞内領域においても，二量体サブユニット間の配置が変化することが推測されてきたが，未だ不明であった。そこで，細胞外領域の構造変化に伴って起こる細胞内領域の動的構造変化のリアルタイム解析を目指して研究を進めた。異色の蛍光物質間の距離が近いほどエネルギーの受け渡し（FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) 効率）が大きくなることが知られているので，構造変化を，FRET 効率の変化として光生理学的に捉えることを計画し，mGluR1 の細胞内領域の様々な箇所に 2 色の蛍光蛋白を付加した。この分子の遺伝子を培養細胞に導入し，細胞膜に発現している分子の蛍光のみを全反射照明下で測光し，グルタミン酸投与に伴う FRET 効率の変化を解析した。その結果，(1)サブユニットの内部では明らかな構造変化は起こらない。(2)二量体サブユニットの，細胞内ループ 1 が相互に遠ざかる。(3)二量体サブユニットの，細胞内ループ 2 が相互に近づく。という知見が得られた。これらの結果から，リガンド投与により，mGluR1 の細胞内領域においては，個々のサブユニットはあまり顕著な構造変化を起こさず，2 つのサブユニット間の相対的配置が変化することが想定された。

ところで，我々は，mGluR1 が，グルタミン酸のみならず，細胞外の Ca^{2+}，Gd^{3+}等の多価陽イオンによっても活性化されることを以前報告した。Gd^{3+}については，結晶構造解析により，その結合部位が，グルタミン酸結合部位と異なる 2 つのサブユニット間の負電荷を持つアミノ酸に富む領域に同定された。グルタミン酸と Gd^{3+}の結合部位，すなわち作用様式が異なるため，それぞれの結合に伴って起こる細胞内領域の構造変化，ひいては，G 蛋白質とのリンクが異なるという可能性も考えられる。この仮説を検証するために現在進めている，Gq 系（細胞内 Ca^{2+}濃度）と Gs 系（細胞内 cAMP 濃度）の応答の同時記録の結果についても紹介したい。

Tateyama M, Abe H, Nakata H, Saitoh O, Kubo Y
Ligand- induced rearrangement of the intracellular dimeric conformation of metabotropic glutamate receptor1a. Nature Struct Molec Biol 11: 637-642, 2004.

（9）内因性カンビノイドによる線条体シナプス伝達の調節

鳴島 円[1]，内ヶ島 基政[2]，松井 稔[3]，真鍋 俊也[3]，渡辺 雅彦[2]，狩野 方伸[1]
（[1]金沢大院・医・シナプス発達・機能学，[2]北海道大院・医・解剖発生，
[3]東京大・医科研・基礎医科学・神経ネットワーク分野）

内因性カンナビノイドは脳のさまざまな部位で逆行性の抑制性シグナル伝達物質として働いている。内因性カンナビノイドはシナプス後細胞の脱分極に伴う Ca^{2+}流入およびGq/11タンパク共役型代謝型受容体の活性化により合成・放出されることが知られている。本研究では，大脳基底核神経回路の入力核であり，カンナビノイド受容体（CB1受容体）が多く発現している線条体に注目し，内因性カンナビノイドによるシナプス伝達修飾機構について解析した。

線条体出力細胞である中型有棘ニューロン（MS ニューロン）から whole cell 記録を行い，興奮性および抑制性シナプス電流(EPSC, IPSC)を観測すると, IPSC でのみ，シナプス後細胞の脱分極によるシナプス伝達の一過性の減少が観測された。この IPSC の抑制は，CB1 受容体の阻害薬(SR141716)により消失したことから，内因性カンナビノイドによるシナプス伝達調節であると考えられる。次に，MS ニューロンへのシナプス入力はコリン作動性介在ニューロン由来のアセチルコリンにより修飾されることが知られているため，ムスカリン受容体と内因性カンナビノイドの関係について解析した。ムスカリン受容体の賦活薬(oxotremorine-M)を投与すると，EPSC・IPSC ともに振幅が減少したが，IPSC に対する効果のみ，SR141716 により阻害された。また, 低濃度の oxotremorine-M 存在下では，弱い脱分極によっても内因性カンナビノイドによるシナプス伝達抑制が誘起されることも示された。これらの oxotremorine-M の効果は，細胞内の G タンパク阻害薬(GDPβS)の投与，M1 受容体の特異的阻害薬である pirenzepine の投与，および M1 受容体ノックアウトマウスで消失したことから，MS ニューロン上の M1 受容体が関与していると考えられる。以上の結果より，MS ニューロンへの抑制性入力に対して，MS ニューロンの脱分極，MS ニューロン上の M1 ムスカリン受容体の活性化および弱い脱分極と弱い受容体活性化の組み合わせにより，内因性カンナビノイド系を介した逆行性シナプス伝達抑制が起こることが明らかとなった。

（10）シナプス前 Gi/o 共役型受容体を介する微小シナプス電流の調節

山崎 美和子，橋本 浩一，狩野 方伸 （金沢大学　医学系研究科　シナプス発達・機能学）

カンナビノイド受容体は Gi/o 共役型受容体の一つであり，中枢神経系においてはシナプス前終末に存在し，その活性化により神経伝達物質の放出が抑制される。小脳プルキンエ細胞では，興奮性および抑制性入力の両方のシナプス前終末に 1 型カンナビノイド受容体（CB1 受容体）が存在する。興奮性および抑制性の入力線維の刺激によって誘発される活動電位依存的なシナプス伝達は CB1 受容体活性化によって抑制される。しかし，活動電位に依存しない微小シナプス後電流に関しては，CB1 受容体活性化の効果に相違が見られる。即ち，微小抑制性シナプス後電流 (mIPSC) はカンナビノイド受容体アゴニスト(WIN55,212-2) により減弱するが, 微小興奮性シナプス後電流 (mEPSC) は影響されないことが知られている。この違いが何に起因するものなのかを明らかにする目的で, 生後 2 週のマウス小脳急性スライスを用いて mIPSC/mEPSC 記録を行い，種々の細胞外カルシウム濃度における WIN55,212-2 の効果を調べた。従来の報告と同様，細胞外カルシウム濃度 2 mM（生理的標準濃度）では WIN55,212-2 投与により mIPSC のみが抑制され，mEPSC は抑制されなかった。細胞外カルシウム濃度を 2 mM から 0 mM に下げると mIPSC の頻度は減少し，WIN55,212-2 投与による頻度の減少が起こらなくなった。一方細胞外カルシウム濃度を 0 mM に下げても mEPSC の頻度は変化しなかった。次に細胞外カルシウム

濃度を 5 mM に上げると mEPSC の頻度は著しく増加し，WIN55,212-2 投与による抑制を受けるようになった。またカルシウムイオノフォア (A23187) 投与でも同様の現象が観察された。

以上の結果より，CB1 受容体活性化がカルシウム依存的な mIPSC/mEPSC を選択的に抑制する可能性が示唆された。細胞外カルシウム濃度 2 mM において，抑制性の終末内は恒常的にカルシウム濃度が高く，カルシウム依存的な mIPSC が生じているために WIN55,212-2 による抑制を受けやすいが，興奮性終末内はカルシウム濃度が低いためにカルシウム依存的な mEPSC が殆ど生じておらず WIN55,212-2 による抑制を受けないという可能性が考えられた。さらには同じ Gi/o 共役型受容体である $GABA_B$ 受容体やグループⅢ代謝型グルタミン酸受容体の活性化も，mEPSC および mIPSC に対して CB1 受容体活性化と同様の効果を示すことが明らかになった。よって，プルキンエ細胞における，Gi/o 共役型受容体活性化を介する mIPSC/mEPSC の調節の程度は，カルシウム依存的な放出の程度に依存する可能性が示唆された。

（11）電位依存性 Ca^{2+}チャネルβサブユニットの生理機能的複合体生成

森 泰生（京都大学大学院工学研究科）

神経系の電位依存性 Ca^{2+}チャネルはα1，β，α2δ，γの 4 つのサブユニットから構成されている。α1 はチャネルポアを形成し，電位センサーの機能を担うなどチャネル形成に中心的な役割を担っているのに対し，β，α2δ，γ 各副サブユニット群はα1 に結合してその発現・機能調節を行っており，これらを欠いたα1 単体では生理的なチャネルとして機能する事は出来ない。特にβサブユニットによる調節機能は重要であり，α1 を介した Ca^{2+}電流はβの存在によって劇的に増大する。

神経前終末部からの神経伝達物質の放出は，電位依存性 Ca^{2+}チャネルを介したカルシウム流入により惹起される。しかしその開口放出部近傍にどのように電位依存性カルシウムチャネル群がターゲットされるのか，など神経終末部における Ca^{2+}チャネル活性制御機構に関しては未だ不明な点が多い。我々はβサブユニットが電位依存性チャネルサブユニットとしての機能以外に，新たな役割を有する可能性があると考え，新規結合因子の単離を試みた。

酵母ツーハイブリッド法を用いたβ相互作用蛋白質探索の結果, いくつかのエキソサイトーシス関連分子を得，電位依存性 Ca^{2+}チャネルのβサブユニットを介して，電気生理学的にチャネル特性を変化させる事が明らかとなった。

本研究は，神経伝達物質放出時における電位依存性 Ca^{2+}チャネル活性調節機構解明につながるものと考えられる。

12. 脳磁場計測によるヒト脳機能マッピング

2005 年 11 月 2 日－11 月 4 日

代表・世話人：柿木 隆介（大学共同利用法人・自然科学研究機構・生理学研究所）
所内対応者：柿木 隆介（大学共同利用法人・自然科学研究機構・生理学研究所）

（1）脳磁図による視覚性運動検出機構の探索（オープニングレクチャー）

金桶吉起（生理学研究所 統合生理研究系 感覚運動調節研究部門）

（2）『目の動き』に関わる顔輪郭情報の影響

三木研作[1,2]，渡辺昌子[2]，本多結城子[2,3]，中村舞子[2,4]，柿木隆介[2,3,5]
([1]日本宇宙フォーラム，[2]生理学研究所，[3]総合研究大学院大学生命科学研究科，
[4]東京慈恵医科大学神経内科，[5]科学技術振興財団社会技術研究システム）

（3）表情の変化する顔刺激を用いた脳磁場反応の検討

中村舞子[1,2]，三木研作[1,3]，渡辺昌子[1]，本多結城子[1,4]，井上聖啓[2]，柿木隆介[1,4,5]
([1]自然科学研究機構 生理学研究所 統合生理研究系 感覚運動調節研究部門，
[2]東京慈恵会医科大学 神経内科，[3]日本宇宙フォーラム，
[4]総合研究大学院大学 生命科学研究科 生理科学専攻，
[5]科学技術振興財団 社会技術研究システム）

（4）顔認知における意識閾値以下の刺激の影響

寶珠山稔，柿木隆介
（名古屋大学医学部保健学科，生理学研究所 統合生理研究系 感覚運動調節研究部門）

（5）球面型生体磁気計測システムを用いた長潜時聴覚応答の記録

太田圭亮，高松亮介，小山幸子，栗城眞也
（北海道大学 電子科学研究所 量子計測研究分野）

（6）合成母音刺激による誘発磁場 N1m の検討

尾形エリカ，湯本真人，伊藤憲治，関本荘太郎，狩野章太郎，加我君孝
（東京大学大学院 医学系研究科 脳神経医学専攻 感覚・運動神経科学講座）

（7）数字の循環読み上げ音声による聴覚ミスマッチ脳磁場

官振傑[1]，湯本真人[2]，狩野章太郎[1]，伊藤憲治[3]，尾形エリカ[4]，水落智美[4]，加我君孝[1,4]
([1]東京大学医学部 耳鼻咽喉科，[2]検査部，[3]認知・言語医学，[4]感覚・運動神経科学）

（8）ミスマッチ陰性成分は多モード内部モデルの予測誤差を反映する

湯本真人[1]，伊藤憲治[3]，宇野彰[6]，狩野章太郎[2]，金子裕[4]，斎藤治[5]，加我君孝[2]，矢冨裕[1]
([1]東京大学医学部病態診断医学，[2]耳鼻咽喉科学，[3]認知・言語医学，
[4]国立精神・神経センター武蔵病院脳外科，[5]精神科，[6]筑波大学人間総合科学）

（9）疎性を用いた MEG の解析手法の提案

黒田俊道（早稲田大学大学院理工学研究科）

(10) 深部にあるアルファ波と高周波リズムの発生源

川端啓介[1]，内野勝郎[2]，村田和優[3]，外池光雄[4]，岩木直[5]
([1]前大阪府立大学先端研，[2]平成医療学園専門学校，[3]藍野学園短大，[4]千葉大工学部，[5]産総研関西支所）

(11) MEG40Hz 成分の位相同期の計測とそのモデル化の試み

田中慶太，川勝真喜，根本幾（東京電機大学）

（12）随意運動後のβ帯域同期と性格傾向の相関

志々田一宏[1]，橘詰顕[2]，小野田慶一[1]，山下英尚[1]，岡本泰昌[1]，山脇成人[1]
（[1]広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 精神神経医科学，
[2]広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 脳神経外科学）

（13）運動準備過程における一次および二次体性感覚野活動の時系列的変動

和坂俊昭[1, 2]，柿木隆介[1]
（[1]自然科学研究機構 生理学研究所 統合生理研究系 感覚運動調節研究部門，[2]日本宇宙フォーラム）

（14）刺激における不調和さの視覚誘発脳磁図反応に対する影響の検討

原田暢善[1]，岩木直[1]，外池光雄[2]
（[1]産業技術総合研究所関西センター 人間福祉医工学部門，[2]千葉大学工学部 メディカルシステム工学科）

（15）Random-dot motion からの 3 次元構造知覚に関連する脳内過程

岩木直[1]，外池光雄[2]，John W. Belliveau[3]
（[1]産業技術総合研究所 人間福祉医工学研究部門，[2]千葉大学工学部 メディカルシステム工学科，
[3]Massachusetts General Hospital）

（16）種々の第 2 次仮現運動に対するヒト脳反応

田中絵実，野口泰基，金桶吉起，柿木隆介
（生理学研究所 統合生理研究系 感覚運動調節研究部門）

（17）Prader-Willi 症候群の体性感覚誘発磁場所見－Angelman 症候群との相違について－

江川潔[1]，朝比奈直子[1]，白石秀明[1]，須藤章[1]，香坂忍[1]，斉藤伸治[1]，中根進児[2]，有働康代[2]
（[1]北海道大学大学院医学研究科小児科，[2]北海道大学病院臨床検査部）

（18）聴覚性のてんかん発作を有するてんかん患者の脳磁図

福島克之，仲野久美子，芳村勝城，渡辺裕貴
（国立病院機構静岡てんかん神経医療センター）

（19）短周期ペア刺激の聴覚誘発 M50 回復に反映される統合失調症の左半球機能異常

湯本真人[1]，斎藤治[4]，宇野彰[6]，伊藤憲治[3]，宇川義一[2]，金子裕[5]，矢冨裕[1]
（[1]東京大学医学部病態診断医学，[2]神経内科学，[3]認知・言語医学，
[4]国立精神・神経センター武蔵病院精神科，[5]脳外科，[6]筑波大学人間総合科学）

（20）左痙性不全片麻痺の患者にみられた mirror movement について

久保田雅也，木村育美，広瀬宏之，榊原洋一
（都立八王子小児病院小児内科，成育医療センター，お茶の水女子大学）

（21）においの知覚に及ぼす認知的要因の効果－MEG および脳波の同時計測による検討

小林剛史[1,2]，小早川達[2]，秋山幸子[2,3]，戸田英樹[2,4]，斉藤幸子[2,5]
（[1]文京学院大学，[2]産業技術総合研究所，[3]日本体育大学，[4]筑波大学，[5]斉藤幸子味覚嗅覚研究所）

（22）逃したくない被験者をなんとか計測する方法

小早川達[1]，小見山彩子[2]，池田稔[2]，戸田英樹[1]
（[1]産業技術総合研究所 人間福祉医工学研究部門，[2]日本大学医学部）

（23）音楽の基本構造の認知に関わる神経的基盤の解明：MEG 計測による検討

大塚明香，長谷川寿一，栗城眞也
（東京大学 21 世紀 COE プログラム「心とことば-進化認知科学的展開」，北海道大学 電子科学研究所）

（24）調性音楽における和音の階層構造と脳磁場の関係

福田大輔，大塚明香，栗城眞也，福田正人，村田昇
（早稲田大学大学院 理工学研究科 電気情報生命専攻）

(25) 音色のカテゴリー知覚の聴性誘発 N100m 潜時への反映

水落智美[1]，湯本真人[2]，狩野章太郎[3]，伊藤憲治[4]，山川恵子[4]，加我君孝[1,3]
([1]東京大学大学院医学系研究科感覚運動神経科学，[2]東京大学医学部付属病院検査部，
[3]東京大学医学部付属病院耳鼻咽喉科，[4]東京大学大学院医学系研究科認知・言語医学)

(26) 体性感覚誘発磁場における素のインパルス応答への一考察

岸田邦治[1]，横田康成[1]，深井英和[1]，篠崎和弘[2]，石井良平[3]，鵜飼聡[3]
([1]岐阜大学工学部応用情報学科，[2]和歌山県立医科大学精神医学教室，
[3]大阪大学大学院医学研究科神経機能医学講座)

(27) Statistical Parametric Mapping を用いた Minimum Current Estimation の電流源推定結果の標準脳化

橋詰顕，栗栖薫，飯田幸治，白水洋史，志々田一宏，小野田慶一
(広島大学大学院医歯薬学総合研究科創生医科学専攻先進医療開発科学講座)

(28) 電流源の方向を大脳皮質表面に垂直に限定した脳内活動源推定法の開発

樋脇治[1]，樋口信司[1]，早見武人[1]，橋詰 顕[2]，栗栖 薫[2]
([1]広島市立大学情報科学部，[2]広島大学大学院医歯薬学総合研究科創生医科学専攻先進医療開発科学講座)

(29) 体性感覚二点刺激による MMNm 反応

赤塚康介，柿木隆介
(生理学研究所 感覚運動調節研究部門，総合研究大学院大学 生命科学研究科)

(30) 痛覚関連体性感覚誘発脳磁場に対する睡眠の影響

王暁宏，乾幸二，柿木隆介（生理学研究所 感覚運動調節研究部門)

(31) 高頻度反復刺激による視覚誘発脳磁場反応：健常若年成人と老年者での検討

後藤純信[1,2]，飛松省三[1,2]
([1]国際医療福祉大学リハビリテーション学部作業療法学科，[2]九州大学大学院医学研究院脳研臨床神経生理)

(32) 時間表象の形成に関する脳内メカニズム

野口泰基，柿木隆介
(生理学研究所 統合生理研究系 感覚運動調節研究部門)

(33) 日本語単語（漢字）と英語単語の黙読時における左右側頭後頭葉の活動について

寺田さとみ[1]，中村仁洋[2]，原信子[2]，湯本真人[3]，宇川義一[1]
([1]東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻神経内科，
[2]東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻音声・言語医学，[3]東京大学医学部病態診断医学)

(34) 音の中心周波数と帯域幅に関わる脳磁界反応

添田喜治，中川誠司
(産業技術総合研究所 人間福祉医工学研究部門)

(35) 高周波可聴音の立ち上がり時間が聴覚誘発脳磁界に及ぼす影響

萬谷惇[1,2]，中川誠司[1]，小谷賢太郎[3]，堀井健[3]
([1]産業技術総合研究所 人間福祉医工学研究部門，[2]関西大学大学院工学研究科，
[3]関西大学工学部システムマネジメント工学科)

(36) 高周波可聴音および骨導超音波に対する聴覚誘発脳磁界の計測

中川誠司（独立行政法人産業技術総合研究所 人間福祉医工学研究部門)

(37) ゆらぎを持つ光源に対する心理的プリファレンスと大脳活動との関係

岡本洋輔[1,2]，中川誠司[2]，矢野隆[1]，安藤四一[1]
([1]熊本大学大学院自然科学研究科，[2]産業技術総合研究所人間福祉医工学研究部門)

（38）視覚逆方向マスキングの有無による脳活動の変化案

川勝真喜，阿部雅也，田中慶太，小谷誠（東京電機大学）

（39）脳磁図，網膜電図同時記録による視覚野初期応答潜時の検討

乾幸二，三木研作，金桶吉起，柿木隆介

（生理学研究所 統合生理研究系 感覚運動調節研究部門）

（40）漢字，ハングル文字呈示による言語優位半球の同定－周波数解析とフラクタル次元解析の比較－

金子裕，岡崎光俊，湯本真人

（[1] 国立精神神経センター武蔵病院脳神経外科武蔵病院神経外科・臨床検査部，

[2] 国立精神・神経センター武蔵病院精神科，[3] 東京大学医学部附属病院検査部）

（41）日本語における母音無声化の脳内表現

船津誠也 [1]，今泉敏 [1]，橋詰顕 [2]，栗栖薫 [2]

（[1] 県立広島大学，[2] 広島大学医学部）

（42）発話理解時における感情認知処理過程－MEG を用いた検討

矢倉晴子 [1]，外池光雄 [2,3]，中川誠司 [2]，岩木直 [2]，西原玲子 [1]，荻野敏 [1]

（[1] 大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻博士後期過程統合保健看護科学分野，

[2] 千葉大学工学部メディカルシステム工学科，[3] 独立行政法人産業技術総合研究所人間福祉医工学研究部門）

【参加者名】

赤塚 康介（生理研・統合生理・感覚運動），赤松裕介（東大・医），綾部 友亮（慶應大大院・社会学），荒木 一将（愛学大・歯），石津 智大（早大・文学），乾 幸二（生理研・統合生理・感覚運動），岩木 直（産総研・人間福祉），江川 潔（北大大院・医），王 暁宏（生理研・統合生理・感覚運動），太田 圭亮（北大・電研），大塚 明香（東京大学 21COE），岡 さち子（東薬大・生命科学），尾形 エリカ（東大大院・医），緒方 克敏（電通大大院・システム工学），緒方 勝也（九大大院・脳研臨床神経生理），岡本 洋輔（熊大大院・自然科学），小川 真司（日医大・千葉北総病院），荻野 祐一（群大大院・医），加古 真祥（早大・理工学），葛西 裕介（早大・理工学），金子 裕（国立精神神経センター・武蔵病院），川勝 真喜（東京電機大学），川端 啓介（前大阪府大・先端科学研），官 振傑（東大・医），菅野 正光（広大・保健学），岸田 邦治（岐阜大・工学部），木村 育美（国立成育医療センター），木村 壮志（早大学・理工学），久保田 雅也（都八王子小児病院），栗城 眞也（北大・電研），黒田 俊道（早大・理工学），後藤 純信（国際医療福祉大・リハビリ），小早川 達（産総研・人間福祉），小林 剛史（文京学院大・人間学），志々田 一宏（広大大院・医歯薬），設楽 直也（群大・耳鼻咽喉），白井 健吾（早大・理工学），関口 貴裕（東京学芸大・教育心理），添田 喜治（産総研・人間福祉），高松 亮介（北大・電研），武井 雄一（群大大院・脳神経精神行動），田代 研之（九大大院・医），田中 絵実（生理研・統合生理・感覚運動），田中 慶太（東京電機大・先端工学），辻 健史（生理研・統合生理・感覚運動），寺田 さとみ（東大大院・医），飛松 省三（九大・医），中川 誠司（産総研・人間福祉），長崎 信一（広大・医歯薬），長峯 隆（京大・医・高次脳機能研究センター），中村 昭範（国立長寿医療センター），中村 仁洋（東大大・医），中村 祐（早大・理工学），中村 舞子（生理研・統合生理・感覚運動），野口 泰基（生理研・統合生理・感覚運動），橋詰 顕（広大大院・医歯薬），濱田 泰一（金工大・生命情報学科），原 信子（東大大・医），原田 暢善（産総研・人間福祉），樋脇 治（広島市立大・情報科学），福士 珠美（科学技術振興機構・社会技術研究開発センター），福島 克之（国立病院機構・静岡てんかん・神経医療センター），福田 大輔（早大大院・理工学），藤田 貴子（九大・医・脳研臨床神経生理），伏見 健志（広大・医・保健学），船津 誠也（県立広大・学術情報センター），寶珠山 稔（名古屋大・医・保健），前川 敏彦（九大大院・医・脳研臨床神経生理），前澤 仁志（京大・医・高次脳機能研究センター），萬谷 惇（産総研・人間福祉），水落 智美（東大大院・医），矢倉 晴子（阪大大院・医・保健），山崎 貴男（九大大院・医・脳研臨床神経生理），山田 由美（北陸先端科学技術大学院大学・知識科学），湯本 真人（東大・医・病

態診断医学），芳村 勝城（国立病院機構・静岡てんかん・神経医療センター），和坂 俊昭（生理研・統合生理・感覚運動），渡辺 究（早大・理工学），渡邉 昌子（生理研・統合生理・感覚運動），渡辺 裕貴（国立病院機構・静岡てんかん・神経医療センター）

【概要】

本年の研究会は，参加者が約 90 名にのぼり，42 演題が発表され，極めて活発な議論が行われた。また，約 40 名の大学院生が参加し，3 日間にわたる研究会期間を通じて，若い研究者達の熱心な討論は非常に印象深いものであった。

生理学研究所に日本で初めての大型脳磁計が導入されてから，15 年が過ぎようとしている。その間に，日本では脳磁図研究が著しく進み，現在では，日本は世界で最も脳磁図研究の盛んな国といっても過言ではない。現在は，全国の主要大学の大学病院に脳磁計が設置され臨床応用の試みが盛んに行われている。それと平行して，生理学研究所をはじめとする多くの研究機関にも脳磁計が設置され，ヒトの脳機能の解明を目指して研究が続けられている。

今回の研究会では，演題は「視覚」，「顔認知」，「聴覚」，「体性感覚」，「嗅覚，味覚」，「運動」，「言語」，「臨床応用」，「工学」といった幅広いジャンルから発表され，わが国における脳磁図研究の裾野の広がりを実感させられた。しかし，脳磁図という共通の手法によって行われた研究ばかりであり，例え自分の専門外であっても十分に理解可能であり，また勉強になる発表ばかりであった。

この 10 年間は機能的 MRI の熱狂的なブームが，特に米国と英国においておこり，日本でも近年，研究者が著しく増加してきている。しかし，脳磁図の持つ高い時間分解能による時間情報の詳細な検討は，機能的 MRI ではけして行えないものであり，今後も脳磁図の長所を十分に生かした研究の発展をのぞんでやまない。

統合生理研究系　感覚運動調節部門・教授
柿木隆介

（1）脳磁図による視覚性運動検出機構の探索（オープニングレクチャー）

金桶吉起（生理学研究所・統合生理研究系・感覚運動調節研究部門）

“運動がどのような神経機構のもとに視知覚されるか”という問題に，多くの分野の研究者が 70 年以上も取り組んできた。そして脳磁図という手法がこの研究に使用され始めたのは，わずか 10 年前のことである。以来多くの脳磁図研究がこの分野の発展に貢献してきたが，それらはかならずしも他の分野（神経生理学，心理学など）の研究者に広く受け入れられているわけではない。その理由のひとつには，脳磁図という手法に対する懐疑心があると思われる。本講演では運動速度の検出機構，運動の空間的統合の神経機構について，我々の研究成果を最新の知見を含めて紹介しつつ，なぜ脳磁図研究が他の分野の研究者に認められにくいのか，またどのようにすれば分野を超えて広く認知されるようになるのかを議論したい。

（2）『目の動き』に関わる顔輪郭情報の影響

三木研作 [1,2]，渡辺昌子 [2]，本多結城子 [2,3]，中村舞子 [2,4]，柿木隆介 [2,3,5]
（[1] 日本宇宙フォーラム，[2] 生理学研究所 統合生理研究系 感覚運動調節研究部門，
[3] 総合研究大学院大学生命科学研究科，[4] 東京慈恵医科大学神経内科，
[5] 科学技術振興財団社会技術研究システム）

我々はこれまで「顔の部分の動き」に対するヒトの運動視中枢（MT/V5 野）の活動について脳磁図を用い調べてきた。今回，「目の動き」が単なる「ドットの動き」と区別されるための要因を検討した。

仮現運動を利用した 2 条件の視覚刺激を用い誘発脳磁場を測定した。(1) EYES:　模式的な顔の絵（輪郭，目，口）の中で目の部分が動く刺激。(2) DOTS:　EYES より輪郭を除いた刺激。単一等価電流双極子モデルを用い，活動源を推定した。

全被験者で明瞭な誘発磁場が記録され，活動源は後頭側頭部，MT/V5 野付近に位置推定された。活動源の大きさ，頂点潜時，推定位置に関し検討を行った。頂点潜時及び推定位置に両条件で有意な差はなかったが，活動の大きさは，EYES の方が DOTS よりも有意に大きかった。

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情報が重要な役割を担っている可能性が示唆された。

（3）表情の変化する顔刺激を用いた脳磁場反応の検討

中村舞子 [1,2]，三木研作 [1,3]，渡辺昌子 [1]，本多結城子 [1,4]，井上聖啓 [2]，柿木隆介 [1,4,5]
（[1] 自然科学研究機構 生理学研究所 統合生理研究系 感覚運動調節研究部門，
[2] 東京慈恵会医科大学 神経内科，[3] 日本宇宙フォーラム，
[4] 総合研究大学院大学 生命科学研究科 生理科学専攻，[5] 科学技術振興財団 社会技術研究システム）

【目的】表情認知に関する報告のほとんどは静止画を用いたもので，表情の変化に着目したものは少ない。我々は仮現運動刺激を利用し中性顔から表情顔へ，あるいはその逆へ変化する際の脳活動につき検討した。

【方法】対象は右利き健常成人 10 名。刺激として中性顔(N)，表情顔（笑顔，H，および嫌悪顔，D），表情を伴わない顔（歯を出す，T，および閉眼，C）の顔写真を用いた。第 1 刺激(S1)と第 2 刺激(S2)を連続して提示し，全頭型脳磁計を用いて記録した。

【結果】被験者 8 例で後頭側頭部に刺激提示後 140～200ms に最大振幅を持つ反応が得られた。この反応の最大振幅および頂点潜時につき検討したところ，S1 間には差を認めなかったが，S2(H，D) で得られた振幅は他の S2 よりも大きかった。S2(N) の振幅には先行する S1 による差はなかった。

【考察】特定の表情へと変化する動きは後頭側頭部で特異的に処理される可能性が示唆された。

（4）顔認知における意識閾値以下の刺激の影響

寶珠山稔，柿木隆介
（名古屋大学医学部保健学科，生理学研究所 統合生理研究系 感覚運動調節研究部門）

【目的】これまでの研究から，ヒトでは視覚刺激としての顔が優位性をもって処理されていることが示されている。刺激はそれが意識にのぼるまでにすでに一定の情報処理がなされていると考えられるが，本研究では刺激としての顔が意識閾値以下の刺激でも優位性をもって処理されていることを示す。

【方法】黒いチェッカー地に赤と緑で描かれた画像と，赤と緑を反転させた同じ画像を高頻度(100Hz)で交互に呈示ことで color-opponent flicker effect を用いた視覚閾値以下(subliminal)の刺激を作成することができる。顔，花，ランダムの画像を subliminal 刺激として与え，その後に顔あるいは花の画像を呈示し視覚誘発脳磁場(VEF)を記録した。

【結果】同じ画像が subliminal 刺激として与えられた場合には VEF 成分は大きくなり，その割合は顔刺激でより顕著であり，subliminal な視覚情報処理における顔の優位性を示すものであった。

（5）球面型生体磁気計測システムを用いた長潜時聴覚応答の記録

太田圭亮，高松亮介，小山幸子，栗城眞也
（北海道大学　電子科学研究所　量子計測研究分野）

聴覚誘発脳磁界のピークである P2m は，N1m に比べその特性が明らかになっていない。楽音（ピアノ長三和音）を連続呈示した場合，2〜5 音目の振幅の減衰は N1m に比べ P2m で小さい(Kanda et al., 2004)。本研究では，繰り返しによる N1m, P2m 振幅の減衰が刺激音によって異なるかを調べるため，楽音（ピアノ単音 A3），言語音（日本語母音/a/，男性話者），純音（楽音，言語音に基本周波数・エンベロープを合わせたもの）に対する脳磁界を計測した。刺激音はそれぞれ長さ 312.5ms とし 312.5ms の無音区間を挟み 3 音連続，HL+40dB で呈示した。計測には北大脳科学研究教育センターの球面型生体磁気計測システムを用い記録した。N1m と P2m が認められる後方極大周辺の 12ch を選択し RMS 値を計算した。その結果，N1m，P2m の 2 音目以降の減衰率は刺激音により異なる傾向がみられた。

（6）合成母音刺激による誘発磁場 N1m の検討

尾形エリカ，湯本真人，伊藤憲治，関本荘太郎，狩野章太郎，加我君孝
（東京大学大学院 医学系研究科 脳神経医学専攻 感覚・運動神経科学講座）

昨年本研究会で発表した母音の脳内局在と同様のパラダイムを用い，合成母音刺激による誘発磁場を 204 チャネル全頭型脳磁計を用いて計測した。F0=130，F3＝2500 で F1，F2 が a(700，1200)，e(600，1500)，i(500，1800)，o(600，900)，u(500，1200)となる 5 母音(LowF2 条件)と，同じ F0, F3 を持ち，F1, F2 が a(500, 1800), e(400, 2100), i(300，2400)，o(400，1500)，u(300，1800)となる 5 母音（HighF2 条件）を Klatt 合成にて作成した。これらを 1 名の被験者に対して条件毎に擬似ランダムに両耳提示し，e でボタン押しをするよう教示し，各母音 150 回以上加算した。同様の計測を 8 回施行し，e を除く各母音に対する誘発磁場 N1m の局在推定を行ったところ，前後方向において母音局在の同様な乖離傾向が見られた。

（7）数字の循環読み上げ音声による聴覚ミスマッチ脳磁場

官振傑[1]，湯本真人[2]，狩野章太郎[1]，伊藤憲治[3]，尾形エリカ[4]，水落智美[4]，加我君孝[1,4]
（[1]東京大学医学部 耳鼻咽喉科，[2]検査部，[3]認知・言語医学，[4]感覚・運動神経科学）

日本語の数字 4 の読みには shi (4s)と yon (4y)があり，昇順では主に前者が用いられ，降順では後者のみが用いられる。我々は 1 から 7 までの循環読み上げ音声において，4 の読みの違いと順序間違いを低頻度に含む音韻列を用い，ミスマッチ陰性磁場の記録を試みた。計測は昇順と降順の 2 ブロックで構成され，昇順ブロックは，1→2→3→4s→5→6→7 の循環を標準(60%)とし，読みの違い(1→2→3→4y→5→6→7)と順序間違い(1→2→3→4s→5→4s→5→6→7)を擬似ランダムに各 20%含む音韻列を用いた。降順ブロックは，7→6→5→4y→3→2→1 の循環を標準(60%)とし，読みの違い (7→6→5→4s→3→2→1)と順序間違い (7→6→5→4y→3→4y→3→2→1)を擬似ランダムに各 20%含む音韻列を用いた。双方の逸脱刺激により記録されたミスマッチ陰性成分の異同と特徴に関して報告する。

（8）ミスマッチ陰性成分は多モード内部モデルの予測誤差を反映する

湯本真人[1]，伊藤憲治[3]，宇野彰[6]，狩野章太郎[2]，金子裕[4]，斎藤治[5]，加我君孝[2]，矢冨裕[1]
([1]東京大学医学部病態診断医学，[2]耳鼻咽喉科学，[3]認知・言語医学，
[4]国立精神・神経センター武蔵病院脳外科，[5]精神科，[6]筑波大学人間総合科学)

ミスマッチ陰性成分 (MMN) は，その聴覚オドボール課題による記録様式から，近過去と現在との聴覚環境の変化を検出（バックワード比較）する神経機構を反映すると考えられてきた。我々は，ランダムな音節や音符系列を予告として視覚提示し，これとは不一致となる音を低頻度で含む聴覚刺激と照合する視聴覚間オドボール課題を用い，視聴覚間逸脱音に対して MMN 相当成分が記録されることを報告した。この MMN は，時間，相互作用，個人差要因等において従来の MMN とは特性が異なるが，同一の神経基盤に基づく。MMN 記録における聴覚オドボール課題は感覚記憶の機能を評価する簡便で優れた計測手法であるが，MMN 生成の神経機構は，環境変化の検出よりもむしろ，多モード内部モデルにおける予測誤差検出（フォワード比較）機構として，日々頻繁に機能している。注意下の知覚は予測を不可避的に伴い，多モード内部モデルの適応的更新，即ち学習を伴う。

（9）疎性を用いた MEG の解析手法の提案

黒田俊道（早稲田大学大学院理工学研究科）

画像処理の手法の中に，Sparsecording というものがある。これは対象の画像を限られた基底の中から更に少ない基底を用いて（使用する基底が疎らになるように）再構成する手法である。本研究では，測定によって得られた MEG をその発火位置が疎になるような解析手法を考えている。また，正規分布のような波形の組合せで解を求めることにより，解析結果が滑らかに，時間毎に飛び飛びにならないようにして，より信憑性のある解析手法の解析を目指している。本発表では，手法についての簡単な説明と，この手法を用いての解析結果の報告を行なう予定である。

（10）深部にあるアルファ波と高周波リズムの発生

川端啓介[1]，内野勝郎[2]，村田和優[3]，外池光雄[4]，岩木直[5]
([1]前大阪府立大学先端研，[2]平成医療学園専門学校，[3]藍野学園短大，
[4]千葉大工学部，[5]産総研関西支所)

昨年のこの研究会で，閉眼で安静な状態にある被験者の MEG 信号に現れる後頭部の強いアルファを解析して，左右の半球に 1 個づつの活動源があり，そのダイナミックスは 90 度の位相差を持っていることを述べた。（これは 1 ケの源が交互に移動すると考えてもよい。）その後求めた dipole を MR 図に落としてみた。それによると，右半球の発生源は脳の中心に近い，非常に深いところにあり，ある時刻ではどの方向の脳壁へも最大 50mm ぐらいにある。この dipole は位置座標が浅い方へ周期的に動くのであるが，奇妙なことには，fitting factor g は深いほう（80%以上にも達する）が浅い方よりも大きいのである。これは浅部にはさしたる局部的な活動源がなく，深部での活動源の強度が非常に強いからとみてもよい。これらのデータの信頼性はリズムの周期により再現することからも補強される。さらに，高周波（40Hz まで）での解析を行うと，求められた dipole 強度 Q が大きく g が相

対的に大きい時刻では視床や脳幹上部付近にあることを見出した。この原因としてはアルファ波リズムを誘起する速い Impulse（動物や in vitro の組織で電極を埋め込んだ実験で報告された）の低周波成分が観察されたのではないかと考えている。この様な深部での活動の全体像を掴むことは重要なことである。この更なる発展の可能性についても御討論を乞いたい。因みに使用した産総研の MEG は 0.1-100Hz，400Hz サンプリング，digital filter は 9-40Hz である。

（11）MEG40Hz 成分の位相同期の計測とそのモデル化の試み

田中慶太，川勝真喜，根本幾（東京電機大学）

本研究では，40/s で断続するチャープ音に対する脳磁界を計測し，40Hz 成分の phase coherence を求めた。この 40Hz 成分には自発成分（ガンマ波）と，40/s の頻度の音刺激に対する定常応答が含まれると考えられるが，簡単な考察により，刺激による phase coherence の上昇は誘発反応のみでは説明できないことが分かる。そこで，自発成分の位相が刺激に同期していると考えられるが，自発成分と誘発成分を分離するのは困難である。ここでは分離はひとまず置いて，現象論的に位相の振る舞いを記述するため，応答の 40Hz 成分を $a(t)\exp\{i(2\pi 40t+\varphi(t))\}$ とした。$a(t)$ の変化は位相 $\varphi(t)$ の変化より十分遅いと仮定し，位相に対する微分方程式モデルを構築した。このモデルによって計算される phase coherence とその実測値との比較などにより，モデルに含まれるパラメータの推定を行った。現在，実験条件とパラメータの推定値との関係などを調べている。

（12）随意運動後のβ帯域同期と性格傾向の相関

志々田一宏[1]，橋詰顕[2]，小野田慶一[1]，山下英尚[1]，岡本泰昌[1]，山脇成人[1]
（[1]広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 精神神経医科学，
[2]広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 脳神経外科学）

【目的】随意運動後に中心溝周囲に生じるβ帯域の同期(post-movement beta synchronization：PMBS)は，皮質の抑制機能や皮質-皮質下回路の機能を反映すると考えられている。一方，衝動性・損害回避傾向といった個人のもつ性格や気質も，同様の脳機能の表現の一つとして捉えることができる。そのため今回，質問紙を用いて評価した性格傾向と PMBS の関連を調べた。
【方法】右利き健常者 35 名が自己ペースで右示指の随意運動を行っている時の脳磁場を記録。EMG をトリガーとしてβ帯域の周波数解析を行った。性格傾向の評価として Temperament and Character Inventory(TCI)を用いた。
【結果】右半球の PMBS の magnitude は，TCI の新奇性追求尺度と負の相関を示した。右半球の PMBS ピーク潜時は TCI の新奇性追求尺度と正の相関を示した。
【考察】運動抑制機能が新奇性追求の高さ（≒衝動性）などの性格傾向に関与している可能性が示唆された。

（13）運動準備過程における一次および二次体性感覚野活動の時系列的変動

和坂俊昭[1,2]，柿木隆介[1]
（[1]自然科学研究機構 生理学研究所 統合生理研究系 感覚運動調節研究部門，[2]日本宇宙フォーラム）

随意運動遂行に関連して一次体性感覚野(SI)の活動は減少するが(gating)，二次体性感覚野(SII)の活動については解明されていない。本研究では，脳磁図を用いて自発的指伸展動作の準備過程における SI および SII 活動の時系列的変動を検討した。右手首に連続的に提示される電気刺激を無視しながら，被験者には自発的な右第二指の伸展動作を行うよう指示した。準備過程は筋放電前 3000ms までを 5 区間に分割し，各区間における SI と SII 活動を比較すると，筋放電前 500ms では SI 活動(P30m)は有意な減少を示すのに対して，運動と反対側の SII 活動は有意な増大を示した。準備過程にみられる SI と SII の変動は，運動遂行に関与する運動関連領域からの遠心性投射が原因と考えられるが，この投射による影響は SI と SII では異なることから，随意運動遂行における SI と SII の機能的役割が異なることが示唆された。

（14）刺激における不調和さの視覚誘発脳磁図反応に対する影響の検討

原田暢善[1]，岩木直[1]，外池光雄[2]
（[1]産業技術総合研究所関西センター 人間福祉医工学部門，[2]千葉大学工学部 メディカルシステム工学科）

刺激における不調和さの視覚誘発脳磁図反応に対する影響の検討を行った。動物の線画を用いて，動物の首の挿げ替えにより，視覚刺激の不調和さを，低不調和（正常映像），中不調和，高不調和の三段階に変化させた映像を作成し，線画刺激の不調和さの視覚誘発脳磁図反応に対する影響について検討を行った。側頭領域のチャンネルの加算平均波形の約 170-300ms の成分において，視覚刺激の不調和さの減少にともない反応強度が増大する傾向を示すことが明らかとなった。すなわち，側頭領域の約 170-300ms の活動の変化は，実生活の経験で形成された，視覚的なトレースの存在が活動の変化に反映したものであると考えられ，それが，脳磁図反応を増加させる方向に作用したと考えられた。不調和さの低下にともない反応が増大する結果は，先行する fMRI の研究の結果と丁度逆の結果であり，血流量の増加減少では捕らえることの出来ない，脳磁図反応において検出しえた結果であると考えられた。

（15）Random-dot motion からの3次元構造知覚に関連する脳内過程

岩木直[1]，外池光雄[2]，John W. Belliveau[3]
（[1]産業技術総合研究所 人間福祉医工学研究部門，
[2]千葉大学工学部 メディカルシステム工学科，[3]Massachusetts General Hospital）

透明の球面上に配置された多数のドットを中心軸周りに回転運動をさせ，それを二次元平面に投影したものを観察すると，二次元平面上のランダムドットの動きから，奥行きのある三次元の球状構造が知覚される。我々は A) 三次元球の回転，B) 二次元円盤の回転，C) ランダムな運動が知覚される 3 種類の視覚刺激を呈示し，被験者の MEG 計測を行った。LCMV 型空間フィルタを用いて誘発 MEG データから脳内神経活動の時空間特性を可視化するとともに，Wavelet 変換を用いた時間-周波数解析により自発脳活動の刺激に同期した変化を定量的に評価した。この結果，

parietal，parieto-occipital，および occipito- temporal 領域で，三次元物体知覚条件(A)における誘発活動の有意な増大(140-260ms)およびα・β帯域における自発活動の有意な減少(ERD)が同時に観測された。

（16）種々の第2次仮現運動に対するヒト脳反応

田中絵実，野口泰基，金桶吉起，柿木隆介
（生理学研究所 統合生理研究系 感覚運動調節研究部門）

属性の異なる second-order motion を処理する共通メカニズムの存在を検討するために，3 種類の second-order (contrast, texture, flicker)と 1 種類の first-order の仮現運動に対する MEG 反応を比較検討した。Motion onset 反応の第 1 成分のピーク潜時・振幅には，各属性間で反応特性に違いが見られたが，その信号源は MT+付近に推定された。また，second-order に first-order を重ねた mixed motion に対しては, contrast が他の second-order とは大きく異なる反応特性を示した。 よって，どの属性の motion も MT+の活動を必要としているが，その活動様式は異なること，first-, second-order 間の相互作用も second-order の刺激属性によって異なることが示された。

（17）Prader-Willi 症候群の体性感覚誘発磁場所見－Angelman 症候群との相違について－

江川潔[1]，朝比奈直子[1]，白石秀明[1]，須藤章[1]，香坂忍[1]，斉藤伸治[1]，中根進児[2]，有働康代[2]
([1]北海道大学大学院医学研究科小児科，[2]北海道大学病院臨床検査部)

【目的】Prader-Willi 症候群(PWS)，Angelman 症候群(AS)は 15q11-q13 上の父性，母性発現遺伝子を各々原因とする遺伝性疾患である。両者とも多くは $GABA_A$ 受容体関連遺伝子を含む広範な染色体ヘテロ欠失により発症し，その親由来のみを相違とする。また少数は欠失を伴わずに発症する。昨年 AS の体性感覚誘発磁場(SEF)において，N1m の著明な遅延を欠失例のみに認め $GABA_A$ 受容体関連遺伝子が関与する可能性を報告した。今回 PWS の SEF を検討した。

【方法】PWS 欠失例 3 例，非欠失例 2 例の正中神経刺激による SEF を全頭型脳磁計にて測定した。

【結果】5 例の N1m 潜時は 18.0-21.2m（中央値 19.1ms）と正常であった。N1m, P1m 成分の多くは低反応であり，遺伝的機序による差異はなかった。PWS と AS 欠失例では $GABA_A$ 受容体関連遺伝子欠失の関与は異なると考えられた。

（18）聴覚性のてんかん発作を有するてんかん患者の脳磁図

福島克之，仲野久美子，芳村勝城，渡辺裕貴
（国立病院機構静岡てんかん神経医療センター）

【目的】聴覚発作の脳波・脳磁図所見の特徴について報告する。

【対象】脳磁図検査を行ったてんかん 635 人から，聴覚発作を示す患者を抽出し，発作症状，脳波所見，脳磁図所見について検討した。

【結果】本結果では典型的な聴覚発作の頻度は，部分発作を持つてんかん約 600 人中 3 人(0.5%)であった。大脳皮質の機能局在を反映する部分発作の中で，聴覚発作は，音が低く（高く）感じる，耳鳴りなどの症状で起始し 10 数秒から 1-2 分持続し消失する。時にはこの聴覚症状に

引き続き意識が曇り，稀には全身のけいれん発作へ進展する。脳波では側頭部を中心に鋭い棘波が反復性に出現する傾向がみられた。脳磁図では dipole が Heschl 横回に顕著に集積する特徴がみられた。

【結論】聴覚発作は比較的稀な発作である。脳磁図 dipole が Heschl 横回に際立つ特徴から，Heschl 横回のてんかん性活動が聴覚発作と関連していることが示唆された。

（19）短周期ペア刺激の聴覚誘発 M50回復に反映される統合失調症の左半球機能異常

湯本真人[1]，斎藤治[4]，宇野彰[6]，伊藤憲治[3]，宇川義一[2]，金子裕[5]，矢冨裕[1]
（[1]東京大学医学部病態診断医学，[2]神経内科学，[3]認知・言語医学，
[4]国立精神・神経センター武蔵病院精神科，[5]脳外科，[6]筑波大学人間総合科学）

統合失調症患者, 健常者各 10 名を対象とし, 持続 10ms の 2kHz 純音による 8 種類のペア刺激 S1-S2（間隔 50, 70, 100, 150, 200, 300, 500, 700ms）をペア間隔 1.4-1.6s で等確率ランダムに両耳提示し，誘発脳磁場を各 100 回以上加算記録した。ペア間隔 700ms 時の S1 に対する誘発成分を S1 反応とし，S1-S2 誘発波形からこれを減算した残存 S2 誘発成分を S2 反応として，S1 の M50 推定電源による両反応の電源強度波形を比較した。両波形の潜時 0-200ms 間の相互相関係数は，ペア間隔が短くなる程低下($p<0.01$)したが, 左半球で健常群に比し患者群が有意な低下(150，500ms にて $p<0.05$)を示した。健常群の M50 回復率は両半球とも S 字曲線を示したが，左半球で患者群が有意な低下(200，300ms にて $p<0.05$)を示し，統合失調症の左聴覚野機能異常が示唆された。

（20）左痙性不全片麻痺の患者にみられた mirror movement について

久保田雅也，木村育美，広瀬宏之，榊原洋一
（都立八王子小児病院小児内科，成育医療センター，お茶の水女子大学）

症例:27 才男性。周生期の詳細不明だが 7 ヶ月より“左手を使わず握っている”ことに気付かれ，左痙性不全片麻痺と診断された。右上肢の使用時左上肢に mirror movement が出現した。今回，MEG，tractography，fMRI にて mirror movement の発症機序について検討した。MRI 上右脳室拡大を認めた。内包後脚を起点とした tractography では右錐体路線維は左と比較し，細く粗であった。右正中神経刺激での体性感覚誘発磁場の計測で刺激をトリガーに左手を握る課題を加えると左半球での中潜時成分のダイポールが中心溝より前方へ移動した。左手の運動での fMRI では右運動野での反応が大きかったが同側（左半球）の反応は検出されず。この mirror movement は左錐体路の同側支配が発達上強化されたものと思われるが MEG，tractography の結果はそれを示唆する所見であった。

（21）においの知覚に及ぼす認知的要因の効果－MEG および脳波の同時計測による検討

小林剛史[1,2]，小早川達[2]，秋山幸子[2,3]，戸田英樹[2,4]，斉藤幸子[2,5]
（[1]文京学院大学，[2]産業技術総合研究所，[3]日本体育大学，[4]筑波大学，[5]斉藤幸子味覚嗅覚研究所）

嗅覚系の知覚，順応/慣化過程には，生体内外の多様な変数が関与している。嗅覚刺激の濃度，温度，湿度，持続時間といった生体外の要因は，嗅覚提示装置の発達によってかなり厳密な統制が可能になった。一方で，生体

内の要因，即ち嗅覚刺激が受容体に結合する末梢レベルと，その信号がより高次に処理される中枢レベルの機能の分離検討は極めて困難である。しかし，我々は刺激提示条件の統制によって末梢レベルに及ぼす影響を相対的に減少させることで，中枢レベル特有の機能を特異的に検討する可能性を見いだした。具体的には，可能な限り嗅覚刺激提示時間を減少させる条件を構築した上で，当該刺激に対して 2 種類の情報提示（ポジティブ情報 vs. リスク情報）を行った。その結果，情報の内容に依存して有意な感覚強度および順応/慣化過程の差が生じた。現在，この差に関わる脳内過程を検討するために，同条件で MEG および脳波の同時計測を行っている。

（22）逃したくない被験者をなんとか計測する方法

小早川達[1]，小見山彩子[2]，池田稔[2]，戸田英樹[1]
（[1]産業技術総合研究所 人間福祉医工学研究部門，[2]日本大学医学部）

我々のグループは昨年の発表において，両側の弧索神経が切断された被験者を用い，高濃度の食塩水が三叉神経に与える影響についての報告を行った。しかしこのような両側の弧索神経が切断された被験者の数は少ない上に，高齢者が多い（本実験に用いた被験者の平均年齢は 63.8 歳）。そのため歯の詰め物などによるアーチファクトが発生する可能性が高く，本実験においては 4 人中 2 人にアーチファクトが認められた。そこで本実験ではこのようなチャンネル間で相関が高い（同期している）信号に対して，小林らが提案した（小林 哲生，栗城 真也：多チャネル誘発脳磁界計測における自発脳磁界成分低減の検討，信学技報 1996-06，pp7-12）主成分分析を用いてこれらのアーチファクトの除去を試みた。本発表ではこれらの手法を用いた場合のデータの質の改善の程度やその問題点について検討を行う。

（23）音楽の基本構造の認知に関わる神経的基盤の解明：MEG 計測による検討

大塚明香，長谷川寿一，栗城眞也
（東京大学 21 世紀 COE プログラム「心とことばー進化認知科学的展開」，
北海道大学 電子科学研究所）

本研究は，音楽における調性・韻律システムの脳神経活動への影響を調べる事を目的としている。音楽の理論的な基本構造である 4 及び 5 音の和音進行列をピアノ音で生成し，終結部を完全終止(PC)，進行の途中で係留する半終止(HC)，曖昧に終止する偽終止(MC)の 3 種類に変化させ，これを被験者に提示した時の MEG 信号を計測した。第 1 音目提示後，2 音目以降の和音により誘発された N1m/P2m 反応の強度は一旦減少したが，PC と MC では終結部へむかって回復を示した。また，PC の最終和音である主和音は，MC の最終和音である関係短調和音よりも大きな反応を誘発した。更に，HC と MC の最終和音提示の 1 拍後の無音期間に，もう 1 音を期待した為に内的に誘発されたと思われる反応が観察された。これらの結果は，調性・韻律システムの影響を示すものと考えられ，更にトップダウンの認知処理の関与を示唆すると提案される。

（24）調性音楽における和音の階層構造と脳磁場の関係

福田大輔，大塚明香，栗城眞也，福田正人，村田昇
（早稲田大学大学院 理工学研究科 電気情報生命専攻）

本研究は，調性音楽における和音(chord)の階層構造と脳神経活動との関連を調べることを目的とする。刺激は Krumhansl の提案した probe-tone method に従って作成した。まずピアノ音による 2 オクターブの長調または短調の上昇音階(scale)により調性を確立させた後，主和音(tonic chord)または関係調和音(relative chord)を提示した。被験者には提示した上昇音階に対して，後に続く和音が安定して感じられるか否かを判断してスイッチを押す，という課題を与え，MEG 装置（エレクタ）により脳磁図を計測した。長調音階の場合，和音の N1m 反応の振幅は，主和音よりも関係調和音の方が大きくなるという傾向が見られた。さらに詳しく見るため，音階と和音の組み合わせによって N1m/P2m 反応にどのような違いが現れるかを，分散分析を用いて解析している。

（25）音色のカテゴリー知覚の聴性誘発 N100m 潜時への反映

水落智美[1]，湯本真人[2]，狩野章太郎[3]，伊藤憲治[4]，山川恵子[4]，加我君孝[1,3]
([1]東京大学大学院医学系研究科感覚運動神経科学，[2]東京大学医学部付属病院検査部，
[3]東京大学医学部付属病院耳鼻咽喉科，[4]東京大学大学院医学系研究科認知・言語医学)

スペクトル包絡は音色の定常的な要素を構成し，音の重要な情報を伝える。3 つのカテゴリー(vocal，instrumental，linear)のスペクトル包絡と，2 つの基本周波数(F0)以外は音響要素が全て一致した 24 種類の複合音を無視条件下で両耳提示し，誘発される N100m のカテゴリー内での動態を潜時に注目して分析した。その結果，F0 による有意差は vocal ではみられず instrumental 及び linear (nonvocal)で両半球にみられ，刺激音間での有意差は vocal では両半球，nonvocal では右半球のみでみられた。また，個々の音についての検定では，vocal 全てと nonvocal の一部の音で F0 非依存性が確認され，カテゴリーごとの特徴はみられなかった。以上より音色のカテゴリーには，vocal と nonvocal，F0 依存性と非依存性の 2 つが存在していることが示唆された。

（26）体性感覚誘発磁場における素のインパルス応答への一考察

岸田邦治[1]，横田康成[1]，深井英和[1]，篠崎和弘[2]，石井良平[3]，鵜飼聡[3]
([1]岐阜大学工学部応用情報学科，[2]和歌山県立医科大学精神医学教室，
[3]大阪大学大学院医学研究科神経機能医学講座)

独立成分解析で処理後，フィードバックシステム論的手法を用いて体性感覚誘発磁場の SQUID チャンネル間の伝達関数とそのインパルス応答をこれまで同定してきた。伝達関数は数理学上からは満足できるものであったが，左右半球にある活動部位間のそれらには生理学上から期待される時間遅れがほとんどみられなかった。この原因として，同定した伝達関数は期待する素の伝達関数でなく合成伝達関数である可能性があること，また，SQUID データは lead field で異なる脳内活動部位の磁場が混合されたためであった。そこで，脳内活動部位の電流源データに変換するために優決定型問題として逆問題を解き，その後，素の伝達関数を得る確率を高めるために 4 成分のフィードバックモデルを用いて脳内電流源データを解析した。その結果，期待される時間遅れを持つインパルス応答が SI と反対側にある SII らしき部位間で見られた。

（27）Statistical Parametric Mapping を用いた Minimum Current Estimation の電流源推定結果の標準脳化

橋詰顕，栗栖薫，飯田幸治，白水洋史，志々田一宏，小野田慶一
（広島大学大学院医歯薬学総合研究科創生医科学専攻先進医療開発科学講座）

【目的】fMRI や PET では被験者の脳活動部位を標準脳座標に変換する手段として Statistical Parametric Mapping (SPM)という MathWorks 社製行列演算ソフトウェア Matlab で動作するツールを用いている。脳磁図のデータも SPM を用いて標準脳化を行えるようにする。
【方法】Neuromag 社製脳磁計 Neuromag System で計測した脳磁図データを, L1 ノルム推定ソフトウェア Minimum Current Estimation (MCE)で電流源推定を行った。被験者の MRI 画像を脳磁図の Head Position Indicator 座標上の解剖画像データに変換, MCE の推定結果を機能画像データとし，SPM 上に展開した。
【結果】MCE のデータの標準脳化に成功した。
【結論】本法により脳磁図のデータの被験者間における統計学的検討が可能となった。

（28）電流源の方向を大脳皮質表面に垂直に限定した脳内活動源推定法の開発

樋脇治[1]，樋口信司[1]，早見武人[1]，橋詰 顕[2]，栗栖 薫[2]
（[1]広島市立大学情報科学部，[2]広島大学大学院医歯薬学総合研究科創生医科学専攻先進医療開発科学講座）

大脳の神経活動に伴う脳磁界の主な発生源は，大脳皮質の表面に対して垂直に配列した錐体細胞であり，個々の錐体細胞の細胞内電流が加算的に生じたときに頭外で計測されるような大きさの磁界が発生すると考えられている。本研究では，このような考えに基づき，脳磁界の発生源を大脳皮質表面に垂直に配列した電流源に限定し脳内活動源の位置を推定する方法の開発を試みた。各被験者の頭部 MR 画像を用いて大脳皮質表面に垂直な電流源を予め配置し，計測された脳磁界からそれぞれの電流源の大きさを L2 ノルム最小化法により推定することにより脳内活動源を求めるソフトウェアを構築した。この手法の妥当性を確認するために体性感覚誘発磁界について ECD 法で求めた電流源との比較検討を行なった。

（29）体性感覚二点刺激による MMNm 反応

赤塚康介，柿木隆介
（生理学研究所 感覚運動調節研究部門，総合研究大学院大学 生命科学研究科）

聴覚刺激を用いたミスマッチ反応に関する研究は広く行われているが，体性感覚刺激を用いた研究は少ない。そこで，本研究においては体性感覚刺激を用いたときのミスマッチ反応について二点識別刺激を用いて検討した。はじめに二点識別閾(DT)を測定し，体性感覚二点刺激によるミスマッチタスクを行った。標準刺激として，二点間の距離を DT minus (DT×10 %)，逸脱刺激として DT minus (DT×20%), DT plus(DT×10%), DT plus (DT×100%) に設定し 3 条件を行った。逸脱刺激 DT minus(DT×20 %)時に波形が 150-250 ms で有意に増大し，DT plus (DT×100 %) 時に波形が 30-70 ms，150-250 ms で有意に増大した。今回の研究により, 体性感覚刺激においてもミスマッチ反応が起こることが示唆された。

（30）痛覚関連体性感覚誘発脳磁場に対する睡眠の影響

王暁宏，乾幸二，柿木隆介
（生理学研究所 感覚運動調節研究部門）

【目的】痛覚関連体性感覚誘発脳磁場に対する睡眠の影響について検討した。
【方法】10 名健常被験者の左手背に痛み刺激を与え，37 チャンネル脳磁計二基(Bti)を用いて覚醒時と睡眠時脳磁場を記録した。記録脳磁場を多信号信号源解析法 BESA を用いて解析した。
【結果】覚醒時に，刺激対側半球と同側半球では明瞭な磁場成分 1M と 1M(i)が記録された。平均頂点潜時は対側で 148ms，同側 157ms であった。多信号信号源解析を行うと，対側の第一次体性感覚野(SI)，両側の第二次体性感覚野(SII)と島(Insula)，同側の内側部側頭葉(MT)及び帯状回(ACC)に活動源が認められた。対側の SI，SII，島の頂点潜時は約 150ms で，1M 成分に，同側の SII と島の頂点潜時は約 160ms で，1M(i)成分に相当すると考えられる。一方，MT と ACC の頂点潜時は約 190ms で，1M より遅い磁場成分に MT と ACC からの活動が含まれると考えられる。すべての活動源の活動は，睡眠時にほぼ消失した。
【考察】SI，SII，島，ACC 及び MT の脳活動は全て，痛覚認知に関連することと考えられる。

（31）高頻度反復刺激による視覚誘発脳磁場反応：健常若年成人と老年者での検討

後藤純信[1,2]，飛松省三[1,2]
([1]国際医療福祉大学リハビリテーション学部作業療法学科，[2]九州大学大学院医学研究院脳研臨床神経生理)

【目的】高頻度反復刺激(HRS)で誘発される視覚誘発脳磁場(VEF)の反応特性を検討する。
【方法】対象は健常若年成人 10 名と老年者 6 名。半側視野に格子縞（格子 50 分，刺激時間 1 秒，刺激間隔 1.5 秒）を呈示し，刺激頻度 4Hz（8 回反転/秒）で VEF を記録した。200 回加算平均し，単一電流双極子(ECD)の発生源を推定した。
【結果】transient 型反応(TR)の P100m とそれに続く steady-state 型反応(SS)を認めた。P100m 潜時は平均 130 ms で，SS をフーリエ分析すると刺激頻度に対応した反応を認めた。TR と SS の ECD はいずれも刺激視野対側後頭葉に推定され，SS の方が広く分布していた。この傾向は老年者でより明瞭であった。
【考察】HRS では，TR の潜時と振幅（時間情報）のみならず SS の位相と振幅（時間と周波数情報）を定量分析でき，多面的に視覚機能変化を評価できる。

（32）時間表象の形成に関する脳内メカニズム

野口泰基，柿木隆介
（生理学研究所 統合生理研究系 感覚運動調節研究部門）

目の前に視覚刺激が提示された時，我々の脳はその刺激がどのぐらいの時間提示されていたかを感じることができる。このような感覚を時間感覚と言うが，その形成に関わる脳内のメカニズムは殆ど解明されていない。本実験では脳磁計を用いて視覚誘発脳磁場(VEF)を計測し，その onset 反応と offset 反応の時間差から算出した刺激の「脳内時間」を，同じ刺激に対して被験者が感じた主観的な時間の長さ（心理物理的手法で計測）と比較した。その結果，①ある特定の状況下では両者の間に乖離が生じること，②このような乖離状況においては，

onset-offset 間の時間差よりも VEF の振幅の方が主観的な時間の長さと深く関係していること, の 2 点が示された。以上の結果は，人における時間感覚が，視覚野の神経活動における時間的な情報だけではなく，神経反応そのものの強さも加味して形成されていることを示唆する。

（33）日本語単語（漢字）と英語単語の黙読時における左右側頭後頭葉の活動について

寺田さとみ[1]，中村仁洋[2]，原信子[2]，湯本真人[3]，宇川義一[1]
（[1]東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻神経内科，
[2]東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻音声・言語医学，[3]東京大学医学部病態診断医学）

視覚呈示された言語に対しての脳活動については，一次視覚野の活動に続いて側頭後頭葉に活動が観察されることが知られている。この経路については，英語と日本語で異なる経路が使われている可能性が, fMRI の研究などで示唆されている。今回は健常者を対象にして，英語と日本語（漢字）の単語をを視覚呈示し，誘発脳磁場を各 100 回以上加算した。日本語は NTT データベースシリーズ，英語は MRC psycholinguistic database より，単語親密度が一定以上で，文字数が一定範囲内の語を選択し，呈示は 0.5sec，ISI は 3sec とし，自然・非自然の判断をボタン押しをさせながら黙読させた。左右側頭後頭葉（紡錘状回）における活動について，言語間，半球間の検討を行った。

（34）音の中心周波数と帯域幅に関わる脳磁界反応

添田喜治，中川誠司
（産業技術総合研究所 人間福祉医工学研究部門）

音に関わる脳磁界反応において, 純音やその複合音を用いてピッチ（音の高さ）との関連性，特に tonotopy（周波数局在機構）に関連する研究はよく行われている。しかし，等しい音圧レベルであっても音の高さ（周波数）が変われば，心理的な音の大きさ（ラウドネス）が変わることはよく知られているが, このことに関連する脳活動を調べた研究は少ない。本研究では，等音圧レベル下での周波数に対応する脳活動，特に反応強度に注目し，1 オクターブバンドノイズ，1/3 オクターブバンドノイズ，帯域幅 130 Hz の音を用い，中心周波数を 250 Hz～8000 Hz の間で変化させた時の脳磁界計測を行った。刺激は，継続時間 0.5 s，刺激間間隔 1.5 s でランダムな順序で呈示し，各刺激について 50 回以上の加算平均を行った。解析の結果, 中心周波数 1000 Hz 付近で N1m 反応が大きくなる傾向が見られた。

（35）高周波可聴音の立ち上がり時間が聴覚誘発脳磁界に及ぼす影響

萬谷惇[1,2]，中川誠司[1]，小谷賢太郎[3]，堀井健[3]
（[1]産業技術総合研究所 人間福祉医工学研究部門，[2]関西大学大学院工学研究科，
[3]関西大学工学部システムマネジメント工学科）

ヒトの聴覚脳機能研究は，主に音声周波数領域 (～5000Hz) の音の処理に関して行われてきた。5000Hz 以上の高周波音は，音声知覚よりも音源定位などにおいて重要な役割を果たすといわれており，聴覚皮質の活動にも低周波音との違いが表れる可能性がある。我々は 16000Hz までの高周波音の呈示が可能な刺激装置を開発

し，高周波音に対する聴覚誘発脳磁界の計測を行っている。今回は，刺激音の立ち上がり時間が聴覚誘発脳磁界に及ぼす影響を検討した。立ち上がり時間を変化させた刺激音に対する聴覚誘発脳磁界を計測し，高周波音と低周波音との間で比較を行った。その結果，低周波音においては立ち上がり時間の増加に伴い N1m の振幅が減少し，潜時が増加する傾向が見られた。一方，高周波音においては一概にそのような傾向は見られなかった。

（36）高周波可聴音および骨導超音波に対する聴覚誘発脳磁界の計測

中川誠司
（独立行政法人産業技術総合研究所 人間福祉医工学研究部門）

骨導で呈示された周波数 20000 Hz 以上の高周波音（骨導超音波）は，聴覚健常者はもとより重度感音性難聴者にも知覚されるが，そのピッチは周波数にかかわらずほぼ一定で，10000～14000 Hz の気導音のピッチに相当する。一方，5000 Hz 以上の高周波可聴音に対する聴覚野の活動に関する報告は少なく，その機序については未解明な部分も残されている。本研究では，16000 Hz までの高周波気導可聴音および 30000 Hz 骨導超音波トーンバーストに対する聴覚誘発脳磁界計測を行い，聴覚野の活動を検討した。500～12000 Hz の気導音に対しては聴覚野内でのトノトピシティが認められた。また，対側刺激と同側刺激ではトノトピシティの方向に差異が見られた。骨導超音波に対する活動部位は，ピッチおよびラウドネスのほぼ等しい高周波気導音と有意に異なっており，それぞれの知覚メカニズムの差異を示唆する結果となった。

（37）ゆらぎを持つ光源に対する心理的プリファレンスと大脳活動との関係

岡本洋輔 [1,2]，中川誠司 [2]，矢野隆 [1]，安藤四一 [1]
（[1] 熊本大学大学院自然科学研究科，[2] 産業技術総合研究所人間福祉医工学研究部門）

ゆらぎを持つ光源に対する心理的好ましさと大脳活動との関係について検討を行なった。視覚刺激として輝度の時間的変動の様子が異なる 5 種類の刺激を用意した。まず心理実験を行い，それぞれの刺激に対する心理的好ましさの度合い（プリファレンス尺度値）を測定した。次に心理実験の結果を基に，被験者ごとにプリファレンス尺度値の最も高い刺激と低い刺激を選択し，それらの刺激を提示している間の大脳活動を全頭型脳磁計を用いて計測した。計測された脳磁界のアルファ波帯域の自己相関関数を解析した結果，プリファレンスの低い刺激を提示した場合に比べて，プリファレンスの高い刺激を提示した場合に左後頭部付近で自己相関関数の有効継続時間が有意に長くなった。このことは，プリファレンスの高い刺激を提示したときに，左後頭部でのアルファ活動が時間的により安定していることを示している。

（38）視覚逆方向マスキングの有無による脳活動の変化

川勝真喜，阿部雅也，田中慶太，小谷誠（東京電機大学）

単独で呈示されれば認知可能である視覚情報の認知が，時間的に連続して後から入ってくる視覚情報によって影響・阻害される事があり，視覚逆方向マスキング現象として知られている。本研究ではマスク効果有りとマスク効果なしの 2 種の刺激を用意した。この刺激を用いて単語・非単語弁別課題中の誘発脳磁界を計測し，認知

阻害度の違う場合の脳磁界反応の差異を検討した。単語・非単語弁別には，少なくとも形態処理と意味処理が行われる。マスク効果がある場合には形態処理は行われるが意味処理は行われないと考える事ができる。つまり，現れる差異は形態処理以降の文字に関する処理であると考えた。実験の結果，マスク効果の条件間の反応の差は主に潜時 200ms 近辺以降の左側頭部等にみられた。

（39）脳磁図，網膜電図同時記録による視覚野初期応答潜時の検討

乾幸二，三木研作，金桶吉起，柿木隆介
（生理学研究所 統合生理研究系 感覚運動調節研究部門）

【背景，目的】体性感覚や聴覚誘発皮質活動に比べ，視覚領域では皮質初期反応の潜時について報告が一致していない。網膜電図と脳磁図を同時記録することにより，フラッシュ刺激に伴う信号が皮質に到達するタイミングを検討した。
【方法】フラッシュ刺激を右眼に与え，BTi 社製脳磁計 1 基を用いて後頭部より誘発磁場を記録した。網膜電図は，右下眼瞼より記録した。両者とも 500 回の試行を加算し，解析に用いた。
【結果】最初の誘発磁場成分(1M)は，立ち上がり潜時が刺激後 26 ミリ秒，頂点潜時が 37 ミリ秒であった。単一双極子モデルによる解析では，責任部位は第一次視覚野付近に推定された。網膜電図では，19 ミリ秒で陰性頂点となる a 波と，60 ミリ秒で陽性頂点となる b 波が記録された。a 波の頂点潜時と 1M の立ち上がり潜時には有意な相関が認められた(p=0.0013)。
【考察，結論】網膜電図で最初に記録される電位，photoreceptor current，は一定した陰性電位であり，陽性へ向かう電位の出現（a 波頂点）は，信号が視細胞から網膜内側へ伝えられるタイミングをほぼ反映する。1M は a 波より 7 ミリ秒遅れて出現し，網膜－皮質間の伝導時間を考慮すると，皮質での最初の活動と考えられる。

（40）漢字，ハングル文字呈示による言語優位半球の同定－周波数解析とフラクタル次元解析の比較－

金子裕，岡崎光俊，湯本真人
([1] 国立精神神経センター武蔵病院脳神経外科武蔵病院神経外科・臨床検査部，
[2] 国立精神・神経センター武蔵病院精神科，[3] 東京大学医学部附属病院検査部)

漢字およびハングル文字を視覚呈示し，漢字に対しては黙読する課題を行った。Neuromag 社製 VectorView を用いて MEG を測定し，raw data に対して数理解析を行った。周波数解析では，短潜時 FFT 解析によって non-phase locked synchronization/desynchronization を求め，漢字刺激とハングル文字刺激で統計的有意差の得られた潜時・周波数・チャンネルをマッピングした。フラクタル次元解析では解析ウィンドウをずらしながらフラクタル次元の経時的変動を求め，統計的有意差の得られた潜時・チャンネルをマッピングした。周波数解析には周波数の選択に恣意性があったが，フラクタル次元解析には恣意性がない。右利きの 16 名の健常者を被検者に実験を行い，その結果を報告する。

（41）日本語における母音無声化の脳内表現

船津誠也[1]，今泉敏[1]，橋詰顕[2]，栗栖薫[2]
（[1]県立広島大学，[2]広島大学医学部）

日本語における母音無声化においては，無声化した母音（無声化母音）と無声化していない母音（非無声化母音）は音韻論的には異音の関係にあるとされているが，両者は音響的にはかなり異なっている。このような音響的には全く異なる無声化母音と非無声化母音が脳内で如何に処理されるかについて，いまだ明らかになってはいない。本研究においては，無声化母音と非無声化母音が脳内で如何に処理されるか，異なる音素を処理する場合とは異なるのかを明らかにするために脳磁図を用いミスマッチ反応(MMF)を計測した。音素が異なる条件では，左半球の ECD モーメントが右半球より有意に大きかった。一方，無声化―非無声化条件では右半球が左半球より大きい傾向が見られたが有意差はなかった。この条件の場合には，音声学的識別を伴っていることから左半球もある程度賦活され，左右の半球差が小さくなったと解釈された。

（42）発話理解時における感情認知処理過程－MEG を用いた検討

矢倉晴子[1]，外池光雄[2,3]，中川誠司[2]，岩木直[2]，西原玲子[1]，荻野敏[1]
（[1]大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻博士後期過程統合保健看護科学分野，
[2]千葉大学工学部メディカルシステム工学科，
[3]独立行政法人産業技術総合研究所人間福祉医工学研究部門）

情緒的プロソディ認知能力(Emotional Prosody Recognition: EP)とは発話において「喜び」「悲しみ」といった感情を理解する能力のことである。この EP が関与する事象関連電位(ERP)について，オドボールパラダイムによる P300 成分の関与が多く報告されているが，EP 処理そのものに関する脳活動と詳細な場所情報について明らかにされていない。そこで我々は，時間と空間の両方の見地から解析可能な脳磁界計測(Magnetoencephalography : MEG)を用い，音声の感情的な特徴に注目する課題(E-task)と，語頭音に注目する課題(P-task)の脳活動を推定した。その結果，EP 処理に含まれる注意に関与した脳活動が，右側頭葉後部における刺激開始後 0.18s という非常に早い時間に生じることを示唆した(E-task>P-task**，**; p.<0.01)

13. 高次脳機能研究の新展開

2006 年 1 月 16 日－1 月 17 日

代表・世話人：高田昌彦（東京都神経科学総合研究所）
所内対応者：南部　篤（生体システム研究部門）

（1）WGA トランスジーンによる甘味・苦味情報を伝導する脳内神経回路の可視化
杉田　誠，柴　芳樹（広島大学大学院医歯薬学総合研究科　創生医科学専攻　病態探究医科学講座）

（2）到達運動の企画・実行過程における前頭皮質内の階層構造
星　英司（玉川大学　学術研究所　脳科学研究施設）

（3）代謝調節型グルタミン酸および $GABA_B$ 受容体による淡蒼球ニューロンの活動制御とパーキンソン病モデルでの発現変化
金田勝幸（生理研　認知行動発達機構）

（4）サル視覚皮質 V4 野における両眼立体視の奥行き表現
梅田和昌，田辺誠司，藤田一郎（大阪大学大学院　生命機能研究科　認知脳科学研究室）

（5）Adaptation methods における fMRI と単一細胞活動記録の比較
澤村裕正（東京大学医学部　眼科視覚矯正科）

（6）前頭連合野における行動選択のコントロール
筒井健一郎（東北大学大学院　生命科学研究科 脳情報処理分野）

（7）霊長類前頭前皮質機能コラムとドーパミン修飾
平田快洋（北海道大学大学院　医学研究科　高次脳機能学分野）

（8）低周波および高周波ネットワーク・オシレーションを介した新皮質－海馬間相互作用
礒村宜和（理研 BSI　脳回路機能理論研究チーム，ラトガーズ大　CMBN）

（9）扁桃体と社会的コミュニケーション
堀　悦郎（富山大学大学院医学系研究科　システム情動科学，科学技術振興機構　CREST）

【参加者名】

高田昌彦（東京都神経科学総合研究所），稲瀬正彦（近畿大学），泰羅雅登（日本大学），小林和人（福島県立医科大学），筒井健一郎（東北大学），堀　悦郎（富山大学），星　英司（玉川大学），杉田　誠（広島大学），澤村裕正（東京大学），磯村宜和，石金浩史（理化学研究所），平田快洋（北海道大学），梅田和昌（大阪大学），雁木美衣（東京都神経科学研究所），喜多　均（テネシー大学），宮下英三（東京工業大学），伊佐　正，吉田正俊，金田勝幸，池田琢朗，武井智彦，加藤利佳子，小川　正，鯉田孝和，原田卓也，坂野　拓，神作憲司，内山仁志，森戸勇介，李　順姫，南部　篤，畑中伸彦，橘　吉寿，知見聡美，高良沙幸，田　風（生理研）

【概要】

われわれは行動する際，視覚・聴覚・体性感覚などの外部（感覚）情報や学習・記憶・情緒などの内部（自己）情報に基づいて，もっとも適切な運動あるいは動作様式を選択，決定，実行する。日常的に設定されたさまざまな行動目標を達成するため，脳はこれら多種多様の情報を状況に応じて有機的に統合し，運動情報として運動野に出力しなければならない。また，物を掴む，腕を伸ばすなど，われわれが日常的に行う個々の動作は，長年にわたる経験や習慣に基づき脳内で形成された運動プログラムに従って，ほとんど無意識のうちに実行されている。状況に応じて意識的かつ合目的的にある特定の行動を企画，遂行しようとする際，脳はそれまでに学習，獲得してきた無数の運動プログラムや認知・思考パターンの中から状況に最も適合したものを選び出し，それらを時系

列的に順序よく組み合わせて，まとまりのある一連の行動として出力しなければならない。しかし，このような行動の組織化の神経機構については未だ明らかになっていない。

すなわち，脳科学は本来，脳機能をシステムとして理解し，究極的には“個体の組織化された行動発現のメカニズム”の解明をめざす学問領域である。しかし，現在の脳科学は，研究の進展とともに，研究テーマがそれぞれの専門分野ごとに細分化されるようになった結果，個々の分野の研究者がカバーあるいはフォローできる学問領域も狭小化し，各専門分野を横断的かつ統合的に捉え，相互理解を深めることがきわめて困難な状況になってきた。個々の研究領域にのみ注目していると，個体としての脳機能の全体像を見失う恐れがあり，生命現象を統合的に理解しようとする脳科学の基本的立場に基づいた研究姿勢が必要不可欠である。したがって，“個体レベルでの高次脳機能をシステム的に理解する”ためには，要素としての個々の神経機構を詳細に解析するだけでなく，それらを統合的に機能させる神経システムの解明が重要であり，そのような視点から研究が展開されなければならない。

「高次脳機能研究の新展開」と題した本研究会では，神経解剖学，神経生理学，分子生物学，情報工学など，多岐にわたる専門分野の若手あるいは中堅の研究者が，運動，感覚，認知，及び情動の各分野に関する最新の知見を紹介し，各分野における研究の趨勢，問題点，及び今後の展開に関する忌憚のない意見を活発に交換したい。

（1）WGA トランスジーンによる甘味・苦味情報を伝導する脳内神経回路の可視化

杉田　誠，柴　芳樹（広島大学大学院医歯薬学総合研究科・創生医科学専攻・病態探究医科学講座）

口腔内の味細胞に発現する味覚受容体に，味物質が結合することにより惹起される味覚情報は，複数の神経細胞を介し，脳内の各種神経細胞に投射され，受容・識別されるとともに，行動的反射や情動的反応を惹起します。哺乳類の苦味，甘味，うま味の味覚受容体に関する最近の発見は，異なる味質が味細胞でいかに感知され，暗号化されるのかをさし示しました。しかし，味覚情報がどのように脳に伝達され，味覚の認識がされているかについては不明な点が多く存在します。本研究では，マウスにおいて苦味受容体(mT2R5)もしくは甘味/うま味受容体(mT1R3)を発現し，苦味もしくは甘味/うま味を感知する味細胞に，シナプス間を移動するトレーサータンパク質(tWGA-DsRed)を選択的に発現させ，脳内でトレーサーに標識される神経細胞の位置を可視化することで，苦味および甘味情報を伝導する脳内神経回路を明らかにすることを試みました。延髄弧束核・橋結合腕傍核・視床後内側腹側核において，甘味受容味細胞から輸送された tWGA-DsRed を受けとる神経細胞群は，苦味受容味細胞からの入力を受ける神経細胞群に比べ，より前方に配置していました。また大脳皮質味覚野と扁桃体においては，部分的重複と分離がみられました。観察された苦味と甘味の情報を伝導する脳内神経回路の差異は，味覚認識を可能にする神経基盤の一端を示していると考えられました。

（2）到達運動の企画・実行過程における前頭皮質内の階層構造

星　英司（玉川大学　学術研究所　脳科学研究施設）

随意運動の発現過程における大脳前頭皮質の役割を明らかにするために，行動課題を遂行している被験体から神経細胞活動を記録・解析するという手法を用いて研究を行ってきた。本発表では，2 つの異なる行動課題のもとで到達運動を企画・実行中の被験体の前頭前野，運動前野，一次運動野から記録した細胞活動の具体例を示しつつ，これらの領野間の機能的差異，機能的関係を議論する。

第一の行動課題では，記憶すべき見本刺激とそれに引き続いて提示された選択刺激を，行動のルールに基づいて統合し，到達運動の標的を選択することが要求された。この課題を遂行中の被験者の前頭前野から細胞活動を記録したところ，1)見本刺激を反映する細胞活動，2)選択刺激を反映する細胞活動，そして，3)選択された標的の位置を反映する細胞活動が見出された。さらに，これら3 種類の細胞活動の時間経過を解析したところ，前頭前野の情報表現が，見本刺激から選択刺激へ，そして，選択刺激から標的の位置へ，と短時間で変遷することが明らかになった。これらの結果は，“見本刺激と選択刺激の情報を行動のルールに従って統合し，標的の位置という運動の情報を選択・生成する”という一連の過程が前頭前野で再現されていることを示唆した。一方で，同じ課題で，一次運動野から細胞活動を記録したところ，一次運動野はこのような過程を反映しておらず，到達運動の実行自体を反映することが明らかとなった。

第二の行動課題では，到達運動に使用する手の指示と，到達する標的の位置の指示が連続して与えられ，これら2 つの異なる指示内容を統合して到達運動を企画することが要求された。なお，これらの２つの指示の順序は20試行毎に入れ替えられた。この課題を遂行中の被験体の運動前野から細胞活動を記録したところ，第一の指示が与えられた後には，1)使用する手の指示を選択的に記憶する細胞活動，2)標的の位置を選択的に記憶する細胞が観察された。さらに，第二の指示が与えられた後には，3)これらの2 つの情報を統合する細胞活動が見出された。これらの結果は，“使用する手，到達する標的の位置という異なる運動の情報を収集・統合して将来の運動を企画する”という過程において，運動前野が重要な役割を果たすことを示唆した。

以上の結果をまとめると，

1)前頭前野は複数の情報を統合して標的の選択に関与する。

2)運動前野は到達運動に使用する手の情報と標的の位置情報を収集し，これらを統合して到達運動の企画をする。

3)一次運動野は企画された運動を実行する。

という前頭皮質内の機能的差異が明らかとなる。さらに，これを解剖学的ならびに生理学的研究から得られている知見と総合することにより，“前頭前野で行動に必要な多様な情報の生成がなされ，運動前野でこれらが統合されて運動情報として企画される。そして，運動前野と一次運動野が企画された運動の準備・実行に関与する。”という前頭皮質内の階層構造を提案したい。

（3）代謝調節型グルタミン酸および $GABA_B$ 受容体による淡蒼球ニューロンの活動制御とパーキンソン病モデルでの発現変化

金田 勝幸（生理研・認知行動発達機構）

近年の研究から大脳基底核には様々なタイプの代謝調節型グルタミン酸および $GABA_B$ 受容体がユニークな発現様式を示すことが明らかとなってきた。本研究会では大脳基底核を構成する重要な核である淡蒼球におけるこれら受容体の機能に関する 2 つの話題を紹介したい。

(1)$GABA_B$ 受容体および mGluR1 を介した淡蒼球ニューロンの活動制御

げっ歯類の淡蒼球（霊長類では淡蒼球外節）は，主として線条体と淡蒼球自身から GABA による抑制性入力を，また，視床下核からグルタミン酸作動性興奮性入力を受けている。一方，淡蒼球はその GABA 性投射を大脳基底核のほぼすべての核に送っている。したがって，大脳基底核による運動制御機構を理解する上で淡蒼球ニューロンの活動制御機構を解明することはきわめて重要であると考えられる。これまでの報告から，淡蒼球ニューロンの活動はイオンチャネル型グルタミン酸受容体および $GABA_A$ 受容体を介して制御されていることが明らかとなっているが，代謝調節型グルタミン酸受容体(mGluRs)や $GABA_B$ 受容体の役割については不明の点が多い。そこでこれらの受容体が淡蒼球において実際に機能しうるのかどうかをラット脳スライス標本を用いてホールセル記録法により検討した。淡蒼球内の連続電気刺激により，速い EPSPs/IPSPs に続いて遅い IPSP が誘発された。この遅い IPSP は $GABA_B$ 受容体アンタゴニスト

により完全に抑制されたことから，シナプス後膜に存在する $GABA_B$ 受容体を介して発現したと考えられた。一方，刺激により誘発される $GABA_A$ 受容体を介する速い IPSCs は $GABA_B$ アンタゴニストの投与により増大したことから，刺激により遊離された GABA がシナプス終末に存在する $GABA_B$ 受容体を活性化し，GABA の遊離を抑制していることが示唆された。さらに，内包の連続刺激では速い EPSP/IPSP に続いて，遅く持続的な脱分極が誘発された。この脱分極は mGluR1 選択的アンタゴニストにより部分的に抑制された。以上の結果は，シナプス性に遊離された GABA およびグルタミン酸がそれぞれ $GABA_B$ 受容体および mGluR1 を活性化することにより，淡蒼球ニューロンの活動制御において重要な役割を果たしている可能性を示している。

(2)パーキンソン病モデルサルにおける mGluR1a の発現減少

パーキンソン病時には視床下核の活動が異常に増大していることが注目を集めている。そこでこのような視床下核の活動上昇が mGluRs の発現に与える影響をドパミン神経毒である MPTP を投与することにより作成したパーキンソン病モデルサルを用いて検討した。その結果，調べた 7 つの mGluRs サブタイプのうち，mGluR1a の発現のみが視床下核の主要な投射先である淡蒼球内節・外節および黒質網様部において特異的に減弱していることを見いだした。この発現減少の機能的意義を調べる目的で，正常サルの淡蒼球内節・外節ニューロン活動に対する mGluR1 アゴニストおよびアンタゴニストの局所投与の影響を調べたところ，アゴニスト投与により淡蒼球内節・外節ニューロンの発火頻度は上昇し，アンタゴニストでは減少することが分かった。さらに，パーキンソン病モデルサルでは，特に淡蒼球内節においてこれらのアゴニストやアンタゴニストの効果が正常サルの場合と比較して減弱する傾向が認められた。以上の結果は，mGluR1a の特異的な発現減少は視床下核の過剰な興奮に対する代償機構であることを示唆している。

（4）サル視覚皮質 V4野における両眼立体視の奥行き表現

梅田和昌，田辺誠司，藤田一郎（大阪大学大学院　生命機能研究科　認知脳科学研究室）

ヒトを含む霊長類は，優れた両眼立体視能力をもつ。視覚系は，奥行きに伴って左右の網膜像に生じるわずかなズレ，両眼視差を奥行き知覚の手がかりとしている。両眼立体視は，(1)視差のある二枚の網膜像をどのように一つの視覚像にするのか，(2)二次元的な網膜像からどのように両眼視差を算出し奥行きの知覚へ結びつけるのか，という二つの大きな問題を含んでいる。我々はこれらの問題を解明するため，覚醒下のサル視覚皮質 V4 野から単細胞の電気活動記録した。

実験 1 : V4 野において対応点問題は解決されているか？

二枚の網膜像から一つの奥行きを伴った視覚像を構築するためには，左右それぞれの網膜上で由来の等しい二点を対応付けしなければならない。この問題を対応点問題という。V4 野において対応点問題が解決されているかを調べるため，通常のランダム・ドット・ステレオグラム(cRDS)と輝度反転 RDS(aRDS)を用いて，両眼視差感受性を調べた。aRDS は左右眼に投影するドットの輝度を反転させた RDS であり，両眼視差が存在しても奥行きを伴った面構造を知覚させない。対応点問題がすでに解かれた段階にある神経細胞ならば，cRDS の両眼視差に応答を示しても，aRDS の両眼視差には応答を示さないと考えられる。実験の結果，V4 野の神経細胞の多くで，aRDS の両眼視差に対する応答が V1 野よりも減弱していた。この結果は V4 野において対応点問題が解かれつつあることを示唆する。

実験 2 : V4 野は相対視差をコードしているか？

両眼視差は，絶対視差と相対視差に分類される。絶対視差はある点と個体が固視している面との奥行きの差に依存し，相対視差はある点とその周囲との奥行き差に依存する。過去の心理物理研究から，奥行き知覚は相対視差に依存することが示されている。そこで，V4 野において相対視差がコードされているかを調べた。RDS を中心領域と周辺領域に分割し，それぞれの両眼視差を調節することで，さまざまな奥行き面の組み合わせに対する神経活動を記録した。その結果，V4 野の神経細胞のほとんどが中心領域と周辺領域の相対視差に対して感受性を示

した。このことは V4 野の神経細胞群が相対視差に基づく奥行き表現を行っていることを示唆する。

以上のように, V4 野が奥行き知覚と対応した神経活動を示すことから, V4 野を含む腹側経路における両眼情報処理は立体視に貢献していると考えられる。

（5）adaptation methods における fMRI と単一細胞活動記録の比較

澤村　裕正（東京大学医学部眼科視覚矯正科）

Functional magnetic resonance image (fMRI) が脳機能研究に用いられるようになって以来多数の知見が得られている。fMRI はヒトを被験者として用いることができる，一時に多数の脳領域の活動を記録することができるという利点を持つが，時間解像度・空間解像度は劣る。一方従来よく用いられていた単一細胞活動記録は時間・空間解像度に優れ，単一神経細胞の刺激選択性あるいは刺激へのチューニングを調べるのに非常に有用であるものの，侵襲度が高く，脳の全ての領域を一時に記録することは非常に困難であるという欠点をもつ。

近年 fMRI を用いて視覚野の神経細胞群の選択性を推測するのに adaptation methods がよく用いられている。その根幹をなす論理は以下である。単一の刺激が連続して提示された場合(A-A), A に応答する細胞群は 2 回目の A の刺激提示に対して減弱した応答を示す(adaptation)。異なる刺激が続けて提示された場合には(B-A), その減弱した応答の程度がその細胞群の選択性を反映している，というものである。例えば B-A と提示された場合の adaptation の程度が A-A と提示された場合と同程度であったなら, その細胞群は B 及び A には選択性がないと判断されるし，全く adaptation を示さなかった場合にはその細胞群は A に選択性があると判断される。一見この論理は正しいようであるがこの論理を用いるにはある前提が存在する。それは「細胞群の選択性と adaptation の程度が相関する」，というものである。

そこで今回はこの前提が正しいか否かを fMRI と単一細胞活動記録を比較することにより調べることにした。ヒトの fMRI の知見からは物体を認知する領域(lateral occipital complex=LOC)が単一視覚刺激により adaptation 効果を示すことは既に知られているが，サルの fMRI の知見はまだ得られていないためまず単一視覚刺激を与えた場合に adaptation 効果が起こるか否かを確認した。また, 物体の大きさを変化させた場合に得られたヒト fMRI の知見（LOC では size invariance を示した）とサル単一細胞活動記録の知見（いくつかの細胞では size invariance を示した）が異なっていたため，種が異なっていたためか，実験手法が異なっていたためかを調べるために同一の刺激をサル及びヒトを被験者として用い，その際の脳活動を fMRI で調べた。その上で単一細胞活動記録を用いて adaptation methods の前提が正しいか否かを調べた。

今回の発表で, 我々の実験結果からサルを用いた fMRI でも adaptation 効果が見られたこと，ヒトとサルとでは同定度の size invariance を示したこと，そして adaptation methods で用いられていた前提と結果が完全には一致しないことを報告する。

（6）前頭連合野における行動選択のコントロール

筒井 健一郎（東北大学 大学院生命科学研究科 脳情報処理分野）

われわれは自由であるがゆえに，日ごろから様々な場面で行動の選択をせまられている。そのなかで，複数の行動の選択肢があり，それらの選択肢からどれを取れば最良の結果が得られるか（どの選択肢の価値が最も高いか）が曖昧な場面においては，選択に時間と心理的負担を要する。そのような場面はとりわけ「意思決定状況」と呼ばれている。本研究では，そのような意思決定状況における行動選択をコントロールしている神経機構を明

らかにすることを目的とした。そのため，2 種類の自由選択課題（毎試行，刺激Aと刺激Bのいずれかを選択させる課題）をそれぞれ別の 2 頭のサルに訓練した後，課題を遂行させながら前頭連合野のニューロンの活動を記録した。

第一課題として，並立 VI（変動間隔）スケジュールを基にデザインした変動確率課題を用いた。この課題は，刺激AとBのどちらを取ったほうがより報酬を得られやすいかを予想さながら反応させるもので，最も基本的な意思決定状況であるといえる。この課題をサルに行わせながら前頭連合野からニューロン活動を記録すると，多くのニューロンの活動が，サルが刺激 A を選ぼうとしているときと，刺激 B を選ぼうとしているときで異なる活動を示すことが見つかった。すなわち，これらのニューロンの活動を観察すると，サルが実際に刺激を選択する何秒も前から，その試行でサルがどちらの刺激を選ぶのかを予測することが出来た。これらのニューロンの活動は，これまでに運動関連領域にて記録されたことが報告されている「運動の準備」に関する活動とは，本質的に異なる。すなわち，運動の準備に関わる活動は，どの効果器を使って，どちらの方向に反応するかに依存していたが，今回記録されたニューロンは，効果器を右方向に動かすか，左方向に動かすかに関わらず，ある特定の刺激をとろうとしているときに選択的に活動しているのである。これらの事実は，前頭連合野のニューロンが，意思決定の初期の段階，すなわち，具体的な運動の準備よりも抽象度の高い，行動の目的設定に重要な役割を果たしていることを示唆している。

第二課題としては，無報酬刺激 A を多数回選ぶと，それに応じて後に報酬刺激Bを選んだときの報酬量が増える「貯金課題」を考案した。このは，すぐ得られる少量の報酬を我慢して，無報酬の反応を繰り返して将来の報酬が増やさないといけないため，刺激の価値を評価する能力のほかに，衝動的な行動を抑えて将来のために努力する「自己統制」の能力が必要となる，より高度な意思決定状況であると考えられる。この課題をサルに行わせながら前頭連合野からニューロン活動を記録すると，反応に先立って予期的に発火するニューロンが多数記録された。これらのニューロンのほとんどは，サルが無報酬刺激を選ぶときと，報酬刺激を選ぶときで異なる反応をしていた。すなわち，背外側部を中心とする前頭連合野外側部のニューロンの多くは，サルが無報酬刺激を選ぶときだけ予期的な発火をしていたが，前頭眼窩部のニューロンの多くは，サルが報酬刺激を選ぶときだけ予期的な発火をしていた。また，報酬そのものに対する反応も，背外側部では一部のニューロンでのみ認められたが，前頭眼窩部においては多くのニューロンで認められた。これらの結果は，「貯金課題」を遂行する上で，それらの領域が異なる働きをしていることを示唆している。すなわち，前頭連合野背外側部は，衝動的な反応を抑制しながら将来のより大きな報酬のための行動の発現に深く関わっているのに対して，眼窩部は，近い将来に得られそうな報酬の期待や，実際に得られた報酬の評価などに関わっていると考えられる。

これらの結果より，前頭連合野が，意思決定を実現する上で，非常に重要な役割を果たしていることが明らかになった。今後の課題としては，前頭連合野に対する神経阻害物質注入による可逆的機能阻害や，物理的な破壊によって，どのようにサルの行動が変容するかを調べる必要がある。また，前頭連合野と，頭頂連合野や大脳基底核などのほかの領域の役割が，どのように異なるかも調べていく必要があるだろう。

（7）霊長類前頭前皮質機能コラムとドーパミン修飾

平田快洋（北海道大学大学院　医学研究科　高次脳機能学分野）

霊長類前頭前皮質(PFC)は，ワーキングメモリなどの高次の認知機能を担っている。特にその背外側領域は，視床や他の皮質領域と入出力をもち，細胞体や軸策終末がコラム状の構造を形成している。また，皮質第 IV 層の電気刺激によりコラム活動が誘発されることが *in vitro* で示されてきた。さらに，PFC は，ドーパミンとその受容体が豊富な脳領域として知られ，D1 受容体を介して認知機能が修飾されることが示されてきた。しかしながら，細胞構築学的コラム構造とコラム活動の関係，さらに，コラム活動に対するドーパミン修飾作用は全く明らかに

されていない。そこで本研究では，解剖学的手法と膜電位感受性色素を用いた光学測定法を組み合わせ，これらの問題にアプローチした。

まず，細胞構築学的コラム構造とコラム活動の関係を明らかにするために，実験開始前に麻酔下のサル前頭前皮質 9 野に逆行性蛍光トレーサーである Fast Blue(FB)を注入した。2 週間の生存期間後，麻酔下のサル前頭前皮質主溝周辺領域から組織ブロックを採取し，厚さ 400μm のスライスを作成した。実験開始直前に膜電位感受性色素（RH482 あるいは RH155）によりスライスを染色し，皮質の主な入力層である第 IV 層を電気刺激することにより誘発された活動を，光学測定システム(SD1001)を用いて検出した。始めに，皮質第 IV 層を電気刺激すること，皮質に垂直に一定幅を持ったコラム活動が誘発された。その後，実験に用いた各々のスライスにおいてコラム構造を同定し，電極跡，皮質表面および白質との境界を目印としてコラム活動の画像と重ね合わせした。その結果，コラム活動内部に FB で逆行性に染色された遠心性ニューロン群がコラム状のクラスタを作って存在していることが分かった。これらの結果は，1)前頭連合野背外側部に実際に機能コラムが存在することと，2)コラム活動が他の皮質へ投射する遠心性ニューロン群を駆動することが出来ることを示唆している。

続いて，ドーパミン受容体活性化がコラム活動に及ぼす影響を，受容体アゴニストを用い光学的に調べた。コラム活動が観察された脳スライスにドーパミン D1 受容体アゴニスト(SKF38393, 20μM)を添加したところ，コラム幅に影響を与えることなく興奮性シナプス伝達のみを増強した。一方で，D2 受容体活性化は，コラム活動になんら影響を与えなかった。これらの結果は，コラム内部でのシナプス伝達を D1 受容体が隣接するコラムに影響を与えることなく増強することを示唆している。

これらのことから，前頭前皮質の機能コラムは，ドーパミン D1 受容体活性化により増強し，機能コラム内部で情報処理を行った後，強い出力を他の皮質領域へ送っているかもしれない。これらは，高次認知機能を担う前頭前皮質の基礎的，かつ，重要な神経メカニズムの一つであると考えられる。

（8）低周波および高周波ネットワーク・オシレーションを介した新皮質－海馬間相互作用

礒村　宜和（理研 BSI　脳回路機能理論研究チーム，ラトガーズ大　CMBN）

ノンレム睡眠中や特定の麻酔条件下では，脳波記録中に大脳新皮質では持続的に 1～数 Hz 周期の序波/低周波オシレーション slow oscillation が，海馬では間欠的に 80-250 Hz の高周波オシレーション fast oscillation（リップル）が観察される。近年，睡眠中に新皮質と海馬はこのような同期的オシレーション活動を介して神経情報の相互交換をおこなっている可能性が提唱され，さらに新皮質と海馬の相互作用を担う入出力インターフェースとして嗅内野や海馬台の神経細胞活動が注目されている。そこで我々は，ウレタン・ケタミン麻酔下の成熟ラットをもちいて，新皮質，嗅内野表深層，海馬台あるいは海馬各領域の単一神経細胞から細胞内記録法により膜電位変化を記録して形態を同定すると同時に，海馬領域から局所フィールド電位とマルチユニット活動を記録し，新皮質の低周波オシレーションと海馬の高周波オシレーションの領域間相互作用を解析した。その結果，1)嗅内野，海馬台錐体細胞の膜電位はアップ状態，ダウン状態の 2 相性変化を示し，それぞれ新皮質領域の低周波オシレーションと同期していた，2)海馬 CA3，CA1 細胞はアップ・ダウン膜電位遷移をまったく示さなかった，3)歯状回細胞はアップ状態の嗅内野入力により直接駆動されるが，CA3，CA1 細胞は嗅内野アップ・ダウン状態に関わらず発火活動を示した。4)CA1 領域では高周波オシレーションもガンマ(30-80 Hz)・オシレーションも嗅内野アップ・ダウン状態に関わらず発生した，5)海馬の高周波オシレーションと新皮質の低周波オシレーションの発生は 1 秒程度の遅延をもって相関していた。このように，嗅内野と海馬台領域は新皮質領域に類似した低周波オシレーションの性質を示し，海馬は新皮質入力に依存せず自律的に高周波およびガンマ・オシレーションを発生する能力を有することを明らかにした。

（9）扁桃体と社会的コミュニケーション

堀　悦郎（富山大学大学院医学系研究科　システム情動科学，科学技術振興機構　CREST）

我々は日常的に，顔表情，目線，ジェスチャーなどの非言語的なコミュニケーションを行っている。特に顔は社会的な意味を強く持っており，顔からの情報は固体の識別のみならず，他者の精神状態を理解するのに利用されている。他者の精神状態を理解することは，円滑なコミュニケーションに必要不可欠であり，これが欠如した精神科疾患として自閉症，躁うつ病，統合失調症，注意欠損多動性障害などが挙げられる。近年，これらのコミュニケーション障害を呈する疾患が社会的に注目を集めており，教育学的問題にもなっている。一方，これまでの神経心理学的および神経生理学的研究から，扁桃体は自己の情動発現のみならず，他者の精神状態を理解する役割も担っている可能性が示唆されている。扁桃体は他の大脳感覚領域と共に，様々な事象の認知や情動の処理に関与すると考えられている。ほ乳類にいては，扁桃体が進化あるいは分化するに従って，それと共に情動的および社会的な行動も複雑に進化あるいは分化している。

本研究会では，社会的コミュニケーションにおける扁桃体の役割に焦点を当て，演者らの研究結果を紹介したい。まず，社会的シグナルに対するサル扁桃体ニューロンの応答性についての神経生理学的な研究結果を紹介する。顔表情あるいは視線方向に関する遅延非見本合わせ課題を遂行中のサル扁桃体からニューロン活動を記録した。顔刺激としては，様々なヒトおよびサルの写真を用いた。単一ニューロン活動の記録にはガラス被覆タングステン電極を用い，各刺激に対するニューロン応答を比較した。その結果，サル扁桃体にはヒトおよびサルの顔刺激に対して識別的に応答するニューロンが存在した。これらのニューロンには，特定の人物の特定の顔表情や特定の視線方向に応答するものがあった。さらに，サルと日常的に接している実験者の顔刺激に対しては，他の人物の顔刺激に比べてより識別的に反応することが明らかとなった。この結果は，扁桃体が社会的シグナルの学習に関与することを示している。

ついで，ヒトの共有注意機構に対する顔表情の影響についての心理学的研究結果を紹介する。共有注意とは，他者と同一の物に注意を向ける機構のことである。実験では，モニタ上に呈示されるターゲットの位置検出課題を行った。被験者は，ターゲットが呈示された位置に対応したキーを素早く押すことが要求された。ターゲットの呈示に先がけて，被験者に様々な顔表情および視線方向の顔写真を短時間呈示した。その結果，ターゲットの直前に呈示された顔刺激の視線方向とターゲットの出現位置が一致した場合には，被験者の反応時間が有意に短くなっていた。さらに，顔刺激が笑顔の場合には，他の顔表情に比べて被験者の反応時間が著しく短かった。この結果は，他者の顔表情が共有注意機構に影響を及ぼすことを示している。

これらの結果から，扁桃体を中心とした社会的コミュニケーションに関する神経機構について考察したい。

14. シナプスの一生：誕生・維持・除去過程の統合的理解に向けて

2005 年 12 月 1 日－12 月 2 日

代表・世話人：柚﨑通介（慶應義塾大学　医学部　生理学）
所内対応者：重本隆一（自然科学研究機構　生理学研究所　脳形態解析）

（1）Novel role of CaMKII in the maintenance and regulation of synaptic structure
林　康紀（理研-MIT Neuroscience Research Center）

（2）Experience-driven synaptic delivery of AMPA receptors *in vivo*
高橋　琢哉 (Cold Spring Harbor Laboratory, Neurobiology)

（3）リン酸化による NMDA 受容体局在調節とシナプス可塑性の制御
渡部　文子（東京大学医科学研究所　神経ネットワーク）

（4）後シナプスニューレキシンのシナプス形成における抑制的役割
谷口　弘樹(Cold Spring Harbor Laboratory, Neurobiology)

（5）NMDA 受容体細胞外ドメインの新たな役割
加藤　明彦(Eli Lilly)

（6）シナプス形成におけるネクチンの役割
匂坂　敏朗（大阪大学大学院医学系研究科　分子生物学）

（7）プレシナプスアクティブゾーンにおけるリン酸化プロテオーム
大塚　稔久（富山大学医学部　臨床分子病態学）

（8）ショウジョウバエ嗅覚地図の構築における Notch コードの役割
遠藤　啓太（発生・再生科学総合研究センター　神経回路発生）

（9）神経伝達物質放出量の制御機構の一考察
高森　茂雄（東京医科歯科大学　医歯学総合研究科　脳神経病態学）

(10) NR2B リン酸化残基改変マウスの情動異常の解析
デラワリ　ミナ（東大医科学研究所　癌細胞シグナル研究分野）

(11) Rab3 GAP によるシナプス伝達と可塑性の制御
坂根亜由子（徳島大　ヘルスバイオサイエンス　分子病態学）

(12) Translocation of drebrin and F-actin from dendritic spines to shafts was regulated by myosin II ATPase activity
水井利幸（群馬大学医学系研究科　高次細胞機能学）

(13) ATP 受容体チャネル P2X2 の膜電位と ATP に依存した"ゲート"機構の解析
藤原祐一郎（自然科学研究機構　生理学研究所　神経機能素子研究部門）

(14) Quantitative analysis of GABAA receptor subunits expressed in hippocampal CA1 pyramidal cells by SDS-digested freeze-fracture replica labeling (SDS-FRL)
春日井　雄（自然科学研究機構　生理学研究所　脳形態解析部門）

(15) Quantitative analysis of AMPA and NMDA receptors in the retino- and cortico-geniculate synapses as revealed by SDS-digested freeze-fracture replica labeling (SDS-FRL)
足澤悦子（自然科学研究機構　生理学研究所　脳形態解析部門）

(16) 突起形態における樹状突起局在性転写コアクチベーターMAL の役割
田渕明子（富山大学薬学部・分子神経生物学研究室）

(17) 新しい分泌性シナプス機能修飾因子セレブリンファミリーの解析
飯島崇利（慶應義塾大学　医学部　生理学）

【参加者名】

安部健太郎，遠藤啓太（理化学研究所・発生再生科学総合研究センター），飯島崇利，石田　綾，掛川　渉，亀川雄一，幸田和久，田川義晃，松田恵子，松田信爾，柚崎通介（慶應義塾大学　医学部），飯田純子，井上明宏，岡部繁男，高森茂雄，畑　裕（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科）石井　裕，久保義弘，重本隆一，篠原良章，立山充博，中條浩一，長友克広，挾間雅章，深澤有吾，藤原祐一郎，山肩葉子（生理学研究所），井上英二（カン研究所），大塚稔久，田渕明子，所　崇，比嘉　進，山口桂司（富山大学医学部），片岡正和（信州大学工学部），加藤明彦（Eli Lilly），狩野方伸，橋本浩一（大阪大学大学院医学系研究科），小林静香，関野祐子，デラワリ　ミナ，中澤敬信，真鍋俊也，渡部文子（東京大学医科学研究所），齊藤　実（東京都医学研究機構東京都神経科学総合研究所），坂根亜由子，佐々木卓也（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部），匂坂敏朗（大阪大学大学院医学系研究科）崎村建司，武井延之（新潟大学脳研究所），白尾智明，水井利幸（群馬大学大学院医学系研究科），瀬藤光利（岡崎統合バイオサイエンスセンター），高雄啓三（京都大学医学研究科），高岸芳子（名古屋大学環境医学研究所），高橋琢哉，谷口弘樹（Cold Spring Harbor Laboratory），竹居光太郎（横浜市立大学医学部），林　康紀（RIKEN-MIT Neuroscience Research Center），尾藤晴彦（東京大学大学院医学系研究科），平井宏和（金沢大学学際科学実験センター），本田知之（三重大学大学院医学系研究科），山田麻紀（東京大学薬学系研究科）

【概要】

脳を構成する 1000 億個を超える神経細胞は，特異的なシナプス結合によって情報を伝達すると同時に，シナプスにおいて記憶を蓄えると考えられている。個体の発達と共に誕生した新たなシナプスは，環境要因や学習過程に応じて特定のシナプスのみが選択的に強化され，さまざまな分子が集合して成熟し，一部のシナプスは除去されていく。近年，このようなシナプスの形成・維持・除去過程は，発達段階の脳のみならず，個体の一生を通じてダイナミックに起きる現象であることが明らかになってきた。このようなシナプスの形成・維持過程の分子的基盤の解明は，児童期・青年期における教育・学習効果に関する理論的知見を与え，老化に伴う記憶の障害機構を理解するための重要な鍵を与えると期待される。この一連の過程の分子機構を解明していくためには，分子生物学，生化学，生理学，解剖学，細胞生物学，遺伝学，システム脳科学などの異なる分野の人材による学際的なアプローチとその統合が不可欠である。そこで，本研究会では，広く他分野の研究者を集め，情報交換と交流を図ることを目的とし，演題(1)-(9)では，最先端で活躍中の演者を交えて一演題当たり一時間程度の十分な時間をかけて，徹底的な討論を行った。また若手研究者の育成を図るために，演題(10)-(17)は若手研究者がポスターを用いて，やはり十分な時間をかけて討論した。これらの討議のプロセスにより，解決可能な新規の問題点を洗い出し，今後の領域横断的な研究のシーズを見出すことができたと考えている。

（1）Novel role of CaMKII in the maintenance and regulation of synaptic structure

林　康紀（理研-MIT Neuroscience Research Center）

The synapse is a highly organized cellular specialization that reorganizes its structure and composition according to input strength-both positively and negatively. The mechanisms orchestrating these changes remain largely elusive. We previously reported that activity dependent bidirectional regulation of actin at the synapse is involved in postsynaptic assembly-disassembly, and serves as a substrate for bidirectional synaptic plasticity. Tetanic stimulation rapidly and persistently shifts the F-actin/G-actin equilibrium towards F-actin in dendritic spines. The molecular mechanism involving this regulation has not yet been discovered.

We have hypothesized that CaMKII, a serine/threonine protein kinase highly enriched in excitatory synapses, is involved in this regulation. Here we present experimental evidence suggesting that CaMKII has a structural role in stabilizing actin cytoskeleton in dendritic spines.

（2）Experience-dependent synaptic delivery of AMPA receptors in vivo

高橋　琢哉　（Cold Spring Harbor Laboratory, Neurobiology)

The molecular modifications that occur in the intact vertebrate brain as a consequence of experience are still poorly understood. One crucial question is whether natural stimuli in vivo induce the synaptic delivery of GluR1.

To test this, I injected Sindbis virus carrying recombinant AMPA receptors into barrel cortex of rats with or without whiskers in vivo at P12, an age characterized by rapid experience-dependent development of barrel cortex circuitry. 2 days later, I cut acute slices and tested delivery of AMPA receptors to synapses from layer4 to layer2/3 pyramidal neurons with an electrophysiological technique.　I found that recombinant and endogenous GluR1 were delivered to synapses in the intact whisker rats but not in the deprived whisker rats. This showed that synaptic delivery of GluR1 is experience-dependent. In vitro experiments showed that synaptic delivery of GluR2 is activity-independent. Consistent with these in vitro results, recombinant and endogenous GluR2 were delivered to synapses both in the intact and deprived whisker rats.　So the model, which was developed from in vitro experiments, applies to experience-dependent plasticity in vivo.

（3）リン酸化による NMDA 受容体局在調節とシナプス可塑性の制御

渡部　文子（東京大学医科学研究所　神経ネットワーク）

神経伝達効率の長期増強(LTP) にはNMDA 型グルタミン酸型受容体(NMDAR) が重要な役割を担うことが知られているが，生理的条件下で NMDAR 機能がどのように調節されているのかに関しては不明な点が多い。LTP 誘導刺激をはじめ，虚血やエタノール暴露など様々な系において NMDAR のリン酸化が報告されており，生理的に多様な機能を担っていることが示唆されている。

そこで我々はNR2B の主要なリン酸化部位である 1472 番目チロシン残基に変異を導入したノックインマウス (YF) の詳細な解析を行うことにより生体内での役割を検討した。免疫電顕による解析で野生型マウス(WT) では NMDAR はシナプス後肥厚部の中心部分に偏って局在しているが YF では均等に近く散在していた。また YF の扁桃体では NR2B とα-アクチニンとの結合が顕著に減弱していた。一方 YF では NMDA/AMPA 電流比，AMPA 電流の mEPSC の大きさや頻度にも有意な差は無かったが，LA における LTP は有意に減弱しており，また恐怖条件付け学習行動にも障害が見られた。LTP 誘導刺激による NMDA 電流の加算に変化は見られなかったが，YF の扁桃体では NR2B と CaM キナーゼ II との結合が顕著に減弱していた。これらの結果からこのリン酸化は受容体の局在や下流シグナル系を制御することにより，シナプス可塑性の誘導や学習行動も制御している可能性が示唆された。

（4）後シナプスニューレキシンのシナプス形成における抑制的役割

谷口　弘樹 (Cold Spring Harbor Laboratory, Neurobiology)

シナプスは神経細胞同士の信号伝達を仲介する場所であり，その形態的，機能的変化は学習記憶の基盤メカニズムと考えられている。よってシナプス形成を制御するメカニズムを解明することは発生生物学的見地からのみならず，脳機能を理解する上でも重要かつ興味深い課題となっている。本研究では，シナプス形成を抑制する分子の同定，その機能解析を目的とした。NLG は培養海馬神経細胞に発現すると顕著な前シナプス誘導活性を示す

ので, スクリーニングの指標として有用であると考えた。そこで，NLG と候補分子を共発現し，NLG の活性を阻害する分子を目的のものとした。その結果，興味深いことに NLG の受容体である Nrx1beta がそのような阻害活性を持つことがわかった。pan-Nrx 抗体を用いた，免疫細胞染色，免疫電子顕微鏡の解析から，Nrx は前シナプスばかりではなく，後シナプスにも存在することが明らかになった。また，NLG とシスで共存する Nrx1beta は，NLG-Nrx1beta 間のトランス相互作用を阻害することが明らかになった。さらに興味深いことに Nrx1beta の培養海馬神経細胞における過剰発現は NLG タンパクの発現増加を誘導することもわかった。以上の結果をふまえ，後シナプス Nrx1beta のシナプス形成における抑制的役割について議論したい。

（5）NMDA 受容体細胞外ドメインの新たな役割

加藤　明彦 (Eli Lilly)

NMDA 受容体はシナプス可塑性，過剰な興奮による神経細胞死に関わる最も重要なイオン透過性グルタミン酸受容体である。イオン透過性グルタミン酸受容体は細胞外ドメイン，膜貫通ドメイン，細胞内ドメインからなる。細胞外ドメインは, リガンド結合ドメインのほかに 400 アミノ酸からなる N-terminal domain (NTD)が存在する。NTD は最も大きなドメインであるにもかかわらず, 機能解析は立ち遅れている。

私どもは NMDA 受容体の必須サブユニットである，NR1 の NTD と相互作用する分子を同定することを通して NTD の機能を探ることを試みた。Alkaline phosphatase と融合した NR1-NTD を哺乳動物細胞から分泌させ，これをプローブに用いて海馬の初代培養を染色したところ，神経細胞で強いシグナルが得られた。このことは海馬に NR1-NTD と結合する分子が存在することを示している。次いで，発現クローニングを用いて NR1-NTD と結合する分子の同定を行ったところ，ユビキチンリガーゼの基質特異性を決定する F-box タンパクのひとつ，Fbx2 であることが分かった。Fbx2 は糖タンパクと結合してユビキチン化することが報告されている。実際, NR1 は Fbx2 と, high mannose タイプの糖鎖依存的に結合してユビキチン化されることを見出した。このことは，NR1 の NTD がいったん lumen 側ないし，細胞外に出た後，再度細胞質側に戻り，ユビキチン化されて分解されるという，「retro-translocation」を受けていることを示している。

さらに興味深いことに，Fbx2 の dominant negative を海馬神経細胞に導入すると, 神経活動依存的に NR1 の免疫染色強度が増加することに加え，細胞表面の NMDA 受容体を介する電流が増加することを見出した。このことから，NR1 の細胞外ドメインを介した Fbx2 によるユビキチン化が，機能的な NMDA 受容体の数を減らす役割を果たしているのではないかと考えている。

（6）シナプス形成におけるネクチンの役割

匂坂　敏朗（大阪大学大学院医学系研究科　生化学　分子生物学）

神経シナプスはニューロン間の特殊な細胞間接着であり，その特異性と可塑性は細胞間接着分子により制御されている。その形は，海馬 CA3 領域において，神経伝達の場 (synaptic junction (SJ)) を中心に，その周りをシナプスの機械的な接着 (puncta adherentia junction (PAJ)) が取り囲むという同心円状の形をしている。PAJ は，上皮の細胞間接着と同様に，前，後シナプス膜が対称的な形態を保っており, 細胞間接着分子が集積している。この PAJ には，イムノグロブリン系細胞間接着分子であるネクチン-1 が前シナプス膜にネクチン-3 が後シナプス膜に非対称性に局在している。また，ネクチンの結合タンパク質であるアファディンと N-カドヘリンは対称性に PAJ に

局在している。そこで，PAJ におけるネクチンの機能を調べるために，ネクチン-1 とネクチン-3 のノックアウトマウスを作成した。両方の変異マウスにおいて，PAJ の数が減少していた。さらに，苔状線維の走行異常が認められた。これらの結果から，ネクチンは PAJ の形成に関与していて，またそれにより苔状線維の走行を維持していることが考えられた。

（7）神経シナプス・アクティブゾーンにおけるリン酸化プロテオーム

大塚　稔久（富山大学医学部　臨床分子病態学講座）

神経伝達物質を含有したシナプス小胞は，活動電位による刺激によりカルシウムイオンが流入すると，プレシナプスの形質膜と融合し神経伝達物質をシナプス間隙に放出する。この一連のステップは，特異的な場であるアクティブゾーンにおいて厳密に制御されている。

アクティブゾーンを構成する蛋白質群としては Bassoon, Piccolo，RIM，Munc13-1，および私共が見いだした CAST および ELKS が知られている。なかでも，CAST/ELKS ファミリーは，他のアクティブゾーン蛋白質と相互作用することにより，アクティブゾーンにおいて 巨大な蛋白質複合体を形成している。さらに，この複合体は静的なものではなく，非常にダイナミックで，神経伝達物質の放出においても重要な役割を担っている。

私共は，最近，神経終末においてユニークな局在を示すセリンスレオニンキナーゼを同定した（SAD キナーゼ）。本セッショントークでは，この SAD キナーゼの機能解析のデータを中心に紹介し，アクティブゾーン形成とその機能発現におけるリン酸化シグナル伝達機構の役割について議論したい。

（8）ショウジョウバエ嗅覚地図の構築における Notch コードの役割

遠藤　啓太（理化学研究所　発生・再生科学総合研究センター　神経回路発生研究チーム）

キイロショウジョウバエの嗅覚神経系では，脊椎動物の嗅覚神経系同様，特定の嗅覚受容体を発現する嗅覚神経細胞が脳内の一次嗅覚中枢である嗅覚葉（脊椎動物の嗅球に相当)の特定の糸球体へ軸索を投射している。我々は，この特異的な軸索投射に関わる遺伝子の同定を目的とし，嗅覚神経細胞の軸索投射に異常を示す突然変異のスクリーニングを行った結果，Notch タンパクが下流の遺伝子を活性化する際に必要な核内因子をコードする *mastermind* 遺伝子の変異を分離した。

この変異をもつ嗅覚神経細胞は一部の特定の糸球体へのみ軸索を投射し，反対に，Notch シグナルに対して抑制的に働く *numb* 遺伝子の変異をもつ嗅覚神経細胞は，これとは相補的な糸球体へのみ軸索を投射する。また，これらの変異をもつ嗅覚神経細胞は，それぞれ特定の，かつ，相補的なセットの嗅覚受容体のみを発現する。したがって，嗅覚神経細胞の発生運命が Notch シグナルの ON/OFF によって大きく二分され，その運命に従って軸索投射の特異性が制御されていることが明らかになった。

Notch ON/OFF それぞれの発生運命をもつ嗅覚神経細胞が軸索を投射する領域は嗅覚葉内で大きく分かれている。また，それぞれの領域は投射する軸索の走行パターンに基づいて更に複数のドメインへと分けることができる。したがって，Notch ON/OFF に従った軸索投射機構が，嗅覚神経細胞のもつ他の遺伝情報と組合わさることによって嗅覚神経系全体の回路構築に寄与していることが示唆された。

（9）神経伝達物質放出量の制御機構の一考察

高森　茂雄（東京医科歯科大学大学院　医歯学総合研究科　脳神経病態学）

グルタミン酸は哺乳類神経系の主要な興奮性神経伝達物質である。ニューロンがグルタミン酸を放出するためには，神経終末の細胞質に存在するグルタミン酸がシナプス小胞内に輸送される必要がある。この重要な過程を担う膜蛋白質が小胞型グルタミン酸トランスポーター(VGLUT)である。2000 年の VGLUT1 の同定を契機に，現在までに，3 つの VGLUT イソ型が同定され，VGLUT を分子指標とした脳内のグルタミン酸神経回路が刻々と明らかになってきた。興味深いことに，哺乳類脳内では，VGLUT1 と VGLUT2 が相補的な分布を示す。また，VGLUT3 は，これまでグルタミン酸作動性ニューロンとは考えられていなかったニューロンに発現しており，その生理学的な意味は謎である。更に最近になって，統合失調患者や虚血モデル動物などで，脳部位特異的な VGLUT イソ型発現量の変化が誘起されることが報告され，VGLUT 発現量に伴うシナプス伝達強度の変化の生理学的な意義や病態への関与などが示唆されている。今回は, VGLUT 分子同定の経緯を概説すると共に, VGLUT に着目したグルタミン酸神経回路の分子多様性・VGLUT のシナプス伝達強度への影響など，最近の知見を交えて総括的に紹介する。

（10）NR2B リン酸化残基改変マウスの情動異常の解析

デラワリ　ミナ（東大医科学研究所　癌細胞シグナル研究分野）

（11）Rab3 GAP によるシナプス伝達と可塑性の制御

坂根亜由子（徳島大　ヘルスバイオサイエンス　分子病態学）

（12）Translocation of drebrin and F-actin from dendritic spines to shafts was regulated by myosin II ATPase activity

水井利幸（群馬大学医学系研究科　高次細胞機能学）

（13）ATP 受容体チャネル P2X2の膜電位と ATP に依存した"ゲート"機構の解析

藤原祐一郎（自然科学研究機構　生理学研究所　神経機能素子研究部門）

（14）Quantitative analysis of GABAA receptor subunits expressed in hippocampal CA1 pyramidal cells by SDS-digested freeze-fracture replica labeling (SDS-FRL)

春日井　雄（自然科学研究機構　生理学研究所　脳形態解析部門）

（15）Quantitative analysis of AMPA and NMDA receptors in the retino- and cortico-geniculate synapses as revealed by SDS-digested freeze-fracture replica labeling (SDS-FRL)

足澤悦子（自然科学研究機構　生理学研究所　脳形態解析部門）

（16）突起形態における樹状突起局在性転写コアクチベーターMAL の役割

田渕明子（富山大学薬学部・分子神経生物学研究室）

（17）新しい分泌性シナプス機能修飾因子セレブリンファミリーの解析

飯島崇利（慶應義塾大学　医学部　生理学）

15. 大脳皮質機能単位の神経機構

2005 年 10 月 20 日－10 月 21 日

代表・世話人：姜　英男（大阪大学・大学院歯学研究科）
所内対応者：川口泰雄（大脳神経回路論研究部門）

（1）大脳皮質の自発活動　－常同性と活動予測性とグラフパターン－

池谷裕二（東京大学・大学院薬学系研究科）

（2）大脳皮質局所回路における層依存的同期特性

坪　泰宏（理化学研究所・脳科学総合研究センター・脳回路機能理論研究チーム）

（3）大脳皮質 GABA ニューロンが形成するギャップ結合性ネットワークの 3 次元的広がり

福田孝一（九州大学・大学院医学研究科・神経形態学）

（4）発達期海馬における，カンナビノイド受容体によるアンチ・ヘッブシナプス

安田浩樹（大阪大学・大学院医学系研究科・神経生理学）

（5）神経オシレーションによる大脳皮質間機能連絡の強化

吉村　弘（金沢医科大学・顎口腔機能病態学）

（6）線条体の行動価値表現と大脳基底核の強化学習モデル

鮫島和行（玉川大学・学術研究所・脳科学研究施設）

【参加者名】

福田孝一（九州大学院・医），姜　英男（大阪大学院・歯），安田浩樹（大阪大学院・医），宋文杰（大阪大学院・工），金子武嗣，加藤伸郎，藤山文乃，日置寛之，大平耕司，中村公一，倉本恵梨子，田中康代，田中琢真，越水義登，雲財知，亀田浩司（京都大学院・医），青柳富誌生，野村真樹（京都大学院・情報），北野勝則（立命館大学・情報理工），吉村弘（金沢医科大学），吉村由美子（名古屋大学・環境医学研），福田敦夫（浜松医科大学・医），池谷裕二（東京大学院・薬），森田賢治（東京大学・生産技術研究所），山下晶子（日本大学・医），小島久幸（東京医科歯科大），鮫島和行（玉川大学・学術研究所），端川勉，深井朋樹，一戸紀孝，坪泰宏（理化学研究所），南部篤，伊藤南，川口泰雄，窪田芳之，大塚岳（生理学研究所）

【概要】

平成 17 年 10 月 20～21 日に 6 人の演者による講演と議論を行なった。「大脳皮質の自発活動－常同性と活動予測性とグラフパターン－」池谷裕二氏は，カルシウムイメージング法を用いて皮質切片標本から大規模な神経活動記録を行い，自発活動の時空構造に特定の繰り返し配列が多数含まれていることを明らかにし，その配列から神経活動が予測できることを示した。「大脳皮質局所回路における層依存的同期特性」坪泰宏氏は，錐体細胞における位相応答曲線を調べ，ラット運動野では 2/3 層と 5 層錐体細胞では，それぞれ，二相性及び単相性の異なる位相応答を示すことを明らかにし，さらに二相性応答を示す細胞間に同期化が生じうる可能性をシミュレーションにより示した。「大脳皮質 GABA ニューロンが形成するギャップ結合性ネットワークの 3 次元的広がり」福田孝一氏は，大脳皮質の parvalbumin 陽性非錐体細胞は，他の 60 個もの同種の細胞とギャップ結合している事を示した。「発達期海馬における，カンナビノイド受容体によるアンチ・ヘッブシナプス」安田浩樹氏は，幼若な海馬で，興奮性入力が活動依存的に活動性の低い興奮性シナプスを抑圧する異シナプス性長期抑圧に，カンナビノイド受容体が関与する事を示した。「神経オシレーションによる大脳皮質間機能連絡の強化」吉村 弘氏は，カフェイン投与により，スライス標本一次視覚野に発生したオシレーションが二次視覚野，脳梁膨大後野へと伝播すると，同領域を発信源とする 8-10Hz のオシレーションが引き起こされ，その結果，入力信号の強化が生じるこ

とを明らかにし，オシレーションが機能的連絡を強化するという仮説を提唱した。「線条体の行動価値表現と大脳基底核の強化学習モデル」鮫島和行氏は，サルに選択肢課題をさせ，大脳皮質から線条体ではこれから選択する行動の価値を表現し，それに基づいた行動選択が大脳基底核の出力核群において行われるという強化学習モデルを報告した。個々の講演において，白熱した討論が 30 分以上おこなわれ，学会等では出来ない深い議論が行なわれた。

（1）大脳皮質の自発活動　ー常同性と活動予測性とグラフパターンー

池谷裕二（東京大学・大学院薬学系研究科）

脳は外部情報が与えられなくても自発的に活動している。従来こうした外界から孤立した神経細胞の活動は無用なノイズとして解釈されてきたが，近年我々は，自発活動には偶発レベルを越えた秩序が潜んでいることを明らかにした。カルシウムイメージング法を用いて皮質切片標本から大規模な神経活動記録を行い，自発活動のパターンを数理解析したところ，その時空構造には特定の繰り返し配列（シークエンス）が多数含まれていることが判明した。幾多の方法でデータをシャッフルすると，いずれの場合もシークエンス数が有意に減少することから，シークエンスの存在は偶発的な帰結では説明できないと考えられる。シークエンスを形成する神経活動は，古典的なホップフィールド回路とマカロック・ピッツモデルを組み合わせると，高い正確性をもって予測できることがわかった。さらに，現在進行中の研究ではあるが，視床を刺激すると流動的だった自発活動が特定ノイズパターンに固定されることから，外部入力は，皮質応答を誘発するのではなく，遷移する内部状態から特定の「相」を選択する役割を演じていると解釈される。つまり，静的な受動システムではなく，内発的に情報を生み出す「自発創生システム」として大脳皮質を捉えなおす必要がある。

（2）大脳皮質局所回路における層依存的同期特性

坪　泰宏（理化学研究所・脳科学総合研究センター・脳回路機能理論研究チーム）

大脳皮質には特徴的な層構造がみられ，各層を構成する神経細胞の投射先，形態，電気的性質などが層により異なることが様々な研究からわかってきた。さらにこの層構造をもつ局所回路がどのように機能しているのかを知るためには，構成要素である神経細胞の相互作用特性を調べることが必要である。そこで我々は，相互作用の基本的性質を表現する「位相応答」と呼ばれる性質を，大脳皮質の構成要素の大半である錐体細胞に対して調べた。位相応答を調べる方法は 2 通り知られている。発火モデルを構築しこのモデルに対して位相縮約を用いる間接的方法と，神経細胞から実験により直接位相応答を記録する直接的方法である。本研究では，近年有効であることが実験的に示されてきている直接的方法を用いた。結果として，ラット運動野では II/III 層の錐体細胞の多くは同期傾向が強いが，V 層の錐体細胞の多くは同期傾向が弱いことがわかった。この細胞特性が局所回路においてどのような機能的役割を果たすのかについても，少し言及したい。

（3）大脳皮質 GABA ニューロンが形成するギャップ結合性ネットワークの3次元的広がり

福田孝一（九州大学大学院・医学研究科・神経形態学）

大脳皮質の GABA ニューロンが相互にギャップ結合を形成していることが近年明らかにされた。しかし従来の電子顕微鏡的研究ではギャップ結合の存在を局所的に示すことしかできず，大脳皮質構築におけるその 3 次元的な分布を知ることは困難であった。最近私は技術的問題の改良により，ギャップ結合の空間的分布の検討を可能とした。ネコ視覚皮質において，一個のパルブアルブミン(PV)陽性 GABA ニューロンが平均 60 個ものギャップ結合を他の PV ニューロンと形成し，樹状突起に沿った結合部位の分布は生理学的な予想を大きく越えた広がりを示し（細胞体から 380 ミクロンまで），ギャップ結合による連鎖は皮質内を側方にどこまでも続いていくと思われること，さらに PV ニューロンの大きな樹状突起野が，光学的に記録した方位選択性カラムには束縛されない大きな重なりを示すことを明らかにした。これらの事実は，リズムと同期性の実現に関連しうる構造が，大脳皮質の中に驚くほどの密度と広がりを持って初めから用意されていることを示唆する。

（4）発達期海馬における，カンナビノイド受容体によるアンチ・ヘッブシナプス

安田浩樹（大阪大学・大学院医学系研究科・神経生理学）

活動に応じてシナプス伝達を強化するヘッブシナプスは，海馬における学習・記憶の形成，活動依存的な神経回路の再構築に関与すると考えられている。ただ，幼若な神経組織においては抑制系の発達が乏しく，大きな興奮性増加を伴う可塑的変化は病的興奮を起こす可能性がある。幼若海馬には成熟期とは異なり，PKA によって生じる，比較的小さな長期増強が生じることを報告した(Yasuda et al. 2003)。一方，幼若な海馬では，興奮性入力が活動依存的に興奮性シナプス自身を抑圧するメカニズムが発達しており，長期増強に伴って，高頻度刺激を受けないシナプスに異シナプス性長期抑圧が生じた。活動の低いシナプスを抑圧して活動の高いシナプスを相対的に増強することにより，小さな長期増強を補完するメカニズムであると考えられる。この異シナプス性長期抑圧は①若いほど程度が大きく，②生後数週間にわたって観察され，発達とともに消失する。③カンナビノイド受容体が関与していて，④細胞内だけではなく，細胞間に広がっている可能性がある。

（5）神経オシレーションによる大脳皮質間機能連絡の強化

吉村　弘（金沢医科大学・顎口腔機能病態学）

大脳皮質における神経オシレーション活動の，皮質間信号伝播への影響を調べた。中枢神経賦活剤であるカフェインが，脳スライスに含まれる神経回路の機能を効果的に増幅することがわかってきた。このカフェインをラット視覚野スライスに適用し，光学的計測法を用いて，一次視覚野の白質刺激によって引き起こされる神経活動の振る舞いを動的に観察した。一次視覚野に発生した信号は，二次視覚野さらに脳梁膨大後野へと伝播し，二次視覚野浅層および脳梁膨大後野深層を発信源とする 8-10Hz のオシレーションを引き起こした。それぞれの振動源から NMDA 受容体の活動に依存する振動性信号が配信され，この振動性活動は，一次視覚野から二次視覚野を経て脳梁膨大後野へと向かう non-NMDA 受容体依存性の入力信号を強化する役割を担っていた。これらの実験結果から，ある間隔で局在する振動装置が大脳新皮質－大脳辺縁系間における機能的連絡を強化する，という仮説が導き出された。

（6）線条体の行動価値表現と大脳基底核の強化学習モデル

鮫島和行（玉川大学・学術研究所・脳科学研究施設）

これからすることを決定するとき，その結果の良さを評価することは重要になる。大脳基底核は運動や報酬に関わることがこれまで示唆されてきたが，報酬の情報が意志決定にどのように関わるのかは，まだわかっていない。我々は意志決定時の大脳基底核の機能を調べるために，サルに各行動に割り付けられた報酬の確率に基づいて二つの選択肢から一つを選ぶ課題を訓練し，線条体から細胞外電気記録を行った。選択行動直前の線条体投射細胞の活動のうち 2/3 がある 1 つの行動選択に対する報酬予測（行動価値）を表現し，より少ない細胞で相対的な価値，もしくは行動選択そのものを表現していた。この結果は，大脳皮質から大脳基底核の入力部である線条体ではこれから選択する行動の価値を表現し，それに基づいた行動選択が大脳基底核の出力核群において行われ，行動の結果得られる報酬によって行動価値が更新される，という強化学習モデルを示唆する。

16. シナプス伝達の細胞分子調節機構

2005 年 12 月 8 日－12 月 9 日

代表：岡部繁男（東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科）
所内対応者：伊佐正（生理学研究所・認知行動発達機構）

（1）トモシン-PKA による神経伝達物質放出の制御

匂坂敏朗[1]，持田澄子[2]，高井義美[1]
（大阪大学大学院・医学研究科・生化学分子生物学講座[1]，東京医科大学・生理学第一講座[2]）

（2）網膜リボンシナプスにおけるエクソサイトーシスの時空間分布

緑川光春，立花政夫（東京大学大学院人文社会系研究科・心理学教室）

（3）Calyx of Held シナプスにおける伝達効率飽和のメカニズム

山下貴之，上田壮志，谷真紀，高橋智幸（東京大学大学院医学系研究科・神経生理学研究室）

（4）クラミドモナス光感受性チャネルを用いた神経細胞光刺激法の開発

八尾寛，石塚徹，荒木力太（東北大学（院）生命科学研究科・脳機能解析分野）

（5）視覚野における興奮性および抑制性神経結合特異性の解析

吉村由美子（名古屋大学・環境医学研究所・視覚神経科学分野）

（6）iv マウス海馬神経回路における左右差の消失

川上良介[1,2]，伊藤功[2]（生理学研究所脳形態解析研究部門[1]・九州大学理学研究院生物科学部門[2]）

（7）褐色脂肪細胞でのミトコンドリアと滑面小胞体間の両方向性 Ca^{2+} カップリングと Ca^{2+} 流入の多面性制御機構

日暮陽子，久場雅子，須崎尚，久場健司（名古屋学芸大学・管理栄養学部解剖生理）

（8）定量的単一細胞 RT マルチプレックス PCR 法による急性スライス標本のラット海馬神経細胞の解析

都筑馨介，塚田昌大，小澤瀞司（群馬大学大学院医学系研究科・神経生理分野）

（9）液体打撃実験モデルラット脳海馬 CA1 ニューロンにおける過興奮

蓮尾博[1]，大場（古賀）さとみ[1,2]，村岡範裕[2]，赤須崇[1]
（久留米大学医学部生理学・統合自律機能部門[1]，脳神経外科学[2]）

(10) 小脳長期抑圧におけるグルタミン酸受容体デルタ 2 サブユニットのはたらき

矢和多智，平野丈夫（京都大学大学院・理学研究科・生物物理学教室）

(11) NMDA 受容体複合体のリン酸化による機能調節

中澤敬信，山本雅（東京大学医科学研究所・癌細胞シグナル研究分野）

(12) シナプス後部蛋白質の絶対数の定量

岡部繁男，杉山佳子（東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科）

(13) 内因性カンナビノイドによる線条体抑制性シナプスの伝達調節

鳴島円[1]，内ヶ島基政[2]，松井稔[3]，真鍋俊也[3]，渡辺雅彦[2]，狩野方伸[1,4]
([1]金沢大学大学院・医学研究科・シナプス発達・機能学,
[2]北海道大学大学院・医科学研究科・解剖発生学分野,
[3]東京大学・医科学研究所・基礎医科学・神経ネットワーク分野,
[4]大阪大学大学院・医科学研究科・細胞神経科学)

(14) 代謝調節型受容体を介した淡蒼球ニューロン活動の制御機構

金田勝幸[1,2]，喜多均[1]
([1]Department of Anatomy and Neurobiology, University of Tennessee, Memphis,
[2]生理学研究所・認知行動発達機構研究部門)

（15）前脳基底核シナプス伝達の生後発達変化

籾山俊彦（生理学研究所・脳形態解析部門）

【参加者名】

都筑馨介，齋藤康彦，高鶴裕介（群馬大・医），平野丈夫，田川義晃，川口真也，矢和多智，大槻元，関優子，鶴野瞬，北川雄一，水野秀信，宮脇寛行，畔柳智明（京大・理），八尾寛（東北院・生命科学），持田澄子（東京医科大），岡部繁男，栗生俊彦，佐藤映美，西田秀子，申義庚，川端いづみ，中澤敬信（東京医科歯科大），小松由紀夫，黒谷亨，吉村由美子，高田直樹，稲垣壮，任鳴，稲葉三枝，舟橋梨江（名大・環境），立花政夫，緑川光春（東大・院人社），高橋智幸，齋藤直人，堀哲也，鈴木大介，中村行宏，山下貴之，渡邊博康，金子雅博，山下慈郎，上田壮志，大島知子，松山恭子，コウ・アイディ（東大・医），匂坂敏朗（阪大院・医），成田和彦（川崎医科大），久場健司，久場雅子，日暮陽子（名古屋学芸大），神谷温之（北大・医），真鍋俊也，関野祐子，海津正賢（東大・医科研），伊藤功，川上良介，（九州大・理），蓮尾博（久留米大・医），早戸亮太郎（九州工・生命体），狩野方伸（大阪大・医），鳴島円（金沢大・医），重本隆一，川口泰雄，籾山俊彦，岸本卓哉，前島隆司，橘吉寿，北村明彦，西巻拓也，畠山裕康，和田浩之，足澤悦子，堀部尚子，伊佐正，金田勝幸（生理研）

【概要】

平成 17 年 12 月 8-9 日の 2 日間にわたり自然科学研究機構・岡崎カンファレンスセンターにおいて「シナプス伝達の細胞分子調節機構」に関する研究会を開催した。この研究会は平成 9 年から毎年開かれており，今回は約 60 名が参加し，15 の演題が発表された。プレシナプスにおける伝達物質放出機構，シナプス後部での情報伝達メカニズム，大脳・海馬の局所神経回路構築，大脳基底核のシナプス機能，等に関する新しい実験結果が報告された。伝達物質の放出とその制御については，網膜リボンシナプスでの開口放出の光学的測定，グルタミン酸伝達の飽和に関する発表があった。シナプス後部情報伝達については，NMDA 受容体のチロシンリン酸化と扁桃体でのシナプス可塑性の関連，小脳デルタ 2 受容体に結合し長期抑圧を制御する分子の同定，単一シナプス後部に存在する PSD 足場蛋白質の絶対数の定量に関する発表があった。また局所回路構築に関連して，クラミドモナス光感受性チャネルを利用した新規の神経細胞活性化法，内臓逆位マウスにおける海馬神経回路網の変化が報告された。また大脳基底核での内因性カンナビノイドの役割，代謝型受容体による調節についての発表もあった。この研究会には，分子生物学者，電気生理学者，形態学者が参加しており，様々な観点から活発な討論が交わされ，今後の共同研究の良い契機となった。神経科学会や生理学会においては一般演題がほとんどポスターになり若手の講演の機会が減っているが，本研究会においては若手研究者による発表が多く，かつその発表は良く準備されたものであった。また様々な側面からの質問に対しても的確な回答がなされ，この会に参加する若手研究者の高い能力と広い知識を頼もしく感じた。今後もこの研究会を継続し，若手研究者育成の役割を果たす必要がある事を確認し，来年度以降の計画を立案する事となった。

（1）トモシン-PKA による神経伝達物質放出の制御

匂坂敏朗[1]，持田澄子[2]，高井義美[1]
（[1]阪大院・医・生化学・分子生物学講座，[2]東京医科大学・生理学第一講座）

神経伝達物質の放出において，まずシナプス小胞は，軸索輸送によりシナプス前膜（ターゲットとなる膜）に運ばれる（ターゲッテイング）。シナプス小胞は，アクテイブゾーンにおいて，シナプス前膜の Ca^{2+}チャンネルの近傍にドッキングした状態になり，さらに Ca^{2+}濃度の上昇に応答できる状態に成熟する（プライミング）。Ca^{2+}

が流入した際，Ca^{2+}チャンネル周辺の局所的に上昇したCa^{2+}濃度に依存して，シナプス前膜とシナプス小胞の融合が起こり，シナプス小胞内の神経伝達物質が放出される。これまで，ターゲッテイングにはRab3A系の蛋白質，ドッキングと融合には普遍的膜融合装置を構成するSNARE系の蛋白質，そしてプライミングにはアクテイブゾーン構成蛋白質が関与していることが明らかにされている。これまで，私共は，神経伝達物質の放出にSNARE系の活性制御タンパク質であるトモシンが抑制的に働くことを明らかにしている。トモシンがt-SNAREとトモシン複合体を形成し，小胞融合に必須な7S SNARE複合体の形成を抑制することにより，神経伝達物質の放出を制御している。最近，トモシンがプライミングに関与していることが明らかにされつつある。一方，PKAが，ドッキングとプライミングを制御していることが知られている。ドッキングにおいては，SNAP-25をPKAがリン酸化することにより調節することが知られているが，プライミングにおいてのPKAのリン酸化基質は，未だ同定されていない。PKAによるトモシンの活性調節を検討したところ，PKAがトモシンをリン酸化することにより，シンタキシン-1との結合親和性が減弱した。このPKAによるトモシンのリン酸化により，培養ラット上頸交感神経におけるアセチルコリンの分泌が制御されていることが判明した。また，このトモシン− PKA系は，ペプチドホルモンである下垂体アデニルシクラ− ゼ活性化ポリペプチド(PACAP)によるアセチルコリンの分泌調節に関与していた。以上の結果から，トモシンはPKAにより活性調節を受けることにより，SNARE系を介して神経伝達物質放出を制御していると考えられた。

（2）網膜リボンシナプスにおけるエクソサイトーシスの時空間分布

緑川光春，立花政夫（東大・院人社・心理）

キンギョ網膜双極細胞の軸索終末部には，シナプスリボンと呼ばれる微細構造があり，その周囲には多数のシナプス小胞が係留されている。シナプスリボン直下の細胞膜にCa^{2+}チャネルが局在し，エクソサイトーシスはこの部位に限局して生じると考えられている。双極細胞のエクソサイトーシスには，即時に放出されるプールサイズの小さな成分(RRP)とCa^{2+}緩衝剤の影響を受けて放出が遅れるプールサイズの大きな成分(RP)がある。本研究では，シナプスリボン・Ca^{2+}流入部位・開口放出部位の位置関係を特定し，2種類のエクソサイトーシスとの関連を調べた。

形態学的実験は，兵庫医科大学の塚本吉彦教授と共同研究を行い，キンギョ網膜の超薄連続切片を電子顕微鏡で観察して，Mb1型双極細胞の軸索終末部におけるシナプスリボンやシナプス小胞の分布を定量的に解析した。また，薬理学的にRPを増加させる操作を行った場合に，シナプス小胞の分布がどのように変化するのかを調べた。生理学的実験には，キンギョ網膜から単離したMb1型双極細胞を用い，膜電位固定下で，蛍光ラベルしたシナプスリボンの位置，脱分極によって生じるCa^{2+}スポットの位置，蛍光ラベルしたシナプス小胞の開口放出部位を近接場光顕微鏡で観察した。

その結果，形態学的研究から，RRPを構成するシナプス小胞はシナプスリボン近傍の形質膜にドックされているが，RPを構成するシナプス小胞はシナプスリボンから離れた部位にドックされていることが示唆され，また，シナプスリボンが存在しないにもかかわらずシナプス小胞の集積した部位があり，その直下にはPSDやシナプス後細胞の突起が存在することがわかった。近接場光顕微鏡を用いた電気生理的研究から，シナプスリボンの位置はCa2+流入部位（Ca^{2+}スポットの中心）と一致していること，RRPを構成するシナプス小胞はCa^{2+}流入直後に大部分がシナプスリボン近傍で放出されるが，RPを構成するシナプス小胞は，EGTA(5 mM)存在下ではCa^{2+}流入後数百 ms 遅れて，シナプスリボンから離れた部位で放出されることが明らかになった。

以上の結果から，キンギョ網膜のMb1型双極細胞においてはドックしたシナプス小胞とCa^{2+}チャネルの集積部位（シナプスリボンの存在する形質膜近傍）との距離が2 種類のエクソサイトーシスを生じさせる重要な要因であると考えられる。

（3）Calyx of Held シナプスにおける伝達効率飽和のメカニズム

山下貴之，上田壮志，谷真紀，高橋智幸
（東京大学大学院医学系研究科神経生理学研究室）

中枢神経系のシナプスにおいて，伝達物質放出量が増えても後シナプスの応答が増大しない場合がある。これは後シナプス受容体が伝達物質によって飽和していることが原因と考えられているが，メカニズムの詳細は明らかでない。そこで我々は，受容体飽和のメカニズムを幼若（生後 7-8 日）calyx of Held シナプスを用いて検討した。この日齢のシナプスでは，小胞の放出確率を上昇させても神経刺激によって誘発される AMPA 受容体を介する興奮性後シナプス応答(evoked EPSC)の振幅が増大しないことが知られている。

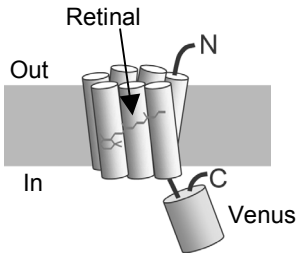
シナプス前末端と後細胞から同時ホールセル記録を行い，前末端に高濃度のグルタミン酸を注入したところ，自発性シナプス電流応答(quantal EPSC)の振幅が増大し，後シナプス AMPA 受容体が単一小胞由来のグルタミン酸によって飽和しないことが示された。一方グルタミン酸注入によって evoked EPSC の振幅は増大しなかった。細胞外 Ca^{2+}/Mg^{2+}濃度比を下げて放出確率を減少させた後に同様の実験を行うと evoked EPSC の増大が観察された。これらの結果は複数の小胞に由来する伝達物質の重複によって受容体が飽和に達することを示唆する。

しかし，この見かけ上の飽和には AMPA 受容体の脱感作が関与している可能性が考えられる。そこで cyclothiazide によって AMPA 受容体脱感作をブロックした後，前末端に高濃度グルタミン酸を注入したところ，正常細胞外液においても evoked EPSC の増大が観察され，見かけ上の飽和は AMPA 受容体の脱感作によることが明らかになった。そこで outside-out patch への急速投与法を用いて AMPA 受容体の脱感作に必要な最低グルタミン酸濃度を検討したところ，1μM 以上のグルタミン酸の持続投与によって AMPA 受容体の脱感作が観察された。この濃度のグルタミン酸が定常的に存在するか否かをテストするために，0 mM Mg^{2+}液下で D-APV を投与すると後シナプス細胞から記録されるノイズレベルの低下が認められた。このノイズの振幅は，シナプス前末端のグルタミン酸を washout しても変化しないことから，シナプス外に由来すると結論された。常在グルタミン酸の濃度について現在検討中である。

（4）クラミドモナス光感受性チャネルを用いた神経細胞光刺激法の開発

八尾寛，石塚徹，荒木力太
（東北大学（院）生命科学研究科・脳機能解析分野）

神経細胞ネットワークの機能は，人為的な刺激入力と，それらの出力情報を解析することで研究されてきた。遺伝子工学的にニューロンに光感受性を導入することにより，分子レベルで同定されたニューロンを高い解像度で刺激できることが期待される。緑藻類の一種のクラミドモナスの眼点に分布する古ロドプシンファミリータンパク質の一つチャネルロドプシン 2(ChR2)は，走光性行動における光受容を担っているが，青色光に応答する陽イオン選択的なイオンチャネル，すなわち，光受容体チャネルであると考えられている（図）。そこで，この分子を用いて神経細胞を光刺激するアイデアを持つに至った。また，この分子を PC12 細胞に発現させた実験系を用いて，光感受性のキネティクスを解析し，光刺激の要件を求めた。



ChR2 のアポタンパク質の C 末 1～315 アミノ酸に蛍光タグ Venus を結合させた cDNA コンストラクトを作成し，PC12 細胞に導入した。パッチクランプホールセル膜電位固定下に，青色発光ダイオード(LED)による光パルス刺激に対する電流応答を解析した。また，

この分子の遺伝情報を組み込んだシンドビスウィルスベクターを作成し，マウス脳定位固定化に vivo の海馬に接種した。海馬スライスを作成し，ChR 発現ニューロンにパッチクランプ法を適用し，電流固定下に青色 LED 光パルス刺激に対するニューロンの膜電位応答を解析した。

ChR2 を発現している PC12 において，膜電位-60 mV 固定のとき，LED 光刺激によりピーク（不活性化成分）とプラトー（非不活性化成分）からなる内向き電流（光電流）が引き起こされた。光の強さに対し，不活性化成分は比例して増大したが，非不活性化成分は飽和する傾向を示した。活性化および不活性化の速度定数は光の強さの 1 次関数に従った。活性化は，不活性化に比べ約 10 倍速く，LED の最大光の時定数が約 2ms だった。光電流は，LED 光をオフにすることで ms オーダーの時定数で回復した。不活性化，非不活性化それぞれの成分の反転電位はほぼ 0mV であり，Na 濃度に依存した。ChR2 を発現させた海馬ニューロンに対し膜電流固定下に LED 光刺激により強さ依存的に脱分極し，活動電位が引き起こされた。光応答の大きなダイナミックレンジ，オン・オフの速さ，繰り返して刺激できること，非特異的陽イオン透過性などの性質から，ChR2 光刺激が興奮性シナプス入力の代替手段になることが示唆された。

（5）視覚野における興奮性および抑制性神経結合特異性の解析

吉村由美子（名古屋大学・環境医学研究所・視覚神経科学分野）

大脳皮質一次視覚野では，視覚刺激の要素的特徴の抽出や，その要素情報の統合が行われ，ものを合目的的にみるための初期段階の情報処理がなされている。このような処理を可能にする神経回路の構造的・機能特性を調べるために，ラット視覚野の前額断切片標本を用い，ケージドグルタミン酸とレーザー光を用いた局所刺激法と２細胞からの同時ホールセル記録法を組み合わせて実験を行った。視覚野 2/3 層内，50μm 以内の近距離にあった 2 個の錐体細胞からペア記録を行った結果，単シナプス性興奮性結合は約 20%のペア間で観察され，残りの 80%ではみられなかった。では 20%の錐体細胞間にある興奮性結合はどのようなルールで形成されているのだろうか？　この問題を検討する目的で，切片標本上の約 500μm（水平方向） x 1350μm（垂直方向）の範囲内の数百ヵ所をグルタミン酸の脱ケージ化により個別に局所刺激し，それにより誘発される EPSC を 2 個の細胞から同時に記録した。この EPSC に相互相関解析を適用し，両ニューロンへの共通入力の割合を調べた。単シナプス性結合が見られた錐体細胞ペアでは，両細胞が 2/3 層内の別の細胞や 4 層から高い割合で興奮性共通入力を受けていたが，直接結合していないペアでは共通入力は稀であった。5 層からの興奮性共通入力，および 2/3 層・4 層からの抑制性共通入力の割合は，錐体細胞間の結合の有無に依存せず，前者が約一割，後者が約二割であった。

抑制性細胞には多数のサブタイプが存在するが，ケージドグルタミン酸による刺激法では，刺激している細胞の種類を同定できない。そこで，抑制性細胞と錐体細胞からペア記録を行い，サブタイプを同定した細胞間で同様の解析を行った。2/3 層の錐体細胞と fast-spiking 細胞（FS 細胞）から同時記録を行い，両細胞間の神経結合を解析した結果, 47%のペアでは FS 細胞が錐体細胞に抑制性入力を与えていたが，そのうち約 3 分の 2 は一方向性結合だった。錐体細胞が FS 細胞に興奮性入力を与えている確率はサンプル全体の 19%だったが，そのほとんどすべてが双方向性に結合しており，非常に高い結合特異性がみられた。この双方向性結合ペアでは，別の 2/3 層錐体細胞および 4 層からの興奮性入力を高い割合（約 20%）で共有していた。5 層からの興奮性入力は，細胞ペア間の結合の有無や種類に関係なく，約一割が共有されていた。一方，2/3 層錐体細胞と発火パタンに adaptation がみられる抑制性細胞（AD 細胞）から同時記録を行った結果，12%のペアでは抑制性結合のみが，9%のペアでは興奮性結合のみが同定され，全体の 4%のペアで双方向性結合が観察された。それぞれのペアにおける共通の興奮性入力は稀で，入力層ごとの解析結果も差がなかった。

以上の結果より，1) 2/3 層内および 4 層から 2/3 層への興奮性結合は，近傍の錐体細胞や FS 細胞からなる特定のニューロン群を選択的に結合することによって従来報告されている機能コラムよりもはるかにファインスケールのサブネットワークを形成し，おそらく特異性の高い情報処理計算を実行していること，また，2) 5 層から

の興奮性入力や AD 細胞由来の抑制性入力は複数のサブネットワークにまたがっており，非特異的あるいは統合的なコントロールをしていること，が示唆された。視覚野内の層構造や機能コラムの中にさらに独立な計算単位となるサブネットワークが埋め込まれており，皮質の局所神経回路がこれまで考えられてきたよりもはるかに精密な機能的ネットワークの組み合わせと，それを統合する回路によって構成されている可能性が考えられる。

（6）iv マウス海馬神経回路における左右差の消失

川上良介[1]，伊藤功[2]（[1]生理学研究所脳形態解析研究部門，[2]九州大学理学研究院生物科学部門）

脳の非対称性は，その高次機能や局在においてこれまで明らかにされてきているが，どのようにして脳の非対称性が形成されるのかについては明らかではない。これまで我々は，マウス海馬神経回路において NMDA 受容体ε2 サブユニットが海馬の左右および錐体細胞の上下に非対称に分布していることを，ε2 サブユニット選択的阻害剤である Ro25-6981 の感受性，シナプスにおけるε2 サブユニットのタンパク量，および NMDA 受容体によって誘導される LTP の生後発達を解析することにより明らかにした。

この発見はげっ歯類においても脳の神経回路は非対称であることを分子レベルから示した発見であった。しかしながら，このような脳の非対称性がいつどのように形成されるかについては明らかでなかった。

そこで我々は，体軸の左右の非対称性に着目した。脊椎動物の体軸の非対称性形成に関しては，内蔵の左右非対称性を指標とした研究があり，その発生初期段階で内蔵の非対称性を形成する分子メカニズムについては明らかにされている。内臓の非対称性を決定する遺伝子に lrd(left-right dynin)があり，この遺伝子に異常をもつ iv マウスは内臓正位と逆位が等比率で生まれてくる系統である。今回この iv マウスの海馬神経回路はどのようになっているのかを明らかにすることを目的とし，電気生理学的手法を用いて Ro25-6981 の感受性および LTP の生後発達を指標として解析を行った。その結果，これまでの研究で示した海馬の NMDA EPSC に対する Ro の効果と同様に，control のマウス(iv(+/-))ではどのシナプスにおいても有為差はみられなかったが，海馬交連切断による同側入力シナプスの解析では非対称性が観られた。しかしながら，iv マウスの海馬は内蔵の位置に関わりなく，頂上樹上突起と基底樹上突起の間で有為差がみられ，海馬交連切断マウスにおいても同様であった。これらの結果は，iv マウスにおいては脳の非対称性の形成が乱れており，またその乱れは内蔵の位置とは無関係であることが示唆された。次に，iv マウスの海馬 LTP の生後発達を錐体細胞の上下で比較解析した。その結果，アダルトマウスの海馬では頂上樹上突起と基底樹上突起での LTP は十分な大きさで誘導され，またその大きさに差は観られなかった。しかしながら，低週齢の LTP はアダルトマウスと比べ，基底樹上突起では高く，頂上樹上突起では低く抑えられていることが明らかになった。

これまでの結果は，iv マウス海馬神経回路は，内臓位置とは関係なく海馬の左右非対称性が失われていることを示している。このことから，神経回路の非対称性形成機構は少なくとも内臓の非対称形成機構とは異なることが示唆される。

（7）褐色脂肪細胞でのミトコンドリアと滑面小胞体間の両方向性 Ca^{2+} カップリングと Ca^{2+} 流入の多面性制御機構

日暮陽子，久場雅子，須崎尚，久場健司
（名古屋学芸大学管理栄養学部解剖生理）

熱産生器官である褐色脂肪細胞は，交感神経線維の支配を密に受け，β_3 受容体の活性化を介して，脂質のβ酸化からミトコンドリアでの電子伝達の促進と同時に，脱共役蛋白 (UCP) を活性化し，ミトコンドリアの膜電位の

減少を減少し，ATP を合成することなく熱を発生する。一方，α_1 受容体の活性化は，IP_3 による Ca^{2+}遊離と容量性 Ca^{2+}流入により細胞内 Ca^{2+}濃度($[Ca^{2+}]_i$)を一過性に上昇する。昨年度の研究会で，1)β_3 受容体の活性化によるミトコンドリアからの Ca^{2+}遊離により滑面小胞体からの Ca^{2+}遊離が起こり，これにより容量性 Ca^{2+}流入が活性化されること，2)滑面小胞体からの Ca^{2+}遊離によりミトコンドリアからの Ca^{2+}遊離が起こること，3)更なる滑面小胞体からの Ca^{2+}遊離刺激は容量性 Ca^{2+}流入を抑制することを示した。今回は，このミトコンドリアと滑面小胞体間の両方向性 Ca^{2+}カップリングの特性とミトコンドリアによる新しい Ca^{2+}流入の制御機構について報告する。

培養したラット褐色脂肪細胞に Ca^{2+}イメージング法と蛍光によるミトコンドリア膜電位測定法を応用した。ミトコンドリアの脱共役剤である FCCP の投与により，3 相性の$[Ca^{2+}]_i$ 上昇が起こり，第 1 相はミトコンドリアの膜電位減少を伴い，第 2 相と第 3 相は外液の Ca^{2+}除去により消失し，外液の pH の上昇により顕著に促進されるが，Na^+除去では影響されない。従って，第 2 相と第 3 相は細胞外からの Ca^{2+}流入により発生し，この Ca^{2+}流入による$[Ca^{2+}]_i$ 上昇は細胞膜の Ca^{2+}ポンプの活動により処理されることが解った。第 3 相は昨年報告したとおり容量性 Ca^{2+}流入によるが，第 2 相はミトコンドリア膜電位変化と第 3 相の発生に密接に関係する。すなわち，第 2 相の立ち上がりはミトコンドリア膜電位の再分極相に一致し，第 3 相が発生するとその発生は抑制される。ミトコンドリアから滑面小胞体へのカップリングと滑面小胞体からミトコンドリアへのカップリングは，細胞によりかなり異なることが解った。FCCP による$[Ca^{2+}]_i$ 上昇の第 3 相中の発生が，一群の細胞では発生しない。さらに，サプシガーギンによる容量性 Ca^{2+}流入の活性化中での FCCP による$[Ca^{2+}]_i$ の変化は，細胞により大きく異なり，サプシガーギン投与前より$[Ca^{2+}]_i$ 上昇が大きくなるもの，逆に小さくなるもの，あるいは，消失するものが見られた。

以上の結果は，ミトコンドリアと滑面小胞体が機能的に両方向性に連関し，2 種の細胞膜での Ca^{2+}流入機構を 2 面性に制御し，この制御機構が細胞の異なる条件下で，多様に変化し，ノルアドレナリンのα_1 作用とβ_3 作用を介して，ATP の生成とエネルギー散逸のバランスを巧妙に制御することが示唆される。

（8）定量的単一細胞 RT-マルチプレックス PCR 法による急性スライス標本のラット海馬神経細胞の解析

都筑馨介，塚田昌大，小澤瀞司（群馬大学大学院医学系研究科・神経生理分野）

中枢神経系では, 機能分子が異なった目的に使われている。AMPA 型グルタミン酸受容体のサブユニット GluR2 を例にとれば, そのノックアウトマウスは正常に誕生するが，空間学習の障害，パブロフ型刺激報酬学習障害といった記憶学習の障害が見られるばかりでなく，雄マウスの性行動の減少といった行動の異常が見られる。GluR2 を構成要素に持つ AMPA 受容体に阻害作用を示すバルビタールの作用は，GluR2 のノックアウトマウスでは弱いことが予想されたが，実際は逆で，麻酔にかかり易い。その理由は，抑制性ニューロンに対する抑制がおこりにくいためであると説明されている。このように，素子として働くひとつひとつの機能分子が様々なニューロンのネットワーク上の演算に影響を与えた結果として，個体レベルでの機能変化は生じる。したがって，ひとつひとつの機能分子の役割は，どの細胞において発現し，また，その分子がどれだけの重みを持って働いているかという文脈の中で論じられなければならない。以前私たちは，ラット大脳皮質体性感覚野の急性スライス標本より，ホールセルパッチクランプ法によってその細胞の発火特性を調べたのち，細胞質 mRNA をパッチ電極内に回収し，逆転写反応後，マルチプレックス PCR を行って，mRNA の発現プロファイルを調べ報告した。錐体細胞は相互に類似性が高いのに対し，紡錘形をした介在ニューロンは多様性が高く，これを 3 つのグループに分類した。しかし，同一細胞種に属するニューロンの分子的多様性については明らかになっていない。本研究では細胞種の分類が詳細になされているラット海馬を用い，急性スライス標本において 4 種類の細胞（CA1 錐体細胞，CA3 錐体細胞，歯状回顆粒細胞，介在ニューロン）における 32 種類の遺伝子の発現プロファイルを調べた。

【方法】生後 15-20 日齢のラット海馬より急性スライス標本を作製し，電気生理学記録を行ったのち細胞質をパッチ電極内に回収し，直ちに 400 分子の AMPA 受容体サブユニット GluR2 に対する内部標準物質 RNA を加え，ランダムプライマーを用いて逆転写を行った。小胞型グルタミン酸トランスポーター(VGluT1，VGluT2)，グルタミン酸脱炭酸酵素(GAD65，GAD67)，カルシウム結合タンパク質，神経ペプチドなど，32 種類の遺伝子を増幅するプライマーを混合したプライマーカクテルにより，25 サイクルの PCR を行って第一段の増幅を行った後，単一遺伝子を増幅する第二段の PCR を行い，個々の遺伝子の発現を調べた。

【結果】パッチクランプ法によって細胞質を回収した 73 個の細胞において，平均して 8.7 種類の遺伝子が検出された。検出された遺伝子の数は 4 種類の細胞間で有意差がなかった。細胞種に特徴的に検出される mRNA も存在したが，多くの mRNA は細胞種が違うことによって検出される確率が異なるという確率的分布パターンを示した。遺伝子の検出確率から$\chi 2$ 乗検定によって 4 種類の細胞の発現プロファイルの違いを調べたところ，CA1 ならびに CA3 錐体細胞と介在ニューロンの差異が最も大きく，次いで歯状回顆粒細胞と介在ニューロン，CA1 錐体細胞ならびに CA3 介在ニューロンと顆粒細胞の順であった。CA1 錐体細胞と CA3 錐体細胞の差異は小さく，調べたすべての遺伝子において同一細胞種内での検出確率のばらつきのレンジ内にあった。発現した遺伝子相互の相関は，GAD65 と GAD67 に高い相関が見られた。VGluT1 と GAD65 および GAD67 の間に高い逆相関が見られたが，VGluT1 と VGluT2 の間には相関性は見られなかった。一方，NMDA 受容体サブユニット NR2D と AMPA 受容体サブユニット GluR4 は GAD65 および GAD67 と高い相関を示した。

（9）液体打撃実験モデルラット脳海馬 CA1ニューロンにおける過興奮

蓮尾博[1]，大場（古賀）さとみ[1,2]，村岡範裕[2]，赤須崇[1]
（久留米大学医学部生理学・統合自律機能部門[1]，脳神経外科学[2]）

頭部外傷後の記憶，認知障害，てんかんなどの機序の一つに海馬の損傷が想定されているが，それが引き起こされる機序についてはまだ不明の点が多い。今回我々は，中等度の実験的頭部外傷後の海馬 CA1 領域の神経活動について膜電位感受性色素(RH482)を用いた光学的測定法(Fuji HR Deltaron 1700 system)と電気生理学的記録法を応用して検討した。頭部外傷は，液体打撃装置(Dragonfly HPD-1700)を用いて，ペントバルビタール麻酔下に，中等度圧（4.2 気圧）の打撃を左側頭頂骨に空けた直径約 3mm の開窓部を介して 1 回与えた。外傷後 1 週間の Wistar 系 rat(250-300 g)から海馬水平断スライス標本（厚さ 400 μm）を作製し，CA1 領域で Schaffer 側枝の電気刺激（10, 20, 30, 40, 50 V の 5 段階の刺激強度）による光学的応答を記録した。光学的応答にはテトロドトキシンに感受性のある時間経過の早い応答(fast peak)と興奮性アミノ酸受容体アンタゴニストに感受性のある時間経過の遅い応答(slow peak)が認められた。これらの応答をコントロール群（Sham 群）と外傷群で比較した結果，外傷群では Sham 群に比較して傷害側（左側）および反対側（右側）を問わず光学的応答の増強を認めた。その増強の程度は 30V 刺激の場合 fast peak で約 60%，slow peak で約 100% の増強であった。次に外傷後過興奮を指標として，外傷後比較的早期（早期投与群：30 分と 90 分の 2 回）とそれより遅れて（遅延投与群：240 分と 300 分の 2 回）ジアゼパム(10 mg/kg)を腹腔内投与したそれぞれの群における光学的応答を比較検討した。この時，ジアゼパム投与により引き起こされる体温下降による影響を少なくするためにヒートパッドをラット体下部に敷いて体温をコントロールした。この結果，ジアゼパム早期投与群では sham 群と同等の応答を，また遅延投与群では外傷群と同等の応答を示した。

以上の結果より，外傷後 1 週間における海馬 CA1 領域の神経活動が促進されていること（外傷後過興奮）が確認された。また，この外傷後過興奮が早期に腹腔内投与されたジアゼパムにより抑制され，外傷後遅延投与では抑制されないことからジアゼパムの過興奮抑制効果を得るには，早期投与が必要なことが示唆された。外傷後の障害発生機序としては早期にグルタミン酸や GABA の

放出が数倍に増加することが報告されており，我々が作製した外傷モデルにおいても外傷 7 日後にみられるグルタミン酸作動性シナプスの過興奮がグルタミン酸過剰に関与していること，また頭部外傷後早期のジアゼパム投与はグルタミン酸過剰による障害を軽減していることが示唆された。

（10）小脳長期抑圧におけるグルタミン酸受容体デルタ2サブユニットのはたらき

矢和多智，平野丈夫
（京都大学大学院　理学研究科　生物物理学教室）

イオノトロピックグルタミン酸受容体デルタ 2 サブユニット(GluRδ2)は，小脳プルキンエ細胞で特異的に発現しており，小脳長期抑圧発現に必須であることが知られている。しかしながら，GluRδ2 がどのようにして長期抑圧誘導に関わるのかは分かっていない。私たちは，GluRδ2 欠損マウスから調整した培養プルキンエ細胞に様々な変異を持った GluRδ2 を発現させることにより，GluRδ2 の長期抑圧誘導に関わる部位を決定し，さらに GluRδ2 がどのように長期抑圧に関わっているかを明らかにすることをめざしている。GluRδ2 は C 末端細胞内に 151 のアミノ酸を持つが，膜貫通部位から数えて約 20 アミノ酸を残したサブユニットを発現させた細胞では野生型サブユニットを発現させた細胞と同様に長期抑圧を誘導できた。しかし細胞内 C 末端 13 アミノ酸のみを残したサブユニットでは長期抑圧を回復できなかった。また，C 末細胞内領域の 14 から 20 番目のアミノ酸である SKEDDKE を野生型に発現させることで長期抑圧を抑制することができた。この部位に結合する分子を yeast two hybrid 法により探索したところ, PICK1 (Protein interacting with C Kinase 1)が SKEDDKE 依存的に GluRδ2 に結合することが判明した。PICK1 は小脳長期抑圧や海馬における可塑性において重要な役割を担っていることが知られている分子である。これらのことから，GluRδ2 は PICK1 と結合することで長期抑圧に関与していると考えられる。

（11）NMDA 受容体複合体のリン酸化による機能調節

中澤敬信，山本雅（東京大学医科学研究所・癌細胞シグナル研究分野）

NMDA 型グルタミン酸受容体（NMDA 受容体）は興奮性シナプス伝達を担い, 中枢神経系における神経細胞の発達・分化や記憶・学習といった脳高次機能，及び神経細胞死に必須な役割を果たしている。NMDA 受容体複合体は PSD-95，Shank ，Homer などの足場タンパク質，Cadherin や Catenin などの接着分子，Actin，α-actinin2，Spectrin などの細胞骨格系分子，CaMKII，ERK，Fyn などのキナーゼ分子，及び様々な情報伝達系分子から構成されている。NMDA 受容体機能の発現にはそれら分子の適切な時空間的調節が重要であると考えられる。

NMDA 受容体自身も Fyn チロシンキナーゼが触媒するリン酸化によって迅速な制御を受けているという知見が蓄積されつつある。我々は NR2B 上の主要なリン酸化残基として Tyr-1252，Tyr-1336，Tyr-1472 を同定し，それらが Fyn によってリン酸化されることを示してきた [1]。また，Tyr-1472 をフェニルアラニンに置換したノックインマウス（YF/YF マウス）を作製し解析を行ったところ，YF/YF マウスは扁桃体依存的な脳高次機能に異常があり，NR2B のシナプス上での局在にも異常が見られることが明らかになった。Tyr-1472 にはα-actinin2 やエンドサイトーシス時のアダプターとして機能する AP-2 がリン酸化依存的に会合することを見出しており，Tyr-1472 のリン酸化は NMDA 受容体とそれらの分子との会合を調節することによって扁桃体機能に必須な役割を果たしていることが示唆された [2]。また Tyr-1336 には PI-3 Kinase の p85 サブユニットがリン酸化依存的に会合することを見出した。虚血

誘導時に NR2B-p85 の会合が増強されることから，Tyr-1336 のリン酸化は虚血誘導時の NMDA 受容体を介したシグナル伝達調節に関与していることが示唆された。

我々は，さらに Fyn の基質の一つとして新規 RhoGAP 分子 p250GAP を同定した [3]。p250GAP は NR2B と会合し，スパインに局在している。また p250GAP は NMDA 受容体の刺激に応じて脱リン酸化される。p250GAP を過剰発現することによって，スパインの形態異常が引き起こされることから p250GAP は NMDA 受容体の活性に応じたスパインの形態形成に関与している可能性を考えている。

以上のデータから，Fyn は後シナプスにおいて様々な分子をリン酸化することによって脳高次機能を調節していることが明らかになった。

Reference

1) T. Nakazawa *et al.*, ***J. Biol. Chem.*** 276: 693-699 (2001)
2) T. Nakazawa, A.M. Watabe, S. Komai *et al.*, ***submitted***
3) T. Nakazawa *et al.*, ***Mol. Biol. Cell*** 14: 2921-2934 (2003)

（12）シナプス後部蛋白質の絶対数の定量

岡部繁男，杉山佳子（東京医科歯科大学　大学院医歯学総合研究科）

我々の研究室では海馬におけるグルタミン酸作動性シナプスの動的な性質を捉える為に，培養海馬神経細胞を利用してシナプス後部蛋白質の蛍光イメージングを行っている。グルタミン酸作動性シナプスのシナプス後部の形質膜直下にはシナプス後肥厚部(PSD)と呼ばれる構造が存在する。PSD は多種類の膜蛋白質・足場蛋白質・シグナル分子・細胞骨格蛋白質の複合体であるが，その分子組成および分子構築の原理については不明の点が多い。

今回 4 種類の代表的な PSD の足場蛋白質(PSD-95, GKAP, Shank, Homer)について，その単一シナプスあたりの分子数を推定した。まず全反射顕微鏡で測定した GFP1 分子の蛍光強度を基礎として，直径 40 nm および 100 nm の蛍光ビーズの蛍光強度が GFP 何分子に相当するのかを算定した。次に GFP 融合 PSD 蛋白質を発現させた培養海馬神経細胞において, 既にキャリブレーションした蛍光ビーズとの蛍光量の比較を行う事で, 単一シナプスに存在する，蛍光を発している GFP 分子の数を求めた。次に培養神経細胞における各 GFP 融合蛋白質の chromophore 形成効率を，大腸菌より精製した choromophore 形成効率が既知の GFP 標本と比較する事により推定し，単一シナプスにおける GFP 融合 PSD 蛋白質の総数を求めた。最後に GFP 融合 PSD 蛋白質を発現する培養海馬神経細胞と，過剰発現を行っていない細胞との間での各足場蛋白質発現量の比率を求め，内在性の PSD 蛋白質の数を推定した。成熟した培養海馬神経細胞において, 興奮性細胞のシナプス後部には，平均して 270 個の PSD-95 family 蛋白質，170 個の GKAP family 蛋白質，310 個の Shank family 蛋白質，340 個の Homer family 蛋白質が存在する事が明らかとなった。また培養の経過と共に単一シナプスに存在する PSD 蛋白質の量は増加し, 培養二週間目以降はその絶対数が安定化する事もわかった。

以上の結果は，4 種類の PSD 足場蛋白質全体の単一シナプスあたりの平均質量が約 100 MDa に相当することを意味している。T. Reese の研究室から最近発表されたデータによると，脳より精製された PSD の平均質量は 1000 MDa にあたる(PNAS 102(2005)11551-11556)。従って 4 種類の足場蛋白質の占める質量は PSD 全体の 10%に相当する事となり，PSD を維持する構造としてこれら 4 種類の蛋白質の形成する複合体が主要なコンポーネントである事が確認された。

（13）内因性カンビノイドによる線条体シナプスの伝達調節

鳴島円[1]，内ヶ島基政[2]，松井稔[3]，真鍋俊也[3]，渡辺雅彦[2]，狩野方伸[1,4]
（[1]金沢大院・医・シナプス発達・機能学，[2]北海道大院・医・解剖発生，[3]東京大・医科研・基礎医科学・神経ネットワーク分野，[4]大阪大院・医・細胞神経科学）

内因性カンナビノイドは脳のさまざまな部位で逆行性の抑制性シグナル伝達物質として働いている。内因性カンナビノイドはシナプス後細胞の脱分極に伴う Ca^{2+} 流入および $G_{q/11}$ タンパク共役型代謝型受容体の活性化により合成・放出されることが知られている。本研究では，大脳基底核神経回路の入力核であり，カンナビノイド受容体（CB1 受容体）が多く発現している線条体に注目し，内因性カンナビノイドによるシナプス伝達修飾機構について解析した。

線条体出力細胞である中型有棘ニューロン（MS ニューロン）から whole cell 記録を行い，興奮性および抑制性シナプス応答(EPSC, IPSC)を観測すると, IPSC でのみ，シナプス後細胞の脱分極によるシナプス伝達の一過性の減少が観測された。この IPSC の抑制は，CB1 受容体の阻害薬(SR141716)により消失したことから，内因性カンナビノイドによるシナプス伝達調節であると考えられる。次に，MS ニューロンへのシナプス入力はコリン作動性介在ニューロン由来のアセチルコリンにより修飾されることが知られているため，ムスカリン受容体と内因性カンナビノイドの関係について解析した。ムスカリン受容体の賦活薬(oxotremorine-M)を投与すると，EPSC・IPSC ともに振幅が減少したが，IPSC に対する効果のみ，SR141716 により阻害された。また，低濃度の oxotremorine-M 存在下では，弱い脱分極によっても内因性カンナビノイドによるシナプス伝達抑制が誘起されることも示された。これらの oxotremorine-M の効果は，細胞内の G タンパク阻害薬(GDPβS)の投与，M_1 受容体の特異的阻害薬である pirenzepine の投与，および M_1 受容体ノックアウトマウスで消失したことから，MS ニューロン上の M_1 受容体が関与していると考えられる。以上の結果より，MS ニューロンへの抑制性入力に対して，MS ニューロンの脱分極，MS ニューロン上の M_1 ムスカリン受容体の活性化および弱い脱分極と弱い受容体活性化の組み合わせにより，内因性カンナビノイド系を介した逆行性シナプス伝達抑制が起こることが明らかとなった。

（14）代謝調節型受容体を介した淡蒼球ニューロン活動の制御機構

金田勝幸[1,2]，喜多均[1]
（[1]Department of Anatomy and Neurobiology, University of Tennessee, Memphis
[2]生理学研究所　認知行動発達機構研究部門）

大脳基底核の主要な核の一つである淡蒼球は，GABA 作動性抑制性入力とグルタミン酸作動性興奮性入力を受けている。淡蒼球ニューロンの高頻度の自発発火は，イオンチャネル型グルタミン酸受容体および $GABA_A$ 受容体を介して制御されていることが知られている。一方で，代謝調節型グルタミン酸受容体(mGluRs)や $GABA_B$ 受容体の淡蒼球での機能的な役割については，その豊富な発現にもかかわらず，不明の点が多い。そこで本研究では，これらの代謝調節型受容体がシナプス性に活性化されるのかどうか，また，その活性化が淡蒼球ニューロン活動に影響をあたえるのかをラット脳スライス標本を用いてホールセル記録法により検討した。淡蒼球あるいは内包の連続刺激（50 Hz，20 発）は，速い EPSPs/IPSPs，遅い IPSP(slow IPSP, sIPSP)，およびそれに続く遅い持続的な脱分極(slow depolarization, sDEPO)からなる応答を誘発した。sIPSP は淡蒼球の，また，sDEPO は内包の刺激でそれぞれより頻繁に誘発された。NBQX，CPP，および gabazine（それぞれ AMPA/Kainate, NMDA, および $GABA_A$ 受容体アンタゴニスト）のバス適用で速い EPSPs/IPSPs はブロックされた。$GABA_B$ 受容体アンタゴニストの

CGP55845 は sIPSP を抑制し，sDEPO を増大させた。sDEPO は mGluR1 選択的アンタゴニストにより部分的に抑制された。sIPSP と sDEPO はいずれも刺激のパルス数と頻度依存性を示した。セルアタッチ法により淡蒼球ニューロンの自発発火活動に対する連続刺激の効果を調べたところ，淡蒼球の刺激では CGP55845 感受性の発火のポーズが観察され，内包の刺激では mGluR1 アンタゴニストに部分的に感受性を示す発火頻度の上昇が観察された。一方, CGP55845 のバス適用は NBQX 感受性の EPSCs のアンプリチュードには影響を与えなかったが，gabazine 感受性の IPSCs のアンプリチュードを有意に増大させた。この結果は，シナプス終末に存在する $GABA_B$ 受容体の刺激が GABA の放出を抑制していることを示唆している。以上の結果は，淡蒼球に発現する mGluR1 と $GABA_B$ 受容体がシナプス性に放出されたグルタミン酸と GABA によりそれぞれ活性化されうることを示しており，代謝調節型受容体が淡蒼球ニューロンの活動制御に関与していることを示唆している。

（15）前脳基底核シナプス伝達の生後発達変化

籾山俊彦（生理学研究所・脳形態解析部門）

中枢神経系のシナプス伝達には複数種のカルシウムチャネルが関与していることが知られている。げっ歯類の中枢スライス標本を用いた最近の電気生理学的研究によれば，いくつかのシナプスでは生後 2-3 週間で N 型カルシウムチャネルの関与が消失して P/Q 型およびその他のカルシウムチャネルにより伝達が制御されるようになること，別のいくつかのシナプスでは生後 50 日位まで N 型チャネルの関与が変化なく持続することが報告されている。

大脳基底核あるいは前脳基底核では，成熟動物脳のスライス標本からの記録が困難であったためにシナプス伝達の生後発達に関する情報が得られなかったが，私は最近いくつかの技術的改良を試み，生後数ヶ月までのラット脳のスライス標本からのホールセル記録法を確立して，生後発達変化を解析した。これらの核の 3 つのシナプスで解析を行なった結果，いずれも，上記の 2 つの生後発達パターンの中間的特性を示した。すなわち，生後 40-60 日までに N 型チャネルの関与が徐々に減少するが，完全には消失しない，また，N 型チャネル関与の減弱とともに，P/Q 型チャネルの関与が増大する，というパターンであった。中枢シナプス伝達を制御するカルシウムチャネルの生後発達変化は多様であることを示唆するデータと考えられる。このようなシナプス形成以後の変化は，大脳基底核，前脳基底核の生理的機能，生理活性物質によるシナプス伝達修飾機構，さらに病態との関連からも興味深い。

17. 超高圧電子顕微鏡の医学生物学分野への応用

2006年2月4日－2月5日

代表・世話人：有井達夫（生理学研究所）

（1）生理学研究所の医学生物学用超高圧電子顕微鏡の特徴

有井達夫（生理学研究所）

（2）厚切り切片での立体構築について

片桐展子（東京女子医大・総合研）

（3）Three dimensional reconstruction of Drosophila retinal cell ultrastructure employing HVEM

Sung Sik HAN, Ji Young MUN (Korea University, School of Biosciences & Biotechnology)

（4）ラット腎糸球体メサンギウム細胞表面に存在する機能分子；Thy-1

追手　巍（新潟大学・医歯学総合研究科腎研究施設）

（5）超高圧電顕をとおして見た細胞小器官の立体構造

野田　亨（藍野大学・医療保健学部）

（6）超高圧電子顕微鏡によるシナプスの立体観察

五十嵐　広明（東邦大学・医学部）

（7）嗅球ニューロン・グリアの三次元構造解析

樋田一徳（徳島大学大学院・ヘルスバイオサイエンス研究部）

（8）Approaches to synaptic plasticity with HVEM

Im Joo RHYU (Korea University, College of Medicine)

（9）哺乳類神経前駆細胞の細胞分裂機構：形態学および分子生物学的アプローチ

小曽戸陽一（理化学研究所 CDB）

(10) 赤核細胞樹状突起のシナプス形成とフィロポディア

村上富士夫（大阪大学・生命機能研究科）

(11) 超高圧電子顕微鏡による神経細胞およびグリア細胞の三次元解析

濱　清（生理学研究所）

(12) 超高圧電顕によるカサゴ鰓筋の横行小管-筋小胞体複合構造立体構築に関するステレオ観察

鈴木季直（神奈川大学・理学部）

(13) 3-D reconstruction of plastid crystalline bodies during development

InSun KIM (Keimyung University, College of Natural Sciences)

(14) Thymic nurse cells forming a dynamic microenvironment for thymocytes differentiation

江崎太一（東京女子医科大学・医学部）

(15) ウイルス感染細胞の全裁標本による超高圧電子顕微鏡観察

吉田まり子（岡山大学・医歯薬学総合研究科）

(16) 神経系培養細胞における神経栄養因子受容体の分布

遠藤泰久（京都工芸繊維大学）

(17) ステロイドホルモンによる神経細胞機能形態調節機構の解明

－超高圧電子顕微鏡による解析アプローチ－

小澤一史（日本医科大学）

(18) 網膜ニューロン間の電気シナプス

日高　聰（藤田保健衛生大学・医学部）

（19）海馬歯状回 mossy cell の背腹方向での構造的，化学的，電気生理学的差異

小坂俊夫（九州大学・医学部）

（20）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（生理学研究所）

【参加者名】

Ji, Sang Yong, Kim, InSun (Keimyung University), Han, Sung Sik, Kim, Ji Hui, Kim, Kang Min, Lee, Kyung Eun, Mun, Ji Young, Rhyu, In Joo (Korea University), 野田亨（藍野大学），村上富士夫（大阪大学），吉田まり子（岡山大学），鈴木季直（神奈川大学），小坂俊夫（九州大学），遠藤泰久，西田倫希，吉村亮一（京都工芸繊維大学）江崎太一，片桐展子（東京女子医大），五十嵐広明（東邦大学），樋田一徳（徳島大学），中村栄男（名古屋大学），追手巍（新潟大学），小澤一史（日本医大），日高聰（藤田保健衛生大），小曽戸陽一（理化学研究所），喜多山篤，新田浩二（統合バイオ），有井達夫，大庭明生，窪田芳之，児玉貴史，重本隆一，濱　清，古家園子，水野　昇，山口　登（生理学研究所）

【概要】

生理学研究所の超高圧電子顕微鏡は，昭和 55 年 3 月の生理研研究会「医学生物学における超高圧電子顕微鏡にかける夢」での全国からの研究者（理工学分野の研究者を含む）による報告と討論，その後の機種選定委員会での議論を経て導入された日本で最初の全国共同利用の医学生物学用専用機種である。昭和 57 年 3 月に搬入され，同年9月より全国に課題を公募して11月より使用が開始された。以来 23 年余が経過している。この間，多くの関係者からの暖かいご支援もあり，設置当初の機能をさらに充実させ，現在も 10^{-6}Pa 台のドライでクリーンな真空のもとに安定に稼動してきている。

23 年余のうちに，380 件を越える全国（外国を含む）からの課題が採択され，積極的な応用研究が行なわれて，これまでに 160 編を超える英文和文の論文を生み出してきた。これらの成果は，解剖学会，生理学会を始めとする各種学会などおよび生理研研究会において個別にあるいは部分的に纏まった医学生物学領域への超高圧電子顕微鏡の応用研究として数多く報告されてきている。しかし超高圧電子顕微鏡の医学生物学への応用分野だけに限った広範な生理研研究会はこれまで開かれていなかった。そこで今回，超高圧電子顕微鏡を利用してこれまで成果を挙げてきた研究者に参加を呼びかけ各自の医学生物学分野での成果を報告し今後の展望を諮るための研究会を行った。医学生物学分野での超高圧電顕分野での主要な特徴である厚い試料の観察可能性を生かした脊椎動物脳内の神経細胞およびグリア細胞の超微細形態の三次元的な形態の解明を行った研究成果を中心に 20 課題の報告があり超高圧電子顕微鏡の医学生物学領域への有効性を再確認した。平成 16 年 4 月の生理学研究所などの国立大学共同利用機関の法人化に伴い今後とも一層成果を期待される折から，これまでの超高圧電子顕微鏡共同利用実験の利用に当たっての組織体制と運営を見直す良い機会ともなった。

（1）生理学研究所の医学生物学用超高圧電子顕微鏡の特徴

有井達夫（生理学研究所）

生理学研究所の超高圧電子顕微鏡（H-1250M 型）は，1981 年に開発された東京工業大学の超高圧電子顕微鏡（H-1250S 型）のドライでクリーンな真空系と高分解能光学系を基に，医学生物学用に役立てるために各種の工夫をしている。医学生物学用としての超高圧電子顕微鏡の重要な特徴は，厚い試料の立体観察（$\pm\theta^\circ$ の傾斜像による）が可能なことである。このために，超高圧電子顕微鏡にローテーションフリーズーム機能を導入し，全ての

倍率で傾斜軸をフィルムの長辺に平行となるように設定した。またサイドエントリー試料傾斜機構にはユーセントリック機能の傾斜（±45°まで）を可能としていた。試料の傾斜角度の校正を行って測定誤差をあきらかにした。また初めて機械的シャッターを中間レンズの下部に導入し試料に対して一様露光を可能としその照射量を確実に制御できるようにした。これらは立体写真の撮影に極めて重要でありその後の立体観察および解析が容易となった。

シャッター方式はその後，第二コンデンサーレンズ直下にも導入された。この結果，生理学研究所独自のミニマムドーズシステムを開発することができ照射に弱い試料にも有効に応用できることが明らかとなっている。

1994 年には試料位置で電子線をより平行に照射できるように対物レンズを新しく設計し導入した。1995 年には，－60°から＋60°まで 1°から 2°間隔で連続傾斜した像からトモグラフイ再構築を行えるようにサイドエントリー傾斜傾斜台を改良して全国の医学生物学分野の研究者により一層の便宜を図っている。

（2）厚切り切片での立体構築

片桐展子（東京女子医科大学　総合研究所　研究部）

イソアワモチ（海産の腹足類）の外套皮下組織にある眼外光受容（皮膚光覚細胞，DP 細胞）の形態と軸索の走行を調べるために, 加温オスミウム染色しエポキシ樹脂包埋した 0.2～0.4μm 厚さの連続切片を超高圧電顕(×1,500～×30,000)で観察した。三次元立体構築には，①DP 細胞と軸索をトレースした図を描き, 最終的に 1 枚に重ね合わせる。立体構築ソフトとして②OZ95-VM32，③DeltaViewer を用いた。

厚切り切片は加温オスミウム染色によって組織に高コントラストが得られ，通常の透過電顕と同様に観察できた。軸索は部位によって直径 1μm 以下にもなるがその走行を組織内で追跡できた。DP 細胞の軸索起始部は他の光受容細胞にはみられない特異な部位の微絨毛の密在する端部と細胞質の境界部から出る。また，幼動物にみられた未成熟の DP 細胞においても，成熟した DP 細胞と同様の起始部と走行を辿ることが明らかになった。軸索は OZ95-VM32 による三次元構築では表面の透過度を変えて, DP 細胞の軸索が小神経束に入る状態や細胞内の微絨毛や核を透視できた。また，DeltaViewer では立体構築像を任意の方向に回転できるので, DP 細胞と軸索の全体像を理解し易かった。

（3）Three dimensional reconstruction of Drosophila retinal cell ultrastructure employing HVEM.

Ji Young Mun, Sung Sik Han (School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University)

The study about structure of Drosophila melanogaster's retinal cell using electron microscopy was carried in detail. But, these results can have limitation in function research because of two-dimensional structure and chemical fixation. High voltage electron microscopy (HVEM) has been a natural outgrowth of the desire to obtain 3-dimensional information due to problems related to interpretations of 3-dimensional images from 2-dimensional electron microscopes is numerous. Also, the fine-structure preservation of cells can be achieved by using fast-freezing followed by freeze-substitution (FS) techniques. The fast freezing is so much better due to the speed of fixation, which freezing virtually means stopping all molecular movement. It is estimated that samples prepared by high pressure freezing are fixed in 20-50 msec, as compared to the seconds and/or minutes by chemical fixations. In this study, the adult retina of Drosophila Melanogaster was investigated employing HVEM, fixation by high pressure freezing followed FS, thick serial sections, and 3-dimensional reconstruction. From this investigation, the distribution of

microtubules, mitochondria, and nuclei was reconstructed as three-dimensional structure using IMOD program. The current data provide us more precise cellular information and better understanding on the animal vision mechanism in new dimension.

（4）ラット腎糸球体メサンギウム細胞表面に存在する機能分子：Thy-1

追手　巍（新潟大学大学院医歯学総合研究科腎研究施設機能制御学分野）
有井　達夫（自然科学研究機構生理学研究所形態情報解析室）

【はじめに】私どもはラット腎糸球体細胞に対する各種単クローン抗体を作製し，その中にメサンギウム細胞に存在する Thy-1.1 と特異的に反応する抗体(1-22-3)を見つけた。本研究では同じ Thy-1.1 分子に対する他の単クローン抗体(OX-7)と比較し，両分子の細胞局在を超微形態学的に検索，対応抗原エピトープの分子内局在，及びその分子の機能について検索した。

【方法と結果】1．免疫組織学的検索；培養ラットメサンギウム細胞を用い，2 重染色すると 1-22-3 は細胞表面のみ，OX-7 は細胞表面及び細胞外基質の一部にも結合した。血管内皮細胞と混合培養したメサンギウム細胞に対する両抗体の結合を共焦点レザー顕微鏡で観察した。1-22-3 は両細胞の接触する部位に優位に局在した。2．超微形態学的検索；メサンギウム細胞と内皮細胞を混合培養し, 両抗体を 1 次抗体として培養液に加え反応させた。2 次抗体として 6 nm colloidal gold, 30 倍希釈）(Jackson Immunoresearch Lab.Inc)を同様に生細胞状態で反応させ，0.02% sodium azide 含有 PBS で洗浄後，2%グルタールアルデヒドで 固定し, 通常のエポン包埋による電顕試料を作成した。約 1μm の厚い切片を超高圧電子顕微鏡（生理研 日立 H-1250M, 1000 kV）で観察した。1-22-3 は内皮細胞と接触する部位のメサンギウム細胞表面に結合し, OX-7 はメサンギウム細胞全周の細胞表面と細胞外成分とも結合することが明確となった。3．1-22-3 対応抗原の Thy1-1 分子内局在；GST 融合蛋白法とペプチドマッピング法により, 1-22-3 認識エピトープは Thy-1.1 分子 N 末端 15-23 アミノ酸配列上に存在した。4．1-22-3，OX-7 の結合によるメサンギウム細胞の Ca^{++}シグナル；メサンギウム細胞培養液中に両単クローン抗体を添加し，細胞内 Ca^{++}濃度の変化を測定した。1-22-3 刺激により細胞内 Ca^{++}濃度は急激に増加し，暫時低下するものの長く持続していた。

【結語】ラット腎糸球体メサンギウム細胞上に存在する Thy-1.1 分子は接着分子, 細胞内シグナル伝達に関わる機能分子として存在することが明らかとなった。

（5）超高圧電顕をとおして見た細胞小器官の立体構造

野田　亨（藍野大学医療保健学部理学療法学科）

電子顕微鏡を含めて，顕微鏡で見る細胞はともすると平面的なものと捉えがちになるが，細胞は本来，立体であり，その中の核を始めとする細胞小器官もそれぞれの細胞内部で特有の立体的ひろがりを持っている。細胞小器官の立体的な構造を捉えようとする方法には走査型電子顕微鏡や通常の透過型電子顕微鏡を用いた連続超薄切片からの立体再構成などがあるが，細胞の厚切り切片を用いた超高圧電子顕微鏡による観察法はより直接的で，情報量が多く，細胞小器官の立体像を捉えるための最も優れた観察法の一つということができる。しかしながら，この方法から形態的な情報を最大限に引き出すためには超高圧電子顕微鏡下で細胞小器官を特異的に，しかも明瞭に染め出しておくことが必要であり，そのための処理が最終的な超高圧電顕像の良し悪しを決定しているといえる。このステップは細胞化学，あるいは組織化学と呼ばれる方法であり，それらには銀やオスミウムなどを用

いた古典的染色法，酵素組織化学，免疫組織化学などの方法がある。講演ではこれまで演者が種々の細胞化学的染色を行って観察してきた細胞小器官の超高圧電顕像を紹介し，超薄切片からは直接得ることのできない細胞小器官本来の立体像の特徴を述べる。

（6）超高圧電子顕微鏡によるシナプスの立体観察

五十嵐広明（東邦大学医学部解剖学講座微細形態学分野）

シナプスを特異的に染色する方法として知られるethanolic phosphotungstic acid (E-PTA) 染色法を超高圧電子顕微鏡による厚切り切片の観察にも応用できるものと考え，E-PTA 染色を施したラット大脳前頭皮質の 0.5〜2μm の切片を作製して観察した。最小の 0.5μm 厚の設定は，E-PTA 染色によるヒト等の大脳皮質のシナプスの直径が 0.24〜0.42μm と計測されていたことによる。すべての厚さでシナプスが観察できたが，比較的コントラストの強い 0.5μm 切片を主として観察した。後シナプス側，鉛直方向から見たシナプスの全体像では，円形あるいは楕円形の細網状の少し電子密度の高い postsynaptic density(PSD)が観察され，前シナプス側に電子密度の高い presynaptic dense projection(PDP)が六角形あるいは三角形の分布様式をとって presynaptic grid を構成しているのが観察された。なお，PDP は一定の分布様式をとらないものも多く存在した。比較的大きな PSD の中央付近にはperforation(PR)が存在し，大きな PSD では PR が 3〜4 個存在するものもあった。以上の観察結果は従来の報告とほぼ同じものであったが，切片に傾斜をかけて初めてシナプスの立体像を記載することが出来た上，切片に 90°の傾斜をかけることにより，同一のシナプスの正面像と側面像を初めて得ることができた。

（7）嗅球ニューロン・グリアの三次元構造解析

樋田一徳（徳島大学大学院・ヘルスバイオサイエンス研究部）

単純な層構造を示す嗅球は，近年の分子レベルの解析によって多様な嗅覚情報を精巧に処理することが判り，複雑な脳神経回路網の基本的構造の解明の為の重要な鍵が見出せるものと期待されている。我々はこれまでシナプス結合による脳構築モデルとして，電子顕微鏡連続切片によるラット嗅球神経回路の三次元構造解析を進めてきた。嗅球ニューロンのシナプスは径 0.2μm 以下の突起に形成することも多く，このためシナプスを形成する突起の細部及び全体像の三次元的構造を正確に知るには共焦点レーザー顕微鏡の解像度では難しく，現状では超高圧電子顕微鏡による立体構造解析以外に確実な方法はない。そこで嗅球ニューロンのうち糸球体内のシナプス結合を同定した Calbindin, Tyrosine Hydroxylase, 及び Calretinin 免疫陽性ニューロンを超高圧電子顕微鏡により解析を行ない，いずれも径 0.2μm 以下の突起を識別・追跡でき，光学顕微鏡では不明であった糸球体内細部での突起の正確な分布と相互の近接構造が明らかとなった。これらの知見により，同定を行ったシナプス結合の神経回路内の存在意義がより明確となった。

本研究会ではこれまでの所見を紹介し，嗅球を中心とした脳神経回路解析における統合的な顕微鏡的解析の有用性を論じた。また超高圧電子顕微鏡の今後の魅力的な解析の可能性について専門家との有意義な討論を行なった。

（8）Approaches to synaptic plasticity with high voltage electron microscopy (HVEM)

Kea Joo Lee, Im Joo Rhyu (Department of Anatomy College of Medicine, Korea University)

Synapses are specialized interneuronal junctions where signals are propagated from one to another. Most excitatory synapses consist of presynaptic axon terminals and postsynaptic dendritic spines in a mammalian central nervous system. Shapes and number of dendritic spines are dramatically changed under various physiological or pathological conditions such as development, environmental enrichment, learning, hormonal states, ataxia, and mental retardation. To analyze dendritic spines quantitatively or qualitatively, light microscopy (LM), laser confocal microscopy, transmission electron microscopy (TEM), and HVEM have been generally used. Because dendritic spines are numerous and small in size, standard LM may not adequately identify spine morphology. The profiles of dendritic spines appear to be fragmental in thin sections for TEM; thus, without an adequate 3-D reconstruction method, TEM is not suitable for quantifying structural dimensions and composition of spines. HVEM has been effectively applied to quantitative studies of spines by using 3–5 μm thick sections and taking advantage of its high resolution and penetrating power.

We have analyzed the detailed morphology of the dendritic spines in hippocampal neurons and Purkinje cell in some physiologic and pathologic conditions with HVEM. The density, length and spine have been analyzed in the acrobat trained rat, P/Q type calcium channel mutant, and fmr-1 knock out mice, which is an animal model of human fragile X syndrome. The density and length of Purkinje cell dendritic spine were increased in the acrobat trained rat cerebellum. But the density and length of the dendritic spine of Purkinje cell were decreased in the P/Q type calcium channel mutant. The increased spine density and length of fmr-1 knock mice were observed in dentate granule cell of the hippocampus.

The HVEM provide a useful tool in synaptic plasticity studies and in extracting 3 dimensional information of the nervous system.

（9）哺乳類神経前駆細胞の細胞分裂機構：形態学および分子生物学的アプローチ

小曽戸陽一（理化学研究所・発生再生科学総合研究センター・非対称細胞分裂研究グループ）

脊椎動物の中枢神経系神経細胞の前駆細胞である神経上皮細胞が，細胞増殖的対称分裂および神経細胞生成的非対称分裂を行う際に，apical 表層の細胞体と basal lamina とのコンタクトは大変細長い形状（直径 1μm以下，長さ 100μm以上）となるものの，プロセス様の構造物(basal process)として保持されている。光学顕微鏡ではその微細構造の空間的情報の観察が困難であるため，細胞分裂の際に basal process がどのように娘細胞に引き継がれるかについては不明な点が多い。我々は超高圧電子顕微鏡および免疫染色法による形態学的解析から，basal process が細胞分裂時にはその apical-basal 軸に沿って分裂しうることを示した。細胞分裂期の basal process 内には細胞分裂溝の構成蛋白質である anillin が塊状の局在を示し，さらに anillin の局在と basal process の分裂点が一致している場合があることが見いだされた。また，細胞分裂の進行に連れて塊状 anillin の局在は basal 側から apical 側に移動し，最終的に細胞体の分裂溝に引き継がれることがタイムラプス解析等により示された。我々の研究から少なくとも神経発生の初期段階において，神経上皮細胞の basal process は細胞体分裂に先立って分裂し，その結果娘細胞に引き継がれる場合があることが示された。

（10）赤核脊髄路細胞樹状突起におけるフィロポディア状突起とシナプス形成

村上富士夫（大阪大学大学院生命機能研究科）

The formation of synaptic contacts is a crucial event which is achieved by complex interactions between incoming axons and the neurons in the target. We have focused on spine-like dendritic protrusions (SLDPs), which are transient pleomorphic protrusive structures seen in developing brains. Accumulating in vitro evidence suggested that the SLDP plays an important role in synaptogenetic interactions with axons. To test this idea, we examined whether the SLDPs are the preferential sites of synapse formation. The ultrastructure of biocytin-labeled corticorubral (CR) terminals was examined in serial thin sections during the period of synaptogenesis in newborn cats. We found that a major proportion (86%) of the CR synapses was formed on SLDPs. The presynaptic terminals were often invaginated by fine processes extending from the tips of SLDPs. Presumptive CR synapses were also found on SLDPs of HRP-labeled rubrospinal cells, suggesting that SLDPs postsynaptic to labeled CR terminals originate at least in part from rubrospinal cells. Thus, SLDPs may represent preferred sites of synapse formation and play a role in synaptogenic interactions during brain development.

We also examined CR synapses in adult cats. Electron microscopic observation of serial thin sections of Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin-labeled axons revealed that approximately 60% of CR terminals formed synapses on dendritic spines. CR axons terminated on dendritic spines originating from the intermediate or distal dendrites of rubrospinal cells (>200 μm apart from the soma), in contrast to kittens in which CR fibers terminate on SLDPs originating from the proximal dendrites (< 100 μm apart from the soma). Thus, CR synapses appear to undergo remarkable remodeling after initial termination on SLDP.

（11）超高圧電子顕微鏡による神経細胞及びグリア細胞突起の三次元定量解析

浜　清（生理学研究所名誉教授）

超高圧電子顕微鏡の高い電子線透過能を利用すると厚い生物試料の立体観察が可能である。生理学研究所の 1000 kV HVEM は生物試料の 3 次元立体計測のための特性（ローテーションフリー，ズーム，長焦点対物レンズ等の光学系の他，0.1° の精度で±60° ユウセントリック傾斜が可能なサイドエントリー試料ホールダー）を備えた世界で初めての生物専用機である。演者等は±θ° 傾斜立体像を用いて 3 次元定量解析を行なう方法を開発し，厚さ 3μm の横紋筋切片を用い横細管の 3 次元定量に成功した(Hama et al. 1985, Arii & Hama 1987)。

神経細胞やグリア細胞の複雑な突起の 3 次元定量解析には厚い切片を用いた HVEM 解析が特に有効である。

ラット歯状回顆粒細胞の Golgi 染色標本から 5 μm の連続切片を作成し，上記の HVEM ステレオ解析法によって樹状突起棘の形状，長さ，数量と密度，表面積について 3 次元定量解析を行い興味ある所見を得た(Hama et al. 1994)。

星状グリア細胞の突起は脳内に極めて繊細，複雑な網目を作っていて，その広範な三次元定量解析は光学顕微鏡，連続超薄切片による再構築法，及びステレオ解析などでは不可能である。我々は－60° から＋60° まで 2° 間隔の連続傾斜像から星状グリア細胞突起のトモグラフイ再構築を行って，その体積と表面積を計測し，星状グリア細胞の突起が極めて大きな表面積/体積比を持つ事を発見した(Hama et al. 2004)。此の事は神経細胞とグリア細胞間の緊密な機能的相関を考える上で重要な指標となる。

Hama, K., Arii,T., and Nakamura,S., Insitu Experiments with High Voltage Electron Microscopes. H. Fujita ed, pp 455 -460, 1985.

Arii, T. & Hama,K. J. Electron Microsc. 36: 177-1995, 1987

Hama, K., Arii, T., and Kosaka, T., Microsc. Res. Tech. 29: 357-367, 1994.

Hama,K, Arii,T., Katayama, K., Martone, M., and Ellisman, H. J. Neurocytol. 33: 277-285, 2004.

（12）超高圧電顕によるカサゴ鰾筋の横行小管-筋小胞体複合構造立体構築に関するステレオ観察

鈴木　季直（神奈川大学理学部生物科学科）

骨格筋（横紋筋）では，筋形質膜から筋小胞体への興奮伝達のため，横行小管（T-管）とそれを両側から挟み込む 2 つの筋小胞体終末槽が triad を形成している。筆者と共同研究者は，横紋筋であるカサゴ鰾筋の収縮-弛緩にともなう細胞内 Ca^{2+}動態を研究するためにまず筋線維の微細構造観察を行なったが，この筋では，同一筋線維内に規則的に分布する Z 型と AI 型の 2 種の triad が含まれ，それらの分布境界領域には，triad の他に，2 本の T-管と 3 つの筋小胞体終末槽からなる pentad と，3 本の T-管と 4 つの筋小胞体終末槽からなる heptad （著者ら命名）が含まれていることを見出した(*J. Electron Microsc.* 52:337-347, 2003)。Triad より複雑な pentad や heptad の構築様式を明らかにするために，樹脂包埋試料から厚さ 0.5 μm の切片を作製し，生理学研究所の超高圧電子顕微鏡(Hitachi H-1250M HVTEM)で観察し，ステレオ撮影した。その結果，筋節の Z 帯部位にある T-管が分枝し，両側に伸び，A 帯と I 帯の境界部位で Z 帯と平行に走行し，それらを筋小胞体終末槽が取り囲むことで heptad が構築されることが明らかにされた。Pentad はこの heptad の T-管 3 本のうち，A 帯と I 帯の境界部位にあるべき 1 本が欠けた変則的な heptad と考えられる。一般に，骨格筋は，筋種ごとに，2 種の triad のうちどちらか一方の型のみを含むが，本研究の結果は，AI 型 triad が Z 型 triad から分化する可能性と，AI 型 triad のみを含む骨格筋は Z 型 triad のみを含む骨格筋よりもさらに進化したレベルにあることを示唆した。

（13）3-D reconstruction of plastid crystalline bodies during *Sedum rotundifolium* development

InSun Kim (Biology Department, Keimyung University)

Employing HVEM and tomography, the present study attempted to reconstruct the 3-D plastid crystalline inclusion bodies detected during *Sedum rotundifolium* development. The 3-D reconstruction has been based on data attained from the tilting, tomography, and diffractogram. The plastid inclusion body differentiated during CAM metabolism and revealed quite peculiar structural pattern. The inclusion bodies were intrathylakoidal and non-membrane bounded structures. Being irregular in shape and variable in size, their structural attributes considerably affected the plastid morphology in early development. Fusion or branching was common between the inclusion bodies. The elements within the crystalline body exhibited either parallel or lattice arrangement depending on the section angle. The crystalline inclusions consisted of tubular elements exhibiting a hexagonal arrangement of the six substructures with a 17.9-18.6 nm periodicity between elements. Implications of such changes in the tubular inclusions in relation to CAM will be discussed.

（14）胸腺ナース細胞は胸腺細胞分化のための動的微小環境を形成する
（Thymic nurse cells forming a dynamic microenvironment for thymocytes differentiation）

江崎太一（東京女子医科大学医学部 解剖学・発生生物学講座）

胸腺ナース細胞(Thymic nurse cells: TNC)は，その胞体内に多数の細胞を抱き込み特異な細胞複合体を形成した胸腺上皮細胞の一つである。本研究では，リンパ球過形成を伴った良性胸腺腫を自然発症する BUF/Mna 系ラットの胸腺を用いて，TNC の in situ における形態学的特徴を免疫組織学的・超微形態学的に検索し，その細胞生物

学的意義を考察した。光顕および通常電顕の観察により，TNC 内はリンパ球のみならずマクロファージを含む極めて多様な細胞集団から成ること，増殖細胞が存在すること，また胸腺ホルモン FTS や細胞接着因子 ICAM-1 などの存在が確認された。さらに，厚さ 5μの連続切片を用いた超高圧電顕での観察において，TNC 内では細胞同士がいくつかのコンパートメント毎に仕切られて包含されていること，さらには TNC 表層のコンパートメントから胸腺細胞が活発に出入りしていることが明らかとなった。以上より，TNC 内は包含された細胞に多様性と増殖性ならびに移動性があり，極めて動的な状態であることが示された。そのことは TNC が胸腺細胞の分化・成熟のために極めて重要な微小環境を提供している可能性が強く示唆された。

（15）ウイルス感染細胞の全載標本作製による超高圧電子顕微鏡観察

吉田まり子（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・病原ウイルス学分野）

ウイルス感染細胞の細胞内部におけるウイルス粒子の存在様式を探るために，感染細胞の全載標本を作成して超高圧電子顕微鏡(HVEM)観察することを試みた。全載標本の観察には，①細胞質周辺部は観察できるが，核を含む中心部は観察できない，②ウイルス感染細胞の形態変化によっては内部の観察が困難，③細胞表面上のウイルス粒子と内部のウイルス粒子の区別が困難などの問題点がある。そこで，解決策として，解析の目的をウイルス粒子とそれを取り囲む空胞構造の相互関係に絞り，表面上の粒子と細胞内部の粒子を区別するために，HVEM によるステレオ観察および HVEM と走査型電子顕微鏡(SEM)による同一部位観察を行った。単純ヘルペスウイルス 1 型感染細胞では，ゴルジ由来の細胞質内空胞に，多数のウイルス粒子が集積した像を観察でき，細胞周辺部の粗面小胞体の内部にはウイルス粒子を認めなかった。サイトメガロウイルス感染細胞では，HVEM で核内封入体構造が明瞭に観察でき，dense body と呼ばれる異型粒子の構造が成熟粒子と同様に出芽によって空胞膜に包まれ，ヌクレオカプシドを含まないことが明瞭になった。ポックスウイルスでは，細胞外に放出された成熟粒子はゴルジ由来空胞膜または表面膜由来の外膜を被っていることが明白になった。このように，全載標本によるウイルス感染細胞の HVEM 観察は，立体的な空胞構造におけるウイルス粒子と膜との相互関係を探るのに非常に有用であった。

（16）神経系培養細胞における神経栄養因子受容体の分布

遠藤泰久（京都工芸繊維大学）

神経系培養細胞 PC12 を用い神経成長因子受容体(TrkA)が細胞膜陥入構造であるカベオラに関連するか否か，免疫電顕および超高圧電顕による三次元立体再構築により検討した。電顕試料用メッシュ上に培養した細胞を TrkA，カベオリン-1（カベオラ関連タンパク質），クラスリン（飲込み小胞の被覆タンパク質）の抗体で免疫染色し臨界点乾燥を施し，超高圧電顕により傾斜撮影を行ない 3 次元再構築ソフト（r-image 及び IMOD）で解析した。TrkA 免疫反応はカベオラとは形態の異なる細胞膜直下の陥入構造が多数集まったクラスターや lysosome に主に認められた。カベオリン-1 免疫反応はカベオラ構造を示さず，細胞質中に網目状に分布していた。クラスリン免疫反応は飲込み小胞や endosome に明瞭に認められた。恐らく TrkA は神経成長因子と結合した後，クラスリン依存的経路で細胞質中に取り込まれ，カベオリンは細胞質中の輸送系に何らかの関与をしていると考えられる。

（17）ステロイドホルモンによる神経細胞機能形態調節機構の解明 －超高圧電子顕微鏡によるアプローチ－

小澤一史（日本医科大学・大学院医学研究科・生体制御形態科学部門）

副腎皮質から分泌されるコルチコステロイドは脂溶性物質ホルモンであり, 血液脳血管関門を容易に通過して, 受容体を介することによって神経系の細胞に直接作用する。脳内におけるコルチコステロイド受容体には，ミネラルコルチコイド受容体 (mineralocorticoid receptor, MR) とグルココルチコイド受容体 (glucocorticoid recdptor, GR)が知られている。この 2 つの受容体は海馬領域において豊富に分布しており，血中コルチコステロンの変動に伴い両者の受容体の機能的調節がなされている。

血中コルチコステロンの変動によって，海馬の錐体細胞（CA1, CA2 領域）や歯状回顆粒細胞において機能的な変動のみならず，樹状突起の棘の変化を中心とした，形態学的な変動もダイナミックに生じることが，超高圧電子顕微鏡を用いた三次元観察によって明らかとなった。海馬は脳におけるストレス応答の中心として考えられており，この反応性が視床下部－下垂体－副腎系といった実際のストレス応答軸に直接関わることが考えられている。従って，海馬領域におけるコルチコステロンへの反応性やその際の海馬神経細胞における形態変化の解析は，ストレス現象の解明に直接つながることと考えられる。血中のコルチコステロンの変動が，GR の発現調節や神経細胞の機能発現調節のみならず, 神経細胞の構造, 特にシナプス形成と密接な関係のある樹状突起棘の密度や形状とも密接に関係する可能性が見出されたことは, 神経間の情報伝達システムを考える上で興味深い結果が得られたと考えている。特に，超高圧電子顕微鏡によるステレオ観察が，このような解析に有用であることも興味深く，今後さらに超高圧電子顕微鏡によるトモグラフィー観察を合わせたより詳細な観察の展開を考えている。

（18）網膜ニューロン間の電気シナプス：ギャップ結合における開口チャネル割合の計測

日高　聰（藤田保健衛生大学医学部）

ギャップ結合はニューロン間の電気シナプスを形成する。ニューロン間電気シナプスにおける細胞間チャネルの開口割合を計測した。視覚系の主要な興奮性ニューロン・α型網膜神経節細胞は同一型との間で電気シナプスを形成している。二連のホールセルパッチクランプ法で細胞間ギャップ結合のチャネルコンダクタンスは最大 2.45nS（平均 1.35nS, n=9）であった。2 つの細胞間で樹状突起同士の接触回数は平均 7 回であった(n=12)。超高圧電子顕微鏡を用いて 5μm の厚切り切片の標本で, 樹状突起間の接触部位にギャップ結合を同定し，そのギャップ結合の大きさを測定した結果，平均 0.86μm の直径であった(n=14)。ギャップ結合蛋白サブユニット・コネキシン 36 がα型網膜神経節細胞間のギャップ結合を構成している結果（単一チャネルコンダクタンス，15pS）と，ギャップ結合チャネル粒子・コネクソンの密度は 5,180 particles/μm^2 であることから，電気シナプスの細胞間チャネルの開口割合は 0.8%と計算された。電気シナプスがα型網膜神経節細胞間で同期興奮を引き起こすために, この細胞間開口チャネルの機能が評価された。α型網膜神経節細胞間にあるギャップ結合の開口チャネルの割合は，電気シナプスの形成がよく知られている網膜アマクリン細胞間や水平細胞間のものに匹敵した。

（19）海馬歯状回 mossy cell の背腹方向での構造的，化学的，電気生理学的差異

小坂俊夫（九州大学大学院　医学研究院　基礎医学部門　神経形態学分野）

海馬歯状回 mossy cell は hilus に存在する大型多極性のグルタメイトを神経伝達物質とする興奮性ニューロンであり，その樹状突起近位部（及び種によっては細胞体そのもの）に顆粒細胞の mossy terminals からシナプスを受ける特徴的な大型の複雑な複合スパイン thorny excrescences を有している。マウスやハムスターではカルシウム結合蛋白 calretinin の含有，thorny excrescences の構造の面で背腹側の長軸方向で明確な差異がある。すなわち，背側海馬の mossy cell は腹側海馬の mossy cell より複雑な thorny excrescences を有し，一方 calretinin は背側海馬の mossy cell に陽性で背側海馬の mossy cell では陰性である。更に興味深いことに電気生理学的性質においても大きな差異があることが明らかとなった。スライスパッチクランプ法で，マウス海馬歯状回 mossy cell の電気生理学的性質を検討したところ，背側海馬の mossy cell は自発的な EPSP の頻度, 最大値が腹側海馬の mossy cell より大きかった。更に，シナプス結合を遮断すると膜電位が約 −50mV 程度に脱分極し，背側海馬の mossy cell はスパイク発火がなくなったが，腹側海馬の mossy cell はリズム的バースト発火を示した。この腹側海馬の mossy cell のリズム的発火に I_{NaP} が大きな役割を果たしていることが明らかになった。本研究は藤瀬昇（熊本大），劉陽（九大），村川亮（九大），神野尚三（九大），石塚智（九工大）氏との共同研究である。

（20）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（生理学研究所）

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ことが明らかになっている。小脳において，バーグマングリアに ETB 受容体の mRNA が豊富に存在することが in situ hybridization 法で報告されていた。そこで，ETB 受容体の一部欠損を持つ AR 系統（sl 劣性遺伝子を持つ）の野生型と sl/sl ラットを用いて，生後発生過程における ETA および ETB 受容体の発現を免疫電顕で観察した。その結果，野生型においては，生後 5 日から ETB 受容体が発現し，生後 2 週齢までは細胞膜およびゴルジ装置に局在し，3 週齢以降では，ゴルジ装置にのみ局在した。ETA 受容体は生後 7 日から 2 週齢まで細胞全体に存在した。一方，sl/sl ラットでは ETB 受容体は検出できず，生後 5 日から 2 週齢まで ETA 受容体が発現していた。すなわち，sl/sl ラットでは ETB 受容体の替わりに ETA 受容体が生後 5 日に発現し，代償的に機能していることが考えられる。次に，野生型と sl/sl ラットの小脳のゴルジ染色標本を作製し，3-4μm の厚切り切片を超高圧電顕で観察し，3 次元構築を行った。現在，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，野生型，sl/sl ラットの生後発生過程について解析している。

18. 位相差断層電子顕微鏡の医学的・生物学的応用

2006 年 1 月 26 日－1 月 27 日

代表・世話人：金子康子（埼玉大学・理学部）

所内対応者：永山國昭（岡崎統合バイオサイエンスセンター・ナノ形態生理）

（1）Single Particle Analysis of GroEl by Zernike Phase Contrast TEM

Radostin Danev，永山國昭（岡崎統合バイオサイエンスセンター）

（2）位相差電子顕微鏡で観るシアノバクテリアの生活環

金子康子（埼玉大学理学部）

（3）位相差電子顕微鏡による無染色生物試料の観察～高圧凍結・凍結超薄切片法の試み～

新田浩二，永山國昭（岡崎統合バイオサイエンスセンター）

花市敬正，高瀬弘嗣（花市電子顕微鏡技術研究所）

（4）蛍光タンパク質タグ法による *Mycoplasma pneumoniae* の細胞構造観察

見理　剛（国立感染症研究所細菌第二部）

（5）位相差電子顕微鏡による氷包埋を行った原核・真核細胞の観察

臼田信光，厚沢季美江，中沢綾美（藤田保健衛生大学医学部解剖学 II）

Radostin Danev，永山國昭（岡崎統合バイオサイエンスセンター）

（6）微小管の枝分かれ－進化における意義と構造解明へのアプローチ

村田　隆（基礎生物学研究所）

（7）生きたシアノバクテリアにおけるフィコビリソームなどの超分子を見る

仲本　準（埼玉大学理学部）

（8）投影型 X 線顕微鏡による生物観察

吉村英恭（明治大学理工学部）

（9）蛋白質トモグラフィー

岩崎憲治（大阪大学蛋白質研究所）

(10) 試料に応じた電子線トモグラフィの適用－TEM・STEM・クライオトモグラフィー

青山一弘（日本エフイー・アイ株式会社）

(11) TEM における 3 次元情報の構築技法（トモグラフィー）

及川哲夫（日本電子株式会社）

(12) 氷包埋を行った培養細胞の位相差電子顕微鏡による観察

厚沢季美江，臼田信光（藤田保健衛生大学医学部解剖学 II）

瀬藤光利，Radostin Danev，永山國昭（岡崎統合バイオサイエンスセンター）

(13) 位相差電子顕微鏡による脂質ナノチューブ形成過程の研究

由井宏治，神谷昌子，清水敏美（東京理科大学理学部化学科）

伊藤耕三（東京大学大学院新領域創成科学研究科）

Radostin Danev，永山國昭（岡崎統合バイオサイエンスセンター）

(14) TEM で観る線状高分子の結晶モルフォロジー

辻　正樹（京都大学化学研究所）

(15) 位相差 TEM の高分子材料への応用

登阪雅聡（京都大学化学研究所）

(16) ブロックコポリマーの無染色 TEM 観察と電子線トモグラフィー

長谷川博一（京都大学大学院工学研究科）

(17) エネルギーフィルターTEM による高分子の可視化

堀内　伸（産業技術総合研究所 ナノテクノロジー研究部門）

(18) シリカ系ナノ細孔材料の TEM 観察

佐々木優吉（財団法人ファインセラミックスセンター）

(19) 電子線ホログラフィーによるミクロ～ナノ領域の電場・磁場の観察

平山　司（財団法人ファインセラミックスセンター）

(20) 偏光と位相差による生体試料の可視化観察－－光学顕微鏡でみる数十 nm の世界－－

加藤　薫（産業技術総合研究所・脳神経情報研究部門）

(21) アポディゼーション位相差顕微鏡の生細胞観察への適用

大瀧達朗（株式会社ニコン）

【参加者名】

青山一弘（日本エフイー・アイ株式会社），赤坂　哲（京都大学工学研究科），明坂年隆（朝日大学歯学部），秋元裕介（株式会社豊田中央研究所），厚沢季美江（藤田保健衛生大学医学部），新井善博（日本電子株式会社），石塚和夫 (HREM Research Inc.)，石本志高（独立行政法人理化学研究所），岩崎憲治（大阪大学蛋白質研究所），上田友彦（松下電工株式会社），臼田信光（藤田保健衛生大学医学部），及川哲夫（日本電子株式会社），大石健太郎（浜松医科大学），太田明雄（金沢大学大学院），大瀧達朗（株式会社ニコン），岡　渉（住友ベークライト株式会社），海原敏裕（豊田通商株式会社），加藤　薫（産業技術総合研究所），金子康子（埼玉大学理学部），木下圭介（トヨタ自動車株式会社），見理　剛（国立感染症研究所），近藤　裕（ヤマハ発動機株式会社），佐々木優吉（財団法人ファインセラミックスセンター），塩澤真人（株式会社豊田中央研究所），塩野谷美和子（トヨタ自動車株式会社），鈴木教友（株式会社豊田中央研究所），田中雅嗣（東京都老人総合研究所），辻　正樹（京都大学化学研究所），登阪雅聡（京都大学化学研究所），中浦誠（株式会社三井化学分析センター），仲本　準（埼玉大学理学部），永山國昭（岡崎統合バイオ），新田浩二（岡崎統合バイオ），長谷川博一（京都大学工学研究科），服部　亮（豊田通商株式会社），平山　司（財団法人ファインセラミックスセンター），堀内　伸（産業技術総合研究所），本田敏和（日本電子株式会社），松井　孝（磐田化学工業株式会社），村田　隆（基礎生物学研究所），元木創平（日本電子株式会社），山田祐記子（京都大学大学院），山羽宏行（日本メナード化粧品株式会社），由井宏治（東京理科大学理学部），吉村英恭（明治大学理工学部), RAHMAN MD. MASUDUR（豊橋技術科学大学), 高瀬弘嗣（株式会社花市電子顕微鏡技術研究所），丸山貴広（豊田通商株式会社），喜多山　篤（統合バイオ），花市敬正（株式会社花市電子顕微鏡技術研究所), Radostin Danev（統合バイオ），藤田　真（株式会社島津製作所），木下千草（ヤマハ発動機株式会社），高橋佳子（統合バイオ），谷口美惠子（名古屋大学工学部），磯田正二（京都大学化学研究所），上野清昭（日本電子株式会社），檜山武史（基生研）

【概要】

この研究会は, 平成 12 年よりスタートした電子顕微鏡の研究会（“定量的高分解能電子顕微鏡法”, “電子位相顕微鏡の医学・生物学への応用”, “位相差断層電子顕微鏡の医学・生物学への応用”）の総決算とでも呼ぶべきもので，過去の蓄積が多数の共同研究者の発表という形で反映されている。また顕微鏡学会関西支部と共催で講演会・研究会を持つ機会を得たため，関心を医学・生物学の周辺にも向ける試みをした。顕微鏡学会に向けたタイトルは「ソフトマテリアルの無染色観察－見えないものを観る」であった。

岡崎で開発された位相差電子顕微鏡法は，特に伝統的な生物電顕において有効性を発揮し始めており，無染色電顕法という新しい分野を切り開きつつある。この新しい経験を生物電子顕微鏡関係者以外にも広く知ってもら

うため，研究会は，顕微鏡学会共催の形をとり，非生物分野をも包含するソフトマテリアル（有機物質，高分子，ゲル，ゾル，ガラス）一般を対象とすることとした。今まで電顕の対象となりにくかった材料の発表も含まれており，従来と一味違った研究会になった。具体的には 1 月 26 日の午後を共同研究で生まれた，位相差電顕の医学・生物学への応用成果の発表にあて，1 月 27 日の午前を断層法（トモグラフィー）を含む生物応用の紹介にあて，午後前半を位相差電顕の一般材料への応用可能性の探究，そして午後後半を光学顕微鏡における位相差法の生物応用の紹介にあてた。見えないものを観る方法としての位相差顕微鏡法が，電顕，光顕一体となって進展していく将来の方向を予感させた。

（1）Single Particle Analysis of GroEl by Zernike Phase Contrast TEM

Radostin Danev，永山國昭（岡崎統合バイオサイエンスセンター）

We discuss the application of Zernike Phase Contrast Transmission Electron Microscope (ZPC-TEM) to acquisition of image data for single particle analysis of biological samples.

The ZPC-TEM utilizes a Zernike phase plate [1-3] which consists of a thin film with a small hole in the center. It is positioned at the back-focal plane of the objective lens. This phase plate introduces half pi phase shift to the scattered electrons leaving the central beam of unscattered electrons intact. The resulting images exhibit much higher overall contrast due to the presence of low spatial frequencies which are strongly attenuated in images acquired using a conventional TEM. The ZPC-TEM has overall “flat” frequency response compared to the “band-pass” filter characteristics of the conventional defocus phase contrast TEM.

Data and results of single particle analysis using ZPC-TEM images are presented. Theoretical and practical aspects in the application of ZPC-TEM are discussed.

1. K. Nagayama, J. Phys. Soc. Jpn., 68 (1999) 811.
2. R. Danev, K. Nagayama, Ultramicroscopy 88 (2001) 243.
3. R. Danev, K. Nagayama, J. Phys. Soc. Jpn., 70 (2001) 696.

（2）位相差電子顕微鏡で観るシアノバクテリアの生活環

金子康子（埼玉大学理学部）

ヒルベルト微分電子顕微鏡法により急速凍結したシアノバクテリアの微細構造をそのまま観察することが可能となった[1,2]。この方法により，桿状のシアノバクテリア *Synechococcus* sp. PCC 7942 の生活環における微細構造変化を，樹脂包埋超薄切片を用いた従来法とは異なる視点から観察することを試みた。*Synechococcus* sp. PCC 7942 は，光合成を行い分裂と細胞伸長を繰り返して増殖する原核単細胞生物である。主な細胞内構造として，光合成に関与するチラコイド膜やカルボキシソームなどが知られていたが，新たに巨大なポリリン酸体が各細胞に規則的に配置することが明らかになった。さらに細胞内における DNA の動態を可視化することを目指して BrdU を取り込ませた細胞の観察を行った。DNA の複製, 転写, タンパク質の合成，チラコイド膜の発達，細胞分裂過程など，生きている状態に極めて近い微細構造観察の試みを通して，ヒルベルト微分電子顕微鏡法の可能性について考察したい。

(1) Kaneko Y., Danev R., Nitta K., and Nagayama K.: In vivo subcellular ultrastructures recognized with Hilbert differential contrast transmission electron microscopy. J. Electron Microsc. 54, 79-84 (2005)
(2) Kaneko Y., Danev R., Nagayama K., Nakamoto H.: Intact carboxysomes in a cyanobacterial cell visualized by Hilbert differential contrast transmission electron microscopy. J. Bacteriol. 188, 805-808 (2006)

（3）位相差電子顕微鏡による無染色生物試料の観察～高圧凍結・凍結超薄切片法の試み～

新田浩二，永山國昭（岡崎統合バイオサイエンスセンター）
花市敬正，高瀬弘嗣（花市電子顕微鏡技術研究所）

最も生きた状態に近い透過型電子顕微鏡による生物試料観察を行う方法として，単細胞や高分子等の微細な試料の場合は氷包埋法，多細胞からなる試料の場合は凍結切片法がある。凍結切片法は弱く固定した後，ショ糖により氷晶形成を防止し凍結，切片化を行う方法が主流である。近年，多細胞からなる試料を高圧下で凍結することにより，氷晶形成を防止し，そのまま切片化し観察する高圧凍結・凍結超薄切片観察が行われはじめている。しかし，無染色凍結切片の観察は非常に低コントラストであり，深いデフォーカスをとる必要性によりコントラストを上げることによる分解能低下は避けられない。

近年開発された位相差電子顕微鏡は無固定，無染色の生物試料を正焦点で高コントラスト観察を可能にした。このことは，より生体に近い状態の高分解能観察が可能になると同時に，細胞形態とともに分子形態の新しい知見が期待できる。

本研究では高圧凍結・凍結切片観察が位相差電子顕微鏡に適した生物試料作製法の一方法と考え，今回は主に無処理ハムスターをエーテル麻酔し，肝臓，筋組織を切り出した後，高圧凍結，低温を保持したまま凍結切片作製，切片回収し，ヒルベルト位相差電子顕微鏡観察を行った結果を報告する。

（4）蛍光タンパク質タグ法による *Mycoplasma pneumoniae* の細胞構造観察

見理　剛（国立感染症研究所細菌第二部）

マイコプラズマ肺炎の原因菌 *M. pneumoniae* は細胞の一端に分化した接着器官を有している。この接着器官による細胞付着性と運動性が *M. pneumoniae* の病原性には必須な要素であると考えられている。接着器官は *M. pneumoniae* の細胞骨格様の構造によって内部からささえられて形成されていると考えられているが，その詳細な構造は不明である。今後，*M. pneumoniae* の病原性を詳しく理解するためにも，接着器官と細胞骨格の詳細な構造を調べていく必要がある。我々は接着器官と細胞骨格の構造を探る一つの手段として蛍光タンパク質を利用してこれらの構造を視覚化する検討を行っている。これまでに，接着器官を構成するタンパク質のうち数種を蛍光タンパク質でラベルし，接着器官部位に局在している様子を生細胞で観察している。また，二種の蛍光タンパク質を用いた二重標識によって，それぞれのタンパク質の相対的な位置関係も比較できるようになっている。*M. pneumoniae* は自律増殖が可能な最小クラスの生物であり，ゲノムサイズは約800kb，含まれるORFの数は689 個しかない。現在，これらすべてのORF産物の細胞内局在パターンを蛍光タンパク質によって視覚化することを計画している。この解析から *M. pneumoniae* の接着器官と細胞骨格の未知の成分が網羅的に検索され，細胞構造に関する新たな知見が得られることを期待している。

（5）位相差電子顕微鏡による氷包埋を行った原核・真核細胞の観察

臼田信光，厚沢季美江，中沢綾美（藤田保健衛生大学医学部解剖学 II）
Radostin Danev，永山國昭（岡崎統合バイオサイエンスセンター）

【目的】位相差電子顕微鏡法は，細胞内構造が本来持っている物質の密度の差によって引き起こされる電子波の位相の遅れを，位相コントラストとして可視化する。氷包埋を行った原核・真核細胞を広く観察し，医学研究への

応用を試みた。
【材料と方法】氷包埋標本 : 大腸菌，納豆菌，各種動物の精子, ヒト血小板を カーボン薄膜を張ったグリッド上に採取した。液体窒素で冷却した液体エタン中で浸漬急速凍結固定を行った。電子顕微鏡観 察 : 電子顕微鏡の液体ヘリウム冷却試料室に標本を移して観察した。後焦点面に炭素薄膜からなる Hilbert 位相板や Zernike 位相板を装置した JEOL JEM-3100FFC 電子顕微鏡により加速電圧 300kV で無染色で観察した。
【結果と考察】細菌においては，凍結保存の状態から増殖に至る過程の微細構造変化が観察された。精子においては, 人工授 精に適した凍結保存の状態の微細構造を観察するとともに，脊椎動物の種差を観察した。血小板においてはトロンビンによる凝集過程を観察した。以上の位相差電子顕微鏡観察から，種を問わず細胞内構造と変化を無染色の状態で観察できることがわかった。生物の有する真の構造とその動態を観察できるため，電子顕微鏡の新たな医学への応用が行える可能性が示された。

（6）微小管の枝分かれー進化における意義と構造解明へのアプローチ

村田　隆（基礎生物学研究所）

微小管はα, βチューブリンヘテロダイマーが重合してできたチューブ状のポリマーで，細胞分裂における染色体の分配，細胞内輸送，細胞極性の形成・維持などに働く。細胞内の微小管重合核はγチューブリン複合体である。動物細胞ではγチューブリン複合体は中心体に局在し，微小管は中心体から放射状に伸長する。一方，高等植物の細胞は中心体を持たず，微小管の形成機構はほとんど不明であった。

高等植物の細胞が細長く伸びる時には微小管が細胞膜に沿って並び（表層微小管列），細胞の伸長方向を制御することが知られている。表層微小管列を構成する微小管の起源を調べたところ, 微小管は既存の微小管上で重合開始し，既存の微小管に対して約 40°の枝状に伸び出すことがわかった。単離細胞表層を用いた無細胞系でγチューブリンの役割を解析したところ，細胞質中に存在するγチューブリン複合体が既存の微小管に結合し, 微小管の枝分かれ状形成を起こさせることがわかった(Murata et al. Nature Cell Biol. 7, 961-968, 2005)。

細胞が外側からくびれて分裂する動物細胞と異なり，高等植物の細胞は細胞内に細胞板を形成することにより分裂する。細胞板は隔膜形成体と呼ばれる微小管構造によりつくられる。隔膜形成体の発達に伴う微小管の挙動を GFP-αチューブリン発現細胞を用いて詳細に観察したところ，隔膜形成体の発達に伴い微小管の枝分かれによる形成が起こることが示唆された。これらの結果から，高等植物の細胞は微小管の枝分かれ形成機構を獲得したことにより多様な微小管構造を形成し，特徴的な様式の細胞伸長，細胞分裂が可能になったと推測された。現在，微小管の枝分かれに働くαチューブリン複合体タンパク質を探索するとともに，微小管枝分かれ部位の微細構造の解析を進めている。

（7）生きたシアノバクテリアにおけるフィコビリソームなどの超分子を見る

仲本　準（埼玉大学理学部）

シアノバクテリア（藍藻）は，光合成細菌とは異なり光化学系 I 及び II をもち，植物同様に酸素発生型の光合成を行なう原核生物で, 葉緑体の起源と考えられている。光合成色素として，クロロフィル，カロテノイドの他に，フィコシアニンやアロフィコシアニンなどのフィコビリタンパク質をもつ。多数のフィコビリタンパク質が集合してフィコビリソームと呼ばれる巨大な(5〜20 x 10^6 Da)アンテナ色素複合体を形成する。フィコビリソームの構成ポリペプチドで，発色団をもたない数種類のリンカーポリペプチドは，高度に秩序正しく構築されたこの超分

子の骨格をなすと考えられている。細胞総タンパク質量の 50%にも達するフィコビリソームは窒素の貯蔵形態の一つであるとも考えられていて，栄養条件に迅速に応答してダイナミックな量的・質的変化をする。そのサイズ，細胞内の蓄積量，チラコイド膜上における規則正しい配置などの理由からフィコビリソームは顕微鏡観察に適した超分子であると考えて，細胞におけるこの超分子の構造と，その構築・分解過程（中間体・前駆体構造）の解明を研究目的とした。フィコビリタンパク質の結晶は 100 年以上も前に報告され, 1980 年代に Schirmer と Huber らによって原子レベルで構造決定がなされた。しかし，リンカーポリペプチドの不安定性故か，その構造，従ってフィコビリソームの「骨組み」の構造は未解明である。また，従来の透過電子顕微鏡による「成熟した」単離フィコビリソームの観察例はあるが，「未成熟の」ものについては解析はなされていない。

実験材料として，「最も単純な」フィコビリソームをもつシアノバクテリア *Synechococcus* sp. PCC7942 株を用いた。金子らは，この株が，永山らにより開発されたヒルベルト微分コントラスト(HDC)電子顕微鏡を用いた‘生きた’細胞の微細構造観察に適したものであることを示したが，カルボキシソーム（多面体顆粒）中のリブロース-1,5-二リン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ酵素のパラ結晶も高コントラストで観察可能であった (Kaneko et al., 2006)。HDC 電子顕微鏡によるフィコビリソーム構造等の解析結果について報告する。

（8）投影型 X 線顕微鏡による生物観察

吉村英恭（明治大学理工学部）

X 線顕微鏡の開発は，可視光より波長が短く高い分解能が期待されることから 20 世紀の初頭から盛んに行われてきたが，X 線の物質に対する屈折率がほとんど 1 であるので光学顕微鏡のような屈折を利用したレンズを作ることができず，長い間大きな進歩が見られなかった。近年，微細加工技術が発達したことにより，フレネルゾーンプレートとよばれる回折を利用した集光光学系ができるようになり X 線顕微鏡の分解能も 30nm 程度に達するまでになった。しかしこの光学系は効率が悪いことから非常に明るい光源が要求され，放射光施設のような大規模な実験施設でなければ利用できない欠点がある。このことは条件を変えて多くの写真を撮る必要がある生物の研究には大きな障壁となっている。ここで紹介する投影型X線顕微鏡はレンズを使わない簡単な原理のX線顕微鏡である。小さなX線光源の直下に試料を置くおくことで球面波として広がるX線により試料の拡大投影像を得る，つまり簡単に言えば「影絵顕微鏡」である。X 線源は走査電子顕微鏡により収束させた電子線を走査せずに金属薄膜の 1 点に静止させ，そこから発生する X 線を使うので，電子顕微鏡を使う程度の手軽さで X 線顕微鏡像を得ることができる。分解能は X 線光源の大きさで決まり，金のテストパターンを使った実験では約 0.1μm が得られ光学顕微鏡よりややよい程度となっている。レンズを使っていないので厚さ数 mm の試料でも全体に焦点が合うことを利用して，昆虫のマイクロ CT を試みた。また，電子線を照射する薄膜の金属を変えることで異なった波長の X 線を発生させることができるので，コントラストの違いから被写体の構成元素をある程度推測できる。ここでは生物体内にある鉄の粒子の存在を非破壊的に観察した例を紹介する。

（9）蛋白質トモグラフィー

岩崎憲治（大阪大学蛋白質研究所）

単粒子トモグラフィーは，我々が開発している「電子線トモグラフィーを応用して，単離精製されたタンパク質あるいは，細胞・組織の中の超分子構造を視覚化する方法」である。その特徴として次の 4 つがあげられる。(1)トモグラフィーの原理に基づいているので，結果に対して信頼性がある。(2)わずか数個～数十個の粒子から三次

元構造を求めることができる。(3)計算量が少なく，一台の PC で二，三日以内に結果が得られる。(4)大きくコンフォメーションの異なる同種のタンパク質が混在している場合，一つ一つの粒子の三次元情報に基づいて粒子を分類，平均化することで，それらの構造を求めることができる。電子顕微鏡を使用したタンパク質の構造解析では，単粒子解析法が有名だが，その解析方法のため，結果として提示される三次元構造の正しさを保証する指標がない。誰しも経験する問題として，構造の収束が起こらず，解析過程で出力されるどの構造を最終的な三次元構造として決定すればよいかわからないということがある。本方法は，例え低分解能でも，すばやく信頼性のある三次元構造を出力し，さらに分解能を改善するため，引き続き単粒子解析を行う場合の適切な初期構造を提供してくれる。単粒子トモグラフィーの最終目標は，精製タンパク質ではなく，細胞におけるタンパク質の三次元視覚化であるが，現在の段階でも，強力な構造解析のツールとして我々の研究室でその成果をあげている。本講演では，実際にこの方法を用いて明らかになった，コラーゲン結合型インテグリンや，脳の層構造形成を司る細胞外シグナル分子リーリンの三次元構造を紹介する。

（10）試料に応じた電子線トモグラフィの適用－TEM・STEM・クライオトモグラフィー

青山一弘（日本エフイー・アイ株式会社）

透過型電子顕微鏡法を三次元に拡張するためのトモグラフィの応用は，近年，大きな展開を見せている。既に装置開発の段階は過ぎ，具体的な成果の収穫期に入ったといえるだろう。電子顕微鏡法が元々の目的であった生物試料の観察に留まらず，様々な対象物に適用されるために色々なモディファイを加えられていったのと同様に，電子線トモグラフィもまたそのバリエーションを増やしつつある。

TEM トモグラフィ　電子線トモグラフィの基本である。通常，ほとんどのものに対して適用可能。

STEM トモグラフィ　基本的なトモグラフィ取得のシステムは通常の TEM モードと共通である。TEM モードと比較し 2 つの点において優れた特徴をもっている。HAADF 法により試料の結晶性による回折波の影響を軽減できること，傾斜による同一像内のフォーカス不均一を回避できることである。結晶性試料, 半導体試料に好適。

クライオトモグラフィ　FEI では高傾斜ユーセントリック，ヘリウム冷却ステージを持つ極低温電子顕微鏡 TECNAI-Polara を開発した。これにより生体細胞もしくは組織の凍結切片を用いたクライオトモグラフィが可能となった。さらに，クライオトランスファー機構をもつので，急速凍結→クライオセクションにより作成された氷包埋試料の観察も可能である。

連続切片へのトモグラフィの適用　電子線トモグラフィは試料の立体構造を解析することを目的とするが，電子線の透過能の低さのため，一般に試料の厚さに非常に大きな制約がある。超高圧電子顕微鏡を用いれば細胞レベルの厚さの解析も可能であるが，それでもまだ厚さの限界は厳然と存在する。試料を連続切片化すれば原理的にこの制限を回避する事ができる。

（11）TEM における3次元情報の構築技法（トモグラフィー）

及川哲夫（日本電子株式会社）

透過電子顕微鏡(TEM)は，ナノスケール・オーダーでの材料研究において最も有力な観察・分析装置として広く利用されている。TEM では試料を透過した電子で形成される 2 次元の透過像を観察するため，その空間分解能は 0.1 nm 前後と極めて高いにもかかわらず，試料の厚み方向の情報を精度よく求めることは困難であった。そこでこの欠点を補うために，CT(Computed Tomograph)法の原理を応用した TEM-CT 法 [1)]が最近一般化し，高分子

材料や生物試料などで応用が広まりつつある。

この技法では，多方向からの投影像を得るために試料を傾斜して観察方向を変ながら撮影を行う。図 1 は，試料を 0 度から 90 度まで傾斜した時のグリッド像の変化を示している。傾斜角が 70 度を越えると有効視野が著しく狭くなり，これが実用上の傾斜の限界となる。

一方，試料からの正確な情報を構築するためには，撮影する画像に正確な形態情報が記録されてなくてはならない。画像のコントラストや S/N を改善することが基本的問題として表面化している。特に厚い試料においては非弾性散乱によるバックグランドの除去が不可欠であり，一方で，試料の包埋方法[2)]も課題となっている。

本講演では，これらの改善技法の例を中心にその応用例を紹介する。

1) H. Furukawa, M. Shimizu, Y. Suzuki and H. Nishioka.; JEOL News 36 (2001) 12.
2) A. Sato; Proc. 4th world Congress of Cellular and Molecular Biology (Poitiers) (2005) p15.

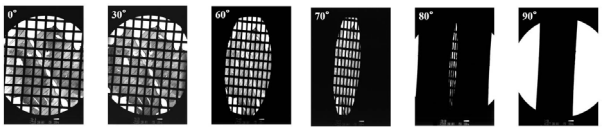


図1. 高傾斜リテイナーを用いた試料傾斜によるグリッド像の変化

（12）氷包埋を行った培養細胞の位相差電子顕微鏡による観察

厚沢季美江，臼田信光（藤田保健衛生大学医学部解剖学 II）
瀬藤光利，Radostin Danev，永山國昭（岡崎統合バイオサイエンスセンター）

【目的】位相差電子顕微鏡観察では，生物材料を無染色で高コントラストに観察できる。この特徴をいかして，化学固定・脱 水・樹脂包埋・染色という，人工的な作業を細胞に加えることなく，培養細胞の構造を直接観察することを試みた。

【材料と方法】PtK2 および HEK293 細胞は，10%FBS を添加した Dulbecco 変法 MEM で炭素薄膜を張ったプラチナメッシュ上に培養した。一部の細胞では微小管阻害剤 nocodazole を作用させ，細胞構造の変化を観察した。比較のために，ラット肝臓を材料として細胞分画法により得た細胞小器官と，ラット脳より得た微小管(twice-cycled microtubule)を観察した。氷包埋：液体窒素で冷却した液体エタン中で浸漬急速凍結固定を行った。電子顕微鏡観察：電子顕微鏡の液体ヘリウム冷却試料室に標本を移して観察した。後焦点面に炭素薄膜からなる Hilbert 位相板を装置した JEOL JEM-3100FFC 電子顕微鏡により加速電圧 300kV で無染色で観察した。

【結果と考察】単離した細胞小器官と微小管は，まるで染色を行ったように高コントラストで観察できた。培養細胞においては，核周囲の厚い構造は観察できなかったが，辺縁部では，細胞骨格・細胞小器官が明瞭に観察された。nocodazole を細胞に作用させ蛍光抗体法で観察すると微小管が消失していたが，位相差電子顕微鏡観察によって構造変化が確認できた。つまり，氷包埋と位相差電子顕微鏡を組み合わせて用いると，極めて生きている状態に近い細胞超微構造とその動態を直接観察できることが示された。

（13）位相差電子顕微鏡による脂質ナノチューブ形成過程の研究

由井宏治，神谷昌子，清水敏美（東京理科大学理学部化学科）
伊藤耕三（東京大学大学院新領域創成科学研究科）
Radostin Danev，永山國昭（岡崎統合バイオサイエンスセンター）

【緒言】ある種の脂質分子は水中で自己集合し nm オーダーのチューブ状構造体「脂質ナノチューブ」を形成する。カーボンナノチューブが疎水性であるのに対し，脂質ナノチューブは親水性であることが特徴で，タンパク質や

DNA 等の生体高分子の包接や，ドラッグデリバリーのキャリア等の応用が期待されている。脂質分子の自己集合過程の理解は，物理化学的に興味深いだけでなく，内外径の制御といった応用の観点からも重要であるが，未解明な点が多い。そこで瞬間凍結法と位相差電子顕微鏡法とを組み合わせ，脂質ナノチューブの自己集合過程の直接観測を試みた。

【実験】糖脂質分子(N-(11-cis-octadecenoyl)-β-D-glucopyranosylamine)5mg を水 100ml 中に加熱分散させ，2.5 度/分の速度で冷却した。自己集合の盛んな 60 度に達した際にサンプリングし急速凍結した。測定は液体ヘリウム温度 (4K) で JEM-3100FFC(JEOL)を用い，ヒルベルト干渉法を用いてコントラストを上げた。

【結果と考察】本脂質ナノチューブの最終内径・外径はそれぞれ 50nm，200-300nm であるが，まず脂質 2 分子膜 5-6 層が，定まったピッチで順次巻いてチューブの芯となる構造（内径 130nm，外径 180nm）が急速に形成されることが判明した。さらにこの芯チューブの内外に脂質 2 分子膜が順次積層し，最終形態に至ることが分った。これは脂質ナノチューブのごく初期の段階を直接追跡した初めての例として大変興味深い。これまで脂質ナノチューブの形成過程は，形成の早さ，サンプルの薄さ，適切な染色法のなさにより，一般に電子顕微鏡観測が困難であったが，位相差法と急速凍結法を用いることで直接観測が可能になり，本手法の有機自己集合体研究への有用性が明らかになったといえる。

（14）TEM で観る線状高分子の結晶モルフォロジー

辻　正樹（京都大学化学研究所）

ポリエチレンやイソタクチック・ポリスチレンのように立体規則性の良い一次構造を有する屈曲性線状高分子は，通常，分子鎖が折りたたまれた結晶，言わば分子内結晶を作る。即ち，これらの高分子を溶融状態から，あるいは溶液から結晶化させると，薄板状の結晶，いわゆるラメラ晶を形成し，分子鎖はその板面にほぼ垂直に充填され，上面と下面で折りたたまれている。例えば，希薄溶液からは孤立した薄板状「単結晶」が生長し，また時には溶融状態からはラメラ晶から成る「球晶」が高次構造として形成されるが，それらの結晶成分の割合を表す「結晶化度」は 100%とは成り得ず，必ず非晶成分が残る。

本講演では，溶融紡糸によって得られる合成繊維のモデル試料として，溶融状態から「ずり歪み」下で結晶化させた一軸配向薄膜中における「シシカバブ構造」や，静置場で結晶化させた時に得られる固体構造のモデル試料として，2 次元球晶構造を有する薄膜のモルフォロジーなどを TEM 観察した例を紹介する。これらの結果から得られる情報は，繊維など結晶性高分子固体の力学物性等と固体構造との間の関係を考察するうえで，また，力学物性等の向上した高分子材料を創製するうえで重要であると考えられる。因みに，これらの試料の結晶モルフォロジーを調べる際には，制限視野電子回折や暗視野観察が主たる手法になるため，また場合によっては個々の微結晶の配向状態や格子欠陥等の知見を得るため高分解能観察も行うので，基本的には無染色観察を行っている。

（15）位相差 TEM の高分子材料への応用

登阪雅聡（京都大学化学研究所）

透過型電子顕微鏡(TEM)は原子の大きさに迫る高い解像力を持っている装置だが，物質の微細構造を観察するためには解像力に加えて像のコントラストが必要である。高分子試料は一般に像のコントラストが低いため，通常は特定の部分に重金属原子を付着させる「染色」「シャドウイング」などの前処理を行い，コントラストを高

めた試料を観察している。しかし，これらの前処理手法が適用できないため，内部構造の判定できない試料も数多く存在している。また，染色法の場合はナノスケールの構造が染色過程で元の構造と変わってしまう可能性がある。こうした問題に対して，これまで元素分析の手法を組み合わせる試みが成されてきたが，多量の電子線を照射する必要があるため電子線損傷という別の問題が引き起こされていた。あるいは，非常に大きなデフォーカスで観察する手法も提案されているが，この場合も分解能がかなり犠牲となってしまう。

こうした問題を解決すべく，位相差 TEM が開発された。この装置は位相差光学顕微鏡と同様に位相板を後焦点面に配置しており，散乱ビームと非散乱ビームの間に干渉を生じさせて無染色試料も高いコントラストで観察できる。この場合，正焦点付近でも高いコントラストが得られるので，デフォーカスコントラスト法とは異なり分解能を大きく犠牲にする事も避けられる。例として，カーボンブラックを充填した天然ゴムの場合は，カーボンブラック粒子と同時に，コンパウンディングに用いられるステアリン酸の結晶格子も撮影されていた。また，ブロックコポリマーやその他の高分子試料も，無染色のまま高いコントラストで観察された。この様に高分子材料の分野でも，位相差 TEM による無染色観察で研究の幅が大きく広がると期待される。

（16）ブロックコポリマーの無染色 TEM 観察と電子線トモグラフィー

長谷川博一（京都大学大学院工学研究科）

ブロックコポリマーは異種の鎖状高分子を共有結合で連結した自然界には存在しない構造を持つ高分子であるが, その連結効果により様々の興味深い現象が発現する。「ミクロ相分離」もその一つであり，互いに非相溶な高分子を成分とするブロックコポリマーは，分子のサイズ程度である数十〜数百 nm の周期と，1，2，3 次元の様々な幾何学的パターンを持った規則的な相分離構造を形成する。これらのパターンを利用した電子材料，パターンドメディア，ナノコンポジット，ナノ多孔体，フォトニッククリスタルなどのナノ材料の開発研究が盛んであるが，TEM によるミクロ相分離構造の観察は不可欠である。

ジエン系高分子を一成分とするブロックコポリマーの TEM 観察には従来からオスミウム酸染色法が用いられてきたが，ポリアセチレンなどの機能性高分子を成分とするブロックコポリマーには染色不可能なものが多く，無染色 TEM 観察法の開発が望まれていた。近年，エネルギーフィルタリング TEM や位相コントラスト TEM が開発され，無染色観察が可能となった。我々はこれらの手法を用いていくつかのブロックコポリマーについてミクロ相分離構造の無染色観察を行い, 良好な結果を得た。また，複雑なミクロ相分離構造や構造欠陥の研究には 3 次元構造の観察が有効であるが，我々は電子線トモグラフィーを用いることにより興味深い構造や現象を見出すことができた。講演ではこれらの手法を用いたいくつかの研究例を紹介する。

（17）エネルギーフィルターTEM による高分子の可視化

堀内　伸（産業技術総合研究所 ナノテクノロジー研究部門）

高分子は軽元素のみから構成されるため, TEM での観察には重金属による染色が必要にある。エネルギーフィルターTEM(EFTEM)により，試料を透過した非弾性散乱電子を分光し，結像することにより，無線色により良好なコントラストで高分子を観察することが可能であり，さらに，元素マッピング，EELS を併用することにより，構造を定量的に解析することが可能となり，得られる情報量は通常の TEM に比べはるかに高くなる。高分子界面は，複合材料，塗膜，接着など高分子材料のいろいろな局面において材料の性能，機能に影響を与える。我々

は，高分子界面の解析に EFTEM を適用し，界面ナノ構造と物性との相関に関して研究を行ってきた。本講演では，元素マッピングによる高分子界面の可視化と ImageEELS による元素組成の定量的解析を行い，界面接着強度と界面ナノ構造との相関，及びゴム材料における無機フィラーとゴムとの相互作用に関する研究例を紹介する。

（18）シリカ系ナノ細孔材料の TEM 観察

佐々木優吉（財団法人ファインセラミックスセンター）

酸化珪素を主な成分とするナノ空間材料（ゼオライトやメソポーラスシリカ）は，0.4nm～数 nm の細孔チャンネルが規則的に三次元配列している。ナノ空間材料の多くは準安定相であり，電子線照射によって短時間で非晶質化する。ナノ空間材料の高分解能 TEM 観察を実現するためには，高感度記録媒体を用いた低電子線照射量観察が最も有効であり，これによって空間分解能 0.2nm 以下の像を得ることが可能である。

ナノ空間材料は，結晶構造に由来して形成される微細な細孔チャンネルが機能場として利用される。本研究では，CCD カメラを用いた低電子線照射量観察を行い，ナノ空間材料内の細孔チャンネルの高分解能 TEM 観察を実現するとともに，イオン交換能を有する Si-Al-O 系ゼオライトの高分解 TEM 観察像の画像定量解析を試みた。その結果，イオン交換 ($Na^+ \Rightarrow Ag^+$) 状態が，像観察によって判別可能であることを確認した。

また，層状ケイ酸塩内での有機カチオンのミセル形成によって，非晶質酸化珪素を壁とする直径約 3nm の細孔チャンネルが一次元に規則配列したメソポーラスシリカが形成される過程を，低電子線照射量観察によって解明した結果についても紹介する。

（19）電子線ホログラフィーによるミクロ～ナノ領域の電場・磁場の観察

平山　司（財団法人ファインセラミックスセンター）

真空中や試料中の電場・磁場を電子線ホログラフィーで観察することを顕微鏡学的に表現すれば，「純位相物体を透過した電子波の低空間周波数位相情報を強度情報に変換して画像表示する」ということになる。また，これは「見えないものを無染色で観る」という本講演会の趣旨にぴったりあてはまる。

電子線ホログラフィーは，Gabor が電子レンズの収差を補正するという目的で 1940 年代に考案した手法であり，ホログラムの撮影と像再生の 2 段階の操作よりなる結像方法である。ホログラムは電界放出型電子銃を持つ電子顕微鏡を用いて，試料や観察したい空間を通り抜けた電子波（物体波）と何も存在しない空間を通ってきた電子波（参照波）を重ね合わせて干渉させることによって得られる。この 2 つの電子波を干渉させるのに使うのが電子線バイプリズムである。得られた干渉縞は「ホログラム」と呼ばれ，試料の位相情報は干渉縞の曲がりとしてフィルムや CCD カメラ等に記録される。

撮影したホログラムは，以前はマッハツエンダー干渉計と呼ばれる光学装置を用いて再生したが，最近ではコンピューターを用いた解析が主に用いられるようになった。フーリエ変換等を用いて位相情報を抽出し，試料直下の複素波動場を求めることができる。複素波動場は視覚的に表現しにくいので，位相の傾きを濃淡で表す「位相分布像」や同じ位相値の部分を等位相線として結ぶ「干渉顕微鏡像」などで表現する。

（20）偏光と位相差による生体試料の可視化観察－－光学顕微鏡でみる数十 nm の世界－－

加藤　薫（産業技術総合研究所・脳神経情報研究部門）

この発表では，偏光と位相差による，位相物体としての生体試料の光学顕微鏡観察のエッセンスを取り扱う。

【偏光観察の概説】複屈折は光学的異方性の一つである。偏光顕微鏡で観察できる。複屈折の観察は，位相差と関係が深い。複屈折性の試料の界面で，光波は，o 波と e 波という 2 つの波に分かれる。試料透過後に o 波と e 波の間に位相差（リタデーション）を生じるが，偏光顕微鏡は，o 波と e 波の位相差を検出するのである。

【偏光顕微鏡とシンヤスコープ】最も簡便な偏光顕微鏡は，対物側，コンデンサー側に，1 対の偏光器を取り付けたものである。しかし，実際に，偏光器を顕微鏡の中に組み込むと，偏光特性の劣化が生じる。例えば，偏光器だけの状態で，消光比が 100 万でも，同じ偏光器を顕微鏡に組み込むと，消光比は低下してしまう。これを改善したのが，レクティファイアー（井上信也博士の考案）である。この顕微鏡で，井上らは，精子内部の染色体の構造が調べ，細胞中の DNA 構造の最初の知見を出した。

【Polscope】偏光顕微鏡での解析では，回転ステージでの試料の回転操作が必須で，画像処理には馴染まない。そこで，試料を固定し，偏光波の振動方向と状態を電子制御し，サンプルのリタデーションを計測する顕微鏡システム(PolScope)が考案された。私はこのシステムの立ち上げと生体試料観察への応用に取り組み，神経成長円錐内部のアクチン繊維束（直径数十 nm）を無染色で可視化することに成功した。movie を交えて紹介する。

【偏光から位相差へ】偏光顕微鏡は，生細胞内の微結晶を観察できるが，ランダムな方向をとる蛋白は観察できない。蛋白質の量比を捉えるには，位相差顕微鏡の方が適している。私は大瀧と共同で，位相差顕微鏡の改良に取り組み，アクチンの網目の可視化に成功した。

（21）アポディゼーション位相差顕微鏡の生細胞観察への適用

大瀧達朗（株式会社ニコン）

位相差顕微鏡は，生細胞の無染色観察に威力を発揮する。近年我々は，位相差顕微鏡の欠点であるハロを減じ，位相差の検出力を高めたアポディゼーション位相差法を開発した。最近開発した開口数 1.30 の油浸アポディゼーション位相差対物レンズは，光学顕微鏡の解像限界以下の微細構造，例えば細胞小器官のアクチン束や顆粒等の観察に適する。このアポディゼーション法の原理と生細胞観察について述べる。

位相差法による像コントラストは，位相物体で生じる直接光と回折光の変調した合成で得られる。位相差が微小な場合，回折光強度は位相差に比例する。検出力を高めるためには直接光の強度を弱めると良いが，検出力を高めるほどハロが発生しやすい。不要なハロは，細胞全体など大きな構造に多く見られる点に着目し，大きな構造だけを選択的に低コントラストにするのがアポディゼーション法である。構成は，顕微鏡の対物レンズ内に置かれたリング形状の位相板に，アポディゼーション帯と呼ぶ吸収帯を設ける。アポディゼーション帯の作用で所定の大きさの物体で生じる回折光の強度を減じ，その大きさの物体の像コントラストを低くする。一方，微細な観察対象の回折光の大部分は変調が無く，高コントラストの像が得られる。

結果は，直径 20 - 60 nm のアクチン束やストレスファイバーを無染色の生細胞内で可視化できたことに加え，明るい光学系を利用してタイムラプス像として捉えた。ミトコンドリアや核膜も良好に可視化できている。さらに特徴的なことは，像の低周波数成分を低コントラストにする効果で，断層的な像を得ることができる。このようにアポディゼーション位相差法は，生細胞の微細構造を無染色のまま観察する方法として優れており，特に生細胞の動的観察に有効な方法である。

19. DNA 構造を基盤とするゲノム生理学の展開

2005 年 11 月 17 日－11 月 18 日

代表・世話人：鳥越秀峰（東京理科大学理学部）
所内対応者：永山國昭（ナノ形態生理）

（1）ミニサテライト DNA 配列が形成する特殊高次構造の生化学解析と電子顕微鏡解析

加藤幹男（大阪府立大学大学院理学系研究科）

（2）Polypurine/polypyrimidine 配列の比較ゲノム解析

金谷重彦（奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科）

（3）特殊 DNA 構造に基づく人工的遺伝子発現制御とテロメア調節機構に関する解析

鳥越秀峰（東京理科大学理学部応用化学科）

（4）酵母ゲノムにおいてヌクレオソーム形成を阻害する DNA 構造による転写制御機構の解析

清水光弘（明星大学理工学部）

（5）ほ乳類βグロビン遺伝子転写制御領域に存在する進化的に保存された DNA 構造

木山亮一（産業技術総合研究所）

（6）人工染色体の構築と利用

池野正史（藤田保健衛生大学総合医科学研究所）

（7）DNA 塩基損傷の認識と修復機構

菅澤　薫（理化学研究所）

（8）バクテリアのプラスミド分配に関与するらせん状構造体を視覚化する試み

仁木宏典（国立遺伝学研究所系統生物研究センター）

（9）細胞死 DNA 断片化の生理学

水田龍信（東京理科大学生命科学研究所）

(10) DNA に印された配列以外の情報を読む

大山隆（甲南大学理工学部）

(11) 地球上は細胞外 DNA だらけ？―微生物バイオフィルムから見た DNA－

野村暢彦（筑波大学大学院生命環境科学研究科）

(12) 植物細胞における生体防御・プログラム細胞死・細胞周期制御のクロストーク

朽津和幸（東京理科大理工学部）

(13) Analytic theory for DNA condensation

石本志高（理化学研究所）

(14) ゲノム生理学研究会への提言

永山國昭（岡崎統合バイオサイエンスセンター）

【参加者名】

鳥越秀峰（東京理科大），田中宏幸（奈良先端大），木山亮一（産総研），水田龍信（東京理科大），仁木宏典（遺伝研），池野正史（藤田保健衛生大），加藤幹男（大阪府立大），菅澤薫（理化研），金谷重彦（奈良先端大），清水光弘（明星大），朽津和幸（東京理科大），石本志高（理化研），大山隆（甲南大），野村暢彦（筑波大），丁雷（生理研），福井由宇子（基生研），小澤一益（統合バイオ）

【概要】

平成 17 年度大学共同利用機関法人自然科学研究機構生理学研究所研究会 No.19「DNA 構造を基盤とするゲノム生理学の展開」は，提案代表者：鳥越秀峰（東京理科大学理学部），所内対応者：永山國昭（岡崎統合バイオサイエンスセンター・ナノ形態生理）のオーガナイズにより平成 17 年 11 月 17-18 日に岡崎コンファレンスセンター2 階小会議室で開催された。出席者約 20 名を集め，口頭発表 14 件が行われ，白熱した議論が展開された。主たるトピックスとしては，「DNA 高次構造とゲノム機能」，「クロマチン構造とゲノム機能」，「DNA 情報制御とゲノム機能」，「多様な生命現象とゲノム機能」，「DNA 構造の原点から見たゲノム機能」が取り上げられた。初日の講演会終了後に懇親会が催され，さらに掘り下げた議論が展開され，参加者相互間の学問的理解が深まり，非常に有意義であった。これらの流れの中で，新しい共同研究の展開が模索されると共に，永山教授により開発されて生理学研究所に導入された位相差電子顕微鏡の共同利用の機運が高まり，「染色体の構造異常」に特に焦点を当てて共同利用を展開する方向性が提示された。

（1）ミニサテライト DNA 配列が形成する特殊高次構造の生化学解析と電子顕微鏡解析

加藤幹男（大阪府立大学大学院理学系研究科）

ミニサテライト DNA は，一般に，ゲノムに散在している 10bp から 100bp 程度の単位が数回から数十回縦列に繰り返している配列である。これらのミニサテライト領域においては，その縦列回数はきわめて多型性に富んでおり，その原因として不等交叉や複製時の伸長/欠失が想定されている。本研究では，海水魚 *Acanthopagrus latus* 由来の 30bp を単位とするミニサテライト DNA を材料として，多型をもたらす構造要因を明らかにするために，電気泳動移動度，化学修飾，および電子顕微鏡などによる解析を試みた。

化学修飾実験の結果から，一本鎖状態のミニサテライト DNA は，反復単位においてヘアピン様構造を形成することが示唆された。マグネシウムイオンの存在は，これらの化学修飾実験の結果に影響しなかったが，電気泳動移動度には大きく影響することがわかった。すなわち，マグネシウムイオンは，塩基対形成に影響を与えることなく，一本鎖 DNA 分子を凝縮させる（電気泳動移動度を大きくする）ことが示唆された。凝縮した一本鎖 DNA 構造は，電子顕微鏡によって直接観察された。このような一本鎖状 DNA の高次構造形成は，DNA 複製の鋳型鎖で起こると相補鎖の合成を一時停止することでミスアライメントを誘発したり，新生相補鎖においては Okazaki fragment 5’側での高次構造形成を誘発したりすることで，繰り返し数の変動をもたらす原因のひとつであると考えられる。

（2）Polypurine/polypyrimidine 配列の比較ゲノム解析

金谷重彦（奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科）

Polypurine/polypyrimidine 配列は，3 重鎖構造(Triplex)のような特殊な立体構造の構築と関係し，転写制御や複製機構といった分子生物学的機能との関連が示唆されている。また現在，ゲノムプロジェクトの進展に伴って，250 種以上のバクテリアに加え，ヒトやマウスのような高等真核生物のゲノム配列も決定されている。そこで，3 重鎖構造のような非 B 型 DNA 構造のゲノム多様性を把握する目的で，これらのゲノムデータを基に AG または TC 含量が 90%で 300bp 以上の長さを閾値とし，生物種間における Polypurine/polypyrimidine 配列の出現特徴を調べた。結果，バクテリアでは Archaea にのみ 2 種見つかり，どちらも Metanosarcina 属であった。また，脊椎動

物ゲノムでは大量の Polypu/py 断片が見つかり, *H.sapiens* において染色体間でその分布形態に特徴が見られた。更に今回，Polypu/py 配列がヒト染色体の複製タイミングに与える影響について，ヒトゲノム全体に拡張して解析を行った。

（3）特殊 DNA 構造に基づく人工的遺伝子発現制御とテロメア調節機構に関する解析

鳥越秀峰（東京理科大学理学部応用化学科）

様々な生物の染色体の全塩基配列が明らかにされ，多数の遺伝子が同定されているが，機能未知のままの遺伝子は少なくない。機能未知の遺伝子発現を人工的に活性化・抑制して表現型を検討するのが，機能未知の遺伝子機能を推測する有力な手段である。本研究では，任意の遺伝子上流配列を認識し，下流の任意の遺伝子発現を人工的に制御し得る人工転写因子の創製を試みたので紹介する。具体的には，機能未知の遺伝子の上流配列と 3 本鎖核酸を形成しうる 1 本鎖核酸に，転写因子の活性化・抑制ドメインをつなげ，これを機能未知の遺伝子の上流配列に結合させ，機能未知の遺伝子発現を制御するものである。

一方，染色体末端のテロメアは G 塩基に富む反復配列からなり，3’末端は突出した 1 本鎖 DNA 領域である。テロメア長の変化は細胞の老化や癌化と密接な関係にある。テロメア長の調節には，テロメラーゼと共に，テロメアの 2 本鎖及び 1 本鎖 DNA 領域に特異的に結合する蛋白質が関与する。本研究では，分裂酵母のテロメア 1 本鎖 DNA 領域とこの領域に特異的に結合する蛋白質 Pot1 について解析したので紹介する。分裂酵母のテロメア 1 本鎖 DNA 領域は G 塩基に富み，Na^+や K^+イオン存在下で折れ畳まり，G 塩基 4 個が同一平面上に並んだ 4 本鎖核酸を形成した。これに Pot1 蛋白質を添加すると，4 本鎖核酸がほどけることを見つけた。この現象と他の結果を合わせてテロメア調節機構について考察する。

（4）酵母ゲノムにおいてヌクレオソーム形成を阻害する DNA 構造による転写制御機構の解析

清水光弘（明星大学理工学部）

多くの真核生物遺伝子の転写は，クロマチンの構造変化を介して制御されていると考えられているが，このことを *in vivo* で検証する方法は限られている。この問題に対して，我々は，出芽酵母ゲノムの正確な位置に，比較的短い，様々なヌクレオソーム阻害配列を導入することによって，局所的クロマチンの機能を解析する新しいアプローチを確立した。出芽酵母 a-細胞特異的遺伝子 *BAR1* のプロモーター領域に，A_n•T_n と $(CG)_n$• $(CG)_n$ 配列（それぞれ *B’*構造と Z-DNA を形成できる）を挿入し，α2/Mcm1p による転写抑制におけるヌクレオソームポジショニングの機能について解析した。A_n または $(CG)_n$ 配列が長くなるほど，α細胞における *BAR1* の脱抑制が大きくなった。そして，この *BAR1* の脱抑制が見られた A_n または $(CG)_n$ を挿入したプロモーターでは，ヌクレオソームポジショニングが破壊されていることが示された。したがって，ヌクレオソームポジショニングは a-細胞特異的遺伝子の転写抑制機構に本質的な役割を持つことが実証された。このアプローチの普遍性を調べるために，無機リン酸飢餓状態で誘導発現される *PHO5* 遺伝子の発現制御におけるヌクレオソームの機能の解析も進めている。

（5）ほ乳類βグロビン遺伝子転写制御領域に存在する進化的に保存された DNA 構造

木山亮一（産業技術総合研究所）

ヌクレオソームは 1 細胞中に約 10^7 個あり，それらが隣り同士や離れた者同士の間で相互作用をしていることから非常に複雑であり，特に高次のクロマチン構造と機能との関係については研究が余り進んでいない。我々は，このような複雑なクロマチンの状態を解析する作業仮説として,「ヌクレオソームには階層構造(hierarchy)がある」と考えている[1-3]。すなわち，全てのヌクレオソームが同じような挙動を示すわけではなく，機能的に重要なヌクレオソーム(key nucleosome)のグループとそうでないものがあるということである。我々は，今回，ジヌクレオソーム（ヌクレオソーム二量体）の解析結果[4, 5]をもとに，約 30 個以上のグロビン遺伝子プロモータ領域に関して塩基配列の比較を行い，遺伝子の転写開始点から 200～400 bp 上流の領域に高等動物において進化的に保存された領域を見いだした。この領域は，塩基配列自体の相同性は低いが，AA-あるいは TT-ジヌクレオチドの高い出現頻度を特徴とし，折曲り構造（ベント DNA 構造）を示した。また，ヒト，マウス，ラビット及びギャラゴの 4 つの種における 18 個の遺伝子領域の解析から AA-ジヌクレオチドの平均の周期は約 13 bp であった。このような領域が進化的に良く保存されていることは，ヌクレオソームの配置の情報が既にゲノム DNA に記されていることを意味すると考えられ，グロビン遺伝子の転写反応にとって重要な意味を持つことが示唆される。

1. Onishi & Kiyama. *Nucl. Acids Res.* 29, 3448-3457, 2001:
2. Kiyama & Trifonov. *FEBS Letters* 523, 7-11, 2002:
3. Onishi & Kiyama. *Recent Devel. Nucl. Acids Res.* 1, 131-150, 2004:
4. Kato et al. *J. Mol. Biol.* 332, 111-125, 2003:
5. Kato et al. *J. Mol. Biol.* 350, 215-227, 2005.

（6）人工染色体の構築と利用

池野正史（藤田保健衛生大学総合医科学研究所）

遺伝子の発現制御や，遺伝子の次世代への伝達を担う染色体は，ゲノム DNA を精密かつ柔軟に調整する構造体であり，細胞周期に伴いダイナミックにその構造を変化させる。染色体が保有する 3 機能領域，複製起点・セントロメア・テロメアにより，染色体は細胞核内に安定に維持される。この染色体の機能領域はゲノム配列に依存して形成される。私たちはこれまでに，ヒト-アルファサテライト DNA を用いて，ヒト細胞染色体とは独立に存在しうる「人工染色体」を構築し，ゲノム配列に基づく染色体の構造形成を示した。人工染色体の構築は再現的であると同時に，一度細胞内で構築された人工染色体を微小核融合法により様々な細胞株に移すことができることから，遺伝子導入ベクターとしての利用開発に取り組んでいる。また，遺伝子発現領域などの染色体機能領域を人工染色体上に再現することが可能であり，染色体機能の解析系を構築している。本研究会では，ヒト型遺伝子を付加した人工染色体を保有する細胞やマウスの作製と，人工染色体からの遺伝子発現や人工染色体の次世代への伝達安定性について紹介する。

（7）DNA 塩基損傷の認識と修復機構

菅澤　薫（理化学研究所）

ゲノム DNA は活性酸素や放射線，化学物質などによって絶え間なく損傷を受けている。DNA 損傷は転写や複製の妨げとなり，細胞死や突然変異，ゲノム不安定化等をもたらすことによって，がんなどのさまざまな病態を

引き起こす可能性がある。このような事態を未然に回避するための防御機構として，種々の DNA 修復機構が生物にとって重要な役割を果たしている。

DNA 損傷の大部分は，塩基部分の損傷と単鎖切断によって占められる。しかしながら，長大なゲノム DNA に発生した数少ない損傷塩基を，圧倒的過剰に存在する正常塩基の中から見つけ出して修復するのは決して容易なことではない。我々は，紫外線や化学物質によって誘起される種々の塩基損傷を対象とするヌクレオチド除去修復(NER)機構に着目し，C 群色素性乾皮症(XPC)タンパク質を含む複合体の機能が損傷部位の認識と修復反応の開始に必須であることをこれまで示してきた。XPC 複合体の生化学的な性状解析から明らかになった，NER 機構が化学構造上まったく共通性を持たない種々の塩基損傷を認識するための分子基盤，および NER 反応の分子機構について議論する。

（8）バクテリアのプラスミド分配に関与するらせん状構造体を視覚化する試み

仁木宏典（国立遺伝学研究所系統生物研究センター）

バクテリア，すなわち原核細胞での染色体の移動機構に関してその分子的なメカニズムは長らく不明である。特に，真核細胞の染色体分配で重要なチューブリンやアクチンが原核細胞には存在していないことから，全くことなる染色体の移動機構が考えられてきた。しかしながら，チューブリンやアクチンといった細胞骨格タンパクが原核細胞に見いだされ，その一部は DNA の移動機構に関与していることが近年，明らかにされた。

バクテリアの性決定因子である F プラスミドは固有のプラスミド移動機構を持っており，これは 3 つの遺伝子により構成されている。この移動の分子機構を明らかにするため蛍光タンパク標識方法を利用して，生きた細胞内でプラスミドの移動とその移動のためのモータータンパク質 SopA を観察した。プラスミドと SopA タンパク質は細胞内をそれぞれ周期的に移動しその局在を変化させる。このとき，SopA タンパク質は細胞の極付近に凝縮し強い蛍光輝点として観察される。さらに，この構造とは別に，SopA タンパク質は繊維状の構造体を形成し，細胞内をらせん状に走る。この構造が，プラスミドの移動とその方向性の決定に重要な働きを持つものを考えられる。らせん状 SopA の構造変化を生きた細胞内で追い，プラスミドの運動性を作り出す機構を探っている。

（9）細胞死 DNA 断片化の生理学

水田龍信（東京理科大学生命科学研究所）

多細胞生物の細胞死は，顕微鏡下での形態学的特徴から，ネクローシスとアポトーシスの 2 つに大別される。過剰な外的刺激による強引な細胞死であるネクローシスに対して，アポトーシスは遺伝子に制御された自発的な細胞死であり，形態形成，神経系，免疫系の確立など，基本的な生命現象に深く関与している。しかし，その生理的メカニズムに関しては不明な点が多い。アポトーシスの生化学的特徴として有名なものに，ヌクレオソーム単位での DNA 断片化がある。この現象はリンカー部位での DNA の切断として説明されているが，コアのヌクレオソーム単位が 146 塩基対に対して，観察される DNA 断片が 180～200 塩基対とやや長く，単純にリンカー部位での切断だけでは説明できない。我々はこれまで，アポトーシス時の DNA 断片化を触媒する酵素の一つに注目し解析を行ってきた。その結果，この酵素が働くためにはリンカーヒストンが必要であることを見出した。このことは，リンカーヒストンのリンカーDNA 結合部位がこの酵素の標的となることを示している。リンカーヒストンは染色体の折り畳みに必須とされてきたが，染色体の分解にも重要な機能を有することが示唆された。

（10）DNA に印された配列以外の情報を読む

大山隆，福江善朗，井上正太郎，隅田周志，棚瀬潤一（甲南大学理工学部）

DNA の塩基配列と構造は，コインの表と裏のように切っても切れない関係にある。したがって，同じ塩基配列をもつ DNA が同じ構造をもつことは当然としても，意外なことに，異なった塩基配列をもつ DNA が同じような高次構造をとったり，似たような機械的特性をもったりする場合がしばしばある。最近になって，DNA のこのような高次構造や特性は遺伝情報の一つ（高次の遺伝情報）となっていて，世代を越えてクロマチンを再現するために機能したり，遺伝子発現を保証するためのクロマチンの構築や維持に寄与したりしていることが明らかになってきた。

我々はこれまでの研究で，負の超らせんを擬態したベント DNA がクロマチン内の DNA の空間的位相を制御して，転写活性化因子などが標的配列に結合できるようにしていることを明らかにしてきた。これとは別に，最近我々は，クラス II 遺伝子のプロモーターには共通の機械的特性があることを発見した。興味深いことに，プロモーターとは無関係な DNA 断片にこの特性をもたせると，この断片が細胞内でプロモーターとして機能することが明らかになった。また我々は，DNA が自己集合する性質をもっていることも見出した。DNA の自己集合は生理的濃度のマグネシウムイオン存在下で起こり，混合 DNA 溶液中でも起こる。この現象は，反復配列の折り畳みや，相同的組換え，減数分裂時の染色体対合など，さまざまな生命現象に関与している可能性がある。本研究会では，DNA のコンフォメーションや機械特性に隠された遺伝情報と DNA の自己集合現象の生物学的意義について議論する。

（11）地球上は細胞外 DNA だらけ？－微生物バイオフィルムから見た DNA－

野村暢彦（筑波大学大学院生命環境科学研究科）

海洋に浮遊する細胞外 DNA の大規模解析が Venter によりなされ約二千種に属する新規遺伝子が検出された。海洋以外にも多くの地球環境で細胞外 DNA の報告が相次いでいる。また，それらの DNA 長は数十キロ bp という遺伝子情報を有するのに十分な点も興味深いところである。

一方，その地球環境上のあらゆるところで微生物は同種あるいは異種の微生物細胞と細胞外高分子物質（細胞外マトリクス）からなるバイオフィルムを形成し集団生活を送っていることが明らかとなってきている。興味深いことに，このバイオフィルムを構成する細胞外マトリクス中には細胞外 DNA が含まれており，DNase 処理を行うとバイオフィルム形成能が失われる。それは DNA が細胞内の遺伝情報の発現や維持だけでなく，細胞外においては“遺伝”とは全くことなる働きを司っている可能性を有していることを示唆している。

以上の背景を中心に，微生物バイオフィルム形態の三次元時空間解析からの DNA についてと，さらに DNA の物性についての研究を紹介させていただき議論の材料とさせていただく

（12）植物細胞における生体防御・プログラム細胞死・細胞周期制御のクロストーク

朽津和幸（東京理科大理工学部）

植物は動物のように移動して不利な環境から逃げる代わりに，病原体の感染を認識し，生体防御応答を誘導するなど，悪環境や外敵から自分を守る巧妙な自然免疫システムを進化の過程で獲得して来た。感染防御応答の過

程では，感染部位の細胞が自律的な細胞死を起こすと同時に，周辺の組織で迅速な防御遺伝子発現や抗菌性物質の合成などが誘導され，病原体の増殖と拡散を阻止する。この細胞死は，動物のアポトーシスとの類似点や相違点が指摘されているが，その機構は未解明の点が多い。病原菌由来のタンパク質を感染シグナルとして認識し，高度に同調的に自律的な細胞死が誘導される培養細胞を用いた実験系を構築し，解析した結果，自然免疫･細胞死シグナル伝達系が細胞周期の時期により厳密に制御され，細胞死に先立ち細胞周期が特定の時期に停止するという，細胞周期と細胞死のクロストーク機構の存在が明らかとなった。細胞死制御の分子機構を解析するため，動植物ゲノムの比較解析の新しい手法を開発し，新規細胞死制御因子の同定と機能解析を試みている。アポトーシス抑制因子 IAP の相同遺伝子は植物ゲノム中に見出されないが，BIR ドメインと共通の起源から進化したと考えられる BLD (BIR-like domain)を持つ新規遺伝子群 ILP ファミリーを発見した。ヒトにも ILP が存在し，HsILP1 はヒト培養細胞のアポトーシスを抑制することが明らかとなった。

（13）Analytic theory for DNA condensation

石本志高，菊池伯夫（理化学研究所）

二重らせん DNA 鎖は，多量のマイナス電荷をまとう高分子一本鎖である。しかし，適当な水溶液中では電荷がさえぎられ自由な半屈曲性高分子鎖となる。さらに，spermine(4+)，spermidine(3+)，Mg^{2+}等のプラスの多価イオンを加えると，鎖間にファンデルワールス力に似た短距離有効引力が生じることも知られていた。加えてここ十年の研究で，トロイド状（ドーナツ状の形態）に巻きついた状態が基底状態の第一候補であることが分かってきた。この DNA 凝縮と呼ばれる現象では，運ぶ遺伝情報や線状・環状の違いに依らず，また DNA の全長にも鈍感で，経験的に一定の半径に巻きつくことが知られている。DNA 輸送等 DNA マニピュレーションへの応用が期待されている。

これら構造転移に関する物理的過程は，数理モデルでモデル化され，自由エネルギーに関して分子動力学やモンテカルロ計算で一定の理解が得られてきた。けれど，引力ありでは非常に煩雑になり，また，これらのアプローチでは予言性を持つ解析的な理論に至らない。我々は，このモデルをファインマン的な経路積分において引力項付きで定式化し，解析的にトロイド状態を導出した。さらに，構造を決めるパラメータを発見し，これを基にウィップ（ロッド）ートロイド相転移や共生相，グロビュールートロイド相転移，コイルーウィップ相転移等，構造相転移を議論する。

（14）ゲノム生理学研究会への提言

永山國昭（岡崎統合バイオサイエンスセンター）

この研究会の主旨は分子生物学を越えた DNA 情報の生物学的，生理学的活用にある。昨年もゲノム構造研究は，配列構造から物理構造へと肉薄し，本丸のクロマチン立体構造へ向かうべしと提言した。今年はさらに踏み込んだこの研究会の出口について社会連携的提言を行いたい。

2002 年よりスタートしたもう 1 つの研究会「電子位相顕微鏡の医学的・生物学的応用」は大変生産的で，約 10 の研究グループと共同研究を行い，特許 4 件，論文発表済 6 報，投稿予定 5 報の成果をあげた。さらに来年度研究会の延長線上に，私を代表者とし研究会メンバー数人を分担者とする特別推進研究を応募するまでいたった。その内容は位相差電子顕微鏡法をさらに発展させ，トモグラフィーと融合し，生命時系列現象の「4 次元アトラス」作りを行うものである。無染色氷包埋法の確立により生物電顕の効率が 100 倍向上したことがこうした時間

空間 4 次元電顕（4 次元アトラス）の作成を可能にしている。

ゲノム生理学研究会もこうした大型のプロジェクトに発展する余地を持っている。しかし，そのためにはしっかりとした研究会の出口が見えなければならない。

体細胞遺伝変異による癌関連病，生殖細胞遺伝変異による遺伝病等の診断に染色体構造異常の検出は欠かせない。しかし何を持って染色体構造異常を定義するのか。この研究会はそこに切り込めるはずだ。我々は DNA 配列構造，DNA トポロジー構造，DNA 物理構造，クロマチン構造，染色体構造，核構造など幅広い階層構造を研究対象としており，これらの相互連関をつかまえられる数少ない研究者集団と言える。現在，国はポストゲノムのプロジェクトとして「染色体構造異常と病態診断」を大きな目玉にしようとしている。ここを 1 つの出口と見据え，社会への提言可能な研究者集団に成長し，我々独自のプロジェクトを提案できる実力を身につけたい。

20. 唾液腺研究からの生理機能研究，その戦略的展開

2006 年 2 月 24 日− 2 月 25 日

代表・世話人：杉谷博士（日大松戸歯）村上政隆（生理研・統合バイオ）

所内対応者：村上政隆（生理研・統合バイオ）

（1）マウス顎下腺の器官形成過程での細胞動態：高圧凍結/凍結置換 (HPF/FS) 法の
応用による微細構造学的解析

松浦　幸子（松本歯科大学・口腔解剖学）

（2）唾液腺の上皮管腔形成におけるクローディンの役割

檜枝洋記（大阪大学大学院・理学研究科生物科学専攻）

（3）ラット顎下腺腺房細胞のタイト結合と細胞骨格の構造変化

橋本貞充（東京歯科大学・病理学，口腔科学研究センター）

村上政隆（自然科学研究機構生理学研究所・ナノ形態生理）

（4）ラット唾液腺 AQP5 と AQP1 に対する自律神経切除及び SNI-2011 投与の影響

李　雪飛，細井和雄（徳島大学大学院・ヘルスバイオサイエンス研究部口腔分子生理学分野）

（5）AQP5 は傍輸送経路調節のシグナルを受容するのか？

村上政隆（自然科学研究機構生理学研究所・ナノ形態生理）

Murdiastuti K（Gadjah Mada 大学歯学部　歯周病学, Jogjakarta, Indonesia）

細井和雄（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス専攻口腔分子生理学）

Hill AE（Cambridge 大学，生理学研究室）

（6）ラット耳下腺における aquaporin-6 の存在

松木美和子，橋本貞充（東京歯科大学口腔科学研究センター，同病理学講座）

道家洋子，佐藤慶太郎（日本大学松戸歯学部生理学）

下野正基（東京歯科大学口腔科学研究センター，同病理学）

杉谷博士（日本大学松戸歯学部生理学）

（7）発生工学的トレーシングによる特定味覚伝導路の可視化

杉田　誠，　柴　芳樹

（広島大学大学院医歯薬学総合研究科・創生医科学専攻・病態探究医科学（口腔生理学））

（8）ラット上唾液核細胞への抑制性シナプス入力に関する検討

藤井　昭仁（岡山大学医歯薬学総合研究科・口腔生理学分野）

（9）摂食飼料の性状とラット顎下腺唾液分泌の分析

小橋　美由紀（岡山大学医歯薬学総合研究科・口腔生理学分野）

(10) 分泌型 IgA の細胞内輸送機構

浅野正岳，小宮山一雄（日本大学・歯学部病理学）

(11) 耳下腺腺房細胞の開口放出における cAMP 分解系の役割

杉谷博士（日本大学松戸歯学部・生理学）

西連寺央康（同・歯科麻酔・生体管理学），佐藤慶太郎（同・生理学）

(12) 耳下腺腺房細胞のアミラーゼ分泌機構における Rab エフェクターと SNARE の関係

今井あかね，梨田智子，下村浩巳（日本歯科大学新潟歯学部・生化学・先端研究センター）

福田光則（理化学研究所・福田独立主幹研究ユニット）

【参加者名】

松浦幸子（松本歯大口腔解剖），檜枝洋記（大阪大大院理生物），橋本貞充（東京歯大），李雪飛（徳島大大院），松木美和子（東京歯大），佐藤慶太郎（日本大松戸歯），杉田　誠（広島大大院医歯薬），藤井昭仁（岡山大大院医歯），小橋美由紀（岡山大大院医歯），杉谷博士（日本大松戸歯），浅野正岳（日本大歯）今井あかね（日本歯大新潟歯），村上政隆（生理研・統合バイオ）

【概要】

唾液分泌機能の発現にかかわる部品および解剖学的経路の大半は一部分を除き存在が確定された。しかしこれら微視的材料研究の成果は再構成され，分子レベルの知見は巨視的な機能に具体的に繋がらなければならない。これは唾液分泌研究に留まらず分子生理学研究の大きな目的である。本研究会は唾液腺を縦糸に，1) 全身機能と唾液分泌と連関を自律神経/内分泌機能から観測, 2) 唾液腺神経支配と細胞/細胞間隙機能の活性化, 3) 分泌顆粒内タンパク質の存在様式と維持/放出, 4) 形態形成と補修のテーマを討論することにより横糸として紡ぎ，巨視的唾液腺機能を従来別個に研究されてきた分子/細胞/神経機能の研究成果を具体的に統合することを目的とし第 2 回目が開催された。

（1）マウス顎下腺の器官形成過程での細胞動態：高圧凍結/凍結置換 (HPF/FS) 法の応用による微細構造学的解析

松浦　幸子（松本歯科大学　口腔解剖第 2）

マウス顎下腺の発生は胎生 11 日, 口腔粘膜上皮が増殖肥厚し直下の間葉組織に陥入する出芽成長に始まる。上皮塊はその後，増殖と分枝を繰り返し樹状に分岐した導管とその先端の腺房に分化し基本形態がつくられる。腺原基として確認される E13 以降，上皮塊先端部は球状であり（終末球），下方成長と分枝のみでは説明できない増殖成長様式が存在することを示す。終末球・上皮細胞は重層から単層になり，腺腔・管腔を備えた腺房と介在部に形態分化し，次いで唾液の合成，分泌，輸送を行う機能的分化を遂げる。この形態変化に関与していると考えられる細胞内の可溶性物質の局在については，これまで技術的な問題から解明が進んでいなかった。そこで顎下腺の器官形成過程での細胞動態を，細胞・組織内での物質の保持，不動化に優れている高圧凍結/凍結置換 (HPF/FS)法を応用した微細構造学的解析で明らかになったことを紹介し，唾液腺器官形成研究への新たな視点を提供する。

（2）唾液腺の上皮管腔形成におけるクローディンの役割

檜枝洋記（大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻）

哺乳類の唾液腺における上皮管腔形成は，細胞シートの単純な変形・伸長によるものではなく，組織構築のダイナミックな変化を伴っている。すなわち，口腔上皮細胞シートから細胞塊が形成された後，その内部に腔が生じ，外界と通じることによって管腔構造が完成する。この過程がタイトジャンクション(TJ)やアピカル膜の新たな形成を伴っていることに着目し，マウス胎仔唾液腺の上皮管腔形成過程における TJ 分子クローディンの役割を解析した。培養唾液腺原基におけるクローディンの発現を阻害すると，上皮管腔形成が著しく抑制された。また，アピカル膜分子の発現・局在が阻害され，アピカル膜の微細構造にも異常が見られた。クローディンがアピカル膜形成と共役することによって唾液腺の上皮管腔形成に寄与している可能性について考察する。

（3）ラット顎下腺腺房細胞のタイト結合と細胞骨格の構造変化

橋本貞充（東京歯科大学・病理学講座，口腔科学研究センター）
村上政隆（自然科学研究機構生理学研究所・ナノ形態生理学）

タイト結合の選択的透過機構の解析を目的として，ラット潅流顎下腺を用いた，急速凍結法によるディープエッチング・フリーズフラクチャーレプリカ法により，タイト結合と腺腔側膜直下の細胞骨格の超微構造変化について検討した。タイト結合を構成する膜内粒子は，細胞膜直下に介在する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。CCh/IPR 混合刺激により，腺腔面の平滑化と分泌顆粒の融合が起こると共に，タイト結合を構成する膜内粒子の配列が変化し基底側方向に伸長した。タイト結合の膜内粒子と細胞膜を裏打ちする短小な微細線維を介して，直下のアクチン線維との直接，結合しており，タイト結合部および腺腔側膜直下のアクチン線維束は，非刺激群に比べ刺激群ではより密となっていた。このことから，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ともない，タイト結合の膜貫通蛋白の局在が変化し，傍細胞輸送経路の透過性が亢進する可能性が示された。

（4）ラット唾液腺 AQP5と AQP1に対する自律神経切除及び SNI-2011投与の影響

李　雪飛，細井和雄（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部口腔分子生理学分野）

【目的】本研究はラット顎下腺における水チャネル，アクアポリン(AQPs)の自律神経系による調節機構を明らかにする目的で行った。

【方法】7 週齢雄性の SD ラットを用い，顎下腺を支配する自律神経である交感神経または副交感神経切除を上頚神経及び鼓索神経を切断することにより行った（それぞれ CSTD, CTD とする）。術後 15 日目から SNI-2011(10mg/kg), ピロカルピン(0.3mg/kg)クロロキン(50mg/kg)を連続 7 日間経口投与した。AQP5 と AQP1 の蛋白質レベルをウェスタンブロッティングで，又 mRNA レベルをノーザンブロッティングと RT-PCR，リアルタイム PCR により解析した。

【結果】CSTD は AQP5 及び AQP1 蛋白質レベルに大きな影響を与えなかった。CTD はラット顎下腺の重量と AQP5 蛋白質レベルを減少させたが，AQP5 mRNA レベルには顕著な影響を与えなかった。CTD ラットに対するムスカリン M3 アゴニスト，SNI-2011 の投与は，低下した AQP5 蛋白質含有量を著明に回復させ，AQP1 含有量を増加させたが，ピロカルピン投与はこれらに影響を与えなかった。SNI-2011 投与は AQP5 及び AQP1 mRNA レベルに顕著な影響を示さなかった。CTD はリソソーム酵素カテプシン B，D，E の活性を上昇させ，SNI-2011 はこの上昇を抑制した。カテプシン B，D，E の mRNA レベルも CTD により上昇したが，SNI-2011 はこの上昇を抑制しなかった。リソソーム変性剤であるクロロキンの投与によりリソソームを変性させ，その機能を抑制すると，副交感神経切除により減少した AQP5 の発現は回復した。

【結論】副交感神経による AQP5 発現レベルの調節は転写レベルによるのではなく，リソソーム酵素系により制御されていると考えられた。

（5）AQP5は傍輸送経路調節のシグナルを受容するのか？

村上政隆（自然科学研究機構生理学研究所，ナノ形態生理）
Murdiastuti K（Gadjah Mada 大学歯学部　歯周病学, Jogjakarta, Indonesia）
細井和雄（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス専攻口腔分子生理学）
Hill AE（Cambridge 大学，生理学研究室）

灌流顎下腺(SMG)を用い，carbachol 刺激による水分泌速度を電子天秤にて測定しながら，sucrose 添加により灌流液の浸透圧を上昇させると，水分泌は減少する。しかし，浸透圧差により水分泌が駆動されるとした場合の予測値より大きな分泌速度の減少が観察される。この現象は，浸透圧を AQP5 が感知し，傍細胞輸送が浸透圧に応じ調節されているモデルによれば説明できる(Hill & Shachar-Hill, 2006)。遺伝的に SMG の AQP5 が低く発現したことを Western-blot で確認しながら AQP5 を非常に低発現させたラット (Murdiastuti, K. *et al.* 2002)を用い，灌流 SMG 高浸透圧実験を行なった結果，水分泌は水分泌が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。これらの AQP5 低発現ラットでは傍細胞輸送の調節が失われ，浸透圧差に従った分泌が行なわれたことを示唆している。一方，Hg イオンを SMG 導管から逆行性に注入すると Hg 濃度に依存して水分泌は阻害されたものの，高浸透圧による水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。これらの結果は AQP5 と傍細胞輸送を含むフィードバック制御回路の存在を示唆している。

（6）ラット耳下腺における aquaporin-6の存在

松木美和子，橋本貞充，下野正基（東京歯科大学　口腔科学研究センターおよび病理学講座）
道家洋子，佐藤慶太郎，杉谷博士（日本大学松戸歯学部　生理学教室）

Aquaporin (AQP)は，水を選択的に透過する機能をもつ 6 回膜貫通型のチャンネルタンパクとして発見された。現在，AQP0-AQP12 までの 13 種類が同定・報告されており，さらに，水以外にグリセロール，尿素，脂質，イオンの透過機能を持つタイプも明らかとなった。AQP は細胞形質膜に局在し，ほ乳類においては，消化管，肝臓，脳，肺などの臓器に分布するとともに，細胞内小器官の膜上にも存在し，刺激に応じて局在の変化するタイプも存在する。我々は，唾液腺における AQP の存在を検討したところ，ラット耳下腺における AQP6 mRNA の発現を RT-PCR にて確認した。また，AQP6 タンパク質の発現を抗 AQP6 抗体を用いた western blotting により確認した。さらに，共焦点レーザー顕微鏡により AQP6 が介在部導管および腺房細胞のタイト結合付近に局在すること，また，b レセプター刺激により局在が変化することを認めた。これらのことから，ラット耳下腺に AQP6 が発現し，分泌機能に関与する可能性が示唆された。

（7）発生工学的トレーシングによる特定味覚伝導路の可視化

杉田　誠，柴　芳樹
（広島大学大学院医歯薬学総合研究科・創生医科学専攻・病態探究医科学講座（口腔生理学））

生物は有害物質の摂取をさけ，必要栄養物質を摂取するために，進化の過程で味覚受容の多様性を獲得しました。哺乳類は，塩味，酸味，甘味，苦味，うま味の 5 つを基本味として認識します。そして味覚は 5 基本味の組

み合わせで，認知されます。味を感知する細胞（味細胞）に発現する味覚受容体に，味物質が結合することにより惹起される味覚情報は，複数の神経細胞を介し，脳内の各種神経細胞に投射され，受容・識別されるとともに，唾液分泌反射，行動的・情動的反応を惹起します。しかし，味覚情報がどのように脳に伝達され味覚が認識されるか，また味覚刺激により誘発される反射・反応が惹起されるかについては不明な点が多く存在します。そこで自身の研究では，発生工学的アプローチを用いて，苦味および甘味情報を伝導する神経回路を可視化することで，味覚認識が脳内でいかに行われるかを明らかにしようと試みました。特にマウスにおいて，苦味受容体もしくは甘味/うま味受容体を発現し，苦味もしくは甘味/うま味を感知する味細胞に，シナプス間を移動するトレーサータンパク質(tWGA-DsRed)を選択的に発現させ，脳内でトレーサーに標識される神経細胞の位置を比較したところ，苦味と甘味の情報を伝導する脳内神経回路に差異がみられ，延髄弧束核・橋結合腕傍核・視床後内側腹側核において，甘味受容味細胞からの入力を受ける神経細胞群は，苦味受容味細胞からの入力を受ける神経細胞群に比べ，より前方に配置していました。大脳皮質味覚野と扁桃体においては，部分的重複と分離が観察されました。観察された苦味と甘味の情報を伝導する脳内神経回路の差異は，味覚識別を可能にする神経基盤の一端を示していると考えられ，このトランスジェニックマウスは，味覚受容・識別を可能にする神経細胞群の細胞機能，唾液分泌反射や行動的・情動的反応を惹起する神経回路基盤，そして神経回路の構築に関与する分子を解明するために，有効に用いることができると考えられました。

（8）ラット上唾液核細胞への抑制性シナプス入力に関する検討

藤井昭仁（岡山大学医歯薬学総合研究科　口腔生理学分野）

近年，上唾液核細胞へのシナプス入力において，興奮性はグルタミン酸，抑制性は $GABA_A$ およびグリシン受容体を介することが明らかとなった。唾液腺活動は上位中枢からの制御を受けているが，抑制性入力に注目した研究は未だなされていない。本研究では，除脳および正常ラットの矢状断新鮮脳スライス標本を用い，1) GABA およびグリシンの潅流　2) 上唾液核周囲の電気刺激で誘発される抑制性シナプス後電流をホールセルパッチクランプ法にて測定した。除脳動物の 17% (n=7/41)では上位中枢からのみ抑制性入力を受けていることが示唆された。83% (n=34/41)では上位および下位中枢から抑制性入力を受けていることが示唆された。本研究において全ての上唾液核細胞は上位中枢から抑制性入力を受けていることが明らかとなった。このことから唾液分泌は興奮性入力のみならず上位中枢からの下行性抑制性入力によっても調節されていることが示唆された。

（9）摂食飼料の性状とラット顎下腺唾液分泌の分析

小橋美由紀（岡山大学医歯薬学総合研究科・口腔生理学分野）

【目的】摂食時に唾液分泌が誘発されることはよく知られている。本研究では，顎下腺からの唾液分泌量を測定し，様々な性状の飼料を摂取した時の唾液分泌動態について検索した。

【方法】ラットを測定箱の中で，自由に摂食・飲水出来るよう訓練をした。訓練を終えたラットに，麻酔下で顎下腺カニューレと両側咀嚼筋筋電図用電極を装着し，唾液分泌量と咬筋活動量を測定した。

【結果】1) 3 分間の唾液分泌量は粉末飼料，硬ペースト状飼料，中ペースト状飼料，固形飼料，軟ペースト状飼料の順に多かった。2) 摂食飼料の乾燥重量は軟ペースト状飼料，中ペースト状飼料，硬ペースト状飼料，そして粉末飼料と固形飼料の順に多かった。3) 3 分間の筋活動量は種々の飼料で似通っていた。4) 歯ぎしりは記録中に大きな筋活動を引き起こしたが，唾液の分泌は誘発しなかった。このことから唾液分泌は，単に顎運動や歯根膜感覚だけでは

生じないことが考えられた。また，飼料の水分含有量などの性状が分泌量に影響することがわかった。

（10）分泌型 IgA の細胞内輸送機構

浅野正岳，小宮山一雄（日本大学　歯学部　病理学教室）

口腔は消化器系・呼吸器系組織の門戸であり，常に外来抗原にさらされている。これら抗原の生体内への侵入は，血清由来の IgG 分子を中心とする全身免疫および唾液腺をはじめとする口腔由来の局所免疫（粘膜免疫）により制御されている。局所免疫において主体的働きを担う分子が分泌型 IgA(S-IgA)であり, IgA2 分子（2 量体 IgA）と joining chain (J chain)および 2 量体 IgA のレセプターである polymeric immunoglobulin receptor (pIgR) の細胞外領域である secretory component (SC)から構成されている。これら S-IgA の構成成分である IgA および J chain は上皮下の形質細胞により，また SC は上皮細胞により産生される。上皮細胞内の S-IgA の輸送経路については MDCK 細胞のシステムにより多くのことが解明されて来た。本発表では S-IgA の上皮細胞内輸送経路について概説し，最近新たに注目されている pIgR の機能についてまとめてみたいと考えている。

（11）耳下腺腺房細胞の開口放出における cAMP 分解系の役割

杉谷博士，佐藤慶太郎（日本大学松戸歯学部 生理学講座）
西連寺央康（日本大学松戸歯学部 歯科麻酔・生体管理学講座）

耳下腺腺房細胞においては，βアドレナリン受容体刺激により細胞内 cAMP 濃度の上昇が起こり，消化酵素アミラーゼの開口放出が引き起こされる。細胞内 cAMP の合成に関しては, 受容体に共役した三量体 GTP 結合タンパク質の活性化に引き続くアデニル酸シクラーゼの活性化に依存する。一方, cAMP 分解は, 分解酵素である cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE)が担っている。現在，PDE には基質特異性，阻害剤親和性，活性調節機構等が異なる 11 種類の PDE ファミリーが報告されている。我々は，ウサギ耳下腺腺房細胞のアミラーゼ開口放出における cAMP 分解系の役割を検討した。

アミラーゼ分泌に対する PDE 阻害剤の効果を検討したところ，非刺激時のアミラーゼ分泌に対する効果は認められなかったが，rolipram の存在下でβアゴニストであるイソプロテレノールによるアミラーゼ分泌が促進された。細胞内 cAMP 濃度に対する rolipram の効果を検討したところ，イソプロテレノールによる cAMP 産生が有意に促進された。陰イオン交換カラムによりウサギ耳下腺腺房細胞の cAMP-PDE を部分精製したところ，Ca^{2+}，カルモジュリン，cGMP などには非依存性の活性を示した。また，部分精製画分において抗 PDE4B 抗体と反応するバンドが認められた。さらに，抗 PDE4B 抗体を用いて免疫沈降を行った後の部分精製画分には cAMP-PDE 活性は認められなかった。

以上の結果より，ウサギ耳下腺腺房細胞では PDE ファミリーのうち PDE4B が存在し，β受容体の活性化を介する調節性開口放出の調節に関わることが示唆された。

（12）耳下腺腺房細胞のアミラーゼ分泌機構における Rab エフェクターと SNARE の関係

今井あかね[1]，梨田智子[1]，下村浩巳[1, 2]，福田光則[3]
（日本歯科大学新潟歯学部[1]生化学講座・[2]先端研究センター，[3]理化学研究所・福田独立主幹研究ユニット）

我々はラット耳下腺腺房細胞内のsoluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion attachment protein receptor (SNARE)の局在とイソプロテレノール(IPR)刺激によるアミラーゼ分泌に対する Rab27 とそのエフェクターの関与を明らかにしてきた。Rab は真核細胞において細胞内膜輸送をコントロールする低分子量 GTPase でエフェクターによって制御を受けている。一方，唾液腺の開口分泌メカニズムに SNARE 仮説を当てはめた検証がなされてきたが，具体的には不明な点が多かった。この別々と思われてきたメカニズムの共役を解明するために，Rab3, Rab8, Rab27 の共通エフェクターである Slp4-a/granuphilin と t-SNARE である syntaxin の相互作用がアミラーゼ分泌に関与しているかどうかを調べた。COS-7 細胞に Slp4-a, Munc18-2, syntaxin2 または 3 を発現させ相互作用を調べた結果，Munc18-2 依存的に Slp4-a と syntaxin が結合した。また，Slp4-a の syntaxin との結合ドメインである Slp4-a-linker domain の GST 融合タンパク質あるいは Slp4-a-linker domain に対する抗体をストレプトリジン O 処理腺房細胞に導入すると，濃度依存的に IPR 刺激によるアミラーゼ分泌を阻害した。これらの結果から，IPR 刺激によるアミラーゼ分泌に Slp4-a と syntaxin の相互作用が関与していることが示唆された。

21. 生物ロコモーションの統合的研究

2005 年 11 月 24 日－11 月 25 日

代表・世話人：東島眞一（岡崎統合バイオサイエンスセンター・神経分化）
所内対応者：岡村康司（岡崎統合バイオサイエンスセンター・神経分化）

（1）卵由来精子活性化ペプチドによる精子鞭毛運動修飾の解析
馬場昭次（お茶の水女子大大学院・人間文化・人間環境科学）

（2）海生プランクトンの運動とチャネル
筒井泉雄（一橋大学・生物）

（3）尾索動物オタマジャクシの遊泳運動
西野敦雄（岡崎統合バイオ・時系列生命現象・神経分化）

（4）プラナリアの行動制御を担う脳機能と神経回路網の解析
阿形清和（京都大学・生物物理）

（5）魚類の遊泳を支配する中枢神経系の形態と機能
植松一眞（広島大大学院・生物圏科学・水族生理学）

（6）硬骨魚後脳の分節構造にもとづいて構築された逃避運動回路与
小田洋一（名古屋大大学院・理・生命理学）

（7）ゼブラフィッシュの脊髄神経回路の構築
東島眞一（岡崎統合バイオ・時系列生命現象・神経分化）

（8）昆虫の匂い源探索の行動制御機能
神崎亮平（東京大大学院・情報理工学・知能機械情報学）

（9）生物運動の力学シミュレーション
劉浩（千葉大・工・電子機械工学・生物機械）

(10) ウサギ跳躍運動の発現・制御機構：ネコ歩行制御系との比較
松山清治（札幌医大・医・第二生理）

(11) 歩行における運動軌道計画
西井淳（山口大・理・自然情報科学科）

【参加者名】

馬場昭次（お茶の水女子大大学院），筒井泉雄（一橋大学），西野敦雄（岡崎統合バイオ），阿形清和（京都大学），植松一眞（広島大大学院），小田洋一（名古屋大大学院），東島眞一（岡崎統合バイオ），神崎亮平（東京大大学院），劉浩（千葉大），松山清治（札幌医大），西井淳（山口大），岡村康司（岡崎統合バイオ），柴小菊（東京大学），小橋常彦（名古屋大学），谷合由章（山口大学），日置智子（山口大学），衣川亜衣子（神戸大学），久木田文夫（岡崎統合バイオ），岩崎広英（岡崎統合バイオ），村田喜理（岡崎統合バイオ），木村有希子（岡崎統合バイオ），黒川竜紀（岡崎統合バイオ），MD.ISRAIL HOSSAIN（岡崎統合バイオ），佐々木真理（岡崎統合バイオ），佐藤千恵（岡崎統合バイオ），野田昌晴（基生研）

【概要】

生物のロコモーションは，ゲノムにより決定された生物種毎に異なるスケール，形態に規定されながら，それに伴う物理環境に適用できるような大きな多様性を示す。その一方で，それを構成する分子や細胞特性，神経回路などのユニットは共通なものを使用しており，マクロな共通原理に裏付けられている。このように共通の構

成成分に依存しながらも生物種によって特化した生理機能を発揮できるシステムの理解は，ポストゲノム時代の生物科学や生理科学の大きな目標のひとつとも位置付けられる。多様な生物のロコモーションの原理を理解することは，単に生物の生理機構を解明することに留まるのではなく，医用工学への応用，マイクロマシンの開発，ロボティクスへの応用など，21 世紀の人間社会に密接に関わる工学分野へと大きく波及する可能性が期待される。今回は，平成 14 年度に行なわれた研究会に引き続き，ロコモーションの要素と構成に焦点を当て，基礎生物学分野のロコモーション研究者（無脊椎動物鞭毛繊毛運動，尾索動物オタマジャクシ），数理科学的立場の研究（エネルギー効率や流体力学の立場からの数理シュミレーション），神経解剖学的視点（頭足類の高速処理神経システム，脊椎動物型中枢神経回路），イオンチャネルなどの分子的要素の視点（筋細胞膜特性）の各分野から研究者を集め，一泊二日での研究会を行なった。

（1）卵由来精子活性化ペプチドによる精子鞭毛運動修飾の解析

馬場昭次（お茶の水女子大大学院・人間文化・人間環境科学）

受精は，卵と精子の相互作用によって成り立っている。卵ゼリー層に含まれる因子が，精子の運動活性化，卵への走化性，先体反応，種特異的な膜認識など，様々な受精の過程に深く関わっていることは，ほ乳類を始めとする多くの生物で知られている。その中でも，低分子で拡散性の精子活性化因子は，卵から離れた精子にも作用することができ，広範囲にわたって卵と精子の相互作用を仲介し，受精の過程において重要な役割を果たしていると考えられている。

ここでは，ウニの精子活性化ペプチドの一つである speract について，そのケージド体を用いて speract の作用で精子の鞭毛運動が非対称性を増すことを示した実験，LED ストロボ照明を蛍光の励起に用い鞭毛内カルシウムイオンの変動と鞭毛運動を同時に測定した実験，ホヤ精子の活性化・走化性誘因因子である SAAF を用いて行った精子の走化性行動時における鞭毛運動の変化の詳細な解析などについて報告した。

（2）海生プランクトンの運動とチャネル

筒井泉雄（一橋大学）

筋の進化を考える上で平滑筋から骨格筋への変遷は最も注目すべき項目の 1 つである。筋の構造の変化以上に機能（筋細胞収縮の際の細胞内 Ca イオン濃度増加プロセス）の変化は特筆すべきものである。平滑筋では Ca の細胞外から細胞内へ流入が必須であるが，骨格筋においては Ca の細胞外から細胞内へ流入は必須ではなく，細胞内 Ca の増加は細胞内の Ca 貯蔵部位からの放出によって制御されている。骨格筋収縮時における細胞内 Ca イオン濃度増加プロセスは，脊椎動物骨格筋細胞においては興奮収縮連関 (Excitation-Contraction ; E-C coupling) として報告 (Schneider & Chandler 1972) され，T 管膜に存在している機能分子 Dihydropyridine (DHP) 受容体が，膜の脱分極を感知し細胞内 Ca を貯蔵部位から遊離させることが報告されている。膜の脱分極を感受し細胞内 Ca を遊離させる機構(Depolarization-induced-Ca-release ; DICR)の有無が骨格筋と平滑筋を分けていると考えられ，この情報伝達を司る機能分子 Dihydropine(DHP)受容体の作用実体は膜内電荷移動(Charge Movement : CM)として捉えられている。DHP 感受性の CM の有無を骨格筋平滑筋分離の指標とすることができることから，動物進化の段階において重要な位置を占めている海生プランクトンを用いて，この DHP 感受性 CM の有無，運動に必須の細胞内 Ca イオン濃度増加プロセス，流入を司るチャネル特性の三者の関連解明を系統発生的に試みたので報告した。

（3）尾索動物オタマジャクシの遊泳運動

西野敦雄（岡崎統合バイオサイエンスセンター・時系列生命現象・神経分化）

ホヤ，オタマボヤ，ウミタルなどを含む尾索動物は，オタマジャクシ形態を生じる。そのオタマジャクシ形態は，脊椎動物のオタマジャクシに比べて著しく少数で単純な細胞構成から成り立っている。しかしながら，それぞれのオタマジャクシ形態は複数の運動パターンを示し，また敏鋭な感覚刺激に対する反応をも行うなど，その形態の単純さに関わらず，各々の遊泳に関わる情報処理は画一的ではない。

ホヤ幼生，オタマボヤ，ウミタル幼生が示す運動は，個々の神経・筋肉細胞の生理現象から体まるごとの運動を再構成することが実現できると期待される。またそれぞれの運動機能の多様性，さらには脊椎動物のオタマジャクシ形態の遊泳機構との相違の理解は，各々の系統発生と適応戦略を考える上で本質的な問題を含んでいると考えられる。

以上を考え，運動パターンの高速度画像解析，筋肉細胞の電気生理学的特徴の解析，神経・筋肉系に発現しているイオンチャネル分子種の同定を進めている。現在までに定めた各動物種の運動生理学上の特徴を紹介しながら，その中で最も解析が進展しているカタユウレイボヤ幼生における結果を中心に議論を深めた。

（4）プラナリアの行動制御を担う脳機能と神経回路網解析

阿形清和（京都大学大・生物物理）

われわれは，1991 年からプラナリアの再生研究の近代化に努め，特に脳の再生については重点的に取り組んできた。多くの脳で発現する遺伝子を RNAi 法でノックダウンし，nou-darake 遺伝子を筆頭に脳の再生に関与する遺伝子を同定することに成功した。と同時に，その過程で脳の機能異常のプラナリアが多数でき，プラナリアが脳の高次機能の解明にきわめて有用な動物であることを示した。

頭部遺伝子ライブラリー由来の約 5 万クローンをシークエンスし，それらの遺伝子の発現解析を行いデータベース化している。また，約 1,000 個の単一神経細胞について 200 種類の遺伝子について発現プロファイリングをしており，プラナリアの脳の神経細胞が多様化していることを個々の神経細胞の発現解析で明らかにしている。

近年，個々の遺伝子については RNA 干渉法で機能解析が可能となっており，プラナリアは脳の再生システムと組み合わせることによって，再生脳できれいに遺伝子のノックダウンが可能である。その結果，脳の再生に関与する遺伝子，行動制御に関する遺伝子が同定できるようになった。ここでは主に，負の走行性を指標にプラナリアの行動制御に関わる遺伝子を紹介した。

（5）魚類の遊泳を支配する中枢神経系の形態と機能

植松一眞・吉田将之（広島大学大学院生物圏科学研究科・生物圏共存科学専攻・水族生理学研究室）

サケが体側筋で産卵することを知ったことをきっかけに，我々の魚類神経科学研究が始まった。ようやくコイで遊泳中枢を同定したものの，その細胞構築と脊髄との連絡様式の解明は不十分であった。ここ数年の研究で，内側縦束核の細胞構築の概要が明らかになった。これまで内側縦束核の一部と思われていた細胞集団は動眼神経核であった。この研究には，魚類において初めてクローニングしたアセチルコリン合成酵素の遺伝子を元に作製

した mRNA プローブを用いた。さらに内側縦束核のニューロンは脊髄の末端まで軸索を伸ばし，側枝により運藤ニューロンや介在ニューロンと接続していることが分かった。また，遊泳に同期して活動するニューロンも見つかった。

また，関連した研究として，真骨魚類の小脳に特有な出力細胞である，いわゆる広樹状突起細胞の形態・伝達物質・他の脳領域との連絡様式が新たに解明された。哺乳類において小脳は運動の制御に必須の器官である。しかしながら，魚の小脳体を切除しても，ほぼ正常に泳ぐことができる理由は未だ不明である。一方，古典的恐怖条件付けの手法によりキンギョの小脳体が記憶の場である可能性を示す結果を得た。

さらに，キンギョの最初期遺伝子 c-fos（ニューロンが活動すると発現する）をクローニングし，c-fos に対する mRNA プローブを用いて，遊泳直後に遊泳中枢のニューロンや脊髄運動ニューロンに c-fos が多く発現することを確認した。

（6）硬骨魚後脳の分節構造にもとづいて構築された逃避運動回路

小田　洋一（名古屋大学大学院理学研究科）

脊椎動物の脳は吻尾軸方向に並ぶ分節を一つの基本構造として成り立つ。我々は分節構造にしたがって配置されるニューロンが機能的にどのような関係にあるかを，サカナの逃避運動を制御する回路構成から理解したいと考えている。

我々はマウスナー・シリーズの入出力特性と相互結合および逃避運動における活動を調べ，以下の結果を得た。

(1) 金魚のマウスナー・シリーズは，逃避運動の誘発に必要な聴神経から同じように求心性投射を受ける。

(2) M 細胞から MiD2cm と MiD3cm へ一方向の結合が見出され，同側へは抑制性結合，対側へは興奮性結合であった。

(3) 逃避運動中のゼブラフィッシュ稚魚から後脳 RS ニューロンの活動をカルシウムイメージングで計測した。多くの逃避運動は M 細胞の発火を伴う(M escape) が，M 細胞の活動を伴わずに起こる逃避運動(Non M escape) もまれに起こる。M escape の潜時は Non M escape より 5 ミリ秒短い。

(4) M 細胞を破壊すると，遅い Non M escape しか起こらない。

(5) M 細胞と MiD3cm の活動は相補的であり，それぞれ M escape と Non M escape の発現に関与すると考えられる。

これらの結果から，聴覚入力で誘発される逃避運動は M 細胞とその相同ニューロンからなる多重の回路によって制御されうるが，最も潜時の短い逃避運動の発現には M 細胞が優先して働くことが必要であると考えられる。

（7）ゼブラフィッシュ脊髄神経回路の構築

東島眞一（岡崎統合バイオサイエンスセンター・時系列生命現象・神経分化）

ゼブラフィッシュ脊髄神経回路の形成機構を，発生期に少数の細胞で発現する転写因子の観点から調べている。脊髄神経回路について，発生から機能までをつなげ，また，哺乳類の対応する細胞（特定の転写因子を発現する細胞）の回路中での機能に関して手がかりを得ることを目的としている。本研究会では，alx（哺乳動物 Chx10 のゼブラフィッシュホモログ）に関する解析を中心に発表する。alx 陽性細胞で GFP を発現するトランスジェニックフィッシュを作製し alx を発現する細胞を可視化した（以下，alx 細胞と呼ぶ）。その結果，alx 細胞は，同側下行性の介在ニューロンであることが明らかになった。また，マーカー遺伝子との二重染色により，alx 細胞の大半（おそらくすべて）はグルタミン酸作動性の興奮性神経細胞であることを明らかにした。仮想運動時の alx 細胞の活

動を調べた結果, alx 細胞にはおおまかに分けて 2 種類存在し，早く産まれるものはより強い運動（逃避，早い遊泳）時に活動し，遅く産まれるものは通常の遊泳行動時に活動することが明らかとなった。また，どちらのタイプのものも運動ニューロンに興奮性のシナプス結合をしていた。これらのことから，alx 細胞は逃避，遊泳時に運動ニューロンの活動を直接制御する神経細胞であることが示された。

（8）昆虫の匂い源探索の行動制御機構

神崎亮平（東京大学大学院情報理工学系研究科　知能機械情報学専攻）

匂いは空中に分布し，分布状態を絶え間なく複雑に変化させている。このような環境下でも昆虫は数キロメートルにわたり，たとえば雄の蛾は，雌が放出するフェロモンの匂いを頼りに雌の居所を探し出している。われわれが暗闇で，匂い源を探し出すことを想像すると昆虫がいかに困難な問題を解決しているかがわかる。ここでは，このような昆虫の匂い源探索行動をモデルとして，微小な脳システムが，この問題をいかにして解決しているかを，鱗翅目昆虫カイコガ(*Bombyx mori*)をモデルとしてまず(1)行動戦略から，そして(2)この行動戦略を解発する神経基盤について，ニューロンレベルでの分析結果から説明する。次に，(3)このような分析結果をロボティクスにより統合し，昆虫の神経・行動機能に基づいた小型移動ロボットを用いた(1)と(2)の検証結果を紹介する。また，(4)実際に飛行する昆虫に超小型のテレメトリを装着することにより，無拘束下で，自由に飛行する昆虫の生体情報（飛翔筋活動など）を遠隔計測することが可能となってきたので, この研究結果についても併せて紹介した。

（9）生物運動の力学シミュレーション

劉　浩　（千葉大学　工学部）

Characterized by complex geometry and complicated dynamic process, biological mechanical phenomena in swimming and flying are usually of four-dimensional nature, namely, spatial three-dimensional and one-dimensional in time. The current paradigm for understanding of power and energetics in swimming and flying relies exclusively on the consistent potential theories to analyze the physics qualitatively as well as the observations and measurements to visualize the flow so as to support the theories. We propose a new paradigm of *simulation-based biological fluid dynamics* to digitize and visualize swimming and flying by using a computational mechanical modeling of the biological fluid dynamics through faithful reconstruction of morphology and representation of realistic kinematics of individual object. We have developed an integrated computational system as a baseline for the simulation-based biological fluid dynamics, which involves four subsystems of the morphological modeling, the kinematic modeling, the computational fluid dynamic modeling, and the post-processing for visualization. This integrated system has been validated to be feasible in modeling fluid dynamic phenomena in animal locomotion through a series of stepwise studies and applications for two realistic modeling of hydro-and aerodynamics of undulatory swimming and insect flight.

（10）ウサギ跳躍運動の発現・制御機構：ネコ歩行制御系との比較

松山清治（札幌医科大学・医学部・生理学第二講座）

自然界において各動物種は環境や生態的地位に適応してそれぞれに特有の歩行パターンを発達させている。四足哺乳類のネコとウサギについて見ると，これらは生態系で捕食者‐被食者の対極的地位にあり，このためネコは探索-捕獲行動に必要な低速移動のための左右交代性歩行 walk から高速移動に適する左右非交代性歩行 gallop まで幅広い歩行パターンを備えているが，ウサギは被食回避のための高速逃避行動に直結する gallop 類似の跳躍歩行 hopping を基本パターンとしている。この歩行パターンの違いはそれぞれの動物種において特異発達した歩行器官とともにその運動制御に関わる中枢神経機構の違いによると考えられる。

われわれはウサギの左右非交代性跳躍歩行とネコの左右交代性歩行の発現に関わる神経機構にどのような違いがあるかを知るため，新たにウサギ跳躍実験標本を開発し，これを用いて跳躍歩行誘発に関わる脳幹‐脊髄神経機構の特徴について検討した。具体的には除脳ウサギ標本の中枢内で跳躍歩行誘発部位を同定し，さらに誘発された跳躍運動の動作解析も行いその特徴を明らかにした。また跳躍歩行誘発に関わる脳幹由来の下行性投射系の同定も試みた。本研究会ではウサギを用いた研究で得られた成績について報告するとともに，これらを従来のネコの研究で得られた成績と比較し両動物種の歩行制御機構の特徴と違いについて考察した。

（11）歩行における運動軌道計画

西井淳（山口大学理学部自然情報科学科）

多足動物が歩くとき，歩容，歩幅，脚の運動周期，脚や胴体の運動軌道等の運動パラメータの選び方は無数に存在する。生体はどのようにして，その中からある 1 つの組合せを選んでいるのだろうか？　この問題は，生体の運動様式の理解につながるだけでなく，神経系が運動の学習・制御を行う仕組みを検討する上でも，その計算アルゴリズムの本質に関わる極めて重要な問題である。

生体が運動を行う際，その消費エネルギーを低く押さえることは生存確率を高くするために重要であろう。そこで，生体の様々な運動が「消費エネルギー最小化」という拘束条件に基づいて計画されているかどうかの検討を現在すすめている。今回は，(1)多足歩行における歩容・歩幅・足の運動周期，および(2)遊脚運動軌道に関する検討結果を報告した。また，歩行運動の学習制御モデルについても紹介した。

22. バイオ分子センサー研究会

2006 年 6 月 9 日− 6 月 10 日

代表・世話人：富永真琴（岡崎統合バイオサイエンスセンター）
所内対応者：岡村康司（岡崎統合バイオサイエンスセンター）

（1）Distribution of volume-sensitive maxi-anion channels in cardiomyocytes and its ATP releasing role

Amal K. Dutta，Ravshan Z. Sabirov，浦本 裕美，岡田 泰伸（生理学研究所・機能協関）
Yuri E. Korchev，Andrew Shevchuk (MRC Clinical Center, United Kingdom)

（2）細胞容積センサー機能を生みだす境界面分子群の相互作用

赤塚 結子（三重大学大学院医学系研究科・再生統御医学）
清水 貴浩，岡田 泰伸（生理学研究所・機能協関）

（3）脳内 Na^+センサー：Na_xチャネルの生理的役割

檜山 武史，渡辺 英治，野田 昌晴（基礎生物学研究所・統合神経生物学）
渡辺 英治（基礎生物学研究所・神経生理学）

（4）代謝型グルタミン酸受容体シグナル伝達のリガンド依存性

立山 充博，久保 義弘（生理学研究所・神経機能素子）

（5）機械受容チャネルの分子機構

成瀬 恵治（名古屋大学大学院医学系研究科・細胞生物物理学）

（6）摂食行動に及ぼす視床下部 AMP キナーゼの調節作用

箕越 靖彦，志内 哲也，岡本 士毅，斉藤 久美子（生理学研究所・生殖，内分泌系発達機構）

（7）共鳴ラマン分光法が明らかにする一酸化炭素により ON/OFF が制御される転写調節因子 NPAS2 のしくみ

内田 毅（岡崎統合バイオサイエンスセンター・生体分子）

（8）PKA/Ca^{2+}シグナルを制御する線条体神経細胞質センサーの機能的連関

西 昭徳（久留米大学医学部・薬理学）

（9）Ca^{2+}センサータンパク質 NCS-1 の神経の興奮性と生存における生理的役割

西谷 友重（国立循環器病センター研究所・循環分子生理）

(10) B リンパ球特異的アダプター分子 BCAP の機能発現機構

黒崎 知博（理化学研究所・免疫，アレルギー科学総合研究センター）

(11) 胆汁酸誘導体によるビタミン D 受容体活性化機構の解析

槇島 誠，川名 克芳（日本大学医学部・生化学）
安達 竜太郎（大阪大学大学院医学系研究科）

(12) 酸化ストレスセンサーとユビキチンライゲース：Nrf2-Keap1 システムによる酸化ストレス応答機構

小林 聡（筑波大学・TARA センター）

(13) 生理活性脂質受容体 BLT とプロトン感知性受容体 G2A

横溝 岳彦（東京大学大学院医学系研究科・生化学分子生物学）

(14) 電位センサーをもつイノシトールリン脂質ホスファターゼの機能

岡村 康司，村田 喜理，岩崎 広英，佐々木 真理，Israil Hossain
（岡崎統合バイオサイエンスセンター・神経分化）

(15) 温度感受性 TRP チャネルの構造と機能

富永真琴（岡崎統合バイオサイエンスセンター・細胞生理）

【参加者名】

内田 毅，岡村 康司，岩崎 広英，久木田 文夫，佐々木 真理，Md. Israil Hossain，村田 喜理，富永 真琴，富永 知子，柴崎 貢志，飯田 陶子，稲田 仁，曽我部 隆彰，Sravan Mandadi，島貫 恵実，西井 博子，冨樫 和也，東 智広，村山 奈美枝，島 麻子，三村 明史，林 良樹，平松 弘嗣，永山 國昭（岡崎統合バイオサイエンスセンター），岡田 泰伸，Amal Kumar Dutta，清水 貴浩，浦本 裕美，沼田 朋大，温井 美帆，久保 義弘，立山 充博，長友 克広，石井 裕，箕越 靖彦，志内 哲也，東 幹人，Abduqodir Toychev，李 順姫，Elbert Lee，鍋倉 淳一，松本 希，張 一成，北村 明彦（生理学研究所），野田 昌晴，檜山 武史，清水 秀忠，渡辺 英治，山田 美鈴，堀口 吾朗，藤倉 潮（基礎生物学研究所），横溝 岳彦（東京大・院医），槇島 誠（日本大・医），川名 克芳（大阪大），小林 聡（筑波大），黒崎 知博（理化学研究所），成瀬 恵治（名古屋大・院医），西谷 友重，若林 繁夫（国立循環器病センター研究所），西 昭徳（久留米大・医），赤塚 結子（三重大・医）

【概要】

生体内の全ての細胞は，細胞内外環境の大きな変化の中でその環境情報を他のシグナルに変換し，細胞内や周囲の細胞に伝達することによって環境変化に対応しながら生存している。最近，形質膜の代謝型受容体のみならず，チャネルやトランスポーターなどの膜輸送蛋白質も，さらには細胞質内タンパク質，核蛋白質も情報センサーの働きをしていることが明らかになりつつある。これらのバイオ分子センサータンパク質は種々の化学的，物理的，生理的情報を受容して他のシグナルに速やかに変換する能力を持っている。バイオ分子センサータンパク質の構造と機能やそのシグナル変換機序を解明していくことは，生命科学の本質である「細胞の生存」を解明するうえで極めて重要である。こうした趣旨のもとに過去 3 年間バイオ分子センサー研究会が行われたが，バイオ分子センサーによって感知された細胞環境情報が細胞生存応答をもたらすためにいかに細胞内で情報交換・情報統合されているかについての視点が欠けていた。この点こそ，センサーが機能する本質である。そこで，バイオ分子センサータンパク質の構造と機能の解明に加えて，センサー間相互作用，情報統合にも踏み込んだ新たな研究転換を目指してこの研究会を開催した。60 名余りのバイオ分子センサー研究者が一同に会し，15 題の演題発表があった。対象のセンサーは，電位センサー，温度センサー，機械刺激センサー，脂質センサー，ガスセンサー，Na^+センサー，Ca^{2+}センサー，H^+センサーなど多岐にわたった。活発な討論，情報交換がなされ，「バイオ分子センサー」研究の発展に有益な会であった。

（1）Distribution of volume-sensitive maxi-anion channels in cardiomyocytes and its ATP releasing role

Amal K. Dutta，Ravshan Z. Sabirov，浦本 裕美，岡田 泰伸（生理学研究所・機能協関）
Yuri E. Korchev，Andrew Shevchuk（MRC Clinical Center, United Kingdom)

ATP release is known to be induced by cell swelling from a variety of cell types including cardiomyocytes and to play a crucial role in purinergic signaling. Cardiomyocytes swell in various pathophysiological conditions such as congestive cardiac failure, ischemia, endotoxic shock and dilated or hypertrophic cardiomyopathies. In the present study, we examined the involvement of volume-sensitive maxi-anion channels in swelling-induced ATP release from neonatal rat cardiomyocytes in primary culture and their distribution pattern on the sarcolemmal surface. Using a luciferin-luciferase assay, ATP was found to be released to the bulk solution when the cells were subjected to hypotonic, hypoxic or ischaemic stress. The cell surface ATP level on a single cardiomyocyte, measured by a biosensor technique, was found to exceed a micromolar level. Conventional patch-clamp studies showed that all three stimuli induced activation of single-channel events with a large unitary conductance (~390 pS). The pharmacological properties of the swelling-induced ATP release and maxi-anion channel were identical to each other. The channel was selective to anions and showed significant permeability to ATP^{4-} ($P_{ATP}/P_{Cl} \sim 0.1$) and

$MgATP^{2-}$ (P_{ATP}/P_{Cl}~ 0.16). After taking a 3-D image of the cell by a scanning ion conductance microscopy technique in which a fine-tipped patch pipette was employed as a probe to monitor the cell surface morphology, the same pipette was employed for patching the specified regions on the cells. We found that the density of functional ATP-conductive maxi-anion channel is higher in the central region of the cell body compared to the cell extensions. These results indicate that maxi-anion channels are distributed on the sarcolemma predominantly near the cell body center and serve as a pathway for ATP release in hypotonic, hypoxic and ischemic conditions.

（2）細胞容積センサー機能を生みだす境界面分子群の相互作用

赤塚 結子（三重大学大学院医学系研究科・再生統御医学）
清水 貴浩，岡田 泰伸（生理学研究所・機能協関）

細胞外及び細胞内の浸透圧変化に対応して自らの体積を一定に保とうとする働きは，動物細胞が生命を維持する上で必要不可欠な機能であるが，最近ではこの容積調節の破綻が細胞死につながることが明らかとなっており，細胞がいかに自らの容積をセンスし対応するかという点に注目が集まっている。細胞が一旦膨張した状態から元の体積に戻る調節性容積減少(regulatory volume decrease: RVD)の過程は，細胞内の蛋白質による情報伝達を介して，最終的には細胞内からの K^+と Cl 流出が駆動力となり，細胞内の水が細胞外に流出することによって達成される。特にこの場合の Cl の通り道であるチャネルは細胞の容積上昇を感知して開口するために容積感受性 Cl チャネル(VSOR)と名づけられているが，最近では容積調節だけでなくアポトーシスにも深く関わっていることがわかってきている。

我々は VSOR の分子同定を目指す過程で，その制御因子として ABC トランスポータスーパーファミリーに属する ABCF2 を同定した。ABCF2 を大量発現させた HEK 細胞では，VSOR の電流が抑制されることと，RVD の遅延が起こることがわかっている。また，ABCF2 がアクチン結合蛋白質であるアクチニン-4 と結合すること，さらにその結合量は低浸透圧刺激によって増えることを見出しており，RVD 過程における細胞膜直下で，アクチン–アクチニン-4–ABCF2 が相互作用して容積センサーとして働き，VSOR を制御する可能性が示唆された。

（3）脳内 Na^+センサー：Na_xチャネルの生理的役割

檜山 武史，渡辺 英治，野田 昌晴（基礎生物学研究所・統合神経生物学）
渡辺 英治（基礎生物学研究所・神経生理学）

Na_xは電位作動性 Na チャンネル・ファミリーに属し，体内 Na^+濃度付近を閾値とする Na^+センサーとして働く。我々は Na_x 遺伝子ノックアウトマウスを作成し，Na_x が哺乳動物の塩/水恒常性の中枢である脳室周囲器官(CVO)に発現し，体液 Na^+レベルセンサーとして機能することを明らかにしてきた。Na_x によって検出された情報が CVO の活動に変換される機構を調べるため，Na_xの細胞内局在を調べた。免疫電子顕微鏡法と二重免疫染色法により，Na_x が上衣細胞と星状細胞から広がったニューロン周囲膜状突起に特異的に発現することを示した。CVO の一つである脳弓下器官から単離したグリア細胞においてイオンイメージングを行ったところ細胞外 Na レベル増加に応答した。 さらに，グルコース・イメージング法を用いて CVO の Na_x 陽性グリア細胞が Na 依存的にグルコース取り込みを増加させること，その過程で Na_x が重要な役割を果たすことを明らかにした。以上より，Na_xを発現するグリア細胞がまず体液 Na レベルの生理的増加を検出し，次にグリアのグルコース代謝の亢進を含む細胞内 Na 依存的な機構を介して CVO の神経活動を制御することが示唆された。非興奮性グリア細胞と興奮性神経細胞との緊密なコミュニケーションに基づいて Na 恒常性の制御中枢が機能すると考えられる。

（4）代謝型グルタミン酸受容体シグナル伝達のリガンド依存性

立山 充博，久保 義弘（生理学研究所・神経機能素子）

代謝型グルタミン酸受容体 1 型(mGluR)について，グルタミン酸のみならず細胞外の多価陽イオンによっても活性化されること，複数種の GTP 結合蛋白質と共役しうること，が知られている。すなわち，mGluR1 を介するシグナル伝達の上流と下流には，複数の経路が存在する。我々は，異なるタイプのリガンドであるグルタミン酸と Gd^{3+}では，活性化されるシグナル伝達経路に差異があるという可能性を検証した。細胞内 Ca^{2+}濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 変動と細胞内 cAMP 濃度 ($[cAMP]_i$) 変動を同時に記録することにより，グルタミン酸が mGluR1 を介して Gq（$[Ca^{2+}]_i$ 上昇）と Gs（$[cAMP]_i$ 上昇）を活性化することを確認した。これに対して，Gd^{3+}投与では Gq の活性化は見られたが，Gs の活性化は見られなかった。この結果は，活性化されるシグナル伝達経路が，リガンドのタイプにより異なることを示している。X 線結晶構造解析により，グルタミン酸のみ結合した場合とグルタミン酸と Gd^{3+}の両方が結合した場合では，mGluR1 の細胞外の構造に差異があることが，明らかになっている。そのため，リガンドのタイプによりもたらされる受容体の立体構造の差異により活性化されるシグナル伝達経路に差異が生じるものと考えられる。そこで，mGluR1 を介するシグナル伝達の受容体構造依存性について，FRET を用いた解析を進めている。

（5）機械受容チャネルの分子機構

成瀬 恵治（名古屋大学大学院医学系研究科・細胞生物物理学）

機械受容チャネルは外界からの機械的刺激を電気信号に変換するイオンチャネルで，細菌からヒトに至るまであらゆる細胞に存在する。体性感覚系・心血管系などにおいて重要な役割を果たしている。

近年，トリ及びヒト心筋より伸展依存性・カルシウム依存性カリウムチャネル(SAKCA)の単離・同定を行った。SAKCA チャネルは STREX 配列という独特な配列をもっており，この STREX 配列が伸展刺激受容活性の責任配列であることがわかった。マウス・ウサギの STREX 配列は伸展刺激感受性がなかったので，トリ・ヒトの STREX 配列と比較したところ $ERA_{672\text{-}674}$（トリ），$ERA_{712\text{-}714}$（ヒト）が重要であることが判明した。トリ STREX 配列の Ala^{674} を Thr^{674} に置換，または STREX 配列自体を除去することにより SAKCA の伸展刺激感受性を失わせることが出来た。STREX-GFP と SAKCA チャネルを共発現させた CHO 細胞に発現させると細胞膜に STREX 配列が集まることがわかり，且つ，SAKCA チャネルの伸展感受性が消失した。Excised パッチ膜の細胞質側から STREX 配列からなる合成ペプチドを投与すると SAKCA チャネルの伸展感受性が消失した。これらのことから STREX 配列は細胞膜に存在する物質と結びつき膜の張力を感知することが示唆された。

（6）摂食行動に及ぼす視床下部 AMP キナーゼの調節作用

箕越 靖彦，志内 哲也，岡本 士毅，斉藤 久美子（生理学研究所・生殖，内分泌系発達機構）

AMP キナーゼ(AMP-activated protein kinase)は，細胞内のエネルギーレベルの低下（AMP/ATP 比の上昇）によって活性化し，代謝，イオンチャネル活性，遺伝子発現を変化させて細胞内 ATP レベルを回復させることから“metabolic sensor”と呼ばれている。しかし近年の研究により，AMP キナーゼは，メトホルミンなどの糖尿病治療薬，運動，レプチンやアディポネクチンなどのホルモン，さらには自律神経によって活性化することが明らかとな

り，AMP キナーゼが細胞内エネルギー代謝だけでなく，個体全体の糖・脂質代謝，エネルギー消費を調節することが明らかとなった。

さらにごく最近 AMP キナーゼは，エネルギー消費だけでなく，摂食行動をも制御することが判明した。我々は，レプチン，インスリン，グルコース，メラノコルチン，ニコチンなど摂食抑制因子の多くが，視床下部 AMP キナーゼ活性を低下させることをみいだした。また，絶食後や摂食促進神経ペプチド AGRP によって活性が逆に上昇した。さらにアデノウイルスを用いて dominant negative (DN)あるいは constitutively-active (CA) AMPK を視床下部に発現させると，DN は摂食抑制を，CA は摂食亢進を引き起こした。このように AMP キナーゼは，摂食行動とエネルギー消費機構の両調節に関わるシグナル分子であり，特に視床下部 AMP キナーゼは，栄養素，ホルモンの共通シグナル分子として摂食行動を制御すると考えられる。

（7）共鳴ラマン分光法が明らかにする一酸化炭素により ON/OFF が制御される転写調節因子 NPAS2のしくみ

内田 毅（岡崎統合バイオサイエンスセンター・生体分子）

NPAS2 は一酸化炭素 (CO) センサーとして新たに発見されたヘム蛋白質で，哺乳類の脳で発現し，転写調節因子として働く。DNA と結合する basic helix-loop-helix ドメインと 2 つの PAS ドメインをもち，酸素センサー蛋白質である FixL や DOS と高い相同性をもつ。各 PAS ドメインはそれぞれ 1 つのヘムと結合し，そこに CO が結合する。NAD(P)H による還元状態で BMAL-1 という蛋白質とヘテロダイマーを形成し，配列特異的に DNA と結合するが，ヘムに CO が結合すると DNA から解離する。つまり，CO の結合というシグナルが BMAL-1 との界面に伝わり，BMAL-1 とのヘテロダイマーが解離することで，DNA から遊離する。

CO による NPAS2 のシグナル伝達機構を明らかにするため，共鳴ラマン分光法を用いてセンサー部位であるヘム周辺の構造について検討した。その結果，最近いくつかのセンサーヘム蛋白質で見つかっているように，Cys が酸化型のヘムに配位しており，これがヘム鉄の還元により，His に交換することがわかった。この His は近傍のアミノ酸残基と水素結合をしているが，CO の結合によりヘム鉄から解離し，近傍との水素結合も切断される。このようにセンサー部位であるヘムに CO が結合・解離することにより，ヘム近傍に存在する水素結合のネットワークを含む構造が変化することにより，BMAL-1 とのヘテロダイマーが解離・形成し，遺伝子の発現が制御されることが明らかになった。

（8）PKA/Ca^{2+}シグナルを制御する線条体神経細胞質センサーの機能的連関

西 昭徳（久留米大学医学部・薬理学）

線条体神経には，PKA と細胞内 Ca^{2+}シグナルを統合・制御する 2 つのリン酸化タンパク，DARPP-32(Dopamine- and cAMP-Regulated Phosphoprotein, Mr 32 kDa)と RCS(Regulator of Calmodulin Signaling)が選択的に発現している。DARPP-32 は PKA により Thr34 残基がリン酸化されると PP-1 活性を抑制する。また，PKA によりリン酸化された DARPP-32 は PP-2B により脱リン酸化される。一方，RCS は PKA により Ser55 残基がリン酸化されると calmodulin と結合し，Ca^{2+}/calmodulin 依存性酵素活性を抑制する。つまり，DARPP-32 は PKA/Ca^{2+}シグナルのセンサーとして，RCS は PKA シグナルのセンサーとして機能している。黒質から線条体に投射するドーパミン作動性神経は，線条体における運動機能や認知機能の調節に中心的役割を担っている。これまでの研究により，ドーパミンによる線条体神経の機能調節には DARPP-32 によるドーパミン細胞内情報伝達の増幅が重要であり，DARPP-32 と RCS は機能的相互作用

を示すことを明らかにした。ドーパミン情報伝達における DARPP-32 と RCS リン酸化の機能的役割，相互作用を紹介する。

（9）Ca^{2+}センサータンパク質 NCS-1の神経の興奮性と生存における生理的役割

西谷 友重（国立循環器病センター研究所・循環分子生理）

NCS-1(Neuronal Ca^{2+} sensor -1)は，主に神経や心臓に発現している Ca^{2+}結合タンパク質で，もともと神経のシナプス伝達に関わる因子として知られていた。私たちは以前，NCS-1 が Aータイプ K^+チャネル(Kv4)の Ca^{2+}感受性の活性化因子であることを初めて報告したが，その後，他の Ca^{2+}チャネルやイノシトールリン酸化酵素の活性化などを介して神経伝達物質の分泌促進を行うこと，またシナプスの短期可塑性を制御することなど多様な機能を持つことが報告されている。しかし，NCS-1 の興奮性細胞のサバイバル-アポトーシス経路における役割については今のところ全く報告がない。私たちは，最近の実験結果から NCS-1 が，1)障害を受けた神経においてその発現量が増加すること，2)NCS-1 高発現細胞が種々のストレスに対し抵抗性を示すことから，NCS-1 が障害神経におけるサバイバル因子として働くという全く新規の機能を持つこと，さらに 3)NCS-1 がサバイバル促進作用を持つ神経栄養因子 GDNF の下流に存在しその作用を仲介するという，神経栄養因子と Ca^{2+}センサーの新たな相互関係を明らかにしつつある。本研究会では，私たちの最近の知見を中心に NCS-1 の持つ多彩な機能について紹介し，バイオ分子センサータンパク質としての NCS-1 の生理的意義について議論したい。

（10）B リンパ球特異的アダプター分子 BCAP の機能発現機構

黒崎 知博（理化学研究所・免疫，アレルギー科学総合研究センター）

B リンパ球受容体(BCR)を介する抗原認識によって引き起こされるシグナルは，B 細胞の分化・活性化に必須であり，したがって，BCR シグナルの分子機序解明は依然として重要な課題である。

BCR を介するシグナルの第一段階は Syk をはじめとするチロシンキナーゼの活性化によって生じるが，私たちは Syk の生理的基質 BCAP を単離し，この分子のノックアウトマウスを作製することにより，まず，その生理機能を探索した。BCAP 欠損マウスでは B リンパ球の最終分化の障害，および T 細胞非依存性免疫応答の低下が認められ，この B 細胞特異的アダプター分子 BCAP が BCR の下流で働き，生体において重要な役割を担っていることを明らかにした。更に，なぜこのような B リンパ球の最終分化の障害が生じるかを in vitro の実験を駆使して探索した。その結果，BCAP 欠損 B 細胞は野生型 B 細胞に比し，生存・増殖反応を司っている転写因子 c-Rel の減少が認められた。この c-Rel の減少が vivo においても重要な機構であることは，BCAP 欠損マウスより採取した骨髄細胞に c-Rel を強制発現すると，B リンパ球の最終分化が回復することにより確かめられた。

（11）胆汁酸誘導体によるビタミン D 受容体活性化機構の解析

槇島 誠，川名 克芳（日本大学医学部・生化学）
安達 竜太郎（大阪大学大学院医学系研究科）

活性型ビタミン D3 の受容体であるビタミン D 受容体(VDR)は，カルシウム代謝や骨代謝の調節のみならず，

免疫調節，細胞の分化誘導など様々な生理作用を有することが知られている。我々の研究により，核内レセプターFXRに加えてVDRも胆汁酸の受容体として機能することが明らかになった。

活性型ビタミンD3（内分泌シグナル）と二次胆汁酸であるリトコール酸（生体異物シグナル）の2種類のリガンドに反応するVDRとこれらのリガンドとの構造活性相関を明らかにするために，VDR変異体に対する活性型ビタミンD3とリトコール酸の作用を比較検討し，VDRのリガンド結合ポケットへの結合様式の相違を明らかにしたが（平成15年度バイオ分子センサー研究会），今回はリトコール酸誘導体のVDRに対する効果を検討した。リトコール酸の3位水酸基の修飾によりVDRに対する活性が増加した。検討した誘導体の中でリトコール酸アセテートが最も強くVDRを活性化した。リトコール酸アセテートのFXRに対する作用は弱く，PXRには作用しなかった。リトコール酸3位修飾体のうち，イソリトコール酸やウルソコラン酸はリトコール酸よりも強力にFXRを活性化したが，VDRには作用しなかった。活性型ビタミンD3とリトコール酸とでは，VDRに対する結合様式のみならず，VDR-RXRヘテロ二量体としての活性化様式に相違があるとの報告もあり，VDRの生理機能を解明する上で胆汁酸誘導体の利用は有用であると考えられる。

（12）酸化ストレスセンサーとユビキチンライゲース：Nrf2-Keap1システムによる酸化ストレス応答機構

小林 聡（筑波大学・TARAセンター）

外来ストレスに対する生体防御機構では，センサーによるストレス感知と細胞内因子へのシグナルの伝播，そして最終的には，転写因子の活性化による防御系遺伝子の誘導的発現という一連の秩序だったプロセスにより，恒常性維持がもたらされる。近年我々は，活性酸素種や食餌性異物である親電子性物質に代表される“酸化ストレス”に対する生体防御機構において，Nrf2-Keap1システムがきわめて重要な機能を有していることを，分子生物学ならびに遺伝子破壊マウスの解析を通じ証明してきた。転写因子Nrf2は，酸化ストレス応答遺伝子を発現誘導するメインプレーヤーであり，一方Keap1はNrf2の核移行を阻害する抑制性因子である。最近我々は，Keap1が2つのシステイン残基により酸化ストレスを感知する“センサー”として機能していること，さらに非ストレス下ではNrf2を分解抑制させる“ユビキチンライゲース”としても機能することを明らかにした。また，このストレス応答制御機構の破綻と疾患の相関を示唆する知見として，ヒト肺ガンにおけるkeap1遺伝子変異を見出している。このことは，ストレス応答の抑制機構もまた生体の恒常性維持には重要であることを意味している点で，興味深い。本発表では，酸化ストレス応答制御におけるKeap1の分子機構を中心に，その生理的意義に関しても考察したい。

（13）生理活性脂質受容体BLTとプロトン感知性受容体G2A

横溝 岳彦（東京大学大学院医学系研究科・生化学分子生物学））

生理活性脂質は産生細胞への刺激に伴って産生され，標的細胞に作用したのち速やかに分解されるという特徴を有する。生理活性脂質の作用は細胞膜に存在するGタンパク質受容体(GPCR)と核内受容体を介して行われる。ロイコトリエンB4(LTB4)は，好中球の活性化因子として知られる生理活性脂質であり，我々はLTB4高親和性受容体BLT1と低親和性受容体BLT2を同定し，解析を進めている。共にGi/o，GqファミリーのGタンパク質を活性化するGPCRであるが，BLT1は白血球特異的に，BLT2は比較的広範な発現を示す。BLT1欠損マウスでは，好中球が関与する古典的炎症モデルにおいて減弱した反応が見られることに加え，Th1型，Th2型免疫反応にも異常が観察され，LTB4が免疫反応においても重要なメディエーターであることが明らかになりつつある。G2Aはかつてリゾ

リン脂質である LPC（リゾフォスファチジルコリン）の受容体であると報告されたが，我々は最近，G2A が細胞外のプロトン濃度を感知するプロトンセンサーであること, LPC はむしろ G2A に対して抑制的に作用することを見いだした。これまでに得られた知見を総括し，今後の展望を討論したい。

（14）電位センサーをもつイノシトールリン脂質ホスファターゼの機能

岡村 康司，村田 喜理，岩崎 広英，佐々木 真理，Israil Hossain
（岡崎統合バイオサイエンスセンター・神経分化）

従来，膜電位センサーはイオンチャネル固有の構造と考えられ，膜電位変化によるシグナル伝達についての研究は，イオンチャネルまたはトランスポーターなどのイオンの出入りを制御する分子に限定されてきた。我々はホヤゲノムからイオンチャネル関連分子を網羅的に検索した（*Physiol. Genomics*, in press）ところ，電位依存性チャネルの電位センサーを有しながらイオンが通るポア領域を欠き，その代わりに C 末端側にガン抑制遺伝子として知られる PTEN と相同性の高い酵素ドメインを有する新規分子を見出した。この分子は電位センサーがイオン通路以外の機構を制御する始めての例であり，現在論争になっている電位センサーの動作原理を理解する上でも，また膜電位変化の生理的役割を捉えなおす上でも，新たな視点を提供する。昨年度本研究会では，この分子がチャネルと同様なゲート電流を示し電位感受性をもつこと，in vitro において PIP3 の燐酸を脱リン酸化するホスファターゼ酵素活性を有すること，また K チャネル活性を指標とした実験からその酵素活性が膜電位に依存して変化することなどを報告した（*Nature*, 2005）。今回は，①これまで K チャネル活性を指標として解析してきた VSP の電位依存的酵素活性が，PIP2 の可視化によっても確認できたこと，②酵素活性の膜電位依存性が S4 様のドメインの特性で規定されること，③脊椎動物の相同分子が Ci-VSP と同様に電位依存的ホスファターゼの性質をもつこと，について新たな知見を得たので報告する。

（15）温度感受性 TRP チャネルの構造と機能

富永真琴（岡崎統合バイオサイエンスセンター・細胞生理）

哺乳類には現在までに 6 種類の温度感受性 TRP チャネルが知られており，それぞれが特異な活性化温度閾値を有する（TRPV1 > 43 度, TRPV2 > 52 度, TRPV3 > 32-39 度, TRPV4 > 27-35 度, TRPM8 < 25-28 度, TRPA1 < 17 度）。TRPV1 の活性化温度閾値は固定したものではなく，PKC によるリン酸化によって 10 度以上も変化する。TRPV4 の温度閾値は体温近傍であるが，TRPV4 は感覚神経にはほとんど発現せず，表皮ケラチノサイトや視床下部視索前野に発現することから，皮膚での温度受容や体温調節にも重要な働きをしていることが推測される。新生仔マウスのケラチノサイトの培養系を確立し，発現する TRPV4 ならびに TRPV3 の機能的な発現を Ca^{2+}-imaging 法で確認した。さらに，前回の本研究会で新規温度感受性 TRP チャネル TRPM2 を報告し，TRPM2 が膵β細胞でのインスリン分泌に関与することを発表したが，TRPM2 は K_{ATP} チャネル非依存的，cAMP 依存的なインスリン分泌に関わることが明らかとなった。また，種々の TRP チャネルの機能を制御することが報告されている 2-APB が TRPM2 活性を強く抑制することを見出した。

23. 体温調節，温度受容研究会

2006 年 9 月 27 日− 9 月 28 日

代表・世話人：永島 計（早稲田大学 人間科学学術院）
所内対応者：富永 真琴（自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター・細胞生理研究部門）

（1）建築環境工学あるいは環境心理学の立場からの温冷感および快適感

久野 覚（名古屋大学大学院環境学研究科都市環境学専攻）

（2）体温調節における皮膚温の役割

中村 真由美，依田 珠江（早稲田大学 人間科学学術院）
江崎 秀範（ホンダ技術研究所）
彼末 一之（早稲田大学 スポーツ科学学術院物）

（3）視索前野 GABA 受容機構を介した発熱時および寒冷時の熱産生

大坂 寿雅（国立健康・栄養研究所）

（4）ヒト暑熱環境下における皮膚血管拡張反応と皮膚交感神経活動の関係

上條 義一郎
（信州大学大学院医学研究科 加齢適応医科学独立専攻 個体機能部門 スポーツ医科学分野）

（5）骨格筋エネルギー代謝に及ぼす視床下部の調節作用

箕越 靖彦，志内 哲也，岡本 士毅，李 順姫，鈴木 敦，斉藤 久美子
（生理学研究所 発達生理学研究系生殖・内分泌系発達機構）

（6）脂肪エネルギー消費分子としての UCP1 の役割

岡松（小倉）優子，斉藤 昌之（北海道大学大学院 獣医学研究科）

（7）細胞外液浸透圧と体温調節

鷹股 亮（奈良女子大学 生活環境学部 生活健康学講座）

（8）運動時の体温決定因子：末梢からの非温熱性入力の重要性

能勢 博（信州大学大学院 医学研究科 スポーツ医科学分野）

（9）磁気共鳴 (MR) 信号を利用した脳温・深部温の評価

吉岡 芳親，神原 芳行，松村 豊（岩手医大 先端医療研究センター）
及川 浩（岩手県立二戸病院 放射線科）
江原 茂（岩手医大 放射線科）
井上 敬，小川 彰（岩手医大 脳外科）

(10) 生体リズムと体温

山仲 勇二郎，高須 奈々，橋本 聡子，本間 研一（北海道大学大学院医学研究科第一生理学講座）

(11) 冬眠中のハムスターのエネルギー代謝と抗酸化機構

橋本 眞明，Peter G. Osborne（旭川医大・第一生理）

(12) ヒトの体温調節における脊髄の役割についての仮説

紫藤 治，丸山 めぐみ，アブドゥル・ハク（島根大学医学部 環境生理学講座）
和田 昭彦，北垣 一（島根大学医学部 放射線医学講座）

(13) UCP1 遺伝子導入による肥満・糖尿病に対する治療法開発

片桐 秀樹（東北大学大学院 医学系研究科 創生応用医学研究センター 再生治療開発分野）

(14) 老化と体温調節

山下 均（国立長寿医療センター研究所 老化制御研究部）

（15）発熱に関わるホスホリパーゼ A_2 のアイソタイプ

松村 潔（大阪工業大学情報科学部 生物科学研究室）

堀 あいこ，山本 知子，細川 浩，小林 茂夫（京都大学情報学研究科 生体情報処理分野）

（16）発汗のメカニズム

芝崎 学（奈良女子大学 生活環境学部）

（17）体温リズムの調節機構とその生理学的意義

永島 計（早稲田大学 人間科学学術院）

（18）冷感における冷受容チャネルの役割

細川 浩，阿部 潤次，岡澤 慎，澤田 洋介，松村 潔，小林 茂夫（京都大学）

（19）温度感受性 TRP チャネルの構造・発現・機能

富永 真琴（自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター・細胞生理研究部門）

【参加者名】

斉藤 昌之，岡松（小倉）優子，北尾 直也（北海道大学大学院獣医学研究科），山仲 勇二郎（北海道大学大学院医学研究科），橋本 眞明（旭川医科大学医学部），吉岡 芳親（岩手医科大学先端医療研究センター），片桐 秀樹（東北大学大学院医学系研究科附属創生応用医学研究センター），大坂 寿雅（国立健康・栄養研究所），彼末 一之（早稲田大学スポーツ科学部），永島 計，小林 章子，中村 真由美，狩野 真清，依田 珠江，安原 祥（早稲田大学人間科学部），能勢 博，上條 義一郎，後藤 正樹，宮川 健（信州大学大学院医学研究科），篠崎 圭一，宮澤 誠司（岐阜大学大学院連合獣医学研究科），山下 均（国立長寿医療センター研究所 老化制御研究部），久野 覚（名古屋大学大学院環境学研究科），細川 浩（京都大学情報学研究科），松村 潔（大阪工業大学情報科学部），芝崎 学，鷹股 亮（奈良女子大学生活環境学部），末盛 智彦（岡山大学大学院医歯学総合研究科），紫藤 治，丸山 めぐみ（島根大学医学部医学科），箕越 靖彦，岡本 士毅，志内 哲也（生理学研究所 生殖・内分泌系発達機構），富永 真琴，富永 知子，柴崎 貢志，飯田 陶子，稲田 仁，Sravan Mandadi，曽我部 隆彰，西井 博子，富樫 和也，東 智広，村山 奈美枝，島 麻子（岡崎統合バイオサイエンスセンター 細胞生理）

【概要】

体温は最も古くかつ精力的に研究されてきた生理学分野である。しかしながら，他のホメオスタシス調節機構，例えば循環調節あるいは体液調節（浸透圧調節）に比較し，遅れをとっていることは否定できない。この原因としては，温度受容器の分子レベルの解析，体温・代謝にかかわる化学物質の発見，体温調節にかかわる特異的な神経機能の同定の遅れに起因しているところが大きいと思われる。しかしながら，この 10 年以内の飛躍的な躍進により，これらの問題点が解決されつつある（温度感受性イオンチャネルの発見，中枢-末梢にいたる神経回路網の同定，発熱に関わる物質の同定，熱産生の分子機構，生理心理学的手法，新たな測定技術等）。しかし，残念ながら体温調節は他の調節系に比べ非常に多くの生理機能に関係しているため，体温に関する研究者が各々のフィールドに分散し，十分な情報が得られないことが多い。今回の研究会の目的は‘体温’をキーワードに，これらの研究者が集まり，各々の研究成果を発表・情報交換し，個々の知識を統合，体温調節の新たな概念を確立することであった。また体温研究における問題点を討議，かつ明らかにし，あらたな研究テーマを創成することを目的とした。研究会においては基礎研究から臨床応用までを目的とする多彩な研究者が集まり，有意義な討議がなされた。また将来への研究会の発展につながる問題提議がなされた。

（1）建築環境工学あるいは環境心理学の立場からの温冷感および快適感

久野 覚（名古屋大学大学院環境学研究科都市環境学専攻）

古くから，温冷感の測定には，日本語の場合「暑い」「暖かい」「どちらでもない」「涼しい」「寒い」を，英語の場合「hot」「warm」「neutral」「cool」「cold」を並べた尺度が使われている。しかし，環境が変動している場合にこの尺度では困る場合がある。例えば，夏期に屋外から冷房空間へ入った場合，屋外では「暑い」であり，入室後は「涼しい」となるが，やがて「どちらでもない」と変化する。尺度上でオーバーシュートすることになる。

一方，このオーバーシュート現象とも絡み，快適感については，「comfortable」という言葉だけでは十分捉えることができないので「pleasant」という言葉も併用するべきであるという議論がかつて起こった。現在，測定尺度としては，不快の度合いを測る片側尺度を使う場合が多いが，pleasant な状態も評価するために「快適－不快」の両側尺度が用いられることも多い。この場合は，中間点の問題が生じる。

ここでは，Gagge が使った温度感覚，McIntyre の positive/negative thermal pleasure，Cabanac の pleasantness を紹介しつつ，全体を統一的に説明できる久野の二次元温冷感モデルについて説明する。環境状態と生理状態を二軸にとった平面上で，上述の現象が説明できることを示す。

（2）体温調節における皮膚温の役割

中村 真由美，依田 珠江（早稲田大学 人間科学学術院）
江崎 秀範（ホンダ技術研究所）
彼末 一之（早稲田大学 スポーツ科学学術院）

恒温動物でも体温は部位によって異なり，大きく変動する部位(shell)と比較的安定に保たれる中心部(core)に分かれる。つまり体温調節とは core の温度を調節する（制御量とする）機能と考えられる。これは基本的には negative feedback により達成されている。さらにそれに加えて，最も高頻度で出現する「外乱」である環境温変化にする feed forward を行うことで制御の質を高めている。環境温変化は皮膚で受容される。皮膚温の情報は特に行動性体温調節に重要な役割をはたす。そして温度に関係した感覚は「熱い・冷たい」という温度感覚と，「暑い・寒い」という温熱的快・不快感（快適感）に区別され，またそれぞれ全身の感覚と局所感覚がある。このような感覚が，①どのような機序で発生し，②どのような特徴を持ち，③相互にどのように関係するか，などについてはまだ不明な点が多い。我々は皮膚温と温熱的感覚の関係性を調べることを目的として，皮膚温，局所的温度感覚・快適感をコンピュータの人体模型上に再現するシステム（データ可視化システム）を開発した。そこで得られたデータを中心に皮膚からの温度入力の，特にヒトでの特徴について概観する。

（3）視索前野 GABA 受容機構を介した発熱時および寒冷時の熱産生

大坂 寿雅（国立健康・栄養研究所）

ウレタン・クロラロース麻酔ラットの皮膚を 2-6°C 冷やすと酸素消費率が増加する(Osaka, J Physiol, 2004)。視索前野背側部に GABA を微量注入しても熱産生反応が誘起されるが，この部位に $GABA_A$ 受容体拮抗薬である bicuculline methiodide (BMI)を前投与しておくと皮膚冷却によって誘起される熱産生反応が阻止される(Osaka, Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2004)。したがって視索前野の GABA 受容機構が寒冷時の熱産生を介してい

る。では，この機構は発熱時の熱産生に寄与しているであろうか。

発熱物質であるリポ多糖類(LPS, 1 μg/kg)をウレタン・クロラロース麻酔ラットに静脈内投与したところ三相性の熱産生反応がおき, 極大値は約 60, 100, 130 分だった。心拍数は酸素消費と並行して増加し，結腸温度は単相性に 1.5-2.5 ℃ 上昇した。LPS 投与後の 40, 80, 120 分に視索前野背側部に BMI を両側注入すると熱産生反応は阻止された。視索前野腹内側部は発熱の最終メディエーターとされるプロスタグランディン(PG)E_2 感受性部位であるが，この部位に PGE_2 を注入して誘起される熱産生，頻脈，高体温の反応も視索前野背側部への BMI 前投与によって阻止された。したがって，視索前野背側部の GABA 受容機構は寒冷時のみならず発熱時の熱産生も介しており，視索前野からの熱産生出力機構であると考えられる。

（4）ヒト暑熱環境下における皮膚血管拡張反応と皮膚交感神経活動の関係

上條 義一郎
（信州大学大学院医学研究科 加齢適応医科学独立専攻 個体機能部門 スポーツ医科学分野）

ヒトの皮膚交感神経（節後線維）には発汗神経，血管収縮神経，血管拡張神経が含まれると言われている。一方，皮膚血流の神経性調節も能動性収縮と能動性血管拡張が関与しており非常に複雑である。そこで，我々は暑熱環境下における皮膚交感神経活動(SSNA)の増強と皮膚血管拡張の関係を調べるために，安静座位で water-perfused suit を着用した被験者 5 名の腓骨神経から SSNA とその支配領域の皮膚血流量（LDV; レーザー血流計），発汗活動(SR)，平均血圧(MAP)を同時測定した。暑熱負荷は suit に流す水温を 34℃から 40℃まで 2℃ずつ 30 分毎に上昇させ，各ステージ最終 10 分間にデータ収録を行った。その結果，皮膚血管コンダクタンス(CVC=LDV/MAP)は bretylium により局所性に収縮活動を抑制した部位において暑熱負荷上昇に従い増加したが，正常部位では変化しなかった。このことは，正常部位の能動性血管拡張が収縮活動により抑制されることを示す。また，同じ神経支配領域内の異なる 2 箇所で測定された CVC を 20 秒毎に区切り 10 分間の相関関数と対応する 20 秒間のバースト数を求めたところ，2 箇所の CVC の相関係数はバースト数増加により高くなる傾向を示した。そこで各ステージのバースト多発時（間隔＜2 秒）のその発生から 20 秒間の CVC と SR を加算平均したところ，SR の振幅は暑熱負荷 40℃で大きく増加するのに対し，CVC の振幅は暑熱負荷 38℃で増加し，バーストの振幅の増加と一致した。これらの結果は皮膚血管拡張に SSNA の増強が関与することを示す。

（5）骨格筋エネルギー代謝に及ぼす視床下部の調節作用

箕越 靖彦，志内 哲也，岡本 士毅，李 順姫，鈴木 敦，斉藤 久美子
（生理学研究所 発達生理学研究系生殖・内分泌系発達機構）

骨格筋はヒトにおいて最大の臓器であり，熱産生，特に交感神経による熱産生に重要な役割を果たしていることが知られている。私どもはこれまで，熱産生を促進するホルモン・レプチンが骨格筋においてグルコース，脂肪酸の利用を促進することを明らかにしてきた。レプチンは，視床下部に作用して交感神経を活性化し，β作用を通して骨格筋でのグルコースの取り込みを促進する。また同時に，視床下部・交感神経系，及び骨格筋への直接作用によって骨格筋 AMP キナーゼを活性化し，脂肪酸酸化を高める。

さらに私どもは最近，睡眠・覚醒の調節に関わる視床下部神経ペプチド・オレキシンが，レプチンと同様，交感神経のβ作用を介して骨格筋でのグルコース利用を促進することを見いだした。オレキシンを視床下部腹内側核(VMH)に作用させると，運動や摂食行動を惹起しない微量投与によって骨格筋支配交感神経活動を活性化し，

グルコース利用を促進した。また，アドレナリンβ受容体ノックアウトマウスではオレキシンによるグルコースの取り込み促進作用が完全に抑制された。オレキシンは，食餌探索行動を始め様々な行動発現に際して活性化する。このことからオレキシンは，覚醒レベルを維持するとともに骨格筋での代謝を調節することで，行動発現並びにその遂行に寄与している可能性がある。

（6）脂肪エネルギー消費分子としての UCP1の役

岡松（小倉）優子，斉藤 昌之（北海道大学大学院 獣医学研究科）

褐色脂肪のミトコンドリアに存在する脱共役タンパク質(UCP1)は，交感神経由来のアドレナリンのβ作用により活性化されて，酸化的リン酸化を脱共役し，エネルギーを熱に変換する。熱産生分子としての UCP1 が，寒冷下での体温維持に重要であることは，1)寒冷刺激により褐色脂肪への交感神経活動が増加する，2)UCP1 欠損マウスやアドレナリンβ受容体欠損マウスが寒冷不耐性である，などの事実からも明らかである。一方，UCP1 が活性化すると褐色脂肪では細胞内の中性脂肪や血中から供給される脂肪酸が熱産生の基質として燃焼されるので，脂肪エネルギー消費分子としての機能も注目されている。そこで，エネルギー消費における UCP1 の役割を明らかにするために，アドレナリンβ3 受容体作動薬を用いて検討した。β3 受容体作動薬を単回投与すると，野生型マウスでは，褐色脂肪組織温度が上昇し，全身のエネルギー消費量（酸素消費量）が増加した。さらに，慢性投与すると体脂肪が減少した。しかし，UCP1 欠損マウスでは何れの反応も認められなかった。また，慢性投与時には，野生型マウスにおいては褐色脂肪のみならず，通常 UCP1 の発現が見られない白色脂肪にも UCP1 が新たに出現していた。これら異所性発現した UCP1 のエネルギー消費への寄与についても検討しているのであわせて紹介したい。

（7）細胞外液浸透圧と体温調節

鷹股 亮（奈良女子大学 生活環境学部 生活健康学講座）

体温調節機能と体液調節機能は，密接に関連し合い機能している。古くから，脱水は体温上昇時の体温調節機能を抑制することが知られている。通常の脱水は，細胞外液（血漿）量の減少と細胞外液（血漿）浸透圧の上昇を伴う複合的な刺激であるが，我々は主に血漿浸透圧が体温調節機能に及ぼす影響について研究を行い，以下の点を明らかにした。

血漿浸透圧上昇は，体温上昇時の体温調節機能を抑制する。この抑制は，体温調節反応である発汗および皮膚血管拡張反応の核心温閾値を上昇させることによる。ヒトにおける実験では，血漿浸透圧 1 momol/kg H_2O の上昇に対して，皮膚血管拡張および発汗の核心温閾値の上昇は，約 0.03-0.04 ℃である。

血漿浸透圧上昇による体温調節反応の抑制は，少量の水分を飲み込むと一時的に解除される。血漿浸透圧上昇時に少量の水分を摂取することにより口渇感およびバゾプレッシン分泌が一時的に抑制されるが，これは口腔咽頭反射として知られている。少量の水分摂取により，浸透圧調節反応が抑制されるだけではなく，血漿浸透圧の変化を伴わずに体温調節反応の抑制が解除されたことから，血漿浸透圧上昇時の体温調節反応の抑制は中枢性であり，血漿浸透圧上昇による体温調節反応の抑制に関与する中枢部位は，浸透圧調節部位と少なくとも一部は共有していることが示唆された。

血漿浸透圧上昇による体温調節反応の抑制は，暑熱順化により減弱する。

（8）運動時の体温決定因子：末梢からの非温熱性入力の重要性

能勢 博（信州大学大学院 医学研究科 スポーツ医科学分野）

運動時の体温は，活動筋の産熱と皮膚血流・発汗による熱放散のバランスによって決定される。従来から，運動時の体温は運動強度に比例して上昇することが知られており，この原因として，勿論，活動筋からの熱産生が増加することが考えられるが，それとは別に，一定の体温上昇による皮膚血管拡張などの放熱が抑制されることも関与する。この現象が「産熱の亢進」と「放熱の抑制」が同時に起こっている点において「発熱」の現象に似ていることから，運動開始時には「脳の意志」によって体温を上昇させているのではないか，との仮説が成立する。一方，最近，我々は，1)運動時には運動強度に比例して血漿浸透圧が上昇し，この浸透圧に比例して皮膚血管拡張が抑制されること，2)この皮膚血管拡張抑制は，運動前に低張性食塩水を輸液しておけば抑制することができること，3)暑熱順化すれば運動時の皮膚血管拡張が亢進するが，この際，血漿浸透圧上昇による皮膚血管拡張抑制の感受性が鈍化していること，を明かにした。以上の結果は，運動強度に依存する体温上昇は，脳の意志によって決定されるのではなく，末梢の血漿浸透圧上昇によって体温調節反応が抑制され，「仕方なく」上昇していることを意味する。では，何のために皮膚血管拡張の抑制が起きるのか，本発表では，その合目的性についても考察する。

（9）磁気共鳴 (MR) 信号を利用した脳温・深部温の評価

吉岡 芳親，神原 芳行，松村 豊（岩手医大 先端医療研究センター）
及川 浩（岩手県立二戸病院 放射線科）
江原 茂（岩手医大 放射線科）
井上 敬，小川 彰（岩手医大 脳外科）

磁気共鳴法の非侵襲性と磁気共鳴信号の温度依存性を組み合わせることで，非侵襲的な深部温度計測を行った。使用した装置は，GE 社製 SIGNA Horizon LX 3.0 T であり，健康成人ボランティアを対象とした。測定部位は，大脳（男女各 18 名）と下腿部（男性 5 名）のヒラメ筋（中心側）と腓腹筋（外側）である。下腿部では，室温環境下(20-25℃)と共に，腓腹部表面より加温(40℃)・冷却(10℃)を行いながら内部温度を計測した。

大脳深部白質では，関心領域を，$2x2x2cm^3$ とした場合，数分程度の積算を行えば，0.2℃ 以内の再現性で温度計測が可能であり，経時的にもこの程度の精度で追跡・評価ができると考えられた。下腿部では，体動やそれに伴う血流の変動を考慮する必要が有ると思われたが，やや精度が低下した。男性(n=18)では，前頭葉の温度は，深部白質の温度より約 0.4℃低く($p<0.05$)，女性(n=18)では，差がなかった。また，男性では，深部白質の温度と鼓膜温が相関したが，女性では相関しなかった。室温環境下では，腓腹筋付近の温度は，ヒラメ筋付近の温度に較べ約 2℃低かった。また，腓腹部表面の温度を 10℃（冷却）にすると，腓腹筋付近では，有意に温度が下がったが，中心側のヒラメ筋付近では，有意な変化は認められなかった。環境温度が下がった場合でも，下腿部中心部の温度は維持される傾向にあり，大きな温度勾配ができることが分かった。空間・時間分解能は，現段階では数 mL・数分であるが，磁気共鳴法を用いることで，生理的条件下での深部温度の評価が可能である。

（10）生体リズムと体温

山仲 勇二郎，高須 奈々，橋本 聡子，本間 研一（北海道大学大学院医学研究科第一生理学講座）

昼夜変化のない環境下で深部体温リズムを長期にわたり測定すると被験者の約20%の被験者で睡眠覚醒リズムと乖離し，それぞれの周期でフリーランする内的脱同調がみられる。内的脱同調はヒトの生物時計が複数の振動体により構成されることを示唆しているが，振動体の局在や振動体間の同調機序については不明である。

当教室では脱同調パラダイムを用いて，ヒトの睡眠覚醒リズムが強制的なスケジュールにメラトニンリズムとは関わりなく同調すること。しかし，身体運動を加えることにより，メラトニンリズムの同調も促進されることを示し，いわゆる非光同調の機構を明らかにすることにより，この問題へアプローチすることが可能と考えられた。今回は，ヒトの生物時計の2振動体仮説，体温リズムの解析法について述べる。また，身体運動が生物時計に与える影響について検討した隔離実験データを報告する。

（11）冬眠中のハムスターのエネルギー代謝と抗酸化機構

橋本 眞明，Peter G. Osborne（旭川医大・第一生理）

室温 4±1℃恒暗下で冬眠中のシリアン・ハムスター(*Mesocricetus auratus*)は，直腸温6℃，呼吸はBiot様で4～6分に一回4～6呼吸が連続し，心拍は不整で4～8回/分，エネルギー代謝は覚醒安静時の1～5%程度である。覚醒を開始すると心拍と呼吸は規則的になり，5～6時間で覚醒に至る。褐色脂肪組織(BAT)の温度変化が検出されるのは心電図に変化が現れてから1～3時間後である。温度上昇が始まると2～3時間で30℃以上も体温が上昇し，エネルギー代謝の盛んな臓器は強い酸化ストレスに曝され，冬眠動物にはそれに対処する生得的機構が存在すると思われる。脳の局所活動（エネルギー代謝）は局所血流とよく一致することが知られているが，覚醒中の脳血流はBAT温度上昇に伴い，急激に増加する。体内抗酸化物質の一つとされるアスコルビン酸(AA)はゲッ歯目動物では肝臓で合成され血液で運ばれ，活性酸素種による酸化産物デヒドロAAとなり，局所的にグルタチオンによる還元をうけ再生される。冬眠からの覚醒中の動物で血漿，脳脊髄液，脳組織中のAA，尿酸，グルタチオン濃度を測定した。組織中AA，グルタチオン共に変化はなく，血漿中，脳脊髄液中の尿酸，グルタチオンは覚醒に伴い増加，AAは減少した。

（12）ヒトの体温調節における脊髄の役割についての仮説

紫藤 治，丸山 めぐみ，アブドゥル・ハク（島根大学医学部 環境生理学講座）
和田 昭彦，北垣 一（島根大学医学部 放射線医学講座）

脊髄はその加温や冷却により対応する体温調節反応が発現することから，体温調節機構の一翼を担っていると考えられる。しかし，その生理的役割については未だ解明されていない。脊髄は硬膜に包まれ脊柱管内に存在し，その周囲には良く発達した前後の内椎骨静脈叢が存在する。脊柱管内の椎骨動脈叢は上行腰静脈や腰静脈を介し，腸骨静脈や下大静脈と連絡するが，これら静脈には弁が存在しない。従って，腹腔内圧が上昇した時には，腹腔内の静脈血が椎骨に囲まれて変形し難い静脈叢へ移動すると考えられる。これらから，我々は次の仮説を考えた。下肢運動中には活動筋を経由した体内で最も温度の高い静脈血が下肢から躯幹部へ帰還する。この時，運動による腹筋の収縮や呼吸運動により腹腔内の静脈が定期的に圧迫され，下肢から帰る高温の静脈血の多くが脊柱管の

静脈叢内を経由して，右心房へ帰還する。この結果，脊髄は高温の静脈血により周囲から加温され，皮膚血管拡張や発汗などの体温調節反応を迅速に起こすと伴に，その反応強度を増加させる。今回はこの仮説を検証する第一歩として，下肢運動後の腹部静脈造影を direct contrast-enhanced MR venography により行った。

（13）UCP1遺伝子導入による肥満・糖尿病に対する治療法開発

片桐 秀樹（東北大学大学院 医学系研究科 創生応用医学研究センター 再生治療開発分野）

肥満・糖尿病患者の増加が注目を集めているが，その治療法としては現在でも食事療法や運動療法が中心である。これらの病態ではインスリン抵抗性やレプチン抵抗性がその発症に関与している。そこで我々は，モデル動物に肥満・糖尿病を発症させた後，エネルギー消費を亢進させる目的で，脱共役蛋白 UCP1 を肝臓及び腹腔内脂肪組織に発現させ，治療効果を検討し，個体におけるエネルギー代謝調節機構を解析した。

まず，高脂肪食により肥満・糖尿病を発症させたマウスの肝臓に UCP1 遺伝子を導入したところ，脂肪肝改善などの肝における局所効果に加え，内臓脂肪組織の脂肪蓄積の減少やレプチン抵抗性の改善といった多臓器における代謝改善効果が認められ，その結果，肥満・糖尿病・高脂血症が改善した。

次に，高脂肪食負荷にて肥満・糖尿病の病態発症後の腹腔内脂肪組織に UCP1 遺伝子導入を試みたところ，その発現は局所的・限定的であったにもかかわらず，体重増加は抑制され，耐糖能・インスリン抵抗性・レプチン抵抗性の著明な改善が観察された。

以上，一臓器（組織）でのエネルギー代謝の亢進により，他臓器の代謝が影響を受けることが認められたことから，臓器・組織間の代謝情報ネットワークの存在が示唆される。このエネルギー・糖代謝恒常性維持機構の破綻が肥満・糖尿病とも考えられ，代謝情報ネットワークをターゲットとした治療法開発の可能性について論じてみたい。

（14）老化と体温調節

山下 均（国立長寿医療センター研究所 老化制御研究部）

われわれ恒温動物において最も重要な生理機能である体温調節能が老化と共に低下する。これは例えば，加齢動物における耐寒性の低下として観察され，その原因の一つとして熱産生機能の低下が関連することが示唆されてきた。熱産生機能を担う中心分子としては，ミトコンドリアに局在する脱共役蛋白質(Uncoupling protein, UCP)の重要性が明らかとなっている。特に，褐色脂肪組織に特異的に存在する UCP1 は最も強力な熱産生蛋白質であり，寒冷環境下での体温調節や過食時における余剰エネルギーの消費など，いわゆる適応性熱産生において重要な役割を果たすことが明らかとなっている。しかしながら，一般的にヒトでは褐色脂肪組織は生後急速に消退し成人では UCP1 を検出することが難しいことからヒトでの UCP1 の実質的な役割には疑問が持たれていた。このような状況下において，我々は UCP1 遺伝子を欠損するマウスを作製し，体温調節とエネルギー代謝における UCP1 の普遍的な役割，加齢・個体老化における UCP1 欠損の影響を解析してきた。その結果，①UCP1 は通常の室温環境下での恒温性制御においても重要であること，②UCP1 欠損による熱産生の低下は体表からの熱放散の抑制と UCP1 非依存性の熱産生により部分的に代償されるが，これらの代償作用も老化と共に低下し体温調節能の低下を招くこと，などが明らかとなった。今回，これらの成績について報告したい。

（15）発熱に関わるホスホリパーゼ A_2 のアイソタイプ

松村 潔（大阪工業大学情報科学部 生物科学研究室）
堀 あいこ，山本 知子，細川 浩，小林 茂夫（京都大学情報学研究科 生体情報処理分野）

感染・炎症時に起こる全身性の発熱では，脳内プロスタグランジン E_2(PGE_2)が本質的な役割を果たしている。PGE_2 は生体膜リン脂質を原材料とし，3 段階の酵素反応（アラキドン酸カスケード）を経て生成される。これまでの研究により発熱に関わるアラキドン酸カスケードの第 2 段階はシクロオキシゲナーゼ-2(COX-2)，第 3 段階はミクロソーム型 PGE 合成酵素(mPGES-1)であることが確定した。しかしその第 1 段階の酵素ホスホリパーゼ A_2(PLA_2)のアイソタイプは未確定である。PLA_2 には 10 種類以上のアイソタイプがあり，カルシウム依存性細胞質型($cPLA_2$)，カルシウム非依存性細胞質型($iPLA_2$)，分泌型($sPLA_2$)の 3 群に大別される。本研究ではそれぞれの群に特異的な阻害剤を用いて，発熱に関わる PLA_2 のアイソタイプの特定を行った。

In vivo 実験 : ラットに LPS を静脈投与し発熱を起こした。3 群の PLA_2 にたいする阻害剤のうち，$iPLA_2$ 特異的阻害剤(BEL)腹腔内投与のみが LPS による脳脊髄液中の PGE_2 濃度上昇と発熱を抑制した。しかし BEL 腹腔内投与は LPS による血中サイトカインの上昇，脳血管内皮細胞の COX-2 発現も低下させた。すなわちこの結果からは，発熱時の脳内 PGE_2 産生に iPLA2 が関与しているか結論できない。そこで次の *ex vivo* 実験を行った。

Ex vivo 実験：ラットに LPS を静脈投与し 1 時間後に脳血管・髄膜を採取した。このサンプルを PLA_2 阻害剤含有の緩衝液中で培養し，放出された PGE_2 を測定した。その結果 $iPLA_2$ 阻害剤が COX-2 発現を抑制することなく PGE_2 産生を低下させた。

以上の結果は $iPLA_2$ が発熱に関わるホスホリパーゼ A_2 のアイソタイプであることを示す。

（16）発汗のメカニズム

芝崎 学（奈良女子大学 生活環境学部）

エクリン汗腺からの発汗による熱放散は，運動時や暑熱暴露時の体温調節において必要不可欠である。古代ギリシャの時代から汗に関する記述はあるが，汗腺機能などを含む発汗の調節メカニズムに関する研究は，この 1 世紀の間に飛躍的に進んだ。発汗反応は，主に核心温度や皮膚温度の変化によって増減するが，これらの温度の変化とは独立して，運動に関連する要因や体液調節に関する要因によっても変化する。また，発汗反応は，様々な環境に適応した変化を示すことも報告されている。今回の発表では，汗に関する研究の歴史を含め，これまでの発汗に関する研究を紹介し，現在わかっている神経経路と汗腺周囲のメカニズム，および今日の発汗調節に関する見解を要約する。

（17）体温リズムの調節機構とその生理学的意義

永島 計（早稲田大学 人間科学学術院）

体温調節機構の解明は，主に恒温動物がいかに体温の恒常性を維持しているかを明らかにすることを目標に行われきた感がある。しかしながら，定常の環境下において明らかな体温の概日リズムが存在する。この現象は必ずしも体温は一定に調節されているわけではない可能性を示唆している。しかしながら，この体温概日リズムのメカニズム，その生理学的意義は未だ明らかではない部分が多い。この疑問を解決するためにわれわれは，次の

ような実験を行い，知見を得たので紹介する。i) 熱放散効率を変化させる環境温度を変化させても体温の概日リズムは保たれる。また視交叉上核を破壊したラットでは環境温度の変化に対しても，体温はほぼ一定である。この際いずれのラットも熱産生，熱放散を共に変化させることによって体温を維持している。；ii) 温度中性域においては，視交叉上核破壊ラットあるいは時計遺伝子ノックアウトマウスにおいて体温は熱産生依存性にゆらぎをみせるが，正常ラット，マウスにおいては熱産生の変化に対する体温の変化は小さく，昼夜の熱放散効率の変化が体温のリズムを決定づける主たる因子と考えられた。これらの実験により，体温リズムは生体により制御されたものであり，時間の情報が体温調節機構を変化させることによる現象であるとわれわれは考えている。またこれらの反応は体内のエネルギーの効率的な利用，保持に重要と考えられ，その実験的証拠も提示する。

（18）冷感における冷受容チャネルの役割

細川 浩，阿部 潤次，岡澤 慎，澤田 洋介，松村 潔，小林 茂夫（京都大学）

環境温の低下で生まれる冷感は，行動性体温調節を引き起こす不可欠の因子である。温度低下による冷受容チャネルの活性化で末梢の冷線維が興奮し，そのインパルスが脳に伝わることで冷感が起きる。末梢神経細胞には，TRPM8 と TRPA1 の二種の冷受容チャネルが発現している。これらのチャネルの冷感における役割を検討した。まず，TRPM8 と TRPA1 の発現系を用いて，22 種の冷感剤と 12 種の刺激物質による活性化を検討した。その結果，すべての冷感剤は TRPM8 を活性化したが TRPA1 を活性化しなかった。一方，すべての刺激物質は TRPA1 を活性化したが TRPM8 を活性化しなかった。このことは TRPM8 と TRPA1 は，共に冷却で活性化されるが，冷感を生むのは TRPM8 であり TRPA1 ではないことを示す。TRPM8 が冷感を引き起こすには TRPM8 のたんぱく質が皮膚直下の神経終末に存在することが必要である。冷感剤のほとんどは舌で冷感を引き起こす物質であったので，舌における TRPM8 たんぱく質の発現を免疫染色法で解析した。TRPM8 陽性の神経細胞線維は，舌の前部にある茸状乳頭付近に多く存在していた。その神経線維の先端は，上皮細胞層に達していたが味雷には達していなかった。以上のことから，TRPM8 は舌の冷感に関与するが，味覚系とは異なると示唆された。

（19）温度感受性 TRP チャネルの構造・発現・機能

富永 真琴（自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター・細胞生理研究部門）

哺乳類には現在までに 6 種類の温度感受性 TRP チャネルが知られており，それぞれが特異な活性化温度閾値を有する（TRPV1 > 43 度, TRPV2 > 52 度, TRPV3 > 32-39 度, TRPV4 > 27-35 度, TRPM8 < 25-28 度, TRPA1 < 17 度）。TRPV1 は，カプサイシン・酸・43 度以上の熱という生体に痛みを惹起する複数の刺激によって活性化するが, その活性化温度閾値は固定したものではなく, PKC によるリン酸化によって 10 度以上も低下する。従って，体温でも TRPV1 が活性化して痛みを惹起しうることになり, 急性炎症性疼痛の 1 つのメカニズムと考えられる。TRPV4 の温度閾値は体温近傍であるが，TRPV4 は感覚神経にはほとんど発現せず，表皮ケラチノサイトや視床下部視索前野に発現することから，皮膚での温度受容や体温調節にも重要な働きをしていることが推測される。新生仔マウスのケラチノサイトの培養系を確立し, 発現する TRPV4 ならびに TRPV3 の機能的な発現を Ca^{2+}-imaging 法で確認した。また，体温計をマウスに埋め込み，自由行動下での体温計測も行っている。さらに，報告されている 6 つの TRP チャネルに加えて，TRPM2 が温度を感知して開口する新たな温度感受性 TRP チャネルであることを見いだし，膵β細胞においてインスリン分泌に関与することを報告する。

24. 痛みの分子機構と治療戦略研究会

2005 年 12 月 15 日－12 月 16 日

代表・世話人：仙波　恵美子（和歌山県立医科大学・医学部）
所内対応者：富永 真琴（自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター・細胞生理研究部門）

（1）PMA-induced re-sensitization of desensitized TRPV1 is mediated by PKC epsilon and phosphorylation at Ser 800
Sravan Mandadi（自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター・細胞生理研究部門）

（2）膀胱上皮細胞の蓄尿と痛みに関する検討
百田芳春（秋田大学医学部・機能制御医学講座）

（3）テトロドトキシン非感受性ナトリウム電流はプロスタグランジンの影響を受けない
鄭泰星（広島大学大学院医歯薬学総合研究科・病態探求医科学・神経生理学）

（4）侵害受容性小型 DRG ニューロンにおける $Na_V1.9$ 電流の異常増大（“キンドリング”）の誘発メカニズム
柿村順一（広島大学大学院医歯薬学総合研究科・病態探求医科学・神経生理学）

（5）後根神経節ニューロンの活動電位発生における TTX 非感受性 Na チャネル・$Na_V1.9$ の役割
中本千泉（広島大学大学院医歯薬学総合研究科・病態探求医科学・神経生理学）

（6）末梢神経特異的な新しい CRMP-2 isoform (periCRMP-2) の解析
片野泰代（関西医科大学　医化学）

（7）GPR7 の侵害刺激伝達における役割
山本達郎（千葉大学大学院医学研究院・麻酔学領域）

（8）ラットの三叉神経脊髄路核尾側亜核の侵害受容ニューロンに対する 5HT2A 受容体サブタイプの役割
岡本圭一郎（和歌山県立医科大学医学部・生理学/解剖学）

（9）ラット脊髄膠様質ニューロンにおける興奮性シナプス伝達のホスホリパーゼ A2 活性化による促進
藤田亜美（佐賀大学医学部医学科生体構造機能学講座）

(10) 脊髄膠様質ニューロンにおける GIRK チャネルの機能的役割
中塚映政（佐賀大学医学部医学科生体構造機能学講座）

(11) 関節前肢不動化モデル動物の行動学的変化と脊髄可塑的変化
大迫洋治（高知大学医学部　整形外科）

(12) ラット癌性疼痛モデルにおける機械的および熱性痛覚過敏に対する TRPV1 および TRPV2 の関与
篠田雅路（名古屋大学大学院医学系研究科・機能形態学講座・機能組織学分野）

(13) 脊髄後角膠様質細胞の形態学的分類と興奮性・抑制性シナプス入力との相関
八坂敏一（九州大学大学院医学研究院・統合生理学）

(14) 脊髄内痛覚情報伝達に対するドーパミン受容体の作用
玉江昭裕（九州大学大学院医学研究院・統合生理学）

(15) 脊髄内痛覚情報伝達に及ぼす ATP のシナプス前性および後性作用
塩川浩輝（九州大学大学院医学研究院・統合生理学）

(16) ミクログリアにおける $P2X_4$ 受容体の発現制御機構
津田誠（九州大学大学院薬学研究院・薬効解析学分野）

(17) シスプラチンによって引き起こされる痛覚過敏のメカニズムの解析
堀紀代美（名古屋大学大学院医学系研究科・機能形態学講座・機能組織学分野）

(18) 神経結紮誘発性神経因性疼痛に対するモルヒネ先制鎮痛効果
松本みさき（長崎大学大学院・医歯薬学総合研究科・分子薬理学分野）

（19）がん性神経因性疼痛とモルヒネ耐性

木口倫一（長崎大学大学院・医歯薬学総合研究科・分子薬理学分野）

（20）帯状疱疹後神経痛モデルマウスにおける皮膚神経線維の組織学的変化

佐々木淳（富山大学・薬学部・薬品作用学）

（21）GeneChip による帯状疱疹痛モデルマウスの脊髄後角における網羅的遺伝子発現解析

高崎一朗（富山大学生命科学先端研究センター）

（22）神経根性疼痛モデルにおける遺伝子解析

高山文治（福島県立医科大学　整形外科）

（23）運動器障害によって作製した慢性痛症モデル動物：発症誘導要因としての炎症の役割は？

櫻井博紀（愛知医科大学　痛み学講座）

（24）加齢ラットにおける遅発性筋痛 (DOMS) について

松田輝（名古屋大学環境医学研究所・神経性調節）

（25）加齢変化が関与する異常疼痛発現の神経機構

北川純一（日本大学歯学部　生理学）

（26）求心路遮断性疼痛に対する鏡療法は自己受容感覚に関連した痛みに有効である

住谷昌彦（大阪大学大学院医学系研究科生体統御医学麻酔集中治療医学講座）

（27）病的痛みは視覚とクロスモーダルである

住谷昌彦（大阪大学大学院医学系研究科生体統御医学麻酔集中治療医学講座）

（28）触覚刺激による痛覚抑制は皮質レベルで生じる

乾　幸二（自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター・感覚運動調節部門）

（29）痛み関連脳活動の報告－第 3 報－

牛田享宏（高知大学医学部　整形外科）

教育講演（１）DRG における TRP family の発現と機能

野口光一（兵庫医科大学・解剖）

教育講演（２）ミクログリアの活性化と神経細胞傷害

錫村明生（名古屋大学環境医学研究所・神経免疫）

教育講演（３）イメージングによる痛覚認知メカニズムの研究：主として MEG と fMRI について

柿木隆介（自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター・感覚運動調節部門）

【参加者名】

森山 朋子（弘前大学医学部），梁瀬 晴子，百田 芳春（秋田大学医学部），矢吹　省司，関口 美穂，高山 文治，立原 久義，渡辺 和之，小林 義尊，加藤 欽志，町下 智（福島県立医科大学医学部），山本 達郎，田辺 瀬良美，土橋 玉枝（千葉大学大学院医学研究院），岩田 幸一，北川 純一，原田 聡之，鈴木 郁子（日本大学医学部），高崎 一朗（富山大学生命科学先端研究センター），佐々木 淳，藤田 真英，大森 優（富山大学薬学部），鈴木 重行，杉浦 康夫，尾崎 紀之，篠田 雅路，堀 紀代美（名古屋大学大学院医学系研究科），肥田 朋子，松居 宏樹，岩本 泰子，長谷川 多美子，山本 綾，森下 光（名古屋大学医学部），錫村　明生，水村 和枝，佐藤 純，片野 坂 公明，田村 良子，松田 輝，妹尾 詩織，那須 輝顕（名古屋大学環境医学研究所），熊澤 孝朗，橋本 辰幸，山口 佳子，櫻井 博紀，高畑 成雄，大道 裕介，吉本 隆彦，山田 郁美（愛知医科大学医学部），田崎 洋光（鈴鹿医療科学大学保健衛生学部），伊藤 誠二，片野 泰代（関西医科大学医学部），真下 節，住谷 昌彦（大阪大学大学院医学系研究科），仙波 恵美子，岡本 圭一郎（和歌山県立医科大学医学部），松原 貴子，大鶴 直史（神戸大学医学部），野口 光一（兵庫医科大学医学部），緒方 宣邦，柿村 順一，松冨 智哉，鄭 泰星，中本 千泉（広島大学大学院医歯薬学総合研究科），牛田　享宏，川崎 元敬，池本 竜則，泉 仁，西上 智彦，大迫 洋治（高知大

学医学部），吉村 恵，玉江 昭裕，塩川 浩輝，八坂 敏一（九州大学大学院医学研究院），井上 和秀，津田 誠，長谷川 茂雄（九州大学大学院薬学研究院），熊本 栄一，中塚 映政（佐賀大学医学部），植田 弘師，井上 誠，松本 みさき，木口 倫一（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科），柿木 隆介，乾 幸二（生理学研究所 感覚運動調節研究部門），富永 真琴，富永 知子，柴崎 貢志，稲田仁，曽我部 隆彰，Mandadi Sravan，富樫 和也，東 智広，村山 奈美枝（岡崎統合バイオサイエンスセンター 細胞生理部門）天野 賢一（持田製薬 創薬研究所），加藤 久晴(BTG)，米良 紀久，近藤 渉（日本たばこ産業(株)医薬総合研究所），本田 繁之，森江 俊哉，池田 和仁（大日本住友製薬(株)薬理研究所）

【概要】

最近の痛みの基礎研究の進展は目覚ましい。各種侵害受容器やイオンチャネルのクローニングと機能の解明が進み，様々な動物モデルにおいて，一次知覚伝達系や脊髄後角での細胞内シグナリングやグリアの活性化・サイトカインの産生等が痛覚系の可塑性に働くメカニズムが明らかにされてきた。しかし，これらの研究成果が，ヒトにおける疼痛にどのように関与しているかという点は，まだまだ未解明である。神経因性疼痛など鎮痛薬が奏効しない難治性の疼痛については，その発症機序の解明と新たな鎮痛薬の開発が急務となっている。また最近は，痛みによる脳活動の変化が脳画像により可視化され，これまで不明であった脳による痛みの制御機構が明らかになり，慢性痛のメカニズムの解明につながることが期待されている。

痛みのメカニズムを解明し，その原因治療に迫るには，基礎医学・臨床医学の各領域の研究者の共同作業が必要である。本研究会は，痛みの発生と制御の分子機構について，様々な側面から議論を行い，新たな治療戦略の構築と，わが国の疼痛研究のさらなる発展を目指すものである。

平成 17 年度の本研究会では，末梢から脳にいたる痛覚伝達系の各レベルでの研究の到達点と未解明の問題点が明らかにされた。末梢レベルでは，TRPV1 の感作・脱感作のメカニズム，TTX 非感受性 Na チャンネルの痛覚受容における役割，脊髄後角での可塑性におけるドーパミンや ATP，ミクログリア活性化の役割，また，癌性神経因性疼痛モデル，帯状疱疹後神経痛モデルにおける疼痛発症のメカニズム，さらに運動器障害による慢性痛や遅発性筋痛についても新たなモデルが提唱された。中枢レベルでは，加齢による異常疼痛発症のメカニズム，病的疼痛における視覚系の関与と治療への応用，脳イメージング法を用いた痛みの中枢メカニズムの解析などの研究発表に対し，活発な議論が行われた。

（1）PMA-induced re-sensitization of desensitized TRPV1 is mediated by PKC epsilon and phosphorylation at Ser 800.

Sravan Mandadi [1, 2], Tomoko Tominaga [1, 2], Mitsuko Numazaki [3],
Namie Murayama [1, 2], Basil D. Roufogalis [4], Makoto Tominaga [1, 2]
([1] Section of Cell Signaling, Okazaki Institute for Integrative Bioscience,
[2] Department of Physiological Sciences,The Graduate University for Advanced Studies,
[3] Department of Anesthesiology, University of Tsukuba School of Medicine,
[4] Faculty of Pharmacy, University of Sydney)

Important mechanisms that regulate inhibitory and facilitatory effects on TRPV1- mediated pain are desensitization and phosphorylation, respectively. Using Ca^{2+}-imaging, we have previously shown that desensitization of TRPV1 upon successive capsaicin applications was reversed by protein kinase C activation in dorsal root ganglion neurons and CHO cells. Here, using both Ca^{2+}-imaging and patch-clamp methods, we show that PMA-induced activation of PKCε is essential for increased

sensitivity of desensitized TRPV1. TRPV1 has two putative substrates S502 and S800 for PKCε-mediated phosphorylation. Patch clamp analysis of HEK293 cells expressing single mutants S502A or S800A and double mutant S502A/S800A show equal contribution of S502 or S800 towards increased sensitivity of desensitized TRPV1. Since S502 is a non-specific substrate for TRPV1 phosphorylation by other kinases PKA or CAMKII, a role of PKC specific substrate S800 is further investigated. Evidence for *in vivo* phosphorylation of TRPV1 at S800 is demonstrated for the first time. We also show that the expression level of PKCε parallels the amount of phosphorylated TRPV1 protein. These results, obtained using an antibody specific for TRPV1 phosphorylation at S800. Furthermore, the anti-phosphoTRPV1 antibody detects phosphorylation of TRPV1 in rat DRG neurons and may be useful for research regarding nociception in native tissues. This study identifies PKCε and S800 as important therapeutic targets that regulate sensitivity of TRPV1 and may be effectively used for better management of TRPV1-mediated pain states regulated by PKC.

（2）膀胱上皮細胞の蓄尿と痛みに関する検討

百田芳春，梁瀬晴子，石濱寛子，河谷正仁（秋田大学医学部　機能制御医学講座）

過活動膀胱や間質性膀胱炎では尿意切迫感や蓄尿時膀胱痛という症状を引き起こし，膀胱粘膜の知覚神経の異常な活動が推察されている。また膀胱上皮細胞は ATP や一酸化窒素を放出し，知覚神経に情報を伝達している可能性が考えられている。膀胱は蓄尿時には交感神経が優位になり，β作用を介する膀胱排尿筋の弛緩と，α作用による内尿道括約筋の収縮によって蓄尿が維持されると認識されている。尿意切迫感や膀胱痛は蓄尿機能の異常と考えると，膀胱におけるアドレナリン作動性受容体の役割が重要になる。我々は，膀胱にはアドレナリン作動性α1A，1B 及び 1D 受容体を発現することを確認し，膀胱上皮細胞には少なくともα1D を発現していることを明らかにし，膀胱上皮細胞にベジクル性モノアミントランスポーターを発現すること，また膀胱上皮細胞にカテコールアミンを含むことを見出してきた。そこで蓄尿過程において，カテコールアミンの作用が優位になり，これらを受容する膀胱上皮細胞のα1D 受容体が，膀胱からの ATP の放出を調節し，知覚神経を介する脊髄反射を引き起こし蓄尿の維持に関連していると考えた。α1D 受容体拮抗薬（ナフトピジル，1.5mg/kg）により，膀胱拡張時に発生する知覚神経（L6 後根線維）の放電および尿中 ATP 量が抑制された。従って，何らかの膀胱拡張時に膀胱上皮から放出される ATP によって蓄尿時における膀胱痛が発生すると考えた。

（3）テトロドトキシン非感受性ナトリウム電流はプロスタグランジンの影響を受けない

鄭泰星，柿村順一，松冨智哉，中本千泉，緒方宣邦
（広島大学大学院医歯薬学総合研究科・病態探求医科学・神経生理学）

$Na_V1.8$ および $Na_V1.9$ は痛覚伝搬に関わる小型後根神経節(DRG)ニューロンに特異的に発現する TTX-非感受性 Na チャネルである．$Na_V1.8$ によって引き起こされる Na 電流が prostaglandin E_2(PGE_2)により増強されることが報告されている。この結果は，炎症などに伴う疼痛過敏の病態生理のひとつとして広く認められている。さらに最近，$Na_V1.9$ についても同様の結果が報告されている。本報告は，これまでの私達の研究で得られた DRG ニューロンにおける TTX-非感受性 Na 電流に関する知見を基に，PGE_2 と Na チャネルの関連を再検討したものである。

$Na_V1.8$ によって引き起こされる Na 電流は，PGE_2 によって全く影響を受けなかった。先に私たちは $Na_V1.9$ 電流について，記録中に電流の大きさが一過性に増大するという現象(“kindling”)が観察されること，またこの kindling は ATP をピペット内に加えると抑制されることを報告している(Pflugers Arch, 449, 76-87, 2004)。ATP をピペッ

ト内に加え，kindling を抑制した条件下では，PGE_2 は $Na_V1.9$ 電流に対しても効果は認められなかった。細胞内環境に影響を与えないナイスタチン法を用いて検討した場合も同様の結果であった。一方，全く同一の実験条件下で，カプサイシン投与による内向き電流は，PGE_2 によって著明に増大した。

PGE_2 は $Na_V1.8$ および $Na_V1.9$ による TTX-非感受性 Na 電流を増強しない。これまでに報告されている TTX-非感受性 Na 電流に関する実験では， $Na_V1.9$ の kindling を PGE_2 の Na 電流に対する薬理作用であると誤認した可能性が考えられる。今回の結論は TTX-非感受性 Na チャネルと PGE_2 の関連についての定説を根本的に否定するものである。

（4）侵害受容性小型 DRG ニューロンにおける $Na_V1.9$電流の異常増大（“キンドリング”）の誘発メカニズム

柿村順一，鄭泰星，松冨智哉，中本千泉，緒方宣邦
（広島大学大学院医歯薬学総合研究科・病態探求医科学・神経生理学）

$Na_V1.9$ は侵害受容性小型 DRG ニューロンに特異的に発現している Na チャネルである。$Na_V1.9$ 電流のキンドリングは，細胞内環境が保たれた状態で記録することができるナイスタチン法では観察されないことから，何らかの細胞内因子により調節を受けることが示唆される。私達は細胞内 ATP の減少がキンドリングを誘発する要因である事を既に報告している。しかし，ATP 以外の調節因子の関与は未だ明らかではない。そこで本研究では $Na_V1.9$ 電流に対する GTP および PKC 活性化薬 PMA の効果を検討した。

GTP (500 μM)を細胞内添加した群では，対照群と比較して，キンドリングの発生率およびピーク電流値の増大率に有意な差は認められなかった。PMA (100 nM)を添加した群では，発生率には影響が認められなかったが，増大率には有意な低下が認められた。PMA 添加群において，保持電位-80mV ではピーク電流値が経時的に減少するが，-120mV では維持される現象がみられ，不活性化曲線の過分極側への移行が確認された。このことより，PMA による増大率の低下は，チャネルの不活性化が原因であると考えられ，ATP によるキンドリングに対する直接的抑制作用とは異なるものである。

以上の事より，G タンパク質系や PKC 系が $Na_V1.9$ のキンドリングに直接的に関与している可能性は低いと考えられたが，PKC 系はキンドリングと無関係に，$Na_V1.9$ の不活性化を促進することが確認された。現時点においては，キンドリングを誘発する直接的な要因の一つとして，細胞内 ATP の減少が挙げられる。神経障害時に細胞内 ATP が枯渇することにより $Na_V1.9$ 電流が増大し，神経細胞の興奮性に対して促進的に作用する可能性が考えられる。

（5）後根神経節ニューロンの活動電位発生における TTX 非感受性 Na チャネル・$Na_V1.9$の役割

中本千泉，松冨智哉，鄭泰星，柿村順一，緒方宣邦
（広島大学大学院医歯薬学総合研究科・病態探求医科学・神経生理学）

侵害情報を伝搬する小型 DRG ニューロンに特異的に発現している $Na_V1.9$ は，他の Na チャネルより過分極側に活性化閾値を示し，持続型の Na 電流を起こす。これらの性質から，$Na_V1.9$ が活動電位の閾値下でニューロンの興奮性を制御している可能性が示唆される。本研究では，単一のマウス小型 DRG ニューロンにおいて，電位固定法による Na 電流記録と電流固定法による活動電位記録を併せて解析することにより，$Na_V1.9$ が活動電位発生に果たす役割を検討した。

$Na_V1.9$ 電流が記録されたニューロンにおける膜電位記録では，通常では活動電位が誘発されないような閾値下の脱分極通電によって起こる，TTX 投与によっても消失

しない持続的な脱分極反応が観察された。この脱分極反応は通電が終了した後も継続し，最終的に活動電位発生を誘導した。このことは，この脱分極反応が $Na_V1.9$ によるものであり，これが脱分極通電による受動的な脱分極に加えて閾値下での脱分極を増強し，活動電位の発生を促進したことを示す。さらに，$Na_V1.8$ ノックアウトマウスにおいて，F イオンを細胞内陰イオンとして用いて $Na_V1.9$ 電流を異常に増大させたときのみ，TTX 存在下でも活動電位が起こりえることを見出した。この場合の活動電位は通常と異なり，全か無の法則に従わず，脱分極通電の強さに依存した大きさを示した。

これらの結果から，小型 DRG ニューロンにおいて，正常時には，$Na_V1.9$ は，それ自身では活動電位の本体にはならず，活動電位の発生に対して促進的調節を行っていることが示された。さらにその大きさが異常に増大するような状況では，それ自身が，非定型的ではあるが，活動電位の本体になり得ることが示された。

（6）末梢神経特異的な新しい CRMP-2 isoform (periCRMP-2) の解析

片野泰代（関西医科大学　医化学教室）

【目的】1 次求心性線維は侵害刺激を脊髄へ伝達する。刺激に伴い後根神経節細胞(DRG)では CGRP や SP などの生理活性物質が産生され，DRG の中枢側と末梢側へ極性をもって輸送される。物質輸送の極性決定機構を明らかにする目的で DRG 中枢側(C fraction)と末梢側(P fraction)神経線維を用いたプロテオミクス解析を行い，P fraction に特異的な分子を同定し，更なる解析を行ったので報告する。

【方法】C および P fraction は L4-6 の脊髄神経より得，可溶化後，ラージサイズ(20Ｘ70cm)ゲルを用い 2 次元電気泳動を行った。銀染色後，発現量に有意差がある，あるいは特異的なスポットを MALDI TOF-MS にて同定した。同定分子に対し，生理機能を明らかにするために坐骨神経損傷モデルを用い解析した。

【結果と考察】P fraction 特異的分子として CRMP-2 を同定した。CRMP-2 は神経系に広く存在し，発生過程で重要な機能を担う。また修飾などの違いにより複数のスポットとして検出されるが，同定した CRMP-2 スポットは脊髄，DRG,脳などの組織には認められなかったことから P fraction に特異的であるとし periCRMP-2 と名付けた。現時点では，他の CRMP-2 スポットとの構造，修飾の違いについては明らかになっていない。periCRMP-2 は坐骨神経結紮後，その発現量が減少することから末梢組織に特異的な神経変性および再生機構への関与が示唆された。

（7）GPR7の侵害刺激伝達における役割

山本達郎（千葉大学大学院医学研究院麻酔学領域）

GPR7 は，1995 年に発見された orphan G protein coupled receptor である。この受容体は，オピオイド受容体とソマトスタチン受容体に高い相同性を有しており，神経細胞に発現していることが報告されている。GRP7 は大脳皮質・海馬・視床下部・脊髄に分布していることが知られてきた。2002 年その内因性リガンドとして neuropeptide W (NPW)と neuropeptide B (NPB)が相次いで報告された。NPW や NPB を GPR7 に作用させると，forskolin による cAMP の蓄積が抑制される。最近の報告では，炎症や神経因性疼痛時に GPR7 の発現がシュワン細胞で増加することが報告されている(Zaratin et al, 2005)。また，NPB-null mice では炎症時の hyperalgesia の発症が抑制されることが報告されている(Kelly et al, 2005)。我々は各種疼痛モデルにおける NPW と NPB をラット髄腔内投与の効果を検討した。NPW，NPB は投与量依存性に，フォルマリンテストの疼痛行動，カラゲニン皮下注による mechanical allodynia・Seltzer モデルでの mechanical allodynia を抑制した。しかしながらコントロールラットにおける hot

plate test と von Frey hair により mechanical nociceptive test では鎮痛効果を示さなかった。これらの結果から，GPR7 は脊髄後角細胞の過敏化に関係した疼痛に選択的に作用することが明らかとなり，今後の展開が期待される。

（8）ラットの三叉神経脊髄路核尾側亜核の侵害受容ニューロンに対する $5HT_{2A}$ 受容体サブタイプの役割

岡本圭一郎，木村晃久，堂西倫弘，玉井靖彦（和歌山県立医科大学医学部生理学第一）
仙波恵美子（和歌山県立医科大学医学部解剖学第二）

Temporomandibular disorder は顎顔面部の慢性疼痛を主症状とする病態である。原因として中枢神経系の可塑的変化によるメカニズムが示唆され，内因性の疼痛制御機構の変調が関与しているとされる。三叉神経脊髄路核尾側亜核(Vc)の侵害受容ニューロンは 5HT 性下行性入力によって 5HT2A 受容体を介しその興奮性が変調されると推測される。今回 Vc 部の 5HT2AR の役割を電気生理学的（細胞外記録），Fos 免疫組織化学的，行動学的（顎顔面部ホルマリンテスト）に雄ラットを用い検討した。Vc と C2 脊髄の移行部 (Vc/C2)の浅層から Deep unit（顔面部深部組織に機械刺激に対する受容野を持つが皮膚からの入力を持たない）または WDR unit を単離した。Vc/C2 部表面に 5HT2AR 作動薬(DOI)を滴下しておくとホルマリン咬筋注射 or pinch 刺激によって引き起こされる Deep or WDR unit activity は vehicle 群に対し低下した。DOI を脳室内投与するとホルマリンの咬筋注射による Fos 陽性細胞数は vehicle 投与群と比較して Vc/C2 部の浅層で減少した。Intracisternal に DOI を投与するとホルマリン咬筋刺激による顔面部の疼痛関連行動時間は vehicle 群と比較して短縮した。以上の結果は Vc/C2 領域に存在する 5HT2AR は顎顔面部侵害刺激に対し抗侵害作用を示し，顎顔面痛の発現や持続に深く関与することを示唆する。

（9）ラット脊髄膠様質ニューロンにおける興奮性シナプス伝達のホスホリパーゼ A_2 活性化による促進

藤田亜美，岳海源，柳涛，古賀亜希子，中塚映政，熊本栄一（佐賀大学医学部医学科生体構造機能学講座）

脊髄後角の痛み伝達におけるホスホリパーゼ $A_2(PLA_2)$ の役割を知るために，PLA_2 活性化作用を持つメリチンが，皮膚末梢から脊髄に入力する痛み情報の制御に重要な役割を果たす膠様質ニューロンの興奮性シナプス伝達にどんな作用を及ぼすかを調べた。実験は，成熟ラット脊髄横断薄切片の膠様質ニューロンにホールセル膜電位固定法を適用することにより行った。メリチンは濃度依存性に自発性の興奮性シナプス後電流(sEPSC)の発生頻度を増加させた (EC_{50} = 1.1 μM)。この作用は PLA_2 阻害剤 (4-bromophenacryl bromide, 10 μM) , 細胞外 Ca^{2+} 除去, Ca^{2+} チャネル阻害剤 La^{3+}(30 μM)により抑制される一方，アラキドン酸(AA)代謝阻害剤である indomethacin (INDO; 100 μM) や nordihydroguaiaretic acid(NDGA; 100 μM)により影響を受けなかった。メリチンと同様な sEPSC 発生頻度増加は AA(50 μM)によってもみられ，これも INDO や NDGA により影響を受けなかった。以上より，脊髄後角の PLA_2 活性化により生成される AA は，その代謝経路を介さずに神経終末の膜電位依存性 Ca^{2+} チャネルを通って細胞外から細胞内へ流入する Ca^{2+} 量を増加させることによりグルタミン酸放出を促進すると示唆される。

（10）脊髄膠様質ニューロンにおける GIRK チャネルの機能的役割

中塚映政，藤田亜美，古賀亜希子，柳涛，熊本栄一（佐賀大学医学部医学科生体構造機能学講座）

G 蛋白共役型 K チャネル（GIRK チャネル）は中枢神経系に広く存在し，シナプス伝達に重要な役割を果たしている。これまでに GIRK チャネルには４つのサブユニット(GIRK1-4)が存在することが明らかとなっているが，近年，脊髄において GIRK1 と GIRK2 サブユニットが膠様質に特異的に発現しており，熱性痛覚過敏やモルヒネの鎮痛作用などに関与することが指摘された。今回，我々は後根付き成熟ラット脊髄横断切片の膠様質ニューロンにパッチクランプ法を適用して，痛覚情報伝達における GIRK チャネルの機能的役割を検討した。後根を反復性電気刺激しても膠様質ニューロンに緩徐なシナプス応答は観察されなかったが，脊髄深層を局所的に反復性電気刺激すると約 30%の膠様質ニューロンにおいて緩徐な抑制性シナプス後電流(slow IPSC)が発生した。この slow IPSC の振幅は刺激回数依存的に増強し，灌流液から Ca を除去することによって有意に減少した。また，slow IPSC の振幅は K チャネル阻害剤存在下および細胞膜 G タンパク質阻害剤存在下において著明に減少し，GIRK チャネル阻害薬によって有意に抑制された。以上の結果より，脊髄介在ニューロンあるいは下行性抑制性神経線維終末から遊離される内因性神経伝達物質によって GIRK チャネルが活性化し，膠様質ニューロンの膜が過分極することが明らかとなった。したがって，本機序が脊髄内 GIRK チャネルの鎮痛機構に寄与することが示唆された。

（11）関節前肢不動化モデル動物の行動学的変化と脊髄可塑的変化

大迫洋治（高知大学医学部　神経生物・解剖学教室）
牛田享宏，川崎元敬（高知大学医学部　運動機能学教室）
西上智彦（高知大学医学部　リハビリテーション部）

骨折，捻挫，打撲などの運動器の診療に際し，保存療法の一部として局所の安静が用いられることが多い。しかし近年，関節の不動化に伴う廃用が筋骨格系の運動機能障害のみならず患肢の痛みなどの発症要因となっていることが指摘されている。そこで我々は，関節の不動化が感覚情報処理機能に及ぼす影響について検討する目的で，ギブス固定法により作製した手関節拘縮モデルラットの行動学的および電気生理学的解析を行い，以下のような興味深い変化を認めている。①拘縮に陥った前肢（以下患肢）はグルーミング，摂食行動，歩行などの ADL 動作に用いることはない。②患肢を触られると逃避行動を示す。③脊髄後角細胞において関節運動や痛みの伝達に関与する wide-dynamic range (WDR)細胞数の割合が増加している。今回はこれら行動学的・電気生理学的評価に加え，モデル動物の脊髄における神経ペプチドの放出や最初期遺伝子の発現など神経化学的解析結果を報告する。モデル動物に認められるこれらの変化は，関節の拘縮に伴う不動化が脊髄へ入力する感覚情報を長期的に変調し，ひいては脊髄内細胞の性格にも可塑的変化を引き起こしている可能性を示唆すると考える。

（12）ラット癌性疼痛モデルにおける機械的および熱性痛覚過敏に対する TRPV1，TRPV2の関与

篠田雅路，荻野亜希奈，尾﨑紀之，杉浦康夫
（名古屋大学大学院医学系研究科 機能形態学講座　機能組織学分野）

【目的】癌の進展により自発痛，機械的および熱性痛覚過敏が生じるが，そのメカニズムは不明な点が多い。今回わ

れわれはラットの癌性疼痛モデルの作成を試みた。また腫瘍部位における自発痛，機械的および熱性痛覚について，熱感受性受容体である TRPV1, TRPV2 の関与を検討した。【方法】Fisher 系ラット(9W, ♂, n=6)の足底に扁平上皮癌(SCC-158)を移植し，腫瘍部位における自発痛，機械的および熱性痛覚閾値の変化を観察した。腫瘍移植 22 日後 Capsazepine（TRPV1 アンタゴニスト）および Ruthenium red（TRPV1,2 アンタゴニスト）を腫瘍部位に投与し，痛覚閾値の変化を観察した。また後根神経節(DRG) における TRPV1,2 の発現の変化を観察した。【結果】腫瘍移植 14 日目以降，腫瘍移植部において自発痛，機械的および熱性痛覚過敏が出現した。反対側の足底においても熱性痛覚過敏が出現した。機械的痛覚過敏は Capsazepine ならびに Ruthenium red により，熱性痛覚過敏は Ruthenium red により完全に抑制された。また腫瘍移植側 DRG において，中型および大型の TRPV1 陽性細胞と大型の TRPV2 陽性細胞が増加した。反対側 DRG では大型の TRPV1 陽性細胞が増加した。【考察】癌による機械的痛覚過敏には TRPV1，熱性痛覚過敏には TRPV1 と TRPV2 の関与が示唆された。

（13）脊髄後角膠様質細胞の形態学的分類と興奮性・抑制性シナプス入力との相関

八坂敏一（九州大学大学院医学研究院　統合生理学）

痛みを伝える主な線維である Aδおよび C 線維は脊髄後角・特に膠様質にシナプスを作る。膠様質細胞は全て介在神経で, その約 30%が抑制性伝達物質を持っており，また脳幹からの下行性調節系線維からの入力も受けているため，膠様質は痛み情報が最初に修飾される部位として注目されている。膠様質細胞は電気生理学的・形態学的・神経化学的に多様であることが知られており，近年これらの要素を組み合わせて膠様質細胞の特徴を調べる試みがいくつか報告されている。これらの報告ではそれぞれの細胞タイプについて，主に後根刺激による興奮性のシナプス応答が調べられている。脊髄における抑制性神経伝達が正常な感覚情報処理に必須であることはよく知られていることであるが，後根刺激による抑制性シナプス応答については一部しか報告されていない。今回我々は，脊髄後角膠様質細胞の形態を分類し，それぞれの細胞タイプで観察される後根刺激により起こる興奮性および抑制性シナプス入力を調べた。細胞のタイプは 4 種類に分類され，それらはこれまでの報告とよく一致するものであった。細胞タイプごとのシナプス入力を調べたところ，細胞タイプごとに特徴的な入力パターンを持っていることが明らかとなり，それぞれに異なった神経回路を介していることが推測された。我々の結果と他の報告とを考え合わせると，脊髄膠様質においていくつかのタイプの異なる神経細胞が複雑に絡み合った機能的モジュールを形成していることが示唆された。

（14）脊髄内痛覚情報伝達に対するドーパミン受容体の作用

玉江昭裕（九州大学大学院医学研究院・統合生理学）

下行性痛覚抑制経路の一つにドーパミン系の関与が示唆されてきたが，その作用機序に関しては明らかではなかった。そこで細胞レベルでのメカニズムを理解するため，我々は行動学的研究および脊髄膠様質からのホールセルパッチクランプ法を用いて痛覚情報伝達におけるドーパミンの働きを検討した。ドーパミンの髄腔内投与は機械的痛覚閾値を上昇させ, D2 様受容体作動薬は同様の作用を示したが, D1 様受容体作動薬は作用を示さなかった。電流固定下において，ドーパミンは膠様質神経細胞を過分極させ，後根電気刺激により誘起された活動電位を抑制した。電圧下では，TTX 存在下にドーパミンは外向き電流を誘起し，それは電極内液への Cs^+もしくは GDP-β-S 付加により阻害され，またバリウム存在下において抑制された。ドーパミンにより誘起された電流の逆転電位は，ネルンストの式により計算された K^+チャネルの平衡電位にほぼ一致した。D2 様受容体作動薬はドーパ

ミンによる外向き電流と同様の作用を示したが, D1 様受容体作動薬は何ら作用を示さなかった。また，ドーパミンによる外向き電流は, D2 様受容体拮抗薬によって抑制され，D1 様受容体拮抗薬では抑制されなかった。一方，ドーパミンは微小 EPSC の振幅および発生頻度には有意な変化を引き起こさなかった。これらにより，ドーパミンは主にシナプス後性に働き，D2 様受容体を介し G 蛋白によって仲介される K^+チャネルを活性化し，膠様質細胞に外向き電流を誘起することが示唆された。

（15）脊髄内痛覚情報伝達に及ぼす ATP のシナプス前性および後性作用

塩川　浩輝，古江　秀昌，吉村　恵（九州大学大学院医学研究院　統合生理学）
中塚　映政（佐賀大学医学部医学科生体構造機能学講座）

近年，ATP-P2X 受容体は脊髄後角において侵害性感覚情報を修飾することが明らかとなり，注目されている。今回, 我々はラット脊髄スライス標本を用いて脊髄後角深層細胞からパッチクランプ記録を行い, シナプス前ならびにシナプス後細胞における P2X 受容体の役割を薬理学的に検討した。約 60%の脊髄後角深層細胞において，ATP 受容体広作動域作動薬である ATP-γS の灌流投与によって内向き電流が観察された。しかし, 同一細胞において, P2X 受容体作動薬であるα,β-methylene ATP の灌流投与による内向き電流は観察されなかった。一方，ATP-γS あるいはα,β-methylene ATP の灌流投与によって，約 70%の細胞においてグルタミン酸を介する興奮性シナプス後電流の発生頻度の増強効果が観察された。ATP-γS の灌流投与によって生じた内向き電流と興奮性シナプス後電流の発生頻度の増強効果は，いずれも ATP-P2X 受容体拮抗薬である PPADS によって阻害され，TNP-ATP によっては阻害されなかった。以上の結果より，脊髄後角深層細胞のシナプス前とシナプス後細胞には異なるサブタイプの ATP-P2X 受容体が発現しており, 異なったメカニズムで痛覚情報を増強することが明らかになった。

（16）ミクログリアにおける $P2X_4$受容体の発現制御機構

津田　誠，井上和秀（九州大学大学院薬学研究院薬効解析学分野）

最近，神経因性疼痛に脊髄後角でのグリア細胞の役割が注目されている。以前我々は，神経因性疼痛動物モデルの脊髄後角において，ATP 受容体サブタイプである $P2X_4$ 受容体の発現がミクログリアで著明に増加し，同受容体を遮断することでアロディニアが抑制されることを報告した。すなわち，ミクログリアにおける $P2X_4$ 受容体の発現増加が神経因性疼痛発症において重要なステップであることを示した。本研究会では，$P2X_4$ 受容体の発現制御機構として，細胞外マトリックス分子であるフィブロネクチン(FN)およびその膜受容体であるインテグリンを介する経路を見出した最近の研究成果について報告する。

初代培養ミクログリア細胞を FN で処置することで，$P2X_4$ 受容体の mRNA およびタンパク質レベルが増加し，$P2X_4$ 受容体介在性の細胞内カルシウム応答も増大した。FN による $P2X_4$ 受容体発現増強作用は，インテグリン機能阻害抗体で抑制され，また，MEK 阻害剤で著明に抑制された。In vivo 神経因性疼痛モデルの脊髄後角では，$P2X_4$ 受容体の発現増加初期に，FN 発現レベルの増加が認められ，さらに，ERK の活性化もミクログリア特異的に誘発された。以上の結果より，FN は MAP キナーゼを活性化して $P2X_4$ 受容体発現を増加すると考えられ，in vivo においてもミクログリアでの $P2X_4$ 受容体発現増強機構の一端を担っている可能性が示唆された。

（17）シスプラチンによって引き起こされる痛覚過敏のメカニズムの解析

堀 紀代美，尾崎紀之，篠田雅路，杉浦康夫
（名古屋大学大学院医学系研究科　機能形態学講座　機能組織学分野）
鈴木重行（リハビリテーション療法学専攻　理学療法学分野）

【目的】シスプラチン投与ラットにみられる痛覚過敏のメカニズムを明らかにするため，皮膚および筋の知覚神経におけるイオンチャネルの発現を調べた。
【方法】SD 雄性ラットにシスプラチンを反復投与した。皮膚と筋に対する痛覚テストを行なった後，後根神経節(DRG)を採取し，TRPV1，TRPV2，$P2X_3$，ASIC3 の発現を免疫組織化学的に調べた。また，逆行性トレーサー Fluoro-Gold(FG)を用い，腓腹筋由来の DRG 細胞におけるイオンチャンネルの発現も調べた。
【結果】シスプラチン投与群では皮膚の機械的痛覚過敏が確認され，また熱性痛覚鈍麻となる傾向が見られた。また，シスプラチン投与群では腓腹筋の圧痛閾値の低下と握力の低下を認め，筋の痛覚過敏の存在も示唆された。
　シスプラチン投与群の DRG では TRPV2, $P2X_3$, ASIC3 陽性細胞数が有意に増加し，$P2X_3$ と ASIC3 は FG で標識された筋由来の DRG 細胞でも有意に増加していた。
【結論】シスプラチン投与により皮膚の機械的痛覚過敏に加え，筋の痛覚過敏も示唆された。DRG において TRPV2, $P2X_3$，ASIC3 陽性細胞が増加していたことから，シスプラチンによる痛覚過敏にはこれらのイオンチャンネルの関与が考えられた。また筋由来の DRG 細胞においても $P2X_3$，ASIC3 陽性細胞が増加しており，筋の痛覚に変化をもたらしていると思われた。

（18）神経結紮誘発性神経因性疼痛に対するモルヒネ先制鎮痛効果

松本みさき，井上　誠，植田弘師（長崎大学　大学院医歯薬学総合研究科　分子薬理学分野）

【目的】神経因性疼痛治療の一つとして，神経傷害前に薬物を適用するという先制適用が有効であることが知られている。本研究では，坐骨神経結紮誘発性神経因性疼痛に対するモルヒネの先制適用の有効性を評価し，その分子機構を明らかにすることを目的としている。
【方法】ddY 系雄性マウス（体重 20-24 g）を用い，マウス右後肢の坐骨神経の半分を完全に結紮することで神経因性疼痛モデルを作成した。鎮痛効果の指標として，右後肢に熱刺激あるいは機械刺激を与え，後肢を退くまでの閾値を評価した。
【結果】以下の 4 点について明らかになった。①坐骨神経結紮 30 分前にモルヒネを皮下投与することで，結紮 7 日後に認められる熱性過敏応答ならびに機械性アロディニアが完全に抑制された。②同様な鎮痛効果はモルヒネの脳室内前処置によっても観察されたが，脊髄クモ膜下腔内前処置では観察されなかった。③神経傷害後の脊髄後角において認められる c-Fos ならびに PKCγの発現上昇も，結紮 30 分前にモルヒネを処置することで完全に抑制された。④モルヒネ前処置による鎮痛効果並びに脊髄蛋白質発現上昇に対する抑制効果はセロトニン受容体やノルアドレナリン受容体阻害薬の脊髄クモ膜下腔内処置により完全に拮抗された。
【考察】本研究からモルヒネは先制鎮痛効果を発揮することが明らかになった。その効果の分子機構としてはセロトニン系ならびにノルアドレナリン系下降性抑制神経の賦活化によるものであることが明らかになった。

（19）がん性神経因性疼痛とモルヒネ耐性

木口倫一，三浦花子，中原麻美，井上誠，植田弘師（長崎大学　大学院医歯薬学総合研究科　分子薬理学分野）
下山恵美（千葉大学　大学院医学研究院　自律機能生理学）

モルヒネに代表される麻薬性鎮痛薬は強力な鎮痛効果を示すが，一方で乱用時に依存性および耐性が形成されることが問題視されている。しかしがん患者の訴える疼痛緩和など，臨床の場において正しく用いられる限り，依存性および耐性は形成されないと言われている。そこで今回我々は, がん性疼痛モデルにおける慢性疼痛下に, モルヒネ鎮痛効果と耐性形成がどのように影響を受けるかを検討した。

BALB/c 雄性マウスの右後肢坐骨神経近傍に Meth A Sarcoma 細胞腫 5 x 10^4 細胞を接種すると，15 日後に外観上顕著な肥大が観察された。一方，熱および機械的刺激誘発性の痛覚過敏やアロディニア現象は接種後より徐々に観察され，15 日後には最大となった。接種 15 日後の剖検では肥大したがん細胞が坐骨神経を絞扼し，神経を損傷していることが観察された。正常マウスおよびがん性疼痛マウスの両群において，モルヒネ (3mg/kg) 投与はいずれも有意な鎮痛効果を示したが，両群における鎮痛効果の曲線下面積(AUC)には有意差は観察されなかった。モルヒネ (3 mg/kg) を 1 日 1 回，6 日間慢性的に投与したとき，正常マウス群では鎮痛効果が 30%程度に減弱することが観察されたが，がん性疼痛マウス群では殆ど鎮痛効果の減弱は観察されなかった。これらの結果より，がんによる慢性疼痛時にはモルヒネ耐性形成能が欠如することが確認された。本発表の機会を通じてがん末期におけるモルヒネ増量とモルヒネ耐性との関連について議論してゆきたいと考えている。

（20）帯状疱疹後神経痛モデルマウスにおける皮膚神経線維の組織学的変化

佐々木淳（富山大学　薬学部　薬品作用学）

帯状疱疹後神経痛では，衣類が擦れるだけで激しい疼痛感覚を生じるアロディニアが認められることが多く，その発現部位は疱疹部位だけでなく隣接した皮膚節にも及ぶ。アロディニア部位が疱疹部位を越えて広がる説明として，疱疹部位を支配する末梢神経損傷をトリガーとする中枢感作仮説が用いられることが多い。しかし，末梢神経の損傷領域とアロディニア発現領域との対応を詳しく調べた報告はない。そこで本研究では，帯状疱疹後神経痛モデルマウスを用いて，疱疹部位とそれに隣接した皮膚節におけるアロディアの発現，皮膚神経線維の損傷の有無を調べた。疱疹部位では疱疹出現 2-3 日前からアロディニアが発現したが，隣接した皮膚節では疱疹出現とほぼ同時期から観察された。また，疱疹部位の方が高いアロディニアスコアを示した。免疫染色法を用いて表皮内神経線維数を調べた結果，疱疹部，隣接した皮膚節共に，有意に神経線維数が減少しており，減少の程度は疱疹部の方が重度であった。神経興奮薬物であるカプサイシンにより誘発される疼痛関連行動の発現時間も，疱疹部，隣接した皮膚節共に，有意に減少した。坐骨神経の電子顕微鏡画像から，有髄神経線維数，無髄神経数共に，コントロールに比べて有意に減少しており，神経線維の変性も観察された。以上の結果より，アロディニア部位が疱疹部位を越えて広がるのは，末梢神経での強い免疫・炎症反応が，疱疹部位だけではなく，隣接した皮膚節の神経線維も損傷してしまうことが原因の一つであることが示唆される。

（21）GeneChip による帯状疱疹痛モデルマウスの脊髄後角における網羅的遺伝子発現解析

高崎 一朗（富山大学・生命科学先端研究センター・ゲノム機能解析分野）
谷口 佳奈，佐々木 淳，倉石 泰（富山大学・薬学部・薬品作用学）

本研究では，帯状疱疹痛の疼痛関連遺伝子の同定と治療薬開発のためのターゲット分子の探索を目的として，マウスに単純ヘルペスウイルス I 型(HSV-1)を経皮接種することにより作製される帯状疱疹痛モデルマウスを用い，脊髄後角における遺伝子発現を網羅的に解析した。

雌性 C57BL/6J マウスを使用し，後肢膝関節下部に HSV-1(1×10^6 pfu)を経皮接種した。疼痛関連反応の測定は，von Frey filament（1.6 mN および 9.8 mN）を使用し，後肢足蹠に適用した際に生じる逃避反応を疼痛関連行動の指標とした。網羅的遺伝子発現の解析には 10,000 種類以上のプローブが搭載されたマウス発現解析用 GeneChip(Murine Genome U74Av2, Affymetrix)を使用した。HSV-1 接種マウスの脊髄後角から RNA を抽出し，Affymetrix 社のプロトコルに従い GeneChip 解析を行った。

HSV-1 接種マウスは，帯状疱疹様の皮疹を発症し，アロディニアと痛覚過敏が観察された。脊髄後角を接種側と非接種側に分けて RNA を抽出し，GeneChip 解析を行ったところ，非接種側と比較して接種側で 2 倍以上発現の増大する遺伝子が 139 個，1/2 以下に発現の減少する遺伝子が 9 個検出された。

今回は発現の増大した遺伝子に注目し，いくつかのターゲット分子に対する阻害薬，抗体投与およびノックアウトマウスにおける行動解析を行ったので紹介したい。

（22）神経根性疼痛モデルにおける遺伝子解析

高山 文治，菊地 臣一，矢吹 省司，関口 美穂，渡辺 和之，立原 久義（福島県立医科大学整形外科学講座）
藤田 勇，今里 暁，中谷 紀章[2]，嶋田 英輝[2]，新庄 勝浩（ファイザー(株)中央研究所）

【目的】腰椎椎間板ヘルニアによる疼痛の病態には，機械的因子と化学的因子の両者が関与していると考えられている。機械的因子とは，ヘルニア塊による神経組織の機械的な圧迫のことであり，化学的因子とは，椎間板髄核に含まれるサイトカインなどの炎症惹起物質のことである。疼痛の機序を解明するためには，機械的因子と化学的因子を区別する 2 種類の神経根性疼痛モデルの検討が必要である。我々は，これらの 2 種類のモデルでの疼痛の機序を解明するため，Gene Chip を用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。

【方法】ラットの第 5 腰椎椎弓の後根神経節 (DRG) の直上に骨孔をあけ，機械的因子としてステンレス製の rod を挿入したモデル（rod 群）と化学的因子として尾椎から採取した髄核を留置したモデル（髄核群）を作成した。von Frey filament を用いた痛覚閾値の測定を行い，閾値の低下を認めたラットのみから DRG 組織を採取し，GeneChip 解析を行った。

【結果】行動学的検討では，両群で術後 3 日より疼痛閾値の低下を示し，術後 21 日まで持続した。GeneChip 解析では，術後 3 日は両群ともに類似した遺伝子発現変動が認められた。しかし，術後 7 日目は，rod 群と髄核群では，異なる遺伝子の発現変動が認められた。rod 群では，炎症に関連した遺伝子と cell cycle に関与した遺伝子の発現上昇が認められた。一方，髄核群では，疼痛に関与していると考えられるイオンチャンネル遺伝子の発現上昇が認められた。

【考察】本研究の結果より，機械的因子と化学的因子による疼痛の機序は，時間の経過に伴い異なってくる機序が存在する可能性が示唆された。

（23）運動器障害によって作製した慢性痛症モデル動物：発症誘導要因としての炎症の役割は？

櫻井博紀[1]，橋本辰幸[1]，大道裕介[1]，吉本隆彦[1,2]，高畑成雄[1,3]，江口国博[1,4]，山口佳子[1]，熊澤孝朗[1]
（[1]愛知医科大学痛み学講座，[2]名古屋大学大学院医学系研究科
[3]札幌医科大学大学院医学研究科，[4]愛知学院大学歯学部生理学講座）

運動器障害が慢性痛症の発症の原因の一つとして考えられている。これまで，我々は運動器障害を誘因として長期の痛み行動を呈する慢性痛症モデルラットを 2 種開発した。

筋傷害性モデル：一側下肢腓腹筋内側頭に LPS に続き 24 時間後に高張食塩水を反復投与することで作製。

不動化モデル：一側下肢を屈曲位で 2 週間ギプス固定することで作製。

これらのモデルは足底での痛み行動が両側性に亢進し，10 週以上持続する。

この長期の痛み行動は反対側まで及ぶことより中枢の関与が示唆された。

LPS による炎症誘発が痛み行動の長期持続に関与している可能性を考え，不動化モデルにおいて，ギプス固定前に LPS を投与したところ，逆に痛み行動は長期持続しなかった。また，筋傷害性モデルにおいても LPS を高濃度にすると痛み行動は長期持続しなかった。

これらのことより，慢性痛症発症に至る LPS による炎症誘発として，ある至適条件が伴わなければならないことが示唆された。条件として，炎症の程度，および，炎症誘発後から次の刺激が加わるまでの時間の 2 点が可能性として考えられる。

（24）加齢ラットにおける遅発性筋痛 (DOMS)について

松田　輝[1]，田口　徹，田村　良子，水村　和枝（名古屋大学環境医学研究所 神経性調節分野
[1]名古屋大学大学院医学系研究科 リハビリテーション療法学専攻）

不慣れな運動後に生じる筋痛（遅発性筋痛：以下 DOMS）は筋の圧痛を主な特徴とし，強度で不慣れな運動を行ってから 24～72 時間後にピークとなるが，安静時の痛みはほとんどない。そのメカニズムは不明だが，伸張性収縮（Eccentric Contraction：以下 ECC）によって生じやすいことが知られている。そこで我々は，若年ラット（8 週齢）に ECC を負荷し，筋圧痛閾値，脊髄後角における c-Fos 陽性細胞の発現を指標に，ラットにおいても DOMS が生じることを示した。

今回，130～139 週齢の加齢ラットを用いて，長指伸筋(EDL)に ECC を負荷し，圧痛閾値測定と c-Fos の脊髄後角における発現を指標に加齢による DOMS の変化を調べた。その結果，圧痛閾値は若年ラットでは ECC 負荷後 1～3 日目まで有意に低下し（2 日目に最低値），4 日目に戻ったが，加齢ラットでは，1～5 日目まで有意に低下し（3 日目に最低値），7 日目で戻り，遅発性筋肉痛が長く続くことが明らかになった。ECC3 日後（若年群では 2 日後）に運動筋を圧迫刺激することによって生じる c-Fos 蛋白発現は，若年ラットでは脊髄 L4 レベルの後角表層にのみに有意に増加したが，加齢ラットでは脊髄 L4 に加え L5 レベルの後角表層にも有意な増加が観察され，筋からの痛み情報が若年ラットよりも脊髄の広いレベルに伝達されることが明らかになった。

（25）加齢変化が関与する異常疼痛発現の神経機構

北川純一，坪井美行，岩田幸一（日本大学　歯学部　生理学）

高齢化が進む日本において，身体機能の低下を防止するため，加齢に伴う痛みの受容機構の変化を解明するこ

とは，高齢者の QOL の維持につながる重要な研究テーマであるといえる。今回は，我々がこれまでに調べた老齢ラットを用いて行ってきた加齢現象が痛覚受容に与える影響に関する研究結果について報告する。

免疫組織化学的検索により，成熟ラットの脊髄表層と深層には数多くのセロトニンおよびノルアドレナリン合成酵素であるドーパミンβハイドロキシラーゼ陽性線維が存在するが，老齢ラットでは有意に減少していた。後足底への CFA 注射後に誘導される発熱・腫脹は，老齢ラットにおいて成熟ラットより長期間持続した。脊髄後角に分布する WDR ニューロン活動は，炎症の有無に関わらず大きな違いはみられなかったが，成熟ラットの NS ニューロンの活動性は炎症により増加した。熱刺激に対して，炎症がない時には老齢ラットは，成熟ラットの応答性に比べ強い反応を示したが，CFA 注射後には，逆に成熟ラットの応答性が顕著に増加し，老齢ラットより強い反応を示した。老齢ラットの自発放電は炎症の有無に関わらず高い発火頻度を示していた。以上の結果から，加齢に伴う異常疼痛発症には，下行性疼痛抑制系の機能不全による上行路と下行路における機能のアンバランスが原因となる可能性が示された。

（26）求心路遮断性疼痛に対する鏡療法は自己受容感覚に関連した痛みに有効である

住谷昌彦，真下節（大阪大学大学院医学系研究科生体統御医学麻酔集中治療医学講座）
宮内哲（独立行政法人情報通信研究機構関西先端研究センター脳情報グループ）

【背景】幻肢痛の治療として報告された鏡療法は，CRPS に対しても有用とされ難治性疼痛全般への治療効果が期待される。しかしながら，幻肢痛に対する効果は逸話的でしかなく，これまで検証されたことはない。そこで今回我々は，幻肢痛を含む求心路遮断性疼痛に対して鏡療法を行い，その効果を検証した。

【対象】四肢切断 6 人，腕神経叢損傷 4 人，末梢神経損傷 2 人，脊髄部分損傷 1 人

【方法】鏡療法：1 日 1 回 10〜15 分間，健側四肢を鏡に映しながら自由に運動させ，患側四肢が鏡の中で動いているような映像を観察させた。これを患者の希望に応じ数週間〜数ヶ月継続した。その際，自発的に述べる痛みの性質を適宜記録した。

【結果】鏡療法によって，疼痛軽減 50%以上: 5 人，25-50%軽減: 4 人，0-25%軽減: 4 人であり，有意な疼痛緩和が得られた(VAS: 6.15+/-1.8→4.38+/-2.4, $p<0.01$)。自発的に述べる痛みを exteroceptive な性質（EX 群）（例：針で刺されるような）と proprioceptive（PR 群）な性質（例：絞られるような）に分類すると，鏡療法は PR 群に対して有意に疼痛緩和を示した($p<0.01$)。

【結論】鏡療法は，求心路遮断性疼痛に対して有用である。特に自己受容感覚に関連した痛みの疼痛緩和効果が強い。皮膚受容器（外受容器）は運動への関与が少ないことが知られており，鏡療法は求心路遮断による知覚運動協応（身体表象）の破綻を，視覚を介して代償・補正する治療であると考えられる。

（27）病的痛みは視覚とクロスモーダルである

住谷昌彦，真下節（大阪大学大学院医学系研究科生体統御医学麻酔集中治療医学講座）
宮内哲（独立行政法人情報通信研究機構関西先端研究センター脳情報グループ）

【背景】視覚と体性感覚が相互に影響を及ぼしあうことは既に知られている。我々はこれまで，CRPS 患者の病的な痛みあるいは求心路遮断による体性感覚経験の変化が視覚を介した空間認知に影響を与えることを示してきた。今回は，視覚経験の変化が体性感覚認知，特に病的な痛みの認知に影響を与えるかを検討した。

【方法】20° プリズムによる非患側（左右）方向への視野偏位に対する順応を用いて視覚経験を変化させた。実験 1)5 人の CRPS 患者（患側：右 4，左 1）にプリズム順応を行った。実験 2)右 CRPS 患者 2 人に対して患側方向視

野偏位プリズムなど複数のプリズムを用いてプリズム順応を行った。実験 1，2 ともにプリズム順応は 1 日 1 回プリズムを着用して 50 ポインティング動作を 2 週間行う。順応前・順応直後・順応開始 2 週間後の 3 時点で疼痛の程度(VAS)・プリズム順応の程度を評価した。
【結果】実験 1，2 ともに順応直後に VAS が変化した患者はいなかったが，5 例全例で 2 週間後には疼痛が軽減した(VAS: 5.8+/-1.48→2.4+/-1.52，p<0.02)（実験 1）。プリズム順応は非患側方向の偏位に対して方向特異的に疼痛緩和効果があった（実験 2）。
【結論】プリズム順応による視覚経験の変化は，方向特異的に再現性のある疼痛緩和効果を示した。このことから，病的な痛みは視覚とクロスモーダルであると言える。またプリズム順応によって疼痛緩和とともに CRPS の特徴的な症状も寛解したことから，臨床応用できる可能性がある。

（28）触覚刺激による痛覚抑制は皮質レベルで生じる

乾　幸二，辻　健史，柿木隆介
（自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター・感覚運動調節研究部門）

痛む部位に触覚刺激を加えると疼痛が軽減することはよく知られており，実験的にも確認されている。しかしながらその機序は明らかにされていない。Melzack と Wall(1965)による関門制御説の提唱以来，多くの研究がこの抑制の責任部位を脊髄と考えそのメカニズムを検討してきたが，抑制が皮質レベルで生じる可能性についてはほとんど検討されてこなかった。
【方法】9 名の健康成人男性の背中（第 9 胸椎の高さ）に，痛覚刺激（ES，表皮内電気刺激法）と触覚刺激（TS，皮膚表面電気刺激）を種々のタイミングで与え，大脳皮質の応答を脳磁図を用いて記録した。TS から ES までの conditioning-test interval (CTI) は 11 条件で，それぞれ-500, -300, -100, -60, -40, -20, 0, 50, 100, 300, 500 ミリ秒である。これに ES 及び TS 単独呈示のコントロール条件を加え，計 13 条件の記録を行った。
【結果・考察】痛みの程度（VAS スコア）は，CTI –20ms の条件で最も低かった。脳磁図では，ES により刺激後 150 ミリ秒付近を頂点とする明瞭な磁場成分が全例で記録され，信号源解析の結果は第一次体性感覚野と第二次体性感覚野が主な活動源であることを示した。ペア刺激の際の ES に対する皮質応答は，先行する TS により顕著に抑制されたが，遅れて皮質に到達する触覚信号(CTI -40, -60, -100 ms)によっても明瞭に中断された。この結果は，この抑制が皮質レベルで生じたことを示す。抑制の程度は，TS の信号が ES の信号よりも脊髄に先に到達するか遅れて到達するかに影響を受けず，脊髄の関与は小さいか，なかったものと考えられる。

Inui K et al.: Cerebral Cortex, in press

（29）痛み関連脳活動の報告－第3報－

牛田享宏，池本竜則，泉仁（高知大学医学部整形外科）
村田和子（高知大学医学部放射先部）
田中茂樹（仁愛大学心理学科）

運動器における痛みの研究はこれまで局所の病態やそれに伴う疼痛発生メカニズムに主眼がおかれてきた。しかし，痛みは主観的な感覚であるため局所のメカニズムだけでは説明出来ない点が多い事がわかってきている。そこで我々は患者本人が苛まされている痛みを理解するためには最終的に痛みを認識している脳の活動の分析を行う必要があると考え，脳 SPECT や functional MRI（以下 fMRI）を用いた研究を行ってきた。これまでの結果ではアロデニアと痛覚過敏を持つ慢性の神経因性疼痛患者に対して，疼痛部に実際に痛み刺激を加える“実体験タスク”を行うと帯状回，S1，S2 に活動を認めた一方で痛みの中枢である視床の活動は検出することが出来なかっ

た。また，アロデニア症状を有する患者に痛みの経験を想起させる“仮想の痛み刺激タスク”を用いて患者の中で引き起こされる脳内の信号伝達を捉える研究を行ったところ，“仮想の痛み刺激タスク”のビデオを見ただけでも少なからず不快感を訴えており，“実体験タスク”の際にみられる帯状回や前頭前野における脳活動を認めた。

次に我々は健常者に手掌を注射針で刺すような光景を“仮想の痛み刺激タスク”として視認させた際みられる脳活動部位を検出する実験を行った。この結果を患者の場合と比較することで，慢性疼痛患者特有の脳活動パターンについての調査も併せて行ったので報告する。

教育講演（1）DRG における TRP ファミリーの発現と機能

野口光一（兵庫医科大学 解剖学第 2 講座）

1997 年にカプサイシン受容体 TRPV1 の遺伝子がクローニングされ，熱刺激によっても活性化され，複数の有効刺激を持つ多刺激痛み受容体として機能することが明らかとなって以降, TRP ファミリーの研究は盛んとなり，ペインリサーチにおける中心テーマとなっている。一次感覚ニューロンの神経終末に存在する TRP ファミリー分子が，温度刺激やその他刺激を活動電位に変換し，その情報が中枢へと伝達されると考えられており，その感受性の調節機構などに関して数多くの報告がなされている。

本研究会では，TRP ファミリー分子の中で，3 つのサブファミリーのそれぞれ代表的な分子，TRPV1，TRPA1，TRPM8 に関して，ラット DRG を用いて詳細に分布を調べた結果を報告する。また，TRPA1 や TRPM8 など，冷刺激に関与すると考えられている分子について，末梢炎症モデルやニューロパチックペインモデルにおける発現変化とその機能的意義についても報告する。さらに本教室でこの数年来研究を続けている細胞内シグナル伝達因子との関係に関する仕事にも触れたい。TRPA1 の特異的な発現から推察される特定の神経栄養因子による調節機構の可能性についても言及したい。

教育講演（2）ミクログリアの活性化と神経細胞傷害

錫村明生（名古屋大学環境医学研究所　神経免疫）

炎症性神経疾患のみならず虚血性疾患，変性性疾患においても変性に陥った神経細胞の周囲に活性化されたミクログリアが存在する。これらは，変性神経細胞からのシグナルにより活性化され，神経保護作用を担っている可能性も考えられるが，変性細胞を貪職・処理する役割や，反対に直接エフェクターとして神経細胞を傷害している可能性も考えられる。実際に in vitro の神経細胞とミクログリアの共培養系でみると，ミクログリアを活性化することにより周囲の神経細胞は細胞死に陥る。ミクログリアと神経細胞をミリポア膜で分離して培養し，直接の接触なしにミクログリアを活性化しても神経細胞死が誘導できることから，ミクログリア由来の液性因子が神経傷害性に働いていると考えられる。これら液性因子として，炎症性サイトカイン以外に，一酸化窒素やフリーラディカル，興奮性アミノ酸などがあげられている。また, 海馬のスライス培養を LPS と IFNγで刺激することにより，海馬の長期増強 (LTP) が抑制される。これは，培養中のグリア細胞が活性化されサイトカインをはじめとする液性の傷害因子を産生し，神経細胞の機能障害，特にシンプスの可塑性を障害することによると考えられる。この実験系に炎症性サイトカインや NO の産生阻害薬を添加すると，LTP の抑制は解除される。

以上の結果から活性化ミクログリアが直接あるいは間接的に神経細胞の生存，機能を障害することは明らかである。本研究会では，我々の実験成績を示し，ミクログリアの神経傷害機序について考察する。

教育講演（3）イメージング手法による痛覚認知メカニズムの研究：主として MEG と fMRI について

柿木隆介（自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター・感覚運動調節研究部門）

ヒトでの脳内痛覚認知機構を，高い時間分解能（ミリ秒単位）を有する脳磁図(MEG)と，高い空間分解能を有する機能的磁気共鳴画像(fMRI)を用いて解析した。近年の科学技術の進歩により，小径有髄の Aδ線維(first pain)と無髄の C 線維(second pain)を選択的に刺激することが可能となってきた。MEG は初期認知機構の解明に適している。Aδ線維刺激の場合，MEG の頂点潜時は上肢刺激では 200msec（C 線維刺激の場合は 750msec。以下も同様），下肢刺激では 250msec 前後(1200msec)である。MEG を詳細に解析することにより，Aδ線維刺激，C 線維刺激共に，左右の上下肢いずれの部位を刺激しても刺激対側の第 1 次感覚野(SI)と両側の第２次感覚野(SII)，島，扁桃体，帯状回が，時間的にオーバーラップしながら活動する事が明らかとなった。fMRI は視床，島，帯状回における活動部位の詳細な解析に適している。Aδ線維刺激，C 線維刺激共に，両側の視床，SII，島，帯状回に有意な活動上昇が見られた。島前部，帯状回の一部，pre-SMA では，C 線維刺激により特異的に活動が上昇しており，second pain 認知に特異的な部位である可能性が示唆された。

25. TRP チャネル研究会

2006 年 7 月 13 日− 7 月 14 日

代表・世話人：井上隆司（福岡大学医学部）
所内対応者：富永真琴（岡崎共同研究機構生理学研究所）

（1）温度感受性 TRP チャネル

富永真琴（岡崎統合バイオサイエンスセンター・細胞生理研究部門）

（2）癌性疼痛における TRPV1 の役割

尾崎紀之，浅井英明，長嶺健二郎，篠田雅路，杉浦康夫
（名古屋大学大学院医学系研究科機能形態学機能組織学）
藤内 祝（細胞治療学（ハイメディック）寄附講座）
上田 実（頭頸部・感覚器外科学講座顎顔面外科学分野）

（3）シクロホスファミドによるマウス膀胱炎における TRPV1 の役割

中村靖夫，河谷正仁（秋田大学医学部機能制御医学講座器官制御学分野）
富永真琴，東智広，森山朋子（岡崎統合バイオサイエンスセンター・細胞生理部門）
並木幹夫（金沢大学医学部泌尿器科）

（4）グリコール酸ピーリングによる表皮ターンオーバー促進のメカニズム

傳田澄美子，傳田光洋，日比野利彦（(株）資生堂　ライフサイエンス研究センター）
根岸　圭，櫛方暢晴，若松信吾（東京女子医科大学付属青山女性医療研究所・美容医療科）

（5）マクロファージに発現する TRPV2 チャネルの制御機構

長澤雅裕，小島至　（群馬大学生体調節研究所）

（6）筋細胞変性のメカニズム ～筋ジストロフィー，心筋症の新しい治療ターゲット～

岩田　裕子，片野坂友紀，重川宗一，若林繁夫（国立循環器病センター研究所）

（7）Microtubule-associated protein 7 類似蛋白 (MAP7R) による TRPV4 機械受容の閾値の調節

鈴木誠（自治医大薬理）

（8）マウス蝸牛外有毛細胞における TRPV4 受容体刺激による細胞内 Ca^{2+}動態

沈静，久保伸夫，山下敏夫（関西医科大学耳鼻咽喉科学教室）
原田成信（はらだ耳鼻科）
鈴木誠（自治医科大学薬理学教室）

（9）TRPV4 シグナルは NaK-ATPase をリクルートするか

伊村明浩（京都大学大学院医学研究科・先端領域融合医学研究機構）

(10) TRP チャネルとしてのマウス PKD2L1 遺伝子の機能解析

村上　学，大場貴喜，徐　峰，佐藤栄作，尾野恭一，渡邊博之，伊藤　宏，飯島俊彦
（秋田大学医学部機能制御医学）

(11) 神経細胞死における TRPM2 の中心的な役割

金子周司，川上聖子，伊藤悦子，南　利幸（京都大学大学院薬学研究科，生体機能解析学分野）
久米利明，赤池昭紀（京都大学大学院薬学研究科，薬品作用解析学分野）
原　雄二，若森　実，高田悠記，森　泰生（京都大学大学院工学研究科，分子生物化学分野）

(12) 細胞容積調節に関与する TRPM7 チャネルの性質

沼田朋大，清水貴浩，岡田泰伸
（生理学研究所機能協関，総研大生理科学専攻，日本学術振興会）

（13）心肥大シグナルと TRPC1 チャネル蛋白

大場貴喜，渡邊博之，高橋陽一郎，伊藤　宏

（秋田大学医学部内科学講座　循環器内科学分野・呼吸器内科学分野）

村上　学，尾野恭一，飯島俊彦（秋田大学医学部・機能制御医学講座）

（14）PLCγ2 と TRPC3 の機能的相互作用による B 細胞受容体シグナルの増幅

沼賀　拓郎（総研大・生命・生理）

森　泰生（京都大学大学院工学研究科，分子生物化学分野）

（15）Desensitization and activation of mTRPC5 expressed in HEK cells

Insuk So

(Department of Physiology and Biophysics,

Seoul National University College of Medicine, Korea)

（16）チロシンリン酸化による TRPC チャネルの活性制御

久恒智博（理研・発生神経生物）

黒田有希子，中村健，道川貴章，水谷顕洋（東大医科研・脳神経発生分化）

中村京子，井上貴文（カルシウムオシレーション国際プロジェクト・科技団）

御子柴克彦（理研・発生神経生物，東大医科研・脳神経発生分化，

カルシウムオシレーション国際プロジェクト・科技団）

（17）血管緊張度調節における機械刺激による TRPC6 チャネル増強作用の生理的役割

井上隆司（福岡大学医学部生理学）

Lars Jorn Jensen，伊東祐之（九州大学大学院医学研究院生体情報薬理学）

森泰生（京都大学大学院工学研究科合成生物）

（18）脳毛細血管内皮細胞における TRP チャネルの生理的機能と SK チャネルとの機能連関

今泉祐治，山崎大樹，山村寿男，大矢進（名古屋市立大学大学院薬学研究科細胞分子薬効解析学）

村木克彦（愛知学院大学薬学部細胞薬理学）

浅井清文（名古屋市立大学大学院医学研究科分子神経生物学）

（19）心筋線維化における $G\alpha_{12/13}$ を介した Ca^{2+} シグナリングの役割

西田　基宏（九州大学大学院薬学研究院）

（20）創薬標的としての TRP チャネル

佐野頼方，稲村耕平，岡田英嗣，望月忍（アステラス製薬株式会社，研究本部，分子医学研究所）

（21）内皮細胞における膜伸展刺激によって誘発される Ca 放出の分子機構

成瀬恵治（名古屋大学大学院医学研究科・細胞科学講座細胞生物物理学）

【参加者名】

Mandadi Sravan（統合バイサイエンスセ），So Insuk（ソウル大・医），飯田　陶子（統合バイサイエンスセ），石井　正和（昭和大），石井　裕（生理研），板津　直美（名古屋市大院），伊藤　悦子（京都大院），稲田　仁（統合バイサイエンスセ），井上　華（生理研），井上　隆司（福岡大・医），今泉　祐治（名古屋市大院），今里　暁（ファイザー），伊村　明浩（京都大院），岩田　裕子（国循セ），浦本　裕美（生理研），大野　晃稔（名古屋市大院），大場　貴喜（秋田大・医），大矢　進（名古屋市大院），岡田　泰伸（生理研），小川　明日香（名古屋市大・薬），尾崎　紀之（名古屋大院），片野坂　友紀（国循セ），加藤　賢太（京都大院），金子　周司（京都大学），木村　泰介（名古屋市大院），久保　伸夫（関西医大），久保田　幸治（京都大院），小島　至（群馬大・生体調節研），小山　晃紀（昭和大・薬），坂本　多穂（名古屋市大・薬），佐々木　真理（統合バイサイエンスセ），佐野　頼方（アステラス製薬），柴崎　貢志（統合バイサイエンスセ），島　麻子（統合バイサイエンスセ），島貫　恵実（統合バイ

サイエンスセ），清水　貴浩（生理研），新庄　勝浩（ファイザー），須崎　正隆（治医大），鈴木　商信（東京大院），鈴木　誠（自治医大），曽我部　隆彰（統合バイサイエンスセ），曽我部　正博（名古屋大院），高橋　信之（生理研），高橋　陽一郎（秋田大・医），田中　良一（名古屋市大・薬），沈　静（関西医大），傳田　澄美子（資生堂），冨樫　和也（統合バイサイエンスセ），富永　真琴（統合バイサイエンスセ），中尾　賢治（京都大院），中川　哲彦（ファイザー），長澤　雅裕（馬大・生体調節研），中條　浩一（生理研），永田　雅俊（大阪大学），中村　靖夫（秋田大・医），成瀬　恵治（名古屋大院），新見　大輔（京都大院），西井　博子（統合バイサイエンスセ），西田　基宏（九州大院），丹羽　里実（名古屋市大・薬），温井　美帆（生理研），沼賀　拓郎（京都大院）沼田　朋大（生理研），萩原　民雄（昭和大・医），原田　成信（原田耳鼻咽喉科），東　智広（統合バイサイエンスセ），久恒　智博（理研），檜山　武史（基礎生物研），藤森　智宏（名古屋市大・薬），藤原　祐一郎（生理研），堀田　真吾（名古屋市大・薬），前田　良太（京都大学），松浦　孝範（大阪大学），南　利幸（京都大院），村上　学（秋田大・医），村山　奈美枝（統合バイサイエンスセ），森　泰生（京都大院），森村　浩三（名古屋市大・薬），森本　岳（名古屋市大・薬），柳　文乃（名古屋市大・薬），山岡　とも子（京都大院），山崎　大樹（名古屋市大・薬），山村　寿男（名古屋立大・薬），山本　伸一郎（京都大院），吉田　卓史（京都大院），若森実（京都大院），渡邊　博之（秋田大・医）

【概要】

TRP 蛋白質(transient receptor potential protein)は，近年，産学両分野の研究者の強い関心を集めつつある，種々の物理化学刺激によって活性化される広範な Ca^{2+}流入チャネル群（TRP チャネル遺伝子スーパーファミリー）である。この蛋白質は中枢・末梢神経系を始めとしたほぼ全ての組織に発現しており，知覚伝導，体液調節，血圧・消化管運動・呼吸調節，免疫・炎症反応，生殖行動など，生体の多彩な機能の調節やその破綻によって生じる疾病にも密接に関わっていることが明らかになりつつある。また，家族性低マグネシウム血症，多発性嚢胞腎等の遺伝性疾患や，ムコリピドーシス，筋ジストロフィー，アルツハイマー病などの進行性変性疾患との関連も示唆されており，未だ有効な治療法のない様々な疾患に対する薬物治療の有望な分子標的となる可能性が，世界の医療関係・製薬企業の注目を集めている。本研究会では，7 月 13 日から 2 日間にわたり，本邦のみならず韓国も含めた 90 人近くの TRP 蛋白質（チャネル）の研究者が一同に会し，21 題の口演，4 題のポスター発表を行い，活発な情報交換と討議を行った。発表の内容は，個々の TRP チャネルの活性化・制御機構に関する最新の成果から，病態の解明につながる新しい知見の発表，更に次世代の創薬に向けたハイスループットスクリーニングの試みに到るまで極めて多岐にわたり，改めてこの蛋白質ファミリーを中心とした今後の研究の重要性と可能性を実感させる充実した会となった。そして研究会の終了後，複雑且つ多種多様な TRP チャネルの全体像をつかみ，今後進むべき研究の方向性を決めていくには，このような会を通した定期的な情報交換が必要不可欠であることを再認識した，という感想や意見が多数の参加者から寄せられている。

（1）温度感受性 TRP チャネル

富永真琴（岡崎統合バイオサイエンスセンター・細胞生理研究部門）

哺乳類には現在までに 6 種類の温度感受性 TRP チャネルが知られており，それぞれが特異な活性化温度閾値を有する（TRPV1 > 43 度, TRPV2 > 52 度, TRPV3 > 32-39 度, TRPV4 > 27-35 度, TRPM8 < 25-28 度, TRPA1 < 17 度）。多くは感覚神経に発現しているが, TRPV3 や TRPV4 のように表皮ケラチノサイトに強く発現するものもある。カプサイシン受容体 TRPV1 が熱のみならずカプサイシンで活性化するように，温度感受性 TRP チャネルの多くは 温度以外の有効刺激を有する。TRPV1 の活性化温度閾値は固定したものではなく PKC 依存的なリン酸

化によって 10 度近く低下し, 体温でも活性化するようになる。これは，急性炎症性疼痛発生の 1 つのメカニズムと考えられている。TRPV4 はケラチノサイトに加えて視床下部視索前野に発現することから，皮膚での温度受容や体温調節にも重要な働きをしていることが推測される。ケラチノサイトが受容した温度刺激はどのようにして感覚神経に伝達されるのであろうか。新生仔マウスのケラチノサイトと感覚神経の共培養系の確立を目指している。私達はまた，TRPM2 が温度受容体として機能することを見出したので，その活性化機構を生理学的意義とあわせて報告したい。

（2）癌性疼痛における TRPV1の役割

尾崎紀之，浅井英明，長嶺健二郎，篠田雅路，杉浦康夫
（名古屋大学大学院医学系研究科機能形態学講座機能組織学分野）
藤内 祝（細胞治療学（ハイメディック）寄附講座）
上田 実（頭頸部・感覚器外科学講座顎顔面外科学分野）

【目的】癌に伴う痛みのメカニズムを明らかにするため, マウスおよびラットに癌細胞を移植し, 痛覚と知覚神経節における transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1(TRPV1)の変化を観察した。
【材料と方法】マウスの足底部および大腿部に，またラット下顎歯肉部に扁平上皮癌を移植し，痛覚，腫瘍浸潤，知覚神経節における TRPV1 陽性細胞の変化を調べた。
【結果】マウスの足底部や大腿部に扁平上皮癌を移植すると自発痛を示唆する行動や足底部の機械的および熱性痛覚過敏が見られた。後根神経節において TRPV1 陽性細胞が増加し，TRPV1 拮抗薬 capsazepine は熱性痛覚過敏を抑制した。またラット下顎歯肉部に扁平上皮癌を移植すると顔面の機械的および熱性痛覚過敏が見られ，三叉神経節で TRPV1 陽性細胞が増加した。
【結論】マウスおよびラットに扁平上皮癌を移植し癌性疼痛の動物モデルを開発した。また腫瘍移植群の知覚神経節において TRPV1 が増加し，TRPV1 の拮抗薬が痛覚過敏を抑制したことから，扁平上皮癌の移植による癌性疼痛には TRPV1 の関与が示唆された。

（3）シクロホスファミドによるマウス膀胱炎における TRPV1の役割

中村靖夫，河谷正仁（秋田大学医学部機能制御医学講座器官制御学分野）
富永真琴，東智広，森山朋子（岡崎統合バイオサイエンスセンター・細胞生理部門）
並木幹夫（金沢大学医学部泌尿器科）

TRPV1 は膀胱が炎症時の痛覚過敏や過活動に関与していると報告されている。 また，間質性膀胱炎の患者の膀胱内へのカプサイシンの注入によって，症状およびペインスコアの改善が報告されている。そこで本研究では，TRPV1 欠損マウス(TRPV1 KO)に抗癌剤であるシクロホスファミド(CYP)を投与して慢性膀胱炎を引き起こし，その膀胱機能への影響について評価を行った。

1. 覚醒下拘束下における膀胱内圧測定：溶媒腹腔内投与群の ICI において WT（337.6 ± 27.5 秒）と TRPV1 KO（288.7 ± 35.9 秒）で差を認めなかった。WT において CYP (150mg/kg) 腹腔内投与群の ICI（116.8 ± 8.2 秒）は溶媒腹腔内投与群の ICI より短縮した($p < 0.01$)。一方, TRPV1 KO において CYP (150mg/kg) 腹腔内投与群の ICI（251.5 ± 16.5 秒）は溶媒腹腔内投与群の ICI と有意差を認めなかった。溶媒腹腔内投与群の MVP において各群間で有意差を認めなかった。

2. 病理組織学的検討 : 溶媒腹腔内投与群では WT においても TRPV1 KO においても光顕微鏡下で炎症所見は認められなかった。CYP (150mg/kg)腹腔内投与群では WT においても TRPV1 KO においても膀胱の出血および炎症

所見を認めた。膀胱の出血および炎症の領域や範囲に光顕微鏡下でWTとTRPV1 KO間に明らかな差を認めなかった。

【結論】今回の実験結果からCYPで誘発された慢性膀胱炎による頻尿の発現機序にTRPV1が関与していることが示唆された。

（4）グリコール酸ピーリングによる表皮ターンオーバー促進のメカニズム

傳田澄美子，傳田光洋，日比野利彦（（株）資生堂　ライフサイエンス研究センター）
根岸　圭，櫛方暢晴，若松信吾（東京女子医科大学付属青山女性医療研究所・美容医療科）

グリコール酸(GA)によるケミカルピーリングの作用を３次元皮膚モデルを用いて検討した。GA 塗布後に培地中に放出される情報伝達物質を測定し，BrdU 取り込みの後，組織学的検討を行った。GA 塗布 10 分後までにATP が遊離し，24 時間後に IL-1αおよび BrdU 陽性細胞数が増加していた。この細胞増殖は酸感受性イオンチャネルである VR1 のアンタゴニストによって抑制された。また，培養ケラチノサイトに GA を投与すると細胞内 Ca 濃度が上昇し，これは VR1 アンタゴニストによって抑制された。よって，GA は皮膚モデルにおいて表皮・真皮の細胞増殖を促進し，これには VR1 を介した表皮細胞内 Ca 濃度変化とそれに続いて起こる ATP 遊離，さらにIL-1αなどのサイトカインによる表皮―真皮相互作用が関与していると考えられた。

（5）マクロファージに発現するTRPV2チャネルの制御機構

長澤雅裕，小島至　（群馬大学生体調節研究所）

マクロファージには TRPV2 チャネルが発現していたが，TRPV ファミリーの他のメンバーTRPV1, 3-6 の発現は極めて低かった。非血清存在下，TRPV2 チャネルは細胞内に局在したが，血清投与により一部が細胞膜に移行した。さらに fMLP を投与すると細胞膜への移行が促進された。パッチクランプ法により Cs^+をチャージキャリアーとしたチャネル電流が観察されたが，TRPV チャネルを抑制する ruthenium red，変異型 TRPV2 遺伝子導入，TRPV2　siRNA の投与により抑制された。この Cs^+電流は fMLP 投与によって増加した。また fMLP 投与により急速でかつ持続的な細胞内 Ca^{2+}濃度の増加が惹起されたが，細胞外液 Ca^{2+}の除去，ruthenium red 投与，変異型 TRPV2 遺伝子導入, siRNA 投与などにより持続相の Ca^{2+}上昇が消失し一過性の上昇になった。fMLP により惹起される TRPV2 の細胞膜へのトランスローケーションはPI-３キナーゼを抑制するワートマニンや百日咳毒素によりブロックされた。fMLP によるマクロッファージの遊走はruthenium red投与, 変異TRPV2遺伝子導入, siRNA投与により抑制された。以上の結果から，マクロファージにおいて，fMLP は百日咳毒素感受性G蛋白を介するPI-3 キナーゼ活性化に依存する機構によって TRPV2 を細胞内から細胞膜へとトランスローケーションさせ，この機構が持続的な細胞質 Ca^{2+}濃度上昇さらにはマクロファージ遊走に関与していると結論された。

（6）筋細胞変性のメカニズム ～筋ジストロフィー，心筋症の新しい治療ターゲット～

岩田　裕子，片野坂友紀，重川宗一，若林繁夫（国立循環器病センター研究所）

ジストロフィー筋細胞におけるストレッチ刺激による Ca^{2+} 流入の増大と筋細胞壊死の関係を解明し，ストレッチ感受性チャネルの病態形成における役割を検討した。この目的のため，心筋より GRC/TRPV2 をクローニング

し，心筋症・筋ジストロフィー症筋細胞における TRPV2 含量および局在変化を検討した。TRPV2 を心筋細胞膜に過剰発現させたマウスを用いて病態形成における役割を検討した。

TRPV2 発現細胞は，成長因子，ストレッチ，浸透圧刺激等に反応して，細胞内から細胞膜へ局在変化し，Ca^{2+} 流入を増加させた。TRPV2 の局在をしらべたところ，正常筋細胞では，細胞内および介在板（心筋）に存在し，ジストロフィンまたはデルタサルコグリカン(δ-SG)欠損筋細胞では筋細胞表面膜に多く存在していた。一方 TRPV2 含量は両者筋細胞で大差なかった。心筋症ハムスター筋細胞へアデノウィルスベクターを用いてδ-SG 遺伝子を導入または，TRPV2 アンチセンス遺伝子を導入することにより，細胞膜に存在する TRPV2 が減少し，Ca 動態の異常およびストレッチ刺激に対する細胞変性が軽減された。TRPV2 を心筋細胞膜に過剰発現させたマウスは繊維化を伴う心筋症を呈した。

ジストロフィン複合体異常基づく筋細胞変性に TRPV2 を介する Ca^{2+} 流入の増大が重要な役割を果たしており重要な治療ターゲットとなりうる可能性が示唆された。

（7）Microtubule-associated protein 7 類似蛋白 (MAP7R) による TRPV4機械受容の閾値の調節

鈴木誠（自治医大薬理）

TRPV4 は機械受容チャネルで，低浸透圧による cell-swell で活性化される。これはアラキドン酸の放出からその代謝産物によると考えられている。しかし，TRPV4 ノックアウトマウスでは圧力やせん断力での反応がなくなっており，生化学的経路のみで説明できない部分もありうる。我々は MAP7 が TRPV4 の結合蛋白である事を示した。しかし，この蛋白は機械受容の閾値は変化無く膜への移動に関与していた。今回 MAP7R を神経組織よりクローニングした。TRPV4 の stable transform cell を作製し，さらに TRPV4+MAP7R の stable transform cell を作製した。細胞内 Ca の変化から，TRPV4 の活性化は MAP7R によって 2kPa から 0.5kPa 以下に有意に低下した。パッチクランプでも MAP7R+TRPV4 細胞では直接膜を吸引する事で，活性を観察する事ができるようになった。MAP7R は機械受容 TRP チャネルの閾値を変えうるはじめての蛋白といえる。

（8）マウス蝸牛外有毛細胞における TRPV4受容体刺激による細胞内 Ca^{2+} 動態

沈静，久保伸夫，山下敏夫（関西医科大学耳鼻咽喉科学教室）
原田成信（はらだ耳鼻科）
鈴木誠（自治医科大学薬理学教室）

Ca^{2+} 透過性チャンネルと考えられている浸透圧感受性受容体(TRPV4)は，細胞内情報伝達機構において重要な役割を演じていることが明らかにされつつある。内耳液のイオン環境及び透過性の変化による局所の浸透圧変化は，蝸牛の外有毛細胞の運動能及び細胞内 Ca^{2+} 濃度に影響を与え，結果聴覚機能になんらかの影響を与える可能性も考えられる。TRPV4 の遺伝子が，蝸牛の内有毛細胞，外有毛細胞，螺旋神経節細胞，血管条 margin 細胞に発現していることは既に報告されているがその機能は不明であった。そこで我々は，野生型及び TRPV4 knock-out マウスを用い，蝸牛の TRPV4 の発現，単離外有毛細胞における低浸透圧刺激による細胞内 Ca^{2+} 動態について比較検討を行った。

RT-PCR 方法によって，野生型のマウス蝸牛において TRPV4 遺伝子の発現が検出されたが，knock-out マウスの蝸牛では陰性であった。single-cell RT-PCR 解析により，TRPV4 遺伝子は野生型マウス蝸牛の螺旋神経節細胞，外有毛細胞，内有毛細胞に発現していることが確認された。これらの細胞では TRPV4 免疫反応も陽性であったが，knock-out マウスにおいては，いずれの細胞でも陰性であ

った。又，低浸透圧刺激及び TRPV4 の agonist である 4α-PDD に対して，野生型マウス外有毛細胞の$[Ca^{2+}]_i$ 上昇が認められた。この上昇は TRPV 受容体の antagonist である Ruthenium Red により抑制された。一方，TRPV4 knock-out マウス外有毛細胞では，低浸透圧刺激及び 4α-PDD による$[Ca^{2+}]_i$ 上昇が認められなかった。

以上の結果から，TRPV4 受容体が外有毛細胞における細胞内情報伝達機構において重要な役割を演じている可能性が考えられた。

（9）TRPV4シグナルは NaK-ATPase をリクルートするか

伊村明浩（京都大学大学院医学研究科・先端領域融合医学研究機構）

ヒト型老化疾患モデルマウスとして報告された *klotho(kl)* マウスをヒントにして，Klotho 分子の機能を解析してきた。Klotho 分子は一回膜貫通型の I 型膜タンパクであり，主として遠位尿細管，脈絡膜，上皮小体の細胞内の膜構造中に分布する。細胞膜表面に分布する量は少ないこと，また，膜貫通部位近傍で切断されて分泌され，体液中を循環することが判っていた。その細胞膜上での結合分子の探索のため，免疫沈降法と LC-MS による解析を行ったところ，Na,K-ATPase を同定した。Na,K-ATPase は細胞膜内外のイオン濃度勾配を調節する基本的な分子である。Klotho は，細胞内部で Na,K-ATPase とカップルすることで活性調節を行う分子ではないかと考え，脈絡膜の Na,K-ATPase 発現を比較したところ，トータル発現量では差はなかったが，KO マウスの Na,K-ATPase の細胞表面分布量は有意に低下していた。

脳脊髄液は脈絡膜によってその大部分が産生されているが，その成分管理システムは知られていない。試みに脳脊髄液中の Ca 濃度を測定したところ，*kl*-KO マウスでは有意に低下していた。我々は，1. 脳脊髄液の成分管理に Na,K-ATPase が関与している 2. 脈絡膜細胞自体に感知システムが備わっている 3. 感知システムが何らかの機構で Na,K-ATPase の活性制御を行う という想定で仮説を立てた。脳脊髄液を感知するシステムに該当すると思われるセンサー分子を調べたところ，TRPV4 が有力な候補の一つであると考えられるいくつかのデータを得た。現在我々は，Klotho 分子は TRPV4 シグナルに従って Na,K-ATPase を細胞膜にリクルートするための分子装置であると想像している。

（10）TRP チャネルとしてのマウス PKD2L1遺伝子の機能解析

村上 学，大場貴喜，徐 峰，佐藤栄作，尾野恭一，渡邊博之，伊藤 宏，飯島俊彦
（秋田大学医学部機能制御医学）

多発性嚢胞腎(polycystic kidney disease；PKD)は PKD1(85%)あるいは PKD2(10%)の遺伝子変異により常染色体優勢遺伝をきたす疾患である。PKD 分子はアミノ酸配列の類似性から transient receptor potential (TRP)チャネルの一翼をになうと考えられている。本研究では残る 5%の多発性嚢胞腎の原因遺伝子の候補として，マウスではその cDNA クローンが知られていない PKD2L1 に着目し，その全長 cDNA およびゲノム遺伝子構造を明らかにし，さらに TRP チャネルとしての陽イオンチャネル機能を解析した。

PKD2L1 はマウス染色体 19C3 に位置し，15 のエキソンを有することが明らかになった。PKD2L1 は生体に広く発現が認められた。HEK293 細胞における単独発現では細胞膜よりも粗面小胞体 (ER) に発現が多かったが，PKD1 との共発現により PKD2L1 の多くは細胞膜表面へ移行すること，PKD1 と結合すること，陽イオンチャネルを形成することが明らかになった。さらにアミノ酸 C 末端にある coiled-coil domain を削ることにより，上記の膜移行効果が消失したことから，PKD2L1 の coiled-coil domain が PKD1 との結合に重要であることが明らかになった。さらに PKD2L1 のアミノ酸配列上に ER 上に留まるための配列(ER retention signal: KDEL)に似た配列を 2

つ見出し，この配列が PKD2L1 単独発現時における細胞内局在に重要であることが明らかになった。
【結語】PKD2L1 は PKD1 と結合することにより ER から細胞膜表面へ移行し，陽イオンチャネルを形成する。本研究により PKD2L1 の異常により多発性嚢胞腎を来たす可能性が示唆された。

（11）神経細胞死における TRPM2の中心的な役割

金子周司，川上聖子，伊藤悦子，南　利幸（京都大学大学院薬学研究科，生体機能解析学分野）
久米利明，赤池昭紀（京都大学大学院薬学研究科，薬品作用解析学分野）
原　雄二，若森　実，高田悠記，森　泰生（京都大学大学院工学研究科，分子生物化学分野）

過酸化水素を初代培養ニューロンに暴露させると，短時間の内にニューロン死が惹起される。この過酸化水素誘発ニューロン死と，細胞内酸化還元状態によって開口が制御されている TRPM2 チャネルとの関連について研究した。免疫染色法によって，ラット胎仔由来大脳皮質ニューロンの大多数で TRPM2 タンパクの発現が確認された。培養ニューロンへの過酸化水素適用は，ニューロン死と同じ濃度範囲で，Ca^{2+}流入による細胞内 Ca^{2+}濃度の上昇を引き起こした。クローニングしたラット TRPM2 cDNA の一次配列は Nudix モチーフ領域でヒトやマウスとは異なっていたが，ヒト胎児腎臓由来 (HEK) 細胞に強制発現させると過酸化水素による Ca^{2+}流入および細胞死が観察された。低分子干渉 RNA を用いた遺伝子サイレンシングによって，TRPM2 の発現低下に伴って，過酸化水素誘発 Ca^{2+}流入の減少と過酸化水素誘発ニューロン死の減少が認められた。これらの結果から，神経細胞において TRPM2 チャネルは神経の細胞内 Ca^{2+}調節と生存において重要な役割を果たしていることが示唆された。

（12）細胞容積調節に関与する TRPM7チャネルの性質

沼田朋大，清水貴浩，岡田泰伸（生理学研究所機能協関，総研大生理科学専攻，日本学術振興会）

動物細胞は異常浸透圧下での膨張後，速やかに正常容積へと復帰する能力を持つ。この Regulatory Volume Decrease (RVD)と呼ばれる容積調節は，膨張時に細胞内 Ca^{2+}濃度上昇が起き，それに引き続いて KCl 流出と水流出がもたらされることによって達成される。HeLa 細胞にパッチクランプ法を適用し，この際の Ca^{2+}流入経路と考えられる膜伸展感受性カチオンチャネルの性質を単一チャネルレベルで調べた結果，21 pS の単一チャネルコンダクタンスを持ち，膜伸展刺激，電位，阻害剤(Mg^{2+}, ruthenium red, SKF96368, Gd^{3+})感受性を示した。ホールセルの電流成分は，細胞容積感受性，外向整流性，阻害剤感受性を示した。RT-PCR 法で mRNA の発現を調べた結果，TRPM7 の発現を確認した。さらに siRNA を用い，TRPM7 をノックダウンすると単一チャネル, ホールセル電流を抑制した。fura-2 細胞内 Ca^{2+}測定法で，低浸透圧刺激によって実際に Ca^{2+}流入が起こり，これは阻害剤，siRNA により抑制されることが確認された。RVD 過程もまたこれらの阻害剤や siRNA により抑制されることが判明した。また HEK293T 細胞に TRPM7 を発現させ 電流性質を調べた所, HeLa 細胞に内在的に発現している電流性質と同様の結果を得た。従って，TRPM7 チャネルが RVD をトリッガーする Ca^{2+}流入経路を与えることが明らかになった。

（13）心肥大シグナルと TRPC1 チャネル蛋白

大場貴喜, 渡邊博之, 高橋陽一郎, 伊藤　宏
（秋田大学医学部内科学講座　循環器内科学分野・呼吸器内科学分野）
村上　学, 尾野恭一, 飯島俊彦（秋田大学医学部・機能制御医学講座）

心肥大形成において細胞内 Ca 濃度の上昇は calcineurin/NFAT 系を介した心肥大シグナルの活性化に関わっている。本研究では，細胞の増殖・分化に関連する新しい Ca 流入チャネルとして近年注目されている TRP チャネルについて，その心肥大形成における役割を検討した。

新生仔ラット培養心筋細胞にエンドセリンによる肥大刺激を加えると，肥大心筋細胞では細胞表面積や BNP 発現の増加とともに TRPC1 チャネル蛋白の up-regulation が認められた。次にタプシガーギンで誘発されたストア作動性 Ca 流入(SOCE)を測定したところ，肥大心筋細胞では対象の約 2.5 倍に増加していた。HEK293T を用いた発現解析では，TRPC1 過剰発現細胞では SOCE 増加による細胞内 Ca 濃度上昇とともに，NFAT 転写活性の亢進を認めた。これらの反応は，TRPC1 の C 端欠損体を共発現させると有意に抑制された。さらに免疫沈降法を用いた検討から，肥大心に発現している TRPC1，C3，C5，C6，M4 チャネル蛋白と TRPC1，その足場蛋白である Homer はホモ/ヘテロ多量体によるチャネル複合体を形成していることが示唆された。TRPC1 の up-regulation は腹部大動脈結紮ラットの肥大心でも認められ。正常ラット心発達過程では，TRPC1，Homer は胎生期に多く発現しており，新生期，成熟期と経時的に減少，肥大心で up-regulation するという胎児性心筋遺伝子産物の特徴を有していた。

TRPC1 チャネル蛋白は心肥大過程において再発現し，SOCE-NFAT 転写活性を介して心肥大反応を制御していると考えられる。

（14）PLCγ2と TRPC3の機能的相互作用による B 細胞受容体シグナルの増幅

沼賀　拓郎（総研大・生命・生理）
森　泰生（京都大学大学院工学研究科，分子生物化学分野）

免疫 B 細胞において，B 細胞受容体刺激に惹起される細胞内 Ca^{2+}濃度上昇は，細胞内ストアからの放出による一過的な上昇と，それに引き続く細胞外からの流入による持続的なオシレーションにより構成される。これまでに我々は，ニワトリ免疫系 B 細胞株である DT40 を用いて，Ca^{2+} 流入によるホスホリパーゼ C (PLC) γ2 の，形質膜への集積を伴う活性化により，持続的な Ca^{2+} オシレーションが制御されていることを報告した。また，PLCγ2 のこの活性化には TRPC3 との機能的･物理的相互作用が重要であることを示した。そしてこの PLCγ2 の Ca^{2+}依存的な活性化が，BCR シグナリングの増幅において重要であるということを提唱した。今回，DT40 に内在的に発現する TRPC3 のノックアウト(KO) 細胞株を作製した。その解析から，内在的 TRPC3 が，ジアシルグリセロール(DAG) 活性化チャネルを構成していることが示唆された。また TRPC3-KO 細胞において，PLCγ2 の膜集積が抑制されることを明らかにした。この結果と一致してイノシトール 3 リン酸産生，および Ca^{2+}オシレーションの抑制が観察された。一方，PLCγ2 のもうひとつの産物である DAG について，シグナル経路の解析を行った結果，TRPC3 チャネルの欠損により PKCβの形質膜への移行，および ERK の活性化が抑制されていることを明らかにした。これらのことから，TRPC3 と PLCγ2 は，B 細胞シグナル伝達全体を増幅させることを明らかにした。

（15）Desensitization and activation of mTRPC5 expressed in HEK cells

Insuk So (Department of Physiology and Biophysics, Seoul National University College of Medicine, Korea)

The classical type of transient receptor potential channel (TRPC) is a molecular candidate for Ca^{2+}-permeable cation channels in mammalian cells. TRPC5 are rapidly desensitized after activation by G protein coupled receptor. First, we investigated the desensitization process of mTRPC5 and localized the molecular determinants of the desensitization by mutagenesis. TRPC5 was initially activated by muscarinic stimulation with 100 μM carbachol and then decayed rapidly even in the presence of carbachol (desensitization). Increased EGTA and omitting MgATP in the pipette solution slowed the rate of desensitization. Protein kinase C (PKC) inhibitors, 1 μM chelerythrine, 100 nM GF109203X and PKC peptide inhibitor (19-36), inhibited the desensitization of TRPC5 activated by 100 μM carbachol. When TRPC5 current was activated by intracellular GTPγS, PKC inhibitors prevented the desensitization. Mutation of T972 to alanine slowed the desensitization process dramatically among 11 mutants. We conclude that the desensitization process of TRPC5 occurs via PKC phosphorylation and threonine at 972 residue might be important for PKC phosphorylation of mouse TRPC5.

Since TRPC channels have calmodulin (CaM) binding sites at their C-termini, we investigated the effect of CaM on mTRPC5. TRPC5 was initially activated by muscarinic stimulation with 50 μM carbachol and then decayed rapidly even in the presence of carbachol. Intracellular CaM (150 μg/ml) increased the amplitude of mTRPC5 current activated by muscarinic stimulation. CaM antagonists (W-7 and calmidazolium) inhibited mTRPC5 currents when they were applied during the activation of mTRPC5. Pretreatment of W-7 and calmidazolium also inhibited the activation of mTRPC5 current. Inhibitors of myosin light chain kinase (MLCK) inhibited the activation of mTRPC5 currents, whereas inhibitors of CaM-dependent protein kinase II did not. However, inhibitors of CaM or MLCK did not show any effect on GTPγS-induced currents. Application of both Rho kinase inhibitor and MLCK inhibitor inhibited GTPγS-induced currents. We conclude that CaM and MLCK modulates the activation process of mTRPC5 without any effect on the desensitization process.

（16）チロシンリン酸化による TRPC チャネルの活性制御

久恒智博（理研・発生神経生物）
黒田有希子，中村健，道川貴章，水谷顕洋（東大医科研・脳神経発生分化）
中村京子，井上貴文（カルシウムオシレーション国際プロジェクト・科技団）
御子柴克彦（理研・発生神経生物，東大医科研・脳神経発生分化，
カルシウムオシレーション国際プロジェクト・科技団）

様々な細胞外刺激は，PLC を活性化し，その結果 TRPC チャネルの活性化を促す事が知られている。しかしながら，TRPC チャネルの詳細な活性制御機構は明らかにされていない。我々は，TRPC6 チャネルが Src ファミリーチロシンキナーゼの一つ，Fyn によりチロシンリン酸化されることを初めて明らかにした。また，EGF 刺激により TRPC6 チャネルのチロシンリン酸化が COS-7 細胞内で増大すること，さらにシングルチャネルレコーデイング法により Fyn による TRPC6 チャネルのチロシンリン酸化がそのチャネル活性を増大させることを明らかにした。現在，我々は，他の TRPC チャネルのチロシンリン酸化の可能性を調べている。

（17）血管緊張度調節における機械刺激による TRPC6チャネル増強作用の生理的役割

井上隆司（福岡大学医学部生理学）
Lars Jorn Jensen，伊東祐之（九州大学大学院医学研究院生体情報薬理学）
森泰生（京都大学大学院工学研究科合成生物）

血管内圧の上昇は，‘myogenic response’と呼ばれる反射性血管収縮反応を引き起こす。本研究では，この反応の分子機序を明らかにする目的で，機械刺激による活性化が報告されている TRPC6 チャネルの制御における血管収縮性メディエーター20-HETE の役割について検討した。

TRPC6 を過剰現した HEK293 細胞にカルバコール(100μM)を投与し，続いて低浸透圧溶液暴露(HTS)による細胞膨張を引き起こすと，受容体活性化陽イオン電流(I_{TRPC6})の振幅は可逆的な増強を示した。HTS による I_{TRPC6} の増強効果は，20-HETE の産生を選択的に阻害することが知られている HET0016(3-10μM)の前投与によってほぼ完全に抑制された。ラット腸間膜動脈第 2，3 分枝の筒状標本内を収縮発生の閾値に近い低濃度のフェニレフリン(0.05-1.0μM)で刺激し灌流内圧を増加させると，myogenic response の著しい増強が観察された。HET00166 (10μM)による前処置は，この myogenic response の増強をほぼ完全に抑制した。

これらの結果は，20-HETE の産生がラット腸間膜動脈の中枢部において，myogenic response を媒介する重要な過程であることを示唆しており，この過程には，交感神経刺激によって既に活性化されている血管の TRPC6 チャネルが，機械刺激によって更に増強されるという，ある種の synergism が重要な役割を果たしていると考えられた。

（18）脳毛細血管内皮細胞における TRP チャネルの生理的機能と SK チャネルとの機能連関

今泉祐治，山崎大樹，山村寿男，大矢進（名古屋市立大学大学院薬学研究科細胞分子薬効解析学）
村木克彦（愛知学院大学薬学部細胞薬理学）
浅井清文（名古屋市立大学大学院医学研究科分子神経生物学）

脳血管内皮細胞において，TRP チャネルは主な Ca^{2+}流入経路として重要な生理的役割を果たしていると推測されている。本研究では，ウシ脳血管内皮不死化細胞(t-BBEC 117)を用い，ATP 刺激に対する反応において作動する TRP チャネルの機能的役割とサブタイプの同定について検討した。ATP 刺激による$[Ca^{2+}]_i$ 上昇には一過性上昇と持続相の 2 相が観察された。細胞外液を Ca^{2+}-free にすることにより消失した持続相には，TRPC3 が寄与していることを示唆する薬理学的な結果を得た。ホールセルクランプ下で ATP により惹起された膜電流は，主に非選択性陽イオンチャネル電流とアパミン感受性の Ca^{2+}活性化 K^+チャネル電流であった。RT-PCR による検討により t-BBEC 117 には TRPC1，TRPC3，TRPM7，SK2，$P2Y_1$，$P2Y_2$ および $P2Y_{12}$ が発現していることが示唆された。結果を総合すると，P2YX 受容体を ATP 刺激することにより，SK2 と TRP チャネル（TRPC3 あるいは TRPC1 と 3 の複合体と推定される）がそれぞれ Ca^{2+}遊離と DAG 産生を介して活性化される。SK2 による細胞の過分極は TRP チャネルを介した Ca^{2+}流入を増幅させ，さらにこれが$[Ca^{2+}]_i$ と SK2 チャネル活性を高く保つと考えられる。t-BBEC 117 細胞の増殖は適当な濃度の細胞外 ATP により促進され，その促進は SK2 チャネルブロッカーにより抑制された。ATP 作用時の SK2 と TRP チャネルの相乗的な機能連関が脳血管内皮細胞増殖を促進させる可能性を示した。

（19）心筋線維化における $G\alpha_{12/13}$ を介した Ca^{2+} シグナリングの役割

西田　基宏（九州大学大学院薬学研究院）

心筋線維芽細胞は，正常心筋細胞における細胞外マトリックスの維持や，障害心筋・不全心筋における線維化や免疫応答のメディエーターとして中心的役割を果たしている。三量体 G_{12} ファミリータンパク質 $G_{12/13}$ は，様々な G protein-coupled receptor と共役し，様々な細胞応答を引き起こす。しかし，心臓における $G_{12/13}$ タンパク質の役割については未だ明らかでない。我々は，$G_{12/13}$ 選択的阻害タンパク（p115-RhoGEF の RGS ドメイン(p115-RGS)）を用いて，アンジオテンシン(Ang) II 受容体刺激による $G\alpha_{12/13}$ 活性化が，Ang II 刺激による活性酸素(ROS)生成および MAP kinase 活性化に関与することを明らかにした。また，心筋線維芽細胞では，Ang II 受容体刺激による $G_{12/13}$ の活性化が，ROS 産生と細胞内 Ca^{2+} 濃度($[Ca^{2+}]_i$)上昇を介して NFAT 活性化を引き起こすことを明らかにした。$G\alpha_{13}$ 活性化による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が SKF96365 処置により完全に抑制されたことから，受容体活性化 Ca^{2+} 透過型チャネルの活性化の関与が示唆された。$G\alpha_{13}$ を介した Ca^{2+} 流入は interleukin-6 の発現誘導に関与していた。一方，心筋特異的に p115-RGS を発現させたマウスでは，大動脈狭窄により惹起されるコラーゲン産生が有意に抑制された。これらの結果は，$G\alpha_{12/13}$ が心臓の線維化応答に関与することを示唆している。

（20）創薬標的としての TRP チャネル

佐野頼方，稲村耕平，岡田英嗣，望月忍（アステラス製薬株式会社，研究本部，分子医学研究所）

イオンチャネルに関する研究は，測定技術の進歩（パッチクランプ法など）や遺伝子クローニングにより飛躍的に進歩してきた。そして現在，ヒトゲノム情報をもとに網羅的なイオンチャネル遺伝子の単離，および解析が行なわれつつある。その結果，イオンチャネルが生体内において重要な生理機能を担っていることが明らかになりつつある。一方，現在医療現場で使用されている治療薬のうちおおよそ 15%はイオンチャネルを標的としていることから，創薬標的分子としてもイオンチャネルが有効であることが期待されている。そこで我々は，イオンチャネル分子の生理機能解明を通して，創薬標的としてのイオンチャネル研究を行っている。イオンチャネルの生理機能解明には，イオンチャネル単体での機能，単離組織における機能，個体レベルでの機能などさまざまな情報を必要とする。この中から，我々は最も単純化された系としてクローン化された遺伝子の機能解析に着目し，創薬標的としてのイオンチャネル研究を行なっている。本研究会では，上記のイオンチャネル研究の中から特に TRP チャネルに着目し，創薬研究標的としての研究結果を報告する。

（21）内皮細胞における膜伸展刺激によって誘発される Ca 放出の分子機構

成瀬恵治（名古屋大学大学院医学研究科・細胞科学講座細胞生物物理学）

伸展刺激に対してヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)は形態変化・タンパク質発現などさまざまな応答をする。我々のこれまでの研究から伸展可能 PDMS（polydimethylsiloxane，シリコーン）膜上に培養した HUVEC に伸展刺激によるカルシウム透過性機械受容(SA)チャネルを介したカルシウム上昇が重要であることが判明した。近年の研究により TRP チャネルが機械受容チャネルの構成成分であることが報告され始めたので，HUVEC における伸展依存性カルシウム上昇に TRPV2 が関与しているかどうかを検討した。TRPV2 を HUVEC の cDNA ライブラリより分離した。COS7 細胞に一過性に発現させると伸展依存性カルシウム上昇が見られ，HUVEC に TRPV2 の siRNA を導入すると伸展依存性カルシウム上昇は抑えられた。以上から，TRPV2 が HUVEC において伸展依存性カルシウム流入に強く関与していることが示唆された。

26. 神経科学の道具としての fMRI 研究会

2005 年 11 月 24 日－11 月 25 日

代表・世話人：Kang Cheng (Laboratory for Cognitive Brain Mapping, RIKEN Brain Science Institute)
所内対応者：定藤　規弘（生理学研究所心理生理学）

（１）Parallel Acquisition Methods in Functional MRI
Matthew Nielsen, Osamu Takizawa (Siemens-Asahi Medical Technologies Ltd., Tokyo, Japan)

（２）SENSE or TSENSE, Which is best for fMRI?
R. Allen Waggoner and Mauro Castagli (RIKEN - Brain Science Institute)

（３）Nonlinear Local Electro-Vascular Coupling
Riera JJ, Wan X, Jimenez JC, Kawashima R (Tohoku University)

（４）Spatial precision of BOLD fMRI: a combined point spread function and modeling study
Ken'ichi Ueno, R. Allen Waggoner, Keiji Tanaka, Kang Cheng
(Laboratory for Cognitive Brain Mapping,RIKEN Brain Science Institute)

（５）Direct demonstration of tuning to stimulus orientation in human V1: a high-resolution fMRI study with a novel stimulation paradigm
Pei Sun, Justin Gardner, Mauro Costagli, Kenichi Ueno, R.Allen Waggoner, Keiji Tanaka, Kang Cheng
(Lab. for Cognitive Brain Mapping, RIKEN Brain Science Institute, Wako-shi, Japan)

（６）Retinotopy analysis of higher order visual areas in humans
Naokazu Goda（生理学研究所感覚認知情報）

（７）A method for evaluation of learning effects within a stimulus-related brain activity during paired-association task
Hiroki C. Tanabe（生理学研究所心理生理学）

（８）MEG/fMRI spatio-temporal source localization method
Okito Yamashita, Masaaki Sato, Taku Yoshioka
（国際電気通信基礎技術研究所　脳情報研究所）

（９）Spontaneous and event related EEG correlates of Fmri
Xiaohong Wan, Jorge Riera, Ryuta Kawashima (NICHe, Tohoku University)

(10) Neural substrates of spontaneous electroencephalographic activity related to the emergence of the hypersonic effect
Manabu Honda[1,2,3]
([1] Department of Cortical Function Disorders,National Institute of Neuroscience,National Center of Neurology and Psychiatry ;
[2] Laboratory of Cerebral Integration,National Institute for Physiological Sciences;
[3] SORST,JST)

（11）Spatial position representation in the human brain revealed by parametric analysisMasaya Misaki,
Satoru Miyauchi, Takashi Abe, and Shigeyuki Kan
(Brain Information Group,National Institute of Information and Communications Technology)

【参加者名】

万　小紅（東北大），Jorge Riera（東北大），Kang Cheng（理研），Matthew Nielsen（シーメンス），Pei Sun（理研），R.Allen Waggoner（理研），磯尾　綾子（理研），上野　賢一（理研），郷田　直一（生理研感覚認知情報），近藤　洋史(NTT)，滝沢　修（シーメンス），田中　靖人（情報通信研究機構），松田　佳尚（理研），三崎　将也（情報通信研究機構），宮内　哲（情報通信研究機構），望月　寛子（産総研），山下　宙人(ATR)，Mauro　Costagli（理研），

野口　泰基（生理研感覚運動調節），定藤　規弘（生理研心理生理），神作　憲司，田邊　宏樹，齋藤　大輔，荒牧　勇，豊田　浩士，田中　悟志，原田　宗子，中下　悟，村瀬　未花，内山　祐司，大塩　立華，牧　陽子，森戸　勇介，酒井　朋子，内山　仁志，間野　陽子

【概要】

This year's Seiriken Kenkyu Kai: fMRI ―A Tool for Neuroscience Research―（平成 17 年度生理研研究会「神経科学の道具としての機能的 MRI 研究会」）was smoothly and successfully conducted on Nov. 24 and 25, 2005 at Seiriken.

The meeting attracted more than 40 attendees from universities and research institutions. Ten speakers (with one cancellation due to family emergency) presented their recent works on methodological aspects of fMRI and related techniques (MEG and EEG), including parallel imaging, electro-vascular coupling, fMRI-constrained source localization for MEG and EEG measuremnts, and novel stimulation paradigms and analysis methods for fMRI studies.

Dr. Matthew Nielson and Dr. Allen R. Waggoner presented their works on parallel imaging. Dr. Nielson examined the effects of parallel acquisition methods on EPI quality and time-series statistics and concluded that due to reduced echo train length using multiple receiving coils, parallel imaging in general helps in reducing geometric distortion. Dr. Waggoner compared two types of parallel imaging reconstruction methods, i.e., SENSE and TSENSE and by making systematic comparisons using data acquired from both auditory and visual experiments concluded that TSENSE is especially useful in the presence of large motions.

Simultaneous measurements of EEG and fMRI continued to attract attentions at the meeting. Dr. Jorge Rieta addressed the issue related to the nonlinear electro-vascular coupling, and presented a detailed biophysical model of how electrical and hemodynamic brain signals are generated within a basic cortical unit. The model explicitly addressed several aspects in relation to EEG and fMRI data fusion. Dr. Xiaohong Wan presented their recent works on simultaneous EEG and fMRI measurements both in spontaneous and event-related activities, and outlined a model interpreting the physiological meaning of fMRI by correlating them with the concurrently recorded stimulus-evoked EEG signals and those recorded during the resting state. In a theoretical study, Dr. Yamashita presented a framework for localizing MEG sources based on fMRI activation patterns.

The inherent limitation of BOLD fMRI's spatial resolution has not been successfully addressed. Dr. Ueno presented their recent works investigating point-spread functions (PSF) of BOLD signal in the tissue region of human V1 using spatially localized and size-varied stimuli. A subsequent modelling study indicated that with the measured PSF of ~1.8 mm, BOLD fMRI can be used for resolving human ocular dominance columns with measure ~1.0mm in width, as has been shown previously. Dr. Sun further presented their recent high-resolution works with a novel stimulation paradigm, showing that the tuning to stimulus orientation in human V1 could be directly demonstrated using BOLD fMRI.

Some interesting activation results were also presented at the meeting. Dr. Goda presented some detailed retinotopic mapping results in higher order visual areas and clearly showed the existence of multiple retinotopic representations around areas V4, V3A and MT. Dr. Tanabe presented a method for evaluating learning effects within a stimulus-related brain activity when the subjects performed a paired-association task. Finally, using a parametric analysis method, Dr. Misaki presented their recent data regarding the spatial position representation in the human occipito-parieto-frontal regions.

In summary, this annual meeting has provided a useful forum for young investigators in the field of functional imaging in Japan to exchange and discuss new ideas. It is strongly felt that the meeting should be continued and a broader range of topics, including neurobiology-related issues, to be covered in the future meetings.

（1）Parallel Acquisition Methods in Functional MRI

Matthew Nielsen, Osamu Takizawa (Siemens-Asahi Medical Technologies Ltd., Tokyo, Japan)

We examine the effects of parallel acquisition methods on echo-planar image quality and time-series statistics as typically used in fMRI. In EPI, one train of RF echoes encodes one 2D image. Without parallel acquisition, the required echo train length is equal to the number of pixels along the phase-encoding axis of the image, and within one echo train, the amplitude of each echo decreases exponentially with time constant T2*. To be maximally sensitive to the BOLD effect while having a high SNR, each echo should occur slightly earlier than T2*. However, images are at least 64x64 pixels, and the time needed to form and sample 64 echoes is typically 30-60ms while T2* in human cerebral cortex is 70-80ms in a homogeneous 1.5T field. Such a long acquisition window relative to T2* means (1) that most of the echoes cannot occur at the optimum point in time, and (2) that k-space is sampled with non-uniform sensitivity causing image blurring. In addition, systematic phase errors accumulated with each echo cause distortion and "N/2 ghost" artifacts, making a shorter acquisition desirable.

Parallel acquisition methods use multiple RF coils with different, overlapping sensitivity profiles to simultaneously receive multiple samples of each echo. Information about the sensitivity profiles is used to combine data from all coils and thereby reduce the number of echoes required to encode an image. In anatomical images, such methods cause a tolerable reduction in SNR, but this reduction does not immediately apply to fMRI.

（2）SENSE or TSENSE, Which is best for fMRI?

R. Allen Waggoner and Mauro Castagli (RIKEN - Brain Science Institute)

Partially Parallel Imaging techniques are having dramatic effects on many areas of MRI. But there are many different methods of acquisition and reconstruction, which works best for fMRI? We compare the traditional SENSE method with TSENSE, a method originally developed for minimizing the motion reconstruction errors in cardiac imaging. Motion effects are also a problem for fMRI, but the magnitude of the motions are not as large as in the case of cardiac imaging. To determine if TSENSE is also beneficial for fMRI, we have collected both SENSE and TSENSE data sets, with various levels of acceleration, during the same experimental session. Both visual and auditory paradigms were used to evaluate the relative performance of SENSE versus TSENSE.

（3）Nonlinear Local Electro-Vascular Coupling

Riera JJ, Wan X, Jimenez JC, Kawashima R (Tohoku University)

In this paper, we present a detailed biophysical model of how electrical and hemodynamic brain signals are generated within a basic cortical unit. The model is obtained from coupling a canonical neuronal mass and an expandable vasculature. In this proposal, we explicitly address several aspects related to electroencephalographic (EEG) and functional magnetic resonance imaging (fMRI) data fusion: a) the impact of the cerebral architecture (at different physical levels) on the observations; b) the physiology involved in electro-vascular coupling; and c) energetic considerations to gain a better understanding of how the glucose budget is used during neuronal activity. The model has three components. The first is the neural mass model of three neuronal sub-populations that responds to incoming excitatory synaptic

currents. The second and third components model the generation of measured electrical and hemodynamic signals respectively. In the first part, we describe, in some detail, the biophysical model and establish its face validity using simulations of visually evoked responses under different luminous contrasts and flicker frequencies. Finally, we will use exactly the same model as a forward or observation model to estimate underlying biophysical parameters using real EEG and fMRI data.

（4）Spatial precision of BOLD fMRI: a combined point spread function and modeling study

Ken'ichi Ueno, R. Allen Waggoner, Keiji Tanaka, Kang Cheng
(Laboratory for Cognitive Brain Mapping,RIKEN Brain Science Institute)

The inherent limitation of BOLD fMRI's spatial resolution has not been sufficiently addressed in relation to the field strength, tissue-vessel compartments and sensory stimuli employed. In this study conducted on a Varian 4 Tesla system, we investigated point spread functions of BOLD signal in the tissue region of human V1 using spatially localized and size-varied stimuli (4°, 2°, 1°, 0.5°, 0.25°and 0.125° in visual angle). For each size, a block of 16s stimulus-on period, in which the stimulus was flashed at 4Hz, and a block of 16s blank period were repeated 14 times. The activation amplitudes for all voxels within the ROI defined by 4° stimulus, calculated as % signal changes between stimulus and blank periods, were then plotted against the geometric distance from the activation center. We found that the activation size decreased gradually as the stimulus size decreased, and the amplitude of the % signal change at the activation center also scaled with the stimulus size. From stimulus size 2° to the smallest size (0.125°), the estimated FWHM of BOLD signal decreased monotonically. The linear fit between FWHMs and stimulus sizes resulted in an intercept of ~1.8mm, which was taken as the estimated point spread. A modeling study in the context of mapping functional architectures using this point spread function was conducted.

（5）Direct demonstration of tuning to stimulus orientation in human V1: a high-resolution fMRI study with a novel stimulation paradigm

Pei Sun, Justin Gardner, Mauro Costagli, Kenichi Ueno, R.Allen Waggoner, Keiji Tanaka, Kang Cheng
(Lab. for Cognitive Brain Mapping, RIKEN Brain Science Institute, Wako-shi, Japan)

Although the preference for stimulus orientations in human visual cortex has been inferred indirectly in a few studies using fMRI, tuning to particular stimulus orientations has not been directly demonstrated using this technique. In an effort towards revealing orientation selectivity and its spatial arrangement in human V1, we have conducted an fMRI study with a novel stimulation paradigm and a differential mapping method. High-resolution (0.625x0.625x3mm) fMRI images were acquired using a 4-segment EPI pulse sequence with a 3-inch surface coil. Two slices (volume TR=2s) were prescribed to cover individual subject's V1 in the banks of the calcarine sulcus. During the experiment, subjects viewed epochs of 36s full-field square-wave gratings sandwiched between 24s blank displays, and performed a color-change detection task on the central fixation point. Each grating rotated continuously in a clockwise direction for 270 deg (15 deg per TR). The gratings started rotation at either 0 or 90 deg, thereby creating two orientation conditions that are orthogonal to each other continuously, each of which was repeated 12 times. After voxels that responded to these grating stimuli were identified, we performed a voxel-by-voxel analysis and calculated the differential response (difference of averaged estimated hemodynamic response functions to the two orthogonal gratings) for the middle 180 deg. We found that

responses of the majority of activated voxels were modulated by the grating's orientation and individual voxels were sharply tuned to particular orientations. Our results, therefore, provide the first demonstration that orientation selectivity in humans can be directly studied using fMRI.

（6）Retinotopy analysis of higher order visual areas in humans

Naokazu Goda（生理学研究所感覚認知情報）

視覚皮質は複数の視覚野から構成されている。このうち，いくつかの視覚野の位置と境界はレチノトピーに基づいて定めることが可能である。このため，fMRI 研究において視覚野間の機能比較の際にレチノトピーに基づく視覚野定義がよく利用される。しかしながら，ヒトの V3 野より高次の視覚野に関してはレチノトピーについてまだ不明な点も多く，それらの位置と境界を fMRI を用いて定めることは容易ではない。この理由には，高次視覚野ではそもそも明瞭なレチノトピーが存在しないこと，使用する視覚刺激が高次視覚野の賦活に適していないこと，レチノトピー及び視覚野地図がヒトとサルの間で大きく違っているためにサルについての電気生理学的知見を援用できないことなどが考えられる。本発表では，現在行っているヒト高次視覚野領域（特に V4 野や V3A 野の周辺部）のレチノトピー解析について報告し，測定・解析手法に関する諸問題について考察する。

（7）A method for evaluation of learning effects within a stimulus-related brain activity during paired-association task

Hiroki C. Tanabe（生理学研究所心理生理学）

To clarify the distribution of the neural substrates and their dynamics during learning, we conducted functional MRI with paired-association learning. We developed a method called whole-brain cross-trial regression analysis to evaluate temporal changes of brain activity. In this seminar, I'll talk on this method in detail, and then show the data applied with this.

In the experiment, subjects had to find pre-defined pairs in a trial and error manner. Each trial consisted of the successive presentation of a pair of stimuli (S1 and S2) with a fixed interval of 1550 ms. Feedback was given by picture whether the response was correct or incorrect to the subjects in each trial. We applied a whole-brain cross-trial regression analysis to investigate the learning effect in the stimulus- or feedback-related neural activity. Briefly, we at first calculated the linear trend (slope) from the 1st to the last trial at each scan point using the least squares method in each and every voxel for each individual. Group inference was then conducted by a one sample t-test using the average of the delay period (5 to 8th scan point) and feedback period (12 to 14th scan point) summary images of each subject, which should represent the recall process for the paired associates and building association, respectively. The results indicate that representation of paired associates might be accomplished by unimodal sensory, polymodal associate, and memory-related areas. The superior temporal sulcus is seemed to be involved in building paired association.

（8）MEG/fMRI spatio-temporal source localization method

Okito Yamashita, Masaaki Sato, Taku Yoshioka
（国際電気通信基礎技術研究所　脳情報研究所）

To clarify the brain function, it is important to know how a certain task is processed by several brain regions involved. MEG is one of the key tools to answer this question due to its high temporal resolution. MEG, however, does not have enough spatial resolution by itself, therefore the spatial information obtained by the other modalities such as fMRI should be combined. In this talk I will present a source localization method of MEG based on fMRI activities, which is now developing in ATR.

（9）Spontaneous and event related EEG correlates of fMRI

Xiaohong Wan, Jorge Riera, Ryuta Kawashima
(NICHe, Tohoku University)

In this presentation, we will talk about our works in simultaneous EEG and fMRI recording, both in spontaneous and event-related activities. Currently, simultaneous EEG/fMRI technique is believed to be most promising to explore the spatiotemporal human brain functions, due to their noninvasive feature. However, there are several technical and theoretical issues to be solved prior to implement this advanced technique into cognitive/psychological neurosciences. Firstly, how to get the clean EEG signals from the noisy data during fMRI scanning? Secondly, how to fuse the two different modalities in one framework? In theoretical consideration, combination of the electrical signals of EEG with the hemodynamic responses of BOLD signals definitely enhances us to understand the nature of functional imaging in terms of physiological basis, because the functional imaging signals are not a direct measure of neural activity, rather, are related to the cerebral energy consumption and blood flow.

In outline, the first part of our presentation will be focused on the technical issues of data analysis, and the later part will be related to the physiological meaning of fMRI signals implicated by correlation with the concurrent EEG signals in stimulus evoked and resting conditions.

（10）Neural substrates of spontaneous electroencephalographic activity related to the emergence of the hypersonic effect

Manabu Honda[1,2,3]
([1]Department of Cortical Function Disorders,National Institute of Neuroscience,National Center of Neurology and Psychiatry;
[2] Laboratory of Cerebral Integration,National Institute for Physiological Sciences;
[3]SORST,JST)

Sounds containing an inaudible high-frequency component (HFC) with non-stationary fluctuation activate deep-lying brain structures and evoke physiological, psychological, and behavioural responses (hypersonic effect). To evaluate the emergence of the hypersonic effect using the electroencephalogram (EEG), we analyzed the regional cerebral blood flow (rCBF) and spontaneous EEG simultaneously measured.

First, to examine the whole neuronal network involved in the emergence of the hypersonic effect, principal component analysis was applied to the rCBF data measured from subjects who were

exposed to full-range sound including both HFC and low-frequency component (LFC) and LFC alone. The activity of the first principal component of rCBF data including the upper brainstem (midbrain), hypothalamus, thalamus, precuneus, prefrontal cortex, and anterior cingulate gyrus was significantly correlated with the alpha2 component recorded from 7 electrodes in the central and parieto-occipital regions. Vice versa, the averaged alpha2 potential obtained from the above 7 electrodes was significantly correlated with the rCBF of deep-lying brain structures. These results show that the alpha2 potential of spontaneous EEG measured from central and parieto-occipital regions is a plausible index of the deep-lying brain activity reflecting the emergence of the hypersonic effect.

（11）Spatial position representation in the human brain revealed by parametric analysis

Masaya Misaki, Satoru Miyauchi, Takashi Abe, and Shigeyuki Kan
(Brain Information Group, National Institute of Information and Communications Technology)

Most fMRI studies to date have linked a predefined function to a specific brain region. However how the brain processes the information had not been defined so much from fMRI activation data. To determine how information is processed in a specific region of the brain, we explored which region was activated and how the task parameters modulated the activation.

In the experiment, which had an event-related design, we explored the spatial position representation in the human brain while the subject tracked a moving point with their eyes. The fMRI data was analyzed using parametric modulation. We used a non-linear regression analysis using an artificial neural network in which the target spatial position was the regression parameters. Viewpoint- and head-centered spatial positions were used to define the regression parameters.

The analyses revealed that the activations of the visual cortices and the dorsal stream areas were systematically modulated depending on the spatial positions of the target. The correspondence between the target position and the activated region was most distinct in the visual cortices, and this correspondence became less distinct from the parietal regions to the premotor regions. Viewpoint- and head-centered representations were intermixed in each region, and it is noticed that head-centered modulations were observed even in the primary visual cortex.