研究活動報告

〔 目　　次 〕

分子生理研究系

神経機能素子研究部門 11
概　要
内耳外有毛細胞のモーター蛋白プレスチンのレコンビナント蛋白の精製と単粒子構造解析
（久保義弘，山本友美，三尾和弘，小椋利彦，佐藤主税）
代謝型グルタミン酸受容体の多様な機能を制御する機構の解明
（立山充博，久保義弘）
KCNE 会合による KCNQ1 チャネル電位センサードメインの調節
（中條浩一，久保義弘）
イノシトールリン脂質による ATP 受容体チャネル $P2X_2$ の脱感作とイオン選択性の調節
（藤原祐一郎，久保義弘）
$P2X_2$ 受容体チャネルの膜電位と ATP 濃度に依存したゲート機構
（藤原祐一郎，Batu Keceli，久保義弘）
内耳外有毛細胞に存在する膜電位作動性モーター蛋白質複合体の同定
（伊藤政之，久保義弘）
カフェインによって活性化される細胞膜上受容体の分子同定
（長友克広，久保義弘，齊藤修）
マウス小脳プルキンエ細胞における平行線維刺激による slow PSCs の lobule 間における差異
（石井裕，久保義弘）
代謝型受容体 mGluR1α および $GABA_BR$ 間の相互作用の異種発現系を用いた研究
（松下真一，立山充博，久保義弘）
分子神経生理研究部門 14
概　要
グリア細胞の発生・分化
（小野勝彦，竹林浩秀，池田和代，西澤匠，池中一裕）
神経幹細胞の生成と維持
（松下雄一，Akhilesh Kumar，村岡大輔，東幹人，成瀬雅衣，池中一裕，等誠司）
神経細胞の移動・軸索ガイダンス
（渡辺啓介，竹林浩秀，西澤匠，池中一裕，小野勝彦）
グリア細胞の異常と精神神経疾患
（李海雄，市原有美，田中久貴，馬堅妹，山田元，田中謙二，東幹人，等誠司，池中一裕）
N 結合型糖鎖の制御
（鳥居知宏，等誠司，Akhilesh Kumar，山田元，伊藤磯子，池中一裕）
細胞内代謝研究部門 17
概　要
力学環境に対する接着構造の応答の分子機構
（平田宏聡，曽我部正博）
破骨細胞におけるプロトン分泌制御機構の研究
（久野みゆき）
ウニ受精時の一酸化窒素 (NO) 増加の役割
（毛利達磨，経塚啓一郎）

神経ステロイドによる海馬シナプス長期増強の誘導機構
（曽我部正博）

細胞器官研究系

機能協関研究部門 19
概　要
アポトーシス誘導時における調節性容積増大(RVI)の抑制
（前野恵美，高橋信之，岡田泰伸）
細胞縮小により活性化されるカチオンチャネルを抑制すると，浸透圧性細胞縮小のみでアポトーシスが誘導される
（清水貴浩，Wehner Frank，岡田泰伸）
持続的細胞縮小はアポトーシス誘導の十分条件である
（温井美帆，清水貴浩，前野恵美，岡田泰伸）
アストロサイトからの虚血/細胞膨張時におけるグルタミン酸放出は二つのアニオンチャネルによってもたらされる
（Liu Hong-tao，Sabirov Ravshan，井上　華，岡田泰伸）
マキシアニオンチャネルの分子実体は VDAC であるという通説は誤りである
（Sabirov Ravshan，Craigen William，岡田泰伸）

生体情報研究系

感覚認知情報研究部門 23
概　要
初期視覚系における輪郭線の折れ曲がりの表現
（伊藤　南，浅川晋宏，Yi Wang）
サル下側頭皮質色選択性ニューロン活動と色知覚の関係
（松茂良岳広，鯉田孝和，小松英彦）
色カテゴリー識別時の視覚野ニューロン活動
（鯉田孝和，小松英彦）
視覚選択における後頭頂連合野の機能的役割
（小川　正，小松英彦）
機能的核磁気共鳴画像法 (fMRI) によるサル視覚皮質における機能地図計測
（郷田直一，原田卓弥，伊藤南，小川正，小松英彦，豊田浩士，定藤規弘）
神経シグナル研究部門 25
概　要
Ca^{2+}/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II による海馬シナプス可塑性の制御
（山肩葉子，井本敬二，小林静香，真鍋俊也，梅田達也，井上明宏，岡部繁男）
皮質視床シナプスによる視床投射細胞への興奮性-抑制性の調節機構
（宮田　麻理子，井本　敬二）
小脳顆粒細胞－介在ニューロン間興奮性シナプス伝達のペアパルス増強
（佐竹伸一郎，井本敬二）
2 種類の同期タイミングを識別する神経回路
（井上　剛，井本　敬二）
Tottering マウスにおける欠神発作と大脳基底核回路との関係
（加勢大輔，井本敬二）

統合生理研究系

感覚運動調節研究部門 27
概　要
視覚性運動情報処理の新しい考え
（金桶吉起）
ヒト視覚野での情報処理の流れ
（乾幸二，柿木隆介）
侵害情報を伝える複数のヒト脊髄視床路の証明
（辻健史，乾幸二，柿木隆介）
触覚による痛覚抑制の皮質機序
（乾幸二，辻健史，柿木隆介）
ヒト聴覚野での階層処理
（乾幸二，軍司敦子，三木研作，柿木隆介）
C 線維信号による脳活動 fMRI 研究
（秋云海，野口泰基，本田学，中田大貴，田村洋平，田中悟志，定藤則弘，王暁宏，乾幸二，柿木隆介）
MEG，ERG 同時計測による初期視覚野活動のタイミングの検討
（乾幸二，山南浩実，三木研作，金桶吉起，柿木隆介）
Go/Nogo 課題における筋出力強度と運動抑制の関係性について
（中田大貴，乾幸二，和坂俊昭，田村洋平，赤塚康介，木田哲夫，柿木隆介）
体性感覚刺激 Go/Nogo 課題における N140 成分の特徴
（中田大貴，乾幸二，和坂俊昭，田村洋平，木田哲夫，柿木隆介）
体性感覚刺激を用いた二点識別時の自動的検出機構
（赤塚康介，和坂俊昭，中田大貴，木田哲夫，寶珠山稔，田村洋平，柿木隆介）
自発的足関節背屈の運動準備における脛骨神経刺激 SEP の変動
（和坂俊昭，木田哲夫，中田大貴，柿木隆介）
ヒトの時間感覚の形成メカニズム
（野口泰基，柿木隆介）
母語と第二言語の視覚形態処理に関する MEG 研究
（井原綾，柿木隆介）
4-6 歳児における 1 年間の音楽訓練が聴覚誘発脳磁反応の発達に影響することがわかった
（藤岡孝子，柿木隆介）
静脈注射による嗅覚関連脳磁図の周波数解析
（宮成愛，柿木隆介）
ランダムドットブリンキングを用いた顔認知に関連する誘発脳波
（三木研作，渡辺昌子，竹島康行，照屋美加，本多結城子，柿木隆介）
バックワードマスキング現象の視覚誘発脳磁場反応
（橋本章子，渡辺昌子，乾幸二，宝珠山稔，村瀬澄夫，柿木隆介）
生体システム研究部門 33
概　要
上肢到達運動課題実行中の淡蒼球ニューロンの活動様式
（畑中伸彦，高良沙幸，橘吉寿，南部篤）
抗てんかん薬ゾニサミドがパーキンソン症状を改善するメカニズムを探る
（橘吉寿，南部篤，岩室宏一）
ジストニアの病態に関する研究－DYT1 トランスジェニックモデルマウスにおけるニューロン活動の記録
（知見聡美，南部篤，Pullanipally Shashidharan）

大脳皮質機能研究系

脳形態解析研究部門 35
概　要
グルタミン酸受容体のシナプス内分布様式とそれらのシナプス伝達へ与える影響
（足澤悦子，深澤有吾，松井　広，重本隆一）
小脳運動学習の記憶痕跡
（王文，馬杉－時田美和子，Andrea Lörincz，深澤有吾，重本隆一）
海馬における長期増強現象とグルタミン酸受容体の局在変化
（深澤有吾，重本隆一）
樹上突起スパイン内アクチン細胞骨格系の可視化
（深澤有吾）
海馬 NMDA 受容体局在の左右差
（篠原良章，川上良介，重本隆一）
タグ導入による $GABA_A$ 受容体の電子顕微鏡的定量法
（Mate Sümegi，深澤有吾，重本隆一）
$GABA_B$ 受容体とカリウムチャネルの棘突起特異的共存
（Akos Kulik，深澤有吾，重本隆一）
前脳基底核と黒質－線条体ドーパミン系の電気生理学的および形態学的解析
（籾山俊彦）
シナプス-グリア複合環境の動的変化による情報伝達制御
（松井　広）
大脳神経回路論研究部門 39
概　要
皮質棘突起への抑制性と興奮性入力の二重支配
（窪田芳之，畑田小百合，川口泰雄）
皮質回路における発火パタンに依存した結合回路
（大塚岳，川口泰雄）
前頭皮質 5 層錐体細胞の皮質下構造に依存した機能分化
（森島美絵子，川口泰雄）
アセチルコリン作用の GABA 細胞サブタイプ依存性
（Allan G. Gulledge，川口泰雄）
大脳皮質非錐体細胞への抑制性シナプス入力と興奮性シナプス入力の割合
（関川明生，窪田芳之，川口泰雄）
心理生理学研究部門 41
概　要
人物の多様式表象と adaptation
（杉浦　元亮，間野　陽子，佐々木　章宏，定藤　規弘）
対連合学習を成立させるための神経基盤の解析
（田邊　宏樹，定藤　規弘）
自己顔評価に関わる神経基盤
（守田知代，板倉昭二，定藤規弘）
「自分に対する良い評判を獲得しようとする動機」の神経基盤に関する研究
（出馬圭世，齋藤大輔，定藤規弘）
同側第一次運動野における非対称な運動頻度依存的活動抑制
（林正道，齋藤大輔，荒牧勇，浅井竜哉，藤林靖久，定藤規弘）
物語理解における感情変化の検出の神経基盤
（米田英嗣，齋藤大輔，楠見　孝，定藤　規弘）

他者の感情を認知する際の視点取得に関わる神経基盤の解明
（間野陽子，原田宗子，齋藤大輔，杉浦元亮，定藤　規弘）
NIRS と fMRI の同時計測を用いた BOLD 応答の非線形性の由来に関する検討
（豊田　浩士，定藤　規弘）

発達生理学研究系

認知行動発達機構研究部門 44
概　要
随意運動の制御におけるシナプス前抑制の役割
（関　和彦，武井　智彦）
第一次視覚野損傷サルの残存視覚運動変換機能とその神経生理
（吉田 正俊，伊佐 正）
黒質網様部から上丘中間層 GABA 作動性ニューロンへの抑制性入力
（金田勝幸，伊佐かおる，伊佐正）
$GABA_B$受容体を介する上丘でのバースト発火制御機構
（金田勝幸，伊佐かおる，伊佐正）
把握運動に関与する脊髄ニューロンの役割　−フィールド電位を用いた解析−
（武井　智彦，関　和彦）
The origin of spreading burst activities in the local circuit of the superior colliculus
(Penphimon Phongphanphanee，Tadashi Isa)
生体恒常機能発達機構研究部門 46
概　要
発達期における神経伝達物質のスイッチング
（鍋倉淳一，西巻拓也，山口純弥）
細胞内 Cl^- 制御機構 KCC2 による GABA の興奮－抑制スイッチと分子機構の解明
（鍋倉淳一，渡部美穂，北村明彦，和氣弘明，堀部尚子）
カンナビイドによる海馬抑制性伝達調節
（前島隆司）
クリプトンーYAG レーザーを用いた脳虚血障害モデル動物作成技術の開発
（鍋倉淳一，和氣弘明，堀部尚子）
In Vivo 多光子顕微鏡を用いた大脳皮質神経細胞の微細構造の可視化と長期可塑性の変化
（鍋倉淳一，和氣弘明，高鶴裕介，稲田浩之）
グリアの生体内動態の観察
（鍋倉淳一，和氣弘明，高鶴裕介，稲田浩之）
生殖・内分泌系発達機構研究部門 49
概　要
AMP キナーゼによる生体エネルギー代謝の調節機構の解明
（箕越　靖彦，岡本　士毅，志内　哲也，田中　智洋，益崎　裕章，窪田　直人，門脇　孝）
レプチン，神経ペプチド，BDNF による糖・脂質代謝調節機構の解明
（箕越　靖彦，志内　哲也，李　順姫，斉藤　久美子）
脂肪酸酸化を促進するレプチン・シグナル伝達機構の解明
（箕越　靖彦，鈴木　敦）
AMP キナーゼ・ファミリー，ARK5 による代謝調節作用の解明
（箕越　靖彦，鈴木　敦）

脳機能計測センター

形態情報解析室 52
概　要
小腸絨毛上皮下線維芽細胞の中間系フィラメント
（古家　園子）
超高圧電子顕微鏡 (H-1250M：1,000kV) 像における磁界型レンズのヒステリシス効果
（有井達夫）
機能情報解析室 53
概　要
意志に関係する脳活動の研究
（遠本　徹）
生体情報解析室 53
概　要

行動・代謝分子解析センター

遺伝子改変動物作製室 55
概　要
リコンビナーゼで被覆した EGFP 遺伝子はラットゲノムに導入されやすいか？
（平林 真澄，加藤 めぐみ，金子 涼輔）
マウス精巣内でラット精原細胞から分化した精子細胞の正常性
（平林 真澄，加藤 めぐみ，篠原 隆司）
ラット卵子の自発的活性化機構における Mos-MEK-MAPK 経路の役割
（伊藤 潤哉，加藤 めぐみ，平林 真澄）
大脳皮質第一次視覚野上に存在する遠近感の知覚に必須の機能ユニット
“眼優位カラム”の発達形成メカニズムの解明に向けて
（冨田　江一，三宝　誠，山内　奈央子，平林 真澄）

統合バイオサイエンスセンター

時系列生命現象研究領域 57
概　要
電位感受性ホスファターゼ Ci-VSP の分子作動原理の解析
（村田喜理，岩崎広英，Mohammad Israil Hossain，黒川竜紀，東島眞一，岡村康司）
電位依存性プロトンチャネル分子の同定と分子機能の解析
（佐々木真理，大河内善史，黒川竜紀，高木正浩，岡村康司）
ゼブラフィッシュを用いた，脊髄神経回路網の解析
（木村有希子，佐藤千恵，東島眞一）
尾索動物オタマジャクシ型幼生の運動機能に関わるイオンチャネル関連分子の総括的解析
（西野敦雄，岡村康司）

戦略的方法論研究領域 60
概　要
位相板用炭素薄膜の材料科学的研究
（Radostin Danev，重松 秀樹，大河原 浩，永山 國昭，宇理須恆雄）
Aharonov-Bohm 効果を応用した位相差電子顕微鏡の開発
（安田 浩史，大河原 浩，永山 國昭）

DNA/RNA 塩基配列の電子顕微鏡 1 分子計測法の開発
（喜多山　篤，大河原 浩，永山國昭，片岡正典）
膜タンパク質の単粒子解析
（重松 秀樹，Radostin DANEV，曽我部 隆彰，永山 國昭，清中 茂樹，森 泰生）
超高圧電子顕微鏡による位相差像観察
（新田 浩二，重松 秀樹，Radostin Danev，永山 國昭，Sang-Hee Lee，Young-Min Kim）
種々の漢方薬の潅流ラット顎下腺に対する水分泌促進作用
（村上政隆，魏　睦新，丁　煒）
In vitro および In vivo における分泌唾液蛋白の相違
（村上政隆，大河原浩，Massimo Castagnola，Chiara Fanali，Rosanna Inzitari，Irene Messana，Alessandro Riva，Felice Loffredo, Francesca Testa-Riva，Jörgen Ekström）
顕微質量分析装置の開発
（瀬藤光利，早坂孝宏，新間秀一）
翻訳後修飾による細胞内輸送制御の研究
（瀬藤光利，早坂孝宏，新間秀一，池上 浩司，松本 峰男，矢尾育子）
エンドソームーゴルジ細胞内膜系の選別輸送のメカニズムと生理機能
（大橋正人）

生命環境研究領域 65
概　要
表皮 TRPV4 の結合蛋白質の解析
（東智広，曽我部隆彰，福見知子，富永真琴）
TRPV4 の体温制御機構への関与の解析
（稲田仁，柴崎貢志，福見知子，富永真琴）
表皮ケラチノサイトから感覚神経への温度情報伝達のメカニズムの解析
（Sravan Mandadi，曽我部隆彰，柴崎貢志，福見知子，富永真琴）
表皮ケラチノサイトにおける TRPV4 の生理機能の解析
（曽我部隆彰，富永真琴，福見知子）
海馬における TRPV4 の機能解析
（柴崎貢志，富永真琴）
TRPM2 のインスリン分泌への関与の解析
（川端二功，稲田仁，森泰生，富永真琴）
発達期脊髄領域における温度感受性 TRP チャネルの発現と機能
（村山奈美恵，柴崎貢志，富永真琴）
免疫系細胞における温度感受性 TRP チャネルの発現・機能解析
（稲田仁，富永真琴）
ショウジョウバエ painless チャネルの温度感受性解析
（曽我部隆彰，門脇辰彦，富永真琴）
PKD2L1/PKD1L3 複合体による酸味受容
（稲田仁，石丸喜朗，松波宏明，富永真琴）
mDia 結合タンパク質の探索と機能解析
（島貫恵実，福見知子）
神経回路形成における mDia を介する情報伝達経路の役割
（島貫恵実，柴崎貢志，福見知子）

動物実験センター 69
概　要

計算科学研究センター 71
概　要
核酸塩基識別子の設計と合成
（片岡正典，永山國昭）
ユニバーサル核酸の創生
（片岡正典）
全塩基修飾型核酸標識法
（片岡正典）

技術課 73
1．概　要
（大庭明生）
2．施設の運営状況
①統合生理研究系
(1) 生体磁気計測装置室
（永田　治）
②脳機能計測センター
(1) 形態情報解析室
（山口　登）
(2) 機能情報解析室
（佐藤　茂基）
(3) 生体情報解析室
（吉村伸明，村田安永）
③生理研・基生研共通施設
(1) 電子顕微鏡室
（前橋　寛）
(2) 機器研究試作室
（加藤勝己）
④動物実験センター（岡崎共通研究施設）
（佐治俊幸，廣江猛，窪田美津子，小池崇子）

分子生理研究系

神経機能素子研究部門

【概要】

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

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

内耳外有毛細胞のモーター蛋白プレスチンのレコンビナント蛋白の精製と単粒子構造解析

久保義弘，山本友美
三尾和弘，小椋利彦，佐藤主税（産総研，脳神経情報）

内耳外有毛細胞は，膜電位変化に伴い伸縮しその細胞長を変える。10kHz 超という驚異的に高速の膜電位変化にまで細胞長伸縮が追従するため，その機構は長く関心の的であった。2000 年に，膜電位を細胞長に変換する分子としてプレスチンが同定された。我々は，将来的にプレスチンの状況依存的構造変化を解析することを視野にいれ，単粒子構造解析法による構造解析に着手した。

まず，プレスチンの C-末端に FLAG tag を付加したコンストラクトを作成し，バキュロウイルスベクターに組み込み，昆虫細胞 Sf9 に感染させた。膜画分を回収し，FLAG 抗体によるアフィニティ精製と，ゲル濾過により精製を行った。ゲルろ過における elution profile のマーカー蛋白との比較，および非変性ゲルを用いた電気泳動の結果から，プレスチン蛋白が 4量体であることが示唆された。精製産物のピーク分画を用い，酢酸ウランにより負染色して電顕撮影したところ，単一蛋白粒子像が観察された。量体数に関する仮定を含めずに，最初の数ラウンドの解析を進めたところ，4 量体に最もよく合致する結果が得られた。 4 量体であるという仮定を取り入れて 3 次元像の解析を行った結果，77 x 77 x 115Å の弾丸のような形状をしていることが明らかになった。さらに，細胞内領域に付加した FLAG tag に対する抗体の結合の様子から, 弾頭側が細胞外側を向いていることが示された。

代謝型グルタミン酸受容体の多様な機能を制御する機構の解明

立山充博，久保義弘

代謝型グルタミン酸受容体 1 型(mGluR1)は，記憶や学習に関係する「神経回路の可塑性」に重要な役割を担い，

複数の G 蛋白質(Gs，Gq，Gi)と共役して多様な細胞応答をもたらす。これまでに mGluR1 を介するシグナリングの多様性が，受容体の活性型構造の差異により制御されることを報告したが，今年度，さらに，細胞骨格蛋白質の一種である 4.1G 蛋白質との会合によっても制御されることを見出した。これは，4.1G との共発現により mGluR1 の Gs 経路活性化が有意に抑制されたが，Gq 経路の応答は抑制されなかったという結果から得られた知見である。また，mGluR1 と相互作用することが知られている homer1c 蛋白質では，このような作用が見られなかったことから，特異的な制御機構であると考えられる。さらに，mGluR1 の C 末端遠位にある負電荷アミノ酸残基クラスターが会合に重要であることも解明した。現在，シグナリングの多様性に対して受容体 C 末端の果たしている役割について研究を進めている。

KCNE 会合による KCNQ1 チャネル電位センサードメインの調節

中條浩一，久保義弘

KCNQ1 は電位依存性の K^+チャネルであり，そのゲーティングの性質は補助サブユニットの KCNE ファミリーの存在によって大きく変化する。我々はヒト KCNQ1 遺伝子の S4 ドメインの A226 にシステイン変異を導入し，電位センサーの動きが KCNE1 または KCNE3 存在下で変化するかどうか解析を行った。システインを修飾する化学物質 MTSET または MTSES を，A226C チャネルが発現するアフリカツメガエル卵母細胞に投与し，その修飾の速度から電位センサーの動きを解析した。その結果，KCNE1 が共発現することで，KCNQ1 チャネルの電位センサーの動きがおよそ 13 倍遅くなっていることを見出した。また KCNE3 が共発現することで電位センサーはつねに上に（細胞外に向かって）上がったままになっていることも見出した。電位センサーの動きが KCNE によって調節されるという今回の結果は，KCNE による KCNQ1 電流の修飾のメカニズムを解明するにあたって，重要な知見となるものである。

イノシトールリン脂質による ATP 受容体チャネル $P2X_2$ の脱感作とイオン選択性の調節

藤原祐一郎（現カリフォルニア大学サンフランシスコ校），久保義弘

イノシトールリン脂質 (PIPn) は，種々のイオンチャネルの活性を制御することが知られている。我々は，ATP 受容体チャネル $P2X_2$ もまた PIPn によって調節を受けることを明らかにし，さらに，その構造基盤にアプローチすると共に，活性調節とポアの拡大現象との連関について解析した。ツメガエル卵母細胞を発現系として用いた 2 本刺膜電位固定法による電気生理学的解析において，PI3 kinase のブロッカーは，$P2X_2$ チャネルの脱感作を加速した。また，C 末端細胞内部の膜貫通部位直下領域（近位細胞内領域）に存在する陽電荷を持ったアミノ酸残基の点変異 K365Q, K369Q によっても，脱感作は加速した。さらに，ATP 投与後，N-methyl-D- glucamine (NMDG) に対する透過性が一時的に増加し，その後，脱感作の進行に伴って減少すること，その減少速度が，PI3 kinase のブロッカー，および上記点変異により加速することを観察した。また，近位細胞内領域のレコンビナント蛋白を用いた解析により，ニトロセルロース膜上での PIP および PIP_2 に対する結合が確認された。さらに近位細胞内領域に EGFP を付加して培養細胞に発現させた実験により，この領域が細胞膜に結合していることが観察された。以上の結果から，細胞膜に存在する PIPn が，$P2X_2$ チャネル C 末端の近位細胞内領域の陽電荷に富む領域に，静電的相互作用によって結合することによって，チャネル活性の維持とイオン選択性の調節に重要な役割を果たしていることが示唆された。

$P2X_2$ 受容体チャネルの膜電位と ATP 濃度に依存したゲート機構

藤原祐一郎（現カリフォルニア大学サンフランシスコ校），Batu Keceli，久保義弘

P2X は細胞外 ATP によって活性化されるイオンチャネルである。電位センサーと考えられるような電荷を有するアミノ酸残基のクラスターはないため，膜電位依存性を持つチャネルとは認識されていない。

我々は，ツメガエル卵母細胞を発現系として用い，二本刺し膜電位固定下で，ATP 投与後の定常状態における $P2X_2$ チャネル電流と膜電位との関係を定量的に解析した。脱分極電位から過分極電位へのパルス刺激を与えた時，緩徐な内向き電流の活性化相が見られた。この活性化は，より高い脱分極電位に，より長く保持した時に，より顕著にみられた。このことから，膜電位に依存したゲート機構が存在し，過分極電位で開きやすいことが明らかになった。この活性化相は，細胞外の ATP 濃度に依存性を示し，ATP 濃度が低い時は活性化が遅く，高い時は速かった。すなわち，ATP 投与後の定常状態において，$P2X_2$ チャネルは膜電位と ATP 濃度に依存する「ゲート」機構を持つことが新たに示された。

この機構の詳細を明らかにするために，ATP 結合部位，および，膜貫通部位のアミノ酸残基を変異させた変異体を作成し，現在，その機能解析を進めている。

内耳外有毛細胞に存在する膜電位作動性モーター蛋白質複合体の同定

伊藤政之，久保義弘

プレスチンは，外有毛細胞に特異的に発現している SLC26 陰イオントランスポーターファミリーに属する蛋白である。プレスチン内部に抱え込まれた Cl^- が膜電位依存的にプレスチン分子内を translocate して分子の“カサ”が変化することが，外有毛細胞における膜電位-細胞長変換機構であると提唱されているが，その実態の真の理解にはまだほど遠い。我々は，プレスチンと相互作用し，内耳外有毛細胞内で膜電位作動性モーター蛋白質複合体を形成する分子群の同定を目指している。今年度，tag を付加した組換え蛋白を用いたプルダウン産物の 2 次元電気泳動法を用いた解析を進めたが，決定的な結合分子の同定には至らなかった。今後，本手法による解析を継続すると共に，酵母 2 ハイブリット法により，結合分子の探索を進める計画である。

カフェインによって活性化される細胞膜上受容体の分子同定

長友克広，久保義弘
齊藤修（長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部）

カフェインは，コーヒー等に含まれるキサンチン誘導体物質で，生体に対しては，中枢神経系の覚醒作用，筋の収縮作用，利尿作用等を示す。その作用機序として，覚醒作用に関しては，アデノシン受容体に阻害剤として作用してその機能を抑制することが，筋収縮については，細胞内 Ca^{2+} ストアのリアノジン受容体に作用し Ca^{2+} 放出を起こすことが，利尿作用に関しては，細胞内 phospohdiesterase を抑制することが，それぞれ想定されている。

我々は，これまでに，機能解析の実験結果に基づいて小腸上皮細胞 STC-1 の細胞膜上にカフェインに対する受容体が存在することを見いだした。この知見は，カフェインが，既知のものと全く異なる新しい作用機序を持つ可能性を示唆するものである。

今年度，我々は，分子実態を明らかにする目的で，カフェインに対する細胞膜上受容体をコードする cDNA を，

卵母細胞を発現系として用いる機能発現法によりクローン化する実験を開始した。Gq 応答を引き起こす新規の代謝型受容体を念頭にスクリーニングを行ってきたが，これまでのところ，単離には至っていない。今後，代謝型受容体以外の可能性も視野に入れて，スクリーニングを継続する計画である。

マウス小脳プルキンエ細胞における平行線維刺激による slow PSCs の lobule 間における差異

石井裕，久保義弘

代謝型グルタミン酸受容体 1 型(mGluR1)は小脳プルキンエ細胞における運動学習やシナプス可塑性に必要である。平行線維刺激は mGluR1αを介して 2 つのシグナル経路を活性化することが知られている。1 つは G_q 経路であり，1 つは slow なシナプス後電流(sPSC)である。小脳は 10 個の lobule からなり，lobule 間によって機能に差があることが明らかとなってきている。我々は，出生後 14-17 日の矢状断スライスを用いて，lobule 間で sPSC が異なっていることを見いだした。AMPA 受容体と $GABA_A$ 受容体の阻害剤存在下でプルキンエ細胞から whole-cell patch 法により電流記録を行った。平行線維の高頻度刺激により lobule 9 では一過性の内向き電流が観察された。Lobule 10 の一過性の内向き電流は，lobule 9 よりもピークに達するまでの時間が長く，電流量は小さかった。また，内向き電流に先立ち，一過性の外向き電流が観察された。これらのことから，プルキンエ細胞における平行線維刺激による sPSC は少なくとも lobule 9 と 10 で異なっていることが示唆された。

代謝型受容体 mGluR1αおよび $GABA_BR$ 間の相互作用の異種発現系を用いた研究

松下真一，立山充博，久保義弘

近年，小脳プルキンエ細胞において代謝型受容体である mGluR1 と $GABA_BR$ 間の相互作用が報告されている。mGluR1 のグルタミン酸感受性が細胞外 Ca^{2+} により増強されダイナミックレンジが拡大することが見出された。その後，この Ca^{2+} の作用が $GABA_BR$ 阻害剤によりブロックされ，$GABA_B1R$ ノックアウトマウスにおいては消失し，細胞外 Ca^{2+}による mGluR1 のグルタミン酸感受性増強が $GABA_BR$ を介して起きていることが報告された。我々は，まず，既に報告のある小脳からの両受容体の免疫共沈を HEK293T 細胞系で再現することを試みた。その結果，2 種のサブユニット GB1a/GB1b および GB2 のヘテロダイマーから成る $GABA_BR$ は, 両サブユニットが存在するときのみならず，GB1a/GB1b または GB2 単独の場合でも mGluR1αと免疫共沈することが判った。これらのサブユニット間の相互作用による細胞膜上発現レベルの変化を明らかにするために，細胞外領域に対する抗体を用いた免疫染色による解析を進めている。

分子神経生理研究部門

【概要】

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

脳神経系では他の組織とは異なり多様性が大である。大げさに言えば，神経細胞は一つ一つが個性を持っており，そのそれぞれについて発生・分化様式を研究しなければならない程である。また，均一であると考えられてきたグリア細胞にも性質の異なる集団が数多く存在する

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

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

糖蛋白質糖鎖の解析法を開発し極めて微量な標品から構造解析可能となった。脳内において，新しい糖鎖構造を発見し，その生理学的意義について検討している。

グリア細胞の発生・分化

小野勝彦，竹林浩秀，池田和代，西澤匠，池中一裕

Olig2 は，運動ニューロン，オリゴデンドロサイトの発生に必須の分子である。前脳，間脳，脳幹など，さまざまな領域における Olig2 陽性前駆細胞の時期特異的な細胞系譜解析を行った。前脳では，比較的遅い時期（胎生 14 日頃）まで，ニューロンを生み出す Olig2 陽性細胞が存在することが明らかとなった。前脳 Olig2 陽性細胞は，GABA ニューロンとコリナージックニューロンに分化すること，そして，胎生後期以降の前脳 Olig2 陽性細胞は，おもにアストロサイトに分化することが明らかとなった。脳幹の Olig2 陽性細胞は，運動ニューロンのみならず，セロトニンニューロンにも分化することが示され，Olig2 陽性細胞の分化多様性が明らかとなりつつある。

アストロサイトにも，発生する場所に応じて，ニューロンと同様に様々サブタイプがある可能性を想定し，アストロサイトの多様性についての解析も進めている。

神経幹細胞の生成と維持

松下雄一，Akhilesh Kumar，村岡大輔，東幹人，成瀬雅衣，池中一裕，等誠司

神経幹細胞は全ての神経細胞・グリア細胞の供給源であり，脳の構築に非常に重要であるにもかかわらず，その生成の分子機構は不明な点が多い。本グループは早期胚の epiblast において神経幹細胞の前駆細胞である未分化神経幹細胞の培養に成功し，神経幹細胞の誘導に Notch シグナルの活性化が必須であることを解明した。今後もさらに，未分化神経幹細胞の誘導機構の解明を進める。そこで得られた知見を ES 細胞に適応し，試験管内での ES 細胞から神経幹細胞の誘導を試みる。一方，神経幹細胞は成体脳においても一部の領域（海馬や嗅球など）に新生神経細胞を供給し，脳機能維持に必要であることが示唆された。特に，海馬における神経新生は，記憶や学習といった脳の高次機能と関係する可能性が指摘されている。本グループでは，成体脳における神経幹細胞を減少させる因子としてストレスに注目し，ストレスが神経幹細胞の自己複製能を低下させるメカニズムの解明を進めている。また，抗うつ薬や気分安定薬などの向精神薬が神経幹細胞の減少を回復させる可能性を示唆するデータを得ており，そのメカニズムも含めて今後も精力的に解析していく。

神経細胞の移動・軸索ガイダンス

渡辺啓介，竹林浩秀，西澤匠，池中一裕，小野勝彦

脊髄の組織構築形成をモデルとして，回路網形成と細胞移動の制御機構を解析した。まず，一次求心性線維の脊髄内における回路網形成において，脊髄背外側部で一過性に発現する netrin 1 が抑制的に作用して waiting period を形成することを明らかにし報告した (Watanabe et al. Development, 2006)。ついで，脊髄背側部に由来するニューロンの腹側方向への移動のメカニズムに注目した。*Olig3-lacZ* ノックインマウスを用いて，LacZ 陽性細胞を指標としてその移動を可視化した。さらに脊髄形成異常を呈する変異マウス（Netrin 1, DCC, Gli2 などの欠損マウス）との交配により，背側部に由来する細胞の移動への影響を解析した。その結果，脊髄腹側部に発現する netrin 1 と移動細胞で発現する受容体 DCC の作用により，誘因性に移動が制御されていることを見出した。

グリア細胞の異常と精神神経疾患

李海雄，市原有美，田中久貴，馬堅妹，山田元，田中謙二，東幹人，等誠司，池中一裕

脱髄モデルマウスである PLP トランスジェニックマウス(PLPTg)は，2 ヶ月齢までに一度髄鞘がほぼ正常に形成され，Na^+チャネル，K^+チャネルはそれぞれ正常にクラスタリングする。5 ヶ月齢頃から脱髄が始まり，K^+チャネルのクラスタリングが崩れはじめ，8 ヶ月齢までに Na^+チャネルのクラスタリングも崩壊していく。中枢神経において跳躍伝導速度の低下が顕在化するが一般の運動能力は低下していない 2-4 ヶ月齢の PLPTg マウスを用い，京都大学・宮川剛博士と共同で詳細な行動解析を行ったところ，バーンズ迷路で参照記憶の障害があることが判明した。今後この行動変化の細胞･分子基盤の解析を進める。

一方アストロサイトの障害モデルとして，Alexander 病の原因遺伝子である変異 GFAP を発現するトランスジェニックマウスを作出した。Alexander 病の病理の特徴である GFAP 凝集体は，変異 GFAP がわずか 30%過剰発現するだけで形成されることが明らかになった。GFAP 凝集体の存在は内在 GFAP の発現を増加させ，別の中間径フィラメントであるネスチンを誘導したが，正常な中間径フィラメントを形成することなく凝集体にとり込まれていた。このモデルマウスでは海馬 CA1 の LTP が形成されやすいことや，カイニン酸全身投与でけいれんを起こしやすいことなど，神経回路異常を窺わせる変化が認められる。アストロサイトの細胞骨格異常が神経回路異常にどのように関与するのか，さらにこれが Alexander 病の病態生理にどのように関与するのか検討していく予定である。

N 結合型糖鎖の制御

鳥居知宏，等誠司，Akhilesh Kumar，山田元，伊藤磯子，池中一裕

すべての細胞表面は糖鎖で覆われており，細胞間相互作用やシグナル伝達に深く関わっている。これまでに我々は (1)マウス，ヒト脳内に発現する糖鎖の割合は高い類似性示すこと，(2)脳内糖鎖発現パターンは個体発生の各時期で劇的に変化すること，(3)いくつかの糖鎖の発現量が顕著に変化することを明らかとした。本年度は詳細な解析方法である 3D-HPLC でシアル酸付加糖鎖の構造解析を行い，大脳皮質の発達過程において劇的に変化するシアル酸糖鎖を同定した。その糖鎖は新規の構造であった。また，質量分析計を同定に組み込み，検出感度の上昇を図った。

細胞内代謝研究部門

【概要】

細胞が刺激に対し適切に応答する細胞シグナリング機構の解明は命の謎と進化を解く鍵である。本部門では，電気生理学と先端バイオイメージングを用いてイオンチャネルや細胞内シグナル分子の動態を測定し，細胞応答に至るシグナルネットワークの時空間統御機構の解明を目指している。特に細胞の機械刺激受容/応答機構（細胞力覚機構）の解明を中心課題に設定して，細胞運動における機械シグナリングの役割，あるいは機械刺激に対する細胞骨格や接着斑の応答機構を調べている。また，受精機構について Ca^{2+} 動態を中心に解析している。さらに，シナプス可塑性に対する神経ステロイドの調節作用の分子機序についても研究を始めている。

力学環境に対する接着構造の応答の分子機構

平田宏聡
曽我部正博

繊維芽細胞などの接着性細胞は，接着斑と呼ばれる超分子構造によって細胞外基質と接着する。接着斑では，細胞外基質の受容体であるインテグリンが，クラスターを形成し，多様な細胞質タンパク質の集積を介してアクチン骨格と結合している。接着斑におけるインテグリンーアクチン骨格間の結合強度は細胞内外の力学的環境に応じて変化するが，その分子機構は不明なままである。接着斑ではアクチンの重合が盛んであり，接着斑における F-アクチン量の調節はインテグリンーアクチン骨格間結合強度の調節に重要であることが想像される。そこで我々は，力学的負荷が接着斑でのアクチン重合に及ぼす効果について調べた。その結果，力学的負荷により接着斑におけるアクチン重合活性は高まること，また，このアクチン重合活性の増加には，アクチン調節関連タンパク質 zyxin の接着斑への力学的負荷依存的な集積が関わっていることが明らかとなった。

破骨細胞におけるプロトン分泌制御機構の研究

久野みゆき

破骨細胞は骨と接する細胞膜（波状縁）からプロトンや蛋白分解酵素を分泌し骨基質を溶解する。プロトン分泌の主体であるポンプ (Vacuolar-type H^+-ATPase: V-ATPase) は 13 種のサブユニットから構成される複合分子である。ポンプ電流はチャネル電流に比べ小さく，native 細胞から検出するのは容易ではないが，培養破骨細胞を用いて，さまざまな条件下で V-ATPase のプロトン分泌能をリアルタイム定量することが可能となり，破骨細胞機能のネガティブフィードバックシグナルとなる細胞外カルシウムが V-ATPase 電流を抑制することが証明できた。V-ATPase は細胞内ライソゾーム膜から細胞膜にリクルートされ，また細胞膜から再度取り込まれる。この Exocytosis・endocytosis の過程やサブユニットの集合・解離が Ca による抑制機構に関わるかどうかを現在検討している。

ウニ受精時の一酸化窒素(NO)増加の役割

毛利達磨
経塚啓一郎（東北大（附）浅虫海洋生物学研究センター）

受精時のウニ卵ではカルシウム増加と同様に一酸化窒素(NO)の増加も起こるが，その機能やシグナル伝達についてはまだほとんどわかっていない。NO 増加と内外のイオンの関係を調べるために電位固定法と NO 感受性蛍光色素によるイメージングの同時測定を行った。NO 増加は受精の最初のシグナルではなく細胞内カルシウム増加のピークの直後に増加することがわかった。次に「NO 増加は酸素消費を抑制して有害な反応性酸素種(ROS)の産生を抑制している」という仮説をたて，NO 増加を抑制した時とそうでない時とで酸素消費が異なるか検討した。酸素電極を用いて，受精時の酸素消費を測定したところ，NO 吸収剤 PTIO 有無に関わらず，酸素消費量に違いは見られなかったことから，仮説は否定的であった。さらに受精時の呼吸増加に伴い増加すると考えられる NAD(P)H の自家蛍光シグナルを測定すると，2 相性の増加を示した。NAD(P)H シグナルは PTIO 存在下では 2 相目の部分が抑制された。このことは NO 増加は 2 相目の NAD(P)H 増加のシグナルの原因であることを示している。現在その機能に付いてさらに研究を進めている。

神経ステロイドによる海馬シナプス長期増強の誘導機構

曽我部正博

神経細胞で合成される多様なステロイド（神経ステロイド）はシナプス可塑性や神経傷害修復の昂進をはじめとした様々な神経薬理作用を示すことが知られている。我々はこれまでに，脳中で最も豊富な神経ステロイド pregnenorone sulphate (PREGS)に注目し，海馬シナプス可塑性に対する急性作用機序を調べてきた。その結果，PREGS 自身が海馬シナプス伝達を長期増強する(chemLTP)と伴に活動依存的 LTP 誘導の周波数閾値を下げることを報告してきた。今回，PREGS の代謝産物で，かつ PREGS よりもはるかに低濃度で作用する DHEAS (dehydroepiandrosterone sulphate) のラット脳海馬のシナプス伝達に対する作用機序を調べた。その結果，DHEAS のスライス標本に対する急性投与は，短期増強は誘導するが，chemLTP は誘導せず，活動依存的 LTP 誘導にも効果がないことが分かった。しかし，DHEAS の一週間慢性投与は，活動依存的 LTP のプライミングを導いた。このプライミングは PREGS のように刺激周波数閾値を下げるのではなく，刺激パルス数の閾値を下げるという様式で行われ，シナプス後膜を介したものであることが示唆された(Chen, et al., 2006a)。さらにその分子機構を調べたところ，DHEAS はシナプス後膜の sigma1 受容体に作用したのち，Src キナーゼ依存的に NMDA 受容体機能を促進し，その結果流入した Ca^{2+}が再び Src を刺激するというポジティブフィードバック回路が働いて，NMDA リセプターを長時間感作することが分かった (Chen, et al., 2006b)。

細胞器官研究系

機能協関研究部門

【概要】

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

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

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

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

アポトーシス誘導時における調節性容積増大 (RVI)の抑制

前野恵美，高橋信之，岡田泰伸

細胞には容積を一定に維持するための細胞容積制御機構が備わっており，容積が減少した場合，それを刺激として，調節性細胞容積増大(RVI)が起こる。しかし，アポトーシス誘導時には，アポトーシス性細胞容積減少(AVD)という持続的な容積減少が起こる。このとき，細胞縮小後の RVI を AVD が凌駕するのか，それとも RVI がアポトーシス時には抑制されているのかこれまで不明であった。しかし，アポトーシス刺激後，細胞に高浸透圧刺激を行うと正常な RVI が観察されないことから，後者であることが明らかとなった。また高浸透圧条件下で RVI を阻害するとアポトーシスが誘導されること，ならびに RVI を示さない細胞にイオントランスポータを発現させて RVI を起こさせると，高浸透圧刺激によるアポトーシスが抑制されることから，RVI が高浸透圧条件下での細胞に生存に重要であることが明らかになった。この結果は次の論文に報告：Maeno et al. 2006 FEBS Lett 580, 6513-6517.

細胞縮小により活性化されるカチオンチャネルを抑制すると，浸透圧性細胞縮小のみでアポトーシスが誘導される

清水貴浩，Wehner Frank（マックスプランク分子生理学研究所），岡田泰伸

細胞縮小により活性化されるカチオンチャネル HICC は，浸透圧性細胞縮小後の調節性容積減少 (RVI) に寄与

する。アポトーシス時には持続的な細胞縮小が伴われることから，RVI 抑制による浸透圧性細胞縮小の持続がアポトーシスを誘導するかをヒト上皮 HeLa 細胞において検討した。高浸透圧負荷は，元来 RVI を示すこの細胞の生存率に影響を与えなかったが，HICC 阻害剤であるフルフェナミン酸，Gd^{3+}を投与すると，アポトーシスが引き起こされた（図 1）。これら阻害剤がアポトーシスを生じる濃度依存性は，HICC 電流のこれら阻害剤に対する感受性と相関していた。以上の結果は，RVI に寄与する HICC の機能抑制が浸透圧性細胞縮小を持続し，アポトーシス誘導することを示している。この結果は次の論文に報告：Shimizu et al. 2006 Cell Physiol Biochem 18, 295-302.

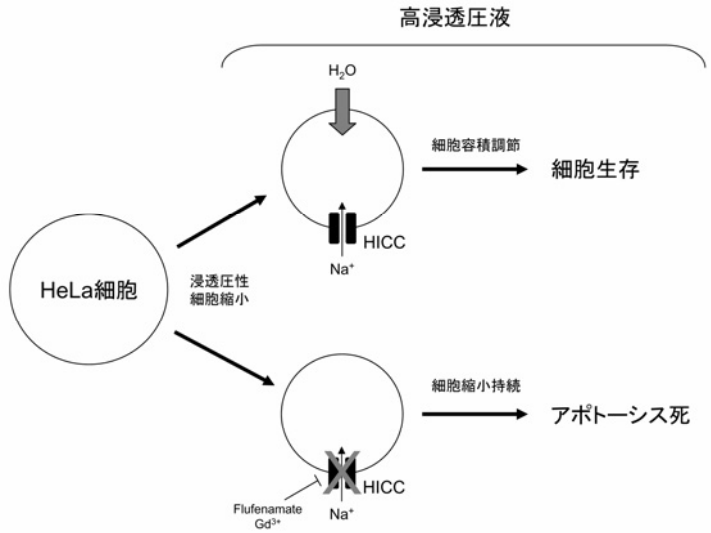


図 1：HICC/RVI 抑制下では高浸透刺激のみがアポトーシス刺激となる

持続的細胞縮小はアポトーシス誘導の十分条件である

温井美帆，清水貴浩，前野恵美，岡田泰伸

アポトーシス死には持続性細胞縮小 apaptotic volume decrease (AVD) が伴われる。この発生を阻止すると，アポトーシス死が救済されるので, AVD はアポトーシスの必要条件である。今回，AVD は十分条件でもあることを示した。

細胞外液中の Cl^-を等浸透圧的に大部分他の大型アニオンに置き換えると，ヒト上皮 HeLa 細胞は持続的に縮小し，アポトーシス死が誘導された（図 2）。この結果は次論文に報告：Maeno, Shimizu & Okada 2006 Acta Physiol 187, 217-222.

次に，細胞外液中のすべての Na^+を等浸透圧的に取り除いたところ, HeLa 細胞は持続性細胞縮小を示した後にアポトーシスに陥った（図 2）。この細胞縮小を阻止するとアポトーシスも抑制された。この結果は次の論文に報告：Nukui, Shimizu & Okada 2006 J Physiol Sci 56, 335-339.

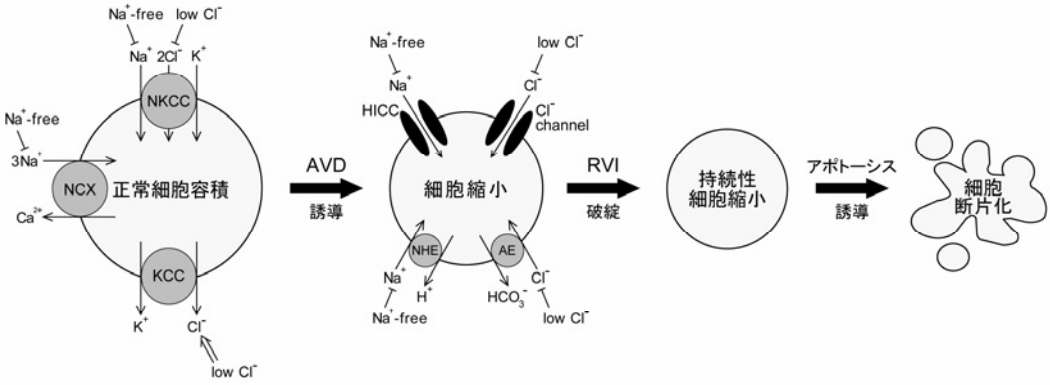


図 2：細胞外 Na^+除去や Cl^-濃度減少による持続的細胞縮小化とアポトーシス誘導のメカニズム

アストロサイトからの虚血/細胞膨張時におけるグルタミン酸放出は二つのアニオンチャネルによってもたらされる

Liu Hong-tao，Sabirov Ravshan，井上　華，岡田泰伸

グルタミン酸は脳における重要な細胞外シグナル分子である。グルタミン酸は虚血刺激や低浸透圧刺激によってアストロサイトから放出されるが，その放出路にはギャップジャンクションヘミチャネル, エキソサイトシス, Na-グルタミン酸コトランスポータ逆回転などのいくつかの説があった。しかし，培養マウスアストロサイトからの虚血性/細胞膨張性グルタミン酸放出は, これらいずれの阻害剤によっても影響を受けなかった。これに対し，細胞膨張時に開口し，グルタミン酸透過性を示す容積感受性外向整流性 (VSOR)アニオンチャネルとマキシアニオンチャネルの阻害剤によって，グルタミン酸放出は抑制を受けた。それゆえ，図 3 のようなモデルが考えられた。これらの結果は次の論文に報告：Liu et al. 2006 Glia 54, 343-357.

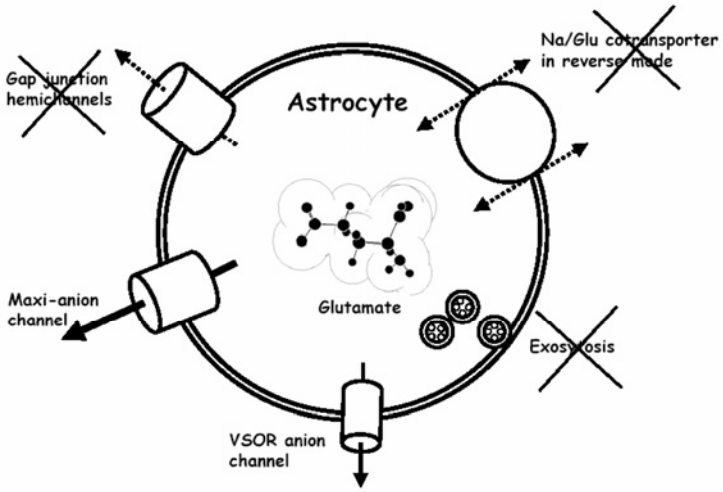


図 3：アストロサイトからの虚血性グルタミン酸の放出路への二種類のアニオンチャネルの関与

マキシアニオンチャネルの分子実体は VDAC であるという通説は誤りである

Sabirov Ravshan，Craigen William（ベイラー医科大学），岡田泰伸

マキシアニオンチャネルは多くの細胞に発現し，細胞外シグナル ATP を細胞内から放出する通路を与えている。ミトコンドリアのポリンとよばれるアニオンチャネルの分子実体は VDAC であるが，これに形質膜発現型イソホームの存在が知られるようになり，この形質膜 VDAC がマキシアニオンチャネルの本体と広く考えられるようになった。VDAC には 3 種のイソホームがあるが，VDAC1/3 のダブルノックアウトマウス由来の線維芽細胞にも，更にはこれに siRNA 法によって VDAC2 をノックダウンをした場合にも，マキシアニオンチャネル活性は何らも影響を受けなかった。これらの結果は次の論文に報告：Sabirov et al. 2006 J Biol Chem 281, 1879-1904.

生体情報研究系

感覚認知情報研究部門

【概要】

感覚認知情報研究部門は視知覚および視覚認知の神経機構を研究対象としている。我々の視覚神経系は複雑な並列分散システムである。そこでは数多くの脳部位が異なる役割を果たしつつ，全体として統一のとれた視知覚を生じる精巧な仕組みがあると考えられる。また二次元の網膜像から世界の三次元構造を正しく理解できる仕組みもそなわっている。視知覚におけるこれらの問題を解明するために，大脳皮質を中心とするニューロンの刺激選択性や，異なる種類の刺激への反応の分布を調べている。具体的な課題として(1)初期視覚野における輪郭とその折れ曲がりの表現，(2)大脳皮質高次視覚野における色選択性ニューロン活動と知覚の関係，(3)色カテゴリー識別時の視覚野ニューロン活動，(4)大脳皮質における視覚的注意のメカニズム，(5)fMRI によるサル大脳視覚野活動計測，などに関する研究を行った。

初期視覚系における輪郭線の折れ曲がりの表現

伊藤　南，浅川晋宏

Yi Wang (Center for Brain and Cognitive Sciences Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences)

我々は物体の形状を認識する過程を明らかにするために，注視課題を遂行中に第二次視覚野より単一細胞記録を行い，図形の輪郭に含まれる折れ曲がりに対して選択的な反応を示すニューロンが第二次視覚野に多数存在することを見いだした。本年度はその神経メカニズムを明らかにするために以下の研究を行った。1.Linear-Nonlinear 型のモデルによるシミュレーションを行い，大多数のニューロンで刺激中に含まれる個々の半直線成分に対する興奮性又は抑制性の反応の線形和により折れ曲がりに対する選択性が説明できることを示した。2.①拮抗阻害剤の局所投与等の薬理学的な手法により抑制性入力が占める役割を明らかにする，②逆相関法により興奮性/抑制性入力の受容野内外における空間分布の偏りの視点から折れ曲がりに対する選択性を再検討する為に，麻酔標本による記録実験系を新たに立ち上げた。次年度へ引き続き記録を継続中である。

サル下側頭皮質色選択性ニューロン活動と色知覚の関係

松茂良岳広，鯉田孝和，小松英彦

サルの下側頭皮質 TE 野色選択ニューロン活動と色知覚の関係について調べるために，わずかな色の差を識別する近似色選択課題をサルに行わせ，課題遂行中のサルの色判断とニューロン活動の関係を定量的に調べた。ROC 解析により求めたニューロン活動にもとづく色弁別閾と，同時に得られたサルの行動から求めた色弁別閾を比較すると一般的にはニューロンの方がサルの弁別能力よりも低かった。次に試行ごとの個々のニューロン活動の揺らぎと，サルの色判断の揺らぎの相関を ROC 解析により定量的に調べた。その結果，サルの色判断と TE 色選択性ニューロンの活動には一般的に正の相関がみられた。一方，ニューロンの色に対する感度の鋭さと色判断に対する貢献度との間には相関が無かった。これらの結果から, TE 野においては多数の色選択性ニューロン集

団の活動がサルの色判断行動に寄与していることが示唆された。

色カテゴリー識別時の視覚野ニューロン活動

鯉田孝和，小松英彦

弁別とカテゴリー化は視知覚の二つの異なる側面である。これは色知覚においても顕著に見られる。同じ色刺激を見ても，細かい色の識別を行わないといけない状況と，細かい色の差は無視してカテゴリー判断を行わないといけない状況では動物が表出する反応は異なる。このように同じ色刺激に対して状況によって異なる反応を行う時に，下側頭皮質前部の色選択ニューロンの活動が変化することはすでに報告した。今年度は，この変化が上の二つの機能にどのように関わっているかを詳しく分析した。カテゴリ課題時にはサルは呈示された色刺激が赤か緑かを判断することが要求される。このような判断を行うことに寄与する信号が課題の間でどのように変化するかを調べたところ，カテゴリ課題時に増大し弁別課題時に減少することがわかった。このことは，課題依存的な下側頭皮質前部のニューロン活動の変化の主要な意義はカテゴリ課題の遂行を助けることにあることを示している。

視覚選択における後頭頂連合野の機能的役割

小川　正，小松英彦

視野内で目標とする物体を探す視覚探索を行うときの後頭頂連合野機能を，サルの頭頂間溝外側部(LIP, 7a)からニューロン活動を記録することによって調べた。実験では，複数刺激の中で色または形次元で目立つ刺激を選択して眼球運動を行うことが要求され，どちらの特徴次元で目標を探索するかは試行ブロックごとに切り替えた。実験の結果, (1)受容野内の刺激が目標となる場合であっても，目標刺激が最適な色・形特徴を有し，かつ特定の特徴次元で目立つ場合にのみ活動強度を増大させるニューロン群と，(2)目標刺激の視覚的属性にかかわりなく活動強度を増大させるニューロン群が見出された。視覚的属性に依存した選択過程と依存しない選択過程が同一領野に存在することから，後頭頂連合野は視覚情報から運動情報への変換過程の重要な一部を形成していると考えられる。

機能的核磁気共鳴画像法(fMRI)によるサル視覚皮質における機能地図計測

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

機能的核磁気共鳴画像法(fMRI)には一度に大脳皮質の広い領域の活動を計測できる特長があり，サルを用いた fMRI は，単一ニューロン活動記録法等との併用による多面的研究アプローチを可能にする手法として期待されている。本年度は，前年度に開発したサル fMRI 実験システムを用い，2 頭のサルについて，運動ランダムドット刺激や物体画像刺激，色モンドリアン刺激等の種々の視覚刺激に対する反応を計測し，視覚皮質における運動・形・色情報処理に関する機能地図及び視野地図について検討した。その結果，運動・形・色に強い反応を示す領域は高次視覚領野においてそれぞれ複数の小領域に局在していることが明らかになった。特に，色に対する

反応小領域の位置は，電気生理実験により他のサルにおいて色選択性ニューロンが多数見出されている位置とも対応しており，それら小領域の機能的重要性が示唆される。

神経シグナル研究部門

【概要】

昨年に引き続き，シナプスの可塑性，神経回路の機能，チャネル異常による神経疾患の病態等に関する研究を，主に電気生理学的な手法で行った。

Ca^{2+}/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II による海馬シナプス可塑性の制御

山肩葉子，井本敬二（生理研），小林静香，真鍋俊也（東京大医科研），
梅田達也，井上明宏，岡部繁男（東京医科歯科大）

海馬 CA1 領域におけるシナプスの長期増強(LTP)は，高次脳機構のひとつである学習・記憶の細胞・分子メカニズムを解明するための基本モデルと考えられ，LTP に関与する分子について，多くの研究が進められてきた。中でも，Ca^{2+}/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II(CaMKII)は LTP に必要な分子として注目を集めている。我々は，CaMKIIα の ATP 結合に必要なアミノ酸残基を置換することにより不活性型としたノックインマウス(K42R)を新たに開発し，このマウスを用いて CaMKII が上記機能に果たす役割について，検討を進めている。具体的には，海馬組織を用いた生化学的解析，海馬スライス標本を用いた電気生理学的解析，海馬培養神経細胞を用いた細胞生物学的解析，マウスの行動学的解析といった多方面からのアプローチを駆使することにより，総合的な理解を目指している。

皮質視床シナプスによる視床投射細胞への興奮性-抑制性の調節機構

宮田　麻理子，井本　敬二

皮質視床シナプスは視床投射細胞に興奮性シナプスを形成すると同時に，その側枝は，抑制性細胞である網様体細胞にシナプスを形成し，網様体細胞から視床投射細胞に抑制性シナプスを作ることで，皮質視床シナプスは視床に対し feed forward inhibition も与える。皮質視床シナプスの興奮性-抑制性入力の精巧なバランス調節が，感覚情報処理に重要と考えられているが，その調節機構はシナプスレベルで殆ど明らかになっていない。我々は皮質視床シナプスのカイニン酸受容体によるシナプス前性機構に着目した。視床投射細胞と網様体細胞から皮質視床シナプス EPSC を同時に記録して，外液に極薄い濃度のカイニン酸投与すると，カイニン酸受容体を介するシナプス前性作用が，投射細胞に対してはシナプス伝達を抑制し，網様体細胞に対しては促進した。この効果は，皮質視床シナプス伝達による内因性グルタミン酸においても同じであった。

小脳顆粒細胞－介在ニューロン間興奮性シナプス伝達のペアパルス増強

佐竹伸一郎，井本敬二

小脳スライス-パッチクランプ法を用いて，顆粒細胞軸索（上向性線維および平行線維）の電気刺激に伴い分子層介在ニューロンから記録される興奮性シナプス後電流 (EPSC) の性質を調べた。30〜100 ミリ秒間隔で 2 発ペアパルス刺激を与えると，2 発目 EPSC の振幅値と減衰時定数が著しく増大した。薬理学的検討や量子解析を行い，EPSC 振幅増大はシナプス小胞の放出確率および放出多重性の増強，減衰時間増大は遅延したシナプス小胞放出の増強により惹起されたことを示唆する結果を得た。引き続き，活動電位の連続発生がシナプス小胞放出過程を増強する分子基盤について検討している。

2 種類の同期タイミングを識別する神経回路

井上　剛，井本　敬二

神経回路は, 神経細胞とシナプスによって構築される。神経回路における信号処理能力は，そのシナプス配線ルールに強く依存する。すなわち，どのようなシナプス配線図が，どのような信号処理能力を有しているのか対応させていくことは重要である。今年度我々は，視床―大脳皮質神経回路に着目し，視床由来の 2 種類の同期的入力（同時入力と時間のずれた入力）を識別することが可能な神経回路の配線ルールを探索した。その識別は，収束性と発散性が組み合わさった特徴的なフィードフォワード抑制回路で達成可能であることがわかった。その神経回路配線図において，もし大脳皮質抑制神経細胞である fast-spiking (FS) 細胞が脱分極していた場合，同時入力の方がより強く大脳皮質 4 層主要細胞を興奮させた。しかしながら，同一神経回路にもかかわらず，もし FS 細胞が比較的過分極していた場合，時間のずれた入力の方がより強く大脳皮質 4 層主要細胞を興奮させた。

Tottering マウスにおける欠神発作と大脳基底核回路との関係

加勢大輔，井本敬二

欠神発作の発生には視床－大脳皮質回路が強く関与していることが知られているが，てんかん波の伝播において大脳基底核回路が関与している可能性が，欠神発作モデルラットを用いた実験により示唆されている。しかしスライス標本を用いたシナプスレベルでの解析は行われていない。

本研究では欠神発作モデルマウスの tottering マウスを用いて，欠神発作と大脳基底核回路との関係を in vivo 及び in vitro の実験により詳細に評価することを目的としている。

2006 年度は in vivo の実験を主に進め，てんかん波の測定システムを立ち上げた。これまでにグルタミン酸受容体拮抗剤の黒質への投与により，投与後のてんかん波の発生頻度が減少する傾向が見られている。

統合生理研究系

感覚運動調節研究部門

【概要】

2006 年度は 3 名の総合研究大学院大学生（後期 3 年過程 3 名）と 4 名の博士研究員（望月秀紀君, 赤塚康介君, 田中絵実さん，本多結城子さん）が新たに仲間に加わった。逆に，総研大学生，博士研究員として 4 年間共に研究を続けてきた中田大貴君が名古屋大学医学部に博士研究員として移った。現在，留学しているのは，藤岡孝子さん（カナダ・トロントの Rotman Institute），和坂俊昭君（米国 NIH），岡本英彦君（ドイツ，ミュンスター大学）の 3 名である。また木田哲夫君が 8 月より米国 NIH に留学した。また総研大卒業生（現在は名古屋大学医学部の博士研究員）の野口泰樹君はカリフォルニア工科大学に留学している。このように人事はかなり変動しているが，常に 20 名近くの研究者が共に研究にいそしんでいる。

医学（神経内科，精神科，小児科など），歯学，工学，心理学，言語学，スポーツ科学など多様な分野の研究者が，体性感覚，痛覚，視覚，聴覚，高次脳機能（言語等）など広範囲の領域を研究しているのが本研究室の特長であり，各研究者が自分の一番やりたいテーマを研究している。こういう場合，ややもすると研究室内がバラバラになってしまう可能性もあるが，皆互いに協力し合い情報を提供しあっており，教室の研究は各々順調に行われている。脳波と脳磁図 (MEG)を用いた研究が本研究室のメインテーマだが，最近はそれに加えて機能的磁気共鳴画像(fMRI)，近赤外線分光法(NIRS)，経頭蓋磁気刺激(TMS)を用いた研究も行い成果をあげている。

共同研究も順調に進んでいる。国際的にはドイツ，ミュンスター大学の Pantev 教授の研究室，トロントの Rotman Institute の Ross 教授の研究室，NIH の Hallett 教授の研究室，イタリアの Chieti 大学の Romani 教授の研究室との共同研究が着実に成果をあげている。また，国内では生体磁気共同研究が 6 件行われており，また中央大学とは乳児の NIRS 記録により興味ある結果を得つつある。

研究員一同，より一層の努力を続けて質の高い研究を目指していきたいと思っている。

視覚性運動情報処理の新しい考え

金桶吉起

物体の運動は，その方向と速度によって規定されるベクトルである。そして動物の視覚野は少なくとも局所においては，運動をベクトルとして検出している可能性が指摘されている。しかし，視野の広い範囲に広がる複雑な運動が全体としていかなる意味をもつかを認識する過程では，局所的な運動がなんらかの方法で空間的に統合される必要がある。このとき，局所運動がそのままベクトルとして空間統合されると考えると大変複雑な神経機構が必要になり，またベクトルによる空間統合とは矛盾する実験結果も多い。そこで Scalar fields theory が提唱された。この説によると，運動情報は速度のみ，あるいは方向のみの物理量をもとに空間的に統合されることになる。これは色と運動情報の空間的統合が misbinding される錯視を用いて検証された。またこの説によると，初期視覚野は古典的な考えである階層的情報処理の最下位にあるのではなく, 他の皮質に局所情報を必要に応じて受け渡すという並列的情報処理にかかわることになる。これは最近の生理学的, 心理学的実験結果と合致している。(Prog. Neurobiol. 80, 219-240, 2006; Neuroreport 17, 1841-1845, 2006)

ヒト視覚野での情報処理の流れ

乾幸二，柿木隆介

右目へのフラッシュ刺激による皮質活動の時間的，空間的詳細を MEG を用いて検討した。8 ヶ所の皮質部位の活動が認められた。最初の活動は第一次視覚野(V1)にあり，平均の立ち上り潜時は 27.5ms であった。続いて，左 V6，両側 V2（背側および腹側），左 V5，両側 V4 相当部位が活動した。それぞれの立ち上り潜時は 31.8(V6), 32.8（左 V2v），32.2（右 V2v），33.4（左 V2d），32.3（右 V2d），37.8（左 V5），46.9（左 V4）及び 46.4ms（右 V4）であった。従って，皮質―皮質連絡に要する時間はおよそ 4-6ms であり，聴覚や体性感覚でのデータと同等である。さらに，V1，V2，V5，V6 の活動様式は他の感覚系と同様に三相構造を示した。これらの結果より，各感覚系に共通する情報処理様式があるものと考えられた。

(J Neurophysiol 96: 775-784, 2006)

侵害情報を伝える複数のヒト脊髄視床路の証明

辻健史，乾幸二，柿木隆介

動物では侵害情報は脊髄後角のレベルで既に二つの異なる処理経路に分かれるとされているが，ヒトでの知見は乏しい。背部中央の異なるレベル(C7，Th10)を刺激することで得られる大脳誘発電位を用いることで，侵害情報が複数の伝導路で脊髄内を上行するか否かを検討した。C7，Th10 いずれのレーザー刺激でも，明瞭な活動が刺激対側第一次体性感覚野(S1)，両側弁蓋領域及び帯状回に認められた。C7 刺激と Th10 刺激の背部での距離と誘発活動の潜時差より脊髄内の伝導速度 (CV)を算出すると，S1 の CV(16.8m/s)が他の二者（弁蓋 9.3，帯状回 10.1）よりも有意に早く，侵害情報が少なくとも二つの異なる経路で伝達されることが確認された。

(Pain 123: 322-311, 2006)

触覚による痛覚抑制の皮質機序

乾幸二，辻健史，柿木隆介

痛む部位をさすると除痛効果のあることは古くから知られているが，その機序は明らかではない。とりわけ，多くの研究がその責任部位を脊髄に求めて行われてきたために，皮質での抑制機序は全く考慮されてこなかった。触覚および痛覚刺激を，種々のタイミング(CT interval -500 から 500ms)で背部に与え，誘発脳磁場を記録した。痛覚刺激誘発皮質活動は，触覚刺激を先行して呈示した場合と，20-60ms 遅れて呈示した際に顕著に抑制された。侵害情報は，CTI -60 と CTI -40，CTI -20ms の条件では触覚信号よりも先に脊髄を通過しており，この抑制が脊髄レベルで生じたものでないことが明瞭である。さらに，CTI -40 と CTI -60ms の条件では，侵害情報は皮質へも触覚情報よりも先に到達しており，侵害刺激による皮質活動は，遅れて皮質に到達した触覚信号によっても強力に抑制されることが判明した。

この結果は，Melzack と Wall の関門制御説を積極的に否定するものではないが，少なくとも本実験の条件下では，脊髄の関与を見いだすことはできなかった。

(Cereb Cortex 16: 355-365, 2006)

ヒト聴覚野での階層処理

乾幸二，軍司敦子，三木研作，柿木隆介

サルでは，聴覚情報は第一次聴覚野(core)，次いでそれをとりまく belt 領野さらにそれをとりまく parabelt 領野の順に階層的に処理されることが知られているが，情報伝達の詳細は明らかではない。ヒトでの知見は乏しい。本研究では，クリック音刺激により誘発される皮質活動の活動様式とタイミングを MEG を用いて詳細に検討した。

刺激対側半球に，6 ヶ所の皮質活動を認めた。Heschl 回内側部（第一次聴覚野），Heschl 回外側部，頭頂葉後部(PPC)，上側頭回前部，上側頭回後部及び planum temporale (PT)が順次活動し，それぞれの立ち上り潜時は，17.1，21.2，25.3，26.2，30.9，47.6ms であった。この結果は，聴覚情報が側頭葉平面を内側から外側に向かって順次処理されていくことを示す。また，後上方へ向かう経路（後部上側頭回，PPC あるいは PT）と，前方へ向かう経路（前部上側頭回）の，少なくとも二つの処理経路を示唆され，並列階層処理の概念に矛盾しない。

(Cereb Cortex 16: 18-30, 2006)

C 線維信号による脳活動 fMRI 研究

秋云海，野口泰基，本田学，中田大貴，田村洋平，田中悟志，定藤則弘，王暁宏，乾幸二，柿木隆介

fMRI を用いて，末梢（手背）の C 受容器刺激による脳活動と A-delta 受容器刺激による脳活動を直接比較した。刺激には YAG レーザーを用いた。いずれの刺激も視床，第二次体性感覚野，島および 24/32 野（主に前部帯状回後部, ACC）を活動させたが, ACC 上部, pre-SMA, 島の活動は C 刺激で有意に強かった。このことから，A-delta と C の脳内処理に違いがあることが示された。C 受容器は second pain に関わることから，情動あるいは動機付けの側面により強く関わると考えられる。C 受容器刺激で有意に強活動を示した上記皮質部位がこれらの側面に関わっていると考えられる。

(Cereb Cortex 16: 1289-1295, 2006)

MEG，ERG 同時計測による初期視覚野活動のタイミングの検討

乾幸二，山南浩実，三木研作，金桶吉起，柿木隆介

視覚刺激による最も早いヒト皮質活動の部位と潜時については様々な報告があり一定していない。本研究では網膜電図 (ERG)と MEG を同時計測することにより，MEG で得られた最初の活動が, 最も早い活動として妥当かどうかを検討した。刺激は右目へのフラッシュ刺激で，500 回の試行結果を加算した。ERG の a 波頂点潜時は，平均 20ms であった。最も早い MEG の成分は 37ms 頂点(37M)で，立ち上りは 30.2ms であった。A 波頂点は概ね信号が網膜を出発するタイミングを反映しており，37M（a 波から 10ms 後）の潜時は，網膜－皮質伝導時間を考慮すると，最初の皮質活動として妥当であると考えられた。

(Neuroimage 30: 239-244, 2006)

Go/Nogo 課題における筋出力強度と運動抑制の関係性について

中田大貴，乾幸二，和坂俊昭，田村洋平（東京慈恵会医科大学神経内科），赤塚康介，木田哲夫，柿木隆介

ヒト脳における運動遂行と抑制過程の関係性について検討を行なった。その関係性を検討するために，本実験では経頭蓋磁気刺激法を用いた。結果として，被験者が行なう課題において，筋の収縮力が増大すればするほど，運動遂行過程における運動誘発電位の振幅が増大した。これは一次運動野の興奮性が筋の出力強度の増加と共に増大していることを示唆した。これとは別に，運動抑制過程における運動誘発電位を測定したところ，発揮しなければならない筋出力強度の増加とは反対に，運動誘発電位の振幅が減少した。つまりこれは，運動遂行時に筋の出力が多く必要とされる状況下において，その動作を抑制する場合，動作を抑制する神経活動は増大し，一次運動野の興奮性が抑制されていることを示唆する。この結果から，運動抑制過程において，抑制に関わる脳活動は，積極的に一次運動野に関与し，フレキシブルにその脳活動が変動していることがわかった。

(Clin Neurophysiol 117: 1669-1676, 2006)

体性感覚刺激 Go/Nogo 課題における N140 成分の特徴

中田大貴，乾幸二，和坂俊昭，田村洋平（東京慈恵会医科大学神経内科），木田哲夫，柿木隆介

運動抑制が行なわれる際に，抑制が誘発される外界からの刺激が視覚，聴覚，体性感覚であっても，抑制に関わる脳活動の時間や大きさの変化が共通するのか，しないのかを検討するため，本実験では，脳波を用い，体性感覚刺激を用いた際の特徴を明らかにした。刺激後約 140ms に陰性電位成分が記録され，運動抑制過程に関係していると考えられた。体性感覚刺激部位を変えても，電位成分に影響はなかった。しかし，運動遂行の際に反応する手を変えたところ，抑制過程において，反応対側の電極部位における電位振幅が，同側の部位よりも有意に大きくなることがわかった。このことは視覚，聴覚刺激を用いた研究では見られなかったことから，体性感覚刺激を用いた際の特徴の 1 つと考えられる。

(Neurosci Lett 397: 318-322, 2006)

体性感覚刺激を用いた二点識別時の自動的検出機構

赤塚康介，和坂俊昭，中田大貴，木田哲夫，寶珠山稔，田村洋平，柿木隆介

二点識別に関する自動的検出機構を解明することを目的として MEG を用いて測定を行った。その結果，標準刺激を一点と感じ逸脱刺激を二点と感じるような場合，又は標準刺激を二点と感じ逸脱刺激を一点と感じるような場合に，逸脱刺激後 30-70 ms，150-250 ms にミスマッチ反応 (MMF) が記録された。しかし，標準刺激と逸脱刺激共に一点と感じる場合，又は標準刺激と逸脱刺激共に二点と感じるような場合には MMF は記録されなかった。したがって，標準刺激，逸脱刺激が一点か二点かを自動的に判別したときにだけ MMF が誘発されたと考えられる。また，この実験により誘発された MMF は第一次体性感覚野と第二次体性感覚野に信号源が推定された。このことは，聴覚刺激を用いた実験においても第一次聴覚野と第二次聴覚野に信号源が推定されることと同様に，刺激に対して主要な反応を示す部位が MMF には関与していることを示唆するものと考えられる。

(Clin Neurophysiol.; 118: 403-411,2007)

自発的足関節背屈の運動準備における脛骨神経刺激 SEP の変動

和坂俊昭，木田哲夫，中田大貴，柿木隆介

随意運動遂行に関連して体性感覚系に変動がみられる。これまでの研究では，主働筋を支配する体性感覚領域の活動は，運動関連領域からの遠心性投射の影響を受けて抑制されることが知られていた。本研究では，主働筋の運動遂行に対して重要な働きを担う拮抗筋を支配する体性感覚領域に対する遠心性抑制の影響を検討した。被験者には自己ペースで足関節背屈を行わせ，その準備過程に記録される運動関連脳電位(MRCPs)を基準とした区間における体性感覚誘発電位(SEPs)の振幅変化を比較した。拮抗筋を支配する体性感覚領域の活動は，MRCPs の構成成分である Negative slope が出現するときに減少した。この結果は，遠心性抑制が拮抗筋を支配する体性感覚領域にも作用することを示しており，脊髄レベルで知られる相反性神経支配に類似する神経機構が大脳皮質レベルにも存在することを示唆している。

(Clin Neurophysiol: 117: 2023-2029, 2006)

ヒトの時間感覚の形成メカニズム

野口泰基，柿木隆介

目の前に視覚刺激が提示された時，我々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，「光陰矢のごとし」という格言もあるように，ヒトが持つ時間感覚は必ずしも正確でないことが知られている。

この不正確さの原因を探るため，ヒト視覚野における神経反応を MEG を用いて計測した。被験者は 2 連発の視覚刺激を見せられた後，2 番目の刺激の提示時間が 1 番目の刺激の提示時間より長いか，短いかを判断した。1 番目も 2 番目も同じ提示時間であった場合，被験者はある時は「2 番目の方が長い」と答えるが，別の時は「2 番目の方が短い」と答える（本当は同じ長さであることを，被験者は知らない）。この 2 つの状況において，2 番目の刺激に対する脳反応を比較した。

一般に脳は視覚刺激が出現した時と消えた時の 2 回，強い神経反応を示す。「長い」と答えた時も，「短い」と答えた時も，この 2 つの反応のタイミングに変化は無かった。つまり脳が刺激の出現と消滅を捉えた時間は同じだった。だが被験者が「長い」と答えた時は，「短い」と答えた時より，刺激の出現に対する脳反応が有意に強い傾向が見られた。これらの結果は，脳に強い神経反応が引き起こされたとき，人はその刺激をより「長い」と感じる傾向があることを示している。言い換えれば脳反応の「強さ」という非時間的な情報を使って時間感覚が作られていることになり，ヒトが持つ時間感覚の不正確さを説明する 1 つの原因として考えられた [Cereb Cortex 16(12): 1797-1808, 2006]。

母語と第二言語の視覚形態処理に関する MEG 研究

井原綾，柿木隆介

母語と第二言語の処理は同様のメカニズムで行われているか，それとも異なるメカニズムで行われているかについて未だ一致した見解はない。本研究では，韓国語を母語とし，日本語を第二言語として学習している韓国人被験者が，ハングル，カナ，擬似文字を認知するときの自発脳活動の差を MEG を用いて解析した。その結果，全ての条件で両側後頭側頭部におけるγ帯域活動(60～90 Hz)の増強とα帯域活動 (8～13 Hz) の減弱が認められた。左側 γ 帯域活動は条件間に差はなく，右側ではハングル，カナ，擬似文字の順に活動強度が小さかった。α 帯域活

動の減弱は，擬似文字と比べてハングルとカナで長く持続した。これらの自発脳活動の違いは，前語彙処理に関与する神経ネットワークの活動が文字と擬似文字で，さらには母語と第二言語とで異なることを示唆する。

(Neuroimage 29: 789-796, 2006)

4-6 歳児における 1 年間の音楽訓練が聴覚誘発脳磁反応の発達に影響することがわかった

藤岡孝子，柿木隆介

バイオリンの音，およびノイズ音を刺激として聴覚誘発脳磁反応を 4-6 歳児より 1 年間 4 回にわたり記録した。子供のグループは，半分が 1 年間音楽教室（スズキメソード）に通い自宅練習を行ったが，あとの半分は学校の授業以外の音楽訓練は行わなかった。

聴覚誘発脳磁場は，両側で顕著な P100m, N250m, P320m, および N450m 反応を認めた。これらのピーク潜時は P100m 反応以外ですべて 1 年の間に有意に変化した。P100m 反応と N450m 反応はバイオリン音に対する反応の振幅がノイズ音に対するものと比べ有意に大きかった。また，N250m 反応の潜時と振幅の一年間での変化の度合いも，バイオリン音に対するもののほうが大きかった。P100m と P320m 反応は左聴覚野のほうが右よりも大きかった。これはこの年齢の子供の脳では左半球のほうが先に発達していることと関係していると考えられた。

この範囲での反応波形の一年間による発達変化は，音楽訓練児の反応においてバイオリン音に対するものに限定されていたが，非訓練児においては，刺激音にかかわらず同程度の発達変化が起きていた。

(Brain 129: 2593-2608, 2006)

静脈注射による嗅覚関連脳磁図の周波数解析

宮成愛，柿木隆介

ヒトにおける嗅覚関連誘発 MEG を検討した。特に，ニオイ刺激を与える前後で，有意に変化の見られる部位とその周波数帯域を，開口合成解析法(SAM)を用いて検討した。ニオイ強度の違いによる反応部位とその周波数帯域を検討するため，thiamin propyl disulfide (TPD)と thiamine tetrahydrofurfuryl disulfide monohydrochloride (TTFD)の 2 種類を，嗅覚既往歴のない健常者 9 名に静脈点滴した。TPD と TTFD は，それぞれ強い嗅感覚と弱い嗅感覚を誘起する。データは SAM 法を用い，事象関連同期 (ERD)もしくは，事象関連非同期 (ERS)を統計的に検討した。本実験の結果から，前頭葉や頭頂葉を含む広範囲の神経ネットワークが嗅覚関連情報処理に関与していること，そして，強いニオイ刺激と弱いニオイ刺激に対する脳内の情報処理過程は異なることが示唆された。

(Brain Topogr 18: 189-199, 2006)

ランダムドットブリンキングを用いた顔認知に関連する誘発脳波

三木研作，渡辺昌子，竹島康行，照屋美加，本多結城子，柿木隆介

初期視覚野の活動を抑えるランダムドットブリンキング(RDB)を用い，顔認知過程を反映する誘発脳波を調べ

た。以下の視覚刺激を用いた。(1)Upright：輪郭，目，口からなる模式的な正立顔。(2)Inverted：Upright 条件を逆にしたもの。正立顔としての全体性は失われているが，空間的配置は Upright と同じ。(3)Scramble：Upright や Inverted と構成要素は同じだが，内部構造の空間的配置自体が異なる。(4)Star：被験者に出現回数を数えてもらったが，記録はおこなっていない。T5，T6 電極で，頂点潜時が刺激提示後 250 ミリ秒の陰性波(N-ERP250)が各条件でみられた。N-ERP250 の頂点潜時は，Inverted と Scramble 条件で，Upright に比べ有意に延長していた。また最大振幅に関しては，条件間に有意な差はみられなかった。この結果より，正立顔を構成する要素が失われていくことで，顔認知過程において，正立顔では起こらない顔の部分の分析的情報処理が行われていることが示唆された。

バックワードマスキング現象の視覚誘発脳磁場反応

橋本章子・渡辺昌子・乾幸二・宝珠山稔・村瀬澄夫（信州大学医学部医療情報学）・柿木隆介

心理行動実験で，最初の視覚刺激(Stim-1)を 16ms 提示し，次の刺激(Stim-2)の提示時間を 16ms，48ms，144ms にして同じ場所に連続提示した。すると，Stim-1 の見え方は Stim-2 の提示時間の長さによって変化し，Stim-2 が 144ms のとき見えなくなった。Stim-1 が見えなくなるこの現象を，特にバックワードマスキングとよぶ。我々はこの Stim-1 の視知覚の変化に伴う視覚野での反応を MEG を使い記録した。比較条件として，単独で Stim-2 だけを提示した。その結果, Stim-1 の視知覚に関係なく，さらには，Stim-2 だけを単独で提示しても，視覚誘発反応は全ての条件に一貫して頂点潜時 180ms 周辺に観察され，振幅に Stim-2 の提示時間の違いが反映された。これらの結果は以下のことを示唆する。

1)見えない刺激 Stim-1 の情報も視覚野で処理される，2)180ms 周辺のこの視覚誘発反応は視知覚を直接は反映しない，3)Stim-2 の視覚情報は，Stim-1 の情報の流れにのって処理が短縮化される。

(Neuroscience 137：1427-1437, 2006)

生体システム研究部門

【概要】

私達を含め動物は，日常生活において周りの状況に応じて最適な行動を選択し，あるいは自らの意志によって四肢を自由に動かすことにより様々な目的を達成している。このような随意運動を制御している脳の領域は，大脳皮質運動野と，その活動を支えている大脳基底核と小脳である。逆にこれらの領域に異常があると，パーキンソン病やジストニアに見られるように，随意運動が著しく障害される。本研究部門においては，このような随意運動の脳内メカニズムおよびそれらが障害された際の病態，さらには病態を基礎とした治療法を探ることを目的としている。

そのために，①課題遂行中の霊長類の神経活動の記録を行う，②大脳基底核疾患を中心とした疾患モデル動物（霊長類・げっ歯類）からの記録を行う，③このような疾患モデル動物に様々な治療法を加え，症状と神経活動の相関を調べる，ことを行っている。

上肢到達運動課題実行中の淡蒼球ニューロンの活動様式

畑中伸彦，高良沙幸，橘吉寿，南部篤

大脳基底核は大脳皮質－基底核連関の一部として，運動の遂行，企図，運動のイメージ，習慣形成などに関わ

るとされている。淡蒼球は神経解剖学的に異なる線維連絡を持つ外節・内節に分類される。しかし両者はともに大脳基底核の入力部である線条体より抑制性の，また視床下核より興奮性の入力を受ける。それにより，大脳皮質一次運動野(MI)や補足運動野(SMA)を電気刺激すると，両者で 3 相性の応答が観察される事が知られている。すなわち，大脳皮質－視床下核を経由する早い興奮性応答，大脳皮質－ 線条体を経由する抑制性応答，そして大脳皮質－線条体－淡蒼球外節－視床下核を経由する遅い興奮性応答である。ただし，これまでの研究からこの 3 つの応答の強度は，淡蒼球ニューロン毎によって異なることが報告されている。

このような入力の強さの違いによって，実際の運動時における個々の淡蒼球ニューロンの活動様式に違いが見られるであろうか？　われわれはサルを用いて，MI や SMA から入力を受けている淡蒼球ニューロンの皮質刺激に対する応答様式と，実際に上肢到達運動を遂行させた際の活動様式の関係を観察している。今後は，単一ニューロン記録と薬物の微量注入を併用し，淡蒼球ニューロンへの興奮性・抑制性入力を神経薬理学的に遮断した際の運動課題に関連した活動様式の変化を観察することにより，それぞれの役割について検討する予定である。

抗てんかん薬ゾニサミドがパーキンソン症状を改善するメカニズムを探る

橘吉寿，南部篤
岩室宏一（東京大・脳神経外科）

従来，てんかん患者に使用されていたゾニサミド（大日本住友製薬）が抗パーキンソン病作用を発現する，ということが神経内科のグループから近年報告され始めた。しかしながら，この作用機序の詳細に関しては全く不明であるのが現状であり，我々の部門では，電気生理学的手法を用いることで，その機序の神経生理学的基盤を解明するよう試みた。MPTP 神経毒を投与することで作成したパーキンソン病モデルサルの視床下核・淡蒼球内節ニューロンを記録すると，bursting（群発発射）や oscillation（発振活動）といった異常発射パターンが多数観察された。このモデルサルにゾニサミドの静脈内投与を行うと，パーキンソン症状の改善と共に，大脳基底核ニューロンの異常発射パターンは消失あるいは減弱した。これは，代表的パーキンソン病治療薬である L-dopa と同様の効果をもつことから，ゾニサミドをパーキンソン病治療薬として使用することの科学的論拠の一端を証明できたと考えられる。

ジストニアの病態に関する研究－DYT1 トランスジェニックモデルマウスにおけるニューロン活動の記録

知見聡美，南部篤
Pullanipally Shashidharan（マウントサイナイ医科大学）

ジストニアは，作動筋と拮抗筋に同時に起こる筋収縮により，体幹，四肢の異常運動を示す疾患である。適切なモデル動物が存在しなかったことから，正確な病態については未だ明らかにされていない。本研究では，全身性ジストニアの原因遺伝子の 1 つとして同定されている DYT1 遺伝子に変異を加えることによって作製したジストニアモデルマウスにおいて，大脳基底核ニューロンの活動を覚醒条件下で記録した。大脳基底核の出力核である淡蒼球内節と黒質網様部，および淡蒼球外節ニューロンにおいて，自発発火頻度の著しい低下と，長い活動休止期間を持つ異常な発火パターンが観察された。また，これらのニューロンは，大脳皮質運動野の電気刺激に対して，長い抑制を伴う異常な応答パターンを示すことがわかった。これらの結果から，淡蒼球内節，黒質網様部および淡蒼球外節の異常な発火パターンが，異常運動の出現に関与していることが示唆された。

大脳皮質機能研究系

脳形態解析研究部門

【概要】

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

具体的な研究テーマとしては，1)グルタミン酸受容体および GABA 受容体と各種チャネル分子の脳における電子顕微鏡的局在を定量的に解析し，脳機能との関係を明らかにする。2)これらの分子の発達過程や記憶，学習の基礎となる可塑的変化に伴う動きを可視化し，その制御メカニズムと機能的意義を探る。3)脳の NMDA 受容体局在の左右差とその生理的意義を探る。4)前脳基底核，黒質－線条体ドーパミン系等の情動行動に関与する脳内部位のシナプス伝達機構および生理活性物質によるその修飾機構を電気生理学的手法を用いて解析し，それらの分子的基盤を明らかにする。5) 大脳基底核関連疾患の治療法の確立のため，神経幹細胞移植による細胞の分化，シナプス再構築や神経回路の再建に関する形態学的および電気生理学的解析を行なっている。

グルタミン酸受容体のシナプス内分布様式とそれらのシナプス伝達へ与える影響

足澤悦子，深澤有吾，松井　広，重本隆一

グルタミン酸性シナプス伝達は中枢神経系における主要な興奮性伝達機構である。これまでに電気生理学的手法や免疫電子顕微鏡法を用いてシナプス後膜に発現するグルタミン酸受容体の発現量や機能解析がなされてきた。しかし，シナプス後膜にグルタミン酸受容体がどのように分布し，それがシナプス伝達にどのように関わっているかは，技術的な限界のために不明な点が多い。そこで我々は，故藤本和教授（福井県立大学）により開発された凍結割断レプリカ免疫標識法 (SDS-digested freeze-fracture replica labeling, SDS-FRL)を改良し，ラット外側膝状体のリレー細胞に形成される機能的に異なる 2 種類のシナプスにおける AMPA, NMDA 受容体の 2 次元的な分布様式を解析した。その結果，これら受容体は，シナプス内で数個の cluster を形成し，シナプス内に不均一に分布していることが明らかになった。さらに SDS-FRL 法より得られた実際の AMPA，NMDA 受容体分布情報と各受容体の kinetic model を用いたシミュレーションを組み合わせ，受容体局在とシナプス応答の関係を検討した結果，この不均一分布が個々のシナプス伝達の大きさの不均一性に与える影響は小さく，発現する受容体数に依存して個々のシナプス特性が規定されることか明らかになった。これらの結果により，シナプスは発現するすべてのグルタミン酸受容体がシナプス応答に寄与できるほど十分小さく，これによりシナプス応答が安定化されるように作られていることが示唆された。

小脳運動学習の記憶痕跡

王文，馬杉ー時田美和子，Andrea Lörincz，深澤有吾，重本隆一

ある種の運動の学習が行われる過程で小脳における，平行線維―プルキンエ細胞シナプスの長期抑圧現象が関与することが知られている。しかし，実際に学習した動物において，このシナプスに存在する AMPA 受容体数やシナプスの構造にどのような変化が起こるのかは知られていなかった。我々は，マウスの水平性視機性眼球運動をモデルとして一時間の学習で引き起こされる短期適応が，小脳片葉の平行線維―プルキンエ細胞シナプスにおける AMPA 受容体密度の減少を伴っていることを，凍結割断レプリカ標識法によって明らかにした。また，5 日間連続の一日一時間の学習によって引き起こされる長期適応は，AMPA 受容体ではなく平行線維―プルキンエ細胞シナプス自体の減少を伴っていることを明らかにした。これらの結果は，脳内に短期的に刻まれる記憶の痕跡が，長期的に安定化されるに従って，構造的な変化へと変換されることを示している。さらにこの変換に関わる分子メカニズムを解明することを目指している。

海馬における長期増強現象とグルタミン酸受容体の局在変化

深澤有吾，重本隆一

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

この樹状突起スパインは長さ 1 ミクロンほどの構造物であり，その内部構造や細胞膜表面の分子分布を明らかにするには電子顕微鏡レベルの定量的な分子局在解析技術が必要である。そこで故藤本和教授（福井県立大学）により開発された凍結割断レプリカ免疫標識法 (SDS-digested freeze-fracture replica labeling) を応用し，シナプス可塑性誘導前後の神経伝達物質受容体，イオンチャネル，開口放出関連タンパク質等の分子局在を解析している。

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

樹上突起スパイン内アクチン細胞骨格系の可視化

深澤有吾

脊椎動物の中枢神経系には，樹状突起スパインと呼ばれる突起状の構造にシナプスを形成する神経細胞が多く見られ，アクチン細胞骨格に富む点で特徴的である。既にこのスパイン内アクチン細胞骨格の動態と，学習・記憶（神経可塑性）との機能的関連性を示す知見が多く得られているが，その分布や調節機構は明らかにされてい

ない。この樹状突起スパインは長さ1ミクロンほどの構造物であり，その内部構造や細胞膜表面の分子分布を明らかにするには電子顕微鏡レベルの定量的な分子局在解析技術が必要である。そこで，電子顕微鏡レベルの新規技術を駆使して，スパイン内アクチン細胞骨格を多角的に可視化し，その局在を詳細に捕らえることを目指している。具体的には，1) 従来通りの固定標本を試料として，電子顕微鏡断層撮影法を行い，その内部構造を可視化する。(国立精神・神経センター神経研究所　諸根信弘博士との共同研究)，2) 凍結割断レプリカエッチング法を用いてスパイン細胞膜直下の裏打ち構造を可視化する。3) 培養神経細胞の無固定・無染色標本のスパインを位相差電子顕微鏡法で観察し，その内部構造を明らかにする(生理研・ナノ形態　永山國昭教授との共同研究)。

これらの解析を通して，樹状突起スパイン内の微細構造を明らかにし，神経伝達関連分子の局在情報と合わせて考察する事で，シナプス機能の調節メカニズムを明らかにしたい。

海馬 NMDA 受容体局在の左右差

篠原良章，川上良介，重本隆一

脳の機能的な左右差はヒトでよく知られているが，その分子基盤はほとんど知られていない。我々は九州大学の伊藤功助教授らとの共同研究により，マウスの海馬NMDA受容体サブユニットNR2Bが左右の海馬の対応するシナプスで非対称に配置されていることを発見した。この左右差は NR2A ノックアウト動物で増強されており，電子顕微鏡的な解析で錐体細胞シナプス特異的な NR2B 標識密度の左右差を検出した。この左右差は介在神経細胞上のシナプスには存在せず，同種の神経軸索が作るシナプスにおいても，シナプス後部の神経細胞の種類の違いによって非対称性の有無が決まることが明らかとなった。この NMDA 受容体量の左右差に対応して，CA1 放射状層での Schaffer collateral シナプスにおける長期増強現象は，右よりも左で早く発達することが明らかになった。さらにこの非対称性の生理的意義を解明することを目指している。

タグ導入による $GABA_A$ 受容体の電子顕微鏡的定量法

Mate Sümegi，深澤有吾，重本隆一

脳内における機能分子の局在を電子顕微鏡レベルで可視化し正確に定量する方法論の開発のために，電子顕微鏡用タグの開発を行っている。さまざまなタグを付加した $GABA_A$ 受容体γ2 サブユニットを培養神経細胞や脳に発現させ，タグ付受容体の機能と局在を電気生理学的方法と形態学的方法で調べる。γ2 サブユニットを欠損する遺伝子改変マウスから作成した培養神経細胞においては，$GABA_A$ 受容体がシナプスに集積せず，樹状突起上に散在していた。これにレンチウィルスを用いて γ2 サブユニットを導入したところ，正常な $GABA_A$ 受容体クラスターの形成が認められた。このシステムを使ってタグ付受容体の機能を調べている。また小脳プルキンエ細胞に発現する $GABA_A$ 受容体チャネルには一個の γ2 サブユニットが含まれていることから，γ2 の数を計測することによってチャネル数を定量することを試みる。小脳での発現にもレンチウィルスによるタグ付 γ2 サブユニットの遺伝子導入を使用している。

$GABA_B$ 受容体とカリウムチャネルの棘突起特異的共存

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

脳内における主要な抑制性伝達物質である GABA には，イオンチャネル型の $GABA_B$ 受容体と G 蛋白共役型の $GABA_B$ 受容体が存在する。我々は，免疫電子顕微鏡法を用いて小脳，視床，海馬における $GABA_B$ 受容体の異なる局在を報告してきた。$GABA_B$ 受容体は海馬錐体細胞の樹状突起においてカリウムチャネルと共役し，ゆっくりとした過分極をおこすことがしられていたが，今回我々は，$GABA_B$R1 と GIRK2 サブユニットが，海馬錐体細胞の棘突起シナプス周辺で特異的な共局在を示すことを明らかにした。このような共局在は樹状突起のシャフトにおいては認められず，2 つの蛋白質は別々のクラスターに分かれて分布していた。さらに $GABA_B$ 受容体の機能調節機構や脳における役割の解明を目指す。

前脳基底核と黒質－線条体ドーパミン系の電気生理学的および形態学的解析

籾山俊彦

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

黒質－線条体ドーパミン系は随意運動調節に関与し，この系の障害とパーキンソン病等の大脳基底核関連疾患とが関係していることが示唆されている。脳虚血後のシナプス結合や神経回路の再建に関する基礎的知見はこれまで非常に少なかった。現在，線条体に虚血処置を加えたラットの新生細胞の分化，シナプス再構築について形態学的および電気生理学的解析を行なっている。

シナプス-グリア複合環境の動的変化による情報伝達制御

松井　広

シナプス前終末部から放出された伝達物質は細胞外空間を拡散し，その広がり方に従って，神経細胞間の情報伝達の特性は決定される(Matsui and von Gersdorff, 2006)。伝達物質の拡散を制御し，学習や記憶に重要とされるシナプス辺縁の受容体の活性化を制御できる格好の位置に，グリア細胞が存在する。我々は，シナプス－グリア複合環境の動的変化が，伝達物質濃度の時空間特性にどう影響するのか調べている。これまで，シナプス前細胞からグリア細胞のほうに向けて異所性のシナプス小胞放出があり，これがニューロン－グリア間の素早い情報伝達を担っていることを示してきた(Matsui and Jahr, 2006)。この情報伝達によってグリア細胞の形態や機能が制御されている可能性を，二光子励起イメージングによって解析している(Matsui, 2006)。グリア細胞によるシナプスの包囲率の相違が，シナプス伝達にどんな影響を与えるのかを，電気生理学・電子顕微鏡法も組み合わせて解明する。

大脳神経回路論研究部門

【概要】

大脳皮質は多くの領域から構成され，それぞれが機能分担をすることで知覚，運動，思考といった我々の知的活動を支えている。大脳皮質がどのようにしてこのような複雑な情報処理をしているかは未だに大きな謎になっている。この仕組みを知るためには，皮質内神経回路の構造と機能を明らかにする必要がある。皮質神経回路は種々のタイプの神経細胞から構成されていることは知られているが，個々の神経細胞の情報処理方式・空間配置や，また，それらの神経結合の法則性に関してはほとんど理解されていない。本部門では，大脳皮質の内部回路の構造的・機能的解析を行ない，皮質局所回路の構築原理を解明することを目標としている。その解析のために，皮質を構成するニューロンタイプを，化学物質発現・生理的性質・軸索投射・樹状突起形態など多方面から同定した上で，これらの神経細胞間のシナプス結合を電気生理学・形態学の技術を組み合わせて調べている。現在は主に，各ニューロンタイプの樹状突起上におけるシナプス配置，錐体細胞サブタイプ間のシナプス結合特性，非錐体細胞サブタイプから錐体細胞への神経結合選択性を定量的に解析している。最終的には，これらの解析結果をベースに，ニューロンタイプの機能分担や層構造の役割，さらに皮質から他の皮質領域・基底核・脳幹などへの多様な投射の機能的意味を探求していこうと考えている。

皮質棘突起への抑制性と興奮性入力の二重支配

窪田芳之，畑田小百合，川口泰雄

非錐体細胞 9 個のターゲットを電子顕微鏡 3 次元再構築法で検討した結果，全ての細胞で，実に 25-50%が棘突起である事を突き止めた。さらに，そのほとんどの棘突起は，もう一つのシナプス入力（非対称性）を受けていた（DI 棘突起）。次に，この DI 棘突起を神経支配している興奮性入力が，錐体細胞由来なのか，視床からの入力なのかを明らかにした。皮質では，VGLUT1，VGLUT2 陽性終末のオリジンがそれぞれ錐体細胞と視床投射細胞である事を利用して，DI 棘突起に，どの VGLUT 陽性神経終末が入力するかを検討した。全ての層から 700 余の棘突起を電子顕微鏡で観察した結果，VGLUT2 陽性神経終末が入力する棘突起の約 10%で抑制性入力を受ける事がわかった。また，VGLUT2 陽性神経終末が入力する棘突起は perforated synapse が多く，大きめの棘突起である事もわかった。

皮質回路における発火パタンに依存した結合回路

大塚岳，川口泰雄

大脳皮質錐体細胞の発火特性は多様であることが知られている。我々は，前頭皮質 5 層錐体細胞においてスライスパッチ記録を行い，発火パタンを通電時にスパイク規則的に発生する細胞と通電の初期にしかスパイクが発生しない細胞，また通電開始時にバースト発火する細胞の 3 種類に分類した。今回，2/3 層錐体細胞から 5 層錐体細胞へのシナプス入力を発火パタンで分類したニューロンサブタイプごとに検討した。その結果，通電に対してスパイクが規則的に発生する細胞とバースト発火する細胞はそれらの細胞体の 5 層内の位置に関係なく 2/3 層から入力を受けるのに対して，通電の初期にしかスパイクが発生しない細胞は細胞体が 5 層の上部にあるものは 2/3 層の上部にある細胞から，5 層下部に位置する細胞は 2/3 層の下部にある細胞から入力を受ける傾向にあることがわかった。2/3 層からの入力は発火パタンサブタイプによって異なると考えられる。

前頭皮質 5 層錐体細胞の皮質下構造に依存した機能分化

森島美絵子，川口泰雄

これまでに, 二種類の 5 層錐体細胞, 橋核投射細胞（CPn 細胞）と対側線条体投射細胞（CCS 細胞）の形態やシナプス結合選択性を明らかにした。今年度はサブタイプ間のシナプスコンタクト部位の樹状突起分布を調べた。コンタクト部位は CCS/CCS 結合では主に基底樹状突起であるのに対して，CCS/CPn 結合では尖端樹状突起にもみられた。結合可能性を見積もるために，軸索と樹状突起間が近接距離にある樹状突起部位（近接点）を求めた。シナプス結合がみられないペアーでも近接点があり，結合があった場合は約 2 割がコンタクトしていた。尖端樹状突起への近接点は, 両方の結合で見られたのに対して，コンタクト頻度は CCS/CPn 結合で大きかった。結合している CCS 細胞では樹状突起形態に相同性がみられた。皮質下構造へ投射する 5 層細胞は複雑に機能分化しているが，それらの間には固有の結合選択性があることがわかった。

アセチルコリン作用の GABA 細胞サブタイプ依存性

Allan G. Gulledge，川口泰雄

アセチルコリンの大脳皮質 GABA 細胞への作用は, 研究グループによって大きく異なる考え方が出されてきた。今回，GABA 細胞サブタイプへのアセチルコリンの一過性応答を再検討した。m2 型ムスカリン受容体を介した過分極が CCK 陽性大型バスケット細胞でみられた。ニコチン受容体を介した脱分極は，VIP 細胞やニューログリア様細胞でみられた。FS 細胞，ソマトスタチン細胞では，他のグループによる報告とは異なり一過性応答は殆ど観察できなかった。私たちの以前の持続的投与結果と合わせると，アセチルコリンは皮質下構造に投射する 5 層錐体細胞を一過性に抑制する一方，GABA 細胞ではニコチン受容体による脱分極・ムスカリン受容体による過分極・ムスカリン受容体による緩徐な持続的脱分極がサブタイプごとに異なる組み合わせで発現し，これらを介して抑制性回路活動を調節していることが明らかになった。

大脳皮質非錐体細胞への抑制性シナプス入力と興奮性シナプス入力の割合

関川明生，窪田芳之，川口泰雄

大脳皮質の非錐体細胞である parvalbumin (PV)細胞，calretinin (CR) 細胞，somatostatin (SOM) 細胞，substance P receptor (SPR) 細胞に入力する興奮性と抑制性の神経終末の割合を求めた。ラット前脳の切片を，それぞれの抗体を用いて染色し，超薄切片を作製し，包埋後免疫組織化学法で GABA 染色を施した。電子顕微鏡観察の結果，PV 細胞に入力している GABA 神経終末は全体の 1 割程度で，残りは，非対称性の興奮性と思われる神経終末であった。しかし，GABA 入力の大半は細胞体を神経支配していた。一方，CR 細胞と SOM 細胞に入力している GABA 神経終末は，全体の 3 割程度であった。それぞれ細胞体への入力の 2/3 は GABA 神経終末であった。SPR 細胞に入力している GABA 神経終末は, 全体の 2 割程度であり，樹状突起の太さに関わらず，GABA 神経終末支配が認められた。

心理生理学研究部門

【概要】

認知，記憶，思考，行動，情動，感性などに関連する脳活動を中心に，ヒトを対象とした実験的研究を推進している。脳神経活動に伴う局所的な循環やエネルギー代謝の変化をとらえる脳機能イメーシング（機能的 MRI）と，時間分解能にすぐれた電気生理学的手法を統合的にもちいることにより，高次脳機能を動的かつ大局的に理解することを目指す。特に，機能局在と機能連関のダイナミックな変化を画像化することにより，感覚脱失に伴う神経活動の変化や発達および学習による新たな機能の獲得など，高次脳機能の可塑性（＝ヒト脳のやわらかさ）のメカニズムに迫ろうとしている。最近は，言語・非言語性のコミュニケーションを含む人間の社会行動の神経基盤とその発達過程に重点をおいて研究を進めている。

人物の多様式表象と adaptation

杉浦　元亮，間野　陽子，佐々木　章宏，定藤　規弘

人物認知は,顔や名前などの単様式の感覚処理を経て,多様式表象に至る階層的な処理と考えられている。感覚刺戟の反復提示による脳賦活の低下(adaptation)は，その領域と反復処理される情報表象との密接な関連を示すと考えられているが，この関係が多様式表象においても成立するかは不明である。今回我々は顔認知課題を用いて,多様式表象に関わる皮質領域で, BOLD 信号の adaptation が観測されるかを調べた。24 名の健常被験者に個人的知己，有名人，未知の人物の顔写真を 2 回づつ提示し，顔の既知未知判断中の脳活動を fMRI を用いて測定した。個人的知己の認知と有名人の認知との間で統計的に有意な活動の差が見られる領域（すなわち人物の多様式表象に関わると考えられる）で，統計的有意な adaptation が観測された。adaptation は単感覚表象だけでなく多様式表象の処理に関わるネットワークにおいても起きることが示唆された。

対連合学習を成立させるための神経基盤の解析

田邊　宏樹，定藤　規弘

連合学習を成立させる神経基盤について検討するため,難易度の異なる 2 つの遅延型対連合学習 (PA) 課題と対照条件として遅延見本合わせ (DMS) 課題を遂行中の脳活動を機能的 MRI により計測した。イメージング解析の結果，上側頭溝前方部の活動は，易しい PA 課題では全被験者において学習の初期に活動が高く学習が進むにつれて減衰するのに対し, DMS 課題では最初から活動がないことが明らかとなった。また，難しい PA 課題では被験者毎の最終セッションの成績と上側頭溝の第一セッションから最終セッションの脳活動の減少の割合に相関があった。これらのことから上側頭溝前方部の活動が対連合の形成に重要な役割を果たすことが示唆された。また，作業記憶の component を示す遅延期間での PA-DMS コントラストにおいて両側の背外側前頭前野(DLPFC)と頭頂間溝(IPS)，左腹外側前頭前野 (VLPFC) の活動がみられ，この活動は学習中に変化しないことを見いだした。さらに，これらの領域内で難しい PA 課題の被験者の成績と相関するのは VLPFC のみであることが分かった。このことから，対連合学習における DLPFC と VLPFC の役割の違いが明らかとなった。

自己顔評価に関わる神経基盤

守田知代（科学技術振興機構），板倉昭二（京都大学），定藤規弘

自己像のフィードバックが与えられると，自己認知プロセスに加えて自己評価的な認知活動が開始される。理想的な基準との間にズレが検出されると，負の自己意識感情（例：恥ずかしさ）が生起することが知られている。本研究では，自己認知と自己評価に関わる神経基盤の違いを明らかにすることを目的とした。予め撮影されたビデオ画像から切り出された顔写真を用い，自己顔および他者顔を評価しているときの脳活動を fMRI を用いて計測した。他者顔に比べて自己顔を評価している際に，右側前頭前野，島，帯状回および後頭葉の活動が増加していた。右側前頭前野の活動のピークは，運動前野付近(BA6/44)および，より前方の下前頭回付近（BA45/46）の 2 箇所に存在し，これら 2 領域の活動は異なる様相を示していた。前方の下前頭回の活動が，自己意識感情の強度に伴って変化していたことから，この領域が自己評価に関与しているものと考えられる。

「自分に対する良い評判を獲得しようとする動機」の神経基盤に関する研究

出馬圭世，齋藤大輔，定藤規弘

日常生活の様々な場面において，「他者に自分に対して良い印象を持ってもらいたい」という動機や期待は，我々の意思決定や行動に影響を及ぼす。また，「ヒトの利他性の進化」に関する理論的研究からも評判(reputation) の重要性が指摘されている。そこで本研究では，自分に対する良い評判を獲得しようとする動機の神経基盤を，機能的 MRI を用いて検討した。実験では，他者の前で社会規範に関する自分の行動傾向を呈示するという課題を被験者に行わせることにより，その動機が高まった状態を作り出した。解析の結果，その動機が高まった際に，内側前頭前野と尾状核において有意な活動の増加が見られた。尾状核は報酬系 (reward system) の一部であることが知られており，内側前頭前野は自分の評判の表象において役割を果たすことが知られていることから，この二つの部位は social reward system として，我々の日常の社会的意思決定・行動において重要な役割を果てしていると考えられる。

同側第一次運動野における非対称な運動頻度依存的活動抑制

林正道，齋藤大輔（科学技術振興機構），荒牧勇（情報通信研究機構），
浅井竜哉（福井大学），藤林靖久（福井大学），定藤規弘

手指の運動には対側の第一次運動野(M1)からの皮質脊髄路と共に，錐体交差しない同側 M1 からの投射と，脳梁を介した対側 M1 から同側 M1 への M1 の神経連絡が深く関わっている。近年の電気生理学的知見では，これらに左右非対称性があることが示されている。運動頻度の増加は対側 M1 の神経活動を増加させるが，同側 M1 の運動頻度との関連は明らかにされていない。本研究では，片手手指の対立運動を複数の異なる運動頻度で遂行中の脳活動を，fMRI を用いて計測，評価した。運動する手と対側の M1 の活動は左右半球で差は見られなかったが，同側 M1 では有意な左右非対称性があり，右半球では運動頻度依存的な活動の抑制，左半球では活動が抑制されるものの運動頻度依存的に緩和されるという結果を得た。これらの結果は，運動頻度の上昇に伴った M1 間の抑制，及び M1 の同側支配が共に左半球優位であることを示唆している。

物語理解における感情変化の検出の神経基盤

米田英嗣，齋藤大輔，楠見　孝（京都大学），定藤　規弘

我々は物語を読む際に，主人公の感情変化を検出しながら理解している。物語主人公の感情変化を検出するには，変化前の主人公の感情状態を理解し，変化後の感情状態を認識しなくてはならない。本研究では，主人公の感情変化を検出する際に賦活する脳部位を明らかにするために，fMRI を用いて検討した。被験者は状況設定文と感情価を持った結末文から構成される文章を読み，状況設定文と結末文の間で生じる主人公の感情変化の程度を三段階で判断した。ネガティブな状況からポジティブな結末になる物語とポジティブな状況からポジティブな結末になる物語を比較した結果，左外側前頭眼窩皮質，左側頭極，背内側前頭皮質，右の小脳に活動が見られた。この結果は，これらの領域がネガティブからポジティブにいたる感情価の変化の方向を表象していることを示している。本研究から，左外側前頭眼窩皮質を含んだ前頭前野—側頭部ネットワークが感情変化の検出に重要な役割を果たしていることが示唆された。

他者の感情を認知する際の視点取得に関わる神経基盤の解明

間野陽子，原田宗子，齋藤大輔，杉浦元亮，定藤　規弘

視点取得は他者の知覚を取得し理解する能力であり他者の感情を認知する際に必要となる。我々は他者の感情に共感する際の視点取得の神経基盤を fMRI を用いて検討した。被験者は二文から成る状況文を読み，主人公の感情を忖度する課題を行った。一文目の主人公が二文目の出来事と同じ場所に存在する場所一致条件と，別の場所に存在する場所不一致条件を用いて視点取得のワークロードを実験的に操作した。被験者に提示される二文目は条件間で同じ内容に設定し文脈効果により変化する脳活動を計測した。その結果，場所不一致条件において主人公の感情を忖度する際の神経基盤が場所一致条件時と比較して後部帯状皮質と右側側頭頭頂連結部での賦活が確認された。後部帯状皮質は視点取得と感情語の評価に関連することが知られており，側頭頭頂連結部は他者の心的表象の理解と同様に空間的な視点取得に関与することが知られている。我々は後部帯状皮質と右側側頭頭頂連結部の両領域が他者の感情を認知する際の視点取得のワークロードに関与することを示唆する。

NIRS と fMRI の同時計測を用いた BOLD 応答の非線形性の由来に関する検討

豊田　浩士（科学技術振興機構），定藤　規弘

blood oxygenation level-dependet (BOLD)応答の，異なる持続時間の刺激に対する非線形性については，機能的MRI(fMRI)を用いた多くの研究が知られている。先行研究により，この非線形性の由来は，神経順応や酸素摂取率(OEF)応答の非線形性によるとされているが，後者に関する定量的な検討はなされていない。我々は fMRI と近赤外分光法(NIRS)の同時計測により，OEF 応答が，BOLD 応答の非線形性にどの程度寄与するのかを定量的に調べた。4 通り持続時間の視覚刺激に対する BOLD 信号と NIRS 由来のヘモグロビン濃度の変化を計測した。これら応答の非線形性を，インパルス応答関数と飽和非線形指数を用いて定量的に評価した。BOLD 応答は，NIRS 計測から導出した OEF 応答と同等の飽和非線形性を示した。NIRS 計測から導出した脳血液量の応答は，BOLD 応答に比してより小さな飽和非線形性を示した。BOLD応答のこの種の非線形性は，主としてOEF応答のそれによる，と結論付けた。

発達生理学研究系

認知行動発達機構研究部門

【概要】

2006 年度は 1996 年に研究室がスタートして 10 周年の節目の年だった。

科学技術振興機構の戦略的創造研究推進事業(CREST)での「神経回路網における損傷後の機能代償機構」に関する共同研究が本格化してきた。皮質脊髄路の脊髄レベルでの損傷後の機能代償過程についての実験が PET と可逆的機能ブロック法による実験がひと段落し，電気生理学的な回復過程の評価，さらにはマイクロアレイによる遺伝子発現の網羅的解析にターゲットが移ってきた。また，一次視覚野損傷後のサッケード運動制御についても，心理物理・行動解析実験と並行して，中脳上丘からの単一細胞活動記録実験が本格化してきた。また，HFSP での「トップダウン的，ボトムアップ的注意の神経機構」に関する国際共同研究も本格化し，南カリフォルニア大学の Itti 博士やカナダのクイーンズ大学の Munoz 教授のグループとの共同研究も開始し，客員研究員としての来訪が頻繁になってきた。研究室のスタッフとしては斎藤紀美香さんが非常勤研究員に。また坂谷智也君が英国オックスフォード大学への留学から帰国して研究員として着任した。高浦加奈さんが総研大 1 年に入学。また加藤智子さんが技術支援員として研究室に加わった。また，伊佐がブレインサイエンス振興財団の第 20 回塚原仲晃記念賞を受賞した。

随意運動の制御におけるシナプス前抑制の役割

関　和彦，武井　智彦

筋神経からの感覚フードバックは随意運動の制御に重要であることは広く知られているが，その感覚入力がどのように運動指令に組み込まれているかについては確立した知見がない。この点を明らかにするため，サルに単純な手首屈曲伸展運動を訓練し，脊髄ニューロンの筋神経刺激に対する応答性の変化を随意運動の各局面で比較した。その結果，I 群筋神経より単シナプス性入力を受ける脊髄ニューロンの応答性は筋に誘発される反射性応答がその時の運動と拮抗する場合のみ顕著に抑制されることが示された。さらに，記録されたニューロンの上肢筋群への出力を spike-triggered averaging 法を用いて調べた結果，一部のニューロンは運動ニューロンへの興奮性直接投射を持つことが明らかになった。以上の結果から，I 群筋神経から脊髄への求心性入力が (1) 脊髄内の正帰還回路を介して筋活動の促進に用いられている事，(2) しかし 1 が行われている随意運動と拮抗する場合は，シナプス前抑制を介して抑制されること，の 2 点が示唆された。

第一次視覚野損傷サルの残存視覚運動変換機能とその神経生理

吉田 正俊，　伊佐 正

盲視の動物モデルとして片側の第一次視覚野を外科的に切除したニホンザルを二匹作成して，急速眼球運動を指標とした行動実験および神経生理学的実験を行った。(1)強制選択型の視覚誘導性眼球運動課題を遂行できることを確認した。(2) 視覚検出型の視覚誘導性眼球運動課題の成績が(1)の課題から予想されるよりも悪いことを見出した。(3) 時間的ギャップを (1) の 課題に加えることで express saccade と同等の潜時を持つ急速眼球運動が起

こることを見いだした。(4)上丘から(1)の課題遂行中の単一神経活動を記録し，視覚刺激への反応および急速眼球運動の遂行に関わる活動があることを見出した。(5)さらに(2)の課題遂行中の視覚刺激への反応は視覚検出の成功不成功と相関していることを見出した。(6)また，(3)の課題遂行中の活動は正常な動物での express saccade 時に見られる活動と類似していた。

黒質網様部から上丘中間層 GABA 作動性ニューロンへの抑制性入力

金田勝幸，伊佐かおる，伊佐正

黒質網様部 (SNr)からの GABA 作動性抑制性投射が上丘中間層 (SGI)投射ニューロンのみでなく, SGI の抑制性ニューロンにも入力しているのか否かを検討した。

GAD67-GFP マウスの SNr に BDA を注入したところ，その神経終末が SGI の GABA 作動性ニューロン上にシナプスを形成していることが共焦点顕微鏡による解析から明らかとなった。さらに，スライス標本を用いて SNr の電気刺激による応答を SGI GABA 作動性ニューロンからホールセル記録したところ, $GABA_A$ 受容体アンタゴニスト感受性で単シナプス性の IPSCs が誘発されることが分かった。以上の結果は，SNr からの抑制性投射が SGI GABA 作動性ニューロンにも入力していることを示しおり，SNr の入力が単に SGI の興奮－抑制のバランスを制御しているのみではないことを示唆している。

$GABA_B$ 受容体を介する上丘でのバースト発火制御機構

金田勝幸，伊佐かおる，伊佐正

上丘中間層ニューロンのバースト発火の制御における $GABA_B$ 受容体の役割をスライス標本上でホールセル記録法により検討した。$GABA_A$ 受容体アンタゴニスト存在下，浅層の電気刺激により中間層ニューロンでバースト発火が誘発された。このバースト発火の持続時間は $GABA_B$ 受容体アンタゴニスト CGP52432 (CGP) のバス適用により顕著に増大した。同様の効果は CGP を浅層に局所適用することでも観察された。また，浅層ニューロンのバースト発火の持続時間も CGP のバス適用で有意に増大した。さらに，NMDA 受容体アンタゴニストの浅層への局所適用は浅層ニューロンのみでなく，中間層ニューロンのバースト発火を顕著に抑制した。以上の結果は，浅層に存在する $GABA_B$ 受容体の活性化が浅層ニューロンのバースト発火の持続時間を制限し，それにより，中間層ニューロンのバースト発火の持続時間も制限していることを示唆している。

把握運動に関与する脊髄ニューロンの役割　－フィールド電位を用いた解析－

武井　智彦，関　和彦

筋活動を生み出す中枢神経活動の解析法として，神経発火をトリガーとした筋電図の加算平均法（Spike-triggered Average 法）が存在する。通常この解析には一万回程度の加算平均が必要であり，従来，全ての神経活動に対して長時間の記録を行い，オフライン解析によってようやく神経活動による筋出力の効果を検証するという方法がとられてきた。本共同研究では，多チャンネル筋電図に対してオンラインで Spike-triggered Average 解析を行うシステムを開発することで，神経活動記録中に神経活動による筋出力の効果を検出し，より効果的に興味対象となる神経活動を探索する手法を確立することを目指した。なお研究内容のうち，解析システ

ムの設計, 解析プログラムの作成を松村, 武井が担当し, 筋電図・神経活動記録などシステムの生理学実験への適用を伊佐・関が担当した。

まず慢性筋電図計測のため, サルの上肢筋肉 16 種類にワイヤー電極を慢性的に埋め込み，数ヶ月単位での安定した筋電図の導出を行った。これらの筋電図信号は，デジタイジングののち, PC メモリに常時バッファリングされた。次に，サルの脊髄神経活動を細胞外記録し，その神経発火時点をオンラインで検出し，このトリガー信号を同じ PC へと入力した。Spike-triggered Average 法については，松村ら(Matsumura et al. *J. Neurosci* 1996) による細胞内電位の加算平均法を応用し，神経発火時点をトリガーとして記録した筋活動をオンラインで加算平均を行い，その解析結果を PC 画面上に表示するプログラムを作成した。

本年度の成果として，(1) 多チャンネル筋電図をサンプリングし（16 チャンネル，5kHz），PC メモリにバッファリングするシステムの構築，および (2) バッファリングされた筋活動をオンラインで加算平均するソフトウェアの開発を完了した。さらに，擬似神経活動を用いて本システムの作動試験を行った結果，本システムによって約 100Hz までの神経活動に対して正常にオンライン解析を行えることが確認された。

これらの結果は，本システムが実際の神経活動記録実験へ応用可能であることを示している。今後，本システムを神経活動記録実験に適用することで，従来のオフライン解析のみの実験よりも効率的に興味対象の神経活動を探索し，それらを選択的に記録することが可能になると期待される。

The origin of spreading burst activities in the local circuit of the superior colliculus

Penphimon Phongphanphanee[1,2] and Tadashi Isa[1,2,3]

([1]Department of Developmental Physiology, National Institute for Physiological Sciences
[2]School of Life Science, The Graduate University for Advanced Studies
[3]Core Research for the Evolutionary Science and Technology (CREST),
Japan Science and Technology Corporation (JST))

Our previous studies have shown that when slices of the superior colliculus (SC) are exposed to a solution containing 10 μM bicuculline and a low concentration of Mg^{2+} (0.1 mM), most neurons in deeper layers (dSC) and some neurons in the superficial layers (sSC) exhibited spontaneous depolarization and burst firing. In present study, we used this condition to study the mechanism of the spread of burst activity in the mice SC slices with the field potential recording from 64 multi-planar electrodes and the whole cell patch clamp recording. The burst originally occurred from the ventral portion of the sSC and then spread to the dSC. Current injection to a wide-field vertical (WFV) cell, mainly located in the ventral sSC, could evoke the burst response, which spread from the sSC to the dSC. The WFV cells uniquely exhibit large I_h currents among the SC cell groups and application of 50-100 μM ZD7288, a I_h blocker, completely eliminated the spontaneous bursts. These finding supported the idea that WFV cells are the origin for the propagation of burst activity in the SC.

生体恒常機能発達機構研究部門

【概要】

当部門は，発達および障害回復の過程で一旦形成された機能的神経回路に起こる再編成のメカニズムを回路レベルで解明することを主な目標に研究をしている。そのため，3 つのサブテーマについて研究を進めている。1) 発達期における再編のメカニズムとして，シナプスレベルにおいて，伝達物質のスイッチング，2)細胞内イオン

環境の変化による GABA の興奮性から抑制性へのスイッチとその制御機構について細胞内 Cl イオンくみ出し分子 KCC2 の機能制御を中心に，神経栄養因子，環境/回路活動による制御を検討している。3)本年度から神経回路の可塑的変化を生体で観察するため，フェムト秒パスルレーザーを用いた多光子励起法を利用して，マウス大脳皮質細胞の全層にわたる可視化技術の確立および向上を目指している。更に，同一動物の同一微細構造を長期間にわたり繰り返し観察する技術も確立した。これらの技術を利用して，現在，神経回路の微細構造の長期変化の観察を試みている。人事として本年度 4 月から，群馬大学から高鶴裕介氏が生理研非常勤研究員として，山口純弥氏が総研大 1 年生として研究に参加した。また，平成 17 年 1 月に九州大学から石橋仁氏が待望の助教授として部門の研究に参加した。また，米国テキサス大学 Malcom Brodwick 博士が外国人客員教授として細胞内 Cl 濃度調節機構の研究に，ピッツバーグ大学 Karl Kandler 博士がとオーストラリアサウスウェールズ大学 Andrew Moorhouse 氏が伝達物質のスイッチングの研究に外国人訪問研究員として参画した。

発達期における神経伝達物質のスイッチング

鍋倉淳一，西巻拓也，山口純弥

ラット聴覚系中経路核である外側上オリーブ核に内側台形体核から入力する伝達物質自体が未熟期の GABA から成熟期のグリシンに単一終末内でスイッチすることを微小シナプス電流の特性の解析などの電気生理学的手法，神経終末内の GABA，GAD やグリシン免疫電顕や免疫組織学的手法を用いて明らかにした。この伝達物質のスイッチングは，発達期における主要な再編成機構である余剰回路の除去や伝達物質受容体の変化と並ぶ大きなカテゴリーの変化と考えられる。現在，脳の発達に対する GABA の重要性に注目が集められている。このモデル系および海馬において，何故未熟期には GABA である必要があるのかを，GABA の未熟期における興奮性および $GABA_B$ 受容体の発達変化と関連機能について検討している。

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

鍋倉淳一，渡部美穂，北村明彦，和氣弘明，堀部尚子

未熟期および虚血や傷害後早期に GABA は興奮性伝達物質としての作用を獲得する。これは $GABA_A$ 受容体に内蔵するチャネルを流れる Cl^- イオンの向きによって決定されるため，細胞内 Cl^- イオン濃度によって GABA は興奮性/抑制性が決定される。この細胞内 Cl^- イオン濃度は神経細胞特異的に発現する K^+-Cl^- トランスポーターである KCC2 によって主に決定されている。発達期や再生期における KCC2 の発現，およびその機構を検討している。KCC2 の発現制御に関して，細胞内制御分子の探索を行なっている。

カンナビイドによる海馬抑制性伝達調節

前島隆司

未熟期海馬においては，リズム活動があり，海馬回路形成・発達を制御している。このリズム活動は CA3 領域に存在するリズムジェネレーターによって海馬全体に伝播する。このリズム発生の一因として GABA の脱分極作用が関与している。CA3 領域における GABA 回路の制御機構について，シナプス工細胞の代謝型グルタミン酸作

動性受容体の活性化によって逆行性に内因性カンナビノイドが抑制性神経終末に作用し，GABA 放出を抑制していることを明らかにした。

クリプトンーYAG レーザーを用いた脳虚血障害モデル動物作成技術の開発

鍋倉淳一，和氣弘明，堀部尚子

脳障害の回復期における神経回路の可塑性の研究を遂行するにあたり，生体において，程度の一定した脳障害モデルを作成する必要がある。任意の脳血管の閉塞・再開通を任意に行なうことができる技術を脳虚血作成技術に精通している八尾博史博士と共同で開発を行なう。具体的には，ローズベンガル色素を静脈注入後，任意の脳血管にクリプトンレーザーを極短時間照射し，血栓形成による閉塞を作成する。任意の時間後に高エネルギーパルスレーザーである YAG レーザーを照射し，血管の再開通を起こさせる。この技術はマウスでは頭骸骨を駆けることなく，非観血的に閉塞・再還流が可能であり，脳虚血・障害の分野では画期的技術となる。

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

鍋倉淳一，和氣弘明，高鶴裕介，稲田浩之

神経回路の発達および脳障害の回復期における神経回路の可塑性の研究を遂行するにあたり，究極的に生体での観察が不可欠である。そのため，生体における神経回路の可視化のため，長波長短パルスレーザーを利用して生体深部の微細構造を観察可能な多光子励起法を種々の神経細胞に蛍光蛋白が発現している遺伝子改変動物に適用し，大脳皮質回路の可視化する方法の立ち上げを行った。光路の開発・調節，頭蓋骨に適用する特殊アダプターの開発などを行い，マウスにおいて，大脳皮質表面から 1 ミリの深部まで観察可能な技術のを行った。その結果，大脳皮質錐体細胞を全層にわたり，樹状突起，棘突起，軸策などのその微細構造を観察することが可能であり，また，同じ微細構造を数日間にわたり連続観察可能となった。さらに，同レーザーを利用して，生体において微細構造の局所障害をおこす技術の開発に成功している。脳虚血により，障害神経細胞の樹状突起および極突起が数週間に渡り，形成・消失を繰り返すこと，また，通常，シナプス前終末様構造物が，障害後 2 週目までは盛んに形成および消失を繰り返し，その後安定化することなど新たな生体内での微細構造の変化を検討している。

グリアの生体内動態の観察

鍋倉淳一，和氣弘明，高鶴裕介，稲田浩之

生体多光子顕微鏡をミクログリアに GFP が特異的に発現しているマウス（Iba1-GFP マウス）に適用し，ミクログリアの生体内動態を観察している。特に，in vitro では不可能である resting 状態のミクログリアの動態と，観察中にレーザーを用いた極局所の障害を与えることにより，ミクログリアの活性化による変化を連続観察することに成功した。Resting と活性化ミクログリアでは，突起の動態速度は同じであるが，resting 状態では突起伸展・退縮の方向性に一定したものが観察されないのに対し，活性化状態では，障害部位に対して突起伸展，障害と反対側に対しては突起退縮がより優位になり，伸展退縮の方向性の極性が生じることが判明した。また，脳形態松井助手とともに S100beta-GFP 動物を用いて，小脳のバーグマングリアの動態を生体内で観察している。

生殖・内分泌系発達機構研究部門

【概要】

本研究部門は，視床下部による摂食行動の調節と末梢組織における代謝調節機構の解明を目指して研究を行っている。視床下部は，摂食行動（エネルギー摂取）とエネルギー消費機構（栄養代謝）を巧みに調節することによって生体エネルギーを一定に保つ重要な働きを担う。しかし，近年，この調節機構の異常が肥満，糖尿病，高血圧など，生活習慣病の発症と密接に関連することが明らかとなってきた。当部門では，視床下部における生体エネルギー代謝の調節機構を分子レベルで解明し，その分子機構を通して生活習慣病など様々な疾患の原因・治療法を明らかにしたいと考えている。現在実施している主たる研究課題は次の通りである。1)AMP キナーゼによる生体エネルギー代謝の調節機構の解明，2)レプチン，神経ペプチド，BDNF による糖・脂質代謝調節機構の解明，3)脂肪酸酸化を促進するレプチン・シグナル伝達機構の解明，4)AMP キナーゼ・ファミリー，ARK5 による代謝調節作用の解明。

AMP キナーゼによる生体エネルギー代謝の調節機構の解明

箕越　靖彦
岡本　士毅
志内　哲也
田中　智洋（京都大学大学院医学研究科）
益崎　裕章（京都大学大学院医学研究科）
窪田　直人（東京大学大学院医学系研究科糖尿病代謝内科）
門脇　孝（東京大学大学院医学系研究科糖尿病代謝内科）

我々は, AMP キナーゼがレプチンやアディポネクチンなどホルモンによって活性化して骨格筋における脂肪の利用を促進すること，視床下部 AMP キナーゼが摂食行動を制御することを明らかにしている。本研究課題では，AMP キナーゼによる生体エネルギー代謝の調節機構を明らかにするため，活性型並びに不活性型 AMP キナーゼを視床下部にレンチウイルスを用いて発現させ，摂食行動に及ぼす影響を調べた。その結果，マウス視床下部室傍核に活性型 AMP キナーゼを発現させるとマウスの摂食量が増加，肥満することに加え，食餌に対する嗜好性が変化することを見出した。また我々は，レプチンによる骨格筋での AMP キナーゼの活性化が脳のメラノコルチン受容体を介すること，メラノコルチン受容体作動薬を脳室内に投与すると，レプチン抵抗性を有する肥満マウスにおいても骨格筋での AMP キナーゼを活性することを見出した。さらに我々は，アディポネクチンが，末梢組織だけでなく，視床下部の AMP キナーゼをも活性化し，レプチンの作用に拮抗して摂食量を増加させることを見出した。

レプチン，神経ペプチド，BDNF による糖・脂質代謝調節機構の解明

箕越　靖彦
志内　哲也
李　順姫
斉藤　久美子

我々は，レプチンが摂食行動を抑制するだけでなく，視床下部－交感神経系の働きを介して褐色脂肪組織や骨格筋などエネルギー消費器官でのグルコースおよび脂肪酸の利用を促進することを明らかにしてきた。我々は，この作用がレプチンだけでなく，視床下部に特異的に発現する神経ペプチド・オレキシンによっても惹起されることを見いだした。オレキシンは，睡眠覚醒レベルの調節，報酬系の調節などに関与する。このことからオレキシンは，覚醒レベルを高めると同時に，骨格筋での代謝を亢進させるなど，食餌獲得行動など行動発現の調節に関与すると考えられる。さらに我々は，オレキシンが味覚刺激によって活性化され，その結果，交感神経－β2アドレナリン受容体経路を介して骨格筋での糖の取り込みを促進することをβ受容体のノックアウトマウスなどを用いて明らかにした。

また，最近我々は，マウスに高脂肪食を摂取させると，脂肪細胞において BDNF が発現することを見出した。そして，発現した BDNF が脂肪細胞自らに作用し，TrkB-T1 受容体を介して血栓形成を促進するアディポカイン，PAI-1 の発現を抑制することを見出した。現在，このシグナル伝達機構について in vivo，in vitro の両面で調べている。

脂肪酸酸化を促進するレプチン・シグナル伝達機構の解明

箕越　靖彦
鈴木　敦

本研究では，筋芽細胞株である C2C12 細胞を用いて脂肪酸酸化を促進するレプチンのシグナル伝達機構を調べている。この研究により，レプチンが，ATM 並びに CaMKKβを介して AMP キナーゼを活性化することを見いだした。活性化した AMP キナーゼは，acetyl-CoA carboxylase (ACC)をリン酸化してその活性を抑制し，その結果，ACC の産物である malonyl-CoA 量を低下させる。malonyl-CoA は脂肪酸をミトコンドリアに取り込む酵素，CPT1 の強いアロステリック阻害剤であるので，malonyl-CoA 量が低下することで CPT1 活性が上昇し，ミトコンドリアでの脂肪酸酸化が促進する。さらに我々は，活性化した AMP キナーゼが核内に移行し，脂肪酸酸化関連遺伝子の発現に関わる転写調節因子 PPARαの発現を促進することを見出した。ミトコンドリアでの脂肪酸酸化と核内の PPARαの発現は，AMP キナーゼのβサブユニットによって制御されることを見出した。

AMP キナーゼ・ファミリー，ARK5 による代謝調節作用の解明

箕越　靖彦
鈴木　敦

ARK5 (AMPK-related kinase 5) は AMPK ファミリーの一つであり，IGF1 やインスリンによって活性化する腫瘍細胞の悪性化因子である。しかし，正常組織における生理作用は解明されていない。ARK5 は，脳，心臓，骨格筋に発現するが，今回我々は，ARK5 が，ob/ob 肥満マウス脂肪組織において強く発現することを見出した。そこ

で，骨格筋と脂肪細胞における ARK5 の機能を調べた。ARK5 は，ob/ob マウスの脂肪細胞だけなく，約 1 週間高脂肪食を摂取させたマウス脂肪細胞，3T3-L1 脂肪細胞においても恒常的に ARK5 を発現していた。インスリンは，骨格筋，ob/ob マウス，高脂肪食を摂取したマウスの脂肪細胞の ARK5 を活性化した。3T3-L1 脂肪細胞と C2C12 骨格筋細胞に dominant negative (DN)-ARK5 を発現させたところ，インスリンによる分化，糖取込み，Akt 及び GSK3 のリン酸化が抑制された。さらに，レンチウイルス及び電気穿孔法を用いてマウス副睾丸，皮下脂肪組織に DN-ARK5 を発現させると，高脂肪食摂取による肥大が抑制され，インスリンによる Akt，GSK3 のリン酸化も抑制された。以上の実験結果から，ARK5 は，ob/ob 及び高脂肪食を摂取したマウスの脂肪細胞，並びに骨格筋においてインスリン作用を増強すると考えられる。特に，脂肪細胞では，高脂肪食による脂肪細胞の肥大，増殖に関与している可能性が高い。現在，DN-ARK5 を脂肪細胞，骨格筋で発現するトランスジェニックマウスを作製しており，これを用いて ARK5 の機能をより明らかにしたいと考えている。

脳機能計測センター

形態情報解析室

【概要】

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

超高圧電子顕微鏡室では，医学生物学用超高圧電子顕微鏡（H-1250M 型；常用 1,000kV）を，昭和 57 年 3 月に導入して同年 11 月よりこれを用いての共同利用実験が開始されている。平成 18 年度は共同利用実験計画が 25 年目に入った。本研究所の超高圧電顕の特徴を生かした応用研究の公募に対して全国から応募があり，平成 17 年度は最終的に 14 課題が採択され，実施された。このうち 7 件は，海外の研究者による研究あるいは海外の研究者が関係するものである。これらは，厚い生物試料の立体観察と三次元解析，薄い試料の高分解能観察等である。共同利用実験の成果は，超高圧電子顕微鏡共同利用実験報告の章に詳述されている。超高圧電子顕微鏡室では，上記の共同利用実験計画を援助するとともに，これらの課題を支える各種装置の維持管理及び開発，医学生物学用超高圧電子顕微鏡に関連する各種基礎データの集積および電子顕微鏡画像処理解析法の開発に取り組んでいる。電子線トモグラフィーによる手法には，UCSD，NCMIR による方法及びコロラド大で開発された IMOD プログラムでの方法を用いて解析を進めている。

本年度の超高圧電顕の利用状況の内訳は，共同利用実験等 143 日，修理調整等 49 日である（技術課脳機能計測センター形態情報解析室報告参照）。電顕フィルム等使用枚数は 7,697 枚，フィラメン点灯時間は 481 時間であった。装置は，平均 73%の稼働率で利用されており，試料位置で 10^{-6} Pa 台の高い真空度のもとに，各部の劣化に伴う修理改造を伴いながらも，高い解像度を保って安定に運転されている。

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

小腸絨毛上皮下線維芽細胞の中間系フィラメント

古家　園子（形態情報解析室）

生体内には，星状の形態を示す特殊な線維芽細胞が存在する。肝臓の星細胞，小腸や大腸上皮下の線維維芽細胞などがその典型である。これらは，病理的な状態では脱分化してαアクチンを発現するようになり，盛んな免疫応答をかねそなえた平滑筋様の細胞へと変化する。

従来，正常状態における小腸絨毛上皮下線維芽細胞のメカノセンサーとしての機能に注目して研究を進めてきたが，今回は生後発達過程におけるこれらの細胞の中間系フィラメントやαアクチンの発現の変化を各種の抗体を用いて，免疫組織化学の手法にて解析を行った。

超高圧電子顕微鏡 (H-1250M：1,000kV)像における磁界型レンズのヒステリシス効果

有井達夫（形態情報解析室）

顕微鏡においては，倍率は基本的に重要な要素である。生理研の超高圧電子顕微鏡ではグレーティングレプリカを用いて校正されている。実際に像を撮影するときには，scan1（メッシュ像；約 225 倍のディフォカス像）のモードにおいて一様に照射してから撮影する方法を薦めている。これは，エポン包埋切片などにおいてメッシュ全体

を一様に弱い照射を行うことにより試料を安定化することにおいても効果がある。その後，zoom モードに移行して撮影するが，低倍の撮影においては，倍率 45k 倍(k:1,000)以下で観察し 50k 倍以上としないようにすることを勧めている。これは現在の生理研の超高圧電子顕微鏡において，倍率 50k 倍を越えると，結像のモードが変更されるので，50k 倍以上で撮影した後に，45k 倍までの比較的低い倍率で撮影すると，実際の倍率が 10%以上減少することによる。これを避けるには，50k 倍以上で撮影後，45k 倍以下の低倍で撮影するときには，一度，scan1 のモードにしてから撮影するようにする。この操作により，5% 以内の倍率の再現性を得ることができる。倍率の変化は，磁界型レンズのヒステリシス効果に由来するものである。

機能情報解析室

【概要】

随意運動や意志・判断などの高次機能を司る神経機構の研究が進められた。サルを検査対象として，大脳皮質フィールド電位の直接記録や陽電子断層撮影法などを併用して解析している。

意志に関係する脳活動の研究

達本　徹

「意欲」や「意志」の神経機序は不明な点が多い。これまでに陽電子断層撮影法を用いた研究で，前頭前野・前帯状野・海馬の脳血流量が想定される意欲の変化と一致した変動を示すことを明らかにした。大脳辺縁系と前頭前野の「意欲」への関与を示唆する知見と考えられる。さらに一歩進めて，この脳領域でどのような神経活動が行われているのかを解明するために，運動課題を行うサルの大脳皮質フィールド電位を記録した。その結果，前帯状野 32 野と前頭前野 9 野のシータ波活動が「意欲」や「注意」に相関していると解釈可能な知見を得た。両部位のシータ波は高いコヒーレンスを示し，これらの部位が機能的に関連していることを示唆する。ヒトの脳波で「注意の集中」に関連して観察される前頭正中シータ波(Frontal midline theta rhythms)に相当するものと考えられる。現在，サルのシータ波の発生状況をさらに詳しく研究中である。

生体情報解析室

【概要】

生体情報解析室は，根本知己准教授と機能協関研究部門より一時的に出向した高橋直樹技術職員（2007 年 5 月まで）からなる 2 光子顕微鏡を担当するグループと，生体情報解析用コンピュータシステム，所内情報ネットワークの維持管理を担当する吉村伸明技術課職員，村田安永技術課職員から構成される。本稿では 2 光子顕微鏡グループについてのみ概要を述べる。2 光子顕微鏡グループは機能協関研究部門，生体恒常機能発達部門の協力を得，5F511 号室クリーンルームに広帯域高出力型の超短光パルスレーザーとレーザースキャニング型蛍光顕微鏡からなる 2 光子顕微鏡システムを計 3 台管理している。本年度は広波長帯域の近赤外フェムト秒パルスレーザー装置を新たに導入し，主としてカルシウムイメージングなど細胞機能イメージングを可能とした。

本年度，2 光子顕微鏡グループは，分泌腺・神経組織における形態変化や機能イメージング，開口放出の分子機構について研究を推進した。まず生体恒常機能発達機構研究部門と共同し，個体 in vivo イメージング用正立型

2 光子顕微鏡システムを構築した。本システムでは麻酔下のマウス大脳新皮質の表面から0.9mm以上深部においても断層像を得ることが可能であり，世界でトップクラスのスペックを実現することに成功した。さらに動的なレーザー特性制御システムを開発し，世界にさきがけて，麻酔マウス大脳新皮質 V 層の basal dendrite の超微細構造を明瞭に可視化することに成功した（知的財産委員会了承済，特許申請準備中）。さらに，科学振興機構産学共同シーズイノベーション化事業（顕在化ステージ）の支援を受け，多光子励起法における①in vivo イメージング技術②レーザー光学的な特性③対物レンズ等光学要素④生体標本の安定化（知的財産委員会了承済，特許申請準備中）といった要素技術の開発を推進した。

また，神経伝達物質の開口放出について名古屋大学大学院医学系研究科・廣瀬謙造教授，並木繁行博士の開発したグルタミン酸検出用蛍光プローブを用いて 2 光子顕微鏡によるライブイメージングの検討を行った。さらに，イノシトールリン脂質やカルシウムイオンを介したシグナル伝達系による開口放出の研究を開始した（九州大学大学院歯学研究院・平田雅人教授，兼松隆准教授らのグループと共同研究）。またカルシウム依存性の開口放出における溶液輸送過程，溶液輸送については唾液腺標本を用いたリアルタイムイメージング手法の開発を行い，水チャネルの動態とその生理的な役割について示唆を得た（日本大学松戸歯学部・杉谷博士教授，松木（福島）美和子博士との共同研究）。膵臓外分泌腺における水チャネル AQP12 の生理的機能について，東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・佐々木 成教授，内田信一准教授，頼 建光博士のグループにて作成されたノックアウトマウスを用いて検討を行った。

さらに，2 光子顕微鏡グループでは狭義の細胞生理学の枠を越えた応用研究も開始した。発生生物学においては，バイオ分子センサープロジェクトの支援を受け，体左右差の発生を決定するノード流を検知するセンサー分子について，基礎生物学研究所時空間制御研究室・野中茂紀准教授と共に研究を開始した。特定のシグナル分子の動態を世界にさきがけて可視化することに成功した。また免疫細胞の 2 光子 in vivo イメージングについて，関西医科大学附属生命医学研究所所長木梨達雄教授，戎野幸彦博士のグループと共に研究を開始し，生きたマウスのリンパ節への細胞運動を観察することに成功した。その他，企業と共同実験を数件実施したが，守秘義務のため内容は割愛する。

定期的に自主的なバイオイメージング・セミナーを 12 回開催し，生理学研究所，基礎生物学研究所，分子科学研究所を横断した多くの若手研究者の参加があった。

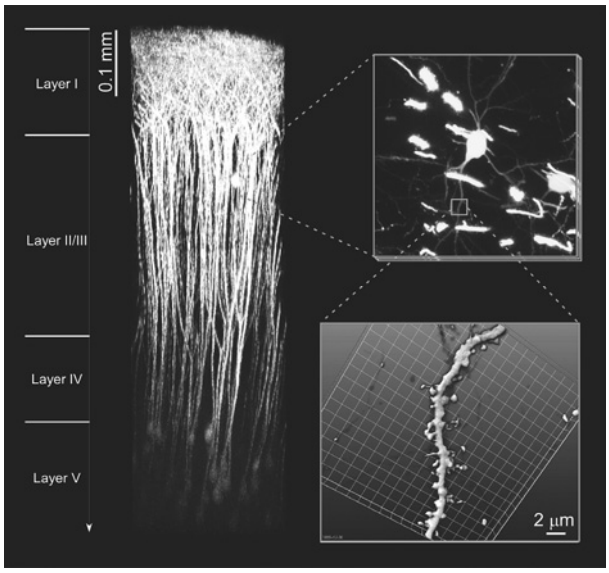


図 1.　生きているマウスの大脳皮質の GFP 発現神経細胞群の 3 次元再構築。2 光子顕微鏡の優れた深部到達性は，生体深部の微小細胞形態や活動を観察することを可能とする。新たに構築した“*in vivo*”2 光子顕微鏡は，大脳表面から 0.9mm 以上の深部を観察することが可能であり，マウス個体を生かしたまま大脳皮質全体を可視化し得る世界トップクラスの顕微鏡である。 (鍋倉淳一教授との共同研究)。

行動・代謝分子解析センター

遺伝子改変動物作製室

【概要】

脳機能に代表されるような複雑な生物反応機構の解明に分子生物学的技術と発生工学的技術を駆使して作製する遺伝子転換動物は必要不可欠で，とくにラットの遺伝子ターゲッティング技術の開発は脳神経系遺伝子を含む数万にも及ぶ遺伝子の役割を研究するために切望されている。遺伝子改変動物作製室では遺伝子改変動物 （マウス，ラット） の作製技術を提供しつつ，遺伝子ターゲッティングによるノックアウトラットの作製, さらには, 作製した遺伝子改変動物の脳研究への積極的応用を目指している。これまでに ES 細胞や精原細胞の株樹立を試みるとともに，核移植や顕微授精など，ラットにおける発生工学的技術の高度化に加えて，遺伝子改変動物を利用した高次脳の発達形成メカニズムの解明に取り組んできた。研究課題のうち下記の 4 題について具体的に示す。(1) 顕微授精 (ICSI) 技術を応用したラットへの外来遺伝子の導入，(2) 精子幹細胞 （GS 細胞）による KO ラット作製, (3) クローンラット開発に向けたラット卵子の自発的活性化機構の解明, (4) 大脳皮質第一次視覚野上に存在する遠近感の知覚に必須の機能ユニット“眼優位カラム”の発達形成メカニズムの解明研究。

リコンビナーゼで被覆した EGFP 遺伝子はラットゲノムに導入されやすいか？

平林 真澄，加藤 めぐみ，金子 涼輔

マウス，ヤギ，ブタでは，リコンビナーゼ(RecA) タンパクで被覆した外来遺伝子を用いるとトランスジェニック (Tg) 動物の作製効率が改善されるという。そこで EGFP および OAMB 遺伝子を RecA タンパクで被覆し，前核注入法と顕微授精法によるラット個体ゲノム上への導入効率を調べた。しかし RecA を介した Tg ラットの作製効率は 0～2.9% に過ぎず, 対照区の値 (0.9～2.8%) と差は認められなかった。当該タンパク質がゲノムに対して外来遺伝子を組み込まれやすくする働きを持つかどうかについては，ラットでは否定的な結果しか得られなかった。

マウス精巣内でラット精原細胞から分化した精子細胞の正常性

平林 真澄，加藤 めぐみ，篠原 隆司（京都大）

精原細胞の精子形成を研究するためには精細管移植が必須で，生殖幹細胞の分化能を評価するためにも有効な手段となる。しかしながら，異種動物間の環境下で成熟した生殖細胞が正常に分化し，かつ雄性配偶子として正常に機能するかどうか，証明されていなかった。そこでラット精原細胞をマウス精細管に移植することで精子細胞へと分化させ，それらをラット卵子に顕微授精して産仔発生能を検討した。生後 2 週齢の EGFP-Tg ラット精巣から酵素処理により精子幹細胞を採取し，予めブスルファンを投与することで内因性の精細胞を枯渇させたヌードマウスの細精管内に移植した。移植 5 ヶ月後のマウス精巣にはラット生殖細胞由来の EGFP 発現が見られ，半数体の精子細胞および成熟精子が観察された。これらの精子細胞をラットの未受精卵子に顕微授精することで産仔に寄与することを証明した。また，性成熟後の妊孕性および正常なゲノム刷り込みパターンを保持しているこ

とも確認した。種間生殖細胞移植と顕微授精による産仔獲得は，遺伝子改変動物の作製ならびに絶滅危惧種の保護に有効な手段になり得る。

ラット卵子の自発的活性化機構における Mos-MEK-MAPK 経路の役割

伊藤 潤哉，加藤 めぐみ，平林 真澄

体細胞核を移植した再構築胚に高率に早期染色体凝集 (PCC) を誘起するには MPF 活性を高く維持しておく必要があり，これに関わる細胞周期停止因子 (CSF) を探索した。自発的活性化が多発する Wistar 由来ラット卵子とあまり起こらない SD 由来ラット卵子との Mos およびその下流の MEK，MAPK 活性，ならびにサイクリン B 量の比較から，この経路 (Mos-MEK-MAPK) が CSF として機能していたと示唆された。また，プロテアソーム抑制剤を用いた実験から，ラット卵子に特徴的でクローン作製の障害となる自発的活性化という現象には，プロテアソームを介した Mos-MEK-MAPK および p34cdc2 kinase の不活性化機構が関与していると考えられた。

大脳皮質第一次視覚野上に存在する遠近感の知覚に必須の機能ユニット “眼優位カラム”の発達形成メカニズムの解明に向けて

冨田　江一，三宝　誠，山内　奈央子，平林 真澄

大脳皮質第一次視覚野には，多くのカラム構造をした機能ユニットが存在する。中でも，遠近感の知覚に重要と考えられる眼優位カラムは，発生研究および可塑性研究の一番の対象である。この眼優位カラム構造は，出生前後の発生期に大まかに形成され，その後の発達期，外部からの視覚入力によって機能的なカラム構造へと可塑的に構築される。しかしながら，この過程における詳細な分子メカニズムは明らかにされていない。当教室では，発生期から発達期にかけて，このカラム構造に特異的に発現している因子群の単離に成功した。さらに，この中の 1 因子の遺伝子シークエンスを解析したところ，この因子は，色々な制御因子の活性化と集積化をコントロールするシャペロンタンパク質の 1 つであることが分かった。今後は，遺伝子改変動物のシステムを利用して，この因子群の機能解析を行うことで，発生期から発達期における，眼優位カラム形成を司る分子メカニズムを明らかにする。

統合バイオサイエンスセンター

時系列生命現象研究領域

【概要】

研究室発足後 5 年目となり，おもに岡村教授らを中心とする電位依存性チャネルなどをはじめとする電位センサー蛋白の動作原理と生理機能の解析と，東島准教授らを中心とする，神経回路形成機構の解析について，安定した研究体制が確立しつつある。今年もイオンチャネル関連分子の解析と，運動機能に関わる神経回路機能の解析を進めた。これまで電位センサーはイオンチャネル固有の構造で膜電位シグナルは細胞膜を介するイオンの出入りを基盤とすると考えられてきたが，我々は電位センサーとホスファターゼを一分子内に併せ持つ新規分子(Ci-VSP)を同定し，その動作原理の解明を行った。更に最近見出された電位センサードメインのみをもつ VSOP1 の電位依存性プロトンチャネルとしての機能を解析した。これらの蛋白の存在は，膜電位シグナルが従来知られてきた以上に幅広い現象に関わる可能性を示唆しており，これらの動作原理の解明と生理機能の解析により膜電位のあらたな生理的役割が明らかになると期待される。また，東島助教授らは転写因子 Chx10 ホモログの遺伝子発現により特徴づけられるニューロンを生きた状態で可視化したトランスジェニックゼブラフィッシュを用いて哺乳類脊髄介在ニューロンの基本デザインに関する知見を得ている。脊椎動物に類縁である尾索動物を用いて，運動パターンがどのようにイオンチャネルの特性や発現と関連するかを明らかにするため，遊泳運動の画像解析と電気生理学記録を行った。

電位感受性ホスファターゼ Ci-VSP の分子作動原理の解析

村田喜理
岩崎広英
Mohammad Israil Hossain
黒川竜紀
東島眞一
岡村康司

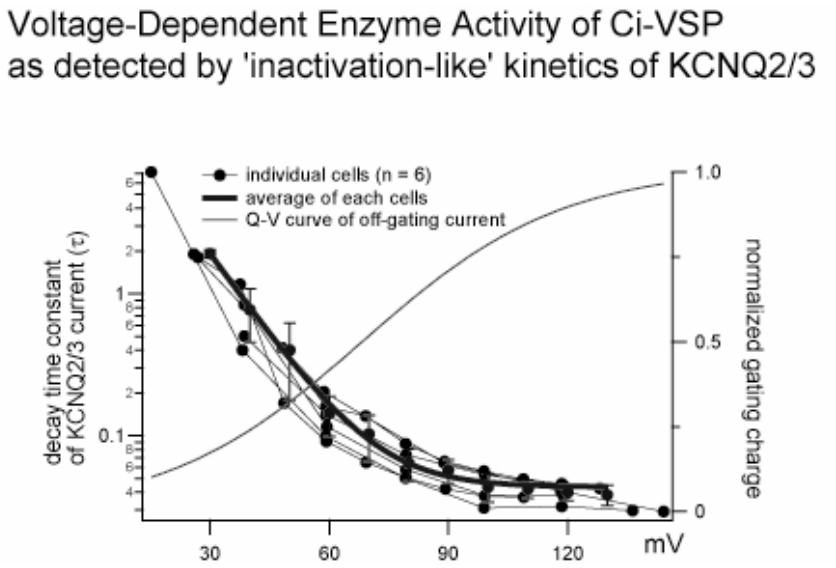
電位依存性チャネルの電位センサーをもちながらイオンの通過部位（ポア領域）をもたず，かわりに C 末側にホスファターゼドメインをもつ分子 VSP について，以下の解析を行った。

(1)酵素活性をリアルタイムで計測するため，ツメガエル卵母細胞に PH-ドメイン GFP と Ci-VSP を共発現させ，共焦点蛍光顕微鏡による蛍光イメージングを行った。脱分極に伴い PLC-delta 由来 PH ドメイン GFP のシグナルは減少し過分極に伴い増加した。また PtdIns(3,4,5)P3 のイメージングを行った結果，PtdIns(4,5)P2 と同様に脱分極に伴い減少し過分極に伴い増加した。脱分極時での PtdIns(4,5)P2 の減少の程度を確認するため，GIRK2 チャネル，IRK1 チャネル，KCNQ2/3 チャネルをそれぞれ Ci-VSP と共発現させ電流測定により各イオンチャネルの活性が減衰するキネティクスを計測した。ゲート電流の移動チャージ量が増え続ける膜電位範囲である 100mV まで電流の減衰速度が加速することがわかり電位センサーの可動膜電位範囲において酵素活性がチューニングされることから，電位依存性イオンチャネルと同様に電位センサーの動きが，下流の構造変化をもたらすことを示した (J. Physiol.in press)（図）。

(2)電位センサードメインと酵素ドメインの共役の強さを調べる目的で，ゼブラフィッシュ VSP を tsA201 細胞に発現させ酵素ドメインの状態によりゲート電流の性質が変化するかどうかを調べた。活性中心のシステインをセリンに置換すると有意にゲート電流が加速し，ホスファターゼ阻害剤バナジン酸で同様な効果が確認された。この効果は細胞内のホスホイノシチドの環境が変化した

ためではなく酵素ドメインの構造変化によるものであると考えられた。

(3)酵素特性の詳細を明らかにするため Ci-VSP およびゼブラフィッシュ VSP について細胞内領域と GST の融合蛋白を作成しマラカイトグリーンアッセイと TLC アッセイにより各種ホスホイノシチドを基質として脱リン酸化能を解析した。PtdIns(3,4,5)P3 以外にも PtdIns(4,5)P2 に対して脱リン酸化能が確認され(1)の研究結果から示唆されたように，VSP が PTEN とは異なっていて PtdIns(4,5)P2 も脱リン酸化できる能力があることが示された。



電位依存性プロトンチャネル分子の同定と分子機能の解析

佐々木真理
大河内善史
黒川竜紀
高木正浩
岡村康司

電位依存性プロトンチャネル活性をもつ VSOP1 について動作原理を理解するための解析を行った。また VSOP1 がこれまでミクログリア細胞，マクロファージなどで活性酸素産生に関わる電位依存性プロトンチャネルの分子実体であるかどうかの検討を行った。具体的に以下の解析を行った。

(1)VSOP1 の分子特性の解析

VSOP1 は通常の電位依存性チャネルに見られる S4 領域に類似した配列をもつ。通常の電位依存性チャネルと同じようなメカニズムで膜電位感知を行っているかを明らかにするため点変異を導入し，電位依存的ゲーティングに与える影響を調べた。S4 領域のアルギニンを他のアミノ酸に変化させると電位依存性がシフトしたが，陽電荷をキャンセルまたは陰電荷に変更した場合のシフトは，より開きやすい方向でありまた同じ陽電荷をもつアミノ酸であるリジンに変更しても大きな電位依存性のシフトが見られた（黒川，岡村，高木）。

(2)VSOP1 の組織発現パターンの解析

VSOP1 の in vivo での役割を明らかにするため，細胞内ドメインを GST 融合タンパクとして精製しウサギに免疫してポリクローナル抗体を得た（佐々木，岩崎）。従来の電気生理学的解析で発現することが知られていた

ミクログリアやマクロファージでの発現に着目して，in situ hybridization 法及び免疫抗体法により解析した。その結果，脾臓の血球細胞や脳内ミクログリア細胞に明確な発現を認めた（大河内）。

(3)VSOP1 ノックアウトマウスの作成と解析

Gene trap 法により VSOP1 遺伝子領域に挿入のある ES 細胞を用いてキメラマウスを作成し，このマウスの脾臓を用いてウェスタンブロットを行ったところ，VSOP1 蛋白の発現が欠落していることを確認した。また好中球とマクロファージからホールセルパッチ記録を行ったところ，電位依存性プロトン電流が完全に消失していた（佐々木，岡村）。これらのことから VSOP1 は従来血球細胞などで記載されてきた電位依存性プロトンチャネルの分子実体であると考えられた。

ゼブラフィッシュを用いた，脊髄神経回路網の解析

木村有希子
佐藤千恵
東島眞一

神経発生過程においては異なった転写因子の発現の組み合わせにより，形態学的に異なったタイプの介在神経細胞が分化してくることが示唆されている。しかしながら，これらの介在神経細胞が，最終的に神経回路網の中で機能的にどのようなタイプの神経細胞へ分化していくかは，まだよく分かっていない。我々はこの課題に対して，ゼブラフィッシュを用いて研究を進めている。とくに，特定の種類の神経細胞で，蛍光タンパク質を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュを作製して，それら神経細胞を生きたまま可視化することを方法論の中心に据えている。すでに，Chx10，Dbx1，gsh1，atoh1，nkx2.2，Evx1，Evx2，BarH1，pax6 などの遺伝子に関して，緑色ないし赤色の蛍光タンパク質を発現するトランスジェニックラインを作製することに成功している。これらのラインを用いて，脊髄神経の発生機構，および回路機能の詳細な解析を進めている。

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

西野敦雄（日本学術振興会特別研究員）
岡村康司

尾索動物は脊椎動物と近縁な動物系統である。尾索動物は脊椎動物と共通の体制を持ったオタマジャクシ形態を示すが，その細胞構成はきわめて単純である。ホヤ幼生の場合，筋肉細胞数は高々40 個で，運動神経細胞は 10 個に満たない。それにもかかわらず，尾索動物のオタマジャクシは高度に制御された遊泳運動を行う。本研究は，カタユウレイボヤ幼生およびオタマボヤを材料として，個体レベルの運動能力を正確に定め，それを支える神経生物学的・分子生理学的基盤を明らかにすることを目的としていた。

本年はカタユウレイボヤ幼生の遊泳運動を制御する重要な機能素子としてニコチン受容体 (nAChR)，グリシン受容体 (GlyR) に特に注目し，そのホヤ幼生における発現様式と，分子機能についての解析を行った。

1. カタユウレイボヤゲノム配列を詳細に調べることで，新たに二つの nAChR サブユニットを見出した。これらを含め合計 10 個の nAChR サブユニット遺伝子の全長 cDNA 配列とゲノム上の遺伝子構造を明らかにした。分子系統解析から，尾索動物は脊椎動物と類似の nAChR サブユニット構成を持つことが確かめられた。
2. 尾芽胚期から幼生期に至る段階での発現様式を in situ hybridization 法により定め，幼生の筋肉細胞で発現するサブユニット群と，神経細胞で発現するサブユニット群を決定した。
3. 幼生の筋肉で発現するサブユニット (Ci-nAChR-A1, -BGDE3, -B2/4) に注目し，さらに解析を進めた。筋肉で

発現する 3 つのサブユニットと蛍光タンパク質との融合タンパク質を幼生筋肉に発現させると，筋肉帯背側縁に沿ったステッチ状の構造に共局在した。このステッチは，運動神経細胞の軸索とよく重なることから，これら 3 つが，確かに神経筋シナプス後膜に濃縮することを示した。

4. 幼生の筋肉で発現する A1, BGDE3, B2/4 をアフリカツメガエルの卵母細胞に発現させ解析したところ，この 3 種のサブユニットを共発現させると，生理的濃度の ACh に反応して大きな電流が観察された。このとき，B2/4 を共発現しないと電流量が著しく減少し, BGDE3 を共発現しないと電流が消失した。またこの A1, BGDE3, B2/4 で構成されるイオンチャネルは著しい内向き整流性を示すこと，相当量のカルシウム透過性を示すことを明らかにした。これらは，脊椎動物の筋肉型 nAChR よりむしろ神経型 nAChR に近いチャネル特性である。
5. BGDE3 に対するモルフォリノオリゴを用いて幼生における発現を抑制すると，遊泳運動が完全に抑制された。

以上により，カタユウレイボヤにおける筋肉型 nAChR のサブユニット構成，局在様式，電気的特性，生体内での機能を解明した。

また，脊椎動物で左右交互の体幹筋収縮を調節する GlyR について，ホヤの相同遺伝子を単離し，同様の解析を行った。ホヤ GlyR は神経系では運動神経細胞に主に発現するほか, 筋肉細胞でも発現していると示唆された。同様のパターンは同遺伝子の 2.5kb 上流の配列の導入によっても観察された。カエル卵母細胞にこれを発現させたところ，グリシンに反応した電流が観察された。

戦略的方法論研究領域

【概要】

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

永山グループは位相差電子顕微鏡の開発と，その応用としての DNA1 分子の塩基配列直読法の開発，チャネル蛋白質の電子線構造解析研究無染色細胞の *in vivo* 高分解能形態観察を行った。

物質輸送に関する研究が主眼である村上グループは，南京医科大学と共同研究で漢方薬の唾液分泌促進効果について，摘出ラット唾液腺を用い調査を継続発展した。カソリック大学ローマ校とイエテボリ大学と協力して灌流顎下腺と in situ 顎下腺の分泌唾液を比較検討するため，唾液中のペプチド/蛋白の質量分析を開始した。

瀬藤グループは質量顕微鏡法開発応用，翻訳後修飾による細胞内輸送の制御の研究を行った。

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

位相板用炭素薄膜の材料科学的研究

Radostin Danev，重松 秀樹，大河原 浩，永山 國昭
宇理須恆雄（分子研）

位相板の帯電防止は電子位相顕微鏡にとって死命を制する重要な要素技術である。帯電の原因が位相板に付着した 3 種（有機物，無機物，金属酸化物）汚れによることがわかったので，その解決法を探求した。作製行程を見直しおよび積極的な洗浄を試みたが，完全に汚れに伴う耐電を除去することはできなかった。そこで，その帯電を完全に遮蔽する方法としての「炭素膜サンドイッチ法」について，その遮蔽効果を解析した。現在，論文執筆中。

Aharonov-Bohm 効果を応用した位相差電子顕微鏡の開発

安田 浩史，大河原 浩，永山 國昭

位従来の薄膜位相板による電子線ロスの問題を解消できる，Aharonov-Bohm 効果を応用した位相板の開発を行っている。2 通りの位相板を試作し位相変化の観察を行った。1) 炭素薄膜上に保持した強磁性体パーマロイを長方形環状の細線に加工した位相板。2) サブミクロン白金細線上にコバルト薄膜を形成し棒状に加工した位相板。両位相板ともに Ge 薄膜観察から位相変化を捕えることに成功した。方法 1)についてサブミクロン細線の環状工作が困難であり加工方法を継続検討している。方法 2)についてサブミリ長の単磁区構造を持ったコバルト細線棒状位相板開発を進めている。

DNA /RNA 塩基配列の電子顕微鏡 1 分子計測法の開発

喜多山　篤，大河原 浩，永山國昭
片岡正典（計算科学研究センター）

DNA/RNA の塩基配列決定の高速化を図るため，電子顕微鏡技術を基軸に新しい方法論を開発している。この方法は i) 全核酸塩基の化学修飾による体積・電子密度差の増幅と DNA/RNA の一本鎖への解離, ii) 完全伸長した多数の一本鎖 DNA/RNA 分子の一方向整列によるアレイ作成，iii)アレイ化した一本鎖 DNA/RNA の電顕による観察と識別，iv)修飾塩基間のコントラスト差から塩基配列の解読，の 4 つの要素技術により成り立っている。核酸の化学修飾法について，チミン・ウラシルを除く構成塩基全てを塩基選択的に化学修飾することに成功し，各塩基間の体積と電子密度差の増幅が実現した。また修飾塩基の識別には 0.3nm の空間分解能と定量的コントラスト測定の 2 要件を満たす電子顕微鏡として，JST の委託開発プログラムを利用して日本電子と共同で開発した 200kV の位相差電顕を用いて一本鎖の修飾 DNA の観察を行い，いくつかの構造的知見を得た。

膜タンパク質の単粒子解析

重松 秀樹，Radostin Danev，曽我部 隆彰，永山 國昭
清中 茂樹，森 泰生（京都大学大学院工学研究科）

位相差電子顕微鏡を用いた蛋白質の単粒子解析を実施し，モデル蛋白質(GroEL)の立体構造の決定を行った。現在論文執筆中。構造解析ターゲットとして 3 種類（TRPM2，TRPV4 など）の膜蛋白質の組み換え発現系の構築に成功した。それぞれ界面活性剤可溶化状態での標品の取得に成功し，発現量などの点から TRPV4 に絞り込んで，氷包埋試料の単粒子解析を行った。先のモデル蛋白質の結果をふまえて，構造決定を試みている。

超高圧電子顕微鏡による位相差像観察

新田 浩二，重松 秀樹，Radostin Danev，永山 國昭
Sang-Hee Lee，Youn-Joong Kim（Korea Basic Science Institute）

超高圧電子顕微鏡においては，その電子線加速電圧の高さから通常より厚い試料の観察に期待が寄せられる。その一方でコントラストがつきにくいことが問題であったが，われわれが開発している位相差電子顕微鏡法を適用することで十分なコントラストが得られることを期待して，これに取り組んだ。これまで 120kV, 200kV，300kV において位相差電子顕微鏡を開発した経験をふまえ，さらに 1000kV における位相差電子顕微鏡像の取得をめざし，韓国，Korea Basic Science Institute 所有の超高圧電子顕微鏡を利用した共同研究を展開した。その結果，炭素薄膜位相板を用いることで, 1000kV の加速電圧における急速凍結細胞の無染色像の取得に成功し，現在論文執筆中である。

種々の漢方薬の潅流ラット顎下腺に対する水分泌促進作用

村上政隆
魏　睦新，丁　煒（南京医科大学第一付属医院　中医内科）

唾液分泌低下に対して治療効果のある漢方薬が多く知られているが，これらの薬物が直接唾液腺に作用するのかどうか？　また直接作用があるとすれば，唾液を誘発するのかあるいは唾液水分分泌速度を増強するのかを摘出ラット顎下腺の血管灌流標本を用い，水分分泌速度を測定し検討してきた。2006 年度は 2005 年度に検討した漢方薬 10 種類に加え，新たに 10 種類を検討した。

雄性成体ラットから顎下腺を摘出，血管灌流標本を作製。分泌導管にカニューレを施し，これを電子天秤上のカップに導き，分泌された唾液重量を時間微分して分泌速度を求めた。漢方薬は，薬物は灌流液中に推定治療血液濃度で添加，遠沈後上清を 0.45 ミクロンフィルターを通したものを使用した。唾液分泌刺激の対照としてカルバコール 0.2μMを用いた。最初 5 分間対照刺激をおこなうと, 分泌が誘発され初期 30 秒にピークをもつ初期相とその後緩やかに増加し持続期に入る持続相に分かれた。薬物を灌流系より 5 分間洗い流し，漢方薬単独を加えたが 1 種類（甘草）のみ CCh 刺激がなくても分泌反応を起こした。他の 19 種類の漢方薬は，単独使用では唾液分泌を誘発しなかった。漢方薬添加後 5 分でこれにカルバコールを重畳すると，20 種類の漢方薬のうち 15 種類で唾液分泌の増強が観察された。いずれも初期相には影響がなく，分泌持続相の分泌速度を増強させた。唾液腺に直接作用をもたらした 15 種の薬物に対する反応は 3 つのパターンに分けることができた。I) 持続期全般を緩やかに増強する。（プラトー値が高い）II) 持続期にはいり継続して分泌が増加し 5-10 分で最大値になった後緩やかに減少する。III) 持続期にはいり継続して分泌が増加し 5-10 分で最大値になった後対照刺激のプラトー値より低レベルで分泌が持続する増強と抑制の二相性パターン。I のパターンは養陰剤に, II のパターンは（補気剤, 清熱剤, 化痰剤（日本漢方では祛痰剤），3 種混合）に，III のパターンは活血剤に，それぞれ漢方薬分類に対応した。増強効果のない 5 種の薬物がヒトで分泌増加を起こすのは神経活動の変化によるものと推定された。

唾液分泌促進作用を有する漢方薬には唾液腺に直接作用し唾液分泌の持続相を増強する薬物が 15 種類存在し，漢方の薬効機序に対応する作用パターンが存在した。これまで，西洋医学的手法により，細胞生理学的反応を臓器レベルに外挿してすべてを理解しようとしていたが，今回観察された分泌増強パターンが生じる機構を少なくとも，1) 細胞内信号系への漢方薬の修飾効果，2) 傍細胞輸送系の開閉の調節機構，3) 臓器循環系の漢方薬による調節の 3 つの視点から詳細な実験を進めてゆく必要がある。一方，唾液腺臓器レベルでは効果の見られなかった漢方薬は，おそらく個体（全身）レベルで神経系/内分泌

系に作用し，唾液分泌を増強しているものと予測される。これらの薬物の効果については全身症状の変化を別個に考察することにより，機序の理解を進める可能性がある。今後，西洋医学的手法と中国医学の経験を結びつけ　蛋白分泌に対する漢方薬の影響や細胞内信号伝達に及ぼす影響などを調べることにより唾液分泌機序の新しい視点が生まれる可能性は極めて高い。また，単一細胞の生理学実験で得られない組織/器官系の反応パターンが漢方薬の分類と一致したことは，漢方分類が組織生理学研究に大きな示唆を与えることを示しており，逆に漢方分類の現代生理学的な理解に繋がることは疑いない。

In vitro および In vivo における分泌唾液蛋白の相違

村上政隆，大河原浩
Massimo Castagnola，Chiara Fanali，Rosanna Inzitari，Irene Messana（カトリック大学医学部ローマ校）
Alessandro Riva, Felice Loffredo, Francesca Testa-Riva（カリアリ大学医学部細胞形態学）
Jörgen Ekström（ゲーテボー大学神経科学および生理科学部）

ムスカリン受容体あるいはαアドレナリン受容体を刺激し細胞内 Ca 濃度を上昇させる刺激様式と，βアドレナリン受容体を刺激し細胞内サイクリック AMP 濃度を上昇させる刺激様式で，唾液腺細胞から分泌される唾液の成分が異なることが知られている。前者は初期一過性に蛋白分泌（アミラーゼ，ムチンなど）させるが刺激持続期には蛋白分泌は少量となる。また，水分分泌は初期一過性に増加しピークをつくり，その後再度分泌が増加してプラトー相を形成する。一方，後者は刺激開始で蛋白分泌を緩やかに増加させ，刺激開始 5 分で最大蛋白分泌となり持続刺激で蛋白分泌は緩やかに減少する。しかし水分分泌は起こらない。前者と後者の刺激を同時に細胞に与えると分泌蛋白は急速に増加し細胞内の分泌顆粒は枯渇する。しかし，分泌される蛋白成分が刺激様式により変化するか否かについて，生体内で神経刺激を受けた場合と，単離し人工灌流液でカルバコール，イソプロテレノールの刺激を腺に与えた場合の分泌蛋白/ペプチドの相同については実験結果がなかった。本研究は EC (Euro-Community) の Interlink Project として，カトリック大学ローマ校/カリアリ大学/ゲーテボー大学/生理学研究所が協力して研究を開始した。

村上がカリアリ大学で立ち上げた唾液腺灌流系をローマカトリック大学で立ち上げ，予備実験を行い，ラット顎下腺及び耳下腺の血管灌流系からカルバコール，イソプロテレノールの刺激を施し唾液を採取した。この唾液にプロテアーゼ阻害を施し，質量分析によりラット唾液中のペプチド/蛋白の組成を検討した。一方，Ekström はラット個体を用い，麻酔下で交感神経，副交感神経 (auriculo-temporal N)を刺激し唾液を採取し質量分析を実施した。唾液蛋白には DNA 情報からそのまま翻訳された蛋白質のみならず，post-translational modification を受けた蛋白/ペプチドも含まれ，膨大な数のスペクトルとしてデータが集積された。現在，灌流腺 in vivo 腺に共通の蛋白/ペプチドを抽出し，これを唾液腺からのみ分泌され，血液由来でない，内因性の蛋白として抽出し，公開されているデータベースと比較し同定作業を行っている。今後　岡崎で灌流腺より採取した唾液試料を用い，刺激様式の違いによる分泌蛋白の変化について検討する計画である。

顕微質量分析装置の開発

瀬藤光利，早坂孝宏，新間秀一

本開発は(株)島津製作所，癌研究会，大阪大学，理化学研究所の参画機関とともに，5 年計画で 2004 年より始

まった。顕微質量分析装置の原理は，顕微鏡下の生物試料にレーザーを照射し，イオン化された物質を吸引し，高感度質量分析装置で測定を行う。測定試料上をレーザーで 2 次元走査し得られた質量スペクトル群から，分子の生体内分布の可視化，また多段階質量分析を用いた物質同定も可能である。開発すべき要素技術は 5 つである。レーザー照準技術と 2 次元試料走査・環境制御技術，これにより 2 次元の解像度が決まる。高収率イオン搬送技術と高感度質量分析技術，これにより感度を向上させることが可能となる。そして，得られた情報を処理し，画像として再構成する IT 技術である。我々は特に生体試料より高効率でイオン化を実現するための試料前処理技術の開発し報告している。現在までにこれらの手法を用いてマウス脳組織切片上における蛋白質や脂質の分布可視化と分子同定を成功させ，さらには臨床試料への応用も可能であることを示した。

翻訳後修飾による細胞内輸送制御の研究

瀬藤光利，早坂孝宏，新間秀一
池上 浩司，松本 峰男，矢尾育子（三菱生命研）

単アミノ酸側鎖付加はチュブリンなどに起こる翻訳後修飾である。神経細胞の発達に伴って亢進することが知られているが，その分子実体は明らかではない。我々はチュブリン翻訳後修飾の一つ polyglutamylation に注目し，その酵素である polyglutamylase の同定を試みた。その結果，TTLL 遺伝子ファミリーのうち TTLL7 がチュブリンサブユニットであるβチュブリンに対して特異的にグルタミン酸付加反応を行うこと，それが神経突起成長に必要であることを明らかにした。また，αチュブリンに対してグルタミン酸付加反応を行うとされていた複合体のうち PGs1 が機能低下した ROSA22 ミュータントマウスを解析することにより，αチュブリンの polyglutamylation が KIF1 キネシンモーター蛋白質の方向性を制御する分子標識の役割を果たすことを明らかにした。以上，本研究の成果は，これまで不明であった細胞な物質輸送の制御メカニズムの解明に大きな発展をもたらし，細胞間における情報伝達異常により引き起こされる疾患を治療するための新たなターゲットになりうる可能性を示した。

エンドソームーゴルジ細胞内膜系の選別輸送のメカニズムと生理機能

大橋正人

エンドソームーゴルジ細胞内膜系の選別輸送のメカニズムと生理機能を解析し，これまでに細胞シグナル伝達分子などの機能分子の選別におけるコレステロール代謝系や脂肪滴表層ドメインの関与について知見を得てきた。

今回，解析を極性上皮細胞動態における細胞内膜系の機能解析に発展させるため，上皮系細胞の未だ数の限られているエンドソームーゴルジ細胞内膜系マーカー分子の，FL-REX (fluorescence localization-based retrovirus-mediated expression cloning)法による探索・同定を進めた。極性上皮細胞から GFP-cDNA 融合ライブラリーを構築し，上皮細胞株に発現させ，エンドソームーゴルジ細胞内膜系様の局在を示す細胞をクローン化した。発現した GFP 融合 cDNA を解析したところ，エンドソームーゴルジ細胞内膜系への局在が知られている既知の蛋白質，既知であるがこれまで局在の知られていなかった蛋白質，そして，機能局在とも未知の蛋白質を同定した。現在，これらの蛋白質分子の膜系への局在の意味に注目するとともに，得られた分子，細胞を用いて，上皮細胞動態における細胞内膜系の役割の解析を進めている。

生命環境研究領域

【概要】

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

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

表皮 TRPV4 の結合蛋白質の解析

東智広，曽我部隆彰，福見知子，富永真琴

温度感受性 TRP チャネルの 1 つ TRPV4 は，もともと低浸透圧で活性化するチャネルとして報告されたが，我々が温度感受性も有することを報告した。TRPV4 は，感覚神経のみならず表皮ケラチノサイトや視床下部で発現することが知られている。表皮は温度変化に直接曝露される部位であり，視床下部は体液浸透圧や体温の調節中枢として機能していると考えられている。そこで，TRPV4 の活性制御機構を明らかにする目的で皮膚の cDNA ライブラリーを用いて TRPV4 の細胞内ドメインと結合する蛋白質のスクリーニングを行い，興味深い結合蛋白質を得た。両蛋白質の結合に重要なドメインを明らかにした。両蛋白質を HEK293 細胞に共発現させることによって，TRPV4 活性増強が観察され，この活性制御にPKCのリン酸化が関与していることが明らかとなった。

TRPV4 の体温制御機構への関与の解析

稲田仁，柴崎貢志，福見知子，富永真琴

温度感受性 TRP チャネルの 1 つ TRPV4 は視床下部に発現しており，体温調節機能への関与が推察されている。特異的抗体を用いて，視床下部神経での TRPV4 の発現を確認した。そこで，野生型マウスと TRPV4 欠損マウスの腹腔内に温度計を埋め込み，自由行動下に体温の連続記録を行った。無刺激の状態では，両マウス間で体温の概日周期に大きな変化はみられなかった。暑熱負荷等のストレスを加えたときの体温記録を行い，TRPV4 の体温制御機構への関与を明らかにしていきたい。視床下部での TRPV4 活性の制御機構の解明を目的として cDNA ライブラリーを用いて TRPV4 の細胞内ドメインと結合する蛋白質のスクリーニングを行い，興味深い結合蛋白質を得た。両蛋白質の結合に必要なドメインを明らかにした。この結合によって TRPV4 機能が制御され，体温調節能が変化していることを想定して実験を進めている。

表皮ケラチノサイトから感覚神経への温度情報伝達のメカニズムの解析

Sravan Mandadi，曽我部隆彰，柴崎貢志，福見知子，富永真琴

温度感受性 TRP チャネルの TRPV4，TRPV3 は表皮ケラチノサイトに強く発現しており，感覚神経にはほとんど発現していない。この事実は，温かい温度が表皮ケラチノサイトで受容され，その情報が感覚神経へ伝達される可能性を示唆する。ケラチノサイトは刺激に反応して種々の化学物質を放出することが知られている。そこで，温度刺激によってケラチノサイトから物質が放出され，表皮層に伸びた感覚神経終末に発現するその物質の受容体によって温度情報が伝達される，という仮説を立て，その検証と関与する物質の同定を試みた。ケラチノサイトと感覚神経の共培養系において，温度刺激を行うとケラチノサイト，感覚神経細胞の両方で細胞内 Ca^{2+}濃度の上昇が観察された。両細胞の応答に時間差があり，先ずケラチノサイトで反応がみられたことから，温度刺激に応じてなんらかのケラチノサイトから神経細胞への情報伝達がなされていることが推察された。次に，知られたイオンチャネル型神経伝達物質受容体($P2X_2$，$5HT_3$，NMDA)を HEK293 細胞に発現させ，ケラチノサイトと共培養して，パッチクランプ法を適用してイオンチャネル型神経伝達物質受容体をバイオ分子センサーとして用いて，伝達物質の同定を行った。

表皮ケラチノサイトにおける TRPV4 の生理機能の解析

曽我部隆彰，富永真琴，福見知子

温度感受性 TRP チャネルの TRPV4，TRPV3 は表皮ケラチノサイトに強く発現しているが，TRPV3 がより主に表皮での温度感知に関わっていることを観察している。TRPV4 の温度感知以外のケラチノサイトでの機能を明らかにする目的でケラチノサイト cDNA ライブラリーを用いて TRPV4 の細胞内ドメインと結合する蛋白質のスクリーニングを行い，興味深い結合蛋白質を得た。また，野生型マウスと TRPV4 欠損マウスの表皮組織の観察を進めている。

海馬における TRPV4 の機能解析

柴崎貢志，富永真琴

温度感受性 TRP チャネルの 1 つである TRPV4 が海馬神経細胞において体温下で恒常的に活性化して静止膜電位の形成を介して神経興奮性に重要な役割を担っていることを報告したが，その生理学的意義を明らかにする目的で，野生型マウスと TRPV4 欠損マウスでの記憶・学習能力を含めた行動解析，脳波解析，海馬神経細胞での長期増強の解析を進めている。

TRPM2 のインスリン分泌への関与の解析

川端二功，稲田仁，森泰生（京都大学），富永真琴

TRPM2 チャネルが膵臓β細胞に発現して体温下で β-NAD^+，ADP-ribose，cyclic ADP-ribose 等のリガンドに

よって活性化してCa^{2+}流入からインスリン分泌を惹起することを報告しているが，この事実は TRPM2 活性化物質が糖尿病治療薬となる可能性を示唆している。そこで，TRPM2 に作用する物質をスクリーニングして，阻害物質を見いだした。その阻害物質は，リガンドのみならず熱刺激による TRPM2 チャネル活性も完全に抑制した。さらに，グルコース依存性の膵島からのインスリン分泌も有意に抑制し，TRPM2 のインスリン分泌への関与をさらに裏付ける結果となった。京都大学森泰生博士の研究室から TRPM2 欠損マウスを得て，個体レベルで耐糖能等の解析を進めている。

発達期脊髄領域における温度感受性 TRP チャネルの発現と機能

村山奈美恵，柴崎貢志，富永真琴

温度感受性 TRP チャネルは，一般には感覚神経や表皮ケラチノサイトで温度受容に関わっていると考えられている。しかしながら，後根神経節 (DRG) 神経細胞の発達過程において温度受容を全く必要としない胎生期においても発現が認められる。このことは，温度感受性 TRP チャネルが成体における温度受容とは全く異なる，発達期特異的な役割を有していることを強く示唆している。この仮説を検証するために，発達期マウスの脊髄領域における TRPV1，TRPV2，TRPM8，TRPA1 の発現様式を解析し，これらのチャネルの発現時期，パターンを同定した。これらの TRP チャネルは発達期において，形成直後の DRG 神経細胞や一部の脊髄神経細胞においてのみ発現が確認された。また，カルシウムイメージング法を用い，この発現パターンに一致した機能的チャネルの存在を確認した。これらの結果より，TRP チャネルが細胞増殖や細胞移動などのような発生過程に特異的な生理現象に密接に関わっている可能性が強く示唆された。現在，dominant-negative 変異体チャネルを用いた実験を行い，成体とは異なる発達過程特異的なチャネル機能の解明を目指している。

免疫系細胞における温度感受性 TRP チャネルの発現・機能解析

稲田仁，富永真琴

体温の免疫機能における重要性は報告されているが，その分子メカニズムは明らかではない。そこで，RT-PCR 法を用いて，マウス免疫組織，単離免疫系細胞，免疫系組織由来培養細胞での温度感受性 TRP チャネル遺伝子の発現を解析した。その結果，複数の温度感受性 TRPV，TRPM チャネルが発現していることが明らかとなった。現在，発現している温度感受性 TRP チャネルが免疫系細胞での温度依存性細胞内Ca^{2+}濃度変化，サイトカイン放出等の細胞機能に関与しているかどうかの解析を進めている。

ショウジョウバエ painless チャネルの温度感受性解析

曽我部隆彰，門脇辰彦 (名古屋大学)，富永真琴

哺乳類において低温刺激や種々の侵害刺激を受容する TRPA1 チャネルのショウジョウバエホモログの 1 つは，熱刺激非感受性の変異体 (painless) の原因遺伝子のコードする蛋白質で，変異体では侵害性熱刺激感受性が欠如していることが明らかになっている。しかし，そのチャネル蛋白質の電気生理学的性質は明らかではない。そこで，painless cDNA を HEK293 細胞に導入して，パッチクランプ法を用いて熱刺激によるチャネル電流応答を観

察した。その結果，painless チャネルは，40 度を超える温度刺激によって活性化する非選択性陽イオンチャネルであることが明らかとなった。

PKD2L1/PKD1L3 複合体による酸味受容

稲田仁，石丸喜朗（デューク大学），松波宏明（デューク大学），富永真琴

動物において，酸味受容は傷んだ食物や刺激の強い液体を避けるために必須な感覚である。酸味受容の分子機構は長年不明のままであったが，PKD1L3/PKD2L1 チャネル複合体を有力な酸味受容体候補として報告した。マウスにおいて，PKD1L3 および PKD2L1 の発現は一部の味細胞で観察され，甘味・旨味・苦味の受容に関与するとされる IP3 受容体や TRPM5 の発現とは重ならなかった。HEK293 細胞を用いた強制発現系において，PKD1L3 および PKD2L1 は複合体を形成することが明らかになった。また，PKD1L3 および PKD2L1 の共発現は膜表面への移行に必須であることが組織化学的・生化学的に確認された。PKD1L3 および PKD2L1 を共発現させた HEK293 細胞では，酸刺激特異的に細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が観察された。パッチクランプ法を用いた電気生理学的解析によって，PKD1L3/PKD2L1 チャネル複合体を発現させた HEK293 細胞において，pH 3.0 以下の酸刺激によって一過性の膜電流が引き起こされることが確認された。

mDia 結合タンパク質の探索と機能解析

島貫恵実，福見知子

Rho の標的蛋白質である mDia の細胞運動における役割の解明を目指している。Yeast-two Hybrid 法を用いていくつかの mDia 結合蛋白質を見いだしている。その 1 つは actin 結合蛋白質ある。この蛋白質が mDia と協調することで細胞接着斑の安定化等に関与する可能性もある。また，文献的にこの蛋白質は細胞のがん化能に関与するとの報告もあるので，mDia とこの蛋白質の関連を，生化学的および細胞生物学的に解析している。

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

神経回路形成における mDia を介する情報伝達経路の役割

島貫恵実，柴崎貢志，福見知子

mDia および mDia を介する新たな情報伝達経路の解析によって，細胞運動の時・空間的制御機構を解明し，神経の成長円錐の形態維持・軸索伸長過程への寄与を検討している。新規 mDia 結合蛋白質 DIP が mDia による軸作伸展作用の下流で機能することを見いだした。また，mDia，DIP の中枢神経系での部位特異的な発現を発生初期から *in situ* hybridization 法， 免疫組織学法を用いて検討し，両者が中枢神経系の様々な部位で共局在することを確認した。現在，作製した DIP knock out mouse の中枢神経系の組織形成等における役割を個体レベル，および神経細胞初代培養系で検討中である。

動物実験センター

【概要】

平成 18 年度に掲げた以下の事業計画について，すべて遂行することができた。

1. 明大寺地区の本館地下 SPF 化：第二期工事完了
   実験室の工事，個別換気システム飼育ラックの導入，焼却炉の撤去など。
2. 本館地下 SPF 化に伴う明大寺地区シャワー室の改修工事完了
3. サルの飼育ケージに対する施錠設置（全ケージ完了）
4. 実験時におけるサルの移動経路の変更
5. 法令改正への対応
   1) ケタミン麻薬指定に対応する麻薬研究者免許の取得
   2) サルの飼育許可取得
   3) 自然科学研究機構動物実験規程の制定（2007/2/23）
      教育訓練の実施（3 回）
6. サル飼育担当者の所属の明確化
7. 動物実験センターの検査体制の充実
   腫瘍細胞の移植，凍結保存技術の確立
   血液凝固系検査
   麻薬保管庫の設置
   以上を実施。
8. 動物実験センターの研究および技術開発・獲得
9. サル，イヌ，ネコ：個体識別用マイクロチップの適用（全頭実施）
10. 山手地区：SPF 飼育室と各研究室とを結ぶネットワークの構築完了
11. エレベーター，ダムウェイターの改修
12. 実験動物技術者二級資格取得

以上 12 項目の達成により，センターでの業務にかかわる利便性および信頼性が少しでも改善できればと願う次第である。今後も毎年事業計画を示し，動物実験センター運営委員会の承認に基づいて，センターのサービス向上を図る所存である。

＜明大寺地区の本館地下 SPF 化＞

2005 年度より 3 か年計画で，明大寺地区の本館地下 SPF 化を行っている。昨年度の第一期工事では，B-16, B-17 の改修工事および飼育ラック，ケージ交換ステーション，バイオクリーンベンチの導入を実施した。2 年目の第二期工事では，B-9, B-10, B-13, B-14 の改修工事，個別換気ケージシステムの追加導入およびケージ交換ステーション・クリーンベンチの導入まで進展した。さらにダイオキシンの問題に対応すべく，ダイオキシン濃度を測定して焼却炉の撤去を行った。生理学研究所および基礎生物学研究所のご協力により，当初の計画を大幅に前倒しで進めることができ，全工程の約 9 割まで達成できた。最終年度の第三期工事では，残りの小部屋・トイレの改修工事および扉の設置を予定している。2007 年 9 月に利用者への SPF 施設オープンを目指している。

＜研究・技術開発＞

実験動物の皮膚科学・形成外科学領域の研究および伴侶動物の病態研究

当センターでは，下記の研究を進めているところである。2006 年度より，学会発表と論文投稿を定常的に行い，施設としての研究活動を開始した。

1. 皮膚科学および形成外科学領域を中心とした病態モデルの作出：ヘアレス動物およびニホンザルの皮膚を用いて，表皮あるいは真皮に存在するメラノサイトの機能を調べている。ヘアレス動物では表皮にメラノサイトを，そしてニホンザルでは真皮にメラノサイトを有することを見いだした。前者は紫外線に対するメラノサイトの挙動を調べ，後者は真皮メラノサイトーシスのモデル動物として研究を進めている。
2. 伴侶動物の腫瘍細胞バンクの創設：動物細胞利用実用化として伴侶動物の腫瘍細胞を生体培養し，機能性腫瘍の特徴を調べている。確立できた腫瘍細胞株は凍結保存し，伴侶動物の腫瘍細胞バンクの創設を試みている。現在までに，イヌで 5 ライン，ネコで 1 ラインの腫瘍株を確立し得た。
3. 伴侶動物の肥満症の病態研究：イヌおよびネコの肥満症を臨床病理学的に調べ，治療法の確立を目指している。今年度は，肥満症の動物を作出することができた。
4. モルモットを用いた妊娠中毒症の研究：モルモットの妊娠中毒症を臨床病理学的および病理組織学的に検査し，この病態解明を実施している。
5. 実験動物飼育管理技術の開発：麻酔方法，エンリッチ

メントの評価，給水システムの改善，ストレスの評価と軽減などを検討している。このうち，サルの麻酔方法については，メデトミジンーミダゾラム組み合わせ法によるニホンザルの不動化を確立した。現在，ケタミンの代替法として利用している。マウスのエンリッチメントとしては，nest box をミュータントマウスに適用して生存率の改善効果を確かめ，ストレス軽減の有無を評価している。給水システムの改善では，従来の方式による漏水事故を調べ，さらに改善方法の一つとして給水パックを導入し，その性能を確認した。その他として，体外受精における培地を改良し，胚操作技術の飛躍的改善に結びつけることができた。

＜終わりに＞

本年度をもって，13 年間動物実験センター長を務められた池中教授がセンター長職を退任され，平成 19 年度からは伊佐教授が新センター長に就任されることを申し添えます。

計算科学研究センター

【概要】

様々な機能性生体様物質の創生を目指している。なかでも核酸の塩基対構造に注目し，4 種類の天然塩基を区別することなく塩基対を形成する動的構造変化型ユニバーサル塩基とそれをオリゴヌクレオチドに導入したユニバーサル核酸，高い塩基認識能と塩基対形成能および様々な機能を有する人工核酸塩基，核酸中の全塩基を塩基選択的に標識する手法を開発している。それら人工の核酸塩基を利用して，塩基対構造を深く理解するとともに，電子顕微鏡をはじめとする各種計測装置を利用した一分子核酸配列解析技術への応用についても研究を進めている。人工核酸塩基と反応剤の設計・評価に計算科学研究センターに設置された大型計算機とプログラムライブラリーを利用する。

核酸塩基識別子の設計と合成

片岡正典，永山國昭

透過型電子顕微鏡を用いる DNA 配列直読法は多数の DNA 断片を増幅することなく配列情報を画像化し，高速・低価格で配列解析を実現する方法である。この塩基配列解析法では一本鎖 DNA 断片中のすべての核酸塩基を正確に特定し，電子顕微鏡へ識別情報を提供する“核酸塩基識別子”の開発が鍵となる。核酸塩基識別子は核酸塩基を特定する認識部と識別情報を提供する指示部，それらを繋ぐ接続部から構成される。認識部には高い塩基選択性や識別子同士の会合抑制，各種溶媒に対する高い溶解性といった多くの要求が集中し，天然型核酸塩基の適用が困難であることが示唆された。報告者は上記要求を満たす新たな人工核酸塩基の開発を計画し，天然型の塩基対構造を基盤として，1,4-デヒドロピラジンを水素供与体，1,4-ジオキシンを水素受容体とする三環性複素環を認識部として設定した。指示部としては透過型電子顕微鏡において 4 種の塩基の識別に必要な高い明暗差を得るために，電子密度差の大きな 4 種の重原子会合体を設定した。接続部にメチレン鎖を採用して認識部と指示部を結合することにより核酸塩基識別子の基本設計を完成させた。未だ全合成には至っていないが，核酸塩基識別子は一本鎖 DNA 中の核酸塩基 1 個を識別する分子であり，電子顕微鏡観察に止まらずその応用範囲は極めて広い。

ユニバーサル核酸の創生

片岡正典

報告者の開発した，相対する塩基に呼応して動的に構造変化して天然型核酸塩基 4 種すべてと塩基対を形成しうる動的構造変化型ユニバーサル塩基をペプチド核酸型のオリゴヌクレオチドへの導入に成功した。天然のオリゴヌクレオチドとの会合体形成について吸収スペクトルで調査したところ，如何なる配列であっても安定な複合体を形成することが明らかとなった。核酸配列を全く認識せず，核酸に対して特異的に複合体を形成する人工核酸の例はなく，その波及効果は計り知れない。

全塩基修飾型核酸標識法

片岡正典

これまでに類を見ない，核酸中の塩基全てを化学的に標識する手法を開発した。本法は塩基選択的に塩基を分解，遊離させてリボースを生成させる第一段階とリボースに対して標識剤を導入する第二段階からなり，一度の操作で，核酸中の同種の塩基全てを標識できる。本法は塩基選択的に行え，反応条件を変えて 4 度繰り返すことで，全ての塩基に異なる標識を施すことも可能である。また，標識剤は 1 級あるいは 2 級のアミノ基を有しているほとんどの標識剤を導入できる。実際に本法を用いて，11 個の金からなる金属クラスターによってオリゴヌクレオチドの多点標識に成功しており，配列解析技術など様々な応用が期待される。

技術課

大庭明生

1. 概要

今年度の人事は，生体膜研究部門・河西教授の転出に伴い細胞器官研究系技術係・高橋直樹技術係員を生体情報系技術係・福田直美技術係員の育児休業中の代行として細胞生理研究部門に配置し，復帰後は生体情報解析室に配置換えした。行動・代謝分子解析センター・遺伝子改変動物作製室の立ち上げに対して生体情報研究系技術係・三宝誠技術係員の配置を行い，また行動様式解析室の立ち上げ準備に対して動物実験センター・動物実験技術係・佐治俊幸技術主任を併任とした。

課の研究活動への貢献を一層進めるため下記の事業を実施した。

①技術課研修セミナーの開催

研究所の今後の研究および研究体制の動向，研究を支える技術，その技術の今後の方向性と重要性，そのなかで技術職員の負うべき責任を基本テーマに，課のあるべき方向と今後の技術動向を探ることを目的に第 8 回技術課セミナーとともに，核融合科学研究所，分子科学研究所，基礎生物学研究所の技術職員を招聘し，その分野の最新情報を聴講する特別研修セミナーおよび岡崎ものづくり推進協議会を通して岡崎に開発型企業を招聘し，企業の開発現場の現況を聴講する岡崎開発型企業セミナーを開催し，他機関との技術連携活動を推進した。また技術課長が岡崎ものづくり推進協議会から招聘を受け，技術課の研究現場の技術活動について紹介をした。

②生理科学実験技術トレーニングコースでの技術指導

電気生理の実験手法の一つであるパッチクランプ実験をテーマに，『PICマイコンによる温度コントローラーとバスチェンバーの作製』と『C言語による PICプログラミング』の 2 コースを担当し，3 人の若手研究者の技術指導に当たった。

③科学研究費補助金（奨励研究）申請の推進

業務を展開，推進していくための問題意識の養成，その解決のための計画および方法の企画能力の養成，さらにはその表現力と説明力の養成を通じて，業務上の技術力の総合的な向上を図ることを目的に標記の申請を行い，下記の 2 課題の採択を得た。

(1) 加藤勝巳：実験機材製作時の非金属材料選定指針の検討

(2) 佐治俊幸：マウス，ラット用飲水量連続計測装置の開発

④奨励研究採択シンポジウムの開催

時代要請に対応した技術認識と向上に立った技術職員の業務の社会的開示を推進するために奨励研究採択者による第 3 回の報告会を 15 演題で行った。この報告は『生理学技術研究会報告（第 29 号）』にまとめた。

⑤成茂神経科学研究助成基金の申請の推進

課の自立的運営のためには独自の運営資金の確保が重要な課題である。今回，女性技術職員，産学連携，サイエンスパートナーをキーワードに，石原博美技術係員を代表者にして奨励研究採択課題技術シンポジウムの開催経費を申請し，採択された。

⑥放送大学利用による専門技術研修の受講

研究の高度化と多様化の進むなかで技術職員の研修は重要な課題である。今回研修科目として『脳科学の進歩』，『分子生物学』，『統計学入門』『光電子技術と IT 社会』，『ベンチャー企業論』を選び，10 名が受講した。

⑦生理学技術研究会の開催

全国の大学等の技術職員の技術連携と交流を目的に第 29 回生理学技術研究会を基礎生物学研究所・技術課と合同で開催した（平成 19 年 2 月 15 日－16 日）。会では，口演発表が 25 題，ポスター発表が 43 題あり，研修講演として『温度感知の分子機構』（富永真琴，生理学研究所）を行った。また技術課・三宝誠技術職員が『クローン技術』を話題講演をした。これらの報告は『生理学技術研究会報告（第 29 号）』にまとめた。

⑧東海北陸地区等の技術職員研修

東海北陸地区の大学等の技術職員の技術交流と向上を目的に毎年当番校による技術研修が行われているが，今年度は電気・電子コース（富山大学）を受講した。また実験動物関係教職員高度技術研修（熊本大学），総合技術研究会（名古屋大学），静岡大学技術研究会（静岡大学），高エネルギー加速器研究機構技術職員シンポジウム（高エネルギー加速器研究機構），文部科学省・研究機関等における実験動物等の実施に関する基本方針説明会（京都大学，順天堂大学），国立大学法人動物実験

施設協議会（富山大学），感染症診断・予防実技研修会（実験動物中央研究所），神経科学学会（京都）に参加し，業務の研究支援力の強化を図った。

⑨労働安全衛生資格取得および技能講習受講

研究所の安全衛生を課業務として充実するために下記の資格取得と技能受講を行った。

(1)衛生工学衛生管理者，(2)第 1 種衛生管理者，

(3)第 1 種圧力容器取扱作業主任者，(4)特定化学物質等作業主任者，(5)職場巡視・点検セミナー

(6)リスクアセスメント実務研修会

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

⑩第 1 回自然科学研究機構技術研究会の開催

技術職員の業務の紹介と業務連携を目的に，5 月 22，23 日の両日，国立天文台三鷹で開催した。会では 24 演題の発表があり，詳細は『第 1 回自然科学研究機構技術研究会集録』としてまとめた。

⑪岡崎 3 機関技術課長会と機構技術会議の開催

岡崎 3 研究所の動向の意見交換を，事務センターの総務課長，施設課長を交え毎月 1 回開催している。また核融合科学研究所，時に国立天文台も交え毎月 1 回の相互訪問による情報交換も行っている。

⑫核融合科学研究所技術部の外部評価への参加

技術部の研究支援体制等に関する外部評価の専門委員の委託を受け，技術部の研究支援活動の説明と現場視察を通して評価を行った。評価作業を通して研究支援活動の様々なあり方を理解する事が出来た。

2. 施設の運営状況

①統合生理研究系

(1) 生体磁気計測装置室

永田　治

【概要】

本年度は全頭型生体磁気計測装置において各種実験が順調におこなわれており，大きなトラブルは報告されていないが，システム管理上発生した問題および改修点は次の通りである。

4 台設置されている A/D コンバータユニット用電源の内 1 台が遅延リレー不良により起動不能になったため修理を行った。また，起動に時間を要するものがもう 1 台あるため交換予定であるが，起動後は安定しているため実験スケデュールによって交換予定を調整したい。最終的には部品の耐久性を考慮してすべての電源において交換を予定している。

刺激装置としては画像提示用プロジェクタのランプが使用耐久時間の 3000 時間を超えたため全体的な輝度低下が発生したため新規交換し刺激投影面全体において輝度差が最大 1〜5%以内となるよう調整をおこなったが，次年度以降に部品が生産中止となるため予備部品を 1 本調達することとした。さらにスクリーン背部壁面に乱反射によるフレア対策を実施した。

解析システムにおいてはデータ記録容量に不足が生じたため，ハードディスクサーバに RAID5 による領域を 480GByte 増設した。なお，生理研基幹に接続する端末の増加に伴い新規の IP 取得が困難となってきたため，すべての端末において新規のアドレスへ変更を行い，同時にローカルエリアにおけるゲートウェイのアドレス変更もおこなった。

その他，三次元 MRI 画像解析環境の更新においては，現在の機材に一部障害が発生しているため更新を急いでいるが，主要機能のうち 70%程度が終了しており，最終的には次年度において残りの機能とユーザインタフェース等の整備をおこない完了できる予定である。

平成 18 年度　生体磁気計測装置共同利用実験の実施状況

年　月	総日数	休　日	修理・点検	利用日数	稼働率	所外利用日数	備　考
2006 年 04 月	30	10	0	18	90%		
05 月	31	11	2	14	77%	2	
06 月	30	8	1	16	76%	2	シールドルーム補修作業（1 日）
07 月	31	11	0	15	75%	6	
08 月	31	8	2	17	100%	6	トレーニングコース使用 4 日（1～4 日）
09 月	30	10	0	16	80%		
10 月	31	10	4	17	100%		プロジェクタ光源交換，輝度調整作業（1 日）
11 月	30	10	1	17	89%		被験者椅子修理（1 日）
12 月	31	11	3	16	94%		シールドルーム西側内壁乱反射防止加工作業（1 日）
2007 年 01 月	31	12	2	17	100%	6	データサーバ用 RAID5-HD:480Gbyte 増設（1 日）
02 月	28	9	2	19	100%		A/D 電源用不良遅延リレー1 本交換
03 月	31	10	2	19	100%		
04 月	30	10	2	18	100%		ゲートウェイ WS の IP アドレス変更

＊総日数はセンサを使用した計測実験の総日数であり，解析装置の使用日数は含まれていない。
　また，トレーニングなど実験以外の用途も含まれていない。
＊稼働率＝利用日数/（総日数－(休日＋点検日)）×100

②脳機能計測センター

(1) 形態情報解析室

山口　登

【超高圧電子顕微鏡利用状況】

今年度における超高圧電子顕微鏡共同利用実験は，合計 14 課題が採択され，全ての課題が実施された。これらの共同実験の成果は，超高圧電子顕微鏡共同利用実験報告の章に詳述されている。超高圧電子顕微鏡の年間の利用状況を表にまとめたので下記に示す。稼動率は，利用日数と使用可能日数より求めている。本年度の主な超高圧電子顕微鏡の改良・修理としては，レンズ冷却水用流量センサーおよび温度センサーの取り付け，フィルム送り機構の修理，フィルム乾燥機の TMP 冷却用ファンの取り付け作業などが行われた。

2006 年度　超高圧電顕月別稼働率

年　月	総日数	休 日	調整日	使用可能日　数	所内利用	所外利用	計	稼働率	備　考
2006 年 4 月	30	10	4	16	5	0	5	31%	
5 月	31	11	7	13	5	0	5	38%	壁補修工事
6 月	30	8	8	14	10	0	10	71%	壁補修工事
7 月	31	11	5	15	7	8	15	100%	修理　4 日
8 月	31	8	1	22	8	14	22	100%	
9 月	30	10	6	14	2	2	4	29%	修理　2 日
10 月	31	10	4	17	7	2	9	53%	
11 月	30	10	6	14	6	6	12	86%	修理　3 日
12 月	31	11	3	17	3	8	11	65%	
2007 年 1 月	31	12	3	16	1	11	12	75%	
2 月	28	9	1	18	1	17	18	100%	
3 月	31	10	1	20	7	13	20	100%	
計	365	120	49	196	62	81	143	73%	

フィラメント点灯時間　　480.7 時間
使用フィルム枚数　　7,697 枚

(2) 機能情報解析室

佐藤　茂基

【概要】

今年度の装置整備状況は，主な事項として次の通りである。今年度は，6 月に制御用電源ユニットが故障し部品の交換修理を行ったが，7 月に再度不調になり電源ユニットの修理交換を行った。

2 月にシム電源が不調になり点検を行ったが，修理交換するユニットがメーカーに無かった為，現在交換ユニット待ちである。不調だが MRI の撮影は可能である。

平成 18 年度の MR 装置利用実績を別表に記す。

【機器利用率】

平成 18 年度リアルタイム装置月別稼働率

年月	総日数	保守	使用可能日数	所内利用日数	所外利用日数	計	利用率	備考
2006 年　4 月	30	0	30	0	4	4	13%	
5 月	31	1	30	0	4	4	13%	
6 月	30	7	23	0	4	4	17%	制御用電源ユニット修理
7 月	31	9	22	0	4	4	18%	制御用電源ユニット修理
8 月	31	1	30	0	4	4	13%	
9 月	30	4	26	0	3	3	12%	停電
10 月	31	3	28	0	0	0	0%	停電
11 月	30	1	29	0	4	4	14%	
12 月	31	1	30	0	3	3	10%	
2007 年　1 月	31	1	30	0	2	2	7%	
2 月	28	5	23	0	2	2	9%	シム電源不調
3 月	31	2	29	0	2	2	7%	定期点検
計	365	35	330	0	36	36	11%	

*保守以外の祝祭日は，使用可能日に含めた。
*同一日に複数の利用者（グループ）が有る場合でも，利用日数は 1 日とした。

(3) 生体情報解析室

吉村伸明，村田安永

【概要】

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

生体情報解析システムは，データ解析・可視化，信号処理，画像処理，数式演算，統計処理，電子回路設計などの多くのアプリケーションを備え，これらは高機能ワークステーション上での利用のみならず，各部門施設の PC に直接導入し，ライセンスサーバで認証を行うことでの利用も可能である。登録者は 104 名で，研究推進のための積極的な利用がある。

生理学研究所のネットワーク利用状況は，メール登録者が 436 名。WWW 登録者が 65 名。LAN の端末数が 1686 台。所内向けのダイヤルアップサービスは 24 回/週，2 時間/週。VPN サービスは 23 回/週，28 時間/週の利用があった。

所外からのメール受信数は 35,000 通/週。所外へのメール発信数は 5,100 通/週。WWW は 4,600 台/週の端末から 62,000 ページ/週の閲覧があった。

③生理研・基生研共通施設

(1) 電子顕微鏡室

前橋　寛

【概要】

今年度も，明大寺地区と山手地区の透過型電子顕微鏡各1台(JEM-1200EX，JEM-1010)の保守契約(年1回点検)を継続した。

JEM-1010 本体と付属の CCD カメラの倍率表示等を同期させるため，電顕本体にカメラ制御基板を挿入した。

保守契約をしていない JEM-1200EX（B-15 号室）は利用頻度が少ない為，一時的にナノ形態生理部門に貸し出すこととなり，山手地区に移転した。

共焦点レーザー顕微鏡(LSM-510)の ArKr レーザー管が寿命となり交換した。さらに，制御用コンピュータが動作不良となり，新しいコンピュータと交換した。それに伴い制御用ソフトウェアがバージョンアップ（Ver.2.0 から Ver.3.2）し Average，Scan Zoom 機能の強化および深部と表層部の明るさ補正機能，2D Deconvolution 等追加された。

2006 年度 電子顕微鏡講習会は，電子顕微鏡の取扱いおよび調整（明大寺地区コース JEM-1200EX，山手地区コース JEM-1010 使用）という内容で行われ，計 9 名の参加があった。

【研究内容一覧表】

本年度, 室を利用してなされた研究の総件数は 44 件であった。機構内では 31 件あり，機構外は，国内で 8 件，国外では中国，ハンガリー，オーストリアの研究者による利用が 5 件あった。下記の表はその研究部門・施設，大学，研究所と研究内容の一覧表である。

利用内容一覧表

二研究所

研究所	部門・施設	研究内容
生理研	機能協関	・生後ラット感覚ニューロンの機能分子発現機構
	神経シグナル	・カルシウムチャネル変異マウスにおけるシナプス超微小形態解析
	分子神経生理	・成体脳における側脳室周囲に存在する神経幹細胞の niche の微細構造の観察 ・新生神経細胞のシナプス構造の観察 ・脱髄モデルマウスの幹細胞移植による再ミエリン構造の観察 ・Ventricular Mixing の意義と制御機構 ・Olig3 細胞の移動様式の解析
	大脳神経回路論	・大脳皮質神経結合の解析
	脳形態解析	・小脳シナプスの形態学的解析 ・小脳運動学習によるシナプス形態やグルタミン酸受容体の変化 ・ラット外側膝状体における glutamatergic synapse 上に発現する ionotropic receptor の局在解析 ・SDS-FRL 法の脳組織への適用法の確立とこれを用いたグルタミン酸受容体の局在解析 ・電子顕微鏡を用いたシナプス受容体の定量
	ナノ形態生理	・樹状突起スパイン部の観察 ・位相板開発における薄膜観察 ・電子顕微鏡による膜蛋白質機能構造の決定 ・生体組織の凍結・樹脂抱埋切片の位相差電子顕微鏡観察 ・microtubule に結合するタンパク質の観察
	神経分化	・ゼブラフィッシュの神経細胞の観察
	形態情報解析室	・消化管および小脳におけるエンドセリン受容体の分布に関する研究
	技術課	・昆虫類（主としてコメツキムシ類）の表皮面の微細構造の研究 ・凍結割断両面レプリカ免疫電顕法を用いた小脳グリア細胞の標識

研究所	部門・施設	研究内容
基生研	高次細胞機構	・高等植物で遺伝子産物の細胞内局在を調べる
	生物進化	・植物細胞における微小管の構築機構
	光情報	・シロイヌナズナにおける葉緑体光定位運動の解析 ・フォトトロピンの細胞内局在と機能解析
	植物発生遺伝学	・葉の発生制御過程の解析
	性差生物	・生殖腺の性分化に関する研究
	分子細胞生物学	・オートファージの形態学的解析
	分子遺伝学	・アサガオの epidermal traits に関わる遺伝子の研究
	形態形成	・細胞極性関連遺伝子改変マウスの機能解析
	統合神経生物学	・遺伝子改変動物由来の生体組織の電子顕微鏡解析 ・遺伝子改変マウスの中枢神経系におけるシナプス構造の形態観察

所外（国内）

大学・研究所	研究代表者名	研究内容
水産総合研究センター養殖研究所	小林　亨	精巣分化過程における精巣構造組織構造の 3 次元的解析
大阪府立大学	加藤　幹男	DNA が形成する特殊構造の観察
東京歯科大学	橋本 貞光	唾液腺傍細胞輸送経路の検討
京都大学化学研究所	濱崎　万穂	たんぱく質の細胞内局在の同定
国立長寿医療センター研究所	中西　章	ポリオーマウィルスベクター生成の確認
藤田保健衛生大学	厚沢　季美江	培養細胞の電子顕微鏡像と位相差電子顕微鏡観察像との比較検討
花市電子顕微鏡技術研究所	花市　敬正	凍結薄切法による細胞内生体分子の直接観察の研究
花市電子顕微鏡技術研究所	高瀬　弘嗣	位相差電子顕微鏡の試料調整法の研究

所外（国外）

国名，大学，研究所	研究者名	研究内容
中国 西安交通大学	WANG, Ying	小脳シナプスの形態学的解析 小脳運動学習によるシナプス形態やグルタミン酸受容体の変化
中国 K.Kleung Brain Research Centre	WANG, Wen	グルタミン酸受容体の小脳と海馬の分布の解析
ハンガリー デブレツェン大学	ANTAL, Miklos	脊髄におけるグルタミン酸局在
ハンガリー Department of Comparative Physiology University of Szeged,Faculty of Science	LÖRINCZ ,Andrea	海馬における NMDA と AMPA 受容体の分布の解析
オーストリア インスブルック大学	KAUFMANN, Walter	SDS-FRL 法および pre-embedding 法によるイオンチャネルの分布

（2）機器研究試作室

加藤勝己

【概要】

機器研究試作室は多種多様な医学・生物学用実験機器の開発と改良，それに関わる技術指導，技術相談を室の役割としている。今，我々の周りには便利な物品があふれ，自分で工夫して作ったり，改良する機会が少なくなり，新しい研究には新しい研究機器を作るという『ものづくり』が希薄になり，一方で，最近の研究の多様化は室に新たな役割の模索を迫っている。そうした認識のもと，『ものづくり』能力の重要性の理解と機械工作ニーズの新たな発掘と展開を目指すために，室では，2000 年度から，医学・生物学の実験研究に使用される実験装置や器具を題材にして，機械工作の基礎的知識を実習主体で行う機械工作基礎講座を開講し，2007 年度は，2006 年度同様，汎用工作機械の使用方法を主体に実習する初級コースと応用コース（アクリル樹脂製パッチクランプ用チェンバー，簡易型一軸式マニュプレータ，レンズ及びフィルターホルダーの 3 テーマから受講希望者が選択）の二コースを開講する準備を進めている。参加希望者は，二コース合わせ生理研 7 名，基生研 2 名で，初級

コースは半日を 1 回，応用コースはガイダンスの後，マンツーマンで 3～4 回の講習を行う予定である。

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

なお，機器研究試作室の平成 18 年度の利用状況は，以下の通りである。

機器研究試作室利用機器表　（件数）

月	ﾌﾗｲｽ盤	ﾎﾞｰﾙ盤	ｺﾝﾀｰﾏｼﾝ	旋盤	横切盤	ｸﾞﾗｲﾝﾀﾞｰ	切断機	NCﾌﾗｲｽ盤	その他	計
4	15	10	8	9	13	7	1	3	9	75
5	21	11	13	11	9	9	3	0	14	91
6	34	20	21	25	10	15	11	0	27	163
7	27	20	20	24	9	9	13	0	26	148
8	43	21	22	6	6	3	11	6	17	135
9	51	29	24	28	20	12	8	3	36	211
10	31	24	19	27	7	9	7	2	19	145
11	43	27	21	16	7	6	9	4	25	158
12	21	16	9	5	4	4	2	4	9	74
1	16	5	14	11	11	5	3	3	15	83
2	16	10	7	7	7	4	5	4	18	78
3	16	5	9	5	8	3	3	0	11	60
合計	334	198	187	174	111	86	76	29	226	1421

機器研究試作室利用人数表

月	生理研	基生研	その他	合計	延べ時間
4	33	12	0	45	80
5	36	11	0	47	82
6	60	11	0	71	186
7	54	13	0	67	139
8	75	3	1	79	198
9	93	11	0	104	236
10	49	8	0	57	142
11	64	2	0	66	140
12	37	3	0	40	78
1	40	5	0	45	128
2	38	3	0	41	126
3	29	5	0	34	57
合計	608	87	1	696	1592

機器研究試作室部門別利用状況

感覚認知情報	124 名	感覚運動調節	71 名	認知行動発達機構	60 名
ナノ形態生理	41 名	動物実験センター	38 名	生体恒常機能発達機構	18 名
機能情報解析室	18 名	生体情報解析室	17 名	心理生理学	13 名
神経シグナル	11 名	形態情報解析室	10 名	脳形態解析	6 名
生体システム	5 名	大脳神経回路論	5 名	神経分化	3 名
神経機能素子	3 名	電子顕微鏡室	3 名	生殖・内分泌系発達機構	2 名
機能協関	1 名	技術課	1 名	機器研究試作室	145 名
ERATO 分化全能性進化	17 名	時空間制御	13 名	植物発生遺伝学	13 名
生物進化	11 名	脳生物学	10 名	光情報	7 名
分析室	4 名	分子細胞生物学	1 名	RI 実験センター	1 名
大型スペクトログラフ室	1 名	構造多様性	1 名	細胞器官培養室	1 名
人工気象室	1 名				
分子研その他	1 名				

④動物実験センター（岡崎共通研究施設）

佐治俊幸，廣江猛，窪田美津子，小池崇子

【概要】

3 年計画による明大寺地区陸生動物室の SPF 化の第二期改修を行った。予算として生理学研究所から 1,930 万円，基礎生物学研究所から 500 万円，及びセンターの自助努力で 300 万円が計上された。本年度は，2 室の SPF 化（1 室は飼育室，他の 1 室は実験室），個別換気方式の飼育ラック，ケージ交換ステーション等とクリーン飼育室及び実験室の改修，焼却炉の撤去工事を行った。改修の最終年度にあたる平成 19 年度には, 地下の残る実験室等の改修と廊下の改修を行う予定である。

外来生物法の制定及び感染症予防法の改正による環境省及び厚生労働省へアカゲザル，カニクイザル，タイワンザルの申請書に引き続き，その他のマカク属サルに関し，動物愛護法の改正による飼育許可を受けた。

自然科学研究機構動物実験規定が制定され，飼育室及び実験室の指定申請を行い，教育訓練を実施した。

実験動物の授受に関し，年間で 54 件の導入と 43 件の供与があった。平均すると毎週 2 件の授受が行われており，それに伴う条件や書類の確認，ユーザーへのアドバイスに費やされる時間が増大している。

【受精卵凍結・クリーンアップ事業】

平成 17 年度と比べ，受精卵凍結保存依頼は減少し，導入動物に対するクリーンアップはほぼ同様の依頼があった。過去に当センターで受精卵凍結した胚に関する融解移植依頼は，平成 17 年度より増加した。また今回行った融解移植の中には, 事業を始めた当初の 1998 年に凍結した胚も含まれていたが，産仔を得ることが出来，問題なく長期保存されていることも証明された。

実施件数としては，受精卵凍結保存がのべ 20 件，クリーンアップ兼受精卵凍結保存がのべ 6 件，過去に当センターで受精卵凍結した胚の融解･移植はのべ 6 件であった。

【明大寺地区　陸生動物室】

平成 18 年度の飼育室利用部門数は，32 研究部門（生理研 17 部門，基生研 7 部門，統合バイオサイエンスセンター 5 部門，他 3 部門）であった。

動物飼育数は減少の傾向を示している。飼育費等の負担金徴収のために，飼育数を抑える傾向があるのだろうか。そこで，空きスペースを利用し，山手地区の利用者も明大寺地区の飼育室が使用できるようにした。また，サルの搬入数が増加し，検疫室が常時使用されている状態で一年間が経過した。これに伴い，サルケージ洗浄等に係る作業員の負担が増加している。

【山手地区 動物実験センター分室】

平成 18 年度の飼育室利用部門数は，12 研究部門（生理研 5 部門，基生研 2 部門，統合バイオサイエンスセンター5 部門）であった。

利用者講習会を毎月開催するとともに，陸生動物利用者には実務講習会を実施している。各受講者はそれぞれ 37 名，35 名であった。

全 SPF 飼育室およびマウス・ラット一時保管室 2 の病原微生物モニタリングが，3 ヶ月に 1 回のペースで実施され，異常は検出されなかった。

また，ハエ準備室をアリマキ飼育室として，利用を開始した。

【明大寺及び山手地区 水生動物室】

平成 18 年度の水生動物室利用状況は，生理研・基生研両研究所あわせて 7 部門・施設の利用があった。

平成 19 年度より基礎生物学研究所の耐震補強工事に伴う水生動物室の改修工事が計画されており，その改修内容を検討している。この改修のために本年度は水槽類の機器の業者による修理を極力行わずに，手持ちの補修部品で修理を行うか，大きな故障時には使用中止にすることとした。

陸生動物　　部門別・動物種別搬入数（平成 18 年度）

動物種 / 部門	明大寺地区							山手地区	
	マウス	ラット	ウサギ	モルモット	ネコ	イヌ	サル	マウス	ラット
神経機能素子	69								
機能協関	317	53							
機能協関（樫原）		46							
分子神経生理	214							1,686	
神経シグナル	102							2,208	41
感覚認知情報							5		
生体システム	11	6					10		
認知行動発達機構	73	46					13		
脳形態解析	201			4				1,549	274
大脳神経回路論									173
形態情報解析室		44							
機能情報解析室							1		
生態情報解析室	20	1							
生殖内分泌系	855	17							
生体恒常機能	234	141						1	
動物実験センター	239	12			3			588	
高次細胞機構			2						
性差生物学								2	2
統合神経生物学								452	
行動生物学		30							
脳生物学	199	22	3				3		
時空間制御	243	166							
分子発生	24							762	
神経分化								190	
ナノ形態生理		88						15	42
分子環境生物学								433	
細胞生理								2,208	23
遺伝子改変動物作製室								929	761
分子動力学	17								
合　　計	2,818	672	5	4	3	0	32	11,023	1,316

水生動物　月別・動物種別搬入数（平成 18 年度）

種＼月	４月	５月	６月	７月	８月	９月	１０月	１１月	１２月	１月	２月	３月	合計
メダカ								500		290			790
ティラピア		10									23		33
アフリカツメガエル	3												3
ベラ					20			90					110
ウナギ													0
ヒトデ		100				130							230
ウニ											120	110	230
ホヤ											100	400	500
ナマコ		4		43									47
海水(t)			20			12			8	8			48