計画共同研究報告

〔 目　　次 〕

１．細胞容積センサーとして働く分子群の機能連関解析（赤塚　結子ほか）..... 154
２．バゾプレッシン-GFP ニューロンにおける浸透圧感受性メカニズムの解明（上田陽一ほか）..... 154
３．小脳バーグマングリアにおける BMP シグナリングの役割を解明する（山田 真久）..... 155
４．シナプス後膜におけるグルタミン酸受容体のトラフィック制御機構（柚﨑 通介）..... 155
５．GABA シグナリングにおける新規分子 PRIP の役割解明研究（兼松隆ほか）..... 156
６．骨格筋 AMPK 活性化を指標とする視床下部のレプチン感受性低下（レプチン抵抗性）の分子機構
（益崎 裕章ほか）..... 157
７．視床下部の摂食調節にかかわる生体分子センサーについての機能形態学的研究（塩田清二ほか）..... 157
８．アディポネクチンの中枢・末梢作用に及ぼす AMP キナーゼ (AMPK) の調節機構と
その生理的意義に関する研究（窪田　直人ほか）..... 158
９．CNR/プロトカドヘリン α 遺伝子トランスジェニックマウスの作製と機能解析（八木 健ほか）..... 159
10．ゲノム情報に基づく神経発生関連膜タンパク分子機能の解析（高橋　弘樹ほか）..... 159
11．VSP（膜電位感受性蛋白）の鳥類における生理機能の解明（本間 光一ほか）..... 161
12．電位依存性プロトンチャネル VSOP の感染防御における役割（鈴木和男ほか）..... 161
13．膜電位センサー分子の動作原理解明とモジュール組換え（宮脇敦史ほか）..... 162
14．脊椎動物のイオンチャネル関連分子のアミノ酸配列推定と，そのタンパク質の機能解析
（斎藤成也ほか）..... 163
15．抹消温度受容器における温度検出機構の解析（水村和枝ほか）..... 164
16．感覚神経における侵害刺激センサーとしての TRPA1 の役割（野口光一ほか）..... 164
17．シリコンベース膜蛋白バイオセンサー製作のためのタンパク質発現・精製・集積技術開発
（宇理須恒雄ほか）..... 165
18．ミツバチの社会性行動を担う新規温度受容センサーの生理機能の解析（門脇辰彦ほか）..... 165
19．膵 β 細胞のインスリン分泌様式による TRPM2 channel の意義（最上秀夫ほか）..... 166
20．ドーパミン受容体欠損マウスを利用した黒質網様部ニューロンの自発発火活動の解析（山田勝也ほか）..... 166
21．凍結割断法を用いた一次嗅覚路の解析（高見　茂ほか）..... 167
22．運動学習記憶に関連するシナプス微細形態の検索（永雄 総一ほか）..... 167
23．mGluR1 レスキューマウスの電気生理学的解析（饗場　篤ほか）..... 168
24．ラット精子幹細胞を用いた顕微授精（篠原 隆司ほか）..... 168
25．生殖幹細胞を用いたラットゲノムへの外来遺伝子導入ならびに内在遺伝子改変（保地 眞一ほか）..... 169
26．大脳シナプスの in vivo2 光子画像解析（河西春郎ほか）..... 169
27．CNR/プロトカドヘリン遺伝子ジーンターゲティングマウスの作製と機能解析（八木 健ほか）..... 170

1. 細胞容積センサーとして働く分子群の機能連関解析

赤塚　結子（三重大学大学院医学系研究科）
高橋　信之，岡田　泰伸

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

現在までに報告者は，VSOR の調節蛋白質としてATP-binding cassette (ABC) 蛋白質スーパーファミリーに属するABCF2を同定しているが，機能協関部門の岡田泰伸教授との共同研究によって，ABCF2 を大量発現させた HEK293T 細胞では VSOR 電流が著明に抑制されること，それに一致して RVDも著明にブロックされること，また siRNA で ABCF2 の発現を抑制すると RVD は更新することが明らかになった。さらに，ABCF2 がアクチン結合蛋白質であるアクチニン-4 と結合すること，その結合には両者のアミノ末端側領域が必要であり，低浸透圧刺激によって両者の親和性が約 2 倍強くなること，またアクチニン-4 を大量発現させた HEK293T 細胞では後期の RVD が亢進し，siRNA でその発現を抑制すると後期のRVDが抑制されることがわかった。さらに，アクチニン-4 の発現量を変化させたこれらのHEK293T 細胞では，VSOR 電流の大きさに変化はなかったことから，アクチニン-4 は VSOR の活性化に直接関与しないと考えられる。つまり，低浸透圧刺激をうけてVSOR が活性化された後，VSOR を負に調節する ABCF2 とアクチニン-4 がより強く結合することによって，VSOR と ABCF2 の再結合が抑制され，後期 RVD が亢進すると考えられた。

現在，ABCF2結合蛋白質の検索から，新規のVSOR 調節因子が同定されており，解析を進めている。

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

上田陽一，藤原広明，横山　徹（産業医科大学・医学部）
斎藤　健（産業医科大学・医学研究科）
浅野　亘（京都大学・大学院農学研究科）
岡田 泰伸

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

今回，我々は昼夜・雌雄差における高浸透圧刺激に対する感受性の違いを検討した。(1) 明期において高浸透圧刺激に対し室傍核および視索上核において *c-fos* 遺伝子発現が有意に増加するほか，血漿浸透圧，血漿ナトリウム濃度，血中バゾプレッシン濃度に変化が生じることを

見出した。(2) 雌雄差においては，血中ナトリウム濃度変動に対するバゾプレッシン分泌の感受性は雌の方が高い傾向にあることを見出した。次に，視索上核大細胞性神経分泌細胞へのシナプス入力に対する浸透圧変化の影響をホールセルパッチクランプ法を用いて検討した。その結果，(1) 興奮性入力は高浸透圧刺激により有意に増加し，この反応はTRPVブロッカーとして用いたルテニウムレッドによって抑制されることを見出した。また，カプサイシン非感受性であった。大細胞性神経分泌細胞にはカプサイシン非感受性のTRPV1変異型が存在しているとされるが，同様のTRPファミリーが大細胞性神経分泌細胞へのシナプス入力にも存在していると考えられる。(2) 高浸透圧環境下では抑制性入力が減少し，高浸透圧刺激に数時間わたり暴露させた後，低浸透圧刺激を行うと抑制性入力が増加することを見出した。一方，BDNFの投与で抑制性入力が減少し，TrkB拮抗薬でこの反応は有意に抑制された。単離・同定したバゾプレッシン-GFPニューロンにBDNFを投与したところGABA電流が有意に減少した。抑制性入力における浸透圧応答の変化にBDNFの関与が示唆された。今後，バゾプレッシン産生ニューロンの浸透圧感受性に対するTRPVの関与，バゾプレッシン産生ニューロンへのシナプス入力の浸透圧感受性において更なる検討を行っていく予定である。

3. 小脳バーグマングリアにおけるBMPシグナリングの役割を解明する

山田 真久，新家 瑠奈，工藤　もゑこ（理化学研究所）
中野　高志（奈良先端科学技術大学院大学・情報科学研究科）
重本　隆一

骨形成因子 (BMP) は神経発生期に細胞の運命決定に関与する因子として知られている。しかし，生後マウス小脳に発現している BMP 分子の役割は全く分かっていない。我々は生後一ヶ月齢のマウス小脳においてBMP2/4分子が抑制性神経細胞に特異的に発現していること，さらに BMP 受容体の一種である BMP 受容体 IB 遺伝子 (ALK6) がバーグマングリアに発現している事を観察した。そこで本研究では BMP シグナルがどのような機構をもって神経機能発現に関与するのか検討した。プルキンエ細胞またはバーグマングリアで BMP シグナルの活性化に伴う周囲の細胞への影響を観察する為に，シナプスでの形態，電気生理学的神経機能評価（平行線維から小脳プルキンエ細胞への伝達効率が長期に渡って低下する現象である LTD の形成への影響）を検討したところ，小脳の神経細胞の興奮により（高 K 刺激）BMP が細胞から放出されたことから，BMP は小脳抑制性神経細胞のシナプス部位に蓄積している可能性がある。そこで，BMP の免疫電子顕微鏡的解析を行ったが，抑制神経のシナプス終末には明確な陽性シグナルは観察できなかった。今後は，BMP 受容体 IB の局在変化を免疫電子顕微鏡法で解析する。

4. シナプス後膜におけるグルタミン酸受容体のトラフィック制御機構

柚﨑 通介，鳴海 栄，掛川 渉（慶應義塾大学医学部）
重本　隆一

記憶・学習を支えるシナプス可塑性の実体は，神経活動に基づくシナプス後膜における AMPA 型グルタミン酸受容体の数の増減であることが，近年明らかとなってきた。本研究計画では，神経活動がどのようなバイオ分子によりセンスされ，どのようにしてAMPA受容体の数の制御に変換されるのか，さらにAMPA受容体の数の制御が，どのようにしてシナプス形態の変化に変換されて長期記憶を担うのかを明らかにすることを目的とした。

小脳失調を示すδ2 受容体欠損マウスや Cbln1 欠損マウスでは小脳平行線維―プルキンエ細胞シナプスにおける LTD 障害が明らかとなっている。これらの遺伝子変異マウスにおいて，AMPA 受容体の数の制御過程のどこが障害されているのかを明らかにするために，小脳切片にさまざまな化学的な刺激を与えることにより LTD が誘導できるかどうかを電気生理学的に検討し（慶應大学柚崎研），SDS-FRL 法によりシナプス後膜における AMPA 受容体の数の変化を調べた（生理研重本研)。平成 19 年度には，まずホルボルエステル刺激によるプロテインキナーゼ C 活性化によって急性小脳切片における AMPA 受容体の数の変化を SDS-FRL 法で定量できるかどうかを予備実験により確認した。さらに，Cbln1 欠損マウスやδ2 受容体欠損マウスでは，定常状態において AMPA 受容体の数が増加していること，正常マウスとは異なりプロテインキナーゼ C 活性化によって AMPA 受容体のエンドサイトーシスが起きないこと，を明らかにした（論文準備中)。今後さらにさまざまな LTD 誘導刺激を用いることにより，より詳細な検討を行っていく予定である。

5. GABA シグナリングにおける新規分子 PRIP の役割解明研究

兼松隆，平田雅人，竹内 弘（九州大学歯学研究院）
石橋仁，鍋倉淳一（生理学研究所）

我々は，PRIP(PLC-related catalytically inactive protein) を見出し，この分子が $GABA_A$ 受容体シグナリングに関わること（PRIP を介した $GABA_A$ 受容体のエンドサイトーシス機構の分子基盤解明）を明らかにしている。一方，PRIP は，$GABA_A$ 受容体の γ サブユニット（ジアゼパム感受性受容体）の細胞膜発現を促進する調節分子 GABARAP ($GABA_A$ receptor γ subunit-associated protein) に結合し，GABARAP とγサブユニットとの結合を競合的に阻害する。よって，ジアゼパム感受性受容体の細胞膜発現量を調節する分子である可能性が示唆された。そこで，PRIP-1 & 2 ダブルノックアウト(PRIP DKO) マウスを用いて$GABA_A$受容体γ2サブユニットの細胞膜発現量がPRIPによってどのように調節されるか，その分子基盤解明に本共同研究で取り組んだ。研究成果を以下に概説する。

1. *PRIP* DKO マウスの海馬神経細胞を単離し電気生理学的解析（I_{GABA} 測定）を行った結果，$GABA_A$ 受容体のジアゼパム感受性が野生型に比べて低下していた。さらに，高架式十字迷路試験を行い，不安水準を指標にジアゼパムに対する感受性を調べた結果，*PRIP* DKO マウスは行動学的解析においてもジアゼパム感受性が低下していた。

2. [^{3}H] flumazenil を用いた結合実験解析の結果，*PRIP* DKO マウスの海馬神経細胞表面の $GABA_A$ 受容体 γ 2 サブユニットの発現量が40%程度減少していることが分かった。しかしかがら，各サブユニットの全発現量に差は認められないので，このγ2サブユニットの膜発現量の低下は，*PRIP* 欠失が GABARAP に依存したγ2 subunit の形質膜への輸送に影響を与えた結果であると考えた。

そこで，PRIP を介したγ2 subunit 輸送の分子基盤を明らかにするために，以下の実験を行った。

3. PRIP は，$GABA_A$ 受容体βサブユニットに結合する。そこで，PRIP とβサブユニットの結合を阻害するペプチド(interference peptide)をHEK 細胞に遺伝子導入し，リコンビナント$GABA_A$受容体（α, β, γ サブユニット）膜発現解析実験を行った。その結果，interference peptide の導入は，α/βサブユニットの細胞膜発現量には影響しなかったが，γサブユニットの発現量を顕著に低下させた。さらに，interference peptide を使って，野生型マウスの海馬神経細胞のI_{GABA}に対するジアゼパムの影響を調べた結果，PRIP DKO マウスの様にジアゼパム感受性が低下した。

以上より，PRIP 分子は，$GABA_A$ 受容体βサブユニットに結合して，GABARAP が受容体γ2 サブユニットに結合する過程を促進する機能分子であることを明らかにすることが出来た。

6. 骨格筋 AMPK 活性化を指標とする視床下部のレプチン感受性低下（レプチン抵抗性）の分子機構

益崎 裕章，石井 崇子（京都大学大学院医学研究科内科学講座内分泌代謝内科）
箕越 靖彦，志内　哲也，岡本　士毅

レプチンは視床下部・交感神経系を介して骨格筋 AMP キナーゼを活性化し，糖脂質代謝を亢進する。私達は高脂肪食が容易に視床下部でレプチン抵抗性とAMPキナーゼ活性化障害を惹起することを報告してきた (Tanaka T et al. Diabetes 54:2365, 2005)。本年度は，参加研究者らが構築してきた骨格筋AMPキナーゼ活性の精密評価法と脳室内ICV カニュレーションの技術を用い，骨格筋 AMP キナーゼ活性を生化学指標としてレプチン抵抗性の分子メカニズムを解析し，視床下部メラノコルチン系の治療的意義の解明を目指した。

4型メラノコルチン受容体アゴニスト(MT-II)の脳室内投与は骨格筋 AMPK および ACC のリン酸化を亢進させ，4 型メラノコルチン受容体アンタゴニスト(SHU9119)の脳室内共投与，あるいはアグーチマウスにおいてはレプチンによる骨格筋 AMP キナーゼ活性化が完全に遮断された。アグーチマウスにおけるこのような効果が肥満に伴う二次的なものである可能性を除外するため，肥満が完成する前の段階である 6 週齢アグーチマウスを用いて同様の検討を行なったが同様の結果を得た。高脂肪食により骨格筋 AMPK および ACC のリン酸化が低下したレプチン過剰発現トランスジェニックマウスに対するレプチン脳室内投与は骨格筋 AMPK 活性化をもたらさず，過食や糖脂質代謝異常も是正されなかった。

一方，このレプチン抵抗性状態における 4 型メラノコルチン受容体アゴニスト(MT-II)の脳室内投与は骨格筋 AMPK および ACC のリン酸化の亢進を回復させ，過食の正常化，糖脂質代謝の正常化をもたらした。本研究の結果から，高脂肪食性肥満に伴うレプチン抵抗性は MC4R より上流のシグナル伝達障害に起因することが示唆され，MC4R アゴニストの肥満症に対する治療薬としての臨床的意義が注目される。最近の報告では 高脂肪食性肥満を来たしたマウス視床下部室傍核では MC4R 遺伝子発現レベルが著明に上昇しており，このような状態は本来的に MC4R アゴニストの効果が発揮されやすい状態にプライミングされている可能性が示唆される(Cell Metabolism 5:181-194, 2007)。ヒトにおいても同様のメカニズムが働いていると仮定すると安全に応用できる MC4R アゴニストは肥満症に対する極めて優れた治療法となることが期待される。

7. 視床下部の摂食調節にかかわる生体分子センサーについての機能形態学的研究

塩田清二，影山晴秋（昭和大学医学部第一解剖学教室）
竹ノ谷文子（星薬科大学薬学部体育学研究室）
箕越靖彦（自然科学研究機構生理学研究所）

生体のエネルギー代謝調節のうち摂食調節を司るのは主に視床下部ニューロンであり，栄養状態で変動する血中グルコース，遊離脂肪酸，レプチンなどの末梢からの情報をこのニューロンはつねに感知している。近年，オレキシン，ガラニン様ペプチド (GALP) やグレリンなどの視床下部性神経ペプチドが摂食調節研究に重要なはたらきを持っていることが明らかにされつつある。そこで，これら神経ペプチドによる脳内の摂食調節機構を機能形態学的に解析することを目的とした共同研究をおこなった。

満腹中枢として重要な役割をしている視床下部腹内側核のニューロンネットワークを明らかにするために機能形態学的研究を行い，マウスまたはラットの視床下部腹内側核において満腹ニューロンと摂食促進作用をもつオレキシンニューロンが視床下部腹内側核で密接な神経相関をしていることを免疫組織化学的に明らか

にした。またオレキシンの受容体 (OX1-R と OX2-R) の，とくに摂食調節に関係している OX1-R が視床下部腹内側核のニューロンに多数みられていることを免疫組織化学法を用いて明らかにした。したがって，オレキシンは視床下部腹内側核に投射し，摂食調節あるいはエネルギー調節を行っている可能性が強く示唆された。現在は，両者のニューロン間のシナプス形成を電顕的に観察している。また現在，腹内側核のニューロンの神経分布を可視化する目的で，成体の腹内側核のニューロン特異的に発現する転写因子である SF-1 をターゲットとし，SF-1-EGFP 遺伝子改変動物を作製している。

これまでの共同研究において GALP の脳室内投与は骨格筋での糖の取り込みを増加させることが示されていることから，GALP は視床下部と骨格筋との間の情報伝達に関与していることが示唆される。また中枢神経系において GALP はレプチンのシグナルの下流にあり，レプチンによるエネルギー代謝経路の一翼を担っていると考えられている。そこで，現在末梢組織，特に骨格筋における AMP キナーゼのリン酸化を生化学的にしらべ，脂肪酸代謝との関係やその詳細な分子機構について検討をしているところである。

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

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

アディポネクチンは，レプチンとともに脂肪細胞から分泌されるアディポカインである。レプチンは中枢では生体内エネルギーセンサーである視床下部で AMPK 活性を低下させることにより摂食を抑制することが報告されているが，アディポネクチンの中枢における生理的な役割は十分には解明されていない。そこで我々はアディポネクチンの中枢における生理的役割に興味をいだき，本研究を行った。

血清・髄液中のアディポネクチン濃度や視床下部のアディポネクチン受容体発現と摂食との関連について検討したところ，血糖値やインスリン値，レプチン値が絶食時に低く再摂食時に上昇したのに対し，アディポネクチンの血中濃度，髄液濃度は逆に絶食時に高く再摂食時には有意に低下した。さらに視床下部弓状核において，AdipoR1 の発現は絶食時に高く再摂食時に有意に低下したことから，視床下部におけるアディポネクチンは主に絶食時に作用している可能性が示唆された。視床下部弓状核の AMPK 活性は再摂食により有意に低下したが，アディポネクチンはこの再摂食によって低下した AMPK 活性をAdipoR1を介して有意に増加させた。さらにアディポネクチンの摂食に対する作用について検討したところ，アディポネクチンは摂食量を AdipoR1，AMPK を介して増加させ，また，個体の酸素消費量を有意に抑制した。以上のことからアディポネクチンは視床下部弓状核を介して，AMPK 活性化作用，摂食量増加作用，エネルギー代謝抑制作用を有することが明らかとなった。

本研究より，アディポネクチンの生理的な役割として，レプチンと協調して摂食を調節していることが明らかとなった。また，一回ごとの摂食という短期のエネルギー調節だけでなく，アディポネクチンはレプチンとともに長期的なエネルギー調節，すなわち体脂肪量の調節にも重要な役割を果たしていると考えられる。すなわち脂肪量が低下するとレプチンは低下しアディポネクチンは増加し，エネルギー代謝を抑制し脂肪蓄積を増加するように働く。一方脂肪量が増加すると今度は逆にレプチンが増加しアディポネクチンが低下し，エネルギー代謝が亢進して脂肪蓄積が過度に起こらないように働く。このようにレプチンとアディポネクチンは短期的なあるいは長期的なエネルギー調節に重要な役割を果たしていると考えられる。

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

八木 健，平林 敬浩，金子 涼輔，平野 敬三，糸賀 康人（大阪大学大学院・生命機能研究科）
平林 真澄（生理学研究所･遺伝子改変動物作製室）

CNR/プロトカドヘリン (Pcdh) は脊椎動物の脳神経で発現する多様化膜分子群であり, マウスでは 14 種のファミリー分子が存在している。これらの各分子種は染色体上で縦列し，多様化した可変領域エクソンがそれぞれ共通の定常領域エクソンにスプライシングされ発現する。各分子種の発現様式を単一プルキンエ細胞レベルで解析した結果, 一つのプルキンエ細胞では Pcdh 分子群は複数の分子種を発現し，その分子種の組み合わせは個々のプルキンエ細胞ごとに異なっていた。また，発現している各分子種について染色体由来を調べると，片方の染色体のみに由来するものが多数であったことから，同遺伝子には今までにない新たな染色体レベルでの発現調節機構の存在が示唆されている。

これまでに動物種間でのゲノム相同性解析，DNase Hypersensitive assay さらに培養細胞を用いた Luciferase Reporter Assay などの解析から Pcdh 遺伝子の発現調節に関わることが予想される複数の遺伝子領域を同定した。

本研究ではこの遺伝子領域が Pcdh 遺伝子発現調節にどのように関わっているかを動物個体レベルで解析するため, 最小プロモータおよび reporter 遺伝子の下流に同領域をつなげた外来遺伝子を構築し，これを導入したトランスジェニックマウスの作製を行った。現在までに複数のトランスジェニックマウス系統が得られており，現在詳細な解析を進めている。

10. ゲノム情報に基づく神経発生関連膜タンパク分子機能の解析

高橋　弘樹，山田 成宏，木下 典行（基礎生物学研究所）
堀田　耕司（慶応大学理工学部）
小笠原　道生（千葉大学理学系研究科）
岡戸　晴生，平井　志伸（東京都神経科学総合研究所）
稲葉　一男，中地　美都（筑波大学下田臨海実験センター）
坂田　宗平（学習院大学理学部）
大澤　匡範，衣笠　哲史（東京大学大学院医学系研究科）
西野　敦雄
岡村　康司

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

1) 神経-脊索相互作用の分子基盤の確立

中軸中胚葉である脊索は体軸伸長において働くのみならず，神経誘導や神経管形成過程においても重要な役割を果たしていると考えられている (Jessell, 2000; Wilson and Maden, 2005)。これまでに尾索動物ホヤを用いて，*Brachyury* 遺伝子のターゲット遺伝子群 450 遺伝子を明らかにし，ホヤの脊索形成過程の分子機構を解析してきた (Takahashi, et.al. 1999; Hotta et al. 2000; Hotta, et al. 2007)。さらに，脊索形成に必須である *Brachyury* 遺伝子のターゲット遺伝子群のうち脊索に発現する遺伝子が 42 遺伝子，神経系に発現する遺伝子が 239 遺伝子も存在

することが新たに明らかになった(Hotta, et al. 2008)。また，脊索特異的に発現する遺伝子のモルホリノアンチセンスオリゴ(MO)によるノックダウン機能阻害実験の結果から，脊索形成に異常がみられるのみならず神経形成過程に異常が現れる遺伝子が数多く明らかになり，脊索-神経相互作用の分子的実体が明らかになりつつある。

2) **神経-脊索相互作用を担う膜タンパク質の機能解析**

ショウジョウバエのScabrous (fibrinogrn-like protein) は遺伝学的な解析から感覚神経細胞分化に Notch と協調して働くことが示唆されているが，その脊索動物ホモログの発生過程における役割は解析されていない。これまでに, 尾索動物ホヤの*Brachyury*の標的遺伝子である*Ci-fibrn*の mRNA は脊索細胞のみに特異的に発現することを脊索動物で初めて明らかにした。Ci-fibrn 蛋白質の局在を Ci-fibrn:EGFP 融合蛋白質あるいは Ci-fibrn 抗体を作製して調べたところ，脊索鞘に加えて脊索細胞外の脊側神経細胞の軸索に沿って繊維状に伸びて局在することが明らかになった。そこで，Notch と Scabrous のホモログである Ci-fibrn の関係を解析すると，Notch シグナルによって Ci-fibrn タンパク質の局在そのものが変化することが明らかになった。また，培養細胞を用いた免疫沈降実験から Notch の細胞外ドメインと Ci-fibrn の C 末端部分が結合することが示された。さらに，Notch シグナルを阻害すると同時に Ci-fibrn の変異体を発現させると幼生期では，頭部において神経細胞の分化異常，尾部において神経軸索の走行異常が観察された。このことから，脊索動物 Ci-Notch と Ci-fibrn は，神経細胞分化・形成において協調的に働くことが示唆された。

発表論文：

1. Hotta, K., Takahashi, H., Satoh, N. & Gojobori, T. *Brachyury*-downstream gene sets in a chordate, *Ciona intestinalis*: Integrating notochord specification, morphogenesis and chordate evolution. ***Evo. Dev.*** 10, 37-51 (2008).
2. Hotta, K., Yamada, S., Ueno, N., Satoh, N. & Takahashi, H. *Brachyury*-downstream notochord genes and convergent extension in *Ciona intestinalis* embryos. ***Dev. Growth Differ.*** 49, 373-382 (2007).
3. Hotta, K., Mituhara, K., Takahashi, H., Inaba, K., Oka, K., Gojobori, T. & Ikeo, K. A web-based interactive developmental table for ascidian *Ciona intestinalis*, including 3D real-image embryo reconstructions: I. from fertilized egg to hatching larva. ***Dev Dynamics.*** 236, 1790-1805 (2007).

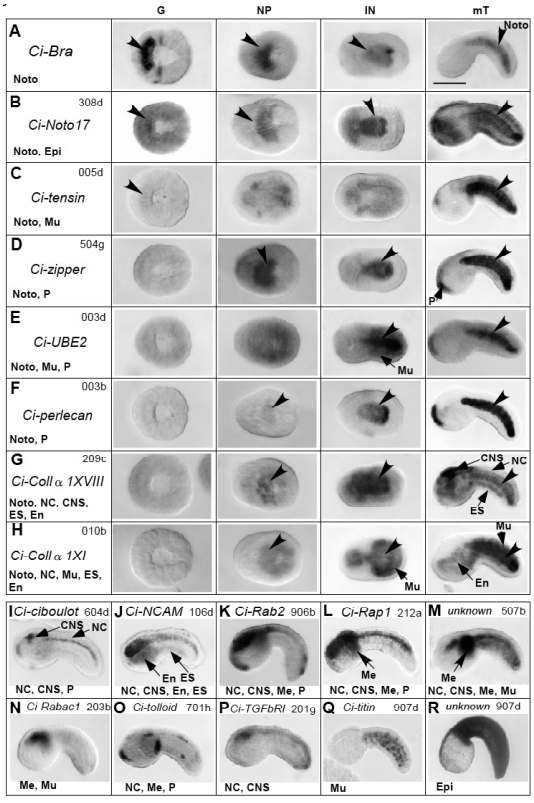


図　カタユウレイボヤ胚での遺伝子発現を in situ hybridization で見たもの

11. VSP（膜電位感受性蛋白）の鳥類における生理機能の解明

本間 光一（帝京大学薬学部），山口真二（帝京大学薬学部），蒲野淑子（総合研究大学院大学）
黒川竜紀，岡村康司

本研究課題では，鳥類（ニワトリ）を用いて胚発生と脳におけるVSPの役割を，生化学的，生理学的に解析することにより，その生理機能を明らかにすることを目的とした。

ニワトリ VSP の構造決定

ホヤ VSP と，独自に構造決定したニワトリ VSP のアミノ酸配列を比較した結果，高い相同性を示し，ゲート電流活性，酵素活性に必要とされるアミノ酸も保存されていた。また，膜貫通領域の 4 番目の領域 (Segment4)は，正電荷を持つアミノ酸残基が 2 つの疎水性アミノ酸残基にはさまれながら 4 回以上繰り返し並ぶという特徴的な構造を示すことが分かった。

ニワトリ VSP のゲート電流活性と酵素活性の測定

ゲート電流の定量解析を行った結果，膜電位依存的に電荷量が変化した。また，Segment4 の正電荷を欠失させた蛋白質では電流が見られなくなることから，膜電位の感知は Segment4 の移動に基づいていることが示唆された。酵素活性の測定結果では，ニワトリ VSP がホスファターゼ活性を持ち，さらに膜電位依存性を持つことが分かった。

ニワトリ VSP の遺伝子発現局在の解析

ニワトリの胚発生時と孵化後の脳における遺伝子発現を解析した結果，胚発生時では 1 日胚から 7 日胚まで発現しており，孵化後の脳では大脳・中脳・小脳に発現がみられた。また組織局在としては，胚発生時では体節・腎・消化管など様々な器官に発現しており，大脳では脳室に沿って，中脳では層構造に，小脳ではプルキンエ細胞や顆粒細胞に発現していることが示された。

ニワトリ VSP の細胞形態におよぼす機能解析

ニワトリ培養線維芽細胞 DF-1 に VSP 発現ベクターを遺伝子導入した。すると，細胞の形状が変化し，突起進展が見られるようになった。これは，VSP が細胞形態の維持や分化に関与している可能性をしめす。

本研究により VSP は，高等脊椎動物である鳥類においても膜電位感受性，酵素活性が共に保存された膜蛋白であり，ニワトリの胚発生や脳機能において重要な役割を担っていることが示唆された。また，細胞の形態維持や分化に関与する可能性が示された。今後，VSP 発現組織において，*in vivo*，*in ovo* での過剰発現や遺伝子抑圧を行い，VSP 遺伝子の重要性を示していくことが課題である。

学会発表

Yamaguchi S, Kamigaki H, Takano T, Homma K.J. Developmental expression of avian VSP: Electro-chemical signaling by membrane proteins-Biodiversity and Principle 2007.

12. 電位依存性プロトンチャネル VSOP の感染防御における役割

鈴木和男，大島正道（国立感染症研究所），荒谷康昭（横浜市立大学）
大河内善史，岡村康司

電位依存性プロトンチャネルは貪食細胞の食機能と活性酸素生成において，細胞内 pH，ファゴゾーム内 pH および酵素活性化に関わる分子と考えられてきたが，その分子実体は長く不明であった。本研究では電位依存性プロトンチャネル VSOP が感染防御の主要な細胞である好中球とマクロファージにおいてどのようなメカニズムで生理機能に関わりかを明らかにし，感染防御機能における VSOP の役割を明らかにする。

VSOP の Gene trap 法によるノックアウトマウスのバッククロスを行い，B6 については 10 代の掛け合わせが終了し，個体マウスを用いて感染実験を行う準備が整った。

正常マウスとノックアウトマウスから好中球を単離し，活性酸素産生能を比較したところ，ノックアウトマウスで，superoxide anion の産生が有為に減少しているという知見が得られた。パッチクランプ法による計測の結果，ノックアウトマウスでは，PMA 刺激時においても静止時

においても，電位依存性プロトンチャネル電流が見られなかった。Current clamp モードでの計測により PMA 刺激時に膜電位が，正常マウス由来の好中球とどのように異なるかも検証を試みている。

学会発表：

口頭発表

Y. Okochi, M. Sasaki, H. Iwasaki, T. Kurokawa & Y. Okamura

「Biochemical characterization of voltage-gated proton channel, VSOP, in phagocytes」

42nd ANNUAL SCIENTIFIC MEETING OF ESCI IN Geneva, Switzerland, 26 29 MARCH 2008.

ポスター発表

A. El Chemaly, Y. Okochi, Y. Okamura & N. Demaurex

「Is the Hv1 proton channel required for the activity of the NADPH oxidase?」

42nd ANNUAL SCIENTIFIC MEETING OF ESCI IN Geneva, Switzerland, 26 29 MARCH 2008.

Aug;5(8):683-5.

13. 膜電位センサー分子の動作原理解明とモジュール組換え

宮脇敦史，筒井秀和，水野秀明，片山博幸（理化学研究所）
村田喜理，岡村康司，大河内　善史

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

神経細胞においては，活動電位と呼ばれる動的な膜電位変化が起こる。神経回路の中を駆け巡る活動電位の時空間パターンを可視化するための実用的な光プローブが求められてきた。理研脳科学総合研究センター宮脇チームと自然科学研究機構生理学研究所神経分化研究部門の研究チームは，2005 年以降，Ci-VSP の電位センサー領域を利用して蛍光性膜電位プローブを開発することを企て膜電位依存的なタンパク質の微妙な構造変化を蛍光信号の変化に効率よく変換するシステムを目指した。Ci-VSP の電位センサー領域に，たとえばオワンクラゲに由来する 2 種類の蛍光タンパク質（CFP と YFP）を融合し，純タンパク質性の膜電位感受性蛍光プローブを作製した。CFP の発光スペクトルと YFP の吸収スペクトルの間には重なりがあるため，CFP と YFP との相対的空間配置に依存して CFP の励起エネルギーが YFP へ移動する現象（蛍光共鳴エネルギー移動）で発光させる。研究チームは，蛍光共鳴エネルギー移動に基づくさまざまなプローブ遺伝子を構築し，アフリカツメガエルの卵母細胞発現システムに導入し，それらの性能を解析した。同様のアプローチによる蛍光性膜電位プローブの開発は，ほかの研究チームでも精力的になされてきたが，感度が低いことが欠点として指摘されていた。

サンゴやイソギンチャクの仲間には蛍光タンパク質を産生するものがある。宮脇チームは有限会社アマルガムと共同で，これら海洋動物から蛍光タンパク質の遺伝子を取り出し，2002 年に沖縄の海で採集した石サンゴのウミキノコとクサビライシを材料に，それぞれ mUKG と mKOκという単量体の蛍光タンパク質を開発した。

mUKG は緑色の，mKOκはオレンジ色の蛍光を発する。mUKG の発光スペクトルと mKOκ の吸収スペクトルの間に重なりがあるため，CFP/YFP と同様に mUKG/mKOκもまた蛍光共鳴エネルギー移動を検出するペアとして活用できる。mUKG と mKOκ を Ci-VSP の電位センサー領域に融合したコンストラクトを数多く作製し，膜電位変化に対する反応を調べそれらの中から著しい反応を示すものが見つかり，「Mermaid（マーメイド）」と命名した。Mermaid は，ほかの純タンパク質性の蛍光性膜電位センサーと比べて数倍から 10 倍の感度を示す。

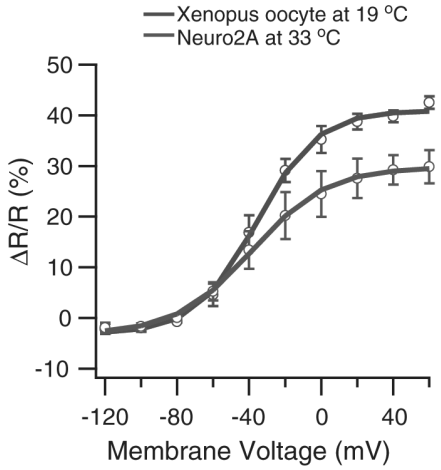
培養細胞に発現させて膜電位変化に伴う蛍光信号を解

析したところ神経細胞で起こる活動電位に相当する変化をリアルタイムに捉えることができた。さらに蛍光画像を高速に取得することができる顕微鏡システムを構築して，Mermaid を発現する大脳皮質神経細胞や心筋細胞の電気活動の広がりを直接的に可視化することに成功した。

今後，さまざまな動物種を使って Mermaid を発現する形質転換個体が作製されると期待される。Mermaid を特定のニューロンに発現させることにより，これまで不可能であった特定細胞種レベルでポピュレーションでの電気的活動のダイナミクスを解析できるようになり，脳の情報処理獲得の制御を知ることにつながるであろう。高感度の蛍光性膜電位プローブを心筋細胞などで発現させれば，in vivo レベルでの組織の生理の研究に役立つツールとなると期待される。非興奮性の細胞種で発現することができれば，これまで明らかにされなかった生理的な膜電位変化を解析することができる。実際，Ci-VSP は非興奮性の細胞種にも発現が検出されておりそうした存在の意義に迫ることができる。さらに膜電位を指標とするドラッグ･スクリーニングにも役立つことが期待される。

発表論文

Tsutsui H, Karasawa S, Okamura Y, Miyawaki A.Improving membrane voltage measurements using FRET with new fluorescent proteins.2008, Nature Methods Aug;5(8):683-5.



図：Mermaid の FRET 変化量の電位依存特性

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

斎藤成也，隅山健太（国立遺伝学研究所）
蒲野淑子，増山和花（総合研究大学院大学）
西野敦雄，岡村康司（岡崎統合バイオサイエンスセンター）

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

前年度 VSP について進めた解析を，電位依存性プロトンチャネルについて進め，ウニ，珊瑚，ホヤ，マウス由来の VSOP の電気生理学的特性の比較を行った。その結果，同じ温度での測定で，マウス＜ホヤ＜珊瑚＜ウニの順番で活性化速度が速くなり，生息温度との相関が考えられた。マウスとウニでは，20 倍以上の速度の違いが見られた（最大値の半値に達するまでの時間での比較)。低温で生息する生物程，速い時定数の活性化を起こす傾向にあることは，VSOP を発現する貪食細胞が異なる温度でも生物種に適した効率での活性酸素産生を担えるように環境適応をしている可能性がある。今後，近縁種で異

なる生息温度の種間での比較を行うことによりこの仮説を検証したい。

VSP については，Xenopus VSP の膜電位依存性を他の動物種と比較する実験を行い，ホヤ＜ゼブラフィッシュ＜カエルの順で，閾値が右にシフトしていることがわかった。これまでほ乳類由来の VSP はゲート電流が確認できないことから，進化の過程で次第に電位センサーとしての機能が退化し，電位感受性を失った可能性が示唆された。このことは，前年度に明らかにした，ほ乳類での進化速度の増加と対応していると推察され，VSP の生理機能がほ乳類進化の過程で大きく変更された可能性がある。

学会発表

岡村康司, Thomas McCormack, 黒川竜紀, 斎藤成也「電位センサー蛋白の多様性から見た細胞膜電位シグナル伝達機構の進化」日本進化学会　シンポジウム 2008.8

15. 抹消温度受容器における温度検出機構の解析

水村和枝，片野坂公明，申正樹，田口　徹，妹尾　詩織（名古屋大学環境医学研究所）
矢島弘毅（名古屋掖済会病院整形外科）
Sravan Mandadi，曽我部隆彰，柴崎貢志，富永真琴
（生理学研究所・岡崎統合バイオサイエンスセンター）

現在までに明らかになっている 9 つの温度感受性 TRP チャネルのうち 5 つは体温近傍の温かい温度で活性化する。このうち，TRPV3, TRPV4 は表皮ケラチノサイトに強く発現することが知られている。TRPV3, TRPV4 は温度情報を電気信号に変換する温度センサーとして機能するが，温度感覚が感覚神経から中枢に伝達されて初めて生じることは，ケラチノサイトで感知された温度情報が何らかの形で感覚神経に伝達されることを示唆する。これまでの形態学的な研究から，ケラチノサイトと感覚神経の間にはシナプスのような構造は存在しないことが知られている。新生仔マウスの表皮ケラチノサイトと後根神経節細胞の共培養系を確立した。ケラチノサイトは Ca^{2+}要求性が小さく, Ca^{2+} を必要とする感覚神経細胞との共培養は困難をきわめたが，最適条件を見いだした。その共培養の細胞に温度刺激を加えて，細胞内 Ca^{2+}濃度の変化を観察した。放出される物質が洗い流されないようにチェンバー溶液の流れを止めて，チェンバー自身を加熱した。40 度までの温度刺激によって両細胞で細胞内 Ca^{2+}濃度増加が観察された。複数の ATP 受容体阻害剤を用いて実験行って感覚神経細胞での細胞内 Ca^{2+}濃度増加のみが特異的に阻害されたことから，温度刺激によってケラチノサイトから ATP が放出されて感覚神経に発現する ATP 受容体に作用することが強く示唆された。これを以下の実験で検証した。イオンチャネル型 ATP 受容体 P2X2 を強制発現させた HEK293 細胞をバイオセンサーとして用いて，マウスケラチノサイトと共培養して温度刺激によってケラチノサイトから ATP が放出されること確認した。また，TRPV3 欠損マウスではなく野生型マウスのケラチノサイトから ATP が熱依存的に放出されることを生化学的に証明した。

16. 感覚神経における侵害刺激センサーとしての TRPA1 の役割

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

2003 年に侵害性冷刺激受容体として遺伝子クローニングされた TRPA1 は，その後複数の侵害刺激（わさび，

マスタードオイル，シナモンなど）によって活性化される侵害刺激受容の中心的分子として注目されている。炎症時に大量に放出されるトリプシン，トリプターゼがPAR2受容体の活性化からPIP_2量の減少を介してTRPA1活性を増強させることを報告していたが，同じく炎症時に放出されるブラジキニンがそのGqに共役した代謝型受容体の活性化からPKA, PKCの両カスケードを介してTRPA1活性を増強させることが明らかとなった。両カスケードのうち，PKAの活性化がより強く働くことが分かり，このメカニズムによるTRPA1の活性化が炎症時痛の増強に関与することは，マウスを用いた個体レベルの解析で検証された。

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

宇理須恒雄，手老龍吾（分子科学研究所）
小中信典（徳島大学工学部）
内海 裕一（兵庫県立大学高度産業科学技術研究所）
藤原　邦代（兵庫県立大学大学院工学研究科）
南雲　陽子（筑波大学大学院生命環境科学研究科）
柴崎貢志，富永真琴（生理学研究所・岡崎統合バイオサイエンスセンター）

分子科学・材料科学分野のシリコン表面ナノ制御技術およびアレイ構造形成技術と生命科学分野の膜タンパク発現・精製技術とを融合し，新たにシリコン基板上への膜タンパク/脂質二重膜の集積技術を開発するとともに，これを発展させて，シリコン電子集積回路と統合した，新規バイオ分子センサーを開発することを目的とする。さらに，単一チャンネル単一イオン計測など新たな膜タンパク電気生理特性の新規計測法や，ゲノム創薬用大規模スクリーニング応用素子の開発基盤を確立する。絶縁特性が良い事で知られているSOI (Si on Insulator) 構造のシリコン基板を用い，これにさらに酸化膜を形成することで，テフロン並の低雑音基板を実現できることを理論的示し，実際に，グラミシジン/DϕPCの系でテフロン基板なみの低雑音で単一イオンチャンネル電流の観測に成功した。厚さ600μmのSOI基板に直径1μm前後の微細貫通孔を形成する技術を開発した。この微細貫通孔にカプサイシン受容体TRPV1を強制発現させたHEK293細胞を吸引，固定し，ホールセルモードを形成した。パッチ抵抗を数百MΩにまで高めることができた。ついで，片側のチェンバーにカプサイシン溶液を流して，TRPV1チャンネルの活性化によると思われる電流の計測に成功した。今後，このシリコン基板をいかに効率よくカプサイシン感知センサーとして利用できるようにするか，検討を重ねていきたい。

18. ミツバチの社会性行動を担う新規温度受容センサーの生理機能の解析

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

2003年に侵害性冷刺激受容体として遺伝子クローニングされたTRPA1は，その後複数の侵害刺激（わさび，マスタードオイル，シナモンなど）によって活性化される侵害刺激受容の中心的分子として注目されている。TRPAファミリーとTRPMファミリーに属するミツバチTRPチャネル6つをクローニングして哺乳類expression vectorに入れたコンストラクトを作成した。その6つのミツバチTRPチャネルをHEK293細胞に強制発現させて，Ca^{2+}イメージング法を用いて温度感受性を検討した。ミツバチの体温はそれほど高くないので，HEK293細胞は

33 度で培養した。37 度で培養した時には温度刺激による反応がみられなかった 1 つの TRPA サブファミリーに属するチャネルが 33 度で培養すると温度刺激に対して大きな反応を示した。このチャネル応答は Ca^{2+}イメージング法，全細胞型パッチクランプ法で確認し，Ca^{2+}透過性の高い非選択性陽イオンチャネルとして機能することが判明した。また，この TRPA チャネルは哺乳類 TRPA1 チャネルに作用することが知られている複数の化合物によっても活性化することが分かった。ミツバチでは遺伝子改変個体を作成することが困難なため，この TRPA チャネルを強発現するショウジョウバエを作成して温度感受性を検討している。活性化温度閾値は細胞培養温度である 33 度より低いために，一度冷刺激を加えた後に熱刺激したときに活性化電流が観察される。培養温度が活性化温度閾値が低くて，温度上昇時にのみチャネルが活性することを確認すべく，昆虫細胞 sf-9 細胞やアフリカツメガエルを用いたアッセイ系の確立を目指している。

19. 膵β細胞のインスリン分泌様式による TRPM2 channel の意義

最上秀夫（浜松医科大学医学部）
富永真琴（生理学研究所・岡崎統合バイオサイエンスセンター）

TRPM2 チャネルは 2006 年に温度感受性があることが分かり，膵β細胞での温度依存性インスリン放出に関与することが報告された。膵β細胞における高濃度グルコース刺激によって少なくとも 1) Ca^{2+}, DAG (Diacylglycerol)，及び cAMP が同時に惹起されることがインスリン分泌第二相の形成に必要である。2) 更にインスリン開口胞出時における細胞膜近傍でのこれら分泌シグナルの変化，特に細胞膜近傍の Ca^{2+}変化が重要であり isoform 選択的な PKC 活性化の鍵となると考えている。よって，第二相の分泌様式に密接に関係していると考えられる TRPM2 チャネルを介する上記シグナル変化，更にインスリン分泌に及ぼす影響を全反射蛍光顕微鏡などを用いてリアルタイムに検討して，膵β細胞における TRPM2 チャネルの生理的意義を確立すること及び cADPribose 合成酵素である CD38 の役割を再評価することを目的とした。インスリン産生細胞株である INS-1 及び Min6 細胞を接着性の少ない培養ディッシュに蒔くと形態的にも機能的にも本来のラ氏島の中の膵β細胞群に近い pseudoislet (PI) を形成することが知られている。TRPM2 を安定発現細胞及びノックダウン細胞を用いて PI を作製して培養し，その培養環境下と同一条件下でグルコース刺激によるインスリン分泌シグナルの変化 (Ca^{2+}, cAMP, DAG) をモニターすると同時にインスリン分泌を測定して，インスリン分泌細胞における TRPM2 の役割の検討を行った。

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

山田勝也（弘前大学医学部）
富永真琴（生理学研究所・岡崎統合バイオサイエンスセンター）

中脳黒質網様部 (SNr) は運動制御を司る大脳基底核の出力核で，脳内で最も高頻度の自発発火活動を示す GABA 作動性ニューロンから構成される。我々はマウス脳スライス標本を用いた細胞外記録により，SNr ニューロンが視床下部摂食中枢ニューロンと同様，グルコース濃度の低下により自発発火活動が増大するグルコース感受性を有すること，ならびにドーパミン投与によりオシレーションを含む発火増大を示すことを見出した。

本研究では，これらの特性に寄与するシナプス伝達機構を明らかにする目的で，生後 20 日齢前後の野生型およびドーパミン受容体欠損マウスを用いてスライスパッチクランプ法による解析を行った。昨年度確立した，黒質

緻密部から SNr へと伸びる樹状突起を保存したスライス標本の SNr ニューロンからホールセル記録を行ない，近傍に細胞外電気刺激を与えることによりシナプス電流を誘発した。このシナプス電流には non-NMDA グルタミン酸性成分，NMDA 性成分，GABA 性成分の他に，これらをすべて薬理学的に遮断した状態で誘発される成分があり，この成分は strychnine で遮断されたことから，グリシン受容体を介する成分と考えられる。中脳領域のニューロンでグリシン性シナプス入力を受けるニューロンは少なく，これが SNr ニューロンのユニークな発火特性に寄与していることが示唆される。

21. 凍結割断法を用いた一次嗅覚路の解析

高見　茂，長谷川 瑠美（杏林大学保健学部）
重本　隆一

脳由来神経栄養因子 (BDNF) の膜受容体 TrkB が，ラット嗅細胞軸索膜近傍に存在している事が，我々の研究室により包埋後イムノゴールド法を用いて明らかにされた。本共同研究では, Freeze-fracture replica immunolabeling (FRIL) 法を用いて，ラット嗅細胞軸索膜における TrkB 分子の分布を観察する事を，平成 19 年度の目的とした。成獣 Wister ラットを灌流固定後，嗅細胞軸索を含む嗅粘膜および嗅球組織を採取した。凍結割断用の前処理，凍結割断，割断面のカーボンおよびプラチナコート，SDS 処理を行なった。これに，TrkB，あるいは脳組織ニューロン軸索のマーカーのひとつ SNAP25 抗体を用いたイムノゴールド法を行い，5 nm あるいは 10 nm 金粒子を標識した。この組織試料をグリッドに乗せ，透過電子顕微鏡 (TEM) 観察を行なった。まず，嗅細胞軸索の形態学的同定を行なった。嗅粘膜では粘膜固有層内の軸索が集合している嗅神経線維束 (ONB)，嗅球では，嗅球に入る前，および嗅球表層の ONB を観察した。ONB の同定は可能であったが, ONB を構成する軸索と軸索を包む Olfactory ensheathing cell (OEC) との判別が膜内粒子の密度や分布パターンの上では困難であった。次に，各抗体の免疫反応性について検討した。嗅粘膜における SNAP25 免疫反応は，特異的にみられなかった。TrkB 免疫反応でも，SNAP25 と同様，嗅粘膜では特異的な反応がみられなかった。一方，嗅球における TrkB 免疫反応は，比較的特異的であった。

上記実験で用いた方法は，脳組織において至適な条件であったため，平成 20 年度は，特に嗅粘膜において，至適な実験条件を設定する必要がある。至適条件において TrkB および SNAP25 あるいは嗅細胞軸索や OEC のマーカーで二重染色をする事によって, TrkB の分布を解析する必要がある。また，TrkB ノックアウト動物を用いてコントロール実験を行う必要もある。

22. 運動学習記憶に関連するシナプス微細形態の検索

永雄 総一，松野　仁美，岡本　武人，戸高　宏（理化学研究所）
岡部 繁男（東京医科歯科大学医学部）
首藤 文洋（筑波大学大学院人間総合科学）
Wajeeha Aziz (CPSP (College of Physicians & Surgeons Pakistan))
久保 義弘，重本　隆一（生理学研究所）

眼球運動の学習のメカニズムと長期抑圧現象の関係を調べる為に，薬理学と電気生理学を用いた研究を行う。RNA マイクロアレイを用いて，記憶形成に関係する遺伝子を検索し小脳における記憶定着のメカニズムを解析する。小脳皮質のシナプス伝達可塑性である長期抑圧 (LTD)が運動学習の原因であるという仮説が提唱されて

いる。我々はマウスの眼球反射を用いて，長期と短期の運動学習をそれぞれ定量評価できるパラダイムを開発した。学習後に小脳皮質の出力を可逆的に遮断したところ，短期の学習の記憶は完全に消去されるのに対して，長期の学習の記憶は変化しなかった。さらに，長期の学習の記憶の痕跡が，皮質の出力先である前庭核に形成されていることと，LTD が短期と長期の学習に不可欠であることを見出した。これらの所見から，始めに小脳皮質の LTD により学習の記憶痕跡が形成されるが，学習が長期間に及ぶと，記憶痕跡がその出力先の前庭核に移動し，そこで長期の記憶痕跡として固定化されるという仮説が示唆される。小脳皮質に形成された短期記憶の痕跡が，いつどのようにしてシナプスを越えて移動するか，そのメカニズムを実験的に検討した。マウスの水平性視機性眼球反応 (HOKR) の適応を用いた実験を行い，心理学で昔からよく知られている分散効果に，記憶痕跡の移動が関与していることと，記憶痕跡の移動が学習の開始後の数時間で生じることを見出した。サルを用いた実験により，マウスで得られた所見が霊長類で確認できるかを検討した。形態学の研究を行い，前庭核で形成される長期の運動記憶の痕跡を担うシナプスの部位を検討した。また，マイクロアレイ法を用いて，運動学習に相関して小脳皮質で発現が変動する遺伝子群を同定し，記憶痕跡の固定化に関与する可能性のある分子群を検討した。

23. mGluR1 レスキューマウスの電気生理学的解析

饗場　篤，葛西 秀俊，越後 瑠夏（神戸大学・大学院医学研究科）
井本敬二，宮田麻理子

代謝型グルタミン酸受容体一型には二つのサブタイプがある。一つは C 末に長い domain を有し，homer に結合する mGluR1a であり，他方は結合しない mGluR1b である。これら二つのサブタイプが細胞内にどのようなシグナルカスケードを駆動させ，ひいてはシナプス機能，生体にどのような役割を果たしているのかは十分明らかになっていない。そこで，mGluR1KO の小脳プルキンエ細胞のみに，このサブタイプのどちらかのみをレスキューさせたマウスにおいて，行動学的，電気生理学的な解析を網羅的に行った。平行線維シナプスの高頻度刺激による mGluR1current は 30Hz あたりでは，mGluR1b レスキューマウスのほうが，mGluR1a マウスより小さい値を示したが，200Hz 以上の高頻度では両者に差は認められなかった。行動では mGluR1b レスキューマウスは協調運動能力は正常であるにもかかわらず，運動学習には障害みとめられた。mGluR1a マウスはこれらが正常であった。今後これらの行動の違いと電気生理学的所見の関連を検討する予定である。

24. ラット精子幹細胞を用いた顕微授精

篠原 隆司（京都大学大学院医学研究科・遺伝医学講座分子遺伝学分野）
平林 真澄（生理学研究所・遺伝子改変動物作製室）

【ラット精子幹細胞を用いたトランスジェニックラットの作成】

精子幹細胞からのノックアウト動物作製には，1) 試験管内での精子幹細胞の遺伝子改変，2) 遺伝子改変された幹細胞からの精子，子孫の作製が必要となる。昨年度我々はラット精子幹細胞をマウスで発生させ，そこから得た精子で子孫作製に成功したことを報告した（PNAS 103, 13624 (2006))。今年はこの 2) のステップをさらに進め，遺伝子改変した精子幹細胞からの子孫作製をマウスへの異種移植法を用いて行った。今回は特に ES 細胞の遺伝子破壊によく利用されているレトロウイルス，レンチウイルスベクターを用いた検討を行った。

生後 10 日～14 日目の SD ラットの精巣をトリプシンとコラゲナーゼにより酵素処理を施し，バラバラにした細

胞に enhanced green fluorescence protein (EGFP) を発現するレトロウイルスもしくはレンチウイルスベクターを感染させた。ウイルス感染した培養細胞はブスルファン処理により不妊になったヌードマウスの精巣内に移植した。移植後，5 ヶ月目に精巣をバラバラにし，EGFP を発現するラット生殖細胞を回収した。回収された細胞のうち，round spermatids, spermatozoa を用いて合計 742 個の卵細胞に顕微授精を行ったところ，31 匹の産仔を得た。このうち 15 匹が EGFP を発現するトランスジェニックラットであった。興味深いことにレトロウイルスを用いた場合には産仔を得ることはできたが（6 匹/312 個の卵子），トランスジェニック動物を得ることができなかった。これはレンチウイルスの方が効率よく遺伝子改変に利用できることを示している（25 匹/430 個の卵子，15 匹のトランスジェニック産仔)。

この作製効率は通常の前核への DNA 注入法を用いた場合に比較して, 異種移植法を用いた場合の方が約5〜10倍の効率でトランスジェニックラットの作製ができることを示しており (10.3% vs. 〜2%), 精子幹細胞を利用した場合の利点が明らかになった。

25. 生殖幹細胞を用いたラットゲノムへの外来遺伝子導入ならびに内在遺伝子改変

保地 眞一（信州大学・繊維学部）
土屋 隆司，辻岡　那美，長瀬　裕樹，渡辺　香（信州大学大学院・工学系研究科）
平林 真澄（生理学研究所・遺伝子改変動物作製室）

本研究では KO ラット作製技術の開発に道筋をつけるため，雄性生殖幹細胞である A 型精原細胞に着目して，生体内エレクトロポレーション法による A 型精原細胞への外来遺伝子導入，ならびにブスルファン処理したレシピエントラット精巣への A 型精原細胞移植を行った。

まず EGFP 遺伝子溶液 (3 mg/ml) を 2〜4 週齢のウィスター系雄ラットの精細管内に注入し，エレクトロポレーション処理を施した。1ヶ月後に EGFP 蛍光を呈した精巣の割合は 3.4% (2/59) であり，EGFP 陽性精巣から単離した円形精子細胞あるいは伸張精子細胞の 0.9〜2.4% が EGFP 蛍光を発した。これらの EGFP 陽性生殖細胞を同系統雌由来の卵母細胞に顕微授精したが，EGFP-Tg ラットの作出には成功しなかった。

次に EGFP 遺伝子をホモに持つ Tg ラットから A 型精原細胞を調製し，胎仔期にブスルファン感作させた 3 週齢の雄ラット精巣に移植した。精原細胞移植から 2.5〜4 ヶ月後，71% (5/7) のレシピエント精巣で EGFP 蛍光が認められた。一方，野生型ラット（未処理対照）の精巣に移植した場合, EGFP 細胞の定着は起こらなかった。EGFP 陽性精巣の凍結切片を作製して EGFP に対する免疫染色を施したところ，精細管の基底膜上に移植細胞が定着していること，精母細胞や円形精子細胞に至る分化が移植細胞由来で起こっていることが確認できた。この結果は，胎仔期のラット精巣をブスルファンで処理すると移植精原細胞の定着に必要な幹細胞ニッチが提供される，ということを示している。

26. 大脳シナプスの in vivo 2 光子画像解析

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

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

【成果】前年度に引き続き，2 光子励起法による大脳皮質

シナプス可視化技術の改良を目的として共同研究を行ってきた。具体的には，thy-1 プロモーターに GFP を導入したトランスジェニック動物 H-line おいては，明るい 2 光子蛍光が得られ，これに対して超短パルスレーザーのビーム性状，パワーやパルス幅などのスペックを最適化し，深部到達性の検討を進めた。この結果，大脳皮質の表面から 800 ミクロン位にある錐体細胞の細胞体，および樹状突起スパインは 300 ミクロン位まで観察が前年度までの研究で達成された。これに加え，ケプラーシステムの自動化により，ビーム経の組織深部の自動最適化を行い，大脳皮質全層（800 ミクロン）の錐体細胞のスパイン構造がサブミクロンレベルでの明瞭な観察が達成できた。

これに加えて，樹状突起スパインの観察には，脳の呼吸や脈拍による微細な動きを押さえることが重要である。これには手術の術式および麻酔深度が影響することがわかった。ガラス窓の固定法などについて工夫を行うことにより，再現性よく固定のよい観察が可能となった。また，生体適合性のよい合成ポリマーをガラスにコートすることを検討した結果，神経細胞そのものがより鮮明に観察されることがわかってきた。現在，グリア細胞の反応について検討中である。

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

27．CNR/プロトカドヘリン遺伝子ジーンターゲティングマウスの作製と機能解析

八木 健，平林 敬浩，平山　晃斉，岡山　厚，村上　貴洋（大阪大学大学院・生命機能研究科）
平林 真澄，冨田 江一，三宝 誠，山内 奈央子（生理学研究所 ・ 遺伝子改変動物作製室）

神経回路形成において，個々の神経細胞が適切な相手とシナプス結合を形成するには，細胞膜表面分子群による多様化分子認識機構の存在が想定される。

クラスター型プロトカドヘリン分子群である CNR (Cadherin-relatedneuronalreceptor)/プロトカドヘリン(Pcdh) αファミリーはマウスでは 14 分子種が存在しており, いずれの分子種も 1 回膜貫通型分子であり，主に中枢神経で発現が認められている。Pcdhα 遺伝子構造は各分子種ごとに異なる多様化した 14 個の縦列した可変領域エクソンと共通にスプライシングされる 3 つのエクソンからなる共通領域エクソンで構成され，各 CNR/Pcdhα分子種はひとつの可変領域エクソンと共通領域エクソンがスプライシングされ発現している。各分子種の発現様式を単一プルキンエ細胞レベルで解析した結果，一つのプルキンエ細胞では CNR/Pcdhαは複数の分子種を発現し，その分子種の組み合わせは個々のプルキンエ細胞ごとに異なっていた。また，発現している各分子種について染色体由来を調べると，片方の染色体のみに由来するものが多数であったことから，同分子群はニューロンの個性（多様性）を担う分子であることが予想される。

そこで本研究では CNR/プロトカドヘリンαファミリーの遺伝的多様性が，脳神経系においてどの様な役割をもつのかを明らかにすることを目的とし CNR/プロトカドヘリンα 遺伝子に多様化をもたらす可変領域エクソンの数を変換したジーンターゲティングマウスの作製を行った。その結果，これまでに 14 種類の可変領域エクソンを 1，4，10，18，24，27 種類に変換させたマウスの作製に成功した。これらのマウスについて野生型マウスとの相違点を解析したところ，可変領域数を変換したマウスでは Pcdhα 分子種の発現様式，神経投射に異常が認められた。