

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

スプライシングの違いにより同一遺伝子から作られる新規代謝型受容体と分泌蛋白の解析
(久保義弘, 山本友美)

C 末端領域による代謝型グルタミン酸受容体の機能制御機構の解明
(立山充博, 久保義弘)

コイルドコイルドメインによる KCNQ チャネルの会合と発現の制御
(中條浩一, 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)

カフェイン受容体としてのマウス TRPA1 チャネル
(長友克広, 久保義弘)

GABA_B 受容体の活性化にともなうサブユニットの配置変化
(松下真一, 立山充博, 久保義弘)

P2X₂ 受容体チャネルの膜電位と[ATP]に依存したゲート機構の点変異体を用いた解析
(Batu Keceli, 久保義弘)

マウス小脳 lobule10 のプルキンエ細胞における GABA_B 受容体活性化 K⁺ 電流の薬理学的解析
(石井裕, 久保義弘)

プレスチンの電位依存的構造変化の FRET 法による解析
(Kristin Rule, 立山充博, 久保義弘)

分子神経生理研究部門.....	15
-----------------	----

概 要

グリア細胞の発生・分化
(小野勝彦, 竹林浩秀, 等誠司, 成瀬雅衣, 後藤仁志, 臼井紀好, 池田一裕)

神経幹細胞の生成と維持
(等誠司, 成瀬雅衣, 松下雄一, Akhilesh Kumar, 池田一裕)

神経細胞の移動・軸索ガイダンス
(小野勝彦, 竹林浩秀, 稲村直子, 臼井紀好, 池田一裕)

グリア細胞の機能と病態
(田中謙二, 李海雄, 竹林浩秀, 清水崇弘, 池田一裕)

脳における N- 結合型糖鎖構造解析
(鳥居知宏, 等誠司, Akhilesh Kumar, 東幹人, 山田 元, 伊藤磯子, 池田一裕)

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, 曾我部正博)

細胞膜における酸分泌の制御メカニズム
(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, 曾我部 正博, 経塚 啓一郎)

神経ステロイドによる虚血性神経障害の防止作用 (曾我部 正博)	
ナノ形態生理研究部門.....	19
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)	
Aharonov-Bohm 効果を応用した位相差電子顕微鏡の開発 (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 (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, 曾我部 隆彰, 富永 真琴, 飯田 秀利, 永山 國昭)	
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)	
種々の漢方薬の灌流ラット顎下腺に対する水分分泌促進作用 (村上政隆, 魏 睦新, 黄 沁)	
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, Francesca Testa-Riva, Jörgen Ekström, 林 知也, 恵良聖一)	
顕微質量分析装置の開発 (瀬藤光利, 早坂孝宏, 井上菜穂子)	
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, 井上菜穂子, 池上 浩司, 松本 峰男, 矢尾育子)	
エンドソーム-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)	

細胞器官研究系

生体膜研究部門.....	24
概 要	
てんかん関連リガンド LGII の生理機能の解明 (深田優子, 岩永剛, 深田正紀)	
PSD-95 パルミトイル化酵素による AMPA 受容体動態制御 (則竹淳, 深田優子, 岩永剛, 深田正紀)	
Gα パルミトイル化酵素の同定と性状解析 (堤良平, 深田優子, 深田正紀)	
機能協関研究部門.....	25
概 要	
TRPM7 は細胞容積調節に関与するメカノセンサーチャネルである (沼田朋大, 清水貴浩, 岡田泰伸)	
過興奮によるニューロンの膨張とネクロシス死の誘導メカニズムの解明：容積感受性クロライドチャネルの役割 (井上 華, 岡田泰伸)	
抗ガン剤耐性に容積感受性クロライドチャネルが関与 (LEE Elbert, 清水貴浩, 沼田朋大, 岡田泰伸, 伊勢知子, 河野公俊)	
細胞生理研究部門.....	28
概 要	

- 表皮 TRPV4 の結合蛋白質の解析
(東智広, 曾我部隆彰, 福見-富永知子, 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
(曾我部隆彰, 富永真琴, 福見-富永知子)
- 海馬における TRPV4 の機能解析
(柴崎貢志, 富永真琴)
- 低酸素, 高グルコース環境の TRPV1 機能への影響の検討
(Violeta Ristoiu, 柴崎貢志, 富永真琴)
- TRPA1 チャネルの新規刺激物質の発見
(藤田郁尚, 内田邦敏, 富永真琴)
- TRPM2 のインスリン分泌への関与の解析
(内田邦敏, 川端二功, 稲田仁, 森泰生, 富永真琴)
- mDia 結合タンパク質の機能解析
(松浦敦子, 福見-富永知子)

生体情報研究系

感覚認知情報研究部門.....	31
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)	
注意にもとづく視覚グルーピングに選択的なサル頭頂間溝皮質ニューロンの活動 (横井 功, 小松英彦)	
サル下側頭皮質における色選択的活動分布: fMRI 研究 (郷田直一, 原田卓弥, 伊藤 南, 小松英彦, 小川 正, 豊田浩士, 定藤規弘)	
ポップアウト時におけるサル視覚皮質活動: fMRI 研究 (郷田直一, 原田卓弥, 伊藤 南, 小松英彦, 小川正, 豊田浩士, 定藤規弘)	
神経シグナル研究部門.....	33
概 要	
ラット小脳顆粒細胞一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)	
単一神経回路における複数のシナプス統合 (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, 井上 剛, 井本敬二)	
Ca ²⁺ /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II 活性が制御する学習・記憶 (山肩葉子, 柳川右千夫, 井本敬二)	
視床内側毛帯シナプスの生後発達 (竹内雄一, 井本敬二, 宮田麻理子)	
視床 VB 核神経回路網におけるアセチルコリン作用とその相違 (南雲康行, 川上順子, 井本敬二, 宮田麻理子)	
神経分化研究部門.....	35
概 要	
電位依存性ホスファターゼと PTEN との基質特異性の比較 (岩崎広英, Md. Israil Hossain, 村田喜理, 岡村康司)	

電位依存性プロトンチャネルの分子構成

(黒川竜紀, 大河内善史, 佐々木真理, 高木正浩, 岡村康司)

ゼブラフィッシュ脊髄の二種類の V2 ニューロンは神経前駆体細胞の最終分裂により生じる

(木村有希子, 佐藤千恵, 東島眞一)

統合生理研究系

感覚運動調節研究部門..... 37

概 要

Inner experience of pain: imagination of pain while viewing images showing painful events forms subjective pain representation in human brain

(心の痛みのメカニズム解明)

(荻野祐一, 乾 幸二, 柿木隆介)

Time-varying cortical activations related to visual-tactile cross-modal links in spatial selective attention

(空間的注意における視覚-触覚間クロスモダルリンクに関わる脳磁界反応)

(木田哲夫, 乾 幸二, 和坂俊昭, 赤塚康介, 田中絵美, 柿木隆介)

Left hemispheric dominance during auditory processing in noisy environment

(騒音環境下での聴覚信号処理における左半球の優位性: カクテルパーティー効果の解明)

(岡本英彦, 柿木隆介, Stracke H, Ross B, Kakigi R, Pantev C)

Neural activation to upright and inverted faces in infants measured by near infrared spectroscopy

(近赤外分光法 (NIRS) によって乳児の顔認知に半球間機能差が発見された)

(大塚由美子, 仲渡江見, 金沢 爽, 山口真美, 渡辺昌子, 柿木隆介)

種々の第 2 次視覚性仮現運動刺激に対するヒト脳反応特性

(田中絵実, 野口泰基, 柿木隆介, 金桶吉起)

Interhemispheric difference for upright and inverted face perception in humans: an event-related potential study

(正立顔・倒立顔情報処理の左右半球間差: 事象関連電位を用いた検討)

(本多結城子, 渡邊昌子, 中村舞子, 三木研作, 柿木隆介)

侵害刺激による早期皮質活動

(王曉宏, 乾幸二, 柿木隆介)

痛覚関連誘発電位は, 心周期の修飾を受ける

(Edwards L, 王曉宏, 乾幸二, 柿木隆介)

「目の動き」を見たときの後頭側頭部の活動に対する顔輪郭とパーツ情報の影響

(三木研作, 渡辺昌子, 本多結城子, 中村舞子, 柿木隆介)

Voluntary attention changes the speed of perceptual neural processing

(知覚性神経処理の注意による加速効果)

(野口泰基, 田邊宏樹, 定藤規弘, 寶珠山稔, 柿木隆介)

Spatial contexts can inhibit a mislocalization of visual stimuli during smooth pursuit

(視空間的要因による眼球運動性位置ずれ現象の補正)

(野口泰基, 下條信輔, 柿木隆介, 寶珠山稔)

Objective examination for two-point stimulation using a somatosensory oddball paradigm: an MEG study

(赤塚康介, 柿木隆介)

The effect of stimulus probability on the somatosensory mismatch field

(赤塚康介, 柿木隆介)

生体システム研究部門..... 42

概 要

運動遂行中におけるマカサル視床下核の活動様式の解明

(畑中伸彦, 高良沙幸, 橘吉寿, 南部篤)

サル視床下核における大脳皮質運動領野からの投射様式

(橘吉寿, 岩室宏一, 南部篤)

覚醒下モデルマウスからニューロン活動を記録して, ジストニアの病態を解明する

(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..... 44

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, Wajeeha Aziz, 足澤悦子, 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)

海馬シナプスの左右差

(篠原良章, 川上良介, 重本隆一)

Calyx of Held シナプス成熟過程における受容体配置の変化と機能

(釜澤尚美, 松井広, 重本隆一)

GABA_B 受容体とイオンチャネルの共存

(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

(靱山俊彦)

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..... 48

概 要

大脳皮質非錐体細胞への GABA 作働性, 非 GABA 作働性シナプス入力

(窪田芳之, 畑田小百合, 関川明生, 川口泰雄)

大脳皮質における興奮性結合の特異性

(大塚岳, 川口泰雄)

前頭皮質 5 層錐体細胞と抑制性細胞の結合特性

(森島美絵子, 川口泰雄)

抑制性ニューロンを選択的蛍光標識したラットによる大脳皮質 GABA 作働系の解析

(平井康治, 川口泰雄, 柳川右千夫)

アセチルコリン作用からみた大脳新皮質の層構造と海馬領域の相同性

(Allan T. Gullledge, 川口泰雄)

心理生理学研究部門..... 50

概 要

個人的に親近な場所と有名な場所の脳内表象

(杉浦 元亮, 間野 陽子, 佐々木 章宏, 定藤 規弘)

ベンハムコマを用いた主観的色知覚の脳内表現の解析

(田邊 宏樹, 森戸 勇介, 酒井 朋子, 定藤 規弘)

対連合学習過程の脳内機構の解析

(田邊 宏樹, 定藤 規弘)

ヒト線条体における社会的・金銭的報酬の処理

(出馬圭世, 齋藤大輔, 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, 杉浦元亮, 齋藤大輔, 定藤 規弘)

両手協調運動の非対称性・effective connectivity 解析の適用:fMRI 研究

(牧 陽子, Kevin Wong, 尾崎統, 杉浦 元亮, 定藤 規弘)

予告効果の神経基盤

(谷中 久和, 齋藤 大輔, 定藤 規弘)

聴覚-触覚の時間弁別に関与する神経基盤:機能的 MRI 研究

(村瀬未花, Vanessa Krause, 河内山隆紀, 林 正道, 田辺 宏樹, 定藤 規弘)

注意が単語の無意識的処理過程に与える影響とその脳内機序

(松本 敦)

覚醒度の低下に伴う閉眼パタンの変化と脳活動

(市川 奈穂, 脇田敏裕, 定藤 規弘)

発達生理学研究系

認知行動発達機構研究部門..... 55

概 要

随意運動の制御における脊髄反射回路の役割 -随意運動中の活動様式と末梢感覚入力との関連性-

(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)

マウス上丘局所 GABA 作動性ニューロンによる wide-field vertical cell の活動制御機構

(金田勝幸, 伊佐正)

幼若時片側除皮質ラットにおける皮質脊髄路の大規模変化

(梅田達也, 伊佐正)

ボトムアップ性視覚注意における一次視覚野の機能

(池田琢朗, 吉田正俊, 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 lateral interaction in the superficial of the mouse superior colliculus slice

(Penphimon Phongphanphanee, Tadashi Isa)

一次運動野の機能脱失にともなう鏡像運動の生成機構

(坪井史治, 齋藤紀美香, 伊佐 正, 西村幸男)

片側一次視覚野切除サルの上丘における単一細胞活動記録

(高浦 加奈, 吉田 正俊, 伊佐 正)

生体恒常機能発達機構研究部門..... 59

概 要

神経伝達物質のスイッチング

(石橋仁, 西巻拓也, 山口純弥, 鍋倉淳一)

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 (渡部美穂, 石橋仁, 平尾顕三, 北村明彦, 和氣弘明, 鍋倉淳一)	
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 (高鶴祐介, 吉友美樹)	
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技術の確立と神経細胞・グリアの生体内動態の観察 (和氣弘明, 高鶴裕介, 稲田浩之, 江藤圭, 鍋倉淳一)	
生殖・内分泌系発達機構研究部門.....	61
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, 戸田 知得, 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)	
エネルギー代謝に及ぼす Dmbx-1 調節作用の解明 (三木 隆司, 箕越 靖彦, 志内 哲也)	

脳機能計測センター

形態情報解析室.....	63
概 要	
小腸絨毛上皮下線維芽細胞間のギャップ結合 (古家園子, 古家喜四夫)	
超高压電子顕微鏡によるトモグラフィー解析について (有井達夫)	
機能情報解析室.....	64
概 要	
注意に係る脳活動の研究 (遠本 徹)	
生体情報解析室.....	64
概 要	

行動・代謝分子解析センター

遺伝子改変動物作製室.....	66
概 要	
p34 ^{cdc2} kinase 活性低下に関わる Calmodulin 依存性キナーゼ (CaMKII) の関与について (伊藤 潤哉, 平林 真澄)	
ラット成熟卵子中の核およびその周辺部は MII 期の維持に必須である (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認知に必須の機能ユニット “眼優位カラム” の可塑的形成メカニズムの解明に向けて (富田 江一, 三宝 誠, 山内 奈央子, 平林 真澄)	

動物実験センター.....	68
概 要	

計算科学研究センター 70

概 要

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－塩基置換法

(片岡正典, 永山國昭)

全塩基修飾型核酸標識－塩基拡張法

(片岡正典, 永山國昭)

技術課 72

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, 竹島 康行)

②脳機能計測センター

(1) 形態情報解析室

(山口 登)

(2) 生体機能情報解析室

(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、生物物理学の興味から「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継続して進めている。以下に今年度行った研究課題とその内容の要約を記す。

スプライシングの違いにより同一遺伝子から作られる新規代謝型受容体と分泌蛋白の解析

久保義弘，山本友美

我々は、遺伝子データベース中に代謝型グルタミン酸受容体 mGluR1 と類似した、長い N 末端細胞外領域と 7 回膜貫通領域を有する Orphan 受容体を見いだした。さらに、遺伝子情報データベースの検索により、この分子（分子 X とする）の特徴として、スプライシングの違いにより同一遺伝子から、full length の orphan 受容体 (Long-X) とその N 末端の細胞外部分のみからなる分泌蛋白 (Short-X) の両方がつくられることがわかった。そこで、分子 X の機能を明らかにすることを目的として実験を開始し、以下の知見を得た。(1) まず、EST データベースに登録があるとは言え、発現していないという可能性が懸念されるので、RT-PCR により発現解析を行ったところ、脳において Long-、Short- の両方の発現が確認された。

(2) 分子は存在しても機能的な役割は果たしていないという可能性があるため、得られた cDNA に FLAG tag を付加して発現ベクターに組み入れ、HEK 293 細胞に発現させ実験を行った。通常のウシ胎児血清 10% 加の培養液で培養したところ、Long-X を発現させた細胞は顕著な形態変化を起こし、多数の大小の突起を出すようになることが観察された。この結果は、Long-X が、形態変化を起こす何らかの細胞生理学的機能を持つことを示唆する。(3) Short-X の場合は、発現させても、際だった形態変化はみられなかった。分子は、膜上には存在せず、若干細胞内にクラスター化して貯留していた。さらに、培養上清を用いて Western blot を行ったところ、Short-X が培養液中に分泌されていることが確認された。

C 末端領域による代謝型グルタミン酸受容体の機能制御機構の解明

立山充博，久保義弘

代謝型グルタミン酸受容体 I 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。この多様なシグナリングを制御する機構として、これまで、受容体活性型構造の差異や細胞骨格蛋白質 4.1G との結合などを報告しているが、今年度は、受容体 C 末端領域による制御機構を明らかにした。mGluR1 には、長い C 末端を有する mGluR1 α と C 末端領域の短いスプライスバリエントの mGluR1 β があり、C 末端領域の短いバリエントでは、Gq 活性化に減弱がみられること

が知られていたが、我々は、mGluR1 β では Gi や Gs の活性化が有意に抑制されていることを見出した。これは、長い C 末端の欠損により近位 C 末端領域の basic amino acid residues (RRKK) がむき出しになり、特定の G 蛋白質と mGluR1 との結合を阻害する事によると考えられた。現在、mGluR1 による非選択性陽イオンチャネル TRPC の活性化機構について研究している。

コイルドコイルドメインによる KCNQ チャネルの会合と発現の制御

中條浩一, 久保義弘

KCNQ チャネルはてんかんの原因遺伝子としても知られている電位依存性カリウムチャネルであり、細胞内 C 末端領域のコイルドコイルドメインによって 4 量体を形成すると考えられている。KCNQ2 と KCNQ3 はそれぞれホモ 4 量体でイオンチャネルを構成することができるが、両者のヘテロ 4 量体によるイオンチャネルはホモ 4 量体のチャネルに比べて 10 倍以上の電流を発現することができる。このヘテロ多量体化による発現量の制御機構を明らかにする目的で、コイルドコイルドメインのデリレーション変異体、キメラ変異体を作成し、それらの電流量、タンパク質の発現量などを解析した。その結果、KCNQ2

のコイルドコイルドメインの存在が膜上に効率よく発現するために必要なこと、KCNQ2 非存在下では KCNQ3 のコイルドコイルドメインはむしろ電流量を抑制する方向に働くことを見出した。またサブユニット間の静電相互作用にも着目し、これらの相互作用を壊すような点変異体を作成した。それにより、サブユニット間の静電相互作用のネットワークが、ヘテロ多量体構成に重要な役割を果たしていることも見出した。今回得られた知見は、KCNQ チャネルの変異によって生じる、てんかんのメカニズム解明にも役立つ可能性がある。

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

プレスチンは内耳外有毛細胞に特異的に発現しているモータータンパク質で、膜電位依存的に細胞を伸縮させるという非常にユニークな性質を有する。我々は、この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。今年度は酵母 2 ハイブリッド法による結合分子の探索を試みた。プレスチンの N 末端及び C 末端の細胞内領域をベイトとし、マウス蝸牛 cDNA ライブラリ

ーを用いてスクリーニングを行ったところ、大量の陽性クローンが得られたが、そのほとんどが擬陽性クローンで真の陽性クローンの単離には至っていない。今後、本手法による探索と平行して、プレスチンが存在する外有毛細胞側壁膜に存在する分子の中から特に相互作用が期待される分子を選び出し、免疫沈降法によって個別に相互作用を検討する実験も併せて行う。

カフェイン受容体としてのマウス TRPA1 チャンネル

長友克広, 久保義弘

我々は、これまでに、機能解析の実験結果に基づいてマウス腸由来神経内分泌細胞 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。当初、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、 $[Ca^{2+}]_i$ イメージング法により、 Ca^{2+} permeable な Transient Receptor Potential (TRP) channel の関与が示唆された。PCR 法により STC-1 に、ワサビやニンニク、シナモンの成分によって活性化される TRPA1 チャンネルが発現していることが分かった。

マウス TRPA1 チャンネルを発現させた HEK 細胞およびアフリカツメガエルの卵母細胞にカフェインを投与すると濃度依存的に活性化することが分かった。TRPA1 が内

在的に発現しているマウス後根神経節 (DRG) を急性単離し、 $[Ca^{2+}]_i$ イメージングを行うと、野生型の DRG から TRPA1 特異的な細胞内 Ca^{2+} 上昇が観察されたが、TRPA1 ノックアウト (KO) マウスの DRG では特異的な応答は見られなかった。嗜好性をみる実験 (二瓶法) において、野生型マウスはカフェイン入りの水を避けるが、TRPA1-KO マウスでは水とカフェイン入りの水の消費量に顕著な差は見られなかった。以上の結果から、マウス TRPA1 チャンネルは、カフェインによって活性化されること、そして、TRPA1 チャンネルがカフェインを含む飲水の忌避行動に役割を果たしていることが明らかになった。

GABA_B 受容体の活性化にともなうサブユニットの配置変化

松下真一, 立山充博, 久保義弘

GABA_B 受容体は、代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR) 等とともに G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) の Family C に属している。リガンド結合時の GPCR の細胞外領域の動きがどのようにして膜貫通部位を経て細胞内領域に伝達されるのかというメカニズムについては、X 線結晶構造解析がなされている種類が現在のところ極めて限られているゆえに、大いに興味を持たれている。そこで、GABA_B 受容体を構成する 2 種のサブユニット GB1a および GB2

それぞれの細胞内ループに蛍光蛋白を挿入し、リガンド投与時の FRET 変化を計測したところ、GB1a のループ 2 と GB2 のループ 1 または 2 との間で FRET の減少が起きることが判った。これは、本部門で既に得られている mGluR1α の場合の FRET 変化とは様式が大きく異なるものであり、現在、そのサブユニット間や内部の動きをさらに詳しく調べている。

P2X₂ 受容体チャンネルの膜電位と [ATP] に依存したゲート機構の点変異体を用いた解析

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ンネルである。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ンネルとは認識されていない。

昨年度までに、我々は、アフリカツメガエル卵母細胞を用いて、ATP 投与後の定常状態における P2X₂ チャンネル電流と膜電位との関係を定量的に解析し、膜電位依存

的ゲートが存在すること、さらに、この活性化相が、細胞外 ATP 濃度に依存性を示すことを見いだした。明確な膜電位センサー領域は存在しないことから、そのゲート機構の由来として、「ATP の結合自体、もしくは、ATP が結合した ATP 結合部位の構造変化が、膜電位依存的である。」という可能性を想定し、以下の変異体解析により検証した。ATP 結合部位の変異体 K71A, K71R, R290A,

R290K では、野生型でみられる、膜電位 – コンダクタンス関係の ATP 濃度依存性、活性化時定数の ATP 濃度依存性が、共に減弱する傾向があったが、ATP 感受性が激減していたため、解析できる ATP 濃度に限りがあり、明確な結論を導くことができなかった。そこで、さらに、ATP 感受性の低下が激しくない 2 種の変異体 K69R および K308R について詳細な解析を行った。K69R 変異体は、野生型に比し 35 倍の EC_{50} 値の増加を示した。その膜電位 – コンダクタンス関係は ATP 濃度依存性を示したが、

野生型と異なり活性化時定数は ATP 濃度依存性を示さなかった。K308R 変異体の EC_{50} 値の増加は 8 倍と緩徐であった。その膜電位 – コンダクタンス関係、および活性化時定数は、野生型と異なり ATP 濃度依存性を示さなかった。以上の「ATP 結合部位の環境を変えることにより膜電位感知機構が変化する」という実験結果から「ATP 結合にまつわる膜電位依存性が、 $P2X_2$ チャネルの膜電位依存的活性化の源である。」という可能性が示唆された。

マウス小脳 lobule10 のプルキンエ細胞における $GABA_B$ 受容体活性化 K^+ 電流の薬理学的解析

石井裕, 久保義弘

小脳は 10 の lobule からなり、それらの間で機能的な差が報告され始めている。我々は出生後 14-18 日のマウス小脳矢状断面スライスを用いて、AMPA 受容体・ $GABA_A$ 受容体阻害剤存在下でプルキンエ細胞から電気記録を行った。高頻度電気刺激を分子層に与えることにより、代謝型グルタミン酸受容体 1 型 (mGluR1) を介する内向き電流 (mGluR current) が観察されることは知られているが、lobule10 ではこの内向き電流に加えて、一過性の外向き電流が観察された。この外向き電流は lobule3 では観察

されなかった。この外向き電流は $GABA_B$ 受容体の阻害剤で阻害された。 $GABA_B$ 受容体は G 蛋白質活性化内向き整流性 K^+ チャネル (GIRK) を活性化することが知られている。しかし、この電流は GIRK 阻害剤である *tertiapin-Q*、細胞内外の Cs^+ 、細胞外 TEA で阻害されず、細胞外 Ba^{2+} による阻害が弱かった。以上のことから小脳 lobule10 で観察された、 $GABA_B$ 受容体は GIRK ではなく、それ以外の K^+ チャネルを活性化している可能性が示唆された。

プレスチンの電位依存的構造変化の FRET 法による解析

Kristin Rule (カリフォルニア工科大学), 立山充博, 久保義弘

プレスチンは、これまでの電気生理学的解析により、Non-linear capacitance を示すことから、膜電位依存性の構造変化を起こすことが想定されるが、その実態は不明である。そこで、分子の構造変化を実証し、さらにその詳細を知るために、全反射照明下での FRET 解析を開始した。まず、N/C 末端細胞内領域のどちらか、もしくは両方に、蛍光蛋白 CFP/YFP を付加したコンストラクトを作成した。全反射照明下での観察により、N 末端に蛍光蛋白を付加すると、発現はするものの細胞膜には出現しないことがわかった。そこで、これらは除外し、C 末端に CFP を付加したものと YFP を付加したものを共発現させ、FRET 解析を行った。細胞外液中の K^+ 濃度を 4 mM から

140 mM に変えることにより、膜電位を変化させ、その時の FRET 変化をモニターした。その結果、脱分極に伴い、FRET 値が減少することを観察した。膜電位感知能を有しない代謝型グルタミン酸受容体では、この変化はみられなかったもので、 K^+ 濃度変化に伴う artifact ではなく、プレスチンの構造変化を反映するものと考えられた。さらに、N 末端に、変異導入により -CCRECC- モチーフを導入し、FIAsh 等の小分子を化学ラベルし、サブユニット間の N 末端と C 末端間、サブユニット内の N 末端と C 末端間等における構造変化の解析を行ったところ、同じく FRET が減少する傾向が観察され、さらに詳細な解析を進めている。

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，等誠司，成瀬雅衣，後藤仁志，白井紀好，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，体性運動ニューロンのみならず，

鰓性および内臓性運動ニューロンや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。これらを調節する因子として Olig2 結合蛋白質の解析を進めている。

前脳オリゴデンドロサイトの発生部位について解析を進め，背側と腹側の境界領域に局限していることが，分かった。

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

等誠司，成瀬雅衣，松下雄一，Akhilesh Kumar，池中一裕

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。さらに，未分化神経幹細胞から神経幹細胞への誘導には，*glial cells missing 1/2* 遺伝子が関与していることを明らか

にし、その分子機構の解明を進めている。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、躁うつ病の治療に用いられる気分安定薬が成体脳における神経幹細胞の自己複製能を高めること、それが Notch シグナルの活性化によることを明らかにした。今後は、気分安定薬の Notch シグナルにおける分子標的の同定や、神経幹細胞の増加が気分を安定させるそのメカニズムの解明に取り組む。

神経細胞の移動・軸索ガイダンス

小野勝彦, 竹林浩秀, 稲村直子, 臼井紀好, 池田一裕

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するために、脊髄の回路網形成および視床網様核の細胞の移動について研究を行った。今までに、一次求心性線維の脊髄内における回路網形成においては、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た。今年度、増田知之博士（福島県立医大）との共同研究から、一次求心性繊維が後根神経節から脊髄背側部まで向かう際にも（つまり脊髄に入る前の段階でも）、*netrin 1* が反発性因子として作用していることを見出し

た。また、感覚神経の軸索ガイダンスについては、*Olig2* ノックアウトマウスで感覚ニューロンの軸索ガイダンスの異常がみられ、それが運動ニューロンの欠損によると推測され、詳しい解析を進めている。視床網様核の細胞の移動については、発生中の視床網様核において、*Olig2* 陽性細胞から分化したニューロンの局在が、発生が進むにつれて脳室側から表皮側へと変化していた。このことは、発生中の視床網様核ではニューロンが脳室側から表皮側へ移動している可能性が考えられ、経時観察による解析を検討している。

グリア細胞の機能と病態

田中謙二, 李海雄, 竹林浩秀, 清水崇弘, 池田一裕

アストロサイトのダイナミックな機能を評価する上で、細胞内 *Ca* イメージが良く用いられている。しかし、細胞内 *Ca* の増減は、アストロサイトのシナプス伝達調整能力にどのように関与するのか不明なままである。シナプス伝達調整に直接関わる分子のダイナミズムを捉える技術が求められている。アストロサイトからシナプス伝達に影響を与える重要な分子；グルタミン酸と ATP が放出することが生化学的な実験から知られているが、そのダイナミズムは分かっていない。そこで我々はバイオセンサーの技術を用いて、培養アストロサイトから放出される

グルタミン酸と ATP の放出ダイナミズムを定量することを試みた。この方法により、培養アストロサイトからグルタミン酸、ATP が放出することが分かったが、同時にその開口部位が極めて限局した部位であることもわかり、この手法で測定が困難なケースもあることが分かった。今後は ATP とグルタミン酸の放出を他の方法で可視化する技術開発に移行する。

脱髄性疾患のモデルマウス (*plp-tg*) において、*Olig2* 細胞の系譜を解析した。正常マウスと比べて細胞の分化が促進されていた。

脳における N-結合型糖鎖構造解析

鳥居知宏, 等誠司, Akhilesh Kumar, 東幹人, 山田 元, 伊藤磯子, 池田一裕

すべての細胞表面は糖鎖で覆われており, 細胞間相互作用やシグナル伝達に深く関わっている。これまでに我々は(1)マウス, ヒト脳内に発現する糖鎖の割合は高い類似性示すこと, (2) 脳内糖鎖発現パターンは個体発生に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, (4) 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

的に変化する新規シアル酸糖鎖が存在すること, を明らかにした。本年度は N-結合糖鎖構造決定の微量化を諮り, 1マイクログラムの糖蛋白質を電気泳動した後糖鎖構造を決定できるようにした。また, 生検資料からも糖鎖構造を決定した。

フコース転移酵素 10(FucT10)の機能解析を行い, 糖蛋白質糖鎖にフコースを転移することを明らかにした。

細胞内代謝研究部門

【概要】

生命は, 環境感知機構と細胞内シグナル機構に支えられた適切な細胞応答で実現されている。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感覚(細胞力覚)に注目し, メカノセンサーの分子実体(イオンチャネル・細

胞骨格/接着斑など)とその仕組みの解明, および細胞運動や細胞形態調節における役割を調べている。また, 破骨細胞におけるプロトンシグナリングや受精における NO/Ca²⁺シグナリングに関する基礎的研究を行っている。一方で, 神経ステロイドによる記憶促進/虚血傷害保護作用のシグナル機構を調べながら, 臨床医学への橋渡しの研究を展開している。

力学環境に対する接着構造の応答の分子機構

平田宏聡
曾我部正博

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-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。接着斑における F-アクチン量の調節はインテグリン-アクチン骨格間結合強度の調節に重要で

あると想像されているが, 詳しい分子機構は不明である。今年度までに我々は, 力学的負荷が接着斑でのアクチンの重合を促進させること, このアクチン重合の促進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を明らかにした(J Cell Sci, in press)。現在, zyxin の局在の調節機構を明らかにするため, 力学的負荷に応答して zyxin との結合が変化するタンパク質の同定を進めている。

細胞膜における酸分泌の制御メカニズム

久野みゆき

細胞膜には多様なプロトン輸送機構が備わっており細胞内外の pH 環境・プロトンシグナル・酸分泌などの細胞機能を調節している。破骨細胞は酸を分泌して骨組織を溶解し骨のリモデリングを行うが、骨吸収窩に蓄積された Ca が破骨細胞の機能を抑制するネガティブフィードバック機構として働くことが知られている。私達は細胞膜面積とプロトンポンプ (Vacuolar-type H^+ -ATPase: V-ATPase) 電流を同時測定し、V-ATPase が細胞膜と細胞

内小胞の間を行き来する実態をリアルタイムで定量的に捉えることができた。その結果、Ca が V-ATPase を細胞小胞へ取り込むエンドサイトーシスを強く促進することが明らかになり、V-ATPase が高密度で存在する膜はそれ自体でエキソサイトーシス・エンドサイトーシスの優位ターゲットとなり電位依存性プロトンチャネルとは共存しないことが示唆された。

ウニ受精時の一酸化窒素 (NO) 増加の役割

毛利達磨, 曾我部 正博

経塚 啓一郎 (東北大学院生命科学 (附) 浅虫海洋生物学研究センター)

ウニ卵受精時の一酸化窒素 (NO) 増加について卵活性化の引き金なのか、どんな働きがあるのか検討した。NO 増加と内外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との同時測定を行った。NO 増加は受精の引き金ではなく細胞内カルシウム増加の後に増加することを確認した。受精時の NO 増加の役割を調べるために NO 吸収剤 PTIO を用いて、NO 増加を抑制した時とそうでない時とで酸素消費、Redox 変化 (NADH/NADPH), H_2O_2 産生を測定した。酸素消費を酸素電極を用いて測定したところ、PTIO 存在下では全

体の酸素消費量はコントロールに比べて減少していた。NADH/NADPH の自家蛍光シグナルも PTIO 存在下ではその増加が抑制された。酸素消費の原因である H_2O_2 の産生を蛍光試薬 Amplex Red で測定した。PTIO 存在下では H_2O_2 の産生は抑制された。また、PTIO 存在下では化学的機械的刺激により受精膜はコントロールに比べて遥かに弱くなっていた。これらのことから NO の役割として受精膜硬化を促進する働きが示唆されたので論文にまとめて投稿した (Dev Biol in press)。

神経ステロイドによる虚血性神経障害の防止作用

曾我部 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促進をはじめとした様々な作用を示すことが知られている。我々はこれまで、典型的な神経ステロイドである pregnenolone sulphate (PREGS) や dehydroepiandrosterone sulphate (DHEAS) に注目し、空間学習や海馬シナプス可塑性 (LTP) に対する促進作用の分子機序を明らかにしてきた。本年度は 2

種の神経ステロイド (estrogen (E2), dehydroepiandrosterone (DHEA)) の虚血性神経傷害に対する保護作用について調べた。E2 が虚血性神経細胞死を低減することは知られていたが、軽い虚血で生じる学習記憶障害への効果は不明であった。我々は、まず虚血で海馬 LTP 誘導が傷害されることを明らかにするとともに E2 の虚血前投与で、それが完全に防げることを、またそれがシナプス後細胞の

E2 受容体 α を介した作用であることを明らかにした (Neuropharmacol, 2007)。一方老化防止薬として使われてきた DHEA は事前投与のみではなく、虚血後投与（最長

48 時間後）でも虚血性神経細胞死を防止するという驚くべき作用があることを発見した（論文投稿中）。現在その分子機構について研究を進めている。

ナノ形態生理研究部門

【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開発、チャネルを中心とした蛋白質の電子線構造解析、無染色細胞の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ソーム-ゴルジ細胞内膜系の選別輸送のメカニズムと生理機能の研究を行った。

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

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。炭素薄膜作製行程において汚れ付着が避けられないことがわかったので、昨年度汚

れ帯電を完全に除去するため電磁遮蔽の方法を応用し、「炭素膜サンドイッチ法」を開発した。今年度はサンドイッチ法の高精度化を試みた。

Aharonov-Bohm 効果を応用した位相差電子顕微鏡の開発

大河原 浩, 永山 國昭

薄膜位相板を用いた場合の電子線損失問題を解消できる, Aharonov-Bohm (AB) 効果を応用した位相板の開発を行っている。AB 効果位相板は極めて細い一本の棒磁石を対物レンズ後方の絞りに橋かけし、磁石が作り出すベクトルポテンシャルを利用する。今年度は電子線ホログラフィー用のパイプリズムを用い、0.8 ミクロン白金細線上にコバルト薄膜を形成し棒状に磁石作製を試みた。そ

の結果、0.8 μm 細線では太すぎる事が判明し、更に細い白金線を作出するため、2 μm 白金線から焦点イオンビーム装置で切り出すことを行った。しかし、2 μm 径では細すぎて絞り穴に架橋を行うことが出来ず、結局 10 μm 白金線から 0.3~0.5 μm 幅の白金線を切り出し、刀様のブレードの刃の上を細線磁石のサポートをすることに成功した。

DNA / RNA 塩基配列の電子顕微鏡 1 分子計測法の開発

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。T

と U を除く 3 種の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可能となった。DNA / RNA を背景ノイズなく担持する材料としてカーボンナノチューブ (CNT) が有望視されているが、我々も修飾化 DNA を CNT に巻き付け、日本電子の 200kV の用いて 1 本鎖状態 DNA 分子の観察を行った。

膜タンパク質の単粒子解析

重松 秀樹, Radostin DANEV, 曾我部 隆彰, 富永 真琴, 飯田 秀利, 永山 國昭

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。結果は J. Struct. Biol. に発表した。構造解析ターゲットとして用いる 3 種類 (TRPM2, TRPV4, MCA2) 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 と MCA2 に絞り込んで、氷包埋試料の電子顕微鏡単粒子解析を行った。モデル蛋白質 Gro EL の結果をふまえて、膜蛋白質の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, Young-Min Kim (Korea Basic Science Institute)

超高圧電子顕微鏡においては、高加速電子線の透過力を用いた通常より厚い試料の観察に期待が寄せられている。ただし、透過力の高さはコントラストが付きにくいことを意味し、無染色試料の観察はほとんど不可能だった。しかし、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

を昨年度 1000kV 位相差電子顕微鏡により証明した。1000kV 電顕としては、韓国, Korea Basic Science Institute 所有の超高圧電子顕微鏡システムを利用し、共同研究を展開した。今年度も引き続き蛋白質と細胞の無染色試料につき、氷包埋状態の観察を行った。現在論文執筆中である。

種々の漢方薬の灌流ラット顎下腺に対する水分分泌促進作用

村上政隆

魏 睦新, 黄 沁 (南京医科大学第一附属医院 中医内科)

唾液分泌低下に対して治療効果のある漢方薬が多く知られているが、これらの薬物が直接唾液腺に作用するのだろうか？ また直接作用があるとすれば、唾液を誘発するのがあるいは唾液水分分泌速度を増強するのかを摘出ラット顎下腺の血管灌流標本を用い、水分分泌速度を測定し検討してきた。2005-2006 年度に漢方薬 20 種類を検討し、15 種類で唾液分泌の増強が観察された。反応は 3 つのパターンに分けることができた。I. 唾液分泌の持続期はわずかに上昇、連続的に基線を増加させた。II. 増強した水分分泌は分泌持続期において緩やかに減少した。すなわち、分泌は最大値に達した後 5~10 分で緩やかに減少した。III. 分泌持続期において分泌は最大値に達した後急速に減少し 8 分くらいで新たなプラトー相を形成した。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。

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 0.2 μ M を用いた。最初 5 分間対照刺激をおこなうと、分泌が誘発され初期 30 秒にピークをもつ初期相とその後緩やかに増加し持続期に入る持続相に分かれた。

薬物を灌流系より 5 分間洗い流し、漢方薬単独を加えたが 1 種類 (甘草) のみ CCh 刺激がなくても分泌反応を起こした。

2007 年度は、増強機構を明らかにする目的で、酸素消費、ouabain の効果、傍細胞経路を通過する色素分泌を、代表的な増強パターンを示す漢方薬について測定した。3 つの増強パターンを示す代表的な薬物について、いずれの薬でも単独で酸素消費が増加した。I と II の cch 無添加時の酸素消費増加は ouabain で抑制され、Na/KATPase 活性化の関与が示された。また III でも分泌増強のパターンと平行して酸素消費の増加が確認された。酸素消費/分泌増加はともに ouabain で阻害され、唾液水分分泌機構で水分分泌増強にかかわると想定される Na⁺/K⁺ATPase 活性が増加していることが示された。また、パターン III の漢方薬では傍細胞経路の開閉が蛍光色素の分泌測定により示された。このことは傍細胞輸送の水分輸送の駆動力として Na.KATPase とリンクした機構を推定しなければならない可能性が生じた。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 つのレベルから詳細な実験を進めてゆく必要が示された。

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, 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)

林 知也 (明治国際医療大), 恵良聖一 (岐阜大学医学部)

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継続している。

一方、林/恵良と継続してきた灌流ラット顎下腺に加えたヒトアルブミンが酸化、NO 化を受ける実験を継続しているが、同時に種々のグロブリンの分泌も観測されている。唾液への免疫グロブリンの分泌は知られているが、これらの分子修飾についても、あわせて、今後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，井上菜穂子

本開発は 4 年計画で 2004 年より開始し、現在、(株)島津製作所、癌研究会、大阪大学、三菱化学生命科学研究所の参画機関と共同で行っている。顕微質量分析装置の原理は、顕微鏡下の生物試料に対して大気圧下でレーザーを照射し、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を開発し報告している。現在までにこれらの手法を用いることによりマウス脳組織切片上において主に細胞骨格を構成する蛋白質やホスファチジルコリン、ホスファチジルイノシトール、およびスルファチドなどの脂質を分布可視化することに成功し、脂質についてはその分子構造の違いまで明らかにした。さらには大腸癌肝転移組織における正常部と癌部において脂質発現に差が存在することを可視化することにより明らかにし、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, 井上菜穂子

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。

我々はチュブリン側鎖へのグルタミン酸付加, いわゆる polyglutamylation に注目し, その酵素である polyglutamylase の同定を試みてきた。その結果, TTLL7 が β チュブリンへのグルタミン酸付加反応を行い, 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 チュブリンへの 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てきた。

本年度はチュブリンへのグリシン付加反応, polyglycylation に注目し, その酵素が TTLL10 であること

を明らかにした。さらに免疫沈降法とタンデム質量分析の融合により, TTLL10 の基質が NAP1 であることを明らかにした。

またこれらの翻訳後修飾酵素に加えてシナプス小胞輸送を制御するユビキチンリガーゼ SCRAPPER を発見した。SCRAPPER はシナプスの活動性を調節する酵素であり, RIM1 に直接結合し, ユビキチン化を行う。この SCRAPPER 依存的なユビキチンプロテアソーム系が RIM1 を介したシナプス小胞の放出確率の調節とプレシナプスの可塑性の調節に寄与していることが示された。この報告はユビキチン化修飾のシナプスでの生理的な意義についての初めての報告であり, Cell 誌の表紙を飾った。

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, 極性上皮細胞の形態形成シグナル制御における細胞内膜系の果たす役割を解析するため, 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 cDNA-GFP 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。

これまでに得られた GFP 融合蛋白質を解析したところ, これらはもともとなった細胞の cDNA ライブラリー内容を反映すると考えられる特徴的な膜蛋白質群からなり, 特定の GFP 融合ライブラリーからは, 発生における形態形成シグナル制御に関わっていることが既知である複数の膜蛋白質も得られた。また, 特定の膜オルガネラに局在するいくつかの機能詳細不明の蛋白質を同定した。これらの内, エンドソームーゴルジ系に動的に局在し, かつ初期発生シグナル伝達を制御することが実験的に示唆される蛋白質を同定したので, 現在その作用メカニズムを解析中である。

細胞器官研究系

生体膜研究部門

【概要】

脳の興奮性神経伝達を司る AMPA 型グルタミン酸受容体の動態や機能を制御する機構を下記の 2 点に着目して解明し、神経可塑性およびてんかんや認知症などの脳神経疾患発症のメカニズムの理解を目指す。

(1) シナプス膜蛋白質ネットワークの同定と機能解析
シナプス膜蛋白質（受容体、イオンチャネル、接着分子など）は足場蛋白質、シグナル蛋白質などと複合体（ネットワーク）を形成して、その機能を遂行する。独自に開発した特異性の高い生化学的手法により、脳組織からシナプス蛋白質複合体を精製・同定する。同定したシナ

プス蛋白質ネットワークがシナプス伝達効率を制御する機構を分子細胞生理学的、遺伝学的手法を用いて統合的に明らかにする。

(2) パルミトイル化脂質修飾機構の全容解明

翻訳後脂質修飾であるパルミトイル化は、外界刺激に応答してシナプス蛋白質のシナプス膜局在を制御し、シナプス伝達効率や細胞内情報伝達を調節する。我々は独自に発見したパルミトイル化酵素群を手がかりとして、シナプス活動に応答した AMPA 受容体の動態制御機構を明らかにする。

てんかん関連リガンド LGI1 の生理機能の解明

深田優子, 岩永剛, 深田正紀

脳内の主要な興奮性シナプス伝達を司る AMPA 受容体は神経活動に応じてシナプス発現が精密に制御され、シナプス伝達効率を規定している。最近、私どもはシナプス足場蛋白質 PSD-95 複合体として AMPA 受容体附属サブユニット Stargazin, 膜蛋白質 ADAM22, および分泌蛋白質 LGI1 を同定した。これら 3 つの蛋白質は痙攣・てんかんに関連のある蛋白質であった。これまでに、私どもは LGI1 が ADAM22 のリガンドとして機能し、AMPA 受

容体機能を促進することを報告した。今年度は LGI1 の作用機構を明らかにするために、タグ付き LGI1 を発現させたトランスジェニックマウスを作成し、脳内 LGI1 複合体を精製、同定した。これまでに同定していた ADAM22 以外にもいくつかの新規 LGI1 結合蛋白質を見出した。現在、LGI1 複合体の生理機能、および LGI ファミリーの機能解析を進めている。

PSD-95 パルミトイル化酵素による AMPA 受容体動態制御

則竹淳, 深田優子, 岩永剛, 深田正紀

これまでに、私どもは PSD-95 を特異的にパルミトイル化する酵素 P-PAT (DHHC2, 3, 7, 15) を同定し、P-PAT が PSD-95 のパルミトイル化を介してシナプス機能を制御することを見出した。今年度は P-PAT の活性が神経活動によりどのように調節されているかを検討した。海馬培養神経細胞をグルタミン酸受容体の阻害剤で処理したところ、PSD-95 のパルミトイル化レベルが著しく増加し、

PSD-95 がシナプス膜に集積することが明らかとなった。この神経活動依存的な PSD-95 のパルミトイル化はシナプス近傍に存在する DHHC2 によるものであり、ゴルジ体に局在する DHHC3 によるものではないことが明らかとなった。さらに、神経活動遮断時に観察される DHHC2 による PSD-95 のシナプスへの移動は AMPA 受容体の恒常性維持に必要であることが分かった。

G α パルミトイル化酵素の同定と性状解析

堤良平, 深田優子, 深田正紀

3 量体 G 蛋白質 α サブユニット (G α) は古くからパルミトイル化を受けることが知られており, パルミトイル化が細胞膜への集積や機能の発揮に重要であることが示唆されてきたが, G α パルミトイル化酵素は同定されていなかった。私どもは DHHC パルミトイル化酵素群から G α に対するパルミトイル化酵素をスクリーニングし, DHHC3 および DHHC7 が G α パルミトイル化を亢進することを見出した。一方, RNA 干渉により DHHC3 および DHHC7 の発現を抑制したところ, G α のパルミトイル化

が低下するとともに G α の細胞膜への局在が減弱した。また, アゴニスト依存的な α_{1A} アドレナリン受容体・G α_q を介した情報伝達系に DHHC3 および DHHC7 が必須であることを示した。さらに, photoconversion 法や FRAP 法を利用し, G α_q のパルミトイル化依存的なゴルジー細胞膜間の双方向輸送を明らかにした。以上の結果から, DHHC3 および DHHC7 が生理的 G α パルミトイル化酵素であり, G α の動態を制御していることが明らかとなった。

機能協関研究部門

【概要】

細胞機能のすべては, 細胞膜におけるチャネル (イオンチャネル, 水チャネル) やトランスポーター (キャリア, ポンプ) の働きによって担われ, 支えられている。私達は容積調節や吸収・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, トランスポーター, レセプター, センサー, メッセンジャ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明らかにしようとしている。主たる研究課題は次の通りである。

(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 (異常浸透圧環境下においても) その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ー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持続性の容積変化をもたらして細胞死を誘導する。多くの細胞のアポトーシス, ネクローシス, 更には脳神経細胞や心筋細胞の虚血性細胞死の分子メカニズムを解明する。特に, イオンチャネルの関与とそのメカニズムを明らかにし, 「細胞死の生理学」という分野を切り開く。

(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し, 他のチャネルやトランスポーター制御にも関与する多機能性蛋白質である。特に, アニオンチャネルや ATP チャネルや TRP カチオンチャネルの容積センサー機能, メカノ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。

TRPM7 は細胞容積調節に関与するメカノセンサーチャネルである

沼田朋大, 清水貴浩, 岡田泰伸

動物細胞はたとえ異常浸透圧環境下におかれて収縮・膨張を強いられたとしても, 速やかに正常容積へと復帰

する能力を持っている。浸透圧性膨張後の容積調節は Regulatory volume decrease (RVD) と呼ばれる。RVD は,

細胞膨張後に細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が起き、それに引き続き KCl の流出とそれに伴う水の流出によって達成されることがわかっている。しかしながら、RVD 過程において Ca^{2+} 流入経路として考えられている膜伸展刺激活性化カチオンチャネルの性質の詳細や分子実体については長い間、不明であった。

今回私達は、ヒト上皮 HeLa 細胞における RVD 過程に

関与する膜伸展刺激で活性化するかチオンチャネルの分子が Mg^{2+} や Gd^{3+} に感受性を示す TRPM7 であることを発見した。さらにヒト上皮(HEK293)細胞に強制発現された TRPM7 クローンも、膜伸展刺激、細胞容積増大、液灌流刺激により活性化すること発見した。これらの結果は次の 2 つの論文に報告 : Am J Physiol Cell Physiol. 292: C460-467, 2007, Cell Physiol Biochem. 19: 1-8, 2007.

過興奮によるニューロンの膨張とネクロシス死の誘導メカニズムの解明 : 容積感受性クロライドチャネルの役割

井上 華, 岡田泰伸

グルタミン酸受容体の過剰刺激による神経細胞死は過興奮性毒性と呼ばれ、虚血やてんかんなどの病態に深く関連していることが知られている。今回我々は、グルタミン酸受容体の持続的な活性化が神経細胞の膨張をもたらしてネクロシスを引き起こすメカニズムを検討し、容積感受性外向整流性 (VSOR) Cl^- チャネルが重要な役割を果たしていることを明らかにした (図 1)。VSOR チャネルは細胞膨張によって活性化され細胞容積調節 (膨張から正常容積への回復) を担うチャネルであるが、過興奮刺激によっても活性化される。過興奮時に見られる神経細胞の持続的な膨張 (necrotic volume increase : NVI)

には、VSOR チャネルを介する Cl^- の流入が必要で、このチャネルを薬剤により抑制すると過興奮による神経細胞の膨張もネクロシスも抑えられる。また細胞死を引き起こさない短時間の過興奮刺激の後には、膨張した神経細胞は元の容積に回復することができるが、VSOR チャネル阻害剤によってこの回復は抑制された。このように VSOR チャネルは過興奮が長時間持続する場合には傷害を悪化させて神経細胞のネクロシスを誘導し、短時間でマイルドな場合にはその後の回復に働くことが明らかとなった。この結果は次の論文に報告 : J Neurosci 27: 1445-1455, 2007.

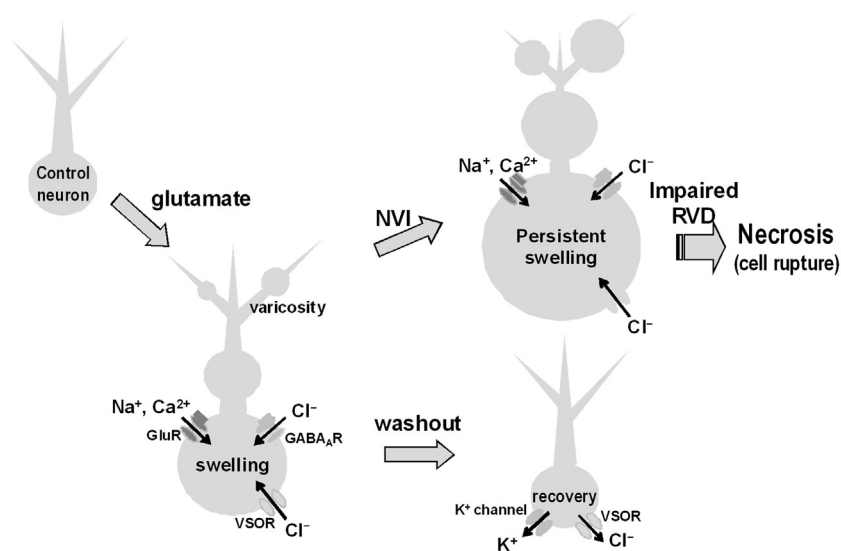


図 1 : 過興奮性神経細胞傷害における VSOR アニオンチャネルの役割

抗ガン剤耐性に容積感受性クロライドチャンネルが関与

LEE Elbert, 清水貴浩, 沼田朋大, 岡田泰伸

伊勢知子, 河野公俊 (産業医大)

ガン細胞の抗ガン剤耐性はガン治療において難問中の難問である。プラチナから成るシスプラチンという広く使われている抗ガン剤は DNA と付加体を形成することによってガン細胞にアポトーシス性細胞死を誘導する。しかし、シスプラチンに対し内因性あるいは獲得性耐性を有するガン細胞が何種類も存在している。今回、獲得性シスプラチン耐性モデルとしてシスプラチン耐性 KCP-4 細胞株を用いて、その耐性メカニズムを研究した。細胞容積調節に関与している容積感受性外向整流性 (VSOR) クロライドチャンネルの活性化がアポトーシス誘導に重要な役割を果たしていることが知られているので、KCP-4 細胞においてホールセルパッチクランプ法で VSOR クロライドチャンネルの活性を調べたところ、この

チャンネルの機能的発現はほとんど見られなかった。VSOR クロライドチャンネル活性の欠落がシスプラチン耐性の因子であるものと仮定して、チャンネルの活性を回復させることを試みた。ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (トリコスタチン A) によって遺伝子転写を促進させると VSOR クロライドチャンネル活性の部分的回復が見られ、そしてこの活性回復によってシスプラチン耐性が失われることを細胞生存率とカスパーゼ 3 活性測定で確認した。これらの結果により、VSOR クロライドチャンネル活性の欠落が KCP-4 ガン細胞のシスプラチン耐性の原因となっていることが明らかとなった (図 2)。この結果は次の論文に報告 : J Cell Physiol 211: 513-521, 2007.

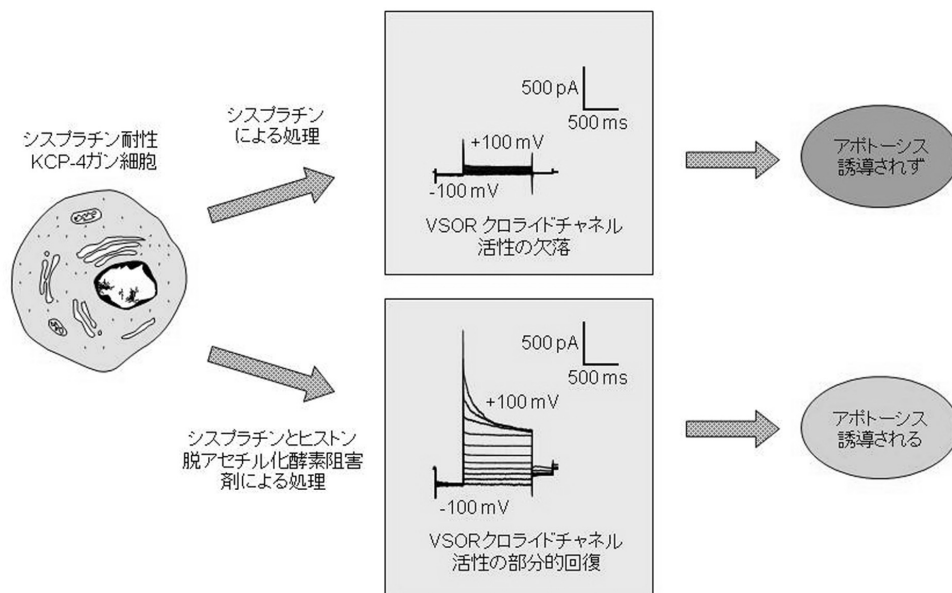


図 2 : 抗ガン剤耐性における VSOR アニオンチャンネルの役割

細胞生理研究部門

【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 TRP チャネルに焦点をあて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。特に、small G 蛋白質 Rho とその関連蛋白質 mDia, DIP に焦点をあてて解析を進めている。

表皮 TRPV4 の結合蛋白質の解析

東智広, 曾我部隆彰, 福見-富永知子, 富永真琴

温度感受性 TRP チャネルの 1 つ TRPV4 は、もともと低浸透圧で活性化するチャネルとして報告されたが、我々が温度感受性も有することを報告した。TRPV4 は、感覚神経のみならず表皮ケラチノサイトや視床下部で発現することが知られている。表皮は温度変化に直接曝露される部位であり、視床下部は体液浸透圧や体温の調節中枢として機能していると考えられている。そこで、TRPV4 の活性制御機構を明らかにする目的で皮膚の

cDNA ライブラリーを用いて TRPV4 の細胞内ドメインと結合する蛋白質のスクリーニングを行い、興味深い結合蛋白質を得た。両蛋白質の結合に重要なドメインを明らかにした。両蛋白質を HEK293 細胞に共発現させることによって、TRPV4 活性増強が観察され、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。加えて、この結合の生理学的意義をマウスケラチノサイトで明らかにした。

表皮ケラチノサイトにおける TRPV4 の生理機能の解析

曾我部隆彰, 富永真琴, 福見-富永知子

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。その結果、TRPV4 がアドヘレンスジャンクションでコンプレックスを形成してケラチノサイトの細胞接着能を制御して、皮膚のバリアー機能に影響を及ぼしていることが明

らかとなった。TRPV4 欠損マウスの皮膚では、水分がタイトジャンクションを越えて野生型マウスより速やかに移動すること、それを防ぐために角質層が肥厚している

ことが判明した。電子顕微鏡による観察で、TRPV4 欠損マウスの皮膚では、アドヘレンスジャンクション、タイトジャンクションの形成が未熟であることが分かった。

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実験を進め、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に有意な差が認められること、海馬由来とされる脳波活動に野生型マウスと TRPV4 欠損マウスで差が見られることが明らかとなった。

低酸素、高グルコース環境の TRPV1 機能への影響の検討

Violeta Ristoiu, 柴崎貢志, 富永真琴

糖尿病では痛み等を主症状とする神経症を合併することが知られており、その発症と感覚神経細胞が低酸素、高血糖に曝されることの関連が知られている。また、この糖尿病性神経症の痛み感覚にカプサイシン受容体 TRPV1 の発現・機能の変化が伴うことも報告されている。そこで、TRPV1 の発現や機能への低酸素、高グルコース環境の影響を解析した。その結果、TRPV1 を発現させた

培養細胞や単離感覚神経細胞でカプサイシンによる電流が大きくなって細胞外 Ca^{2+} 依存性の脱感作が起こりにくくなっていることが明らかになった。この現象は PKC によるリン酸化の基質をもたない TRPV1 変異体では起こらず、低酸素、高グルコース環境下で培養した細胞では TRPV1 の総蛋白質量は変わらないものの、リン酸化された蛋白質の量が著しく増加していることが判明した。

TRPA1 チャネルの新規刺激物質の発見

藤田郁尚, 内田邦敏, 富永真琴

TRPA1 チャネルは種々の侵害刺激によって活性化するイオンチャネルである。パラベン防腐剤として化粧品等に広く用いられている。化粧品による痛み感覚にこのパラベンが関与するかどうかを検討する目的で、感覚神経に発現して侵害刺激受容や痛みの緩和に関わると推定されている TRP チャネルへのパラベンの効果を検討

した。その結果、皮膚に届きうる濃度のパラベンが TRPA1 を特異的に活性化することが明らかとなった。また、マウス個体レベルでもパラベンの後肢足底への投与で痛み関連行動が観察されたことから、パラベンは TRPA1 活性化を介して痛みを惹起しているものと推定された。

TRPM2 のインスリン分泌への関与の解析

内田邦敏, 川端二功, 稲田仁, 森泰生 (京都大学), 富永真琴

TRPM2 チャンネルが膵臓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 Ca²⁺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, この細胞レベルでの TRPM2 の生理学的意義が生体でも認められるかどうかを, 京都大学森泰生博士の研究室から TRPM2 欠損マウスを得て

解析した。その結果, TRPM2 欠損マウスから得られた膵臓β細胞はグルコース存在下で熱による細胞内 Ca²⁺濃度増加を示さないこと, 経口グルコース負荷試験において野生型マウスと比較して TRPM2 欠損マウスで血糖の増加が有意に大きく, 正常化が遅いことが判明した。

mDia 結合タンパク質の機能解析

松浦敦子, 福見-富永知子

Rho の標的蛋白質である mDia の結合蛋白質として知られる DIP の細胞運動における役割の解明を目指して, DIP 欠損マウスを作成した。DIP 欠損マウスから得られた繊維芽細胞は野生型マウスの繊維芽細胞に比べて細胞

運動が著しく低下し, DIP 欠損繊維芽細胞へ DIP 遺伝子を導入することによってその現象が正常化したことから, DIP がアクチン再構成を介して細胞運動の制御に関わっていることが明らかになった。

生体情報研究系

感覚認知情報研究部門

【概要】

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

するために、大脳皮質を中心とするニューロンの刺激選択性や、異なる種類の刺激への反応の分布を調べている。具体的な課題として(1) 初期視覚野における輪郭とその折れ曲がりの表現、(2)大脳皮質高次視覚野における色選択性ニューロン活動と知覚の関係、(3)大脳皮質におけるグルーピングと視覚的注意のメカニズム、(4) 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 (中国科学アカデミー)

我々は物体の形状を認識する過程を明らかにする為に図形の輪郭に含まれる折れ曲がりに対する反応選択性を初期視覚野で調べてきた。これまで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多数のニューロンが折れ曲がり刺激に選択的な反応を示すことを見いだした。これらの刺激選択性形成のメカニズムを明らかにすることを目的として昨年度より麻酔標本からの記録を開始した。その結果 (1) 麻酔下でも折れ曲がり刺激に選択

的に反応するニューロンが記録されること、(2) 刺激サイズによらず受容野内部の情報で折れ曲がり刺激を表現するニューロンと、折れ曲がり選択性が刺激サイズに依存しており受容外からの情報を必要とするニューロンがともに第二次視覚野に存在することを見いだした。これらの結果は第二次視覚野およびその入力源である第一次視覚野がともに折れ曲がり刺激選択性形成に寄与することを示唆する。

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。行動から求めた色弁別閾値は、白や

赤の付近では低く弁別感度が良いのに対し、緑やシアン付近では高く弁別感度が相対的に悪いという色による違いが見い出された。一方ニューロンの弁別閾値の色度図上での分布にも行動と同様の傾向が見い出された。このことは TE 野ニューロンの色選択的な活動が、サルの色弁別と強い相関を持っていることを更に明瞭に示す結果であり、TE 野の色選択性ニューロンの活動がサルの色判断行動に寄与していることを支持する結果である。

注意にもとづく視覚グルーピングに選択的なサル頭頂間溝皮質ニューロンの活動

横井 功, 小松英彦

視覚グルーピングの神経メカニズムについて調べるために、グルーピングを必要とする検出タスクを設定し、サル頭頂間溝 (IPS) 後壁皮質から単一細胞外記録を行った。視覚刺激は白または黒の 5 つの正方形ドットが十字に配置して構成される。同じコントラストのドットが水平または垂直に並ぶパターンをターゲット刺激とした。離散的なドットをひとまとまりのターゲット刺激として検出するためのグルーピングには方位とコントラストの

要因が含まれるが、このうち縦または横の方位に選択的な注意を向けさせてその方位にグルーピングを誘導した。記録した大部分のニューロンが注意を向けているターゲットの方位に選択的な反応を示した。方位選択性は注意を向けている方位とターゲットの方位が一致する条件では増強し、一致しない条件では減弱した。この結果は IPS のニューロンが注意によって制御される視覚グルーピングにおいて重要な役割を担っていることを示唆する。

サル下側頭皮質における色選択的活動分布：fMRI 研究

郷田直一, 原田卓弥, 伊藤 南, 小松英彦
小川 正 (京都大学)
豊田浩士, 定藤規弘 (心理生理学)

我々は機能的 MRI (fMRI) を用いてサルの視覚皮質における機能地図を明らかにする研究に取り組んでいる。本年度は、特にサル下側頭皮質において色選択性ニューロンがどのように分布しているかを明らかにするため、様々な視覚刺激を用いて下側頭皮質における色選択的反応の分布を計測した。有彩色刺激に対する反応と無彩色刺激に対する反応とを比較すると、有彩色により強く反

応する領域は下側頭皮質前部及び後部外側面のそれぞれ数 mm の小領域に局限していることが見出された。またそれら小領域の位置は、用いる視覚刺激によって異なる場合があることも示された。以上の結果から、下側頭皮質において色選択性ニューロンは一様に分布しているのではなく、複数の小領域に集積していること、また、それら小領域の反応特性には違いがあることが示唆される。

ポップアウト時におけるサル視覚皮質活動：fMRI 研究

郷田直一, 原田卓弥, 伊藤 南, 小松英彦
小川正 (京都大学)
豊田浩士, 定藤規弘 (心理生理学)

視野の中に多数の物体があるとき、周囲の物体と色などの特徴において大きく異なっている物体は目立ち（ポップアウトし）注意を自動的に引き付ける。このようなポップアウトに関わる情報処理の全体像を明らかにするため、サルが注視課題を遂行中にポップアウトする対象を含む視覚刺激を呈示し、ポップアウトに伴って生じる様々な皮質領域の活動変化を fMRI を用いて計測した。

その結果、V2/V3 野、V4 野、及び LIP 野領域において、ポップアウト時の反応促進が確認された。さらに、上側頭溝後壁の V4 野及び MT 野の前方に位置する領域にもポップアウト時の反応促進が観察された。本結果から、低次視覚野及び後部頭頂領域に加え、高次視覚野領域がポップアウトの情報処理に関与している可能性が示唆される。

神経シグナル研究部門

【概要】

神経細胞・シナプスの研究を継続するとともに、これらの基礎的な機能が生体にどのように反映されるかを、脳スライスを用いた電気生理的測定、in vivo 測定、および恐怖記憶形成に関わる行動実験等を行い検討した。部

門としては、in vivo の脳活動を微小な神経核に薬剤を注入してその効果を検討する系等で実験技術のレベルアップが図られた。

ラット小脳顆粒細胞－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

ラット小脳スライス－パッチクランプ法を用いて、顆粒細胞軸索（上向性線維）の電気刺激に伴い、分子層介在ニューロン（籠細胞）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。薬理学的検討やキネティクス解析を行い、① EPSC 振幅増大はシナプス小胞の放

出確率ならびに放出多重性の増強、減衰時間増大は非同期的シナプス小胞放出の増強により惹起されたこと、また、②この非同期的放出は $\text{Ca}_v2.1$ (P/Q-型) カルシウムチャネルにより制御されている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、異なる Ca^{2+} チャネルサブタイプを介して、シナプス小胞放出過程に影響する分子的基盤について検討している。

単一神経回路における複数のシナプス統合

井上 剛，井本敬二

本研究では、構造的に単一の神経回路配線が、どの程度フレキシブルな信号処理を行うことができるのか、信号処理能力の可能性に関して検討した。スライスパッチクランプ法にダイナミッククランプ法を取り入れることにより、ある特定の神経回路配線を調べる実験系を確立し、視床－大脳皮質間の神経回路に適用した。この神経回路では、時間のずれたタイミング（5 ms 程度）の視床入力、効果的に大脳皮質 4 層主要細胞を興奮させた。

ノルエピネフリンを与えると、全く同じ神経回路配線にも関わらず、同時タイミングの視床入力が大脳皮質主要細胞を効果的に興奮させた。アデノシンを与えると、同時タイミングも時間のずれたタイミングも同程度に強く大脳皮質主要細胞を興奮させた。これらの結果は、単一の視床－大脳皮質神経回路が三種類のシナプス統合を呈すること、またそれらのシナプス統合が異なる神経修飾物質によってスイッチされることを示している。

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，井上 剛，井本敬二

この研究では、欠神発作のモデルマウスである *tottering* マウスを用いて、欠神発作と大脳基底核回路と

の関係性を 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た。

in vivo の実験では黒質ニューロンの発火率の推移がてんかん波に同期していること、及び黒質への興奮性伝達の阻害がてんかん波の発生を阻害することが明らかとなった。これらの結果は大脳基底核が、欠神発作の発生・維持に関与していることを示唆している。基底核がどのような仕組みで欠神発作に関与しているか調べるため、

in vitro の実験を行った。本実験では大脳基底核回路内で黒質の上流に位置し、黒質への興奮性伝達を有する視床下核のニューロンの性質を調べた。その結果、*tottering* マウスでは視床下核ニューロンの興奮性が増強されていることが示唆された。

Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II 活性が制御する学習・記憶

山肩葉子, 柳川右千夫 (群馬大学), 井本敬二

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、それを制御する分子として、Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMKII) が注目を集めている。我々は、CaMKII α の不活性型ノックインマウスを作製し、CaMKII α のキナーゼ活性が海馬依存性の学習・記憶に果たす役割の解明を進めている。このマウスを用いて、海

馬 LTP と相関が深い受動的回避テストを行ったところ、野生型マウスでは、1 回のトレーニングで回避学習が成立するのに対し、不活性型マウスでは、回避学習が成立するまでに、複数回のトレーニングが必要であった。この所見は、このマウスで観察された海馬 LTP の障害と対応するものであり、今後、学習障害モデルマウスとして、さらに詳細な分子メカニズムの研究に貢献できるものと考えられる。

視床内側毛帯シナプスの生後発達

竹内雄一, 井本敬二, 宮田麻理子

内側毛帯シナプスは体性感覚情報を視床に伝える求心性シナプスである。内側毛帯シナプスの生後発達を電気生理学的に明らかにすることは、視床における体性感覚処理を理解する上で重要である。生後 0-39 日齢の C57BL/6 マウス脳切片上において内側毛帯繊維を刺激して、ホールセル記録法により視床リレー細胞から興奮性シナプス

後電流 (EPSCs) を記録した。その結果、発達に伴い入力繊維数の増減、シナプス強度の増強、EPSCs の鋭化などが観察され、特に生後 6-10 日の間に顕著な変化が観察された。EPSCs の鋭化に関して、AMPA 受容体の組成変化に注目し、薬理学的な検討も行っている。

視床 VB 核神経回路網におけるアセチルコリン作用とその相違

南雲康行, 川上順子 (東京女子医大), 井本敬二, 宮田麻理子 (生理研)

従来より、視床におけるアセチルコリン (ACh) 神経を介した感覚情報処理は、*in vivo* ならびに解剖学的に実証されてきていた。しかしながら、視床神経回路網におけるシナプスレベルでの ACh 作用の解析については、これまでに報告が少なく点在する報告も統一した見解がなさ

れていないのが現状である。本研究では、抹消からの感覚情報を伝達する内側毛帯シナプスと大脳皮質から視床へ feedback される感覚情報を伝達する皮質視床シナプスの二つの興奮性シナプスに対する ACh の影響に着目した。その結果、ACh の処置は、内側毛帯線維刺激による EPSC

にはほとんど影響を及ぼさず、皮質視床投射線維刺激からの EPSC のみを減弱させた。また、ACh は皮質視床シ

ナプスにおいて paired-plus ratio ならび coefficient of variation の増加を引き起こした。

神経分化研究部門

【概要】

研究室では、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、久木田助教による電位依存性チャネルの物性の解析を進めてきた。今年は、電位センサードメインタンパクの基本的動作原理の解明を進めると同時に、トランスジェニックゼブラフィッシュラインを作成

して脊髄神経回路の形成機構の解析を進めた。Ci-VSP については酵素ドメインの特性を中心に解析した。VSOP1 の電位依存性プロトンチャネルとしての基本構成を電気生理学と生化学の両面から明らかにした。ゼブラフィッシュを用いた研究では、神経前駆体細胞がニューロンペアーを生じる際に、非対称分裂が再現的に生じることを明らかにした。

電位依存性ホスファターゼと PTEN との基質特異性の比較

岩崎広英

Md. Israil Hossain

村田喜理

岡村康司

Ci-VSP の VSP とは、Voltage Sensor-containing Phosphatase (電位センサーをもつリン脂質脱リン酸化酵素)の略で2005年に発見した、電気信号を化学信号に変換するというユニークな特性をもつタンパク質である。Ci-VSP は、がん抑制遺伝子として知られている PTEN と良く似たタンパク質構造を持っている。PTEN は細胞の増殖に関わるリン脂質 PIP3 を分解することで、がんの発生を抑えることが知られている。今回、研究グループはがん抑制遺伝子 PTEN と

Ci-VSP とを詳細に比較したところ、Ci-VSP は、PTEN と似た構造を持つが、リン脂質 PIP3 を分解するだけでなく、PIP2 と呼ばれる別のリン脂質にも分解することを明らかにした。PTEN と Ci-VSP 酵素の化学信号を伝える部分の違いは、たった一つのアミノ酸配列に由来する可能性が高い。これらの発見は、PTEN がどのようにリン脂質 PIP3 を分解し、がん発生を抑えているのかそのメカニズム解明にもつながると期待される。

電位依存性プロトンチャネルの分子構成

黒川竜紀

大河内善史

佐々木真理

高木正浩

岡村康司

電位依存性イオンチャネルは、様々なタイプのイオン

チャネルが単離・同定され、その分子特性が調べられて

きた。我々の研究室では新規の膜タンパク分子を見つけ、これが電位依存性プロトンチャネルであることを証明した (Sasaki, M. et al.: Science, 312:589- 592, 2006)。この分子は、電位依存性チャネルと同様に電位センサードメインは持っているがポアドメインをもたず、Voltage-Sensor Only Protein (VSOP) と名づけられた。これまで電位依存性チャネルの電位センサーが動作するにはポアを形成する膜貫通領域が重要であると考えられてきた。しかし VSOP はポアを持たず電位センサードメインのみでイオンを透過させると考えられ、この分子の動作機構を解明することは、電位依存性チャネル全般のメカニズムの解明につながると期待される。

多くのイオンチャネルでは、オリゴマーを形成することで、機能的な構造をとることが知られている。VSOP においてはまだ機能的な構成単位はわかっていない。本研究では、VSOP は何量体で機能的なチャネルを構成しているかを調べた。動物細胞に強制発現させた VSOP (C 末端に Myc もしくは HA タグを付加) を用いて免疫沈降法を行うと、Myc と HA それぞれの抗体で Myc または HA が付加された VSOP が共に沈降した。このことより、VSOP はオリゴマーを形成していることが示唆された。また、VSOP の細胞質領域を除去したものでは、タンパク質間の相互作用は減少していることから、VSOP のオリゴマー形成には細胞質領域が重要であると考えられた。

ゼブラフィッシュ脊髄の二種類の V2 ニューロンは神経前駆体細胞の最終分裂により生じる

木村有希子
佐藤千恵
東島眞一

脊髄腹側の p2 前駆体細胞領域からは二種類の介在神経細胞、V2a と V2b ニューロンが生じることが知られている。これまでに、V2a と V2b の分化には、分裂終了後の細胞間で起こる Delta-Notch シグナリングを介した相互作用が関与することが示されていた。しかし、V2a と V2b の細胞系譜は不明であり、上記の細胞間相互作用がどの細胞どうして起こるかについては分かっていなかった。我々は p2 前駆体細胞の最終分裂直前に GFP を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュ Tg [vsx1:GFP] を作成し、この問題に取り組んだ。経時観察により、GFP でラベルされた p2 前駆体細胞の大部分は、一度だけ分裂し、V2a と V2b ニューロンを対で生むことが分かった。この結果は、V2a と V2b ニューロンが一对のニューロンを生じる分裂、かつ非対称な分裂によって生じることを示している。さらに、Delta-Notch シグナリングの相互作用が姉妹細胞間で起こることが、この分裂が結果として非対称になるために重要な役割を果たしていることを示唆する結果も得られた。この細胞運命決定のメカニズム

はショウジョウバエの神経母細胞が、非対称分裂によって二つの異なるニューロンを生じる場合と良く似ている。しかし、ショウジョウバエの場合と異なり、ゼブラフィッシュの p2 前駆体細胞の分裂軸の方向は決まっていないことも分かった。これらの結果は、脊椎動物の神経発生において、一对のニューロンを生じる神経前駆体細胞の最終分裂が、分裂軸の方向性に依存しないメカニズムを介して、二つの異なるニューロンを生むことができることを示している。

本研究は、脊椎動物の中樞神経系において、1 つの神経前駆体細胞から非対称分裂により 2 つの異なるタイプのニューロンが再現的に生じることを示す初めての例である。哺乳類脳形成においても、1 つの前駆体細胞によりニューロンペアを産生する例が知られている。そこにおいても、本研究で示されたように、Delta-Notch を介した姉妹細胞同士の相互作用により 2 つの異なるタイプのニューロンが生じる機構が存在するかもしれない。

統合生理研究系

感覚運動調節研究部門

【概要】

2007年度は、博士研究員の赤塚康介君が国立久留米工専の助教に栄転した。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、木田哲夫君（米国 NIH）、岡本英彦君（ドイツ、ミュンスター大学）、の4名である。また総研大卒業生の野口泰樹君は、学振の海外研究者に採用され、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らしている。

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、カリフォルニア工科大学の下條教授、ミネソタ大学の Domino 教授、英国のバーミンガム大学の Edwards 先生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、また中央大学心理学科とは乳児の NIRS 記録により、群馬大学麻酔科とは「心の痛み」に関して興味ある結果を得つつある。

Inner experience of pain: imagination of pain while viewing images showing painful events forms subjective pain representation in human brain (心の痛みのメカニズム解明)

荻野祐一（群馬大学医学部）、乾 幸二、柿木隆介

以前から「心の痛み」といった表現が良く使われてきたが、その実態は不明であった。しかし、今回の研究で初めて心が痛いと感じるときの脳活動が明らかにされた。研究では、機能的 MRI (fMRI) を用いて、痛みを想像したときの脳活動を計測したところ、それは本当に痛みを与えられたときとほぼ同一の場所であった。また、恐怖の画像を呈示した時には扁桃体に活動が見られ、同じような不快な画像に対しても、心が痛い時とは異なる脳活動が見られた。本研究により、確かに「心は痛む」ことを、

最新の脳科学機能画像を用いて初めて科学的に証明することに成功した。近年、科学文明が進むことによって発生している様々な新しい心の問題、例えば教育現場で問題になっている「いじめ」や、社会恐怖症、あるいはうつ病の増加などの原因解明や治療につながる重要な研究と考えられる。

なお、この研究は群馬大学麻酔科との共同研究の成果である。(Ogino Y, Nemoto H, Inui K, Saito S, Kakigi R, Goto F. Cerebral Cortex 2007; 17: 1139-46.)

Time-varying cortical activations related to visual-tactile cross-modal links in spatial selective attention (空間的注意における視覚-触覚間クロスモダルリンクに関わる脳磁界反応)

木田哲夫, 乾 幸二, 和坂俊昭, 赤塚康介, 田中絵美, 柿木隆介

空間的注意による神経活動の変化はよく知られている。近年この注意効果は他の感覚モダリティにも及ぶこと(クロスモダルリンク)が報告されたが、その神経機構の時間動態は未だ解明されていない。本研究では脳磁場記録により、視覚-触覚間のクロスモダルリンクに関わる皮質処理の時間動態を調べた。視覚、触覚ともに標的、非標的刺激を右視野(右手第2指)、左視野(左手第2指)に約1秒間隔でランダム順に提示した。被験者は4つの注意条件をランダム順に行った(右体性感覚・左体性感覚・右視覚・左視覚注意)。右手体性感覚刺激に対する二

次体性感覚野(SII)付近の脳磁場反応(潜時80ms～)は、右体性感覚注意時だけでなく右視覚注意時にも増大したが、一次体性感覚野の反応には有意な変化は認められなかった。左手刺激でも同様の結果が得られた。これらの結果より、体性感覚入力に対する潜時80ms以降のSII近辺の神経活動は、注意された感覚モダリティに関係なく、空間的注意により変化することが示唆された。(Kida T, Inui K, Wasaka T, Akatsuka K, Tanaka E, Kakigi R. J Neurophysiol 2007; 97, 3585-3596)

Left hemispheric dominance during auditory processing in noisy environment (騒音環境下での聴覚信号処理における左半球の優位性: カクテルパーティー効果の解明)

岡本英彦, 柿木隆介, Stracke H, Ross B, Kakigi R, Pantev C (ドイツ, ミュンスター大学)

日常生活において私たちは、自分達にとって意味のある音信号と同時に、自分達にとって意味のない雑音に晒されている。音信号処理の過程で、これら音信号と雑音によって引き起こされた神経活動は互いに干渉しあうと考えられる。今回の実験では脳磁図を用いて、雑音と信号音によって引き起こされる神経活動の、一次聴覚野と関連聴覚野における相互作用を計測した。音信号と雑音は同側(ipsi-lateral masking)または対側(contra-lateral masking)に提示された。その結果、音信号と雑音の相互干渉作用により、両条件下で音信号により惹起された脳神経活動の有意な減少がみられたが、左半球の神経活動の低下は右半球に比し、有意に小さかった。この結果より、騒音環

境下においては、左半球の方が右半球より音信号処理に重要な働きをすると考えられる。日常生活において、私たちは声と雑音に同時にさらされており、雑音による神経活動を抑える必要がある。いわゆる「カクテルパーティー効果」はこの脳活動によると考えられる。今回私達が発見した、騒音環境下における左半球の優位性は、声のような複雑な音声刺激処理における、左半球優位性に繋がるのではないかと考えられる。(ドイツ ミュンスター大学・カナダ トロント大学との共同研究)。Okamoto H, Stracke H, Ross B, Kakigi R, Pantev C (2007) BMC Biol. 5, 52. (Online Journal)

Neural activation to upright and inverted faces in infants measured by near infrared spectroscopy (近赤外分光法(NIRS)によって乳児の顔認知に半球間機能差が発見された)

大塚由美子, 仲渡江見, 金沢 爽, 山口真美 (中央大学心理学科), 渡辺昌子, 柿木隆介

近赤外分光法(NIRS)を用いて、正立顔と倒立顔の提示に対する乳児の脳活動を計測した。NIRSは脳血流の変

化を非侵襲的に計測する技術である。さらに、NIRSは計測中に身体や頭部を固定する必要が無いため、覚醒状態

にある乳児を対象とした脳活動の計測に非常に有用である。本研究では乳児用に新たに開発されたプローブを用いて計測を行った。生後 5-8 ヶ月の乳児 10 名を対象として、正立の顔と倒立の顔を観察中の左右側頭部位における脳血流の変化を計測した。本研究の結果は以下のようである。(1)正立顔の観察中には、右側頭部位において酸素化ヘモグロビン(oxy-Hb)濃度と総ヘモグロビン(total-Hb)濃度が上昇した。(2)右側頭部位においては、正立顔観察中の総ヘモグロビン(total-Hb)濃度と倒立顔観察中の総ヘモグロビン(total-Hb)濃度が異なっていた。

(3) これらの結果から、正立顔の認知には左半球よりも右半球がより重要な役割を果たすと考えられた。さらに、(4) 顔認知に関与すると考えられている左右両半球側頭部の上側頭溝(STS)付近において、最も大きな脳血流の変化が示された。本研究の結果から、脳血流反応の計測を行うことで乳児期において顔の倒立効果に半球間機能差が存在することがはじめて明らかにされた。なお、本研究は中央大学文学部との共同研究である。(Otsuka Y, Nakato E, Kanazawa S, Yamaguchi MK, Watanabe S, Kakigi R: Neuroimage. 34 (1):399-406, 2007)

種々の第 2 次視覚性仮現運動刺激に対するヒト脳反応特性

田中絵実, 野口泰基, 柿木隆介, 金桶吉起

視覚的に運動を検出する機構は、大きく分けて 2 とおりあるといわれている。ひとつは、運動物体の輝度変化を検出するもので、他のひとつは模様、コントラストなど輝度変化のない場合の運動検出機構である。前者は第 1 次、後者は第 2 次の運動検出機構と呼ばれている。第 2 次運動検出機構が第 1 次運動検出機構とどのように異なる機構によるのか、また第 2 次運動検出機構はただひとつの機構であるのか、依然不明である。我々は、コントラスト、模様、時間周波数によって定義された図形の仮

現運動刺激を作成し、それらに対するヒト脳反応を脳磁図にて記録し、第 1 次仮現運動刺激に対する反応と比較検討した。反応はいずれもヒト MT+付近を中心に分布し、各刺激間での差はなかった。しかし、反応特性はそれぞれで有意に異なっていた。これらの結果は、第 2 次運動の検出にはそれぞれの刺激特性に応じて定義された領域の検出には独自の検出機構が存在すること、そしてその後は共通の運動検出機構によって処理されることを示唆する。(Neurosci. Res. 2007, 59, 172-182)

Interhemispheric difference for upright and inverted face perception in humans: an event-related potential study

(正立顔・倒立顔情報処理の左右半球間差：事象関連電位を用いた検討)

本多結城子, 渡邊昌子, 中村舞子 (東京慈恵会医科大学神経内科), 三木研作, 柿木隆介

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

その結果、すべての被験者において刺激呈示後 150～250 ミリ秒に後側頭部で大きな陰性成分 N170 が記録された。振幅は両半球において正立顔と比較し、倒立顔で増大していた。潜時は右半球において正立顔と比較し、

倒立顔で延長していたが、左半球では明瞭な相違はみられなかった。また、半球間伝達時間を検討した結果、左半視野に倒立顔刺激が呈示された際のみ著明な短縮がみられ、右半球は倒立顔の情報を左半球に速やかに伝達していることが示唆された。左半球では倒立顔刺激に対し潜時の延長はなく振幅の増大を示すことから、倒立顔に対する特別な情報処理過程が存在する可能性が考えられた。(Honda Y, Watanabe S, Nakamura M, Miki K, Kakigi R, Brain Topography, 20, p.31-39)

侵害刺激による早期皮質活動

王曉宏, 乾幸二, 柿木隆介

レーザー刺激は選択的侵害刺激として有用な方法であるが、熱伝導により侵害受容器を興奮させるために試行毎の受容器興奮に若干の時間的ずれが発生してしまう。このために微弱な早期活動が加算の結果失われている可能性を検討するために、試行毎の皮質活動を解析し、応答潜時を揃えて再加算する (L-AVE) 方法で検討した。刺激は左手背へのレーザー刺激である。

【結果】従来の報告と同様に、皮質応答の主体はおおよそ 170ms に頂点のある両側第二次体性感覚野 (S2) と、ほぼ

同じ潜時の刺激対側 S1 の活動であった。これに加え、L-AVE の波形では刺激後 110ms 付近にこれら 3 部位の活動が認められた。従って侵害刺激は少なくとも 110ms 後には体性感覚野で処理されていると考えられる。侵害刺激の皮質での情報処理様式は、主活動 (170ms 付近) の S1 と S2 の潜時を元に考察されてきたが、この考えを見直す必要があると思われる。(Exp Brain Res 180: 481-489, 2007)

痛覚関連誘発電位は、心周期の修飾を受ける

Edwards L, 王曉宏, 乾幸二, 柿木隆介

動脈圧受容器反射が痛みを修飾することは知られている。しかしながら他覚的にこれを検証した研究はこれまでなかった。本研究では、左手背へのレーザー刺激により誘発される痛覚関連脳電位 N2/P2 成分の振幅と心周期の関連を検討した。

【結果】N2/P2 振幅は、収縮期 (R 波から刺激までの時間が 250ms から 450ms) のトライアルで有意に減少した。

動脈弓及び頸動脈の圧受容器は R 波後 100-400ms で発火が頂点に達すること、及び圧受容器から大脳への伝導時間を考慮すると、このタイミングは心収縮による圧受容器の興奮が侵害情報処理に影響を与えたと考えるのに極めて妥当である。本研究は心周期が痛覚に影響を及ぼすことを誘発活動を用いて示した初めてのものである。(Pain 137: 488-494, 2008)

「目の動き」を見たときの後頭側頭部の活動に対する顔輪郭とパーツ情報の影響

三木研作, 渡辺昌子, 本多結城子, 中村舞子, 柿木隆介

日常生活では、顔の動きの認知は大変重要であり、我々はこれまで「顔の部分の動き」に対するヒトの運動視中枢 (MT/V5 野) の活動について脳磁図を用い、調べてきた。今回、「目の動き」が単なる「ドットの動き」と区別されるための要因と考えられる顔の輪郭とパーツ情報の影響を検討した。

2 枚の刺激を連続提示し、被験者に運動が知覚される仮現運動を利用した 2 条件の視覚刺激を用い、誘発脳磁場を測定した。(1) CDL: 模式的な顔の絵 (輪郭, 目, 口) の中で目の部分が動く刺激。(2) CD: CDL 条件より口の部分を除いた刺激。(3) DL: CDL 条件より輪郭を除いた

刺激。(4) D: CDL より輪郭と口を除いた刺激。単一等価電流双極子モデルを用い、活動源を推定した。

活動源は後頭側頭部, MT/V5 野付近に推定された。頂点潜時及び推定位置に両条件で有意な差はなかったが、活動の大きさは、右半球では、CDL 条件の方が CDL, DL, D 条件よりも有意に大きかった。また左半球では、CDL 条件の方が DL, D 条件よりも有意に大きかった。

ヒトの MT/V5 野で「目の動き」に対する特異的な活動が起こり、その際、顔の輪郭とパーツの情報が重要な役割を担っている可能性が示唆された。(NeuroImage 35: 1624-1635, 2007)

Voluntary attention changes the speed of perceptual neural processing (知覚性神経処理の注意による加速効果)

野口泰基 (名古屋大学医学部保健学科), 田邊宏樹, 定藤規弘
寶珠山稔 (名古屋大学医学部保健学科), 柿木隆介

目の前のある空間に注意を向けているとき、その空間に出現した刺激への反応は、注意を向けていないときに比べて有意に速くなる。この注意による加速効果は反応時間を指標とする心理学の研究では古くから知られてきたが、脳の中の神経活動が注意による同様の効果を受けられるかどうかは未解明であった。本研究では時間分解能に優れた脳磁計(MEG)を用いてこの点を検討したところ、

①視覚刺激によって誘発された視覚性脳磁場反応の潜時は、その刺激に注意を払うことによって有意に短縮されること、②この潜時の短縮は、同時に得られた被験者の行動指標(反応時間)の短縮と有意な相関を示すこと、の2点が明らかになった。これらの結果は、注意に対する従来の心理学見解を神経科学的な面から証明したものである。(European Journal of Neuroscience, 25(10):3163-3172)

Spatial contexts can inhibit a mislocalization of visual stimuli during smooth pursuit (視空間的要因による眼球運動性位置ずれ現象の補正)

野口泰基 (名古屋大学医学部保健学科), 下條信輔 (カリフォルニア工科大学生物学科)
柿木隆介, 寶珠山稔 (名古屋大学医学部保健学科)

追従性眼球運動中に視覚刺激を瞬間提示すると、その刺激の位置は眼球運動を行っている方向にずれて知覚される (smooth-pursuit mislocalization)。従来は視覚刺激が脳内に到達するのにかかる時間的ラグがこの位置ずれ現象を生み出していると考えられてきたが(時間説)、我々の研究では当該視覚刺激がずれる方向にもう1つ別の視覚

刺激(障害物)を提示することで、この位置ずれが抑制されることを見出した。この結果は従来の時間説では説明できず、視覚刺激同士の位置関係という空間的な要因も、位置ずれ現象に関与していることを示している。

(Journal of Vision, 7(13):13.1-15)

Objective examination for two-point stimulation using a somatosensory oddball paradigm: an MEG study

赤塚康介, 柿木隆介

ヒトの体性感覚を研究していく上で有用な方法として二点識別閾測定法がある。この測定法の問題点として、被験者の内因的な要素に影響を非常に受けやすいという点がある。そこで、この問題を解決するために、オドボール課題を用いて誘発されるミスマッチ反応を用いて、自動的二点識別検出機構を解明することを目的として実験を行った。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ミスマッチ反応が

記録された。また、ミスマッチ反応は一次体性感覚野と二次体性感覚野に発生源が推定された。今回の研究により、二点識別に関して刺激に注意を向けない状態でも誘発される体性感覚ミスマッチ反応を測定することができた。この方法により、臨床の場において被験者の内因的な問題に結果の左右されることのない神経生理テストとして利用することが可能であると思われる。(Clinical Neurophysiology 2007; 118: 403-411)

The effect of stimulus probability on the somatosensory mismatch field

赤塚康介, 柿木隆介

聴覚刺激を用いたミスマッチ反応に関する研究は多いが、体性感覚刺激による研究は少なく、その詳細については明らかになっていない。そこで、本研究では体性感覚刺激を用いた逸脱刺激の刺激頻度がミスマッチ反応の大きさや潜時に影響を与えるか検討した。その結果、逸脱刺激の頻度が 10% のときにミスマッチ反応が記録された。発生源を推定したところ刺激対側一次体性感覚野、刺激対側二次体性感覚野に推定された。今回の研究では、逸脱刺激の刺激頻度が10% のときにはミスマッチ反応が

みられたが、20%, 30%のときにはミスマッチ反応はみられなかった。このことは、体性感覚刺激によるミスマッチ反応も聴覚刺激により誘発されるものと同様に逸脱刺激の刺激頻度により影響を受けるという特徴を持っていることを示唆するものであり、多くの研究が報告がされている聴覚刺激により誘発されるミスマッチ反応と同様の特徴を体性感覚ミスマッチも持っていることが判明した。(Experimental Brain Research. 2007; 181:607-614)

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。

平成 19 年度から、新たに佐野裕美研究員が加わり、手法が従来の神経生理学的・神経解剖学的方法から、新たに分子生物学的方法にも広がりつつある。

運動遂行中におけるマカクサル視床下核の活動様式の解明

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。大脳基底核を構成する核の一つである視床下核は大脳皮質からの興奮性入力を受け、淡蒼球内節および外節と黒質網様部に興奮性の出力を送る。この出力は線条体を経由する直接路よりも速く到達するためハイパー直接路と呼ばれる。また視床下核は淡蒼球外節からの抑制性入力(間接路)を受けており、大脳基底核の

出力核である淡蒼球内節および黒質網様部に時間的に差のある 2 種類の出力を送るとされている。このように、視床下核は大脳基底核の入力核でもあり、介在部でもある複雑な働きをしていると考えられる。われわれはサル視床下核ニューロンを大脳皮質運動野にある一次運動野近位領域および遠位領域、補足運動野上肢領域に対する刺激への応答様式から分類し、その後、そのニューロンの遅延期間付き 3 方向への上肢到達運動課題を実行中の

活動様式を記録した。今後は単一ニューロン記録と薬物の微量注入を併用し、視床下核ニューロンへの興奮性・抑制性入力ブロックした場合の運動課題実行中の活動

様式を観察し、興奮性・抑制性の入力があるどのように影響を与えていたか検討する予定である。

サル視床下核における大脳皮質運動領野からの投射様式

橘吉寿，岩室宏一，南部篤

大脳皮質運動領野から視床下核への投射様式を解明するために、マカクサルを用いて、視床下核ニューロンの一次運動野と補足運動野の電気刺激に対する応答性を調べた。大脳皮質運動領野から投射を受ける視床下核ニューロンの約30%は一次運動野と補足運動野の両方の電気刺激に対して応答し、約70%はどちらか一方に応答した。

また、一次運動野からの投射領域は視床下核背外側に、補足運動野からの投射領域は視床下核腹内側にあり、各領域内では後肢、前肢、口腔顔面の体部位再現を認めた。以上から、大脳皮質運動領野から視床下核への投射は、ある程度の機能および体部位局在を保ちつつ、運動に関する情報を統合処理している可能性が示唆された。

覚醒下モデルマウスからニューロン活動を記録して、ジストニアの病態を解明する

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、持続性または反復性の筋収縮により、体幹、四肢の異常運動を示す疾患である。適当なモデル動物が存在しなかったことから、正確な病態については明らかにされていない。本研究では、ジストニアの病態を解明することを目的として、ヒト全身性ジストニアの原因遺伝子(DYT1)を組み込むことによって作製したジストニアモデルマウスのニューロン活動を、覚醒条件下で記録した。大脳基底核の出力部である淡蒼球内節にお

いて、ニューロンの自発活動の著しい低下と、バーストや長い活動休止を伴う異常な活動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り、ジストニアにおける異常運動の出現に関与していることが示唆された。さらに実験を進めることにより、ジストニアの正確な病態を明らかにし、効果的な治療法を検索する事が出来ると期待される。

大脳皮質機能研究系

脳形態解析研究部門

【概要】

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

具体的な研究テーマとしては、1) グルタミン酸受容体および GABA 受容体と各種チャネル分子の脳における電子顕微鏡的局在を定量的に解析し、脳機能との関係を明らかにする。2) これらの分子の発達過程や記憶、学習の

基礎となる可塑的变化に伴う動きを可視化し、その制御メカニズムと機能的意義を探索。3) 脳の NMDA 受容体局在の左右差とその生理的意義を探索。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、それらの分子の基盤を明らかにする。5) 大脳基底核関連疾患の治療法の確立のため、神経幹細胞移植による細胞の分化、シナプス再構築や神経回路の再建に関する形態学および電気生理学の解析を行なう。5) 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のメカニズムを明らかにする。

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, Wajeeha Aziz, 足澤悦子, 深澤有吾, 重本隆一

ある種の運動の学習が行われる過程で小脳における、平行線維—プルキンエ細胞シナプスの長期抑圧現象が関与することが知られている。しかし、実際に学習した動物において、このシナプスに存在する AMPA 受容体数やシナプスの構造にどのような変化が起こるのかは知られていなかった。我々は、マウスの水平性視機性眼球運動をモデルとして一時間の学習で引き起こされる短期適応が、小脳片葉の平行線維—プルキンエ細胞シナプスにおける AMPA 受容体密度の減少を伴っていることを、凍結

切断レプリカ標識法によって明らかにした。また、5 日間連続の一日一時間の学習によって引き起こされる長期適応は、AMPA 受容体ではなく平行線維—プルキンエ細胞シナプス自体の減少を伴っていることを明らかにした。これらの結果は、脳内に短期的に刻まれる記憶の痕跡が、長期的に安定化されるに従って、構造的な変化へと変換されることを示している。さらにこの変換に関わる分子メカニズムを解明することを目指している。

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

脊椎動物の中樞神経系には、樹状突起スパインと呼ばれる突起状の構造にシナプスを形成する神経細胞が多く見られ、このスパインはアクチン細胞骨格に富む点で特徴的である。既にこのスパイン上に形成されるシナプスと、学習・記憶（神経可塑性）、或いは神経疾患との機能的関連性を示す知見が多く得られているが、その分子機構は明らかにされていない。そこで、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ように変化する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切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、どのよう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

脊椎動物の中樞神経系には、樹状突起スパインと呼ばれる突起状の構造にシナプスを形成する神経細胞が多く見られ、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。

海馬シナプスの左右差

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。さらにシナプス形態や他のグルタミン酸受容体の左右差を調べたところ、CA1 放射状層においては、右から入力を受けるシナプスが、左から入力を受けるシナプスに比べ、サイズが大きく mushroom type のスパインが多く、AMPA 型グルタミン酸受容体 GluR1 サブユニットの密度

が高いことを発見した。NR1, NR2A, GluR2 などその他のサブユニットは、これらのシナプスに同じ密度で分布しているが、サイズの違いから蛋白総量は右から入力を受けるシナプスの方で約 1.5 倍多くなっている。さらにこの非対称性の生理的意義を解明するために、左右の脳を分断したマウスで空間学習を調べたところ、右の海馬を用いた場合の方が、左の海馬を用いた時に比べ、学習能力が高いことが明らかになった。現在、これらの現象の因果関係を解明することを目指している。

Calyx of Held シナプス成熟過程における受容体配置の変化と機能

釜澤尚美, 松井広, 重本隆一

脳における情報処理が正常に機能するためには、シナプス伝達効率の最適化が必要である。聴覚系のシナプスでは特に、数百 Hz 以上の速度で送られてくる信号を正確に伝達する機能が必要である。ラットでは、生後 3 週間で聴覚系の機能が完成するが、それまでの間にシナプスの成熟が迅速に行なわれる。我々は calyx of Held (前蝸牛核神経終末端) と MNTB (台形体核) 主要神経細胞が形成する巨大シナプスの発達過程に着目し、このシナプスにおける受容体配置の最適化の過程に、どのような戦略が用いられているのかを調べることにした。Calyx of Held は杯状の形態を示し、MNTB 細胞体上にグルタミン酸作動性シナプスを形成する。このシナプスは、凍結割

断レプリカ像では、大きな細胞体とその周囲に密着した扁平な構造として観察されるため、受容体の 2 次元的配置を解析するのに適している。レプリカ標識法による AMPA 受容体・NMDA 受容体に対する標識は、主要細胞の細胞体 E-face 上に存在する膜内粒子 (IMP) のクラスターとその周辺に認められた。生後 1 週間ではグルタミン酸受容体のクラスターの IMP 密度は低く、抗 AMPA 単独、抗 NMDA 単独で標識されるクラスターと、両者に対する標識が混在するクラスターが観察された。生後 3 週間では IMP クラスターの凝集密度は上昇し、NMDA 受容体に対する標識はほとんど存在しなくなった。同様の发育段階のスライス標本で、MNTB 主要細胞から電気

生理学的記録を行ったところ、ひとつひとつのシナプス小胞の開口放出に対する応答 (mEPSC) が検出され、AMPA 受容体、NMDA 受容体それぞれに由来する成分が確認された。今後、シナプス前終末のアクティブゾーン部位の形態学的な同定も試み、これらの知見と電気生理学から得られる情報を対比させ、さらに、伝達物質拡散

の数理的シミュレーションも用いることで、発育にともなうシナプス後細胞の受容体配置の変化に加えて、前細胞のグルタミン酸放出部位とシナプス後細胞の受容体配置が空間的に制御される過程を明らかにすることを目指す。本研究を通して、聴覚系特有の高速なシナプス伝達を実現するための形態学的基盤を解明したい。

GABA_B 受容体とイオンチャネルの共存

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_A 受容体と G 蛋白共役型の GABA_B 受容体が存在する。我々は、免疫電子顕微鏡法を用いて小脳、視床、海馬における GABA_B 受容体の異なる局在を報告してきた。GABA_B 受容体は海馬錐体細胞の樹状突起においてカリウムチャネルと共役し、ゆっ

くりとした過分極をおこすことが知られていたが、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。さらに GABA_B 受容体と電位依存性カルシウムチャネルや mGluR 受容体とカリウムチャネルの共存について解明を目指す。

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

靱山俊彦

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、その広がり方によって、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。本部門では、皮質出力がどのように作られるという観点から、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。そのために、多様な皮質領域や皮質下構造に投射する前頭皮質を構成する錐体細胞・介在細胞のニューロンタイプを、分子発現・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。皮質振動現象におけるニューロンタイプの発火様式や、皮質外シナプス入力パターンの解析も併せて行うことで、大脳システムでの前頭皮質局所回路の機能的役割を理解したいと考えている。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、徐波におけるニューロン活動様式を定量的に解析している。

大脳皮質非錐体細胞への GABA 作働性、非 GABA 作働性シナプス入力

窪田芳之、畑田小百合、関川明生、川口泰雄

大脳皮質 GABA ニューロンであるパルブアルブミン細胞、カルレチニン細胞、ソマトスタチン細胞、サブスタンス P 受容体細胞上の GABA と非 GABA 作働性シナプス分布を調べた。化学的マーカーに対する抗体を用いてサブタイプを染色・超薄切片作製後、包埋後免疫組織化学で GABA 局在を同定し、電顕観察した。GABA シナプス密度はサブタイプによらずにほぼ一定である上に、細胞体・樹状突起上の部位にもあまり依存しなかった。一

方、非 GABA シナプス（おそらく大半は興奮性シナプス入力）の分布密度はサブタイプにより大きく異なっていた。非 GABA シナプス密度は、高い方から、パルブアルブミン、サブスタンス P 受容体、ソマトスタチン、カルレチニン細胞の順であった。カルレチニン細胞では GABA 終末と非 GABA 終末の分布密度はほぼ同じ位になっていた。皮質 GABA ニューロンへの興奮性入力はサブタイプごとに分化していると考えられる。

大脳皮質における興奮性結合の特異性

大塚岳、川口泰雄

前頭皮質 5 層錐体細胞は電気生理的・形態的に多様であり、発火特性からは 3 種類に分類できる。我々は、発火特性を同定した 2 個の 5 層錐体細胞から同時記録し、

2/3 層錐体細胞をグルタミン酸投与で発火させ、同一 2/3 層細胞から共通入力を受ける確率が 5 層錐体細胞発火サブタイプの組み合わせやサブタイプ間のシナプス結合に

影響されるのかを検討した。その結果、5 層細胞が同一 2/3 層細胞から共通入力を受ける確率は、同じサブタイプペアの方が異なるサブタイプペアより高かった。さらに、同じ 5 層サブタイプペアでは、シナプス結合があるものが無いものより共通入力確率が高くなった。

一方、異なるサブタイプペアが共通入力を受ける確率は 5 層間結合の有無に影響されなかった。以上の結果は、2/3 層から 5 層への興奮結合が 5 層錐体細胞サブタイプやその結合に依存したサブネットワークを形成することを示唆する。

前頭皮質 5 層錐体細胞と抑制性細胞の結合特性

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) には固有の結合選択性があることを明らかにした。今年度は、FS 細胞から二種類の錐体細胞への抑制性シナプス電流を解析した。トランスジェニック蛍光標識した GABA 細胞からホールセル記録を行い、通電発火様式から FS 細胞を同定した。CPn, CCS 細胞は投射先からの蛍光逆行性標識で同定した。FS 細胞からの抑制性電流の平均振幅、潜時、

立ち上がり時間、減衰時間は二種類の錐体細胞サブタイプ間で差は見られなかった。FS 細胞が錐体細胞に抑制性電流を起こす確率は、錐体細胞間興奮結合より高く、約 25% であった。FS 細胞に興奮性出力を送る錐体細胞では、標的 FS 細胞から抑制を受ける確率が興奮結合のないものに比べて高かった。FS 細胞から CCS 細胞への抑制性シナプス強度は、その CCS/FS 間の反回興奮結合の有無に依存していた。

抑制性ニューロンを選択的蛍光標識したラットによる大脳皮質 GABA 作働系の解析

平井康治, 川口泰雄, 柳川右千夫 (群馬大学)

大脳皮質 GABA 細胞が選択的に蛍光標識され、それらを錐体細胞から容易に区別できるラットを用いて脳切片標本で GABA 細胞から記録し、特異的発現分子が知られていないニューログリアフォーム細胞の解析を行った。ニューログリアフォーム細胞の特有な発火様式を確認した上で、化学的マーカーを検索した。その結果、これらがアクチン結合蛋白質であるアルファ-アクチニン-2 を選択的に発現することがわかった。そこで、GABA 細胞

蛍光標識の利点を生かして、パルプアルブミン、ソマトスタチン、VIP、コレシストキニン、カルレチニン、アルファ-アクチニン-2 という、GABA 細胞の細胞体に発現する 6 種類のペプチド・蛋白質の発現様式を定量的に調べた。GABA 細胞の中での各物質の発現割合をみると、1 層、2/3 層、5 層では 9 割以上、6 層では 9 割近くの GABA 細胞が 6 つのマーカーの内、少なくとも一つを持っていることがわかった。

アセチルコリン作用からみた大脳新皮質の層構造と海馬領域の相同性

Allan T. Gulledge, 川口泰雄

新皮質の 5 層錐体細胞は一過性のアセチルコリン投与に対して著明に過分極するのに対して、2・3 層錐体細胞ではそれはみられなかった。アセチルコリンを海馬錐体細胞に一過性に与えると CA3 領域では過分極が見られ

なかったが、CA1 領域ではムスカリン受容体、細胞内カルシウム上昇を介した SK チャネルによる過分極が起きた。新皮質では 2・3 層から 5 層錐体細胞への結合が主要な興奮性経路の一つなのに対して、海馬では CA3 から

CA1 錐体細胞へのシナプスが主な興奮経路であり、皮質外投射はそれぞれ 5 層と CA1 錐体細胞が担っている。従って、アセチルコリンは層構造下位の興奮性細胞の発火を一過性に抑制し、皮質外への出力を遮断する可能性がある。

ある。アセチルコリン作用・皮質内経路・皮質外投射様式を合わせて考えると、新皮質 2・3 層錐体細胞は CA3 錐体細胞に、5 層のものは CA1 のものに対応すると考えられる。

心理生理学研究部門

【概要】

認知、記憶、思考、行動、情動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ジング（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。最近では、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。

個人的に親近な場所と有名な場所の脳内表象

杉浦 元亮，間野 陽子，佐々木 章宏，定藤 規弘

メディアで目にするような有名な場所と、日常生活を送る個人的に親近な場所とでは、心的表象は異なると考えられる。前者は主に典型的な写真や意味の情報で表象されているのに対し、後者では実際にそこで経験した自伝的出来事との関係が深いと考えられる。この心的表象の違いの神経基盤を明らかにするために fMRI 実験を行った。25 名の健康被験者に個人的に親近な場所、有名な場所、未知の場所の風景写真を 2 回ずつ提示し、場所の既知未知判断中の脳活動を測定した。個人的に親近な場所の認知と有名な場所の認知との際に、未知の場所を見ているときに比べて統計的に有意に脳活動が上昇する領域を明らかにした。また個人的に親近な場所の認知時に有名な場所の認知時に比べて有意に活動が高い領域も明らかにした。さらに個人的に親近な場所の認知と有名な場所の認知それぞれについて 1 回目の提示時に比べて 2 回目の提示時に脳活動低下（adaptation：その領域がその場

所に選択的な情報をコードしているかどうかの指標）が見られる領域も調べた。有名な場所の認知の際には主に左半球外側に賦活し、個人的に親近な場所の認知の際には両側大脳半球内外側広範に賦活が見られた。2 条件を直接比較すると、有名な場所の認知の際には右側頭頭頂接合部及び頭頂葉内側に有意な活動両の差が見られた。一方 adaptation は有名な場所の認知の際には主に左角回に、個人的に親近な場所の認知の際には右側頭葉内側に見られた。以上の結果から 1) 個人的に親近な場所と有名な場所とでは脳メカニズム的にも異なる形で表象されていること、2) 個人的に親近な場所の表象は右側頭頭頂接合部及び頭頂葉内側の関与で特徴付けられること、3) 場所の既知未知判断に必要な、場所選択的な情報のコードは、有名な場所については左角回で、個人的に親近な場所については右側頭葉内側で、行われていることが示唆された。

ベンハムコマを用いた主観的色知覚の脳内表現の解析

田邊 宏樹, 森戸 勇介, 酒井 朋子, 定藤 規弘

「ベンハムコマ」と呼ばれる錯視を用いて、主観色の知覚に関する脳内処理機構を検討した。ベンハムコマによる主観色の生起については多くの心理実験がなされ末梢レベルの関与が主観色生起の主要因と考えられてきたが、最近の研究では中枢レベルの関与も示唆されている。本研究では、機能的MRIを用いて、ベンハムコマによる主観色知覚時の大脳皮質視覚野の関与を、神経活動マッピングと活動領域間の有効結合 (effective connectivity) 解析により行った。実験はコマの回転速度と主観的な色の見えに関する実験（速度ベンハム実験）と物理色と主観色との比較に関する実験（色ベンハム実験）である。速

度ベンハム実験では回転速度を上げていくと主観色が生じ、それらに対応して腹側視覚野の活動が強くなることが観察された。一方色ベンハム実験では主観色条件では物理色条件に比べて有意な脳活動の差は見られなかった。有効結合解析の結果、速度ベンハム実験においては V1 と V4 の有効結合が色が見える条件で有意に高まり、色ベンハム実験においては V4 から V1 への修飾効果が物理色に比べ主観色条件の方が大きかった。このことからベンハムコマにより主観色知覚が生じる際には V1 と V4 の有効結合が重要であり、V4 から V1 へのフィードバック信号が大きく関与する可能性が示された。

対連合学習過程の脳内機構の解析

田邊 宏樹, 定藤 規弘

我々はこれまでに、連合学習を成立させる神経基盤について検討するため、遅延型対連合学習(PA)課題を遂行中の脳活動を機能的MRIにより計測し、上側頭溝前部活動が学習の初期に活動が高く学習が進むにつれて減衰すること、作業記憶の component を示す遅延期間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)の活動がみられること、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 のみであることを明らかにした。本年度はこの学習過程のモデルとしてレスコーラ・ワグナーモデルを改変したモデルを作成し、シミュレーションを行った。実データとシミュレーションの比較をすることにより各活動領域の役割についてさらに詳しく検討を行った。

ヒト線条体における社会的・金銭的報酬の処理

出馬圭世, 齋藤大輔, 定藤規弘

自分が他者からどう見られているか(評判: reputation)は我々の普段の行動に多くの影響を持つ。他者からの「自分に対する良い評判」は、食事をおごる、同僚の仕事を手伝う、寄付をする、などの向社会的行動のインセンティブの一つであると考えられている。そこで、本研究では、「自分に対する他者からの良い評判は、金銭報酬と同様に脳の報酬系を賦活させる」という仮説を検討した。機能的核磁気共鳴装置(fMRI)内で、自分に対する良

い評判と金銭報酬を知覚させると、報酬系として知られる線条体の賦活が共通して見られた。これは、他者からの良い評判は、報酬としての価値を持ち、脳内において金銭報酬と同じように処理されていることを示している。この結果は、様々な異なる種類の報酬を比較し、意思決定をする際に必要である「脳内の共通の通貨」の存在を強く支持しており、複雑なヒトの社会的行動の神経科学的理解への重要な最初の一歩である。

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

物語を理解することは、時間、空間、因果関係、主人公の心的状態といった複数の次元を持った心的表象を、たえず更新することであると考えられる。この動的な心的表象は、状況モデルと呼ばれる。

感情情報を含んだ物語を読むことで生成される状況モデルは、メンタライジングの神経基盤によって表象されるという仮説を確かめるために、fMRI を用いて検討を行った。23 人の健康被験者が、3 種類の異なった感情価を持つ状況説明文章と、先行する文章と一貫した同一のタ

ーゲット文から構成される文章を読んだ。つまり、ターゲット文を読むことによって状況モデルの更新を促す課題を用いた。ターゲット文に関連した脳活動は、メンタライジングネットワークの一部である背内側前頭前野と側頭極に加え、感情の評価に関連する外側前頭眼窩皮質において、ネガティブな感情価を持った状況の文脈を与えた場合に相関した。したがって、状況モデルの感情の次元は、感情評価の神経基盤とメンタライジングネットワークによって表象されていることが明らかになった。

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, 杉浦元亮, 齋藤大輔, 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、主人公の感情を付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付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。

両手協調運動の非対称性・effective connectivity 解析の適用：fMRI 研究

牧 陽子, Kevin Wong (統計数理学研究所), 尾崎統 (統計数理学研究所)
杉浦 元亮, 定藤 規弘

両手協調運動の運動形態による安定性の相違の神経基盤を調べる目的で fMRI 実験を行い、多変量自己相関解析(Akaike causality model) の fMRI 時系列データへの適用により、賦活部位間の関連性 (effective connectivity) を解析した。Akaike causality model では、状態の予測・遷移はノイズ (外部入力分散) によって駆動される確率的なものとして想定している。そこで、時系列相互間のノイズ寄与度 (the noise contribution ratio (NCR)) を賦活部位間

の関連性の変数とした。

対称運動時には、優位側運動領域から非優位側運動領域への寄与度は逆方向に比べて大きくなることから、非優位側の運動は優位側に依存して生成されることが示唆された。他方、非対称運動時には双方の寄与度に差が見られないことから、両側運動生成に依存関係は無く、独立して運動が行われることが示唆された。この研究により、先行研究で明らかにされていた皮質下経路に加えて、

皮質における半球間相互作用が両手運動の安定性に関連していることが示された。

予告効果の神経基盤

谷中 久和, 齋藤 大輔, 定藤 規弘

研課題を行う際、ターゲットを提示する直前に予告刺激を提示すると、行動成績が向上することが知られている（予告効果, warning effect）。行動・電気生理・イメージングの先行研究から、予告効果は注意の警戒状態を引き起こし、運動処理を増進することが明らかにされてきた。しかし、これまでのイメージング研究では警戒状態と運動処理の増進に関連する領域は分けられていない。そこで、機能的 MRI を用いて、予告刺激関連領域は警戒状態そのものに関連した領域と増進される運動関連領域

に分けられるのではないかと考え、予告刺激付の Go/NoGo 課題を用いて検討した。この結果、網様体を含む中脳が予告刺激に特異的に活動し、前帯状皮質、補足運動前野、視床、大脳基底核、島が予告刺激と運動実行の両方に関連して活動することが分かった。これら結果から、予告刺激は警戒状態そのものに関与した中脳網様体を通じて運動関連領域を活動させていることが示唆された。

聴覚－触覚の時間弁別に関与する神経基盤：機能的 MRI 研究

村瀬未花, Vanessa Krause (Heinrich Heine University of Duesseldorf, Germany)

河内山隆紀 (国際電気通信基技術研究所), 林 正道, 田辺 宏樹, 定藤 規弘

異なる感覚信号の同時性を認識することは、環境の一貫した知覚表象をつくるために重要である。本研究では、同時性を意識的に認識する際の多感覚領域の機能的役割を解明することを目的とし、この領域での不応期が同時性の知覚表象をコード化すると仮説を立て、機能的 MRI 研究を行った。MRI 実験前に各被験者の同時性/非同時性の閾値を測定し、刺激間隔を被験者が同時であると感じられる間隔（閾値下）と、2つの刺激が非同時であると感じられる間隔（閾値上）に分類した。実験には同時性判別課題を用い、機能的 MRI 実験中被験者は、刺激を同

時と感じたか、非同時と感じたかをボタン押しによって報告した。

同時性/非同時性の閾値は、聴覚刺激が先行する課題で 59 ± 22 ms、触覚刺激が先行する課題で 74 ± 19 ms であった。左下前頭回と後頭頂間溝は、閾値下のとき閾値上に比べ統計的に有意な活動抑制を示した。これらの領域は聴覚刺激と触覚刺激が個々に提示された時にも活動する多感覚領域である。これらの結果は、多感覚領域である左下前頭回と後頭頂間溝が、異種感覚刺激（聴覚－触覚）の同時性の判断に重要な役割を担うことを示唆する。

注意が単語の無意識的処理過程に与える影響とその脳内機序

松本 敦

ヒトは様々な情報を意識的にだけでなく無意識的にも処理している。長い間、この無意識的な処理は注意などの意識的な処理とは独立に存在するという仮説が支持さ

れてきた。そこで、実際に単語の無意識的な処理に対して注意が影響をあたえるのかどうかを fMRI を用いて検討した。単語が短時間呈示され、被験者はその単語の呈

示に気付かず、意識的には同定されなかった。にもかかわらず、左半球の紡錘状回や、上側頭回などの単語の処理に関わるといわれている領域に活動がみられた。このことは単語が無意識的に処理されたことを示している。さらに、このような単語に対する無意識的な処理は、注意を喚起して、単語の呈示に注意を向けさせている時にもみ観察された。つまり、単語の無意識的な処理が注意

の影響を受けない、という従来の説をくつがえしたことになる。また領域間の情報の連絡を調べた結果、注意を喚起することによって賦活した左半球の頭頂葉や前頭葉が上側頭回などの無意識的な処理をコントロールしていることが明らかになった。今後は注意だけではなく他の意識的な処理が無意識的な処理に与える影響を検討していく予定である。

覚醒度の低下に伴う閉眼パターンの変化と脳活動

市川 奈穂, 脇田敏裕 (豊田中央研究所), 定藤 規弘

本研究では、覚醒度の低下(眠気)に伴う行動(課題パフォーマンス)、末梢特徴(閉眼特性)、脳活動(fMRI)の相関関係をモデル化することを目的として実験を行った。実験参加者(20~30代の男女20名)は、教示・練習の後、fMRIの中で単調な課題(Go/NoGo課題)を1時間半程度行い、脳機能画像の撮像と共に、アイ・カメラで眼の変化を記録した。行動及び末梢指標の結果として、一瞬目あたりの閉眼時間(WCET: Weighted Closed Eye Time)の延長と、反応時間の遅延との間に相関が見られる

ことが示された。このような閉眼時間の延長傾向に関連する脳領域として、視床の賦活が高まるほど閉眼時間が短くなる、という負の相関が観測された。本研究では、覚醒度変化を反映し、外から観測し得る末梢指標である閉眼指標(WCET)が課題パフォーマンスの低下、および、上行性網様体システムの中間部にある視床の賦活と関連することを示した。また、今後予定されている、行動、閉眼特性、脳内メカニズムの高精度なモデル化に向けて、基盤となる研究成果を示した。

発達生理学研究系

認知行動発達機構研究部門

【概要】

2007 年度は新たに梅田達也君が博士研究員として参加。一方で脊髄損傷プロジェクトを中心になって担ってきた CREST 研究員の西村幸男君が 7 月より米国ワシントン大学に留学した。CREST のプロジェクトは 3 年目、HFSP も 3 年目を迎え、成果が多く得られるようになってきた。5 月には米国フロリダで開催された Vision Science Society の年会で HFSP 共同研究チームでシンポジウムを主催するとともに米国、オランダ、カナダの研究チームと合宿を行い、共同研究の進捗状況を報告しあうとともに今後の研究計画を議論した。翌 2008 年 1 月には今度は、我々がホストとなって沖縄でミニシンポジウムを開催するとともに合宿を行った。HFSP の共同研究では、カナダ国クイーンズ大学の Munoz 教授と大学院

生の Marino 氏が一定期間滞在して上丘のスライス標本での実験を行うとともに南カリフォルニア大学の Itti 博士とも片側一次視覚野損傷サルの注意に関する共同研究を行っている。また CREST でのプロジェクトでは、サルの脊髄損傷からの回復過程での大脳皮質の様々な部位の活動変化とその機能回復への寄与を解析した研究を 2007 年 11 月に Science 誌に発表することができた。一方で米国 Duke 大学の Hall 教授との上丘局所神経回路において中間層から浅層への抑制性投射を解析した論文を米国科学アカデミー紀要に発表することができた。その他、様々な研究の成果が順次発表できる体制になってきたと感じている。

随意運動の制御における脊髄反射回路の役割 — 随意運動中の活動様式と末梢感覚入力との関連性 —

関 和彦, 武井智彦

我々は、覚醒サルにおいて脊髄反射回路に関わるニューロンを同定する方法を確立し、随意運動中に同定されたニューロンの活動を記録することによって、随意運動の制御における脊髄反射回路の役割を明らかにしようとしている。本年度は脊髄ニューロンの上腕末梢求心神経への電気刺激によって得られる同定パターンと随意運動中の活動様式との関連性について検討した。実験にはニホンザル 2 頭を用いた。遅延時間付き手首屈曲進展運動を行わせている間のニューロン活動を下位頸髄より記録した。ニューロンの同定は、サルの筋求心神経（橈骨神経深枝 DR）、皮膚求心神経（橈骨神経深枝 SR）、混合神経（正中神経 M）に慢性的に装着したカフ電極へ与えた

電気刺激に対する反応を用いて行った。そして、各神経への電気刺激に対して応答のあったニューロン ($n=174$) のうち単シナプス性の潜時で応答を示したニューロン ($n=70$) を解析対象にした。その結果、大部分のニューロン ($DR=82\%$, $M=72\%$, $SR=100\%$) において手首運動に応じた発火頻度の変化が認められた。またそれらの活動性の変化パターンはそれぞれの求心神経の受容器の位置（手掌部か、手背部か）に有意に関連していた。この結果は、手首運動によって引き起こされる皮膚・筋受容器からのフィードバック（re-afference）が脊髄ニューロンをドライブしている可能性を示していた。

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) 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。(4) 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。(5) 強制選択型の視覚誘導性眼球運動課題での急速眼球運動の軌道を解析し、正常視野への急速眼球運動と比べて、軌道が真っ直ぐになっていることを見出した。また、急速眼球運動の反応潜時の分布が正常視野と比べて変わっていることを見出した。これらのことは、第一次視覚野損傷が、視覚のみならず、急速眼球運動のコントロールおよび意思決定の過程へ影響を及ぼすことを示唆している。

マウス上丘局所 GABA 作動性ニューロンによる wide-field vertical cell の活動制御機構

金田勝幸, 伊佐正

上丘浅層の wide-field vertical (WVF) cell はその樹状突起を浅層内で広範に投射し、動く物体の認知に関わっている。この細胞の活動制御における局所 GABA 作動性ニューロンの役割をマウスの上丘スライス標本を用いてホールセル記録により検討した。その結果、(1) WVF cell は局所 GABA 作動性ニューロンから feedforward 抑制を受けていること、(2) この抑制により視神経の連続刺激によってもバースト発火は誘発されないこと、(3) 抑制

性入力とは遠位よりも近位の樹状突起に強く入力している傾向があること、(4) ひとつの細胞の抑制性入力を細胞内からブロックすると、視神経の連続刺激によってバースト発火が誘発されること、が明らかになった。以上の結果は、局所 GABA 作動性ニューロンが WVF cell の発火パターンを決定する上で重要な役割を果たしていることを示唆している。

幼若時片側除皮質ラットにおける皮質脊髓路の大規模変化

梅田達也, 伊佐正

幼若時片側除皮質ラットでは、成熟時において対側上肢の運動機能に異常が少ない。その代償機構の神経メカニズムの解明のため、解剖学的・電気生理学的手法を用いて、幼若時片側除皮質ラットにおける下行性神経回路を調べた。損傷皮質と対側の運動野に順行性トレーサー BDA を導入した結果、導入領域と対側の上丘・赤核・橋核、同側の後索核・脊髓灰白質といった通常の投射領域

とは反対側の領域にも軸索投射が確認された。更に、錐体を電気刺激した結果、両側の運動ニューロンから多シナプス性の活動が惹起された。同側運動ニューロンへのシグナルは脊髓介在ニューロンを介する経路と網様脊髓ニューロンを介する経路によって伝わっていた。以上の結果は、幼若時片側除皮質後、上肢運動を制御する代償的な神経回路が広範囲で形成されることを示唆する。

ボトムアップ性視覚注意における一次視覚野の機能

池田琢朗, 吉田正俊, 伊佐正

視覚刺激の提示後に当該位置への反応が速くなる現象 (attention capture: 注意補足) と, 逆に反応が遅くなる現象 (Inhibition of return: 復帰抑制) が知られている。こうしたボトムアップ性視覚注意の神経基盤を調べるために, 片側の一次視覚野を除去したニホンザルを用いた行動実験を行ったところ, 一次視覚野の除去に伴い復帰抑制は

消失するものの注意補足は残存することを発見した。この結果は, 一次視覚野は復帰抑制において重要である一方で, 注意補足においては必ずしも不可欠ではないことを意味しており, 一次視覚野を介した皮質系視覚経路と上丘を中心とした皮質下の視覚経路の間に機能的な差異があ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

我々は, 把握運動の制御における脊髄神経機構の役割を解明するために, ニホンザルを対象とした電気生理学の実験を行っている。当該年度は脊髄で記録されるフィールド電位に着目し, 把握運動中の脊髄神経活動 (Local field potential: LFP) と上肢筋活動 (EMG) 間の相関関係 (コヒーレンス) を検討した。

2 頭のニホンザルに対して示指と拇指でレバーを摘む課題を訓練し, さらに外科的手技により脊髄 LFP を記録するためのチャンバー及び EMG 記録用のワイヤー電極を装着した。サルがレバーを静的に保持している期間を対象として信号間のコヒーレンスを調べたところ, 164 組の LFP-EMG ペアのうち 34 組 (21%) において有意なコヒーレンスが認められた。さらにこれらのコヒーレンスの周波数帯域を調べると, ①14-55Hz に限局したコヒーレンス (narrowband coherence: NB) と②5-100Hz にわたるコヒーレンス (broadband coherence: BB) の 2 群が存

在することが明らかとなった。

各群の課題中の時間的変化を調べた結果, BB 群はサルがレバーを動的に摘んでいる期間及び静的に保持している期間で認められるのに対して, NB 群は動的な運動時に限局して現れることが明らかとなった。また信号間の時間関係を調べたところ, BB 群では脊髄 LFP が EMG に先行していた (平均 7.1ms) のに対して, NB 群は多くのペアにおいて EMG が LFP に先行した (平均 13.3ms)。さらに, 脊髄内での解剖学的分布を比較したところ, NB 群は背側から腹側の広い部位で認められたのに対して, BB 群は腹側部に限局して認められた。

これらの結果から, NB 群は動的な運動時に生じる感覚フィードバックが脊髄の広範な神経機構へと入力されていることを示していると考えられた。一方, BB 群は脊髄運動ニューロンプールから支配筋活動へ神経活動が伝播していることを反映していると推察された。

The lateral interaction in the superficial of the mouse superior colliculus slice

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))

Lateral connections within the superior colliculus (SC) have been proposed to mediate temporal and spatial competition among multiple visual stimuli. Many models commonly assume that the strength of the local neuronal connections depends on the distance between neurons. To test these models, we measured the excitatory and inhibitory responses of SGS cells in the horizontal slices, comprised of stratum griseum superficiale (SGS) and stratum opticum (SO), and preserving the local architecture of the topographical map. We used the 8x8 planar array electrodes to stimulate the

various locations in the SO and recorded postsynaptic responses from the cell in the SGS by whole-cell patch-clamp recording. We found short-range excitation surrounded by long-range inhibition in the local circuits of the SGS layer. When excitatory and inhibitory interactions were separated and compared with voltage-clamp recordings at different holding potentials, inhibition exhibited a delayed onset and longer duration than the excitation. We conclude that local lateral interactions in the SGS layer play a key role in the competition of visual input in the SC local circuit.

一次運動野の機能脱失にともなう鏡像運動の生成機構

坪井史治, 斎藤紀美香, 伊佐 正

西村幸男 (ワシントン大学, 生物物理)

中枢神経系に損傷を負った際に、鏡像運動が出現することがある。本研究では、この鏡像運動の生成機構を明らかにするために、サル一次運動野 (M1) に GABA_A 受容体のアゴニストであるムシモルの微量注入 (0.5-3 μ l) し、一時的な機能脱失モデルを作成して鏡像運動を起こさせ、その生成に関与する中枢機序を調べた。

2 頭のサルを対象に、右手固定状態で左手の把持運動を行わせ、左右上肢筋の EMG 活動とビデオ撮影によって動作を記録した。右の M1 指領域へムシモルを注入し

た結果、左手で把持動作を行おうとすると手指の運動障害がみられるとともに右手に鏡像運動が出現し、左右同名筋間で鏡像的な EMG 活動も観察された。そこで次に、左の M1 指領域へムシモルを注入したところ、この右手の鏡像運動及び鏡像的な EMG 活動は消失した。以上の結果より、M1 の機能脱失後に出現する鏡像運動の生成には鏡像運動肢と反対側の M1 が関与していることが示唆された。

片側一次視覚野切除サルの上丘における単一細胞活動記録

高浦 加奈, 吉田 正俊, 伊佐 正

当研究室では健在までに、盲視のモデル動物である片側一次視覚野切除サルを用いて損傷視野内での視覚運動

変換応力について各種サッケード課題での検討を行ってきており、これらのサルが視覚誘導性サッケード課題だ

けでなく記憶誘導性サッケード課題をも遂行可能であることを明らかにしてきた。

本研究ではこれらの損傷視野内での視覚運動変換能力の神経基盤を検討するために、課題遂行時の上丘中間層での単一細胞活動記録を行っている。現在までに損傷側

上丘が健常側上丘と同様に視覚応答・運動性発火活動を示すだけでなく、さらに視覚誘導性サッケード課題の記憶保持期間に強い持続性発火活動を示すことなどが確認されている。

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) 神経回路の可塑的变化を生体で観察するため、フェムト秒パルス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やシナプスの可視化技術の確立および技術向上をお

こなった。その結果、マウス大脳皮質全層における神経細胞・グリア細胞およびその微細構造を可視化することが可能となった。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9月に北村明彦 JST 研究員が味の素中央研究所に転出した。本年度4月に江藤圭氏が特別共同利用研究員として九州大学から、また10月から平尾顕三氏が総研大3年生（後期入学）として研究に参加した。オーストラリアサウスウェールズ大学 Andrew Moorhouse 氏が外国人客員教授として伝達物質のスイッチングの研究に、またブルガリアアカデミー神経生物学研究所から Jana Chekalarova が学術振興機構短期招聘研究員として脳障害の回路再編機構の研究に参画した。

神経伝達物質のスイッチング

石橋仁，西巻拓也，山口純弥，鍋倉淳一

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、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 GABA_B 受容体遺伝子改変動物を用いて検討している。また、GABA からグリシンへスイッチするメカニズムについても検討を神経終末内 GABA およびグリシン濃度の変化の観点から開始した。

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

渡部美穂, 石橋仁, 平尾顕三, 北村明彦, 和氣弘明, 鍋倉淳一

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、障害により、KCC2 の脱リン酸化と内在化、その後の蛋白発現の消失により GABA 作用は短時間で脱分極さへスイッチすることが判明した。細胞内制御分子の探索を行なっている。

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

高鶴祐介, 吉友美樹

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開発し、その精度の向上を行っている。具体的には、ローズベンガル色素を静脈注入後、任意の脳血管にクリプトンレーザーを

極短時間照射し、血栓形成による閉塞を作成する。任意の時間後に高エネルギーパルスレーザーである YAG レーザーを照射し、血管の再開通を起こさせる。この技術はマウスでは頭蓋骨を駆けることなく、非観血的に閉塞・再還流が可能であり、脳虚血・障害の分野では画期的技術となる。

In Vivo 多光子顕微鏡を用いた大脳皮質神経細胞の微細構造の可視化技術の確立と 神経細胞・グリアの生体内動態の観察

和氣弘明, 高鶴裕介, 稲田浩之, 江藤圭, 鍋倉淳一

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、大脳皮質微細構造の可視化している。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を行い、大脳皮質錐体細胞を全層にわ

たり、樹状突起、棘突起、軸索などのその微細構造を観察することが可能となった。また、未熟期動物におけるイメージングを行うため、未熟マウス頭蓋骨に装着する観察システムを開発し、出生直後のマウスの大脳皮質イメージングを行うことが可能となった。これらを用いて 1) ミクログリアとシナプス構造の監視機構、2) 新生マウスにおける大脳皮質 GABA ニューロンの細胞移動、3) 虚血動物におけるシナプスリモデリングを中心に観察を行っている。さらに、生体 2 光子励起観察法を用いて 5 件の共同研究を行った。

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。本年度実施した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) エネルギー代謝に及ぼす Dmbx-1 の調節作用の解明。

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、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。今回、視床下部 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、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。さらにその作用発現には神経

細胞での脂肪酸代謝が関わることを見出した。さらに我々は、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 キナーゼを活性化することを見出した。また、脂肪細胞で産生されるアディポネクチンが、末梢組織だけでなく、視床下部に作用して AMP キナーゼを活性化し、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、戸田 知得、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いる。今回我々は、

レプチンによるグルコースの取り込み促進作用に視床下部のメラノコルチン受容体が必須であることを明らかにした。

さらに、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・オレキシンが、骨格筋でのグルコースの利用を選択的に促進することを見いだした。そして、この作用が骨格筋を支配する交感神経- β 2アドレナリン受容体の働きによることを、各末梢組織のノルエピネフリン代謝回転速度の測定、 β 受容体ノックアウトマウスを用いた実験によって明らかにした。 β 受容体ノッ

クアウトマウスの骨格筋に β 2 アドレナリン受容体を発現させると、その組織においてのみオレキシンによるグルコースの取り込み促進作用が回復した。

さらに我々は、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。また、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明らかにした。その抑制作用に、転写因子であるFoxo1が関わることも見出した。

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作用機構を調べた。レプチンによってAMPキナーゼが活性化し、活性化したAMPキナーゼがacetyl-CoA carboxylase (ACC) をリン酸化してその活性を抑制すること、その結果、ACCの産物であるmalonyl-CoA量を低下して、malonyl-CoAによるミトコンドリア酵素CPT1への抑制作用を解除、ミトコンドリアでの脂肪酸酸化を促進することを明らかにした。さらに、活性化したAMPキナーゼが核内に移行して、脂肪酸酸化関連遺伝子の発現に関わる転写調節因子

PPAR α の発現を促進することを見出した。また、AMPキナーゼが活性化した後、細胞質に残るのか核内に移行するかを、AMPキナーゼ・ β サブユニットのアイソフォームが決定することを見出した。すなわち、 β 1を持つAMPKは、ミトコンドリア膜に結合することによってACCをリン酸化し、ミトコンドリアでの脂肪酸酸化を直接促進する。これに対して、 β 2を持つAMPKは、膜に結合することなく、活性化すると核に移行して遺伝子発現を促進することを明らかにした。

エネルギー代謝に及ぼすDmbx-1調節作用の解明

三木 隆司 (神戸大学大学院医学研究科)

箕越 靖彦, 志内 哲也

Dmbx-1は、発生期の脳において一過性に発現するホメオドメイン型転写因子であり、その遺伝子欠損(KO)マウスが著明なやせと酸素消費の亢進を認めることから、KOマウスでは脳におけるエネルギー代謝制御機構に異常を来していると考えられる。そこで、KOマウスの脳室内に様々な摂食調節神経ペプチドを投与し、各摂食調節系がKOマウスにおいてどのように変化しているかを調べた。その結果、このマウスは、摂食促進ペプチドであるAgRPの摂食促進作用が選択的に失われていることを見出した。さらに、野生型マウスとKOマウスにAgRPを

脳室内投与し、脳内各部位におけるnorepinephrineとdopamineの代謝回転を測定したところ、野生型マウスで認められるAgRP投与後の視床下部でのdopamineの代謝回転亢進作用が、KOマウスでは全く変化しないことを発見した。このことからDmbx1は、AgRPによる摂食促進作用のみならず、dopamine代謝回転の亢進作用にも関与することが明らかとなった。Dopamineは、報酬系と密接に関連していることが知られているので、KOマウスの著明な「やせ」と拒食にdopamineニューロンの異常が関与している可能性がある。

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 19 年度は共同利用実験計画が 26 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 19 年度は最終的に 13 課題が採択され、実施された。このうち 5 件は、国外の研究者による研究あるいは国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、コロラド大で開発された IMOD プログラムでの方法など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 126 日、修理調整等 59 日である（技術課脳機能計測センター形態情報解析室報告参照）。電顕フィルム等使用枚数は 6,729 枚、フィラメン点灯時間は 426 時間であった。平成 19 年度は、装置は 68% の稼働率で利用され、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間のギャップ結合

古家園子，古家喜四夫（JST，細胞力覚プロジェクト）

小腸絨毛上皮下線維芽細胞は消化管上皮の基底膜の下で細胞網を形成し、lamina propria を包んでいる特殊な線維芽細胞であり、血管や神経終末、絨毛の平滑筋とも隣接しており、絨毛におけるシグナル伝達の要の役割をはたしていると考えられる。絨毛の下部 1/3 では細胞の形は幅広い細胞突起を保つフラットな形態であるが、上

部 2/3 では細胞は星状の形態に変化している。細胞間はギャップ結合でつながっており、星形でもフラットな形態でも、ギャップ結合の透過性に有意の差はみとめられない。絨毛上皮下線維芽細胞間のギャップ結合の開閉や透過性の制御機構を FRAP 法で検討している。

超高圧電子顕微鏡によるトモグラフィー解析について

有井達夫

±60 度の範囲内において数度おきに連続的に傾斜して得られる多数枚の超高圧電子顕微鏡傾斜像を用いてコ

ンピュータートモグラフィー手法により得られる三次元再構成した三次元データの基本的な特性について研究し

ている。特に試料による電子線の吸収効果とフィルムから得られる電子線強度との関係に注目して得られる精度を検討している。

また断層画像から 3 次元量を求めるためのソフトウェア（アナライズなど）による 3 次元形態情報の値の精度をモデルを用いて検討している。

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慢性埋め込

み電極を利用し、大脳皮質フィールド電位の記録解析を行っている。

注意に関係する脳活動の研究

達本 徹

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

「意欲」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。この活動はヒトの脳波で「注意の集中」に関して観察される Frontal midline theta rhythms に相当すると考えられる。埋め込み電極による高い空間分解能を活かして、現在、32 野と 9 野の間の情報の流れについて解析を行うとともに、さらに多くの領野での記録を試みている。

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共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ていた。本稿では 2 光子顕微鏡グループについての概要を述べる。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。本年度は新たにポンプ用のグリーンレーザー光源を

改良し、より広範囲の発振波長を達成することに成功した。さらに既存の波長領域においても高いレーザー出力を得られるようになり、in vivo イメージングに有効であった。またフェムト秒パルス用チャープ補正系とオートコリレータを導入し、対物レンズ後の標本位置におけるレーザーパルス幅を最小にする操作を容易に実行できるようになった。

本年度、2 光子顕微鏡グループは、内分泌・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、構築した世界でトップクラスの個体 in vivo イメージング用正立型 2 光子顕微鏡システム用い

て、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った。さらに本年はその特性を推し進めると共に原因解明に努め、第 V 層錐体細胞の basal dendrite の in vivo 可視化に世界で初めて成功した。この成果は、平成 19 年度文部科学省科学技術週間パネル展に「生きた脳の内側から神経細胞を覗く」（和気弘明，鍋倉淳一，根本知己）として出品し受賞した。このような 2 光子顕微鏡の要素技術の顕在化は、昨年度に引き続き、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）の支援を受け推進した。

開口放出の分子機構に関して、膵臓ランゲルハンス島 β 細胞をモデルとして、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ついて検討を行った。（九州大学大学院歯学研究院・平田雅人教授，兼松隆准教授グループと共同研究）。膵臓外分泌腺における水チャンネル 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、昨年度に引き続きバイオ分子センサープロジェクトの支援を受け、身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実施した。また関西医科大学附属生命医学研究所所長・木梨達男教授，戎野幸彦博士のグループと共に、免疫細胞の 2 光子 in vivo イメージングについて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、その運動に重要な分子の同定に成功した。その他、企業と共同研究契約を締結し 2 光子顕微鏡法の可能性を探索した結果、新しい酵素機能測定法の可能性が出てきた。

定期的にバイオイメージング・セミナーを自主的に開催し、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。

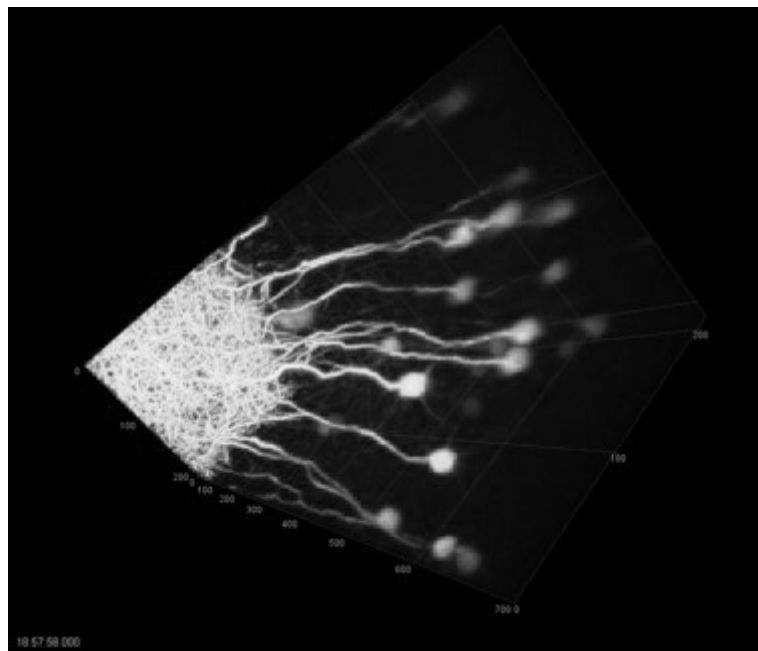


図 1. 平成 19 年度文部科学省科学技術週間パネル展受賞作品
「生きた脳の内側から神経細胞を覗く」

行動・代謝分子解析センター

遺伝子改変動物作製室

【概要】

脳が機能を発揮するという事は、個体の行動・精神活動に直結する。それ故、脳機能を研究する際には個体レベルでの解析が必須となる。特に、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改変動物を利用することは非常に有益な解析手段といえる。マウスにおいてジーンターゲティング法は確立しているが、脳研究分野で古くから汎用されてきたラットにおいては、この技術はいまだ未開発であり、非常に切望されている。遺伝子改変動物作製室では遺伝子改変動物（マウス、ラット）の作製技術を提供しつつ、遺伝子ターゲティングによ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 3 題について具体的に示す。クローンラット開発に向け、(1)ラット卵子の自発的活性化機構の解明、(2) p34^{cdc2} kinase 活性を支持する細胞周期停止因子の探索を行った。さらに、遺伝子改変マウスの脳研究への応用を目指して、(3) 大脳皮質第一次視覚野上に存在する遠近感の認知に必須の機能ユニット“眼優位カラム”の可塑的形成メカニズムの解明研究を進めた。

p34^{cdc2} kinase 活性低下に関わる Calmodulin 依存性キナーゼ (CaMKII) の関与について

伊藤 潤哉, 平林 真澄

ラット再構築胚において高率に早期染色体凝集 (PCC) を誘起させることを目的に、p34^{cdc2} kinase 活性を支持する細胞周期停止因子 (CSF) を探索した。まず、ラットの系統によって自発的活性化率が異なる原因について、CSF の機能を有すると考えられている Mos および p34^{cdc2} kinase 活性に焦点を当てて CSF の制御機構を検討した。自発的活性化がほとんど認められない Sprague-Dawley (SD) 由来ラット卵子では、Mos およびその下流の MEK (MAPKK), MAPK とも高い活性を維持し、cyclin B 量も多く認められた。しかし SD 由来ラット卵子を MEK 抑制剤の U0126 で処理すると MEK/MAPK 活性の著しい低下が認められ、多くの卵子が活性化した。一

方、多くの卵子が自発的に活性化する Wistar 由来ラット卵子では、Mos/MEK/MAPK の著しい低下が認められ、cyclin B 量も著しく減少した。しかし proteasome 抑制剤の MG132 で処理した Wistar 由来ラット卵子では Mos および cyclin B 量は高く維持され、自発的に活性化した卵子の割合も減少した。以上のことから、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 p34^{cdc2} kinase の不活性化が関与していると考えられた。以上の知見を応用し、PCC が効率的に誘起されるラット再構築胚の作製を進めているところである。

ラット成熟卵子中の核およびその周辺部は MII 期の維持に必須である

伊藤 潤哉, 加藤 めぐみ, 平林 真澄

第二減数分裂中期 (MII 期) での減数分裂の停止には細胞周期停止因子 (CSF) の高い活性が必須で, MAP kinase 系 (Mos/MEK/MAPK) および成熟促進因子 (MPF; p34^{cdc2} kinase+cyclin B) が重要な役割を持つことが知られている。われわれは自発的に減数分裂を再開するラット MII 卵子では p34^{cdc2} kinase 活性が低下すること, そして除核卵子ではその活性がさらに低下することを報告した。このことから核およびその周辺部は CSF 活性の維持に必要であると考えられ, 除核した卵子の MAP kinase 系および MPF 活性について検討した。

まず, SD系雌ラットの排卵卵子を除核あるいは除核と同容量の細胞質を除去し, 操作完了直後および 1 時間培養後の p34^{cdc2} kinase 活性を比較し, total cdc2 および cyclin B をウェスタンブロット解析した。その結果, 操作完了直後では, 細胞質除去区, 除核区とも p34^{cdc2} kinase 活性に変化は認められなかったが, 除核区ではその後 1 時間

で有意に低下した。またこの区では cyclin B も有意に減少し, total cdc2 もわずかに減少した。

次に, 排卵卵子を除核後 1 時間まで培養し, p-MEK, p-MAPK の検出を行い, プロテアソーム阻害剤の MG132 および脱リン酸化抑制剤のオカダ酸 (OA) で処理した除核卵子の cyclin B, p-MAPK も測定した。その結果, 未処理区の p-MEK および p-MAPK は培養 1 時間後まで変化しなかったが, 除核区では両方の急激な減少が認められた。さらに除核卵子を OA 処理した時, p-MAPK は増加し, MG132 と OA の両処理では cyclin B と p-MAPK の両方が増加した。以上のことから, ラット MII 卵子の核とその周辺部には cyclin B の分解と MEK の脱リン酸化の両方を抑制する因子が存在し, その働きにより CSF 活性は高く維持され MII 期で減数分裂を停止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認知に必須の機能ユニット “眼優位カラム” の可塑的形成メカニズムの解明に向けて

富田 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, 視覚の認知に必須と考えられている機能ユニットが多数存在する。中でも, 遠近感の認知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。第一次視覚野において, 同側眼から視覚入力をうける神経細胞群と反対側眼から入力を受ける神経細胞群それぞれは, 別々にクラスターを形成している。さらに, これら同側眼クラスターと反対側眼クラスターは交互にパッチ上に並びカラム状構造をとっているため, 各々同側・反対側眼優位カラムと呼ばれている。同側・反対側眼優位カラムは, 出生前後の発生期, 互いに混ざり合い各々見分けがつかない状態だが, 発達期になると, 外部からの視覚入力に促されて互いに分離を始め, 成人期には同側・反対側が完全に分かれたカラム構造となる。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。

い。当教室では, 発生期から発達期にかけて, 同側眼優位カラムに特異的に発現している因子群の単離に成功した。この中の 1 因子の遺伝子シーケンスを解析したところ, この因子は様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因子の 1 つであることが分かった。さらに, このシャペロンは alternative splicing により少なくとも長さの違う 2 種類のフォームが存在すると予想されたので, 現在これの真偽を解析中である。今後は, この 2 種類のフォームのうちいずれが同側眼優位カラムに特異的に発現しているか検討し, より特異的なフォームの個体レベルでの機能解析を行いたい。最終的に, 発生期から発達期における, 同側・反対側眼優位カラムの分離を促す分子メカニズムが明らかに出来ると期待している。

動物実験センター

【概要】

平成 19 年度に掲げた以下の事業計画について、途中修正を加えつつ実施した。

1. 明大寺地区地下 SPF 化の第三期工事終了

最終年度の今期は残りの小部屋・トイレの改修工事および扉の設置を果たし、器具・機材の搬入を行った。2008 年 4 月オープンに向けて、個別換気ケージシステムを用いた SPF 施設の利用者説明会 (2/29) を開催し (教育訓練も兼ねた)、施設稼働準備はほぼ整った。

2. 利用者徴収金の変更

下期より実施し、計画通りの歳入を得た。

3. 自然科学研究機構動物実験規定に基づく動物実験の実施

動物実験計画書および結果報告書を提出して、動物実験を実施した。新しいシステムに移行したが、支障なく動物実験を進めることができた。

4. 胚操作業務

外部飼育委託業務の 2 名について、胚操作技術を習得させ、現在業務として実施中である。

6 月から 6 か月間、木・金曜日に全日集中してマスターした。胚操作定常業務および本館 2 階・新館 3 階のクリーン化のためである。

5. 新館 3 階および本館 2 階のクリーン化

11 月開始を目指したが、本年度は生理学研究所負担による病原微生物・寄生虫の検査 (本館 2 階、新館 3 階) に留まった。

その結果、4 室で病原微生物が見つかり、事故対策委員会を招集した。長年、普通動物施設に存在した病原微生物であり、完全撲滅することを目指し、研究環境を整える。

自然科学研究機構の普通環境清浄度レベル (国動協の定めるカテゴリー A および B が陰性) を定め、新館 3 階だけでなく、本館 2 階もクリーン化を図る。感染対策説明会 (2008.4.21) を開催して、現状および今後の方針を明示した。岡崎の 3 つの SPF 施設を守るためにもクリーン化を進める。

6. 全実験動物の搬入・搬出の traceability 確保

国動協加盟校でも達成できている施設は数少なく、

今後さらに充実させたい。

7. 実験動物技術者二級資格取得

1 名が受験して資格を取得することができた。これにより、有資格者が合計 5 名となった。

< 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、引き続き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。本年度は生理学研究所研究会と学会を開催でき、他部門と同様な活動状況に漸く達した。

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。本年度は真皮メラノサイトーシスに対する治療方法の検討を行った。また、金属アレルギーおよび光線アレルギーのモデル実験を行った。形成外科領域では創傷被覆材の評価法を動物実験で行った。

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、イヌとネコで 10 ラインの腫瘍株を確立し得た。機能性腫瘍と思われる腫瘍株を見だし、今後さらに掘り下げる。伴侶動物に長い年月をかけて自然発生した腫瘍細胞を利用して、ヒトの腫瘍に対する診断・治療技術を推し進める方法であり、従来の実験動物に人為的に腫瘍を誘発させて研究を推進する方法とは異なる点で、医学部の臨床系が注目している。獣医領域の研究から医学分野に情報を発信できれば何よりと期待している。

実験動物飼育管理技術の開発：麻酔方法、環境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、メドトミジン・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実用に供している。他の研究機関でも利用され定番化している。マウスのエンリッチメントとしては、紙製の 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認できた。給水システムの改善として給水パックを導入し、従来法（給水ビン方式）と比較したが、格段の違いを見いだせなかつた。

その他：実験動物臨床医学における救急医療に着手した。また、サル類の case report として副腎皮質機能亢進症の病態および noma の治療成績についても検証した。これらの症例をヒトや伴侶動物の病態と比較して、類似点あるいは相違点を探りつつある。

計算科学研究センター

【概要】

様々な機能性生体様物質の創生を目指している。なかでも核酸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。

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す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－塩基置換法

片岡正典, 永山國昭

核酸中の同種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。本法は塩基選択的の反応を組み合わせ、標識を 4 度繰り返すことで塩基ごと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標識剤を導入できるため、目的に応じて標識剤を自由に選択できる特長も有している。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、透過型電子顕微鏡を用いた配列解析技術など様々な応用が期待される。

全塩基修飾型核酸標識－塩基拡張法

片岡正典, 永山國昭

塩基置換法とは異なる、核酸中の同種の塩基全てを化

学的に標識する手法を開発した。置換法に比して装置の

要求度は高いものの安価・簡便な操作で標識を完了し、顕微鏡などの一分子観察技術を用いて4種の塩基を識別可能とする。本法は塩基を構成するヘテロ環を増環する修飾反応に基づいており、塩基選択的であることから様々なパターンで各塩基を標識できる多様性も有する。

また、解離剤を用いなくとも直接二重鎖 DNA を標識反応に供することができ、標識後は自動的に一本鎖に解離する。本法は塩基置換法と同様に核酸中の同種の塩基全てを標識できる、これまでに類を見ない標識法である。

技術課

大庭明生

1. 概要

今年度の人事は、生体膜研究部門・深田正紀教授の着任に伴い生体情報解析室・高橋直樹技術係員を生体膜研究部門に配置換えをした。また広報展開推進室の立ち上げと小泉周准教授の着任に伴い感覚運動調節研究部門・永田治技術係長を広報推進展開室に配置換えをした。

課の研究活動への寄与と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

岡田泰伸教授の所長への就任に伴い岡田新所長を技術課研修セミナーに招聘し、『技術課への提言』をテーマにセミナーを開催した。講演で、研究活動からの技術成果のデータベース化と研究所が進めている脳研究の成果の 4 次元脳機能イメージング化を、点検連携資料室と広報展開推進室とともに、推進する提言がなされた。特に前者については、これまで技術課が作成してきた生理学実験技術データベースを公開した。

②生理科学実験技術トレーニングコースでの技術指導

生理学研究所が毎年主催し、実施している生理科学実験技術トレーニングコースで、『生理学実験のための電気回路・機械工作・プログラミング』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、7 名の若手研究者の技術指導を行った。

③生理科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 30 回を基礎生物学研究所・技術課と合同で開催した(平成 20 年 2 月 14 日-15 日)。会では、口演発表が 22 題、ポスター発表が 45 題あり、研修講演として『ショウジョウバエを材料として用いた生殖細胞形成機構に関する研究』(小林 悟, 基礎生物学研究所・岡崎統合バイオサイエンスセンター・発生遺伝学研究部門)、特別講演として『脳・ブレインインタフェース・ロボット』(川人 光男, 株式会社国際電気通信基礎技術研究所, 脳情報研究所)を行った。これらの報告は『生理学技術研究会報告(第 30 号)』にまとめた。

④奨励研究採択課題技術シンポジウムの開催

時代要請に対応した技術認識と向上に立った技術職員の業務の社会的開示を推進するために奨励研究採択

者による第 4 回の報告会(平成 20 年 2 月 15 日)を 12 演題で行った。この報告は『生理学技術研究会報告(第 30 号)』にまとめた。

⑤自然科学研究機構技術研究会の開催

自然科学研究機構技術職員の業務の紹介と業務連携を目的に、第 2 回を分子科学研究所で開催した(平成 20 年 6 月 25-26 日)。会では 21 演題の発表があり、詳細は『第 2 回自然科学研究機構技術研究会集録』としてまとめた。

⑥東海北陸地区技術職員研修等の受講と参加

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り行われている技術研修で、生物・生命コース(浜松医科大学, 1 名)と情報処理コース(静岡大学, 1 名)を受講した。

また、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, 2 名)、大阪大学・京都大学・神戸大学連携シンポジウム(大阪大学, 3 名)、天文学に関する技術シンポジウム(国立天文台, 1 名)、感染症の病原体等の管理規制に関する説明会(名古屋, 1 名)、国際規制物質の使用に関する申請等の講習会(大阪, 1 名)、日本動物実験技術者講習会(名古屋, 2 名)、電子顕微鏡ミクロームワークショップ(大阪, 1 名)、日本神経科学学会(横浜, 1 名)、日本分子生物学会(東京, 1 名)、日本肥満学会(東京, 1 名)にも参加し、業務の研究支援力の強化を図った。

⑦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(1)実験科学とその方法(2 名)、(2)基礎生物学(3 名)、(3)人体の構造と機能(3 名)、(4)人間情報科学と e-ランニング(1 名)、(5)精神分析入門(1 名)を選び、10 名が受講した。

⑧科学研究費補助金(奨励研究)の採択

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) 佐治俊幸：ホームケージ用摂水摂餌量連続計測装

置の開発

(2) 齊藤久美子：脂肪酸酸化調節因子マロニル CoA 量の測定法の開発

また核融合科学研究所と岡崎 3 機関が合同で、『高出力レーザ用保護メガネの開発』を課題に奨励研究を申請し、採択された。

⑨成茂神経科学研究助成基金の採択

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、女性技術職員の研究支援をキーワードに、窪田美津子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を申請し、採択された。

⑩地域連携事業への参加

岡崎商工会議所主催による『ものづくり岡崎フェア（知的財産活用フェア）』が開催（2 月 14－15 日）され、岡崎 3 機関・技術課は、『技術課の紹介』をテーマに展

示を行い、地域との連携を図った。

⑪安全衛生技能講習等の受講と参加

研究所の安全衛生を課業務として充実するために、第 1 種衛生管理者講習（岡崎、1 名）、特定化学物質等作業主任者技能講習（名古屋、1 名）、酸素欠乏・硫化水素危険作業技能講習（名古屋、1 名）、有機溶剤作業主任者技能講習（名古屋、1 名）、高圧ガス製造第 2 種 CE 設置事業所保安講習（名古屋、1 名）を受講した。

また、核融合科学研究所で開催された第 4 回安全衛生に関する情報交換会（3 月 12 日）に 3 名が参加し、安全衛生に関する知見を深めた。

⑫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。

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，竹島 康行

【概要】

2007 年 4 月～9 月

センサチャンネルにおいて、1 チャンネルにノイズの増加が見られたため、アンプの交換調整などの対策を行なったが改善されなかったため、ハードサイクルをかねてセンサ基盤の交換を行なった。その結果、平均的なノイズレベルは基本スペックを超えるレベルで調整できており、同様のセンサが稼働している他サイトと比較してもトップレベルである。今後適切な保守管理が行なわれていれば今後三年間はハードサイクル等大きな修理は必要ない最善の状態と判断できるのでこのまま後任者に引き継ぐこととする。

三次元 MRI 画像解析環境の更新においては、各機能の PC への移植がほぼ完了したが、ユーザインターフェイスに一部不備があり検討を要する。基本的にはモジュール単位であれば利用可能であり、四次元的な表現においても十分対応できると思われる。ただし、利用においては最低限 AVS のネットワーク操作知識を要する。

2007 年 10 月～3 月

ハードサイクル後に、一部のチャンネルにおいてスパイク状のノイズが発生したため、再度チャンネルの調整をおこなった。

平成19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
2007年04月	30	10	2	18	100%		
05月	31	10		21	100%		
06月	30	9	2	17	89%		
07月	31	10	1	16	80%	2	YAGレーザー修理、トレーニングコース使用4日（24～27日）
08月	31	8	2	19	90%		
09月	30	12		15	83%	2	
10月	31	9	22	0	0%		チャネル修理およびセハードサイクル・センサ分解修理
11月	30	9	8	1	8%		ハードサイクル(チャネル修理)
12月	31	12	5	3	21%		ハードサイクル
2008年01月	31	12	1	15	83%		チャネル調整
02月	29	9	4	16	100%		チャネル調整
03月	31	11	0	16	80%		

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

②脳機能計測センター

(1)形態情報解析室

山口 登

【超高压電子顕微鏡利用状況】

今年度における超高压電子顕微鏡共同利用実験は、合計 13 課題が採択され、全ての課題が実施された。これらの共同実験の成果は、超高压電子顕微鏡共同利用実験報告の章に詳述されている。超高压電子顕微鏡の年間の利用状況を表にまとめたので下記に示す。稼働率は、利用日数と使用可能日数より求めている。本年度の主な超高

圧電子顕微鏡の改良・修理としては、自動昇圧用モーターの交換および対物レンズ可変用ロータリースwitchの交換、高压印加用レジンコンデンサーの点検・交換、フィルム乾燥機用ターボモレキュラーポンプの交換などが行われた。

2007 年度 超高压電顕月別稼働率

年 月	総日数	休 日	調整日	使用可能日数	所内利用	所外利用	計	稼働率	備 考
2007 年 4 月	30	10	5	15	4	0	4	27%	
5 月	31	10	8	13	3	0	3	23%	修理 4 日
6 月	30	9	9	12	5	4	9	75%	修理 8 日
7 月	31	10	4	17	5	8	13	76%	
8 月	31	8	4	19	2	3	5	26%	
9 月	30	12	5	13	3	5	8	62%	修理 2 日
10 月	31	9	5	17	6	2	8	47%	
11 月	30	9	4	17	9	5	14	82%	
12 月	31	12	7	12	5	7	12	100%	点検 5 日
2008 年 1 月	31	12	2	17	3	14	17	100%	
2 月	29	9	2	18	1	17	18	100%	
3 月	31	11	4	16	3	12	15	94%	
計	366	121	59	186	49	77	126	68%	

フィラメント点灯時間 425.7 時間
 使用フィルム枚数 6,729 枚

(2) 生体機能情報解析室

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、fMRI 装置の共同利用実験は合計 12 課題が採択され、これら実験課題が実施された。

今年度、リアルタイム装置本体において長期間の修理

を要する故障は起きず、比較的安定した稼働状態であった。所外の利用者は 3 グループあり、装置利用の有効性から日程を重ねて使用している。

平成 19 年度の fMRI 装置とリアルタイム装置利用実績を別表に記す。

【機器利用率】

平成 19 年度 fMRI 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	土日 実施	利用率	備考
2007 年 4 月	30	0	20	12	9	21	1	103%	
5 月	31	0	21	12	10	22	1	102%	
6 月	30	2	21	10	8	18	1	92%	定期点検
7 月	31	1	21	10	9	19	1	93%	
8 月	31	0	23	14	10	24	1	102%	
9 月	30	0	18	12	6	18	2	94%	
10 月	31	3	22	5	15	20	3	97%	定期点検 液体ヘリウム補給
11 月	30	0	21	2	16	18	1	83%	
12 月	31	1	19	10	6	16	0	89%	液体ヘリウム補給
2008 年 1 月	31	1	19	11	3	14	2	72%	修理
2 月	29	2	20	12	4	16	1	86%	液体ヘリウム補給
3 月	31	0	20	12	5	17	2	80%	
計	366	10	245	122	101	223	16	91%	

*土日に実施された実験は 0.5 日分を平日に振り替えて計算

平成 19 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
2007 年 4 月	30	1	29	0	3	3	10%	
5 月	31	1	30	0	4	4	13%	
6 月	30	1	29	0	3	3	10%	
7 月	31	1	30	0	3	3	10%	
8 月	31	1	30	0	3	3	10%	
9 月	30	4	26	0	0	0	0%	停電
10 月	31	4	27	0	5	5	19%	停電
11 月	30	1	29	0	3	3	10%	
12 月	31	1	30	0	3	3	10%	
2008 年 1 月	31	1	30	0	2	2	7%	
2 月	29	1	28	0	2	2	7%	
3 月	31	4	27	0	2	2	7%	定期点検
計	366	21	345	0	33	33	10%	

*保守以外の土曜、日曜、祝祭日は、使用可能日に含めた。

*同一日に利用者が複数あった場合でも、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、今年度 2 月に更新を行った。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ネットワークライ

センス用アプリケーションを備えている。ネットワーク認証により各部門施設の PC 上でこれらアプリケーションが供用できる。登録者は 103 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 431 名。WWW 登録者が 66 名。LAN の端末数が 1,827 台。所内向けのダイヤルアップサービスは 9 回/週、1.4 時間/週。VPN サービスは 37 回/週、47 時間/週の利用があった。

所外からのメール受信数は 21,000 通/週。所外へのメール発信数は 11,000 通/週。WWW は 4,700 台/週の端末から 74,000 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】

明大寺地区の電子顕微鏡の利用が少なくなってきたが、各地区 1 台ずつ利用できる装置を維持するため透過型電子顕微鏡 (JEM-1200EX, JEM-1010) の保守契約（年 1 回点検）を継続した。明大寺地区電子顕微鏡室には 5 月から基生研より共通利用として、透過電子顕微鏡 (H-7600, CCD カメラ付属試料ステージ傾斜機構最大傾斜角 $\pm 60^\circ$) が移設された。

昨年度、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コンピュータから入力できるようにしたが、本体のキーボードからテキスト入力モードを変更する必要がある為、使い勝手が少し悪くなった。

昨年度、購入した共焦点レーザー顕微鏡 (LSM-510) の制御用コンピュータが立ち上がらなくなったが、メモ

リーとハードディスクの抜き差しで起動するようになった。

利用者との情報交換を目的に、電子顕微鏡室に関するブログを開設することを始めた。故障状況や、使い方、試料作製法等、画像を交えて投稿し、コメント（コメントされた人にメール送信）にて情報交換するようにし、WEB サイトに情報を共有し蓄えるようにした。

【研究内容一覧表】

本年度、室を利用してなされた研究の総件数は 36 件であった。機構内では 29 件あり、機構外は、国内で 7 件、国外では中国、ドイツの研究者による利用が 3 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
	神経機能素子	・神経機能素子の細胞内局在の解析
	生体システム	・線条体による運動制御機構の解明
	大脳神経回路論	・大脳皮質神経結合の解析 ・大脳皮質局所回路のシナプス結合解析
	脳形態解析	・記憶の脳内表現と長期定着メカニズム ・Rat P3 小脳 プリキンエ細胞の超薄切片による3次元再構築 ・海馬シナプス可塑性の分子基盤の解析
	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・樹脂包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
	遺伝子改変動物作製室	・ラット初期胚におけるDNA脱メチル化解析
	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
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 ・タンパク質の細胞内局在の解析 ・シロイナズナの組織の観察 ・植物の茎頂組織の観察 ・ヒメツリガネゴケ遺伝子改変植物の観察
	光情報	・シロイナズナにおける葉緑体光定位運動の解析
	構造多様性	・動物細胞および酵母細胞の超微形態観察
	性差生物	・生殖腺の性分化に関する研究
	分子遺伝学	・イネ MET1 遺伝子の相同組み換えによるノックイン改変
	形態形成	・細胞極性関連遺伝子改変マウスの機能解析 ・Xenopus laevis 胚上皮組織の観察
	統合神経生物学	・遺伝子改変動物由来の生体組織の電子顕微鏡解析 ・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	精細管形成の分子機構
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
理化学研究所	工藤もゑこ	小脳パーグマンングリアにおける BMP シグナリングの役割の解明

所外（国外）

国名、大学、研究所	研究者名	研究内容
中国 第四軍医大学 解剖学科 K.K.Leung 脳研究センター	李 雲慶	Pastic changes of NMDAR and AMPAR in the spainal dorsal horn induced by neuropathic pain in the rat
中国 第四軍医大学 解剖学科 K.K.Leung 脳研究センター	WANG, Wen	グルタミン酸受容体の小脳と海馬の分布の解析
ドイツ フライブルク大学	Akos Kulik	SDS-digested freeze-fracture replica immunoelectron microscopy

(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』が希薄になっている。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、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、2008 年度は、施設担当職員の配置転換もあったため、汎用工作機械の使用法

を主体に実習する初級コース（リキャップ台）と応用コース（簡易型一軸式マニピュレータ）の 2 コースを開講し、現在は初級コースの開講中である。参加希望者は、2 コース合わせ生理研 6 名、基生研 18 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 19 年度の利用状況は、以下の通りである。

平成19年度 機器研究試作室 利用報告

機器研究試作室利用機器表 (件数)

月	フライ盤	コンタマシ	ボール盤	旋盤	横切盤	切断機	ベルトグラインダ	NCフライ盤	その他	計
4	24	9	5	2	5	6	1	2	5	59
5	8	8	13	7	15	9	8	1	13	82
6	21	14	15	10	12	7	5	0	19	103
7	21	16	13	15	16	17	8	0	37	143
8	16	6	8	7	6	5	0	0	12	60
9	21	22	11	19	8	13	8	5	20	127
10	31	16	14	12	8	5	5	3	15	109
11	37	23	15	15	12	3	3	2	34	144
12	17	12	9	6	2	1	2	0	10	59
1	26	13	11	12	7	3	0	0	9	81
2	15	8	7	9	11	2	3	1	19	75
3	22	13	9	5	3	5	1	0	21	79
合計	259	160	130	119	105	76	44	14	214	1121

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	29	5	0	33	68
5	47	5	0	52	61
6	47	5	0	52	93
7	52	11	0	63	37
8	29	3	1	33	74
9	39	6	0	45	164
10	42	3	0	45	79
11	61	6	0	67	122
12	33	2	0	35	59
1	38	2	0	40	46
2	34	1	0	35	66
3	38	1	0	39	81
合計	489	50	1	540	1139

機器研究試作室部門別のべ利用状況

感覚認知情報	137 名	認知行動発達機構	69 名	ナノ形態生理	53 名
動物実験センター	33 名	心理生理学	15 名	生体恒常機能発達機構	15 名
機能情報解析室	12 名	感覚運動調節	10 名	神経シグナル	11 名
生体膜	10 名	機能協関	6 名	形態情報解析室	5 名
神経分化	3 名	神経機能素子	3 名	生体システム	5 名
技術課	1 名	江橋研究室	2 名	生殖・内分泌系発達機構	1 名
生体情報解析室	1 名	機器研究試作室	99 名		
ERATO 分化全能性進化	20 名	脳生物学	10 名	生物進化	11 名
光情報	7 名	形質転換生物研究施設	2 名	R I 実験センター	1 名
人工気象室	1 名	形態形成	1 名	構造多様性	1 名
時空間制御	13 名	生殖生物学	1 名	所長研究室	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 化の第三期改修を行った。本年度は、地下の残る実験室等の改修と廊下の改修を行い地下エリアの SPF 化が終了した。各部屋の清掃消毒及び使用方法の決定等を平成 20 年度当初に行い、SPF 飼育室の稼働を目指す。

SPF 飼育室の立ち上げとともに、一般飼育室のクリーン化をはかるため、はじめて全飼育室の一斉モニタリングを行った。その結果、マウス肝炎ウイルス、Mycoplasma pulmonis, Bordetella bronchiseptica を検出した。すぐに感染症対策委員会を立ち上げて、今後の方針について話し合いを行い、Minimum requirement カテゴリー A, B の病原性微生物がいない環境を目指すことになった。

実験動物の授受に関し、年間で 48 件の導入と 49 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】

山手地区でも明大寺地区と平行して、受精卵凍結事業を行う体制が整い、利用者からの依頼に柔軟に対応できるようになった。

実施件数としては、受精卵凍結保存がのべ 22 件、クリーンアップ兼受精卵凍結保存が 15 件、過去に当センターで受精卵凍結した系統の融解・移植の依頼があり、9 件行った。

【明大寺地区 陸生動物室】

平成 19 年度の飼育室利用部門数は、21 部門（生理研

14 部門、基生研 5 部門、統合バイオサイエンスセンター 2 部門）であった。動物数飼育数は、マウス、ラット、サルで増加傾向にある。

マウス・ラット一般飼育室では、クリーン化のための一斉モニタリングを行った。動物および飼育室内のクリーンアップ完了後には、3 ヶ月に 1 回のペースで行う予定である。

【山手地区 動物実験センター分室】

平成 19 年度の飼育室利用部門数は、14 部門（生理研 7 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 39 名、32 名であった。

全 SPF 飼育室およびマウス一時保管室 1、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。

【明大寺及び山手地区 水生動物室】

平成 19 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 2 年計画で行われる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スタートした。本年度は、ポンプ室のみが改修されたが、次年度の水槽室改修のために、不要水槽の解体を行った。平成 20 年度の秋までは、水槽室が使用できないために基生研南側のドライエリアへ飼育水槽 10 基を移設し飼育が可

能となるようにし、改修後に必要となる水槽もドライエリアへ移動させた。また、ホヤを飼育しているグループには、山手地区へ動物を移動させてもらい、耐震補強工

事に備えた。

平成 20 年度秋までに、耐震補強工事後の水生動物室の水槽設置計画を策定する必要がある。

陸生動物 部門別・動物種別搬入数（平成 19 年度）

部門	動物種	明大寺地区					山手地区	
		マウス	ラット	ウサギ	モルモット	サル	マウス	ラット
神経機能素子		42						
細胞内代謝		42						
生体膜		40					190	42
機能協関		193	30		31			
機能協関（椋原）			45					
分子神経生理		340					1,758	8
神経シグナル							3,162	25
感覚認知情報						6		
生体システム		36				11	20	
認知行動発達機構		125	62			14		
脳形態解析		122					901	280
大脳神経回路論								210
形態情報解析室			38					
機能情報解析室								
生態情報解析室		88						
生殖内分泌系		879	10					
生体恒常機能		178	138					
動物実験センター		300					236	3
高次細胞機構				3				
性差生物学								
統合神経生物学		4					145	7
脳生物学		299	35			4		
細胞器官培養		8	2					
時空間制御		127	109					
分子発生							597	
神経分化		20					777	
ナノ形態生理			83				8	70
分子環境生物学		20					263	70
細胞生理		45					2,967	6
遺伝子改変動物作製室							921	688
分子動力学		26						
合 計		2,934	552	3	31	35	11,945	1,409

水生動物 月別・動物種別搬入数（平成 19 年度）

種 \ 月	4 月	5 月	6 月	7 月	8 月	9 月	10 月	11 月	12 月	1 月	2 月	3 月	合計
メダカ		500						500					1,000
ティラピア				6									6
アフリカツメガエル													0
ポリプテルス セネガルス		10											10
ヒトデ	9												9
ウニ	66			50							60		176
ホヤ	400	200	70										670
ナマコ													0
海水(t)	8		16			8							32