自 然 科 学 研 究 機 構

生理学研究所年報

第28巻

2007

はじめに

生理学研究所年報第 28 巻をここに刊行し、平成 18 年（2006 年）度における共同利用研究機関としての生理学研究所の事業活動、研究成果の報告をさせていただきます。

生理学研究所は、1977 年 5 月に開設されて本年で 30 周年を迎えました。そして、2004 年 4 月より大学共同利用機関法人自然科学研究機構を構成する 5 研究機関の 1 つとなって 3 年目となりました。「法人化」の後に、生理学研究所は自己努力によっていくつかの組織改編を行いながら、「人体基礎生理学の研究と研究者育成のための唯一の大学共同利用機関」としての役割をよりよく果しうる体制を整えてまいりました。2006 年度におきましても、運営費交付金の削減の続く中にもかかわらず、コミュニティ研究者の皆様のご協力と、所員一同の努力によって大きな成果をあげることができたものと自負していますが、関係者の皆様のご評価・ご判定を仰ぐ次第であります。

われわれ所員一同「生体を対象に分子、細胞、器官、個体レベルの研究を推進し、究極において人体の機能を総合的に解明することを目標とする」姿勢を堅持しながら、主として脳の働きと生体恒常性の仕組みについての研究に、引き続き努力を重ねてまいりたいと考えております。

（なお、2006 年度は水野昇前所長の在任期間ではありましたが、2007 年 4 月より所長の任に就いております私からご挨拶させていただきました。）

平成 19 年 11 月 1 日

生理学研究所長　岡田泰伸

生理学研究所年報

〔　目　　次　〕

職　員（2006 年度）…… i

研究活動報告

分子生理研究系 …… 11
細胞器官研究系 …… 19
生体情報研究系 …… 23
統合生理研究系 …… 27
大脳皮質機能研究系 …… 35
発達生理学研究系 …… 44
脳機能計測センター …… 52
行動・代謝分子解析センター …… 55
統合バイオサイエンスセンター …… 57
動物実験センター …… 69
計算科学研究センター …… 71
技　術　課 …… 73

研究発表

発　表　論　文 …… 85
学　会　発　表 …… 101

一般共同研究報告 …… 123

計画共同研究報告 …… 147

磁気共鳴装置共同利用実験報告 …… 167

超高圧電子顕微鏡共同利用実験報告 …… 179

生体磁気計測装置共同利用実験報告 …… 195

研究会報告 …… 203

各種シンポジウム

第 35 回生理研コンファレンス・統合脳国際シンポジウム …… 459
第 36 回生理研コンファレンス …… 465
総合研究大学院大学・生理学研究所　国際シンポジウム（第 37 回生理研コンファレンス） …… 471

トレーニングコース

生理科学実験技術トレーニングコース …… 475

セミナー報告 …… 479

大学院特別講義 …… 505

職員（2006 年度）

所　　長　　水　野　　昇

分子生理研究系

神経機能素子研究部門

教　　授　久　保　義　弘
助　教　授　立　山　充　博
助　　手　中　條　浩　一
非常勤研究員　伊　藤　政　之（2006.4.1～）
大学院生　長　友　克　広
〃　　石　井　　裕
大学院生　松　下　真　一（2006.4.1～）
研　究　生　Batu Keceli（2006.4.1～2006.9.30）
大学院生　Batu Keceli（2006.10.1～）

分子神経生理研究部門

教　　授　池　中　一　裕
助　教　授　小　野　勝　彦
〃　　等　　誠　司
助　　手　竹　林　浩　秀
〃　　田　中　謙　二
研　究　員　成　瀬　雅　衣
非常勤研究員　渡　辺　啓　介（～2007.3.31）
大学院生　東　　幹　人（～2006.9.30）
特別協力研究員　田　中　久　貴（～2006.3.31）
大学院生　鳥　居　知　宏
研　究　員　丁　　雷（～2006.9.4）
特別協力研究員　中　島　弘　文（～2006.3.12）
研　究　員　馬　　堅　妹（～2005.12.12）
大学院生　村　岡　大　輔（～2006.3.31）
特別共同利用研究員　市　原　有　美（～2006.3.31）
〃　　池　田　和　代（～2006.11.13）
大学院生　松　下　雄　一（2006.4.1～）
〃　　李　　海　雄（2006.4.1～）
〃　　Akhilesh Kumar（2006.10.1～）
総研大研究生　西　澤　　匠（2006.10～）

細胞内代謝研究部門

客員教授　曽我部　正　博
客員助教授　久　野　みゆき
助　　手　毛　利　達　磨
非常勤研究員　平　田　宏　聡

細胞器官研究系

機能協関研究部門

教　　授　岡　田　泰　伸
助　　手　清　水　貴　浩
〃　　高　橋　信　之
助　　手　樫　原　康　博
特任助手　井　上　　華（～2006.3.31）
研　究　員　浦　本　裕　美
〃　　LEE, Elbert
日本学術振興会特別研究員　沼　田　朋　大
日本学術振興会外国人特別研究員　LIU, Hongtao
〃　　MANDADI, Sravan（～2006.12.15）

大学院生　TOYCHIEV, Abduqodir
〃　長谷川　裕　一
大学院生　佐　藤　かお理

生体情報研究系

感覚認知情報研究部門

教　授　小　松　英　彦
助教授　伊　藤　　南
助　手　小　川　　正（1998.4～2006.5）
〃　郷　田　直　一
研究員　鯉　田　孝　和
〃　平　松　千　尋（2006.7～）
大学院生　安　田　正　治
〃　横　井　　功
〃　松茂良　岳　広
〃　原　田　卓　弥
〃　坂　野　　拓
特別共同利用研究員　浅　川　晋　宏（2006.4～）

神経シグナル研究部門

教　授　井　本　敬　二
助教授　宮　田　麻理子
助　手　佐　竹　伸一郎
〃　山　肩　葉　子
〃　井　上　　剛
非常勤研究員　佐々木　幸　恵（～2007.3）
研究員　児　玉　貴　史（2006.4～2006.12）
大学院生　加　瀬　大　輔
〃　中　川　　直

統合生理研究系

感覚運動調節研究部門

教　授　柿　木　隆　介
助教授　金　桶　吉　起
助　手　乾　　幸　二
〃　渡　辺　昌　子
研究員　和　坂　俊　昭（2004.4.1～）
〃　橋　本　章　子（2003.4.1～）
日本学術振興会特別研究員　平　井　真　洋（2006.4.1～）
日本学術振興会外国人特別研究員　王　　暁　宏（2004.9.1～）
科学技術振興機構研究員　三　木　研　作（2004.4.1～）
〃　木　田　哲　夫（2006.4.1～）
大学院生　中　田　大　貴（2003.10.1～2006.9.30）
〃　本　多　結城子（2004.4.1～）
大学院生　田　中　絵　実（2004.4.1～）
〃　赤　塚　康　介（2004.4.1～）
〃　鯨　井　加代子（2005.4.1～）
〃　坂　本　貴和子（2005.4.1～）
〃　浦　川　智　和（2005.4.1～）
〃　宮　崎　貴　浩（2006.4.1～）
〃　岡　　さち子（2006.4.1～）
特別共同利用研究員　辻　　健　史（2004.4.1～2006.9.30）
〃　宮　成　　愛（2003.4.1～2006.10.31）
〃　安　藤　博　文（2006.4.1～2006.12.31）

生体システム研究部門

教　　授　南部　篤
助　　手　畑中伸彦
〃　　橘　吉寿
外国人研究員　田　風
特別訪問研究員　喜多　均
助　　手　知見聡美
大学院生　高良沙幸
特別共同利用研究員　岩室宏一
大学院生　高原大輔

大脳皮質機能研究系

脳形態解析研究部門

教　　授　重本隆一
助教授　籾山俊彦
助　　手　深澤有吾
〃　　松井　広
日本学術振興会特別研究員　川上良介
専門研究職員　足澤悦子
〃　　春日井　雄
専門研究職員　篠原良章
（～2006.8.31）
日本学術振興会外国人特別研究員　ANDREA, Lörincz
外国人研究員　MÀTÉ, Sümegi
（2006.5.15～2006.11.14）
〃　MIKLÓS, Antal
（2006.5.22～2006.8.21）

大脳神経回路論研究部門

教　　授　川口泰雄
助教授　窪田芳之
助　　手　大塚　岳
大学院生　関川明生
〃　　平井康治
〃　　牛丸弥香
日本学術振興会外国人特別研究員　GULLEDGE, Allan Thomas
非常勤研究員　森島美絵子
（2006.4.1～2006.11.30）
助　　手　森島美絵子
（2006.12.1～）

心理生理学研究部門

教　　授　定藤規弘
助教授　杉浦元亮
（2006.10～）
助　　手　神作憲司
（～2006.5）
〃　　田邊宏樹
研究員　豊田浩士
〃　　齋藤大輔
〃　　荒牧　勇
（～2006.9）
〃　　原田宗子
（～2006.12）
大学院生　谷中久和
（2006.10～）
〃　　中下　悟
（～2007.3）
〃　　村瀬未花
（～2007.3）
大学院生　内山祐司
〃　　森戸勇介
〃　　牧　陽子
〃　　間野陽子
〃　　出馬圭世
（2006.4～）
〃　　酒井朋子
〃　　進藤誠悟
〃　　佐々木章宏
（2006.4～）
〃　　林　正道
（2006.4～）
〃　　藤井　猛
（2006.10～）
〃　　谷中久和
（2006.10～）
特別共同利用研究員　大塩立華
（～2006.9）

特別共同利用研究員　内山仁志（～2006.10）
特別共同利用研究員　米田英嗣（～2007.3）

発達生理学研究系

認知行動発達機構研究部門

教授　伊佐正
助手　関和彦
〃　吉田正俊（2003.6～2008.5）
〃　金田勝幸（2005.9～2010.8）
科学技術振興機構研究員　西村幸男
〃　池田琢朗
〃　加藤利佳子
専門研究職員　坂谷智也
非常勤研究員　高橋雅人
〃　齋藤紀美香
大学院生　坪井史治
〃　Penphimon Phongphanphanee
特別共同利用研究員　武井智彦
産学官連携研究員　宮地まり
〃　山根到

生体恒常機能発達機構研究部門

教授　鍋倉淳一
助教授　石橋仁（2007.1.15～）
助手　前島隆司
特任助手　渡部美穂
非常勤研究員　高鶴裕介（2006.4.1～）
研究員（CREST）　北村明彦
特別共同利用研究員　和氣弘明
大学院生　西巻拓也
〃　堀部尚子（～2007.3.31）
大学院生　稲田浩之
技術推進員　杉浦未記
〃　大場多津子
事務補佐員　齋藤永子（2006.4.1～）
大学院生　山口純弥（2006.4.1～）
事務補佐員　三城和子（2006.4.1～）

生殖・内分泌系発達機構研究部門

教授　箕越靖彦
助手　岡本士毅
〃　志内哲也
特任助手　鈴木敦
研究員　李順姫

脳機能計測センター

形態情報解析室

助教授　有井達夫
助手　古家園子

機能情報解析室

助教授　逵本徹

生体情報解析室

助教授　根本知己

行動・代謝分子解析センター

遺伝子改変動物作製室

助教授　平林真澄（2002.7.1～）
助手　冨田江一（2006.7.1～）
科学技術振興事業団技術員　加藤めぐみ（2002.7.1～2004.3.31）
専門研究職員　加藤めぐみ（2004.4.1～）
科学技術振興事業団技術員　山内奈央子（2005.4.1～）
特別共同利用研究員　雨宮和絵（2006.4.1～2007.3.31）

岡崎共通研究施設
（生理学研究所関連）
岡崎統合バイオサイエンスセンター

時系列生命現象研究領域

教授　岡村康司
助教授　東島眞一
助手　久木田文夫
〃　岩崎広英
非常勤研究員　村田喜理
〃　西野敦雄
非常勤研究員　木村有希子
〃　大河内善史
〃　黒川竜紀
〃　HOSSAIN, Mohammad
〃　小谷素子

戦略的方法論研究領域

教授　永山國昭
客員教授　TACHEV, Krasimir（～2005.3）
助教授　村上政隆
〃　瀬藤光利
助手　大橋正人
〃　片岡正典
専門研究職員　杉谷正三（～2006.3）
共同研究員　杉谷正三（2006.4～）
専門研究職員 特任助手　DANEV, Radostin
専門研究職員　内田仁（～2006.3）
〃　早坂孝宏
〃　重松秀樹
大学院生　新間秀一（～2007.3）
専門研究職員　安田浩史（～2006.7）
共同研究員　木下(尾田)千草（～2006.3）
大学院生　HOSSAIN, Israil（～2006.9）
特別訪問研究員　魏陸新（～2005.9）
専門研究職員　喜多山篤（～2006.3）
共同研究員　喜多山篤（2006.4～）
非常勤研究員　新田浩二
大学院生　LOUKANOV, Alexandre
共同研究員　花市敬正
文部省外国人研究員　KUVICHKIN, Vasily（2006.4～2006.10）
大学院生　福田善之
〃　飯島寛文

生命環境研究領域

教授	富永真琴	助手 柴崎貢志
助教授	福見知子	特任助手 稲田仁

動物実験センター　助教授 木村透

計算科学研究センター　助手 片岡正典

技術課　課長 大庭明生

研究系技術班　班長 大河原浩

分子生理研究系技術係

係員	高木正浩	係員 山田元
〃	山本友美	

細胞器官研究系技術係

係長	小原正裕	係員 高橋直樹

生体情報研究系技術係

主任	戸川森雄	係員 三寶誠
係員	福田直美	〃 石原博美

生体調節研究系技術係

係長	伊藤昭光	係員 竹島康行

大脳皮質機能研究系技術係

係長	伊藤嘉邦	係員 神谷絵美

発達生理学研究系技術係

係長	永田治	係員 齋藤久美子
係員	森将浩	〃 吉友美樹

研究施設技術班　班長 市川修

脳機能計測技術係

係長	山口登	係員 村田安永
係員	吉村伸明	〃 佐藤茂基

動物実験技術係

主任	佐治俊幸	係員 廣江猛
係員	窪田美津子	〃 小池崇子

電子顕微鏡技術係

係　　長　前　橋　　寛

工作技術係

係　　長　加　藤　勝　己

技術支援員　伊　藤　磯　子
〃　土　屋　勝　代
〃　畑　田　小百合
〃　岩　瀬　　恵
〃　松　永　知　子
〃　山　澤　美　緒
〃　水　野　みどり
〃　高　田　和　子
〃　澤　　栄　恵
〃　大　西　智　子
〃　伊　藤　俊　幸
（～2006.8.31）

技術支援員　浅　井　友理子
〃　小　林　麻　澄
（～2006.5.15）
〃　宮　本　香　奈
〃　山　西　ユ　ミ
（2006.5.16～）
〃　田　中　美　穂
〃　榊　原　加　奈
（2006.10.16～2007.3.16）

事務支援員　向　　和　子
〃　松　澤　敬　子
〃　浅　井　明　代
〃　小　林　裕　子
〃　杉　浦　友　美
〃　坂　本　　愛
〃　浦　川　裕　乃

事務支援員　岡　本　友　紀
〃　吉　田　千菜美
（～2006.10.13）
〃　柴　田　利　江
〃　中　出　敦　子
（2006.10.16～）

【研究活動報告】

研究活動報告

〔 目　　次 〕

分子生理研究系

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

神経ステロイドによる海馬シナプス長期増強の誘導機構
（曽我部正博）

細胞器官研究系

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

生体情報研究系

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

統合生理研究系

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

大脳皮質機能研究系

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

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

発達生理学研究系

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

脳機能計測センター

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

行動・代謝分子解析センター

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

統合バイオサイエンスセンター

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

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

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

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

動物実験センター 69
概　要

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

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

分子生理研究系

神経機能素子研究部門

【概要】

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

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

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

久保義弘，山本友美
三尾和弘，小椋利彦，佐藤主税（産総研，脳神経情報）

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

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

代謝型グルタミン酸受容体の多様な機能を制御する機構の解明

立山充博，久保義弘

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

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

KCNE 会合による KCNQ1 チャネル電位センサードメインの調節

中條浩一，久保義弘

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

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

藤原祐一郎（現カリフォルニア大学サンフランシスコ校），久保義弘

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

$P2X_2$ 受容体チャネルの膜電位と ATP 濃度に依存したゲート機構

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

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

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

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

内耳外有毛細胞に存在する膜電位作動性モーター蛋白質複合体の同定

伊藤政之，久保義弘

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

カフェインによって活性化される細胞膜上受容体の分子同定

長友克広，久保義弘
齊藤修（長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部）

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

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

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

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

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

石井裕，久保義弘

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

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

松下真一，立山充博，久保義弘

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

分子神経生理研究部門

【概要】

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

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

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

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

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

グリア細胞の発生・分化

小野勝彦，竹林浩秀，池田和代，西澤匠，池中一裕

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

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

神経幹細胞の生成と維持

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

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

神経細胞の移動・軸索ガイダンス

渡辺啓介，竹林浩秀，西澤匠，池中一裕，小野勝彦

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

グリア細胞の異常と精神神経疾患

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

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

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

N 結合型糖鎖の制御

鳥居知宏，等誠司，Akhilesh Kumar，山田元，伊藤磯子，池中一裕

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

細胞内代謝研究部門

【概要】

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

力学環境に対する接着構造の応答の分子機構

平田宏聡
曽我部正博

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

破骨細胞におけるプロトン分泌制御機構の研究

久野みゆき

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

ウニ受精時の一酸化窒素(NO)増加の役割

毛利達磨
経塚啓一郎（東北大（附）浅虫海洋生物学研究センター）

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

神経ステロイドによる海馬シナプス長期増強の誘導機構

曽我部正博

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

細胞器官研究系

機能協関研究部門

【概要】

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

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

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

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

アポトーシス誘導時における調節性容積増大 (RVI)の抑制

前野恵美，高橋信之，岡田泰伸

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

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

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

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

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

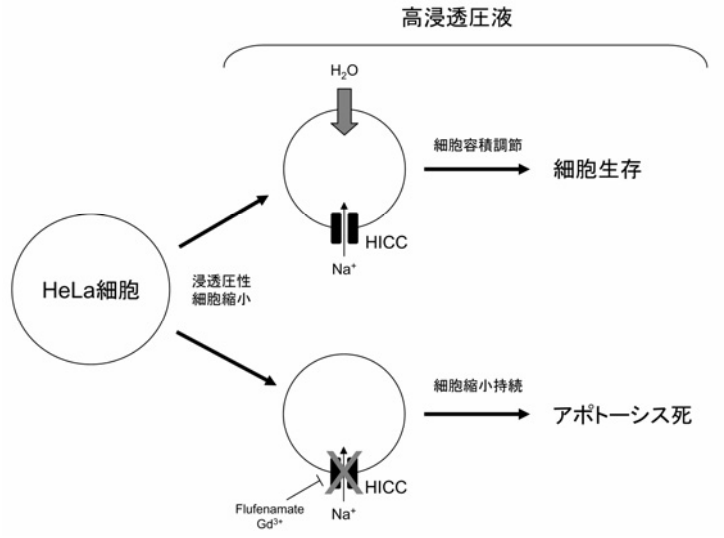


図 1：HICC/RVI 抑制下では高浸透刺激のみがアポトーシス刺激となる

持続的細胞縮小はアポトーシス誘導の十分条件である

温井美帆，清水貴浩，前野恵美，岡田泰伸

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

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

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

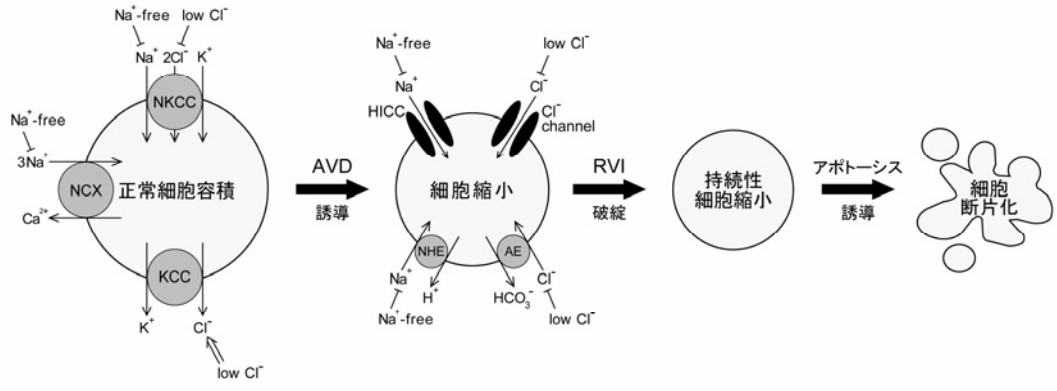


図 2：細胞外 Na^+除去や Cl^-濃度減少による持続的細胞縮小化とアポトーシス誘導のメカニズム

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

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

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

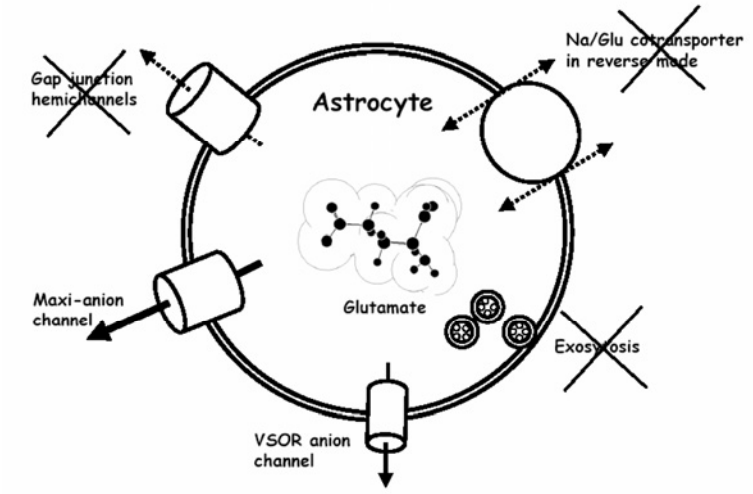


図 3：アストロサイトからの虚血性グルタミン酸の放出路への二種類のアニオンチャネルの関与

マキシアニオンチャネルの分子実体は VDAC であるという通説は誤りである

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

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

生体情報研究系

感覚認知情報研究部門

【概要】

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

初期視覚系における輪郭線の折れ曲がりの表現

伊藤　南，浅川晋宏
Yi Wang (Center for Brain and Cognitive Sciences Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences)

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

サル下側頭皮質色選択性ニューロン活動と色知覚の関係

松茂良岳広，鯉田孝和，小松英彦

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

団の活動がサルの色判断行動に寄与していることが示唆された。

色カテゴリー識別時の視覚野ニューロン活動

鯉田孝和，小松英彦

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

視覚選択における後頭頂連合野の機能的役割

小川　正，小松英彦

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

機能的核磁気共鳴画像法(fMRI)によるサル視覚皮質における機能地図計測

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

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

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

神経シグナル研究部門

【概要】

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

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

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

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

皮質視床シナプスによる視床投射細胞への興奮性-抑制性の調節機構

宮田　麻理子，井本　敬二

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

小脳顆粒細胞－介在ニューロン間興奮性シナプス伝達のペアパルス増強

佐竹伸一郎，井本敬二

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

2 種類の同期タイミングを識別する神経回路

井上　剛，井本　敬二

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

Tottering マウスにおける欠神発作と大脳基底核回路との関係

加勢大輔，井本敬二

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

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

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

統合生理研究系

感覚運動調節研究部門

【概要】

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

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

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

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

視覚性運動情報処理の新しい考え

金桶吉起

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

ヒト視覚野での情報処理の流れ

乾幸二，柿木隆介

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

(J Neurophysiol 96: 775-784, 2006)

侵害情報を伝える複数のヒト脊髄視床路の証明

辻健史，乾幸二，柿木隆介

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

(Pain 123: 322-311, 2006)

触覚による痛覚抑制の皮質機序

乾幸二，辻健史，柿木隆介

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

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

(Cereb Cortex 16: 355-365, 2006)

ヒト聴覚野での階層処理

乾幸二，軍司敦子，三木研作，柿木隆介

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

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

(Cereb Cortex 16: 18-30, 2006)

C 線維信号による脳活動 fMRI 研究

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

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

(Cereb Cortex 16: 1289-1295, 2006)

MEG，ERG 同時計測による初期視覚野活動のタイミングの検討

乾幸二，山南浩実，三木研作，金桶吉起，柿木隆介

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

(Neuroimage 30: 239-244, 2006)

Go/Nogo 課題における筋出力強度と運動抑制の関係性について

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

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

(Clin Neurophysiol 117: 1669-1676, 2006)

体性感覚刺激 Go/Nogo 課題における N140 成分の特徴

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

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

(Neurosci Lett 397: 318-322, 2006)

体性感覚刺激を用いた二点識別時の自動的検出機構

赤塚康介，和坂俊昭，中田大貴，木田哲夫，寶珠山稔，田村洋平，柿木隆介

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

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

自発的足関節背屈の運動準備における脛骨神経刺激 SEP の変動

和坂俊昭，木田哲夫，中田大貴，柿木隆介

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

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

ヒトの時間感覚の形成メカニズム

野口泰基，柿木隆介

目の前に視覚刺激が提示された時，我々はその刺激がどのぐらいの時間，提示されていたかを感じることができる。このような感覚を時間感覚と言うが，「光陰矢のごとし」という格言もあるように，ヒトが持つ時間感覚は必ずしも正確でないことが知られている。

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

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

母語と第二言語の視覚形態処理に関する MEG 研究

井原綾，柿木隆介

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

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

(Neuroimage 29: 789-796, 2006)

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

藤岡孝子，柿木隆介

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

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

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

(Brain 129: 2593-2608, 2006)

静脈注射による嗅覚関連脳磁図の周波数解析

宮成愛，柿木隆介

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

(Brain Topogr 18: 189-199, 2006)

ランダムドットブリンキングを用いた顔認知に関連する誘発脳波

三木研作，渡辺昌子，竹島康行，照屋美加，本多結城子，柿木隆介

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

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

バックワードマスキング現象の視覚誘発脳磁場反応

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

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

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

(Neuroscience 137：1427-1437, 2006)

生体システム研究部門

【概要】

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

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

上肢到達運動課題実行中の淡蒼球ニューロンの活動様式

畑中伸彦，高良沙幸，橘吉寿，南部篤

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

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

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

抗てんかん薬ゾニサミドがパーキンソン症状を改善するメカニズムを探る

橘吉寿，南部篤
岩室宏一（東京大・脳神経外科）

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

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

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

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

大脳皮質機能研究系

脳形態解析研究部門

【概要】

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

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

グルタミン酸受容体のシナプス内分布様式とそれらのシナプス伝達へ与える影響

足澤悦子，深澤有吾，松井　広，重本隆一

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

小脳運動学習の記憶痕跡

王文，馬杉－時田美和子，Andrea Lörincz，深澤有吾，重本隆一

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

海馬における長期増強現象とグルタミン酸受容体の局在変化

深澤有吾，重本隆一

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

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

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

樹上突起スパイン内アクチン細胞骨格系の可視化

深澤有吾

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

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

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

海馬 NMDA 受容体局在の左右差

篠原良章，川上良介，重本隆一

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

タグ導入による $GABA_A$ 受容体の電子顕微鏡的定量法

Mate Sümegi，深澤有吾，重本隆一

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

$GABA_B$ 受容体とカリウムチャネルの棘突起特異的共存

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

脳内における主要な抑制性伝達物質である GABA には，イオンチャネル型の $GABA_B$ 受容体と G 蛋白共役型の $GABA_B$ 受容体が存在する。我々は，免疫電子顕微鏡法を用いて小脳，視床，海馬における $GABA_B$ 受容体の異なる局在を報告してきた。$GABA_B$ 受容体は海馬錐体細胞の樹状突起においてカリウムチャネルと共役し，ゆっくりとした過分極をおこすことがしられていたが，今回我々は，$GABA_BR1$ と GIRK2 サブユニットが，海馬錐体細胞の棘突起シナプス周辺で特異的な共局在を示すことを明らかにした。このような共局在は樹状突起のシャフトにおいては認められず，2 つの蛋白質は別々のクラスターに分かれて分布していた。さらに $GABA_B$ 受容体の機能調節機構や脳における役割の解明を目指す。

前脳基底核と黒質－線条体ドーパミン系の電気生理学的および形態学的解析

籾山俊彦

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

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

シナプス-グリア複合環境の動的変化による情報伝達制御

松井　広

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

大脳神経回路論研究部門

【概要】

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

皮質棘突起への抑制性と興奮性入力の二重支配

窪田芳之，畑田小百合，川口泰雄

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

皮質回路における発火パタンに依存した結合回路

大塚岳，川口泰雄

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

前頭皮質 5 層錐体細胞の皮質下構造に依存した機能分化

森島美絵子，川口泰雄

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

アセチルコリン作用の GABA 細胞サブタイプ依存性

Allan G. Gulledge，川口泰雄

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

大脳皮質非錐体細胞への抑制性シナプス入力と興奮性シナプス入力の割合

関川明生，窪田芳之，川口泰雄

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

心理生理学研究部門

【概要】

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

人物の多様式表象と adaptation

杉浦　元亮，間野　陽子，佐々木　章宏，定藤　規弘

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

対連合学習を成立させるための神経基盤の解析

田邊　宏樹，定藤　規弘

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

自己顔評価に関わる神経基盤

守田知代（科学技術振興機構），板倉昭二（京都大学），定藤規弘

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

「自分に対する良い評判を獲得しようとする動機」の神経基盤に関する研究

出馬圭世，齋藤大輔，定藤規弘

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

同側第一次運動野における非対称な運動頻度依存的活動抑制

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

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

物語理解における感情変化の検出の神経基盤

米田英嗣，齋藤大輔，楠見　孝（京都大学），定藤　規弘

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

他者の感情を認知する際の視点取得に関わる神経基盤の解明

間野陽子，原田宗子，齋藤大輔，杉浦元亮，定藤　規弘

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

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

豊田　浩士（科学技術振興機構），定藤　規弘

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

発達生理学研究系

認知行動発達機構研究部門

【概要】

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

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

随意運動の制御におけるシナプス前抑制の役割

関　和彦，武井　智彦

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

第一次視覚野損傷サルの残存視覚運動変換機能とその神経生理

吉田 正俊，　伊佐 正

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

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

黒質網様部から上丘中間層 GABA 作動性ニューロンへの抑制性入力

金田勝幸，伊佐かおる，伊佐正

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

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

$GABA_B$ 受容体を介する上丘でのバースト発火制御機構

金田勝幸，伊佐かおる，伊佐正

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

把握運動に関与する脊髄ニューロンの役割　－フィールド電位を用いた解析－

武井　智彦，関　和彦

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

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

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

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

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

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

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

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

生体恒常機能発達機構研究部門

【概要】

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

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

発達期における神経伝達物質のスイッチング

鍋倉淳一，西巻拓也，山口純弥

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

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

鍋倉淳一，渡部美穂，北村明彦，和氣弘明，堀部尚子

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

カンナビイドによる海馬抑制性伝達調節

前島隆司

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

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

クリプトンーYAG レーザーを用いた脳虚血障害モデル動物作成技術の開発

鍋倉淳一，和氣弘明，堀部尚子

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

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

鍋倉淳一，和氣弘明，高鶴裕介，稲田浩之

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

グリアの生体内動態の観察

鍋倉淳一，和氣弘明，高鶴裕介，稲田浩之

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

生殖・内分泌系発達機構研究部門

【概要】

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

AMP キナーゼによる生体エネルギー代謝の調節機構の解明

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

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

レプチン，神経ペプチド，BDNF による糖・脂質代謝調節機構の解明

箕越　靖彦
志内　哲也
李　順姫
斉藤　久美子

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

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

脂肪酸酸化を促進するレプチン・シグナル伝達機構の解明

箕越　靖彦
鈴木　敦

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

AMP キナーゼ・ファミリー，ARK5 による代謝調節作用の解明

箕越　靖彦
鈴木　敦

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

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

脳機能計測センター

形態情報解析室

【概要】

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

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

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

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

小腸絨毛上皮下線維芽細胞の中間系フィラメント

古家　園子（形態情報解析室）

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

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

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

有井達夫（形態情報解析室）

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

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

機能情報解析室

【概要】

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

意志に関係する脳活動の研究

達本　徹

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

生体情報解析室

【概要】

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

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

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

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

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

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

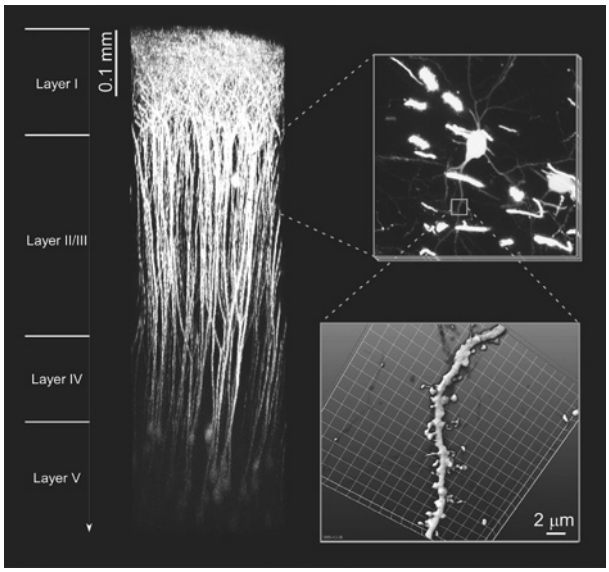


図 1.　生きているマウスの大脳皮質の GFP 発現神経細胞群の 3 次元再構築。2 光子顕微鏡の優れた深部到達性は，生体深部の微小細胞形態や活動を観察することを可能とする。新たに構築した“*in vivo*”2 光子顕微鏡は，大脳表面から 0.9mm 以上の深部を観察することが可能であり，マウス個体を生かしたまま大脳皮質全体を可視化し得る世界トップクラスの顕微鏡である。 (鍋倉淳一教授との共同研究)。

行動・代謝分子解析センター

遺伝子改変動物作製室

【概要】

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

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

平林 真澄，加藤 めぐみ，金子 涼輔

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

マウス精巣内でラット精原細胞から分化した精子細胞の正常性

平林 真澄，加藤 めぐみ，篠原 隆司（京都大）

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

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

ラット卵子の自発的活性化機構における Mos-MEK-MAPK 経路の役割

伊藤 潤哉，加藤 めぐみ，平林 真澄

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

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

冨田　江一，三宝　誠，山内　奈央子，平林 真澄

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

統合バイオサイエンスセンター

時系列生命現象研究領域

【概要】

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

電位感受性ホスファターゼ Ci-VSP の分子作動原理の解析

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

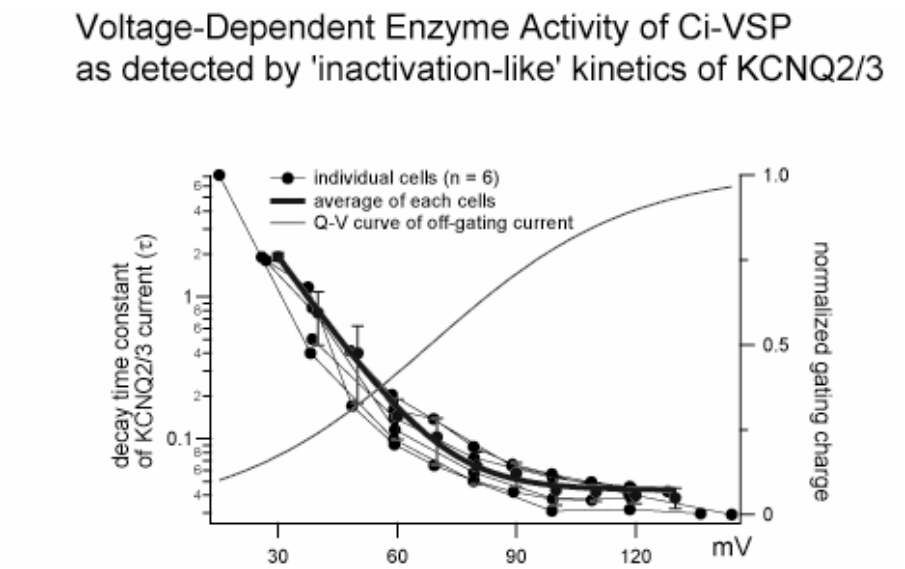
電位依存性チャネルの電位センサーをもちながらイオンの通過部位（ポア領域）をもたず，かわりに C 末側にホスファターゼドメインをもつ分子 VSP について，以下の解析を行った。

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

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

ためではなく酵素ドメインの構造変化によるものであると考えられた。

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



電位依存性プロトンチャネル分子の同定と分子機能の解析

佐々木真理
大河内善史
黒川竜紀
高木正浩
岡村康司

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

(1)VSOP1 の分子特性の解析

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

(2)VSOP1 の組織発現パターンの解析

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

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

(3)VSOP1 ノックアウトマウスの作成と解析

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

ゼブラフィッシュを用いた，脊髄神経回路網の解析

木村有希子
佐藤千恵
東島眞一

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

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

西野敦雄（日本学術振興会特別研究員）
岡村康司

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

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

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

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

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

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

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

戦略的方法論研究領域

【概要】

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

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

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

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

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

位相板用炭素薄膜の材料科学的研究

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

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

Aharonov-Bohm 効果を応用した位相差電子顕微鏡の開発

安田 浩史，大河原 浩，永山 國昭

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

DNA /RNA 塩基配列の電子顕微鏡 1 分子計測法の開発

喜多山　篤，大河原 浩，永山國昭
片岡正典（計算科学研究センター）

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

膜タンパク質の単粒子解析

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

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

超高圧電子顕微鏡による位相差像観察

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

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

種々の漢方薬の潅流ラット顎下腺に対する水分泌促進作用

村上政隆
魏　睦新，丁　煒（南京医科大学第一付属医院　中医内科）

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

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

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

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

In vitro および In vivo における分泌唾液蛋白の相違

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

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

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

顕微質量分析装置の開発

瀬藤光利，早坂孝宏，新間秀一

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

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

翻訳後修飾による細胞内輸送制御の研究

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

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

エンドソームーゴルジ細胞内膜系の選別輸送のメカニズムと生理機能

大橋正人

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

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

生命環境研究領域

【概要】

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

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

表皮 TRPV4 の結合蛋白質の解析

東智広，曽我部隆彰，福見知子，富永真琴

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

TRPV4 の体温制御機構への関与の解析

稲田仁，柴崎貢志，福見知子，富永真琴

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

表皮ケラチノサイトから感覚神経への温度情報伝達のメカニズムの解析

Sravan Mandadi，曽我部隆彰，柴崎貢志，福見知子，富永真琴

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

表皮ケラチノサイトにおける TRPV4 の生理機能の解析

曽我部隆彰，富永真琴，福見知子

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

海馬における TRPV4 の機能解析

柴崎貢志，富永真琴

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

TRPM2 のインスリン分泌への関与の解析

川端二功，稲田仁，森泰生（京都大学），富永真琴

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

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

発達期脊髄領域における温度感受性 TRP チャネルの発現と機能

村山奈美恵，柴崎貢志，富永真琴

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

免疫系細胞における温度感受性 TRP チャネルの発現・機能解析

稲田仁，富永真琴

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

ショウジョウバエ painless チャネルの温度感受性解析

曽我部隆彰，門脇辰彦（名古屋大学），富永真琴

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

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

PKD2L1/PKD1L3 複合体による酸味受容

稲田仁，石丸喜朗（デューク大学），松波宏明（デューク大学），富永真琴

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

mDia 結合タンパク質の探索と機能解析

島貫恵実，福見知子

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

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

神経回路形成における mDia を介する情報伝達経路の役割

島貫恵実，柴崎貢志，福見知子

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

動物実験センター

【概要】

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

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

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

＜明大寺地区の本館地下 SPF 化＞

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

＜研究・技術開発＞

実験動物の皮膚科学・形成外科学領域の研究および伴侶動物の病態研究

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

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

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

＜終わりに＞

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

計算科学研究センター

【概要】

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

核酸塩基識別子の設計と合成

片岡正典，永山國昭

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

ユニバーサル核酸の創生

片岡正典

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

全塩基修飾型核酸標識法

片岡正典

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

技術課

大庭明生

1. 概要

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

課の研究活動への貢献を一層進めるため下記の事業を実施した。

①技術課研修セミナーの開催

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

②生理科学実験技術トレーニングコースでの技術指導

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

③科学研究費補助金（奨励研究）申請の推進

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

(1) 加藤勝巳：実験機材製作時の非金属材料選定指針の検討

(2) 佐治俊幸：マウス，ラット用飲水量連続計測装置の開発

④奨励研究採択シンポジウムの開催

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

⑤成茂神経科学研究助成基金の申請の推進

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

⑥放送大学利用による専門技術研修の受講

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

⑦生理学技術研究会の開催

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

⑧東海北陸地区等の技術職員研修

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

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

⑨労働安全衛生資格取得および技能講習受講

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

(1)衛生工学衛生管理者，(2)第 1 種衛生管理者，

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

(6)リスクアセスメント実務研修会

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

⑩第 1 回自然科学研究機構技術研究会の開催

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

⑪岡崎 3 機関技術課長会と機構技術会議の開催

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

⑫核融合科学研究所技術部の外部評価への参加

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

2. 施設の運営状況

①統合生理研究系

(1) 生体磁気計測装置室

永田　治

【概要】

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

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

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

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

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

平成 18 年度　生体磁気計測装置共同利用実験の実施状況

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

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

②脳機能計測センター

(1) 形態情報解析室

山口　登

【超高圧電子顕微鏡利用状況】

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

2006 年度　超高圧電顕月別稼働率

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

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

(2) 機能情報解析室

佐藤　茂基

【概要】

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

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

平成 18 年度の MR 装置利用実績を別表に記す。

【機器利用率】

平成 18 年度リアルタイム装置月別稼働率

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

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

(3) 生体情報解析室

吉村伸明，村田安永

【概要】

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

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

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

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

③生理研・基生研共通施設

(1) 電子顕微鏡室

前橋　寛

【概要】

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

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

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

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

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

【研究内容一覧表】

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

利用内容一覧表

二研究所

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

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

所外（国内）

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

所外（国外）

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

（2）機器研究試作室

加藤勝己

【概要】

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

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

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

なお，機器研究試作室の平成 18 年度の利用状況は，以下の通りである。

機器研究試作室利用機器表　（件数）

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

機器研究試作室利用人数表

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

機器研究試作室部門別利用状況

感覚認知情報	124 名	感覚運動調節	71 名	認知行動発達機構	60 名
ナノ形態生理	41 名	動物実験センター	38 名	生体恒常機能発達機構	18 名
機能情報解析室	18 名	生体情報解析室	17 名	心理生理学	13 名
神経シグナル	11 名	形態情報解析室	10 名	脳形態解析	6 名
生体システム	5 名	大脳神経回路論	5 名	神経分化	3 名
神経機能素子	3 名	電子顕微鏡室	3 名	生殖・内分泌系発達機構	2 名
機能協関	1 名	技術課	1 名	機器研究試作室	145 名

ERATO 分化全能性進化	17 名	時空間制御	13 名	植物発生遺伝学	13 名
生物進化	11 名	脳生物学	10 名	光情報	7 名
分析室	4 名	分子細胞生物学	1 名	R I 実験センター	1 名
大型スペクトログラフ室	1 名	構造多様性	1 名	細胞器官培養室	1 名
人工気象室	1 名				

分子研その他　1 名

④動物実験センター（岡崎共通研究施設）

佐治俊幸，廣江猛，窪田美津子，小池崇子

【概要】

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

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

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

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

【受精卵凍結・クリーンアップ事業】

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

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

【明大寺地区　陸生動物室】

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

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

【山手地区 動物実験センター分室】

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

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

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

また，ハエ準備室をアリマキ飼育室として，利用を開始した。

【明大寺及び山手地区 水生動物室】

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

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

陸生動物　　部門別・動物種別搬入数（平成 18 年度）

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

水生動物　月別・動物種別搬入数（平成 18 年度）

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

【研　究　発　表】

a. 発表論文

b. 学会発表

a.　発表論文

〔　目　　次　〕

神経機能素子研究部門 86
分子神経生理研究部門 86
細胞内代謝研究部門 87
機能協関研究部門 88
感覚認知情報研究部門 89
神経シグナル研究部門 89
感覚運動調節研究部門 90
生体システム研究部門 92
脳形態解析研究部門 92
大脳神経回路論研究部門 92
心理生理学研究部門 93
認知行動発達機構研究部門 94
生体恒常機能発達機構研究部門 94
生殖・内分泌系発達機構研究部門 95
形態情報解析室 95
機能情報解析室 95
生体情報解析室 95
遺伝子改変動物作製室 96
時系列生命現象研究領域　神経分化 96
戦略的方法論研究領域　ナノ形態生理 97
生命環境研究領域　細胞生理 98
動物実験センター 99
計算科学研究センター 99

発　表　論　文

《神経機能素子研究部門》

1) 英文原著論文

1. Tateyama M & Kubo Y (2006) Dual signaling is differentially activated by different active states of the metabotropic glutamate receptor1α. Proc Natl Acad Sci USA 103:1124-1128.
2. Misaka T, Murate M, Fujimoto K & Kubo Y (2006) The dynamin-related mouse mitochondrial GTPase OPA1 alters the structure of the mitochondrial inner membrane when exogenously introduced into COS-7 cells. Neurosci Res 55:123-133.
3. Fujiwara Y & Kubo Y (2006) Functional roles of charged amino acid residues on the wall of the cytoplasmic pore of Kir2.1. J Gen Physiol 127:401-419.
4. Fujiwara Y & Kubo Y (2006) Regulation of the desensitization and ion selectivity of ATP-gated $P2X_2$ channels by phosphoinositides. J Physiol 576:135-149.
5. Itoh M, Nagatomo K, Kubo Y & Saitoh O (2006) Alternative splicing of RGS8 gene changes the binding property to the M1 muscarinic receptor to confer receptor type-specific Gq regulation. J Neurochem 99:1505-1516.

2) その他

1. 久保義弘 (2006) イオンチャネル・受容体の“機能する姿”の解明へ向けて。細胞工学 25:228-230.
2. 立山充博 & 久保義弘 (2006) 代謝型グルタミン酸受容体の動的構造変化とシグナリングの多様性。細胞工学 25:247-250.

《分子神経生理研究部門》

1) 英文原著論文

1. Sakuma K, Fujimoto I, Hitoshi S, Tanaka F, Ikeda T, Tanabe K, Toyokuni S, Wada H, Mio T, Mishima M & Ikenaka K (2006) An N-glycan structure correlates with pulmonary metastatic ability of cancer cells. Biochem Biophys Res Commun 340:829-835.
2. Ito S, Kawano Y, Katakura H, Takenaka K, Adachi M, Sasaki M, Shimizu K, Ikenaka K, Wada H & Tanaka F (2006) Expression of MAGE-D4, A novel MAGE family antigen, is correlated with tumor-cell proliferation of non-small cell lung cancer. Lung Cancer 51:79-88.
3. Watanabe K, Tamamaki N, Furuta T, Ackerman SL, Ikenaka K & Ono K (2006) Dorsally derived netrin-1 provides an inhibitory cue & elaborates the “waiting period” for primary sensory axons in the developing spinal cord. Development 133:1379-1386.
4. Tanabe K & Ikenaka K (2006) In-column removal of hydrazine and N-acetylation of oligosaccharides released by hydrazinolysis. Anal Biochem 348:324-326.
5. Nakahira E, Kagawa T, Shimizu T, Goulding MD & Ikenaka K (2006) Direct evidence that ventral forebrain cells migrate to the cortex and contribute to the generation of cortical myelinating oligdendrocytes. Dev Biol 291:123-131.
6. Ma J, Matsumoto M, Tanaka KF, Takebayashi H & Ikenaka K (2006) An animal model for late onset chronic demyelination disease caused by failed terminal differentiation of oligodendrocytes. Neuron Glia Biol 2:81-91.
7. Furusho M, Ono K, Takebayashi H, Masahira N, Kagawa T, Ikeda K & Ikenaka K (2006) Involvement of the Olig2 transcription factor in cholinergic neuron development of the basal forebrain. Dev Biol 293:348-357.
8. Masahira N, Takebayashi H, Ono K, Watanabe K, Ding L, Furusho M, Ogawa Y, Nabeshima Y, Alvarez-Buylla A, Shimizu K & Ikenaka K (2006) Olig2-positive progenitors in the embryonic spinal cord give rise to not only to motoneurons and oligodendrocytes, but also to a subset of astrocytes and ependymal cells. Dev Biol

293:358-369.
9. Tanaka KF, Ochi N, Hayashi T, Ikeda E & Ikenaka K (2006) Fluoro-Jade: New fluorescent marker of Rosenthal fibers. Neurosci Lett 407:127-130.
10. Tao H, Ono K, Kurose H, Noji S & Ohuchi H (2006) Exogenous FGF10 can rescue an eye-open at birth phenotype of FGF10-null mice by activating activin and TGFα-EGFR signaling. Dev Growth Differ 48:339-346.
11. Nagata I, Ono K, Kawana A & Kimura-Kuroda J (2006) Aligned neurite bundles of granule cells regulate orientation of Purkinje cell dendrites by perpendicular contact guidance in two-dimensional and three-dimensional mouse cerebellar cultures. J Comp Neurol 499:274-289.
12. Wada T, Haigh JJ, Ema M, Hitoshi S, Chaddah R, Rossant J, Nagy A & van der Kooy D (2006) Vascular endothelial growth factor directly inhibits primitive neural stem cell survival but promotes definitive neural stem cell survival. J Neurosci 26:6803-6812.
13. Alexson TO, Hitoshi S, Coles BL, Bernstein A & van der Kooy D (2006) Notch signaling is required to maintain all neural stem cell populations − irrespective of spatial or temporal niche. Dev Neurosci 28:34-48.
14. Naruse M, Nakahira E, Miyata T, Hitoshi S, Ikenaka K & Bansal R (2006) Induction of oligodendrocyte progenitors in dorsal forebrain by intraventricular microinjection of FGF-2. Dev Biol 297:262-273.
15. Lim DA, Suarez-Farinas M, Naef F, Hacker C, Menn B, Takebayashi H, Magnasco M, Patil N & Alvarez-Buylla A (2006) In vivo transcriptional profile analysis reveals RNA processing and chromatin remodeling as prominent processes for adult neurogenesis. Mol Cell Neurosci 31:131-148.
16. Abematsu M, Kagawa T, Fukuda S, Inoue T, Takebayashi H, Komiya S & Taga T (2006) bFGF endows dorsal telencephalic neural progenitors with ability to differentiate into oligodendrocytes but not GABAergic neurons. J Nourosci Res 83:731-743.

2) その他

1. 池中一裕，成瀬雅衣 (2006) オリゴデンドロサイトの分化シグナル，特集 ミエリン化の機構とその異常。生体の科学 57:158-161.
2. 鳥居知宏，池中一裕 (2006) 糖鎖研究におけるバイオインファーマティクスの現状，特集 1 脳機能解析にバイオインフォーマティクスは有効か？ 脳 21 9:33-38.
3. 渡辺啓介，小野勝彦 (2006) 脳の形態解析テクノロジー；19 世紀から 21 世紀まで。バイオテクノロジージャーナル 6:92-96.

《細胞内代謝研究部門》

1) 英文原著論文

1. Nomura T, Yoshimura K & Sokabe M (2006) Lipid-protein interaction of the MscS mechanosensitive channel examined by scanning mutagenesis. Biophys J 91:2874-2881.
2. Yokoyama S, Yokoyama Y, Kawai T, Kobayashi S, Nagimo M, Oda K, Nimura Y & Sokabe M (2006) Bipahsic activation of liver regeneration associated signals at an eraly stage after potal vein branch ligation. Biochem Biophys Res Comm 349:732-739.
3. Kobayashi S, Nagino, M, Yokoyama Y, Nimura T & Sokabe M (2006) Evaluation of hepatic interleukin-6 secretion following portal branch ligation using a minimal surgical stress model. J Surg Res 135:27-33.
4. Takeda H, Komori K, Nishikimi N, Nimura Y, Sokabe M & Naruse K (2006) Bi-phasic activation of eNOS in response to uni-axial cyclic stretch is mediated by differential mechanisms in BAECs. Life Sci 79:233-239.
5. Kuge T, Van Meerveld GB & Sokabe M (2006) Stress-induced breakdown of intestinal barrier function in the rat: reversal by wood creosote. Life Sci 79:913-918.
6. Chen L, Yamada K, Nabeshima T & Sokabe M (2006) α7 nicotinic acetylcholine receptor as a target to rescue deficit in hippocampal LTP induction in β-amyloid infused rats. Neuropharmacol 50:254-268.
7. Chen L, Dai XN & Sokabe M (2006) Chronic

application of DHEAS enhances long-term potentiation in rat hippocampal CA1 via sigma 1 receptor. Neuropharmacol 50:380-392.

8. Chen L, Miyamoto Y, Dai XN, Mori N & Sokabe M (2006) Chronic DHEAS administration facilitates hippocampal long-term potentiation through the Src family kinase-dependent activation of ERK. Neuropharmacol 51:659-670.
9. Li Z, Zou1 R, Cui1 S, Xei1 G, Cai1 W, Sokabe M & Chen L (2006) DHEAS prevents LTP impairment following forebrain ischemia in rat hippocampal CA1 by regulating tyrosine phosphorylation of NMDA receptor. Neuropharmacol 51:958-966.
10. Sakai H, Kawawaki J, Moriura Y, Mori H, Morihata H & Kuno M (2006) pH dependence and inhibition by extracellular calcium of proton currents via plasmalemmal vacuolar-type H^+-ATPase in murine osteoclasts. J Physiol 576:417-425.
11. Miyashita T, Tatsumi H, Hayakawa K, Mori N & Sokabe M (2006) Quantitative estimation of Na^+-K^+ ATPase activity in the endolymphatic sac epithelial cells of guinea-pig. Pflügers Arch (in press).
12. Dai S, Chen L & Sokabe M (2006) Neurosteroid estradiol rescues ischemia-induced deficit in the long-term potentiation in rat hippocampal CA1 neurons. Neuropharmacol (in press).

2) その他

1. Furuya K, Furuya S & Sokabe M (2006) Mechanosensing in intesitinal villi: ATP signaling in subepithelial fibroblasts network. “Biomechanics at Micro and Nano-scale Levels, Volume II” (Ed Wada H), World Scientific Publishing, Hackensack, NJ, pp 72-84.
2. 曽我部正博 (2006) 単一細胞内シグナリングの時空間特性：シナプス可塑性のモデルとしての細胞力覚機構。“ニューロインフォマティクス”（臼井支朗 編），オーム社，東京，pp 13-21.
3. 高橋賢，曽我部正博 (2006) カリウムチャネルの比較生物学。生体の科学「生物進化の分子マップ」57:472-473.
4. 吉村健二郎，野村健，曽我部正博 (2006) 細胞メカノセンサーの実体と機能。物理学雑誌 (in press)。

《機能協関研究部門》

1) 英文原著論文

1. Sabirov RZ, Sheiko T, Liu H, Deng D, Okada Y & Craigen WJ (2006) Genetic demonstration that the plasma membrane maxi-anion channel and voltage-dependent anion channels (VDACS) are unrelated proteins. J Biol Chem 281:1897-1904.
2. Maeno E, Shimizu T & Okada Y (2006) Normotonic cell shrinkage induces apoptosis under extracellular low Cl^- conditions in human lymphoid and epithelial cells. Acta Physiologica 187:217-222.
3. Liu H, Tashmukhamedov BA, Inoue H, Okada Y & Sabirov RZ (2006) Roles of two types of anion channels in glutamate release from mouse astrocytes under ischemic or osmotic stress. Glia 54:343-357.
4. Nukui M, Shimizu T & Okada Y (2006) Normotonic cell shrinkage induced by Na^+ deprivation results in apoptotic cell death in human epithelial HeLa cells. J Physiol Sci 56:335-339.
5. Shimizu T, Wehner F & Okada Y (2006) Inhibition of hypertonicity-induced cation channels sensitizes HeLa cells to shrinkage-induced apoptosis. Cell Physiol Biochem 18:295-302.
6. Maeno E, Takahashi N & Okada Y (2006) Dysfunction of regulatory volume increase is a key component of apoptosis. FEBS Lett 580:6513-6517.

2) その他

1. Okada Y (2006) Cell volume-sensitive chloride channel: Phenotypic properties and molecular identity. “Mechanisms and Significance of Cell Volume Regulation” (Ed. F Lang), Karger, Basel, (Contribution to Nephrology 152) pp 9-24.
2. Okada Y (2006) Foreword: Ion channel roles in cell death induction. J Membrane Biol 209:1-2.
3. Okada Y, Shimizu T, Maeno E, Tanabe S, Wang X &

Takahashi N (2006) Volume-sensitive chloride channels involved in apoptotic volume decrease and cell death. J Membrane Biol 209:21-29.

《感覚認知情報研究部門》

1) 英文原著論文

1. Matsumoto M, Togawa M & Komatsu H (2006) Air-driven eye shutter system for vision experiments using awake behaving animals. J Neurosci Methods 153:130-134.
2. Ogawa T & Komatsu H (2006) Neuronal dynamics of bottom-up and top-down processes in area V4 of macaque monkeys performing a visual search. Exp Brain Res 173:1-13.
3. Amano K, Goda N, Nishida S, Ejima Y, Takeda T & Ohtani Y (2006) Estimation of the timing of human visual perception from magnetoencephalography. J Neurosci 26:3981-3991.
4. Kawawaki D, Shibata T, Goda N, Doya K & Kawato M (2006) Anterior and superior lateral occipito-temporal cortex responsible for target motion prediction during overt and covert visual pursuit. Neurosci Res 54:112-123.

2) その他

1. Komatsu H (2006) The neural mechanisms of perceptual filling-in. Nat Rev Neurosci 7:220-231.
2. Ogawa T & Komatsu H (2006) A neural pooling hypothesis for target selection in visual search. “Brain-Inspired IT II: Decision and behavioral choice organized by natural and artificial brains” (Ed Ishii K, Natsume K & Hanazawa A), Elsevier, Amsterdam, pp. 69-72.

《神経シグナル研究部門》

1) 英文原著論文

1. Satake S, Song SY, Cao Q, Satoh H, Rusakov DA, Yanagawa Y, Ling EA, Imoto K & 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.
2. Sasaki S, Huda K, Inoue T, Miyata M & Imoto K (2006) Impaired feedforward inhibition of the thalamocortical projection in epileptic Ca^{2+} channel mutant mice, tottering. J Neurosci 26:3056-3065.
3. Tallini YN, Ohkura M, Choi BR, Ji G, Imoto K, Doran R, Lee J, Plan P, Wilson J, Xin HB, Sanbe A, Gulick J, Mathai J, Robbins J, Salama G, Nakai J & Kotlikoff MI (2006) Imaging cellular signals in the heart in vivo: Cardiac expression of the high-signal Ca^{2+} indicator GCaMP2. Proc Natl Acad Sci USA 103:4753-4758.
4. Itoh H, Horie M, Ito M & Imoto K (2006) Arrhythmogenesis in the short-QT syndrome associated with combined HERG channel gating defects: a simulation study. Circulation J 70:502-508.
5. Yamagata Y, Imoto K & Obata K (2006) A mechanism for the inactivation of Ca^{2+}/calmodulin-dependent proteinkinase II during prolonged seizure activity and its consequence after the recovery from seizure activity in rats in vivo. Neuroscience 140:981-992.
6. Inoue T, Murakami M, Watanabe S, Inokuma Y & Kirino Y (2006) In vitro odor-aversion conditioning in a terrestrial mollusk. J Neurophysiol 95:3898-3903.
7. Miyata M & Imoto K (2006) Different composition of glutamate receptors in corticothalamic and lemniscal synaptic responses and their roles in the firing responses of ventrobasal thalamic neurons in juvenile mice. J Physiol 575:161-174.
8. Inoue T & Imoto K (2006) Feedforward inhibitory

connections from multiple thalamic cells to multiple regular-spiking cells in layer 4 of the somatosensory cortex. J Neurophysiol 96:1746-1754.

9. Kodama T, Itsukaichi-Nishida Y, Fukazawa Y, Wakamori M, Miyata M, Molnar E, Mori Y, Shigemoto R & Imoto K (2006) A $Ca_V2.1$ calcium channel mutation rocker reduces the number of postsynaptic AMPA receptors in parallel fiber-Purkinje cell synapses. Eur J Neurosci 24:2993-3007.

2) その他

1. 宮田麻理子 (2006) 炎症性疼痛と代謝型グルタミン酸受容体。Clinical Neuroscience 24:180-184.

《感覚運動調節研究部門》

1) 英文原著論文

1. Kaneoke Y, Kakigi R (2006) Spatial integration of visual motion with separate speed and direction information. Neuroreport 17(18): 1841-1845.
2. Fujioka T, Ross B, Kakigi R, Pantev C, Laurel T (2006) One year of musical training affects development of auditory cortical evoked fields in young children. Brain 129(Pt 10): 2593-2608.
3. Wasaka T, Kida T, Nakata H, Kakigi R (2006) Pre-movement modulation of tibial nerve SEPs caused by a self-initiated dorsiflexion. Clin Neurophysiol 117(9): 2023-2029.
4. Kida T, Wasaka T, Nakata H, Akatsuka K, Kakigi R (2006) Active attention modulates passive attention-related neural responses to sudden somatosensory input against a silent background. Exp Brain Res 175(4): 609-617.
5. Kida T, Wasaka T, Inui K, Nakata H, Akatsuka K, Kakigi R (2006) Centrifugal regulation of human cortical responses to a task-relevant somatosensory signal triggering voluntary movement. Neuroimage 32(3): 1355-1364.
6. Hoshiyama M, Kakigi R, Takeshima Y, Miki K, Watanabe S (2006) Priority of face perception during subliminal stimulation using a new color-opponent flicker stimulation. Neurosci Lett 402(1-2): 57-61.
7. Inui K, Kakigi R (2006) Temporal analysis of the flow from V1 to the extrastriate cortex in humans. Neurophysiol 96 (2): 775-784.
8. Nakata H, Inui K, Wasaka T, Tamura Y, Akatsuka K, Kida T, Kakigi R (2006) Higher anticipated force required a stronger inhibitory process in go/nogo tasks. Clin Neurophysiol 117(8): 1669-1676.
9. Watanabe S, Kakigi R, Miki K, Puce A (2006) Human MT/V5 activity on viewing eye gaze changes in others: A magnetoencephalographic study. Brain Res 1092(1): 152-160.
10. Kida T, Wasaka T, Nakata H, Akatsuka K, Kakigi R (2006) Centrifugal regulation of a task-relevant somatosensory signal triggering voluntary movement without a preceding warning signal. Exp Brain Res 173(4): 733-741.
11. Tsuji T, Inui K, Kojima S, Kakigi R (2006) Multiple pathways for noxious information in the human spinal cord. Pain 123(3): 322-331.
12. Hoshiyama M, Kakigi R, Takeshima Y, Miki K, Watanabe S (2006) Differential priming effects of color-opponent subliminal stimulation on visual magnetic responses. Hum Brain Mapp 27(10): 811-818.
13. Miyanari A, Kaneoke Y, Ihara A, Watanabe S, Osaki Y, Kubo T, Kato A, Yoshimine T, Sagara Y, Kakigi R (2006) Neuromagnetic changes of brain rhythm evoked by intravenous olfactory stimulation in humans. Brain Topogr 18(3): 189-199.
14. Inui K, Okamoto H, Miki K, Gunji A, Kakigi R (2006) Serial and parallel processing in the human auditory cortex: a magnetoencephalographic study. Cereb Cortex 16(1): 18-30.
15. Inui K, Tsuji T, Kakigi R (2006) Temporal analysis of cortical mechanisms for pain relief by tactile stimuli in humans. Cereb Cortex 16(3): 355-365.
16. Inui K, Sannan H, Miki K, Kaneoke Y, Kakigi R (2006) Timing of early activity in the visual cortex as revealed by simultaneous MEG and ERG recordings. Neuroimage

30(1): 239-244.

17. Nakamura M, Watanabe S, Gunji A, Kakigi R (2006) The MEG response to upright and inverted face stimuli in a patient with Williams syndrome. Pediatr Neurol 34(5): 412-414.
18. Noguchi Y, Kakigi R (2006) Time representations can be made from non-temporal information in the brain: an MEG study. Cereb Cortex 16(12): 1797-1808.
19. Nakata H, Inui K, Wasaka T, Tamura Y, Kida T, Kakigi R (2006) The characteristics of the nogo-N140 component in somatosensory go/nogo tasks. Neurosci Lett 397(3): 318-322.
20. Hashimoto A, Watanabe S, Inui K, Hoshiyama M, Murase S, Kakigi R (2006) Backward-masking: The effect of the duration of the second stimulus on recognition of the first stimulus. Neuroscience 137(4): 1427-1437.
21. Kida T, Wasaka T, Nakata H, Kakigi R (2006) Centrifugal regulation of task-relevant somatosensory signals to trigger a voluntary movement. Exp Brain Res 169 (3): 289-301.
22. Qiu Y, Noguchi Y, Honda M, Nakata H, Tamura Y, Tanaka S, Sadato N, Wang X, Inui K, Kakigi R (2006) Brain processing of the signals ascending through unmyelinated C fibers in humans: an event-related functional magnetic resonance imaging study. Cereb Cortex 16(9): 1289-1295.
23. Ihara A, Kakigi R (2006) Oscillatory activity in the occipitotemporal area related to the visual perception of letters of a first/second language and pseudoletters. Neuroimage 29 (3): 789-796.

2) その他

1. Kaneoke Y (2006) Magnetoencephalography: In search of neural processes for visual motion information. Prog Neurobiol 80: 219-240.
2. Hoshiyama M, Kakigi R (2006) Functional changes in cortical components of somatosensory evoked responses by stimulus repetition. Supplement 59 Clin Neurophysiol 149-157.
3. Miki K, Watanabe S, Kakigi R (2006) Cortical activities elicited by viewing mouth movements: A magnetoencephalographic study. Supplement 59 Clin Neurophysiol 27-34.
4. Inui K, Wang X, Qiu Y, Tsuji T, Nakata H, Kakigi R (2006) Cortical processing of noxious information in humans: a magnetoencephalographic study. Supplement 59 Clin Neurophysiol 127-133.
5. 柿木隆介 (2006) 生理学研究所の歴史，共同利用機関の歴史とアーカイブズ 2004 総合研究大学院大学第 12 章 pp.319-327（編者　平田光司）中川印刷（株）
6. 柿木隆介 (2006) 特集「痛みの中枢機構」によせて，ペインクリニック 27 (12)：1503-1504.
7. 乾幸二 (2006) ヒト侵害受容系の電気生理学的検索，ペインクリニック 27 (12)：1505-1517.
8. 野口泰基，柿木隆介 (2006) ヒト視覚腹側路における神経順応効果の時間的動態, 臨床脳波 48 (12)：761-766.
9. 乾幸二，柿木隆介 (2006) 感覚情報の階層的処理，臨床脳波 48 (11)：697-703.
10. 柿木隆介，秋云海，野口泰基，本田学，中田大貴，田村洋平，田中悟史，定藤規弘，王暁宏，乾幸二 (2006) C 線維を上行する信号によって賦活される脳部位：機能的磁気共鳴画像 (fMRI) を用いた研究，Pain Research 21 (3)：95-102.
11. 藤岡孝子，柿木隆介 (2006) 聴覚性認知 (1) 音を聞き分けるーMEG による局在，月刊　臨床神経科学 (Clinical Neuroscience) 24 (11) 1200-1201.
12. 寳珠山稔，柿木隆介 (2006) 意識閾値以下の顔刺激による脳反応，臨床脳波 48(8)：468-473.
13. 成冨博章，柿木隆介，大平貴之，梶田泰一，鎌田恭輔, 川口秀明, 千葉喜英, 飛松省三, 吉峰俊樹 (2006) 脳血管障害患者に対する脳磁図検査ガイドライン，脳卒中 27 (4) 445-456.
14. 軍司敦子，柿木隆介，寳珠山稔 (2006) 発声時の聴覚誘発反応，臨床脳波：48 (6)：355-359.
15. 乾幸二，柿木隆介 (2006) 痛みの脳内機構，脳と神経 58 (1)：5-15.
16. 藤岡孝子，柿木隆介 (2006) 聴覚野からはじまる音楽認知，臨床脳波 48 (1)：25-30.

《生体システム研究部門》

1) 英文原著論文

1. Kita H, Chiken S, Tachibana Y & Nambu A (2006) Origins of $GABA_A$ and $GABA_B$ receptor mediated responses of globus pallidus induced after stimulation of the putamen in the monkey. J Neurosci 26:6554-6562.
2. Miyachi S, Lu X, Imanishi M, Sawada K, Nambu A & Takada M (2006) Somatotopically arranged inputs from putamen and subthalamic nucleus to primary motor cortex. Neurosci Res 56:300-308.
3. Kita H, Chiken S, Tachibana Y & Nambu A (2007) Serotonin modulates pallidal neuronal activity in the awake monkey. J Neurosci 27 : 75-83.

2) その他

1. 南部篤 (2006) DBS に神経生理学が寄与できること。臨床脳波 48 : 327-336.

《脳形態解析研究部門》

1) 英文原著論文

1. Lujan R & Shigemoto R (2006) Localization of metabotropic GABA receptor subunits $GABA_B1$ and $GABA_B2$ relative to synaptic sites in the rat developing cerebellum. Eur J Neurosci 23:1479-1490.
2. Inamura M, Itakura M, Okamoto H, Hoka S, Mizoguchi A, Fukazawa Y, Shigemoto R, Yamamori S & Takahashi M (2006) Differential localization and regulation of stargazin-like protein, gamma-8 and stargazin in the plasma membrane of hippocampal and cortical neurons. Neurosci Res 55:45-53.
3. Kulik A, Vida I, Fukazawa Y, Guetg N, Kasugai Y, Marker CL, Rigato F, Bettler B, Wickman K, Frotscher M & Shigemoto R (2006) Compartment-dependent colocalization of Kir3.2-containing K^+ channels and $GABA_B$ receptors in hippocampal pyramidal cells. J Neurosci 26:4289-4297.
4. Vigot R, Barbieri S, Brauner-Osborne H, Turecek R, Shigemoto R, Zhang YP, Lujan R, Jacobson LH, Biermann B, Fritschy JM, Vacher CM, Muller M, Sansig G, Guetg N, Cryan JF, Kaupmann K, Gassmann M, Oertner TG & Bettler B (2006) Differential compartmentalization and distinct functions of $GABA_B$ receptor variants. Neuron 50:589-601.
5. Shaban H, Humeau Y, Herry C, Cassasus G, Shigemoto R, Ciocchi S, Barbieri S, van der Putten H, Kaupmann K, Bettler B & Luthi A (2006) Generalization of amygdala LTP and conditioned fear in the absence of presynaptic inhibition. Nat Neurosci 9:1028-1035.
6. Momiyama T & Zaborszky L (2006) Somatostatin presynaptically inhibits both GABA and glutamate release onto rat basal forebrain cholinergic neurons. J Neurophysiol 96:686-694.

2) その他

1. 重本隆一，深澤有吾 (2006) 凍結割断レプリカ免疫標識法。生体の科学 57:273-280.
2. 籾山俊彦 (2006) 線条体 GABA 性シナプス伝達修飾とその生後発達。“GABA : 最新の話題 New Frontiers of Neurotransmitter Research”（佐藤公道，辻省次 et al. 編），Excerpta Medica / Elsevier Japan, Tokyo, pp 37-56.
3. Matsui K & von Gersdorff H (2006) The great escape of glutamate from the depth of presynaptic invaginations. Neuron 50:669-671.
4. Matsui K & Jahr CE (2006) Exocytosis unbound. Curr Opin Neurobiol, 16:305-311.

《大脳神経回路論研究部門》

1) 英文原著論文

1. Kawaguchi Y, Karube F, Kubota Y (2006) Dendritic branch typing and spine expression patterns in cortical nonpyramidal cells. Cereb Cortex 16:696-711.

2. Morishima M, Kawaguchi Y (2006) Recurrent connection patterns of corticostriatal pyramidal cells in frontal cortex. J Neurosci 26:4394-4405.

《心理生理学研究部門》

1) 英文原著論文

1. Aramaki Y, Honda M & Sadato N (2006) Suppression of the non-dominant motor cortex during bimanual symmetric finger movement: a functional magnetic resonance imaging study. Neuroscience 141:2147-2153.
2. Aramaki Y, Honda M, Okada T & Sadato N (2006) Neural correlates of the spontaneous phase transition during bimanual coordination. Cereb Cortex 16: 1338-1348.
3. Bohlhalter S, Goldfine A, Matteson S, Garraux G, Hanakawa T, Kansaku K, Wurzman R, Hallett M (2006) Neural correlates of tic generation in Tourette syndrome: an event-related functional MRI study. Brain 129: 2029-2037.
4. Fridman EA, Immisch I, Hanakawa T, Bohlhalter S, Waldvogel D, Kansaku K, Wheaton L, Wu T, Hallett M (2006) The role of the dorsal stream for gesture production. Neuroimage 29:417-428.
5. Iidaka T, Matsumoto A, Nogawa J, Yamamoto Y & Sadato N (2006) Frontoparietal network involved in successful retrieval from episodic memory. Spatial and temporal analyses using fMRI and ERP. Cereb Cortex 16:1349-1360.
6. Iidaka T, Matsumoto A, Haneda K, Okada T & Sadato N (2006) Hemodynamic and electrophysiological relationship involved in human face processing: evidence from a combined fMRI-ERP study. Brain Cogn 60:176-186.
7. Iidaka T, Matsumoto A, Ozaki N, Suzuki T, Iwata N, Yamamoto Y, Okada T & Sadato N (2006) Volume of left amygdala subregion predicted temperamental trait of harm avoidance in female young subjects. A voxel-based morphometry study. Brain Res 1125:85-93.
8. Kansaku K, Johnson A, Grillon ML, Garraux G, Sadato N & Hallett M (2006) Neural correlates of counting of sequential sensory and motor events in the human brain. Neuroimage 31:649-660.
9. Kitada R, Kito T, Saito DN, Kochiyama T, Matsumura M, Sadato N & Lederman SJ (2006) Multisensory activation of the intraparietal area when classifying grating orientation: a functional magnetic resonance imaging study. J Neurosci 26:7491-7501.
10. Miyamoto JJ, Honda M, Saito DN, Okada T, Ono T, Ohyama K & Sadato N (2006) The representation of the human oral area in the somatosensory cortex: a functional MRI study. Cereb Cortex 16:669-675.
11. Qiu Y, Noguchi Y, Honda M, Nakata H, Tamura Y, Tanaka S, Sadato N, Wang X, Inui K, Kakigi R (2006) Brain processing of the signals ascending through unmyelinated C fibers in humans: An event-related functional magnetic resonance imaging study. Cereb Cortex, 16:1289-1295.
12. Saito DN, Okada T, Honda M, Yonekura Y, Sadato N (2006) Practice makes perfect: the neural substrates of tactile discrimination by Mah-Jong experts include the primary visual cortex. BMC Neurosci, 7:79.
13. Tanaka M, Sadato N, Okada T, Mizuno K, Sasabe T, Tanabe HC, Saito DN, Onoe H, Kuratsune H & Watanabe Y (2006) Reduced responsiveness is an essential feature of chronic fatigue syndrome: a fMRI study. BMC Neurol 6:9.
14. Uchiyama H, Seki A, Kageyama H, Saito DN, Koeda T, Ohno K & Sadato N (2006) Neural substrates of sarcasm: A functional magnetic-resonance imaging study. Brain Res 1124:100-110.

2) その他

1. Sadato N (2006) Cross-modal plasticity in the blind revealed by functional neuroimaging. Suppl Clin Neurophysiol 59:75-79.

《認知行動発達機構研究部門》

1) 英文原著論文

1. Isa T, Ohki Y, Seki K & Alstermark B (2006) Properties of propriospinal neurons in the C3-C4 segments mediating disynaptic pyramidal excitation to forelimb motoneurons in the macaque monkey. J Neurophysiol 95:3674-3685.
2. Tanaka H, Ikenaka K & Isa T (2006) Electrophysiological abnormalities precede apparent histological demyelination in the central nervous system of mice overexpressing proteolipid protein. J Neurosci Res 84:1206-1216.
3. Sooksawate T & Isa T (2006) Properties of cholinergic responses in neurons in the intermediate gray layer of rat superior colliculus. Eur J Neurosci 24:3096-3108.

2) その他

1. Isa T & Sparks DL (2006) Microcircuit of the superior colliculus: A neuronal machine that determines timing and endpoint of saccadic eye movements. “Microcircuits. The interface between neurons and global brain function” (Ed Grillner S & Graybiel AM), MIT Press, Cambridge, MA, pp 5-34.
2. Kiehn O, Büschges A, Duch C, Grillner S, Isa T, Lansner A, Pflüger H-J, Richter DW, Sillar KT, Smith JC & Sparks DL (2006) Group report: Microcircuits in the motor system. “Microcircuits. The interface between neurons and global brain function” (Ed Grillner S & Graybiel AM), MIT Press, Cambridge, MA, pp 77-104.
3. 西村幸男，伊佐正 (2006) 手の巧緻運動を支える皮質脊髄路とその損傷後の機能回復。実験医学 24（No.15 増刊号）: 200-207.
4. 伊佐正 (2006) 脳の損傷からどう立ち直るか。“2005 世界脳習慣の講演より 子どもの脳から大人の脳へ”（脳の世紀推進会議 編），クバプロ，東京，pp 69-104.
5. 伊佐正 (2006)「ニホンザル」バイオリソースプロジェクトについて。遺伝 60: 30-31.

《生体恒常機能発達機構研究部門》

1) 英文原著論文

1. Nakamura T, Jeromin A, Smith G, Kurushima H, Koga H, Nakapeppu Y, Wakabayashi S, Nabekura J (2006) Novel role of neuronal Ca^{2+} sensor-1 as a survival factor up-regulated in injured neurons. J Cell Biol 172:1081-1091.
2. Matsumoto N, Noda E, Nabekura J (2006) Run down of GABAergic depolarization during metabolic inhibition of rat hippocampal CA1 neurons. Life Sci 79:1021-1026.
3. Kanematsu T, Yasunaga A, Mizoguchi Y, Kuratani A, Kittler JT, Jovanovic JN, Takenaka K, Nakayama KI, Fukami K, Takenawa T, Moss SJ, Nabekura J, Hirata M (2006) Modulation of $GABA_A$ receptor phosphorylation and membrane trafficking by phospholipase C-related inactive protein/protein phosphatase 1 and 2A signaling complex underlying brain-derived neurotrophic factor-dependent regulation of GABAergic inhibition. J Biol Chem 281:22180-22189.
4. Mizoguchi Y, Kitamura A, Wake H, Ishibashi H, Watanabe H, Nishimaki T, Nabekura J (2006) BDNF occludes $GABA_B$ receptor-mediated inhibition of GABA release in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. Eur J Neurosci 24:2135-2144.

2) その他

1. 鍋倉淳一 (2006) 神経回路の発達子どもの脳から大人の脳へ。NPO 法人脳の世紀推進会議編 クバプロ pp 41-68.

《生殖・内分系発達機構研究部門》

1) 英文原著論文

2) その他

1. 箕越靖彦 (2006) 中枢における食欲・エネルギー代謝調節機構と肥満による障害。BIO Clinica 21: 355-360.
2. 箕越靖彦 (2006) AMP キナーゼとエネルギー代謝調節作用。医学のあゆみ 217:120-126.
3. 箕越靖彦 (2006) 抗肥満シグナル：レプチン－AMP キナーゼ経路による摂食・代謝調節作用。実験医学 24:2458-2466.
4. 箕越靖彦 (2006) AMPK と脂肪酸による中枢性摂食調節作用。BIO Clinica 21:2458-2466.
5. 箕越靖彦 (2006) AMP キナーゼとエネルギー代謝調節作用。“糖尿病学 2006”診断と治療社，東京，pp 49-59.
6. 箕越靖彦 (2006) AMP キナーゼによる代謝調節作用。“糖尿病学の進歩第 40 集”（日本糖尿病学会編），診断と治療社，東京，pp 193-201.

《形態情報解析室》

1) 英文原著論文

1. Ikkai T, Arii T & Shimada K (2006) Excimer fluorescence as a tool for monitoring protein domain dynamics applied to actin conformation changes based on circulary polarized fluorescence spectroscopy. J Fluoresc 16:367-374.

2) その他

1. Furuya K, Furuya S, Sokabe M (2006) Mechanosensing in intestinal villi: ATP signaling in subepithelial fibroblasts network. In “Biomechanics at micro- and nanoscale levels” Vol 2. Ed. Wada H, World Scientific, p 72-84.

《機能情報解析室》

1) 英文原著論文

1. Tsujimoto T, Shimazu H & Isomura Y (2006) Direct recording of theta oscillations in primate prefrontal and anterior cingulate cortices. J Neurophysiol 95:2987-3000.

《生体情報解析室》

1) 英文原著論文

1. Kishimoto T, Kimura R, Liu TT, Nemoto T, Takahashi N & Kasai H (2006) Vacuolar sequential exocytosis of large dense-core vesicles in adrenal medulla. EMBO J 25:673-682.
2. Kasai H, Kishimoto T, Nemoto T, Hatakeyama H, Liu TT & Takahashi N (2006) Two-photon excitation imaging of exocytosis and endocytosis and their spatial organizations. Adv Drug Deliv Rev 58:850-877.
3. Hatakeyama H, Kishimoto T, Nemoto T, Kasai H & Takahashi N (2006) Rapid glucose sensing by protein kinase A for insulin exocytosis in mouse pancreatic islets. J Physiol 570:271-282.

《遺伝子改変動物作製室》

1) 英文原著論文

1. Kobayashi T, Amemiya K, Takeuchi K, Tsujioka T, Tominaga K, Hirabayashi M, Ishikawa H, Fukui Y & Hochi S (2006) Contribution of spermatozoal centrosomes to microtubule-organizing center in Antarctic minke whale (Balaenoptera bonaerensis). Zygote 14:45-51.
2. Iwanami Y, Kobayashi T, Kato M, Hirabayashi M & Hochi S (2006) Characteristics of rat round spermatids differentiated from spermatogonial cells during co-culture with Sertoli cells, assessed by flow cytometry, microinsemination and RT-PCR. Theriogenology 65: 288-298.
3. Hirabayashi M, Kato M, Kaneko R, Hirabayashi T, Morita M & Hochi S (2006) No effect of recombinase-mediated DNA transfer on production efficiency of transgenic rats. Exp Anim 55:131-135.
4. Fujihira T, Kobayashi M, Hochi S, Hirabayashi M, Ishikawa H, Ohsumi S & Fukui Y (2006) Developmental capacity of the Antarctic minke whale (Balaenoptera bonaerensis) vitrified oocytes following in vitro maturation and parthenogenetic activation or intracytoplasmic sperm injection. Zygote 14:89-95.
5. Ito J, Kaneko R & Hirabayashi M (2006) The regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II during oocyte activation in the rat. J Reprod Dev 52:439-447.
6. Shinohara T, Kato M, Takehashi M, Lee J, Chuma S, Nakatsuji N, Kanatsu-Shinohara M & Hirabayashi M (2006) Rats produced by interspecies spermatogonial transplantation in mice and in vitro microinsemination. Proc Natl Acad Sci USA 103:13624-13628.

2) その他

1. Hirabayashi M, Kato M & Hochi S (2006) Transgenesis via intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in rodents (Mini review). J Mamm Ova Res 23:86-90.

《時系列生命現象研究領域》

1) 英文原著論文

1. Sasaki M, Takagi M & Okamura Y (2006) A voltage sensor-domain protein is a voltage-gated proton channel. Science 312:589-592.
2. Shirahata E, Iwasaki H, Takagi M, Changqing Lin, Vann Bennett, Okamura Y & Hayasaka K (2006) Ankyrin-G regulates inactivation gating of the neuronal sodium channel, Nav1.6. J Neurophysiol 96:1347-1357.
3. Kimura Y, Okamura Y & Higashijima S (2006) alx, a zebrafish homolog of Chx10, marks ipsilateral descending excitatory interneurons that participate in the regulation of spinal locomotor circuits. J Neurosci 26:5684-5697.

2) その他

1. 岡村康司，村田喜理，岩崎広英，佐々木真理 (2006) 膜電位を感じて活性を変化させるイノシトールリン脂質脱リン酸化酵素。蛋白質核酸酵素 51:18-26.
2. 岡村康司 (2006) 電位センサーの動作原理と電位感受性酵素 VSP。細胞工学 25:231-235.
3. 佐々木真理，高木正浩，岡村康司 (2006) 電位依存性プロトンチャネルはポア（孔）構造をもたない分子である。実験医学 24:1785-1788.
4. 和田　洋，西野　敦雄，倉谷　滋 (2006) 遺伝子から見た脊索動物の起源。生体の科学 57 (5): 360-362.
5. 西野　敦雄 (2006) 海産無脊椎動物の発生と進化。「動物の形態進化のメカニズム」（佐藤矩行，倉谷滋編）「21 世紀の動物科学」シリーズ　第 3 巻所収，日本動物学会，培風館。（印刷中）

《戦略的方法論研究領域》

1) 英文原著論文

1. Kaneko Y, Danev R, Nagayama K & Nakamoto H (2006) Intact carboxysomes in a cyanobacterial cell visualized by Hilbert differential contrast transmission electron microscopy. J Bacterol 1882:805-808.
2. Tosaka M, Tsuji M, Ogawa T, Kitano H, Nakano K, Kohjiya S, Danev R & Nagayama K (2006) Self-assembly of nano-sized arrays on highly oriented thin films of poly(tetrafluoroethylene). Polymer 47:951-955.
3. Sugitani S & Nagayama K (2006) Complex observation in electron microscopy. VI. Comparison of information transfer reliability between Zernike complex observation and transport of intensity equation method. J Phys Soc Jpn 75:084401:1-7.
4. Ohta A, Danev R, Nagayama K, Mita T, Asakawa T & Miyagishi S (2006) Transition from nanotubes to micelled with increasing concentration in dilute aqueous solution of potassium N-acyl phenylalaninate. Langmuir 22:8472-8477.
5. Fukuda Y, Kawano Y, Tanikawa Y, Oba M, Koyama M, Takagi H, Matsumoto M, Nagayama K & Setou M (2006) In Vivo imaging of the dendritic arbors of layer V pyramidal cells in the cerebral cortex using a laser scanning microscope with a stick-type objective lens. Neurosci Lett 400:53-57.
6. Setou M, Radostin D, Atsuzawa K, Yao I, Fukuda Y, Usuda N & Nagayama K (2006) Mammalian cell nano structures visualized by cryo Hilbert differential contrast transmission electron microscopy. Med Mol Morph 39:176-180.
7. Murakami M, Murdiastuti K, Hosoi K & Hill AE (2006) AQP and the control of fluid transportin a salivary gland. J Membr Biol 210:91-103.
8. Sugiura Y, Shimma S & Setou M (2006) Thin sectioning improves the peak intensity and signal-to-noise ratio in direct tissue mass spectrometry. J Mass Spectrom Soc Jpn 54:45-48.
9. Shimma S, Furuta M, Ichimura K, Yoshida Y & Setou M (2006) A novel approach to in situ proteome analysis using a chemical inkjet printing technology and MALDI-QIT-TOF tandem mass spectrometer. J Mass Spectrom Soc Jpn 54:133-140.
10. Sugiura Y, Shimma S & Setou M (2006) Two-step matrix application technique to improve ionization efficiency for matrix-assisted laser desorption/ionization in imaging mass spectrometry. Anal Chem 78: 8227-8235.
11. Shimma S, Furuta M, Ichimura K, Yoshida Y & Setou M (2006) Direct MS/MS analysis in mammalian tissue sections using MALDI-QIT-TOFMS and chemical inkjet technology. Surf Int Anal (in press).
12. Sugii S, Lin S, Ohgami N, Ohashi M, Chang CC & Chang TY (2006) Roles of endogenously synthesized sterols in the endocytic pathway. J Biol Chem 281:23191-23206.
13. Mitomo H, Shigematsu H, Kobatake E, Furusawa H, Okahata Y (2007) IgG binding kinetics to oligo B protein A domain on lipid layers immobilized on a 27 MHz quartz-crystal microbarance J. Mol. Recognit. 83-89.

2) その他

1. 永山國昭 (2006) 自己組織化と自己集積化。表面科学（日本表面科学会）27:1.
2. 永山國昭 (2006) 複素光学への道－究極の位相差法 V－AB 効果利用位相版。O plus E（新技術コミュニケーションズ）1 月号，pp 94-96.
3. 永山國昭 (2006) 複素光学への道－3 次元結像法 I－2 次元理論の拡張。O plus E（新技術コミュニケーションズ）2 月号，pp 201-204.
4. 永山國昭 (2006) 複素光学への道－3 次元結像法 II－無収差位相差法への応用。O plus E（新技術コミュニケーションズ）3 月号，pp 309-312.
5. 永山國昭 (2006) 複素光学への道－3 次元結像法 III－実時間無収差位相差電子顕微鏡。O plus E（新技術コミュニケーションズ）4 月号，pp 426-429.
6. 永山國昭 (2006) 複素光学への道－閑話休題－位相をめぐって。O plus E（新技術コミュニケーションズ）5 月号，pp 529-531.
7. 永山國昭 (2006) 複素光学への道－閑話休題－複素

数の感性。O plus E（新技術コミュニケーションズ）6 月号，pp 629-633.
8. 永山國昭 (2006) 生命科学の終焉と新しい科学ー50 年後の世界。蛋白質拡散酵素 51:1712-1714 .
9. Danev R & Nagayama K (2006) Applicability of thin film phase plates in biological electron microscopy. BIOPHYSICS 2:35-43.
10. 曽我美勝，恵良聖一，平松宏一，村上政隆，瀬尾芳輝，加藤一夫，藤本守 (2006) 生理現象と高分子排除体積効果 (Excluded Volume Effect) --- 高分子活量係数 (I). 日本生理学会誌 68:4-14.
11. 曽我美勝，恵良聖一，平松宏一，村上政隆，瀬尾芳輝，加藤一夫，藤本守 (2006) 生理現象と高分子排除体積効果 (Excluded Volume Effect) --- 高分子活量係数 (II). 日本生理学会誌 68:47-57.
12. 瀬藤光利，杉浦悠毅 (2006) マスイメージングを用いた脳のマルチディメンジョンメタボロミクス。脳 21 9:6-11.
13. 小河潔，竹内貞夫，出水秀明，原田高宏，吉田佳一，瀬藤光利 (2006) 顕微質量分析装置の開発。島津評論 62:125-135.
14. 新間秀一，瀬藤光利 (2006) 研究紹介顕微質量分析装置のバイオナノテクノロジーへの応用。表面科学 27:79-85.
15. 新間秀一，杉浦悠毅，瀬藤光利 (2006) ASMS Conference レポート透明導電性シートを用いたイメージング質量分析用試料作成法。J Mass Spectrom Soc Jpn 54:210-211.
16. 古田大，新間秀一，中西豪，瀬藤光利，安藤英治 (2006) ケミカルプリンタの MALDI-Imaging への応用。島津評論 63:93-99.
17. 瀬藤光利，向井政博 (2006) 顕微質量分析装置の開発。Medical Science Digest (in press).
18. 新間秀一，杉浦悠毅，瀬藤光利 (2006) バイオイメージングの新展開質量分析顕微鏡の開発と応用。細胞工学 (in press)。
19. 大橋正人 (2006) エンドサイトーシス経路における選別輸送。“先端生物医学研究・医療のための遺伝子導入テクノロジー：ウイルスを用いない遺伝子導入法の材料，技術，方法論の新たな展開（遺伝子医学 MOOK 5 号）”（原島秀吉，田畑泰彦 編），メディカルドュ，大阪，pp 180-185.

《生命環境研究領域》

1) 英文原著論文

1. Togashi K, Hara Y, Tominaga T, Higashi T, Konishi Y, Mori Y & Tominaga M (2006) TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion. EMBO J 25:1804-1815.
2. Mandadi S, Tominaga T, Numazaki M, Murayama N, Saito N, Armati PJ, Roufogalis BD & Tominaga M (2006) Increased sensitivity of desensitizaed TRPV1 by PMA occurs through PKCε-mediated phosphorylation at S800. Pain 123:106-116.
3. Ishimaru Y, Inada H, Kubota M, Zhuang H, Tominaga M & Matsunami H (2006) TRP family members, PKD1L3 and PKD2L1, form a candidate sour taste receptor. Proc Natl Acad Sci USA 103:12569-12574.
4. Inada H, Iida T & Tominaga M (2006) Different expression patterns of TRP genes in murine B and T ltmphocytes. Biochem Biophys Res Commun 350: 762-767.
5. Yoshida T, Inoue R, Morii T, Takahashi N, Yamamoto S, Hara Y, Tominaga M, Shimizu S, Sato Y & Mori Y (2006) Nitric oxide activates TRP channels by cysteine S-nitrosylation. Nat Chem Biol 2:596-607.
6. Morita A, Iwasaki Y, Kobata K, Iida T, Higashi T, Oda K, Suzuki A, Narukawa M, Sasakuma S, Yokogoshi H, Yazawa S, Tominaga M & Watanabe T (2006) Lipophilicity of capsaicinoids and capsinoids influences the multiple activation process of rat TRPV1. Life Sci 79:2303-2310.

2) その他

1. Tominaga M (2006) Gating, sensitization and desensitization of TRPV1. “The Nociceptive Membrane” (Ed Oh U), Elsevier, San Diego, pp 181-197.
2. Tominaga M (2006) The role of TRP channels in thermosensation. “TRP Ion Channel Function in Sensory

Transduction and Cellular Signaling Cascades" (Ed Liedtke WB & Heller S), CRC Press, Boca Raton, pp 271-286.
3. Tominaga M (2006) Nociception and TRP channels. "Handbook of Experimental Pahramacology Vol. 179" (Ed Flockerzi V), Springer, Heidelberg, pp 489-505.
4. 富永真琴 (2006) 培養細胞での cDNA 導入によるチャネル・受容体機能の検討法。"痛み研究のアプローチ"（河谷正仁 編），真興交易医書出版部，東京，pp 97-102.
5. 富永真琴 (2006) TRP チャネル。"痛み研究のアプローチ"（河谷正仁 編），真興交易医書出版部，東京，pp 146-152.
6. 富永真琴 (2006) TRP チャネルと痛み。"日本薬理学雑誌くすりとからだ" 127:128-132.
7. 富永真琴 (2006) 消化管における TRPV1 の発現と機能。"日本薬理学雑誌くすりとからだ" 128:78-81.
8. 富永真琴 (2006) 痛みと温度受容の分子・細胞メカニズム。実験医学 24（15 増刊）: 54-59.
9. 富永真琴 (2006) 痒みに関わる分子に迫る。科学（岩波書店）12:1234-1235.

《動物実験センター》

1) 英文原著論文

1. Kimura T (2005) Effects of fasting therapy in obese dogs on body weight, and hematological, blood coagulation and serum biochemical values. West Ind Vet J 5:10-20.

2) その他

1. 木村　透　(2006) ケタミンの麻薬指定。NBR Newsletter 3: 6-9.
2. 廣江　猛，木村 透 (2006) 近交系マウス C57BL/6J およびトランスジェニックマウスの体外受精における培地の比較試験。日比臨医会誌 14: 54-59.

《計算科学研究センター》

1) 英文原著論文

1. Kuroda K, Kodama H, Kataoka M, Hayakawa Y (2006) A ribonucleoside with pyrimido [4,5-d] pyrimidine - 2,4,5,7 - (1H,3H,6H,8H) - tetraone as a nucleobase, which universally binds to natural nucleosides. Nucleic Acids Symposium Series 50:17-18.

b.　学会発表

〔　目　　次　〕

神経機能素子研究部門 102
分子神経生理研究部門 102
細胞内代謝研究部門 104
機能協関研究部門 105
感覚認知情報研究部門 106
神経シグナル研究部門 107
感覚運動調節研究部門 108
生体システム研究部門 109
脳形態解析研究部門 110
大脳神経回路論研究部門 111
心理生理学研究部門 112
認知行動発達機構研究部門 113
生体恒常機能発達機構研究部門 114
生殖・内分泌系発達機構研究部門 115
形態情報解析室 116
生体情報解析室 116
遺伝子改変動物作製室 117
時系列生命現象研究領域　神経分化 117
戦略的方法論研究領域　ナノ形態生理 118
生命環境研究領域　細胞生理 121
動物実験センター 122
計算科学研究センター 122

学　会　発　表

《神経機能素子研究部門》

1. Tateyama M, Kubo Y (2006.2) Regulation mechanisms and structural rearrangements of metabotropic glutamate receptor1. JSPS Korea-Japan Joint Seminar “Molecular and systemic basis of neurological disorders”.（岡崎）
2. 久保義弘，石原圭子 (2006.3) 内向き整流性 K^+ チャネルの 2 種のサブユニット Kir2.1 と Kir3.4 のヘテロ多量体形成の解析。第 83 回日本生理学会大会（前橋）
3. 藤原祐一郎，久保義弘 (2006.3) ATP 受容体チャネル $P2X_2$ の膜電位と ATP に依存した“ゲート”機構の解析。第 83 回日本生理学会大会（前橋）
4. 中條浩一，久保義弘 (2006.3) KCNQ チャネルの C 末端細胞内領域に存在する 2 つのコイルドコイルドメインの役割。第 83 回日本生理学会大会（前橋）
5. 長友克広，伊藤政之，久保義弘，齊藤修 (2006.3) RGS8 による受容体選択的な Gq 応答抑制の分子機構。第 83 回日本生理学会大会（前橋）
6. 石井裕，中田裕康，久保義弘 (2006.7) 代謝型アデノシン受容体と代謝型 ATP 受容体の機能的ヘテロ多量体形成。第 29 回日本神経科学大会（京都）
7. 立山充博，久保義弘 (2006.7) 代謝型グルタミン酸受容体の多様なシグナリングは 4.1G により制御される。第 29 回日本神経科学大会（京都）
8. 久保義弘, 立山充博 (2006.9) 代謝型グルタミン酸受容体の機能制御機構と動的構造変化。第 3 回インビトロジェンシンポジウム「バイオサイエンスの最先端」（湘南国際村）
9. 久保義弘 (2006.10) 代謝型グルタミン酸受容体の機能制御機構と動的構造変化。分子科学研究所装置開発室・技術セミナー「微細加工技術と生命科学・医科学応用」（岡崎）
10. 久保義弘 (2006.11) 代謝型グルタミン酸受容体の機能制御機構と動的構造変化。大阪大学蛋白質研究所セミナー「膜タンパク質のファンクショナルダイナミクス― 先進的膜タンパク質研究：ロドプシン・GPCR の世界―」（大阪）

《分子神経生理研究部門》

1. Ono K (2006.2) Lineage analysis of the Olig2 expressing cells in the central nervous system. Myelin Gordon Conference (Ventura, USA).
2. Ikenaka K (2006.3) Causes for the arrested oligodendrocyte development in demyelinating diseases. American Society for Neurochemistry 35th Annual meeting (Portland, USA).
3. 池中一裕，田中謙二 (2006.3) アレキサンダー病モデルマウス 第 83 回日本生理学会（前橋）
4. 小野勝彦，渡辺啓介，池中一裕 (2006.3) 脊髄背側部で発現するネトリン-1 は一次求心性線維を抑制的にガイドする。第 111 回解剖学会総会（相模原）
5. 村上志津子，小野勝彦 (2006.3) GnRH ニューロンの移動経路におけるガイダンス分子とレセプターの発現。第 111 回日本解剖学会総会・全国学術総会（東京）
6. 渡辺啓介，池中一裕，小野勝彦 (2006.5) 脊髄後角由来 netrin-1 による一次感覚神経の軸索投射制御。第 70 回日本生化学会中部支部例会（名古屋）
7. 東幹人，等誠司，池中一裕 (2006.5) 神経幹細胞に対する気分安定薬の薬理作用と作用機序の解明。第 70 回日本生化学会中部支部例会（名古屋）
8. 鳥居知宏，戸田年総，辻崇一，等誠司，池中一裕 (2006.5) 3D-HPLC を用いた大脳皮質発達過程において発現する新規 α2,6 シアル酸付加糖鎖構造解析。第 70 回日本生化学会中部支部例会（名古屋）
9. Hitoshi S (2006.6) Neural stem cell kinetics under stress condition. The 4th International Society for Stem Cell Research (Toronto, Canada).
10. Torii T, Ishii A, Toda T, Hitoshi S, Ikenaka K (2006.7) I

Identification of a novel N-glycan structure containing α 2,6- sialic acid in the mouse cerebral cortex during development. The 7th Biennial Meeting of the APSN (Singapore).

11. Ikeda K, Ono K, Takebayashi H, Kuriyama S, Ikenaka K (2006.7) Stage-specific defferentiation of olig2 -expressing cells in he mouse brainstem. The 7th Biennial Meeting of the APSN (Singapore).
12. Ma J, Tanaka KF, Yanada G, Ikenaka K (2006.7) Cystatin F induction in demyelinating disease of CNS. 7th Biennial Meeting of the APSN (Singapore).
13. Watanabe K, Ikenaka K, Ono K (2006.7) Netrin 1 is required for formation of the dorsal spinal cord. The 7th Biennial Meeting of the APSN (Singapore).
14. Ikenaka, K. (2006.6) Regulation of oligodendrocyte development. IBRO-ISN School (Singapore).
15. Ikenaka, K. (2006.7) Lineage Analysis of Olig2-positive cells. 7th Biennial Meeting of the APSN (Singapore).
16. Naruse, M., Miyata, T., Hitoshi, S., Ikenaka, K. and Bansal, R. (2006.7) Insuction of oligodendrocyte progenitors in dorsal forebrain by intraventricular microinjection of FGF-2. The 7th Biennial Meeting of the APSN (Singapore).
17. Ikenaka K, Ma J, Tanaka KF (2006.7) Change in the character of microglia coincide with the impaired remyelination by oligodendrocytes. The 2006 meeting on Glia in Health & Disease. Cold Spring Harbor Laboratory (Cold Spring Harbor, USA).
18. Tanaka KF, Ikenaka K (2006.7) Abnormalities found in Alexander disease-model mouse. The 2006 meeting on Glia in Health & Disease. Cold Spring Harbor Laboratory (Cold Spring Harbor, USA).
19. 小野勝彦，古性美記，池田和代，竹林浩秀，池中一裕 (2006.7) 前脳における Olig2 細胞の系譜解析-2：Olig2 発現細胞はニューロン，オリゴデンドロサイト，アストロサイトが時期依存的に分化する。第 29 回日本神経科学大会（京都）
20. 渡辺啓介，竹林浩秀，池中一裕，小野勝彦 (2006.7) 胎仔期脊髄において Netrin-1 は Olig3 系譜細胞の腹側方向への移動を制御する。第 29 回日本神経科学大会（京都）
21. 増田知之，渡辺啓介，池中一裕，小野勝彦，八木沼洋行 (2006.7) 脊髄腹側の netrin-1 は一次求心性線維の脊髄到達前のガイダンスに関与する。第 29 回日本神経科学大会（京都）
22. 村上志津子，小野勝彦 (2006.7) GnRH ニューロンの移動経路における軸索ガイダンス分子と受容体の発現。第 29 回日本神経科学大会（京都）
23. 青野幸子，黒田喜幸，松井ふみ子，時田義人，中西圭子，伊田みちる，伊川正人，岡部勝，小野勝彦，大平敦彦 (2006.7) 神経系に特異的に発現するニューログリカン C の遺伝子改変マウスの解析。第 29 回日本神経科学大会（京都）
24. 辰巳晃子，竹林浩秀，眞部孝幸，池中一裕，和中明生 (2006.7) 損傷脳における Olig2 陽性オリゴデンドロサイト前駆細胞のアストロサイトへの分化。第 29 回日本神経科学大会（京都）
25. 鳥居知宏，戸田年総，高木淑江，辻崇一，等誠司，池中一裕 (2006.8) 大脳皮質発達過程における分岐鎖 α 2,6 シアル酸付加 N 結合型糖鎖の構造解析。第 26 回日本糖質学会年会（仙台）
26. Naruse M, Nakahira E, Miyata T, Hitoshi S, Ikenaka K, Bansal R (2006.8) Induction of oligodendrocyte precursors in fetal cerebral cortex by intraventricular injection of FGF-2. The 16th Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience (Banff, Canada).
27. Kagawa T, Abematsu M, Fukuda S, Inoue T, Takebayashi H, Komiya S, Taga T (2006.8) bFGF endows dorsal telencephalic neural progenitors with ability to differentiate into oligodendrocytes but not GABAergic neurons. The 16th Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience (Banff, Canada).
28. Ono K, Ikeda K, Furusho M, Takebayashi H, Ikenaka K (2006.9) Neuronal and glial differentiation of Olig2-positive progenitors with a stage-specific manner in the mouse forebrain. Cold Spring Harbor Laboratory meeting; Axon guidance, Synaptogenesis, & Neural Plasticity 2006 (Cold Spring Harbor, USA).
29. Watanabe K, Takebayashi H, Ding L, Ikenaka K, Ono K (2006.9) Netrin-1 is required for formation of functional architecture of the spinal cord. Roles in DRG axon guidance and in ventral-ward migration of dorsal

interneurons. Cold Spring Harbor Laboratory meeting; Axon guidance, Synaptogenesis, & Neural Plasticity 2006 (Cold Spring Harbor, USA).

30. Ikenaka K, Torii T, Ishii A, Toda T, Takaki Y, Tsuji S, Hitoshi S (2006.9) A novel N-glycan structure containing β 1,3-galactose residue in the mouse cerebral cortex 第 28 回日本生物学的精神医学会，第 36 回日本神経精神薬理学会，第 49 回日本神経化学会大会合同年会（名古屋）
31. Tatsumi K, Takebayashi H, Manabe T, Ikenaka K, Wanaka A (2006.9) Olig2+ progenitors differentiate to astrocyte and involve in glia scar formation in the adult cortex. 第 28 回日本生物学的精神医学会, 第 36 回日本神経精神薬理学会，第 49 回日本神経化学会大会合同年会（名古屋）
32. Ikeda K, Ono K, Takebayashi H, Kuriyama S, Ikenaka K (2006.9) Lineage analysis of Olig2-expressing cell in the mouse caudal brainstem. 第 28 回日本生物学的精神医学会，第 36 回日本神経精神薬理学会，第 49 回日本神経化学会大会合同年会（名古屋）
33. Naruse M, Nakahira E Miyata T, Hitoshi S, Ikenaka K, Bansal R (2006.9) Induction of oligodendrocyte progenitors in dorsal forebrain by intraventricular injection of FGF-2. 第 28 回日本生物学的精神医学会, 第 36 回日本神経精神薬理学会，第 49 回日本神経化学会大会合同年会（名古屋）
34. Hitoshi S, Maruta N, Higashi M, Kato N, Ikenaka K (2006.9) Dynamics of neural stem cells in the adult mammalian brain under stress conditions. 第 28 回日本生物学的精神医学会，第 36 回日本神経精神薬理学会，第 49 回日本神経化学会大会合同年会（名古屋）
35. Higashi M, Ikenaka K, Hitoshi S (2006.9) Molecular mechanism of mood stabilizing drugs in the adult brain. 第 28 回日本生物学的精神医学会，第 36 回日本神経精神薬理学会，第 49 回日本神経化学会大会合同年会（名古屋）
36. Ikenaka K, Ma J, Tanaka KF (2006.9) Changes in the character of microglia coincide with the impaired remyelination by oligodendrocytes. Round table of the ESF Marie network on: “Myelin structure and its role in autoimmunity” (Bari, Italy).
37. Masahira N, Takebayashi H, Park KC, Yamada S, Nakabayashi H, Toyonaga S, Yawata T, Kaji T, Nakasato M, Nakai E, Chihara T, Ikenaka K, Shimizu K (2006.10) A lineage analysis of Olig2-expressing progenitors by the tamoxifen-inducible CreER$^{(TM)}$ recombinase. International Society for Neuroimmunology.（名古屋）
38. Yawata T, Park KC, Toyonaga S, Chihara T, Masahira N, Ikenaka K, Shimizu K (2006.10) Efficacy of suicide gene therapy using high-titer retrovirus vector for cancer stem cells derived from malignant glioma. International Society for Neuroimmunology.（名古屋）
39. Ikenaka K (2006.12) An improved method to determine N-linked sugar chain structure from pmol level of glycoproteins. The 2nd ISN Special Neurochemistry Conference on Neural Glycoproteins and Glycolipids (Antigua and Barbuda).
40. Ishii A, Ikenaka K, Pfeiffer S (2006.12) Glycomic analysis of myelin membrane subdomains. The 2nd ISN Special Neurochemistry Conference on Neural Glycoproteins and Glycolipids (Antigua and Barbuda).

《細胞内代謝研究部門》

1. Sakai H, Kawawaki J, Moriura Y, Mori H, Morihata H, Kuno M (2006.2) Proton currents through the plasmalemmal vacuolar-type H^+-ATPase in osteoclasts. The 50th Annual Meeting of Biophysical Society (Salt Lake City, USA).
2. Ando H, Kuno M, Shimizu H, Muramatsu I, Oiki S (2006.2) The streaming potential measured by a novel osmotic pulse method revealed variable K^+-water coupling ratios for the HERG potassium channel. The 50th Annual Meeting of Biophysical Society (Salt Lake City, USA).
3. Sokabe M (2006.3) Key Note Lecture: Cytoskeleton can work as a mechanosensor. The 10th Membr Res Forum.（京都）

4. Sokabe M (2006.3) Mechanotransduction in cells is conducted by supuramolecular complex. The TMS 2006 Annu Meeting (San Antonio, USA).
5. 酒井啓，川脇順子，森浦芳枝，森啓之，森畑宏一，久野みゆき (2006.3) 破骨細胞の細胞膜に発現する空胞型 H^+-ATPase 電流の特性と膜電位および pH 依存性。第 83 回日本生理学会大会（前橋）
6. Sokabe M (2006.4) Mechanosensing and gravisensing in cells. The 27th Annual International Gravitational Physiology Meeting.（大阪）
7. 曽我部正博 (2006.5) メカノバイオロジーと細胞機能。第 79 回日本内分泌学会学術総会（神戸）
8. 曽我部正博 (2006.6) キーノートレクチャー“内皮細胞におけるメカノトランスダクションの多様性”。第 29 回日本バイオレオロジー学会（福岡）
9. Sokabe M (2006.7) Facilitation of Synaptic Plasticity by Neurosteroid in Rat Hippocampal Slices as Studied by Optical Recordings. The 4th Inter Neurosci Sympo China (Kunming, China).
10. Sokabe M (2006.7-8) Two types of mechanosensors in endothelial cells. The 5th World Congress on Biomechanics (Munich, Germany).
11. 久野みゆき，森畑宏一，川脇順子，翁昌子，澤田誠，酒井啓 (2006.7) 乳酸アシドーシス環境におけるマイクログリアのプロトンチャネル活性化。第 29 回日本神経科学大会（京都）
12. Sokabe M (2006.9) Mechanosignaling during cell shape remodeling: role of cytoskeleton International Symposium on “Bionanosystems”.（松島）
13. 曽我部正博 (2006.9) 重力感知とメカノセンサー。宇宙生物科学会第 20 回大会，第 2 回若手シンポジウム（大阪）
14. 曽我部正博 (2006.9) メカノバイオロジーの基礎としての“細胞力覚”。2006 年度日本機械学会全国大会（熊本）
15. 毛利達磨 (2006.9) ウニ卵受精時の電気的変化，細胞内 Ca^{2+} 変化，精子侵入抑制。日本動物学会第 77 回大会（松江）
16. Sokabe M (2006.10) Role of cytoskeleton in cell mechanosensing. The 21st European Cytoskeleton Forum, Biopolis (Singapore).
17. Sokabe M (2006.11) Variety of cell mechano-sensing: emerging role of actin cytoskeleton. EABS & BSJ.（沖縄）

《機能協関研究部門》

1. Okada Y, Shimizu T, Numata T, Maeno E, Takahashi N (2006.2) Requisite roles of disordered cell volume regulation in apoptosis. Korea-Japan Basic Scientific Cooperation Program. Korea-Japan Joint Seminar: Molecular and Systemic Basis of Neurological Disorders.（岡崎）
2. Okada Y, Shimizu T, Inoue H, Sabirov R, Takahashi N, Dutta AK, Liu H (2006.3) Novel roles of anion channels in a physiology and pathophysiology. 第83回日本生理学会大会（前橋）
3. Shimizu T, Wehner F, Okada Y (2006.3) Inhibition of hypertonicity-induced cation channel sensitizes HeLa cells to shrinkage-induced apoptosis. 第 83 回日本生理学会大会（前橋）
4. Takahashi N, Subramanian M, Okada Y (2006.3) Signal mechanisms of regulatory volume increase (RVI) in HeLa cells and of RVI inhibition under apoptotic stimulation. 第 83 回日本生理学会大会（前橋）
5. Inoue H, Okada Y (2006.3) Volume-sensitive chloride channel involved in necrotic neuronal death by excitotoxicity. 第 83 回日本生理学会大会（前橋）
6. Numata T, Shimizu T, Okada Y (2006.3) Mechanical stress activates TRPM7 channels expressed in HEK293T cells. 第 83 回日本生理学会大会（前橋）
7. Lee EL, Shimizu T, Takahashi N, Okada Y (2006.3) Restoration of volume-sensitive chloride current in cisplatin-resistant human epidermoid cancer KB cells decreases their cisplatin resistance. 第 83 回日本生理学会大会（前橋）
8. Dutta AK, Okada Y, Korchev YE, Shevchuk A, Sabirov RZ (2006.3) Maxi-anion channels in rat cardiomyocyte sarcolemma are heterogeneously distributed. 第 83 回日

本生理学会大会（前橋）

9. Liu H, Sabirov RZ, Okada Y (2006.3) Hypoxia activates maxi-anion channels and thereby induces ATP release from astrocytes. 第 83 回日本生理学会大会（前橋）
10. Nukui M, Shimizu T, Okada Y (2006.3) Na^+ deprivation induces persistent cell shrinkage and apoptotic cell death. 第 83 回日本生理学会大会（前橋）
11. Toychiev A, Sabirov RZ, Okada Y (2006.3) Regulation of maxi-anion channel by calcium, magnesium and ATP. 第 83 回日本生理学会大会（前橋）
12. Sabirov RZ, Sheiko T, Liu H, Deng D, Okada Y, William C (2006.3) Gene deletion and silencing refutes the long held hypothesis that maxi-anion channel is a plasmalemmal VDAC. 第 83 回日本生理学会大会（前橋）
13. Wang H, Shimizu T, Okada Y (2006.3) Electrophysiological properties of acid-activated anion channels in HeLa cells. 第 83 回日本生理学会大会（前橋）
14. Okada Y, Maeno E, Shimizu T, Takahashi N (2006.6) Volume-sensitive anion channel involved in apoptosis induction. The 5th International Congress of Pathophysiology.（北京）
15. Wang J, Fu X, Hou X, Cui Q, Morishima S, Okada Y, Shimizu T (2006.6) Single channel properties of volume-sensitive Cl^- channel in ClC-3 deficient cardiomyocyte. The 5th International Congress of Pathophysiology.（北京）
16. 岡田泰伸 (2006.6) 細胞容積調節，細胞死誘導，細胞外シグナル放出のメカニズムにおけるアニオンチャネルの役割。第 41 回日本小児腎臓病学会（名古屋）
17. 岡田泰伸 (2006.9) 細胞生死を決定するアニオンチャネル。第 3 回バイオサイエンスの最先端シンポジウム（神奈川）
18. 井上　華，岡田泰伸 (2006.9) 脳スライス標本を用いた容積感受性クロライドチャネルの過興奮毒性神経細胞死への関与の検討。第 53 回中部日本生理学会（甲府）
19. Zamaraeva MV, Sabirov RZ, Manabe K, Okada Y (2006.9) Ca-dependent activation of glycolitic ATP production is a major contributor for the elevation of ATP level during the early stage of apoptosis. 第 53 回中部日本生理学会（甲府）
20. Uramoto H, Okada Y (2006.10) Protection of ischemic injury by activation of CFTR Cl^- channel in heart in vivo. The 6th Congress of the Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies.（ソウル）
21. Numata T, Shimizu T, Okada Y (2006.10) Mechano-stress sensitivity of TRPM7 channel. The 6th Congress of the Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies.（ソウル）

《感覚認知情報研究部門》

1. 山岸典子，Callan D E，郷田直一，Anderson S J，川人光男 (2006.1) 刺激提示前の注意による低次視覚野の変化と作業パフォーマンスの関係。日本視覚学会 2006 年冬季大会（東京）
2. 小松英彦，鯉田孝和 (2006.7) Effects of task demands on color processing in area TE of the monkey. 第 29 回日本神経科学大会（京都）
3. 伊藤南，小松英彦 (2006.7) Comparison of the angle representation in macaque visual areas V1 and V2. 第 29 回 日本神経科学大会（京都）
4. 安田正治，小松英彦 (2006.7) Relationship between color and shape selectivity in area TEO of the monkey. 第 29 回 日本神経科学大会（京都）
5. Goda N, Koida K, Komatsu H (2006.7) Color encoding in LGN and natural color statistics. The Fourth Asian Conference on Vision.（松江）
6. Yasuda M, Komatsu H (2006.7) Color selectivity and visual topography of neurons in area TEO of the monkey. The Fourth Asian Conference on Vision.（松江）
7. Ogawa T, Komatsu H (2006.7) Feature and context-dependent representation of visual saliency in the posterior parietal cortex of the monkey. The Fourth Asian Conference on Vision.（松江）

8. Ito M, Komatsu H (2006.7) Extraction of angles features embedded within contour stimuli in the macaque early visual system. The Fourth Asian Conference on Vision.（松江）
9. Komatsu H, Koida K (2006.7) Color representation and the task relevance in the visual cortex of the monkey. The Fourth Asian Conference on Vision.（松江）
10. Matsumora T, Koida K, Komatsu H (2006.7) Correlation between fine color similarity judgment and neural activity in the inferior temporal cortex of the monkey. The Fourth Asian Conference on Vision.（松江）
11. 小松英彦 (2006.9) Neural representation of color information in the cerebral cortex. 日本神経回路学会第 16 回全国大会（名古屋）
12. Shibata K, Yamagishi N, Goda N, Yoshioka T, Yamashita O, Sato M, Kawato M (2006.10) Feature attention modulates activity in feature specific visual areas before stimulus onset: an fMRI constrained MEG study. Society for Neuroscience 36th Annual Meeting (Atlanta, Georgia).
13. 伊藤南 (2006.10) 初期視覚系における物体の輪郭線抽出の神経メカニズム。第 18 回日本知能情報ファジイ学会 ファジイ・コンピューティング研究部会 ワークショップ，第 3 回脳と知覚研究会ワークショップ（岡崎）
14. 伊藤南 (2006.11) 私達の脳はどのようにして輪郭線の形状を識別するのか？―大脳皮質視覚領野の初期部分の寄与。第 21 回生体・生理工学シンポジウム（鹿児島）

《神経シグナル研究部門》

1. Yamagata Y (2006.3) The role of Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II in epilepsy. 第 79 回日本薬理学会年会（横浜）
2. Yamagata Y (2006.3) The role of Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) in neuronal activity revealed by inactivated CaMKIIα knock-in mouse. 第 83 回日本生理学会大会（前橋）
3. Yamagata Y, Sakagami H, Imoto K, Obata K, Yanagawa Y (2006.7) The role of Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II in neuronal functions revealed by inactivated CaMKIIα knock-in mouse. 第 29 回日本神経科学大会（京都）
4. Satake S, Song S-Y, Konishi S, Imoto K (2006.7) Neuronal glutamate transporter EAAT4 controls climbing fiber-mediated presynaptic inhibition of GABAergic transmission at cerebellar interneuron-Purkinje cell synapses. 第 29 回日本神経科学大会（京都）
5. Miyata M, Imoto K (2006.7) Kainate receptors differentially regulate release at two corticothalamis synapses. 第 29 回日本神経科学大会（京都）
6. Imoto K, Kodama T, Shigemoto R, Fukazawa Y, Mori Y (2006.7) Impaired transmission of parallel fiber-Purkinje cell synapses involves postsynaptic alterations in $Ca_V2.1$ mutant mice, rocker. 第 29 回日本神経科学大会（京都）
7. 佐竹伸一郎，井本敬二 (2006.9) ラット小脳異種シナプス抑制におけるニューロン型グルタミン酸輸送体 EAAT4 の役割。日本動物学会第 77 回大会（松江）
8. Yamagata Y, Sakagami H, Imoto K, Obata K, Takao K, Miyakawa T, Yanagawa Y (2006.9) The role of CaMKII in neuronal functions revealed by inactivated knock-in mouse. 第 28 回日本生物学的精神医学会・第 36 回日本神経精神薬理学会・第 49 回日本神経化学会大会合同大会（名古屋）
9. Miyata M (2006.10) Thalamic mGluR1-PLCbeta4 cascade in inflammatory pain. The 6th Congress of The Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies, Soul 2006 (6th FAOPS) (Seoul, Korea).
10. Yamagata Y, Hatanaka N, Sakagami H, Imoto K, Obata K, Takao K, Miyakawa T, Yanagawa Y (2006.10) The role of protein kinase activity of Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II α in brain functions. 2006 Molecular and Cellular Cognition Society Meeting in Atlanta (Atlanta, GA, USA).
11. Yamagata Y, Hatanaka N, Sakagami H, Imoto K, Obata K, Yanagawa Y (2006.10) The role of protein phosphorylation in brain functions revealed by

inactivated Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II α knock-in mouse. The 36th Annual Meeting, Society for Neuroscience (Atlanta, GA, USA).

12. Kodama T, Fukazawa Y, Shigemoto R, Mori Y, Imoto K (2006.10) A $Ca_V2.1$ calcium channel mutation rocker induces a postsynaptic alteration in parallel fiber-Purkinje cell synapses. The 36th Annual meeting of the Society for Neuroscience (Atlanta, GA, USA).

《感覚運動調節研究部門》

1. Miki K, Watanabe S, Honda Y, Nakamura M, Kakigi R (2006.12) Effects of face contour and features on occipitotemporal activity when viewing eye movement. 16th International Toki Conference advanced imaging and plasma diagnostics (Toki, Japan).
2. Nakata H, Kakigi R (2006.12) Somato-motor inhibitory processing in humans: a study with MEG and ERP. 16th International Toki Conference Advanced Imaging and Plasma Diagnostics (Toki, Japan).
3. Kida T, Wasaka T, Inui K, Akatsuka K, Nakata H, Kakigi R (2006.12) Centrifugal regulation of human cortical responses to a task-relevant somatosensory signal triggering voluntary movement: A magnetoencephalographic study. 16th International Toki Conference Advanced Imaging and Plasma Diagnostics (Toki, Japan).
4. Tanaka E, Noguchi Y, Kakigi R, Kaneoke Y (2006.12) The magnetoencephalographic neural activity related to the perception of apparent motion defined by various cues. 16th International Toki Conference Advanced Imaging and Plasma Diagnostics (Toki, Japan).
5. Akatsuka K, Nakata H, Kida T, Kakigi R (2006.12) Somatosensory mismatch responses using oddball paradigm; an MEG study. 16th International Toki Conference Advanced Imaging and Plasma Diagnostics (Toki, Japan).
6. Kaneoke Y, Urakawa T, Kakigi R (2006.10) Human visual motion process with separate speed and direction information: Evidence from a psychophysical and a magnetoencephalographic studies. Society for Neuroscience 36th Annual Meeting (Atlanta, USA).
7. Honda Y, Watanabe S, Nakamura M, Miki K, Kakigi R (2006.9) Interhemispheric differences on face perception. 17th International Society for Brain Electromagnetic Topography (ISBET2006) (Chieti, Italy).
8. Akatsuka K, Nakata H, Kakigi R (2006.9) Automatic detection of the somatosensory two-point discrimination and the effect of stimulus probability. 17th International Society for Brain Electromagnetic Topography (ISBET2006) (Chieti, Italy).
9. Kakigi R (2006.9) Painful brain. Keynote lecture.17th International Society for Brain Electromagnetic Topography (ISBET2006) (Chieti, Italy).
10. Akatsuka K, Wasaka T, Nakata H, Kida T, Kakigi R (2006.9) Automatic detection processes in two-point discrimination: an MEG study. The 28th International Congress of Clinical Neurophysiology (Edinburgh, UK).
11. Kakigi R (2006.9) Update on evoked potentials and fields. Breakfast session. The 28th International Congress of Clinical Neurophysiology (Edinburgh, UK).
12. Kakigi R (2006.9) New aspects on the function of spinal cord (spinothalamic tract) related to pain. Symposium “Pain syndrome” The 28th International Congress of Clinical Neurophysiology (Edinburgh, UK).
13. Miki K, Watanabe S, Honda Y, Nakamura M, Kakigi R (2006.9) Effects of face configuration and features on occipitotemporal activity when viewing eye movement. The 28th International Congress of Clinical Neurophysiology (Edinburgh, UK).
14. Kaneoke Y (2006.8) Physiological evidence that motion direction is processed by the neural mechanism distinct from that of speed. The 15th International Conference on Biomagnetism (BIOMAG2006) (Vancouver, Canada).
15. Fujioka T, Ross B, Kakigi R, Pantev C, Trainor L (2006.8) Maturation of auditory cortex to musical sound in children. The 15th International Conference on Biomagnetism (BIOMAG2006) (Vancouver, Canada).
16. Miki K, Watanabe S, Honda Y, Nakamura M, Kakigi R

(2006.8) Effects of face configuration and features on occipitotemporal activity when viewing eye movement. The 15th International Conference on Biomagnetism (BIOMAG2006) (Vancouver, Canada).

17. Tanaka E, Noguchi Y, Kakigi R, Kaneoke Y (2006.8) The magnetoencephalographic neural activity related to the perception of second-order apparent motion. The 15th International Conference on Biomagnetism (BIOMAG2006) (Vancouver, Canada).
18. Kakigi R (2006.8) Somatosensory systems and Pain Investigation of pain perception following C-fiber stimulation in humans. Symposium 10. The 15th International Conference on Biomagnetism (BIOMAG2006) (Vancouver, Canada).
19. Kida T, Wasaka T, Akatsuka K, Inui K, Nakata H, Kakigi R (2006.8) Centrifugal regulation of human cortical responses to a task-relevant somatosensory signal triggering voluntary movement: A magnetoencephalographic study. The 15th International Conference on Biomagnetism (BIOMAG2006) (Vancouver, Canada).
20. 橋本章子, 乾幸二, 渡邉昌子, 柿木隆介 (2006.11-12) 視覚誘発皮質活動に与えるプライミング効果 第 36 回日本臨床神経生理学会（横浜）
21. 中田大貴, 柿木隆介 (2006.11-12) ポスターセッション発表 体性感覚誘発 Go/Nogo 電位における刺激間間隔・呈示確率の効果　第 36 回日本臨床神経生理学会（横浜）
22. 浦川智和，金桶吉起，田中絵実，柿木隆介 (2006.11-12) 大きさが視覚性運動速度知覚に与える影響：脳磁図反応による検討 第 36 回日本臨床神経生理学会（横浜）
23. 赤塚康介，中田大貴，木田哲夫，柿木隆介 (2006.11-12) 体性感覚 MMN の存在の証拠 第 36 回日本臨床神経生理学会（横浜）
24. 柿木隆介 (2006.11-12) 教育講演 痛覚情報処理の臨床神経生理学 第 36 回日本臨床神経生理学会（横浜）
25. 三木研作，渡邉昌子，竹島康行，照屋美加，本多結城子, 柿木隆介 (2006.11-12) ランダムドットブリンキングを用いた顔認知過程に関連する誘発脳波 第 36 回日本臨床神経生理学会（横浜）
26. 木田哲夫，乾幸二，中田大貴，赤塚康介，柿木隆介 (2006.11-12) 空間的注意における視覚－体性感覚モダリティリンクに関わる脳磁場反応 第 36 回日本臨床神経生理学会（横浜）
27. 柿木隆介 (2006.10.13)「脳科学と教育」タイプ I 領域シンポジウム顔認知のメカニズム：その機能発達と学習効果の解明（東京）
28. 三木研作，渡邉昌子，本多結城子，中村舞子，柿木隆介 (2006.9-10)「目の動き」を見たときの後頭側頭部の活動に対する顔輪郭とパーツ情報の影響 第 11 回日本顔学会（東京）
29. 柿木隆介 (2006.9)「脳波と脳磁図を用いた顔認知機構の解明」 第 30 回日本神経心理学会総会（名古屋）
30. 金桶吉起 (2006.7) シンポジウム（高次視覚機能の病態・機構・再生）運動視の神経機構－非侵愁的研究によるアプローチ 第 29 回日本神経科学学会シンポジウム（京都）
31. 乾幸二，辻健史，柿木隆介 (2006.7) 触覚刺激による痛覚抑制は皮質レベルで生じる 第 28 回日本疼痛学会（神戸）
32. 辻健史，乾幸二，柿木隆介 (2006.7) ヒト脊髄における侵害刺激情報は複数の経路を上行する 第 28 回日本疼痛学会（神戸）
33. 野口泰基，柿木隆介 (2006.6) 時間表象の形成に関する脳内メカニズム 第 21 回日本生体磁気学会大会（東京）
34. 三木研作，渡邉昌子，本多結城子，中村舞子，柿木隆介 (2006.6)『目の動き』を見たときの後頭側頭部の活動に対する顔輪郭とパーツ情報の影響 第 21 回日本生体磁気学会大会（東京）

《生体システム研究部門》

1. 橘吉寿，岩室宏一，高田昌彦，南部篤 (2006.6) パーキンソン病モデルサルにおける異常な淡蒼球ニューロン活動。第 21 回日本大脳基底核研究会（葉山）
2. 南部篤 (2006.7) 定位脳手術の神経生理学的基盤。第 29 回日本神経科学大会（京都）
3. 知見聡美，田風，高田昌彦，長谷川一子，南部篤

(2006.7) ジストニアモデルマウスにおける小脳プルキンエ細胞の活動。第 29 回日本神経科学大会（京都）

4. 畑中伸彦，高良沙幸，橘吉寿，高田昌彦，南部篤 (2006.7) 運動課題遂行中のサルにおける線条体ニューロン活動への GABA 作動性調節。第 29 回日本神経科学大会（京都）
5. 宮地重弘，澤田香織，岡戸晴生，南部篤，高田昌彦 (2006.7) 黒質ドーパミンニューロンにおけるカルビンディン強制発現によりパーキンソン病が抑制される。第 29 回日本神経科学大会（京都）
6. 橘吉寿，岩室宏一，高田昌彦，南部篤 (2006.7) パーキンソン病にみられる異常な淡蒼球ニューロン活動を改善する新たな可能性。第 29 回日本神経科学大会（京都）
7. 高良沙幸，畑中伸彦，橘吉寿，高田昌彦，南部篤 (2006.7) 運動野から入力を受けるサル線条体ニューロンの運動課題遂行中の活動様式。第 29 回日本神経科学大会（京都）
8. Takada M, Miyachi S, Sawada K, Inoue K, Okado H, Nambu A (2006.10) Recruitment of calbindin into dopaminergic nigrostriatal neurons protects against the onset of Parkinsonian motor signs. 36th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Atlanta, USA).
9. Yumoto N, Lu X, Miyachi S, Nambu A, Fukai T, Takada M (2006.10) Neural activity dependent on prediction and detection of elapsed time in macaque area 9. 36th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Atlanta, USA).
10. Lu X, Miyachi S, Ito Y, Nambu A, Kitazawa S, Takada M (2006.10) Somatotopic organization of inferior olive as evidenced by multisynaptic inputs to primary motor cortex. 36th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Atlanta, USA).

《脳形態解析研究部門》

1. 篠原良章 (2006.3) Quantitative analysis of NR2A and NR2B subunits in hippocampal pyramidal synapses by SDS-FRL. 日米情報交換セミナー「シナプス可塑性の分子機構」 (Hawaii, USA).
2. 重本隆一 (2006.3) Memory traces for short- and long-term cerebellar motor learning. 日米情報交換セミナー「シナプス可塑性の分子機構」(Hawaii, USA).
3. 籾山俊彦 (2006.3) ラット前脳基底核アセチルコリン性ニューロンへのシナプス伝達を制御するカルシウムチャネルサブタイプの生後発達変化。第 79 回日本薬理学会年会（横浜）
4. 重本隆一 (2006.3) NMDA 受容体の輸送と局在。第 83 回日本生理学会大会（前橋）
5. 籾山俊彦 (2006.3) 大脳基底核神経回路再生過程におけるシナプス伝達機構の解析。第 83 回日本生理学会大会（前橋）
6. 松井広 (2006.3) ニューロン－グリア細胞間の情報伝達が引き起こす細胞外空間の動的変化。第 83 回日本生理学会大会（前橋）
7. Shigemoto R, Masugi-Tokita M, Wang W, Shutoh F, Lorincz A, Fukazawa Y, Molnar E, Nagao S, Nakadate K (2006.7) Memory traces in short- and long-term cerebellar motor learning. The 5th Forum of European Neuroscience (Wien, Austria).
8. Momiyama T (2006.7) Dopamine D1-like receptors selectively block P/Q-type calcium channels to inhibit excitatory transmission onto cholinergic neurons in the rat basal forebrain. The 5th Forum of European Neuroscience (Wien, Austria).
9. Lorincz A, Wang W, Molnar E, Sprengel R, Shigemoto R (2006.7) Impaired cerebellar motor learning and associated ampar reduction in glur1 deficient mice. The 5th Forum of European Neuroscience (Wien, Austria).
10. 籾山俊彦 (2006.7) 前脳基底核アセチルコリン性ニューロンにおける D1 形受容体を介する P/Q 型カルシウムチャネル遮断によるグルタミン酸遊離抑制。第 29 回日本神経科学大会（京都）
11. 深澤有吾，板倉 誠，高橋正身，斉藤善人，井ノ口馨，Elek Molnar，重本隆一 (2006.7) 凍結割断レプリカ免疫標識法を用いた海馬神経細胞膜上イオン

チャネル型グルタミン酸受容体分布の高解像度解析。第 29 回日本神経科学大会（京都）

12. 松井広 (2006.7) ニューロン－グリア細胞間の情報伝達が引き起こす細胞外空間の動的変化。第 29 回日本神経科学大会（京都）
13. 春日井雄，深澤有吾，ロバァツ デビット，ショモジィ ピィタァ，シグハァト ワァナァ，重本隆一 (2006.7) SDS-FRL 法による海馬錐体細胞上 GABA-A 受容体サブユニットの定量的局在解析。第 29 回日本神経科学大会（京都）
14. 足澤悦子，深澤有吾，Elek Molnar，渡辺雅彦，重本隆一 (2006.7) AMPA および NMDA 受容体は網膜および皮質－外側膝状体シナプス上において異なる局在様式を示す。第 29 回日本神経科学大会（京都）
15. Shigemoto R (2006.9) A Novel Approach to high resolution Quatitative Localization of Neurotransmitter Receptors in the Brain: SDS-digested Freeze-fracture Replica Labeling. 第 16 回国際顕微鏡学会議（札幌）
16. Shigemoto R (2006.10) Memory Traces in Short- and Long-Term Cerebellar Motor Learning. Neuroscience 2006 (Atlanta, USA).
17. Kasugai Y, Fukazawa Y, Roberts JDB, Somogyi P, Sieghart W, Shigemoto R (2006.10) Localization of $GABA_A$ receptor subunits on rat hippocampal pyramidal cells by freeze-fracture replica immunolabeling. Neuroscience 2006 (Atlanta, USA).
18. Tarusawa E, Fukazawa Y, Molnar E, Watanabe M, Shigemoto R (2006.10) Differential localization of AMPA and NMDA receptors in retino- and cortico-geniculate synapses as revealed by SDS-digested freeze-fracture replica immunogold labeling. Neuroscience 2006 (Atlanta, USA).
19. Wang W, Lorincz A, Shigemoto R (2006.10) Disassociation of long-term adaptation from short-term adaptation in mouse horizontal optokinetic response (HOKR). Neuroscience 2006 (Atlanta, USA).
20. Fukazawa Y (2006.10) Distributions of ionotropic glutamate receptors in the plasma membrane of hippocampal neurons as revealed by freeze-fracture replica immunogold labeling. 16th Neuropharmacology Conference (Atlanta, USA).
21. Momiyama T (2006.10) D1-like receptors selectively block P/Q-type calcium channels to reduce glutamate release onto cholin ergic neurons in the rat basal forebrain. 第 6 回アジア・オセアニア生理学会議 (Seoul, Korea).

《大脳神経回路論研究部門》

1. Otsuka T, Morishima M, Kawaguchi Y (2006.7) Target dependent diversity of intrinsic membrane properties in rat frontal layer 5 pyramidal cells. 第 29 回日本神経学会科学大会（京都）
2. Kubota Y (2006.7) GABAergic cells provide synaptic input to a subpopulation of spines in neocortical pyramidal neurons. 第 29 回日本神経学会科学大会（京都）
3. Gulledge A, Park S, Stuart G, Kawaguchi Y (2006.7) Regional, cell type, and layer-specific differences in cholinergic modulation of neocortical neurons. 第 29 回日本神経学会科学大会（京都）
4. Kubota Y, Karube F, Kawaguchi Y (2006.7) Dendritic dimensions of cortical GABAergic nonpyramidal cells. 第 35 回生理研国際シンポジウム（岡崎）
5. Kawaguchi Y (2006.7) Layer V pyramidal cell diversity and their synaptic connections. 第 35 回生理研国際シンポジウム（岡崎）
6. Kubota Y, Hatada S, Kondo S, Karube F, Kawaguchi Y (2006.10) Cortical GABAergic neurons preferentially innervate spines contacted by thalamocortical afferents. Society for Neuroscience 36th Annual Meeting (Atlanta, USA).
7. Gulledge A, Kawaguchi Y (2006.10) Heterogeneous actions of acetylcholine in neocortical interneurons. Society for Neuroscience 36th Annual Meeting (Atlanta, USA).
8. Puig M, Ushimaru M, Kubota Y, Watakabe A,

Yamamori T, Yanagawa Y, Kawaguchi Y (2006.10) Corticostriatal, cortico-raphe, and fast-spiking cell activity in the rat frontal cortex during cortical oscillations in vivo: Modulation by serotonin. Society for Neuroscience 36th Annual Meeting (Atlanta, USA).

《心理生理学研究部門》

1. Sadato N (2006.3) Learning effect in cross-modal integration. Seiriken/Sokendai International Symposium (The 34th NIPS Conference): Cross-modal integration and plasticity (Okazaki, Japan).
2. 荒牧　勇，定藤規弘，本田　学 (2006.3) 両手鏡像運動時における右一次運動野の活動低下。第 8 回日本ヒト脳機能マッピング学会（岡崎）
3. 飯高哲也，野川純平，神作憲司，定藤規弘 (2006.3) 異なった人種の表情認知にかかわる脳内機構－事象関連型 fMRI を用いた研究－。第 8 回日本ヒト脳機能マッピング学会（岡崎）
4. 内山祐司，豊田浩士，本田　学，吉田晴世，河内山隆紀，江部和俊，定藤規弘 (2006.3) 左下前頭回における文法処理機能の分離。第 8 回日本ヒト脳機能マッピング学会（岡崎）
5. 大塩立華，田中悟志，定藤規弘，本田　学 (2006.3) 空間情報の脳内操作における運動前野と頭頂葉の機能分担。第 8 回日本ヒト脳機能マッピング学会（岡崎）
6. 大塩立華 (2006.3) I do dance, I do science. 第 83 回日本生理学会大会（前橋）
7. 神作憲司 (2006.3) リハビリ装置：脳科学と医療の視点から。医療機器分科会（名古屋）
8. 齋藤大輔，豊田浩士，岡田知久，本田　学，米倉義晴，定藤規弘 (2006.3) 熟練者における触覚弁別の神経基盤：磁気共鳴画像法 (fMRI) を用いた研究。第 8 回日本ヒト脳機能マッピング学会（岡崎）
9. 定藤規弘 (2006.3) What Neuroimaging Can Do for Developmental Psychology.「脳科学と社会」研究開発領域 第 2 回情報統計ワークショップ（東京）
10. 牧　陽子，荒牧　勇，神作憲司，定藤規弘 (2006.3) 両手強調運動時の左半球優位性：fMRI 実験。第 8 回日本ヒト脳機能マッピング学会（岡崎）
11. 村瀬未花，齋藤大輔，河内山隆紀，田邊宏樹，田中悟志，荒牧　勇，本田　学，定藤規弘 (2006.3) 読唇における異種感覚統合への前頭眼窩皮質の関与：機能的 MRI 研究。第 8 回日本ヒト脳機能マッピング学会（岡崎）
12. Sadato N (2006.3-4) Learning effect in cross-modal integration. Cooperative Joint Conference on Neuroscience (Gifu, Japan).
13. Aramaki Y and Sadato N (2006.6) Role of the rostral putamen in the initiation of bimanual finger movements. 12th Annual Meeting of the Organization for Human Brain Mapping (Florence, Italy).
14. Kansaku K, Umeyama S, Nishimori Y, Yamane S, Sadato N, Kitazawa S (2006.6) Independent component analysis applied to event-related fMRI signals: a selection method for physiologically relevant components. The 12th Annual Meeting of the Human Brain Mapping (Florence, Italy).
15. Ritz Oshio, Satoshi Tanaka, Takashi Hanakawa, Norihiro Sadato, Manabu Honda (2006.6) Functional specificity of premotor an d parietal cortex for spatial mental-operation. 12th Annual Meeting of the Organization for Human Brain Mapping (Florence, Italy).
16. Maki Y, Aramaki Y, Sadato N (2006.6) The left hemispheric specialization for bimanual coordination: an fMRI study. 12th Annual Meeting of the Organization for Human Brain Mapping (Florence, Italy).
17. 定藤規弘 (2006.6) 視覚と認知～「見えども見えず」その脳内機構と機能的 MRI。東京臨床脳画像解析研究会（東京）
18. Sadato N, Hiroshi Toyoda (2006.7) Simultaneous measurement of hemoglobin concentration changes and BOLD signal response during visual stimulation by NIRS and fMRI.　第 29 回日本神経科学大会（京都）
19. 春野雅彦，神作憲司，荒牧　勇，川人光男 (2006.7) Different neural correlates of stimulus-action-dependent

and stimulus-dependent reward predictions revealed by fMRI. 第 29 回日本神経科学大会（京都）

20. Iidaka T, Nogawa J, Kansaku K, Sadato N (2006.10) Neural correlates involved in processing the same race faces -an event-related functional magnetic resonance imaging study-. An event-related fMRI study. The 36th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Atlanta, USA).
21. Kansaku K, Nakajima Y, Sadato N (2006.10) Neural correlates of counting: the differences between count up and count down. The 36th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Atlanta, USA).
22. Hayashi MJ, Saito DN, Asai T, Fujibayashi Y, Yonekura Y, Sadato N (2006.10) Frequency-dependent suppression of right M1 by the right hand movement: a functional MRI study. The 36th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Atlanta, USA).
23. 定藤規弘 (2006.10) 視覚と認知～見えども見えず。DDW-Japan 2006 第 72 回日本消化器内視鏡学会総会（札幌）
24. 定藤規弘 (2006.10) 感覚脱失に伴う脳可塑性と異種感覚統合：脳機能画像法によるアプローチ。ヒューマンフォーラム 2006　Honda R&D（和光）
25. Sadato N (2006.11) Learning effect in cross-modal integration. Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (Okinawa, Japan).
26. 定藤規弘，豊田浩士 (2006.11) 化石ヒト頭骨からの 3 次元仮想脳復元。 第 60 回日本人類学会大会（高知）
27. 定藤規弘 (2006.11) 脳可塑性と異種感覚統合　脳機能画像法によるアプローチ 日立中研・基礎研合同研究会（国分寺市）
28. Sadato N (2006.12) Cross-modal integration and plasticity revealed by functional magnetic resonance imaging. 16th International Toki Conference Imaging and Plasma Diagnostics (Toki, Japan).
29. Sadato N (2006.12) Learning effect in the cross-modal integration. International Symposium on Advanced Neuroimaging (Taipei, Taiwan).
30. Sadato N (2006.12) Neural substrates of the spontaneous phase transition during bimanual coordination. International Symposium on Advanced Neuroimaging (Taipei, Taiwan).

《認知行動発達機構研究部門》

1. Nishimura Y, Onoe H, Perfiliev S, Isa T (2006.3) Longitudinal study of the involvement of several motor cortical regions in functional recovery after the Lesion of the Corticospinal Tract at Cervical Spinal Cord in Monkeys. 第 83 回日本生理学会大会（前橋）
2. Isa T (2006.7) What we can learn from the functional recovery after brain injury. 第 29 回日本神経科学大会（京都）
3. 西村幸男，尾上浩隆，Sergei Perfiliev，塚田秀夫，伊佐正 (2006.7) 皮質脊髄路損傷後の手の機能回復おける運動関連領野の貢献。第 29 回日本神経科学大会（京都）
4. 吉田正俊，伊佐 正 (2006.7) ニホンザル盲視モデルの残存視覚は正常視野の閾値近辺での視覚と同じか？ 第 29 回日本神経科学大会（京都）
5. 武井智彦，関和彦 (2006.7) 把握動作おける霊長類脊髄ニューロンの役割。第 29 回日本神経科学大会（京都）
6. 岡田研一，井上由香，伊佐正，小林康 (2006.7) サル脚橋被蓋核ニューロンにおける視覚運動関連活動の状況依存性の解析。第 29 回日本神経科学大会（京都）
7. 小林康，岡田研一，伊佐正，井上由香 (2006.7) 視覚誘導性サッカード課題中の報酬，報酬予測誤差に関係したサル脚橋被蓋核ニューロンの活動の解析。第 29 回日本神経科学大会（京都）
8. 大石高生，肥後範行，村田弓，山下晶子，西村幸男，松田圭司，林基治，関和彦，伊佐正 (2006.7) サル頚髄側索破壊後の運動関連領野と脊髄の GAP-43 発現の増加。第 29 回日本神経科学大会（京都）

9. Phongophanphanee P, Kaneda K, Isa T (2006.7) Analysis of spread of activity in the local circuit of superior colliculus by using multi-channel field potential recording system. 第 29 回日本神経科学大会（京都）
10. Okada K, Inoue Y, Isa T, Kobayashi Y (2006.10) Influences of reward prediction on neuronal activity of the pedunculopontine tegmental nucleus during visually guided saccade tasks in monkeys. The 36th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Atlanta, USA).
11. Perfiliev SN, Wessberg J, Johnels B, Isa T, Steg G (2006.10) Reflexive initiation of goal-directed limb movement in cats, monkeys, and humans. The 36th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Atlanta, USA).
12. Phongphanphanee P, Kaneda K, Isa T (2006.10) Analysis of spread of activity in the local circuit of superior colliculus. The 36th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Atlanta, USA).
13. Lee P, Sooksawate T, Yanagawa Y, Isa K, Isa T, Hall WC (2006.10) A reciprocal inhibitory pathway from the intermediate to the superficial layer of the superior colliculus. The 36th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Atlanta, USA).
14. Yoshida M, Isa T (2006.10) Residual visuomotor processing in the monkeys with unilateral lesion in the primary visual cortex: Comparison with normal, near-threshold vision. The 36th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Atlanta, USA).
15. Seki K, Takei T (2006.10) Primary afferent depolarization evoked by natural stimulation of cutaneous afferent in monkey. The 36th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Atlanta, USA).
16. Takei T, Seki K (2006.10) Involvement of the primate spinal neurons in the control of precision grip. The 36th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Atlanta, USA).
17. Sakatani T, Isa T (2006.12) Possible roles of GABA in stabilizing the saccade control system in the downstream of the superior colliculus. The Cold Spring Harbor Laboratory Workshop [The GABAergic System] (Cold Spring Harbor, USA).

《生体恒常機能発達機構研究部門》

1. Nishimaki T, Jang IS, Nabekura J (2006.3) 外側上オリーブ核に入力する抑制性シナプス前終末における代謝型グルタミン酸受容体の発達変化。第 83 回日本生理学会大会（前橋）
2. Nabekura J (2006.7) Transmitter switching in developing auditory neurons. 第 29 回日本神経科学会（京都）
3. Nishimaki T, Jang IS, Nabekura J (2006.7) Developmental Decrease of Presynaptic $GABA_B$ Receptor Function in Rat LSO Neurons. 第 29 回日本神経科学会（京都）
4. Nabekura J (2006.10) Developmental switching of neuronal transmitter and new approach for neuronal circuits study. The 6th Korea-Japan Joint symposium of cardiovascular, smooth muscle and neuroscience (Seoul, Korea).
5. Nishimaki T, Jang IS, Ohno K, Nabekura J (2006.10) Physiological Role of $GABA_B$ Receptor at Inhibitory synapses in Developing Rat LSO neurons. Society for Neuroscience 36th Annual Meeting (Atlanta, USA).
6. Wake H, Watanabe M, Nabekura J (2006.10) Early Changes In KCC2 Phosphorylation In Response to Neuronal Stress Results In Functional Downregulation. Society for Neuroscience 36th Annual Meeting (Atlanta, USA).

《生殖・内分泌系発達機構研究部門》

1. 箕越靖彦 (2006.2) AMP キナーゼによる代謝調節作用。第 40 回糖尿病学の進歩（金沢）
2. 箕越靖彦 (2006.2) 肥満と糖尿病の科学―内分泌器官としての脂肪細胞の新たな機能。第 86 回国研セミナー（岡崎）
3. 箕越靖彦 (2006.3) アディポサイトカインとメタボリックシンドローム。第 24 回八幡浜・大洲―消化器・糖尿病・内分泌疾患研究会（八幡浜）
4. 鈴木敦, 岡本士毅, 志内哲也, 李順姫, 斉藤久美子, 箕越靖彦 (2006.3) AMP キナーゼを活性化するレプチンの細胞内シグナル伝達機構 : 骨格筋細胞 C2C12 を用いた解析。第 2 回メタボリズムのゲノムネットワーク研究会（大磯）
5. Minokoshi Y (2006.3) Regulatory role of the hypothalamus in body energy metabolism -Involvement of leptin-AMP kinase system-. Symposium “Regulation of energy metabolism and food intake by the hypothalamus, autonomic nerves and endocrine system”.（大阪大学蛋白質研究所，大阪）
6. Minokoshi Y, Suzuki A, Okamoto S, Shiuchi T, Lee S, Saito K (2006.3) Regulatory role of leptin-AMP kinase system in body energy metabolism. 第 83 回日本生理学会大会（前橋）
7. Suzuki A, Okamoto S, Shiuchi T, Lee S, Saito K, Minokoshi Y (2006.3) Leptin activates α2AMPK in C2C12 muscle cells through ATM and PI-3 kinase/ Nur77/CaMKKβ-dependent pathways. 第 83 回日本生理学会大会（前橋）
8. Minokoshi Y (2006.4) Signaling pathway for leptin-induced fatty acid oxidation in C2C12 muscle cells. 2006 Seoul Symposium on Obesity and Diabetes (Seoul, Korea).
9. 箕越靖彦 (2006.5) 視床下部における食欲・代謝制御機構－AMP キナーゼの調節作用を中心に－。第 79 回日本内分泌学会学術総会（神戸）
10. 箕越靖彦 (2006.6) 生体エネルギー代謝に及ぼすレプチン-AMP キナーゼ・システムの調節作用とその異常。第 19 回糖尿病フォーラム・イン・広島（広島）
11. 箕越靖彦 (2006.6) 生体エネルギー代謝に及ぼす AMP キナーゼの調節作用。第 1 回 Kyoto Expert Meeting（京都）
12. 箕越靖彦 (2006.7) レプチン・シグナルの多様性がもたらす動物の体重維持機構。自然科学における階層と全体 第 3 回シンポジウム（箱根）
13. 箕越靖彦 (2006.7) 生体エネルギー代謝に及ぼす AMP キナーゼの調節作用とそのシグナル伝達機構。第 3 回 Neuroscience Frontier Research Conference（東京）
14. 箕越靖彦 (2006.8) 生活習慣病の分子機構解明に挑む II。人間生命科学プロジェクト全体会議（葉山）
15. Shiuchi T, Okamoto S, Inoue T, Suzuki A, Lee S, Saito K, Imoto K, Minokoshi Y (2006.9) Orexin/hypocretins increase glucose uptake in skeletal muscle trough the ventromedial hypothalamus-sympathetic nervous system. The 16th International Symposium on Regulatory Peptide.（箱根）
16. Suzuki A, Okamoto S, Lee S, Saito K, Shiuchi T, Minokoshi Y (2006.9) Signaling pathway for leptin-induced fatty acid oxidation in C2C12 muscle cells. The 4th International AMPK meeting (Snowmass, USA).
17. Minokoshi Y, Okamoto S, Shiuchi T, Lee S, Saito K, Suzuki A (2006.9) Intracellular signaling pathway for leptin-induced fatty acid oxidation in C2C12 muscle cells. 10th International Congress on Obesity (Sydney, Australia).
18. Minokoshi Y (2006.9) Regulatory role of AMP-activated protein kinase in energy homeostasis. Satellite meeting of 10th International Congress on Obesity (Hamilton Island, Australia).
19. Minokoshi Y (2006.9) AMPK and hypothalamic function. 42nd Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes (Copenhagen, Denmark).
20. 岡本士毅, 志内哲也, 鈴木敦, 箕越靖彦 (2006.1) 視床下部 AMP キナーゼによる摂食行動の調節作用－レンチウイルスを用いた解析。第 27 回日本肥満学会（神戸）
21. Minokoshi Y (2006.11) Central and peripheral effects of

leptin on AMP-activated protein kinase. 197th Meeting of the Society for Endocrinology (London, UK).

22. 箕越靖彦 (2006.11) 生体エネルギー代謝に及ぼす AMP キナーゼの調節作用。第 32 回日本応用酵素協会研究発表会（大阪）
23. 箕越靖彦 (2006.12) 脂肪細胞における AMPK ファミリーの生理的並びに病態生理的意義。平成 18 年度「アディポミクス，脂肪細胞の機能世界と破綻病態の解明」班会議（大阪）
24. 箕越靖彦 (2006.12) AMPK-alpha2/AMPK -beta1/AMPK-gamma1 複合体関連研究。タンパク 3000 プロジェクト網羅的解析プログラム・班会議 （横浜）
25. 箕越靖彦 (2006.12) レプチン・シグナルの多様性がもたらす動物の体重維持機構。自然科学における階層と全体（生物系における情報統合と階層連結）研究発表会（岡崎）

《形態情報解析室》

1. 西田倫希，陣内浩司，有井達夫，鷹岡昭夫，吉村亮一，遠藤泰久 (2006.7) PC12 細胞における神経栄養因子受容体の局在：膜タンパクの三次元構造解析。第 29 回日本神経科学大会（京都）
2. 片桐展子，片桐康雄，重松康秀，有井達夫，和田昌昭 (2006.9) 電顕トモグラフィーによる感杆型光受容細胞内の photic vesicle の三次元観察。日本動物学会第 77 回大会（松江）
3. 小澤一史，楊　春英，澤井信彦，松本恵介，有井達夫 (2006.10) コルチコステロイドの変動に伴う海馬領域グリア細胞の形態変化と機能について。第 33 回日本神経内分泌学会（横浜）
4. 小曽戸陽一，樋田一徳，Dubreuil V，清蔭恵美，有井達夫，Huttner W (2006.12) 哺乳類神経前駆細胞の細胞分裂機構：basal process について。日本分子生物学会 2006 フォーラム（名古屋）
5. Kosodo Y, Toida K, Dubreuil V, Kiyokage E, Arii T, Huttner W (2006.12) Cytokinesis of neuroepithelial stem cells involves their basal process. American Society for Cell Biology 46th meeting (San Diego, USA).

《生体情報解析室》

1. 根本知己，河西春郎 (2006.3) 2 光子顕微鏡を用いたカルシウム依存性開口放出現象の可視化解析技術。特定領域研究「生体膜トランスポートソームの分子構築と生理機能」公開シンポジウム（東京）
2. 和氣弘明，根本知己，鍋倉淳一 (2006.7) Two photon Excitation Methods for Living Brain. 文部科学省特定領域「グリアーニューロン回路網による情報処理機構の解明」ワークショップ（熱海）
3. 根本知己，和氣弘明，鍋倉淳一 (2006.7) 2 光子顕微鏡を用いた細胞機能画像解析法―その原理と大脳皮質 in vivo イメージングへの応用。文部科学省特定領域「グリアーニューロン回路網による情報処理機構の解明」ワークショップ（熱海）
4. 根本知己 (2006.7) 2 光子顕微鏡による逐次開口放出と大脳新皮質の in vivo イメージング。 日本顕微鏡学会関西支部平成 18 年度特別講演会（京都）
5. 根本知己 (2006.7) 2 光子顕微鏡の原理と応用− カルシウム依存性細胞機能の可視化解析と大脳皮質 in vivo イメージングに向けて。日本神経科学大会ランチョンセミナー（京都）
6. Nemoto T, Kishimoto T, Liu TT, and Kasai H (2006.9) Visualization of Ca^{2+} dependent exocytosis by two-photon microscopy. International Symposium on Bio-nanosystems (Miyagi. Japan).
7. 根本知己 (2006.9) 2 光子顕微鏡による細胞の形態と機能の in vivo 可視化技術。第 12 回生化学会近畿支部テクニカルセミナー（大阪）
8. 根本知己 (2006.9) 2 光子顕微鏡による細胞微小形態と小胞動態の in vivo 可視化解析法。 特定領域研究「生体膜トランスポートソームの分子機構と生理機能」平成 18 年度第 1 回班会議（宮城）
9. Nemoto T (2006.10) Exocytosis and fluid secretion in

exocrine glands studied by two-photon microscopy. 3rd International Symposium on Salivary Glands in honor of Niels Stensen (Okazaki, Japan).

10. Nemoto T (2006.11) Invited speaker: Two-photon functional imaging of neurons and secretory gland cells. EABS & BSJ 2006 (Okinawa, Japan).
11. 根本知己 (2006.11) 2 光子顕微鏡をもちいた細胞機能の可視化解析。レーザー学会第 2 回マイクロ固体フォトニクスシンポジウム（横浜）
12. Nemoto T (2006.12) Invited speaker: In vivo functional imaging of neurons and secretory gland cells by near infrared ultra-short pulse laser light. Advanced Imaging and Plasma Diagnostics, 6th International Toki Conference (Toki, Japan).
13. 根本知己 (2006.12) 2 光子顕微鏡による細胞動態と開口放出の in vivo イメージング。分子生物学フォーラム 2006（名古屋）
14. 根本知己 (2006.12) 日本大学松戸歯学部セミナー（松戸）
15. 和氣弘明，根本知己，鍋倉淳一 (2006.12) Two photon Excitation Methods for Living Brain. 文部科学省特定領域「セルセンサーの分子連関とモーダルシフト」班会議（福岡）

《遺伝子改変動物作製室》

1. 林 文立，長瀬 祐樹，土屋 隆司，木村 建，平林 真澄，保地 眞一 (2006.9) 母体ラットへのブスルファン投与によって誘起される新生仔精細管内の変化。第 99 回日本繁殖生物学会（名古屋）
2. 雨宮 和絵，加藤 めぐみ，保地 眞一，平林 真澄 (2006.10) トランスジェニックラットの作製効率における前核注入法と ICSI-Tg 法の比較。第 40 回日本実験動物技術者協会総会（京都）
3. 平林 真澄 (2006.10) ラットの顕微授精技術。ナショナルバイオリソースプロジェクト− ラット共催シンポジウム「ラット生殖工学技術の進歩」。第 40 回日本実験動物技術者協会総会（京都）
4. 真下 知士，徳田 智子，柳原 克彦，平林 真澄，中西 聡，庫本 高志，芹川 忠夫 (2006.11) ENU ミュータジェネシスによる新規ラットリソース資源。第 23 回日本疾患モデル学会大会（伊香保）

《時系列生命現象研究領域》

1. Murata Y, Okamura Y (2006.2) Voltage sensor domain drives modification of phosphatase activity of the voltage sensor containing phosphatase, Ci-VSP. The 50th Biophysical Society Annual Meeting (Salt Lake City, USA).
2. 村田喜理，岡村康司 (2006.3) 電位センサードメインに存在する負電荷残基の，膜電位感受性酵素 Ci-VSP の膜電位感受における役割，第 83 回日本生理学会大会（前橋）
3. Hossain I, Sasaki M & Okamura Y (2006.3) Role of cytoplasmic domain in voltage sensor movement of Z-VSP. 第 83 回日本生理学会大会（前橋）
4. Higashijima S ¸2006.4) Development of spinal interneurons inzebrafish The 1st Italy-Japan Meeting on "Vertebrate Organogenesis" (Ischia, Italy).
5. 木村有希子，佐藤千恵，東島眞一 (2006.6) ゼブラフィッシュ脊髄運動系神経回路形成機構の解析。第 39 回日本発生生物学会年会（広島）
6. Okamura Y (2006.7) Voltage sensor domain proteins. Breaking News, Gordon Research Conference on Ion Channel (Tilton, USA).
7. Okamura Y, Kurokawa T, Takagi M & Sasaki M (2006.7) Molecular identification of voltage-gated proton channel. Gordon Research Conference on Ion Channel (Tilton, USA).
8. Okamura Y (2006.8) Mechanisms of voltage sensor domain proteins. Gordon Research Conference on NOX family NADPX oxidases (Les Diablerets, Switzerland).

9. 西野敦雄，岡村康司 (2006.9) カタユウレイボヤ幼生の筋肉帯におけるアセチルコリン受容体の構成と発現。第 77 回日本動物学会（松江）
10. 木村有希子，佐藤千恵，東島眞一 (2006.9) ゼブラフィッシュ脊髄介在神経の運動系神経回路における機能解析。第 77 回日本動物学会（松江）
11. Kimura Y, Satou C, Higashijima S (2006.10) *alx*, a zebrafish homolog of *Chx10*, marks ipsilateral descending excitatory interneurons that participate in the regulation of spinal locomotor circuits. The Wenner-Gren Foundations International Symposium, "Networks in Motion" (Stockholm, Sweden).
12. Okamura Y, Hossain Md I, Okochi Y, Kurokawa T, Gamano T, Masuyama W, Homma K, Saito N, Higashijima S, Iwasaki H (2006.11) Voltage-regulated phosphatases from sea urchin to mammals: conserved mechanism of voltage-mediated signaling in deutrostome reproduction? International symposium on Cell Signaling in Gamete Activation from Basic Research to ART.（東京）
13. McCormack TJ, Okamura Y (2006.11) Cloning of a voltage-gated proton channel from an Echinoderm and a Cnidarian. International symposium on Cell Signaling in Gamete Activation from Basic Research to ART.（東京）
14. 岡村康司 (2006.12) 膜電位シグナルを伝達する新たな膜タンパク質。日本分子生物学フォーラム（名古屋）
15. 佐藤千恵，木村有希子，小谷素子，東島眞一 (2006.12) ゼブラフィッシュ交叉型脊髄神経の解析。日本分子生物学会 2006 フォーラム（名古屋）

《戦略的方法論研究領域》

1. 永山國昭 (2006.2) 位相差電子顕微鏡の過去と未来。岡崎統合バイオサイエンスセンター創設 5 周年記念シンポジウム（岡崎）
2. Nagayama K (2006.2) *in vivo* Subcellular Structures Revealed with Phase Contrast Transmission Electron Microscopy. Korea-Japan Joint Seminar "Molecular & Sytemic Basis of Neurological Disorders".（岡崎）
3. 橋本貞充，村上政隆 (2006.2) ラット顎下腺腺房細胞のタイト結合と細胞骨格の構造変化（タイト，水輸送)。生理研研究会「唾液腺研究からの生理機能研究，その戦略的展開」（岡崎）
4. 村上政隆，Murdiastuti K, 細井和雄, Hill AE (2006.2) AQP5 は傍輸送経路調節のシグナルを受容するのか？ 生理研研究会「唾液腺研究からの生理機能研究，その戦略的展開」（岡崎）
5. 瀬藤光利 (2006.2) TTLL 分子ファミリーの同定とその機能。第一回骨免疫ワークショップ（東京）
6. 瀬藤光利 (2006.2) 顕微質量分析によるナノバイオマシン制御解析と創薬。日本薬学会主催「第 7 回創薬ビジョンシンポジウム」および「第 2 回ナノバイオ国際シンポジウム」（東京）
7. 平修，瀬藤光利 (2006.2) ナノバイオマシンを用いた遺伝子診断ツールの開発。－ナノバイオ産業化シンポジウム－産総研・滋賀県工業総合センター・長浜バイオ大学合同シンポ（滋賀）
8. 永山國昭 (2006.3) 話題提供「再現」"位相差電子顕微鏡で切り拓く生命科学の地平－解剖学の復権－"。生命シンポジウム「生命科学の新しい地平を拓く」（東京）
9. 永山國昭 (2006.3) 科学は見えるものから見えないものを観る時代へ。NINS シンポジウム「見えてきた！宇宙の謎。生命の謎。脳の謎」（東京）
10. 永山國昭 (2006.3) 位相差電子顕微鏡で見えてきた生き物のナノ世界。NINS シンポジウム「見えてきた！宇宙の謎。生命の謎。脳の謎」（東京）
11. Murakami M, Murdiastuti K, Hosoi K, Shachar-Hill B, Hill AE (2006.3) Effects of osmolarity change on fluid secretion by the perfused submandibular gland in normal and low-AQP5 rats. 第 83 回日本生理学会（前橋）
12. Setou M (2006.3) Research and Development of Mass Microscope. 3rd international conference of Atomic Level Characterizations between China and Japan (Amoy, China).
13. Murakami M, Segawa A, Hill AE, Shachar- Hill B, Hashimoto S, Hosoi K, Murdiastuti K (2006.4) Function

and morphology of the paracellular route for salivary secretion. Focussed Meeting of the Physiological Society "Frontiers in Epithelial Transport" (Manchester, UK).

14. 瀬藤光利 (2006.4) 顕微質量分析装置で生命をはかる。「生命をはかる」研究会 第 17 回研究会（東京）
15. Nagayama K (2006.5) Enhancement of TEM Contrast with Phase Plates for Soft Materials. Spring Meeting of Korean Society of Electron Microscopy (Seoul, Korea).
16. 瀬藤光利 (2006.5) 顕微質量分析装置の開発－質量顕微鏡に向けて－。JST-SENTAN シンポジウム「質量分析技術－先端計測機器への展開－」（東京）
17. 瀬藤光利 (2006.5) 顕微質量分析における試料前処理の最適化。第 54 回質量分析総合討論会（大阪）
18. 瀬藤光利 (2006.5) イメージングマスペクトロメトリー/顕微質量分析装置。情報計算化学生物学会（CBI 学会）（東京）
19. 永山國昭 (2006.6) 未来の人材を育む「科学技術・理科大好きプラン」第二部「科学者としての選択」。New Education EXPO 2006 in Tokyo（東京）
20. 永山國昭 (2006.6) 電子顕微鏡によるタンパク質構造解析。第 28 回構造生物応用研究会（東京）
21. Murakami M (2006.6) History of Physiology in Japan. JSPS サマースクール（葉山）
22. Ohashi M (2006.6) Membrane traffic of Shh signaling proteins influenced by molecules implicated in the functions of intracellular lipid droplets. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress（京都）
23. 瀬藤光利 (2006.7) 翻訳後修飾による細胞内輸送の制御：質量顕微鏡を用いた解析。財団法人野口研究所（東京）
24. 新間秀一，瀬藤光利 (2006.7) 透明導電性シートを用いたイメージング質量分析用生体標本サンプルの作成法。第 33 回 BMS コンファレンス（滋賀）
25. 新間秀一，瀬藤光利 (2006.7) 質量分析イメージング。顕微鏡学会関西支部総会（京都）
26. 瀬藤光利 (2006.7) 顕微質量分析法。学振 151 委員会ナノバイオフュージョン分科会（東京）
27. 瀬藤光利 (2006.7) 顕微質量分析計の開発と応用。島津製作所 MALDI ユーザーズミーティング（東京）
28. 瀬藤光利 (2006.7) シナプス小胞輸送を制御する新しいユビキチンリガーゼについて。3rd, Neuroscience Frontier Research Conference (NEFRE)（東京）
29. 永山國昭 (2006.8) 複素観測と位相差電子顕微鏡。第 31 回原子衝突研究協会研究会（岡崎）
30. 永山國昭 (2006.8) 電顕による生細胞観察 I。位相差電子顕微鏡の原理と開発。平成 18 年度文部科学省ナノバイオサマースクール（富士）
31. 永山國昭 (2006.8) 電顕による生細胞観察 II。位相差電子顕微鏡の応用。平成 18 年文部科学省ナノバイオサマースクール（富士）
32. 永山國昭 (2006.9) 位相差電子顕微鏡法の開発と生物学への応用研究。日本顕微鏡学会第 51 回瀬藤賞受賞講演会（札幌）
33. Nagayama K (2006.9) B-26:Round Table: Multi-scale Microscopy Imaging and Information Techniques 60-10a "In vivo Subcelluler Stmetures Revealed with Phase-Plate-Equipped Electron Microscopes". The 16th International Microscopy Congress.（札幌）
34. Nagayama K (2006.9) B-7, "Advanced in Phase Microscopy in Biology and Medicine" P7-a1 Aharonov-Bohm Phase Plate in Transmission Electron Microscopy. The 16th International Microscopy Congress（札幌）
35. Nagayama K (2006.9) Functional Electron Microscopic Imaging (f-EMI) Based on Phase Contrast Cryo-TEM. IUPAB-UNESCO Joint Program (Ottawa, Canada).
36. 永山國昭 (2006.9) Functional Electron Microscopic Imaging Development with a Combination of Phase TEM and EELS. 第 1 回 NIBB バイオイメージングフォーラム（岡崎）
37. 村上政隆 (2006.9) 唾液腺潅流法による唾液腺水分分泌の研究。日本歯科基礎医学会シンポジウム（鶴見）
38. Setou M (2006.9) Development of Mass Microscope. The 16th International Microscopy Congress.（札幌）
39. 新間秀一，瀬藤光利 (2006.9) AXIMA-QIT を用いたイメージング質量分析－生物・医学への応用－。第一回質量分析夏の学校（大阪）
40. 瀬藤光利 (2006.9) 顕微質量分析計の開発と応用。第 31 回日本医用マススペクトル学会年会（名古屋）
41. 永山國昭 (2006.10) 色に見る科学と芸術の出会い。岡崎商工会議所情報文化部会講演会（岡崎）

42. Riva A, Kumakura K, Murakami M (2006.10) The work of Fabricius ab Aquapendente (Harvey's Teacher) in the light of the recently restored Tabulae Pictae: its influence in the development of modern anatomy in Europe and in Japan. 第 3 回ステンセン記念国際唾液腺シンポジウム（岡崎）
43. Murakami M, Shinozuka N, Kishimoto N (2006.10) Clinical examination using saliva: Influence of fluid secretion on the concentration of glucose in saliva: How to overcome the problem for *in vivo* application. 第 3 回ステンセン記念国際唾液腺シンポジウム（岡崎）
44. Hayashi T, Murakami M, Nishikawa H, Era S (2006.10) Oxidative modification of serum albumin via paracellular route of rat submandibular gland. 第 3 回ステンセン記念国際唾液腺シンポジウム（岡崎）
45. Shinozuka N, Fujiwara S, Kishimoto N, Murakami M, Sakurai T, Sugiya H, Furuyama S (2006.10) Clinical examination using saliva: an *in vivo* application to human adults. 第 3 回ステンセン記念国際唾液腺シンポジウム（岡崎）
46. Wei M, Murakami M (2006.10) Investigation on the influences of Chinese herbs on salivary secretion in rat submandibular gland. 第 3 回ステンセン記念国際唾液腺シンポジウム（岡崎）
47. Hashimoto S, Murakami M (2006.10) Control of paracellular transport and its morphological evidence in perfused rat submandibular gland. 第 3 回ステンセン記念国際唾液腺シンポジウム（岡崎）
48. Hayasaka T, Sugiura Y, Shimma S, Hoshikawa Y, Noda T, Setou M (2006.10) MALDI based mass imaging revealed abnormal distribation of phospholipids in cancer. 第 3 回ステンセン記念国際唾液腺シンポジウム（岡崎）
49. 瀬藤光利 (2006.10) イメージング質量分析による生体組織分析。AIST 計測フロンティア公開セミナー（つくば）
50. 瀬藤光利 (2006.10) 質量顕微鏡によるヒト脳の解析に向けて：ブレインバンク拡張への大きな期待。第一回ブレインバンクシンポジウム（福島）
51. 瀬藤光利 (2006.10) 糖脂質のマスイメージング。第 4 回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム（東京）
52. 瀬藤光利 (2006.10) 生体の質量顕微鏡観察のための表面処理法。第 27 回表面科学セミナー「生体系機能表面の基礎から応用まで」（東京）
53. 新間秀一，瀬藤光利 (2006.10) 質量分析を用いた生体分子可視化法－医学的応用を中心に－。総合研究大学院大学生命科学研究科合同セミナー（静岡）
54. 永山國昭 (2006.11) 顕微鏡で見えてきた生き物のナノ世界。第 44 回日本生物物理学会年会（第 5 回東アジア生物物理学シンポジウムとの合同会議）市民講演会（沖縄）
55. Nagayama K (2006.11) In vivo Molecular Imaging with Phase-Contrast Cryo-TEM (How to directly visualize functions in the cell with TEM?). 第 44 回日本生物物理学会年会（第 5 回東アジア生物物理学シンポジウムとの合同会議）（沖縄）
56. Setou M, Shimma S (2006.11) Imaging Science for Biophysics. 第 44 回日本生物物理学会年会（第 5 回東アジア生物物理学シンポジウムとの合同会議）（沖縄）
57. 瀬藤光利 (2006.11) 質量顕微鏡の開発状況。理研 BSI セミナー（埼玉）
58. 瀬藤光利 (2006.11) 質量顕微鏡の開発と応用。マイクロビームアナリシス第 141 委員会第 126 回榊奨励賞受賞講演（大阪）
59. 村上政隆 (2006.12) 摘出血管灌流唾液腺の研究成果と展望。第 51 回日本唾液腺学会（東京）
60. 瀬藤光利 (2006.12) 脂質蓄積ミオパチー生検筋の質量分析顕微鏡による解析。厚生労働省精神・神経疾患研究委託所 H18 年度清水班班会議（東京）
61. 瀬藤光利 (2006.12) 質量顕微鏡を用いたマルチディメンジョナルメタボロミクス。理研・植物科学センター（横浜）
62. Yao I, Takagi H, Ageta H, Kahyo T, Hatanaka K, Inokuchi K, Setou M (2006.12) Neural F-box Protein Scrapper Regulates Synaptic Vesicle Release. 46th Annual Meeting The American Society for Cell Biology (San Diego, USA).

《生命環境研究領域》

1. 富 永 真 琴 (2006.2) TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion. The Minerva Gentner Symposia on TRP channels and Ca^{2+} signaling (Eilat, Islael).
2. 富永真琴 (2006.3) カプサイシン受容体 TRPV1 の構造・機能と消化管における痛覚過敏。第 79 回日本薬理学会年会（横浜）
3. 富永真琴 (2006.3) 温度感受性 TRP チャネルの活性制御機構。第 83 回日本生理学会大会（前橋）
4. 柴崎貢志，鈴木誠，水野敦子，富永真琴 (2006.3) 体温調節が海馬神経活動に与える影響:TRPV4 による膜電位の制御。第 83 回日本生理学会大会（前橋）
5. 小田-望月紀子，楠野智幸，花田経久，富永真琴，富永知子，鈴木誠，山田久夫，山田廣成 (2006.3) 輻射熱に対する体温調節における TRPV4 の関与。第 83 回日本生理学会大会（前橋）
6. 冨樫和也，富永真琴 (2006.3) TRPM2 によるインスリン分泌機構。第 83 回日本生理学会大会（前橋）
7. 東智広，沼崎満子，富永知子，黒田俊一，富永真琴 (2006.3) PDZ-LIM タンパクによる TRPV4 活性の調節機構。第 83 回日本生理学会大会（前橋）
8. Tominaga T, Sokabe T, Shimanuki E, Tominaga M (2006.6) TRPV4 channel is important for epidermal barrier function in vivo. The 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology.（京都）
9. Tominaga M, Togashi K, Hara Y, Higashi T, Mori Y, Tominaga T (2006.6) TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion. The 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology.（京都）
10. Tominaga M (2006.7) Sensitization of TRPV1 through G-protein-coupled metabotropic receptors. The 15th World Congress of Pharmacology (Beijing, China).
11. Tominaga M (2006.7) Ca^{2+} influx through TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion. 2006 FASEB Summer Research Conferences: Calcium and Cell Function (Colorado, USA).
12. Sokabe T, Mizuno A, Suzuki M, Tominaga M, Fukumi-Tominaga T (2006.7) Crucial role of TRPV4 in epidermal barrier function. 2006 FASEB Summer Research Conferences: Calcium and Cell Function (Colorado, USA).
13. 富永真琴 (2006.7) 痛み刺激受容，温度受容に関わる TRP チャネル。日本耳鼻咽喉科学会 第 54 中部地方部会連合会（四日市）
14. 柴崎貢志，鈴木誠，水野敦子，富永真琴 (2006.7) TRPV4 による海馬神経活動，スパイン動態の制御。第 29 回日本神経科学大会（京都）
15. 小田-望月紀子，楠野智幸，花田経久，富永真琴，富永知子，鈴木誠，山田久夫，山田廣成 (2006.7) 輻射熱に対する体温調節における TRPV1 および V4 の関与。第 29 回日本神経科学大会（京都）
16. 富永真琴 (2006.7) 温度感受性 TRP チャネルを介した温度受容のメカニズム。第 29 回日本神経科学大会（京都）
17. 富永真琴 (2006.8) 温度受容の分子メカニズム。日本臨床体温研究会 第 21 回学術集会（札幌）
18. 柴崎貢志，鈴木誠，水野敦子，富永真琴 (2006.9) 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。第 53 回中部日本生理学会（甲府）
19. Mandadi S，福見-富永知子，柴崎貢志，曽我部隆彰，鈴木誠，水野敦子，富永真琴 (2006.9) 表皮に発現する温度感受性 TRP チャネルから感覚神経への温度情報の伝達機構。第 53 回中部日本生理学会（甲府）
20. 富永真琴 (2006.12) 温度感覚受容体。日本分子生物学会 2006 フォーラム（名古屋）
21. Fukumi-Tominaga T, Sokabe T, Yonemura S, Suzuki M, Mizuno A, Tominaga M (2006.12) Involvement of TRPV4-mediated intracellular Ca^{2+} increase in cell-cell adhesion of keratinocytes and barrier functio of skin. 日本分子生物学会 2006 フォーラム（名古屋）
22. 松浦敦子，柴崎貢志，富永真琴，福見-富永知子 (2006.12) Rho GTPases の下流蛋白質 DIP/WISH の神経突起伸展における役割。日本分子生物学会 2006 フォーラム（名古屋）
23. 曽我部隆彰，マンダディ スラバン，福見-富永知子，柴崎貢志，鈴木誠，水野敦子，富永真琴 (2006.12) 表

皮に発現する温度感受性 TRP チャネルから感覚神経への温度情報の伝達機構。日本分子生物学会 2006 フォーラム（名古屋）

《動物実験センター》

1. 木村 透，佐治俊幸，廣江　猛，窪田美津子，小池崇子 (2006.5.12) ニホンザルの皮膚真皮メラノサイトーシス。第 53 回日本実験動物学会（神戸）
2. 木村 透，佐治俊幸，廣江　猛，小池崇子，窪田美津子 (2006.9.22) ニホンザルの口腔に生じたノーマ (noma) の病態および治療成績。第 142 回日本獣医学会（山口）
3. 佐治俊幸，廣江　猛，小池崇子，窪田美津子，木村透，夏目克彦 (2006.10.28) Hydropac^{TM} 給水システムの評価試験。第 40 回日本実験動物技術者協会（京都）
4. 小池崇子，松永知子，佐治俊幸，廣江　猛，窪田美津子，木村 透 (2006.10.27) ニホンザルにおけるメデトミジン－ミダゾラムの不動化。第 40 回日本実験動物技術者協会（京都）

《計算科学研究センター》

1. Kenji Kuroda, Hidehiko Kodama, Masanori Kataoka, Yoshihiro Hayakawa (2006.11.20) A strategy for selective N-acylation of purine pyrimido [4,5-d] pyrimidine - 2,4,5,7 - (1H,3H,6H,8H)- tetraone as a nucleobase, which universally binds to natural nucleosides 第 33 回核酸化学シンポジウム（大阪）

【一般共同研究報告】

一般共同研究報告

〔 目　　次 〕

１．G 蛋白質共役応答の調節に関する分子生物学的研究（斉藤修ほか）..... 126
２．イオンチャネル・受容体の動的構造機能連関（柳（石原）圭子ほか）..... 126
３．神経細胞の移動および機能維持に対する細胞外シグナル分子の解析（馬場広子ほか）..... 127
４．悪性グリオーマ特異的レトロウイルスベクターの開発と遺伝子治療の臨床応用に関する基礎的検討
（清水惠司ほか）..... 127
５．神経系発生分化過程での糖鎖動態の解析と医療への応用（辻　崇一ほか）..... 128
６．mGluR1 レスキューマウスの電気生理学的解析（饗場　篤ほか）..... 129
７．大脳基底核を巡る線維連絡の研究（高田昌彦ほか）..... 129
８．サル歩行モデルを用いた二足歩行運動の制御機序
（稲瀬　正彦ほか）..... 129
９．脳の左右差に関する統合的研究―体軸形成に異常を示す変異マウスを用いたアプローチ
（伊 藤　功）..... 130
10．線条体投射神経終末の分布領域および分子局在の解析（横井峰人ほか）..... 131
11．運動学習記憶に関連するシナプス微細形態の検索（永雄総一ほか）..... 131
12．ドーパミン受容体欠損マウスを利用した黒質網様部ニューロンの自発発火活動の解析（山田勝也ほか）..... 132
13．遺伝子改変動物を利用した大脳皮質抑制性ニューロンにおける神経活動の解明（柳川右千夫ほか）..... 133
14．皮質抑制性細胞における神経伝達物質放出の調節機構（吉村　由美子ほか）..... 133
15．齧歯類および霊長類における大脳皮質錐体細胞への抑制性および領域外からの入力の 3 次元的解析
（一戸　紀孝ほか）..... 134
16．マカクザルの中枢神経系の損傷からの運動機能回復に関する組織学的研究（大石高生ほか）..... 135
17．大脳シナプスの in vivo2 光子画像解析（河西春郎ほか）..... 135
18．GABA シグナリングにおける新規分子 PRIP の役割解明研究（兼松隆ほか）..... 136
19．発達期におけるてんかん波発生機構の解明（夏目季代久ほか）..... 136
20．視床下部 NPY ニューロンにおける AMP キナーゼのシグナル伝達と摂食調節における役割
（矢田　俊彦ほか）..... 137
21．随意運動発現を司る神経機構の研究（美馬達哉ほか）..... 137
22．クジラ体外成熟卵子への精子注入後の体外発生能（福井 豊ほか）..... 138
23．精子幹細胞を用いたノックアウトラット作成（篠原隆司ほか）..... 138
24．ニホンザルの真皮メラノサイトーシスを用いた母斑治療モデルの確立（遠藤隆志ほか）..... 139
25．伴侶動物における機能性腫瘍の検索および腫瘍細胞の系統保存（丸尾幸嗣ほか）..... 139
26．DNA およびクロマチン高次構造の電子顕微鏡による解析（加藤幹男ほか）..... 140
27．位相差電子顕微鏡の医学・生物学的応用（臼田信光ほか）..... 141
28．自律神経系中枢の MRI による研究（瀬尾芳輝ほか）..... 141
29．唾液腺分泌終末における内因性蛋白分泌と外因性蛋白分泌の sorting 機構（杉谷博士ほか）..... 142
30．発生現象における膜電位シグナル伝達の分子機構とその役割の解明（岡本治正ほか）..... 143
31．エンハンサートラップ法によるゼブラフィッシュの神経発生および神経機能の解析（武田洋幸ほか）..... 143
32．DIP/WISH の血小板凝集における役割（小田　淳ほか）..... 144
33．脳組織培養系による神経ステロイドの機能形態学的解析（樋田一徳ほか）..... 144
34．ラット精原細胞の長期培養、ならびに分化誘導後の顕微授精（保地 眞一ほか）..... 145
35．エネルギー代謝調節における Dmbx-1 の役割の解明（三木　隆司ほか）..... 145
36．多チャンネル筋電図のオンライン解析システムの構築（松村　道一ほか）..... 146

1. G 蛋白質共役応答の調節に関する分子生物学的研究

斉藤修，田中久喜（長浜バイオサイエンス大学，バイオサイエンス学部）
久保義弘（生理学研究所）

RGS タンパクは，Gαの GAP 能をもつ G 蛋白質共役受容体系の調節因子である。そのうち，両親媒性の N 端のみを特徴とするプロトタイプ的な RGS が，B/R4 ファミリーである。RGS タンパクは，これまでその生化学的性質から RGS ドメインで G 蛋白質に結合して G 蛋白質選択的に作用するとされてきたが，最近の研究から，この B/R4RGS タンパクは，何らかの機構で特定の受容体系を識別・選択して，その下流の G 蛋白質を制御するファミリーであることが分かってきた。我々が研究を進めている B/R4 メンバーの小脳特異的な RGS8 の Gq 系の調節では，RGS8 が N 端部の MPRR 配列をコアにムスカリン M1 受容体に直接結合することが受容体選択性の一つの機構であることを昨年明らかにした。さらに海外のグループも同様の報告を行い，一般的な B/R4 の作用機序であると考えられつつある。しかし，直接結合出来ない受容体系も B/R4 は選択して調節する。即ち，直接結合以外に，受容体を間接的に識別して調節するシステムがあると考えられる。そこで，本年度は，RGS8 結合蛋白質群を探索して，さらに同定因子がどのようにして RGS8 の制御選択性等に寄与しているのか明らかにする事を目的に研究を行った。

小脳のライブラリーに対して RGS8 をバイトに Two hybrid スクリーニングを行って結合蛋白質を探索した結果，20 個の陽性クローンが単離された。各クローンの配列決定を行った結果，受容体結合能を持つ足場タンパク spinophilin (SPL)が見出された。そこで，この SPL が実際に RGS8 に結合能を持つかどうか，SPL-GST 融合蛋白質を調製し組み換え RGS8 蛋白質と反応させ，プルダウン実験を行った。すると，SPL には明らかな RGS8 結合能があることが判明し，さらに RGS8 の各欠失蛋白質との結合解析から RGS8 上の SPL 結合部位が N 端の MPRR 配列であることが明らかになった。即ち，RGS8 上の受容体結合部と受容体をリクルートする SPL の結合部位が全く同一であることが判明したのである。そこで次に，実際に RGS8 に対して SPL と M1 受容体が競合して結合するのかどうか，3 者のプルダウン解析さらに BRET 解析で検討した。すると，SPL 存在下で M1 結合が解除されてくることが明らかになった。SPL に幾つかの受容体の結合能が知られていることから考察すると，SPL 結合によって RGS8 の作業効率，さらに制御する受容体系が変化する可能性が十分考えられる。今後は，これらの結合性の解析と同時に，生理学的解析によって RGS8 の各ムスカリン受容体系への調節選択性や作用効率が SPL 発現でどう変化するか明らかにしていく。また，同時に RGS8 が微小管モーターKif1a に，さらに低分子量 G 蛋白質活性調節因子 RGL3 にも結合する事が明らかになり，これらの因子との相互作用が G 蛋白質共役系調節に如何に関わっているのかも今後明らかにしていく。

2. イオンチャネル・受容体の動的構造機能連関

柳（石原）圭子，鄢定紅（イエンディンホン）（佐賀大学医学部）
久保義弘（生理学研究所）

本共同研究では昨年度，強い内向き整流性カリウムチャネルを形成する Kir2 サブファミリーのサブユニット Kir2.1(IRK1) と G 蛋白制御内向き整流性カリウムチャネルを形成する Kir3 サブファミリーのサブユニット Kir3.4 (GIRK4) が異所性発現系においてヘテロ多量体としてイオンチャネルを形成することを，免疫共沈降実験や機能欠損 (dominant negative) 型変異体を用いた電気生理学的実験によって見出した。本年度は CFP あるいは YFP を結合させた 2 種類のサブユニットを HEK 細胞に共発現させ，共焦点顕微鏡を用いて細胞内局在の観察を行い，Kir2 サブファミリーに属するサブユニットと Kir3 サブファミリーに属するサブユニットのヘテロ多量体チャネ

ル形成について検討を行った。その結果，Kir2-Kir3 サブファミリー間では Kir2.1 と Kir3.1 および Kir2.1 と Kir3.4 の組み合わせがヘテロチャネルを形成し得ること，また Kir2 サブファミリー内では Kir2.1 と細胞外 pH 感受性を示す Kir2.3 の組み合わせは Kir2.1 と Kir2.2 の組み合わせに比べてヘテロチャネルを形成しにくいことが示された。これらの結果は各種細胞に存在する内向き整流カリウムチャネル機能の多様性を解明する手掛かりとなると考えられる。

3. 神経細胞の移動および機能維持に対する細胞外シグナル分子の解析

馬場広子，山口宜秀，林明子，鈴木彩佳，星登美子（東京薬科大学薬学部）
中平英子，長谷川明子（国立精神神経センター神経研究所）
村上志津子（順天堂大学医学部）
清水健史（熊本大学発生医学研究センター）

神経細胞の分化，移動および興奮性の獲得・維持に関わる細胞内外の分子およびその作用機構の解明を目的として研究を進め，本年度は下記のような結果を得た。

髄鞘の主要糖脂質であるスルファチドを欠損したマウスでは，パラノードにおける髄鞘・軸索間結合が欠損する。本年度は中枢神経系の絞輪部に突起を伸ばすアストロサイトの変化を解析した結果，加齢と共にランビエ絞輪軸索上のイオンチャネルの局在が大きく変化するのに一致して，脊髄白質のアストロサイトが活性化していくことがわかった。また，免疫染色結果から，活性化アストロサイト間あるいはこれらと髄鞘間の Gap 結合の変化が明らかになった(Suzuki et al. J Neurosci Res in press)。絞輪アストロサイトは，細胞外基質の分泌や Gap 結合を介した K^+バッファリングなどによって軸索興奮性を維持すると考えられ, これに関与する分子を解析中である。また，同マウス末梢神経系の解析結果から，スルファチドが欠損した有髄神経では，絞輪軸索内部のミトコンドリアに異常を来すことが明らかになった (Hoshi et al. Glia, 2007)。この結果から，髄鞘のスルファチドは髄鞘・軸索間結合を介して軸索の輸送あるいはエネルギー要求性に関与することが示された。今後はこれらの分子機構を明らかにしていく予定である。

ニワトリ胚では，脳内に進入した GnRH ニューロンは終脳と間脳の境界領域である第三脳室前壁の背側部近傍で腹側方向へと移動方向を変える。この領域に軸索ガイダンス分子であるネトリンを異所性発現させると，GnRH ニューロンはより背側へと移動し腹側方向への移動が抑制される。ガイド構造である嗅神経分枝も同時に背側に伸長しており，GnRH ニューロンの移動異常は 2 次的効果である可能性が考えられた。しかしながら，7.5 日胚の前脳背内側部を切り出し，ネトリン遺伝子導入細胞塊とコラーゲンゲルによる共培養を行った結果，細胞塊に面した培地に移動した GnRH ニューロン数の割合は対照群に比べると有意に高く，GnRH ニューロンの移動にネトリン分子が直接関与することが示された。前脳腹側底部に発現するネトリン分子は GnRH ニューロンの腹側方向への移動に重要な役割を果たしていると考えられる (Murakami and Ono. Neurosci Res, 2006)。

4. 悪性グリオーマ特異的レトロウイルスベクターの開発と遺伝子治療の臨床応用に関する基礎的検討

清水惠司，朴啓彰，中林博道，豊永晋一，八幡俊男，政平訓貴，中居永一（高知大学医学部）
栗山茂樹，出口章広（香川大学医学部），中根恭司（関西医科大学），中村秀次（兵庫医科大学）

高知大学医学部脳神経外科学教室では，悪性グリオーマ患者に対するレトロウイルスベクター(MBP/pIP250+)

を用いた遺伝子治療の臨床応用の一環として，ヒトに近い霊長類（コモン・マーモセット）を用いた安全試験を行っている。このレトロウイルスベクター接種後の脳の変性や損傷の有無，および他臓器の形態変化について非侵襲的に調べ，この治療用ベクターの安全性を確認することを目的として MRI での検査を行っている。

高知大学動物実験施設において 12 ヶ月前にレトロウイルスベクター (MBP/pIP250+) を脳内に投与した。このベクター投与 1 ヶ月後に採血を行い，RT-PCR にてウイルスベクターが血液中に発現していないことを確かめた。このコモン・マーモセットを平成 19 年 1 月 18 日高知大学動物実験施設より自然化学研究機構生理学研究所の動物実験施設に搬送した。翌 1 月 19 日，このコモン・マーモセットにケタミン(30mg/kg), キシラジン(10mg/kg)を筋肉内投与して麻酔した後，MRI 施設に移し MRI の撮像を行った。撮影途中コモン・マーモセットが覚醒し始めたためケタミン(15mg/kg)，キシラジン(5mg/kg)を筋肉内に追加投与した。単純 MRI 撮像後，造影剤カドシアミドを 0.3ml 使用し，造影 MRI を撮像した。

頭部単純 MRI ではウイルスベクター刺入部位は確認できたが，脳内に損傷はみられず，また，造影 MRI でも異常造影効果は示されなかった。脳内へのウイルスベクター投与による脳内の有害事象はなかった。体部 MRI においては，心臓の動き，呼吸変動により解像度の良い画像は得られなかったが，肺，肝臓，脾臓，腎臓など胸腔内，腹腔内臓器のサイズ，形態に異常所見はみられなかった。造影剤使用後の画像においても異常な造影効果を示す領域はなかった。

今回の実験結果より，レトロウイルスベクター投与による有害事象はないことが示された。今回の実験は予定している 5 頭のうちの 2 頭目の結果であり，さらに実験を行いレトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療の安全性を確認していく予定である。

5. 神経系発生分化過程での糖鎖動態の解析と医療への応用

辻　崇一，鈴木邦彦，高木淑江，岡田洋子（東海大学未来科学技術共同研究センター）
長谷純宏，長束俊治（大阪大学），中北慎一（香川大学），山中龍也（久留米大学）
土屋尚人（新潟大学），佐久間圭一郎（京都大学），藤本一朗（東京大学）

【はじめに】糖鎖は主に糖タンパク質や脂質などに結合し細胞表層に局在し，細胞間相互作用をはじめとして様々な役割を演じている。神経系の発生分化過程や病変に伴い，これら糖鎖の組成はダイナミックに変動することを示す状況証拠は多いが，その実態をまだ把握できていないのが現状である。そこで，糖鎖分析と糖鎖関連遺伝子群の発現解析を通じて発生分化過程の糖鎖変化を網羅的に把握し，それを基に様々な病気と糖鎖変化の関連を解析することを主たる目的とする。神経系の発生分化過程に参画する糖鎖関連遺伝子は少なくとも 200 前後はあると考えられるが，本共同研究ではまず手始めとしてシアル酸転移酵素ファミリーに焦点を絞って解析をする。それは，糖鎖の中でも非還元末端にシアル酸を持つ糖鎖が神経系機能や発生分化過程で様々な役割・機能を発現していると考えられているからである。同酵素ファミリーは少なくとも 20 種のメンバーからなり，今までの初歩的な解析からメンバーの中には神経系発生分化過程で時空間特異的な発現をするものがあることが明らかになっている。その実態を詳細に把握するために，個々の遺伝子が何時何処で発現し，あるいはシャットダウンするのかをまず明らかにする。

【研究結果・考察】シアル酸転移酵素遺伝子の発現量は概して極めて少ないこと，各メンバー間で相互に似た配列を持つことから，20 種の各メンバーの発現を比較検討することが容易ではなかった。最近まで competitive PCR を用いて 20 種のメンバーの発現解析系を確立し検討を行ってきたが，定量性が無いため相互に比較検討のできるデータが得られなかった。そこで，リアルタイム-PCR による半定量的な発現解析系の確立を試みてきたが，本年度，幾つかのメンバーの遺伝子発現に関して，半相対定量が可能となってきた。この方法を用いると，マウス C57BL6 の神経系発生分化過程で見る限り，

1) ほぼユビキタスに発現するものと発現時期が限定されたものがあること

2) 検討を行った中では，ST8Sia-II, ST6Gal-II 以外はいずれも発現量は僅少で，発現部位を in situ hybridization で解析するのは難しいことが明らかとなった。

今後，発現量の多いものに関しては in situ hybridization を主に用いて解析を進め，少ないものに関しては in situ PCR 系を確立し解析を進める予定である。

6. mGluR1 レスキューマウスの電気生理学的解析

饗場　篤（神戸大学・大学院医学系研究科）
宮田　麻理子（生理学研究所）

代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR) のうち，mGluR1 は mGluR5 と共にグループ I を形成し，三量体 G 蛋白質 Gq と共役しプロテインキナーゼ C(PKC) 活性や細胞内カルシウム濃度を調節している。本研究では，mGluR1 サブタイプのうち，mGluR1a mGluR1b サブタイプ各々のみプルキンエ細胞で発現するマウスを用いて，昨年度から共同研究を行ってきた。本年度は実験をさらに重ね，小脳長期抑圧現象 (LTD) が mGluR1a レスキューマウスでは回復し，mGluR1b レスキューマウスでは欠損することを明確にした。mGluR1a のみ c 末端ドメインを有し homer 蛋白と結合するため，そのシグナルが LTD には必須であることが明確になった。今後 mGluR1 電流の性質の違いなど詳細な解析をする予定である。

7. 大脳基底核を巡る線維連絡の研究

高田昌彦（東京都神経科学総合研究所）
泰羅雅登（日本大学大学院総合科学研究科）
南部　篤（生理学研究所）

大脳基底核の機能を考える上で，大脳皮質との相互連絡を知ることが重要である。しかし，従来の方法では，経シナプス的な投射を調べるには限界があった。狂犬病ウイルスがシナプスを超えて逆行性に感染することを利用して，これをトレーサーとして用い，大脳皮質間での線維連絡の解析を行った。なお，ウイルスの注入は東京都神経科学総合研究所の感染実験室で行った。

一次運動野の下肢領域，近位・遠位上肢領域，口腔顔面領域に狂犬病ウイルスを注入した。注入後，4 日目で，線条体と視床下核に体部位局在を示すラベルが見られ，これらは，大脳皮質から視床，淡蒼球内節を介して経シナプス的に逆行性にラベルしたものであると考えられる。このラベルは，大脳皮質線条体投射あるいは，大脳皮質視床下核投射の終末部位とよく一致していた。これは，大脳皮質―大脳基底核ループが，体部位に関して閉じたループであることを示唆している。

8. サル歩行モデルを用いた二足歩行運動の制御機序

稲瀬　正彦，中陳　克己（近畿大学医学部）
森　大志（山口大学農学部）
南部　篤（生理学研究所）

歩行運動において，四肢のリズム運動および体幹の姿勢を制御する基本的な神経機構は脳幹および脊髄内に配

置される。これらの神経機構に対して，サルの大脳皮質に存在する複数の運動領野はそれぞれ直接的に投射する。皮質網様体路細胞と皮質脊髄路細胞の皮質内分布様式が領野間において異なることを考慮すると，各運動領野が歩行にかかわる脳幹―脊髄神経機構を，平行する二つの下行路を介して分担的に制御することが推察される。

本研究の目的はサル大脳皮質運動領野における二足歩行運動の分担制御機序の解明である。そのためにサルに流れベルト上を無拘束の状態で四足歩行および二足歩行を遂行させ，一次運動野，補足運動野および背側運動前野から歩行中の神経細胞活動を導出記録した。記録には独自に開発した電動式マイクロマニピュレータを用いた。そして記録された神経細胞の活動様式において，① 四足歩行と二足歩行とにおける異なりと② 記録領域間における異なりに着目し，各運動領野のそれぞれが歩行運動のどのような側面を制御しているのかを明らかにしようと試みた。

現在まで 54 個の皮質神経細胞から課題関連活動を記録した。一次運動野の下肢領域では四足歩行において，多くの神経細胞 (15/21) が歩行周期に一致した相動的な発射様式を示した。歩容を二足歩行に変換しても，相動的な活動様式を示す細胞の割合 (14/21) に変化は認められなかった。補足運動野の体幹・下肢領域では四足歩行において，約半数の神経細胞 (7/13) が持続的又は持続的＋相動的な発射様式を示した。歩容を二足歩行に変換すると，このような活動様式を示す細胞の割合 (12/13) は著明に増加した。背側運動前野の下肢領域では四足歩行において，相動的な活動様式を示すもの (6/20)，相動的＋持続的な活動様式を示すもの (8/20)，および歩行の開始前後において burst 状に発火して，かつ歩行の継続に伴いその発射頻度を漸減させるもの (4/20) が記録された。歩容を二足歩行に変換しても，これらの活動様式を示すそれぞれの細胞の割合に変化は認められなかった。

以上の結果は，サル大脳皮質運動領野の下肢領域における分担的歩行制御機序の一端を示すものであり，サルの一次運動野は肢のリズム運動を，補足運動野は体幹の直立姿勢を，背側運動前野は歩行運動の発動をそれぞれ制御する可能性を示唆する。

9. 脳の左右差に関する統合的研究－体軸形成に異常を示す変異マウスを用いたアプローチ

伊 藤　功（九州大学大学院理学研究院）

成獣マウス海馬神経回路には NMDA 受容体 NR2B サブユニットの非対称なシナプス配置に基づく機能的・構造的左右非対称性が存在していることを我々は明らかにした。本研究はこの発見をさらに発展させ，脳の左右差の形成時期とこれに関与する遺伝子の解明。脳の左右差の行動学的意義の解明。および左右非対称な神経回路の形成に関与する細胞外シグナルの解明，をめざして総合的な検討を行うことを目的とする。

本年度は，内臓系の左右軸形成機構と比較しつつ，脳の左右差の形成時期とその機構を解析することを目的として，体軸の形成に異常を示す変異マウス（iv マウス）を用いた解析を行った。その結果は，iv マウス海馬では左右の非対称性が消失していることが明らかになった（投稿中）。また，iv マウスにおける左右差の消失は，右側異性を特徴としており，左右の海馬がともに右海馬の特徴を示すように変化していた。この結果は，左右差の形成機構が内臓系と脳とでは異なっていることも示唆している。

これらの成果に立脚し，来年度は左右差の形成と維持に関与するシグナルの同定を目指して，DNA マイクロアレイによる解析を中心に研究を行う。

10. 線条体投射神経終末の分布領域および分子局在の解析

横井峰人（京都大学大学院医学研究科）
佐野裕美（京都大学大学院医学研究科）

線条体投射神経細胞にGFPあるいはsynaptophluorinを発現するトランスジェニックマウスを用いて，線条体投射神経細胞の投射領域の解析を行った。私たちは，線条体投射神経細胞の投射領域のなかで，これまであまり解析がすすんでいない，外側視床下部領域に注目した。その結果，線条体投射神経細胞は外側視床下部の前亜領域の限られた領域に投射すること，さらに，この領域には，GABA 作動性軸索終末が存在すること，側坐核からの投射が存在すること，GABA 作動性神経細胞があまり分布せずグルタミン酸作動性神経細胞が主に分布すること，メラニン凝集ホルモン含有ニューロンあるいはオレキシン/ハイポクレチン含有ニューロンが分布しないこと，を明らかにした。この結果に基づき，側坐核―外側視床下部亜領域―メラニン凝集ホルモン含有ニューロンからなる閉鎖神経回路の存在を提唱し，この神経回路が快楽的摂食行動に関与する可能性を提案した (J. Neurosci. 27: 6948-6955(2007))。

11. 運動学習記憶に関連するシナプス微細形態の検索

永雄総一（理研・脳科学総合研究センター・運動学習制御）
岡部繁男（東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科）
首藤文洋（筑波大学大学院人間総合科学研究科）
重本隆一，久保義弘（生理学研究所）

マウスの眼球反射を用いて長期運動学習と短期運動学習を定量評価できる適応のパラダイムを開発し，それを用いて，学習成立後に小脳皮質の出力を可逆的遮断したところ，短期運動学習の記憶は完全に消去されるのに対して，長期運動学習の記憶は影響を受けないことを見出した。さらに，長期記憶の痕跡が，皮質の出力先である前庭核に形成されているという電気生理学の所見と，LTD と長期記憶との因果関係を示す所見を発表した (Shutoh et al., Neuroscience 139, 767-0777, 2006)。小脳皮質に形成された短期記憶の痕跡が，どのようにしていつシナプスを越えて前庭核へ移動するかを実験的に検討した。

1) 短期記憶から長期記憶への固定化の必要条件の決定

B6 マウスを用いて 3 つの実験群を作成した。①群には毎日 1 時間の視覚訓練を行ったのちに，ガス麻酔下，両側小脳片葉に刺入し，GABA のアゴニストのムシモールを 0.5μl を投与した。②群には視覚訓練後，毎日ガス麻酔下，両側小脳片葉にリンゲル液 0.5μl を投与した。③群には，視覚訓練を行わず，毎日ガス麻酔下，両側小脳片葉にムシモールを 0.5μl を投与した。4 日間の訓練期間中 1 時間の訓練によって生じる短期の適応には，①と②群間に差は見られなかったのに対して，4 日間の訓練によって生じる長期の適応にでは，①群は②群に比し有意に減弱しており，訓練を行わなかった③群と差はなかった。これらの実験結果は，短期記憶から長期記憶の移行に，訓練直後の数時間の小脳皮質の活動が重要であることを示唆する。

2)プルキンエ細胞における短期記憶と長期記憶の遺伝子発現パターンの比較

マウスの小脳皮質の凍結切片からレーザーマイクロダイセクション法を用いて，プルキンエ細胞層と顆粒細胞層を切り出した後 RNA を抽出し，そ遺伝子発現の違いをアフィメトリクス社のジーンチップ法を用いて定量化した。40,000 の遺伝子に対して 4,000 個程度の遺伝子についてはプルキンエ細胞と顆粒細胞に発現量に差があることを見出した。眼球運動の短期と長期適応に相関して発現が変動する遺伝子群を，マイクロアレイ法により検索した。B6 マウスを用いて 4 群の実験群を作成した。①群は，5 日間暗闇の中で飼育した。②群には，4 日間暗闇

で飼育し，5 日目に 1 時間の視覚訓練を行った。③群には，1 日 1 時間の視覚訓練を 4 日間行うとともに，訓練時以外は暗闇の中で飼育した。④群には 1 日 1 時間の視覚訓練を 5 日間行うとともに，訓練時以外は暗闇の中で飼育した。5 日目に断頭し，脳を摘出し小脳片葉とそれに隣接する傍片葉をそれぞれ分離摘出し，RNA を抽出した。アフィメトリクス社のジーンチップ法を用いて遺伝子発現を定量化し，各群間の差を統計的に評価した。その結果，約 90 個の遺伝子群は短期適応に特異的に相関して変動し，約 160 個の遺伝子群は，長期適応に特異的に相関して変動することがわかった。

3) 霊長類の眼球反射の長期運動学習と小脳皮質の活動

2 頭のアカゲサルに左右逆転プリズムを装着し，チェック模様のスクリーンを見せ，2 時間持続的に正弦波状にチェアーを回転させてトレーニングした。トレーニング終了後もサルに逆転プリズムを持続的に装着させた。このようなトレーニングを 3 日間連続的に行い，水平性前庭動眼反射 (HVOR) の利得への影響を見た。2 時間のトレーニングにより短期の適応が生じ反射の利得が低下したが，持続的にプリズムを装着した場合には，反射の利得がさらに低下し，長期適応が生じた。短期適応と長期適応の直後に，両側の小脳片葉にリドカイン溶液を注入し，適応に対する効果を現在調べているところである。

今後の見通しについて

小脳皮質に長期抑圧によって形成された短期運動学習の記憶痕跡が，練習を繰り返すことにより，何らかの修飾をうけて，経シナプス的に出力先の前庭（小脳）核に移行することが本年度の実験結果から示唆される。本年度は，その移行に，訓練直後の数時間程度の小脳皮質の活動が重要であることが明らかにされた。小脳皮質が長期適応と関係してどのような影響を前庭核に及ぼしうるかを，形態と分子生物学的方法を用いてさらに検討するつもりである。またマウスで得られた所見が動物界全体に普遍的であるかどうかを，霊長類のアカゲサルを用いて検討する予定である。

12. ドーパミン受容体欠損マウスを利用した黒質網様部ニューロンの自発発火活動の解析

山田勝也（弘前大学大学院・医学研究科・統合機能生理学講座）
籾山俊彦（自然科学研究機構・生理学研究所・脳形態解析研究部門）

中脳黒質網様部 (SNr) は大脳基底核の主要な出力核で，GABA 作動性ニューロンから構成され，脳内で最も高頻度の自発発火活動を示す。一方隣接する黒質緻密部 (SNc) のドーパミンニューロンは，SNr に伸ばした樹状突起からドーパミンを放出する (dendritic release) が，その生理的意義はよくわかっていない。SNr に対するドーパミンの影響の解析は，基礎研究上の意義に加えて SNc のドーパミンニューロンの変性疾患であるパーキンソン病の病態理解にも役立つ可能性がある。申請者らは脳スライスを用いた細胞外記録による予備実験から，GABA 受容体ならびに興奮性アミノ酸受容体に対する阻害剤存在下，ドーパミンにより SNr ニューロンの発火頻度が上昇することを見出した。そこで本応答の作用機序や受容体サブタイプなどの詳細の解明を目指した研究を開始した。

マウスの脳スライスの SNc に蛍光色素 DiI を注入してインキュベーションの後観察し，SNc と SNr の間の線維連絡をよく保存するスライス切断角度を決定した。生後 13-34 日令マウスを用い，過分極通電時に h-current を示さないことを特徴とする SNrGABA 作動性ニューロンからセルアタッチモードもしくは conventional なホールセルパッチクランプ記録を行なった。

野生型マウスおよびD1受容体とD2受容体を共に欠失させたダブル KO マウスの SNrGABA 作動性ニューロンに対し，ドーパミン D1 受容体アゴニストおよび D2 受容体アゴニストを投与する実験から，SNrGABA 作動性ニューロンのドーパミン応答には D1-like 受容体ならびに D2-like 受容体の両者を介した機構が含まれることが示唆された。

一方，急性単離した SNr ニューロンのうち，h-current を示さない GABA 作動性ニューロンでドーパミンに応答するものは認められなかった (20/20)。また h-current

を示すドーパミンニューロンは，全例 (9/9) がドーパミンにより過分極した。以上からドーパミンは興奮性アミノ酸もしくはGABA以外のシナプス伝達を介し，或いはグリア細胞を介して間接的に GABA 作動性ニューロンの自発活動に影響する可能性が示唆された。実際グリシンが単離 SNrGABA 作動性ニューロンを脱分極 (8/14) 若しくは過分極 (6/14) させることが判明し，更に解析を進めている。

13. 遺伝子改変動物を利用した大脳皮質抑制性ニューロンにおける神経活動の解明

柳川右千夫，柿崎利和，齊藤康彦（群馬大学・大学院医学系研究科）
川口泰雄，平林真澄（生理学研究所）

大脳皮質におけるリズミックな神経活動，神経が同期して活動する現象，シナプス可塑性の形成には，抑制性ニューロンが行う神経情報処理が重要な役割を果たしていると考えられている。しかしながら，抑制性ニューロンは，多様な形態をもち，in vitro および in vivo で正確に同定することは困難である。そこで，我々が作成した抑制性ニューロンに特異的に Venus 蛍光分子が発現するトランスジェニックラット（VGAT-Venus ラット）を用いて組織学的解析を行った。大脳皮質 GABA ニューロンには，パルブアルブミンやソマトスタチン等の化学マーカーで分類される複数のサブタイプが存在する。VGAT-Venus ラット大脳皮質 GABA ニューロン全体に対するサブタイプの割合について，Venus の蛍光とパルブアルブミンやソマトスタチン等に対する抗体による 2 重染色を用いて検討した。その結果，6 種類の化学マーカー（パルブアルブミン，ソマトスタチン，バソアクティブ・インテスティナル・ポリペプチド，コレシストキニン，カルレチニン，α-アクチニン）で GABA ニューロン全体の 95% 以上を占めることを明らかにした。

大脳皮質抑制性ニューロンの形態学的および電気生理学的特性を理解するには，他の領域における抑制性ニューロンに関する知見が重要である。そこで，VGAT-Venus ラット前庭神経核と舌下神経前位核に存在する抑制性ニューロンの電気生理学的解析を開始した。また，抑制性ニューロンを EGFP で標識した GAD67-GFP マウスを利用して，バレル皮質における抑制性ニューロンの機能など，様々な抑制性ニューロンの機能や形態について解析した。

大脳皮質抑制性ニューロンに様々な機能プローブを発現する遺伝子改変マウスを作成するために，テトラサイクリンシステムの利用について検討を行っている。

14. 皮質抑制性細胞における神経伝達物質放出の調節機構

吉村　由美子，高田　直樹，小松　由紀夫（名古屋大学・環境医学研究所）
根東　覚（東京医科歯科大学大学院・医歯学総合研究科）
窪田　芳之，畑田小百合，川口　泰雄（生理学研究所）

興奮性あるいは抑制性信号をシナプス後細胞に伝えるAMPA/カイニン酸/NMDA 受容体や $GABA_A$ 受容体等のイオンチャネル型受容体が，様々な脳領域においてシナプス前終末にも存在し，神経伝達物質の放出を調節することが近年多数報告されている。最近，我々は，大脳皮質の 2/3 層の局所神経回路を電気生理学的手法により解析し，錐体細胞が抑制性介在細胞の樹状突起・細胞体を介さずに，抑制性細胞の軸索終末に存在する AMPA/カイニン酸受容体を直接活性化し，近隣の錐体細胞に抑制をかけることを示唆する結果を報告した(Ming et al., Science 2007)。この結果から，抑制性細胞の活動とは別個に，錐体細胞がその周辺の錐体細胞に迅速に抑制をかける機構が，皮質内で機能していると考えられるが，そのような構造を形態学的に示す結果は報告されていない。

そこで，電気生理学的研究により推定された軸索・軸索シナプスを介する抑制性シナプス回路を形態学的に同定する目的で，本共同研究を開始した。

まず，ラット大脳皮質の切片を，電子顕微鏡で観察した。興奮性神経終末と思われる非対称型の PSD をもつ神経終末と，抑制性神経終末と思われる対称型の PSD をもつ神経終末が近接して存在するかを検討した。これまでの検索では，興奮性神経終末と抑制性神経終末が近接して，典型的なシナプスを形成する所見は得られていない。また，シナプス構造がなくても，興奮性終末から放出されたグルタミン酸が spill over し，近傍の抑制性終末に作用して GABA が放出された結果，近傍の錐体細胞が抑制される可能性が考えられる。そこで，興奮性神経終末に隣接する抑制性の軸索終末表面にグルタミン酸受容体が存在し，しかもその抑制性終末が錐体細胞の細胞表面にシナプス接着しているような構造が存在するかを検討している。現在，Lowcryl 樹脂に包埋した組織を用いて，グルタミン酸受容体を postembedding immunohisochemistry でラベルし，そのような構造が観察できるかどうか解析中である。

15. 齧歯類および霊長類における大脳皮質錐体細胞への抑制性および領域外からの入力の 3 次元的解析

一戸　紀孝，冨岡　良平，松下　敦子，Kathleen S. Rockland
（独立行政法人理化学研究所・脳皮質機能構造研究チーム）
窪田　芳之（生理学研究所）

大脳皮質の神経細胞の中で多数を占める興奮性の錐体細胞の神経活動は興奮性・抑制性の多様な入力の影響を受けている。これらの入力が作るシナプスは，錐体細胞の樹状突起または細胞体表面に，入力の起源により特異的な分布をしていると考えられ，その分布は神経細胞の行っている計算上重要であると考えられている。今回，我々は，この錐体細胞表面への入力の分布に関して，2 つのプロジェクトを行った。1 つは，ラット周嗅皮質の各層の錐体細胞尖頭樹状突起への parvalbumin (PV) 陽性 GABAergic 終末のシナプス分布の検討である。実験は，まず周嗅皮質の近傍の TE 野に EGFP を感染細胞に発現させるアデノウィルスを注入し，周嗅皮質内の錐体細胞を Golgi 様にラベルし,その切片で PV と GABA の終末マーカーvesicular GABA trasnportor (VGAT) を異なった蛍光色素で染め出し，共焦点顕微鏡を用いて，これらの終末の接触部位を検索した。その結果，尖頭樹状突起の細胞体からの距離が大きくなるにつれて，接触部位の密度が下がるが，0 にはならないことが示された。この結果は, PV 陽性終末が細胞体周囲に接触する傾向があるという，これまでの考えを支持するとともに，遠位の樹状突起でも，細胞によっては相当の PV 陽性終末が接触するということを示す。また，同じ切片を電子顕微鏡用に処理し，共焦点顕微鏡で同定された 8 個の接触部位が実際に 8 個ともシナプスを作っていることを確認した。2 つめのプロジェクトはマカクザルの下側頭葉前部 (TE) の錐体細胞を，上と同様に下側頭葉後部 (TEO) へのウィルスの注入を用いて EGFP 標識するとともに，順行性のトレーサーBDA を TEO に注入し，feedforward-feedback loop の存在と，そのシナプス結合部位について共焦点顕微鏡を用いて検討した。その結果，TE の 5 層の錐体細胞の尖頭樹状突起が 4 層を通る際に，TEO からの投射終末と接触することが示された。この接触部位は，棘突起上以外に，樹状突起のシャフトも含む。興奮性の終末は，一般に棘突起にシナプスするといわれており，現在，実際にこのシャフトへの接触部位がシナプスを形成しているかを, 電顕写真 3 次元再構築を使った検討をしている。

16. マカクザルの中枢神経系の損傷からの運動機能回復に関する組織学的研究

大石高生（京都大学霊長類研究所），肥後範行，村田弓（産業技術総合研究所）
伊佐正，齋藤紀美香（生理学研究所）

ヒトをはじめとする霊長類は指を独立に動かすことにより，物体の操作などの器用な運動を行うことができる。皮質脊髄路を延髄レベルで切断すると指の器用な運動が永久に消滅した (Lawrence and Kuypers, 1968) が，皮質脊髄路の切断が頚髄 C4/5 レベルの場合は運動機能が回復することが伊佐らによって示された(Sasaki et al., 2004)。神経回路の構造的変化による機能代償がこの運動機能回復の基盤になっているという仮説を検討するため，構造変化のマーカー分子の一つである GAP-43 の遺伝子発現とタンパク発現を皮質脊髄路損傷ザルで組織学的に検討した。対照となる正常マカクザル (n=8) の運動関連皮質では，GAP-43 の mRNA は主として V-VI 層に存在し，II-III 層での発現は弱かった。脊髄への投射をもつ V 層の大型錐体細胞における発現は，小型の錐体細胞における発現よりも弱かった。皮質脊髄路切断後 2 週間から 1 ヶ月経過した個体 (n=5) の一次運動野では，V-VI 層に加えて II-III 層でも顕著な遺伝子発現が見られ，さらに損傷と同側の一次運動野では V 層の大型錐体細胞においても顕著な発現が見られた。皮質脊髄路切断後 3-4 ヶ月経過した個体 (n=6) では発現レベルは減少するものの，II-III 層では正常個体よりも強い遺伝子発現が見られた。また，皮質脊髄路切断個体では，正常個体に比べて，一次運動野に加え，運動前野腹側部の III 層に有意な遺伝子発現の上昇が見られた。このことは，皮質脊髄路切断後に大脳皮質の複数の領野において神経回路の変化が生じた可能性を示唆する。脊髄では外側皮質脊髄路などで，破壊側の方が反対側よりも GAP-43 を強く発現する構造が多く見られた。二重染色により GAP-43 陽性構造を検討したところ，MAP2 との共存はなく，ニューロン特異的エノラーゼと共存していた。また，GFAP との共存はほとんどなかった。これらのことから，GAP-43 陽性構造の大部分はニューロンの軸索であることが確認できた。ただし，損傷部より尾側の白質内にごく少数 GAP-43 と GFAP の共存像が観察され，少数のアストロサイトが GAP-43 を発現することを確認した。皮質脊髄路切断後には運動関連皮質だけでなく脊髄でも軸索伸長を含む神経回路の構造変化が起こっていることが示唆される。

17. 大脳シナプスの in vivo2 光子画像解析

河西春郎，野口潤，宮崎崇史（東京大学医学部）
鍋倉淳一，和気弘明，高鶴裕介（生理学研究所）

【目的】河西研究室では 2 光子励起顕微鏡を用いた大脳海馬・皮質のシナプスの動態及び安定性の解析を行ってきており，動物 in vivo での実験を開始している。本共同研究では，生理学研究所生体恒常性発達機構研究部門で開発した新しい標識動物を共同利用することにより，回路形成に関係するシナプス前部・後部の統合的可塑性安定性の研究を行うための技術開発を行う。

【成果】thy-1 プロモーターに GFP を導入したトランスジェニック動物 H-line おいては，明るい 2 光子蛍光が得られ，これに対して超短パルスレーザーのビーム性状，パワーやパルス幅などのスペックを最適化し，深部到達性の検討を進めた。この結果，大脳皮質の表面から 800 ミクロン位にある錐体細胞の細胞体まで明瞭に観察され，その樹状突起を脳表面まで追跡できることがわかった。また，樹状突起スパインは 300 ミクロン位まで観察可能で，II/III 層の錐体細胞については，樹状突起やスパインの全容を可視化することが可能となった。

樹状突起スパインの観察には，脳の呼吸や脈拍による微細な動きを押さえることが重要である。これには手術の術式が大きく影響することがわかった。頭蓋の開口の大きさやガラス窓の固定法などについて工夫を行うことにより，再現性よく固定のよい観察が可能となった。最

近，ガラスを脳に接着させることによる脳への炎症性反応の誘起が懸念されている。これに対しては，生体適合性のよい合成ポリマーをガラスにコートすることを検討した結果，神経細胞そのものがより鮮明に観察されることがわかってきた。現在，グリア細胞の反応について検討中である。

この様に，脳の 2 光子観察は大きな可能性を秘めているが，この手法による研究には引き続き多数のノウハウを蓄積する必要がある。脳の 2 光子観察を始めている研究室は日本では極めて少なく，本共同研究にある二つの研究室が協力することにより，今後も一層，効果的にこの分野の発展に貢献することが期待される。

18. GABA シグナリングにおける新規分子 PRIP の役割解明研究

兼松隆・平田雅人（九州大学歯学研究院）
鍋倉淳一（生理学研究所）

我々が発見し遺伝子クローニングを行った新しいイノシトール 1,4,5 三リン酸結合性タンパク質分子は, PLC-δ1 と高い相同性を有するが，PLC 酵素活性を持たない。そこで PLC-related but catalytically inactive protein (PRIP)と名付けた。PRIP 分子には，PRIP-1 と PRIP-2 の 2 つのサブタイプがある。我々は PRIP-1/-2 ダブルノックアウトマウス (PRIP-DKO) を作製して機能解析の実験を進めた。その結果，PRIP 分子は $GABA_A$ 受容体のエンドサイトーシス過程を調節する分子である事を明らかにする事ができた。その概要を以下に列挙する。

1. $GABA_A$ 受容体のエンドサイトーシスは，受容体βサブユニットのリン酸化レベルによって調節を受ける事を明らかにした。

2. βサブユニットの脱リン酸化調節には PRIP とタンパク質脱リン酸化酵素 (PP1, PP2A) 複合体が重要である事を明らかにした。

3. PRIP 分子が $GABA_A$ 受容体のβサブユニットに直接結合することで，タンパク質脱リン酸化酵素 (PP1, PP2A) の足場タンパク質として機能する事を明らかにした。

4. $GABA_A$ 受容体は，AP2/クラスリン複合体によって被覆されエンドサイトーシスが誘導されるが，この過程を PRIP が $GABA_A$ 受容体のβサブユニットのリン酸化レベルを変える事で調節する可能性を示した。

19. 発達期におけるてんかん波発生機構の解明

夏目季代久，新井潤，緒方元気（九州工業大学大学院生命体工学研究科）
鍋倉淳一（生理学研究所）

発達期におけるてんかん波において，Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネルの関与は今まで明らかにされてこなかった。特に，発達期には，脱分極性の GABA 電位が発生し，Adult 期とは異なる反応が起こると考えられる。本研究では，発達期におけるてんかん波発生過程における Ca^{2+}依存性 K^+チャネルの関与を明らかにする事を目的とする。5,6 日齢のスライスからは Giant depolarization potential(GDP) と考えられる自発的な神経リズムを, 8,9 日齢のスライスでは $GABA_A$ 受容体阻害薬の SR-9551 投与により発生するてんかん波を用いて実験した。GDP 様の自発的発火活動には $GABA_A$ 受容体と AMPA 受容体の両方を介したシナプスが必要である。さらに，これら自発的発火活動に対して，Ca^{2+} 依存性 K^+チャネル（SK チャネル）阻害薬である apamine (100μ M) の投与を行うと，自発的発火頻度の振幅は減少し，自発的発火活動の発火頻度が上昇した。この事から自発発火活動は GDP と考えられ，その振幅及び発火頻度は SK チャネルによって調節が行われていることが示唆される。また 2) の実験においても，apamin の投与により波形が変化し，さらに周波数が減少した。以上の事から, 発達期のてんかん発火に対しては，Adult 期とは異なり，Ca^{2+}依存性 K^+チャネルは，epileptogenesis に関わっている事が明らかになった。

20. 視床下部 NPY ニューロンにおける AMP キナーゼのシグナル伝達と摂食調節における役割

矢田　俊彦（自治医科大学医学部生理学講座統合生理学部門）
河野　大輔（自治医科大学医学部生理学講座統合生理学部門）
栗田　英治（自治医科大学医学部生理学講座統合生理学部門）
西田　慎吾（自治医科大学医学部生理学講座統合生理学部門）
箕越　靖彦（生理学研究所）

AMP キナーゼ (AMPK) は，細胞内エネルギーゲージであり，視床下部における AMPK の活性化は摂食の亢進を引き起こすことが報告されている。視床下部における AMPK の活性は，全身のエネルギー状態や，摂食亢進物質グレリンや摂食抑制物質レプチン，インスリンなどによって変化することが報告されている。視床下部弓状核には，摂食亢進ニューロンの NPY ニューロンと摂食抑制ニューロンの POMC ニューロンが存在しており，グレリン，レプチンの重要な標的となっている。本研究では，AMPK による摂食亢進機構を明らかにするため，視床下部弓状核における AMPK の役割を検討した。

成熟ラット（5-7 週令）から単離した視床下部弓状核ニューロンを用いて，fura-2 蛍光イメージングにより細胞内 Ca^{2+} 濃度($[Ca^{2+}]_i$) を測定し，AMPK 活性化剤 AICAR の作用を調べた。測定後，抗 NPY 抗体，抗 POMC 抗体，抗リン酸化 AMPK 抗体，抗リン酸化 ACC 抗体を用いて，免疫染色を行った。

AICAR (200 mM) は弓状核ニューロンの 24%において $[Ca^{2+}]_i$ を増加させた。また，AICAR 応答後のニューロンにおいて，AMPK と ACC のリン酸化が確認された。弓状核 AICAR 応答性ニューロンの約 40% は NPY 免疫陽性ニューロンであった。一方，POMC 免疫陽性ニューロンは AICAR に対して $[Ca^{2+}]_i$ 応答を示さなかった。さらに，AICAR の脳室内投与により有意に摂食が亢進し，この摂食亢進は NPY-Y1 受容体拮抗薬の同時投与により抑制された。次に摂食亢進物質グレリンとの関係を調べた。AICAR 応答性ニューロンの約 70% において，グレリンの添加は $[Ca^{2+}]_i$ を増加させた。グレリン応答後のニューロンにおいて，AMPK と ACC のリン酸化が確認された。また，グレリンによる $[Ca^{2+}]_i$ の増加は，AMPK 阻害剤 compound C によって抑制された。

以上の実験結果から，AMPK は，NPY ニューロンを含む視床下部弓状核ニューロンを直接活性化させ，摂食を亢進させることが明らかとなった。また，グレリンによる弓状核ニューロンの活性化の一部は AMPK により仲介されることが示唆される。これらの実験結果から，AMPK を介した弓状核ニューロンの活性化およびホルモンの刺激受容は，摂食調節に重要な役割を果たしていると考えられる。

21. 随意運動発現を司る神経機構の研究

美馬達哉（京都大学大学院医学研究科）
島津秀紀（徳島大学大学院医学研究科）
礒村宜和（理化学研究所）
逵本徹（生理学研究所）

ヒトの脳波活動と上肢の筋電図活動の間には相関が認められる。この相関関係は大脳皮質運動野から筋肉への運動制御過程を反映している可能性がある。しかし，一次運動野が近隣の運動関連領野と関係しながら筋収縮をコントロールしていることは一見当然とも考えられるにもかかわらず，その神経機構は十分には解明されていない。我々は，動物実験を行うことによってこの仕組みを神経回路レベルで解明できる可能性があると考え，サル

の大脳皮質フィールド電位と上肢筋電図活動の記録及び解析を行った。その結果，筋電図活動と相関を示す大脳皮質の複数部位を特定することができた。さらに運動の実行中にこれらの相関関係がどのように変化するかを明らかにした。現在，これらの成果を発表すべく準備中である。

22. クジラ体外成熟卵子への精子注入後の体外発生能

福井 豊（帯広畜産大学・畜産学部・家畜増殖学研究室）
保地 眞一（信州大学・繊維学部・資源生物学講座）
平林 真澄（生理学研究所・遺伝子改変動物作製室）

【クロミンククジラ卵母細胞のガラス化後の体外成熟, 単為発生および顕微授精による胚発生能】

南極海鯨類調査捕鯨で得られた成熟および未成熟クロミンククジラ卵母細胞（未成熟卵子）のガラス化・加温後の体外成熟，顕微授精による体外受精および胚発生を検討した。本研究では，ガラス化法として cytochalasin B（CB: 7.5μg/ml，30 分）前処理の効果，および 2 種類の凍結媒液（30% ethylene glycol : EG 単独，15% EG+15% dimethylsulfoxide : DMSO）を比較した。ガラス化・加温後の体外成熟率は，成熟および未成熟クロミンククジラで各々60.9% と 53.1%で有意な差は見られなかった。しかし，ionomycine（5μM，4 分）と 6-dimethylaminopurin（DMAP: 2mM，3.5 時間）による単為発生処理後の卵子活性率は未成熟クジラ(46.4%)より成熟クジラ(76.7%)で有意に (P<0.05) 高かった。EG 単独および EG+DMSO における体外成熟率は，各々22.2%，30.2%と後者で高かったが，有意差は見られなかった。また，CB の前処理の効果も見られなかった（処理＋: 30.4%, 処理―: 27.3%)。成熟クジラから得られた，175 個の未成熟卵子を EG+DMSO でガラス化・加温後（CB 前処理なし），10% クジラ卵胞液を含む TCM 199（浸透圧は 390 mOsM に調整）で 40-50 時間の体外成熟培養後，27 個が成熟した。このうち，13 個の卵子に ICSI（卵細胞質内精子注入）を行い，その後 Vero 細胞との共培養に供した。培養 3 日目までに 6 個 (46.2%) が分割（2～5 細胞期）し，さらに培養を継続したが，桑実胚，胚盤胞への発生は観察されなかった。以上の結果から，成熟および未成熟クロミンククジラの卵母細胞のガラス化保存には，CB の前処理は必要でないこと，2 種類の凍結媒液（30% EG 単独，15% EG+15% DMSO）に差はないことが明らかになった。

23. 精子幹細胞を用いたノックアウトラット作成

篠原隆司（京都大学大学院・医学研究科）
平林 真澄，加藤 めぐみ（生理学研究所・遺伝子改変動物作製室）

培養精子幹細胞（Germline Stem，GS 細胞）を用いた生殖工学技術ははじめにマウスで樹立され，この技術をラットへと適用することが次の大きな課題である。平成 18 年において我々は以下の実験成果をあげることができた。

1) SD ラット，BN ラット，Wistar ラットからの GS 細胞の樹立，凍結保存を行った。また，凍結保存後に再融解してもその増殖が正常に起こることを確認した。
2) ラット精子幹細胞を，免疫不全マウスを仮親にすることでラット子孫の作成を行うことに成功した (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:13624-13628. 2006)。

これによりラットを飼育するスペースの削減，子孫作成のスピードの短縮につながることが期待される。この成果は異種の精巣内でも精子形成が正常に進行し，そこから生じた精子を利用し正常な個体発生に利用できる点を示した点で画期的なものであった（ラットとマウスの遺伝的な距離はヒトとチンパンジーとほぼ同程度と考え

られています)。

この異種移植の技術が発展すれば，より大型の動物の精子を小型動物の精巣内で発生させることで，飼育スペースやエサの削減につながるのみならず，希少動物の遺伝情報の保存にも有効に利用できることが予想される。精子幹細胞は GS 細胞として試験管内で増やし，遺伝子改変を行うことも可能であることから（平成 18 年 5 月 23 日の PNAS 誌に掲載し，報道発表されました)，異種を用いた精子幹細胞の遺伝子改変は新しい生殖工学の手法となることが予想される。

24. ニホンザルの真皮メラノサイトーシスを用いた母斑治療モデルの確立

遠藤隆志（筑波大学臨床医学系形成外科学）
木村　透（自然科学研究機構　動物実験センター）

形成外科診療において，真皮メラノサイト病変はよく見られる色素異常症のひとつである。蒙古斑は日本人乳幼児に見られる生理的現象であるが，その発生・消退機序は未だ解明されていない。太田・伊藤母斑および青色母斑についても原因および治療方法は十分に究明されていない。研究の遅れとして，適切な実験動物が見いだされていないことが挙げられる。本研究の目的は次の 2 点である : 1. ニホンザルの真皮メラノサイトがヒトの病変と同一であることを確認し，2. 真皮メラノサイト病変の治療に役立つモデル病変であるかを調べる。

本年の試験として，ニホンザルの皮膚外観を画像解析した。皮膚色を色彩色差計で計測し，数値化を図った。さらに，皮膚生検材料を用いて，病理組織学的検査を行った。

【観察成績】有色素部位はすべての個体に見られ，体表の 1/4-1/2 程に分布していた。皮膚色の測定成績では，有色素部位の L*，a*および b*値はいずれも白色部位に比して有意に低い値を示した。

【病理組織学的検査成績】有色素部位の表皮には，メラニン顆粒を含むメラノサイトは認められなかった。真皮層には，多量のメラニン顆粒を有する紡錘形あるいは樹状突起を持つメラノサイトが明瞭に観察された。これらの細胞は，細胞集団を形成せず，また，周囲に結合組織の増生も認められなかった。一方，白色部位の皮膚には表皮および真皮両層にメラニン顆粒は一切観察されなかった。

以上の観察所見および病理組織学的検査成績から，ニホンザルの有色素部位の皮膚はヒトの真皮メラノサイトーシスと同一であることがわかった。霊長類であるニホンザルは，真皮層にメラノサイトが存在する皮膚構造を有する実験動物であることがわかった。本動物の皮膚は，真皮メラノサイトーシスや母斑病変の発生原因の解明，さらに真皮メラノサイト病変の治療技術の向上に役立つことが示唆された。次年度は，脱色素剤を用いて真皮メラノサイト病変の治療方法の手がかりとしての活用を目指す。

25. 伴侶動物における機能性腫瘍の検索および腫瘍細胞の系統保存

丸尾幸嗣（岐阜大学応用生物科学部獣医学課程獣医分子病態学分野）
森　崇（岐阜大学応用生物科学部獣医学課程獣医分子病態学分野）
木村　透（自然科学研究機構　動物実験センター）

伴侶動物の高齢化に伴い，小動物臨床において腫瘍性疾患の診断・治療は重要な課題となっている。また，腫瘍細胞自身が産生する生理活性物質が，生体の機能に様々な影響を及ぼすことがわかり，近年この機能性腫瘍細胞が注目されている。しかし，伴侶動物の腫瘍細胞を継代移植し，保存する例は極めて少ない。本研究の目的は，岐阜大学付属動物病院にて採取された機能性腫瘍細胞を継代し，系統的に保存する技術を確立することである。さらに，系統的に保存された腫瘍株の中から興味あるものに注目し，その腫瘍細胞が産生する因子を僅かな

りとも解明することである。最終目標は，各種腫瘍細胞を系統保存する腫瘍バンクを作り，必要な腫瘍株を供するシステムを樹立することである。

岐阜大学付属動物病院に来院した患畜（イヌ・ネコ）で，臨床所見および各種検査成績から機能性腫瘍と診断されたものを対象とした。外科手術により採取された機能性腫瘍細胞を SCID マウスに継代移植した。5 代にわたって SCID マウスに継代した後，この腫瘍組織を凍結保存にて半永久的に保存した。次いで，凍結保存した腫瘍を融解し，再び SCID マウスに移植して，生着の有無を確認した。今年度は凍結保存技術の確立し，伴侶動物の腫瘍細胞をイヌで 5 ライン，ネコで 1 ライン収集保存できた。来年度も継続して，同様に腫瘍株を収集し，保存ライン数を増やす予定である。また，病理組織検索を実施し，腫瘍細胞の産生する生理活性物質の手がかりの一端を突き止める。

26. DNA およびクロマチン高次構造の電子顕微鏡による解析

加藤幹男（大阪府立大学理学部）
永山国昭（岡崎統合バイオサイエンスセンター）

反復配列 AL79 は，30bp の反復単位鎖長のうち，18bp のポリプリン/ポリピリミジン領域を含む縦列繰り返し（ミニサテライト）である。これらの領域は，ゲノム中で繰返し回数の多型がしばしば見られる。このような性質をもたらす構造要因を知るために，一本鎖 DNA を鋳型とするプライマー伸長実験，化学修飾，電子顕微鏡観察，円偏光二色性スペクトルの温度依存変化，示差走査熱量計による熱融解解析を行った。その結果，反復単位は安定なミニヘアピン構造を形成することが示された (Kato et al. Comparat. Biochem. Physiol. Pt.B 146, 427-437; 2007)。

また我々は，この領域を含む超らせんプラスミド pAL79 が，一次元目に酸性 (pH4.6)・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において新奇な泳動図を示すことを見出した。すなわち，トポアイソマーのスポットは格子点上に現れた。一方，反復配列を含まない pUC19 DNA では，トポアイソマーは通常みられるように曲線上にスポットが並んだ。一次元目に中性条件を用いた場合は pAL79，pUC19 ともに通常の泳動図を示した。酸性条件は，ポリプリン/ポリピリミジン領域において分子内三重鎖形成を促進することが知られており，pAL79 は酸性条件下で三重塩基対合を含む特殊な高次構造を形成すると予想された。そこで，電子顕微鏡観察を行った所，pAL79 DNA 試料では様々な形状の分子（相互にきつく絡み合った棒状分子, 分枝した棒状分子, ゆるく絡み合った分子，開いた環状）が観察されたが，pUC19 DNA 試料ではほとんどがゆるく絡み合った分子であった。今後, これらの形状の差異をもたらす要因と，ミニサテライト配列が周辺 DNA 領域に及ぼす効果について解析を進める。

27. 位相差電子顕微鏡の医学・生物学的応用

臼田信光，中沢綾美，谷口孝喜，厚沢季美江（藤田保健衛生大学・医学部）
金子康子，仲本準（埼玉大学・理学部）
小柳義夫（京都大学・ウイルス研究所）
前島一博（理化学研究所）
登阪雅聡（京都大学・化学研究所）
Rasmus Schroeder（マックスプランク研究所）
永山國昭（岡崎統合バイオ）

高コントラストを特徴とする 2 つの電子顕微鏡法，ゼルニケ位相差法と微分干渉法（ヒルバート微分法）を用いて応用研究を行った。高加速の 300kV 電顕を用いた位相差法では，電子染色なしで安定して高コントラストの電顕像が得られた。無生物であるゴムのような高分子材料や氷包埋を行った様々な生物材料を対象として研究を行っている。

培養全載細胞観察においてはミトコンドリア等の細胞小器官と微小管等の細胞骨格が明確に認められた (Setou M, Atsuzawa K, Usuda N, Nagayama K et al., Med Mol Morphol 39, 176-180, 2006)。血小板や精子においては細胞内部構造が立体的に観察された。同様の観察はウィルスやバクテリアにも適用可能であり，細胞小器官内の酵素蛋白質分子の配列を in situ に観察することができた (Kaneko Y, Nakamoto H et al., J Bac 188, 805-808, 2006)。

高コントラストに生の蛋白質・生細胞を観察できる特性を利用して，様々な蛋白質，蛋白質の複合体としての超分子立体構造，細胞小器官およびそれらの関係を生細胞の中にあるままでの直接観察が実現した。これらの基礎的成果を病態解明に生かすことが試みられている。

28. 自律神経系中枢の MRI による研究

瀬尾芳輝，若松永憲（獨協医科大学　医学部）
鷹股　亮（奈良女子大学　生活環境学部）
荻野孝史（国立精神・神経センター　神経研究所）
森田啓之，田中邦彦（岐阜大学　大学院医学研究科）
吉本寛司（京都府立医科大学　大学院医学研究科）
村上政隆（生理学研究所）

我々は，脳機能画像法 (fMRI) により，自律神経中枢の神経活動を空間的・経時的に測定し解析する事を目標として実験を行っている。2006 年度も，自律神経活動に関係する様々な刺激を加え，それによって引き起こされる視床・視床下部・延髄における自律神経機能中枢の反応を経時的に追った。その中から，前庭機能についての解析結果について報告する。

Galvanic vestibular stimulation (GVS) および Caloric stimulation はともに前庭機能検査として用いられているが，GVS は茎状突起上に装着した電極を用いて体表から刺激するため，前庭系以外の部位も刺激されている可能性がある。今回の研究では，これらの刺激が前庭系を特異的に刺激するかどうかを調べるため，GVS と caloric stimulation に対する中枢興奮部位を前庭系正常ラットと前庭破壊ラットで比較検討した。中枢興奮部位の測定は Mn^{2+} 造影 MRI により行った。前庭系が正常なラットでは, GVS および caloric stimulation により median vestibular nucleus および cerebellar vermis の信号強度が有意に増加したが，前庭破壊ラットではこれらの部位の信号強度変化は見られなかった。以上の結果より, GVS および caloric stimulation は特異的に前庭系を刺激し，小脳を介して姿勢制御に関わっている可能性が示唆された。

29. 唾液腺分泌終末における内因性蛋白分泌と外因性蛋白分泌の sorting 機構

杉谷博士，三井烈，福島美和子，祁兵，吉垣純子（日本大学松戸歯学部）
橋本貞充（東京歯科大学），林知也（明治鍼灸大学）
村上政隆（生理研，統合バイオサイエンスセンター）

分泌終末での唾液蛋白質は腺細胞が合成する内因性蛋白と血液より移行する外因性蛋白の混合物である。外因性蛋白の移行に関して細胞密着部を通過する傍細胞輸送調節の理解が必要である。本年はことに細胞密着部の形成・維持・調節について検討した。

1) 細胞間密着部の形成

初代培養ラット耳下腺腺房細胞の細胞間密着部を電子顕微鏡で観察した。細胞群は，単層になる群と，半球状のクラスターを形成する群に分類できた。単層群では細胞間の頭頂側に，クラスター群では表面細胞間の頭頂側にタイト結合を認めた。また，クラスター内部には腺腔が存在し，腺腔を取り囲む細胞間にもタイト結合を認めた。タイト結合を持つ細胞群を，単層になった M 細胞，クラスター表面の S 細胞，クラスター内部の I 細胞に分類した。クローディン 3 および 4 の発現を調べると，I 細胞が腺房細胞としての機能を持つと考察された。

2) 細胞間密着部の維持と調節

細胞間密着部を有す唾液腺由来培養細胞 SMIE 細胞を用い，transepithelial resistance (TER)を 細胞間結合の機能の指標とし，神経伝達物質による機能の制御を検討した。神経伝達物質ニューロキニン A (NKA) により TER が上昇した。また，タプシガーギンでも TER は上昇，細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が細胞間をより密着させることを示した。一方，無血清培地に IGF-1 を添加して SMIE 細胞を培養すると，タイト結合の形態や関連タンパク質の発現が保持され，TER も維持された。これは，IGF-1 がタイト結合の発現と機能維持に関与することを示唆した。

3) 唾液腺における AQP6 の役割

AQP ファミリーの 1 つ AQP6 が，腺腔側膜近傍に局在することを認めた。また，AQP6 はタイト結合のマーカー蛋白質である ZO-1 の近傍に局在することが認めた。AQP6 は水よりも塩素やヨウ素イオンを透過するチャンネルとして機能することが近年明らかにされていることから，傍細胞輸送系でのイオン輸送と関連すると考察された。

4) 傍細胞経路を通過する IgG

これまで，灌流液のアルブミンが傍細胞経路を通り唾液に移行すること，その時，活性酸素によって SH 基が修飾されること，一酸化窒素 (*NO*) が SH 基に結合した *S*-ニトロソアルブミンが唾液中に出現することを明らかにした。市販のアルブミンは，少量 IgG 分画を含むため，今回，灌流液中の IgG 分画の唾液中への移行をアルブミン分画と比較した。灌流液と唾液の HPLC プロフィールを比較すると，アルブミン分画と IgG 分画の溶出時間のピークが一致した。それぞれの分画の Saliva/Perfusate (S/P) 比は，0.32±0.22（%，平均値±標準偏差），0.22±0.16 (%)であった。唾液分泌量と S/P 比の関係には相関関係はなく，灌流液中のタンパク質の唾液中への移行に際し，アルブミンと IgG は同様の挙動を示すことが示唆された。

30. 発生現象における膜電位シグナル伝達の分子機構とその役割の解明

岡本治正（産業技術総合研究所）
海老原達彦（産業技術総合研究所）
吉田　学（東京大学臨海実験所）
稲葉一男（筑波大学下田臨海実験センター）
柴　小菊（筑波大学下田臨海実験センター）
木下典行（基礎生物学研究所）
佐藤裕公（筑波大学下田臨海実験センター）
東島眞一（生理学研究所）
Mike Levin (Harvard School of Dental Medicine)
岡村康司（生理学研究所）

近年，発生現象における遺伝子発現のプログラムについては深い理解がなされるようになったが，左右非対称の形成など内在的な遺伝プログラム以外に発生過程の細胞生理学的現象の重要性が再認識されつつある。本研究では細胞内シグナル伝達や膜電位などの細胞生理機構の役割を両生類，尾索動物，哺乳類など動物種横断的に，理解することを目的として，岡崎統合バイオサイエンスセンターと筑波大，産総研による共同実験の成果として見出された Ci-VSP に注目し，各動物種での発現様式および分子機能の解析を行った。カタユウレイボヤ幼若体において Ci-VSP の発現パターンを in situ hybridization 法により行い，血液系細胞，消化管，胃に発現が確認された。一方，ゼブラフィッシュにおいてはすでに消化管での発現が in situ hybridization 法により観察されていたが，成魚において VSP の発現様式は明らかでなかった。そこで，RT-PCR 法を用いて各臓器での VSP 遺伝子の発現を検討した結果，精巣，脳に発現が見られたが，消化管には発現が検出されず，発生途中の一過的な発現であることが示唆された。現在，両生類について胚での発現様式を解析中である。

31. エンハンサートラップ法によるゼブラフィッシュの神経発生および神経機能の解析

武田　洋幸（東京大学大学院理学系研究科生物科学・教授，提案代表者）
東島　眞一（自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター）

ゼブラフィッシュの多数のエンハンサートラップラインをスクリーニングすることにより，神経系のきわめて少数の細胞で発現する転写因子，接着分子，チャネル分子を見付け出し，(i) 転写因子，接着分子に関しては解剖学的な解析により発生における機能を明らかにし，(ii) チャネル分子については，電気生理学的な解析により運動系ネットワーク中での生理的な機能を明らかにすることを目標として研究を進めている。昨年度までの研究で，50 系統を超える数のラインについてスクリーニングを行い，中枢神経系の少数の細胞で GFP の発現がみられるいくつかのラインを見いだした。今年度は，そのうちの 1 つのライン, HK-GFP に着目して研究を行った。HK-GFP ラインにおいては，後脳ではマウスナー細胞特異的に発現がみられ，また，脊髄においては非常に少数（各半体節あたりほぼ 1 つ）の交叉型介在ニューロンで発現が見られる。この交叉型介在ニューロンから電気生理学記録をおこなった結果，これらの細胞は，逃避行動時のみに発火すること，また，マウスナー細胞と電気的シナプスを作っていることが明らかとなった。このように，エンハンサートラップ法により細胞を同定して電気生理学記録を行うことの有用性が示された。

32. DIP/WISH の血小板凝集における役割

小田　淳（北海道大学大学院医学研究科）
福見−富永　知子（岡崎統合バイオサイエンスセンター）

Rho ファミリーG 蛋白質の下流蛋白質である, mDia および WASP 結合蛋白質としてほぼ同時期に同定された DIP/WISH は，当初 actin polymerization を促進し，かつ様々なシグナル因子の adaptor として働くことの可能な分子として報告された。その後，富永の研究により，DIP/WISH の細胞運動時におけるシグナル伝達因子としての役割が報告された。

小田らは血小板においても DIP/WISH が発現していること，血小板凝集時に必須なシグナル伝達経路に DIP/WISH が関与している可能性を見い出したため，DIP/WISH 抗体を提供することで，より詳しくシグナル伝達経路と血小板凝集の関連を検討した。また，富永の作製した DIP/WISH KO マウスを供与し，現在このマウスでの血小板凝集能を検討中である。

33. 脳組織培養系による神経ステロイドの機能形態学的解析

樋田一徳，水主智佳，山本登志子（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部形態情報医学分野）
古家園子，有井達夫（自然科学研究機構生理学研究所脳機能計測センター形態情報解析室）

ステロイドはコレステロールを基質に側鎖切断酵素 (p450scc) によるプレグネノロン合成から始まり, 複数の代謝酵素により各種ステロイドが合成･代謝される。種々のステロイドのうち，テストステロン及びエストラジオールは特に生理活性を有して脳内可塑性及び性分化に影響を及ぼすことが知られている。これらのステロイドの機能を深く理解するためには，これらのステロイドがどこに局在してどのように作用するかを知ることが基本となる。申請者らは従来，末梢の生殖・内分泌器官とは独立して脳内で産生されるステロイドホルモン（神経ステロイド）の存在意義と機能の解明を目指し，成体のマウス及びラットの嗅球，小脳，海馬におけるステロイド合成酵素の活性と遺伝子及び蛋白発現，及び免疫組織化学的局在を解析してきた。本研究は，血流の存在しない脳組織培養系を用いて，神経ステロイドの発現について解析を行ったものである。

方法は，生後 3 日から 7 日ラットの嗅球，小脳，及び海馬の新鮮脳スライスを作製し，7 日から 18 日間の比較的長期培養を行った後，テストステロン及びプロゲステロン還元酵素の 5α-reductase, テストステロン合成酵素の 17β-hydroxysteroid dehydrogenase (17βHSD)，及びステロイド代謝 key enzyme の 17α水酸化酵素 (p450c17) について解析を行った。

はじめに，培養脳スライスのニューロン・グリア構成を解析した。培養条件を検討した後に解析を行った結果，calbindin，calretinin，parvalbumin，tyrosine hydroxylase，S100βなどの局在が培養スライス内で観察された。次いで培養スライス組織における酵素及びエストラジオール受容体の遺伝子発現を RT-PCR 法で解析し，生体脳の発現に比べ少ないものの上記 3 酵素の発現を確認した。注目すべきはエストラジオール受容体のより強い発現が認められたことである。現在，real time PCR とウエスタンブロットによる生体脳との発現の定量的比較，またステロイド代謝諸酵素に対する抗体を用いた局在について現在解析を行っている。今後，本共同研究によって確立した当実験系を用いて，各種ステロイド物質のスライス内投与によるニューロン・グリア構成及びステロイド代謝の発現と局在の変動を解析する計画である。

34. ラット精原細胞の長期培養，ならびに分化誘導後の顕微授精

保地 眞一，土屋 隆司（信州大学大学院・工学系研究科）
平林 真澄（生理学研究所・遺伝子改変動物作製室）

内在遺伝子を改変する手立てがないラットにおいて，精原細胞株を樹立して遺伝子改変し，体外で半数体にしてから顕微授精で産仔を得るという試みは困難を極めた。またマウスと比較すると，外来遺伝子の導入に利用できる手法にさえかなりの差がありそうである。本研究では，遺伝子溶液を注入したマウス精巣にエレクトロポレーションをかけるという外来遺伝子導入法がラットで機能するかどうかを調べるため，新生仔雄ラットの精巣にEGFP 遺伝子を打ち込んでエレクトロポレーションをかけ，生殖幹細胞ゲノムに直接 EGFP 遺伝子を導入することを試みた。EGFP 遺伝子溶液を半分以上の精細管に行き渡らせるよう注入できた精巣を対象にピンセット型電極で挟み，エレクトロポレーターによって静電パルス（35～50 V，50 msec，X 方向と Y 方向 各 4 回）を与えた。予備実験の結果から，新生仔雄ラットが 2～3 週齢に達してから, 1mg/ml 以上の濃度に調製した EGFP DNA を精巣網経由で加圧注入することが重要であるとわかった。DNA 注入から 6 週間後に EGFP の蛍光が認められた精巣をマイクロスライサーで切片にしたところ，その蛍光は精細管基底膜近傍から発せられており，精原細胞レベルで形質転換が起こっていたものと示唆された。しかし精細胞を単離・調製した後の蛍光精子細胞の比率は極めて低く(2.4%)，これらの細胞の顕微授精による産仔作出も外来遺伝子導入も確認できなかった。

35. エネルギー代謝調節における Dmbx-1 の役割の解明

三木　隆司（神戸大学大学院医学系研究科細胞分子医学）
箕越　靖彦（生理学研究所）

Dmbx-1 は脳に発現するホメオドメイン型転写因子であるが、その生理機能は全く不明である。これを明らかにする目的で，Dmbx-1 の遺伝子欠損(KO)マウスを作製したところ，KO マウスは著明な痩せと酸素消費量の亢進を認めた。そこで本研究では KO マウスで認められるエネルギー代謝制御異常のメカニズムを解明することを目的に解析を行った。

まず摂食量を測定したところ，KO マウスでは摂食量は有意に減少していた。一方，運動量は明期，暗期とも著明に増加していた。KO マウスと野生型マウスの視床下部での摂食関連ペプチドの発現をリアルタイム RT-PCR 法により解析したところ，摂食関連ペプチドの発現調節は正常であると考えられた。また，レプチンによる摂食抑制効果と視床下部弓状核における STAT3 リン酸化も保たれていた。一方，KO マウスと野生型マウスに orexigenic peptide である NPY 及び, AGRP を脳室内投与したところ，NPY の効果は正常であったが，AGRP による摂食促進作用は障害されていた。このことから，*Dmbx-1* 欠損マウスの痩せの原因としては AGRP の受容体であるメラノコルチン受容体，及びそのシグナル伝達機構に異常があると考えられた。事実，Dmbx-1 の発現部位を *in situ* ハイブリダイゼーション法により詳細に解析したところ, 胎児期(E15.5)では, 脳幹部に強い Dmbx-1 の発現が認められ，特に，メラノコルチンシグナルを受ける孤束核や傍腕核に強い発現が認められた。孤束核及び傍腕核における Dmbx-1 の発現は, E17.5 以降の胎仔や成体の脳では極端に減弱することから，Dmbx-1 はこれらの部位の神経分化に寄与し，その遺伝子破壊は，脳幹部における AGRP の作用低下を引き起し，摂食低下や多動を伴う極端な痩せをひき起こすと考えられる。

36. 多チャンネル筋電図のオンライン解析システムの構築

松村　道一，武井　智彦（京都大学大学院人間・環境学研究科）
伊佐　正，関　和彦（生理学研究所）

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

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

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

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

【 計画共同研究報告 】

計画共同研究報告

〔 目　　次 〕

１．容積感受性 Cl^-チャネルの候補蛋白質の機能解析（赤塚結子ほか）..... 150
２．バゾプレッシン-GFP ニューロンにおける浸透圧感受性メカニズムの解明（上田陽一ほか）..... 150
３．タンパク質チロシン脱リン酸化酵素 (PTP) による細胞容積感受性イオンチャネル活性化制御の解析
（新谷隆史ほか）..... 151
４．脂肪細胞の細胞容積・肥大化をモニターする分子機構の解析（河田照雄ほか）..... 151
５．痛み情報による脳内情動関連領野シナプス可塑性の分子機構の解明（加藤総夫）..... 152
６．神経終末部における PLC および電位センサーチャネルの役割とその発達変化に関する研究
（石橋仁ほか）..... 153
７．神経回路の発達・再編におけるバイオ Cl^-センサーとしての GABA/グリシン応答の解析研究
（福田敦夫ほか）..... 153
８．Ca^{2+}センサータンパク質 NCS-1 の興奮性細胞におけるサバイバル作用とその分子機構の解明
（西谷友重ほか）..... 154
９．視床下部の糖･エネルギー代謝感知メカニズムと交感神経系の役割の解明（片桐 秀樹ほか）..... 154
10．アディポネクチンの中枢・末梢作用に及ぼす AMP キナーゼ (AMPK) の調節機構と
その生理的意義に関する研究（門脇　　孝ほか）..... 155
11．メタボリックシンドローム病態における脂肪細胞－脳シグナル伝達破綻の分子メカニズム
（益崎　裕章ほか）..... 156
12．摂食調節に関わる生体分子センサーについての機能形態学的研究（塩田 清二ほか）..... 156
13．摂食調節系の分子メカニズムに関する生理学的研究（中里　雅光ほか）..... 157
14．CNR/プロトカドヘリンα遺伝子トランスジェニックマウスの作製と機能解析（八木 健ほか）..... 158
15．Pit-1 遺伝子を導入したトランスジェニックラットの作製（鈴木 敦詞ほか）..... 158
16．VSP（膜電位依存性蛋白）の鳥類における生理機能の解明（本間光一ほか）..... 159
17．ゲノム情報に基づく神経発生関連膜タンパク分子機能の解析（高橋　弘樹ほか）..... 160
18．膜電位センサー分子の動作原理解明とモジュール組換え（宮脇敦史ほか）..... 161
19．脊椎動物のイオンチャネル関連分子のアミノ酸配列推定と，そのタンパク質の機能解析
（斎藤成也ほか）..... 161
20．新規分子センサーを用いた，ゼブラフィッシュの発生過程および神経回路の解析（永井　健治ほか）..... 162
21．シリコンベース膜蛋白バイオセンサー製作のためのタンパク質発現・精製・集積技術開発
（宇理須恒雄ほか）..... 163
22．抹消温度受容器における温度検出機構の解析（水村和枝ほか）..... 163
23．ミツバチの社会性行動を担う新規温度受容センサーの生理機能の解析（門脇辰彦ほか）..... 164
24．感覚神経における侵害刺激センサーとしての TRPA1 の役割（野口光一ほか）..... 164
25．マウス網膜コリン作動性アマクリン細胞に発現するクロライドトランスポーター（金田　　誠ほか）..... 165
26．領域特異的転写因子の神経発生における役割について（竹林 浩秀ほか）..... 165
27．dominant negative ARK5 を骨格筋に特異的に発現するトランスジェニック・マウスの作成および解析
（箕越 靖彦ほか）..... 166

1. 容積感受性 Cl^-チャネルの候補蛋白質の機能解析

赤塚結子（三重大学大学院医学系研究科），清水貴浩，岡田泰伸

細胞外及び細胞内の浸透圧変化に対応して自らの容積を一定に保とうとする働きは，動物細胞が生命を維持する上で必要不可欠な機能であるが，最近ではこの容積調節の破綻が細胞死につながることが明らかとなっており，細胞がいかに自らの容積をセンスし対応するかという点に注目が集まっている。細胞が一旦膨張した状態から元の体積に戻る調節性容積減少 (regulatory volume decrease: RVD) の過程は，細胞内の蛋白質による情報伝達を介して，最終的には細胞内からの K^+と Cl^-流出が駆動力となって細胞内の水が細胞外に流出することによって達成される。特にこの場合の Cl^-の通り道であるチャネルは細胞の容積上昇を感知して開口するために容積感受性 Cl^-チャネル (VSOR) と名づけられているが，このチャネル分子の実体が不明であるため，RVD 分子のメカニズムにはわからない点も多い。

現在までに報告者は，VSOR の調節蛋白質として ATP-binding cassette (ABC) 蛋白質スーパーファミリーに属する ABCF2 を同定しているが，今回の共同研究によって，ABCF2 を大量発現させた HEK293T 細胞では VSOR 電流が著明に抑制されること，それに一致して RVD も著明にブロックされること，また siRNA で ABCF2 の発現を抑制すると RVD は亢進することが明らかになった。さらに，ABCF2 がアクチン結合蛋白質であるアクチニン-4 と結合すること，その結合には両者のアミノ末端側領域が必要であること，またアクチニン-4 を大量発現させた HEK293T 細胞では RVD が亢進し，siRNA でその発現を抑制すると RVD が抑制されることがわかった。つまり，ABCF2 は直接的であるか間接的であるかは不明であるが，VSOR を負に制御する調節因子であること，アクチニン-4 はその抑制を解除する方向に働くことが考えられた。この結果に基づき，ABCF2 結合蛋白質を検索し，VSOR の候補蛋白質の同定を試みている。

2. バゾプレッシン-GFP ニューロンにおける浸透圧感受性メカニズムの解明

上田陽一，藤原広明，横山　徹（産業医科大学・医学部）
斎藤　健（産業医科大学・医学研究科）

バゾプレッシンは視床下部室傍核および視索上核に局在する大細胞性神経分泌ニューロンで産生され，下垂体後葉に投射した軸索終末から血液中に分泌される。バゾプレッシン産生ニューロンには浸透圧感受性があり，血漿浸透圧の増加によってバゾプレッシン合成・分泌が促進される。我々は，バゾプレッシン産生ニューロンに特異的に GFP を発現するバゾプレッシン-GFP トランスジェニックラットを作製し，蛍光顕微鏡下で GFP 蛍光を指標に生細胞の状態でバゾプレッシンニューロンを容易に同定することを可能にした。本共同研究では，本トランスジェニックラットを用いて，バゾプレッシン産生ニューロンの浸透圧感受性についての詳細なメカニズムを解明することを目的としている。

我々は，これまで本ラットで 5 日間の高張食塩水飲水負荷により視床下部 GFP 遺伝子の発現が著明に増加することを明らかにした。今回，急性浸透圧刺激による視床下部 GFP 遺伝子の発現を c-*fos* 遺伝子発現と比較検討した結果，血漿浸透圧と GFP 遺伝子発現に c-*fos* 遺伝子発現ほどではないが有意な正の相関を認めた。さらに，本ラットの視索上核を含む脳スライス標本から急性単離したバゾプレッシン-GFP ニューロンを用い，細胞レベルでの浸透圧感受性を検討した。単離ニューロンは蛍光顕微鏡下で容易に同定することができ，ホールセルパッチクランプ法を用いた電気記録では，バゾプレッシン産生ニューロンに特徴的な間欠型放電パターンを記録することができた。現在，マンニトールを用いた高浸透圧刺激による変化を解析中である。また，視索上核大細胞性ニューロンへの入力における浸透圧感受性についてホールセルパッチクランプ法を用いて検討し，興奮性入力は高浸透圧刺激により有意に増加し，この反応は TRPV ブロ

ッカーであるルテニウムレッドによって抑制されることを見出した。また，抑制性入力は高浸透圧刺激によって影響を受けないが，数時間にわたり高浸透圧状態にあると低浸透圧刺激に対して有意な増加反応を示すことを見出した。今後，バゾプレッシンニューロンの浸透圧感受性に対する TRPV の関与，バゾプレッシンニューロンへのシナプス入力の浸透圧感受性において細胞内情報伝達系を含めた分子メカニズムについて検討する予定である。

3. タンパク質チロシン脱リン酸化酵素 (PTP) による細胞容積感受性イオンチャネル活性化制御の解析

新谷隆史，野田昌晴（自然科学研究機構　基礎生物学研究所）
高橋信之，岡田泰伸

低浸透圧刺激等による細胞容積の増大で活性化されるイオンチャネルの中で，マキシ陰イオンチャネルは，グリア細胞などに発現し，シグナル分子として作用するグルタミン酸や ATP の放出をもたらすことが知られている重要なイオンチャネルである。申請者らは，この低浸透圧刺激によるマキシ陰イオンチャネルの活性化が，受容体型タンパク質チロシン脱リン酸化酵素（受容体型 PTP)阻害剤の添加により抑制されることを見出した。そこで本申請共同研究では，細胞容積感受性イオンチャネル活性化制御における受容体型 PTP の関与を解明することを目的とする。

まずパッチクランプ法を用いた電気生理学的解析により，PTP 阻害剤の作用についての詳細な検討を行い，PTP 阻害剤の中で，vanadate，dephostatin，bromtetramisole および チロシン脱リン酸化酵素阻害剤カクテルが，マキシ陰イオンチャネルの低浸透圧刺激による活性化を阻害することが明らかとなった。

次に，野田らが作製した受容体型 PTP である PTP-zeta (ζ) ノックアウトマウスから線維芽細胞を調製して電気生理学的に検討したところ，野生型の細胞と比べて，マキシ陰イオンチャネルの低浸透圧刺激による活性化が有意に抑制されていることが判明した。

以上の結果は，マキシ陰イオンチャネルの低浸透圧刺激による活性化に，PTP が重要であること，特に受容体型 PTP である PTPζが関与している可能性が高いことを示唆する。今後，PTPζノックアウト繊維芽細胞に，PTPζ発現ベクターを導入する回復実験などを行い，より詳細なマキシ陰イオンチャネル活性化機構を解析する予定である。

4. 脂肪細胞の細胞容積・肥大化をモニターする分子機構の解析

河田照雄，楠堂達也，後藤　剛，向井佐輝子，浅野　亘（京都大学大学院農学研究科）
岡田泰伸，高橋信之，井上　華

脂肪細胞は，脂肪を貯めることにより，その容積を約 1～2 万倍まで肥大化し，可逆的に維持しうる能力を備えている。この脂肪細胞の肥大化は，肥満と密接に関連しており，さらに糖尿病や高血圧といった生活習慣病を引き起こす主要因である。そこで本研究では，脂肪細胞が，自身でその発達度合いをどのようにモニターしているのか，その形態形成・容積維持・肥大化制御を行っているかを解明することを目的とする。

本共同研究で同定を試みる容積センサーは，成熟した脂肪細胞に特異的に発現していることが予想される。そこで，まず DNA マイクロアレイ法によりマウス脂肪組織におけるイオンチャネルの発現解析を行った。その結果，機械刺激によっても活性化されることが報告されている非選択性陽イオンチャネル TRPV2 が，成熟脂肪細胞に特異的に発現していることが明らかとなった。そこでまず容積センサーの候補分子として，TRPV2 に着目する

こととした。

分化した脂肪細胞での TRPV2 の機能解析を行うため，TRPV2 を過剰発現させた小型脂肪細胞モデル 3T3-L1 細胞を樹立した。この細胞に，TRPV2 アゴニストである 2-APB を添加すると，Fura-2 によるカルシウムイメージング法により細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が観察された。さらに，TRPV2 過剰発現細胞を用いてパッチクランプ実験を行ったところ，2-APB によりカルシウムイオン電流が観察された。

次に，TRPV2 の過剰発現が，3T3-L1 細胞の脂肪細胞への分化にどのような影響を与えるかを検討するため，上記の TRPV2 過剰発現 3T3-L1 細胞に分化誘導処理を行い，分化誘導後に，各種分化マーカー遺伝子の発現定量などの脂肪細胞分化の評価を行った。その結果，TRPV2 過剰発現細胞では，複数の分化マーカー遺伝子の発現が有意に低下していた。また細胞質中の中性脂肪 (TG) の蓄積は，TRPV2 過剰発現細胞で有意に抑制されていた。これら脂肪細胞の分化マーカー遺伝子の誘導や TG 蓄積に関与することが知られている核内転写因子の発現も，TRPV2 の過剰発現により低下していた。以上の結果から，3T3-L1 脂肪細胞分化に対して，TRPV2 の過剰発現は抑制的に作用し，またその作用点は分化誘導・促進を担う核内転写因子の発現誘導よりも上流である可能性が考えられた。

5. 痛み情報による脳内情動関連領野シナプス可塑性の分子機構の解明

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）

痛みの本質は不快な「情動的体験」であり，慢性痛の臨床医学的問題の核心は，原発症状消退後も持続するその苦痛や不快感，不安などの情動的側面にある。痛みの情動成分の成立に関与する神経回路として, Bernard らは脊髄後角浅層疼痛特異的ニューロンから上行し逆側脚傍核外側部 (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 spino-limbic pathway を同定した。CeLC は「nociceptive amygdala」とも呼ばれその 78% のニューロンが侵害刺激によって興奮する。脊髄神経結紮神経因性疼痛モデルを作成し，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，CeLC におけるシナプス伝達が allodynia 成立の強度に依存して増強される事実を見出し, 今年度報告した (Ikeda et al., Pain, 127: 161-172, 2007)。

このシナプス増強の形成機構の解明を目的として研究を進めた。CeLC 興奮性シナプスの微細形態を神経因性疼痛成立側と非成立側の比較検討のうえ解析した。細胞体近傍の非対称シナプスには，神経因性疼痛成立側と非成立側の間に著明な差が認められなかった。今後 PB 由来の軸索の終末を同定して比較する必要がある。

一方，上記の電気生理学的実験で用いたスライス標本における PB-CeLC 上行路の CeLC 近傍での走行の順行性蛍光標識による同定を試みた。固定脳組織の PB に DiI 結晶を装着し 8 週後, 厚さ 400μm の切片を作成したところ，CeA 内側部に CeA に投射する神経束が観察され，刺激電極設置位置と一致していることが確認された。

さらに, 神経因性疼痛モデル動物から CeA を含む脳ブロックを摘出し，digoxigenin 標識した RNA プローブ（GluR1 および GluR2 に対する sense および antisense)を用いて in situ hybridization を行ったところ, GluR1 遺伝子の発現がシナプス伝達増強が生じている側の CeLC において対側よりも増加している所見が得られた。

以上より, 神経因性疼痛動物の PB-CeLC シナプスにおける機能的な伝達効率の変化は受容体発現レベルを含むシナプスの局所的かつ微細な変化によって生じている可能性が示された。

6. 神経終末部における PLC および電位センサーチャネルの役割とその発達変化に関する研究

石橋仁（九州大学医学研究院）
桂林秀太郎（崇城大学薬学部）
賀数康弘（九州大学医学研究院）
鍋倉淳一（生理学研究所）

シナプスはシナプス前神経終末部，シナプス後細胞およびグリア細胞に囲まれており，シナプス周囲の細胞外スペースはそれほど広くない。シナプス伝達，特に高頻度のシナプス伝達の場合には，シナプス前神経終末部への Ca^{2+} 流入に加え，シナプス後細胞に Ca^{2+} が流入すると，シナプス周囲の細胞外 Ca^{2+} 濃度は急速に低下する。従って，細胞外からの Ca^{2+} 流入に依存せずに，脱分極自体により神経終末部内で Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 放出が起こる現象は，シナプス伝達とその修飾に重要な役割をしていると考えられる。本共同研究の目的は，神経終末部の脱分極が PLC の活性化を介して神経伝達物質放出を増強するメカニズムを完全に解明し，さらにその生理学的な意義を明らかにすることにある。実験にはラット脊髄後角または海馬 CA3 領域より機械的処理のみによって急性単離した神経細胞を用い，パッチクランプ法を適用することによって自発性抑制性シナプス後電流 (IPSC) を記録した。GABA またはグリシン作動性 IPSC を指標にして，実験を行った。細胞外 Ca^{2+}-free 条件下，高 K^+ 溶液 (30mM) により神経終末部の脱分極刺激を行うと，自発性 IPSC の頻度が著明に増加した。この IPSC の頻度増加は, 高 K^+ 溶液を洗浄した後約 10 分でコントロールのレベルに戻った。一方，細胞外の Na^+ を除去した条件下では, 高 K^+ 溶液自体の IPSC 頻度増加作用に変化はないものの，洗浄後の回復がほとんど認められなかった。細胞外 Na^+ は Na^+/Ca^{2+} 交換体を介した Ca^{2+} 排出に重要であることから，細胞外に Ca^{2+} がなくても，高 K^+ 刺激により細胞内 Ca^{2+} 放出が起こっていることが示唆された。実際，膜透過性の Ca^{2+} キレート剤である BAPTA-AM により，高 K^+ 刺激の応答が抑制された。高 K^+ による神経終末部の脱分極によって，神経終末部内の Ca^{2+} 貯蔵部位から Ca^{2+} 放出が起こること，この機序に PLC の活性化が重要であることが明らかになった。

7. 神経回路の発達・再編におけるバイオ Cl^-センサーとしての GABA/グリシン応答の解析研究

福田敦夫，熊田竜郎，古川智範（浜松医科大学）
鍋倉淳一，渡部美穂（生理学研究所）

発達および障害後の回路再編における Cl^-トランスポーターの関与を証明するため，以下の研究を行った。

ラットの限局性皮質形成異常モデルでは，poly microgyria 類似の微小脳回形成過程の移動細胞において，取込型 Cl^-トランスポーターNKCC1 の増加と排出型 KCC2 の減少による細胞内 Cl^- 濃度 ($[Cl^-]_i$) 上昇，その結果としての GABA の抑制から興奮への変化が見られた。これらの変化は一種の脱分化で，5-6 層の細胞は発生が早いため脱分化できず，脱分化できた皮質板細胞のみが lesion 部位に移動して微小脳回を形成したと考えられた。また，難治てんかん患者の摘出 cortical dysplasia 組織周囲の小型神経細胞では KCC2 が有意に減少しており，てんかん焦点における Cl^-ホメオスタシスの異常による GABA の興奮性作用あるいは抑制作用の減弱が示唆された。paracrine 的に放出された GABA が脳の発達に重要であると考えられているが, 内因性に大量に存在し $GABA_A$ 受容体のアゴニストにもなり得るタウリンの影響は考慮されていなかった。そこで我々は母体のタウリン合成

能を阻害したモデルを作成した。妊娠 14 日目に脳室帯の新生神経細胞特異的に HcRed 遺伝子を導入した。その結果，タウリンが GABA 以上に $GABA_A$ 受容体の内因性アゴニストとして作用し，cortical plate における radial 細胞移動の stop signal として働いている可能性を見出した。

8. Ca^{2+}センサータンパク質 NCS-1 の興奮性細胞におけるサバイバル作用とその分子機構の解明

西谷友重，若林繁夫（国立循環器病センター研究所）
鍋倉淳一（生理学研究所）

NCS-1 (Neuronal Ca2+ sensor -1) は，主に神経や心臓に発現している Ca^{2+}結合タンパク質で，もともと神経のシナプス伝達に関わる因子として知られていた。私達は最近，“NCS-1 が障害を受けた神経細胞においてその発現量が増加するサバイバル因子として働く”という全く新しい重要機能を見出した。そこで本研究では，1) NCS-1 の神経細胞死抑制作用ならびに細胞機能回復作用を in vitro および in vivo 両方の系で確定すると共に，2) その詳細な作用機構を解明し，各種神経変性疾患における病態的意義を明らかにすることを目的とした。

1. 神経切断や各種ストレス下の神経細胞において，NCS-1 の発現量が増加する。

2. その生理的意義はサバイバル促進作用。

3. NCS-1 は，サバイバル作用をもつ神経栄養因子 GDNF の下流に存在し，PI3K/Akt の経路を活性化することにより，そのサバイバル作用を仲介する。

4. 神経切断時においても神経が死滅しないのは内因性の抗アポトーシス機構によるものであるが，それに NCS-1 が重要な役割を果たしている。

これらの発見は，NCS-1 の全く新しい生理機能およびその分子機構を示したものであり，種々の神経変性疾患克服への応用が期待される。また，NCS-1 は未成熟心筋にも高発現していることから，現在，心筋細胞における生理機能について検討中である。

9. 視床下部の糖･エネルギー代謝感知メカニズムと交感神経系の役割の解明

片桐　秀樹（東北大学大学院医学系研究科再生治療開発分野）
石垣　泰（東北大学病院糖尿病代謝科）
山田　哲也（東北大学病院糖尿病代謝科）
箕越　靖彦

生活習慣病の基礎疾患である肥満症患者の爆発的増加が社会問題となっている。肥満症は，摂取エネルギーと消費エネルギーの差の増加によって発症するが，日々の食事量や活動量の変動がそのまま直接に体重の変化に反映されることはない。エネルギー摂取臓器，エネルギー貯蔵臓器, エネルギー消費臓器が密接に連携を取り合い，情報を共有することによって体重の恒常性を維持しているからである。本研究では，糖・脂質代謝の変化を視床下部がどのように感知し，求心性神経，交感神経によってどう調節しているかを明らかにすることを目的に研究を行った。さらに，その破綻と考えられる肥満･糖尿病やメタボリックシンドロームの発症機序の解明および治療法開発につなげることを目的とした。

肥満・糖尿病・高脂血症のマウスモデルを用い，アデノウィルスを用いた後天的遺伝子導入の手法等による，エネルギー代謝調節における末梢組織と中枢との情報のやりとりについて検討した。その結果，脂肪組織からの求心性神経シグナルが食欲の調節に関与していること，肝臓からの求心性神経シグナルがエネルギー代謝情報を中枢に伝え，交感神経遠心路の活動の変化を介して全身

のエネルギー代謝の調節が行われていることを見出した。また，末梢組織における脂肪の取り込みを抑えることで，中枢におけるエネルギー摂取や消費が変化すること，さらに，交感神経遠心路の活性化が，脂肪組織におけるアディポサイトカインの一つアディポネクチンの発現に影響を与えることを見出した。これらから，ホルモン因子と自律神経シグナルは互いに協調して全身の代謝を調節し，さらに，中枢神経系がその統御を行う仕組みが示唆される。現在，中枢神経系の局所への遺伝子導入や破壊・切断等の手技を用いて，検討を進めている。上記，末梢組織での代謝変化誘導の手法を組み合わせて，これらの末梢組織からの代謝情報を中枢が受け取りプロセスしていく機構につき，生理学研究所生殖・内分泌発達機構研究部門　箕越靖彦教授の研究室との共同研究をさらに発展させていきたいと考えている。

10. アディポネクチンの中枢・末梢作用に及ぼす AMP キナーゼ (AMPK) の調節機構とその生理的意義に関する研究

門脇　　孝（東京大学大学院医学系研究科糖尿病代謝内科）
窪田　直人（東京大学大学院医学系研究科糖尿病代謝内科）
窪田　哲也（東京大学大学院医学系研究科糖尿病代謝内科）
伊藤　晋介（東京大学大学院医学系研究科糖尿病代謝内科）
箕越　靖彦

アディポネクチンは，レプチンとともに脂肪細胞から分泌されるアディポカインである。レプチンは中枢では生体内エネルギーセンサーである視床下部で AMPK 活性を低下させることにより摂食を抑制し，末梢では骨格筋における AMPK 活性を上昇させ脂肪酸酸化を促進させる。一方アディポネクチンも肝臓，骨格筋において AMPK 活性を上昇させ脂肪酸酸化を促進し，インスリン感受性ホルモンとして作用することが明らかとなっているが，中枢におけるその役割はまだ不明である。そこで本研究では，アディポネクチンが視床下部においてどのような調節作用を営んでいるかを調べた。

我々は，まずはじめに，視床下部におけるアディポネクチン受容体の発現を調べた。2 つのアディポネクチン受容体，AdipoR1/AdipoR2 はいずれも視床下部において発現が認められ，その程度は肝臓での発現量に匹敵した。さらに，AdipoR1/AdipoR2 の発現はいずれもレプチン受容体が強発現している視床下部の特に弓状核の部分に強く認められた。次に我々は髄液中にアディポネクチンが存在するかどうかについて調べた。髄液中のアディポネクチン濃度は血中の約 1/5000 程度存在した。また，血清と髄液のアディポネクチンの分画について検討したところ，血清では高分子量が多く検出されたが，髄液では高分子量はわずかで，主に中分子量が多く検出され，中枢では主に中分子量のアディポネクチンが作用すると考えられた。さらに摂食とアディポネクチンの関連について検討したところ，血中のアディポネクチン濃度と視床下部における AdipoR1 の発現は絶食時に上昇し，逆に摂食後低下することが明らかとなった。これに対して AdipoR2 の発現は絶食，摂食後で有意な変化は認められなかった。次に外来性にアディポネクチンを脳室内に投与した。その結果，摂食後に低下した視床下部の AMPK 活性が，アディポネクチン投与により，絶食時とほぼ同程度まで上昇することを見出した。また，AMPK 活性と一致して，摂食量も増加した。以上のことより，アディポネクチンは中枢，特に視床下部において摂食さらには個体のエネルギー調節に重要な役割を果す可能性が示唆される。これらの結果は，現在，論文に投稿中である。

11. メタボリックシンドローム病態における脂肪細胞 －脳シグナル伝達破綻の分子メカニズム

益崎　裕章（京都大学大学院医学系研究科内科学講座内分泌代謝内科）
田中　智洋（京都大学大学院医学系研究科内科学講座内分泌代謝内科）
箕越　靖彦

レプチンは視床下部・交感神経系を介して骨格筋 AMP キナーゼを活性化し，糖脂質代謝を亢進する。我々は最近，高脂肪食性肥満の病態においてはレプチンによる骨格筋 AMP キナーゼ活性化が減弱することを示しメタボリックシンドローム治療におけるレプチン抵抗性解除の重要性を明らかにした (Tanaka T et al. Diabetes 54:2365, 2005)。本研究ではレプチン抵抗性の分子メカニズムを探索し，骨格筋糖脂質代謝調節における中枢メラノコルチン系の意義を明らかにする目的で，種々のモデル動物に対するメラノコルチン受容体アゴニスト，アンタゴニストの中枢投与を行い，骨格筋 AMPK，下流の acetyl CoA carboxylase (ACC) のリン酸化を検討した。

マウス脳室内カニューラ，皮下カニューラを留置・馴化させ，カニューラより以下に述べる薬剤を脳室内投与（一日 2 回，5 日間)し，皮下カニューラからの過剰量抱水クロラール投与にて麻酔後，骨格筋のサンプリングを実施した。この方法は実験上の様々なストレスや飼育環境によって容易に変動する骨格筋 AMP キナーゼ活性を極めて安定的かつ再現性をもって評価することが出来る方法であり，生理学研究所の箕越靖彦教授の御指導によって確立した。骨格筋 AMP キナーゼ活性化の評価には，リン酸化 AMP キナーゼ抗体，AMP キナーゼの直下流に位置する ACC（アセチル CoA カルボキシラーゼ)リン酸化抗体，サムスペプチドを用いた酵素活性の測定と骨格筋中性脂質含量測定を利用した。

マウスの脳室内にメラノコルチン受容体アゴニスト (MT-II) を投与すると，骨格筋 AMPK および ACC のリン酸化が顕著に亢進した。レプチンによる骨格筋 AMPK および ACC のリン酸化の増加は，メラノコルチン受容体アンタゴニスト (SHU9119) の脳室内共投与，あるいは内因性メラノコルチン拮抗物質，agouti 蛋白を視床下部で異所性に高発現する遺伝性肥満 KKAy マウスにおいて明らかに減弱した。これらの実験により，骨格筋 AMPK の活性化の減弱がレプチン抵抗性の程度とよく相関すること，さらに，メラノコルチンアゴニストが先天的，後天的に誘導されたレプチン抵抗性の状態にも効果を発揮することが明らかとなった。以上の実験結果は，現在，論文に投稿中である。

12. 摂食調節に関わる生体分子センサーについての機能形態学的研究

塩田 清二（昭和大学医学部第 1 解剖学教室）
舟橋 久幸（昭和大学医学部第 1 解剖学教室）
影山 晴秋（昭和大学医学部第 1 解剖学教室）
竹ノ谷 文子（星薬科大学薬学部体育学研究室）
箕越　靖彦

摂食調節や生体のエネルギーの恒常性を司るのが視床下部の化学受容ニューロンであり，栄養状態で変動する血中グルコース，遊離脂肪酸やホルモンなどの末梢からの情報をこのニューロンは感知している。しかしオレキシン，ガラニン様ペプチド (GALP) やグレリンなどの新規 G タンパク質共役型レセプター (GPCR) リガンドの発見により，摂食調節研究は大きな転換点を迎えている。そこで摂食行動を結ぶ神経機構を機能形態学的に解析することを目的として研究を行った。

満腹中枢として機能する視床下部腹内側核 (VMH) にはグルコース受容ニューロンが存在することが知られているが，どのような神経ペプチドを産生するニューロン

であるかは未だ不明である。外側視床下部にあるオレキシン含有ニューロンの軸索が VMH に豊富にあることから，VMH ニューロンのマーカーである SF-1 転写因子と 2 重免疫染色を行い，オレキシンニューロンと VMH ニューロンとの神経相関をしらべた。オレキシン免疫陽性ニューロンの軸索は VMH および第 3 脳室周囲部に分布していた。また SF-1 免疫陽性細胞は VMH に限局して存在していることを確認した。オレキシン免疫陽性ニューロンの軸索は SF-1 免疫陽性ニューロンへ投射していた。その投射は VMH 内側よりも外側で多く観察された。この結果から，オレキシンは VMH を介して，摂食調節を行っていることが示唆された。今後はこの投射が生理学的にどのような意義を持っているのかを検討して行く予定である。

GALP は摂食調節ペプチドとして知られているが，我々や他の研究グループの報告によりエネルギー代謝を亢進することが明らかとなってきた。しかしながら，末梢組織でのエネルギー代謝調節は不明である。そこで GALP を脳室内投与した時の末梢組織でのグルコース取り込み量を 2-デオキシグルコース (2-DG) の取り込み量で測定した。その結果，GALP 投与で骨格筋の腓腹筋，ヒラメ筋，長指伸筋で 2-DG の取り込み量を有意に増大させたが，褐色脂肪組織や白色脂肪組織など他の組織では有意な変化はなかった。これらの結果から，GALP は骨格筋のグルコースの取り込みを増大させることが明らかとなったので，今後中枢から骨格筋でのエネルギー代謝の情報経路を神経解剖学的さらには組織レベルで検討して行く予定である。

13. 摂食調節系の分子メカニズムに関する生理学的研究

中里　雅光（宮崎大学医学部内科学講座神経呼吸内分泌代謝学分野）
山口　秀樹（宮崎大学医学部内科学講座神経呼吸内分泌代謝学分野）
上野　浩晶（宮崎大学医学部内科学講座神経呼吸内分泌代謝学分野）
伊達　　紫（宮崎大学フロンティア科学実験総合センター）
十枝内　厚次（宮崎大学医学部内科学講座神経呼吸内分泌代謝学分野）
箕越　靖彦

摂食とエネルギー代謝調節は，中枢と末梢で産生される物質の複雑な相互関係により，巧妙に調節されている。視床下部は，エネルギー代謝調節の中枢として機能しており，どのような分子が働いているかを明らかにすることは中枢性代謝調節を理解する上で，重要である。われわれは，新規摂食調節物質の探索を行い，グレリン，神経ペプチド W，ニューロメジン U，アスビオシンなどの新規ペプチドを発見するとともに，消化管で産生される摂食調節ペプチドの多くが，迷走神経求心路を介して，末梢情報を中枢に伝達することを明らかにしてきた。本研究は，脳幹の孤束核に伝達された末梢情報がどのように視床下部に伝達されるか，また視床下部における神経間の分子情報伝達機構を明らかにすることで，摂食調節系の分子機構を解明することを目的とした。

われわれはグレリン，コレシストキニン，ペプチド YY の摂食調節シグナルが迷走神経を介して，視床下部に伝達されることを明らかにしてきた。本年度は，さらに末梢におけるインスリンの変動が肝臓によって受容され，迷走神経を介して，中枢に伝達されることを明らかにした。また，本研究において末梢におけるグレリンの摂食亢進作用は，孤束核でノルアドレナリン神経を活性化し，投射先である視床下部弓状核のノルアドレナリンα1 もしくはβ2 受容体を介して摂食亢進に機能することを見出した。さらに，視床下部において，中枢での生理作用が不明であった脱アシル化グレリンが，摂食亢進に機能し，グレリンシステムは総合的に摂食亢進に作用していることを見出した。また，加齢に伴い内因性のグレリン分泌は減少するが，グレリン投与による摂食亢進作用は，世代に関係なく維持されており，グレリン補充が生体機能維持に有効であることを明らかにした。これらグレリンの摂食亢進機序に加えて，中枢投与において摂食抑制に機能する神経ペプチド W も胃で産生されており，絶食による分泌抑制と再摂食による分泌亢進を見出した。現在，末梢で唯一摂食亢進に機能するグレリンを摂食亢進

シグナルのバイオマーカーとして利用することを検討している。これらの実験結果は，末梢と中枢で複雑なネットワークを形成している摂食調節機構の解明に貢献すると考えている。

14. CNR/プロトカドヘリンα遺伝子トランスジェニックマウスの作製と機能解析

八木 健，平林 敬浩，金子 涼輔（大阪大学大学院・生命機能研究科）
平林 真澄（生理学研究所・遺伝子改変動物作製室）

クラスター型プロトカドヘリン分子群である CNR (Cadherin-related neuronal receptor) /プロトカドヘリンαファミリーはマウスでは 14 分子種が存在しており，いずれの分子種も主に中枢神経で発現が認められている。その遺伝子構造は各分子種ごとに異なる多様化したエクソンが縦列した可変領域と共通にスプライシングされる 3 つのエクソンからなる共通領域で構成され，各 CNR/Pcdhα 分子種はひとつの可変領域エクソンと共通領域エクソンがスプライシングされ発現している。各分子種の発現様式を単一プルキンエ細胞レベルで解析した結果，一つのプルキンエ細胞では CNR/Pcdhαは複数の分子種を発現し，その分子種の組み合わせは個々のプルキンエ細胞ごとに異なっていた。また，発現している各分子種について染色体由来を調べると，片方の染色体のみに由来するものが多数であったことから，同分子群はニューロンの個性（多様性)を担う分子であることが予想される。

本研究では CNR/Pcdhα分子群の中で最も発現量が多く，単一プルキンエ細胞での発現解析においてほぼ全ての細胞において発現していた CNR c2 アイソフォームに着目し，種々のトランスジェニックマウス作製を行った。

まず，同分子の発現様式を詳細に解析することを目的とし，CNR c2 プロモータの制御下で蛍光タンパク質 EGFP を発現する外来遺伝子を導入した Tg マウスを作製した。この Tg マウスを組織学的に解析したところプルキンエ細胞の他に，嗅球，海馬など CNR/Pcdhα分子群が発現している組織において蛍光が観察された。また，この Tg マウスの脳から採取した神経細胞を EGFP の蛍光を指標にセルソーターで分取し CNR/Pcdhα分子群を発現している細胞のみを単離することを試みている。さらに動物個体での分子機能解析を行うために CNR c2 アイソフォームを Cre 酵素の発現によりコンディショナルに過剰発現する Tg マウスを作製した。現在，この Tg マウスについて神経回路形成における異常などの組織学的解析を進めている。

15. Pit-1 遺伝子を導入したトランスジェニックラットの作製

鈴木 敦詞，安田 啓子，関口 佐保子（藤田保健衛生大学・内分泌代謝内科）
長尾 静子（藤田保健衛生大学・疾患モデル教育研究センター）
平林 真澄（生理学研究所・遺伝子改変動物作製室）

老化に伴う変化では骨組織より軟部組織へのカルシウムの移行がその一因と想定されている。細胞外基質石灰化の中核をなす基質小胞でのリン酸取り込みを担う細胞膜Ⅲ型 Na 依存性リン酸輸送担体 Pit-1 遺伝子を過剰発現するトランスジェニック (Pit-1/Tg) ラットを共同研究にて作製したが，この Pit-1/Tg ラットは腎臓での糸球体障害を惹起し，生後 8 週目頃より巣状の糸球体障害が明らかとなり，低アルブミン血症，蛋白尿，高脂血症というネフローゼ症候群パターンを示した。この Pit-1 の過剰発現によるネフローゼ症候群の発症には腎糸球体での上皮細胞に対する細胞外リンによる負荷が関与することが想定されたため，経時的にその変化を検討するとともに，in vivo で骨代謝マーカー，カルシウム・リン代謝について検討した。糸球体の変化は，出生直後から糸球体成熟時期に至る時期から基底膜の肥厚がはじまり，最終的には上皮細胞足突起構造の消失に至った。終末期には糸球

体の一部では半月体形成も認められ，腎硬化症を示唆する所見であった。In vivo での Pit-1Tg における血清リン濃度の上昇は TmP/GFR の上昇をともない，この変化は糸球体での変化よりも，近位尿細管血管腔側での Pit-1 活性の上昇を反映すると考えられた。また雌 Pit-1 Tg ラットでは軽度の低カルシウム血症に起因する副甲状腺機能亢進症が認められたが，ビタミン D 濃度に関しては何ら影響を認めなかった。新規リン利尿因子である fibroblast growth factor 23 (FGF23) は血清リン濃度と負の相関を示し，FGF23 が少なくとも近位尿細管血管腔側のリン輸送の制御に関して，主な調節因子である可能性は低いと考えられた。

16. VSP（膜電位依存性蛋白）の鳥類における生理機能の解明

本間光一，山下真二（帝京大学）
黒川竜紀

【目的】本研究課題では，鳥類（ニワトリ）の胚発生および脳機能における VSP の役割を生化学的，生理学的に解析することにより，その生理機能を明らかにすることを目的とする。具体的には，1. VSP の胚発生時と孵化後における遺伝子発現の変動と組織局在。2. 胚発生時における VSP 遺伝子の過剰発現系と遺伝子抑圧系を用いた必要性の証明。3. 孵化直後に見られる学習記憶（親子関係の刻印付け）における遺伝子発現変化。4. VSP による細胞内情報伝達メカニズムの生化学的，生理学的解析。の以上 4 点について明らかにしてゆく。

【途中経過】電位センサー蛋白 VSP は最初ホヤのゲノムから同定されたが，脊索動物に幅広く存在し，各動物種での分子機能，生理機能を解析することにより，膜電位シグナル伝達における VSP の役割が解明できると期待される。脊椎動物の中でニワトリは，初期発生の解析が進んでいるとともに，刷り込みなどの動物行動の優れた実験系である。神経系での VSP の役割を理解するため，トリ VSP の cDNA を同定し，発現実験によりその分子機能を同定するとともに，ニワトリ神経系での VSP の遺伝子発現を調べた。

その結果，トリ VSP（以下 Gg-VSP）は，tsA201 細胞においてゲート電流を発現し，電位感知機能があることが明らかになった。さらに Gg-VSP の細胞内ドメインを GST 融合蛋白として大腸菌に合成させ，マラカイトグリーンアッセイによりイノシトールリン脂質の脱リン酸化能を調べたところ，Ci-VSP やゼブラフィッシュ VSP と同様な基質特異性を示した。これらのことから，基本的に Gg-VSP は Ci-VSP とほぼ同様な分子機能を有すると考えられた。さらに，神経系での遺伝子発現を in situ hybridization 法により検討した結果，大脳皮質の大きめの細胞と小脳プルキンエ細胞に発現が認められた。とくに小脳プルキンエ細胞での発現は，キメラ状のパターンを示し，活動依存的な発現により誘導される可能性が示唆された。さらに，蛋白レベルでの発現様式を明らかにするため，Gg-VSP の細胞内領域と GST の融合蛋白を抗原として用いてウサギに免疫し，ポリクローナル抗体を作成した。これを用いて発現様式を解析したところ，プルキンエ細胞での著明な発現が検出された。大脳皮質での発現は明確ではなかった。

これらの結果から，トリの神経系では VSP は小脳機能と関連していることが示唆された。今後，アフィニティー精製した抗体を用いて上記の知見を確認するとともに，培養細胞などの系を用いてプルキンエ細胞での VSP の役割を明らかにする実験を行う予定である。

17. ゲノム情報に基づく神経発生関連膜タンパク分子機能の解析

高橋　弘樹，山田　成宏，堀田　耕司，小笠原　道生，岡戸　晴生，
西野　敦雄，木下　典行，稲葉　一男，岡村　康司

神経発生過程における細胞間相互作用には生物種間で高度に保存された膜タンパク群の分子機能が重要である。しかし，これら膜タンパク質群の分子機能は遺伝子の点と点の繋がりとしては解明されているがダイナミックな時系列としての理解には程遠い。本研究では，近年ゲノム情報が整備されるとともに単一細胞レベルでの個体発生が記述された原索動物ホヤ胚やEST情報が整備されたアフリカツメガエル胚を用い，神経発生関連膜タンパク質とくに Notch シグナルや膜電位センサー分子のダイナミックな分子機能を個体まるごとのシステムで時系列的に解析を進めることを目的とした。

1) **神経形成における脊索の役割**

脊索動物の発生過程において，脊索は体軸伸長において働くのみならず，神経誘導や神経管形成過程においても重要な役割を果たしていると考えられているが，その分子メカニズムについては明らかにされていない点が多い。これまでに, 我々はホヤの Ci-fibrn (Ci-Fibrinogen-like) の mRNA は脊索細胞のみに特異的に発現することを脊索動物で初めて明らかにしている。興味深いことに Ci-fibrn タンパク質の局在を Ci-fibrn 抗体と GFP 融合タンパク質を用いて調べたところ，脊索細胞および脊索細胞外の表皮感覚細胞および中枢神経細胞に沿った繊維状の構造に局在することが明らかになった（図 1)。

2) **神経-脊索相互作用を担う膜タンパク質**

ショウジョウバエの Scabrous は遺伝学的な解析から Notch と相互作用することが示唆されている。そこで, Notch と Scabrou のホモログである Ci-fibrn の関係を解析すると, Notch シグナルによって Ci-fibrn タンパク質の局在そのものが変化することが明らかになった。また，培養細胞を用いた免疫沈降実験から Notch の細胞外ドメインと Ci-fibrn の C 末端部分が結合することが示された。さらに, Notch シグナルを阻害すると同時に Ci-fibrn の変異体を発現させると幼生期では，頭部において神経細胞の分化異常，尾部において神経軸索の走行異常が観察された。このことから，Ci-Notch と Ci-fibrn は，神経細胞分化・形成において協調的に働いていることが示唆されており，機能解析を進めている。

発表論文

Hotta,K., Yamada,S., Ueno, N., Satoh, N. & Takahashi, H. *Brachyury*-downstream notochord genes and convergent extension in *Ciona intestinalis* embryos. *Dev. Growth Differ.* **49**, in press (2007).

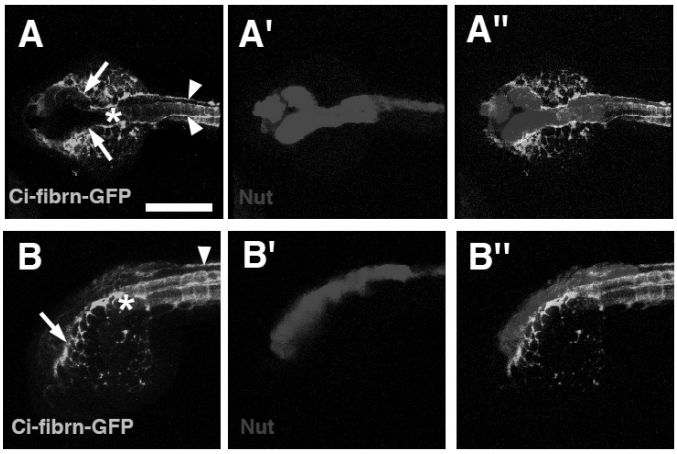


図 1. カタユウレイボヤの幼生期における Ci-fibrn の局在 **(A)**頭部脊側から見た Ci-fibrn　の局在　**(B)** 頭部側面から見た Ci-fibrn　の局在。CNS マーカーである Ci-Nut:RFP との二重染色像。＊: 脊索の最前位 矢印：頭部脊側の Ci-fibrn の発現　矢尻：尾部脊側の Ci-fibrn の発現

18. 膜電位センサー分子の動作原理解明とモジュール組換え

宮脇敦史，筒井秀和，水野秀明，片山博幸，村田喜理

電位センサーはポア領域と並んで電位依存性チャネルの重要なモジュール構造であり，3 次元結晶構造が解かれたことを契機に，ここ数年分子動作原理を巡って熱い論争が続いている。最近尾索類のゲノム情報から電位依存性チャネルの電位センサーモジュールと酵素モジュールを合わせもつ新規分子が同定され，電位センサータンパクの動作原理の解明とそれに基づく応用のための新しい材料が提供された。本研究では新規電位センサー蛋白において膜電位変化による分子内情報伝達機構を明らかにするとともに，モジュールの変異導入や他の分子との組換えにより新規機能の創成を目指した。

電位センサー蛋白 VSP と VSOP の膜貫通ドメインを蛍光タンパクに融合させたコンストラクトを数種類作成し，発現系細胞に発現させ，フォトマルチプライヤーを用いて膜電位依存的な蛍光強度の変化が生じるかを検討した。数種類の例で, 蛍光強度の変化を検出することができた。電位センサードメインにさまざまな変異を導入し，時間分解能を上げるとともに，蛍光強度の変化が生じる膜電位範囲を生理的な範囲（-60mV から+20mV)にシフトさせることを行った。

また，PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) は，膜貫通ドメインを含まないが，VSP の細胞内領域と高い相同性を示す。VSP における膜電位依存的な酵素活性の制御機構を明らかにする試みとして，PTEN に VSP の電位センサーを融合させ，酵素活性を膜電位依存的に制御できるかを検討しようとしている。そのための準備として，PTEN の活性中心のアミノ酸配列を VSP 型に変更し，PtdIns(4,5)P2 を基質とする脱リン酸化能を生じさせる実験を試みた。Alanine を Glycine に変更した PTEN を GST 融合蛋白として大腸菌に合成させ，マラカイトグリーンアッセイを行ったところ，PTEN 本来の基質である PtdIns(3,4,5)P3 だけでなく，PtdIns(4,5)P2 も脱リン酸化されることを見出した。今後 VSP の膜貫通ドメインとの融合蛋白を作成し，ツメガエル卵母細胞の発現系を用いて VSP-PTEN キメラから膜電位依存的な酵素活性が検出されるかどうかを検討する予定である。

19. 脊椎動物のイオンチャネル関連分子のアミノ酸配列推定と，そのタンパク質の機能解析

斎藤成也，隅山健太，増山和花，西野敦雄

【目的】バイオインフォマティクスの手法を用いて VSP などのイオンチャネル関連分子について脊椎動物祖先型分子を推定し，その機能を発現実験により解析するとともに，脊椎動物の進化過程での機能改変のためゲノム的動態を明らかにする。

【結果】

(1) 系統樹解析

電位センサー蛋白 VSP は，脊索動物に幅広く存在し，昨年度の系統樹解析により哺乳類において進化速度が速いことを見出した。今年度は哺乳類と鳥類の中間であるオポッサムおよび棘皮動物であるウニの VSP の遺伝情報を用いて系統樹を作成し直すともに，酵素ドメインの機能解析を行った。その結果，動物進化の系統樹と同様にオポッサム VSP は哺乳類と鳥類の VSP の間に位置し，前回得られた哺乳類で進化速度が速いという知見を支持した（図参照)。また，ウニ VSP はもっとも基部に位置し, 脊索動物の VSP の起源に関連が深いことが推察された。

(2) 生化学実験による酵素活性の比較

マウス VSP の細胞内領域と GST の融合蛋白を蛋白精製し，マラカイトグリーンアッセイ法によって，基質特異性を調べた。マウス VSP は PtdIns(4,5)P2 を脱リン酸化することを見出し，Ci-VSP，ゼブラフィッシュ VSP と同様な酵素特性を示すことが明らかになった。更に，Xenopus VSP についても同様な解析を行い，他の VSP と同様に PtdIns(4,5)P2 を脱リン酸化する活性があることを

明らかにした。これら VSP が共通に PtdIns(4,5)P2 を脱リン酸化する原因を明らかにするため，VSP と相同であるが PtdIns(4,5)P2 を脱リン酸化できない PTEN とのアミノ酸配列の比較を行ったところ，活性中心のアラニンが VSP では共通にグリシンになっていることに気づいた。このグリシンをアラニンに変更すると，PtdIns(4,5)P2 への酵素活性が失われることが，マラカイトグリーンアッセイおよび TLC (Thin layer chromatography) による解析で，明らかになった。

(3) ウニ VSP の分子特性を明らかにするため，発現系細胞を用いて電気生理学的計測を行った。tsA201 細胞ではゲート電流は見られなかったが，ツメガエル卵母細胞においては OFF 電流が計測された。GIRK2 を用いて電位依存性 PtdIns(4,5)P2 酵素活性を調べたところ，弱いながら，電位感受性が検出された。いまのところ，発現量に問題があると考えられるので，Ci-VSP と同程度の電位感受性があるか否かは明確ではないが，哺乳類以外の VSP はウニからトリまで電位感知機能が備わっていると考えられ，哺乳類で生理機能が特殊化された可能性が示唆された。今後入手が困難であることが予想されるが，オポッサムの VSP の cDNA を用いて電位センサー機能を解析したい。

以上のことから，（ウニについてはまだこれからであるが）動物種を超えて VSP の酵素特性は共通であること，哺乳類においては遺伝子配列の進化速度が加速していること，電位センサー特性は動物種によって大きく異なることから，VSP は進化の過程で電位感知機能は変えたものの酵素活性の特性は変化させず，進化の過程で共通の細胞内シグナルを媒介することになったと考えられる。

20. 新規分子センサーを用いた，ゼブラフィッシュの発生過程および神経回路の解析

永井　健治（北海道大学電子科学研究所・教授，提案代表者）
東島　眞一（自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター）

提案代表者らは，遺伝学的にコードされたカルシウムインディケーターである cameleon を従来より高感度にチューンすることに成功している。本研究では，その新世代 cameleon である YC3.6 および YC2.6 を，イメージングに適した生物ゼブラフィッシュに適用して，神経発生過程におけるカルシウムシグナルの役割を調べることを目的とした。まず，カルシウムへのアフィニティが低い方の YC3.60 を，体全体で発現を促すプロモーターであるリーク型の hsp70b プロモーターのもとにつないだコンストラクトによりトランスジェニックフィッシュを作製した。アフィニティが低い方をまず用いた理由は，シグナルが得られるならば，そちらの方がよりカルシウムの濃度変化のタイムコースを忠実にモニターしてくれることが期待されたためである。得られたトランスジェニック胚を用い，1 日胚でみられる自発的神経活動（1 秒に 1 度ほどの頻度で，体全体を一方向へ屈曲させる自発的運動）に伴うカルシウムシグナルが得られるかどうか検討したところ，期待するようなシグナルは得られなかった。カルシウムへの感受性が低い方のインディケーターを用いたのがネガティブな結果の原因であると考え，感受性が高い方のインディケーターYC2.60 を用い，hsp70b プロモーターによるトランスジェニックフィッシュを作製した。現在，このトランスジェニックフィッシュを用いてカルシウムイメージングをおこなっている段階である。

21. シリコンベース膜蛋白バイオセンサー製作のための タンパク質発現・精製・集積技術開発

宇理須恒雄，手老龍吾（分子科学研究所）
小中信典（徳島大学工学部）
富永真琴（生理学研究所・岡崎統合バイオサイエンスセンター）

分子科学・材料科学分野のシリコン表面ナノ制御技術およびアレイ構造形成技術と生命科学分野の膜タンパク発現・精製技術とを融合し，新たにシリコン基板上への膜タンパク/脂質二重膜の集積技術を開発するとともに，これを発展させて，シリコン電子集積回路と統合した，新規バイオ分子センサーを開発することを目的とする。さらに，単一チャンネル単一イオン計測など新たな膜タンパク電気生理特性の新規計測法や，ゲノム創薬用大規模スクリーニング応用素子の開発基盤を確立する。絶縁特性が良い事で知られている SOI (Si on Insulator) 構造のシリコン基板をもちい，これにさらに酸化膜を形成することで，テフロン並の低雑音基板を実現できることを理論的示し，実際に，グラミシジン/DϕPC の系でテフロン基板なみの低雑音で単一イオンチャンネル電流の観測に成功した。世界にも例の無い，体内（脳内）埋め込みやマイクロ流体回路埋め込みを目指した超小型プレーナー型パッチクランプバイオセンサーの製作を目指して，開発を進めた。厚さ 600μm の SOI 基板に直径 1μm 前後の微細貫通孔を形成する技術を開発した。収束イオンビームによる方法とプラヅマエッチングによる方法の二通りを開発したが，今のところ，収束イオンビーム法のほうがシール抵抗で良好な結果が得られている。ついで，この微細貫通孔に HEK293 細胞を設置し，ホールセルモードを形成した後，カプサイシン刺激によるチャンネル電流の観測に成功した。

22. 抹消温度受容器における温度検出機構の解析

水村和枝，片野坂公明，矢島弘毅，申正樹（名古屋大学環境医学研究所）
富永真琴（生理学研究所・岡崎統合バイオサイエンスセンター）

現在までに明らかになっている 9 つの温度感受性 TRP チャネルのうち 5 つは体温近傍の温かい温度で活性化する。このうち，TRPV3，TRPV4 は表皮ケラチノサイトに強く発現することが知られている。TRPV3，TRPV4 は温度情報を電気信号に変換する温度センサーとして機能するが，温度感覚が感覚神経から中枢に伝達されて初めて生じることは，ケラチノサイトで感知された温度情報が何らかの形で感覚神経に伝達されることを示唆する。これまでの形態学的な研究から，ケラチノサイトと感覚神経の間にはシナプスのような構造は存在しないことが知られている。新生仔マウスの表皮ケラチノサイトと後根神経節細胞の共培養系を確立した。ケラチノサイトは Ca^{2+}要求性が小さく，Ca^{2+}を必要とする感覚神経細胞との共培養は困難をきわめたが，最適条件を見いだした。その共培養の細胞に温度刺激を加えて，細胞内 Ca^{2+}濃度の変化を観察した。放出される物質が洗い流されないようにチェンバー溶液の流れを止めて，チェンバー自身を加熱した。40 度までの温度刺激によって両細胞で細胞内 Ca^{2+}濃度増加が観察された。しかし，ケラチノサイトに比べて神経細胞で細胞内 Ca^{2+}濃度増加の遅れがみられ，平均して 1.2 秒の遅れであった。この遅れは，ケラチノサイトから感覚神経細胞に情報が伝達されるという仮説を支持する結果である。ケラチノサイトからは種々の刺激に応じて ATP を放出することが知られている。そこで，ATP 受容体阻害剤である PPADS (100 mM) もしくは suramin (100 mM) で前処理したところ，感覚神経細胞での細胞内 Ca^{2+}濃度増加のみが特異的に阻害された。この結果から，温度刺激によってケラチノサイトから ATP が放出されて感覚神経に発現する ATP 受容体に作用することが強く示唆された。

23. ミツバチの社会性行動を担う新規温度受容センサーの生理機能の解析

門脇辰彦，辻内誠也（名古屋大学大学院生命農学研究科）
富永真琴（生理学研究所・岡崎統合バイオサイエンスセンター）

2003 年に侵害性冷刺激受容体として遺伝子クローニングされた TRPA1 は，その後複数の侵害刺激（わさび，マスタードオイル，シナモンなど）によって活性化される侵害刺激受容の中心的分子として注目されている。TRPA ファミリーと TRPM ファミリーに属するミツバチ TRP チャネル 6 つをクローニングして哺乳類 expression vector に入れたコンストラクトを作成した。その 6 つのミツバチ TRP チャネルを HEK293 細胞に強制発現させて，Ca^{2+}イメージング法を用いて温度感受性を検討した。ミツバチの体温はそれほど高くないので，HEK293 細胞は 33 度で培養した。事実，37 度で培養した時には温度刺激による反応がみられなかった TRP チャネルが 33 度で培養すると温度刺激に対して大きな反応がみられることがあった。検討した 6 つの TRP チャネルのうち TRPA ファミリーに属する 1 つのチャネルを発現させた HEK293 細胞に置いて 40 度までの温度刺激に対して細胞内 Ca^{2+}濃度の増加が認められた。

ミツバチ TRP チャネルの温度応答性の陽性コントロールとしてショウジョウバエで熱刺激感受性を欠失した変異体の原因遺伝子 painless を強制発現させた HEK296 細胞を用いた。Painless 遺伝子を導入した HEK293 細胞は Ca^{2+}イメージング法において熱刺激に対して細胞内 Ca^{2+}濃度の大きな増加が観察され，パッチクランプ法でも熱活性化電流が観察された。

24. 感覚神経における侵害刺激センサーとしての TRPA1 の役割

野口光一，戴毅（兵庫医科大学医学部）
富永真琴（生理学研究所・岡崎統合バイオサイエンスセンター）

2003 年に侵害性冷刺激受容体として遺伝子クローニングされた TRPA1 は，その後複数の侵害刺激（わさび，マスタードオイル，シナモンなど)によって活性化される侵害刺激受容の中心的分子として注目されている。抗 TRPA1 ポリクローナル抗体を作成して，Western blotting 法によって TRPA1 蛋白質を認識することを確認した。ラット後根神経節をその抗 TRPA1 抗体を用いて染色し，陽性細胞が小径の細胞であること，陽性細胞が有髄神経のマーカーである NF200 の抗体で染色されないこと，TRPV1 陽性細胞での TRPA1 陽性率が高いこと，炎症に関連する PAR2 受容体陽性細胞とも重なりが大きいことを明らかにした。PAR2 受容体の特異的刺激剤によって TRPA1 活性が増強することが TRPA1 を強制発現させた HEK293 細胞，ラット後根神経節細胞でパッチクランプ法を用いた解析によって明らかになった。この TRPA1 機能増強には PIP_2 量の減少が関与していることが示唆された。

25. マウス網膜コリン作動性アマクリン細胞に発現する クロライドトランスポーター

金田　　誠（慶應義塾大学医学部）
霜田　幸雄（東京女子医科大学総合研究所）
鍋倉　淳一（生理学研究所）

コリン作動性アマクリン細胞には複数の Cl トランスポーター (K-Cl and Na-K-Cl cotransporters) が存在し，その樹状突起上の分布がトランスポーターごとに異なることが網膜神経節細胞の方向選択性の形成に関係しているのではないかとの仮説が提唱されている。しかしながらコリン作動性アマクリン細胞に実際どのような C1 トランスポーターが存在し，またその局在がどうなっているのかという点について，形態学的にまったく明らかにされていなかった。そこで本共同研究ではコリン作動性アマクリン細胞に存在する Cl トランスポーターを免疫組織化学的手法を用いて形態学的に同定し，その樹状突起上の分布を明らかにすることを目的として実験を行った。KCC2 の分布を共焦点顕微鏡を用いて検討した。

KCC2 抗体に対する免疫反応は内顆粒層，内網状層，神経節細胞層で陽性であった。特に内網状層で陽性反応が最も強く，GFP でラベルされたコリン作動性アマクリン細胞の樹状突起との重なりが観察された。また，内顆粒層と神経節細胞層では細胞体表面で免疫反応陽性像が観察された。以上の結果から，マウス網膜内網状層ではコリン作動性アマクリン細胞樹状突起上に KCC2 が存在する可能性が示唆された。コリン作動性アマクリン細胞樹状突起が保存されているフラットマウント標本を用いて，共焦点顕微鏡を用いて GFP と KCC2 の共存をもとに樹状突起上の分布を検討することにした。しかしながらフラットマウント標本ではコリン作動性アマクリン細胞樹状突起同士の重なりが激しく，GFP 陽性像をもとにした一本の樹状突起の同定は困難であった。そこで GFP 陽性像をもとに同定した単一コリン作動性アマクリン細胞に biocytin を注入して再染色し，共焦点顕微鏡を用いて biocytin と KCC2 の免疫反応の重なりを形態学的に同定し，コリン作動性アマクリン細胞樹状突起上の KCC2 の分布の観察を予定している。

26. 領域特異的転写因子の神経発生における役割について

竹林 浩秀，池中 一裕（生理学研究所　分子神経生理研究部門）
冨田 江一，平林 真澄（生理学研究所　遺伝子改変動物作製室）

胎仔期中枢神経系では，特定の転写因子のセットが領域特異的に発現することにより神経幹細胞に位置情報を与える。そして，特定の領域より特定の細胞種が産生される。我々が同定した basic helix-loop-helix 型の転写因子 Olig2，Olig3 の神経発生における機能と，これらの転写因子を発現する細胞の細胞系譜について，詳細に解析するために Olig2-Cre ノックインマウスおよび Olig3-lacZ ノックインマウスの作製を試みた。それぞれの組換え ES 細胞を 8 細胞期の ICR マウス胚に注入したのち，仮親マウスに移植してキメラマウスを作製した。今回使用した組換え ES 細胞からは，比較的低いキメラ率のマウスが生まれた（毛色から推測すると，高いものでも 40%程度の ES 細胞寄与率であった）。これらのうち一匹の Olig3-lacZ キメラマウスから，ES 細胞由来のマウスが生まれ，Germ Line Transmission を確認することができた。

現在，Olig3-lacZ ヘテロマウス同士の交配により，ノックアウトマウスを作製することを試みている。また，Olig2-Cre キメラマウスの交配を継続して行い，Germ Line Transmission が起こるかどうか経過観察中である。

27. dominant negative ARK5 を骨格筋に特異的に発現するトランスジェニック・マウスの作成および解析

箕越 靖彦，岡本 士毅，鈴木 敦，志内 哲也，李 順姫
（生理学研究所生殖・内分泌発達機構研究部門）
冨田 江一，平林 真澄
（生理学研究所　遺伝子改変動物作製室）

生体のエネルギー代謝を制御する AMPK (AMP-activated protein kinase) には，現在複数の関連因子が単離・報告されている。ARK5 は，AMPK の触媒体サブユニットファミリーに属する因子であり，現在までに悪性腫瘍での特異的発現や腫瘍細胞の生存・浸潤・転移活性誘導が報告されている腫瘍悪性化関連因子である。その発現は広く悪性腫瘍に認められるが，脳・骨格筋・心臓等，幾つかの非腫瘍組織でも認められる。また最近我々は，肥満動物の脂肪組織において ARK5 が新規に発現誘導されていることを見いだした。培養細胞を用いた研究から，骨格筋細胞において ARK5 は糖取込みを促進し，脂肪細胞ではインスリン感受性にも関与することを見出した。このように ARK5 は，腫瘍悪性化に加えメタボリック・シンドロームへの関与が考えられる。この可能性をより確かなものにするためには，遺伝子改変動物を使用した研究が非常に有効である。

そこで本研究では，組織特異的プロモーター（骨格筋：human skeletal muscle actin；脂肪細胞：AP2)を用い，マウス骨格筋または脂肪細胞に dominant negative (DN)-ARK5 を発現させ，糖・脂質代謝にどのような影響を及ぼすかを調べることを目的として共同研究を進めている。我々は，ARK5 の制御領域欠損した触媒体領域のみかつ活性中心となるスレオニン残基のアラニン変換変異体が dominant negative (DN) として機能することを見いだしているので，これを DN-ARK5 として用いた。

ごく最近，行動・代謝分子解析センター，遺伝子改変動物作製室において骨格筋特異的発現 DN-ARK5 トランスジェニック (Tg) マウス（F0 世代)の作成が完了したので，今後 Tg マウス・ラインの確立を行った後，インスリン感受性や糖･脂質代謝の変化を解析する予定である。

【磁気共鳴装置
共同利用実験報告】

磁気共鳴装置共同利用実験報告

〔　目　　次　〕

１．呼吸困難感の中枢情報処理機構の解明
（越久　仁敬ほか）..... 170
２．単語復唱時の脳賦活研究
（萩原裕子ほか）..... 170
３．視覚障害者脳の身体像形成に関与する視覚野での運動感覚情報処理様式の研究
（内藤栄一）..... 171
４．磁気共鳴画像装置による脳賦活検査を用いたヒトの情動とストレス脆弱性に関する研究
（飯高哲也）..... 172
５．機能的磁気共鳴画像法を用いた脳における時間順序判断メカニズムの解明
（高橋　俊光ほか）..... 172
６．人での立体視機能，並列情報処理過程の解明
（宇賀　貴紀ほか）..... 173
７．マカクザル及びコモンマーモセットの MRI テンプレートの作成と PET 研究への応用
（渡辺　恭良ほか）..... 173
８．非侵襲的脳機能検査による疲労・疲労感と学習意欲の評価法
（渡辺恭良ほか）..... 174
９．磁気共鳴画像診断用新規造影剤の開発
（阪原晴海ほか）..... 175
10．非侵襲的脳機能画像法を用いた向精神薬服用時の高次脳機能研究
（尾崎紀夫）..... 176
11．顔認識における視覚情報統合メカニズムの解明
（伊丸岡　俊秀）..... 177

1. 呼吸困難感の中枢情報処理機構の解明

越久　仁敬（兵庫医科大学生理学第一講座）
岡田　泰昌（慶應義塾大学月ヶ瀬リハビリテーションセンター内科）
定藤　規弘（生理学研究所大脳皮質機能研究系心理生理学研究部門）

呼吸困難感は呼吸器疾患における最も一般的な臨床症状であり，様々な情動反応を引き起こすと考えられている。その中枢情報処理機構の局在や情報処理過程は，これまで脳波解析と PET で主に検討されてきたが，測定方法や時間・空間解像度に問題があり，未だ解明されていない。我々は，fMRI を用いた呼吸困難感の中枢情報処理機構の解明を目指している。

本実験では，当初，同一プロトコールで空間解像能に優れる fMRI と時間解像能に優れる脳波解析を引き続いて行い，脳血流変化部位と電気活動部位の比較検討によって情報処理過程の解明を目指すことを計画した。健常被検者に対して，2 種類の呼吸抵抗負荷（粘性および弾性抵抗負荷)を周期的に与えながら fMRI を行う。非負荷時と負荷時の fMRI を比較検討して脳血流変化部位を同定する。同一被検者に，同一プロトコールの呼吸抵抗負荷試験を行い, その時の脳波変化を多チャンネル計測し, 起電部位を推定する。得られた結果に対して，活性化部位が 1) 粘性抵抗負荷と弾性抵抗負荷で異なるか，2) fMRI と脳波解析で異なるかを検討する, というものであった。ところが検討の結果，この方法では呼吸抵抗負荷に伴う換気努力，すなわち呼吸筋活動の増加に伴う運動野などの活性化が情動反応に重畳されるという問題点があることが判明した。そこで，呼吸抵抗負荷時の呼吸困難感を，換気量を変化させることなしに増減させ，fMRI 信号の差分を計測することを考えた。吸息時に吸気筋である上部肋間筋を振動させ，呼息時に呼気筋である下部肋間筋を振動させる同相胸壁振動刺激は，換気量を変化させることなく呼吸困難感を軽減させ，逆相胸壁振動刺激は呼吸困難感を増加させることが知られている。そこで，胸壁振動刺激を与えながら fMRI を行い，同相胸壁振動刺激時と逆相胸壁振動刺激時の fMRI 信号の差分をとることにより，大脳皮質運動野あるいは脳幹呼吸中枢から生じる呼吸運動指令 (respiratory motor command) に関連する脳領域を除去し，純粋に呼吸困難感に関与する脳領域を分離抽出することに計画変更した。

本年度は，兵庫医大における予備実験において，同相胸壁振動刺激が粘性および弾性呼吸抵抗負荷時の呼吸困難感を軽減させることを確認した。また，fMRI 測定室内で使用できる非金属製の胸壁振動装置を開発した。本実験は次年度に予定している。

2. 単語復唱時の脳賦活研究

萩原裕子（首都大学東京大学院）
尾島司郎（科学技術振興機構）
定藤規弘（生理学研究所）

人間は，他人の発した言葉や言語音を聞いて，同じことを繰り返して言う, すなわち, 復唱をする能力を持つ。復唱行動は，幼児が最初の単語を発話する頃には既に発現しており，それ以降も子供は頻繁に周囲の発言を復唱することから，母語獲得における復唱の役割の解明が待たれる。

また，外国語学習においても，モデルスピーカーの発音を復唱することは，現代社会で広く行われている学習方法の一つであり，復唱に関わる脳内メカニズムの解明は，脳科学の社会的貢献という意味からも，重要な課題である。

しかし，MRI 内で被験者が復唱を行うと口の動きによるノイズが発生するため，MRI による復唱実験は技術的に容易ではない。我々は，MRI によるこの研究課題を始める前に，ニューロイメージング手法の中では比較的被験者の動きに強いとされる光トポグラフィーを用いた研

究を行っている。

成人を対象にした光トポ実験では，被験者が知っている単語（学習済み)と知らない単語（学習前)を復唱するときには，知らない単語のほうが，脳活動が有意に低下（活動抑制)する領域があることを見出した。この傾向は，母語にも外国語にも見られる。また，小学生を対象にした大規模な実験でも，成人と同様な結果が見られ，復唱に関わる脳内メカニズムが成人と子供で共通しているという仮説が支持されている。

今回の MRI の研究では，これまでの光トポの研究を発展させ，復唱による脳活動領域の正確な同定を目指す。光トポは，頭皮に配置された光ファイバーの位置でのトポグラフィーが分かるだけで，頭の内部のトモグラフィーは得られない。MRI を行うことで，光トポでは見えない脳領域の膨大なデータが得られることが期待される。

2006 年度は，口の動きによるノイズを考慮した MRI 実験パラダイムの開発に費やした。このパラダイムは光トポのパラダイムと重要な点で共通性を持ちつつ，ノイズの影響をなるべく抑えるものでなければならない。また光トポと MRI では，データ解析方法が異なるので，この点も考慮したパラダイムにする必要がある。来年度はこのパラダイムをさらに修正し，本格的な実験に入る予定である。

3. 視覚障害者脳の身体像形成に関与する視覚野での運動感覚情報処理様式の研究

内藤栄一（独立行政法人情報通信研究機構＆ATR 脳情報研究所）

研究代表者は，四肢の腱への振動刺激によって惹起される四肢の運動錯覚経験に関与する脳活動の研究を行ってきた (Naito 2004a,b; Naito et al.1999,2002a,b, 2005; Naito&Ehrsson 2001,2006)。この錯覚は振動刺激が興奮させる筋紡錘からの求心性 Ia 線維入力によって惹起され，四肢の動きを伴わずに被験者は明瞭な四肢運動を経験する。

まず，閉眼健常者 19 名で右手，左手，右足，左足の運動錯覚に関連する脳活動を測定した。運動錯覚中には錯覚を経験している体部位に対応した運動領野（反対側 1 次運動野，運動前野，補足運動野および帯状回運動皮質尾側部，同側小脳)の活動が見られた。これに加えて，四肢の相違に無関係で，四肢共通に補足運動野吻側部，右半球前頭-頭頂葉および右大脳基底核に脳活動が認められた。特に補足運動野および帯状回運動皮質などの内側面運動野吻側部には，四肢特有領域，両手領域，反対側四肢領域および四肢共通領域が尾側から吻側の順に配列していることがわかった (Naito et al. 2007)。

また，健常者が手の運動錯覚を経験している最中に，実際には動いていない手をみると，運動錯覚が減弱することがわかっている。これは運動感覚に対する視覚の優位性として知られている。この現象を利用して脳がどのようにこの視覚優位性を計算するかを検証した。その結果，上頭頂葉後部領域の活動が視覚の優位性に関与していることがわかった。さらに，この活動の度合いは視覚の運動感覚に対する優位性（＝視覚によってどの程度運動錯覚が減弱するかの度合い)と正の相関を示し，視覚の優位性が上頭頂葉後部領域で計算されていることを強く示唆した (Hagura et al. 2007)。

これらの知見は，視覚障害者が運動感覚情報処理を行う際に観察されるであろう脳活動を理解するための基礎となる。

引用文献

Naito E, Nakashima T, Kito T, Aramaki Y, Okada T and Sadato N (2007) Human limb-specific and non limb-specific brain representations during kinesthetic illusory movements of the upper and lower extremities. *European Journal of Neuroscience* **25**: 3476-3487.

Hagura N, Takei T, Hirose S, Aramaki Y, Matsumura M, Sadato N and Naito E (2007) Activity in posterior parietal cortex mediates the visual dominance over kinesthesia. *Journal of Neuroscience* **27**: 7047-7053.

4. 磁気共鳴画像装置による脳賦活検査を用いたヒトの情動とストレス脆弱性に関する研究

飯高哲也（名古屋大学　大学院医学系研究科）

従来の研究から，ストレスに関わる脳活動として扁桃体と前頭葉の相互作用が重要であることが分かっている。本年度の研究では，顔刺激と不快な音声刺激を同時に呈示することで被験者に情動的なストレスを与える fMRI 実験を行った。この実験では，最初に被験者に対して 2 種類の顔刺激（CS+と CS-)を呈示した。次いで CS+に対しては不快な音声刺激を同時に呈示し，CS-には音声刺激を加えなかった。これにより CS+に対する嫌悪条件付けが可能であることは，予備実験における皮膚電気反応により確かめられている。この一連の課題遂行中に，fMRI を用いて全脳をカバーして脳賦活検査を行った。現在までに 20 名の被験者の実験が終了している。予備的なデータ解析では，CS+に対する扁桃体の反応は実験の初期に強く次第に低下して行くことが分かった。反対に背外側前頭前野の活動は時間に関わらず一定であった。扁桃体の活動は顔と不快な音声刺激を結びつけることで，脳内にネガティブな情動的変化を形成する可塑的な過程を表している可能性がある。今後はさらに被験者数を増やしてグループ解析を行う予定である。

次に海外の研究室との共同研究で，顔認知に関わる扁桃体の活動や，衝動性に関わる前頭葉の活動が人種や文化によって影響を受けるかどうかについて検討した。これは米国 Northwestern 大学心理学講座の Joan Chiao 博士との共同実験である。ここでは怒り・恐怖などの表情を認知している時の脳活動を fMRI を用いて計測した。また Go/NoGo 課題では, 運動反応を抑制するときの脳活動を測定した。前者では主に扁桃体の賦活が，後者では主に右前頭前野の活動が測定できる。このような脳活動はそれぞれストレス脆弱性や衝動制御などに関係していると考えられている。現在までに 12 名の日本人を生理研で, 7 名の北米在住日本人を Northwestern 大学でそれぞれ実験した。現在は 2 群間のグループ比較を行っているところである。

最後に性格傾向と脳活動との関連を fMRI を用いて検証した。この課題では各被験者において個人主義の性格傾向に関する質問紙を行った。この結果に基づいて，自己の性格傾向を判断する課題を行っているときの脳活動を比較した。その結果前頭葉内側部と個人主義の性格傾向との関係が有意であった。この結果は現在投稿準備中である。

5. 機能的磁気共鳴画像法を用いた脳における時間順序判断メカニズムの解明

高橋　俊光（順天堂大学・医学部）
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・感覚機能系障害研究部）
定藤　規弘（心理生理学研究部門）
北澤　茂（順天堂大学・医学部）

脳のニューロン間の信号の伝達には時間がかかり，しかも多数のループがあるので，信号の前後関係は逆転しやすい。しかし，信号の順序の誤りは生存を脅かす可能性があるから，脳の中には，時間を安定に表現するための何らかの原理が隠されているはずだ。脳の中の時間情報処理の基本原理に迫ることが本研究の目標である。

我々はこれまでに，右手と左手に加えた刺激の時間順序を判断する課題において，腕を交差すると主観的な時間順序が逆転するという錯覚を発見した。その結果を説明するために，2 つの事象の時間順序は，空間内の 2 つの事象としての情報と，事象の情報を含まない動きの情報に一度分離され，その後統合されて再構成される，という時間順序判断の「動き投影仮説」を提案した。本研究では機能的磁気共鳴画像法を用いて，この仮説の検証を試みた。本年度は主に昨年度までに得られたデータの解析を行った。

時間順序判断に固有の脳内活動部位を検出するには，時間順序判断課題と同一の刺激と反応を用いて行う別種の対照課題が必要である。我々は，非磁性の点字刺激装置を使って左右の手指に与える刺激点数を変え，その点数の大小を判断する課題を対照課題とした。時間順序を判断する際に点数の大小を判断する時よりも有意に強く活動した部位は，左大脳半球の中下前頭回 (BA6, BA44-47)，および中側頭回 (BA21) であった ($p<0.001$)。BA6 には手中心の空間座標系が，BA44,45 は体中心座標系が表現されていると報告されている。また，BA21 の活動領域は動きの視覚野の MT/V5 に隣接している。従ってこれらの領域の活動は，時間順序判断に空間座標系と動きの情報が寄与することを示唆しており，前述の「動き投影仮説」と矛盾しない。

6. 人での立体視機能，並列情報処理過程の解明

宇賀　貴紀（順天堂大学医学部）
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）
定藤　規弘（生理学研究所大脳皮質機能研究系）

立体視とは両眼視差，すなわち物体が両眼に落とす網膜像の位置のズレから生じる奥行き知覚のことである。サル大脳皮質視覚野では，背側視覚経路（空間視経路）で絶対視差（1 つの物体の注視点に対する両眼視差)の情報処理が，腹側視覚経路（物体視経路)で相対視差（2 つの物体の絶対視差の差)の情報処理が行われていると考えられている。本研究では，これらサルでの知見を基に，ヒトでも絶対視差・相対視差情報の並列処理が行われているのか，それぞれの情報処理がどの脳部位で行われているのかを検証する。

本研究では，ヒトが絶対視差・相対視差それぞれを弁別している最中に，fMRI を撮影し，絶対視差・相対視差に特異的な脳の賦活が見られるかを検討する。さらに，脳内磁気刺激を用いて特定部位の脳活動を一時的に休止させると，絶対視差・相対視差に特異的な情報処理過程の欠落が見られるかを検討する。絶対視差検出課題では，被験者はテレビ画面に呈示される 1 つの物体が注視点の手前にあるのか，奥にあるのかを答える。相対視差検出課題では，被験者は 2 つの物体のどちらが手前にあり，どちらが奥にあるのか，その相対関係を答える。サルの知見では，大脳皮質 MT 野は絶対視差の検出をしているのに対し，V4 野は相対視差の検出をしていることが示されている。もし人でも同様であれば，絶対視差検出課題では MT 野が，相対視差検出課題では V4 野が賦活されると予想される。さらに，MT 野の脳活動を一時的に休止させた場合には絶対視差検出課題の成績のみが低下し，V4 の脳活動を一時的に休止させた場合には総体視差検出課題の成績のみが低下すると予想される。本年度は刺激提示，および解析プログラムの作成を完了させた。今後は予備実験を施行後，本実験に移る予定である。

7. マカクザル及びコモンマーモセットの MRI テンプレートの作成と PET 研究への応用

渡辺　恭良，水間　広，水野　敬（大阪市立大学大学院医学研究科）
尾上　浩隆（東京都医学研究機構）
横山ちひろ（京都府立医科大学）
宮下英三（東京工業大学）
伊佐　正，豊田　浩士（生理学研究所）

これまでに我々は，マカクサル（アカゲサル）に陽電子断層撮像法(positron emission tomography, PET)を用い

た非侵襲的な脳機能イメージング法を適用して，視覚認知，時間知覚，記憶・学習などの脳高次機能に関わる神経機構について明らかにしてきた。小型の霊長類であるマーモセットには，ヒトの社会適応不全の動物モデルとして，小家族の集合体という社会構造の類似性，効率的な繁殖サイクルなど，マカクサルにはない霊長類動物モデルとしての特徴を持つ。また，非侵襲的に生体内分子動態を観察する分子イメージング技術は，遺伝/環境―機能分子―脳内回路―行動連関を解くために有用な技術である。しかし，これまでにマーモセットを用いた行動評価系に基づく分子イメージング研究は実現されていない。今回，MRI を用いて，マーモセットの頭部画像の撮像を行った。これまでのマカクサルにおける撮像条件を基本に，ヒト用のヘッドコイル，サル用に特注されたサーフェースコイルを用いた撮像を行った。撮像は，十分なシグナルの強度が得られなかったことから，50cc のコーニング社製遠心管に水を満たしたものを頭部横に置き行った。約 5 分の撮像を 4 回行い，加算平均した。しかし，得られた画像の解像度は低く，皮質下構造を同定するまでには至らなかった。このことから，マーモセットの撮像には，専用のサーフェースコイルの開発が必要と考えられ，現在，設計を開始している。

8. 非侵襲的脳機能検査による疲労・疲労感と学習意欲の評価法

渡辺恭良（大阪市立大学・大学院・医学研究科・システム神経科学）
水野敬（大阪市立大学・大学院・医学研究科・システム神経科学）
田中雅彰（大阪市立大学・大学院・医学研究科・システム神経科学）
定藤規弘（岡崎生理研大脳皮質機能研究系心理生理学研究部門）
田邊宏樹（岡崎生理研大脳皮質機能研究系心理生理学研究部門）

学習意欲の脳神経メカニズムを解明するため，機能的磁気共鳴画像法 (fMRI) を用いて意欲賦活時の脳血流反応の変化を検討した。大学生 14 名（22.4 ± 1.2 歳)を対象に，ワーキングメモリ課題（n-back テスト)を施行させた。n-back テストは，n 個前に呈示された数字と，今，呈示された数字が同じかどうかを判断するテストである。課題遂行中に，正解するとポイントが加算される金銭的報酬セッションと，「課題の正解率が被験者の知能レベルを示す」といったインストラクションによる成績的報酬セッションを設け，それぞれのセッション時のパフォーマンス（正解率と反応時間)と脳神経活動を比較検討した。また，全ての被験者は，課題前に平常時の学習意欲に関する自己記入式質問票 (Academic achievement motivation scale) の記入を行った。金銭的報酬時と成績的報酬時における反応時間，正解率には差がみられなかった。また，ワーキングメモリと関連して賦活された脳部位は，先行研究とほぼ同様であった。質問票による学習意欲のスコアとの相関解析を行った結果，成績的報酬時にのみ，学習意欲が高い被験者ほど大脳基底核の賦活レベルが高いことがわかった (Fig.1)。さらに，大脳基底核の賦活レベルは課題パフォーマンスとも相関した (Fig.2)。大脳基底核の賦活レベルは平常時の学習意欲およびパフォーマンスと関連性を認めたことから，この部位は学習意欲を規定する重要な脳部位であることが示唆された。単なる金銭的報酬により賦活された意欲ではなく，脳科学と教育という視点から，学習や成績といった因子と関連のある，学習意欲の脳機能イメージング研究の第一歩として，大変重要な成果が得られた。

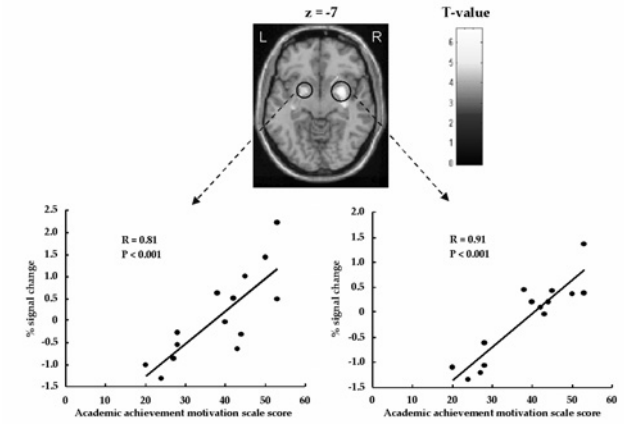


Fig. 1

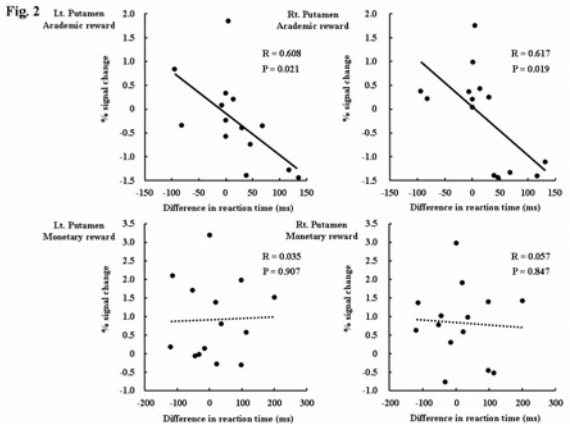


Fig. 2

9. 磁気共鳴画像診断用新規造影剤の開発

阪原晴海（浜松医科大学医学部）
定藤規弘（自然科学研究機構生理学研究所）
竹原康雄（浜松医科大学医学部）
村松克晃（浜松医科大学医学部）

【背景】現在臨床現場で使用されている造影剤は血管外漏出性の造影剤が主たるものであるが，血管内に滞留する造影剤を使用することにより，病変診断能が向上したり，得られる情報にバリエーションが期待できたりすることが考えられる。我々は血管内に一定時間停滞する性質を有する造影剤 dendrimers DTPA-D1Glu (OH)（分子量 1448.45D ; 以下デンドリマーと呼称)を使用して，従来の血管外漏出性造影剤である Gd-DTPA との比較において，その有用性を様々な動物モデルで調査している。

【目的】本研究の目的は，昨年度に引き続き，組織特異性あるいは病変特異性をもった，磁気共鳴画像診断用の新しい造影剤の開発を行うことである。本年度は現在，通常の臨床機で使用される頻度の高い gradient-echo 法をベースにした高速撮像法による動脈優位相においてもデンドリマーが Gd-DTPA よりも有意に高い腫瘍検出率を有するかどうかを評価した。

【方法】F344 ラットに 100 ppm の diethylnitrosamine を混和した蒸留水を給水して 100-110 日間通常飼育下で化学発癌（肝細胞癌)を誘導した 2 匹 4 結節を対象に, Gd-DTPA (0.1mol/kg) による造影 T1 強調画像（3DVIBE 法)の連続撮影を 2 時間後まで行った。Gd-DTPA による造影 MRI 終了後，5 時間以上間隔をあけて，引き続き同様の撮像をデンドリマー (0.05mol/kg) を用いて施行した。撮影後肝臓を摘出し，連続切片を作製，H&E 染色した。多血肝細胞癌結節の平均信号を計測し，背景肝の平均信号に対する signal-intensity-ratio (SIR) を計算した。

【結果】デンドリマーでは動脈優位相を含む造影後 2 時間にわたるすべての時相で Gd-DTPA と比較して明らかに高い SIR で肝細胞癌を濃染させ，しかもその濃染が持続する傾向があることが示された。図 1 は 4 結節についての SIR の経時推移で，本造影剤（デンドリマー)が Gd-DTPA に比してすべての時相で優れていることがわかる。

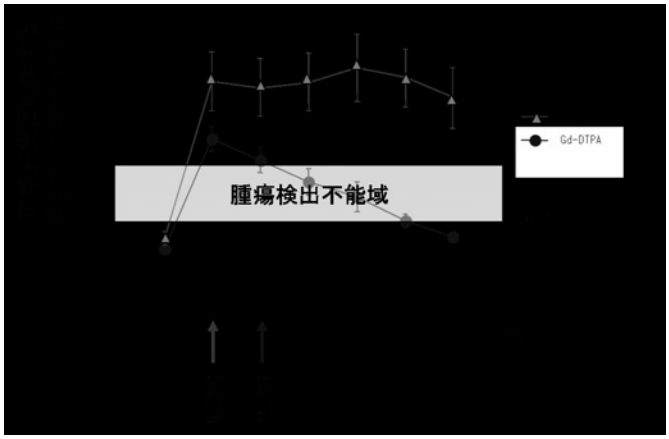


図 1

10. 非侵襲的脳機能画像法を用いた向精神薬服用時の高次脳機能研究

尾崎紀夫（名古屋大学大学院医学系研究科　細胞情報医学専攻 脳神経病態制御学講座 精神医学分野）

【目的】向精神薬服用時の自動車運転の中止が勧告され，患者の就労や日常生活に制限をもたらしている。そこで，社会復帰を目指し，抗うつ薬服用中の患者を念頭に置き，健常被験者を用いて抗うつ薬が運転技能・認知機能に与える影響を検討した。

【対象と方法】被験者は日常的に運転を行う健常男性 17 名で，問診や精神科診断面接により身体・精神疾患を有さないことを確認した。被験者の平均年齢は 35.8±3.3 歳であった。被験者には，予め人格傾向 (TCI)と抑うつ度(BDI),普段の就労状況 (JCQ)，日中の眠気 (ESS)，衝動傾向 (BIS11) を質問紙により確認した。

パロキセチン(PAR)10mg，アミトリプチリン (AMI) 25mg 及びプラセボ(PCB)を用いた二重盲検，クロスオーバー試験法（Wash Out 期間は 1 週間以上)を行った。服用前，1 時間後，4 時間後で運転技能・認知機能・Stanford 眠気尺度を評価し，試験終了後に副作用を確認した。運転課題はドライビングシュミレーターを用いた追従課題（車間距離の維持)，車線維持課題（横方向の揺れ)，飛び出し課題（ブレーキ反応時間)を行い，認知課題は Continuous Performance Test，Wisconsin Card Sorting Test，N-Back Test を行った。結果は Freidman 検定を行い，5% 未満を有意差とした。

なお，本研究は名古屋大学医学部倫理委員会の承認を得て，被験者全員から書面による同意を得て行われた。

【結果】追従・車線維持課題において服用 4 時間後の AMI 群で有意な成績低下を認めた。4 時間後の眠気は AMI 群で有意に強く，PAR 群は PCB 群と有意差を認めなかった。また，4 時間後の AMI 群で持続的注意の有意な低下を認めた。

【結論】AMI により追従・車線維持課題などの成績が低下したが，PAR では運転技能や認知機能に有意な影響を与えなかった。これらの結果から，社会復帰や日常生活を考慮した抗うつ薬の選択が重要であると考えられた。

【今後の方向性】運転作業のストレス起因性を調べるために血中物質測定を行う。また，向精神薬に対する反応性，ストレス起因性の個体差を明らかにするために MRI 画像を加味する。抗不安薬であるジアゼパム及びタンドスピロンを用い，さらに運転技能及び認知機能に与える影響を調査する。

11. 顔認識における視覚情報統合メカニズムの解明

伊丸岡　俊秀（金沢工業大学情報フロンティア学部）

顔は個体の識別だけでなく個体の感情状態を他者に伝達する，社会的動物にとってきわめて重要なコミュニケーションツールである。これまでの研究では顔の認識はモジュール化されており，個体を識別するための情報と感情状態を表す表情は別々に処理されていると考えられている。しかし生態学的には，個体にとって重要な他者については，『誰がどういう表情をしているのか』といった個体識別情報と感情情報が統合されている必要があると考えられる。本研究では個体情報と感情の統合に関わる神経活動を明らかにする。

実験では，まず被験者に対して 2 枚 1 対の顔写真からなる標準刺激を与え，その 3 秒後に顔写真 1 枚からなる比較刺激を与える。被験者の課題は比較刺激が標準刺激のうちの一枚と一致するかどうかを判断することである。ただし標準刺激は (1) 同一個体の異なる 2 つの表情 (2) 異なる個体の同一表情 (3) 異なる個体の異なる表情(4) 比較刺激とは異なる性の個体で構成されており，被験者は課題に答えるために (1) 表情のみ, (2) 個体情報のみ, (3) 表情と個体情報が統合された情報， (4) 性別のみを記憶する必要がある。このような課題における標準刺激呈示から比較刺激呈示までの期間の脳活動を event-related fMRI によって計測し，これまでのところ 6 名の被験者が参加した。

現在得ている結果では，刺激呈示に伴って腹側を中心とする視覚野全般と前運動野などに活動が見られているが，(1) から (4) の各条件間に顕著な違いは得られていない。

現在の課題では，被験者は標準刺激呈示後に記憶すべき情報を選択する必要があるため，それに伴う活動が結果の多くを占めている可能性がある。今後は課題選択の負荷を減らし，顔情報の統合，記憶にともなう神経活動を明らかにする必要がある。

【超高圧電子顕微鏡共同利用実験報告】

超高圧電子顕微鏡共同利用実験報告

〔 目　　次 〕

１. Morphological investigation of Purkinje cell dendrite and dendritic spine
according to functional evolution in the rat cerebellum
（Jee-Woong Kim ほか）..... 182
２. 嗅球ニューロン・グリアの三次元構造解析
（樋田一徳ほか）..... 182
３. 超高圧電子顕微鏡を用いた新たな試料観察法の開発
（野田　亨）..... 183
４. イソアワモチの幼生における柄眼形成過程の超高圧電顕観察
（片桐　展子ほか）..... 183
５. 神経系培養細胞における受容体などの 3 次元構造解析
（遠藤　泰久ほか）..... 184
６. 消化管壁内 Dogiel I 型ニューロンの樹状突起様神経突起の三次元解析
（長浜真人ほか）..... 185
７. Three-dimensional analysis of ultra-structure of functionally identified neurons
in the mouse olfactory bulb
（Emi Kiyokage ほか）..... 186
８. 3-D Reconstruction of Plastid Crystalline Bodies during Development
（Kim InSun）..... 186
９. Study on the role of Bax ibitor-1 (Bi-1) protein in mitochondrial formation in human cells
（Seok-Won Jeong ほか）..... 187
10. The structure analysis of ommatidia in *Drosophila melanogaster*
（Ji Young Mun ほか）..... 187
11. ラット脳内神経細胞突起の三次元再構築
（濱　清ほか）..... 188
12. 哺乳類神経上皮細胞からの非対称分裂による神経細胞生成
（小曽戸陽一ほか）..... 188
13. 電気シナプスを形成した網膜及び脳ニューロンの樹状突起の構造
（日　高　聰）..... 189
14. 脳内ステロイドホルモン環境の変化と神経細胞及びグリア細胞の機能形態変化の解析
（小澤一史）..... 190

1. Morphological investigation of Purkinje cell dendrite and dendritic spine according to functional evolution in the rat cerebellum

Jee-Woong Kim, Seung Nam Park, Im Joo Rhyu (Korea Univ)
Tatsuo Arii, Keiji Imoto (NIPS)

The lobule of cerebellum is classified phylogenetically into archicerebellum, paleocerebellum and neocerebellum. The previous studies based on transmission electron microscopy reported the density of the synapses between parallel fiber varicosities and Purkinje cell dendritic spines is higher in neocerebellum than archicerebellum. The morphometric analysis of dendritic spines with high-voltage electron microscope was undertaken to reveal morphological diversity of the dendritic spine according to functional compartment of the cerebellum.

Adult rat cerebella were dissected and stained according to a rapid Golgi protocol. Four-micrometer sections were observed with high voltage electron microscopy and some morphometric analyses were performed with Scion Image. The density, length, diameters of spine neck, area of spine and spine shape distribution were measured in the lobule II, VI and X in the vermal and paravermal regions.

No significant differences in the density, length, and area of spine and spine shape distribution throughout the cerebellar lobules were observed. The diameters of dendritic spine neck showed moderate difference in the case of mushroom and branched-type spines. The diameters of dendritic spine in neocerebelum (VI) showed a tendency smaller than that of spine neck in the lobule II and X. The dendritic spine morphology of Purkinje cells did not show remarkable difference throughout the lobules.

We need to do more works to explain the different results in this study from the previous reports.

2. 嗅球ニューロン・グリアの三次元構造解析

樋田一徳（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部形態情報医学分野）
有井達夫（自然科学研究機構生理学研究所脳機能計測センター形態情報解析室）

我々はこれまで嗅球のニューロンとグリア構成について超高圧電子顕微鏡による三次元構造解析を行ってきた。従来，免疫電子顕微鏡でシナプス結合を同定した介在ニューロン群の解析を進めたが，本実験では，嗅球への遠心性入力成分であるセロトニン(5-hydroxytryptamine; 5-HT)ニューロンの三次元構造について解析を行った。

5-HT 含有ニューロンはラット及びマウス脳内では脳幹縫線核に起始し全脳に投射分布している。光学顕微鏡による観察では，嗅球には 5-HT 免疫陽性の線維のみで細胞体はない。5-HT 線維は, 糸球体層に最も密に分布し, 次いで顆粒細胞層に多いが外網状層には線維は少なく, 最表層の嗅神経層には観察されない。そこで本実験では, 糸球体層の 5-HT 線維について解析を行った。

糸球体層では 5-HT 線維は，層を横断する像が共焦点レーザー顕微鏡にて観察される。しかし単一の 5-HT 線維を追跡するには限界があり, 糸球体内での正確な分布, 隣接の傍糸球体領域及び複数の糸球体間の連続性は不明である。

固定した嗅球から 50μm 厚のスライスを作製，抗 5-HT 抗体，ビオチン化二次抗体, ナノゴールド・蛍光 (FITC or Alexa) 同時標識ストレプトアビジンによりレーザー顕微鏡で観察後，Co/Ni 増感 DAB 及び銀増感を行い，更に 2～5μm 厚の切片を作製し，超高圧電子顕微鏡で立体観察を行った。

糸球体内で 5-HT 線維は偏在せず構造内全体に一部分枝をしながら蛇行し分布伸長している。頻繁に数珠玉状構造を呈し，膨大部ではミトコンドリアが観察される。以前解析した tyrosine hydroxylase ニューロンほど密な分布ではなく, また calbindin や calretinin ニューロンのような蜂巣状構造は示さない。この 5-HT 線維は糸球体内の

みならず隣接する傍糸球体領域にも存在し，糸球体内線維と連続し，複数の糸球体を横断する像が観察された。

5-HT 線維は投射ニューロン及び各種介在ニューロンと接触しシナプス結合を形成していることが観察されている。このため，本実験解析知見とも併せて，複数の糸球体での異種のニューロン群への遠心性調節効果が今後解明されるべき課題として提起される。現在，シナプス結合を形成するニューロン種の定量的同定と，他の層を含めた超高圧電子顕微鏡を用いたより詳細な三次元構造解析を行っている。

3. 超高圧電子顕微鏡を用いた新たな試料観察法の開発

野田　亨（藍野大学医療保健学部理学療法学科）

免疫組織化学的染色法は，現在，特定の蛋白分子を標識する方法として広く用いられている。この方法のうち，比較的感度がよく，電子顕微鏡による観察に適した酵素抗体法を基本として，それに古典的な還元オスミウム溶液による染色法を組み合わせることによって，これまでの酵素抗体法で生じる反応産物の電子密度を超高圧電子顕微鏡による観察に耐えるほどに向上させ，細胞小器官等の立体構造観察を可能にしようと試みた。4% パラホルムアルデヒドで固定したラットの組織をクリオスタットを用いて約 10μm 厚の凍結切片とし，免疫組織化学に使用した。一次抗体としてはライソゾーム全体を標識させるためにライソゾーム酵素である cathepsin D に対する抗体，小胞体全体を標識させるために可溶性小胞体内のカルシウム結合蛋白である calreticulin に対する抗体等を一次抗体とし，それぞれに蛍光標識を付けた二次抗体で反応性を確認した後，同条件の別の切片を用いて，酵素抗体法を行った。二次抗体を反応させた後に，DAB 反応を行い, 1 つのグループは通常の 25mM PIPES 緩衝 1% 四酸化オスミウムで，もう 1 つのグループはこれまで知られている還元オスミウムを用いた染色法のうち Zinc iodide osmium (ZIO) 液を用いて後固定を行い，脱水，切片の上から樹脂を入れた BEEM カプセルで覆い，重合させた。硬化後スライドガラス上の切片を樹脂ブロック側に回収し，ダイアモンドナイフで 1μm，あるいはそれ以上の厚さの厚切り切片を作製し，生理学研究所の超高圧電子顕微鏡 (H-1250M) で切片の観察を行った。これまでのところ 2 種類の一次抗体のによる反応性の違いは明瞭に認められるものの，通常の 1% 四酸化オスミウムで後固定したものと，Zinc iodide osmium (ZIO) 液で後固定したものとの間では反応産物の電子密度に明瞭な差を認めることはできなかった。これまでの報告では ZIO 染色法を今回，切片で利用していること，あるいは免疫組織化学で頻用されているパラフォルムアルデヒド単独固定でも染色可能であるかなど，いくつかの点はまだ再確認すべき点もあり，今回の研究結果において ZIO 染色が試料の電子密度増加に有効でなかった原因の検討事項として，試料側の条件も再検討される必要があると考えられた。

4. イソアワモチの幼生における柄眼形成過程の超高圧電顕観察

片桐　展子（弘前学院大学・看護学部）
片桐　康雄（弘前学院大学・看護学部）
有井　達夫（生理研超高圧電顕）

Onchidium sp. 軟体動物，腹足類)は，卵嚢内で veliger 幼生期を経て成体に近い形態まで生長した後に孵化する。柄眼は産卵後 8 日目の veliger 幼生に原基が形成され，そのまま成体の眼となる（片桐ら 1999)。加温オスミウム染色は組織に高いコントラストを与えるので，超高電圧電顕を用いると準厚切切片においても微細構造が，通常の電顕のように観察可能である。特に柄眼の光受容細胞内の photic vesicles (PV) は加温オスミウム染色で黒染さ

れる（図 1)。PV は軟体動物視細胞にあるロドプシン－レチノクロム系におけるレチノクロムの局在部位として知られる。veliger 幼生は小さく，眼の部位は固定試料では識別できない。準厚切連続切片を作成し，超高電圧電顕観察によって柄眼の形成過程を明らかにしたい。

【材料と方法】イソアワモチ類の産卵後 10 日目 veliger 幼生と孵化後の幼動物を 2% オスミウム水溶液で 40°, 48 時間処理，エポン包埋した。0.2～0.3μm 厚さの連続切片を酢酸ウランと鉛染色，超高圧電顕で 1,500～20,000 倍で観察した。

【結果と考察】イソアワモチ類は多種類で多数の光受容器からなる特異な多重光受容系を持つ。柄眼は主要な光受容器で，直径 200μm，球形の胞状で，角膜と網膜からなり，内部にレンズがある。網膜に 2 タイプの感杆型光受容細胞と支持細胞が区別される。黒い色素顆粒が網膜の細胞に含まれるが角膜細胞にはない。タイプ 1 の光受容細胞は微絨毛と PVs が特徴である。

10 日目 veliger 幼生の眼は直径 12μm と小さく，構成細胞も少ない。色素顆粒は含まれるが，微絨毛は未発達，PVs は認められない。支持細胞との識別ができない（図 2A，B)。孵化後の幼動物は直径 22μm，構成細胞は多くなり，小型であるが成体の眼に近い。微絨毛は光受容細胞の頂部からレンズを囲むように束状で存在，PVs は黒染せず，支持細胞との識別も難しい（図 3A，B)。加温オスミウム染色によって粗面小胞体やゴルジ装置，核膜腔が黒染されている。

幼生と幼動物の眼は黒点として識別されるが，光受容細胞に PVs は明瞭に認められなかった。その理由として，①眼は形成途中にあり PVs がまだ形成されていないか少量である，②PVs がまだ未成熟で，オスミウム染色に不染であることが考えられる。

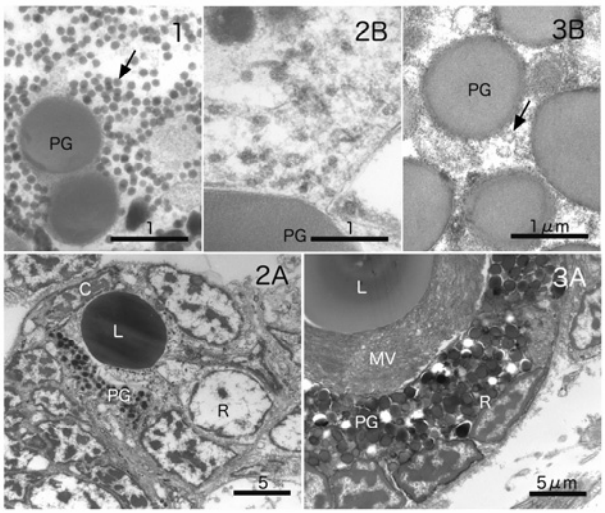


図 1　成体の柄眼。タイプ 1 感桿型光受容細胞の細胞質内にある photic vesicle（↓)は黒染。

図 2A, B　10 日目 veliger 幼生の眼。網膜(R)の細胞に色素顆粒 (PG) は含まれるが，微絨毛は未発達, PVs は認められない。

図 3A, B　孵化後の幼動物の眼, 網膜(R)の細胞に多数の色素顆粒(PG)が含まれる。微絨毛(MV)は束状にレンズ(L)を囲む。photic vesicle（↓)は黒染しない。
C; 角膜の細胞

5. 神経系培養細胞における受容体などの 3 次元構造解析

遠藤　泰久・吉村　亮一・西田　倫希（京都工芸繊維大学）
有井　達夫

神経細胞の突起の途中に形成される数珠状の膨大部 (varicosity) はシナプス形成に関わるだけでなく，脳内や末梢組織における非シナプス的情報伝達部位として機能している。我々のこれまでの培養細胞を用いた研究により，varicosity の形成頻度が標的細胞との混合培養によって増加すること，anterograde だけでなく retrograde にも移動すること，微小管形成阻害剤 taxol により動きが抑制されることなどが明らかとなっている。しかし，その形成機構はほとんど不明のままであり，超高圧電子顕微鏡により細胞骨格の微小管の 3 次元構造解析を試みた。

ホルムバール支持膜を張った金メッシュを 70%エタノールで滅菌後，コラーゲンコートを施し，神経細胞株 NG108 細胞を DMEM 培地に 1mM dbcAMP を添加し 3 日間培養した。細胞を 0.1%Triton X-100，0.1M PIPES，1mM $MgSO_4$，2mM EGTA，2M glycerol，pH6.75 で 10-15 分処理し，チュブリンのモノマーなど低分子を抽出後，4%パ

ラフォルムアルデヒド固定した。抗チュブリン抗体により ABC-HRP 法で免疫染色し，DAB，硫酸ニッケルアンモニウムで発色した。1%オスミウム酸で後固定し，エタノール系列で脱水し，二酸化炭素− 臨界点乾燥を行った。試料をカーボン蒸着後，超高圧電子顕微鏡（H-1250M　加速電圧 1,000kV）により，同一視野を－60 度から＋60 度まで 2 度刻みの傾斜連続写真を撮影し，IMOD により神経突起および varicosity における微小管の 3 次元画像解析を行った。

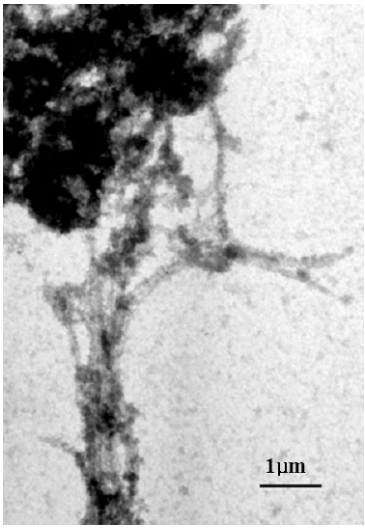


図 1：NG108 細胞の神経突起および varicosity の一部の超高圧電子顕微鏡写真。抗チュブリン抗体により微小管のコントラストを高めている。

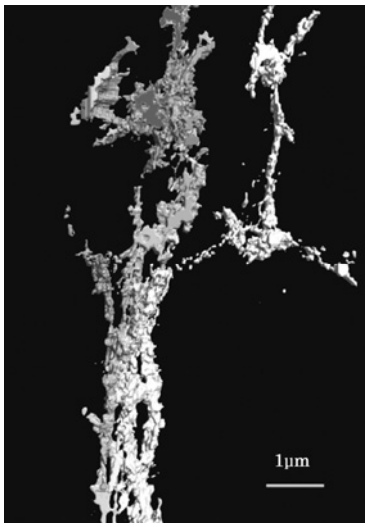


図 2：NG108 細胞の神経突起および varicosity における微小管の 3D image。

6. 消化管壁内 Dogiel I 型ニューロンの樹状突起様神経突起の三次元解析

長浜真人（鈴鹿医療科学大学医用工学部）
有井達夫（生理学研究所形態情報解析室）

消化管壁内神経叢内には多くのニューロンが含まれておりその数は脊髄に含まれるニューロン数に相当します。これらの壁内ニューロンは形態学的にサブタイプに分類されていますが，細胞体周囲の複数の短い樹状突起と一本の長い軸索様突起を持つ Dogiel I 型のニューロンは運動性ニューロンあるいは介在性ニューロンの性格を持ち，VIP，PACAP，5-HT などの神経活性物質を含有することが知られています。VIP は平滑筋に対し，弛緩作用を示す神経ペプチドで，VIP を含有するニューロンは筋層間神経叢内において抑制性運動ニューロンとして機能すると考えられています。既に私共の報告でこれらの樹状突起様突起には多数のシナプス入力が確かめられておりましたが，微細な三次元構築に関する解析はありませんでした。今回，我々は免疫染色（ABC 法とニッケル・コバルト増感法)を施した VIP 含有ニューロンをプラスチック包埋し，3-5 ミクロン切片を作製して超高圧電子顕微鏡にて観察しました。超高圧電顕により，①ニューロンの細胞体周囲に微細で短い突起を立体的に観察することができました。②入力する長い軸索様突起と樹状突起様突起あるいは神経細胞体との三次元的な位置関係を観察することができました。今後，超薄切切片による通常電顕観察の連続切片によるシナプス軸索様突起と樹状突起様突起のシナプス構築関係と今回の超高圧電顕所見を比較対照し，消化管ニューロンのシナプス伝達機構の解析を計画しております。

7. Three-dimensional analysis of ultra-structure of functionally identified neurons in the mouse olfactory bulb

Emi Kiyokage, Yuzhen Pan, Adam C. Puche, Michael T. Shipley
(Department of Anatomy and Neurobiology, University of Maryland School of Medicine, MD, USA)
Kazunori Toida (Department of Anatomy and Cell Biology,
Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima)

The olfactory bulb is specialized for the neural processing the molecular signals of smell. Mitral and tufted cells are projection neurons of the olfactory bulb. These neurons receive synaptic inputs from olfactory sensory neurons in the glomerui and project their axons into higher cortical structures. This pathway is regulated by inhibitory interneurons such as periglomerular cells, granule cells, and other kind of interneurons. We have been investigating the neuronal organization of the olfactory bulb by both structural and physiological analyses. To understand synaptic effects of GABAergic interneurons, we need to know the distribution and localization of GABA receptors in the olfactory bulb. We have started analyzing three-dimensional ultrastructures of physiologically identified neurons and the organization of GABA receptors in the olfactory bulb by high-voltage electron microscopy (HVEM).

All experiments were performed on olfactory bulb slices obtained from male GAD65 and TH transgenic mice expressing green fluorescent protein (GFP). TH-GFP (+) cells were recorded by whole cell patch clumping. After that biocytin filled cells were stained with Co/Ni-DAB and reconstructed by Neurolucida. In contrast, GAD6-GFP slices were double immunostained with anti-GFP and anti-$GABA_A$ receptor antibodies and labeled by colloidal gold. All these slices were embedded in Epon-Araldite resin, resectioned at 1-3 μm using ultramicrotome, and examined with HVEM.

It was possible to observe three-dimensional structure of biocytin filled TH neurons using HVEM. $GABA_A$ receptors were mainly distributed along membrane of cell bodies, primary, and secondary dendrites of mitral cells and some receptors were found in the cytoplasm. In the glomerular layer, $GABA_A$ receptors were localized in glomerular neuropil, and cell bodies of GFP positive cells which existed in the periglomerular region. We are investigating optimal staining condition for suitable contrast to visualize TH neurons. We will investigate their type of cells expressing $GABA_A$ receptors on dendrites in the glomeruli. Our goal is to provide a quantitative analysis of $GABA_A$ receptor on several classes of olfactory bulb neurons.

8. 3-D Reconstruction of Plastid Crystalline Bodies during Development

Kim, InSun (Biology Department, Keimyung University)

The ultrastructure of plastids was investigated in succulent leaves of *Sedum rotundifolium* to examine changes that occur during leaf development. In the study, leaves were placed into etiolated, immature, young, and mature categories by developmental stage and size. Features of tubular inclusion bodies and starch grains in the plastids were of particular interest. The vacuole size, tubular inclusion bodies and starch grains in the plastids became remarkably different as the leaves developed. Etioplasts of the unexposed leaves had prolamellar bodies, abundant starch grains, large tubular inclusion bodies, few plastoglobuli, and thylakoid systems. Membranes of the thylakoids were still continuous with those of the prolamellar body. The plastids were often influenced by the presence and profile of inclusion bodies and starch grains throughout early stages. Morphology was highly variable in the etioplasts but consistently hemispherical or ovoid in

mature chloroplasts. Tubular inclusion bodies were most abundant in the etiolated leaves, but disappeared completely with development. Starch grains were also significantly reduced in size. Young and mature mesophyll cells exhibited normal chloroplast ultrastructure and huge central vacuoles with extremely thin peripheral cytoplasm. Grana were extensive and comprised a large portion of the chloroplasts. Traces of peripheral reticulum were also discovered in chloroplasts of the expanded leaves. Implications of ultrastructural changes in tubular inclusions and starch grains during development are discussed with relevance to Crassulacean acid metabolism (CAM).

9. Study on the role of Bax inhibitor-1 (Bi-1) protein in mitochondrial formation in human cells

Seok-Won Jeong, Young R. Seo (Dep. Pharmacology, Institute for Basic Medical Science, Medical Research Center, School of Medicine, Kyung Hee University)

Apoptosis-related signaling pathway has been recently highlighted due to the very important implications on numerous health problems including neurodegenerative disease. Bax inhibitor-1 (Bi-1) protein has been known to have ability to suppress Bax-induced apoptosis in mammal cells. Though the Bi-1 was reportedly suggested to play a role in endoplasmic reticulum (ER)-mediated stresses, the function and localization of the Bi-1 protein has not been clear. Our recent study using conventional electron microscopy, we confirmed the localization of Bi-1 associated with ER membrane. Furthermore, we also found the localization of Bi-1 in mitochondria as a novel aspect of Bi-1 for the role in apoptosis process. In this study, potential roles of Bi-1 protein in mitochondria-dependent apoptosis has been investigated employing a high voltage electron microscopy (HVEM), which has been effectively applied to study the three-dimensional structure. Particularly, we are focusing on the alteration of mitochondrial structure in human 293 cells, depending on Bi-1 functional status. Our ongoing study from the reconstructed images of the mitochondrial formation in Bi-1 normal and Bi-1 defective 293 cells might be able to give a new insight on understanding the process of programmed death in mammal cells.

10. The structure analysis of ommatidia in *Drosophila melanogaster*

Ji Young Mun, Kyung Eun Lee, Se Jin Park, Sung Sik HAN
(School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University)

The *Drosophila* retinal cell is widely used to study development and cell signaling processes. In the past decades, conventional chemical fixation has been used to study the structure of retinal cells in *Drosophila*. Rapid freezing methods are superior to chemical fixation methods due to their fixation speed. Some *Drosophila* tissues, such as the eyes, do not freeze well due to their surrounding cuticle layer. Therefore, in the case of the *Drosophila* retina, the benefits of high pressure freezing and freeze substitution (HPF-FS) have not been fully realized. In this study, a retinal cell from *Drosophila melanogaster* was studied using the HPF-FS method. Compared to chemical fixation, the preservation of the cytoplasm in the HPF-FS sample was improved on the whole. The HPF-FS cell membranes were smoother than that of chemical fixation. In addition, HPF-FS preserved the mitochondria structures very well. These results of the present study suggest that HPF-FS is superior to other fixation methods for the preservation of the retinal cell structure.

11. ラット脳内神経細胞突起の三次元再構築

濱　清（生理学研究所）
Ellisman, MH (NCMIR, UCSD)

ラット脳内神経細胞突起の三次元再構築にあたり，二軸傾斜で撮影された画像を処理することを進めている。

生理研で使用している UCSD, NCMIR によるトモグラフィーソフトは，旧型で処理に時間がかかる。一方，コロラド大で開発された IMOD トモグラフィーソフトは，広く普及して自動化が進んでおり使用が容易で高速である。

このソフトでは，二軸傾斜による画像の解析ソフトを備えており，これによりトモグラフィー解析の信頼性が向上することが期待される。二軸傾斜の条件を満たす状態で加速電圧 1,000kV で±60 度の範囲で 2 度おきに撮影された超高圧電子顕微鏡画像に応用して解析を進めている。一軸傾斜で撮影されたそれぞれの断層像を融合したときに得られる画像の精度を検討し，応用の可能性を検討している。

12. 哺乳類神経上皮細胞からの非対称分裂による神経細胞生成

小曽戸陽一，末次妙子（理化学研究所・発生再生科学総合研究センター）
樋田一徳，清蔭恵美（徳島大学大学院・神経情報医学部門・情報統合医学講座・形態情報医学分野）
有井達夫（生理学研究所・脳機能計測センター・形態情報解析室）

中枢神経系神経細胞の前駆細胞である神経上皮細胞は, 主に neuroepithelium の apical 表層で細胞分裂を行う。脳発生の初期には，細胞増殖のための対照的な分裂，後に神経細胞を生み出す非対称的分裂（一つの神経上皮細胞から, 神経上皮細胞および神経細胞が生成する)が一定の割合で見受けられる。近年のタイムラプス観察により，分裂期では細胞体と basal lamina のコンタクトは大変細長い形状（直径 1μm 以下，長さ 100μm 以上)となるものの, プロセス様の構造物 (basal process)として保持されていることが示された。しかしながら，細胞分裂の際に basal process がどのように娘細胞に引き継がれるかについては不明な点が多い。現在までの報告では，basal process はその極めて細長い構造上，細胞分裂の際には分裂することはなく，どちらかの娘細胞に不均等に分配されるとされている。その不均等な分配が娘細胞の非対称な運命決定 (増殖的あるいは神経生成的)に働いているとの示唆もある。

我々は，basal process の形態学的情報を得るためには電子顕微鏡観察が必要であると考え，これまでに様々な手法による観察を試みてきた。当初通常型の電子顕微鏡を用いてその観察を試みたが，細長い basal process の全体構造を把握することは極めて困難であった。また，走査型電子顕微鏡による観察も行ったが，神経上皮組織のように混み合った状況では，basal process の形態を追うことがやはり困難であった。そこでこれら通常型電子顕微鏡の弱点を克服できる，すなわち厚い試料（5μm まで）の観察が可能である，生理学研究所の超高圧電子顕微鏡 (H-1250M) による basal process の観察を，前年度に引き続き行った。我々はこれまでに，マウス 10.5 日胚の終脳の神経上皮細胞の basal process の微細構造を評価するための観察手法の確立を行ってきた。それらのうち，ゴルジ染色法と超高圧電子顕微鏡を組み合わせることにより basal process を可視化する方法がもっとも適していると考え，この方法で多くのサンプルを観察した（図 1)。この観察の結果，細胞分裂期において，basal process がその非常に細長い構造にもかかわらず，細胞体分裂より前の段階で分裂している可能性を示す知見を得る事に成功した。

現在我々は，上記の超高圧電子顕微鏡の観察結果を含めた，神経上皮細胞の basal process の細胞分裂時の挙動に関する知見をまとめた論文を投稿中である。

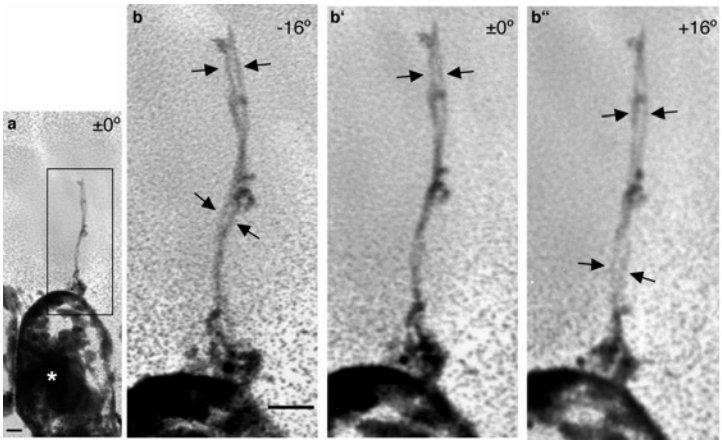


図 1　細胞分裂期の哺乳類神経上皮細胞の超高圧電子顕微鏡像。 a は低倍率，b-b"は，a の黒四角部分の拡大像。b-b',b'-b"は,それぞれステレオペア写真となっている。矢印は，対となる 2 本の basal process が細胞体（＊）から伸長していることを示している。Bar=1μm

13. 電気シナプスを形成した網膜及び脳ニューロンの樹状突起の構造

日　高　　聰（藤田保健衛生大学医学部生理学教室）

ニューロン間での電気シナプスの形成について，発現するコネクシンの型が解明され，実験手法を組み合わせた解析が可能になった。電気シナプスを電気生理学的に解析したニューロンを細胞内標識し，超薄切片でギャップ結合を同定すると共に，5μm の厚さの切片を 1,000kV の加速電圧の超高圧電子顕微鏡下で解析することによって，電気シナプスを形成する樹状突起の立体構造を解明する。蛍光染色したニューロンに，抗コネクシン抗体を用いた免疫細胞化学法を適用し，共焦点レーザースキャン顕微鏡で解析することによって，樹状突起間の電気シナプスの部位を特定できるようになった。

視覚系のニューロンに注目して，視覚中枢に出力する網膜神経節細胞間や，網膜内三次の介在ニューロン・抑制性のアマクリン間の電気シナプスの機能構造解析を行なった。Dual patch-clamp 法によって通電実験を行い，電気シナプスの形成度を判断した。二連の電圧固定法で細胞間電流を測定し，細胞間チャネルの最大コンダクタンスを測定した（網膜神経節細胞間 2.45 nS，アマクリン細胞間 5.48 nS)。細胞ペアを Lucifer yellow で標識して解析した結果，樹状突起間の接触部位は平均 7 個（網膜神経節細胞間，n = 12)，23 個（アマクリン細胞間，n = 24)であった。一方，5μm の厚さの切片を作成し，超高圧電子顕微鏡で樹状突起の立体構造を解析し，接触部位は close membrane apposition の形態を呈することが分かった。超薄切片で樹状突起間の接触部位に微細形態的なギャップ結合を同定した。超高圧電子顕微鏡の解析標本で，close membrane apposition 形態の接触領域を計測することによって，ギャップ結合斑の大きさを測定した。平均直径は，網膜神経節細胞間で 0.86μm (n = 14) アマクリン細胞間で 7μm (n = 24)(図 1)であった。そこで，ギャップ結合の開口チャネルの割合を見積もった。凍結割断レプリカ法で得られたギャップ結合斑のコネクソン粒子の形態と密度（図 2)，細胞間でのギャップ結合の存在数と，報告されている最大シングルチャネルコンダクタンスから，コネキシンチャネルの開口確率が均一でないと仮定した場合，測定した最大細胞間チャネルコンダクタンスから，ギャップ結合の開口チャネルの割合は，網膜神経節細胞間で 0.8%，アマクリン細胞間で 0.2%と計算された。網膜ニューロン群が同期して活動電位を発生していることを考えた場合に，このチャネル開口率の妥当性を検討した。

文献

1) Hidaka, S. et al., (2004) *Journal of Neuroscience*, **24** (46): 10553-10567.
2) Hidaka, S. et al. (2005) *Journal of Integrative Neuroscience*, **4** (3): 313-340.
3) 日　高　　聡 (2006)日本顕微鏡学会誌「顕微鏡」**41** (2): 117-119.

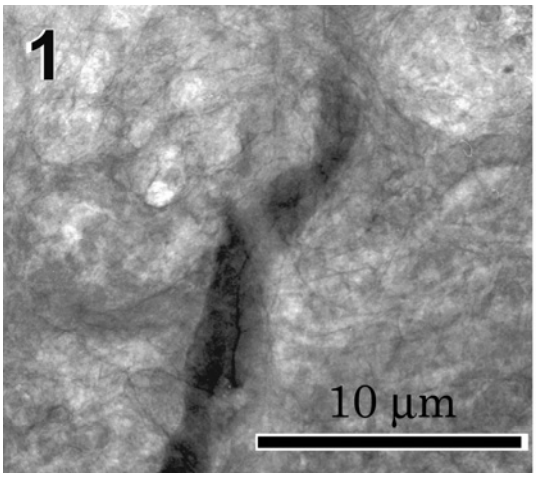


図 1：網膜内網状層内アマクリン細胞間の樹状突起先端の相互接触部位。close membrane apposition 形態の接触領域が見える。厚さ 5μm 切片の 1,000kV の加速電圧の超高圧電子顕微鏡像。

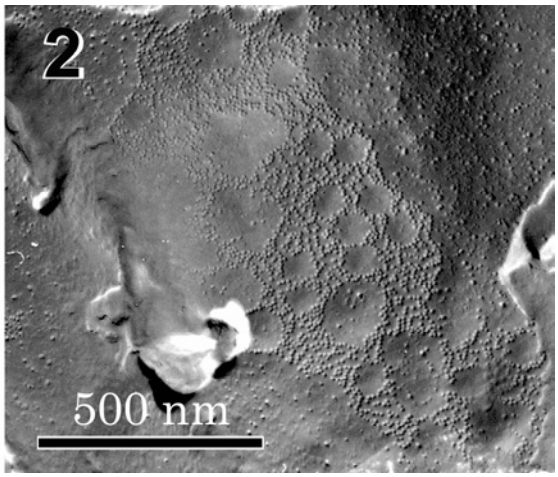


図 2：網膜内網状層のギャップ結合斑にあるコネクソン粒子の形態。コネクソン粒子の結晶状もしくは網状や線状の分布。凍結割断レプリカ法による標本の電子顕微鏡像。

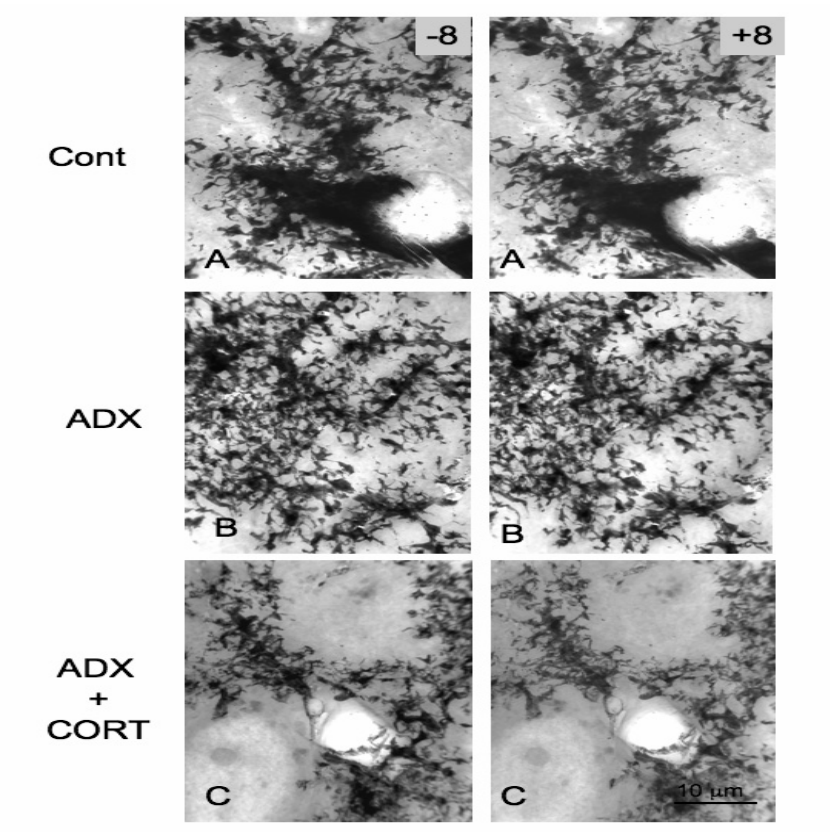
14. 脳内ステロイドホルモン環境の変化と神経細胞及びグリア細胞の機能形態変化の解析

小澤一史（日本医科大学 大学院医学研究科　生体制御形態科学分野）

生体は絶えず変化する外的環境に対応するよう，体内の生理的状態を恒常的に保とうとする機構，すなわちホメオスターシス homeostasis を有している。このホメオスターシスにひずみを生じさせる物理的，精神的事象がストレス stress である。興味深いことに，物理的，精神的事象のいずれにしても，ストレスは下垂体前葉からの ACTH（adreno- corticotropic hormone 副腎皮質刺激ホルモン）分泌を促し，副腎皮質からコルチゾール cortisol を分泌させる。したがって，血中のコルチゾール値の量を見ることによって，ストレスを受けているかどうかを判断することが出来る。

海馬は，この副腎皮質ホルモンであるコルチゾールの受容体を有する神経細胞やグリア細胞（特に星状グリア細胞)が多数発現しており，脳におけるストレス応答の中核中枢として反応する部位であり，これまでに特に神経細胞における微細構造の変動について，報告がなされてきた。一方，グリア細胞の形態変化については，あまりはっきりとした報告はない。そこで，コントロール（対照)群，副腎摘出 (ADX) 群，副腎摘出+コルチコステロン (CORT) 補充群の 3 群におけるグリア細胞の形態変化について，ゴルジ染色を施したラット脳の標本を用いて，超高圧電子顕微鏡観察を行った。コントロール群に比べ，ADX 群では，顕著なグリア細胞の数の増加とともに微細形態的に細胞の肥大と突起の拡がりが認められ，CORT の補充により，コントロール群に近い形状に戻る様子を示した。

これらの変化は，同じ実験環境における神経細胞の形態変化と逆の現象の傾向を示しており，神経細胞の機能形態と連動するグリア細胞の機能変化を示唆し，興味深い所見であると考えられ，現在，さらに多角的な検索を進めている。



図の説明：超高圧電顕で観察する星状グリア細胞のステレオ像 (A)コントロール群、(B) 副腎摘出(ADX)群、(C) 副腎摘出＋コルチコステロン補充(ADX+CORT) 群。ADX 群において、グリア細胞の顕著な肥大、突起の拡張が観察される。Bar = 10 μm

《超高圧電子顕微鏡共同利用実験での業績リスト》

発表論文

1. 日高　聰　(2006) 同期興奮を引き起こす網膜神経節細胞間の電気シナプスの構造機能解析。顕微鏡 41, 117-119.
2. Ikkai T, Arii T, Shimada K (2006) Excimer fluorescence as a tool for monitoring protein domain dynamics applied to actin conformation changes based on circulary polarized fluorescence spectroscopy, J Fluoresc 16, 367-374.
3. Kim IS (2006) High voltage electron microscopy of structural patterns of plastid crystalline bodies in Sedum rotundifolium. Kor J Electron Microsc 36: 73-82.
4. Kim IS, Park SC, Han SS, Kim ES (2006) Three-dimensional analysis of the mesophyll plastids using ultra high voltage electron microscopy. Kor J Electron Microsc 36: 217-226.
5. Kim IS (2006) Changes in the plastid ultrastucture during Sedum rotundifolium leaf development. J Plant Biology 49: 376-383.

学会報告

1. 小 曽 戸 陽 一 (2006.1) Cytokinesis of mammalian neuroepithelial cells involves their basal process.　慶應義塾大学国際シンポジウム・大脳皮質形成と神経細胞のダイナミクス。(東京)
2. 樋田一徳 (2006.3) 嗅球シナプス神経回路機能の微細構造的基礎。第 111 回日本解剖学会総会（相模原）
3. 日高　聰 (2006.3) 網膜アマクリン細胞間電気シナプスの機能構造の特性 Structural and functional properties of homologous electrical synapses between retinal amacrine cells. 第 83 回日本生理学会大会（前橋）
4. Mun JY, Yu YS, Kim JH, Kim JH, Kim KW, Han SS (2006.4) Rhabdomere formation through vesicles in late pupal stage of Drosophila melanogaster; Observation using high-pressure freezing and/freeze-substitution, and high-voltage electron microscopy. Vision research annual meeting (Fort Lauderdale, USA).
5. Kim JH, Kim JH, Kim KW, Han SS (2006.4) Novel ultrastructural findings in drosophila photorecptor cells; high-pressure freezing/ freeze-substitution vs chemical fixation. Vision research annual meeting (Fort Lauderdale, USA).
6. Kim IS(2006.5) Three dimensional reconstruction of the plastid tubular elements. The 37th Annual Meeting of the Korean Society of Electron Microscopy (Seoul, Korea).
7. Kim IS(2006.5) Presentation of the subcellular structure dynamics using two different 3-D image processing programs. The 37th Annual Meeting of the Korean Society of Electron Microscopy (Seoul, Korea).
8. 西田倫希，陣内浩司，有井達夫，鷹岡昭夫，吉村亮一，遠藤泰久 (2006.7) PC12細胞における神経栄養因子受容体の局在：膜タンパクの三次元構造解析。第29回日本神経科学大会（京都）
9. Hidaka S (2006.7) Estimation of open channel fraction of electrical synapses between retinal ganglion cells. 第 29 回日本神経科学大会（京都）
10. Kim IS(2006.8) Three dimensional analyses of sub-cellular structures by HVEM and tomography. The 61st Annual Meeting of the Korean Association of Biological Sciences (Seoul, Korea).
11. Noda, T(2006.9) Three-dimensional structures of cell organelles observed by HVEM. 16th International Microscopy Congress (Sapporo, Japan).
12. Yoshida, M, Yamada M (2006.9) Budding of Human Immunodefficiency Virus Observed By High Voltage Electron Microscope. 16th International Microscopy Congress (Sapporo, Japan).
13. Mun JY, Kim KM, Kim ES, Kim JH, Han SS (2006.9) Three Dimensional Reconstruction of Cellular Structure in Retina Using HVEM. 16th International Microscopy Congress (Sapporo, Japan).
14. Lee KE, Ryu JS, Park SJ, Kim JH, Han SS (2006.9) Structure and movement of trichomonas in a liquid medium. 16th International Microscopy Congress (Sapporo, Japan).
15. 片桐展子，片桐康雄，重松康秀，有井達夫，和田昌昭(2006.9) 電顕トモグラフィーによる感杆型光受容

細胞内の photic vesicle の三次元観察。日本動物学会第 77 回大会（松江）

16. 小澤一史，楊　春英，澤井信彦，松本恵介，有井達夫 (2006.10) コルチコステロイドの変動に伴う海馬領域グリア細胞の形態変化と機能について。第 33 回日本神経内分泌学会（横浜）
17. Lee KE, Ryu JS, Jung MK, Kim JH, Han SS (2006.11) Movement of Trichomonas vaginalis in the TYM medium. Korean Electron Microscopy Conference (Seoul, Korea).
18. Lee KE, Ryu JS, Jung MK, Kim JH, Han SS (2006.12) Structure of Trichomonas vaginalis and their movement. 2006 Korea-Singapore International Biotechnology Symposium (Singapore).
19. 小曽戸陽一，樋田一徳， Dubreuil V，清蔭恵美，有井達夫，Huttner WB(2006.12) 哺乳類神経前駆細胞の細胞分裂機構： basal process について。日本分子生物学会 2006 フォーラム（名古屋）
20. Kosodo Y, Toida K, Dubreuil V, Kiyokage E, Arii T, Huttner WB (2006.12) Cytokinesis of neuroepithelial stem cells involves their basal process. American Society for Cell Biology 46th meeting (San Diego, USA).

【生体磁気計測装置
共同利用実験報告】

生体磁気計測装置共同利用実験報告

〔　目　　次　〕

１．誘発脳磁場のウェーブレット変換による時間周波数可視化に関する研究
（川田　昌武）..... 198
２．Williams 症候群の認知機能（ウィリアムズ症候群における正立顔，倒立顔に対する反応）
（中村みほほか）..... 198
３．脳磁計を用いたヒトにおける感覚情報処理の研究
（寳珠山　稔）..... 199
４．異言語話者による音声の脳内処理過程に関する検討
（大岩昌子）..... 199
５．脳磁図を用いた声認知に関連するヒト脳機能の研究
（軍司敦子ほか）..... 200
６．前頭葉シータ波活動と脳高次機能
（佐々木和夫ほか）..... 200
７．脳磁図を用いた上顎・下顎の歯種による皮質再現部位と他の口腔および顔面領域との比較
（佐藤　亨至）..... 201

1. 誘発脳磁場のウェーブレット変換による時間周波数可視化に関する研究

川田　昌武（徳島大学）

本研究課題では，誘発脳磁場に対してウェーブレット変換 (Wavelet Transform) を用いた時間周波数成分可視化を行い，その発現機序について新たな知見を得ることを目的としている。

これまでに, ウェーブレット変換を用いたヒト脳波（運動関連脳電位)の時間周波数可視化を独自に進めた結果, 本手法が脳波の発現機序を解明する上で有効である可能性を示した。本手法ではウェーブレット変換として，連続関数 (Gabor) によるマザーウェーブレットを用いていたが，周波数分解能を連続的に決定できるという利点があるものの，積分を利用しているため，計算時間を要するという欠点がある。そこで，高速離散ウェーブレット変換 (Fast Discrete Wavelet Transform) のプログラムを作成し，本課題への準備とした。

また, 本研究課題では位置特定も重要となることから, Minimum Norm Solution による位置推定法を脳波データに利用する試みも実施し，第 7 回脳磁場ニューロイメージング（生理学研究所於，2006 年 12 月）にて発表した。

今後，上記の手法を組み合わせ誘発脳磁場の解析を行う予定としている。

2. Williams 症候群の認知機能
（ウィリアムズ症候群における正立顔，倒立顔に対する反応）

中村みほ（愛知県心身障害者コロニー　発達障害研究所）
稲垣真澄（精神神経センター精神保健研究所）
渡辺昌子，平井真洋，三木研作，本多結城子，柿木隆介

【背景と目的】ウィリアムズ症候群（以下 WS）の視覚認知機能に関しては，視空間認知が，物の形や色の認知に比べて苦手であるとされており，その原因として視覚認知の背側経路の障害が考えられている。一方，視覚認知腹側経路の機能の一つである顔認知の能力は比較的保たれているとされてきたが，倒立顔に対する反応は特異であるとする報告もみられ，我々も，13 歳の WS 患児において脳磁図による検討を行い，正立顔への反応は健常成人と変わらないのに対し，健常成人で見られる倒立顔に対する反応潜時の遅れが見られない（倒立効果がない）ことを報告した(Pediatr Neurol. 2006)。

今回はこれまでの検討を発展させ，他の WS 患児らにおいても，顔認知の倒立効果を認めないという所見を確認しうるか否か，およびその結果が同年齢の定型発達者と異なるか否かについて, MEG ならびに事象関連電位を用いて検討した。

【方法】MEG 検査の対象は 13 歳女性 (sub.1) の WS 患者で，正立顔，倒立顔，オブジェクト（車）を視覚刺激として提示し，反応潜時，推定双極子部位を同年齢定型発達者（2 名)と比較した。

事象関連電位検査は 16 歳(sub.2)，14 歳(sub.3)，11 歳(sub.4)の男性患者を対象に，正立顔，倒立顔，オブジェクトを視覚刺激として提示し，反応潜時並びに振幅を健常同年齢児データと比較した。

【結果と考案】sub.1 に対する MEG 検査では，同年齢定型発達者では 2 名ともに認めた反応潜時の遅れを認めず, 倒立効果を認めない結果となった。事象関連電位検査では，sub.2 については倒立効果を認めず，同年齢コントロール群と異なる結果となったが，sub.3 については，倒立顔に対してコントロール群と同様に反応潜時の延長，振幅の増大を認め，倒立効果を認めた。sub.4 については，倒立効果は明確ではなかったものの，同年齢定型発達児との有意な違いを認めなかった。

倒立効果を認める児（既報告例 1 例，sub.1，sub.2)と定型発達者との有意差を認めない例 (sub.3，4) について，その他の発達経緯について検討したところ，視空間認知の検査所見に相違を認めることから，倒立効果の発現，ならびに顔の認知の成熟に関して，腹側経路と背側経路

のかかわりを含めた更なる検討の必要性が示唆された。

3. 脳磁計を用いたヒトにおける感覚情報処理の研究

寳珠山　稔（名古屋大学医学部保健学科）

感覚情報処理の基本的かつ重要な要素の 1 つとして逸脱反応の検出がある。Mismatch negativity(MMN) は注意の向けられていない一定の刺激系列の中で稀に逸脱刺激によって誘発される反応であり，逸脱刺激の自動的検出の脳内プロセスを反映するものと考えられる。MMN が生じる過程では時間経過の中での感覚記憶が重要な要素であり後に続く刺激との相互反応の差異が MMN として記録されるものである。一方，一連の刺激系列の中で，ある刺激が先行する刺激と同じものであるか否かにより神経群の活動は影響を受ける。自覚的な認知や弁別というプロセスを生じない場合でも，この現象 (adaptation) は末梢レベルあるいは中枢レベルの各段階で生じている可能性がある。Adaptation は，ひいては刺激の弁別や認知，あるいは MMN の出現を生じていく神経活動に寄与するものと考えられるが，MMN そのもの発生機序との異同は明確ではない。

本研究では，周波数構成が異なるものの弁別ができない 2 つの聴覚刺激を用いて Mismatch field(MMF)と adaptation 反応について全頭型脳磁計を用いて計測した。健常被験者 10 名について 7 つの周波数（中心周波数 675Hz）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 (S1) として与え CS6 には含まれない 675 Hz の音(S2)に対する聴覚誘発脳磁場(auditory evoked magnetic field, AEF) の adaptation を観察した。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。

AEF の adaptation としての変化は潜時 200 ms の成分 (P2m) について S1 が CS7 であった場合に P2m の減衰として認められた。しかし，CS6 と CS7 による MMF は検出できなかった。P2m の電流原は聴覚野内であるものの潜時約 100 ms で認められる成分 (N1m) のそれより約 1cm 前方に推定された。

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。本研究結果は，大脳皮質レベルにおいても AEF の adaptation による変化と MMN は区別されうることを示すものと考えられた(Hoshiyama et al., Eur J Neurosci, 2007)。

4. 異言語話者による音声の脳内処理過程に関する検討

大岩昌子（名古屋外国語大学）

音声言語の知覚，認知について異言語話者間での比較検討をすることで，言語が保持する音声的特質が母語話者の脳内処理過程に及ぼす影響を音響学的および生理学的に検証してきた。日本語話者およびフランス語話者による音声に関わる心理実験，および発話の音響分析を行い，各言語話者の発話に含まれる周波数成分，各話者による音節などの持続時間，また高さの制御を捉えた。また音声言語の受容過程について，各母語話者（日本語，英語，フランス語）を対象に，母語，あるいは母語以外の音節構造を持つ非言語の音刺激に対する聴覚誘発脳磁場 (Auditory Evoked magnetic Field: AEF)を検討してきた。日本語に特殊モーラとして存在する長音に注目し，母語に長音を持たないフランス語話者と日本語話者における聴覚野の活動パターンに対する母語の影響を脳磁図 (MEG) を用いて生理学的に検討した。指標としてミスマッチフィールド (MMF) という，1 秒前後の短い間隔で繰り返し提示される同一の音（標準刺激）の中に，それとは異なる音響的特性を持つ逸脱刺激がまれに挿入され

た場合に，逸脱刺激に対して特異的に出現する誘発脳磁場成分を用いた。日本語話者，フランス語話者ともに，長音を含む語音が逸脱刺激の際の MMNm（Long 条件），単音を含む語音が逸脱刺激の際の MMNm（Short 条件）が左右大脳半球の側頭部に認められた。しかし，検出された MMNm は日本語話者，フランス語話者において差が認められ，母語に弁別的な長母音を持つか持たないかで聴覚野の反応が異なることが明らかになった。

5. 脳磁図を用いた声認知に関連するヒト脳機能の研究

軍司敦子（国立精神・神経センター 精神保健研究所）
柿木隆介

発話に関連して生じる脳活動は，さまざまな皮質領域が並行して連続的に賦活される。このような活動を捉えるため，SAM(synthetic aperture magnetometry: SAM) 法を用いて，発話中の脳磁図における事象関連脱同期 (Event-related desynchronization: ERD) の解析を試みた。

健常成人を対象に，singing，speaking，humming，imagining 課題に対する MEG 反応を比較したところ，いずれの発話においても，α波(8-15Hz)およびβ波(15-30Hz) 帯域における ERD が両側半球の感覚運動野発声関連部位で認められた。singing 条件に対する ERD は，右半球において speaking 条件や humming 条件に対する ERD よりも有意に大きいことから，喉頭調節の相違や構音の有無が反映されたと思われる。すなわち，発声関連部位のコントロールは両側から支配を受けているものの，歌のような複雑な構音や調音をともなう場合には半球間の優位性が生じるのかもしれない。

さらに，実際の発声をともなわない歌唱の想起では，高γ波 (60-120Hz) 帯域の ERD がブローカ領野で認められた。この結果から，実際の発声企画・実施と共用する脳活動とは別に，語想起に特異的に反映される処理過程が示唆された。

6. 前頭葉シータ波活動と脳高次機能

佐々木和夫（自然科学研究機構）
南部篤，逵本徹

前頭葉のシータ波活動が，ヒトやサルの或る種の脳高次機能に関係している可能性が示唆されている。サルの大脳皮質から直接記録を行うと「注意集中」に関連すると解釈可能なシータ波活動が前頭前野 9 野と前帯状野吻側端 32 野に観察されるため，ヒトで観察されるシータ波活動も，それに相当する部位の機能を反映している可能性が高い。「注意集中」は多様なプロセスと関連していると考えられるため，その主たる要素を抽出することが望まれる。そのためには主観的内観を報告できるヒトを対象とした研究を行うのが有効であろう。このような観点から，我々はヒトが各種作業課題を行う際の脳磁場を解析し，シータ波の発生要因の検討と発生源推定を行った。その結果，時間の持続感覚や意識集中に関連すると考えられるシータ波活動が脳磁場計測でも認められ，主観的な集中の度合いとシータ波の発生はよく一致した。またその発生源は前頭葉背外側部および内側部に推定された。これはサルでの結果と矛盾しない。未解明である「意識」と前頭葉シータ波の関連を示唆する結果である。

7. 脳磁図を用いた上顎・下顎の歯種による皮質再現部位と他の口腔および顔面領域との比較

佐藤　亨至（東北大学病院　矯正歯科）

すでに，Penfield らは一次運動野・感覚野の広い部分が舌や口唇など口腔に関与していることを報告している(1952)。最近，口腔の最も重要な機能である咀嚼が，高齢者では認知症の予防に関係し，若年者では判断・記憶・学習などに影響するのではないかと考えられるようになってきた。そこで，咀嚼がどのように高次脳機能メカニズムに影響を与えているかを解明することが必要である。

また，切歯，犬歯，小臼歯，大臼歯はそれぞれ形態の違いから与えられた咀嚼機能が異なっていることは明らかである。しかし，これらの皮質における SI での再現が異なることを示した研究はない。歯は，歯根膜を介して歯槽骨に植立されているが，人体で最も鋭敏な感覚受容器であり，わずか数十μm の太さの髪の毛でさえも感じ取ることができる。したがって，矯正歯科治療をはじめとして咬合の再構成を図る場合は，これらの中枢における機能分担を明らかとする必要がある。まず本研究では，その基礎的情報を得るために，時間分解能の優れた MEG を用いて歯に対する刺激方法の確立と，口腔の他の領域である舌，歯肉，口唇や顔面領域の刺激による再現部位と比較することを目的とした。

今年度は，アーチファクトの少ないデータが得るための歯に対する効果的な刺激方法の確立を行うことから検討を開始した。刺激の加算は 1000 回程度行うため，苦痛を与えないように配慮する必要がある。したがって，痛みを伴う電気刺激ではなく，機械刺激を選択することとした。バルーンを用いて歯を介して歯根膜への機械刺激を行うこととし，個々の歯に対する刺激装置の試作を行った。試作された機械刺激装置を用いて実験を行ったところ，切歯，犬歯，小臼歯，大臼歯に選択的に刺激が与えられ，アーチファクトの少ないデータが得られることが確認された。

しかし，その後研究の進め方について柿木教授らと色々と模索していたが，残念ながら研究の遂行には至らなかった。

【研　究　会　報　告】

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：曽我部　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 adcances 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）

（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）

（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，曽我部　正博（名古屋大学大学院医学系研究科細胞生物物理）

（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

ノメディス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・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。エネルギッシュな発表が相次ぎ，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・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内向き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。我々は古典的内向き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ペルミン（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ペル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 ホメオスター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－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 チャンネルは，電位依存性のカリウムイオンチャンネルである。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，チャン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ト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－ニフェカラント複合体のイオン電流のシミュレーションから，薬剤のブロックのメカニズムを議論した。

（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）

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部域はなく，膜電位依存性を持つチャネルとは認識されていない。

我々は, ツメガエル卵母細胞を発現系として用い, 2 本刺し膜電位固定下で，ATP 投与後の定常状態における $P2X_2$ チャネル電流と膜電位との関係を定量的に解析した。$P2X_2$ チャ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，チャネルポアの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，$P2X_2$ チャネルは，膜電位と ATP 濃度に依存するゲート機構を持つことが新たに示された。

現時点では，膜電位と ATP 濃度に依存してチャ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 $P2X_2$ 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，$P2X_2$ の負染色電顕像の 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，イオンチャン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いている状態で，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]，曽我部　正博 [1,2,3]
（[1] 名大院　医　細胞生物物理，[2]JST 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 1.9Å 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 3.2Å 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：曽我部　正博（名古屋大学大学院医学系研究科）
所内対応者：久保　義弘（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
渡邉　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，渡邉博康（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），曽我部正博（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発展によって，シグナリングを担う主要な分子の構造が次々に明らかになり，その構造機能連関や細胞内での動態が明らかになりつつある。このような現状を踏まえ，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. Leto[3]，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
[3]Molecular 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）と尿細管糸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 Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 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 PLCγ2 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 (PLCζ) 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 Ca^{2+} 遊離（Ca^{2+} 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 Ca^{2+} オシレーションが停止する。我々は PLCζ 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 Ca^{2+} 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。PLCζ 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，Ca^{2+} 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 PLCζ の Ca^{2+} 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

渡邉博康，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）

哺乳動物の中枢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。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 200μM 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 チャネルの生理機能を明らかにすることを目的に，本チャ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 /CaMKIγ 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・長さと相関することが明らかになった。すなわち CLICK-III/CaMKIγ 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 Ca^{2+} 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 PLCβ の Ca^{2+} 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 を薬理学的に阻害すると 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 依存的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を 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。ポドゾームには 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 のポドゾ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。以上からを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相関し 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βγ 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，シナプス伝達の様々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

栂谷内　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―

渡邉　泰祐（理化学研究所）

(17) MS^n 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），渡邉泰祐（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），栂谷内晶（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，この分野の先端を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 FACScan 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-セレクチ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-セレクチ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-セレクチ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について調べたところ，E-セレクチン刺激による 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-セレクチン刺激によるアクチンの変化を観察すると，E-セレクチン刺激後 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-セレクチ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-セレクチンとの接着を阻害するだけでなく，E-セレクチ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，[2]CREST, 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 の可溶型組換体を作成し，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），あるいは牛顎下腺ムチン (BSM) などを用いた。可溶型組換体が 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，ウエ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。α2,6 又はα2,3 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 (Aβ) 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 Aβ 重合機構としてガングリオシド GM1 に結合した Aβ (GM1-bound Aβ, GAβ) が Aβ 重合のシードとして機能する可能性があること，また，GAβ 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 Aβ 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 Aβ を添加すると，クロロキン処理細胞では Aβ 重合が促進した。また，この Aβ 重合促進は，GM1 結合性コレラ毒素および GAβ 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 GAβ 形成をとおして，Aβ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おり，AD 発症に GM1 代謝の撹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に上昇する。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ると考えられる。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) は遅発型クラッベ病の表現型を呈し，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ベ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，サポシン 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，サポシン 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・スフィンゴリピ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]，中北愼一[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授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-アセチルラクト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）β1,3-*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

栂谷内 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β1,3-*N*-アセチルグルコサミン転移酵素遺伝子 (β3GnT) 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β3GnT のうちβ1,3-*N*-アセチルグルコサミン転移酵素 2 (β3GnT2) 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β1,3GlcNAc 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β1,3 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β1,3Glucose 転移酵素遺伝子の探索のため，これまで知られている β3GT 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。可溶型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-*p*NP 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β1,3Glucose 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 β1,3Fucose-α-*p*NP であることが強く示唆され, この酵素は β1,3Glusose 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，β1,3Glusose 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Siaα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manを主要構造とする。哺乳類の *O*-Man 型糖鎖修飾は a-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 GlcNAcβ1-2Manの形成に係る GlcNAc 転移酵素 (protein *O*-mannose β1,2-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－

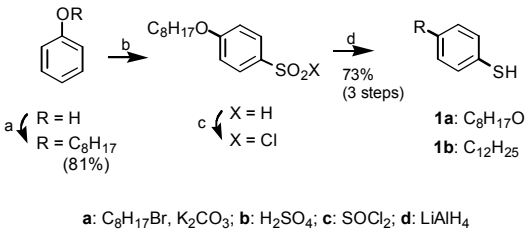
梶本哲也，石岡祐一，加藤孝博，長谷川純也，野出 學（京都薬科大）

【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。

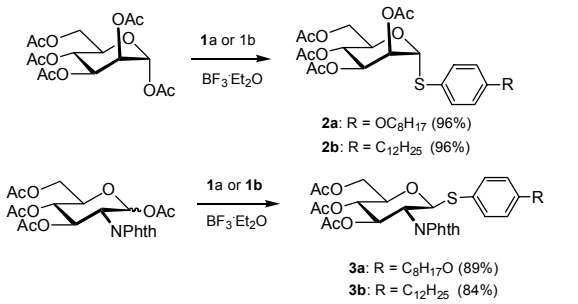
【実験・結果】演者らは以前，炭素数12以上のアルカンチオールが無臭であることを報告している。本知見に基づき，ベンゼン環の直線炭素数を 4 と換算して，*p*-オクチルオキシベンゼンチオール (1a) を無臭ベンゼンチオールとして合成した。また一方で，合成洗剤の原料となる*p*-ドデシルベンゼンスルホン酸を還元して得られる*p*-ドデシルベンゼンチオール (1b) も利用することとした(Scheme 1)。

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

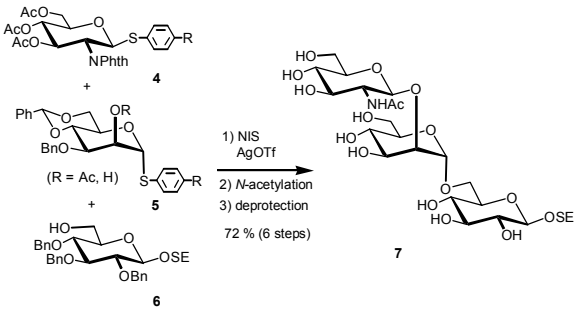
グリコシド (2，3) を高収率 (<96%) で得た (Scheme 2)。続いて 2，3 から誘導した 4，5 をドナーとし，グルコース誘導体 (6) に順次グリコシル化を行い，脱保護と N-アセチル化により GnTaseV に対する阻害剤の鍵中間体となる三糖 (7) の合成を完全無臭の条件で達成した (Scheme 3)。また，本手法をシアロ二糖 (8) の合成にも適用し，良好な結果を得た (Scheme 4)。



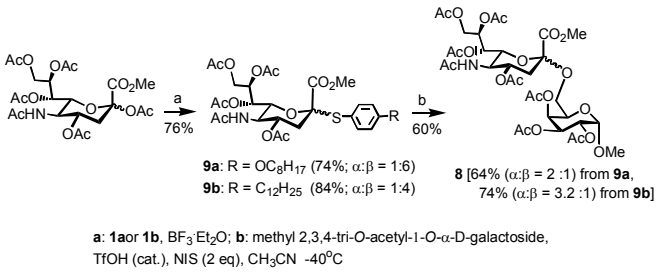
Scheme 1　Synthesis of *p*-octyloxybenzenethiol (1a, 1b)



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



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



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—

渡邉泰祐
（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。

（17）MS^{n}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 MS^n 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 MS^n 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 CIDMS^n (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，MS^1 の親イオン(*m/z*=953.8 (*z*=3))から得られた MS^2 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 CIDMS^3 スペクトルは，PA 化 N 型糖鎖（標準品）から得られた CIDMS^3 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，MS^n 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 CIDMS^3 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 MS^2 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 CIDMS^3 スペクトルは，標準品シアリルルイス X (sLe^x) の MS^2 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，MS^n 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]，中北愼一[3]，長谷純宏[3]，等　誠司[1]，池中一裕[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はなく，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。そこで本研究会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）染色体疑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-1α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

鍔田　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　－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）

(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-κB 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）ネクロー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関部門）

【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），鍔田武志（東京医科歯科大学難治疾患研究所），厳斌成（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），佐藤かお里（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）染色体疑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-1α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-1α) 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とした。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，細胞死の時空間的パターンを明らかにし，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 fibloblast 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 <I>c</I> 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) と言う 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的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，酸化的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

鍔田　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-κB 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-κB, 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は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-kB 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・DAP12 や FcRg を介した, PLCg の活性化が必要であるが，ITAM と PLCg 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 PLCg 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～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-1βなどのサイトカイン遺伝子の発現が 10～50 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。本研究会では，DNA 損傷によって誘導される HeLa 細胞の SAPK/JNK 活性化に Daxx と癌抑制遺伝子産物 Ras Ras association domain family 1C (RASSF1C) が関与することを見出したので報告する。1) Daxx は promyelocytic leukaemia-nuclear bodies (PML-NBs) に局在し，DNA 損傷によってユビキチン化され分解された。2) RASSF1C は Daxx と結合し, PML-NBs に共局在していた。3) RASSF1C は Daxx 分解に依存して, 核から細胞質に移行した。4) 核から放出された RASSF1C は細胞質の微小管と結合し，SAPK/JNK 活性化誘導やアポトーシス誘導に関与した。すなわち，核内 PML-NBs に存在する Daxx-RASSF1C 複合体が DNA 損傷のセンサーとしてとして機能し，RASSF1C の細胞質への放出を介して, SAPK/JNK 活性化誘導するという興味深い分子機構を見出した。本研究成果は，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。本研究会では, 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-κB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-κB の活性化の障害された細胞では，活性酸素(ROS) の蓄積が生じ，遷延化する c-Jun N-terminal kinase (JNK) の活性化が誘導されることを，我々はこれまでに明らかにしてきたが，その分子メカニズムの詳細は不明であった。今回，我々は NF-κB 欠損細胞では，アポトーシス抑制タンパクである c-FLIP$_L$ が TNFα 刺激により速やかに分解されることを見いだした。逆に c-FLIP$_L$ を発現させることにより, NF-κB 欠損細胞で生じる ROS 産生や JNK の活性化が抑制されることが明らかとなった。興味深いことに *c-Flip-/-*マウス由来の細胞では，NF-κB 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 TNFα 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 医歯学総合研究科，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 (iPLA2β) を同定した。ついで，iPLA2β の病理的役割と生理機能を明らかにする目的で iPLA2β 欠損マウスを作成し解析した。その結果，iPLA2β 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，iPLA2β 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，iPLA2β 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 iPLA2β 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）ネクロー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，ネクローシス死誘導におけるネクローシス性容積増加 (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ーシス死は，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 がネクロー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ー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]，曽我部正博[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 Grinstein[2]（[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：PPARα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 PPARα 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めて示された。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テーション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テーションシステムは，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 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）

膵臓の導管系は，高濃度（ヒトでは 140 mM に達する）の HCO_3^- を含む等張液を分泌する。管腔膜を介する HCO_3^- 分泌の機構としては，CFTR による輸送（CFTR の HCO_3^- conductance）と，SLC26 family 輸送体による Cl^--HCO_3^- 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 HCO_3^--free，150 mM Cl^- の条件で測定を開始した。表層灌流液を 25 mM HCO_3^- -5% CO_2-125 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（CO_2 の流入による）した後に上昇，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^--HCO_3^- 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]，曽我部正博[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度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 μM) 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 μM) により完全に消失したが，Gd^{3+} (1 μM)，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 μM)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 PPARαのリガンドとして知られているが，PPARαK/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 の介助の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，脳室上衣，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，G_0/G_1 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，G_0/G_1 期遅延による増殖抑制効果を示した。また，G_0/G_1 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α 3 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 Grinstein[2]（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）

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 B^0 型アミノ酸トランスポーター B^0AT1(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，B^0AT1 の頂上膜移行が抑制されることから，Tctex1 が B^0AT1 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: PPARα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 (PPARα) 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 PPARα 刺激薬 (Eicosatetraynoic acid (ETYA), WY14643), 8BrcGMP により再現され，AA と PPARα 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 PPARα 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 PPARα 刺激薬は $[Ca^{2+}]i$ 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 PPARα 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/ PPARα/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，このことからも 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 歳以上の健常高年者が 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 歳以上の健常高年者が 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

蓑部　悦子[1)]，韓　冬雲[1,2)]，Zahangir A. Saud[1)]，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 $Ca_V1.2$ および $Ca_V1.3$ 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^+/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・医・薬理学）

（12）マウス大動脈平滑筋細胞における Na^+/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)]）

（13）心筋ミトコンドリア Na^+/Ca^{2+}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），蓑部　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. Saud [1)]，王　午陽[1)]，はお　麗英[3)]，亀山　正樹[1)]
（鹿児島大学大学院・医歯学総合研究科・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ネルを活性化し，その濃度-反応関係は 2μM 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 %程度の弱いチャネル活性効果を示し，チャネルの 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2[1)]，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 ($I_{Ca,L}$) 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，$I_{Ca,L}$ 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+}チャネル $Ca_V1.2$及び $Ca_V1.3$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+}チャネルを構成するα_1 サブユニットとして $Ca_V1.2$ と $Ca_V1.3$ 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，房室結節に限局している。両者は相同性が高いにも拘わらず，$Ca_V1.3$ の活性化及び不活性化の電位感受性は $Ca_V1.2$ より約-15mV シフトしている。$Ca_V1.2$ 型の第 2 膜貫通リピートを $Ca_V1.3$ に置換した CD2 キメラチャネルは $Ca_V1.3$ 型の電位依存性不活性化を示す。そこで $Ca_V1.2$ と $Ca_V1.3$ 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，$Ca_V1.3$

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 Ca^{2+} 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 Ca^{2+}チャネルβサブユニットと結合し L 型 Ca^{2+}電流 ($I_{Ca,L}$) 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 Ca^{2+}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 $I_{Ca,L}$ 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 $I_{Ca,L}$ 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 Ca^{2+}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，β_1 受容体は Gs，Gi/o，β2 受容体は Gs，Gi/o，Gq，β_3 受容体は Gs との共役が確認された。しかし，β_3 受容体が非 Gi/o 経路を介して K_G チャネルの活性化を行なった，β_3 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 の心筋イオンチャネルに及ぼす作用が注目されている。
【目的】ALD の I_f チャ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・医歯学総合研究科・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考えられている。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 μM) 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 μM)。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 Na^+/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）

Na^+/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 (IC_{50}=18nM)。NCX1 と NCX3 間のキメラ解析ならびにシステインスキャニング解析により，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 Na^+/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)]）

Na^+/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 Na^+/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 Na^+/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 nMCa^{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　惠二（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），松嵜　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が伴っているもので，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い，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変化は，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」の切替りに相関する脳活動の 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って，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って，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) 視覚運動刺激によって歪むのは，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,…と減少していく奇数調波 (3f, 5f,…) 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的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を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さった時に，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様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て計 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，マカクザ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，その他の領野は 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限局していた。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－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ア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 $P2X_4$ 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-Redondo[2]，古家 喜四夫[2]，

山本 希美子[3]，安藤 譲二[3]，曽我部 正博[1,2]

（[1]名古屋大･医･細胞生物物理，[2]JST･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 Abdin，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 $P2X_4$ 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 $P2X_7$ 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）

（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（東京慈恵医大・総合医科学研究センター・神経生理）

（Ｐ２）中枢シナプス前 A_1 受容体の in-vivo 遺伝子ノックダウン

繁冨 英治（東京慈恵医大・総合医科学研究センター・神経生理）

（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・医科学研・神経ネットワーク）

（Ｐ４）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）

（Ｐ５）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）

（Ｐ６）ミクログリアの $P2X_4$ 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）

（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（九州大・薬・薬効解析）

（Ｐ８）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）

（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（東京慈恵医大・薬理）

（Ｐ10）OGD-induced ATP release via maxi-anion channels in mouse astrocytes

Hongtao Liu（生理研）

（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（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，周東智（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，繁冨英治，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，輿水崇鏡，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，輿水，小林の発表があり，輿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−血管内皮細胞機能連関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プ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 $P2Y_1$ 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 $P2X_2$ 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 Ca^{2+}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 Ca^{2+}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 $P2X_7$ 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，本邦のプ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。プリン作動性情報伝達に関与する受容体および細胞外 ATP 代謝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プ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プ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/ phoshodiesterase 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，NPP1 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 Cγ 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-1β 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－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–ペリサイト–血管系連関に注目し，アストロサイト–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 Ca^{2+} wave を呈するが，これは ATP 及び $P2Y_1$ 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 $P2Y_2$ 受容体が発現しており，Ca^{2+} 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–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 Ca^{2+} 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 $P2Y_2$ 受容体作用薬 UTP で灌流刺激すると，細胞内 Ca^{2+} 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–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 $DiOC_5$ (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。$DiOC_5$ (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，$DiOC_5$ (3)の膜電位感受性を，$DiOC_5$ (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，$DiOC_5$ (3)で ER と核膜をラベルし ATP を投与すると，$DiOC_5$ (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うる[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 Ca^{2+}-activated potassium channels in Ca^{2+} store control Ca^{2+} release. *FEBS J* **273**:3585-3597.
3. Yamashita M (2006)‘Quantal’Ca^{2+} 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ア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）

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アントサブユニット $P2X_{2e}$ 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。$P2X_{2e}$ 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アントである $P2X_{2b}$ 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 $P2X_2$ 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 $P2X_2$ 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，$P2X_{2e}$ 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。$P2X_{2e}$ 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アントの $P2X_{2b}$ 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 $P2X_2$ 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 $P2X_2$ 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，$P2X_2$ 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 $P2X_4$ 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-Redondo[2]，古家 喜四夫 [2]，
山本 希美子 [3]，安藤 譲二 [3]，曽我部 正博 [1, 2]
([1] 名古屋大･医･細胞生物物理，[2]JST･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 $P2X_4$ 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，$P2X_4$ 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 $P2X_4$ 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 $P2X_4$-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，$P2X_4$ 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 $P2X_4$-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滲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，$P2X_4$-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 $P2X_4$-mGFP であると考えられた。これらの $P2X_4$-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℃）を示した。$P2X_4$ 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 $P2X_4$ 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 $P2X_4$ を細胞に共発現し同時観察したところ，細胞膜上の $P2X_4$ 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 $P2X_4$ 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―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($^{123/125}$I-iomazenil) を用いる神経機能評価，② RI 標識したオクタン酸 ($^{11/14}$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。

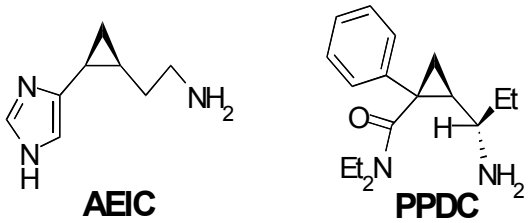
本会では，我々の研究成果を中心に，分子イメージングによる脳虚血病態，特にニューロン・グリア機能解析に関する最近の知見を紹介する。

（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しうる。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”，杉本直己偏，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研究分野

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，アストロサイトを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
－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）

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 μM)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張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 Abdin，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$P2X_7$選択的作動薬BzATPを前処置することにより，細胞外Ca^{2+}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，$P2X_7$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Vmaxを著明に低下させたが，Km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$P2X_7$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，新生児期カプ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，カプ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ると考えられた。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 $P2X_4$ 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 $P2X_4$ 受容体の発現がミクログリアで著明に増加し，同受容体を遮断することでアロディニアが抑制されることを報告した。すなわち，神経因性疼痛発症にミクログリアにおける $P2X_4$ 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 $P2X_4$ 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，$P2X_4$ 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，$P2X_4$ 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，$P2X_4$ 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 $P2X_4$ 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）

頚髄症・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 $P2X_7$ 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 ATPγS (100 μM) 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，ATPγS (100 μM)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 μM) ならびに BzATP (100 μM) 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 μM) ならびに UDP (100 μM) 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 μM) を灌流投与すると ATPγS (100 μM) と同様に内向き電流が観察された。さらに，ATPγS 灌流投与によって生じた内向き電流は，$P2Y_1$ 受容体拮抗薬である MRS2179 (30 μM) の存在下において完全に阻害された。

以上の結果から，約半数の脊髄前角のシナプス後細胞において $P2Y_1$ 受容体が発現しており，脊髄損傷によって遊離されるであろう細胞外 ATP によって脊髄前角細胞は $P2Y_1$ 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，脊髄損傷の急性期における遅発性神経障害に $P2Y_1$ 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）

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 A_1 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連関が維持された 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。今回はシナプス前アデノシン A_1 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，頚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，麻酔ラットの頚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：繁冨英治，山田千晶，田村友穏）。

（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 $P2X_2$ 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 $P2X_2$ 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。$P2X_2$ 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か減少した。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 $P2X_2$ 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 A_3 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 Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 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 $P2X_7$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】$P2X_7$受容体は，ATP との結合により活性化すると陽イオンの流入，分子量 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 $P2X_7$受容体を介する Erk1/2 の活性化がネクロー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 $P2X_7$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。$P2X_7$受容体蛋白質の発現は特異的抗体を用いたウエスタンブロット解析により，細胞障害性は細胞外に漏出した乳酸脱水素酵素の活性を測定することにより調べた。細胞径の変化はフローサイトメーターを用いて前方散乱光を測定することにより解析した。

【結果および考察】$P2X_7$ 受容体蛋白質の発現量は胸腺細胞に比べて脾臓細胞に多く，ATP 処置による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，$CD4\text{-}8^+$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，$P2X_7$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 $P2X_7$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 (IP_3) 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。蛍光物質の細胞内潅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 照射および細胞外潅流の時間を 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) を示すものがあった。

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 A_1受容体の in-vivo 遺伝子ノックダウン

繁冨 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シグナリング関連機能分子が多数同定されている。細胞外プリンシ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。

頚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 A_1 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 A_1 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 A_1 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 A_1 受容体に対する合成 siRNA（A_1 受容体 siRNA），ランダム siRNA および PBS を導入した。A_1 受容体 siRNA 導入後 3-14 日において，節状神経節における A_1 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 ±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±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 A_1 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シ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 theremosensation

Mandadi Sravan[1]・福見-富永 知子[1,2]・柴崎 貢志[1,2]・曽我部 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。

先ず，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，$5\text{-}HT_3$ 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 $TRPV_3$, TRPV4 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 TRPV3 欠損マウス，TRPV4 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 P2X4 channel activity

Fernando Lopez-Redondo[1], Kimiko Yamamoto[2], Joji Ando2, Kishio Furuya[1],
Takeshi Kobayashi[3], Keiji Naruse[4] & Masahiro Sokabe[1,3,5]
([1]Cell Mechanosensing, SORST, JST; [2]Dept Biomed Engin Grad Sch Med, Univ of Tokyo;
[3]Dept Cell Biophys, Nagoya Univ Grad Sch Med; [4]Grad Sch Med, Dent & Pharmacy, Okayama Univ,
[5]Dept 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 TRPV1 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 know 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 $P2X_4$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 $P2X_4$受容体 ($P2X_4R$) 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，$P2X_4R$ 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 $P2X_4R$ 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 $P2X_4R$ 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，$P2X_4R$ 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 $P2X_4R$ の発現を亢進していると考えられる。FN による $P2X_4R$ 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 $P2X_4R$ 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。$P2X_4R$ 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，$P2X_4R$ 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，触刺激を激烈な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 $P2X_3$ 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 A_2 (cytosolic phospholipase A_2; $cPLA_2$) 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 $cPLA_2$ 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 $cPLA_2$ の活性化およびこの活性化に対する選択的 $P2X_3$ 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。

$cPLA_2$ の活性化は，活性化型である Ser505 リン酸化型 $cPLA_2$ (phosphorylated $cPLA_2$; phospho- $cPLA_2$) 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-$cPLA_2$ 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-$cPLA_2$ 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-$cPLA_2$ 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。$cPLA_2$ には 4 つのサブタイプ (α，β，γ，δ) が存在し，その中でも $cPLA_{2\alpha}$ 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 $cPLA_{2\alpha}$ 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-$cPLA_2$ の発現レベルが低下した。さらに，選択的 $P2X_3$ 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-$cPLA_2$ 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 $P2X_3$ および $P2X_{2/3}$ 受容体を介した $cPLA_2$ 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）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[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）

α7 ニコチン性アセチルコリン受容体（α7 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α7 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α7 受容体の発現を確認したが，ミクログリアのα7 受容体は神経細胞に発現するイオンチャネル型のα7 受容体とは異なり，PLC 活性化と IP_3 生成を介して細胞内ストアからの Ca^{2+} 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α7 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 $P2X_7$ 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，α7 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/IP_3 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 $P2X_7$ 受容体を介して $[Ca^{2+}]_i$ 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 IP_3 受容体遮断薬 xestospongin 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α7 受容体は $P2X_7$ 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，α7 受容体は PLC/IP_3 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 $P2Y_1$ 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 $P2Y_1$ 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 ischenia. 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 μM, 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, $P2X_7$ 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]，曽我部 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 $P2Y_2$ や乳腺筋上皮細胞が持つ $P2Y_1$ の活性化を介して Ca^{2+} 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 10μM 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証している。

（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 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 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 $[Ca^{2+}]_i$ 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 $P2X_7$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 $P2Y_2$ 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，$P2Y_2$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 $P2Y_2$受容体アゴニスト UTP で刺激すると，細胞内 Ca^{2+}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 細胞培養上清中に含まれる 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，$P2Y_2$受容体刺激により細胞内 Ca^{2+}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 $P2X_7$ 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 $P2X_7$ 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差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 $P2X_7$ 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 $P2X_7$ 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’- 一リン酸 (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，脳は大脳（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）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）

（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）

（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/CaMKIγ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）

【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，斉藤紀美香，佐々木幸恵，山肩葉子，井本敬二（生理研）

【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，さらには炎症反応におけるカルシウムシグナリングなどが議論された。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 C1P）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，カルシウムイオのフォアで脱顆粒を誘導した際に細胞内の C1P 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）

ミリストイル基は，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 のミリストイ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。ミリストイ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。ミリストイ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トイル化タンパク質データベースを構築し(http://mendel.imp.ac.at/ myristate/myrbase/)，その中からミリストイル化により 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画分―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 のヒトホモローグは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－，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)-γ2 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-γ2 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-γ2 is essential for mature B cell development. (2003) *J. Exp. Med.* **198**, 581-589

Hikida, M. and Kurosaki, T. Regulation of phospholipase C-γ2 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 (FcεRI) 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 FcεRI 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し，カルシウムストア依存性カルシウムチャネル (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。僅か二文字で書けてしまいますが，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., Itohara, 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 C^{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βγ 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. Hashimotodani, 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

ュリン(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ている。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/CaMKIγ 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・軸策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/CaMKIγ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プレニル化，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，神経細胞軸策・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・長さと相関することが分かった。樹状突起とは対照的に軸策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/CaMKIγ 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）

αCalcium/Calmodulin dependent protein kinase II (αCaMKII) 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。αCaMKII は細胞内 Ca イオン濃度上昇に伴い 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) αCaMKII の活性変動の in vivo リアルタイムモニタリング

αCaMKII 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αCaMKII 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-αCaMKII と CFP-CaM を用いたαCaMKII と CaM との相互作用解析系, YFP-αCaMKII-CFP を用いたαCaMKII 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αCaMKII 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αCaMKII 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αCaMKII の脳高次機能に対する役割の解明

αCaMKII 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, αCaMKII 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，αCaMKII 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αCaMKII 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；αCaMKII 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，その活性が大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）

（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），福島章顕，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，大川宣昭（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 (α4, α5, β2) の特異的サブユニットが存在する。こられ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，β2 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，α4 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 α5 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。

先ず, 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 との会合性に変化が生じ，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. Sompolinsky, Y. Yarom & M. H^{TM}usser : 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ディファ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 1 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。

1.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）

下オリー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 $P2X_4$ 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，その広がり方に従って，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，これまで統一的見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ー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ー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，バー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，バー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-glial 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 欠損マウスー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 silkmoth 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大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

寳珠山　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），野嶌　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（白鴎大・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 ではけして行えないものであり，今後も脳磁図の長所を十分に生かした研究の発展をのぞんでやまない。

（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変化を観測した。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変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。

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とする。

（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。焦点をしぼり，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。

【シミューレーション】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）

感覚情報は大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ありますが，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大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）

【背景】NeuroScan 社製視聴覚刺激呈示装置 STIM では呈示困難な視覚提示課題を作成する。
【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度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βERD 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大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大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，大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，実用に耐えると考えられる。

（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」と言う前提から「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

寳珠山　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変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文政(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 構造画像を標準脳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。ニオイ物質にはバニリンを用い，刺激提示時間は 200 ms，刺激間間隔は 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, Hijiyama 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（生理学研究所 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ていた。

（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 variably 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 accepts 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 Toki[1], Yasumasa Okamoto[1], Keiichi Onoda[1],
Akiko Kinoshita[1], Shigeto Yamawaki1, Hiroshi Yoshida[2]
（1Department of Psychiatry and Neurosciences,
Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University
[2] Department of Social and Clinical Psychology,
Faculty of Contemporary Culture, Hijiyama 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 cingulated 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(3mAx5)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]
([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)

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 cortex[1]. 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 task[2]. 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
中陦克己（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（京都大・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），中陦克己（近畿大学），野崎大地（東京大学大学），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，纐纈大輔（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行動目標を達成するため，脳はこれら多種多様の情報を状況に応じて有機的に統合し，運動情報として運動野に出力しなければならない。また，物を掴む，腕を伸ばすなど，われわれが日常的に行う個々の動作は，長年に

わたる経験や習慣に基づき脳内で形成された運動プログラムに従って，ほとんど無意識のうちに実行されている。状況に応じて意識的かつ合目的的にある特定の行動を企画，遂行しようとする際，脳はそれまでに学習，獲得してきた無数の運動プログラムや認知・思考パターンの中から状況に最も適合したものを選び出し，それらを時系列的に順序よく組み合わせて，まとまりのある一連の行動として出力しなければならない。しかし，このような行動の組織化の神経機構については未だ明らかになっていない。

すなわち，脳科学は本来，脳機能をシステムとして理解し，究極的には“個体の組織化された行動発現のメカニズム”の解明をめざす学問領域である。しかし，現在の脳科学は，研究の進展とともに，研究テーマがそれぞれの専門分野ごとに細分化されるようになった結果，個々の分野の研究者がカバーあるいはフォローできる学問領域も狭小化し，各専門分野を横断的かつ統合的に捉え，相互理解を深めることがきわめて困難な状況になってきた。個々の研究領域にのみ注目していると，個体としての脳機能の全体像を見失う恐れがあり，生命現象を統合的に理解しようとする脳科学の基本的立場に基づいた研究姿勢が必要不可欠である。したがって，“個体レベルでの高次脳機能をシステム的に理解する”ためには，要素としての個々の神経機構を詳細に解析するだけでなく，それらを統合的に機能させる神経システムの解明が重要であり，そのような視点から研究が展開されなければならない。

「高次脳機能研究の新展開」と題した本研究会では，神経解剖学，神経生理学，分子生物学，情報工学など，多岐にわたる専門分野の若手あるいは中堅の研究者が，運動，感覚，認知，及び情動の各分野に関する最新の知見を紹介し，各分野における研究の趨勢，問題点，及び今後の展開に関する忌憚のない意見を活発に交換したい。

(1) 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も臨床的研究も多い。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的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は，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，経シナプス的に運動ニューロンに終止する最終介在細胞を同定した。経シナプス的に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 が点燈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燈したら右側，緑が点燈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

中陣　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覚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野は脳幹・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野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大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マ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の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同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の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を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みえるが，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，頭頂葉内側壁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変化を捉え，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はずであったが，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 adcances 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，薗村貴弘（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，冨岡良平，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 Gulledge，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，冨田江一，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 anesthsized (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 の量を免疫ブ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。この結果は免疫ブ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）

哺乳類の大脳皮質には，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ニック受容体により，シナプス前性に促通を受ける。また，光学的計測により，視床由来入力の促通には，興奮に続いて抑制が起こることも明らかにした。電気生理的実験により，この抑制は視床由来入力が，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，ニコチニック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蔽す

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, pyramidals 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 野ニューロンは大脳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 割のペアーで生じた。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の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って，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，苅部冬紀，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，シナプス入力は，細胞体近傍の 50μm 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 a7 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，纐纈大輔（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 方にお願いした。宮地氏は，狂犬病ウィルスを用いて，サルの皮質・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制の低い修飾と，高次視覚野あるいは V1 野 6 層のニューロンが関係するであろう遅く選択制の強い修飾，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「がちんこ」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 $G_{q/11}$ タンパク共役型代謝型受容体の活性化により合成・放出され，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どもの研究についてお話したい。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，そのダイナミッ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 a7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 a7 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 a7 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 a7 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 a7 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，a7 nACh 受容体に特異的に結合する蛍光色素でラベルした Alexa488 a 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 a7 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 a7 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 a7 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]，繁冨英治[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

小澤瀞司（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外の新知見

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），小澤瀞司（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），繁冨英治（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），冨田江一（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），和気弘明（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いるのではないかとの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，synaptsin 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）
繁冨英治（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。麻酔ラットの頚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い。

（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

渡邉博康，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）

哺乳動物の中枢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

小澤瀞司（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否かを調べた。

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，プルキンエ細胞内に 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プ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

picrotoxin 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，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ストである 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 ($GABA_B$R1KO 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 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）

熱産生器官である褐色脂肪細胞は，β_3 受容体の活性化を介して，脂質のβ酸化からミトコンドリアでの電子伝達の促進と同時に，脱共役蛋白 (UCP) を活性化し，ミトコンドリアの膜電位を減少し，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 Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 濃度測定法を応用した。FCCP の投与は 3 相性の $[Ca^{2+}]_i$ 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 Ca^{2+} 除去により部分的に消失し，第 2 相に細胞外 Ca^{2+} 依存成分と細胞内 Ca^{2+} 遊離依存成分の存在が判明し，後者は U73122 で消失した。又，無 Ca^{2+} 液中での CPA による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は FCCP の Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 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 Ca^{2+}-誘起性 Ca^{2+} 遊離が起こることが示唆される。一方，第 2 相の細胞外 Ca^{2+} 依存成分 Ca^{2+} 流入は，オリゴマイシンにより消失し，細胞内 Mg^{2+} 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 Ca^{2+} 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（生理学研究所認知行動発達機構研究部門）
足澤悦子，納富拓也，重本隆一（生理学研究所脳形態解析研究部門）
平林真澄（生理学研究所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 (WFV) 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 WFV 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気的に 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. WFV 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. WFV 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様になった。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ういう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, RRR) 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℃，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 頻度増加作用はα7 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α7 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 (Ihold) のシフトを惹起した。しかし，低濃度 SR95531 では Ihold 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 Ihold 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と考えられた。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，α1 とα5 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α1 受容体を介して全層で，V 層においてはさらにα5 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所分子生物学部門）
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 －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所分子生物学部門）

（3）細菌染色体の高次構造構築機構の解析
大庭良介（京都大学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
小暮健太朗（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）

（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－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－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　命科学研究所分子生物学部門），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　健太朗（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），臼田　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）

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あてられはじめた。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，情報的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所分子生物学部門）

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ー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。ネクローシスでは逆に，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 DNAseγ 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，DNAseγ はネクローシス 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～30nm 幅のファイバー構造～80nm 幅のファイバー構造～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であることを示唆している。

次に，30nm・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～10nm ファイバー～30nm ファイバー～80nm ファイバー～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ヤーである 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 のスペーサーと 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 20μM 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 5μM 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

小暮健太朗（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− 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 以上の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，a-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ってよい。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掻痒の感がある。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㈱）

（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 1μm 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 から数個の一列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圧凍結・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，曽我部隆彰，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な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，最近は，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

臼田信光，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 μM 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体形成に必須である MreB タンパク質がアクチンであることが明らかにされた。これらタンパク質は細胞内で重合し，繊維状の構造体を形成し，さらに螺旋状になる。これらの発見以降，螺旋状に分布するバクテリアタンパク質が今も新たに見つかっている。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.

Chenjuan 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 (Güteborg University)

P21: Melatonin-evoked protein secretion from the rat parotid gland *in vivo*.

Hülay Çevik Aras (Güteborg Univeersity)

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.

Kenjji 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) Expresssion and function of aquaporin-6 in the rat salivary glands.

Hiroshi Sugiya, 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 occurreDNAturally 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 IP_3 and Ca^{2+} 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 Nedd4-2.

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 Dinudom (Sydney University School of Medical Sciences)

P58: Ca^{2+} influx induced by ionomycin under a high $[K^{+}]_o$ 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），新間秀一（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体感していただいた。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，講演とリュ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年間のマススペクト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，冨樫和也，稲田仁，曽我部隆彰，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・先導科学研究科）

（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

槇島誠，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・機能協関研究部門）

（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 応答のモーダルシフト

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）

【参加者名】

槇島 誠（日本大学・医），宇野 茂之（日本大学・医），松縄 学（日本大学・医），田邊 勉（東京医科歯科大学大学院・医歯），小泉 修一（国立医薬品食品衛生研究所・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－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），曽我部 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），冨樫 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，冨樫和也，稲田仁，曽我部隆彰，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 を越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 (PIP_3) 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(PIP_2)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，PIP_2 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 PIP_2 濃度が増大し，脱分極時に PIP_2 濃度が減少することが明らかとなった。しかし，PIP_3 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 PIP_3 が脱リン酸化されて PIP_2 が生成されたためと仮定すると，PIP_2 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， PIP_3 または PIP_2 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，PIP_2 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，PIP_3 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 PIP_3 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 PIP_3 のみならず PIP_2 をも基質として脱リン酸化することが明らかになった。PIP_2 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，PIP_2 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
（岡崎統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 PIP_2 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。②PIP_2 への感受性が高い IRK1 をレポーターとして用いた実験，PIP_3 やPIP_2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貪食時での 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，膜電位が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・先導科学研究科）

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 PACαと PACβ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 FAD)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

槇島誠，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。LXRα及びLXRβ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・機能協関研究部門）

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，そののちにネクロー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 distict 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 Gd^{3+}, 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 Ca^{2+}結合タンパク質の一つであるカルシニュリン様タンパク質 (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 Y^{3+}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 $P2Y_2$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）

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 Aδ 線維には $P2X_{2/3}$ 受容体が，小型 c 線維には $P2X_3$ 受容体及び $P2Y_2$ 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 $P2Y_2$ 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 $P2Y_2$ 受容体作用薬 UTP を注入し $P2Y_2$ 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，$P2Y_2$ 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)，$P2Y_2$ 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。Ca^{2+}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（$P2Y_2$ 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 Ca^{2+}の流入が認められ，この Ca^{2+}流入は Gd^{3+}で抑制された。さらに，$P2Y_2$ 受容体の先行刺激により，この機械刺激誘発 Ca^{2+}流入の刺激閾値は低下し，また最大応答も増大した。以上，$P2Y_2$ 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，$P2Y_2$ 受容体が小型 DRG 神経に局在し機械刺激に対する Ca^{2+}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/水恒常性の中枢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 の上衣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 応答のモーダルシフト

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）

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^-汲みいれ分子である 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変化によって誘導されると考えられている。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）

曽我部隆彰，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），曽我部隆彰（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　芙実（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），冨樫　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（統合バイオサイエンスセンター），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）

【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 ヵ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ィ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，このような会を通し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 (100μM) 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 [^{3}H]-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 [^{3}H]-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-excitable 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 21th 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ー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 Cs^+ 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 though 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 statue 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-κB 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 TRPV4mRNA 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）
曽我部隆彰，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. 4α-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 capsazepin, 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 チャネルは物理的刺激により活性化される可能性があることが明らかになってきた。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，(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，(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なだけではなく，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 PKCβ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 (Homers 1b 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－

山内かづ代（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 A_2 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 A_2 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的実験から，ブラジキニン(BK) に対する痛み受容器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的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 (OSMRβ)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, OSMRβが TRPV1 と $P2X_3$ 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 OSMRβ 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 OSMRβ 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，OSMRβ 発現細胞と完全に一致した。以上の結果は，OSMRβ 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　紺野愼一　関口美穂（福島県立医科大学医学部整形外科学教室）

【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 (10μg)，高用量 5-HT 群：5-HT (30μg)，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 群に比較して，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・整形外科学）
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(TNFα) 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 TNFα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），TNFα 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℃ 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,TNFα・1ng/ml 群 49.060±25.606,TNFα・10ng/ml 群 73.739±53.996,TNFα・100ng/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，TNFα・10ng/ml 群では高値であり有意差を認め ($p<0.05$)，TNFα・1ng/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。TNFαに関しては，低濃度では軸索伸長を抑制し, 中濃度では軸索伸展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 Schmucker[1]（Dana-Farber 癌研究所・[1]Cancer 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 週のオ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。はじめに生理的状態での侵害・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，EC_{50} 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）

TRPA 1 は最も新しい TRP チャネルファミリーで，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 $P2Y_1$ 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，$P2Y_1$ 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，新生児期カプ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，カプ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 lipoxygenase 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; $cPLA_2$) 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，$cPLA_2$ 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 $cPLA_2$ 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 $cPLA_2$ 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，$cPLA_2$ の活性化型である Ser505 リン酸化型 $cPLA_2$ (phospho-$cPLA_2$) 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-$cPLA_2$ 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 $cPLA_2$ 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-$cPLA_2$ 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

$cPLA_2$ 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 Aβ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 Aβ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 Aδ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 Aβ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，Aδ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 Aβ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 Aβ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（札幌医科大学麻酔学講座）

【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，鎮痛力は弱いが慢性痛や嘔気に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，$P2X_3$，ASIC3 の発現を免疫組織化学的に調べた。また，逆行性トレーサー Fluoro-Gold(FG)を用い，腓腹筋由来の DRG 細胞におけるイオンチャンネルの発現も調べた。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学的な検討も加えた。

【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，$P2X_3$，ASIC3 陽性細胞数が増加し，$P2X_3$，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 $P2X_3$ と ASIC3 が有意に増加し，$P2X_3$，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学的検討から，シスプラチンによる痛覚過敏には，TRPV2，$P2X_3$，ASIC3 が関与していると考えられた。また $P2X_3$，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の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酔集中治療医学講座
[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[2]
[1]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さ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。今回の研究では健常者 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 G I 群では有意な脳活動が検出されなかったが，G II 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付属病院・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}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}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}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浸襲的で身体に負担をかけない ^{1}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ミッターとして放出される。この時，ATP は感覚神経のいくつも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も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変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，エキソサイトー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実を見出した(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，疼痛入力の長期化に伴う 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

曽我部隆彰（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　発達生理学研究系生殖・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），杉山麿人（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・レヌカ（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），曽我部隆彰（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，温度受容器の分子レベルの解析，体温・代謝にかかわる化学物質の発見，体温調節にかかわる特異的な神経機能の同定の遅れに起因しているところが大きいと思われる。しかしながら，この 10 年以内の飛躍的な躍進により，これらの問題点が解決されつつある（温度感受性イオンチャネルの発見，中枢-末梢にいたる神経回路網の同定，発熱に関わる物質の同定，熱産生の分子機構，生理心理学的手法，新たな測定技術等）。しかし，残念ながら体温調節は他の調節系に比べ非常に多くの生理機能に関係しているため，体温に関する研究者が各々のフィールドに分散し，十分な情報が得られないことが多い。今回の研究会の目的は‘体温’をキーワードに，これらの研究者が集まり，各々の研究成果を発表・情報交換し，個々の知識を統合，体温調節の新たな概念を確立することであった。また体温研究における問題点を討議，かつ明らかにし，あらたな研究テーマを創成することを目的

とし，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には相関がなかった。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

盛がついたダイアルで申告させた。冷刺激時，刺激部位における局所的温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。全身的感覚に関しても，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，全身的感覚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，協調し密接に連関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・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梢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-Cyclopentyltheophilline(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と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

曽我部隆彰（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プ法により検討した。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℃/500mL)の摂取では，一過性に 0.5℃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℃/500mL)の摂取では，0.4℃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，0.5-1.0℃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℃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，健常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－脊椎動物における恒温性の起源か？

杉山麿人，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(PGE_2) 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 PGE_2 の原材料としてだけでなく，AA を PGE_2 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

繁冨 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

礒村宜和（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

Kentaro 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 δ2 型グルタミン酸受容体のリン酸化部位の役割

仲神龍一（慶應大学部生理学教室）

（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　惠枝，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），繁冨 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＆京都大学生命科学研究科），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），礒村　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）），新間秀一，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），柚﨑　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。こられによって，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βγ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・薬理学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。先ず，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

繁冨　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 A_1 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 A_1 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 A_1 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，A_1 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 A_1 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 A_1 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 A_1 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 A_1 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

礒村宜和 [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 作動性入力が誘発刺激により一過性に興奮性に転じ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実例として，

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きている。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科）

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充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　[4]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[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，内田穣，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，草苅　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 ofBiostudies)

（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，田渕明子
（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δ2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：逵本 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 Fmθ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 Fmθ 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

逵本徹（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），逵本徹（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 (Fmθ) 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 Fmθ 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 Fmθ 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 Fmθ 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 cingulated cortex (ACC) を含んだ medial prefrontal cortex (mPFC) を Fmθ 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 Fmθ に似たリズムが出現することや，Fmθ 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，Fmθ 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，Fmθ 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，Fmθ 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，Fmθ 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 Fmθ 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 Fmθ 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，Fmθ 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，Fmθ 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α～β帯域の ERD，頭頂間溝水平部にてβ～low γ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，優位に活動する領野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

達本徹（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 (Fmθ) 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が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 Fmθ 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 Fmθ 波の相同物と考えて矛盾なく，Fmθ 波の解明に役立つ可能性がある。

【 各種シンポジウム 】

第 35 回生理研コンファレンス・統合脳国際シンポジウム

Recent Advances in Cortical and Hippocampal Microcircuits
大脳皮質・海馬の局所神経回路研究

第 35 回生理研コンファレンス・統合脳国際シンポジウム「大脳皮質・海馬の局所神経回路研究」は，2006 年 7 月 24 日−26 日の 3 日間に，自然科学研究機構・岡崎コンファレンスセンターにおいて開催された。大脳皮質の神経回路構築の解析は，現在，大きな飛躍の時を迎えていると言っても過言ではない。今まで未知であった多くの事実が分子脳科学や多電極記録法等のシンポは目覚ましく，多くの新しい事実が次々と報告されている。その中でも，リーディング的存在の研究者達（Edward M Callaway 博士 (Salk Institute, USA), Sacha B Nelson 博士 (Brandis Univ., USA), Gabor Tamas 博士 (Szeged Univ., Hungary), Jackie Schiller 博士 (Technion, Israel), Takao K Hensch 博士 (RIKEN-BSI, Harvard Univ. USA)）にご参加頂き，最新の成果を発表していただいた。さらに，日本の大脳皮質神経回路研究の諸先生方にも，秀でた研究を発表していただき，トータルで 18 演題の口頭発表について活発な質疑応答が交わされた。さらに，ポスター発表にも 31 演題が集まり，日本の若き神経科学研究者や院生達も，第一線を走っておられる研究者と直接ディスカッションする機会を得た事で，大いに刺激を受けた事であろう。総数 124 名（うち，外国人 14 名）の参加者同士の交流も深まり，多くの意味で非常に有意義であった。打ち解けた雰囲気の中で実り多いディスカッションが行われ，非常に楽しい会合となった。

Monday, July 24

Opening Remarks　Yumiko Yoshimura

Session 1: Physiological network connectivity in hippocampal microcircuitry

1. Yuji Ikegaya (Univ. of Tokyo, Tokyo)
   Spontaneous activity and ongoing plasticity of CA3 recurrent networks

2. Adi Cymerblit and Yitzhak Schiller (Technion, Israel)
   Network dynamics during the development and maintenance of seizures in pilocarpine and picrotoxin treated rats

Session 2: Anatomical network connectivity in hippocampal microcircuitry

3. Ryuichi Shigemoto (NIPS, Okazaki)
   Asymmetrical organization of glutamate receptors in left and right hippocampal synapses
4. Shozo Jinno, Thomas Klausberger, Laszlo F. Marton, Yannis Dalezios, Pablo Fuentealba, Wai Yee Suen, Eric A. Bushong, Darrell Henze, György Buzsáki and Peter Somogyi (Oxford Univ., UK: Hungarian University of Transylvania, Hungary: University of Crete, Greece: Institute of Applied and Computational Mathematics. Greece: The State University of New Jersey, USA)
   Novel long-range GABAergic projections in the hippocampal formation and beyond

Session 3: Network connectivity in cortical microcircuitry

5. Gábor Tamás, János Szabadics, Szabolcs Oláh, Gergely Komlósi, Pál Barzó, Gábor Molnár (Univ. of Seged, Hungary)
   Single spike triggered event sequences in networks of the human cerebral cortex in vitro
6. Yasuo Kawaguchi (NIPS, Okazaki)
   Layer V pyramidal cell diversity and their synaptic connections

Tuesday, July 25

Session 4: Plasticity in the visual cortex

7. Yumiko Yoshimura (Nagoya Univ., Nagoya)
   Functional roles of T-type Ca^{2+} channels in visual cortical plasticity
8. Takao K Hensch (RIKEN-BSI, Wako)
   GABA circuit control of critical period plasticity in visual cortex

Session 5: Microcircuitry in vivo

9. Victoria M Puig, Mika Ushimaru, Yoshiyuki Kubota, Akiya Watakabe, Tetsuo Yamamori, Yuchio Yanagawa, Yasuo Kawaguchi (NIPS & NIBB, Okazaki, Gunma Univ., MIT, USA)
   Cortico-striatal, cortico-raphe and fast-spiking cell activity in the rat frontal cortex during cortical oscillations in vivo: modulation by serotonin
10. Ichiro Fujita (Osaka Univ., Osaka)
    Functional and Anatomical Architecture of the Inferior Temporal Cortex

Session 6: Microcircuitry of inhibitory neurons

11. Edward Callaway, Takuma Mori, Xiangmin Xu, Ian Wickersham, and David Lyon (Salk Inst, USA)
    Unraveling cell type and fine-scale specificity of cortical connections
12. Yukio Komatsu (Nagoya Univ., Nagoya)
    A new form of inhibitory synaptic actions between nearby pyramidal neurons in visual cortex
13. Fumitaka Kimura (Osaka Univ., Osaka)
    Cholinergic control of cortical network and thalamocortical transmission

Wednesday, July 26

Session 7: Anatomical aspects of cortical microcircuitry

14. Kathleen Rockland (RIKEN-BSI, Wako)
    Cortical projection neurons: phenotypes and input maps
15. Takaichi Fukuda (Kyushu Univ, Fukuoka)
    Dendritic network of cortical interneurons linked by gap junctions

Session 8: Synaptic integration along dendrite

16. Jackie Schiller (Technion, israel)
    Synaptic integration and plasticity within non-linear dendritic subunits

Session 9: New aspects in cortical microcircuitry analysis

17. Yoshiyuki Kubota, Fuyuki Karube, Yasuo Kawaguchi (NIPS, Okazaki)
    Dendritic dimensions of cortical GABAergic nonpyramidal cells
18. Sacha B Nelson (Brandeis Univ., USA)
    Physiological Genomics of Cortical Circuits in Health and Disease

Closing Remarks Yoshiyuki Kubota

Poster

Poster I Anatomical and Physiological Analysis of Local Circuits in Neocortex

P-1. Quantification of excitatory and inhibitory synapses onto parvalbumin- and calretinin-positive GABAergic neurons in the rat cerebral cortex.
Akio Sekigawa, Yoshiyuki Kubota, Yasuo Kawaguchi
Div. Cerebral Circuitry, NIPS, Okazaki, Dept. Physiol. Sci. Grad. Univ. Advanced Studies, Okazaki

P-2. Cortical interneuron organization analysis by in vivo Venus labeling of GABAergic cells in BAC transgenic rats
Yasuharu Hirai[1,2], Masakazu Uematsu[2,3], Satoe Ebihara[2], Kuniya Abe[4], Sachiko Yosida[3], Megumi Kato[2], Masumi Hirabayashi[2], Yuchio Yanagawa[5,6] and Yasuo Kawaguchi[1,2]
[1]Grad. Univ. Advanced Studies, Okazaki, Japan, [2]NIPS, Okazaki, Japan, [3]Toyohashi Univ. Tech., Toyohashi, Japan, [4]RIKEN, Tsukuba, Japan, [5]Gunma Univ., Gunma, Japan, [6]SORST

P-3. Regional, cell type, and layer-specific differences in cholinergic inhibition of neocortical neurons
Allan T. Gulledge[1,2], Susannah Park[2], Greg J. Stuart[2] & Yasuo Kawaguchi[1],
[1]Division of Cerebral Circuitry, National Institute for Physiological Sciences, Okazaki, Japan, [2]Divison of Neuroscience, JCSMR, Australian National University, Canberra, Australia

P-4. Laminar sources of synaptic input to layer 1 neurons in rat visual cortex
Takuma Mori, Edward M. Callaway
Systems Neurobiology Laboratories, Salk Inst., La Jolla, CA, USA

P-5. Fluorescence activated cell sorting and expression-profiling of parvalbumin-positive GABAergic neocortical interneurons from mouse barrel cortex.
Ethan M. Goldberg, Hyo-Young Jeong, and Bernardo Rudy.
NYU School of Medicine, Department of Physiology & Neuroscience, New York, U.S.A.

P-6. How is γ frequency rhythmic firing of neocortical regular spiking neurons shaped by recurrent inputs?

Kenji Morita[1], Rita Kalra[2], Kazuyuki Aihara[3], and Hugh P. C. Robinson[2]

[1]RIKEN Brain Science Institute, [2]Department of Physiology, Development, and Neuroscience, University of Cambridge, [3]Institute of Industrial Science, University of Tokyo, and ERATO, JST

P-7. Multisite recordings on the signal propagation pattern in local circuit of the visual cortex

Makoto Osanai, Yusuke Takeno, Ryousuke Hasui, Tetsuya Yagi

Graduate School of Engineering, Osaka University

P-8. Synaptic connection patterns between pyramidal cell subtypes in layer V of rat frontal cortex

Mieko Morishima, Yasuo Kawaguchi

Division of Cerebral Circuitry, National Institute for Physiological Sciences

P-9. Target-dependent diversity of intrinsic membrane properties in rat frontal Layer 5 pyramidal cells

Takeshi Otsuka, Mieko Morishima, and Yasuo Kawaguchi

Div. Cerebral Circuitry & Structure, NIPS, Okazaki

P-10. A distinctive layer 5 pyramidal neuron in monkey association cortex, morphologically identified by EGFP – adenovirus infection

Marie Wintzer, Kathleen S. Rockland

Lab for Cortical Organization and Systematics, RIKEN BSI, Wako, Japan

P-11. Classification of layer 6 neurons by in situ hybridization

Akiya Watakabe[1], Noritaka Ichinohe[2], Sonoko Ohsawa[1], Tsutomu Hashikawa[3], Kathleen S. Rockland[2], and Tetsuo Yamamori[1]

[1]Div of Brain Biol., National Institute for Basic Biology, [2]Lab for Cortical Organization and Systematics, RIKEN BSI, [3]Lab for Neural Architecture, RIKEN BSI

Poster II　Physiological Analysis *in vivo*

P-12. Burst spikes encode multiple quantities in a time-compressive manner

Toshiyuki Ishii[1,2], Tomonori Manabe[1] and Toshihiko Hosoya[1]

[1]RIKEN Brain Science Institute, [2]Toho University

P-13. Direction selectivity and arrangement of neurons in single barrel columns in the rat somatosensory cortex examined with *in vivo* two-photon calcium imaging

[1]Koji Ikezoe, [2]Yoshiya Mori, [3,4]Kazuo Kitamura, [2,4]Hiroshi Tamura, [2,4]Ichiro Fujita

[1]Grad. Sch. Engineering Science, [2]Grad. Sch. Frontier Biosciences, [3]Grad. Sch. Medicine, Osaka University, Osaka, Japan, [4]CREST, JST, Saitama, Japan

P-14. Spatiotemporal dynamics of surround suppression in cat V1: spatial-frequency dependency

Ayako Ishikawa, Satoshi Shimegi, Hiroyuki Kida, Hiroshi Sakamoto, Hiromichi Sato

Grad. Sch. Front. Biosci. & Grad. Sch. Med., Osaka Univ., Japan

P-15. Spatiotemporal dynamics of surround suppression in cat V1: stimulus-size and orientation-contrast

Satoshi Shimegi, Hiroyuki Kida, Ayako Ishikawa, Hiroshi Sakamoto, Hiromichi Sato

Grad. Sch. Med., & Grad. Sch. Front. Biosci., Osaka Univ., Japan

P-16. Clustering of color-selective cells in macaque area V4: analysis with multiple single-unit recordings

Yasuyo Kotake, Hiroshi Morimoto, Hiroshi Tamura, Ichiro Fujita

Grad. Sch. Frontier Biosciences, Grad. Sch. Engineering Science, Osaka Univ., CREST, JST, Japan

P-17. Inter-spike interval statistics and visual stimulus discrimination capability of neurons in the monkey inferior temporal cortex

Shunta Tate, Hiroshi Tamura, Ichiro Fujita

Lab Cognitive Neurosci., Grad Sch Frontier Biosciences, Osaka University, Osaka, Japan, Japan Society for the Promotion of Science, Tokyo, Japan

Poster III　Development and Plasticity in Neocortex

P-18. Postnatal changes in the colocalization of VGluT1 and VGluT2 immunoreactivities at single axon terminals of the mouse neocortex

Kouichi Nakamura[1,2], Akiya Watakabe[3], Hiroyuki Hioki[1], Fumino Fujiyama[1], Yasuyo Tanaka[1], Tetsuo Yamamori[3], Takeshi Kaneko[1,2]

[1]Department of Morphological Brain Science, Graduate School of Medicine, Kyoto University, [2]CREST, JST, [3]Division of Brain Biology, National Institute for Basic Biology

P-19. Activity-dependent development of interhemispheric connections in mouse visual cortex

Hidenobu Mizuno, Tomoo Hirano, Yoshiaki Tagawa

Dept. Biophys., Kyoto Univ. Grad. Sch. Sci., Kyoto, Japan; CREST, JST, Kawaguchi, Japan

P-20. Transient layer-specific zinc-positive neurons in the developing rat somatosensory cortical system

Noritaka Ichinohe, Daniel Potapov, Kathleen S Rockland

Laboratory for Cortical Organization and Systematics, Brain Science Institute, RIKEN, Wako, Japan

P-21. Layer and area specific gene expression profiling in developing rat cerebral cortex

Toshio Miyashita, Marie Wintzer, *Tomokazu Konishi, Noritaka Ichinohe, Kathleen S. Rockland.

Lab. for Cortical Organization and Systematics, Brain Science Institute, RIKEN. *Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University

P-22. Truncated TrkB-T1 regulates the morphology of neocortical layer I astrocytes in adult rat brain slices

Koji Ohira[1,2], Nobuo Funatsu[1], Koichi J Homma[3], Yoshinori Sahara[1], Motoharu Hayashi[4], and Shun Nakamura[1,2]

[1]Department of Biochemistry and Cellular Biology, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, Tokyo, Japan. [2]Core Research for Evolutional Science and Technology (CREST), Japan Science and Technology Agency, Saitama, Japan. [3]Department of Molecular Pathology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University, Kanagawa, Japan. [4]Department of Cellular and Molecular Biology, Primate Research Institute, Kyoto University, Aichi, Japan.

P-23. Dynamic role of inhibitory circuits in visual cortical plasticity.

Y. Yazaki-Sugiyama, K. Siu*, T. Fukai*, T. K. Hensch;

Lab for Neuronal Circuit Development, *Neural Circuit Theory, RIKEN BSI, Wako, JAPAN

Poster IV　New Techniques in Cortical Microcircuitry Analysis

P-24. Efficient Gene Transduction in Neurons with Lentivirus by Improved Neuron-Specific Promoters

Hiroyuki Hioki[1,], Hiroshi Kameda[1], Hisashi Nakamura[1], Taro Okunomiya[1], Kohei Ohira[1], Kouichi Nakamura[1,2], Masako Kuroda[1], Takahiro Furuta[1], Takeshi Kaneko[1,2]

[1]Department of Morphological Brain Science, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan. [2]Core Research for Evolutional Science and Technology, Japan Science and Technology Agency (CREST), Kawaguchi, Japan

P-25. Development of dendrite-targeting signals using lentivirus vectors with neuron-specific promoter

Hiroshi Kameda[1], Hiroyuki Hioki[1], Takahiro Furuta[1], Koji Ohira[1], Wakoto Matsuda[1], Kouichi Nakamura[1,2], Takeshi Kaneko[1,2]

[1]Department of Morphological Brain Science, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan, [2]CREST, JST

P-26. Golgi-like Visualization of cortical neurons by virus vectors.

Ryohei Tomioka and Kathleen S. Rockland

Lab for Cortical Organization and Systematics, RIKEN BSI

P-27. A Novel Genetic Method for Reversibly Inactivating Mammalian Neurons In Vivo

Yoshiaki Yamaguchi[1], Elaine M. Tan[1,3], Gregory D. Horwitz[2], Thomas D. Albright[2] and Edward M. Callaway[1]

[1]Systems Neurobiology Laboratories, [2]Vision Center Laboratory, The Salk Institute, La Jolla, USA, [3]Neurosciences Graduate Program, UCSD, La Jolla, USA,

Poster V　Physiological Analysis in Hippocampus

P-28. The effects of body temperature on hippocampal neural activity: control of membrane potential through TRPV4 activation

Koji Shibasaki[1,2], Makoto Suzuki[3], Atsuko Mizuno[3], Makoto Tominaga[1,2]

[1]Section of Cell Signaling, Okazaki Institute for Integrative Bioscience, [2]Department of Physiological Sciences, The Graduated University for Advanced Studies, [3]Department of Pharmacology, Jichi Medical University

Poster VI　Anatomical Analysis in Basal Ganglia

P-29. Difference in Organization of Corticostriatal and Thalamostriatal Synapses between Patch and Matrix Compartments of Rat Neostriatum.

Fumino Fujiyama[1], Tomo Unzai[1], Kouichi Nakamura[1,3], Sakashi Nomura[2], and Takeshi Kaneko[1,3]

[1]Department of Morphological Brain Science, Graduate School of Medicine, Kyoto University, [2]Department of Physical Therapy, School of Health Sciences, Faculty of Medicine, Kyoto University, Kyoto, JAPAN and [3]CREST, JST.

P-30. Axonal arborization of midbrain dopaminergic neurons: single-cell study

Wakoto Matsuda[1], Takahiro Furuta[1], Koichi Nakamura[1,2], Takeshi Kaneko[1,2]

[1]Department of Morphological Brain Science, Graduate School of Medicine, Kyoto University[2] CREST

P-31. Single cell tracing of thalamostriatal projection neurons with reference to patch and matrix compartments of rat striatum

Tomo Unzai[1], Fumino Fujiyama[1], Takeshi Kaneko[1,2]

[1]Department of Morphological Brain Science, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan, [2]CREST, Japan

第 36 回生理研コンファレンス

第 36 回生理研コンファレンスは，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生理研研究会と合同で 2006 年 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。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。

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年間のマススペクト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高く評価され，具体的な実験プランも直接研究者間で相談された。

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。

生理学研究所は2007年創立30周年を迎えるが，これまで岡崎市民には大きな支援を受けてきた。今回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体感していただいた。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，講演とリュートの演奏を味わった。

20 October Friday　　CITIZEN FORUM

Opening Lecture: Alessandro Riva (Cagliari) The work of Fabricius ab Aquapendente (Harvey's Teacher) in the light of the recently restored Tabulae Pictae: its influence in the development of modern anatomy in Europe and in Japan.

Lute Concert: Terrell Stone (Music Conservatory of Vicenza, Italy) Lute music from the court of Francis I and Padovan lute music.

21 October Saturday　　SCIENCE SESSION

O. Opening of Science Session

Talk: Alessandro Riva (Cagliari) Stensen and early history of glands and exocrine secretion.

A. Diagnostics using saliva and Proteomics of Saliva

Talk: Masataka Murakami (Okazaki), Naoki Shinozuka (Sapporo) Clinical examination using saliva: Influence of fluid secretion on the concentration of substrate in saliva: How to overcome the problem for *in vivo* application.

Talk: Anders Bennick (Toronto) Extraoral functions of salivary proteins.

Talk: Josie A Beeley (Glasgow) Human salivary proteins- A fascinating complex of polymorphic and polyfunctional proteins.

Poster: Tiziana Cabras (Cagliari) A proteomic study of saliva from celiac patients.

Poster: Rosanna Inzitari (Rome) Salivary acidic proline-rich proteins in preterm newborns.

Poster: Tomoya Hayashi (Nantan, Kyoto) Oxidative modification of serum albumin via paracellular route of rat submandibular gland.

Poster: Marco Piludu (Cagliari) A preliminary study on salivary protein expression in diabetic patients.

Poster: Naoki Shinozuka (Sapporo) Clinical examination using saliva: an *in vivo* application to human adults.

Talk: Massimo Castagnola (Rome) How the technique works and how the researcher can take a profit from the MS strategies.

Talk: Francisco ML Amado (Aveiro) Salivary glands and saliva composition: a proteomic approach.

Talk: Irene Messana (Cagliari) Salivary peptides as potential substrates of type2 transglutaminase.

Talk: Massimo Castagnola (Rome) Pre-secretory Post-translational modifications common to different families of human salivary proteins.

Talk: Chenjuan Yao (Tokushima) Tissue kallikrein mK13 is a candidate of the processing enzyme for pro-IL-1b in the mouse submandibular gland.

Poster: Rui Vitorino (Aveiro) Protein content comparison of mouse subamndibular and parotid salivary glands.

Poster: Chiara Fanali (Rome) Characterization of different proline-rich peptides from pig parotid glands.

Poster: Joanna Anton Monteiro, Massimo Castagnola (Rome) Tyrosine sulfation of Histatin 1. A post-translational modification specific of submandibular glands.

Poster: Hiroko Inoue (Kita-Kyushu) Different roles of salivary mucins in viscosity and spinnbarkeit of human saliva.

Poster: Takahiro Hayasaka, Mitsutoshi Setoh (Okazaki) MALDI based Mass Imaging revealed abnormal distribution of phospholipids in cancer.

B. Therapeutics by modulation of salivary gland

Video: Bruce Baum (Bethesda) Clinical applications of gene transfer to salivary glands.

Talk: Takayoshi Sakai (Osaka) Morphogenesis and cleft formation of salivary gland epithelia: Exploration of new functional regulators.

Poster: Naozumi Ishimaru (Tokushima) A novel role of RbAp48 for tissue-specific apoptosis in the salivary glands depending on estrogen deficiency.

Poster: Masatake Asano (Tokyo) Ionomycin inhibit the soluble protein transport between ER and Golgi.

Poster: Wei Muxin (Nanjing) Investigation on the influences of Chinese herbs on salivary secretion in rat submandibular gland.

Poster: Hideaki Kagami (Tokyo) Possible involvement of clusterin in the regeneration process of rat submandibular gland.

Poster: Wei Muxin (Nanjing) Effect of Dan Di Qiong Yu granule on salivary gland of Sjogren syndrome mice.

Poster: Tomoko Nashida (Niigata) Relation of proteoglycan to sorting amylase into secretory granules/vesicles.

Poster: Hiromi Shimomura (Niigata) Activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP in the rat parotid acinar cells.

C. Neural control of salivary secretion in response to environmental change

Talk: Kiyotoshi Inenaga (Kokura) Pilocarpine induces salivary secretion and thirst in rats.

Talk: Ryuuji Matsuo (Okayama) Electrophysiological analysis of the afferent activity from the submandibular salivary gland in the rat.

Talk: Xuefei Li (Tokushima) Effects of autonomic denervation and administration of SNI-2011 on the expression of AQPs in the rat salivary gland.

Talk: Jörgen Ekström (Göteborg) Neural- and hormonal-induced protein synthesis and mitotic activity and the dependence on NO-generation.

Poster: Kentaro Ono (Kita-Kyushu) Relationship of chewing-stimulated whole saliva flow rate and salivary gland size in humans.

Poster: Ken'ichi Ishizuka (Niigata) Cardiac-related activity in superior salivatory nucleus neurons in anaesthetized rats.

Talk: Yoshihiro Mitoh (Okayama) Electrophysiological study on the descending excitatory synaptic inputs to the superior salivatory nucleus in the rat.

Talk: David K Ann (Los Angeles) Functions, regulation and mechanisms of action of SUMOylation in salivary cells.

Poster: Akihito Fujii (Okayama) Electrophysiological study of the inhibitory inputs from the forebrain and brainstem to the superior salivatory nucleus in rats.

Poster: Miyuki Kobashi (Okayama) Role of the feeding center for submandibular salivary secretion during feeding behavior in the rat.

Poster: Nina Khosravani (Göteborg) The facial nerve and its influence on the parotid gland.

Poster: Hülay Çevik Aras (Göteborg) Melatonin-evoked protein secretion from the rat parotid gland *in vivo*.

Poster: Hajime Ishibashi (Matsudo) Induction of general anesthesia with propofol increases salivary flow.

Poster: Minoru Matsui (Tokyo) Salivary secretion by MR3-KO mice.

22 October Sunday

D. Structural differentiation and functional expression of salivary gland

Talk: Yohki Hieda (Osaka) Regulation of epithelial tube formation in developing mouse submandibular gland.

Talk: Matthew Hoffman (Bethesda) FGF10 regulates branching morphogenesis during salivary gland development.

Talk: Tetsuya Akamatsu (Tokushima) Involvement of a subtilisin-like proprotein convertase, PACE4, in branching morphogenesis and AQP5 expression in the rat embryonic submandibular gland.

Poster: Kenichiro Kikuchi (Tokyo) Freeze fracture studies of tight junctions in mouse salivary glands and cultured salivary cell lines.

Poster: Masanori Kashimata (Gifu) Shared or non-overlapping intracellular signaling pathways activated by EGFR or FGFR differentially regulate branching morphogenesis in fetal mouse submandibular glands.

Poster: Yuuichi Kadoya (Sagamihara) Cellular aspect of salivary gland branching morphogenesis.

Poster: Nunuk Purwanti (Tokushima) The expression of cellular markers of duct/acini and side population dynamics in the duct-ligated mouse submandibular gland.

Poster: Shinya Yamamoto, Satoshi Fukumoto (Fukuoka) Role of PDGF in salivary gland morphogenesis.

Poster: Wataru Masuda (Kita-Kyushu) The change of the subcellular localization of CD38 in the rat sublingual gland during saliva secretion.

D. Structural differentiation and functional expression of salivary gland

Talk: Arthur Hand (Farmington) Submandibular and sublingual glands in Nkx2-3 mutant mice.

Talk: Shoichi Iseki (Kanazawa) A novel mouse protein differentially regulated by androgens in the submandibular and lacrimal glands.

Talk: Kenjji Mishima (Yokohama) Identification and therapeutic potential of salivary gland side population cells.

Poster: Osamu Amano (Sakado, Saitama) Heat shock protein 27kDa (Hsp27) regulates differentiation and regeneration of acinar cells of the rat submandibular gland.

Poster: Sachiko Matsuura (Shiojiri, Nagano) 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.

Poster: Miwako Matsuki (Matsudo) Effects of actin-related drugs on exocytosis in parotid acinar cells.

Poster: Sadamitsu Hashimoto (Chiba) Control of paracellular transport and its morphological evidence in perfused rat submandibular gland.

Poster: Atsuko Sato (Fukuoka) 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.

E. Functional morphology of secretory granules

Talk: Bernard Tandler (Cleaveland) Ultrastructure of the ovine parotid gland.

Talk: Alessandro Riva (Cagliari) A morphometric study by HRSEM of the secretory responses of human salivary glands stimulated *in vitro* by various secretagogues.

Talk: Hiroshi Sugiya, Miwako Matsuki (Matsudo) Expresssion and function of aquaporin-6 in the rat salivary glands.

Talk: David Giovannucci (Toledo, Ohio) Analysis of secretory dynamics in mouse parotid acinar cells reveals multiple pathways for secretory granule fusion.

Poster: Akane Imai (Niigata) Roles of Rab27 and its effectors in isoproterenol-induced amylase release from rat parotid acinar cells.

Poster: Matthew J Betzenhauser (Rochester) Subtype-specific regulation of inositol (1,4,5)- trisphosphate receptors by protein kinase A

Poster: Tomomi Nemoto (Okazaki) Exocytosis and fluid secretion in exocrine glands studied by two-photon microscopy.

Poster: Akiko Shitara (Ishikari-Tobetsu) Multi-photon imaging of cellular heterogeneity in the sensitivity of Ca^{2+} responses in rat parotid ducts.

Poster: Raffaella Isola (Cagliari) Morphological changes induced by histatins in *Candida albicans*: A microscopic and submicroscopic comparison.

Poster: Hideaki Tamaki (Sagamihara) Sequential appearance of Golgi proteins during *de novo* formation of the Golgi apparatus in parotid acinar cell.

Poster: Yosuke Tojyo (Ishikari-Tobetsu) Comparison of cluster formation of GFP-IP3 receptors in HSY, a human salivary cell line, and COS-7 cells.

Poster: Konosuke Kumakura (Tokyo) Possible Involvement of Myosin-ATPase in the spatio-temporal regulation of exocytosis in adrenal chromaffin cells.

F. Control for fluid/electrolyte transport via trans-/paracellular routes

Talk: James Melvin (Rochester) The ion and fluid secretion mechanism.

Talk: R James Turner (Bethesda) Structural and functional significance of the dimerization of the secretory Na-K-2Cl cotransporter (NKCC1).

Talk: Jun Yamazaki (Fukuoka) Localization and function of CLCA in rat submandibular glands.

Poster: Yusuke Imai (Otsu) Bond graph expression on an epithelial transport system.

Poster: Martin C Steward (Manchester) A modular approach to computational modelling of epithelial electrolyte transport.

Poster: Varga Gabor (Budapest) Bicarbonate secretion by cultured salivary gland cells

Poster: Chikara Hirono (Hiroshima) Regulation of Cl secretion by muscarinic cholinergic and adrenergic stimulation in acinar cells of rat salivary gland.

Poster: Yoshiro Sohma (Takatsuki) Voltage-dependent transient activity of Na^+/H^+ exchanger.

23 October Monday

F. Control for fluid/electrolyte transport via trans-/paracellular routes (continued)

Talk: A E Hill (Cambridge) A feedback control model of fluid transport in salivary gland.

Talk: Anil G Menon (Cincinnati) Evidence for interaction between transcellular and paracellular water transport pathways: signaling between Aquaporin-5 and the tight junction complex in mouse salivary glands.

Talk: Junko Yoshigaki (Matsudo) Change of claudin expression in primary cultured parotid acinar cells.

Poster: Christine Delporte (Brussels) Impaired aquaporin-5 distribution in salivary glands from a Sjögren's syndrome mouse model.

Poster: Mileva R Karabasil (Tokushima) Molecular and cellular analyses of mutant AQP5 which occurred naturally in Sprague-Dawley rats.

Poster: Retsu Mitsui (Matsudo) Regulation of intercellular junctions in polarized salivary cells.

Poster: Tetsuji Nakamoto (Rochester) The use of gene disruptions and isolated, perfused glands to examine mouse submandibular function.

Poster: Yoshiteru Seo (Mibu, Tochigi) Water permeability as measured by NMR in salivary gland cells.

G. Stimulus-Secretion Coupling for starting electrolyte transport

Talk: James W Putney Jr (Research Triangle Park) Calcium signaling mechanisms in salivary gland cells and other epithelial cells.

Talk: Akihiko Tanimura (Ishikari-Tobetsu) Monitoring IP_3 and Ca^{2+} dynamics in salivary and other cell lines.

Talk: David I Yule (Rochester) Intracellular calcium signaling: mechanistic insight from analysis of distinct signals in parotid and pancreas.

Talk: Jason Bruce (Manchester) Regulation of the plasma membrane Ca^{2+}-ATPase in parotid acinar cells.

Poster: Philip Poronnik (St Lucia, Queensland) Muscarinic receptor mobilization of plasma membrane Ca^{2+}-ATPase in epithelial cells: Role of the NHERF2 PDZ scaffold.

Poster: Jenny Ekberg (St Lucia, Queensland) Regulation of KCNQ2/3 by the ubiquitin ligase Nedd4-2.

Poster: Keitaro Satoh (Matsudo) Secretagogues stimulate phosphorylation of MARCKS in parotid acinar cell.

Talk: Shumuel Muallem (Dallas) Regulation of TRPC channels by STIM1.

Talk: Min Goo Lee (Seoul) Shank2 as a key regulator of epithelial transport in apical membrane.

Talk: David I Cook (Sydney) The regulation of the epithelial Na^+ channels by UTP.

Talk: Anuwat Dinudom (Sydney) Signaling pathways regulating Na^+ transport in salivary ducts.

Poster: Hideyo Yoshida (Takatsuki) Ca^{2+} influx induced by ionomycin under a high $[K^+]_i$ in rat submandibular acinar cells.

Poster: Il-Ha Lee (Sydney) Regulation of the epithelial sodium channel by caveolin.

Poster: Xibao Liu (Bethesda) The role of TRP channel in the salivary gland fluid secretion.

総合研究大学院大学・生理学研究所　国際シンポジウム（第 37 回生理研コンファレンス）

総合研究大学院大学・生理学研究所　国際シンポジウム「膜電位―化学シグナルの新展開：多様性とメカニズム Electro-Chemical Signaling by Membrane Proteins: Biodiversity & Principle」は，自然科学研究機構・岡崎コンファレンスセンターにおいて平成 19 年 3 月 14－16 日の 3 日間で開催された。電気情報を化学情報に転換する機構は，エネルギーの産生，神経情報伝達，活性酸素の代謝をはじめとする生命秩序の維持に本質的役割を担っている。ここ数年，イオンチャネルやトランスポーターを始めとする膜蛋白の詳細な動作原理が明らかになり，またゲノム情報との連携により新しい膜蛋白分子群が発見され，細胞膜での電気化学連関機構について新しい研究展開がみられている。膜蛋白に関して生理学，構造生物学，細胞生物学，ゲノム科学の複数の分野での研究者を集め，電気化学連関機構に関わる膜蛋白質を中心として学際的融合的な研究・教育の発展を目指した。15 名の研究者が口演し，事前登録者 150 名を含む約 200 名が参加した（うち企業から 5 名）。岡崎統合バイオサイエンスセンターと阪大蛋白研との連携研究である膜蛋白質研究国際フロンティア形成の国際シンポジウムも兼ねており，意図したとおり幅の広い研究領域からの参加となり質問や議論も分野の垣根を越えたものであった。ひとつのハイライトは電位センサーの動きに関するセッションで，ここ数年 Nature 誌などで熱い議論が続いてきた電位センサーの動作原理について白熱した議論が交わされた。1 日目，2 日目のポスターセッションでは 40 件ものポスター発表が行われ，また，アメリカナショナルアカデミーの会員でもある Francisco Bezanilla（シカゴ大学）と Gunnar von Heijne（ストックホルム大学）による特別教育講演も行われた。すべてのセッションで活発な議論が交わされ，特に学生からの質問が多くなされたのは総研大国際シンポジウムとしても大きな成果であった。

Wednesday, March 14th

Opening remark

1. Kenjiro Yoshimura (Tsukuba University)
   Mechanosensitive channel responds to and resists the membrane stretch
2. Yoshinori Fujiyoshi (Kyoto University)

Significance of multifunctional channels

3. Special Lecture 1:Francisco Bezanilla (University of Chicago)
   The operation of the voltage sensor
4. Ehud Y. Isacoff (University of California at Berkeley)
   Sensing voltage
5. Peter Larsson (Oregon Health & Science University)
   Mechanisms of voltage activation in hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels
   Poster session
6. Jianmin Cui (Washington University)
   Interaction between the Voltage-Sensor and Cytosolic Domain in BK Channels
7. Ming Zhou (Columbia University)
   Functional Coupling between Voltage-Dependent Potassium Channel and Aldo-keto Reductase

Thursday, March 15th

8. Hideki Kandori (Nagoya Institute of Technology)
   Mechanism of light-driven proton and chloride-ion pumps
9. Takeshi Murata (JST ERATO Iwata project)
   Ion transport mechanism of V-ATPase
10. Tomitake Tsukihara (Institute for Protein Research, Osaka University)
    Proton pumping coupled with dioxygen reduction of cytochrome c oxidase
11. Special Lecture2: Gunnar von Heijne (Stockholm University)
    Membrane protein assembly
12. Andy Spencer (University of Alberta)
    Potassium channel diversity in lower metazoans - relating structure to voltage sensitivity and physiological function
13. Yasushi Okamura (Okazaki Institute for Integrative Bioscience, NIPS, NINS)
    Biodiversity of voltage sensor domain proteins
14. Yoshihiro Kubo (NIPS, NINS)
    Voltage and [ATP]- dependent "gating" of ATP receptor channel $P2X_2$
    Poster session

Friday, March 16th

15. Thomas DeCoursey (Rush University Medical Center)
    pH- and voltage-dependent gating enables voltage-gated proton channels to perform their physiological functions
16. Ai-Sun Tseng (Forsyth institute and Harvard School of Dental Medicine)
    Biophysical control of tail regeneration in Xenopus
17. Paul Kemp (Cardiff School of Biosciences)
    Potassium channel protein partners: gas sensing in the nervous system
18. Makoto Tominaga (Okazaki Institute for Integrative Bioscience, NIPS, NINS)
    Thermosensitive TRP channels: their structure- function relationship and physiological significance
19. Gisela Wilson (University of Michigan)
    EAG potassium channels: new functions for voltage-sensing

Closing remark

【トレーニングコース】

第 17 回 生理学研究所 生理科学実験技術トレーニングコース
“生体機能の解明に向けて”－分子・細胞レベルからシステムまで－

2006 年 7 月 31 日－8 月 4 日

担当：伊佐　正（認知行動発達機構）

【概要】

平成 18 年度で第 17 回を迎える生理科学トレーニングコースは 7 月 31 日（月）より 8 月 4 日（金）まで生理学研究所の明大寺，山手両キャンパスにて開催された。下記の 16 個のコースを設定し，受講者の公募を行ったところ，約 200 名の応募を受けた。本来全員を採択して受講していただきたいところであるが，キャパシティに限りがあることからそのうち 146 名を採択して受講していただいた。

既にこのトレーニングコースは国内の若手生理学研究者，神経科学者の間で広く浸透している。アメリカでは Marine Biology Lab や Cold Spring Harbor など，実験手技を実際に学ぶコースが開催されている。しかしながらわが国ではそのようなコースは比較的まれである。生理学研究所のトレーニングコースでは，ほとんどのコースで実際に第一線の研究に用いられている実験設備を実習に提供し，実験のエクスパートが直接教えている。このようにして，新しい実験手法を紹介するだけでなく，他ではなかなか得ることができない実験のコツや実験データの解釈といったことも重要な要素となっている。若手研究者育成の重要性が指摘されている今，生理学研究所としては，今後とも研究者コミュニティの核となる研究所として，若手研究者の育成のためにこのコースをより継続，発展させていきたいと考えている。

プログラムは以下の通りである。

【講演】

膜電位情報はどのように細胞の中へ伝えられるか？：膜電位感受性タンパクの多様性と原理

岡村康司教授（岡崎統合バイオサイエンスセンター・神経分化研究部門）

【実習内容】

(1)　位相差電子顕微鏡の原理と実践

新田浩二（ナノ形態生理）

(2)　免疫電子顕微鏡法

重本隆一（脳形態解析）

(3)　N-結合型糖鎖の解析

池中一裕（分子神経生理）

(4)　in vitro 発現系を用いたイオンチャネル・受容体の機能解析

岡村康司（統合バイオ神経分化，神経機能素子）

(5)　パッチクランプ基本法とその応用

富永真琴（機能協関，生体恒常機能発達，統合バイオ神経分化，統合バイオ細胞生理）

(6)　2 光子顕微鏡による観察の基礎

根本知己（脳機能計測センター生体情報解析）

(7)　スライスパッチクランプ法（基礎コース）

井本敬二（神経シグナル）

(8)　スライスパッチクランプ法（応用コース）

籾山俊彦（脳形態解析）

(9)　局所神経回路の形態的解析法

窪田芳之（大脳神経回路論）

(10)　マウス・ラットの発生工学技術

三寶誠（行動・代謝分子解析センター）

(11)　生理学実験のための電気回路・機械工作

大庭明生（技術課）

(12)　摂食・飲水行動発現機構入門

志内哲也（生殖・内分泌系発達機構）

(13)　麻酔下動物での電気生理実験

伊佐正（認知行動発達機構）

(14)　慢性動物実験法入門

南部篤（生体システム）

(15)　脳磁図によるヒト脳機能研究の基礎

金桶吉起，柿木隆介（感覚運動調節）

(16)　脳機能画像解析入門

田邊宏樹（心理生理）

また，例年通りコースの終了後，受講者にアンケートをとってその意見を次回以降に活かすようにしている。主な意見は以下の通り。尚，アンケートの全内容は生理学研究所のホームページで公開されている (http://www.nips.ac.jp/training/2006/TC2006Q.pdf) ので，そちらを参照されたい。

【アンケート結果】受講者　146 名，うち回答者 109 名（回収率 75%）

1. 参加者の身分 (%)

学部学生 10，大学院生（修士）25，大学院生（博士）30，大学等の研究員（ポスドク）8，企業の研究者 7，国立研究所などの研究者 1，助手・講師 15，その他 4

2. このトレーニングコースは何で知りましたか？（複数回答可）(%)

インターネット 38，雑誌などの広告 0，友人・知人・先生の紹介 61，ポスター 7，以前参加したことがある 13，その他 1

3. 参加動機は？（複数回答可）(%)

自分の研究レベルの向上 81，新たな分野を研究したい 46，ほかの研究者との交流 37，生理研や総研大に興味があったため 18，その他 3

4. インターネットを使った応募方法や電子メールによる連絡について（複数回答可）(%)

便利でよかった 98，不便だった 0，やり方がわかりにくい 1，連絡が来なくて心配だった 5，連絡が多すぎた 0，特になし 0

5. 受講料（10,200 円）は？(%)

高い 2，ちょうどよい 61，安い 38，無回答 0

6. トレーニングコースを利用するためにかかった交通費・宿泊費は？(%)

負担が大きい 15，これぐらいはやむをえない 71，たいした負担ではない 15，無回答 0

7. 受講料・交通費・旅費の補助を研究費・研究室・会社などから受けましたか？(%)

すべて自己負担 44，部分的に（おおよそ 2/3 まで）補助を受けた 10，ほとんど（おおよそ 2/3 以上）補助を受けた 46，無回答 0

8. 講演はいかがでしたか？（複数回答可）(%)

ためになった 65，面白かった 68，難しかった 29，興味の無い分野で退屈だった 2，内容が簡単でつまらなかった 0，その他 7，無回答 1

9. 実習期間は？(%)

長い 2，ちょうどよい 83，短い 15，無回答 0

10. 自習内容 (%)

大変満足 69，満足 28，まあまあ 2，少し不満 1，かなり不満 2，無回答 0

11. 交流会に関して（複数回答可）(%)

研究スタッフと交流できた 51，他の参加者と交流できた 69，有意義だった 40，面白かった 36，時間の無駄だった 0，不参加 6，無回答 0

【セミナー報告】

セミナー報告

1. カルモジュリンによる電位依存性 Ca^{2+}チャネルの両極性フィードバック制御の分子機構

森　誠之（Johns Hopkins 大学 バイオメディカルエンジニアリング学部 研究員）

(2006.4.5)

電位依存性 Ca^{2+}チャネルのカルシウム依存的フィードバック制御がカルシウム結合蛋白質“カルモジュリン(CaM)”の直接相互作用によって成されていることが明らかになってきた。ここで，CaM は L 型 Ca^{2+}チャネルに対してはネガティブフィードバック，逆に P/Q 型 Ca^{2+}チャネルに対してはポジティブフィードバックの方向に働くことが知られているが，それらの分子機構についてはまだ良く分かっていない。そこでこれら両極的な機能を比較することで, 鍵となる分子機構を見出したい考えた。グリシンリンカーを用いたエンジニア Ca^{2+}チャネルや，FRET などの実験から得られた予備的な結果を紹介したい。

（担当：井本敬二）

2. A Surprise Theory of Attention

Laurent Itti (Assistant Professor of Computer Science, University of Southern California)

(2006.4.12)

The concept of surprise is central to sensory processing, adaptation and learning, attention, and decision making. Yet, no widely-accepted mathematical theory currently exists to quantitatively characterize surprise elicited by a stimulus or event, for observers that range from single neurons to complex natural or engineered systems. We describe a ormal Bayesian definition of surprise that is the only consistent formulation under minimal axiomatic assumptions. Surprise quantifies how data affects a natural or artificial observer, by measuring the difference between posterior and prior beliefs of the observer. Using this framework we measure the extent to which humans look towards surprising things while watching television and video games. We find that surprise is the strongest known attractor of human attention, with 72 percent of all human gaze shifts directed towards locations more surprising than on average, a figure which rises to 84 percent when considering only gaze targets simultaneously selected by four humans. The resulting theory of surprise is applicable across different modalities, datatypes, tasks, and abstraction levels.

（担当：伊佐 正，吉田 正俊）

3. イノシトールリン脂質代謝異常による不随意運動の発現

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）

(2006.4.20)

ホスファチジルイノシトールは，細胞膜系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 (PIs) 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 PIs 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。また，PIs 可視化マウス（PIs 結合モジュールと GFP の融合タンパク質を発現するトランスジェニックマウス）の利用によって，PIs 局在化の機構と生理的

意義を検討している。今回のセミナーでは，L-PIPase (leucine-rich phosphoinositide phosphatase) の欠損マウスが呈する不随意運動と病態の発現メカニズムに関して，最近の知見を発表する。

（担当：籾山　俊彦）

4. 初期視覚系における輪郭線の表現の神経メカニズム

伊藤南（感覚認知情報部門）

(2006.4.25)

私たちが物体を認知するに際して，物体の輪郭線の形状は重要な手がかりの一つとなります。では我々の脳はどのようにして輪郭線の形状を表現するのでしょうか？大脳皮質視覚野の中でも腹側視覚路が物体認知の神経メカニズムを担うと考えられています。腹側視覚路の最終段に位置する下側頭葉 TE 野のニューロンは輪郭線の形状を含む中程度に複雑な刺激特徴に対して選択的な反応を示すことが明らかにされています。一方，腹側視覚路の初期に位置する第一次視覚野のニューロンは小さな受容野内に呈示された線成分の傾きに選択的な反応を示すことが知られております。しかしながら，その中間部分においてこうした局所部分の刺激特徴の表現が物体全体の表現へとまとめ上げられていく様子についてはいまだあまりよく分かっていません。私たちは最も単純な組み合わせ刺激ということで折れ曲がり刺激に着目し，腹側視覚路における折れ曲がり刺激に対する選択性ならびにその形成の様子を明らかにすることで輪郭線表現の神経メカニズムを明らかにできるのではないかと考えました。本日のセミナーではそのような考え方でここ数年続けております第一次視覚野ならびに第二次視覚野からの記録結果についてについてまとめてお話したいと思います。注視課題を遂行中のサルより単一細胞外記録を行いましたところ，第二次視覚野において多数の細胞が折れ曲がりに刺激に対する選択性を持つことが明らかになりました。最適な折れ曲がり刺激の半直線成分の両方または一方は個々の半直線に対する反応選択性のピークと一致しましたが，選択性自体は二本の直線成分の特異的な組み合わせに依存しており，単に各線成分に個別に反応しているものではないと考えられます。一方，個々の線成分に依らず折れ曲がりの角度や刺激の方向を表す細胞は見つかりませんでした。これらの結果より折れ曲がりの表現が各半直線成分による方位選択的な興奮性入力ないしは抑制性入力の特異的な組み合わせによっており，第二次視覚野が折れ曲がりの検出の初期段階を担うのではないかと考えています。

（担当：小野　勝彦）

5. Intermediate GABAergic neuron progenitors in the mouse neocortex

玉巻伸章（熊本大学医学薬学研究部脳回路構造学分野）

(2006.5.1)

マウス大脳皮質は大きく分けて 2 種類の神経細胞で構成されています。一つは興奮性神経細胞であり他方は抑制性神経細胞です。大脳皮質の全ての抑制性神経細胞は GABA を伝達物質として使うので，大人の大脳皮質では GABA 神経細胞＝抑制性神経細胞といえます。最近，興奮性神経細胞の一部は，脳室帯ではなく，脳室下帯や，中間帯で作られていることが明らかになりました。そのような神経産生の前駆細胞のことを，神経細胞マーカーを発現していることから Intermediate neuron progenitor と呼んでいます。では大脳皮質 GABA 神経細胞はどのような経過をたどって生み出されるのでしょうか。GABA 神経細胞の検出に役立つ GAD67-GFP knock-in mouse では，GABA の合成酵素 GAD67 のプロモーター活性に依存して GFP が発現し，脳の組織内で GFP の蛍光で検出することが出来ます。GABA 神経細胞の発生を追う目的で，マウス胎児の大脳皮質で GFP 陽性細胞を色々と調べてみますと，中には分裂真っ最中の細胞や DNA を合成している細胞がいることが明らかとなりました。このよう

な細胞は Intermediate GABAergic neuron progenitor と呼ぶことを提唱しています。

Intermediate GABAergic neuron progenitor は全て, MAP2, Tuj1 陽性ですが分裂能を持っています。また，生後になっても脳室下帯に残存し，刺激を与えると盛んに BrdU を取り込み増殖すると考えられます。

（担当：鍋倉　淳一）

6. プレシナプス蛋白質 RIM1αの翻訳後修飾による神経伝達物質放出の制御

瀬藤　光利（岡崎統合バイオサイエンスセンター戦略的方法論（ナノ形態生理）部門）

(2006.5.11)

神経活動の制御において神経伝達物質放出の制御が重要である。プレシナプスの蛋白質 RIM1αはアクティブゾーンを構成し，シナプス小胞の放出に関与していると考えられているが，その制御機構は明らかでない。今回，我々は SAD1 キナーゼが RIM1αを直接リン酸化し, グルタミン酸の放出確率を制御すること(Neuron in press)，さらに新規ユビキチンリガーゼが RIM1αを直接ユビキチン化しプロテアソーム依存的に分解すること（投稿中）を見出したので，それら酵素のミュータントマウスの質量顕微鏡による解析を交えて紹介したい。

（担当：小野　勝彦）

7. A Functional Role for Motor Cortical Oscillations

Stuart Baker（NewCastle 大学　Neuroscience センター助教授）

(2006.5.12)

Motor cortical recordings often show waves of oscillatory activity around 25Hz.

These synchronise with similar oscillations in contralateral muscles. Although much studied, until now there have been few plausible suggestions as to what their functional role might be.

In this seminar, I will examine certain pieces of experimental data which do not fit with established ideas about these oscillations. From these, I will suggest a speculative hypothesis of what their functional role might be, namely to achieve a proprioceptive recalibration of the motor system.

I will then present some of our more recent data to support this.

（担当：伊佐　正，関　和彦）

8. Exploration of Mechanotransduction in Cells and Implications in Fundamental Cellular Functions：p130Cas Serves as a Direct Mechano-sensor in Force-intiated Src Signaling Through Unfolding-dependent Substrate Priming

澤田　泰宏 (Department of Biological Sciences,Columbia University)

(2006.5.25)

物理的な力（メカニカルストレス）が，循環器，神経，骨など多くの組織の発生や機能の制御に重要な役割を果たしていることが知られている。さらに，癌の浸潤や転移において基質への接着が重要であることは，癌細胞の機能調節あるいは癌化自体における，メカニカルストレスに関わる生物学的現象の重要性を示唆する。近年の細胞のメカニカルストレス応答機構に関する研究により，様々な細胞内シグナルがメカニカルストレスによって活

性化されることが明らかとなっている。しかし，細胞のメカニカルストレスの受容機構，すなわち細胞に負荷される物理信号が細胞内の（生）化学信号に変換される直接的なメカニズムについては，イオンチャネルの関与が知られているのみである。これまでに我々は，small GTPase の一つである Rap1 の活性化が細胞伸展による p38 MAP キナーゼの活性化に関わっていること（文献 1），細胞骨格 (detergent-insolublestructure) 中に細胞伸展の受容機構があること（文献 2），細胞骨格中のタンパクのチロシンリン酸化が細胞伸展による Rap1 の活性化に重要な役割を果たしていることを報告した（文献 3）。今回はこの研究をさらに進め，Src ファミリーキナーゼの基質である p130Cas のチロシンリン酸化が細胞伸展による Rap1 の活性化に重要であること，および細胞伸展による p130Cas のチロシンリン酸化の促進はその基質部分のコンフォメーションの変化を介していることを明らかにした。したがって，p130Cas は伸展という物理信号を（生）化学信号に変換する分子といえる。イオンチャネル以外のメカニカルストレス受容体としては最初の報告となる。さらに，本講演では，酵素反応の制御における基質の役割の重要性に関してもふれる。

（担当：岡村　康司）

9. Properties of C3-C4 Spinal Neurons during Voluntary Arm Movements in the Behaving Monkey

Steve I. Perlmutter（University of Washington, Dept. of Physiology& Biophysics
及び米国国立霊長類研究センター助教授）

(2006.5.31)

Evolution has given the primate a unique, direct pathway from the motor areas of the cerebral cortex to arm muscle motoneurons. This pathway conveys enormous control capability and has endowed the primate with a wide, flexible repertoire of movement. There are other, less direct, corticospinal pathways that contribute to this behavioral repertoire. Motor cortical areas have dense terminations in interneuronal fields throughout the cervical cord. What is the function of these projections? One descending pathway relays cortical signals disynaptically to motoneurons through short, premotor, propriospinal neurons in the C3-C4 segments. In the cat, this pathway exerts significant control over forelimb reaching movements, and recent evidence suggests that it is also important in primates. We are recording the activity of interneurons in the C3-C4 segments of monkeys performing trained hand, arm, and neck movements to help elucidate the functional role of this propriospinal pathway in the primate. Our data provide insights into the organization of cortical control of movement and have implications for potential mechanisms of motor recovery following spinal cord injury.

（担当：伊佐　正，関　和彦）

10. Activation of Potassium Channels（ポタシウムチャネルのトラフィッキングと活動の調節機構）

Min Li (Professor of Neuroscience and Physiology, Johns Hopkins University, Baltimore, USA)

(2006.6.19)

Potassium channels play a critical role in controlling membrane excitability. Using genetics analyses and chemical biology techniques, we have been investigating the signaling processes that regaulte channel expression and activities. The seminar will discuss special properties of new trafficking motifs and chemical probes targeted to potassium channels.

（担当：久保　義弘）

11. Molecular anatomy of synaptic contacts between nociceptive primary afferents and sensory neurons in the spinal dorsal horn

Antal Miklos (Professor and Chairman, Department of Anatomy,
Histology and Embryology Faculty of Medicine, University of Debrecen, Hungary)

(2006.6.21)

All vertebrate animals possess a sensory system that allows them to detect potentially tissue-damaging (or noxious) stimuli. The proper functioning of this system is essential to protect their bodies from tissue damage. Nerve impulses generated by noxious stimuli are conducted by C and A-delta (nociceptive) primary afferent fibers to the superficial spinal dorsal horn. Spinal neurons receive and process these signals, and in certain conditions transmit them to higher brain centers where nociceptive impulses generate pain. The seminar is going to focus on the first site of synaptic processing of pain-related signals, and intends to give an overview about the molecular anatomy of synaptic contacts between nociceptive primary afferents and spinal sensory neurons. It will be shown that the molecular architecture of these synapses is highly complex that gives various possibilities for pre- and postsynaptic modulation. It will also be emphasized that in addition to being highly complex, the molecular organization of these synaptic contacts shows a high degree of activity evoked plasticity; e.g. enhanced activities of nociceptive primary afferents in certain pathologic conditions like chronic inflammation or nerve injury induce various changes in the molecular organization of these synapses that contribute to the development of central sensitization and chronic pain syndromes.

（担当：重本 隆一）

12. 淡蒼球内節の活動パターンー正常サルとパーキンソン病モデルサルを比較してー

橘　吉寿（生理学研究所　統合生理研究系　生体システム研究部門）

(2006.6.22)

大脳基底核の主要な出力部である淡蒼球内節は，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と密な線維連絡を保っていることが，これまでの研究から明らかとなっています。今回のセミナーの前半では，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って，巧妙に制御されていることを明らかにした研究結果について発表します。また，後半では，パーキンソン病モデルサルの淡蒼球内節において，正常サルでは見られない bursting や oscillation といった異常な活動パターンが観察されたことを紹介し，パーキンソン病の病態生理について迫りたいと考えています。

（担当：小野　勝彦）

13. 脊髄一次求心性線維の投射路を規定する分子メカニズム

増田　知之（福島県立医科大学　神経解剖・発生学講座）

(2006.7.7)

増田先生は，福島県立医科大学，神経解剖・発生学講座（八木沼洋行教授）から共同研究で分子神経生理部門にこられます。増田先生は，脊髄神経節 (DRG) から脊髄方向へまた末梢方向へ軸索が伸長する分子メカニズムを調べておられます。この研究は，筑波大学基礎医学系大学院で志賀 隆教授の下で始められ，現在も続けているものです。これまでに，DRG の axon がなぜ脊髄背側部から脊髄に進入するのかという問題に着目し，これが分

泌性シグナルおよび細胞表面分子によって制御されていることを明らかにされてきました。来所の機会にこれまでの研究成果を紹介していただきますので，お誘いあわせの上おいでください。

（セミナーは日本語で行われます）

Dr. Tomoyuki Masuda, an assistant professor of Department of Anatomy in Fukushima Medical University, has been studying mechanisms by which DRG axon pathfinding is regulated, for nearly 10 years. He started this work under a guidance of Dr. Takashi Shiga, a professor of Tsukuba University. Dr. Masuda has elucidated that several secreting, cell surface and extracellular matrix molecules play roles of chemo- and contact-repulsion on DRG axons elongation to guide the axons to the dorsal spinal cord or to periphery. He comes to the Ikenaka's lab for collaboration and will have a seminar about his recent findings. Please come and enjoy his talk.

（担当：渡辺啓介，小野勝彦）

14. Phasic cholinergic signaling in the neocortex

Allan Gulledge (Division of Cerebral Circuitry)

(2006.7.13)

Acetylcholine is a central neurotransmitter critical for cognitive function. We show that transient ACh receptor activation generates cell-type specific responses in neocortical neurons. In layer 5 pyramidal neurons, ACh acts via M1 muscarinic receptors,intracellular calcium release, and subsequent SK-type calcium-activated potassium channels to inhibit neuronal output. Pyramidal neurons in layer 3 were generally much less responsive to ACh, but substantial apamin-sensitive inhibitory responses occurred in deep layer 3 neurons of the visual cortex. Fast spiking (FS) nonpyramidal neurons in all cortical areas were non-responsive to ACh, even when exposed to very high agonist concentrations (5 mM). When applied to non-FS interneurons in layers 3 and 5, ACh generated mecamylamine-sensitive nicotinic responses (37% of cells tested), apamin-insensitive hyperpolarizing responses (10% of neurons), or no response at all (53% of cells). Responses in interneurons were similar across cortical layers and regions, but were correlated with cell physiology. Finally, ACh generated nicotinic responses in all layer 1 neurons tested. These data demonstrate that phasic cholinergic input can inhibit projection neurons throughout the cortex while sculpting intracortical processing, especially in superficial layers.

（担当：小野　勝彦）

15. Remodeling of the Atrium in Hypertension: A Basis to Increased Susceptibility to Atrial Tachyarrhythmia?

Andrew F. James (University of Bristol, UK)

(2006.7.18)

The major research focus of our laboratory is cardiac electrophysiology and the basis to arrhythmia. Atrial fibrillation (AF), the most common arrhythmia (its incidence increasing with age), is associated with increased mortality. AF has many causes and its etiology is complex. Animal models, in which causes of AF are studied in isolation, have provided valuable insights into the mechanisms underlying the disease. However, while hypertension is the most prevalent risk factor for AF, to date there have been no reports of atrial remodeling in any animal model of hypertension. We have examined the remodeling of the left atrium (LA) associated with hypertension, using spontaneously hypertensive rats (SHR) and their normotensive Wistar Kyoto control (WKY) at two ages; 12-weeks and 42- weeks. The incidence of LA

tachyarrhythmia (AT) following burst pacing in excised perfused whole hearts was increased in 42-week SHR compared with their age-matched WKY controls and compared with the 12- week SHR, demonstrating the development of a substrate for arrhythmia with age in hypertensive animals. This increased susceptibility to AT was not associated with changes in LA effective refractory period. On the other hand, whole-cell Ca^{2+} currents in isolated LA myocytes showed evidence of remodeling. There was also evidence of LA structural remodeling in SHR: SHR LA was hypertrophied compared to WKY and showed evidence of fibrosis. In conclusion, this study provides the first evidence of atrial remodeling producing a substrate for AT in an animal model of hypertension. Our work on sex differences in ventricular repolarisation and drug-induced arrhythmia was also presented in this seminar.

（担当：岡田泰伸）

16. Towards a neural prosthesis for motor injury

Andrew Jackson (Dept of Physiology and Biophysics, University of Washington, Seattle USA)

(2006.7.24)

Our research uses small implantable electronic circuits (Neurochips) for neural recording and stimulation with the aim of building artificial connections to replace or augment nervous pathways lost through injury or disease. For example, activity recorded in the motor cortex could be used to control electrical stimulation of the spinal cord to restore function following spinal cord injury or stroke. In this talk I will discuss the development of our Neurochip technology, and describe a series of experiments designed to test the feasibility of this approach in primates. We used a Neurochip to record the activity of motor cortex cells and arm muscles during completely unrestrained movement and compared this to data collected using a conventional tracking task. We saw robust correlations between cells and muscles on a variety of time-scales over the repertoire of waking behaviour. The range of correlation values was comparable during task performance, although many individual cells exhibited interesting differences across conditions. In a second experiment we investigated arm movements elicited by electrical stimulation of the cervical spinal cord in anesthetised primates. We found that a full range of movements could be elicited at low thresholds from sites distributed throughout the cord. Often movements involved the synergistic activation of multiple muscles. We are currently using Neurochips to implement long-term artificial connections within the motor cortex and hope soon to extend this to artificial cortico-spinal connections. We propose that a prosthesis comprised of many such connections could help to restore motor function following injury.

（担当：伊佐　正）

17. Fast-spiking neocortical GABAergic interneurons in layer 2/3 mouse barrel cortex: Molecular contributions to cell function

Ethan M. Goldberg (New York University School of Medicine)

(2006.7.27)

Abstract: Fast-spiking GABAergic interneurons (FS cells) are the most common subtype of neocortical GABAergic interneuron, and are so named for the striking ability to discharge sustained trains of thin action potentials at high frequency in a non-accomodating fashion. We show that the cellular neurophysiology of FS cells can be described by three so-called “voltage regimes,” a subthreshold, near-threshold, and suprathreshold regime. The behavior of FS cells within each of these voltage regions is dominated by a different, and specific, type of potassium conductance. These conductances contribute to many aspects of FS cell physiology, including the maintenance of the resting membrane potential, input

resistance, action potential threshold, and suprathreshold firing properties of FS cells. In addition, some of the ion channels expressed at the FS cell soma are also present at the FS cell synapse, where these channels regulate the efficacy and dynamics of neurotransmitter release. It is interesting to note the parallel between the diversity of neocortical interneurons and the molecular and biophysical diversity of potassium channels expressed in the brain. Our current work is aimed at a precise molecular identification of the channel proteins that underlie the potassium conductances in FS cells.

（担当：窪田　芳之）

18. 脳磁計 (MEG) を用いた高次視覚野のイメージング

野口　泰基（感覚運動調節研究部門）

(2006.8.7)

脳磁計 (MEG) は磁場検出器を頭の表面に置き，脳の活動（電気信号）が生み出す磁界を捉える技術です。細胞記録法や核磁気共鳴画像法 (fMRI) と同様に脳の神経活動を観察することができますが，特に (1) 非侵襲的な手法なので人間を被験体に出来る，(2) 時間分解能が高い（ms 単位），という 2 つの利点を併せ持つことが特徴です。そのため他の動物ではなく「人間」において顕著に見られるような日常的な心理現象，特にミリ秒単位の「時間」的変化を伴うような現象を扱うことを得意としてきました。ここでは「プライミング効果」および「時間錯覚」という人間が持つ 2 つの心理現象に焦点を当て，それらの現象が脳内における視覚野の活動の時間的変化と密接に関わっていることを示した最近の研究をご紹介したいと思います。

（担当：小野　勝彦）

19. ゼブラフィッシュ分節時計における同期とノイズ耐性のメカニズム
Synchronized and noise-resistant oscillation in the somite segmentation clock of zebrafish

武田　洋幸（東京大学大学院理学系研究科・生物科学専攻）

(2006.9.7)

複雑な構造を持つ私たちのからだが正しく作られるためには，多くの遺伝子が秩序だって，かつ正確に発現することが必須である。一方，遺伝子発現のタイミングは本来それほど正確なものではなく，生体内ではおおきなばらつきをもつことが明らかになりつつある。正確なからだづくりのためには，この“遺伝子発現のばらつき”の影響を積極的に排除する必要がある。今回我々は背骨の繰り返しパターンを作るために必要な分節時計の作動原理の一端を，ゼブラフィッシュ胚を用いた胚操作実験と数学的シミュレーションにより明らかにした。特に，“遺伝子発現のばらつき”は，細胞を単位とする多数の小さな時計がノッチ・デルタと呼ばれる細胞表面で機能する分子を介して大きな集合体をつくることによって最小化され，からだの中で正確に時が刻まれていることを明らかにした。

（担当 : 東島眞一）

20. 脊椎動物における味覚受容の分子基盤
The molecular nature of taste reception in vertebrates

石丸　喜朗 (Duke University Medical Center)

(2006.9.14)

我々ヒトを含め動物は，食物の栄養価，毒性，塩含有量，酸度を味覚系を用いて評価している。口腔に取り込まれた味物質は，味蕾という組織に存在する“味覚受容体”で受容される。このシグナルは味神経を通じて最終的に脳へと到達し，味覚として認識される。最近我々は，魚類における 2 種類の味覚受容体候補 T1R，T2R ファミリー，及び，哺乳類の酸味受容体候補 PKD1L3/PKD2L1 を同定した。これらの味覚受容体候補を中心として，ここ数年で急激に明らかになりつつある脊椎動物における味覚受容の分子機構に関する話をしたい。

（担当：富永真琴）

21. 体温維持が海馬神経活動に与える影響：温度センサー蛋白質による膜電位の制御

柴崎　貢志（岡崎統合バイオサイエンスセンター助手）

(2006.9.21)

古典的な研究により，我々が体温を維持していることにより神経活動が室温条件下よりも活発になっていることが，温度条件を変化させた電気生理学的解析や脳波解析により明らかとされている。しかしながら，どのような分子メカニズムで体温を情報源とした神経活動上昇が起こるのかは全く未解明である。近年，様々な温度により活性化する温度センサー蛋白質として TRP チャネルが同定された。現在までに 9 つの TRP チャネルが温度センサーとして機能することが明らかとなっている（2 つが熱刺激の受容，2 つが冷刺激の受容，残りの 5 つが体温近傍の暖かさを受容）。最近，演者は体温近傍の温度により活性化する温度センサー蛋白質・TRPV4 が脳に広範に存在すること，特に海馬において高発現が見られることを見いだした。TRPV4 はカルシウム透過性の高い非選択的陽イオンチャネルである。ここに着目し，野生型，TRPV4 欠損型の海馬神経細胞を用いた電気生理学的解析を行い，体温によるチャネルの活性化，陽イオンの流入，海馬神経細胞の静止膜電位の脱分極が引き起こされることを明らかとした。今回の昼食セミナーでは，TRPV4 の発現分布，神経細胞内局在，神経機能への影響に焦点をあててお話を進めたい。そして，我々が体温維持をすることにより神経細胞が興奮しやすい土台環境を作り出していることを考察したい。

（担当：小野 勝彦）

22. Axon-glia interactions and the control of myelination

Klaus-Armin Nave (Max-Planck-Institute of Experimental Medicine,Germany)

(2006.10.16)

Myelination of axons is a prerequisite for rapid impulse conduction in the nervous system and essential for normal motor and cognitive functions. In the peripheral nervous system, Schwann cells (SC) either engulf multiple small-caliber axons (Remak bundle), or single-out and spirally enwrap larger axons with a multi-lamellar myelin sheath. We have previously shown that axonal neuregulin-1 signaling to glial cells that express ErbB receptors is a critical regulator of myelination and myelin sheath thickness in vivo. Mice with reduced NRG1 gene dosage are hypomyelinated, whereas transgenic mice with elevated NRG1 expression in DRG and motoneurons are hypermyelinated. In the PNS, NRG1 type III is the responsible isoform. Whether NRG1 serves a similar function in the myelination of axons in the central nervous

system is not known but of obvious clinical relevance. Also the molecular mechanisms downstream of ErbB receptor activation that initiate the spiral wrapping by SC are unknown. By targeting a null mutation of the PTEN gene to SC, we can demonstrate that the signaling lipid PtdIns (3,4,5) P3 (PIP3) induces myelin membrane outgrowth. In adult mice, elevated PIP3 activates Akt1 and causes hypermyelination as well as myelin outfoldings that resemble the pathology of human CMT4B. Surprisingly, elevated PIP3 is sufficient to induce the wrapping of small C-fiber axons in Remak bundels, and even the ensheathment of collagen fibers that completely lack axonal surface signals. These observations demonstrate a key role for PIP3 in inducing spiral wrapping and driving myelin membrane outgrowth.

（担当：池中一裕）

23. KCNQ チャネルの活性制御機構：細胞内構造のゲーティングにおける役割

中條　浩一（神経機能素子研究部門）

(2006.10.18)

電位依存性 K^+チャネルファミリーの一部を構成する KCNQ チャネルは, 心臓や神経細胞などに発現しており, 不整脈やてんかんなどの原因遺伝子でもあることから, 細胞の興奮性制御に重要な役割を果たしていることが知られている。近年ホスファチジルイノシトール (4,5) 2 リン酸 (PIP2) をはじめ，PKC や Ca^{2+}など，細胞内シグナル伝達に関わるさまざまな物質によって制御されていることが明らかになってきている。これらの物質による KCNQ チャネル活性の制御機構, 特に PKC のリン酸化によるゲーティングの性質の変化についてお話ししたい。また，C 末端細胞内領域には 2 つのコイルドコイルドメインが存在し，チャネルが 4 量体構造をとるために重要であると考えられているが，その他にもゲーティングあるいは発現量調節に重要な働きを持つことが示唆される結果を得た。これらの知見について紹介した。

（担当：小野　勝彦）

24. Chronic Inactivity Increases the Fraction of High Vesicular Release Probability Pool at Hippocampus Synapse

桂林秀太郎（崇城大学 薬学部 薬理学研究室）

(2006.11.15)

Christian Rosenmund (Baylor College of Medicine) の研究室で行った神経終末における伝達物質放出機構・vesicle recycling の活動依存性変化を中心に，伝達物質放出の可塑的変化の最先端のお話をしていただきます。多数ご参加ください。

なお，セミナーは英語で (Talk will be given in English) 行っていただく予定です。

Disuse of synaptic activity causes homeostatic adaptations of the pre and postsynaptic functions. Here we show that in hippocampal autaptic cultured neurons long-lasting tetrodotoxin-induced chronic inactivity potentiates evoked responses. While we found that the potentiation was due to a presynaptic mechanism, the size of the readily releasable pool size was unchanged. Dynamics of short-term plasticity, and unchanged apparent Ca^{2+}-sensitivity imply that the presynaptic potentiation is unlikely due to a change in the efficiency of the Ca^{2+}-triggering step.

Interestingly, while complete, genetic blockade of release activity did not prevent the development of presynaptic potentiation, chronic absence of synaptotagmin-1 prevented them. Moreover, rescues of synaptotagmin-1 using two different viruses reveal that the vesicle machinery requires prolonged period for the presynaptic potentiation. Our data suggest a novel, inactivity-mediated vesicle localization system underlying the heterogeneity of the vesicular release

probability, involving the unknown molecular interactions with synaptotagmin-1.

（担当：鍋倉　淳一）

25. Development and plasticity of inhibitory circuits in the auditory system

Karl Kandler（ピッツバーグ大学）

(2006.11.16)

Kandler 博士は抑制性回路の発達リモデリング関して世界最先端の研究者です。近年，聴覚系をモデルとした回路において，抑制性回路の synapse elimination や，発達期において GABA/グリシンとグルタミン酸の co-release の存在などを報告しています。

Kandler K, Gillespie DC.Developmental refinement of inhibitory sound-localization circuits.Trends *Neurosci.* 2005 Jun;28(6):290-6.

Gillespie DC, Kim G, Kandler K. Inbitory synapses in the developing auditory system are glutamatergic. *Nat Neurosci.* 2005 Mar;8(3):332-8. *Epub* 2005 Jan 30

Kim G, Kandler K. Elimination and strengthening of glycinergic/GABAergic connectionsduring tonotopic map formation. *Nat Neurosci.* 2003 Mar;6 (3):282-90.

（担当：鍋倉　淳一）

26. Neural machinery for detecting and measuring faces in fMRI-identified macaque face patches

Doris Tsao (Head of Young Research Group, Institute for Brain Research, University of Bremen)

(2006.11.17)

What are the neural circuits underlying face perception in primates? Using fMRI in alert monkeys, we identified three face-selective regions in the temporal lobe. In my talk, I will describe single-unit recordings targeted to two of these fMRI identified face patches. Single-unit recordings targeted to the middle face patch revealed that almost all visually responsive neurons in this region are strongly face selective. Experiments with a sequence of cartoon faces rapidly changing along 19 feature dimensions revealed that most cells in the middle face patch are tuned to small subsets of facial feature dimensions; tuning to different parameters was independent and usually ramp-shaped, suggesting face coding by dimensions rather than exemplars. Recordings from a second, more anterior face-selective region showed that almost all cells in this region are also face selective. However, functionally, this new anterior area differs in several ways from the middle face patch: 1) cells are much more strongly view selective 2) view selectivity is highly mirror symmetric, 3) a subset of cells show separable coding of identity and view direction, and 4) LFPs, biphasic in shape in response to all objects, are several tens of milliseconds faster for faces than other objects.

（担当：小松英彦）

27. Klotho は体液 Ca 恒常性を司る

伊村　明浩（科学振興助教授）

(2006.11.20)

1997 年に「老化に似た表現型」を示す変異マウスとその責任遺伝子が報告され，klotho と名付けられました。(Nature,97)。以来マウスの解析を行い，klotho 遺伝子機能の全容を解明したので報告する。遺伝子欠損を生物の設

計ミスと考えると，破綻が波及して起きた最終現象が「老化様の」表現型である。そこで，「老化」の直接的原因を探ると，ヴィタミン D 過剰症であった。その原因は，ヴィタミン D 活性化酵素の過剰発現であった。さらに深く探るため，ヴィタミン D 欠乏食を与えることで症状をレスキューし，より直接的な表現型を探索した。klotho 遺伝子は脈絡膜，副甲状腺，尿細管に発現しているが，それぞれの部位で，脳脊髄液の Ca 低下，副甲状腺ホルモンの分泌低下，尿中 Ca 再吸収低下が見いだされた。また，別のアプローチとして Klotho の結合タンパク質を同定したところ，Na,K-ATPase であることが判明した。併せて考えると，「Klotho は体液 Ca 調節の中枢部位に位置し，Ca 濃度に反応して Na,K-ATPase の活性を調節しているのではないか？」という仮説が浮上した。しかし当時，そのようなイメージを支持してくれる知見は皆無であった。この仮説を検証するためには，Klotho は Na,K-ATPase とどこでどのように結合しているのか，Ca 濃度に反応して Na,K-ATPase の活性は変化するのか，Na, K-ATPase の活性がどのように体液 Ca 恒常性と関係するのか，Klotho 欠損がどのようにしてヴィタミン D 活性化酵素の発現上昇に結びつくのか，などの諸問題が山積していた。それらに対峙し，時に共同研究者の助力によりたどり着いた成果が，今回の報告である。偶然の遺伝学により発見された klotho は，遺伝子から想定される情報が乏しく，厳しい逆遺伝学のルートをたどらねばならなかった。今から考えると，もっと良い進路があったかもしれず，生理学の視点からご批判を賜りたいと思っています。

（担当：富永真琴）

28. 膜電位依存性酵素 Ci-VSP の基質特異性

岩崎　広英（岡崎統合バイオサイエンスセンター神経分化研究室）

(2006.11.29)

Ci-VSP は電位依存性イオンチャネルの電位センサー様の膜貫通領域と，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構成される分子である。これまでに，Ci-VSP が PTEN と同様にホスファチジルイノシトール 3,4,5-三リン酸(PI(3,4,5)P3)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(PI(4,5)P2)を生成するホスファターゼ活性を有すること，および膜電位を脱分極させると PI(4,5)P 2 が減少し，過分極させる PI(4,5)P2 が増大することから Ci- VSP の酵素活性が膜電位によって調節されることを報告した。今回 Ci-VSP の基質特異性について解析を試みたところ, PTEN と異なり Ci-VSP は PI(4,5)P2 を基質として脱リン酸化を行なうことが明らかとなった。このことから Ci- VSP は脱分極時において活性化され，PI(4,5)P2 濃度を減少させる活性をもつホスファターゼであることが明らかとなった。さらに，363 番目のグリシンをアラニンに置換すると PTEN 型の基質特異性を示すことから，このアミノ酸が基質特異性に重要であることが明らかとなった。

（担当：小野　勝彦）

29. 尾索動物オタマジャクシの遊泳運動とその生理基盤～ロコモーション・ゲノム・イオンチャネル～

西野　敦雄（岡崎統合バイオサイエンスセンター　神経分化研究部門）

(2006.11.29)

尾索動物は脊椎動物にきわめて近縁な無脊椎動物である。尾索動物は生活史の中で，脊椎動物のものに似た，オタマジャクシ型の体制を示す。そのオタマジャクシは，脊椎動物よりはるかに少数の細胞により構成されることを特徴としている。その一種，カタユウレイボヤ Ciona intestinalis のゲノムは完全に解読されており，また近年トランスジェニック技術も確立されるなど，海産動物では唯一，モデル生物としての位置を占めつつある。

尾索動物オタマジャクシは，その細胞構成の単純さに関わらず, 洗練された遊泳運動を行う。しかし現在まで,

尾部筋肉の収縮制御やその神経制御の分子的生理機構はほとんど不明であった。尾索動物オタマジャクシの運動制御機構を理解することは，脊椎動物の単純な「ひな型」を提示し，脊椎動物に「もともと何が備わっていたのか？」, そして「何が脊椎動物に特異的な特徴なのか？」を明示することにつながる。

演者はこれまで，神経分化研究部門において，①カタユウレイボヤ幼生の遊泳運動の定量的解析を行い，また②カタユウレイボヤゲノムからイオンチャネル遺伝子を網羅的に同定するプロジェクトに参加した。さらに，③遊泳運動制御に関与することが特に期待されるニコチン受容体 nAChR を主とするリガンド作動性イオンチャネル群に注目し，全長 cDNA の単離・解析を進め，これにより，④ホヤ幼生の遊泳筋で機能する nAChR のサブユニット構成を定めた。⑤また，そのチャネルの電気的解析から，ホヤ幼生筋の nAChR は脊椎動物の筋肉型よりもむしろ神経型に類似した特性を示すことが分かってきた。

（担当：岡村康司）

30. Cryo-EM study of dynein-microtubule interaction

水野直子 (Texas Southwestern Medical Center)

(2006.12.4)

Recent Biochemical studies of dynein, a minus-end-directed microtubule motor, have shown ATP-cycle dependent conformational changes. However, most experiments have been based on a 2D negative staining classification of dynein and were carried out in the absence of microtubules. The present study has carried out an analysis using cryo-EM and 3D reconstruction methods to investigate the structural interaction of dynein bound to microtubules.

The current investigation has used single particle analysis, in combination with helical image analysis of microtubules. Recombinant cytoplasmic dynein containing 2/3rds of the heavy chain's C-terminal region was expressed in Dictyostelium. Images were collected using a CCD camera and (14.3) microtubules were selected manually according to their moiré patterns. Approximately 300 microtubule filaments were analyzed. 1200 dynein particles, sparsely bound to microtubules, were selected. Images of microtubules were straightened and magnifications normalized. To select particles overlapped with microtubule density on images, the density from microtubules was computationally removed, The initial model was made from dynein decorated to the microtubule with sub-stoichiometric amount by reconstruction using microtubule helical symmetry. During the refinement process, cluster analysis was added to remove incorrect density of dynein. The reconstructed dynein microtubule complex showed a disk feature of dynein whose axes is orthogonal to the microtubule. Seven sub-domains of dynein were clearly visualized together with a short tail on top of the disk.

（担当：永山國昭）

31. Single particle analysis of Gro EL with Zernike phase contrast TEM

Radostin Danev (OIB, NINS)

(2006.12.4)

We research the application of Zernike Phase Contrast Transmission Electron Microscope (ZPC-TEM) to acquisition of image data for single particle analysis. The ZPC-TEM utilizes a Zernike phase plate which consists of a thin film with a small hole in the center. It is positioned at the back-focal plane of the objective lens introducing a half pi phase shift to the scattered electrons leaving the central beam of unscattered electrons intact. The resulting images exhibit much higher contrast and information content compared to the conventional TEM.

We present a comparison between 3D models of proteins generated using ZPC and conventional TEM data. Finding

and boxing the particles in the ZPC-TEM images is much easier due to the high contrast. CTF fitting and demodulation is not necessary for the ZPC-TEM data which greatly simplifies the reconstruction process. Combined all the advantages of the ZPC-TEM technique can shorten dramatically the time required for generation of 3D model of unknown specimens at intermediate resolutions. If higher resolution is required the model can be further refined by adding small defocus conventional TEM data to the dataset.

（担当：永山國昭）

32. Structural Analysis of Non-Selective Cation Cannel TRP-V4 using a Phase-Contrast Transmission Electron Microscope

重松秀樹 (OIB, NINS)

(2006.12.4)

Transient receptor potential (TRP) family is widely expanding superfamily of non-selective cation channels; most of them are permeable for Ca^{2+}. TRP superfamily is classified into seven subfamilies according to the sequence homology: the TRPC (Canonical) family, the TRPV (Vanilloid) family, the TRPM (Melastatin) family, the TRPP (Polycystin) family, the TRPML (Mucolipin) family, the TRPA (Ankyrin) family, and the TRPN (NOMPC) family. Some of TRPV and TRPM are known to as a temperature-sensitive channel, although each has a different range of temperature sensitivity. TRPV4 is activated by hypotonic stimuli and also by warm temperature; ~27-35℃ resulting in an increase in intracellular Ca^{2+} concentration, All TRP channels have putative six-transmembrane (6TM) domains, which are thought to assemble as tetramer to form cation-permeable pores. To dissolve the tertiary structure of such macromolecules, transmission electron microscopy (TEM) is known as one of powerful methods. Recombinant TRPV4 was expressed using baculo virus-infected Sf-9 cells and purified using genetically attached hexa histidine-tag. The membrane fraction was solubilized by detergent and purified by affinity chromatography and following size-exclusion chromatography, The detergent solubilized TRPV4 was analyzed using a phase-contrast cryo-TEM in its size distribution and purity. The single-particle analysis of its tertiary structure has been underway and the preliminary structure has been determined.

（担当：永山國昭）

33. Direct Observation of Intracellular Materials Using a Phase Contrast Transmission Electron Microscope (TEM)

新田浩二 (OIB, NINS)

(2006.12.4)

Generally intracellular materials become visible with microscopes once labeled by specific markers. To observe biological specimens using TEM, moreover it is requested to prepare samples with lengthy steps of fixation, dehydration, resin embedding, sectioning and staining. Specific markers have many varieties including heavy metal agents and immune or enzyme reactions. In these methods, chemical fixatives are necessary for agents to penetrate into the cell. This procedure, however, introduces serious artifacts.

The phase contrast TEM has been developed to solve this problem in our laboratory. It has become possible to observe biological objects without staining in the ice embedded state of whole cells.

We expect that the intracellular materials can be directly observed at a high resolution with phase contrast TEM without the traditional sample treatment.

We have also succeeded to observe unstained resin embedded sections including Qdots in a correlateal manner with light and electron microscopes. We could observe the cryo-section of Qdots treated cells after high pressure freezing.

（担当：永山國昭）

34. Unique Mechanism of Action of Alzheimer's Drugs on Brain Nicotinic Acetylcholine Receptors and NMDA Receptors

Toshio Narahashi (John Evans Professor of Pharmacology, Department of Molecular Pharmacology and Biological Chemistry, Northwestern University Medical School Chicago, IL 60611, USA)

(2006.12.6)

Alzheimer's disease is one of the most serious neurological disorders, yet no effective cure has been developed yet, as we do not know the exact cause of the disease. At present, only symptomatic treatments are being used to improve the patient's conditions. Since Alzheimer's disease is known to be associated with down-regulation of both cholinergic and glutamatergic NMDA systems, several anticholinesterases are being used for the symptomatic treatment of the disease in the U.S. Recently, memantine, an NMDA receptor blocker, has been approved. This raises many questions as to how these drugs work. We have recently found that some of these anticholinesterases also stimulate the down-regulated NMDA receptor and that memantine works to modulate the NMDA-mediated glutamatergic system in a very unique manner through its neuroprotective action. These studies pave the way toward further developments of more effective therapeutic drugs for Alzheimer's disease patients.

（担当：鍋倉　淳一）

35. The radial bias: a different slant on visual orientation sensitivity in human and non-human primates

佐々木由香 (Athinoula A. Martinos Center for Biomedical Imaging, Department of Radiology, Massachusetts General Hospital)

(2006.12.13)

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.

（担当：柿木　隆介）

36. 中枢神経系におけるギャップ結合の構造の多様性：Freeze-fracture Replica Immunogold Labeling (FRIL) による解析

釜澤　尚美 (Department of Biomedical Sciences, Colorado State University)

(2006.12.15)

Freeze-fracture Replica Immunogold Labeling (FRIL) は，藤本が開発した SDS-FRL 法 (1)を基に，レキサンを利用した replica grid mapping 法 (2)を組み合わせた手法で，電子顕微鏡の観察結果を組織の切片像と対応させて解析することができるため，中枢神経系のような複雑な組織の解析に有用である。本講演では，FRIL の手法を紹介するとともに，FRIL を用いた研究例として，ギャップ結合の構造の多様性について，またギャップ結合と神経伝達

物質受容体の局在と両者の関連性について考察したい。Rash らは中枢神経系において，ギャップ結合を構成するタンパク，コネキシン (Cx) の細胞種特異的な発現を FRIL の結果を基に提案してきた (3)。従来ギャップ結合は斑状 (plaque) を呈すると考えられてきたが，最近我々は，コネクソンがひも状や網状に会合したギャップ結合を網膜の神経細胞間に見いだした (4)。また，ギャップ結合の数，大きさも中枢神経系の部位によって非常に多様であり，数個から数千個のコネクソンで形成されるギャップ結合が存在した。さらに，ギャップ結合は神経伝達物質受容体と高頻度に隣接して観察された。これらの多様な形態および局在様式は，ギャップ結合の未知の役割を示唆すると考えられ，超微構造学から得られた新しい知見として興味深い。

（担当：重本 隆一）

37. Effects of Viscosity on Calcium Release Channel Gating (In Japanese)

Brodwick Malcom (Texas University Associate Professor)

(2006.12.18)

（担当：鍋倉淳一）

38. Maxi-anion channel and VSOR chloride channel serve as releasing pathways of signalling molecules from astrocytes

Liu Hongtao（劉 洪涛）（日本学術振興会外国人特別研究員　細胞器官研究系機能協関研究部門）

(2007.1.5)

Astrocytes release glutamate upon hyperexcitation in the normal brain, and in response to pathologic insults such as ischemia and trauma. In our experiments using cultured mouse astrocytes, both hypotonic and ischemic stimuli caused the release of glutamate, which occurred with little or no contribution of gap junction hemichannels, vesicle-mediated exocytosis, or reversed operation of the Na-dependent glutamate transporter. Cell swelling and chemical ischemia activated, in cell-attached membrane patches, anionic channels (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. These properties are different from those of volume-sensitive outwardly rectifying (VSOR) Cl^- channels, which were also expressed 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 0.21 ± 0.07 and 0.15 ± 0.01, respectively. However, the release of glutamate was significantly more sensitive to Gd^{3+}, a blocker of maxi-anion channels, than to phloretin, a blocker of VSOR Cl^- channels. We conclude that these two channels jointly represent a major conductive pathway for the release of glutamate from swollen and ischemia-challenged astrocytes, with the contribution of maxi-anion channels being predominant. On the other hand, in our separate study, we demonstrated that maxi-anion channels but not VSOR chloride channels are involved in ATP release from astrocytes under the stress of OGD (oxygen-glucose deprivation). In our recent study using neuron-glia cocultures, we have shown that the involvement of VSOR, but not maxi, anion channels in bradykinin-induced glutamate-mediated signalling from astrocytes to neurons. Thus, both maxi-anion channels and VSOR Cl^- channels in astrocytes play important roles in the brain functions dependent on the situations.

（担当：小野　勝彦）

39. 放出可能なシナプス小胞プールの補充の Ca^{2+}依存性とその機能的役割

細井　延武（マックス-プランク生物物理化学研究所 膜生物物理研究部門研究員）

(2007.1.11)

放出可能なシナプス小胞のプールはいったん枯渇すると数秒の時定数で補充される。Calyx of Held シナプスにおいて，この補充過程は，シナプス前終末での活動依存的な Ca^{2+} 濃度上昇によって Ca^{2+}/calmodulin 依存的に促進されることが明らかにされている (Sakaba et al., 2001)。しかし，シナプス小胞プールの補充速度と Ca^{2+}濃度との間の定量的な関係は，いまだ明らかにされていない。そこで，プール補充の単純なモデルを構築し，ペアパルスを用いて，シナプス小胞プールを枯渇させた後の EPSC とシナプス前終末の Ca^{2+} 濃度を同時に測定することによって，補充速度と Ca^{2+} 濃度の関係を定量的に調べた。その結果，小胞プールの補充速度は，シナプス前細胞の Ca^{2+} 濃度に対して直線的に速くなり，cooperativity は見られないことが明らかになった。実験データに基づいてプール補充のモデルから推定したところ，プール補充速度は，100 Hz の生理的なスパイク列の刺激中に，刺激前に比べて 10 倍ほど速くなっていることが分かり，この Ca^{2+} 依存性の補充速度の促進が，高頻度刺激中の持続的なシナプス伝達を維持していることが分かった。

（担当：井本敬二）

40. 単一シナプスでの情報伝達の可視化

(Imaging spatiotemporal dynamics of signal transduction in individual synapses)

安田　涼平 (Duke University, Assistant Professor)

(2007.2.7)

In the central nervous system, most excitatory synapses terminate on dendritic spines, tiny (~0.1 femtoliter) protrusions emanating from the dendritic surface. Calcium influx into spines activates signaling networks composed of tens of species of molecules to induce synaptic plasticity and other adaptive reactions. Although many of the molecules required for synaptic plasticity have been identified, the signaling mechanisms by which calcium dynamics in spines are decoded and translated into specific cellular responses are unknown. To further our understanding of signal transduction in spines, we have developed a technique to measure protein-protein interactions in individual spines using fluorescence resonance energy transfer (FRET). By combining fluorescence lifetime imaging with 2-photon laser scanning microscopy, we can achieve robust FRET detection with single-synapse resolution deep in brain slices. Using this technique, we have imaged the activation of the GTPase protein Ras in response to calcium influx into spines. Ras is an essential component of the signaling pathways that lead to rapid synaptic potentiation, the formation of new synapses, and the regulation of dendritic excitability. When 2-photon glutamate uncaging is used to stimulate a single spine, Ras activation occurs initially at the stimulated spine, and subsequently spreads more than 10 μm into the parent dendrite and nearby spines. The same stimulation induces both structural and functional plasticity in the stimulated spine, as indicated by a long-term (~60 min) spine enlargement associated with a potentiation of postsynaptic glutamate receptor current. To understand how Ras activation spreads and the role it may play in synaptic plasticity, we are now developing techniques to image molecules upstream and downstream of Ras.

（担当：岡田泰伸）

41. 遺伝性高血圧疾患の分子病態 — WNK4 ノックインマウスの作成と解析 —

内田　信一（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科腎臓内科学・助教授）

(2007.2.8)

偽性低アルドステロン症 II 型（以下 PHAII）は，高血圧，高 C1 性アシドーシス，高 K 血症をきたす優性遺伝形式の遺伝病である。腎臓遠位尿細管でのクロライド再吸収の亢進がそのメカニズムと言われてきたが，その責任遺伝子として，WNK キナーゼという新規キナーゼの変異が同定された。見つかった変異は，WNK1 はイントロンの変異，WNK4 はミスセンス変異であったが，これら変異の持つ意味，またこれら WNK キナーゼの上流および下流に存在する分子も未だ明らかでない。PHAII の病態を説明すべく，これら WNK と種々のチャネル・トランスポーターをアフリカツメガエル卵母細胞や MDCK 細胞に強制発現させ，これたら輸送体に対する WNK の作用についての報告が相次いだが，どの報告も強制発現による非特異的影響が懸念された。今回我々は真の分子病態を明らかにすべく，ヒト PHAII 患者と同じ変異を持つ WNK4 ノックインマウスの作成に成功した。このマウスの解析により，PHAII の真の分子病態を明らかにする。

（担当：鍋倉　淳一，岡田　泰伸）

42. ABC トランスポータの NBD ゲーティングエンジンの動作機構

相馬　義郎（大阪医科大学 基盤医学 I 講座 生理学教室・講師／
John M. Dalton Cardiovascular Research Center, University of Missouri-Columbia, USA）

(2007.2.8)

ABC (ATP Binding Cassette) 蛋白質は，よく保存された 2 つの ATP 結合ドメイン NBD (Nucleotide Binding Domain) を共通に持つスーパーファミリーを形成している。ABC トランスポータにおいては，NBD は ATP の加水分解エネルギーをトランスポータ分子の輸送機能を発揮するために必要な機械的駆動力に変換していると考えられる。ABC トランスポータは，生理学的に重要な様々に異なる機能・構造を持つが，この“NBD エンジン”の動作メカニズムはすべての ABC トランスポータにおいて共通していると推測される。

Cystic Fibrosis Transmembrane-conductance Regulator (CFTR) は，このスーパーファミリーの中で唯一イオンチャネルの機能を有し，パッチクランプ法によってリアルタイムで NBD の動態の観察が可能な ABC トランスポータ分子である。この CFTR をモデルシステムとして，ABC トランスポータ・スーパーファミリーに共通した NBD エンジンの動作メカニズムの解明を試みた。

（担当：岡田泰伸，鍋倉淳一）

43. Using the anti-saccade task to probe brain function and dysfunction

Douglas P. Munoz (Department of Physiology, Queens Univ, Canada)

(2007.2.14)

（担当：伊佐　正）

44. AMPA 型グルタミン酸受容体の動態制御機構

深田　正紀（国立長寿医療センター研究所，室長）

(2007.2.15)

シナプス間の情報伝達効率は使用状況によって柔軟に変化し，記憶や学習の基盤を成します。この制御機構の

破綻は認知症やてんかん等の神経疾患の重要な一因と考えられています。AMPA 型グルタミン酸受容体（AMPA 受容体）は脳内の興奮性神経伝達の大部分を司るので，この受容体がどのようにしてシナプス膜へ輸送され，その機能が制御されているかは現在の神経科学における重要な問題です。我々はポストシナプスの代表的な足場蛋白質である PSD-95 に着目して AMPA 受容体の制御機構を解析してきました。本セミナーでは 1) PSD-95 のシナプス膜局在を規定するパルミトイル化脂質修飾酵素，および 2) PSD-95 結合蛋白質として同定したリガンド・受容体 LGI1/ADAM22 による新しい AMPA 受容体制御機構について報告した。

（担当：岡田泰伸）

45. 蛍光単分子観察が明らかにした細胞内アクチン制御の謎

渡邊　直樹（京都大学医学部，助教授）

(2007.2.15)

アクチン線維は細胞質膜直下の主要な構成成分であり，重合・脱重合を繰り返し細胞の形態変化・運動を制御する。我々は分子可視化を通して，生きたアクチン細胞骨格の重合・解離動態を捉える手法を実現した。これにより，細胞伸展縁の葉状仮足において，線維の 3 分の 1 が 10 秒以内の短寿命で脱重合することがわかった。更に，インビトロではアクチン伸長端に高親和性で結合するキャッピングプロテインが，細胞内では急速に（半減期 1.2 秒）解離すること，その解離がアクチン崩壊に依存することから，アクチン崩壊のメカニズムとして「高頻度線維切断-再結合仮説」を提唱した。また，アクチン核化・重合を促進するフォルミンファミリーの 1 つで，アクチンストレス線維形成や平滑筋収縮を制御する G 蛋白質 Rho の標的分子 mDia1 が，伸長するアクチン反矢じり端に結合したままプロセッシブに分子移動する性質をもつことが見出された。分子イメージングによって明らかにされつつある，予想外に動的な細胞骨格改変のための分子機構やその制御シグナルの本態を紹介した。

（担当：岡田泰伸）

46. 海馬長期増強現象の分子機構

林　康紀 (RIKEN-MIT, Assistant Professor)

(2007.2.15)

シナプス可塑性の一つである海馬長期増強現象は，記憶の細胞モデルとして考えられている。シナプス後部には可塑性に関わる多数の蛋白が存在し，その物理的・生化学的なネットワークがシナプス伝達の維持と可塑性に重要と考えられる。我々は，電気生理学に分子生物学，イメージングの手法を組み合わせたアプローチでその分子機構を探ってきた。今回のセミナーでは，まず CaMKII とアクチンによるシナプス後部の形態と分子組成の量的な調節機構について解説した。これは，これまでシグナル分子であると考えられてきた CaMKII が細胞骨格の一員であるということを位置づけるものである。次にシナプス後部から伝達物質の放出確率の逆行性調節機構について解説した。以前，一酸化窒素，アラキドン酸などが逆行性伝達物質の候補として考えられたが，この結果は細胞接着因子がこのような役割を果たしうるということを示すものである。

（担当：岡田泰伸）

47. 匂いやフェロモンの受容機構の多様性と進化

東原　和成（東京大学新領域創生科学研究科，助教授）

(2007.2.21)

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。空間を飛びかう匂いやフェロモン，また，飛ばない不揮発性フェロモンの受容機構の解析を通して得られた知見をもとに，哺乳類，昆虫，植物など生物全般の嗅覚を介した個体間コミュニケーションのやりかたの進化的変遷を議論した。

（担当：岡田泰伸）

48. タイトジャンクション：細胞間をシールする分子メカニズム

古瀬　幹夫（神戸大学医学部，教授）

(2007.2.21)

私たちの体は, 皮膚により外界から守られるとともに, 上皮系細胞がつくるシートによって様々なコンパートメントに分けられている。上皮細胞シートは，細胞膜上のトランスポーター蛋白質やサイトーシスによって方向性のある物質輸送を行う一方で，細胞間隙において物質の受動的な拡散，いわゆる「漏れ」を制限しており，その総和として各コンパートメントに特有の環境が動的に維持される。このとき，細胞同士の隙間をシールして「漏れ」を防ぐバリアとしてはたらくのがタイトジャンクション (TJ) と呼ばれる細胞間接着構造である。私たちの研究グループは，TJ の分子構築の中心を成す接着分子クローディンファミリーを同定してその性質を解析してきた。本セミナーでは，クローディン研究から明らかになってきた TJ のバリア機能の分子基盤と今後の課題について紹介した。

（担当：岡田泰伸）

49. A role of the cerebellum in visual perception - fact or fiction ?

Peter Their (Hertie-Institut fur Clinical Brain Research,
Department of Cognitive Neurology, Tübingen, Germany)

(2007.2.22)

（担当：伊佐　正）

50. 蛍光ゼブラフィッシュを用いた脊髄神経回路の解析～発生から生理機能まで

東島　眞一（岡崎統合バイオサイエンスセンター，神経分化研究部門）

(2007.2.28)

異なった転写因子の発現の組み合わせにより，形態学的に異なったタイプの介在神経細胞が分化してくること

が示唆されている。しかしながら，これらの介在神経細胞が，最終的に神経回路網の中で機能的にどのようなタイプの神経細胞へ分化していくかは，まだよく分かっていない。ゼブラフィッシュは，その脊髄神経回路が単純であるため，上記の課題を追求するためのよいモデル生物である。こういった背景の元，我々は，特定の転写因子の発現する神経細胞の，発生分化および，回路中での機能の解析を，ゼブラフィッシュを用いて進めている。この課題にアプローチするため，中枢神経系の特定の種類の神経細胞で，蛍光タンパク質を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュを作製して，それら神経細胞を生きたまま可視化することを方法論の中心に据えて研究している。可視化することで，神経細胞の発生過程（軸索の伸長，樹状突起の成長，神経細胞の移動等）をダイレクトに追跡することができる。さらには，機能している神経回路中で，蛍光を発する特定のクラスの神経細胞をねらって電気生理学的な解析を行うことができる。このような解析を通じて，神経発生から神経機能解析までをつなげていきたいと考えている。本セミナーでは，我々のアプローチの概略を紹介するとともに，Chx10 陽性細胞と，En1 陽性細胞に関する研究を紹介したい。

（担当：小野　勝彦）

51. 画像解析法を用いた精子機能調節機構の解析

吉田　学（東京大学大学院　理学系研究科　附属臨海実験所）

(2007.3.5)

受精に至る過程において，精子は放精の際の運動開始，雌由来物質による運動活性化，卵に対する走化性，受精能獲得，先体反応，卵との結合など，刻々とその機能を変化させている。この精子機能の調節においては，いずれの過程においても環境中のカルシウムイオンが必須であることが知られており，細胞外からのカルシウム流入がこれらの制御機構に深く関わると考えられている。しかし，精子は大きさが小さい上に高速で運動をするため，従来のイメージング技術では細胞内カルシウムイオンの挙動を測定することは困難であった。特に鞭毛運動調節とカルシウムとの関連は古くから興味が持たれていたが，数十 Hz で運動する鞭毛を可視化することはほとんど不可能であった。

我々は，新たに LED ストロボ照明装置を用いて，高速蛍光イメージングを可能とする装置を開発し，精子走化性における鞭毛運動調節機構の解析を中心に研究を行っている。今回は，これまでの精子におけるイメージング研究について，最近得られた鞭毛内カルシウムイメージングの結果と併せて紹介する。

（担当：根本知己）

52. ヒト側頭極は何をしているか

杉浦　元亮（大脳皮質機能研究系心理生理学部門）

(2007.3.8)

ヒトの側頭葉の前端部「側頭極」は謎の領域である。脳損傷患者の研究では，この領域の損傷によって逆行性健忘（自分の過去や知人など，自伝的記憶が思い出せない）や人物認知障害が起きることから，自伝的記憶の想起に関与している可能性が示唆されている。脳機能イメージングでも，この領域が自伝的記憶の想起や人物認知によって活動することが示されている。しかし，単語リスト等を用いた典型的な出来事記憶想起課題では，この領域が活動するという報告はない。一方で，最近の脳機能イメージング研究では，文章理解課題，情動を誘発する課題，社会認知を要求する課題等，直接自伝的記憶とは関係のない課題を遂行する際に側頭極が活動するという報告が増えている。私はこれまでの PET・fMRI 研究で，側頭極が人物認知において記憶内容そのものではなく，記憶内容を関連付ける役割に関係している可能性を示してきた。そして，この「関連付ける」という概念を発展させ側頭極の機能を一般化できるのではないかと予想している。

今後の側頭極研究はシステム脳科学研究諸領域の総力戦になるであろう。重要課題として，まず側頭極の根本

的 (primary) な機能概念の探索，すなわち「側頭極は何をしているのか」が挙げられる。この課題に対しては PET や fMRI を用いたイメージング研究に社会心理学的な多変量解析的アプローチを取り入れることで概念的な進展が期待される。また，側頭極が解剖学的に複数の領域に細分化されることがサルの研究で示されており，側頭極のサブ領域の考え方をヒト脳の研究に取り入れる必要がある。その際には他領域との繊維連絡についての動物解剖研究とヒト脳イメージング研究との積極的な比較検討が必要である。さらに，「関連付ける」ことが側頭極の特徴だとすれば，MEG や EEG 等の時間分解能に優れたイメージング手法を用いることで，側頭極の役割を逐次的な認知処理過程の中に位置づけることが必要であろう。また，ヒト脳における機能領域同定で中心的な役割を果たすと期待される fMRI においては，側頭極近傍における磁化率アーチファクトの問題にどう対処するかという技術的問題も重要検討課題である。

（担当：小野　勝彦）

53. 人・機械適応系に関する研究（筋電義手使用時の脳活動について）

横井　浩史（東京大学精密機械工学専攻）

(2007.3.9)

個性適応型情報処理技術は，人の運動機能を，機械・電子・化学等の工学技術を用いて，外部装置に置き換えることを可能とする技術である。この技術は，直接的には，工学と医学との融合を通して，肢体不自由者の機能再建を支援し，残された感覚運動系のあらゆる可能性を甦らせる能力を有しており，さらには，これまで人が持ち得なかった超精密複雑な領域を探査するための人工感覚や，巨大でハイパワーな装置などを自在に操作する新しい制御機能を開拓するような可能性をも持ち合わせている。本発表では，個性適応型情報処理を筋電義手の制御に応用し，利用者の利便性を高めることを目的とした実験結果について述べる。利用者と筋電義手の関係性の変化を定量的に求めるために，fMRI 解析を用い，脳の賦活状態を調査した。特に運動野と感覚野の適応的な反応に興味深い結果が得られており，これらについて詳しく述べるとともに，人と機械の相互適応系に関する研究方針と将来展望について概観する。

（担当：伊佐　正）

54. Non-invasive Medical Diagnostic Devices : from Bench to Bedside To Business

Ian Smith（カナダ MRC 部長，Inst. Biodiagnostics 所長）

(2007.3.14)

Ian Smith 博士は，fMRI の発明者小川誠二博士と同門 (Gutowsky) の NMR 専門家で，高分解能 NMR による有機物構造解析を経て草創期の MRI 分野に転身，1990 年代初めに Biodiagnostics 研究所を設立した。以来，所長を続けている。17 テスラをはじめとする数台の MRI を中心に NMR 分光法，赤外イメージング，蛍光イメージングを駆使して，ガン，アルツハイマーなどの非侵襲診断法を確立している。現在世界生物物理学連合の会長職も兼ね，この方面の世界的リーダーであり，生物物理的手法面からの新しい応用分野を開拓している（文責永山）。

（担当：永山　國昭）

55. 一次視覚野ニューロンにおける受容野周囲抑制のメカニズム，皮質ネットワークの動作原理の理解を求めて

尾関　宏文（米国ノースウエスタン大学　博士研究員）

(2007.3.26)

細胞内記録法は，スパイク発火応答に加え，膜電位応答，興奮性および抑制性入力量の変化を調べることが可

能である。David Ferster 研究室ではネコ一次視覚野 (V1) ニューロンから in vivo whole-cell patch clamp による細胞内記録実験を行い, V1 における入出力とその情報処理を研究している。V1 ニューロンの受容野刺激応答は受容野周囲に提示する刺激によって抑制性修飾を受け，受容野刺激と周囲刺激の方位が同一であるとき最大の抑制を生じる。周囲抑制の程度は膜電位応答よりもスパイク応答の方が顕著であり，膜電位の発火閾値が抑制を増強していることが分かった。また，周囲抑制下では興奮性入力量の低下のみならず抑制性入力量の低下も生じていることが分かった。この周囲刺激の方位に依存した興奮性入力量の低下は皮質下ニューロンの活動低下によるものではなかった。皮質内抑制の一過性の活動増加が興奮性および抑制性ネットワークの活動低下をもたらすことを示し，ニューロンの活動性を安定化させる皮質ネットワークのダイナミクスについて新しいモデルを紹介する。

（担当：窪田　芳之）

【大学院特別講義】

大学院特別講義

1．第 89 回 (2006.5.10)
演者：大脳皮質機能研究系・心理生理学研究部門　定藤　規弘　教授
演題：感覚脱失に伴う脳可塑性と異種感覚統合：脳機能画像法によるアプローチ

2．第 90 回 (2006.5.24)
演者：分子生理研究系・神経機能素子研究部門　久保義弘　教授
演題：ATP 受容体チャネルの思いがけない性質

3．第 91 回 (2006.6.28)
演者：発達生理学研究系・生体恒常機能発達機構研究部門　鍋倉　淳一　教授
演題：発達期における神経回路の再編成

4．第 92 回 (2006.7.5)
演者：生体情報研究系・神経シグナル研究部門　井本　敬二　教授
演題：カルシウムチャネルと神経疾患

5．第 93 回 (2006.9.20)
演者：脳機能計測センター・生体情報解析室　根本　知己　助教授
演題：多光子励起過程を用いた細胞機能顕微解析法

6．第 94 回 (2006.10.18)
演者：統合生理研究系・感覚運動調節研究部門　柿木　隆介　教授
演題：脳波と脳磁図が開く脳研究の新しい世界

7．第 95 回 (2006.11.22)
演者：発達生理学研究系・生殖・内分泌系発達機構研究部門　箕越　靖彦　教授
演題：摂食行動の分子メカニズム

8．第 96 回 (2006.12.20)
演者：生理学研究所・心理生理学研究部門　杉浦　元亮　助教授
演題：脳が先か世界が先か：社会認知・行動へのコネクショニスト的視点

9．第 97 回 (2007.1.31)
演者：統合バイオサイエンスセンター・細胞生理　福見-富永　知子　助教授
演題：細胞の形を制御する細胞骨格とその情報伝達機構

10. 第 98 回 (2007.2.21)
演者：生理研・動物実験センター　木村　透　助教授
演題：イヌとサルの獣医皮膚科学

11. 第 99 回 (2007.3.7)
演者：統合バイオサイエンスセンター・ナノ形態生理　村上　政隆　助教授
演題：腺分泌における経細胞輸送と傍細胞輸送

生理学研究所年報　第２８巻

発　　行　　2007 年 11 月 1 日
編 集 者　　定 藤 規 弘
発 行 者　　自然科学研究機構
生 理 学 研 究 所
〒444-8585　岡崎市明大寺町字西郷中 38
電話〈0564〉55-7700
FAX〈0564〉52-7913
URL:http://www.nips.ac.jp
印 刷 製 本　　株式会社　エニウェイ
〒171-0014　東京都豊島区池袋 2-19-3
万葉ビル 2F
電話〈03〉3988-5656