

研究会報告

〔 目 次 〕

1. 膜機能分子ダイナミクスの分子機構解明に向けて (代表者: 老木 成稔 2006 年 9 月 28 日-9 月 29 日)	207
2. 細胞シグナリングの時空間統御機構解明への方略探索 (代表者: 曾我部 正博 2006 年 10 月 5 日-10 月 6 日)	215
3. 病態糖鎖研究会 (代表者: 辻 崇一 2006 年 9 月 25 日-9 月 26 日)	225
4. 細胞死研究の新たな展開と関連する素過程 (代表者: 仁科 博史 2006 年 10 月 31 日-11 月 1 日)	239
5. 上皮膜輸送活性化因子を探して: 宿主防御バリアーの最前線 (代表者: 中張隆司 2006 年 12 月 12 日-12 月 13 日)	250
6. イオンチャネル・トランスポーターと心血管機能: 最近の知見と今後の展開 (代表者: 亀山 正樹 2006 年 12 月 19 日-12 月 20 日)	258
7. 視知覚への多角的アプローチ-生理, 心理物理, 計算論 3 (代表者: 塩入 諭 2006 年 6 月 8 日-6 月 9 日)	267
8. Neuro-glio-vascular interaction におけるプリン作動性シグナリングの病態生理的機能 (代表者: 南 雅文 2006 年 9 月 7 日-9 月 8 日)	274
9. カルシウムシグナリング研究の新潮流 2 (代表者: 徳田雅明 2006 年 11 月 16 日-11 月 17 日)	301
10. シナプス可塑性の分子的基盤 (代表者: 高橋 正身 2006 年 6 月 28 日-6 月 29 日)	311
11. 脳磁場計測によるヒト脳機能マッピング (代表者: 柿木 隆介 2006 年 12 月 13 日-12 月 15 日)	321
12. 神経科学の道具としての fMRI 研究会 (代表者: 本田 学 2006 年 11 月 16 日-11 月 17 日)	336
13. 高次脳機能研究の新展開 (代表者: 高田昌彦 2007 年 1 月 17 日-1 月 18 日)	344
14. Recent advances in cortical and hippocampal neural microcircuit studies (大脳皮質・海馬の局所神経回路研究) (代表者: 吉村由美子 2006 年 7 月 24 日-7 月 26 日)	352
15. 大脳皮質機能単位の神経機構 (代表者: 金子武嗣 2006 年 12 月 7 日-12 月 8 日)	363
16. シナプス伝達の細胞分子調節機構 (代表者: 神谷温之 2006 年 12 月 4 日-12 月 5 日)	367
17. DNA 構造を基盤とするゲノム生理学の展開-DNA, 蛋白質, 膜の相互作用 (代表者: 水田龍信 2006 年 11 月 9 日-11 月 10 日)	377
18. 位相差断層電子顕微鏡の医学・生物学的応用 (代表者: 金子 康子 2007 年 1 月 25 日)	386

19. 第 3 回唾液腺機能からの生理機能研究・その戦略的展開 (第 3 回ニールスステンセン記念 国際唾液腺シンポジウム, 第 36 回生理研国際シンポジウムと合同開催)	
(代表者: 村上政隆 2006 年 10 月 20 日-10 月 23 日)	391
20. バイオ分子センサー研究会	
(代表者: 富永真琴 2006 年 6 月 26 日-6 月 27 日)	399
21. TRP チャネル研究会	
(代表者: 井上隆司 2006 年 6 月 12 日-6 月 13 日)	408
22. 「痛みの分子機構と治療戦略」研究会	
(代表者: 仙波 恵美子 2006 年 11 月 15 日-11 月 16 日)	418
23. 体温調節, 温度受容研究会	
(代表者: 永島計 2007 年 1 月 11 日-1 月 12 日)	434
24. シナプス形成と可塑性機構獲得の統合的理解へ向けた学際的アプローチ	
(代表者: 大塚稔久 2006 年 11 月 30 日-12 月 1 日)	443
25. Fm θ 研究会	
(代表者: 遠本 徹 2007 年 3 月 11 日)	453

1. 膜機能分子ダイナミクスの分子機構解明に向けて

2006 年 9 月 28 日－9 月 29 日

代表・世話人：老木 成稔（福井大学 医学部）

所内対応者：久保 義弘（自然科学研究機構 生理学研究所 神経機能素子）

（1）CFTR チャネル NBD ゲーティングエンジンの動作機構

相馬 義郎（大阪医科大基礎医学 I 生理学教室）

（2）内向き整流カリウムチャネルの 2 モードモデル

柳（石原）圭子（佐賀大学医学部生体構造機能学器官細胞生理分野）

（3）細胞膜 Vacuolar-type H^+ - ATPase を介するプロトン電流の特性

久野 みゆき, 酒井 啓, 川脇 順子, 森浦 芳, 森 啓之

（大阪市立大学大学院医学研究科分子細胞生理学）

（4）HERG チャネル－薬物複合体のカリウムイオン透過シミュレーション

神谷 成敏, 米澤 康滋, 中村 春木（神戸大学大学院医学系研究科）

（5）ATP 受容体チャネル $P2X_2$ の思いがけない性質

藤原 祐一郎, 久保 義弘（生理学研究所神経機能素子研究部門）

（6）電顕画像の単粒子解析法による $P2X_2$ イオンチャネルとアルツハイマー関連タンパク質 γ -セクレターゼの構造解明

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

（7）細胞膜上でのシグナル変換の 1 分子イメージング解析

楠見 明弘（京都大学医学部再生医科学研究所）

（8）心筋細胞数値モデル (Kyoto Model) の利用

皿井 伸明, 竹内 綾子, 松岡 達, 野間 昭典

（京都大学医学研究科ナノメディシン融合教育ユニット細胞機能制御学）

（9）機械受容チャネル MscL は閉じていられるぐらい固く、膜の張力で開くぐらい軟らかい

吉村 建二郎（筑波大学生命環境科学研究科構造生物科学専攻）

（10）分子動力学シミュレーションによる大腸菌機械受容チャネル MscL のゲーティング機構の解析

澤田 康之, 村瀬 雅樹, 曾我部 正博（名古屋大学大学院医学系研究科細胞生物物理）

（11）KcsA チャネルのゲーティングによる構造変化

老木 成稔, 清水 啓史, 岩本 真幸, 今野 卓, 佐々木 裕次（福井大学医学部分子生理）

（12）人工平面膜に再構成した膜タンパク質のダイナミクス計測技術

田端 和仁, 野地 博行（大阪大学産業科学研究所高次細胞機能講座）

（13）膜超分子イオニックモーターの分子構築

本間 道夫（名古屋大学大学院理学研究科）

（14）チャネルの機能を構造から理解するために

藤吉 好則（京都大学大学院理学研究科生物物理学教室）

【参加者名】

藤吉好則（京都大学大学院理学研究科生物物理学教室），
本間道夫，寺島浩行（名古屋大学大学院理学研究科），久
野みゆき（大阪市立大学大学院医学研究科分子細胞生理
学），楠見明弘（京都大学医学部再生医科学研究所），神

谷成敏，（神戸大学大学院医学系研究科），田端和仁（大
阪大学産業科学研究所高次細胞機能講座），皿井 伸明（京
都大学医学研究科ナノメディシン融合教育ユニット細胞
機能制御学），竹内 綾子（京都大学大学院医学研究科ナ

ノメディシン融合教育ユニット), 姫野友紀子, 金鳳柱 (京都大学医学研究科細胞制御統御学), 佐藤主税 (産業技術総合研究所脳神経情報研究部門), 相馬 義郎 (大阪医科大基礎医学 I 生理学教室), 辰巳仁史, 澤田康之, 村瀬雅樹, 高橋賢, 町山裕亮 (名古屋大学医学研究科細胞生物物理), 柳 (石原) 圭子 (佐賀大学医学部生体構造機能学器官細胞生理分野), 吉村建二郎 (筑波大学大学院生命環境科学研究科構造生物科学専攻), 野村健 (科学技術振興機構 ICORT/SORST), 石井孝広, 山田玲 (京都大学大学

院医学研究科神経生物学), 畠岡由香里 (松下電器産業 (株) 先端技術研究所), 久木田文夫 (生理研統合バイオ), 黒川竜紀, 村田喜理, 大河内善史, 西野敦雄, 蒲野淑子, 岡村康司 (統合バイオ神経分化), 沼田朋大 (生理研機能協関), 佐竹伸一郎 (生理研生体情報), 老木成稔 (福井大学医学部分子生理), 久保義弘, 立山充博, 中條浩一, 長友克広, 松下真一, Batu Keceli, 石井裕 (生理研神経機能素子)

【概要】

チャネル・トランスポーター・ポンプなど膜機能分子の構造・機能に関する情報が近年急速に蓄積し, 分子機構についての理解が深まっている。分子が働く有様をダイナミックに捉えることこそ生理学の目指すところであるが, その目的を達成するための大きな前進が行われてきた。このような進歩の裏には基本的な手法の絶え間ない技術革新が基礎にある。そのような研究の初期に芽生えたアイデアや地道な実験の工夫などをじっくりと議論できるための場を作るべく本研究会を開催した。膜機能分

子の分子機構の解明という共通の目標に向かって様々なバックグラウンドを持つ研究者が集い, 研究の現状を概観し, 将来の進歩を展望することができた。エネルギーシユな発表が相次ぎ, 比較的余裕を持ったスケジュールの中で十分に議論を深めることができた。原子レベルの構造から一分子の機能・ダイナミクスまで, 実験的・理論的解析が急速に展開している現状を把握でき, 若い研究者が積極的に参加できる研究会に発展させたいと考えている。

(1) CFTR チャネル NBD ゲーティングエンジンの動作機構

相馬 義郎 (大阪医科大基礎医学 I 生理学教室)

ABC トランスポーターは, 2 つの Nucleotide Binding Domain (NBD) を持つ膜タンパク質の総称で, およそ 50 種のメンバーを内包するスーパーファミリーを形成して, 生理学的に重要な役割を果たしている。これら 2 つの NBD は, ATP 分子の結合と加水分解のサイクルを繰り返して, トランスポーター分子の輸送機能を発揮するための機械的駆動力を供給している。このスーパーファミリーのメンバーである CFTR チャネルでは, この NBD エンジンの駆動力を利用してチャネルゲートの開閉を行っていると考えられる。

最近の研究結果により, それぞれの NBD の ATP 結合

部位は他方の NBD への対向面にあり, それらの結合部位に ATP が結合して, ATP2 分子を挟み込んだ形で NBD 2 量体を形成することが明らかになってきた。現在, CFTR チャネルにおいては, この 2 量体形成によってチャネルゲートは閉から開状態に遷移し, ATP の加水分解による 2 量体の解離に伴ってゲートが閉状態に戻るという作業仮説が提唱されている。

本研究会では, この ABC トランスポーター・スーパーファミリーに共通していると考えられる NBD エンジンの作動動態についてのより詳細な解析および分子構造との連関について紹介した。

(2) 内向き整流カリウムチャネルの2モードモデル

柳 (石原) 圭子 (佐賀大学医学部生体構造機能学器官細胞生理分野)

強い内向き整流性を示す古典的 inward 整流カリウムチャネルは脱分極電位で外向き電流が流れないが、逆転電位付近では外向き電流が流れる。この外向き電流は心筋、骨格筋、血管内皮細胞など様々な細胞において膜電位を負電位側に維持し、さらに心筋細胞では活動電位の速い再分極を引き起こす。この外向き電流が流れるメカニズムは依然不明である。例えばセルアタッチモードでは外向きの単一チャネル電流は記録されないし、時間依存性の開閉機構は逆転電位より正電位側では最大に閉じてしまう。我々は古典的 inward 整流カリウムチャネルの分子実態と考えられる Kir2 チャネルを 293T 細胞に発現させ、インサイドアウトパッチ膜から巨視的電流を記録して外

向き電流の機序を検討した。その結果、チャネルの時間依存性開閉を引き起こすのは細胞内のスperlミン (4 価ポリアミン) とチャネルとの電位依存性の相互作用 (ブロック) であるとして矛盾しないが、最大コンダクタンスのうち Kir2.1 で約 10%, Kir2.2 で約 7 % の成分を担うチャネルはスperlミンによるブロックに対する感受性が低く、外向き電流はこのチャネルを通ることが示唆された。細胞膜内側に存在するポリアミン種が異なるとブロックに対する感受性が低いチャネルの割合は変化し、ポリアミンはチャネルと結合して、ポリアミン感受性の異なる 2 つのチャネル・モードの平衡を制御する働きを合わせ持つと考えられる。

(3) 細胞膜 Vacuolar-type H^+ -ATPase を介するプロトン電流の特性

久野 みゆき¹, 酒井 啓¹, 川脇 順子², 森浦 芳枝¹, 森 啓之¹
(大阪市立大学大学院医学研究科分子細胞生理学¹・中央研究室²)

細胞膜には、プロトン (H^+) を選択的にトランスポートするチャネル、ポンプ、トランスポーターなど多様な機能分子が存在する。その動作原理や活性調節のメカニズムはさまざまであるが、自己調節的な feedback に基づき pH ホメオスタシスの枠組みの中で働くと考えられている。電気生理学的手法はイオントランスポートの研究に威力を発揮するが、イオンチャネルに比べポンプやトランスポーター活性の検出には制約が多い。Vacuolar-type H^+ -ATPase (V-ATPase) は細胞内の小胞膜に普遍的に存在し、小胞内への物質取り込みの原動力としての重要な

役割を担っている。しかし、ある種の細胞では、分子的に同一の V-ATPase が細胞膜にも発現している。私達は、細胞膜に高密度に V-ATPase を発現しているマウス培養破骨細胞を用いて V-ATPase 電流の検出を試みた。ホールセルクランプ下で、細胞内 ATP に依存し、V-ATPase のブロッカー (bafilomycin A1 および DCCD) によって抑制される H^+ 電流が記録された。 H^+ の平衡電位よりはるかに過分極側でも外向きに流れたが、振幅は細胞内外の pH および電位勾配に依存し、細胞外 Ca^{2+} によって抑制された。

(4) HERG チャネルー薬物複合体のカリウムイオン透過シミュレーション

神谷 成敏¹, 米澤 康滋², 中村 春木² (¹神戸大・院・医, ²阪大・蛋白研)

ヒト ether-a-go-go-related gene (HERG) にエンコードされる HERG チャネルは、電位依存性のカリウムイオンチャネルである。HERG は心臓で多く発現し、不整

脈に関わるため、薬剤との作用機序の研究が行われている。本研究では、チャネル内外のイオンをブラウン運動する粒子として取り扱う Brownian Dynamics (BD) プロ

グラムを開発し、HERG のイオン電流のシミュレーションを行った。このプログラムでは、フェムト秒からミリ秒オーダーのシミュレーションが可能である。

HERG チャンネルの結晶構造はこれまで得られていないため、KvAP (PDB ID, 1ORQ)をテンプレートとしたホモロジーモデルを用いた。HERG と薬剤ニフェカランとのドッキングシミュレーションから複合体モデルを構築した。膜と溶媒の水は、それぞれ、誘電率 4.0, 78.5 の連続誘電体とした。カリウム、塩化物イオンは粒子として取り扱い、濃度を 150 mM とした。HERG チャンネ

ルのフィルター部分の原子を粒子として、それ以外の部分を mesh として取り扱う新規モデル (Particle-Particle Particle-Mesh, PPPM) を採用し、フィルター部分におけるイオンとの相互作用を高精度で評価した。HERG チャンネルのアポ体のシミュレーションから、実験で得られた単一チャンネルのイオン電流の外部電場依存性を再現することを確認した。また、HERG-ニフェカラン複合体のイオン電流のシミュレーションから、薬剤のプロットのメカニズムを議論した。

(5) ATP 受容体チャンネル P2X₂の思いがけない性質

藤原 祐一郎, 久保 義弘 (生理学研究所神経機能素子研究部門)

P2X 受容体は細胞外 ATP によって活性化される非選択性陽イオンチャンネルである。分子構造上は 2 回膜貫通型のサブユニットの 3 量体であることが知られている。2 つの膜貫通部位には膜電位センサーを思わせる領域はなく、膜電位依存性を持つチャン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、2 本刺し膜電位固定下で、ATP 投与後の定常状態における P2X₂ チャンネル電流と膜電位との関係を定量的に解析した。P2X₂ チャンネル電流は内向き整流性を示すことが知られているが、脱分極電位から過分極電位へのパルス刺激を与えた時、チャンネルポアを持つ性質による瞬時の電流レベルの変化に加え、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、P2X₂ チャンネルは、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。

現時点では、膜電位と ATP 濃度に依存してチャンネルの活性化が起こる機構の詳細は明らかではないが、ATP は負電荷を帯びているため、ATP の結合自体に膜電位依存性がある可能性も考えられよう。

(6) 電顕画像の単粒子解析法による P2X₂ イオンチャンネルとアルツハイマー関連タンパク質 γ -セクレターゼの構造解明

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

ATP はエネルギー源として有名だが、痛みを感じるときの細胞間情報伝達物質としても用いられている。その受容体である P2X および P2Y は、痛みを受ける皮膚から中枢神経系までの経路に豊富に存在していて、その遺伝子群は十数種類にもおよび、super family を形成している。普通の接触が痛みに感じられる遺伝病など様々の遺

伝病の原因遺伝子としても、この種類のチャンネルが同定されている。しかし、その構造は未知であった。その中の P2X はそれ自体がイオンチャンネルであり、ATP との結合によって開く。我々は生理研の久保・山本等との共同研究により、P2X₂ の負染色電顕画像の 2 次元平均化による可視化に成功し、全体として花瓶の様な形の 3 量体

であることを解明した。3 量体構造は、イオンチャネルとして極めて新規である。本受容体種は我々の体内のほとんどの細胞に存在しており、その新たな機能の発見が期待されている。

また膜タンパク質である γ -secretase は一回膜貫通型タンパク質を細胞膜内で切断するプロテアーゼであり、

部分的に疎水的なペプチド断片を細胞外に放出する。これらの切断産物には、アルツハイマー症患者脳内に老人斑として蓄積し、その病因に深く関連すると考えられている β -アミロイドも含まれる。膜タンパク質の超分子複合体である γ -secretase の低分解能での構造解明に、東大の岩坪・富田・浜窪等との共同研究により成功した。

(7) 細胞膜上でのシグナル変換の1分子イメージング解析

楠見 明弘 (京都大学医学部再生医科学研究所)

胞中の生体ナノシステムがはたらく仕組みを理解するためには、生きている細胞中で、ナノシステムがはたらく状態、そのナノシステムを直接観察し調べることが望ましい。細胞内のナノシステムは、基本的に、熱揺らぎや熱拡散運動によって作られはたらく。したがって、非同期で確率過程論的に動き回る分子がどのようににナノシステムの機能を創出するかということが、興味

の中心となる。近年、システムを作る1分子ずつを生細胞中で追跡し、挙動を調べる方法が大きく進みつつある。その結果、数個から数10個の分子が短寿命の複合体を作り、この複合体が、情報伝達などの機能を担うユニットとなるらしいという例がいくつも見いだされるようになった。これらの具体例を紹介した。

(8) 心筋細胞数理モデル (Kyoto Model) の利用

皿井 伸明, 竹内 綾子, 松岡 達, 野間 昭典
(京都大学医学研究科ナノメディシン融合教育ユニット細胞機能制御学)

生体を構成する機能要素を細かく分割して、タンパク分子レベルでの機能の解明がなされている。しかしながら、生体内では非常に多くの機能性タンパクなどが複雑な相互反応をしているため、個々の分子機能が分かっても必ずしも系全体の振る舞いが把握できない。そこで、個々の分子機能を数式化し、それらを統合した数理モデルを作成し、計算機上で生命現象を再現する手法、すなわちシステムバイオロジーと呼ばれる手法が近年急速に立ち上がりつつある。我々は独自に包括的な心筋細胞の数理モデルを作成し、研究のツールとして用いている。Na/Ca 交換機転をノックアウトしても心機能が保たれたという報告に対して、モデルを用いた解析を行った結果、

実験で示された Ca 電流の低下と共に、細胞膜 Ca ポンプの活性上昇が生じている可能性を提示した。さらに、Na/Ca 交換機転が Ca ポンプよりも優位な系の方がより安定で、効率的であることを示した。また、Na/K ポンプを抑制しても細胞容積変化が起こらないという実験結果をモデルを使って検討したところ、細胞膜 Ca ポンプが細胞容積を保つ上で重要な働きをしていることが示され、追加実験の結果もモデル予測を支持するものであった。直接計測することが困難な細胞膜 Ca ポンプの働きを、コンピュータシミュレーションにより可視化できた。なお、京都モデルはインターネットで公開しており、自由に利用可能である。

(9) 機械受容チャネル MscL は閉じていられるぐらい固く、膜の張力で開くぐらい軟らかい

吉村 建二郎 (筑波大学生命環境科学研究科構造生物科学専攻)

バクテリアには MscL という機械受容チャネルが普遍的にある。単離精製し人工膜に埋め込んでも機械受容の能力が正常であることから、細胞膜の張力を直接的にチャネルタンパクが感じていると考えられている。細胞膜の張力でチャネルが構造変化を起こしイオンが通る穴が開くためには、チャネルタンパクは外からの力により構造変化を起こすぐらいゆるい部分をもたないとならない。MscL は 2 回膜貫通型のサブユニットの 5 量体であるが、その 1 回目の膜貫通部位 TM1 の細胞内側が束ねられていて、チャネルの穴が閉じている。束ねられている部分は疎水的であるが、そこに親水的なアミノ酸への変異を入れると MscL は開きやすくなり、逆に疎水的なア

ミノ酸を導入すると MscL は開きにくくなる。このことから TM1 の細胞内側が適度にゆるく束ねられていることが MscL の細胞膜の張力への感度を決めていると考えられる。一方、脂質と接している部分には細胞膜の張力を受けるところがあるはずである。脂質と相互作用している疎水的なアミノ酸のすべてを逐一親水的なアミノ酸に置換して機械受容能を調べた結果、細胞外側の細胞膜の表面直下に変異が入ると機械受容能が失われることが分かった。したがって、この部分が細胞膜の張力を受け取っていると考えられるが、それは、膜タンパク一般が細胞膜から陰圧 (タンパクを広げようとする力) を受ける部位と一致する。

(10) 分子動力学シミュレーションによる大腸菌機械受容チャネル MscL のゲーティング機構の解析

澤田 康之¹, 村瀬 雅樹², 曾我部 正博^{1,2,3}

(¹名大院 医 細胞生物物理, ²JST ICORP/SORST 細胞力覚, ³生理研 分子生理)

大腸菌機械受容チャネル MscL は二回膜貫通ヘリックスを持つホモ 5 量体で構成されており、細胞膜の膜面に発生した張力を直接感受してゲーティング (開口) する膜蛋白質である。大腸菌 MscL の 3D 構造は、同様の構造を有する結核菌 MscL の結晶解析に基づいて提案されている。これまでに電気生理 (パッチクランプ) や電子常磁性スピン (EPR), あるいは分子動力学シミュレーションに基づいて、いくつかのゲーティングモデルが提案されている。しかし、これらの先行研究では脂質膜と MscL タンパクとの間の相互作用が考慮されておらず、MscL がどの部位で膜面張力を受容し、それがどのようにゲーティングを導くかは明らかにされていない。そこで本研

究では、蛋白質-脂質膜間の相互作用を考慮したモデルを作成して分子動力学シミュレーションを行った。

MscL の初期構造には既に提案された大腸菌 MscL の構造モデルを用い、その周囲に脂質二重膜 (POPC) を配置した。次に MscL を含む膜の内外に水分子を配置した。膜面張力は膜面に平行な方向の圧力を下げることにより発生させた。

その結果、膜面張力による MscL の開口が確認できた。さらに、これまでに報告されている開きやすい変異体 (F29N) や、開きにくい変異体 (F78N) のモデルを作成して同様のシミュレーションを行ったところ、実験結果と整合性のある結果が得られた。

(11) KcsA チャネルのゲーティングによる構造変化

老木 成稔, 清水 啓史, 岩本 真幸, 今野 卓, 佐々木 裕次
(福井大学医学部分子生理, Spring-8, JASRI, CREST, JST)

最近数年間で数種類の K チャネルの立体構造が得られた。これらの像から明らかになったことは、ポアドメ

イン構造の高い共通性と、開・閉構造のチャネル分子種間の共通性である。このことから、K チャネルに共通のゲート機構が存在すると想像される。開閉 2 構造のスナップショットをつなぐダイナミックな構造変化をリアルタイムでたどるための方法を確立する必要がある。1 分子 X 線計測法 (Diffracted X-ray Tracking [DXT], Sasaki et al. 2000) では、蛋白質に結合させた金ナノ結晶からの X 線回折スポットの動きから、蛋白質の微小な構造変化をリアルタイムで捉えることができる。この方法を KcsA カリウムチャネルに適用するための方法を開発し、KcsA チャネルの pH 依存性ゲーティングを捉えた。チャネル

分子の大域的な構造変化を捉えるために細胞質ドメインに金結晶を結合させた。ここで、立体構造未決定の細胞質ドメインの表面露出残基を明らかにするために、表面プラズモン共鳴法を使った新しい方法を確立した。C 末端残基が最も露出性が高く、また pH 依存性ゲーティングにともない細胞質ドメイン自体の構造変化が存在することが明らかになった。KcsA 分子をガラス基板の上に直立させて固定し、白色 X 線による回折スポットの運動を追跡した。pH によって運動様式が大きく変わることが明らかになった。

(12) 人工平面膜に再構成した膜タンパク質のダイナミクス計測技術

田端 和仁, 野地 博行 (大阪大学産業科学研究所高次細胞機能講座)

今回我々は、人工脂質二重膜に再構成された膜タンパク質をリアルタイムに観察しうるシステムを開発した。我々は、このシステムを用いて、細胞内における小胞輸送系を顕微鏡下に再構成した。

真核細胞における小胞輸送は、まず小胞体からゴルジ体への輸送に始まる。そしてゴルジ体で修飾を受けたタンパク質は、再び小胞輸送系によって、各細胞内小器官に輸送されていく。この輸送の第一段階である小胞体からゴルジ体への輸送は、COPII と呼ばれるタンパク質複合体によってなされている。COPII 小胞は、Sec23/24p と Sec13/31p からなる COPII コートタンパクによって覆われており、輸送されるタンパク質は、この COPII コートと直接結合することにより、COPII 小胞に選択的に取り

込まれる。この COPII コートと輸送されるタンパク質との結合は、低分子量 GTPase である Sar1p によって制御されていると考えられている。ところが、これまで輸送小胞が形成される様子は、電子顕微鏡による固定されたスナップショットという、静止した情報しか得られないという限界があった。輸送されるタンパク質が輸送小胞に取り込まれる過程をリアルタイムで可視化することができれば、輸送小胞形成の分子レベルでの作用機序について詳細に解析を行うことができる。そこで我々は、COPII 小胞形成を人工脂質平面膜上に再現し、全反射顕微鏡下で蛍光標識した輸送されるタンパク質の動態を 1 分子レベルで可視化した。

(13) 膜超分子イオニックモーターの分子構築

本間 道夫 (名古屋大学大学院理学研究科)

細菌はべん毛と呼ばれる運動器官をスクリューのように回転させ液体中を自由に泳ぎ回る。べん毛の根元にはイオンの電気化学ポテンシャル差を駆動力として回転する分子モーターが存在し、その回転力はモーターの固定子と回転子の相互作用を通じて発生すると考えられてい

る。細菌表層膜に埋まったべん毛の根元部分は基部体と呼ばれる構造がある。グラム陰性菌の基部体は L, P, MS リングと、それらをつなぐロッドから成り立っている。モータータンパク質は基部体の周囲に存在すると考えられている。べん毛の周りに形成される固定子のタン

パク質として、ビブリオ菌の Na^+ 駆動型べん毛モーターでは PomA/PomB 複合体, 大腸菌の H^+ 駆動型べん毛モーターでは MotA/MotB 複合体が同定されており, それぞれ Na^+ チャネル, H^+ チャネルとして機能する。PomB および MotB の C 末端領域にはそれぞれ推定ペプチドグリカン結合モチーフがあることから, 固定子は膜上に固定さ

れていると考えられている。海洋性細菌である *Vibrio alginolyticus* は, 細胞の極に 1 本形成される Na^+ 駆動型の極べん毛をもつ。このべん毛形成において, どのような機構で極という特定の位置にべん毛モーターは構築され, 一本という本数はどのように制御されているのかについて最新の知見を紹介した。

(14) チャネルの機能を構造から理解するために

藤吉 好則 (京都大学大学院理学研究科生物物理学教室)

極低温電子顕微鏡の開発を行っているが, 神経細胞における情報伝達機構を理解すること, すなわち, チャネルの機能を構造から理解することを目指している。この手法を用いて, 分解能 1.9 Å で脂質分子や水分子と共に水チャネルアクアポリン- O の構造が解析された (Nature, 438, 633-638 (2005))。この解析でアクアポリン- 1 の構造解析 (Nature, 407, 599-605 (2000)) により提案した水選択透過機構が確認された。また, アセチルコリン受容体の構造解析 (Nature, 423, 949-955 (2003)) によって, そのゲーティング機構のモデルが提案された。最近, アクアポ

リン- 4 の立体構造を 3.2 Å 分解能で解析した。その結果, 結晶の二層間の特異的な相互作用から, グリア細胞ラメラで発現する水チャネルが接着分子として機能していることが示唆された (J. Mol. Biol., 355, 628-639 (2006))。結晶ができない場合でも単粒子解析法により, Na^+ チャネル (Nature, 409, 1047-1051 (2001)) や IP3R (J. Mol. Biol., 336, 155-164 (2004)) 等の構造が解析された。このように, 水やイオンチャネルの構造が解析されて, 膜を介した情報伝達機構の一端が理解されるようになってきた。

2. 細胞シグナリングの時空間統御機構解明への方略探索

2006 年 10 月 5 日－10 月 6 日

代表・世話人：曾我部 正博（名古屋大学大学院医学系研究科）

所内対応者：久保 義弘（神経機能素子研究部門）

- (1) 貪食細胞における活性化型 NADPH oxidase 複合体形成機構の可視化
 --- p40phox のアダプター蛋白としての機能獲得メカニズムの解明 ---
 上山 健彦, 辰野 敏彦, 川崎 拓実, 住本 英樹, Thomas L. Leto, 齋藤 尚亮
 (神戸大学バイオシグナル研究センター)
- (2) 腎マクラデンサ細胞のシグナル機構
 福田 英一, 川田 英明, 安岡 有紀子, 秋場 理沙, 広瀬 茂久, 河原 克雅
 (北里大学医学部)
- (3) STIM1 を介した B 細胞抗原受容体刺激によるストア作動性カルシウム流入誘発機構
 馬場 義裕, 黒崎 知博 (理化学研究所免疫アレルギーセンター)
- (4) PLC-zeta の構造・機能関連と生物学的意義
 伊藤 昌彦, 淡路 健雄, 宮崎 俊一 (東京女子医科大学医学部)
- (5) 樹状突起スパインの動態と統計
 河西 春郎, 安松 信明, 松崎 政紀, 宮崎 崇史 (東京大学大学院医学系研究科)
- (6) シナプス小胞エンドサイトーシスにおける Ca^{2+} チャンネル synprint site の役割
 渡邊 博康, 山下 貴之, 斉藤 直人, 岩松 明彦, 森 泰生, 高橋 智幸
 (東京大学大学院医学系研究科)
- (7) 小脳における R 型 Ca チャンネルの生理機能
 田邊 勉, 小山内 実, 三枝 弘尚, 数野 安亜, 永山 晋, 胡秋平, Zong Shuqin, 村越 隆之
 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科)
- (8) 膜アンカー型神経特異的 CaM キナーゼ, CLICK-III/CaMKI γ による樹状突起伸展制御
 尾藤 晴彦, 竹本-木村 さやか, 石原 奈津実 (東京大学大学院医学系研究科)
- (9) 海馬シナプスにおける内因性カンナビノイドの産生と分解・除去機構
 橋本谷 祐輝, 狩野 方伸 (大阪大学大学院医学系研究科)
- (10) 神経突起伸長におけるアストロサイト自発的カルシウムシグナルの役割
 金丸 和典, 大久保 洋平, 廣瀬 謙造, 飯野 正光 (東京大学大学院医学系研究科)
- (11) NO によるニトロシル化を介した TRP チャンネル活性化とそのシグナル統合における意義
 森 泰生, 高橋 重成, 山本 紳一郎, 吉田 卓史 (京都大学工学部研究科)
- (12) TRPV2 チャンネルの細胞内局在と制御
 長澤 雅裕, 中川 祐子, 小島 至 (群馬大学生体調節研究所)
- (13) Lactic acidosis におけるプロトンチャンネルの 2 相性応答機構
 久野 みゆき, 森畑 宏一, 川脇 順子, 翁 昌子, 酒井 啓
 (大阪市立大学大学院医学系研究科)
- (14) HERG チャンネルのタンデム 2 量体による薬物結合様式の解明
 老木 成稔, 明貝 俊彦, 柳承希, 清水 啓史 (福井大学医学部)
- (15) G 蛋白質制御内向き整流性カリウムチャンネル Kir3.2 の細胞質領域の立体構造
 稲野辺 厚, 倉智 嘉久 (大阪大学大学院医学系研究科)

(16) グルタミン酸の可視化解析

廣瀬 謙造, 並木 繁行, 坂本 寛和, 飯沼 将 (名古屋大学大学院医学系研究科)

(17) 核構造とシナプス局所的翻訳の分子イメージング解析

徳永 万喜洋, 椎名 伸之, 廣島 通夫, 十川 久美子 (遺伝研)

(18) 血管内血小板凝集と凝固能のリアルタイムモニター

最上 秀夫, 林 忠毅, 村上 雄介, 浦野 哲盟 (浜松医科大学)

【参加者名】

黒崎知博, 馬場義裕 (理研免疫アレルギーセンター分子制御グループ), 森泰生, 若森実, 片野正展, 三木崇史, 瓜生幸嗣, 秋山智志, 高橋重成, 水野雄介 (京都大学工学部研究科), 河原克雅, 福田英一 (北里大学医学部), 小島至, 長澤雅裕, 中川祐子 (群馬大学生体調節研究所), 高橋智幸, 鈴木大介, 山下貴之, 渡邊博康 (東京大学大学院医学系研究科), 久野みゆき, 川脇順子 (大阪市立大学大学院医学系研究科), 飯野正光, 金丸和典, 間下雅士 (東京大学大学院医学系研究科), 齋藤尚亮, 山上健彦, 柏木香保里 (神戸大学バイオシグナル研究センター), 宮崎俊一, 伊藤昌彦 (東京女子医科大学医学部), 廣瀬謙造, 並木繁行, 菅生厚太郎 (名古屋大学大学院医

学系研究科), 最上秀夫 (浜松医科大学), 倉智嘉久, 稲野辺厚 (大阪大学大学院医学系研究科), 老木成稔 (福井大学医学部), 河西春郎 (東京大学大学院医学系研究科), 尾藤晴彦 (東京大学大学院医学系研究科), 田邊勉 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科), 徳永万喜洋 (遺伝研), 橋本谷祐輝 (大阪大学大学院医学系研究科), 曾我部正博 (名古屋大学大学院医学系研究科), 岡村康司, 大河内善史 (統合バイオ神経分化), 毛利達磨 (生理研細胞内代謝), 大塚岳 (生理研神経回路), 沼田朋大 (生理研機能協関), 久保義弘, 立山充博, 中條浩一, 伊藤政之, 長友克広, 松下真一, Batu Keceli, 石井裕 (生理研神経機能素子)

【概要】

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

(ミクロからマクロへの構造展開機構)の原理を探るための有効な研究方略を探ることを目的とした。

本年度は昨年を上回る 20 題の講演と 40 名以上の参加者を得て、受容体・チャネルからオルガネラ・細胞・組織のシグナル伝達へと展開する質の高い発表と活発な討論が行われた。手法も分子生物, 生化学, 電気生理学, 先端イメージングと多岐にわたり, 世界最先端で最高水準といって過言ではない内容であった。加えて, 徒に競争的ではない協力的な雰囲気の中で, いくつかの実質的な共同研究が実現・進行していることは, 本研究会の特筆すべき成果である。2 年間にわたる研究会活動を通して, 細胞シグナリングの時空間統御機構の面白さと将来性を実感できたと同時に, 適当なサイズの異分野研究者の集団が共通の課題に集中して忌憚のない議論を展開し, 実りある共同研究を探ることの重要性が再確認された。

(1) 貪食細胞における活性化型 NADPH oxidase 複合体形成機構の可視化 --- p40^{phox} のアダプター蛋白としての機能獲得メカニズムの解明 ---

上山健彦¹, 辰野敏彦¹, 川崎拓実¹, 住本英樹², Thomas L. Leto³, 齋藤尚亮¹

(¹神戸大学バイオシグナル研究センター・分子薬理分野, ²九州大学生体防御医学研究所

³Molecular Defenses Section, LHD/NIAID/NIH)

【目的】貪食細胞は、進入物の殺菌のために NADPH oxidase (Nox2) に由来する活性酸素種を用いる。貪食細胞での活性酸素の産生には、2 つの細胞膜成分 (Nox2, p22phox) と 4 つ細胞質成分 (p47phox, p67phox, p40phox, Rac) による食胞膜上での Nox の活性化型複合体の形成が必須であり、正常細胞にとって危険な活性酸素産生は厳密に制御されている。4 つ細胞質成分のうち phox 蛋白は、静止時より細胞質にて複合体を形成しており (p47phox-p67phox-p40phox 複合体)、刺激時に Rac とは独立して食胞膜に移行する。今回我々は、Fcγ receptor を介した貪食作用時の p47phox-p67phox-p40phox 複合体の食胞膜移行メカニズムの解明を試みた。

【結果】RAW264.7 細胞における刺激時、単独では膜への

移行を示さない GFP-p67phox は、p47phox との共発現により細胞膜に、p40phox との共発現により early endosome に移行した。これらは、Fcγ receptor を介した貪食作用時でも再現され、GFP-p67phox は p47phox との共発現により早期の食胞膜に、p40phox との共発現により成熟した食胞膜に、時間差をもって集積した。これらの結果は、p40phox と p47phox が、それ自身では膜移行能を持たない p67phox を食胞膜に移行させる「アダプター蛋白」として機能することを意味する。さらに、刺激により p40phox がアダプター蛋白として機能するメカニズムは、p40phox の分子内結合の切断によって起こる、PI(3)P に特異的結合能を持つ PX domain の露出ためであることを見出した。

(2) 腎マクラデンサ細胞のシグナル機構

福田英一¹, 川田英明¹, 安岡有紀子¹, 秋場理沙¹, 広瀬茂久², 河原克雅¹

(¹北里大学医学部, ²東京工業大学生命理工学部)

体液（細胞外液）量は、レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系（液性調節）と尿管系球体フィードバック (TGF) 機構による糸球体濾過量 (GFR) 調節により制御されている。TGF 機構の中心的役割を果たすマクラデンサ (MD) 細胞は、濾液中の Cl⁻ 濃度をモニターし、輸入細動脈にシグナルを伝え、輸入細動脈の収縮およびレニン分泌を変化させ、GFR を調節している。しかし、MD 細胞自身の細胞内シグナル伝達機構には不明な点が多い。

方法：(1) 株化した MD 細胞 (NE-MD 細胞: Yasuoka et al, 2005) を用い、細胞外液中の Na⁺ と Cl⁻ 濃度を別々に変化させ、細胞内 pH (BCECF) または Ca²⁺ 濃度 (fura-2) の蛍光強度変化を光学的に測定した。(2) NE-MD 細胞から RNA・蛋白質を抽出し、COX-2 遺伝子 (real time PCR 実験) および nNOS 蛋白 (Western blotting 解析) 発現量

の外液 Na⁺, Cl⁻ 濃度依存性を調べた。

結果：(1) 低 Na⁺・低 Cl⁻ 溶液共に COX-2 遺伝子の発現量が増加した。(2) nNOS 蛋白の発現量は、低 Cl⁻ 溶液にくらべ低 Na⁺ 溶液での増加量が小さかった。(3) Amiloride (100 μM) または EIPA (100 μM) (Na-H 交換輸送体 (NHE) 阻害薬) 存在下で、furosemide (Na-K-2Cl 輸送体阻害薬) による nNOS 蛋白発現誘導が抑制された。(4) 低 Na⁺ 溶液置換および EIPA 投与により細胞内 pH は低下 (酸性化) した。(5) 低 Na⁺ 溶液置換により細胞内 Ca²⁺ 濃度は、増加しなかった。

まとめ：(1) 低 Na⁺ 溶液置換による細胞内酸性化が、furosemide (または低 [NaCl]) 誘導 nNOS 蛋白発現を抑制した。(2) COX-2 の発現調節は、細胞内酸性化の影響を受けなかった。結論：糸球体濾液中の [NaCl] 変化は NE-MD 細胞膜の NHE, Na-K-2Cl 輸送体を介して細胞内

に伝えられ、COX-2 および nNOS 発現を独立して調節している。細胞内酸性時の nNOS 発現低下による TGF 機構

緩衝能低下は、COX-2 の発現亢進により代償されることが示唆された。

(3) STIM1を介した B 細胞抗原受容体刺激によるストア作動性カルシウム流入誘発機構

馬場義裕, 黒崎知博

(理研横浜研究所 免疫アレルギー科学総合研究センター 分化制御研究グループ)

B 細胞抗原受容体 (BCR) 刺激により活性化した PLC γ 2 によって産生される IP3 は IP3 受容体を介して細胞内カルシウムストアである小胞体 (ER) からのカルシウム放出を引き起こし、細胞外からのストア作動性カルシウム (SOC) 流入を誘導する。しかし、ER ストアのカルシウム放出がどのようにして SOC チャネルを活性化するのかは不明である。最近同定された STIM1 分子は ER ストアのカルシウムセンサーとして働き、SOC チャネル活性化に関与する分子と考えられるが、実際にどのようなメカニズムでストア枯渇と SOC チャネル活性化

を機能的に結びつけるのかは明らかでない。そこで我々はこの疑問にアプローチするため、STIM1 遺伝子を欠損した DT40 B 細胞株を樹立し、さらに種々の STIM1 ドメイン変異体をその STIM1 欠損細胞に発現させ、STIM1 の機能解析を行ったところ、定常状態および BCR 刺激時において、STIM1 がユニークな細胞内挙動を示すこと、そして、この動きが SOC 流入に重要であることが明らかとなった。さらに、STIM1 の動的挙動および SOC 流入に必須の STIM1 機能ドメインを同定した。

(4) PLC-zeta の構造・機能関連と生物学的意義

伊藤昌彦, 淡路健雄, 宮崎俊一 (東京女子医大・医・第二生理)

Phospholipase C-zeta (PLC ζ) は、哺乳類受精の精子-卵融合に際して精子細胞質から卵細胞質に移行し、IP3 受容体を介する小胞体からの反復性 Ca²⁺ 遊離 (Ca²⁺ オシレーション) を誘起して卵活性化を誘発する精子因子の有力候補として注目されている。精子由来卵活性化因子は媒精 4~5 時間後に形成される前核に移行する。他方、前核形成時に Ca²⁺ オシレーションが停止する。我々は PLC ζ と蛍光蛋白質 Venus を連結した蛋白質をコードする cRNA をマウス卵に注入して発現させると Ca²⁺ オシレーションを誘起し、卵を活性化し、次いで前核に移行することを確認した。PLC ζ 分子は N 端側の 4 つの

EF-hand domain, 中央部の X と Y の catalytic domain, C 端側の C2 domain から成り、X-Y 間で折れ曲がる部分が想定されている。このヒンジ領域に核移行シグナルが存在した。他方、EF1 domain の疎水性アミノ酸に変異を加えた場合や C2 domain を欠失した場合も、Ca²⁺ オシレーション誘発能および核移行能が喪失した。これらの構造-機能解析から、EF-hand domain と C2 domain により形成される立体構造が機能活性に重要であることを示す。さらに PLC ζ の Ca²⁺ オシレーション誘起能と核移行能の生物学的意義を論ずる。

(5) 樹状突起スパインの動態と統計

河西 春郎, 安松 信明, 松崎 政紀, 宮崎崇史 (東京大学大学院医学系研究科)

大脳錐体細胞樹状突起スパインの形態は多様で、頭部

体積はグルタミン酸受容体の機能発現と強く相関する。

そこで、シナプス長期可塑性の動態を、スパイン頭部体積を指標にして、スライス培養標本で数日にわたって測定する実験系を構築した。NMDA 受容体に依存する活動依存的な可塑性として、スパイン頭部増大、減少、そしてスパイン除去が観察された。これらは長期増強や長期抑圧に対応すると考えられる。しかし、この活動依存的可塑性では大きなスパインはなかなか生成されない。一

方、NMDA 受容体やスパイクに依存しない可塑性、内因的可塑性、が観察された。この可塑性は緩慢ながら、スパイン新生と増大、収縮と除去のすべての変化を含み、シナプス結合の生物学的なゆらぎと考えられる。この内因的可塑性によって大きな安定なスパインの生成が説明され、また、スパインの統計分布が解釈可能となる。

(6) シナプス小胞エンドサイトーシスにおける Ca^{2+} チャンネル synprint site の役割

渡邊博康, 山下貴之, 斉藤直人, 岩松明彦, 森泰生, 高橋智幸
(東京大学大学院医学系研究科・神経生理学教室)

哺乳動物の中樞神経におけるシナプス伝達は主として N 型と P/Q 型電位依存性 Ca^{2+} チャンネルによって媒介される。N 型と P/Q 型 Ca^{2+} チャンネルの細胞内ドメインにはエクソサイトーシス関連タンパク質と結合する synprint site と呼ばれる部位があり、この部位をブロックするとシナプス伝達が抑制を受けることから、この部位はエクソサイトーシスに関与するとの仮説が提唱されている (synprint 仮説)。

我々は最近この synprint site にエンドサイトーシス関連タンパク質 AP-2 が結合することを見出した。AP-2 は synaptotagmin と結合してシナプス小胞のクラスリン形成を行うが、synaptotagmin は、また synprint site と結合することが知られている。そこで、これら三者の結合関係を検討した。その結果、三者の結合が同一部位で行われ、結合が互いに拮抗することが明らかになった。さらにまた、三者の結合関係には Ca^{2+} 依存性が認められた。すなわち低濃度 Ca^{2+} において synprint は主に AP-2

と結合しているが、 Ca^{2+} 濃度が $200\mu\text{M}$ に達すると顕著に synaptotagmin と結合が増大することが明らかとなった。次に calyx of Held シナプス前終末端に synprint peptide を細胞内投与して、synprint site のシナプス伝達における役割を再検討した。膜容量測定によってシナプス小胞のエクソサイトーシスおよびエンドサイトーシスを測定したところ、synprint peptide はエクソサイトーシスに作用せずにエンドサイトーシスをブロックすることが明らかになった。

したがって synprint peptide のシナプス伝達抑制作用は、エクソサイトーシスのブロックによる直接作用でなく、エンドサイトーシスのブロックを介する間接的効果と推論される。これらの結果は従来の synprint 仮説を覆すものであり、エンドサイトーシスへの関与を基盤とした新たな synprint 仮説の構築が必要であることが明らかになった。

(7) 小脳における R 型 Ca チャンネルの生理機能

田邊勉, 小山内実, 三枝弘尚, 数野安亜, 永山晋, 胡秋平, Zong Shuqin, 村越隆之
(東京医科歯科大学・院・認知行動医学系・細胞薬理学分野)

電位依存性 Ca チャンネルは運動制御、運動学習などの様々な小脳機能において重要な役割を果たしている。R 型 Ca チャンネルは、顆粒細胞、プルキンエ細胞等に発現していることがこれまでに免疫組織化学的手法、電気生理学的手法を用いて明らかにされているが、その機能的

役割は不明のままである。我々は、R 型 Ca チャンネルの生理機能を明らかにすることを目的に、本チャンネル遺伝子欠損マウスの小脳機能に不全がないかどうかを検討した。まずロータロッドを用いた行動実験の結果、ヘテロ欠損及びホモ欠損マウスにおいて運動学習の遅延が認め

られた。次いで種々の電気生理学的解析を行った。小脳の平行線維・プルキンエ細胞間の興奮性シナプスにおける長期抑圧 (LTD) を検討したところ、ヘテロ欠損マウスにおいては、LTD が消失していること、ホモ欠損マウスでは一見正常であることが明らかとなった。一方、プルキンエ細胞をカレントクランプモードで保持し、カレント注入によるプルキンエ細胞から発生するスパイク数

を調べたところ、R 型 Ca チャネル発現量の低下に依存して減少することが明らかとなった。したがって R 型 Ca チャネルはプルキンエ細胞の発火現象に関与することが示唆された。以上、R 型 Ca チャネルは小脳機能にとって必須ではなく調節的な役割を果たしていることが示唆された。

(8) 膜アンカー型神経特異的 CaM キナーゼ, CLICK-III/CaMKI γ による樹状突起伸展制御

尾藤晴彦, 竹本-木村さやか, 石原奈津実 (東京大学大学院医学系研究科神経生化学分野)

我々は以前に神経細胞特異的 CaM kinase, CLICK-III/CaMKI γ を同定した (Takemoto- Kimura et al., 2003)。今回我々は, CLICK-III/CaMKI γ が, プレニル化ならびにパルミトイル化の2重脂質修飾を受けており, 膜挿入にはプレニル化が必須であることを見出した。生化学的実験により, 複数の脂質修飾反応を介して, 本酵素が形質膜やゴルジ膜などの特定膜器官の脂質ラフト画分へとソー

トされ, 多量体形成することが示唆された。一方, 発生初期の培養大脳皮質細胞への遺伝子導入実験により, 本酵素活性が細胞体から伸びる樹状突起数・長さに関連することが明らかになった。すなわち CLICK-III/CaMKI γ は, 大脳皮質細胞の形態形成に密接に関与するキナーゼである可能性が示唆された。

(9) 海馬シナプスにおける内因性カンナビノイドの産生と分解・除去機構

橋本谷祐輝, 狩野方伸 (大阪大学大学院医学系研究科 細胞神経科学)

内因性カンナビノイド (eCB) は脳の様々な領域のシナプスにおいて逆行性シグナルとして働き, 短期的および長期的にシナプス伝達を調節している。eCB のニューロンからの産生は, 脱分極による細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇, または Gq 共役型受容体の活性化により引き起こされる。また, この二つの刺激が同期すると eCB 発生は著明に促進される。私たちは, この相乗効果が PLC β の Ca²⁺ 感受性に起因することと, 放出される eCB はおそらく 2-アラキドノイルグリセロール (2-AG) であることを明らかにした。このように eCB のニューロンからの産生の機構に関しては多くのことが明らかになってきたが, シナプス間隙へ放出された eCB が, どのようにして除去されるのかについてはよくわかっていない。今回, 私たちは海馬培養ニューロン・ペアより CB 感受性の IPSC を記録し,

シナプス前終末に存在する 2-AG 分解酵素モノアシルグリセロールリパーゼ (MGL) の働きについて検討した。MGL を薬理的に阻害すると 2-AG 投与によって生じる IPSC 抑制が著しく延長した。さらに脱分極誘起による eCB の逆行性シグナルも同様に顕著な延長を示した。また高濃度の MGL 阻害剤を投与すると徐々に IPSC が抑制された。この抑制は CB 受容体 (CB1R) のアンタゴニストで回復したことから CB1R 依存적であると結論された。したがって, 海馬において eCB が恒常的に放出されていると考えられる。MGL はシナプス前終末において, 逆行性シグナルの終結を制御するだけでなく, 恒常的に放出されている周囲の eCB レベルを下げ, 逆行性シグナルの S/N 比を改善する役割を持つと考えられる。

(10) 神経突起伸長におけるアストロサイト自発的 Ca^{2+} シグナルの役割

金丸和典¹, 大久保洋平¹, 廣瀬謙造², 飯野正光¹

(¹ 東京大学大学院医学系研究科細胞分子薬理学, ² 名古屋大学大学院医学系研究科細胞生理学)

アストロサイトはダイナミックな細胞内 Ca^{2+} シグナルを自発的に起こす細胞として知られている。今回我々は、この自発的 Ca^{2+} シグナルがアストロサイトの重要な機能の一つである、神経細胞成長の促進機能に関わることを報告する。IP3 脱リン酸化酵素である IP3 5-phosphatase の安定導入により自発 Ca^{2+} シグナルを抑制したアストロサイトを作製することに成功し、これと共培養した単離海馬ニューロンの成長を評価した。成長円錐のタイムラプス・イメージングにより、 Ca^{2+} シグナル

欠損アストロサイト上では、成長円錐の進行速度が減少することを確認した。またこの現象は、成長円錐が Ca^{2+} シグナル欠損アストロサイトと接触した直後に速やかに起こることから、接触因子の関与が示された。さらに、多数の神経細胞の形態を網羅的に解析することにより、 Ca^{2+} シグナル欠損アストロサイト上では軸策伸長も減少することを確認した。これらの結果は、アストロサイトの自発的 Ca^{2+} シグナルが細胞膜表面の状態を調整することにより、神経突起伸長を促すことを示唆する。

(11) NO によるニトロシル化を介した TRP チャネル活性化とそのシグナル統合における意義

森泰生, 高橋重成, 山本紳一郎, 吉田卓史

(京都大学大学院工学研究科 合成・生物化学専攻)

多様な生命現象に関与している Ca^{2+} シグナルの生態応答特異性の決定は、タンパク質分子複合体の（シグナルソーム）形成が関与する。一方、内皮由来弛緩因子 (EDRF) である一酸化窒素 (NO) も、様々な生理作用が明らかにされてきた。細胞内への Ca^{2+} 流入による Ca^{2+} 濃度上昇は一酸化窒素合成酵素 (NOS) を活性化し、NO を産生するがこれを担うチャネルの分子実体は未だ明らかになっていない。

今回、従来受容体刺激により活性化する Ca^{2+} チャネルとして分類された TRPC5 が細胞内の NO などによる酸化状態を感知して活性化し Ca^{2+} 流入させることを見いだしその活性化機構および生理的意義を探った。その結

果 TRPC5 の特定のシステイン残基が細胞の内側から酸化修飾を受け活性化することが明らかになった。

また培養牛大動脈内皮細胞において受容体刺激を行うと NO 産生および細胞内 Ca^{2+} 上昇が見られた。これらの応答は TRPC5 に対する siRNA の適用により抑制されたことから TRPC5 が受容体刺激による Ca^{2+} 流入を担い内皮型 NOS を活性化、産生された NO により TRPC5 の更なる活性化が引き起こされる、正の制御機構の存在が示唆された。さらに形質膜において TRPC5 と内皮型 NOS が蛋白複合体を形成、これにより Ca^{2+} や NO のシグナルが効率よく伝達され、遺伝子発現や細胞増殖といった生理応答が引き起こされると考えられる。

(12) TRPV2チャネルの細胞内局在と制御

長澤雅裕, 中川祐子, 小島至 (群馬大学生体調節研究所 細胞調節分野)

TRP チャネル・スーパーファミリーのメンバーは、リガンド作動性、受容体活性化カルシウムチャネル分子としてさまざまな生理的役割を担っている。TRPV ファミ

リーのメンバーである TRPV2 は、肺・脾臓のマクロファージに高発現している。非刺激時、TRPV2 チャネルは細胞内コンパートメント主に小胞体上に局在したが、血

清・fMLP の投与により一部が細胞膜に移行した。パッチクランプ法により Cs^+ をチャージキャリアーとしたチャネル電流が観察され、ruthenium red, 変異型 TRPV2 遺伝子導入, TRPV2 siRNA の投与により抑制されることから TRPV2 電流と考えられるが, この Cs^+ 電流は血清や fMLP 投与によって増加した。GFP 標識した TRPV2 を用いて細胞内の動態をモニターすると, 血清や fMLP により惹起される TRPV2 のトランスローケーションは PI-3 キナーゼ阻害剤ワートマニン・LY compound により抑制され, また三量体型 G 蛋白を抑制する百日咳毒素によりブロックされた。TRPV2 の細胞膜上の局在を詳細に

検討すると, TRPV2 は focal complex の特殊な形態であるポドソームに局在した。ポドソームには Rho, Rac, Cdc 42 などの低分子量 G 蛋白, Src や Pyk2 などのキナーゼ, gelsolin などのアクチン制御蛋白が局在するが, dominant-negative Rac の導入により TRPV2 のポドソームへの局在化は抑制された。fMLP によるマクロファージの遊走は ruthenium red 投与, 変異 TRPV2 遺伝子導入, LY compound 投与により抑制された。以上からマクロファージの接着, 遊走機構に TRPV2 が関与していると考えられた。

(13) Lactic acidosis におけるプロトンチャネルの2相性応答機構

久野みゆき, 森畑宏一, 川脇順子, 翁昌子, 酒井啓

(大阪市立大学大学院医学研究科・分子細胞生理学, 中央研究室)

膜電位依存性プロトンチャネルは脱分極によって開口し H^+ を選択的に透過させるチャネルであり, その閾膜電位や H^+ 透過の driving force は, 細胞膜を介する pH 勾配 (Δp) に依存している。必然的に, 細胞外 pH が低下すればチャネル活性は抑えられ, 上昇すれば増強するはずである。しかし, 組織アシドーシスを考えると, 事はそれほど単純ではない。実際, 細胞外 pH と細胞内 pH は連動する事が多く, 細胞内外の ΔpH の変化やチャネル活性の変動の予測は難しい。私達は, 高密度で H^+ チャネルを発現するマイクログリアを用いて, 代表的な代謝性ア

シドーシスである Lactic acidosis に際しての H^+ チャネル応答を検討した。Lactate (pH 6.8) を投与すると, ΔpH の増加と共に H^+ channel が徐々に活性化される。投与後 5 分では, ΔpH の変化とチャネル活性は関連し lactate 濃度に依存したが, ΔpH が定常に達した後もチャネル活性は 1 時間以上に渡って高進した。この late phase ではチャネル電気特性が大きく変化していた。 H^+ チャネルの顕著な活性化は Lactic acidosis の病態を調節する要因のひとつとなる事が示唆される。

(14) HERG チャネルのタンデム2量体による薬物結合様式の解明

老木 成稔¹, 明貝俊彦^{1,2}, 柳承希², 清水啓史¹

(¹福井大学・医学部・分子生理, ²武田薬品・医薬研究本部)

HERG カリウムチャネルは心筋の再分極に関わり, このチャネルの遺伝的異常により QT 延長症候群が引き起こされ致死的不整脈のリスクが高まる。HERG チャネルの特徴は, 後天的にも多様な薬物によってブロックされ QT 延長を引き起こすことである。様々な薬物の結合に際し, HERG チャネルの中心空洞にある芳香環残基 (S6 ヘリックス上の Tyr652・Phe656) が寄与することが知られている。しかしホモ 4 量体で対称構造をもつ HERG チ

ャネル分子に対して, 薬物がどのサブユニットの, どの残基に結合するか, という情報は得られていない。このような空間的な結合様式を明らかにすることなしにドラッグデザインの戦略は見通しが立たない。そこで HERG チャネルのタンデム 2 量体を作成し, 結合候補部位へ変異 (単一変異・二重変異) を導入した。電気生理学的に薬物 (cisapride) に対する定常阻害濃度とブロックキネティクスを求めた。タンデム 2 量体の一方のサブユニッ

トに二重変異を導入したものと、2つのサブユニットにまたがって導入したものを比べると結合様式に大きな差が見られた。熱力学的二重変異サイクル解析によって、

サブユニット間の残基に協同性が見られた。これらのことから、cisaprideの結合トポロジーが明らかになった。

(15) G 蛋白質制御内向き整流性カリウムチャネル Kir3.2の細胞質領域の立体構造

稲野辺 厚, 倉智 嘉久

(大阪大学大学院医学系研究科薬理学講座 分子・細胞薬理学)

G 蛋白質制御内向き整流性カリウム (KG) チャネルは抑制性 G 蛋白質共役型受容体刺激により、遅延性の抑制性後シナプス膜電位を形成する。黒質ドーパミン神経において KG チャネルは Kir3.2 の同種複合体、他の神経細胞においては Kir3.1-Kir3.3 の異種複合体として機能する。KG チャネルの活性化は G 蛋白質 $\beta\gamma$ サブユニットや Na^+ , アルコール等の低分子の細胞質領域への直接結合が引き金である。しかし、KG チャネルの細胞質領域における構造変化に関する知見は少なかった。

本研究では生理的に存在する Kir3.2 同種複合体の細胞質領域を X 線結晶構造に基づいて解析した。結晶は低分

子のチャネル活性化因子の共存下で得られたが、オリゴマーの集合状態や二次構造の配置は、活性化因子非存在下の Kir3.1 のそれらと近似していた。しかし、既知の KG チャネルの構造と比較すると、膜貫通領域に面した局所のループ構造が異なることが判った。この領域は、KG チャネルにおいて PIP2 結合に関与するアミノ酸が分布する領域で、Kir2.1 においてはアンダーセン症候群における変異が多く分布し、ゲート機構にも関与する領域である。以上の知見は、細胞質領域によるチャネル活性制御において、この局所領域が関与することを示唆している。

(16) グルタミン酸の可視化解析

廣瀬謙造, 並木繁行, 坂本寛和, 飯沼将

(名古屋大学大学院医学系研究科・細胞生理学)

グルタミン酸は中枢神経系における主要な興奮性シナプス伝達物質である。しかし、グルタミン酸の空間的挙動について直接的な解析はほとんど行われていない。我々は、GluR2 由来のグルタミン酸結合蛋白質と蛍光性分子からなるグルタミン酸プローブの開発を行ない、シナプス伝達に伴うグルタミン酸放出の直接的イメージングを試みた。海馬培養神経細胞シナプスにおけるグルタミン酸放出のイメージングに適用した結果、単一シナプスからのグルタミン酸放出の可視化に成功し、このプローブが優れた空間解像度でシナプス伝達解析を可能にす

ることが明らかとなった。また、ホルボールエステルによるグルタミン酸放出の増強効果を解析し、その増強効果に空間的な不均一性があることを見出した。さらに、活動電位に依存せず自発的に生ずる一過性で空間限局性のグルタミン酸放出が観測された。薬理学的解析によって、この自発的グルタミン酸放出が単一小胞の開口放出に由来するものであることが示された。我々の開発したグルタミン酸プローブは、今後、シナプス伝達のような特性や制御機構を理解するのうえで役立つものと考えられる。

(17) 核構造とシナプス局所的翻訳の分子イメージング解析

徳永万喜洋^{1,2,3}, 椎名伸之¹, 廣島通夫², 十川久美子²
(¹ 遺伝研・構造センター, ² 理研・免疫センター, ³ 総研大)

(1) 神経シナプス可塑性における局所的翻訳の制御機構
樹状突起の後シナプスにおいて、タンパク質のシナプス刺激依存的な局所的翻訳は、シナプス長期増強のしくみの一つとして注目されている。その場として、mRNA の輸送や翻訳制御の中心的な役割を担っているのが、RNA granule である。我々は、新規 RNA 結合タンパク質 RNG105 を、RNA granule における翻訳制御因子として同定した。mRNA に直接結合して翻訳を抑制し、刺激により mRNA から解離して翻訳が活性化するという、新しいタイプの制御メカニズムを見いだした。さらに、ネットワークの形成に関与していることもわかりつつある。

(2) 1 分子定量解析と数値モデリング

細胞内・生体内の分子機能を明らかにするためには、分子機構をシステムとして理解することが今後重要である。細胞質-核間輸送の分子機構に関して、数値モデリングを行った。1 分子イメージング定量解析から得られた結合分子数・結合定数・相互作用といったパラメータを基に、ブラウン運動・結合解離・反応をシミュレーションした。その結果、核内輸送速度や濃度依存性など、実験結果をよく説明できた。このように、細胞における生体分子のダイナミックな姿、相互作用、生命現象を定量的に明らかにできる。1 分子研究は、システムとしての細胞・生命の研究へと新たな道を開拓している。

(18) 血管内血小板凝集と凝固能のリアルタイムモニター

最上 秀夫, 林 忠毅, 村上 雄介, 浦野 哲盟 (浜松医科大学生理学)

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

我々は、in vivo 血流環境下における血栓形成過程を検討するために、マウス腸間膜静脈を用いて細胞外膜への PS の exposure を血小板活性化の指標としてリアルタイム解析を行った。GFP (green fluorescent protein) マウス

腸間膜静脈においてレーザー照射により血管内皮細胞を傷害した。GFP 標識血小板と PS の特異的なリセプターである alexa568 標識 annexin V を用いて、血小板凝集及び血液凝固開始シグナルとして PS を可視化し、共焦点レーザー蛍光顕微鏡にてそれぞれの蛍光強度の変化を 3 次元的にモニターした。両指標をモニターして in vitro の実験とも比較することにより以下のことが明らかとなった。1) Ca^{2+} 依存的に血小板凝集と凝固が進行する。2) 血管内での血小板凝集塊における PS の発現は、凝集塊の深部・中心部を起点として空間的に広がっていき、血流と接する表層ではその発現が少なかったことより、PS の発現には血流の関与は少ないことが示唆された。最後に血管内での血小板凝集能と凝固能について論じたい。

3. 病態糖鎖研究会

2005 年 9 月 25 日－9 月 26 日

代表・世話人：辻 崇一（東海大学・未来科学技術共同研究センター）

所内対応者：池中 一裕（分子神経生理部門）

- (1) Sialidase NEU4 は大腸がんの悪性形質を制御する
塩崎 一弘（宮城県立がんセンター）
- (2) 担癌状態におけるムチンを介した免疫抑制機構の解析
中田 博（京都産業大学）
- (3) エンドサイトーシス経路異常による GM1 ガングリオシド蓄積とアミロイドβタンパク質の重合促進
湯山 耕平（国立長寿医療センター研究所）
- (4) 免疫性ニューロパチーと抗ガングリオシド抗体：ガングリオシド複合体抗体を中心に
楠 進（近畿大学）
- (5) スフィンゴリピドーシスモデルマウスにおける領域特異的神経細胞死
松田 純子（東海大学）
- (6) ガレクチンの分子間相互作用
宮西 伸光（香川大学）
- (7) ヒアルロン酸細胞外マトリックスによる腫瘍内血管新生促進作用の解明
小山 洋（信州大学）
- (8) ケラタン硫酸とグリオーシス
門松 健治（名古屋大学）
- (9) コンドロイチン硫酸鎖の硫酸化による合成制御とヘルペスウイルス感染
北川 裕之（神戸薬科大学）
- (10) HNK-1 糖鎖生合成酵素 GlcAT-S 遺伝子欠損マウスの作製とその生化学的解析
小林 恭子（京都大学）
- (11) 神経可塑性における HNK-1 糖鎖機能に関する研究
森田 一平（京都大学）
- (12) β 1,3-*N*-アセチルグルコサミン転移酵素 2 遺伝子ノックアウトマウスの解析
梅谷内 晶（産業技術総合研究所）
- (13) TSR ドメイン上の *O*-Fuc 特異的グルコース転移酵素のクローニングと機能解析
佐藤 隆（産業技術総合研究所）
- (14) *O*-マンノース型糖鎖の生合成と筋ジストロフィー症
萬谷 博（（財）東京都高齢者研究福祉振興財団東京都老人総合研究所）
- (15) 無臭ベンゼンチオールを用いた糖鎖の合成—癌転移に関与する *N*-アセチルグルコサミン転移酵素 V の阻害剤を指向した糖鎖合成—
梶本 哲也（京都薬科大学）
- (16) *N*-結合型糖鎖ビーズを用いた *A. oryzae* の解析—糖タンパク質品質管理機構の理解から異種タンパク質高生産に向けて—
渡邊 泰祐（理化学研究所）
- (17) MSⁿ スペクトルマッチングによる糖ペプチドの直接構造解析の試み
出口 喜三郎（北海道大学）

(18) ピリジルアミノ化法を使った糖鎖解析法の微量化

鳥居 知宏 (生理学研究所)

【参加者名】

鈴木邦彦 (東海大学未来化学技術共同研究センター), 松田純子 (東海大学未来化学技術共同研究センター), 岡田洋子 (東海大学未来化学技術共同研究センター), 門松健治 (名古屋大・院・医), 湯山勝彦 (国立長寿医療センター研究所), 萬谷博 (東京都老人総合研究所), 渡邊泰祐 (理化学研究所), 松尾一郎 (理化学研究所), 楠進 (近畿大・医), 梶本哲也 (京都薬大・創薬科学フロンティア), 北川裕之 (神戸薬大・生化学), 板野直樹 (信州大・院・医), 小山洋 (信州大・院・医), 梅谷内晶 (産業技術総

合研究所), 佐藤隆 (産業技術総合研究所), 塩崎一弘 (宮城県立がんセンター・研究所), 中田博 (京都産業大・工), 小林恭子 (京都大・院・薬), 森田一平 (京都大・院・薬), 長谷純宏 (大阪大・院・理), 長束俊治 (大阪大・院・理), 石水毅 (大阪大・院・理), 中北慎一 (香川大・総合生命科学実験センター), 宮西伸光 (香川大・総合生命科学実験センター), 出口喜三郎 (北海道大・院・先端生命科学), 小笠原諭 (産業技術総合研究所)

【概要】

糖鎖が第三の生命鎖として脚光を浴びるようになって久しいが, 「糖鎖の持つ基本的な機能は何か」という疑問に対して明解な解答は未だ得られていない。本研究会はこの問題を解くべく研究をしている多方面の研究者を集め, 現在抱えている問題点を顕在化し, 問題解決への糸口を探ろうとするものである。

今まで, 複合糖質糖鎖が直接あるいは間接的に病態に関与していることを示す知見が集積され, 病態と糖鎖との関連を詳細に検討すれば, 糸口が見つかることが十分に期待できたので, 病態と糖鎖に焦点を当てて来た。し

かし, 糖鎖研究の発展により, 糖鎖は広く生命現象に関与することが明らかとなってきたので, 今回は対象を病態に限らず, 様々な生命現象に拡大し研究会を開催した。また, 糖鎖研究の発展には, 糖鎖分析・合成の微量化, 高速化, 汎用化が必須で, この分野の先端に行く研究者にも参加をしてもらい, 糖鎖機能研究の現状と問題点を検討し, 情報交換を行った。その結果, 研究者間の相互理解が深まり, 研究の新たな展開や共同研究の可能性が十分に期待できる成果を得ることができた。

(1) Sialidase NEU4は大腸がんの悪性形質を制御する

塩崎一弘¹, 山並秀章², 山口壹範¹, 宮城妙子¹

(¹宮城県立がんセンター研究所 生化学部, ²宮城県立がんセンター 外科)

シアリダーゼは糖タンパクや糖脂質の非還元末端からシアル酸を切断する。シアリダーゼはこれまで NEU1, NEU2, NEU3 の3つが同定されている。我々は昨年, 新規シアリダーゼ (NEU4) のクローニングと性状解析について報告した。NEU4 は基質特異性や細胞内局在などの多くの点で他のシアリダーゼと相違する。これまでがんににおいて NEU1 や NEU3 が悪性度や様々な形質に深く関与していることを明らかにしてきた。そこで, 今回は NEU4 のがん性変化を明らかにし, NEU4 ががんの形質にどのような影響を与えているかについて検討した。

大腸がん手術摘出組織 (n=25)を用い, 大腸がんと正常組織における NEU4 の発現を Real-time PCR で測定した。大腸がんでは正常組織に比べ, がん部で NEU4 の発現量は有意に低下し (p<0.001), 悪性度を上昇させる NEU3 の発現と逆の傾向を示した。そこで, 大腸がん細胞で NEU4 安定発現株を作成し, がん形質の変化を検討したところ, NEU4 は足場依存性増殖を抑制し, TRAIL によるアポトーシスを促進した。また, 運動能や浸潤能, 接着能の抑制も認められ, NEU4 による大腸がん細胞の悪性度の低下が示唆された。

そこでこれら悪性度の変化のうち、接着能や運動能に注目して解析を行った。NEU4 は大腸がん細胞では糖タンパク、糖脂質の両方を水解し、優先的に糖タンパク糖鎖のシアル酸を切断していた。NEU4 はムチンのシアル酸残基をよく切断することから、ウェスタンブロットおよびFACSscan解析を行ったところ、シアリル Le^aとシアリル Le^xのシアル酸残基の著しい減少が明らかとなった。シアリル Le^a、シアリル Le^xの減少に伴い、NEU4 導入細胞ではこれらシアリルルイス抗原をリガンドとするE-セレクトインに対する接着能が有意に低下していた。また、大腸がん細胞をE-セレクトインで刺激すると運動能の著しい上昇が認められたが、NEU4 はその上昇を抑制した。次に運動能について、E-セレクトイン刺激によるシグナル伝達の変化を検討した。NEU4 はp38 とERKのリン酸化を抑制し、JNKのリン酸化には影響しなかった。p38の下流のシグナルであるHsp27はアクチンの再構成を行い、運動能を上昇させることが知られているためリン酸化

化について調べたところ、E-セレクトイン刺激によるHsp27のリン酸化をNEU4は抑えていた。さらに、蛍光染色によりE-セレクトイン刺激によるアクチンの変化を観察すると、E-セレクトイン刺激後2時間でHsp27のリン酸化に伴うアクチンの構造変化が認められ、NEU4 導入細胞においてその割合は低下していた。また、E-セレクトインでコートしたディッシュ上で大腸がん細胞は増殖速度が促進されたが、NEU4 過剰発現株で増殖速度の促進は認められなかった。

以上の結果により、NEU4 はNEU3とは逆に大腸がんでは発現が減少し、過剰発現により悪性度を減少させることが明らかとなった。NEU4 は細胞表面のシアリル Le^aやシアリル Le^xのシアル酸を除去し、E-セレクトインとの接着を阻害するだけでなく、E-セレクトイン刺激によるシグナル伝達を減弱させることで、運動能や増殖能の抑制を行っている可能性が示唆された。

(2) 担癌状態におけるムチンを介した免疫抑制機構の解析

中田 博^{1,2}, 戸田宗豊², 太田麻利子¹, 竹内紀子², 村田健臣³, 井上瑞江²
(¹京都産業大・生物工, ²CREST, JST, ³静岡大・農)

上皮性癌細胞の産生するムチンは、癌組織や血流中に分泌される。血流中に存在するムチン上の癌関連糖鎖抗原は腫瘍マーカーとして使用されてきたが、分子レベルで癌細胞の生物学的特性との関連性はほとんど明らかにされていない。しかしながら、その存在量と5年生存率には逆の相関性があることが知られている。ムチンには癌関連糖鎖抗原も含めた多様なO-グリカンと一定のアミノ酸配列の繰り返し構造(タンデムリピート)が存在することを特徴とする。免疫担当細胞上には、シグレックファミリーと呼ばれるシアル酸を含む糖鎖を認識するレクチンが存在する。多くのシグレックファミリーの細胞質側には、ITIMと呼ばれる免疫抑制性のシグナルを伝える構造が存在し、基本的に各免疫担当細胞上に発現しているシグレック分子を介して各細胞の生物活性が抑制されるものと予想される。我々は、シグレック2, 3, 7, 9の可溶性組換え体を作成し、ムチンの結合を確認するとともに、細胞レベル及び個体レベルでのムチンの結合が及ぼす影響について検討している。今回は、B細胞上の

シグレック2と樹状細胞上のシグレック9について最近の知見を述べる。

1) シグレック2を介した系

ムチンとしては、ヒト腸癌細胞LS180の培養上清より精製したムチン(MUC2)、マウス乳癌細胞TA3-Haより調製したムチン(エピグリカニン)、あるいは牛頸下腺ムチン(BSM)などを用いた。可溶性組換え体がMUC2ムチンやBSMを固相化したプレートに結合することを確認するとともに、遺伝子改変シグレック2(130ArgをAlaに変換)やN末端領域欠損シグレック2では同プレートに結合しないことから、その結合が特異的であることが確認された。次に、B細胞受容体(BCR)を介した情報伝達に対するシグレック2を介したムチンの結合の影響について検討した。ムチン存在下で抗IgM抗体(F(ab')₂)でDaudi細胞を刺激した後、細胞を回収し、lysateを調製した。抗シグレック2抗体で免疫沈降し、沈降物をSDS-PAGE、ウェスタンブロッティング後にリン酸化されたシグレック2とリクルートされたSHP-1を

検出したところ、いずれもムチンの濃度依存的に減少した。また、同様に MAPK のリン酸化も減少し、情報伝達が抑制されていることがわかった。次に、マウス乳癌細胞ムチン産生株 TA3-Ha, 非産生株 TA3-St の担癌マウスを用いて検討した。TA3-Ha 担癌マウスでは、血中にムチンが放出されることが知られている。それぞれの担癌マウスの脾臓の T 及び B 細胞を比較したところ、TA3-Ha 担癌マウスにおいて B 細胞が減少していることがわかった。さらに、脾臓マージナルゾーン B 細胞 (CD21, CD1d 陽性) が特異的に減少していることが明らかとなり、組織化学的にもマージナルゾーンの形成不全が見られた。また、同細胞集団の機能である T 細胞非依存性抗原に対する抗体産生能も低下していた。TUNEL 法による組織染色でアポトーシス細胞が多く見られた。なお、シグレックノックアウトマウスのみならずリガンド結合部位を欠損したシグレック 2 を発現するトランスジェニックマウスにおいても同様の現象が見られることが報告されており、シグレック 2 の本来の生物学機能との関連で興味深

い。

2) シグレック 9 を介した系

シグレック 9 についても可溶性組換え体を作製し、各種ムチンあるいは人工グリコポリマーに結合することを確認した。シグレック 9 の発現をヒト末梢血単球から成熟樹状細胞への分化過程で調べると、単球レベルでの発現は弱く、未熟樹状細胞で強く発現された後に成熟樹状細胞では少し減少する傾向が見られた。LPS による未熟樹状細胞から成熟樹状細胞への分化過程で、ムチン存在下あるいは非存在下でサイトカインの産生を比較した。IL-12 の産生は著しく減少するのに対し、IL-10 は増加する傾向が見られた。 $\alpha 2,6$ 又は $\alpha 2,3$ 結合シアル酸をもつ人工グリコポリマーのいずれにも同様の効果が認められた。また、抗シグレック 9 抗体によっても同様の効果が見られた。これらの結果は、ムチンはシグレック 9 を介して樹状細胞に作用し、免疫バランスを Th2 に偏らせているものと考えられる。

(3) エンドサイトーシス経路異常による GM1 ガングリオシド蓄積と アミロイド β タンパク質の重合促進

湯山耕平, 山本直樹, 柳澤勝彦

(国立長寿医療センター研究所・アルツハイマー病研究部)

アルツハイマー病 (AD) 発症には、アミロイド β タンパク質 ($A\beta$) の重合とその重合体によって引き起こされる神経細胞毒性発現が重要な役割を果たしている。これまでの研究から、脳内での $A\beta$ 重合機構としてガングリオシド GM1 に結合した $A\beta$ (GM1-bound $A\beta$, GA β) が $A\beta$ 重合のシードとして機能する可能性があること、また、GA β 形成が GM1 のクラスター化に依存することが明らかになっている。

今回は、神経細胞のエンドサイトーシス経路異常が、細胞内 GM1 レベルと分布におよぼす影響、また、その GM1 の変化と $A\beta$ 重合の関係について検討した結果について発表する。PC12 細胞を、エンドサイトーシス経路の異常を引き起こす薬剤であるクロロキンで処理した結

果、GM1 の細胞表面および細胞内での蓄積が観察された。また、クロロキン処理細胞では、初期エンドソームの肥大が観察され、細胞内での GM1 蓄積部位と一致した。さらに、細胞外から $A\beta$ を添加すると、クロロキン処理細胞では $A\beta$ 重合が促進した。また、この $A\beta$ 重合促進は、GM1 結合性コレラ毒素および GA β 抗体の添加により抑制された。今回の実験結果から、PC12 細胞において、クロロキン処理によるエンドサイトーシス経路異常が、GM1 レベルの増加と GA β 形成をとおして、 $A\beta$ 重合を促進していることが示された。AD 患者の脳において、初期エンドソームの肥大を含むエンドサイトーシス経路の異常が報告されており、AD 発症に GM1 代謝の攪乱が関与している可能性が示唆された。

(4) 免疫性ニューロパチーと抗ガングリオシド抗体： ガングリオシド複合体抗体を中心に

楠 進（近畿大学神経内科）

免疫性ニューロパチー，なかでも Guillain-Barré 症候群 (GBS) や IgM パラプロテイン血症を伴うニューロパチーでは，血中に抗ガングリオシド抗体が高頻度上昇する。従来単独のガングリオシドを抗原として抗体測定が行われてきた。標的抗原の局在と臨床症状が対応することから，標的抗原の局在部位に抗体が特異的に結合し，神経障害を引き起こすと考えられている。ガングリオシドは膜表面抗原であり，リン脂質や他のガングリオシドと細胞膜上で共存してラフトを形成しているため，その臨床的意義の解析には他の分子の及ぼす影響も考慮する必要がある。最近われわれは，ガングリオシドと各種リン脂質，あるいは二種類のガングリオシドの混合抗原を用いて，GBS 患者血中の抗体測定を行った。その結果，抗ガングリオシド抗体の活性には共存するリン脂質が大きく影響を及ぼすこと，二種類のガングリオシドからなる複合体を特異的に認識する抗体が上昇する例があるこ

とが明らかになった。

二種類のガングリオシドが共存すると，糖鎖同士の相互作用により新しいエピトープが形成されと考えられる。とくに GD1a と GD1b からなる複合体に対する抗体は，人工呼吸器の使用を必要とする重症 GBS に強く関連することから，重症 GBS のマーカーとして有用であり，また GBS の重症化のメカニズム解明の鍵となるものである。さらに，抗 GQ1b 抗体が特異的に認められる Miller Fisher 症候群においても，GQ1b と GM1 あるいは GQ1b と GD1a からなる複合体を認識する例があり，前者の抗体を持つ例は感覚障害を欠くこともわかった。

これら混合抗原あるいは複合抗原に着目して検討を行うことは，抗糖脂質抗体の，早期診断および予後判定の指標としての有用性を高め，同時に病態の詳細な解明に結びつくと考えられる。

(5) スフィンゴリピドーシスモデルマウスにおける領域特異的神経細胞死

松田純子，米重あづさ，久保延恵，鈴木邦彦

（東海大学・未来科学技術共同研究センター・糖鎖工学研究施設）

疎水基としてセラミドを持つスフィンゴ糖脂質は，近年，細胞の増殖・再生・分化を含む様々な生物機能においてその役割が注目され，神経系においても神経機能の発現における重要性が明らかになってきた。スフィンゴ糖脂質のライソゾームにおける遺伝性代謝障害・スフィンゴリピドーシスはその多くが小児期に神経系に重篤な障害をきたす。

スフィンゴ脂質活性化たんぱく質（サポシン A, B, C, D）は共通の前駆体であるプロサポシンから誘導される相同性の糖たんぱく質で，多くの疎水性スフィンゴ糖脂質のライソゾームにおける分解に必要である。我々は，ヒトの疾患が知られておらず，その生体内での機能が明らかでなかったサポシン A とサポシン D に着目し，それぞれの特異的ノックアウトマウスを作成してきた。サポ

シン A ノックアウトマウス (Sap-A KO) は遅発型クラッペ病の表現型を呈し，サポシン A は生体内においてガラクトシルセラミダーゼ (GALC) の必須の活性化たんぱく質であることが明らかになった。2005 年には，Spiegel らにより乳児型クラッペ病の病像を呈するヒトのサポシン A 欠損症が報告された。最近我々は GALC の遺伝的欠損によるモデルマウスである *Twitcher* マウスと Sap-A KO のダブルノックアウトマウスを作成した。その結果，ダブルノックアウトマウスは *Twitcher* マウスより寿命が短く，易刺激性，痙攣発作を認め，大脳皮質 II 層，IV 層，脳海馬体 CA3 錐体細胞に特徴的な神経細胞死が見出された。脂質分析ではダブルノックアウトマウス脳には *Twitcher* マウスより有意に多くのラクトシルセラミドの蓄積が認められた。

一方、サボシンDノックアウトマウス (Sap-D KO) は生後2ヶ月ごろより多尿、生後4ヶ月ごろより運動失調を呈し、病理学的には、腎臓では主として腎尿細管細胞の変性壊死と水腎症を、中枢神経系では小脳プルキンエ細胞の選択的脱落と脳白質血管周囲へのPAS陽性多核細胞の集積を認めた。生化学的分析では、腎臓と小脳において、HFA-セラミドの蓄積を認め、この蓄積は表現型の認められる組織分布、病勢の進行とよく一致していた。これらの結果より、サボシンDは生体内において酸性セラミダーゼの活性化たんぱく質であり、HFA-セラミドの代謝に必須であることが推定された。HFA-セラミドの蓄積と腎病変、小脳病変の因果関係を示唆する所見として、

セラミドの下流の代謝産物であるスフィンゴシンをスフィンゴシン-1-リン酸に代謝する酵素・スフィンゴシンキナーゼ (SPHK1a) が野生型マウスの小脳プルキンエ細胞に左右対称性の特徴的パターンで発現し、Sap-D KOではSPHK1aを発現していないプルキンエ細胞群がより早期に細胞死に至ることが明らかになった。また、Sap-D KOマウス由来初代培養プルキンエ細胞は野生型マウスに比し明らかにその寿命が短かった。

以上、スフィンゴ糖脂質の代謝異常症・スフィンゴリビドーシスモデルマウスにそれぞれ領域特異的神経細胞死を認めることはスフィンゴ糖脂質の神経系における特異的な生理機能を推定させ興味深い。

(6) ガレクチンの分子間相互作用

宮西伸光¹、西 望²、安部博子²、加塩裕美子²、住吉 渉¹、中北慎一¹、山内清明²、
中村隆範²、平島光臣²、平林 淳¹ (香川大・¹総合生命、²医)

【目的】ガレクチンはβ-ガラクトシドを有する糖鎖を特異的に認識するレクチンで、哺乳動物では、15種類の遺伝子が同定されている。ガレクチンファミリーは、その構造からプロトタイプ、キメラタイプ、タンデムリピートタイプの3種のサブグループに分類される。しかし、ガレクチン群の生体内での真の役割については殆ど解明されていない。プロトタイプのガレクチン (ガレクチン-1, 2 など) は一般に二量体を、キメラ型ガレクチン (ガレクチン-3) はN-末端領域の介在によって多量体化することがすでに知られているが、直列反復型ガレクチン (ガレクチン-8, 9 など) のオリゴマー形成能については殆ど知られていない。そこで、本研究では、これらガレクチンの生体内での存在状態や機能調節機構を解明する一助として、複合体形成の可能性について解析を試みた。ガレクチンファミリーのうち、特に生体免疫システムの様々な場面で機能しているヒトのガレクチン-9を中心に、オリゴマー形成に関する分子間相互作用について調べた。

【方法】分子間相互作用を解析するための検出装置として、フロンタルアフィニティークロマトグラフィー (FAC)、表面プラズモン共鳴装置 (Surface Plasmon Resonance; SPR)を用いた。分析するガレクチンとして、ガレクチン-1, 3, 8, 9S (リンカードメインの長さが最

も短いタイプ)を用いた。さらに、分子間相互作用の観察されたガレクチン-9に関してはリンカードメインを取り除いた安定型ガレクチン-9 (null)、ガレクチン-9のN末端CRDのみを発現したN-CRD、C末端CRDのみを発現させたC-CRDを大腸菌発現系で作成し用いた。これらをセンサチップ、あるいはカラムに固定化し、各ガレクチン溶液をインジェクションすることによって相互作用を観察した。また、タイプの異なるガレクチン同士のクロスリンク、阻害糖、温度の影響についても検討した。

【結果】ガレクチン-9は、糖鎖を持たない他のガレクチンとの間にタンパク質相互作用が確認された。また、この相互作用に対する糖の影響を調べたところ、ラクトースが相互作用を強く阻害したが、ガラクトース、N-アセチルガラクトサミン、メリビオースでは効果が限定的であり、グルコース、マンノース、マルトースにはまったく阻害効果が認められなかった。ガレクチン-9はそれ自身を含め他のガレクチンと相互作用することが初めて定量的に示された。この結合はタンパク質間相互作用に基づくが、ガレクチンのβガラクトシド結合能とつよい相関が認められたことから、生体内では多様な糖鎖シグナル伝達のための糖鎖複合体形成に関与している可能性が示唆された。

(7) ヒアルロン酸細胞外マトリックスによる腫瘍内血管新生促進作用の解明

小山 洋^{1,2}, 神奈木 玲児^{3,4}, 木全 弘治⁵, 谷口 俊一郎¹, 板野 直樹^{1,4}¹信州大・院医・分子腫瘍, ²信州大・医・第二外科, ³愛知県がんセ・分子病態,
⁴科技構・CREST, ⁵愛知医科大・分子医科研

癌細胞周囲に形成されるヒアルロン酸 (HA) 糖鎖に富んだ細胞外マトリックスは、癌細胞の増殖や浸潤・転移との密接な関係が見出されている。今回我々は MMTV-Neu 乳癌発症モデルマウスを用い、HA による腫瘍形成や増殖、血管新生への影響を検討した。HA 合成酵素 2 (HAS2) 遺伝子を導入したコンディショナルトランスジェニックマウス (cTg) を作製し、乳腺上皮細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現するマウスと交配させ、Cre リコンビナーゼ存在下に HAS2 遺伝子が転写され、HA が過剰発現するモデルを作製した。この HAS2 cTg モデルに乳癌を形成させるため MMTV-Neu マウスと交配させ、乳腺上皮と乳癌細胞における HAS2 の発現と HA 産生を誘導した。その結果、HA 過剰産生群ではコントロール群に比べ、腫瘍内の HA マトリックスの形成増加と共に、乳癌形成頻度や腫瘍増殖速度の著明な増加を認めた。また、腫瘍血管新生に関しては、HA 過剰産生

群ではコントロール群に比べ、より微小な新生血管が著明に誘導されていた。さらに HA 過剰産生群では、腫瘍内へ間質細胞が著しく動員され、HA 依存的な血管新生の促進に腫瘍間質と間質由来血管新生因子の関与が示唆された。また、動員された間質細胞周囲の HA マトリックスに large chondroitin sulfate proteoglycan である versican の共局在が認められた。これらより、腫瘍内 HA マトリックスにおいて、HA は versican と共同して間質細胞を動員し、間質細胞が活性化されることで FGF-2 や CXCL12 等の血管新生因子を産生して血管新生を促進する可能性が示唆された。

共同研究：米田 雅彦（愛知県立看護大・栄養代謝），
磯貝 善蔵（国立長寿医療セ・先端医療）藤森 実，天野 純
（信州大・医・第二外科）

(8) ケラタン硫酸とグリオーシス

門松健治（名大・院・医）

ケラタン硫酸 (KS) はガラクトースと N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) の 2 糖の繰り返し構造からなるグリコサミノグリカンである。ガラクトースと GlcNAc の C6 位が硫酸化される。特に後者の硫酸化は KS 鎖の伸長に必須である。N-acetylglucosamine 6-O-sulfotransferase (GlcNAc6ST) はこの硫酸化を担うと考えられてきたが、中枢神経系の KS 産生を担う GlcNAc6ST は同定されていなかった。我々は GlcNAc6ST -1 が脳 KS 産生とグリア性瘢痕の形成に重要な役割を果たすことを見出した。

GlcNAc6ST -1 欠損マウスの脳では KS に特異的な抗体 5D4 に反応する KS が消失した。大脳皮質に刺傷を与えると、GlcNAc6ST -1 欠損マウスの脳では 5D4 反応性 KS 発現誘導が起こらず、グリア性瘢痕の形成が著しく抑制された。グリア性瘢痕は傷害された神経軸索の再生を抑制する因子として知られている。実際、GlcNAc6ST-1 欠損マウスでは神経軸索再生が助長された。これらの成果は今後、グリア性瘢痕形成の分子機構解明と、中枢神経傷害の治療への応用の道を開くと考えられる。

(9) コンドロイチン硫酸鎖の硫酸化による合成制御とヘルペスウイルス感染

北川裕之 (神戸薬科大学・生化学)

コンドロイチン硫酸鎖やヘパラン硫酸鎖は、様々な細胞増殖因子や細胞外マトリックス成分と相互作用し、細胞接着、増殖、分化、形態形成といった細胞活動を制御したり、ウイルスや細菌が細胞に感染する際の足場として利用される。特に、細胞表面のヘパラン硫酸鎖は、I 型単純ヘルペスウイルスが感染する際のレセプターとして機能することが知られているが、最近我々は、E 単位と名付けられた特徴的なジ硫酸化 2 糖単位 (GlcA-GalNAc(4S, 6S)) を多く含むコンドロイチン硫酸 E が、I 型単純ヘルペスウイルスが感染する際のレセプターとして機能していることを明らかにしている。以前、カナダの Tufaro らは、I 型単純ヘルペスウイルスに感受性を示すマウス L 細胞を変異源で処理することにより、I 型単純ヘルペスウイルスの感染に対し 99% 以上の抵抗性を示す変異株 sog 9 細胞を単離していた。この sog 9 細胞は、コンドロイチン硫酸鎖の合成不全を示すことが報告されていたが、欠損遺伝子など、その詳細な性質は明らかになっていなかった。我々は、マウス L 細胞が、I 型単純ヘルペスウイルスの感染に関与するコンドロイチン硫酸 E というタイプの糖鎖を合成していること、およ

び市販のイカ軟骨由来のコンドロイチン硫酸 E が、マウス L 細胞への I 型単純ヘルペスウイルスの感染をヘパリンよりも強力に阻害することを報告していた。そこで、L 細胞と sog 9 細胞より硫酸化グリコサミノグリカン鎖を精製し、組成分析を行なったところ、sog 9 細胞のコンドロイチン硫酸量は、L 細胞の 3 分の 1 にまで減少し、特に E 単位などの 4 位が硫酸化された糖鎖が減少していた。そこで、4 位の硫酸化に関与する硫酸基転移酵素の発現を調べたところ、sog 9 細胞ではコンドロイチン 4-硫酸基転移酵素 -1(C4ST-1) の発現が欠損していることが判明した。また、L 細胞と sog 9 細胞で合成されているコンドロイチン硫酸鎖の長さを調べたところ、L 細胞にくらべ sog 9 細胞由来の鎖長は短くなっていた。さらに C4ST-1 遺伝子を sog 9 細胞に導入するとコンドロイチン硫酸鎖長は長くなり、E 単位量も増加し、I 型単純ヘルペスウイルスの感染性も回復した。このように、C4ST-1 はコンドロイチン硫酸鎖の合成量や特徴的な E 単位の発現を調節し、I 型単純ヘルペスウイルスの感染性を制御していることが明らかとなった。

(10) HNK-1糖鎖生合成酵素 GlcAT-S 遺伝子欠損マウスの作製とその生化学的解析

小林恭子 (京都大学薬学研究科 生体分子認識学)

HNK-1 糖鎖は、神経系に高発現している糖鎖で、N-アセチルラクタサミン構造の非還元末端に硫酸化グルクロン酸が結合した特徴的な構造をもつ。我々はすでに、HNK-1 糖鎖の生合成が二種のグルクロン酸転移酵素 (GlcAT-P, GlcAT-S) により調節されることを明らかにした。また、脳では主に GlcAT-P が発現しており、その遺伝子欠損マウスの解析により GlcAT-P の合成する HNK-1 糖鎖が神経可塑性や記憶学習などの脳の高次機能に深く関わっていることを示した。さらに近年、GlcAT-S は脳よりも腎臓において高発現しており、腎臓での非硫酸化型 HNK-1 糖鎖の生合成に関与していることを明らかにした。

そこで今回、GlcAT-S が合成する HNK-1 糖鎖の機能解析を目的として、GlcAT-S 遺伝子欠損マウスの作製を行った。GlcAT-S 遺伝子の開始メチオニンを含むエクソン 1 を β -ガラクトシダーゼ遺伝子とネオマイシン耐性遺伝子で置換するようターゲティングベクターを構築し、これを ES 細胞にトランスフェクションした。相同組み換えをおこした ES 細胞を選び出し、組み換え ES 細胞より得られたキメラマウスから GlcAT-S 遺伝子欠損マウスを得た。

GlcAT-S 遺伝子欠損マウスのサザンブロット解析とノザンブロット解析により、相同組み換えが正しく起こり、GlcAT-S が mRNA レベルで完全に欠失していることが確

かめられた。作製された遺伝子欠損マウスは、見かけ正常に出生、遅延なく成長し、同じ週齢での外観、体重において野生型マウスとの間に大きな差は認められなかった。GlcAT-S 遺伝子欠損マウスでは、腎臓膜画分のウェスタンブロット解析により、腎臓内の非硫酸化型 HNK-1 糖鎖がほぼ完全に欠失していることが示された。一方、脳での HNK-1 糖鎖の発現量には大きな変化は見られなかったことから、脳内の HNK-1 糖鎖生合成における GlcAT-S の寄与は小さいことが示された。

腎臓において、非硫酸化型 HNK-1 糖鎖は皮質部分と髄質内部に発現していることが明らかにされている。作

製された GlcAT-S 遺伝子欠損マウスでは、腎臓切片の免疫染色により、皮質の非硫酸化型 HNK-1 糖鎖が消失していることが示された。このことから、GlcAT-S が腎臓皮質の非硫酸化型 HNK-1 糖鎖を合成していることが確認された。一方、腎臓髄質に見られる非硫酸化型 HNK-1 糖鎖は GlcAT-S 遺伝子欠損マウスで消失しなかった。これらの糖鎖は GlcAT-P によっても合成されないことが明らかとなっていることから、腎臓髄質に見られる非硫酸化型 HNK-1 糖鎖の生合成には GlcAT-S, GlcAT-P 以外の転移酵素が関与していると考えられる。

(11) 神経可塑性における HNK-1糖鎖の機能解明に関する研究

森田一平（京都大学大学院 薬学研究科）

HNK-1 糖鎖は、神経系において高発現する糖鎖抗原で、時期および領域特異的に厳密に制御を受けた発現様式を示すことが知られている。本糖鎖の生合成に主要なグルクロン酸転移酵素 (GlcAT-P) 遺伝子欠損マウスでは、脳内の HNK-1 糖鎖のほとんどが消失しており、海馬 CA1 領域において長期増強 LTP (long term potentiation) の有意な減弱が明らかとなっている。さらに、モリスの水迷路を用いた行動試験の結果、GlcAT-P KO マウスでは空間認識能力の低下が認められ、HNK-1 糖鎖は神経可塑性や学習記憶等の脳の高次機能に重要な糖鎖であることが示された。

脳内での HNK-1 糖鎖消失による LTP の減弱のメカニズムを解明するため、マウス脳より、シナプスを構成するタンパク質が集積している PSD (postsynaptic density) 画分を生化学的に調製し、HNK-1 糖鎖を発現する分子の探索を行った。その結果として、長期増強 (LTP) や長期抑圧 (LTD) などのシナプス可塑性を制御するグルタミン酸受容体のうち AMPA 型受容体サブユニットの一つである GluR2 に特異的に HNK-1 糖鎖は発現し、シナプス膜に多く発現していることを明らかにした。

次に、HEK293 細胞を用いて、GluR2 に発現する HNK-1 糖鎖の機能を検討した。その結果として、GluR2 は HNK-1 糖鎖の付加により、細胞内への取り込みが減少し、それに伴い細胞表面での発現量が増加することが明らかとなった。さらに、初代海馬神経培養細胞を用い、シナプス可塑性を変化させる AMPA や NMDA 等の刺激を与えることにより、GlcAT-P KO マウス神経細胞では、GluR2 の細胞内取り込みが有意に亢進していることが明らかとなった。

また、初代海馬神経培養細胞に対し、GluR2 の局在を調べたところ、GlcAT-P KO マウス神経細胞では、WT マウス神経細胞と比較し、局在が変化していることが観察された。さらに、PSD-95 や F-actin のようなポストシナプスに局在するタンパク質の局在についても異常が見られた。GluR2 にはポストシナプス膜に局在し、スパインの形成と成熟に関与していることが既に報告されている。以上の結果から、GluR2 上に発現する HNK-1 糖鎖の消失は、GluR2 の細胞内への取り込みを促進し、それに伴い樹状突起スパインの形成を障害していることが示唆された。

(12) β 1,3-*N*-アセチルグルコサミン転移酵素 2 遺伝子ノックアウトマウスの解析

梶谷内 晶

(産業技術総合研究所・糖鎖工学研究センター・糖鎖遺伝子機能解析チーム)

我々のグループでは、NEDO の糖鎖遺伝子 (GG) プロジェクトとして、これまでに *in silico* クローニング法によって多くの糖転移酵素遺伝子を単離してきた。現在までに β 1,3-*N*-アセチルグルコサミン転移酵素遺伝子 (β 3GnT) は 8 つの酵素からなるファミリーを形成していることが明らかとなっている。それら単離された遺伝子よりリコンビナント酵素を作製し、各種オリゴ糖受容体基質を用いた *in vitro* での酵素基質特異性解析を行った結果、複数ある β 3GnT のうち β 1,3-*N*-アセチルグルコサミン転移酵素 2 (β 3GnT2) が主たるポリラクトサミン合成活性を担っているのではないかと結論した。そこで、この酵素の遺伝子ノックアウトマウスを作製し、*in vivo* におけるポリラクトサミンが一体どの酵素によって合成されているのか、そして *in vivo* におけるポリラクトサミン

の生物学的機能、などについての解析を行った。

レクチンなどを用いたフローサイトメトリー、レクチンブロット、そしてメタボリックラベリング法などの糖鎖構造解析を行った結果、このノックアウトマウスでは、*N*-glycan 上の長鎖ポリラクトサミン構造が有意に減少していることが明らかとなった。本酵素が *in vivo* における長鎖のポリラクトサミン合成に主たる役割を担っていることが明らかとなった。

また、ポリラクトサミン鎖の減少により、免疫学的異常が起こるのかどうかについて表現型の解析をした結果、ノックアウトマウスの血球細胞において、種々の刺激に対する応答性に違いが生じていることが明らかとなった。

尚、本研究はNEDOの支援を受け実施したものである。

(13) TSR ドメイン上の *O*-Fuc 特異的グルコース転移酵素遺伝子のクローニングと機能

佐藤 隆

(産業技術総合研究所・糖鎖工学研究センター・糖鎖遺伝子機能解析チーム)

タンパク質のセリンまたはスレオニンに直接 fucose が結合した *O*-fucose 糖鎖は、これまでに epidermal growth factor like repeat (EGF) domain 上と、thrombospondin type 1 repeat (TSR) domain 上に報告されている。EGF domain 上の *O*-fucose は β 1,3GlcNAc 転移酵素である Fringe によりさらなる糖鎖修飾を受ける。この Fringe による糖鎖修飾は、形態形成過程において Notch 受容体を介したシグナル伝達の制御に関与し、生物学的に重要な機能を果たすことが知られている。一方、TSR domain 上の *O*-fucose には β 1,3 結合で Glucose が付加されているが、この Glucose を転移する転移酵素遺伝子は未だ見つかっておらず、糖鎖の機能に関しても全くわかっていない。

我々は新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) のヒト糖鎖合成関連遺伝子ライブラリー構築プロジェクトにおいて、新規糖鎖遺伝子の探索を行ってきた。新規 β 1,3Glucose 転移酵素遺伝子の探索のため、これまで知

られている β 3GT モチーフをクエリー配列としてあらゆるデータベースに対して検索を行い、新規糖転移酵素遺伝子を見出した。可溶性のリコンビナント酵素を作製し、糖転移酵素活性をスクリーニングしたところ、Fucose- α -pNP に対して Glucose を転移する活性が確認された。反応産物を薄層クロマトグラフィーで展開したところ、活性のみが報告されている CHO 細胞内在性の β 1,3Glucose 転移酵素による反応産物と同じ位置にシグナルが検出された。これらの結果から、反応産物は Glucose β 1,3Fucose- α -pNP であることが強く示唆され、この酵素は β 1,3Glucose 転移酵素であると考えられた。この酵素は、TSR domain 上の *O*-Fucose に対しのみ Glucose を転移する活性を有し、EGF domain 上の *O*-Fucose に対しては活性を示さなかった。細胞内局在を検討した結果、 β 1,3Glucose 転移酵素は N-末端にシグナル配列を持つ分泌型の可溶性の酵素で、C-末端の KDEL 様配列 “REEL”

依存的に ER に存在することがわかった。

以上の結果より, TSR domain 上の *O*-fucose 糖鎖の生合

成は, EGF domain 上のものとは異なり ER で行われることが考えられた。

(14) *O*-マンノース型糖鎖の生合成と筋ジストロフィー症

萬谷 博

(財団法人東京都高齢者研究・福祉振興財団・東京都老人総合研究所)

筋ジストロフィーとは筋線維の壊死や変性により, 進行性の筋力低下や筋萎縮を呈する遺伝性疾患群の総称である。先天性筋ジストロフィーに分類される Muscle-eye-brain 病 (MEB) と Walker-Warburg 症候群 (WWS) は滑脳症などの中枢神経系の形成異常を伴うことを特徴とする。MEB の原因遺伝子として *POMGnT1* が, WWS の原因遺伝子として *POMT1* と *POMT2* が同定されている。これらの原因遺伝子産物が *O*-マンノース (*O*-Man) 型糖鎖の生合成に係る糖転移酵素であったことから, *O*-Man 型糖鎖の異常が先天性筋ジストロフィー症の原因となることが明らかとなり, 糖鎖異常による筋ジストロフィーという新たな病態概念が提唱された。また, 中枢神経系の発生や筋組織の維持における *O*-Man 型糖鎖の重要性が示された。

O-Man 型糖鎖とは, 蛋白質の Ser あるいは Thr にマンノース (Man) が結合したタイプの糖鎖であり, 哺乳類では Sia α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man を主要構造とする。

哺乳類の *O*-Man 型糖鎖修飾は α -ジストログリカン (α -DG) というタンパク質で観察されるが, これまで α -DG 以外のタンパク質では確認されていない。*O*-Man 型糖鎖の生合成において, POMGnT1 は GlcNAc β 1-2Man の形成に係る GlcNAc 転移酵素 (protein *O*-mannose β 1,2-N-acetylglucosaminyl transferase 1) であり, POMT1 と POMT2 は Thr に Man を転移する *O*-Man 転移酵素 (protein *O*-mannosyltransferase 1, 2) である。これまでの研究から, MEB および WWS 患者では, *POMGnT1*, *POMT1*, *POMT2* 遺伝子の変異によりそれぞれの糖転移酵素活性が消失することで, α -DG が糖鎖不全となり筋ジストロフィー症が発症するという発症メカニズムが示された。

今回, *O*-Man 型糖鎖の生合成機構を中心とした研究から明らかにしてきた, *O*-Man 型糖鎖および関連糖転移酵素と先天性筋ジストロフィー症について, 最近の知見を加えて紹介したい。

(15) 無臭ベンゼンチオールを利用したオリゴ糖の合成 — 癌の転移能に関与する GnTase V に対する阻害剤を指向したオリゴ糖合成 —

梶本哲也, 石岡祐一, 加藤孝博, 長谷川純也, 野出 學 (京都薬科大)

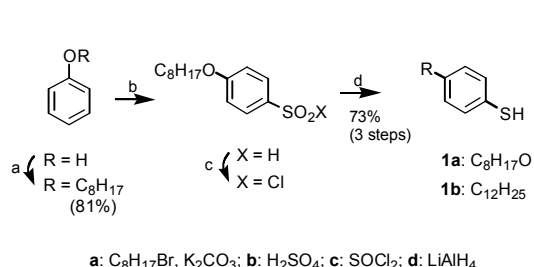
【目的】チオグリコシドはグリコシル化反応における優れたグリコシルドナーであるが, 調製時のみならずグリコシル化反応での利用時においてもチオール特有の悪臭を伴う操作上の欠点を有している。そこで今回, 演者らは, ベンゼンチオールの無臭誘導体の調製と無臭ベンゼンチオールを利用したチオグリコシドの合成およびグリコシル化反応を検討し, 反応性の優れたチオグリコシドを無臭条件で取り扱う手法の開発を試みた。

【実験・結果】演者らは以前, 炭素数 12 以上のアルカン

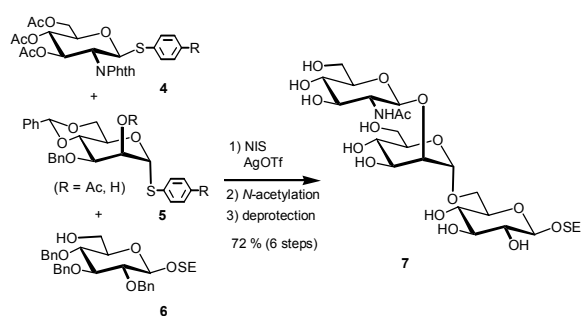
チオールが無臭であることを報告している。本知見に基づき, ベンゼン環の直線炭素数を 4 と換算して, *p*-オクチルオキシベンゼンチオール (1a) を無臭ベンゼンチオールとして合成した。また一方で, 合成洗剤の原料となる *p*-ドデシルベンゼンスルホン酸を還元して得られる *p*-ドデシルベンゼンチオール (1b) も利用することとした (Scheme 1)。

得られた 1a, 1b を BF₃・Et₂O 存在下 *N*-フタロイルグルコサミンおよびマンノースの peracetate と反応し, チオ

グリコシド (2, 3) を高収率 (>96%) で得た (Scheme 2)。続いて 2, 3 から誘導した 4, 5 をドナーとし、グルコース誘導体 (6) に順次グリコシル化を行い、脱保護と N-アセチル化により GnTaseV に対する阻害剤の鍵中間体

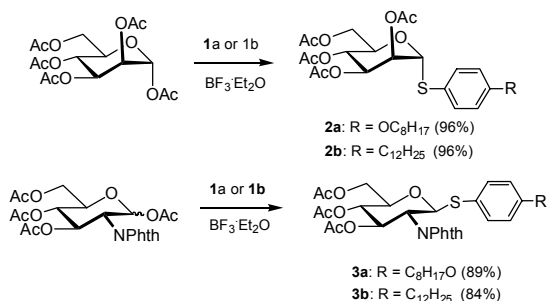


Scheme 1 Synthesis of *p*-octyloxybenzenethiol (1a, 1b)

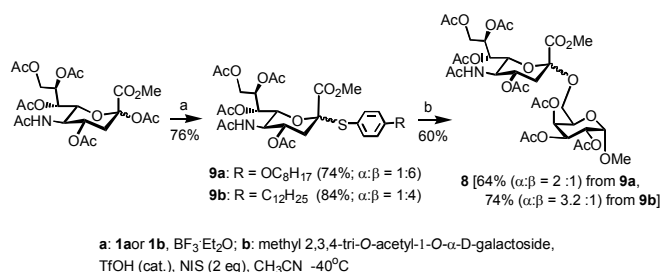


Scheme 3 Synthesis of trisaccharides (7) from phenyl 1-thioglycosides (4, 5, 6)

となる三糖 (7) の合成を完全無臭の条件で達成した (Scheme 3)。また、本手法をシアロ二糖 (8) の合成にも適用し、良好な結果を得た (Scheme 4)。



Scheme 2 Synthesis of Thioglycosides (2, 3) Using Odorless Benzenethiols



Scheme 4 Synthesis of Sialoside (8)

(16) N-結合型糖鎖ビーズを用いた *A. oryzae* の解析 —糖タンパク質品質管理機構の理解から異種タンパク質高生産に向けて—

渡邊泰祐

(理化学研究所 伊藤細胞制御化学研究室)

麹菌 *Aspergillus oryzae* は、古来より日本酒、醤油、味噌等の伝統食品の発酵生産に用いられている。安全性に関しては米国食品医薬品局 (FDA) から、GRAS (Generally Regarded As Safe) として認定されており、有用タンパク質を生産するホストとしての利用が期待されている。しかしながら、麹菌由来のタンパク質が g/L オーダーの生産量であるのに対し、異種タンパク質の生産レベルは mg/L 程度に留まっている。この原因の一つとして翻訳後の分泌過程における問題が指摘されている。新生タンパク質の多くは、小胞体において糖鎖が付加される。なかでもアスパラギン (N-) 結合型糖鎖付加は真核生物に広く保存された普遍的な機構であり、N-結合型糖鎖を介したタ

ンパク質品質管理機構に関する研究が近年盛んに行われている。当研究室では、糖タンパク質品質管理機構の解明を目的として有機合成化学的手法を用いた研究を行っており、小胞体型糖鎖を系統的に合成することに成功している。また、合成した糖鎖を用いて、レクチンとの相互作用解析およびレクチン機能解析のための分子プローブ作製に関する研究を行っている。

我々は小胞体型糖鎖を固定化したビーズを用いたアフィニティークロマトグラフィーによって、生体内から糖鎖認識分子を網羅的に取得可能であると考えた。今回の発表では Glc1Man9GlcNAc2 糖鎖結合ビーズに結合した糖鎖認識タンパク質の同定、糖鎖に対する結合特異性、

および細胞内における局在解析を行った結果を報告する。

小胞体を含む膜タンパク質画分は, *A. oryzae* 菌体破砕物を遠心分離法に供することにより調製した。得られた小胞体画分を用いて Glc1Man9GlcNAc2 ビーズに結合するタンパク質を取得した。取得したタンパク質は, 種々の糖鎖結合ビーズとの結合実験を行った結果, Glc1Man9 糖鎖特異的に結合することを確認した。この Glc1Man9 糖鎖結合タンパク質は麹菌ゲノムデータベース (<http://www.bio.nite.go.jp>) を利用した LC/MS/MS 解析より, *A. oryzae* における calnexin (CNX) であると同定された。細胞内での局在を調べるために CNX-EGFP 融合タンパク質を発現する形質転換体を取得し, 可視化を試みた。EGFP 蛍光と細胞染色の観察を行った結果, CNX が小胞体に局在することが確認された。今後は, CNX 高発現株および破壊株を取得し, 小胞体内におけるタンパク質品質管理が異種タンパク質生産性に及ぼす影響について評価する予定である。

bio.nite.go.jp) を利用した LC/MS/MS 解析より, *A. oryzae* における calnexin (CNX) であると同定された。細胞内での局在を調べるために CNX-EGFP 融合タンパク質を発現する形質転換体を取得し, 可視化を試みた。EGFP 蛍光と細胞染色の観察を行った結果, CNX が小胞体に局在することが確認された。今後は, CNX 高発現株および破壊株を取得し, 小胞体内におけるタンパク質品質管理が異種タンパク質生産性に及ぼす影響について評価する予定である。

(17) MSⁿ スペクトルマッチングによる糖ペプチドの直接構造解析の試み

出口喜三郎², 伊藤裕基^{1,2}, 山田久里子^{1,2}, 永井伸治¹, 武川泰啓², 中川裕章², 篠原康郎²,
西村紳一郎² (¹(株) 日立ハイテクノロジーズ, ²北海道大学大学院先端生命科学研究院)

【はじめに】近年, 質量分析計による糖タンパク質, 糖ペプチドシーケンス解析が急速に進歩しつつあるが, 糖鎖部分も含めた完全な構造解析にはまだ多くの課題がある。我々は, PA (2 アミノピリジン) 化 N 型糖鎖を用いて, 正及び負イオン CID MSⁿ スペクトルマッチングによる糖鎖構造解析を行ってきた。しかし, 試料の微量化に伴い, 糖ペプチドから糖鎖を酵素や化学処理で切り出すことなく, 直接糖鎖構造解析することが必要になりつつある。今回, NanoHPLC/ESI-LinearIT-TOF MS (日立ハイテク製 NanoFrontierL) を用いた糖ペプチドの正・負イオン MSⁿ スペクトルマッチングによる直接構造解析方法の検討を行ったので報告する。

【方法と結果】

N 型糖ペプチド構造解析:

卵黄由来の酸性 (ジシアリル) N 型糖ペプチドを用いた実験では, 負イオン CIDMSⁿ ($n=1-3$) (CID) スペクトルは, 正イオンモードと異なり, シアル酸脱離のフラグメントが少ない。更に, MS¹ の親イオン ($m/z=953.8$ ($z=3$)) から得られた MS² スペクトルは, キトビオースのグリコシド結合間で開裂したフラグメントイオン (B_6 ,

$m/z=1000.4$ ($z=2$)) を生成する。そのイオンから得られる CIDMS³ スペクトルは, PA 化 N 型糖鎖 (標準品) から得られた CIDMS³ スペクトルともよく一致することから, B_6 タイプのフラグメントイオンに対しても, MSⁿ スペクトルマッチングが有効であることが分かった。さらに, ペプチドのアミノ酸シーケンスや糖結合位置の決定も, 正イオン CIDMS³ スペクトルで行える。

O 型糖ペプチド構造解析:

シアリルルイス X (sLe^x) を結合した合成 O 型糖ペプチドでは, 負イオン MS² スペクトルは, シアル酸およびフコース含むフラグメント C_3 イオン ($m/z=819.3$) を生成する。そのイオンから得られる CIDMS³ スペクトルは, 標準品シアリルルイス X (sLe^x) の MS² スペクトルと一致する。一方, 異性体であるシアリルルイス A (sLe^a) とは一致しないことから, MSⁿ スペクトルマッチングは O 型糖鎖の同定にも有効である。また, 3' 及び 6'-シアリルラクトースを結合した糖ペプチドでも, 同様の結果が得られた。ECD (電子捕獲解離) スペクトルによるペプチドシーケンス解析も, 併せて紹介する。

(18) ピリジルアミノ化法を使った糖鎖解析法

鳥居知宏¹, 田辺和弘², 中北慎一³, 長谷純宏³, 等 誠司¹, 池田一裕¹

(¹自然科学研究機構生理学研究所分子神経生理部門,

²三菱化学化学技術研究センター分析事業部, ³大阪大学大学院理学研究科)

糖鎖は細胞の表面の大部分に発現し, 細胞間や細胞-基質間相互作用に重要な役割を果たしていると考えられている。その糖鎖解析においてピリジルアミノ化法を用いた解析は, 蛍光検出を可能にするだけでなく, 質量分析においてポジティブイオンモードでの糖鎖検出感度が大幅に向上する利点があることから国際的にも高い評価を受けており現在の糖鎖研究を支えている方法である。

そのため多くの研究室でピリジルアミノ化法を用いた糖鎖解析を行っており, 一般的にはグリコペプチダーゼ A あるいはヒドラジン分解による N 結合型糖鎖の遊離とゲル濾過精製を行い PA 化した後に再びゲル濾過精製を行って HPLC 解析する。しかし, 残存ヒドラジンや未反応 PA などの煩雑物が解析に影響を与えることが少なくなく, 微量の糖鎖を解析する為にはそれらの除去が課題であった。そこで本研究では当研究室で日常的に行っている HPLC 解析を行う前処理と分離能を大幅に改善した HPLC 解析について報告したい。

我々はこれまでの条件検討の結果, 糖鎖解析の前処理過程においてグラファイトカーボンカラムを用いることによって効果的にヒドラジン除去, カラム内での再アセ

チル化を可能にし, 作業時間を大幅に縮小することができた。さらにこれまでは PA 化反応後フェノール-クロロホルムによって未反応 PA を除去してきたが, PA 化反応後のサンプルをそのままセルロースカラムで精製する方法を採用することによって回収率を向上させた。これらの煩雑物の除去や回収率の向上により微量糖鎖の解析が実用化レベルまで達することができた。

一方, HPLC 解析の条件についても微量化糖鎖解析に対応するため検討を行ってきた。順相 HPLC 解析ではグラジエント条件やカラムを変更しこれまでより長い解析時間を費やすこととなったが, より高い分離能を得ることが出来た。その結果順相 HPLC での分画をこれまでの限られてきた本数から 30 本へと大幅に増やすことができ, 主要なピークに隠されていた微量な糖鎖までも同定することが可能になった。

この方法の採用により, 従来の方法では比較的困難であった糖鎖を多量に含む組織の解析が容易になったことから, 我々は大脳皮質発達過程において発現するシアル酸付加 N 結合型糖鎖の解析を行ったので, その解析結果についても併せて報告する。

4. 細胞死研究の新たな展開と関連する素過程

2006 年 10 月 31 日－11 月 1 日

代表・世話人：仁科 博史（東京医科歯科大学・難治疾患研究所）

所内対応者：岡田 泰伸（生理学研究所）

- （1）染色体凝縮異常によって生じる四倍体細胞は典型的ハウスキーピング遺伝子産物 eEF1A/EF-1 α の
発現低下による新規細胞死で除去される
米原 伸（京都大学大学院生命科学研究科）
- （2）カスパーゼの新たな生理機能とその調節機構
三浦 正幸（東京大学薬学部遺伝学教室）
ショートトーク 個体発生における細胞死のパターン解析
中嶋 悠一朗（東京大学大学院薬学部・大学院生修士課程）
- （3）ミトコンドリアと細胞死
清水 重臣（東京医科歯科大学難治疾患研究所）
- （4）Apaf1 によるアポトーシス制御機構
吉田 裕樹（佐賀大学医学部分子生命科学講座・生体機能制御学分野）
- （5）VCP 蛋白質の機能解析
垣塚 彰（京都大学大学院生命科学研究科）
- （6）パエル受容体によるドーパミン神経変性メカニズム
高橋 良輔（京都大学大学院医学系研究科）
- （7）イノシトールリン脂質代謝による神経細胞調節
佐々木 雄彦（秋田大学医学部・病理病態学・感染制御学）
- （8）抗原受容体を介する B リンパ球アポトーシスにおける小胞体ストレスの役割
鏑田 武志（東京医科歯科大学難治疾患研究所）
- （9）NFATc1 の自己増殖が支配する破骨細胞分化シグナル
高柳 広（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科）
ショートトーク 破骨細胞における Tec ファミリーチロシンキナーゼ ー分化と生存の制御ー
岡本 一男（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科）
- （10）アポトーシスや赤血球の脱核における DNA 分解の異常
川根 公樹・長田 重一（大阪大学大学院医学系研究科）
- （11）SAPK/JNK 活性化制御機構と生理的役割
仁科 博史（東京医科歯科大学難治疾患研究所）
ショートトーク MST1 によるカスパーゼ非依存的核凝集誘導には JNK が必須である
浦 誠司（東京医科歯科大学難治疾患研究所ポスドク）
- （12）ASK ファミリーによるストレス応答と細胞死制御
一條 秀憲（東京大学大学院薬学系研究科）
- （13）NF- κ B による細胞死抑制のメカニズム
中野 裕康（順天堂大学医学部免疫学）
- （14）オートファジーによる飢餓対応と細胞内品質管理
水島 昇（東京医科歯科大学大学院細胞生理学分野）

(15) ユビキチンファミリーによる生体機能制御

千葉 智樹 (筑波大学大学院生命環境科学研究科)

(16) ミトコンドリアユビキチンリガーゼの機能

柳 茂 (東京薬科大学生命科学部分子生化学)

(17) 疾患と非アポトーシス型細胞死

辻本 賀英 (大阪大学大学院医学系研究科)

(18) ネクロシス死誘導におけるアニオンチャネルの役割

岡田 泰伸 (生理学研究所機能協働部門)

【参加者名】

仁科博史 (東京医科歯科大学難治疾患研究所), 中村 貴 (東京医科歯科大学難治疾患研究所), 浦 誠司 (東京医科歯科大学難病治疾患研究所), 生江美佐子 (東京医科歯科大学難治疾患研究所), 長田重一 (大阪大学大学院医学系研究科), 辻本賀英 (大阪医科歯科大学難治疾患研究所), 鰐田武志 (東京医科歯科大学難治疾患研究所), 巖城成 (東京医科歯科大学難治疾患研究所), 一條秀憲 (東京大学大学院薬学系研究科), 小口 遥 (東京大学大学院薬学系研究科), 高木美穂 (東京大学大学院薬学系研究科), 村上史織 (東京大学大学院薬学系研究科), 木下英幸 (東京大学大学院薬学系研究科), 藤澤貴央 (東京大学大学院薬学系研究科), 垣塚 彰 (京都大学大学院生命科学研究科), 安田邦彦 (京都大学大学院生命科学研究科), 小池雅昭 (京都大学大学院生命科学研究科), 大久保裕介 (京都大学大学院生命科学研究科), 米原 伸 (京都大学大学院生命科学研究科), 大串雅俊 (京都大学大学院生命科学研究科), 黒木俊介 (京都大学大学院生命科学研究科), 高橋涼香 (京都大学大学院生命科学研究科), 伊藤 亮 (京都大学大学院生命科学研究科), 高橋良輔 (京都大学大学院医学系研究科), 田代善崇 (京

都大学大学院医学系研究科), 山門穂高 (京都大学大学院医学系研究科), 江川斉宏 (京都大学大学院医学系研究科), 中野裕康 (順天堂大学医学部免疫), 中島章人 (順天堂大学医学部免疫), 吉田裕樹 (佐賀大学医学部), 白石裕士 (佐賀大学医学部), 三浦正幸 (東京大学大学院薬学部), 中嶋悠一郎 (東京大学大学院薬学部), 倉永英里奈 (東京大学大学院薬学部), 大澤志津江 (東京大学大学院薬学部), 清水重臣 (東京医科歯科大学難治疾患研究所), 千葉智樹 (筑波大学大学院生命環境科学研究科), 水島 昇 (東京医科歯科大学大学院), 佐々木雄彦 (秋田大学医学部), 柳 茂 (東京薬科大学生命科学部), 福田敏史 (東京薬科大学生命科学部), 杉浦 歩 (東京薬科大学生命科学部), 楊 立偉 (東京薬科大学生命科学部), 高柳 広 (東京医科歯科大学大学院), 岡本一男 (東京医科歯科大学大学院), 岡田泰伸 (生理学研究所), 井上 華 (生理学研究所), 高橋信之 (生理学研究所), 浦本裕美 (生理学研究所), 沼田朋大 (生理学研究所), E.L.Lee (生理学研究所), 佐藤かおり (生理学研究所), 青島晃宏 (基礎生物学研究所)

【概要】

細胞死は個体の発生や恒常性維持に必須の生命現象であり, その破綻は個体の死や病態を引き起こす。細胞死の分子機構の詳細な解析から, 細胞死を誘導する受容体, 実行装置, 細胞死センサーなど様々な素過程に関わる分子が次々に明らかにされてきた。また, 死細胞を個体から除去する現象やそれに関わる分子の解明も著しい進展を見せている。一方, 細胞内の不要分子の処理や自己消化に関わる素過程など他領域の研究成果が細胞死研究に新たな視点を与えつつある。このように細胞死研究は自己の成熟に加え, 他領域研究の成果を取り入れながら新

たな広がりを見せている。このような状況で, 精力的に細胞死研究および関連分野を研究している研究者が一同に会し, その分子機構と生理的役割に関して交流の場を持つことは非常に意義のあることと考えられる。世界をリードする研究成果を出してきた我が国の細胞死研究が更なる発展をするために, 本研究会は開催された。2日間にわたって最先端の研究成果が報告され, 活発な議論と有益な情報交換がなされ, 本研究会の目的は十分達成されたと考えられる。

(1) 染色体凝縮異常によって生じる四倍体細胞は典型的ハウスキーピング遺伝子産物 eEF1A/EF-1 α の発現低下による新規細胞死で除去される

米原 伸 (京都大学大学院生命科学研究科)

細胞分裂期における染色体の凝縮異常（不全）によって、娘細胞間を DNA が架橋する anaphase bridge という構造が認められ、核分裂が成功せずに、二核四倍体の細胞が生じることがある。このような細胞の染色体は不安定であり、変異が蓄積することによって細胞のがん化が誘導されるという。我々は、このような染色体凝縮異常による二核四倍体細胞を誘導する系を作製し（転写因子 CREB の転写活性に依存しない作用、あるいは DNA トポイソメラーゼ II 阻害剤 ICRF-193 の作用）、生じた二核四倍体細胞が caspase 非依存性の新規細胞死によって除去されることを見いだした。そして、この細胞死はハウス

キーピング遺伝子産物として著名な翻訳伸長因子 eEF1A1 (EF-1 α) の発現抑制によって誘導されるということを示した。また、この eEF1A1 の発現抑制は、1) eEF1A1 mRNA の 5' 非翻訳領域が標的となって誘導されること、2) CHO 細胞では mRNA の不安定化と翻訳阻害、ヒト細胞では翻訳阻害によって誘導されることを明らかにした。そして、この翻訳阻害に関わる分子の同定も行った。染色体凝縮異常によって生じる二核四倍体細胞が除去される新しい細胞死と、その分子機構が明らかとなりつつある。この新規細胞死の生理的役割を明らかにしていくことが今後必要と考えられる。

(2) カスパーゼの新たな生理機能とその調節機構

三浦 正幸 (東京大学大学院薬学系研究科)

カスパーゼはアポトーシス実行に必須のプロテアーゼとして線虫で同定された。線虫では細胞死が個体の生存には必要なく、細胞死誘導による不要細胞の効率よい除去がカスパーゼの主たる働きである。しかし、ヒトやショウジョウバエといった多くの多細胞動物では細胞死は個体の生存に必須であり、細胞死やそのシグナル構成因子の生理機能は未だ多くが謎とされている。

カスパーゼは様々なストレス刺激や発生シグナルの乱れを感知して活性化される。発生過程で増殖性の違う細胞集団が接したときには、栄養因子受容に劣る増殖性の

悪い細胞集団で選択的にカスパーゼの活性化がおこり除去される（細胞競合）。また、何らかの原因で過剰なアポトーシスが生じた場合は失われた細胞を埋め合わせるべく増殖シグナルがアポトーシス細胞から分泌される（代償性増殖）。この現象にカスパーゼは必須の役割を果たすことが遺伝学的な研究により明らかになってきた。さらに、これまでカスパーゼは活性化すると細胞死が誘導されると考えられてきたが、細胞が受けるストレスの程度によってそれに応じたレベルの活性化を示し、細胞死以外の生理機能を果たすことが明らかになった。

個体発生における細胞死のパターン解析

中嶋 悠一朗、倉永 英里奈、三浦 正幸 (東京大学大学院薬学系研究科)

プログラム細胞死は個体の形態形成を始めとした正常な発生に重要である。特に、アポトーシスという形態的特徴をもつ細胞死において、カスパーゼと呼ばれるシステインプロテアーゼを中心とした機構は進化的に保存されて

いる。個体という細胞社会において、細胞死の時空間的模式を明らかにし、生理的寄与を知るには、組織の中で「死にゆく細胞」を直接見るというアプローチが有効となる。個体中で細胞死の生体イメージングを行うにあたり、

カスパーゼ活性化の FRET インディケーター (SCAT) を発現するトランスジェニックショウジョウバエを作製し、蛹期における腹部表皮の入れ替わりの現象を解析した。死にゆく幼虫表皮細胞においてカスパーゼ活性化パターン

を 1 細胞レベルで検出する系を確立し、細胞死のパターンについて解析した結果、表皮の細胞死には特定のパターンが存在することが明らかになった。

(3) ミトコンドリアと細胞死

清水 重臣 (東京医科歯科大学難治疾患研究所), 辻本 賀英 (大阪大学大学院医学系研究科遺伝子学)

アポトーシスのシグナル伝達機構にはミトコンドリアの膜透過性変化が関与しており, Bcl-2 ファミリー蛋白質はこれを調節することにより細胞死を制御している。Bcl-2 ファミリー蛋白質のうち, Bcl-2 は強いアポトーシス機能を有している。我々は, この Bcl-2 を腸上皮に過剰発現させたトランスジェニックマウスを作製し, クローン病モデルマウスと交配し, クローン病における腸上皮アポトーシスの影響を検討した。その結果, Bcl-2 トランスジェニックマウスと交配したクローン病マウスは病状が大き

く改善した。即ち, クローン病の病態には腸上皮アポトーシスの関与が明確となった。また, 我々はアポトーシス抵抗性の Bax/Bak ダブルノックアウトマウスの embryonic fibroblast や胸腺細胞の解析を詳細に行った。その結果, ①これらの細胞にアポトーシス刺激を加えても, アポトーシスは観察されないが, non-apoptotic な細胞死は観察されること, ②この細胞死には, オートファジー様の形態変化を伴うこと, ③オートファジーを抑制することにより細胞死が緩和されること, を見いだした。

(4) Apaf1によるアポトーシス制御

吉田 裕樹 (佐賀大学医学部 分子生命科学)

Apaf1 は, ミトコンドリア依存性アポトーシス経路においてシトクロム c の存在下にカスパーゼ 9 を活性化するアダプター分子として働く。Apaf1 欠損マウスは胎性致死であり, 発生過程におけるニューロンのアポトーシス低下とニューロンの蓄積が認められたことから, Apaf1 依存性アポトーシスは, 脳の発生過程における不必要なニューロンの除去に重要な役割を果たしているものと考えられた。また, Apaf1 欠損胎仔線維芽細胞は, 抗がん剤処理や紫外線照射などのストレスにより誘導されるアポトーシスに抵抗性を示す。Apaf1 欠損マウスを C57BL/6 マウスに戻し交配を進める過程で, 外見上

野生型マウスと差を認めず, 正常に成長し妊性も有する Apaf1 ホモ欠損マウスが確認された。これらのマウスでは, 脳の構造にも異常を認めず, 腸管上皮のアポトーシスも野生型と同程度に認められた。以上のことは, Apaf1 依存性アポトーシスが個体の発生に必須ではなく, 何らかの代替経路により生理的アポトーシスが誘導されていることを示している。また, 小胞体ストレス経路は Apaf1 依存性アポトーシスに加え非依存的な細胞死も誘導すること, 成長因子欠損は Apaf1 欠損細胞にも緩徐な細胞死をもたらすことから, Apaf1 に依存しない新しい細胞死誘導経路の存在が示唆される。

(5) VCP 蛋白質の機能解析

垣塚 彰（京都大学大学院生命科学研究科 / SORST (JST)）

我々は、神経変性疾患の発症に深く関わる分子として VCP (Valosin-containing protein) という AAA ファミリーに属する ATPase の機能解析を行っている。VCP の細胞内の局在を抗体を使った免疫染色法で解析すると主に細胞質に存在している。しかし、ポリグルタミンなどの異常な蛋白質が蓄積した細胞では、核内に VCP の局在を示す細胞が増えてくる。おそらく何らかの変化が VCP に生じた結果、局在が変化したものと考えられた。そこで、ポリグルタミンを発現させた細胞と発現させていない細胞から VCP を精製し、質量解析によって、ポリグルタミンによって VCP に何らかのアミノ酸修飾が起きている可能性を検証した。その結果、ポリグルタミンの発現

に依存して、近接する 2 ヶ所のアミノ酸にリン酸化が、1 ヶ所にアセチル化が誘導されることが明らかになった。この 3 つのアミノ酸の修飾を模倣するアミノ酸として、それぞれグルタミン酸 (D), アスパラギン酸 (E), グルタミン (Q) に置換した変異体 (DEQ 体) を作成し、培養神経細胞 (PC12) に発現させた。この変異体では、顕著な核移行が観察された。さらに、驚いたことに、PC12 細胞の神経突起の退縮を誘導する活性があることが見出された。すなわち、VCP は、細胞内にポリグルタミンが蓄積してくるとリン酸化とアセチル化修飾を受け、その結果、核内に移行し、おそらく核内で神経突起の退縮を引き起こす作用を担っていることが推測された。

(6) パエル受容体によるドーパミン神経変性メカニズム

高橋 良輔（京都大学大学院医学研究科脳病態生理学講座臨床神経学）

我々は常染色体劣性若年性パーキンソン病 (AR-JP) の原因遺伝子産物でユビキチンリガーゼである Parkin の基質としてパエル受容体 (Pael-R) を同定した。Pael-R は折り畳み効率の低い蛋白質であり、培養細胞で過剰発現させると、小胞体ストレスを引き起こしてアポトーシスを生じさせる。Pael-R を過剰発現するトランスジェニックマウス (Pael-Tg) を作製したところ、軽度のドーパミン神経細胞数の減少を認めた。更に parkin-KO マウスに Pael-R-Tg マウスを掛け合わせた parkin-KO/Pael-R-Tg マウスでは上記の変化が Pael-R の量依存的に増強された。

parkin-KO/Pael-Tg マウスではドーパミン細胞死は 2 年齢で約 40% に達した。このマウスの脳では持続的な小胞体ストレスのマーカー上昇及びカルボニル化タンパク質など酸化ストレス指標の増加が見られた。更に 18 ヶ月齢以降でミトコンドリア複合体 I の活性低下がみられた。以上の結果から、parkin-KO/Pael-Tg マウスは AR-JP の病態をよく再現し、小胞体ストレス、酸化ストレスが相乗的に作用して変性が引き起こされ、ミトコンドリアの複合体 I の活性低下が更に変性過程を加速するのではないかと考えられた。

(7) イノシトールリン脂質代謝による神経細胞死調節

佐々木 雄彦（秋田大学医学部 病理病態医学講座 感染制御学分野）

ホスファチジルイノシトールは、細胞膜を構成する微量リン脂質である。ホスファチジルイノシトールのイノシトール環が、その 3, 4, 5 位水酸基に可逆的なリン酸化を受ける結果、7 種類のイノシトールリン脂質が生成される。

これらは、脂質性シグナル分子として個々に固有の機能を持ち、多様な細胞応答を制御する。我々はこれまでに、PI3K, PTEN, SHIP, PIPKI などのイノシトールリン脂質代謝酵素の欠損マウスを用いて、これらの酵素の欠損が、

発がんや免疫機能異常など、多様な病態へとつながることを見出した。L-PIPase (leucine-rich phosphoinositide phosphatase) はイノシトールリン脂質脱リン酸化酵素である。L-PIPase の欠損マウスは、メンデル率に則って生まれるが、生後 12 日目から不随意運動を呈した。また、

脳波解析の結果、てんかんを発症することが明らかとなった。L-PIPase 欠損マウス脳では、顕著なアポトーシスの亢進とグリオーシスが観察されたことから、L-PIPase の神経細胞死への関与が示唆された。

(8) 抗原受容体を介する B リンパ球アポトーシスにおける小胞体ストレスの役割

鏑田 武志 (東京医科歯科大学疾患生命科学研究部, CREST, JST)

成熟 B リンパ球は抗原刺激によりアポトーシスをおこし、そのアポトーシスは活性化 T 細胞由来の CD40L 分子との反応により阻害される。病原微生物は T 細胞を活性化できるので、病原微生物に反応する B 細胞は免疫応答をおこし、T 細胞を活性化できない自己抗原に反応した自己反応性 B 細胞はアポトーシスをおこして免疫トレランスが保たれる。我々は、正常 B 細胞および抗原授与体架橋でアポトーシスをおこす B 細胞株 WEHI-231 を用いて、抗原授与体を介するアポトーシスのメカニズムを解析した。その結果、抗原受容体を介するアポトーシスの際に活性酸素が生成され、N アセチルシステインなど

で活性酸素の産生を阻害するとアポトーシスが阻害された。この結果から、抗原受容体を介するアポトーシスには活性酸素の生成が必要であることが明らかになった。また、抗原受容体架橋により小胞体ストレスが誘導され、活性酸素産生の阻害により小胞体ストレスも阻害された。さらに、シャペロン BipP を過剰発現すると抗原受容体架橋による小胞体ストレスが阻害され、またアポトーシスも著明に阻害された。これらの結果から、抗原受容体を介する B リンパ球アポトーシスに小胞体ストレスが重要な役割を果たすことが強く示唆された。

(9) NFATc1の自己増殖が支配する破骨細胞分化シグナル

高柳 広 (東京医科歯科大学大学院分子情報伝達学)

骨のホメオスタシスの維持には破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成のバランスが重要である。我々は破骨細胞の分化に必須のサイトカイン RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) がどのようなシグナルを伝達し、破骨細胞分化を誘導しているのかを分子レベルで解明する研究を続けている。

RANKL は NF- κ B, MAP キナーゼ, AP-1 といった転写因子やシグナル経路を活性化することが知られていた。しかし、このような経路はさまざまなサイトカイン・増殖因子・ストレスなどで活性化され、インターロイキン 1 のように破骨細胞分化を誘導できないサイトカインによっても活性化されるため、破骨細胞に対する特異性がない。そこで、破骨細胞特異的な RANKL 誘導遺伝子を同定するため Affymetrix 社の GeneChip を用いて RANKL

誘導遺伝子の網羅解析を行った。その結果、リンパ球で発見された転写因子の一つである nuclear factor of activated T cells c1 (NFATc1) が RANKL シグナルを統合する破骨細胞分化のマスター転写因子であることを発見した。NFAT の活性化にはカルシウムシグナルとカルシニューリンが重要であるため、カルシニューリン阻害剤である FK506 やサイクロスポリン A は破骨細胞分化を強く抑制する。さらに、破骨細胞でカルシウムシグナルを活性化する受容体の探索の中から、免疫グロブリン様受容体からの共刺激シグナルがこの経路の活性化に重要な役割を果たすことが明らかになった。

このように、免疫細胞で発見された転写因子 NFAT が、骨格系細胞でも広範に役割を果たすことは、骨格系と免疫系の密接な関係を示す一方、この経路を用いて破骨細

胞のみを抑制する治療の難しさを示唆している。それ故、破骨細胞特異的なシグナル伝達機構をさらに解明するこ

とが、今後の新しい治療戦略に道を開くと考えられる。

破骨細胞における Tec ファミリーチロシンキナーゼ - 分化と生存の制御 -

岡本 一男（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科）

単球・マクロファージ系細胞由来の破骨細胞は、骨吸収能を持つ多核細胞であり、その分化・成熟には破骨細胞分化因子・RANKL が必要である。RANKL 刺激により、破骨細胞内で NF- κ B や AP-1 などが活性化され、破骨細胞分化のマスターレギュレーター・NFATc1 が誘導される。また NFATc1 は、RANKL 依存的に誘導されるカルシウムシグナルによって活性化し、破骨細胞分化特異的な遺伝子の発現を誘導する。

NFATc1 の活性化に必要なカルシウムシグナルは、免疫グロブリン様受容体と ITAM を有した膜結合型分子・

DAPI2やFcR γ を介した、PLC γ の活性化が必要であるが、ITAM と PLC γ の間を結ぶシグナル伝達経路は明らかにされていない。今回我々は、非受容体型チロシンキナーゼの Tec ファミリーキナーゼが、ITAM と PLC γ 間のシグナル経路に関わることで、破骨細胞分化を制御することを明らかにし、さらに破骨細胞分化に関わる ITAM $\sim$ カルシウムシグナル経路が B 細胞受容体のシグナル伝達経路と極めて類似していることを見出した。また Tec ファミリーキナーゼが、破骨細胞分化の過程で誘導されるアポトーシスを制御していることも示唆された。

(10) アポトーシスや赤血球の脱核における DNA 分解の異常

川根 公樹，長田 重一（大阪大学大学院生命機能研究科）

アポトーシスでは死細胞の DNA は 2 段階で分解される。すなわち、死細胞内での CAD (caspase-activated DNase) による分解と、死細胞がマクロファージに貪食された後、リソソームに存在する DNase II による分解である。一方、赤血球の最終分化段階で排除された核はマクロファージによって貪食され、DNase II によって分解される。今回、DNase II 遺伝子を生後、薬剤の投与によって欠失させるマウスを作成した。このマウスを [poly(IC)] で処理すると数週間のうちに DNase II 遺伝子は除去され、それに応じて、さまざまな組織のマクロファージがリソソーム内に未分解 DNA を蓄積した。これ

らのマクロファージは活性化されており、TNF を産生していた。このマウスは歳をとるにしたがって、指先、手・足首、ひじ・ひざの順に関節炎を発症した。発症した関節では TNF、IL-6 や IL-1 β などのサイトカイン遺伝子の発現が 10 $\sim$ 50 倍に増加しており、滑膜細胞が著しく増殖し、軟骨や骨を破壊していた。このマウスに、抗 TNF 抗体を投与したところ、関節炎の発症を抑制した。以上の結果は、アポトーシス細胞や赤血球前駆細胞から由来する DNA が分解されずマクロファージに残存すると、マクロファージが活性化され、マクロファージから産生された TNF が関節炎を誘起することを示唆している。

(11) SAPK/JNK 活性化制御機構と生理的役割

仁科 博史 (東京医科歯科大学難治疾患研究所)

SAPK/JNK シグナル伝達系は様々なストレスに応答し、細胞死の誘導、細胞の増殖促進や生存維持、細さらに細胞の老化抑制などの様々な細胞の運命を制御する。受容体刺激など細胞膜を介する SAPK/JNK 活性化の分子機構に比べて、DNA 損傷によって誘導される核から細胞質へのシグナル経路については未だ不明の点が多い。本研究では、DNA 損傷によって誘導される HeLa 細胞の SAPK/JNK 活性化に Daxx と癌抑制遺伝子産物 Ras association domain family 1C (RASSF1C) が関与することを見出したので報告する。1) Daxx は promyelocytic leukaemia-nuclear bodies (PML-NBs) に局在し、DNA 損傷

によってユビキチン化され分解された。2) RASSF1C は Daxx と結合し、PML-NBs に共局在していた。3) RASSF1C は Daxx 分解に依存して、核から細胞質に移行した。4) 核から放出された RASSF1C は細胞質の微小管と結合し、SAPK/JNK 活性化誘導やアポトーシス誘導に関与した。すなわち、核内 PML-NBs に存在する Daxx-RASSF1C 複合体が DNA 損傷のセンサーとして機能し、RASSF1C の細胞質への放出を介して、SAPK/JNK 活性化誘導するという興味深い分子機構を見出した。本研究結果は、細胞死の誘導に関与する SAPK/JNK の持続的な活性化機構の一端を担う可能性がある。

MST1によるカススペース非依存的核凝集誘導には JNK が必須である

浦 誠司 (東京医科歯科大学難治疾患研究所)

細胞の自殺であるアポトーシスは、個体の発生や恒常性の維持に必要な不可欠なメカニズムである。アポトーシスが誘導された細胞では、カススペースと呼ばれる一群のプロテアーゼが活性化され、このカススペースが様々な基質を切断することにより核凝集や DNA の断片化などの現象を引き起こす。MST1 はカススペースによって切断され活性化されるストレス応答 MAPK シグナル伝達経路の MAPKKKK である。我々は、MST1 の活性化が核凝集

などの様々なアポトーシスに特徴的な変化を誘導することから、MST1 がカススペースのエフェクターとして機能することを明らかにしてきた。さらに、JNK ストレス応答 MAPK シグナル伝達経路における MAPKK である MKK4/7 を欠損した ES 細胞を用いて、MST1 による核凝集において JNK の活性化が必須であること、また、JNK の活性が核凝集を誘導するために十分であることを明らかにした。

(12) ASK ファミリーによるストレス応答と細胞死制御

一條 秀憲 (東京大学・大学院薬学系研究科・細胞情報学教室, CREST)

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

ASK1 がアルツハイマー病において認められる神経細胞死のメディエーターとしてこれらの疾患に関わっていることも示唆されている。一方、ASK1 は皮膚損傷ストレスに応答して炎症性サイトカインの産生ならびにマクロファージの遊走・活性化を伴う発毛促進に必要なことも明らかになってきた。本研究では、活性酸素 (ROS) による ASK1 の活性制御機構について紹介するとともに、ASK ファミリー経路を介する炎症と発毛の関連性なら

びに筋萎縮性側索硬化症における小胞体ストレスと

ASK1 の病態生理学的役割について報告する。

(13) NF- κ B による細胞死抑制のメカニズム

中野 裕康 (順天堂大学医学部 免疫学)

NF- κ B の活性化の障害された細胞では、活性酸素 (ROS) の蓄積が生じ、遷延化する c-Jun N-terminal kinase (JNK) の活性化が誘導されることを、我々はこれまでに明らかにしてきたが、その分子メカニズムの詳細は不明であった。今回、我々は NF- κ B 欠損細胞では、アポトーシス抑制タンパクである c-FLIP_L が TNF α 刺激により速やかに分解されることを見いだした。逆に c-FLIP_L を発現させることにより、NF- κ B 欠損細胞で生じる ROS 産生や JNK の活性化が抑制されることが明らかとなった。興味深いことに c-Flip^{-/-}マウス由来の細胞では、NF- κ B の活性化に障害が認められないにもかかわらず、カスパー

ゼ依存性および非依存性の JNK の活性化および ROS の蓄積が誘導されることが明らかとなった。さらに c-FLIP_L によるカスパーゼ非依存性の JNK の抑制のメカニズムを検討したところ、c-FLIP_L が TNF α 依存性に MKK7 と直接会合し、MEKK1, ASK1 および TAK1 と MKK7 との会合をブロックすることで、JNK 経路の活性化を抑制していることが明らかとなった。以上より c-FLIP_L はカスパーゼ依存性および非依存性に誘導される JNK の活性化および ROS 産生を抑制することが初めて明らかとなった。

(14) オートファジーによる飢餓適応と細胞内品質管理

水島 昇 (東京医科歯科大学大学院 歯歯学総合研究科, 科学技術振興機構・SORST)

オートファジーはリソソームを分解の場とする、細胞質成分の非特異的な分解システムである。私達は、全身のオートファゴソームが蛍光標識されるモデルマウスを作製し、オートファジーの活性は通常は低いものの、絶食時の成体マウスや出生直後の新生児の全身で顕著に誘導されることを示した。新生児は経胎盤栄養の突然の遮断による生理的な飢餓状態ある。そこでオートファジー不能マウス (Atg5 欠損マウス) を作製したところ、このマウスは出生直後に深刻な栄養不良に陥ることが明らかとなった。すなわち、オートファジーは、栄養飢餓時に細胞が自身の一部を分解し栄養素であるアミノ酸を内因的に供給するための重要な生理的機構であると考えられた。

一方で、Atg5 ノックアウトマウスは神経や肝細胞内に

ユビキチン陽性のタンパク質凝集体が蓄積していることも観察された。これは胎生期の低いレベルのオートファジーも、細胞内タンパク質の品質管理として重要な働きをしていることを示している。さらに神経特異的 Atg5 ノックアウトマウスを作製したところ、このマウスは 4 週目頃より神経変性疾患様の運動機能異常を呈するようになり、広範囲の神経細胞内にユビキチン陽性封入体が観察された。この封入体形成は、オートファジーによる細胞質全体のタンパク質代謝回転不全の結果であると考えられた。以上のことから、誘導されるオートファジーは飢餓適応として、基底レベルの恒常的オートファジーは細胞内品質管理機構としてそれぞれ異なった生理的重要性をもつものと理解される。

(15) ユビキチンファミリーによる生体機能制御

千葉 智樹 (筑波大学大学院・生命環境科学研究科)

選択的なタンパク質分解は生体の積極的なプロセスであり、細胞周期進行、シグナル伝達、転写制御、細胞死などあらゆる生命現象に重要な役割を果たしている。この選択的タンパク質分解はユビキチンが分解される基質に共有結合することによって制御されている。サイトゾルタンパク質や核タンパク質がユビキチン化されるとプロテアソームが分解し、膜タンパク質がユビキチン化されるとリソソームが分解する。また真核生物では細胞質

成分をリソソーム系へと輸送し分解するオートファジー経路も存在し、プロテアソームとリソソームは協調的に細胞内浄化システムとして機能している。本セミナーではユビキチン系、プロテアソーム系、オートファジー系のノックアウトマウス解析などから明らかとなってきたタンパク質分解の素過程および制御機構について紹介し、「タンパク質分解機構の破綻による細胞死」と「タンパク質分解による細胞死」について討議した。

(16) ミトコンドリアユビキチンリガーゼの機能

柳 茂 (東京薬科大学 生命科学部 分子生命科学科 分子生化学研究室)

私たちはこれまで神経回路網形成過程の分子メカニズムについて解析を行ってきた。とくに神経突起の崩壊と消失において活性酸素がセカンドメッセンジャーとして用いられていることを見いだした。この活性酸素によりダメージを受けたミトコンドリアがユビキチン化を受けて細胞内から細胞外へと排除される興味深い現象を観察した。このようにミトコンドリアにユビキチン化を引き起こすユビキチンリガーゼを同定しようと試みた結果、新規膜型ミトコンドリアユビキチンリガーゼ MITOL の同定に成功した (Yonashiro *et al.* EMBO J. 2006)。MITOL はミトコンドリア外膜に特異的に局在し、膜 4 回貫通するというユニークな構造をもつ。今回、HeLa 細胞を用い

て MITOL を RNAi 法により蛋白発現を抑制すると、ミトコンドリアの断片化が観察されたので、ミトコンドリア分裂因子 (Drp1, Fis1) との関連を解析した結果、MITOL がミトコンドリア分裂因子を基質にしてミトコンドリアダイナミクスを調節していることを明らかにした。しかしながら予備的な実験結果より、MITOL はミトコンドリア分裂因子の制御機構にとどまらず、ミトコンドリアタンパク質の品質管理機構や免疫応答機構など様々な役割をしている可能性が示唆された。本シンポジウムでは MITOL に関する予備的な実験結果を交えて細胞死との関連性について報告する。

(17) 疾患と非アポトーシス型細胞死

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

種々の細胞株において低酸素・低グルコースにより誘導される細胞死はカススペース非依存的であることを見出し、この細胞死の分子機構を解析するために、この細胞死に付随してみられる核収縮に注目し、核収縮に関わる因子として、 Ca^{2+} 非依存的 phospholipase A2 (iPLA2 β) を同定した。ついで、iPLA2 β の病理的役割と生理機能を明

らかにする目的で iPLA2 β 欠損マウスを作成し解析した。その結果、iPLA2 β 欠損マウスは 1 年半頃から運動異常が顕著になり、病理学的には中枢神経系 (脳と脊髄) に軸索・シナプスの変性を伴う神経異常を呈することが判明し、iPLA2 β が神経細胞の維持、特に軸索・シナプスの維持に必須であることが明らかになった。最近、ヒ

トの遺伝性神経変性疾患である Infantile neuroaxonal dystrophy (INAD) や Neurodegeneration with brain ion accumulation (NBIA) において, iPLA2 β のヒトホモログ遺伝子に変異があることが明らかになり, これら疾患も

公汎な軸索変性を特徴とすることから, 我々の iPLA2 β 欠損マウスはこれらヒト疾患の良いモデル動物になっていることが明らかになった。

(18) ネクロシス死誘導におけるアニオンチャネルの役割

岡田 泰伸, 井上 華, 鍋倉 隆, 王 海燕, 清水 貴浩, 沼田 朋大 (生理学研究所機能機関部門)

今回, ネクロシス死誘導におけるネクロシス性容積増加 (NVI) と, それにおけるアニオンチャネルの関与について検討した。乳酸アシドーシス時におけるグリア細胞のネクロシス死は, 乳酸とプロトンと Na^+ と Cl^- の細胞内流入による NVI 発生と, 細胞内プロトン蓄積による容積調節性アニオンチャネル VSOR の抑制による NVI の持続によることが明らかとなった。細胞外強酸性条件下では上皮細胞に新たなアニオンチャネル ASOR が

活性化し, これを介する Cl^- 流入による NVI がネクロシス死をもたらすことを明らかにした。更には, 過興奮毒性下における大脳皮質ニューロンにおける NVI や varicosity 形成に関与する Cl^- 流入には, VSOR がその通路を与えることを明らかにした。いずれも NVI や varicosity 形成を阻止するとネクロシス死は救済されたことから, NVI やそれに関与するアニオンチャネルが極めて重要な役割を果たすことが結論された。

5. 上皮膜輸送活性化因子を探して：宿主防御バリアーの最前線

2006年12月12日－12月13日

代表・世話人：中張隆司（大阪医科大学 生理学）

所内対応者：岡田泰伸（自然科学研究機構 生理学研究所 機能協関部門）

- (1) 病原細菌定着因子及び毒素の菌体内輸送システムに関する顕微鏡による解析
呉 紅, 中野隆史, 佐野浩一（大阪医科大学・予防社会医学）
- (2) 嚢胞性線維症原因遺伝子 CFTR の成熟化・分解における MAPK の関与
杉田 誠（広島大学大学院医歯薬学総合研究科・創生医科学専攻・病態探究医科学講座（口腔生理学））
- (3) 膵導管細胞の管腔膜を介する HCO_3^- 輸送
石黒 洋, 成瀬 達, 洪 繁, 近藤孝晴, 山本明子（名古屋大学大学院医学系研究科
健康栄養医学, 消化器内科学）
- (4) 小腸 Subepithelial Fibroblasts のメカノセンサー, バリアーとしての働き
古家喜四夫¹, 古家園子², 曾我部正博^{1,3,4}（¹ 科学技術振興機構・細胞力覚プロジェクト,
² 生理学研究所・脳機能計測センター, ³ 名古屋大学大学院・医学研究科,
⁴ 生理学研究所・細胞内代謝部門）
- (5) 有機フッ素化合物 Perfluorooctane sulfonate (PFOS) によるマウス気管線毛運動の活性化
松原絵里子, 小泉昭夫（京都大学大学院医学研究科環境衛生学）
- (6) 熱ショック転写因子による線毛運動の維持
高木栄一, 藤本充章, 御厨剛史, 林田直樹, 王倍倍, 井上幸江, 中張隆司¹, ○中井 彰
（山口大学大学院医学系研究科医化学分野, ¹ 大阪医科大学生理学教室）
- (7) ヒト胃癌細胞株における NKCC 阻害薬による増殖抑制メカニズムの解明
宮崎裕明¹, 塩崎敦¹, 新里直美¹, 中張隆司², 丸中良典¹
（京都府立医科大学大学院¹ 生理機能制御学² 大阪医科大学 生理学）
- (8) 消化器ガン細胞の膜極性維持に関与するポンプとチャネル
酒井秀紀¹, 渡辺智子², 藤井拓人¹, 高橋佑司¹, 森井孫俊¹, 堀川直樹², 竹口紀晃¹, 塚田一博²
（富山大学大学院医学薬学研究部¹ 薬物生理学, ² 第二外科）
- (9) 好中球の化学走化作用の際の NHE1 の役割
林 久由^{1,2}, Sergio Grinstein²（¹ 静岡県立大学・食品栄養科学部・生理学研究室,
² Program in Cell Biology, The Hospital for Sick Children, Toronto, Ontario, Canada）
- (10) 腎尿細管上皮における有機溶質トランスポーター輸送活性化因子の探索
安西尚彦¹, 金井好克¹, 遠藤 仁^{1,2}（¹ 杏林大学医学部薬理学教室, ² (株)富士バイオメディックス）
- (11) アラキドン酸による胃幽門線粘液細胞 Ca^{2+} 調節性開口放出の増強：
PPAR α を介した NO/cGMP 経路の活性化
中張隆司, 森 禎章, 窪田隆裕（大阪医科大学 生理学）
- (12) アラキドン酸 (ARA) 摂取による脳機能改善効果について
紺谷昌仙（サントリー株式会社 健康科学研究所）
- (13) ルテオリンによる細胞膜機能の修飾
西野輔翼（京都府立医科大学大学院 分子生化学）
- (14) Caco-2 細胞におけるフラボノイド代謝酵素の発現と基質特異性
室田佳恵子, 吉田修治, 寺尾純二（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部食品機能学分野）

【参加者名】

岡田 泰伸（生理学研究所 機能協関）、高橋 信之（生理学研究所 機能協関）、浦本 裕美（生理学研究所 機能協関）、井上 華（生理学研究所 機能協関）、Elbert Lan Lee（生理学研究所 機能協関）、Liu Hongtau（生理学研究所 機能協関）、沼田 朋大（生理学研究所 機能協関）、長谷川 裕一（生理学研究所 機能協関）、Abduqodir Toychiev（生理学研究所 機能協関）、佐藤 かお理（生理学研究所 機能協関）、小泉 昭夫（京都大学大学院医学研究科）、松原絵里子（京都大学大学院医学研究科）、丸中 良典（京都府立医科大学大学院生理機能制御学）、新里 直美（京都府立医科大学大学院生理機能制御学）、宮崎 裕明（京都府立医科大学大学院生理機能制御学）、中島 謙一（京都府立医科大学大学院生理機能制御学）、徳田 深作（京都府立医科大学大学院生理機能制御学）、西野 輔翼（京都府立医科大学大学院分子性化学）、杉

田 誠（広島大学大学院医歯薬学総合研究科）、成瀬 達（名古屋大学大学院医学系研究科）、石黒 洋（名古屋大学大学院医学系研究科）、柴田 浩志（サントリー株式会社健康科学研究所）、紺谷 昌仙（サントリー株式会社健康科学研究所）、中井 彰（山口大学医学部）、酒井 秀紀（富山大学大学院医学薬学研究部）、古家喜四夫（科学技術振興機構・細胞力覚プロジェクト）、室田佳恵子（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部）、鈴木 裕一（静岡県立大学）、林 久由（静岡県立大学）、遠藤 仁（杏林大学 医学部）、安西 尚彦（杏林大学 医学部）、呉 紅（大阪医科大学 医学部 微生物学教室）、窪田 隆裕（大阪医科大学 医学部 生理学教室）、森 禎章（大阪医科大学 医学部 生理学教室）、中張 隆 司（大阪医科大学 医学部 生理学教室）

【概要】

平成 18 年 12 月 12-13 日に研究会「上皮膜輸送活性化因子を探して：宿主防御バリアーの最前線」を開催した。最初のセッションで、H.pylori の菌体内輸送システム、CFTR の成熟化と分解の調節、膵臓導管の HCO_3^- 分泌が紹介された。第 2 のセッションでは、小腸絨毛の subepithelial fibroblast のメカノセンサー機能の ATP 調節、環境汚染物質であるフッ素化合物 PFOS が電位依存性 Ca^{2+} チャンネルからの Ca^{2+} 流入を増加させ線毛運動を活性化することが示され、線毛運動が環境汚染指標となる可能性が示唆された。また、熱ショック蛋白転写因子が β -tubuline の発現を介して線毛運動の調節に関わっていることも明らかにされた。第 3 のセッションでは、イオン輸送と細胞機能の関係が紹介された。腎臓尿細管の有機溶質トランスポーターとイオン輸送体がカップルしての発現し、物質輸送に関わっていること、イオン輸送体の発現が癌の悪性度と関わること、さらに細胞内イオン

が癌細胞の増殖、好中球の遊走に関わっていることが報告され、イオン輸送が様々な細胞機能の調節に関わっていることが示唆された。第 4 のセッションでは、アラキドン酸とフラボノイドの生理活性について紹介された。アラキドン酸の生理作用が多岐にわたること、同時に細胞レベルではアラキドン酸が $\text{PPAR}\alpha$ を刺激し cGMP の集積を起こすことが報告され、生理作用との関係が今後の課題として挙げられた。一方、フラボノイドは腸管で吸収、代謝（不活性化）されるが、その吸収、代謝の詳細（フラボノイド吸収における構造特異性があること等）が明らかにされた。さらに、フラボノイドのルテオリンは癌増殖を抑制する効果があることが明らかにされ、その結果が報告された。生理活性物質探索の重要性が新たに示された。生体防御の最前線に位置する上皮膜の機能とそれを制御する内因性、外因性生理活性物質についての有意義な議論がなされた。

(1) 病原細菌定着因子及び毒素の菌体内輸送システムに関する顕微科学的解析

呉 紅，中野隆史，佐野浩一（大阪医科大学・予防社会医学）

病原細菌が産生する定着因子や毒素は菌体内で産生された後、多くが特定の部位で機能を発揮し、また菌体外

に分泌される。このことから、病原因子にはこれら因子が細胞内で移動するための輸送システムが菌体内に存在

すると考えられる。このシステムを解析するのに免疫電子顕微鏡法が有用であるが、従来の方法では十分な像コントラストが得られなかった。そこでわれわれは胃粘膜疾患の病原微生物 *Helicobacter pylori* の輸送システムを明らかにするため、アルシアンブルーを用いた免疫電子顕微鏡コントラスト増強法を開発した。本法を用い、*H. pylori* の定着因子 urease と分泌毒素 CagA について詳細に解析し、共に菌体外 pH 依存的な菌体内ナノトランスポーターシステムが存在すること、さらに両者は膜

タンパク UreI 指向性の有無において異なるシステムであることを明らかにした。*H. pylori* の定着因子 urease や毒素 CagA などの病原因子の菌体内ナノトランスポーターシステムは、これら病原因子の活性調節機構のひとつであり、*H. pylori* 除菌のターゲットになりうる可能性をもつ。このように免疫電子顕微鏡法を応用し、さまざまな病原細菌の定着因子や毒素などの菌体内タンパク輸送システムを明らかにすることは、病原細菌がもつ様々な機能の解明に重要な役割を担っていると考えた。

(2) 嚢胞性線維症原因遺伝子 CFTR の成熟化・分解における MAPK の関与

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

粘膜上皮細胞の腺腔側膜 Cl⁻チャネルとして働く CFTR の遺伝的機能不全症 (嚢胞性線維症) は、全身性外分泌腺機能障害・呼吸器感染を誘発する致死率の高い疾患である。CFTR が ER で翻訳された後に、いかにして成熟型の機能的コンフォメーションをとり腺腔側形質膜へ輸送されるか、またいかにして異常なコンフォメーションをとった CFTR が分解されるか、その分子機構には不明な点が多い。本研究では、成熟型 CFTR の生成を制御する分子機構を解明するために、上皮系培養細胞に GFP-CFTR およびその変異体を遺伝子導入し、発現さ

せ、細胞内情報伝達系阻害剤の投与時や目的遺伝子導入時における、成熟型 CFTR の生成量変化および形質膜移行動態を観察した。嚢胞性線維症の治療薬として用いられる butyrate 誘導体の培養液への添加は、培養細胞での成熟型 GFP-CFTR の生成と GFP-CFTR の形質膜移行を顕著に促進したが、R ドメインを欠損する CFTR (GFP-ΔR-CFTR) においては、その効果は微弱であった。Butyrate は CFTR の R ドメインを介して、成熟型 CFTR の生成および形質膜移行を促進し、その促進には ERK/MAPK の活性化が関与することが示唆された。

(3) 膵導管細胞の管腔膜を介する HCO₃⁻ 輸送

石黒 洋, 成瀬 達, 洪 繁, 近藤孝晴, 山本明子

(名古屋大学大学院医学系研究科 健康栄養医学 消化器内科学)

膵臓の導管系は、高濃度 (ヒトでは 140 mM に達する) の HCO₃⁻を含む等張液を分泌する。管腔膜を介する HCO₃⁻分泌の機構としては、CFTR による輸送 (CFTR の HCO₃⁻ conductance) と、SLC26 family 輸送体による Cl⁻-HCO₃⁻ exchange が候補であり、管腔内 (膵液中) の anion 組成と膜電位によって寄与率が変化すると考えられる。モルモットの単離小葉間膵管の管腔内に、BCECF-dextran あるいは ABQ-dextran を注入して、管腔容積とともに管腔内の pH あるいは Cl⁻濃度を測定した。

表層、管腔内とも HCO₃⁻-free, 150 mM Cl⁻の条件で測定を開始した。表層灌流液を 25 mM HCO₃⁻-5% CO₂-125 mM Cl⁻溶液に切り替えると、溶液の基礎分泌が見られ、管腔内 pH は一時的に低下 (CO₂の流入による) した後上昇、管腔内 Cl⁻濃度は急速に低下し 2 分後に約 90 mM となった。net の Cl⁻輸送を算出すると、この 2 分間に Cl⁻の吸収が起こっている事がわかり、管腔膜の Cl⁻-HCO₃⁻ exchange によると考えられた。現在、Slc26a6 ノックアウトマウスを用いて検討中である。

(4) 小腸 Subepithelial Fibroblasts のメカノセンサー, バリアーとしての働き

古家喜四夫¹, 古家園子², 曾我部正博^{1,3,4} (¹ 科学技術振興機構・細胞力覚プロジェクト,
² 生理学研究所・脳機能計測センター, ³ 名古屋大学大学院・医学研究科,
⁴ 生理学研究所・細胞内代謝部門)

小腸絨毛の Subepithelial Fibroblasts は, 上皮基底層直下でネットワークを形成し絨毛固有層を覆っており, その細胞突起は上皮, 平滑筋, 血管, 神経ともコンタクトし, エンドセリン, ATP, Sub-P など多様な受容体を持ち, 小腸絨毛のいろいろな機能を制御する細胞と考えられている。その1つの働きはバリアー機能で, 増殖因子をはじめ各種の細胞間パラクラインメディエーターを放出することにより上皮細胞を制御するとともに, この細胞自身が cAMP 濃度に応じて形を扁平状と星状の間で変化させ免疫細胞等の透過性を制御していると考えられる。2 つ目は絨毛の機械的性質の制御機能で, この細胞

が持つ平滑筋様の収縮性 (そのため Myofibroblasts とも呼ばれている) と, 細胞の形の変化に伴う機械的性質の変化によって絨毛全体の動きをダイナミカルに制御していると考えられる。3 つ目はメカノセンサー機能で, 腸の内容物が絨毛を押すなどの機械刺激によってこの細胞が反応し ATP を放出することにより周りの細胞及び神経系に情報を伝えていると考えられる。このように Subepithelial Fibroblasts は従来考えられてきた腸上皮の傷の治癒といった病的な場合だけではなく, 正常な状態の生理機能に関与していることが分かってきた。

(5) 有機フッ素化合物 Perfluorooctane sulfonate (PFOS) によるマウス気管線毛運動の活性化

松原絵里子, 小泉昭夫 (京都大学大学院医学研究科環境衛生学)

PFOS の環境衛生に対する効果については未だはっきりしていない。本研究では, マウス気管スライス標本を用い線毛運動を高速カメラを用い観察し, 線毛運動周波数 (CBF) を測定した。非刺激時の CBF は 15-20Hz であった。PFOS (100 μ M) は CBF を約 10% 増加させた。この反応は PFOS 濃度に依存しており, 細胞外の Ca^{2+} を取り除くことにより抑制された。PFOS による CBF の上昇は, nifedipine (30 μ M) により完全に消失したが, Gd^{3+} (1 μ M), Ni^{2+} (1 mM) では消失しなかった。また, 細胞外の K^{+} 濃度の上昇 (50 mM [K^{+}]_o) によっても CBF が活性

化され, この CBF の活性化は, nifedipine (30 μ M) により消失した。PFOS は細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を引き起こしていた。また, PFOS は $\text{PPAR}\alpha$ のリガンドとして知られているが, $\text{PPAR}\alpha$ K/O マウスにおいても CBF 上昇を引き起こした。これらの結果から, PFOS は nifedipine-sensitive voltage activated Ca^{2+} permeable channels を活性化することにより CBF を上昇させていた。

今回の結果は, 気管 CBF が PFOS の毒性評価の一つの指標となる可能性を示唆している。

(6) 熱ショック転写因子による線毛運動の維持

高木栄一, 藤本充章, 御厨剛史, 林田直樹, 王倍倍, 井上幸江, 中張隆司¹, 中井 彰
 (山口大学大学院医学系研究科医化学分野, ¹ 大阪医科大学生理学教室)

熱ショック応答は, すべての生物に存在する普遍的な生体防御機構であり, 一群の熱ショック蛋白質 (Hsp) の

発現を特徴とする。この応答を制御するのが熱ショック転写因子 (HSF) である。HSF 遺伝子群は個体発生過程

においても生殖臓器や脳形成に重要で、さらにプラコードに由来する感覚器の維持にも必須の役割を担うことが分かっている。しかしながら、Hspの制御の異常がどのクライアント蛋白質 (Hspの介助に必要な蛋白質のこと) の質的な、あるいは量的な異常を導くかは明らかにされていない。

今回、我々は線毛運動を有する組織 (鼻腔および気管の呼吸上皮、脳室上皮、卵管上皮) において線毛の鞭打ち運動を観察した。その結果、HSF1欠損マウスの組織では野生型に比べ線毛振幅頻度 (CBF) が小さいことが

分かった。これらの組織において HSF1 の標的遺伝子である Hsp 蛋白質群の発現を調べた。その結果、野生型マウスの線毛において Hsp90 の発現がきわめて高く、逆に HSF1 欠損マウスの線毛の Hsp90 の発現が著明に低下していた。さらに、線毛に特異的に発現し、線毛運動に関わる b チュブリン IV 型が HSF1 欠損マウスにおいて顕著に減少していることを見いだした。線毛運動による粘液線毛クリアランス機能は外的異物に対する最初のバリアーであり、その維持に熱ショック転写因子が必須の役割を演じていることが明らかとなった。

(7) ヒト胃癌細胞株における NKCC 阻害薬による増殖抑制メカニズムの解明

宮崎裕明¹, 塩崎 敦¹, 新里直美¹, 中張隆司², 丸中良典¹

(京都府立医科大学大学院¹ 生理機能制御学, ²大阪医科大学 生理学)

近年 Cl⁻ 輸送体発現調節を介した細胞増殖制御が報告されているが、メカニズムは不明のままである。本研究において、ヒト胃癌細胞株 (MKN28, MKN45) における、Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter (NKCC) の発現レベルと NKCC 阻害薬による細胞増殖に与える影響を明らかにし、Cl⁻ 輸送体による細胞増殖調節メカニズムの解明を試みた。Real-time PCR により NKCC mRNA 発現レベルを測定したところ、MKN45 (低分化型) の NKCC mRNA レベルは、MKN28 (中分化型) よりも高かった。NKCC 阻害剤感受性容積減少率により測定した NKCC 機能活性は、MKN45 でより高かった。NKCC 阻害薬は、NKCC 機能活性の高い MKN45 においてのみ、G₀/G₁ 期遅延による増

殖抑制効果を示した。NKCC の機能阻害により細胞内 Cl⁻ 濃度低下を介した細胞増殖抑制が想定されることから、低 Cl⁻ 濃度培地により MKN 細胞を培養したところ、G₀/G₁ 期遅延による増殖抑制効果を示した。また、G₀/G₁ 期から S 期への進行を促進する cyclin E/CDK2 および cyclin D/CDK4・6 の機能を阻害する p21 タンパクの解析を行ったところ、低 Cl⁻ 濃度培地で培養した細胞において、p21 タンパクの発現量が有意に上昇していた。本研究により、Cl⁻ 輸送体を介した細胞内 Cl⁻ 濃度の制御が細胞増殖をコントロールしている可能性が強く示唆された。

(8) 消化器ガン細胞の膜極性維持に関与するポンプとチャネル

酒井秀紀¹, 渡辺智子², 藤井拓人¹, 高橋佑司¹, 森井孫俊¹, 堀川直樹², 竹口紀晃¹, 塚田一博²

(富山大学大学院医学薬学研究部¹ 薬物生理学, ²第二外科)

消化管などのすべての正常上皮細胞には Na⁺,K⁺-ATPase α1 アイソフォームが存在し高度に極性を維持しているが、腎臓ガンや前立腺ガン細胞においてはα1 アイソフォームの発現量が減少し、低分化で細胞膜極性が崩れた状態になることが報告されている。我々は、ヒト大腸ガン (中・高分化型) 組織においてα1 アイソフォームの発現

量が減少する一方で、神経系特異的なα3 アイソフォームの発現量が顕著に上昇することを見出した。大腸ガン細胞の膜極性維持には Na⁺,K⁺-ATPase の発現パターンの変化が関与しているものと考えられる。

また胃上部・中部領域の胃ガン (中・高分化型) 組織において、正常粘膜では発現しない水チャネル AQP5 が、

高発現していることを見出した。低分化型・未分化ガン組織では発現増加が認められなかった。AQP5 は、ガン細胞が形成する腺管内腔 apical 側に発現していた。胃低分化型腺ガン組織由来の細胞株である MKN45 に、ヒト

AQP5 を発現させると細胞の分化の促進が観察された。AQP5 は胃ガン細胞の極性維持に密接に関与しているものと考えられる。

(9) 好中球の化学走化作用の際の NHE1 の役割

林 久由^{1,2}, Sergio Grinstein² (静岡県立大学・食品栄養科学部・生理学研究室,
²Program in Cell Biology, The Hospital for Sick Children, Toronto, Ontario, Canada)

細胞の遊走には多くの因子が関与していることが考えられているが、Na⁺/H⁺ 交換輸送体 (NHE1) が重要な役割をしていることが考えられている。このため、単離したヒト好中球を用いて、化学遊走の際の細胞内 pH 変化を pH 感受性色素で測定した。また化学走化作用はタイムラプス顕微鏡を用いて画像を同時に取得し、画像解析ソフトで解析した。化学遊走物質である fMLP により、好中球の NHE1 は活性化されたが、細胞外液の Na⁺除去また

は NHE1 の特異的抑制剤では化学遊走は抑制されなかった。NADPH オキシダーゼ活性化とアクチン細胞骨格の再構築のため細胞内は酸性化され、その結果として NHE1 は活性化されたと考えられた。好中球の化学走化作用は細胞内の著しい酸性化並びに細胞外の酸性化で抑制された。これらのことより好中球の化学走化作用には NHE1 は必要ではなく、生理的な細胞内外の pH が重要であることが示唆された。

(10) 腎尿細管上皮における有機溶質トランスポーター輸送活性化因子の探索

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

腎尿細管上皮細胞に存在する有機溶質トランスポーターは、薬物や毒素などの生体異物の解毒・排泄に関与するだけでなく、ラジカルスカベンジャー作用を持つ尿酸や生体必須物質である糖、アミノ酸などの内因性物質の再吸収等を介して生体の防御に重要な役割を果たしている。我々が 2002 年に分子同定した腎臓の尿酸/アニオン交換輸送体 URAT1 は、乳酸やニコチン酸など細胞内アニオンであるモノカルボン酸の外向きの濃度勾配を利用して、糸球体ろ液中の尿酸を細胞内に取り込む。モノカルボン酸は腎尿細管細胞頂上膜(管腔側)に存在する Na⁺-アニオン共輸送体である SMCT1/2 により再吸収され、外向き濃度勾配が形成される。すなわち SMCTs を介した細胞内のモノカルボン酸蓄積が腎尿酸輸送の活性化因子となる。この SMCTs はその細胞内 C 末端に PDZ モチー

フを持つことから、前回の本研究会で発表した尿酸トランスポーター URAT1 と同様の PDZ タンパク質と結合する可能性がある。今回酵母 Two-hybrid 法により SMCT1 に結合する 2 つの PDZ タンパク質の同定に成功した。また最近腎近位尿細管及び小腸での中性アミノ酸吸収が障害される常染色体劣性の遺伝性疾患 Hartnup 病の原因遺伝子として同定された B⁰ 型アミノ酸トランスポーター B⁰AT1(SLC6A19)が、その細胞内 C 末端を介してダイニンモータータンパク質軽鎖の Tctex1 と結合することを、酵母 Two-hybrid 法にて明らかにした。Tctex1 siRNA 処理により、B⁰AT1 の頂上膜移行が抑制されることから、Tctex1 が B⁰AT1 の細胞膜移行を介してその輸送活性を制御する因子となる可能性が示唆された。

(11) アラキドン酸の胃幽門線粘液細胞 Ca^{2+} 調節性開口放出の増強: PPAR α を介した NO/cGMP 経路の活性化

中張隆司, 森 禎章, 窪田隆裕 (大阪医科大学 生理学)

アラキドン酸 (AA, 10 nM – 2 μM) は胃幽門線粘液細胞の Ca^{2+} 調節性開口放出を増強する。この AA による増強は peroxisome proliferation activation receptor α (PPAR α) の阻害剤 (MK886) により消失することを見出した。さらに AA の効果は PPAR α 刺激薬 (Eicosatetraynoic acid (ETYA), WY14643), 8BrGMP により再現され, AA と PPAR α 刺激薬による Ca^{2+} 調節性開口放出の増強は PKG 阻害薬 (Rp8BrPET-cGMPS), L-NAME により消失した。また, NO donor (NOC12) は AA と PPAR α 刺激薬の効果

を再現した。また, アセチルコリン(ACh) 刺激により活性化した胃幽門線粘液細胞の開口放出は, MK886, Rp8BrPET-cGMPS, L-NAME より 2/3 に抑制された。AA と PPAR α 刺激薬は $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の動員には影響を及ぼさなかった。また, 胃幽門粘膜では, AA と PPAR α 刺激薬は cGMP の集積を引き起こした。胃幽門線粘液細胞からの粘液分泌には AA/ PPAR α /NO/cGMP のカスケードが重要な役割を果たしていることが示された。

(12) アラキドン酸 (ARA) 摂取による脳機能改善効果について

紺谷昌仙 (サントリー株式会社 健康科学研究所)

アラキドン酸 (以下 ARA) はドコサヘキサエン酸 (以下 DHA) と同様, 必須脂肪酸のひとつとして知られている。身体の中で作り出す量が限られているため, 必ず食事から肉, 卵, 魚などの食材を摂取することによって, 身体の中に摂り入れる必要のある栄養成分のひとつである。この ARA は身体のなかの細胞の膜部分を構成し, 身体中のいたる組織に存在している。実はその ARA や DHA の量は組織によって大きく異なり, 中でも脳に豊富に含まれることが知られているが, 興味深いことに脳(海馬)に含まれる ARA, DHA 量は加齢とともに減少すること, そしてアルツハイマー病患者では特にその減少が顕著であることが報告されており, このことから ARA は生体にとって必要不可欠な成分であることが容易に推

察される。

一方で演者らは, この ARA を老齢動物 (ラット) に摂取させることによって, 脳内の ARA の量が若齢動物 (ラット) と同程度に維持・回復できること, そして老化に伴う脳機能の低下 (海馬 LTP 増強, 記憶・学習能力など) が改善されることを明らかにした。

またヒトでの臨床評価では, 60 歳以上の健康高齢者が ARA を摂取することによって認知能力 (情報処理能力, 集中力) が改善されること, また, もの忘れを訴える 60 歳以上の健康高齢者が ARA と DHA を含有する油脂を併用摂取することによって記憶力 (即時記憶) と集中力が改善することも明らかにした。

(13) ルテオリンによる細胞膜機能の修飾

西野輔翼 (京都府立医科大学大学院 分子生化学)

天然フラボノイドの一種であるルテオリンは変異原性を持たないフラボノイドとして知られており, 予防医学の分野での有用性が高く, 実用化へ向けた多面的な研究

が進められている。その結果, 抗酸化作用が強いことや, 発がんプロモーションを抑制することなどがすでに明らかにされている。最近になってがん細胞増殖効果が明ら

かとなったが、その作用機序に細胞膜機能の修飾が重要な役割を果たしていることを見出したので報告する。

(14) Caco-2細胞におけるフラボノイド代謝酵素の発現と基質特異性

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

フラボノイドは植物性食品に含まれる機能性成分であり, 代表的なフラボノイドとしては, 多くの野菜や飲料に含まれるケルセチンや, 大豆食品中に含まれるイソフラボン類などがある。フラボノイドは吸収後, ほとんどが小腸粘膜および肝臓で第二相解毒酵素により代謝された抱合体として生体内に存在している。我々はこれまでにヒト小腸吸収モデルとして汎用されている Caco-2 細胞を用いて, 構造の異なるフラボノイドの吸収代謝について比較してきた。本研究では, Caco-2 細胞に発現するフラボノイド代謝に関わる第二相解毒酵素群について活性測定および発現解析を行った。

Caco-2 細胞ホモジネートのフラボノイドに対する抱合

活性を測定したところ, グルクロン酸転移酵素 UGT 活性は非常に低く検出限界以下であったが, 硫酸転移酵素 SULT 活性はケルセチン, アピゲニンに対して高く, ゲニステインに対しては低いことが示された。Caco-2 細胞における UGT と SULT のタンパク質発現量は, 見かけの活性と同様に SULT で高かった。

以上の結果より, Caco-2 細胞において, フラボノイドは主に SULT の作用により硫酸抱合体となることが示唆された。さらに, ゲニステインなど B 環が 3 位に結合するイソフラボンは, SULT の基質になりにくくその他のフラボノイドに比較して Caco-2 細胞内で代謝されにくいことが示唆された。

6. イオンチャネル・トランスポーターと心血管機能：最近の知見と今後の展開

2006年12月19日－12月20日

代表・世話人：亀山 正樹（鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・神経筋情報生理学）

所内対応者：岡田 泰伸（自然科学研究機構・生理学研究所）

（1）L型 Ca^{2+} チャネルの Ca^{2+} 依存性 facilitation と不活性化の分子機構

養部 悦子¹⁾, 韓 冬雲^{1,2)}, Zahangir A. Saud¹⁾, 王 午陽¹⁾, はお 麗英²⁾, 亀山 正樹¹⁾
(鹿児島大院・医歯総合・神経筋情報生理学¹⁾, 中国医大・薬理²⁾)

（2）心室筋 α_1 アドレナリン受容体刺激による L 型 Ca^{2+} チャネルの細胞内制御機構

大内 仁¹⁾, 佐々木 博之²⁾, 栗原 敏¹⁾
(慈恵医大・医・第二生理¹⁾, 同総合医科学研究センター²⁾)

（3）L 型 Ca^{2+} チャネル $\text{Ca}_v1.2$ および $\text{Ca}_v1.3$ のゲーティング制御機構

中瀬古（泉）寛子, 水流 弘通, 赤羽 悟美
(東邦大・医・薬理学)

（4）低分子量 G 蛋白質 Rad による心筋 L 型 Ca^{2+} チャネル調節機構

村田 光繁, 矢田 浩崇, 湯浅 慎介, 牧野 伸司, 佐野 元昭, 福田 恵一
(慶應義塾大・医・再生医学)

（5）電気生理学的手法を用いた 3 種の β アドレナリン受容体と 3 量体 G たんぱく質の共役能の解析

稲生 大輔^{1,2)}, 稲野辺 厚²⁾, 倉智 嘉久²⁾
(東京大・医科研ヒトゲノム解析センター¹⁾, 大阪大院・医・薬理²⁾)

（6）アルドステロン の I_f チャネル発現に対する影響

武藤 貴雄¹⁾, 安井 健二¹⁾, 大草 知子³⁾, 原田京子¹⁾, 山内 正樹²⁾, 児玉 逸雄²⁾
(名古屋大・環境医学研・生体情報計測・解析（スズケン）寄附部門¹⁾,
同・心血管分野²⁾, 山口大学大学院医学研究科³⁾)

特別講演（1）心筋リモデリングとイオンチャネル発現制御

桑原 宏一郎
(京都大学大学院・医学研究科・内分泌・代謝内科学)

特別講演（2）心筋再生研究の現状と展望

福田 恵一
(慶應義塾大学・医学部・再生医学)

（7）内向き整流 K^+ チャネルの異なるサブファミリー Kir2 - Kir3 間のヘテロ多量体形成の解析

石原 圭子¹⁾, 山本 友美²⁾, 久保 義弘²⁾
(佐賀大・医・生体構造機能・器官細胞生理¹⁾, 生理研・神経機能素子²⁾)

（8）内向き整流性の変調による催不整脈作用

古川 哲史, 谷 義則, 三浦 大志, 黒川 洵子, 中村 一文, 大江 透
(東京医科歯科大・難治疾患研・生体情報薬理)

（9）不整脈を引き起こす心筋型 KCNQ チャネル変異体の機能解析

中村 友紀, 上原 明, 井上 隆司
(福岡大・医・生理学)

(10) Kv1.5 電流におよぼす lipoxygenase 阻害薬と phosphatidylinositol 3-kinase 阻害薬の抑制作用

丁 維光¹⁾, 公 英子^{1,2)}, Wu Jie^{1,2)}, 堀江 稔²⁾, 松浦 博¹⁾
(滋賀大・医・細胞機能生理学¹⁾, 同呼吸循環器内科²⁾)

(11) 新規 Na⁺/Ca²⁺交換体阻害薬 YM-244769 の作用特性

喜多 紗斗美, 岩本 隆宏
(福岡大・医・薬理学)

(12) マウス大動脈平滑筋細胞における Na⁺/Ca²⁺交換反応の電気生理学的機能について

村田 秀道¹⁾, 堀田 真吾¹⁾, 山村 寿男¹⁾, 大矢 進¹⁾, 岩本 隆宏²⁾, 今泉 祐治¹⁾
(名古屋市立大学大学院薬学研究科 細胞分子薬効解析学分野¹⁾,
福岡大学医学部薬理学教室²⁾)

(13) 心筋ミトコンドリア Na⁺/Ca²⁺交換 (mitNCX) の機能

金 鳳柱, 松岡 達
(京都大院・医・細胞機能制御学)

【参加者名】

亀山 正樹 (鹿児島大院・医), 岡田 泰伸 (生理研),
木村 純子 (福島県医大・医), 坂本 多穂 (福島県医
大・医), 鷹野 誠 (自医大), 福田 恵一 (慶應義塾大・
医), 村田 光繁 (慶應義塾大・医), 大内 仁 (東京慈
恵会医大・医), 赤羽 悟美 (東邦大・医), 中瀬古 寛
子 (東邦大・医), 古川 哲史 (東京医歯科大・難治研),
渡辺 泰秀 (浜松医大・医), 高橋 信之 (生理研),
浦本 裕美 (生理研), Elbert Lan Lee (生理研), 沼田 朋
大 (生理研), Liu Hongtao (生理研), Abduqodir Toychiev
(生理研), 佐藤 かお理 (生理研), 長谷川 裕一 (生
理研), 今泉 祐治 (名古屋市大院・薬), 大矢 進 (名
古屋市大院・薬), 山村 寿男 (名古屋市大院・薬), 堀
田 真吾 (名古屋市大院・薬), 村田 秀道 (名古屋

市大院・薬), 大野 晃稔 (名古屋市大院・薬), 岩浪 真
(名古屋市大院・薬), 井戸田 晴奈 (名古屋市大院・薬),
堀 優子 (名古屋市大院・薬), 船橋 賢司 (名古屋市
大院・薬), 安井 健二 (名古屋大院・医), 武藤 貴雄
(名古屋大院・医), 松浦 博 (滋賀医大), 丁 維光 (滋
賀医大), 豊田 太 (滋賀医大), 竹内 綾子 (京都大院・
医), 金 鳳柱 (京都大院・医), 桑原 宏一郎 (京都大
院・医), 倉智 嘉久 (大阪大院・医), 稲生 大輔 (大
阪大院・医), 上原 明 (福岡大・医), 中村 友紀 (福
岡大・医), 岩本 隆宏 (福岡大・医), 喜多 紗斗美 (福
岡大・医), 石原 圭子 (佐賀大・医), 養部 悦子 (鹿
児島大院・医)

【概要】

心血管系の細胞膜に存在するイオンチャネルやトラ
ンスポーターは、電気的興奮や細胞内へのシグナル伝達
など重要な役割を持ち、種々の心血管機能に関わって
いる。近年、多くのイオンチャネルやトランスポーターの
遺伝子が単離・同定され、それらの遺伝子の変異に起因
するイオンチャネル病の存在が明らかにされている。さ
らに、遺伝子変異による産生蛋白の構造異常とそれによ
り招来された機能異常との関連についても解析が進ん
で来た。しかし、チャネルやトランスポーターの遺伝子

発現が生理的および病態生理学的条件下でどのように
制御されているかについては、あまり明らかではない。

本研究会では、このような状況のもと、心血管系のイ
オンチャネルやトランスポーターの専門家が集まり、最
新の研究成果の発表と活発な討論を行い、心血管系のイ
オンチャネルやトランスポーターの調節や遺伝子発現
制御についての研究戦略の構築を目指した。本研究会で
得られた成果を基盤として、今後、新たな研究が展開さ
れるものと期待される。

(1) L 型 Ca^{2+} チャンネルの Ca^{2+} 依存性 facilitation と不活性化の分子機構

蓑部 悦子¹⁾, 韓 冬雲^{1,2)}, Zahangir A. Saud¹⁾, 王 午陽¹⁾, はお 麗英³⁾, 亀山 正樹¹⁾
(鹿児島大学大学院・歯学総合研究科・神経筋情報生理学¹⁾,
中国医科大学・薬理学²⁾, 中国医科大学薬学院・薬物毒理学³⁾)

Inside-out パッチ法を用いた研究により, カルモジュリン (CaM) やカルパスタチンドメイン L (CSL) が Ca^{2+} チャンネルの活性に関与することが判明した。CaM は濃度依存的にチャンネルを活性化し, その濃度-反応関係は $2\mu\text{M}$ で最大 (on-cell パッチ下での開確率の 140-300 %) となる bell-shape 型を示す。この関係は, チャンネルに 2 つの CaM 結合部位 (activation site と inactivation site) があると仮定した数式にあてはめることができた。CSL は CaM に

比べ 15 %程度の弱いチャンネル活性効果を示し, チャンネルの activation site に結合する partial agonist であることが示唆された。CaM と CSL を同時にチャンネルに作用させたところ, CaM に対する CSL の抑制が確認された。また, チャンネルの細胞内ドメインの GST 融合ペプチドを作成し, pull-down 法を用いて CaM と CSL の結合部位を検討したところ, C 末端部に CaM と CSL との競合を示唆する部位が見出された。

(2) 心室筋 α_1 アドレナリン受容体刺激による L 型 Ca^{2+} チャンネルの細胞内制御機構

大内 仁¹⁾, 佐々木 博之²⁾, 栗原 敏¹⁾
(東京慈恵会医科大学・生理学講座第2¹⁾, 同 DNA 医学研究所・分子細胞生物学研究部²⁾)

α_1 アドレナリン受容体刺激は β アドレナリン受容体刺激と並び, 心筋細胞内 Ca^{2+} 動態を変化させ興奮収縮連関を調節しているが, Ca^{2+} を介した細胞内情報伝達制御機構の詳細は明らかでない。最近, 我々は, α_1 アドレナリン受容体刺激により, L 型 Ca^{2+} 電流 (I_{CaL}) が反応初期に一時的に減弱し, その後, 徐々に増大する二相性変化を報告した。また, I_{CaL} に対する α_1 アドレナリン受容体刺激の効果は, 濃度及び時間依存性に異なる 2 つの効果

(positive phase と negative phase) に分類されることを明らかにし, それぞれの効果発現に関与する細胞内制御機構を解明してきた。本発表では, α_1 アドレナリン受容体サブタイプである α_{1A} と α_{1B} が, それぞれ異なる細胞内情報伝達系を介して, 心室筋 L 型 Ca^{2+} チャンネルを制御している分子メカニズムについて報告する。(本研究の一部は, 日本心臓財団若年研究者研究奨励 (藤基金), 循環器学研究振興財団研究助成の援助を受けて行った。)

(3) L 型 Ca^{2+} チャンネル $\text{Ca}_v1.2$ 及び $\text{Ca}_v1.3$ のゲーティング制御機構

中瀬古 (泉) 寛子, 水流 弘通, 赤羽 悟美
(東邦大学・医学部・医学科・薬理学講座)

心臓には L 型 Ca^{2+} チャンネルを構成する α_1 サブユニットとして $\text{Ca}_v1.2$ と $\text{Ca}_v1.3$ が発現している。前者は心臓全体に発現しているのに対し, 後者は洞房結節, 心房, 房室結節に局限している。両者は相同性が高いにも拘わらず, $\text{Ca}_v1.3$ の活性化及び不活性化の電位感受性は $\text{Ca}_v1.2$ より約 -15mV シフトしている。 $\text{Ca}_v1.2$ 型の第 2 膜貫通リピートを $\text{Ca}_v1.3$ に置換した CD2 キメラチャンネルは

$\text{Ca}_v1.3$ 型の電位依存性不活性化を示す。そこで $\text{Ca}_v1.2$ と $\text{Ca}_v1.3$ の電位感受性の差異を担う分子機構を解明するため, 電荷の異なるアミノ酸に着目し, 両者のアミノ酸を置換した変異 Ca^{2+} チャンネルを解析した。その結果, IIS4 セグメントの Tyr (1.2 型) / His (1.3 型) と I-II 細胞外ループ中の His (1.2 型) / Asp (1.3 型) の相違が膜電位感受性の差異に関与することが明らかとなった。一方, $\text{Ca}_v1.3$

は電位依存性不活性化が遅く、定常的な電流成分が多いこと、また、Ca_v1.3 型の C 末を Ca_v1.2 に置換した Ca²⁺チャネルにおいては Ca_v1.2 に比較して定常電流成分が増加することを見出した。Ca_v1.3(-/-) マウス洞房結節の

活動電位幅は野生型に比較して短いことが報告されている。よって、Ca_v1.3 は電位依存性不活性化が遅く、活動電位幅の維持に貢献していることが示唆された。

(4) 低分子量 G 蛋白質 Rad の心筋 L 型カルシウムチャネル調節機構

矢田 浩崇, 村田 光繁, 湯浅 慎介, 牧野 伸司, 佐野 元昭, 福田 恵一
(慶應義塾大学・医学部・再生医学講座)

低分子量 Ras 関連 G 蛋白 RGK ファミリー (Rad, Gem, Rem) が L 型 Ca²⁺チャネルβサブユニットと結合し L 型 Ca²⁺電流 (I_{CaL}) を抑制することが知られている。なかでも Rad は心臓に多く発現しているが、その役割は不明である。本研究の目的は、内因性 Rad の心臓における電気生理学的役割を検討することである。ドミナントネガティブ(DN) 変異型 Rad をアデノウイルスベクターで心筋細胞に強発現することにより内因性 Rad とβサブユニットとの蛋白相互作用を抑制した。DN Rad を強発現した心筋細胞では、細胞膜の L 型 Ca²⁺チャネルαサブユニット蛋白の発現量及びそれに伴う peak I_{CaL} の有意な増加が認められた。さらに、DN Rad を心臓特異的に発現した

トランスジェニックマウス (TG) では、活動電位持続時間の延長に伴い心電図上 QT 間隔延長を認め、洞停止、房室ブロック及び心室性期外収縮などの不整脈が出現した。さらに、TG マウスにエピネフリンを投与すると野生型マウスには見られなかった心室頻拍が誘発された。これらの結果は、心筋細胞において内因性 Rad が I_{CaL} を生理的条件下で抑制し、活動電位持続時間や QT 間隔を短縮することにより不整脈発生を予防していることを示唆した。以上より、Rad は心筋 L 型 Ca²⁺チャネルの細胞膜への発現を調節し、心血管疾患の催不整脈作用に関与している可能性がある。

(5) 電気生理的手法を用いた3種のβアドレナリン受容体と三量体 G 蛋白質の共役能の解析

稲生 大輔^{1),2)}, 稲野辺 厚¹⁾, 倉智 嘉久¹⁾
(大阪大学大学院・医学系研究科・薬理学講座¹⁾,
東京大学科学研究所・ヒトゲノム解析センター²⁾)

G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) によるシグナル伝達は、1 種類の三量体 G 蛋白質のみを介すると考えられてきたが、近年では 1 種類の GPCR が複数の G 蛋白質と共役する例が多数報告されている。しかし、GPCR の複数共役は、実験系が変化すると見えない場合も存在し、GPCR-G 蛋白質の共役様式はさらに謎に包まれている。そこで今回、Gs, Gi/o, Gq の三種の G 蛋白質との共役を 1 つの実験系で同時に検出できる手法を構築した。本手法では、イオンチャネルの活性測定により G 蛋白質共役の評価を行った。共役の評価法は以下の通りである。HEK293T 細胞が内因性に持つ Cl⁻ チャネルの電流の増加

を Gs, 異所性に発現させた G 蛋白質制御内向き制御 K⁺チャネル (K_G チャネル) の電流の増加を Gi/o, K_G チャネルの電流の減少を Gq との共役の指標とした。そして、3 種のβアドレナリン受容体について本手法を用いた所、β₁ 受容体は Gs, Gi/o, β₂ 受容体は Gs, Gi/o, Gq, β₃ 受容体は Gs との共役が確認された。しかし、β₃ 受容体为非 Gi/o 経路を介して K_G チャネルの活性化を行なった、β₃ 受容体-Gi/o の共役が確認されなかったなどの課題も残り、他の GPCR の G 蛋白質共役能の評価に同様に用いるにはさらなる検討が必要である。

(6) アルドステロンの I_f チャンネル発現に対する影響

武藤 貴雄¹⁾, 安井 健二¹⁾, 大草 知子²⁾, 原田 京子¹⁾, 山内 正樹³⁾, 児玉 逸雄³⁾
(名古屋大学・環境医学研究所・生体情報計測・解析 (スズケン) 寄附研究部門¹⁾,
山口大学・医学部・循環病態内科学²⁾, 名古屋大学・環境医学研究所・心血管分野³⁾)

【背景】アルドステロン(ALD) 拮抗薬による心不全患者の突然死予防効果が, 大規模臨床試験 (RALES・EPHESUS) により明らかにされ, 近年, ALD の心筋イオンチャンネルに及ぼす作用が注目されている。

【目的】ALD の I_f チャンネル発現に対する作用と ALD 拮抗薬の効果について検討した。

【方法】新生児ラット培養心筋細胞に ALD(10-8M)を添加し, whole-cell patch clamp 法 (action potential, I_f 電流), real-time PCR 法 (HCN1・HCN2・HCN4 mRNAs), Western-Blot 法 (HCN1・HCN2・HCN4 蛋白) を用いて,

ALD の作用を評価した。ALD 拮抗薬として spironolactone (10^{-7} M), eplerenone (10^{-6} M) を用いた。

【結果】培養心筋の自発収縮は, ALD 添加によって 1.6 倍に有意に増加した。 I_f チャンネル電流は, ALD によって有意に増加した (1.9 倍)。HCN2 と HCN4 の mRNA 発現量は, それぞれ 1.2 倍, 1.4 倍に有意に増加した。HCN2 と HCN4 の蛋白量は, それぞれ 1.6 倍, 1.8 倍に有意に増加した。ALD 拮抗薬はこれらの ALD の作用を抑制した。

【結論】ALD はラット培養心筋細胞の I_f チャンネルの発現を増加させ, ALD 拮抗薬はその効果を抑制した。

特別講演 (1) 心筋リモデリングとイオンチャンネル発現制御

桑原 宏一郎

(京都大学大学院・医学研究科・内分泌代謝内科学講座)

心肥大および心不全において心室におけるイオンチャンネル発現変化が起こり, それが病態形成に重要な役割を果たしていることが知られている。我々は病的心において発現亢進する心筋胎児型遺伝子群の複数の遺伝子上に転写抑制配列である neuron-restrictive silencer element (NRSE) が存在することを見出した。NRSE に結合する転写抑制因子 neuron-restrictive silencer factor (NRSF) の優勢抑制変異体を心臓で過剰発現するトランスジェニックマウス (Tg) を作製したところ, 拡張型心筋症類似の病態を呈するとともに, 心室性頻拍により突然死した。Gene chip などの解析の結果, Tg マウスの心室において

HCN2,4 や CACNA1H といった胎児期の心筋に発現しているイオンチャンネルの発現亢進が判明した。実際これら遺伝子には NRSE が存在し, NRSF により直接的に発現制御されていることが考えられた。これら心筋胎児型イオンチャンネルは生後心室での発現は低下するが, 病的状態において再度心室での発現が亢進することが報告され, 心不全や不整脈の発症への関与が指摘されている。NRSF の機能修飾が, 他の心筋胎児型遺伝子と同様, これら胎児型イオンチャンネルの病的心における発現制御に重要な役割を果たし, 心不全の病態形成に関与している可能性が示唆された。

特別講演 (2) 心筋再生研究の現状と展望

福田 恵一

(慶應義塾大学・医学部・再生医学教室)

現在心筋に分化できる細胞は骨髄間葉系幹細胞, 組織

幹細胞, 胚性幹細胞の 3 種が存在する。我々はこれまで

骨髄間葉系幹細胞が培養条件下に心筋細胞に分化することを報告した。また、発生時期に心臓予定領域に発現する液性因子をスクリーニングし、これを利用して胚性幹細胞を特異的に心筋細胞に分化誘導する方法を開発した。この物質はノギンと呼ばれ、胎仔期には神経を誘導する物質として知られていたが、作用時間や濃度等を調節することで高率に心筋細胞を誘導できる。心筋細胞を心臓に移植して心不全を治療する試みは、10年前から試みられてきた。当初はラット胎仔心筋を心臓に直接注射

する方法が取られた。我々は再生心筋細胞を単離する技術を開発し、これを心臓に移植した。再生心筋細胞は心臓に生着し、周囲の心筋細胞と GAP 結合していた。さらに我々はフィブリンコートした培養皿上で心筋細胞をシート状にすることに成功した。この方法は細胞に傷害を与えることなく培養皿から細胞を剥離することができ、さらに重層することにより厚みのある組織を作成することができる。これらの方法を用い、心筋再生を早く現実の医療にしたいと考えている。

(7) 内向き整流 K^+ チャネルの異なるサブファミリーKir2–Kir3間のヘテロ多量体形成の解析

石原 圭子¹⁾, 山本 友美²⁾, 久保 義弘²⁾

(佐賀大学・医学部・生体構造機能学・器官細胞生理分野¹⁾,
生理学研究所・神経機能素子研究部門²⁾)

内向き整流 K^+ チャネルの α サブユニットには、7つのサブファミリーに属する多くの種類のものがあり、同じサブファミリーや異なるサブファミリーに属するサブユニットが組み合わさって四量体のチャネル基本構造を作る例が知られている。今回私たちは、G 蛋白制御内向き整流 K^+ チャネルのサブユニットである Kir3.1 (GIRK1) や Kir3.4 (GIRK4) が、強い内向き整流性を示す心臓の I_{K1} チャネルのサブユニットである Kir2.1 (IRK1) とヘテロ多量体となってチャネルを形成するかどうかを、

HEK293T 細胞やアフリカツメガエル卵母細胞の発現系を用いて検討した。その結果、免疫共沈降、共焦点顕微鏡を用いた局在の観察、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 解析、および dominant negative mutants を用いた実験で、これらのサブユニットがヘテロマーとなってチャネルを形成することを支持する結果を得た。心臓の洞結節や心房筋ではこれらのサブユニットは共発現しており、IRK1/GIRK1 あるいは IRK1/GIRK4 ヘテロ複合体チャネルが生理的役割を持つことが示唆された。

(8) 内向き整流性の変調による催不整脈作用

古川 哲史¹⁾, 谷 義則²⁾, 三浦 大志¹⁾, 黒川 洵子²⁾, 中村 一文²⁾, 大江 透¹⁾

(東京医科歯科大学・難治疾患研究所・生体情報薬理分野¹⁾,
岡山大学大学院・歯学総合研究科・循環器内科学²⁾)

【背景・目的】 Andersen-Tawil syndrome (ATS) は当初 QT 延長症候群タイプ 7 (LQT7) に分類されたが、QT 間隔の延長の有無には議論の余地が残る。今回 QT 延長を伴う本邦 ATS 家系で KCNJ2 の T75M 変異を同定したので、その電気生理学的特性を検討した。

【方法】 Whole-cell patch 法により電流-電圧特性曲線 (I-V curve) を、inside-out 法により細胞内 Mg^{2+} ・spermine 感受性を検討した。

【結果】 WT/T75M ヘテロ複合体チャネルでは I-V curve において内向き整流性の増強を認めた。KCNJ2 チャネルの内向き整流性は電位依存性 Mg^{2+} ブロック・spermine ブロックによるが、WT/T75M ヘテロ複合体チャネルでは電位依存性 Mg^{2+} ブロックの程度が増強していた。

【結論】 我々は以前 HERG チャネル不活性化の電位依存性のシフトによる内向き整流性増強を伴う LQT 家系を報告しており、今回の症例ではメカニズムは異なるもの

の内向き整流性の増強は QT 間隔の修飾因子となりうる ことが示唆された。

(9) 不整脈を引き起こす心筋型 KCNQ チャネル変異体の機能解析

中村 友紀¹⁾, 上原 明²⁾, 井上 隆司²⁾

(福岡大学大学院・医学研究科・人間生物系細胞分子制御学¹⁾,
福岡大学・医学部・生理学²⁾)

Istvan Ando (Hungarian Academy of Sciences), Bok-Luel Lee (Pusan National University)

遅延性 K チャネル電流の遅い成分である KCNQ チャネルは、活動電位の再分極相を形作る。このチャネルのポアヘリックスのトリプトファン残基にミスセンス変異が入ると、心臓では QT 延長症候群に脳ではてんかんになることが知られる。これらのチャネル病で見られる心筋型 KCNQ1 および脳型 KCNQ3 の両アイソフォームにおける変異体について、チャネル電流の性質が変異によりどのように変化するかを HEK や *Xenopus oocyte* などの再構成系を用いて調べた。ホモ複合体の変異体ではほぼ完全に電流

が消失し、ヘテロ複合体ではドミナントネガティブ的に抑制された。このような電流抑制の程度から、同変異は両チャネル病を引き起こすのに十分と考えられた。変異により、時間依存性の電流活性化は遅延した。選択性フィルタ周辺の構造解析の結果、イオン選択性フィルタが変異により不安定な構造になることが示唆された。いずれの KCNQ においても、このトリプトファン残基は、正常なチャネル機能を保つために必要不可欠と考えられた。

(10) Kv1.5 電流におよぼす lipoxygenase 阻害薬と phosphatidylinositol 3-kinase 阻害薬の抑制作用

丁 維光¹⁾, Wu Jie^{1),2)}, 公 英子^{1),2)}, 辻 啓子²⁾, 堀江 稔²⁾, 松浦 博¹⁾

(滋賀医科大学・医学部・細胞機能生理学¹⁾, 呼吸循環器内科²⁾)

Kv1.5 チャネルはヒトにおいては主に心房筋に発現しており、その薬物によるブロックは心房細動の効果的な治療法になりうると思われている。本研究では、hKv1.5 の野生型 (WT) およびポア領域の変異体 (R487V) を CHO 細胞に導入し、全細胞型パッチクランプ法を用いて lipoxygenase 阻害薬と phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) 阻害薬の作用を検討した。PI3-K 阻害薬である LY294002 は濃度依存性 ($IC_{50} = 7.2 \mu M$) に Kv1.5/WT 電流を抑制し、その抑制作用は完全に可逆的であった。また、LY294002 による電流抑制は主に脱分極パルス中に発

生・進行し open-channel block の特性を示した。LY294002 と異なった構造をもつ PI3-K 阻害剤である wortmannin は Kv1.5/WT 電流を抑制しなかったことから、LY294002 は直接チャネルに作用しているものと考えられた。LY294002 の抑制作用は、Kv1.5/R487V で有意に減弱した。Lipoxygenase 阻害剤である cinnamyl-3,4-dihydroxy- α -cyanocinnamate (CDC) も主に脱分極パルス中に Kv1.5/WT 電流を濃度依存性に抑制した ($IC_{50} = 6.3 \mu M$)。これらの実験データは Kv1.5 チャネル阻害剤の開発に寄与することが期待される。

(11) 新規 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体阻害薬 YM-244769 の作用特性

喜多 紗斗美, 岩本 隆宏
(福岡大学・医学部・薬理学教室)

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体 (NCX) は、心筋、脳、血管平滑筋など様々な臓器に発現しており、細胞内 Ca^{2+} ホメオスタシスの維持に重要な働きをしている。近年、国内製薬会社から、いくつかのベンジルオキシフェニル系 NCX 阻害薬が開発されている。今回、新規 NCX 阻害薬 YM-244769 (YM) の作用特性について解析した結果を報告する。NCX には 3 種のサブタイプ (NCX1, NCX2, NCX3) が存在するが、YM は NCX1, NCX2 に比べて NCX3 (Ca^{2+} 取り込み活性) を選択的に阻害した。NCX3 に対する阻害効力は、既存の NCX 阻害薬 (KB-R7943, SN-6) に比

べて約 100 倍強力であった ($\text{IC}_{50}=18\text{nM}$)。NCX1 と NCX3 間のキメラ解析ならびにシステインスクランニング解析により、 α -2 領域に存在する Gly-833 が YM の阻害親和性に重要であることが示唆された。さらに、YM は NCX1 と NCX3 を共発現する神経細胞 SH-SY5Y の低酸素・再酸素化障害を既存の NCX 阻害薬に比べて強力に阻止した。以上の結果より、YM は NCX3 の機能解析に有効な研究ツールであると考えられ、また中枢神経系の虚血保護薬として期待される。

(12) マウス大動脈平滑筋細胞における $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換反応の電気生理学的機能について

村田 秀道¹⁾, 堀田 真吾¹⁾, 山村 寿男¹⁾, 大矢 進¹⁾, 岩本 隆宏²⁾, 今泉 祐治¹⁾
(名古屋市立大学大学院薬学研究科 細胞分子薬効解析学分野¹⁾,
福岡大学医学部薬理学教室²⁾)

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体 (NCX) は細胞膜を介した電気化学的駆動力に依存して双方向性に働く Ca^{2+} 輸送体として心筋では起電性を有する。しかし血管平滑筋での NCX 発現が心筋に比べ低いため、その電気生理学的機能特性は不明である。NCX1.3 タンパクを平滑筋組織に 6-8 倍過剰発現したマウス (TG) は、食塩の高摂取により高血圧を示す (岩本ら *Nature Med.*, 2004)。本研究では NCX1.3 高発現マウス大動脈平滑筋を用いて、正常マウス (WT) と比較することにより NCX 機能を解析した。血管平滑筋で

は細胞内局所筋小胞体からの自発的 Ca^{2+} 遊離 (Ca^{2+} スパーク) により大コンダクタンス Ca^{2+} 活性化 K^+ チャネルが開口し、一過性外向き電流 (STOC) が生じる。我々は STOC の頻度が TG の大動脈平滑筋細胞において WT よりも有意に増加していることを発見した。TG 大動脈平滑筋では静止時において NCX1.3 を介して流入した Ca^{2+} がリアノジン受容体活性化により Ca^{2+} スパークを発生させ STOCs の頻度を上昇させるため、静止張力調節に寄与している可能性が示唆された。

(13) 心筋ミトコンドリア $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換 (mitNCX) の機能

金 鳳柱, 松岡 達
(京都大学大学院・医学研究科・細胞機能制御学)

心筋ミトコンドリア $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換 (mitNCX) の機能を解明する目的で、サポニン透過性ラット心室筋細胞のミトコンドリア Ca^{2+} (Ca^{2+}_m) を Rhod-2 を用いて測定した。無 Na^+ 下に、300nM Ca^{2+} 液を灌流すると、Rhod-2 蛍光は

約 9 倍増加し、 Ca^{2+} ユニポータ抑制剤 (Ruthenium Red : RR) により増加は抑制された。モネンシンを用いて Na^+ を前負荷 (50 mM Na^+) しても、RR 存在下には Ca^{2+}_m 増加は起こらなかった。この実験条件下では、ミトコンド

リアへの Ca^{2+} 流入は Ca^{2+} ユニポーターが主でミトコンドリア NCX(mNCX) の逆交換は関与しないと考えられた。300 nM Ca^{2+} 投与での定常状態から Ca^{2+} を除去すると, Na^{+} 濃度依存性に Ca^{2+}m は減少した。減少初速度の半飽和 Na^{+} 濃度は 1.1 mM であった。 Na^{+} 依存的 Ca^{2+}m 減少は

CGP-37157 (mNCX 阻害剤) により抑制された。mNCX が主要な Ca^{2+}m 排出機構であると考えられた。ミトコンドリア基質 (リン酸, コハク酸, ピリビン酸) 除去と FCCP の投与により, 膜電位 (TMRE で測定) は脱分極したが, mNCX による Ca^{2+}m 排出には著明な変化は無かった。

7. 視知覚への多角的アプローチ—生理, 心理物理, 計算論3

2006年6月8日–6月9日

代表・世話人：塩入 諭（東北大学）

所内対応者：小松 英彦（生理学研究所）

- (1) 情動刺激に対するサル扁桃核ニューロンの応答
中村 克樹（国立精神神経センター神経研究所）
- (2) 多義的知覚と両眼視野闘争の脳内離散的確率過程
村田 勉（情報通信研究機構未来 ICT 研究センターバイオ ICT グループ）
- (3) 複眼視細胞の分光感度はどう決まるか
蟻川 謙太郎（総合研究大学院大学葉山高等研究センター）
- (4) 視覚運動刺激による空間位置表象の歪み
渡邊 克巳（東京大学先端科学技術研究センター）
- (5) 奥行き弁別の学習過程での大脳皮質 MT 野の活動
宇賀 貴紀（順天堂大学医学部）
- (6) 両眼間速度差に基づく奥行き運動知覚
塩入 諭（東北大学電気通信研究所）
- (7) 経頭蓋磁気刺激による視知覚干渉のメカニズムと逆行性信号伝播
宮脇 陽一（NICT/ATR Computational Neuroscience Laboratories）
- (8) 追従眼球運動を起こす視覚刺激の性質
河野 憲二（京都大学大学院医学研究科認知行動脳科学）
- (9) ニホンザル盲視モデルの残存視覚：正常視野の閾値近辺での視覚との比較
吉田 正俊（生理学研究所認知行動発達機構研究部門）
- (10) 奥行運動知覚に貢献するコントラスト変化
北川 智利（NTT コミュニケーション科学基礎研究所人間情報研究部）
- (11) 中高次視覚皮質の多細胞受容野同時計測へのアプローチ
大澤 五住（大阪大学大学院生命機能研究科）
- (12) 照明認識視空間の概念とその応用
篠田 博之（立命館大学情報理工学部）
- (13) サル下部側頭葉における刺激依存的なスパイク相関の動的変化
平林 敏行（東京大学大学院医学系研究科統合生理学教室）
- (14) 色の気づきとヒト視覚皮質の視野地図, 並列階層構造
山本 洋紀（京都大学大学院人間環境学研究科）

【参加者名】

塩入 諭（東北大学電気通信研究所），中村 克樹（国立精神神経センター神経研究所），村田 勉（情報通信研究機構未来 ICT 研究センター），蟻川 謙太郎（総合研究大学院大学葉山高等研究センター），渡邊 克巳（東京大学先端科学技術研究センター），宇賀 貴紀（順天堂大学医学部），宮脇 陽一（NICT/ATR Computational

Neuroscience Laboratories），河野 憲二（京都大学），北川 智利（NTT コミュニケーション科学基礎研究所），大澤 五住（大阪大学大学院），篠田 博之（立命館大学），平林 敏行（東京大学大学院），山本 洋紀（京都大学），一戸 紀孝（理化学研究所脳科学総合研究センター），岩永 知幸（横浜市大），内川 恵二（東京工業

大学), 大宮 祐男 (横浜市大), 鹿内 学 (奈良先端科学技術大学院大学), 金子 智道 (花王株式会社スキンケア美容センター), 木下 充代 (総合研究大学院大学葉山高等研究センター), 栗木 一郎 (東北大学電気通信研究所), 佐藤 雅之 (北九州市立大学), 篠崎 隆志 (理化学研究所), 篠森敬三 (高知工科大学教育センター), 柴崎 弘道 (横浜市大), 庄司 将章 (東京工業大学大学院), 瀬川 かおり (東京工業大学), 滝 祐平 (東京工業大学大学院), 武田 二郎 (東京工業大学大学院), 永井 岳広 (東京工業大学大学院), 平松 千尋 (東京大学大学院), 福島邦彦 (関西大学), 福屋 貴之 (東京工業大学大学院), 松尾 啓史 (東京工業大学大学院), 松宮 一道 (東北大学電気通信研究所), 森井 政仁 (東京工業大学大学院), 佐藤 俊治 (東北福祉大), 西田 眞也 (NTT コミュニケーション科学基礎研究所), 三好 智満 (大阪大学), 鬢櫛 一夫 (中京大学), 藤井 正樹 (中京大学), 高瀬 慎二 (中京大学), 青木 佑紀 (京都大学), 行松 慎二 (中京大学), 高橋 伸子 (愛知淑徳大

学), 青木 賢治 (東京工業大学), 松寄 直幸 (豊橋技術科学大学), 繁桝 博昭 (豊橋技術科学大学), 木原 健 (京都大学), 観音 隆幸 (豊橋技術科学大学), 林 勲 (関西大学), 中村 みほ (コロニー研究所), 堺 浩之 (理化学研究所), 鈴木 一隆 (浜松ホトニクス), 天野 薫 (NTT コミュニケーション科学基礎研究所), 金谷 英俊 (東京大学), 秦 志傑 (東京工科大学), 増田 和了 (東京工科大学), 松浦 清人 (京都大学), Cook N.D. (関西大学), 原澤 賢充 (NHK 技研), 廣瀬 信之 (京都大学), 遠山 和也 (東京工科大学), 小川 正 (京都大学) 以下生理学研究所 吉田 正俊, 高良 沙幸, 木田 哲夫, 酒井 朋子, 浦川 智和, 橋本 章子, 野口 泰基, 鯨井 加代子, 内山 仁志, 中川 直, 池田 琢郎, 田中 絵実, 佐々木 章宏, 森戸 勇介, 加勢 大輔, 田邊 宏樹, 岡 さち子, 高浦 加奈, 金田 勝幸, 小松 英彦, 伊藤 南, 郷田 直一, 鯉田 孝和, 横井 功, 安田 正治, 松茂良 岳広, 原田 卓弥, 坂野 拓

【概要】

生理学研究所研究会, 「視知覚への多角的アプローチ—生理, 心理物理, 計算論3」は, 平成18年6月8日, 9日に生理学研究所において開催された。参加者は関連学会と日程の重複があったにも拘わらず100名近くに達した。参加者は多分野にわたる大学院生を含む若手の研究者が多く, 学際領域としての将来性が期待できる。8日には8件の講演と懇親会, 9日は6件の講演があり, 活発な議論が行われた。講演は, 生理学, 心理物理学,

計算論の立場の気鋭の研究者を中心とした興味深い内容で占められ, 電気生理, 脳活動記録, 心理物理, 計算論などで複数の領域に関連し, また他の感覚との関連についてのものもあり, 学際性の豊かな研究会であった。参加者からは, 視覚研究者の学際的な意見交換の場として非常に有益な研究会との声が多く, 今後の視覚研究分野の発展に貢献することに疑いはない。

(1) 情動刺激に対するサル扁桃核ニューロンの応答

中村 克樹 (国立精神神経センター神経研究所)

情動認知の神経メカニズムを調べる目的で, 情動刺激に対するサル扁桃核ニューロンの応答性を調べた。これまでの多くの研究では, 用いる刺激に大きな問題があった。まず, 多くの研究が静止画像を用いている点である。一般的にサルの情動表出は姿勢や表情の変化に音声に伴っているもので, ダイナミックな変化が重要な情報である。こうした情動表出をできるだけ自然に提示するため, 今回の実験にはビデオ刺激を用いた。次に, サルにヒト

の写真を用いた研究が多い点である。今回は, アカゲザルに同種他個体の種特異的情動表出を提示した。3頭のアカゲザルから3種類 (scream, coo, aggressive threat) の刺激を用意し, 情動表出のタイプの要因だけでなく個体の要因がニューロン応答に及ぼす影響も検討できるようにした。さらに, ヒトやサルでは情動のやり取りを視覚的にも聴覚的にも行えるという特徴がある。扁桃核ニューロンの聴覚応答性についても検討した。

(2) 多義的知覚と両眼視野闘争の脳内離散的確率過程

村田 勉（情報通信研究機構未来 ICT 研究センターバイオ ICT グループ）

多義的知覚と両眼視野闘争は、同じ図を見ていても意識にのぼる「見え」が自発的に変化するという点で共通性がある。私たちは、これらの現象における「見え」の自発的切替りの時間インターバル分布を定量的に解析した。その結果、この時間分布は刺激の種類によらずガンマ分布という統計分布によくしたが、その形状を決めるパラメータが自然数になることを発見した。このことは、上記パラメータの自然数に対応する個数の脳の離散

的状態があり、その間を確率的に遷移する過程（ポアソン過程）が、「見え」の切替りの仕組みとして重要な役割を果たすことを示している。つまり視覚意識の自発的变化は、脳の離散的確率機構によって引き起こされることがわかった。また、「見え」の切替りに関連する脳活動の fMRI 研究において、異なる刺激で共通して活動する部位と「見え」のコンテンツの個別性に依存する部位が見られたことを報告する。

(3) 複眼視細胞の分光感度はどう決まるか

蟻川 謙太郎（総合研究大学院大学葉山高等研究センター）

視物質の他にも、視細胞の分光感度を決めている要因は多い。トリなどの錐体にある油滴はよく知られているが、実は定量的な研究はほとんどない。この講演では、昆虫複眼の視細胞に含まれるさまざまな色素と視細胞分光感度との関係を、詳細な生理学的データに基づいて紹介する。

モンシロチョウの個眼には9個の視細胞が含まれる。視細胞は個眼中央部で集合し、直径約2ミクロンの感桿を形成する。感桿周囲には橙や紅色の色素があつて、こ

の色と分布で個眼は3つのタイプに分けられる。9個中6個の視細胞には同じ視物質が発現しているが、分光感度は多様である。どの個眼にも560 nmに感度極大をもつ細胞が2つあるが、他の4つは、橙の個眼では620 nm、紅の個眼では640 nmに極大がシフトしている。この原因はもちろん色素である。この他、短波長を吸収する蛍光色素もあつて、これがモンシロチョウでは分光感度の性差を作り出していることも分かってきた。

(4) 視覚運動刺激による空間位置表象の歪み

渡邊 克巳（東京大学先端科学技術研究センター）

瞬間提示された刺激の位置は、運動する視覚刺激と比較した場合、実際の相対位置からずれて知覚される。この現象に対しては、視覚的注意や刺激特性の違いによる処理時間差、運動の補間、刺激位置の時間平均処理など様々な説明がなされている。我々は瞬間提示刺激と運動刺激の二次元的な位置関係を操作することで、(a) 運動刺激周辺の非対称な視覚空間位置表象の歪みが強く影響していることを示した。また、(b) 視覚運動刺激によつ

て歪むのは、空間そのものではなく表象された視覚物体の位置であること、(c) 位置表象の歪みは網膜座標系の運動情報によっていることなどを示す結果も得た。これらの結果は、視覚運動刺激が物体の視覚的位置をダイナミックに変化させるとともに「オブジェクトベースの視覚表象が網膜座標系の運動情報に影響を受けている」ことを示す点で興味深い。

(5) 奥行き弁別の学習過程での大脳皮質 MT 野の活動

宇賀 貴紀 (順天堂大学医学部)

長期の学習によって、感覚情報により鋭敏に反応できるようになる「知覚学習」の脳内メカニズムの定説は、「学習により感覚ニューロンの感度がより鋭敏になる」というものである。しかし、サル初期視覚野ニューロンの感度は学習によってほとんど変化しない。本実験では、サルが奥行き弁別を学習する過程を行動レベルで追いつながら大脳皮質 MT 野ニューロンの活動を記録し、ニューロンの奥行きに対する感度と、ニューロン活動とサルの

答えとの相関 (choice probability) の変化を測定した。サルの弁別閾値は学習とともに徐々に下がったが、ニューロンの弁別閾値は全く変化しなかった。それに対し、choice probability は学習とともに徐々に上昇した。これらの結果は、学習により感覚ニューロンの感度が鋭敏になるのではなく、サルが学習の過程で感覚ニューロンから上手く情報を読み出せるようになるという仮説を支持する。

(6) 両眼間速度差に基づく奥行き運動知覚

塩入 諭 (東北大学電気通信研究所)

奥行き運動知覚に関する手掛りのうち両眼性のものは、両眼視差の時間変化と両眼間速度差の 2 つがある。我々はいくつかの実験によって、両眼間速度差が実際に奥行き運動の知覚に関わることを示した。それらの知見に基づき、運動残効による速度差に基づく奥行き運動知覚を用いて、両眼間速度差による奥行き運動知覚の空間周波数選択性、色刺激への選択性を調べた。その結果、単眼

の運動に比べて、空間周波数選択性は広いこと、色刺激に対しても応答し、色刺激と輝度刺激の間の両眼間速度差にも応答することなどを明らかにした。両眼間速度差の処理過程が、異なる空間周波数、輝度と色など単眼の運動情報を統合した後で、両眼速度を比較していることを示唆する結果であり、運動処理の階層構造を理解する上でも重要な知見といえる。

(7) 経頭蓋磁気刺激による視知覚干渉のメカニズムと逆行性信号伝播

宮脇 陽一 (NICT/ATR Computational Neuroscience Laboratories)

神経細胞に刺激 (外乱) を与え、その際の知覚変化を調べることは、知覚と神経活動の因果関係を知る上で有効な手段である。非侵襲的にこれを可能にする唯一のツールが経頭蓋磁気刺激 (TMS) であるが、その作用メカニズムはほとんど分かっていない。そこで本研究では、Hodgkin-Huxley 型の神経細胞モデルを用いて V1 ハイパーコラムを構築し、TMS 型外乱が系に与える影響を理論的に検証した。結果、コラム内神経細胞群のスパイク活動は TMS によって一過的に上昇したのち強く抑制された。また発火の局在度 (刺激選択性に相当) も同時に減少した。抑制効果が最大になるのは視覚刺激入力後約

100 ms で TMS 印加した場合であり、実験結果とも定量的に一致した。後過分極を担うイオンチャネルを阻害した場合でも実験結果が再現されることから、神経細胞それ自身が直接的に抑制される効果よりも、シナプスを介した神経細胞間の相互抑制作用のほうが支配的であると考えられる。また TMS による視知覚抑制の特徴的な時間特性を再現するには局所回路内あるいは他領野からの再帰性興奮入力の仮定が必要であり、TMS による視知覚抑制が視覚入力の求心性信号伝播阻害だけで生じるものではないという仮説が理論面から示唆された。

(8) 追従眼球運動を起こす視覚刺激の性質

河野 憲二（京都大学大学院医学研究科認知行動脳科学）

追従眼球運動 (Ocular Following Responses) は突然動く視覚刺激によって誘発される、潜時が短い眼球運動で、視界のぶれを防ぎ、視覚機能をよい状態に保つ機能を持つと考えられる。サルを用いたニューロン活動記録と局所破壊実験から、その発現には大脳 MST 野、背外側橋核、小脳腹側傍片葉を含む経路が関与していると考えられている。この眼球運動を起こす視覚刺激の性質を、矩形波からその基本周波数成分を差し引いた波 (Missing

Fundamental, MF 縞) の仮現運動刺激を用いて調べた。MF 縞とは振幅が $1/3, 1/5, \dots$ と減少していく奇数調波 ($3f, 5f, \dots$) から構成される波である。この波を基本周期の $1/4$ 波長ずつ移動させると、刺激の動く方向とは反対の、 $3f$ 要素の動く方向に眼が動いた。この結果は視覚刺激から運動を検出する機構が時空間視覚フィルターの性質を持っていることを示している。

(9) ニホンザル盲視モデルの残存視覚：正常視野の閾値近辺での視覚との比較

吉田 正俊（生理学研究所認知行動発達研究部門）

マカクザルの第一次視覚野 (V1) を片側的に除去して作成した盲視動物モデルにおいて、視覚検出能力および急速眼球運動への V1 除去の影響を、視覚誘導性急速眼球運動課題を用いて調べた。

損傷視野における検出輝度の閾値は正常視野の対応する位置と比べて上昇していた。正常視野の視覚標的の輝度コントラストを下げて、損傷視野の視覚標的への弁別能と同程度になるように条件を揃えたうえで、急速眼球運動への影響を調べた。急速眼球運動の終止点は損傷視

野への急速眼球運動では正常視野へのものと比べてばらついていることを見出した。

これらのことは、V1 を介した情報伝達は視覚検出だけでなく、正確な眼球運動の制御にも関わっていることを示している。また、以上のことは、V1 を片側的に除去したマカクザルにおいても人の盲視患者と同様に、損傷視野での残存視覚が、正常視野での閾値近辺の視覚と比べて質的に異なっているとする仮説を支持している。

(10) 奥行運動知覚に貢献するコントラスト変化

北川 智利（NTT コミュニケーション科学基礎研究所人間情報研究部）

遠くにある視対象のコントラストは低く、近くにある対象のコントラストは高い。これまでにコントラストが奥行知覚の手がかりの一つであることが示されてきた。それでは、コントラストが時間的に変化した時には、対象が奥行方向に動いて見えるのだろうか。予備的な観察ではコントラストの変化だけでは奥行運動知覚は生じなかった。しかし、サイズ変化と組み合わせた時には、コントラストの変化は奥行運動知覚に影響を与えた。同心

円状の正弦波縞の位相をある時間間隔において反転させた刺激は、拡大・縮小のどちらにも見ることができるが、同時にコントラストを変化させたときには、コントラストが上昇（下降）する場合には同心円が拡大（縮小）するように見えた。さらに、このような視覚刺激に順応した後には運動残効が生じた。これらの結果は、コントラストの変化がサイズ変化と組み合わせた時に、奥行運動知覚の手がかりとして有効であることを示唆する。

(11) 中高次視覚皮質の多細胞受容野同時計測へのアプローチ

大澤 五住 (大阪大学大学院生命機能研究科)

従来の高次視覚野の研究では、様々な物体のイメージや図形サンプルに基づく刺激セットや、アルゴリズム的に生成した曲率をもつ縞模様や図形等が細胞の形状選択性の計測に利用されてきた。これらの刺激は実験者から見て、細胞が何に反応しているのかを直感的に理解しやすい長所はあるが、経験的に選ばれた有限なセットであることから、真に最適な刺激は全く別の形であるかもしれないという不確定性を排除する事は困難だった。

新たに開発した局所スペクトラム逆相関法 (LSRC) は、ダイナミックランダムドット刺激に基づき、受容野内で方位選択性等が一樣でないことによる形状選択性を探るために適した解析法である。シミュレーションと V1, V2 野での実験により、この手法の有効性を検討した。特定の形状を陽に含まない本質的に無限の形を含むランダム刺激により、多くの細胞の同時解析を可能にする本手法の高次視覚野への適用の可能性を考察する。

(12) 照明認識視空間の概念とその応用

篠田 博之 (立命館大学情報理工学部知能情報学科)

照明に対する脳内表現を仮定し、それを Frame of Reference として明るさや色の知覚を推定する。これを「照明認識視空間」と呼ぶ。今回はその概念と表現方法、さらにその応用例として「高齢者色覚の二元性」の実験を紹介する。実験では若齢被験者が色フィルター越しに知覚白色点を求め(疑似高齢者条件)、フィルターなし(若齢者条件)と比較した。これを異なる色モードに対して行った。高齢者では黄変した水晶体により網膜上の物理

的な光色は変化する。しかし色恒常性と同等の神経系補償機構のために若齢者と同等の色の見えとなる。以上がこれまでの知見であるが、物体色モードではまさにその通りの結果となった。しかし光源色モードでは知覚白色点にずれが見られ、高齢者と若齢者の色覚が一致しないことが示された。実験結果とともに、この色覚の二元性が、どのようにして照明認識視空間から予測されるのか解説する。

(13) サル下部側頭葉における刺激依存的なスパイク相関の動的変化

平林 敏行 (東京大学大学院医学系研究科統合生理学教室)

複雑な図形の脳内表象において、繰り返し学習された図形に対して神経細胞の反応選択性が変化する機構は明らかになってきた。しかし、既知図形の組み合わせによって新たに形成された図形の表象については、まだ未解明な点が多い。本研究では、繰り返し学習させた顔の部分図形(目、鼻、口)各 40 種類ずつを組み合わせで計 64,000 種類の顔刺激を作成し、同じ部分図形をランダムに並べた非顔刺激とで、マカクサル下部側頭葉単一神経細胞間の相関発火を比較した。その結果、解析を行った

30 ペアの神経細胞対の相関発火は、顔刺激を呈示した場合の方が、非顔刺激を呈示した場合よりも有意に強かった ($P < 0.003$)。また、その差は、刺激呈示開始後 300 ms 以内に有意に現れた。本研究により、課題遂行中のサルの下部側頭葉神経細胞群が、部分図形の配置に応じてダイナミックな相関発火を示すことがわかった。本研究は認知処理実行中の大脳皮質局所神経回路内の機能的結合とそのダイナミクスの解明に、スパイク相関解析が有用な道具となりうることを示唆するものである。

(14) 色の気づきとヒト視覚皮質の視野地図，並列階層構造

山本 洋紀（京都大学大学院人間環境学研究科）

色の気づきの神経相関を，ヒト視覚野を対象に，fMRIを用いて調べた。色の気づきがメタコントラスト現象で低下する時，脳活動も低下するか否かを視覚野毎に検討した。刺激はターゲットとその周囲に遅れて提示されるマスクからなり，実験では，両者が同色の条件と異色の条件を交互に16秒間づつ被験者に繰り返し提示した。このとき，ターゲットの気づきは同色条件で大きく低下した。この色の気づきに相関した脳活動は，V8で最も大き

く，その次がV2とV3，その他の領域はV1と同程度だった。興味深いことに，腹側経路の階層の途中，V4vで一度減少していた。低次野と高次野を直接結ぶバイパス経路が関与している可能性がある。また，V1，V2，V3野の活動低下は，ターゲットをレチノトピックに表象している領域に局限していた。低次視覚野の視野地図には，色がどこにあるのかではなく，どこに見えるのかという情報が保持されている。

8. Neuro-glio-vascular interaction におけるプリン作動性シグナリングの 病態生理的機能

2006年9月7日－9月8日

代表・世話人：南 雅文（北海道大・薬・薬理学）

所内対応者：井本 敬二（神経シグナル）

(1) 血管内皮細胞の ATP 分解酵素活性におよぼす炎症性サイトカインの影響

松岡 功, 唐 燕* (高崎健康福祉大学・薬学部・薬効解析, *福島医大・医・薬理)

(2) 血管周皮細胞（ペリサイト）－ATP/P2 受容体シグナルを介したアストロサイトー毛細血管連関－

藤下 加代子¹, 末石 浩二^{1,2}, 片岡 泰文², 井上 和秀³, 小泉 修一¹

(¹国立衛研・薬理部, ²福岡大学・薬・薬学疾患管理, ³九州大学・院・薬・薬効解析)

(3) カルシウムストアに存在する BK チャンネルによるカルシウム放出の制御

山下 勝幸 (奈良医大・第一生理)

(4) 新規 P2X スプライシングバリエントを用いたサブユニット相互作用の解析

輿水 崇鏡¹, 上野 晋², 柳原 延章², 辻本 豪三¹

(¹京都大学薬学研究科ゲノム創薬科学分野, ²産業医科大学医学部薬理学講座)

(5) 細胞膜上における P2X₄ 受容体の動態の 1 分子ビデオイメージング解析

小林 剛¹, 武田 美江¹, Fernando Lopez-Redondo², 古家 喜四夫²,

山本 希美子³, 安藤 譲二³, 曾我部 正博^{1,2}

(¹名古屋大・医・細胞生物物理, ²JST・SORST・細胞力覚プロジェクト,

³東京大院・医・医用生体工学講座システム生理学)

(6) 神経・グリア機能解析のための分子イメージング研究

渡辺 恭良 (理化学研究所分子イメージング研究プログラム,

大阪市立大学大学院医学研究科システム神経科学)

(7) 分子イメージングによる脳虚血病態のニューロン・グリア機能解析

久下 裕司 (京都大学大学院薬学研究科・病態機能分析学分野)

(8) 神経伝達物質受容体リガンドの論理的設計とその薬理活性

周東 智 (北海道大学薬学研究院・創薬有機化学研究室)

(9) 個体レベルでのニューロン・グリア機能解析に資するイメージング法の開発

永井 健治 (北海道大学・電子科学研究所・ナノシステム生理学研究分野)

(10) 2 光子顕微鏡を用いた in vivo グリア細胞のカルシウム動態解析

高田 則雄, 平瀬 肇 (理化学研究所 脳科学総合研究センター)

(11) ATP によるミクログリア突起運動調節

－脳スライス培養を用いたリアルタイムイメージングによる解析－

南 雅文 (北海道大学大学院薬学研究院 薬理学研究室)

(12) 脊髄ミクログリアにおけるグルタミン酸トランスポーター機能制御に対する ATP 受容体の役割

森岡 徳光, Md Joynal Abidin, 北山 友也, 森田 克也, 土肥 敏博

(広島大学大学院医歯薬学総合研究科)

(13) 脊髄内 P2X_{2/3} 受容体を介した長期持続性アロディニアの誘導および維持におけるグリア細胞の役割

中川 貴之¹, 若松 佳代¹, 前田 早苗¹, 南 雅文², 佐藤 公道³, 金子 周司¹

(¹京都大学薬学研究科生体機能解析学分野, ²北海道大学薬学研究科薬理学分野, ³安田女子大学)

- (14) ミクログリア P2X₄ 受容体の発現における細胞内情報伝達機構
津田 誠, 井上 和秀 (九州大学大学院薬学研究院薬効解析学分野)
- (15) 細胞外 ATP の脊髄前角細胞へ及ぼす影響について
中塚 映政, 古賀 秀剛, 青山 貴博, 藤田 亜美, 熊本 栄一
(佐賀大学医学部生体構造機能学講座神経生理学分野)
- (16) シナプス前プリン受容体の発現機能連関解析 —シナプス前分子の *in vivo* gene silencing—
加藤 総夫 (東京慈恵会医科大学・総合医科学研究センター・神経生理学研究室)
- (17) P2X 受容体を介したマウス網膜における経路特異的な応答の修飾
金田 誠, 石井 俊行*, 重松 康秀**, 細谷 俊彦*, 霜田 幸雄**
(慶應大・医・生理, *理研・脳センター・細谷研究ユニット, **東京女子医大・総研)
- (18) Generation of adenosine A3 receptor humanized mice for the evaluation of the human antagonists
Mitsuo Satoh, Kazuya Yamano, Miho Inoue, Shigehiro Masaki, Mayumi Saki, Michio Ichimura
(Pharmaceutical Research Center, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.)
- (19) T 細胞の分化・成熟による P2X₇ 受容体活性の変動
原田 均, 月本 光俊, 前畑 真知子, 五十里 彰, 高木 邦明, 出川 雅邦
(静岡県立大・薬)
- (20) 受容体刺激による PIP2 減少と IP3 増大の測定法の開発 —PH-GFP の代替として—
尾松 万里子, 藤居 祐介, 松浦 博 (滋賀医科大学・生理学講座・細胞機能生理学部門)
- (P 1) 孤束核シナプス前 P2X 受容体によるシナプス伝達制御
～laser photolysis 法を用いた時間空間限局的 ATP 投与～
井村 泰子 (東京慈恵医大・総合医科学研究センター・神経生理)
- (P 2) 中枢シナプス前 A₁ 受容体の *in-vivo* 遺伝子ノックダウン
繁富 英治 (東京慈恵医大・総合医科学研究センター・神経生理)
- (P 3) アデノシン A1 受容体によるラット海馬スライス内興奮伝播制御
関野 祐子 (東京大・医科学研・神経ネットワーク)
- (P 4) Neurotransmitters involved in thermosensation
Sravan Mandadi (生理研・岡崎統合バイオサイエンスセンター・細胞生理)
- (P 5) FM1-43 a vital dye used to detect P2X₄ channel activity
Fernando Lopez-Redondo (科学技術振興機構・細胞力覚プロジェクト)
- (P 6) ミクログリアの P2X₄ 受容体発現制御におけるフィブロネクチンの作用解明
豊満 笑加 (九州大・薬・薬効解析)
- (P 7) 難治性疼痛における ATP 受容体を介した細胞質型ホスホリパーゼ A2 の活性化
長谷川 茂雄 (九州大・薬・薬効解析)
- (P 8) α7 ニコチン性アセチルコリン受容体のホスホリパーゼ C 活性化を介したミクログリアの機能調節
濱 千紘 (広島大・薬・薬効解析)
- (P 9) 細胞外 ATP による海馬アストロサイト自発的カルシウム・オシレーションの頻度調節
川村 将仁 (東京慈恵医大・薬理)
- (P 10) OGD-induced ATP release via maxi-anion channels in mouse astrocytes
Hongtao Liu (生理研)
- (P 11) 乳腺組織サンプルからの機械刺激による ATP 放出
古家 喜四夫 (科学技術振興機構・細胞力覚プロジェクト)

- (P12) 血管周皮細胞 (ペリサイト)–ATP/P2 受容体シグナルを介した
マトリックスメタロプロテアーゼ放出–

末石 浩二 (国立医薬品食品衛生研究所・薬理)

- (P13) ケラチノサイト HaCaT 細胞における P2Y 受容体を介したインターロイキン 6 産生機構の解析

小林 大策 (東北大・薬・細胞情報薬学)

- (P14) ATP および NAD による細胞死誘導機構の相違

前畑 真知子 (静岡県立大・薬・衛生・分子毒性)

- (P15) デオキシグルコースに依存した MDCK 細胞へのアデニンヌクレオチドの取り込み

右田 啓介 (福岡大・医・薬理)

- (P16) マウス脳内のアデニル酸シクラーゼの内因性阻害物質 3'-AMP の産生酵素系の基礎的検討

藤森 廣幸 (摂南大・薬・衛生分析化学)

【参加者名】

南雅文 (北海道大院薬学), 永井健治 (北海道大 電子科学研), 小林大策 (東北大院薬学), 伊藤政明, 松岡功 (高崎健康福祉大薬学), 関野祐子 (東京大医科研), 高橋由香里, 加藤総夫, 繁富英治, 井村泰子, 山本清文 (東京慈恵会医科大), 金田誠 (慶應義塾大医), 高田則雄 (理研 脳科学総合研究センター), 大久保聡子, 末石浩二, 藤下加代子 (国立医薬品食品衛生研), 中田裕康 (東京都神経科学総合研), 柴田圭輔 (星薬科大学/国立衛研), 森倫範 (新宿鍼灸柔整専門学校), 須藤久美 (昭和大学院薬学), 和光未加 (共立薬科大薬), 今井利安 (日本ケミファ 研究所), 佐藤光男, 鈴木伸之 (協和発酵工業医薬研究センター), 天野賢一 (持田製薬), 原田均, 前畑真知子 (静岡県立大薬), 最上秀夫 (浜松医科大), 志内伸光, 小林剛 (名古屋大院医学), 水村和枝 (名古屋大環境医学研), Lopez-Redondo Fernando, 古

家喜四夫 (科学技術振興機構・細胞力覚プロジェクト), 綿野智一 (大阪大谷大薬学), 渡辺恭良 (大阪市立大院医学), 藤森廣幸 (摂南大薬学), 尾松万里子 (滋賀医科大), 小林希実子 (兵庫医科大), 山下勝幸 (奈良県立医科大), 久下裕司, 興水崇鏡, 中川貴之 (京都大院薬学), 土肥敏博, 濱千紘, 森岡徳光, 原田佳奈 (広島大院医歯薬学総合), 井上和秀, 上野光, 岡綾香, 片岡彩子, 北野順子, 齊藤秀俊, 津田誠, 豊満笑加, 中村康次, 長谷川茂雄, 増田隆博 (九州大院薬学), 右田啓介 (福岡大医), 中塚映政 (佐賀大医), 長谷彩乃, 檜山武史, 野中茂紀, 小林弘子 (基生研), 富永真琴, andadi Sravan (岡崎統合バイオ), Liu Hongtao, 松井広, 大塚岳, 根本知己, 和気弘明, 高鶴裕介, 稲田浩之, 立山充博, 石井裕, 岡田泰伸, 佐竹伸一郎, 井本敬二 (生理研)

【概要】

発表：口頭発表 20 題, ポスター発表 16 題

セッション 1 では, まず, 松岡および藤下により, 血管内皮細胞および脳血管周皮細胞機能の調節におけるプリン作動性シグナル伝達の役割についての発表と質疑応答がなされた。引き続き, 山下, 興水, 小林の発表があり, 興水および小林はイオンチャネル型 ATP 受容体分子と蛍光蛋白質との融合蛋白質発現系を用いた受容体機能および 1 分子レベルでの動態解析に関する最新の研究成果を発表した。

セッション 2 では, 「グリア細胞活性化の可視化と分子機能解析」を主題とし, 神経-グリア-血管内皮細胞機能関連の分子機構解明へのアプローチのための研究手法

と最近の研究成果が紹介された。渡辺および久下は, PET などの個体レベルでのイメージング手法の有用性と今後の展望について述べ, さらに脳虚血などの病態時のグリア細胞活性化の可視化への応用について動物実験による研究結果を中心に研究成果を発表した。周東は, イメージング研究や生化学的・薬理学的研究に必要となる情報伝達物質受容体の新規リガンドの創製法に関して, シクロプロパンをコアとして多様な官能基の立体配置を三次元的に制御する興味深い合成戦略とそれによるヒスタミン H3 受容体選択的リガンドの創製について紹介した。永井は, 分子機能イメージングに必要となる蛍光プローブ分子の創製手法とその応用例について, 高田は, 二光子

顕微鏡を用いたインビボでのグリア細胞内カルシウム動態解析について、南は、脳スライス培養系を用いたミクログリア形態変化のリアルタイム観察について、それぞれ研究成果を発表し、質疑応答がなされた。

セッション3では、森岡、中川、津田により、痛覚過敏およびアロディニアの誘発とその持続における脊髄内ブリン作動性シグナル伝達の役割を脊髄内グリア細胞機能との関連から検討した研究結果が報告され活発な討論がなされた。中塚は、脊髄前角細胞におけるATP受容体の役割について検討し、ATPがP2Y₁サブタイプを介して脊髄前角細胞を脱分極させることを示した。加藤は、孤束1次求心路-2次ニューロン間興奮性シナプス伝達調節におけるシナプス前アデノシン受容体機能解析について、シナプス前分子のin vivo gene silencing法を用いた新しい研究手法を紹介し、シナプス前アデノシン受容体を介した抑制効果について報告した。

セッション4では、金田によりマウス網膜におけるP2X₂受容体を介したOFF経路特異的な情報伝達制御について電気生理学的手法による研究成果が報告された。佐藤はヒト型アデノシンA3受容体およびヒト/マウスキメラ型アデノシンA3受容体をノックインした遺伝子改変マウスの作製とそれを用いた薬理学実験の結果につい

て発表した。興味深いことにヒト型アデノシンA3受容体は、マウスでは、アゴニスト刺激によりCa²⁺動員は惹起するが、PI3K経路にはカップルしないことが示された。アデノシンA3受容体を介した生体反応がCa²⁺動員系を介するものかPI3K経路を介するものかを個体レベルあるいは組織レベルで検討するために有用な実験動物であると考えられる。原田は、ATPによる成熟T細胞での細胞死誘導におけるP2X₇受容体の役割と細胞死誘導メカニズムについて、尾松は、抗PIP2抗体を用いた免疫組織学的研究によりATPあるいはUTP刺激時の細胞膜内PIP2量変化の詳細な時間経過について、それぞれ研究成果を発表し質疑応答を行った。

以上の口頭発表に加え、16題のポスターが2日間にわたって掲示され、第2日目に1時間の討論時間が設けられて活発な意見交換がなされた。

本研究会では、口頭発表で時間が不足し討論を尽くしきれなかった感があり、今後の課題であると考えられるが、全体を通して、新しい研究成果の発表とそれに対する活発な討論が行われ、「研究者間の密な情報交換による、本邦のブリン作動性シグナリング研究のレベル向上」という本研究会の目的は十分に達成できたものと考えられる。

(1) 血管内皮細胞のATP分解酵素活性におよぼす炎症性サイトカインの影響

松岡 功, 唐 燕*

(高崎健康福祉大学・薬学部・薬効解析, *福島医大・医・薬理)

細胞外のATP代謝に関わるecto-nucleotidaseは、P2受容体の刺激作用を終結させるだけでなく、細胞膜局所における迅速なアデノシン産生をもたらし、アデノシン受容体を介する作用への情報変換に重要な役割を果たしている。ブリン作動性情報伝達に関与する受容体および細胞外ATP分解酵素遺伝子が同定されて以来、ATPやアデノシンの生理的役割が数多く明らかにされてきたが、ATPやアデノシンの細胞外動態を考えるとブリン作動性情報伝達は生体の恒常性維持のみならず組織が物理的、化学的に侵襲を受けた炎症時にも重要な役割をはたすと考えられる。炎症部位では種々のサイトカイン産生が亢進し、周辺組織の細胞の遺伝子発現を変化させ、細胞応答のre-programmingが生じる。また、血小板や内皮細胞から放出されるATPやADPの分解が障害されると循環

器系疾患の原因になることも明らかにされている。しかし、どのような機序でATP代謝酵素の機能変化が生じるかは知られていない。本研究では、炎症性疾患におけるブリン作動性シグナルの役割を解明する過程の1つとして、炎症反応で中心的役割を果たす内皮細胞を用いて、細胞外ATP分解酵素の発現およびATP分解活性に及ぼす炎症性サイトカインの影響を検討した。

ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)には、高活性のATP分解酵素が存在し、ATPを直接AMPに変換し、アデノシンを蓄積させた。RT-PCRにてHUVECに発現するATP分解酵素を検討した結果、ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (CD39)とecto-5'-nucleotidase (CD73)の発現が強く、ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (NPP1)の発現も認められた。インターフェロン(IFN)-γ

を添加すると、ATP 分解活性が減少し、逆に、AMP からアデノシンの産生が亢進した。この時、CD39 の遺伝子発現が低下し、CD73 の発現が上昇していたが、NPPI は変化しなかった。IFN- γ の作用は用量および時間依存的に増大し、10 ng/ml, 24 時間の作用で CD39 は対照の約 30%にまで減少し、CD73 は 2.5 倍に上昇した。このような遺伝子発現の変化は、ヒト大動脈および肺動脈内皮細胞、脳微小血管内皮細胞でも同様に認められた。CD39 および CD73 の遺伝子発現の変化は、核内 RNA でも生じていたことから、転写レベルで調節されていると考えられた。

IFN- γ は受容体活性化により JAK チロシンリン酸化酵素を活性化し、STAT1 を介して転写調節を起こすが、同

時に MAP キナーゼ、PI3 キナーゼおよびホスホリパーゼ C γ などを活性化することが知られている。種々の情報伝達系阻害薬のうち IFN- γ の作用を阻害したのは JAK-STAT1 情報伝達系阻害剤のみであった。他のサイトカインでは TNF- α および IL-1 β に IFN- γ と同様の作用が認められたが、IFN- α , IL-6, IL-8, TGF- β などでは CD39 発現の変化は見られなかった。また、IFN- γ と TNF- α または IL-1 β は相乗的に CD39 の発現と ATP 分解活性を低下させた。このような相乗効果は TNF- α と IL-1 β の間では見られなかった。

以上の結果から、IFN- γ は血管内 ATP 分解の恒常性に影響し、炎症時のプリン作動性応答の変化に大きく関与すると考えられた。

(2) 血管周皮細胞 (ペリサイト)

—ATP/P2 受容体シグナルを介したアストロサイトー毛細血管連関—

藤下 加代子¹, 末石 浩二^{1,2}, 片岡 泰文², 井上 和秀³, 小泉 修一¹

(¹ 国立衛研・薬理部, ² 福岡大学・薬・薬学疾患管理, ³ 九州大学・院・薬・薬効解析)

中枢神経系でのグリア細胞によるダイナミックな情報伝達制御に注目が集まっている。脳内では、ニューロンと密接して存在するアストロサイトがシナプスから漏れ出た伝達物質を受けとる一方、自らも液性因子を放出してシナプス伝達を制御する。このような、所謂「三者間シナプス」の形成には、ATP 及び P2 受容体が中心的な役割を果たしている。他方でアストロサイトは、その足 (endfoot) を血管系にも伸ばしている。最近アストロサイトによる血流制御に関する報告がいくつかなされたが (Zonta et al., 2003; Mulligan & MacVicar, 2004; Takano et al., 2006), その制御様式及び機序についてはまだ議論の最中である。また血管系のうち、毛細血管や微小血管の血管壁外周にはペリサイト (周皮細胞) と呼ばれる細胞が存在し、アストロサイトと密接な解剖学的位置関係を呈しているが、その生理的役割についてはまだ不明な点が多い。そこで私達は、このアストロサイトーペリサイトー血管系連関に注目し、アストロサイトーペリサイト間での ATP/P2 受容体を介したコミュニケーションおよびペリサイトでの ATP/P2 受容体を介したシグナルの生理学的な役割について検討を行った。ラット海馬初代培養アストロサイトは、機械刺激により周囲のアストロ

サイトに伝播する Ca²⁺ wave を呈するが、これは ATP 及び P2Y₁ 受容体依存的であった。また、ラット脳初代培養ペリサイトを用いた薬理学的な検討から、ペリサイトでは主に P2Y₂ 受容体が発現しており、Ca²⁺ wave 等の機能とリンクしていることが明らかとなった。そこでアストロサイトーペリサイト共培養系を作製し、単一のアストロサイトに機械刺激を与えたところ、近傍アストロサイトだけでなくペリサイトへも、P2 受容体を介した Ca²⁺ wave が伝播した。ペリサイトは α -smooth muscle actin を発現することが知られている。そこでペリサイトを ATP 及び P2Y₂ 受容体作用薬 UTP で灌流刺激すると、細胞内 Ca²⁺ 濃度 の上昇に続いて細胞の収縮が観察された。また、このペリサイトの収縮反応は UTP 濃度依存的であり、suramin によって有意に抑制されたことから P2Y₂ 受容体を介した応答であることが示唆された。以上、アストロサイトは gliotransmitter ATP により、シナプス伝達の制御だけでなく、ペリサイトの収縮・弛緩応答にも関与していることが明らかとなった。これら ATP を介したアストロサイトーペリサイト連関は、局所脳血流の制御と密接に関連している可能性が示唆された。

(3) カルシウムストアに存在する BK チャネルによるカルシウム放出の制御

山下 勝幸 (奈良医大・第一生理)

中枢神経系は神経管を構成する神経上皮から発生する。神経上皮細胞の増殖に ATP 受容体の活性化と細胞内 Ca 動員が必要であることを、発生初期鶏胚の網膜神経上皮を用いた研究から報告した。さらに、細胞周期のうち S 期細胞の核内 Ca 濃度が ATP 受容体の活性化により上昇することを明らかにした¹。この研究において、小胞体 (ER) と核膜を、ER の蛍光プローブである DiOC₅ (3) でラベルしたところ、その蛍光強度が自発的にオシレートすることを発見した。DiOC₅ (3) は電位感受性色素であり、Ca オシレーションが起こることは既に観察していたので、DiOC₅ (3) の蛍光オシレーションは、Ca ストアの膜電位変化を示すと考えられた。そこで、Ca ストアの膜電位変化機構の解明と Ca ストアに存在するイオンチャネルの同定を行なった。

まず、DiOC₅ (3) の膜電位感受性を、DiOC₅ (3) でラベルしたパッチ膜を電位固定することにより決定した。その結果、1 mV の電位変化に対し、1.3 % の蛍光強度変化を示した。また、DiOC₅ (3) で ER と核膜をラベルし ATP を投与すると、DiOC₅ (3) 蛍光は二相性の強度変化を示した。この変化は、Ca 放出により Ca ストアの膜電位が負方向へ変化し、続いて、ストアの Ca ポンプによる Ca

uptake により正方向へ変化したことを示唆する。核膜からのパッチ記録と抗体ラベルから、BK チャネルが Ca ストアに存在することが示唆された。このチャネルはストア内の正方向への電位変化、および、ストア内 Ca 濃度上昇により活性化された。これらの結果から、Ca ストアに存在する BK チャネルの活動によって、Ca ストアの膜電位が脱分極と過分極の二つの状態をとることが示唆された。事実、Ca ストアの膜電位は振幅が 45 mV におよぶ双安定性のオシレーションを示した²。Ca ストアの膜電位変化は Ca 放出を制御し、Ca オシレーションの発生、および、その細胞間同期を担うメカニズムとして考える³。

1. Sugioka M, Yamashita M (2003) Calcium signaling to nucleus via store-operated system during cell cycle in retinal neuroepithelium. *Neurosci Res* **45**:447-458.
2. Yamashita M, Sugioka M, Ogawa Y (2006) Voltage- and Ca²⁺-activated potassium channels in Ca²⁺ store control Ca²⁺ release. *FEBS J* **273**:3585-3597.
3. Yamashita M (2006) 'Quantal' Ca²⁺ release reassessed – a clue to oscillation and synchronization. *FEBS Lett* (published online).

(4) 新規 P2X スプライシングバリエントを用いたサブユニット相互作用の解析

奥水 崇鏡¹, 上野 晋², 柳原 延章², 辻本 豪三¹

(¹ 京都大学薬学研究科ゲノム創薬科学分野, ² 産業医科大学医学部薬理学講座)

P2X 受容体チャネルのスプライシングによる機能変化が、サブユニット間の相互作用に及ぼす影響については未だ詳細な検討がなされていない。今回我々はマウス下垂体に発現する新たなバリエントサブユニット P2X_{2c} の機能とサブユニット間相互作用について解析した結果を報告する。P2X_{2c} はカルボキシル基 (C) 末細胞内部分の一部に相当する塩基配列が、スプライシングにより in-flame で欠失し、これまで知られている全長の P2X_{2a} や C 末スプライシングバリエントである P2X_{2b} よりもさらに短くなっていることが判明した。C 末のスプライシ

ング反応は P2X₂ 遺伝子の最終エクソン内に存在する cryptic splicing site が利用され、マウス P2X₂ 遺伝子の 5' 上流には下垂体成長ホルモン産生細胞株で特異的に活性化されるエンハンサー領域が存在した。動物細胞あるいはアフリカツメガエル卵母細胞に強制発現させた場合、P2X_{2c} サブユニットは単独で陽イオンチャネルを形成し、ATP の potency は P2X_{2a} と同程度を示した。P2X_{2c} の機能面では、ATP の継続する或は反復する刺激に対し野生型の P2X_{2a} やスプライシングバリエントの P2X_{2b} よりもはるかに早い脱感作を起こす特徴を持っていた。よって

P2X_{2e} の C 末構造は、2 回膜貫通領域を持つ ATP 受容体の脱感作に重要な受容体部分を同定する手掛かりとなる有用な知見であった。下垂体前葉細胞には P2X_{2a} と P2X_{2b} をコードする RNA がほぼ等量共存し、P2X_{2e} の発現量はこれらの約半分程度であった。P2X_{2a} が P2X_{2b} や P2X_{2e} と同一細胞に共存した場合ヘテロマーを形成した。よって P2X_{2a} による持続的細胞内カルシウム濃度の上昇がヘテロマーを形成することで制限されることが示唆された。

受容体 C-末の異なるスプライシング様式がサブユニット間相互作用に及ぼす影響について、生きたままの細胞を用いて調べることを目的に、P2X_{2a}、P2X_{2b}、P2X_{2e} の C-末あるいはアミノ基末に GFP 蛍光蛋白質と Luciferase 発光蛋白質を付加した融合蛋白質を共発現させ、光振動エネルギー移動現象 (biological resonance energy transfer, BRET) の有無を観察した。発光/蛍光蛋白質を融合後も P2X サブユニットの細胞膜への局在、ATP 感受性、脱感作様式、生化学的なサブユニット間相互作用には影響が見られなかった。共発現細胞において

C-末同士あるいは C-末とアミノ基末において BRET が惹起され P2X₂ サブユニット間の相互作用を解析することに成功した。興味深いことに P2X₂ 受容体の C-末はスプライシングを受けて短くなる程相互作用が強くなることが判明した。更に、C-末が短くなる程、アミノ末端との相互作用も強くなった。これら細胞内におけるサブユニット間の相互作用は ATP の刺激では変化せず、この相互作用は構成的であると考えられた。

以上、新たに同定された P2X_{2e} サブユニットを用いた解析により、P2X₂ 受容体の脱感作機構、及びサブユニット細胞内部分における相互作用の理解に繋がる、重要な知見を得ることができたのでここに報告した。

[参考文献]

Koshimizu T, Kretschmannova K, He ML, Ueno S, Tanoue A, Yanagihara N, Stojilkovic SS, Tsujimoto G (2006) Carboxyl-terminal splicing enhances physical interactions between the cytoplasmic tails of purinergic P2X receptors. *Mol Pharmacol* 69:1588-1598.

(5) 細胞膜上における P2X₄受容体の動態の1分子ビデオイメージング解析

小林 剛¹, 武田 美江¹, Fernando Lopez-Redondo², 古家 喜四夫²,
山本 希美子³, 安藤 譲二³, 曾我部 正博^{1,2}

(¹名古屋大・医・細胞生物物理, ²JST・SORST・細胞力覚プロジェクト,
³東京大院・医・医用生体工学講座システム生理学)

血管内皮細胞は、細胞膜表面上に発現した P2X₄受容体を介して血流の変化を感知することができる。その際に、血流の shear stress (せん断応力) の変化が細胞内へのカルシウムイオンの細胞内流入へ変換される。このような力学刺激応答におけるカルシウム動員は一つの細胞においても空間的に制御されており、細胞膜上の小器官であるカベオラが多く存在する部位で反応が見られることが報告されている。我々は、それらの力学応答の空間制御には、P2X₄受容体のダイナミクスの空間的な調節が重要な役割を果たしているのではないかと考え、細胞膜上における P2X₄ 受容体の動態の可視化解析を試みている。そのため、C 末端に monomeric GFP を融合した P2X₄-mGFP を培養細胞に発現し、蛍光イメージングを行った。しかし、通常の落射蛍光顕微鏡や共焦点顕微鏡を用いて観察すると、細胞内小胞に GFP の強いシグナルが

認められたが、細胞膜上には、その発現がほとんど見られなかった。これまで、P2X₄受容体は細胞膜上に発現するが多くは細胞内小胞に存在することが報告されている。従って、細胞膜上には少数の受容体分子が存在し、それに由来する蛍光シグナルが、細胞内小胞に存在する P2X₄-mGFP 由来の蛍光の中に埋もれてしまい検出できていないと考えられた。そこで、我々は、細胞膜上の受容体分子を可視化するために、全反射蛍光顕微鏡による 1 分子イメージングを行った。励起用レーザ光を全反射させしみ出したエバネッセント光により培養細胞の細胞膜近傍を選択的に励起すると、P2X₄-mGFP を発現した細胞では、細胞内小胞由来の明るい蛍光強度の輝点のほかに、暗い輝点が観察された。暗い輝点は、その蛍光強度分布やその一段階消光から判断して、GFP 1 分子レベルの信号であり、焦点平面を 2 次元的に拡散運動したこと

から、細胞膜上の P2X₄-mGFP であると考えられた。これらの P2X₄-mGFP 分子のほとんどは速い拡散運動（拡散係数 0.6 mm²/s at 32°C）を示した。P2X₄ 受容体の細胞外部位を認識する蛍光標識プローブを用いて細胞膜上の P2X₄ 受容体分子を特異的に検出しイメージングした場合でも、同様の運動が観察された。また、輝点の蛍光強度分布から、細胞膜上の受容体は報告されているように

3 量体で存在すると考えられた。カベオラのマーカーである caveolin-GFP と P2X₄ を細胞に共発現し同時観察したところ、細胞膜上の P2X₄ 受容体分子と caveolin との共局在は認められなかった。これらの結果より、力学刺激応答時に観察される細胞内カルシウム動員の空間的な制御には、カベオラと P2X₄ 受容体分子の安定的な相互作用には依存しないと考えられた。

(6) 神経・グリア機能解析のための分子イメージング研究

渡辺 恭良（理化学研究所分子イメージング研究プログラム、
大阪市立大学大学院医学研究科システム神経科学）

ポジトロンエミッショントモグラフィー (PET) 等による「分子イメージング」により、神経機能、グリア機能、そして、その統合による脳機能に関する機能分子や病態時の異常分子を追跡することができる。現在、文部科学省の分子イメージング研究プログラムがスタートし、その中で、神経・グリア分別機能分子イメージングや、Genotype と Phenotype との橋渡し研究が行われる。理化学研究所フロンティア研究システム (FRS) 分子イメージング研究プログラムは、そのプログラムの中で、「創薬候補物質探索拠点」として拠点形成の任務を与えられ、様々な神経科学領域の共同研究についてもプロジェクト化を担っていく。

我々は、科学技術振興機構の国際共同研究（1993-1997 年）、日本学術振興会の未来開拓学術研究事業（1998-2003 年）、文部科学省学術創成研究（2001-2006 年）のプロジェクトを中心に PET を用いた分子イメージング研究を行ってきた。PET においては、適切なポジトロン核種で標識した化合物を開発し、それらを超高感度分子プローブとして、生きて機能している状態での生化学的分子情報

の動態追跡を行う。PET を用いて脳局所血流量を計測する脳賦活試験により、脳タスク依存的な配座（担当部位）や神経回路網の情報が得られる。また、その脳機能担当部位でどのような神経伝達物質やシグナル伝達分子が働いているかについては、PET を用いて神経伝達物質やその受容体をイメージング・定量解析することが必要である。脳発達障害、学習障害や慢性疲労を含む脳病態において重要視される様々な因子と細胞情報伝達、特異的物質代謝について、新規のイメージング法を開拓し、これらを用いた基礎・臨床研究により分子一機能の橋渡しをすることが主眼である。そして、病態時のそれぞれの変化を探ることによって、病態の分子動態的把握、治療候補薬剤の効果について検討する。このような方法論が“個”のポストゲノム研究・ゲノム創薬研究を進めるのに有力であることを十分意識し、同一個体の脳機能発達過程や老化・病的過程の脳内分子環境推移を解明することを目指して研究を進めている。ここでは、動物用マイクロ PET を用いた研究の現状や我々が開発してきた Bioradiography などの方法論についても紹介したい。

(7) 分子イメージングによる脳虚血病態のニューロン・グリア機能解析

久下 裕司（京都大学大学院薬学研究科・病態機能分析学分野）

虚血性脳血管障害は、最も頻発する脳神経系疾患のひとつであり、その罹患患者数は増加傾向にある。近年、この脳虚血病態において、神経細胞だけでなく、グリア

（特にアストロサイト）細胞や、神経細胞－グリア細胞の相互作用が重要な役割を担っていることが明らかとなってきた。

一方、分子イメージング技術は、生体内における生命現象の分子プロセスを生きた状態で画像として表示することができる技術であり、生体機能の解明に役立つものとして注目されている。これらには、放射性同位元素 (RI) で標識したプローブを用いる RI 分子イメージング法 (ポジトロン CT, シングルフォトン CT)、蛍光 (発光) 分子で標識したプローブを用いる光イメージング法などがあり、それぞれの特長を生かして種々の研究に用いられている。

我々は、RI が物質透過性と定量性に優れることから、小動物だけでなく、大動物やヒトにおいても定量的解析が可能な RI 分子イメージング技術に着目し、分子イメージングによる脳虚血病態解析に関する研究を展開してき

た。すなわち、① RI 標識した中枢性ベンゾジアゼピン受容体リガンド ($^{123/125}\text{I}$ -iomazenil) を用いる神経機能評価、② RI 標識したオクタン酸 ($^{11/14}\text{C}$ -octanoate) を用いるアストロサイトの機能評価、及び ③ 神経・グリア機能とシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) 発現の解析等を通して、神経・グリア機能と COX-2 発現が、虚血の程度と関連し、時間的・空間的にダイナミックに変化していることを示してきた。また、最近では、分子イメージングによる COX-2 発現の可視化を目指して、COX-2 を標的とする RI 標識プローブの開発に取り組んでいる。

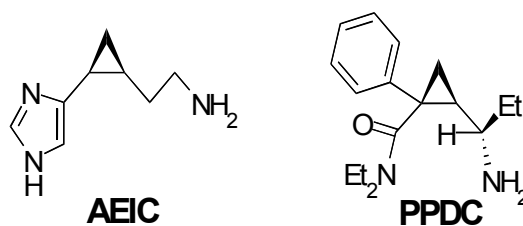
本会では、我々の研究成果を中心に、分子イメージングによる脳虚血病態、特にニューロン・グリア機能解析に関する最近の知見を紹介する。

(8) 神経伝達物質受容体リガンドの論理的設計とその薬理活性

周東 智 (北海道大学薬学研究院・創薬有機化学研究室)

ゲノム創薬への社会的期待は極めて大きい。ヒトゲノム解読やバイオインフォマティクスの急速な進歩に伴い、創薬標的蛋白質の同定が効率化されつつあるが、新薬開発は必ずしも加速されていないのが現状である。この主な原因は、コンビナトリアルケミストリー・化合物ライブラリー・HTS (high throughput screening) 等の創薬テクノロジーを用いたランダムスクリーニングを基本とする昨今の新薬開発戦略が必ずしも効果的ではないこと、即ち、標的分子同定後の新薬に至る段階の効率的な方法論の欠如にある。従って、創薬標的分子に対して特異的に結合する低分子リガンド (アゴニストやアンタゴニスト) の合理的・効率的な創製を可能にする方法論の開発が急務であり、これが成されて初めて本質的なゲノム創薬は実現する。私達は、細胞膜受容体に対する特異的なリガンドを論理的に創製する方法の開発に有機化学からアプローチしている。

標的分子に対する薬の親和性の強弱は、結合する際の自由エネルギー変化 (ΔG) に依存する。従って、標的との結合に好適な官能基が好適に三次元配置された低分子 (薬) がエンタルピーとエントロピーの両面から有利となり、 ΔG の大きな減少を伴い強力に標的と結合し、強い薬理活性が発現する。これを踏まえて、好適な官能基



とその好適な三次元配置 (配座) を合理的に見出すことが可能な“立体的多様性を鍵とする分子設計法”を考案した。この方法の特徴は、立体的に小さくかつ強固なシクロプロパンの構造特性を活用して、三次元的に多様な構造に官能基を制御した一連の配座制限型誘導体を設計・合成し、薬理活性を評価することにある。

本講演では、上記方法論により創製した中枢における神経伝達物質受容体リガンドである AEIC 及び PPDC について紹介する。AEIC は、中枢新薬の創薬標的に想定されているヒスタミン H3 受容体に対する初めての高選択的アゴニストである。一方、PPDC はアルツハイマー病との関係で最近注目されている NMDA 受容体に対する、従来にないタイプの特異的なアンタゴニストである。

参考文献

1. Kazuta Y, Matsuda A, Shuto S. *J Org Chem* **67**: 1669-1677 (2002).
2. Kazuta Y, Hirano K, Natsume K, Yamada S, Kimura R, Matsumoto S, Furuichi K, Matsuda A, Shuto S. *J Med*

Chem 46: 1980-1988 (2003).

3. 周東 智, 松田 彰, 創薬: オングストロームの分子設計。 “ナノバイオエンジニアリング, 化学フロン

ティア 13”, 杉本直己編, 2004, pp37-49.

4. Watanabe M, Kazuta Y, Hayashi H, Yamada S, Matsuda A, Shuto S. *J Med Chem* (in press).

(9) 個体レベルでのニューロン・グリア機能解析に資するイメージング法の開発

永井 健治 (北海道大学・電子科学研究所・ナノシステム生理学的分野)

特定の外界刺激に応じて, 細胞内では特定のシグナル伝達反応が起こり, 細胞の分化, 形態変化, 分裂, 死などの現象が誘起される。こうした細胞内の情報伝達に関わる分子群とそれらの相互作用に関する知見は我々の頭では記憶できないほど蓄積している。しかし, これらの知見からは “生体システムに潜む原理” を理解することは難しい。これはちょうどコンピュータ回路図を手にし, それに従ってコンピュータを作ることができても, コンピュータが何故作動するのかを理解できないのと同じで

ある。 “生体システムに潜む原理” を理解するためには, 生体情報がどのように動き回っているのかを “見る” 技術と生体分子を “操作” する技術が必要である。本研究会では特に, 蛍光タンパク質や化学発光タンパク質の共鳴エネルギー移動を利用した機能指示薬の開発とそれを用いたリアルタイム機能イメージングについての我々の知見を紹介し, 個体レベルでのニューロン・グリア機能解析に迫るための今後の展望を述べたい。

(10) 2光子顕微鏡を用いた in vivo グリア細胞のカルシウム動態解析

高田 則雄, 平瀬 肇

(理化学研究所 脳科学総合研究センター)

大脳皮質において最も数の多いグリア細胞はアストロサイトである。アストロサイトには神経細胞と相互作用するためのさまざまな機構がある。例えば, アストロサイトは神経情報伝達物質の受容体 (AMPA 受容体, P2X 受容体, mGlu 受容体など) を持ち, また自ら情報伝達物質 (Glu, GABA, ATP, D-serin など) を放出することが知られている。これらの受容体の活性化あるいは情報伝達物質放出の際にはアストロサイトの細胞内カルシウム濃度が上昇する。そのため細胞内カルシウム応答はアストロサイト活動の指標と考えられている。

アストロサイトのカルシウム応答のパターンには一過的上昇, 持続的上昇, 周期的振動が知られており, アストロサイトへの刺激特性に依存してパターンが変化すると考えられている。また, アストロサイトを Glu で繰り返し刺激することで, 周期的振動パターンを示すカルシウム応答の周波数が長時間上昇する (長期増強) ことが報告されている (Pasti et al., 1995)。さらに, 単一のアストロサイトに生じた細胞内カルシウム上昇は近隣のアスト

ロサイトに伝播することが示されている (Nedergaard, 1994)。これらの事実からアストロサイトはこれまで想定されていなかった脳神経情報処理も担うのではないかと予想されている。

上記の知見は in vitro の系を用いた実験で得られたものである。アストロサイトの形態や受容体の発現状態は細胞外の環境によって大きく変化することが知られている。in vitro の系では脳血流や神経細胞の自発的活動が失われているため, in vitro の研究で示唆されたアストロサイトの機能が実際の脳内でも生じる現象かどうかは不明である。そこで我々は麻酔下ラットの大脳皮質を2光子顕微鏡観察することで, in vivo におけるアストロサイトの自発的カルシウム動態を解析した。アストロサイトの細胞内カルシウム濃度の計測には緑色のカルシウム感受性蛍光色素 (Oregon Green BAPTA-1, Fluo-4) を用いた。神経細胞とアストロサイトを区別するために, アストロサイトの特異的に染色する赤色の蛍光色素 (Sulforhodamine-101) を用いた。その結果, 幼弱ラットと

成熟ラットではアストロサイトの自発的カルシウム上昇の頻度が異なることが判明した。また大脳皮質の層ごとにアストロサイトの活動状態が異なることを見つけた。カルシウム上昇の持続時間や時空間的な同期性について現在解析中である。

参考文献

Nedergaard M (1994) Direct signaling from astrocytes to

neurons in cultures of mammalian brain cells. *Science* **263**: 1768-1771.

Pasti L, Pozzan T, Carmignoto G (1995) Long-lasting changes of calcium oscillations in astrocytes. A new form of glutamate-mediated plasticity. *J Biol Chem* **270**:15203-15210.

(11) ATP によるミクログリア突起運動調節 ー脳スライス培養を用いたリアルタイムイメージングによる解析ー

南 雅文

(北海道大学大学院薬学研究院 薬理学研究室)

ミクログリアは、通常、脳内で多数の細長い突起を有するラミファイド型と呼ばれる形態をとり、周囲の細胞と接触し脳内環境を監視しているが、脳組織が傷害されると周囲からの様々な因子に反応して突起を退縮させた活性化状態のアメボイド型へとその形態を変化させる。本研究では、脳組織に傷害を与えたときに生じるミクログリアの形態変化について、その調節機構を明らかにすることを目的として脳スライス培養を用いた検討を行った。

培養海馬スライスにレーザーを用いて傷害を与えると、傷害直後にミクログリアは急速に傷害部位に向かって突起を伸長させ、この突起伸長は 30 分程度で収束した。一方、傷害部位の反対側においては突起の退縮が観察された。

細胞の傷害によって細胞外へと漏出した ATP が、ミクログリアの傷害部位への突起伸長を惹起する可能性が考えられた。そこで、ATP の受容体である P2 プリン受容体の阻害薬である Reactive Blue 2 (RB2) および ATP 分解酵素である apyrase の効果を検討したところ、これらの薬物はいずれもミクログリアの傷害部位への突起伸長を

有意に抑制した。

ミクログリア突起伸長を調節する細胞内シグナル伝達を明らかにする目的で、先ず、cAMP のアナログである dbcAMP (10-100 μ M) の処置を行ったところ、濃度依存的に突起伸長を抑制することが明らかとなり、cAMP-A キナーゼ系がミクログリア突起伸長を抑制的に調節している可能性が示唆された。

傷害部位へのミクログリア突起伸長はインビボにおいても観察されることが最近報告されたが、インビボではその分子機構の解析が難しいと考えられるのに対して、本実験系では各種阻害薬や中和抗体を用いた解析を容易に行うことができるという利点を有しており、脳組織傷害時におけるミクログリアの形態変化・細胞移動制御の分子機構を研究する上で有用であると考えられる。

【謝辞】

Iba1-EGFP トランスジェニックマウスを御供与下さいました国立精神・神経センター神経研究所 高坂 新一先生、および研究方法に関して多くの御指導・御助言を賜りました京都大学医学研究科 先端領域融合医学研究機構 木村 宏先生に深謝いたします。

(12) 脊髄ミクログリアにおけるグルタミン酸トランスポーター機能制御に対する ATP 受容体の役割

森岡 徳光, Md Joynal Abidin, 北山 友也, 森田 克也, 土肥 敏博

(広島大学大学院医歯薬学総合研究科)

グルタミン酸は中枢神経系における主要な神経伝達物

質であるが、過剰なグルタミン酸は神経細胞障害を引き

起こすことが知られている。それ故、シナプス間隙におけるグルタミン酸濃度制御は様々な神経疾患に関与する重要なファクターである。グルタミン酸トランスポーター (EAAT) は、細胞外グルタミン酸濃度の調節を担う最も重要な機能分子であり、その機能異常は様々な病変に関与していることが報告されている。従来、アストロサイトに発現する EAAT が専ら細胞外グルタミン酸濃度制御に深く関与すると考えられてきたが、近年ミクログリアにおいても EAAT が発現し、様々な病態時において機能変化が生じていることが報告されつつある。しかしながら、ミクログリアにおける EAAT 機能制御機構についての詳細は未だ明らかではない。そこで本研究では脊髄由来初代培養ミクログリアを用いて制御候補因子として ATP の役割に注目し、脊髄ミクログリアにおける EAAT 機能に対する影響を検討した。培養脊髄ミクログリアにおいてはグリア型 EAAT である GLAST 及び GLT-1 が発

現していることが確認された。さらに ATP 及び P2X₇ 選択的作動薬 BzATP を前処置することにより、細胞外 Ca²⁺ 及び Na⁺ 非依存的にグルタミン酸取り込み能は有意に減少した。BzATP によるグルタミン酸取り込み抑制作用は、P2X₇ 選択的拮抗薬 brilliant blue G 及び ATP peiodate oxidized 前処置によりほぼ完全に消失した。さらに MEK/ERK 阻害剤である U0126 及び抗酸化剤である N-acetyl-L-cysteine 前処置によっても BzATP によるグルタミン酸取り込み抑制作用は部分的に消失し、両者の併用によりほぼ完全に消失した。また BzATP はグルタミン酸取り込み能に対して V_{max} を著明に低下させたが、K_m は無影響であった。以上の結果から、脊髄ミクログリアにおける P2X₇ は ERK 活性化及び酸化ストレス増大を介してグルタミン酸輸送能を制御し、脊髄内におけるグルタミン酸ホメオスタシスに関与している可能性が示唆された。

(13) 脊髄内 P2X_{2/3} 受容体を介した長期持続性アロディニアの誘導および維持におけるグリア細胞の役割

中川 貴之¹, 若松 佳代¹, 前田 早苗¹, 南 雅文², 佐藤 公道³, 金子 周司¹

(¹ 京都大学薬学研究科生体機能解析学分野, ² 北海道大学薬学研究科薬理学分野, ³ 安田女子大学)

ATP や P2X 受容体アゴニストを脊髄くも膜下腔内 (i.t.) に投与すると、持続時間の短い痛覚過敏 (<数分) や、アロディニアが惹起されることが知られているが、我々は、このアロディニアの持続時間が、末梢投与した場合のアロディニア (<約 2 時間) と比較して、非常に長期間にわたって持続 (3~4 週間) するものであることを見出した。この脊髄内 ATP 誘発長期持続性アロディニアは、新生児期カブサイシン処置によっても影響を受けず、P2X_{2/3} 受容体選択的拮抗薬あるいは NMDA 受容体拮抗薬 MK-801 の同時処置により消失したことから、カブサイシン非感受性一次感覚神経中枢端に存在する P2X_{2/3} 受容体の活性化がトリガーとなり、グルタミン酸遊離-NMDA 受容体活性化を介して誘導されと考えられた。しかしながら、P2X_{2/3} 受容体拮抗薬は、ATP 投与翌日の形成されたアロディニア (維持初期) に対しては僅かに抑制作用を示したものの、ATP 投与 7 日後のアロディニア (維持後期) に対しては影響を与えず、また MK-801 はいずれの時間においても影響を与えなかった。次に、

脊髄内ミクログリアおよびアストロサイトをそれぞれのマーカーである OX-42 および GFAP で免疫染色したところ、ミクログリアは ATP 投与数時間~1 日後、アストロサイトは 1~3 日後にかけて、それぞれ活性化を示す変化を示した。また、ミクログリア阻害薬ミノサイクリンおよびグリア細胞代謝阻害薬フルオロシトレートの効果を検討したところ、ミノサイクリンは誘導期 (同時投与) において、フルオロシトレートは誘導期~維持初期 (ATP 投与 1 日後) において抑制作用を示したが、維持後期 (ATP 投与 7 日後) においてはどちらも影響を与えなかった。次に、脊髄内 ERK のリン酸化を検討したところ、ATP 投与 1-8 時間後に顕著な ERK リン酸化の亢進が認められ、維持初期においても高いレベルを持続していた。MEK 阻害剤 U-0126 の投与により、長期持続性アロディニアは誘導期~維持初期において有意に抑制されたが、維持後期において影響は見られなかった。これらの結果から、ATP の i.t. 投与によって惹起される長期持続性アロディニアは、誘導期~維持期初期にかけては、脊髄内の

ミクログリアおよびアストロサイトが,おそらく ERK のリン酸化を介して,時間経過とともに役割を変えながら関与すると考えられる。

(14) ミクログリア P2X₄ 受容体の発現における細胞内情報伝達機構

津田 誠, 井上 和秀 (九州大学大学院薬学研究院薬効解析学分野)

最近,末梢神経損傷により発症する神経因性疼痛に脊髄後角でのグリア細胞の役割が注目されている。以前我々は,神経因性疼痛動物モデルの脊髄後角において,ATP 受容体サブタイプである P2X₄ 受容体の発現がミクログリアで著明に増加し,同受容体を遮断することでアロディニアが抑制されることを報告した。すなわち,神経因性疼痛発症にミクログリアにおける P2X₄ 受容体の発現増加が重要なステップであることを示した。そこで今回は,ミクログリアにおける P2X₄ 発現調節に関わる細胞内情報伝達機構について報告する。

初代培養ミクログリア細胞は, P2X₄ 受容体の発現を増加させるフィブロネクチンで処置し,前回の報告と一致して, P2X₄ 受容体タンパク質レベルの増加が認められ

た。その増加は, Src ファミリーキナーゼ (SFK) 阻害剤 PP2 および MEK 阻害剤 U0126 で著明に抑制された。さらに, MEK の下流分子である ERK は, フィブロネクチンによりリン酸化され, 活性化状態になり, その活性化は PP2 で抑制された。さらに, フィブロネクチンは, 転写因子 CREB をリン酸化し, ミクログリア核内レベルを顕著に増加した。この CREB のリン酸化は PP2 および U0126 で抑制された。以上の結果は, P2X₄ 受容体の発現は SFK/MEK/ERK 経路が関与していることを明らかにしている。また, 核内における転写因子 CREB の活性化が P2X₄ 受容体の転写調節に何らかの役割を有している可能性が予想される。

(15) 細胞外 ATP の脊髄前角細胞へ及ぼす影響について

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

頸髄症・椎間板ヘルニア・変形性脊椎症など日常遭遇する疾患から, 後縦靱帯骨化症・脊髄腫瘍など稀な疾患までを含めると広義の脊髄損傷を呈するものは数多い。特に, 外傷性脊髄損傷によって急激に四肢や体幹の麻痺を呈し, ADL は著しく低下する。脊髄損傷による麻痺の主原因は直接外力による脊髄神経細胞の損傷であるが, 遅発性に麻痺は急激に拡大する。直接外力による不可逆的な脊髄神経細胞損傷は治療困難であるが, 急性期における遅発性脊髄障害への対策は非常に重要であり, 長らく副腎皮質ステロイドホルモンの大量療法が施行されてきた。しかしながら, 副腎皮質ステロイドホルモン大量療法の有効性は乏しいだけでなく副作用も多く, 新しい作用機序を有する治療薬の登場が待ち望まれている。近年, Nature Medicine 誌に脊髄損傷の急性期治療として

P2X₇ 受容体阻害薬が有効であると報告されて, 脊髄損傷における ATP 受容体の関与が指摘された。しかしながら, 脊髄前角細胞における ATP 受容体の機能的役割はほとんど知られていない。

今回, ラット脊髄横断スライス標本にホールセルパッチクランプ法を適用し, 脊髄前角細胞における ATP 受容体の役割を検討した。電位固定法を用いて保持膜電位を -70 mV に固定して, 代謝安定型の ATP 受容体広作動域作動薬である ATP γ S (100 μ M) を灌流投与すると, 約 40% の脊髄前角細胞において内向き電流が観察された。また, ATP γ S (100 μ M) によって内向き電流が観察される細胞に P2X 受容体作動薬である α,β -methylene ATP (100 μ M) ならびに BzATP (100 μ M) を灌流投与したが内向き電流は観察されなかった。同様に, P2Y 受容体作動薬で

ある UTP (100 μ M) ならびに UDP (100 μ M) の灌流投与により内向き電流は観察されなかったが、2-methylthio ADP (100 μ M) を灌流投与すると ATP γ S (100 μ M) と同様に内向き電流が観察された。さらに、ATP γ S 灌流投与によって生じた内向き電流は、P2Y₁ 受容体拮抗薬である MRS2179 (30 μ M) の存在下において完全に阻害された。

以上の結果から、約半数の脊髓前角のシナプス後細胞

において P2Y₁ 受容体が発現しており、脊髓損傷によって遊離されるであろう細胞外 ATP によって脊髓前角細胞は P2Y₁ 受容体を介して脱分極することが明らかとなった。したがって、脊髓損傷の急性期における遅発性神経障害に P2Y₁ 受容体が深く関与している可能性が示唆された。

(16) シナプス前プリン受容体の発現機能関連解析 ーシナプス前分子の in vivo gene silencingー

加藤 総夫 (東京慈恵会医科大学・総合医科学研究センター・神経生理学研究室)

中枢神経系におけるシナプス伝達の多くが、シナプス周囲プリン受容体の活性化によって修飾される。特に、アデノシン A₁ 受容体と P2X 受容体チャネルは、多くの興奮性シナプスにおいてシナプス前に局在し、それぞれ電位依存性カルシウムチャネルの修飾と直接的カルシウム流入によって神経伝達物質放出を制御する。これらの機構が、グリオトランスミッター ATP とその細胞外変換体アデノシンを介したアストロサイトによるシナプス伝達の修飾におけるインターフェースとして機能している可能性を示す証拠が近年蓄積しつつある。これらシナプス前プリン受容体タンパクの発現制御機構は大部分未解明であり、特に、軸索終末・樹状突起構造とシナプス周囲グリア細胞突起との構造的関連が維持された in vivo のシナプスにおけるシナプス前プリン受容体の発現とその機能の関連についてはまったく解析が行われていない。その最たる原因は in vivo のシナプスにおけるシナプス前タンパクの選択的かつ特異的発現制御を行いうる実験系が存在しないことにある。

この問題に答える実験系として、我々は、in vivo 神経節 gene silencing 法を開発した。今回はシナプス前アデノシン A₁ 受容体のノックダウンの影響を検討した結果を紹介する。本研究の背景となった実験的事実は以下の 5 つである。

1. 胸腹部の内臓感覚受容器から延髄孤束核に収斂する迷走神経求心路を介した内臓感覚情報の一次求心性線

維の細胞体は、頸部の節状神経節に局在している。

2. これらの一次求心性線維は脳内に入り孤束核で 2 次ニューロンとシナプスを形成する。このシナプスはグルタミン酸を伝達物質とする興奮性シナプスである。

3. この興奮性シナプスにはシナプス前 A₁ 受容体が発現し、その活性化は N 型電位依存性カルシウムチャネルの抑制を介して刺激誘発シナプス伝達を抑制する。

4. 孤束核シナプス前 A₁ 受容体は節状神経節で合成され、迷走神経求心路を経て輸送される。

5. 培養節状神経節細胞において、RNA 干渉法がアデノシン A₁ 受容体の発現を効果的に抑制する。

以上の知見に基き、我々は、麻酔ラットの頸部節状神経節を露出し、電気穿孔法によって合成 short-interfering RNA (siRNA)、および、GFP 発現非ウィルスベクターを導入し、それぞれ、一次求心性細胞における特定タンパクの発現抑制、および、外来タンパクの強制発現を可能にする系を確立した。アデノシン A₁ 受容体 siRNA 導入は節状神経節 mRNA 発現を著明に減弱 (< 30%) させ、さらに、その 11-13 日後に作成した急性孤束核スライスにおいて、孤束一次求心路-2 次ニューロン間興奮性シナプス伝達に対するアデノシンの抑制効果が減弱した。本法の意義と限界、および、シナプス前プリン・シグナルの機能的意義の解明に対する貢献の可能性について論じたい (研究協力者: 繁富英治, 山田千晶, 田村友穂)。

(17) P2X 受容体を介したマウス網膜における経路特異的な応答の修飾

金田 誠, 石井 俊行*, 重松 康秀**, 細谷 俊彦*, 霜田 幸雄**

(慶應大・医・生理, *理研・脳センター・細谷研究ユニット, **東京女子医大・総研)

マウス網膜コリン作動性アマクリン細胞には ON 型と OFF 型の二種類が存在する。われわれは免疫組織化学的検討とパッチクランプ法を用いた電気生理学的検討から、マウス網膜では P2X₂ 受容体が OFF 型コリン作動性アマクリン細胞に選択的に発現していること、ATP を投与すると OFF 型コリン作動性アマクリン細胞の P2X₂ 受容体が活性化され陽イオン電流が流れることを過去に報告してきた。P2X₂ 型は OFF 経路特異的に存在することから、マウス網膜では ON 経路と OFF 経路で ATP を介した応答制御機構が異なっていることが考えられる。そこでマウス網膜ホールマウント標本からマルチ電極法を用いて網膜神経節細胞の光応答を記録し、光刺激で生じる網膜神経節細胞の光応答がどのような P2X 受容体の制御を受けているのかについて検討を行った。

今回の実験では、光刺激で発火頻度が上昇する ON 型と、光刺激を中止すると発火頻度が上昇する OFF 型の二種類の網膜神経節細胞が記録された。ON-OFF 型の細胞

は記録されなかった。光刺激に対して安定した応答を示す網膜に PPADS を投与して P2X 型プリン受容体を介する応答を遮断すると、OFF 型では光刺激に対する発火頻度の上昇が見られたが、ON 型では発火頻度は変わらないうえ減少した。OFF 型で見られる発火頻度の上昇を詳しく検討するため、光刺激一周期の間に観察される活動電位発火数の総数を 100% とし、刺激の開始 (ON 型は光刺激開始時, OFF 型は光刺激中止時) からの発火頻度の総数の積算が 85% を越える時間 (T85) を計測した。その結果 OFF 型では PPADS 投与時の T85 の値が著明に増大していた。一方 ON 型では T85 の値に変化が認められなかった。

以上の結果からマウス網膜では P2X 受容体を介する OFF 経路特異的な修飾機構が存在するものと考えられる。またわれわれのこれまでの研究結果から、OFF 経路特異的な修飾機構には P2X₂ 受容体を介する経路が関係しているものと考えられた。

(18) Generation of adenosine A₃ receptor humanized mice for the evaluation of the human antagonists

Mitsuo Satoh, Kazuya Yamano, Miho Inoue, Shigehiro Masaki, Mayumi Saki, Michio Ichimura

(Pharmaceutical Research Center, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.)

Although selective antagonists for the adenosine A₃ receptor (A₃AR), a member of the G_{i/o} protein-coupled receptors, have been indicated as potential drugs for anti-asthma or anti-inflammation, the in vivo evaluation of the antagonists using rodents in the first step of drug development has been hampered by the lack of highly potent antagonists for the rodent A₃AR. To evaluate the pharmacological effects of human A₃AR antagonists in mice, we generated mice by replacing the mouse A₃AR gene with its human counterpart. The human A₃AR normally led to the mobilization of intracellular Ca²⁺ in mice. However, unexpectedly, the human A₃AR did not lead to the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)

γ-signaling pathway in mice, probably due to the uncoupling of mouse G_{i/o} protein(s). To overcome the uncoupling, we next generated A₃AR chimeric mice by replacing the mouse A₃AR gene with a human/mouse chimeric A₃AR sequence in which whole intracellular regions of the human A₃AR were substituted for the corresponding regions of the mouse A₃AR. The chimeric A₃AR led to the intracellular Ca²⁺ elevation and activation of the PI3Kγ-signaling pathway in mice, which are equivalent to the actions induced by the A₃AR in wild-type mice. The human A₃AR antagonist had the same binding affinities for the chimeric A₃AR as the human A₃AR and completely antagonized the potentiation. This is the first

direct evidence that the uncoupling of member(s) of the mouse G proteins to the human A3AR is due to a sequence difference in the intracellular regions of A3AR and our results demonstrate that the A3AR chimeric mice can be widely

employed as A3AR functionally humanized mice, which is the first rodent model for pharmacological evaluations of the human A3AR antagonists.

(19) T細胞の分化・成熟による P2X₇受容体活性の変動

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

【目的】P2X₇受容体は, ATP との結合により活性化すると陽イオンの流入, 分子量 300 程度までの分子を通す小孔の形成, サイトカインの放出, 細胞死などを引き起こす¹。我々は, これらに加えて細胞外の Cl⁻ に依存した細胞径の縮小 (細胞縮小) が誘導されることを報告している²。一方, マウス胸腺細胞において P2X₇受容体を介する Erk1/2 の活性化がネクロシスの誘導に関与するという報告もある³。本研究では, マウス T 細胞の分化・成熟による P2X₇受容体活性の変動について検討した⁴。

【方法】4-6 週齢雄性 BALB/c マウスの胸腺および脾臓から分離した細胞を用いて実験を行った。P2X₇受容体蛋白質の発現は特異的抗体を用いたウエスタンブロット解析により, 細胞障害性は細胞外に漏出した乳酸脱水素酵素の活性を測定することにより調べた。細胞径の変化はフローサイトメーターを用いて前方散乱光を測定することにより解析した。

【結果および考察】P2X₇受容体蛋白質の発現量は胸腺細胞に比べて脾臓細胞に多く, ATP 処置による小孔の形成および細胞死の誘導も脾臓細胞においてより強く検出された。細胞径の変化について観たところ, 胸腺細胞中約 8 割を占める未分化な CD4⁺8⁺胸腺細胞は ATP にほとんど反応せず, CD4⁺8⁺胸腺細胞 < CD4⁺8⁻胸腺細胞 < CD8⁺脾臓細胞 < CD4⁺脾臓細胞の順に強い細胞縮小の誘導が認められた。B 細胞には細胞縮小が誘導されなかった。これらのことは, 分化・成熟した T 細胞において細胞縮

小活性が強いことを示す。ATP 処置により誘導される細胞縮小化は, 細胞外液中の塩素イオン濃度を低下させることにより抑制されたが, Erk1/2 リン酸化阻害薬 U0126 の前処置によっては影響されなかった。一方, Erk1/2 のリン酸化は細胞外液中の塩素イオン濃度に影響されなかった。ATP 処置による細胞死の誘導は細胞外液中の塩素イオン濃度の低下および U0126 前処置によりそれぞれ抑制されたことから, P2X₇受容体活性化による細胞死の誘導は独立した二つの経路を介して誘導されることが示唆された。

本研究結果から, 分化・成熟した T 細胞において, ATP に高感度に応答して細胞死が誘導されることが明らかとなった。今後, 末梢での T 細胞の機能制御における P2X₇受容体の役割を調べることが重要と考えられる。

[参考文献]

1. Virginio C, MacKenzie A, North RA, Surprenant A (1999) *J Physiol* **519**:335-346.
2. Tsukimoto M, Harada H, Ikari A, Takagi K (2005) *J Biol Chem* **280**:2653-2658.
3. Auger R, Motta I, Benihoud K, Ojcius DM, Kanellopoulos JM (2005) *J Biol Chem* **280**:28142-28151.
4. Tsukimoto M, Maehata M, Harada H, Ikari A, Takagi K, Degawa M (2006) *J Immunol* **177**:2842-2850.

(20) 受容体刺激による PIP2 減少と IP3 増大の測定法の開発 —PH-GFP の代替として—

尾松 万里子, 藤居 祐介, 松浦 博

(滋賀医科大学・生理学講座・細胞機能生理学部門)

細胞膜リン脂質の一員であるホスファチジルイノシトール-4,5-二リン酸 (PIP2) は, ホスホリパーゼ C (PLC) 連関型受容体刺激によって活性化される PLC によって分解され, セカンドメッセンジャーであるホスファチジルイノシトール-三リン酸 (IP₃) 及びジアシルグリセロール(DAG) を生成する。PIP2 の分布や分解の動態は PIP2 に対して高い親和性を持つプレクストリンホモロジー (PH) ドメインと融合させた蛍光タンパク GFP を培養細胞に発現させることによって観察されてきたが, トランスフェクションの成功しにくい単離細胞において観察することは困難であった。

今回, 我々は PIP2 および IP3 の両方を認識する抗 PIP2 抗体を用いた免疫染色により, 受容体刺激によって引き起こされる細胞膜 PIP2 の減少を測定する方法を確立した。PIP2 は膜脂質の一部であるため, 通常の免疫染色法

を改良し, 細胞膜内側に分布する PIP2 の蛍光画像を得た。細胞膜 PIP2 の減少は, 細胞内蛍光シグナルに対する細胞膜の蛍光シグナルの比を用い定量した。この方法を用いて褐色脂肪細胞を ATP で刺激して細胞膜 PIP2 の変化を測定したところ, 細胞膜における減少のピークは ATP では刺激後 10 秒であり, その後は徐々に再合成され, 2 分後には刺激前と同レベルまで回復することがわかった。この現象は細胞を UTP で刺激した時にも見られ, P2Y 受容体刺激による PIP2 の減少と再合成の過程を観察していると考えられた。別の Gq/PLC 連関型受容体である α 受容体をノルアドレナリンで刺激しても同様の結果が得られた。

これらのことから, 抗 PIP2 抗体を用いた免疫染色によって得られる情報について検討する。

(P1) 孤束核シナプス前 P2X 受容体によるシナプス伝達制御 ～laser photolysis 法を用いた時間空間限局的 ATP 投与～

井村 泰子, 和光 未加, 加藤 総夫

(慈恵医大・神経生理)

ATP がアストロサイトから放出される 'gliotransmitter' である証拠が近年数多く提示されている。内臓感覚情報を受容・統合する延髄孤束核においてシナプス前 P2X 受容体チャネルの活性化は, 終末内へのカルシウム流入を介してグルタミン酸放出を促進する (Kato & Shigetomi, 2001; Shigetomi & Kato, 2004)。このシナプス前 P2X 受容体の生理的機能を解明するために以下の 2 つの実験を行った。

【実験 1】若齢 Wistar 系 rat 孤束核における glial fibrillary acidic protein (GFAP) および neuronal nuclei (NeuN) の発現を免疫組織染色法により観察するとともに, シナプス周囲構造の電子顕微鏡観察を行った。その結果, 孤束核においても NeuN 陽性ニューロンの周囲を GFAP 陽性アストロサイト突起が取り囲み, また, 非対称シナプスの

多くがアストロサイト様構造に囲まれている事実が判明した。

【実験 2】実験 1 の結果は, シナプス周囲のアストロサイトが放出する ATP がシナプス前 P2X 受容体活性化を介したグルタミン酸放出を促進する可能性を示しているが, これを検証するためには, 極短時間かつシナプス近傍限局的な細胞外 ATP 濃度上昇によって十分かつ即時的な伝達物質放出が誘発される可能性を検証する必要がある。この問題に答えるために, 時間空間限局的投与が可能な laser photolysis 法を用い, シナプス近傍への ATP 局所投与の影響を観察した。

同週齢 rat の脳幹から作成した孤束核を含む厚さ 400 μm の冠状断スライス標本を用い, 近赤外線顕微鏡観察下に孤束核小型ニューロンを同定後, ホールセル法によ

り活動電位非依存的シナプス後電流 (mEPSC) を記録した。蛍光物質の細胞内灌流によって樹状突起を視認し、突起上またはその近傍に laser 光束 (3 μm 径) の標的を設定した。DMNPE-caged ATP を細胞外微小圧投与し、laser 照射および細胞外灌流の時間を Flash-and-Flush 法により制御して、時間限局的に細胞外 ATP 濃度を上昇させ、シナプス入力の変化を記録した。

Laser 照射直後 (数 100 ms) から mEPSC 頻度の著明な増加が観察された。この増加は caged ATP の非存在下には観察されず、PPADS によって抑制された。また、この

増加が、細胞外 ATP 濃度の急速な低下にともなって速やかに消退する細胞と、数秒～10 数秒にわたり残存する細胞が認められた。さらに、短時間 (100-500 ms) ATP 投与による mEPSC 頻度増加応答には樹状突起上の部位依存性 (<5 μm) を示すものがあつた。

以上の結果、アストロサイトから極近傍シナプスへの時間空間的に限局した ATP 放出は数 100 ms・数 μm レベルの時空間範囲においてシナプス前 P2X 受容体を活性化することが可能であることが示唆された。

(P2) 中枢シナプス前 A₁受容体の in-vivo 遺伝子ノックダウン

繁富 英治^{1,2}, 山田 千晶¹, 加藤 総夫¹

(¹ 東京慈恵医大・総合医科学研究センター・神経生理, ² 日本学術振興会特別研究員)

感覚神経節において、プリン受容体および細胞外プリン代謝酵素を含む細胞外プリングナリング関連機能分子が多数同定されている。細胞外プリングナリングは感覚神経節神経細胞→2 次ニューロン間のシナプス伝達制御に重要な役割を演じているが、各分子の機能を選択的に抑制する方法論が存在しないことが原因で、これらの分子の機能的意義は未解明である。

頸部に位置する節状神経節からの 1 次求心線維は、延髄孤束核に投射し、孤束核 2 次ニューロンとグルタミン酸作動性シナプス (以下、孤束核シナプス) を形成する。このシナプス前終末で働くタンパクの mRNA は節状神経節で合成される。節状神経節において in vivo 遺伝子ノックダウンを行い、脳スライスを用いた孤束核シナプス伝達解析によって、分子の機能解析をする実験系の確立を目的とした。

節状神経節において、アデノシン A₁ 受容体の mRNA (Middlekauff et al., 1998) およびタンパク (Krstew et al., 1998) の発現が報告されている。孤束核シナプスにおいて、シナプス前 A₁ 受容体の活性化はシナプス前抑制を示す (Kato & Shigetomi, 2001; Tsuji & Kato, 2003)。節状神経節において A₁ 受容体の in vivo 遺伝子ノックダウンを行い、シナプス伝達調節に及ぼす影響を検討した。

麻酔下、Wistar 系ラット (19-24 日齢) の右節状神経節にエレクトロポレーション法を用いて A₁ 受容体に対する合成 siRNA (A₁ 受容体 siRNA), ランダム siRNA および PBS を導入した。A₁ 受容体 siRNA 導入後 3-14 日において、節状神経節における A₁ 受容体の mRNA レベルは、無処置の神経節に対して 30% 以下に減少した。孤束核シナプス伝達に及ぼす遺伝子ノックダウンの影響を評価するために、脳スライス標本を用いて、1 次求心線維刺激誘発興奮性シナプス後電流 (eEPSC) を記録し、その振幅に及ぼすアデノシン (100 μM) の影響を検討した。siRNA 導入 9 日後までは、アデノシンは、無処置群と同程度 ($41.1 \pm 7.3\%$) かつ同様の時間経過で eEPSC 振幅を抑制した。導入 11 日後、この抑制は $17.8 \pm 3.8\%$ まで有意に減弱した。siRNA によるアデノシンの eEPSC 振幅抑制の減弱は導入後 13 日まで持続した。ランダム siRNA および PBS 導入はアデノシンによる eEPSC 振幅抑制に影響しなかった。以上より、in vivo 遺伝子ノックダウンによる節状神経節の遺伝子発現抑制により、孤束核シナプスのシナプス前 A₁ 受容体機能の減弱に成功した。この新しい技術は、感覚神経節神経細胞→2 次ニューロン間のシナプスにおいて、シナプス前終末で働くプリングナリング関連分子の機能解析を可能とする。

(P3) アデノシン A1受容体によるラット海馬スライス内興奮伝播制御

関野 祐子 (東京大学 医科学研究所 神経ネットワーク)

神経活動に伴い細胞外に遊離するアデノシンは、脳の活動レベルを調節する因子として知られている。我々はこれまでに、内因性アデノシンがシナプス可塑性をも制御していることを報告してきた。テタヌス刺激 (100 Hz 1 秒間) で誘発する海馬 CA1 領域の長期増強は、アデノシン A2 受容体拮抗薬により形成が阻害される。20 Hz 以下のテタヌス刺激で誘発する長期増強ではテタヌス刺激直後の一過性シナプス伝達抑制により増強率が低下するが、アデノシン A1 受容体拮抗薬はこの一過性シナプス伝達抑制を阻害する。さらに、長期増強の形成を阻止する低頻度テタヌス刺激 (1 Hz 1000 発) の脱長期抑制効果も、アデノシン A1 受容体拮抗薬により阻害される。このように、内因性に神経細胞外に存在するアデノシンはシナプス可塑性を制御する因子であることは明らかであるが、学習記憶のメカニズムとの関与は未だ明らかではない。我々は、アデノシン A1 受容体が海馬内情報処理を神経回路レベルでどのように制御しているかを解析し、アデノシン A1 受容体と学習記憶メカニズムとの関連を明らかにすることを目的としている。本研究会では、ラット脳から精製したアデノシン A1 受容体を用いて作製したポリクロナール抗体およびモノクロナール抗体により明らかにしたアデノシン A1 受容体の海馬内分布と、さらに、CA3 領域から CA1 領域への興奮伝播に対するアデノシン A1 受容体の役割について電気生理学的手法と膜電位変動の光学的測定法を用いて解析した結果を紹介する。

1. アデノシン A1 受容体の海馬内分布と海馬回路機能調節

我々は、ラット脳アデノシン A1 受容体特異的ポリクロナール抗体および新規に作製したモノクロナール抗体を用いて、海馬の CA2 領域に他の領域と比べて高密度にアデノシン A1 受容体が存在することを明らかにした (Neuroscience 93:955-967, 1999; J Comp Neurol 411: 301-316, 1999)。このことから、海馬 CA2 領域は海馬内の他の部位に比べて興奮性が低く保たれている可能性が高く、我々は「海馬 CA2 領域が脳内のアデノシン量の変動に応じて On/Off 機能を有するゲート部位である」という仮説を提唱した (神経研究の進歩 vol.45 (2) 283-296, 2001)。ラットでは海馬 CA2 領域は狭小であるが、サルやヒトでは発達して CA3, CA1 とほぼ同等の細胞数となることから、CA2 領域は高次情報処理に重要な部分であると考えている。

2. 海馬スライス内興奮伝播回路の光学測定法による解析

膜電位感受性色素を使って膜電位変動を可視化する光学測定法により、海馬の歯状回-CA3-CA1 神経回路での興奮伝播の時間空間パターンを解析して、CA2 領域を飛び越えた CA3-CA1 間の単シナプス経路以外に、CA2 を経由する CA3-CA2-CA1 伝播経路を見いだした。 (J Neurophysiol 78:1662-1668, 1997)。

アデノシン A1 受容体が、CA2 領域の興奮性を他の領域よりも低く抑えていると考えられるので、アデノシン A1 受容体拮抗薬の作用を海馬スライス標本で電気生理学的に検証し、さらに拮抗薬の作用部位を光学測定法により解析したところ、CA3-CA2-CA1 の興奮伝播が誘導されることがわかった。

(P4) Neurotransmitters involved in thermosensation

Mandadi Sravan¹・福見-富永 知子^{1,2}・柴崎 貢志^{1,2}・曾我部 隆彰¹・鈴木 誠³・水野 敦子³・富永 真琴^{1,2}

(¹岡崎統合バイオサイエンスセンター・細胞生理部門, ²総研大・生命科学・³自治医科大学・薬理学講座)

温度感受性 TRP チャネル TRPV3, TRPV4 は体温近傍の温かい温度を受容し、表皮ケラチノサイトに強く発現している。ケラチノサイトの TRPV3, TRPV4 で感知された

温度情報は感覚神経に電気信号として伝えられなければならない。そのために、神経伝達物質のような拡散性分子が存在すると仮定し、その分子の同定を試みた。

まず、マウスケラチノサイトと感覚神経細胞の共培養系を確立し、温度刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加が先ず、ケラチノサイトで起こり、続いて感覚神経細胞で起こることを確認した。次に、バイオ分子センサーを用いたシステムを開発した。マウスのケラチノサイトと各種イオンチャネル型受容体 (P2X_2 受容体, 5-HT_3 受容体, NMDA 受容体) を発現させた HEK293 細胞を共培養し、HEK293 細胞にパッチクランプを行い whole-cell mode にした後、HEK293 細胞を浮かせてケラチノサイトに近づけた。ケラチノサイトを温度刺激したときの各バイオ分子センサーによる陰性電位での内向き電流の発生を指標

にして、ケラチノサイトから放出される物質の同定を試みた。ケラチノサイトから HEK293 細胞を遠ざけた時にはケラチノサイトの温度刺激に電流がみられないことを **negative control**, HEK293 細胞に発現させた各受容体のリガンドを投与したときにはケラチノサイトから遠ざけても内向き電流がみられることを **positive control** とした。さらに、ケラチノサイトにおける温度受容に TRPV_3 , TRPV_4 どちらの温度感受性 TRP チャネルがより関与しているかを TRPV_3 欠損マウス, TRPV_4 欠損マウスのケラチノサイトを用いて検証した。

(P5) FM1-43 a vital dye used to detect P2X_4 channel activity

Fernando Lopez-Redondo¹, Kimiko Yamamoto², Joji Ando², Kishio Furuya¹,

Takeshi Kobayashi³, Keiji Naruse⁴ & Masahiro Sokabe^{1,3,5}

(¹Cell Mechanosensing, SORST, JST; ²Dept Biomed Engin Grad Sch Med, Univ of Tokyo;

³Dept Cell Biophys, Nagoya Univ Grad Sch Med; ⁴Grad Sch Med, Dent & Pharmacy, Okayama Univ,

⁵Dept Mol Physiol, Natl Inst Physiol Sci)

Besides its broad utilization in vesicle recycling experiments, the styryl dye FM1-43 had been proved successful in the screening of activity-dependent channel activation (Meyers et al, J Neurosci 23:4054-4065,2003). Hair cells in mouse cochlear cultures are selectively labeled by brief exposure to FM1-43 only when the mechanotransduction channel at the tip links is open. P2X_4 and TRPV_1 channels also uptake FM1-43 in a ligand-gated fashion. Endothelial cells in vitro have a polygonal shape and the application of shear stress orients and elongate the cells in the direction of fluid flow. The mechanism of shear stress sensing has still not been elucidated. Our previous work clearly demonstrated a principal role of the ATP subtype receptor P2X_4 in flow sensing by endothelial cells (Yamamoto et al, Nat Med 12:133-137, 2006; Yamamoto et al, Circ Res 87:385-391, 2000).

Here, we use confocal imaging technique to show FM1-43 uptake into HEK, HeLa and CHO cells transfected with the ATP receptor subtype P2X_4 upon stimulation with ATP and local flow applied by a microtube located 200 μm over the cell surface. There is dose-dependency in the ATP-induced FM1-43 uptake. It is known that a point mutation in P2X_4 (Y378F) affecting the internalization motif renders P2X_4 on the membrane surface. Our results show that the continuous presence of P2X_4 into the plasma membrane does not modify the pattern of FM1-43 uptake. The mechanical flow force produces a slight uptake of FM1-43 that increases highly if ATP is present in the perfusate solution. These results indicate functional activity of P2X_4 in various heterologous systems and suggest that P2X_4 could be a primary shear-stress sensor in endothelial cells.

(P6) ミクログリアの P2X₄受容体発現制御におけるフィブロネクチンの作用解明

豊満 笑加, 津田 誠, 井上 和秀

(九州大学大学院薬学府・薬効解析学分野)

神経因性疼痛は、癌や糖尿病などによる神経障害によって引き起こされ、既存の鎮痛薬に抵抗性を示すことから臨床現場で非常に大きな問題となっているが、その発症メカニズムはいまだ不明な部分が数多く存在する。そのような中、当研究室での実験により、ATP 受容体サブタイプ P2X₄受容体 (P2X₄R) の発現増加が神経因性疼痛の発症に重要であるということ、P2X₄R の発現増加はミクログリアに特異的であることが明らかとなった(Tsuda et al. 2003)。したがって、ミクログリアにおける P2X₄R の発現増加が神経因性疼痛発症に重要なステップであることが考えられる。しかし、この発現メカニズムは全くの謎である。最近我々は、細胞外マトリックス (ECM) のひとつであるフィブロネクチン(FN) が P2X₄R の発現制御に関与していることを明らかにした (Nasu-Tada et al. 2006)。そこで本研究では、FN によるミクログリアでの P2X₄R の発現増加に関わるインテグリン分子の同定、及び、細胞内シグナル伝達経路の解明を目指した。

ラット初代培養ミクログリアを FN で処置することにより、P2X₄R の発現は著明に増加し、この発現増加はエチスタチン ($\alpha_5\beta_1$, $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_v\beta_3$ インテグリン阻害剤)、及び、 β_1 インテグリン機能阻害抗体の前処置により抑制

された。また、ミクログリア細胞は、 α_5 および β_1 インテグリンタンパク質を共に発現していたことから、FN は $\alpha_5\beta_1$ インテグリンを介して P2X₄R の発現を亢進していると考えられる。FN による P2X₄R の発現増加は、MEK 阻害剤 U0126 や PI3K 阻害剤 LY294002 で抑制された。さらに、FN 処置により、リン酸化 ERK (活性化型) の発現レベルが上昇し、その細胞内分布は核周辺で顕著に見られた。そこで、ERK の下流に存在する転写因子 CREB の活性化を検討したところ、FN によりリン酸化 CREB の発現がミクログリアの核内で著明に増加した。興味深いことに、CREB のリン酸化は、U0126 および LY294002 により抑制されたが、ERK のリン酸化は U0126 のみで抑制された。

以上の結果より、FN が情報伝達するインテグリンは $\alpha_5\beta_1$ であり、その下流で活性化された PI3K および ERK が P2X₄R の発現増加に関与することを明らかにした。さらに、PI3K と ERK は独立した経路で CREB をリン酸化することも示した。P2X₄R のプロモーター領域には、CREB 結合領域が存在することから、P2X₄R は CREB を介して転写レベルで制御されている可能性が考えられる。

(P7) 難治性疼痛における ATP 受容体を介した細胞質型ホスホリパーゼ A₂の活性化

長谷川 茂雄, 津田 誠, 井上 和秀

(九州大・薬・薬効解析)

糖尿病や末期癌などに伴う末梢神経等の損傷や変性により、触刺激を激しい痛みと感じてしまうアロディニア (異痛症) を主症状とした神経因性疼痛が発症する。神経因性疼痛は非ステロイド性抗炎症薬やオピオイドなどの既存の鎮痛薬が奏効しない難治性疼痛であり、その発症メカニズムには不明な点が多く、現在までのところ、有効な治療法が確立されていない。このような状況の中、近年、ATP と難治性疼痛との関連に大きな注目が集まっており、末梢の一次求心性神経に発現している P2X₃ およ

び P2X_{2/3} 受容体が、炎症性疼痛や神経因性疼痛における痛覚過敏やアロディニアに関与していることが示唆されている。一方、プロスタグランジン類をはじめとする脂質メディエーターも ATP と同様に痛みに関与していることから、それらの産生酵素である細胞質型ホスホリパーゼ A₂ (cytosolic phospholipase A₂; cPLA₂) の活性化が痛覚伝達系の制御に重要な役割を担っている可能性が推察できる。細胞レベルでは、ATP により cPLA₂ が活性化されることから、本研究では、後根神経節細胞 (dorsal root

ganglion; DRG) における cPLA₂ の活性化およびこの活性化に対する選択的 P2X₃ および P2X_{2/3} 受容体アンタゴニストの効果について検討した。

cPLA₂ の活性化は、活性化型である Ser505 リン酸化型 cPLA₂ (phosphorylated cPLA₂; phospho- cPLA₂) タンパク質をその特異的抗体を用いた免疫組織染色法により検出し、その発現レベルから評価した。神経因性疼痛病態モデルでは、損傷側 DRG ニューロンにおいて、phospho-cPLA₂ の発現レベルの増加および細胞膜近傍へのトランスロケーションが観察された。一方、慢性炎症性疼痛病態モデルではこのような現象は見られなかった。phospho-cPLA₂ の細胞膜へのトランスロケーションは主に大型 DRG ニューロンにおいて観察され、また、このような phospho-cPLA₂ 陽性ニューロンは神経損傷後経時的に増加し、この経時変化は神経損傷によるアロディ

ニア発現の経時変化とほぼ一致した。cPLA₂ には 4 つのサブタイプ (α , β , γ , δ) が存在し、その中でも cPLA_{2 α} はアラキドン酸を含むリン脂質に選択性を示し、脂質メディエーターの産生に特に重要であることが知られている。そこで、選択的 cPLA_{2 α} 阻害剤を髄腔内投与した結果、アロディニアが抑制されると同時に、損傷側 DRG ニューロンにおける phospho-cPLA₂ の発現レベルが低下した。さらに、選択的 P2X₃ および P2X_{2/3} 受容体アンタゴニストである A-317491 により、phospho-cPLA₂ の発現レベルと細胞膜へのトランスロケーションが抑制された。以上の結果より、DRG ニューロンにおける P2X₃ および P2X_{2/3} 受容体を介した cPLA₂ の活性化および細胞膜へのトランスロケーションは神経損傷時に特異的に誘発される現象であり、神経因性疼痛に重要な役割を果たしていることが示唆される。

(P8) α 7 ニコチン性アセチルコリン受容体のホスホリパーゼ C 活性化を介したミクログリアの機能調節

濱 千紘¹, 原田 佳奈¹, 宮野 加奈子¹, 松林 弘明^{2,3}, 酒井 規雄², 秀 和泉¹, 仲田 義啓¹
(広島大院・医歯薬¹ 薬効解析,² 神経・精神薬理,³ 広島工大・健康情報)

α 7 ニコチン性アセチルコリン受容体 (α 7 受容体) は主に神経細胞に発現し、神経保護などの機能を果たすことが知られている。しかし近年、マクロファージやアストロサイトなどの非神経細胞においても α 7 受容体の発現が報告されている。我々は、ラット脳ミクログリアにおける α 7 受容体の発現を確認したが、ミクログリアの α 7 受容体は神経細胞に発現するイオンチャネル型の α 7 受容体とは異なり、PLC 活性化と IP₃ 生成を介して細胞内ストアからの Ca²⁺ 遊離を引き起こす新しいタイプの受容体であることが示唆された。さらに、ミクログリアの α 7 受容体が、JNK および p38 の活性化抑制を介した転写後調節により LPS 刺激による傷害的な TNF 遊離を抑制する一方で、ATP/BzATP 刺激による P2X₇ 受容体を介した保護的な TNF 遊離を増強することを見出した。そこで今回、 α 7 受容体による ATP/BzATP 誘発 TNF 遊離促進の機序を解明するとともに、TNF 遊離制御における PLC/IP₃

経路の関与を検討した。

ラット脳ミクログリア初代培養細胞において、ATP/BzATP は MAP キナーゼ (ERK, JNK, p38) を活性化し、TNF mRNA 発現を誘導する。ニコチンはこの ATP/BzATP の作用には無影響であった。BzATP は P2X₇ 受容体を介して [Ca²⁺]_i 上昇を引き起こすが、ニコチンはこの作用を増強した。さらにニコチンは、LPS 誘発 TNF 遊離を抑制したが、この作用は IP₃ 受容体遮断薬 xestospongine C により消失した。

以上の結果より、ミクログリアに発現する α 7 受容体は P2X₇ 受容体のイオンチャネル機能を高め、MAP キナーゼ非依存的な経路で転写後段階を調節することにより、ATP/BzATP 誘発 TNF 遊離を促進する可能性が示された。また、 α 7 受容体は PLC/IP₃ 経路を介して TNF 遊離を制御し、ミクログリアの神経保護機能を高める可能性が示唆された。

(P9) 細胞外 ATP による海馬アストロサイト自発的カルシウム・オシレーションの頻度調節

川村 将仁, 川村 将弘

(東京慈恵会医科大学・薬理学講座第 1)

アストロサイトが自発的カルシウム・オシレーションを引き起こすことはグリア細胞において観察される自発活動の一例として知られている。近年, グリア細胞が神経伝達物質 (ATP, glutamate 等) の放出を介してグリア間および神経細胞間伝達に積極的に関与している可能性が示されてから, アストロサイトの細胞内カルシウム動態がさらに注目されるようになった。しかし, 自発的カルシウム・オシレーションの調節機構およびその機能的役割については未解明である。本研究では海馬アストロサイトにおける自発的カルシウム・オシレーションの調節機構を解明するために, 細胞外 ATP による自発的カルシウム・オシレーションの頻度変化について, 海馬スライス培養標本によるカルシウム・イメージング法を用いて検討した。

ATP は海馬 CA3 領域上昇層においてアストロサイトの細胞内カルシウム濃度を一過性に上昇させた後, 投与

後 20 分以上持続する自発的カルシウム・オシレーションの頻度増加を引き起こした。(1) Adenosine および NECA がカルシウム・オシレーションの頻度を増加したこと, (2) CGS15943 および MRS1754 が ATP によるカルシウム・オシレーション頻度増加を抑制したことから, ATP による自発的カルシウム・オシレーションの頻度増加は, ATP が adenosine に加水分解された後に活性化される adenosine A_{2B} 受容体を介していると考えられた。一方, ATP による一過性細胞内カルシウム濃度上昇は P2Y₁ 受容体および adenosine A_{2B} 受容体の活性化を介していた。

細胞外 ATP が P2Y₁ 受容体および adenosine A_{2B} 受容体という異なる二つの受容体を活性化することにより, アストロサイトの細胞内カルシウム濃度および自発的カルシウム・オシレーション頻度の調節を担っていると考えられる。

(P10) OGD-Induced ATP Release via Maxi-Anion Channels in Mouse Astrocytes

Hongtao Liu, Sabirov Ravshan, 岡田 泰伸 (生理研 機能協関)

ATP and glutamate represent two important signaling molecules involved in bidirectional glia-neuron communication in both physiological and pathological conditions. Our previous studies demonstrated that the maxi-anion channel and the volume-sensitive outwardly rectifying (VSOR) chloride channel jointly serve as conductive pathways for glutamate release from primary cultured mouse astrocytes subjected to hypotonic stress or chemical ischemia. In the present study, we tested a possible role of the maxi-anion channel in ATP release from primary cultured mouse astrocytes subjected to oxygen-glucose deprivation (OGD) stress. In response to OGD stress, astrocytes exhibited massive release of ATP as detected by a luciferine-luciferase assay. Using a biosensor technique, it was demonstrated that the local concentration of ATP reaches

a level of approx. 4 μ M, which is sufficient to activate most types of purinergic receptors. The OGD-induced ATP release was inhibited by blockers of maxi-anion channel (Gd^{3+} and arachidonic acid), but not by inhibitors of other candidate pathways for ATP release, such as gap junction hemichannel, CFTR, MRP, VSOR, exocytosis, P2X₇ receptor and pannexin. The same maneuver caused activation of the maxi-anion channels similar to those activated by hypotonicity and chemical ischemia. The channels were found to be permeable to the anionic form of ATP with the permeability ratio of ATP/Cl of 0.11 ± 0.01 . The OGD stress also induced activation of maxi-anion channel in astrocytes in the acutely isolated brain slices from mice expressing GFP protein under the control of GFAP promoter. Therefore, it is concluded that the maxi-anion channel serves as the pathway for

ischemia-induced ATP release from astrocytes in vitro. Also it is likely that the maxi-anion channel mediates ATP release

from astrocytes in the brain in situ.

(P11) 乳腺組織サンプルからの機械刺激による ATP 放出

古家 喜四夫¹, 志内 伸光², 曾我部 正博^{1,2}

(¹ 科学技術振興機構・細胞力覚, ² 名古屋大学大学院・医・細胞生物物理)

生体における普遍的な細胞外情報伝達物質である ATP は、細胞の機械的刺激によって放出され、機械刺激受容や機械刺激情報伝達のキー分子とも考えられる。授乳期の乳腺において乳腺腺胞は、腺胞内のミルクを射出するため下垂体後葉から内分泌されたオキシトシンによって収縮したり、腺胞内に溜まっていくミルクによって膨張したり、外部からの機械刺激を受けるなど、生理的条件下で種々の大きな機械的ストレスを受けている。

私たちはマウスの授乳期乳腺の初代培養細胞系を用いて、乳腺細胞がタッチやストレッチといった機械刺激に非常に敏感で刺激によって ATP を放出し、乳腺分泌細胞が持つ P2Y₂ や乳腺筋上皮細胞が持つ P2Y₁ の活性化を介して Ca²⁺ シグナルが伝播することなどを明らかにし、乳腺腺胞において ATP シグナリング系が乳汁分泌の増強

や制御に重要な寄与をしていることを示唆してきた。

今回の発表では、より生体内に近い状態にある乳腺の組織サンプルでの ATP シグナリングの様子を、Luciferin-Luciferase バイオルミネッセンスを用いたリアルタイム ATP イメージングシステムにより明らかにする。乳腺組織を数 mm 角程度に細切しコラーゲンゲルに埋め込んだ組織サンプルは一週間以上にわたり機能、形態を維持している。このサンプルにタッチ刺激やストレッチ刺激を与えると用量依存的に ATP 放出が見られた。その放出濃度をルミネッセンス強度から定量すると数 μM から 10 μM であった。またオキシトシンの投与によっても ATP 放出が見られた。これらのことは乳腺においてメカノシグナリングと ATP シグナリングがカップルし乳汁分泌に関与しているという私達の考えを確認している。

(P12) 血管周皮細胞（ペリサイト）

—ATP/P2受容体シグナルを介したマトリックスメタロプロテアーゼ放出—

末石 浩二^{1,2}, 多田 薫¹, 藤下 加代子¹, 片岡 泰文², 小泉 修一¹

(¹ 国立衛研・薬理部, ² 福岡大学・薬・薬学疾患管理)

血管周皮細胞（ペリサイト）は、微小血管や毛細血管の血管壁外周に位置する細胞で、特に網膜や脳に多く存在していることが知られているが、その詳細な機能については不明な部分が多い。脳内では、血液脳関門（BBB）の構成員として機能する他、血管形成の際に重要な役割を担うと言われている（Bergers & Song, 2005）。血管新生の際には、血管の一部を分解して新生血管の道筋を作る必要がある。血管基底膜はラミニン、ファイブロネクチン、コラーゲンなどの細胞外マトリックス（ECM）から構成されており、ECM を分解するたんぱく質としてマトリックスメタロプロテアーゼ（MMPs）が知られてい

る。MMPs は細胞から pro-体として分泌された後、プラスミン、活性酸素等の作用を受けて活性型 MMPs となる。MMPs の中でもとくに血管新生との関与が示唆されている分泌型ゼラチナーゼの一つ MMP-9 は、細胞内 Ca²⁺ 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 依存的に放出されることが示唆されている（Gu & Wiley, 2006）。私達はこれまでに、ペリサイトとアストロサイトが近接して存在し共に毛細血管を取り囲んでいること、種々の機能的 P2 受容体を発現していること、さらに両者が ATP を介してコミュニケーションを取り $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇等の応答を呈すること、を明らかにしてきた。そこで今回私達は MMP-9 に注目し、

ATP/P2 受容体シグナルを介したペリサイトおよびアストロサイトでの MMP-9 産生・放出能について検討を行った。その結果ペリサイトでは、BzATP 処置群及び apyrase 処置群の培地上清中の pro-MMP-9 含有量増加が観察された。つまりペリサイトは ATP の枯渇時、または高濃度 ATP 存在下でおそらく P2X₇ 受容体を介して MMP-9 を産生・放出するものと考えられる。一方アストロサイトでは、P2 受容体シグナルを遮断する条件下で pro-MMP-9 放出量の増加が見られ、この応答に関与する

責任受容体は Gi 共役型 P2Y 受容体であった。また、その応答の過程には TNF- α が深く関与することが示唆された。種々の病態時や血管等の細胞損傷時に細胞外への ATP 放出・漏出は亢進すること、またこのとき細胞外 ATP 分解酵素発現が亢進することが知られている。このように、ペリサイトまたはアストロサイトは ATP 濃度の急激な変化に伴って異なるメカニズムで MMP-9 を産生・放出し、その後の生理及び病態生理的応答の一端を担っている可能性が示唆された。

(P13) ケラチノサイト HaCaT 細胞における P2Y 受容体を介した インターロイキン6産生機構の解析

小林 大策¹, 大久保 聡子², 中畑 則道¹

(¹東北大学・院・薬・細胞情報薬学分野, ²国立衛研・薬理)

皮膚はヒトの全身を覆い、一種の防御壁として周囲の環境からの様々なダメージから生体を保護しており、皮下組織、真皮、そして表皮及びその付属器とから構成されている。ケラチノサイトとは皮膚の中でも最も上層に位置する表皮の角化細胞を指し、真皮との境界に存在している基底細胞から有棘細胞、顆粒細胞、そして角質細胞へと徐々に分化していき、最終的にいわゆる「あか」となって剥がれ落ちていく。このようにケラチノサイトは皮膚の中でも最も外側に位置しているために物理的刺激、もしくは温度変化といった何らかの刺激に常にさらされている。最近の研究からケラチノサイトを含む様々な細胞において、物理的刺激に応じて細胞内から細胞外へ ATP が放出され、様々な生理作用をもたらすことが報告されている。ルシフェリン-ルシフェラーゼ法を用いて、培地交換という物理的刺激の前後においてケラチノサイトの株化細胞である HaCaT 細胞の培養上清中の ATP 量を測定したところ、培地交換から数秒後の培養上清中には静置時の約 60 倍もの ATP が含まれていた。一方、放出された ATP は、ATP 感受性の P2X もしくは P2Y 受容体を介して自分自身もしくは周囲の細胞に対して様々な生理作用をもたらすことが知られている。これま

で我々は、HaCaT 細胞に、様々な P2 プリン受容体サブタイプが発現し、その中でも ATP, UTP をアゴニストとする P2Y₂ 受容体が豊富に発現することを報告してきたが、皮膚における P2 受容体の生理的意義については未だ明らかではない。そこで、本研究では HaCaT 細胞を用い、P2Y₂ 受容体を介する薬理作用について解明することを試みた。

HaCaT 細胞を P2Y₂ 受容体アゴニスト UTP で刺激すると、細胞内 Ca²⁺濃度上昇と共にホスファチジルイノシトールリン脂質代謝回転の亢進がみられた。一方、UTP による刺激後約 30 分をピークとしてサイトカインの一種であるインターロイキン 6 (IL-6) mRNA の発現が上昇した。さらに、ELISA 法により HaCaT 細胞培養上清に含まれる IL-6 タンパク質量を測定したところ、UTP による刺激後約 3 時間をピークとして時間依存的に IL-6 タンパク質量が増加した。これらの反応は UTP の濃度依存的に生じ、suramin や BAPTA-AM によって抑制されたが、GF109203X には影響されなかった。

以上のことから皮膚表皮のケラチノサイトにおいて、P2Y₂ 受容体刺激により細胞内 Ca²⁺濃度上昇を介して IL-6 産生が促進することが示唆された。

(P14) ATP および NAD による細胞死誘導機構の相違

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

【目的】T 細胞上に発現する P2X₇ 受容体は、リガンドである ATP との結合により活性化され、小孔の形成、細胞縮小を伴った細胞死を誘導する^[1]。一方、最近 T 細胞表面に発現する ecto-ADP-ribosyl-transferase 2(ART2)が細胞外に放出された NAD を基質として P2X₇ 受容体を ADP リボシル化することにより活性化する可能性が報告されている^[2]。そこで、本研究では P2X₇ 受容体活性化機構の解明を目的に、ATP および NAD によるマウス T 細胞の細胞死誘導機構の相違について解析した。

【方法】4-5 週齢雄性 BALB/c マウスより調製した脾臓細胞を用い、ATP ならびに NAD 処置による小孔の形成、細胞径の変化、ホスファチジルセリン (PS) の細胞表面への露出ならびに細胞死の誘導への影響について比較検討した。

【結果および考察】ATP 処置 10 分後に細胞径の縮小（細胞縮小）を伴ったエチジウムイオンの強い取り込み（小孔形成）、ならびに PS の細胞表面への露出が、90 分後にはプロピジウムイオンの取り込み（細胞死の誘導）が観察された。細胞膜抗原により脾臓細胞の細胞種を分別し

て解析した結果、ATP に応答して細胞死を誘導した細胞群は T 細胞であった。一方、NAD 処置では、ATP に比べて小孔の形成は弱く、細胞縮小はほとんど観察できなかった。また、細胞死の誘導能も ATP に比べると弱かったが、PS の細胞表面への露出は反対に強かった。

以上より、ATP と NAD による P2X₇ 受容体活性化には異なる機構が存在することが示唆され、それぞれが果たす役割に違いがあるものと考えられた。PS の細胞表面への露出は、マクロファージによる貪食に重要とされるが、T 細胞の遊走、組織への接着・浸潤に関わるという報告もあり、NAD による P2X₇ 受容体活性化を介した役割を考える上で興味深い。

参考文献

- [1] Tsukimoto M, Maehata M, Harada H, Ikari A, Takagi K, Degawa M (2006) *J Immunol* 177:2842-2850.
- [2] Seman M, Adriouch S, Scheuplein F, Krebs C, Freese D, Glowacki G, Deterre P, Haag F, Koch-Nolte F (2003) *Immunity* 19:571-582.

(P15) デオキシグルコースに依存した MDCK 細胞へのアデニンヌクレオチドの取り込み

右田 啓介, 趙 玉梅, 桂木 猛
(福岡大・医・薬理)

ATP はすべての細胞に存在し、細胞内外で重要な物質である。細胞内外の輸送は、小胞輸送、トランスポーター、チャネルにより行われている。また、細胞内外には ATP 分解酵素が存在し、ADP、AMP、アデノシンへと代謝される。これらの代謝産物も細胞内外で重要な役割を担っている。ATP は細胞内に高濃度存在することが知られている。細胞を機械刺激、低浸透圧刺激あるいは受容体刺激すると、ATP は細胞外へ放出される。放出された ATP は受容体と結合し生理作用を示し、代謝あるいは取り込みにより細胞外から除去される。一般的に ATP はアデノシンに代謝されてから細胞外に取り込まれると考え

られている。しかし、細胞が損傷し高濃度の ATP が細胞外に漏出した場合は、ATP、ADP、AMP が直接細胞内に取り込まれる可能性も考えられる。そこで、本研究では、アデニンヌクレオチドの取り込みについて検討を行った。放射ラベルされたアデノシン、AMP、ADP、ATP は、MDCK 細胞に経時的・濃度依存的に細胞内へ取り込まれた。AMP、ADP、ATP の取り込みはアデノシンの取り込みに比べると少量であった。また、アデノシン、AMP、ADP、ATP の取り込みはヌクレオシドトランスポーター拮抗薬のジピリダモールと NBTI により濃度依存的に抑制された。次に、細胞内の ATP が減少したときの取り込

みについて検討した。ミトコンドリア拮抗薬の CCCP とアンチマイシンはアデノシン, AMP, ADP, ATP の取り込みを抑制した。しかし, 2 デオキシグルコースで細胞内 ATP 量を減少させると, AMP, ADP, ATP の取り込みは上昇したが, アデノシンの取り込みは変化がなかった。また, グルコース除去溶液やショ糖置換溶液では細

胞内 ATP は有意に減少せず, AMP, ADP, ATP の取り込みも増加は見られなかった。これらのことから, 2 デオキシグルコースで解糖系が抑制され極端に細胞内 ATP が減少したとき, 細胞外からの AMP, ADP, ATP の取り込みが細胞内 ATP を補充するために増加する可能性が示唆された。

(P16) マウス脳内のアデニル酸シクラーゼの内因性阻害物質 3'-AMP の産生酵素の基礎的検討

藤森 廣幸, 宮本 晃洋, 芳生 秀光
(摂南大・薬・衛生分析化学)

細胞内に存在するアデノシン 3'-リン酸 (3'-AMP) は, アデニル酸シクラーゼ (AC) の内因性阻害物質とされており, AC の P-site にアロステリック的に作用し, cAMP の生成を制御していると考えられている。3'-AMP はある種の RNA 分解酵素 (3'-AMP 産生酵素) が mRNA の poly(A)tail 等を加水分解する際の反応生成物であると考えられている。しかし, 3'-AMP およびその産生酵素に関する生体内意義は未だ不明である。

我々は, マウス大脳の 3'-AMP 産生酵素活性は加齢に伴って大きく変動するが, 小脳の産生酵素活性はあまり変動しないことを認めた。解剖学的には, 脳は大腦 (前頭葉等), 海馬, 中脳, 線条体, 視床下部, 橋・延髄, 小脳等に分画できる。本研究では, 前頭葉, 海馬, 視床下部等に本当に 3'-AMP 産生酵素が存在するのか検討すること。また, 糖尿病誘発剤ストレプトゾトシン (STZ) により, 神経障害を起こすことが知られているので, STZ 投与時に脳の 3'-AMP 産生酵素活性が変動するのか等を

含め基礎的検討を行った。

マウスの腹腔内に STZ を投与し, 糖尿病を誘発させ, 摘出した脳を常法に従って, 8 画分に分けた。3'-AMP 産生酵素活性は基質 poly(A)を用いて測定した。3'-AMP 等の adenine 類は標識試薬 chloroacetaldehyde で蛍光化した後, HPLC 法により分離・定量した。

小脳の 3'-AMP 産生酵素活性は他の 7 部位に比べ, 最も低かった。小脳の活性に比べ, 前頭葉, 脳の残部, 海馬, 視床下部の産生酵素活性は約 6 倍から 10 倍高かった。STZ 投与群の視床下部の産生酵素活性は対照値に比べ減少傾向が認められた。しかし, 他の 7 部位の同活性は STZ 投与しても変化しなかった。以上の結果より, 3'-AMP 産生系は前頭葉, 海馬, 視床下部において何らかの生体内意義を担っている可能性がある。また, STZ は視床下部の 3'-AMP 産生酵素系に何らかの影響を及ぼしていることが示唆された。

9. カルシウムシグナリング研究の新潮流 2

2006 年 11 月 16 日－11 月 17 日

代表・世話人：徳田雅明（香川大学医学部・医学部），
山内 卓（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部）
所内対応者：井本敬二（神経シグナル）

（1）カルシウムシグナリング研究の新潮流 (2)

山内 卓（徳島大院ヘルスバイオサイエンス研究部），徳田雅明（香川大医），井本敬二（生理研）

（2）CaM を介したスフィンゴ脂質代謝制御

光武 進，五十嵐 靖之（北海道大学・大学院薬学研究院・生体機能化学）

（3）CaM による脂肪酸修飾タンパク質を介した膜画分—細胞質間シグナル伝達の制御

林 宣宏（藤田保健衛生大学総合医科学研究所）

（4）Ca²⁺/CaM による細胞分裂期キナーゼ Aurora-A の機能制御

浦野 健（名古屋大学・大学院医学系研究科・機能分子制御学）

（5）抗原レセプターを介するカルシウム制御機構

黒崎知博（理化学研究所免疫アレルギー科学総合研究センター 分化制御）

（6）活性酸素，カルシウムによるマスト細胞の活性化生存制御機構

鈴木良弘（日本大学大学院先端医学・分子細胞免疫・アレルギー学部門）

（7）インスリン分泌機構における Cdk5 によるカルシウムシグナル制御

富澤一仁（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・細胞生理学）

（8）調節性小胞輸送におけるシナプトタグミン様蛋白質 (Slp) の役割

福田光則（東北大学大学院・生命科学研究科・膜輸送機構解析分野）

（9）代謝型受容体相互作用によるシナプス後シグナルの調整

田端俊英，狩野方伸（大阪大学・医学系研究科・細胞神経科学）

（10）CaM キナーゼカスケード標的分子の探索と機能調節

徳光 浩，小林 良二（香川大学・医学部・生体情報分子学）

（11）新規 CaM キナーゼ CLICK-III/CaMKI γ による樹状突起形成制御

竹本-木村 さやか，石原奈津実（東京大学大学院医学系研究科・神経生化学）

（12）CaM キナーゼの in vivo における活性制御と脳高次機能に対する役割の解明

喜田 聡（東京農業大学・応用生物科学部・バイオサイエンス学科）

（13）活性酸素ストレスと CaM キナーゼ

渡邊泰男（昭和薬科大学・薬理学），徳田雅明（香川大学・医学部・細胞情報生理学）

【参加者名】

徳田雅明（香川大医），光武進（北海道大院薬学），福田光則（東北大院生命科学），阪上洋行（東北大医），竹本さやか，尾藤晴彦（東京大院医学），喜田聡，古市隆大，福島穂高，野本真順（東京農業大応用生物科学），鈴木良弘，吉丸哲郎，井上寿男，北村香奈（日本大医），渡邊泰男，神戸敏江，宮本嘉明（昭和薬科大），黒崎知博（理化学研究所），石田英之，東島直子（東海大医），林

宣宏，近藤晶子，中村政志，萩原英雄，高崎さゆり，竹内真粧美（藤田保健衛生大），浦野健（名古屋大院医学），松原守（京都学園大），田端俊英（大阪大院医学），富澤一仁，韓小建（岡山大院医歯学総合），山内卓，落合祥啓，黒木大介，林佳江，山口弘子，田中利枝（徳島大薬），徳光浩，小林良二，藤本智仁，揺本沙紀，波多野直哉，神鳥和代，董有毅，逢坂和昌，藤本真知子，高田麻紀，

塚本郁子, 齋藤まど香 (香川大医), 亀下勇 (香川大農),
山本秀幸 (琉球大医), 中川直, 佐竹伸一郎, 斉藤紀美

【概要】

平成 16 年度の第 1 回目の研究会『カルシウムシグナリング研究の新潮流』では, EF ハンドカルシウム結合蛋白質や, カルモデュリン依存性酵素という, 蛋白質に注目しての発表を組んだが, 今回はカルシウムシグナルを用いて起こる生体反応・生体機能に注目してのプログラムを企画した。

脂質シグナルや細胞分裂シグナルなどのシグナル系でのカルシウム制御の重要性や, 神経機能や免疫機能, さらに炎症反応におけるカルシウムシグナリングなどが

香, 佐々木幸恵, 山肩葉子, 井本敬二 (生理研)

議論された。幅広い分野からの発表により, これまでに余り交流のなかった分野の研究者間の議論が実現したことについては, 参加者からも大変有意義な研究会になったとの評価を受けた。また第 1 回目の参加者も多数参加し, 今回の研究会との継続性も確保できたことも特記される。

これからも参加者全員がカルシウムシグナリングをキーワードとして交流を継続するとともに, さらに裾野を広げていく努力をしていくことを約して会を終えた。

(1) カルシウムシグナリング研究の新潮流 (2)

山内 卓 (徳島大院ヘルスバイオサイエンス研究部), 徳田雅明 (香川大医), 井本敬二 (生理研)

平成 16 年に引き続きここにカルシウムシグナリングの新潮流のテーマで研究会を開催できますことは私たちにとって大きな喜びであります。

本研究会では, 細胞機能をタンパク質機能の総合的制御という観点から知るために, カルシウムシグナリングに焦点をあて展開します。カルシウムシグナルは非常に短時間から, かなり長時間に亘り多くの生理機能調節において重要な役割を果たしています。このシグナル経路に関わる分子は極めて多岐に渡ることから, 現状では, 体系化された研究の展開はなされていないと思われます。カルシウムシグナリングにおいては, カルシウム結合蛋白質がシグナルを受容し, それを次の蛋白質・酵素との相互作用により実現することが一般的でありますし, これまでに多種多様なカルシウム結合タンパク質が知られています。

前回は, カルシウムシグナルについて広くタンパク質の構造と機能に注目し, 第 1 部では『EF ハンドカルシウム結合蛋白質の新たな展開』として, カルモデュリンをはじめ EF ハンドカルシウム結合蛋白質のカルシウム受容機構とその後のシグナル伝達様式や新しい機能について 6 演題の発表があり, それを受けて, 第 2 部では『カルモデュリン依存性酵素の新しい展開』として, カムキ

ナーゼを中心としたカルモデュリン依存性酵素の機能およびそのシグナリング機構を, 神経組織ばかりでなく様々な組織における解析について 9 演題が発表がありました。生理的現象から見るとかなり広い範囲に渡った発表となりました。

今回は主に実際に実験に携わっている若い研究者の方々の発表を中心に計画されています。第 1 部は『生体反応とカルシウムシグナル』として, 免疫系, 分泌系, 筋肉の収縮等, 生体機能調節とその異常による病態について 6 演題の発表があります。第 2 部は『神経機能とカルシウムシグナル』として, シナプス伝達や神経細胞の形態形成, カムキナーゼによる調節等について 6 演題の発表があります。前回と発表者が大幅に交代しておりますことは, カルシウムシグナルの研究分野および研究者の多様性を示しているものと考えています。

カルシウムシグナリングにおいて, ダイナミックな情報処理の基礎過程を担う重要な分子の制御機構と働きに注目して本研究会が計画されましたが, 参加者の皆様がお互いに情報交換され, 新しい共同研究や新しい分野への発展の示唆となれば幸いです。また, 本研究会を企画・実施・協力して下さる関係者の皆様に深い感謝を申し上げます。

(2) CaM を介したスフィンゴ脂質代謝制御

光武 進, 五十嵐 靖之 (北海道大学・大学院薬学研究院・生体機能化学)

スフィンゴ脂質は、コレステロールやグリセロリン脂質と並んで細胞膜を構成する脂質群で、近年、脂質マイクロドメインの形成に重要な働きを持つ事や代謝物が細胞内セカンドメッセンジャーとして働く事が明らかになり注目を集めている。中でもセラミド (以下 Cer) は、細胞内脂質セカンドメッセンジャーとして細胞周期の停止やアポトーシスの誘導に関与する事が知られている。セラミドキナーゼ (以下 CERK) は、このセラミドをリン酸化しセラミド 1-リン酸 (以下 CIP) を生成する酵素で 2002 年にクローニングされ、脳や心臓に mRNA の発現が高いものの様々な組織に広く分布している事が明らかになった⁽¹⁾。我々は、マスト細胞のモデル細胞としてよく用いられる RBL-2H3 細胞を用いた実験で IgE- 抗原または、カルシウムイオンのフォアで脱顆粒を誘導した際に細胞内の CIP 量が増加する事を見いだした。また、CERK を安定発現させた細胞株 RBL-CK3 では、親株と比較して 5 倍程度の脱顆粒の促進が観察された。これらの結果から CERK は、RBL 細胞の Ca^{2+} 依存的な脱顆粒に関与していることが明らかになった⁽²⁾。一方 CERK の 1 次構造には、 Ca^{2+} が直接結合するような領域が見当たらず、どのような機構で Ca^{2+} 依存的に活性化されるか興味が持たれた。興味深い事に反応液中にカルモジュリン (以下 CaM) を加えた所、CERK は 600 nM という低濃度の Ca^{2+}

によって活性化され、また CaM アンタゴニストとして知られる W-7 でこの活性化は抑えられた。さらに CaM-Sepharose を用いた結合実験により、 Ca^{2+} 依存的な CERK - Ca^{2+} /CaM 間の結合部位が CERK の C 末端部分の aa422-435 に存在する事が解った⁽³⁾。つまり、細胞内に於いて CERK は、 Ca^{2+} /CaM 複合体と結合し活性化される事が明らかになった。これまでグリセロリン脂質の代謝系において Ca^{2+} /CaM の関与が報告されてきたがスフィンゴ脂質の代謝酵素が直接 Ca^{2+} /CaM によって制御されているという報告は無く、Cer の細胞内セカンドメッセンジャーとしての働きと併せて考えると興味深い。今回の研究会では、この他に最近我々が行った CERK 阻害剤の仕事⁽⁴⁾ も併せて紹介出来ればと考えている。

(参考文献)

- Mitsutake S, Kim TJ, and Igarashi Y, *Sphingolipid Biology*, 207, Springer (2006)
- Mitsutake S, Kim TJ, Inagaki Y, Kato M, Yamashita T, and Igarashi Y, *J. Biol. Chem.* 279, 17570 (2004)
- Mitsutake S, and Igarashi Y, *J. Biol. Chem.* 280, 40436 (2005)
- Kim, JW, Inagaki Y, Mitsutake S, Maezawa N, Katsumura S, Ryu YW, Park CE., Taniguchi M, and Igarashi Y *Biochim. Biophys. Acta*, 1738, 82 (2005).

(3) CaM による脂肪酸修飾タンパク質を介した膜画分—細胞質間シグナル伝達の制御

林 宣宏 (藤田保健衛生大学総合医科学研究所)

ミリスチル基は、膜画分へタンパク質が移行する際のアンカーとして考えられてきたが、これまでに、Neuron-specific Acidic Protein-22kDa(NAP22), HIV Nef, Src kinase のミリスチル基が細胞内シグナル伝達系の主要因子であるカルモジュリン(CaM) との相互作用も制御していることを明らかにしてきた。この相互作用は、プロテインキナーゼ C による、CaM 結合部位のリン酸化により制御される。ミリスチル化タンパク質は複数の細胞内シグナル伝達系のクロストークにより制御されて膜画分と細胞質領域を往来することで、空間的に異なる

領域間のシグナルの連絡を担っている。ミリスチル化蛋白質の機能ドメインのアミノ酸配列が、移行する膜画分の違いを反映して多様であると同時に CaM の制御を受けるために両親媒性を保持していることにより、このメカニズムは機能している。ゲノムワイドの解析によりミリスチル化タンパク質データベースを構築し (<http://mendel.imp.ac.at/myristate/myrbase/>), その中からミリスチル化により CaM とも相互作用するものを抽出することでシグナル伝達経路のクロストークポイントの同定を進めている。

CaM によるミリストイル化タンパク質を介した膜面分一細胞質間シグナル伝達の制御の生理的意義を理解するためには、生きた細胞内でのミリストイル化タンパク質の動態を知る必要がある。一分子追跡, in cell NMR, 質量分析により観測対象分子の細胞内での位置情報と機能構造の変化を同時にリアルタイムで検出し, さらにその翻訳後修飾やプロセッシング, どのような分子と複合体を形成しているのかに関する情報, 等を得て, それらを統合することで細胞をマイクロラボとして使用する実験系の開発を進めている。

(参考文献)

1. Takasaki, A., Hayashi, N., Matsubara, M., Yamauchi, E. & Taniguchi, H. (1999). *J Biol Chem* **274**, 11848-53.
2. Hayashi, N., Izumi, Y., Titani, K. & Matsushima, N. (2000). *Protein Sci* **9**, 1905-13.
3. Hayashi, N., Matsubara, M., Jinbo, Y., Titani, K., Izumi, Y. & Matsushima, N. (2002). *Protein Sci* **11**, 529-37.
4. Matsubara, M., Titani, K., Taniguchi, H. & Hayashi, N. (2003). *J Biol Chem* **278**, 48898-902.
5. Maurer-Stroh, S., Gouda, M., Leite, F., Novatchkova, M., Schleiffer, A., Schneider, G., Wildpaner, M., Hayashi, N. & Eisenhaber, F. (2004). *Genome Biology* **5**, Article R21.
6. Hayashi, N., Nakagawa, C., Ito, Y., Takasaki, A., Jinbo, Y., Yamakawa, Y., Titani, K., Hashimoto, K., Izumi, Y. & Matsushima, N. (2004). *J Mol Biol* **338**, 169-80.
7. Matsubara, M., Jing, T., Kawamura, K., Shimojo, N., Titani, K., Hashimoto, K. & Hayashi, N. (2005). *Protein Sci* **14**, 494-503.

(4) Ca^{2+} /CaM による細胞分裂期キナーゼ Aurora-A の機能制御

浦野 健 (名古屋大学・大学院医学系研究科・機能分子制御学)

ショウジョウバエや酵母において染色体分離の調節タンパク質として同定されたプロテインキナーゼ Aurora のヒトホモログは3種類存在する。Aurora-A は, 中心体および紡錘体極に存在し, 中心体の分離成熟や紡錘体ダイナミクスを制御していることが知られている。多くのがん細胞において DNA 増幅やタンパク質の発現増強が認められており, がん治療の標的分子となっている。

多くのキナーゼにおいてキナーゼ領域より C 末端は制御領域として機能している場合が多いが, Aurora ファミリーにその C 末端領域は存在しない。つまり C 末端領域に代わる制御タンパク質が存在する可能性が考えられた。また, Ca^{2+} は細胞分裂の様々な制御に関与することが知られている。そこで, Ca^{2+} 存在下で Aurora-A に結合するタンパク質を解析したところ, カルモジュリンを同定した。構造学的解析からもカルモジュリン結合領域が存在することが判明した。実際, Ca^{2+} 依存的にカルモジュリンは Aurora-A と直接結合し, さらにそのキナーゼ活性を抑制した。さらに GFP 融合カルモジュリンを用いて細胞内での挙動を確認したところ, 中心体および紡錘体極に存在し, Aurora-A の時間的空間的動態と一致した。

また, 細胞内の Ca^{2+} 濃度は分裂後期に上昇していた。

Ca^{2+} /カルモジュリン複合体によるキナーゼ活性の直接的抑制は初めての報告である。分裂後期促進複合体による Aurora-A のタンパク質分解と協調して, 分裂後期において Ca^{2+} /カルモジュリンが Aurora-A のキナーゼ活性制御を行っており, この発見はがん治療への応用が期待される。

(参考文献)

1. 浦野 健: 細胞周期集中マスター 北川雅敏編, レビュー編 第1章 細胞周期を制御するリン酸化酵素一, 株式会社 羊土社, 東京, 2006年6月
2. 浦野 健: 華麗なる Aurora 一族—クロマチン動態におけるプロテインキナーゼ Aurora の役割—。生化学 **77**: 253-260, 2005
3. Ohashi S, Sakashita G, Ban R, Nagasawa M, Matsuzaki H, Murata Y, Taniguchi H, Shima H, Furukawa K and Urano T.: Phospho-regulation of human Protein Kinase Aurora-A: Analysis using anti-phospho-Thr288 monoclonal antibodies. *Oncogene*, in press.

(5) 抗原レセプターを介するカルシウム制御機序

黒崎知博（理化学研究所免疫アレルギー科学総合研究センター 分化制御）

B リンパ球抗原受容体 (BCR) 刺激により、脂質代謝酵素ホスホリパーゼ (PLC)- γ 2 が活性化されるが、この酵素の B リンパ球の分化・免疫応答における重要性は、ノックアウトマウスの解析より示されてきた。PLC- γ 2 は PIP2 を水解して IP3 と DAG を産生する酵素であり、BCR 刺激により生じるカルシウム動員に必須である。

生じた IP3 がどのような分子機序を用いて、カルシウムの細胞内上昇を制御しているかを明らかにする目的で、ノックアウトが容易にできるモデル B リンパ球 DT40 を用いて研究を行ってきており、以下のことを明らかにすることができた。1) 生じた IP3 は ER に存在する IP3 レセプターに結合して細胞内プールからカルシウムを動員することが、これに引き続く細胞外プールからのカルシウム動員に必須であること。2) 細胞内プールのカルシウム枯渇は、ER に存在する STIM1 分子が感知する。3) 感知した STIM1 分子は、細胞膜直下に移動し凝集し、そしてこの、移動・凝集がおそらく細胞膜内に存在するチャンネル分子である Ori を活性化することにより細胞外プールからのカルシウム動員を引き起す。

(参考文献)

Sugawara, H. et al. Genetic evidence for involvement of type 1, type 2, and type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in signal transduction through the B cell antigen receptor. (1997) *EMBO J.* **16**, 3078-3088

Miyakawa, T. et al. Ca^{2+} -sensor region of IP3 receptor controls intracellular Ca^{2+} signaling. (2001) *EMBO J.* **20**, 1674-1680

Hikida, M. et al. Coupling between B cell receptor and phospholipase C- γ 2 is essential for mature B cell development. (2003) *J. Exp. Med.* **198**, 581-589

Hikida, M. and Kurosaki, T. Regulation of phospholipase C- γ 2 networks in B lymphocytes. (2005) *Adv. Immunol.* **88**, 73-96

Baba, Y., et al. Constitutive and inducible movement of STIM1 on ER and its sub-compartment contributes to coupling STIM1 to store-operated Ca^{2+} entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (in press)

(6) 活性酸素、カルシウムによるマスト細胞の活性化生存制御機構

鈴木良弘（日本大学大学院先端医学・分子細胞免疫・アレルギー学部門）

われわれは、マスト細胞が抗原刺激により活性酸素 (ROS) を産生することおよび ROS が細胞内カルシウムを制御することを明らかにしている (Suzuki et al. *J. Immunol.* 171:6119-6127, 2003)。この ROS 産生には高親和性 IgE 受容体 (Fc ϵ RI) の β 鎖と Lyn の結合と phosphoinositide-3-kinase (PI3K) 活性化が必要であることが示された。これらのシグナルは eNOS を介した NO 産生を誘導し、マスト細胞の活性化反応を負に制御することが示唆された。一方、NO はマスト細胞を活性化細胞死から防御することがわかった。また Fc ϵ RI β 鎖はミトコンドリアにおけるカルシウム流入と mitochondrial

permeability transition pore (MPTP) を介するカルシウム流出を調節し、このカルシウム流出は、細胞内カルシウムの上昇をもたらす、カルシウムストア依存性カルシウムチャンネル (store-operated calcium channels, SOCs) の活性化を抑制するネガティブフィードバック機構として機能していることが推測された (Suzuki et al. *J. Leukoc. Biol.* 79: 508-518, 2006)。本講演では最近明らかになりつつある L 型カルシウムチャンネル (LTCC) のマスト細胞死抑制機能についても紹介し、ROS およびカルシウムシグナルによるマスト細胞の機能生存制御機構について話題を提供したい。

(7) インスリン分泌機構における Cdk5によるカルシウムシグナル制御

富澤一仁 (岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・細胞生理学)

サイクリン依存性キナーゼ 5(Cdk5) は神経細胞に豊富に存在し、神経細胞の移動・層構造の形成、シナプス可塑性あるいは神経伝達物質放出制御など神経細胞において多機能を有するセリン・スレオニンリン酸化酵素である。特に神経終末において P/Q 型電位依存性 Ca^{2+} チャネル (VDCC) をリン酸化することにより、神経終末への Ca^{2+} 流入を抑制している。最近我々は、Cdk5 が膵β細胞に発現し、ブドウ糖応答性インスリン分泌を制御していることを明らかにした。膵β細胞における Cdk5 阻害は、低血糖時ではインスリン分泌に影響を及ぼさないが、高血糖時ではインスリン分泌を促進する。この分子メカニズムは、

Cdk5 が膵β細胞の L 型 VDCC の 783 番のセリンをリン酸化することにより、細胞内への Ca^{2+} 流入を制御していることによるものであった。2 型糖尿病患者に対し、スルフォニル尿素剤、ナテグリニドなどのインスリン分泌促進剤が広く臨床で使用されているが、これら薬剤には低血糖の副作用がしばしば認められる。Cdk5 は低血糖を誘発しない糖尿病治療薬の新しい薬剤標的となると考えられる。

(参考文献)

Tomizawa et al., *J Neurosci* **22**, 2590 (2002)

Tomizawa et al., *J Cell Biol* **163**, 813 (2003)

Wei et al., *Nat Med* **11**, 1104 (2005)

(8) 調節性小胞輸送におけるシナプトタグミン様蛋白質(Slp)の役割

福田光則 (東北大学大学院・生命科学研究科・膜輸送機構解析分野)

「分泌」とは膜輸送 (メンブレントラフィック) の一形態で、細胞内を移動してきた小胞が細胞膜と融合し小胞の内容物を細胞外へと放出する現象です。僅か二文字で書いてしまっていますが、実際には下図に示すように少なくとも四つのステップからなる複雑な現象です。分泌には細胞内で恒常的に行われている構成性の分泌と、外界からの刺激に依存して起こる「調節性の分泌」の二種類が存在します。神経伝達物質放出に代表される調節性分泌の多くは、分泌小胞と細胞膜の融合がカルシウムイオン濃度により厳密に制御されることから、小胞上にはカルシウムイオン濃度の上昇を感知するセンサー (「カルシウムセンサー」) の存在が提唱されています。シナプス小胞上にはカルシウム・リン脂質結合領域 (C2 ドメイン) をタンデムに持つシナプトタグミン I 分子が豊富に存在しており、現在では神経伝達物質放出の際のカルシウムセンサーと広く信じられています。分泌を起こすためには二種類の膜 (分泌小胞と細胞膜) の結合が不可欠なため、シナプトタグミンの C2 ドメインはカルシウムを結合する以外にも小胞と細胞膜のドッキングあるいは融合に重要な役割を果たすと考えられています。シナプトタグミンのファミリーは主に神経細胞や内分泌細胞で発現

していますが、調節性の分泌は他の非神経系の細胞でも幅広く見られる現象です。本講演では、非神経系にも幅広く発現するシナプトタグミン類似分子として同定したシナプトタグミン様蛋白質 (Slp=スリップ) の内分泌、外分泌における役割、特に低分子量 G 蛋白質 Rab27 のエフェクターとしての機能に焦点を当て、最近の知見を紹介する予定です。

(参考文献)

Fukuda, M. (2005) Versatile role of Rab27 in membrane trafficking: Focus on the Rab27 effector families. *J. Biochem.* **137**, 9-16

Tsuboi, T. and Fukuda, M. (2006) Rab3A and Rab27A cooperatively regulate the docking step of dense-core vesicle exocytosis in PC12 cells. *J. Cell Sci.* **119**, 2196-2203

Tsuboi, T. and Fukuda, M. (2006) The Slp4-a linker domain controls exocytosis through interaction with Munc18-1·syntaxin-1a complex. *Mol. Biol. Cell* **17**, 2101-2112

Saegusa, C., Tanaka, T., Tani, S., Itoharu, S., Mikoshiba, K. and Fukuda, M. (2006) Decreased basal mucus secretion by Slp2-a-deficient gastric surface mucous cells. *Genes Cells* **11**, 623-631.

(9) 代謝型受容体相互作用によるシナプス後シグナルの調整

田端俊英, 狩野方伸 (大阪大学・医学系研究科・細胞神経科学)

細胞外カルシウム・イオン(Ca^{2+}_o) はシナプス前ニューロンからの伝達物質放出のトリガーとして働くことがよく知られている。最近, 我々はマウス小脳プルキンエ細胞 (PC) をモデルとした一連の研究により, Ca^{2+}_o がシナプス後ニューロンのシグナリングにも重要であることを明らかにした⁽¹⁾。

PC の樹状突起棘にはタイプ 1 代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR1) が発現している。mGluR1 は Gq タンパクと共役し, 陽イオン・チャネルの開口や細胞内ストアからの Ca^{2+} 放出などの細胞反応と連関する。我々は Ca^{2+}_o が PC の mGluR1 反応を誘発することを見出した⁽²⁾。mGluR1 反応の Ca^{2+}_o 濃度依存性が発現系で示された Ca^{2+}_o -mGluR1 親和性⁽³⁾とほぼ一致することから, Ca^{2+}_o は PC の mGluR1 を直接活性化すると考えられる。

また Ca^{2+}_o はグルタミン酸によって誘発された PC の mGluR1 反応を増強することが分かった (Ca^{2+}_o -mGluR1 増強)^(2,4)。PC の樹状突起棘には Gi/o タンパク共役型 γ アミノ酪酸受容体 (GABABR) も発現している⁽⁵⁾。GABABR を薬理的に阻害, もしくは遺伝子的にノックアウトすると, Ca^{2+}_o -mGluR1 増強が消失した⁽⁴⁾。従って Ca^{2+}_o -mGluR1 増強は GABABR によって仲介されると考えられる。

Ca^{2+}_o -mGluR1 増強は先行研究⁽⁶⁾で報告された比較的高濃度の GABA 類似体 GABABR アゴニストによる mGluR1 反応の増強とは根本的に異なる。 Ca^{2+}_o -mGluR1 増強は mGluR1 のグルタミン酸親和性の変化を反映したものであることが分かった^(2,4)。また Gi/o タンパクに依存しないことが分かった⁽⁴⁾。免疫共沈でマウス小脳から GABABR と mGluR1 の複合体が検出されたこと⁽⁴⁾を考えあわせると, Ca^{2+}_o を受容した GABABR は直接もしくは

Gi/o タンパク以外のアダプター分子等を介して近接する mGluR1 を変調すると考えられる。一方, GABA 類似体 GABABR アゴニストによる増強は主として mGluR1 と Gq タンパク・シグナル・カスケードの連関効率の変化によるものであることが分かった⁽⁷⁾。また Gi/o タンパク $\beta\gamma$ サブユニットに依存することが分かった^[(6,7) および未発表データ]。

PC の mGluR1 は運動学習を支えるシナプス可塑性である小脳長期抑圧 (LTD) の誘導で中心的な役割を果たす。 Ca^{2+}_o -mGluR1 増強は PC のグルタミン酸誘発電流の LTD を促進した⁽⁴⁾。また GABA 類似体 GABABR アゴニストは Ca^{2+}_o の効果に対して加算的にさらなる促進作用を示した (未発表データ)。

以上の結果は, Ca^{2+}_o が伝達物質とは異なる様式で代謝型受容体に作用することで, 多様なシナプス後シグナルを創出する可能性を示している。

(参考文献)

- (1) T. Tabata, M. Kano, Mol. Neurobiol. 29, 261-270 (2004).
- (2) T. Tabata, A. Aiba, M. Kano, Mol. Cell. Neurosci. 20, 56-68 (2002).
- (3) Y. Kubo, T. Miyashita, Y. Murata, Science 279, 1722-1725 (1998).
- (4) T. Tabata et al., Proc Natl Acad Sci U S A 101, 16952-16957 (2004).
- (5) A. Kulik et al., Eur. J. Neurosci. 15, 291-307 (2002).
- (6) M. Hirono, T. Yoshioka, S. Konishi, Nat. Neurosci. 4, 1207-1216 (2001).
- (7) T. Tabata, T. Yoshida, K. Hashimoto, Y. Hashimoto, M. Kano, Paper presented at Neuroscience 2005 Annual Meeting Program 332.20 (2005).

(10) CaM キナーゼカスケード標的分子の探索と機能調節

徳光 浩, 小林 良二 (香川大学・医学部・生体情報分子学)

細胞内カルシウムは細胞内情報伝達因子として筋収縮, 分泌反応, 神経伝達物質の放出さらには遺伝子発現

調節にいたる様々な生理作用を調節することが知られている。特に, カルシウム受容タンパク質であるカルモデ

ユリン(CaM)を活性化因子とする Ca^{2+} /CaM-依存性タンパク質リン酸化酵素群 (CaM-キナーゼ) によるリン酸化反応を介した情報伝達機構は、これら多様なカルシウムシグナル伝達の中心的なメカニズムの一つと考えられる。近年、CaM-キナーゼ活性化リン酸化酵素 (CaM-KK) の同定とその遺伝子クローニングにより、2 種類の多機能性 CaM-キナーゼ (CaM-KI および CaM-KIV) が上流に位置する CaM-KK によるリン酸化反応を介して機能調節を受けることが示され、CaM-キナーゼカスケードと呼ばれる新しい細胞内カルシウム情報伝達機構の概念が提唱された^{1,2)}。

また CaM-キナーゼカスケード分子(CaM-KK/CaM-KI) が線虫 *C.elegans* より遺伝子クローニングされ、CaM-キナーゼカスケードが真核生物において広く保存されたカルシウム情報伝達システムであることが機能的再構成により明らかになるとともに^{3,4,5)}、この新しいカルシウム伝達機構の詳細な分子メカニズムについても解明されつつある^{6,7,8)}。

CaM-キナーゼカスケード研究の展開は、ノックアウトマウスを用いた個体解析から、小脳の発達や不妊との関連さらには、海馬における後期の長期増強 (LTP) への関与⁹⁾ など多くの重要な生理作用が明らかとなってきた。しかし一方で、どのような標的リン酸化基質分子がこれら CaM-キナーゼカスケードの生理機能に関与して

いるかは不明な点が多く、このブラックボックスを解明するためには、CaM-キナーゼカスケードの生理的基質分子の同定が不可欠である。最近、私達はタンパク質リン酸化酵素・基質間相互作用を質量分析法を用いて捕らえる手法を開発し、これにより CaM-KK/CaM-KI カスケードの基質分子の網羅的同定を行うとともに、リン酸化の生理的意義について検討したので、その結果を報告する¹⁰⁾。加えて独自に開発した CaM-KK 阻害剤(STO-609)^{11,12)} を用いた新たなリン酸化酵素カスケードの知見を含め、CaM-キナーゼカスケードについて分子メカニズムから生理機能まで包括的に議論したい。

(参考文献)

- 1) Tokumitsu et al. JBC, 269, 28640, 1994
- 2) Tokumitsu et al. JBC, 270, 19320, 1995
- 3) Eto et al. JBC, 274, 22556, 1999
- 4) Tokumitsu et al. JBC, 274, 15803, 1999
- 5) Kimura et al. EMBO rep. 3, 962, 2002
- 6) Tokumitsu et al. JBC, 271, 5617, 1996
- 7) Tokumitsu et al. JBC, 275, 20090, 2000
- 8) Tokumitsu et al. JBC, 279, 40296, 2004
- 9) Kang et al. Cell 106, 771, 2001
- 10) Tokumitsu et al. JBC, 280, 35108, 2005
- 11) Tokumitsu et al. JBC, 277, 15813, 2002
- 12) Tokumitsu et al. JBC, 278, 10908, 2003

(11) 新規 CaM キナーゼ CLICK-III/CaMKI γ による樹状突起形成制御

竹本-木村 さやか、石原奈津実 (東京大学大学院医学系研究科・神経生化学)

神経細胞樹状突起・軸索の形成および可塑性発現は遺伝的情報と神経活動情報の両者が協調的に作用することで達成される。後者による神経突起形態制御において細胞内カルシウムシグナリングが重要な役割を果たすことが示されているが、その分子機構についての知見は限られている。

我々は以前に膜挿入型神経特異的 CaM キナーゼ、CLICK-III/CaMKI γ を同定した(Takemoto-Kimura et al., 2003)。CLICK-III の活性化は他の CaM キナーゼと同様にカルシウム上昇に依存する。興味深いことに本酵素はブレニル化、パルミトイル化という複数の脂質修飾反応を介して、形質膜やゴルジ膜などの特定膜器官へとソート

され、多量体形成することが生化学的実験により示唆された。また、モデル細胞において CLICK-III は、脱分極刺激による神経突起形成を脂質修飾依存的に誘導することを明らかとした。

一方、本酵素は神経突起形成が盛んである胎生後期のマウス大脳皮質に多く発現している。そこで、培養大脳皮質細胞への遺伝子導入実験により、神経細胞軸索・樹状突起形成への関与を検討したところ、本酵素の活性が樹状突起数・長さに関連することが分かった。樹状突起とは対照的に軸索形成における関与は観察されなかった。

以上の結果より、CLICK-III/CaMKI γ は、大脳皮質細

胞のカルシウム依存的樹状突起形態形成に密接に関与するキナーゼであり、形質膜やゴルジ体への脂質修飾によ

る局在化が樹状突起形成において積極的な役割を担う可能性が示唆された。

(12) CaM キナーゼの in vivo における活性制御と脳高次機能に対する役割の解明

喜田 聡 (東京農業大学・応用生物科学部・バイオサイエンス学科)

α Calcium/Calmodulin dependent protein kinase II (α CaMKII) は前脳領域に高発現し、 Ca^{2+} 情報伝達系の下流に存在するキナーゼとして脳高次機能制御に中心的な役割を果たすと考えられている。 α CaMKII は細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に伴い Ca-CaM 複合体との結合によって活性化され、さらに 286 番目のスレオニン(Thr)の自己リン酸化を受けると Ca-CaM の解離後も活性化状態が維持される。一方、CaMKIV も前脳領域に発現し、CREB キナーゼとして記憶能力に関わることが知られている。我々はこれら CaM キナーゼ群による脳機能制御の分子メカニズムの解明を目指して、in vivo における CaM キナーゼの活性変動のリアルタイムモニタリングとマウス遺伝学的手法を用いた CaM キナーゼ群の脳高次機能に対する役割の解明に取り組んでいる。

(1) α CaMKII の活性変動の in vivo リアルタイムモニタリング

α CaMKII と GFP 変異体群との様々な融合タンパク質を作製し、FRET を用いて培養細胞における α CaMKII の活性変動のリアルタイム解析を試みている。現在までに YFP- α CaMKII と CFP-CaM を用いた α CaMKII と CaM との相互作用解析系、YFP- α CaMKII-CFP を用いた α CaMKII の構造変化解析系の開発に成功しており、二つの系を併用することで α CaMKII の活性変動制御機構の解析を試みている。将来的にはこれらのイメージング用プローブを発現するマウスを作製し、脳機能発現時の α CaMKII の活性変動を追跡したいと考えている。

(2) マウス遺伝学的手法を用いた α CaMKII の脳高次機能に対する役割の解明

α CaMKII は学習・記憶能力に必須であると考えられて

いるが、過去のノックアウトマウスの解析から、 α CaMKII が学習能力のみならず、情動行動にも関与することが示唆された。我々は、 α CaMKII の情動行動制御及び学習能力に対する役割の解明を目的として、前脳特異的に α CaMKII を過剰発現するトランスジェニックマウス (TgM) を作製し、その表現型を解析した。この TgM は野生型よりも約 2.5 倍量の CaMKII 発現量を示した。さらに、open field test, elevated zero maze test 等の解析結果から、この変異型マウスには不安行動の亢進が観察され、また、攻撃性も高いことが明らかとなった。以上の結果と、過去の知見との比較から、CaMKII の発現量と不安状態が正に相関することが考察された。

(3) マウス遺伝学的手法を用いた CaMKIV の脳高次機能に対する役割の解明

CaMKIV は過去のノックアウトマウスの解析結果から、長期記憶形成に必須であることが知られている。我々はマウス海馬における CaMKIV の発現量が加齢と共に減少することから、CaMKIV 過剰発現により加齢に伴う記憶力低下が妨げられるのではないかと考え、この仮説を検討している。現在までの解析から、CaMKIV 過剰発現マウスでは加齢に伴う記憶能力低下が観察されないことを示唆する結果が得られている。

(参考文献)

喜田 聡, 加藤健一, 岩本拓, 伊藤元則; 分子内・分子間 FRET を利用した生細胞内分子動態のリアルタイムイメージング, 日本農芸化学会誌 77, 432-436, 2003
喜田 聡, 吉田太郎, 遠藤健悟; α CaMKII 発現量に応じた攻撃性の変化, アニテックス 14, 259-265, 2002

(13) 活性窒素ストレスと CaM キナーゼ

渡邊泰男 (昭和薬科大学・薬理学), 徳田雅明 (香川大学・医学部・細胞情報生理学)

中枢神経における一酸化窒素 (NO) は, 生体内情報伝達物質として記憶・学習・細胞死など, 重要かつ多彩な働きを持つ。近年, 機能タンパク分子のシステインニトロソ化によるシグナル伝達は, レドックス制御による翻訳後修飾のプロトタイプとなっている。脳虚血時には, 神経型 NO 合成酵素 (nNOS) と局在を共にしている Matrix- metalloprotease-9 が nNOS の産生する NO によってニトロソ化修飾を受け活性化されアポトーシスを引き起こすことが報告されている⁽¹⁾。一方, nNOS は CaM キナーゼ I, II ^(2,3)ならびに MAPK シグナルの下流分子である ribosomal S6 kinase⁽⁴⁾によるリン酸化修飾を受け, その活性が脳基底核線条体のドパミン信号系⁽⁵⁾, 海馬神経の虚血信号系で調節されている⁽⁶⁾。我々は nNOS をリン酸化する酵素 (nNOS キナーゼ群) のニトロソ化による

活性制御機構の解明を行っている。今回, シナプス後神経細胞で nNOS と局在を共にする CaM キナーゼ II が, nNOS の産生する NO によるニトロソ化修飾を受け, キナーゼ活性が調節されていることを分子・細胞レベルで解析したので報告する。

(参考論文)

- (1) Gu Z. et al. Science (2002) 297, 1186-1190
- (2) Komeima K. et al. J. Biol. Chem. (2000) 275, 28139-28143
- (3) Song T. et al. FEBS Lett. (2004) 570, 133-137
- (4) Song T. et al. Biochem. J. (2006) in press
- (5) Nishi A. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2005) 102, 1199-1204
- (6) Osuka, K. et al J. Cerebr. Blood F. Met. (2002) 22, 1098-1106

10. シナプス可塑性の分子的基盤

2006年6月28日－6月29日

代表・世話人：高橋 正身（北里大学医学部）

所内対応者：井本 敬二（神経シグナル）

- (1) シナプス間隙物質による神経終末の組織化

西宗 裕史 (Harvard Univ. Dept. MCB, Univ. of Kansas Medical Sch. Dept. Anatomy & Cell Biology)

- (2) 神経伝達物質の同期性放出を制御するシナプトタグミンの役割

西木 禎一（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科）

- (3) SAD キナーゼによる神経伝達物質放出の調節機構

大塚稔久（富山大学大学院医学薬学研究部）

- (4) AMPA 受容体のリン酸化と脂質修飾による trafficking 制御

林 崇（ジョンズ・ホプキンス大学医学部神経科学科）

- (5) NMDA 受容体の欠損は海馬 CA3 領域の興奮性の亢進を引き起こす

福島 章頭¹, 中尾 和人¹, 篠江 徹², 真鍋 俊也², 三品 昌美¹

(¹ 東京大学医学系研究科・分子神経生物学教室,

² 東京大学医科学研究所・神経ネットワーク分野)

- (6) 生体内における神経活動の2光子励起イメージング

喜多村和郎（大阪大学大学院医学系研究科細胞神経科学）

- (7) 2光子励起光標識法を用いた単一スパインのアクチン繊維構築の解析

本蔵 直樹（東京大学大学院 医学系研究科 疾患生命工学センター）

- (8) 微小管動態制御を介した樹状突起伸張の分子機構

大川 宜昭, 井ノ口 馨（三菱化学生命科学研究所）

- (9) M1 受容体を介した海馬 CA1 領域における長期増強の修飾機構

篠江 徹, 松井 稔, 真鍋 俊也（東京大学医科学研究所 神経ネットワーク分野）

- (10) 拡散を介した小脳異種シナプス抑制の分子基盤：グルタミン酸輸送体が担う役割

佐竹 伸一郎, 井本 敬二（生理研神経シグナル）

- (11) アストロサイトの機能変化とシナプス伝達の可塑性

小泉 修一（国立衛研・薬理）

- (12) ニューロン－グリア細胞間の情報伝達によるシナプス空間の動的制御

松井 広（生理研・脳形態解析）

- (13) 神経ペプチド PACAP による高次脳機能調節

橋本 均^{1,2}, 新谷 紀人¹, 角田 享也², 松田 敏夫^{2,3}, 馬場 明道¹

(¹ 大阪大・院薬・神経薬理, ² 大阪大・院医・子どものこころの分子統御機構研セ,

³ 大阪大・院薬・複合薬物動態)

- (14) マウスと昆虫におけるフェロモン受容メカニズム

佐藤 幸治, 東原 和成（東京大学大学院新領域創成科学研究科）

【参加者名】

高橋正身（北里大医），佐藤幸治（東京大院新領域創成科学），福島章頭，本蔵直樹，松崎政紀，尾藤晴彦，藤井哉（東京大院医学），真鍋俊也，渡部文子，篠江徹（東

京大医科学研），畑裕（東京医科歯科大医）井ノ口馨，大川宜昭（三菱化学生命科学研），小泉修一，大久保聡子（国立医薬品食品衛生研），板倉誠（北里大医），阿部

輝雄 (新潟大脳研), 片岡正和 (信州大工), 大塚稔久, 所崇, 比嘉進 (富山大医), 森泰生, 瓜生幸嗣, 三木崇史, 加藤賢太, 山崎浩史, 秋山智志, 清中茂樹 (京都大院工学), 橋本均 (大阪大院薬学), 狩野方伸, 喜多村和郎, 橋爪幹 (大阪大院医学), 西木禎一 (岡山大院医歯薬学総合), 林崇 (Johns Hopkins 大), 西宗裕史 (Harvard

大), 福田善之, 岩崎広英 (統合バイオ), 石井裕, 加勢大輔, 井上剛, 佐々木幸恵, 稲田浩之, 西巻拓也, 高鶴裕介, 渡部美穂, 山口純弥, 和気弘明, 前島隆司, 野田昌晴, 北村明彦, 春日井雄, 川上良介, 深澤有吾, 根本知己, 佐竹伸一郎, 松井広, 井本敬二 (生理研)

(1) シナプス間隙物質による神経終末の組織化

西宗 裕史 (Harvard Univ. Dept. MCB, Univ. of Kansas Medical Sch. Dept. Anatomy & Cell Biology)

シナプス前終末に存在する電位依存性カルシウムチャネルとアクティブゾーンは神経伝達に重要な分子と構造である。これらのシナプス前終末における組織化と維持は, シナプス形成にとって不可欠であり, また可塑性に関与する可能性が高い。我々は, 電位依存性 PQ, N タイプカルシウムチャネルとシナプス間隙の細胞外マトリックス分子 (ラミニン) の相互作用によりアクティブゾーン構造が組織化されている知見を得た。まず, シナプス形成研究のモデルとなってきた神経筋接合部において得られた知見を報告する。さらに, この様なカルシウムチャネルの細胞外蛋白質相互作用が中枢神経系のシナプスにおいてもシナプス前終末の組織化に関与する可能性について予備的な結果を紹介したい。さて, ラミニン分子は 3 つの異なるサブユニット (α , β , γ) から形成される 3 量体だが, 神経筋接合部には 3 種類 ($\alpha 4$, $\alpha 5$, $\beta 2$) の特異的サブユニットが存在する。これらサブユニットの遺伝子欠損マウスの解析から, 個々のラミニンサブユニットは異なる機能を担うことが解ってきた。シナプス前終末に対しては, $\beta 2$ サブユニットがカルシウムチャネルと相互作用しアクティブゾーンを組織化し, $\alpha 4$ がアクティブゾーンの位置と大きさの調整する。一方でシナプス後細

胞に対しては $\alpha 5$ が, 神経伝達物質受容体集合体の形態的分化を調節している結果を得た。このようにラミニン分子はシナプス前終末だけでなくシナプス後細胞にも作用してシナプス形成とその成熟に関与する可能性が考えられる。

1. Nishimune H, Sanes JR, Carlson SS. (2004) A synaptic laminin-calcium channel interaction organizes active zones in motor nerve terminals [Research Article]. *Nature* ; 432 : 580-587
2. Fernandez-Chacon R, Wolfel M, Nishimune H, Tabares L, Schmitz F, Castellano-Munoz M, Rosenmund C, Montesinos ML, Sanes JR, Schneggenburger R, Sudhof TC. (2004). The synaptic vesicle protein CSPalpha prevents presynaptic degeneration. *Neuron* ; 42 : 237-251.
3. Nishimune H, Vasseur S, Wiese S, Birling MC, Holtmann B, Sendtner M, Iovanna JL, Henderson CE. (2000). Reg-2 is a motoneuron neurotrophic factor and a signalling intermediate in the CNTF survival pathway. *Nature Cell Biol.* 2 : 906-914.

(2) 神経伝達物質の同期性放出を制御するシナプトタグミンの役割

西木 禎一 (岡山大学大学院医歯薬学総合研究科)

シナプス伝達を担う神経伝達物質は, シナプス前終末においてシナプス小胞に蓄えられている。細胞膜の興奮に伴う Ca^{2+} の神経終末内への流入がシナプス小胞の開口

放出を引き起こし, 伝達物質はシナプス間隙へ遊離する。神経伝達物質放出の Ca^{2+} センサーの最有力候補は, シナプス小胞膜タンパク質シナプトタグミン 1 である。しか

しながら、神経伝達物質放出におけるシナプトタグミン 1 のくわしい機能は不明のままである。この問題を明らかにするために、シナプトタグミン 1 遺伝子欠損マウスの海馬から調製した神経細胞を微小基質ドット上で培養し、自己シナプスを形成させた単一ニューロンからの伝達物質放出を、パッチクランプ法により解析した。刺激に対する神経伝達物質の放出は、刺激後数ミリ秒で素早く放出される同期性成分と、その後数百ミリ秒間にわたり放出が続く非同期性成分に分けられる。シナプトタグミン 1 欠損神経細胞では、同期性成分が消失している一方で、非同期性成分が増加していた。その結果、刺激後 400 ミリ秒間に放出された伝達物質の総量には有意な差がなかった。このことから、シナプトタグミン 1 は伝達物質の放出において二つの役割をもつことが明らかとなった。ひとつは、シナプス小胞の開口放出を刺激に同期させて瞬時に引き起こすことであり、もうひとつは非同期性の放出を抑制することである。さらに、アミノ酸置

換により Ca^{2+} 結合部位を変異させたシナプトタグミン 1 遺伝子を神経細胞に発現させ、伝達物質放出に対する影響を調べた。その結果、シナプトタグミン 1 の Ca^{2+} に対する親和性が低下すると、伝達物質放出の同期性成分が減り、非同期性成分が増えることが示唆された。さらに、シナプトタグミン 1 への Ca^{2+} の結合が同期性放出に必須であること、非同期性成分の抑制には Ca^{2+} 結合は関与しないことが示された。このように、シナプトタグミン 1 は神経伝達物質放出の刺激に対する同期性を制御している。

1. Nishiki T and Augustine GJ. (2004) Dual roles of the C2B domain of synaptotagmin I in synchronizing Ca^{2+} -dependent neurotransmitter release. *J Neurosci.*, 24: 8542-8550.
2. Nishiki T and Augustine GJ. (2004) Synaptotagmin I synchronizes transmitter release in mouse hippocampal neurons. *J Neurosci.*, 24: 6127-6132.

(3) SAD キナーゼによる神経伝達物質放出の調節機構

大塚稔久（富山大学大学院医学薬学研究部）

神経終末の形質膜直下に存在するアクティブゾーン (Active zone; AZ) は、シナプス小胞が特異的にドッキングする場所で、神経伝達を時間的・空間的に制御する構造体として機能している。私共が見出した AZ 蛋白質 CAST および ELKS は AZ の主要構成分子であり、他の AZ 蛋白質 Bassoon, Piccolo, RIMs, Munc13-1 と巨大な分子複合体を形成し、AZ の形成・維持・機能発現に関与していることが明らかになりつつある。また、AZ に関連する一連の研究過程で、私共は、神経細胞の極性形成（軸索と樹状突起の形成）を制御するリン酸化酵素 SAD キナーゼがシナプス小胞と AZ に局在していることを明らかにした¹。SAD キナーゼはリン酸化の活性依存的に神経伝達物質の放出を制御しており、さらに、AZ において RIM1 を特異的にリン酸化する。AZ の構築・機能発現に関わるシグナル伝達機構については不明な点が多いが、このユニークな局在を示す SAD キナーゼの同定を足がかりに、AZ におけるリン酸化ネットワークの全容解明とその生理的な役割について新たな知見が得られることを期待している。

1. Inoue, E., Mochida, S., Takagi, H., Higa, S., Deguchi-Tawarada, M., Takao-Rikitsu, E., Inoue, M., Yao, I., Takeuchi, K., Kitajima, I., Setou, M., Ohtsuka, T.*, and Takai, Y. (2006) SAD: a presynaptic kinase associated with synaptic vesicles and the active zone cytomatrix that regulates neurotransmitter release. *Neuron* 50: 261-275. (*corresponding author)
2. Deguchi-Tawarada, M., Inoue, E., Takao-Rikitsu, E., Inoue, M., Kitajima, I., Ohtsuka, T.*, and Takai, Y. (2006) Active Zone Protein CAST is a Component of Conventional and Ribbon Synapses in Mouse Retina. *J. Comp. Neurol.* 495: 480-496. (*corresponding author)
3. Takao-Rikitsu, E., Mochida, S., Inoue, E., Deguchi-Tawarada, M., Inoue, M., Ohtsuka, T.*, and Takai, Y. (2004) Physical and functional interaction of the active zone proteins, CAST, RIM1, and Bassoon, in neurotransmitter release. *J. Cell Biol.* 164:301-311. (*corresponding author)
4. Ohtsuka, T.*, Takao-Rikitsu, E., Inoue, E., Inoue, M., Takeuchi, M., Matsubara, K., Deguchi-Tawarada, M.,

Satoh, K., Morimoto, K., Nakanishi, H., and Takai, Y. (2002) CAST: a novel protein of the cytomatrix at the active zone of synapses that forms a ternary complex

with RIM1 and Munc13-1. J. Cell Biol. 158: 577-590. (*corresponding author)

(4) AMPA 受容体のリン酸化と脂質修飾による trafficking 制御

林 崇 (ジョンズ・ホプキンス大学医学部神経科学科)

AMPA 型グルタミン酸受容体は、中枢神経系において速い興奮性シナプス伝達を担う主要なイオンチャンネル型受容体である。この AMPA 受容体の制御は、学習・記憶の分子基盤として重要な役割を果たすと考えられる。これまで AMPA 受容体自体の分子修飾による機能や局在の調節機構は、可逆的なセリン・スレオニンリン酸化を中心として精力的に研究が展開されて来た。今回、新たにチロシンリン酸化および脂質修飾の一種であるパルミトイル化による AMPA 受容体の局在と trafficking の制御を明らかにしたのでこれを紹介する。

まず、AMPA 受容体 GluR2 サブユニットの C 末端領域に存在するチロシン残基が、Src ファミリーチロシンキナーゼによりリン酸化される事を見出した。そして、このチロシンリン酸化に伴って GluR2C 末端結合タンパク質 GRIP1/2 および PICK1 との会合性に变化が生じ、細胞表面の AMPA 受容体がエンドサイトーシス機構によって刺激依存的に神経細胞内に取り込まれる事を示した。

次いで、AMPA 受容体各サブユニットの二カ所の共通配列中のシステイン残基がパルミトイル化される事を明

らかにした。その結果、受容体サブユニット間の会合性やチャンネルの電流電圧特性には影響を与える事なく、受容体の細胞内局在が制御された。即ち、チャンネルポア領域を構成する第二膜貫通領域のパルミトイル化により AMPA 受容体のゴルジ体局在が制御された。また、C 末端領域のパルミトイル化は、AMPA 受容体の表面発現の維持とグルタミン酸受容体アゴニストの刺激による神経細胞内への取り込みに関与した。

以上の結果から、従来研究の進んでいたセリン・スレオニンリン酸化に加え、AMPA 受容体のチロシンリン酸化および脂質修飾もシナプス可塑性における重要な分子制御機構であると示唆された。

1. Hayashi T, Huganir RL. (2004) Tyrosine phosphorylation and regulation of the AMPA receptor by Src family tyrosine kinases. J. Neurosci. 24, 6152-6160.
2. Hayashi T, Rumbaugh G, Huganir RL. (2005) Differential regulation of AMPA receptor subunit trafficking by palmitoylation of two distinct sites. Neuron 47, 709-723.

(5) NMDA 受容体の欠損は海馬 CA3領域の興奮性の亢進を引き起こす

福島 章顕¹, 中尾 和人¹, 篠江 徹², 真鍋 俊也², 三品 昌美¹

(¹ 東京大学医学系研究科・分子神経生物学教室,

² 東京大学医科学研究所・神経ネットワーク分野)

海馬 CA3 錐体細胞は、豊富に存在するリカレント回路により同期発火する。この同期発火は海馬脳波の発生、記憶の形成、さらにてんかん発作の発症に関与すると考えられている。海馬スライスの実験から CA3 野での同期発火は NMDA 受容体依存的なシナプス結合の増強を引き起こし、てんかん発生に関与すると考えられてきた。

しかしながら、意外にも CA3 錐体神経細胞選択的に NMDA 受容体を欠損したマウスは、カイニン酸誘発発作をより発症しやすくなっていた。変異体マウス CA3 野の局所脳波において異常な EEG スパイクが検出され、この EEG スパイクの発生時には個々の CA3 錐体細胞のユニット活動が著しく増加していた。これらの結果は変異体

の CA3 錐体神経細胞がより同期発火しやすくなったことを示唆している。CA3 野の興奮性の増大の機構を調べたところ、変異体 CA3 錐体細胞において、AMPA 受容体応答と GABA_A 受容体応答の比に変化は検出できなかったが、高頻度刺激で誘発される後過分極電流が変異体マウスで消失していることが明らかになった。以上の結果

は、NMDA 受容体は CA3 錐体細胞の同期発火を制限することで CA3 リカレントネットワーク全体の興奮性を抑制することを示唆しており、これはおそらく NMDA 受容体と後過分極電流との共役によって達成されていると考えられる。

(6) 生体内における神経活動の2光子励起イメージング

喜多村和郎（大阪大学大学院医学系研究科細胞神経科学）

2 光子励起イメージング法は、生体内すなわち生きた脳内において単一神経細胞の活動を捉えることのできる強力な手法である。これまでの細胞外記録法やユニット記録法では得られなかった情報を可視化することが可能であることから、近年、非常に多くの研究者から注目を集めている。我々は、特に、脳内における単一神経細胞の入出力関係を明らかにすることを目標に、2 光子励起カルシウムイメージングとホールセル記録の同時計測を行ってきた。

麻酔下のラット小脳において、プルキンエ細胞からホールセル記録と樹状突起内カルシウムイメージングを行った。感覚刺激で誘発される登上線維入力由来の複雑スパイクが観察され、それによって起こる樹状突起内カルシウム信号を電位変化と同時に捉えることに成功した。登上線維入力により、プルキンエ細胞の樹状突起全体に

わたりカルシウム濃度の上昇が見られ、平行線維シナプスのスパインにおいても顕著なカルシウム上昇が観察された。このことは、登上線維入力が生体内において、全体的な統合シグナルとして機能していることを示唆している。

また、2 光子励起イメージングを用いた生体内におけるパッチクランプ記録の成功率向上のために、新たな方法の開発を行っている。研究会では、この方法およびこれを応用した、生体内における単一神経細胞の機能改変法について紹介したい。

最近の論文

Y. Loewenstein, S. Mahon, P. Chadderton, K. Kitamura, H. Sompolsky, Y. Yarom & M. HTMusser : Bistability of cerebellar Purkinje cells modulated by sensory stimulation. *Nature Neurosci.* 8, 201-211 (2005).

(7) 2光子励起光標識法を用いた単一スパインのアクチン繊維構築の解析

本蔵 直樹（東京大学大学院 医学系研究科 疾患生命工学センター）

大脳皮質においては、興奮性シナプスの多くは樹状突起のスパインに形成される。スパインの構造は非常に多様であり、近年スパイン頭部構造の大きさに依存して、機能的なグルタミン酸受容体の発現量が決まること、長期増強に際してはスパインの頭部の増大が起きること、またこの構造可塑性がスパイン初期形態に依存することが示されている。スパインにはアクチン繊維 (F-actin) が多く存在するが、他の細胞骨格タンパク質である微小管や中間系フィラメントは存在せず、F-actin が主要な細胞骨格と考えられている。しかし、これまでの研究では単

一スパイン内での F-actin の構築、即ちその配列や動態、は未知であった。そこで私は GFP の改変タンパク質 PA-GFP と β -actin を融合した DNA を作製し、遺伝子銃を用いて CA1 錐体細胞へ導入し、単一スパインに存在するアクチン分子の動態を、2 光子励起顕微鏡を用いて蛍光観察した。2 光子励起光活性化法を用いてアクチン分子の構成を調べたところ、拡散速度の違いから G-actin（ミリ秒の拡散）と F-actin（分の拡散）は明確に区別でき、これよりスパインには F-actin が濃縮していることが定量的に示された。また G-actin の速い拡散のために、2 光

子励起光活性化を行った 1 秒後に観察される蛍光像は、F-actin のみを反映していることがわかった。この方法論を用いてスパインの F-actin を調べたところ、F-actin には動的小および安定的な性質を持つ 2 種類のプールが存在することが分かった。安定的な F-actin プールはスパイン体積に比例してその存在比率が増し、その存在量はスパイン体積の 2 乗に比例した。こうして、大きなスパインの F-actin は小さいスパインのそれより全体として安定であることがわかった。一方、動的な F-actin はスパイン先端部から基底部に向けてトレッドミリングしており、スパイン体積が大きいほど流れは速く、かつ長さも長いこと

がわかった。これは大きなスパイン程、F-actin は大きな力でスパインを膨張させていること、即ち、スパイン体積はアクチン重合の速さで決まることを示唆した。実際、スライス標本にアクチン重合阻害剤である Latrunculin A を投与したところ、スパイン頭部体積は数分以内に収縮することが明らかとなった。この様に、私はサブスパインレベルのアクチン繊維の構築を初めて明らかにした。動的 F-actin プールはスパイン頭部形態をよく説明した。一方、安定的プールは、スパインのネック形態及びスパインの形態安定性に関係することが示唆された。

(8) 微小管動態制御を介した樹状突起伸張の分子機構

大川 宜昭, 井ノ口 馨 (三菱化学生命科学研究所)

小脳プルキンエ細胞の樹状突起は、神経細胞群の中でも特に複雑な形態を示し、その発達は、平行線維・登状線維とのシナプス形成を伴いつつ生後 2-3 週目の間に劇的に進むことが知られている。この樹状突起の伸展・パターン形成は微小管の動態制御を伴うと想定されているが、その分子機構の詳細は不明である。我々は生後 2-3 週のプルキンエ細胞特異的のディフェレンシャルスクリーニングを行い、プルキンエ細胞発達に寄与する因子の同定を行ってきた。

得られた候補因子の 1 つは微小管の脱重合促進因子である stathmin であり、プルキンエ細胞における stathmin の発現は生後 12 日から 18 日にかけて減少することが観察された。Stathmin の発現低下が樹状突起伸展に重要であるという仮説のもと、初代培養プルキンエ細胞に stathmin を過剰発現させたところ、樹状突起の伸展阻害が観察された。また、stathmin はリン酸化を受けることで微小管崩壊活性を失うが、その活性低下に重要とされる Ser16 のリン酸化は、神経活動依存的に CaMKII により触媒されることが示唆された。我々は、CaMKII 活性がプルキンエ細胞樹状突起伸展に重要であることも見いだしている。さらに、樹状突起伸展との関連性が示唆されている電位依存性 L 型カルシウムチャンネル及び I 型代謝型グルタミン酸受容体の阻害剤により、Ser16 のリン酸化レベルは有意に減少した。以上の結果は、プルキンエ細胞樹状突起発達における stathmin の発現減少、及

び、神経活動依存的カルシウムシグナリングを介した CaMKII による stathmin のリン酸化の重要性を示唆している。

さらに我々は、上記スクリーニングにより発達期プルキンエ細胞で発現上昇する因子として NAT1 を同定した。NAT1 は、触媒活性を持つ ARD1 と複合体を形成しアセチルトランスフェラーゼとして機能する。ARD1, NAT1 はともに微小管と共局在を示すことが観察されたとともに、in vitro において、ARD1-NAT1 複合体はブタ脳より精製した tubulin のアセチル化を促進した。微小管を構成する α -tubulin のアセチル化は、微小管の安定性との関連が示唆されている。また、ARD1 の RNAi および、ドミナントネガティブ型 ARD1 の過剰発現は、 α -tubulin の脱アセチル化酵素である HDAC6 の過剰発現と同様に初代培養プルキンエ細胞の樹状突起発達を阻害した。以上の結果は ARD1-NAT1 複合体が未同定であった α -tubulin のアセチル化制御因子であること、及び、この複合体による α -tubulin のアセチル化制御を介し、樹状突起伸展が微小管レベルで制御されていることを示唆している。

以上の結果から、樹状突起発達における微小管動態制御の重要性が示唆された。今後は、上記の結果を踏まえ、構造的・機能的可塑性発現への微小管制御機構の関与を検討したい。

I.Ohkawa N., et al. (2006) Stathmin, a microtubule

destabilizer, mediates the development of dendritic arbors

in cerebellar Purkinje cells. Submitted.

(9) M1受容体を介した海馬 CA1領域における長期増強の修飾機構

篠江 徹, 松井 稔, 真鍋 俊也 (東京大学医科学研究所 神経ネットワーク分野)

ムスカリン性アセチルコリン受容体 (mAChR) は、学習や記憶の形成に重要な役割を担う海馬のシナプス可塑性を制御すると考えられている受容体の一つである。しかしながら、これまでに行われてきた研究では、比較的高い濃度の mAChR アゴニストが用いられ、またアンタゴニストのサブタイプ選択性も十分なものではなかった。そのため、生理的な濃度のアセチルコリンがシナプス可塑性の制御に関与しているのか、さらにその場合、どのサブタイプがその効果を担うのかは、未だ明らかにされていなかった。本研究では、これらの問題を検討するために電気生理学的な手法を用いて解析を行った。その結果、サブタイプ非選択的な mAChR アゴニストであるカルバコールを低濃度 (50 nM) でマウス海馬スライス標本に灌流投与することにより、CA1 領域における興奮性シナプス伝達の長期増強 (LTP) が増大することが明らかとなった。また、この LTP の増大効果は、M1 受

容体ノックアウトマウスにおいて消失していた。一方、M3 受容体ノックアウトマウスでは、この増大効果は正常であった。また、両ノックアウトマウスの LTP そのものは正常であった。さらに、野生型マウスにおいて海馬上昇層を高頻度刺激して内側中隔核に由来するコリン作動性神経終末から内因性アセチルコリンを放出させると、LTP がやはり増大した。また、この内因性アセチルコリンによる LTP 増大効果は、M1 受容体ノックアウトマウスで消失していた。これら一連の結果から、コリン作動性神経終末から生理的に放出されるアセチルコリンは、シナプス後細胞の M1 受容体を介してシナプス可塑性を修飾することが示唆された。

1. Shinoe T, Matsui M, Taketo MM, Manabe T (2005) Modulation of synaptic plasticity by physiological activation of M1 muscarinic acetylcholine receptors in the mouse hippocampus. *J Neurosci* 25:11194-11200.

(10) 拡散を介した小脳異種シナプス抑制の分子基盤：グルタミン酸輸送体が担う役割

佐竹 伸一郎, 井本 敬二 (生理研神経シグナル)

下オリブ核から小脳への登上線維を反復刺激 (5 Hz, 1 s) すると、籠細胞 - プルキンエ細胞間の GABA 作動性シナプス伝達が一時的に (~10 s) 減弱する (即ち、プルキンエ細胞を脱抑制するため、小脳出力が強化されることになる)¹。登上線維の興奮性伝達物質は、放出部位から拡散して前シナプス性 AMPA 型グルタミン酸受容体を活性化することにより、籠細胞の GABA 放出を抑制したと推定している²。この異種シナプス抑制の分子基盤を明らかにするため、登上線維の伝達物質が拡散する過程において、グルタミン酸輸送体が果たす役割を検討した。EAAT4/GLT-1 特異的阻害薬 threo-3-methylglutamate (IC₅₀ = ~100 μM) は、低濃度 (30 μM) で登上線維刺激に伴う GABA シナプス抑制を顕著に増強した。一方、GLT-1 阻害薬 dihydrokainate (IC₅₀ = ~30 μM) は、高濃

度 (300 μM) で投与しても無効であった。プルキンエ細胞に豊富に存在するニューロン型グルタミン酸輸送体 EAAT4 が、登上線維 - 籠細胞間異種シナプス抑制を制御する役割を担っていることを示唆している。

EAAT4 は、小脳において矢状方向に zebrin-II と重複する様式で帯状に発現している。この性質を利用して EAAT4 発現量と異種シナプス抑制について検討を行い、EAAT4 低発現領域では登上線維刺激に伴う GABA シナプス抑制を容易に誘発できるが、高発現領域では誘発できないことを見出した。小脳異種シナプス抑制には、プルキンエ細胞の EAAT4 発現量に依存した領域特異性があると考えられる。登上線維を強く反復刺激 (5 Hz, 30 s) すると、登上線維 - プルキンエ細胞間シナプス伝達 (AMPA 受容体) に長期抑圧が惹起される。この時、プ

ルキンエ細胞のグルタミン酸輸送体は逆に長期増強を起こす。登上線維シナプスに長期抑圧を誘発すると、異種シナプス抑制は有意に減弱した。プルキンエ細胞（後シナプス細胞）は、グルタミン酸回収能を変化させて、拡散を介した登上線維 - 籠細胞（前シナプス細胞）間クロストークを逆行性に制御できることを示唆している。こうした観察結果に基づき、ニューロン型グルタミン酸輸送体が小脳皮質の情報処理に主導的役割を果たす可能性について議論したい。

1. Satake S., Saitow F., Rusakov D. and Konishi S. (2004)

AMPA receptor-mediated presynaptic inhibition at cerebellar GABAergic synapses: a characterization of molecular mechanisms. *Eur. J. Neurosci.* 19, 2464-2474.

2. Satake S., Song S.-Y., Cao Q., Satoh H., Rusakov D. A., Yanagawa Y., Ling E.-A., Imoto K. and Konishi S. (2006) Characterization of AMPA receptors targeted by the climbing fiber transmitter mediating presynaptic inhibition of GABAergic transmission at cerebellar interneuron-Purkinje cell synapses. *J. Neurosci.* 26, 2278-2289.

(11) アストロサイトの機能変化とシナプス伝達の可塑性

小泉 修一（国立衛研・薬理）

アストロサイトはシナプスを取り囲み、ほとんどすべての神経伝達物質受容体を有し、シナプス間隙から漏れた伝達物質に素早く応答する。また、刺激に応じてグリア伝達物質 (gliotransmitter) を放出し、ニューロンを含む周辺細胞とコミュニケーションをとる。このようにニューロンの活動は周囲のグリア細胞、特にアストロサイトによって積極的・即時的な制御を受けていることがわかってきた。本研究では、gliotransmitter として中心的役割を果たす ATP とその受容体 P2 受容体に注目し、アストロサイトによるシナプス伝達制御様式の詳細、さらに炎症・外傷等の病態時に即座に反応性に変化するアストロサイトの機能変化がシナプス伝達効率に与える影響についても述べる。

ラット海馬初代ニューロン-グリア共培養細胞では、アストロサイトは刺激依存的に ATP を細胞外に放出し、ATP 依存的及び即時的に興奮性シナプス伝達を制御した。この ATP を介した tripartite synapse（三者間シナプス；pre-, post- 及び astrocyte が作る peri-synapse）によるコミュニケーションが、所謂シナプス伝達の本体である可能性が示唆された。一方アストロサイトは神経活動に依存しない自発的 ATP 放出能を有しており、周辺細胞は常に一定以上の ATP 刺激に曝されていた。このアストロサ

イトの自発的な ATP 放出が、近傍ニューロンのシナプス伝達を恒常的にも制御していることが明らかとなった。炎症及び外傷等の病態時には、アストロサイトは素早く反応性アストロサイトに変化する。肥厚化した短いプロセスを有する特徴的な形態を呈し、種々の刺激応答性及びアウトプット能を変化させる。反応性アストロサイトは ATP 放出能が著しく亢進していた。このような gliotransmitter 放出能の変化はシナプス伝達効率に強く影響することが示唆される。これまで『脳の可塑性研究』は、『シナプスの可塑性研究』として行われてきたが、より変わり身の早いグリア細胞の機能変化は、脳の可塑性によりダイナミックに影響することが予想される。

1. Koizumi S., Fujishita K., Tsuda M., Shigemoto-Mogami, Y. and Inoue K. (2003) Dynamic inhibition of excitatory synaptic transmission by astrocyte-derived ATP in hippocampal cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 11023-11028.

2. Tsuda M., Shigemoto-Mogami Y., Koizumi S., Mizokoshi A., Kohsaka, S., Salter M. W. and Inoue K. (2003) Induction of P2X₄ ionotropic ATP receptor in spinal hyperactive microglia gates neuropathic pain. *Nature*, 424, 778 - 783.

(12) ニューロン-グリア細胞間の情報伝達によるシナプス空間の動的制御

松井 広 (生理研・脳形態解析)

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、その広がり方によって、神経細胞間の情報伝達の特性は決定される。しかし、伝達物質がどんな速度で、どの程度の距離まで、いかなる濃度で拡散するのか、これまで統一的理解は得られていない。特に、シナプス間隙を越えた伝達物質の広がりを制御する要素としては、グリア細胞に高密度で発現しているトランスポーターによる伝達物質回収機構が考えられる。しかし、このトランスポーターがどれだけ重要な役割をしているのかに関して、議論は紛糾している (Otis et al., 1997; Auger and Attwell, 2000; Takatsuru et al., 2006)。

本研究では、小脳登上線維および平行線維からバグマングリア細胞に向けて、シナプス小胞の異所放出があり、放出されたグルタミン酸がバグマングリア細胞の Ca^{2+} 透過型 AMPA 受容体を活性化していることを突き止めた (Matsui and Jahr, 2003; 2004; Matsui et al., 2005; Matsui and Jahr, 2006)。これは、シナプス間隙に放出された伝達物質が溢れ出て、グリア細胞まで拡散することによって、ニューロン-グリア細胞間の情報伝達が行なわれるとする従来の視点を覆す発見である。またこれまで、

バグマングリア細胞の Ca^{2+} 透過型 AMPA 受容体の活性化に従って、グリア細胞によるシナプス部位の包囲率が制御されていることが提唱されてきた (Iino et al., 2001)。本研究では、二光子イメージングを用いて、バグマングリア細胞の形態が分単位でダイナミックに変化することを明らかにした。したがってグリア細胞は、各々のシナプスによって働きが異なり、その役割も刻一刻と変化するものであると予測される。

1. Matsui K, Jahr CE (2006) Exocytosis unbound. *Current Opinion in Neurobiology*, in press.
2. Matsui K, Jahr CE, Rubio ME (2005) High concentration rapid transients of glutamate mediate neural-glia communication via ectopic release. *Journal of Neuroscience*, 25: 7538-7547.
3. Matsui K, Jahr CE (2004) Differential control of synaptic and ectopic vesicular release of glutamate. *Journal of Neuroscience*, 24: 8932-8939.
4. Matsui K, Jahr CE (2003) Ectopic release of synaptic vesicles. *Neuron*, 40: 1173-1183.

(13) 神経ペプチド PACAP による高次脳機能調節

橋本 均^{1,2}, 新谷 紀人¹, 角田 享也², 松田 敏夫^{2,3}, 馬場 明道¹(¹大阪大・院薬・神経薬理, ²大阪大・院医・子どものこころの分子統御機構研セ,³大阪大・院薬・複合薬物動態)

神経ペプチドは一般に、共発現する低分子性神経伝達物質の作用を、そのセカンドメッセンジャー系の活性化時間や方向性などを変化させることにより、長いタイムスパンで修飾する。私たちは、神経ペプチド PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) の選択的受容体 PAC1 のクローニングを契機として、PACAP の生理・病態的意義、創薬標的分子としての可能性を探る研究を進め、これまでに精神行動の調節など、予測外の機能を見出してきた。マウスにおけるノックアウト表現型には、1) 新規環境下での多動、探索行動の増加、高頻

度の跳躍、2) 脳内の感覚運動ゲーティング機能を反映するとされる音刺激驚愕反応におけるプレパルス抑制の低下、3) 海馬シナプス可塑性および記憶保持過程の障害などが観察された。またこれらの分子機構へのアプローチとして、4) 抗精神病薬や精神刺激薬への薬理反応が、臨床治療効果と類似すること、5) 精神刺激薬による多動の調節機構に、特定のセロトニン受容体が関与することなども見出した。以上の結果は、PACAP シグナル系を直ちに創薬標的として位置づけるものではないが、PACAP 欠損マウスが、精神疾患や認知障害等の神経生物学や感

受性遺伝子の研究に有用な、予測的妥当性を有した病態モデルである可能性を示すものである。

1. Tanaka K, Shintani N, Hashimoto H, Kawagishi N, Ago Y, Matsuda T, Hashimoto R, Kunugi H, Yamamoto A, Kawaguchi C, Shimada T, Baba A. (2006) Psychostimulant-induced attenuation of hyperactivity and prepulse inhibition deficits in *Adcyap1*-deficient mice. *J. Neurosci.*, 26: 5091-5097.

2. 橋本 均, 新谷 紀人, 馬場 明道 (2006) PACAP 欠損マウス—新しい精神機能障害モデル。脳と精神の医学, 17: 47-52.
3. Hashimoto H, Shintani N, Baba A. (2006) New insights into the central PACAPergic system from the phenotypes in PACAP- and PACAP receptor-knockout mice. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, in press.

(14) マウスと昆虫におけるフェロモン受容メカニズム

佐藤 幸治, 東原 和成 (東京大学大学院新領域創成科学研究科)

多くの生物は社会性の維持や的確な繁殖相手を見つけ出すために、種特異的な物質を介したケミカルコミュニケーションを利用している。これらの物質はフェロモンと呼ばれ、哺乳類と昆虫ではそれぞれ独自にその受容機構が発達している。マウスでは未だフェロモンそのものが数々のヴェールに包まれているが、主嗅球を介して雌マウスを誘引する雄の尿由来の揮発性フェロモンが最近報告された。この他にもマウスでは古くからフェロモン受容器官として鋤鼻器の存在が知られており、最近我々の研究グループで、雄マウスの涙腺から特異的に分泌されるペプチド(ESP1) がメスの鋤鼻器を活性化することを明らかにした¹⁾。このペプチドのアミノ酸配列はゲノム中に多重クラスターを形成してコードされており、様々な相同遺伝子が含まれる。発現解析およびリコンビナントによる電気生理学的な応答解析を行ったところ、主嗅覚器ではなく鋤鼻器がESPペプチドの受容器官であることがわかった。つまりマウスは主嗅覚系と揮発性フェロモン、および鋤鼻器と非揮発性フェロモンの2段階の嗅覚性感覚刺激を介した情報伝達手段を発達させてきたと思われる。

一方昆虫では既に数百種のフェロモンが同定されており、それらは触角中のフェロモン受容体を発現している

嗅細胞で受容される。昆虫におけるフェロモン受容の分子機構はほとんど未解明であるが、最近我々はカイコの雄誘因物質、ボンビコールの受容体を同定した²⁾。この受容体が生体同様に高感度でボンビコールを受容するためにはOr83bファミリーの受容体との共発現が必須であり、匂い刺激に対して非選択的カチオン電流が発生することを明らかにした³⁾。このように異種間で独自なフェロモン受容機構は、生物が進化させてきた究極の化学センサーの分子基盤と言える。

- 1) Kimotto H, Haga S, Sato K, and Touhara K. (2005) Sex-specific peptides from exocrine glands stimulate mouse vomeronasal sensory neurons. *Nature*, 437: 898-901.
- 2) Sakurai T, Nakagawa T, Mitsuno H, Mori H, Endo Y, Tanoue S, Yasukochi Y, Touhara K, and Nishioka T. (2004) Identification and functional characterization of a sex pheromone receptor in the silkworm *Bombyx mori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 16653-16658.
- 3) Nakagawa T, Sakurai T, Nishioka T, and Touhara K. (2005) Insect sex-pheromone signals mediated by specific combinations of olfactory receptors. *Science*, 307: 1638-1642.

11. 脳磁場計測によるヒト脳機能マッピング

2006年12月13日－12月15日

代表・世話人：柿木 隆介（自然科学研究機構・生理学研究所）

所内対応者：柿木 隆介（自然科学研究機構・生理学研究所）

- (1) 注意の磁場イメージング：体性感覚・聴覚皮質の早期可塑性

橋本 勲（金沢工業大学・東京赤坂研究所）

- (2) 生体磁気計測の基礎と応用

内川 義則（東京電機大学・理工学部電子情報工学科）

- (3) 脳波側からみた脳磁場計測

長峯 隆（京都大学・医学研究科附属高次脳機能総合研究センター・臨床脳生理学領域）

- (4) 言語脳活動の計測と解析法

栗城 眞也（北海道大学・電子科学研究所）

- (5) ヒト脳機能マッピングの現状と将来

柴崎 浩（京都大学・名誉教授）

- (6) The radial bias: a different slant on visual orientation sensitivity in human and non-human primates

佐々木 由香（ハーバード大学）

- (7) 感覚情報の階層処理

乾 幸二（生理学研究所・感覚運動調節研究部門）

- (8) DirectX を用いた四分の一パターン反転視覚刺激示課題の開発

橋詰 顕（広島大学大学院・先進医療開発科学講座脳神経外科）

栗栖 薫，長崎 信一，谷本 啓二（広島大学大学院・病態情報医科学講座歯科放射線科）

- (9) Fundamental Research on Electrical Brain Mapping of Motor Imagination

Mastake Kawada (The University of Tokushima)

Richard M. Leahy (University of Southern California)

- (10) 聴覚・視覚誘発脳磁図反応における刺激の規則性，親密度および調和性の可交換性

原田 暢善，岩木 直，外池 光雄（産業技術総合研究所関西センター・人間福祉医工学部門）

- (11) ボタン押し練習前後の反応時間と脳磁場周波数変化について

菅野 正光，岩田 全弘，藤村 昌彦，弓削 類（広島大学大学院・保健学研究科）

橋詰 顕，栗栖 薫（広島大学大学院・医歯薬学総合研究科・脳神経外科学）

- (12) 運動様式の違いによる運動誘発磁場の脳皮質運動野と感覚野の反応の相違について

小川 真司（日本医科大学・千葉北総病院リハビリテーション科）

（慶應義塾大学・医学部リハビリテーション医学教室）

- (13) パターンリバーサル刺激視覚誘発反応 P100 成分の発生機構の検討

仲間 大貴，三浦 太一，畑中 啓作，北村 吉宏

（岡山理科大学・理学部応用物理学科・岡山療護センター）

- (14) MEG による言語優位半球の同定 - Wada テストとの比較

金子 裕，岡崎 光俊（国立精神神経センター・武蔵病院脳神経外科・臨床検査部・精神科）

- (15) 音色のカテゴリー知覚の聴性誘発 N1m の下降脚への反映
水落 智美, 加我 君孝 (東京大学大学院・医学系研究科・感覚運動神経科学)
湯本 真人 (東京大学・医学部附属病院・検査部)
狩野 章太郎 (東京大学・医学部附属病院・耳鼻咽喉科)
伊藤 憲治, 山川 恵子 (東京大学大学院・医学系研究科・認知言語医学)
- (16) ノンパラメトリック統計を用いた信号源の統計的有意性の推定
鈴木 祐子, 関原 謙介 (首都大学東京大学院・工学研究科・システム基礎工学専攻)
- (17) 時間相関の存在する複数信号源のための Beamformer 法
木村 壮志 (早稲田大学大学院・理工学研究科・電気情報生命専攻)
- (18) 言語性課題遂行時における自発脳磁界の解析
高松 亮介, 平田 恵啓, 栗城 眞也 (北海道大学・電子科学研究所)
川勝 真喜 (東京電機大学・情報環境学部)
- (19) 誘発磁場と信号解析におけるその数理
岸田 邦治, 横田 康成 (岐阜大学・工学部応用情報学科)
- (20) 棘波自動検出システムを用いた, 脳磁図棘波の定量化の試み
芳村 勝城 (静岡てんかん・神経医療センター)
渡辺 裕貴 (国立精神神経センター・武蔵病院精神科)
- (21) 聴覚誘発 MEG 応答の刺激依存性 ―刺激音の周期的構造による影響―
鷲尾 大輔, 栗城 眞也 (北海道大学・電子科学研究所)
- (22) 聴覚 MMN と adaptation 反応
寶珠山 稔 (名古屋大学・医学部保健学科)
- (23) 両耳間時間差と両耳間相関度に関わる脳磁界反応
添田 喜治, 中川 誠司 (産業技術総合研究所・人間福祉医工学研究部門)
- (24) 時間的に振幅変調された視覚刺激に対する脳磁界反応
岡本 洋輔, 矢野 隆, 安藤 四一 (熊本大学大学院・自然科学研究科)
中川 誠司, 藤井 健司 (産業技術総合研究所・人間福祉医工学研究部門)
- (25) 格闘時における脳磁場反応と心理的要因の関係
中川 慧, 伏見 健志, 岩田 全広, 河原 裕美, 藤村 昌彦, 弓削 類
(広島大学大学院・保健学研究科)
橋詰 顕, 栗栖 薫 (広島大学大学院・医歯薬学総合研究科・脳神経外科学)
志々田 一宏 (広島大学大学院・医歯薬学総合研究科・精神神経医科学)
- (26) MEG 信号の独立成分分析による分離
岩木 直 (産業技術総合研究所・人間福祉医工学研究部門)
- (27) 空間フィルタおよび解剖学的標準化を用いた脳磁場の周波数解析
志々田 一宏, 小野田 慶一, 山下 英尚, 岡本 泰昌, 山脇 成人
(広島大学大学院・医歯薬学総合研究科・精神神経医科学)
橋詰 顕, 栗栖 薫 (広島大学大学院・医歯薬学総合研究科・脳神経外科学)
中川 慧, 伏見 健志, 弓削 類 (広島大学大学院・保健学研究科)
- (28) 肘関節屈曲, 過伸展動作観察時における脳磁場反応
伏見 健志, 中川 慧, 岩田 全広, 藤村 昌彦, 弓削 類 (広島大学大学院・保健学研究科)
橋詰 顕, 栗栖 薫 (広島大学大学院・医歯薬学総合研究科・脳神経外科学)
志々田 一宏 (広島大学大学院・医歯薬学総合研究科・精神神経医科学)

(29) 気体刺激のリアルタイムモニタリングによる嗅覚誘発電位・脳磁場の同時計測(2)

小早川 達, 後藤 なおみ, 戸田 英樹 (産業技術総合研究所・人間福祉医工学研究部門)

秋山 幸代 (国立スポーツ科学センター・スポーツ科学部)

小林 剛史 (文京学院大学・人間学部)

斉藤 幸子 (斉藤幸子味覚嗅覚研究所)

【参加者名】

中川 慧 (広島大・大学院), 伏見 健志 (広島大・大学院), 菅野 正光 (広島大・大学院), 芳村 勝城 (静岡てんかん神経医療センター), 西村 勉 (京都大・大学院), 山代 幸哉 (鹿児島大・大学院), 橋詰 顕 (広島大・先進医療開発科学), 中川 誠司 (産業技術総合研究所), 山崎 貴男 (九州大・医学研究院), 綾部 友亮 (慶應大・大学院), 萩原 綱一 (九州大・大学院), 川田 昌武 (徳島大・ソシオテクノサイエンス), 原田 暢善 (産業技術総合研究所), 後藤 純信 (国際医療福祉大・リハビリテーション), 岩田 全広 (名古屋大・大学院), 小川 真司 (日本医科大・千葉北総病院), 早坂 友成 (国際医療福祉大・大学院), 三浦 太一 (岡山理科大・理学部), 仲間 大貴 (岡山理科大・大学院), 畑中 啓作 (岡山理科大・理学部), 斎藤 優 (早稲田大・大学院), 水落 智美 (東京大・大学院), 葛西 祐介 (早稲田大・大学院), 及川 敬敏 (早稲田大・大学院), 加古 真祥 (早稲田大・大学院), 佐々木 貴志 (早稲田大・理工学部), 嶋田 裕介 (早稲田大・理工学部), 嶋田 育代 (早稲田大・理工学部), 堂脇 可菜子 (早稲田大・理工学部), 鈴木 祐子 (首都大学東京・大学院), 前澤 仁志 (京都大・大学院), 木村 壮志 (早稲田大・大学院), 高松 亮介 (北海道大・大学院), 高津 治 (熊本大・医学部), 岸田 邦治 (岐阜大・工学部), 金子 裕 (国立精神神経センター・武蔵病院), 中島 大輔 (九州大・大学院), 尾崎 剛 (大

阪大・大学院), 鷲尾 大輔 (北海道大・大学院), 雨宮 薫 (慶應大・大学院), 岡本 洋輔 (熊本大・大学院), 岩木 直 (産業技術総合研究所), 志々田 一宏 (広島大・大学院), 小早川 達 (産業技術総合研究所), 青山 敦 (慶應大・理工学研究科), 緒方 勝也 (九州大・医学研究院), 御代田 亮平 (東京大・大学院), 山崎 貴也 (東京大・大学院), 添田 喜治 (産業技術総合研究所), 宮田 智也 (東京大・大学院), 森田 武志 (静岡県立総合病院), 齊藤 崇子 (九州大・芸術工学研究院), 軍司 敦子 (国立精神神経センター・精神保健研究所), 長崎 信一 (広島大・医歯薬学総合研究科), 大鶴 直史 (神戸大・大学院), 野鳥 一平 (神戸大・大学院), 河原 裕美 (広島大・大学院), 東浦 拓郎 (筑波大・大学院), 金田 健史 (白鷗大・発達科学部), 飛松 省三 (九州大・医学研究院), 寶珠山 稔 (名古屋大・医学部), 中村 みほ (愛知県心身障害者コロニー), 柿木 隆介 (生理研), 金桶吉起 (生理研), 渡邊 昌子 (生理研), 乾 幸二 (生理研), 三木 研作 (生理研), 木田 哲夫 (生理研), 平井 真洋 (生理研), 中田 大貴 (生理研), 橋本 章子 (生理研), 赤塚 康介 (生理研), 田中 絵実 (生理研), 本多 結城子 (生理研), 浦川 智和 (生理研), 鯨井 加代子 (生理研), 坂本 貴和子 (生理研), 宮崎 貴浩 (生理研), 岡 さちこ (生理研), クリスチャン・アルトマン (生理研)

【概要】

本年の研究会は、参加者が約 65 名にのぼり、22 の一般演題と 6 つの教育講演が発表され、極めて活発な議論が行われた。また、約 40 名の大学院生が参加し、3 日間にわたる研究会期間を通じて、若い研究者達の熱心な討論は非常に印象深いものであった。

生理学研究所に日本で初めての大型脳磁計が導入されてから、15 年が過ぎようとしている。その間に、日本では脳磁図研究が著しく進み、現在では、日本は世界で最も脳磁図研究の盛んな国といっても過言ではない。現

在は、全国の主要大学の大学病院に脳磁計が設置され臨床応用の試みが盛んに行われている。それと平行して、生理学研究所をはじめとする多くの研究機関にも脳磁計が設置され、ヒトの脳機能の解明を目指して研究が続けられている。

今回の研究会では、演題は「視覚」、「聴覚」、「体性感覚」、「嗅覚」、「運動」、「言語」、「臨床応用」、「工学」といった幅広いジャンルから発表され、わが国における脳磁図研究の裾野の広がりを実感させられた。しかし、

脳磁図という共通の手法によって行われた研究ばかりであり、例え自分の専門外であっても十分に理解可能であり、また勉強になる発表ばかりであった。

この10年間は機能的MRIの熱狂的なブームが、特に米国と英国においておこり、日本でも近年、研究者が著

しく増加してきている。しかし、脳磁図の持つ高い時間分解能による時間情報の詳細な検討は、機能的MRIでは行えないものであり、今後も脳磁図の長所を十分に生かした研究の発展をのぞんでやまない。

(1) 注意の磁場イメージング：体性感覚・聴覚皮質の早期可塑性

橋本 勲（金沢工業大学・東京赤坂研究所）

選択的注意は認知過程の入り口であり、有用な情報の選別と優先処理を行う情報処理の制御である。3b野起源のM50成分を指標として選択的注意による体性感覚野の可塑的变化を観測した。2指と3指からの同時感覚入力に対して、一方の指に注意を向けることが、その指の投射野を選択的に賦活し、同時に他方の指からの入力に対する投射野の反応を抑制することを見出した。その基盤にはtop-down制御による3b野錐体細胞の水平結合を介する超早期の可塑的变化があると考えられた。聴覚系においても、周波数(400 Hzと4 kHz トーンピップ)に対する選択的注意により1次聴覚野起源のN100m双極子の位置が変化し、特に右半球で2つの周波数音に対するN100m双極子間の距離が増大した。

の位置が変化し、特に右半球で2つの周波数音に対するN100m双極子間の距離が増大した。

先天聾では体性感覚刺激が聴覚野を賦活することが知られている。健常人の指先に与えられた3種の振動刺激(180, 280, 380 Hz)を識別するのは困難な課題である。振動刺激の後に同一周波数の音刺激をフィードバックとして与えると、振動の触感への聴覚イメージを誘導できる。このようなフィードバック条件下では振動周波数識別の向上に伴い、聴覚野の反応(潜時150-200 ms)が出現し、体性感覚周波数識別に聴覚野の関与が示唆された。

(2) 生体磁気計測の基礎と応用

内川 義則（東京電機大学・理工学部電子情報工学科）

人間の心臓、脳や肺などからは地球の環境磁界の一万分の一から一億分の一程度の微弱な磁界が発生している。今日、これらの磁界を測定し、病気の診断および脳や心臓の機能解析に応用しようとする研究が各国で盛んに行われてきている。本講演では、「生体磁気計測の基

礎と応用」の題で、これら生体磁気研究を支える技術としての磁界計測法、SQUIDシステムおよび信号処理法や周辺装置について三次元ベクトル計測法を含む計測例と解析例を通して述べることにする。

(3) 脳波側からみた脳磁場計測

長峯 隆（京都大学・医学研究科附属高次脳機能総合研究センター・臨床脳生理学領域）

生体内における電磁現象では静場近似が成立することから、脳波計測と脳磁場計測は、脳内の電気現象をと

らえる表裏一体のものとして語られることが多い。しかしながら、頭蓋、脳などの物理学的性質によって、両者

間にはいくつかの相違点も見いだされる。脳磁場計測の方法立案、結果解釈などの参考になると思われるこの相違点を、再度、脳波側から眺めてみたい。

頭蓋骨を通しての脳波成分の減衰が高周波数帯でより大きいことから、高周波数成分は脳磁場、徐波成分は脳波記録がより適していると推定される。波形の形状が、両者間で異なる可能性も考慮すべきかもしれない。

不関電極を必要とする脳波記録に対し、脳磁場計測は細胞内電流の絶対値を推定するといわれる。しかしながら、推定できるのはあくまでも頭表に水平な電流成分の

みである。本当に推定したいものが細胞膜内外の電位差であることを考えると、脳波を用いての逆問題推定の方がより正解に近いものを出す場合もありうる。

従来の脳磁場研究は、点活動として仮定できる電流源を主な対象としてきた。今後、連合野のように広がりをもった活動を考えていくにあたっては、脳磁場計測で検出しにくい脳表に垂直な電流活動を考慮する必要がある。どのような形で波形に現れてくるか、脳波計測が参考になるであろう。

(4) 言語脳活動の計測と解析法

栗城 眞也（北海道大学・電子科学研究所）

言語機能のように高次な脳の働きを MEG でイメージングするのは簡単ではない。研究の対象から始まり刺激作成、呈示法、タスク、信号処理、信号源解析、表示法に至るまでの首尾一貫した方法論が見当たらない。本講演では、教育的な観点を念頭に置きながら、我々の研究室が過去数年にわたって試行錯誤してきた言語機能計測と解析の概要を紹介する。

【研究目的】言語学の専門家との共同で、統語機能に着目した。焦点をしばり、日本語の特徴である句の移動に関係する脳活動を計測することを目指した。

【刺激と呈示法】SOV（主語－目的語－述語）からなる節（単文）を S－V で挟んだ複文形式とし、単文の主語と述語を交換した移動文(SVO)と正規文の対照とした。文を読む速度に合わせ、句ごとに視覚呈示する時間を設定した。

【タスク】タスクは SVO, SOV いずれに対しても、問題

文のあとに正規な順序で質問となる単文を呈示し、命題関係（誰が誰に何をした？）の正否を判断させた。刺激文を読むと同時に移動文が理解されるプロセスをねらった。

【シミュレーション】電流分布推定のなかで局在した信号源分布を推定する L1 ノルム法を採用し、シミュレーションにより精度と標準偏差を評価した。

【信号源解析】L1 ノルム法により推定した多数の信号源をシミュレーションで得られた標準偏差（位置の不確かさ）を考慮して重ね合わせることで、活動の集中した領域を前頭、側頭、後頭などに特定した。最後に、それらの活動中心を固定して逆問題解析し、色々な領域での活動の時間推移を求めた。

【結論】古典的な言語野を越えて広い領域が統語機能に関連することが分かった。

(5) ヒト脳機能マッピングの現状と将来

柴崎 浩（京都大学・名誉教授）

Recent advance of technologies has enabled us to visualize functional specialization or localization and connectivity of human brain non-invasively. Two main streams of functional brain mapping are currently available; one based on the electrophysiological and the other based on the hemodynamic

principle. Electrophysiological techniques include EEG, MEG, and transcranial magnetic stimulation (TMS). Functional neuroimaging techniques include PET, functional MRI, and the more recently developed near-infrared spectroscopy (NIRS). This lecture will discuss neurovascular

coupling, characteristics of each technique, multi-disciplinary approach, functional connectivity, and future directions of human brain mapping. Experimental and clinical studies suggest that the hemodynamic change of brain is correlated better with the local field potentials of neuronal discharges than the post-synaptic action potentials (spikes) within a certain range of neuronal activation. As for EEG/MEG, in addition to the source localization estimated from the electrical or magnetic field, analysis of rhythmic oscillations of various frequency bands has added useful information both clinically and experimentally. It is well known that the biggest difference between EEG and MEG exists in the orientation of source current to be recorded. MEG records only the source current tangentially oriented to the head surface whereas EEG records both tangential and radial sources. EEG is seen widespread over the head surface due to volume conduction while MEG is not influenced by different electrical conductivity of various structures surrounding the cerebral cortex. Practically, MEG is not applicable to ictal recording of epilepsy patients because the head has to be fixed throughout the recording. Repetitive TMS reversibly

interferes with the function of the underlying cortex, thus creating a virtual lesion. EEG and MEG provide higher time resolution than the hemodynamic techniques. Since NIRS does not require the strict head fixation, it can be applied to the infants and children, ictal recording of epileptic seizures, and activation studies employing the behavioral task like walking. Taking advantage of each individual technique, it is useful to combine two or more techniques either simultaneously or independently. The most important advance in recent years is the development of techniques for investigating functional connectivity among different brain areas, such as coherence analysis of rhythmic oscillations of various frequency bands among different cortical areas, and the more recently advanced diffusion tensor imaging. Future development of human brain mapping heavily depends on discovery of a new technology or further advance in the currently available technologies. Furthermore, use of the most appropriate technique available among others is of utmost importance to solve each specific question, and multi-disciplinary approach by taking advantage of each individual technique will further increase the scientific value of each technique.

(6) The radial bias: a different slant on visual orientation sensitivity in human and non-human primates

佐々木 由香 (ハーバード大学)

It is generally assumed that sensitivity to different stimulus orientations is mapped in a globally equivalent fashion across primate visual cortex, at a spatial scale larger than that of orientation columns. However some evidence predicts instead that radial orientations should produce higher activity than other orientations, throughout visual cortex. Here this radial orientation bias was robustly confirmed using 1) human psychophysics, plus fMRI in 2) humans and 3) behaving monkeys. In visual cortex, fMRI activity was at least 20%

higher in the retinotopic representations of polar angle which corresponded to the radial stimulus orientations (relative to tangential). In a global demonstration of this, we activated complementary retinotopic quadrants of visual cortex by simply changing stimulus orientation, without changing stimulus location in the visual field. This evidence reveals a neural link between orientation sensitivity and the cortical retinotopy, which have previously been considered independent.

(7) 感覚情報の階層処理

乾 幸二 (生理学研究所・感覚運動調節研究部門)

感覚情報は脳皮質において階層的に処理されると考えられています。主な根拠は動物実験での解剖学的所見と単一細胞記録による受容野の知見ですが、情報処理の時間的流れを実際に確認した研究はほとんどありません。ヒトでは、実験手技の制限から知見はさらに限られています。私は脳磁図を用いてヒト脳皮質での情報処理の階層性を求めて実験を行ってきました。触覚、痛覚、聴覚及び視覚情報処理について検討した結果、以下のような共通性を見いだしました。

1) サルでの解剖学的階層構造にほぼ合致する活動の流れがあり、各皮質間連絡の時間はおおよそ5ミリ秒でした。IV層入力-III層出力のfeedforward pathwayによるものであるとするとほぼ妥当な値ではないかと考えられます。

2) 初期過程では情報は基本的に近接する領域に順次伝達され、情報処理の流れは一定方向へ向かいます (例

えば、3b野-1野-5野の、中心後回を後方へ向かう流れ)。

3) 並行する処理経路が存在し (例えば中心後回を後方へ向かう背側路とS1からS2へ向かう腹側路)、並列階層的な情報処理の概念に矛盾しません。

4) 初期皮質活動は約10ミリ秒感覚で2階活動の向きを逆転させ、三相構造を示します。このような活動様式は、感覚情報処理初期過程における共通する皮質層内伝導を反映するものと考えます。

5) 三相構造を示す初期活動の後、持続の長い活動が生じます (例えばS2の後期活動)。この活動は初期活動とは異なる役割をもつものと考えられます。

6) 後期活動の後、持続の非常に長い活動が前部帯状回と海馬付近に生じます。これらの活動は、受動的な注意や意識的認知に関わると考えられます。

このような実験結果に基づき、ヒトでの階層的感覚情報処理について考察してみたいと思います。

(8) DirectXを用いた四分の一パターン反転視覚刺激課題の開発

橋詰 顕 (広島大学大学院・先進医療開発科学講座脳神経外科)

栗栖 薫, 長崎 信一, 谷本 啓二 (広島大学大学院・病態情報医科学講座歯科放射線科)

【背景】NeuroScan社製視聴覚刺激呈示装置STIMでは呈示困難な視覚刺激課題を作成する。

【方法】プログラム言語はMS-Visual C++ 7.1, DirectX9.0Cを用いた。640×480画素のフルスクリーンで視覚呈示を行い、内480×480画素を20×20の白黒市松模様とし、600ミリ秒毎に上下左右が約四分の一ずつ反転する課題を作成した。遮蔽した右外側に白丸を表示させ、

photosensorで検出することでトリガー信号を作成した。最低加算回数を50回とし、20歳代健常者9名(女性7名)の脳磁場計測を行い、sLORETAを用いて電流源推定した。

【結果】7例で明瞭なP100mが認められ、内6例で視野に対応した視覚野の電流源推定が可能であった。

【結語】DirectXを使うことで、STIMでは困難な視覚呈示刺激課題の作成が可能であった。

(9) Fundamental Research on Electrical Brain Mapping of Motor Imagination

Mastake Kawada (The University of Tokushima)

Richard M. Leahy (University of Southern California)

近年、ブレイン・コンピュータ・インターフェイス

(Brain Computer Interface: BCI)の研究が活発に進められ

ている。BCI は脳内電磁現象に伴う信号を、外部装置で利用するというものである。任意の運動をイメージした場合に、どのような脳活動が発生するかを把握できれば、その信号を利用した BCI が実現できると考えられる。本報告では、脳内電磁現象を利用した BCI を開発するための基礎研究として、任意の運動をイメージした際に発生する EEG から、その活動部位を推定した結果について述

べる。本研究では、脳活動部位の推定法として Minimum Norm Solution を用い、任意運動として右手、及び、右足をイメージした際の EEG データを用いた。同結果より、右手、及び、右足の運動イメージ時の活動部位には相違があり、その活動部位は右手の方が右足より大きいという知見を得た。

(10) 聴覚・視覚誘発脳磁図反応における刺激の規則性、親密度および調和性の可交換性

原田 暢善, 岩木 直, 外池 光雄 (産業技術総合研究所関西センター・人間福祉医工学部門)

聴覚誘発脳磁図反応において、刺激間隔の $1/f$ ゆらぎのべき乗の増加、すなわち規則性の増加、および 4 文字ひらがなの日本語音声刺激の親密度の増加にともない、一次聴覚野の活動強度および潜時が減少することが明らかになった。また視覚誘発脳磁図反応において、動物の首および胴体の意味的距離の減少にともなう不調和さの減少 (調和性の増加)、および 4 文字ひらがなの親密度の増加にともない視覚誘発脳磁図反応の 220ms 成分の活動

強度が増加することが明らかになった。本来、質的に異なる、聴覚刺激の規則性および親密度、および、視覚刺激の親密度および調和性が脳皮質活動で同様な作用を持つことが明らかになった。質的に異なる刺激要因が脳皮質活動に対する作用要因として互いに交換可能であり、その作用を数量的にコントロールしうることが示された。

(11) ボタン押し練習前後の反応時間と脳磁場周波数変化について

菅野 正光, 岩田 全弘, 藤村 昌彦, 弓削 類 (広島大学大学院・保健学研究科)
橋詰 顕, 栗栖 薫 (広島大学大学院・医歯薬学総合研究科・脳神経外科学)

【目的】事象関連脱同期/同期(ERD/ERS)は皮質の抑制機能や皮質-皮質下回路の機能を反映すると考えられている。一方、反応時間も一般に練習により短縮することが運動学習の研究等で確認されている。そこで今回、練習前後の反応時間と脳磁場周波数を比較検討した。

【方法】右利き健常成人 12 名が stroop 課題に合わせボタン押しを行っている時の脳磁場を記録した。視覚提示を

トリガーとして β 帯域の周波数解析を行った。

【結果】12 名中 9 名が練習後、反応時間を短縮しかつ正答率も向上させた。また練習後、全員が β ERD を小さくした。

【考察】練習を行った事により運動は馴化され、反応時間と ERD に反映したと考えられた。

(12) 運動様式の違いによる運動誘発磁場の脳皮質運動野と感覚野の反応の相違について

小川 真司（日本医科大学・千葉北総病院リハビリテーション科）
（慶應義塾大学・医学部リハビリテーション医学教室）

【目的】運動様式の違いによる脳皮質運動野と感覚野の反応の相違を観察する。

【方法】右利き健常者 6 人の示指背屈運動と手関節背屈運動における運動誘発磁場を計測した。運動野の反応は、対側の 1 次運動野を中心に 10 チャンネルを選択し、単一ダイポール推定法において、Goodness of fit (G 値) 90%以上の条件下で、最も G 値の高いダイポールを求めた。感覚野の反応は、対側の中心溝を挟んだ 30 チャンネルを選択

し、G 値 80%以上の条件下で、最も G 値の高いダイポールを求めた。それぞれのダイポールにおける、G 値、潜時、モーメント、位置を記録した。

【結果】被験者 6 人中、示指運動では、運動野の反応は 1 人、感覚野の反応は 3 人に、手関節運動では、運動野の反応は 5 人、感覚野の反応は 4 人にダイポールが推定された。

【考察】条件を一定にし、脳皮質の反応を観察したところ、運動様式による相違があると考えられた。

(13) パターンリバーサル刺激視覚誘発反応 P100成分の発生機構の検討

仲間 大貴、三浦 太一、畑中 啓作、北村 吉宏
（岡山理科大学・理学部応用物理学科・岡山療護センター）

われわれは、パターンリバーサル刺激による視覚誘発磁界を単一双極子モデルにより信号源解析し、視覚誘発反応 N75-P100-N145 成分が一次視覚野鳥距溝底の同一場所から発生することを示した。三相波が同一場所で経時的に発生することから、これら誘発反応は、視覚情報が網膜から一次視覚野に到達した際生じるのではなく、一次視覚野から高次視覚野を経由し、再度一次視覚野に戻った際生じるという仮説を唱えた。この仮説は、N145 成

分に関して、2 双極子モデル解析法により潜時 135 ms 付近に V4 の活動が認められ支持されたが、P100 成分に関しては高次視覚野の活動を同定できなかった。この理由として、高次視覚野の活動が、リバーサル刺激を構成するオンセット刺激とオフセット刺激で打ち消しあう可能性を考え、オンセット/オフセット刺激を別に行い、リバーサル刺激と比較することで P100 成分の発生機構を検討した。

(14) MEG による言語優位半球の同定 - Wada テストとの比較

金子 裕、岡崎 光俊（国立精神神経センター・武蔵病院脳神経外科・臨床検査部・精神科）

MEG による言語優位半球同定の信頼性の検証を目的とした。対象はてんかんの外科治療の過程で MEG による言語優位半球の同定と Wada テストを行った 10 例である。MEG のよる言語の優位半球の同定は、漢字およびハングル文字を視覚呈示し、漢字に対しては黙読する課題で行った。Neuromag 社製 204 チャンネル脳磁計を用いて MEG を測定し、MATLAB を用いて周波数・統計解析を行った。MEG で言語の優位半球が左と診断された

のは 3 例、右と診断されたのは 5 例、両側性と診断されたのは 2 例であった。左と診断された 3 例では、Wada テストでも左と診断された。右と診断されたのは 5 例では、Wada テストでは 4 例が右で 1 例が両側性と診断された。両側性と診断された 2 例では、Wada テストでは 1 例が左で 1 例が右と診断された。MEG による言語の優位半球の同定と Wada テストは概ね一致しており、実用に耐えらると思える。

(15) 音色のカテゴリー知覚の聴性誘発 N1m の下降脚への反映

水落 智美, 加我 君孝 (東京大学大学院・医学系研究科・感覚運動神経科学)

湯本 真人 (東京大学・医学部附属病院・検査部)

狩野 章太郎 (東京大学・医学部附属病院・耳鼻咽喉科)

伊藤 憲治, 山川 恵子 (東京大学大学院・医学系研究科・認知言語医学)

音色の定常的な要素を構成するスペクトル包絡の違いが聴性誘発磁場に与える影響を調べるために、3 つの音色 (vocal, instrumental, linear) のスペクトル包絡を持つ基本周波数 110Hz の 12 種類の複合音を無視条件下で両耳提示し、誘発される N1m の頂点及び下降脚の潜時を分析した。N1m の頂点潜時は vocal に対する潜時が他の 2 つの音色より有意に早く、その下降脚は linear に対する潜時が instrumental より有意に早かった。また両成

分の潜時において左右半球間での有意差はみられなかったが、音色と左右半球での交互作用がみられた。更に、各音色に対して N1m の頂点および下降脚の潜時差を比較すると、linear が他の 2 つの音色より有意に短かった。これらより vocal では N1m 成分の下降脚が延長することがわかり、人の声は聴覚野での早期の処理に時間を要する可能性が示唆された。

(16) ノンパラメトリック統計を用いた信号源の統計的有意性の推定

鈴木 祐子, 関原 謙介 (首都大学東京大学院・工学研究科・システム基礎工学専攻)

ノンパラメトリック統計を用いた信号源の統計的有意性を推定する方法として、3 種類の方法を提案する。1, ブートストラップ法を用いた、等価電流ダイポールモデルの信頼度区間の推定。2, ランダマイゼーションテストを用いた、空間フィルタ出力の統計検定。3, 2 条件の

計測に対する、パーミュテーションテストによる再構成結果の統計評価。以上の 3 種類それぞれについて、シミュレーション結果と、実測 MEG データを用いた結果を報告する。

(17) 時間相関の存在する複数信号源のための Beamformer 法

木村 壮志 (早稲田大学大学院・理工学研究科・電気情報生命専攻)

MEG データを用いた脳の高次機能解明を行うために、より精度の高い複数信号源推定手法の開発が望まれている。Beamformer 法は、時間的に安定した推定解を得られる点で非常に有用な手法であるが、時間相関の存在する複数信号源を推定できないという短所がある。そこで我々はこの問題を解決するために、データ共分散行列の信号空間固有ベクトルを個々の成分に分解し、共分散行列を再構成することにより、時間相関成分を除去する手

法を提案した。以前の報告では、固有ベクトルを分解する方法として Multi-Dipole Fitting を用いていたが、その際に先見情報として信号源数を把握しておく必要があった。そこで、信号源数が不明のときでも固有ベクトルを分解できる方法として L2 ノルム最小化法を用いることにした。新たに考案した手法をシミュレーションと実験データに適用したところ、時間相関のある複数信号源を推定できた。

(18) 言語性課題遂行時における自発脳磁界の解析

高松 亮介, 平田 恵啓, 栗城 眞也 (北海道大学・電子科学研究所)

川勝 真喜 (東京電機大学・情報環境学部)

連想性の高い文を提示し、その時の自発脳磁界から言語機能に関連した脳活動を抽出することを目的として行なった。被験者にプライミング句 (例:「壁に絵を」) を提示し、その句から連想される動詞 (例:「掛ける」) を想起させ、その後動詞を提示して文章に整合性があるかどうかを判断する課題を遂行中の脳磁界を計測した。

101ch 脳磁計で記録した raw data から加算平均した誘発反応を引いたものを自発性脳磁界として、50 epoch ま

でのデータを解析した。Wavelet を用いた時間 - 周波数解析を行い、反応が見られた時間(0-200 ms)と周波数帯(5-9 Hz)を切り出し、主成分分析をして寄与率が 5%以上の成分のみとして雑音を除去した。その後、L2 ノルムによる電流密度分布を計算し、標準脳の表面上に活動源を推定した。その結果、左前頭葉と右側頭後部に言語機能に関連していると見られる自発活動の変化を認めた。

(19) 誘発磁場と信号解析におけるその数理

岸田 邦治, 横田 康成 (岐阜大学・工学部応用情報学科)

体性感覚と聴覚におけるダイナミックスは脳磁図の加算平均波形に含まれるだけでなく、そのゆらぎにも含まれているはずである。この方針に沿ったアプローチとして、時間構造に基づく同時対角化なる ICA のアルゴリズムを誘発磁場の抽出のために用いてきた。用いたアルゴリズムでは相互相関の最小化を目指していたが、誘発磁場に適用した場合にはデータ数等の制約から、独立までの分解はアルゴリズム上でできなくともよいと当初思

っていた。しかし、誘発磁場の場合には「独立成分解析では独立成分の相互相関は無いはず」という前提から「無相関化は不可能である」と変更すべきであった。この視点をこれまでの発表に付け加えると、共分散行列の対角化はブロック対角化と修正される。このため、アルゴリズムの「相関の最小化」には誘発磁場に対応した特有の数理があることを紹介する。つまり、「from ICA to BSS」なる標語を紹介する。

(20) 棘波自動検出システムを用いた、脳磁図棘波の定量化の試み

芳村 勝城 (静岡てんかん・神経医療センター)

渡辺 裕貴 (国立精神神経センター・武蔵病院精神科)

渡辺らが開発した棘波自動検出システムにおいて、検出の条件 (棘波判定パラメータ) を変えることにより、ある条件に限定した棘波の等価電流双極子分布を描出することが可能である。今回この方法を用いて、てんかん患者 10 例について、各てんかん患者における発作間欠時棘波を立ち上がりから頂点までの勾配の違いによって分類し、これらの棘波の分布を調べてみた。その結

果、棘波の等価電流双極子が推定される位置のばらつきが大きい患者ほど、勾配がなだらかな棘波が多い傾向が認められた。また、発作症状や画像診断等から推定されるてんかん原性領域の付近では棘波の勾配が急で、離れるにつれてなだらかになる傾向を視覚化することができた。これらの手法はてんかんにおける irritative zone のより詳細で客観的な分析に役立つ可能性がある。

(21) 聴覚誘発 MEG 応答の刺激依存性 — 刺激音の周期的構造による影響 —

鷲尾 大輔, 栗城 眞也 (北海道大学・電子科学研究所)

【はじめに】聴覚性誘発脳磁界の代表的な応答として N1m や P2m と呼ばれる成分が知られている。P2m の詳細については明らかになっていないが、これまでの報告から P2m は刺激音の周期的構造に関係している可能性があると考えられる。従って、本研究では刺激音の周期的構造に対する脳活動を検討することを目的とした。

【実験】男性 3 名 (全員右利き) が被験者として参加した。刺激音として周期的構造を持つピアノ音と非周期的構

造を持つ人工音を用いて計測した。脳磁界計測には球面型 101 チャンネル MEG 計測装置を用いた。応答波形の強度評価のため後方極大 20 チャンネルの RMS 値を計算した。

【結果と考察】刺激音に対する N1m の RMS 振幅は、ピアノ音と人工音で差は見られなかったが、P2m の振幅は自然音の方が大きかった。これは、P2m がピアノ音のような規則正しい周期的構造の波形に対してよく反応して誘発されるためであると考えられる。

(22) 聴覚 MMN と adaptation 反応

寶珠山 稔 (名古屋大学・医学部保健学科)

弁別ができない 2 つの聴覚刺激を用いて Mismatch field (MMF) と adaptation 反応について脳磁計を用いて計測した。

【方法】7 つの周波数 (中心周波数 675 Hz) で構成される音 (CS7) と中心の周波数を除いた 6 つの周波数で構成される音 (CS6) を作成し、CS6 あるいは CS7 を先行刺激として与え、675 Hz の音に対する聴覚誘発脳磁場 (AEF) の adaptation について観察した。MMF については CS6 を標

準刺激、CS7 を逸脱刺激として記録した。

【結果】AEF の adaptation としての変化は P2m (200ms) について認められた。しかし、CS6 と CS7 による MMF は検出できなかった。

【考察】刺激の差異が弁別閾値以下である場合の MMN の出現については議論があるが、本研究では少なくとも大脳皮質レベルで MMF を生じない刺激での adaptation を検出しえた。

(23) 両耳間時間差と両耳間相関度に関わる脳磁界反応

添田 喜治, 中川 誠司 (産業技術総合研究所・人間福祉医工学研究部門)

音源の位置を知る能力は、人間にも動物にも重要である。頭の一方側にある一つの音源について考えたとき、遠い方の耳に到達する音は近い方の耳に到達する音に比べて、時間的に遅れ、強さは弱くなる。この場合、音源の場所に関する手がかりは、両耳間時間差と両耳間強度差である。また、両耳に到達する音の相関は、音像の広がり感と関係があり、両耳間相関が低いほど広い音像が知覚されることが明らかにされている。つまり、両耳

間相関が低いほど音像が広がってしまい、音源の場所はわかりにくくなる。本研究では、音源の位置の知覚に関して重要な要素である、両耳間時間差と両耳間相関度を变化させて脳磁界計測を行い、N1m 反応に注目して解析を行った。解析の結果、両耳間相関度が高いときに、両耳間時間差の増加に伴い N1m 振幅が大きくなる傾向が見られた。しかしながら、両耳間相関度が低いときには、両耳間時間差の効果は見られなかった。

(24) 時間的に振幅変調された視覚刺激に対する脳磁界反応

岡本 洋輔, 矢野 隆, 安藤 四一 (熊本大学大学院・自然科学研究科)
中川 誠司, 藤井 健司 (産業技術総合研究所・人間福祉医工学研究部門)

時間周波数の異なる複数の信号を合成した視覚刺激を呈示すると、各構成信号の周波数の差に相当する成分が知覚される。しかし、各構成信号の周波数及びそれらの差がもたらす知覚の違いについて詳しく調べた例はなく、差分周波数の抽出メカニズムの詳細は明らかにされていない。本実験では、振幅変調刺激のキャリア周波数、変調周波数およびその変調度を変化させて知覚閾値を測定すると共に、脳磁界計測を行った。解析の結果、変調周波数に対応する脳反応成分が見られた。その大き

さは、キャリア周波数が低い場合は変調度の増大と共に大きくなったが、キャリア周波数が高い場合は変調度の増加に伴う変化は見られなかった。これはキャリア周波数が高くなると変調周波数に対応する成分が知覚されにくくなるという閾値測定の結果に対応している。また変調周波数に相当する正弦波刺激に対する脳活動との比較から、両者の知覚に関する視覚系の処理の違いが示唆された。

(25) 格闘時における脳磁場反応と心理的要因の関係

中川 慧, 伏見 健志, 岩田 全広, 河原 裕美, 藤村 昌彦, 弓削 類
(広島大学大学院・保健学研究科)
橋詰 顕, 栗栖 薫 (広島大学大学院・医歯薬学総合研究科・脳神経外科学)
志々田 一宏 (広島大学大学院・医歯薬学総合研究科・精神神経医科学)

【目的】格闘時の脳磁場反応と心理的指標の関係を調べた。

【方法】パンチング動画を注視させ、攻撃側・守備側の視点から、攻撃に的中する場合としない場合の脳磁場反応を比較した。解析には空間フィルター法、心理的指標には気質性格検査を用いた。

【結果】後頭・頭頂領域で、画像提示後 300ms 前後と 500ms 前後で脳磁場反応が確認された。立場の違いによって、

脳磁場反応に差がみられ、守備側でより大きな反応がみられる傾向にあった。また、運動野付近にも反応がみられる被験者もあった。

【考察】後頭・頭頂領域の活性の第 1 成分は画像の動き始め、第 2 成分はパンチング動作に対する反応、運動野付近は動作のイメージングによる反応と考えられた。各反応に対する磁場強度の違いは、心理的要因が関係する可能性が考えられた。

(26) MEG 信号の独立成分分析による分離

岩木 直 (産業技術総合研究所・人間福祉医工学研究部門)

MEG 信号は、(A) 刺激に誘発されて発生する誘発脳磁界成分、(B) 内的な処理に関連する内因性成分、(C) 自発脳活動に由来する成分、(D) 刺激装置や体動などに起因するアーチファクト、(E) 外来ノイズなど、さまざまな信号の重ねあわせである。現在までに、これらの成分

を分離し、解析対象の信号(Signals-of-Interest)を抽出する、あるいは雑音を除去するためのさまざまな手法が考案されてきた。そのような手法の一つである独立成分分析(independent component analysis: ICA)は、近年さまざまな信号に適用されてきている有力な信号分離手法であ

る。研究会では、ICA を(i) 電気刺激や眼球運動にともな
ってよるアーチファクトの除去, (ii) 自発脳活動や心磁

図信号の分離, (iii) 誘発脳磁図に含まれる複数の成分の
分離に適用した結果について紹介する。

(27) 空間フィルタおよび解剖学的標準化を用いた脳磁場の周波数解析

志々田 一宏, 小野田 慶一, 山下 英尚, 岡本 泰昌, 山脇 成人
(広島大学大学院・医歯薬学総合研究科・精神神経医科学)

橋詰 顕, 栗栖 薫 (広島大学大学院・医歯薬学総合研究科・脳神経外科学)

中川 慧, 伏見 健志, 弓削 類 (広島大学大学院・保健学研究科)

【背景・目的】さまざまな課題施行時に生じる β 帯域などの周波数変化を捉えることで、皮質の活動を評価することが試みられている。しかし、センサーごとの周波数解析では、センサーと脳の位置関係が被験者間で異なるためグループ解析が困難であった。そこで今回、空間フィルタおよび SPM2 による解剖学的標準化を用いて周波数解析を行った。

【方法】被験者 6 名が自発運動、単語生成課題などの課題を行っているときの脳磁場を記録。個人の MRI の脳内

に 5mm 間隔に置いた格子点上の接平面方向の電流を sLORETA により推定し、 β 帯域の活動を加算平均した。このデータを、SPM2 により MRI 構造画像を標準化した情報を用いて空間的に変形し、被験者間で統計検定した。

【結果】生理学的に妥当と思われる部位に脱同期がみられた。

【考察】空間フィルタと解剖学的標準化は、グループ解析に有用であった。

(28) 肘関節屈曲、過伸展動作観察時における脳磁場反応

伏見 健志, 中川 慧, 岩田 全広, 藤村 昌彦, 弓削 類 (広島大学大学院・保健学研究科)

橋詰 顕, 栗栖 薫 (広島大学大学院・医歯薬学総合研究科・脳神経外科学)

志々田 一宏 (広島大学大学院・医歯薬学総合研究科・精神神経医科学)

【目的】生理学的動作と実際には起こり得ない非生理学的動作の観察における視覚情報処理および認知機構の差異を調べた。

【方法】3D 人体画像作成ソフト POSER6 を用い、矢状面を向いた人体モデルの肘関節 70° 屈曲、過伸展画像を作成した。DirectX を用いて動画化し、左右肘関節動作をランダムに 480×480 画素、視野角約 20° でスクリーンに提示した。解析には、空間フィルターを用いて電流源推

定を行った。

【結果】13 名中 8 名の被験者において、屈曲動作観察時よりも過伸展動作観察時で、約 200-300 ms の頂点潜時で右後頭側頭領域の脳磁場反応が大きくなる傾向がみられた。

【考察】非生理学的動作の観察は、生理学的動作よりもイメージが困難なため、その認識においてより多くの神経活動が必要になる可能性が考えられた。

(29) 気体刺激のリアルタイムモニタリングによる嗅覚誘発電位・脳磁場の同時計測(2)

小早川 達, 後藤 なおみ, 戸田 英樹 (産業技術総合研究所・人間福祉医工学研究部門)

秋山 幸代 (国立スポーツ科学センター・スポーツ科学部)

小林 剛史 (文京学院大学・人間学部)

斉藤 幸子 (斉藤幸子味覚嗅覚研究所)

本研究は、我々のグループで開発した超音波ガスセンサーを用い、気体刺激をリアルタイムにモニターすることによって誘発された嗅覚誘発電位と脳磁場を同時に計測し、検討することを目的とした。ニオイ物質にはパニリンを用い、刺激提示時間は 200 ms, 刺激間隔は 40 s として 30 回提示を 1 セッションとし、日を変えて合計

7-9 セッションを繰り返し、約 200 回の加算データを得た。超音波ガスセンサーの出力を基準にして加算した結果、前頭の電極 (Fpz) において 190ms 付近に陰性成分が認められ、Cz, Pz ではその振幅の現象が見られた。同時に計測した脳磁場データについて、複数セッションにまたがった加算・解析を現在行っている。

12. 神経科学の道具としての fMRI 研究会

2006 年 11 月 16 日－11 月 17 日

代表・世話人：本田 学 (国立精神・神経センター)

所内対応者：定藤規弘 (生理学研究所 心理生理学)

(1) Mapping cortical activity using fMRI in awake behaving monkeys

Naokazu Goda, Takuya Harada, Minami Ito, Hiroshi Toyoda, Norihiro Sadato, Hidehiko Komatsu (NIPS)

Tadashi Ogawa (Kyoto Univ.)

(2) Network extraction using exploratory multivariate analysis of intersubject variability in task-related activation

Motoaki Sugiura (Dept. Cerebral Research, NIPS, Okazaki, Japan)

(3) A Toolbox for NN-ARX Modeling of fMRI Time Series

Bosch, J., Riera, J., Biscay, R., Galka, A., Valdes, P., Sadato, N. and Ozaki, T.

(情報システム研究機構, 統計数理研究所)

(4) Motion correction in k-space for fMRI

Costagli M, Waggoner RA, Ueno K, Tanaka K, Cheng K (RIKEN Brain Science Institute)

(5) Electromagnetic Source Imaging: Resolution Spread Function-Constrained and

Functional MRI-Guided Spatial Filtering

Xiaohong Wan (RIKEN Brain Science Institute)

(6) Hemodynamic correlates of human sleep spindles: A simultaneous EEG-fMRI study

Takeyuki Mori, Noriko Sato (National Center of Neurology and Psychiatry)

Kimitaka Anami (Takatsuki Hospital)

(7) Sex differences in automatic emotion processing: Association with harm avoidance

Shigeru Toki, Yasumasa Okamoto, Keiichi Onoda, Akiko Kinoshita, Shigeto Yamawaki

(Department of Psychiatry and Neurosciences, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University)

Hiroshi Yoshida (Department of Social and Clinical Psychology,

Faculty of Contemporary Culture, Hijiya University)

(8) 脳機能計測を目指した MRS による非侵襲的脳内温度測定

吉岡芳親^{1,5}, 高濱祥子^{1,5}, 及川浩^{2,5}, 神原芳行^{1,5}

松村豊^{1,5}, 江原茂¹, 関淳二^{3,5}, 精山明敏^{4,5}

(¹ 岩手医科大学 先端医療研究センター, ² 岩手県立二戸病院 放射線科,

³ 国立循環器病センター研究所 生体工学部, ⁴ 大阪大学大学院 生命機能研究科,

⁵ 科学技術振興機構 CREST)

(9) 赤外線カメラによるラット神経活動に伴う脳表温度変化の計測

駒井豊¹, 大井康浩², 精山明敏³, 関淳二¹

(¹ 国立循環器病センター研究所 生体工学部, ² 大阪大学歯学系研究科, ³ 大阪大学生命機能研究科)

(10) The role of the human left ventral premotor cortex for exact enumeration of successive stimuli

Kenji Kansaku^{1,2,3}

(¹ Cognitive Functions Section, Dept of Rehabilitation for Sensory Functions, Res Inst of National Rehabilitation Center for Persons with Disabilities (NRCD), Tokorozawa, Japan

² Division of Cerebral Integration, Dept of Cerebral Research, NIPS, Okazaki, Japan

³ Human Motor Control Section, Medical Neurology Branch, NINDS, Bethesda, USA)

(11) A motor network study by concurrent fMRI and TMS technique

Takashi Hanakawa, Tastuya Mima, Mitsunari Abe, Kimitaka Anami,

Shin-ichi Urayama, Manabu Honda, Hidenao Fukuyama

(国立精神・神経センター 神経研究所 疾病研究第七部

京都大学医学研究科附属高次脳機能総合研究センター)

【参加者名】

上田一貴(広島大学大学院教育学研究科), 天野 薫(NTT コミュニケーション科学基礎研究所), 加美由紀子(九州大学大学院歯学研究院), 尾崎 統, Bosch, Jorge, Biscay, Rolando, Kevin, Won(情報システム研究機構統計数理研究所), 山村裕美(筑波大学大学院人間総合科学研究科), 松田佳尚, 小川昭利, COSTAGLI, Mauro, 万 小紅(理化学研究所脳科学総合研究センター), 作田由衣子, 熊谷智博(東北大学大学院文学研究科), 土岐 茂(広島大学大学院精神神経医学講座), 平野好幸(放射線医学総合研究所分子イメージング研究センター), 森 健之(国立精神・神経センター武蔵病院放射線診療部), 兒玉直樹(産業医科大学神経内科), 吉岡芳親(岩手医科大学先端医療研究センター), 金 完哉, 渡邊和子(岐

阜大学医学系研究科生理学分野), 加藤 誠(情報通信研究機構未来 ICT 研究センター), 本田 学, 花川 隆(国立精神・神経センター神経研究所), 関 淳二, 駒井 豊(国立循環器病センター研究所生体工学部), 橘 篤導(神奈川歯科大学生体機能学講座), 郷田直一(生理学研究 感覚認知情報), 神作憲司(国立身体障害者リハビリテーションセンター研究所), 水谷 勉(茨城大学大学院), 田中靖人, 劉 国相(情報通信研究機構バイオ ICT グループ), 定藤規弘, 杉浦元亮, 田邊宏樹, 豊田浩士, 齋藤大輔, 原田宗子, 大塩立華, 中下 悟, 村瀬 未花, 内山仁志, 米田英嗣, 森戸勇介, 牧 陽子, 間野陽子, 出馬圭世, 谷中久和, 酒井朋子, 林 正道, 佐々木章宏, 藤井 猛(生理学研究所 心理生理学)

【概要】

1990 年に発見された blood oxygen level dependent (BOLD)効果を主な原理とする機能的磁気共鳴画像法(以下 fMRI)は近年著しく普及し、ヒトを含む霊長類の脳機能を非侵襲的に探る上で卓越した可能性をもつことが明らかとなってきた。その反面、いまだ手法自体の歴史が浅いため、適切な撮像方法や統計的解析法といった技術面のみならず、記録される信号変化のもつ生理学的意味(即ち局所脳血流あるいは電気的活動との関係など)を理解する上でも検討すべき課題が山積している。本研究会では、このように萌芽的側面を有する fMRI 手法を、技術的ならびに生理学的な諸課題について活発な議論をおこなうとともに、情報交換の場を提供することを目的とする。具体的には、現在、fMRI 研究を盛んに実施している研究施設や装置開発など関連領域の研究者並びに技術者から、fMRI の記録・解析における技術的側面、ならびに BOLD 効果などの生理学的側面に関連する研究成果を募集し、発表ならびに討議をおこなう。

こうした活動を通して、fMRI を神経科学の確固たる道具として育て上げることを目標とする。平成 18 年 11 月 16 日-11 月 17 日の 2 日間に渡り、所内外あわせて 59 名の参加者を得て、第 5 回 fMRI 研究会を行った。fMRI に関する技術的ならびに生理学的な諸課題について活発な議論をおこなうとともに、情報交換の場として有効に機能した。具体的には、現在、fMRI 研究を盛んに実施している研究施設や装置開発など関連領域の研究者並びに技術者による、fMRI の記録・解析における技術的側面、ならびに BOLD 効果などの生理学的側面に関連する研究成果 11 演題について、口頭発表ならびに討議を活発に行った。例年同様、国内研究機関に在籍する外国人研究者の参加が多かったため、出来るだけ英語による発表・討論を行うことに留意した。fMRI の技術的、生理学的側面に焦点を絞った研究会は国内に類をみず、会終了後のアンケートでも継続開催の希望が多数出た。

(1) Mapping cortical activity using fMRI in awake behaving monkeys

Naokazu Goda, Takuya Harada, Minami Ito, Hiroshi Toyoda, Norihiro Sadato, Hidehiko Komatsu(NIPS)

Tadashi Ogawa(Kyoto Univ.)

fMRI study in awake behaving monkey is expected to be a new valuable experimental approach for investigating large-scale brain function, which is complementary to electrophysiological recordings from relatively small number of neurons. Here, we report the results of preliminary fMRI in the awake monkeys aimed to map retinotopy and motion- as well as form-selective regions in the visual cortex, with our experimental setups developed for fMRI in the awake monkeys.

Two monkeys were trained to fixate for 1-4s at a central fixation spot. The monkey viewed a screen in the 'sphinx' position inside a custom monkey chair. The head was fixed rigidly with the chair. Eye position was measured by tracking the pupil with an IR video camera. We presented stimuli of the different conditions (checkerboard wedges for retinotopic mapping, moving/stationary dots and object/noise pictures for measuring motion- and form-selective activities, respectively)

in a block-design; each block consisted of 4 trials, in each of which the stimulus was presented for 0.5-3.5s during the fixation. BOLD responses during the blocks were measured using a 3T scanner and a surface coil with EPI sequences optimized to reduce susceptibility artifact. The data with large head/body motion were excluded from the analysis.

We obtained the retinotopic maps in areas V1/V2/V3/V3A/V4 in good agreement with the maps reported by previous electrophysiological studies. We found robust motion-selective activities within superior temporal sulcus (STS) including area MT, and form-selective activities as patches within STS and gyrus in the inferior temporal cortex, largely consistent with previous electrophysiological studies. Interestingly, some of these were observed in the regions where electrophysiological recordings were not explored. These results demonstrate the feasibility and the utility of fMRI for functional mapping in the monkey visual cortex.

(2) Network extraction using exploratory multivariate analysis of intersubject variability in task-related activation

Motoaki Sugiura (Dept. Cerebral Research, NIPS, Okazaki, Japan)

In complex environment in the daily life, perception and behavior differ among individuals. Each brain may respond incidentally or engage complementary processes to different extents for a single behavioral goal. This entails intersubject variability in activation and reduces the sensitivity of the conventional intersubject analysis of the functional imaging study, which tests the average between-condition difference in activation, treating the between-subject effect as noise. A novel approach to identification of brain networks using this intersubject variability has been recently proposed (Sugiura et al., Human Brain Mapping 2006, in press). The assumption is simply that a network for a specific cognitive mechanism will be activated differently in different subjects and that this

will be expressed as a systematic pattern of intersubject variability. A principal component analysis (PCA) is used to summarize patterns of variability, over subjects, in regions of interest (ROIs) showing task-specific effects. Inclusion of multiple ROIs and task conditions enables to extract patterns of intersubject variability in distributed networks induced by different conditions. The principal component scores enters a voxel-by-voxel multiple regression analysis of subject-specific activations (i.e., contrast images). The resulting statistical parametric maps identify cortical networks that participate in the principal modes of intersubject variability. The functional attribution of these principal components is based on the functional selectivity of the ROIs

used in the PCA. Examples of the successful applications of this approach will be presented and the limitation of the

technique will be discussed.

(3) A Toolbox for NN-ARX Modeling of fMRI Time Series

Bosch,J., Riera,J., Biscay,R., Galka,A., Valdes,P., Sadato,N. and Ozaki,T.

(情報システム研究機構, 統計数理研究所)

A Matlab software is presented to analyze fMRI data on the basis of the NN-ARX approach^[1]. NN-ARX is a voxel-wise methodology for estimating both the brain responses to stimuli contained in fMRI data, as well as gathering areas of the brain highly correlated. In contrast with other models, NN-ARX takes also into consideration dynamic aspects of consecutive fMRI scans interpreted as a multiple time series. The software includes facilities for data preprocessing (SPM like) but can also accept the output from SPM preprocessing. Automated brain segmentations as well as coregistration to Talairach space are provided. The software offers options for the estimation of the optimal model parameters. To estimate the correlated areas, interesting voxels are selected as reference. The voxels of interest can be taken either from the voxels that show higher stimulus activation values or the voxels with higher innovations (the residual after model

estimation). The HRF is also estimated for each experimental condition and shown as a 3D spatial map. A Hotelling T2 is used to assess the significance of the stimuli related activations as well as to assess differences between conditions. By pinpointing with the mouse over the spatial maps, a specific voxel can be picked up and its specific HRF is displayed for each condition. Information about the reference voxels is provided and the user can study them separately. Also, for a selected voxel, the optimal model selection, the parameters, the original and the estimated signals are shown, as well as the HRF for each condition, the residuals and some statistical tests about the residuals.

[1] fMRI activation maps based on the NN-ARx model, Riera-Diaz, J.J.; Bosch-Bayard, J.; Yamashita, O.; Kawashima, R.; Sadato, N.; Okada, T.; Ozaki, T. *Neuroimage*, **23**(2), (2004), 680-697

(4) Motion correction in k-space for fMRI

Costagli M, Waggoner RA, Ueno K, Tanaka K, Cheng K (RIKEN Brain Science Institute)

Unlike the most widely used applications such as AFNI and SPM that operate in image domain, the algorithm presented here corrects 3D rigid-body motion by operating in k-space, thus decoupling and independently correcting rotation and translation effects.

Rotations between two volumes to be aligned are visible in their 3D-FFT magnitude data, where no contribution from translational effects is present. Since rotations in k-space are always about the origin of the spatial frequency axes, we estimate them by aligning spherical shells of equal radius, centered at the origin, encoding magnitude Fourier data of the

volumes to be registered. After correcting rotations, we exploit the Fourier shift theorem for treating translations: a shift along any spatial axis introduces a linear phase change along the corresponding frequency axis, which is estimated by considering the cross power spectrum (CPS) of the original and the translated volumes. Translation correction is achieved by fitting a linear function (a hyperplane in 3D) to the phase of the CPS, adding it to the Fourier transform of the test volume, and finally inverse Fourier-transform the result. The method is non-iterative, and can accurately detect subvoxel translations.

The algorithm was tested on both synthetic and real EPI time series, and compared to the registered data obtained with AFNI and SPM2. Better volume registration was achieved by serial application of motion correction in k-space and then in

image-space, the former step being more robust to local minima and correcting for larger motions, and the latter seeming more suitable for fine corrections.

(5) Electromagnetic Source Imaging: Resolution Spread Function-Constrained and Functional MRI-Guided Spatial Filtering

Xiaohong Wan (RIKEN Brain Science Institute)

The problem of spatial ambiguity in electromagnetic source imaging has been unresolved. Our heuristic analysis points out the discrepancy between the estimated source and the real source arises from the other sources' interference. We suggest a novel and simple solution based on the principle of spatial filtering combined with the Backus-Gilbert method by minimizing the estimated source power and effectively suppressing the other sources' interference. Within this

framework, the functional MRI information can be also effectively integrated into the inverse solution and the source localization is not biased by incompatible knowledge. Our Monte Carlo simulations of EEG system based on a realistic head model show that the resolution spread function-constrained and functional MRI-guided spatial filtering provides precise source localization, even in the cases of multiple simultaneously active sources.

(6) Hemodynamic correlates of human sleep spindles: A simultaneous EEG-fMRI study

Takeyuki Mori, Noriko Sato (National Center of Neurology and Psychiatry)

Kimitaka Anami (Takatsuki Hospital)

The EEG-fMRI is being applied to the examinations of the distributed neural networks related to spontaneous neural activities such as awake (alpha rhythms etc.) and sleep (sleep spindles, K complexes etc.) electrophysiological phenomena as well as epileptiform activities. In the present study, we tried to utilize the EEG-fMRI for mapping hemodynamic correlates of sleep spindles.

The sleep spindle is a distinct EEG event observed in non-REM sleep, especially in Stage II of the sleep cycle. Although sleep spindles have been considered to play a role in sleep maintenance, their physiological implication still remains to be clarified. We investigated the hemodynamic

correlates of spindles using an EEG-fMRI measurement in 43 normal volunteers. Twelve out of the 43 subjects succeeded in reaching Stage II sleep during fMRI acquisition. We found positive spindle-related BOLD signal changes in the early sensorimotor areas, auditory areas, visual areas, anterior cingulate cortex, posterior cingulate cortex and the thalami. The results indicate that extensive cortical and subcortical areas are involved in the formation of spindles. We suggest that such spindle-related neural substrates play important roles in sensory processing and sleep protection during non-REM sleep.

(7) Sex differences in automatic emotion processing: Association with harm avoidance

Shigeru Toki¹, Yasumasa Okamoto¹, Keiichi Onoda¹,
Akiko Kinoshita¹, Shigeto Yamawaki¹, Hiroshi Yoshida²

(¹Department of Psychiatry and Neurosciences,
Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University

² Department of Social and Clinical Psychology,
Faculty of Contemporary Culture, Hijiya University)

Background: Neural science revealed that females appear to be more sensitive and responsive to social, emotional information, including facial expression, than are males. Although subcortical, automatic, face processing has been considered to take an important role in face perception, no neuroimaging studies have been done to elucidate sex differences in subconscious emotion processing and its relationship with personality variables.

Methods: Using fMRI, we investigated the neural responses associated with the subconscious (backwardly-masked) perception of fearful, happy, disgust and neutral faces in 32 healthy volunteers (16 males, 16 females) who varied in harm avoidance, associated with trait anxiety and also threat processing.

Results: When subtracting the activation values of males from those of females, suprathreshold positive signal changes were detected in the right medial frontal gyrus during masked

happy presentation, and in the left superior parietal lobule and the right parahippocampal gyrus during masked fear presentation. When subtracting the activation values of females from those of males, suprathreshold positive signal changes were detected in the right anterior cingulate and the right caudate during the masked disgust presentation. While, in females, the harm avoidance positively correlated both, with happy-related neural activation in the right medial frontal gyrus, and with fear-related activation in the right parahippocampal gyrus, in males, there was no such correlation.

Conclusions: Our findings suggest sex-related neural responses to emotional stimuli and could contribute to the understanding of mechanisms underlying sex-related vulnerability of the prevalence and severity of anxiety and mood disorders.

(8) 脳機能計測を目指した MRS による非侵襲的脳内温度測定

吉岡芳親^{1,5}, 高濱祥子^{1,5}, 及川浩^{2,5}, 神原芳行^{1,5},
松村豊^{1,5}, 江原茂¹, 関淳二^{3,5}, 精山明敏^{4,5}

(¹ 岩手医科大学 先端医療研究センター, ² 岩手県立二戸病院 放射線科,

³ 国立循環器病センター研究所 生体工学部, ⁴ 大阪大学大学院 生命機能研究科,

⁵ 科学技術振興機構 CREST)

体内温度は生命活動の基盤となる物理量であり、組織の活動度、血流、環境に影響されながら統合的・有機的に制御されていると考えられ、生理的条件下の脳においても部位差があるし活動により変動していると考えられる。安静時の脳は基礎代謝の約 20%を占めており（約 20 ワット）、同等の産熱が行われている。また、活動時

には代謝が 10%前後変化すると考えられており、温度は脳活動を評価する一手段となると思われる。しかし、精度の高い非侵襲的な脳内温度計測は容易では無く、脳内温度に関する情報は非常に乏しいのが現状である。温度は定量的に取り扱う事が可能であり、精度良く温度計測ができるようになれば、安静時の脳活動レベル、個体間

の比較, 脳活動の絶対量を評価できる可能性が有る。私たちは, 磁気共鳴法で得られる温度情報を用いた脳機能

評価方法を模索しており, これまでに行ってきた磁気共鳴法を用いた脳内温度計測について発表する。

(9) 赤外線カメラによるラット神経活動に伴う脳表温度変化の計測

駒井豊¹, 大井康浩², 精山明敏³, 関淳二¹

(¹ 国立循環器病センター研究所生体工学部, ² 大阪大学歯学系研究科, ³ 大阪大学生命機能研究科)

脳機能を可視化する新しい手法として, 脳局所温度を計測する方法が提案されている。しかし, その基礎となる生理学的データは限られている。近年, 高感度の赤外線カメラ (インジウムアンチモン) が実用化されたことにより, 脳の局所的な活動に伴う温度変化を脳表で探知することが可能となった。脳表の温度変化は, 脳神経活, 及び, それとカップルする脳血流変化によってもたらされると考えられることより, 脳神経活動の起きた領域, 及び, 強度を推測する有効な情報と考えられる。

本研究では, 麻酔下のラットの下肢に電気刺激 (3mA×5) を与え, 誘起される脳感覚野での温度変化を経頭蓋, 及び, 頭蓋骨除去後の硬膜表面で計測した。経頭蓋での計測では, 最も変化の顕著な部位で, 刺激開始から 2.9 秒後に 0.065 度の上昇, 頭蓋除去後には 2.0 秒後に 0.087 度の温度上昇が観察され, 後者の方がより鋭い空間分布を示した。本計測系は, 局所的な温度変化を探知するのに十分な感度と再現性があることが示された。

(10) The role of the human left ventral premotor cortex for exact enumeration of successive stimuli

Kenji Kansaku^{1,2,3}

(¹Cognitive Functions Section, Dept of Rehabilitation for Sensory Functions, Res Inst of National Rehabilitation Center for Persons with Disabilities (NRCD), Tokorozawa, Japan

²Division of Cerebral Integration, Dept of Cerebral Research, NIPS, Okazaki, Japan

³Human Motor Control Section, Medical Neurology Branch, NINDS, Bethesda, USA)

Adult humans have the ability to count successive stimuli exactly. What brain areas underlie this uniquely human process? To investigate the neural basis, we first used functional magnetic resonance imaging (fMRI) and investigated brain areas involved in counting small numbers of successive stimuli up to 4, and demonstrated activations in the bilateral lateral premotor cortex¹. We further applied fMRI and found that the upper part of the left ventral premotor cortex was preferentially activated during counting of successive sensory stimuli presented 10 to 22 times, while the area was not activated during small number counting up to 4. We then used transcranial magnetic stimulation (TMS) to assess the necessity of this area, and found that stimulation of

this area preferentially disrupted subjects' exact large number enumeration (10-22). Stimulation to the area affected neither subjects' number word perception nor their ability to perform a non-numerical sequential letter task². The results suggest that the left ventral premotor cortex is indispensably involved for exact counting of large numbers of successive stimuli.

1. Kansaku, K. et al. Neural correlates of counting of sequential sensory and motor events in the human brain. *Neuroimage* **31**, 649-60 (2006).
2. Kansaku, K, et al. The role of the human ventral premotor cortex in counting successive stimuli. *Exp Brain Res* **178**, 339-50 (2007).

(11) A motor network study by concurrent fMRI and TMS technique

Takashi Hanakawa, Tastuya Mima, Mitsunari Abe, Kimitaka Anami,
Shin-ichi Urayama, Manabu Honda, Hidenao Fukuyama
(国立精神・神経センター 神経研究所 疾病研究第七部
京都大学医学研究科附属高次脳機能総合研究センター)

The concurrent functional MRI and transcranial magnetic stimulation technique can potentially visualize the whole brain networks connected to the stimulated site. However, the quantitative relationship between TMS intensity and BOLD signals in the stimulated and remote areas is yet to be elucidated. To answer this question, fifteen healthy subjects were scanned on a 3-T MRI scanner. An MRI-compatible figure-of-eight TMS coil was attached to the subject's scalp site adequate for eliciting right thumb movement. BOLD measurement was performed with the gradient-echo EPI ($TR=2.7$ s/ $TE=30$ ms) modified for "stepping-stone" sampling, which enabled online monitoring and recording of motor evoked potentials during scanning. A single TMS pulse was delivered during the delay periods (200 ms) between each volume acquisition. The intensity of TMS pulses was varied

from 30% to 95% of machine output (110% with a booster) at a 5% step (mean frequency at ~ 0.15 Hz). SPM analyses revealed activation of motor and sensory networks as well as auditory areas during TMS stimulation with higher intensities. BOLD signal changes as a function of TMS intensities were assessed in the directly stimulated left primary motor cortex (M1) and other remote areas including supplementary motor areas (SMA). A sharp increase in BOLD signals was observed in M1 only above the 80% stimulation corresponding to the resting motor threshold. The remote motor areas, SMA, for example, showed an increase in signals even below the motor threshold. Further investigation will be necessary to clarify the energy requirement in the direct and remote areas influenced by TMS.

13. 高次脳機能研究の新展開

2007 年 1 月 17 日－1 月 18 日

代表・世話人：高田昌彦（東京都神経科学総合研究所）

所内対応者：南部 篤（生体システム研究部門）

- (1) サルにおける物体認知・認知記憶に関与する 2 つの下側頭皮質領野 (TE 野・周嗅皮質)
および初期視覚野 V4 の遺伝子発現プロファイル
一戸紀孝（理研・BSI）
- (2) ドーパミン誘導性運動の調節に対する前頭前皮質－大脳基底核回路の機能
八十島安伸（福島医大・生体情報伝達研）
- (3) 上丘から水平性および垂直性眼球運動ニューロンに至る経路
伊澤佳子（東京医歯大・医）
- (4) サル内側前頭前野は行動選択に動的に関与する
松坂義哉（東北大・医）
- (5) 霊長類の大脳皮質における歩行制御機序
中隋克己（近畿大・医）
- (6) 両腕運動と片腕運動：同じ腕の運動学習に関わる脳内過程の違い
野崎大地（東京大・教育）
- (7) 大規模空間でのナビゲーションにかかわる脳内機構
佐藤暢哉（日本大・医）
- (8) ヒトの音声認識の動物モデル：合成母音の弁別学習におけるラット聴覚連合野の役割
工藤雅治（新潟大・脳研）
- (9) なぜ行為の観察をすると運動性言語野が反応するのか？
脇田真清（京大・霊長研）
- (10) 淡蒼球内節ニューロン活動の調節機構とその破綻がもたらす運動異常
橘 吉壽（生理研）

【参加者名】

高田昌彦（東京都神経科学総合研究所），泰羅雅登，佐藤暢哉（日本大学），中隋克己（近畿大学），野崎大地（東京大学大学院），工藤 雅治（新潟大学），伊澤 佳子（東京医科歯科大学），脇田真清，宮地重弘，半田高史，井上雅仁，額田大輔（京都大学霊長類研究所），松坂義哉（東北大学大学院），八十島安伸（福島県立医科大学），神代（石橋）真里（国立精神・神経センター），一戸紀孝（理化学研究所），小高 泰，肥後範行，村田 弓（産業技術総合研究所），丹治 順（玉川大学 脳研究施設），

荒牧 勇（未来 ICT 研究センター），喜多 均（米国テネシー大学），小川 正（京都大学），佐々木哲也，山森哲雄，定金 理，渡我部昭哉，廣川純也（基生研），橘 吉寿，伊佐 正，南部 篤，畑中 伸彦，知見 聡美，高良沙幸，岩室宏一，関 和彦，板野 拓，安田正治，平松千尋，松茂良岳広，吉田正俊，高浦加奈，小松英彦，加藤利佳子，鯉田孝和，小野勝彦，金田勝幸，坂谷智也，池田琢朗，西村幸男，坪井史治，斉藤紀美香，豊田浩士，林 正道（生理研）

【概要】

われわれは行動する際，視覚・聴覚・体性感覚などの外部（感覚）情報や学習・記憶・情緒などの内部（自己）情報に基づいて，もっとも適切な運動あるいは動作様式を選択，決定，実行する。日常的に設定されたさまざまな

な行動目標を達成するため，脳はこれら多種多様の情報を状況に応じて有機的に統合し，運動情報として運動野に出力しなければならない。また，物を掴む，腕を伸ばすなど，われわれが日常的に行う個々の動作は，長年に

わたる経験や習慣に基づき脳内で形成された運動プログラムに従って、ほとんど無意識のうちに実行されている。状況に応じて意識的かつ合目的にある特定の行動を企画、遂行しようとする際、脳はそれまでに学習、獲得してきた無数の運動プログラムや認知・思考パターンの中から状況に最も適合したものを選び出し、それらを時系列的に順序よく組み合わせて、まとまりのある一連の行動として出力しなければならない。しかし、このような行動の組織化の神経機構については未だ明らかになっていない。

すなわち、脳科学は本来、脳機能をシステムとして理解し、究極的には“個体の組織化された行動発現のメカニズム”の解明をめざす学問領域である。しかし、現在の脳科学は、研究の進展とともに、研究テーマがそれぞれの専門分野ごとに細分化されるようになった結果、個々の分野の研究者がカバーあるいはフォローできる学問領域も狭小化し、各専門分野を横断的かつ統合的に

捉え、相互理解を深めることがきわめて困難な状況になってきた。個々の研究領域にのみ注目していると、個体としての脳機能の全体像を見失う恐れがあり、生命現象を統合的に理解しようとする脳科学の基本的立場に基づいた研究姿勢が必要不可欠である。したがって、“個体レベルでの高次脳機能を系統的に理解する”ためには、要素としての個々の神経機構を詳細に解析するだけでなく、それらを統合的に機能させる神経システムの解明が重要であり、そのような視点から研究が展開されなければならない。

「高次脳機能研究の新展開」と題した本研究会では、神経解剖学、神経生理学、分子生物学、情報工学など、多岐にわたる専門分野の若手あるいは中堅の研究者が、運動、感覚、認知、及び情動の各分野に関する最新の知見を紹介し、各分野における研究の趨勢、問題点、及び今後の展開に関する忌憚のない意見を活発に交換したい。

(1) サルにおける物体認知・認知記憶に関与する2つの下側頭皮質領野（TE 野・周嗅皮質）および初期視覚野 V4の遺伝子発現プロファイル

一戸紀孝（理化学研究所・脳科学総合研究センター・脳皮質機能構造研究チーム）

サルの下側頭皮質は物体認知に関わる腹側視覚経路の最終段階に位置すると考えられている。下側頭皮質には、二つの細胞構築学的に異なる領域が区別され、ひとつは外側にある TE 野で、もう一つは内側にある周嗅皮質(PRh)である。TE 野と PRh は、互いに密な連絡を持つがそれぞれ異なった機能への関与が考えられている。すなわち、TE 野がより外界の即時情報の解析、PRh がより再認記憶、意味記憶、連合記憶などの記憶への機能が想定されている。大脳皮質の各領野の機能の違いは、線維連絡の違い、その局所回路の違い等によると考えられるが、それぞれの領野における分子構成の違いによる寄与も大きいと考えられる。我々は、上記の二つの機能に関与すると考えられているサル下側頭皮質の2領域さらに階層的に低いと考えられる初期視覚野 V4 の遺伝子発現の違いを GeneChip を用いて網羅的に調べた。その結果、

PRh において強く発現している遺伝子の中には、可塑性に関与していると考えられる遺伝子が多く見られることがわかった。この中には、成長因子とその受容体、棘突起の運動に関連すると考えられる actin や tubulin 関連遺伝子、その関連シグナル伝達系が含まれる。また、近年、同様に genechip を用いた方法でマウス視覚野の critical period に関連すると考えられている遺伝子との共通性も強いことが分かり、これらの遺伝子は PRh において想定されている高い連合能力に関与しているかもしれない。また、アルツハイマー病の神経細胞死に関与する遺伝子・Parkinson 病に関与する遺伝子が多数が PRh において高く発現しており、このことは、アルツハイマー病・Parkinson 病の病変が PRh 周囲から始まることを考えると興味深いと思われる。

(2) ドーパミン誘導性運動の調節に対する前頭前皮質－大脳基底核回路の機能

八十島 安伸 (福島県立医科大学・医学部附属生体情報伝達研究所・生体機能研究部門)

ドーパミン性神経伝達については、受容体サブタイプの種類やその分布、細胞内情報伝達の分子機構、ニューロンの細胞生理に対する薬理作用、作業記憶課題に対する作用などの多くの知見が報告されてきた。ドーパミン性ニューロンの変性脱落がパーキンソン病の病因であることから臨床的研究も多い。しかしながら、高度な複雑性を有する大脳皮質－大脳基底核回路のシステムとしての動作において、ドーパミン性神経伝達が果たす役割とその制御機構には依然として不明瞭な点が多い。

我々は、視床下核(subthalamic nucleus, STN)のニューロンをイムノトキシン細胞標的法によって特異的に破壊すると、脳内ドーパミン伝達の状態に応じて、STN や関連する大脳基底核回路が行動制御において相反的に機能することを示唆した(Yasoshima et al., 2005)。STN ニューロンの選択破壊を受けた遺伝子改変マウスは新規な環境における馴化が障害された (自発運動の増加)。一方、メタンフェタミンの投与によって誘導される運動亢進 (移所行動増進) は無処理群マウスに比べて破壊群マウスでは減弱した。STN はメタンフェタミン投与によって活性化されること、その活性化が淡蒼球に興奮性作用を及ぼすことも示唆された。すなわち、STN-淡蒼球経路はメタンフェタミンによる移所行動の亢進を十分に誘

発するために機能することが示唆される。これまでの大脳基底核モデルでは、STN を含む間接路は運動の抑制に寄与すると考えられてきたが、上記の結果から、STN からの興奮性出力は、ドーパミン性伝達の状態依存的に淡蒼球や黒質に対して異なる作用を付与し、結果として、移所行動の促進と抑制という相反的な機能を担うことが示唆される。

メタンフェタミン投与時に STN を活性化させる神経機構について調べるため、STN に対して直接投射 (ハイパー直接路) が示唆されている前頭前皮質(prefrontal cortex, PFC)に着目した。PFC は、意思決定、問題解決、作業記憶、そして、認知や行為の実行制御を担うことが示唆されている。ドーパミン性神経伝達は PFC の高次脳機能において重要な調節因子であると示唆されているが、運動の制御に対する PFC でのドーパミン信号の役割についての詳細は未解明である。我々は、ドーパミン性薬物誘発性の移所行動という単純な実験モデル系を用いて、運動制御に対する PFC の役割と、上記の STN による運動の量的制御に対して PFC がどのような役割を担うのかを検討している。本講演では、ドーパミン誘導性の移所運動の制御において PFC-STN 経路が果たす役割を中心に述べたい。

(3) 上丘から水平性および垂直性眼球運動ニューロンに至る経路

伊澤佳子 (東京医科歯科大学システム神経生理学)

動物は、視野周辺部に興味ある物体が出現するとサッケードを行い視標を中心窩に捉える。このサッケードにおける上丘から外眼筋運動ニューロンへの神経回路を明らかにするため、これまで上丘から水平性眼球運動ニューロンに至る神経回路を電気生理学および形態学的手法を用いて解析してきた。その結果、上丘から外直筋運動ニューロンおよび外転神経核内介在ニューロンへの興奮性及び抑制性入力、従来想定されていた 3 シナプス性の興奮性経路と 4 シナプス性の抑制性経路より短い、いずれも最短で 2 シナプス性の経路であって、興

奮は傍正中橋網様体内の興奮性バーストニューロンにより中継され、抑制は傍正中橋延髄網様体内の抑制性バーストニューロンを介していることが明らかになった。

これに対して垂直性サッケードの出力経路については、その神経回路の詳細に不明の点が多い。中脳のフォレル野やカハール間質核が関与することなど断片的な所見は報告されているが、上丘の電気刺激によって垂直性眼球運動ニューロンにはほとんど反応が生じないとされてきた。本研究は垂直性眼球運動ニューロンの内、滑車神経核の上斜筋運動ニューロンにおいて上丘から

の神経回路を解析し、これを上丘から水平性眼球運動ニューロンへの神経回路と比較検討した。クロラロース麻酔したネコにおいて上斜筋運動ニューロンから細胞内記録を行い、上丘を電気刺激すると2シナプス性の興奮性入力と抑制性入力が見られた。そこでこれらの興奮性入力と抑制性入力を中継する部位を同定するために、滑車神経にWGA-HRPを注入し、経シナプスの運動ニューロンに終止する最終介在細胞を同定した。経シナプスのラベルされた細胞はフォレル野およびカハール間

質核、前庭神経核に認められたので、次にそれらの介在細胞の内、フォレル野およびカハール間質核を電気刺激した。その結果、それぞれから上斜筋運動ニューロンに単シナプス性の興奮性および抑制性入力があることが判明した。以上の結果から、垂直眼球運動系において上丘から運動ニューロンへの入力経路は、水平眼球運動系の場合と同様に、興奮性経路および抑制性経路のいずれも2シナプス性であることが明らかになった。

(4) サル内側前頭前野は行動選択に動的に関与する

松坂 義哉（東北大学大学院医学系研究科・生体システム生理学教室）

霊長類の内側前頭前野が行動制御に果たす役割を明らかにする目的で、競合解決課題を遂行中のニホンザルの内側前頭前野における神経活動を調べた。この課題では、サルの眼前に設置されたパネルの左右どちらかにLEDが点灯してサルに押すべきキーを指示する。サルはLEDの位置とは無関係に赤が点灯したら右側、緑が点灯したら左側のキーを押すと報酬を得られる。LEDの位置はcongruent trialでは押すべきキーと同側に、incongruent trialでは反対側に提示される。この課題を遂行しているサルの内側前頭皮質から神経細胞活動を記録した結果、前補足運動野のさらに前方の領域に課題遂行に関係した神経細胞の集団が存在する事を発見した。この領域は以下の性質によって隣接する前補足運動野、補足眼野、補足運動野とは区別された。

1. 受動的に与えられた感覚刺激（視覚、聴覚、体性感

覚）に対して応答しない。

2. 眼球運動に関連して活動せず、また皮質内微小電流刺激によって運動が誘発されない。

また、この領域では競合の有無によって神経活動が影響されるケースが前補足運動野、補足運動野よりも比較的多く見られたが、大部分の神経細胞は競合の不在下(congruent trial)でも課題に関連した活動を示した。しかし、サルを一定期間以上congruent trialだけで再訓練すると内側前頭前野の神経細胞は課題関連活動を示さなくなった。対照的に前補足運動野、補足運動野では長期間にわたる競合の不在下でも課題関連活動を示す神経細胞が多数記録された。これらの所見からは、内側前頭前野の行動選択への関与は課題のコンテキストに応じて動的に変化することが示唆される。

(5) 霊長類の大脳皮質における歩行制御機序

中俣 克己（近畿大学医学部 生理学第一講座）

歩行運動において、四肢のリズム運動および姿勢（筋緊張）を制御する基本的な神経機構は脳幹および脊髄内に分散的に配置される。これらの神経機構は体性感入力に加えて上位中枢からの下行性入力によって制御される。一方サルの大脳皮質に存在する複数の運動領域は脳幹・脊髄に対して豊富に直接投射する。脳幹へ投射す

る神経細胞と皮質脊髄路細胞の皮質内分布様式が領域間において異なることを考慮すると、各皮質領域が歩行にかかわる基本的な脳幹-脊髄神経機構を分担的に制御することが推察される。我々は先行研究において、ニホンサルの一次運動野・下肢領域を局所的に不活性化すると跛行が生ずることを、また補足運動野・体幹/

下肢領域を不活性化すると歩行に伴う体幹の動揺と四肢関節の過屈曲・過伸展が生ずることを観察した。

本研究の目的は霊長類の脳皮質における歩行制御機序の解明である。そのために新たな電動式マイクロミニピュレータを開発して、流れベルト上を無拘束の状態で四足歩行または二足歩行するサル的一次運動野および補足運動野から単一神経細胞活動を記録した。そして四足歩行中における神経細胞活動の修飾様式から、各皮質領域における生得的な歩行運動の分担制御機序を明らかにしようと試みた。さらに二足歩行中における神経細胞活動の修飾様式を四足歩行のそれらと比較することから、二足歩行に特徴的な皮質制御機序の解明を試みた。

一次運動野・下肢領域から記録された神経細胞は、四足歩行において歩行周期に一致した相動的な活動様式を示した。歩容を四足歩行から二足歩行へ変換する

と、これらの神経細胞は相動的な発射活動を保ちながら発射頻度を増加させた。また一次運動野から記録された多くの細胞は、歩行速度の増加に対してそれらの発射頻度を増加させた。補足運動野の体幹・下肢領域から記録された神経細胞の多くは相動的或いは持続的かつ相動的な活動様式を示した。歩容を四足歩行から二足歩行へ変換すると、これらの神経細胞の殆どは持続的かつ相動的な活動様式を示し、それらの発射頻度を増加させた。

以上の結果から、歩行運動においてサル的一次運動野は脊髄リズム生成神経回路網の出力を直接的/間接的に制御すること、補足運動野は運動の遂行に必要な筋緊張の制御に重要な役割を果たすことが示唆された。さらに二足歩行の制御に関わる皮質下神経機構は、四足歩行のそれらに比べてより大脳皮質からの出力に依存することが示唆された。

(6) 両腕運動と片腕運動：同じ腕の運動学習に関わる脳内過程の違い

野崎大地 (東京大学大学院教育学研究科)

例えば左腕の運動を片腕だけで行おうと、右腕の運動を付け加えて行おうと、左腕の運動自体に特別な違いがあるわけではない。ところが、運動学習の観点からすると、もう一方の腕の運動を付け加えて両腕運動とすることには大きな意味があることが明らかになった。

新奇な力場の存在下でリーチング運動をおこなうと、最初のうちは手先の軌道は大きく曲げられてしまうが、試行を繰り返すにつれて直線的な軌道を取り戻す。腕が力場に適応した度合い(運動学習効果)は、力場を切った試行(キャッチ試行)で生じる力場と反対方向への手先の動き(後効果)の大きさによって評価することができる。まず、被験者は左腕だけのリーチング動作によって力場を学習した。十分な適応後、左腕だけで行うキャッチ試行、両腕を一緒に動かすキャッチ試行の二つを行ってもらったところ、両腕運動時に左手が示す後効果の大きさは、片腕運動時の6~7割に留まった。つまり、片腕運動によって獲得した左腕の運動学習効果は、両腕運動時の左腕には6~7割しか転移しない。

これは両腕運動時に右腕と一緒に動かすために生ずる脳の負担増のせいだろうか？ 次に、最初から両腕を

一緒に動かして、左腕への力場を学習してもらった(右腕に力場は課さない)。この場合にも、両腕運動によって左腕が獲得した学習効果は、片腕運動時の左腕に6~7割しか転移しなかった。したがって、両腕運動に伴う注意の分散や動作の協調に必要な脳の負担増が関係しているのではない。むしろ、図に示すように、同じ左腕が学習効果を獲得するといっても、それに関与する脳内過程が片腕運動時と両腕運動時で一部異なっていると考えることによって自然な説明が可能である。

この図式が妥当である証拠として、さらに我々は、ここから導かれる二つの予測、(1)片腕運動で左腕への力場を学習した後、力場を切り両腕運動を繰り返すと左手が示す後効果が徐々に減少し左腕は学習効果を失ってしまうかのように見えるが、片腕運動に切り替えると直ちに隠れていた後効果が出現すること(つまり、片腕運動時の左腕のみ学習効果を保持している)、(2)従来、同時に適応することが極めて困難だとされてきた全く反対の方向を向いた二つの力場に、片腕運動時の左腕と両腕運動時の左腕のそれぞれに別々の力場を割り当てることによって同時にかつ容易に適応できること、が実際に

観察されることを示した。腕の運動は片腕運動・両腕運動に関わらず見かけ上は同じだが、運動学習という窓を

通すことによって、それらの制御過程の大きな違いが観測可能となったのである。

(7) 大規模空間でのナビゲーションにかかわる脳内機構

佐藤暢哉（日本大学大学院医学研究科応用システム神経科学，科学技術振興機構 CREST 研究員）

私たちの日常生活において、現在地から離れた目的地に移動することはもっとも基本的な行動といえる。このような移動の際、私たちはほとんど意識することなく正確な道順をたどることができる。このことは特定の場所においてどう進めばよいのかといったルートにそった情報、「ルート知識 (route knowledge)」が一連のリストとして私たちの脳の中にたくわえられていることを示唆している。しかし、これまでのところ、このようなルート知識が脳内に実際にあるのか、またそれがどのように保持されているのかといったことはほとんど明らかにされていない。そこで、大規模空間での空間認知機能がどのように脳内で実現されているのかを調べるために、サルに仮想空間内でのナビゲーション課題を訓練し、頭頂葉内側部のニューロン活動を記録した。

コンピュータ・グラフィックスによって立体的な仮想建造物（いくつかの部屋，玄関ホール，廊下，エレベーターなどからなる）を作り出した。サルには，手元のジョイスティックを操作することによって仮想建造物内を移動し，指定した目的の部屋まで移動することを課題として要求した。

このナビゲーション課題を遂行しているサルの頭頂

葉内側部のニューロン活動を記録した結果，仮想建造物内の場所によって活動性を変化させるものが見受けられた。そのような場所選択的なニューロンのいくつかは，もっとも活動した場所近辺の静止画像や，そのルートを受動的に呈示した場合には活動性を弱めた。このことは，場所選択的なニューロン活動が視覚情報だけに依存しているわけではないことを示唆している。

頭頂葉内側部のいくつかのニューロンは，仮想建造物内の特定の場所で右に曲がったときに活動するといったような，特定の場所で特定の行動をとったときに活動した。また，ある行き先を目指しているときだけ活動をする，つまり，同じ場所での同じ行動であっても行き先が違っているときは活動しないニューロンが見受けられた。このようなニューロンは，特定の場所を目指して移動するルート上のある一区画でどう進めばよいのかという情報，つまり「ルート知識」を表象していると考えられる。目的地までの要所において，このような情報を頭頂葉内側部の各ニューロンが表象しており，それらが系列的に活動することによって，目的地までの正確なルートをたどることができると考えられる。

(8) ヒトの音声認識の動物モデル：合成母音の弁別学習におけるラット聴覚連合野の役割

工藤雅治，菱田竜一，高橋邦行，澁木克栄（新潟大学脳研究所システム脳生理学分野）

ヒトの音声の認識について PET や fMRI による研究がおこなわれているが，分子・細胞レベルの解析には動物実験が必要である。我々は学習の研究に適したラットを用い，合成母音の弁別学習について検討した。母音は声帯の振動を音源とし，基音と倍音成分からなる。声道における共鳴現象により数箇所の周波数帯で倍音のエネルギーが大きくなる。これをホルマントといい，周波数

の低い方から第一ホルマント，第二ホルマント等と呼ぶ。複数のホルマント構造を持つことは母音として必須の性質であり，第一と第二ホルマントの周波数により母音が「アイウエオ」のどれであるかが決まる。我々は複数のホルマントからなる母音様の音を極モデルにより合成し，ラットに弁別させた。2 つの音を聞かせ，一方が鳴っているときに給水口を舐めると報酬として水を

与え、他方がなっているときには水を与えないことにより、4日間のセッションで弁別学習させることができた。聴覚野を破壊した動物では母音様の音の弁別学習が阻害された。一方、単一ホルマントの弁別や、純音の周波数弁別は聴覚野破壊により阻害されなかった。これらより単一ホルマントは聴覚野より下位で弁別されるが、複数のホルマントを持つ母音様の音の弁別学習は聴覚野でおこなわれることが分かった。聴覚野は一次聴覚野とその周囲の聴覚連合野からなる。聴覚野の局所破壊をおこなったところ、母音様の音の弁別学習は一次聴覚野の

破壊では阻害されず、背側・吻側聴覚連合野の破壊で阻害された。ヒトの音声認識はウェルニッケ領野でおこなわれるが、ラット聴覚連合野における母音様の音の弁別はヒトの音声認識の動物モデルとなり得ると考えられる。我々は、ミトコンドリアのフラビン蛋白の蛍光を利用した大脳皮質の機能イメージング法を開発し、マウス感覚野の経験依存的可塑性を捉えることに成功している。今後この方法を用い、母音様の音の弁別学習による可塑的变化を捉え、音声認識の分子・細胞メカニズムを探りたい。

(9) なぜ行為の観察をすると運動性言語野が反応するのか？

脇田真清 (京都大学霊長類研究所)

ヒト左下側頭回(ブローカ野)は運動性言語野として知られる。しかし、この部位は他者動作の観察に反応する領野、いわゆるミラーニューロンシステムの一つでもある。このミラーニューロンシステムの活動を説明する仮説の一つとして、シミュレーション理論がある。この仮説に従えば、このシステムは、観察する行為の知識とは無関係に、観察者自身が再現可能な動作に反応する。例えば、バレエダンサーは、相手のパートの演技よりも自分のパートの演技に対して、ミラーニューロンシステムの反応強度が高くなることが報告されている。

そこで、観察される行為と観察者自身の運動表象との関連を明らかにするために、ブローカ野の活動への観察視点と利き手の影響を調べた。被験者には、箸を使った操作を、自己視点と他者視点から撮影しそれぞれを左右反転させた4種類の映像を呈示した。皮質活動の測定には近赤外分光法を用いた。

結果、被験者ごとに反応傾向にばらつきはあったが、全体として、観察する動作が右手の条件と自己視点の条件で、ブローカ野の活動が高かった。しかし、この結果

は利き手や視点の影響を受けるというより、被験者が自身の行為を観察しているように見える映像に対して強く活動すると考えられる。他者視点の右手(あるいは左手)の動作は見慣れた動作のほずであったが、反応は高くなかった。したがって、ブローカ野は動作に関する知識ではなく、観察者自身が遂行可能な行為に強く反応するといえる。この結果は、観察した行為が被験者自身の運動表象に符号する場合に、この部位が活動することを示していると考えられる。

しかし、ブローカ野は運動性言語野として知られる領野でもある。発話行動が調音する一音ごとの要素を、単語、文節や文章として体制化する性質を考えると、ブローカ野が発話に限らず運動の連鎖の体制化に関与していると仮定される。そうであるなら、観察する行為が観察者の運動表象と符合することは、その行為を積極的に体制下(あるいは再構成)している過程を反映しているとは考えられないだろうか。そこで、現在行っている予備実験を紹介しつつ、運動性言語野の活動を観察対象の体制化という側面から説明を試みる。

(10) 淡蒼球内節ニューロン活動の調節機構とその破綻がもたらす運動異常

橘 吉寿 (生理学研究所・生体システム研究部門)

外界の状況に適した行動を選択し、運動を正確なタイ

ミングで実行することは、ヒトを含め動物にとって必要

不可欠な機能である。これらの行動企画・運動制御には、大脳皮質とともに小脳・大脳基底核・視床といった脳領域が関与している。なかでも、大脳基底核は、その機能異常によりバリズム、パーキンソン病、ジストニアといった運動障害が惹起されることから、運動発現に深く関与していると考えられる。

大脳皮質に端を発する運動情報は、大脳基底核に入力し、情報処理された後、視床を介して、再度大脳皮質に戻る事が知られている。これらの回路のなかで、淡蒼球内節は、大脳基底核の出力部に位置し、入力部である視床下核や線条体、あるいは中継核である淡蒼球外節から密な線維連絡を受けている。今回、正常サルの淡蒼球内節ニューロン活動が、視床下核からのグルタミン酸作動性の興奮性入力と、線条体および淡蒼球外節からのGABA作動性の抑制性入力により巧妙に制御されていることについて報告する。

これまで、大脳基底核疾患の運動障害に対する病態生理として、その本質的な要因を、淡蒼球内節ニューロンの発射頻度の増減に求める説 (DeLong, Trends Neurosci. 13: 281-5. 1990) と発射パターンの変化に求める説 (Bergman et al., Trends Neurosci. 21: 32-38. 1998) がある。今回、バリズムやパーキンソン病モデルサルの淡蒼球内節ニューロンを記録したところ、発射頻度の増減に加えて、bursting や oscillation といった淡蒼球内節ニューロンの異常な活動パターンが観察され、これは視床下核や、線条体あるいは淡蒼球外節から淡蒼球内節への入力の異常に由来するとの結果を得たので報告する。今回示す淡蒼球内節ニューロンの異常な活動パターンによって運動障害が説明できるとすれば、大脳基底核疾患に対する脳深部刺激療法の作用メカニズムも、高頻度刺激によって発射パターンを変化させるということで説明可能であるかもしれない。

14. Recent advances in cortical and hippocampal neural microcircuit studies

(大脳皮質・海馬の局所神経回路研究)

2006 年 7 月 24 日－7 月 26 日

代表・世話人：吉村由美子（名古屋大学・環境医学研究所・視覚神経科学）

所内対応者：川口泰雄（大脳神経回路論研究部門）

- (1) Spontaneous activity and ongoing plasticity of CA3 recurrent networks
池谷裕二（東京大学・大学院薬学系研究科）
- (2) Network dynamics during the development and maintenance of seizures in pilocarpine and picrotoxin treated rats
Yitzhak Schiller(Technion, Israel)
- (3) Asymmetrical organization of glutamate receptors in left and right hippocampal synapses
重本隆一（生理学研究所・脳形態解析研究部門）
- (4) Novel long range GABAergic projections in the hippocampal formation and beyond
神野尚三（オックスフォード大学, UK）
- (5) Single spike triggered event sequences in networks of the human cerebral cortex in vitro
Gábor Tamás (Univ. of Seged, Hungary)
- (6) Cholinergic control of cortical network and thalamocortical transmission
木村文隆（大阪大学大学院・医学系研究科）
- (7) Functional roles of T-type Ca^{2+} channels in visual cortical plasticity
吉村由美子（名古屋大学・環境医学研究所・視覚神経科学）
- (8) GABA circuit control of critical period plasticity in visual cortex
ヘンシュ貴雄（理化学研究所・脳科学総合研究センター）
- (9) Cortico-striatal, cortico-raphe and fast-spiking cell activity in the rat frontal cortex during cortical oscillations
in vivo: modulation by serotonin
Victoria M Puig（生理学研究所・大脳神経回路論研究部門）
- (10) Functional and Anatomical Architecture of the Inferior Temporal Cortex
藤田一郎（大阪大学大学院・生命機能研究科）
- (11) Unraveling cell type and fine-scale specificity of cortical connections
Edward Callaway (Salk Inst, USA)
- (12) A new form of inhibitory synaptic actions between nearby pyramidal neurons in visual cortex
小松由紀夫（名古屋大学・環境医学研究所・視覚神経科学）
- (13) Layer V pyramidal cell diversity and their synaptic connections
川口泰雄（生理学研究所・大脳神経回路論研究部門）
- (14) Cortical projection neurons: phenotypes and input maps
Kathleen Rockland（理化学研究所・脳科学総合研究センター）
- (15) Dendritic network of cortical interneurons linked by gap junctions
福田孝一（九州大学大学院・医学研究院）
- (16) Synaptic integration and plasticity within non-linear dendritic subunits
Jackie Schiller (Technion, Israel)

(17) Dendritic dimensions of cortical GABAergic nonpyramidal cells

窪田芳之 (生理学研究所・大脳神経回路論研究部門)

(18) Physiological genomics of cortical circuits in health and disease

Sacha B Nelson (Brandeis Univ., USA)

【参加者名】

Edward M Callaway, 山口賀章, 森琢磨 (The Salk Institute for Biological Studies), Gábor Tamás (University of Szeged), Sacha B Nelson (Brandeis University), Jackie Schiller, Yitzhak Schiller (Technion, Israel), Ethan M. Goldberg (New York Univ. School of Medicine), 及川賢輔 (St. Boniface General Hospital Research Centre), 福田孝一, 神野尚三 (九州大学), 藤田一郎, 木村文隆, 八木哲也, 小竹康代, 舘俊太, 池添貢司, 小山内実, 石川理子, 七五三木聡, 丸山敦子, 田村弘, 森理也 (大阪大学), 金子武嗣, 藤山文乃, 中村公一, 雲財知, 大平耕司, 柴崎貢, 日置寛之, 水野秀信, 亀田浩司, 古田貴寛, 中村悠, 田中康裕, 田中康代, 奥宮太郎, 田中琢真, 青木高明, 青柳富誌生, 野村真樹, 田川義晃, 菌村貴弘 (京都大学), 松田和郎 (滋賀医大), 小松由紀夫, 吉村由美子, タハミナ・ベグム, ファルク・レジャ, 高田直樹, 稲垣

壮, 稲葉美枝 (名古屋大学・環研), 池谷裕二 (東京大学), 石井俊行 (東邦大学), Katheleen Rockland, Takao K Hensch, 一戸紀孝, Marie Wintzer, 宮下俊雄, 富岡良平, 細谷俊彦, 杉山陽子, 森田賢治, 黒谷亨, 久保田一政, 丸岡久人, Charles Rockland, 俣賀宣子, 我妻明湖 (理学化学研究所), 坪川宏 (東北大学), 重本隆一, 岡村康司, 小松英彦, 川口泰雄, 窪田芳之, Victoria M Puig, Allan Gullledge, 大塚岳, 森島美絵子, 関川明生, 平井康治, 北村明彦, 牛丸弥香, 井上華, 牧陽子, 加勢大輔, 児玉貴史, 中川直, 内山仁志, 井上剛, 高鶴裕介, 稲田浩之, 小川正, 前島隆司, 富田江一, 佐々木幸恵, 足澤悦子, 郷田直一, P. Penphimon, 富永真琴, 東島眞一, 柴崎貢志, 篠原良章 (生理研), 山森哲雄, 渡我部昭哉, 廣川純也, 高司雅史, 佐々木哲也, 米原圭祐, 野中茂紀 (基生研)

【概要】

大脳皮質や海馬には多種多様なニューロンが存在し, それらが複雑に神経結合を形成することにより, その機能を実現していると考えられる。近年の大脳皮質や海馬の神経回路解析には, 従来の解剖学的, 電気生理学的手法に加え, 分子・細胞生物学, 遺伝子工学, イメージング技術等が導入され, 数多くの新しい知見が報告されている。本シンポジウムでは, 特にニューロン種や神経回路を同定した研究に着目し, 最新の技術を使って解析を進めている国内外の18名の研究者に講演をお願いした。

また, 31題のポスター演題が集まった。演題は分子からシステムレベルに至るまで多岐に渡ったが, どの演題もひとつのレベルからの解析にとどまらず, 各レベルの関連性を意識した, スケールの大きなものであった。3日間の会期中, リラックスした雰囲気の中で, 熱心な質疑応答や意見交換が行われた。学会では実現できないような密度の高い議論があり, 新たな着想や新規技術の導入を刺激するなど, この分野の今後の進歩に貢献できるシンポジウムになったと思われる。

(1) Spontaneous activity and ongoing plasticity of CA3 recurrent networks
(海馬 CA3 野ネットワークの自発活動と自発可塑性)

池谷裕二 (東京大学・大学院薬学系研究科)

海馬 CA3 野は連合/交連線維シナプスによる再帰型回路を含んでいる。培養海馬スライス標本にカルシウム蛍光指示薬を負荷し, 約100個のCA3野ニューロンから一斉にスパイク活動を光学測定した。生理的なイオン組成

の細胞外液を適用すると, ニューロンは自発発火を始めた。この自発活動に潜む空間パターンのマクロ特性を精査するために主成分解析を行ったところ, 回路活動は幾多の状態 (network state) に分離可能であり, 各 state はそ

れ自体で安定であることが明らかになった。すなわち、回路活動は数十秒ほど一つの state に留まるが、しだいに新しい state を生み出し、内発的に新 state へと移行していった。この遷移は突然生じ、非可逆であった。CA3 野錐体細胞からホールセルパッチクランプ記録したところ、この自発活動は UP 状態と DOWN 状態の交替(slow oscillation)によってもたらされていることが明らかとな

った。自発活動によりシナプスの重みが徐々に変動した。この自発的な可塑性は slow oscillation の周波数によって規定されていたが、その方向と大きさはシナプス種によって異なっていた。この可塑性が生じると自発活動のパターンも変化した。以上のことから、CA3 野回路は自発活動を通じて自己書換を行っていると考えられた。

(2) Network dynamics during the development and maintenance of seizures in pilocarpine and picrotoxin treated rats

Yitzhak Schiller(Technion, Israel)

Jackie Schiller(Technion, Israel)

RATIONALE: Seizures are associated with hyper-synchronous electrical activity in the EEG recordings. However, the network dynamics at the single neuron level during the development and maintenance of seizures remains largely unknown. In this study we studied the firing behavior of single neurons, and monitored synchronization between the different recorded neurons during developing and ongoing seizures evoked by pilocarpine and picrotoxin.

METHODS: Multi-electrode extra-cellular recordings of single units and local field potentials were performed from the hippocampus of anesthetized (urethane) and awake rats under control conditions and after administration of pilocarpine and picrotoxin. The two convulsants were administered either by systemic (I.P.) or local (intra-hippocampal) injection. In addition simultaneous intracellular whole-cell recordings were performed.

RESULTS: Immediately after administration of pilocarpine and picrotoxin, prior to initiation of clinical or electrographic seizures, the frequency of spikes decreased, and synchronization between neurons, as measured by the cross-correlogram, markedly diminished or disappeared all

together. In contrast after clinical and electrographic seizures initiated the frequency of spikes gradually increased, neurons tended to fire in bursts and the inter-neuron synchronization markedly increased. The cross-correlograms during the clinical seizure revealed higher values and wider time-windows as compared to control conditions. Similar results were obtained in anesthetized and awake rats; in systemic (I.P.) and local intrahippocampal administration of the convulsants, and with pilocarpine and picrotoxin. Simultaneous intracellular whole-cell recording from anesthetized rats demonstrated the intracellular correlate of developing seizures.

CONCLUSION: In this study we showed that during the development of pharmacologically induced seizures synchronization of firing between different neurons in the hippocampus decreased dramatically, while only later during clinical seizures inter-neuronal synchronization gradually increased. These findings may promote our understanding of the network dynamics responsible for seizure initiation and maintenance. Moreover, in future it may serve as the basis for detection of impending seizures in human patients

(3) Asymmetrical organization of glutamate receptors in left and right hippocampal synapses (左右の海馬シナプスにおけるグルタミン酸受容体の非対称性配置)

重本隆一 (生理学研究所・脳形態解析研究部門)

シナプスにおけるグルタミン酸受容体の数はシナプ

ス伝達の基本的要素のひとつである。我々は最近、マウ

スの海馬 CA1 領域において左右の NMDA 型グルタミン酸受容体サブユニット NR2B の量が非対称であることを発見した。反対側海馬からの交連線維を切断した後では, NR2B の選択的阻害薬 Ro 2569-81 の効果が右よりも左の stratum radiatum で大きく左よりも右の, stratum oriens で大きかった。そのような動物からシナプス後肥厚部タンパクを精製し NR2B の量を免疫プロット法で定量したところ右より左の CA1 radiatum で 1.5 倍の NR2B 免疫反応性を検出した。しかしながら従来の postembedding 免疫電子顕微鏡法ではこの差異を検出で

きなかった。これはおそらく立体障害によって 1 チャネルに 2 つの NR2B を検出できないためと考えられる。

今回はこの問題を乗り越えるためにレプリカ免疫電子顕微鏡法 (SDS freeze-fracture immunolabeling method) を用いた。この方法では細胞の表面を直接免疫反応でできるため効率よくシナプスの受容体を可視化でき, 左の CA1 stratum radiatum で右の 1.5 倍の NR2B を検出した。この結果は免疫プロット法とよくあっている。われわれはこの非対称性がシナプスの構造や機能にどのような影響を及ぼすかについて議論した。

(4) Novel long range GABAergic projections in the hippocampal formation and beyond (海馬における投射型 GABA 作動性ニューロンの新たな展開)

神野尚三, Thomas Klausberger, Laszlo F. Marton, Yannis Dalezios,
Pablo Fuentealba, Wai Yee Suen, Eric A. Bushong, Peter Somogyi
(オックスフォード大学, UK)

Darrell Henze, György Buzsáki (The State University of New Jersey, USA)

大脳皮質の多くの領域は投射性のグルタミン酸作動性ニューロンによって結合されている。一方で, GABA 作動性ニューロンは主として局所回路で作用すると考えられ, 介在ニューロンと呼ばれることも多い。しかしながら, GABA 作動性ニューロンの一部には遠隔の皮質領域に軸索を投射しているものがあり, それらは領域間の活動性の同期や協調に重要な役割を果たしていることが示されている。海馬の GABA 作動性ニューロンについては, 内側中隔への投射が知られており, 海馬のリズム活動に関与している。近年になり, 皮質の投射型 GABA 作動性ニューロンは少しずつ注目を集めるようになって

たが, その詳細については未だに不明な点が多い。今回我々は, 海馬から内側中隔や海馬台への GABA 作動性の投射について, *in vivo* single cell recording と tracer labelling を組み合わせた集学的な研究を行った。これにより, 海馬の CA1 領域に分布している GABA 作動性ニューロンについて, 内側中隔と海馬台の両方に投射しているニューロンや, 海馬台のみ, もしくは内側中隔のみに投射しているニューロンなど, 4 種類の投射型ニューロンを同定した。これらの海馬の投射型 GABA 作動性ニューロンは, 大脳辺縁系における広域的な活動性の調整に関与していると考えられる。

(5) Single spike triggered event sequences in networks of the human cerebral cortex in vitro

Gábor Tamás, János Szabadics, Szabolcs Oláh, Gergely Komlósi, Gábor Molnár
(Department of Comparative Physiology, University of Szeged)
Pál Barzó (Department of Neurosurgery, University of Szeged)

The performance of the human cerebral cortex is unparalleled by the nervous system of other species and this is presumably supported by refined, but largely unknown

features of the human microcircuit.

We performed simultaneous whole cell patch clamp recordings from up to four neurons in acute slices derived

from association cortices. Our recordings showed that single action potentials in identified human pyramidal cells could trigger reliable and stereotyped series of multiple postsynaptic potentials in simultaneously recorded target cells. Moreover, such series of postsynaptic potentials were composed of both excitatory and inhibitory responses. The latency of identified postsynaptic potentials showed a range of 3 to 30 ms. The

timing of the onset was correlated with the standard deviation of the latency, but the probability of transmission was not correlated with latency parameters.

In conclusion, groups of human neurons are functionally coupled by spike-to-spike transmission suggesting that feed-forward connections are exceptionally powerful and abundant in the human neocortex.

(6) Cholinergic control of cortical network and thalamocortical transmission (皮質内局所回路と視床皮質投射に対するアセチルコリンによる制御)

木村文隆 (大阪大学大学院・医学系研究科神経生理)

哺乳類の脳皮質には、前脳基底部大細胞核群からアセチルコリン(ACh)含有性神経線維の密な投射を受けていることが知られており、AChは皮質内神経回路に対して重要な制御をしていると想定されているが、その制御様式の詳細については未だに不明な点が多い。我々はこれまで、視覚野及び体性感覚野皮質を用いて、AChはこれまで考えられてきたように単に細胞の興奮性を上昇あるいは下降させるといった作用を持つだけでなく、皮質への入力をその由来に依存して制御する、いわば入力由来依存性のゲートコントローラーとして働く可能性を指摘してきた。すなわち、皮質細胞への入力は、皮質由来のものは興奮性も抑制性も共にシナプス前性に2つの異なるムスカリニック受容体によって抑制されるが、

一方で視床由来のものはニコチン受容体により、シナプス前性に促進を受ける。また、光学的計測により、視床由来入力の促進には、興奮に続いて抑制が起こることも明らかにした。電気生理学的実験により、この抑制は視床由来入力、より選択的に抑制性細胞への入力を増強していることによるものであることが明らかとなった。抑制性細胞への入力を選択的に増強することにより、ニコチン受容体の活性化はフィードフォワード抑制によりシナプス後細胞のスパイクタイミングを制御する作用があることも示された。以上の結果は、アセチルコリン細胞の活性は、皮質細胞を視床よりの、より強い影響下におく可能性がさらに支持されたものと考えられる。

(7) Functional roles of T-type Ca^{2+} channels in visual cortical plasticity (視覚野可塑性における T 型 Ca^{2+} チャンネルの役割)

吉村由美子 (名古屋大学・環境医学研究所・視覚神経科学)

視覚野神経細胞の反応選択性は感受性期の視覚体験に依存して可塑的に調節される。今回、我々は T 型 Ca^{2+} チャンネル依存性長期増強が視覚反応可塑性に関与するかを検討した。ラット視覚野切片標本を用いて解析した結果、この長期増強は感受性期の視覚野で顕著にみられ、開眼前及び成熟期には全く誘発されなかった。一方、出生直後からの暗室飼育により視覚体験を遮断された視覚野では、成熟後も長期増強誘発機構が維持された。

また、視覚野錐体細胞から T 型 Ca^{2+} チャンネル電流を測定した結果、その電流は感受性期に顕著で、成熟するに従って減弱した。この減弱は暗室飼育によって阻害された。これらの年齢依存性、経験依存性は実際の視覚反応可塑性の特性とよく一致している。そこで、このチャンネルの視覚反応可塑性への関与を直接検討するために、麻酔下のラット視覚野から視覚誘発電位を記録し、眼優位可塑性を調べた。感受性期に動物の片眼を数日間遮断す

ると、非遮蔽眼への刺激による視覚反応は増大し、遮蔽眼刺激に対する反応は減弱することが知られている。片眼遮蔽中に T 型 Ca^{2+} チャンネル阻害剤を一次視覚野に慢性的に投与すると、非遮蔽眼刺激の視覚反応の増大が阻害

された。以上の結果は、T 型 Ca^{2+} チャンネル依存性長期増強が視覚体験に依存した反応増強機構に関与することを支持する。

(8) GABA circuit control of critical period plasticity in visual cortex

ヘンシュ 貴雄 (理化学研究所・脳科学総合研究センター)

Competitive plasticity of binocular inputs following monocular deprivation (MD) is prominent in the primary visual cortex (V1) during an early critical period. In humans or animals raised with an occlusion of one eye, the consequent loss of cortical spiking response to the deprived eye (ocular dominance plasticity) leads to lifelong amblyopia (loss of visual acuity). Genetic or pharmacological manipulation of specific GABAergic circuits directly controls the timing of this critical period and its eventual anatomical consolidation (Hensch, 2005). Consequently, non-permissive

molecular 'brakes' in the extracellular milieu may delimit the dramatic cortical plasticity and are targets for therapeutic strategies. Recently, MD has been reported to conversely enhance open eye responses in adult mice dependent upon the integrity of visual cortex. We address to what extent these forms of plasticity induced by the same MD share common mechanisms with development. Our observations support the view that adult perceptual learning and classical ocular dominance plasticity are independent processes.

(9) Cortico-striatal, cortico-raphe and fast-spiking cell activity in the rat frontal cortex during cortical oscillations *in vivo*: modulation by serotonin

MV Puig, M Ushimaru, Y Kubota, Y Kawaguchi (Div Cerebral Circuitry, NIPS)

A Watakabe, T Yamamori (Div Brain Biol, NIBB)

Y Yanagawa (Gunma Univ Sch of Med, Japan)

The frontal cortex and striatum form “loops” that are known to participate in high cognitive processes. Moreover, there is a strong reciprocal connection between the frontal cortex and the dorsal raphe (DR), main origin of the cortical serotonergic innervation. We studied how cortico-striatal (CS), cortico-raphe (CR) and fast-spiking (FS) cells are modulated by slow-wave-sleep (SWS) oscillations and serotonin (5-HT) in the frontal cortex of anesthetized rats. We recorded single units and local field potentials in transgenic rats that express a GFP in GABAergic interneurons. FS cells were juxtacellularly stained with neurobiotin and its identity confirmed by the expression of parvalbumin. The DR was electrically stimulated to assess the effects of 5-HT on the

recorded cells and pharmacological experiments were conducted to unveil the 5-HT receptors that mediate the responses. FS cells display a high-success short-delay excitation to striatal and DR stimulation, suggesting a convergent activation of FS by CS and CR neurons. In the process of awakening, 2 different firing patterns were detected: units that increase (i) and decrease (d) their firing rates during desynchronized periods. Interestingly, most of the CS and CR neurons display pattern i, but FS cells are equally distributed. Thus, pyramidal and interneurons are differently modulated by SWS. Furthermore, FS-i cells and CR neurons fire after the peak of the slow oscillation (up-state) but FS-d cells fire consistently before the peak,

suggesting a different time course of activation during SWS. The stimulation of the DR promoted longer up-states and increased the frequency of the oscillation in periods of deep anesthesia. Moreover, 60% of CS, 33% of CR and 50% of FS

cells were inhibited by 5-HT through 5-HT_{1A}R and 20% of CS, 55% of CR and 40% of FS were excited through 5-HT_{2A}R. The expression of 5-HTR was confirmed by *in situ* hybridization.

(10) Functional and Anatomical Architecture of the Inferior Temporal Cortex (下側頭葉皮質：機能構築と解剖学的構造)

藤田一郎 (大阪大学大学院・生命機能研究科)

物体認識において重要な役割を果たす下側頭葉皮質 TE 野のニューロンは、形、色、テクスチャー、両眼視差、またはこれらの組み合わせに対して反応する。個々のニューロンは特定の刺激群に反応し、TE 野ニューロン全体は多様な刺激選択性を持つ。これら多様な性質を持つニューロンはどのように並んでおり、その配置は、TE 野の解剖学的構造と関連しているだろうか。また、これら機能構築や解剖学的構造は生後、どう、発達するのであろうか。

似た図形刺激に反応する TE 野ニューロンは大腦皮質表面に対して垂直方向に、層をまたがるように分布する傾向にあり、機能的なコラム構造を形成している。コラムの幅は平均 0.4-0.5 ミリと見積もられているが、ばらつきは大きい。隣り合うコラムが反応する図形の間の関連性は不明確であり、何か特別な視覚パラメータが皮質表面方向に滑らかに表現されているという証拠は得られていない。むしろ、従来の結果は TE 野における視覚特徴表現はパッチ状地図を形成していることを示唆して

いる。図形のような高次元情報を 2 次元皮質表面に写像する場合、不連続点・不連続線が形成されることは必然的であると考えられる。TE 野ニューロンは両眼視差にも感受性を持っており、その反応する両眼視差によって細胞がクラスターしている。この視差クラスターと図形特徴コラムの間の関係は未解明である。

TE 野の解剖学的構造の特徴は、V1 野とは非常に異なっている。例えば、TE 野の第 3 層の錐体細胞は、V1 野のそれにくらべて、より大きな樹状突起野をもち、枝わかれが多く、またスパインの分布密度が高い。また、水平軸索は TE 野の方が、V1 野にくらべ、遠くへ投射し、その分枝終末集団のサイズは大きくまた分布やサイズは不規則である。樹状突起野のサイズと水平軸索分枝終末集団のサイズは似ており、また、機能的コラム構造ともおなじ範囲にある。生後直後の動物においても、水平軸索や樹状突起の領野特異的違いは明らかであるが、その後、1-2 年の長い期間をへて、成体型の領野特徴を V1、TE のそれぞれが備えるようになる。

(11) Unraveling cell type and fine-scale specificity of cortical connections

Edward Callaway, Takuma Mori, Xiangmin Xu, Ian Wickersham, and David Lyon
(Salk Inst, USA)

We used laser scanning photostimulation to map local input to inhibitory neurons in layer 1 of rat visual cortex and layer 2/3 of mouse barrel cortex. Mouse studies used transgenic animals with GFP expressed in subsets of inhibitory neurons. In layer 1, axon-descending cells receive excitatory input predominantly from layer 2/3 while neurogliaform cells

receive stronger input from deeper layers. Layer 2/3 neurons also receive inputs that vary systematically by cell type. Two subtypes of Martinotti cells, distinguished by calretinin (CR) expression, also differ in morphology and intrinsic physiology. CR+ Martinotti cells receive excitatory input predominantly from layer 2/3, while the CR- Martinotti

cells also receive strong excitation from layer 4. Irregular-spiking basket cells also receive strong excitatory input from layers 2/3 and 4, but they often have a gap at the top of layer 4, with little or no input. Fast-spiking basket cells and pyramidal cells in mouse barrel cortex receive input indistinguishable from cells in rat visual cortex, with strong input from layers 2/3 and 4, and only weak input from deeper layers. These observations, along with other studies showing that even neighboring neurons of the same type can receive

input from different sources, imply that better methods are required for relating circuitry to function and for examining circuitry with single cell resolution in vivo. We have developed a method that allows the neurons directly presynaptic to a single neuron to be labeled genetically. This method is compatible with functional characterization of the postsynaptic neuron and future development should also allow functional characterization of the presynaptic cells by expression of genetically encoded activity sensors.

(12) A new form of inhibitory synaptic actions between nearby pyramidal neurons in visual cortex (視覚野の錐体細胞間の新しい抑制性シナプス作用)

小松由紀夫 (名古屋大学・環境医学研究所・視覚神経科学)

マウス視覚野スライス標本において、近接する2個の2/3層錐体細胞からホール・セル記録を行い、一方の細胞に活動電位を発生させると、他方の細胞に潜時が一定で単シナプス様の抑制性シナプス後電流(IPSC)と思われる反応が約2割のペアで生じた。この電流は、GABA_A受容体阻害薬、non-NMDA受容体阻害薬のどちらを投与しても消失したので、多シナプス性IPSCと考えられる。薬理学的に活動電位の発生を止めた状態で、錐体細胞の細胞体に向けてグルタミン酸を局所的に投与すると錐体細胞にIPSCが発生した。免疫組織学的実験により、錐体細胞の細胞体の周りにはGABA作動性シナ

プス前終末とグルタミン酸作動性シナプス前終末が近接して存在し、GABA作動性シナプス前終末にはnon-NMDA受容体が存在することが分かった。従って、2/3層錐体細胞は、近傍の錐体細胞の細胞体に軸索側枝を送り、その終末からグルタミン酸を放出して、抑制性シナプス前終末のnon-NMDA受容体を活性化してGABAを放出させ、その細胞体にIPSCを発生させると考えられる。この結果は、錐体細胞は抑制性介在ニューロンの細胞体に活動電位を発生させなくても、近傍の錐体細胞を抑制できることを示唆している。

(13) Layer V pyramidal cell diversity and their synaptic connections (大脳皮質5層錐体細胞の多様性とシナプス結合)

川口泰雄, 森島美絵子, 大塚岳
(生理学研究所・大脳神経回路論研究部門)

大脳皮質の構造・機能原理を解明するには、ニューロンクラスを同定した上で、それらの間の結合特異性を明らかにすることが求められる。錐体細胞は投射先の違いでサブタイプに分けられ、その分布は層構造とある程度相関している。しかし、同じ領域の一つの層にも皮質外投射パターンが異なる複数の錐体細胞があることが知られている。同じ層内での投射ニューロンの機能分化を

知るために、ラット前頭皮質5層錐体細胞の形態・発火様式・シナプス結合を調べた。逆行性蛍光標識法で投射先を同定して、ホールセル記録を行い細胞内染色した。投射パターンと樹状突起形態・発火様式はある程度相関していたが、同じサブタイプの中でも皮質の深さ方向に従って形態がさらに分化していることがわかった。一つのサブタイプでは、近傍で結合している細胞の形態が似

ている場合が多かった。5 層では同じ投射パターン錐体細胞が小さなクラスターを作っていると思われる。

(14) Cortical projection neurons: phenotypes and input maps

Kathleen Rockland (理化学研究所・脳科学総合研究センター)

A major obstacle in microcircuitry research has been the difficulty in achieving clear identification in Golgi-like detail of cells of origin of particular long-distance pathways. This is important to provide morphological criteria and corroboration of cellular subtypes; that is, many projections originate from neurons in two or more distinct layers, but these are not necessarily homogeneous between or even within layers. Visualization of detailed morphology is also essential for elucidation of cell-type specific input maps. Injection of EGFP-adenovirus *in vivo* is one way of producing reliable Golgi-like visualization of neurons projecting to the injection site (Tomioka and Rockland, 2006). This significantly expedites morphological characterization of projection neurons (as presented here, in two posters by R. Tomioka, and M. Wintzer). In addition, virus infection can be combined with

immuno-processing or tracer injections, and material analyzed by confocal microscopy. One set of preliminary data will be presented from rat perirhinal cortex, where we scored the distribution of putative parvalbumin contacts on dendrites of two populations of pyramidal neurons, at the border of layers 1 and 2. As predicted from light microscopic studies (Ichinohe et al., 2003), contacts were more abundant on dendrites belonging to layer 2 pyramidal neurons than on those from layer 5. Separate data will be presented concerning putative contacts from BDA-labeled cortical projections on specific dendritic domains of EGFP-labeled neurons. Material is from monkey perirhinal cortex, and, among other questions, addresses whether there is a closed connectional loop, where BDA-labeled temporal cortical projections directly contact EGFP-labeled neurons in perirhinal cortex, that project back to the injection site.

(15) Dendritic network of cortical interneurons linked by gap junctions

福田孝一 (九州大学大学院・医学研究院)

大脳皮質の GABA ニューロンの中で、パルブアルブミン(PV)を含有するグループは、お互いの間にギャップ結合を形成する。しかし方法論上の困難さが原因となつて、ギャップ結合を介して PV ニューロンがどのような空間的ネットワークを構成しているかという問題は全く不明であった。我々は神経細胞特異的なギャップ結合蛋白であるコネキシン 36 に対する免疫組織化学染色を応用し、ギャップ結合によって連結された樹状突起ネットワークの 3 次元的構成を初めて明らかにした。その際に、共焦点レーザー顕微鏡で微小な点として認められる構造物を電子顕微鏡にて再度観察し、ギャップ結合との確実な対応を確かめた。視覚皮質において、一つの PV

ニューロンあたり約 60 個ものギャップ結合が存在し、樹状突起の近位部だけでなく遠いところにも(細胞体から 380 ミクロンまで)位置していた。大きな樹状突起野は非常に密に折り重なり、樹状突起ネットワークが横方向に連続的な構成をとることが示唆された。同様の構造を線条体でも確認した。ギャップ結合による密な樹状突起ネットワークの存在は、PV ニューロンが局所的なシンチチウムを形成していることを強く示唆する。PV ニューロンは錐体細胞の発火のタイミングの制御により集団的活動の時間的パターンの形成に関係すると考えられているが、シンチチウムの存在は、集団的活動のリズムと同期性との関連を推測させる。

(16) Synaptic integration and plasticity within non-linear dendritic subunits

Jackie Schiller (Technion, Israel)

In my talk I will describe the integrative and plasticity properties of thin basal dendrites of cortical pyramidal neurons. These dendrites receive the majority of the cells' synaptic inputs, so determining their integrative and plasticity properties is of prime importance. Previous studies have most often reported global linear or sublinear summation in these dendrites. Using confocal imaging and dual-site focal

synaptic stimulation of identified thin dendrites in rat neocortical pyramidal neurons we show that thin dendrites provide a layer of independent computational "subunits" that sigmoidally modulate their inputs prior to global summation. Next I will describe the plasticity rules used by these fine basal dendrites putting a special emphasis on the role of NMDA-spike in local synaptic plasticity processes.

(17) Dendritic dimensions of cortical GABAergic nonpyramidal cells

窪田芳之, 荻部冬紀, 川口泰雄 (生理学研究所・大脳神経回路論研究部門)

ラット大脳皮質の非錐体細胞の樹状突起のシナプス入力特性と太さに関して発表した。神経細胞 3 次元描画像解析装置(NeuroLucida)を用いて樹状突起や軸索を 3 次元再構築した数百に及ぶ、神経細胞標本の中から、FS basket 細胞, Martinotti 細胞, double bouquet 細胞, large basket 細胞それぞれに関して、樹状突起がほぼ完全にスライス標本中に残っているものを 1 つずつ選出し、連続超薄切片を作成し電子顕微鏡観察した。樹状突起上のシナプス入力、樹状突起の太さ、樹状突起分岐部分の親樹状突起と娘樹状突起の太さを測定し、それぞれ細胞体からの距離との相関等の形態的なデータを解析した。結果、シナプス入力、細胞体近傍の 50 μ m あたりまでは

密度が低かったが、それより遠位部は一定の密度である事がわかった。樹状突起の太さは、細胞体からの距離には相関せず、むしろその部分から遠位部の樹状突起の総延長に相関して太さが決まる事がわかった。また、分岐点では、Rall model (親樹状突起のインピーダンスは 2 つの娘樹状突起のインピーダンスの和に等しいという法則) が当てはまる事を証明する事ができた。また、分岐点では、親樹状突起の断面積は 2 つの娘樹状突起の断面積の和に等しい事がわかった。以上の結果は、神経細胞の基本的特徴を解析したこれまでに類い稀な貴重な結果であると考えられる。

(18) Physiological Genomics of Cortical Circuits in Health and Disease

Sacha B. Nelson (Brandeis University)

The mammalian forebrain is comprised of tens to hundreds of areas each containing a comparable number of distinct cell types. Identification and classification of these many cell types has long been recognized as a prerequisite to understanding brain function. For example, an enduring question in the study of the neocortex is the degree to which a single canonical circuit comprised of a set of canonical cell

types can be recognized across cortical areas. A major impediment to answering such questions has been the difficulty of objectively defining cell types. I will describe our recent approach to this problem using global gene expression profiles measured with DNA microarrays. Based on thousands of genes differentially expressed across subsets of GABAergic interneurons and glutamatergic projection

neurons, we have begun to construct an objective neuronal taxonomy of forebrain cell types. I will also describe our recent studies of cell-type specific changes in the physiology and gene expression of cortical neurons in a mouse model of the developmental disorder Rett Syndrome. Human patients suffering from this disease lose or fail to develop many higher cortical functions including language, some forms of

cognition and purposive hand use. In most cases a single gene, MECP2 is responsible and mice lacking the gene recapitulate many features of the disease. We have found that these mice have an altered balance between cortical excitation and inhibition and also exhibit cell type specific changes in cortical gene expression.

15. 大脳皮質機能単位の神経機構

2006 年 12 月 7 日－12 月 8 日

代表・世話人：金子武嗣（京都大学大学院・医学研究科・高次脳形態学）

所内対応者：川口泰雄（大脳神経回路論研究部門）

- (1) 大脳基底核，小脳，前頭前野から一次運動野への体部位再現的入力様式－狂犬病ウイルスの逆行性越シナプス感染を用いた解析

宮地重弘（京都大学・霊長類研究所・行動発現分野）

- (2) 内因性カンナビノイドによる線条体シナプス伝達の修飾

狩野方伸（大阪大大学院・医学系研究科・細胞神経科学）

- (3) 理論統合脳科学の視点からの一考察 — 基底核と上丘 —

中原裕之（理化学研究所・脳総研・理論統合脳科学研究チーム）

- (4) ミダゾラムによる大脳皮質第 V 層の GABA 作動性シナプスにおける $\alpha 7$ ニコチン受容体の誘導

山本純偉（筑波大学大学院・人間総合科学研究科）

- (5) 広視野情報処理の時空間解析

七五三木 聡（大阪大学大学院・医学系研究科・認知行動科学）

【参加者名】

宋文杰（熊本大学・医），福田孝一（九州大学院・医），狩野方伸，木村文隆，七五三木聡（大阪大学大学院・医），金子武嗣，藤山文乃，日置寛之，古田貴寛，中村公一，田中康代，田中琢真，越水義登，雲財知，亀田浩司，田中康裕（京都大学大学院・医），宮地重弘，額額大輔（京都大学院・霊長類研），吉村由美子，高田直樹（名古屋

大学・環境医学研），小島久幸（東京医科歯科），山下晶子（日本大学・医），端川勉，中原裕之，一戸紀孝，坪泰宏（理化学研究所），山本純偉（筑波大大学院），渡我部昭哉，定金理（基礎生物研究所），水野昇，等誠司，橘吉寿，金田勝幸，郷田直一，小野勝彦，竹林浩秀，川口泰雄，窪田芳之，大塚岳，森島美絵子（生理学研究所）

【概要】

今回は最初の 3 題は，大脳皮質との関連をみながら基底核・線条体についての講演を，宮地重弘（京大・霊長研），狩野方伸（阪大・医学系），中原裕之（理研）の 3 方をお願いした。宮地氏は，狂犬病ウイルスを用いて，サルの大脳皮質・基底核の神経連絡の研究を報告し，狩野氏は線条体ニューロンにおける線条体抑制ニューロンからの抑制生入力と，および大脳皮質からの興奮性入力についてカンナビノイド逆行性伝達について講述した。中原氏は，皮質から興奮性入力を受けて基底核から抑制生入力を受ける上丘で，非対称性神経連絡を仮定すれば上丘の眼球運動制御について理論的に説明できることを呈示した。後半の 2 題は大脳皮質での神経回路の議論を，山本純偉（筑波大・人間総合科学），七五三木聡（阪大・健康体育）の 2 氏に語っていただいた。山本氏は皮質第 5 層錐体細胞への抑制生入力終末において，薬剤刺激によりニコチン

受容体が短時間のうちに選択的に誘導され，抑制伝達を促進する現象を紹介し，その薬剤刺激のメカニズムについて議論がわいた。七五三木氏は視覚皮質の広視野情報処理の実体を「マスキング」現象を用いて解析していて，ヒトの心理物理実験とネコでの単一ニューロン記録実験を用いて，2 種類の視覚情報処理修飾があり，外側膝状体ですでに生じているであろう速くて選択性の低い修飾と，高次視覚野あるいは VI 野 6 層のニューロンが関係するであろう遅く選択性の強い修飾，の 2 つに分離されることを示した。

講演での議論は活発で，初日は 6 時半間の予定が 7 時過ぎまで，2 日目も予定時間をオーバーして講演・議論が続いた。とくに，七五三木氏の講演は 2 時間 40 分といういままで最長のものとなった。こうした「がらんこ」議論の場は，通常の学会等では行うことができないので，それを可能にする生理研研究会は貴重な存在である。

(1) 大脳基底核、小脳、前頭前野から一次運動野への体部位再現的入力様式—狂犬病ウイルスの逆行性越シナプス感染を用いた解析

宮地重弘 (京都大学・霊長類研究所・行動発現分野)

狂犬病ウイルスは、神経細胞特異的に感染し、シナプスを介して逆行性に感染が伝搬する。このウイルスを神経トレーサーとして用いることによって、脳内の特定の神経回路網の全体像を可視化することができる。我々は、この手法を用いて、運動制御に関わる神経回路の構成を解析してきた。運動の制御には、大脳皮質前頭連合野、大脳基底核、小脳などの脳領域が関与しているが、最終的な脳からの出力は、一次運動野からの皮質脊髄路を介して脊髄へと送られる。一次運動野にはいわゆる身体部位再現地図があり、一次運動野内の特定の領域は、特定の身体部位の運動を制御する。我々は、サル一次運

動野のうち下肢、上肢近位部、上肢遠位部、および顔を表現する領域に狂犬病ウイルスを微量注入し、シナプスを介して逆行性にウイルスラベルされた細胞の分布を前頭前野、大脳基底核、小脳の各領域において解析した。その結果、各領域から一次運動野への多シナプス性入力 が身体部位再現的に構成されていることが確認できた。また、同じウイルスを用いて前頭前野各領域への側頭および頭頂連合野からの多シナプス性入力様式を解析したので、合わせて報告し、これら多シナプス神経路の機能について議論する。

(2) 内因性カンナビノイドによる線条体シナプス伝達の修飾

狩野方伸 (大阪大大学院・医学系研究科・細胞神経科学)

内因性カンナビノイドは脳の様々な部位で逆行性の抑制性シグナル伝達物質として働いている。内因性カンナビノイドはシナプス後細胞の脱分極に伴う Ca^{2+} 流入および $\text{G}_{\text{q/11}}$ タンパク共役型代謝型受容体の活性化により合成・放出され、逆行性にシナプス前終末の CB1 カンナビノイド受容体に作用して、伝達物質放出を減弱させることが知られている。今回私たちは、生後 15~21 日齢のマウス線条体の中型有棘ニューロン (MS ニューロン) から抑制性シナプス後電流 (IPSC) を記録し、内因性カンナビノイドによる逆行性伝達の機構を調べた。その結果、線条体において内因性カンナビノイドが①MS ニュ

ーロンの強い脱分極、②MS ニューロン上の M_1 ムスカリン受容体の活性化、および③弱い脱分極と弱い M_1 ムスカリン受容体活性化の組み合わせにより合成・放出されることを明らかにした。さらに、コリン作動性介在ニューロンの活動の増減や、細胞外 ACh 濃度の変動によって、脱分極による内因性カンナビノイド放出の強度が変動した。この結果は、内因性カンナビノイド系はコリン作動性介在ニューロンの活動により細胞外 ACh 濃度依存的に制御されており、コリナージック系は内因性カンナビノイド系を介して、線条体からの出力調節に関わっていることを示唆している。

(3) 理論統合脳科学の視点からの一考察 —基底核と上丘—

中原裕之 (理化学研究所・脳総研・理論統合脳科学研究チーム)

講演では、大脳基底核—上丘回路に関する私の研究についてお話をしたい。中でも、特に、二つの研究を中心に話す。一つは、ドーパミン神経細胞活動と報酬予測

誤差の関係に関する研究である。ドーパミン神経細胞活動が報酬予測誤差を表すとき、通常の報酬確率のみならず、以前の報酬試行を勘案した条件付報酬確率に基づい

て、報酬予測誤差を表すことができることを示す。この結果は、大脳基底核の学習が内部モデルを利用したモデルベースの学習を取り込むことができることを示唆する。もう一つは、上丘での神経細胞活動のダイナミクスに関する研究である。サッケードに伴う上丘の神経細胞活動のダイナミクスが、いわゆるダイナミック・モータ

ー・エラーを表現するかどうか長年の論争が続いてきた。本研究では、上丘内での神経細胞同士の結合に非常に簡単な結合を仮定することで、そのダイナミクスが得られることを示す。この結果は、この長年の論争に一つの解決をもたらす(のかもしれない)ことを示唆する。

(4) ミダゾラムによる大脳皮質第 V 層の GABA 作動性シナプスにおける $\alpha 7$ ニコチン受容体の誘導

山本純偉 (筑波大学大学院・人間総合科学研究科)

ミダゾラムは他のベンゾジアゼピン系薬物と異なり脳波所見上も比較的覚醒のパターンを示すこと、アセチルコリンエステラーゼ阻害薬の投与により効果の一部がリバースされる。中枢神経系において $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン(nACh)受容体は主にシナプス前に存在し、神経伝達物質の遊離を調節していることから、ミダゾラムがシナプス前 $\alpha 7$ nACh 受容体に関与しているのではないかと考え以下の実験を行った。

約 2 週令ラットの脳スライス標本を用い、大脳皮質体性感覚野第 V 層の錐体細胞にホールセルパッチクランプを行い微小シナプス後電流(mIPSC)を記録した。ミダゾラムの灌流投与により mIPSC の頻度が増加した。しかし、他のベンゾジアゼピン系薬物では増加せず、ベンゾジアゼピンの拮抗薬の投与によっても抑制されなかったことから GABA_A 受容体以外を介した機序であることが示唆された。ミダゾラムによる mIPSC 頻度増加作用は $\alpha 7$ nACh 受容体阻害剤 methyllycaconitine により抑えられたが、ニコチン単独では増加しなかったことから、ミダゾラムにより $\alpha 7$ nACh 受容体が細胞膜へ誘導され、内因性アセチルコリンにより GABA の放出頻度が増加したのではないかと考えた。機械的に急性に単離した錐体細胞に、 $\alpha 7$ nACh 受容体に特異的に結合する蛍光色素でラベルした Alexa488 α ブンガロトキシンを用いて調べたところ、ミダゾラムにより有意に細胞表面の $\alpha 7$ nACh 受容体が増加するのが観察された。また、シナプス終末に特異的に取り込まれる FM1-43 で共染色したところその増加した $\alpha 7$ nACh 受容体の多くがシナプス終末に存在することが推測された。更に、ミダゾラムによる mIPSC の頻度増加作用は PKC 阻害薬によって抑制され、PKC が関与していることが示唆された。また、この作用は Glutamate 作動性神経や大脳皮質の他の層の GABA 作動性神経では認められず、GABA ニューロンのシナプス後 nACh 受容体にも作用しなかったことから、大脳皮質第 V 層の GABA 作動性神経のシナプス終末に特異的に見られる現象であることが明らかになった。

ミダゾラムは大脳皮質第 V 層の GABA 作動性シナプス前終末において $\alpha 7$ nACh 受容体の膜移行を誘導することにより GABA の放出頻度を増加させた。これはミダゾラムの鎮静作用に関する新しい機序の発見にとどまらず、GABA-コリン系を介した睡眠-覚醒サイクルを含む大脳皮質回路機能発現への全く新しいメカニズムの提案である。

(5) 広視野情報処理の時空間解析

七五三木聡 (大阪大学大学院・医学系研究科・認知行動科学)

石川理子 (大阪大学大学院・医学系研究科・認知行動科学)

木田裕之 (大阪大学大学院・医学系研究科・認知行動科学)

阪本広志 (大阪大学大学院・医学系研究科・認知行動科学)

佐藤宏道 (大阪大学大学院・医学系研究科・認知行動科学)

一次視覚野(V1)ニューロンの受容野刺激に対する応答は、受容野周囲の刺激特徴に依存して主に抑制性の修飾(文脈依存的反応修飾)を受けることが知られており、広範囲の皮質活動を統合的にコントロールするメカニズムとして、また、視覚認知における「図地分化」あるいは「視野の分節化」の神経基盤として注目されている。このような応答特性の形成には、少なくとも、1)LGN から V1 へのフィードフォワード投射、2)V1 から LGN へのフィードバック投射、3)V1 内神経回路、4)V1 と高次視覚野の間の双方向性結合、といった神経回路の複雑な機能連関の関与が指摘されている。我々は、麻酔非動化

したネコ V1 から単一ユニット記録を行ない、グレーティング刺激に対する反応の修飾効果の時間特性に着目し、そのダイナミクスを検討したところ、受容野周囲刺激呈示後の時間と共に、統合される視野範囲の拡大、刺激方位選択性の先鋭化、刺激空間周波数選択性および布置依存性のシフトが観察された。おそらく複数の入力チャンネルが異なるタイミングで相互作用し合うことで形成されるとみられる反応修飾の神経メカニズムおよびその機能的意義を、同様の刺激セットを用いて行なったヒトの心理物理実験の結果と併せて議論する。

16. シナプス伝達の細胞分子調節機構

2006 年 12 月 4 日－12 月 5 日

代表・世話人：神谷温之（北海道大学大学院医学研究科神経機能講座分子解剖学分野）

所内対応者：鍋倉淳一（生理学研究所生体恒常機能発達機構研究部門）

- (1) TRPM7 イオンチャネルはコリナージックシナプス小胞の開口放出を制御する
持田澄子（東京医科大学細胞生理）
- (2) 網膜双極細胞終末部におけるシナプスリボンと開口放出部位の同定
立花政夫¹，緑川光春¹，塚本吉彦²
(¹ 東京大学大学院人文社会系研究科心理²，兵庫医科大学生物)
- (3) シナプス前機能分子の *in vivo* ノックダウン
加藤総夫¹，繁富英治^{1,2}，山田千晶^{1,3}
(¹ 東京慈恵会医科大学神経生理学，² 日本学術振興会特別研究員，³ 共立薬科大学大学院)
- (4) シナプス小胞エンドサイトーシスにおける Ca^{2+} チャンネル synprint site の役割
渡邊博康，山下貴之，斉藤直人，岩松明彦，森泰生，高橋智幸
(東京大学大学院医学系研究科神経生理)
- (5) フィロポディア・スパイン形成におけるアストログリアの役割
西田秀子，岡部繁男（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科）
- (6) 小脳登上線維・プルキンエ細胞シナプス伝達におけるグリア型グルタミン酸トランスポーターの役割
小澤瀨司（群馬大学）
- (7) 幼若期小脳登上線維・プルキンエ細胞間シナプスにおける双方向性可塑性
大槻元，平野丈夫（京都大学大学院理学系研究科生物物理）
- (8) 皮質錐体細胞間に見られる新しいタイプの抑制回路
小松由紀夫（名古屋大学環境医学研究所視覚神経科学）
- (9) グルタミン酸・GABA 共放出仮説の再検討
神谷温之（北海道大学大学院医学研究科分子解剖）
- (10) 聴覚中経路外側上オリーブ核への抑制性入力における代謝型グルタミン酸受容体
および GABA_B 受容体機能の発達変化
西巻拓也¹，張一成²，大野浩司³，鍋倉淳一¹
(¹ 生理学研究所生体恒常機能発達機構研究部門，² 慶北大学校，³ 浜松医科大学解剖)
- (11) 褐色脂肪細胞のミトコンドリア—ER—細胞膜間の Ca^{2+} カップリングとノルアドレナリンによる制御
日暮陽子，早戸亮太郎，久場雅子，久場健司（名古屋学芸大学管理栄養学部解剖生理）
- (12) 上丘の動き検出ニューロンの発火タイミング決定における樹状突起 H 電流の役割
伊佐正¹，遠藤利朗¹，足澤悦子²，納富拓也²，平林真澄³，重本隆一²
(¹ 生理学研究所認知行動発達機構研究部門，² 脳形態解析研究部門，³ 行動代謝分子解析センター)
- (13) 卵巣摘出ラット脊髄におけるセロトニン受容体の可塑性
吉村恵（九州大学医学研究院）
- (14) 海馬シナプスの左右非対称性
篠原良章，重本隆一（生理学研究所脳形態解析研究部門）

(15) 単一海馬苔状繊維シナプスの開口放出ダイナミクス

須山成朝, 引間卓弥, 荒木力太, 石塚徹, 八尾寛
(東北大学大学院生命科学研究科脳機能解析)

(16) PKC によるシナプス開口放出修飾の多様性

引間卓弥, 荒木力太, 石塚徹, 八尾寛 (東北大学大学院生命科学研究科脳機能解析)

(17) 大脳皮質 V 層錐体細胞への GABA 作動性シナプス伝達に関するシナプス前とシナプス後の新知見

福田敦夫 (浜松医科大学生理学第一講座)

【参加者名】

神谷温之 (北海道大学大学院医学研究科), 小澤澪司 (群馬大学), 吉村恵 (九州大学大学院医学研究科統合生理), 八尾寛 (東北大学大学院生命科学研究科), 須山成朝 (東北大学大学院生命科学研究科), 引間卓弥 (東北大学大学院生命科学研究科脳機能解析), 持田澄子 (東京医科大学細胞生理), 立花政夫 (東京大学大学院人文社会系研究科心理), 荒井格 (東京大学大学院人文社会系研究科), 中村行宏 (東京大学大学院医学系研究科神経生理), 山下貴之 (東京大学大学院医学系研究科神経生理), 渡邊博康 (東京大学大学院医学系研究科神経生理), 高橋智幸 (東京大学大学院医学系研究科), 堀哲也 (東京大学大学院医学系研究科神経生理), 真鍋俊也 (東京大学医科学研究所), 中澤敬信 (東京大学大学院医科学研究所癌細胞シグナル研究分野), 岡部繁男 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科), 平野丈夫 (京都大学大学院理学系研究科生物物理), 田中洋光 (京都大学大学院理学系研究科生物物理), 杉山優子 (京都大学大学院理学系研究科生物物理), 矢和多智 (京都大学大学院理学系研究科生物物理), 吉田盛史 (京都大学大学院理学系研究科), 大槻元 (京都大学大学院理学系研究科), 畔柳智明 (京都大学大学院理学系研究科), 阪東勇輝 (京都大学大学院理学系研究科), 宮脇寛行 (京都大学大学院理学系研究科), 畠山淳 (熊本大学発生医学研究センター), 加藤総夫 (東京慈恵会医科大学神経生理学), 繁富英治 (東京慈恵会医科大学神経生理学), 井村泰子 (東京慈恵会医科大学), 久場健司 (名古屋学芸大学管理栄養学部解剖生理), 久場雅子 (名古屋学芸大学管理栄養学部解剖生理), 日暮陽子 (名古屋学芸大学管理栄養学部解剖生理), 早戸亮太郎 (名古屋学芸大学管理栄

養学部解剖生理), 小松由紀夫 (名古屋大学環境医学研究所視覚神経科学), 堀部尚子 (名古屋大学環境医学研究所視覚神経科学), 福田敦夫 (浜松医科大学生理学第一講座), 伊佐正 (生理学研究所認知行動発達研究部門), 金田勝幸 (生理学研究所認知行動発達研究部門), 重本隆一 (生理学研究所脳形態解析研究部門), 松井広 (生理学研究所脳形態解析研究部門), 川上良介 (生理学研究所脳形態解析研究部門), 篠原良章 (生理学研究所脳形態解析研究部門), 富田江一 (生理学研究所行動代謝分子解析センター), 窪田芳之 (生理学研究所大脳神経回路論研究部門), 森島美絵子 (生理学研究所大脳神経回路論研究部門), 中條浩一 (生理学研究所神経機能素子研究部門), 佐竹伸一郎 (生理学研究所神経シグナル研究部門), 中川直 (生理学研究所神経シグナル研究部門), 竹林浩秀 (生理学研究所分子神経生理研究部門), 富永真琴 (岡崎統合バイオサイエンスセンター細胞生理), 川端二功 (岡崎統合バイオサイエンスセンター細胞生理), 東智広 (岡崎統合バイオサイエンスセンター細胞生理), 鍋倉淳一 (生理学研究所生体恒常機能発達機構研究部門), 前島隆司 (生理学研究所生体恒常機能発達機構研究部門), 渡部美穂 (生理学研究所生体恒常機能発達機構研究部門), 北村明彦 (生理学研究所生体恒常機能発達機構研究部門), 高鶴裕介 (生理学研究所生体恒常機能発達機構研究部門), 和氣弘明 (生理学研究所生体恒常機能発達機構研究部門), 西巻拓也 (生理学研究所生体恒常機能発達機構研究部門), 稲田浩之 (生理学研究所生体恒常機能発達機構研究部門), 山口純弥 (生理学研究所生体恒常機能発達機構研究部門)

【概要】

シナプスの機能に関する研究は神経科学の中心課題の一つである。伝達物質の同定に始まり, 電気生理学的研究により概念を確立した化学シナプス伝達の研究は, 近年, 遺伝子工学, パッチクランプ法, 光学的測定法など

の技術を導入することにより, 大きく進展し, シナプス伝達調節の分子機構, 細胞機構に関する知見が集積しつつある。中枢神経系においてシナプスは化学的情報と電気的情報が直接的に関わり合う重要な場であり, シナプ

ス機能の解明は中枢神経機能の分子基盤の解明そのものである。今後、さらにシナプスの研究を発展させるためには、多面的なアプローチと専門分野の境界を超えた共同研究が不可欠である。本研究会は、生理学、生化学、

形態学の立場からシナプス研究の最先端にある研究者が一堂に会して情報交換を行うことを目的とする。自由活発な討論と、若手研究者の参加を通じて、新たな研究の方向と、共同研究の可能性を模索する。

(1) TRPM7イオンチャネルはコリナージックシナプス小胞の開口放出を制御する

持田澄子（東京医科大学・細胞生理）

シナプス小胞膜にイオンチャネルが存在して伝達物質放出を制御しているのではないかと仮説が提唱されている。肥満細胞分泌顆粒内に存在が確認されたイオン交換マトリックスはヒスタミン、セロトニンや陽イオンを含み、顆粒膜のイオンチャネルから供給される陽イオンがこれらの顆粒内物質と置き換わることによって分泌が起こると考えられており、シナプス小胞でも開口放出に際して同様な現象が起こっている可能性が示唆されていた。培養上頸交感神経節細胞シナプスでの実験から、この仮説を裏付ける次のような結果が得られた。

1. TRP チャネルファミリーの TRPM7 イオンチャネルは、神経筋接合部や培養交感神経節細胞シナプスの小胞、すなわちアセチルコリンを含有するシナプス小胞に特異的に発現している。

2. シナプス小胞 TRPM7 イオンチャネルは、Snapin との結合を介して、synapsin I・synaptotagmin I と複合体を形成する。
3. シナプス小胞 TRPM7 イオンチャネルの発現量を操作すると、伝達物質放出量とキネティックスが変化した。
4. Snapin との結合を阻害すると伝達物質放出が減少した。

従って、シナプス小胞 TRPM7 イオンチャネル活性がコリナージックシナプス小胞の開口放出に重要な役割を果たしていることが伺われ、神経伝達物質の放出が従来考えられていたような拡散による受動的な現象ではない可能性を示唆する。

(2) 網膜双極細胞終末部におけるシナプスリボンと開口放出部位の同定

立花政夫、緑川光春（東京大学大学院人文社会系研究科・心理）

塚本吉彦（兵庫医科大学医学・生物）

キンギョ網膜から単離した Mb1 双極細胞の軸索終末部に全反射型蛍光顕微鏡を適用し、各種蛍光プローブを用いて Ca^{2+} 流入部位・シナプスリボン・シナプス小胞の融合部位を可視化した。膜電位固定下で Ca^{2+} 電流を活性化させると、 Ca^{2+} 流入部位はシナプスリボンの存在部位に一致していた。細胞内に 5 mM EGTA を導入した状態では、双極細胞からの伝達物質放出を早い成分と遅い成分に分離して観察することができる。この条件下で 1.5 秒の長い脱分極パルスを与えると、シナプス小胞の融合は、 Ca^{2+} 電流の活性化直後には主にシナプスリボンの近傍で生じ、遅れてシナプスリボンから離れた部位で多く

生じた。PKC を活性化させると伝達物質の遅い成分のみが増強される。PKC をフォルボールエステルで活性化した条件下でシナプス小胞融合の時空間分布を調べたところ、シナプスリボンから離れた部位での融合が有意に増加することがわかった。電子顕微鏡で観察した結果、PKC 処理した網膜では、Mb1 双極細胞軸索終末部の形質膜にドックしたシナプス小胞の数はシナプスリボンから離れた部位で有意に増加することが明らかになった。シナプスリボンから離れた部位でシナプス小胞が凝集している部位には、対面するシナプス後ニューロンの突起に PSD が見いだされた。Mb1 双極細胞では、軸索終末部からの

シナプス出力はリボンシナプスとリボン無しシナプスの両方によって担われており、前者は一過性、後者は持続

性の伝達に主に関与していると考えられる。

(3) シナプス前機能分子の *in vivo* ノックダウン

加藤総夫 (東京慈恵会医科大学・神経生理学)

繁富英治 (東京慈恵会医科大学・神経生理学, 日本学術振興会特別研究員)

山田千晶 (東京慈恵会医科大学・神経生理学, 共立薬科大学大学院)

シナプス前構造において神経伝達物質の放出とその制御に関与すると考えられている分子は数百に及ぶ。しかし、クローニングされたそれらの分子の機能を *native* なシナプスにおいて同定する方法は極めて限られている。特に、軸索終末・樹状突起構造とシナプス周囲グリア細胞突起との構造的連関が維持された *in vivo* のシナプスにおけるシナプス前機能分子群の発現とその機能の連関についてはまったく解析が行われていない。その最たる原因は *in vivo* のシナプスにおけるシナプス前タンパクの選択的かつ特異的発現制御を行いうる実験系が存在しないことにある。

この問題に答えうる実験系として、我々は、*in vivo* 神経節 *gene silencing* 法を開発した。今回はその応用として

シナプス前アデノシン A_1 受容体ノックダウンの影響を検討した結果を紹介する。麻酔ラットの頸部節状神経節を露出し、電気穿孔法によって合成 siRNA, および, GFP 発現非ウィルスベクターを導入し、それぞれ、一次求心性細胞における特定タンパクの発現抑制、および、外来タンパクの強制発現を可能にする系を確立した。アデノシン A_1 受容体 siRNA 導入は節状神経節 mRNA 発現を著明に減弱させ、さらに、その 11-13 日後に作成した急性孤束核スライスにおいて、孤束 1 次求心路-2 次ニューロン間興奮性シナプス伝達に対するアデノシンの抑制効果が有意に減弱した。シナプス伝達制御機構の分子-機能連関の解析における本法の意義と限界について論じた。

(4) シナプス小胞エンドサイトーシスにおける Ca^{2+} チャンネル *synprint site* の役割

渡邊博康, 山下貴之, 斉藤直人, 岩松明彦, 森 泰生, 高橋智幸

(東京大学大学院医学系研究科・神経生理)

哺乳動物の中樞神経におけるシナプス伝達は主として N 型と P/Q 型電位依存性 Ca^{2+} チャンネルによって媒介される。N 型と P/Q 型 Ca^{2+} チャンネルの細胞内ドメインにはエクソサイトーシス関連タンパク質と結合する *synprint site* と呼ばれる部位があり、この部位をブロックするとシナプス伝達が抑制を受けることから、この部位はエクソサイトーシスに関与するとの仮説が提唱されている。我々は最近この *synprint site* にエンドサイトーシス関連タンパク質 AP-2 が結合することを見出した。AP-2 は *synaptotagmin* と結合してシナプス小胞のクラスリン形成を行うが、*synaptotagmin* は、また *synprint site* とも結合することが知られている。そこで、これら三者の結

合関係を検討した。三者の結合が同一部位で行われ、結合が互いに拮抗することが明らかになった。さらにまた、三者の結合関係には Ca^{2+} 依存性が認められた。すなわち低濃度 Ca^{2+} において *synprint* は主に AP-2 と結合しているが、 Ca^{2+} 濃度が 200 μM に達すると顕著に *synaptotagmin* と結合が増大することが明らかとなった。次に *calyx of Held* シナプス前終末端に *synprint peptide* を細胞内投与して、*synprint site* のシナプス伝達における役割を再検討した。膜容量測定によって *synprint peptide* はエクソサイトーシスに作用せずにエンドサイトーシスをブロックする。

(5) フィロポディア・スパイン形成におけるアストログリアの役割

西田秀子, 岡部繁男 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科)

海馬スライス培養系において CA1 および CA3 領域の錐体細胞を rhodamine-dextran で, またアストログリアを GFP によって標識し, 二光子顕微鏡により樹状突起に形成されるフィロポディア・スパイン構造とアストロサイトの微小突起の相互作用について解析した。フィロポディア・スパインとアストログリアの接触時間は, 極めて短い場合と, 非常に長い場合の 2 群に分けられ, 特に非常に長い接触時間を保つ場合に, スパインへの形態変化を高い頻度で起こす傾向が見られた。

フィロポディア・スパインの寿命および形態学的な成熟が, アストログリアの接触と因果関係を持つことを示すため, まずアストログリアの運動性を Rac1 の dominant negative 変異体を発現させることで慢性的に抑制した。

アストログリアの運動性の低下により, フィロポディア・スパインとアストログリアの接触が低下している事を確認した。比較的長期のアストログリアの運動性の抑制により, フィロポディア・スパインの形態はフィロポディア型のものへと変化した。次に EphA4/Fc および ephrin-A3/Fc の存在下でも, アストロサイトとフィロポディア・スパインの接触自体は対照群と同様に観察されたが, アストログリアとの接触を受けたフィロポディア・スパインにおいてその寿命が特異的に短縮した。

以上の結果はアストログリアの直接的な接触が, 局所的にフィロポディア・スパインの維持・成熟を制御することを示している。

(6) 小脳登上線維—プルキンエ細胞シナプス伝達におけるグリア型グルタミン酸トランスポーターの役割

小澤滯司 (群馬大学)

小脳のプルキンエ細胞は登上線維とグルタミン酸作動性シナプスを形成し, このシナプスはベルクマングリアの突起により取り囲まれている。BG には, グルタミン酸トランスポーターとして, 多量の GLAST と少量の GLT-1 が発現し, シナプス活動に伴って CF 終末から放出されるグルタミン酸を迅速に除去している。正常の成熟動物では, PC は 1 本の CF によって支配されるが, 幼弱動物や種々の機能分子のノックアウトマウスでは複数の CF による多重支配が見られ, 小脳性運動失調の原因の一つとされている。GLAST ノックアウトでは, CF 刺激により複数のステップからなる CF 応答が高い頻度で観察されることから多重支配の存在が報告されてきた。

しかし, 今回, 我々は, この複数ステップの応答の大部分は CF 刺激により放出されたグルタミン酸が GLAST により適切に除去されないために, 本来の CF 支配下にある PC 以外の隣接する PC にスピルオーバーすることにより起こる現象であり, 野生型においても, グリア型グルタミン酸トランスポーターの選択的阻害剤である PMB-TBOA の投与によって同様の現象を誘発できた。従って, グリア型グルタミン酸トランスポーターは, CF 終末より放出されるグルタミン酸が, 当該 CF によって直接支配されていない周辺部の PC へスピルオーバーすることを阻止することにより, CF-PC 間の 1 対 1 シナプス結合を維持すると結論できる。

(7) 幼若期小脳登上線維・プルキンエ細胞間シナプスにおける双方向性可塑性

大槻 元, 平野丈夫 (京都大学大学院理学系研究科生物物理)

登上線維の剪定過程に登上線維—プルキンエ細胞間における可塑性が関わっているのではないかと考え, 幼弱

期に神経活動依存的に長期的な伝達効率変化が起こるかどうかを調べた。

成体ラットの登上線維シナプスでは、登上線維を 5Hz で 30 秒間刺激することでシナプス後部変化に依存した長期抑圧が誘導されることが知られている。生後 7-9 日齢マウス小脳で登上線維に 5Hz で 20 秒間刺激を加えたところ、シナプス伝達効率が持続的に変化した。このシナプス可塑性の方向は強いシナプス入力を示す登上線維では長期増強が、他方弱いシナプス入力を示すものでは長期抑圧が引き起こされた。条件刺激前後での PPR と CV を比較したところ、長期増強時には PPR・CV が減少し、長期抑圧時には PPR・CV ともに増大した。これらの結果は、長期増強および抑圧がシナプス前細胞からの

伝達物質放出変化を伴うことを示唆している。また、ブルキンエ細胞内に BAPTA を充填すると、強い登上線維シナプスにおいても長期増強は誘導されずに長期抑圧が起こった。この結果は、シナプス後細胞での細胞内 Ca^{2+} 濃度変化が長期増強誘導に関わることを示唆している。幼弱期の登上線維のうちブルキンエ細胞に強いシナプスを形成しているものは、自身の活動によって長期増強が起こることでより強化され、弱いシナプスを形成している線維では長期抑圧が起こることでさらに弱まることにより、登上線維の剪定が進行するのではないかと推察される。

(8) 皮質錐体細胞間に見られる新しいタイプの抑制回路

小松由紀夫 (名古屋大学環境医学研究所視覚神経科学)

新しいタイプの信号伝達が錐体細胞間で行われることを示唆する結果をマウス視覚野で得た。近接する 2/3 層錐体細胞からペアー記録を行い、一方の細胞に活動電位を発生させると、他方の細胞に IPSC が約 1/4 のペアーにおいて誘発された。この錐体細胞間 IPSC は潜時がほぼ一定で、単シナプス様の特性を持つが、bicuculline だけでなく NBQX により消失し、多シナプス性 IPSC と考えられる。TTX 存在下で、これらの受容体のアゴニストを電気泳動により記録錐体細胞の細胞体に向けて局所的に投与すると、bicuculline と NBQX のどちらによっても消失する IPSC が発生した。4 層を電気刺激して 2/3 層錐体細胞に誘発される単シナプス様の IPSC は、灌流液に NBQX を加えると、その振幅は約 40%程度減少した。こ

のとき IPSC の時間経過にはほとんど変化が見られなかった。したがって、NBQX で消失した成分は錐体細胞の軸索が逆向性に刺激されて生じた錐体細胞間 IPSC で、残った成分は抑制性細胞の軸索が刺激されて生じた IPSC と考えられる。記録細胞の細胞体の近傍に別のパッチ電極を用いて NBQX を局所的に投与しても灌流液に NBQX を加えた場合と同様に IPSC の減少が見られたので、錐体細胞間 IPSC を伝える non-NMDA 受容体はターゲット錐体細胞のごく近傍に存在すると考えられる。

以上の結果は、2/3 層錐体細胞が軸索-軸索シナプスを介して抑制性細胞の活動とは無関係に近傍の錐体細胞を直接抑制できることを示唆している。

(9) グルタミン酸・GABA 共放出仮説の再検討

神谷温之 (北海道大学大学院医学研究科分子解剖)

近年、発達期の脊髄や脳幹の一部の抑制性シナプスでは GABA とグリシンが共放出されることが明らかとなった。また、海馬苔状線維シナプスでは興奮性伝達物質であるグルタミン酸に加えて GABA を放出する可能性が示され注目を集めている。本研究では、幼弱期苔状線維シナプスからのグルタミン酸・GABA 共放出仮説の妥当性について、スライスパッチクランプ法を用いて再検

討を行った。生後 2 ないし 3 週のマウス海馬スライス標本において、歯状回顆粒細胞層に強い刺激と弱い刺激を交互に与え、CA3 野ニューロンから記録されるシナプス応答に対するグルタミン酸受容体阻害薬の効果を比較した。弱い刺激によるシナプス応答は CNQX と AP5 の投与により完全に消失したのに対し、強い刺激に対する応答の一部は残存し、この成分は GABA_A 受容体阻害薬

microtoxin の投与により消失した。顆粒細胞層の強い刺激により苔状線維以外の成分を同時に刺激し、順向性あるいは軸索反射の機構を介して CA3 野ニューロンに単シナプス性 IPSC を生じたと考えられた。歯状回顆粒細胞層の弱い刺激で選択的に苔状線維を刺激した際には単シ

ナプス性 IPSC を生じなかったことから、幼弱期の苔状線維シナプスからグルタミン酸と GABA が共放出されるという仮説は、不適切な実験条件によるアーチファクトであると考えた。

(10) 聴覚中継路外側上オリーブ核への抑制性入力における代謝型グルタミン酸受容体および GABA_B 受容体機能の発達変化

西巻拓也, 鍋倉淳一 (生理学研究所生体恒常機能発達機構研究部門)

張 一成 (慶北大学校)

大野浩司 (浜松医科大学解剖)

聴覚中継路核である外側上オリーブ核 (LSO) は内側台形体核 (MNTB) から抑制性の入力を受けており、音源定位に重要な働きをしている。この抑制性入力は、発達に従って GABA からグリシンへスイッチする。この抑制性入力が幼若期に GABA である生理学的意義を解明するために、我々はそのシナプス前終末に存在する GABA_B 受容体に注目し、その機能的役割について電気生理学的な検討を行った。その結果、MNTB 刺激によって惹起される抑制性シナプス電流 (IPSC) の振幅は、幼若期(P2-11)のラットではテタヌス刺激下では内因性 GABA によって有意に抑制され、また GABA_B 受容体選択的アゴニ

トである baclofen 投与によっても有意に抑制されたが、これらの GABA_B 抑制はどちらも発達に従い消失した (~P18)。

さらに、幼若期にのみ機能する GABA_B 受容体の生理的な意義について検討するため、シナプス伝達の発達に関して GABA_B 受容体のノックアウトマウス (GABA_BR1KO mice) を用いて解析したところ、KO mice では幼若期、成熟期ともにシナプス伝達の異常が観察された。以上の結果より、GABA_B 受容体は神経回路発達に重要な役割を果たしていることが示唆された。

(11) 褐色脂肪細胞のミトコンドリア—ER—細胞膜間の Ca²⁺カップリングとノルアドレナリンによる制御

日暮陽子, 早戸亮太郎, 久場雅子, 久場健司 (名古屋学芸大学管理栄養学部解剖生理)

熱産生器官である褐色脂肪細胞は、β₃ 受容体の活性化を介して、脂質のβ酸化からミトコンドリアでの電子伝達の促進と同時に、脱共役蛋白 (UCP) を活性化し、ミトコンドリアの膜電位を減少し、ATP を合成することなく熱を発生する。培養したラット褐色脂肪細胞に細胞質の Ca²⁺イメージング法とミトコンドリア膜電位測定法、カメレオンの蛍光による ER 内 Ca²⁺濃度測定法を応用した。FCCP の投与は 3 相性の [Ca²⁺]_i 上昇を起こす。第 1 相はミトコンドリアの膜電位減少を伴い、第 2 相は外液の Ca²⁺除去により部分的に消失し、第 2 相に細胞外 Ca²⁺

依存成分と細胞内 Ca²⁺遊離依存成分の存在が判明し、後者は U73122 で消失した。又、無 Ca²⁺液中での CPA による [Ca²⁺]_i 上昇は FCCP の Ca²⁺応答直後には消失した。このことからミトコンドリアからの Ca²⁺遊離により PLC が活性化され、局所的に産生された IP₃ の作用下で ER から Ca²⁺-誘起性 Ca²⁺遊離が起こることが示唆される。一方、第 2 相の細胞外 Ca²⁺依存成分 Ca²⁺流入は、オリゴマイシンにより消失し、細胞内 Mg²⁺濃度の上昇を伴った。このことから、脱共役にカップルした Ca²⁺流入は共役再開に伴って産生される代謝産物により活性化され

ることが示唆される。更に、これらの脱共役により活性化される機構が、細胞膜の β_3 受容体の活性化により起こ

ることが解った。

(12) 上丘の動き検出ニューロンの発火タイミング決定における樹状突起 H 電流の役割

伊佐 正, 遠藤利朗 (生理学研究so認知行動発達機構研究部門)

足澤悦子, 納富拓也, 重本隆一 (生理学研究so脳形態解析研究部門)

平林真澄 (生理学研究so行動代謝分子解析センター)

上丘の浅灰白層深部および視神経層に存在する wide field vertical (WV) cellは上丘に存在する様々なニューロン群の中でも特に活性化の時定数が早いH電流を多量に発現している。Thy1-GFP ラットの上丘において免疫電子顕微鏡による解析を行ったところ, HCN1 分子が WV cell の細胞体ではなく, 樹状突起に発現していることを確認した。一方で, スパイク発火は細胞体とは電氣的に isolate されている樹状突起において起きていることが示唆された。そこで, このような現象に対する樹状突起に発現する H 電流の関与を検討し, 以下の結果を得た。

1. WV cell の樹状突起には Na チャンネルが発現し, 活動電位を生成する。

2. WV cell の発現樹状突起に発現する H 電流は, 細胞体の膜電位には依存せずに樹状突起のシナプス入力部の膜電位をスパイク発火閾値に固定することによって, 弱いシナプス入力に対しても high fidelity に短潜時で発火応答できるようにしている。

3. 一方で膜抵抗を下げることで長潜時で安定しない発火応答は抑制されている。

このように, スパイク発火の閾値を下げて短潜時の発火応答を着実に起こさせる一方で膜抵抗を下げることで長潜時の発火応答を防ぐ, という dual function を樹状突起の H 電流は有しており, それによって確実な動きの情報処理を行うことに寄与していることが示唆された。

(13) 卵巣摘出ラット脊髄におけるセロトニン受容体の可塑性

吉村 恵 (九州大学医学研究院)

カルシトニン製剤による慢性疼痛の抑制は, 骨密度の増加より早期に見られる。そこで, 卵巣摘出(OVX)ラットモデルを用い, 脊髄スライスに後根を付した標本と in vivo で慢性痛の発生機序を調べた。Sham 群では A デルタ線維と C 線維刺激の EPSC はセロトニンによってシナプス前性に抑制されたが, OVX ラットでは A デルタ線維の EPSC は抑制されたものの, C 線維 EPSC は抑制を受けなかった。次にカルシトニン製剤を投与した OVX ラットを用いて検討した。その結果, C 線維誘起の EPSC は再び抑制をうけるようになった。脊髄後角細胞から in vivo パッチクランプ記録を行った。受容野皮膚への機械的触と痛み刺激によって, EPSC の burst が記録され, そ

の振幅には有意差がなかった。セロトニンを脊髄に直接投与したところ両者を同等に抑制した。ところが, OVX ラットでは触刺激応答に比較して, 痛み刺激応答は有意に振幅が増大していた。また, セロトニン投与によって触刺激応答は抑制されたが, 痛み応答には変化がなかった。次にカルシトニン製剤で処置したラットで検討した。Sham と同様, 刺激応答に有意差が見られなくなった。以上から, A デルタおよび C 線維終末にはセロトニン受容体が発現しており, 卵巣摘出によって C 線維終末に発現していた受容体が消失する。そのため痛み刺激応答の増大とセロトニンによる抑制の消失が見られたものと考えられる。

(14) 海馬シナプスの左右非対称性

篠原良章, 重本隆一 (生理学研究所脳形態解析研究部門)

ヒトの脳の高次機能には左右差があることはよく知られているが, それを支える分子基盤は全く分かっていない。我々は以前に NMDA 受容体のうち, NR2B サブユニットが海馬錐体細胞の左右のシナプスで非対称な分布を持つことを報告した。(Kawakami et al., Science (2003))。

この海馬の左右差がどのような生理的な意義を持っているかを探るため, 他のグルタミン酸受容体についても調査したところ, 我々は AMPA 受容体 GluR1 サブユニットも海馬で分布量が異なることを新たに発見した。GluR1 の左右非対称性は NR2B サブユニットと反対の方向性を持っていた。つまり海馬のシナプスの NR2B が多

くなる側では, GluR1 サブユニット総量は少ないという興味深い知見が得られた。

そこで SDS-FRL 法を用いて, 海馬 CA1 錐体細胞の樹状突起から GluR1 と NR2B を定量したところ, 単一シナプスレベルにおいても, GluR1 サブユニット量と NR2B サブユニット量は逆相関を持っていることが分かった。このシナプスレベルでの 2 つの分子の逆相関関係が受容体量の左右差を作る一因になっていると考えられる。しかし, 海馬の左右でどうして受容体量の差が違うのかは, 今後解かなくてはならない問題である。

(15) 単一海馬苔状繊維シナプスの開口放出ダイナミクス

須山成朝, 引間卓弥, 荒木力太, 石塚徹, 八尾寛
(東北大学大学院生命科学研究科脳機能解析)

中枢神経シナプスにおいては, シナプス小胞のエキソサイトーシスにおいて短期および長期の可塑性が顕著に認められ, これらが学習・記憶のメカニズムの要素であると考えられている。シナプス小胞は, ドッキング, プライミング, 形質膜との融合, エンドサイトーシスなどの素過程を経てリサイクルしている。生理学的にこれらの素過程は, ドッキングまたはプライミング状態にある小胞の数 (Readily releasable pool, RRP) と小胞と形質膜の融合確率 (pf) により定量化される。中枢神経シナプスは, 多様性が顕著であるため, 個々のシナプス前終末について素過程を計測する必要がある。今回, エキソサイトーシスの光学的機能プローブ, シナプトフルオリン法

を用いた海馬苔状線維終末の単一シナプス素過程解析の結果について報告する。シナプトフルオリンを海馬苔状線維終末特異的に発現するトランスジェニックマウス TV-42 の急性海馬スライスを作製し, 共焦点顕微鏡下に同定した大型の単一シナプス前終末における活動依存的な蛍光強度の変動を計測した。多くのシナプスにおいて, pf が非常に小さい特徴が認められ, 25°C, 10Hz の刺激に対して, その平均値は, 0.02 であった。このことから, RRP が大きいことが示唆される。これが, 高頻度の活動や増強に対応して安定的に伝達する能力の基盤になっていると考えられる。

(16) PKC によるシナプス開口放出修飾の多様性

引間卓弥, 荒木力太, 石塚徹, 八尾寛 (東北大学大学院生命科学研究科脳機能解析)

海馬苔状線維シナプスでは, シナプス前性の可塑性が起こることで知られている。このシナプスにおいて, フ

ォルボルエステルは小胞の融合確率及び ready releasable pool (RRP) の増加により開口放出を増強させる。今回,

これら二つのメカニズムの詳細を単一のシナプス前終末ごとに解析した。蛍光開口放出プローブであるシナプトフルオリンを苔状線維シナプス前終末特異的に発現するトランスジェニックマウスを用いて、海馬急性スライス下に個々のシナプス前終末を同定し、それぞれにおける開口放出を光学的に計測した。その結果、フォルボルエステルによる開口放出増強作用は、個々のシナプス前終末で異なっていた。フォルボルエステルは、融合確率の小さいシナプス前終末に対して、融合確率を増大するよ

うに作用した。また、融合確率の大きいシナプスでは、融合確率が増加する代わりに RRP が増加した。そして、PKC 阻害剤存在下では、フォルボルエステルによる増強作用は起こらなかった。すなわち、フォルボルエステルの開口放出増強作用は、PKC 依存的であり、融合確率の増大と RRP の増加が引き起こされるかは、シナプスに依存していることが示される。個々のシナプスの分子的多様性が背景に存在していることが示唆される。

(17) 大脳皮質 V 層錐体細胞への GABA 作動性シナプス伝達に関する シナプス前とシナプス外の新知見

福田敦夫 (浜松医科大学生理学第一講座)

ラット脳スライス大脳皮質第 V 層の錐体細胞で GABA_A 受容体を介する mIPSC を記録した。ミダゾラムにより mIPSC 頻度は増加した。しかし、他のベンゾジアゼピン系薬物では増加せず、ベンゾジアゼピン受容体拮抗薬でも抑制されなかった。ミダゾラムの mIPSC 頻度増大作用は $\alpha 7$ nAChR 阻害剤により抑えられ、ミダゾラム存在下でのニコチン投与で劇的な相乗効果がみられた。シナプス前終末の $\alpha 7$ nAChR の膜移行がミダゾラムにより誘導された。以上のミダゾラムの作用は PKC 阻害薬によって抑制された。ミダゾラムの灌流投与は保持電流 (I_{hold}) のシフトを惹起した。しかし、低濃度 SR95531 では I_{hold} シフトは起こらず mIPSC のみ消失した。さら

に GABA トランスポーター阻害剤は mIPSC 振幅に影響を与えずミダゾラムと同方向の I_{hold} シフトのみ惹起した。以上から、大脳皮質第 V 層錐体細胞にはトニック GABA_A 受容体電流が存在し、ミダゾラムにより増強されることが考えられた。ミダゾラムは第 V 層では他層より有意に強かった。V 層のトニック電流は有意に強く、 $\alpha 1$ と $\alpha 5$ が有意に多く発現していた。zolpidem は両層で同等のトニック電流を惹起したが、L-655708 は V 層においてのみトニック電流をブロックした。以上から大脳皮質では $\alpha 1$ 受容体を介して全層で、V 層においてはさらに $\alpha 5$ 受容体を介してより強い持続性 GABA_A 受容体刺激があることが明らかになった。

17. DNA 構造を基盤とするゲノム生理学の展開—DNA, 蛋白質, 膜の相互作用

2006 年 11 月 9 日—11 月 10 日

代表・世話人：水田龍信（東京理科大学生命科学研究分子生物学部門）

所内対応者：永山國昭（自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター）

- (1) 2006 年研究会の挨拶 ー核, ミトコンドリア, 葉緑体の共通モデル
永山國昭（自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター）
- (2) 膜と DNA の破壊による細胞死の様式
水田龍信（東京理科大学生命科学研究分子生物学部門）
- (3) 細菌染色体の高次構造構築機構の解析
大庭良介（京大生命科学研究科統合生命科学専攻）
- (4) DNA 高次構造の自己組織化と生物活性
吉川祐子（名古屋文理大学短期大学部食物栄養学科）
- (5) オリゴアルギニン PEG 脂質とプラスミド DNA との複合体構造と遺伝子発現効率
米谷芳枝（星薬科大学医薬品化学研究所創剤構築研究室）
- (6) 脂質膜アセンブリーによる新規人工遺伝子デリバリーシステムの構築
小暮健太郎（北海道大学大学院薬学研究院創剤薬理学分野）
- (7) 再構成させた細胞骨格との相互作用による巨大リボソームの形態形成
滝口金吾（名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻）
- (8) 単一 GUV 法を用いたペプチドや DNA と脂質膜の相互作用の解析
山崎昌一（静岡大学大学院創造科学技術研究部統合バイオサイエンス）
- (9) Morphology of Ternary Complexes between Liposomes, DNAs and Cations
Vasily Kuvichkin（自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター）
- (10) 反復配列を含む超らせん DNA 分子の形状と DNA 分子間相互作用の解析
加藤幹男（大阪府立大学大学院理学系研究科生物科学専攻）
- (11) DNA 凝集体の理論：ファンデルワールス〜クーロン相互作用
石本志高（岡山光量子科学研究所）
- (12) ゲノム解析から得られるもの：腎癌関連遺伝子 *kank* の生理機能解析
木山亮一（産業技術総合研究所）
- (13) DNA・蛋白質複合体の相互作用様式
鳥越秀峰（東京理科大学理学部応用化学科）
- (14) 酵母ゲノムおよびミニ染色体における DNA 構造を利用したクロマチン構造制御およびタンパク質
ーDNA 相互作用の解析
清水光弘（明星大学理工学部化学科）
- (15) クロマチン工学の開拓
大山 隆（早稲田大学教育総合科学学術院）
- (16) 2006 年研究会の総括ーDNA/RNA 機能ゲノミクスの立上げ
永山國昭（自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター）

【参加者名】

永山 國昭（統合バイオ）、水田 龍信（東京理科大・生命科学研究分子生物学部門）、大庭 良介（京大・生命

科学研究科統合生命科学専攻), 吉川 祐子 (名古屋文理大・短期大学部食物栄養学科), 米谷 芳枝 (星薬科大・医薬品化学研究所創剤構築研究室), 小暮 健太郎 (北海道大・大学院薬学研究院創剤薬理学分野), 滝口 金吾 (名大・大学院理学研究科生命理学専攻), 山崎 昌一 (静岡大・大学院創造科学技術研究部統合バイオサイエンス), Vasily Kuvichkin (統合バイオ), 加藤 幹男 (大阪大・大学院理学系研究科生物科学専攻), 石本 志高 (岡山光量

子科学研究所), 木山 亮一 (産業技術総合研究所), 鳥越 秀峰 (東京理科大・理学部応用化学科), 清水 光弘 (明星大・理工学部化学科), 大山 隆 (早稲田大学教育総合科学学術院), 田中 雅嗣 (東京都老人総合研究所健康長寿ゲノム探索), 白田 信光 (藤田保健衛生大・医 I), 金子 康子 (埼玉大・教育学部), 仁木 宏典 (情報システム研究機構国立遺伝学研究所系統生物研究センター), 前島 一弘 (理研・今本細胞核機能研究室)

【概要】

ゲノム構造は、一次塩基配列, DNA トポロジー, DNA 物理構造, クロマチン構造, 核構造などの幅広い階層構造を有し, 生命の基本骨格を成すとともに, 病態の発現とも深く関与する。ヒトゲノムに代表されるゲノムプロジェクトの進展により塩基配列の決定はほぼ完了したものの, その他の多層的ゲノム構造に関しては未解明の点が多く, 研究者間の交流も多くない。本研究会は多層的ゲノム構造研究の最先端にある研究者を一堂に集め, 生理学研究所の位相差電子顕微鏡の利用を一つの手段として, ゲノム構造の相互関連を捉えることができる研究集団として成長することを目指している。具体的には, 分野横断的な DNA/RNA 機能ゲノミクス研究の立ち上げを最終目標としている。このような理念のもと, 平成 18 年度研究会は, 提案代表者: 水田龍信 (東京理科大学), 所内代表者: 永山國昭 (統合バイオサイエンスセンター) のオーガナイズにより 11 月 9-10 日に岡崎コンファレン

スセンターで開催された。出席者約 20 名を集め, 口頭発表 15 件が行われた。今回は「DNA, 蛋白質, 膜の相互作用」という副題のもと, 多層的ゲノム構造を念頭に, それと相互作用を行う分子に関する最新の話題が提供された。特に膜との相互作用では, DNA 機能の新たな可能性が提示され, 活発な討論が行われた。発表者はそれぞれ生物物理学, 分子生物学, 免疫学, 創剤薬理学, 高分子工学, 理論物理学を専門とするが, 「DNA 構造」と「DNA との相互作用」を共通のキーワードとして, 独自の立場から発表を行った。その結果, 相互間の学問的理解が深まり, 従来の専門分野の枠組みを越えた共通基盤の形成の可能性が見えてきた。このような共通の問題意識と共同研究の機運の高まりを受け, 最終総括では, 生理学研究所をハブとして, 新しい研究領域を立ち上げるための具体的な話し合いが行われた。

(1) 2006年研究会の挨拶一核, ミトコンドリア, 葉緑体の共通モデル

永山國昭 (自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター)

3 年目を迎えた本研究会だが, 今年は昨年以上に新展開を期待したい。RNAi に 2006 年度のノーベル生理・医学賞が与えられ, ポストゲノムの展開に新たな焦点が当てられはじめた。特に DNA-RNA-蛋白質の遺伝子発現ネットワークが極めてダイナミックなものであり, 情報の側面だけでは細胞内の遺伝/生理過程がとらえきれないことが明確になってきた。本研究会参加者は, 何らかの意味で生理的実体としての核酸および核酸・生体分子複合体を研究しており, 情報を構造と機能に結び付けよ

うとしている。こうしたグループが共通に持つべき研究上の大目標は何であろうか。そこを今年は考えてみたい。一例としてその出自が共生バクテリアと考えられている, 核, ミトコンドリア, 葉緑体の共通モデルは何かという問題をたててみた。これらに共通するのは DNA/RNA の存在と 2 層膜構造の存在である。この 2 つの事実は関係があるのかないのか。両者を合理的に結びつける新しいモデルを提案し, 新規イメージング法 (f-EMI) を用いた実証方法について考察したい。

(2) 膜と DNA の破壊による細胞死の様式

水田龍信（東京理科大学生命科学研究科分子生物学部門）

生物の基本的構成要素は膜と DNA である。いずれが欠けても、もはやそれは生物とはいえない。生物が生物でなくなる現象を死と定義すれば、膜または DNA の破壊は死と表裏一体の関係にある。細胞は生物の最小単位の一つである。多細胞生物の細胞の死（細胞死）は大きく分けてネクロシスとアポトーシスの二つの様式に分類できる。アポトーシスではまず DNA の分解があり、その後、二次的に膜の破壊へと至る。ネクロシスでは逆に、まず膜の破壊があり、引き続いて DNA の分解に向かう。細胞死は生物の形態形成、神経系や免疫系などの高次機能の確立において、大きな役割を担っているが、そのメカニズムに関しては不明な点が多い。我々は細胞

死 DNA 断片化酵素 DNase γ に注目し、これまで精製蛋白を用いた一分子レベルの解析、過剰発現系による細胞レベルの解析、遺伝子ノックアウトマウスを用いた個体レベルの解析を行ってきた。その結果、DNase γ はネクロシス DNA 断片化酵素であることが判明した。180 bp のヌクレオソーム単位の DNA 断片化はアポトーシスの判断基準の一つであるが、必ずしもアポトーシスに限定されないことが明らかになった。また、細胞核内のクロマチンを特異的に分解すると、核がつぶれていくことから、クロマチンは遺伝情報を担うだけでなく、核の骨格としても機能していることが示唆された。

(3) 細菌染色体の高次構造構築機構の解析

大庭良介、竹安邦夫（京都大学生命科学研究科統合生命科学専攻）

原核生物・真核生物を問わず、染色体はタンパク質等によって階層的に折り畳まれ、細胞あるいは核内に収められている。細菌ゲノム（ヌクレオイド）では、DNA $\sim$ 30nm 幅のファイバー構造 $\sim$ 80nm 幅のファイバー構造 $\sim$ 高次凝集体、という階層構造が報告されている。本研究では、この階層構造構築機構の解析を行った。

Dps タンパク質はヌクレオイドを凝集させる因子の一つとして知られている。大腸菌における Dps 依存的なヌクレオイド凝集機構を解析から、①対数増殖期において Fis タンパク質が凝集を阻害する、②Fis が Topoisomerase I と DNA gyrase の発現を抑制している、③Topoisomerase I と DNA gyrase の発現が凝集を促進することが分かった。ヌクレオイド凝集が起きる細胞内の DNA トポロジーの状態を調べるため、細胞質抽出液を用いてプラスミド

DNA のトポロジー変化を調べたところ、④ヌクレオイド凝集が起こる株では DNA トポロジーが変化することが分かった。以上の結果は、『DNA のトポロジーが動的である』ことが Dps 依存的なヌクレオイド凝集に必要なことを示唆している。

次に、30nm $\cdot$ 80nm ファイバー構造への RNA の関与を調べた。RNase 等を用いた実験から、バクテリアではヌクレオソーム構造の代わりに太さ 10nm のファイバー構造が存在し、30nm ファイバー以上の構造体の保持に新生合成一本鎖 RNA が関与していることがわかった。この結果から我々は、新しいヌクレオイド階層構造『DNA $\sim$ 10nm ファイバー $\sim$ 30nm ファイバー $\sim$ 80nm ファイバー $\sim$ 高次凝集体』というモデルを提案する。

(4) DNA 高次構造の自己組織化と生物活性

吉川祐子 (名古屋文理大学短期大学部食物栄養学科)

生体の遺伝情報を伝える DNA は、その大きさが数 10 μm から数 10mm にもおよぶ巨大分子であり、細胞内ではコンパクトに折り畳まれた凝縮状態で存在している。*in vitro* でも、ポリアミン、PEG などの中性高分子、あるいは、陽イオン性の界面活性剤などを添加すると、DNA の凝縮や沈殿を引き起こすことが知られている。このような *in vitro* での DNA 凝縮は、細胞内での DNA の高次構造変化のモデル系とみなすことが出来る。

10 年程前までは、DNA の凝縮は、ある閾値以上の凝縮剤の濃度で凝縮が開始し、凝縮の転移は連続的であるとみなされていた。それに対して、蛍光顕微鏡による DNA の単一分子観測法により、DNA の折り畳みは、著しい不連続性の伴った転移現象でありことが近年明らか

になった。今回の講演では、このような DNA の凝縮過程を制御することにより、多様な折り畳み構造が生成することを紹介したい。また、DNA の酸化損傷である二重鎖切断反応の速度を、単一分子観測により、定量的に解析したのでこれについても報告する。更には、凝縮転移による高次構造の多様性と、その生物学的な意味についても考察を行いたい。

【文献】

Y. Yoshikawa et al., *Eur. J Biochem.*, **268**, 2593-2599 (2001).

Y. Yoshikawa et al., *FEBS Lett.*, **566**, 39-42 (2004).

Y. Yoshikawa et al., *Biophys. J.* **90**, 993-999 (2006).

K. Hibino et al., *Chem. Phys. Lett.*, **426**, 405-409(2006)

(5) オリゴアルギニン PEG 脂質とプラスミド DNA との複合体構造と遺伝子発現効率

米谷芳枝 (星薬科大学医薬品化学研究所創剤構築研究室)

遺伝子治療には安全で高効率に遺伝子導入できる非ウイルスベクターの開発が不可欠である。しかしながら、非ウイルスベクターは遺伝子導入効率が低い欠点がある。そこで、遺伝子送達用ベクターの開発のために、細胞膜透過性ペプチドキャリアーである HIV-1Tat フラグメントのように、細胞内に高効率で遺伝子を運べる可能性のあるオリゴアルギニンからなる脂質を合成し、遺伝子との複合体の物理化学的性質と、遺伝子導入効率を調べた。

オリゴアルギニン脂質は、ArgN (N=4~10)と、ポリエチレングリコール 2000 のスパーサーと 3,5-bis(dodecyloxy)benzamide(BDB) からなる人工脂質 (ArgN-PEG-BDB)である。各脂質は水に溶解し、ミセルとなる。Arg10-PEG-BDB では、臨界ミセル濃度は約 20 μM であった。ヒト子宮頸部がん細胞である HeLa 細胞にお

いてルシフェラーゼ遺伝子をコードしたプラスミド DNA を用いて遺伝子発現を調べたとき、オリゴアルギニン脂質ミセルは、そのアルギニン鎖長が 10 のとき最も高い発現効率を示した。Arg10-PEG-BDB は、臨界ミセル濃度以下である 5 μM において、さらに高い遺伝子発現を示し、このときの遺伝子発現効率は市販の遺伝子導入試薬の lipofectamine2000 に匹敵した。

Arg10-PEG-BDB ミセルと遺伝子の複合体は、動的光散乱から求めたサイズは約 1.5 μm で表面電位が+43mv であった。複合体の構造を、原子間力顕微鏡 AFM、位相差電子顕微鏡、暗視野顕微鏡で観察した結果、遺伝子にミセルが絡まった長い形状であることが確認され、また、臨界ミセル濃度以下においても同じような構造が観察された。

(6) 脂質膜アセンブリーによる新規人工遺伝子デリバリーシステムの構築

小暮健太郎（北海道大学大学院薬学研究院創剤薬理学分野）

近年、ウイルスベクターの病原性・免疫原性が問題となり、より安全な人工遺伝子デリバリーシステムが注目されている。しかし、ウイルスに比べ遺伝子送達能力が低いことが欠点である。我々は、ウイルスを超える人工遺伝子デリバリーシステム開発を目的として、独自のパッケージングコンセプト Programmed Packaging (Programming・Design・Assembly) に基づき、新規人工遺伝子デリバリーシステムである多機能性エンベロープ型ナノ構造体(MEND)の構築に成功している。MEND は、

エンベロープ型ウイルスの構造特性を模したものであり、凝縮化核酸コアと脂質エンベロープから構成され、コアとエンベロープに多種類の機能性素子をトポロジーをコントロールして搭載することが可能である。通常の我々の領域の学会では、機能評価にのみ注目が集まってしまうためアセンブリーを強調した発表を行う機会は少ないが、今回は凝縮化核酸コアの脂質膜アセンブリーを中心に最近の MEND に関する成果を紹介させていただく。

(7) 再構成させた細胞骨格との相互作用による巨大リポソームの形態形成

滝口金吾（名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻）

細胞は膜によって外部から仕切られ機能を維持している。従って膜の挙動を制御している機構を探ることは非常に重要である。古くから生体膜の形態の調節決定因子として細胞骨格の存在が指摘されていたが、細胞骨格が膜にどのように作用するかはまだ不明な点が多い。なぜならこれまでの研究手法は、試料全体から得られる平均化されたシグナルをもとに解析するものであった。それらの手法の限界を相補するため、本研究では細胞骨格構成蛋白質（アクチンやチューブリンなど）を封入した巨大リポソームを構築し、内部で細胞骨格様ネットワークを再構成させたときに個々の膜が示す振舞いや形態変化を光学顕微鏡（主に暗視野顕微鏡）を用いて直接観察した。

例えば、アクチンと同時にアクチン線維架橋蛋白質を封入した実験では、リポソームに起きる形態変化が、各架橋蛋白質の濃度ではなく、各々のアクチン架橋様式に対応したものであることが明らかになった。この結果は、共同して働く結合蛋白質の性質種類を変えることによって、定性的にリポソームを様々な形態に分化させられることを示している。今はまだリポソーム内に基本的な細胞骨格構造を再構成させるのに成功した段階であるが、この系の開発を更に進めることによって、分子レベルでの動的な機構が細胞全体の生命活動を支えている仕組みを明らかに出来ればと考えている。

(8) 単一 GUV 法を用いたペプチドや DNA と脂質膜の相互作用の解析

山崎昌一（静岡大学大学院創造科学技術研究部統合バイオサイエンス）

従来の生体膜/脂質膜の研究では、小さな直径（50～500 nm）の一枚膜リポソーム（SUV や LUV）や多重層リポソームが多く存在する水溶液を用いて種々の物理化学的装置による物理量の集団平均の測定が行われてきた。一方直径 10 μm 以上一枚膜リポソームである巨大リ

ポソーム(GUV)を用いた実験では、1 個の GUV の構造や物理量の変化をリアルタイムで測定することが可能である。我々はこの利点を生かして物質と脂質膜界面の相互作用の高感度な測定や膜融合・膜分裂の過程の詳細な観測などに成功した。¹⁾ 昨年我々は抗菌性ペプチドと脂質

膜の相互作用を GUV を用いて研究して、ペプチドが脂質膜にポアを形成することを直接的に示し、ポア形成の速度論など従来の方法ではわからない情報を得ることに成功した²⁾。さらにこの研究で、多くの GUV から得た 1 個の GUV の物理量を統計的に解析することで、小さなリポソームの集団を用いた研究とは質的に異なる情報が得られることを初めて示した (単一 GUV 法)。本講演で

は単一 GUV 法により得られた成果を説明し、その方法の利点を解説する。さらに最近行っている DNA と脂質膜の相互作用の単一 GUV 法による研究の予備的な結果を説明し、議論する。

1) *e-J. Surf. Sci. Nanotech.* **3**, 218, 2005

2) *Biochemistry*, **44**, 1582/3, 2005

(9) Morphology of Ternary Complexes between Liposomes, DNAs and Cations

Vasily Kuvichkin (自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター)

Ternary complexes made of DNA, neutral lipids and cations have been studied for more than 30 years though they are far less acknowledged compared with DNA-cationic lipid complexes (lipoplexes). The major concern with lipoplexes is the medical application but that with ternary complexes is understanding of the lipid role in the cell as neutral (zwitterionic) lipids are major characters in the cell membrane. Till recently direct lipid-nucleic acid interactions, thought to be the cause of the DNA membrane complexes, have been overlooked with a few exceptions of research groups including us. The disregard may arise from the difference in DNA-lipid interactions between the two complexes, subtle

one controlled by the cation concentration in ternary complexes and strong and visible one in lipoplexes. A lot of efforts have been made to grasp the direct evidence of the DNA involvement in the ternary complex but failed because of the subtleness.

The application of phase contrast TEM to the ternary system seems to make an epoch by its visibility of DNA molecules without staining. We have found that DNA is an actual fusogen for neutral liposomes under a proper condition of cations. Morphological aspects of the ternary complexes such as DNA condensation, liposome contacts, liposome fusions and their intermediates will be reported.

(10) 反復配列を含む超らせん DNA 分子の形状と DNA 分子間相互作用の解析

加藤幹男 (大阪府立大学大学院理学系研究科生物科学専攻)

負の超らせん環境下で誘起される高次構造転移として、分子内三重鎖構造や、十字架型構造の形成が良く知られている。これらの特殊高次構造は、その形成に際して負の超らせんを吸収し、その変化は、アガロースゲル二次元電気泳動によって求めることができる。今回、我々は、ミニサテライト配列 AL79 を含む超らせんプラスミド DNA が、一次元目に酸性 (pH4)、二次元目に中性 + クロロキンの緩衝液を用いた電気泳動実験で、新奇な泳動図を示すことを見出した。すなわち、トポアイソマーは連続な曲線上になく、超らせん数が 1 からおよそ 9 (今回のアガロースゲルの分解能限界) までの格子点上に分

布していた。このことは、ある超らせん数を持つプラスミド DNA 分子は、見かけの超らせん数 (移動度) の異なるさまざまな形状を取り得ることを示すものである。一方、反復配列を含まない pUC19 DNA は通常の泳動図を示した。電子顕微鏡観察の結果は、AL79 DNA は、pUC19 DNA に比べて分子が凝集した構造物を形成しやすいことを見出している。この AL79 塩基配列の立体構造特性を明らかにするために、現在、超らせん DNA 分子の化学修飾実験による構造解析と、さまざまな条件での顕微鏡観察を進めている。

(11) DNA 凝集体の理論：ファンデルワールス～クーロン相互作用

石本志高（岡山光量子科学研究所）

完全屈曲性を持つ高分子ガウス鎖の連続理論は、場の理論による相転移の記述等よく知られている。一方、DNA 等のより一般の半屈曲性高分子鎖については、数値計算で一定の理解は得られたが、予言性を持つ解析理論に至っていなかった。我々はこのモデルを経路積分において引力項付で定式化し、DNA 凝縮に特徴的なトロイド

状態を解析的に導き出した[Ishimoto, Kikuchi: J. Chem. Phys. 125 (2006) 074905]。更に実験との一致を見、ウィップ-トロイド相転移を発見した。これを発展させ、異なる引力相互作用によるトロイド半径のスケーリング則を提案した[Ishimoto, Kikuchi: in preparation]。

(12) ゲノム解析から得られるもの：腎癌関連遺伝子 *kank* の生理機能解析

木山亮一（産業技術総合研究所）

近年、ゲノムを直接比較し解析する技術が開発され、癌組織と正常組織の DNA を直接比較することが可能になってきた。我々はその比較ゲノムの手法としてゲノムサブトラクション法を用いて腎細胞癌 (renal cell carcinoma) DNA の変異部位を網羅的にクローニングし、得られたクローンについて解析し、染色体 9p24 部位にある新規の癌関連遺伝子 *Kank* を得た。*Kank* 遺伝子は、clear cell タイプの腎細胞癌において高頻度で遺伝子発現の消失/減少を示し、癌細胞中で強制発現を行うと細胞増殖阻害及び細胞形態変化を示した。したがって、*Kank* 遺伝子は癌抑制遺伝子と考えられる。*Kank* 遺伝子は、腎臓の尿

細管で良く発現しており、腎臓由来の細胞において細胞移動に関係する membrane ruffling 部位に局在していた。我々は、*Kank* タンパク質に結合するタンパク質を探索したところ、膜波打ち構造 (lamellipodium) に関与する IRSp53 タンパク質と相互作用を行うことがわかった。*Kank* タンパク質が IRSp53 タンパク質に結合して IRSp53 タンパク質の機能を阻害することにより、膜受容体などからのシグナルを Rac1 から IRSp53 を経由して WAVE2 に伝達する過程を阻害し、actin 重合反応を阻害するものと考えられる。

(13) DNA・蛋白質複合体の相互作用様式

鳥越秀峰（東京理科大学理学部応用化学科）

DNA 結合蛋白質が DNA を特異的に認識する機構を明らかにすることは、細胞核内の生命現象を分子論的に解明する上で非常に重要である。真核生物の染色体末端のテロメア DNA の長さは細胞の老化や癌化と密接な関係にあり、この長さの調節には、テロメラーゼと共にテロメア DNA に特異的に結合する蛋白質が関与する。本研究では、テロメアのリーディング鎖の 3'末端の突出した 1 本鎖 DNA 領域に特異的に結合する Pot1 蛋白質に注目し、この蛋白質の DNA 結合ドメイン (Pot1DBD)とテロ

メア 1 本鎖 DNA 領域との相互作用機構を解析した。Pot1DBD とテロメア 1 本鎖 DNA 領域との複合体の 3 次元構造は X 線結晶構造解析により明らかとなり、相互作用に関与すると期待されるアミノ酸残基が示唆されている。しかし、これらのアミノ酸残基のうちいくつかは他の種類のアミノ酸残基に置換しても、テロメア 1 本鎖 DNA 領域との結合能がほとんど変化せず、テロメア 1 本鎖 DNA の認識にほとんど寄与していないという意外な結果が得られている。この結果を踏まえて、2 本鎖 DNA

結合蛋白質が 2 本鎖 DNA を認識する分子機構との相違 点などについて考察する。

(14) 酵母ゲノムおよびミニ染色体における DNA 構造を利用したクロマチン構造制御 およびタンパク質-DNA 相互作用の解析

清水光弘 (明星大学理工学部化学科)

クロマチンの基本単位であるヌクレオソームは、プロモーターなどにおいてしばしば正確な位置に形成され (ヌクレオソームポジショニング), 遺伝子発現制御のメカニズムの一つとして提唱されている。一方, DNA は塩基配列, トポロジーなどに依存して, 通常の B 型 DNA とは異なる特殊な構造を形成する。我々は, 出芽酵母ゲノムの正確な位置に, さまざまなヌクレオソーム排除配列 (特殊な B' 構造または左巻 Z-DNA を形成できる) を導入するアプローチを確立し, α -細胞特異的遺伝子 *BAR1* ならびに無機リン酸飢餓状態で誘導発現される *PHO5* の転写抑制におけるヌクレオソームポジショニングの重要

性を明らかにした。本研究の結果は, ゲノムにおいて DNA 構造によってヌクレオソームの配置を改変し, 遺伝子発現を人為的に制御できる可能性を示している。一方では, ポジショニングしたヌクレオソームを有する酵母ミニ染色体のアッセイ系を用いて, アクチベーターのヌクレオソーム DNA への結合を解析した。*Cys6-Zn2* ドメインを持つ *Hap1* は, ヌクレオソーム中央の認識部位には結合できないことが *in vivo* で示され, ヌクレオソームポジショニングが転写因子のアクセスを制御することが示された。

(15) クロマチン工学の開拓

大山 隆¹, 隅田周志², 棚瀬潤一¹ (¹早稲田大教育総合科学学術院生物, ²甲南大学理工学部生物学科)

真核細胞のゲノム DNA 上で外来遺伝子を思い通りに発現させる技術はまだない。これを実現するためにはクロマチンの構造を改変したり修飾したりする技術 (“クロマチン工学”) の開発が欠かせない。真核細胞の場合, 遺伝子発現の開始段階に関わる基盤的構造は, 30 乃至 10 nm の太さのクロマチン繊維である。ゲノム DNA は, これらの繊維内で機能的に折り畳まれているはずであるが, ヌクレオソームの配置を決める情報の所在や, ヌクレオソームの連鎖を機能的に折り畳む仕組みについてはほとんど何も分かっていない。これらを解明することは, クロマチン工学開拓のための第一歩と考えられる。

クロマチン繊維を構築するための情報の多くは, DNA

の高次構造や特性に印されていると考えられている。実際, 我々は, 負の超らせんを擬態したベント DNA が転写のための局所的クロマチンの構築ならびにクロマチンの動態に寄与していることを見出し, すでに報告した。ベント DNA をうまく使うと, 少なくとも HeLa 細胞や COS 細胞では, クロマチンからの転写を高度に活性化できる。現在, ベント DNA の機能が細胞分化と個体発生の影響を受けるかどうかについて検討を始めている。今回, ES 細胞を用いた解析結果について報告するとともに, DNA の機械的特性と転写の関係についても整理し, クロマチン工学について展望したい。

(16) 2006年研究会の総括—DNA/RNA 機能ゲノミクスの立上げ

永山國昭（自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター）

挨拶で本研究会の目標について触れ、一例を提案した。「核、ミトコンドリア、葉緑体の共通モデル」というテーマである。人によってはこれは、“生命の起源”や“進化論”問題であり本研究会で扱っているような現世的なテーマと結びつかない、と思うかもしれない。確かに個別的な生物現象の底に共通テーマを見出すのは困難である。そこでポストゲノムにふさわしいDNA/RNA 研究法の確立というところに共通項が見出せないか考えてみたい。

現在の細胞生物学の隆盛は遺伝子タグである蛍光性蛋白質 (FP) の出現と遺伝子融合技術に支えられているといつてよい。この手法のおかげで遺伝子発現物の細胞内挙動が明確になり、分子過程が明らかになった。しかし機能分子（蛋白質）の源である情報分子 (DNA/RNA) に関して、まだその細胞内挙動は不明確である。蛍光染色

による顕微イメージング手法はあるが、FP と異なり遺伝子タグではないので常に隔靴搔痒の感がある。挨拶でも述べた新しいイメージング法、機能電顕イメージング法 (f-EMI) は、この隘路を突き破る可能性がある。それは機能イメージングに使われるハロゲン元素タグが FP のような遺伝子タグ（ハロゲンを含む核酸塩基が生合成で取り込まれる）だからである。この利点と電顕の高分解能性で全く新しい手法、DNA/RNA 機能イメージング、が生まれることを期待したい。このイメージングは極めて包括的であり、i) DNA/RNA 局在の経時変化、ii) NA/RNA—蛋白質相互作用、iii) DNA/RNA—膜相互作用、iv) DNA/RNA 複合体構造等の研究、すなわち、本研究会で扱っている全ての研究対象を支援できる。本研究会をベースに新機種法と磨れた生物系の融合による特定研究「DNA/RNA 機能ゲノミクス」の立上げを提案したい。

18. 位相差断層電子顕微鏡の医学・生物学的応用

2007年1月25日

代表・世話人：金子 康子（埼玉大学教育学部）

所内対応者：永山 國昭（自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター）

（1）位相差電子顕微鏡の将来展望

永山 國昭（自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター）

新井 善博（日本電子(株)）

（2）HDC TEM によるシアノバクテリア生体高分子の観察

金子 康子（埼玉大学教育学部）

（3）Q ドットの位相差法への応用

新田 浩二（自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター）

（4）TRPV4 の単粒子解析

重松 秀樹（自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター）

（5）高精度トポグラフィ計測に基づく電子線トモグラフィ

馬場 則男（工学院大学情報学部コンピューター科学科）

（6）位相差/分析融合電子顕微鏡によるペルオキシゾームの構造解析

臼田 信光（藤田保健衛生大学医学部解剖学Ⅱ）

（7）ミトコンドリアゲノムの複製と転写の可視化

田中 雅嗣（東京老人総合研究所健康長寿ゲノム探索）

（8）バクテリアに見いだされた細胞骨格タンパク質

仁木 宏典（情報システム研究機構国立遺伝研究所系統生物研究センター）

【参加者名】

葦原 雅道（阪大・大学院生命機能研究科），厚沢 季美江（藤田保健衛生大・医学部解剖学Ⅱ），新井 善博（日本電子(株)），伊藤 知彦（名大・大学院理学研究科生命理学専攻），臼田 信光（藤田保健衛生大・医学部解剖学Ⅱ），内田 友幸（(株)見果てぬ夢），加藤 貴之（阪大・大学院生命機能研究科），加藤 幹男（大阪府立大・大学院理学研究科生物化学専攻），金子 康子（埼玉大・教育学部），亀谷 清和（信州大・ヒト環境科学研究支援センター機器分析部門），喜多山 篤（テラベース(株)），栗田 弘史（豊橋技術科学大），小玉 優哉（味の素(株)），小西 浩気（日本電子(株)），重松 秀樹（統合バイオ），鈴木 三喜男（日本電子(株)），高瀬 弘嗣（(株)花市電子顕微鏡技術研究

所），田中 雅嗣（老人研・健康長寿ゲノム探索），仲本 準（埼玉大・大学院理工学研究科），永山 國昭（統合バイオ），仁木 宏典（遺伝研・系統生物研究センター），新田 浩二（統合バイオ），服部 亮（豊田通商(株)），花市 敬正（(株)花市電子顕微鏡技術研究所），馬場 則男（工学院大・情報学部コンピューター科学科），平野 篤（筑波大・大学院数理物質科学研究科），藤浪 昭男，本田 敏和（日本電子(株)），丸山 貴広（豊田通商(株)），水野 彰（豊橋技術科学大），宮田 知子（阪大・大学院生命機能研究科），村田 隆（基生研），諸根 信広（国立精神・神経センター神経研究所），山口 正視（千葉大・真菌医学研究センター）

【概要】

この研究会は平成12年よりスタートした電子顕微鏡の研究会（“定量的高分解能電子顕微鏡法”，“電子位相差顕微鏡の医学・生物学的応用”，“位相差断層電子顕微

鏡の医学・生物学的応用”）を継承しており，今回は特に，これまでの多くの共同研究の成果を踏まえ，今後の進展の方向性について展望するための集中的な発表・討論を

期した。そのため、あえて開催期間を1月25日午後のみ
の半日としたが、結果的に多くの参加者を得た。岡崎で
開発された位相差電子顕微鏡法は、無染色の生物試料観
察に特に威力を発揮し、従来法では観察が困難であった
様々な生物試料の微細構造を明瞭に提示してきた。この
成果は国内外で着実に注目されてきており、海外におい
ても複数の研究施設で追随する技術の開発が始まっている。

まず導入部で岡崎における位相差電子顕微鏡開発の歴
史の概要とともに、新たな理論に基づく今後の進展の可
能性が概観され、位相差電子顕微鏡が威力を発揮してき
た氷包埋した生物試料に関する研究発表が続いた。膜タン
パク質の単粒子解析や、細胞の微細構造を丸ごと観察
した研究例とともに、高圧凍結した組織から作製した凍

結切片を観察するという意欲的な試みも紹介された。ま
た今後位相差電子顕微鏡観察への応用が期待される電子
線トモグラフィの現状と開発状況に関する発表・討論が
行われた。現在、位相差電子顕微鏡に付随するエネルギー
フィルターを活用して同一試料・同一視野の元素分析
を行い、無染色生物試料の微細構造情報と物質機能情報
を重ね合わせるという、位相差電子顕微鏡法の新たな局
面が切り拓かれつつある。この手法を用いた最新の研究
報告に続き、今後の応用の可能性、また本技法を確立す
るために解決すべき問題点など、熱心な発表・討論が展
開された。位相差電子顕微鏡が今後、生物に普遍的な多
くの未解決事項の解明に威力を発揮していくことを予感
させる意義深い研究会となった。

(1) 位相差電子顕微鏡の将来展望

永山國昭（岡崎統合バイオサイエンスセンター）

新井善博（日本電子㈱）

過去数年にわたる位相差法の開発で何が達成された
か、原理的側面と応用的側面に分けて吟味する。特に、
弱い位相物体にしか適用できないと考えられていた位相
差法が、強い位相物体（全載細胞）にも適用できることを
手がかりに、位相差原理の新しい解釈を提示する。その

上で、位相差法の発展が将来どの方向に展開し、何が可
能となるかを展望する。蛋白質、ウィルスの単粒子解析、
全載細胞の無染色解析、組織凍結切片の無染色解析につ
いて言及したい。

(2) HDC TEM によるシアノバクテリア生体高分子の観察

金子康子，仲本 準（埼玉大学教育学部）

新田浩二，Radostin Danev，永山國昭（岡崎統合バイオサイエンスセンター）

シアノバクテリアは原核の光合成生物で、真核植物細
胞の葉緑体の起源と考えられている。細胞内には光化学
反応系を有するチラコイド膜、炭酸固定酵素の集積体で
あるカルボキシソームやポリリン酸体などの構造が存在
する。*Synechococcus* sp. PCC7942 は直径が1 μ m 近い桿
菌で分裂と伸長を繰り返して増殖する。DAPI で染色す
ると DNA は2 から数個の一行に並んだスポット状に観
察され、細胞分裂直後は2 個のスポットとして存在する。
氷包埋した細胞を丸ごと HDC TEM 観察することによ

り、生きている状態に極めて近い細胞内構造や生体高分
子を観察することが可能となった。細胞内の DNA 分子
を同定することを目指し、活発に増殖する細胞にチミジ
ンアナログである BrdU を取り込ませると、DAPI 染色に
対応する位置に電子密度の高い領域が現れ、繊維状の構
造が認められた。さらに、エネルギーフィルターによる
元素像(ESI)を組み合わせる試みと今後の可能性につい
て紹介したい。

(3) Q ドットの位相差法への応用

新田浩二, 重松秀樹, 永山國昭 (岡崎統合バイオサイエンスセンター)

電子顕微鏡を用いて細胞内物質を同定するために、酵素・免疫反応を利用したラベル技術が用いられている。近年、蛍光・電子顕微鏡の両方に適用できるマーカーとして、Q ドットが用いられてきている(Giepmans et al. 2005)。Q ドットはエンドサイトーシス経路によって細胞内に取り込むことが可能であり、無固定での観察が可能である。

本研究では最も生きた状態を保持できる高压凍結・凍結超薄切片を用いて細胞内物質同定、電子顕微鏡トモグ

ラフィーによる詳細な細胞内構造観察への足がかりとして、まず Q ドットを取り込ませた無染色培養細胞の樹脂包埋切片観察、続いて凍結切片観察を行った。その結果、樹脂包埋切片を用いて蛍光・電子顕微鏡による同視野観察が可能であり、さらに凍結切片を作製でき、Q ドットと考えられる粒状の構造を観察できた。

位相差法により生体に近い状態の詳細な細胞内構造観察が可能となり、同時に分子局在の新しい知見が期待できる。

(4) TRPV4の単粒子解析

重松秀樹, 曾我部隆彰, 永山國昭, 富永真琴 (岡崎統合バイオサイエンスセンター)

Transient Receptor Potentia l(TRP) は、受容体活性化 Ca^{2+} チャネルである。構造的特徴としては、六回の膜貫通領域を持つこと、他のチャネルとの構造比較から四量体を形成することが提唱されている。今回、位相差電子顕微鏡の膜蛋白質機能構造解析への展開として、ratTRPV4 の組み換え発現系の構築と界面活性剤可溶化状態での単粒子解析に取り組んだ。発現系としては Baculo virus を用いた昆虫細胞発現系を使い、二段階のク

ロマトグラフィにより単一蛋白質として精製した。生化学的な手法から多量体形成が示唆されており、ネガティブ染色像からも直径 10 nm 程度の構造が確認された。単粒子解析には、氷包埋したサンプルの Zernike Phase Contrast イメージを用いた。現在四回対称性を考慮することで、初期三次元構造を得ることが出来たので是を報告する。

(5) 高精度トポグラフィ計測に基づく電子線トモグラフィ

馬場則男 (工学院大学)

電子線トモグラフィ法は直接的な 3 次元可視化や構造解析が可能のためその応用が盛んに行われている。しかし、試料作成や電子線損傷の問題を別にしても、試料傾斜角度制限による情報欠落問題 (missing wedge) が内在し、奥行き方向の分解能を劣化させ、場合によっては、極端な歪みをももたらす。我々は、これを解消するため、高精度トポグラフィ計測に基づく全く新たな再構成法を開発した。レプリカ試料から応用を開始し、最近、ネ

ガティブ染色や切片試料にその手法を発展させている。最も新たな手法では、試料内部の密度関数を、非常に多くの極微小な点の集合で近似し、これを、連続傾斜投影像の強度分布などを拘束条件に、数値演算法から求める。生体高分子のネガティブ染色試料に応用したところ、ほぼ完全に missing wedge が解消され、しかも従来の約 5 分の 1 程度の非常に少数の傾斜像から正確な再構成が実現した。

(6) 位相差/分析融合電子顕微鏡によるペルオキシゾームの構造解析

白田信光, 厚沢季美江 (藤田保健衛生大学 医学部 解剖 2・細胞生物学)

Danev Radostin, 永山國昭 (岡崎統合バイオサイエンスセンター)

杉谷正三 (テラベース株式会社)

位相差電子顕微鏡は物体が有する密度情報を高コントラストに可視化できる。細胞の無染色観察が可能となり、細胞内構造が本来有する超微構造を観察できるようになった。さらに機能に関する情報を同時に取得する新しい観察法として位相差/分析融合電顕法を試みているので、その到達状況を報告したい。

ラット肝臓組織から蔗糖密度勾配法にて peroxisome 分画を得て、急速凍結し氷包埋した。位相差電顕観察を行うと同時に、分析電顕法により銅と鉄の局在を観察した。

比較のためには、ラット肝臓組織をパラフォルムアルデヒド固定した後に樹脂包埋超薄切片について同様の観察を行った。peroxisome の matrix には鉄の、core には銅の局在が観察された。

peroxisome は特徴的な構造を有する細胞小器官で、matrix にはヘム蛋白質 catalase が局在して、core は銅蛋白質 urate oxidase の結晶であることが知られている。

peroxisome が新しい観察法の開発において、適切なモデル材料となると考えられた。

(7) ミトコンドリアゲノムの複製と転写の可視化

田中雅嗣 (東京都老人総合研究所・健康長寿ゲノム探索)

伊藤雅史・藤田泰典 (岐阜県国際バイオ研究所)

新田浩二・永山國昭 (岡崎統合バイオサイエンスセンター)

金子康子 (埼玉大学)

ミトコンドリアゲノムは母親からのみ伝えられ (maternal inheritance), 1 細胞に数千コピー存在し (multiplicity), 核ゲノムより 10-20 倍進化速度が速い (high mutational rate) などの特徴がある。我々はヒトのミトコンドリアゲノムの機能的多様性が、メタボリック症候群・糖尿病・心筋梗塞・脳梗塞などの生活習慣病に対する易罹患性に関与していることを最近明らかにした (文献 1-7)。

ヒトのミトコンドリアゲノムは 16569 塩基対からなる環状二重鎖 DNA (周長 4.3 μm) であり、37 個の遺伝子 (2 rRNA, 22 tRNA, 13 mRNA) が存在する。このうち 28 個の遺伝子 (2 rRNA, 14 tRNA, 12 mRNA) はミトコンドリア DNA (mtDNA) の重鎖 (heavy strand, H 鎖) によってコードされており、9 個の遺伝子 (8 tRNA, 1 mRNA) が軽鎖 (light strand, L 鎖) によって規定されている。mtDNA の複製と転写を制御する領域は 1122 bp の major non-coding region (塩基番号 1-576 と塩基番号 16024-16569) に存在し、H 鎖・L 鎖の転写開始点と H 鎖の複製開始点がある。

一方、L 鎖の複製開始点は塩基番号 5730-5760 にあるとされている。L 鎖は CA-rich であるのに対し、H 鎖は GT-rich である。これは、鎖に関して非対称的に変異が発生するためである (Tanaka et al. Strand asymmetry in human mitochondrial DNA mutations. Genomics 22/327-335, 1994)。最近、L 鎖の複製時に RNA が高頻度で取り込まれ、後に DNA によって置き換えられることが報告された。これが鎖非対称的な変異発生に関連する可能性がある。

我々は、位相差電子顕微鏡を用いてミトコンドリアゲノムの複製と転写を可視化する目的で、核の thymidine kinase を欠損した骨肉腫細胞 143B-TK (-) に由来する細胞株を用いている。ミトコンドリア内には別の thymidine kinase が存在するので、培地に添加した BrdU, IdU, FdU は選択的に mtDNA に取り込まれる。用いた細胞株は 3 種である。143B-TK (-) を低濃度の ethidium bromide に長期暴露し、mtDNA を枯渇させた ρ^0 細胞、 ρ^0 細胞に MELAS (ミトコンドリア脳筋症) 患者に由来する 3243A>G 変異

を有するミトコンドリアを導入した 2SD 細胞, 同じ患者に由来するが 3243A>G 変異のないミトコンドリアを有する 2SA 細胞を実験に使用する。BrdU, IdU, FdU を 100 μ M の濃度で培地に添加し 48 時間培養し, PIERCE Mitochondria Isolation Kit を用いてミトコンドリアを単離し, 位相差電子顕微鏡で観察する。理論的には, 元素イメージング法 (ESI) は FdU を取り込んだ mtDNA の観察に適し, 位相差法は IdU を取り込んだ mtDNA の観察に適している。これらにより, mtDNA 複製の局在部位とミトコンドリア内膜・外膜との関係を明らかにできるものと期待される。

- [1] Enrichment of longevity phenotype in mtDNA haplogroups D4b2b, D4a, and D5 in the Japanese population. Alexe G, Fuku N, Bilal E, Ueno H, Nishigaki Y, Fujita Y, Ito M, Arai Y, Hirose N, Bhanot G, Tanaka M. *Hum Genet* in press: 2007
- [2] Mitochondrial haplogroup N9a confers resistance against type 2 diabetes in Asians. Fuku N, Park KS, Yamada Y, Nishigaki Y, Cho YM, Matsuo H, Segawa T, Watanabe S, Kato K, Yokoi K, Yamaguchi S, Nozawa Y, Lee HK, Tanaka M. *Am J Hum Genet* in press: 2007
- [3] Identification of mitochondrial DNA polymorphisms

that alter mitochondrial matrix pH and intracellular calcium dynamics. Kazuno AA, Munakata K, Nagai T, Shimozono S, Tanaka M, Yoneda M, Kato N, Miyawaki A, Kato T. *PLoS Genet* 2: e128, 2006

- [4] Mitochondrial haplogroup N9b is protective against myocardial infarction in Japanese males. Nishigaki Y, Yamada Y, Fuku N, Matsuo H, Segawa T, Watanabe S, Kato K, Yokoi K, Yamaguchi S, Nozawa Y, Tanaka M. *Hum Genet*: 2007
- [5] Mitochondrial haplogroup A is a genetic risk factor for atherothrombotic cerebral infarction in Japanese females. Nishigaki Y, Yamada Y, Fuku N, Matsuo H, Segawa T, Watanabe S, Kato K, Yokoi K, Yamaguchi S, Nozawa Y, Tanaka M. *Mitochondrion*: 2007
- [6] Women with mitochondrial haplogroup N9a are protected against metabolic syndrome. Tanaka M, Fuku N, Nishigaki Y, Matsuo H, Segawa T, Watanabe S, Kato K, Yokoi K, Yamaguchi S, Nozawa Y, Yamada Y. *Diabetes* in press: 2007
- [7] Mitochondrial DNA and cancer epidemiology. Verma M, Naviaux R, Tanaka M, Kumar D, Franceschi C, Singh K. *Cancer Res* in press: 2007

(8) バクテリアに見いだされた細胞骨格タンパク質

仁木 宏典 (国立遺伝学研究所系統生物研究センター原核生物遺伝研究室)

タンパク質の蛍光標識方法, いわゆる GFP 標識により生きた細胞内でのタンパク質の局在が観察可能になった。さらに, 蛍光顕微鏡画像の処理技術により, 原核細胞においても細胞骨格系タンパク質が, 存在していることが次々と分かって来ている。まず細胞分裂の収縮環として知られていた FtsZ タンパク質がバクテリアチューブリンであること, さらに桿状の細胞形態形成に必須である MreB タンパク質がアクチンであることが明らかに

された。これらタンパク質は細胞内で重合し, 繊維状の構造体を形成し, さらに螺旋状になる。これらの発見以降, 螺旋状に分布するバクテリアタンパク質が今も新たに見つかっている。F プラスミドの分配のための, モータータンパク質である SopA タンパク質も螺旋状構造を形成する。このようなタンパク質の構造とその動態変化をさらに詳細に見ることの意義について紹介したい。

19. 第3回唾液腺機能からの生理機能研究・その戦略的展開
(第3回ニールスステンセン記念国際唾液腺シンポジウム,
第36回生理研国際シンポジウムと合同開催)

2006年10月20日－10月23日

代表・世話人：村上政隆（自然科学研究機構生理学研究所統合バイオサイエンスセンター）

所内対応者：同上

O. Opening Lecture

(0) Stensen and early history of glands and exocrine secretion.

Alessandro Riva (Cagliari University)

A. Diagnostics using saliva and Proteomics of saliva.

(1) Clinical examination using saliva: Influence of fluid secretion on the concentration of substrate in saliva:

How to overcome the problem for *in vivo* application.

Masataka Murakami (National Institute for Physiological Sciences, NINS), Naoki Shinozuka (SapporoIDL)

(2) Extraoral functions of salivary proteins.

Anders Bennick (Toronto University)

(3) Human salivary proteins- A fascinating complex of polymorphic and polyfunctional proteins.

Josie A Beeley (Glasgow University)

P1: A proteomic study of saliva from celiac patients.

Tiziana Cabras (Cagliari University)

P2: Salivary acidic proline-rich proteins in preterm newborns.

Rosanna Inzitari (Catholic University of Rome)

P3: Oxidative modification of serum albumin via paracellular route of rat submandibular gland.

Tomoya Hayashi (Meiji University of Oriental Medicine)

P4: A preliminary study on salivary protein expression in diabetic patients.

Marco Piludu (Cagliari University)

P5: Clinical examination using saliva: an *in vivo* application to human adults.

Naoki Shinozuka (Sapporo IDL)

(4) How the technique works and how the researcher can take a profit from the MS strategies.

Massimo Castagnola (Catholic University of Rome)

(5) Salivary glands and saliva composition: a proteomic approach.

Francisco ML Amado (Aveiro University)

(6) Salivary peptides as potential substrates of type2 transglutaminase.

Irene Messana (Cagliari University)

(7) Pre-secretory Post-translational modifications common to different families of human salivary proteins.

Massimo Castagnola (Catholic University of Rome)

(8) Tissue kallikrein mK13 is a candidate of the processing enzyme for pro-IL-1b in the mouse submandibular gland.

Chenjua Yao (Tokushima University Graduate School)

P6: Protein content comparison of mouse submandibular and parotid salivary glands.

Rui Vitorino (Aveiro University)

P7: Characterization of different proline-rich peptides from pig parotid glands.

Chiara Fanali (Catholic University of Rome)

P8: Tyrosine sulfation of Histatin 1. A post-translational modification specific of submandibular glands.

Joanna Anton Monteiro, Massimo Castagnola (Catholic University of Rome)

P9: Different roles of salivary mucins in viscosity and spinnbarkeit of human saliva.

Hiroko Inoue (Kyushu Dental College)

P10: MALDI based Mass Imaging revealed abnormal distribution of phospholipids in cancer.

Takahiro Hayasaka, Mitsutoshi Setoh (Okazaki Institute for Integrative Bioscience, NINS)

B. Therapeutics by modulation of salivary gland.

(9) Clinical applications of gene transfer to salivary glands.

Bruce Baum (National Institute of Dental and Craniofacial Research, NIH, DHHS)

(10) Morphogenesis and cleft formation of salivary gland epithelia: Exploration of new functional regulators.

Takayoshi Sakai (Osaka University Graduate School of Dentistry)

P11: A novel role of RbAp48 for tissue-specific apoptosis in the salivary glands depending on estrogen deficiency.

Naozumi Ishimaru (Institute of Health Biosciences, Tokushima University Graduate School)

P12: Ionomycin inhibit the soluble protein transport between ER and Golgi.

Masatake Asano (Nihon University School of Dentistry)

P13: Investigation on the influences of Chinese herbs on salivary secretion in rat submandibular gland.

Wei Muxin (Nanjing Medical University)

P14: Possible involvement of clusterin in the regeneration process of rat submandibular gland.

Hideaki Kagami (Institute of Medical Sciences, University of Tokyo)

P15: Effect of Dan Di Qiong Yu granule on salivary gland of Sjogren syndrome mice.

Wei Muxin (Nanjing Medical University)

C. Neural control of salivary secretion in response to environmental change.

(11) Pilocarpine induces salivary secretion and thirst in rats.

Kiyotoshi Inenaga (Kyushu Dental College)

(12) Electrophysiological analysis of the afferent activity from the submandibular salivary gland in the rat.

Ryuuji Matsuo (Okayama University Graduate School of Medicine and Dentistry and Pharmaceutical Sciences)

(13) Effects of autonomic denervation and administration of SNI-2011 on the expression of AQPs in the rat salivary gland.

Xuefei Li (Institute of Health Biosciences, Tokushima University Graduate School)

(14) Neural- and hormonal-induced protein synthesis and mitotic activity and the dependence on NO-generation.

Jörgen Ekström (Göteborg University)

P16: Relationship of chewing-stimulated whole saliva flow rate and salivary gland size in humans.

Kentaro Ono (Kyushu Dental College)

P17: Cardiac-related activity in superior salivatory nucleus neurons in anaesthetized rats.

Ken'ichi Ishizuka (Nippon Dental University School of Life Dentistry at Niigata)

(15) Electrophysiological study on the descending excitatory synaptic inputs to the superior salivatory nucleus in the rat.

Yoshihiro Mitoh (Okayama University Graduate School of Medicine and Dentistry and Pharmaceutical Sciences)

(16) Functions, regulation and mechanisms of action of SUMOylation in salivary cells.

David K Ann (Norris Cancer Center, University of Southern California)

P18: Electrophysiological study of the inhibitory inputs from the forebrain and brainstem to the superior salivatory nucleus in rats.

Akihito Fujii (Okayama University Graduate School of Medicine and Dentistry and Pharmaceutical Sciences)

P19: Role of the feeding center for submandibular salivary secretion during feeding behavior in the rat.

Miyuki Kobashi (Okayama University Graduate School of Medicine and Dentistry and Pharmaceutical Sciences)

P20: The facial nerve and its influence on the parotid gland.

Nina Khosravani (Göteborg University)

P21: Melatonin-evoked protein secretion from the rat parotid gland *in vivo*.

Hülay Çevik Aras (Göteborg University)

P22: Induction of general anesthesia with propofol increases salivary flow.

Hajime Ishibashi (Nihon University School of Dentistry at Matsudo)

P23: Salivary secretion by MR3-KO mice.

Minoru Matsui (Institute of Medical Sciences, University of Tokyo)

D. Structural differentiation and functional expression of salivary gland.

(17) Regulation of epithelial tube formation in developing mouse submandibular gland.

Yohki Hieda (Osaka University Graduate School of Sciences)

(18) FGF10 regulates branching morphogenesis during salivary gland development.

Matthew Hoffman (National Institute of Dental and Craniofacial Research, NIH, DHHS)

(19) Involvement of a subtilisin-like proprotein convertase, PACE4, in branching morphogenesis and AQP5 expression in the rat embryonic submandibular gland.

Tetsuya Akamatsu (Institute of Health Biosciences, Tokushima University Graduate School)

P24: Freeze fracture studies of tight junctions in mouse salivary glands and cultured salivary cell lines.

Kenichiro Kikuchi (Nippon Dental University School of Life Dentistry at Tokyo)

P25: Shared or non-overlapping intracellular signaling pathways activated by EGFR or FGFR differentially regulate branching morphogenesis in fetal mouse submandibular glands.

Masanori Kashimata (Asahi University School of Dentistry)

P26: Cellular aspect of salivary gland branching morphogenesis.

Yuichi Kadoya (Kitasato University School of Medicine)

P27: The expression of cellular markers of duct/acini and side population dynamics in the duct-ligated mouse submandibular gland.

Nunuk Purwanti (Institute of Health Biosciences, Tokushima University Graduate School)

P28: Role of PDGF in salivary gland morphogenesis.

Shinya Yamamoto, Satoshi Fukumoto (Kyushu University Faculty of Dental Science)

P29: The change of the subcellular localization of CD38 in the rat sublingual gland during saliva secretion.

Wataru Masuda (Kyushu Dental College)

(20) Submandibular and sublingual glands in Nkx2-3 mutant mice.

Arthur Hand (University of Connecticut Health Center)

(21) A novel mouse protein differentially regulated by androgens in the submandibular and lacrimal glands.

Shoichi Iseki (Kanazawa University Graduate School of Medical Science)

(22) Identification and therapeutic potential of salivary gland side population cells.

Kenji Mishima (Tsurumi University School of Dental Medicine)

P30: Heat shock protein 27kDa (Hsp27) regulates differentiation and regeneration of acinar cells of the rat submandibular gland.

Osamu Amano (Meikai University School of Dentistry)

P31: Temporary accumulation of glycogen in the epithelial cells during developmental differentiation of the mouse submandibular gland revealed by the high-pressure freezing/freeze substitution-TEM.

Sachiko Matsuura (Matsumoto Dental University)

P32: Effects of actin-related drugs on exocytosis in parotid acinar cells.

Miwako Matsuki (Nihon University School of Dentistry at Matsudo)

P33: Control of paracellular transport and its morphological evidence in perfused rat submandibular gland.

Sadamitsu Hashimoto (Tokyo Dental College)

P34: Localization of G proteins in the main excretory duct of the rat submandibular gland with special reference to the MED tuft cell and the taste bud type II cell.

Atsuko Sato (Fukuoka Dental College)

E. Functional morphology of secretory granules

(23) Ultrastructure of the ovine parotid gland.

Bernard Tandler (Case Western Reserve University School of Medicine)

(24) A morphometric study by HRSEM of the secretory responses of human salivary glands stimulated *in vitro* by various secretagogues.

Alessandro Riva (Cagliari Univ)

(25) Expression and function of aquaporin-6 in the rat salivary glands.

Hiroshi Sugiyama, Miwako Matsuki (Nihon University School of Dentistry at Matsudo)

(26) Analysis of secretory dynamics in mouse parotid acinar cells reveals multiple pathways for secretory granule fusion.

David Giovannucci (University of Toledo Health Science Center)

P35: Relation of proteoglycan to sorting amylase into secretory granules/vesicles.

Tomoko Nashida (Nippon Dental University School of Life Dentistry at Niigata)

P36: Activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP in the rat parotid acinar cells.

Hiromi Shimomura (Nippon Dental University School of Life Dentistry at Niigata)

P37: Roles of Rab27 and its effectors in isoproterenol-induced amylase release from rat parotid acinar cells.

Akane Imai (Nippon Dental University School of Life Dentistry at Niigata)

P38: Subtype-specific regulation of inositol (1,4,5)- trisphosphate receptors by protein kinase A.

Matthew J Betzenhauser (Rochester University)

P39: Exocytosis and fluid secretion in exocrine glands studied by two-photon microscopy.

Tomomi Nemoto (National Institute for Physiological Sciences, NINS)

P40: Multi-photon imaging of cellular heterogeneity in the sensitivity of Ca^{2+} responses in rat parotid ducts.

Akiko Shitara (Health Sciences University of Hokkaido School of Dentistry)

P41: Morphological changes induced by histatins in *Candida albicans*: A microscopic and submicroscopic comparison.

Raffaella Isola (Cagliari University)

P42: Sequential appearance of Golgi proteins during *de novo* formation of the Golgi apparatus in parotid acinar cell.

Hideaki Tamaki (Kitasato University School of Medicine)

P43: Comparison of cluster formation of GFP-IP3 receptors in HSY, a human salivary cell line, and COS-7 cells.

Yosuke Tojyo (Health Sciences University of Hokkaido School of Dentistry)

P44: Possible Involvement of Myosin-ATPase in the spatio-temporal regulation of exocytosis in adrenal chromaffin cells.

Konosuke Kumakura (Life Science Institute, Sophia University)

F. Control for fluid/electrolyte transport via trans-/paracellular routes.

(27) The ion and fluid secretion mechanism.

James Melvin (Rochester University)

(28) Structural and functional significance of the dimerization of the secretory Na-K-2Cl cotransporter (NKCC1).

R James Turner (National Institute of Dental and Craniofacial Research, NIH)

(29) Localization and function of CLCA in rat submandibular glands.

Jun Yamazaki (Fukuoka Dental College)

P45: Bond graph expression on an epithelial transport system.

Yusuke Imai (Osaka Medical College)

P46: A modular approach to computational modelling of epithelial electrolyte transport.

Martin C Steward (Manchester University Faculty of Life Sciences)

P47: Bicarbonate secretion by cultured salivary gland cells.

Varga Gabor (Hungarian Academy of Sciences-Semmelweis University Joint Research Organization)

P48: Regulation of Cl secretion by muscarinic cholinergic and adrenergic stimulation in acinar cells of rat salivary gland.

Chikara Hirono (Hiroshima University Graduate School of Biomedical Sciences)

P49: Voltage-dependent transient activity of Na⁺/H⁺ exchanger.

Yoshiro Sohma (Osaka Medical College)

(30) A feedback control model of fluid transport in salivary gland.

A E Hill (Physiological Laboratory Cambridge University)

(31) Evidence for interaction between transcellular and paracellular water transport pathways: signaling between

Aquaporin-5 and the tight junction complex in mouse salivary glands.

Anil G Menon (Cincinnati University)

(32) Change of claudin expression in primary cultured parotid acinar cells.

Junko Yoshigaki (Nihon University School of Dentistry at Matsudo)

P50: Impaired aquaporin-5 distribution in salivary glands from a Sjögren's syndrome mouse model.

Christine Delporte (Free University of Brussels)

P51: Molecular and cellular analyses of mutant AQP5 which occurred naturally in Sprague-Dawley rats.

Mileva R Karabasil (Institute of Health Biosciences, Tokushima University Graduate School)

P52: Regulation of intercellular junctions in polarized salivary cells.

Retsu Mitsui (Nihon University School of Dentistry at Matsudo)

P53: The use of gene disruptions and isolated, perfused glands to examine mouse submandibular function.

Tetsuji Nakamoto (Rochester University Medical Center)

P54: Water permeability as measured by NMR in salivary gland cells.

Yoshiteru Seo (Dokkyo University School of Medicine)

G. Stimulus-Secretion Coupling for starting electrolyte transport

(33) Calcium signaling mechanisms in salivary gland cells and other epithelial cells.

James W Putney Jr (National Institute of Environmental Health Sciences)

(34) Monitoring IP₃ and Ca²⁺ dynamics in salivary and other cell lines.

Akihiko Tanimura (Health Sciences University of Hokkaido School of Dentistry)

(35) Intracellular calcium signaling: mechanistic insight from analysis of distinct signals in parotid and pancreas.

David I Yule (Rochester University School of Medicine and Dentistry)

(36) Regulation of the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase in parotid acinar cells.

Jason Bruce (Manchester University Faculty of Life Sciences)

P55: Muscarinic receptor mobilization of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase in epithelial cells: Role of the NHERF2 PDZ scaffold.

Philip Poronnik (Queensland University School of Biomedical Sciences and Pharmacy)

P56: Regulation of KCNQ2/3 by the ubiquitin ligase Ned4-2.

Jenny Ekberg (Queensland University School of Biomedical Sciences and Pharmacy)

P57: Secretagogues stimulate phosphorylation of MARCKS in parotid acinar cell.

Keitaro Satoh (Nihon University School of Dentistry at Matsudo)

(37) Regulation of TRPC channels by STIM1.

Shumuel Muallem (University of Texas Southwestern Medical Center)

(38) Shank2 as a key regulator of epithelial transport in apical membrane.

Min Goo Lee (Yonsei University College of Medicine)

(39) The regulation of the epithelial Na^{+} channels by UTP.

David I Cook (Sydney University School of Medical Sciences)

(40) Signaling pathways regulating Na^{+} transport in salivary ducts.

Anuwat Dinodom (Sydney University School of Medical Sciences)

P58: Ca^{2+} influx induced by ionomycin under a high $[\text{K}^{+}]_o$ in rat submandibular acinar cells.

Hideyo Yoshida (Osaka Medical College)

P59: Regulation of the epithelial sodium channel by caveolin.

Il-Ha Lee (Sydney University School of Medical Sciences)

P60: The role of TRP channel in the salivary gland fluid secretion.

Xibao Liu (National Institute of Dental and Craniofacial Research, NIH)

【参加者名】

14ヶ国から50名、国内から70名の唾液腺分野の第一線研究者が集い講演40題、ポスター60題が発表された。参加者のうち発表者を演題とともに上に列挙した。その他参加した共同研究者および参加者を次に列挙する。山科正平（北里大学医学部）、下野正基（東京歯科大学）、細井和雄（徳島大学大学院）、Ding Wei（南京医科大学）、Francisco Loy（Cagliari University）、Bruria Shachar-Hill（Cambridge University）、中西康夫（大阪大学）、池田理恵

（日本歯科大学）、小山典子（朝日大学）、大野健司（朝日大学）、加藤靖浩（東京歯科大学）、林美樹夫（関西医科大学）、金剛寛泰（広島大学大学院）、桜井健（日本大学松戸歯学部）、藤原 優（札幌 IDL）、伊藤禎二（札幌 IDL）、新聞秀一（岡崎統合バイオサイエンスセンター）、杉浦悠毅（岡崎統合バイオサイエンスセンター）、大橋正人（岡崎統合バイオサイエンスセンター）、富永真琴（岡崎統合バイオサイエンスセンター）

【概要】

本研究会は、日本学術振興会平成18年国際学術集会助成事業として、第3回ニールス・ステンセン記念国際唾液腺シンポジウムおよび36回生理研コンファレンスと合同で10月20日から23日の会期で自然科学研究機構岡崎コンファレンスセンターにて開催された。

本会は対象を唾液腺に限定し、形態学、生理学、生化学、薬理学、病理学、細胞生理学の研究者達の成果のすりあわせを同じテーブルで行い、新しい概念を模索し臨床応用へ連結する芽を育むことを目的とした。アブストラクト集は別途作成し会議中に配布した。また会議後拡

大アブストラクトを作成し CD-ROM に収納，ホームページ <http://www.nips.ac.jp/~masataka/stensen/stensen.html> から閲覧可能とした。本年報ではシンポジウム/研究会の各セッションのサマリーを以下に記載した。

生理学研究所は 2007 年創立 30 周年を迎え，長く岡崎市民には大きな支援を受けてきた。本会ではその恩返し

と基礎研究を市民に理解していただくため，市民公開講座と市民公開演奏会を開催し，歴史的な学問の基盤と国際的な広がりを感じていただいた。会場の岡崎コンファレンスホールにシンポジウム参加者と岡崎市民，岡崎 3 研究所の職員，高校生ら約 200 名が参加し，講演とリユートの演奏を味わった。

A. 唾液による化学診断と分泌蛋白のプロテオミクス

唾液を臨床データとして取扱うための重要な合意として，唾液分泌速度と唾液中の基質濃度の関係図を作成し，この相関から評価すべきことが議論された。分泌蛋白/ペプチドの分析がこの 5 年間のマスマスプロスコピーの技術革新で本格的に稼働し始めた。分泌蛋白は細胞内

分泌顆粒内で貯蔵され，細胞から分泌され，導管を通る間にも修飾をうけ，さらに口腔内でも修飾を受けることが議論され，数多くのフラグメントについても将来の研究課題として残された。

B. 唾液機能を付与するための遺伝子治療

喉頭がん，咽頭がんなどの放射線治療により唾液腺の腺房など分泌終末の機能が失われる。腺房の機能を導管に肩代わりさせ，水分分泌機能を加えるプロジェクトが

本年アメリカ公衆衛生院 (NIH) で開始された。基礎研究が具体的な臨床応用に発展した希有の例であり，聴衆を大きく勇気づけた。

C. 環境変化に応じた唾液分泌調節の神経機構

従来あまり問題にされていなかった唾液腺からの求心性信号の存在が確定され，これがどのように中枢に作用し，唾液分泌を統御するか次に探索することとなった。唾液減少症に用いられるピロカルピンが脳室周囲系を刺

激し「口渇」を誘導することが示された。このため，体液量調節の観点から，本薬の唾液分泌作用との関連が複雑になることが指摘され，本薬を含む研究の問題点が明らかになった。

D. 唾液腺構造分化と機能発現

唾液腺が発達段階で枝をはり，管腔を形成する。唾液腺での幹細胞を探索し，これを唾液腺機能不全患者に自己移植し機能を回復させてゆくことは唾液腺分野の組織

工学者の目標である。本会では幹細胞の探索の成果，接着分子の細胞内骨格の制御が討議された。

E. 分泌顆粒の機能形態

分泌顆粒が均一ではなく下部構造をもつことは既に報

告されてきたが，今回，グリコーゲンの沈着が幼少期の

唾液腺分泌顆粒の傍らに発見され、顆粒の成熟との関係が注目された。また顆粒のアクアポリン 6 は陰イオン輸

送を介し分泌顆粒内物質の濃縮を制御することが議論された。

F. 経/傍細胞輸送調節

細胞からの水分分泌と細胞の間を通過する傍細胞輸送による水分分泌について、アクアポリン 5 を浸透圧受容体としてその信号により傍細胞経路が開閉する説が初め

て国際学会で発表され高く評価され、具体的な実験プランも直接研究者間で検討された。

G. 分泌開始を誘導する細胞内信号系

Ca 信号系について 12 年前に岡崎で開催された唾液腺ワークショップからの研究史が総括され、細胞内 Ca ストアの実態として連結した小胞体のアイデアが提出、今

後細胞内信号系の実態を微細形態学で観測する手法が話し合われた。

20. バイオ分子センサー研究会

2006 年 6 月 26 日－6 月 27 日

代表・世話人：富永真琴（岡崎統合バイオサイエンスセンター）

所内対応者：岡村康司（岡崎統合バイオサイエンスセンター）

(1) 温度センサーTRP チャネルの構造と機能

富永真琴, 柴崎貢志, 富樫和也, 稲田仁, 曾我部隆彰, Sravan Mandadi, 東智広, 村山奈美枝, 富永知子
(岡崎統合バイオサイエンスセンター・細胞生理研究部門)

(2) 膜電位依存性酵素 Ci-VSP の酵素活性

岩崎広英, 村田喜理, 岡村康司 (岡崎統合バイオサイエンスセンター・神経分化研究部門)

(3) 電位センサードメイン蛋白の多様性とメカニズム

岡村康司, 村田喜理, 岩崎広英, 佐々木真理, Israil Hossain, 黒川竜紀, 高木正浩
(岡崎統合バイオサイエンスセンター・神経分化研究部門)

(4) 一人三役の光センサー蛋白, 光活性化アデニル酸シクラーゼ (PAC) の分子内ドメイン相互作用による
光活性化機構

渡辺正勝 (総合研究大学院大学・先端科学研究科)

(5) コレステロール代謝センサーLXR による細胞増殖の制御

榎島誠, 川名克芳 (日本大学医学部・生化学)

(6) 酸感受性アニオンチャネルとその酸誘導性細胞死における役割

清水貴浩, 王海燕, 岡田泰伸 (生理学研究所・機能協同研究部門)

(7) Glutamate Release via Stress-sensor Anion Channels from Mouse Astrocytes

Hong-tao Liu, Hana Inoue, Ravshan Z. Sabirov and Yasunobu Okada
(Department of Cell Physiology, National Institute for Physiological Sciences)

(8) Na^+/H^+ 交換輸送体の調節因子 CHP の構造と pH センシング機構

若林繁夫 (国立循環器病センター研究所・循環分子生理部)

(9) 後根神経節細胞の P2Y_2 受容体と機械刺激応答

小泉修一 (国立医薬品食品衛生研究所・薬理部)

津田 誠, 井上和秀 (九州大学大学院・薬学研究院)

(10) バゾプレッシン分泌ニューロンへのシナプス入力：アンギオテンシン II およびカンナビノイドの効果

上田陽一 (産業医科大学医学部・第1生理学)

(11) 脳内 Na^+ センサー Na_x がグリアのグルコース代謝を調節する

檜山武史, 清水秀忠, 渡辺英治, 長倉彩乃, 野田昌晴 (基礎生物学研究所・統合神経生物学研究部門)

(12) 匂いとフェロモンのセンサー

東原和成 (東京大学大学院・新領域創成科学研究科)

(13) 発達・障害時における細胞内 Cl^- 調節機構の変化と GABA 応答のモダルシフト

鍋倉淳一, 渡部美穂, 和気弘明 (生理学研究所・生体恒常機能発達機構研究部門)

(14) センサー機能のモダルシフトによる触覚受容の病的変化のメカニズム

田邊 勉 (東京医科歯科大学大学院・認知行動医学系・細胞薬理学分野)

【参加者名】

榎島 誠 (日本大学・医), 宇野 茂之 (日本大学・医), 学院・医歯), 小泉 修一 (国立医薬品食品衛生研究所・
松縄 学 (日本大学・医), 田邊 勉 (東京医科歯科大学大 薬理), 篠崎 陽一 (NTT 物性科学基礎研究所), 東原 和

成 (東京大学大学院・新領域創成科学), 中川 龍郎 (東京大学大学院・新領域創成科学), 若林 繁夫 (国立循環器病センター研究所・循環分子生理), 西谷 友重 (国立循環器病センター研究所・循環分子生理), 上田 陽一 (産業医科大学・医), 渡辺 正勝 (総研大), 伊関 峰生 (総研大) 松永 茂 (総研大), 鈴木 武士 (総研大) 野田 昌晴 (基生研・統合神経生物) 檜山 武史 (基生研・統合神経生物) 清水 秀忠 (基生研・統合神経生物), 張 藍帆 (基生研・統合神経生物), 長倉 彩乃 (基生研・統合神経生物), 渡辺 英治 (基生研・統合神経生物), 山田 美鈴 (基生研・統合神経生物), 鍋倉 淳一 (生理研・生体恒常機能発達機構), 渡部 美穂 (生理研・生体恒常機能発達機構), 岡田泰伸 (生理研・機能協関), 清水 貴浩 (生理研・機能協関), 高橋 信之 (生理研・機能協関), 井上 華 (生理研・機能協関), Liu Hongtao (生理研・機能協関), 佐藤かお理 (生理研・機能協関), Toychiev (生理研・機能協関), 沼田朋大 (生理研・機能協関), 李海雄 (生理研・機能協関), Elbert Lee (生理研・機能協関), 岡村 康

司 (岡崎統合バイオ・神経分化), 大河内善史 (生理研・神経分化), 岩崎 広英 (岡崎統合バイオ・神経分化), 久木田 文夫 (岡崎統合バイオ・神経分化), 村田 喜理 (岡崎統合バイオ・神経分化), 西野 敦雄 (岡崎統合バイオ・神経分化), 佐々木 真理 (岡崎統合バイオ・神経分化), 黒川 竜紀 (岡崎統合バイオ・神経分化), Thomas McCormack (岡崎統合バイオ・神経分化), Israil Hossain (岡崎統合バイオ・神経分化), 斉藤 恵亮 (岡崎統合バイオ・神経分化), 富永 真琴 (岡崎統合バイオ・細胞生理), 福見一富永知子 (岡崎統合バイオ・細胞生理), 柴崎 貢志 (岡崎統合バイオ・細胞生理), 稲田 仁 (岡崎統合バイオ・細胞生理), 曾我部 隆彰 (岡崎統合バイオ・細胞生理), Mandadi Sravan (岡崎統合バイオ・細胞生理), 富樫 和也 (岡崎統合バイオ・細胞生理), 東 智広 (岡崎統合バイオ・細胞生理), 村山 奈美枝 (岡崎統合バイオ・細胞生理), 古山富士弥 (名古屋市立大・医学部), 松下 真一 (生理研・神経機能素子), 高鶴裕介 (生理研・生体恒常), 和気弘明 (生理研・生体恒常)

【概要】

生体内の全ての細胞は, 細胞内外環境の大きな変化の中でその環境情報を他のシグナルに変換し, 細胞内や周囲の細胞に伝達することによって環境変化に対応しながら生存している。最近, 形質膜の代謝型受容体のみならず, チャンネルやトランスポーターなどの膜輸送蛋白質も, さらには細胞質内タンパク質, 核蛋白質も情報センサーの働きをしていることが明らかになりつつある。これらのバイオ分子センサータンパク質は種々の化学的, 物理的, 生理的情報を受容して他のシグナルに速やかに変換する能力を持っている。バイオ分子センサータンパク質の構造と機能やそのシグナル変換機序を解明していくことは, 生命科学の本質である「細胞の生存」を解明するうえで極めて重要である。こうした趣旨のもとに過去4年間バイオ分子センサー研究会が行われたが, バイオ分子センサーによって感知された細胞外環境情報が細胞生

存応答をもたらすためにいかに細胞内で情報交換・情報統合されているか, また, そのバイオセンサー分子がいかに変化 (モーダルシフト) しながら細胞外環境情報をダイナミックに感知して環境変化に適応しているか, という視点が欠けていた。そこで, バイオ分子センサータンパク質の構造・機能協関, センサー間相互作用に加えて, センサータンパク質のモーダルシフトにも踏み込んだ新たな研究の発掘・進展を目指してこの研究会を開催した。70名余りのバイオ分子センサー研究者が一同に会し, 14題の演題発表があった。対象のセンサーは, 電位センサー, 温度センサー, 機械刺激センサー, 脂質センサー, Na^+ センサー, Ca^{2+} センサー, H^+ センサーなど多岐にわたった。活発な討論, 情報交換がなされ, 「バイオ分子センサー」研究の発展に有益な会であった。

(1) 温度センサーTRP チャネルの構造と機能

富永真琴, 柴崎貢志, 富樫和也, 稲田仁, 曾我部隆彰, Sravan Mandadi, 東智広, 村山奈美枝, 富永知子

(岡崎統合バイオサイエンスセンター・細胞生理研究部門)

1989年にショウジョウバエで最初の遺伝子がクローニングされたTRPイオンチャネルスーパーファミリーは、現在では7サブファミリーを擁し、哺乳類でも30を超えるイオンチャネルが明らかになっている。TRPチャネルは種々の化学物質刺激のみならず、温度刺激、機械刺激、浸透圧刺激等のセンサーとして機能するが、温度センサーTRPチャネルは1997年に遺伝子クローニングされたカプサイシン受容体TRPV1が熱センサーであることが明らかになって以来、これまでに9つの温度センサーが明らかになっている。温度センサーTRPチャネルは感覚神経のみならず多くの細胞に発現して温度情報を感知していることが明らかになってきた。また、オルソログと考えられる温度センサーTRPチャネルが種によ

って異なるセンシング温度閾値を有していることが明らかになっており、環境温度に適応する形で生物がセンシング機構を変化(モーダルシフト)させてきたと理解することができる。研究室では、これまで、TRPV1の温度センシング機構が環境によって変化(モーダルシフト)するメカニズムを研究してきたが、最近、TRPV4が海馬に強く発現して、深部体温によって常に活性化され脱分極から海馬神経細胞細胞の興奮性を規定していることを見いだした。また、新たな温度センサーを探索する過程で、 β -NAD⁺やADP-riboseによって活性化されることが報告されていたTRPM2が温度によって活性化すること、cyclic ADP-riboseの作用ターゲットとして機能して膵臓でのインスリン分泌に関わることを発見した。

(2) 膜電位依存性酵素Ci-VSPの酵素活性

岩崎広英, 村田喜理, 岡村康司(岡崎統合バイオサイエンスセンター・神経分化研究部門)

Ci-VSP(*Ciona intestinalis* voltage-sensor containing phosphatase)は電位依存性チャネルの電位センサーに相同性を有する膜貫通領域構造と、イノシトールリン脂質のホスファターゼであるPTENと高い相同性を有する細胞質領域から成る分子である。PTENはホスファチジルイノシトール3,4,5-三リン酸(PIP₃)の3位のリン酸基を脱リン酸化してホスファチジルイノシトール4,5-二リン酸(PIP₂)を生成する酵素活性を有する。そこでCi-VSPの細胞質領域をグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)融合蛋白質として大腸菌に発現させ、精製してin vitroにて酵素活性を測定したところ、Ci-VSPもPTENと同様のホスファターゼ活性を有することが明らかになった。さらに、PIP₂濃度依存的にチャネル活性が増大する各種Kチャネルをアフリカツメガエル卵にCi-VSPと共発現させて膜電位を変化させたところ、過分極時にPIP₂濃度が増大し、脱分極時にPIP₂濃度が減少することが明らかと

なった。しかし、PIP₃は平常時においてはイノシトールリン脂質の非常にマイナーな構成成分であり、膜電位変化によりPIP₃が脱リン酸化されてPIP₂が生成されたためと仮定すると、PIP₂濃度が膜電位依存的に大きく変動することは説明がつかない。実際、PIP₃またはPIP₂にそれぞれ特異的に結合するPH(Pleckstrin Homology)ドメインを結合させたGFPをCi-VSPに発現させ、膜電位変化に伴う蛍光変化を測定したところ、PIP₂濃度は電気生理学的解析と同様に過分極時に増大し脱分極時に減少したが、PIP₃濃度は膜電位変化に伴った大きな変動を示さなかった。この結果は、Ci-VSPがPIP₃以外の基質を有する可能性を示唆している。

そこで、Ci-VSPの基質特異性についてGST-Ci-VSPを用いてin vitroの系で解析したところ、Ci-VSPはPIP₃のみならずPIP₂をも基質として脱リン酸化することが明らかになった。PIP₂は細胞膜を構成するイノシトールリン脂質のうちの主要成分であることから、Ci-VSPの酵素活

性は脱分極時に活性化され、PIP₂ を分解することが明らかとなった。さらに、Ci-VSP の基質特異性について PTEN との関連から解析を試みた。Ci-VSP の活性中心部位は PTEN の活性中心と非常に良く保存されているが、PTEN の 126 番目のアラニンに相当するアミノ酸が Ci-VSP ではグリシンとなっている。そこで Ci-VSP のグリシンをアラニンに置換したところ、基質特異性は PTEN 型に変

わった。PTEN の三次元構造は既に X 線結晶解析により明らかにされており、活性中心はループ状の構造を取っていることが知られている。A126 はループの中央付近に位置しており、Ci-VSP ではアラニンがグリシンに置換されたことによりループの自由度が増大し、基質特異性が緩くなっていると推察される。

(3) 電位センサードメイン蛋白の多様性とメカニズム

岡村康司, 村田喜理, 岩崎広英, 佐々木真理, Israil Hossain, 黒川竜紀, 高木正浩
(岡崎総合バイオサイエンスセンター・神経分化研究部門)

尾索動物ホヤのゲノムから見出された Ci-VSP は電位依存性チャネルに類似した電位センサードメインとホスファターゼドメインを併せ持ち、膜電位依存的にイノシトールリン脂質酵素活性を変化させる (Murata et al, Nature, 2005)。今回は、以下の VSP に関する知見を紹介する。①KCNQ2/3 チャネルを PIP₂ のレポーターとして用いた実験から、電位センサーのもつ電荷の動きの電位依存性と、酵素活性変化の電位依存性が良く一致し、酵素活性は幅広い膜電位範囲で可変である。②PIP₂ への感受性が高い IRK1 をレポーターとして用いた実験、PIP₃ や PIP₂ のイメージング, in vitro での酵素活性の計測から、過分極ではなく、脱分極により酵素ドメイン機能が活性化される (Murata et al, in preparation)。③VSP は後口動物に幅広く存在し、脊椎動物の VSP も同様な分子機能を有

する。

更に、最近明らかにした別の電位センサードメインを有する膜タンパク VSOP (Voltage-sensor only protein) を同定した。VSOP は、ポアドメインを持たないにも関わらずプロトンを選択的に透過させる機能をもつ。これまで免疫細胞の食食時での Respiratory burst に関わるとされてきた電位依存性プロトンチャネルの実体であると考えられる (Sasaki et al, Science, 2006)。

これまで考えられてきた以上に電位センサードメインは通常のイオンチャネルに限定されず機能的な多様性に富んでおり、これらの「電位センサードメイン蛋白」の研究は今後電位センサーやイオンチャネルの動作原理の理解に繋がると同時に、膜電位に関わる新たな生物現象の理解に重要であると期待される。

(4) 一人三役の光センサー蛋白、光活性化アデニル酸シクラーゼ (PAC) の分子内ドメイン相互作用による光活性化機構

渡辺正勝 (総合研究大学院大学・先端科学研究科)

光活性化アデニル酸シクラーゼ (Photoactivated Adenylyl Cyclase, PAC) は、単細胞鞭毛藻ミドリムシ (*Euglena gracilis*) の光回避反応のセンサーとして機能するフラビン蛋白質である (Iseki et al. 2002 Nature 415, 1047)。PAC は互いに良く似た PAC α と PAC β の 2 種類のサブユニットからなり、それぞれのサブユニットには発色団結合に寄与する BLUF (a sensor of Blue Light Using

EAD) ドメイン (F1, F2) とアデニル酸シクラーゼ触媒ドメイン (C1, C2) が交互に 2 箇所ずつ存在する。すなわち、PAC は同一分子内にモジュールとして光センサー機能とエフェクター機能を持つユニークなアデニル酸シクラーゼであり、このことにより、センシング、シグナル伝達、シグナル出力の謂わば一人三役を実現している。PAC の光活性化メカニズムは極めて興味深い問題であり、モ

ジュール間相互作用の解析を進めることによりそれが解き明かされ、センサー蛋白における一般原理への発展も

期待される。

(5) コレステロール代謝センサーLXR による細胞増殖の制御

榎島誠, 川名克芳 (日本大学医学部・生化学)

Liver X receptor (LXR) は、オキシステロール受容体として機能する核内受容体である。LXR は、コレステロールの過剰状態に伴い細胞内に増加するオキシステロールによって活性化し、標的遺伝子の発現を誘導する。その結果、肝臓においてコレステロールから胆汁酸への変換(齧歯類)やコレステロールの胆汁中への排出を促進し、小腸粘膜ではコレステロールの吸収を抑制する。またマクロファージからのコレステロール逆転送系を刺激する。このように、LXR はコレステロールの代謝センサーとしてその代謝制御において重要な働きをしている。コレステロールなど動物性脂質を多く含む欧米型食習慣によって動脈硬化性疾患とともに大腸がんのリスクも増加する。そこで、脂質代謝調節性核内受容体と大腸がんの

発症機構との関連性を検討した。その結果、LXR の活性化が、大腸がんの誘導因子の一つと考えられている β -カテニンの活性を抑制することを見いだした。LXR α 及びLXR β は、リガンド依存性に β -カテニンの転写誘導活性を抑制した。LXR リガンドは、大腸がん細胞における β -カテニン標的遺伝子の発現を低下させ、細胞増殖を抑制した。動物性脂質の摂取とは逆に植物性繊維の摂取は大腸がんの発症を抑制すると言われている。LXR は植物ステロールにも反応することが報告されており、植物性繊維によるがん抑制作用における LXR の関与が示唆される。このように、LXR は代謝と細胞機能を関連付ける重要な分子センサーといえる。

(6) 酸感受性アニオンチャネルとその酸誘導性細胞死における役割

清水貴浩, 王海燕, 岡田泰伸 (生理学研究所・機能協同研究部門)

近年、いくつかの細胞種において、細胞外酸性化がイオンチャネルを調節することが報告されている。また、細胞は酸ストレスにより傷害を受けることが知られている。そこで本研究では、ヒト上皮 HeLa 細胞における酸感受性イオンチャネルの発現と、その酸誘導性細胞死における役割を検討した。まず初めに、パッチクランプ全細胞記録法によって、本細胞に酸感受性アニオンチャネルが機能的に発現していることを見出した。このチャネル電流は、強い酸性化 (pH < 5) ではじめて活性化し、著しい外向き整流性を示した。イオン選択性は、 $I > Br > Cl$ であり、 Cl チャネル阻害剤である DIDS および phloretin により抑制された。Outside-out パッチクランプ

単一チャネル記録法によって、酸感受性アニオンチャネルの単一チャネルコンダクタンスは 4.75 pS であることが判明した。また、細胞を酸溶液 (pH 4.5) に 1 時間さらすと、PI 陽性細胞が増加した。この細胞死は、DIDS 投与により抑制された。さらに、細胞死誘導時には細胞容積変化が伴われることが知られていることから、細胞容積変化を測定した。すると酸処理により細胞膨張が生じ、DIDS はこの膨張も抑制することが判明した。これらの結果から、細胞外を酸条件にすると、酸誘導性アニオンチャネルが活性化され、これを介したイオン流入が生じることで細胞が膨張し、そののちにネクロシス性細胞死が引き起こされることが結論された。

(7) Glutamate Release via Stress-sensor Anion Channels from Mouse Astrocytes

Hong-tao Liu, Hana Inoue, Ravshan Z. Sabirov and Yasunobu Okada

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

Patch-clamp studies showed that hypotonic or ischemic stress activates maxi-anion channels with a large unitary conductance (~400 pS) and inactivation kinetics at potentials more positive than +20 mV or more negative than -20 mV in cultured mouse astrocytes. These properties are distinct from those of volume-sensitive outwardly rectifying (VSOR) Cl channels which were also activated in these cells and exhibited an intermediate unitary conductance (~80 pS) and inactivation kinetics at large positive potentials of more than +40 mV. Both maxi-anion channels and VSOR Cl channels were permeable to glutamate with permeability ratios of glutamate to chloride of 0.20–0.01 and 0.15–0.01, respectively. Glutamate release assay demonstrated that

hypotonic or ischemic stimulation leads to the release of glutamate from mouse astrocytes. Pharmacological studies excluded significant contributions of gap junction hemichannels, vesicle-mediated exocytosis and reversed operation of the Na⁺-dependent glutamate transporters to the release of glutamate. The glutamate release was prominently sensitive to Gd³⁺, a blocker of maxi-anion channel, and less, but significantly, sensitive to phloretin, a blocker of VSOR Cl channel. We conclude that under osmotic and ischemic stress, maxi-anion channels and VSOR Cl channels jointly represent a major conductive pathway for the release of glutamate from astrocytes, with the contribution of maxi-anion channels being predominant.

(8) Na⁺/H⁺交換輸送体の調節因子 CHP の構造と pH センシング機構

若林繁夫 (国立循環器病センター研究所・循環分子生理部)

細胞内 pH, Na⁺濃度, 細胞容積の調節はあらゆる生物の生存に必須である。この重要な役割を担う Na⁺/H⁺交換輸送体 (NHE, SLC9 ファミリー) は, 増殖因子, ホルモンなどの化学物質に加えて, 高浸透圧, ストレッチなど機械的刺激を含むあらゆる種類の細胞外シグナルによって活性化を受けるという点で特に興味深い。活性制御は細胞質側に内蔵する pH センサーの働きによって起こるが, その実体については現在不明である。私達はこれまで, 9 種類知られる NHE アイソフォームのうち形質膜発現型の NHE (NHE1-5) の膜直下細胞質ドメインには EF ハンド Ca²⁺結合タンパク質の一つであるカルシニユリン様タンパク質 (CHP) が強固に結合し, この相互作用が

NHE の生理活性に必須であることを明らかにしてきた。最近, CHP (CHP2 アイソフォーム) とその NHE1 側の結合ドメインとの複合体の結晶構造を Y³⁺存在下 2.7Å の解像度で決定し, CHP が NHE ファミリータンパク質に特異的に結合する分子基盤を原子レベルで明らかにした。結晶構造によれば, NHE の膜直下領域は CHP の N-および C-lobe によって形成される疎水性の溝 (hydrophobic cleft) に疎水性相互作用および特異的な水素結合によって選択的に結合すること, また CHP の N-および C-lobe をつなぐ比較的長いリンカー (CHP-unique region) が存在することなど興味深い特徴が明らかになった。

(9) 後根神経節細胞の P2Y₂受容体と機械刺激応答

小泉修一 (国立医薬品食品衛生研究所・薬理部)

津田 誠, 井上和秀 (九州大学大学院・薬学研究院)

細胞外 ATP が知覚・痛覚情報伝達に果たす役割が注目

されている。一次求心性神経には種々の ATP 受容体 “P2

受容体”が発現しており，例えば痛み刺激を伝える A δ 線維には P2X_{2/3} 受容体が，小型 c 線維には P2X₃ 受容体及び P2Y₂ 受容体が存在し，それぞれ異なる分子メカニズムで痛覚伝達を制御している。本研究では c 線維に存在する P2Y₂ 受容体がメカノセンサーとの相互作用により，神経因性疼痛に特徴的なメカニカルアロディニア（異痛症）を引き起こすことを報告する。

ラット後肢足底部に P2Y₂ 受容体作用薬 UTP を注入し P2Y₂ 受容体を刺激すると，軽微な触刺激に対して痛み応答を呈するメカニカルアロディニアが誘発された。すでに先行する報告により，P2Y₂ 受容体刺激により PKC を介した TRPV1 受容体の sensitization が惹起され，熱刺激に対する過敏応答が惹起されることが明らかとされているが (Moriyama et al., J. Neurosci., 2003)，P2Y₂ 受容体刺激により惹起されるメカニカルアロディニア形成には，PKC 及び TRPV1 の関与は少なかった。Ca²⁺イメージング法により，培養 DRG 神経細胞の各種 ATP アナ

ログの応答性を検討したところ，UTP 応答細胞（P2Y₂ 受容体発現細胞）は，ほぼ小型後根神経節（DRG）細胞に局在し，また，UTP 応答細胞の過半数はカプサイシン応答細胞（TRPV1 発現細胞）であった。しかし，カプサイシン非応答性の小型 DRG 神経細胞も存在した。培養小型 DRG 神経細胞に機械刺激を加えると，刺激強度依存的に細胞外 Ca²⁺の流入が認められ，この Ca²⁺流入は Gd³⁺で抑制された。さらに，P2Y₂ 受容体の先行刺激により，この機械刺激誘発 Ca²⁺流入の刺激閾値は低下し，また最大応答も増大した。以上，P2Y₂ 受容体刺激により，メカニカルアロディニアが誘発されること，P2Y₂ 受容体が小型 DRG 神経に局在し機械刺激に対する Ca²⁺流入の応答感受性を亢進させることが明らかになった。このように，ATP センサー・メカノセンサー相互作用により，触刺激が痛みとして伝達され，メカニカルアロディニアが形成される可能性が示唆された。

(10) バゾプレッシン分泌ニューロンへのシナプス入力：アンギオテンシンⅡおよびカンナビノイドの効果

上田陽一（産業医科大学医学部・第1生理学）

視床下部室傍核および視索上核に局在するバゾプレッシン分泌ニューロンは，その軸索を下垂体後葉に投射して血中にバゾプレッシンを分泌する。バゾプレッシン分泌ニューロンの神経活動は，種々の液性入力および神経性入力によって調節・修飾されている。我々は，ラット脳スライス標本を用いて，視索上核に局在するバゾプレッシン分泌ニューロンからパッチクランプ法により興奮性および抑制性シナプス入力を記録し，種々の生理活性物質に対するシナプス入力の感受性を検討している。具体的には，(1)アンギオテンシンⅡは興奮性シナプス入力を増強し，抑制性シナプス入力には影響を与えないこと，(2)カンナビノイドは興奮性シナプス入力および抑制性シナプス入力のいずれも抑制することを明らかにした。

最近我々は，バゾプレッシン-eGFP トランスジェニックラットを作成することにより GFP の緑色蛍光を指標にバゾプレッシン分泌ニューロンを同定できるようになった。本トランスジェニックラットでは，室傍核，視索上核，視交叉上核，下垂体後葉に投射する軸索および下垂体後葉に GFP 蛍光を観察することができた。本トランスジェニックラットから作成した脳スライス標本，急性単離ニューロンおよび下垂体後葉の軸索終末においても十分観察可能な GFP 蛍光が観察された。本トランスジェニックラットは，バゾプレッシン分泌ニューロンの化学感受性などの解析に優れたモデルとなることが期待される。

(11) 脳内 Na^+ センサー Na_x がグリアのグルコース代謝を調節する

檜山武史, 清水秀忠, 渡辺英治, 長倉彩乃, 野田昌晴
(基礎生物学研究所・統合神経生物学研究部門)

Na_x は電位作動性 Na チャンネル・ファミリーに属し、生理的範囲の体液 Na^+ 濃度の上昇を閾値とする Na^+ センサーである。我々は Na_x 遺伝子ノックアウトマウスを作成し、 Na_x が哺乳動物の塩/水恒常性の中樞である脳室周囲器官 (CVO) に発現する体液 Na^+ レベルセンサーであり、CVO の上皮細胞と星状細胞から伸びたニューロン周囲膜状突起に特異的に発現していることを明らかにしてきた。今回、グリア細胞が Na^+ レベルを感知する分子・細胞機構を明らかにするため、酵母ツーハイブリッド法を用いて Na_x の細胞内領域に結合する分子を探索した。その結果、 Na_x の C 末端領域が Na/K-ATPase の α サブユニットに結合することを見出した。また、グリア

細胞由来の株化細胞に Na_x を機能的に発現させる系を樹立することに成功した。これを用いて、グルコース取り込みと乳酸放出が細胞外 Na^+ レベル依存的に促進されること、グルコース取り込みの促進には Na^+ の流入と Na_x - Na/K-ATPase 間の相互作用の両方が必要であることを明らかにした。この促進は Na/K-ATPase の機能阻害剤ウワバインにより抑制される。また、CVO の一つである脳弓下器官から単離したグリア細胞及び急性スライス標本においても、細胞外 Na レベルに依存したグルコース取り込みが観察された。以上より、 Na_x は CVO において体液 Na レベルの生理的増加を検出し、グリアのエネルギー代謝を調節していることが示唆された。

(12) 匂いとフェロモンのセンサー

東原和成 (東京大学大学院・新領域創成科学研究科)

人間社会で嗅覚は五感のなかでも最も軽視されているが、多くの生物では、食物認知、個体認識、生殖行動の誘発など生存に不可欠な行動や習性に匂いやフェロモンが深く関わる。匂いセンサーである嗅覚受容体は、多重遺伝子群を形成しており、G タンパク質共役型受容体のなかでも最大のサブファミリーを形成している。我々は、嗅覚受容体の機能解析を、単一匂い応答嗅神経細胞からの機能的クローニングという逆転の発想で成功させ、そ

の後、嗅覚受容体が多種多様な幅広い匂い分子を正確に識別するメカニズムを明らかにしてきた。また、カイコガ性フェロモンの受容体の同定および機能解析に成功し、高感度・高選択性の昆虫フェロモンセンサー機構を明らかにした。マウスでは、遺伝子にコードされている新規ペプチドがオスの涙腺から分泌されてメスの鋤鼻器官に取り込まれ、V2R 受容体発現神経を刺激することがわかった。

(13) 発達・障害時における細胞内 Cl^- 調節機構の変化と GABA 応答のモダリティ

鍋倉淳一, 渡部美穂, 和気弘明 (生理学研究所・生体恒常機能発達機構研究部門)

GABA やグリシンは主要な抑制性伝達物質であり、その応答は時間・空間的な多様性を示す。この多様性についての研究は、長年、受容体構成サブユニットの相違を中心として進められてきた。しかし、GABA/グリシン受容体機能の制御としては、細胞内外 Cl^- 濃度および細胞内

電位に起因する Cl^- イオン透過の方向性および量のダイナミックな変化に注目が集められている。神経細胞内 Cl^- 濃度調節は細胞内 Cl^- くみ出し主要分子である K^+ Cl^- cotransporter (KCC2) と Cl^- 汲み入れ分子である Na^+ K^+ Cl^- cotransporter (NKCC1) によって調節されている。その中

でも、KCC2 は空間的および時間的に発現・機能がダイナミックに変化する。例えば、運動神経細胞でも骨格筋支配細胞では KCC2 発現が高く、高頻度の抑制性入力時においても IPSP はよく保たれているのに対し、KCC2 発現の弱い迷走神経運動核では細胞内 Cl⁻濃度上昇に伴い IPSC の大きさの減少が観察される。

また、KCC2 の発現・機能が未熟期には GABA は脱分

極（しばしば興奮性）作用を示し、発達とともに過分極へスイッチする。しかし、各種障害時には、KCC2 の発現・機能は時間単位で消失し、GABA の脱分極作用が再現する。この過程において、まず KCC2 の脱リン酸化に伴う機能消失とその後の発現自体の消失が観察され、GABA は細胞死を惹起する。

(14) センサー機能のモーダルシフトによる触覚受容の病的変化のメカニズム

田邊 勉（東京医科歯科大学大学院・認知行動医学系・細胞薬理学分野）

アロディニアは神経因性疼痛患者において一般的に認められる触覚異常であり、長期にわたって持続し、患者の QOL 悪化の主要因の一つである。この触感覚から痛み感覚への変換には種々センサー分子群のセンサー機能のモーダルシフトが関与すると考えられている。我々はこれらセンサー分子群の単離と、センサー機能のモーダルシフトによる触覚受容の病的変化のメカニズムを明らかにすることを目的として研究を行っている。

N 型 Ca チャネル欠損マウスの解析から本マウスが神経損傷に伴うアロディニアを示さないことが明らかとなった。アロディニアは神経損傷にともなって引き起こされる神経伝導の可塑的变化によって誘導されと考えられている。そこで野生型マウスと N 型 Ca チャネル欠損

マウスにおいて神経損傷に伴って誘導される遺伝子発現の変動を比較し、野生型マウスで発現上昇し、N 型 Ca チャネル欠損マウスにおいて発現変動しない、あるいは低下する遺伝子群を同定した。

グルココルチコイド受容体の発現量は神経損傷した野生型マウスの脊髄において上昇していたが、N 型 Ca チャネル欠損マウスにおいては減少していた。そこで本受容体拮抗薬を神経損傷した野生型マウスに投与したところアロディニアが消失した。したがってグルココルチコイド受容体はアロディニアの発症、維持にとって重要であることが推察され、本受容体拮抗薬は神経因性疼痛治療薬として有用であることが明らかとなった。

21. TRP チャネル研究会

2006 年 6 月 12 日 - 6 月 13 日

代表・世話人：井上隆司（福岡大学医学部）

所内対応者：富永真琴（岡崎統合バイオサイエンスセンター）

(1) TRP channels - overview

森泰生（京都大学大学院工学研究科分子生物化学）

(2) Molecular basis for calmodulin-dependent kinase II (CAMKII)-mediated regulation of vascular receptor-operated Ca^{2+} entry channel TRPC6

海琳，高橋眞一，下司直美，瓦林靖宏，本田啓，井上隆司
(福岡大学医学部生理学)

森泰生（京都大学大学院工学研究科分子生物化学）

(3) Role of TRPC1 in Angiotensin II-induced vascular hypertrophy

高橋陽一郎，渡邊博之，大場貴喜，伊藤 宏
(秋田大学医学部内科学講座 循環器内科学分野・呼吸器内科学分野)
村上学，飯島俊彦（秋田大学医学部機能制御医学）

(4) Diacylglycerol-mediated Ca^{2+} influx through TRPC3/C6 is essential for angiotensin II-induced cardiac hypertrophy

小野原 直哉，西田 基弘，黒瀬 等
(九州大学大学院薬学研究院薬物中毒学)

井上 隆司（福岡大学医学部生理学）

森 泰生（京都大学大学院工学研究科分子生物化学）

(5) Requirement of Ca^{2+} influx in the thrombin-induced morphological changes of human astrocytoma cells

中尾賢治，Aiko Sugishita，金子周司
(京都大学大学院薬学研究科，生体機能解析学分野)

(6) TRP チャネル拮抗剤による新規修飾方法の開発

加藤賢太，森 泰生（京都大学大学院工学研究科分子生物化学）

(7) Regulation and Localization of the TRPV2 Channel in Macrophage

長澤雅裕，小島 至（群馬大学生体調節研究所）

(8) Involvement of TRPV1 or TRPV2 on nociceptive behavior in rat model of cancer pain

尾崎紀之，篠田雅路，Akiko Ogino，杉浦康夫
(名古屋大学大学院医学系研究科機能形態学機能組織学)

(9) Hypo-osmotically induced hearing impairment in TRPV4 knock-out mice

沈静，久保伸夫，Kohei Kawamoto，山下敏夫（関西医科大学耳鼻咽喉科学教室）
原田成信（はらだ耳鼻科）
鈴木誠（自治医科大学薬理学教室）

(10) Physiological role of the oxidative stress-sensitive TRPM2 Ca^{2+} channel in immunocytes

山本伸一郎，輪島輝明，森泰生（京都大学大学院工学研究科分子生物化学）
清水俊一（昭和大学薬学部病態生理学）

(11) TRPV channels in thermosensation and mechanotransduction

富永真琴（岡崎自然科学共同研究機構統合バイオサイエンスセンター）

(12) TRPV4 の軟骨形成における役割

水野敦子, 鈴木誠 (自治医科大学薬理学講座分子薬理学部門)

網塚憲生, 李 敏啓 (新潟大学超域研究機構)

(13) 体温維持が海馬神経活動に与える影響: TRPV4 による膜電位の制御

柴崎貢志, 富永真琴 (岡崎統合バイオサイエンスセンター・細胞生理部門)

鈴木誠, 水野敦子 (自治医科大学薬理学講座)

(14) Effects of skin surface temperature on epidermal permeability barrier homeostasis

傳田光洋 (資生堂ライフサイエンス研究センター)

曾我部隆彰, 富永知子, 富永真琴 (岡崎統合バイオサイエンスセンター・細胞生理部門)

(15) ヒト臍帯内皮細胞 (HUVEC) における伸展刺激依存 Ca^{2+} 上昇に対する TRPV2 の役割: ストレッチセンサー感度を左右する伸展刺激速度と細胞膜直下細胞骨格の構造

片野坂友紀, 末盛智彦, 成瀬恵治 (岡山大学大学院医歯薬総合研究科システム循環生理)

(16) BCR 刺激に誘導される MAPK 活性化経路におけるジアシルグリセロールに活性化される TRPC3 チャネルの重要性

沼賀 拓郎 (総合研究大学院大学生命科学研究科生理科学)

森 泰生 (京都大学大学院工学研究科合成生物化学)

(17) Regulatory role of neuron-restrictive silencing factor (NRSF) in expression of TRPC1

村上学, 飯島俊彦 (秋田大学医学部機能制御医学)

大場貴喜, 高橋陽一郎, 渡邊博之, 伊藤 宏

(秋田大学医学部内科学講座循環器内科学分野・呼吸器内科学分野)

【参加者名】

Mandadi Sravan (統合バイオサイエンスセンター),
 Toychier (生理研), 池田 知佳子 (名古屋市立大・薬),
 石井 正和 (昭和大学), 石井 裕 (生理研), 伊藤 悦
 子 (京都大院・薬), 稲田 仁 (統合バイオサイエンス
 センター), 井上 隆司 (福岡大・医), 岩田 裕子 (国
 循セ), 岩浪 真 (名古屋市立大・薬), 上原 明 (福岡
 大・医), 大河内 義史 (統合バイオサイエンスセン
 ター), 大野 晃稔 (名古屋市立大院・薬), 岡田 泰伸 (生
 理研), 荻原 和信 (名古屋市立大・薬), 尾崎 紀之 (名
 古屋大院・医), 小野原 直哉 (九州大学), 垣花 優子
 (昭和大学), 片野 正展 (京都大院・工), 片野坂 友
 紀 (岡山大学), 加藤 賢太 (京都大院・工), 門脇 辰
 彦 (名古屋大・生命農学研), 金子 周司 (京都大院・
 薬), 神崎 展 (東北大・先進医工学研), 木村 拓哉 (名
 古屋市立大・薬), 清中 茂樹 (京都大院・工), 久保 伸
 夫 (関西医大), 小島 至 (群馬大・生体調節研), 佐藤
 かお理 (生理研), 佐藤 一洋 (秋田大・医), 佐野 頼
 方 (アステラス製薬), 柴崎 貢志 (統合バイオサイエ
 ンスセンター), 新見 大輔 (京都大院・工), 末盛 智
 彦 (岡山大学), 杉下 亜維子 (京都大院・薬), 曾我部

隆彰 (統合バイオサイエンスセンター), 対洪涛 (生理
 研), 高橋 重成 (京都大院・工), 高橋 陽一郎 (秋田
 大・医), 田中 英実 (名古屋市立大・薬), 張藍帆 (基
 礎生物学研), 沈 静 (関西医大), 辻田 隆一 (旭化成
 ファーマ), 傳田 光洋 (資生堂), 富樫 和也 (統合バ
 イオサイエンスセンター), 富永 真琴 (統合バイオサ
 イエンスセンター), 富永 知子 (統合バイオサイエ
 スセンター), 鳥橋 茂子 (名古屋大・医), 中尾 賢治
 (京都大院・薬), 中川 祐子 (群馬大・生体調節研),
 長友 克広 (生理研), 中村 明子 (昭和大学), 中村 友
 紀 (福岡大・医), 長澤 雅裕 (群馬大・生体調節研),
 成瀬 恵治 (岡山大学), 海琳 (福岡大・医), 長谷川 裕
 一 (生理研), 沼賀 拓郎 (京都大院・工) 沼田 朋大
 (生理研), 東 智広 (統合バイオサイエンスセンター),
 福地 圭介 (三共・創薬基盤研), 藤田 郁尚 (マンダ
 ム中央研), 船橋 賢司 (名古屋市立大・薬), 古山 富
 士弥 (名古屋市立大・医), 水谷 浩也 (名古屋市立大・
 薬), 水野 敦子 (自治医大・医), 水野 雄介 (京都大
 院・工), 宮野 拓也 (京都大院・薬), 宗久 佳子 (秋
 田大・医), 村上 学 (秋田大・医), 村田 秀道 (名古

屋市立大・薬), 村山 奈美枝 (統合バイオサイエンスセンター), 森 泰生 (京都大院・工), 山岡 とも子 (京都大院・薬), 山崎 大樹 (名古屋市大・薬), 山村 寿

【概要】

TRP 蛋白質 (transient receptor potential protein) は, 種々の物理化学刺激によって活性化される広範な Ca^{2+} 流入チャネル群 (TRP チャネル遺伝子スーパーファミリー) である。その広範な生体内発現とユニークな性質のため, 近年, 産学両界の研究者の注目を集めている。特に過去5 ヶ年における研究の進展は目覚しく, 遺伝性疾患や遺伝子改変動物などの解析の結果, 幾つかの生理機能の発現や疾病の発症進行機転において, この蛋白質ファミリーが極めて重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。また, 生活習慣病 (高血圧症, 動脈硬化症), アレルギー性疾患 (気管支喘息, 過敏性腸症候群), QOL に関わる病態 (骨粗鬆症, パーキンソン病, アルツハイマー病) においても, この蛋白質の関与を強く示唆する証拠が次々と得られつつある。第2回目となった本研究会では, 6月12日から2日間にわたり, 本邦の最前線で活躍する80人近くのTRP蛋白質(チャネル)の研究者が一同に会し, 2題の基調講演と若手研究者を中心とした4つのシンポジウムセッションにおける15題の発表を行った。まず基調講演で, 多彩な情報の急速な集積の為に混沌としつつあるTRPチャネル研究の分野が適切に

男 (名古屋市立大・薬), 山本 伸一郎 (京都大院・工), 輪島 輝明 (京都大院・工), 渡邊 博之 (秋田大・医)

総括され, 今後の研究に対する重要な方向付けがなされた。次にシンポジウムでは, 分子・細胞レベルにおける活性化・制御機構に関する最新の知見の発表に加え, 斬新な実験手法やアイデアに基づいた学際的な研究成果の発表が数多くなされ, 若手を中心とした多くの研究者の興味が刺激されて, 活発な討議と情報交換が行われた。例えば, 新規に作成されたノックアウトマウス (TRPV4, TRPM2) の解析から得られた興味深い知見, 癌性疼痛モデルを用いた個体行動の解析, TIRFM を用いた細胞内 trafficking の画像解析, ケミカルバイオロジー, microsurgery, ストレッチチェンバーなどの新しい手法を取り入れた実験の成果など, 今後の研究展開への示唆に富む研究発表が数多く行われた。本研究会は, 第1回にも増して, TRP蛋白質を巡る研究が指数関数的な加速度で展開していることを再確認する場となっただけでなく, この蛋白質が関わる生理機能や病態が予想以上に複雑且つ広範に亘っていることを改めて印象付けることとなった。そして前回と同様, この分野の今後の発展には, このような会を通じた定期的な情報交換が必要不可欠であることを全会一致で確認して散会した。

(1) TRP channels – overview

森泰生 (京都大学大学院工学研究科分子生物化学)

(2) Molecular basis for calmodulin-dependent kinase II (CAMKII)-mediated regulation of vascular receptor-operated Ca^{2+} entry channel TRPC6

海琳, 高橋眞一, 下司直美, 瓦林靖宏, 本田啓, 井上隆司 (福岡大学医学部生理学)

森泰生 (京都大学大学院工学研究科分子生物化学)

The transient receptor potential (TRP) protein homologue TRPC6 is thought to be an integrative receptor-activated and mechanosensitive Ca^{2+} entry channel that regulates vascular tone and remodeling. Recently, studies from our and other laboratories have shown that CaMKII-mediated phosphorylation is likely to be an indispensable step in

priming TRPC6 channels for opening in response to receptor stimulation. In this study, to explore the molecular basis for this phosphorylation-mediated regulation, we performed a mutation analysis of CAMKII consensus motifs on wild-type TRPC6 and its chimera with N-terminal (NT) and transmembrane (TM) domains of TRPC7 (T776).

Search for the CAMKII consensus motif RXX(S/T) identified 7 and 6 candidate sequences on the NT or TM regions of TRPC6 and T776, respectively, but not on the C-terminus. Alanine substitution in these sequences revealed that only the mutations T487A in wild type TRPC6 and T433A in T776 strongly attenuated Ba^{2+} influx evoked by carbachol (100 μM) without affecting their cell-membrane localized expression. The critical importance of T487A for TRPC6 activation was also confirmed by patch clamp experiments, where carbachol-induced current was reduced from 9.4 ± 2.3 to 1.2 ± 0.4 (pA/pF, $n=5$) by alanine substitution. Furthermore, substitution of T487 with negatively charged

amino acid residues such as glutamate or aspartate greatly enhanced whereas their neutralized forms (i.e. glutamine or asparagine) almost abolished receptor-mediated activation of currents. Considering the results of a recent structural analysis of TRPC1, T487 in TRPC6 and T433 in T776 are likely located on a long intracellular stretch between the second and third TM domains (II-III loop). These results suggest, combined with the requisiteness of a putative calmodulin binding site (CIRB) for channel activation, that close spatial arrangement of CIRB and the II-III loop might allow effective phosphorylation of T487 by CAMKII thereby priming the TRPC6 channel for activation by receptor stimulation.

(3) Role of TRPC1 in Angiotensin II-induced vascular hypertrophy

高橋陽一郎, 渡邊博之, 大場貴喜, 伊藤 宏

(秋田大学医学部内科学講座 循環器内科学分野・呼吸器内科学分野)

村上学, 飯島俊彦 (秋田大学医学部機能制御医学)

Angiotensin II (AngII) activates vascular smooth muscle cell (VSMC) growth as one of the major events leading to atherosclerosis and restenosis after vascular injury. Increased Ca^{2+} entry is an important stimulus for VSMC growth, but the association with AngII remains unknown. Transient receptor potential (TRP) channel genes encode Ca^{2+} entry channels that are responsible for store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) during the differentiation and proliferation in various cells. The purpose of this study was to ascertain the potential involvement of TRP channels in AngII-induced VSMC growth. Human coronary artery smooth muscle cells (hCASMC) were studied. Cells were serum-starved (1% FBS) for 48 hrs prior to experiments. AngII (100 nM) evoked hCASMC hypertrophy in which both [^3H]-leucine incorporation and cell size were increased. SOCE elicited by thapsigargin was also greater in hypertrophied hCASMC

than in untreated cells. Although comparative RT-PCR and Western blotting analysis demonstrated constitutive expression of TRPC1, C3, C4, C5 and C6, only TRPC1 expression was increased in AngII-treated hCASMC. Gene silencing using small interfering RNA against TRPC1 decreased SOCE and [^3H]-leucine incorporation. We found NF-kappaB binding sites in 5'-regulatory region of hTRPC1. Electrophoretic Mobility Shift Assay demonstrated that AngII increased hTRPC1 promoter's NF-kappaB binding activity. Transfection of NF-kappaB decoy oligonucleotide inhibited the AngII-induced hypertrophic responses including TRPC1 expression and SOCE increase. In conclusion, our data suggest that AngII and subsequent NF-kappaB activation facilitates hypertrophy in hCASMC through enhancement of TRPC1 expression and SOCE.

(4) Diacylglycerol-mediated Ca^{2+} influx through TRPC3/C6 is essential for angiotensin II-induced cardiac hypertrophy

小野原直哉, 西田基弘, 黒瀬 等 (九州大学大学院薬学研究院薬物中毒学)

井上隆司 (福岡大学医学部生理学)

森 泰生 (京都大学大学院工学研究科分子生物化学)

アンジオテンシン II(Ang II) は心肥大を誘発する生理活性物質として知られている。Ang II 刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は、心肥大形成において重要な役割を果たす。Ang 受容体刺激は、ホスホリパーゼ C(PLC) の活性化を介したイノシトール-1,4,5-三リン酸(IP_3) を産生し、細胞内小胞体からの Ca^{2+} 遊離を惹起することで Ca^{2+} シグナリング経路を活性化すると考えられていた。しかしながら、我々は、 IP_3 ではなく、ジアシルグリセロール(DAG) を介した細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が, Nuclear Factor of

Activated T cells (NFAT) の核内移行を促進することで Ang II による心肥大を引き起こすことを明らかにした。具体的には、Ang II 刺激による DAG を介した心肥大応答には、DAG 感受性の Transient receptor potential (TRP) チャネル TRPC3 と TRPC6 が関与すること、TRPC3/C6 の活性化により生じる脱分極を介した L-型 Ca^{2+} チャネルからの Ca^{2+} 流入が、NFAT シグナル経路を活性化することを見出した。

(5) Requirement of Ca^{2+} influx in the thrombin-induced morphological changes of human astrocytoma cells

中尾賢治, Aiko Sugishita, 金子周司 (京都大学大学院薬学研究科, 生体機能解析学分野)

Numbers of TRPC channel genes are widely expressed in the brain, not only in neurons but also in glial cells including astrocytes, microglia and oligodendrocytes. The phosphoinositide-linked TRPC activity may play important roles in glial cell functions by controlling receptor-coupled Ca^{2+} entry into the non-excitatory cells. To elucidate the physiological and pathological roles of TRPC channels expressed in astroglial cells that are activated after cerebral hemorrhage, we have investigated the effects of thrombin on the morphology of astroglial cells. In astrocytoma 1321N1 cells, at least 3 types of TRPC proteins (C1, C3 and C5) were detected by western blotting and/or immunostaining. Stimulation of protease-activated receptors (PARs) with thrombin triggered retraction of bipolar processes (cell

rounding) within 1 h in a reversible manner thereafter. The thrombin-induced morphological changes were significantly inhibited by PAR1 antagonist peptide, 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) and cyclopiazonic acid (CPA). Thrombin evoked a transient increase in intracellular Ca^{2+} concentration followed by sustaining oscillatory responses, and the Ca^{2+} oscillation was inhibited by 2-APB, CPA and under Ca^{2+} -free condition. These results suggest that thrombin induces Ca^{2+} influx possibly through TRPC channels, which are required to cause the morphological changes leading to activation of astrocytes. This work is partly supported by 21st Century COE Program Knowledge Information Infrastructure for Genome Science.

(6) TRP チャネル拮抗剤による新規修飾方法の開発

加藤賢太, 森 泰生 (京都大学大学院工学研究科分子生物化学)

受容体刺激後の Ca^{2+} 流入を担う Ca^{2+} チャネルとして

TRPC3, TRPC5, TRPC6, TRPC7 が考えられている。し

かし、これらのチャネルに対する選択的な拮抗剤は存在しない。今回はピラゾール誘導体の BTP-2, BTP-3 の阻害作用について報告する。BTP-2 は TRPC ファミリー全

体を阻害し, BTP-3 は TRPC3 のサブタイプを選択的に阻害した。現在, ピラゾール誘導体をもとにアフィニティラベル化剤を設計し, 結合部位の決定を行っている。

(7) Regulation and Localization of the TRPV2 Channel in Macrophage

長澤雅裕, 小島至 (群馬大学生体調節研究所)

The TRPV2 channel is expressed in various tissues including neurons, neuroendocrine cells, epithelial cells in the kidney and liver and blood cells such as macrophages. In the present study, we examined the regulation and localization of the TRPV2 channel in macrophages. When macrophages were cultured in a serum-free condition, immunoreactivity of TRPV2 was detected largely in cytoplasm. Addition of serum induced translocation of some of the TRPV2 to the plasma membrane. A chemotactic peptide fMLP further induced translocation of the TRPV2. In accordance with this, fMLP increased the Ca^{2+} current in macrophage, which was inhibited by ruthenium red and the transfection of the dominant-negative mutant of TRPV2. fMLP-induced translocation of the TRPV2 was blocked by PI 3-kinase inhibitors and pretreatment with pertussis toxin. When cytoplasmic calcium concentration ($[Ca^{2+}]_c$) was monitored

by using fura-2, fMLP induced a rapid and sustained elevation of $[Ca^{2+}]_c$, the latter of which was abolished by removal of extracellular calcium. Addition of ruthenium red or transfection of the dominant-negative mutant of TRPV2 did not affect the initial rise in $[Ca^{2+}]_c$ but blocked the sustained phase of fMLP-induced $[Ca^{2+}]_c$ response. In stimulated macrophages, TRPV2 localized in the podosome, a microdomain involved in adhesion and migration, and colocalized with Rho family small G proteins. Transfection of the dominant-negative Rac, but not Rho or CDC42, inhibited translocation of TRPV2. Finally, addition of ruthenium red or transfection of dominant-negative mutant of TRPV2 inhibited chemotaxis of macrophages induced by fMLP. These results indicate that fMLP induces translocation of TRPV2 by a PI 3-kinase dependent mechanism and this translocation is important for sustained elevation of $[Ca^{2+}]_c$ in macrophage.

(8) Involvement of TRPV1 or TRPV2 on nociceptive behavior in rat model of cancer pain

尾崎紀之, 篠田雅路, Akiko Ogino, 杉浦康夫

(名古屋大学大学院医学系研究科機能形態学機能組織学)

The roles of TRPV1 and TRPV2 were examined in the rat model of cancer pain. Inoculation of squamous cell carcinoma into the planta induced marked mechanical allodynia, heat hyperalgesia and sign of spontaneous pain behavior in the hind paw. Intraplantar administration of TRPV1 antagonist capsazepine or TRPV1 and TRPV2 antagonist ruthenium red did not inhibited spontaneous pain behavior. However,

capsazepine completely inhibited mechanical allodynia. Administration of capsazepine partially, and ruthenium red completely inhibited heat hyperalgesia. Immunohistochemically, the number of TRPV1 and TRPV2-positive large-sized neurons increased. Our results suggest that TRPV1 and TRPV2 play important roles in the development and maintenance of cancer pain.

(9) Hypo-osmotically induced hearing impairment in TRPV4 knock-out mice

沈静, 久保伸夫, Kohei Kawamoto, 山下敏夫 (関西医科大学耳鼻咽喉科学教室)

原田成信 (はらだ耳鼻科)

鈴木 誠 (自治医科大学薬理学教室)

We have recently showed the functional expression of TRPV4 in inner hair cells (IHCs), outer hair cells (OHCs) and spiral ganglion neurons (SGNs) of the mouse cochlea. We also showed the role of TRPV4 in hypotonicity-induced Ca^{2+} response in OHCs. Because changes of intracellular Ca^{2+} concentrations are known to affect somatic motility of OHCs that is thought to contribute to the enhancement of cochlear frequency selectivity by generating negative damping, we therefore assume that the changes of osmolarity in inner ear fluids may cause the hearing impairment which is involved in TRPV4. Here, we firstly developed an animal model of hypotonic inner ear fluids in mice by implanting a mini-osmotic pump into the inner ear of mouse, by which the hypotonic solution was transported into the inner ear. The security of this technique was evaluated by hearing functions, vestibular function and structure tests. We further investigated

whether perilymphatic application of hypotonic solution may impair hearing on wild type and TRPV4 knock-out mice *in vivo*. Results showed that direct delivery of hypotonic solution into mouse inner ear by mini-osmotic pump caused increase in the ABR threshold after 3 days, but it recovered within 7days in the wild type mice. In contrast, a significant ABR threshold shift was still observed 7 days after delivery of hypotonic solution into the inner ear of TRPV4 knock-out mice. Hypotonic artificial perilymph-induced OHCs missing are higher in TRPV4 knock-out mice than that in wild mice after 7 days. Our present results suggested that it is feasible to produce hypotonic inner ear fluids model by implanting mini-osmotic pump into mice inner ear, and TRPV4 is involved in the hypotonic stimulation-induced hearing impairment.

(10) Physiological role of the oxidative stress-sensitive TRPM2 Ca^{2+} channel in immunocytes

山本伸一郎, 輪島輝明, 森泰生 (京都大学大学院工学研究科分子生物化学)

清水俊一 (昭和大学薬学部病態生理学)

TRPM2 is a Ca^{2+} permeable channel activated by redox state changes such as oxidative stress. Although it has been suggested that Ca^{2+} influx via TRPM2 mediate cell death, its physiological significance is still elusive. TRPM2 is expressed in immunocytes such as monocytes and lymphocytes. In monocytic cell line U937, it is known that hydrogen peroxide (H_2O_2) induces chemotactic cytokine

interleukin-8 (IL-8) production via Erk / NF- κ B pathway and that IL-8 is produced via intracellular Ca^{2+} increases. Here, we reveal that oxidative stress-sensitive TRPM2 Ca^{2+} channels are crucial for H_2O_2 -induced IL-8 production in U937. We also report physiological significance of the TRPM2 *in vivo* with regard to the above biological response by utilizing TRPM2 knockout mice.

(11) TRPV channels in thermosensation and mechanotransduction

富永真琴 (岡崎自然科学共同研究機構統合バイオサイエンスセンター)

(12) TRPV4の軟骨形成における役割

水野敦子, 鈴木誠 (自治医科大学薬理学講座分子薬理学部門)

網塚憲生, 李 敏啓 (新潟大学超域研究機構)

TRPV4 は, 神経系や皮膚などで発現し, 熱, 酸, 浸透圧, 等の物理刺激で活性化されることが知られている Ca^{2+} 透過性チャネルである。一方, 骨の発達における軟骨内骨化では, 軟骨細胞の肥大化と細胞死, その後の基質石灰化とダイナミックな改変が起こるが, この分化過程にはメカニカルストレスが影響すると考えられている。今回, 我々は TRPV4 欠損マウス (TRPV4^{-/-}) が軟骨内骨化異常を示すことを見出したので報告する。

野生型マウス骨組織における TRPV4 の発現と局在を RT-PCR と免疫組織化学にて検索した結果, 軟骨細胞および骨芽細胞で TRPV4 mRNA の発現が認められ, 特に成長板軟骨細胞において TRPV4 の局在が観察された。正

常マウス由来の初代軟骨細胞で通常見られる低浸透圧での電気生理学的反応が TRPV4^{-/-}マウス由来の軟骨細胞では欠如していた。骨格での有意な差は尾椎の長さが若干短い以外に認められなかったが, 骨組織の組織学的解析では, 4 週齢の TRPV4^{-/-}の脛骨は野生型と比較してやや厚い成長板軟骨を形成しており, 一部の軟骨カラムは通常の長軸方向の配列を示さず塊状となる軟骨カラム異常が認められ, 均一な肥大化軟骨細胞層形成に一時的な乱れが生じることが明らかとなった。これらの結果から, TRPV4 は軟骨細胞に局在し, 分化途上の軟骨細胞の極性保持に関与するチャネルである可能性が示唆された。

(13) 体温維持が海馬神経活動に与える影響: TRPV4による膜電位の制御

柴崎貢志, 富永真琴 (岡崎統合バイオサイエンスセンター細胞生理部門)

鈴木誠, 水野敦子 (自治医科大学薬理学講座)

TRPV4 は体温程度の温度, 低浸透圧刺激, 4αPDD により活性化され, 皮膚の角化細胞の他, 視床下部や脈絡層での強い発現が報告されている。しかし, 脳内での詳細な発現分布やその役割については未だ解析されていない。そこで, 我々は脳における TRPV4 の発現と機能に着目した。成体マウス脳内の TRPV4 mRNA 発現分布を調べた結果, 既に発現が報告されている脈絡叢や上衣細胞の他に, 海馬に強い発現が認められた。TRPV4 は海馬神経細胞の機能調節を行う因子ではないかと考えられた。TRPV4 蛋白質は細胞体・樹状突起に局在し, さらに海馬神経細胞に機能的に発現していることが確認された。TRPV4 は体温で活性化され, カチオンの流入により膜電位を脱分極側にシフトさせている可能性が考えられ

た。これらの仮説を検証するために, 野生型マウスと TRPV4 欠損マウスより, 海馬初代神経細胞を調整し, 静止膜電位を定量的に比較した。その結果, 野生型マウスより調整した海馬初代神経細胞では, TRPV4 欠損マウスの細胞と比較し約 5mV 程度静止膜電位が浅くなっていることが確認された。また, 電流注入実験を行った結果, TRPV4 欠損マウスより調整した海馬初代神経細胞では野生型の細胞よりも発火が起こりにくいことが確認された。以上の結果より, 温度受容体 TRPV4 は我々の体温で活性化しており, 神経細胞が興奮しやすい土台の環境を産み出す重要な役割を担っていることが明らかとなった。TRPV4 は海馬神経細胞の膜興奮性の制御を担う重要な因子であると考察される。

(14) Effects of skin surface temperature on epidermal permeability barrier homeostasis

傳田光洋 (資生堂ライフサイエンス研究センター)

曾我部隆彰, 富永知子, 富永真琴 (岡崎統合バイオサイエンスセンター・細胞生理部門)

Receptors belonging to the TRP family were recently identified as temperature sensors, and some of them, TRPV1, V3 and V4, are expressed in epidermal keratinocytes. To evaluate the influence of these receptors on epidermal permeability barrier homeostasis, we kept both hairless mouse skin and human skin at various temperatures immediately after tape stripping. At temperatures from 36°C to 40°C, the barrier recovery was accelerated in both cases compare to the control. At 34°C or 42°C, the barrier recovery was delayed compare to the control. 4 α -Phorbol 12,13-didecanone, an

activator of TRPV4, accelerated the barrier recovery, while ruthenium red, a blocker of TRPV4, delayed the barrier recovery. On the other hand, capsaicin, an activator of TRPV1, delayed the barrier recovery, while capsazepine, an antagonist of TRPV1, blocked this delay. 2-Aminoethoxydiphenyl borate and camphor, which are TRPV3 activators, did not affect the barrier recovery rate. Since TRPV4 is activated at about 35°C and above, while TRPV1 is activated at about 42°C and above, these results suggest that TRPV1 and TRPV4 are involved in skin barrier function.

(15) ヒト臍帯内皮細胞 (HUVEC) における伸展刺激依存 Ca^{2+} 上昇に対する TRPV2 の役割 : ストレッチセンサー感度を左右する伸展刺激速度と細胞膜直下細胞骨格の構造

片野坂友紀, 末盛智彦, 成瀬恵治 (岡山大学大学院医歯薬総合研究科システム循環生理)

我々は以前より, ヒト臍帯内皮細胞 (HUVEC) を用いて, 一軸方向の周期的伸展刺激に対して, その伸展率依存的に細胞内の Ca^{2+} が上昇することを報告しているが, 現在までにその分子メカニズムの解明には至っていない。一方近年の研究において, いくつかの TRP チャネルは物理的的刺激により活性化される可能性があることが明らかにしてきた。我々は現在, これらの TRP チャネルのうち, HUVEC に発現している複数の TRP 分子について, その伸展刺激依存性を調べている。今回は, TRPV2 強制発現細胞を用いた実験により得られた知見を中心に, (1) 細胞形態により伸展刺激の感受性が変わることを,

(2) 一定の伸展率であっても伸展速度により感受性が変わることを, (3) 細胞特異的な細胞膜直下の細胞骨格構造が細胞の伸展刺激感受性を反映している可能性があることを, を報告する。これらのことは, HUVEC における伸展刺激依存的な Ca^{2+} 上昇に TRPV2 が関与している可能性が考えられると同時に, 細胞の伸展刺激受容には単に伸展刺激センサータンパク質が発現していることが必要だけでなく, そのセンサーが高感度で作動するために細胞膜直下の細胞骨格の適切な構造が存在することを示唆する。

(16) BCR 刺激に誘導される MAPK 活性化経路におけるジアシルグリセロールに活性化される TRPC3 チャンネルの重要性

沼賀 拓郎 (総合研究大学院大学生命科学研究科生理科学)

森 泰生 (京都大学大学院工学研究科合成生物化学)

B 細胞において, TRPC3 は DAG により活性化される

Ca^{2+} チャンネルを構成している。従来, 多くの非興奮性細

胞において、受容体刺激に惹起される Ca^{2+} 流入は、ストア作動性 Ca^{2+} チャンネルを介すると考えられてきた。そのため、DAG 活性化 Ca^{2+} チャンネルの受容体シグナル伝達における意義はまったく明らかにされていない。本研究では、TRPC3 を欠損させたニワトリ免疫 B 細胞株を作製

し、B 細胞受容体シグナル伝達系における TRPC3 の重要性を解析した。それにより TRPC3 は BCR 刺激に誘導される PKC β の持続的な膜移行を制御し、BCR 刺激に惹起される MAPK の活性化において重要な役割を果たすことを明らかにした。

(17) Regulatory role of neuron-restrictive silencing factor (NRSF) in expression of TRPC1

村上学, 飯島俊彦 (秋田大学医学部機能制御医学)

大場貴喜, 高橋陽一郎, 渡邊博之, 伊藤 宏

(秋田大学医学部内科学講座 循環器内科学分野・呼吸器内科学分野)

The neuron-restrictive silencer factor (NRSF) represses transcription of genes by binding to a DNA sequence element called the neuron-restrictive silencer element (NRSE). The dominant-negative form of NRSF (dnNRSF) has a hypertrophic effect on cardiogenesis through an as-yet-unidentified mechanism. In this study, we examined the potential involvement of transient receptor potential (TRP) channel proteins and their associated scaffolding proteins (Homer1b and 2) in the development of cardiac hypertrophy, using transgenic mice overexpressing dnNRSF (dnNRSF mice).

An NRSE-like sequence was found in the fourth intron of *TRPC1* genomic DNA. We confirmed its interaction with NRSF using electrophoretic mobility-shift assays. RT-PCR and Western analyses revealed significant up-regulation of *TRPC1* in the heart of dnNRSF mice. Transient overexpression of *TRPC1* in HEK 293T cells increased the

activity of the nuclear factor of activated T cells (NFAT) promoter and stimulated store-operated Ca^{2+} channel (SOC)-mediated Ca^{2+} entry, suggesting that the TRPC1 is involved in SOC formation and NFAT activation. Immunoprecipitation analyses revealed that the TRPC1 protein interacts with itself and with TRPC3, TRPC5, TRPC6, and TRPM4, which are also expressed in the myocardium. We also demonstrated that Homer1b interacts with TRP molecules C1-C6 and M4. These results suggest that TRPC1 forms both homomeric and heteromeric channel assemblies; in the latter assemblies, the TRPC1 interacts with Homer proteins and/or with other TRPs. Our findings indicate that TRP and Homer proteins are involved in Ca^{2+} handling and subsequent NFAT activation during the hypertrophic response.

22. 「痛みの分子機構と治療戦略」研究会

2006年11月15日－11月16日

代表・世話人：仙波 恵美子（和歌山県立医科大学・医学部）

所内対応者：富永 真琴（自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター・細胞生理研究部門）

- (1) プロスタグランジン受容体 EP3 を介したブラジキニン反応の増強はブラジキニン B2 受容体の脱感作の減弱による
小崎康子（名古屋大学環境医学研究所・神経性調節分野）
- (2) マウス後根神経節における Interleukin-31 receptor A (IL-31RA) の発現解析
板東高功（和歌山県立医科大学医学部・第二解剖学教室）
- (3) ラット腰部脊髄神経に対するセロトニンによる疼痛関連行動と後根神経節への影響
加藤欽志（福島県立医科大学医学部・整形外科学教室）
- (4) ヒト椎間板培養細胞が後根神経節由来の軸索伸長に及ぼす影響 - mono layer culture を用いて -
山内かつ代（千葉大学大学院医学研究院・整形外科学）
- (5) Dscam の分子多様性は特異的な神経配線のために必要である
近藤真啓（日本大学歯学部・生理学教室/Dana-Farber 癌研究所）
- (6) PACAP シグナル伝達を介した nNOS の機能調節の分子機構
大西隆之（関西医科大学・医化学教室）
- (7) 脊髄におけるカンナビノイドの鎮痛機序解明：in vivo パッチクランプ記録による検討
木谷友洋（札幌医科大学医学部・麻酔科）
- (8) TRPA1 の活性化機構
藤田郁尚（岡崎統合バイオサイエンスセンター・生命環境研究領域細胞生理部門）
- (9) 脊髄内痛覚伝達機構に対する TRPA1 受容体の生理的役割
小杉雅史（佐賀大学医学部・生体構造機能学講座神経生理学分野）
- (10) 脊髄後角における P2Y 受容体を介する抑制性シナプス伝達の賦活化作用
中塚映政（佐賀大学医学部・生体構造機能学講座神経生理学分野）
- (11) 脊髄内 ATP 誘発長期持続性アロディニアの誘導および維持機構
中川貴之（京都大学薬学研究科・生体機能解析学分野）
- (12) ラット脊髄膠様質ニューロンにおける抑制性シナプス伝達のホスホリパーゼ A₂ 活性化による促進
熊本栄一（佐賀大学医学部・生体構造機能学講座神経生理学分野）
- (13) 神経因性疼痛における細胞質型ホスホリパーゼ A₂ の関与
長谷川茂雄（九州大学大学院薬学研究院・薬効解析学分野）
- (14) 神経因性疼痛モデルにおける非侵害性 Aβ線維過敏応答
松本みさき（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・分子薬理学分野）
- (15) 下行性疼痛調整系における MAPK 活性化
井辺弘樹（和歌山県立医科大学医学部・第一生理学教室）
- (16) 術後痛とオピオイドに対するマウス延髄 RVM ニューロン機能特性の系統差
川真田樹人（札幌医科大学医学部・麻酔科）
- (17) CCI ラットの心循環パラメータと寒冷曝露に対する反応の経日変化
佐藤純（名古屋大学環境医学研究所/近未来環境シミュレーションセンター）

(18) 気象変化による慢性痛悪化のメカニズムにおける内耳器官の役割

舟久保恵美 (名古屋大学環境医学研究所)

(19) NAAG Peptidase Inhibitor 局所投与の炎症性疼痛に対する効果

山本達郎 (熊本大学大学院医学薬学研究部・生体機能制御学)

(20) 新しい鎮痛薬カンナビノイド

小川明子 (日本大学歯学部・口腔診断学教室)

(21) シスプラチンによって引き起こされる痛覚過敏におけるイオンチャネルの関与

堀紀代美 (名古屋大学大学院医学系研究科・機能形態学講座機能組織学分野)

(22) 筋障害性慢性痛症モデル動物における筋の組織像

松原貴子 (名古屋学院大学人間健康学部・リハビリテーション学科)

(23) 痛みによる不快情動生成における分界条床核ノルアドレナリン神経伝達の役割

出山諭司 (北海道大学薬学研究院・薬理学研究室/京都大学大学院薬学研究科・生体機能解析)

(24) CRPS 患者は眼-手協調運動が障害されている

住谷昌彦 (大阪大学大学院医学系研究科・生体統御医学 麻酔・集中治療医学講座)

(25) 仮想痛み刺激と脳内神経活動の検討 (fMRI)

池本竜則 (高知大学医学部・整形外科教室)

教育講演 (1) MR スペクトロスコピーを用いた慢性疼痛患者の評価の試み

福井弥己郎 (聖) (滋賀医科大学医学部付属病院麻酔科・ペインクリニックセンター)

教育講演 (2) プリン受容体を介する DRG 細胞内 Ca 反応: 2 光子励起光分解を利用した時空間分析

中山晋介 (名古屋大学大学院医学系研究科・細胞生理学)

教育講演 (3) 慢性疼痛モデル動物扁桃体中心核におけるシナプス可塑性

加藤総夫 (東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター・神経科学研究部神経生理学研究室)

【参加者名】

南 雅文, 出山 諭司 (北海道大学薬学研究院), 川真田樹人, 木谷 友洋 (札幌医科大学医学部), 森山 朋子 (弘前大学医学部), 矢吹 省司, 関口 美穂, 加藤 欽志, 畑下 智 (福島県立医科大学医学部), 山内 かづ代, 荒井 桃子, 遠藤 光晴, 土橋 玉枝 (千葉大学大学院医学研究院), 岩田 幸一, 近藤 真啓, 小川 明子 (日本大学歯学部), 加藤 総夫, 高橋 由香里 (東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター), 尾崎 紀之, 堀 紀代美, 安井 正佐也, 中山 晋介 (名古屋大学大学院医学系研究科), 水村 和枝, 佐藤 純, 片野坂 公明, 小崎 康子, 舟久保 恵美, 松田 輝, 妹尾 詩織, 那須 輝顕 (名古屋大学環境医学研究所), 熊澤 孝朗, 橋本 辰幸, 山口 佳子, 櫻井 博紀, 吉本 隆彦, 高畑 成雄, 森本 温子, 大道 裕介 (愛知医科大学医学部), 松原 貴子, 田崎 洋光, 下 和弘 (名古屋学院大学人間健康学部), 福井 弥己郎 (聖) (滋賀医科大学医学部), 中川 貴之 (京都大学薬学研究科), 伊藤 誠二, 大西 隆之 (関西医科大学), 眞下 節, 住谷 昌彦 (大阪大学大学院医学系研究科), 仙波 恵美子, 板東 高功, 井辺 弘樹 (和歌

山県立医科大学医学部), 野口 光一 (兵庫医科大学), 緒方 宣邦 (広島大学医学部), 牛田 享宏, 池本 竜則, 西上 智彦 (高知大学医学部), 吉村 恵 (九州大学大学院医学研究院), 井上 和秀, 津田 誠, 長谷川 茂雄, 豊満 笑加, 増田 隆博, 北野 順子 (九州大学大学院薬学研究院), 熊本 栄一, 中塚 映政, 小杉 雅史, 青山 貴博, 水田 恒太郎 (佐賀大学医学部), 井上 誠, 松本 みさき (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科), 山本 達郎 (熊本大学大学院医学薬学研究部), 富永 真琴, 柴崎 貢志, 稲田 仁, 曾我部 隆彰, 東 智広, 村山 奈美枝, 川端 二功, 藤田 郁尚 (岡崎統合バイオサイエンスセンター 細胞生理部門) 塚本 三奈, 榎本 隆吾 (アステラス製薬(株)筑波研究所), 砥出 勝雄, 鈴木 誓吾, 奥村 貴子, 今井 暁, 中川 哲彦, 佐藤 真衣子, 山本 渉, 桑山 成樹, 北山 久美子, 谷本 幸 (ファイザー (株) 中央研究所), 吉川 崇, 江里口 義朗, 森江 俊哉 (大日本住友製薬(株)薬理研究所/化学研究所), 佐藤 俊浩 (持田製薬 (株))

【概要】

痛みは生体警告系として重要な役割を果たすが、持続する無用な疼痛は人類にとって最大の苦痛である。我々の生活の質を向上させるためにも、無用な疼痛の克服は今世紀の大きな課題の一つである。脳の 10 年に続き、アメリカ議会は 21 世紀初頭の 10 年を“痛みの 10 年”と位置づけ、痛みの科学的解明と治療と福祉の向上に向けてスタートを切った。その結果、痛みの基礎研究は飛躍的に進展したと言える。しかし、その研究成果をヒトの痛みの理解や難知性疼痛の治療にどう結びつけていくか、ということが今後の大きな課題である。神経因性疼痛など従来の鎮痛薬が奏効しない難治性の疼痛については、その発症機序の解明と新たな鎮痛薬の開発が急務となっている。本研究会は、痛みの発生と制御の分子機構について様々な側面から議論を行い、新たな治療戦略の構築と、わが国の疼痛研究のさらなる発展を目指して企画されたものである。また、本研究会への大学院生や若手の

研究者の参加を促し、次代の疼痛研究を担う研究者の育成を目指すものでもある。

平成 18 年度の本研究会では、末梢から脳にいたる痛覚伝達系の各レベルでの研究成果と未解明の問題点が報告された。末梢レベルでは、各種炎症性メディエーターやサイトカインによる発痛のメカニズム、末梢及び脊髄後角における TRPA1 の活性化機構、後角における ATP や PLA2 の役割、カンナビノイドによる鎮痛のメカニズム、下行性疼痛調整系の中核である RVM ニューロンの活性化と機能特性、神経因性および筋障害性疼痛のモデル作製、気象・気温などの環境要因が痛みに影響を与えるメカニズム、痛みの情動における分界条床核や扁桃体の役割、脳イメージング法による痛みの中枢回路の解析と慢性疼痛患者の評価・治療への応用、などの研究発表に対し、活発な質疑応答が行われた。

(1) プロスタグランジン受容体 EP3 を介したブラジキニン反応の増強はブラジキニン B2 受容体の脱感作の減弱による

小崎康子¹，神部福司¹，妹尾久雄¹，熊澤孝朗²，水村和枝¹

(¹名古屋大学・環境医学研究所，²愛知医科大学・医学部)

我々は、イヌ精巣—上精巣神経 *in vitro* 標本を用いた電気生理学の実験から、ブラジキニン(BK) に対する痛み受容体の反応がプロスタグランジン受容体 EP3 のアゴニストによって増強されること、cAMP を増加させると抑制されることを先に報告した。本報では、イヌの脊髄後根神経節細胞からクローニングした 2 種類の EP3 とマウス BK B2 受容体を共発現する Chinese hamster ovary 細胞株を用いて、BK による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応に対する EP3 アゴニストの影響を観察した。BK を 6 分間隔で 30 秒間 2 度投与すると、2 度目の反応は初回に比べて、有意に減弱した。この脱感作は、2 度目の BK 投与前に EP3 アゴ

ニスト、ONO-AE-248 を投与すると軽減された。この EP3 アゴニストの作用は百日咳毒素に感受性を示し、Gi 蛋白を介した細胞内シグナル系が脱感作の減弱に関与することが示唆された。実際、蛋白キナーゼ A 阻害剤、H-89 による前処置も 2 度目の BK 反応の減弱を軽減した。さらに、初回の BK 反応に対しては ONO-AE-248 および H-89 はともに影響を及ぼさなかった。以上の結果から、プロスタグランジン受容体 EP3 を介した BK 反応の増強は BK B2 受容体の脱感作の減弱によることが明らかとなった。これらの結果は先の電気生理学の実験結果を支持するものである。

(2) マウス後根神経節における Interleukin-31 receptor A (IL-31RA) の発現解析

板東高功 森川吉博 小森忠祐 仙波恵美子 (和歌山県立医科大学医学部・解剖学第二教室)

最近、新たにクローニングされた IL-31 は、その機能

的受容体は固有の受容体サブユニット IL-31RA は

oncostatin M receptor β (OSMR β)と共に複合体から成ることが報告された。また、IL-31 の transgenic mice においてアトピー性皮膚炎類似の皮膚病巣が形成されること、アトピー性皮膚炎のモデルマウスの患部皮膚において IL-31 の mRNA の発現が増加することが報告され IL-31 とアトピー性皮膚炎の関係が注目されている。我々はこれまで、OSMR β が TRPV1 と P2X₃ を共発現する一部の小型 DRG ニューロンに発現することを明らかにしてきた。そこで、これらの OSMR β 発現ニューロンに IL-31RA が

発現して、機能的な IL-31 受容体を形成しているのではないかと考え、まず、ノーザンブロット法および in situ hybridization 法を用いて、IL-31RA の mRNA がマウス後根神経節に発現していることを明らかにした。次に二重免疫染色法により IL-31RA と OSMR β のタンパク質の発現を検討した、ところ、IL-31RA の発現している細胞は、OSMR β 発現細胞と完全に一致した。以上の結果は、OSMR β を発現する小型の DRG ニューロンは、OSM のみならず IL-31 にも感受性であることが明らかとなった。

(3) ラット腰部脊髄神経に対するセロトニンによる疼痛関連行動と後根神経節への影響

加藤欽志 菊地臣一 紺野慎一 関口美穂（福島県立医科大学医学部整形外科教室）

【背景】セロトニン(5-HT)は腰椎椎間板ヘルニアにおける神経根の炎症に関与する化学因子の一つであると考えられている。しかし、その疼痛発現にどの程度関与しているかについては不明である。

【方法】SD 系雌ラットを対象とし、実験系を control 群：溶媒のみ、低用量 5-HT 群：5-HT (10 μ g)、高用量 5-HT 群：5-HT (30 μ g)、髄核群：溶媒 と尾椎より採取した髄核、の以上 4 群に分け、各薬剤を DRG 上に投与した。下肢疼痛の閾値と投与側の L5DRG でのアポトーシス細胞の発現を術前、術後 2, 7, 14, 21 日目に測定した。また control 群と髄核群において、血漿を採取し、5-HT turnover rate (5-HIAA/5-HT) を各測定時点で算出した。

【結果】術後 7 日目では、高用量 5-HT 群と髄核群において、control 群と比較して、有意に下肢疼痛の閾値が低下し、L5DRG でのアポトーシス細胞の増加を認めた。術後 14 日以降では、control 群と比較して、髄核群において、有意に下肢疼痛の閾値が低下していたが、高用量 5-HT 群では差がなかった。5-HT turnover rate は、術後 1 日目と 7 日目で、髄核群において、control 群と比較して、有意に上昇していた。

【考察】腰部脊髄神経に対して高用量の 5-HT の投与によって、下肢疼痛の閾値が低下することが明らかとなった。髄核による腰部脊髄神経根の炎症過程において、5-HT はその早期に関与している可能性が示唆された。

(4) ヒト椎間板培養細胞が後根神経節由来の軸索伸長に及ぼす影響

山内かづ代（千葉大学・大学院医学研究院・整形外科）
遠藤光晴・山下俊英（千葉大学・大学院医学研究院・神経生物学）

背景：椎間板変性は腰痛の一因であるが、人病理学検討から、椎間板周辺にしか存在しない感覚神経線維が、椎間板内層に深く侵入することいわゆる、nerve ingrowth が、その主因とされる。また、椎間板性腰痛患者の椎間板髄核には神経栄養因子(NGF) と腫瘍壊死因子(TNF α) が有意に増加し、それらが、nerve ingrowth を惹起していると考えられているが、詳細な検討は行われていない。
目的：Monolayer culture の手法を用いて、ヒト椎間板髄

核及び TNF α が、後根神経節（以下 DRG）由来の軸索伸長に及ぼす影響について検討すること。

方法：新生児ラットの DRG を 25 個摘出、単離させた DRG 細胞を、ヒト椎間板髄核培養上清（以下 NP）、TNF α recombinant (1ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml) を加えた medium、コントロールとして medium のみ、の中で 37 $^{\circ}$ C 24 時間培養を行った。共培養後、各群における軸索の伸長を測定し比較した。

結果: NP 群 119.906 ± 70.158 , $\text{TNF}\alpha \cdot 1\text{ng/ml}$ 群 49.060 ± 25.606 , $\text{TNF}\alpha \cdot 10\text{ng/ml}$ 群 73.739 ± 53.996 , $\text{TNF}\alpha \cdot 100\text{ng/ml}$ 群 58.280 ± 37.722 , コントロール群 59.505 ± 41.039 (μm) であった。コントロール群と比較して, NP 群, $\text{TNF}\alpha \cdot 10\text{ng/ml}$ 群では高値であり有意差を認め ($p < 0.05$), $\text{TNF}\alpha \cdot 1\text{ng/ml}$ 群は低値であり有意差を認めた ($p < 0.05$)。

考察: 椎間板髄核上清内において軸索伸長が高値であったことより, 髄核に軸索伸長を促進する因子の存在が考えられた。 $\text{TNF}\alpha$ に関しては, 低濃度では軸索伸長を抑制し, 中濃度では軸索伸長を促進する可能性が考えられ, ある一定の濃度を超えると軸索伸長に影響を及ぼさない可能性, 至適濃度の存在が考えられた。

(5) Dscam の分子多様性は特異的な神経配線のために必要である

近藤真啓^{1,2}, Dietmar Schmucker¹ (Dana-Farber 癌研究所・¹Cancer Biology 研究部門,
² 日本大学歯学部生理学教室)

ショウジョウバエ *Dscam* は, 選択的スプライシング機構により 38,000 種類以上の異なった受容体 isoform を発現しうる。われわれは, 機械感覚受容神経細胞 (ms neuron) の軸索を単一神経細胞レベルで標識する実験系を確立し, 遺伝学的アプローチにより, この *Dscam* の分子多様性が神経配線の特異性を決定するために必要であるか否かについて検討した。

野生型ハエにおいて, ms neuron の軸索分枝の位置および長さは, 個体間において定型的であった。そこで, MARCM (Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker) システムにより, ms neuron で特異的に *Dscam* の発現を欠失 (*Dscam^{null}*) させたところ, 軸索は正しい位置より中枢神経系へ進入したが, その後, 伸長を停止し, 適切な

標的細胞へ向けた分枝の形成はおこらなかった。この *Dscam^{null}* ms neuron に 1 種類の *Dscam* isoform を発現させたところ, 基礎的な軸索伸長および分枝の形成能力は回復したが, 適切な標的へ向けた軸索投射および分枝の形成は再現できなかった。また, 12 種類存在する可変 exon 4 の 5 つを異なる組み合わせで欠失させた 2 系統の復帰突然変異体 (いずれの系統も, *Dscam* の分子多様性が野生型の 59% にまで減少) を作製したところ, 各系統の ms neuron は異なる様式で軸索投射異常を示した。

以上の結果より, *Dscam* の分子多様性は, ms neuron の適切な神経配線のために必要であることが明らかになった。

(6) PACAP シグナル伝達を介した nNOS の機能調節の分子機構

大西隆之 (関西医科大学医化学教室)

NMDA 受容体を介した Ca^{2+} の流入による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇によって活性化される酵素の 1 つに神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) がある。神経系株細胞である PC12 細胞において nNOS は主に細胞質に存在するが, 神経ペプチドである PACAP と NMDA の共刺激下により, nNOS は細胞膜にトランスロケーションすることで NO 産生が促進され, この nNOS のトランスロケーションには PACAP シグナル伝達経路が重要であることが明らかになっている。nNOS は N 末端に存在する PDZ ドメインと catalytic ドメインから構成され, nNOS は PDZ ドメインを介して PSD-95 や NMDA 受容体の NR2B サブユニッ

トと相互作用することで nNOS のトランスロケーションが起こると予想している。我々は nNOS の N 末端に存在する PDZ ドメインを含む 1-299aa の nNOS 欠失変異体 (nNOS N) と YFP との融合タンパク (nNOS N-YFP) を作製し, PC12 細胞において細胞膜への nNOS N-YFP のトランスロケーションを定量的に測定する系を構築した。PACAP は少なくとも PKA と PKC のこの 2 つのシグナル系に関与することが明らかになっている。今回 nNOS の細胞膜へのトランスロケーションには薬理学的な実験から PKA と PKC の両方の経路が必要であることを示唆する結果が得られた。

(7) 脊髄におけるカンナビノイドの鎮痛機序解明：in vivo パッチクランプ記録による検討

木谷友洋・川真田樹人・杉野繁一・成松英知・山内正則・並木昭義（札幌医科大学医学部麻酔科）

現在、マリファナの活性成分である Δ -9-テトラヒドロカンナビノールをはじめとした、カンナビノイド (CB) 受容体作動薬の鎮痛効果に高い関心がよせられている。鎮痛機序の研究として CB 受容体作動薬 WIN55212-2 による影響を、脊髄後角膠様質ニューロン (SG ニューロン) で細胞内記録を in vitro に行った報告がある (Moisset et al., 2001)。しかし、SG ニューロンは脊髄内抑制性介在ニューロンや脳からの下行性抑制性ニューロンからの入力を受けており in vitro では抹消から脳までの痛覚ネットワークの解析は困難である。そこでラットの生体脊髄標本を用いた in vivo パッチクランプ法により生体内での WIN55212-2 投与による神経伝達機構の変化を記録し、

痛覚ネットワークの解明に迫った。

【方法】生後 6 週のおスラットにウレタンを 1.2~1.5g/kg を腹腔内投与し全身麻酔した。気管切開し挿管，人工呼吸管理をした上で第 13 胸椎から第 2 腰椎まで椎弓切除した。パッチクランプにより脊髄後角ニューロンの電気活動を記録する。はじめに生理的状态での侵害・非侵害刺激に対する反応を調べた後，WIN 55212-2 を投与し各種刺激に対する反応の変化を記録した。

【結果】WIN55212-2 の投与は，侵害および非侵害刺激によって誘起される興奮性シナプス後電流の振幅を変化させずにその発生頻度を減少させた。

(8) TRPA1 の活性化機構

藤田郁尚（岡崎統合バイオサイエンスセンター細胞生理部門）

近年，痛みの知覚メカニズムの一部に温度感受性 TRP チャンネルが関与していることが明らかになってきた。その中でも TRPA1 は低温（約 17℃）で活性化する冷感受容体として報告されたものであるが，ワサビやカラシの主成分であるイソチオシアン酸アリルや，ニンニクの主成分であるアリシンなどの受容体として痛み刺激の受容に強く関わっていることが最近明らかになりつつある。我々は，TRPA1 が痛み刺激を受容する分子センサーである新たな証拠を見出した。

パラベン は医薬品，化粧品及び食品などで安全性に優れている理由から古くから用いられている防腐剤である。しかし，日本の化粧品市場においては，パラベンは

ピリピリとした刺激を誘発するものと認識されている。パラベンは化学構造的にはベンゼン環とアルキル側鎖を有するものである。我々はパラベンがアルキル側鎖に関係なく TRPA1 を活性化するものであることを Ca イメージング法，パッチクランプ法を用いて見出した。また，メチルパラベンについては活性化膜電流の濃度依存曲線の解析から，EC₅₀ が 4.4mM であることがわかった。さらに，メチルパラベンはイソチオシアン酸アリルと同様にマウスに疼痛関連行動を引き起こし，その行動が TRP チャンネルのブロッカーであるルテニウムレッドによって抑制された。以上の結果から，パラベンのピリピリ感は TRPA1 を介して伝達されることが強く示唆された。

(9) 脊髄内痛覚伝達機構に対する TRPA1 受容体の生理的役割

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

TRPA1 は最も新しい TRP チャンネルファミリーで，冷

刺激以外にマスタードなどの天然化合物によって活性化

される。TRPA1 は、後根神経節ニューロンにおいて TRPV1 と共発現し、侵害性冷感覚のみならず、機械的刺激、炎症による痛覚過敏や神経因性疼痛にも関与していることが示唆されている。近年、上記のような末梢神経系における TRPA1 の役割について研究がなされたが、中枢神経系における関与は全く不明である。今回、マスタードオイルの主成分で、TRPA1 選択的作動薬である allyl isothiocyanate (AITC) が、脊髄後角における興奮性シナプス伝達にどのような作用を及ぼすか調べた。実験は、成熟雄性ラットから作製した脊髄横断スライス標本の膠様質ニューロンにブラインド・ホールセル・パッチクランプ法を適用して行った。AITC は自発性興奮性シナプス後電流の振幅や発生頻度を有意に増加した。AITC

の作用は CNQX 存在下あるいは無カルシウム溶液中では抑制されたが、tetrodotoxin やランタンにより殆ど影響を受けなかった。また、非特異的な TRP チャネル阻害薬である ruthenium red によって完全に抑制された。以上の結果から、膠様質ニューロンのシナプス前終末に TRPA1 が存在しており、その活性化によって直接的なカルシウム流入を介してグルタミン酸の放出を増強することが明らかとなった。このような中枢神経系における TRPA1 の活性化に伴う興奮性シナプス伝達の促進は、痛覚過敏やアロディニアなどの異常知覚に関与する可能性があり、TRPA1 は疼痛治療における新たな標的となる可能性が示唆された。

(10) 脊髄後角における P2Y 受容体を介する抑制性シナプス伝達の賦活化作用

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

細胞外の ATP はイオンチャネル型の P2X 受容体ならびに G 蛋白共役型の P2Y 受容体に結合することによって、様々な生理活性をもたらす。P2X 受容体が痛覚情報伝達に対して重要な役割を果たすことを示唆する多くの研究成果が蓄積されてきたが、P2Y 受容体による感覚情報伝達に対する制御機構に関しては殆ど明らかになっていない。今回、脊髄横断スライス標本を用いて脊髄膠様質ニューロンからパッチクランプ記録を行い、脊髄内感覚情報伝達系に対する P2Y 受容体活性化の影響を電気生理学的に検討した。P2Y 受容体作動薬である UTP や UDP によってグルタミン酸作動性興奮性シナプス後電

流や GABA およびグリシン作動性抑制性シナプス後電流は影響を受けなかった。一方、2-methylthioADP の灌流投与によってグルタミン酸作動性興奮性シナプス後電流の変化は観察されなかったが、GABA およびグリシン作動性抑制性シナプス後電流の発生頻度ならびに振幅は著明に増強した。2-methylthioADP による抑制性シナプス電流の発生頻度の増強作用は tetrodotoxin や CNQX により殆ど影響を受けなかったが、選択的 P2Y₁ 受容体阻害薬 MRS2179 によって有意に抑制された。以上の結果より、脊髄内感覚情報伝達系において、P2Y₁ 受容体が抑制性シナプス伝達の賦活化に関与する可能性が示唆された。

(11) 脊髄内 ATP 誘発長期持続性アロディニアの誘導および維持機構

中川貴之¹, 若松佳代¹, 前田早苗¹, 南 雅文², 佐藤公道³, 金子周司¹

(¹ 京都大学薬学研究科生体機能解析学分野, ² 北海道大学薬学研究科薬理学分野, ³ 安田女子大学)

我々は、ATP や P2X 受容体アゴニストを脊髄くも膜下腔内投与すると、非常に長期間持続する (3~4 週間) アロディニアが惹起されることを見出した。この長期持続性アロディニアは、新生児期カブサイシン処置によって

も影響を受けず、P2X_{2/3} 受容体拮抗薬あるいは NMDA 受容体拮抗薬の同時処置により消失したことから、カブサイシン非感受性一次感覚神経の P2X_{2/3} 受容体の活性化がトリガーとなり、グルタミン酸遊離-NMDA 受容体活性

化を介して誘導されると考えられた。しかし、 $P2X_{2/3}$ 受容体拮抗薬は、ATP 投与翌日の形成されたアロディニア（維持初期）に対しては抑制作用を示したものの、投与 7 日後（維持後期）においては影響を与えなかった。また、脊髄内ミクログリアは ATP 投与数時間～1 日後、アストロサイトは 1～3 日後にかけて、それぞれ活性化しており、ミクログリア阻害薬は誘導期において、グリア細胞代謝阻害薬は誘導期～維持初期において抑制作用を示し

たが、いずれも維持後期においては無効であった。また、ATP 投与 1-8 時間後に脊髄内の ERK リン酸化が認められ、MEK 阻害剤により、アロディニアは誘導期～維持初期において抑制されたが、維持後期においては無効であった。これらの結果から、脊髄内 ATP 誘発長期持続性アロディニアは、誘導期～維持期初期にかけては、脊髄内グリア細胞が、おそらく ERK 活性化を介して、時間経過とともに役割を変えながら関与すると考えられる。

(12) ラット脊髄膠様質ニューロンにおける抑制性シナプス伝達のホスホリパーゼ A_2 活性化による促進

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

痛み伝達制御に重要な役割を果たす脊髄後角第 II 層（膠様質）ニューロンの興奮性シナプス伝達はホスホリパーゼ A_2 (PLA_2) 活性化により促進することを前回報告した。今回、痛み伝達制御における PLA_2 の役割をより詳細に知るために、メリチンが抑制性シナプス伝達にどんな作用を及ぼすか調べた。実験は、成熟雄性ラットから作製した脊髄横断スライス標本の膠様質ニューロンにブラインド・ホールセル・パッチクランプ法を適用して行った。メリチン (1 μM) は GABA およびグリシン作動性の自発性抑制性シナプス後電流 (sIPSC) の振幅や発生頻度を増加し、前者の sIPSC 促進は tetrodotoxin (TTX, 1

μM) により抑制されたが、後者は TTX や CNQX (10 μM) や indomethacin (100 μM) により殆ど影響を受けなかった。そのグリシン作動性 sIPSC 促進作用は、メリチン濃度依存性や脱感作を示し、 PLA_2 阻害剤 4-bromophenacyl bromide (50 μM) や nordihydroguaiaretic acid (100 μM) 存在下で消失した。以上の結果は、 PLA_2 活性化により生成した lipoxigenase 代謝物がグリシン作動性シナプス伝達をシナプス前性および後性に促進することを示している。脊髄後角における PLA_2 活性化は痛み伝達を多様に制御することが示唆される。

(13) 神経因性疼痛における細胞質型ホスホリパーゼ A_2 の関与

長谷川茂雄, 津田誠, 井上和秀 (九州大学大学院薬学府薬効解析学分野)

糖尿病や末期癌などに伴う末梢神経障害により発症する神経因性疼痛は、既存の鎮痛薬が奏効しない難治性の疼痛であり、その発症メカニズムには不明な点が数多く残っている。細胞質型ホスホリパーゼ A_2 (cytosolic phospholipase A_2 ; cPLA₂) はアラキドン酸を含むリン脂質を加水分解し、脂質メディエーターの産生を介して、痛みに関与していることから、cPLA₂ の活性化が痛覚伝達系の制御に重要な役割を果たしている可能性が示唆される。そこで本研究では、神経因性疼痛発症メカニズムにおける cPLA₂ の関与を明らかにするため、その病態モデルを用いて、後根神経節細胞 (dorsal root ganglion;

DRG) における cPLA₂ の活性化について検討した。

末梢神経損傷により、DRG ニューロンにおいて、cPLA₂ の活性化型である Ser505 リン酸化型 cPLA₂ (phospho-cPLA₂) の発現レベルの増加および細胞膜近傍へのトランスロケーションが観察された。Phospho-cPLA₂ 陽性ニューロンは神経損傷後経時的に増加し、この経時変化は神経損傷によるアロディニア発現の経時変化とほぼ一致した。さらに、選択的 cPLA₂ 阻害剤を髄腔内投与した結果、アロディニアが抑制されると同時に、損傷側 DRG ニューロンにおける phospho-cPLA₂ の発現レベルも低下した。以上の結果より、DRG ニューロンにおける

cPLA₂ の活性化は、神経因性疼痛に重要な役割を有していると考えられる。

(14) 神経因性疼痛モデルにおける非侵害性 A β 線維過敏応答

松本みさき, 植田弘師 (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科分子薬理学分野)

当研究室では、発痛効果を有する生理活性物質により侵害線維ごとの評価を可能とする Algogenic-induced paw flexion (APF) 試験を開発し、数多くの物質による解析から侵害線維を薬理学的に 3 種類に分類化してきた。しかしながら、この APF 試験においては、アロディニア機構の解明に必須の A β 線維に相当する知覚応答を観察することができない。本研究では、従来の化学刺激に代えてニューロメーター装置を用い、電気刺激による即時反射性の屈曲応答を評価する Electrical stimulation-induced paw flexion (EPF) 試験を新たに確立した。正常マウスにおいて、5 Hz による C 線維応答はサブスタンス P 拮抗薬と NMDA 拮抗薬により遮断され、250 Hz による A δ 線維応答は NMDA 拮抗薬により遮断された。さらに、

2000 Hz による A β 線維応答は non-NMDA 受容体拮抗薬により遮断され、これら 3 種の線維応答は明らかに異なるものであることが確認された。つぎに、本法を用いて、坐骨神経部分結紮性神経因性疼痛モデルにおける各種線維応答を評価した。C 線維応答では反応閾値の上昇が認められ、A δ 線維では反応閾値の低下が観察された。これらは従来の APF 試験法で確認された Type 1 線維応答の消失ならびに Type 3 線維応答の亢進に一致する知見である。さらに、神経因性疼痛時に A β 線維応答においても閾値の減少、すなわち過敏応答が観察された。この A β 線維応答の性格付けについても議論したい。

Reference: Matsumoto M, Inoue M, Hald A, Yamaguchi A, Ueda H. Mol Pain. 2006 May 8;2:16.

(15) 下行性疼痛調整系における MAPK 活性化

井辺弘樹, 木村晃久, 堂西倫弘, 玉井靖彦 (和歌山県立医科大学 第一生理学講座)
仙波恵美子 (和歌山県立医科大学 第二解剖学講座)

吻側延髄腹内側部 (rostral ventromedial medulla : RVM) セロトニン含有神経細胞は下行性線維を送り、脊髄後角において痛みの伝達を調整している。この下行性疼痛調整系は、痛みの抑制だけではなく、炎症や神経損傷後に見られる痛覚過敏の発生や維持に関与していることが明らかにされ、その機能変化が注目を集めている。

急性および慢性拘束ストレス負荷：2-3 週間の慢性拘束ストレス（1日6時間）により Tail flick test において痛覚過敏が認められた。慢性拘束ストレスにより RVM における pERK 陽性細胞の増加が確認され、それら陽性細胞の約 80%は 5HT ニューロンであった。3 週間の慢性拘束ストレスにより RVM 5HT ニューロンの pERK 陽性率はコントロールに比し 2 倍に増加していた。

末梢組織の炎症：ラット足底への CFA 接種後、1 時間にわたり RVM において pp38 の発現増加が認められた。また、CFA 接種後 7 時間をピークとした pERK の発現増加が認められ、発現増加は 24 時間持続していた。CFA 接種 7 時間後、RVM における pERK 陽性細胞の約 60%は 5HT ニューロンであり、RVM の 5HT ニューロンにおける pERK 陽性率はコントロール群に比し、7 倍に増加していた。

これらの結果は、慢性ストレスや炎症後 RVM セロトニン含有神経細胞の ERK 活性が増加することを示しており、下行性疼痛調整系の機能変化に MAPK が関与している可能性を示唆している。

(16) 術後痛とオピオイドに対するマウス延髄 RVM ニューロン機能特性の系統差

杉野 繁一, 川真田 樹人, 木谷 友洋, 成松 英智, 並木 昭義 (札幌医科大学麻醉学講座)

【はじめに】手術後の疼痛に対する感受性やオピオイドによる鎮痛効果は個人差がある。この個人差の少なくとも一部は、遺伝的要因が関与している。一方、疼痛伝達に関する神経ネットワークにおいて、延髄痛覚受容ニューロン (RVM ニューロン) は下行性疼痛制御系の重要な起始核である。そこで我々は下行性疼痛制御系における術後痛とオピオイド鎮痛の遺伝的影響を検討するために、RVM ニューロンの電気活動の変化を疼痛行動の異なるマウス系統間で検討した。

【方法】CBA, A の 2 系統のマウスをウレタン麻酔下で RVM ニューロンの単一活動電位を細胞外記録した。術後痛モデルとしてマウスの足底を切開、縫合した。また

DAMGO (10-100ng) を脳室内投与し、ニューロンの自発活動および機械刺激に対する応答を記録した。

【結果】148 個の RVM ニューロンを記録した。切開に対して、CBA では自発、誘発反応ともに減少したが、A では変化しなかった。DAMGO 投与では、CBA では多数のニューロンが 10ng では抑制されず、30ng-100ng で抑制された。A ではすべてのニューロンの応答が 10ng 投与により抑制された。

【結論】手術侵襲後とオピオイド投与後の RVM ニューロンの機能特性の変化に系統差があった。下行性疼痛制御系では μ レセプターの機能や発現、さらには神経ネットワーク形成に遺伝的差異があることが示唆された。

(17) CCI ラットの心循環パラメータと寒冷曝露に対する反応性の経日変化

余 錦, 佐藤 純, 水村和枝 (名古屋大学環境医学研究所)

慢性痛における自律神経活動は罹病期間中に変動していると考えられるが詳細は明らかでない。そこで、神経損傷後疼痛ラットに対し寒冷曝露を繰り返し行い、心循環パラメータの反応性から自律神経系の変動を観察した。SD ラットに坐骨神経損傷 (CCI) を施し、自由行動下で記録した腹大動脈圧波形から平均血圧 (MAP), 心拍数 (HR), 心拍間隔変動周波数パワーを求めた。安静時 MAP は術後 4-19 日目において上昇した。安静時 HR は術後 4 日目に上昇後は徐々に低下し 19 日目には低値を示した。心拍間隔変動パワーのうち交感神経活動を反映する低周波成分 (LF)/高周波成分 (HF) 比は MAP と同様の経日変化を示したが、副交感神経活動を反映する HF 値は術後 11 日目以後に高値を示した。

術後 4~19 日目の寒冷曝露 (22℃より 15℃まで冷却) により MAP, HR はともに上昇したが、その程度は術前のものと変わらなかった。LF/HF は寒冷曝露により術後 4, 7 日目以外で上昇したが、HF は術後 11 日目以後に低下した。以上より、1) CCI 術後の交感神経優位性は長く続かない、2) 寒冷曝露に対する交感神経系の反応は健常時~病期において概ね一様である、3) 術後 11 日目以後では寒冷曝露は副交感神経を抑制することが分かった。よって、寒冷曝露は交感神経活動を賦活すると同時に、増強した副交感神経活動を直接抑制することで、慢性痛悪化に至る未知のメカニズムを駆動していることが示唆された。

(18) 気象変化による慢性痛悪化のメカニズムにおける内耳器官の役割

舟久保恵美 (名古屋大学環境医学研究所)

我々は、ヒトの慢性痛が低気圧接近や気温低下などの気象変化により増強する現象を動物実験で再現することに成功した。これらの結果は、ラットに気温や気圧の変化を検出する機構が備わっていることを示しているが、気圧検出機構の存在については何もわかっていない。そこで、鼓膜を外科的に破壊、またはヒ素注入により内耳を破壊した慢性痛モデルラットに対して気圧低下の影響を観察したところ、鼓膜破壊では気圧低下の慢性痛増強効果は消失しないが、内耳破壊ラットの慢性痛増強が抑制される結果を得た。これは内耳に何らかの気圧検出機構が存在することを示唆している。そこで、内耳からの気圧情報は前庭神経系を介して伝えられるとの仮定の下に、気圧低下環境にて麻酔下ラット前庭神経核からの単

一神経放電細胞外記録を行った。

記録電極を刺入しながら前庭神経の電気刺激、あるいはカロリックテスト、回転に対する応答の有無により前庭神経核ニューロンを探し、その後気圧低下環境に曝露し反応を観察した。これまでに数例ではあるが、8 分間で大気圧から 40 hPa 気圧を低下させた際、気圧低下開始後に放電頻度が増加し始め、設定気圧到達後にその放電頻度がピークに達するニューロンを記録することができた。これらの細胞が前庭神経核に位置することは、組織染色でも確認した。今後、さらに気圧感受性ニューロンの同定を進めるとともに、その反応閾値を調べ、圧検出機構を明らかにしていく。

(19) NAAG Peptidase Inhibitor 局所投与の炎症性疼痛に対する効果

山本達郎 (熊本大学医学薬学研究部生体機能制御学)

N-acetyl-aspartyl-glutamate (NAAG)は、哺乳動物の中枢神経系に豊富に存在する神経伝達物質である。NAAG 自身は、Group II mGluR の 1 つである mGluR3 の作動薬として働くが、NAAG peptidase inhibitor により分解され N-acetyl-aspartate (NAA)と glutamate に分解される。NAAG peptidase inhibitor の髄腔内投与・全身投与は、炎症性疼痛モデル・神経因性疼痛モデルにて mGluR3 を介した鎮痛効果を発揮することが報告されている。以上より、NAAG が侵害刺激伝達に関係している可能性が示唆されている。今回、NAAG peptidase inhibitor の炎症部への局所投与により鎮痛効果が発揮されるか否かを検討した。炎症性疼痛モデルとしては、ホルマリンテストとカラゲ

ニンテストを用いた。NAAG peptidase inhibitor としては、ZJ-43・2-PMPA を、mGluR3 の拮抗薬として LY341495 を、mGluR3 の直接の作動薬として SLx-3095-1・APDC・NAAG を用いた。いずれの薬物も、ホルマリンもしくはカラゲニンと一緒にラット後肢に皮下注した。いずれの NAAG peptidase inhibitor もホルマリンテスト・カラゲニンテストで鎮痛効果を発揮した。これらの効果は LY341495 にて完全に拮抗された。また mGluR3 作動薬でも NAAG peptidase inhibitor 同様の鎮痛効果が得られた。以上の結果から、炎症の局所でも NAAG が放出されており、NAAG peptidase inhibitor を用いることにより mGluR3 を介した鎮痛が得られることが示された。

(20) 新しい鎮痛薬カンナビノイド

小川明子 (日本大学歯学部口腔診断学教室)

カンナビノイドはマリファナの有効成分である THC

の化合物の総称である。従来、カンナビノイドは麻薬と

して問題とされてきたが、近年になり有効な治療薬として注目を浴びるようになった。カンナビノイドはオピオイドに比べ、鎮痛力は弱い慢性痛や嘔気には効果があるとされる。

我々は三叉神経領域におけるカンナビノイドの神経生理作用を調べることを目的とした。ラット三叉神経脊髄路核尾側亜核 (Vc) I層とV層の侵害受容神経におけるカンナビノイド受容体アゴニスト、WIN 55,212-2 (WIN-2) の作用を比較した。V層においては、Aδ線維を刺激する急熱刺激とC線維を刺激する緩熱刺激により誘発される神経活動が、共にWIN-2の脊髄路核への局所投与により有意に抑制された。一方、I層においてはWIN-2により、

緩熱による神経活動は有意に抑制されたが、急熱刺激ではされなかった。I層の結果は、ラット顔面への温度刺激に対する逃避反応行動の結果と一致した。また、CB1受容体ノックアウトマウスの顔面受容野皮下にマスタードオイルを投与すると、急熱刺激と緩熱刺激に対するVc侵害受容ニューロンの神経活動は有意に増加したが、カプサイシン投与により変化は見られなかった。以上より、温度刺激に対する逃避反応のWIN-2による抑制は、I層の侵害受容神経の抑制による可能性が示された。また、CB1受容体がカプサイシンの発痛機序に関わっている可能性が示唆された。

(21) シスプラチンによって引き起こされる痛覚過敏におけるイオンチャネルの関与

堀 紀代美^{1,2}, 尾崎紀之¹, 篠田雅路¹, 鈴木重行³, 杉浦康夫¹

(¹名古屋大学大学院医学系研究科 機能形態学講座 機能組織学分野

²名古屋大学医学部附属病院 医療技術部 リハビリ部門

³名古屋大学医学部保健学科 リハビリテーション療法学専攻 理学療法学分野)

【目的】シスプラチン投与ラットにみられる痛覚過敏のメカニズムを明らかにするため、皮膚および筋の知覚神経におけるイオンチャネルの関与を調べた。

【方法】ラットにシスプラチンを反復投与し、皮膚と筋に対する痛覚テストを行なった後、後根神経節 (DRG) を採取し、TRPV1, TRPV2, P2X₃, ASIC3 の発現を免疫組織化学的に調べた。また、逆行性トレーサー Fluoro-Gold (FG) を用い、腓腹筋由来の DRG 細胞におけるイオンチャネルの発現も調べた。さらに、シスプラチン投与ラットにイオンチャネルの拮抗薬を使用し行動薬理的な検討も加えた。

【結果】シスプラチン投与群では皮膚の機械的痛覚過敏が

確認され、筋の圧痛閾値の低下も見られた。シスプラチン投与群の DRG では TRPV2, P2X₃, ASIC3 陽性細胞数が増加し、P2X₃, ASIC3 の拮抗薬の投与により痛覚過敏が抑えられた。また、筋由来の DRG 細胞でも P2X₃ と ASIC3 が有意に増加し、P2X₃, ASIC3 の拮抗薬の投与により筋の圧痛閾値が回復した。

【結論】シスプラチン投与は皮膚の機械的痛覚過敏を引き起こし、筋の圧痛閾値を低下させることがわかった。免疫組織化学および行動薬理的な検討から、シスプラチンによる痛覚過敏には、TRPV2, P2X₃, ASIC3 が関与していると考えられた。また P2X₃, ASIC3 は筋の痛覚の変化にも関与していると考えられた。

(22) 筋障害性慢性痛症モデル動物における筋の組織像

松原貴子^{1,2}, 櫻井博紀¹, 森本温子¹, 橋本辰幸¹, 大道裕介¹, 吉本隆彦¹, 高畑成雄¹, 山口佳子¹, 熊澤孝朗¹ (¹愛知医科大学医学部痛み学講座, ²名古屋学院大学人間健康学部リハビリテーション学科)

一側腓腹筋への LPS (L) と高張食塩水 (H) による複合投与 (LH) で作製する筋障害性慢性痛症モデル動物におい

て、9 週齢の成熟ラット (adult) では足底の痛み行動の亢進が長期にわたって持続するが、3 週齢の幼若ラット (neo)

への処置では亢進がみられなかったことはすでに報告している。この要因として神経系発達に関与が考えられるが、今回は末梢障害筋の傷害像や再生像の違いがその亢進の出現や持続に関与しているかを検討した。

neo と adult に LH 処置 (L 投与 24 時間後に H 投与) を行い、LH 処置後、急性期である 1 日目、1 週目、慢性期の 6、16 週目に未固定の下腿三頭筋を取り出して凍結切片を作成し H-E 染色後に光学顕微鏡で検鏡した。LH 処置の比較対照群として長期的痛み行動亢進を起こさない、L のみ処置群、生理食塩水 (S) 投与後に H を投与した SH 処置群、また、針刺しの影響を見る SS 処置群を作製し、同様に鏡検した。痛み行動は足底の von Frey filament (VFF) テストを指標とした。

6、16 週目では neo, adult とともに一般的には痛みを生じないとされる再生像 (大小不同の中心核線維) がみられ、また、対側筋や同側異名筋には組織学的変化がみとめられなかった。障害筋組織において、長期的痛み行動亢進の有無に関わらず差異が認められなかったことは、障害筋からのシグナルによって亢進が起こっているものではないことが示唆された。

今回の発表では急性期の組織像についても報告するが、今後は障害によって起こるイベントの時期や反応の違いを組織像から判断し、末梢組織の障害部位から発せられる慢性痛を引き起こすトリガー因子を検索し、そのメッセンジャーとなるべき物質の同定を行っていきたい。

(23) 痛みによる不快情動生成における分界条床核ノルアドレナリン神経伝達の役割

出山諭司^{1,2}, 秋山直美¹, 平田美紀枝¹, 中川貴之², 金子周司², 南 雅文¹

¹ 北海道大学大学院薬学研究院薬理学研究室 ² 京都大学大学院薬学研究科生体機能解析学分野)

「痛み」は感覚的成分と情動的成分からなり、情動的成分として、嫌悪、不安、恐怖などの負の情動反応が惹起されるが、その物質的基盤に関する研究は未だ緒についたばかりである。

分界条床核 (BST), 特に腹側領域 (vBST) は A1/A2 領域を起始核とする腹側ノルアドレナリン (NA) 神経束の密な投射を受けており、vBST における NA 伝達は種々の刺激により惹起される不快情動反応やストレス応答に重要な役割を果たしている。そこで本研究では痛みによる不快情動生成において vBST 内 NA 伝達の果たす役割について検討した。実験には雄性 SD 系ラットを用いた。内臓および体性感覚刺激として、それぞれ酢酸腹腔内投与、ホルマリン後肢足底内投与を行い、vBST 内における細胞外 NA 量の変化を in vivo マイクロダイアリシス法

により測定した結果、NA 量は有意に増加した。次に、不快情動反応を定量的に測定するために条件付け場所嫌悪性 (CPA) 試験を行った結果、各侵害刺激を与える 10 分前に vBST 内にβアドレナリン受容体拮抗薬 timolol を投与することで侵害刺激誘発 CPA は有意に減弱された。一方、侵害受容行動は vBST 内 timolol 投与の影響を受けなかった。さらに、侵害刺激を加えず、β受容体作動薬 isoproterenol の vBST 内投与により条件付けを行った結果、濃度依存的に CPA が惹起された。以上の結果から、内臓および体性感覚刺激により vBST 内で NA 遊離が促進され、この NA によるβ受容体を介した情報伝達亢進が痛みによる不快情動生成に重要な役割を担っていることが示唆された。

(24) CRPS 患者は眼—手協調運動 (eye-hand coordination) が障害されている

住谷昌彦^{1,2} 宮内哲³ 眞下節^{1,2}⁽¹⁾ 大阪大学大学院医学系研究科生体統御医学麻醉集中治療医学講座⁽²⁾ 大阪大学医学部附属病院疼痛医療センター⁽³⁾ 独立行政法人情報通信研究機構未来 ICT 研究センター

【背景】これまで我々は、CRPS 患者の視空間認知が暗条件で患側に偏位 (Sumitani et al. *NEUROLOGY in press-1*) し、その視空間偏位を矯正する視野偏位プリズム順応によって疼痛と CRPS 症状が寛解することを報告してきた (Sumitani et al. *NEUROLOGY in press-2*)。このことから、CRPS では知覚 (視覚+体性感覚) - 運動協応の異常が示唆されるため今回我々は、視覚標的に対する上肢到達運動機能の解析を行った。

【方法】上肢 CRPS 患者 6 人 (右 3, 左 3) の患肢・健肢それぞれの示指で、眼前約 30cm にあるスクリーン上の 3 標的と鼻尖との往復運動を行わせ、その運動軌跡を磁気式空間トラッキングセンサー (Sampling rate: 120Hz) を用いて記録した。これを明暗 2 条件で行い、鼻尖と 3 標的を結ぶ直線からの到達運動軌跡の 2 次元的逸脱度 (誤差) と運動時間を評価の対象とした。2 (患肢+健肢) × 2 (明+暗) × 2 (鼻尖→標的課題+標的→鼻尖課題) の 8 条件

について 3 要因分散分析を用いて統計解析を行った。

【結果】1 回の到達運動に係る時間は 3 要因 (全 8 条件) で有意差は無かった。1 回の到達運動あたりの 2 次元的逸脱度は 1 要因 (患肢+健肢) では有意差は見られなかったが、2 要因 (患肢+健肢) × (明+暗) では有意差が見られた。3 要因では有意差は見られなかった。

【考察】CRPS 患者は患肢使用の困難さを訴えることが多いが、患肢の運動時間および 2 次元的逸脱度に健肢と差は無く、運動機能が明らかに低下しているとは言えない。ただし患肢の運動は、手の運動が視覚情報+体性感覚情報によって成される明条件よりも体性感覚情報のみに依存する暗条件のほうが 2 次元的逸脱度は小さく、患肢の視覚情報が到達運動の障害となっていることを示唆する。今回の結果から、CRPS では眼—手協調運動、つまり知覚-運動協応が障害されていると言える。

(25) 仮想痛み刺激と脳内神経活動の検討 (fMRI)

池本竜則¹, 牛田享宏¹, 谷俊一¹, 篠崎淳²¹ 高知大学医学部整形外科 ² 京都大学大学院医学研究科附属高次脳機能総合研究センター

近年、痛みはその感覚を予期することで予期しない場合と比べ、同じ刺激に対する痛みの感じ方が脳内レベルで異なることが functional MRI (以下 fMRI) を用いた研究で報告された。このことからヒトは、実際に痛み刺激が与えられなくても、視覚情報などによって過去の自らの疼痛経験に関連付けられるような痛みを擬似体験すると、脳内神経活動もそれに伴って引き起こされるのではないかと考えられる。そこで我々は、注射手技ビデオを仮想 (擬似) 痛み経験のタスクとして用い、注射針が手を突いた映像を見た際に生じた脳内神経活動を fMRI で検出し、その結果について検討した。今回の研究では健康者 30 人に対して、注射針が右手尺側に刺さるまでの注

射手技ビデオを作製し、その視覚情報により誘発された脳内神経活動を fMRI で撮像した。その際、単に注射手技ビデオのみを提示した群 (GI 群) と、撮像前に注射針による痛み経験させておき撮像時の視覚情報をバーチャル体験として経験させた群 (GII 群) の 2 群に分け、解析には SPM を使用し corrected threshold $P=0.05$ をそれぞれ有意な活動とした。その結果 GI 群では有意な脳活動が検出されなかったが、GII 群では後側頭葉や右頭頂葉 (BA5) の活動に加え、両側島前方、淡蒼球、右側二次体性感覚野 (BA40) などに有意な神経活動が観察された。また、GII 群から GI 群の脳活動部位を差し引いた部位、つまり痛み刺激を予期あるいは予測体験しているものと

考えられる脳部位として両側島前方に有意な神経活動が 検出された(uncorrected threshold $P=0.05$)。

教育講演(1) MR スペクトロスコピーを用いた慢性疼痛患者の評価の試み

福井弥己郎(聖), 岩下成人(滋賀医科大学医学部附属病院・麻酔科ペインクリニックセンター)

慢性疼痛患者では fMRI, PET などによる研究で, 痛みの認知面, 痛みの情動面に関与する前帯状回, 前頭前野の機能的変化が深く関与していることが考えられている。実際の慢性患者の診療においても, 患者間で大きく異なる痛みのとらえ方や痛みに伴う不快感など, 痛みの認知・情動的な側面を把握することが治療成功の重要なポイントになっている。

今回, プロトン MR spectroscopy (以下: $^1\text{H-MRS}$) を用いて前頭前野, 前帯状回の局所脳神経機能を測定することによって, 慢性疼痛の病態を評価する試みについて解説する。

MRS は MRI 装置を使って脳内の代謝物質を測定する方法で, 中でも $^1\text{H-MRS}$ で得られる NAA (N アスパラギン酸) は神経細胞内にしかないため, その値が局所脳神

経機能の指標として臨床応用されている。

対象は慢性疼痛患者 44 人で, $^1\text{H-MRS}$ の方法は, MR 画像を取り T1 強調画像で視床, 前帯状回, 前頭前野の領域を決定し, 各領域の NAA 濃度を LC model を用いて解析, 測定した。さらに健常人 23 人について同様に測定し, 比較を行った。

NAA 濃度の低下が前頭前野, 前帯状回で認められた患者 13 人中 11 人では, 神経ブロック療法などの麻酔科ペインクリニック的アプローチのみでは対処困難であり, 心療内科的, 精神科的アプローチを必要とした。

これらの結果から非侵襲的で身体に負担をかけない $^1\text{H-MRS}$ は, 治療方法の選択にも役立ち, 慢性疼痛患者の評価法として, 新しい検査法になりえる可能性があると考えられる。

教育講演(2) プリン受容体を介する DRG 細胞内 Ca 反応: 2光子励起光分解を利用した時空間分析

中山晋介(名古屋大学・大学院医学系研究科・細胞生理学)

ATP は細胞が障害を受けたり, 神経活動時にコトランスマITTERとして放出される。この時, ATP は感覚神経のいくつかの経路を活性化するため, 痛みの initiator ともなり, また modulator としても働くと考えられる。この反応ではイオノトロピック受容体 (P2X) だけでなく, メタボトロピックプリン受容体 (P2Y) も重要な働きをする可能性が示唆されている。

細胞内 Ca 濃度の上昇は, DRG ニューロンのいくつかの細胞内プロセスをトリガーして, 侵害受容反応の多様な可塑的变化を引き起こす可能性がある。そこで, DRG ニューロン細胞内の Ca 変化に関する詳しい時空間的解析が重要課題と思われる。

本研究では, 共焦点顕微鏡観察下でケイジド ATP を 2 光子励起分解することによって, DRG ニューロンへの

ATP 局所投与作用がどのような細胞内 Ca 変化を惹起するかを調べた。これは, エキソサイトシスや細胞膜破壊時でのポイントソースからの ATP 放出を擬似して観察するものである。この方法によって, DRG ニューロン個別に Ca 反応を惹起したところ, 細胞内 Ca の上昇は光解除による ATP 投与から顕著に遅れた。このことは P2Y 受容体の関与を示唆した。また, 局所投与にも関わらず細胞全体の Ca が均一(同時)に上昇するという興味深い反応であった。さらに薬剤などの特性から, この ATP 投与で惹起される Ca 上昇では, 主に細胞内 Ca 放出チャネルが働くと推定されたが, その反応は all-or-none の法則に従わなかった。すなわち, Ca 上昇の度合 (magnitude) と上昇までの遅れ (latency) は, 光解除により与えた ATP 量 (2 光子励起時間) に依存していた。

教育講演 (3) 慢性疼痛モデル動物扁桃体中心核におけるシナプス可塑性

加藤総夫 (東京慈恵会医科大学・神経生理学研究室)

痛みは不快な感覚であるとともに不快な「情動的体験」である。慢性疼痛患者は健常群よりも有意に高率で情動障害を示す(McWilliams et al., *Pain* 106: 127-, 2003)。慢性的に持続する痛みの本質的な臨床医学的問題は、その苦痛や不快感、不安などの情動的側面にあることは言うまでもない。痛みの情動成分の成立に関与する神経回路として、Bernard らは spino-limbic pathway を同定した (Exp Physiol, 87:251-, 2002)。この経路は脊髄後角浅層疼痛特異的ニューロンから上行し、逆側の橋脚傍核外側部 (PB) でシナプスを介した後、扁桃体中心核外側外包部 (CeLC) へと至る経路であり、疼痛情報の情動成分の成立に深く関与している。この理由から CeLC は「nociceptive amygdala」と呼ばれている。一方、扁桃体中心核は情動関連記憶情報の出力核であるとともに、著明なシナプス伝達可塑性が観察される神経核である。Neugebauer らのグループは、亜急性関節炎モデルおよび大腸炎内臓痛モデルにおいて、モデル形成の数時間後に PB-CeLC 間の興奮性シナプス伝達が NMDA 受容体活性依存的に増大する事を見出した(J Neurosci, 23:52-,

2003; J Physiol 564:907-, 2005)。しかしこのシナプス伝達増大は NMDA 受容体のリン酸化によって生じており、長期的に慢性化した疼痛による扁桃体シナプス可塑性の基盤をなすとは考えがたい。我々は、脊髄神経結紮神経因性疼痛モデルを作成し、約 1 週間にわたり allodynia 応答を定量評価した後、脳スライスを作成して PB-CeLC 興奮性シナプス伝達を記録・解析した結果、(1) CeLC におけるシナプス増強は、allodynia 成立の強度に依存している、および、(2) 増強されたシナプス伝達は non-NMDA 受容体成分の増加に起因している、という事実を明らかにした。さらに、このシナプス増強は、allodynia 応答の改善後も残存した。以上より我々は、疼痛入力 of 長期化に伴う CeLC シナプス伝達増強の「固定化」が慢性疼痛における持続的情動障害の構造的基盤を構成しうると結論した。共同研究者：池田 亮 (慈恵医大・整形外科)，高橋由香里 (慈恵医大・神経生理)。

参考：Ikeda R et al., NMDA receptor-independent synaptic plasticity in the central amygdala in the rat model of neuropathic pain, *Pain* 127:161-, 2007.

23. 体温調節, 温度受容研究会

2007年1月11日－1月12日

代表・世話人：永島計（早稲田大学 人間科学学術院）

所内対応者：富永真琴（生理学研究所 細胞生理部門）

- (1) 運動に関わる要因がヒトの熱放散反応に及ぼす影響

近藤徳彦（神戸大学発達科学部）

- (2) 視床下部視索前野 GABA 感受性機構の熱産生における役割

大坂寿雅（国立健康・栄養研究所）

- (3) 温度感覚, 温熱的快・不快感の部位差

中村真由美（早稲田大学スポーツ科学研究科 博士課程1年）

- (4) 暑熱負荷時の皮膚交感神経活動発火頻度 (BF) の増加は低血液量により抑制されない

上條義一郎（信州大学大学院医学研究科 スポーツ医科学分野）

- (5) 臓器間情報ネットワークによる糖・エネルギー代謝の協調的調節

片桐秀樹（東北大学大学院医学系研究科 創生応用医学研究センター）

- (6) 持久性トレーニング直後の蛋白質・糖質サプリメント摂取が体温調節能に与える影響

後藤正樹（信州大学大学院医学研究科 スポーツ医科学分野）

- (7) プロスタグランジン E2 は視索前野の GABA-A 受容体発現を低下させる

杉本幸彦（京都大学薬学研究科）

- (8) ヒトにおける体温リズムと体温調節

青木健（日本大学医学部 社会医学講座 衛生学/宇宙医学部門）

- (9) ハムスターの冬眠時体温を制御する中枢神経機構

田村豊（福山大学薬学部 薬理学研究室）

- (10) 環境温度変化曝露によるラット LPS 発熱反応への影響

宇野忠（山梨県環境科学研究所 生気象学研究室）

- (11) 表皮ケラチノサイドが温度刺激を受容して感覚神経に温度情報を伝達するメカニズム

曾我部隆彰（岡崎統合バイオサイエンスセンター 細胞生理部門）

- (12) 磁気共鳴スペクトロスコピーによる脳温計測

吉岡芳親（岩手医科大学 先端医療研究センター）

- (13) 体温リズムの生物時計による内因性支配と非光同調因子による外因性修飾作用

山仲勇二郎（北海道大学大学院医学研究科 統合生理学講座時間生理学分野）

- (14) 冷刺激が誘発するゼブラフィッシュ稚魚のふるえ-脊椎動物における恒温性の起源か？

小林茂夫（京都大学情報学研究科 知能情報学専攻生体情報処理分野）

- (15) 温度受容チャネル TRPM8 の分布とその体温調節に関する役割

細川浩（京都大学情報学研究科 知能情報学専攻生体情報処理分野）

- (16) 新しい行動性体温調節動物実験装置

細野剛良（大阪電気通信大学医療福祉工学科）

- (17) アラキドン酸発熱の意外なしくみ

松村潔（大阪工業大学情報科学部）

【参加者名】

富永真琴（自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター 生命環境研究領域 細胞生理部門）、稲田仁（自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター 生命環境研究領域 細胞生理部門）、東智広（自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター 生命環境研究領域 細胞生理部門）、村山奈美枝（自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター 生命環境研究領域 細胞生理部門）、川端二功（自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター 生命環境研究領域 細胞生理部門）、柴崎貢志（自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター 生命環境研究領域 細胞生理部門）、紫藤治（島根大学医学部環境生理）、箕越靖彦（生理学研究所 発達生理学研究室・生殖・内分泌系発達機構）、志内哲也（生理学研究所 生殖内分泌系部門）、門田麻由子（福山大学薬学部薬理学研究室）、新谷光輝（福山大学 グリーンサイエンス研究センター）、森川洋佑（福山大学大学院薬学研究科 医療薬学専攻）、江崎秀範（本田技術研究所）、西谷典浩（大阪工業大学）、杉山鷹人（京都大学大学院情報学研究科 知能情報学専攻生体情報処理分野）、田地野浩司（京都大学大学院情報学研究科 知能情報学専攻生体情報処理分野）、狩野真清（早稲田大学人間科学研究科）、内田有希（早稲田大学人間科学部）、岩間愛音（早稲田大学人間科学部）、柴崎学（奈良女子大学生活環境学部）、和田幸久（日本たばこ産業株式会社 医薬総合研究所 研究企画部）、前川竜也（日本たばこ産業株式会社 医薬総合研究所 生物研究所第4グループ）、兼久智和（日本たばこ産業株式会社 医薬総合研究所 生物研究所第4グループ）、林宏壮（京都大学大学院情報

学研究科 知能情報学専攻生体情報処理分野）、岩崎有作（静岡県立大学大学院 生活健康科学研究科食品栄養科学専攻）、朝山正巳（中京女子大学健康科学部健康スポーツ科学科）、ララニ・レスカ（中京女子大学）、馬場博子（中京女子大学院健康科学研究科）、北沢友紀（中京女子大学院健康科学研究科）、田辺学（静岡県立大学大学院生活健康科学研究科 食品栄養科学専攻）、鹿山由子（静岡県立大学大学院生活健康科学研究科 食品栄養科学専攻）、曾我部隆彰（自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター 生命環境研究領域 細胞生理部門）、大坂寿雅（国立健康・栄養研究所）、小林茂夫（京都大学大学院情報学研究科 知能情報学専攻生体情報処理分野）、細川浩（京都大学大学院情報学研究科 知能情報学専攻生体情報処理分野）、片桐秀樹（東北大学大学院医学系研究科 創生応用医学研究センター）、後藤正樹（信州大学大学院医科学研究科 スポーツ医科学分野）、中村真由美（早稲田大学スポーツ科学研究科）、青木健（日本大学医学部 社会医学講座衛生学/宇宙医学）、田村豊（福山大学薬学部 薬理学研究室）、宇野忠（山梨県環境科学研究所 生気象学研究室）、近藤徳彦（神戸大学発達科学部）、吉岡芳親（岩手医科大学 先端医療研究センター）、山仲勇二郎（北海道大学大学院医学研究科 統合生理学講座時間生理学分野）、杉本幸彦（京都大学薬学研究科 生体情報制御学分野）、上條義一郎（信州大学大学院医学研究科 スポーツ医科学分野）、松村潔（大阪工業大学情報科学部）、細野剛良（大阪電気通信大学医療福祉工学科）、永島計（早稲田大学人間科学学術院）

【概要】

体温は最も古くかつ精力的に研究されてきた生理学分野である。しかしながら、他のホメオスタシス調節機構、例えば循環調節あるいは体液調節（浸透圧調節）に比較し、遅れをとっていることは否定できない。この原因としては、温度受容体の分子レベルの解析、体温・代謝にかかわる化学物質の発見、体温調節にかかわる特異的な神経機能の同定の遅れに起因しているところが多いと思われる。しかしながら、この10年以内の飛躍的な躍進により、これらの問題点が解決されつつある（温度感受性イオンチャネルの発見、中枢・末梢にいたる神経回路網

の同定、発熱に関わる物質の同定、熱産生の分子機構、生理心理学的手法、新たな測定技術等）。しかし、残念ながら体温調節は他の調節系に比べ非常に多くの生理機能に関係しているため、体温に関する研究者が各々のフィールドに分散し、十分な情報が得られないことが多い。今回の研究会の目的は‘体温’をキーワードに、これらの研究者が集まり、各々の研究成果を発表・情報交換し、個々の知識を統合、体温調節の新たな概念を確立することであった。また体温研究における問題点を討議、かつ明らかにし、あらたな研究テーマを創成することを目的

とし、活発な議論が行われた。

(1) 運動に関わる要因がヒトの熱放散反応に及ぼす影響

近藤徳彦 (神戸大学発達科学部)

運動時の熱放散反応 (皮膚血流や発汗反応) は運動時の体温をある範囲内に維持するためには欠かせないものである。この熱放散反応は、体温や皮膚温などの温度に依存する要因 (温熱性要因) の上昇により大きくなることが知られている。しかし、同一体温上で比較すると運動時と安静時の熱放散反応は異なり、その違いは皮膚血流と発汗反応では同じではない。このことから、運動時の熱放散反応には温熱性要因以外の要因 (セントラルコマンド、筋からの末梢性入力、圧や浸透圧受容器からの入力、精神性入力など: 非温熱性要因) の関与が考えられている。非温熱性要因として運動時に関わるセントラ

ルコマンドと筋からの末梢性入力の熱放散反応に及ぼす影響を検討すると、両要因とも発汗反応には促進的に作用するが、皮膚血管拡張反応には主として抑制的作用することが示された。この作用は運動を継続する上で必要なものと推察され、皮膚血管拡張反応の抑制は、運動時の筋への血流配分を確保し、発汗反応への抑制は皮膚血管拡張反応の抑制に伴う熱放散量の減少を補う働きがあるのではと推測される。今後は、運動時の熱放散反応に影響する要因の相互作用という観点からの検討がさらに必要になる。

(2) 視床下部視索前野 GABA 感受性機構の熱産生における役割

大坂寿雅 (国立健康・栄養研究所)

これまでに視床下部視索前野 (POA) の GABA 感受性機構が発熱時および寒冷刺激による熱産生に不可欠であり、熱産生の共通機構である可能性を示唆してきた。しかし、PGE2 発熱は GABA_A 拮抗薬を PGE2 投与と同側のみならず反対側 POA に片側性に局所注入することによってもブロックされ、このとき大脳皮質脳波の 2-4Hz 成分が選択的に増大していた。これらの結果から POA の GABA 受容機構は皮質機能にも影響していることと、熱産生抑制は非特異的現象である可能性が示唆された。しかしながら、GABA_A 拮抗薬を視床下部背内側部に注入し

たときも大脳皮質脳波の 2-4Hz 成分は増大したが、この処置自体で熱産生反応が誘起された。すなわち脳波の変化と熱産生反応とは相関がなかった。また、POA に GABA_A 作動薬を注入して誘起される熱産生反応は視床下部背内側部に GABA_A 作動薬を前投与するとブロックされた。熱産生誘起に興奮性に関わっている視床下部背内側部が GABA による常時抑制を受けており、その起始部が POA の GABA 感受性部位である可能性が示唆され、直列接続している GABA 作動系による抑制と脱抑制とが熱産生制御に重要であると推測された。

(3) 温度感覚、温熱的快・不快感の部位差

中村真由美 (早稲田大学スポーツ科学研究科 博士課程 1 年)

温度感覚、温熱的快・不快感の部位特異性を調べるため、暑熱環境下で局所的な加温、冷却実験を行った。水灌流用チューブで作成した温度刺激装置を頭部、胸部、腹部、大

腿部に装着し、加温時は 42℃、冷却時は 25℃の水を 90 秒間流して温度刺激を行った。全身と刺激部位における温度感覚、および温熱的快・不快感を被験者に -10 から 10 の目

盛がついたダイヤルで申告させた。冷刺激時、刺激部位における局所的溫度感覚に部位差は認められなかったが、温熱的快・不快感に関しては頭部と腹部の間に有意差が認められ、頭部の冷却は特に快適と感じ、腹部の冷却による快適度は低かった。全身的感觉に関しても、頭部冷却時、腹部冷却時の温熱的快・不快感に有意差が認められ、頭部冷却時に特に快適と感じていた。温刺激では、全身的感觉に

関して頭部加温時、胸部加温時の温熱的快・不快感に有意差が認められ、頭部加温時に暑さによる不快感が顕著に増強した。以上のような頭部、体幹部における感覚の特徴は、脳を熱による障害から守る、冷えによる内臓機能の失調を防ぐという意味があると考えられ、部位の機能に応じた温熱的快・不快感の特性があることが示唆された。

(4) 暑熱負荷時の皮膚交感神経活動 (SSNA) 発火頻度 (BF) の増加は低血液量により抑制されない

上條義一郎 (信州大学大学院医学研究科・加齢適応医科学系独立専攻・スポーツ医科学分野)

低血液量により暑熱負荷時の皮膚血管拡張反応が抑制される。しかし、この抑制に SSNA が関与しているか否かについては不明である。そこで我々は、低血液量が暑熱負荷時の SSNA に与える影響を検討した。被験者 18 名を低血液量群 (L, 9 名) とコントロール群 (C, 9 名) に分け、L 群には実験前に利尿剤を投与した。被験者にサーマルスーツを着用させ、これに 34℃の温水を還流し 10 分間の測定後、47℃の温水を 45 分間環流し、この間食道温 (Tes)、腓骨神経 SSNA、同側足背部皮膚血管コンダクタンス (CVC=皮膚血流量/平均血圧)、発汗率(SR)を測定した。その結果、暑熱負荷による CVC 増加は C 群に比べ L 群で 49%低下し ($P<0.05$)、さらに Tes 上昇に対する CVC 増加の感受性 (CVC/Tes)も C 群に比べ L 群で 71%

低下した($P<0.05$)。一方、SR 増加、Tes 上昇に対する SR 増加の感受性(SR/Tes)は両群間で有意差を認めなかった。BF は両群とも暑熱負荷前比べて暑熱負荷時に約 15 回/分増加したが群間に差を認めず、Tes 上昇に対する BF 上昇の感受性(BF/Tes)にも群間に差がなかった。さらに我々は、予め利尿剤を投与し低血液量状態とした 9 名の被験者に同様の暑熱負荷をかけ、暑熱負荷開始後 50 分目以降に生理食塩水を輸液し体液量を回復させ、同様の測定を行った。その結果、暑熱負荷時における CVC/Tes は輸液前と比べ輸液後には 187%増加した($P<0.01$)が、SR/Tes、BF/Tes は輸液により増加しなかった。以上より、低血液量時における皮膚血管拡張抑制は BF では説明できないことが明らかになった。

(5) 臓器間情報ネットワークによる糖・エネルギー代謝の協調的調節

片桐秀樹 (東北大学大学院医学系研究科 創生応用医学研究センター)

全身の各臓器・組織の代謝はそれぞれ個別・無関係に行われているのではなく、個体としての代謝を効率よく一方向に導くべく、協調し密接に関連して進められている。この機構が乱れると、肥満やそれに基づく糖尿病・メタボリックシンドロームといった代謝疾患を引き起こされる可能性がある。しかし、そのメカニズムについては、ほとんど解明されていない。我々は、最近、自律神経系のネットワークが、このような各臓器・組織間の協調的代謝調節に関与していることを見出した。内臓脂肪組織は自律神経にシグナルを送り、食欲を調節している

ということ、さらに、肝臓は過栄養時にエネルギーの蓄積を感知し、自律神経にその情報を伝え、基礎代謝を亢進させることにより、肥満を予防する役割を有しているということである。これらの機構は、過栄養やエネルギー不足といった代謝状態の変化について、自律神経系を使って各臓器は脳にその情報を送り、脳は、管制塔として全身の代謝を制御していることを示している。このような内在するエネルギー代謝調節機構は新たな治療法の開発のターゲットとなりうるものと考えられる。

(6) 持久性トレーニング直後の蛋白質・糖質サプリメント摂取が体温調節能に与える影響

後藤正樹, 上條義一郎, 岡崎和伸, 増木静江, 宮川健, 能勢博
(信州大学大学院医学研究科 スポーツ医科学分野)

若年男性 18 名に暑熱環境下での自転車エルゴメーター運動 (70%VO₂peak, 30 分) を 5 日間行わせ, 運動直後にプラセボ(P, n=9) または蛋白質・糖質サプリメント (S, n=9) を摂取させた。トレーニング後, 血漿量と自転車エルゴメーター運動中 (65%VO₂Peak, 30 分) の食道温に

対する発汗及び前腕皮膚血管コンダクタンスの感受性は P 群に対して S 群で有意に増加した。持久性トレーニング時の蛋白質・糖質サプリメント摂取が, 若年者の血漿量を増加させ体温調節能を亢進させることが明らかとなった。

(7) プロスタグランジン E₂は視索前野の GABA-A 受容体発現を低下させる

杉本幸彦 (京都大学薬学研究科)

プロスタグランジン E₂ (PGE₂) は, 古くから内因性の発熱物質として知られるが, PGE₂ がどのような分子機作で発熱応答を起こすのかは依然不明な点が多い。PGE₂ の受容体には 4 種類のサブタイプが存在するが, 我々が作成した 4 種類のサブタイプを個々に欠損するマウスのうち, EP₃ 欠損マウスのみが PGE₂ 脳室内投与やリポ多糖末投与に対して発熱応答を示さなかった。視索前野は PGE₂ 発熱の感受性が最も高い部位であり, 実際 EP₃ は視索前野に豊富に発現することから, 視索前野の EP₃ 受容体発現ニューロンが発熱の鍵を握ると考えられる

が, この神経の特性や EP₃ 応答の分子機構は不明である。我々は, EP₃ 発現細胞の発現プロファイル解析に基づき, 本細胞が GABA-A を発現することを見出した。さらに, 視索前野での GABA-A 遺伝子発現量ならびにタンパク質発現量は, PGE₂ 投与により低下した。このような応答は, 野生型では認められたが, EP₃ 欠損マウスでは見られなかった。以上の結果から, PGE₂-EP₃ シグナルは, GABA-A 発現低下を来し, この現象は発熱応答と密接に相関することがわかった。

(8) ヒトにおける体温リズムと体温調節

青木健 (日本大学医学部 社会医学講座 衛生学/宇宙医学部門)

昼行性動物であるヒトの体温は, 1 日の中で早朝に最低を示した後, 日中上昇し, 夕方に最高となり, 夜間にかけて下降するリズムを示す。この体温リズムについて whole body で考えた場合, 熱産生と熱放散リズムのずれにより生じる熱収支バランスとの関連性が深い。そしてこの体温リズムに伴い, 熱放散反応 (皮膚血管拡張反応や発汗反応) をはじめとした体温調節反応も, 日内で変動することが知られている。我々の実験でも早朝と夕方を比べると, 皮膚血管拡張や発汗開始の体温閾値は, 安静時の体温レベルに依存し, 夕方では朝に比べて高い方

へシフトした。また, 体温上昇に対する皮膚血管拡張の感受性は, 朝に比べて夕方の方が大きくなった。

さらに体温リズムのなかでも, 夜間のリズム制御には松果体より分泌されるメラトニンが重要な役割を果たしていることから, メラトニンと体温調節反応の関係について検討した。例えば, 高照度環境下での夜間断眠により夜間のメラトニン分泌および体温低下が抑制されることで, 皮膚血管拡張や発汗開始の体温閾値も高い方へシフトした。一方, 日中にメラトニンを経口投与した場合には, 体温の低下に伴い皮膚血管拡張や発汗開始の体温

閾値も低い方へシフトすることに加え、体温上昇に対する皮膚血管拡張の感受性も低下を示した。このように、

体温調節反応は体温リズムに加え、その制御に関係する因子にも影響を受けることが明らかとなってきた。

(9) ハムスターの冬眠時体温を制御する中枢神経機構

田村豊（福山大学薬学部薬理学研究室）

シリアン・ハムスターは、寒冷環境下短日周期で飼育すると冬眠行動を誘発する。ハムスターの冬眠は、体温下降開始から24時間までの導入期、その後の維持期、および体温が上昇する覚醒期の3期に分類される。冬眠開始17時間後（導入期）のハムスター側脳室にアデノシンA1受容体拮抗薬である8-Cyclopentyltheophylline(CPT; 3 nmol)を投与すると、体温は上昇し維持期への移行が阻害された。しかし、A2受容体拮抗薬の3,7-dimethyl-1-propargylxanthine(3 nmol)の投与では覚醒しなかった。さらに、冬眠開始30時間後（維持期）にCPTを投与しても体温の上昇は観察されなかった。一方、オピオイド受

容体拮抗薬のナロキソン(3 nmol)は、導入期に側脳室内投与しても体温上昇を惹起しなかったが、維持期に投与すると体温上昇を惹起し冬眠を中断させた。さらに、thyrotropin-releasing hormone(TRH; 55.2 pmol)を投与すると導入期、維持期のどちらでもハムスターは覚醒し、抗TRH抗体を側脳室内に予め投与しておくことで触刺激による冬眠からの覚醒が抑制された。以上の知見より、ハムスターの冬眠時体温は、アデノシン系、オピオイド系、TRH系という異なる3つの中枢神経系により制御されていると考えられる。

(10) 環境温度変化曝露によるラットLPS発熱反応への影響

宇野忠（山梨県環境科学研究所・生気象学研究室）

夏季や冬季における室内と室外の往復などを想定し高温、低温環境に曝露される場合だけではなく、温度変化が大きい環境に繰り返しさらされる時に生体内恒常性が受ける影響を解明することを目的とし、ラットを25℃環境、持続的な4℃寒冷環境、4℃と27℃間を1時間サイクルで変化する繰り返し温度変化環境などの条件で1～10日間の曝露を行い、ストレス指標として血漿中コルチコステロンの測定を行った。10日間にわたり寒冷、繰り返し温度変化曝露とも25℃曝露よりも、さらに1, 2, 4日間において繰り返し温度変化曝露では寒冷曝露よりも高い値を示し、環境温度の繰り返し変化がより強いストレスを与えることを明らかとした。

また、体温測定用テレメトリーセンサー埋め込みラットをコルチコステロン濃度に顕著な差がみられた2日間曝露した後、LPSの腹腔内投与により引き起こされる発熱反応の比較を行った。寒冷、繰り返し温度変化曝露共に25℃曝露より発熱反応の増強が見られた。また2日間曝露に加え25℃環境にて1日間さらに曝露しコルチコステロンが通常レベルに戻った状態ではさらなる増強が観察されたことから、増加したコルチコステロンの直接的な作用によるものではなく、環境温度変化に伴うストレス環境がLPS発熱反応へ何らかの影響を与えた可能性が示唆された。

(11) 表皮ケラチノサイトが温度刺激を受容して感覚神経に温度情報を伝達するメカニズム

曾我部隆彰 (岡崎統合バイオサイエンスセンター 細胞生理部門)

表皮ケラチノサイトには TRPV3, TRPV4 という2種類の30度台の温度刺激で活性化する温度感受性 TRP チャネルが発現している。この事実は、表皮が最初に温度を感知する部位である可能性を示唆している。その場合、ケラチノサイトで感知された温度情報が感覚神経に伝達されなければならない。ケラチノサイトと感覚神経細胞の共培養系に熱刺激をすると、ケラチノサイトより遅れて感覚神経細胞内の Ca^{2+} 濃度が上昇した。ATP 受容体の阻害剤 PPADS を前処理すると感覚神経細胞のみで Ca^{2+} 濃度上昇が抑制された。次に、ATP 受容体 (P2X_2) を強制発現させた HEK293 細胞をバイオセンサーとして用い、ケラチノサイトとの共培養系においてパッチクラン

ブ法により検討した。熱刺激にともない30度後半で P2X_2 の活性過電流が観察された。この活性過電流は TRPV3 欠損ケラチノサイトを用いると消失したが、TRPV4 欠損ケラチノサイトでは野生型と同等に観察された。セロトニン受容体 (5HT3) やグルタミン酸受容体(NMDAR) では電流は生じなかった。感覚神経細胞をバイオセンサーとして用いた共培養系に熱刺激を加えると、30度後半で感覚神経細胞の P2X_3 活性化電流が観察された。以上の結果から、熱刺激によってケラチノサイトの TRPV3 を介した ATP 放出が起こり、感覚神経の P2X 受容体に作用して温度情報を伝達することが示唆された。

(12) 磁気共鳴スペクトロスコピーによる脳温計測

吉岡芳親, 高濱祥子, 神原芳行, 松村豊 (岩手医科大学・先端医療研究センター, 科学技術振興機構・CREST)
及川浩 (岩手県立二戸病院・放射線科, 科学技術振興機構・CREST)
江原茂 (岩手医科大学・先端医療研究センター, 岩手医科大学・医・放射線科)
井上 敬, 小川彰 (岩手医科大学・医・脳神経外科)

磁気共鳴スペクトロスコピーにより健康成人男性の脳内温度を経時的に測定し、飲水時と運動負荷時の脳内温度変化を評価できるか否かを検討した。冷水($0^\circ\text{C}/500\text{mL}$)の摂取では、一過性に 0.5°C 程度脳内温度が低下し、飲水終了後徐々に上昇した。温水($53^\circ\text{C}/500\text{mL}$)の摂取では、 0.4°C 程度一過性に脳温が上昇した。これらの温度変化は、熱収支で予想された温度変化よりも大きく、一過性であった。また、体温付近の温度の飲水による脳内温度変化は確認できなかった。よって、冷水・温水の摂取に

よる脳内温度変化は、飲水により冷却又は加温された血液の流入によりもたらされたと考えられる。30分程度の軽い運動負荷でも、 $0.5\text{--}1.0^\circ\text{C}$ 程度の脳内温度上昇を観測できた。運動負荷時の食道温の変化は、 0.5°C 程度であり、脳内温度変化の方が大きいと思われた。これは、運動負荷による体全体の温度上昇と脳活動による温度上昇が重なった結果であると考えられる。磁気共鳴スペクトロスコピーにより健常者の脳内温度変化を評価できるようになってきたと思われる。

(13) 体温リズムの生物時計による内因性支配と非光同調因子による外因性修飾作用

山仲勇二郎, 橋本聡子, 高須奈々, 本間さと, 本間研一
(北海道大学大学院医学研究科統合生理学講座時間生理学分野)

ヒトを時刻情報から隔離された恒常環境下で生活させ

ると、睡眠覚醒リズム、深部体温リズムは、約25時間の

フリーラン周期を示す。このことから、通常の明暗周期環境下においては、朝方に光を浴びることにより生物時計を位相前進させ、24時間の環境周期に同調していると考えられる。その一方で、全盲患者の約50%が24時間の概日リズムを示すことから、光以外の環境因子がヒトの生物時計のリズム調節に関与していると考えられている。最近、我々は非光同調因子として運動に注目し、低照度環境下での運動が生物時計の位相反応に及ぼす影響について実験を行った。

本実験は、健康成人男性を対象とし、6泊7日の隔離実験を行った。隔離実験室内は、生物時計の光同調が困難な低照度環境とし、実験3日目から6日目までの4日

間非光同調因子として身体運動を負荷した。生物時計の位相変化は、実験前後の血中メラトニンリズム、体温リズムから評価した。また、実験前後で睡眠脳波、心臓自律神経活動の変化についても比較した。

本研究会では、1) 非光同調因子による生物時計の位相反応、2) 生物時計の位相反応による体温リズムの変化、3) 非光同調因子による体温リズムのマスキング、4) 生物時計の位相反応と体温リズムのマスキングが睡眠脳波および睡眠時心臓自律神経活動に与える影響（体温リズムマスキングの生理学的意義）について検討した結果を報告する。

(14) 冷刺激が誘発するゼブラフィッシュ稚魚のふるえー脊椎動物における恒温性の起源か？

杉山鷹人，細川浩，久枝宏，小林茂夫（京都大学情報学研究科 知能情報学専攻生体情報処理分野）

環境温が下がると、哺乳類や鳥類（恒温動物）は芯温維持のために反射的に体をふるわせて産熱する。このふるえの機構が脊椎動物のどの段階で獲得されたのかわかっていない。ここでは、低温のプールに入れるとゼブラ

フィッシュの稚魚が反射的にふるえるが、成魚では消失することを示す。脊椎動物における恒温性の起源がサカナにあると結論する。

(15) 温度受容チャネル TRPM8の分布とその体温調節に関する役割

田地野浩司，林宏壮，小佐田佳織，柴草哲郎，細川浩，小林茂夫
（京都大学大学院情報学研究科知能情報学）
松村潔（大阪工業大学情報科学）
井上和生，伏木亨（京都大学大学院農学研究科食品生物科学）

環境温が低下すると、皮膚直下の温度受容器が活動し、神経線維に求心性の活動電位を発生する。この活動電位が神経線維を伝わり、自律性、行動性体温調節反応を誘発する。最近、感覚神経の細胞体で発現し、低温とメンソールで活性化する TRPM8 が同定された。この TRPM8 が体温調節反応を引き起こす温度受容器の候補と考えられている。しかし、TRPM8 が感覚神経の末端に実際に発現しているかどうかは明らかでない。本研究では、TRPM8 が皮下に発現しているかどうかを TRPM8 の抗体を使った免疫組織化学的方法で調べた。また、TRPM8 の活性化が自律性、行動性体温調節反応を引き起こすかどうかを、皮膚にメンソールを塗布することで解析した。

免疫組織化学的方法で、抗体による染色により、皮膚直下に TRPM8 を発現している神経細胞の線維が存在することが分かった。皮膚へのメンソール塗布は、後根神経節の TRPM8 発現細胞を興奮させた。また、この刺激により、マウスの芯温は上昇した。このときマウスの酸素消費量が増大し、尾の血管収縮が起こった。酸素消費量の増大は筋肉や褐色脂肪細胞の活性化によるものであった。メンソールを塗布されたマウスは、より高温の環境を好むようになった。これらの結果により、TRPM8 が低温に対する自律性、行動性両方の体温調節反応を引き起こす分子だと結論する。

(16) 新しい行動性体温調節動物実験装置

細野剛良 (大阪電気通信大学医療福祉工学科)

行動性体温調節の動物実験装置として Thermal gradient などが知られている。いずれも大規模なものであったり、煩雑な動物の訓練を必要とするものであった。マウスの滞在エリアの床となるプレートの温度を変え、

「2つの環境温度のうちどちらを選ぶか?」という課題の簡単な構造の装置を構築した。2枚のプレート温を 25℃と 35℃とし、5分毎に温度を入れ換えると、ほどなくマウスは常に 35℃の方を選ぶように行動した。

(17) アラキドン酸発熱の意外なしくみ

松村潔 (大阪工業大学情報科学部)

堀あいこ, 山本知子, 細川浩, 小林茂夫 (京都大学大学院・情報学研究科)

ラット脳室にアラキドン酸 (AA)を投与すると 2 相性の体温上昇が起こった。COX-2 阻害剤は 1 相目には影響せず、2 相目をほぼ完全に抑制した。脳脊髄液中のプロスタグランジン E_2 (PGE₂) も COX-2 阻害剤で低下した。

AA 投与によりクモ膜下腔の血管内皮細胞に COX-2 が誘導された。以上の結果は、AA が PGE₂ の原材料としてだけでなく、AA を PGE₂ に代謝する酵素の誘導因子として機能していることを示す。

24. シナプス形成と可塑性機構獲得の統合的理解へ向けた学際的アプローチ

2006 年 11 月 30 日－12 月 1 日

代表・世話人：大塚稔久（富山大院・医薬・分子病態）

所内対応者：重本隆一（脳形態解析研究部門）

- (1) リガンド作動性イオンチャネルにおける膜外領域の役割
稲野辺 厚（大阪大学大学院医学系研究科 分子細胞薬理学）
- (2) Na^+/Cl^- 依存性神経伝達物質トランスポーター細菌由来ホモログの構造と機能
山下 敦子（理研 播磨研究所）
- (3) 神経筋シナプス接合部の維持とその破綻による筋無力症発症の分子メカニズム
重本和宏（愛媛大学大学院医学系研究科，医療環境情報解析学）
- (4) 活動依存的な小脳興奮性シナプスの機能維持とグルタミン酸受容体の関与
柿澤 昌（東京大学医学系研究科，細胞分子薬理）
- (5) 延髄孤束核シナプス伝達短期可塑性のメタ可塑性と恒常性維持
繁富 英治（東京慈恵会医科大学 神経科学研究部・神経生理）
- (6) インビボおよびインビトロ実験系における海馬ネットワーク・オシレーションの発生メカニズム
磯村宜和（理研 BSI 脳回路機能理論研究）
- (7) 神経系未分化細胞に GFP を発現する nestin-GFP マウスの神経新生研究への応用
山口 正洋（東京大学大学院医学系研究科，細胞分子生理学）
- (8) 神経特異的 RBP-J ノックアウトマウスの行動学的異常とそれに関与する神経回路
谷垣健二（滋賀成人病センター）
- (9) クラミドモナスの光感受性イオンチャネル・チャネルロドプシン 2 を用いた神経細胞の光刺激
石塚 徹（東北大学大学院生命科学研究科，脳機能解析分野）
- (10) Stargazin family ノックアウトマウスにおける AMPA 型受容体局在変化と活性低下
山崎真弥（新潟大学脳研究所 細胞神経生物学分野 SORST・JST）
- (11) Cbln1 ノックアウトマウスにおける運動学習 ～瞬目条件づけによる検討～
江見恭一（慶應義塾大学医学部生理）
- (12) マウス神経筋接合部におけるアクティブゾーン蛋白質の局在
所 崇（富山大学 大学院医学薬学研究部 臨床分子病態検査学）
- (13) 大脳皮質形成における Collapsin response mediating protein 1(CRMP1)の役割
山下直也（横浜市立大学大学院医学研究科分子薬理神経生物学）
- (14) CD47-SHPS-1 系による神経突起形成の制御機構
村田 考啓（群馬大学生体調節研究所 バイオシグナル分野）
- (15) NMDA Receptor activation induces calpain-mediated beta-catenin cleavages for triggering gene expression
Kentarō Abe (RIKEN, Center for Developmental Biology & Kyoto Univ. Grad. School of Biostudies)
- (16) SRF コアクチベーターMKL1/2 の脳における時期，組織特異的発現とリン酸化
堤下 寛之（富山大学分子神経生物学研究室）
- (17) 小脳平行線維－プルキンエ細胞間の LTD における $\delta 2$ 型グルタミン酸受容体のリン酸化部位の役割
仲神龍一（慶應大学生理学教室）
- (18) Sub-, Para-, and non-synaptic distributions of neural septins
Akari Hagiwara (Biochemistry and Cell Biology Unit, HMRO, Kyoto University Graduate School of Medicine)

【参加者名】

稲野辺 厚 (大阪大学大学院医学系研究科・薬理学講座 (分子・細胞薬理学), 山下 敦子, 宮澤 淳夫, 福永 優子, 合田 誠, 入江 克雅, 金 恵枝, 芦川 雄二, 伊原 誠 (理化学研究所 放射光科学総合研究センター 構造生理学研究グループ), 重本和宏 (愛媛大学大学院医学系研究科 予防医学), 渡部 文子, 真鍋 俊也, 関野 祐子 (東京大学医科学研究所・神経ネットワーク分野), 柿澤 昌 (東京大学医学系研究科細胞分子薬理学教室), 繁富 英治, 加藤 総夫 (東京慈恵会医科大学・総合医科学研究センター・神経科学研究部・神経生理学研究室), 塚元葉子 (東京都神経研・統合生理), 尾藤晴彦 (東京大学大学院医学系研究科神経生化学分野), 山口 正洋, 横山 健, 村田 航志 (東京大学大学院医学系研究科 細胞分子生理学教室), 谷垣健二 (滋賀県立成人病センター・研究所), 石塚 徹 (東北大学大学院生命科学研究科脳機能解析分野), 深澤有吾, 重本隆一 (生理学研究所・脳形態解析研究部門), 山肩葉子 (生理学研究所・神経シグナル研究部門), 玉巻 伸章 (熊本大学大学院医学薬学研究部脳回路構造学), 安部健太郎 (理化学研究所・発生生成科学総合研究センター&京大生命科学系研究科), 萩原明 (京都大学大学院医学研究

科先端領域融合医学研究機構), 片山 憲和 (東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻), 磯村 宜和 (独立行政法人理化学研究所脳科学総合研究センター・脳回路機能理論研究チーム), 狩野方伸 (大阪大学医学系研究科・細胞神経科学分野), 比嘉 進, 所 崇, 大塚 稔久 (富山大学大学院医学薬学研究部・臨床分子病態検査学講座), 武内恒成 (京都府立医科大学医学研究科生体機能形態科学), 竹居 光太郎, 山下 直也 (横浜市立大学大学院医学研究科分子薬理神経生物学教室), 崎村建司, 山崎真弥, 阿部 学 (新潟大学脳研究所細胞神経生物学分野), 田渕 明子, 堤下 寛之, 石川 充 (富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)), 新聞秀一, 瀬藤光利 (ナノ形態生理), 村田考啓, 大西浩史 (群馬大学生体調節研究所・バイオシグナル分野), 久保 義弘, 立山 充博, 中條 浩一, 伊藤 政之, 長友 克広, 石井 裕, 松下 真一, Keceli Batu (生理学研究所・神経機能素子研究部門), 柚崎 通介, 幸田 和久, 仲神 龍一, 江見恭一 (慶應義塾大学・医学部・生理学教室), 白尾智明 (群馬大学大学院医学系研究科高次細胞機能学), 高橋琢哉 (横浜市立大学医学部生理学)

【概要】

学習や記憶, 情動形成などの脳の高次機能は, 複雑な神経回路網のシグナル伝達によって制御されており, その基盤をなしている基本ユニットが“シナプス”である。シナプスは, 外的環境や経験によりその構造と機能を変化させる可塑性機構を有している。生後発達期と成熟脳における, シナプス形成とその後の可塑性機構獲得のメカニズムを明らかにすることは, 現代の神経科学における最重要課題のひとつといっても過言ではない。さらに, これら一連の研究は, 基礎研究における貢献のみならず, 広く社会的な関心事でもある教育や学習効果の問題に対して理論的な知見を与えることも期待できる。また, それらの破綻のメカニズムを研究することで, 記憶学習障害を伴う脳神経疾患の発症機構の理解が進むことも期待される。このような問題に取り組むためには, 解剖学・

生化学・生理学・遺伝学・システム脳科学など, 異なる領域の有機的な融合が不可欠であり, 最新の情報と最高水準の研究手法を有する研究者らが密な共同研究を行うことが求められている。

本研究会では, 広く他分野の研究者とりわけ若手研究者を集め, 情報交換と交流を図ることを目標とした。演題 (1)-(9) では1演題あたり1時間程度の十分な時間をとり, 徹底的な質疑応答を行った。さらに演題 (10)-(18) では若手研究者がポスターを用いて, やはり十分な議論を行った。これらによって, 現在までの到達点を明らかにし, また, 解決可能な魅力的かつ新規の課題を発掘するのみならず今後の学際的研究のシーズを生み出すことができたと考えている。

(1) リガンド作動性イオンチャネルにおける膜外領域の役割

稲野辺 厚

(大阪大学大学院医学系研究科 分子細胞薬理学講座)

神経伝達機構は興奮性シナプス伝達、抑制性シナプス伝達そして、シナプス前抑制の3種に分類される。これらの神経伝達は前シナプスへの活動電位伝播、前シナプスからシナプス間隙への神経伝達物質の放出、後シナプスにおける神経伝達物質の受容そして、後シナプスでの膜電位調節という素過程に分類される。後シナプスにおける膜電位形成には、リガンド作動性イオンチャネルが大きく寄与する。この種のイオンチャネルは、細胞内外の化学シグナル(リガンド)を、膜電位である電気シグナル(イオン透過)に変換する素子である。そして、それぞれに関与する領域は、独立した機能単位を構成することが多い。リガンドはそのチャネルの機能単位であるリガンド結合領域に直接結合し、分子内の構造的平衡をシフトさせ、イオンチャネル活性を制御する。イオンチャネルにおけるこの調節機構は特に activation gating の調節と呼ばれている。そのため、リガンドによるリガンド結合領域の構造変化は、activation gating の調節機構の最初の段階であるため、後シナプスの膜電位形成を理解する上で重要である。

主要な興奮性神経伝達物質グルタミン酸は興奮性シナ

プスにおいてイオンチャネル型グルタミン酸受容体に結合し、脱分極性の後シナプス膜電位を形成する。一方、抑制性神経伝達物質による過分極性の後シナプス膜電位形成機構の一つには、G 蛋白質共役型受容体-G 蛋白質-G 蛋白質制御内向き整流性カリウムチャネル系が知られている。前者は、細胞外領域に存在するリガンド結合部位がグルタミン酸を結合し、後者は、細胞質内領域が G 蛋白質 $\beta\gamma$ サブユニットと結合することで、自身の activation gating を調節する。

近年の構造生物学的アプローチによって、細胞の外側、内側からの activation gating を調節する両者のリガンド結合領域におこる構造変化が明らかになってきた。そこで、1) グルタミン酸受容体 NMDA 受容体 NR1 のリガンド結合部位については、この部位のリガンド応答能とチャネル活性化の相関、AMPA 受容体 GluR2 のリガンド結合領域との差異について、2) G 蛋白質制御内向き整流性カリウムチャネル Kir3.2 の細胞質領域については、他の内向き整流性カリウムチャネルの構造との対比することによって、リガンド作動性イオンチャネルにおける膜外領域による activation gating の調節機構について考察したい。

(2) Na^+/Cl^- 依存性神経伝達物質トランスポーター細菌由来ホモログの構造と機能

山下 敦子

(理化学研究所播磨研究所 放射光科学総合研究センター)

タンパク質分子の立体構造は、その分子が機能するメカニズムを知りそれらが関わる素過程を理解する上で、欠かすことのできない情報である。シナプス伝達に関わる分子については、その重要な役者として受容体・チャネル・トランスポーター群を挙げることができるが、それらは解析の難しい膜タンパク質であるため構造研究が遅れていた。ところが昨今の方法論の進展により、次々とそれらの分子の結晶構造が明らかになってきている。本発表ではその1つの例として、我々が行った Na^+/Cl^- 依存性神経伝達物質トランスポーター(NSS)ホモログの

構造・機能解析について紹介したい。

NSS は、中枢神経系の細胞膜に存在する最大の神経伝達物質トランスポーターファミリーである。これらは細胞内外に存在する Na^+ イオンと Cl^- イオンの電気化学勾配を利用して、シナプス間隙に放出されたドーパミン、セロトニン、 γ アミノ酪酸、グリシンなどの主要な神経伝達物質を細胞内にとりこむことにより、シナプス伝達を終焉させ次の信号の到来に備える役割を担っている。NSS ファミリーは、その機能不全がうつ病をはじめ様々な精神疾患の原因となり、それらの治療薬(抗うつ剤など)

や麻薬・覚醒剤（コカインなど）の標的分子でもあることから、医学的・薬理的にも重要な研究対象とされてきた。我々はNSSの相同タンパク質が原核生物にも存在することに着目し、これらをクローニングしてX線結晶構造解析を行った結果、高度好熱菌 *Aquifex aeolicus* 由来のNSS相同体 LeuT_{Aa}の結晶構造を1.65 Å分解能で明らかにすることができた。LeuT_{Aa}の構造は12の膜貫通部位から成り立っており、これまでに報告されたどの膜タンパク質の構造とも似ていないものであった。さらに解析したトランスポーター分子の中央付近にL-ロイシンとNa⁺イオンが結合しているのが観察され、機能実験の結果からLeuT_{Aa}が実際にNa⁺イオンと共役してロイシンを輸送する機能を持つことが判明した。LeuT_{Aa}分子にはαヘリックスが中央付近で中断されほどけた構造を持つ膜貫

通部位が2か所存在しており、基質ロイシンやNa⁺イオンはちょうどこの近傍に結合していて、主鎖を構成する原子やαヘリックスの双極子モーメントなどLeuT_{Aa}の骨格そのものを基質結合に利用する巧妙な設計になっていた。本発表では、それら基質/イオン結合部位の構造を含めたLeuT_{Aa}の分子構造から、トランスポーター分子がどのようにして基質やイオンの特異性を決定しているか、そしてどのようにして構造変化をおこして基質やイオンを輸送しているかについて議論したい。これらの基本的な骨格構造や輸送のメカニズムは実際にシナプスで働くNSSのものと共通と考えられ、今回のLeuT_{Aa}の構造はNSSの機能の理解への大きな手がかりとなると期待できる。

(3) 神経筋シナプス接合部の維持とその破綻による筋無力症発症の分子メカニズム

重本和宏

(愛媛大学大学院医学系研究科 予防医学)

重症筋無力症が、神経筋シナプスの筋側部に集まる神経伝達分子レセプター(アセチルコリンレセプター)に対する自己抗体により発症することは30年前に証明されあまりにも有名である。この場合、運動神経からアセチルコリンによるシナプスを介した筋への神経伝達を阻害する結果、運動麻痺の症状を発症する。一方で重症筋無力症の患者の約20%では、抗アセチルコリンレセプター抗体(抗AChR抗体)は検出されないことから、その発症原因としてAChR抗原以外の自己抗体の存在が予想された。2001年、Hochらはこれらの患者の2/3の血清中に抗MuSK(Muscle specific kinase)抗体を検出されることを報告した。しかし発症動物モデルを示さなかったことから、抗MuSK自己抗体が真の発症原因となりうるのかどうか激しい議論が起きた。一方で我々は、抗MuSK自己抗体により重症筋無力症様の症状を発症することをHochらが報告する数年前に発見しておりそのメカニズ

ムの解析を行っていた。発症したウサギの神経筋シナプスでは、AChRの凝集が減少して筋電図も重症筋無力症と同じパターンを示す。我々の結果は、抗MuSK自己抗体がMuSKの機能を阻止して筋無力症の発症の原因となること、そしてMuSKはシナプス形成だけでなくシナプスの維持にも必須であり共通の機構が存在することを提示した。抗MuSK抗体により発症する重症筋無力症は筋萎縮を伴う重症例が多い。MuSKの機能は筋組織の維持にも必要であることを示している。MuSKの機能、リガンド、そのシグナル機構などについてまだわからないことが多いが、この筋萎縮がどのようなメカニズムによっておきるのか、これまで得られた結果をもとに考察する。我々はALS, sarcopeniaなどの筋萎縮においても神経筋シナプスの維持、可塑性のメカニズムの破綻が大きな役割を果たしていると考えている。

(4) 活動依存的な小脳興奮性シナプスの機能維持とグルタミン酸受容体の関与

柿澤 昌

(東京大学大学院医学系研究科
細胞分子薬理学教室)

神経回路網が構造的・機能的に維持されることは、蓄えた情報を安定に保持するために不可欠である。しかしながら、記憶・学習の基礎過程とされる神経系の可塑性についての研究が進展する一方で、回路網の維持については多くの点で不明である。その主要な原因の一つとして、一般的に、中枢神経系では個々のニューロンが極めて多数のニューロンから入力を受け複雑な構造をしている上に、個々のシナプス応答は非常に微弱であり、シナプスの機能的維持について解析することが困難であることが挙げられる。しかし、成熟マウスの小脳登上線維-プルキンエ細胞シナプス（以下、登上線維シナプス）は、個々のシナプスが極めて明瞭な応答を示し、しかも、個体間・シナプス間で伝達効率がほぼ一定である。我々は、登上線維シナプスのこのような特徴に着目し、成熟動物において、神経活動がシナプスの機能維持に及ぼす影響について調べた。まず、テトロドトキシン(TTX)を、有機樹脂ポリマーを用いて小脳に持続的・局所的に投与し、神経活動を抑制した。数日後に小脳スライス標本上で電気生理学的解析を行ったところ、登上線維シナプス電流応答の振幅に減弱が見られ、これは登上線維終末からのグルタミン酸放出の減少が原因であることが判明した。

さらに、シナプス後膜側の AMPA 型グルタミン酸受容体の阻害薬、NBQX を同様な方法で投与したところ、TTX 投与時と同様に、登上線維からのグルタミン酸放出の減少を伴う、シナプス伝達効率の低下が見られた。したがって、成熟マウス小脳では、AMPA 型グルタミン酸受容体を介するプルキンエ細胞の活動が、何らかの逆行性シグナルを介して、登上線維シナプスの機能を恒常的に維持していることが示された。

さらに、最近、我々は、平行線維-プルキンエ細胞シナプスにも、活動依存的な機能維持機構が存在することを見出した。この平行線維シナプス機能維持には、シナプス後膜側のプルキンエ細胞における、タイプ I 代謝型グルタミン酸受容体-イノシトール 3 リン酸 (IP3)シグナル系の活性化が必要であり、これらのシグナル系が一日間以上阻害されると、平行線維前終末からの伝達物質放出確率が低下する。したがって、プルキンエ細胞に入力する二種類のグルタミン酸作動性の興奮性シナプスには、それぞれ異なるタイプのグルタミン酸受容体シグナル系の活性化と逆行性シグナルを介する、活動依存的な機能維持機構が存在することが明らかになった。

(5) 延髄孤束核シナプス伝達短期可塑性のメタ可塑性と恒常性維持

繁富 英治^{1,2}, 加藤 総夫¹

(¹ 東京慈恵会医科大学・総合医科学研究センター・神経科学研究部
神経生理学研究室

² 日本学術振興会特別研究員)

内臓感覚性 1 次求心線維（孤束）は、延髄孤束核複合体で孤束核 2 次 (NTS) ニューロンと興奮性シナプス（以下、孤束核シナプス）を形成する。我々は、アデノシンがシナプス前アデノシン A₁ 受容体の活性化を介して、孤束核シナプス伝達を強く修飾することを報告してきた (Kato & Shigetomi, 2001, Tsuji & Kato, 2003)。孤束核局所

回路における A₁ 受容体活性化によるシナプス伝達調節細胞分子機構とその生理学的意義を解明することを目的として、脳スライス標本におけるパッチクランプ法を用いて解析したところ、孤束核シナプス伝達の可塑性に関する以下の 3 つの現象を見出した。

1) アデノシンによる標的細胞依存的な短期可塑性の

修飾

孤束核局所回路において、孤束は、NTSニューロンおよび迷走神経背側核 (DMX) ニューロンと興奮性シナプスを形成する。これらのシナプスは、弱い短期抑制ないしは弱い短期増強を示すシナプス (60% の DMX ニューロン) と、強い短期抑制を示すシナプス (全ての NTS ニューロンおよび40% の DMX ニューロン) に分けられる。これらのシナプスに対するアデノシンの影響を検討した。同程度の強い短期抑制を示すシナプスのうち、NTSニューロンでは、強い短期抑制がアデノシンによって、弱い短期抑制もしくは短期増強に転換した。一方、DMXニューロンでは、その強い短期抑制は影響されなかった。以上の結果は、1) アデノシンは短期可塑性の程度および様式を修飾すること (メタ可塑性)、および、2) このアデノシンによるメタ可塑性は標的となるシナプス後ニューロンに依存して生じることを意味している。この機構によって、孤束核複合体における内臓情報処理が多重かつ多様に制御されうると想定される。

2) シナプス前 A₁ 受容体下流分子機構の可塑性

アデノシンのシナプス伝達に及ぼす影響を N 型電位依存性カルシウムチャネル (VDCC) ノックアウト (Ca_v2.2^{-/-})

マウスにおいて調べた。Wild type では、N 型 VDCC 遮断によりアデノシンの抑制作用は 70% 以上抑制された。ところが、Ca_v2.2^{-/-}マウスでも、アデノシンは、wild type と同程度のシナプス伝達抑制作用を示した。この結果は、A₁ 受容体活性化の標的となる分子機構が、シナプス前 VDCC のタイプおよびタンパク質発現に応じて、flexible に変化し、その結果、最適なシナプス伝達調節が維持される可能性を示している。

3) シナプス前 A₁ 受容体の in vivo 遺伝子ノックダウン

In vivo における孤束核シナプス伝達の短期可塑性の生理学的意義は未解明である。この問題を解決する実験系として、孤束終末のシナプス前タンパク質の in vivo 遺伝子ノックダウンを試みた。孤束終末で利用されるタンパク質の mRNA は節状神経節ニューロンの細胞体で合成される。この節状神経節に in vivo で A₁ 受容体 siRNA を導入することにより mRNA 発現を抑え、その結果、孤束終末シナプス前 A₁ 受容体が機能的に減弱した。この実験系により、in vivo で、シナプス前 A₁ 受容体活性化を介したシナプス伝達短期可塑性のメタ可塑性の意義を解明すると期待される。

(6) インビボおよびインビトロ実験系における 海馬ネットワーク・オシレーションの発生メカニズム

磯村宜和^{1,2}, 塚元葉子²

⁽¹⁾ 理化学研究所脳科学総合研究センター・脳回路機能理論研究チーム

⁽²⁾ 東京都神経科学総合研究センター・統合生理研究部門

動物の行動状況に応じて、海馬ではさまざまな同期的かつ周期的な神経活動が観察される。例えば、動物が餌を探しているときやレム睡眠中には顕著なシータ活動 (4-12 Hz) やガンマ活動 (30-80 Hz) が持続して海馬に出現する。一方、動物が餌を摂り身繕いをしているときやノンレム (徐波) 睡眠中には鋭波関連リップル活動 (80-250 Hz) が間欠的に発生する。さらには海馬の神経細胞が病的に過興奮状態に陥るとてんかん発作 (3-5 Hz) が誘発される。我々はこのような海馬ネットワーク・オシレーションの発生の仕組みを解明するために、ラットの海馬や大脳皮質からの細胞内記録とマルチユニット記録を併用したインビボ実験系と、海馬スライス標本からのパッチク

ランプ記録をもちいたインビトロ実験系の二つの切り口で研究を進めてきた。

インビボ実験系：徐波活動を介した海馬と大脳皮質の相互作用

徐波睡眠または麻酔中に、大脳新皮質では神経細胞の脱分極 (アップ) 状態と過分極 (ダウン) 状態の 2 相性遷移を反映した 1-3 Hz ほどの同期的な徐波活動 (または slow oscillation) がみられる。ところが新皮質の徐波活動が海馬や海馬周辺領域に与える影響に関しては不明な点が多かった。我々はウレタン-ケタミン麻酔または自然睡眠中のラットをもちいて、嗅内野各層や海馬台では新皮質にやや遅れてアップ-ダウン遷移が観察されること、海

馬各領域の神経細胞はダウン状態がまったく観察されないが、嗅内野からの入力によりアップ-ダウン遷移による修飾を領域特異的に受けること、海馬のガンマ活動や鋭波関連リップル活動の発生も嗅内野のアップ-ダウン遷移により修飾されることを明らかにした。これらは徐波睡眠時の海馬のネットワーク活動は新皮質の徐波活動の影響を領域特異的に受けることを示唆している。

インビトロ実験系：発作様後発射の発生機構

海馬 CA1 領域の単離スライス標本に高頻度シナプス刺激を与えると、錐体細胞の膜電位上に数十秒間続く 3-5 Hz の同期的振動活動（発作様後発射）が再現性よく誘発される。この発作様後発射の発現には GABA およびグル

タミン酸伝達が関与しており、特に、介在細胞から錐体細胞への GABA 作動性入力誘発刺激により一過性に興奮性に転換することが必須であることを明らかにした。さらに、この一過性の興奮性 GABA 伝達を担う介在細胞は錐体細胞層と多形細胞層に多く分布することを示し、それらの介在細胞群と錐体細胞群が興奮性シナプスで相互に活性化しあって同期発火が実現されるというネットワーク機構を提案するに至った。また最近、このような一過性の興奮性 GABA 伝達への転換には、GABA_A 受容体を直接介した Cl⁻ イオンの細胞内流入と、細胞外 K⁺ 上昇に依存的な細胞内 Cl⁻ イオン蓄積の 2 段階が必要であることを見出した。

(7) 神経系未分化細胞に GFP を発現する nestin-GFP マウスの神経新生研究への応用

山口 正洋

(東京大学大学院医学系研究科 細胞分子生理学)

哺乳類の脳は発生期に形成されると、基本的に神経細胞が新しく作られることはないと考えられてきたが、脳の一部の領域では、成体においても新しい神経細胞が生まれ、既存の神経回路に組み込まれている。なぜ大人になっても新しい神経細胞が生まれ得るのか、新しい神経細胞は脳機能に対してどのように貢献しているのか、という問いに答えるべく、多くのアプローチが試みられている。また、成体の新生神経細胞を利用して、神経損傷や変性疾患の治療をめざす試みが盛んになされている。

成体脳の神経新生、神経再生のメカニズムを知るためには、神経幹細胞、神経前駆細胞を同定し、その性質を詳しく理解することが大切である。我々は以前、神経幹細胞、前駆細胞を効率よく同定し、解析するための手段として、それらの細胞に発現するネスチン遺伝子の発現調節領域を用い、その支配下に GFP を発現するトランスジェニックマウス（nestin-GFP マウス）を作成した。このマウスでは、胎生期、成体を通じて、神経新生がおこる時期、場所特異的に GFP 蛍光が観察される。作成以来 5 年以上が経ち、幸いその間にこのマウス系は多くの研

究者に活用され、神経幹細胞、前駆細胞の性質、神経新生のメカニズム解析に用いられてきた。本シンポジウムでは、このマウス系が利用されてきた事例として、

1. GFP 陽性細胞の FACS による分離、移植医療への応用
 2. GFP 陽性神経前駆細胞の subpopulation の同定とその電気生理学的解析
 3. 病態時の神経再生の解析
- などを挙げて、このマウス系が神経新生研究にどのような形で寄与してきたかを紹介したい。

また、成体の神経新生は、発生期と異なり、成熟した神経回路が既に存在する環境で行われる、ということが大きな特色である。nestin-GFP マウスの解析から、既存の神経回路から神経前駆細胞へのシナプス入力の存在が示唆されている。また、新生神経細胞の生死決定は、新生神経細胞が既存の神経回路とシナプスを作る時期に行われることが分かっている。これら、新生神経細胞と既存の神経回路の関連について、最近の知見を紹介する。

(8) 神経特異的 RBP-J ノックアウトマウスの行動学的異常とそれに関与する神経回路

谷垣健二

(滋賀県立成人病センター 研究所)

統合失調症特有の多彩な症状の原因となる情報処理異常は遺伝的要因による発達障害に環境的要因が重なって引き起こされるのではないかという仮説が着目されている。胎児期神経発生において重要な役割を果たしていることが知られている Notch4 が統合失調症に関与することが最近の遺伝学的解析によって報告されている。統合失調症に関連する Notch4 の遺伝子多型はエンハンサー領域におけるものとシグナルシーケンスに存在するものが同定されており、これらの多型は Notch4 の発現量や細胞膜表面への輸送に影響する可能性が考えられる。Notch シグナルに異常が起こると神経発生自体が多大な影響を受け胎生致死となるため、現在に至るまで成体生

体内における Notch シグナルの神経機能に与える影響はほとんど解析されていない。我々は Notch シグナルの主要な伝達因子である RBP-J の conditional knockout mice を用いることで神経細胞特異的に RBP-J を欠損したマウスを作成し、マウスにおける統合失調症行動の指標とされる pre-pulse-inhibition, 行動量及び中枢興奮薬 metamphetamine への感受性の検討を行った。Notch/RBP-J シグナルの欠損による統合失調症に関与する行動異常とそれに関与する神経回路について考察し、Notch/RBP-J シグナルの統合失調症発症への関与の可能性について議論したい。

(9) クラミドモナスの光感受性イオンチャネル・チャネルロドプシン 2 を用いた神経細胞の光刺激

石塚 徹, 八尾 寛

(東北大学大学院生命科学研究所)

脳組織では様々な性質を持った神経細胞やグリア細胞が重層して複雑なネットワークを形成している。その中からある特定の細胞あるいは細胞のある特定部位での機能を選択的に解析するために、GFP などの蛍光タンパク質やその改変体を利用した蛍光イメージング技術を用いることで、高い空間解像度をもった機能解析が可能になった。それにともない細胞の刺激方法についても、より選択的により効率よく目的の細胞を刺激するための技術が求められている。これらの要求を満たす刺激方法として、遺伝子工学的手法を用いて細胞特異的にフォトアクチベーターを発現させて、光を用いて刺激するアイデアがある。いくつかの研究グループがこのアイデアに基づいて様々なフォトアクチベーターの開発や改良を試みているが、いずれも新たな刺激技術に求められている要求を十分に満たすまでには至っておらず、実用的な段階に達しているとは言えるものではなかった。

私たちは、単一の分子の中に光受容と非選択的陽イオンチャネルの機能をあわせ持つ緑藻類クラミドモナスの

光感受性陽イオンチャネル・チャネルロドプシン 2 (ChR2) に着目し、この分子を用いた神経細胞の光刺激への応用について検討を試みた。チャネルロドプシン 2 はタンパク質部分のチャネルオプシン 2 (chop2) と発色団である all-trans レチナールからなるタンパク質で、460 nm 付近に吸収のピークを持つ。chop2 は全長 737 アミノ酸残基で構成されているが、7 回膜貫通領域を含む N 末端側 1~315 アミノ酸残基だけで光感受性イオンチャネルとしての機能を発揮することが報告されていた。そこで、私たちは chop2 の N 末端側 1~315 アミノ酸残基に黄色蛍光タンパク質の一種 Venus を付加したコンストラクトを作製し、これを PC12 細胞に発現させ、青色発光ダイオードパルス光 (470 nm) を用いて ChR2 光電流のオン・オフの速さを解析した。シンドビスウイルスを用いて ChR2 を発現させた海馬ニューロンでは、光パルスの強さ依存的に脱分極し、活動電位を誘発させることができた。また、光パルスに同期して活動電位を誘発させることにも成功した。すなわち、青色発光ダイオードの光

パルスを用いることで、ニューロンを任意のパターンで刺激できることが示された。本発表ではこれらの実験結果を紹介し、神経細胞の光刺激法としての実用性、この技術の持つ可能性・応用面での活用法について発表する。

【参考文献】

Ishizuka T, Kakuda M, Araki R, Yawo H (2006) Kinetic evaluation of photosensitivity in genetically engineered neurons expressing green algae light-gated channels. *Neurosci Res* **54**: 85-94.

ポスターセッション

(10) Stargazin family ノックアウトマウスにおける AMPA 型受容体局在変化と活性低下

山崎真弥^{1,4}, 深谷昌弘², 駒井太陽¹, 辻田実加¹, 阿部学¹,
夏目理恵^{1,4}, 神谷温之³, 渡辺雅彦²,
崎村建司^{1,4}

(¹新潟大学脳研究所 細胞神経生物学分野, ²北海道大学大学院医学研究科 解剖発生学分野
³北海道大学大学院医学研究科 分子解剖学分野 ⁴SORST・JST)

(11) Cbln1ノックアウトマウスにおける運動学習 ～瞬目条件づけによる検討～

江見恭一¹, 幸田和久¹, 川原茂敬², 柚崎通介¹
(¹慶應義塾大学医学部生理学, ²東京大学薬学部神経生物物理学)

(12) マウス神経筋接合部におけるアクティブゾーン蛋白質の局在

所 崇, 比嘉 進, 北島 勲, 大塚稔久
(富山大学 大学院医学薬学研究部 臨床分子病態検査学)

(13) 大脳皮質形成における Collapsin response mediating protein 1 (CRMP1) の役割

山下直也, 内田穰, 森田麻, 臼井洋, 中村史雄, 竹居光太郎, 五嶋良郎
(横浜市立大学大学院医学研究科分子薬理神経生物学)

(14) CD47-SHPS-1系による神経突起形成の制御機構

村田 考啓, 大西 浩史, 岡澤 秀樹, 村田 陽二, 草薙 伸也, 的崎 尚
(群馬大学生体調節研究所 バイオシグナル分野)

(15) NMDA Receptor activation induces calpain-mediated beta-catenin cleavages for triggering gene expression

Kentaro Abe & Masatoshi Takeichi

(RIKEN, Center for Developmental Biology & Kyoto Univ. Grad. School of Biostudies)

(16) SRF コアクチベーター MKL1/2 の脳における時期, 組織特異的発現とリン酸化

堤下 寛之, 田淵明子

(富山大学分子神経生物学研究室)

(17) 小脳平行線維—プルキンエ細胞間の LTD における $\delta 2$ 型グルタミン酸受容体のリン酸化部位の役割

仲神龍一, 幸田和久, 掛川渉, 近藤哲朗, 柚崎通介

(慶應大学部生理学教室)

(18) Sub-, Para-, and non-synaptic distributions of neural septins

Akari Hagiwara and Makoto Kinoshita

(Biochemistry and Cell Biology Unit, HMRO, Kyoto University Graduate School of Medicine)

25. Fm θ 研究会

2007 年 3 月 11 日

代表・世話人：遠本 徹（生理学研究所 脳機能計測センター 機能情報解析室）

（1）加算作業中の Fm θ と thalamic θ について

末次正知（山口大学医学部 精神科）

（2）石原論文の被引用文献に見る Fm θ 研究の展望

石井良平（大阪大学大学院医学系研究科 精神医学教室）

（3）複雑な手指運動に伴う局所脳律動変化の脳磁図解析

崎原ことえ（大阪大学大学院医学系研究科 機能診断科学講座）

（4）サル前頭葉のシータ波活動

遠本徹（生理学研究所 脳機能計測センター 機能情報解析室）

【参加者名】

篠崎和弘（和歌山県立医科大学 神経精神医学教室），
石原務（NPO 法人緑の地球ネットワーク），石井良平（大
阪大学大学院医学系研究科 精神医学教室），浅田博（大
阪府立大学 総合科学部 総合教育研究機構），岸田邦
治（岐阜大学 工学部 応用情報学科），崎原ことえ（大
阪大学大学院医学系研究科 機能診断科学講座），堀泰

雄（沼隈病院），水谷充良（兵庫県警察本部刑事部 科
学捜査研究所），末次正知（山口大学医学部 精神科），
水木泰（下関病院 精神科），津田久美（医療法人河崎
会水間病院），遠本徹（生理学研究所 脳機能計測セン
ター 機能情報解析室）

【概要】

シータ周波数領域の神経活動は様々な状況で観察さ
れるが、我々の知識は不十分で、この神経活動の意義を
統一的に理解できる段階ではない。脳波によってヒトの
前頭葉周辺で観察されるシータ波は Frontal midline theta
(Fm θ) 波と呼ばれ、「注意集中」を要求される状況下で

しばしば出現する。最近、サルにおいてヒトの Fm θ 波と
相同と考えて矛盾ない神経活動を見出された。本研究会
では、研究をさらに深化発展させることを目的として、
サルの脳の研究者とヒトの Fm θ 波の研究者が、それぞ
れの最新成果を発表し、意見・情報を交換した。

（1）加算作業中の Fm θ と thalamic θ について

末次正知（山口大学医学部 精神科）

水木 泰（下関病院）

藤井正美（山口大学医学部 脳神経外科）

渡辺義文（山口大学医学部 精神科）

鈴木倫保（山口大学医学部 脳神経外科）

EEG, MEG, fMRI を使った研究において、anterior
cingulate cortex (ACC) を含んだ medial prefrontal cortex
(mPFC) を Fm θ の発生源とする報告がいくつかのグル
ープよりなされている。ところで、睡眠中にも Fm θ に

似たリズムが出現することや、Fm θ と睡眠紡錘波が、そ
の形状や分布に類似性が認められることから、今回、Fm θ
出現群と非出現群の二群を設定し、加算作業中と睡眠中
の脳波記録を行った（実験 1）。その結果、Fm θ の出現

機構と睡眠紡錘波のそれは類似している可能性が考えられた。そこで、パーキンソン病の加療目的で、視床下核に電極を植え込まれた患者を対象に、加算作業中と睡眠中の脳波を記録した (実験 2)。その結果、加算作業中に、Fm θ と同時に視床下核から θ リズムが出現し、睡眠

中には同部位 (Fz および視床下核) から θ リズムおよび睡眠紡錘波が出現した。視床下核は睡眠紡錘波の発生源とされる視床網様核に近接している。以上の結果より、Fm θ の発生源として視床網様核が重要である事が示唆された。

(2) 石原論文の被引用文献に見る Fm θ 研究の展望

石井良平 (大阪大学大学院医学系研究科 精神医学教室)

石原論文とは 1972 年に EEG Journal に発表された Fm θ についての最初の英語論文で、現在、教科書では、「臨床脳波学」、「脳波筋電図用語辞典」、Electroencephalography に引用され、Fm θ 研究についての初期の代表的な論文として紹介されている。今回、この論文が過去にどのような論文に引用されたかを検索した。その結果、ワーキングメモリ課題施行時に出現する前頭部シータ波活動についての報告や、脳磁図を用いた活動源推定の報告のインパクト

が高かったが、精神科領域での応用を目指した研究は被引用回数が高くなかった。また、MEG, fMRI などの他の脳機能測定法を用いた研究や、認知課題施行時の律動活動の意義を探る研究が、ここ数年で特に注目を集めていることがわかった。今後は、Fm θ と種々の認知機能との関係や、脳内での発生源のより正確な同定と部位間の関連についての研究が中心となろう。

(3) 複雑な手指運動に伴う局所脳律動変化の脳磁図解析

崎原ことえ (大阪大学大学院医学系研究科 機能診断科学講座)
平田雅之 (大阪大学大学院医学系研究科 機能診断科学講座)
柳星伊 (大阪大学大学院医学系研究科 機能診断科学講座)
加藤天美 (大阪大学大学院医学系研究科 脳神経外科学講座)
吉峰俊樹 (大阪大学大学院医学系研究科 脳神経外科学講座)
依藤史郎 (大阪大学大学院医学系研究科 機能診断科学講座)

【目的】複雑な手指運動の脳内処理メカニズムを解明する。

【方法】健常右利き被験者 10 人に利き手で習熟運動と非習熟運動の 2 種類の手指運動を試行させ、脳信号強度変化の ERD (脱同期反応)、ERS (同期反応) を比較した。

【結果】運動前野にて low γ 帯域の ERD、補足運動野にて $\alpha \sim \beta$ 帯域の ERD、頭頂間溝水平部にて $\beta \sim \text{low } \gamma$ 帯域の ERD がみられた。運動前野の ERD 反応が習熟運動で有意に低下、補足運動野での ERD 反応が習熟運動で有意に増加、頭頂間溝水平部での ERD が習熟運動で有意に低下

した。

【考察】fMRI や PET の先行研究で運動の習熟によって運動前野の脳活動低下、固有補足運動野の活動増加、また頭頂間溝水平部での活動の低下が報告されており、本研究では脳磁図によってさらに関与する局所脳律動変化を捉えた。

【結論】運動の習熟によって、優位に活動する領域が変化しさらに関与する局所脳律動変化にも違いがみられることが明らかになった。

(4) サル前頭葉のシータ波活動

遠本徹（自然科学研究機構 生理学研究所 脳機能計測センター）

ヒトが注意集中する時に、前頭葉周辺で θ 波が記録される。この脳波活動は frontal midline theta (Fm θ) rhythms と呼ばれているが、正確な発生源や発生機構については不明な点が多い。ヒトでそれらを解明することは侵襲的な実験に限られた状況下でしか許されず極めて困難であるため、代替として、サルで Fm θ 波のモデルを作成して大脳皮質埋込電極でその発生源を調べた。サルには一定時間待ってから自分のペースでレバーを動かす課題を行

わせた。前頭前野 9 野と前帯状野 32 野の θ 波活動は運動の 2-3 秒前から徐々に漸増し、運動直後に極大となった。運動後の θ 波活動は、報酬を与えると再度増加して二度目の極大を示したが、報酬を与えないと速やかに低下した。この θ 波活動は、周波数・空間分布・注意負荷との関連性の点においてヒトの Fm θ 波の相同物と考えて矛盾なく、Fm θ 波の解明に役立つ可能性がある。