

研究会報告

〔 目 次 〕

1. イオンチャネル・トランスポーターと心血管機能：細胞機能の分子機序とその統合的理解 (代表者：尾野恭一 2009年11月25日－11月26日)	221
2. シグナル伝達の動的理解を目指す新戦略 (代表者：廣瀬謙造 2009年10月1日－10月2日)	233
3. 作動中の膜機能分子の姿をとらえる－静止画から動画へ－ (代表者：相馬義郎 2009年9月3日－9月4日)	242
4. 神経科学の新しい解析法とその応用 (代表者：高橋正身 2009年7月16日－7月18日)	251
5. 神経系の発生・分化・再生に関する研究の新展開 (代表者：仲嶋一範 2010年3月19日－3月20日)	262
6. シナプス可塑性の分子的基盤 (代表者：服部光治 2009年6月18日－6月19日)	273
7. 視知覚研究の融合を目指して－生理，心理物理，計算論 (代表者：西田眞也 2009年6月18日－6月19日)	281
8. 大脳皮質－大脳基底核連関と前頭葉機能 (代表者：宮地重弘 2009年11月26日－11月27日)	289
9. 感覚刺激・薬物による快・不快情動生成機構とその破綻 (代表者：南 雅文 2009年10月1日－10月2日)	296
10. シナプス機能と病態 (代表者：高橋琢哉 2009年12月14日－12月15日)	307
11. 大脳皮質局所回路の機能原理 (代表者：宋 文杰 2009年11月19日－11月20日)	314
12. 脳機能画像解析中級編：領域間結合解析 (代表者：河内山隆紀 2009年9月24日－9月25日)	318
13. 第3回 Motor Control 研究会 (代表者：北澤 茂 2009年5月28日－5月30日)	320
14. 上皮組織における細胞外環境感受機構 (代表者：丸中良典 2009年11月9日－11月10日)	349
15. シナプス伝達概念志向型研究 (代表者：澁木克栄 2009年11月12日－11月13日)	357
16. 中枢・末梢臓器間連携による摂食，エネルギー代謝調節 (代表者：矢田俊彦 2010年2月12日－2月13日)	366
17. 貪食細胞機能のイメージング (代表者：岡村康司 2010年1月20日－1月21日)	373
18. DNA の凝縮：物理から生理まで (代表者：前島一博 2010年3月10日)	378

19. 電子顕微鏡機能イメージングの医学・生物学への応用「感染症観察」および「その場観察」 (代表者：臼田信光 2010 年 1 月 8 日－1 月 9 日)	384
20. TRP チャネルの機能的多様性とその統一的理解 (代表者：金子周司 2009 年 6 月 4 日－6 月 5 日)	393
21. 痛みの病態生理と神経・分子機構 (代表者：倉石 泰 2009 年 12 月 10 日－12 月 11 日)	407
22. 体温調節，温度受容研究会 (代表者：小林茂夫 2009 年 9 月 10 日－9 月 11 日)	420
23. 医学生物学用超高压電子顕微鏡 (H-1250M) の 30 年 (代表者：有井達夫 2010 年 3 月 5 日－3 月 6 日)	431
24. 光を用いた神経活動の操作－操作法開発から神経回路研究への応用－ (代表者：西丸広史 2009 年 9 月 3 日－9 月 4 日)	439
25. 伴侶動物の臨床医学研究会 (比較腫瘍学・造血系腫瘍への挑戦，麻酔) (代表者：丸尾幸嗣 2009 年 12 月 3 日－12 月 4 日)	446

1. イオンチャネル・トランスポーターと心血管機能： 細胞機能の分子機序とその統合的理解

2009 年 11 月 25 日－11 月 26 日

代表・世話人：尾野恭一（秋田大学・院医・細胞生理）

所内対応者：久保義弘（生理研・神経機能素子）

- （1）低分子量 G 蛋白質 Rad による心筋細胞内 Ca^{2+} 動態の調節機構について
山川裕之，村田光繁，小柴貴子，矢田浩崇，相澤義泰，遠山周吾，福田恵一
（慶應義塾大学医学部再生医学講座）
- （2）心房筋におけるカルシウムシグナル調節機構
赤羽悟美，中瀬古寛子，伊藤雅方（東邦大学医学部医学科・大学院医学系研究科・薬理学講座）
- （3）家族性進行性心臓伝導障害のコネキシン 40 遺伝子変異と機能解析
蒔田直昌¹，住友直方²，関 明子³，萩原誠久³，望月直樹⁴
（¹長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 内臓機能生理学，²日本大学医学部 小児科，
³東京女子医大 循環器内科，⁴国立循環器病センター研究所 循環器形態部）
- （4）心筋細胞肥大における STIM1 の役割
大場貴喜，渡邊博之*，村上 学，佐藤貴子*，伊藤 宏*，尾野恭一
（秋田大学大学院医学系研究科細胞生理学講座，*循環器内科学講座）
- （5）Semi-simultaneous Imaging of Intracellular Calcium and Association of Ca^{2+} entry channel-calmodulin
森 誠之，今井裕子，井上隆司（福岡大学 医 生理学）
- （6）アルドステロン誘発心肥大における $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体の役割
伊豫田拓也¹，喜多紗斗美¹，小室一成²，西山 成³，岩本隆宏¹
（¹福岡大学医学部薬理学，²千葉大学大学院医学研究院循環病態医科学，³香川大学医学部薬理学）
- （7）新しく同定された非定型心筋細胞 atypically-shaped cardiomyocytes (ACMs) の特徴
尾松万里子，松浦 博（滋賀医大・生理・細胞機能生理）
- （8）エンドセリン A 型受容体ノックインマウスによって明らかになった新しい心筋細胞系譜
栗原裕基（東京大学 大学院医学系研究科 分子細胞生物学専攻）
- （9）アンジオテンシン変換酵素 2(ACE2)-apelin による循環機能調節
久場敬司¹，藤澤 進¹，大戸貴代¹，Josef Penninger²，Francois Verrey³，今井由美子¹
（¹秋田大学大学院医学系研究科 情報制御学・実験治療学講座，
²IMBAInstitute of Molecular Biotechnology of the Austrian Academy of the Sciences, Austria,
³Institute of Physiology and Center for Integrative Human Physiology, University of Zürich, Switzerland）
- （10）SA node の自己再生能に学ぶ心筋再生の新たな可能性
木内茂樹¹，宇佐美彬乃¹，下山多映²，大塚文徳²，伊藤理恵¹，
鈴木重人¹，上園 崇¹，栗原順一¹，小野景義¹
（¹帝京大学薬学部薬理学，²帝京大学薬学部環境衛生学）
- （11）HCN4 イオンチャネルを用いた ES 細胞由来心臓ペースメーカー細胞の分取とその特性解析
白吉安昭，伊藤真一，清水夏海，藤井裕士，池内 悠，森川久未，久留一郎
（鳥取大学大学院 医学系研究科 機能再生医科学専攻 再生医療学分野）
- （12）モルモット肺静脈心筋における自発的電気活動の発生機序の解明：組織および単離細胞を用いた検討
行方衣由紀，恒岡弥生，高原 章，田中 光（東邦大学薬学部薬物学教室）

(13) 神経栄養因子による心筋への交感神経軸索の誘導

三輪佳子¹, 李 鍾國¹, 高岸芳子², トビアス オプトホフ³,
平林真澄⁴, 神保泰彦⁵, 児玉逸雄¹

(¹名古屋大学環境医学研究所 心・血管分野, ²同発生・遺伝分野,
³アムステルダム大学医学部, ⁴生理学研究所, ⁵東京大学大学院新領域創成科)

(14) NO による心筋カルシウムチャネル調節

黒川洵子, 黒羽笑加, 松原清二, 笹野哲郎, 中村浩章, 古川哲史
(東京医科歯科大学 難治疾患研究所 生体情報薬理学分野)

(15) カルモジュリンの心筋 Ca^{2+} チャネル (Cav1.2) に対する二重作用

亀山正樹, Asmara H, 蓑部悦子, Saud Z. A., 韓 冬雲, 郭 鳳, 王 午陽, はお麗英
(鹿児島大学 大学院医歯学総合研究科 神経筋生理学)

(16) 内向き整流カリウムチャネルのマグネシウムイオンとポリアミンによらないゲート機構の探索

石原圭子, Yan Ding-Hong, 額原嗣尚 (佐賀大学医学部 生体構造機能学 器官・細胞生理学分野)

(17) 心筋興奮伝導の *in silico* 研究: 心筋ナトリウムチャネルの細胞内局在の興奮伝導への影響

津元国親¹, 芦原貴司², 倉智嘉久^{1,3}

(¹大阪大学臨床医工学融合研究教育センター,

²滋賀医科大学循環器内科・不整脈センター, ³大阪大学大学院医学系研究科)

(18) PDE3 阻害による PKA 依存的な血管収縮抑制の分子機序

西田基宏 (九州大学, 大学院薬学系研究科, 薬物中毒学分野)

(19) スタチンによる骨格筋毒性に小胞膜輸送障害が関与する

坂本多穂, 和栗 聡, 木村純子 (福島県立医科大学 医学部 薬理学講座)

(20) 後天性 QT 延長症候群の遺伝的背景と分子病態

伊藤英樹¹, 坂口知子¹, 岡 優子¹, 宮本 証¹, 堀江 稔¹, 林 維光², 松浦 博², 井本敬二³

(¹滋賀医科大学呼吸循環器内科, ²同細胞機能生理学,

³自然科学研究機構 生理学研究所 神経シグナル研究部門)

【参加者名】

蒔田直昌 (長崎大学大学院・医歯薬学総合研究科), 村田
光繁, 山川裕之 (慶應義塾大学・再生医学教室), 渡邊泰
秀, 山下寛奈, 山川知美 (浜松医科大学・医学部看護学
科), 森 誠之 (福岡大学・医学部・生理学), 古川哲史,
黒川洵子 (東京医科歯科大学・難治疾患研究所・生体情
報薬理学分野), 西田基宏 (九州大学・大学院薬学研究院・
薬効安全性学分野), 柳 (石原) 圭子 (佐賀大学・医学部・
生体構造機能学), 行方衣由紀 (東邦大学・薬学部・薬物
学教室), 津元国親, 倉智嘉久 (大阪大学・臨床医工学研
究教育融合センター), 岩本隆宏, 伊豫田拓也 (福岡大学・
医学部・薬理学), 久留一郎, 白吉安昭 (鳥取大学・大学
院医学系研究科・再生医療学), 南沢 享 (早稲田大学・
理工学術院・生命医科学科), 三尾和弘 (産業技術総合研
究所・バイオメディカル情報研究センター), 鷹野 誠,
伊藤政之 (自治医科大学・医学部・生物物理学部門), 亀

山正樹, 蓑部悦子, アスマラ ハッディムリヤ (鹿児島大
学・大学院医歯学総合研究科・神経筋生理学分野), 尾野
恭一, 大場貴喜, 岡本洋介 (秋田大学大学院・医学系研
究科・細胞生理学講座), 木村純子, 坂本多穂 (福島県立
医科大学・医学部・薬理学講座), 伊藤英樹 (滋賀医科大
学・呼吸循環器内科), 李 鍾國, 三輪佳子, 神谷香一郎,
本莊晴朗, 辻 幸臣, 植田典浩 (名古屋大学・環境医学
研究所), 松浦 博, 尾松万里子 (滋賀医科大学・生理学
講座), 栗原裕基 (東京大学・大学院医学系研究科), 小
野景義, 木内茂樹 (帝京大学・薬学部・薬理学教室), 久
場敬司 (秋田大学・大学院医学系研究科), 赤羽悟美 (東
邦大学・医学部医学科), 横山詩子 (横浜市立大学・医学
部・循環制御医学), 岩本眞理 (横浜市立大学・医学部・
小児科), 古家園子 (生理研・形態情報解析室), 井本敬
二 (生理研・神経シグナル), 久保義弘, 立山充博, 中條

浩一, Keceli Batu, 松下真一, 石井 裕 (生理研・神経

機能素子)

【概要】

平成 21 年度 11 月 25 日 (水)・26 日 (木) の 2 日間、生理学研究所コンファレンスセンターにて研究会を開催した。研究会開催に際してはコアメンバーを中心に演題を募集したところ、他施設からも多く発表希望が寄せられ、本研究会への関心の高さがうかがわれた。

イオンチャネルやトランスポーターは細胞膜電位の形成や電気的興奮、細胞内環境の維持、細胞内情報伝達系の修飾や遺伝子の転写制御等、様々な機能的役割を担っている。心血管系においてはこれらイオン輸送体の機能異常が不整脈や動脈硬化、心不全、肥大など種々の心血管病態の発現や進展に関わっていることが明らかになっており、基礎医学から臨床に至るまで多角的な視野でイオン輸送体分子の病態生理的役割を解析していく必要がある。実際、本研究会においてはイオンチャネル・イオントランスポーター分子を直接の研究テーマとした構造

機能解析 (Ca チャネル, Na/Ca 輸送体, TRP, Kir6.2, コネキシン, 電位依存性 K チャネル) に始まり、心臓自動能、肥大・心不全、家族性伝導障害、QT 延長症候群、心筋細胞内 Ca 動態、再生、血管平滑筋の収縮制御、in silico 研究、創薬・循環薬理、心臓の分化など、イオン輸送体と心血管機能に関する多彩な研究成果が報告された。従来のメンバーに加え、栗原 (東京大)、久留 (鳥取大)、蒔田 (長崎大)、久場 (秋田大)、小野 (帝京大) らが新たに加わったことで、より一層多角的視点からイオンチャネルやイオントランスポーターに関する議論を行うことができた。当日の研究会には 52 名の参加者があり、20 題の研究発表に対して制限時間を超えて多くの質疑が行われた。討論の中から得られた知見をもとに、各研究の今後の発展と共に、新たな研究基盤の確立に至ることを期待したい。

(1) 低分子量 G 蛋白質 Rad による心筋細胞内 Ca^{2+} 動態の調節機構について

山川裕之, 村田光繁, 小柴貴子, 矢田浩崇, 相澤義泰, 遠山周吾, 福田恵一
(慶應義塾大学医学部再生医学講座)

【背景】低分子量 G タンパク質 Rad は心筋 L 型 Ca^{2+} 電流を制御し、その機能異常により不整脈を誘発する。しかし、Rad が L 型 Ca^{2+} チャネルのみを制御するだけで不整脈を誘発しているかは不明である。そこで、本研究の目的は Rad による心筋細胞内 Ca^{2+} 動態の調節機構を解明することである。

【方法および結果】心臓内因性 Rad 活性を抑制するため、心臓特異的にドミナントネガティブ変異型 Rad (DN Rad) を強発現したトランスジェニック (TG) マウスを作成した。マウス心筋細胞を、 Ca^{2+} 蛍光色素 Fluo-4 で染色後、共焦点高速レーザ顕微鏡を用いて Ca^{2+} トランジエントお

よび Ca^{2+} スパークを測定した。その結果、DN Rad TG 細胞の Ca^{2+} トランジエント振幅は、野生型 (WT) マウスと比較し有意に増大しており、 Ca^{2+} スパークおよび自然発生 Ca^{2+} ウェーブの頻度も増加していた。さらに、DN Rad TG マウスでは PKA 活性およびリアノジン受容体 (RYR2) の 2809 番セリン (Ser²⁸⁰⁹) リン酸化が有意に増加していた。また野生型 Rad を培養心筋細胞に強発現すると、イソプロテレノール刺激による PKA 活性化および RYR2 Ser²⁸⁰⁹ リン酸化は有意に抑制された。

【結論】Rad は、PKA 系による RYR2 リン酸化を修飾し、細胞内 Ca^{2+} 動態を制御していることが示唆された。

(2) 心房筋におけるカルシウムシグナル調節機構

赤羽悟美, 中瀬古寛子, 伊藤雅方 (東邦大学医学部医学科・大学院医学系研究科・薬理学講座)

洞房結節細胞のペースメーカー活動電位の形成と制御には、電位依存性 K^+ チャンネルの脱活性化, I_f チャンネルおよび電位依存性 Ca^{2+} チャンネルの活性化に加えて、細胞内 Ca^{2+} シグナルのハンドリング機構が関与することが示されている。我々は、L 型 Ca^{2+} チャンネル $Ca_v1.3$ が $Ca_v1.2$ に比較して高いアベイラビリティを維持し、ペースメーカー電位の閾値および活動電位幅を保障する役割を担うことを報告してきた。さらに薬理的検討を行い、電位依存性 Ca^{2+} チャンネル各サブタイプの中でも特に $Ca_v1.3$ に対する遮断作用が心拍リズムや房室伝導の抑制をもたらすことを見出した。よって、 $Ca_v1.3$ が心拍リズムの維

持に重要な役割を担うことが再確認された。一方、ペースメーカー活動電位は L 型 Ca^{2+} チャンネルを介した Ca^{2+} 流入を引き金として誘発される Ca^{2+} 誘発性 Ca^{2+} 放出機構によっても調節されており、ここでも $Ca_v1.3$ の役割が明らかになりつつある。我々は、心房筋細胞における L 型 Ca^{2+} チャンネルのサブタイプ特異的な Ca^{2+} シグナル変換制御機構を明らかにする目的で細胞内領域と相互作用する蛋白を探索し、 $Ca_v1.2$ と特異的に相互作用する蛋白としてリン脂質結合蛋白 (StarD10) を新たに同定し、StarD10 が心房筋細胞における L 型 Ca^{2+} チャンネルを介した Ca^{2+} シグナルの安定化に関与していることを見出した。

(3) 家族性進行性心臓伝導障害のコネキシン40遺伝子変異と機能解析

蒔田直昌¹, 住友直方², 関 明子³, 萩原誠久³, 望月直樹⁴

(¹長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 内臓機能生理学, ²日本大学医学部 小児科,

³東京女子医大 循環器内科, ⁴国立循環器病センター研究所 循環器形態部)

進行性心臓伝導障害 (cardiac conduction defect; CCD) は、刺激伝導系の特異的な伝導遅延を特徴とする家族性致死性不整脈であり、心筋 Na チャンネル $SCN5A$ の遺伝子異常が明らかにされている。我々は CCD 発端者 139 人の遺伝子解析を行ったところ、完全左脚ブロックを呈し、突然死を伴う CCD の 1 家系に、心房筋と刺激伝導系にはほぼ特異的に発現するギャップジャンクション (GJ) connexin40 (Cx40) の遺伝子変異 Q58L を認めた。 $SCN5A$ や他の GJ の変異はなかった。内因性 GJ を欠損する細胞株 N2A を用いて、細胞-細胞間コンダクタンスをダブルパッチクランプ法で測定した。Q58L-Cx40 ペアのコンダ

クタンスは正常 (WT)-Cx40 ペアに比べ有意に減弱していた (WT=12.9±5.8 nS, n=4; Q58L=1.2±0.7 nS; n=5; mean±SD, $p<0.01$)。共焦点顕微鏡で GFP tagged-Cx40 の細胞内発現パターンを観察すると、WT-Cx40 は、細胞間の限局した領域に強く発現していた。一方、Q58L-Cx40 は、細胞膜にびまん性に発現するものの、WT のような限局した発現パターンは示さず、GJ サブユニット間の連関異常が示唆された。心筋 GJ の変異によって刺激伝導系に強い伝導障害を生じ突然死をきたす新たな致死性不整脈の機序が証明された。

(4) 心筋細胞肥大における STIM1の役割

大場貴喜, 渡邊博*^{*}, 村上 学, 佐藤貴子*, 伊藤 宏*, 尾野恭一
(秋田大学大学院医学系研究科細胞生理学講座, *循環器内科学講座)

【背景】心肥大の形成過程において transient receptor potential (TRP) チャンネルを介したストア作動性 Ca^{2+} 流入

(SOCE) の重要性が報告されている。近年 stromal interaction molecule 1 (STIM1) は SOCE の制御において決定的な役割を行っている分子として同定された。本研究では、心筋細胞肥大の形成過程における STIM1 の重要性について検討する。

【方法と結果】新生仔ラット心筋細胞では、RTPCR および Western blot 解析により STIM1 の発現が認められた。STIM1 の蛋白量を Western blot 法により検討したところ、大動脈縮窄によるラット肥大心筋とその対照群の心筋とは差を認めなかった。新生仔ラット心筋細胞に対し

Endothelin-1 (ET-1) による肥大刺激を 48 時間行ったところ、SOCE, TRPC1 の発現量, 細胞表面積, nuclear factor of activated T cells activation (NFAT) の増加を認めたが、STIM1 の発現量に明らかな変化を認めなかった。ところが siRNA 法による STIM1 ノックダウンを行った細胞では、これらの反応は抑制されており、STIM1 ノックダウンによる心肥大抑制が示唆された。

【結論】心筋細胞肥大の形成過程において、STIM1 は決定的な働きをしていることが考えられる。

(5) Semi-simultaneous Imaging of Intracellular Calcium and Association of Ca^{2+} entry channel-calmodulin

森 誠之, 今井裕子, 井上隆司 (福岡大学 医 生理学)

イオンチャネル, 特に細胞内カルシウム動員に関与するイオンチャネルにおいてカルシウム結合分子カルモジュリン (CaM) は重要な機能を担う。その機能はチャネルの開閉から, 膜輸送など多岐に及ぶ。更にはローカル Ca^{2+} やグローバルな Ca^{2+} をカルモジュリンは個別に感知し, 異なるチャネル制御へと分配するセンサーとして機能することも明らかとなってきた。本研究は細胞内カルシウム動態とチャネル-CaM 相互作用を定量的かつ, 同時にイメージングするシステムを開発し, カルシウム依存のチャネル制御機構を明らかにする目的としている。カ

ルシウム dye として, Fura-2 (AM 体), CaM とチャネル相互作用を FRET (CFP, YFP 融合 Protein) にて行った。現在, 細胞内カルシウム濃度と CaM-チャネル断片 (L-type Ca channel IQ ドメイン, TRPC6 CBD) の間に生じる FRET において, 同期的な変動を確認することができている。これらチャネル-CaM の相互作用は MLCK (Myosin Light Chain Kinase) CaM 結合領域 'M13'-CaM と比べ, 高濃度カルシウム依存性を示していた。チャネル近傍で局所的に上昇する高濃度 Ca^{2+} にのみ反応する上で, 重要なメカニズムと考えられた。

(6) アルドステロン誘発心肥大における $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体の役割

伊豫田拓也¹, 喜多紗斗美¹, 小室一成², 西山 成³, 岩本隆宏¹

(¹福岡大学医学部薬理学, ²千葉大学大学院医学研究院循環病態医科学, ³香川大学医学部薬理学)

アルドステロン (Ald) は種々心血管病に関わっており, その病態形成には酸化ストレスが深く関与すると考えられている。今回, 我々は Ald 誘発性の心リモデリングに焦点を当て, 酸化ストレスと $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体 (NCX1) の関連について検討した。野生型 (WT) および心筋 NCX1 高発現マウス (N1-Tg) に Ald (0.3 $\mu\text{g}/\text{h}$) を 4 週間処置すると, 心肥大および心機能低下が観察されたが, NCX1 ノックアウトマウス (N1-KO) では心肥大は誘導さ

れず, 心機能低下も認められなかった。さらに, Ald 処置と同時に NCX1 阻害薬を WT マウスに投与すると, Ald 誘発性の心肥大は抑制された。これら心臓における遺伝子発現解析では, WT および N1-Tg マウスにおいて Ald 処置に伴う ACE, MR, gp91, NHE1 遺伝子の発現誘導が観察された。一方, N1-KO および NCX1 阻害薬を投与した WT マウスでは, これらの遺伝子発現は変化しなかった。組織学的観察では, 冠血管周囲における線維化および活

性酸素産生が Ald 処置した WT および N1-Tg マウスで顕著に認められた。これらの変化も N1-KO および NCX1 阻害薬を投与した WT マウスでは抑制された。以上の結

果は, Ald によって誘発される心障害とそれに伴う活性酸素産生に NCX1 が関与することを示唆している。

(7) 新しく同定された非定型心筋細胞 atypically-shaped cardiomyocytes (ACMs) の特徴

尾松万里子, 松浦 博 (滋賀医大・生理・細胞機能生理)

心臓は, 心筋細胞, 内皮細胞, 血管平滑筋細胞など種々の細胞から構成されており, 近年では cardiac progenitor cells および side population cells に分類される心筋幹細胞が組織内に存在することも報告されている。我々は, 成体マウスを用いて, 心室組織内にこれまで知られていなかった種類の細胞が存在するかを調べた。ランゲンドルフ灌流による心室筋細胞単離の最終過程において, 遠心によって取り除かれた上清分画を集め, methylcellulose を含む半固形状培地中で培養したところ, 3~5 日後に接着細胞群の中に, 長く伸長し枝分かれした突起を有した形態に変化するとともに自動的に拍動する細胞が出現す

ることを見出した。これらの拍動する細胞のほとんどは多核であり, connexin-43 および HCN4 タンパク質の発現が確認された。また, パッチクランプ法を用い, これらの細胞から洞房結節細胞に類似した自発的活動電位が記録された。しかし, 分裂・増殖は観察されず, 幹細胞マーカーとして知られる細胞表面抗原の発現も見られなかったことから, 心筋幹細胞とは異なる細胞であることが推察された。以上のことから, 心室組織由来の自動性をもつこれらの細胞を非定型心筋細胞 atypically-shaped cardiomyocytes (ACMs) として新規に同定した。

(8) エンドセリン A 型受容体ノックインマウスによって明らかになった新しい心筋細胞系譜

栗原裕基 (東京大学 大学院医学系研究科 分子細胞生物学専攻)

心大血管系の発生において, エンドセリン-1(ET-1) は神経堤細胞のエンドセリン A 受容体 (ETAR) を介し, 主に心流出路~大血管の形成に寄与している。我々は最近, ETAR 遺伝子座に LacZ および EGFP をノックインしたレポーターマウスの発現パターンから, 心流入路から左室の形成に関与する細胞群が特定された。この細胞群は, 心発生初期に静脈洞から心流入路の左側壁にかけて特徴的な分布を示した。マーカー遺伝子発現パターンの解析, 蛍光色素注入による追跡, 移植実験から, この ETAR 発現細胞群は一次心臓領域に由来し, 静脈洞領域から左腹

側の外側彎曲部を通して左心室へと移動し, 左室および両心房の心筋に寄与することが示された。この ETAR-LacZ/EGFP 発現細胞は, 房室接合部の形成に寄与する Tbx2 陽性細胞とは異なるパターンを示したことから, 心臓発生初期から一次心臓領域内において領域化が行われている可能性が考えられた。また, HCN4 などとの発現パターンの比較から, 刺激伝導系形成との関連も示唆された。さらに, ETAR 遺伝子欠損胚の表現型から, ETAR を介したシグナルが本細胞を標的として, 心臓形成に重要な役割を担っていると考えられた。

(9) アンジオテンシン変換酵素2 (ACE2)-apelin による循環機能調節

久場敬司¹, 藤澤 進¹, 大戸貴代¹, Josef Penninger², Francois Verrey³, 今井由美子¹(¹ 秋田大学大学院医学系研究科 情報制御学・実験治療学講座,²IMBAInstitute of Molecular Biotechnology of the Austrian Academy of the Sciences, Austria,³Institute of Physiology and Center for Integrative Human Physiology, University of Zürich, Switzerland)

2009 年 11 月 25-26 日 生理研研究会に参加して、以下の内容で研究発表を行った。アンジオテンシン変換酵素 2 (ACE2) がレニン-アンジオテンシン系 (RAS) を負に調節し、心血管機能の調節、心不全など循環器疾患の病態に寄与し、ACE2 が SARS (重症呼吸不全症候群) ウイルスの受容体であるとともに、ARDS 急性呼吸不全において RAS の制御を介して炎症反応を抑制する。一方で、ACE2 によって制御される新規の心血管作用性ペプチド Apelin が同定され、そのレセプターは、AT1 レセプターと相同性の高い APJ であることがわかった。Apelin

遺伝子欠損マウスを作製し、呼吸器ならびに循環器疾患モデルで解析を行ったところ、Apelin は、加齢や心不全の際に心機能の恒常性を維持するのに重要な役割を担うことが見出され、ACE2-Apelin とのシグナルの相互作用や新しい RAS の制御機構があることが考えられた。また ACE2 は、プロテアーゼ活性とは独立に膜貫通領域ドメインを介して BoAT1 アミノ酸トランスポーターの発現レベルを制御することがわかった。さらに、最近、本研究が明らかにした新しい心機能遺伝子発現調節のメカニズムのデータ (未発表) についても報告した。

(10) SA node の自己再生能に学ぶ心筋再生の新たな可能性

木内茂樹¹, 宇佐美彬乃¹, 下山多映², 大塚文徳², 伊藤理恵¹,鈴木重人¹, 上園 崇¹, 栗原順一¹, 小野景義¹(¹ 帝京大学薬学部薬理学, ² 帝京大学薬学部環境衛生学)

心臓は、体内で最も再生能力に乏しい器官の一つとされる。我々は、洞房結節にあるごく僅かの細胞集団であるペースメーカー細胞が個体の一生に亘り自律拍動の中心であり続ける点に着目し、洞房結節での心筋細胞或はペースメーカー細胞の再生の可能性について、培養系を用いて探ってきた。成獣の洞房結節細胞 (sinoatrial node cell, SANC) を単離して 1~3 週間培養すると、その周囲に自発拍動を示す細胞群が形成され、その面積は培養日数に従い拡大した。この細胞群は心筋必須の遺伝子を発現しており、isoprenaline, acetylcholine によりそれぞれ心

拍数が増加、減少した。EGFP を安定発現した心臓線維芽細胞を SANC と共培養すると、その一部が cTnT や desmin を発現して自発拍動能を獲得した。この心筋再生は細胞内 Ca²⁺シグナルを阻害しておくくと抑制された。一方、このような心筋細胞分化誘導効果は、SANC を培養した conditioned medium では弱く、oxytocin など既知の分化誘導因子や cell-free SANC fraction では認められなかった。これらの結果より、SANC は心臓線維芽細胞を、直接接触による情報伝達及び何らかの液性因子の分泌を介して心筋細胞へ分化誘導すると考えられる。

(11) HCN4イオンチャネルを用いたES細胞由来心臓ペースメーカー細胞の分取とその特性解析

白吉安昭, 伊藤真一, 清水夏海, 藤井裕士, 池内 悠, 森川久未, 久留一郎
(鳥取大学大学院 医学系研究科 機能再生医科学専攻 再生医療学分野)

ES細胞から心臓ペースメーカー細胞を作製し, 徐脈性不整脈などの治療に応用することを目的に研究を行った。具体的には, 心臓ペースメーカー特異的Ifチャネルを構成するHCN4の遺伝子座に, GFP遺伝子をノックインしたマウスES細胞株を樹立し, 続いてGFP (HCN4) 陽性細胞を分取し, 発現する遺伝子, 自律神経に対する応答性, 増殖能などについて解析したので報告する。

樹立したノックイン株 (H7 株) において, GFP の発現は, HCN4 の発現と同様に, 分化誘導後 7 日目後から拍動する細胞で始まり, その後も拍動する領域でのみで観察された。各分化段階にある胚様体からセルソーティングにより, 0.1~3.0% の GFP 陽性細胞を分取するこ

とができた。これら GFP 陽性細胞において, (1) HCN4, Cav3.2などの心臓ペースメーカー細胞で発現しているイオンチャネル, ギャップ結合遺伝子, 心筋特異的トロポミオシンなどが発現していること, (2) パッチクランプ法による解析から, 自動能やIf電流などの心臓ペースメーカー細胞に必要な電氣的性質を有していること, (3) 自律神経系刺激に対する応答能を有していることがわかった。これらの結果は, 分取した GFP 陽性細胞が, 心臓ペースメーカー活性を保持しており, 将来の再生医療に応用できる可能性を持った細胞であることを示唆している。

(12) モルモット肺静脈心筋における自発的電気活動の発生機序の解明 : 組織および単離細胞を用いた検討

行方衣由紀, 恒岡弥生, 高原 章, 田中 光 (東邦大学薬学部薬物学教室)

心筋細胞層を有する肺静脈が心房細動の発生に関与していると報告されたこともあり, 肺静脈心筋がいかなる性質を有するのか注目されている。そこで本研究では, モルモット肺静脈における自発的電気活動の発生機序を薬理学的に検討した。肺静脈心筋の活動電位は左心房筋に比べ静止膜電位が浅く, K^+ の膜透過性が低いことが判明した。 K^+ の膜透過性を減少させるバリウムは肺静脈心筋の静止膜電位を減少させ, 自発活動を誘発した。また I_{K-ACh} 抑制薬 Tertiapin は左心房筋の静止膜電位に影響を与えなかったが, 肺静脈心筋の静止膜電位を減弱させ,

自発活動を誘発した。一方 I_{K-ACh} 活性化薬の carbachol は静止膜電位を増大させ, 自発活動の発生を抑制した。また自発活動を示さない肺静脈組織標本および単離細胞に ouabain を処置すると自発活動の出現が認められ, これらは SEA0400 および ryanodine によって抑制された。以上の結果からモルモット肺静脈心筋は K^+ の膜透過性が低く, 静止膜電位維持力が弱いいため, 細胞内 Ca^{2+} 過負荷によって自発活動を発生しやすい傾向にあることが判明した。

(13) 神経栄養因子による心筋への交感神経軸索の誘導

三輪佳子¹, 李 鍾國¹, 高岸芳子², トビアス オプトホフ³,
平林真澄⁴, 神保泰彦⁵, 児玉逸雄¹

(¹名古屋大学環境医学研究所 心・血管分野, ²同発生・遺伝分野,

³アムステルダム大学医学部, ⁴生理学研究所, ⁵東京大学大学院新領域創成科)

【目的】神経栄養因子 Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) が、心筋における交感神経支配に果たす役割を調べる。

【方法】ラット新生仔の上頸神経節交感神経細胞と心室筋細胞を単離し、1mmの間隔で近接培養を行った。GDNF 添加後5日目に、軸索伸長、神経-心筋接合部の状態を、免疫染色、電子顕微鏡、細胞外電位記録法により観察した。また、アデノウイルスを用いて GDNF を心室筋細胞へ強制発現させ、神経突起の誘導効果を観察した。

【結果】GDNF を添加すると、心筋細胞へ向かう交感神経細胞突起の伸長、接合部での synapsin I, $\beta 1$ adrenergic receptor (BAR) の発現増加が認められた。電子顕微鏡に

よる観察では、心筋細胞に接する神経細胞内に神経終末小胞が存在し、交感神経-心筋接合の形成が見られた。

ニコチン (1 μ M) 添加により、GDNF 添加群の心筋細胞自己拍動レートは、有意に増大した。

アデノウイルスを用いた実験では、交感神経細胞突起が、GDNF 発現心筋細胞に向かって、選択的に伸長するのが観察された。

【結論】神経栄養因子の GDNF は、心筋細胞への軸索誘導と心筋-神経の接合形成を有意に促進した。GDNF は、病態心の機能制御における新しい分子標的となる可能性が示唆された。

(14) NO による心筋カルシウムチャネル調節

黒川洵子, 黒羽笑加, 松原清二, 笹野哲郎, 中村浩章, 古川哲史

(東京医科歯科大学 難治疾患研究所 生体情報薬理学分野)

心筋 L 型カルシウム ($I_{Ca,L}$) チャネルは、興奮収縮連関の要であると同時に、活動電位幅特にプラトー相の規定に重要な役割を果たしている。重要なセカンドメッセンジャーの一つである一酸化窒素 (NO) による心筋 $I_{Ca,L}$ チャネルの調節機構について研究したところ、NO 合成酵素 (NOS) のサブタイプ別の制御機構を見出した。

性ホルモンであるプロゲステロンを単離心室筋細胞に投与したところ、非ゲノム経路での eNOS (内皮型 NOS) のリン酸化により NO が産生され、 $I_{Ca,L}$ の電位依存性がシフトし、電流値が減少した。この作用は、PDE2A の cGMP 依存的な活性化による cAMP の加水分解を介し、

女性の卵胞期における QT 短縮に関与していることが示唆された。

一方、SNP 解析により QT 延長と突然死と有意に相関がみられた分子である NOS1AP を介して、nNOS (神経型 NOS) と $I_{Ca,L}$ チャネルは分子複合体を形成していることを見出した。アデノウイルスベクターを用いて、モルモット心臓に NOS1AP を過剰発現させたところ、 $I_{Ca,L}$ チャネルの電流密度が有意に減少した。

よって、心筋 $I_{Ca,L}$ チャネルは、NOS のサブタイプによって、異なる制御を受けている可能性が示唆された。

(15) カルモジュリンの心筋 Ca^{2+} チャンネル (Cav1.2) に対する二重作用

亀山正樹, Asmara H, 蓑部悦子, Saud Z. A., 韓 冬雲, 郭 鳳, 王 午陽, はお麗英
(鹿児島大学 大学院医歯学総合研究科 神経筋生理学)

カルモジュリン (CaM) は, inside-out パッチで Cav1.2 型 Ca^{2+} チャンネルを低～中濃度で活性化, 高濃度で抑制して, ベル型の濃度-作用曲線を示す。これより, 我々は, Cav1.2 チャンネルが促進と抑制の2つの CaM 結合部位 (*A* and *I* sites; CaM 親和性 $A > I$) を持つという two-site model を提唱した。Cav1.2 チャンネルには4つの CaM 結合部位 (N 末部, I-II ループ, C 末部の preIQ および IQ 領域) があるが, チャンネルの活性化や不活性化に関与するのは1分子の CaM という考えが優勢である。そこで, 我々は *A*

および *I* site の検索を行った。Calpastatin (CS) は CaM と競合しつつチャンネルを活性化するので, *A* site に作用すると考えられる。チャンネルの断片ペプチドを用いた pull-down 実験により, CS の結合部位は IQ 領域であることを見出した。更に, preIQ と IQ 領域を含むペプチドが2個の CaM と結合し, その親和性は $\text{IQ} > \text{preIQ}$ であることを見出した。これらの結果より, Cav1.2 チャンネルの C 末部には2個の CaM 結合部位があり, 促進性 (*A* site) は IQ 領域, 抑制性 (*I* site) は preIQ にあると示唆された。

(16) 内向き整流カリウムチャンネルのマグネシウムイオンとポリアミンによらないゲート機構の探索

石原圭子, Yan Ding-Hong, 顥原嗣尚 (佐賀大学医学部 生体構造機能学 器官・細胞生理学分野)

Kir2.1 チャンネルを用いた研究成果から, 心筋の内向き整流 K^+ チャンネルを通る外向き電流は細胞内のスペルミンや Mg^{2+} がチャンネル孔内面に存在する負電荷を帯びたアミノ酸残基と静電的に結合することによってブロックされると考えられている。我々は Kir2.1 チャンネルが細胞内イオンによるブロックに依らないゲーティングを示すかどうかについてインサイドアウト・パッチ膜を流れる巨視的電流を記録して検討を行った。ポリアミンや Mg^{2+} を含まない細胞質溶液を灌流させても $1\text{nM} \sim 1\text{pM}$ の低濃度のスペルミンによるものと考えられるゲーティングが認められ, 細胞膜の裏打ち構造や細胞質領域のチ

ャンネル孔内にスペルミンが残存している可能性が示唆された。一方, 細胞質側溶液の pH を pH6.8 よりも酸性にすると, 遅い膜電位依存性のゲーティングによって外向き電流が抑制された。これは Mg^{2+} をキレートするために加えた EDTA に含まれる不純物や残存するスペルミンによるブロックとは無関係であると考えられた。重要なポリアミン結合部位である酸性アミノ酸残基を中性化した変異体 (D172N) では pH 依存性のゲーティングが消失した。細胞質溶液の pH が酸性になった際に心筋の内向き整流 K^+ チャンネルのブロッカーとして働く未知の細胞内分子の存在が示唆された。

(17) 心筋興奮伝導の *in silico* 研究: 心筋ナトリウムチャンネルの細胞内局在の興奮伝導への影響

津元国親¹, 芦原貴司², 倉智嘉久^{1,3}

(¹ 大阪大学臨床医工学融合研究教育センター, ² 滋賀医科大学循環器内科・不整脈センター, ³ 大阪大学大学院医学系研究科)

生理的条件下において, 心筋細胞における Gap junction の発現は, 介在板に集中して発現することが知られてい

る。一方, イオンチャンネルの発現に関しても, 細胞内分布に不均一性が存在する。特に, 心筋型 Na^+ チャンネルは

Gap junction と同様、介在板で多く発現し、それ以外の細胞膜での発現が少ないという報告が近年増加している。

本研究では、 Na^+ チャネルの細胞内分布変化に対する興奮伝播への影響を検討した。電気的興奮伝播機構として、gap junction 機構に加え、その接合部でのクレフト空間に誘発される細胞外電位による相互作用 (Electric Field: EF 機構) を仮定し、心筋線維に沿った活動電位の興奮伝播をシミュレートした。Gap junction 機構だけが興奮伝播に

寄与する場合、 Na^+ チャネルの細胞内分布の変化は、興奮伝播速度に影響しない。一方、Gap junction 機構と EF 機構が共に機能することを仮定すると、 Na^+ チャネルの細胞内分布の変化は、興奮伝播に大きな影響を与える。この結果は、心筋細胞間での興奮伝播に関して、Gap junction 機構と EF 機構が共に寄与している可能性を示唆している。

(18) PDE3阻害による PKA 依存的な血管収縮抑制の分子機序

西田基宏 (九州大学, 大学院薬学系研究科, 薬物中毒学分野)

PDE3 阻害剤は PKA を活性化することで、抗血小板作用や血管拡張作用を引き起こす。この過程には、PKA による細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 上昇の抑制が関与すると考えられているが、詳しい機序は定かでない。我々は、PDE3 選択的阻害剤シロスタゾールがジアシルグリセロール活性化 TRP チャネル (TRPC3/6/7) を選択的に抑制することを見出した。PDE3 阻害剤は PKA 依存的に TRPC6 の Thr⁶⁹ をリン酸化することで TRPC6 のチャネル活性を抑制した。PDE3 阻害剤による PKA 活性化は PKA 活性化剤による PKA 活性化と比べると非常に弱いものの、PKA は TRPC3/C6・PDE3 と膜近傍で三者複合体を形成すること

で、局所的に TRPC6 をリン酸化している可能性が示された。ラット血管平滑筋細胞の再構成リング標本でのアンジオテンシン (Ang) II 収縮は、PDE3 阻害によって有意に抑制された。PDE3 阻害による Ang II 収縮抑制効果は、TRPC6 のドミナントネガティブ (DN) 変異体の発現によって完全に消失した。一方、マウス腹部大動脈では、PDE3 阻害による Ang II 収縮抑制効果が TRPC3-DN の発現によって消失した。以上の結果から、PDE3 阻害剤は、PKA 依存的に DAG 活性化 TRPC チャネルを抑制することで、Ang II 刺激による血管収縮を抑制している可能性が示された。

(19) スタチンによる骨格筋毒性に小胞膜輸送障害が関与する

坂本多穂, 和栗 聡, 木村純子 (福島県立医科大学 医学部 薬理学講座)

【背景】高脂血症の治療に用いる HMG-CoA 還元酵素阻害薬 (スタチン) は骨格筋毒性をもつ。我々はスタチンが小胞輸送蛋白 Rab を抑制し筋を空胞化することを報告した。しかし、空胞化に関与する Rab のアイソフォームや空胞化の機序は不明である。我々はスタチンによる Rab 抑制が小胞体ーゴルジ体小胞膜輸送系 (順行輸送) を阻害して、毒性を示す可能性を調べた。

【方法】骨格筋線維はラット短指屈筋からコラゲナーゼで単離し培養した。Rab1A の膜結合能は膜分画での Rab1A 蛋白発現量をもとに調べた。小胞体ストレスは glucose regulated protein 78 (GRP78) 蛋白発現量をもとに評価し

た。

【結果】順行輸送阻害薬 brefeldin A (BFA; 30 μM) を筋線維に投与すると、fluvastatin (Flv) と同様に 72 時間で空胞化を起こし、120 時間後に細胞死をおこした。順行輸送制御蛋白 Rab1A の膜結合能は Flv (1 μM) 投与で顕著に低下した。小胞体ストレスと Flv・BFA 誘発筋毒性の間に相関は無かった。

【結論と考察】スタチンは Rab1A の膜小胞との結合を阻害し、順行輸送を抑制することが分かった。よって、Rab1A がスタチンによる筋毒性に関与する Rab アイソフォームの可能性もある。順行輸送阻害による細胞内環境

悪化が、骨格筋毒性の引き金となると考えられる。

(20) 後天性 QT 延長症候群の遺伝的背景と分子病態

伊藤英樹¹, 坂口知子¹, 岡 優子¹, 宮本 証¹, 堀江 稔¹, 林 維光², 松浦 博², 井本敬二³

(¹ 滋賀医科大学呼吸循環器内科, ² 同細胞機能生理学,

³ 自然科学研究機構 生理学研究所 神経シグナル研究部門)

後天性 QT 延長症候群は普段は正常心電図を示すが、薬剤の投与後や高度の徐脈によって QT 間隔の延長と多形性心室頻拍が惹起される病態を示す。我々はこれらの後天性 QT 延長症候群 82 例と先天性 QT 延長症候群 413 例の遺伝子変異解析を行った結果、後天性の 20 例 (24%) と先天性の 212 例 (51%) に心筋イオンチャネルの遺伝子変異を同定した。さらに哺乳類細胞を用いた電気生理学的解析により、後天性 QT 延長症候群の変異は電流量の

減少あるいは何らかのゲーティングの変化を有していた。Luo-Rudy 心室筋モデルを用いた活動電位波形のシミュレーションでは、薬剤による後天性 QT 延長症候群の変異は先天性より軽微な活動電位持続時間の延長である一方、徐脈性 QT 延長症候群の変異は先天性と同様の変化を示した。以上より、後天性 QT 延長症候群では先天性と同様の遺伝的背景が潜在しているが、その機能変化は誘発因子により変化に富んでいることが示された。

2. シグナル伝達の動的理解を目指す新戦略

2009年10月1日－10月2日

代表・世話人：廣瀬謙造（東京大・院医・神経生物）

所内対応者：久保義弘（生理研・神経機能素子）

- (1) アストロサイトにおける Ca^{2+} シグナル依存的 N-カドヘリン発現維持機構を仲介する新規因子の同定
金丸和典, 大久保洋平, 廣瀬謙造, 飯野正光（東京大・院医・薬理）
- (2) 免疫 B 細胞において TRPC3 チャネルを介した Ca^{2+} 流入と scaffolding 機能が
PLC γ と PKC β の持続的な膜集積・活性化及び Ca^{2+} 振動と ERK の持続的な活性化をもたらす
森 泰生（京都大・院工・分子生物化学）
- (3) B 細胞における STIM 依存的カルシウム流入の生理的役割
松本真典, 馬場義裕, 黒崎知博
（大阪大・WPI 免疫フロンティア研究センター, 理研免疫アレルギー科学総合研究センター）
- (4) 破骨細胞において細胞外 Ca^{2+} により誘発されるエンドサイトーシス機構
久野みゆき, 酒井 啓, 森浦芳枝, 川脇順子（大阪市立大・院医・分子細胞生理学）
- (5) 膵 β 細胞に発現する甘味受容体の機能
小島 至, 中川祐子, 長澤雅裕（群馬大・生体調節研究所）
- (6) マウス腎マクラデンサ細胞における PGE $_2$ 産生調節機構
福田英一, 河原克雅（北里大・医学部・生理学）
- (7) 網羅的 RNAi ライブラリーを用いた機能遺伝子探索～EPRIL テクノロジーの紹介
菅生厚太郎, 太向 勇, 廣瀬謙造（東京大・院医・神経生物）
- (8) Ca^{2+} dynamics in large-scale cellular networks visualized by ultra-sensitive Ca^{2+} probe,
“cameleon NANO”
堀川一樹, 永井健治（北海道大・電子科学研究所）
- (9) シナプス小胞エンドサイトーシスにおけるカルシウム依存性分子機構の生後発達変化
山下貴之, 江口工学, 齋藤直人, Henrique von Gersdorff, 高橋智幸
（沖縄科学技術研究基盤整備機構）
- (10) 神経ステロイドによる虚血性神経細胞死防止の分子メカニズム
曾我部正博, 田中基樹, 陳 玲
（名古屋大学・院医, JST・ICORP/SORST・細胞力覚, 南京医科大）
- (11) シナプスから核へのシグナリング：第2章
尾藤晴彦, 川島尚之, 野中美応, 井上昌俊, 奥野浩行（東京大・院医・神経生化）
- (12) 内因性カンナビノイドを介する逆行性シナプス伝達におけるプロテアーゼ受容体の役割
橋本谷祐輝¹, 少作隆子², 狩野方伸¹
（¹東京大・院医・神経生理, ²金沢大・医薬保健研究域・保健・リハビリテーション科学）
- (13) 代謝型グルタミン酸受容体の多様なシグナリングを調節する機構
立山充博, 久保義弘（生理研・神経機能素子）
- (14) G 蛋白質制御内向き整流性カリウムチャネルの開閉を調節する細胞質領域内の構造変化
稲野辺厚, 倉智嘉久（大阪大・院医・分子細胞薬理）
- (15) イオン透過機構の動的理解を目指して
老木成稔, 岩本真幸, 松木悠佳, 清水啓史（福井大・医学部・分子生理）

【参加者名】

小島 至, 中川祐子, 増淵洋祐 (群馬大学・生体調節研究所), 河原克雅, 福田英一 (北里大学・医学部), 井上昌俊, 尾藤晴彦 (東京大学・大学院 医学系研究科 脳神経医学専攻), 辻本哲宏 (同志社大学・生命医科学部 医生命システム学科), 山下貴之, 堀 哲也 (独立行政法人沖縄科学技術研究基盤整備機構), 曾我部正博, 田中基樹 (名古屋大学大学院・医学系研究科), 久野みゆき, 森浦芳枝 (大阪市立大学・大学院医学研究科), 梶本武利, 森泰生 (京都大学大学院・工学研究科 合成・生物化学専攻), 稲野厚厚, 古谷和春 (大阪大学・医学系研究科), 老木成稔 (福井大学医学部・分子生理), 並木繁行, 廣瀬

謙造, 菅生厚太郎, 太向 勇, 滝川健司, 太田裕作 (東京大学大学院・神経生物学分野), 金丸和典 (東京大学大学院・細胞分子薬理学), 黒崎知博, 馬場義裕, 松本真典 (大阪大学・免疫学フロンティア研究センター), 堀川一樹 (北海道大学 電子科学研究所), 狩野方伸, 橋本谷祐輝 (東京大学・神経生理学分野), 日比輝正 (生理研・多光子), 毛利達磨, 岡田俊昭 (生理研・機能協関), 加塩麻紀子, 夏目和歌, Median Johan, 内田邦敏 (生理研・細胞生理), 稲田浩之 (生理研・生体恒常), 松田尚人 (生理研・生体膜), 久保義弘, 立山充博, 中條浩一, Keceli Batu, 松下真一, 石井 裕 (生理研・神経機能素子)

【概要】

ポストゲノム時代と呼ばれるようになって久しい今日, 我々はゲノムがコードする遺伝子の大部分を知っている。その結果, 細胞機能を司るシグナル伝達機構についても, 様々な分子の役割が同定され, いわばシグナル分子のカタログ化が急速に進んできた。しかし, カタログ化のみでは, 依然としてシグナル伝達を「静的」にしか理解しえない。実際の細胞機能の発現は, シグナル分子の局在や修飾が巧みに調節され, 刻々と変容を遂げることによって実現されている。したがって, 刻々と変容する分子の営みそのものを「動的」に理解することが重要であり, そのための有効な戦略が必要とされている。そこで, 本研究会では, 免疫, 循環, 神経系といった異なった分野においてシグナル伝達機構に関連した問題に取り組んでいる研究者に加えて, 新しい測定技術や解析法の開発に取り組んでいる研究者を集め, 各々の研究分野における成果とその成果を得るための戦略をプレゼンテーションしたうえで分野横断的に議論を行った。全体では4つのセッション (I~IV) を二日間で行った。セッ

ション I は, 主として免疫系等のカルシウムシグナリングに関するものであり, 細胞内外でのカルシウムシグナリングについての新しい知見について議論を行った。セッション II においては, 膵β細胞や腎細胞における新しいシグナル伝達経路についての知見が報告されるとともに, RNAi や蛍光プローブといったシグナル伝達の理解に必須な新しい技術が紹介された。セッション III においては, 神経系のシグナル伝達について多様な視点からの研究成果発表が行われ, 新しい知見について議論が行われた。セッション IV においては, 受容体・チャネル分子に焦点を当てた研究成果が発表され, 主として生物物理学的な見地から詳細な議論が行われた。以上のセッションを通じて, シグナル伝達に関する動的理解について, 多様な分野の研究による多角的な議論を行うことができた。また, 次年度以降も引き続き研究の進捗を目指し, この問題についての議論を継続することの重要性も確認された。

(1) アストロサイトにおける Ca^{2+} シグナル依存的 N-カドヘリン発現維持機構を 仲介する新規因子の同定

金丸和典, 大久保洋平, 廣瀬謙造, 飯野正光 (東京大・院医・薬理)

神経系においてニューロンを取り囲むように存在するアストロサイトは, 様々な神経伝達物質や機械刺激に応じて, さらに非刺激条件下においてもダイナミックな

Ca^{2+} シグナルを示すが, その生理的意義は十分には明らかにされていない。これまでに我々は, この Ca^{2+} シグナルが神経成長因子の一つである N-カドヘリンの発現維

持を介し神経突起伸長を促進することで、脳機能に貢献することを示した。今回、この経路を仲介する新規因子を同定したので報告した。DNA マイクロアレイ解析より、アストロサイトにおいて Ca^{2+} シグナルを抑制すると発現が増大する翻訳抑制因子を見出した。本因子の神経系における機能は報告が乏しく、特にアストロサイトにおける N-カドヘリン発現との関係は一切不明であった。しかし興味深いことに、本因子をアストロサイトに強制発現させると N-カドヘリン発現量が顕著に減少した。さ

らに、 Ca^{2+} シグナル抑制時に起こる N-カドヘリン発現低下は、shRNA を用いた本因子のノックダウンにより消失し、正常アストロサイトと同等な発現量に回復した。これらの結果は、本因子が Ca^{2+} シグナル抑制時に発現上昇する、新規の N-カドヘリン発現抑制因子であることを示している。アストロサイトで頻繁に見られる Ca^{2+} シグナルは、この因子を負に制御することで N-カドヘリン発現を維持し、神経成長を促進する役割を持つと考えられる。

(2) 免疫 B 細胞において TRPC3 チャンネルを介した Ca^{2+} 流入と scaffolding 機能が $\text{PLC}\gamma$ と $\text{PKC}\beta$ の持続的な膜集積・活性化及び Ca^{2+} 振動と ERK の持続的な活性化をもたらす

森 泰生 (京都大・院工・分子生物化学)

B 細胞受容体 (BCR) 刺激はホスホリパーゼ C (PLC) $\gamma 2$ の活性化を引き起こし、細胞外からの Ca^{2+} 流入を免疫 B 細胞に惹起する。B 細胞における細胞外からの Ca^{2+} 流入は、ストア作動性カルシウムチャンネル (SOCC) が、唯一の Ca^{2+} 流入経路であると信じられてきた。近年、 PLC の活性化により産生されるジアシルグリセロール (DAG) が TRPC チャンネルを活性化し Ca^{2+} 流入を引き起こすことが HEK 細胞等の組換え発現系を用いて示された。しかし、B 細胞受容体シグナル伝達系においては、DAG によって活性化される Ca^{2+} 流入に TRPC チャンネルが関与しているか、あるいはその生理的意義が何かは明らかにされていない。本研究では、TRPC3 を欠損させたニワトリの免疫 B 細胞株 DT40 を作製し、B 細胞受容体 (BCR) シグナル伝達系における TRPC3 を介した DAG 活性化 Ca^{2+}

流入の生理的役割を探究した。TRPC3 ノックアウト細胞においては、膜透過型の DAG アナログである OAG による Ca^{2+} 流入が損なわれていた。また、BCR 刺激に誘導される $\text{PLC}\gamma 2$ の膜集積が抑制された。これらの結果と一致して、TRPC3 ノックアウト細胞では Ca^{2+} オシレーション、および Ca^{2+} 依存的転写因子である NF-AT の活性化が抑制されていた。また、BCR 刺激に誘導される $\text{PKC}\beta$ の持続的な膜移行及び ERK の持続的な活性化も抑制された。すなわち、TRPC3 を介した Ca^{2+} 流入は BCR 刺激に惹起される MAPK の活性化において重要な役割を果たすことを明らかにした。さらに、TRPC3 チャンネルタンパク質が scaffold として働き、膜移行した $\text{PLC}\gamma 2$ と $\text{PKC}\beta$ を自身に集積させシグナルソーム形成の中心となることも明らかとなった。

(3) B 細胞における STIM 依存的カルシウム流入の生理的役割

松本真典, 馬場義裕, 黒崎知博

(大阪大・WPI 免疫フロンティア研究センター, 理研免疫アレルギー科学総合研究センター)

免疫細胞における細胞内カルシウムの上昇は主に二つの異なる経路から供給される。一つは細胞内貯蔵庫である小胞体からのカルシウム放出であり、もう一つは細胞膜上のストア作動性カルシウム (Store-operated calcium: SOC) チャンネルを介した細胞外からのカルシウム流入で

ある。特に B 細胞へのカルシウム流入は SOC 流入が主要なものであり、長時間の持続的カルシウムシグナルを維持する上で重要であると考えられているが、これまで SOC 流入が誘導される分子メカニズムは全く不明であった。近年、SOC 流入を誘導する分子として小胞体カル

シウムセンサーSTIM1 およびSTIM2 (STIM1 ホモログ) が同定されたことから、我々はB細胞におけるSTIM依存のカルシウム流入の生理的役割を明らかにするために、B細胞特異的にSTIM1 およびSTIM2の両者を欠損するマウスを作製して解析を行った。B細胞特異的STIM欠損マウスのB細胞分化は正常であったが、B細胞抗原レセプター刺激によるSOC流入はSTIM欠損B細胞で減弱した。また、STIM欠損B細胞の増殖反応は*in vitro*で

は全く認められなかったが、*in vivo*における免疫応答はコントロールマウスと同程度に観察された。さらに、HEL/sHEL免疫寛容モデルマウスを用いて、STIMが自己反応性B細胞の除去に必須であることを明らかにした。以上の結果から、STIMはB細胞におけるSOC流入を誘導し、免疫寛容B細胞の除去に重要な役割を果たしていると考えられた。

(4) 破骨細胞において細胞外 Ca^{2+} により誘発されるエンドサイトーシス機構

久野みゆき, 酒井 啓, 森浦芳枝, 川脇順子 (大阪市立大・院医・分子細胞生理学)

破骨細胞は酸を分泌して骨を溶解する細胞である。細胞膜に発現するプロトンポンプ (空胞型 H^+ -ATPase; V-ATPase) から分泌された酸によって無機基質を溶かした結果、骨吸収窩に蓄積されるCaは破骨細胞の骨吸収を抑制するネガティブフィードバックシグナルとなる。その細胞応答は「Ca感受反応」と総称され、細胞内Caの上昇からアポトーシスまで多様な現象を含んでいる。私達は培養破骨細胞を高濃度のCaで刺激すると数分以内に細胞膜のV-ATPase活性の低下やエンドサイトーシス

の促進など細胞機能の変化に直結する膜応答が起こることを明らかにした。本研究では、細胞膜V-ATPase電流と膜容量 (膜面積の指標) を同時に測定しながら、Ca応答の初期反応である膜変化のメカニズムを検討した。エンドサイトーシスはdynaminインヒビター (dynasore) やV-ATPaseインヒビター (bafilomycin A_1) で抑制された。また細胞外Caによるエンドサイトーシス促進や細胞膜V-ATPase抑制のシグナル伝達にホスホリパーゼCや細胞内Ca濃度の上昇が関与することが示唆された。

(5) 膵β細胞に発現する甘味受容体の機能

小島 至, 中川祐子, 長澤雅裕 (群馬大・生体調節研究所)

甘味受容体は舌の味蕾に発現し、ショ糖、ブドウ糖や甘草などの天然の甘味料や、サッカリン、アスパルテーム、スクラロースなどの人工甘味料など多彩な甘味物質を感知することができるユニークな受容体である。その分子実体は、代謝型グルタミン酸受容体に類似したC型G蛋白共役型受容体T1R2とT1R3のヘテロ二量体である。最近我々は、この甘味受容体が膵β細胞に発現し、 Ca^{2+} 受容系とcAMP受容系を活性化してインスリン分泌を促進することを見いだした。マウス膵β細胞やMIN6細胞には甘味受容体は、T1R2, T1R3, 三量体G蛋白

Gustducinが発現している。β細胞に甘味受容体アゴニストであるスクラロースを添加すると、agust依存的にPLCを活性化させ、同時に細胞外 Na^+ 依存的に Ca^{2+} 流入を惹起し $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が増加する。一方、スクラロースによるcAMPの増加の一部は Ca^{2+} 依存性であるが、 Ca^{2+} 非依存性のコンポーネントもあり、Gs活性化を介する可能性が考えられる。スクラロース作用とグルコースの作用とは相加性がある。β細胞に発現する甘味受容体の生理学的意義に関しては今後さらなる検討が必要である。

(6) マウス腎マクラデンサ細胞における PGE₂ 産生調節機構

福田英一, 河原克雅 (北里大・医学部・生理学)

糸球体濾過量 (GFR) は、遠位尿細管内液 (濾液) の Cl⁻ 濃度変化 (15-60 mM) をシグナルとした尿細管糸球体フィードバック (TGF) 機構により調節されている (Schnermann *et al*, 1976; Bell *et al*, 2004)。腎マクラデンサ (MD) 細胞は、濾液の Cl⁻ 濃度低下を感知するとプロスタグランジン E₂ (PGE₂) を放出し、傍糸球体顆粒細胞からのレニン分泌を促し GFR を維持する (TGF 機構の修飾)。PGE₂ 受容体として E プロスタノイド受容体サブタイプ (EP1-4) が腎臓で発現している。傍糸球体顆粒細胞では EP2/4 が関与していると報告されている。MD 細胞における PGE₂ 合成の律速酵素はシクロオキシゲナーゼ 2 (COX-2) であることが明らかにされているが、TGF 機構の起点となる MD 細胞内のシグナル伝達機構には不明な点が多い。我々は株化したマウス MD (NE-MD) 細胞を用いて、「COX-2 mRNA の発現が細胞内 pH, Ca²⁺, cAMP などにより制御されている」ことを報告した (Akiba *et al*, Kitasato Med J 2007)。本研究では、NE-MD 細胞の cAMP 産生量や放出された PGE₂ 濃度を測定することにより、MD 細胞における PGE₂ 産生調節機構を明らかにすることを目的とする。

【方法】(1) NE-MD 細胞を用い、細胞外液の Cl⁻ 濃度や PGE₂ 添加量 (10⁻⁹-10⁻⁶ M) を変化させて、cAMP 産生量 (RIA 法) や PGE₂ 産生量 (ELISA 法) を測定した。COX-2 mRNA 発現量の時間的変化は real time PCR 法を用いて定量し、GAPDH をコントロールとして相対発現量で比較した。

【結果】(1) NE-MD 細胞には EP1-3 の発現は認められず、EP4 のみが発現していた (RT-PCR)。(2) 培養液に PGE₂ を添加して、cAMP 量 (30 分後) を測定すると、添加した PGE₂ の濃度依存的 (10⁻⁹-10⁻⁶ M) に cAMP 産生量が増加した。(3) PGE₂ (5 μM) 添加により、COX-2 mRNA の発現亢進が認められた。(4) 0 mM および低 Cl⁻ 濃度刺激により PGE₂ 産生量は顕著に増加し (コントロール: 140 mM NaCl Hepes 緩衝液), AH-23848 (EP4 アンタゴニスト) で部分的に抑制された。

【結論】MD 細胞では、細胞外液を Cl⁻ フリーにすると COX-2 の発現亢進により PGE₂ 産生量が増加し、EP4 を介した細胞内 cAMP 濃度の上昇によって、相乗的に COX-2 の発現量を増加させる PGE₂ シグナルの MD 細胞内増幅機構が存在することが示唆された。

(7) 網羅的 RNAi ライブラリーを用いた機能遺伝子探索～EPRIL テクノロジーの紹介

菅生厚太郎, 太向 勇, 廣瀬謙造 (東京大・院医・神経生物)

siRNA もしくは siRNA 発現ベクターを用いた RNAi は、哺乳動物細胞において迅速かつ簡便に実現できる遺伝子発現抑制法として幅広く用いられている。我々は、任意の 2 本鎖 DNA から 1 度に多種類の siRNA 発現ベクターを作製する技術、EPRIL (enzymatic production of RNAi library) 法を開発した。本発表では、EPRIL 法を概説するとともに、どのようなアプリケーションがあるか紹介した。単一遺伝子の cDNA に EPRIL 法を適用した場合、その cDNA の配列を有する siRNA 発現ベクターの集合体 (RNAi ライブラリー) が構築される。この RNAi ライブラリーをスクリーニングすることで、抑制効果の

高い siRNA 発現ベクターを複数種類得ることができる。また、EPRIL 法は、細胞から調製した cDNA の混合物にも適用可能であり、この場合、細胞の転写産物をカバーするのに十分な複雑性を有する RNAi ライブラリーが構築される。この細胞由来の RNAi ライブラリーを特定の形質を指標として選択した結果、その形質に変化を与える siRNA 発現ベクターが得られ、その配列情報から形質に関連する遺伝子の同定が可能であることが示された。以上のように、EPRIL 法は哺乳動物細胞における RNAi の可能性を広げ、遺伝子機能の網羅的な理解において強力なツールとなると期待される。

(8) Ca^{2+} dynamics in large-scale cellular networks visualized by ultra-sensitive Ca^{2+} probe, “cameleon NANO”

堀川一樹, 永井健治 (北海道大・電子科学研究所)

One of the central questions in biology is how genetic programs is reliably operated even in the presence of noise. To understand the mechanism of robust pattern formation, we focused on the development of social amoeba, *Dictyostelium discoideum*, where up to 100,000 cells self-organize into coordinated aggregation streams. Circular- or spiral-shaped aggregation waves are thought to be established by both inter-cellular cAMP relay and intra-cellular Ca^{2+} transient. Although distribution of cAMP during the aggregation process was visualized, spatio-temporal pattern of Ca^{2+} has not reported yet because of no appropriate Ca^{2+} probes to detect subtle change in Ca^{2+} concentration around 50 nM in *Dictyostelium* cells. Thus, we tried to develop ultra-sensitive

Ca^{2+} probes with large dynamic range. Introducing some modifications into CaM-M13 domain of the cameleon molecule, YC3.60 (Nagai et al 2004), we obtained probes with greatly strong Ca^{2+} affinity. Its small Kd value (20 nM) allows us to detect Ca^{2+} dynamics even at 10-150 nM ranges without affecting cellular viability. Large dynamic range (1,450%) also enables us to detect the signaling pattern in 100,000 cellular networks at single cell resolution, being the largest scales to be achieved so far. By combinatorial analysis of simple mathematical modeling and *in vivo* experiments, we will show the evidence of noisy-cellular activity and discuss its constructive roles in the pattern formation.

(9) シナプス小胞エンドサイトーシスにおけるカルシウム依存性分子機構の生後発達変化

山下貴之, 江口工学, 齋藤直人, Henrique von Gersdorff, 高橋智幸
(沖縄科学技術研究基盤整備機構)

神経終末端形質膜のエンドサイトーシスによる小胞形成と, 小胞輸送による放出部位への再補給は, シナプス伝達の維持に不可欠とされている。様々なシナプスにおいてエンドサイトーシスに Ca が関与するとの報告がなされているが, 中枢シナプス小胞エンドサイトーシスの Ca 依存性については統一的な見解がなく, Ca の下流の分子機構についても不明な点が多い。そこで, 我々は, ラット聴覚中継シナプス calyx of Held の神経終末端に膜容量測定法を適用して, この問題を検討した。聴覚獲得前(生後 7-9 日目)の calyx 内に 10 mM EGTA をホールセル・ピペットから投与すると, 連続刺激によって誘発されるエンドサイトーシスの時間経過が遷延した。この

Ca 依存的エンドサイトーシスは, カルモジュリン (CaM) またはカルシニューリン (CaN) の阻害剤により抑制され, これら阻害剤の効果は相互に閉塞 (occlude) することから, 聴覚獲得前の calyx では, 分泌細胞などで報告されているメカニズムと同様に, $\text{Ca}/\text{CaM}/\text{CaN}$ カスケードが小胞エンドサイトーシスを媒介すると結論された。しかし, 小胞エンドサイトーシスにおける $\text{CaM} \cdot \text{CaN}$ の関与は聴覚獲得前の calyx に限定されており, 聴覚獲得後の生後 13-14 日の calyx においては, いずれの阻害薬も無効であった。これらの結果は, 小胞エンドサイトーシスを媒介するメカニズムが生後発達と共にスイッチすることを示唆する。

(10) 神経ステロイドによる虚血性神経細胞死防止の分子メカニズム

曾我部正博, 田中基樹, 陳 玲

(名古屋大学・院医, JST・ICORP/SORST・細胞力覚, 南京医科大)

脳梗塞では梗塞核の急速な神経細胞死に加えて, 梗塞核周辺 (ペナンプラ領域) の神経細胞が発症 2 日後から徐々に死滅する“遅発性神経細胞死”が進行する。発症直後の血栓溶解が良好でも, 現行では遅発性神経細胞死を防ぐことはできず, その防止法の開発は人類的課題といっても過言ではない。

閉経前の女性は, 同年代の男性や閉経後の女性に比べて脳卒中の発症率が低く予後も良好であることから, 女性ホルモンが卒中予防や予後改善に有効であると示唆されてきた。我々は, 脳虚血ラットモデルを用いて, エストロゲンやプロゲステロンの事前投与が遅発性神経細胞死を防止することを報告してきたが^{1,2)}, 脳卒中の発症時期は予測不能であり臨床応用は難しい。一方, 虚血による遅発性神経細胞死は, 再環流 2 日後から 1 週間で経過するので, 発症後から 2 日目までの仮想的治療窓中にス

テロイドを投与することで遅発性神経細胞死を防止できる可能性がある。そこで一過性 (10 分間) 全脳虚血ラットを用いて, 再環流後 1-96 時間の様々なタイミングで種々の神経ステロイドを 1 回腹腔注して海馬神経細胞死に対する効果を調べた。驚くべきことに, テストステロンの前駆体 DHEA は虚血後 4 時間から 48 時間の間であれば, 顕著に神経細胞死を防止した³⁾。最近の電気生理学的解析により, この DHEA 効果はグリア細胞のグルタミン酸輸送体 (GLT-1) の上方調節によることが明らかになった。

引用文献

- 1) Dai, et al, *Neuropharmacol.* 52:1124-1138 (2007).
- 2) Cai, et al, *Neuropharmacol.* 55(2):127-38 (2008).
- 3) Li, et al, *Cereb Blood Flow Metab.* 29, 287-296 (2009).

(11) シナプスから核へのシグナリング : 第2章

尾藤晴彦, 川島尚之, 野中美応, 井上昌俊, 奥野浩行 (東京大・院医・神経生化)

新たな記憶の形成にはシナプス可塑性が不可欠であると考えられている。しかし, 新たな記憶や可塑性の維持固定化にはさらに新規タンパク合成が必要である。ではどのような「シナプスから核へのシグナリング」により, シナプス刺激に応答して必要な遺伝子の転写活性化が核で引き起こされるのであろうか。長期記憶に必須である転写因子 CREB をめぐる研究を通じ, ひとつの具体的な情報伝達経路として, NMDA 受容体+L 型カルシウムチャンネル→Ca²⁺流入→CaMKK→CaMKIV→CREB というシグナルの流れをわれわれは明らかにしてきた。

すなわち神経可塑性を誘導するパターン刺激によって CaMKK-CaMKIV 依存的に, 一過性でない, 「持続的な CREB リン酸化状態」を神経細胞の核内で引き起こすことが重要であるが, その下流で制御される遺伝子 (群) については未だに解明されていない。

神経特異的前初期遺伝子 Arc は, 海馬や大脳新皮質に

おいて生理的刺激により速やかに発現誘導される性質をもち, 現在知られている中で最も感度の高い神経活動の遺伝子マーカーの一つである。と同時に, その遺伝子産物は, F-actin に結合することが知られており, また最近, 興奮性シナプスにおける AMPA 型グルタミン酸受容体のエンドサイトーシスを促進することが報告されている。われわれは, 内在性 Arc の発現様式を良く再現し, 特に強いシナプス活動依存性を付与する新たな転写調節領域 Synaptic Activity-Responsive Element (SARE) を同定し, さらに SARE 内に, 隣接して CREB, MEF2, SRF という 3 つの神経活動依存的転写因子の結合配列が存在することを明らかにした。現在, SARE の各結合配列の意義についてより詳細に検討し, シナプスで発生した生化学的シグナルが, 核内でどのように統合されているのかを探索中である。

(12) 内因性カンナビノイドを介する逆行性シナプス伝達におけるプロテアーゼ受容体の役割

橋本谷祐輝¹, 少作隆子², 狩野方伸¹

(¹ 東京大・院医・神経生理, ² 金沢大・医薬保健研究域・保健・リハビリテーション科学)

Protease-activated receptor 1 (PAR1) は特定のプロテアーゼによって活性化される7回膜貫通型受容体である。PAR1 は脳を含め生体内で広く分布しており、様々な機能を有している。中枢神経系で PAR1 は神経細胞死や神経保護といった神経病理的な面で重要な役割を担っている。しかし生理的な働き、特にシナプス伝達での役割については詳しくわかっていない。本研究では初代培養海馬ニューロンから抑制性シナプス後電流 (IPSC) を記録し、抑制性シナプスでの PAR1 の寄与を調べた。IPSC を記録し PAR1 の活性化酵素であるトロンビン、または PAR1 活性化ペプチドを投与すると一過性に IPSC が抑制され、それが PAR1 アンタゴニストで抑えられた。この

抑制には2発刺激時の増強が伴ったことからシナプス前性の変化であることが示唆された。これまでの研究で様々な Gq/11 共役型受容体の活性化によって内因性カンナビノイド (eCB) が作られることが明らかになっている。PAR1 は Gq/11 と共役することから eCB 系の寄与を調べた。CB1 受容体のアンタゴニスト処理により PAR1 活性化で誘起される IPSC の抑制が消失した。さらに薬理的に eCB 産生を阻害しても PAR1 による IPSC の抑制が抑えられた。以上の結果から、PAR1 は eCB 産生を誘起し CB1 受容体を介してシナプス伝達を抑制することが示唆された。

(13) 代謝型グルタミン酸受容体の多様なシグナリングを調節する機構

立山充博, 久保義弘 (生理研・神経機能素子)

代謝型グルタミン酸受容体 I 型 (mGlu1 α) は、神経回路の可塑性に関わる G 蛋白質共役型受容体である。主に Gq 経路を活性化するが、Gs や Gi/o 経路も活性化することが知られている。我々は、これまでに mGlu1 α の多様なシグナリングが C 末端領域や相互作用蛋白質により調節を受けることを報告してきたが、今回、サブユニット間相互作用もその調節機構として働く可能性を見出した。mGlu1 α はホモ 2 量体であるため、二つのリガンド結合部位と二つの G 蛋白質結合部位を有する。これまで、一つのサブユニットにリガンドが結合すると自身のサブユニット (シス型) と隣のサブユニット (トランス型) を介して Gq 経路を活性化することが知られていたが、

他の経路については知られていなかった。そこで、mGlu1 α が Gq と Gi/o 経路を活性化できる HEK 細胞に種々の変異体を発現させて、この点を検討したところ Gq 経路がシス型のみ、およびトランス型のみで活性化されたのに対し、Gi/o 経路は、シス型のみ、トランス型のみでは、活性化されなかった。同様な結果は、一方のサブユニットに G 蛋白質との共役を阻害する変異体を導入した場合にも観察された。さらに、Gi/o 共役型の mGlu2 でも、トランス型活性化のみでは応答の減弱が見られ、受容体サブユニット間での相互作用を介する調節機構が示唆された。

(14) G 蛋白質制御内向き整流性カリウムチャネルの開閉を調節する細胞質領域内の構造変化

稲野辺厚, 倉智嘉久 (大阪大・院医・分子細胞薬理)

G 蛋白質制御内向き整流性カリウム (K_G) チャネルは

心臓で徐脈、神経で遅延性の抑制性後シナプス膜電位の

形成に寄与する。 K_G チャネルの活性化には他の内向き整流性カリウム (Kir) チャネルと同様にリン脂質 PIP_2 が必須である。しかしながら、 K_G チャネルの活性化は PIP_2 に加えて、三量体 G 蛋白質 $\beta\gamma$ サブユニットや細胞質内 Na^+ 等の活性化因子を必要とする。これらの制御因子は K_G チャネルの細胞質領域に直接結合するため、何らかの構造変化を引き起こすことが予想されているが、この詳細は不明であった。今回我々は K_G チャネル活性化機構の分子基盤を明らかにするために、 K_G チャネルサブユニット Kir3.2 の細胞質領域を活性化因子である Na^+ 存在下、非存在下で結晶化し、X 線結晶構造を比較した。 Na^+ 非存

在下では N 末端と CD ループがイオン結合を介して相互作用していた。一方で、 Na^+ 存在下ではこの相互作用が見られなかった。機能解析から、このイオン結合は PIP_2 に対する親和性を低下させることによって、Kir3.2 チャネルの活性化を抑制していることが判った。以上のことは、Kir3.2 チャネルの開閉に伴い、細胞質領域が大きく構造変化を起こしていることを示唆すると共に、N 末端と CD ループ間のイオン結合の切断が Na^+ による Kir3.2 チャネルの活性化の分子機構であり、その様式は脱抑制であることを示している。

(15) イオン透過機構の動的理解を目指して

老木成稔, 岩本真幸, 松木悠佳, 清水啓史 (福井大・医学部・分子生理)

イオンチャネルがどのようにしてイオン透過の高い選択性と速い透過速度という一見相矛盾する課題を実現することができるのか。イオン透過機構の研究は電気生理学領域で長い歴史を持ち、単一チャネル電流記録法により大きく進歩した。その後、高解像度の i 線結晶解析像が得られ、イオン透過機構の問題は解決したかのような印象を持たれているかもしれない。しかし結晶構造は静止像であり、本来動的な過程であるイオン透過の一面を表すに過ぎない。動いているイオンをどう捉えるか。結晶構造をもとに、イオンの動きの軌跡を辿るべく分子動力

学法などの計算機シミュレーションが盛んに行われている。しかし、選択性がどのように実現しているのか、という本質的問題に関して、未だ回答は得られていない。私達はイオン透過を研究する上で古典的概念に属する流動電位 (Levitt ら) と流束比指数 (Hodgkin ら) の意味を見直し、サイクル流束という新しい概念をツールとして解析する方法を確立した。イオン透過におけるイオン間相互作用, イオン-水相互作用などの振る舞いが明らかになってきた。

3. 作動中の膜機能分子の姿をとらえるー静止画から動画へー

2009年9月3日ー9月4日

代表・世話人：相馬義郎（慶應義塾大学・医学部）

所内対応者：久保義弘（生理研・神経機能素子）

- (1) バクテリオロドプシンの光励起に伴う姿を高速原子間力顕微鏡 (AFM) で捉える
柴田幹大¹, 山下隼人¹, 内橋貴之^{1,2}, 神取秀樹³, 安藤敏夫^{1,2}
(¹金沢大学, ²JST/CREST, ³名古屋工業大学)
- (2) 細菌緑光認識レセプターの色認識と構造変化
鈴木大介, 本間道夫, 須藤雄気 (名古屋大学理学研究科生命理学専攻)
- (3) 光に応答しない膜機能分子の赤外分光測定
神取秀樹, 古谷祐詞 (名古屋工業大学)
- (4) 神経伝達物質トランスポーターホモログ LeuT の結晶構造 ー作動中・作動阻害中ー
山下敦子¹, S. K. Singh², C. L. Piscitelli², E. Gouaux^{2,3}
(¹理研・放射光セ, ²オレゴン健康科学大・ヴォーラム研究所, ³HHMI)
- (5) 光学顕微鏡による分子モーターの構造機能相関の可視化
西坂崇之 (学習院大学 理学部 物理)
- (6) 細胞膜情報処理蛋白質の1分子動態
佐甲靖志 (理研・基幹研究所)
- (7) 単粒子電顕構造解析法と SEM による分子・細胞レベルの観察
三尾和弘¹, 小椋俊彦¹, 丸山雄介¹, 川田正晃¹, 西山英利², 須賀三雄², 佐藤主税¹
(¹産業技術総合研究所, ²日本電子)
- (8) 電位依存性プロトンチャネルの温度依存性を決定する諸因子
久野みゆき, 安藤博之, 森畑宏一, 酒井 啓, 森 啓之, 老木成稔 (大阪市立大学医学部)
- (9) 電位依存性プロトンチャネル細胞内領域の会合とゲーティングへの寄与
藤原祐一郎, 黒川竜紀, 岡村康司 (大阪大学医学系研究科統合生理学)
- (10) ABC トランスポーター NBD エンジンの動作機構 ー機能データからの構造変化予測ー
相馬義郎^{1,2}, 中村友美¹, Y.-C. Yu¹, 古川朋佳³, 松崎陽平¹, T.-C. Hwang²
(¹慶應大・医, ²米ミズーリ大・医, ³東工大)
- (11) 分子動力学シミュレーションによる ABC トランスポーター Sav1866 のダイナミクスの解析
足立健太郎, 櫻井 実 (東京工業大学 バイオ研究基盤支援総合センター)
- (12) 超分子べん毛モーター膜タンパクの集和解離と回転
本間道夫 (名古屋大学理学研究科生命理学専攻)
- (13) 大腸菌機械受容チャネル MscL のゲーティングにおける水の役割
澤田康之¹, 曾我部正博^{2,3} (¹名大院・医・DC4, ²名大院・医, ³JST・ICORP/SORST)
- (14) KCNQ1-KCNE1 イオンチャネル複合体における密度依存的なサブユニット数の変化
中條浩一^{1,2}, Max Ulbrich², 久保義弘¹, Ehud Isacoff²
(¹生理研・神経機能素子, ²カリフォルニア大バークレー校)
- (15) KcsA カリウムチャネルのイオン透過過程を捉える実験的・理論的戦略
老木成稔, 岩本真幸, 松木悠佳, 清水啓史 (福井大学医学部分子生理)

【参加者名】

本間道夫, 須藤雄気, 鈴木大介 (名古屋大学・大学院理学研究科), 佐甲靖志 (理化学研究所), 柴田幹大 (金沢大学・理工学域数物科学類), 山下敦子 (理化学研究所播磨研究所放射光科学総合研究センター), 西坂崇之 (学習院大学・理学部), 櫻井 実, 足立健太郎, 古川朋佳 (東京工業大学), 岡村康司, 藤原祐一郎 (大阪大学・医学系研究科), 相馬義郎, 中村友美 (慶應義塾大学・医学部), 神取秀樹, 川鍋 陽, 浅井佑介, 福田哲也 (名古屋工業大学・大学院工学研究科・未来材料創成工学専攻), 佐藤

主税, 三尾和弘, 丸山雄介 (産総研・脳神経情報), 柳 (石原) 圭子 (佐賀大学医学部・生体構造機能学), 久野みゆき (大阪市立大学・大学院医学研究科), 老木成稔, 岩本真幸, 清水啓史, 松木悠佳 (福井大学医学部・分子生理), 曾我部正博, 澤田康之 (名古屋大学大学院・医学系研究科細胞情報医学専攻), 古谷祐詞 (分子科学研究所・生命・錯体分子科学研究領域), 久保義弘, 立山充博, 中條浩一, Keceli Batu, 松下真一, 石井 裕 (生理学研究所・神経機能素子)

【概要】

平成 21 年度生理学研究所研究会「作動中の膜機能分子の姿を捉える ―静止画から動画へ―」は, 予定通り 2009 年 9 月 3 日 (木)・4 日 (金) の 2 日間にわたって行われた。参加者は計 36 名, 発表演題数は 15 題であり, 一演題あたり約 40 分間の発表・討論時間を確保した。

本研究会のテーマである作動中の膜機能分子の「姿を捉える」とは, 単に分子構造を解くことを意味するのではなく, 対象分子の動的構造変化を強く意識した機能研究も, 本研究会の非常に重要な構成要素である。したがって, 本研究会では, 分子構造解析の専門家から電気生理学者まで幅広い分野にわたる研究者が一堂に会して, 各自の「姿を捉える」測定技術およびそれによって捉えられた「膜機能分子の姿」を静止画から動画への展開を目指すというコンセプトのもとに最新の研究成果の発表・討論がおこなわれた。

本研究会で発表された研究で用いられていた測定方法は, X 線結晶構造解析, 高速分子間力顕微鏡, 赤外線分

光法, パッチクランプ法, 蛍光顕微鏡および新開発の水溶液中電子顕微鏡と多岐にわたっており, それぞれにさらに独自の改良を行ったオリジナリティの高い手法が数多く見られた。

それぞれの測定法における時間分解能, 空間分解能および測定可能環境条件の違いおよび, 研究の対象とするチャネル, トランスポーターおよびモータータンパクなどの機能分子における捻れや回転などの分子運動様式の違いなど, 時間的・空間的に非常に広範のスケールでのさまざまな膜機能分子の動作機構についての最新の知見を, 参加者一同が共有することができた。

参加者達の研究対象と測定手法はそれぞれ大きく異なっていたが, 膜機能分子の動作機構の研究を同じく行っているもの同志, 的を得た活発な討議がなされた。懇親会においても和やかな雰囲気の中にも熱心な議論が続き, 本研究会の参加者たちの中での新たな共同研究のスタートが期待された。

(1) バクテリオロドプシンの光励起に伴う姿を高速原子間力顕微鏡 (AFM) で捉える

柴田幹大¹, 山下隼人¹, 内橋貴之^{1,2}, 神取秀樹³, 安藤敏夫^{1,2}

(¹金沢大学, ²JST/CREST, ³名古屋工業大学)

タンパク質の機能発現と構造変化は密接に関係している。それ故に, タンパク質のダイナミックな振る舞いを直接可視化することは, その機能メカニズムを理解する有力な手掛かりになるに違いない。原子間力顕微鏡 (AFM) は溶液中でタンパク質の構造をナノメートルサイズの分解能で観察することができる。通常の AFM は 1

枚の画像を取得するのに分オーダーの時間が必要であるが, 我々のグループが開発した高速 AFM は走査性能が高く, 機能している生体分子そのものの動的変化を捉えることを可能にしている^[1]。

本研究はバクテリオロドプシン (bR) を対象として外部刺激 (光) によるタンパク質の構造変化の可視化に初

めて成功した。bR は高度好塩菌の細胞膜に存在し、光駆動プロトンポンプ機能をもつ。これまでに様々な手法によって光励起に伴う構造変化は報告されているが、リアルタイム、かつリアルスペースでの可視化は実現されていない。本研究で得られた AFM movie は光励起した bR 分子の構造変化が明瞭に撮影されており、観察された構

造変化は光により何度でも繰り返される。さらに、活性化状態で近接する bR-bR 間の相互作用を発見し、この相互作用は基底状態へ戻る速さに正、負の協同性を示すことを明らかにした。

- [1] T. Ando et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 12468 (2001).

(2) 細菌緑光認識レセプターの色認識と構造変化

鈴木大介, 本間道夫, 須藤雄気 (名古屋大学理学研究科生命理学専攻)

生物は、青・緑・赤を受容し色を認識する。我々は、細菌緑光認識レセプター・センサリーロドプシン I (SRI) を材料に研究を行っている。SRI は、波長に依存した一光子・二光子反応により、誘引・忌避という正反対の反応を起こし、細菌の目としての働きに寄与する。我々は、古細菌にしか存在しないと考えられてきた SRI を、真正細菌から単離した^[1]。この蛋白質 (SrSRI) は、古細菌型に比べて極めて安定であり、これまで困難であった解析が可能となった。本発表では、SrSRI の分光学的性質^[1]、赤外分光解析により明らかとなった構造変化^[2]、脱塩化により明らかになったアニオン結合による色制御とその結

合部位^[3]について述べ、情報伝達分子・HtrI との複合体研究の結果も含め、青色光レセプター・SRII の結果^[4]とも比較しながら SRI の機能発現機構についての議論を行った。

- [1] Kitajima-Ihara T. et al. (2008) *J. Biol. Chem.* 283, 23533-28541.
[2] Suzuki, D. et al. (2008) *Biochemistry* 47, 12750-12759.
[3] Suzuki, D. et al. (2009) *J. Mol. Biol.* in press.
[4] Sudo, Y., and Spudich, J.L. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 16129-16134.

(3) 光に応答しない膜機能分子の赤外分光測定

神取秀樹, 古谷祐詞 (名古屋工業大学)

振動分光法は一般に構造生物学のための解析ツールとして認識されていないが、光受容蛋白質の機能発現のための構造変化をモニターする解析ツールとして高い可能性をもつことを、我々はロドプシン研究において示してきた^[1]。ではこのような赤外分光解析は、光励起とは無縁の一般の蛋白質にどれだけ有効であろうか？ 何らかの刺激による構造変化を赤外差スペクトルの形で抽出する stimulus-induced difference FTIR spectroscopy において、光のように有効な刺激を試料に与えることができれば同様に高精度の計測が可能になるかもしれない。しかし、リガンド結合やイオン結合、pH 変化などの刺激を与えるためには、ロドプシンに対するような透過型の分光法ではなく、エバネッセント波を利用して溶液中で計測が可

能な全反射赤外分光法 (Attenuated Total Reflection FTIR spectroscopy) が必須となる。

我々は最近、全反射法を用いた差スペクトルの測定系を構築したところ、さまざまな膜機能分子の構造機能相関を理解する上で、かなり役に立つことがわかってきた。本講演では、KcsA チャネル (福井大・老木成稔博士、清水啓史博士との共同研究)、べん毛モーター蛋白質 (名大・本間道夫博士、須藤雄気博士との共同研究)、V 型 ATPase (千葉大・村田武士博士との共同研究) の測定結果を紹介し、ATR-FTIR 法の可能性についての議論を行った。

- [1] 古谷祐詞, 神取秀樹, 蛋白質科学会アーカイブ #036 (2008).

(4) 神経伝達物質トランスポーターホモログ LeuT の結晶構造 ー作動中・作動阻害中ー

山下敦子¹, S. K. Singh², C. L. Piscitelli², E. Gouaux^{2,3}

(¹ 理研・放射光セ, ² オレゴン健康科学大・ヴォーラム研究所, ³ HHMI)

高度好熱細菌 *Aquifex aeolicus* 由来 LeuT は, Na^+ イオンと L-ロイシンをはじめとするアミノ酸を共輸送するトランスポーターであり, 中枢神経系シナプス膜に存在する Na^+/Cl^- 依存性神経伝達物質トランスポーター (NSS) のホモログでもある。NSS は, シナプス間隙に放出されたドーパミン, セロトニン, γ アミノ酪酸, グリシンなどの主要な神経伝達物質を細胞内にとりこむことにより, シナプス伝達を終焉させ次の信号の到来に備える役割を担っているトランスポーター群である。また, その機能不全がうつ病をはじめ様々な精神疾患の原因となり, それらの治療薬 (抗うつ剤など) や麻薬・覚醒剤 (コカイン

など) の標的分子でもある, 医学的・薬理的にも重要な膜タンパク質でもある。我々は, きわめて安定な NSS ホモログである LeuT を用いて, 立体構造解析および分子レベルでの機能解析に取り組んできた。そしてこれまでに, LeuT が輸送する基質とイオン全てを結合している, いわば「作動中」の結晶構造, さらに LeuT の輸送を拮抗的に阻害する薬剤や非拮抗的に阻害する薬剤と結合している, いわば「作動阻害中」の結晶構造を高分解能で捉えることに成功した。本講演では, これら構造・機能解析の結果に基づき, LeuT の輸送機構を担う構造基盤についての議論を行なった。

(5) 光学顕微鏡による分子モーターの構造機能相関の可視化

西坂崇之 (学習院大学 理学部 物理)

光学顕微鏡技術のめざましい発展により, 生体分子を 1 分子レベルで調べる研究は, この 10 数年の間に飛躍的に進んでいる。特に分子モーターの分野では, 1 つの分子が生み出すステップ状の動きや化学反応が直接画像化され, 精密な装置としてのタンパク質の動作機構に踏み込むことが可能となってきた。セミナーでは, 独自の技術を 1 分子観察に応用した最新の成果を紹介する。対象は世界最小の回転分子モーターである F1-ATPase (ATP 合成酵素を構成する複合体の一部) であり, ガラスに吸着させた状態で回転軸にマーカーをつけることにより,

機能している様子をビデオカメラで可視化することができる。(1) エバネッセント光の励起光を変調する全反射型顕微鏡を用い, 化学状態と蛋白質内部のコンフォメーション変化がどのように対応しているかについて, 1 分子のレベルで調べた。(2) 蛍光性 ATP による 1 回の化学反応を画像化し, 力学反応とのカップリングを明らかにすることができた。以上の 2 つの知見を軸として, 1 個の分子を対象にした構造生物学の可能性についての議論を行なった。

(6) 細胞膜情報処理蛋白質の1分子動態

佐甲靖志 (理研・基幹研究所)

上皮成長因子受容体 (Epidermal growth factor receptor: EGFR) は, 細胞膜を 1 回貫通するチロシンリン酸化酵素型膜受容体に属する膜内在性蛋白質であり, 細胞増殖にかかわる情報処理反応をおこなっている。EGF が EGFR

の細胞外ドメインに結合すると EGFR は信号伝達のための 2 量体を形成し, 細胞質側で相互リン酸化反応を起こす。EGFR のリン酸化は多種の細胞質蛋白質によって認識される。これらの認識反応の結果のひとつとして, 細

胞膜の細胞質側に存在する膜表在性蛋白質 Ras の活性化がおこり、Ras は種々のエフェクター分子の活性化を制御する。本講演では、細胞内および再構成系における 1 分子蛍光計測法により明らかになった、EGFR と Ras の情報処理反応について報告する。EGF と EGFR の結合反応、EGFR の多量体形成と信号伝達 2 量体の形成反応、

活性化した EGFR とアダプター蛋白質 Grb2 の認識反応、Ras の活性化とエフェクターRaf の分子認識反応などが話題である。1 分子計測の結果は、EGFR や Raf の動的な構造変化が、蛋白質 1 分子レベルでの複雑で合目的的な細胞内情報処理反応を可能にしていることを示唆している。

(7) 単粒子電顕構造解析法と SEM による分子・細胞レベルの観察

三尾和弘¹，小椋俊彦¹，丸山雄介¹，川田正晃¹，西山英利²，須賀三雄²，佐藤主税¹
(¹産業技術総合研究所，²日本電子)

膜タンパク質の多くは、様々のタンパク質と相互に複合体を形成して機能する。それら複合体は安定とは限らず、多くは不安定なものである。例えば、我々の細胞は内側の小胞体内 Ca^{2+} が枯渇すると、その枯渇刺激により細胞外から Ca^{2+} を流入させる。この流入を担うチャネルとして、細胞膜にある Ca^{2+} 放出活性化 Ca^{2+} (CRAC) チャネルが注目を集めている。CRAC チャネルは免疫応答と深い関連があることが報告されている。このチャネルを

構成するのは、細胞膜上のチャネルポアとなる Orai1 と、小胞体膜上で Ca^{2+} 枯渇を感受する STIM1 である。Orai1 は通常は 4 量体を形成していた。しかし、その STIM1 との結合は枯渇時に一過性であり、これまでわれわれが開発してきた単粒子解析でも、その複合体の観察は不可能であった。これらの問題を克服するために、走査型電子顕微鏡を改良することで全く新しい顕微鏡を開発した。

(8) 電位依存性プロトンチャネルの温度依存性を決定する諸因子

久野みゆき，安藤博之，森畑宏一，酒井 啓，森 啓之，老木成稔（大阪市立大学医学部）

電位依存性プロトンチャネル (voltage-gated H^+ channel) は、脱分極によって開口しプロトン (H^+) をその電気化学的ポテンシャルに従って選択的に透過させる。単一チャネル電流が小さく測定が困難なため、 H^+ チャネル機能の研究は殆どが全細胞電流の解析に基づいて行われてきた。そしてチャネルの特性のひとつとして早くから注目されていたのが“高い温度依存性”である。この中から私達は温度ジャンプ法を用いて H^+ 透過過程の温度依存性を抽出した。チャネル開状態における H^+ 透過の活性化エネルギーは一般的なイオンチャネルで報告されている

値に比べ高かった。しかし、この研究過程で細胞膜を介する H^+ -flow にチャネルポアの外での H^+ 移動に伴う要因 (H^+ 枯渇，濃度分極，アクセス抵抗など) が影響を与えることが示唆された。これは H^+ 濃度が他のイオンに比べ極端に低いことや H^+ の物理化学的特性による。哺乳類細胞の生理学的環境では、チャネル外要因の H^+ 透過過程への寄与が大きく、その結果 H^+ 電流の見かけ上の温度依存性は一般のイオンチャネルと区別がつかなくなることが明らかになった。

(9) 電位依存性プロトンチャネル細胞内領域の会合とゲーティングへの寄与

藤原祐一郎, 黒川竜紀, 岡村康司 (大阪大学医学系研究科統合生理学)

我々の研究室で cDNA が単離された電位依存性プロトンチャネル (VSOP/Hv1) は, 電位依存性イオンチャネルの電位センサードメインに相同性が高い膜 4 回貫通分子である。最近, 我々の研究室も含む複数の研究室から同時期に VSOP が 2 量体として機能することが報告された (Koch et. al. PNAS (2008) 他)。細胞内領域をほとんど有さない VSOP であるが C 端細胞内領域には保存性の高い約 50 アミノ酸残基からなるロイシンジッパーモチーフが存在する。その保存性の高い細胞内領域のチャネル機能に対しての役割を知るために今回我々は以下のような解析を行った。マウス VSOP の細胞内 C 端領域を大腸菌を用いて発現・精製し, 水溶液中での物性を解析した。分析超速心による分子量解析により, その領域だけでダ

イマー状態を呈していることが観察された。CD スペクトラム解析からその領域は α -Helix を呈しており, その解離融解温度 (tm 値) は通常のコイルドコイル構造 (tm $\approx$ 60°C) と比較し体温付近の低い温度であり, かつ急峻な温度依存性を呈した。VSOP の C 端細胞内領域の点変異体及び deletion 変異体を HEK 細胞に発現させて電気生理学的に解析を行ったところ, 活性化キネティクスの促進が観察された。電気生理学的にキネティクスの促進が見られた変異体をゲル濾過クロマトグラフィーにより分子量を解析したところ, 解離しモノマー化していた。以上の解析は, C 端細胞内領域はダイマーコイルドコイル構造をとっておりその熱安定性がチャネル会合・ゲーティング両方に寄与していることを示唆していた。

(10) ABC トランスポーター NBD エンジンの動作機構 —機能データからの構造変化予測—

相馬義郎^{1,2}, 中村友美¹, Y.-C. Yu¹, 古川朋佳³, 松崎陽平¹, T.-C. Hwang²
(¹慶應大・医, ²米ミズーリ大・医, ³東工大)

ABC トランスポータースーパーファミリーのメンバーは, よく保存された 2 つの Nucleotide Binding Domain (NBD) を持っている。この 2 つの NBD は ATP 分子を挟み込んだ形での二量体の形成と ATP 分子の加水分解に続く二量体の解離を繰り返すことにより, それぞれのトランスポーター分子が機能を発揮するための駆動力を供給しているという“NBD 二量体ゲーティングエンジン”仮説が提唱され, 現在, 広く認められている。しかしながら, その中間過程や詳細な動作原理などについて未知な部分が多い。

CFTR チャネルは, ABC トランスポータースーパーファミリーのメンバーで唯一, イオンチャネルとしての機能を持ち, チャネルゲートの開閉動態をパッチクランプ法

を用いて観察することにより, その作動サイクル中の NBD エンジンの状態を, 間接的にはあるが, リアルタイムに知ることができる。

現在までに, CFTR の ATP 結合能や加水分解能に影響を与えると考えられるさまざまな点変異や ATP アナログを用いた機能実験が行われ, それらの機能データを, 他の ABC トランスポーターの結晶構造に基づいて作られたホモロジーモデルに適用することにより, CFTR-NBD エンジンの動作機構の説明がなされてきた。

本研究会ではこのアプローチで得られた CFTR-NBD エンジンの作動サイクル中の構造変化の予測とその手法による限界, および期待されるブレークスルーについての議論を行なった。

(11) 分子動力学シミュレーションによる ABC トランスポーター Sav1866 のダイナミクスの解析

足立健太郎, 櫻井 実 (東京工業大学 バイオ研究基盤支援総合センター)

ABC トランスポーターは ATP の加水分解エネルギーを利用して, 様々な物質を細胞内外へ輸送する膜タンパク質である。特に ABCB1 や ABCC1 といったヒトの ABC トランスポーターは癌細胞の多剤耐性獲得に関わっており, 非常に重要である。しかし, これらのタンパク質の輸送機構については未知の点が多い。黄色ブドウ球菌由来の ABC トランスポーター・Sav1866 は ABCB1 と高い配列相同性を有しており, その結晶構造が判明していることから ABCB1 のモデルとして期待されている。本研究ではこの Sav1866 の結晶構造に対し, anisotropic network model (ANM) に基づく振動解析と MD シミュレ

ーションによる原子レベルのダイナミクス解析を行い, 基質輸送メカニズムについて知見を得ることを目的とした。現在までに以下のことが判明している。ANM 解析によると, 今回調べた outward-facing 型の構造では, 膜貫通ヘリックス領域は細胞質側を基点とする開閉運動をもつほか, いくつかの特徴的な運動を潜在的に有していることが分かった。一方 MD のトラジェクトリに対し主成分解析を行ったところ, ATP を加えた系においてこの開閉運動が消失することが判明した。このことから ATP は outward-facing から inward-facing への構造変化を導く開閉運動を制御していると考えられる。

(12) 超分子べん毛モーター膜タンパクの集合解離と回転

本間道夫 (名古屋大学理学研究科生命理学専攻)

細菌のべん毛モーターは, 細胞膜内外のイオンの電気化学的ポテンシャル差をエネルギー源にして駆動する。イオンチャネルであるモーター固定子への共役イオンの流入に伴う固定子と回転子間の相互作用が回転力を発生させていると考えられている。最も研究が進んでいる大腸菌のべん毛モーターでは, 固定子タンパク質として, MotA (モータータンパク質 A), MotB (モータータンパク質 B) という膜に埋まったタンパク質が同定されている。そして, 大腸菌の場合, これらに水素イオンが流れ込んで回転力をつくると考えられている。我々が発見したビブリオ菌のナトリウムイオン駆動型モーターでは, MotA, MotB と相同なタンパク質である Pom (polar motor: 極べん毛モーター) A タンパク質と PomB タンパク質に加えて, 2 種類のモータータンパク質 MotX と MotY があって, モーターが回転する。モータータンパ

ク質 PomA と PomB は, PomA2 分子と PomB1 分子が, 複合体を作り, それがさらに 2 量体化し, (PomA)₄ (PomB)₂ という複合体を作る。この複合体の膜貫通領域がイオンチャネルを形成していると推定されている。イオンチャネル内の荷電残基に共役イオンが結合解離することで, A サブユニットの細胞質領域の構造変化が起こり, 回転子との相互作用が変化することにより, 回転力がつくられると推測されている。最近, ビブリオ菌において, 固定子の集合に MotX と MotY が必要であることが明らかになった。さらに, その集合解離が Na⁺ 依存的にダイナミックに起こることも明らかにしている。この固定子の集合が, 回転子タンパク質である FliG の変異によって影響を受けるという結果も得ている。本発表では, これら我々の最近のデータをもとに, 固定子のダイナミックな集合解離と回転機構についての議論を行なった。

(13) 大腸菌機械受容チャネル MscL のゲーティングにおける水の役割

澤田康之¹, 曾我部正博^{2,3} (¹名大院・医・DC4, ²名大院・医, ³JST・ICORP/SORST)

大腸菌機械受容チャネル MscL は、細胞膜の膜面に発生した張力を直接感受してゲーティング（開口）する膜蛋白質である。MscL は 2 回膜貫通型のホモ五量体で形成されており、大腸菌 MscL の 3D 構造は結核菌由来の MscL の結晶構造を基に提案されている。また、各サブユニットの膜貫通 α ヘリックスでポアを形成している。構造変化に関する情報は、電気生理を用いた実験や EPR の結果から推定されている。さらに、分子動力学 (MD) 計算による開口過程のシミュレーションも報告されている。しかしながら、膜張力で誘起される MscL の構造変化で最も本質的な役割を担う、細胞膜脂質と蛋白質の間の相互作用を原子・分子レベルで直接解析した研究報告はない。そこで本研究では MscL 蛋白質-脂質間相互作用を考慮した分子モデルを作成し、MD 計算を行った。膜面の張力は、脂質膜内での膜面に平行な方向の圧力を一

様に下げることで発生させた。このとき、脂質膜の両面にある親水基付近で特に大きな張力が発生した。張力の発生で MscL の構造変化を誘発させ、その結果本モデルで MscL の開口過程を再現できた。MscL と脂質膜との間の相互作用を解析した結果、脂質膜-水境界付近に位置する Phe78 が最も強く相互作用しており、主要な張力受容部位であることが示唆された。さらに MscL の構造変化に際して、疎水的な環境が形成されているポアの最も狭い領域に水分子の浸潤と透過が起きることで開口が開始した。また、これまでに実験的に知られている、より開口しやすい変異体 (G22N) をモデル上で作成して同様の計算を行ったところ、実験結果と整合性のある結果が得られた。本研究会では野生型ならびに変異体の MscL について、水分子の挙動に注目した開口時の詳細な解析結果を発表した。

(14) KCNQ1-KCNE1 イオンチャネル複合体における密度依存的なサブユニット数の変化

中條浩一^{1,2}, Max Ulbrich², 久保義弘¹, Ehud Isacoff²
(¹生理研・神経機能素子, ²カリフォルニア大バークレー校)

電位依存性カリウムチャネル α サブユニット KCNQ1 は、共発現する β サブユニットの種類によってその性質を大きく変える。心臓では KCNE1 と呼ばれる β サブユニットと分子複合体を構成して、ゆっくりとした開閉のキネティクスを持つ I_{Ks} と呼ばれる電流を担っている。KCNQ1 は、すでに結晶構造解析がなされている Kv1.2 と同様 4 量体であるが、1 つのイオンチャネル (4 つの KCNQ1) に対して何個の KCNE1 が結合するかについてはいまだ議論が続いている。そこで全反射蛍光顕微鏡を用い、単分子レベルでの GFP の退色ステップをカウントすることにより KCNQ1-KCNE1 複合体のストイキオメトリの決定を試みた。KCNQ1 は 4 量体であると予想

されたが、GFP の蛍光タグをつないだ KCNQ1 の退色数も最大 4 回となり、実際に 4 量体であることを確認することができた。一方 GFP をつないだ KCNE1 の退色ステップ数も同様に最大 4 回となり、最大 4 つの KCNE1 がひとつの KCNQ1 複合体に結合する (4 : 4) ことを示唆する結果を得た。さらに KCNQ1 と KCNE1 の膜上発現密度の比率を変えることで、KCNQ1 複合体のストイキオメトリが 4 : 4 のみならず、4 : 2, 4 : 1 といった異なる状態になりうることを示唆する結果を得た。KCNQ1 と KCNE1 のストイキオメトリは従来考えられているよりもフレキシブルなものであるかもしれない。

(15) KcsA カリウムチャネルのイオン透過過程を捉える実験的・理論的戦略

老木成稔, 岩本真幸, 松木悠佳, 清水啓史 (福井大学医学部分子生理)

KcsA カリウムチャネルの高解像度結晶構造が明らかになり, 選択性フィルタ内のイオン分布が様々な条件で求められた。従来, 単一チャネル電流というイオン透過としては巨視的な実験値しか得られてこなかったことから考えると, ポア内イオン分布の情報は透過過程を知る上で全く新しい視点を与えてくれた。実際, 結晶構造をもとに分子動力学法などの計算機実験が行われイオン透過の局所的な軌跡の情報は蓄積している。現在 3 つの異なるレベルの情報 (イオン分布, その微視的な軌跡, 巨視的なイオン流束) が得られているが, これらの情報の間にはその時間的・空間的解像度に大きなギャップがあり, 相互の情報を関連付けることは容易ではない。私達

は新しいアプローチとして水-イオンカップル比の理論的意義に注目し, 実験的に流動電位を測定することによって様々な条件で水-イオンカップル比を求めた。この水-イオンカップル比は, イオン透過過程の離散的モデルではその部分反応経路 (サイクル流束) に相当する情報を与えてくれる。さらに複イオンポアであるカリウムチャネルで実験されてきた流束比指数 (flux ratio exponent) についてもサイクル流束は新しい観点を与えてくれた。本研究会では, イオン透過機構の本質である水-イオン, イオン-イオン相互作用についての議論を行なった。

4. 神経科学の新しい解析法とその応用

2009年7月16日－7月18日

提案代表者：高橋正身（北里大学）

所内対応者：池の中一裕（分子神経生理部門）

- （1）前脳形成過程におけるジンクフィンガー遺伝子 *Fezf1*, *Fezf2* の機能解析
清水健史¹, 中澤祐人¹, 平田 務¹, Young-Ki Bae¹, 可児修一¹,
清水貴史¹, 影山龍一郎², 日比正彦¹
(¹理化学研究所, 発生再生科学総合研究センター (CDB), 体軸形成研究チーム,
²京都大学, ウイルス研究所)
- （2）脳由来神経栄養因子によるミトコンドリアの局在を介した軸索側枝形成の制御
中原聡一郎, 松木則夫, 小山隆太（東京大学 大学院薬学系研究科 薬品作用学教室）
- （3）COUP-TFII は尾側基底核原基に優位に発現し, 尾側細胞移動経路を制御する
金谷繁明, 仲嶋一範（慶應義塾大学・医学部・解剖学）
- （4）偏光顕微鏡を用いた神経突起縮退時の細胞骨格ダイナミクスの解析
犬束 歩（京都大学大学院理学研究科 生物物理学教室 構造生理学講座）
- （5）Cre-loxP システムによるゼブラフィッシュ脊髄神経回路網の解析
佐藤千恵（岡崎統合バイオサイエンスセンター）
- （6）LTP に伴うスパイン増大における CaMKII α のキナーゼ活性の解析
梅田達也^{1,2}, 山肩葉子^{3,4,5}, 真鍋俊也^{5,6}, 岡部繁男⁷
(¹東京医科歯科大学 細胞生物学, ²生理学研究所 認知行動発達機構,
³生理学研究所 神経シグナル研究, ⁴総合研究大学院大学大学院, ⁵CREST,
⁶東京大学 神経ネットワーク, ⁷東京大学 神経細胞生物学)
- （7）聴覚同時検出におけるフィードフォワード抑制機構の働き
山田 玲（京都大学 医学部 神経生物学）
- （8）KCC2 による海馬顆粒細胞の主要樹状突起形成の制御
市川淳也, 松木則夫, 小山隆太（東京大学 大学院薬学系研究科 薬品作用学教室）
- （9）アメボイドミクログリアにおける PLD4 の解析
大谷嘉典¹, 山口宜秀¹, 木谷 裕², 池の中一裕³, 佐藤友美⁴, 古市貞一⁴, 馬場広子¹
(¹東京薬大・機能形態, ²家畜研究センター,
³生理研・分子神経生理, ⁴理研・脳センター・分子神経形成)
- （10）神経幹細胞のアストロサイト分化を制御するエピジェネティクス機構
佐野坂司¹, 波平昌一¹, 神山 淳¹, 蟬 克典¹, 田賀哲也², 中島欽一¹
(¹奈良先端大・分子神経分化制御, ²東京医科歯科大・幹細胞制御)
- （11）小脳皮質形成期の外顆粒細胞層で一時的に GABA が放出され
顆粒細胞前駆体 (GCP) の増殖を制御している
森島寿貴（浜松医科大学 生理学第一講座）

(12) Mechanism underlying gliotransmitter release from cultured astrocytes

Hae Ung Lee¹, Shigeyuki Namiki³, Kenji Tanaka^{1,2}, Kishio Furuya^{4,5,6}, Hongtao Liu⁷,
Masahiro Sokabe^{4,5,6}, Kenzo Hirose³, Yasunobu Okada^{1,7}, Kazuhiro Ikenaka^{1,2}

¹Division of Neurobiology and Bioinformatics, National Institute for Physiological Sciences, Okazaki, Japan,

²The Graduate University of Advanced Studies,

³Department of Neurobiology, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, Tokyo, Japan,

⁴International Cooperative Research Project/Solution Oriented Research for Science and Technology,
Cell-Mechanosensing Project, Japan Science and Technology Agency, Nagoya, Japan,

⁵Department of Physiology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan,

⁶Department of Molecular Physiology, National Institute for Physiological Sciences, Okazaki, Japan,

⁷Department of Cell Physiology, National Institute for Physiological Sciences, Okazaki, Japan)

(13) 統合失調症の動物モデルの作成とその行動薬理学的、組織学的解析

鳥塚通弘, 牧之段学, 山内崇平, 紀本創兵, 辰巳晃子, 奥田洋明, 和中明生, 岸本年史
(奈良県立医科大学 精神神経医学講座, 第二解剖学講座)

(14) Identification and functional analysis of a novel LewisX-synthesizing α 1,3- fucosyltransferase gene
in neural precursor cells

Akhilesh Kumar

(15) 温度感知行動を司る神経回路システム ～分子生理学者が目指すシステムズバイオロジー～

久原 篤 (名古屋大学大学院理学研究科)

(16) 細胞間隙での伝達物質濃度推移が定める信号伝達特性

松井 広 (生理学研究所・脳形態解析研究部門)

(17) 海馬白板のオリゴデンドロサイトの同定および活動電位の軸索伝導に対する修飾効果

山崎良彦 (山形大学医学部生理学講座)

(18) 多光子励起顕微鏡を駆使した骨組織内の *in vivo* ライブイメージング

～骨吸収の新しい調節機序の発見

石井 優 (大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・生体イメージング)

【参加者名】

石井 優 (大阪大学免疫学フロンティア研究センター),
市川淳也 (東京大学大学院薬学系研究科), 犬束 歩 (京
都大学大学院理学研究科), 梅田達也 (生理研認知行動発
達機構), 大谷嘉典 (東京薬科大学大学院薬学研究科),
鹿川哲史 (東京医科歯科大学難治疾患研究所), 金谷繁明
(慶應義塾大学医学部), 工藤佳久 (東京薬科大学), 久
原 篤 (名古屋大学大学院理学研究科), 熊倉鴻之助 (上
智大学理工学部), 熊田竜郎 (浜松医科大学生理学第一),
小山隆太 (東京大学大学院薬学系研究科), 佐藤千恵 (岡
崎統合バイオサイエンスセンター), 佐野坂司 (奈良先端
科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科), 清水健史
(理化学研究所発生・再生科学総合研究センター), 高橋
正身 (北里大学医学部), 鳥塚通弘 (奈良県立医科大学大
学院医学研究科), 中原聡一郎 (東京大学大学院薬学系研

究科), 鍋倉淳一 (生理研生体恒常機能発達機構), 東島
眞一 (岡崎統合バイオサイエンスセンター), 松井 広 (生
理研脳形態解析), 湊原圭一郎 (京都大学大学院理学研究
科), 森島寿貴 (浜松医科大学生理学第一), 山崎良彦 (山
形大学大学院医学系研究科), 山田 玲 (京都大学大学院
医学研究科), 山中章弘 (岡崎統合バイオサイエンスセン
ター), 和中明生 (奈良県立医科大学第二解剖学), 池中
一裕 (生理研分子神経生理), 等 誠司 (生理研分子神経
生理), 田中謙二 (生理研分子神経生理), 吉村 武 (生
理研分子神経生理), 小池崇子 (生理研分子神経生理),
後藤仁志 (生理研分子神経生理), 稲村直子 (生理研分子
神経生理), 李 海雄 (生理研分子神経生理), 範 凱 (生
理研分子神経生理), 清水崇弘 (生理研分子神経生理),
Akhilesh Kumar (生理研分子神経生理), 石野雄吾 (生理

研分子神経生理), 杉尾翔太 (生理研分子神経生理), 宮本愛喜子 (生理研生体恒常機能発達機構), 吉田 明 (生理研多次元共同脳科学推進センター), 佐々木哲也 (基生

研脳生物), 湊佐知子 (基生研統合神経), 桜庭寿一 (基生研統合神経), 服部聡子 (生理研行動様式), 作田 拓 (基生研統合神経), 山肩葉子 (生理研神経シグナル)

【概要】

極めて高度に複雑化した脳の機能を理解していくためには, 異なるコンセプトに基づく多様な解析法を駆使していくことが不可欠となっている。しかし急速な神経科学研究の進展の結果, 夥しい量の情報が溢れ, 異なるコンセプトに基づく研究者間での相互理解は容易ではなくなっている。本研究会では神経科学の様々な分野で活発に研究を行っている若手研究者を集めて最新の研究成果を紹介してもらい, 異なるコンセプトに基づく研究への相互理解を深めることを通じて, より広い視野から神経科学を見つめ直してもらうことを目的とした。

神経発生分野では分化に伴う転写制御や機能分子の役割, 細胞移動, 神経突起の伸長・退縮, 回路形成などの問題を取り上げた。成体の脳機能の解析法については, 多光子励起顕微鏡の新しい利用法の紹介や, シナプス可塑性に伴うスパインの動態の解析などと共に, 神経回路の機能に着目したシステムバイオロジーや, コンピューターシュミレーションを用いた新しいシナプス機能の解

析法などの方法論も取り上げ, 活発な議論を行った。

今回の研究会のもう一つの特徴として, 近年脳機能への役割が注目されているグリア細胞に関わる研究の紹介も積極的に行い, グリア細胞の分化に関わるエピジェネティックな機構や, グリア細胞からの情報分子 (グリアトランスミッター) の放出機構, グリア細胞の機能制御に関わるシグナル分子の同定などの話題も取り上げた。

現在, 我が国には神経科学を分子レベルから個体レベルまで系統的に教育するシステムが残念ながら存在していない。このため若手研究者のものの見方や考え方が, ともすると出身研究室のコンセプトに囚われてしまい, 新たな問題提起や解決法の発見に繋がる広い視野を持つことが難しい状況にあると考えられる。この様な状況を打破していくためには, 様々な分野の若手研究者を一堂に集め自由で活発な議論を行える研究会の重要性が, 今後益々高まってくるものと考えられる。

(1) 前脳形成過程におけるジンクフィンガー遺伝子 Fezf1, Fezf2の機能解析

清水健史¹, 中澤祐人¹, 平田 務¹, Young-Ki Bae¹, 可児修一¹,
清水貴史¹, 影山龍一郎², 日比正彦¹

(¹ 理化学研究所, 発生再生科学総合研究センター (CDB), 体軸形成研究チーム,
² 京都大学, ウイルス研究所)

前脳および嗅覚システム特異的に発現するジンクフィンガー型転写抑制因子 FEZF1, FEZF2 は, マウスとゼブラフィッシュにおいて, 前脳形成, 特に, 皮質投射神経の形成・終脳背側の成長・海馬領域の形成・ドーパミン作動性神経の形成・間脳のパターンニングを制御することが明らかになっている。しかしながら FEZF1, FEZF2 が, どのような分子メカニズムでそれらをコントロールしているかは不明であるので, 転写因子 FEZF1, FEZF2 の標的遺伝子を探索を行った。GeneChip 解析により, Fezf1-/Fezf2-/-胚で発現が増加する遺伝子として bHLH 型転写抑制因子 Hes5 を, 減少する遺伝子として bHLH 型転写活

性化因子 Neurogenin2 を見出した。

Hes5 プロモーターアッセイとクロマチン免疫沈降法 (ChIP) を行った結果, FEZF1, FEZF2 タンパク質が Hes5 プロモーターに結合し, Hes5 の転写を抑制することを明らかにした。

また, Fezf1-/Fezf2-/-マウスの胎生 10.5 日胚において, 神経前駆細胞の増殖の増加と, Tuj1 陽性ニューロンの減少が認められた。終脳の発生初期に Tuj1 陽性ニューロンが減少した結果, Fezf1-/Fezf2-/-マウスにおいてカハールレチウス細胞の減少とサブプレートニューロンの減少, および大脳皮質第 4 層の欠損が誘導されることが分かった。

(2) 脳由来神経栄養因子によるミトコンドリアの局在を介した軸索側枝形成の制御

中原聡一郎, 松木則夫, 小山隆太 (東京大学 大学院薬学系研究科 薬品作用学教室)

側頭葉てんかん患者およびそのモデル動物の海馬歯状回では、顆粒細胞の軸索である苔状線維が過剰な数の側枝を形成する異常発芽が確認されている。軸索側枝の形成および維持にはミトコンドリアによる ATP の供給が不可欠であるため、異常発芽の形成とミトコンドリア動態の関連をラット由来の海馬切片培養系を利用して検証した。異常発芽の形成とミトコンドリアの動態を経時的に観察するために、細胞膜移行性を有する GFP とミトコンドリア移行性を有する DsRed を切片内の顆粒細胞に共発現させ、共焦点顕微鏡を利用した経時観察を行った。そして、GABA_A 受容体の阻害薬であるピクロトキシンを処置することにより、培養切片にてんかん様状態を誘導

した。その結果、苔状線維内のミトコンドリア密度の上昇に伴う側枝数の増加が確認された。次に、ミトコンドリアの軸索内局在を制御する因子として脳由来神経栄養因子 (BDNF) に着目し、その関与を検証した。てんかん様状態における軸索内ミトコンドリア密度の上昇は BDNF の機能阻害抗体によって抑制された。さらに、BDNF を被覆した微小ビーズを苔状線維に接触させると、接触部位にミトコンドリアが局在し、その後、同部位より新たな側枝が形成される様子が観察された。本研究により、てんかん脳における異所性神経回路の形成に、軸索内ミトコンドリア局在の異常が関与する可能性が示唆された。

(3) COUP-TFII は尾側基底核原基に優位に発現し、尾側細胞移動経路を制御する

金谷繁明, 仲嶋一範 (慶應義塾大学・医学部・解剖学)

大脳発生期の尾側基底核原基 (CGE) にて誕生する抑制性神経細胞は、尾側へ向かう領域特異的な移動様式 CMS (尾側細胞移動経路: Caudal migratory stream) を示す (Yozu et al., J Neurosci, 2005)。我々は CMS が CGE 特異的に観察されることから、CMS が CGE 特異的に発現する遺伝子により制御されているのではないかと考え、CGE に特異的に発現する分子を探索した結果、COUP-TFII がほぼ CGE 特異的に発現していることを見出した。さらに CGE 細胞にて siRNA を用いて COUP-TFII を抑制した場合、CMS の移動が抑えられ、逆に MGE 細胞において COUP-TFII を強制発現させた場合において、

CMS が誘導されることを示した。胎生 13.5 日目において COUP-TFII は CGE のみならず腹側と背側の MGE にも発現が見られる。そこで我々は、局所遺伝導入法により腹側 MGE からの移動細胞を可視化したところ、腹側 MGE からも顕著に尾側へ細胞が流れ CMS を形成していることを見出した。この結果は COUP-TFII の発現により、CMS が CGE だけにとどまらず、“COUP-TFII が発現する領域”という広い範囲において発現分子特異的に制御されている可能性を示すものである (Kanatani et al., J Neurosci, 2008)。

(4) 偏光顕微鏡を用いた神経突起縮退時の細胞骨格ダイナミクスの解析

犬東 歩 (京都大学大学院理学研究科 生物物理学教室 構造生理学講座)

神経回路網の形成過程においては、樹状突起や軸索といった神経突起が外環境中のガイダンス因子に応答して正しい経路を選択する。こうした応答においては最終的

に細胞骨格が変化して細胞の形態が再編成されることが必要不可欠である。細胞骨格を構成する微小管やアクチンフィラメントといった構造物は、分子が規則的に配列

しており、細胞内において複屈折性の高い領域として知られている。よって、偏光を用いた観察によって、蛍光分子を導入することなく非侵襲的に細胞骨格のダイナミクスを観察することが可能である。我々は従来型の偏光顕微鏡が持つ方向依存性を解消した LC-PolScope を用いることによって、プロテインホスファターゼ阻害剤である Calyculin A (CL-A) が引き起こす神経突起縮退現象を解析した。縮退過程において細胞骨格の複屈折性が維持

されていたことから、CL-A による神経突起の縮退は従来提起されていたような微小管の脱重合によるものではないことが判明した。また、阻害剤等を用いた薬理実験により、CL-A による神経突起縮退の主な要因はミオシン軽鎖の Thr18, Ser19 におけるリン酸化を介したアクトミオシンの活性化であることが示され、そのリン酸化を担うキナーゼは軸索縮退においてしばしば報告される MLCK や Rho kinase とは異なることが示唆された。

(5) Cre-loxP システムによるゼブラフィッシュ脊髄神経回路網の解析

佐藤千恵 (岡崎統合バイオサイエンスセンター)

高等脊椎動物の神経回路網は複雑であり、解析に困難が伴うことが多い。一方で、ゼブラフィッシュは、脊椎動物の中では比較的その神経回路が単純で、また、胚、幼魚は体が透明で蛍光タンパクでの細胞の可視化に適しているため、近年、神経回路網の解析によく使用されている。我々は、神経発生の過程で、脊髄の背腹軸に沿ってドメイン状に発現する転写因子に関して、その陽性細胞で蛍光タンパク質を発現するトランスジェニックフィッシュを作成し、それらの性質を解析している。これらの転写因子の発生期の脊髄における発現パターンは、脊椎動物間でよく保存されているので、ゼブラフィッシュで得られた知見が、哺乳類などにも有用な情報を与えてくれると期待される。

研究を進めるにつれ、転写因子陽性細胞を単純に蛍光タンパク質でラベルする手法による解析のみでは困難が多いことも分かってきた。転写因子の発現は一過的であるため、成熟した神経細胞においては、蛍光タンパク質の発現が非常に弱くなってしまうこと、転写因子を発現する細胞から、複数のクラスの神経細胞が生じることが多いこと、である。これらの困難を克服するため、現在、Cre-loxP のシステムを取り入れることで、より少ないクラスの神経細胞を、その後期においても可視化することに取り組んでいる。本研究会では、我々の、Cre-loxP システムを用いたゼブラフィッシュ神経回路網の解析の成果を報告したい。

(6) LTP に伴うスパイン増大における CaMKII α のキナーゼ活性の解析

梅田達也^{1,2}, 山肩葉子^{3,4,5}, 真鍋俊也^{5,6}, 岡部繁男⁷

(¹東京医科歯科大学 細胞生物学, ²生理学研究所 認知行動発達機構,

³生理学研究所 神経シグナル研究, ⁴総合研究大学院大学, ⁵CREST,

⁶東京大学 神経ネットワーク, ⁷東京大学 神経細胞生物学)

神経回路網は外界からの刺激に応じて神経細胞間のシナプス結合を可塑的に変化させて機能していると考えられている。近年の光学技術の進歩により、シナプス結合の可塑的变化は、機能的な変化(伝達効率の長期増強: LTP)だけでなくシナプス後部スパインのサイズが増大するといった大きな形態学的変化が同時に起こる事が複

数の研究グループから報告されている。一方、CaMKII α の持続的なキナーゼ活性が LTP 発現に必須であるが、スパインサイズの増大時にスパインへの集積が報告され足場タンパク質としても働いている事が示唆されている。本研究では、キナーゼ活性を欠損した CaMKII α のノックインマウスを作製し、回避学習課題や海馬での LTP にキ

ナーゼ活性が必須である事を示した。更に、海馬スライス培養における単一シナプスの動態を観察する実験から、LTPを誘導する刺激で生じるスパインの持続的な構

造変化においてもキナーゼ活性が必要である事を示した。

(7) 聴覚同時検出におけるフィードフォワード抑制機構の働き

山田 玲 (京都大学 医学部 神経生物学)

動物は両耳間時差 (ITD) を手がかりに音源定位を行う。ITD 検出は脳幹の神経細胞が両側蝸牛神経核からの興奮性シナプス入力の時同時検出器として働くことで行われる。鳥類では層状核 (NL) 神経細胞が、哺乳類では内側上オリーブ核 (MSO) がその役割を担うが、それぞれ抑制性入力が必要な働きを持つ。哺乳類の MSO ではフィードフォワード抑制により、抑制が興奮に対して一定の時間差で入ることが必要とされる。他方、鳥類の NL は上オリーブ核 (SON) を起源とするフィードバック抑制を受ける。SON 細胞は音圧系からの入力を受け、音の強さに応じた抑制により ITD 検出の精度を制御する。他にも抑制性の介在細胞が NL 周囲に存在するが、その役割

は不明であった。今回我々は、スライス標本において蝸牛神経核を電気刺激すると、NL の低い周波数領域の細胞 (low-CF 細胞) において EPSC に同期した IPSC が観察されることを見出した。この IPSC は SON を除去しても観察されることから、介在細胞によると考えられる。実際に介在細胞は low-CF 細胞の周辺に集中して存在することも分かった。これらのことから NL の low-CF 細胞においては音の時間情報を保持したフィードフォワード抑制回路が存在すると考えられる。さらにシミュレーションを用いることで ITD 検出における役割について検討した。

(8) KCC2による海馬顆粒細胞の主要樹状突起形成の制御

市川淳也, 松木則夫, 小山隆太 (東京大学 大学院薬学系研究科 薬品作用学教室)

歯状回門で新生した顆粒細胞は、先導突起に依存した放射状様移動をおこない、して顆粒細胞層に到達する。その後、顆粒細胞は分子層に1~2本の主要樹状突起を形成する。本研究では、先導突起が樹状突起となる可能性及びこれに関与する細胞生物学的メカニズムの解明を目指した。特に、GABA 及び KCC2 (K^+-Cl^- co-transporter) に着目し、その関与を検証した。生後6日齢の GFP 強制発現ラットから作成した歯状回門切片を、野生型由来の海馬切片上に配置する共培養法により、幼若顆粒細胞の移動を経時的に観察した。これにより、先導突起が主要樹

状突起へ成熟することを明らかにした。次に、同系においてビククリン ($GABA_A$ 受容体の阻害薬) を処置したところ、主要樹状突起数は増加した。また、顆粒細胞の初代培養系において、GABA は主要樹状突起以外の短い樹状突起長を減少させた。さらに、GABA は顆粒細胞の細胞体および神経突起における KCC2 の発現を上昇させることを発見した。最後に、フロセミド (KCC2 阻害薬) の処置により、主要樹状突起数が増加することを確認した。以上の結果は、GABA が KCC2 の発現上昇を介して主要樹状突起形成に関与することを示唆する。

(9) アメボイドミクログリアにおける PLD4の解析

大谷嘉典¹, 山口宜秀¹, 木谷 裕², 池田一裕³, 佐藤友美⁴, 古市貞一⁴, 馬場広子¹

(¹ 東京薬大・機能形態, ² 家畜研究センター,

³ 生理研・分子神経生理, ⁴ 理研・脳センター・分子神経形成)

Phospholipase D4 (PLD4) は生後初期の小脳や脳梁における発達期のアメボイド（活性化状態）ミクログリアに発現する分子である。また、病態時における変化を Proteolipid protein (PLP)-transgenic ヘテロ接合体マウスを用いて解析したところ PLD4 は病巣部のアメボイドミクログリアにも発現していることが明らかになっている。

今回、PLD4 の機能を明らかにするために、ミクログリア系細胞 MG6 を用いて解析を行った。LPS (Lipopolysaccharide) で活性化した MG6 では PLD4 発現の明らかな上昇が Western blot により確認できた。MG6 における PLD1, 2, 4 の細胞内局在を免疫染色で検討した結果、PLD1 は細胞の核小体に、PLD2 は細胞質に、PLD4 は核小体を除く核質に多く存在することが明らかになった。また、LPS による刺激時にそれぞれの発現量が増加

し、BioParticle を用いた食食実験では、PLD1, 4 のみが食細胞に移行し、PLD2 の局在には変化がなかった。これらのことから MG6 の食食作用には PLD1, 4 が関連することが示唆された。次に PLD4 に相補的な siRNA (PLD4-siRNA) および Control の siRNA (con-siRNA) で PLD4 発現を抑制した際に食食作用に影響があるかどうかを検討した。その結果、PLD4-siRNA を加えた群では無刺激と LPS 刺激したものどちらの状態においても con-siRNA 群と比べて食食細胞の割合が低く、特に LPS 刺激群では無刺激の場合と同じレベルまで減少し、減少の度合いが大きかった。以上の結果から、MG6 細胞の食食に PLD4 が何らかの役割を果たしていることが示唆された。

(10) 神経幹細胞のアストロサイト分化を制御するエピジェネティクス機構

佐野坂司¹, 波平昌一¹, 神山 淳¹, 蟬 克典¹, 田賀哲也², 中島欽一¹

(¹ 奈良先端大・分子神経分化制御, ² 東京医科歯科大・幹細胞制御)

中枢神経系を構成するニューロン、アストロサイト及びオリゴデンドロサイトは、発生過程において共通の神経幹細胞から産生される。しかし、哺乳類の神経幹細胞は発生初期からそれら細胞種へと分化できる多分化能を有しているわけではない。胎生初期から中期にかけて神経幹細胞はニューロンのみを産生し、胎生後期から生後になって、始めてアストロサイトやオリゴデンドロサイトを産生する。近年の研究から、サイトカインなどを含む「細胞外シグナル」とエピジェネティックなゲノム修

飾を含む「細胞内在性プログラム」の双方が神経幹細胞の分化制御に重要であることが明らかになりつつあるが、神経幹細胞の細胞産生順序を規定するメカニズムについては不明な点が多い。今回我々は、神経幹細胞から早期に生まれたニューロンが、Notch シグナルを介して神経幹細胞に働きかけ、アストロサイト特異的遺伝子の脱メチル化を介して神経幹細胞のアストロサイト分化を誘導することを明らかにしたので紹介したい。

(11) 小脳皮質形成期の外顆粒細胞層で一時的に GABA が放出され 顆粒細胞前駆体 (GCP) の増殖を制御している

森島寿貴 (浜松医科大学 生理学第一講座)

小脳では、シナプス形成前から、外顆粒細胞層 (EGL) の GCP において、GABA_A 受容体が発現しているが、その役割は知られていない。我々は、リガンドである GABA の時空間的な放出をイメージングできる方法を開発し、小脳皮質内での細胞外 GABA の放出の分布を調べた。本方法は GABase による GABA の異化反応の際に起こる NADP が NADPH に変化する副反応を利用する。この NADPH の蛍光強度を測定することで GABA を定量的に可視化できる。小脳皮質での細胞外 GABA レベルをイメージングした結果、皮質形成初期の P3 では、GABA は EGL で強く観察された。さらにこの P3 での GCP に tonic

GABA current が patch-clamp 法で記録されることから、EGL の GABA_AR が細胞外 GABA により持続的に機能していると示唆される。次に、P3 の EGL の GCP は細胞増殖期である為、GCP の増殖における GABA_AR の役割について機能阻害実験により検討した。GABA_AR 阻害剤である BMI を含む EVA 樹脂をラット小脳に移植し、GCP の増殖度合いを細胞分裂マーカーの免疫染色により調べた結果、EGL で増殖している細胞数が大幅に減少した。しかし、TUNEL 陽性の細胞数は変化がなかった。このことから、GABA は発生初期の EGL で、GCP の増殖を制御している可能性が示唆された。

(12) Mechanism underlying gliotransmitter release from cultured astrocytes

Hae Ung Lee¹, Shigeyuki Namiki³, Kenji Tanaka^{1,2}, Kishio Furuya^{4,5,6}, Hongtao Liu⁷,
Masahiro Sokabe^{4,5,6}, Kenzo Hirose³, Yasunobu Okada^{1,7}, Kazuhiro Ikenaka^{1,2}

(¹Division of Neurobiology and Bioinformatics, National Institute for Physiological Sciences, Okazaki, Japan,

²The Graduate University of Advanced Studies,

³Department of Neurobiology, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, Tokyo, Japan,

⁴International Cooperative Research Project/Solution Oriented Research for Science and Technology,
Cell-Mechanosensing Project, Japan Science and Technology Agency, Nagoya, Japan,

⁵Department of Physiology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan,

⁶Department of Molecular Physiology, National Institute for Physiological Sciences, Okazaki, Japan,

⁷Department of Cell Physiology, National Institute for Physiological Sciences, Okazaki, Japan)

Recently, it has revealed that astrocytes sense and integrate synaptic activity and, depending on intracellular Ca²⁺ levels, release gliotransmitters that have feedback actions on neurons. Although these reports provided clues that astrocytes are the active components in the brain, they did not analyze the temporal and spatial pattern of gliotransmitters release from astrocytes. To examine the release of ATP and glutamate, we applied imaging techniques visualizing ATP and glutamate released from astrocytes. Luciferin-luciferase solution was applied to the extracellular fluid of astrocytes to visualize ATP release. To visualize glutamate release,

glutamate optic sensor was applied. This specific probe for detecting glutamate is a hybrid molecule consisting of glutamate-binding protein (extracellular domain of AMPA receptor) and a small-molecule fluorescent dye. We successfully observed ATP or glutamate release from astrocytes and applied these technologies to observe spatio-temporal pattern of gliotransmitters release. By ATP stimulation, intracellular calcium elevation was observed in all astrocytes. However, under the same condition, only few astrocytes (ca. 3~7%) released glutamate. A similar phenomenon was observed in glutamate-evoked ATP release

from astrocytes; even though all astrocytes showed increased intracellular calcium levels, small proportion of astrocytes released ATP by glutamate stimulation (ca. 1%). Our experiments revealed that intracellular calcium elevation was

not enough to evoke gliotransmitter release. For the first time, gliotransmitter release was successfully visualized and the mechanisms of gliotransmitter release were revealed through these imaging technologies.

(13) 統合失調症の動物モデルの作成とその行動薬理学的、組織学的解析

鳥塚通弘, 牧之段学, 山内崇平, 紀本創兵, 辰巳晃子, 奥田洋明, 和中明生, 岸本年史
(奈良県立医科大学 精神神経医学講座, 第二解剖学講座)

統合失調症の発症, 病態には遺伝子異常, 脳発達異常, ストレスなどの様々な要因が複雑に関与している。病因, 病態の解明に加えて, 治療薬の薬効評価に動物モデルは必須のツールであり, 様々なモデルがこれまで作成されている。我々はウイルスパンデミックが後の統合失調症発症につながるという疫学調査に基づいた母体感染モデルに着目し研究を進めている。ウイルス感染と同様の免疫反応の起こさせる Poly I:C を妊娠早期のマウスに投与し, その母体から生まれた仔マウスを解析するものである (以降 Poly I:C マウスと呼ぶ)。Poly I:C マウスは統合失調症様症状として最も認知されている Prepulse inhibition (PPI) の低下を示す。このマウスにおいて我々は

生後一過性に海馬のミエリン化が低下していることを認めた。逆に生後早期の正常マウスの両側腹側海馬にリゾレンチンを注入することで人為的にミエリン化を低下させると成熟期に至って PPI の低下を示すことから, 幼若期の海馬軸索のミエリン化はその後の精神神経発達に重要な役割を担っていると考えられる。Poly I:C マウスではまた脳内のグルタチオン濃度の低下が認められ, 酸化ストレスが高まっている。酸化ストレスを負荷する L-buthionine sulfoximine (BSO) を脳内に投与しさらに水浸拘束ストレスを加えるモデルについても現在検討中であり, これらいくつかのモデルについて紹介したい。

(14) Identification and functional analysis of a novel LewisX-synthesizing α 1,3- fucosyltransferase gene in neural precursor cells

Akhilesh Kumar

LewisX (LeX) or stage specific embryonic antigen-1 (SSEA-1), is an important carbohydrate moiety expressed in undifferentiated embryonic stem cells, 8-cell to blastocyst stages in mouse embryo, in primordial germ cells, neural precursor cells and embryonic carcinoma cells. LeX expression is developmentally regulated in brain and is thought to play a role in cell-cell recognition, neurite outgrowth and neuronal migration during embryonic brain development. To analyze the functional role of LeX determinant in neurogenesis it is necessary to characterize the α 1,3-fucosyltransferase enzyme(s) involved in its synthesis in neural precursor cells.

Immunohistochemistry and in situ hybridization have revealed the co-expression of a novel α 1,3-fucosyltransferase enzyme, fucosyltransferase 10 (FUT10) with LeX epitope in germinal zones around the lateral ventricle in mice embryonic brain. Further, the combinations of in vitro fucosyltransferase assay and high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis have confirmed the α 1,3-fucosyltransferase activity of FUT10 on some specific N-glycan bearing glycoprotein(s). In vitro fucosyltransferase assay revealed that FUT10 can synthesize LeX on bisecting sugar chain bearing glycoprotein(s) from Neuro2a cell lysates but not on pure lacto-N-neotetraose or PA-labeled bisecting sugar chains.

Thus, FUT10 essentially requires the presence of substrate N-glycan bearing protein(s) for synthesizing LeX.

In addition, in vivo loss-of-function studies using RNA interference (RNAi) targeting FUT10 were done. miRNA vectors or control vectors were coelectroporated with an green fluorescent protein (GFP) reporter in utero into the lateral ventricle at embryonic day 14.5 to transfect neural precursor cells of ventricular zone; the distribution of transfected cells were analyzed at embryonic day 17.5. This approach revealed the significance of FUT10 in embryonic brain development. A

control miRNA with no effect on FUT10 expression has no effect on the distribution of transfected cells. In contrast, miRNAs that can suppress FUT10 expression showed mislocalization of GFP labelled cells, with essentially most of the transfected cells remain localized in ventricular zone, subventricular zone and intermediate zone. This defect is rescued by in utero electroporation of FUT10 expression construct along with the effective miRNA, confirming that FUT10 is crucial for the normal embryonic brain development.

(15) 温度感知行動を司る神経回路システム ～分子生理学者が目指すシステムズバイオロジー～

久原 篤 (名古屋大学大学院理学研究科)

感覚受容から記憶そして行動までを処理する神経メカニズムを包括的に理解することは、現在の神経科学における重要な課題のひとつである。我々は、記憶に依存した行動の可塑性を解析できるシンプルなモデル実験系として、線虫 *C. elegans* の温度感知行動を指標に研究を行っている。本会では、「温度感知」と「温度情報処理」に関わる遺伝子と神経回路の生理学的活動に関する最新の知見を紹介する。前半では、これまでに嗅覚ニューロンとして知られていた AWC ニューロンが温度の感知と記憶を行ない、AWC において温度情報が哺乳類の視覚や嗅覚と同様に G タンパク質を介して伝達されることを

紹介する⁽²⁾。後半では、従来の分子遺伝学とカルシウムイメージングやハロロドプシンなどの最新の光学技術を駆使し^(2,3,4)、行動を司るシンプルな神経回路を1つのシステムとしてとらえた研究を紹介する。さらに、実験系で得られた行動解析の結果とコンピューターシミュレーションを組み合わせた、チャレンジングな研究の展望と進行状況を紹介する。

(1) Mori & Ohshima, Nature, 1995

(2) Kuhara et al., Science, 2008

(3) Kuhara et al., Neuron, 2002

(4) Kuhara & Mori, J. Neurosci, 2006

(16) 細胞間隙での伝達物質濃度推移が定める信号伝達特性

松井 広 (生理学研究所・脳形態解析研究部門)

多細胞生物の各細胞は、細胞膜で区切られている以上、細胞の内側同士に連絡がない場合が多い。これらの細胞間で、何らかの信号を伝えたい場合、伝達物質を中継として活用する手段がよく使われる。信号を送る側は、小胞に詰め込んだ伝達物質を開口放出させ、伝達物質を細胞間隙に遊離させる。信号を受け取る側の細胞膜に発現した伝達物質受容体が活性化されれば、信号が伝わる。脳内での信号伝達は、この方式を多用しており、その典

型例は化学シナプスである。シナプス前細胞から、どのような伝達物質が放出されるのか、また、シナプス後細胞に発現している受容体は、どのような伝達物質濃度に対して活性化されるのか、といったシナプス前後細胞の特性に関する研究は進んでいる。一方、伝達物質の細胞間隙での拡散係数が求まっていないため、伝達物質濃度推移の時空間特性は明らかになっていない。また、そもそもシナプス小胞に、何分子の伝達物質が詰まっている

のかも明らかになっていないので、細胞間隙での伝達物質濃度の最大値すら分かっていない。もう一つの問題は、放出部位と受容体との位置関係であり、両者がどの程度一致していなければ信号が伝わらないのかも不明である。

る。本発表では、電気生理学・形態学・シミュレーションを駆使して、グルタミン酸の細胞間隙における動態を推測し、神経細胞間および神経細胞からグリア細胞への信号伝達特性を決定する要因を探った例を紹介する。

(17) 海馬白板のオリゴデンドロサイトの同定および活動電位の軸索伝導に対する修飾効果

山崎良彦（山形大学医学部生理学講座）

オリゴデンドロサイトは、中枢神経系において髄鞘を形成している細胞であり、跳躍伝導による速く確実な活動電位の伝播を可能にしている。変性疾患や虚血性疾患などの病態におけるオリゴデンドロサイトの変化・役割については、以前からそして現在も強く注目されている。最近では、さらに、正常な脳機能の発現や情報処理に対しても積極的に関与していると考えられるようになってきた。我々は、オリゴデンドロサイトの髄鞘形成による活動電位の軸索伝導速度促進以外の機能について知りたいと考え、まず海馬の白質である白板に存在するオリゴデンドロサイトに着目し、ホールセル記録を行った。形態学的特徴から、記録された細胞の多くが成熟したオリ

ゴデンドロサイトであると考えられた。グルタミン酸あるいは GABA の微量局所投与により、また、電気刺激によっても、脱分極性の反応が観察された。オリゴデンドロサイトが様々な刺激で脱分極することがわかったので、CA1 領域の錐体細胞とオリゴデンドロサイトから同時ホールセル記録を行い、活動電位の軸索伝導に対する、オリゴデンドロサイトの脱分極刺激の効果を検討した。その結果、反復する脱分極刺激によって、逆行性に伝導してくる活動電位の潜時が短くなった。以上のことから、オリゴデンドロサイトは髄鞘形成によって跳躍伝導を可能にするだけでなく、髄鞘形成後でも活動電位の伝導速度を修飾する可能性が示唆された。

(18) 多光子励起顕微鏡を駆使した骨組織内の in vivo ライブイメージング ～骨吸収の新しい調節機序の発見

石井 優（大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・生体イメージング）

破骨細胞は単球・マクロファージ系血液細胞から分化する多核巨細胞であり、硬質の骨組織を融解・吸収する特殊な能力を有する。関節リウマチや骨粗鬆症などの骨吸収性疾患では、破骨細胞の機能亢進が病状形成に重要な役割を果たしている。これまでに、破骨細胞分化に関与する数多くの分子機構が明らかにされているが、これらの細胞がいかにして骨表面にリクルートされるのか、また具体的に in vivo でどのように機能しているのかなど、不明な点が多く残されている。演者はこれらの疑問

を解決すべく、多光子励起顕微鏡を駆使して生きたマウスの骨組織内・骨髓内の in vivo イメージングを行い、破骨細胞の遊走・接着が血中に豊富に存在する脂質メディエーターや、骨髓内に存在するケモカインなどによって統合的に制御されていることを解明した。本セミナーではこれらの最新の研究成果に加え、演者が立ち上げた骨組織内の in vivo ライブイメージングの方法論やその今後の応用について、多くの動画を交えて概説する。

5. 神経系の発生・分化・再生に関する研究の新展開

2010年3月19日－3月20日

代表・世話人：仲嶋一範（慶應義塾大学医学部解剖学教室）

所内対応者：池中一裕（生理学研究所分子神経生理研究部門）

- (1) Notchによる神経上皮細胞の極性と脳室側に限局した細胞分裂の協調的制御
大畑慎也，青木 亮，木下繁晴，鶴岡佐知子，山口雅裕，
田中英臣，和田浩則，政井一郎，岡本 仁
(理化学研究所脳科学総合研究所発生遺伝子制御研究チーム)
- (2) 成体神経幹細胞における purinergic signaling の役割
陶山智史，砂堀毅彦，岡野栄之（慶應義塾大・生理学教室）
- (3) 細胞周期調節因子 Cyclin D2 mRNA の時空間的転写後調節は神経上皮細胞の分裂後運命を
非対称に決定し，哺乳類の皮質形成に重要であるかもしれない
恒川雄二（東北大学大学院医学系研究科形態形成解析分野）
- (4) Foxg1による大脳皮質ニューロンの経時的分化能の調節機構
隈元拓馬，グナディ，水谷健一，花嶋かりな（理研 発生・再生研 大脳皮質発生研究チーム）
- (5) Rett 症候群原因遺伝子産物 MeCP2 の機能解析
辻村啓太，鈴木暁也，中島欽一（奈良先端大・バイオ・分子神経分化制御）
- (6) 転写抑制因子 RP58 の astrocyte genesis への関与
平井志伸，丸山千秋，三輪昭子，高橋亜紀代，岡戸晴生（東京都神経研・分子神経生理）
- (7) MicroRNA-124a をコードする網膜の蛋白質非コード RNA *Rncr3* の機能解析
佐貫理佳子，古川貴久（大阪バイオ研・発生生物学）
- (8) 神経核形成過程における細胞移動様式の解明－橋核をモデルとした解析－
篠原正樹，Yan Zhu，村上富士夫（大阪大学大学院・生命機能研究科）
- (9) 大脳皮質錐体細胞における軸索ガイダンス分子 Roundabout1 (Robo1) の役割
権田裕子¹，関口正幸²，田畑秀典³，和田圭司²，仲嶋一範³，内野茂夫¹，高坂新一¹
(¹国立精神・神経センター・神経研究所・代謝，
²国立精神・神経センター・神経研究所・疾病4部，³慶応大・医・解剖)
- (10) COUP-TFII 発現領域に由来する大脳皮質抑制性神経細胞の解析
金谷繁明，田中大介，本田岳夫，田畑秀典，仲嶋一範（慶應・医・解剖）
- (11) 神経系前駆細胞におけるグローバルなクロマチン状態の変化
藤井佑紀，岸 雄介，平林祐介，後藤由季子（東大分生研・情報伝達）
- (12) Early-Arriving Olfactory Axons Deliver Sema3F to the Olfactory Bulb to Repel Late-Arriving Nrp2⁺ Axons
井ノ口霞，竹内春樹，坂野 仁（東京大学・理学系研究科・生物化学専攻）
- (13) NT-3 の軸索誘導活性と作用機構の解明
中牟田信一，船橋靖広，難波隆志，上口裕之，貝淵弘三（名大・医・薬理学）
- (14) 小脳プルキンエ細胞の軸索維持における HuC の機能
角元恭子，岡野ジェイムス洋尚，Robert Darnell，岡野栄之（慶應義塾大学・生理学）
- (15) 感覚神経細胞が，軸索伸展の初期過程で神経成長因子に依存しないのはなぜか？
青木 誠，瀬川 浩，内藤真由美，岡本 仁（理化学研究所 BSI 発生遺伝子制御研究チーム）

(16) Epigenetic control of cell-type specific response to the steroid hormone Ecdysone
in *Drosophila* sensory neurons

金森崇浩, 榎本和生 (遺伝研・神経形態)

(17) 発生過程における神経冠細胞と血管の相互作用

高瀬悠太, 高橋淑子 (奈良先端大学院大学・分子発生生物学講座)

(18) プラナリアの行動解析システムを利用した脳再生と脳機能の解析

山下大河, 井上 武, 西村周泰, Clement Lamy, 阿形清和 (京大・理・分子発生学講座)

(19) 色素細胞の挙動とメラニン輸送の可視化: 表皮培養法を用いたライブイメージング観察

酒井謙一郎, 田所竜介, 村井英隆, 高橋淑子 (奈良先端大・バイオ)

(20) *Sbno1* はマウス神経分化に必須な因子である

高野 愛, 蔵地理代, 出来本秀行, #日比正彦, 寺島俊雄, 勝山 裕 (神戸大学・医, #理研 CDB)

(21) 発生期大脳皮質におけるロコモーション様式の神経細胞移動に関わる制御因子の解析

西村嘉晃^{1,2}, 関根克敏¹, 地濱香央里², 鍋島陽一², 仲嶋一範¹, 星野幹雄^{2,3}, 川内健史^{1,2,4}

(¹慶應大・医・解剖, ²京大・医・腫瘍生物,

³国立精神・神経センター・神経研・診断, ⁴JST・さきがけ)

【参加者名】

相沢慎一 (理化学研究所), 青木 誠 (理化学研究所), 味岡逸樹 (東京医科歯科大学), 猪口徳一 (福井大学), 池田一裕 (生理学研究所), 石井一裕 (東京慈恵会医科大学), 石鍋健太郎 (東京大学), 石野雄吾 (生理学研究所), 伊藤 啓 (東京大学), 伊藤素行 (名古屋大学), 稲村直子 (生理学研究所), 稲生大輔 (東京大学), 井上詞貴 (理化学研究所), 井上 武 (京都大学), 井ノ口霞 (東京大学), 臼井紀好 (生理学研究所), 榎本和生 (国立遺伝学研究所), Bruno Herculano (東京大学), 大島登志男 (早稲田大学), 太田晴子 (名古屋市立大学), 大畑慎也 (理化学研究所), 大輪智雄 (国立精神・神経センター), 岡戸晴生 (東京都神経科学総合研究所), 岡本 仁 (理化学研究所), 岡本麻友美 (名古屋大学), 沖川沙佑美 (名古屋大学), 奥田耕助 (東京大学), 小野勝彦 (京都府立医科大学), 織原-小野美奈子 (慶應義塾大学), 鹿川哲史 (東京医科歯科大学), 角元恭子 (慶應義塾大学), 勝山裕 (神戸大学), 加藤智将 (東京大学), 金谷繁明 (慶應義塾大学), 金森崇浩 (国立遺伝学研究所), 金子 順 (東京大学), 金丸和典 (東京大学), 川内健史 (慶應義塾大学), 河崎洋志 (東京大学), 岸 雄介 (東京大学), 木村康太 (東京大学), 隈元拓馬 (理化学研究所), 黒田一樹 (福井大学), 黒田啓介 (名古屋大学), 桑子賢一郎 (慶應義塾大学), 小曾戸陽一 (理化学研究所), 児玉 健 (名古屋大学), 後藤仁志 (生理学研究所), 権田裕子 (国立精神神経センター), 酒井謙一郎 (奈良先端科学技術大学

院大学), 榎原 明 (名古屋大学), 佐々木哲也 (基礎生物学研究所), 佐藤俊之 (名古屋大学), 佐藤晴香 (大阪大学), 佐藤 真 (福井大学), 佐貫理佳子 (大阪バイオサイエンス研究所), Salma Jasmine (生理学研究所), 澤田雅人 (名古屋市立大学), 澤本和延 (名古屋市立大学), 重本隆一 (生理学研究所), 篠塚直美 (東京大学), 篠原広志 (東北大学), 篠原正樹 (大阪大学), 島谷真由 (東京大学), 嶋村健児 (熊本大学), 清水崇弘 (生理学研究所), 下條博美 (京都大学), 謝敏かく (福井大学), 杉尾翔太 (生理学研究所), 須藤文和 (東北大学), 陶山智史 (慶應義塾大学), 石 龍徳 (東北大学), 瀬戸裕介 (国立精神神経センター), 高瀬悠太 (奈良先端科学技術大学院大学), 高野 愛 (神戸大学), 高橋輝明 (奈良先端科学技術大学院大学), 高橋淑子 (奈良先端科学技術大学院大学), 田口紋子 (岐阜大学), 武田芳樹 (名古屋市立大学), 竹林浩秀 (熊本大学), 田中謙二 (生理学研究所), 田中輝幸 (東京大学), 田辺康人 (大阪大学), 谷本昌志 (名古屋大学), 田畑秀典 (慶應義塾大学), 田谷真一郎 (国立精神・神経センター), 陳 丁熙 (早稲田大学), 陳 揚 (東京大学), 辻村啓太 (奈良先端科学技術大学院大学), 恒川雄二 (東北大学), 壺井將史 (東京大学), 東島眞一 (生理学研究所), 戸田智久 (東京大学), 鳥居健一 (慶應義塾大学), 中島欽一 (奈良先端科学技術大学院大学), 仲嶋一範 (慶應義塾大学), 永田浩一 (愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所), 中牟田信一 (名古屋

屋大学), 難波隆志 (名古屋大学), 西村嘉晃 (慶應義塾大学), 西村周泰 (京都大学), 野中友紀 (基礎生物学研究所), 服部光治 (名古屋市立大学), 花嶋かりな (理化学研究所), 早川靖彦 (ネッパジーン株式会社), 早川 清 (ネッパジーン株式会社), 早瀬ヨネ子 (国立精神神経センター), 久恒辰博 (東京大学), 備前典久 (東京医科歯科大学), 飛田秀樹 (名古屋市立大学), 等 誠司 (生理学研究所), 日比正彦 (名古屋大学), 平井志伸 (東京都神経科学総合研究所), 藤井佑紀 (東京大学), 藤田政隆 (名古屋市立大学), 藤山知之 (国立精神・神経センター), 船橋靖広 (名古屋大学), 古川貴久 (大阪バイオサイエンス研究所), 星野幹雄 (国立精神・神経センター), 堀 啓 (国立精神神経センター), 本田岳夫 (慶應義塾大学),

【概要】

本研究会は, 全国から約 150 名の参加者を得て開催され。神経系の発生・分化・再生に関するさまざまな最新のデータが提示された。そして, 最先端のベテラン研究者や, 若手研究者同士の素朴で活発な議論を通して, 解決の糸口をつかんだり, 将来の新しい展開につながることを目指した。

若手のトレーニングのため, 口頭発表者は博士号取得後 4 年以内を条件とし, 各研究室から 1~2 演題のみに制限して合計 21 演題を採択した。口頭発表の枠として, 1 演題あたり発表 10 分, 質疑 10 分, 計 20 分と十分な討論時間を設けた。質疑 10 分のうち前半 5 分については, 博士号未取得または取得後 4 年以下の質問者を優先とし, 特に若手からの積極的な質問を促した。そのため, 名札についても「博士号未取得または取得後 4 年以下」と「4 年超」とで色分けし, 一目で区別がつくように工夫した。この試みは事後の参加者アンケートでも好評であり, 成功したと考えられる。また, 「時間節約のため, 質問者

増田 匡 (名古屋市立大学), 増田 浩 (名古屋市立大学), 増山典久 (国立精神・神経センター), 松崎文雄 (理化学研究所), 丸山千秋 (東京都神経科学総合研究所), 溝口貴正 (名古屋大学高等研究院), 三田さくら (遺伝学研究所), 宮田卓樹 (名古屋大学), 三輪貴之 (名古屋大学), 村上富士夫 (大阪大学), 森川 麗 (国立遺伝学研究所), 森永智也 (名古屋市立大学), 八木秀司 (福井大学), 山下直也 (横浜市立大学), 山下大河 (京都大学), 山田真弓 (国立精神・神経センター), 山本亘彦 (大阪大学), 吉永怜史 (慶應義塾大学), 吉村 武 (生理学研究所), 李 海雄 (名古屋市立大学), 渡辺陽子 (名古屋市立大学), 渡辺啓介 (熊本大学), 渡邊貴樹 (名古屋大学)

は座長から指名される前にあらかじめマイクの前に立っておく, 「質問者は一回一問で, さらに追加の質問がある場合には質問者列の最後尾について再度質問する」等のルールを設け, 質疑時間を有効に活用できる工夫を行った。以上の結果, 発表終了直後からマイクの前に多くの質問者が並び, 発表内容に関する極めて濃密かつ有意義な討論が行われた。

また, 口演とは別にポスター発表の場も設け, 計 41 演題の発表が行われた。ポスターについては, 一日目には奇数番号と偶数番号それぞれの討論時間を各 55 分設け, 二日目には前半番号と後半番号のそれぞれの討論時間を各 50 分設けて, 十分に発表・議論できる時間を確保した。その結果, それぞれのポスターの前には多くの参加者が集まり, 活発な質疑応答が行われた。

以上の発表及び討論を通じて, 若手研究者のモチベーションを高め, 本分野の発展に貢献することができた。

(1) Notch による神経上皮細胞の極性と脳室側に限局した細胞分裂の協調的制御

大畑慎也, 青木 亮, 木下繁晴, 鶴岡佐知子, 山口雅裕,
田中英臣, 和田浩則, 政井一郎, 岡本 仁
(理化学研究所脳科学総合研究所発生遺伝子制御研究チーム)

神経上皮細胞は高度に発達した細胞極性を持つ初期神経発生神経幹細胞であり, 細胞周期に応じてその核を

移動させ, 脳室側でのみ細胞分裂を行う。ゼブラフィッシュ *epb4115^{rw306}* 変異体では, 細胞極性の維持に必須な

Crb・Epb4115 複合体が形成できないために、神経上皮細胞の細胞極性が破綻していた。I 型膜タンパク質 Crb は Notch と細胞外で結合し、Notch 活性を阻害したが、この抑制は Epb4115 によって回復した。*epb4115^{rw306}* 変異体では、Notch 活性が低下しており、脳膜側で分裂する中間前駆細胞様の細胞数が増加していた。驚いたことに、

Notch を活性化させると、中間前駆細胞様細胞数が減少するだけでなく、細胞極性までもが回復した。さらには、R-Ras が Notch の下流で細胞極性の維持に機能していた。以上から、Crb・Epb4115-Notch シグナルは神経上皮細胞の細胞分裂を脳室側に限局するだけでなく、細胞極性の維持も同時に行っていることが明らかになった。

(2) 成体神経幹細胞における purinergic signaling の役割

陶山智史，砂堀毅彦，岡野栄之（慶應義塾大・生理学教室）

成体哺乳類の側脳室側壁 (SVZ) 及び海馬歯状回 (SGZ) には神経幹細胞が存在し、恒常的な神経新生が起こっている。これらの領域には特異的な微小環境 (niche) が存在し、様々な細胞間コミュニケーションにより神経幹細胞の増殖や運命決定が制御されている。purinergic シグナルは、中枢神経系で細胞間コミュニケーションを担う重要なシグナルであることが知られているが、*in vivo* neurogenic niche における役割は分かっていなかった。

我々は、成体マウス SVZ の神経前駆細胞に purinergic レセプターである P2Y₁ が発現していることを示し、浸透圧ポンプを用いて、ATP および ATP アンタゴニストを脳室へ投与することで、神経前駆細胞の増殖が ATP によって制御されることを示した。

これらの結果より、SVZ neurogenic niche において ATP は神経前駆細胞の増殖を制御していることが明らかとなった。

(3) 細胞周期調節因子 Cyclin D2 mRNA の時空間的転写後調節は神経上皮細胞の分裂後運命を非対称に決定し、哺乳類の皮質形成に重要であるかもしれない

恒川雄二（東北大学大学院医学系研究科形態形成解析分野）

神経上皮細胞は哺乳類神経系源基を構成する細長い極性をもった細胞である。神経上皮細胞は発生初期、対称分裂という 2 つの神経上皮細胞を生み出す分裂を行いその数を増やしていき、発生中期に入ると今度は非対称分裂と呼ばれる 1 つのニューロンと 1 つの神経上皮細胞を生み出す分裂を行いニューロンの数を増やしていく。このよう非対称分裂は脳構築において重要な働きをしていると考えられている。しかしながら、哺乳類神経上皮細胞の非対称分裂においてどのような因子が分裂後の娘

細胞に非対称性を生み出しているのかは未だに分かっていないことが多い。今回我々は、神経上皮細胞において、細胞周期調節因子 Cyclin D2 がいままで哺乳類神経上皮細胞では報告の無かった、mRNA の細胞内局在および局所的な翻訳のメカニズムを用いて分裂後の娘細胞に非対称に分配され、分配された娘細胞は増殖の運命つまり神経上皮細胞としての運命をコミットしている可能性が高いことを発見したので、これを報告する。

(4) Foxg1による大脳皮質ニューロンの経時的分化能の調節機構

隈元拓馬, グナディ, 水谷健一, 花嶋かりな (理研 発生・再生研 大脳皮質発生研究チーム)

大脳皮質を構成するニューロンの多様性は、神経前駆細胞の経時的な分化能の変化によって産み出される。この結果、大脳皮質の脳室帯から異なる種類のニューロンが順次産生される。しかしながら神経前駆細胞の経時的分化能を調節する機構については、未だ不明な点が多い。我々はこれまでに終脳に発現するフォークヘッド型転写因子 Foxg1 が、発生初期に産生されるカハル・レチウス細胞の分化を抑制することを明らかにした。今回、

Foxg1 の発現を時期特異的に制御することによって、大脳皮質細胞の経時的な分化能を解析した結果、グルタミン酸作動性ニューロンの順次産生のタイミングが Foxg1 の発現のオフ、オンの切り換えに伴って移行することを見出した。これらの結果より、Foxg1 が初期細胞から深層投射ニューロンへの分化のスイッチを制御することが明らかになった。現在、この過程において Foxg1 の下流で作動する遺伝子プログラムの同定を進めている。

(5) Rett 症候群原因遺伝子産物 MeCP2の機能解析

辻村啓太, 鈴木暁也, 中島欽一 (奈良先端大・バイオ・分子神経分化制御)

Rett 症候群は進行性の神経発達疾患であり、X 染色体上の *methyl-CpG-binding protein 2* (MeCP2) 遺伝子の変異により発症することが知られている。Rett 症候群は自閉症やてんかん、精神遅滞などの臨床症状を示し、主に女児にのみ発症する。MeCP2 はメチル化 DNA 結合タンパク質ファミリーのメンバーであり、転写抑制因子として機能する。最近、MeCP2 は RNA スプライシング、クロマチンループ構造を制御することや、CREB1 と結合することにより転写活性化因子としても作用することが報告

された。また、これまで MeCP2 はニューロンにおいてのみ発現および機能していると考えられていたが、グリア細胞においても MeCP2 は発現しており、細胞非自律的機構により神経機能に影響を与えることが示された。本研究では、中枢神経系の主要な細胞種における MeCP2 の機能を明らかにするため、それぞれの細胞種において MeCP2 結合タンパク質を網羅的に同定した。本会ではこれらの結果について考察したい。

(6) 転写抑制因子 RP58の astrocyte genesis への関与

平井志伸, 丸山千秋, 三輪昭子, 高橋亜紀代, 岡戸晴生 (東京都神経研・分子神経生理)

RP58 は胚発生期の脳において、大脳皮質と海馬に強く発現する転写抑制因子である。その機能を解明するため、RP58-KO マウスの解析を行ってきた。RP58-KO マウスでは興奮性ニューロンの成熟障害、海馬の低形成、脳室帯の拡大等が見られることがすでに分かっていた。今回新たに、拡大した脳室帯で *id3*, *hes5* の発現が上昇していること、更に、RP58 が直接、*id3* や *hes5* の転写を負に制御していることを明らかにした。*id3*, *hes5* は前駆細胞の

維持に必要な因子である。また、RP58-KO マウスでは、アストロサイトのマーカーであるアクアポリン-4 の早期過剰発現が見られた。よって、RP58 が *id3*, *hes5* の発現を抑制することで、神経への正常な脱分化を誘導している可能性、及び、RP58 の欠失は前駆細胞からの細胞周期離脱が適切に行えず、過剰量の前駆細胞がアストロサイトに分化してしまう可能性を示唆した。

(7) MicroRNA-124a をコードする網膜の蛋白質非コード RNA *Rncr3* の機能解析

佐貫理佳子, 古川貴久 (大阪バイオ研・発生生物学)

網膜は眼球の後方にある中枢神経系組織であり, 光信号を電気信号に変換するのみならず, 色・形・動きなどを抽出する処理も行い, 脳へと視覚情報を送り出している。生体レベルの解析も容易であることから, 中枢神経系の発生・回路形成を理解する良いモデルとして知られている。我々は網膜に高発現する遺伝子のスクリーニングから *retinal non-coding RNA3 (Rncr3)* として登録されている遺伝子を同定した。我々は *Rncr3* に *miR-124a* がコードされていることを見出し, ノックアウトマウスを作製

した。マウス脳に発現する *miRNA* の中で, *miR-124a* は最も多く発現していることが知られている。また *miR-124a* は線虫からヒトまでよく保存されている *miRNA* である。しかしながら *miR-124a* と中枢神経系の発生との関係については, 様々の相反する研究結果が報告されており, 未だ不明な点が多い。網膜における *Rncr3* ノックアウトマウスの解析より, *miR-124a* は神経細胞への分化よりもむしろ, その成熟や維持に重要な機能を持つ可能性が示唆された。

(8) 神経核形成過程における細胞移動様式の解明—橋核をモデルとした解析—

篠原正樹, Yan Zhu, 村上富士夫 (大阪大学大学院・生命機能研究科)

脊椎動物の中枢神経系における基本構造の一つとして神経核がある。神経核は神経細胞の凝集体であり, 中枢神経系に非常に多く存在し, 神経回路の分岐点や中継点として重要な役割を担っている。今回我々は, 小脳前核群の一つである橋核をモデルとし, 神経核形成時の細胞の移動パターンを明らかにする事を目的とした。我々は下菱形に電気穿孔法を用いて *egfp* 遺伝子を導入し, 標識細胞が予定神経核領域に到達する時期にタイムラプス解析を行い, 予定神経核領域に到達した標識神経細胞の

移動の観察を行った。その結果, 神経核系形成後期に橋核に進入する細胞は既に到達している細胞群の腹側に付け加わることで, 核形成初期には多くの細胞が法線方向へ移動するのに対して, 後期では進入方向の逆 (外側) へ向かう細胞が多くなることが示された。これより, 核形成には後から到達する細胞が神経核の外側部に付加され, 移動方向を転換させる事が重要である可能性が示唆された。

(9) 大脳皮質錐体細胞における軸索ガイダンス分子 Roundabout1 (Robo1) の役割

権田裕子¹, 関口正幸², 田畑秀典³, 和田圭司², 仲嶋一範³, 内野茂夫¹, 高坂新一¹

(¹ 国立精神・神経センター・神経研究所・代謝,

² 国立精神・神経センター・神経研究所・疾病4部, ³ 慶応大・医・解剖)

Robo は, 反発性の軸索ガイダンス分子であり, 近年, ヒトにおいて発達障害との関連性が報告されている。本研究では, 生後発達過程の大脳皮質錐体細胞における *Robo1* 分子の機能について検討した。大脳新皮質における *Robo1* の発現は発生の早い時期から認められ, 層構造形成が進むにつれて特定の層に限局していた。*RNAi* を用

いて第 II/III 層の神経細胞での *Robo1* の発現を抑制し経時的に細胞の形態を解析した結果, *RNAi* を導入した神経細胞は生後第 II/III 層の上層に位置し, apical 側に複数の neurite を持ち, basal 側には太く長い neurite を持つ形態が認められた。さらに電気生理学実験を用いて神経活動について解析した結果, mEPSC の頻度が有意に高いこ

とが判明した。以上のことより, Robo1 は生後発達過程
の脳皮質錐体細胞の形態決定に関与する重要な分子で

あることが示された。

(10) COUP-TFII 発現領域に由来する脳皮質抑制性神経細胞の解析

金谷繁明, 田中大介, 本田岳夫, 田畑秀典, 仲嶋一範 (慶應・医・解剖)

脳皮質の発生では, 抑制性神経細胞は主に内側基底
核原基 (MGE) と尾側基底核原基 (CGE) から由来すると
考えられている。近年我々は CGE に優位に発現する因子
として COUP-TFII を見出し, CGE 由来細胞の挙動を制
御することを示した。COUP-TFII は CGE に優位に発現
するが, 腹側 MGE など, CGE 以外の領域の一部にも発

現が認められ, また COUP-TFII は MGE 細胞を尾側へ誘
導する能力があることから, それら領域においても尾側
移動を誘導していることが考えられる。本研究では CGE
外における COUP-TFII 発現領域に由来する細胞群の尾
側移動とその移動経路, および COUP-TFII と移動メカニ
ズムの関わりについて発表する予定である。

(11) 神経系前駆細胞のにおけるグローバルなクロマチン状態の変化

藤井佑紀, 岸 雄介, 平林祐介, 後藤由季子 (東大分生研・情報伝達)

幹細胞は自己複製能と多分化能を併せ持つ未分化細胞
である。組織幹細胞のうちの一つである神経系前駆細胞
は, 自己複製能と, 神経系のさまざまな細胞 (ニューロ
ン, アストロサイト, オリゴデンドロサイト) を生み出
す多分化能を持つ。しかし, その能力は発生時期が進む
につれて失われていく。この時, 細胞内では性質の変化
に伴って遺伝子発現が大きく変化する。遺伝子が発現す

るときには, 特定の遺伝子座においてクロマチン構造が
ゆるむことが知られているが, 本研究では神経系前駆細
胞のクロマチン状態が発生時期の進行につれて核全体で
凝集した状態に変化する事を明らかにした。さらに, こ
のクロマチンの凝集状態が神経系前駆細胞の持つ自己複
製能や多分化能に相関があることが示唆された。

(12) Early-Arriving Olfactory Axons Deliver Sema3F to the Olfactory Bulb to Repel Late-Arriving Nrp2⁺ Axons

井ノ口霞, 竹内春樹, 坂野 仁 (東京大学・理学系研究科・生物化学専攻)

マウス嗅覚系の神経地図形成において, 嗅球の背腹軸
方向に沿った嗅神経細胞 (嗅細胞) の軸索投射位置は,
嗅上皮における細胞体の位置情報によって決定される。
我々は最近, 軸索ガイダンス受容体 Neuropilin-2 とその
反発性リガンドである Semaphorin-3F が嗅上皮において
相補のかつ濃度勾配をなして発現し, 背腹軸に沿った神
経地図のトポグラフィ形成に重要な役割を果たしてい
ることを見出した。分泌性タンパク質である Sema3F は

背側ゾーンに位置する嗅細胞で産生され, 軸索を通して
嗅球へと輸送された後, その背側領域に沈着する。発生
段階において嗅細胞は, 嗅上皮の背側にあるものが先ず
成熟し, 次第に腹側へ向かって成熟範囲を広げていく。
これに呼応して, 嗅球も背側部分から形成が始まり, 嗅
細胞の軸索投射は背側から順次腹側へと進行する。本研
究では先行する軸索が持ち込んだ反発性の cue を, 後に
投射してくる軸索がその受容体の発現レベルを増しなが

ら順次ターゲットに到達するという、神経地図形成の新しいメカニズムが明らかになった 1)。

*Takeuchi H., *Inokuchi K. *et al. Cell*, in revision
(*equally contributed)

(13) NT-3の軸索誘導活性と作用機構の解明

中牟田信一, 船橋靖広, 難波隆志, 上口裕之, 貝淵弘三 (名大・医・薬理学)

海馬の興奮神経細胞では分化の過程において、共通の未成熟な突起から軸索と樹状突起が形成されるが、両者の運命決定機構は未だ解明されていない。神経栄養因子 (NT-3) は、神経細胞の軸索伸長や、樹状突起のスパイン形成に関与している。本研究では、NT-3 の軸索誘導活性とその作用機構を明らかにすることを目的とした。人為的に軸索を誘導する方法として、未成熟な複数の突起のうち 1 つの突起にのみ、局所的に刺激を与える系を確立した。NT-3 の局所刺激は、突起伸長を促し軸索形成を

誘導した。NT-3 のシグナル伝達経路について解析したところ、PLC-IP₃-IP₃ 受容体を介する経路が極性獲得前の突起伸長に関与していることを見出した。さらに、NT-3 刺激は突起先端の成長円錐でカルシウム上昇を誘導した。このカルシウム上昇は、下流分子である CaMKK-CaMKI を活性化した。以上の結果から、NT-3 により 1 本の軸索が誘導される際に、PLC-カルシウム-CaMKI を介したシグナル伝達経路が関与していることが明らかになった。

(14) 小脳プルキンエ細胞の軸索維持における HuC の機能

角元恭子, 岡野ジェイムス洋尚, Robert Darnell, 岡野栄之 (慶應義塾大学・生理学)

Hu 蛋白質 (HuB, HuC, HuD) は、神経細胞特異的に発現する RNA 結合蛋白質で、その発現は Hu 蛋白質の発現は胎仔期から成体期において維持される。脊椎動物の発生期において、Hu が神経細胞への分化過程で重要な機能を担うことが知られているが、成熟神経細胞における Hu 蛋白質の生理機能は明らかにされていない。そこで、Hu ノックアウトマウスの作成および解析を行った結果、こ

れまで報告されている小脳失調モデルマウスと異なり小脳発生を経た後、後天的にプルキンエ細胞の脱落を伴わない軸索変性および運動失調を生じることを見いだした。また成体マウスのプルキンエ細胞では、Hu 蛋白質のうち HuC のみが特異的に発現している。これらの結果から、HuC は発生期に形成された軸索および神経回路を維持する機能を担う可能性が示唆された。

(15) 感覚神経細胞が、軸索伸展の初期過程で神経成長因子に依存しないのはなぜか？

青木 誠, 瀬川 浩, 内藤真由美, 岡本 仁 (理化学研究所 BSI 発生遺伝子制御研究チーム)

Trk シグナルは神経細胞の生存、軸索伸展に関与する。しかし、栄養因子分泌組織から遠い神経細胞がどのようにして軸索伸展及び生存を確保するかは未だ不明な点が多い。新規遺伝子 *sidetrk1* はゼブラフィッシュ Rohon-Beard (RB) 感覚神経細胞において発現し、末梢軸索の伸展を制御している。*Sidetrk1* は Trk と結合し、Trk の細胞

表面への輸送を阻害した。さらに *Sidetrk1* は NGF による Trk シグナルには影響を与えず、PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Peptide) による Trk のリガンド非依存的なシグナルを活性化した。また RB 神経細胞では *pacap1b* 及び受容体 *pac1* が発現しており、*pacap1b* のノックダウンにより RB neuron の末梢軸索進展が阻害

された。この表現型は, Sidetrk1 の過剰発現では回復しなかった。このことから Sidetrk1 は, NGF が得られない

軸索伸展の初期に, PACAP1b による Trk 活性化を促進し, 神経細胞の軸索伸展及び生存に関与すると考えられる。

(16) Epigenetic control of cell-type specific response to the steroid hormone Ecdysone in *Drosophila* sensory neurons

金森崇浩, 榎本和生 (遺伝研・神経形態)

ステロイドホルモンは, ニューロンの生存あるいは死, さらには神経突起の形態変化など様々な細胞応答を引き起こすことにより, 神経回路の構築を制御する。しかし, 個々のニューロンが如何にして異なる細胞応答を示すのかは未解明である。我々は, ショウジョウバエ感覚ニューロンをモデル系としてこの問題にアプローチしている。幼虫から蛹への変態過程において, ステロイドホルモンであるエクジソンはクラス III 感覚ニューロンの細胞死を誘導する一方で, クラス IV 感覚ニューロンに対

しては細胞死を誘導せず樹状突起の刈り込みを引き起す。そこで, 我々はこれらの感覚ニューロンが示す細胞応答のいずれかを特異的に制御する遺伝子の探索を行った。その結果, クロマチンリモデリングに関わるエピジェネティック因子群がクラス IV 感覚ニューロンの樹状突起の刈り込みを特異的に制御することを見出した。本発表では, 異なる感覚ニューロンが示す細胞応答の特異性がクロマチン構造の制御により生み出される, という新たな作用機序を提唱したい。

(17) 発生過程における神経冠細胞と血管の相互作用

高瀬悠太, 高橋淑子 (奈良先端大学院大学・分子発生生物学講座)

血管ネットワークは体の中で厳密に規定されている。発生過程において血管パターンが形成される際には, その周辺組織から何らかの働きかけが起こっていると考えられているが, その細胞・分子実体はまだまだ分かっていない。このメカニズムを解き明かすにあたり, 我々は体節間血管 (ISV) と神経冠細胞の関連に注目した。体節間血管は, 胚体内で最初に形成される動脈である背側大動脈 (DA) からセグメンタルに伸長している血管である。我々は, DA から ISV が伸長する位置と, 神経冠細

胞の一部 (交感神経前駆細胞) が DA 周辺で存在している位置がよく似ていることから, 神経冠細胞が ISV 形成に関係しているのではないかと考えた。そこで, トリ胚を用いて神経冠細胞を除去した所, ISV 形成に異常が見られた。このことから, ISV 形成には神経冠細胞が必要ことが示唆された。興味深いことに, 発生後期では, DA 周辺にいた神経冠細胞は ISV に沿うように移動する。これらのことから, 神経冠細胞と ISV は, 発生過程の様々な時期で相互に作用しあっていることが考えられる。

(18) プラナリアの行動解析システムを利用した脳再生と脳機能の解析

山下大河, 井上 武, 西村周泰, Clement Lamy, 阿形清和 (京大・理・分子発生学講座)

プラナリアは進化的に初めて集中神経系を獲得した生物だと考えられており, その脳は, 単純ながらもよく組織化されていることが分かってきている。実際に, プラ

ナリアの行動は脳によって制御されており, そのため, プラナリアは脳高次機能の解析には非常に興味深く, 脳の基本型を知るのに有用な動物だと考えられる。そこで

今回、脳高次機能の解析を行うために、これまでに確立されていた負の走光性、化学走性の行動解析システムに加え、新たに温度走性、接触走性の行動解析システムの立ち上げを行った。また、今回確立した行動解析システムと RNAi 法による遺伝子ノックダウンを組み合わせた解析によって、温度走性、接触走性に関わる遺伝子や神

経細胞の探索および神経ネットワークの同定も試みた。その結果、温度感受に必要な遺伝子が同定され、またその発現細胞が温度感受細胞であることが示唆された。さらに、温度走性と特定の神経細胞との関わりも見いだされた。

(19) 色素細胞の挙動とメラニン輸送の可視化：表皮培養法を用いたライブイメージング観察

酒井謙一郎，田所竜介，村井英隆，高橋淑子（奈良先端大・バイオ）

動物の表皮には、紫外線から体を守るためにメラニン色素が存在している。メラニン色素は、表皮に存在する色素細胞内の細胞小器官（メラノソーム）で合成されたのち、色素細胞の樹状突起を通して、表皮角化細胞へと輸送される。この輸送については培養細胞を用いた解析や電子顕微鏡による観察から複数のモデルが提唱されているものの、実際の生体内における色素細胞と角化細胞の間でどのようにメラニンがやりとりされるのかについては依然不明な点が多い。私達はトリ胚から単離した表皮組織を培養し、ライブイメージング法を用いて、色素

細胞の挙動およびメラニン輸送を直接可視化することに成功した。この結果、色素細胞の樹状突起がダイナミックに伸展と退縮を繰り返すことが明らかになった。また、メラニン輸送に至る過程で樹状突起が盛んにブループを起こしたのち、メラニンを含んだ膜小胞が細胞外に放出される現象を見いだした。この膜小胞は周囲の角化細胞に輸送される。これらの結果から、少なくともトリ胚表皮においてはメラニン色素が膜小胞を介して色素細胞から角化細胞へと輸送されることが示唆された。

(20) Sbno1はマウス神経分化に必須な因子である

高野 愛，蔵地理代，出来本秀行，[#]日比正彦，寺島俊雄，勝山 裕（神戸大学・医，[#]理研 CDB）

strawberry notch (sbno) 遺伝子はショウジョウバエ遺伝学的解析より文脈依存的 (inductive signaling) に働く Notch シグナル下流因子とされている。しかし脊椎動物脳発生における役割は不明である。今回、我々はマウス大脳皮質発生での Sbno1 の役割について検討した。免疫組織化学的観察から Sbno1 が分化初期ニューロンの核で強く発現している事が分った。マウス胚大脳皮質細胞一次培養系を用いた Sbno1 機能阻害実験ではニューロンの分化が抑制され、この時 Delta like-1 タンパクの減少と Hes5 タンパクの増加が見られた。逆に Sbno1 を強制発現

させるとニューロンの分化が促進された。更に Sbno1 の生化学的機能について知見を得るために酵母 2 ハイブリッドスクリーニングを行った。その結果 Notch シグナル細胞内因子である Su (H) を含むいくつかの遺伝子が単離され、Su (H) と Sbno1 との結合は免疫沈降法においても確認出来た。

以上の結果から、Sbno1 は核内で Notch シグナルを抑制する事でニューロン分化を促進する因子である可能性が示唆された。

(21) 発生期大脳皮質におけるロコモーション様式の神経細胞移動に関わる制御因子の解析

西村嘉晃^{1,2}, 関根克敏¹, 地濱香央里², 鍋島陽一², 仲嶋一範¹, 星野幹雄^{2,3}, 川内健史^{1,2,4}

(¹慶應大・医・解剖, ²京大・医・腫瘍生物,

³国立精神・神経センター・神経研・診断, ⁴JST・さがけ)

哺乳類の大脳皮質は整然とした層構造をなしており、これは発生期における適切な神経細胞移動によって形成される。神経細胞移動は、いくつかの連続的な段階に分けられるが、その中でもロコモーション様式と呼ばれる移動段階は移動過程の最も長い距離を占めており、層構造形成に重要な役割を果たすと考えられている。しかし、従来の実験系では、ロコモーション移動の分子機構を直接解析することは困難であった。本研究では、マウス胎

仔大脳皮質スライス培養を用いた新規阻害剤スクリーニング法を確立し、Cdk5 および Src ファミリーキナーゼがロコモーション移動に関与することを見出した。また、PKC δ の阻害剤として広く用いられていた Rottlerin が、JNK 経路を阻害することによりロコモーション移動を抑制していることも明らかにした。本研究で確立した阻害剤実験系は、ロコモーション移動の分子機構を理解するために有用であると考えられる。

6. シナプス可塑性の分子的基盤

2009年6月18日－6月19日

代表・世話人：服部光治（名古屋市立大学大学院薬学研究科 病態生化学分野）

所内対応者：深田正紀（生体膜研究部門）

- (1) 海馬歯状回の生後発生における DISC1 結合タンパク質 Girdin の役割
榎本 篤（名古屋大学高等研究院/名古屋大学大学院医学系研究科腫瘍病理学）
- (2) 定量的 high throughput DNA シークエンサーを用いた神経分化における microRNA の網羅的発現解析
安東英明（科学技術振興機構 発展研究 カルシウム振動プロジェクト）
- (3) 電位依存性 Ca^{2+} チャンネル新規結合タンパク質 Caprin の同定と機能解析
三木崇史（京都大学大学院 工学研究科 合成・生物化学専攻 分子生物化学分野）
- (4) シナプス可塑性における L 型カルシウムチャンネルの役割
真鍋俊也（東京大学 医科学研究所 神経ネットワーク分野）
- (5) 小脳プルキンエ細胞の活動依存的 PSD タンパク質リモデリング
布施俊光（東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻 神経生化学分野）
- (6) 大脳皮質視覚野における微小神経回路網の経験依存的発達
吉村由美子（生理学研究所・岡崎統合バイオサイエンスセンター 神経分化研究部門）
- (7) 小脳長期抑圧において時間変換スイッチとして機能するポジティブフィードバック機構
田中（山本） 敬子（東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻, JST さきがけ）
- (8) 小脳登上線維－プルキンエ細胞シナプスの生後発達過程
橋本浩一（東京大学大学院医学系研究科 神経生理学）
- (9) Na チャンネル遺伝子変異によるてんかんの分子細胞基盤
山川和弘（理化学研究所・脳科学総合研究センター・神経遺伝研究チーム）
- (10) 神経栄養因子 BDNF の機能未知ドメインが行う脳機能調節
小島正己（産業技術総合研究所セルエンジニアリング研究部門バイオインターフェース研究グループ）

【参加者名】

深田正紀（生理学研究所）、深田優子（生理学研究所）、
横井紀彦（生理学研究所）、岩永 剛（生理学研究所）、
堤 良平（生理学研究所）、松田尚人（生理学研究所）、
高橋直樹（生理学研究所）、則竹 淳（生理学研究所）、
奥慎一郎（生理学研究所）、尾藤晴彦（東京大学）、真鍋
俊也（東京大学）、松尾直毅（藤田保健衛生大学）、榎本
篤（名古屋大学大学院）、田中敬子（東京大学, JST）、大
塚 慧（名古屋大学）、上田（石原）奈津実（名古屋大学）、
木下 専（名古屋大学）、橋本浩一（東京大学）、布施俊
光（東京大学大学院）、三木崇史（京都大学）、中島大志

（京都大学大学院）、八木雅久二（京都大学）、山川和弘（理
化学研究所 脳科学総合研究センター）、安東英明（独立
行政法人科学技術振興機構）、瓜生幸嗣（京都大学大学院）、
水谷顕洋（理化学研究所）、清中茂樹（京都大学）、森 泰
生（京都大学）、服部光治（名古屋市立大学）、大塚稔久
（山梨大学）、高橋正身（北里大学）、吉村由美子（岡崎統
合バイオサイエンスセンター 神経分化研究部門）、小島
正己（独立行政法人 産業技術総合研究所）、川口 港（早
稲田大学大学院）、佐々木哲也（基礎生物学研究所）、吉
田 明（生理学研究所）、小賀智文（大阪大学）

【概要】

脳の機能とその破綻から生じる病態を理解する上で、
シナプス可塑性の分子機構と生理的意義を解明すること

は不可欠である。しかし、一口に「シナプス」といって
も、その構造や機能は多種多様であり、当然、脳神経シ

システム全体における役割や重要性は異なっているであろう。一方、一部の分子の構造や機能は、動物種や神経システムを越えてほぼ完全に保存されているようにも思われる。シナプス可塑性におけるこのような「多様性」と「普遍性」を、誤解無く理解するためには、様々な動物種・システム・実験手技を用いる研究者が一堂に会し、フラ

ンクに話し合う機会が必要不可欠である。本研究会では、シナプス可塑性とその周辺領域に関わりを持つ研究者を幅広く集め、最新の研究成果を発表して頂くとともに、議論に十分な時間を割くことで、今後のシナプス可塑性及び関連分野の新展開を模索したいと考えている。

(1) 海馬歯状回の生後発生における DISC1 結合タンパク質 Girdin の役割

榎本 篤 (名古屋大学高等研究院/名古屋大学大学院医学系研究科腫瘍病理学)

Disrupted-In-Schizophrenia 1 (DISC1) は統合失調症をはじめとした精神疾患の脆弱性因子であり、ほ乳類の脳の発生において神経細胞の移動、分化、およびシナプス形成に重要であることが示されている。最近、成体の海馬歯状回でみられる神経新生 (adult neurogenesis) において DISC1 が重要な働きをしていることが示されている (Cell, 130, 1146-158, 2007)。しかしながら DISC1 あるいはその結合タンパク質がどのような機序で歯状回顆粒細胞の移動、位置決定 (ポジショニング) および分化を制御しているかは明らかではない。

今回私達は、DISC1 がセリン/スレオキナーゼ Akt の基質の一つであるアクチン結合タンパク質 Girdin (Dev. Cell, 9, 389-402, 2005; Nat. Cell Biol., 10, 329-337, 2008) と結合し、両者の結合が海馬神経細胞の軸索の形成において重要であることを示した。RNA 干渉法で DISC1 をノックダウンした神経細胞では Girdin の軸索成長円錐への局在が障害されていた。このことは DISC1 がスキャフォールドタンパク質として Girdin の局在や安定性を制御

していることを示唆する。これら培養神経細胞の実験結果と一致して、Girdin ノックアウトマウスでは歯状回顆粒細胞からの軸索 (苔状線維) の形成が顕著に障害されていた。

歯状回の発生における Girdin の機能は軸索の形成だけでなく、顆粒細胞の位置決定にも重要である。顆粒細胞の内因性 Girdin をレトロウイルスを用いた RNA 干渉法でノックダウンすると細胞の過剰移動と位置決定の異常が生じた。これに一致して Girdin ノックアウトマウスでは歯状回の細胞構築の顕著な異常が観察された。この表現系は DISC1 のノックダウンによって観察される顆粒細胞の位置異常と非常に類似していた。

以上の結果は、海馬歯状回の生後発生あるいは adult neurogenesis における DISC1/Girdin 複合体の生理的な重要性を示唆するものである。現在、樹状突起の形成、および電気生理学的機能における Girdin の役割を検討中である。

(2) 定量的 high throughput DNA シークエンサーを用いた神経分化における microRNA の網羅的発現解析

安東英明 (科学技術振興機構 発展研究 カルシウム振動プロジェクト)

microRNA (miRNA) は約 22 塩基からなるタンパク質をコードしない小さな RNA で、特定の mRNA の主に 3' 非翻訳領域に相補的に結合し、タンパク質の翻訳を抑制する。miRNA は新たなレベルでの遺伝子発現調節機構として、分化、細胞増殖、アポトーシス、癌などの制御に

重要な役割を果たしている。

miRNA の成熟に関わるタンパク質を欠損した ES 細胞は正常に分化できないことから、miRNA は ES 細胞の分化に重要な役割を果たしていることが明らかになっている。我々は、ES 細胞から神経系の細胞への分化の過程に

における miRNA の役割を解明する目的で、次世代 DNA シークエンス技術を用いた miRNA のトランスクリプトーム解析を行った。マウス ES 細胞, ES 細胞から分化誘導した神経外胚系細胞, 神経幹細胞, 初代培養神経細胞, 海馬などから低分子 RNA 画分を精製し, small RNA cDNA library を作製した。これらのライブラリーを Solexa/Illumina 社の high throughput DNA シークエンサーで解析し, ライブラリーあたり数百万から 1 千万以上の配列を解読した。その結果, マウスの約 500 種類の既知 miRNA のうち約 8 割が検出され, また約 80 種類の新規 miRNA が同定された。配列の解読頻度がその発現量に相関していることを利用し, 神経分化における miRNA の

発現量の変化を解析した結果, ES 細胞特異的な miRNA 群, 神経細胞特異的な miRNA 群, 分化の過程で一過性に発現上昇する miRNA 群などが明らかになった。また興味深いことに, 従来 miRNA 成熟の過程で生じる副産物として速やかに代謝されると考えられていた低分子 RNA が, 時には対応する miRNA 以上に蓄積していることが明らかとなり, なんからの機能を持つ可能性が示唆された。以上の解析により, 神経分化における miRNA 全体の発現変動が明らかになった。

本研究は, Oregon Health and Science University (アメリカ) で行われた研究成果である。

(3) 電位依存性 Ca^{2+} チャンネル新規結合タンパク質 Caprin の同定と機能解析

三木崇史 (京都大学大学院 工学研究科 合成・生物化学専攻 分子生物化学分野)

電位依存性 Ca^{2+} チャンネルは, 神経伝達物質放出や神経細胞突起伸長といった様々な生理応答を担う Ca^{2+} 流入経路である。 Ca^{2+} チャンネルがこのような生理的に重要な役割を果たすためには, Ca^{2+} チャンネルの形質膜発現や神経細胞内局在性が重要であるが, その詳細な分子機構は未解明である。

Ca^{2+} チャンネルは 4 つのサブユニット (α_1 , β , α_2/δ , γ) から構成されている。 β サブユニットは α_1 サブユニットに結合することにより, Ca^{2+} チャンネルの形質膜発現やチャンネル特性を制御している。また, 近年, 複数のタンパク質と相互作用し Ca^{2+} チャンネルの足場タンパク質として機能していることも明らかにされつつある。本研究では, β サブユニットの足場タンパク質としての機能に着目し, β サブユニット相互作用タンパク質を網羅的に探索した。

Yeast two-hybrid スクリーニングの結果, 機能未知タンパク質 (Calcium channel processing protein (Caprin) と命名) を得た。Caprin は脳特異的に発現し, 既知のドメイン

やモチーフを有しておらず, N 末端に一回膜貫通領域を持つ膜タンパク質である。生化学的実験から, Caprin は β サブユニットと 2 つのドメイン (Caprin interacting domain 1 (CID1), 及び 2 (CID2)) を介して結合していることが明らかになった。CaprinCID1- β サブユニット間の結合は, α_1 - β サブユニット間の結合を競合的に阻害したのに対し, CID2 は α_1 及び β と 3 者複合体を形成した。以上から, Caprin は β -Caprin 複合体および α_1 - β -Caprin 複合体の二状態を取りうることが示唆された。また, 後者の複合体は, Caprin 上の CID1 への SCG10-like protein (SCLIP, stathmin3) の結合により, 4 者複合体に変化した。SCLIP は神経突起伸長を制御していることが報告されていることから, Caprin-SCLIP 複合体による Ca^{2+} チャンネル制御は, 神経突起における Ca^{2+} チャンネル機能的発現・局在性に寄与する可能性が示された。以上, Ca^{2+} チャンネルは β -Caprin と α_1 - β -Caprin との間のスイッチングによりダイナミックに複合体を形成し, 生理的役割を果たすべくしかるべき場所へとターゲティングされと考えられる。

(4) シナプス可塑性におけるL型カルシウムチャネルの役割

真鍋俊也 (東京大学 医科学研究所 神経ネットワーク分野)

海馬は、事実や出来事、場所などに関する、いわゆる陳述記憶の形成に必須の脳部位であるが、ここでのシナプス伝達は活性化の頻度によって可塑的に変化することが知られている。海馬における興奮性シナプス伝達はグルタミン酸が神経伝達物質として働き、シナプス後細胞のスパインに局在するイオン透過型グルタミン酸受容体が速いシナプス伝達を媒介する。つまり、シナプス前終末からグルタミン酸がシナプス間隙に放出され、スパインに存在する AMPA 受容体に結合することにより通常のシナプス伝達が引き起こされる。海馬 CA1 領域では、シナプスが高頻度で活性化してシナプス後細胞が脱分極すると、通常は細胞外の Mg^{2+} によりブロックされている NMDA 受容体が開口することにより、細胞内に Ca^{2+} が流入して長期増強 (LTP) が誘導されると考えられている。しかし、細胞内の Ca^{2+} 濃度の上昇は NMDA 受容体だけでなく、細胞内ストアーからの放出や膜電位依存性 Ca^{2+} チャネルの活性化などによっても引き起こされる。本発表では、LTP 誘導におけるシナプス後細胞の Ca^{2+} チャネルの新たな役割に関する私たちの最近の研究成果を紹介したい。

私たちの以前の研究では、モルモットの海馬スライス標本の CA1 錐体細胞からシナプス応答をホールセル記録し、脱分極を繰り返すことにより、NMDA 受容体非依存性で、L 型 Ca^{2+} チャネル依存性のシナプス伝達

増強が誘導できることを見出している。しかし、この増強は短期増強であり、20 分程度しか持続しなかった。また、この増強に伴って微小シナプス電流も増大したことから、この短期増強はシナプス後細胞での神経伝達物質に対する感受性の増大により発現していることも明らかとなっていた。しかし、この増強がなぜ LTP にならないのかについてはその時点では不明であった。

そこで、シナプス後細胞の L 型 Ca^{2+} チャネルの活性化のみで LTP が誘導できるかどうかをさらに詳細に検討した。マウスの海馬スライス標本を用いて、 Ca^{2+} チャネルの不活性化も考慮し Ca^{2+} の流入を最適化する条件を検討したところ、6 秒ごとに 1 秒間シナプス後細胞を $-80mV$ から $+10mV$ に 20 回脱分極させるとシナプス伝達増強が長期に持続することが明らかとなった。電気刺激で誘発されるシナプス応答と同時に記録された自発シナプス電流も同程度の増大を示したことから、この増強はシナプス後細胞で発現し、しかも、記録しているニューロンの大多数のシナプスで増強が起こっていることもわかった。この LTP は L 型 Ca^{2+} チャネルおよび CaMKII の阻害薬により抑制された。以上の結果から、 Ca^{2+} チャネルの活性化を最適化すれば、 Ca^{2+} チャネルを介して流入する Ca^{2+} だけでも LTP を誘導することが可能で、その増大はニューロン全体にわたり、NMDA 受容体依存性 LTP と同様に CaMKII が関与することが明らかとなった。

(5) 小脳プルキンエ細胞の活動依存的 PSD タンパク質リモデリング

布施俊光 (東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻 神経生化学分野)

神経回路形成においては、神経細胞間の情報伝達の間であるシナプスが適切な部位において形成され、神経伝達を担う分子が適当量配置されねばならない。小脳プルキンエ細胞は興奮性シナプスの特徴的な構造であるスパインを多数有しており、それらは成熟脳において 1 本の登上線維と無数の平行線維という、シナプス形成部位と電気生理学的性質が全く異なる興奮性入力により支配されている。登上線維および平行線維シナプスに存在する

タンパク質には局在特異性が知られており、それぞれのシナプスでの神経伝達受容と情報処理を担っていると考えられる。しかしながら、この局在差異化の分子メカニズムについてはほとんど知見が得られていない。

我々は、成熟マウス小脳において、プルキンエ細胞後シナプス肥厚部 (PSD) の主要構成タンパク質の一つと考えられる Shank1A/Synamon が平行線維シナプスに潤沢に存在し、登上線維シナプスにおいては僅かしか存在しな

いことを見いだした。この登上線維シナプスにおける局在の選択的減弱が、登上線維の神経活動により制御される可能性を検証する目的で、マウス小脳の初代分散培養系を用いた解析を開始した。この実験系では登上線維は含まれないものの、顆粒細胞からの軸索上の VGlut1 陽性神経終末とプルキンエ細胞の間に数多くのシナプスが形成され、顕著な Shank1A 局在が認められる。この培養プルキンエ細胞に対し登上線維刺激を模した、連続的な P/Q 型カルシウムチャネル開口を伴う高カリウム刺激 (55 mM KCl) や AMPA 受容体アゴニスト (0.5 μ M AMPA) 刺激を与えたところ、確かに Shank1A のシナプス局在の減弱が認められた。この活動依存的減弱は MG132 存在下で抑制されることから、Shank1A は神経活動が活性化するユビキチン/プロテアソーム系によって分解されていると考えられる。興味深いことに、 ω -conotoxin MVIIIC

や ω -agatoxin IVA といった選択的カルシウムチャネルのブロッカーによりこの Shank1A の減弱は妨げられており、P/Q 型カルシウムチャネルを介した持続的なカルシウム流入がスパインにおける Shank1A の存在量を限定しているという可能性を示唆している。

以上の結果は、プルキンエ細胞スパインの PSD タンパク質が、そのシナプスの神経活動の質によりダイナミックに再構成されうること示している。小脳においては、薬理学的手法および遺伝学的手法により神経活動を生体内で修飾した場合にプルキンエ細胞における登上線維および平行線維それぞれの投射領域が競合して変化することが知られているが、本研究はシナプス入力特異的な PSD タンパク質複合体の維持が神経活動依存的機構によって修飾されている可能性を示唆している。

(6) 大脳皮質視覚野における微小神経回路網の経験依存的発達

吉村由美子（生理学研究所・岡崎統合バイオサイエンスセンター 神経分化研究部門）

大脳皮質視覚野の視覚機能は、生後の視覚経験に強く依存して成熟することが知られている。これまでに我々は、ラット大脳皮質視覚野スライス標本を用いた研究により、興奮性シナプスで結合している 2/3 層錐体細胞ペアは、その周辺の興奮性細胞からの入力を高い頻度で共有することを見出し、非常に微細なスケールの特異的な神経回路網が視覚野内に存在することを報告した。しかし、この微小神経回路網が視覚情報処理に関与するかについては明らかではない。そこで、微小神経回路網の形成が、視覚機能と同様に、生後の視覚経験に依存するかについて調べた。生後直後からの暗室飼育により視覚体験を経ないラット視覚野よりスライス標本を作成し、ケージドグルタミン酸による局所刺激法と、複数の 2/3

層錐体細胞からの同時ホールセル記録法を用いて解析した。その結果、暗室飼育したラット視覚野においては、2/3 層錐体細胞が形成する興奮性結合の検出確率は、正常な視覚体験を経た視覚野と比較して有意に低下し、結合が観察された場合も、誘発される興奮性シナプス電流の振幅は小さかった。特異的な興奮性神経結合による微小神経回路は、暗室飼育した視覚野においては、ほとんど観察されなかった。以上の結果から、微小神経回路網の形成には、遺伝的機構のみならず生後の視覚入力に依存して神経結合が精緻化される過程が必要であると考えられ、この神経回路は視覚野ニューロンの反応選択性の基盤であることが示唆される。

(7) 小脳長期抑圧において時間変換スイッチとして機能するポジティブフィードバック機構

田中（山本）敬子（東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻, JST さきがけ）

シナプス長期可塑性の最も重要な特徴の一つは、誘導刺激が短時間であるにも関わらず、誘発される神経伝達

効率の変化が長時間持続することである。小脳長期抑圧 (long-term depression, LTD) も同様で、数分間のシナプス

刺激後に神経伝達効率が徐々に減少し、これが少なくとも数時間維持される現象である。様々なシグナル分子が、この小脳 LTD の誘発に関与することが報告されており、中でも他のシナプス可塑性と同様、細胞内カルシウム (Ca^{2+}) 濃度上昇の重要性は確実である。しかし、 Ca^{2+} 濃度上昇は数分間の LTD 誘導刺激中のみに限定される一過性シグナルであり、これだけでは LTD という長期的な現象の説明がつかない。この時間的ギャップを埋めるメカニズムとして、コンピュータシミュレーションにより、プロテインキナーゼ C (PKC) と MAP キナーゼ (MAPK) を含むポジティブフィードバック機構が分子活性を 60-90 分間にわたって維持し、その結果 LTD が発現・維持されるというモデルが提唱され、実験的な実証が待たれていた。

そこで我々は、 Ca^{2+} 濃度上昇と LTD との関係を調べることにより、どのような性質を持つ機構が Ca^{2+} 濃度上昇以降に働くか、見当をつけることから始めた。その結果、この関係は正の協同作用を示すこと、 Ca^{2+} 濃度上昇の時間成分を蓄積する Leaky integrator の性質を持つことを見出した。これらの実験結果は、上述のポジティブフィードバック機構からなるシミュレーションで再現され、また、ポジティブフィードバック機構を止めると、シミュレーション、実験いずれの場合にも LTD の Ca^{2+} に対する感受性が低下することがわかった。このような実験結果とシミュレーション結果の類似性から、ポジティブフ

ィードバック機構が存在する可能性を強めることができたので、さらに直接的に検証することにした。PKC と MAPK の関係について調べたところ、(A) LTD 刺激による MAPK 活性は PKC に依存すること、(B) PKC を直接活性化することによって誘導される LTD が MAPK を介していること、を示し、このことから PKC が MAPK の上流で働くことがわかった。一方、(C) LTD 刺激による長期的な PKC 活性は MAPK に依存していること、(D) ケージ恒常的活性型 MAPK キナーゼの UV 照射を使って MAPK を直接活性化すると LTD が見られ、この LTD は PKC を介していること、を示し、このことから、MAPK も PKC の上流で働くことがわかった。つまり、PKC と MAPK はお互いに活性化しあうポジティブフィードバック機構を形成していることを示したことになる。さらに、このポジティブフィードバック機構が機能する時間を調べたところ、LTD 誘発刺激後 20-30 分間必要であることがわかった。

これらの結果から、ポジティブフィードバック機構は神経伝達効率が徐々に減少する過程で働く、つまり、 Ca^{2+} のような一過性シグナルを LTD という長期的現象に変換するスイッチとして働く、と結論付けることができた。また、本実験により、ポジティブフィードバック機構がシミュレーションで予測されたものより短時間しか必要ではないことがわかり、これ以降に未知の機構が働く可能性を示唆した。

(8) 小脳登上線維—プルキンエ細胞シナプスの生後発達過程

橋本浩一 (東京大学大学院医学系研究科 神経生理学)

生後すぐの神経回路には成熟期には見られない過剰な神経結合が多数存在するが、生後発達に伴い徐々に不必要な入力除去されて、機能的な神経回路が形成される。小脳登上線維—プルキンエ細胞投射系は、この過程を解析するためのモデル実験系として広く研究がなされている。成熟動物の小脳プルキンエ細胞は、ほとんどの細胞が一本の登上線維によってのみ支配を受けるが、発達初期には一時的に複数の登上線維による支配を受けている。生後 2~3 日齢のプルキンエ細胞は、シナプス強度が比較的同等な複数の登上線維により多重支配されているが、生後 7 日目までに、一本の強い登上線維入力とそれ以外の弱い登上線維入力が入る一つのプルキンエ細胞上で混

在するようになる。これは、最終的に残存してプルキンエ細胞を単一支配する登上線維と、除去される登上線維の機能的選別の結果であると考えられる。この過程の後、過剰シナプスの除去過程が進行し、マウスでは生後 3 週目までに成熟型の単一支配に移行する。

生後発達初期の多重支配登上線維はプルキンエ細胞細胞体にシナプスを形成しているが、成熟動物においては細胞体への投射はなくなり、樹状突起のみを支配するようになる。この過程は“登上線維の translocation”と呼ばれているが、いつ、どのように登上線維の移行が進むのかについては明らかになっていなかった。これらの点を明らかにするため、電気生理学的、形態学的手法を用い

て解析を行った。小脳からスライスを切り出し、プルキンエ細胞細胞体からホールセルパッチクランプ法で記録を行った。入力する登上線維を電気刺激し、誘発される登上線維応答を、プルキンエ細胞を単一支配するもの (CF-mono)、多重支配する登上線維のうち、最大振幅を持つもの (CF-multi-S) とそれ以外の小さい振幅を持つもの (CF-multi-W) に分類した。生後 11-14 日齢の登上線維を Sr^{2+} を含む外液中で電気刺激し、誘発される asynchronous quantal EPSC (qEPSC) を各登上線維グループについて記録したところ、CF-mono と CF-multi-S は、CF-multi-W に比べて 10-90% rise time が遅い qEPSC を多く含むことが分かった。記録部位から離れた部分で発生する qEPSC は樹状突起の電気的な性質から波形がなまって記録されるため、この結果は強化された登上線維のみが記録部位で

ある細胞体から遠い樹状突起で発生している qEPSC を多く含む、すなわち translocate しているのに対し、弱い登上線維はより細胞体近傍でのみ投射していることを示唆している。Translocation が起こる時期を解析するため、同様の解析を登上線維の機能的分化が終了している生後 7-8 日齢で行ったところ、CF-multi-S と CF-multi-W の qEPSC の 10-90% rise time は同等の分布を示したが、生後 9-10 日齢になると遅い 10-90% rise time を示す qEPSC の割合が CF-multi-S において増加し始めることが分かった。これらの結果は、生後 9 日以降に 1 本の最大振幅を持つ登上線維のみ樹状突起に移行するが、それ以外の弱い登上線維は細胞体近傍に取り残されていることを示している。

(9) Na チャネル遺伝子変異によるてんかんの分子細胞基盤

山川和弘 (理化学研究所・脳科学総合研究センター・神経遺伝研究チーム)

複数種のてんかんにおいて複数の電位依存性ナトリウムチャネルサブユニット遺伝子 (SCN1A, SCN2A, SCN1B など) の変異の報告がある。 $\alpha 1$ サブユニット (Nav1.1) をコードする SCN1A 遺伝子の変異は、重篤度が大きく異なる複数種のてんかんで報告されており、常染色体優性遺伝形式を示す熱性痙攣プラス (GEFS+) では約 10%、未だ有効な治療法の無い難治で重篤な知的障害を伴う重症乳児ミオクロニーてんかん (SMEI) では実に約 80% の患者で変異が見られる。GEFS+ 変異は全てがヘテロミスセンス変異であり、その多くが父母からの遺伝である。SMEI 変異は約 3 分の 2 がナンセンスやフレームシフトなどの分断変異であり約 3 分の 1 がミスセンス変異である。更に、SMEI が散発性であることと一致して、ほとんどが *de novo* 変異である。これら変異について我々を含め多くの研究室がパッチクランプ法によるチャネル機能に与える影響を検討しているが、一致した見解には至っていない。一方で我々は 2007 年、SMEI のナンセンス変異を導入した SCN1A 遺伝子ノックインマウスを作成し、出生後当初は正常に育つが、ホモ接合体 (-/-) は出生 10~12 日頃から運動失調と瀕回のてんかん発作を起こし始めて 15 日頃までにすべてが死亡すること、ヘテロ (+/-) も一部が出生後 18 日頃からてんかん発作を起こし始め、生後 1~3 ヶ月で一部が死亡することなどを報告し

た。これらマウスでは分断された Nav1.1 蛋白は発現しておらず、SMEI モデルとなるヘテロ接合体ではハプロ不全が発症の原因と考えられた。更に重要な発見として我々は、Nav1.1 が、大脳皮質、海馬などのパルブアルブミン (PV) 陽性抑制性神経細胞の軸索/細胞体に強く発現すること、他の抑制性細胞や興奮性神経細胞には発現がほとんど見られない事などを見いだした。これは、それまでの他のグループからの報告 (Nav1.1 の興奮性および抑制性神経細胞両者の樹上突起および細胞体での発現) を覆す知見であり、PV 陽性抑制性神経細胞の機能不全が SMEI など SCN1A 変異によるてんかんの発症の背景にある事を示す。これらは有効な治療法を開発する上でも重要な知見である。 $\alpha 2$ サブユニット (Nav1.2) をコードする SCN2A 遺伝子では、我々のグループが最初にてんかん患者 (GEFS+ 亜型) でチャネル機能変化をもたらすミスセンス変異を報告し、その後に別のグループが、より軽症の良性家族性新生児乳児けいれん (BFNIS) で複数のミスセンス変異を報告した。更に我々は複数の小児重症てんかん患者で、SCN2A の *de novo* ナンセンスおよびミスセンス変異を見いだしている。SCN2A でも大きく異なる重篤度を示す複数種のてんかんで変異が見られる点は SCN1A 変異を示すてんかんと類似するが、Nav1.1 と Nav1.2 の脳内における分布と発現する細胞種は大きく異

なると考えられることから、それぞれの発症メカニズムも異なることが予想される。SCN1A, SCN2A に加え、SCN1B や SCN3A にもてんかん患者における変異が見いだされ、SCN8A とてんかんと関わりも取り沙汰されて

いる。有効な治療法の開発にはそれぞれの遺伝子の変異によるてんかんの、細胞レベルでの詳細な発症機序の理解が求められよう。

(10) 神経栄養因子 BDNF の機能未知ドメインが行う脳機能調節

小島正己 (産業技術総合研究所セルエンジニアリング研究部門バイオインターフェース研究グループ)

BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) は NGF (Nerve growth factor) と配列相同性の高い神経成長因子であり、近年までに発見された NT-3 (Neurotrophin-3) NT-4/5 (Neurotrophin-4/5) を含めてニューロトロフィン (NTs: Neurotrophins) ファミリーを形成している。一方、これらリガンドの受容体も、受容体型チロシンキナーゼ Trk ファミリーを形成し、BDNF の高親和受容体は TrkB である。NT/Trk シグナリングは神経細胞の成長、生存、シナプス伝達を促進/調節し、リガンドおよび受容体のノックアウトマウスの解析から各分子の生理的役割も理解されてきた。

しかし、Human genome project が始まった 2000 年頃からこの分野に新たな展開が始まった。その一つは、human polymorphisms の研究であり、BDNF の missense mutation (val66met) は BDNF の分泌経路輸送および活動依存的分泌を阻害し、ヒトエピソード記憶のスコアを低下させた。つまり、げっ歯類研究から見いだされたシナプス機能亢進モデルはヒト脳においても示唆された。

BDNF は他の成長因子に同じく前駆体 (proBDNF: ~32 kDa) として合成されて Furin, PC1/3, MMP などのプロテアーゼにより成熟型 (mBDNF: ~15 kDa) となる。神経栄養因子研究のほとんどは mBDNF に関するものであっ

たが、脳内 BDNF が微量であること、抗体作製が困難であること、BDNF 蛋白質の難溶性の理由から、①proBDNF → mBDNF ②各 isoform の局在や輸送などの細胞メカニズムは依然不明点が多い。Val66Met 変異は BDNF プロドメインに位置することは、BDNF プロドメイン (~16 kDa) の機能性が示唆する。しかし、BDNF プロドメインの種間相同性は高いが、他の蛋白質との相同性はほとんどなく、その組換え蛋白質はランダム構造である。さらに、proBDNF は、mBDNF とは異なり、TNF レセプターファミリーに属する pan-neurotrophin receptor p75 を介して神経細胞死を促進することが報告されている (Teng et al, 2005)。

本研究会では、最近我々が作製した proBDNF → mBDNF 反応が非効率となり、その結果として脳内 BDNF 比が proBDNF >> mBDNF となったモデルマウス (BDNF pro/pro) について、その網羅的行動解析、microMRI などを用いた脳構造解析、p75 ノックアウトマウスとの交配によりレスキューされる表現型解析、ヒト血中に存在する proBDNF を指標にした精神疾患バイオマーカー研究などを報告し、BDNF プロドメインの多機能性、脳疾患研究への期待を考察する。

7. 視知覚研究の融合を目指してー生理, 心理物理, 計算論

2009 年 6 月 18 日ー6 月 19 日

代表・世話人：西田眞也（NTT コミュニケーション科学基礎研究所）

所内対応者：小松英彦（生理学研究所）

- (1) Classification image による顔情報処理ストラテジーの可視化ー一定型発達者と自閉症者の比較ー
永井聖剛（産業技術総合研究所人間福祉医工学研究部門）
- (2) サル大脳皮質における視覚探索の神経機構
ー刺激特徴にもとづいた選択から空間位置にもとづいた選択への変換過程ー
小川 正（京都大学大学院医学研究科）
- (3) 生理実験結果の計算論的解釈と工学的応用ー受容野モデルと盲点補完を例としてー
佐藤俊治（電気通信大学大学院）
- (4) 潜在的運動生成が明かす様々な視覚処理プロセス
五味裕章（NTT コミュニケーション科学基礎研究所）
- (5) 顔知覚における初期経験
杉田陽一（産業技術総合研究所脳神経情報研究部門）
- (6) ヒト MT+野のレチノトピーと受容野サイズ
天野 薫（東京大学大学院新領域創成科学研究科）
- (7) 信号検出理論による知覚的盲目と注意的盲目の判別
金井良太（ユニバーシティカレッジロンドン認知神経科学科）
- (8) Binocular matching and correlation computations: formulation and function
藤田一郎（大阪大学大学院生命機能研究科）
- (9) 運動情報を 2 つのスカラーに分けて処理することの利点
金桶吉起（生理学研究所感覚運動調節研究部門）
- (10) 運動視における身体情報の影響
松宮一道（東北大学電気通信研究所）
- (11) 初期視覚系ニューロンの方位選択性について
佐藤宏道（大阪大学大学院医学系研究科）
- (12) 視覚性短期記憶における特徴の統合と動的更新
齋木 潤（京都大学大学院人間 環境学研究科）
- (13) 下側頭葉皮質ニューロンによる物体の三次元形状の表現
山根ゆか子（理化学研究所 BSI）
- (14) 神経予測と視知覚
神谷之康（ATR 脳情報研究所神経情報学研究室）

【参加者名】

藤田一郎（大阪大学大学院）、佐藤宏道（大阪大学大学院）、
杉田陽一（産業技術総合研究所）、小川 正（京都大学大
学院）、山根ゆか子（理化学研究所 BSI）、齋木 潤（京
都大学大学院）、五味裕章（NTT コミュニケーション科
学基礎研究所）、神谷之康（ATR 脳情報研究所）、永井聖

剛（産業技術総合研究所）、天野 薫（東京大学大学院）、
松宮一道（東北大学電気通信研究所）、金井良太（ユニバー
シティカレッジロンドン）、佐藤俊治（電気通信大学大学
院）、金桶吉起（生理学研究所）、西田眞也（NTT コミュ
ニケーション科学基礎研究所）、塩入 論（東北大学電気

通信研究所), 佐藤雅之 (北九州市立大学), 竹村浩昌 (東京大学大学院), 武田二郎 (東京工業大学大学院), 川島祐貴 (東京工業大学大学院), 西田浩聡 (東京工業大学大学院), 松本知久 (東京工業大学大学院), 吹野徳彦 (東京工業大学大学院), 緒方康匡 (東京工業大学大学院), 服部恭臣 (東京工業大学大学院), 深瀬貴大 (東京工業大学大学院), 藤原匡史 (東京工業大学大学院), 吉田和輝 (東京工業大学大学院), 永福智志 (富山大学大学院), 中田龍三郎 (富山大学大学院), 栗木一郎 (東北大学電気通信研究所), 柴田智広 (奈良先端科学技術大学院大学), 須川真佑 (奈良先端科学技術大学院大学), 山本哲也 (京都大学大学院), 久方瑠美 (東京大学大学院), 金子沙永 (東京大学大学院), 篠森敬三 (高知工科大学), 尾崎弘展 (大阪大学大学院), 相馬祥吾 (大阪大学大学院), 上田祥行 (京都大学大学院), 林 隆介 (理化学研究所 BSI), 大脇崇史 ((株)豊田中央研究所 先端研究センター), 鈴木 航 (理化学研究所 BSI), 寺尾将彦 (東京大学大学院), 瀬戸川剛 (筑波大学大学院), 福島邦彦 (関西大学), 木村晃大 (大阪大学大学院), 三好誠司 (関西大学システム理工学部), 一戸紀孝 (弘前大学), 岡さち子 (総合研究大学院大学), 本吉 勇 (NTT コミュニケーション科学基礎研究所), 成瀬 康 (情報通信研究機構 未来 ICT 研究センター), 小賀智文 (大阪大学大学院), 阿部 悟 (千葉大学大学院), 坂野逸紀 (京都大学大学院), 小林憲史 (東京大学), 阪口 豊 (電機通信大学), 金沢 創 (日本女子大), 山口真美 (中央大学文学部), 堺 浩之 (豊田中央研究所先端研究センター), 大塚由美子 (日本女子大学), 山下和香代 (中央大学), 蒲池みゆき (工学院大学), 芦田 宏 (京都大学), 七五三木聡 (大阪大学), 山崎 翔 (筑波大学), 草間美里 (愛知淑徳大学), 渡辺ひとみ (愛知淑徳大学), 横田悠右 (豊橋技術科学大学), 三木研作 (統合生理), 松田幸久 (金沢工業大学), 松村淳子 (情報通信研究機構), 佐々木亮 (順天堂大学), 岡部昌子 (大

同大学), 下川丈明 (京都大学), 北園 淳 (東京大学), 大坪洋介 (東京大学), 繁樹博昭 (豊橋技術科学大学) 宮崎由樹 (首都大学東京), 伊藤嘉房 (愛知医大), 石橋和也 (神戸大学), 小野和也 (豊橋技術科学大学), 加藤雅也 (豊橋技術科学大学), 金山範明 (東京大学), 丸谷和史 (NTT-CS 研), 鹿田 学 (京都大学), 荻野正樹 (JST), 市川寛子 (中央大学), 秦 重史 (京都大学), 行松慎二 (中京大学), 川口 港 (早稲田大学), 横川武昌 (神戸大学), 五十嵐康彦 (東京大学), 南 哲人 (豊橋技術科学大学), 中島加恵 (豊橋技術科学大学), 則竹洋佑 (豊橋技術科学大学), 永井岳大 (豊橋技術科学大学), 小峰央志 (豊橋技術科学大学), 寺島裕貴 (東京大学), 村上郁也 (東京大学), 宇賀貴紀 (順天堂大学), 熊野弘紀 (順天堂大学), 岡田真人 (東京大学), 川崎 学 (東京大学), 楊 嘉樂 (中央大学), 池田尊司 (京都大学), 原澤賢充 (NHK 放送技術研究所), 鈴木敦命 (名古屋大学), 垣田修 (三重大), 荒井宏太 (豊橋技術科学大学), 鎌谷祐貴 (豊橋技術科学大学), 佐々木博昭 (東北大学), 渡邊淳司 (NTT), 井上康之 (豊橋技術科学大学), 谷岡峻介 (豊橋技術科学大学), 外山純一 (豊橋技術科学大学), 金津将庸 (京都大学), 勝俣安伸 (豊橋技術科学大学), 長谷川国大 (名古屋大学), 大谷智子 (東京大学), 水野愛子 (西尾市民病院臨床), 小濱 剛 (近畿大学), 今井千尋 (東京大学), 廣瀬信之 (京都大学), 齋藤 大 (東京大学), 高橋伸子 (愛知淑徳大学), 半田知也 (北里大学), 酒井宏 (筑波大学), 大杉尚之 (中京大学), 鬼丸真一 (豊橋技術科学大学)

以下, 生理学研究所 石川理子, 林 正道, 高浦加奈, 木田哲夫, 池田琢朗, 関 和彦, 吉田正俊, 田中絵実, 緒方洋輔, 宮原良美, 松吉大輔, 加藤利佳子, 小松英彦, 伊藤 南, 郷田直一, 鯉田孝和, 平松千尋, 横井 功, 原田卓弥, 坂野 拓, 西尾亜希子, 岡澤剛起, 波間智行

【概要】

「視知覚研究の融合を目指して—生理, 心理物理, 計算論」は, 平成 21 年 6 月 18 日, 19 日に岡崎コンファレンスセンター中会議室において開催された。参加者は約 153 名 (過去最高)。生理 6 件, 心理物理 6 件, 計算論 2 件, という意図のプログラム構成だったが, 多くの講演内容が領域横断的で, 研究会が目指す視知覚研究の融合が着実に進んでいることが実感できた。まず, 永井氏は

IC 法の原理と応用をわかりやすく解説した。小川氏はサルの後頭頂葉において視覚探索課題に必要な情報変換が行われている証拠を示した。佐藤俊治氏は V1 の単純型細胞の受容野のモデルとして一般化ガウス微分関数が適切であることを指摘した。五味氏は視覚運動により無意識的に手腕運動が誘導される MFR に関する包括的な解説を行った。杉田氏は顔を見る経験なしに育てられたサ

ルも顔特異的な処理ができるという驚くべき実験を報告した。天野氏は新しい fMRI の分析手法により人の視覚野のマッピングを精緻化した。ロンドンから参加の金井氏は信号検出理論を応用して二種類の盲目状況を区別する試みを紹介した。藤田氏は二種類の両眼立体視処理が存在することを示す心理物理実験を報告した。二日目に入り、まず金桶氏は運動情報を速度と方向の二つのスカラーに分離して処理することの利点を語った。松宮氏は運動残効を用いて身体運動が視覚運動情報処理に与える

影響を検討した。佐藤宏道氏は LGN のニューロンが方位選択性を持たないという常識を覆す一連の研究を解説した。齋木氏は視覚性短期記憶における物体の表象が複数の特徴が統合されたものではないと主張した。山根氏は下側頭葉におけるニューロンの刺激選択性が 3 次元曲面のパラメータ空間でうまく記述できることを示した。最後に神谷氏が神経活動を予測するモデルの重要性を指摘し、今後の視覚神経科学のあり方について巨視的な提案を行って研究会を締めくくった。

(1) Classification image による顔情報処理ストラテジーの可視化 — 定型発達者と自閉症者の比較 —

永井聖剛（産業技術総合研究所人間福祉医工学研究部門）

Classification image (CI) 法は課題遂行中の処理ストラテジーを詳細に可視化できる利点を持つ。例えば、顔画像による個人弁別課題を課すとき、「どの部分にどれくらい強く影響されるか」をピクセル単位で明らかにすることができる。近年は 2 次元空間刺激に加え、1 次元空間刺激、時空間刺激など様々な刺激属性に対応した CI が開発され、顔認知、主観的輪郭、テクスチャ知覚など多様な研究トピックにおいて従来の実験手法（閾値、正答率

等）では検討不可能であった視覚情報処理の諸側面を明らかにしてきた。本発表では CI の測定原理、試行数削減技術の解説に加え、定型発達者および自閉症者の顔情報処理ストラテジーを調べた研究を報告する。先行研究ではグループ間での質的違いが主張されていたが、CI を用いたところ自閉症者グループ内で大きな個人差があり、半数は定型発達者と同様のストラテジーを示すことがわかった。

(2) サル大脳皮質における視覚探索の神経機構 — 刺激特徴にもとづいた選択から空間位置にもとづいた選択への変換過程 —

小川 正（京都大学大学院医学研究科）

視覚探索では、視野内にある個々の物体の「刺激特徴の情報」と、どのような物体を目標として探すのかを決める「行動課題の情報」が重要となる。しかしながら、目標となる物体が特定された後、その物体に視線方向や空間性注意を向けるためには「目標位置の情報」の方がより重要になる。このように視覚探索では、非空間性から空間性の選択に移行する処理過程が存在すると考えられる。このような変換過程を明らかにするため、目標の刺激特徴が多種あり、探索条件に応じて目標刺激が決ま

る視覚探索課題をサルに行わせ、後頭頂葉の LIP 野と 7a 野から単一ニューロン活動を記録した。その結果、「刺激特徴の情報」と「行動課題の情報」を表現するニューロン群と、「目標位置の情報」のみを表現するニューロン群が混在して見出された。これらの結果は、非空間性選択から空間性選択への変換が行われる場として後頭頂葉（LIP 野、7a 野）が重要な役割を果たしていることを示唆する。

(3) 生理実験結果の計算論的解釈と工学的応用 —受容野モデルと盲点補完を例として—

佐藤俊治 (電気通信大学大学院)

V1 単純型細胞の受容野モデルとしてこれまで Gabor 関数が広く用いられてきたが、問題点がいくつか存在する：(i) Gabor 関数のゼロ交差位置は等間隔であるが、実際の実験結果は非等間隔、(ii) 低周波・高周波帯に選択性を持つ受容野に対する近似精度が悪い、(iii) Gabor 関数の出力結果から入力画像を再構成できない。そこで、これら問題点を解決する新しい受容野モデルについて考察する。結果として得られた受容野モデルは、微分階数を実数階 (1.5 階微分など) に拡張した、一般化 Gaussian

derivative 関数となった。この新しい受容野モデルは微分幾何学との親和性が高いため、面方位や奥行き計算などの計算論研究に役立つものと考えられる。微分幾何との親和性を示す一例として、盲点補完モデルについて紹介する。この盲点補完モデルは、Matsumoto & Komatsu (J. Neurophysiology, 2005) の生理実験結果を、微分幾何と最適化問題の観点から計算論的に解釈して構築されたモデルである。最後に、画像修復への応用例についても紹介したい。

(4) 潜在的運動生成が明かす様々な視覚処理プロセス

五味裕章 (NTT コミュニケーション科学基礎研究所)

視覚から運動生成までの情報処理では、視覚>知覚>意志決定>運動プログラム生成>制御というシーケンシャルな流れが主に研究されてきたが、視覚情報が知覚や意志決定を介さず、四肢や眼・体幹の運動生成に直接働きかけるような場合もある。近年我々は、腕到達運動中に与えられた視野の突然の動きに対して短潜時で腕が応答する Manual Following Response (MFR) と名づけた現象に注目し、その視覚情報処理から運動生成までのメカニズムを探っている。視覚運動の時空間周波数に対する MFR

の変化は、いくつかの運動視知覚特性と異なっており、むしろ同様の刺激で誘発される眼球運動と似た時空間周波数特性を示し、さらに脳磁図信号とも相関があることから、知覚と運動生成のための視覚運動情報処理の乖離が示唆された。本講演では、最近明らかになってきた手と目の制御に対する視覚運動処理の違いなども交え、視覚—運動生成処理を明らかにするアプローチを紹介する。

(5) 顔知覚における初期経験

杉田陽一 (産業技術総合研究所脳神経情報研究部門)

生まれた直後のサルを、6ヶ月～24ヶ月間、「顔」と顔に似た映像を一切見せないようにして育てた。これらのサルの顔知覚を、選好注視法 (Preferential looking method) と慣化法 (Habituation method) を用いて調べた。顔を見せる前に行った実験で、既に極めて高度な顔識別能力が備わっていることが明らかになった。サルあるいはヒトの顔写真と顔以外の物体の写真を同時に見せると、顔写真を好んで長く注視した。ひとつの顔写真を長い間見た

後に、同じ顔写真と別の新しい顔写真を同時に見せると、サルの顔、ヒトの顔のどちらに対しても新しい顔写真を好んで長く見続けた。この結果は、以前に見た顔と新しく見た顔を識別したことを示している。さらに、眼・鼻・口などの僅かな違いだけでなく配置の些細な相違も識別できることが明らかになった。また、顔を見せなかった期間に関わらず、全く同じ結果が得られた。生身の「顔」を見せた後に行った実験で、サルの成績は一変した。ヒ

トの顔だけを1ヶ月見せた後に、前と同じ実験を行うと、ヒトの顔写真は好んで見続けるものの、サルの顔に対する好みは消失した。また、前に見た顔写真と新しい顔写真の区別も、ヒトの顔写真に対しては出来るものの、サルの顔写真に対しては全く識別できなくなった。逆に、サルの顔だけを1ヶ月見せた後には、サルの顔写真に対しては以前と同じ成績が得られるものの、ヒトの顔写真を識別する能力は失われてしまった。また、顔を見せなかった期間に関わらず、同じ結果が得られた。以上の結

果は、「顔」の印象（鋳型）は、顔を見たことがなくても形成されること、また、実際に顔を見た後には、身近な「顔」の特徴を迅速に処理するために特殊化されていくことを示している。その後の回復経過を観察するために、サルを通常の飼育室で育てた。飼育室では、他のサルの顔もヒトの顔も見ることができる。しかし、1年間経過しても、失われた識別能力が改善することはなかった。この結果は、顔の識別の発達に明瞭な感受性期が存在していることを示している。

(6) ヒト MT+野のレチノトピーと受容野サイズ

天野 薫（東京大学大学院新領域創成科学研究科）

従来、ヒトにおける運動視関連領野は、運動刺激と静止刺激を交互に提示した際に賦活される部位 (hMT+) として定義されてきた。hMT+はサルの MT, MST を含むと考えられているが、その部位は閾値の設定方法等に依存するなどの問題があり、V1-V4のように、レチノトピーに基づく領野の定義が求められてきた。本研究では、各ボクセルの受容野中心のみならず、受容野サイズをモデル化する新たなポピュレーション受容野マッピングの手

法を用いて、hMT+内に二つの半視野表現が存在することを明らかにした。受容野サイズは、いずれの領野においても偏心度に応じてほぼ線形に増大した。ポピュレーション受容野の大きさは、ニューロンの受容野サイズだけでなく、ボクセル内におけるニューロンの受容野中心のばらつきの成分の影響を受けると考えられるが、両者の成分を分離したところ、後者の影響は相対的に小さいことが示唆された。

(7) 信号検出理論による知覚的盲目と注意的盲目の判別

金井良太（ユニバーシティカレッジロンドン認知神経科学科）

視覚刺激を主観的に見えなくする心理物理学的手法は、意識的知覚と無意識の情報処理での神経活動の違いを同定するため、心理物理学のみならず神経生理学や脳イメージングと組み合わせられて幅広く用いられてきた。本研究では、刺激が呈示された試行のみ、または刺激が不在であると判断された試行のみに対して、確信度が正解不正解をどれだけ弁別できるかを解析することで、心理物理の視覚刺激を見えなくする手法を知覚的盲目と注

意的盲目に分類する方法を示す。低コントラスト、バックワードマスキング、フラッシュ抑制により刺激の検出が困難な状況では、ミス試行と物理的不在が主観的には弁別できないのに対し、注意的瞬目、分割的注意、空間的不確定性では課題の難しさに伴いミス試行の確信度が下がるため主観的弁別が可能であった。この知覚的盲目と注意的盲目の実験手法間での違いが、P意識とA意識という哲学的直感の由来であると考えられる。

(8) Binocular matching and correlation computations: formulation and function (両眼対応計算と両眼相関計算：定式化と機能)

藤田一郎 (大阪大学大学院生命機能研究科)

両眼立体視において、脳は、両眼に投影された外界像の位置ずれ(両眼視差)を検出し、奥行きへと変換する。この過程において、「両眼相関」と「両眼対応」の2つの計算が行われる。両眼相関計算は大澤ら(1990)の両眼視差エネルギーモデルにより数学的に定式化されている。一方、両眼対応計算は、従来、計算の拘束条件が定性的に提案され、計算解を求めるために繰り返し計算過程を組み込むという Marr 以来の考え方で理解されてき

た。本発表では、フィードフォワード機構のみで両眼対応計算を実現するモデルを提唱し、その定式化を行う。そして、両眼相関と両眼対応の2つの計算過程を乖離させる心理学的手法を提案する。その方法を用いて、この2つの計算過程が細かい奥行き知覚と粗い奥行き知覚それぞれにどう貢献しているか、さらに、視覚刺激の時間特性を変えることで2つの計算過程にどう影響するかを調べた心理実験の結果を報告する。

(9) 運動情報を2つのスカラーに分けて処理することの利点

金桶吉起 (生理学研究所感覚運動調節研究部門)

視覚性運動情報処理機構において、ヒト脳が運動ベクトルまたは motion energy model に基づく情報処理をしていると考えることは妥当であり、実際に motion transparency, occlusion, boundary などおそろくすべての知覚現象はこのモデルで説明できる。にもかかわらず、運動ベクトルが2つのスカラーに分けられて処理されている可能性が近年指摘されている。現時点ではヒト脳がど

ちらの処理方法を採用しているか排他的に一方を支持する知見は存在しない。ここでは、ベクトルを2つのスカラーに展開することによって運動情報処理がいかに簡便になりうるか、また他の視覚情報(色や形など)処理との整合性があるかについて具体例(例えば同じ場所に2つの運動が知覚されることの説明など)にて示し、この情報処理方法の意義について考察したい。

(10) 運動視における身体情報の影響

松宮一道 (東北大学電気通信研究所)

我々は、行動中に自己の身体部位の動きを頻繁に見る。この自己の意図を追従する身体部位の動きは、外界の動きから自己生成した動きを区別するときに重要な手がかりを与える。一方、行動に伴って生成される物体の動きは、通常、身体部位情報と独立に処理されると考えられており、視覚的な動きのパターンは運動方向、空間周波数、速度のような視覚刺激の属性あるいは注意によって追跡された運動方向にチューニングされたフィルターを

通して処理され则认为られている。このようなフィルターの存在は運動残効を使って調べられており、運動残効の存在は特定の刺激属性に順応するフィルターの存在に対する証拠とみなすことができる。本講演では、自己生成される物体の動きに順応すると、手の見えが視覚運動残効に影響を与えることを報告する。この結果から、運動視処理機構と身体情報の関連性について議論する。

(11) 初期視覚系ニューロンの方位選択性について

佐藤宏道（大阪大学大学院医学系研究科）

Hubel と Wiesel が 1962 年にネコ一次視覚野 (V1) の方位選択性のモデルを提案して以来, V1 ニューロンに収束する外側膝状体 (LGN) からの入力線維の受容野が特定の傾きを成すように配列しているというのが教科書による方位選択性の説明である。また, 大脳皮質はこの方位チューニングを増強し, 入力強度によらず安定化するように神経回路を構築しているとされている。しかし我々はネコ V1 で受容野周囲を sinusoidal grating で刺激したときに生じる抑制性反応修飾についての研究を進めるうち

に, 少なくともネコでは LGN のレベルで皮質のそれの元になるような方位チューニングが形成され, しかも, 大脳皮質の神経回路の特徴とされてきたコントラスト非依存的方位チューニングが存在していること, そして LGN 内の GABA 抑制がこのチューニングにほとんど寄与していないことなどを見出した。これは初期視覚系の feedforward メカニズムにおいて方位選択性が合目的的に形成されていることを示唆しており, 視床と大脳皮質との関係についての再考を促すものである。

(12) 視覚性短期記憶における特徴の統合と動的更新

齋木 潤（京都大学大学院人間 環境学研究科）

我々の判断や行為においては現前の視覚情報のみならず視覚性の短期記憶情報が重要な役割を果たしている。視覚性短期記憶の容量は 4 個程度の視覚的オブジェクトであるといわれているが, 「視覚的オブジェクト」が記憶の機能単位であるかどうかについては議論がある。オブジェクトの重要な特性である属性のバインディングと, 変化に伴う表象の更新の過程を明確にするため, 複数の運動物体を用いて属性のバインディングと運動に伴う表

象の更新を同時に検討する多物体恒常性追跡法を用いて視覚記憶と視覚的注意の相互作用を検討した心理物理実験, 属性情報と位置情報が統合されたオブジェクト表象の神経基盤を検討した fMRI 実験を紹介する。これらの知見から, 視覚性短期記憶がオブジェクトを単位とした 4 つのスロットではなく, 特徴統合理論のように特徴ベースに構成され, 注意の作用により一過性にオブジェクト表象が構成されている可能性を議論する。

(13) 下側頭葉皮質ニューロンによる物体の三次元形状の表現

山根ゆか子（理化学研究所 BSI）

下側頭葉皮質には視覚的に提示された物体像に強く反応するニューロンが多く存在することが知られており, 視覚情報処理の最終段階と考えられている。下側頭葉皮質ニューロンの 3 次元形状に対する刺激選択性を効率的に調べるために, 進化的アルゴリズムを用いた探索システムを開発した。陰影と両眼視差を加えた 3 次元物体像を視覚刺激として用い, 固視課題遂行中の覚醒サルの下側頭葉皮質ニューロンから記録をとった。刺激の形状を

決めるパラメータを, ニューロンの活動を記録しながら応答に応じて変化させ, 新しい刺激セットを次々にオンラインで用意し提示した。解析の結果, 記録した多くの下側頭葉皮質ニューロンの刺激選択性は, 曲率や方向など 3 次元曲面を記述するパラメータを用いるとよく説明できることが示された。このことは, 2 次元のみならず奥行き方向の情報を含む 3 次元の物体形状が下側頭葉皮質で表現されている可能性を示すものである。

(14) 神経予測と視知覚

神谷之康 (ATR 脳情報研究所神経情報学研究室)

視覚情報処理を理解する上で、「予測」の重要性が認識されつつある。刺激に対する脳の反応を記述しモデルをあてはめる従来のアプローチとは異なり、予測を重視するアプローチでは、新たな（モデルを作るのに利用していない）刺激に対する脳活動を正しく予測できるか（エンコーディング）、新たな脳活動が与えられたとき、それを引き起こした刺激を予測できるか（デコーディング）、脳活動から主観的知覚状態を予測できるか（マインド・

リーディング）、といった観点でモデルや仮説を評価する。視覚研究が現象の解釈を超え、応用も視野に入れた成熟した科学になるためには、このような観点は必須のものであるが、一方で、現象のメカニスティックな理解がないまま、数字の上だけのデータマイニングに終始する危険を伴う。本講演では、高次元の知覚空間と脳信号空間のモデリングに焦点を当てながら、神経予測の可能性と課題を議論する。

8. 大脳皮質－大脳基底核連関と前頭葉機能

2009年11月26日－11月27日

代表・世話人：宮地重弘（京都大学霊長類研究所）

所内対応者：南部 篤（生体システム研究部門）

（1）中脳ドーパミン細胞の投射様式

松田和郎（滋賀医科大学）

（2）脚橋被蓋核における報酬価値とタイミングの表現

岡田研一（大阪大学大学院）

（3）動機づけ学習と線条体

小山 佳，筒井健一郎（東北大学大学院）

（4）対象の選択と運動の選択時における線条体の価値表現

鮫島和行（玉川大学）

（5）ソングバード大脳基底核のさえずり行動中および睡眠中の神経活動

柳原 真（理化学研究所）

（6）尾状核における神経活動の数的表現

二ノ倉欣久（弘前大学）

（7）大脳基底核と運動前野をつなぐネットワーク

星 英司（玉川大学）

（8）側頭および頭頂連合野から外側前頭前野への多シナプス性入力様式

平田快洋（京都大学）

（9）生体内線維連絡イメージングの下側頭葉顔認知システムへの適用

一戸紀孝（弘前大学）

【参加者名】

丹治 順，星 英司，鮫島和行，野々村聡（玉川大学脳科学研究所），高田昌彦，宮地重弘，松本正幸，平田快洋，額田大輔，鴻池菜保（京都大学霊長類研究所），藤本 淳（京都大学），松田和郎（滋賀医科大学），岡田研一（大阪大学），筒井健一郎，小山 佳（東北大学），柳原 真，曾根正光（理化学研究所），二ノ倉欣久，一戸紀孝（弘前

大学），高草木薫，野口智弘（旭川医科大学），則武 厚（関西医科大学），南部 篤，伊佐 正，畑中伸彦，知見聡美，佐野裕美，高良沙幸，金子将也，鯉田孝和，松田尚人，坂野 拓，金桶吉起，岡澤剛起，吉田正俊，波間智行（生理研）

【概要】

大脳基底核は，大脳皮質の広い領域から入力を受け，大脳基底核内で情報処理を受けた後，一部，脳幹に投射するものの，大部分は視床を介して大脳皮質，とくに前頭葉に戻るというループ回路をなしている。大脳基底核内でどのような情報処理が行われているか不明であったし，今でも多くの謎があるが，それでも以下のような様々な研究から，徐々にではあるが着実に明らかになりつつある。

1) 主に霊長類を用いた研究から，大脳基底核は，適切な運動あるいは動作様式を選択，実行するのに関わっている。
2) また，工学的な手法によって解析したところ，大脳基底核の神経活動や神経回路は適切な行動の自立的な選択・学習に適している。
3) 霊長類の基底核回路を解剖学的に解析することにより，大脳基底核が運動機能ばかりでなく，認知機能や情

動にも関わる事が明らかとなってきた。

4) 遺伝子改変動物(げっ歯類)を用いることにより、大脳基底核に発現している受容体や神経伝達物質と機能との関係が、個体レベルで調べられるようになった。

5) ヒトの大脳基底核疾患や、様々な大脳基底核疾患モデル動物の解析により、このような疾患の病態およびその基礎となる基底核の生理が明らかになりつつある。

6) 脳深部刺激療法(DBS)や遺伝子治療など、大脳基底核疾患の新たな治療法も開発されてきた。

このように、大脳基底核は、運動皮質とはもちろんのこと、連合皮質や辺縁系領域などと解剖学的にも機能的

にも密接に連絡し、運動制御、認知、情動など、ヒトおよび動物の行動のさまざまな側面に重要な役割を果たしていることがわかってきた。しかし、脳の各領域の研究は個別になされており、基底核および関連する多くの脳領域の研究を横断的かつ統合的に捉え、相互理解を深める機会が少ない。そこで、本研究会では大脳基底核、連合皮質、辺縁系、さらにはその周辺の研究について、多岐にわたる専門分野の若手あるいは中堅の研究者が、最新の知見を紹介し、各分野における研究の趨勢、問題点、及び今後の展開に関して活発に意見を交換した。

(1) 中脳ドーパミン細胞の投射様式

Axonal arborization of midbrain dopamine neurons: a single-cell morphological study with viral vectors

松田和郎 (滋賀医科大学)

中脳ドーパミン系は、パーキンソン症候群・統合失調症などの疾患あるいは報酬行動・強化学習などに関与するとされる広域投射型モノアミン神経系の一つである。例えば、従来回復が極めて困難であるとされていた外傷後植物症患者の中に中脳ドーパミン神経系の選択的損傷が原因でパーキンソン症候群を呈するサブタイプがあり、ドーパミンの前駆体であるL-ドーパを投与することによって劇的な回復を示す患者群が潜在していることが報告されている(Matsuda et al., 2003; 2005)。中脳ドーパミン神経系は黒質線条体系と中脳皮質辺縁系に大別され、過去の古典的なトレーサー実験によってその大まかな投射経路は判明しているが、単一神経細胞の解像度における定量的・回路的な次元での解明はなされていない。

本研究では、先行研究によって開発されたパルミトイル化膜移行シグナルを結合した緑色蛍光タンパク質(GFP)をコードする遺伝子組換えウイルスベクターをトレーサーとして用いて、細胞体・樹状突起および軸索を完全に可視化することによってドーパミン神経系の投射様式の定量的解析を単一細胞レベルで行った。

中脳黒質線条体路(A9)において単一ドーパミン神経の全軸索を再構成したところ、ドーパミン軸索は線条体

以外にほとんど投射せず、線条体のみに広範囲にかつ非常に高密度に分布していることがわかった。定量的には、1個の中脳黒質ドーパミン細胞は138,000~780,000 μ m(平均466,000 μ m)の軸索を線条体に投射し、一侧の線条体容積の0.45-5.7%の細胞(平均2.7%;細胞数にして75,000個)にシグナルを伝達することが見出された。反対に線条体細胞の側からみると、1個の線条体細胞は95~194個の異なるドーパミン細胞のシグナルを受け取ることになった。したがって、従来の古典的トレーサー実験に基づいた報告と比較して本実験では10倍以上もの軸索を可視化しており、従来の研究がドーパミン神経の軸索分布を大きく過小評価していたことが明らかになった。さらに μ オピオイド受容体との二重染色により、多少のpreferenceはあるものの、単一ドーパミン細胞の軸索はstriosomeとmatrixの両方に分布していて、単一ドーパミン信号がこの2つの線条体コンパートメントに同時に送られることも明らかにされた(Matsuda et al., 2009)。

本研究会では、さらに中脳皮質辺縁系(A10)の知見についても紹介し、あわせて本ウイルスベクターのもつ神経回路解析ツールとしての意義と可能性についても議論した。

(2) 脚橋被蓋核における報酬価値とタイミングの表現

岡田研一（大阪大学大学院生命機能研究科）

中脳の黒質緻密部や腹側被蓋野のドーパミン細胞 (DAcell) は、学習された報酬の手がかり刺激や不意に与えられた報酬に対してバースト応答をすることによって大脳基底核などに報酬予測誤差信号を送り、シナプス可塑性を制御することで強化学習における教師信号の役割を果たしていると考えられている。DAcell においてどのように報酬予測誤差が計算されるかということは学習計算アルゴリズムを含めた強化学習機構を解明する上で重要な問題の一つである。我々は DAcell に強力な興奮性入力を提供している脚橋被蓋核 (Pedunculopontine tegmental nucleus, PPTN) に着目して、覚醒状態のサル PPTN ニューロンから記録を行い、報酬予測、報酬予測誤差に対する PPTN のニューロン活動の寄与を調べた。

これまでの実験により、手がかり刺激 (FT) の形によって報酬量 (RD) が予測できるような報酬予測サッカード課題において、(1) 予測報酬量に対応して活動の大きさが変わる、手がかり刺激提示から始まり報酬後まで続く持続的応答 (FT neuron) と、(2) 実際に与えられた報酬量に対応して活動の大きさが変わる、報酬後の短期的な反応 (RD neuron) が、PPTN の独立したニューロン群から得られた。すなわち、報酬予測誤差の計算に必要な報酬予測、

実報酬信号が PPTN で表現されていることが明らかになった。

さらにこれらのニューロンは、手がかり刺激提示や報酬の与えられるタイミングに対して予測的な活動を示した。ほとんどの FT neuron は手がかり刺激提示前からゆるやかな活動の上昇を示し、その活動の大きさはサルの予測的な眼球運動と相関した。いっぽう RD neuron は、実際に報酬が与えられる前からゆるやかな活動の上昇を示したが、その活動の大きさは予測される報酬量にかかわらず一定だった。さらに FT neuron で持続活動の終わるタイミングは、報酬が得られると予測した時間ではなく、実際に報酬が与えられた時間と一致していた。また、報酬が与えられた後もサルが fixation を続けるような課題を行うと、(1) 課題条件にかかわらず実際に報酬が与えられた後に持続活動が終わる、(2) 報酬が与えられた後も課題の終了まで活動が持続する、ニューロン群が見られた。

これらの結果より、学習に必要と思われる報酬価値の情報だけでなく、課題の遂行に必要と思われるタイミング予測や実際のイベント時間の情報が PPTN で表現されていることが明らかになった。

(3) 動機づけ学習と線条体

小山 佳, 筒井健一郎（東北大学大学院生命科学研究所脳情報処理分野）

中脳ドーパミンニューロンは、報酬予測誤差情報を表現しており、動機づけ学習において重要な役割を担っていることが示唆されている (Schultz and Dickinson, 2000)。近年、この報酬予測誤差の情報が、脳のどこで、どのように計算されているかが注目されており、ドーパミンニューロンに出力を送っている外側手綱核や脚橋被蓋核、外側手綱核に出力を送っている淡蒼球内節などの領域が報酬予測誤差情報に関連した情報を表現していることが新たに報告されている。しかし、ドーパミンニューロンと直接・間接的に密な繊維連絡のある線条体が、報酬予測誤差情報の生成にかかわっているのかは未だ不明な点が多い。本研究

の目的は、線条体において、報酬予測誤差や、それに関連すると考えられる刺激の価値や報酬への期待などの情報がどのように表現されているかを調べることである。

パブロフ型の確率学習課題をラットに訓練し、頭部を固定した状態で線条体からの単一ニューロン活動の記録を行った。課題では、条件刺激として純音を 1.5 秒間提示し、0.5 秒間の遅延期間の後、条件刺激によって示された報酬確率にしたがって報酬 (スクロース水) を与えた。条件刺激の純音には 5 種類を用い、それぞれを 0 % から 100 % までの異なる報酬確率と関連付けた。この課題を十分に訓練した後、線条体から単一ニューロン活動の記録を行った。

記録したニューロンの活動様式を分析するために、まず、刺激に反応したニューロンを、その反応のピークの潜時によって3つのサブタイプに分類した。条件刺激が呈示されてからの0.5秒間、条件刺激が呈示されてから0.5秒後から1.5秒後までの1秒間、遅延期間の0.5秒間のそれぞれの期間において反応のピークを示したニューロンを、それぞれ、タイプI、タイプII、タイプIIIニューロンと分類した。タイプIニューロンの多くは、報酬に対しても同様の一過性の反応を示した。タイプIニューロンの刺激への反応と報酬への反応の多くは、それぞれ、報酬確率に正の相関、負の相関を示していた。この反応様式は、ドーパミンニューロンのものと非常に類似しており、これらのニューロンが報酬予測誤差情報を表現していることが示唆された。タイプII、IIIのニューロンは、いずれも、持続的な発火を示し、その活動は報酬確率に正の相関を示していた。また、報酬には反応を示さなかった。タイプII、IIIのニューロンがどのような課題事象に関係しているのか

を明確にするために、条件刺激の呈示終了から報酬が与えられるまでの遅延期間を延長させて記録を行ったところ、タイプIIニューロンは、遅延期間の違いにかかわらず、条件刺激に対して同じ潜時で反応し、呈示後は自発発火頻度に戻るものが多かった。一方、タイプIIIニューロンは、遅延期間を延長すると、活動のピークが新たな報酬供与のタイミング付近へと移っていく傾向が見られた。これらのことから、タイプIIニューロンは刺激の価値を、タイプIIIニューロンは報酬への期待をそれぞれ表現していることが示唆された。

以上のように、この研究によって、線条体においては、報酬予測誤差や、それに関連すると考えられる刺激の価値や報酬への期待などの情報が表現されていることが明らかになった。これらの結果は、線条体が報酬予測誤差情報の生成や動機付け学習の過程において、重要な役割を果たしている可能性を示唆している。

(4) 対象の選択と運動の選択時における線条体の価値表現

鮫島和行 (玉川大学脳科学研究所)

不確実で変動する環境において適切な意思決定を行い、食物などの報酬を得る行動を行うことは、環境内で生き残るために不可欠な脳機能の1つである未知の環境において報酬を最大化する行動選択を学習する問題は、強化学習としてモデル化されている。モデルは行動の予測のみでなく線条体の神経活動と行動選択肢の報酬予測など、モデルから予測される変数との神経相関が見いだされている (Samejima et al 2005)。

意思決定場面において、行動後に得られる報酬を予測することは、より多くの報酬が見込める行動の選択を可能にし、予測報酬と現実の誤差によって行動を強化するために重要である。しかし、ここでいう行動とは何であろうか？ もっとも単純には、1つの動作を行動として強化することも可能であるし、特定の刺激入力を条件として動作を行う1つの刺激-運動変換を1つの行動として評価することも可能である。一方線条体は、運動関連領域のみならず、前頭前野など認知的操作などに関わる高次領域からも投射をうけ、複数の並列ループを形成している。大脳基底核は特定の動作のみならず、刺激に依

存した対象刺激-運動変換から1つを選択する場面(対象の選択)と学習に関わるであろうか？

この疑問に答えるために2頭のサルに複数刺激のうちその1つに反応することによって報酬を得る課題を訓練し、複数刺激を提示したときの線条体の神経活動を記録した。サルに2つの刺激属性(色4種・形4種)を持つ16種類の視覚刺激から、異なる色/形を持つ2刺激をランダムに提示する(選択刺激)。一定遅延期間の後、この2刺激を順次提示し(ターゲット刺激)、サルは提示されている時間に行動反応・抑制を行うことで、選択を行う。4段階の報酬量を一方の刺激属性(色または形)のみに依存して与え、これを1ブロック(144試行)間固定として学習する。サルの学習行動を解析したところ、4段階の報酬に応じて色または形に応じた刺激-運動変換に対する学習が行えることがわかった。さらに、選択刺激提示時に、選択する対象の報酬予測が表現される線条体投射細胞を見いだした。このことは、線条体が特定の動作を行動とした選択のみならず、刺激-運動変換を行動単位とした選択と強化学習に関与していることを示唆する。

(5) ソングバード大脳基底核のさえずり行動中および睡眠中の神経活動

柳原 真（理化学研究所）

ソングバード (Songbird) と称される鳴禽類の小鳥は、臨界期にさえずりを学習する。まず、感覚学習期において、幼鳥は親鳥がさえずる定型的な歌を聴き憶える。次に、運動学習期において、幼鳥は自らさえずり行動を開始し、聴覚フィードバックを用い自己のさえずる非定型的な歌を聞き憶えた歌にマッチングさせていく。最終的には、幼鳥は親鳥から学んだ歌と同じ定型的な歌をさえずるようになる。このソングバードの脳内には、さえずり行動を制御するために特化した神経回路 (Song system) が存在する。なかでも、線条体や淡蒼球の細胞群に相当するニューロン群から構成される AreaX と称される領域が、さえずりの学習に必須であることが既に脳の破壊実験の結果から明らかにされている。しかしながら、この領域の細胞が実際にさえずり学習をおこなっている際にどのような神経活動を示すのかこれまで不明であっ

た。

本研究では、大脳基底核 AreaX が小鳥のさえずり学習に果たす機能的役割を明らかにすることを目指し、行動中の幼鳥の大脳基底核 AreaX から単一ニューロン活動の記録をおこない、さえずり行動中、さえずり以外の行動中、睡眠中の神経活動をそれぞれ解析した。その結果、1) Area X の細胞はさえずり行動直前からさえずり行動終了にかけて活動を上昇させること、2) これらのニューロンは自己の歌や親鳥の歌に対して聴覚応答を示さないこと、3) さらに、これらのニューロンは睡眠中においてしばしば一過的な発火頻度の上昇を示すこと、などが明らかになった。以上の結果から、ソングバードの大脳基底核 AreaX は、発声という運動に関連した神経活動と睡眠中における神経活動を通してさえずり学習に重要な役割を担っていると考えられる。

(6) 尾状核における神経活動の数的表現

二ノ倉欣久（弘前大院医学部統合機能生理）

数的情報にもとづく合目的行動は様々な動物種において観察されるが、その行動を支える神経基盤がどこでどのように実現しているかについては明らかではない。行動の企画過程における神経細胞活動による数的表現を調べる目的で試行ブロックごとに異なる標的数の連続到達運動が要求されたときのサル脳の広汎な領域から神経活動が記録された。大脳皮質の広汎な領域から情報を集約する尾状核のユニット活動を解析したところ特定の標

的数の提示に選択的に反応する一群の細胞活動が見いだされた。このとき、複数標的が視覚的に提示された場合のみならず記憶情報に依拠した試行ブロック、すなわち標的数情報が明示的に視覚提示されない条件下においても数的情報を反映する選択的活動が認められた。このことは多彩な行動レパートリに内蔵された要素的動作が大脳皮質線状体において数的に表現されうることを示唆している。

(7) 大脳基底核と運動前野をつなぐネットワーク

星 英司（玉川大学脳科学研究所）

大脳基底核は前頭連合野や一次運動野をはじめとする前頭葉と密接に情報のやり取りをしていることが解剖学的研究によって明らかになってきている。また、パーキ

ンソン病などの大脳基底核を中心とする疾患は、高次脳機能から運動機能にいたるまで広汎な脳機能を障害する。こうした知見は、大脳基底核と前頭葉の間の幅広い

機能連関が正常な脳機能の発現において極めて重要な役割を果たしていること、そして、機能連関の破綻が多様な病態の発現につながることを示唆している。しかし、この機能連関については急速に理解が進んでいるが、その神経メカニズムには依然として未知の部分が残されている。

そこで、我々は生理学的研究と解剖学的研究を融合することによって、この問題に取り組むことにした。生理学的研究では、認知情報を動作制御情報に変換し、それに基づいて実際の動作を実行する課題を考案した。この課題を遂行しているニホンザルの前頭葉より細胞活動を記録したところ、運動前野がこれらの過程で中心的な役割を果たしていることが明らかとなった。同時に、運動前野内の前後方向に機能分化が見いだされた。具体的には、1) 動作制御情報は前方部で強く表現されていること、2) 実際の動作に関する情報は後方部で強く表現され

ていること、が明らかとなった。続いて行われた解剖学的研究では、こうして見出された機能分化が大腦基底核と形成されるネットワーク構造とどういった関係にあるのかを解析した。大腦基底核からの出力は視床を介して運動前野に接続しているので、経シナプス性に逆行性に伝搬する性質のある狂犬病ウイルスをトレーサーとして用いた。運動前野に注入された狂犬病ウイルスは逆行性に視床に運ばれ、そこでシナプスを介して大腦基底核の出力部位である淡蒼球内節や黒質網様部に運ばれた。ラベルされた大腦基底核細胞の部位を解析した結果、運動前野の前方部と後方部は、大腦基底核の異なる部位から主要な入力を受けていることが明らかとなった。

以上の結果は、動作制御情報の生成と、それに基づく実際の動作の実行過程において、運動前野は大腦基底核から複数の情報を受けていることを示唆している。

(8) 側頭および頭頂連合野から外側前頭前野への多シナプス性入力様式

平田快洋 (京都大学霊長類研究所)

外側前頭前野は、感覚・記憶などの様々な情報を統合および選択し、運動関連領域に出力を送る戦略的な位置にある。このような脳部位の多シナプス性神経回路の全体像を明らかにすることは、多様な認知機能の神経基盤を統合的に理解する為にきわめて重要である。そこで我々は、神経細胞特異的に感染し、シナプスを介して逆行性に感染が進行する狂犬病ウイルストレーサーをサル外側前頭前皮質の背側部 (9, 46d 野) および腹側部 (46v, 12 野) に各々注入し、記憶情報および視覚情報処理に関わる側頭および頭頂連合野から前頭前野への入力に関わる神経連絡の解析を試みた。まず、外側前頭前皮質 (9, 46d, 46v, 12 野) にウイルスを注入した。注入の 3 日後には、注入部位に直接投射する 1 次ニューロンだけでなくシナプスを越えて 2 次ニューロンが側頭連合野や頭頂連合野で標識された。標識された 2 次ニューロンの分布

には、以下のような傾向があった。1) 9 野, 46d 野への注入では、側頭連合野の内側に位置する傍海馬領域、頭頂葉の内側面 (7m 野) および、頭頂間溝外側壁の尾側部 (LIP 野) に標識ニューロンが分布していた。2) 46v 野への注入では、側頭連合野の外側に位置する TE 野、および、頭頂間溝外側壁の吻側部 (AIP 野を含む) に標識ニューロンが分布していた。3) 12 野への注入では、側頭連合野においては直接投射の強い TE 野を除くと標識細胞は非常に少なく、一方で頭頂連合野では、46v 野への注入と同様に頭頂間溝外側壁の吻側部 (AIP 野を含む) に標識ニューロンが分布していた。以上の結果は、外側前頭前野はその背側部、腹側部で別個に、側頭および頭頂連合野からそれぞれ 2 つのストリームで経シナプス的な入力を受けている事を示唆する。

(9) 生体内線維連絡イメージングの下側頭葉顔認知システムへの適用

一戸紀孝 (弘前大学医学研究科神経解剖・細胞組織学講座)

サル下側頭葉皮質は、顔を含む物体認知に関わる腹側視覚経路の最終段階にあり、前部にあたる TE 野と後部にあり TEO 野より下位に属する TEO 野に分かれる。今回我々は、最近我々が開発した蛍光トレーサーコレラトキシン-Alexa 555 注入による生体内線維結合イメージングを用いて、TE 野の顔に強く反応するスポットに投射する小領域を TEO 野内に生体内で同定し、このスポットの顔を含む視覚刺激に対する反応性を調べた。また、この TEO 野の投射スポットに抑制性神経伝達物質 GABA アゴニスト・ムシモルを注入し、その投射部位である TE 野のスポットの視覚刺激反応性を調べた。

TEO 野の投射スポットの視覚反応性は、ランダムに選んだ TEO 野のスポットに比べて、トレーサー注入部位である TE 野のスポットの視覚反応性より高い相関を示した。また、TEO 野の投射スポットへムシモルを注入することにより、TE 野の視覚反応性が大きく変わることを観察した。この大きな変動は、トレーサー注入部位ではない TE 野の記録では起こらず、また、TEO 野内の任意の部位へのムシモル注入では、起こらないことを確認し

た。上記の結果は、TEO 野から TE 野への投射が強い影響力を持っている事を示唆している。

TE 野とそれに投射する TEO 野のスポットは高い相関を示していたものの、TE 野のスポットは、顔の構成パーツ（目、鼻、口）をシャッフルしたもの（シャッフル顔）よりも顔に対して有意に強く反応していた。しかし、この傾向は、この部位に投射する TEO 野のスポットにはなかった。また、TE 野と投射 TEO 野スポットは、顔と食べ物を見せた時には高い相関を示したが、シャッフル顔と食べ物を見せた時には、相関が低下する傾向を見せた。これらの結果と、報告されている TEO 野の小さな受容野あわせて考えると、TEO 野は顔の部分の情報を TE 野に送っているという考えを支持すると思われた。事実、TEO 野において、reduction process を用いて critical feature を決めると、サルの髪の毛の texture や、目と思われる feature である例が観察された。これらの結果に基づき、本研究会の発表では、TE 野の顔反応性への TEO 野の寄与について考察した。

9. 感覚刺激・薬物による快・不快情動生成機構とその破綻

2009年10月1日－10月2日

代表・世話人：南 雅文（北海道大学薬学研究院薬理学研究室）

所内対応者：重本隆一（大脳皮質機能研究系脳形態解析研究部門）

（1）動物に『快』はあるか？

廣中直行（ERATO 下條潜在脳プロジェクト）

（2）嗅覚入力による快・不快情動生成と他感覚入力への影響

小早川高（大阪バイオサイエンス研究所神経機能学部門）

（3）過食という問題行動の脳基盤：脳内報酬系と味覚情報処理系の機能

八十島安伸（大阪大学人間科学研究科行動生理学研究分野）

（4）内臓刺激による不快感・痛みのメカニズム

尾崎紀之（金沢大学医薬保健研究域医学系神経分布路形態・形成学分野）

（5）双極性障害の神経生物学～脳にとって気分とは何か

加藤忠史（理化学研究所脳科学総合研究センター・精神疾患動態研究チーム）

（6）ストレス脆弱性形成とその修復過程におよぼす養育環境の影響

森信 繁（広島大学医歯薬学総合研究科精神神経医科学）

（7）情動理解のための文化人類学的基礎

池田光穂（大阪大学コミュニケーションデザイン・センター）

（8）痛みによる不快情動生成における分界条床核の役割

南 雅文（北海道大学薬学研究院薬理学研究室）

（9）痛み感受性および鎮痛薬感受性における個人差の遺伝子メカニズム

池田和隆（東京都精神医学総合研究所分子精神医学研究チーム）

（10）価値表象を実現する前頭葉報酬系の機能的役割：神経美学からの視点

川畑秀明（慶応大学文学部人間関係学系心理学専攻）

（11）感情についての現代哲学の理論

河野哲也（立教大学文学部教育学科）

（12）感情制御の発達における破綻と回復

－嘔吐体験がトラウマとなった小学生事例の治療経過から－

大河原美以（東京学芸大学教育心理学講座）

【参加者名】

南 雅文（北海道大学大学院薬学研究院），八十島安伸（大阪大学大学院人間科学研究科），池田和隆（東京都精神医学総合研究所），加藤忠史（理化学研究所脳科学総合研究センター），廣中直行（科学技術振興機構 ERATO 下條潜在脳機能プロジェクト），田口良太（エーザイ（株）筑波研究所），伊早坂智子（国立精神神経センター），大河原美以（東京学芸大学），尾崎紀之（金沢大学），河野哲也（立教大学），池田光穂（大阪大学コミュニケーションデザイン・センター），高橋 弘（国立精神・神経センター），

古屋敷智之（京都大学医学研究科），斎藤顕宜（国立精神神経センター），川畑秀明（慶應義塾大学），高橋宏明（日本たばこ産業株式会社），小早川高（大阪バイオサイエンス研究所），笠井慎也（東京都精神医学総合研究所），森信 繁（広島大学大学院），木村光夫（ライオン株式会社），福土 審（東北大学大学院），杉田 誠（広島大学大学院），片寄洋子（東北大学大学院），加藤総夫（東京慈恵会医科大学），木村佳代（大阪大学），仙波恵美子（和歌山県立医科大学）

【概要】

セッション1では、先ず、廣中が、『動物に「快」はあるか?』という問いに対し、薬物弁別実験の結果を紹介するとともに、ラット海馬における律動脳波（シータ波）に着目した研究において、麻薬摂取に関連した文脈（環境）との関連から、探索行動における報酬の予期が律動脳波発生と関連しているとの実験結果を示した。次に、小早川は、背側の糸球を除去することにより腐敗物や天敵の匂いに対する先天的な忌避行動が消失することを示した昨年度の発表の研究をさらに推し進め、背側糸球除去マウスでは、種々の社会コミュニケーション行動に異常が見られることを報告した。八十島は、摂食に伴う快情動やその制御破綻としての摂食異常について、「むちゃ喰い障害 (binge eating disorder, BED)」のモデルマウス作成とその神経機構の解析について発表した。腹側被蓋野におけるグレリン関連シグナル亢進により誘導される摂食に対する甘味溶液の過剰摂取訓練の影響についての研究成果を報告した。尾崎が、ラット胃のバルーン伸展により内臓痛および不快情動が惹起されることを行動学的解析と筋電図測定により示した。さらに、この動物モデルを用いて、実験的胃潰瘍・胃炎が痛覚を亢進すること、胃潰瘍に伴う痛覚亢進には神経成長因子が関与しているとの研究成果を紹介した。

セッション2では、先ず、加藤が、『ストレスなどの環境変化に伴うドーパミン神経活動変化に際し、これを安定化させる役割を有する神経系、すなわち「気分安定神経系」が存在し、この神経系の進行性機能障害あるいは変性が双極性障害を引き起こす」という「気分安定神経系仮説」を提唱し、神経細胞特的に変異ミトコンドリアDNA 合成酵素を発現するトランスジェニックマウスが双極性障害様の行動変化を示すことを報告した。次に、森信は、母子分離ストレスラットや産褥期うつ病モデルラットに養育された仔ラットが学習性無力を示す、すなわち、うつ病感受性が亢進すること、そのような仔ラットを「豊かな飼育環境 (Environmental Enrichment)」で飼育すると、うつ病感受性亢進が緩和されることを報告し、幼少期の不遇な養育環境後に、養育支援による豊かな環境を提供することによって、うつ病発症感受性の亢進が修復される可能性を示した。続いて、池田^光が、「情動理解のための文化人類学的基礎」とのタイトルで講演を行った。「首狩り」を行う種族における「首狩りと情動」の話を引き合いに出し、神経生理学あるいは脳科学では、

情動モデルの普遍化・一般化に向かうが、文化人類学は、逆にその多様性ならびに「とんでもない情動経験」のパターンを異文化のなかにみてその多様化の原因をさぐるうとするものであるとの話は新鮮であった。

セッション3では、先ず、南が、痛みによる不快情動生成に分界条床核内 CRF 神経情報伝達が関与しており、CRF 受容体の下流に存在するプロテインキナーゼAの活性化が重要であることを報告した。さらに、分界条床核でのグルタミン酸情報伝達も痛みによる不快情動生成に関与していることを示すと同時に、結合腕傍核より分界条床核にグルタミン酸神経投射があることを示し、本グルタミン酸神経系が痛みによる不快情動生成に重要な役割を果たしている可能性について言及した。次に、池田^和は、ヒトにおける痛覚感受性や鎮痛薬感受性と遺伝子多型との関連について、麻薬性鎮痛薬の受容体であるμオピオイド受容体やGタンパク質制御性内向き整流性カリウム (GIRK) チャンネルの遺伝子多型が、痛覚感受性や鎮痛薬感受性の個人差に関与することを報告した。さらに、従来の個別遺伝子多型解析手法に加え、現在進行中の網羅的遺伝子多型解析研究の途中経過についても紹介し、網羅的遺伝子多型解析の可能性について言及した。このようなヒトゲノム解析研究手法は、情動研究においても重要な役割を果たすことが期待される。続いて、川畑は、神経科学、神経生理学の視点から美や芸術にアプローチする神経美学 (neuroesthetics) の立場から、fMRI によって絵画の美しさの評価中の脳活動を検討した研究をもとに、美の絶対的評価と相対的評価、判断と表彰を切り分け、それらが眼窩前頭皮質から前部帯状回の異なる部位の活動が基礎となっていることを紹介した。河野は、哲学の立場から、感情（あるいは情動）は自然種（自然の中に本来的に分類のための切れ目がすでに入っている種類。例：水素と炭素）ではなく、人工種（人間がある領域に規約的に切れ目を入れているもの。例：成人と未成年）であるため、そもそも感情が何であるかは規約的に社会によって定まること、感情を理性や知性と対比させる図式は誤りで、感情は認知的内容によって種類分けされていること、感情は社会と関連していて、個人の態度である感情は社会的に評価を受けることについて論じた。最後に、大河原は、子どもの心理治療を専門とする臨床心理士の立場から、子どもの様々な心理的問題の根底に「感情制御の発達不全」があり、ネガティブ感情（負

情動) 制御の困難が、暴力や攻撃性、不安の身体化としての心身症、不登校、自殺企図などを生じさせることを指摘し、「感情制御の発達不全」がネガティブ感情に対する脆弱性として顕在化した事例の心理治療のプロセスの紹介を通して、大人から情動を否定される経験が、子どもの心理的健康の破綻を生み出すマクロのプロセスについて論じた。

本研究会は、「感覚刺激・薬物による快・不快情動生成機構とその破綻」をテーマとし、平成20年11月に行われた第1回目の研究会では、特に、情動の神経機構およびその破綻である精神疾患・情動障害について、情動の神経機構を研究する生理、薬理、分子生物などの基礎研究者とうつ病や不安障害、薬物依存を研究する臨床研究者との討論の場とすべく講演者の人選を行い、興味深い発表と活発な討論が行われた。第2回目である本研究会では、情動研究が発展していくためには、文理融合型の新しい学術領域の創成が必要ではないかとの考えのもと、基礎生物研究者と臨床医学研究者に加え、哲学、文化人類学、実験心理学、臨床教育学の研究者にも講演を依頼し、生物系研究者と人文社会系研究者との討論の場

を構築することを試みた。本研究会は、『従来は、異なった学会、あるいは、異なったセッションやシンポジウムで研究成果発表や討論が行われてきたものを、「快・不快情動」をキーワードとして一堂に集め、密度の濃い研究成果発表と討論を行うことにより、本邦における情動研究のレベルを一気に高め、我が国のこの分野での国際貢献に資することを目的とする。』という研究会の目的に十分合致したものであった。突っ込んだ討論を行うため、1演者あたりの持ち時間を40分としたが、それでも討論の時間が不足していたことが残念であった。平成20年度の第1回および本研究会では、ラット・マウスなどの齧歯類を用いた生物学の基礎的研究と、ヒトでの臨床医学的研究および人文社会学的研究の講演であった。今後、線虫やショウジョウバエ、ゼブラフィッシュなどの非哺乳類を用いた研究や齧歯類・ヒト以外の哺乳類を用いた研究を進めている研究者にも講演を依頼し、「情動とはそもそも何であるのか」という情動の起源について討論することを目指した研究会を開催し、本邦における情動研究のレベルアップに貢献したい。

(1) 動物に「快」はあるか？

廣中直行 (ERATO 下條潜在脳プロジェクト)

快と不快は情動を構成する最も基本的な次元の一つである。味覚刺激に対する反応を調べると、生後まもないヒトの新生児にも快と不快の表出が認められる。快と不快を表出する神経機構は生得的にヒトに備わっていると考えられる。このような神経機構は進化の産物であり、ヒトと動物の情動表出に基本的な連続性があることも、Darwin 以来ひろく認められている。

にもかかわらず、ヒト以外の動物に「快」情動が存在するかどうかは、まだわかってないと言った方が良い。これは、動物の行動に関する擬人的な説明を避けるという研究者の慎重な態度が一因であろう。しかしその他にも、恐怖や攻撃に比べて「快」を想定できる行動表出の種類が少ないこと、快情動に関与する脳内の責任部位が特定できないことなど、いくつかの理由がある。適切な動物モデルが存在しないことから、快情動の生物学的研究は困難ではあるが、意思決定における情動の役割への

注目、精神疾患におけるアンヘドニアの問題への対処など、基礎・臨床両面にわたって快情動を研究する重要性が認識されるようになっていく。

動物の「快」情動の研究において、脳内のいわゆる「報酬系」、すなわち中脳一辺縁系のドパミン神経が主軸になってきたことはまず間違いない。またその研究法として、麻薬や覚醒剤などの依存性薬物が一定の役割を果たしてきたことも確かである。だが、依存性薬物が報酬系に作用するとして、そのとき動物は「快」を感じているのだろうか？ それをどのような方法で調べることができるのだろうか？ ここでまず、我々が実施してきた「薬物弁別」の実験を紹介し、ニコチンやコカインの効果をラットやサルがどのように自覚したと考えられるかを検討する。生体内の感覚に基づく弁別行動は、現在のところ、動物の「内的」な状態を評価する代表的な方法と言える。次に、麻薬摂取に関連した報酬の予期と探索とい

う側面から、我々がラットの海馬で見出した律動脳波（シータ波）の知見を紹介し、感覚入力から情動価の評価、意思決定を経て運動出力に至るまでの神経活動をネットワークとしてとらえる観点について述べる。情報がネットワークの中をめぐるうちに情動価が生じるという考えは Papez 以来いくつか提唱されているが、現在でもその基本構想は妥当であるように思われる。

動物の行動レベルでは、ある刺激に対する応答的な反応と、その刺激に対する接近・摂取という能動的な反応の両面から「快」に関連する神経活動や生化学的な変化

を把握することはできるだろう。しかしながら、どの時点で生じるどのような反応が「快」なのかを特定することはほぼ不可能に近く、動物で想定される「快」とは、我々が日常的に考える「快」との間には乖離がある。だが、それを逆に言えば、実は我々は自分自身の「快」について、あまりよくわかっていないということなのかも知れない。もしそうであるならば、動物の行動や神経回路・生化学的なメカニズムを研究することによって、人間の「快」に関する新たな洞察を得ることもできるだろう。

(2) 嗅覚入力による快・不快情動生成と他感覚入力への影響

小早川高（大阪バイオサイエンス研究所神経機能学部門）

匂い分子は鼻腔の嗅上皮に局在する嗅細胞によって感知され、その情報は脳の嗅球へと伝達される。嗅上皮にはゾーン構造、嗅球にはドメイン構造と呼ばれるそれぞれ空間的に定義される領域分けが存在している。しかし、これらの領域が匂い認識に対して果たす固有の役割は解明されていなかった。嗅上皮の背側ゾーンまたは腹側ゾーンに特異的に発現する遺伝子プロモーターを用いて Cre 組み換え酵素を発現するノックインマウスと、Cre 組み換え酵素が存在する条件下で神経細胞特異的にジフテリア毒素 A 断片遺伝子を発現するノックインマウスとを掛け合わせる方法で、背側ゾーンまたは腹側ゾーンの嗅細胞が特異的に除去されたミュータントマウス（神経回路の改変マウス）を作り出した。

背側ゾーンの嗅細胞を除去した神経回路の改変マウス（背側除去マウス）では、腹側ゾーンの嗅細胞が除去されずに残されているので、腐敗物の由来の匂い分子や、天敵から分泌される匂い分子を感知することができ、これらの匂い分子の微妙な化学構造の違いを区別して関連学習することもできた。ところが、背側除去マウスは野生型マウスと異なり、腐敗物や天敵に由来する匂い分子に対する先天的な忌避行動を全く示さなかった。一方、背側除去マウスであっても、嫌悪学習を行った場合には匂いに対する忌避行動を示した。これに対して、腹側の嗅細胞を除去した神経回路の改変マウス（腹側除去マウス）は、腐敗物の匂いに対する先天的な忌避行動を示し

た。これらの結果から、マウスの匂いに対する忌避行動は背側の嗅細胞によって先天的に制御されていることが初めて明らかになった。

匂い分子に対する応答を解析した結果、嗅球の背側ドメインの糸球は腐敗臭や天敵臭などの忌避性の匂い分子のみではなく、マウスの社会コミュニケーション反応に関わることが知られている匂い分子によっても活性化されることが明らかになった。また、背側除去マウスにおいては様々な種類の社会コミュニケーション行動に異常が認められた。例えば、オスの背側除去マウスは縄張りに入侵したオスマウスに対して、野生型マウスのように攻撃行動を示さずに性行動を示した。背側除去マウスであっても性分化は正常であったし、尿の匂いを基に雄と雌とを区別することも可能であった。これらの結果から、背側の嗅細胞によって性行動や攻撃行動に影響を与える情動が先天的に制御されていると考えられた。

背側除去マウスにおいてはジフテリア毒素遺伝子の発現が胎生期から開始する。従って、背側除去マウスは背側の嗅細胞に由来する様々な種類の情動の入力を失ったという特殊な状況で生育すると考えられる。このような環境下で生育した個体に対して不快刺激を与えた際の脳内のストレス経路の活性化や行動に与える影響を報告する。嗅覚による快・不快の情動の入力が他の感覚入力による情動の生成にも影響を与える可能性を議論する。

(3) 過食という問題行動の脳基盤：脳内報酬系と味覚情報処理系の機能

八十島安伸（大阪大学人間科学研究科行動生理学研究分野）

何をどのくらい食べるのかという問題は、動物やヒトでは生命維持のための根本問題であり、その対処のためにさまざまな脳機能が用いられている。摂食は生得的行動ではあるが、その一方で、何を食えることができるのか（できないのか）ということは学習によって獲得していくことが多い。摂食では、快・不快という情動も喚起され、摂食に関連した情動記憶も形成される。また、摂食には恒常性を維持するための摂食と、嗜好性に基づく摂食がある。後者は、心理学でいうところの情動性摂食とも重なる点が多い。このように、摂食行動は学習、情動、そして動機づけに関連する脳機能が複雑に関わる行動である。近年の傾向として、ストレスや心理的負担に起因した摂食異常や嗜好性食物の食べ過ぎが多くの人で見られ、結果として、食の快に溺れてしまったり、過食をしたりする場合がある。つまり、摂食には、生命維持のための生理的機能がある反面、食べ過ぎや摂食依存というリスクともなり得る一面もある。我々は、摂食に伴う快情動やその情動記憶の制御破綻としての摂食異常の生物学的背景の解明を目指している。自己制御不能な強い摂食衝動による過食、すなわち、短時間で大量の摂食

をし、かつ、嘔吐や排泄などの不適切な代償行動を伴わない過食を「むちゃ喰い障害(binge eating disorder, BED)」と呼ぶ。BED では生理学的な摂食調節が機能不全に陥り、また、アイスクリーム、ケーキやポテトチップスなどの高カロリーでおいしい食物を大量摂取する。そのため、BED 様過剰摂取行動は、嗜好性に基づく摂食が異常亢進することで生じると考えられる。BED 様過剰摂取行動の背景にある脳基盤を研究するために、動物モデルの作製が必要である。そこで、我々は、マウスを用いて、制限呈示手続きと呼ばれる方法を応用し、甘味溶液をターゲットとする選択的過剰摂取行動の行動モデルを作製中である。この甘味溶液の過剰摂取行動の脳基盤において、脳内報酬系の機能的変化を調べ始めた。特に、腹側被蓋野の機能的変化の物質基盤として、グレリン関連シグナルに着目し、その役割を検討するために、腹側被蓋野へのグレリン注入によって誘導される摂食が甘味溶液の過剰摂取訓練後に影響を受けるかどうかを検討しつつある。また、甘味溶液の過剰摂取行動の形成や維持において、大脳皮質味覚野での高次な味覚情報処理が必要であるのかどうかを調べ始めたので報告したい。

(4) 内臓刺激による不快感・痛みのメカニズム

尾崎紀之（金沢大学医薬保健研究域医学系神経分布路形態・形成学分野）

内臓の痛みは、さまざまな疾患に伴って起こり、患者が医療機関を受診する大きな理由で臨床的に重要であるが、そのメカニズムには不明な点が多い。近年、機能性胃腸症、過敏性腸症候群、間質性膀胱炎など、機能性の痛みを伴う疾患が注目を集めるにつれて、内臓の痛みの研究は急速に増加している。その結果、内臓の痛みは、そのメカニズムが体性痛とはさまざまな点で異なっていることが明らかにされてきた。消化管に代表される内臓痛には、1. 局在性がない、2. 関連痛を伴うことがある、3. 痛みを引き起こす適刺激が皮膚の痛み受容器とは異なり、必ずしも組織損傷を伴わない、などに加え、4. 自律神経系反射や、情動の変化を伴いやすいことがわかつ

てきた。また内臓の痛みは、さまざまなストレスによって修飾されることが報告されている。動物実験においても、ストレスが腸の痛覚過敏を引き起こすことが報告され、機能性胃腸症のモデルとして提唱されている。

我々は、これまで、情動の変化を伴いやすい内臓痛のメカニズムを明らかにするため、動物を用いた胃の痛覚の評価方法を開発してきた。ラットの胃のバルーン伸展は動物に、痛みあるいは少なくとも不快感を引き起こすことを明らかにし、その程度は筋電図の測定で定量的に評価できることを示してきた。また、このモデルを用いて、実験的胃潰瘍や胃炎では胃の痛覚が亢進し、胃潰瘍、胃炎に伴う胃の痛みのメカニズムの解析に有用であるこ

とを示し、とくに、胃潰瘍に伴う胃の痛覚の亢進には神経成長因子が関与していることを明らかにしてきた。

研究会では、胃の痛覚の評価法、器質性の胃腸症である胃潰瘍や胃炎における痛覚過敏のメカニズムについて

て、私たちのこれまでのデータを紹介し、さらに私たちが最近行っている機能性胃腸症モデル開発の試みについて紹介したいと考えている。

(5) 双極性障害の神経生物学～脳にとって気分とは何か

加藤忠史（理化学研究所脳科学総合研究センター・精神疾患動態研究チーム）

双極性障害（躁うつ病）は、躁とうつという、両極端な病相 (episode) の再発を繰り返すことによって、社会生活の障害を来す疾患である。以前は感情障害と呼ばれていたが、感情の中でも、秒～分単位の事象である一次的情動とは異なり、週～月の単位で持続し、全ての感情の基底となる基本的情動である「気分 mood」の障害であることから、うつ病と共に「気分障害」に位置づけられた。古くから統合失調症と並んで二大精神疾患とされてきたが、その原因は未だ完全には解明されていない。

双極性障害の初発時にはストレスが契機となることも多いが、病相反復と共に病相間隔が短縮し、再発病相ではストレスの意義は小さくなる。年に4回以上の病相を伴う急速交代型になってしまうと、もはや気分安定薬は有効ではなくなってしまう。

遺伝学研究では、ANK3 および CACNA1C という、いずれも Ca^{2+} イオン輸送に関わる遺伝子との関連が報告されている。脳画像研究では、脳室拡大が一致した所見であるが、脳内の体積減少部位については一致した見解に至っていない。T2 強調 MRI では、皮質下高信号領域の増加が一致した所見である。血液細胞では、 Ca^{2+} 濃度の上昇が報告されている。また、気分安定薬であるリチウムおよびバルプロ酸は、いずれも神経保護作用を有する。

これらを総合して考えると、双極性障害は、神経細胞レベルでの細胞ストレスに対する脆弱性を伴う疾患と考えられる。我々は、その脆弱性の分子基盤として、ミト

コンドリア機能障害および小胞体ストレス反応障害に着目して研究を行っている。

双極性障害の特徴的な臨床経過と、生物学的研究の成果に基づき、我々は、「気分安定神経系仮説」を提唱した (Kato, *Trends in Neuroscience* 2008)。ストレスなどの環境変化に伴うドーパミン神経系の活性変化に際し、これを安定化させるような神経系、すなわち「気分安定神経系」が存在し、遺伝的要因に基づく細胞レベルのストレス脆弱性を有する者では、この神経系が進行性に機能障害あるいは変性に至るのではないかと、という仮説である。

我々は、神経細胞特異的に変異ミトコンドリア DNA (mtDNA) 合成酵素を発現するトランスジェニックマウスが、双極性障害様の周期的行動変化を示すことを報告したが、現在、この表現型に関わる脳病変を探索するため、変異 mtDNA 蓄積部位を検索中である。

このマウスは、明暗 (12:12h) 条件で、明期初期に行動量が多い特徴を示すが、暗期の光照射で行動量が抑制される、「光マスキング効果」の異常も示した (Kasahara ら、未発表データ) ことから、光マスキング効果に関わる神経系がその原因神経系の候補の一つである可能性が考えられた。もしそうであれば、光などの外部環境に応じて行動量を制御する神経系こそが「気分安定神経系」の実体であり、気分とは、こうした脳機能の主観的体験 (クォリア) であると考えられることでもできる。

(6) ストレス脆弱性形成とその修復過程におよぼす養育環境の影響

森信 繁（広島大学医歯薬学総合研究科精神神経医科学）

これまでに報告されたレトロスペクティブな疫学研

究から、幼少期の不遇な養育環境は成長後のうつ病発症

感受性を亢進させるなど、ストレス脆弱性の形成に関与することが報告されている。しかしながらプロスペクティブな研究は極めて少なく、本当に不遇な養育環境が成長後のストレス脆弱性を亢進させるのかについては、その脳内メカニズムも含めてまだまだ現時点では未解明と考えられる。

このような背景から我々はラットを用いた研究であるが、母子分離 (NI)・養育期の明暗調節・産褥期うつ病 (PD) モデルによって、仔ラットの成長後のストレス脆弱性が正常飼育群とどのように変化するかを解析している。

我々の NI を用いた研究結果は、NI を受けて育ったラットは拘束ストレスに対して視床下部-下垂体-副腎皮質 (HPA) 系のネガティブフィードバック (NF) の障害を示し、低養育環境による HPA 系の機能不全を報告した McGill 大学の Meaney らの一連の研究結果を支持する所見であった。このような研究結果は、うつ病患者で HPA 系の NF の障害が報告されていることから、幼少期の不遇な養育環境は HPA 系の脆弱性を介してうつ病発症感受性を亢進させる可能性があると考えられる。

具体的にラットうつ病モデルである学習性無力 (LH)

試験を用いた NI・PD モデルの実験結果でも、NI ラットや PD モデルラットに養育された仔ラットが、成長後に有意に LH になりやすいことを示していた。また NI ラットや PD モデルラットに養育された仔ラットを、離乳後に豊かな環境 (Environmental Enrichment) で飼育すると、うつ病感受性の亢進は修復される結果も得ている。NI モデルによるうつ病発症感受性亢進の脳内機序には、海馬の LIMK1 遺伝子発現の障害を介した、樹状突起スパインの形成障害が関与していることを示している。PD モデルによる感受性亢進の機序には、海馬のグルココルチコイド受容体の減少に伴う HPA 系の障害が関与していることを示している。

今回の動物実験結果は、幼少期の不遇な養育環境が、その後のストレス脆弱性亢進を導き、その結果うつ病発症感受性が亢進する可能性を示唆している。その一方で、幼少期の不遇な養育環境後に、養育支援による豊かな環境を提供することによって、うつ病発症感受性の亢進が修復される可能性も示している。このような一連の研究結果は、成長後のストレス反応性形成に関与する要因として、養育環境が重要であることを示唆していると思う。

(7) 情動理解のための文化人類学的基礎

池田光穂 (大阪大学コミュニケーションデザイン・センター)

文化人類学者が「情動に関する神経生理学」研究者たちの学術集会に招待された時に、彼/彼女は、生理学者たちの研究発表にどのようにして耳を傾け（できるか否かは不問にして）どのように理解しようと試み、どのようにコメントをおこなおうとするのか。またこの種の「居心地の悪い客」はどのように、その異種 [格闘技的] 共存の場を平和裡にやりすごそうとするのか、ということが本発表者の最大の関心である。そこで人類学者は〈異民族に関する文化現象を分析しその社会を理解する専門家〉であるという自己定義を表明する以上に、神経生理学者のために「役に立つ」存在であることをアピールしなければならない（でないと次回から呼んでもらえない）。人類学という学問分野が神経生理学者たちに具体的にどのような意味をもつのかを次の3つの観点から論じる。

(1) 人類学者は、自らの専門領域の枠組みのなかで人

間の情動をどのような観点から研究するのか？

人類学における研究対象である異民族は、その表面的差異という特徴も手伝って、当初は「浅い観察」あるいは「薄い記述」でも十分仕事ができる時代があった。しかし人類学研究が異文化間の相互理解に与する可能性が浮上すると、より「深い観察」による「厚い記述」が求められるようになってくる (Geertz 1973)。1980 年代「表象の危機」と言われた時期以降、人びとの情動をどのように理解するかの問題は、人類学者の理解の公準としての〈社会的文脈と解釈者主観の尊重〉により複雑な過程のなかでのみ可能であると言われるようになる (Rosaldo 1989)。情動というテーマは客観的記述の邪魔になる雑音ではなく、固有の文化に拘束される人間存在の様式理解の手がかりへと変化したのである。

(2) 人類学者のあつかう「人間の情動」と神経生理学

者のあつかう「それ」とは、いかなる共通点と相違点をもつのか？

情動をあつかう人類学内部での最大の論点は、文化的様式というものがどの程度まで人間の生物学的普遍性に根ざすものなのか、それとも文化的修飾によりほとんど無尽蔵の可塑性をもつのかということである。前者の論点の極北は神経生理学のそれと完全に一致し、後者の南極はすべての情動は文化で説明できるはずだという極端な文化主義者である（これを「強い文化主義」と呼ぼう）。多くの人類学者は、人間は生物学的基盤をもつので、「全ての人間にあてはまる合意 (*consensus gentium*)」は、人間の普遍性（共通性）を基盤にして後天的に学びうる文化的修飾の部分を守備範囲とする立場をとる（これを「弱い文化主義」と呼ぶ）(Kroeber 1953:516)。パラダイムならびに方法論の違いにより、文化的修飾をバイアスか雑音（よくて変数）とみる傾向をもつ神経生理学者と、その探求を学問上の使命 (*imperative*) に他ならないとする人類学者の違いがあるが、後者の多くは折衷主義者である。なぜ折衷主義者なのかという理由は、人類学がもともと自然科学から派生した学問であり、いまだ客観性への信仰の痕跡を残して

いるのだと私は考えている。

(3) 神経生理学者は、人類学者の言う「御託」に耳を傾けることで何か役に立つことはあるのか？

人類学者が、ある社会の人びとの「情動」について研究するとは、その社会の人びとがそのように名付けられた経験を具体的にどのように生きるのかということについて調べることである。これは心や意識について自然科学の観点から探究する研究者にとっては検討に値しない、日常感覚から導き出されてきた常識すなわちフォーク・サイコロジーによる説明に他ならない。おいしい純米焼酎をとり出す技術者にとっての麴粕のようなものだ。ガリレオ『天文対話』のシンプリシオは、研究者は〈言葉〉に酔ってはだめで〈モノ〉に語らせなければならぬと忠告した。従って「役に立つことはない」というのが最初の「浅い結論」である。しかし神経生理学者もまた研究論文という〈言葉〉を扱う動物である以上、その言語と概念の使用について、辛辣な人類学者の助言により、より正確に〈モノ〉に語らせることができる。つまり「役に立つこともあるだろう」が最後の「深い結論」になる。

(8) 痛みによる不快情動生成における分界条床核の役割

南 雅文（北海道大学薬学研究院薬理学研究室）

痛みは、侵害刺激が加わった場所とその強さの認知に関わる感覚的成分と侵害刺激受容に伴う不安、嫌悪、恐怖などの負の情動（以下、不快情動と呼ぶ）の生起に関わる情動的成分からなる。痛みによる惹起される不快情動は、私たちを病院へと赴かせる原動力であり、生体警告系としての痛みの生理的役割にとって重要である。しかしながら、慢性疼痛では、痛みにより引き起こされる不安、抑うつ、恐怖などの不快情動が、患者のQOLを著しく低下させるだけでなく、精神疾患あるいは情動障害の引き金ともなり、また、そのような精神状態が痛みをさらに悪化させるという悪循環をも生じさせる。北米での調査によると、慢性的な痛みを有している人では、気分障害、不安症、うつ状態などの精神疾患・情動障害を患う割合が有意に高くなることが示されており、持続的・反復的な痛みによる情動機構の可塑的変化がその根

底にあるものと考えられる。しかしながら、慢性疼痛による情動機構の可塑的変化のメカニズムはおろか、痛みによる不快情動生成の神経機構についてもほとんどわかっていないのが現状である。

我々は、痛みによる不快情動生成機構について、情動との関連が強く示唆されている扁桃体 (*amygdala*)、および扁桃体中心核や無名質とともに「*extended amygdala*」を構成する脳領域である分界条床核に着目して研究を進めている。昨年度の本研究会では、痛みによる不快情動生成における腹側分界条床核内ノルアドレナリン情報伝達の役割、すなわち、腹側分界条床核において痛み刺激によりノルアドレナリン遊離が促進され、このノルアドレナリンによるβ受容体-アデニル酸シクラーゼ-PKA系活性化が、痛みによる不快情動生成に重要であることを報告している (*J. Neurosci.*, **28**: 7728-7736 (2008))。本口

演では、背外側分界条床核における CRF 受容体を介した cAMP-PKA 系活性化が痛みによる不快情動生成に関与していること、さらには、結合腕傍核より分界条床核に投

射するグルタミン酸神経も痛みによる不快情動生成に関与している可能性について、私たちの研究成果を紹介し、ご批判を頂戴したい。

(9) 痛み感受性および鎮痛薬感受性における個人差の遺伝子メカニズム

池田和隆 (東京都精神医学総合研究所分子精神医学研究チーム)

痛みは危険を伝える重要で原初的な生体防御システムである。従って、痛覚システムの大部分は遺伝子によってプログラムされていると考えられる。また、痛み感受性には個人差があり、この個人差にも遺伝要因が考えられる。一方、過剰な痛みを取り除く鎮痛システムも生体には備えられている。鎮痛システムは鎮痛薬によって活性化されるが、鎮痛薬感受性にも大きな個人差があることが知られている。世界保健機関がん疼痛治療指針の五原則の一つに、「患者ごとに適量を求めること」が挙げられていることから、鎮痛薬感受性個人差は適切な疼痛治療を難しくする大きな要因であることが推察される。また、鎮痛薬感受性個人差にも遺伝要因が考えられてきた。

演者らは、鎮痛薬感受性が異なるマウス系統を調査し、その遺伝子メカニズムを解明してきた。これらの研究成果をヒトに応用するために、健常者や鎮痛薬投与患者を対象として、痛覚感受性や鎮痛薬感受性と遺伝子多型と

の関連を検討した。解析対象遺伝子としては、従来の研究で鎮痛における重要性が指摘されていた、ミューオピオイド受容体 (MOP) やそのシグナル伝達経路を担う分子群に注目した。鎮痛薬感受性の調査の際は、疼痛刺激自体の個人差を最小限とするために、画一的な手術を受けた患者を対象とした。その結果、解析した遺伝子の中で、MOP や G タンパク質活性化型内向き整流性カリウム (GIRK) チャネルの遺伝子多型 (遺伝子配列の違い) が、痛み感受性や鎮痛薬感受性の個人差に関与することが判明した。

これらの研究成果はテーラーメイド疼痛治療に道を拓くものであり、近い将来、個々人での鎮痛薬適量を鎮痛薬投与前の遺伝子検査によって予測できるようになる可能性がある。また、痛みと鎮痛の遺伝子メカニズムの解明は、痛みや鎮痛による情動発現のメカニズムの解明に繋がると期待できる。痛みと鎮痛の遺伝子研究は、心の源流の発見に貢献するかもしれない。

(10) 価値表象を実現する前頭葉報酬系の機能的役割：神経美学からの視点

川畑秀明 (慶応大学文学部人間関係学系心理学専攻)

fMRI など人の脳の活動から精神活動を測定する研究が盛んになるにつれて、神経科学の視点から美や芸術へアプローチがなされるようになってきた。このアプローチは神経美学 (neuroesthetics) とよばれ、神経経済学とともに人文社会科学と自然科学との融合研究としての脳科学として近年注目されている。絵画や図形などの視覚刺激に対する視覚的美しさの知覚や選好と関連した脳の活動が調べられ、美を芸術作品や自然などの対象に対して快く感じられたり、感嘆の念を感じられたりするような評価や価値の高い状態 (体験) としてとらえ、前頭葉や

大脳辺縁系の脳の様々な部位が美の知覚と関係していることが分かるようになってきた。

喜びや幸福、満足感を得ることは人間性の基盤として重要な主観的感情である。喜びや満足感を得る対象は、金銭的報酬や欲しいものを得たときのような経済 (消費) 活動の場合もあれば、好きな音楽や絵画を鑑賞したり表現したりする芸術活動の場合もある。

本発表では、人間が芸術作品について美しさ/醜さを感じるときの脳内基盤や、事物に対する欲求や望ましさの脳内基盤とは何か、を切り口として、価値表象を実現す

る前頭葉報酬系の機能的役割について報告する。

特に、

(1) fMRI によって絵画の美しさの評価中の脳活動を検討した発表者らの研究をもとに、美の絶対的評価と相対的評価、判断と表象を切り分け、それらが眼窩前頭皮質から前部帯状回の異なる部位の活動が基礎となっていることを紹介する。

(2) 美的評価を伴わない課題において、潜在的な価値表象が脳の活動として見られることを報告する。

(3) 判断する視対象のカテゴリに依存した脳活動と、美や欲望を判断する際のそれぞれの脳活動部位の共通性について明らかにする。また、美と欲望の判断に共通してみられる眼窩前頭皮質と前部帯状回の活動について紹介する。

(11) 感情についての現代哲学の理論

河野哲也（立教大学文学部教育学科）

感情や情動といった言葉は日常用語です。心理学者も生理学者も、一旦、その日常的な意味や定義を受け入れ、それに基づいて研究協力者の行動を規定し、その脳生理学的な対応物を研究します。私の発表では、哲学の立場から、感情とはそもそも何なのかを考えていきたいと思っています。

まず、「感情（あるいは、情動, emotion）」について言えるのは、それが自然種ではなく人工種だということです。自然種とは、自然の中に本来的に分類のための切れ目がすでに入っている種類のものです。たとえば、水素や炭素、トッブクォークやアミノ酸などがそうです。これに対して、人工種とは人間がある領域に規約的に切れ目を入れているものです。たとえば、成人や未成年、発展途上国と先進国、知的遅れや優秀児などがそうです。

感情は後者に属する概念です。感情が何であるかは規約的に社会によって定まります。このことは、概念定義を歴史的に追って行けば明らかになります。発表では、情念 (passion) と感情 (emotion) と動機 (motivation) が歴史的にどのように分岐して、心理学の中で用いられるようになったかを説明いたします。

もうひとつ感情について指摘すべきは、それを理性 (reason) や知性 (intellect) と対比させる図式が誤っていることです。感情は一体いくつあるのでしょうか。感情はひとつの感覚でしょうか。たとえば、怒りとはある種の興奮状態だと言ってよいのでしょうか。あるいは、感情と気分との違いはなんのでしょうか。感情の区別が極めて多様

で、分類が難しく、単純な感覚に還元できないのは、感情が認知的内容によって区別されるからです。昆虫や魚類には感情は無いように思われるのは、それらの生き物の認知的能力が低いからです。感情を人間の知的側面と対比させ、感情を理性や知性に対立するもの、それらが欠如したものとして扱うことは誤りです。

最後に指摘すべきは、感情の社会性です。感情は、認知的内容と結びついた一種の態度です。それは単純な感覚ではなく、知的能力に対立するものでもありません。私たちは、欲求（食欲、睡眠欲、性欲など）に対してそれが生じることを社会的に批判しませんし、逆に称賛もしません。しかし、ある種の感情に関しては、私たちは社会的に批判し（嫉妬、憤激、卑下など）、別の感情を賞賛したり、擁護したりします（慈愛、博愛、寛恕など）。これは感情が個人の態度であり、それを社会的に評価する文脈があることによります。感情が理性と対立すると言われるとき、そこでは実は個人と社会のあいだに葛藤が生じているのです。この観点から、哲学者のヌスパウムは新しい民主主義社会における感情教育の可能性について示唆しています。こうした感情の社会性とその道徳的な教育との関連性についても、議論してみたいと思います。

(*) 本発表は、科研費研究「心と行為の哲学的分析による倫理的諸概念の解明——モラル・サイコロジーからの接近——」(基盤(B) 21320009) から支援を受けています。

(12) 感情制御の発達における破綻と回復 —嘔吐体験がトラウマとなった小学生事例の治療経過から—

大河原美以 (東京学芸大学教育心理学講座)

筆者は、子どもの心理治療を専門とする臨床心理士であり、これまでその臨床実践を研究の対象としてきた。

教育現場で見られる子どもたちの心の育ちをめぐる問題は、きわめて深刻な事態に陥っている。筆者は、これまでの臨床経験を通して、子どもたちのさまざまな心理的な問題の根底に、「感情制御の発達不全」をみることができることを指摘してきた。不安、恐怖、嫌悪、怒り、悲しみなどのネガティブ感情を解離させてしまい、その発達のプロセスの中で自己に統合することができないと、その制御に困難をきたし、そのためにさまざまな問題行動や症状を呈することになる。ネガティブ感情制御の困難は、暴力や攻撃性の暴走、不安の身体化としての心身症、不登校、自殺企図やリストカットなどの自傷行為を生じさせ、さまざまな子どもの心理的問題の源となる。ネガティブ感情を、自己の中に統合することができない姿は、過剰適応的な「よい子」の自分と、ネガティブ感情制御困難な「悪い子」の自分との解離を特徴とする自己を構成し、ネガティブ感情の暴走としての攻撃性と、ネガティブ感情に対する脆弱性という相補的な方向性をもつ形で症状化する。また、感情の認知・言語化が困難なアレキシサイミア状態を呈することも特徴としてあげられる。

筆者は、「感情制御の発達不全」に陥る理由として、親(や重要な養育者)が子どもの生理現象としてのネガティ

ヴ感情の表出を否定的に語り、適切な感情語彙を与えないというコミュニケーション不全の問題を指摘し、脳内での感情の情報処理過程におけるダブルバインド状態に注目してきた。筆者が「生理現象としてのネガティブ感情」と認識してきたものは、まさに「原始感覚と情動」と言い換えることができる。

本発表では、「感情制御の発達不全」がネガティブ感情に対する脆弱性として顕在化した事例の心理治療のプロセスの記述を通して、生体防御反応としての原始感覚と情動を、大人から否定される経験が、子どもの心理的健康の破綻を生み出すマクロ(人間の相互作用)レベルでのプロセスを示す。当日は、学校での嘔吐経験がトラウマとなり心身症としての嘔吐が生じた事例(小4男子)と、嘔吐にまつわる強迫症状を呈した事例(小4男子)の2事例の治療援助過程を報告する予定である。

不快感情を表出することなく、大人の指示に従う子どもを「よい子」とみなす現代社会においては、大人の理想と子どもの生体防御反応は対立し、そのために子どもたちの感情制御の力が育たないという深刻な問題が起こっている。原始感覚と情動の否定が脳の情報処理過程においてどのような影響を与え、子どもの感情制御の発達不全をもたらすのか、脳生理学分野との協働により明らかになることが、いま切実に求められている。

10. シナプス機能と病態

2009 年 12 月 14 日－12 月 15 日

代表・世話人：高橋琢哉（横浜市立大学大学院・医学研究科・生理学）

所内対応者：重本隆一（生理学研究所・脳形態解析研究部門）

- (1) 有機小分子蛍光プローブの精密設計に基づく生細胞応答観測・in vivo がんイメージング
浦野泰照（東京大学大学院・薬学系研究科・分子薬学）
- (2) 蛍光タンパク質テクノロジーの展望 ―観て触って探る生命の不思議―
永井健治（北海道大学・電子科学研究所・ナノシステム生理学）
- (3) Imaging the activity patterns of identified single neurons
佐藤 隆 (Janeria Farm)
- (4) 脊髄小脳失調症 14 型(SCA14)の原因となる変異 γ PKC は
初代培養小脳プルキンエ細胞樹状突起の縮小とスパインの減少を引き起こす
関 貴弘（広島大学大学院・医歯薬学総合研究科・神経薬理研究室）
- (5) Disrupted in Spine By Disrupted-in-Schizophrenia-1 (DISC1):
統合失調症の病因・病態としての後シナプス
林 朗子 (Department of Psychiatry and Behavioral Sciences Johns Hopkins University)
- (6) 脊髄小脳変性症 14 型の原因遺伝子である PKC γ のミスセンス変異体は,
マウスプルキンエ細胞における登上線維シナプスの除去と LTD 誘導を阻害する
入江智彦（群馬大学大学院・医学系研究科・神経生理学分野）
- (7) シナプス外グルタミン酸動態の可視化解析
大久保洋平（東京大学大学院・医学系研究科・細胞分子薬理学）
- (8) LPS を用いた末梢免疫系活性化によるミクログリアの形態変化とスパインの変化
根東 寛（東京大学大学院・医学系研究科・神経細胞生物学）
- (9) S100B を介したニューロン・グリア相互作用
平瀬 肇（理化学研究所・脳科学総合研究センター・平瀬研究ユニット）

【参加者名】

伊藤 萌（横浜市立大学）、入江智彦（群馬大学）、浦野泰照（東京大学）、大久保洋平（東京大学）、大屋大祐（横浜市立大学）、岡部繁男（東京大学）、甲斐裕一郎（キッセイ薬品工業株式会社）、狩野方伸（東京大学）、鎌田洋輔（群馬大学）、喜多村和郎（東京大学）、児島信彦（群馬大学）、小宮かさね（横浜市立大学）、根東 寛（東京大学）、酒井規雄（広島大学）、佐藤 隆 (Janeria Farm)、塩田倫史（東北大学）、重本隆一（生理学研究所）、實木亨（横浜市立大学）、関 貴弘（広島大学）、関野祐子（東京大学）、高橋琢哉（横浜市立大学）、高橋 葵（横浜市立大学）、竹居光太郎（横浜市立大学）、竹本 研（横浜市立大学）、多田敬典（横浜市立大学）、田中 茂（広島大学）、永井健治（北海道大学）、西 真弓（奈良県立医

科大学）、西山 潤（慶應義塾大学）、野村寿博（慶應義塾大学）、橋本浩一（東京大学）、林 崇（東京大学）、林朗子 (Johns Hopkins University)、林 康紀（理化学研究所）、平井宏和（群馬大学）、平瀬 肇（理化学研究所）、廣野守俊（理化学研究所）、松井 広（生理学研究所）、松永 渉（基礎生物学研究所）、三浦会里子（慶應義塾大学）、美津島大（横浜市立大学）、宮崎智之（横浜市立大学）初山俊彦（東京慈恵会医科大学）、森口茂樹（東北大学）、山肩葉子（生理学研究所）、山下直也（横浜市立大学）、柚崎通介（慶應義塾大学）、田中慎二（東京大学）、久保義弘（生理学研究所）、栢野藤章（真和クリエーション株式会社）、鍋倉淳一（生理学研究所）、古家園子（生理学研究所）、川上良介（生理学研究所）、Wajeeha Aziz

(生理学研究所), Dwi Wahu Indoriati (生理学研究所), 重松直樹 (生理学研究所), 佐竹伸一郎 (生理学研究所), 深沢有吾 (生理学研究所), 江藤 圭 (生理学研究所),

石橋 仁 (生理学研究所), 窪田芳之 (生理学研究所), 松田尚人 (生理学研究所), 福永浩司 (東北大学), 梅田達也 (生理学研究所) 他

【概要】

本研究会では、広範な分野の研究者、とりわけ若手研究者を集め、「シナプス機能と病態」のテーマの下、活発な質疑応答、情報交換が行われた。特に、イメージング技術 (セッション1)、シナプスと病態 (セッション2)、ニューロングリア相互作用 (セッション3) という、今までのシナプス研究会であまり触れられてこなかったテーマを取り上げた。イメージングはシナプス機能解析のみならず多くの分野において中心的な研究手法になっているが、今回は敢えてシナプス研究以外の研究者にも声をかけ、シナプス研究への応用について活発な議論がされた。

またシナプス機能発現に重要な役割を果たしていることは明らかになりつつあるにもかかわらず、取り上げら

れ方が少ないグリアにも焦点を当てた。さらにシナプス研究の出口ということで病態もテーマとして取り上げ、徹底的な議論が行われた。その他、12演題から成るポスターセッションを行い、参加者の投票によって選出された塩田倫史氏 (東北大院・薬) と實木 亨氏 (横浜市大・医) の口頭発表がセッション4として行われた。

3つの課題のどれも好評であったが特に好評だったのがイメージングのセッションであった。演者の方々のレベルも高く、発表そのものもわかりやすかったため参加者の多くに強い印象を与えたものと思われる。分野外の話であったのも逆に新鮮でよかったと思われる。一方で、質疑応答に参加する参加者の年齢層が高く、若手の積極的な参加が今後の課題となろう。

(1) 有機小分子蛍光プローブの精密設計に基づく生細胞応答観測・in vivo がんイメージング

浦野泰照 (東京大学大学院・薬学系研究科・分子薬学)

「生きている」細胞を「生きたまま」観測する技術として、蛍光プローブ、蛍光顕微鏡を用いた観察手法が近年汎用されている。本観察手法の実現には、観測対象分子に対する選択的な蛍光プローブが必要不可欠であり、現代の生物学研究では、GFPなどの蛍光タンパク質をベースとするプローブと有機小分子をベースとするプローブが繁用されている。しかしながら後者の有機小分子蛍光プローブに関しては、汎用性のある設計法が確立していなかったため、実用的な蛍光プローブは数える程度しかないのが現状であった。

このような中、筆者らは新規蛍光プローブの効率的な開発を可能とする、論理的かつ汎用性の高いプローブデザイン法を、世界に先駆けて複数確立することに成功してきた。さらに本設計理念を拡張し、蛍光プローブ母核として有用な新規蛍光団であるTokyoGreen類などの創製にも成功し、これらの骨格を活用した全く新しい機能

を有する多数の蛍光プローブの開発に成功してきた。具体的には、特定の活性酸素種(ROS)を高選択的に検出可能な蛍光プローブ群や、 β -ガラクトシダーゼなどのレポーター酵素活性、また様々な生体関連酵素反応を高感度に検出可能な蛍光プローブなどの開発に成功した。さらにごく最近、がん抗体やある種の糖タンパク質が、エンドサイトーシスにより選択的にがん細胞に取り込まれる現象を可視化するプローブの開発にも成功した。実際本プローブと蛍光内視鏡を組み合わせることで、生きている動物個体内の1mm以下の微小がん部位を、明確に検出することにも成功した。

本研究会では、演者らが確立した蛍光プローブの設計法から、その活用による種々の蛍光プローブの開発事例、また開発したプローブを活用した生細胞イメージング・in vivo がんイメージング例まで、幅広く紹介する。

(2) 蛍光タンパク質テクノロジーの展望 一観て触って探る生命の不思議一

永井健治 (北海道大学・電子科学研究所・ナノシステム生理学)

我々は、生体分子、細胞レベルの生命現象を研究対象として、遺伝子工学技術に基づく生体分子可視化技術を駆使して、個体の発生や刺激受容と応答に関わる分子間・細胞間相互作用を明らかにすることを大きな研究テーマに掲げている。個々の分子、個々の細胞のふるまいを生きた状態で可視化するのみならず、フェルスター共鳴エネルギー移動などを利用した細胞内斥候分子を細胞内や組織内のあらゆる部位に放つことによって、細胞内シグナル伝達を担うタンパク質のリン酸化状態や細胞内カルシウムイオン濃度の変化といった細胞内シグナルの流れを可視化し、さらには操作する。生体分子や細胞

の相互作用を生きた状態で可視化・操作するアプローチは、ナノスケールの分子ネットワークによって構築されている動的システムとしての生命現象を解明するための大きな流れとなるはずである。

本研究会では細胞内の生体分子動態をより高感度で可視化解析するための蛍光プローブとそのようなプローブ作成を迅速に行うことが可能な新しい DNA コンストラクション法、さらに光照射により任意の時空間で特定のタンパク質を不活性化する方法などを紹介し、これらの技術を総動員することで可能になる、ナノマクロスケールの階層間イメージングについて議論したい。

(3) Imaging the activity patterns of identified single neurons

佐藤 隆 (Janeria Farm)

Nearby neurons, sharing the same locations within the mouse whisker map, can have dramatically distinct response properties. To understand the significance of this diversity, we studied the relationship between the responses of individual neurons and their projection targets. Neurons projecting to primary motor cortex (MI) or secondary somatosensory area (SII) were labeled with red fluorescent protein (RFP) using

retrograde viral infection. We used in vivo two-photon Ca^{2+} imaging to study the responses of RFP-positive and neighboring L2/3 neurons to whisker deflections. Neurons projecting to MI displayed larger receptive fields compared to other neurons, including those projecting to SII. Our findings support the view that intermingled neurons in primary sensory areas send specific stimulus features to different parts of the brain.

(4) 脊髄小脳失調症14型 (SCA14) の原因となる変異 γ PKC は 初代培養小脳プルキンエ細胞樹状突起の縮小とスパインの減少を引き起こす

関 貴弘 (広島大学大学院・医歯薬学総合研究科・神経薬理学研究室)

2003年に神経変性疾患の1つである脊髄小脳失調症14型(SCA14)の原因として γ PKC遺伝子の missense 変異が同定された。我々はこれまでに変異 γ PKCを培養細胞株(CHO, SH-SY5Y)に発現させることにより、変異 γ PKCが凝集体を形成し、アポトーシスを誘発することを明らかにしており、これらの性質がSCA14の発症に関与していると示唆される。本研究ではSCA14の病変部位である

小脳プルキンエ細胞(PC)に変異 γ PKCがどのような影響を及ぼすかを検討した。

蛍光タンパク質 GFP (Green fluorescent protein) を融合させた変異 γ PKC-GFPをマウス胎仔由来初代培養小脳PCに発現させた。胎生14日目のマウス胎仔から小脳を単離し、分散培養を行った。培養14日目(DIV14)もしくはDIV21にアデノウイルスベクターを用いて、PC特異的に

野生型および2種類の変異 γ PKC-GFP (S119P, G128D)を発現させ、DIV28に細胞の観察を行った。

野生型 γ PKC-GFPはPCの細胞体および樹状突起に均一に発現する一方で、変異 γ PKC-GFPの発現するPCの多くで変異 γ PKC-GFP凝集体が観察された。また、野生型 γ PKC-GFP発現PCと比較して、変異 γ PKC-GFP発現PCでは細胞面積、特に樹状突起面積の減少やスパイン密度の低下が観察された。これらの現象は凝集体の有無に関係なく観察された。一方、PCに発現した野生型 γ PKC-GFPは高濃度 K^+ 刺激により樹状突起において細胞質から細胞膜へと一過性の速いトランスロケーションを示したが、変異 γ PKC-GFPではこのトランスロケーションは

ほんのわずかしき観察されなかった。この原因を調べるため、FRAP (Fluorescent recovery after photobleaching) 解析を行ったところ、PCにおいて変異 γ PKC-GFPは野生型と比較して、著しく流動性が低下していた。

以上の結果より、変異 γ PKCは小脳PCでも凝集体を形成する一方で、凝集体形成とは無関係に樹状突起の形態、スパイン密度の低下といった形態的な変化を引き起こすことが明らかとなった。これらは、変異 γ PKCの細胞内流動性により刺激依存性トランスロケーションが障害された結果、樹状突起シグナル伝達に異常が生じる結果として引き起こされたのではないかと考えられる。

(5) Disrupted in Spine By Disrupted-in-Schizophrenia-1 (DISC1):

統合失調症の病因・病態としての後シナプス

林 朗子 (Department of Psychiatry and Behavioral Sciences Johns Hopkins University)

統合失調症は罹患率が高い難治性の疾患であり、遺伝学的影響が大きく、スパイン減少及びグルタミン酸伝達低下などが病態生理として知られている。しかし疾患関連遺伝子が、これら病態生理を惹起するメカニズムについてはほとんど未解明である。

われわれは、スパインの減少と疾患関連遺伝子との関連を検証するために、疾患候補遺伝子のなかでも特に有力な因子、Disrupted-in-Schizophrenia-1 (DISC1) がスパインに局在し、同部位の形態機能を担う Rac1-GEF, Kal-7 と結合することに注目した。野生型 DISC1, Kal-7 と結合出来ない変異型 DISC1 (DISC1- Δ Kal-7), DISC1 RNAiなどをラット皮質初代ニューロンもしくは大脳皮質スライス培養に遺伝子導入法させた結果、DISC1 RNAiはスパインサイズを増大させる一方、DISC1 過剰発現はスパインサイズを減少させることを見出した。DISC1- Δ Kal-7は、スパイン形態に影響を与えなかったことより、スパインに対する DISC1 の効果は Kal-7 との結合が重要であることが考えられた。一方で、長期にわたる DISC1 ノック

ダウンは、シナプスサイズの減少が生じることを見出した。Rac1 の構成的活性型も二相性の現象を示し (短期ではスパインサイズ増大, 長期で縮小), かつ Rac1 活性測定などの生化学的手法より、DISC1 と Kal-7 の結合は神経活動依存的に解離することで Rac1 を活性化するという所見より、DISC1 ノックダウンは Rac1 の構成的活性型、DISC1 過剰発現は Rac1 のドミナントネガティブ型の Phenocopy との結論に至った。

Kal-7 と Rac1 の発現量は統合失調症の死後脳で減少していることが報告されているため、グルタミン酸受容体/DISC1/Kal-7/Rac1 シグナルが本症で脆弱なシグナル伝達経路であることが示唆される。この様な複数の関連因子の相加効果は、多因子遺伝病である統合失調症の性質と良く合致する。DISC1 の発現量は、過剰/過少ともに長期的にはスパインサイズ/密度の減少を惹起することと、上記 Pathway, および統合失調症の病態との関連は、In vivo の解析 (行動実験等) が待たれる。

(6) 脊髄小脳変性症14型の原因遺伝子である PKC γ のミスセンス変異体は、マウスプルキンエ細胞における登上線維シナプスの除去と LTD 誘導を阻害する

入江智彦 (群馬大学大学院・医学系研究科・神経生理学分野)

脊髄小脳変性症 14 型は運動失調を主徴とする神経変性疾患であり、原因遺伝子は protein kinase C γ (PKC γ) のミスセンス変異体 (mutant-PKC γ) である (Chen et al., 2003)。小脳において PKC γ はプルキンエ細胞のみに発現する (Saito et al., 1988)。mutant-PKC γ を培養プルキンエ細胞に発現させると、樹状突起の発達に障害を与え、更にはアポトーシスを引き起こす (Seki et al., 2009)。このような現象は脊髄小脳変性症 14 型の発症原因となっている可能性があるが、未だ培養系の実験に留まっている。そこで、mutant-PKC γ 発現が in vivo プルキンエ細胞にどのような影響を与えるのかを検討するために、レンチウイルスベクターを用いて、発達期マウスの小脳プルキンエ細胞に mutant-PKC γ を発現させることで検討した。

PKC γ 欠損マウスでは、成熟段階においてもプルキンエ細胞に対する登上線維の多重支配が見られる (Kano et al., 1995)。そこで、mutant-PKC γ 発現が登上線維シナプス除去に与える影響を検討した。生後 6~7 日の幼弱マウスのプルキンエ細胞に mutant-PKC γ 発現させ、生後 25 日以降に小脳スライスを作成してパッチクランプ法により解析した。登上線維刺激で誘発される EPSC は、刺激

強度の増加に伴ってステップ状に振幅の増加を示した。このことは 1 個のプルキンエ細胞に複数の登上線維がシナプス形成していることを示している。一方、平行線維刺激で誘発される EPSC に対しては mutant-PKC γ は影響を与えなかった。以上より、発達期のプルキンエ細胞において、mutant-PKC γ は登上線維シナプスの除去に異常を引き起こすことが分かった。

小脳プルキンエ細胞と平行線維間のシナプスで生じる長期抑圧現象 (LTD) は小脳の運動学習機能に重要である。そこで mutant-PKC γ 発現が LTD 誘導を障害するかどうかを検討した。平行線維刺激と細胞体脱分極刺激の組み合わせにより LTD 誘導を行ったところ、野生型 PKC γ 発現細胞では LTD が誘導されたのに対し、mutant-PKC γ 発現細胞では LTD の誘導が障害されていた。このことは mutant-PKC γ の発現が LTD 誘導に必要なシグナルカスケードを何らかの形で阻害している事を示唆している。

今後は、mutant-PKC γ の発現が登上線維シナプスの除去や LTD の誘導阻害を引き起こすメカニズムを明らかにする予定である。

(7) シナプス外グルタミン酸動態の可視化解析

大久保洋平 (東京大学大学院・医学系研究科・細胞分子薬理学)

グルタミン酸は中枢神経系における主要な興奮性神経伝達物質である。従来、グルタミン酸はシナプス間隙内に局限し “point-to-point” のシナプス伝達のみを担うと考えられてきた。しかしながら近年、シナプス間隙から漏れ出したグルタミン酸が、シナプス外部に存在するグルタミン酸受容体を活性化することで、様々な神経・グリア細胞機能に関与することが報告されている。このようなグルタミン酸による “volume transmission” の理解には、シナプス外部におけるグルタミン酸の時間的空間的な動態を解明することが欠かせないが、これまではグルタミン酸濃度を間接的に推測するしかなく、十分な知見

が得られていなかった。本研究では、グルタミン酸動態を直接可視化するために、GluR2 サブユニットのグルタミン酸結合ドメインと蛍光色素をハイブリッドした、グルタミン酸指示分子 (EOS) を新規に開発した。大脳皮質、海馬および小脳のスライス標本の細胞外空間に EOS を固定化し、シナプス活動に伴うグルタミン酸動態を二光子励起顕微鏡により観察した。生理的条件下のシナプス活動に伴い、シナプス外グルタミン酸濃度が局所的にマイクロ M レベルに上昇し、それが数十ミリ秒間滞留することを見出した。さらに in vivo の大脳皮質体性感覚野において、後肢からの体性感覚入力により同様のグルタミン

酸動態が惹起されることを明らかにした。このようなグルタミン酸動態は NMDA 受容体や代謝型グルタミン酸受容体を活性化するのに十分であり、生理的なシナプス活動に伴い、これらのグルタミン酸受容体を介したシナ

プス外伝達が行われていることが示唆される。以上の知見はシナプス外グルタミン酸伝達研究の基盤となるものであり、シナプス間相互作用や神経・グリア相互作用の理解をさらに進めることが期待される。

(8) LPS を用いた末梢免疫系活性化によるミクログリアの形態変化とスパインの変化

根東 寛 (東京大学大学院・医学系研究科・神経細胞生物学)

GFP を大脳皮質錐体細胞に発現するトランスジェニックマウスを利用した *in vivo* imaging により、生体内での興奮性シナプス後部の指標であるスパインの生成・消失の機構が明らかになってきた。我々の研究室では海馬スライス培養標本においてアストログリアの微小突起による直接接触がスパイン寿命と形態の成熟を促進するという結果を得 (J.Neurosci., 2007), さらにグリア細胞によるシナプス動態制御の分子機構を *in vivo* 観察を利用して解析することを試みつつある。頭蓋骨の処理方法によって皮質内のグリア細胞の活性化の程度が異なる可能性が 2007 年に報告されたため、より厳密な生体内でのスパイン生成・消失のモニターに適した手法である *thinned-skull* 法 (菲薄処理を施した骨組織を介して二光子顕微鏡観察を行う方法) を本研究では採用した。

まずコントロールでのスパイン動態を理解するため、2, 7, 28 日間隔で *in vivo* スパイン観察を行った。各時間間隔でのスパイン変化率を計算した所、2 あるいは 7 日間での変化率 (短期変化率) は 3% 程度であり、28 日間では 6% 程度に上昇した。短期変化率を全てのスパインに等しく適用するモデルを仮定すると 28 日間で積算される理論的な変化率 (約 30%) は実測値 (6%) をはるかに上回るため、短期変化率に反映される速い動態は一部のスパインに限定されたものと考えられる。

次に非特異的な免疫賦活作用を持つ LPS を末梢投与することで、血液脳関門の外での急性炎症反応が果たして脳内でのシナプス動態に影響を及ぼしうるのか検討を行った。LPS 投与群では、短期変化率はコントロールと大きな差はなかったが、28 日間のデータで変化率がコントロールの 2 倍程度 (約 10%) に上昇した。短期変化率に有意の差がないことは、前述の速い動態を示すスパイン群への LPS の効果は小さく、それ以外の安定なスパインの遅い変化を選択的に増強した可能性を示唆する。さらに LPS 投与後 28 日間を 1 週間ずつに分けてスパイン変化率を測定しても有意の差が検出できなかった点も、速いスパイン変化に影響がないとする上記の仮説を支持する。

緩徐なスパイン変化が、LPS 投与後の急性炎症反応が収まった後にも持続する、グリア細胞の変化による可能性を検討した。LPS 投与後に GFAP 蛋白質の発現上昇を指標としたアストログリアの活性化は検出されなかったが、Iba1 抗体によるミクログリアの形態に関しては持続的な変化が検出された。

以上のデータは LPS 投与によって引き起こされる緩徐なスパイン変化の維持にミクログリアの持続的な機能変化が相関する可能性、および両者の因果関係についての今後の検討の必要性を示している。

(9) S100B を介したニューロン・グリア相互作用

平瀬 肇 (理化学研究所・脳科学総合研究センター・平瀬研究ユニット)

S100B はアストロサイトに顕著に発現しているカルシウム結合蛋白質である。これまでの S100B 遺伝子改変マウスを用いた先行研究から、S100B がシナプス可塑性や

記憶に関与していることが報告されている。今回、活動中の神経回路においてこの蛋白質の生理的役割を明らかにするため、野生型および S100B 欠損マウス間で、麻酔

下および発作状態における皮質と海馬の自発脳波を比較した。

皮質における徐波 (0.5-2 Hz) および海馬におけるシータ波 (3-8 Hz) および鋭波に伴う速いリップル振動 (120-180 Hz) といった典型的な脳波振動パターンが、両方の遺伝子型で観測された。これらの典型的な脳波振動パターンは振幅・周波数において S100B 遺伝的欠損の影響を受けなかった。しかし、カイニン酸腹腔内投与後 (5-10 mg/kg) に海馬 CA1 野放線層 (str. Radiatum) で発生するガンマ波 (30-80 Hz) では、欠損型で振幅が顕著に小さかった。S100B 欠損マウスにおけるガンマ波の振幅の減少は、S100B タンパクの海馬への局所注入により回復することから、細胞外に分泌された S100B がガンマ波の振幅を上昇させることが示唆された。

そこで、カイニン酸投与によって、実際に S100B の分泌が増加するかどうか検証した。急性海馬スライス標本

を作製し、カイニン酸 (400 nM) に 30 分間浸潤させたところ、細胞外の S100B の濃度が約 5 倍上昇した。薬理実験により、この S100B 分泌増加は神経活動の興奮に伴うシナプス放出によって代謝型グルタミン酸受容体 3 型が活性化されることに起因していることが明らかとなった。これらの結果から、通常の自発神経活動中では、S100B は神経活動に顕著な影響を与えないが、カイニン酸により神経活動が十分に上昇した場合には、アストロサイトから細胞外に分泌される S100B の量が増加し、神経活動が調節されることがわかった。細胞外 S100B が神経細胞に直接的に及ぼす影響については、現在実験中である。近年、グルタミン酸や ATP 等の神経伝達物質を利用したニューロン・グリア相互作用が報告されてきたが、今回、初めてタンパク質を介したニューロン・グリア相互作用を提起する。

11. 大脳皮質局所回路の機能原理

2009 年 11 月 19 日－11 月 20 日

代表・世話人：宋 文杰（熊本大学大学院・医学薬学研究部）

所内対応者：川口泰雄（大脳神経回路論研究部門）

(1) 視床プロジェクト：視床運動核から皮質への投射

金子武嗣（京都大学大学院・医学研究科・高次脳形態学）

(2) 発達期小脳における神経回路形成の *in vivo* 解析

喜多村和郎（東京大学大学院・医学系研究科・神経生理学）

(3) 発達期に見られる視覚経験依存的な視床－皮質投射の再編成

畠 義郎（鳥取大学大学院・医学系研究科・機能再生医科学専攻・生体高次機能学部門）

(4) 神経活動依存的な皮質回路形成の制御機構

山本亘彦（大阪大学大学院・生命機能研究科）

(5) 視覚野抑制性シナプスの両方向性可塑性

小松由紀夫（名古屋大学・環境医学研究所）

【参加者名】

宋 文杰（熊本大学大学院・医学薬学研究部）、畠 義郎（鳥取大学大学院・医学系研究科）、金子武嗣、藤山文乃、日置寛之、古田貴寛、田中琢真、倉本恵梨子、越水義登、大野 幸（京都大学大学院・医学研究科）、青木高明（京都大学・情報学研究科）、野村真樹（京都大学・文学研究科）、平井大地（京都大学・霊長類研究所）、山本亘彦（大阪大学大学院・生命機能研究科）、小松由紀夫、丸山拓郎（名古屋大学・環境医学研究所）、喜多村和郎、河村吉信（東京大学大学院・医学系研究科）、小島久幸（東京医科

歯科大学・医歯学総合研究科）、山下晶子（日本大学・医学部）、小村 豊（産業技術総合研究所）、坪 泰宏（理化学研究所）、一戸紀孝（弘前大学・医学研究科）、渡我部昭哉、定金 理（基礎生物学研究所）、吉村由美子、富田江一、畑中伸彦、古家園子、加勢大輔、石川理子、金子将也、坂野 拓、中川 直、川口泰雄、窪田芳之、大塚 岳、森島美絵子、重松直樹、植田禎史、平井康治、牛丸弥香（生理学研究所）

【概要】

大脳皮質はヒトの多くの根源的な機能を果たしているが、その動作原理はいまだ謎に包まれている。大脳皮質の機能を理解するためには、その神経回路の「ハードウェア」と「ソフトウェア」を理解することがまず要求される。一方、大脳皮質機能のもう一つの本質は環境に対する適応能力で、可塑的であるとともに、安定性も併せ持つ優れたシステムである。本研究会では、大脳皮質のこれらの特徴に着目し、大脳皮質の異なる領域やその関連神経核について、異なる方法で研究を行っている研究者が集まり、各自の最新の研究結果を発表し討論することで、各皮質領域や皮質一般の機能原理の解明を目指す議論を深めることを目的としている。

研究会では、まず、金子武嗣先生（京都大学大学院医

学研究科）が細胞膜移行性緑色蛍光タンパク質を発現する Sindbis virus を利用した単一ニューロンの軸索を完全に可視化できる新しい方法を紹介し、その応用例を示した。この方法は大脳皮質の「ハードウェア」を単一細胞レベルで解明するのに、これから大いに威力を発揮すると期待できる。一方、喜多村和郎先生（東京大学大学院医学系研究科）が 2 光子顕微鏡を利用した効率的な *in vivo* パッチ記録法について解説し、その応用例を提示した。この方法は *in vivo* において大脳皮質の神経細胞とシナプスの統合機能や動的性質を解明するのに威力を発揮し、皮質の「ソフトウェア」の解明に役立つと期待できる。さらに、大脳皮質視覚野の可塑性について、名古屋大学環境医学研究所の小松由紀夫先生が抑制性シナプス

伝達の長期可塑性の角度から、大阪大学大学院生命機能研究科の山本亘彦先生が神経活動と回路形成の角度から、鳥取大学大学院医学研究科の畠義郎先生が経験依存的な可塑性の角度から、それぞれ追究した研究成果が発表され、大脳皮質の可塑的性質とそのメカニズムの一部

が示された。これらの研究発表に刺激され、二日間にわたって会場から大変活発な質疑応答がなされた。時間を気にせずに討論を続ける研究会の方針は参加者に特に好評であった。

(1) 視床プロジェクト：視床運動核から皮質への投射

金子武嗣（京都大学大学院・医学研究科・高次脳形態学）

細胞膜移行性緑色蛍光タンパク質 (palGFP) を発現する Sindbis virus をニューロントレーサーに用いると、生体内での単一ニューロンの軸索を完全に可視化できる。この手法を中脳ドパミンニューロン・線条体投射ニューロンなどですでに使い始めているが、一方で研究室内では「視床プロジェクト」として、視床運動核 (VA-VL)・VM 核・MD 核・外側膝状体・LP 核・後核群・髄板内核群・前核群などの視床投射ニューロンへの応用研究を行っている。最近の視床運動核について知見は以下のよう

にまとまった：

(1) VA-VL 核は小脳からの興奮性入力強い部分 (excitatory subcortical input-dominant zone EZ) と大脳基底核からの抑制性入力強い部分 (inhibitory input-dominant zone IZ) に分かれる。

(2) EZ ニューロンは IZ ニューロンよりも樹状突起が豊富である。

(3) IZ ニューロンは大脳皮質へ投射する際、軸索側枝を線条体に出力するが、EZ ニューロンは出力しない。

(4) IZ ニューロンも EZ ニューロンも共に、皮質運動野を含めて大変広い範囲に投射する。したがって、これらのニューロンは、感覚系視床ニューロンとまったく異なり、カラム状の情報処理をしていないと考えられる。

(5) IZ ニューロンは皮質の第 1 層にその出力の 50% 以上を投射するのに、対して EZ ニューロンは皮質中間層に出力する。したがって、IZ ニューロンのターゲットは 2/3 層あるいは 5 層の錐体ニューロンの尖状樹状突起であり、EZ ニューロンのそれは基底樹状突起であると考えられる。

これらの所見から、運動関連皮質の神経回路について議論してみたい。また、VM 核・MD 核等についても、可能ならば議論して行きたい。

(2) 発達期小脳における神経回路形成の *in vivo* 解析

河村吉信，中山寿子，喜多村和郎，狩野方伸（東京大学大学院・医学系研究科・神経生理学）

生後発達期の中枢神経系では、発達初期に一過性の過剰なシナプス結合が形成されるが、その後、必要な結合は神経活動依存的に強化される一方で、不必要な結合は弱化されて最終的に除去される。このような過程が、適正な機能的神経回路網の形成に必須であると考えられている（シナプスの刈り込み）。これまでわれわれは、発達期小脳における登上線維-プルキンエ細胞シナプスを刈り込みのモデルとして研究を行い、その分子細胞メカニズムを明らかにしてきた (Hashimoto and Kano, 2005)。

しかし、発達期の動物個体 (*in vivo*) の小脳におけるどのようなパターンの神経活動が、シナプスの刈り込みに関係しているのかという点はほとんど明らかではなかった。そこで、今回、*in vivo* ホールセルパッチクランプ法を用いて、複数の登上線維支配をうける発達期小脳プルキンエ細胞から電気活動を記録し、その入出力を詳細に解析した。まず、発達期のプルキンエ細胞には複数の登上線維シナプスが同期的に入力すること、さらにこの同期入力はプルキンエ細胞にバースト状の発火 (Burst

spiking: BS) を引き起こすことを見いだした。また、BS に先行する複数の興奮性シナプス入力 (EPSP) の強度を解析したところ、入力する個々の EPSP の強度は BS とのタイミングに依存することが明らかになった。さらに、

発達に伴い、BS 発生直前に観察される EPSP の強度が選択的に増強していくことがわかった。これらの発見は発達期におこる選択的な登上線維入力の強化は発火タイミング依存的に決定されることを示唆している。

(3) 発達期に見られる視覚経験依存的な視床－皮質投射の再編成

畠 義郎 (鳥取大学大学院・医学研究科)

哺乳類視覚系の眼優位可塑性は、脳の経験依存的発達を理解するための強力なモデルである。生後初期に、一方の眼からの視覚入力を遮断すると、視覚野ニューロンは遮蔽眼への反応性を急速に失い、視床外側膝状体から視覚野への入力軸索のうち、遮蔽眼入力を運ぶものが顕著な退縮を示すとともに、視覚野上でのその投射領域が縮小する。

一方、片眼遮蔽の際に皮質ニューロンの活動を GABA 受容体作動薬で抑制しておくと、通常と逆に、皮質ニューロンは健常眼への反応性を失い、さらに健常眼の情報を運ぶ入力軸索が退縮する。このことは、視覚情報を運ぶ軸索が、標的ニューロンの反応を得られない時、すなわち無効であった場合に、それを淘汰する仕組みが働いて

いることを示している。さらに、ボツリヌス毒素により神経伝達を遮断した皮質でも、同様の視覚入力依存的な軸索退縮が観察されたことから、この変化は、シナプスを介した相互作用を必要としない、シナプス前メカニズムによると考えられる。

この抑制皮質での可塑性の年齢依存性を確認したところ、ネコの眼優位可塑性のピークとされる生後 24 日付近では観察されず、臨界期の終盤である生後 40 日付近で強く観察された。このことから、抑制皮質に見られる軸索再編成は、発達期の後期にのみ発現する可能性が考えられる。すなわち、脳機能が獲得される時期の後に、それが神経回路の再編成により固定される可能性が考えられる。

(4) 神経活動依存的な皮質神経回路の形成機構

山本亘彦 (大阪大学大学院・生命機能研究科)

脳の発生・発達期において、軸索は適切な経路を成長し、標的領域に到達すると枝分かれ・シナプス形成することによって個々の神経細胞と結合する。この神経回路形成の過程において、転写調節因子の発現、引き続きガイダンス分子やその受容体分子の発現などの遺伝的要因がその基本構造を決定するが、一方神経細胞の発火やシナプス伝達による神経活動が重要な役割を果たしていることが示唆されている。これまでに、私たちは大脳皮質における主要な神経回路である視床皮質投射系におい

て、視床軸索が層特異的に枝分かれを形成する分子機構が存在すること、ならびにその枝分かれ形成は視床ニューロンや皮質ニューロンの神経活動によっても制御されることを見出している。興味深い問題は、神経活動が及ぼす生理学的作用、ならびにその分子機構にあると言える。本研究会では、これらの問題に対するアプローチ、成果を紹介し、神経活動依存的な回路形成のメカニズムについて検討する。

(5) 視覚野抑制性シナプスの両方向性可塑性

小松由紀夫（名古屋大学・環境医学研究所）

視覚野錐体細胞の抑制性シナプスでは機能が異なる 2 種類の両方向性の可塑的変化が起こる。一方は、覚醒と睡眠に伴う錐体細胞の反応性の増減に寄与すると考えられるものである。錐体細胞は覚醒時には少し脱分極して活動電位を繰り返し発生する。この状態をスライス標本で再現すると細胞体の抑制に長期抑圧が生じる。徐波睡眠時に見られる、膜電位の低周波振動とその脱分極相での活動電位発生により、細胞体の抑制に長期増強が生じる。抑圧は L 型 Ca^{2+} チャンネルの活性化による GABA_A 受容体のシナプス膜からの除去により、増強は R 型 Ca^{2+} チャンネルの活性化による GABA_A 受容体のシナプス膜への輸送により生じる。他方の可塑性は、シナプス活動を誘発に必要とし、経験依存的視覚機能の発達に寄与する

と考えられる。シナプス前線維に高頻度刺激を与えると、興奮性入力と抑制性入力の相対的強さに依存して、抑制性シナプスに長期増強あるいは長期抑圧が生じる。シナプス後細胞が十分に脱分極し NMDA 受容体が活性化されて Ca^{2+} 濃度が上昇すると長期抑圧が起こり、NMDA 受容体の活性化が不十分な場合には長期増強が生じる。長期増強の誘発には、シナプス後細胞の GABA_B 受容体の活性化、 IP_3 受容体を介する細胞内ストアーからの Ca^{2+} 放出、その結果シナプス後細胞から放出される BDNF によるシナプス前部の TrkB の活性化が必要で、増強はシナプス前部に発現すると思われる。このように 2 種類のシナプス可塑性は分子機構も全く異なっている。

12. 脳機能画像解析中級編：領域間結合解析

2009 年 9 月 24 日－9 月 25 日

代表・世話人：河内山隆紀 (ATR-Promotion 脳活動イメージングセンタ)

所内対応者：定藤規弘 (自然科学研究機構生理学研究所心理生理研究部門)

(1) 領域間結合分析の考え方とその実習

河内山隆紀 (ATR-Promotion 脳活動イメージングセンタ)

(2) 領域間結合解析の実際 ―課題設計・解析・結果の報告―

藤井 猛 (国立精神・神経センター・精神保健研究所・成人精神保健部)

【参加者名】

相澤恵美子 (東北大学行動医学分野), 赤塚 論 (関西学院大学大学院理工学研究科), 出馬圭世 (玉川大学脳科学研究所), 伊藤岳人 (日本医科大学大学院医学研究科), 伊藤博晃 (北海道大学大学院文学研究科), 上田一貴 (東京大学先端科学技術研究センター), 臼井信男 (日本大学大学院総合科学研究科), 大隅尚広 (名古屋大学大学院環境学研究科), 岡田成生 (自治医科大学大学院医学研究科), 小川昭利 (理化学研究所脳科学総合研究センター), 小田正起 (KARC 神戸研究所未来 ICT 研究センター), 小俣圭 (国立精神・神経センター神経研究所), 笠原和美 ((独) JST ERATO 下条潜在脳機能プロジェクト意思決定研究グループ), 金津将庸 (京都大学人間・環境学研究科), 寒 重之 (情報通信研究機構未来 ICT 研究センター), 小林琢也 (岩手医科大学歯学部), 佐藤 弥 (京都大学霊長類研究所), 鹿内 学 (京都大学大学院医学研究科), 重宗弥生 (東北大学加齢医学研究所), 篠崎 淳 (札幌医科大学医学部), 須藤千尋 (千葉大学医学研究院), 高橋英之 (玉川大学脳科学研究所), 橘 亮輔 (同志社大学大学院生命医科学研究科), 田部井賢一 (日本大学大学院総合科学研究科), 長塚昌生 (大阪大学経済研究科), 中村

優子 (九州大学歯学部大学院), 能田由紀子 (ATR-Promotions), 土師知己 (玉川大学脳科学研究所), 橋本照男 (理化学研究所 BSI 象徴概念発達研究チーム), 春野雅彦 (玉川大学脳科学研究所), 藤井 猛 (国立精神・神経センター精神保健研究所), 松田雅弘 (了徳寺大学健康科学学部), 松田哲也 (玉川大学脳科学研究所), 松田佳尚 (JST-ERATO 岡ノ谷情動情報プロジェクト), 松元まどか (玉川大学脳科学研究所), 眞野博彰 (産業技術総合研究所), 水口暢章 (早稲田大学大学院スポーツ科学研究科), 宮腰 誠 (国立長寿医療センター研究所), 山田真希子 ((独) 放射線医学総合研究所), 山田 祐 (国立がんセンター東病院臨床開発センター), 山根承子 (大阪大学経済学研究科), 祐伯敦史 (立命館大学生命科学部), 楊 家家 (岡山大学大学院自然科学研究科), 吉澤浩志 (東京女子医科大学), 李 春林 (岡山大学大学院自然科学研究科), 渡邊言也 (玉川工学研究科), 原田宗子 (名古屋大学医学系研究科), 平松千尋 (生理学研究所), 原田卓哉 (生理学研究所), 木田哲夫 (生理学研究所), 田中絵実 (生理学研究所), 坂谷智也 (生理学研究所)

【概要】

1990 年に発見された機能的磁気共鳴画像法 (以下 fMRI) はヒト脳機能を非襲的に探る上で卓越した可能性をもっている。その発展の一端を担っているのが様々な解析手法である。近年、差分法による伝統的な手法に加えて、脳機能画像の時空間情報を最大限に活用した新しい解析手法が提案されている。我々はこれらの解析に精通し、積極的に利用することが求められているが、その一方で、学際性の高い脳科学分野においては、数理的な

学問背景を持たない研究者や学生も多く、先進的手法に取り組む際の敷居が大変高いのも事実である。実際、国内からの研究成果の発信は、まだ少なく、啓蒙や教育活動が必要であると考えられる。このような fMRI を取り巻く現状を鑑み、国内の脳機能画像法研究の更なる発展のためには、先進的な解析法に関する議論や知識を共有する場の整備が急務であると考え、新しい形の研究会の開催するに至った。

本年度は、脳領域間結合解析をテーマとした。従来の差分法は、脳機能の局在性評価に特化した方法論であったが、本解析法は、局在化した機能領域の統合過程を評価できる手法である。近年、世界的に関心の高まりを見せている分析法の1つであり、国内のfMRI研究がその流れに乗り遅れないためにも、本解析法をテーマとした研究会を開催したいと考えた。

ホームページ等により参加者を募ったところ、定員25名を大きく上回る65名の参加希望者を得た。選考の結

果、45名の参加者で実施した。事後アンケートの結果では、講義や実習を含む新しい研究会の形式は極めて好評で、次年度以降もこのような形式の研究会の実施を望む声が多く寄せられた。また領域間結合分析を自らの実験に取り入れたいと考える参加者が多く見られ、本研究会の開催意義が改めて感じられた。このような先進的な解析法に従事する研究者が増えることで、実際の適用例についての議論も可能となり、今後の研究会の更なる発展が期待される。

(1) 領域間結合分析の考え方とその実習

河内山隆紀 (ATR-Promotion 脳活動イメージングセンタ)

脳機能画像法は、差分法と呼ばれる脳機能の局在性評価に特化した解析法で発展したが、近年、逆に局在化した機能領域の機能統合の過程を評価できる方法である、脳領域間結合分析法が提案された。その思想自体は、脳機能画像法の黎明期より存在したが、近年、動力学的モデルや時系列分析の考え方を発展的に融合することで、例えば、影響の因果性を加味した神経回路レベルでのモデル評価が可能となった。近年、世界的に関心の高まりを見せている分析法の1つである。

本研究会では、まず本解析法の原理や方法に関する知識を講義を通して参加者全員で共有し、その後、実際のデータを用いて、本解析法の技能を身につける時間を設けた。さらにその結果を検討することで、当解析法の有効性や問題点を確認した。また既に本解析法に取り組んでいる研究機関や個人に対しては、研究過程で生じた疑問や課題を持ち寄り、問題解決の糸口を掴むための自由な議論の場を設けた。以上のように、本発表は、全員参加の研究会の場とした。

(2) 領域間結合解析の実際 — 課題設計・解析・結果の報告 —

藤井 猛 (国立精神・神経センター・精神保健研究所・成人精神保健部)

近年、機能的磁気共鳴画像法 (fMRI) において、connectivity 解析 (脳領域間の関係性の解析) に注目が集まっている。しかし、従来の解析方法とは理論および手順が大きく異なるため、独力でその理論を理解した上で、自らの研究に適用するにはハードルが高い。そこで今回、代表的な connectivity 解析の一種である Dynamic causal modeling (DCM) について、その解析と結果の実例を示して適用方法を解説した。

例では失明者による触覚点字判別課題遂行時のデータを用い DCM で解析した。結果は失明者において晴眼者よりも、一次体性感覚野から視覚の背側経路を経て、後頭葉にいたる経路の connectivity が強いことを示した。ま

たこれらの connectivity の強さは失明年齢と負の相関を、課題成績と正の相関を示した。これにより失明者では視覚入力がないにも関わらず、背側経路を介して (晴眼者で視覚野にあたる) 後頭葉に活動が伝播して点字判別に寄与している可能性が示唆された。

このように DCM を有効に使う為には、先行研究から領域間の connectivity に関する仮説を絞り込むことが重要であり、また解析においては従来の方法とは計画行列の組み方が異なることに注意が必要である。これらの理解を通じて、今後 DCM が適用されて多くの成果が生み出されることを期待する。

13. 第3回 Motor Control 研究会

2009年5月28日－5月30日

提案代表者：北澤 茂（順天大・医）

世話人：笥 慎治（都神経研・認知行動）

所内対応者：伊佐 正，関 和彦（生理研・認知行動発達）

（特別講演）中心後回における情報処理について

岩村吉晃（川崎医療福祉大）

（シンポジウム1）運動制御における未解決問題－オムニバース

オーガナイザー：笥 慎治（都神経研・認知行動）

（S1）眼を動かしても世界が動かない理由

北澤 茂（順天大・医）

（S2）運動制御において、顕在と潜在はどのようにインタラクションするのか？

五味裕章（NTT 基礎研・人間情報研究部，JST・ERATO 下條潜在脳プロジェクト）

（S3）社会適応的な運動制御理解へのアプローチ

藤井直敬（理化学研究所）

（S4）遺伝子改変マウスを用いた運動制御の研究の今後の展開

西丸広史（筑波大）

（S5）リハビリテーションに関係した未解決問題－同側経路が寄与しうるのか－

大須理英子（ATR 脳情報研究所）

（S6）複数の運動野があるのは何故？

星 英司（玉川大）

（S7）もうひとつの運動指令

関 和彦（生理研）

（S8）小脳内部モデルに関する素朴な疑問から

笥 慎治（都神経研）

（1）G-substrate の小脳依存性運動学習における役割

岡本武人，白尾智明，遠藤昌吾，永雄総一

（群馬大・院・神経薬理，理研脳センター・運動学習制御，OIST）

（2）小脳における情報処理－入力と出力に含まれる情報の違い－

戸松彩花，笥 慎治（都神経研・認知行動）

（3）金魚小脳 Purkinje 細胞単一神経活動による直流モータ適応制御

片桐和真¹，田中良幸²，平田 豊¹

（¹中部大院・工・情報，²中部大・情報科学研究所）

（4）サル F5-AIP 野における手操作関連神経活動の情報量解析

石田文彦，村田 哲，阪口 豊

（富山高専・電気工学，近畿大・医・第一生理，電通大院・情報システム学）

（5）一次運動野の情報表現に関する考察

宮下英三（東工大院・総理工）

（6）トレッドミル歩行中におけるサル一次運動野の神経細胞活動

中俣克己，森 大志，村田 哲，稲瀬正彦（近大・医・生理，山口大・農・獣医）

- (7) 姿勢変化による短潜時腕運動応答モジュレーションのメカニズム
門田浩二, 五味裕章 (JST-ERATO 下條潜在脳プロジェクト, NTT 基礎研)
- (8) 視線移動に伴った視覚誘導性腕応答のゲイン更新
安部川直稔, 五味裕章 (NTT 基礎研, JST-ETRO 下條潜在脳プロジェクト)
- (9) 経頭蓋的磁気刺激法 (TMS) による運動関連対刺激での脳可塑性の誘導
美馬達哉, Mohamed Nasreldin Thabit Hamdoon, 植木美乃, 小金丸聡子, 福山秀直
(京大院・医・高次脳)
- (10) 身体運動制御に潜む脳内情報処理の冗長性
平島雅也, 野崎大地 (東京大・教育学研究科)
- (11) 特異値分解による歩行運動の制御パラメータの検討
船戸徹郎, 青井伸也, 土屋和雄
(京大院・工・機械理工, 京大院・工・航空宇宙, 同志社・理工・エネ機)
- (12) 弾道歩行に基づくヒト2足歩行の重心軌道解析
香川高弘, 宇野洋二 (名大院・工・機械理工学)
- (13) 歩行中の手先振動を緩和するメカニズム
東郷俊太, 香川高弘, 宇野洋二 (名大院・工・機械理工学)
- (14) 歩行運動における感覚フィードバックの役割
河島則天, 中澤公孝 (国立リハセンター)
- (15) ヒトの歩行における脚関節間協調の解析
垣内田翔子, 橋爪善光, 西井 淳 (山口大院・理工)
- (シンポジウム2) 運動タイミングとリズムの制御機構の研究
オーガナイザー: 大前彰吾 (北大院・医学研究科)
- (S9) サル前頭前野における時間長の認知と再生
湯本直杉 (都神経研)
- (S10) 運動のタイミング制御における前頭葉内側部の役割
國松 淳 (北大院・医学研究科)
- (S11) 経過時間を表現する補足眼野神経活動の研究
大前彰吾 (北大院・医学研究科)
- (S12) タイミング機構の小脳モデル
山崎 匡 (理化学研究所)
- (S13) サルにおけるリズム制御機構
鴻池菜保 (京大・霊長研)
- (16) 大脳皮質 MST 野における追従眼球運動適応中のニューロン活動
大藤智世, 竹村 文 (筑波大院・人間総合・感性認知, 産総研・脳神経)
- (17) 片側一次視覚野切除サルの記憶誘導性サッケードとその神経機構
高浦加奈, 吉田正俊, 伊佐 正 (総研大・生命科学, 生理研・認知行動発達, CREST・JST)
- (18) サッケード眼球運動制御における一次視覚野の機能
池田琢朗, 吉田正俊, 伊佐 正 (生理研, CREST・JST, 総研大)
- (19) サル前頭眼野注視ニューロンの活動とサッケードの抑制
伊澤佳子, 鈴木寿夫, 篠田義一 (東京医科歯科大院・医・システム神経生理)

(20) 上丘スライス標本上での salience map

伊佐 正, Penphimon Phongphanphanee, Robert Marino, 金田勝幸, 柳川右千夫, Douglas Munoz
(生理研・認知行動発達, カナダ・クイーンズ大, 群馬大・遺伝発達行動学)

(21) 視覚的定位行動課題の意思決定におけるラット上丘の働き

長谷川良平, 長谷川由香子 (産総研・脳神経情報・ニューロテクノロジー)

(22) 時間差の学習と同時性の変化

小池康晴, 米山和也, 大石圭一, 川瀬利弘, 神原裕行 (東工大・精密工学研究所)

(23) 運動イメージ想起中の大脳皮質運動野の興奮性変化に対する size-weight illusion の影響

東登志夫, 菅原憲一, 木下 清, 船瀬広三, 笠井達哉
(神奈川県立保健福祉大, 大阪大院・医・予防環境医, 広島大院・総合科学・人間科学, 広島大)

(24) 手位置の脳内表現

羽倉信宏, 番 浩志, Ganesh Gowrishankar, 山本洋紀, 春野雅彦
(ATR 脳情報研究所, Univ. Birmingham, 京都大・人環)

(25) 脚移動体における身体ダイナミクスを考慮した運動制御法の構築

松下光次郎, 横井浩史 (東大院・工・精密機械工学)

(26) 筋電義手の操作に対する習熟度の定量的評価法

北佳保里, 加藤 龍, 横井浩史 (東大院・工・精密機械工学)

(27) 最速タッピング課題からみた指の運動機能トレーニング

青木朋子, 福岡義之, 木下 清 (熊本県立大・環境共生学, 大阪大院・医)

(28) 全身リズム動作における感覚運動協応

三浦哲都, 工藤和俊, 金久博昭 (東京大・総合文化)

(29) 金管楽器演奏中の表情筋の筋活動様相

平野 剛, 三浦哲都, 吉江道子, 工藤和俊, 大築立志, 木下 博
(大阪大院・医・予防環境医, 東京大院・総合文化・生命環境)

(30) 歌唱を伴った表打ちと裏打ちタッピング運動時の脳活動比較-fMRI 研究

小幡哲史, 深見のどか, 植月 静, 木下 博
(大阪大院・医・予防環境医, (株)ニッソーネット, 西播磨リハ病院)

(31) 熟練ドラム奏者の音圧制御動作における音圧パラメータ動作パラメータの関連性

藤井進也, 平島雅也, 工藤和俊, 中村仁彦, 大築立志, 小田伸午
(京大院・人間環境学, 東大院・教育学・総合文化・情報理工学)

(シンポジウム3) 多面的スケールによる脳機能計測・解析法を求めて～超若手の目に映る研究の現場～

オーガナイザー: 深山 理

(S14) ラットカーシステムを用いた運動皮質における可塑的な機能変化抽出の試み

深山 理 (東京大・情報理工)

(S15) 硬膜外神経活動計測を用いた低侵襲 BMI の実現可能性の検討

加藤 龍 (東京大・工学)

(S16) Granger Causality を用いたサルの ECoG における複数領野間の関係性の変化の解析

竹中一仁 (東京大・情報理工)

(S17) 同期における位相角度の分布に基づく領野間の関係性の推定

柳川 透 (理化学研究所)

(シンポジウム4) 脳はどのように両手の協調運動制御を実現するのか?

オーガナイザー: 櫻田 武

- (S18) 両側運動における拘束条件と左右制御系間相互作用の役割
櫻田 武 (東工大)
- (S19) 両腕到達運動中の脳内過程—対側の腕運動に応じた運動学習メモリ (制御過程) の切り替わり—
横井 惇 (東京大)
- (S20) 両手運動の協調パターンと脳活動
荒牧 勇 (情報通信研究機構)
- (32) サル皮質脊髄路：一次運動野手指制御領域から脊髄への軸索投射の髄節及び
脊髄灰白質各層における定量的解析
吉野一斉藤紀美香, 西村幸男, 大石高生, 伊佐 正
(産総研・脳神経情報・システム脳, ワシントン大・生物物理,
京大・霊長研・分子生理, 生理研・認知行動発達, CREST/JST)
- (33) 覚醒サルにおける筋由来の感覚入力に対するシナプス前抑制制評価法の開発
金 祉希, 関 和彦 (生理研・認知行動発達, 総研大・生命科学)
- (34) 把握運動制御における大脳皮質および脊髄神経機構の機能的差異
武井智彦, 関 和彦 (生理研・認知行動発達, 総研大・生命科学)
- (35) 脊髄反射経路における姿勢と運動の制御
高草木薫 (旭川医大・生理学・神経機能)
- (36) 運動単位の動員；発火に関するタマネギ層構造は本当か？
大屋知徹, Stephan Riek, Andrew G. Cresswell
(School of Human Movement Studies, The University of Queensland)
- (37) 頬ひげ刺激に対する覚醒マウスの脳血管反応
田桑弘之, 正本和人, ヨーナス・オーディオ, 松浦哲也, 小島隆行, 管野 巖
(放医研・分イメ, 電通大・工, クオーピオ大, 岩手大・工)
- (38) 近赤外分光計測画像法による筋出力の再構成
南部功夫, 大須理栄子, 佐藤雅昭, 安藤創一, 川人光男, 内藤栄一
(奈良先端大院・情報, ATR 脳情報研, 京都府立医大・医, NICT)
- (39) 脳損傷後の機能回復に対する運動訓練の効果とそのメカニズムの解明
村田 弓, 肥後範行, 西村幸男, 大石高生, 塚田秀夫, 伊佐 正, 尾上浩隆
(産総研・脳神経, ワシントン大, 京大霊長研・分子生理,
浜松ホトニクス・中央研, 生理研・認知鼓動発達, 理研・分子イメージング)
- (40) 慢性期脳卒中片麻痺患者における高頻度磁気刺激と伸筋群の運動訓練の組み合わせによる
上皮機能の回復
小金丸聡子, 美馬達哉, Mohamed Nasreldin Hamdoon, 福山秀直, 道免和久
(兵庫医大院・医・リハビリ, 京大院・医・高次脳研)
- (41) パーキンソン病の運動・認知能力低下の病態解明
花川 隆 (国立精神・神経センター・疾病七部)
- (42) 内部モデルを用いた終端位置制御仮説による筋活動予測
神原裕行, 小池康晴 (東工大・精密工学)
- (43) 動作立ち上がり時の表面筋電位信号を用いた指動作識別
近藤玄大, 加藤 龍, 横井浩史, 新井民夫 (東大院・工・精密機械)
- (44) 筋肉の協調動作に基づいた起立動作の解析
安 琪 (東大院・精密工学)

(45) 手首運動における2つの制御系の同定

【参加者名】

岩村吉晃 (川崎医療福祉大), 相原孝次 (ATR・脳情報), 青木朋子 (熊本県立大・環境共生学), 安部川直稔 (NTT基礎研・感覚運動), 荒牧 勇 (情報通信研究機構・バイオ ICT), 安 琪 (東大院・精密工学), 池上 剛 (東京大院・身体教育学), 池田琢朗 (生理研・認知行動発達), 伊佐 正 (生理研・認知行動発達), 伊澤佳子 (東京医科歯科大・システム神経生理), 石田文彦 (富山高専・電気工学), 一戸紀孝 (弘前大・医), 井上雅仁 (順天堂大・医), 内田雄介 (早稲田大・スポーツ科学), 宇野洋二 (名古屋大院・機械理工), 梅田達也 (生理研・認知行動発達), 大須理英子 (ATR・脳情報研), 大築立志 (東京大院・総合文化), 大藤智世 (筑波大・人間総合・感性認知脳), 大前彰吾 (北大院・医・認知行動), 大屋知徹 (生理研・認知行動発達), 岡本武人 (群馬大・医・神経薬理), 小幡哲史 (大阪大院・医・予防環境医), 垣内田翔子 (山口大院・物理情報科学), 香川高弘 (名古屋大院・機械理工), 寛 慎治 (都神経研・認知行動), 片桐和真 (中部大院・情報工学), 加藤寛之 (東京大院・身体教育), 加藤 龍 (東京大院・精密機械工学), 門田浩二 (JST-ERATO 下條潜在脳機能), 金子将也 (総研大・生命科学), 金田勝幸 (生理研・認知行動発達), 彼末一之 (早稲田大・スポーツ科学), 苅部 淳 (順天堂大・医), 河島則天 (国立リハ研・運動機能障害), 神原裕行 (東工大・精密工学), 北佳保里 (東京大院・精密機械工学), 北澤 茂 (順天堂大・医), 木下 博 (大阪大院・予防環境医), 金 祉希 (生理研・認知行動発達), 国松 淳 (北大院・医), 小池康晴 (東工大・精密工学), 鴻池菜保 (京大霊長研・高次脳機能), Gowrishankar Ganesh (ATR・脳情報研), 小金丸聡子 (京都大・高次脳機能), 五味裕章 (NTT基礎研), 近藤玄大 (東京大院・精密機械工学), 阪口 豊 (電通大院・情報システム), 櫻田 武 (東工大・総合理工), 下門洋文 (筑波大院・人間総合科学), 杉山容子 (筑波大院・人間総合科学), 鈴木裕輔 (奈良先端大・情報科学), 関 和彦 (生理研・認知行動発達), 高浦加奈 (生理研・認知行動発達), 高草木薫 (旭川医大・生理学), 田桑弘之 (放医研・分子イメージング), 武田湖太郎 (国

李 鐘昊, 寛 慎治 (東京都神経研・認知行動)

際医療福祉大学病院・神経内科), 武井智彦 (生理研・認知行動発達), 竹中一仁 (東京大院・情報理工), 田中真樹 (北大院・認知行動), 田中良幸 (中部大・情報工学), 東郷俊太 (名古屋大院・機械理工), 戸松彩花 (都神経研・認知行動), 内藤栄一 (ATR・未来 ICT 研), 長坂泰勇 (理研・脳科学研), 中岡克己 (近畿大・生理学), 南部功夫 (奈良先端大院・情報生命), 西丸広史 (筑波大院・人間総合科学), 野崎大地 (東京大院・身体教育学), 羽倉信宏 (ATR・脳情報研), 長谷川良平 (産総研・脳神経情報), 畑中信彦 (生理研・生体システム), 花川 隆 (国立精神・神経センター・神経研), 東登志夫 (神奈川県立保健福祉大・リハビリ), 平島雅也 (東京大院・身体教育学), 平田 豊 (中部大・情報工学), 平野 剛 (大阪大院・予防環境医), 廣瀬智士 (京大院・人間環境学), 深山 理 (東京大院・情報理工), 福村直博 (豊橋技科大・情報工学), 藤井進也 (京大院・人間環境学), 藤井直敬 (理研・脳科学総合センター), 藤本 淳 (京大院・認知行動), 船戸徹郎 (京大院・人間環境学), 星 英司 (玉川大・脳研), 松下光次郎 (東京大院・精密機械工学), 三浦哲都 (東京大院・総合文化), 三島健太郎 (順天堂大・医), 水口暢章 (早稲田大院・スポーツ科学), 美馬達哉 (京大院・高次脳機能総研), 宮下英三 (東工大・総合理工), 宮地重弘 (京大霊長研), 村田 哲 (近畿大・医), 村田弓 (産総研・脳神経情報), 柳川 透 (理研・BSI), 山形朋子 (玉川大院・工学), 山崎 匡 (理研・BSI・脳科学総合研究センター), 湯本直杉 (都神経研・認知行動), 横井 惇 (東京大院・身体教育), 吉野一斉藤紀美香 (産総研・脳神経情報), 李 鐘昊 (都神経研・認知行動), 渡辺秀典 (生理研・認知行動発達), 岡本悠子 (生理研・心理生理), 北田 亮 (生理研・心理生理), 木田哲夫 (生理研・感覚運動), 岡澤剛起 (生理研・感覚認知), 坂野拓 (生理研・感覚認知), 高原大輔 (生理研・生体システム), 吉田 明 (生理研・多次元), 廣川純也 (基生研・脳生物), 東島眞一 (生理研・神経分化), 槌矢正矢 (京都大), 宮原資英 (生理研), 中村 徹 (其生研・脳生物), 波間智行 (生理研) 糸数隆秀

【概要】

第三回になる本研究会には 101 人の参加があった。世話人は東京都神経科学研究所の笥慎治であった。参加者の平均学位習得後年は約 5 年であり、また工学・体育・リハビリテーションなど学際分野からの参加者が大半をしめた。従って、若手・中堅中心の学際分野を含めた参加者が多数集まるという目的は過去 3 年を通して達成されていると考えられる。また本研究会ではボトムアップ的な運営を行うという方針から、希望者には発表をしてもらうという新たな試みを行った。その結果、合計 68 の口演+ポスター発表があり、活気のある議論が行われた。第二回より開催した優秀発表賞などの試みも定着し

てきた。特別講演では長年体性感覚の研究に関わり、世界の研究をリードされてきた川崎医療福祉大学の岩村吉晃をお願いし、若い世代研究者にとっては今後の研究生生活のよい指針となった。第二回ではランチョンシンポジウムにおいて、生理学だけでなく工学・心理学など学際分野で活躍している PD や若手研究者に講演をいただいた。今年度はこの試みを発展させ、やはり PD など若手中心の公募シンポジウムを企画し、興味深い 4 シンポジウムが行われた。若手研究者が自発的にシンポジウムをオーガナイズし、それをきっかけに研究コミュニティを深化させる試みは成功であった。

（特別講演）中心後回における情報処理について

岩村吉晃（川崎医療福祉大）

体性感覚野の研究史、サル中心後回などにおける情報処理機構において明らかにされてきた知見について、解説がなされ、さらに最近のヒトでの研究についても説明が加えられた。特に、体部位局在的再現 (Somatotopy),

階層的情報処理 (Hierarchical processing), 肢節運動失行 (Limb-Kinetic Apraxia), 触視覚統合などについてご自身の研究成果の中から運動制御と関連の深いテーマを中心に解説が加えられた。

（シンポジウム1）運動制御における未解決問題ーオムニバースー

オーガナイザー：笥 慎治（東京都神経研）

無知の知は理解の出発点である。運動制御について、我々は何を知らないのか？ いくつかの専門分野における未解決問題をオムニバース的に取り上げ、なぜ重要か？ 解決されたらどんな視界が開けるのか？ ではアブロー

チは？・・・等について分かり易く解説し、運動制御の研究における我々の現在位置と今後について考えるきっかけを提供したい。

（S1）眼を動かしても世界が動かない理由

北澤 茂（順天大・医）

我々は 1 秒に 3 回もサッカードを行って外界の情報を取り入れている。網膜像はずれるにもかかわらず、周囲の世界は動かず、我々はサッカードしたことに気付きもしない。一方、目を指で押すと簡単に世界は動く。自分

で足の裏や脇腹をくすぐってもくすぐったくない。しかし、他人にくすぐられるとくすぐったい。二人がペアになって相手の手を交互に押す。「相手に押されたのと同じ強さで押す」というルールを強調しても、押す強さは

エスカレートする。これらの現象は皆、「運動指令の遠心性コピーが運動の結果として生じる求心性の感覚信号を打ち消す」という60年前の仮説で説明できる。しかし、神経系はやみくもに抑制をかけているわけではなく、

「運動の結果」を精密に予測した情報操作を実施しているらしい。神経機構の一端は明らかになっているが、本質の解明はこれからである。この問題は自他の区別の問題にもつながる哲学的にも重要な問題だと感じている。

(S2) 運動制御において、顕在と潜在はどのようにインタラクションするのか？

五味裕章 (NTT 基礎研・人間情報研究部, JST・ERATO 下條潜在脳プロジェクト)

我々は日常生活の動きの中で、慣れた状況とことなる状況におかれたとき「違和感」とよぶ感覚を覚えることがある。私は、この違和感は顕在と潜在（あるいは意識と無意識）のインタラクションの1つの形態であろうと考えている。脳は階層構造の情報処理を行っているといわれながらも、比較的計算理論が整理されてきた顕在的な運動制御と、生理的・行動的現象は捉えやすい自動的で無意識的な感覚運動をスムーズに結びつける枠組みは

十分整理されているとはいいがたい。違和感の情報処理を理解することは、それらを結びつける鍵の一つではないかと考えている。我々の研究室では、停止エスカレータ乗り込み時の動作変化と違和感を取り上げ、そのメカニズム解明を目指してきたが、そこから1つの仮説が浮かびあがってきた。本シンポジウムではその仮説や検証方法について議論いただければと考えている。

(S3) 社会適応的な運動制御理解へのアプローチ

藤井直敬 (理化学研究所)

これまで、皮質運動野における運動制御機構に関しては膨大な個別研究が行われてきた。それでは、私たちはその全貌を完全に理解したと言えるのだろうか？ いや、むしろ、個別研究を幾つ積み重ねても、その全貌には辿り着けないだろうと言う研究者は多い。何故か？ それは、個別の研究がそれぞれ微妙に異なる仮説を証明するための行動課題に基づいているからだ。行動課題とは、行動に関する拘束条件である。すなわち、過去の知

見は、その各個別拘束条件に最適化した脳機能を語っているにすぎない。しかし、社会適応行動のように再現不可能、予測不可能な環境で行われる意思決定のメカニズムを従来のやり方で理解しようとするなら、無限の仮説を立て、それに答え続けなければならない。本シンポジウムでは、私たち研究者が、この心地良い無限地獄から脱し、見通しの良い新しい地平に立つために何が必要かを議論する。

(S4) 遺伝子改変マウスを用いた運動制御の研究の今後の展開

西丸広史 (筑波大)

哺乳類の神経生理学研究において、マウスには現時点で他の哺乳類と比較して遺伝子工学的手法によるアプローチがしやすいという利点がある。例えばこれまで、1) 特定の遺伝子を欠損させたノックアウトマウスにおける

生理学的解析、2) 特異的な遺伝子を発現しているニューロン集団に GFP などの蛍光タンパク質を発現させ標識したマウスを用いて可視下に同定したニューロンの電気生理学的研究などが行われて来た。また最近、3) 特定の

ニューロン集団に異種由来のタンパク質（色素・リガンド・受容体）を発現させ、ニューロンの膜電位活動を制御するスイッチとして用いることでそのニューロン集団の神経回路での役割を明らかにする、といった研究が進

められている。本シンポジウムではこれらのアプローチによる運動制御の神経メカニズムの研究における可能性について論じたい。

（S5）リハビリテーションに関係した未解決問題－同側経路が寄与しうるのか－

大須理英子（ATR 脳情報研究所）

皮質損傷動物実験により、適切な訓練が脳神経系の可塑性を促し、損傷で奪われた機能を回復しうることが示されている。しかし、皮質下損傷が多くを占める脳卒中症例において、どの脳部位が回復に寄与するのか明らかではない。軽度片麻痺では、非麻痺手を拘束して麻痺手を強制使用することで、回復を促すことが実証されている（CI 療法）。非麻痺手拘束により非損傷半球から損傷半球への抑制が解除され損傷半球の可塑性が上昇すると

考えられている。一方、重度片麻痺では、非損傷半球の活動の上昇がみられることがあり、非損傷半球が同側の麻痺手の回復に寄与する可能性も示唆されている。そうであれば、重度片麻痺で非麻痺手を拘束するのは逆効果であり、両手協調運動を使った訓練が有効かもしれない。両側支配が多い近位の動きは回復が早く、同側経路による再学習が起こる可能性がある。これらが明らかになればより効果的なリハビリテーションが期待できる。

（S6）複数の運動野があるのは何故？

星 英司（玉川大）

サルとヒトを含む霊長類の前頭葉には、一次運動野と高次運動野がある。高次運動野は更に細分化されて、現在では、内側面には5つ、外側面には4つもの異なる領野があることが示唆されている。「何故このように多数

の運動関連領野があるのか？」という疑問に対する答えは未だ見つかっていないが、これを見つけようと奮闘することは徒労ではないという点について議論したい。

（S7）もうひとつの運動指令

関 和彦（生理研）

全ての運動は末梢の感覚受容器を刺激し、それらは感覚フィードバック信号として中枢神経系に伝達される。この情報は、遂行した運動のエラーを検出し運動指令をアップデートするのに使われている事はよく知られている。しかし、私は感覚フィードバックにはもう一つの役割、つまり運動指令としての役割があるのではないかと漠然と考えている。つまり、感覚フィードバック信号は高次中枢をバイパスして運動出力系を駆動する事ができ

る。脊髄反射や長潜時反射などはその顕著な例であろう。随意運動の際、一次求心神経は外部環境の変化によって多様な活動をすることが知られているから、それによって引き起こされる筋活動も多様なはずである。それなら、同様に環境に応じて多様なパターンで筋を動員できる下降性運動指令と同様、感覚フィードバック信号も運動指令と呼ぶことができるのではないか。このような末梢性運動指令と下降性運動指令は筋活動のどのような成分を

生成しているのか？ どのように共存しているのか？ 興味はつきない。

(S8) 小脳内部モデルに関する素朴な疑問から

笥 慎治 (都神経研)

小脳に内部モデルがあり予測的な制御に貢献しているという考え方は、広く受け入れられて現在の運動制御の理解の基礎になっている。実際、小脳疾患における神経学的観察、モデルによるシミュレーションならびに機能的イメージングの全てが、この仮説を支持する疑いようなない状況証拠を提供している。しかし、このようなマクロな計算論レベルの仮説 (Marr のレベル 1) を、一歩進めて小脳神経回路に対応させ、ニューロン活動のレベ

ルで理解しようと試みると (Marr のレベル 2, 3) たちまち行き詰る。実は我々は本物の神経回路のダイナミクスを全く知らず、40 年前の Eccles の認識にさえ及ばない事実には呆然とならざるを得ない。この状況は大脳皮質の多重ループネットワークのダイナミクスに目を転じた時、もはや絶望的な状況に見える。我々は、多くの力を結集し遥かな目標に至る戦略を立てる時期にある。

(1) G-substrate の小脳依存性運動学習における役割

岡本武人, 白尾智明, 遠藤昌吾, 永雄総一

(群馬大・院・神経薬理, 理研脳センター・運動学習制御, OIST)

小脳 LTD に NO-cGMP-PKG のカスケードが関与することが知られているが, PKG の基質の G-substrate (GS) の作用についての報告はない。先行研究より, 6 週齢の GS 遺伝子欠損マウス (GS KO) の小脳スライス標本では, LTD が減弱することが報告されている。そこで 6-12 週齢のマウスを用いて, GS KO と Wild-type (WT) の水平性視機性眼球運動 (HOKR) の適応を比較した。スクリーンの

回転刺激による訓練を 1 時間行くと短期の適応が誘発される。6 週齢の GS KO は WT よりも短期の適応が低下していたが, 12 週齢では回復していた。1 日 1 時間の訓練を 4 日間続けると長期の適応が生じるが, 12 週齢の GS KO は WT よりも長期の適応が低下していた。以上の結果は, NO-cGMP-PKG-GS のカスケードが 12 週齢での長期の運動学習に重要であることを示唆している。

(2) 小脳における情報処理—入力と出力に含まれる情報の違い—

戸松彩花, 笥 慎治 (都神経研・認知行動)

小脳は、大脳とともに運動制御に重要な役割を果たしていると言われ、有力とみられる仮説も立てられてきた。しかし、具体的にどのような役回りを担っているかに関する知見はまだ少ない。小脳の機能を論じるためには、小脳内部でどのような情報処理が行われているかの検証が有効である。小脳内のニューロンは、投射先ニューロンが規則的に決まっているため、同一の課題遂行に関す

る各ニューロンの活動を記録することにより、情報処理の流れを捉えることができる。我々のグループでは、右手首による 8 方向へのステップトラッキングを遂行中のサルと同側小脳半球部より 4 種類のニューロンの活動記録を行い、小脳内での情報の流れを追っている。今回は、小脳への入力 (苔状線維) および小脳からの出力 (小脳核) の細胞活動に関して、運動方向に関する情報解析を

行い、その差異を見いだしたので報告する。

(3) 金魚小脳 Purkinje 細胞単一神経活動による直流モータ適応制御

片桐和真¹，田中良幸²，平田 豊¹

(¹中部大院・工・情報，²中部大・情報科学研究所)

眼球運動に関わる小脳 Purkinje 細胞の単純スパイクは運動指令をコードし、運動の適応学習と平行してその発火パターンも変化することが知られている。本研究では、金魚を用い、眼球運動に関わる前庭小脳 Purkinje 細胞の単一神経活動記録を行い、その発火パターンにより直流モータの実時間適応制御を試みた。水槽に金魚を固定し、直流モータの目標回転軌道を金魚の頭部回転刺激として与え、モータ実現軌道と目標軌道の差（誤差）を視覚刺

激として水槽壁面に投影した。これにより金魚の前庭動眼反射適応学習が誘発され、前庭小脳 Purkinje 細胞の発火パターンが視覚のブレを低減するように変化することが期待される。約 1 時間の Purkinje 細胞活動連続記録により、直流モータ制御誤差が適応的に減少することが確認され、単一 Purkinje 細胞が生体以外の制御対象を適応的に制御できることが示された。

(4) サル F5-AIP 野における手操作関連神経活動の情報量解析

石田文彦，村田 哲，阪口 豊

(富山高専・電気工学，近畿大・医・第一生理，電通大院・情報システム学)

感覚入力から運動発現までの脳内過程を環境の物理的時間に沿って理解することをめざし、情報量解析の手法を用いて、手操作運動中の頭頂連合野 AIP と運動前野 F5 で観察された神経活動に含まれる 3 次元物体の形状に関する情報が課題遂行に応じて変化する様子を可視化した。その結果、AIP 野対象-視覚運動型神経細胞群では物体注目区間で相互情報量のピークが現れるのに対し、F5 の同タイプの神経細胞群はそれに遅れる形で相互情報量

が徐々に上昇していくことがわかった。また、AIP の非対象-視覚運動型や運動優位型神経細胞群では物体把持に至る到達運動中にピークが現れ、F5 視覚運動型神経細胞群でも同様の傾向が見られた。頭頂葉 CIP 野から AIP 野を経て F5 へ送られた視覚情報が運動パターンに変換されることが示唆されているが、本解析で見られた AIP と F5 の相互情報量の時間変化は、この視覚運動変換過程を反映しているものと考えられる。

(5) 一次運動野の情報表現に関する考察

宮下英三（東工大院・総理工）

一次運動野のニューロンが、どのような情報をどのように表現しているかを理解することが、脳による運動制御を理解するため、あるいは脳からの情報を復号化するためには重要であると言える。歴史的に見ると、一次運動野の単一ニューロン活動が筋肉の活動量を反映してい

るとの報告があり、これに続いて、単一ニューロン活動には手先の運動あるいは手先力の至適方向が表現されているとの報告があった。しかしながら、至適方向には恒常性がなく、腕の肢位によって変化することが報告されている。このような現象は単一ニューロンによる至適方

向の表現というフレームワークの中ではその原因を説明することは不可能である。本研究では、サル一次運動野のニューロン活動が関節トルクと関節角速度といった時

間変数を情報表現している可能性を動物実験データの解析ならびに数値実験から検討する。

(6) トレッドミル歩行中におけるサル一次運動野の神経細胞活動

中隣克己, 森 大志, 村田 哲, 稲瀬正彦 (近大・医・生理, 山口大・農・獣医)

大脳皮質における二足歩行制御機序の解明を目的として、無拘束のニホンザルに流れベルトの上で四足歩行と二足歩行を交互に遂行させ、歩行中の単一神経細胞活動を一次運動野から記録し、同時に筋活動を体幹・四肢から記録した。そして記録されたこれらの活動を、異なる二つの歩行様式の間で比較した。一次運動野の下肢領域から記録された殆どどの神経細胞は歩容の二足と四足を問わず、歩行周期に一致した相動的な発射活動を示した。

しかし二足歩行中における発射頻度の頂値は四足歩行中に比べて高値を示し、その発射期間は短縮した。一方体幹・下肢から記録された二足歩行中の筋活動の振幅と活動時間は、四足歩行中に比べてともに増加した。以上の結果より、サルの一次運動野は二足歩行と四足歩行の遂行に際して共通の神経基盤を提供するが、二足歩行では瞬間一瞬間の下肢運動の精度を高めるためにより強く動員されることが示唆された。

(7) 姿勢変化による短潜時腕運動応答モジュレーションのメカニズム

門田浩二, 五味裕章 (JST-ERATO 下條潜在脳プロジェクト, NTT 基礎研)

到達運動中の視野背景運動が引き起こす腕運動応答 (manual following response: MFR) の振幅は、環境に応じて機能的にモジュレートされることが知られている。その一例として、昨年我々は姿勢の不安定化に伴い MFR 振幅が増大する現象を報告した。このモジュレーションの原因としては運動出力系の活性水準および視覚情報処理系の感度の変化が想定される。もし前者が原因である場合、モジュレーションは視覚刺激の特性を変化させても

均一に生ずるはずである。そこで姿勢変化による MFR 振幅の変化を、時空間周波数の異なった複数のグレーティングモーションを用いて検討した。その結果、振幅の変化は特定の時空間周波数 (10Hz, 0.2c/deg 周辺) でのみ認められた。つまり、姿勢変化がこれらの時空間周波帯の視覚情報処理に影響を与えており、MFR 振幅のモジュレーションを引き起こしている可能性がある。

(8) 視線移動に伴った視覚誘導性腕応答のゲイン更新

安部川直稔, 五味裕章 (NTT 基礎研, JST-ETRO 下條潜在脳プロジェクト)

上肢到達運動中に視覚運動刺激が提示されると、その刺激方向に反射的な腕応答が生ずる (MFR)。我々はこれまでに、視線と到達目標の空間的關係性に応じて、MFR の大きさが修飾されることを示した。本発表では、このゲイン修飾が“いつ”行われるかの検討について報告す

る。実験では、到達運動中にサッカードを行い、上記関係性の変化に応じた MFR ゲイン更新の有無について調べた。その結果サッカード直後に、その更新に応じた MFR 修飾が観察され、MFR ゲインは実時間で更新されることが示唆された。またサッカードの開始直前に提示

された視覚刺激に対する MFR については、ゲインダウンのみ更新された被験者が 2 名、ゲインアップのみが 3 名、両方向が 1 名であった。このことから、サッカード

準備に関連した信号が予測的に MFR ゲインを更新し得るが、この場合の更新方向については、被験者依存の非対称性があることが明らかとなった。

(9) 経頭蓋的磁気刺激法 (TMS) による運動関連対刺激での脳可塑性の誘導

美馬達哉, Mohamed Nasreldin Thabit Hamdoon, 植木美乃, 小金丸聡子, 福山秀直
(京大院・医・高次脳)

TMS による一次運動野 (M1) 刺激と感覚刺激による M1 への入力を組み合わせた対刺激を反復すると、ヒト M1 での長期増強様の可塑性が誘導できることが知られている。本研究では、視覚刺激による単純反応時間課題を用いて、運動開始時間にあわせて M1 への TMS を施行する対刺激を行い (5 秒間隔, 20 分), その介入前後での M1 興奮性の変化を検討した。運動開始 50ms 前に TMS

を与えた場合には、有意な M1 興奮性の増強が認められたが、50ms 後では変化は認められなかった。この結果は、運動準備に伴う M1 への入力と TMS を組み合わせた対刺激の反復によって生じる可塑性が、spike timing-dependent plasticity に類似した機構による可能性を示唆する。また、こうした手法は、リハビリテーション目的などに臨床応用できる可能性がある。

(10) 身体運動制御に潜む脳内情報処理の冗長性

平島雅也, 野崎大地 (東京大・教育学研究科)

ヒトの身体運動は、様々な冗長性を含んでいる。結果的に生じる運動が同じでも、それを生み出す脳内過程が異なる可能性は十分にある。本研究は、視覚運動変換を用いてこの状況を作り出し、同じ運動に対して異なる脳内過程が存在しうることを示した。リーチング課題で 2 種類のターゲットを交互に提示し、右斜め 30 度のターゲットの場合には、右 30 度の視覚運動変換を与え、左斜め 30 度のターゲットの場合には、左 30 度の変換を与えた。

この課題を達成するには、左右どちらのターゲットに対しても、手をまっすぐ前に動かさねばならない。被験者は、結果的に生じる運動が殆ど同じであることに全く気づかない状態で、この視覚運動変換を学習した。さらに、この視覚運動変換がある状態で、それぞれのターゲットに相反する力場を課したところ、被験者は同時に適応することができた。これは同じ運動に対して異なる神経集団が動員されていることを強く示唆する。

(11) 特異値分解による歩行運動の制御パラメータの検討

船戸徹郎, 青井伸也, 土屋和雄
(京大院・工・機械理工, 京大院・工・航空宇宙, 同志社・理工・エネ機)

歩行の運動学データを構成する主要な空間・時間基底を調べることで歩行運動の移動、安定化に作用する制御パラメータを推定する。関節位置の運動データを特異値分解すると、運動学的な特徴が似ているモードごとに分

解され、各モードは空間基底と時間基底、及びその振幅の積で表現される。歩行データは平均姿勢とそれを中心とする 2 つの周期運動に精度よく分解された。異なる傾斜勾配下での分解結果を比較した結果、各基底は勾配変

化に対して変動の小さい stereo typed pattern であり, 0 次モードの振幅のみが勾配に従って上昇した。また時変モードによる重心の動きを計算すると, 一方は重心を大きく動かし, 他方は歩行周期後に重心位置の変動が残らな

いように動いた。それぞれの基底を運動制御と姿勢制御とする制御則を構成し, シミュレーション上で安定した歩行を確認した。

(12) 弾道歩行に基づくヒト2足歩行の重心軌道解析

香川高弘, 宇野洋二 (名大院・工・機械理工学)

能動的な関節トルクを与えず離脚時の姿勢と速度のみで決まる弾道歩行は, ヒトの歩行の特徴をよく再現することが知られている。弾道歩行の考えに基づくと, 離脚時の姿勢と速度がその後のスイング運動に重要である。そこで本研究では離脚時の重心位置・速度とスイング動作中の重心軌道の関係について弾道歩行のモデルシミュレーションと歩行計測データから解析した。弾道歩行シ

ミュレーションにおいて, 能動的なトルクなしで前方に移動可能となる条件が重心位置と速度の関係として表せることが分かった。また, 歩幅や速度の異なる複数の歩行パターンにおいて, 離脚時の重心位置と速度は条件を満たした。これらの結果は, 前方変位に必要な重心位置と速度の関係は効率的で安定な歩行のための離脚時の重心の制約を予測できることを示唆する。

(13) 歩行中の手先振動を緩和するメカニズム

東郷俊太, 香川高弘, 宇野洋二 (名大院・工・機械理工学)

人間が自然に行う動作において, どのような制御が働いているのか, またどのような方策をとっているのだろうか。その中でも本研究では, 片手でコップに入った水をこぼさずに運ぶという動作をとりあげて, 身体各部位の運動軌道を計測・解析し, そのメカニズムにアプローチする。人間がこの動作を実現するために手先部分の振動を小さくしていると予想し, 三次元位置計測装置を用いて被験者がコップの水を運ぶ動作を計測した。水が入

っている場合と入っていない場合の身体各部位の位置, 速度, 加速度, ジャークを比較した結果, ジャークの差が特に大きいということが分かった。さらに足元から手先に向かうにつれてジャークが段々と小さくなっているという結果も得られた。また, 歩行周期に対応してジャークの値が小さくなるタイミングも見出された。これらの結果の要因として, 関節スティフネスの調整と緩和のタイミングのメカニズムを考察した。

(14) 歩行運動における感覚フィードバックの役割

河島則天, 中澤公孝 (国立リハセンター)

半身性感覚脱失を呈する脳卒中患者の, 極めて興味深い歩行パフォーマンスについて報告する。この患者は歩行運動や粗大運動に関して少なくとも見かけ上は円滑に実現できているようであるが, 本人の内省によると, 歩行運動開始後, 約1分程度を経なければ歩行が安定せず,

この過程は毎回の歩行開始時に生じるという。そこで, 5分間の歩行を1分間のごく短い休息を挟んで3セット反復する運動を用いて歩行中のストライドインターバルを計測し, その変動を検討した。その結果, 被験者の内省に一致して歩行開始後徐々にストライドインターバルが

安定していく過程が認められ、一定のインターバルに収束するタイミングは本人が歩行が安定した、と回答するタイミングに良く一致した。興味深いことに、2 セット

目、3 セット目にも同様に認められた。この現象の発現機序について、①歩行運動における感覚情報の役割、②内部モデルの修正と更新、という側面から考察する。

(15) ヒトの歩行における脚関節間協調の解析

垣内田翔子，橋爪善光，西井 淳（山口大院・理工）

生体は熟練した運動を行なう際、無数にとれる運動軌道の中からほぼ同じ軌道を毎回選択する一方で、試行毎に若干の軌道のばらつきも観察される。本研究では、ヒトの歩行時の脚関節角度のばらつきの解析を行なった。その結果、腰・膝・踝関節の協調によって腰に対する足先の鉛直成分の位置のばらつきが歩行周期全体に渡り小さく抑えられていることがわかった。特に、遊脚中期の

最も足部が床に近づく瞬間及び遊脚終了直前に関節間協調は顕著に見られた。また、接地時の足部の速度が一歩毎にばらつかないように関節間協調が働いていることもわかった。これらのことから、接地の準備を行なう遊脚終期等歩行の安定化に重要なタイミングにおいては、関節間協調が働き、足先位置が巧みに調節されていることがわかった。

(シンポジウム2) 運動タイミングとリズムの制御機構の研究

オーガナイザー：大前彰吾（北大院・医学研究科）

脳が時間情報をどのように処理しているのか、という疑問は歴史が長い。しかし眼や耳のような固有の入出力器官がない時間は、脳内に独立した情報処理システムが存在するか否かですら定かではない。本シンポジウムではタイミングとリズムに焦点を当てた。タイミングの制御には、大脳皮質、小脳、基底核、視床など様々な部位の関与が報告されている。分散した複雑なシステムの研究には、知見の積み上げとそれらの包括的なまとめが必

須である。そこで、本シンポジウムではまず“前頭葉のタイミング制御に果たす役割”を電気生理学的に調べた研究を紹介する。次に“タイミング制御を可能にするニューラルネットワークモデル”の研究を紹介する。最後に、“リズムの制御機構”の研究を紹介する。リズム制御は単にタイミング制御の繰り返しではないと言われている。リズム制御とタイミング制御の比較もこれからの重要な課題である。

(S9) サル前頭前野における時間長の認知と再生

湯本直杉（都神経研）

時間長の情報が脳においてどのように処理されているか調べるため、時間再生課題を構築し、課題遂行中のサル前頭前野皮質から神経活動記録を行った。課題において提示される時間情報は2秒、4秒、もしくは7秒間であり、Instruction Cue LEDの点灯持続時間によって表される。Go Signal出現後、サルはInstruction Cueによって

提示された期間と同じ時間長だけ待機した後にボタンを押す。この課題を遂行中のサル前頭前野内側面（9野）から時間長に特異的な神経活動が記録された。試行結果の正否により、Post-instruction 期間中の発火率に有意な差が見られ、また9野へGABAアゴニストであるムシモールを注入した結果、課題試行時の失敗率に有意な増加が見

られた。これらの結果から、前頭前野皮質が時間情報の認知と再生に大きく関わっている可能性が示唆される。

(S10) 運動のタイミング制御における前頭葉内側部の役割

國松 淳 (北大院・医学研究科)

われわれは自ら意図したタイミングで運動を開始することができる。自発運動の発現に前頭葉内側部が関しているとの報告は数多いが、どのような信号によってそのタイミングが制御されているかはわかっていない。運動性視床の運動準備期間の神経活動が、自発性眼球運動のタイミング制御に関与していることが最近明らかにされた。これらの信号は前頭葉内側部に送られ、自発運動のタイミングを制御している可能性がある。我々は、一

定のタイミングで自発的に運動を開始させる課題 (Self-timed 課題) と視覚刺激に応じて即座に運動を開始させる課題 (External 課題) をサルに訓練し、運動準備期間に前頭葉内側部の微小電気刺激を行った。その結果、External 課題とくらべて、Self-timed 課題で大きく運動潜在時が変化し、前頭葉内側部の運動準備期間の神経活動によって自発的な運動のタイミングが制御されていることが示唆された。

(S11) 経過時間を表現する補足眼野神経活動の研究

大前彰吾 (北大院・医学研究科)

経過時間の予測と検出は日常生活においても重要である。様々な部位の時間情報処理への関与が報告されてきたが、眼球運動の高次中枢である補足眼野については知見が欠けていた。補足眼野に経過時間の表現があるかという疑問に迫るため、500~800 ミリ秒のランダムな遅延期間の直後にサッカードする課題を 2 頭のサルに訓練した。遅延期間は標的が提示されてから固視点消失 (Go シグナル) までとした。課題中の活動を補足眼野の神経

細胞 155 個から記録した結果、遅延期間の長さと Go シグナルの前 300 ミリ秒の期間の発火頻度が有意に相関した神経細胞は 48 (31%)、また Go シグナルの後 300 ミリ秒の期間の発火頻度と有意に相関した細胞は 34 (22%) だった。しかし、これらの活動は運動の反応時間とは相関しなかった。これらの活動は運動の開始自体よりは、むしろ経過時間の予測や検出などの時間情報処理へ貢献していることが示唆された。

(S12) タイミング機構の小脳モデル

山崎 匡 (理化学研究所)

複雑で滑らかな運動は体中の無数の筋肉を正しいタイミングで作動・停止することで実現される。そのため、タイミング制御はあらゆる運動に必要不可欠であり、運動制御において重要な役割を担っている小脳にはその機構が備わっていると考えられている。小脳のタイミング機構は瞬目反射の条件付け課題で実験的にも理論的にも深く研究されており、これまでに多くの数理モデルが提

案されてきた。本発表ではまずこれまで提案されてきたタイミング機構の小脳モデルを概説し、それらのモデルがどのようにしてタイミングを学習し瞬目反射の条件付けを説明するのか紹介する。さらに我々のグループが提案している小脳の Liquid state machine モデルについて、その計算機構とそれを用いたタイミング学習の仕組みを説明する。最後にタイミング学習に限定しない、小脳の

より一般の計算機構についても簡単に触れる。

(S13) サルにおけるリズム制御機構

鴻池菜保（京大・霊長研）

円滑な運動をおこなうためには、ひとつひとつの動作を正確におこなうだけでなく、一連の運動をリズムカルにおこなうことが重要である。今まで、心理学的研究やイメージング研究によって、ヒトのリズム運動における行動特性や関与する脳領域があきらかになっている。しかしこれらの手法では、それぞれの脳領域で、どのように運動のリズムが制御されているか、という疑問に直接答えることはできない。リズム制御の神経機構を細胞レ

ベルで解明するためには、リズムカルな運動課題を遂行中のサルの脳活動を電気生理学的手法で記録することが不可欠である。しかし今まで、サルがヒトと同じようにリズム課題をおこなえるかさえわからなかった。今回、電気生理学の実験に先立ち、サルをリズムカルなボタン押し課題を用いて訓練し、その行動特性を明らかにしたので報告する。

(16) 大脳皮質 MST 野における追従眼球運動適応中のニューロン活動

大藤智世, 竹村 文（筑波大院・人間総合・感性認知, 産総研・脳神経）

我々は、運動学習のメカニズムを解明するために、サルの追従眼球運動を用いた研究を行っている。追従眼球運動は、視野の広い部分の突然の動きに対して、それを追いかけるような、短潜時で生じる眼の動きである。先行研究により、追従眼球運動の発現には大脳皮質 MST 野と小脳腹側傍片葉を含む経路が関与していることが示唆されている。これまで様々な眼球運動や腕運動を対象にして、小脳皮質が学習の座であることを示唆する研究

が多くなされてきた。小脳学習仮説を検証するため、本研究ではまず、小脳の上流に位置し、小脳への入力を送っていると考えられる MST 野から、追従眼球運動適応中の神経活動を記録した。その結果、ほとんどの MST 野のニューロン活動は、学習の前後で学習の原因となる変化を示さなかった。すなわち、MST 野では追従眼球運動の学習中も一定の信号が生成されており、MST 野から小脳への入力は変化していないことが示唆された。

(17) 片側一次視覚野切除サルの記憶誘導性サッケードとその神経機構

高浦加奈, 吉田正俊, 伊佐 正（総研大・生命科学, 生理研・認知行動発達, CREST・JST）

大脳皮質一次視覚野 (V1) への損傷は対応する視野内での視覚的気づきの消失につながる。しかし一部の損傷患者では「盲視」と呼ばれる「視覚的気づきと乖離した視覚運動変換能力」が報告されている。「視覚的気づき」は作業記憶との密接な繋がりが示唆されており、損傷視野内では作業記憶は利用できないだろうと考えられてきた。本研究ではまず、盲視のモデル動物とされている片

側 V1 切除サルが損傷視野内でも記憶誘導性サッケードが可能であることを示した。続いてその神経基盤を調べるために同課題遂行中に上丘から単一神経細胞記録を行ったところ、損傷同側上丘の多くの神経細胞で遅延期間中に持続性の発火活動が観察された。このような持続性発火活動は健常な脳では主に皮質領域で報告されてきている。以上の結果から V1 損傷後も空間作業記憶が利用

可能であること、また V1 損傷後には損傷同側上丘が皮質領域の機能を一部補償している可能性が示された。

(18) サッケード眼球運動制御における一次視覚野の機能

池田琢朗, 吉田正俊, 伊佐 正 (生理研, CREST・JST, 総研大)

視覚対象に対するサッケード眼球運動は、その速さにも関わらず極めて正確であることが知られている。様々な研究の結果から、サッケード眼球運動はその最中になんらかの制御を受けており、それによりばらつきを抑え正確性を高めていることが示唆されているが、その神経基盤は未だ明らかではない。これを調べるために我々は一次視覚野を片側的に損傷したモデル動物を用いてサッケード眼球運動を解析した。この結果、健常側へのサッ

ケードにおいては運動速度のばらつきを補正するように運動の持続時間が変化していた一方で、損傷側へのサッケードにおいては速度に関わらず持続時間はほぼ一定でありその結果運動が不正確になっていることが明らかとなった。この結果は一次視覚野の損傷によってサッケード眼球運動中の補正的な制御が傷害されることを意味しており、視覚野を介したリアルタイムの運動制御機構の存在を示唆するものである。

(19) サル前頭眼野注視ニューロンの活動とサッケードの抑制

伊澤佳子, 鈴木寿夫, 篠田義一 (東京医科歯科大院・医・システム神経生理)

動物は、視野内に興味ある物体が出現するとサッケードを行い視標を中心窩に捉えて注視する。前頭眼野は従来サッケードの発現に重要な役割を果たすことが知られているが、我々は最近微少電流刺激により視覚誘導性サッケードを抑制する部位が前頭眼野に存在することを明らかにした。本研究では、この抑制部位において、特に注視中に強い持続発火を示す注視ニューロンの神経活動を解析した。この注視ニューロンの活動は、注視中に視標を消しても継続したので、網膜中心窩の光刺激に対す

る視覚性応答ではなく注視行動そのものに関連していると考えられる。また、注視ニューロンの発火は通常、視覚誘導性および記憶誘導性サッケードの開始に先行して減少することがわかった。前頭眼野のサッケード抑制部位では注視ニューロンが多数記録されたことから、この部位は注視の際に働き、視野内に現れる視標に対して反射的に起こる眼球運動の抑制に関わるものと考えられる。

(20) 上丘スライス標本上での salience map

伊佐 正, Penphimon Phongphanphanee, Robert Marino, 金田勝幸, 柳川右千夫, Douglas Munoz
(生理研・認知行動発達, カナダ・クイーンズ大, 群馬大・遺伝発達行動学)

視覚空間内の特定のターゲットを選びだす target selection の過程においては、空間を表現するマップの上での winner-take-all の機構が作用するモデルが立てられているが、このような機構が中枢神経系のどこに存在するかは明確でなかった。我々は今回マウスの中脳上丘の

水平断スライスを作成することで上丘の浅層の視覚空間マップと中間層の運動ベクトルマップの構造を維持したまま in vitro で解析する実験系を確立した。このようなスライス上の 1 個のニューロンからホールセル記録を行い、周辺を多チャンネルの刺激電極アレイで網羅的に刺

激したところ、浅層においては近傍興奮、周辺抑制の明確なメキシカンハット型の構造があることが明らかになった。それに対して中間層では興奮が常に優位になって

いた。以上の結果は上丘浅層に winner-take-all の機構が内在していることを示唆する。

(21) 視覚的定位行動課題の意思決定におけるラット上丘の働き

長谷川良平, 長谷川由香子 (産総研・脳神経情報・ニューロテクノロジー)

哺乳類の視覚的定位行動は単純な感覚運動反射ではなく、意思決定のような高次認知機能によって制御されている。我々は視覚的定位行動の脳内機構を調べるために、そのモデル課題として課題困難度（視覚の手掛かりのあいまいさ）を操作した視覚的手掛かりに基づいて左右に離れたレバーを選択する課題をラットに訓練した。各ラットにおいて課題遂行ストラテジーが安定するのを待った後、左右どちらかの上丘にワイヤー電極を埋め込んだ。

まず覚醒自由行動下においてパルス状の微小電気刺激を行い、対側への頭部運動や移動などが誘発されることを観察した。さらに、同じ電極を用いて深麻酔下において通電による熱破壊を行った。その結果、特に課題難易度が高い場合、破壊した上丘と反対側のレバーが正解の試行での成績が悪化するのを観察した。これらの結果から、視覚的定位行動の意思決定に上丘が重要な役割を担っていることを示唆していることが明らかとなった。

(22) 時間差の学習と同時性の変化

小池康晴, 米山和也, 大石圭一, 川瀬利弘, 神原裕行 (東工大・精密工学研究所)

接触タイミングの予測機構を解明するために、現実では起こらない視覚と触覚のタイミングがずれている環境での適応過程を実験的に調べた。視覚刺激は一定の重力加速度で、接触するタイミングを-60 msec, あるいは 60

msec ずらして提示し繰り返し試行を行った。その結果、被験者はほとんどタイミングのずれに気がつかずに 60 回程度の繰り返しにより接触タイミングの予測時間が触覚のタイミングに変化していった。

(23) 運動イメージ想起中の大脳皮質運動野の興奮性変化に対する size-weight illusion の影響

東登志夫, 菅原憲一, 木下 清, 船瀬広三, 笠井達哉
(神奈川県立保健福祉大, 大阪大院・医・予防環境医, 広島大院・総合科学・人間科学, 広島大)

運動イメージ (MI) 想起中の大脳皮質運動野の興奮性変化に対する size-weight illusion (SWI) の影響を、経頭蓋磁気刺激 (TMS) による運動誘発電位 (MEP) によって検討した。方法は、被験者に同じ重さ (300g) で大きさの異なる 2 つの box (S:8×8×8, L:16×16×16cm) を第 3 者が精密把握で持ち上げている動画を見せながら、あたかも自分自身が動作を行っている様に MI を想起させた。TMS

は映像において box が空間で保持されているタイミングに与え、右の第 1 背側骨間筋 (FDI) と拇指球筋 (Thenar muscles; TH) から MEP を導出した。実験は、SWI を経験する前後で実施した。その結果、経験前では FDI の MEP 振幅は L-box 条件の方が有意に大きく、逆に経験後では、S-box 条件の方が有意に大きな値を示した。TH も同傾向を示したが有意差は認められなかった。

(24) 手位置の脳内表現

羽倉信宏, 番 浩志, Ganesh Gowrishankar, 山本洋紀, 春野雅彦
(ATR 脳情報研究所, Univ. Birmingham, 京都大・人環)

ヒトが運動を行う際, 動かす効果器の空間位置を知る必要がある。手運動では, 多くの場合, 運動の目標位置は視覚情報として与えられる (e.g. 目の前に置かれたカップ)。よって運動計画時にはまず手の初期位置を目標と同じ視覚の入力座標上で表現することが効率的だと考えられる。本研究では, 「手位置は視覚と同じ座標上で表現される」という仮説を検証するため, 脳機能画像法 (fMRI) を用いて, 視覚の位置情報を表現する領域 (網膜部位再現領域) 上で手位置情報が表現されるのかを調査

した。脳活動測定中, 被験者の手はマニピュランダムによって様々な位置に受動的に動かされた。被験者は目の前に画面上の注視点を注視した。一つの条件では手位置の変化に対応するカーソルが画面上に提示され (視覚あり条件), 別の条件ではそのカーソルは提示されなかった (視覚なし条件)。本発表では, 網膜部位再現の存在する後部頭頂領域を含む背側視覚領域に両条件で共通の活動が見られたという予備的な結果を報告する。

(25) 脚移動体における身体ダイナミクスを考慮した運動制御法の構築

松下光次郎, 横井浩史 (東大院・工・精密機械工学)

本研究は, 身体系と制御系の相互依存性から生じるダイナミクスに注目し, 脚移動体のための運動制御方法論の構築を目指すものである。提案する方法論は, 三次元動力学シミュレーション上で進化的計算法を利用した脚移動体の身体系と制御系の同時探索を行い, 移動エネルギー効率 (単位移動距離当たり消費するエネルギー量の効率) の良い脚移動体群を獲得, それら脚移動体に共通する身体的特徴および制御則を抽出するものである。駆動関節

を 1 個のみ有する二脚・四脚移動体を対象とした検証実験の結果, 移動エネルギー効率が良いモデルほど特定の身体的特徴に収束し, その身体的特徴がダイナミクスを有効利用し 1 駆動関節による多自由度運動を実現することを例証した。すなわち, 高い相互依存性を有する制御則と身体的特徴が制御自由度・情報処理量の低減につながることを確認した。さらには, 抽出された身体的特徴に基づく実機を開発し, その運動性能を実証した。

(26) 筋電義手の操作に対する習熟度の定量的評価法

北佳保里, 加藤 龍, 横井浩史 (東大院・工・精密機械工学)

従来, 筋電義手の操作に対する習熟評価は, 主観評価や識別率といったパフォーマンス評価が用いられてきたが, 習熟過程を評価するには情報量が少ない。そこで, 表面筋電位を用いることで習熟過程において人の内部で生じる微細な変化を捉えることが可能であること, 人の運動パターンの変化とそのパターンの再現性が運動習熟に密接に関係することに着目し, 筋電位から抽出した運動パターンの再現性と精度の 2 項組で習熟度を表す運動

習熟度評価法を提案する。再現度はある動作を繰り返して行ったときの筋活動パターンのばらつき, 精度は識別対象となる全動作の筋活動パターンの特徴空間上での重複度として定義した。筋電義手の操作中に習熟度と動作識別率を算出した結果, 精度・識別率間に中から強い正の相関があり, さらに精度が高い場合は, 再現度の高さが識別率の向上に影響を与えていることが明らかとなり, 提案手法の習熟度評価指標としての有効性が示された。

(27) 最速タッピング課題からみた指の運動機能トレーニングナビリティ

青木朋子, 福岡義之, 木下 清 (熊本県立大・環境共生学, 大阪大院・医)

ピアノ等の訓練経験のない健常若年者7名を対象に, 1 指(示指, 環指)及び2指交互操作(示指 & 中指, 環指 & 小指)の最速タッピング課題を約1ヵ月間(週3回×4, 計12回)にわたって訓練させ, 指の運動機能トレーニングナビリティを調べた。毎回のトレーニングでは各条件1試行7秒間を10試行ずつ繰り返させ, 十分な休憩後に各条件のタップ間隔を調べた。その結果, 4条件すべてにおいて, 12回のトレーニング終了後にはトレーニング

前に比べて有意にタッピングが速くなった。どの条件もトレーニング開始から2週間以内に急激な向上が見られたが, トレーニング前後での変化は, 環指 & 小指で最も大きく, 示指 & 中指, 環指, 示指の順に小さくなった。一方, トレーニング前後に測定した各指の最大握力に変化は認められなかった。これらの結果から, 短期的トレーニングによる指の運動機能向上には主に神経系の発達が深く関与していることが示唆された。

(28) 全身リズム動作における感覚運動協応

三浦哲都, 工藤和俊, 金久博昭 (東京大・総合文化)

リズム動作の感覚運動同期研究において全身動作を用いた研究は少ない。本研究では, 音楽に合わせた全身動作の熟練者であるストリートダンサーとダンス未経験者に, 全身動作による感覚運動同期課題を行わせ, そのメカニズムを検討した。課題動作として, ストリートダンスのダウンのリズム動作(ビートと膝屈曲を同時: DN), アップのリズム動作(ビートと膝伸展を同時: UP)を8種類の周波数(40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180bpm)で行わせ, 下肢の筋活動測定及び2次元動作解析を行った。

課題動作の難易度評価では, DNよりUPの方が難しいと感じていた。膝関節角度, 角速度を状態空間でプロットして, ビート時の位相角を算出し, DNとUPで比較した。すると, DNの方がUPより安定しており, UPは周波数が高くなるに従い, DNの位相角へと引き込み現象が起きた。これらの結果より, 全身リズム動作にはDNとUPという2つの動作モードが存在していることが明らかになった。

(29) 金管楽器演奏中の表情筋の筋活動様相

平野 剛, 三浦哲都, 吉江道子, 工藤和俊, 大築立志, 木下 博
(大阪大院・医・予防環境医, 東京大院・総合文化・生命環境)

本研究では, 表面筋電図を用いて金管楽器演奏における熟練者と未熟練者の筋活動の相違点について検討を行った。音楽大学でホルンを専攻している12名の熟練者群と, 一般大学でホルンを趣味として演奏している10名の未熟練者群に, メトロノーム(bpm=80)に合わせて, (1)ロングトーン課題(1つの音を一定の長さ吹く課題)と(2)1オクターブ跳躍課題(音高の異なる2つの音を途切れることなく吹く課題)の2つの課題を実施した。5種の表

情筋の平均筋活動を解析した結果, 1オクターブ跳躍課題では3種の筋において, 課題を成功させるための筋活動の変化量が未熟練者よりも熟練者のほうが少ないことが確認された。このことから金管楽器演奏においても, 熟練者では少ない筋活動の変化で高度な課題を達成することがでることが確認された。高いパフォーマンスを維持するために, 特に高い音高に対する筋活動の適切な制御の必要性が示唆された。

(30) 歌唱を伴った表打ちと裏打ちタッピング運動時の脳活動比較—fMRI 研究

小幡哲史, 深見のどか, 植月 静, 木下 博

(大阪大院・医・予防環境医, (株)ニッソーネット, 西播磨リハ病院)

本研究では fMRI を用いて歌唱を伴った表打ちと裏打ちにおける脳の賦活領域を明らかにし, それらの相違点について検討を行った。健常成人 17 名 (男性 3, 女性 14 名) に, メトロノーム (bpm=105) に合わせて, (1) 歌: 1 オクターブのスケールをハミング, (2) 手: メトロノームに合わせて手拍子, (3) 表打ち: ハミング+メトロノーム音に合わせて手拍子, (4) 裏打ち: ハミング+裏打ち (メトロノーム音間の中間で手拍子) の 4 条件を 2 回ずつランダムに 2 セッション実施した。課題呈示は 24.5 sec, 課

題間に安静 (24.5 sec) を挟むブロックデザインを用いた。その結果, 裏打ちは表打ちに比べて, 右半球の補足運動野前方部 (pre-SMA), 運動前野, 小脳, 島, 運動性言語野, 左半球の補足運動野後方部 (SMA-proper), 小脳での活動が有意に上昇することが確認された。このことから, 裏打ちは表打ちに対して, 運動の計画性, 準備, 外部信号 (メトロノーム音) の知覚や内的処理をより必要とすることが考えられる。

(31) 熟練ドラム奏者の音圧制御動作における音圧パラメータ動作パラメータの関連性

藤井進也, 平島雅也, 工藤和俊, 中村仁彦, 大築立志, 小田伸午

(京大院・人間環境学, 東大院・教育学・総合文化・情報理工学)

音楽を演奏するには, 身体を巧みに制御する必要がある。熟練した音楽家は小さな音から大きな音まで音の大きさを自由に变化させることができるが, どのような制御ストラテジーを用いて音圧調節を実現しているのか明らかではない。本研究では, 日本トップレベルのプロドラム奏者が片手ストロークで音量を多段階で調節する際の動作を測定し, 5 セグメント (体幹・上腕・前腕・手・スティック) 16 自由度モデルを用いて三次元動作解析を

おこなった。その結果として, ドラム奏者は音圧を増加させるために, インパクト時のスティックの回転, 手首の屈曲や尺屈, 肘の伸展や回外の角速度を増大させていることがわかった。またインパクト時, つまり動作の最終局面におけるこれら身体遠位部の関節角速度を増大させるため, 動作の初期段階における体幹や肩といった身体近位部の関節角速度を増大させていることがわかった。

(シンポジウム3) 多面的スケールによる脳機能計測・解析法を求めて ～超若手の目に映る研究の現場～

オーガナイザー: 深山 理 (東京大・情報理工)

近年の技術的進歩に伴い, 一回の実験で脳から記録可能な情報量は指数関数的に増大している。しかし, その膨大な情報を十分に活かした解析・応用技術は未だ発展途上にある。本シンポジウムでは, 中枢神経系からの信号計測・解析の現場に携わる若手研究者が, 各々の専門分野に基づき, 以下の 2 点に着目した議論を行う。一つ

は BMI に代表される工学的応用, もう一つは, 大域的な神経活動から得られるネットワークと認知機能の関係性について理解する試みである。両者は, 脳の情報表現を解読し, 我々にとって意味のある形態に変換する点で共通の要素を包含する一方, 対象とするシステムのスケールが大きく異なる。すなわち, 前者では身体各部の運動・

感覚を単位とし、後者ではより大きなスケールでの認知が対象である。本シンポジウムでは、このような多面的

スケールに基づくアプローチによる脳の理解について、参加者と議論を深めたい。

(S14) ラットカーシステムを用いた運動皮質における可塑的な機能変化抽出の試み

深山 理（東京大・情報理工）

大脳の情報処理において、可塑的な機能変化は計算機との間に大きな相違を与える特徴の一つである。本発表では、我々の開発してきた車体型 Brain-Machine Interface「ラットカー」システムを用いた、脳に生じる機能変化の抽出法について考察する。ラットカーシステムでは、ラット運動中枢の細胞外電位と自発的な歩行特徴量を同時計測し、両者の対応関係が適応的に同定される。このとき、計測された神経細胞の担う機能の時間的変化が小さ

ければ、両者の関係を示すパラメータは一定値へと収束することが想定されるが、実際には時間の進行につれてパラメータの変動が見られることが多い。これらの変動を観察すると、大きく3種類の傾向に大別されることが分かった。本発表では、このように計測信号波形から抽出される変動量が生理学的にどのような意味を持つのか（そもそも持ちうるのかも含め）検討したい。

(S15) 硬膜外神経活動計測を用いた低侵襲 BMI の実現可能性の検討

加藤 龍（東京大・工学）

従来型の BMI では、制御信号源として皮質電位、脳波、脳血流変化などが用いられるが、侵襲度と空間分解能・S/N 比との間にはトレードオフがあり、また両極端な関係にある。そこで本研究では、低侵襲で計測可能な硬膜外神経活動に注目し、バランスがとれた BMI の実現可能性について検討した。まず、ラットの頭蓋骨・硬膜間に針電極を留置し、信号特性の検証を行った。急性実験の結果、安楽死前後の硬膜外電位の変化から、計測可能な信号強度や有効な周波数帯などの基礎的な知見が得られ

た。次に、慢性計測を行い、ラットの随意運動の状態と硬膜外電位を同時に計測可能な環境を整え、記録された硬膜外電位からパターン認識を用いた運動状態（安静、歩行、二足立ち）の識別を行った。その結果、運動状態に適した電極配置があること、2 状態で 80%、3-4 状態で 65%とチャンスレベルを大きく超える識別率となったことから、硬膜外神経活動計測を用いた BMI の実現可能性を示した。

(S16) Granger Causality を用いたサル ECoG における複数領野間の関係性の変化の解析

竹中一仁（東京大・情報理工）

従来の神経活動の解析が外的なイベントに関連した神経活動の発見を中心に行われてきたのに対し、近年の多点同時計測技術の発達はその神経活動自身に内在する構造を抽出することを可能にしている。このような神経活動自身の構造を我々は関係性と呼ぶ。このような関係性

の記述方法としてこれまでよく同期現象が扱われてきたが、これは一方法にすぎない。これに対し本研究では新たな関係性記述の方法として、統計的な因果関係の指標となる Granger Causality を用いた解析を行った。サルから計測した ECoG に対して、複数の電極間のある時間間

隔における因果関係の強さを記述し、その因果関係のパターンが時間とともにどのように変化するかを調べた。その結果、日をまたいでも共通の特定のパターンが繰り返し現れ、さらにエサとりタスクの終了に伴って、この

パターンが明確に変化することを見つけた。これは同手法が、関係性記述の一つとして有用であることを示唆している。

(S17) 同期における位相角度の分布に基づく領野間の関係性の推定

柳川 透 (理化学研究所)

近年の多電極計測技術の進展により、脳の複数領野からの同時多点計測が可能になってきた。相互関係性は多点間機能理解の方法として重要な視点であるが、その標準的記述法は定まっていない。一方、同期現象は電極間の相互関係性を推定するための有力な指標と言われてきたが、同期現象によって相互関係性を記述する方法は確立されていない。そこで、本研究では、ECoGを用いて行動中のサルから計測された神経活動の同期現象を解析

し、電極間の相互関係性を推定した。まず、我々は電極間に同期活動が見られる時、その位相角度分布に固有モチーフが存在する事を発見した。そして、固有モチーフの類似性に基づき電極をグループ分けすると、空間的クラスターが抽出でき、それがPFC, PM, M1などの解剖学的領野とほぼ一致することを見つけた。これは、同手法が、脳内ネットワーク機能の関係性記述の一つの方法として有用である事を示唆している。

(シンポジウム4) 脳はどのように両手の協調運動制御を実現するのか？

オーガナイザー：櫻田 武 (東工大)

左右脳半球は主に対側の身体制御に携わっていることが知られている。しかし、これらの制御系は脳梁などの神経接続を介してお互いに様々な情報のやり取りを行っており、協調的な両側運動を実現するための重要な役割を果たしている。また、このような左右制御系間にまたがる情報処理は、固定的な系により行われるのではなく、状況によって変化することが知られている。本シンポジウムでは、運動を生成する際には、制御対象となる身体

部位だけではなく、その対側身体部位との関係性も考慮しつつ、必要に応じて脳内の情報処理が切り替えられているメカニズムについて検討する。具体的には、片手両手・左右の対称性や運動方向など、左右身体部位の相対関係が変化した際に、それぞれどのような情報処理の切り替えが行われているか議論し、その機能的側面を考察する。

(S18) 両側運動における拘束条件と左右制御系間相互作用の役割

櫻田 武 (東工大)

両側運動の安定性などは、左右で駆動する筋の一致や動かす身体部位の運動方向の一致などに依存して変化することが知られているが、その具体的なメカニズムは不明な点が多い。本研究では、以上の特性を脳内に存在す

る拘束条件によって情報処理が切り替えられた結果であると捉える。また、左右制御系は脳梁に代表されるように神経接続が強く、左右制御系がこのような神経接続を介して相互作用している点に着目し、この相互作用が両

側運動の特性を決定付ける情報処理であることを仮説としておき、そのメカニズムを検証した。結果から、運動指令など制御系からの出力情報だけでなく、運動計画などの上位制御系で処理される情報も、左右制御系間で相

互作用しており、脳はこれらの相互作用に対して段階的に情報処理を調節している可能性が示唆された。これらの結果を踏まえ、両側運動制御系が有する情報処理の意味合いを考察していく。

(S19) 両腕到達運動中の脳内過程

— 対側の腕運動に応じた運動学習メモリ（制御過程）の切り替わり —

横井 惇（東京大）

両腕で一つの物体を操作する動作を考えた場合、左右の腕は物体を通して相互に影響を及ぼし合うという複雑な力学的環境下にある。このような状況下で目的の運動を達成するためには、一方の腕の制御器が他方の腕の運動状況（ないし計画）を予め考慮に入れて働く必要があると考えられる。この問題に対し我々は、「両腕運動中において一方の腕の運動状況に応じて他方の腕の制御過程が切り替わっている」という仮説のもとに研究を行ってきた。成人を対象とした心理物理実験では、対称な両

腕動作で獲得した運動学習効果が、非対称な両腕運動時にどの程度転移するのかを調べることによって、一方の腕の運動に応じた制御過程の切り替わりを示唆する結果を得た。また、複数の内部状態をもつ状態空間モデルを用いて実験結果の説明を試みた。

今回の発表では、これらの研究の結果を紹介しつつ、両腕運動における左右の情報の相互作用の機能的な役割について考察を行う。

(S20) 両手運動の協調パターンと脳活動

荒牧 勇（情報通信研究機構）

両手運動は左右片手運動の単純な和ではない。両手運動では、脳梁による左右半球間結合、同側皮質脊髓路などの解剖学的構造により、左右の運動システムが不可避免的に相互作用する。発表者はこうした相互作用は両手の協調運動を困難にする、というネガティブな側面だけでなく、協調パターンによっては情報共有によるコストの削減に役立つ、というポジティブな側面にも注目して研究を進めてきた。ここに両手運動の協調パターンと脳活動に関連する3つの研究を紹介し、両手の協調パター

ンによって各脳部位の活動が動的に変化することを示す。

(1) 左片手運動時と両手鏡像運動時の左手運動制御系の活動差異

(2) 両手運動時の脳活動と左右の片手運動時の脳活動の和の比較

(3) 両手運動のパフォーマンスを運動開始時点の脳活動から予測する

(32) サル皮質脊髓路：一次運動野手指制御領域から脊髓への軸索投射の髄節及び 脊髓灰白質各層における定量的解析

吉野一斉藤紀美香, 西村幸男, 大石高生, 伊佐 正
(産総研・脳神経情報・システム脳, ワシントン大・生物物理,
京大・霊長研・分子生理, 生理研・認知行動発達, CREST/JST)

サル一次運動野において指の運動を制御する領域に高感度の順行性トレーサーを注入し, 皮質脊髓路を下降する軸索が脊髓の第 2 頸髄から第 2 胸髄のどこにどれだけ投射しているかを定量的及び定性的に調べた。脊髓白質部において, 約 9 割の軸索は注入部位と対側の背側側索に確認され, 1 割弱の軸索が同側の背側側索及び腹側前索に確認された。脊髓灰白質において, 軸索投射及び神経終末部が確認されたのは主に対側の VI 層から VII 層と

IX 層であり, 同側では VIII 層であった。神経終末部の多くは対側の第 7 頸髄から第 1 胸髄の IX 層運動ニューロンプールにおいて確認されたが, 軸索の投射が多くみられたのは第 5 頸髄から第 7 頸髄の対側 VI 層から VII 層及び同側 VIII 層であった。これらの事から対側の手指の運動の制御には, 運動ニューロンが分布する髄節よりも 2 ～3 髄節吻側に位置する介在ニューロンが大きく関与している事が考えられた。

(33) 覚醒サルにおける筋由来の感覚入力に対するシナプス前抑制制評価法の開発

金 祉希, 関 和彦 (生理研・認知行動発達, 総研大・生命科学)

目的とする運動が正しく行われるためには, 末梢からの感覚情報が適切に処理される必要があるが, その機構はよく知られていない。この感覚情報の調節機構, 特に求心神経入力を制御する機構として, シナプス前抑制が古くから知られている。しかし, 覚醒行動下の筋求心神経へのシナプス前抑制の評価方法 (興奮性試験) は確立していなかった。そこで我々は, 覚醒サルの手首随意運動中に橈骨神経深枝 (DR) 刺激に対する短潜時応答が認められる脊髓ニューロンを検索し, 同定された脊髓内部

位に微小電流刺激を行った。その結果, DR に装着してあるカフ電極に逆行性電位が記録され, 覚醒サルの筋由来の求心性神経においても逆行性電位を記録できる事が初めて明らかになった。これは覚醒行動下の動物において筋由来の感覚入力に対するシナプス前抑制を評価できる事を示したものである。今後, 運動課題の各局面における逆行性電位の詳細な解析から, 運動課題の局面に依存した変化を検討する。

(34) 把握運動制御における大脳皮質および脊髓神経機構の機能的差異

武井智彦, 関 和彦 (生理研・認知行動発達, 総研大・生命科学)

霊長類における上肢随意運動の制御機構として, 大脳皮質が脊髓運動ニューロンを直接的に制御する経路と, 脳幹および脊髓介在ニューロンを介して間接的に制御する経路が存在することが知られている。それではなぜ中枢神経系はこのような複数の経路を用意しているのだろうか? 我々はこれらの経路の機能的差異を検討する

ため, 把握運動中のサルから一次運動野 (皮質-運動ニューロン細胞) 及び脊髓介在ニューロンの神経活動記録を行い, 両者の筋活動に対する影響を比較した。その結果, 脊髓ニューロンは皮質ニューロンに比べて 1) より多くの筋群の活動生成に関わっており, また 2) 個々の筋に対してもより強い促進効果を持っていることが明らかと

なった。これらの結果から、脊髄介在ニューロンを介した経路によって把握運動における基本的な筋活動パターン

が生成され、さらに直接経路によってより微細な筋活動の調整が行われているという制御図式が示唆された。

(35) 脊髄反射経路における姿勢と運動の制御

高草木薫（旭川医大・生理学・神経機能）

手足や体幹の運動は脊髄反射経路を介して誘発される。特に、外界からの環境にリアルタイムに適応して運動を誘発するためには、体性感覚情報と上位運動中枢からの情報を統合して、目的とする運動とこれを実現させるための姿勢制御が必須となる。本研究では、筋緊張の調節に係る網様体脊髄路と末梢からの体性感覚とが脊髄レベルにおいてどの様に相互作用するのかを解析した。実験には、急性除脳ネコ標本を用いた。筋緊張を減弱させる網様体脊髄路からの興奮性入力を受け、その作用を

運動細胞に伝える脊髄内抑制性介在細胞を電気生理学的に同定し、これに対する末梢からの感覚入力様式を解析した。その結果、筋緊張抑制を誘発する抑制性介在細胞は、屈曲反射経路からの多シナプス性の抑制作用と、骨格筋からのI群線維からの単シナプスの興奮作用を受けることが明らかとなった。これらの成績から、姿勢と運動の統合における脊髄反射経路の機能的役割を考察する。

(36) 運動単位の動員；発火に関するタマネギ層構造は本当か？

大屋知徹, Stephan Riek, Andrew G. Cresswell

(School of Human Movement Studies, The University of Queensland)

随意運動中の運動単位の動員域や発火頻度の活動様式について、高閾値の運動単位は速筋線維から構成されているため、強縮によって最大の筋力を発揮するには高頻度で発火する必要があるにも関わらず、低閾値の運動単位のほうが高頻度で発火すること（タマネギ層構造）が現在実験的に支持されている。この機能的要請と実験的観察に横たわる齟齬を検証するためにヒラメ筋からのBranched wire電極と用いて筋内へ電極を挿入し複数の運動単位の発火を記録し、Decompositionソフトを用いてこ

れを各運動単位の発火列に分解した。この結果、ヒラメ筋において高閾値の運動単位は、閾値下発火頻度や最大発火頻度において低閾値の運動単位を上回ることが示された。ヒラメ筋の運動単位は機能的要請にあった発火様式を示すことが明らかになったが、この発火様式に対する持続性内向き電流 (persistent inward currents) の影響を、動員の最初と最後での発火頻度の違い (onset-offset hysteresis) から検討した。

(37) 頬ひげ刺激に対する覚醒マウスの脳血管反応

田桑弘之, 正本和人, ヨーナス・オーディオ, 松浦哲也, 小島隆行, 管野 巖

(放医研・分子イメージング, 電通大・工, クオービオ大, 岩手大・工)

脳賦活に対する局所脳血流調節機構に関するげっ歯類を用いたこれまでの研究は、麻酔下の実験が主であり、

脳賦活時の脳血管反応と運動動態を同時評価することが不可能であった。本研究では覚醒マウスの脳血管反応及

び行動様式を同時かつ繰り返し長期間計測可能な実験系について報告する。実験には C57BL マウス (5w~7w) を用いた。マウス頭蓋に自家製チャンバーを装着し、計測装置に固定した。自由回転が可能な発泡スチロール上にマウスを乗せ、ボールの回転量から運動量を評価した。頬ひげ刺激に対する脳血管反応を一次体性感覚野におい

てレーザドップラ法により連続計測した。同一個体において頬ひげ刺激に対する脳血流変化及び運動量を 7 日間繰り返し計測した。7 日間の計測において脳血流変化に有意な変動が見られなかったが、運動量においては計測日によるばらつきが認められた。運動量と体性感覚野の活動には相関が認められなかった。

(38) 近赤外分光計測画像法による筋出力の再構成

南部功夫, 大須理栄子, 佐藤雅昭, 安藤創一, 川人光男, 内藤栄一
(奈良先端大院・情報, ATR 脳情報研, 京都府立医大・医, NICT)

近赤外分光計測画像法 (Near-infrared spectroscopy: NIRS) は、可搬性があり、電気性のアーチファクトに強く、ランニングコストが安いなどの特徴から、他の装置との組み合わせはもちろん、NIRS 単体だけでも簡便に脳機能を計測するインターフェースとしての利用が期待されている。しかし NIRS による計測には血圧や脈波などの生体信号が背景ノイズとして混入してしまい、その計測精度が悪くなる危険性を持っている。そこで本研究では、非常に優れた汎化性を持ち、適切な信号成分のみを取り出すことができるスパース線形回帰を用いて、手指

により発生させた異なる強さを持つ筋出力を単一試行で再構成することを試みた。その結果、スパース線形回帰によって筋出力は非常に良く再構成することができ、再構成は背景ノイズではなく生理学的に妥当な脳活動を使っている可能性が高いことが確認された。本研究の結果から、スパース線形回帰は背景ノイズが含まれる信号から課題に関連する脳活動を抽出することが可能であり、NIRS 信号への解析方法として非常に有効であることが示された。今後、スパース線形回帰を利用した高精度 NIRS インターフェースの実現が期待される。

(39) 脳損傷後の機能回復に対する運動訓練の効果とそのメカニズムの解明

村田 弓, 肥後範行, 西村幸男, 大石高生, 塚田秀夫, 伊佐 正, 尾上浩隆
(産総研・脳神経, ワシントン大, 京大霊長研・分子生理, 浜松ホトニクス・中央研, 生理研・認知鼓動発達, 理研・分子イメージング)

脳損傷後にリハビリ訓練が行われるが、その回復のメカニズムは明らかになっていない。運動機能の回復がリハビリ訓練によって促進される事を明らかにするために、サルの大脳皮質運動野 (M1) 損傷モデルを使用した。M1 の手領域にイボテン酸を注入して不可逆的な損傷を作成した後、運動訓練の有無によっておこる回復過程の違いを調べた。損傷直後は把握動作が不可能であったが、訓練群では 1 ヶ月半程度で精密把握が回復した。一方、

非訓練群は精密把握の回復が認められなかった。この結果から、運動訓練が M1 損傷後の運動機能の回復を促進することが示唆された。また、M1 損傷後に精密把握が回復した時期の脳活動を陽電子放出断層撮影法 (PET) で測定した結果、損傷前よりも運動前野腹側部 (PMv) の活動が上昇する傾向が認められた。このことから、PMv が M1 損傷後の運動機能回復に関連している可能性が考えられる。

(40) 慢性期脳卒中片麻痺患者における高頻度磁気刺激と伸筋群の運動訓練の組み合わせによる上皮機能の回復

小金丸聡子, 美馬達哉, Mohamed Nasreldin Hamdoon, 福山秀直, 道免和久
(兵庫医大院・医・リハビリ, 京大院・医・高次脳研)

脳卒中後の神経可塑性変化は、機能回復の生理学的基盤とされる。しかし、脳卒中患者の回復の程度は様々で、神経可塑性は必ずしも正常な機能回復をもたらさない。たとえば、慢性期片麻痺患者はしばしば上肢の屈曲痙性を生じる。我々は今回慢性期脳卒中片麻痺患者において、Use dependent plasticity の理論をもとにした伸展筋群の運

動訓練 (TENS 補助下) と、高頻度経頭蓋磁気刺激を組み合わせる事により、麻痺側上肢機能の回復を認めたので報告する。複数の介入方法を組み合わせることで、ターゲットを絞った神経可塑性を誘導できれば、臨床応用の可能性が広がると期待される。

(41) パーキンソン病の運動・認知能力低下の病態解明

花川 隆 (国立精神・神経センター・疾病七部)

運動速度が遅くなる疾患の代表であるパーキンソン病 (PD) に、認知処理速度の低下が併存することが知られるようになった。PD における運動・認知処理速度の病態を解明するため、健常高齢者と PD 患者で機能的 MRI 実験を行った。被験者は数字の視覚刺激提示に基づく手指タッピング、タッピングの想像、暗算の 3 種類の課題を、4 種類の異なる速度負荷量 (0.25-1 Hz) で行った。PD では低い負荷で正答率が低下したことから、運動・認知処理

速度の低下が裏付けられた。課題関連性活動を比較すると、タッピングとその想像では群間に差はなかったが、暗算中に PD 患者は右前頭前野と頭頂葉の過剰活動を示した。課題負荷に相関する脳活動を比較すると、PD では概して課題負荷に応じた線条体活動の増加が乏しく、タッピングによる線条体活動の差は被殻後外側部に、計算による活動の差は被殻前部-中央部と線条体内での部位局在が認められた。

(42) 内部モデルを用いた終端位置制御仮説による筋活動予測

神原裕行, 小池康晴 (東工大・精密工学)

我々はこれまでに、内部モデル制御と終端位置制御仮説の概念を取り入れた運動制御モデルを提案してきた。我々のモデルの特徴は、目標軌道計画を行わずに二点間の運動が実現できるという終端位置制御仮説の最大の利点を継承しつつ、終端位置制御仮説を棄却した Bizzi らの実験結果も再現できる点にある。我々のモデルを用いることにより、二点間運動や経由点のある運動の手先軌

道の特徴が、複雑な軌道計画無しに再現できることを示してきた。本発表では、手首 2 自由度の到達運動および矢状面内における腕の到達運動に対して、我々のモデルが運動軌道というキネマティックな特徴だけでなく、筋肉の活動パターンというダイナミックな特徴をも再現できるかを検証した結果を紹介する。

(43) 動作立ち上がり時の表面筋電位信号を用いた指動作識別

近藤玄大, 加藤 龍, 横井浩史, 新井民夫 (東大院・工・精密機械)

表面筋電位信号を用いた動作識別において、「手を握る/開く」・「手首を曲げる/伸ばす」などの粗い動作に比べ、細やかな「指動作」の識別は難しい。その理由は、指動作は前腕深部に存在する筋群に支配されるため、動作にともない生じる表面筋電信号の発火量が小さく見分けづらいからである。また、識別に用いる信号を抽出するタイミングに関して、先行研究においては「オンライン抽出の容易さ」という観点から、「動作が安定化した

後」の信号が抽出されてきた。本研究では、「発火量の大きさ」という観点から「動作の立ち上がり時」の表面筋電位信号に注目し、細やかな動作を識別するための方法論の検討を行う。具体的には、「動作が立ち上がり筋電位信号の振幅値がピークとなる一瞬において識別を行い、その識別結果を振幅値が一定の閾値を下回るまで維持する」という手法を提案した。その結果、従来手法と比べて反応速度及び識別率の向上が確認された。

(44) 筋肉の協調動作に基づいた起立動作の解析

安 琪 (東大院・精密工学)

近年、日本では高齢化社会が進み、高齢者の QOL の低下が問題視されている。高齢化による筋力の衰えや神経疾患などで日常生活に困難を抱える人が多く、また介護士の数やシステムは未だ充実していない。これらの問題を解決するために、筆者は人の起立動作に着目をした研究を行ってきた。起立動作は日常生活の様々な行動の起点となる動作であるため、それを積極的にサポートすることは介護予防の観点から見ても重要であると言え

る。しかしながら、起立のメカニズムは現在解明されておらず、有効なアシスト及びトレーニング機器の開発は困難となっている。本研究では、シナジーと呼ばれる複数の筋肉の協調動作に着目した解析を表面筋電位を用いて行った。その結果、人の立ち上がり動作が複数のシナジーによって構成されており、それぞれが重要な役割(動作のダイナミクスの生成と姿勢制御)を果たしていることが分かった。

(45) 手首運動における2つの制御系の同定

李 鐘昊, 寛 慎治 (東京都神経研・認知行動)

本研究では手首運動における筋活動とキネマティクスの因果関係に基づき、筋活動からその生成に与る制御器の情報を抽出する方法を検討した。正常被験者 6 名に手首の step-tracking (ST) 運動と指標追跡運動を行わせ、手首位置と 4 主動筋の筋電図を記録した。関節トルクレベルで筋活動とキネマティクスの因果関係を同定し筋活動がキネマティクスのどの要素と関係が深いかを調べた。その結果、ST 運動では筋活動はほぼ位置成分で説明され

るのに対し、指標追跡運動の筋活動は位置成分に加え速度成分とも強い相関があった。この結果から ST 運動では主に静止ターゲットに対する位置制御が行われ、追跡運動では動くターゲットに対する位置と速度制御を同時に行っていると考えられた。さらに追跡運動の筋活動は位置・速度制御の運動指令と位置制御優位の 2 つの成分に分解され、2 つの制御器が並列動作している可能性が示唆された。

14. 上皮組織における細胞外環境感受機構

2009 年 11 月 9 日－11 月 10 日

代表・世話人：丸中良典（京都府立医科大学大学院医学研究科）

所内対応者：鍋倉淳一（生体恒常機能発達機構）

- (1) 熱ショック転写因子を介するタンパク質恒常性維持の新しい分子機構
中井 彰（山口大学大学院医学研究系研究科医科学分野）
- (2) モルモット卵管上皮線毛運動周波数の卵巣周期中の変化と Estrogen と Progesterone の効果
中張隆司（大阪医科大学生理学）
- (3) ヒト小腸上皮モデルである Caco-2 細胞におけるフラボノイドの代謝と輸送
室田佳恵子（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部）
- (4) 神経突起伸長におけるクロライドイオン輸送体 NKCC1 の役割
ーフラボノイドによる神経再生の試みー
中島謙一（京都府立医科大学大学院医学研究科細胞生理学）
- (5) ヒト及びラット下部消化管における苦味物質の受容と分泌作用
加治いずみ（静岡県立大学院・環境科学研究所 環境生理学研究室）
- (6) アルドステロンによる Na^+ 再吸収亢進は p38 を介する
太田麻利子（京都府立医科大学大学院医学研究科細胞生理学）
- (7) Identification of binding proteins for human Nedd4L C2 domain
Tomoaki Ishigami (Yokohama City University Graduate School of Medicine,
Department of Cardio-Renal Medicine)
- (8) Prostaglandin 輸送体 OAT-PG ノックアウトマウスを用いた腎局所 PGE2 クリアランス機構の解析
波多野亮（大阪大学大学院医学系研究科生体システム薬理学）
- (9) ループ利尿薬の経上皮細胞性分泌の分子機序：
新規ヒト電位依存性有機酸トランスポーター分子 hOATv1 の同定
安西尚彦（杏林大学医学部薬理学教室）
- (10) 代謝性アシドーシスによる腎集合管 V1a 受容体の発現誘導
安岡有紀子（北里大学医学部生理学）
- (11) 脂質ラフトが関与する胃酸分泌調節機構
酒井秀紀（富山大学大学院 医学薬学研究部 薬物生理学）
- (12) 大腸陰イオン輸送における SLC26A3(DRA)の役割
鈴木裕一（静岡県立大学食品栄養科学部）
- (13) 肝細胞におけるウアバイン非感受性 Na^+ -ATPase 活性
藤井拓人（富山大学大学院医学薬学研究部薬物生理学）

【参加者名】

桑原厚和（静岡県立大学・大学院・環境科学研究所），加治いずみ（静岡県立大学/環境科学研究所・生活健康科学研究科），北村健一郎（熊本大学大学院・医学薬学研究部），江藤 圭（生理研・生体恒常），中畑義久（生理研・生体恒常），波多野亮（大阪大学大学院・医学系研究科），金

井好克（大阪大学大学院・医学系研究科），中井 彰（山口大学大学院・医学系研究科），中張隆司（大阪医科大学・医学部），早田 学（熊本大学・医学部），内村幸平（熊本大学・医学薬学研究部），安西尚彦（杏林大学・医学部），櫻井裕之（杏林大学・医学部），河原克雅（北里大学・医

学部), 安岡有紀子 (北里大学・医学部), 實吉 拓 (熊本大学大学院・医学薬学研究部), 石上友章 (横浜市立大学大学院・医学研究科), 杉田 誠 (広島大学・大学院医歯薬学総合研究科), 大黒恵理子 (大阪医科大学・生理学教室), 酒井秀紀 (富山大学・大学院医学薬学研究部), 藤井拓人 (富山大学・大学院医学薬学研究部), 丸中良典 (京都府立医科大学・医学研究科), 宮崎裕明 (京都府立医科大学大学院・医学研究科), 中島謙一 (京都府立医科大学・医学研究科), 太田麻利子 (京都府立医科大学・医

学研究科), 鈴木裕一 (静岡県立大学・食品栄養科学部), 新里直美 (京都府立医科大学大学院・医学研究科), 室田佳恵子 (徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部), 金 善光 (生理研・生体恒常), 宮本愛喜子 (生理研・生体恒常), 平尾顕三 (生理研・生体恒常), 鍋倉淳一 (生理研・生体恒常), 石橋 仁 (生理研・生体恒常), 渡部美穂 (生理研・生体恒常), 唐木晋一郎 (静岡県立大学・環境科学研究所), 細木誠之 (京都府立医科大学・医学研究科細胞生理学)

【概要】

上皮組織は, 体内環境恒常性維持に重要な働きを担っている。このような役割を果たす上で, ホルモンや神経による上皮組織機能制御機構の解明を目指し研究が進められてきた。さらに上皮組織は自らが細胞外環境変化を感受して, 自らの機能制御を行うことにより, 体内恒常性維持に寄与していることも明らかとなってきた。また, 上皮組織は, 体内恒常性維持という観点からのみだけではなく, 外界からの防御としてのバリアー機能も有している。これらの上皮機能発現に重要な働きを担っているのがイオンチャネルやイオン輸送体である。上皮膜輸送制御機構解明に関する研究は, 上皮膜輸送に関与するイオンチャネル・イオン輸送体のクローニングにより飛躍的な進歩が見られた。嚢胞性線維症 (cystic fibrosis) の原因遺伝子として上皮型クロライドイオンチャネルの一種である cystic Fibrosis Transmembrane conductance

Regulator (CFTR) が 1989 年にクローニングされ, 次いで遺伝性高血圧症の一種である Liddle's syndrome の原因遺伝子として上皮型ナトリウムチャネル (Epithelial Na Channel: ENaC) が 1993 年ー1994 年にかけてクローニングされ, その後の研究のブレークスルーとなった。これら CFTR や ENaC をはじめとして, 体内恒常性維持に重要な働きを担イオンチャネルやイオン輸送体は, 我々の細胞外環境感受機構を通じて活性制御が行なわれている。これらのことを踏まえ, 上皮組織におけるイオン輸送制御の分子メカニズム解明を目指し, 研究を推進するために, 本研究会は開催された。この分野において先進的な研究を推進している研究者に講演を行って頂いた。講演発表内容に対する活発な意見交流も行われ, 本研究会での意見交換を基盤として, 今後共同研究へと進展するものと確信している。

(1) 熱ショック転写因子を介するタンパク質恒常性維持の新しい分子機構

林田直樹, 藤本充章, 新川豊英, Ramachandran Prakasam, 譚 克, 瀧井良祐, 中井 彰
(山口大学大学院医学系研究科医化学分野)

タンパク質恒常性の維持はすべての細胞機能の発現に重要である。その維持システムの中で, タンパク質の合成と成熟の過程に重要な役割を演じているのが熱ショック応答である。我々は, 伸長したポリグルタミン蛋白質 (polyQ) が細胞内で凝集体を形成することでタンパク質毒性を発揮するポリグルタミン病をモデルとして, HSF1 を介するタンパク質ホメオスタシスの維持機構を解析してきた。今回, HSF1 の新たなターゲット分子である転写因子 NFATc2 がタンパク質ホメオスタシスに重要

な役割を担うことを明らかにした。NFATc2 欠損 MEF は, HSF1 欠損 MEF と同様に polyQ 凝集体形成が増強した。さらに, 活性化型 HSF1 は野生型 MEF の polyQ の凝集体形成を強く抑制したが, NFATc2 欠損 MEF ではその抑制効果が半減した。また, ハンチントン病 (HD) マウスは, NFATc2 欠損 HD マウスと交配すると寿命が顕著に短縮し, 脳における polyQ 凝集体形成が亢進した。以上の結果から, HSF1 は熱ショックタンパク質だけでなく, 少なくとも NFATc2 を介して, 蛋白質ホメオスタシスを

調節していることが明らかとなった。NFATc2 は細胞内カルシウムの濃度変化により活性の制御をうけることか

ら、カルシウム恒常性とタンパク質恒常性の維持機構に関連があることを示唆した。

(2) モルモット卵管上皮線毛運動周波数の卵巣周期中の変化と Estrogen と Progesterone の効果

中張隆司 (大阪医科大学生理学)

モルモットの卵管采の ovarian cycle 中の線毛運動周波数 (CBF) を測定した。卵胞期直前には CBF は 12Hz に減少した。卵胞期では、 β estradiol (βE_2) 濃度上昇に伴い、CBF は 12Hz から 16 Hz に上昇した。排卵期では、16Hz と高い CBF から 13Hz に減少した。黄体期前期では、 $\beta E_{2,PRG}$ は低濃度に保たれ、CBF は 14 Hz から 17 Hz に上昇した。PRG 濃度が最高値に達する黄体期後期には CBF は 12 Hz に急激に減少した。その後、PRG 濃度が減少すると、15 Hz に増加した。黄体期終了後 CBF は急激に減少した (12Hz)。 βE_2 benzoate (βE_2B) と medroxy PRG

(mPRG) 投与による CBF 変化を調べた。低濃度の βE_2B ($4 \text{ mg} \cdot \text{day}^{-1} \cdot \text{kg-water}^{-1}$) では、CBF は 15 Hz に増加し、高濃度の βE_2B ($40 \text{ mg} \cdot \text{day}^{-1} \cdot \text{kg-water}^{-1}$) では、CBF は 12 Hz に減少した。mPRG ($4\text{--}40 \text{ mg} \cdot \text{day}^{-1} \cdot \text{kg-water}^{-1}$) は、CBF は 12 Hz に減少させた。この βE_2B と mPRG による CBF 変化は、それぞれ ICI-182,780 (βE_2 受容体阻害剤) と mifepristone (PRG 受容体阻害剤) により消失した。このように、ovarian cycle 中のモルモット卵管采 CBF が、 βE_2 と PRG の濃度により決められていた。

(3) ヒト小腸上皮モデルである Caco-2細胞におけるフラボノイドの代謝と輸送

室田佳恵子, 吉田修治, 藤倉 温, 寺尾純二 (徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部)

フラボノイドは植物性食品に含まれる機能性成分であり、抗酸化性などに由来した疾病予防効果が期待されている。植物中では主に配糖体として存在しているフラボノイドは、大部分が腸管管腔にて粘膜酵素や腸内細菌による消化により糖が脱離したアグリコンとなって吸収される。小腸上皮はフラボノイド代謝を司る主要な組織の一つであり、細胞内で第二相解毒酵素群によりグルクロン酸抱合体や硫酸抱合体に変換されたフラボノイドは、小腸上皮細胞の刷子縁側あるいは基底膜側に存在する抱合体排出ポンプによって細胞外へと放出される。刷子縁側への放出、すなわち腸腸循環を阻害すると生体内フラ

ボノイド量が増加することが報告されており、腸管細胞におけるフラボノイドの輸送方向は生体利用性に大きな影響をもたらすといえる。そこで、我々はヒト小腸上皮細胞のモデルとして汎用されている Caco-2 細胞を用いて、代表的なフラボノイドの一つであるケルセチンの細胞内代謝およびそこで産生される代謝物の輸送方向について検討している。今回は、ヒトがケルセチンを摂取した後に血漿中に見出されるケルセチン代謝物と Caco-2 細胞産生代謝物との比較を行い、小腸上皮における輸送方向と生体吸収性について考察したい。

(4) 神経突起伸長におけるクロライドイオン輸送体 NKCC1 の役割 — フラボノイドによる神経再生の試み —

中島謙一, 新里直美, 丸中良典 (京都府立医科大学大学院 医学研究科 細胞生理学)

学習や記憶等の高度な脳機能を可能にしているのは、多数の神経細胞が神経突起を伸長し、シナプス形成により構築される神経回路による。一方、細胞内 Cl^- 濃度変化は、細胞増殖や細胞骨格系再構築を含む様々な細胞機能制御に関与していることが、近年の研究より明らかになってきた。

近年、我々はラット副腎髄質由来 PC12D 細胞 (PC12 細胞の亜株) において、神経成長因子 (NGF) 処理により $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ 共輸送体 (NKCC isoform 1: NKCC1) の発現が増加すること、および NGF による神経突起伸長には NKCC1 が必須であることを明らかにした。PC12 細胞および PC12D 細胞における神経突起伸長は、細胞外のクロライドイオン濃度を低下させることで (Cl^- を NO_3^- または

gluconate に置換) 有意に抑制された。PC12D 細胞は PC12 細胞よりも、より敏速に神経突起を伸長する。PC12 細胞と PC12D 細胞における NKCC1 の発現量を比較すると、PC12D 細胞の方が NKCC1 の発現量は高かった。これは、NKCC1 を介した細胞内へのクロライドイオンの取り込みが、神経突起伸長に対して促進的に働くことを示唆している。また、我々は以前よりある種のフラボノイドが、NKCC を始めとしたイオン輸送体やイオンチャネルの活性を調節していることを報告してきた。今回、PC12 細胞を NGF 処理する際に、フラボノイド (ケルセチン) を同時に作用させておくことにより、NKCC1 活性が亢進し、それを介して神経突起伸長が促進するという興味深い結果を得たので、その詳細について報告する。

(5) ヒト及びラット下部消化管における苦味物質の受容と分泌作用

加治いずみ, 唐木晋一郎, 桑原厚和 (静岡県立大学院・環境科学研究所 環境生理学研究室)

消化管の生理機能の調節には、腸管粘膜上皮における管腔内の化学的情報の感受も関与していると考えられる。しかし、下部消化管での化学受容体の発現と生理機能については、ほとんど明らかになっていない。近年、味覚や嗅覚に関わる化学受容体が次々に同定され、同じ分子群が腸管粘膜でも機能している可能性が報告されている。特に、危険物を感知し排除するための苦味受容機構は、下部消化管においても生体防御機構に寄与しているのではないかと考えられる。そこで我々は、ヒト及びラットの下部消化管粘膜において、苦味受容体 (T2R family) の発現と、 T2R 特異的アゴニスト

6-n-propylthiouracil の組織レベルでの応答を、RT-PCR 法及び Ussing chamber 法を用いて検討した。その結果、1) ヒト及びラットの下部消化管粘膜に T2R が発現していること、2) 管腔側の T2R 刺激により tetrodotoxin 非感受性かつ cyclooxygenase 阻害剤感受性の経上皮陰イオン分泌が誘起されることが明らかとなった。さらに、高濃度のプロスタグランジンは T2R 刺激による管腔側への陰イオン分泌を促進した。腸管粘膜上皮において管腔内の環境を監視し、生理機能の調節に関与する化学受容機構の解明は、生体防御の観点からも今後重要であると考えられる。

(6) アルドステロンによる Na^+ 再吸収亢進は p38 を介する

太田麻利子, 新里直美, 丸中良典 (京都府立医科大学大学院医学研究科細胞生理学)

アルドステロン (ALD) はアミロライド感受性上皮型

ナトリウムチャネル (Epithelial Na^+ channel; ENaC) の転

写制御および細胞内局在制御により Na^+ 再吸収を亢進することが知られている。*Xenopus laevis* 腎遠位尿細管上皮モデル培養細胞 (A6 細胞) において、我々は ALD が p38 を活性化することを見出した。そこで、ALD による ENaC を介した Na^+ 再吸収および ENaC mRNA 発現亢進と p38 の活性化との関連性について検討するために、p38 の特異的阻害剤である SB202190 の効果について調べた。SB202190 は ALD による Na^+ 再吸収亢進および β -ENaC mRNA の発現亢進を著しく抑制した。また、細胞内タンパク質輸送阻害剤である brefeldin A (BFA) と SB202190

の効果について調べたところ、BFA と SB202190 は相加的な阻害効果を示した。一方、プロテアソーム阻害剤である MG132 と SB202190 の影響について調べたところ、MG132 により SB202190 の阻害効果はほぼ回復した。

以上の結果より、ALD による p38 活性化の生理的役割は、 β -ENaC mRNA の発現を亢進するとともに、ENaC の膜からの回収および分解過程を抑制することにより、管腔側膜上での発現量を増大させ、 Na^+ 再吸収を亢進させることであると考えられる。

(7) 上皮性ナトリウムチャンネル特異的ユビキチンリガーゼ Nedd4L の C2ドメイン結合タンパクのクローニング

新城名保美, 石上友章, 梅村将就, 峯岸慎太郎, 牛尾比早子, 内野 和, 梅村 敏
(横浜市立大学大学院医学研究科病態制御内科学)

ヒトの Nedd4L 遺伝子は、上皮性ナトリウムチャンネル (ENaC) に対する負の制御因子としての機能を持っていることから、本態性高血圧症の候補遺伝子と考えられる。ENaC は、尿細管上皮細胞の頂端側細胞膜に局限し発現しており、そのユビキチン化には Nedd4L タンパクの効率的な結合が必須であると考えられる。今回我々は、細胞内での ENaC-Nedd4L 系の分子メカニズムをより詳細に解析する目的で、酵母 2 ハイブリッド法を用いて、ヒト Nedd4L の C2 ドメインとの結合タンパクのクローニングを行った。

【方法】Nedd4L isoform I/II の C2 ドメインを bait vector にクローニングした。ヒトの腎臓 cDNA ライブラリーを用

いて、酵母 2 ハイブリッド法で遺伝子をスクリーニングした。さらに、哺乳類の細胞系での結合を検討する目的で、HEK293 細胞でのタンパク-タンパク相互作用を Matchmaker Chemiluminescent Co-Immunoprecipitation Kit を用いて検討した。

【成績】isoform I に対しては 102 個、isoform II に対しては 202 個の陽性クローンが得られた。単離精製した bait vector をシークエンスし、最終的に 5 個のクローンが共通することが判明した。HEK293 細胞での検討では、NPC タンパクがもっとも強く結合し、本タンパクが C2 ドメインとの結合タンパクであると考えられた。

(8) Prostaglandin 輸送体 OAT-PG ノックアウトマウスを用いた腎局所 PGE2クリアランス機構の解析

波多野亮¹, 高藤和輝¹, Kanyarat Promchan¹, Pattama Wiriyasurmkul¹,
永森收志¹, 松原光伸², 武藤重明³, 浅野真司⁴, 金井好克¹

(¹ 大阪大学大学院医学系研究科生体システム薬理学, ² 東北大学大学院医学系研究科遺伝子医療開発分野,
³ 自治医科大学医学部腎臓内科, ⁴ 立命館大学薬学部分子生理学教室)

演者らは、SLC22 ファミリーに属する Prostaglandin 特異的な輸送体として OAT-PG (Organic Anion Transporter for Prostaglandin) を同定した。本研究では、腎臓に特異的

に発現する OAT-PG の生理機能に関してノックアウト (KO) マウスを作製し、以下の検討を行った。

1) OAT-PG は腎近位尿細管の側基底膜に局在し、細胞

膜において PGE_2 の代謝酵素 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH) と共局在することを確認した。更に、培養細胞を用いた共発現実験において OAT-PG は細胞内 C 末端領域を介して 15-PGDH と蛋白質間相互作用することが示唆された。

2) OAT-PG の KO マウスを用いた実験では、腎皮質のコラゲナーゼ処理によって得られた尿細管懸濁液を用いて、RI 標識した $[\text{H}]\text{PGE}_2$ の取り込み活性を調べたとこ

ろ、KO マウス由来の尿細管懸濁液において $[\text{H}]\text{PGE}_2$ の取り込み活性が有意に低下していた。更に PGE_2 合成刺激時には KO マウスの腎皮質組織中に PGE_2 の有意な貯留が見られ、尿中への代謝物の排泄は有意に低かった。

以上から、OAT-PG は腎皮質において PGE_2 を血中から取り込み、細胞内で 15-PGDH と複合体を形成し腎皮質組織の PGE_2 濃度を調節する新たな役割をもつ分子であると考えられた。

(9) ループ利尿薬の経上皮細胞性分泌の分子機序： 新規ヒト電位依存性有機酸トランスポーター分子 hOATv1 の同定

安西尚彦, Promsuk Jutabha, 櫻井裕之 (杏林大学医学部薬理学教室)

腎臓の有機酸輸送系はアニオン性薬物の排出に重要な役割を果たしている。例えば $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter 2 (NKCC2) 阻害薬であるループ利尿薬は、この有機酸輸送系が担っていると考えられている。利尿薬は尿細管基底側にある有機酸交換輸送体 OAT1/OAT3 により細胞内に取込まれるが、その管腔側への出口の分子実体は未だ不明である。今回我々は、ブタ電位依存性有機酸トランスポーター pOATv1 と相同性をもつヒトクローン hOATv1 の有機酸輸送特性の解析を行い、腎近位尿細管管腔側の有機酸排出路として働く可能性を検討した。hOATv1 は腎臓の代表的有機酸であるパラアミノ馬尿酸 (PAH) の RI 標識体を有意に輸送することが確認された。またその輸送駆動力は Na^+ 非依存性で外液中 NaCl の KCl 置換により、輸送活性が増加することが明らかになり、hOATv1

による有機酸輸送が膜電位依存性である事が示唆された。卵母細胞内に注入した RI 標識 PAH は時間依存性に排出される特性を示し、さらに膜電位固定法による PAH 電流の電位依存性の変化を確認できたことから、我々は本分子がヒトの電位依存性有機酸トランスポーター hOATv1 であると確認した。hOATv1 による PAH 輸送は、多くのアニオン性化合物、特にループ利尿薬により強力に抑制されることを見出し、実際に RI 標識 bumetanide が hOATv1 発現卵母細胞にて排出輸送される事を見出した。ヒト OATv1 は腎尿細管管腔側膜にそのタンパク質局在が報告されていることから、hOATv1 は、細胞内に取込まれた有機酸の管腔側での排出経路であることが示唆された。

(10) 代謝性アシドーシスによる腎集合管 V1a 受容体の発現誘導

安岡有紀子^{1,2}, 小林瑞佳², 河原克雅^{1,2} (¹ 北里大学医学部生理学, ² 北里大学大学院医療系研究科)

腎臓におけるバソプレシン受容体 (V1aR) の役割を明らかにするため、V1aR mRNA のネフロン内局在、代謝性アシドーシス誘発時の尿・血漿電解質濃度/pH/尿中アンモニア排泄量を解析した。

【方法】野生型マウス (10-12 週令) を代謝ケージに入れ、(1) 標準食飼育および (2) アシドーシス誘発 (2%スクロース+ NH_4Cl 溶液負荷) 時の採尿・採血を行った (0, 1, 3,

6 日目)。高感度 in situ hybridization 法 (tyramide-ISH 法) で、V1aR mRNA の腎ネフロン内セグメント毎に、発現量を数値化した。

【結果】標準食飼育時の V1aR mRNA 発現量は、(中-高度) TAL 髓質内層 (ISOM), CCD, OMCD, IMCD; (低い) 糸球体, TAL 皮質/髓質外層 (OSOM), DCT; (無) PCT, PST, TL だった。抗 AQP3 抗体 (集合管主細胞 (PC) のマーカー)

を使った蛍光二重染色法では、V1aR は PC に発現せず、間在細胞 (IC) にのみ発現していた。アシドーシス群マウスの平均尿 pH ($\pm$ SEM) は、 6.52 ± 0.04 (day 0, n=14) から 5.88 ± 0.03 (day 1, n=5), 5.85 ± 0.02 (day 6, n=5) に低下した ($P < 0.001$)。これに対し、血漿 pH は、 7.37 ± 0.02 (day 0, n=5) から 7.17 ± 0.01 (n=5) に低下し (day 1), 6 日後には

元のレベル 7.38 ± 0.02 (n=12) に回復した。V1aR mRNA の発現量は、アシドーシス誘導時に次の 2 セグメント (TAL 髄質内層と OMCD の IC) のみ、有意に ($P < 0.05$) 増加した。

【結論】アシドーシスで誘導されるネフロン内 V1aR 発現は、酸塩基バランスに貢献していることが示唆された。

(11) 脂質ラフトが関与する胃酸分泌調節機構

酒井秀紀, 藤田恭輔, 家原貴大, 藤井拓人, 清水貴浩, 竹口紀晃
(富山大学大学院 医学薬学研究部 薬物生理学)

本研究では、膜マイクロドメインの脂質ラフトが、胃プロトンポンプ (H^+ , K^+ -ATPase) の活性におよぼす効果について検討した。実験には、ブタ胃粘膜から調製した、細胞内胃細管小胞に富むベシクル (TV) およびアピカル膜に富むベシクル (SAV) を用いた。Detergent-resistant membranes (DRM) および non-DRM はベシクルを CHAPS で処理し一連の密度勾配遠心により調製した。

SAV と TV の胃プロトンポンプ活性は methyl- β -cyclodextrin (M β CD) 処理し、コレステロールを引き抜くことで、共に顕著に減少し、水溶性コレステロールの添

加により元のレベルにまで回復した。SAV と TV のプロトン取り込み活性は、M β CD 処理により共に顕著に抑制され、コレステロールの添加により有意に回復した。SAV において、 H^+ , K^+ -ATPase は、DRM と non-DRM の両方の画分に分布している一方、 H^+ , K^+ -ATPase と分子会合し Cl^- 輸送に関与している KCC4 は、DRM にのみ分布していた。これらの結果から SAV において H^+ , K^+ -ATPase がラフトに存在する場合に高い活性を有することが示唆され、胃酸分泌細胞のアピカル膜における酸分泌は脂質ラフトによって正に調節されているものと考えられた。

(12) 大腸陰イオン輸送における SLC26A3(DRA)の役割

鈴木裕一, 林 久由 (静岡県立大学食品栄養科学部)

SLC26A3 (DRA) が大腸 Cl^- 吸収および HOC_3^- 分泌にどのような関与しているかを、SLC26A3 (DRA) 欠損マウスを用いて Ussing chamber 法で検討した。 $^{36}Cl^-$ フラックスは、WT マウスでは盲腸と遠位結腸で $J_{ms}(^{36}Cl^-) > J_{sm}(^{36}Cl^-)$ で、正味の Cl^- 吸収があったが、近位結腸では両者はほぼひとしく正味の Cl^- 吸収は殆どなかった。それに対し DRA 欠損マウスでは、近位結腸での $^{36}Cl^-$ フラックスは WT と差がなかったが、盲腸と遠位結腸では $J_{ms}(^{36}Cl^-)$ のみならず $J_{sm}(^{36}Cl^-)$ も著明に低下し、正味の $^{36}Cl^-$ 吸収は殆ど消失した (0 ではないものの)。以上の結果より、盲腸と遠位結腸で DRA が機能し、 Cl^- 吸収の大部分を担っていること

が示された。また、近位結腸では DRA は全く発現していないか、活性がない状態にあることが示唆された。一方 ^{22}Na フラックスは、3 つの部位ともに $J_{ms}(^{22}Na) > J_{sm}(^{22}Na)$ で、DRA 欠損マウスと WT で大きな差がなかった。DRA 欠損マウスでは Na^+/H^+ 交換輸送と Cl^-/HOC_3^- 交換輸送との機能的なカップリングは見られないことが明らかになった。さらに、管腔側の Cl^- で活性化される HOC_3^- 分泌につき、この活性が大きい盲腸と遠位結腸で、WT と DRA 欠損マウスで比較した。DRA 欠損マウスでは全く消失していた。このことから、DRA は Cl^-/HOC_3^- を介して HOC_3^- 分泌も担っていると考えられた。

(13) 肝細胞におけるウアバイン非感受性 Na^+ -ATPase 活性

藤井拓人, 渋谷和人, 下田恵理, 清水貴浩, 竹口紀晃, 塚田一博, 酒井秀紀
(富山大学大学院 医学薬学研究部 薬物生理学)

ヒト肝細胞癌と正常肝組織において, Na^+ , K^+ -ATPase a-subunit の各アイソフォーム ($\alpha 1\text{NaK}$ - $\alpha 3\text{NaK}$) の発現量を比較すると, ヒト肝細胞癌において $\alpha 3\text{NaK}$ の発現量が正常肝組織に比べて有意に増加していたが, $\alpha 1\text{NaK}$ および $\alpha 2\text{NaK}$ の発現量に有意な変化は見られなかった。次に, ヒト肝細胞癌と正常肝組織の Na^+ , K^+ -ATPase 活性に対するウアバイン感受性を比較したが, 両者間で有意な差は見られなかった。しかし, ヒト肝細胞癌においてウアバイン (10 μM) 感受性の Na^+ , K^+ -ATPase 活性は, 近傍の正常肝組織に比べて有意に上昇していた。従って, 肝

細胞癌において $\alpha 3\text{NaK}$ の発現量の亢進によりウアバイン感受性の Na^+ , K^+ -ATPase 活性が上昇している可能性が示唆された。

また, ヒト正常肝組織および肝細胞癌には高いウアバイン (1 mM) 非感受性 Na^+ -ATPase 活性が存在することを見出した。このウアバイン非感受性 Na^+ -ATPase 活性は, ヒト肝細胞癌由来 HepG2 細胞にも存在した。そこで, HepG2 細胞を用いて肝細胞におけるウアバイン非感受性 Na^+ -ATPase 活性の生理的特徴を検討した。

15. シナプス伝達概念志向型研究

2009年11月12日－11月13日

代表・世話人：澁木克栄（新潟大学脳研究所）

所内対応者：鍋倉淳一（生体恒常機能発達機構）

- (1) 和音に選択的な聴覚野皮質内回路の経験依存的形成
塚野浩明（新潟大学脳研究所システム脳生理学分野）
- (2) 末梢感覚神経の損傷を検出する神経機構
駒形成司（新潟大学脳研究所システム脳生理学分野）
- (3) 海馬錐体細胞と小脳プルキンエ細胞の単一シナプスでの機能と形態の相関
宮脇寛行（京都大学大学院理学研究科生物物理学教室）
- (4) 海馬 CA3野シナプス伝達の異シナプス間相互作用
打田武史（北海道大学大学院医学研究科神経生物学分野）
- (5) 順行性ミトコンドリア軸索輸送とシナプス伝達
馬 敏，持田澄子（東京医科大学細胞生理学講座）
- (6) シナプス前終末における伝達物質放出機構-Ca 結合の生後発達変化
中村行宏（同志社大学生命医科学部神経生理学研究室）
- (7) 扁桃体における抑制性オシレーションとそのドーパミン調節
村越隆之（東京大学大学院総合文化研究科生命環境科学系身体運動科学）
- (8) シナプスタグの分子実体を求めて
岡田大助（理化学研究所脳科学総合研究センター生物言語研究チーム）
- (9) ラット脊髄後角膠様質におけるサイレントシナプスの再考
八坂敏一（佐賀大学医学部生体構造機能学講座）
- (10) ラット脊髄膠様質の GABA とグリシンによる抑制性シナプス伝達のメリチンによる異なった修飾
熊本栄一（佐賀大学医学部生体構造機能学講座）
- (11) 抑制性シナプスの可視化と形態変化
栗生俊彦（徳島文理大学香川薬学部病態生理学講座）
- (12) Molecular determinant differentiating *Chlamydomonas* channelrhodopsins
王 紅霞（東北大学生命科学研究科脳機能解析分野）
- (13) モノカルボン酸トランスポーターを介したアストロサイトによるシナプス伝達の維持
加藤総夫（東京慈恵会医科大学総合医科学研神経生理学）
- (14) 海馬 CA1 GABA シナプスにおけるアストロサイトによる細胞外 Cl⁻バッファリング
江川 潔（浜松医科大学医学部生理学第一講座）

【参加者名】

平野丈夫（京都大学・理学研究科），持田澄子（東京医科大学・細胞生理学講座），宮脇寛行（京都大学大学院・理学研究科），中村行宏（同志社大学・生命医科学部），山下愛美（京都大学大学院・理学研究科），江口工学（独立行政法人 沖縄科学技術研究基盤整備機構），江藤 圭（生理学研究所・生体恒常機能），中畑義久（生理学研究

所・生体恒常機能），高橋智幸（同志社大学・生命医科学部），澁木克栄（新潟大学・脳研究所），駒形成司（新潟大学脳研究所・システム脳生理学分野），打田武史（北海道大学・医学研究科），村越隆之（東京大学・大学院総合文化研究科），江川 潔（浜松医科大学・医学部），王 紅霞（東北大学・生命科学研究科），八尾 寛（東北大学・

生命科学研究科), 熊本栄一 (佐賀大学・医学部), 水田恒太郎 (佐賀大学・医学部), 八坂敏一 (佐賀大学・医学部), 塚野浩明 (新潟大学脳研究所), 藤田亜美 (佐賀大学・医学部), 神谷温之 (北海道大学・大学院医学研究科), 福田敦夫 (浜松医科大学・医学部), 岡田大助 (理化学研究所・脳科学総合研究センター), 金 善光 (生理学研究所・生体恒常機能), 小西史朗 (徳島文理大学・香川薬学部), 宮本愛喜子 (生理学研究所・生体恒常機能), 平尾顕三 (生理学研究所・生体恒常機能), 鍋倉淳一 (生理学研究所・生体恒常機能), 石橋 仁 (生理学研究所・生体

恒常機能), 北村明彦 (味の素 (株)ライフサイエンス研究所), 加藤総夫 (東京慈恵会医科大学・総合医科学研究センター), 永瀬将志 (東京慈恵会医科大学・神経科学研究部), 栗生俊彦 (徳島文理大学・香川薬学部), 渡部美穂 (生理学研究所・生体恒常機能), 鴨井幹夫 (東京慈恵会医科大学・医学研究科), 久場健司 (名古屋学芸大学・管理栄養学部), 安藤 祐 (名古屋学芸大学 大学院・栄養科学研究科), 早戸亮太郎 (名古屋学芸大学・管理栄養学部), 堀 哲也 (同志社大学・生命医科学部), 榊原賢司 (同志社大学・生命医科学部医生命システム学科)

【概要】

シナプス伝達の研究は神経科学の中心課題の一つである。伝達物質の同定に始まり, 生理学的解析により従来の教科書的な概念を確立したシナプス研究は, 遺伝子工学・パッチクランプ・光学的測定などの新技術の導入により分子・細胞機構に関する知見が急速に集積し, 大きく進展・変貌しつつある。中枢神経系ではシナプスは化学的情報と電気的情報が直接的に関わり合う重要な場であり, シナプス機能の解明こそが中枢神経機能の基盤の解明に他ならない。今現在, シナプスの研究をさらに一

層発展させるためには, 多面的アプローチと専門分野の境界を越えた共同研究によって, シナプス伝達や機能に関する新たな概念を志向・形成することが必要とされている。本研究会は, 生理学・生化学・分子生物学・形態学などの立場からシナプス研究の最先端にある研究者が一堂に会して自由活発な討論と, 若手研究者の参加を通じて, 新たな研究の方向性と共同研究の可能性を模索する目的で開催した。

(1) 和音に選択的な聴覚野皮質内回路の経験依存的形成

塚野浩明¹, 窪田 和², 岩里琢治³, 糸原重美⁴, 八木 健⁵, 高橋 姿², 菱田竜一¹, 澁木克栄¹

(¹新潟大脳研生理, ²新潟大医学部耳鼻科, ³国立遺伝学研究所, ⁴理化学研究所, ⁵大阪大学)

我々は和音と不協和音の区別が出来るが, その神経機構は不明である。和音(純正律)の特徴は構成周波数が簡単な整数比になる事である。和音を提示すると最大公約数に対応する基音(F0)が含まれないのに知覚出来る事が知られている(Missing F0)。我々は経頭蓋フラビン蛋白蛍光イメージングを用いてマウスのF0応答を観察した。和音(20+25 kHz)をマウスに提示すると, F0に相当する5kHz領域にも神経活動が見られた。不協和音(19+26 kHz)ではこの現象は起こらなかった。光抑制により20kHz, 25kHzの高周波数領域の神経活動を抑制するとF0応答が起こらなかった事より, F0応答は皮質内回路によって起こると考えられる。

我々は, 自然界の音は常に倍音を含む事に注目し, 和音検知機構は経験依存的に形成されるという仮説を立て, それを支持する結果を得た。第一に鳴かないマウスに育てられた仔はF0応答を示さない。第二に不自然な組み合わせに暴露すると不協和音でも擬似F0応答が起こる。第三にNR1 subunitが大脳皮質特異的に半減したマウスはF0応答を示さない。これらの結果はF0応答がHebb則に基づく可塑性により形成され, 皮質内の現象である事を示す。

また以上から, 和音・不協和音の識別は, 経験依存的に形成される和音選択的聴覚野皮質内回路の活動で識別されるという可能性がある。

(2) 末梢感覚神経の損傷を検出する神経機構

駒形成司¹, 陳 山林^{1,2}, 鈴木晶子³, 菱田竜一¹, 前田健康³, 柴田 実², 澁木克栄¹
(¹新潟大学脳研究所システム脳生理, ²新潟大学医学部形成外科, ³新潟大学歯学部解剖,)

末梢感覚神経が損傷されると、生体は損傷神経の支配する皮膚への物理的な傷害を回避し難くなる。末梢神経の損傷や神経の薬理学的伝導障害により、大脳皮質性感覚脳地図の再編や、残存神経を介する皮質応答の増強が数時間以内に生じることが知られている。しかしその様な急速に生ずる可塑性がどのようにトリガーされるのかは判っていない。従来、末梢神経の自発発火による抑制が取り除かれることで可塑性が生ずるという仮説が提唱されてきた。この説は末梢神経が十分な頻度で自発発火することを前提としているが、そのような頻度の高い自発発火は見つかっていない。私たちはマウス触覚神経に極低頻度 (0.1Hz 以下) の自発発火が存在すること、

この極低頻度自発発火がマイスナー小体に存在しているグリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) によって発生することを見出した。この極低頻度自発発火を途絶させると、皮質応答の急性増強やそれに続く痛覚過敏が生じた。従来 GDNF の機能として後根神経節ニューロンへの栄養効果や神経因性疼痛への鎮痛効果などが良く知られている。我々の結果は、内在性の GDNF がマイスナー小体の触覚センサーに極低頻度の自発発火を発生させるという新たな役割を担っていることを示唆している。この触覚情報に殆ど影響しない程度の極低頻度自発発火が脊髄に届くことで、末梢感覚神経が断線していないことを生体は知ることができると思われる。

(3) 海馬錐体細胞と小脳プルキンエ細胞の単一シナプスでの機能と形態の相関

宮脇寛行, 平野丈夫 (京都大学大学院理学研究科)

中枢神経系において、シナプスの形態や機能は多様であるが、両者の相関はよく分かっていない。そこで我々は海馬錐体細胞、小脳プルキンエ細胞の培養系で個々のシナプスの機能と形態の関係を調べた。まず EGFP を発現させシナプス前細胞を標識し、さらに Alexa594 を含む細胞内液を用いてシナプス後細胞からホールセル記録を行いシナプス後細胞を標識した。テトロドトキシンを細胞外液に加えた上で可視化したシナプス前ボタンのごく近傍に配置した刺激電極に電圧パルスを与えごく少数のシナプスを刺激した。海馬錐体細胞、小脳プルキンエ細胞のいずれにおいても、単一シナプスに由来する EPSC

の振幅は試行ごとに変動した。EPSC を波形の類似性に基づいて分類することにより quantal EPSC を推定した。海馬錐体細胞では、quantal EPSC の振幅とシナプス後部のスパインの大きさに有意な正の相関が認められたが、小脳プルキンエ細胞ではそのような相関は認められなかった。一方、小脳プルキンエ細胞では、シナプス前細胞のシナプスボタンの大きさとシナプス後部のスパインの大きさに有意な正の相関が認められたが、海馬錐体細胞ではそのような相関は認められなかった。これらの結果は、海馬錐体細胞と小脳プルキンエ細胞では、シナプスの機能・形態の制御機構が異なることを示唆している。

(4) 海馬 CA3野シナプス伝達の異シナプス間相互作用

打田武史^{1,2}, 福田 諭², 神谷温之¹

(¹ 北海道大学大学院医学研究科神経生物学分野,

² 北海道大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科学分野)

幼若期の海馬スライスに低濃度のカイニン酸やムシモールを投与すると、苔状線維軸索の興奮性が一過性に増大する。イオンチャンネル型受容体が軸索を脱分極することで興奮性を変化させると想定され、苔状線維からの放出により自己受容体として活性化される可能性と、近傍のシナプスからの伝達物質漏出 (spill-over) により活性化される可能性とが示されてきた。今回我々は、マウスの海馬スライスにおいて、グルタミン酸および GABA の漏出による異シナプス間相互作用の相対的な寄与を同一の条件で比較、検討した。生後 2-3 週の幼若マウスを用いて海馬の急性スライスを作成し室温で実験を行った。CA3 野透明層を電気刺激し、歯状回顆粒細胞層から逆行

性集合活動電位を細胞外記録した。交連/連合線維入力が存在する放線層に第二の刺激電極を刺入して反復刺激 (100 ヘルツ 20 発) を加え、50ms 後の逆行性集合活動電位を記録した。これらの実験では、放線層の反復刺激によって交連/連合線維や抑制性介在ニューロンからグルタミン酸や GABA が放出され、苔状線維の興奮性に影響を及ぼすことが予想される。苔状線維の逆行性集合活動電位の振幅は放線層の反復刺激により軽度増大し、潜時もわずかに短縮した。この作用はグルタミン酸受容体阻害剤 CNQX によってほぼ消失したため、海馬 CA3 野ではグルタミン酸がより強く異シナプス間相互作用を示すと考えられた。

(5) 順行性ミトコンドリア軸索輸送とシナプス伝達

馬 歆, 持田澄子 (東京医科大学・細胞生理学講座)

シンタブリンは KIFB5 モーター分子のアダプターとして、カルゴとミトコンドリア順行性軸索輸送に機能し、シンタブリン欠損は発育途上の海馬神経のシナプス構築を阻害する。シンタブリンの siRNA, KIFB5 モーター分子との結合部位 DNA を長期培養したラット交感神経細胞シナプス前細胞に発現させてシナプス伝達への影響を観察したところ、1) シナプス形成の遅れ、2) シナプス応答の減少、3) 高頻度刺激によるシナプス伝達抑制の促進、4) 高頻度刺激によるシナプス小胞枯渇からの回復の遅れ、5) シナプス前性短期可塑性 (PPF, augmentation,

PTP) の損失、6) 順行性ミトコンドリア軸索輸送の阻害が認められた。4) 5) は、シナプス前細胞への ATP 補給によって回復が認められたことより、神経終末に運ばれたミトコンドリアからの ATP の供給がシナプス小胞のリサイクリングに必須であることが判明した。2) 3) は、ATP 補給では回復せず、カルゴ輸送に依存したシナプス前終末蛋白質が関与していることが示唆され、シンタブリン-KIFB5 モーター分子複合体による順行性ミトコンドリア軸索輸送およびカルゴ軸索輸送はシナプス形成とシナプス伝達の維持に重要であることが明らかとなった。

(6) シナプス前終末における伝達物質放出機構-Ca 結合の生後発達変化

中村行宏^{1,2}, Angus Silver³, David DiGregorio⁴, 高橋智幸^{1,2}⁽¹⁾ 同志社大学生命医科学部神経生理学研究室,² 沖縄科学技術研究基盤整備機構 (OIST) 細胞分子シナプス機能ユニット,³ Department of Physiology, University College London,⁴ CNRS UMR8118 Laboratoire de Physiologie Cérébrale, Université Paris Descartes, France)

生後 7 日齢 (P7) ラットの脳幹聴覚中継巨大シナプス calyx of Held の EPSC は, EGTA のシナプス前終末への注入によって抑制されるが, 生後発達に伴って EGTA の効果は減弱し, 聴覚獲得後の P14 には消失する。一方, 速い Ca 結合速度を持つ BAPTA による EPSC 抑制作用は一定であることから, 発達に伴って伝達物質放出機構に対する Ca の結合強度が変化することが示唆されている。我々は, 共焦点顕微鏡スキャンによるシナプス前終末 Ca 濃度変化の時空間的分布の解析から, 発達に伴う①活動電位幅の短縮と②Ca チャネル密度の減少がシナプス前終末への Ca 流入を減少させることを明らかにしてきたが, ①②のメカニズムがさらに伝達物質放出機構と Ca

の結合強度を調節しうるか検討した。P7calyx にペプチド性 Ca チャネル阻害剤を適用し, 機能的 Ca チャネル密度を人為的に減少させた状態で, シナプス前終末内へ EGTA を注入したところ, EPSC に対する抑制効果は減弱または消失した。一方 P14calyx では, TEA を適用し活動電位幅を増大させた状態で EGTA を注入したところ, EPSC に対する抑制効果が再現した。シナプス前終末における活動電位幅または Ca チャネル密度は, シナプス前終末内の Ca 濃度変化の時空間的分布を変えることによって, 伝達物質放出機構に対する Ca の結合強度を制御していると結論された。

(7) 扁桃体における抑制性オシレーションとそのドーパミン調節

村越隆之, 大城博矩 (東京大学大学院総合文化研究科生命環境科学系身体運動科学)

扁桃体基底外側核 (BLA) は情動反応と認知機能を仲介し記憶の固定に重要な役割を持つと考えられ, また様々な周波数で律動的同期現象を発生し, 病的には癲癇原性にも関わる。我々はラット扁桃体脳スライスの BLA 錐体ニューロンよりホールセル記録を行い, 0.5-3Hz の同期抑制性シナプス活動を自発的または外包等入力線維刺激誘発により観察, このリズムが回路内の複数ニューロン間で同時観察される事を見出した。薬理的検討の結果, このリズム維持には A/K 型グルタミン酸受容体による興奮性伝達が必要である事他に, T 型カルシウムチャネルおよび NMDA 型グルタミン酸受容体が関与していた。この抑制性オシレーションに対し, ドーパミンは初期リ

ズム活動依存的および濃度依存的に相反する作用を示した。すなわち弱い初期状態リズムに対しては低↔中濃度ドーパミンは促進的に作用し, 初期状態で強いオシレーションを発生している場合には高濃度ドーパミンが抑制的に作用した。これらの作用に関わる受容体サブタイプを検討した結果, 亢進作用には D1 様受容体の関与, 抑制的な作用については D2 様受容体関与の可能性が示唆された。In vivo 動物実験の知見から, このリズムが海馬を中心とした内側側頭皮質での神経活動を同期させることでシナプス可塑性形成に寄与し, 殊に情動的覚醒または睡眠時の記憶固定に関わる可能性があるのではないかと推察している。

(8) シナプスタグの分子実体を求めて

岡田大助 (理化学研究所・脳科学総合研究センター・生物言語研究チーム)

シナプス伝達が可塑的变化を起こす仕組み(表現機構)と、変化を起こすシナプスを決める仕組み(入力特異性機構)は初期可塑性ではほぼ解明されたが、長期記憶の細胞過程とされる後期可塑性では両機構とも未知である。それらを初期可塑性で起きた変化を持続させる仕組みと、持続するシナプスを決める仕組みとすれば、長期記憶で入力特異性機構の果たす役割とは長く覚える記憶内容を決定することである。後期可塑性は新しく発現誘導される蛋白群の機能に依存するので、その入力特異性機構とは初期可塑性の起きたシナプスでのみ新規合成蛋白が機能する仕組みである。

シナプスタグ仮説では、細胞体で合成された蛋白質の

機能を可能にする生化学的活性(=シナプスタグ)が初期可塑性で活性化すると仮定する。シナプスタグの生化学的実体とそれが制御する蛋白例は不明である。この活性を明らかにし、仮説を実証すれば後期可塑性の入力特異性機構の解明が見込める。我々の研究の結果、細胞体で合成される後期可塑性関連蛋白質 Vesl-1S の樹状突起からスパイン内への進入はシナプス入力による制御を受けており、この制御がシナプスタグの生化学的実体であること、Vesl-1S はシナプスタグ仮説に従う挙動をする蛋白例であることがわかった。これらの結果により、シナプスタグ仮説が実証された(Okada et al. Science 324, 904-909, 2009)。

(9) ラット脊髄後角膠様質におけるサイレントシナプスの再考

八坂敏一^{1,2}, David I Hughe², Erika Polgar², Gergely G Nagy², 渡辺雅彦³,

John S Riddell², 藤田亜美¹, 水田恒太郎¹, 井上将成¹, 熊本栄一¹, Andrew J Todd²

(¹ 佐賀大学医学部生体構造機能学講座, ² グラスゴウ大学生物医学生命科学研究所脊髄グループ,

³ 北海道大学大学院医学研究科解剖学講座)

NMDA 受容体の応答のみが観察されるグルタミン酸作動性シナプスは、“サイレント”シナプスと考えられている。脊髄後角表層の細胞において、幼若ラットではこの現象が観察されるが、成熟ラットでは観察されないことが報告されている。今回我々は、解剖学的及び電気生理学的手法を用いてこの部位におけるサイレントシナプスについて再度検証した。まず、幼若及び成熟ラットの1-2層におけるAMPA受容体とPSD-95の共存を調べた。その結果、幼若及び成熟ラットでこれらはほぼ完全に共存していた。また、脊髄スライス標本にブラインドパッチクランプ法を適用し、サイレントシナプスを検出した。幼若では9%、成熟では12%のシナプスにおいて、

サイレントシナプス、すなわちAMPA受容体の応答が見られない刺激強度でのNMDA受容体の応答が観察された。しかし、その後AMPA受容体の応答を再度調べると応答が観察された。この現象およびその他の結果により、これらはいわゆるサイレントシナプスではないことが示唆された。サイレントシナプスは実験プロトコールに依存していることが指摘され、これまでに脊髄後角において報告されたサイレントシナプスは、AMPA受容体がないことを示しているのではなく、例えば、新たに形成されたシナプスにおけるAMPA受容体の不安定性のような、他のメカニズムにより観察されたことが示唆される。

(10) ラット脊髄膠様質の GABA とグリシンによる抑制性シナプス伝達のメリチンによる異なった修飾

熊本栄一, 柳 涛, 藤田亜美, 岳 海源, 朴 蓮花, 水田恒太郎, 青山貴博, 八坂敏一

(佐賀大学医学部生体構造機能学講座 (神経生理学分野))

皮膚末梢から脊髄に至る痛み情報は、後角第 II 層 (膠様質) に入力した後、興奮性や抑制性のニューロンからなる神経回路、様々な神経修飾物質の働きにより制御される。その GABA とグリシン作動性の抑制性シナプス伝達がホスホリパーゼ A2 (PLA2) 活性化により異なった経路で修飾を受けることを示唆する結果を得たので報告する。実験は、ラット脊髄横断スライス標本の膠様質ニューロンにホールセル・パッチクランプ法を適用することにより行い、PLA2 活性化ペプチドのメリチンが抑制性シナプス伝達に及ぼす作用を調べた。メリチンは GABA およびグリシン作動性シナプス伝達のいずれも促進したが、両者の間で薬理作用が異なっていた。Na⁺チ

ヤネル阻害剤テトロドトキシン、グルタミン酸受容体阻害剤、細胞外の無 Ca²⁺, $\alpha 1$ アドレナリン受容体阻害剤、マスカリン性とニコチン性のアセチルコリン受容体阻害剤、の各々は、メリチンによる GABA 作動性シナプス伝達の促進を抑制した。一方、グリシン作動性シナプス伝達の促進は、それらの各々により有意に影響を受けなかった。以上より、メリチンはグリシン作動性のシナプス伝達を直接促進する一方、メリチンによる GABA 作動性シナプス伝達の促進は興奮性シナプス伝達の促進と活動電位発生を介するものであり、 $\alpha 1$ アドレナリン受容体、マスカリン受容体およびニコチン受容体の活性化が関与することが示唆された。

(11) 抑制性シナプスの可視化と形態変化

栗生俊彦¹, 柳川右千夫², 小西史朗¹(¹徳島文理大学 香川薬学部 病態生理学講座,²群馬大学 大学院医学系研究科 高次統御系脳神経発達統御学講座)

中枢神経系の興奮性シナプスは、シナプス前部の varicosity とシナプス後部の spine との接触部位に形成される。Spine は、発生および活動に依存してその形態を変化し、活動依存性の形態変化は興奮性シナプスの長期増強を支える基質の一つとなっていることが提唱されている。一方、抑制性シナプスの可塑性も最近少しずつ明らかにされてきているが、その形態変化は、これまでほとんど明らかにされていない。

そこで、抑制性シナプスの動態を可視化するために、抑制性シナプス前部および後部を蛍光蛋白質によって標識し、time-lapse imaging を試みた。Vesicular GABA transporter (VGAT)- Venus トランスジェニック・マウスの海馬神経細胞を分散培養すると、Venus 蛍光シグナルは

抑制性神経細胞に特異的に発現しており、その軸索および varicosity にも蛍光を認め、抑制性シナプス前部の形態を可視化することができた。一方、抑制性シナプス後部の足場蛋白質である gephyrin に蛍光蛋白質 mCherry をつないだ遺伝子をアデノウイルスにより培養海馬ニューロンに導入発現させると、抑制性シナプス後部に局在した mCherry-gephyrin 分子の集積が見られた。このように遺伝子改変マウスを用いる抑制性シナプス前部 varicosity の標識と mCherry-gephyrin による抑制性シナプス後部の標識を組み合わせることにより、抑制性シナプス前部および後部をコンフォーカル顕微鏡により同時に可視化することが可能となった。

(12) Molecular determinant differentiating *Chlamydomonas* channelrhodopsins

Hongxia Wang^{1,2}, Yuka Sugiyama^{2,3}, Takuya Hikima^{1,2}, Toru Ishizuka¹, Hiromu Yawo^{1,2,3}

(¹ 東北大学生命科学研究科, ² 東北大学脳科学グローバル COE, ³ 東北大学医学系研究科)

Channelrhodopsins (ChR1 and ChR2) are membrane proteins in the eyespot region of *Chlamydomonas reinhardtii*, and involved in the photomovement. ChRs are seven transmembrane opsins with a retinal linked in the seventh helix. When ChR is expressed in the mammalian cells, light could evoked an inward current. Despite high identities in the amino acid alignment, ChR1 and ChR2 are different in the photocurrent properties. Since ChR2 is now widely used to activate neurons by light, the molecular structure determining the wavelength and photocurrent differences between ChR1 and ChR2 still remain unclear. To identify the structures determining the differences, we constructed a series of chimeras by replacing the N terminal transmembrane domain

of ChR2 with the counterpart of ChR1. The photocurrent evaluation indicated that the replacements of 5th and 7th helices led to the change of the wavelength sensitivity. Further experiment showed that the exchanges of Tyr226 of ChR1 to Asn187 in the 5th helix and Leu291 to Ile252 (the counterpart in ChR2) in the 7th helix produced the wavelength shift. These results suggest that Tyr226/Asn187 of the 5th helix and Leu291/Ile252 of the 7th helix in ChR1/ChR2 are responsible for the wavelength difference. During these experiments, we identified a few ChRs with green light preference or with enlarged photocurrent which were more suitable for stimulating neurons than wild ChRs.

(13) モノカルボン酸トランスポーターを介したアストロサイトによるシナプス伝達の制御

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

アストロサイトやニューロンは乳酸を細胞内外間で輸送する特異的トランスポーター (モノカルボン酸トランスポーター, MCT) を発現しているが, そのニューロン活動における意義は大部分未解明である。脳幹スライスを作成し, 延髄孤束核ニューロンから膜電位ならびに膜電流を記録して選択的 MCT 阻害薬 α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) の影響を評価した。CHCA は一次求心線維刺激によって生じる EPSC 振幅を約 45% まで有意に減少させた (EC50=340 μ M)。この減少は paired-pulse ratio の有意

な変化を伴わず, またほぼ同程度の減少が AMPA 直接微量投与によって生じる AMPA 受容体電流にも観察された。IPSC 振幅は約 20% 有意に抑制されたがその程度は EPSC 振幅におけるよりも有意に小さかった。通常のグルコース供給がある状態においても, シナプス伝達, 特にシナプス後膜での EPSC もしくは興奮性電流発生に関わるエネルギー消費の多くの部分が乳酸の供給によって維持される可能性が示された。グリア・ニューロン連関におけるその意義を提唱した。

(14) 海馬 CA1 GABA シナプスにおけるアストロサイトによる細胞外 Cl⁻バッファリング

江川 潔¹, 山田順子², 古川智範¹, 柳川右千夫³, 福田敦夫¹

(¹ 浜松医科大学医学部生理学第一講座, ² 弘前大学大学院医学研究科脳神経生理学講座, ³ 群馬大学大学院医学研究科遺伝発達行動学分野)

GABA 作動性神経伝達におけるアストロサイトによる

[Cl⁻]_o 調節機能を明らかにする目的で, GABA 細胞の過

剰興奮に伴うアストロサイトの GABA 応答と抑制性神経伝達への関与を回路網レベルで検討した。電流注入により GABA 細胞を連続発火させると、近傍のアストロサイトからは高い確率で内向き電流が記録され、この内向き電流は低濃度の競合的 GABA_A 受容体阻害剤 (BMI 2μM) で完全にブロックされた。GAT1 阻害剤にてニューロンへの GABA の再取り込みを阻害すると内向き電流は有意に増大し、GAT3 成分の電流も記録された。これらの結果から、アストロサイトはシナプス間隙から spill-over した GABA に応答し、主として GABA_A 受容体を介して細胞外へ Cl⁻を流出させることが明らかとなっ

た。GABA 細胞発火により記録される GABA 応答電流は、ギャップジャンクション阻害剤投与により GABA 細胞ーアストロサイト間の距離依存的に著明に減弱した。錐体細胞層のニューロンより分子網状層テタヌス刺激による IPSC を記録すると、刺激後半での EIPSC の脱分極性シフトはギャップジャンクション阻害剤により有意に増大した。以上から、アストロサイトはギャップジャンクションを介して細胞外 Cl⁻濃度を空間的にバッファリングすることで過剰神経活動時の Cl⁻濃度勾配破綻に対し防御的な役割を果たしている可能性が示唆された。

16. 中枢・末梢臓器間連携による摂食, エネルギー代謝調節

2010年2月12日-2月13日

代表・世話人: 矢田俊彦 (自治医科大学医学部生理学講座統合生理学部門)

所内対応者: 箕越靖彦 (生理学研究所発達生理学研究系生殖・内分泌系発達機構研究部門)

(1) 摂食抑制ペプチド Nesfatin-1 の求心性迷走神経細胞への作用

末梢 Nesfatin-1 の摂食抑制効果における求心性迷走神経の関与の可能性

岩崎有作¹, 加計正文², 中林 肇³, 矢田俊彦¹

(¹自治医科大学医学部生理学講座統合生理学部門,

²自治医科大学さいたま医療センター総合医学第1, ³金沢大学保健管理センター)

(2) ネスファチン-1 の末梢投与効果発現機構に関する検討

清水弘行, 大崎 綾, 土屋天文, 森 昌朋 (群馬大学大学院病態制御内科学)

(3) インクレチンが食後血糖を制御する神経性機序: 肝・胃神経連関の検討

中林 肇¹, 中林逸子², 西澤 誠³, 中川 淳³, 新島 旭⁴

(¹金沢大学保健管理センター, ²金沢大学血管分子生理学,

³金沢医科大学内分泌代謝制御学, ⁴新潟大学生理学)

(4) 生体リズム異常と病気

岡村 均 (京都大学大学院薬学研究科医薬創成情報科学講座システムバイオロジー分野)

(5) 視床下部外側野グルコース感受性ニューロン (GSNs) が産生し摂食中に放出する

オレキシン A (ORX-A) の空間認知効果

大村 裕, 栗生修司, 福永浩司 (九州大学)

(6) ヒト褐色脂肪によるエネルギー消費と肥満との関係

米代武司, 斉藤昌之 (天使大学大学院看護栄養学研究科)

(7) 視床下部・膝ラ氏島においてレプチンにより誘導される新規転写制御因子

小森忠祐, 森川吉博 (和歌山県立医科大学医学部第二解剖学)

(8) 視床下部 Sirt 1 と摂食制御

北村忠弘 (群馬大学生体調節研究所 代謝シグナル研究展開センター)

(9) 摂食調節ペプチド・グレリンによる自律神経機能の調節

児島将康, 佐藤貴弘 (久留米大学分子生命科学研究所・遺伝情報研究部門)

(10) 膵β細胞 Kv2.1 チャネルの代謝性調節

加計正文 (自治医科大学さいたま医療センター総合医学第1)

(11) PrRP の摂食とエネルギー代謝における働き

尾仲達史, 高柳友紀 (自治医科大学医学部生理学講座神経脳生理学部門)

(12) 視床下部オレキシンによる骨格筋での糖代謝調節と動機付け摂食行動との作用連関

志内哲也, 箕越靖彦 (生理学研究所 生殖・内分泌系発達機構研究部門)

【参加者名】

北村忠弘 (群馬大学), 嶋津 孝 (愛媛大学), 児島将康 (久留米大学), 清水弘行 (群馬大学), 中林 肇, 井上 啓 (金沢大学), 大村 裕 (九州大学), 豊田行康, 戸田州俊, 佐藤寛之 (名城大学), 三木隆司, 李 恩瑛 (千葉大学),

山田哲也 (東北大学), 牛飼美晴 (鹿児島大学), 斉藤昌之, 米代武司 (天使大学), 矢田俊彦, 加計正文, 尾仲達史, 岩崎有作, 前島裕子, Udval Sedbazar (自治医科大学), 岡村 均 (京都大学), 森川吉博, 小森忠祐 (和歌山県立

医科大学), 井上尚彦 (味の素 (株)), 伊藤 誠 (日本たばこ産業 (株)), 山下 均 (中部大学), 日比壮信, 小治健太郎 (花王 (株)), 高木一代 (中京女子大学), 松尾 崇

(宮崎大学), 箕越靖彦, 志内哲也, 岡本土毅, 稲垣匡子, 戸田知得, 上條真弘, 横田繁史, 唐 麗君, Eulalia Coutinho, 内田邦敏 (生理学研究所)

【概要】

本研究会は、末梢・中枢クロストークによる摂食、代謝、脳・全身機能の調節をテーマとした。末梢から中枢への求心性迷走神経を介する情報連絡に関して、自治医科大学の岩崎から「摂食抑制ペプチド Nesfatin-1 の求心性迷走神経細胞への作用」、群馬大学の清水から「ネスファチン-1 の末梢投与効果発現機構」、金沢大学の中林から「インクレチンが食後血糖を制御する神経性機序：肝・胃神経連関の検討」について報告された。

神経ペプチドによる中枢から末梢への自律神経を介する情報連絡に関して、久留米大学の児島から「グレリンによる自律神経機能の調節」、自治医科大学の尾仲から「PrRP の摂食とエネルギー代謝における働き」、生理学研究所の志内から「視床下部オレキシンによる骨格筋での糖代謝調節と動機付け摂食行動連関」、天使大学の米代から「ヒト褐色脂肪によるエネルギー消費と肥満との関係」について報告された。

視床下部と膵島の機能を調節する新しい因子として、

和歌山県立医科大学の小森から「視床下部・膵ラ氏島のレプチン誘導性新規転写制御因子」、群馬大学の北村から「視床下部 Sirt1 と摂食制御」、自治医科大学の加計から「膵β細胞 Kv2.1 チャネルの代謝性調節」について報告された。

本研究会の目玉として京都大学岡村均教授は特別講演「生体リズム異常と病気」において、生体リズムによるホルモン分泌や血圧の制御と変調の卓越したご研究を解説して下さい、深く感銘を受けた。本研究領域の創始者である大村裕博士の「グルコース感受性ニューロンが産生するオレキシン A の空間認知効果」のお話から摂食と学習の密接な関連を学び、また嶋津孝博士は示唆に富む多くの発言により会を盛り上げて下さった。一方で多くの大学院生や若手研究者が活発に討議に参加し、末梢・中枢クロストーク研究と世代間クロストークの双方で実り多い研究会となった。

(1) 摂食抑制ペプチド Nesfatin-1 の求心性迷走神経細胞への作用 末梢 Nesfatin-1 の摂食抑制効果における求心性迷走神経の関与の可能性

岩崎有作¹, 加計正文², 中林 肇³, 矢田俊彦¹

(¹自治医科大学医学部生理学講座統合生理学部門,

²自治医科大学さいたま医療センター総合医学第 1, ³金沢大学保健管理センター)

【目的】Nesfatin-1 (Nesf-1) は、2006 年に発見された内因性摂食抑制ペプチドであり、中枢から末梢臓器まで広く分布する。Nesf-1 の中枢、末梢投与は摂食を抑制するが、末梢 Nesf-1 の摂食抑制機序は不明である。本研究では、迷走神経求心路を介した摂食抑制経路を検討するために、迷走神経求心神経節(nodose ganglion: NG)細胞に対する Nesf-1 の直接的作用を、細胞内 Ca^{2+} 応答を指標に検討した。

【方法】マウスの NG を摘出、酵素処理により単一細胞を調整し、FBS と抗生物質を含む MEM 培地にて 18-36h 培養した。Fura-2 を用いた蛍光画像解析により、細胞内 Ca^{2+}

濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 動態を測定した。

【結果、考察】Nesf-1 (0.1-10 nM) は NG 細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を濃度依存的に増加させ、12.5% (33/263) の細胞が 10 nM Nesf-1 に応答した。この応答は細胞外 Ca^{2+} 除去により完全消失し、N 型 Ca^{2+} チャネル阻害剤により強く抑制された。従って、Nesf-1 は求心性迷走神経に直接作用し、N 型 Ca^{2+} を介して $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を上昇させた。全ての Nesf-1 応答細胞が摂食抑制性消化管ホルモン cholecystokin-8 (CCK-8) にも応答したことより、Nesf-1 の摂食抑制経路の一部は CCK-8 と共通しているのかもしれない。

(2) ネスファチン-1の末梢投与効果発現機構に関する検討

清水弘行, 大崎 綾, 土屋天文, 森 昌朋 (群馬大学大学院病態制御内科学)

ネスファチン-1 末梢投与による摂食抑制作用発現機構に関し検討を加えた。ネスファチン-1 ならびにその活性部分と考えられる mid-segment (M30) の腹腔内投与は用量反応性にマウスの摂食行動を抑制し, M30 の皮下投与はより長時間の摂食抑制作用を示した。ネスファチン-1 末梢投与による摂食行動抑制は, カブサイシン前処置マウスにおいて完全に消失することから, 迷走神経系を介した機構の存在の可能性が示唆される。またネスファチン-1 は, nodose ganglion から単離したニューロンに対して直接的な作用を発現する事実も判明し, 迷走神経求心路のニューロンを活性化することが明らかとなってきた。一方, ネスファチン-1 の ELISA 系を確立し, ヒトに

おいては BMI の増加とともに血中ネスファチン-1 濃度が減少することが判明するとともに, マウス腹腔内への 250 pmol/g BW ネスファチン-1 投与では, 投与 30 分後に血中ネスファチン-1 濃度が約 1.5 倍に増加し, 血中インスリン濃度の有意な減少が観察されたが, 血中 GLP-1 濃度や血糖値には有意な影響は認められず, ネスファチン-1 以外の液性因子の変動を介した中枢への摂食抑制機構の可能性は少ないものと考えられた。以上の結果より, ネスファチン-1 の末梢投与による食欲抑制シグナルは, 主に迷走神経系を介して摂食中枢に働き, 動物の摂食行動を抑制するものと考えられる。

(3) インクレチンが食後血糖を制御する神経性機序: 肝・胃神経連関の検討

中林 肇¹, 中林逸子², 西澤 誠³, 中川 淳³, 新島 旭⁴

(¹ 金沢大学保健管理センター, ² 金沢大学血管分子生理学,

³ 金沢医科大学内分泌代謝制御学, ⁴ 新潟大学生理学)

【背景・目的】糖尿病管理に重要な食後血糖は主に胃排出とインスリン (イ) 分泌に影響される。今回は胃排出に強く関与する迷走神経 (迷神) 活動に, GLP-1 等が与える影響を検討した。

【方法・結果】麻酔下にラットの胃・肝迷神活動を測定した。GLP-1 の生理学的 (0.05, 1.0 pmol), 傍生理学的 (0.2 pmol), 薬理学的 (4.0 pmol) 量の 1 分間門脈内投与 (pv) は肝迷神求心性活動を 90 分以上にわたり用量依存性に有意に促進した (既報)。1) 胃迷神遠心性活動は, GLP-1 各量 pv 時, 正常群では 90 分以上にわたり用量依存性に有意に減少し, 肝迷神切断群と対照群では不変。GLP-1 各量大腿静脈投与 (fv) 時も胃迷神遠心性活動は有意に減少

し, 肝迷神切断群では不変。2) 長時間作用型 GLP-1 analog NN2211 の 0.2, 4.0 pmol, pv 時, 肝求心性活動の増加と, 胃遠心性活動の減少を持続的にみとめたが, 肝迷神切断群では消失した。また, 4.0 pmol, fv 時, 肝求心性活動は 60 分に頂値をみる一過性増加を示し, 胃遠心性活動も一過性減少にとどまった。3) 門脈中に GLP-1 と等モルで同時放出され胃作用をもつ GLP-2, pv 時両神経活動は変化せず, 節神経節神経細胞では RT-PCR にて GLP-1R と異なり, -2R 遺伝子発現を検出しなかった。

【結論】GLP-1 は迷神を介し肝・胃および肝・脾神経連関を惹起するが, GLP-2 はしない。この事実は GLP-1 が食後血糖の制御に強く関与することを示唆する。

(4) 生体リズム異常と病気

岡村 均（京都大学大学院薬学研究科医薬創成情報科学講座システムバイオロジー分野）

生体リズムは地球に住む生物にとっては基本的性質であり、哺乳類においては、多くの生理機能が生体時計の下に動いている。近年、生体のほぼ全ての細胞に時を司る時計遺伝子 *clock genes* があり、このわずかな数の時計遺伝子が、数千もの細胞機能に重要な遺伝子を周期的に発現させることが解明された。しかし、近年は長時間労働や、不夜城と化した生活環境の急速な浸透によりライフスタイルが劇的に変動し、生体リズムシステムが破綻の危機に陥っている。このため、生体リズムの異常がもたらす疾病に関心が集まっており、従来の睡眠異常や躁うつ病のみでなく、高血圧、メタボリック症候群、発癌など生活習慣病に至る機構が注目されている。特に、

循環器疾患と生体リズムの関係は高血圧の罹患率が昼夜交代勤務者において高いことなどから疫学的にはよく知られていたが、実際に体内時計と高血圧を結びつける分子機序についてはこれまで全く不明であった。最近、我々は生体リズムの消失した遺伝子改変マウス（*Cry-null* マウス）を用いてリズム異常に関連する病態を検索した。その結果、*Cry-null* マウスでは、副腎球状層で新しいタイプのステロイド合成酵素の異常産生が起こり、アルドステロン分泌が過剰となり、食塩感受性的高血圧を示すことを見出した。このように、リズム異常は、機能遺伝子の発現異常を介して、多くの疾病発症に関与すると考えられる。

(5) 視床下部外側野グルコース感受性ニューロン(GSNs)が産生し摂食中に放出するオレキシン A (ORX-A)の空間認知効果

大村 裕，栗生修司，福永浩司（九州大学）

ORX-A は空腹物質で GSNs に作用して、摂食を促進させる。GSNs はアクソンを海馬 CA1 ニューロンに伸ばし、生体の空間認知に関与している。ORX-A (1.0-10nM) をラット第三脳室に投与して、Morris の水迷路学習に対する効果を検討したところ、空間認知は抑制された。

ORX-A を海馬スライス標本に投与した実験でも、長期増強が抑制された。このとき、シナプス前の伝達物質放出も障害された。また海馬 CA1 ニューロンのカルモジュリンキナーゼ II のリン酸化も抑制された。摂食と高次脳機能との関係は複雑である。

(6) ヒト褐色脂肪によるエネルギー消費と肥満との関係

米代武司，斉藤昌之（天使大学大学院看護栄養学研究科）

褐色脂肪の機能不全が肥満の一因となることは、マウスなどでは良く知られていた。我々はヒト褐色脂肪の機能を FDG-PET/CT により評価し、寒冷刺激で活性化することや肥満度と逆相関することなどを明らかにしてきた。本研究では、健常被験者を対象にして、全身エネルギー消費に対して褐色脂肪がどの程度貢献するのかを定量的に測定し、肥満、特に加齢に伴う体脂肪蓄積との関係を解析した。健康な男女 135 名（20～73 歳）を被験者

とし、急性寒冷刺激後 FDG-PET/CT 撮影を行ったところ、若年者（20～39 歳）の約半数で鎖骨上部に FDG 集積が認められ、これが褐色脂肪であることが確認された。しかし、中年者（40 歳以上）では褐色脂肪の検出率は 10% 未満であった。年齢と肥満度との関係を調べたところ、褐色脂肪を消失した者では加齢に伴い BMI や体脂肪率、内臓脂肪面積などが増加するが、褐色脂肪を有するものではこれらの指標がほとんど増えなかった。更に、褐色

脂肪の保有者と消失者で呼吸分析を行った結果、酸素消費量が前者で有意に高いことが判明した。従って、ヒト成人でも寒冷刺激によって活性化される褐色脂肪が高頻度存在し、全身エネルギー消費の一成分として加齢に

伴う肥満進展の抑止に寄与していることが判明した。これらの結果を中心に、褐色脂肪活性に関与する遺伝並びに環境要因について発表する。

(7) 視床下部・膝ラ氏島においてレプチンにより誘導される新規転写制御因子

小森忠祐, 森川吉博 (和歌山県立医科大学医学部第二解剖学)

近年、肥満に、糖尿病、高血圧、高脂血症が合併したメタボリック症候群が深刻な社会問題となっており、その病態の中で肥満は中心的役割を担っていると考えられている。肥満は摂取エネルギー量が消費エネルギー量を超えたときに生じるが、この体内エネルギーバランスの恒常性を制御する最も重要な分子の一つがレプチンである。白色脂肪細胞から分泌されたレプチンは、脳の視床下部にあるレプチン受容体に結合することにより摂食やエネルギー消費を制御する。しかし、ヒト肥満において、レプチンの異常によるものはごくまれで、ほとんどの場合、血中レプチン濃度が高い、いわゆるレプチン抵抗性の状態にあることが示されている。そこで我々は、レプ

チン欠損 *ob/ob* マウスにレプチンを投与し、そのマウスの脳よりレプチンで誘導される9個の遺伝子を単離した (*leptin-inducible transcripts: LIT*)。この中の *LIT-1* は、視床下部や膝臓において、レプチンによって誘導され、グレリン受容体の発現を抑制し、それによって摂食促進やインスリン分泌抑制などのグレリンの作用を負に制御していることが示唆され、また、肥満糖尿病患者においても、*LIT-1* の3'-flanking 領域に有意な SNP の異常を発見した。これらのことから、レプチン抵抗性、及び肥満からの糖尿病発症に *LIT-1* の異常が関与している可能性が示唆された。

(8) 視床下部 Sirt1 と摂食制御

北村忠弘 (群馬大学生体調節研究所 代謝シグナル研究展開センター)

NAD^+ 依存性のタンパク脱アセチル化酵素である *Sirt1* は、*Foxo1* などの基質の脱アセチルを介してインスリン感受性・代謝を制御することが報告されているが、*Sirt1* の中枢性代謝制御への役割は未解明である。そこで、*Sirt1* が視床下部で摂食行動・エネルギー代謝制御機構を調節するかを検討した。

1) *Sirt1* は視床下部で *Agrp* 及び *Pomc* 陽性ニューロンで発現している。

2) *Sirt1* の視床下部におけるタンパク量は、絶食後の再摂食で増加する。この変化は RNA レベルでは見られない。

3) *Sirt1* は視床下部および視床下部培養細胞 N41 においてユビキチン修飾を受け、プロテオソーム阻害剤存在

下でタンパク量が増加する。

4) マウスの視床下部内側基底部への *Sirt1* 発現ウイルスの *micro-injection* による *Sirt1* の強制発現は、核内滞留型 *Foxo1* による摂食と体重の増加を有為抑制する。

5) *Sirt1* は摂食促進神経ペプチドである *Agrp* の転写を抑制する。この効果には *Sirt1* 酵素活性が必須である。また、核内滞留型 *Foxo1* によって亢進した *Agrp* の転写活性を *Sirt1* は抑制する。なお、*Sirt1* は *Pomc* プロモーター活性には影響を及ぼさない。

以上より、栄養素やホルモンによって視床下部 *Sirt1* タンパク量が調節され、*AgRP* の発現調節を介して摂食がコントロールされると考えられる。

(9) 摂食調節ペプチド・グレリンによる自律神経機能の調節

児島将康, 佐藤貴弘 (久留米大学分子生命科学研究所・遺伝情報研究部門)

申請者らは1999年に胃組織からグレリン(ghrelin)を発見し、これが成長ホルモン分泌促進作用を示すとともに、強力な摂食亢進作用を持つことを明らかにした。グレリンは胃から分泌されて血中を流れるペプチド・ホルモンであり、3番目のSer残基の側鎖が脂肪酸であるn-オクタン酸(C8:0)によって脂肪酸修飾を受けており、さらにこの脂肪酸修飾が活性発現に必須であるという極めてユニークな構造をしている。グレリンは、末梢投与によって摂食亢進作用を示す内因性のペプチド・ホルモンとして唯一のものであり、血中投与や皮下投与によって強力な摂食亢進作用を示す。グレリンは摂食促進や成長ホルモン分泌を調節することによって、生活習慣病や摂食障害の病態と密接な関連がある。

これまでに目立った表現型は見つかっていないグレリンKOマウスについて、申請者らは野生型マウスと比較して詳細に検討した。その結果、グレリンKOマウスに

おいて自律神経機能に異常があることを見つけ出した。グレリン欠損マウスに対して無線テレメトリーシステムを用いて非侵襲的に血圧・心拍数・体温などの自律神経機能を調べた結果、グレリン欠損マウスは血圧不安定、体温維持機構の異常、消化管運動の低下、血圧・体温の日内リズム異常など、自律神経系の異常を示すことが明らかになった。中枢性摂食異常症の患者においては単に摂食障害だけでなく、その他の様々な異常を訴える。これらは血圧・体温・消化管機能などの自律神経系の異常が多く、今回のグレリン欠損マウスの表現型との関連が興味深い。

またグレリン投与によって体温が低下することがわかった。すなわちグレリンは体温を下げることで、余分なエネルギー消費を抑えて、生体の生存に有利な栄養蓄積を行うのだと考えられた。

(10) 膵β細胞 Kv2.1チャネルの代謝性調節

加計正文 (自治医科大学さいたま医療センター総合医学第1)

膵β細胞活動電位発生に重要な電位依存性K⁺チャネル(Kv2.1)が低濃度ブドウで抑制されることがわかった。ラットβ細胞およびKv2.1発現細胞(HEK293細胞)を用いてNystatin法(N法), Whole-cell clamp法(W法)でKv2.1電流を観察した。Kv2.1はブドウ糖濃度2.8mMで電流減少, 16.6mMで電流増加がみられた。減少前値との相対変化率は前者0.48±0.10 (n=4) 後者で1.11±0.06 (n=5, P<0.003) だった。グリセルアルデヒド(11mM)はKv2.1抑制を防止(0.97±0.04, n=7), 10mMピルビン酸, ketoisocaproic acid, またはMgATP細胞内適用も同様だった。FCCPはKv2.1を抑制(0.69±0.06, n=8, P<0.002), 細

胞内MgATP0mMもKv2.1を抑制した。HEK293において細胞内MgATP10mMはチャネル抑制を防止し(0.95±0.08, n=6), 細胞内MgATP0mMによりチャネルは抑制された(0.46±0.07, n=5 P=0.001vs10mM)。以上から膵β細胞のKv2.1チャネルはブドウ糖濃度依存性に調節されている。その調節因子はMgATPを含む細胞内代謝が重要である。Kv2.1チャネルは膵β細胞以外に心臓や神経細胞にも発現していることが知られている。この代謝調節性チャネル活動制御機構は発現各臓器において重要な活動電位制御をしている可能性がある。

(11) PrRP の摂食とエネルギー代謝における働き

尾仲達史, 高柳友紀 (自治医科大学医学部生理学講座神経脳生理学部門)

神経ペプチド PrRP を産生するニューロンは延髄弧束路核, 延髄腹外側部, 視床下部背内側核に存在する。延髄弧束路核の PrRP 産生ニューロンは摂食により活性化される。PrRP 遺伝子欠損動物は, 18 週齢以降に過食となり肥満を呈し糖代謝異常が生じる。PrRP 遺伝子欠損動物では一回摂食量が増えており, 末梢の満腹物質である CCK による摂食抑制作用が大きく減弱していた。これらのデータから, PrRP は中枢における満腹シグナルの伝達を担っている可能性が示唆される。

エネルギー消費に関し, PrRP を外来性に投与すると体温が上昇し酸素消費量が増大すると報告されている。し

かし, PrRP 遺伝子欠損動物で観察される肥満は摂食量を野生型と同じに制限すると観察されなくなる。また, 安静時の酸素消費量は野生型と有意な差はない。これらのデータから, PrRP は安静時におけるエネルギー消費には大きな働きをしていないことが示唆される。ストレス刺激は PrRP 産生ニューロンを活性化し酸素消費量を増大させることが知られている。PrRP 遺伝子欠損動物においてはストレス負荷時の酸素消費量増大反応が減弱していた。従って, PrRP はストレス負荷時のエネルギー消費に重要であることが示唆される。

(12) 視床下部オレキシンによる骨格筋での糖代謝調節と動機付け摂食行動との作用連関

志内哲也, 箕越靖彦 (生理学研究所 生殖・内分泌系発達機構研究部門)

視床下部外側野とその周辺に局在するオレキシンニューロンは, 睡眠・覚醒レベルを制御するほか, 摂食行動, 動機付け行動の調節及び交感神経系の調節に関与する。交感神経は, 視床下部への電氣的刺激あるいはレプチン投与により活性化し, 視床下部腹内側核 (VMH) はその調節部位の一つである。最近, 我々は, 電気生理学的実験によって, オレキシンを作用させると VMH ニューロンが直接興奮するという結果を得た。そこで, VMH にオレキシンを投与すると, マウス及びラットにおいて骨格筋を支配する交感神経活動が選択的に上昇すると同時に, 骨格筋においてグルコースの取込みが増加することを見出した。このようなオレキシンによるグルコース代謝亢進作用は白色脂肪組織においては見られず, また, 摂食量, 自発運動量, 血漿インスリン濃度に変化はなかった。VMH へのオレキシン投与は, インスリンによるグルコースの取込み及びグリコーゲン合成促進作用をも増強した。さらに, 各アドレナリン受容体の選択的阻害剤を投与した実験並びに β アドレナリン受容体遺伝子欠損マウスの骨格筋に $\beta 2$ 受容体遺伝子を導入した実験によって, オレキシンによるグルコース取込み促進作用に骨格筋の $\beta 2$ 受容体が必要であることを突き止めた。

オレキシンニューロンは, 動機付け行動により活性化する。一方, 味覚刺激や炭水化物の経口摂取が交感神経活動を亢進させ, 熱産生を引き起こすことが知られている。そこで, サッカリン溶液を自発的に摂取するように訓練したマウスを用いて, サッカリン摂取がオレキシンニューロン, 骨格筋でのグルコース代謝にどのような効果を及ぼすかを調べた。その結果, サッカリンの自発的摂取後, オレキシンニューロンが活性化し, インスリンによるグルコース取込みおよびグリコーゲン合成促進作用が増強することを見出した。この作用は, VMH へのオレキシン受容体拮抗薬の両側性投与, あるいは $\beta 2$ 受容体阻害薬の腹腔内投与によって抑制された。また, グルコースによって動機付けしたマウスの VMH にオレキシン受容体拮抗薬を両側性に投与すると, グルコース経口摂取後の血糖値上昇がより増強した。これに対して腹腔内にグルコースを投与する方法およびオレキシンノックアウトマウスでは, このような変化は見られなかった。

以上のことから, オレキシンによる骨格筋でのグルコース代謝亢進作用は, VMH-交感神経- $\beta 2$ 受容体経路を介しており, 強い動機付けによる摂食行動直後のエネルギー代謝調節に関与すると考えられる。

17. 貪食細胞機能のイメージング

2010年1月20日－1月21日

代表・世話人：岡村康司（大阪大学大学院・医学系研究科・生命機能研究科）

所内対応者：永山國昭（生理学研究所・岡崎統合バイオサイエンスセンター）

- （1）生体2光子励起イメージングによる破骨細胞（骨の貪食細胞）の遊走・分化・機能の可視化
石井 優（大阪大学免疫学フロンティア研究センター・生体イメージング）
- （2）劇症型 ARDS の発症に関与する Myeloperoxidase
ー トリインフルエンザ H5N1 感染患者と PR-8 (H1N1) 感染モデルマウスに共通の因子ー
鈴木和男（千葉大学大学院医学研究科・炎症制御学）
- （3）食作用時の活性酸素生成酵素 NADPH オキシダーゼの活性化機構
住本英樹（九州大学大学院医学研究院・生化学分野）
- （4）Rac-RhoGDI 複合体の解離・活性化メカニズム ー Rac-RhoGDI 複合体の解離は食胞膜上で起こる ー
上山健彦（神戸大学・バイオシグナル研究センター・分子薬理分野）
- （5）電子線クライオトモグラフィー法による T7 様ウイルスのシアノバクテリアへの感染過程の解析
村田和義（生理学研究所・脳機能計測支援センター）
- （6）イノシトールリン脂質代謝系の自己組織化による自発運動シグナル発生
上田昌宏（大阪大学大学院・生命機能研究科）
- （7）貪食細胞における電位依存性プロトンチャネルの役割
大河内善史（大阪大学大学院・医学系研究科）

【参加者名】

岡村康司（大阪大学大学院医学系研究科）、永山國昭（生理学研究所・岡崎統合バイオサイエンスセンター）、石井優（大阪大学免疫学フロンティア研究センター・生体イメージング）、菊田順一（大阪大学免疫学フロンティア研究センター・生体イメージング）、島津 裕（大阪大学免疫学フロンティア研究センター・生体イメージング）、鈴木和男（千葉大学大学院医学研究科・炎症制御学）、菅 又一（千葉大学大学院医学研究科・炎症制御学）、長尾朋和（千葉大学大学院医学研究科・炎症制御学）、住本英樹（九

州大学大学院医学研究院・生化学分野）、齊藤尚亮（神戸大学・バイオシグナル研究センター・分子薬理分野）、上山健彦（神戸大学・バイオシグナル研究センター・分子薬理分野）、孫 正賢（神戸大学・バイオシグナル研究センター・分子薬理分野）、佐々木雄彦（秋田大学大学院医学系研究科）、千田進介（秋田大学大学院医学系研究科）、村田和義（生理学研究所・脳機能計測支援センター）、上田昌宏（大阪大学大学院・生命機能研究科）、大河内善史（大阪大学大学院医学系研究科）

【概要】

貪食細胞は、従来の異物を除去するという側面だけでなく、獲得免疫の活性・制御に関わる重要な免疫細胞でもある。貪食細胞の機能が欠損すると、感染症疾患、自己免疫疾患に繋がることから、貪食細胞機能の理解は、医療分野の発展にもつながる研究である。現在までに、貪食に関わる多くの分子が同定され、その機能が明らかにされてきたが、貪食細胞機能を理解するためには、これらの分子の時間的・空間的理解、すなわち、どこに局

在し、どのタイミングで活性化するのかを明らかにすることが必要である。そのためには、各分子の蛍光イメージング技術が非常に有効である。貪食は、異物の認識から始まり、細胞内への取り込み、殺菌・分解といった各過程が連続して起きる。近年のイメージング技術の進歩により、これらの細胞内過程の詳細が明らかになってきたが、日本から発信されている研究の貢献度がきわめて高い。本研究会では、これらの細胞内機能の各過程に関

わる分子を研究している研究者が一同に会し、各分子の時空間的機能を議論した。本研究会は、また、国際イメージング学会と一部合同で行われ、生きたままの個体を用いて貪食細胞の動きをとらえる技術がいかに重要である

かを議論する一方、現在世界的に恐れられているトリインフルエンザウイルスに対する生体防御機構を議論した。今後、個体レベルの解析から細胞・分子レベルの解析に渡る各階層の統合的な理解が進むと期待される。

(1) 生体2光子励起イメージングによる破骨細胞（骨の貪食細胞）の遊走・分化・機能の可視化

石井 優（大阪大学免疫学フロンティア研究センター・生体イメージング）

破骨細胞は単球・マクロファージ系血液細胞から分化する多核巨細胞であり、硬質の骨組織を融解・吸収する特殊な能力を有する。関節リウマチや骨粗鬆症などの骨吸収性疾患では、破骨細胞の機能亢進が病状形成に重要な役割を果たしている。これまでに、破骨細胞分化に関与する数多くの分子機構が明らかにされているが、これらの細胞がいかにして骨表面にリクルートされるのか、また具体的に *in vivo* でどのように機能しているのかなど、不明な点が多く残されていた。

演者は最近、2光子励起顕微鏡を駆使してマウスを生

かしたままの状態で骨組織内を観察するイメージング方法を確立した。この方法を用いると、骨組織のリモデリングに関わる破骨細胞や骨芽細胞、骨髄内で分化・成熟を遂げる単球・顆粒球・リンパ球、その他の間葉系細胞や血液幹細胞などの生きた動きを、リアルタイムで観察することができる。演者は特に、破骨細胞の動きと機能に注目して解析を行い、この前駆細胞の骨への遊走・位置決めが、種々のケモカインや脂質メディエーター（スフィンゴシン1リン酸）によって動的に調節されていることを明らかにした。

(2) 劇症型 ARDS の発症に関与する Myeloperoxidase ー トリインフルエンザ H5N1 感染患者と PR-8 (H1N1) 感染モデルマウスに共通の因子ー

鈴木和男（千葉大学大学院医学研究科・免疫発生学・炎症制御学、国立感染症研究所・免疫部）

ベトナムでのトリインフルエンザウイルス (H5N1) 感染が、劇症型 ARDS (FARDS) を誘発することを報告した (J. Infect. Dis., 2009)。その発症機序解明と治療法を開発するため、IFV-PR8 (H1N1) インフルエンザウイルス感染誘導の劇症型肺傷害モデルマウスを作製し、肺傷害機構にかかわるサイトカインストームに連動する因子を検討した。肺組織像の変化は、3-4 日後に炎症細胞の浸潤が顕著になり、肺気管洗浄液 (BALF) 中に多数の好中球と剥離上皮細胞を認めた。BALF 中のサイトカイン・ケモカインレベルは、感染 2 日後に IL-1 α , β , GM-CSF, KC が上昇し、感染 4 日後に MCP-1, IL-6, G-CSF, IL12p40 が上昇した。一方、BALF 中に多数浸潤する好中球と同時に好中球顆粒酵素 Myeloperoxidase (MPO) 活性も上昇した。そこで、MPO-KO を用いて肺傷害への MPO の関与を検

討し、肺組織での IFV の増加は、MPO-KO では、3 日後まではほぼ陰性で、4 日後に陽性細胞が急速に増加した。また、MPO-KO では、BALF 中の細胞浸出の程度も弱かった。マウス BALF 中での IL-1 α , β , GM-CSF に続く KC の急激な上昇は、4 日後に観察された好中球の劇的な肺浸潤の増加に重要な役割を担い、それに続く MCP-1 の上昇は、Th1 や単球（マクロファージ）の遊走、活性化を持続させ極端な炎症細胞の活性化状態が持続していると考えられる。また、MPO-KO の解析から、IFV によって活性化した好中球から放出される MPO が組織傷害にも関与していることが推定される。これらの結果は、H5N1 感染患者の血清および咽頭洗浄液中のサイトカイン・ケモカインと MPO の変動と共通性があると予想される。

(3) 食作用時の活性酸素生成酵素 NADPH オキシダーゼの活性化機構

住本英樹（九州大学大学院医学研究院・生化学分野）

食細胞の1つである好中球は、微生物の侵入局所に速やかに集まり、侵入微生物を認識・食食し殺菌する。この殺菌過程には活性酸素が極めて重要な役割を演じるが、その活性酸素生成を担うのが食細胞 NADPH オキシダーゼである。本酵素は細胞休止時には不活性型であるが、微生物の食作用 (phagocytosis) 時にファゴゾーム膜上で活性化されスーパーオキシド (O_2^-) を生成するようになる。オキシダーゼの酵素本体である膜蛋白質 gp91^{phox} (p22^{phox} と 2 量体を形成) は、細胞膜と特殊顆粒 (好中球の細胞内顆粒の 1 つ) の膜に多量に存在する。しかし、これだけでは O_2^- の生成は起らない。gp91^{phox} が活性化され O_2^- を生成するには、細胞休止時には細胞質に存在する 3 つの特異的蛋白質 (p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox}) と低分子量

G 蛋白質 Rac が必要である。食作用時に、p47^{phox}-p67^{phox}-p40^{phox} の 3 者複合体と Rac は細胞質から別々にファゴゾーム膜に移行するが、ファゴゾーム膜上で p67^{phox} は Rac と結合して gp91^{phox} の構造変化を引き起こし、その結果として gp91^{phox} の活性化 (O_2^- 生成) が起こる。3 者複合体のファゴゾーム膜への移行には、(1) 食作用時にリン酸化され活性化された p47^{phox} の「SH3 ドメインを介した膜蛋白質 p22^{phox} との結合」および「PX ドメインを介した膜リン脂質との結合」、(2) 閉じたファゴゾーム膜 (closed phagosome) で生成されるホスファチジルイノシトール 3-リン酸 (PI3P) と p40^{phox} との結合、等々が必要である。

(4) Rac-RhoGDI 複合体の解離・活性化メカニズム —Rac-RhoGDI 複合体の解離は食胞膜上で起こる—

上山健彦（神戸大学・バイオシグナル研究センター・分子薬理分野）

【背景】食食細胞における NADPH oxidase (Nox) である Nox2 の活性化には、膜成分である flavocytochrome b₅₅₈ (heterodimer of Nox2 and p22^{phox}) と、細胞質成分である p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} の複合体 (p40^{phox}-p47^{phox}-p67^{phox} complex) と small GTPase Rac との膜での複合体形成が必須である。また、p40^{phox}-p47^{phox}-p67^{phox} complex と Rac は、独自のメカニズムにより、膜にターゲットすることが知られている。Rac は、静止時には RhoGDI と複合体を形成し不活性化型として細胞質に存在するが、刺激時には活性化型として膜上で機能する。RhoGDI からの解離が、Rac 活性化の必修のステップであることは周知の事実であるが、この現象が細胞内のどこで、どのようなメカニズムにより起こるのか、などの詳細はわかっておらず、漠然と細胞質内で起きていると信じられてきた。今回我々は、Rac の RhoGDI からの解離および活性

化が、細胞内のどこで起こるのか、更に、そのメカニズムの解明を行った。

【結果】食食細胞に、Phospholipase D2 (PLD2) を過剰発現させると、Rac-RhoGDI 複合体の膜での集積が増強したが、ROS 産生の増加は軽度であった。一方、Rac 特異的な Guanine nucleotide exchange factor (GEF) である Tiam1 の過剰発現では、Rac の集積の増強は誘導できず、ROS 産生量の増加も軽度なものであった。しかし、PLD2 と Tiam1 を共発現させると、著名な ROS 産生の増加が観察された。

【考察】食食時の Rac の活性化には、少なくとも 1. Rac-RhoGDI 複合体の膜移行、2. 膜上での Rac の RhoGDI からの解離・活性化、という 2 つのステップが存在すると考えられた。

(5) 電子線クライオトモグラフィー法による T7様ウイルスのシアノバクテリアへの感染過程の解析

村田和義 (生理学研究所・脳機能計測支援センター)

T7 様ウイルスは、分子生物学的に最も良く調べられているウイルスの一つであり、正二十面体からなるキャプシドに二重鎖 DNA を格納し、そのペントンの一つに、6本のスパイクファイバーで囲まれた伸縮しない短いテイルを持つ。そして、このテイルを宿主の細胞膜と結合させて、そこからファージ DNA を宿主に注入する。ところが、その細菌への感染過程の構造学的な詳細についてはあまり知られていない。本研究では、シアノバクテリア *Prochlorococcus* MED4 (直径 $\sim 0.5\mu\text{m}$) を用い、これに特異的な T7 様ウイルス P-SSP7 を感染させて、その過程を電子線クライオトモグラフィー法で調べた。細胞壁表

面に吸着したファージは、細胞表面とテイルとの角度によって3種類に分類することができた。吸着したファージの50%はその様相から休眠状態 (Sleeping) であることがわかった。さらに、テイルの周りにあるスパイクファイバーと呼ばれる器官の構造変化を3次元像の多変量解析により調べた結果、ファージの吸着過程が進むにつれて、キャプシドの表面に沿って折りたたまれたスパイクファイバーが、テイル先端方向に持ち上がり、テイルに対して垂直に伸びることがわかった。このことから、スパイクファイバーの構造変化が、ファージの吸着過程において重要な役割をしていることが示唆された。

(6) イノシトールリン脂質代謝系の自己組織化による自発運動シグナル発生

上田昌宏 (大阪大学大学院・生命機能研究科)

細胞の様々な機能が分子反応ネットワークの自発的ダイナミクスから自律的に発現する仕組みの解明は、細胞生物学における中心的な課題の一つである。細胞の自発的ダイナミクスが顕著に現われている現象として、細胞の自発運動が挙げられる。自発的に運動している粘菌細胞では、イノシトールリン脂質の $\text{PtdIns}(3, 4, 5) \text{P}_3$ が前進端の仮足に濃縮し、細胞の後ろ側にはない。こうした $\text{PtdIns}(3, 4, 5) \text{P}_3$ 局在の時空間ダイナミクスをイメージングするために、 $\text{PtdIns}(3, 4, 5) \text{P}_3$ に結合する Akt/PKB の PH ドメインと $\text{PtdIns}(3, 4, 5) \text{P}_3$ を分解する PTEN を蛍光標識し、プローブとして用いた。アクチン骨格系を破壊した細胞において環境からの刺激がない状況で両プロー

ブ蛋白質の内在的なダイナミクスを観察した。その結果、 $\text{PH}_{\text{Akt/PKB}}\text{-GFP}$ と PTEN-Halo-TMR は細胞膜上で相互排他的に局在化し、両タンパク質の局在部位が細胞膜上に沿って回転する様子が観察された (自己組織化的進行波形成)。イノシトールリン脂質代謝系の様々な阻害剤を用いて進行波形成を止めると、細胞の自発運動が阻害された。イノシトールリン脂質代謝系の分子反応ネットワークを考慮する事で、反応拡散方程式を用いてこの進行波形成を数理モデル化できる。そのモデル解析により、ミクロのゆらぐ分子からマクロの動的秩序 (極性) が自己組織化されることを通して、自発運動シグナルが発生することが分かってきた。

(7) 貪食細胞における電位依存性プロトンチャネルの役割

大河内善史 (大阪大学大学院・医学系研究科)

マクロファージ・好中球などの貪食細胞は、活性酸素を使って、病原菌・死細胞を殺菌・除去し、感染症・自己免疫疾患などの疾病から自己を防御している。活性酸

素を作る酵素 NADPH オキシダーゼは、NADPH から電子を奪い、酸素に受け渡すと同時に、副産物として細胞内にプロトンを放出するため、細胞膜は脱分極し、細胞

内は酸性化する。このため、貪食細胞には、膜電位と細胞内 pH を制御する因子が必要と考えられていた。電気生理学的な手法を用いた解析により、電位依存性プロトンチャネルの関与が示唆されていたが、その分子実体は長い間不明であった。我々の研究室で発見された電位依存性プロトンチャネル VSOP (voltage sensor only protein) は、貪食細胞で発現しており、電位依存性プロトンチャネルの特徴を保持していた。我々は、貪食細胞における VSOP の機能を調べるために、抗体を作成し、好中球から分離した食胞について、ウェスタンブロット法を用い

て発現を調べた結果、VSOP は食胞に存在することが明らかとなった。次に、ノックアウトマウスを作成し、NADPH オキシダーゼの活性化と連動した VSOP の機能解析に着手した。好中球を PMA で刺激し、活性酸素量を定量した結果、ノックアウトマウスの好中球では、野生型マウスに比べて、産生量が低下していた。さらに、PMA 刺激により、好中球の膜電位の異常上昇、細胞内 pH の低下が見られ、VSOP が食胞において膜電位と細胞内 pH を制御する分子そのものであることが明らかになった。

18. DNA の凝縮：物理から生理まで

2010 年 3 月 10 日

代表・世話人：前島一博（国立遺伝研）

所内対応者：永山國昭（生理学研究所・岡崎統合バイオサイエンスセンター）

(1) DNA 鎖（半屈曲性高分子鎖）の数理モデル及び構造転移の研究

石本志高（岡山光量子科学研究所）

(2) DNA の折り畳み転移：秩序構造の自己生成と荷電効果

吉川研一（京都大学 大学院理学研究科）

(3) DNA の高次構造と放射線感受性

吉川祐子（立命館大学総合理工学研究機構）

(4) 一分子力学応答からみた DNA 凝縮

村山能宏（東京農工大学 工学部 物理システム工学科）

(5) 位相差クライオ電子顕微鏡による DNA およびクロマチン観察

加藤幹男（大阪府立大学大学院 理学系研究科 生物科学専攻）

(6) ヒストンバリエント特異的なヌクレオソームの立体構造と性質

胡桃坂仁志（早稲田大学理工学術院 先進理工学部）

(7) クロマチン構造を制御するヌクレオソーム間相互作用

須賀則之（独立行政法人理化学研究所 生命分子システム基盤研究領域）

(8) 分裂期染色体内と核内の global なクロマチン構造

前島一博（国立遺伝学研究所 構造遺伝学研究センター）

(9) PP2A non-catalytically localizes condensin II to mitotic chromosomes

木村圭志（筑波大学大学院 生命環境科学研究科）

(10) 次世代型シーケンサーの発展と細胞核構造観察の将来像

臼井健悟（理化学研究所 オミックス基盤研究領域）

【参加者名】

石本志高（岡山光量子科学研究所）、吉川研一（京都大学大学院理学研究科）、吉川祐子（立命館大学総合理工学研究機構）、村山能宏（東京農工大学 工学部 物理システム工学科）、加藤幹男（大阪府立大学大学院 理学系研究科 生物科学専攻）、胡桃坂仁志（早稲田大学理工学術院 先進理工学部）、須賀則之（独立行政法人理化学研究所

生命分子システム基盤研究領域）、前島一博（国立遺伝学研究所 構造遺伝学研究センター）、木村圭志（筑波大学大学院 生命環境科学研究科）、臼井健悟（理化学研究所 オミックス基盤研究領域）、村田和義（生理学研究所 ナノ形態生理）、永山國昭（生理学研究所 ナノ形態生理）

【概要】

染色体が発見されてから、100 年以上が経過するが、全長約 2 メートルのヒトゲノム DNA が一体どのように折り畳まれて、染色体を形成するかはほとんどわかっていない。本研究会では、物理学から生理学まで、さまざまなバックグラウンドを持つ、10 人の研究者が生理学研究所に集い、DNA の凝集に関して、活発な discussion が

繰り広げられた。物理学者と生物学者は日頃用いる常識・言語も異なるため、お互いにコミュニケーションをとり、コンセンサスを得ることは時として難しい。しかしながら、何事もトライすることがなければ、成就することもあり得ない。この意味で、本研究会は極めて有意義なものであったと思われる。また、参加者間のいくつ

かの共同研究もうまれている。今後とも、さまざまなバックグラウンドを持つ人たちが定期的に集まり、熱い discussion を持つ機会を継続していきたいと考えている。集まって下さり、忍耐強く互いの意見を聞いて下さった

参加者の皆さま、研究会の進行を手伝って下さった生理学研究所永山研の方々、最後に本研究会を支援して下さった生理学研究所に深く感謝したい。

(1) DNA 鎖（半屈曲性高分子鎖）の数理モデル及び構造転移の研究

石本志高（岡山光量子科学研究所）

自然界で観測される生体高分子（DNA やタンパク質等）はコンパクトな状態で存在することが多々ある。近年の実験技術の発達により、これらの立体構造を単分子レベルで研究できるようになってきた。その生物学的、医学的、産業的重要性と共に、生体高分子研究はますます重要性を増してきている。

これまで、完全屈曲性高分子鎖のコイルーグロビュール転移（凝縮転移）は詳しく研究されてきた。その静的性質・動的性質共によく理解され、ガウス近似や場の理論による定式化によって理論的にも十分に記述されている。一方、DNA や F-アクチン、コラーゲン等、多くの生体高分子は半屈曲性高分子鎖であり、完全屈曲性鎖と異なるドーナツ状の立体的なトロイド構造で凝縮する。

我々は初めて、この半屈曲性高分子鎖の数理モデルを、ファインマン式の経路積分において引力項付きで定式化し、DNA 凝縮に特徴的なトロイド状態を解析的に導出した。この理論を発展させ、異なる 4 種の引力相互作用によるトロイド半径のスケリング則を研究した。例えばクーロン力の場合トロイド半径 rc が全長 L に対して $rc \sim L^{-1/3}$ となることを示した。さらにトロイドが基底状態となる際のトロイド→トロイドグロビュール構造転移に関して、最深部の曲げエネルギー有限効果と引力ポテンシャルによるエネルギーを評価し、転移点を構造パラメータ $cT-TG=(5\sqrt{3})/36 (L/(\pi ld))^{5/3}$ として算出した (ld : DNA 断面の直径約 2nm)。

(2) DNA の折り畳み転移：秩序構造の自己生成と荷電効果

吉川研一（京都大学 大学院理学研究科）

DNA 凝縮と折り畳み転移

100kbp を超える長鎖 DNA は次のような特質を有する。1) 長鎖 DNA は、数万倍程度の密度変化を伴う、著しく不連続な転移現象を示す。一方、数 kbp 以下の短鎖 DNA では、このような転移の特性は消失する。2) 多数の長鎖 DNA の凝縮を測定すると、転移は連続的に“見える”。3) 長鎖 DNA の折り畳み転移は、統計物理学の言葉では、一次相転移であり、無秩序—秩序間の転移としての特徴を示す（核生成—結晶成長の速度過程や折り畳み構造の多様性など）。4) DNA の塩基配列にたいしては非特異的で、かつ多量に存在する物質（ATP, RNA, polyamine など）、すなわち環境パラメータが、長鎖 DNA

の折り畳み転移を引き起こす。凝縮転移には、対イオンの動態が決定的な影響を及ぼす。

クロマチンの高次構造転移

100kbp 以上のサイズの DNA から再構成したクロマチンは、on/off 型の不連続な凝縮転移を示す。それに対して、短鎖 DNA から再構成したポリヌクレオソームでは、このような折り畳み転移の特質は見られない。長鎖 DNA から再構成したクロマチンには、数十 kbp 程度のスケールでの、部分凝縮構造（単一 DNA 分子鎖、解けた部分と凝縮した部分がミクロ相分離する）を示す傾向があり、この構造の安定性は、DNA 荷電の残存電荷に依存している。

(3) DNAの高次構造と放射線感受性

吉川祐子 (立命館大学総合理工学研究機構)

細胞内において、染色体 DNA は、細胞分化、癌化、細胞周期などにより、著しくその形態を変化させることは良く知られており、様々な生命機能発現にはこのような染色体 DNA の高次構造変化が深く関わっていると考えられる。私たちは、これまでに、蛍光顕微鏡による単分子観察法を活用することにより、100 キロ塩基対 (kbp) を越える長鎖 DNA の高次構造変化を系統的に追究してきた。その中で、長鎖 DNA の折り畳み転移は、10 万倍程度の密度変化を伴う on/off 型の不連続な転移であり、折り畳まれた DNA は、多様なナノ秩序構造を自己生成

することを明らかにしてきた。

最近、私たちは、このような蛍光顕微鏡による DNA の一分子観測手法が、長鎖 DNA の二重鎖切断反応の定量的解析に応用可能であることを見出した。これまでは、DNA 損傷に関する *in vitro* 研究は、専ら、キロ塩基対以下の短鎖 DNA やオリゴマーについてのみ進められてきた。一方、ゲノム DNA は、一分子中に一箇所二重鎖切断を受けるだけでも、生命活動に重大な影響を及ぼすと考えられることから、定量的に計測・分析することの出来るような実験方法の開発は重要な課題となっている。

(4) 一分子力学応答からみた DNA 凝縮

村山能宏 (東京農工大学 工学部 物理システム工学科)

生体内では DNA は高度に折れ畳まれており、転写、複製など必要に応じて解きほぐされ、その情報が読み取られる。“熱揺らぎの無視できない環境下で、少数分子による生体分子反応がいかに調節されているのか”という問いに答えるためには、反応に関わる分子の同定やそれらの構造に関する静的知見とともに、反応や一分子のダイナミクスに関する動的知見および定量的知見が不可欠と考えられる。

DNA は2重らせんの直径2nmに対し、全長は数 μ mから数十mmにおよぶ細くて長い高分子鎖である。このような性質を持つDNAは、一価陽イオン存在下でランダムコイル状態にあるが、多価陽イオン存在下で高度に凝

縮することが知られている(DNA凝縮転移)。2点捕捉型光ピンセットを用いて、凝縮転移下で一分子DNAの力学応答を測定した結果、凝縮DNAはスperlミジン(SPD, 3価ポリアミン)濃度に依存して二つの特徴的な力学応答を示すことが分かった。一つは浅い凝縮状態で現れる伸びに対し張力が1-2pN程度の一定値を示すプラトー応答であり、一分子DNA内に凝縮、非凝縮相が共存していることを示している。本講演では、これらの結果とともに、凝縮DNAの伸張-緩和サイクルで生じる力学応答の履歴、およびDNA鎖の熱揺らぎ(空間揺らぎ)についても議論したい。

(5) 位相差クライオ電子顕微鏡によるDNAおよびクロマチン観察

加藤幹男 (大阪府立大学大学院 理学系研究科 生物科学専攻)

DNAはその配列や環境に応じて、三重鎖構造・四重鎖構造やその他の特殊高次構造を形成することができる。これらの特殊高次構造を形成可能な配列は、生物ゲノム中に高い頻度で出現することから、ゲノム機能の発現に何らかの役割を果たしていると考えられている。その機

能の解明には、生きた細胞内での高次構造変化を検出することが必須である。近年、クライオ電子顕微鏡観察によって、DNAやクロマチンの直接(無染色での)観察が可能になっている。さらに、永山らは電子顕微鏡用に新しく位相板を開発して、無染色試料をより高いコントラ

ストで観察することを可能にした。本研究では、この位相差クライオ電子顕微鏡を用い、DNA やクロマチンの高次構造を生体内により近い状態で観察することで、その立体構造の解析を進めた。

培養細胞をデメコルチン処理することによって得た微小核や、調製法によってつぶれた核から放出されたクロマチンを対象として連続傾斜撮影し、その画像から立体

構造を再構成したところ、微小核内部に分布する棒状構造物や繊維状構造物が観察された。また、放出されたクロマチン繊維や、膜断片に付着したリボソームと思われる構造物が観察された。今後、詳細な観察を進めることによってこれら構造物を同定するとともに、DNA 特殊高次構造に影響を及ぼす種々の処理を試料に施し、その効果を調べていく。

(6) ヒストンバリエント特異的なヌクレオソームの立体構造と性質

胡桃坂仁志（早稲田大学理工学術院 先進理工学部）

真核生物のゲノム DNA は、染色体中にクロマチンとして折りたたまれて細胞核内に収納されている。ヌクレオソームはクロマチンの基盤構造であり、ヒストン H2A, H2B, H3, H4 の各二分子からなるヒストン八量体に DNA が巻きついた円盤状の構造体である。染色体の機能構造であるクロマチンは、ヌクレオソームが数珠上に連なり、さらに高次に折りたたまれたものと考えられている。この高次クロマチン構造は、巨大なゲノム DNA を細胞核内に収納するために重要であることはもとより、遺伝子の発現制御、複製、修復、組換えなどの DNA の機能発現にエピジェネティックに関わる機能構造体であることが明らかになってきた。このようなクロマチンのエピジ

ェネティックな遺伝情報制御は、ヌクレオソームを構成しているヒストンの化学修飾やヒストンバリエントの選択的な利用によってなされることが明らかになりつつある。このような背景に基づいて、今回、種々のヒストンバリエントを含むヌクレオソームや、ヒストン化学修飾をミミックした変異体ヒストンを含むヌクレオソームを再構成し、これらのヌクレオソームの立体構造および性質を、X 線結晶構造解析法ならびに生化学的解析によって検討した。これらの解析によって得られた新たな知見に基づいて、クロマチンレベルでの DNA の機能発現機構について議論したい。

(7) クロマチン構造を制御するヌクレオソーム間相互作用

須賀則之（独立行政法人理化学研究所 生命分子システム基盤研究領域）

ヌクレオソームのゲノム配列上のポジショニングなどのクロマチン 1 次構造について詳細な解析が進んでいるが、細胞核内で形成されている 30 nm ファイバーやそれ以上のクロマチン高次構造については、ほとんど分かっていない。それらクロマチン高次構造は、自発的なヌクレオソーム間相互作用や特異的なクロマチン結合タンパク質により、クロマチン 1 次構造が折り畳まれ形成される。ヌクレオソーム間相互作用は、クロマチンファイバーのファイバー内の凝縮とファイバー間の重合を引き起こす。ヒストンオクタマーと 601 配列を用いた再構成 12mer

ヌクレオソームファイバーは、Mg 濃度に依存して、ファイバー内の凝縮とファイバー間の重合を生じる。我々は、ファイバー間の重合中に生じるヌクレオソーム間相互作用をフォルムアルデヒド架橋とマイクロコッカスヌクレアーゼにより検出できることを見つけた。この方法を用いて、*in vivo* のクロマチンファイバー間の相互作用の検出を試みている。これらの結果から、非ヒストンタンパク質のリジン残基アセチル化を介したトランスのクロマチン構造制御機構を議論したい。

(8) 分裂期染色体内と核内の global なクロマチン構造

前島一博 (国立遺伝学研究所 構造遺伝学研究センター)

直径 2nm, 全長 2m にも及ぶヒトゲノム DNA は, まず, 塩基性蛋白質ヒストンに巻かれ, ヌクレオソームになり, さらに折り畳まれて直径約 30nm のクロマチン繊維を形成するとされている。しかしながら, このクロマチン繊維がどのようにして, 最終的に直径約 0.7 μ m の分裂期染色体や, 直径 10 μ m の細胞核の中に折り畳まれているのか? については全くの謎であり, 長年に渡って生物学者たちの興味を集めてきた。私たちは, 「生きた状態」に近い細胞観察ができるクライオ電子顕微鏡や, 溶液中の非結晶物体の構造解析が可能な X 線散乱解析などの物理化学的測定をおこなってきた。これに, 従来の細胞生物学

的手法を組み合わせ, 全く新しい視点から, ヒト分裂期染色体や細胞核内のヒトゲノム DNA の折り畳み構造 (クロマチン organization) を解明しようとしている。現在までの知見ではヌクレオソームに相当する 11nm 散乱のピーク以上の大きな構造は検出されていない。つまり, ヌクレオソーム繊維の不規則な折り畳みによって成り立っていると考えている。このことは, 古くから提唱されているモデルが必ずしも正しくない可能性を示唆している。本結果から考えられる分裂期染色体内部の環境およびその構造を議論したい。

(9) PP2A non-catalytically localizes condensin II to mitotic chromosomes

木村圭志 (筑波大学大学院 生命環境科学研究科)

The assembly of mitotic chromosomes in vertebrates is regulated by condensin I and condensin II, which work cooperatively but demonstrate different chromosomal localization profiles and make distinct mechanistic contributions to this process. We show here that protein phosphatase 2A (PP2A), which interacts with condensin II but not condensin I, plays an essential role in the chromosomal association of condensin II. Surprisingly, our data indicate that PP2A acts as a recruiter protein rather than a

catalytic enzyme to localize condensin II to mitotic chromosomes. This recruiting activity of PP2A was inhibited by okadaic acid, but not by fostriecin, even though both molecules strongly inhibited the catalytic activity of PP2A. Additionally, we found that the chromokinesin KIF4a is also targeted to chromosomes via the non-catalytic activity of PP2A. Thus, our studies reveal a previously unknown contribution of PP2A to chromosome assembly.

(10) 次世代型シーケンサーの発展と細胞核構造観察の将来像

臼井健悟 (理化学研究所 オミックス基盤研究領域)

電気泳動を基本技術としたサンガー法を応用したキャピラリーシーケンサーを用い, 八年という月日をかけてヒトゲノムプロジェクトが完了したのは 2003 年であった。以降, National Human Genome Research Institute による \$ 1000 ゲノムプロジェクトを初めとした研究によって, 従来のシーケンス速度を圧倒的に凌駕する次世代型

シーケンサーが台頭し, 今日のゲノム科学の進展に貢献している。ここで重要なことは, 次世代型シーケンサーの能力は, \$ 1000 ゲノムプロジェクトでの第一の目的である個人全ゲノム配列の再決定のような単に配列決定の手法に限定されず, サンプル処理やデータ処理における高いスループット性を背景に, 遺伝子発現部位の同定や

クロマチン構造の特定などの「ポストゲノム解析」に有用性が見出され、数多くの応用例が開発されていることである。本講演では、現在登場している次世代型シーケンサーの発展について概説するとともに、遺伝子発現機

構やクロマチン構造の解明に通ずるポストゲノム解析について紹介することによって、細胞核内構造観察の将来像について考えてみたい。

19. 電子顕微鏡機能イメージングの医学・生物学への応用 「感染症観察」および「その場観察」

2010 年 1 月 8 日－1 月 9 日

代表・世話人：臼田信光（藤田保健衛生大学医学部）

所内対応者：永山國昭（生理学研究所・岡崎統合バイオサイエンスセンター）

(1) 基調講演：次々と登場する感染症－何が問題か？

倉田 毅（富山県衛生研究所）

(2) 基調講演：C 型肝炎ウイルス粒子の細胞外への放出と感染性を規定する因子

下遠野邦忠（千葉工業大学附属総合研究所）

(3) 単純ヘルペスの増殖と病原性発現の分子機構－ウイルス非必須遺伝子の機能

西山幸廣（名古屋大学大学院医学研究科）

(4) 電子線クライオトモグラフィーによる T7 様ウイルスのシアノバクテリアへの感染過程の解析

村田和義（生理学研究所）

(5) 電子顕微鏡によるプリオンの構造解析

桑田一夫（岐阜大学 人獣感染防御研究センター）

(6) インフルエンザワクチン 特に新型インフルエンザワクチンについて

来海和彦（化学及血清療法研究所）

(7) 日本と世界の結核の現状と最近の電子顕微鏡所見

山田博之（結核予防会結核研究所）

(8) 基調講演：位相差電子顕微鏡と統合バイオイメーキング

永山國昭（岡崎統合バイオサイエンスセンター）

(9) 異常型プリオン蛋白質の細胞内局在

堀内基広（北海道大学大学院獣医学研究科）

(10) Viral Structures Visualized by Zernike Phase Contrast Cryo-electron Tomography

Radostin Danev（岡崎統合バイオサイエンスセンター）

(11) introduction

丹司敬義（名古屋大学エコトピア科学研究所）

(12) 膜細胞骨格の空間構造とその制御タンパク質の空間特異性

臼倉治郎（名古屋大学先端研）

(13) ATP リアルタイムイメージング：メカノセンシング機序としての ATP 放出

古家喜四夫（科学技術振興機構・SORST）

(14) In-situ TEM の多機能化とナノ材料合成、評価への応用

上野武夫（山梨大学燃料電池ナノ材料研究センター）

(15) 環境 TEM によるカーボンナノチューブ成長の高分解能その場観察

吉田秀人（大阪大学大学院理学研究科）

(16) 放射線照射に伴う酸化物セラミックス中の欠陥形成と安定性

安田和弘（九州大学大学院工学研究院）

(17) In situ TEM によるナノ粒子の相生成過程の解析

保田英洋（神戸大学大学院工学研究科）

【参加者名】

倉田 毅（富山県衛生研究所），下遠野邦忠（千葉工業大学附属総合研究所），西山幸廣（名古屋大学大学院医学研究科），村田和義（生理学研究所），桑田一夫（岐阜大学 人獣感染防御研究センター），来海和彦（化学及血清療法研究所），山田博之（結核予防会結核研究所），堀内基広（北海道大学大学院獣医学研究科），丹司敬義（名古屋大学エコトピア科学研究所），臼倉治郎（名古屋大学先端研），古家喜四夫（科学技術振興機構・SORST），上野武夫（山梨大学燃料電池ナノ材料研究センター），吉田秀人（大阪大学大学院理学研究科），安田和弘（九州大学大学院工学研究院），保田英洋（神戸大学大学院工学研究科），金子康子（埼玉大学教育学部），鈴木和男（千葉大学大学院医学研究院免疫発生学），佐々木勝寛（名古屋大学工学研究科），土井浩二（鳥取大学医学部附属病院），西村伸一郎（化学及血清療法研究所），小瀬洋一（日立ハイテクノロジーズ），中澤英子（日立ハイテクノロジーズ），仲西正寿（富士フィルム株式会社），岩崎憲治（大阪大学蛋白研），石原陽介（株式会社東海電子顕微鏡解析），川村修二（株

式会社東海電子顕微鏡解析），高崎智彦（国立感染症研究所），内海晋也（住友化学），加藤智樹（産業総合研究所関西センター），藤田 真（島津製作所設計技術センター），石川貴己（日本電子株式会社 EM 事業ユニット），須賀三雄（日本電子株式会社経営戦略室），藤田芸彦（エイキッド株式会社），寺本華奈江（日本電子株式会社），山口淳二（大阪暁明館病院），山本 洋（エスアイアイナノテクノロジー），高垣謙二（島根県立中央病院），今井友也（京都大学生存研），谷山 明（住友金属工業），板倉広治（花市研究所），喜多山篤（テラベース（株）），丸井隆雄（島津製作所），二村和孝（日立ハイテクノロジーズ），古家園子（生理学研究所），秋田知樹（産業総合研究所），深澤元晶（藤田保健衛生大学），厚澤季美江（藤田保健衛生大学），一色俊之（京都工芸繊維大学大学院 工業科学研究科），臼田信光（森田保健衛生大学医学部），永山國昭（岡崎統合バイオサイエンスセンター），Radostin Danev（岡崎統合バイオサイエンスセンター）

【概要】

本研究会は平成 12 年よりスタートした電子顕微鏡の研究会（“定量的高分解能電子顕微鏡法”，“電子位相差顕微鏡の医学・生物学的応用”，“位相差断層電子顕微鏡の医学・生物学的応用”，“電子顕微鏡機能イメージングの医学・生物学的応用”）を継承しており，本年度で 10 年目になる。

今年度は平成 22 年 1 月 8 日から 9 日に岡崎コンファレンスセンター小会議室で開催した。専門性を追求するために，平成 21 年度日本顕微鏡学会関西支部特別企画講演会と共催し，延べ約 100 人が参加した。生物系では，近年の感染症再興という社会的背景を踏まえ，さらに電子顕微鏡にとってウイルスが最も得意とする観察対象であることを合わせ，「感染症観察」について 10 題の講演が行われた。倉田毅先生（富山県衛生研究所），下遠野邦忠

先生（千葉工業大学附属総合研究所）の 2 名の感染症研究のエキスパートによる基調講演に続き，C 型肝炎ウイルス，単純ヘルペスウイルス，プリオン，インフルエンザウイルス，結核菌などの多彩な超微構造観察結果が報告され，今後の位相差電子顕微鏡における研究を Cryo-electron Tomography に進める際の問題点が議論された。材料系においては，電子顕微鏡内で物質の構造変化を観察する新しい潮流である「その場観察」について 7 題の講演が行われた。ナノ材料に関する工学材料系の発表と共に，細胞骨格，ATP などの生体物質についての研究も報告された。電子顕微鏡の観測機器としての性能を十分に引き出した研究を行うための技術革新について具体的に必要の新規技術が提案された。

（1）基調講演：“次々と登場する感染症－何が問題か”

倉田 毅（富山県衛生研究所）

今から遡ること 30 年余りに，新しく登場したウイルス

感染症は 30 以上，細菌・寄生虫感染症は 15 以上にのぼ

る。1990 年以降の 20 年でも重要感染症は 20 余登場している。それ故、どのような新しい感染症の出現についても対応しうる準備が必須である。日頃から常識レベルの対応力さえあれば、今回のインフルエンザバカ騒ぎはありえなかった。

診断方法も、薬剤も十分にある現在での対応は、大昔とは異なるのに何故？ 要は、感染症をきちっと知り、意思決定しうる人が専門家にも行政にもいなかっただけである。インフルエンザの臨床にとっては、季節性もパンデミックもない、全く同じである。

人類の歴史は、感染症との戦いの歴史といってもよい。近年は、抗生物質等の予防治療薬剤、ワクチン等により

対応が大きくかわってきた。人類が根絶しえた疾患は唯一天然痘のみである (1967～1980)。現在進行中のものがポリオ (1989～) である。3 番目がはしかである。これらが根絶目標にされた理由は、これらのウイルスがヒトからヒトにしか感染せず、いずれも中間宿主 (媒介動物) がなく、良いワクチンがあることである。また、近年登場した疾患は、大部分が人獣共通感染症 (感染症法では動物由来感染症) である。インフルエンザをはじめ、SARS、ニパ、vCJD、ウエストナイル熱、サル痘に加え、拡大しつつあるのがマラリア、デング熱、狂犬病等々である。その他多剤耐性結核菌の流行、HIV/AIDS の激増傾向は看過できない状況である。

(2) 基調講演：C 型肝炎ウイルス粒子の細胞外への放出と感染性を規定する因子

下遠野邦忠 (千葉工大 附属研究所)

【はじめに】HCV は複製に際して脂肪代謝機構、および脂肪輸送機構を利用する。筆者らは HCV 蛋白質が脂肪滴周辺に局在することを明らかにし、その局在が感染性ウイルス粒子を放出するのに重要であることを示した。脂質のウイルス複製における役割が疾患との関連でも注目されている。HCV 複製増殖における脂肪代謝との関連について以下の事が明らかにされてきた。

HCV 感染により脂肪滴が増加し、ウイルスはそれを利用して増える。

ウイルス蛋白質のひとつ、コアにより脂肪滴の量が増える。ウイルス蛋白質は、脂肪滴と会合、あるいはその周辺に局在する。このような状態が感染性ウイルス粒子を産生するのに必要である。

培養細胞中の HCV はリポ蛋白質と会合して存在する。

HCV はリポ蛋白質と会合している。リポタンパク質を除くと感染性は無くなる。

HCV 粒子に会合しているリポタンパク質内の Apolipoprotein E (ApoE) が感染に重要である。

感染性ウイルス粒子は ApoE 抗体で免疫沈降される。沈降しない画分に感染性はない。

ApoE を産生しない細胞から感染性粒子は放出されない。

ApoE を産生しない細胞から放出される非感染性 HCV と ApoE を混ぜても感染性は回復しない。すなわち HCV が感染性を持つためには、細胞内で ApoE と会合してから放出される必要がある。

【まとめ】HCV は細胞の脂肪代謝系を利用して増殖する。HCV 感染者に脂肪症が多い理由はこのような HCV の特殊な増殖様式による可能性が考えられる。

(3) 単純ヘルペスウイルスの増殖と病原性発現の分子機構 ーHSV アクセサリー遺伝子の機能ー

西山幸廣 (名古屋大学大学院医学系研究科ウイルス学)

ヘルペスウイルスは 2 本鎖 DNA をゲノムとする大型の動物ウイルスである。あらゆる脊椎動物には種固有のヘルペスウイルスが存在すると推定され、現存する DNA

ウイルスの中では最も多様性に富んでいる。ヒトからも 8 種類のヘルペスウイルスが発見されており、いずれも病原体として重要な位置を占める。その中で、単純ヘル

ヘルペスウイルス (HSV) はヘルペスウイルス科のプロトタイプとして早くから基礎研究が推進され、増殖機構についての理解が最も進んでいるが、吸着・侵入からゲノム複製、粒子形成を経て細胞外への輸送に至る増殖過程は、ウイルス分子と宿主細胞分子との複雑な相互作用から成り、今なお全容の解明には程遠い。一方、HSV は近年ウイルスベクターや oncolytic virus として医学的な利用が構想されており、ウイルスと細胞と相互作用を分子レベルで解明することは応用研究の立場からも重要な課題となっている。

HSV は少なくとも 74 種の遺伝子を保有するが、その半数以上は培養細胞での増殖に必須ではない、いわゆる“アクセサリ遺伝子”である。しかし、これらのアクセサリ遺伝子はウイルスの生活環、病原性発現に極めて重要な役割を持っていると推測される。我々は 25 種を超える HSV アクセサリ遺伝子の基本的性状を網羅的に解析し、その一部の機能・役割に関しては HSV の増殖・病原性発現機構の理解に不可欠な知見を提供してきた。本講演では、アクセサリ遺伝子に関するこれまでの研究について紹介したい。

(4) 電子線クライオトモグラフィーによる T7様ウイルスのシアノバクテリアへの感染過程の解析

村田和義¹, Wah Chiu² (¹ 生理学研究所, ² 米国ベイラー医科大学)

本研究では、細胞の中でも比較的小さなサイズのシアノバクテリア *Prochlorococcus* MED4 (直径 $\sim 0.5\mu\text{m}$) を用い、これに特異的な T7 様ウイルス P-SSP7 を感染させて、その過程を電子線クライオトモグラフィーで調べた。MED4 を P-SSP7 と混ぜて、経時的にマイクログリッド上に氷包埋すると、自然に近い感染途中のファージの像を得ることができた。この傾斜像を 300kV の電子顕微鏡を用いて 2° 間隔で $\pm 62^\circ$ の範囲で記録し、その 3 次元トモグラムを再構成した。そして、そのトモグラムから細胞の周りに吸着したファージ像を切り出し、分類して平均化すると、感染途中の詳細なファージの 3 次元構造を得ることができた。細胞壁表面に吸着したファージは、細

胞表面とテイルとの角度によって 3 種類に分類することができた。吸着したファージの 50% はその様相から休眠状態であることがわかった。さらに、テイルの周りにあるスパイクファイバーと呼ばれる器官の構造変化を、3 次元像の多変量解析により調べた結果、ファージの吸着過程が進むにつれて、キャプシドの表面に沿って折りたたまれているスパイクファイバーが、テイル先端方向に持ち上がり、テイルに対して垂直に伸びることがわかった。このことから、スパイクファイバーの構造変化が、ファージの吸着過程において重要な役割をしていることが示唆された。

(5) 電子顕微鏡によるプリオンの構造解析に向けて

山口圭一, 松本友治, 桑田一夫 (岐阜大学人獣感染防御研究センター)

アミロイド線維はプリオン病の感染物質の一つであり、毒性や構造が異なるプリオン蛋白質 (PrP) のアミロイド線維が報告されている。そこで、本研究では各種分光法と TEM を用いて、性質が異なる PrP アミロイド線維の構造と伝播機構について調べた。

アミロイド線維形成はマウスの全長プリオン蛋白質 (mPrP (23-231)) を用いて、超音波照射下、37°C で長時間

インキュベートして行なった。その結果、mPrP (23-231) は超音波強度の違いにより、チオフラビン T (ThT) 蛍光値が異なる 3 種類のアミロイド線維を形成することが分かった。TEM 観察により、形成された線維は①アモルファス状凝集体、②ややねじれた線維、③さらにくねくねして絡まりあった線維であることが分かった。次に、これらの線維をシードにしてアミロイド線維の伝播実験を

行った。その結果、mPrP(23-231)線維の ThT 蛍光値と形態はシーディングによって基本的に伝播することが分かった。しかし、細部を見るとシーディングにより線維はやや剛直になる傾向があった。

当研究センターでは、現在、電子線トモグラフィーに

よるアミロイド線維の構造解析を進めている。PrP の部分ペプチド Helix2 や卵白リゾチームのアミロイド線維は細長く剛直であるため高分解能な構造解析に向いている。本研究会ではこれらの取り組みについても紹介する。

(6) インフルエンザワクチン 特に新型インフルエンザワクチンについて

来海和彦（化学及血清療法研究所）

インフルエンザ研究者のほとんどが、次のパンデミックは H5N1 亜型であると疑わなかった 2009 年 4 月下旬、突如として現れた新型インフルエンザウイルス A (H1N1) pdm は、瞬く間に世界各国に広まった。WHO は次々とアラートレベルを上げ、6 月 11 日にはフェーズ 6 を宣言した。この間、ウイルスの拡がりに劣らぬ速さでウイルスの解析は進み、遺伝子配列は数日のうちに web 上に開示され、それがブタ、トリ、ヒトインフルエンザウイルスに由来するトリプルリアソータントであることが分かった。一方、ワクチン株は米国で樹立され、国立感染症研究所を経て、6 月末にワクチン製造所に分与された。ワクチン剤形としては、現行の季節性ワクチンと

同じスプリット型が選択され、化血研は、7 月に季節性インフルエンザワクチン製造を中断、新型インフルエンザワクチン製造に切り替え、フル稼働でワクチン製造が続けられた。同ワクチンの有効性と安全性に係わる臨床試験成績が健康成人を対象として実施され、現行と同様のスプリット型ワクチン 1 回接種でも十分な抗体応答が得られることが示された。しかし、新型インフルエンザの流行が例年よりも 2~3 箇月早く始まったことから、数多くの小中学校で学級・学校閉鎖が相次いだ。今後、迅速なワクチン供給を目指し、細胞培養ワクチンなどの新しいワクチン開発を急がなくてはならない。

(7) 日本と世界の結核の現状と最近の電子顕微鏡所見

山田博之（財団法人結核予防会結核研究所 抗酸菌レファレンス部 細菌検査科）

WHO によれば 2007 年に全世界で年間約 930 万人の新たな結核感染者があり、約 180 万人が結核で死亡している。約 50 万例の多剤耐性結核 (MDR-TB) の存在が推定されており、2008 年末には 55 の国で超多剤耐性結核 (XDR-TB) が見つかっている。日本国内では 2008 年の統計で新規登録患者が 24,760 例あり（罹患率 19.4/人口 10 万）、2,220 人の死亡が登録されている（死亡順位 25 位）。2002 年に実施された全国調査では、3,122 株中、MDR-TB は 1.9%、XDR-TB は 0.5%検出されている。

長期にわたり体内で休眠状態で存在する結核菌は、本来の特徴である抗酸性を失うと考えられている。しかしこの抗酸性が菌体のどのような特徴により付与されてい

るのかは未だ不明である。また、細胞内寄生菌である結核菌がどのようにして phagosome-lysosome fusion を阻害してマクロファージ内で生存するのかについて様々な仮説はあるが可視化を伴う裏付けはなされていない。更に、様々な抗結核薬と菌の標的分子との相互作用、菌体成分の生合成の場についても未だ推測の域を出ていない。

これらを説明するには可視化が必須であり、そのためには光学顕微鏡の分解能を超越した電子顕微鏡による観察が不可欠であると考えられる。今回、最近の結核菌（抗酸菌）に関する電顕観察に関する考察と我々の試みを紹介する。

(8) 基調講演：位相差電子顕微鏡と統合バイオイメージング

永山國昭（岡崎統合バイオサイエンスセンター）

各種の生物用光学顕微鏡は時間変化を追求できる、多色光を使える、蛍光法を使える、そして多光子過程を使うことにより生体の分子過程を選択的かつ定量的に取り出せる。一方電子顕微鏡は光顕の持つこれらの特徴をほとんど持ち合わせていない。元素分析を行う分析電顕も存在するが、生物応用は電子線損傷の壁があり実用化に遠い。電子顕微鏡で唯一光顕を凌駕できる特色は空間分解能の高さである。しかしこの特色も電子線損傷のため充分生かされず、材料科学で実現されるような高分解能は達成されてこなかった。位相差法がこうした生物電子顕微鏡の課題に対しどのような解答を与え得るのか。

位相差法の第 1 の特色は像コントラストの改善にある。コントラスト改善により像分解能も改善される。こ

のにより i) 生物試料法一般の高解像化, ii) 単粒子構造解析における高効率化, iii) 低温トモグラフィ法における高分解能化が達成される。これらの特長を生かした膜蛋白質系, ウイルス系, オルガネラ系への応用成果について紹介する。

位相差法の第 2 の特色は光顕試料と電顕試料を共通化できることにある。電子顕微鏡従来法では重金属染色を用いるため特に蛍光法と相性が悪く、同一試料を観察対象にすることは困難だった。この点を位相差法は解決したため従来独立に発展してきた 2 つの顕微鏡手法が真に融合する可能性がある。CREST で試作した電子・光子ハイブリッド顕微鏡の例を紹介する。

(9) 異常型プリオン蛋白質の細胞内局在

堀内基広（北海道大学大学院獣医学研究科）

プリオン病の病原体の主要構成要素は異常型プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) と考えられている。Taraboulos らは、プリオン持続感染細胞を GdnHCl のような変性剤で処理後に抗 PrP 抗体を用いて蛍光抗体法すると、PrP^C 由来の蛍光が減弱して、PrP^{Sc} 由来の蛍光が増強されることを見出し、この方法が PrP^{Sc} の細胞内局在の解析に用いられてきた。この方法では、使用する抗体や細胞の培養条件により PrP^C 由来の蛍光を検出することが問題となっていたが、我々は、PrP の最もアミロイド原性が高い領域を認識する抗体 (mAb 132) を用いること、PrP^C 由来の蛍光を殆ど検出せずに、信頼性高く細胞内の PrP^{Sc} を蛍光抗体法により検出できることを見出した。これまでに、各

種オルガネラマーカーとの二重染色により、PrP^{Sc} の細胞内局在を解析してきた。その過程で、PrP^{Sc} が既報の初期エンドソーム/リサイクリングエンドソームや後期エンドソーム、リソソームに加えて、トランスゴルジネットワーク (TGN) の近傍にも存在する可能性を見出した。PrP^{Sc} が細胞の膜輸送に関連する細胞内小器官に広く分布していることから、PrP^{Sc} は細胞の膜輸送によりダイナミックに細胞内を移動していると考え、PrP^{Sc} の細胞内輸送経路について解析を進めているので、発表では、PrP^{Sc} の細胞内局在と細胞内輸送について紹介したい。

(10) Viral Structures Visualized by Zernike Phase Contrast Cryo-electron Tomography

Radostin Danev（岡崎統合バイオサイエンスセンター）

In the last few years there is a growing interest in the

development and applications of methods for in-focus phase

contrast electron microscopy. The oldest such technique is the Zernike phase contrast TEM based on thin film phase plates. It was the first one to demonstrate the benefits of the in-focus phase contrast TEM. Few other approaches based on electrostatic or magnetic devices are under development but, despite its limitations, the thin film phase plate is currently the only method available for applications.

Cryo-electron tomography is expected to have a large benefit from the implementation of in-focus phase contrast techniques. A tomogram is based on tilt series of a specimen area using a limited dose. Assuming the specimen is a unique object; the information lost during the acquisition cannot be recovered at a later stage. The in-focus phase contrast, with its

uniform spectral transfer characteristics, can reduce the information loss due to CTF. In addition, it provides an overall contrast increase, which could aid the alignment steps during reconstruction making possible the use of lower total doses, smaller angular steps or smaller fiducial markers. As a result, the application of in-focus phase contrast to cryotomography is expected to produce tomograms with higher resolution and more details.

We show examples of the first applications of Zernike phase contrast to cryo-tomography. The specimens include T4 Phage and Influenza A virus. The discussion will focus on the current state and the future directions of the application of phase plates to cryo-electron tomography.

(11) introduction

丹司敬義 (名古屋大学エコトピア科学研究所)

(12) 膜細胞骨格の空間構造とその制御タンパク質の空間特異性

臼倉治郎 (名古屋大学エコトピア科学研究所)

細胞骨格はアクチン線維, 微小管 (微細管), 中間径線維より構成されるが, 膜直下では主にアクチン線維と微小管からなる。とりわけ, アクチン線維は豊富でその主役をなす。アクチン線維の空間分布を詳細に調べると3つのタイプに分類される。ところで, どのアクチン線維にも結合すべき **effector** タンパク質がなぜ第二タイプのアクチン線維に優先的に分布するのか正確な答えは見つからないが, 制御タンパク質が膜近傍に存在することと関係していると思われる。しかし, 膜密着型のアクチン線維にも分布は少ない。これら **effector** タンパク質の

空間特異性が如何に生まれるかは今後の解析に待たなければならない。

一方, 今回の実験でアクチン線維は **focal contact** とは別に膜上および細胞質内において集積が存在し, 膜表面, 細胞質内を多数のドメインに分割していることがわかった。これらのドメインは細胞質にあってはオルガネラなどの位置決めに役立っているものと考えている。一方膜面で葉状仮足の基部に存在することが多いことから, 形態の決定と関連があるものと考えられる。

(13) ATP リアルタイムイメージング: メカノセンシング機序としての ATP 放出

古家喜四夫 (科学技術振興機構 細胞力覚プロジェクト)

ATP は脳, 血管, 免疫系, 膀胱, 小腸, 乳腺など生体のいたるところで働く重要な細胞間情報伝達物質であ

る。エネルギー物質, 核酸成分として不可欠な ATP を情報伝達物質として用いることのメリットは, すべての細

胞が情報発信源になり得ることであり、またほとんどすべての細胞がなんらかの ATP 受容体を発現しており、情報の受け手にもなり得ることである。興味深いことに多くの細胞や組織において ATP 放出が細胞伸展や溶液の流れなどの機械刺激で引き起こされ、ATP シグナリング系はメカノシグナリングと深く関わっている。ATP シグナリング系の普遍性、重要性はその受容体とともに明らかになってきたが、ATP 放出経路は情報伝達系における根幹部分であるにもかかわらずほとんど分かっていな

い。その機構を明らかにするため、我々は Luciferin-Luciferase 反応による ATP ルミネッセンスを超高感度カメラによって顕微鏡下でリアルタイムイメージングできる装置を開発した。現在 10nM 以下の濃度の ATP を 30ms の時間分解能で観察可能である。この ATP 放出の時間経過から放出濃度や持続時間等が分かる。各種刺激による ATP 放出過程を解析した結果、同じ細胞においてもいくつかの異なる放出経路が存在していることが示された。

(14) *In-situ* TEM の多機能化とナノ材料合成、評価への応用

上野武夫（山梨大学）

300kV 分析電子顕微鏡(日立 H-9500)をベースに *In-situ* TEM を開発した。加速電圧は観察目的に合わせ 100～300kV の範囲から選択できる。鏡体は 3 台の高速ターボ分子ポンプ(260l/s)で構成された差動排気方式とした。試料室の雰囲気はガス供給装置により制御される。ガス供給装置は O₂, N₂, He, Ar, CO₂, NO, H₂, CO の 8 種類のガスを備えたガス供給ユニット、ガスの混合比率、ガス圧、ガス流量などを制御する制御ユニット、ガス分析ユニットなどで構成される。試料加熱ホルダとしては直径 3mm の標準 TEM 試料を最高 1200℃まで加熱できる二軸

傾斜試料加熱ホルダ、粉体試料を最高 1500℃まで加熱できる高温試料加熱ホルダなどを開発した。後者は Si₃N₄ の超高温における層変態、Si とカーボンの反応による SiC ナノ粒子の生成および焼結や、結晶粒界形成過程における Si, C の原子挙動の動的観察などに応用した。さらに、金属蒸着機能を付加した試料加熱ホルダを開発した。これにより、材料の合成とその特性評価実験が可能になった。我々はこの技術をアルミナ担体の合成、担体および触媒ナノ粒子の挙動解析などに応用し、触媒劣化メカニズム解明に有用な情報を得ている。

(15) 環境 TEM によるカーボンナノチューブ成長の高分解能その場観察

吉田秀人（大阪大学大学院理学研究科）

環境制御型透過電子顕微鏡 (ETEM) は、試料周辺へのガスの導入を可能とする環境セルを備えており、気体と固体の反応を原子分解能でその場観察することを可能にする。そのため、材料科学、触媒化学、バイオテクノロジーといった広範な分野で、ETEM 観察は極めて有用である。

我々は、ETEM を用いて、カーボンナノチューブ (CNT) の触媒 CVD 成長をその場観察することに成功した^[1,2]。多層 CNT (MWNT) が酸化シリコン基板上のナノ粒子触媒から成長する際、ナノ粒子触媒内には明瞭な格子縞が

現れており、そのフーリエ変換像を詳細に解析したところ、ナノ粒子触媒内が炭化鉄 (Fe₃C) であることが明らかになった。CNT の成長中にナノ粒子触媒が液体なのか結晶なのか、金属なのか炭化物なのかといった問題には明確な結論が出ていなかったが、我々の観察結果は、これらの問題に明瞭な答えを与えるものである^[1]。

- [1] H. Yoshida, S. Takeda, T. Uchiyama, H. Kohno, and Y. Homma, *Nano Lett.* 8, 2082 (2008).
- [2] H. Yoshida, T. Shimizu, T. Uchiyama, H. Kohno, Y. Homma, and S. Takeda, *Nano Lett.* 9, 3810 (2009).

(16) 放射線照射に伴う酸化物セラミックス中の欠陥形成と安定性

安田和弘 (九州大学工学研究院)

セラミックス中の照射欠陥の形成と安定性は、弾性的なはじき出し過程のみならず電子励起過程に大きく影響を受ける。電子顕微鏡内での電子照射下「その場」観察実験は、電子エネルギーの選択により弾性的なはじき出し損傷および電子励起を同時に、かつ強度比を変化させて試料に付与しながら、照射欠陥の形成・安定性を観察することが可能な手法である。また、一部の副格子に対してのみ選択的にはじき出し損傷を誘起することもできる。本報告では、まず、(1) マグネシア・アルミネート・スピネル中の照射欠陥形成・安定性に及ぼすはじき出し

損傷/電子励起比の効果に関する動的観察実験の結果について述べ、スピネル中の格子間型転位ループが電子照射に伴う電子励起下に孤立した格子間原子に分解・消滅することを示した。次に、(2) 蛍石構造酸化物における酸素イオンの選択的にはじき出し損傷と照射欠陥の形成・成長過程、に関する成果を報告し、電子照射のような比較的低い一次はじき出し原子を誘起する照射環境では、選択的にはじき出された酸素格子間イオンの板状集合体が形成・成長すると考察した。

(17) In situ TEM によるナノ粒子の相生成過程の解析

保田英洋 (神戸大・工)

ナノ粒子においては構成原子に対して表面原子の占める割合が著しく大きくなることに起因して特有の相平衡が認められる。純物質ナノ粒子の融点降下が発見され、その原因が格子振動のソフト化に基づき議論されてきた。近年、合金や化合物のナノ粒子における相平衡に関して、固溶限の増大、規則-不規則相転移温度の低下、バルク二相領域でのアモルファス相の形成等の新たな発見がなされた。このような挙動から、ナノ粒子においては構成原子間の化学的相互作用の寄与が大きくなり、それによって決定される系の自由エネルギーによって相平衡が支配されることが明らかになり、ナノ粒子における

相図を定性的に予測することも可能となった。また、相転移は異相間の自由エネルギー差を駆動力とした原子の再配列が容易に起こることによって支配され、原子の長距離拡散をとまわずに急速に構造が変化する点においてマルテンサイト相転移に類似したダイナミクスを示すことが明らかにされた。一方、最近、化合物ナノ粒子において電子励起によって相転移が起こることが発見され、電子系の寄与も顕著になることが示された。

ここでは、こうした合金・化合物ナノ粒子に特徴的な相生成ダイナミクスについて電顕内その場観察法により解析した結果を紹介する。

20. TRP チャネルの機能的多様性とその統一的理解

2009 年 6 月 4 日－6 月 5 日

代表・世話人：金子周司（京都大学 大学院薬学研究科）

所内対応者：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）

(1) TRPV2 を介した消化管（小腸）運動制御の検討

三原 弘, Boudaka Ammar, 柴崎貢志, 山中章弘, 富永真琴
(岡崎統合バイオサイエンスセンター 細胞生理研究部門)(2) Ca^{2+} 透過チャネル TRPV2 阻害による筋変性疾患改善効果

岩田裕子, 若林繁夫 (国立循環器病センター研究所 循環分子生理部)

(3) ゼブラフィッシュにおける TRPV1 の生理機能の解析

田地野浩二, 細川 浩, 前川真吾, 小林茂夫
(京都大学 情報学研究科 知能情報学 生体情報処理分野)

(4) クラミドモナスにおける TRP チャネルの生理学的意義の解明

藤生健太¹, 中山義敬², 曾我部正博^{1,3,4}, 吉村建二郎⁵
(¹ JST・ICORP/SORST・細胞力覚, ² 東京学芸大学・教育学部,
³ 名古屋大学 医学研究科 細胞生物物理,
⁴ 自然科学研究機構・生理学研究所, ⁵ メリーランド大学・生物)

(5) ホスホジエステラーゼ阻害剤による PKA-TRPC チャネル系を介した血管緊張性の制御

西田基宏¹, 西岡絹恵¹, 有吉麻里奈¹, 井上隆司², Zhong Jian², 平野勝也³,
佐藤陽治⁴, 喜多紗斗美⁵, 岩本隆宏⁵, 森 泰生⁶, 黒瀬 等¹
(¹ 九州大学 薬学研究院 薬効安全性学, ² 福岡大学 医学部 生理学,
³ 九州大学 医学研究院 分子細胞情報学, ⁴ 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部,
⁵ 福岡大学 医学部 薬理学, ⁶ 京都大学 工学研究科 合成生物化学)

(6) ナトリウム利尿ペプチドの抗心肥大作用における TRPC6 阻害の関与

木下秀之¹, 桑原宏一郎¹, 井上隆司², 西田基宏³,
黒瀬 等³, 清中茂樹⁴, 森 泰生⁴, 中尾一和¹
(¹ 京都大学 医学研究科 内分泌代謝内科, ² 福岡大学 医学部 生理学,
³ 九州大学 薬学研究院 薬効安全性学, ⁴ 京都大学 工学研究科 合成生物化学)(7) Snapin をアダプターとする受容体作動性 Ca^{2+} 流入機構

鈴木史子, 森島 繁, 田中高志, 村松郁延 (福井大学 医学部 薬理学領域)

(8) ミクログリア活性化における TRPV4 の病態生理的役割

白川久志, 松谷一慶, 金野真和, 中川貴之, 金子周司 (京都大学 薬学研究科 生体機能解析)

(9) 低酸素/高血糖ストレスによる TRPV1 活性の増強：糖尿病初期の疼痛発症メカニズム

柴崎貢志^{1,2,3}, Violeta Risoiu⁴, Maria-Luiza Flonta⁴, 富永真琴^{1,2,3}
(¹ 岡崎統合バイオセンター 細胞生理部門, ² 生理学研究所,
³ 総合研究大学院大学, ⁴ University of Bucharest, Romania)

(10) 局所麻酔薬によるラット脊髄後角の TRPA1 チャネルの活性化

熊本栄一, 朴 蓮花, 藤田亜美, 蔣 昌宇, 岳 海源, 井上将成, 水田恒太郎, 青山貴博
(佐賀大学 医学部 生体構造機能学講座 (神経生理学分野))

(11) TRP チャネルによる活性分子種センシング

高橋重成, 香西大輔, 山本伸一郎, 清中茂樹, 森 泰生
(京都大学 工学研究科 合成生物化学)

(12) TRPM2 チャネルの精神機能および慢性疼痛における役割: TRPM2 ノックアウトマウスを用いた行動解析

中川貴之¹, 白川久志¹, 前田早苗¹, 山口健太郎¹,
河本 愛¹, 草野綾香¹, 森 泰生², 金子周司¹
(¹京都大学 薬学研究科 生体機能解析学, ²京都大学 工学研究科 合成生物化学)

(13) 炎症性疾患の発症と進展における TRPM2 の役割

廣井理人¹, 山本伸一郎², 輪島輝明^{1,2}, 根来孝治³, 木内祐二¹, 森 泰生², 清水俊一¹
(昭和大学 薬学研究科¹ 病態生理学, ³遺伝解析学, ²京都大学 工学研究科 合成生物化学)

(14) がん細胞の遊走と TRPV2

長澤雅裕, 小島 至, 中川祐子 (群馬大学 生体調節研究所 細胞調節分野)

(15) Orai1 チャネル三次元構造の解明

丸山雄介¹, 小椋俊彦¹, 三尾和弘¹, 加藤賢太²,
金子 雄², 清中茂樹², 森 泰生², 佐藤主税¹
(¹産業技術総合研究所 脳神経情報研究部門, ²京都大学 工学研究科 合成生物化学)

(16) 毛様体筋収縮調節に関与する非選択性陽イオンチャネルの分子候補としての TRPC と Orai1

高井 章, 宮津 基, 石居信人, 荻野 大 (旭川医科大学 生理学講座 自律機能分野)

(17) PKG リン酸化を介した心血管 Ca²⁺流入チャネル TRPC6 の短期・長期制御機構

井上隆司¹, 菅 忠¹, 海 琳¹, 高橋真一¹, 本田 啓¹, 森 誠之¹, 森 泰生²
(¹福岡大学 医学研究科 細胞分子制御学, ²京都大学 工学研究科 合成生物化学)

【参加者名】

堀之内孝広 (北海道大学医学研究科), 高井 章, 宮津 基 (旭川医科大学 生理学講座), 渡邊博之 (秋田大学医学部), 田淵紗和子 (筑波大学第二学群生物学類), 荻野 大 (昭和大学医学部), 廣井理人, 飯塚亮太, 竹中美貴, 遠藤央乃 (昭和大学薬学研究科), 佐藤主税, 丸山雄介, 三尾和弘 (産業技術総合研究所), 藤生健太 (日本科学技術振興機構・ICORP/SORST), 小島 至, 長澤雅裕, 中川祐子 (群馬大学生体調節研究所), 森島 繁 (福井大学医学部), 門脇 真 (富山大学和漢医薬学総合研究所), 織田 聡 (富山大学医学薬学教育部), 金子周司, 中川貴之, 白川久志, 金野真和, 草野綾香, 桑原一樹, 崎元伸哉 (京都大学薬学研究科), 細川 浩 (京都大学情報学研究科), 桑原宏一郎, 中川靖章, 木下秀之 (京都大学医学研究科), 森 泰生, 梶本武利, 沼田朋大, 高橋重成, 加藤賢太,

香西大輔, 澤口諭一, 中尾章人, 井上圭亮, 青木雄大, 八木雅久二 (京都大学工学研究科), 岩田裕子 (国立循環器病センター研究所), 太田利男 (鳥取大学 農学部), 成瀬恵治 (岡山大学医歯薬学総合研究科), 西田基宏 (九州大学薬学研究院), 井上隆司 (福岡大学医学研究科), 熊本栄一, 井上将成, 藤田亜美 (佐賀大学医学部), 小林護, 中西 修, 天野賢一 (キッセイ薬品工業 (株)), 天野賢一 (持田製薬株式会社), 金政利幸, 鈴木紀子 (塩野義製薬 (株)), 川原田宗市 (小野薬品工業株式会社), 橋本公男 (サンスター株式会社), 藤田郁尚 (マンドム中央研究所), 富永真琴, 山中章弘, 曾我部隆彰, 齋藤 茂, 梅村 徹, 小松朋子, 内田邦敏, 加塩麻紀子, 常松友美, 周一鳴, 高山靖規, 川口 仁 (岡崎統合バイオ細胞生理部門)

【概要】

平成 21 年 6 月 4 日及び 5 日に研究会が行われた。17 題の発表があり, TRPC チャネルについて 5 題, TRPV チャネルについて 6 題, TRPM チャネルについて 2 題,

TRPA チャネルについて 1 題, TRP チャネル全般について 2 題, Orai1 チャネルについて 1 題であった。毎年, 新しい TRP チャネル研究者が集い, このチャネル研究の広

さをあらためて実感し、お互いの研究内容についての有意義な討論・情報交換が行われた。具体的には、岡崎統合バイオの三原（以下敬称略）が消化管の TRPV2、国立循環器病センターの岩田が筋細胞の TRPV2、京都大の細川がゼブラフィッシュの TRPV1、JST・ICORP/SORS の藤生がグラムドモナスの TRP チャネルの生理学的および病態生理学的意義を発表した。続いて九州大の西田が PDE 阻害剤による TRPC3/6/7 の制御を、京都大の木下が心肥大における TRPC6 の役割を、福井大の森島が神経伝達物質の遊離機構における TRPC6 の役割を発表した。さらに京都大の白川がミクログリアにおける TRPV4 の役割を、岡崎統合バイオの富永が糖尿病の疼痛発症メカニ

ズムにおける TRPV1 の役割を、佐賀大の熊本が局所麻酔薬による TRPA1 の活性化機構を、京都大の高橋が TRP チャネルによる活性分子種のセンシング機構を報告した。京都大の中川は TRPM2 の精神機能および疼痛における役割を、昭和大の廣井は同じく TRPM2 の炎症性疾患における役割を、群馬大の長澤は TRPV2 のがん細胞の遊走における役割を発表した。さらに、産総研の佐藤は Orail チャネルの三次元構造を発表し、旭医大の高井は毛様体筋における TRPC チャネルの役割について、福岡大の井上は心血管系における TRPC6 の制御機構について発表した。いずれもレベルの高い発表であり、日本における TRP チャネル研究の発展を確信した。

(1) TRPV2を介した消化管（小腸）運動制御の検討

三原 弘, Boudaka Ammar, 柴崎貢志, 山中章弘, 富永真琴
(岡崎統合バイオセンター 細胞生理部門)

TRPV2 は神経系、免疫系をはじめとした様々な組織で発現が認められている。我々は、マウス回腸筋層間神経節において、TRPV2 の発現を遺伝子、蛋白レベルで確認した。そのため、TRPV2 が消化管運動の調節に寄与している可能性が推察された。そこで、免疫染色法を用いて TRPV2 発現細胞のサブタイプ同定を行ったところ、TRPV2 陽性神経の約半数が nNOS 陽性であり、逆に、nNOS 陽性神経の約 90% が TRPV2 陽性であったことから、TRPV2 が一酸化窒素 (NO) の放出に関わる可能性が示唆された。そこで、TRPV2 が消化管において NO 調節に関与しているかを確認するために以下の実験を行った。まず、筋層間神経節細胞の一次培養細胞を用いて Ca イメージング法を適応して検討したところ、高カリウム応答性の神経と思われる細胞の約 50% が TRPV2 アゴニストである probenecid に応答した。次に、オルガンバスで単離小腸片の等尺性収縮を測定したところ、probenecid

投与によって、濃度依存的に収縮は抑制され、その抑制効果は、NO 系阻害薬 (NOS 阻害薬, NO スカベンジャー, guanylate cyclase inhibitor) にて阻害された。probenecid 刺激後の単離小腸片から放出された NOx 濃度を Griess 法にて測定したところ、無投与に比べて有意に上昇が見られた。更に、in vivo 実験として、小腸内容物の移動度を測定したところ、probenecid 全身投与群で肛門側への試験薬の移動が有意に亢進していた。これらの結果は、TRPV2 は消化管の抑制系運動を制御していることを示唆しており、外来性 TRPV2 アゴニストが消化管機能性疾患に適用される可能性がある。NO は消化管において主な抑制系神経伝達物質であり、神経刺激に应答して産生された NO が平滑筋を弛緩させる。NO 産生異常が様々な消化管機能性疾患の原因と推察されていることから、原因不明の消化管機能性疾患に TRPV2 が関わっている可能性が考えられる。

(2) Ca²⁺透過チャネル TRPV2阻害による筋変性疾患改善効果

岩田裕子, 若林繁夫 (国立循環器病センター研究所 循環分子生理部)

筋ジストロフィー（筋ジス）における筋細胞内は恒常

的に Ca²⁺が上昇した状態にあり、それが細胞変性を起こ

す一つの重要な要因であることが動物モデルで明らかになっている。私たちはこれまでに、筋ジス動物の骨格筋細胞において、伸展刺激感受性 Ca^{2+} 透過チャネル (TRPV2) の膜発現の増加と活性化 (細胞外からの Ca^{2+} 流入の増大) が、筋細胞壊死に密接に関与することを報告してきた。TRPV2 の治療標的としての有効性を証明するためには、このチャネル活性を特異的に阻害したときに筋ジスの病態が改善するかどうか解明する必要があるが、現在のところ TRPV2 の特異的な阻害剤は開発されていない。今回、TRPV2 のイオン透過部位に変異を導入してチャネル活性を消失させた TRPV2 を骨格筋特異的に過剰発現させ、ジストロフィン欠損で筋ジスを発症するマウス *mdx* と交配させ、ドミナントネガティブ効果で内在性の TRPV2 活性を抑制した時、筋ジスの病態が改善されるかどうかを検討した。TRPV2 活性が抑制された

交配マウス (*mdx/Tg*) (4, 10, 26 週令) では、*mdx* に比べて、血中クレアチンキナーゼ (CK) 活性、組織学的所見、グリップテストによる筋機能など調べたパラメータすべてにおいて病態改善が認められた。また、同じドミナントネガティブ変異体をアデノウイルスベクターを用いて d-SG 欠損で筋ジスを発症する BIO14.6 ハムスターの骨格筋細胞へ導入したところ、外液 Ca^{2+} 濃度依存性 Ca^{2+} 流入の上昇が抑制され、伸展刺激による CK の漏出も抑制された。さらに、BIO14.6 骨格筋への TRPV2 変異体の導入により筋変性の減弱が認められ改善効果が示された。細胞骨格系蛋白質が欠損した筋ジス筋細胞では TRPV2 の膜発現が亢進しているが、その活性を抑制することにより筋変性が緩和されることが明らかになり、TRPV2 の筋変性治療標的としての可能性が高まった。

(3) ゼブラフィッシュにおける TRPV1 の生理機能の解析

田地野浩二, 細川 浩, 前川真吾, 小林茂夫

(京都大学 情報学研究科 知能情報学 生体情報処理分野)

ゼブラフィッシュは、飼育が容易、多産など遺伝学解析に適した脊椎動物である。哺乳類とほぼ同様の組織・脳構造を持つため発生や疾患研究モデル動物として用いられている。しかし、ゼブラフィッシュにおける TRP チャネルの機能はあまり解析されていない。そこで、温度感受性 TRP チャネルである TRPV1 に着目し、ゼブラフィッシュ TRPV1 (*zTRPV1*) のゼブラフィッシュにおける生理的役割を解析した。

zTRPV1 の発現を解析したところ、*zTRPV1* は受精後 24 時間後から発現がみられた。*zTRPV1* のプロモーターの下流に GFP を発現させたトランスジェニックフィッシュを作成し、*zTRPV1* 発現細胞を解析したところ、*zTRPV1* は感覚神経に発現しており、*zTRPV1* 発現感覚神

経の末端はヒレに投射していた。ゼブラフィッシュの温度依存性の行動を観察したところ、温熱刺激によって遊泳する頻度が上昇した。温熱刺激による遊泳頻度上昇は、温度依存性がありもっとも遊泳行動を起こさない温度は、飼育温度である 28.5 度であった。また、この温熱刺激による遊泳頻度上昇は、受精後 40 時間後からみられた。温熱刺激による遊泳頻度上昇における *zTRPV1* の役割を解析する目的で、*zTRPV1* をノックダウンさせたゼブラフィッシュを作製した。*zTRPV1* をノックダウンした個体では、温熱依存性の遊泳頻度上昇が抑制された。以上の結果から、マウスと同様に *zTRPV1* は温度上昇の感知に関与していることが示唆された。

(4) クラミドモナスにおける TRP チャネルの生理学的意義の解明

藤生健太¹, 中山義敬², 曾我部正博^{1,3,4}, 吉村建二郎⁵¹ JST・ICORP/SORST・細胞力覚, ² 東京学芸大学・教育学部,³ 名古屋大学 医学研究科 細胞生物物理,⁴ 自然科学研究機構・生理学研究所, ⁵ メリーランド大学・生物)

単細胞緑藻類のクラミドモナスは2本の鞭毛をうつことで水中を泳ぐが, 細胞が周りから刺激を受けるとその刺激に応じて鞭毛の打ち方を調節して遊泳方向を変えている。外からの刺激には機械刺激, 光刺激, 化学刺激, 温度刺激, 重力刺激, 電気刺激などさまざまなタイプがあるが, これらの受容機構や受容分子そのものは, 光を受容する Channelopsin を除き分かっていない。そこで我々は, 様々な刺激の受容機構に関与する TRP チャネルに注目して, クラミドモナスの刺激受容機構を解明することに取り組んでいる。はじめに, クラミドモナスのゲノム配列から TRP チャネルの相同遺伝子を BLAST で抽出し, mRNA の発現を確認したところ, これまでに報告のある PKD2 のホモログを含めて, 8つの TRP ホモログ遺伝子を同定することができた。推定アミノ酸配列によるとそれぞれの長さは699~1956 残基であり, 便宜的に名称を TRP1 から TRP7 とした(太字)。クラミドモナスの TRP チャネルが持つアンキリンリピート配列は TRP1, TRP2, TRP5, TRP7 に見られ, 長いものでも4回のリピート配列であった。クラミドモナスの TRP チャネルと代表的な TRP チャネルとの分子系統解析を膜貫通領域の TM5~TM6 を用いておこない, 分子系統樹を作成したところ, TRP1 は TRPV, TRP2 は TRPC, TRP3 は TRPV5 と TRPV6, TRP4 は TRPA, TRP6 は PKD2, TRP7 は TRPC7 の各枝に収まった。クラミドモナスの TRP チャネルが TRP チャネルサブファミリーの多岐にわたって分布することから, 生物が多細胞化する前の段階のクラミドモナスですでに多様な TRP チャネルが有していたことが示唆された。次に, クラミドモナス TRP チャネ

ルのそれぞれに対する抗体を作製して細胞内の局在性をウエスタンブロットと蛍光抗体法で検証した。TRP1 は鞭毛と細胞体, TRP2 と TRP3 は鞭毛, TRP6 は収縮胞, TRP7 は鞭毛と収縮胞のそれぞれに局在することが示された。TRP3 は鞭毛全体に分布が観察されたが, 特に鞭毛の基部近くに顕著に局在した。定量的 RT-PCR で mRNA の発現量を定量すると, 鞭毛再生時の発現量の増加は TRP1, TRP3, TRP4, TRP5, TRP7, PKD2 で見られ, クラミドモナスの TRP チャネルの多くが鞭毛に関わりのある可能性を示した。その中でも, TRP3 は発現量の増加が特に顕著であるうえに, 鞭毛での局在性が特徴的であったので, まずは TRP3 の機能を明らかにしようと考えた。RNAi 法を用いて TRP3 遺伝子の発現抑制株を作製したところ, TRP3 の発現量が野性株の 10%近くに低下した株では細胞の増殖や遊泳は野性株と同じであったが, 機械刺激応答が見られなくなった。すなわち, 野性株では細胞がスライドガラス表面に衝突するとその機械刺激を受容し, 続いて鞭毛の波形変換がおきて後退遊泳を行うが, TRP3 発現抑制株では後退遊泳が観察されなかった。TRP3 が機械受容機構と鞭毛の波形変換のどちらに関わるのかを調べるため, 光刺激に対する応答を観察した。TRP3 発現抑制株では, 強い光を急に当てたときに誘導される鞭毛の波形変換と後退遊泳が観察されたため, TRP3 が鞭毛の波形変換そのものに関わらないことが示された。このことから TRP3 はクラミドモナスの機械刺激受容機構に関わるチャネルであることが示された。

(5) ホスホジエステラーゼ阻害剤による PKA-TRPC チャネル系を介した血管緊張性の制御

西田基宏¹, 西岡絹恵¹, 有吉麻里奈¹, 井上隆司², Zhong Jian², 平野勝也³,
佐藤陽治⁴, 喜多紗斗美⁵, 岩本隆宏⁵, 森 泰生⁶, 黒瀬 等¹

(¹九州大学 薬学研究院 薬効安全性学, ²福岡大学 医学部 生理学,

³九州大学 医学研究院 分子細胞情報学, ⁴国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部,

⁵福岡大学 医学部 薬理学, ⁶京都大学 工学研究科 合成生物化学)

血管平滑筋の弛緩は、内皮依存性弛緩因子（一酸化窒素）による cGMP の産生を介した protein kinase G (PKG) の活性化や、 β_2 アドレナリン受容体刺激による cAMP の産生を介した protein kinase A (PKA) の活性化によって引き起こされる。特に、ホスホジエステラーゼ (PDE) (PDE) 阻害剤は内因性弛緩作用を増強することによって強い血管拡張作用を引き起こす。例えば、血小板凝集阻害薬として市販されているシロスタゾール (CLZ) は、強い抗血小板作用と血管拡張作用をもつ。PDE3 阻害による抗血小板作用や血管拡張作用には、細胞内 cAMP 濃度上昇を介した $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の抑制が関与すると考えられているものの、その詳細な機序についてはよくわかっていない。一方、受容体刺激による血管収縮応答において、ジアシルグリセロール感受性 TRPC チャネルが重要な役割を担うことも知られている。そこで本研究では、CLZ による血管拡張作用の機序解析を中心に、PKA を介した内因性の血管弛緩反応に DAG 感受性 TRPC チャネルの抑制が関与するかどうか検討を行った。

ラット血管マグヌス標本において、CLZ はアンジオテ

ンシン (Ang) II 刺激による収縮応答を濃度依存的に抑制した。この抑制効果は SK&F96565 処置によって消失した。TRPC チャネルを一過的に発現させた HEK293 細胞において、CLZ は DAG 感受性 TRPC チャネル (TRPC3/6/7) を介した Ca^{2+} 流入を濃度依存的に抑制した。CLZ による TRPC6 チャネルの抑制作用は、69 番目のスレオニン残基 (Thr⁶⁹) をアラニンに置換することで解除された。実際に、CLZ は処置時間依存的にリン酸化型 TRPC6 の発現量を増加させ、この増加は PKA 阻害剤を処置することで完全に抑制された。さらに、TRPC6 の不活性型変異体を発現させた血管リング標本では、CLZ による血管収縮の抑制効果が消失していた。

これまで、血管拡張につながる PKA の標的タンパクとして、ミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) や Regulator of G protein Signaling (RGS) が報告されている。しかし本研究により、PDE 阻害剤が PKA を介して DAG 感受性 TRPC チャネルを介した Ca^{2+} 流入を抑制し、Ang II 誘発性の血管収縮を抑制することが初めて明らかとなった。

(6) ナトリウム利尿ペプチドの抗心肥大作用における TRPC6 阻害の関与

木下秀之¹, 桑原宏一郎¹, 井上隆司², 西田基宏³, 黒瀬 等³, 清中茂樹⁴, 森 泰生⁴, 中尾一和¹

(¹京都大学 工学研究科 内分泌代謝内科, ²福岡大学 医学部 生理学,

³九州大学 薬学研究院 薬効安全性学, ⁴京都大学 工学研究科 合成生物化学)

【背景・目的】近年、心肥大等の病的な心室リモデリングにおいて、受容体活性化型 Ca^{2+} チャネルである TRPC family, 特に TRPC6 が calcineurin-NFAT 経路の増幅因子として重要な役割を果たすことが報告された。今回我々はナトリウム利尿ペプチドの抗心肥大作用における標的分子としての TRPC6 の関与を検討した。

【結果】ANP は、ラット新生仔心室筋細胞における ET-1

刺激による Ca^{2+} 流入と NFAT 活性化を抑制し、また HEK293 細胞において TRPC6 由来 Ca^{2+} 流入および陽イオン電流を抑制した。この TRPC6 抑制効果は、PKG 特異的阻害剤や、TRPC6 の PKG リン酸化部位である 69 番目トレオニンをアラニン置換した mutant TRPC6 (TRPC6T67A) により消失した。ANP, BNP 共通の受容体 GC-A を欠失し、高血圧性心肥大を示す GC-A ノックア

ウトマウス (GCA-KO) の心室では TRPC6 mRNA 発現が有意に増加しており, TRPC チャネル阻害薬 BTP2 (20mg/kg/day) 投与は GCA-KO において, 血圧には影響せず, 心エコーでの有意な壁厚の改善, 心体重比の減少を示した。

【結論】ナトリウム利尿ペプチドの抗心肥大作用において, TRPC6 抑制が重要な役割を果たしており, TRPC6 を標的とした治療が心肥大・心不全等の病的な心室リモデリングに対する新たな治療となる可能性が示唆された。

(7) Snapin をアダプターとする受容体作動性 Ca^{2+} 流入機構

鈴木史子, 森島 繁, 田中高志, 村松郁延 (福井大学 医学部 薬理学領域)

一般的に神経伝達物質の放出は, 活動電位による神経終末の脱分極と, それに伴っておきるシナプス終末における電位作動性 Ca^{2+} チャネルの開閉と Ca^{2+} 濃度上昇によって起こることが知られている。一方, α_1 -アドレナリン受容体は脳皮質などの中枢神経に多く分布しており情動の調節などに関与していることが分かっているが, その機能の詳細なメカニズムは不明な点も多い。

近年我々は, α_1 -アドレナリン受容体に Snapin という蛋白が結合すること, Snapin は, TRPC ファミリー分子とも結合し, α_1 -アドレナリン受容体を活性化することにより, TRPC チャネルを介した受容体作動性 Ca^{2+} 流入が起こることを報告した。

Snapin はもともと SNARE 複合体の構成蛋白である Snap-25 に “associate” する蛋白として報告されたとおり, 神経伝達物質の放出に重要な役割を果たす。そこで我々は, Snapin を発現させた PC12 細胞を用いて, 実験を行った。まず, α_1 -アドレナリン受容体刺激後の細胞内 Ca^{2+} 濃度を測定した。Snapin の共発現した細胞では, 持続相での Ca^{2+} 上昇が著明に大きく, また, この持続相は, 細胞外 Ca^{2+} を除去することにより消失し, また TRPC チャネルの阻害薬である La^{3+} や SKF96365 などにより大きく抑制された。次に, α_1 -アドレナリン受容体刺激に伴うドパミン遊離を測定した。 α_1 受容体活性化に伴い, ドパミンの遊離は Snapin の共発現した細胞にて有意に増大していた。またこの増大は, 脱分極に伴う神経伝達物質の遊離に関与することの知られているナトリウムチャネルやカルシウムチャネルをテトロドトキシンやアガトキシンなどによって抑制しても, 変化が見られなかった。一方, 細胞外 Ca^{2+} の含まれていない溶液中では大きく減少し, また TRPC チャネルの阻害薬である SKF96365 などによっても抑制された。

以上のことから, α_1 -アドレナリン受容体活性化後の受容体作動性 Ca^{2+} 流入による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇にて, 神経伝達物質ドパミンが遊離することが示唆された。また, この作用は Snapin と Snapin に相互作用する TRPC チャネルの働きを介することが明らかになった。 α_1 -アドレナリン受容体は活動電位による神経伝達物質の分泌を修飾している可能性があることが示唆された。

(8) ミクログリア活性化における TRPV4 の病態生理的役割

白川久志, 松谷一慶, 金野真和, 中川貴之, 金子周司 (京都大学 薬学研究科 生体機能解析)

脳を構成するグリア細胞の一種であるミクログリアは脳内の免疫担当細胞として神経細胞の生存維持・機能修復に働くことが知られている。しかしミクログリアは, 活性化に伴い一酸化窒素 (NO) やサイトカインをはじめとする種々の因子を産生・放出するとともに, 異常増殖, 遊走, 形態変化を伴って神経傷害的にも働くことが報告されており, 中枢神経変性疾患の病態形成にも関与して

いると考えられる。近年, このようなミクログリアの機能に K^+ チャネルや Cl^- チャネルを含む細胞膜イオンチャネルが重要な役割を担うことが示されつつあるが, カチオン流入経路のひとつと想定される transient receptor potential (TRP) チャネルのミクログリアにおける発現や機能についてはほとんど報告されていない。

そこではじめに, ラット新生仔大脳皮質由来培養ミク

ログリアを用いて, TRPV subfamily の発現について RT-PCR により検討したところ, TRPV1-4 の発現が確認された。次にミクログリア活性化作用を有するエンドトキシンである lipopolysaccharide (LPS) を培養ミクログリアに 24 時間処置したところ, 細胞の形態変化や NO 遊離が誘発されたが, その過程において TRPV4 の mRNA 発現量が減少することが定量的 PCR 法により明らかになった。そこで TRPV4 に着目して, その発現を免疫染色により確認した結果, 大部分の培養ミクログリアに TRPV4 が発現していることが明らかになった。また whole-cell patch clamp 法により TRPV4 アゴニストである 4 α -PDD による応答が観察された。さらに Ca²⁺ imaging 実験を行った結果, 無処置のミクログリアでは濃度依存的に 4 α -PDD による応答が観察されたのに対して, LPS を

24 時間処置して活性化させたミクログリアでは 4 α -PDD による応答が消失していた。

次にミクログリアの異常活性化過程における TRPV4 の役割を検討する目的で, LPS 誘発 TNF- α 遊離量増大に対する 4 α -PDD の作用を検討した結果, 4 α -PDD は有意にその増大を抑制し, その抑制作用は siRNA を用いた TRPV4 の特異的ノックダウンによりほぼ完全に解除された。4 α -PDD は LPS 誘発 NO 蓄積量増大やミクログリア活性化マーカーである galectin-3/MAC-2 の発現増大に対しても, 濃度依存的に抑制作用を示した。以上の結果は, 培養ミクログリアに TRPV4 が発現しており, その活性化過程において TRPV4 が重要な役割を果たしていることを示唆するものである。

(9) 低酸素/高血糖ストレスによる TRPV1 活性の増強：糖尿病初期の疼痛発症メカニズム

柴崎貢志^{1,2,3}, Violeta Risoiu⁴, Maria-Luiza Flonta⁴, 富永真琴^{1,2,3}

(¹ 岡崎統合バイオセンター 細胞生理部門, ² 生理学研究所, ³ 総合研究大学院大学, ⁴ University of Bucharest, Romania)

カプサイシン受容体 TRPV1 は 1997 年に分子実体が初めて明らかとなった侵害刺激受容体であり, 現在までに急性疼痛, 様々な炎症性疼痛に関与することが明らかとなっている。近年, 糖尿病モデル動物で正常時に比べて TRPV1 活性が増強することが見いだされ, 糖尿病性神経因性疼痛への TRPV1 の関与が考察されている。しかしながら, 糖尿病の進行に伴って, どのような因子が TRPV1 活性の増強を引き起こし, 糖尿病性神経因性疼痛が惹起されるのかは全く不明である。

我々は, 糖尿病に伴う高血糖により神経細胞に十分な量の酸素が供給されないことが, TRPV1 活性増強の引き金になるのではないかと仮説を立てた。そして, これを立証するために, ラット DRG 神経細胞を単離し, 人工的に低酸素・高血糖の条件を作製し (以下糖尿病条件と略, 4% O₂, 25 mM グルコース), 24 時間培養後に正常条件 (7% O₂, 7.4 mM グルコース) と TRPV1 活性を比較した。両群の細胞にカプサイシンあるいはプロトンを投与し, TRPV1 電流を記録したところ, 糖尿病条件群で TRPV1 電流の有意な増強を観察した。この結果は, 短期間の低酸素・高血糖ストレスが TRPV1 活性の増強を引

き起こす主要因子であることを強く示唆している。培養細胞である HEK293 細胞に ratTRPV1 を発現させ, 同様の実験を行ったところ, この異所性発現系においても, 糖尿病条件下でカプサイシン電流の増強が認められた。我々は, TRPV1 の活性増強に PKC ϵ による TRPV1 の Ser 残基 502/800 のリン酸化が関与することを報告している。そこで, Ser502/800 を Ala に置換した変異体を用いて実験を行ったところ, この変異体では糖尿病条件下での TRPV1 活性の増強は認められなかった。つまり, 糖尿病条件下での TRPV1 の PKC ϵ によるリン酸化が引き起こされていることが強く示唆された。これを実証するために, Ser800 残基の TRPV1 リン酸化のみを検出する抗体を用いてウェスタンブロッティングを行ったところ, 糖尿病条件下で TRPV1 のリン酸化が増大していることを確認した。

以上の結果より, 糖尿病性神経因性疼痛の発生機序として, 高血糖・低酸素状態の出現, PKC ϵ , 活性の増大, TRPV1 のリン酸化増大, 痛みの惹起というカスケードが存在すると考えられる。

(10) 局所麻酔薬によるラット脊髄後角の TRPA1 チャンネルの活性化

熊本栄一, 朴 蓮花, 藤田亜美, 蔣 昌宇, 岳 海源, 井上将成, 水田恒太郎, 青山貴博
(佐賀大学 医学部 生体構造機能学講座 (神経生理学分野))

TRP チャンネルのファミリーは様々な化学的および物理的な刺激により活性化されることが知られている。例えば, TRPV1 チャンネルは侵害性の熱刺激, プロトンおよびカプサイシンにより活性化される。また, TRPA1 チャンネルは侵害性の冷刺激, マスタードオイル, シナモンオイル, 生姜成分, ニンニク成分などにより活性化されることが明らかになっており, 最近では, 全身麻酔薬により開口することも報告されている。局所麻酔薬が電位依存性 Na^+ チャンネルを抑制することはよく知られているが, 最近, 異種細胞に強制発現された, あるいは, 後根神経節 (DRG) ニューロンに発現している TRP チャンネルを局所麻酔薬が活性化することが報告された。

TRP チャンネルは DRG ニューロンの末梢端に存在し, 皮膚末梢で痛み刺激を受容し中枢神経系に伝える。一方, 中枢端にも存在して痛み情報の伝達の制御に働いていると考えられている。この考えを支持する実験結果として, 皮膚末梢から脊髄後角への痛み伝達の制御に重要な役割を果たす脊髄後角第 II 層 (膠様質) ニューロンにおいて, TRPV1 チャンネルの作動薬カプサイシンや TRPA1 チャンネルの作動薬アリルイソチオシアネート (AITC) がグルタミン酸作動性の自発性興奮性シナプス伝達を促進するという報告がある。しかし, 1 次感覚ニューロンの中枢端をはじめとする中枢神経系に存在する TRP チャンネルが局所麻酔薬により活性化されるかどうかまだ明らかにされていない。そこで我々は, 中枢神経系で局所麻酔薬が TRP チャンネルを活性化するかどうか知る目的で, 膠様質

ニューロンのグルタミン酸作動性自発性興奮性シナプス伝達に及ぼす局所麻酔薬の作用を調べた。実験は, 成熟ラット脊髄横断スライスの膠様質ニューロンへブラインド・ホールセル・パッチクランプ法を適用し, -70 mV の保持膜電位で膜電流を記録することにより行った。局所麻酔薬リドカイン (5 mM) は調べたニューロンの 56% で自発性興奮性シナプス後電流 (EPSC) の振幅を変えずに発生頻度を増加させ, この作用は $1 \sim 5 \text{ mM}$ の範囲で濃度依存性であった。リドカインにより自発性 EPSC の発生頻度の増加が見られたニューロンにおいて, リドカイン除去後 20 分で再度リドカインを投与しても同程度の増加が見られた。リドカインによるシナプス伝達促進作用は, Na^+ チャンネルの阻害剤テトロドトキシン ($0.5 \mu\text{M}$) や TRPV1 阻害剤カプサゼピン ($10 \mu\text{M}$) により影響を受けなかったが, 非選択的 TRP 阻害剤ルテニウムレッド ($300 \mu\text{M}$) により抑制された。AITC ($100 \mu\text{M}$) は調べた膠様質ニューロンの 66% で自発性 EPSC の発生頻度を増加させると報告されているが, AITC が発生頻度を増加させたニューロンでは, リドカインも同様な作用を示した。一方, 同じ局所麻酔薬であるプロカインは, $2 \sim 10 \text{ mM}$ の濃度範囲で自発性 EPSC の発生頻度を増加させなかった。

以上より, 膠様質の神経終末に存在する TRPA1 チャンネルにリドカインが特異的に作用してグルタミン酸の自発放出が促進されると結論される。この作用は膠様質ニューロンの膜興奮性増加に寄与することが示唆される。

(11) TRP チャンネルによる活性分子種センシング

高橋重成, 香西大輔, 山本伸一郎, 清中茂樹, 森 泰生
(京都大学 工学研究科 合成生物化学)

一酸化窒素 (NO) に代表される活性窒素種 (reactive nitrogen species: RNS), 活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS), 活性カルボニル種 (reactive carbonyl species: RCS) などの活性分子種は酸化作用を有する生体内制御分子で

あり, Ca^{2+} シグナルとは「クロストーク」しながら厳密に制御されている。 Ca^{2+} 透過型陽イオンチャンネルを形成する TRP タンパク質は, Ca^{2+} シグナルと細胞刺激・環境との間の「クロストーク」を担う「分子実体」と考えら

れる。我々は、活性分子種シグナルと Ca^{2+} シグナルの「クロストーク」の分子実体として働く TRP チャネル群の同定を行ってきた。

TRPC5 は、脳及び血管内皮細胞に発現し、G タンパク質共役型受容体の刺激により制御されるイノシトールリン脂質代謝回転と連関し活性化する陽イオンチャネルとして同定された。我々は、TRPC5 が NO 適用によりシステイン S-ニトロシル化修飾を介して活性化することを見出した。NO による TRPC5 の活性化には、ボア領域に存在する 553 番目及び 558 番目に存在するシステイン残基 (Cys553, Cys558) が重要であり、これらに相当するシステイン残基は熱感知チャネルである TRPV1, TRPV3, TRPV4 にも保存され、実際、NO に対してこれらの TRP チャネルは反応性を示した。ウシ大動脈内皮細胞を用いた実験により、TRPC5 が受容体刺激時により産出された NO によりニトロシル化修飾を受け、細胞内に Ca^{2+} を流入させていることを明らかにした。これにより、内皮において TRPC5 は持続的な Ca^{2+} 流入及びそれに伴う内皮型 NO 合成酵素活性化を介した持続的な NO 産生を担う重要なチャネルであることが示唆された。

TRPA1 は、後根神経節細胞に高発現し、マスタードオイルに含まれる allyl isothiocyanate などによって活性化される。これら刺激性の化合物はシステイン残基を求電子的に攻撃し、共有結合を形成することで TRPA1 の活性化を引き起こすことが知られている。我々は、TRPA1

がこれらの外因性刺激性物質に加えて、NO, 過酸化水素, プロトン, 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J_2 (15d-PG J_2) などといった内因性炎症性物質によっても活性化されることを明らかにした。15d-PG J_2 による TRPA1 の活性化には細胞内アミノ末端領域の Cys421 及び Cys621 が、NO または過酸化水素による TRPA1 の活性化には Cys421, Cys641 及び Cys665 が、プロトンによる活性化には Cys421 がそれぞれ重要なシステイン残基であり、アゴニスト間で作用するシステイン残基が異なることを見出した。また、後根神経節細胞はこれらの炎症性物質により活性化され、その活性化には TRPA1 が重要であることを示した。以上、TRPA1 は外因性刺激物質を感知するだけではなく、内因性の刺激物質を感知し、炎症という情報を伝えていることが示唆された。

我々の研究により、一部の TRP チャネルは活性分子種感受性チャネルであることが明らかになった。活性分子種の特徴は酸化性であることから、我々はそれぞれの TRP チャネルが特有の酸化状態を感知し、活性化するのではないかと考えた。そこで、化合物の酸化・還元電位 (Redox Potential) と TRP チャネル活性化との相関を調べたところ、化合物の Redox Potential に依存した TRP チャネルの活性を見出した。このことは、生体内で様々な TRP チャネルがレドックス刺激に応じて異なる生理的役割を担っていることが示唆されたことになる。

(12) TRPM2チャネルの精神機能および慢性疼痛における役割：

TRPM2ノックアウトマウスを用いた行動解析

中川貴之¹, 白川久志¹, 前田早苗¹, 山口健太郎¹, 河本 愛¹, 草野綾香¹, 森 泰生², 金子周司¹

(¹ 京都大学 薬学研究科 生体機能解析学, ² 京都大学 工学研究科 合成生物化学)

TRPM2 チャネルは、家族性双極性障害の原因遺伝子探索の過程で見出され、中枢神経系を含め様々な組織に分布することが知られている。中枢神経系においては、我々は、過酸化水素などの酸化的ストレスにより TRPM2 を介した Ca^{2+} 流入が引き起こされ、神経細胞死が惹起されることを報告している。さらに最近、森研究室により TRPM2 ノックアウトマウスが作製され、炎症部位における単球/マクロファージからのケモカイン産生、好中球浸潤といった炎症反応過程の一部に重要な役割を果たして

いることなども明らかとなってきた。しかしながら、TRPM2 チャネルの生理的および病態生理的役割については、解析が開始されたばかりで、その多くはまだ明らかとなっていない。そこで本研究では、TRPM2 ノックアウト(KO)マウスを用いて様々な行動解析を行い、特に、当初注目されていた双極性障害などの精神疾患との関係を探るため精神機能の評価や、末梢組織や脊髄内での炎症反応が発症の要因となる慢性疼痛について検討を行った。

まず、体重、体温といった生理的パラメーター、さらに、自発運動量(locomotor test)や運動協調性(rotarod test)といった運動機能に、野生型およびKOマウス間で差は認められなかった。強制水泳試験法において、KOマウスで、無動作到達時間の延長、総無動作時間の短縮の傾向が認められた(うつ様行動減弱)。また、高架式十字迷路試験において、オープンアームでの滞在時間、侵入回数は両遺伝子型マウス間に差は見られなかったものの、クローズドアームへの侵入回数は有意な増加が認められた(探索行動上昇)。同様に、novel object recognition testにおいて、objectに対する探索行動の延長が認められた(探索行動上昇)が、新奇物質に対する認知記憶に差は認められなかった。さらに、Resident-intruder試験法における総攻撃時間、攻撃頻度は野生型に比べKOマウスで有意な延長及び増加がみられた(攻撃性増加)。以上の結果から、TRPM2遺伝子欠損により、うつ様行動の減弱、探索様行動の上昇、攻撃性の上昇が起こることが示唆された。これらの表現型は、双極性障害の躁状態に対応する行動異常の一面を表しているのかもしれない。

次に、痛覚に関する検討を行った。まず、hot plate test

(52°C), plantar test, von Frey filament testにおいて、正常のKOマウスでも、反応潜時の延長および逃避閾値の上昇が見られた。また、カラゲニンの足底内注射により惹起される炎症性疼痛モデルにおいて、熱性痛覚過敏および機械刺激アロディニアは、KOマウスにおいて有意に減弱されていた。さらに、KOマウスにおいては、カラゲニン注射による浮腫の形成、炎症部位におけるF4/80陽性成熟マクロファージ、Gr-1陽性好中球数の増加、さらに、炎症性サイトカイン(IL-1 β およびTNF- α)の産生といった炎症反応の抑制が認められた。同様に、坐骨神経部分結紮によって誘導される神経障害性疼痛モデルにおいて、機械刺激アロディニアの有意な減弱が認められた。また、神経障害性疼痛の誘導に重要な役割を果たすミクログリアの機能について、KOマウスから調整した培養ミクログリアを用いて検討したところ、ミクログリア活性化に伴うNO産生や貪食能などが抑制されていた。これらの結果から、TRPM2が単球/マクロファージやミクログリアといった免疫担当細胞の活性化に寄与し、炎症性疼痛や神経障害性疼痛の惹起に関与していることが示唆された。

(13) 炎症性疾患の発症と進展におけるTRPM2の役割

廣井理人¹, 山本伸一郎², 輪島輝明^{1,2}, 根来孝治³, 木内祐二¹, 森 泰生², 清水俊一¹
(昭和大学 薬学研究科¹病態生理学,²遺伝解析学,³京都大学 工学研究科合成生物化学)

Melastatin-like transient receptor potential channel 2 (TRPM2) は、酸化ストレスにより活性化され、細胞内にCa²⁺を流入させるイオンチャネルである。生体内では、好中球や単球などの炎症性細胞に発現している。TRPM2の生理的機能は、主に活性酸素誘発の細胞死を媒介することであると考えられていたが、我々は、TRPM2の活性化が単球におけるケモカイン産生を促進することを見出した。この発見は、TRPM2活性化が様々な炎症性疾患の発症や進展に関与している可能性を示すものである。そこで、本研究ではTRPM2欠損マウス(KOマウス)を用いて、慢性炎症性疾患として潰瘍性大腸炎、急性炎症性疾患として心臓の虚血-再灌流障害モデルを作製し、これら炎症性疾患におけるTRPM2の役割を検討した。

マウスにDSSを投与したところ、野生型マウス(WTマウス)では大腸に著しい好中球の浸潤が認められ、潰

瘍形成が誘発されたが、KOマウスで軽度であった。そこで、大腸におけるMIP-2量を測定したところ、KOマウスでは低値であった。以上の結果より、DSS誘発の潰瘍性大腸炎には、炎症部位で産生された活性酸素が、マクロファージにおけるMIP-2産生を亢進し、好中球の浸潤を促進することが関与していると考えられた。次に、心臓の虚血-再灌流障害について検討を行った。虚血-再灌流障害は、虚血組織を再灌流することにより組織障害が進行する現象であり、この過程には活性酸素やケモカイン、好中球の浸潤が深く関わっている。再灌流障害モデルは、左冠動脈を結紮することにより虚血を惹起させた後、その冠動脈の血流を再開することにより作製した。その結果、WTマウスでは、再灌流により梗塞巣の形成が認められたが、KOマウスではその形成が著しく抑制されていた。また、心臓への好中球の浸潤は、KO

マウスでは WT マウスに比べて低下していた。さらに、WT あるいは KO マウスより調製した顆粒球を KO マウスの心臓に導入したところ、WT マウス由来の顆粒球では梗塞巣が増加したが、KO マウス由来の顆粒球では軽度であった。再灌流による心筋壊死には、活性酸素によ

る好中球の TRPM2 活性化を介した好中球の浸潤促進が関与していると考えられた。以上のことから、TRPM2 は炎症性細胞のケモカイン産生や活性化を媒介することにより、慢性炎症性疾患及び急性炎症性疾患の発症や増悪に関与していることが明らかとなった。

(14) がん細胞の遊走と TRPV2

長澤雅裕, 小島 至, 中川祐子

(群馬大学 生体調節研究所 細胞調節分野)

TRP チャネルは、さまざまな生理的な機能を担っているばかりでなく、がん細胞において細胞増殖・浸潤・転移などの病態生理学的な役割も担っていることが報告されている。TRPV ファミリーのメンバーである TRPV2 は、小脳 Purkinje 細胞、肝臓・腎臓の上皮細胞、膵ランゲルハンス島の内分泌細胞、消化管の神経内分泌細胞、肺・脾臓のマクロファージ、白血球などに多く発現している。マクロファージでは、TRPV メンバーのなかでも特に TRPV2 が高発現し、血清・fMLP 刺激でチャネルの一部が細胞膜に移行して、持続的な細胞内カルシウムの上昇を生じる。さらに、その細胞膜上の局在の検討により、

TRPV2 が focal complex の特殊な形態であるポドソームに局在して、マクロファージにおける細胞接着・細胞運動を制御していることを報告してきた。さらに、我々は様々ながん細胞株における TRPV2 の発現の検討を行い、ヒトのメラノーマ細胞株や線維肉腫細胞株においても TRPV2 が高発現していることを見いだした。そこでこれらの細胞株における TRPV2 による細胞内カルシウムの調節、チャネルの局在、TRPV2 ノック・ダウンによる細胞形態・細胞機能の変化について検討をした。その結果、TRPV2 はがん細胞においても、細胞の接着・遊走を制御していることが明らかになった。

(15) Orai1 チャネル三次元構造の解明

丸山雄介¹, 小椋俊彦¹, 三尾和弘¹, 加藤賢太², 金子 雄², 清中茂樹², 森 泰生², 佐藤主税¹

(¹産業技術総合研究所 脳神経情報研究部門, ²京都大学 工学研究科 合成生物化学)

Ca²⁺は細胞内において主に小胞体に貯蔵されており、各種刺激により Ca²⁺が細胞質へと放出される。この放出が長く続くと小胞体内部の Ca²⁺は枯渇し、その枯渇刺激により細胞外から Ca²⁺流入が起きる。この流入を担うチャネルとして、細胞膜にある Ca²⁺放出活性化 Ca²⁺ (CRAC) チャネルが注目を集めている。CRAC チャネルは免疫応答と深い関連があることが報告されている。最近、このチャネルを構成する二つの主要なサブユニットが明らかとなった。すなわち、細胞膜上のチャネルポアとなる Orai1 と、小胞体膜上で Ca²⁺枯渇を感受する STIM1

である。しかしそのチャネル活性化機構や構造的基盤は、未だ不明な点が多い。そこで本研究では、四量体 Orai1 タンパク質を発現・精製し、その電顕画像から三次元構造を 21Å 分解能で再構成した。Orai1 分子は高さ 150Å、幅 95Å の水滴形をしていた。抗体やレクチンを用いてラベルした Orai1 分子を電顕観察することにより、水滴形の先細りの側が細胞質に、丸い側が細胞外にあり、その間の幅広い部分が膜貫通領域であると推定した。この先細りの細胞質領域は長さ 100Å であり、STIM1 と直接結合するためには十分に長いと思われる。

(16) 毛様体筋収縮調節に関与する非選択性陽イオンチャネルの分子候補としての TRPC と Orai1

高井 章, 宮津 基, 石居信人, 荻野 大
(旭川医科大学 生理学講座 自律機能分野)

一般に M3 型ムスカリン受容体 (M₃R) の刺激によって起こる生体反応は, G_{q/11} 蛋白 (G_{q/11}) に共役した信号伝達経路を介して現れるが, その下流に接続する系の本体については必ずしも明確でない場合が多い。視覚遠近調節を司る毛様体筋はほぼ純粋に副交感神経支配の平滑筋であり, しかもその収縮は専ら伝達物質アセチルコリンによる M₃R への刺激の増減に基づいて制御されている。われわれは, この恰好のモデル系を用い, M₃R から収縮蛋白系に至る信号の流れとそれを担う分子を探求してきた。今回は, これまで主にウシ毛様体筋を用いて行ってきた研究の成果として得られた次のような知見について紹介する。(a) 毛様体筋は, M₃R 刺激に伴い平滑筋としては非常に速やかに収縮し (初期相), その後刺激の続く限り一定の張力を保持し続ける (持続相) という特性があり, それが迅速で安定な焦点調節を可能にしている。初期相の形成に必要な細胞内 Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i) の急速上昇は, G_{q/11} 経路で活性化される phospholipase Cβにより産生される IP₃ が筋小胞体 (SR) からの Ca²⁺遊離を起すことによる。毛様体筋 SR にはそのほか, [Ca²⁺]_i 上昇によ

り開く ryanodine 感受性の Ca²⁺放出経路も存在する。(b) 収縮持続相は細胞外からの持続的な Ca²⁺流入を必要とするが, 毛様体筋細胞膜には膜電位依存性 Ca²⁺チャネルはほとんど発現しておらず, 主な流入経路として機能するのは単位コンダクタンスの大きく異なる 2 種類の非選択性陽イオンチャネル (NSCCL と NSCCS) である。毛様体筋細胞膜には少なくとも 4 種類の TRPC チャネル蛋白 (TRPC1, 3, 4 & 6) が発現していることを確認しているが, そのいくつかは NSCCL または NSCCS の本体または構成要素である可能性がある。M₃R 刺激が NSCCS を開口させるのも G_{q/11} を介する信号を介してであり, その際 SR における Ca²⁺枯渇によって活性化されるいわゆる SOC 機構が関与するらしい。SR/形質膜領域には, SOC 機構との関連で注目されている STIM-1 と Orai1 が多く存在する。(c) 毛様体筋において M₃R/G_{q/11} からの信号は, 遊離と流入に伴う [Ca²⁺]_i 上昇を引き起すのと並行して, RhoA/Rho-kinase 系を介して収縮蛋白系の Ca²⁺感受性を高める現象 (いわゆる Ca sensitization) を起す。

(17) PKG リン酸化を介した心血管 Ca²⁺流入チャネル TRPC6の短期・長期制御機構

井上隆司¹, 菅 忠¹, 海 琳¹, 高橋眞一¹, 本田 啓¹, 森 誠之¹, 森 泰生²
(¹福岡大学 医学研究科 細胞分子制御学, ²京都大学 工学研究科 合成生物化学)

TRPC6 is a ubiquitous and predominant isoform expressed in vascular smooth muscle cells (VSMCs) and has been implicated in the regulation of vascular tone and remodelling via neurohormonal and mechanosensitive mechanisms. Although these two mechanisms are generally thought to work independently, our recent investigation has revealed that TRPC6 channel is synergistically activated by receptor and mechanical stimulations via the phospholipase C/G_q-protein/diacylglycerol and phospholipase A₂/ω-hydroxylase/20-hydroxyeicosatetraenoic acid pathways. Experiments with pressurized mesenteric artery have suggested that this

synergism likely contributes to enhanced myogenic responsiveness under near-threshold receptor stimulation. Different lines of evidence also suggest that TRPC6 channel is subject to both positive and negative regulation via activation of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase (CAMKII), and protein kinases C (PKC) and G (PKG); while CAMKII- and PKC-mediated phosphorylation accelerates the time courses of TRPC6 activation and inactivation during receptor stimulation respectively, activation of PKG via stimulation of the nitric oxide or atrial natriuretic peptide/guanylate cyclase/cGMP pathway tonically suppresses TRPC6 channel

activity through its phosphorylation on T69, regardless of receptor or mechanical stimulation. Interestingly, prolonged activation of PKG (10-20min) reactivated TRPC6 channel rendering it spontaneously active with loss of receptor- and mechano-sensitivities. Disruption of actin cytoskeleton by cytochalasin D treatment induced similar consequences. It can

be speculated that phosphorylation of TRPC6 channel by PKG may not only cause an acute tonic inhibition of the channel activation by neurohormonal and mechanical stimuli, but also induce a slow transition between differential activation modes, presumably altering the VSMC phenotype from 'contractile' to 'proliferative' ones.

21. 痛みの病態生理と神経・分子機構

2009 年 12 月 10 日－12 月 11 日

代表・世話人：倉石 泰（富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学研究室）

所内対応者：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）

（1）教育講演 1：TRP チャネルと痛み

富永真琴（岡崎統合バイオサイエンスセンター細胞生理部門）

（2）表皮内電気刺激を用いた細径神経線維機能評価法

大鶴直史^{1,2}，乾 幸二¹，山代幸哉^{1,2}，宮崎貴浩^{1,2}，竹島康行¹，柿木隆介^{1,2}

（¹生理学研究所統合生理研究系感覚運動調節部門，

²総合研究大学院大学生命科学研究科生理科学専攻）

（3）加齢ラットの皮膚 C 線維侵害受容器の反応性と侵害受容逃避閾値の比較

田口 徹，太田大樹，松田 輝，村瀬詩織，水村和枝

（名古屋大学環境医学研究所神経系分野 II）

（4）レーザー痛覚刺激の事象関連電位に対するニコチンの影響

宮崎貴浩，乾 幸二，柿木隆介（生理学研究所統合生理研究系感覚運動調節研究部門）

（5）痛みによる不快情動生成における分界条床核内グルタミン酸神経情報伝達の役割

南 雅文（北海道大学大学院薬学研究院薬理学研究室）

（6）神経因性疼痛時におけるリゾホスファチジン酸依存的な脱髄現象

永井 潤，植田弘師（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科分子薬理学分野）

（7）侵害刺激が TRPV1 以外でも感じられる可能性について

樋浦明夫¹，中川 弘²（¹徳島大学歯学部口腔解剖学教室，²小児歯科学教室）

（8）GPR103 の内因性作動物質である 26RFa の神経障害性疼痛に対する鎮痛効果

山本達郎，宮崎里佳（熊本大学大学院医学薬学研究部生体機能制御学）

（9）抗癌薬投与マウスにおける冷刺激に対する疼痛様反応とその機序

安東嗣修，溝口静香，プナムガウチャン，倉石 泰

（富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学研究室）

（10）過敏性腸症候群モデルマウスに生じる大腸の痛覚過敏にたいする P2X 受容体の役割

篠田雅路^{1,2}，Bin Feng²，Jun-Ho La²，Klaus Bielefeldt²，G.F. Gebhart²

（¹日本大学歯学部生理学教室，

²Center for Pain Research, University of Pittsburgh School of Medicine）

（11） α_2 アドレナリン受容体関連物質による坐骨神経の複合活動電位抑制

水田恒太郎¹，小杉寿文^{1,2}，藤田亜美¹，上村聡子¹，八坂敏一¹，熊本栄一¹

（¹佐賀大学医学部生体構造機能学講座神経生理学分野，²佐賀県立病院好生館緩和ケア科）

（12）教育講演 2：筋性疼痛の発生メカニズム

水村和枝（名古屋大学環境医学研究所神経系分野 II）

（13）繰り返し冷温ストレスによる線維筋痛症モデルの有用性

西依倫子，植田弘師（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科薬理学分野）

- (14) 末梢性動脈閉塞症モデルラットにおける痛覚過敏のメカニズムの解析
堀紀代美^{1,2}, 尾崎紀之³, 鈴木重行⁴, 杉浦康夫¹
(¹名古屋大学大学院医学系研究科機能形態学講座 (機能組織学分野),
²名古屋大学医学部附属病院医療技術部リハビリ部門,
³金沢大学医薬保健研究域医学系神経分布路形態・形成学分野,
⁴名古屋大学大学院医学系研究科リハビリテーション療法学専攻理学療法学分野)
- (15) 帯状疱疹痛マウスモデルにおける自発痛関連行動の評価とその特徴
佐々木淳, 下田倫子, 金山翔治, 安東嗣修, 倉石 泰
(富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学研究室)
- (16) 帯状疱疹痛マウスモデルの脊髄後角広作動域ニューロン及び
末梢神経の機械刺激に対する興奮性の変化
西川幸俊, 佐々木淳, 野島浩史, 安東嗣修, 倉石 泰
(富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学研究室)
- (17) 教育講演3: 骨がん疼痛発生メカニズムと治療標的分子
川股知之 (札幌医科大学医学部麻醉学講座)
- (18) ラット脊髄後角膠様質細胞の形態学的・電気生理学的特性と含有神経伝達物質及び
神経修飾物質に対する応答の相関関係
八坂敏一^{1,2}, Sheena Y. X. Tiong², David I. Hughes², John S. Riddell²,
藤田亜美¹, 熊本栄一¹, Andrew J. Todd²
(¹佐賀大学医学部生体構造機能学講座, ²グラスゴウ大学生物医学生命科学研究所脊髄グループ)
- (19) ラット脊髄後角の痛み伝達制御におけるガラニンの役割
ー興奮性および抑制性のシナプス伝達に対する作用
熊本栄一, 岳 海源, 藤田亜美, 朴 蓮花, 青山貴博, 井上将成, 八坂敏一
(佐賀大学医学部生体構造機能学講座)
- (20) 末梢神経損傷後に発症したアロディニアの維持機構における STAT3 の役割
津田 誠, 高露雄太, 矢野貴之, 辻川智子, 北野順子, 齊藤秀俊, 井上和秀
(九州大学大学院薬学研究院薬理学分野)

【参加者名】

南 雅文 (北海道大学, 薬理学), 川股知之 (札幌医科大学), 古瀬晋吾 (中村記念病院), 岩田幸一, 篠田雅路, 本田訓也 (日本大学, 生理学), 田中 聡, 望月憲招, 井出 進, 田中秀典 (信州大学, 麻醉蘇生学), 水村和枝, 片野坂公明, 田口 徹, 村瀬詩織, 太田大樹, 鈴木実佳子, 那須輝顕, 松田 輝, 久保亜抄子 (名古屋大学, 神経系分野 II), 杉浦康夫, 安井正佐也, 堀紀代美, 林 功栄 (名古屋大学, 機能形態学), 肥田朋子 (名古屋学院大, リハビリテーション学科), 富永真琴, 山中章弘, 曾我部隆彰, 齋藤 茂, Boudaka Ammar, 小松朋子, 梅村 徹, 内田邦敏, 加塩麻紀子, 常松友美, 周 一鳴, 高山靖規, 川口 仁, 三原 弘, 水野秀紀 (岡崎統合バイオサイエンスセンター, 細胞生理), 古江秀昌, 杉山大介, 柳澤義

和, 歌 大介, 井本敬二 (生理学研究所, 神経シグナル研究), 古家園子 (生理学研究所, 形態情報解析), 金 義光 (生理学研究所, 生体恒常機能発達機構), 大鶴直史, 宮崎貴浩, 柿木隆介 (生理学研究所, 感覚運動調節研究), 尾崎紀之 (金沢大学, 神経分布路形態・形成学), 倉石 泰, 安東嗣修, 佐々木淳, 西川幸俊, 後藤義一, 下田倫子, 金山翔治, 溝口静香 (富山大学, 応用薬理学), 樋浦明夫 (徳島大学, 口腔解剖学教室), 井上和秀, 津田 誠, 高露雄太 (九州大学, 薬理学), 本多健治, 中島茂人 (福岡大学, 生体機能制御学), 熊本栄一, 藤田亜美, 八坂敏一, 水田恒太郎, 井上将成 (佐賀大学, 生体構造機能学), 西依倫子, 永井 潤, 植田弘師 (長崎大学, 分子薬理学), 山本達郎 (熊本大学, 生体機能制御学), 稲葉さやか, 小

坂七重（花王株式会社）、猪股裕二（田辺三菱製薬（株））、小川侑記（ライオン株式会社）、今井利安（日本ケミファ株式会社）、小林 護、小林淳一（キッセイ薬品工業（株））、渡邊修造（ラクオリア創薬（株））、藤田真英（塩野義製

薬（株））、臼井健司、阪田昌弘（日本たばこ産業（株））、藤田郁尚（（株）マンダム）、石田康直、田口一貴（日本臓器製薬（株））、森本 缶（東レ（株））、三浦陽介（金印（株））、水口洋子（基礎生物学研究所）

【概要】

本研究会は、神経障害性疼痛、炎症性疼痛、癌性疼痛などの痛みの病態生理の研究者と痛みの神経機構・分子機構の研究者が一堂に会して、研究成果を発表し、意見・情報交換を行うことを目的とした。教育講演は、3つのテーマを選定した。富永真琴先生（生理研）は感覚神経の侵害受容機序の理解に必須の TRP チャネル、特に TRPV1 と TRPA1 の機能について解説された。水村和枝先生（名大）は、遅発性筋痛の動物モデルと COX-2、ブラジキニン、NGF、GDNF などの因子の関与について紹介された。また、川股知之先生（札幌医大）は、がん疼痛の中でも難治性である骨がん疼痛について、その発生機序と治療標的分子について紹介された。教育講演は、若手の疼痛研究者への情報提供を主目的に実施したが、その目的を十分に果たせた内容であった。一般演題は、疼痛性疾患に関するものと疼痛の基礎研究に関するものに大別される。疼痛性疾患に関するものでは、末梢神経

障害（末梢神経の脱髄、抗がん薬の副作用、帯状疱疹など）関係が5題と最も多く、筋性疼痛、内臓痛と末梢性動脈閉塞症に関して各1題が発表された。疼痛の基礎研究に関するものでは、感覚神経の侵害受容（細径線維の選択的な電気刺激法やC線維の加齢変化など）に関するものが3題と最も多く、脊髄後角ニューロンの神経ペプチドに対する反応に関するもの2題が続き、末梢神経への薬物作用、末梢刺激に対する脳誘発電位、および疼痛と情動に関するものが各1題であった。十分な発表時間を設け研究の背景から説明していただくことにより、専門外の研究内容についても理解を深めることが出来た。なお、本研究会のテーマを疼痛関係の研究を広範囲に含むものとしたことで、一般演題の内容も広範囲に及んだが、疼痛性疾患に関するものでは末梢神経障害に関するものが最も多かったことは、最近の疼痛研究の現状を反映したものであろう。

（1）教育講演1：TRP チャネルと痛み

富永真琴（岡崎統合バイオサイエンスセンター細胞生理部門）

感覚神経終末で侵害刺激を受容する（侵害刺激を電気信号に変換する）最も簡単で有効なメカニズムは、陽イオンの流入がもたらす脱分極によって電位作動性 Na^+ チャネルを活性化させて、活動電位を発生させることである。その陽イオンの流入を司る陽イオン透過性のイオンチャネルの多くは高い Ca^{2+} 透過性をもち、その中心的分子が TRP (Transient Receptor Potential) スーパーファミリーに属するカプサイシン受容体 TRPV1 とワサビ受容体 TRPA1 である。

トウガラシの辛み主成分であるカプサイシンの受容体として1997年に単離された TRPV1 は Ca^{2+} 透過性の高い非選択性陽イオンチャネルであり、カプサイシンと同様に生体に痛みを惹起する熱や酸（プロトン）によっても活性化する。その他、多くの有効刺激が報告されてお

り、様々な活性化メカニズムが明らかになっている。TRPV1 欠損マウスの解析から個体レベルでの関与が明らかになっており、TRPV1 を標的とした鎮痛薬の開発が世界中で進められている。侵害冷刺激受容体として2003年に報告された TRPA1 は、その後、ワサビの辛み成分 allyl isothiocyanate の受容体としても機能することが明らかになった。現在までに様々な刺激物質が明らかになっており、その構造基盤もいくらか解明されている。欠損マウスの解析から TRPA1 が侵害刺激受容体として機能することは確認されたが、冷刺激感受性については結論が得られていない。いずれにせよ、TRPA1 が侵害刺激受容に関わっていることは明らかであり、その発現も感覚神経に限局していることから、TRPA1 が TRPV1 に次ぐ新たな鎮痛薬開発のターゲットになることは間違いない

と思われる。

このような感覚神経終末で侵害刺激受容に関わる

TRPV1 と TRPA1 について、自身のデータも含めて最近の知見を紹介したい。

(2) 表皮内電気刺激を用いた細径神経線維機能評価法

大鶴直史^{1,2}, 乾 幸二¹, 山代幸哉^{1,2}, 宮崎貴浩^{1,2}, 竹島康行¹, 柿木隆介^{1,2}

(¹生理学研究所統合生理研究系感覚運動調節部門,

²総合研究大学院大学生命科学研究科生理科学専攻)

【目的】皮膚細径神経線維 (A δ , C 線維) の機能を選択的に評価する方法は確立されていない。特に電気刺激では A β 線維などのより太い神経線維の活動混入のために、選択的な細径神経線維刺激は困難であるとされてきた。今回、我々の研究室で考案した表皮内電気刺激 (IES) が細径神経機能評価に有用であるかを検討した。

【方法】第1実験: リドカインテープの経皮的貼付による細径神経障害モデルを用い、IES が皮膚表層の A δ 線維機能評価に有用であるかを検討した。比較対象として経皮電気刺激 (TS) を用いた。まず、リドカイン貼付による閾値変化を貼付前、1, 3, 5 時間貼付後に各刺激を用いて測定した。また、さらなる客観的な指標として各刺激に対する事象関連電位 (ERP) を、貼付前、5 時間貼付後に脳波計を用いて記録した。第2実験: IES を用い C 線維の

選択的刺激方法の考案を試みた。特殊な電気刺激パラメーターを用い、手背および前腕刺激に対する ERP を記録した。

【結果】第1実験: IES に対する閾値は、貼付前と比較し 5 時間貼付後に著明な増大を示し、ERP は消失した。一方、TS に対する閾値および ERP には変化が認められなかった。第2実験: 各刺激部位 (手背、前腕) に対する ERP 成分 (P1) の潜時差から算出した神経伝導速度は約 1.5m/s であった。

【考察】第1実験: IES は、従来の電気刺激 (TS) では検出できない皮膚表層の A δ 線維機能障害を捉えるのに有用であることを示した。第2実験: 特殊な電気刺激パラメーターを用いることで、IES により C 線維の選択的刺激が行える可能性を示した

(3) 加齢ラットの皮膚 C 線維侵害受容器の反応性と侵害受容逃避閾値の比較

田口 徹, 太田大樹, 松田 輝, 村瀬詩織, 水村和枝 (名古屋大学環境医学研究所神経系分野 II)

本研究では加齢による皮膚侵害受容器の変化を調べるため、ラット皮膚-伏在神経取出し標本を用い、神経幹への電気刺激により単一 C 線維受容器を同定し、種々の反応性を若齢群 (9-14 週齢) と老齢群 (129-138 週齢) との間で比較した。電気的に同定した C 線維のうち機械感受性のあるものの割合は若齢群 (49%) に比べて老齢群 (27%) で有意に低かった。さらに、機械感受性 C 線維侵害受容器のうち、老齢群の機械刺激に対する反応閾値は有意に高く、生じた活動電位数は有意に小さかった。この結果は、機械刺激で受容器をサーチした以前の実験結果 (機械反応性に有意な差はない) と異なっていた。本シリーズでは機械閾値の低い受容器が欠落していたため

と推定された。両実験シリーズを合わせると機械反応性に有意な差はない。しかし、老齢ラットでは C 線維全体のうち機械感受性をもつ線維の割合が低下していたことを考慮すると、機械刺激による侵害受容器の放電総数は減少していると考えられる。また、ブラジキニンや冷刺激に対する反応には差がなく、熱反応の大きさは老齢群で低下する傾向がみられた。一方、行動実験では von Frey テストによる機械逃避閾値は 2 群間で差がなく、Cold plate テストによる逃避行動は老齢群で有意に亢進し、Hargreaves テストによる熱逃避閾値は老齢群で有意に低下した。このように老齢ラットでは侵害刺激に対する C 線維侵害受容器の反応性は減弱傾向であるのに対し、侵

害受容行動レベルでは亢進傾向であるのは、中枢神経系での変化（例えば、下行性疼痛抑制系の機能低下）が大

きく影響しているものと考えられる。

(4) レーザー痛覚刺激の事象関連電位に対するニコチンの影響

宮崎貴浩，乾 幸二，柿木隆介（生理学研究系統合生理研究系感覚運動調節研究部門）

レーザー誘発電位は、レーザーによる皮膚侵害受容器の選択的刺激により得られる事象関連電位である。レーザー刺激はその照射面積、強度を適切に調節することにより、A δ 、C 線維を別々に刺激することができる。レーザー誘発電位の N2, P2 成分は、それぞれ島弁蓋部および帯状回の活動を反映すると考えられているが、その振幅は主観的な痛覚強度を反映していると考えられている。一方、喫煙およびニコチンは、マウス、ラット、ウサギなどで強力な痛覚抑制効果を持つことが示されているが、ヒトでの効果に関しては結論が一致していない。本実験では、レーザー誘発電位の変化を計測することにより、喫煙・ニコチンの痛覚認知に与える影響を評価した。

被験者は実験前日より禁煙し、当日にニコチン 1mg を含有するタバコを 1 本喫煙した。A δ 、C 線維それぞれについてレーザー誘発電位を喫煙前、喫煙 5 分、20 分、35 分、60 分後の計 5 回測定した。コントロールとして別日に、喫煙せずに同様の測定を行った。実験中血漿中ニコチン濃度を継続的に測定した。また実験中の覚醒度の指標として、背景脳波活動の α 帯域成分の周波数を測定した。喫煙・ニコチンは A δ 線維の誘発電位の振幅を減少させたが、C 線維の誘発電位の振幅は、むしろ覚醒度に関連して増加することが示唆された。これらのことから、喫煙・ニコチンの作用が末梢神経線維あるいは痛みの質の差によって異なることが示唆された。

(5) 痛みによる不快情動生成における分界条床核内グルタミン酸神経情報伝達の役割

南 雅文（北海道大学大学院薬学研究院薬理学研究室）

「痛み」は痛いという感覚的成分と、不安、嫌悪、抑うつといった情動的成分よりなるが、情動的成分を担う物質的基盤に関する研究は未だ緒についたばかりである。我々はこれまでに、腹側分界条床核 (vBNST) における β アドレナリン受容体を介したノルアドレナリン神経情報伝達亢進が、痛みによる不快情動生成に重要であることを報告している (J. Neurosci., 28: 7728-7736 (2008))。また、昨年の本研究会では、背外側分界条床核 (dlBNST) におけるコルチコトリピン放出因子 (CRF) 神経情報伝達が、痛みによる不快情動生成に関与していることを示した。本研究では、vBNST 内グルタミン酸神経情報伝達が痛みによる不快情動生成に関与するか否かについて検討

した。実験には雄性 SD 系ラットを用い、条件付け場所嫌悪性 (CPA) 試験により不快情動生成の評価を行った。NMDA 受容体拮抗薬 MK-801 あるいは AMPA 受容体拮抗薬 CNQX の vBNST 内局所投与により、ホルマリン後肢足底内投与により惹起される CPA が用量依存的に減弱した。また、逆行性・順行性トレーサーと免疫染色を組み合わせた実験から、外側結合腕傍核 PBL から vBNST にグルタミン酸神経が投射していることが明らかとなった。以上の結果から、PBL から vBNST に投射するグルタミン酸神経の活動亢進が痛みによる不快情動生成に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

(6) 神経因性疼痛時におけるリゾホスファチジン酸依存的な脱髄現象

永井 潤, 植田弘師 (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科分子薬理学分野)

我々は、末梢神経障害によって生じる神経因性疼痛の初発原因分子として、脂質メディエーターであるリゾホスファチジン酸 (LPA) を同定した (Nature Medicine, 2004)。この分子は LPA₁ 受容体に働き、疼痛関連分子の発現増加や知覚神経の脱髄現象を誘発する。脱髄現象は、その後に生ずるスプラウティング (異常突起伸展) によって、触覚線維と痛覚線維の機能的混線を介して、アロディニア現象の分子基盤となると考えられる。本研究では、脱髄の局在性およびスプラウティングの実験的証拠を得ることを目的とした。まず、脱髄の局在性を明らかにするために、C57BL/6J 系雄性マウスの坐骨神経部分結紮モデルを用いて、坐骨神経、脊髄神経、後根神経のミエリン形態を解析した。その結果、障害部位である坐骨

神経に加えて、後根神経において脱髄が観察された。一方、LPA₁ 受容体遺伝子欠損マウスでは、後根神経における脱髄が消失することを見出した。また、各領域の神経線維を用いた ex vivo 培養実験では、LPA はいずれの領域においても脱髄を誘発した。このことは、神経因性疼痛時における LPA の産生部位が脊髄側に局所的に生じていることを示唆している。次に、スプラウティングを実証するために、神経突起伸展のマーカー分子 GAP43 を用いて解析を行った。その結果、神経障害後の後根神経において GAP43 の発現増加が観察された。以上の研究結果から、神経障害時では LPA 依存的に脊髄後根部の脱髄が生じ、さらにその部位ではスプラウティングが生じることが強く示唆された。

(7) 侵害刺激が TRPV1 以外でも感じられる可能性について

樋浦明夫¹, 中川 弘² (¹徳島大学歯学部口腔解剖学教室, ²小児歯科学教室)

生後早期にカプサイシンを投与して、カプサイシン感受性小型ニューロンが約 70% 消失したマウスは侵害熱刺激に正常に反応する。また、最近 TRPV1 のノックアウトマウスでも侵害熱刺激に正常に反応するという複数の報告がある。TRPV1 が唯一の侵害熱刺激受容体であるなら、このような矛盾した現象は起こらないと考えられる。従って、Woodbury et al. (2004) は TRPV1, 2 に依存しない正常な状態で侵害熱刺激を感じる機構と、TRPV1 に依存する炎症や神経損傷などの病的な状態で侵害熱刺激を感

じる機構の 2 つのメカニズムを提唱した。上記のパラドックスを TRPV1 以外の一次知覚ニューロンの関与で説明することが可能であるか否かを、最近の報告を基に論じたい。つまり、カプサイシン感受性の小型ニューロンが大量に脱落したマウスと TRPV1 欠損マウスに見られる、侵害熱刺激に反応するという矛盾が同一の視点で説明できるかどうかについての試論といえる。率直なご意見を仰ぎたい。

(8) GPR103 の内因性作動物質である 26RFa の神経障害性疼痛に対する鎮痛効果

山本達郎, 宮崎里佳 (熊本大学大学院医学薬学研究部生体機能制御学)

GPR103 は orexin, neuropeptide FF と相同性の高い G 蛋白共役型受容体である。その内因性作動物質として 26RFa, QRFP が知られている。26RFa は NPY Y1 受容体, NPFF2 受容体にも作用することが示されている。今まで

26RFa をラット髄腔内、脳室内へ投与すると、ホルマリントで良好な鎮痛効果を発揮することを報告してきた。今回、26RFa を髄腔内投与もしくは脳室内投与し、神経障害性疼痛に対する鎮痛効果を検討したので報告す

る。

神経障害性疼痛モデルとして、ラット坐骨神経部分結紮モデルを用いた。髄腔内投与には、Yaksh らの方法により腰膨大部近傍の髄腔内へ留置したカテーテルを介して行った。脳室内投与は、側脳室留置したカニューレを介して行った。神経障害性疼痛の程度は、神経障害後に発症するアロディニアの程度により行った。

26RFa は、髄腔内投与・脳室内投与いずれでも投与量依存性にアロディニアの程度を抑制した。また 26RFa の

効果は、NPY Y1 受容体・NPFF2 受容体の拮抗薬である BIBP3226 により拮抗されなかった。

今回の結果から、髄腔内・脳室内 26RFa 投与により神経障害性疼痛に対する鎮痛効果が確認され、この効果は GPR103 を介する可能性が高いことが示された。

参考文献

Neuroscience 157(2008)214-222; Peptides 30 (2009) 1683-1688

(9) 抗癌薬投与マウスにおける冷刺激に対する疼痛様反応とその機序

安東嗣修, 溝口静香, プナムガウチャン, 倉石 泰
(富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学研究室)

我々は、これまでに、白金製剤オキサリプラチンとタキサン系薬パクリタキセルをマウスに投与すると、10～14 日をピークとする冷アロディニアが誘発されることを報告した。ところで、オキサリプラチンは、投与患者に冷刺激に対する急性の知覚過敏も引き起こす。そこで、本研究では、オキサリプラチン及びパクリタキセルが冷刺激に対する知覚過敏反応（冷アロディニア）を引き起こすか、また、その反応に transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) が関与しているか検討した。実験には雄性 C57BL/6 系マウスを用いた。ヒトの臨床用量に相当する用量のオキサリプラチン (3mg/kg) 及びパクリタキセル (5mg/kg) を単回腹腔内注射した。マウス後肢足蹠へアセトンの小球を軽く当てて冷刺激を加え、その反応から冷アロディニアを評価した。オキサリプラチンは、3

日目をピークとして 7 日後には回復する冷アロディニアを生じた。一方、パクリタキセルは冷アロディニアを引き起こさなかった。オキサリプラチンによる冷アロディニアは、TRPM8 拮抗薬 N-(2-aminoethyl)-N'-[4-(benzyloxy)-3-methoxybenzyl]-N'-(1S)-1-(phenyl) ethyl] urea hydrochloride により抑制された。また、後根神経節での TRPM8 mRNA の発現を RT-PCR 法で測定したところ、オキサリプラチン投与後 3 日目に有意に発現が増加した。一方、パクリタキセルでは発現増加が観察されなかった。以上の結果より、オキサリプラチンに特有の急性冷アロディニアがマウスでも観察され、その作用には少なくとも一次感覚神経における TRPM8 の発現増加が関与すると示唆される。

(10) 過敏性腸症候群モデルマウスに生じる大腸の痛覚過敏にたいする P2X 受容体の役割

篠田雅路^{1,2}, Bin Feng², Jun-Ho La², Klaus Bielefeldt², G.F. Gebhart²

(¹ 日本大学歯学部生理学教室, ² Center for Pain Research, University of Pittsburgh School of Medicine)

過敏性腸症候群は大腸に器質的な変化が認められないにもかかわらず、慢性的な痛みや痛覚過敏が生じる疾患である。われわれは過敏性腸症候群モデルマウスを作成し、大腸の伸展にたいする痛覚過敏への P2X 受容体の役割を検討した。

zymosan の大腸管腔への 3 日間連続投与 (300 µg/day) により、大腸に組織学的変化がみとめられないにもかかわらず投与終了後 1 日目より大腸に伸展にたいする痛覚過敏が生じた。P2X₃ KO マウスでは zymosan 投与による大腸の痛覚過敏は生じなかった。大腸に伸展によってお

この P2X 受容体の内因性リガンドである ATP の腸管への遊出量は zymosan 投与により変化せず、また P2X₃ KO マウスにおいても変化しなかった。大腸壁にあらかじめ逆行性トレーサー (DiI) を投与し、zymosan 投与後 1 日目に後根神経節 (T11-L1, L6-S2) をそれぞれ急性単離し、whole cell patch clamp 法を用いて DiI 標識ニューロンの興奮性の変化を記録した。両後根神経節において、zymosan 投与により DiI 標識ニューロンの静止膜電位が上昇し、

Purinergic agonists (ATP, α,β -meATP) によって引き起こされる fast currents (P2X₃ 依存性) の ED₅₀ が減少した。さらに zymosan 投与により、両後根神経節における P2X₃ 陽性大腸投射ニューロン数は変化しなかった。

よって、zymosan 投与による過敏性腸症候群モデルマウスに生じる大腸の痛覚過敏は、大腸投射ニューロンの興奮性の増大と P2X₃ 受容体の過敏化により引き起こされる。(Shinoda et al., Gastroenterology, 2009, in press)

(11) α_2 アドレナリン受容体関連物質による坐骨神経の複合活動電位抑制

水田恒太郎¹, 小杉寿文^{1,2}, 藤田亜美¹, 上村聡子¹, 八坂敏一¹, 熊本栄一¹

(¹ 佐賀大学医学部生体構造機能学講座神経生理学分野, ² 佐賀県立病院好生館緩和ケア科)

麻酔・集中治療領域で鎮静薬および鎮痛薬として使用されているデクスメデトミジンは α_2 アドレナリン受容体の活性化を介して脊髄レベルで鎮痛作用を引き起こすことが知られている。一方、デクスメデトミジンを始めとするアドレナリン受容体作動薬は、局所麻酔作用の増強を目的として局所麻酔薬の補助薬として用いられている。この増強の作用機序として血管収縮や伝導遮断などが考えられている。アドレナリン受容体作動薬の伝導遮断作用を詳しく検討するために、デクスメデトミジンが複合活動電位 (CAP) にどのような作用を及ぼすかを調べた。実験は、トノサマガエルの坐骨神経に air-gap 法を適用して CAP を記録することにより行った。デクスメデトミジンは可逆的かつ濃度依存性に CAP の振幅を減少させた (IC₅₀ = 0.43 mM)。この効果は α_2 受容体拮抗薬のヨヒ

ンビンやアチパメゾールにより拮抗されず、アチパメゾールそれ自身で CAP を抑制した。他の α_2 受容体作動薬について、クロニジンは最大 20 % の抑制、オキシメタゾリン はデクスメデトミジンより低い効率の抑制を示した (IC₅₀ = 1.5 mM)。一方、アドレナリンやノルアドレナリン、 β 受容体作動薬イソプロテレノールおよび α_1 受容体作動薬フェニレフリン (それぞれ 1 mM) は CAP に影響しなかった。以上よりデクスメデトミジンは α_2 受容体の活性化を介さずに CAP を抑制することが明らかとなった。デクスメデトミジン、オキシメタゾリンおよびアチパメゾールのような α_2 アドレナリン受容体関連物質に共通した化学構造が伝導遮断に重要な役割を果たすことが示唆された。この結果は強い伝導遮断作用をもつ局所麻酔補助薬を開発するのに役立つことが期待される。

(12) 教育講演2：筋性疼痛の発生メカニズム

水村和枝 (名古屋大学環境医学研究所神経系分野 II)

筋性疼痛は非常に頻度が高い。多くの場合炎症症状・所見はない。1) 筋拘縮, 2) 筋血流不足, 3) 酸化ストレス等のメカニズムが提唱されてきたが、エビデンスは乏しい。メカニズムの解析のためのモデルとして、運動後 1 日程度遅れて現れる遅発性筋痛がここ数年注目を浴びている。遅発性筋痛は生理的なもので、通常何ら治療を必要としないが、職業によって (例えば外科医)、また運

動選手の場合には不都合なこともある。そのメカニズムとして最も広く信じられているのは、微細筋損傷とその結果生じる炎症である。しかし、我々が作ったモデルでは痛覚過敏や腫脹は見られるもののマクロファージの集積などの炎症像は見られないので、炎症は遅発性筋痛に必須なものではないと考えられる。さらに、生理的であるとはいえ、筋・筋膜性疼痛に見られる硬結やトリガー

ポイント状の変化も見られ (Itoh ら, 2002, 2004), 遅発性筋痛を生じる伸張性収縮を連日繰り返したり, 寒冷ストレスを負荷すると持続の長い筋痛覚過敏が生じるので, 筋性疼痛研究のメカニズム解明に役立つと考えられる。我々の今までの研究で, 麻酔下のラット後肢下腿伸筋 (主として長指伸筋) に伸張性収縮を負荷して誘発した場合, 筋の機械逃避反応閾値は運動負荷 1 日後から 3 日まで低下したのち, 回復した。機械逃避閾値が最も低下している時に記録した筋細径線維受容器の機械反応は亢進しており, これが機械痛覚過敏の末梢機構であろうと考えられる。拮抗薬投与により遅発性筋痛の発生には COX-2 と B2 受容体を介したブラジキニンの作用が重要であることも明らかになった。さらに, 運動負荷した筋において COX-2 は運動直後から 12 時間後まで増大していたのに対し, NGF, GDNF は遅れて 12 時間後から 2 日後 (GDNF は 1 日後まで) まで増大しており, 抗 NGF 抗体または抗 GDNF 抗体の筋注により筋機械痛覚過敏が減弱することなどから, 遅発性筋痛の維持には両神経栄養因子が関わっていると考えられる。B2 拮抗薬は NGF

の発現増大を抑制し, COX-2 阻害薬は GDNF の発現増大を抑制することを見出した。つまり遅発性筋痛にはブラジキニン-B2 受容体-NGF の経路と COX-2-GDNF の経路があることがわかった。両経路の間に何らかの相互作用があるかどうか, 現在未知である。

一方, 筋性疼痛には, 線維筋痛症の様に慢性で全身性の筋痛で, ストレスとの関連が示唆されているものもある。そのモデルになるであろうとされている繰り返し寒冷ストレスモデルを作成し, 筋逃避反応閾値を調べたところ, 4℃-室温の繰り返しでは 3 週間, -3℃-室温の繰り返しでは 7 週間もの間, 筋痛覚過敏が見られた。一方, 皮膚痛覚過敏は 4℃-室温の繰り返しでは見られず, -3℃-室温の繰り返しでのみ見られた。このように皮膚と筋とはこのストレスの影響の受け方が異なることがわかった。このモデルでは下行性抑制系が障害されていると報告されていることを考え合わせると, 筋侵害受容系の方がその影響を受けやすいことが示唆された。

筋性疼痛の研究は未知な部分が多い。本講演が問題提起となれば幸いである。

(13) 繰り返し冷温ストレスによる線維筋痛症モデルの有用性

西依倫子, 植田弘師 (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科薬理学分野)

線維筋痛症は全身性に激しい痛みを生じる, 原因不明の難治性慢性疼痛疾患である。また, 病態モデル動物が確立されていないことなどから, 当疾患を標的とする治療法は十分に確立されていない。そこで本研究では, 病態を反映する線維筋痛症モデル動物の確立を目的とした。患者背景には過度なストレスや外傷などによる痛みの悪循環が想定されることから, マウスに飼育環境温度を繰り返し変化させるストレス (ICS; Intermittent Cold Stress) を負荷した後, 疼痛評価を行った。その結果, 少なくとも 2 週間以上持続する著明なアロディニア現象が観察された。一方, 冷温負荷のみ与えた群ではストレス負荷直後のみ疼痛過敏が認められたことから, 温度環境の繰り返しストレスが慢性痛の誘発因子であることが示

唆された。また, 臨床症状と類似した点として, 熱, 化学, 電気刺激に対しても顕著な疼痛過敏が観察された。

次に, 本モデル動物を薬理学的に評価した。線維筋痛症ではモルヒネ感受性が低いという臨床的知見と一致して, モルヒネは ICS 負荷群の疼痛過敏に対して鎮痛効果を示さなかった。このモルヒネ低感受性について, 下行性抑制系を介したセロトニン神経の代謝回転率を指標にして, 生化学的に解析した。その結果, モルヒネはストレス非負荷群のセロトニン代謝回転率を増加させたが, 負荷群ではその効果は認められなかった。以上の結果から, 本モデル動物は線維筋痛症の臨床病態を反映することが強く示唆された。

(14) 末梢性動脈閉塞症モデルラットにおける痛覚過敏のメカニズムの解析

堀紀代美^{1,2}, 尾崎紀之³, 鈴木重行⁴, 杉浦康夫¹

(¹名古屋大学大学院医学系研究科機能形態学講座 (機能組織学分野),

²名古屋大学医学部附属病院医療技術部リハビリ部門,

³金沢大学医薬保健研究域医学系神経分布路形態・形成学分野,

⁴名古屋大学大学院医学系研究科リハビリテーション療法学専攻理学療法学分野)

【目的】末梢性動脈閉塞症 (PDA) における痛覚過敏のメカニズムを明らかにするため, モデルラットを作製し, その病態ならびに痛覚過敏へのイオンチャネルの関与を調べた。

【方法】ラットの左総腸骨動脈および左腸腰動脈を結紮することで下肢の血流を阻害した PDA モデルラットを作成し, 下腿の皮膚血流量の測定, 皮膚と筋に対する痛覚テスト, 間歇性跛行の評価, 皮膚と筋の組織学的検討を行った。さらに PDA ラットで見られた痛覚過敏に, TRPV1, P2X_{3,2/3}, ASICs の拮抗薬を使用した行動薬理学的検討も加えた。

【結果】PDA 群では処置後 6 週まで皮膚血流の減少が, 3 週まで筋の機械的痛覚過敏が確認され, 12 週まで間歇性跛行が認められた。処置後 4 日では筋の壊死像が観察された。TRPV1 拮抗薬は効果を示さなかったが, P2X_{3,2/3} ならびに ASICs 拮抗薬は筋の痛覚過敏を抑制した。

【結論】PDA ラットは慢性的な筋の痛覚過敏と間歇性跛行を呈し, 末梢性動脈閉塞症の痛みのメカニズムの解明に有用である。下肢の血流阻害による筋の痛覚過敏には, P2X_{3,2/3}, ASICs の関与が示唆され, PDA における痛覚過敏の発現に重要と思われた。

(15) 帯状疱疹痛マウスモデルにおける自発痛関連行動の評価とその特徴

佐々木淳, 下田倫子, 金山翔治, 安東嗣修, 倉石 泰

(富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理研究室)

帯状疱疹は有痛性の皮膚疾患であり, 触刺激により疼痛が生じるアロディニアや持続痛・突発痛といった自発痛を生じる。これまでに我々は単純ヘルペスウイルス I 型の経皮接種により作製する帯状疱疹痛マウスモデルを用いて, アロディニアの評価とその発生機序の解析を行ってきた。今回, このマウスモデルで新たに自発痛の評価を試みた。無人環境下でマウスの行動を解析すると, 皮疹の進展に対応して患部皮膚への自発的舐め行動が増した。動のアロディニアは皮疹の治癒後も持続し慢性化する傾向が強いが, 自発的舐め行動は皮疹の治癒と共に減少し, 皮疹の治癒後ではほとんど観察されなかった。したがって, 自発的舐め行動の増加には神経障害性要素よりも炎症性要素の関与が強いと考えられる。鎮痛薬と

鎮痛補助薬の反応性を調べると, モルヒネとギャバペンチンの抑制効果が強く, メキシレチンも部分的な抑制効果を示した。動のアロディニアにはモルヒネとメキシレチンは無効であることから, 動のアロディニアとは異なる薬物有効性を有している。また, ジクロフェナクナトリウムは患部皮膚の PGE₂ 産生を強力に抑制したが, 自発的舐め行動には無効であった。以上の結果から, 患部皮膚への自発的舐め行動が帯状疱疹期の自発痛関連行動の評価に有用であることが示唆される。特に, 非ステロイド性抗炎症薬が無効な重症例の自発痛モデルとして期待できる。また, 動のアロディニアとは発生経過や薬物有効性が異なることから, 両者の発生機序が異なることが示唆される。

(16) 帯状疱疹痛マウスモデルの脊髄後角広作動域ニューロン及び末梢神経の機械刺激に対する興奮性の変化

西川幸俊, 佐々木淳, 野島浩史, 安東嗣修, 倉石 泰
(富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学研究室)

単純ヘルペスウイルス I 型をマウスに経皮接種すると帯状疱疹様の皮膚病変と機械的アロディニアが生じる。皮膚病変部では動的アロディニアが顕著であるが、その発生機序はよくわかっていない。そこで本研究では、麻酔下で *in vivo* 細胞外電位記録法を用いて、末梢神経と脊髄後角ニューロンのどちらの変調が動的アロディニア発現に関与するのかを検証した。脊髄後角ニューロンとして深部広作動域ニューロン、末梢神経として皮膚病変部を支配する脛骨神経を用い、各種機械刺激に対する興奮性変化を調べた。帯状疱疹痛マウスの脊髄後角広作動域ニューロンでは、絵筆による動的機械刺激に対する興奮

性が増大したが、無鉤ピンセットによる *pinch* 刺激に対する反応性は低下し、フォンフレイ線維による点状機械刺激に対しては有意な変化はみられなかった。皮膚を繰り返し電気刺激しても *wind-up* 現象はみられなかったことから、動的機械刺激に対する興奮性の増大に *wind-up* 機構は関与しないと考えられる。一方、脛骨神経の興奮性は、動的機械刺激、*pinch* 刺激、点状機械刺激いずれに対しても有意に低下した。以上の結果から、末梢神経ではなく、脊髄後角の深部広作動域ニューロンにおける動的機械刺激特異的な興奮性の増大が、帯状疱疹痛マウスの動的アロディニアの発現に関与する可能性が示唆される。

(17) 教育講演3 骨がん疼痛発生メカニズムと治療標的分子

川股知之 (札幌医科大学医学部麻醉学講座)

我が国の人口の高齢化に伴い、現在、2 人に 1 人ががんに罹患し、3 人に 1 人ががんで亡くなる。10 年後には 3 人に 2 人ががんに罹患し、2 人に 1 人ががんで亡くなることが推測されている。また、近年のがん治療の発展によりがん患者の予後が飛躍的に延長している。したがって、がん医療においては治療だけではなく患者の身体的・精神的症状を管理する緩和医療の充実と QOL の向上が求められている。特に、患者 QOL において痛みのコントロールは重要である。がん疼痛治療法として

NSAIDs とオピオイドを両輪とした WHO 方式がん疼痛治療法が標準的治療法として広く普及している。しかしながら、本法は万能ではなく、約 30% の患者で十分な疼痛緩和が得られない。したがって、患者 QOL 向上のためにがん疼痛のメカニズムを解明し新たな治療法を開発する必要がある。がん疼痛の中でも難治性疼痛である骨がん疼痛に注目し、骨がん疼痛モデル動物を用いて研究を行ってきた。これまでに明らかとなった骨がん疼痛発生メカニズムと治療標的分子について発表する。

(18) ラット脊髄後角膠様質細胞の形態学的・電気生理学的特性と含有神経伝達物質及び神経修飾物質に対する応答の相関関係

八坂敏一^{1,2}, Sheena Y. X. Tiong², David I. Hughes², John S. Riddell²,
藤田亜美¹, 熊本栄一¹, Andrew J. Todd²

(¹ 佐賀大学医学部生体構造機能学講座 (神経生理),

² グラスゴウ大学生物医学生命科学研究所脊髄グループ)

侵害受容線維が終止する脊髄後角膠様質細胞を、活動

電位発火パターン、形態、含有神経伝達物質、神経修飾

物質に対する反応を指標として分類した。Islet cell は全て抑制性であったが、central, vertical, radial cell には抑制性と興奮性が混在していた。しかし、多くの vertical cell は興奮性であり、大型の一例を除く全ての標準型 radial cell も興奮性であった。脱分極性の通電に対し、興奮性細胞の多くがA型カリウム電流の関与する発火パターンを示したのに対し、抑制性細胞の多くでは持続性発火が見られた。ノルアドレナリンとセロトニンによる膜過分極性の応答は興奮性・抑制性細胞の両細胞で観察されたが、ソマトスタチンによる膜過分極性応答は抑制性細胞

でのみ観察された。脊髄後角内では興奮性介在細胞がソマトスタチンを合成していることが報告されており、これらの細胞がソマトスタチンを分泌して抑制性細胞を抑制し、脱抑制を起こしている可能性が示唆された。また興奮性細胞の多くがA型カリウム電流の関与する発火パターンを示していることと考え合わせると、ERKによるこのチャンネルのリン酸化がソマトスタチンの分泌をトリガーしていることが推察され、痛覚異常にこの回路が関与する可能性が示唆された。

(19) ラット脊髄後角の痛み伝達制御におけるガラニンの役割 —興奮性および抑制性のシナプス伝達に対する作用

熊本栄一, 岳 海源, 藤田亜美, 朴 蓮花, 青山貴博, 井上将成, 八坂敏一
(佐賀大学 医学部生体構造機能学講座 (神経生理学分野))

脊髄後角第II層(膠様質)は皮膚末梢から脊髄後角に inputsする痛み伝達の制御に重要な役割を果たすと考えられている。我々は、昨年の本研究会において、神経ペプチドの1つであるガラニンが膠様質ニューロンの自発性興奮性シナプス後電流 (EPSC) の振幅を変えずに発生頻度を増加させること、さらに、膜の過分極や脱分極を誘起することを報告した。今回、痛み伝達制御におけるガラニンの役割を更に知るために、そのシナプス後細胞への作用を抑制した条件下で、ガラニンがA δ 線維やC線維の刺激により誘起される単シナプス性のEPSC、また、GABAやグリシンを介する抑制性シナプス後電流 (IPSC) にどんな影響を及ぼすかを調べた。実験は、成熟雄性ラット脊髄横断薄切片の膠様質ニューロンヘブラインド・ホールセル・パッチクランプ法を適用することに

より行った。ガラニン (0.1 μ M) は、調べたニューロンの約90%で単シナプス性A δ 線維誘起EPSCの振幅を約40%減少させる一方、約67%のニューロンで単シナプス性C線維誘起EPSCの振幅を約20%減少させた。残りのニューロンではEPSCは影響を受けなかった。自発性IPSCの振幅と発生頻度、さらに局所電気刺激により誘起されるIPSCの振幅はガラニン(0.1 μ M)により影響を受けなかった。以上より、ガラニンはA δ 線維やC線維を介する単シナプス性の興奮性シナプス伝達をシナプス前性に抑制すること、また、前者の作用は後者の作用より強いことが明らかになった。この作用は自発性興奮性シナプス伝達や膜電位の変化と共にガラニンによる痛み伝達制御に寄与することが示唆される。

(20) 末梢神経損傷後に発症したアロディニアの維持機構におけるSTAT3の役割

津田 誠, 高露雄太, 矢野貴之, 辻川智子, 北野順子, 齊藤秀俊, 井上和秀
(九州大学大学院薬学研究院薬理学分野)

末梢神経の損傷後に脊髄において産生される種々のサイトカインが神経障害性疼痛に重要な役割を担っていることが示唆されている。最近、サイトカインシグナル

伝達を担う転写因子STAT3が神経障害性疼痛モデルラットの脊髄ミクログリアで活性化し、神経障害性疼痛の発症に関与することが報告されている。しかし、疼痛の

維持過程における STAT3 の関与については依然不明である。そこで本研究では、末梢神経損傷後に形成したアロディニアの維持機構における STAT3 の役割について検討した。

第 5 腰髄脊髄神経に損傷を加え、脊髄後角を STAT3 抗体で免疫染色をしたところ、損傷後 3 日目から 5 日目をピークとして STAT3 活性化の指標となる核内への局在が認められた。各細胞マーカーとの二重免疫染色の結果から、STAT3 の核内移行は、ミクログリアではなく、アストロサイト特異的に起こっていることが明らかとなった。STAT3 はアストロサイトの増殖応答に関与していることから、まず神経損傷後のアストロサイト細胞増殖

を調べた結果、神経損傷後 5 日目をピークにアストロサイトの分裂が誘導された。そこで、アストロサイトの分裂に対する STAT3 の役割を検討するため、STAT3 の活性化を抑制する JAK2 阻害剤 AG490 を損傷後 3～5 日目に脊髄くも膜下腔内へ投与したところ、5 日目のアストロサイトにおける分裂活性が有意に減少した。さらに、AG490 は神経損傷後に一旦形成したアロディニアも有意に改善した。

以上の結果から、末梢神経損傷後に脊髄後角アストロサイトで JAK2/STAT3 シグナル系が活性化し、アストロサイトの細胞増殖、さらに神経障害性疼痛の維持に寄与していることが明らかとなった。

22. 体温調節, 温度受容研究会

2009年9月10日－9月11日

代表・世話人: 小林茂夫 (京都大学 大学院情報学研究科)

所内対応者: 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)

(1) 体温調節における DRG 小型ニューロンの役割と UCP

山下 均 (中部大学生命健康科学部生命医科学科)

(2) TRPM8 と低温環境下での体温調節

田地野浩司¹, 細川 浩¹, 前川真吾¹, 松村 潔²,
柴草哲郎³, 井上和生³, 伏木 亨³, 小林茂夫¹,

(¹ 京都大学 情報学研究科 知能情報学 生体情報処理分野,

² 大阪工業大学 情報科学部, ³ 京都大学大学院農学研究科食品生物科学)

(3) 温熱的快適性の部位特異性

中村真由美^{1,4}, 依田珠江², 春日桃子¹, Larry I. Crawshaw³,
内田有希⁴, 時澤 健⁴, 永島 計⁴, 彼末一之¹

(¹ 早稲田大学スポーツ科学学術院, ² 獨協大学国際教養学部,

³ Department of Biology, Portland State University, ⁴ 早稲田大学人間科学学術院)

(4) 寒冷暴露に備えた冷涼環境下での代謝調節

内田邦敏^{1,2}, 志内哲也^{2,3}, 稲田 仁¹, 箕越靖彦^{2,3}, 富永真琴^{1,2}

(¹ 岡崎統合バイオ (生理研), 細胞生理, ² 総研大, 生理科学, ³ 生理研, 生殖・内分泌)

(5) ハムスターの褐色脂肪組織 (BAT) は冬眠行動に不可欠か? : 低温下での BAT 機能

北尾直也, 橋本眞明 (旭川医科大学 生理学講座 自律機能分野)

(6) ヒト褐色脂肪: 寒冷下での体温・エネルギー消費の調節

米代武司¹, 会田さゆり¹, 松下真美², 斉藤昌之¹

(¹ 天使大学大学院 看護栄養学研究科, ² 天使大学 看護栄養学部)

(7) ヒト褐色脂肪: 加齢に伴う変化

斉藤昌之¹, 米代武司¹, 会田さゆり¹, 松下真美²

(¹ 天使大学大学院 看護栄養学研究科, ² 天使大学 看護栄養学部)

(8) レプチンおよびグレリンが絶食時の時間特異的体温調節反応に及ぼす影響

時澤 健, 尾上侑己, 内田有希, 森 久恵, 中村真由美, 永島 計

(早稲田大学 人間科学学術院 統合生理学研究室)

(9) プロスタグランジン E₂ はどのようにして脳から消去されるか

松村 潔, 鈴木亜弥子 (大阪工業大学情報科学部)

前川真吾, 細川 浩, 小林茂夫 (京都大学・院・情報学研究科)

(10) 終板器官周囲部でのノルアドレナリンの体温低下作用

大坂寿雅 (国立健康・栄養研究所)

(11) 生存戦略としての生物時計—その分子・細胞メカニズム

本間さと (北海道大学大学院医学研究科生理学講座 時間生理学分野,

北海道大学大学院医学研究科 (寄附講座) 時間医学講座)

(12) 温度受容と TRP チャネル

富永真琴 (自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター (生理学研究所),

総合研究大学院大学生命科学研究科生理科学専攻)

(13) 体温調節の中樞神経メカニズム

中村和弘 (京都大学・生命科学系キャリアパス形成ユニット)

(14) 「省エネ型体温調節」暑熱馴化の意義—個体レベルと社会レベルの観点から

紫藤 治, 松崎健太郎, 片倉賢紀, 丸山めぐみ, 李 光華 (島根大学医学部環境生理)

(15) ハムスターの冬眠時体温調節機構と神経細胞保護

田村 豊 (福山大学薬学部)

(16) エネルギー代謝と体温調節の接点：昆虫の省エネ型体温調節

梅田真郷 (京都大学化学研究所・超分子生物学研究領域)

【参加者名】

齊藤昌之 (天使大学看護栄養学研究科), 米代武司 (天使大学看護栄養学研究科), 岡松優子 (北海道大学獣医学研究科), 本間さと (北海道大学医学研究科), 北尾直也 (旭川医科大学医学系研究科), 山田哲也 (東北大学医学系研究科), 永島 計 (早稲田大学人間科学学術院), 時澤 健 (早稲田大学人間科学学術院), 中村真由美 (早稲田大学人間総合研究センター), 内田有希 (早稲田大学人間科学研究科), 森 久恵 (早稲田大学人間科学部), 大坂寿雅 (国立健康・栄養研究所), 山下 均 (中部大学生命健康科学部), 中村和弘 (京都大学生命科学系キャリアパス形成ユニット), 小林茂夫 (京都大学情報学研究科), 田地野浩司 (京都大学情報学研究科), 梅田真郷 (京都大学化学研究所), 南 丈也 (京都大学医学研究科), 松村 潔 (大阪工業大学情報科学部), 紫藤 治 (島根大学医学部医学科), 松崎健太郎 (島根大学医学部医学科), 田村 豊 (福山大学薬学部), 門田麻由子 (福山大学薬学部), 勝田秀樹 (福山大学薬学部), 佐藤貴弘 (久留米大学), 児島将康 (久留米大学), 山口秀明 ((株) アイシン・コスモ

ス研究開発部), 八木 章 (江崎グリコ), 三富敦浩 (株式会社伊藤園所), 岡部利恵 (株式会社伊藤園), 石井智海 (花王), 矢野花映 (花王), 小田英志 (花王), 井垣通人 (花王), 兼久智和 (日本たばこ産業), 小林淳一 (キッセイ薬品工業), 大澤晴美 (大塚製薬株式会社), 橋本公男 (サンスター株式会社), ホーシンニー (NTT コミュニケーション), 山岡一平 (株式会社大塚製薬), 富永真琴 (岡崎統合バイオ細胞生理), 山中章弘 (岡崎統合バイオ細胞生理), 曾我部隆彰 (岡崎統合バイオ細胞生理), 梅村 徹 (岡崎統合バイオ細胞生理), 齋藤 茂 (岡崎統合バイオ細胞生理), 小松朋子 (岡崎統合バイオ細胞生理), 内田邦敏 (岡崎統合バイオ細胞生理), 常松友美 (岡崎統合バイオ細胞生理), 加塩麻紀子 (岡崎統合バイオ細胞生理), 周一鳴 (岡崎統合バイオ細胞生理), 高山靖規 (岡崎統合バイオ細胞生理), 三原 弘 (岡崎統合バイオ細胞生理), 水野秀紀 (岡崎統合バイオ細胞生理), 川口 仁 (岡崎統合バイオ細胞生理)

【概要】

平成 21 年 9 月 10 日及び 11 日に研究会が行われた。今回で 5 回目になる研究会は, 昨年度に続き京都大学小林 (以下敬称略) が研究代表者をつとめ, 体温をテーマに分子, 神経, 心理生理学に至るまで様々な分野の研究者が集まり, 研究発表, 情報交換, 議論, 新たな研究テーマを模索した。今年度は, 1 日目に口演をおこない, 2 日目にシンポジウムをおこなった。

9 月 10 日には, 中部大学山下が DRG の TRP の発現と UCP の関係を, 京都大学細川が TRPM8 による体温調節を発表した。早稲田大学中村は, 温感, 冷感を生む脳部位と, 快不快感を生む脳部位の違いを議論した。褐色脂肪組織 (BAT) は, 主要な産熱効果器である。生理研の内

田は, 冷涼環境下での代謝調節をのべた。旭川医大の北尾は, 冬眠中のゴールデンハムスターが覚醒する時, BAT の熱産生が重要であることを示した。天使大学米代は, ヒトでも, BAT は体温維持とエネルギー消費に寄与することを示した。天使大学の齋藤は, 加齢にともなう BAT の変化を調べ興味深いデータを示した。早稲田大学時澤は, 摂食ペプチド (レプチンの低下, グレリンの増加) が絶食時の体温調節反応に及ぼす影響を調べた。PGE₂ は, 脳に作用して発熱を誘発する。大阪工業大学松村は, PGE₂ が脳から除去されるしくみを発表した。国立健康・栄養研大坂は, ノルアドレナリンの体温低下作用を発表した。11 日には, 「省エネ型体温調節」のタイトルでシ

ンボジウムを行った。北海道大学本間は、生存における生物時計の重要性を述べた。生理研富永は、温度受容にかかわる TRP チャネルを発表した。京都大学中村は、体温調節の経路の詳細を発表した。島根大学紫藤は、低体

温の可能性を論じた。福山大学田村は、ハムスターの冬眠時体温調節を発表した。京都大学梅田は、ハエの低温選択性変異体を同定した。2 日間にわたって、活発な討議がなされた。

(1) 体温調節における DRG 小型ニューロンの役割と UCP

山下 均 (中部大学生命健康科学部生命医科学科)

体温の恒常性は環境温度の受容とそれに基づく体熱制御反応により調節されている。末梢で受容した温度感覚は後根神経節 (DRG) ニューロンを介して温痛覚情報として中枢へ伝えられる。我々は新生仔期にカプサイシンを投与した (Cap) ラットを用いて、DRG ニューロンにおける TRP ファミリー分子の発現変化、外界温度刺激に対するラットの応答性の変化、骨格筋および褐色脂肪組織におけるミトコンドリア脱共役タンパク質 (UCP) の発現変化などについて検討した。組織学的解析において、未処置のコントロール (Cont) ラットと比較して、Cap ラットでは DRG 小型ニューロンの脱落が顕著に認められた。DRG における TRP 分子の遺伝子発現を検討した結果、Cap ラットでは TRPV2 の発現レベルに変化はみられ

なかったが、TRPV1, TRPM8, TRPA1 の発現レベルの有意な減少が認められた。また、Cap ラットは体温がやや低く環境温度の変化に対する応答性が有意に低下していた。熱産生組織である骨格筋と褐色脂肪組織における UCP 分子の発現を調べた結果、UCP2 と UCP3 の発現レベルは両組織において変化はみられなかったが、褐色脂肪組織の UCP1 発現レベルの有意な減少が Cap ラットにおいて観察された。以上の結果は、DRG 小型ニューロンにおける温度受容機能の低下が体温調節に大きく影響することを示す。一方、UCP2 は DRG 小型ニューロンにおいて高い発現レベルを示し、TRPV1 と共発現していることが見出されたことから、UCP2 の温痛覚受容における役割が予想された。

(2) TRPM8と低温環境下での体温調節

田地野浩司¹, 細川 浩¹, 前川真吾¹, 松村 潔²,
柴草哲郎³, 井上和生³, 伏木 亨³, 小林茂夫¹

(¹ 京都大学 情報学研究科 知能情報学 生体情報処理分野,

² 大阪工業大学 情報科学部, ³ 京都大学大学院農学研究科食品生物科学)

環境温の低下で皮膚温が低下する。皮膚温低下は、皮膚内に投射し、冷却に反応する感覚神経で受容され、産熱反応の誘発や放熱反応の抑制を生む。最近、感覚神経の細胞体及び神経終末に、メンソールと冷却に反応するイオンチャネル TRPM8 が存在することがわかった。しかし、TRPM8 がどのように体温調節に関与しているかは十分に知られていない。本研究では、TRPM8 の体温調節への関与を明らかにするため、マウスの体幹皮膚にメンソールを塗付し、芯温変化と効果器応答を調べた。野生

型マウスでは、メンソール塗布で 1.3°C 芯温が上昇した。この芯温上昇は、TRPM8 ノックアウトマウスでは見られなかった。また、野生型マウスでは、メンソール塗付による芯温の上昇時に、酸素消費量の増加がみられ、震えや褐色脂肪細胞の活性化が起こった。加えて、尾の血管収縮がみられた。以上のことは、TRPM8 を発現する神経線維から熱獲得性効果器までのあいだに配線があることを示す。TRPM8 は皮膚温低下に依存した体温調節反応を媒介すると結論される。

(3) 温熱的快適感の部位特異性

中村真由美^{1,4}, 依田珠江², 春日桃子¹, Larry I. Crawshaw³,

内田有希⁴, 時澤 健⁴, 永島 計⁴, 彼末一之¹

(¹ 早稲田大学スポーツ科学学術院, ² 獨協大学国際教養学部,

³ Department of Biology, Portland State University, ⁴ 早稲田大学人間科学学術院)

【背景】我々はこれまでに皮膚表面の局所的な温度刺激実験を顔面, 胸部, 腹部, 大腿部 (実験 1), 頸部, 手, 足底, 腹部 (実験 2) において行い, 加温・冷却に伴って生じる快・不快感 (温熱的快適感) が刺激部位によりどのように異なるかを調べた。その結果から①頭部: 体幹部と比べて低い温度を好む, ②体幹部 (特に腹部): 頭部と比べて高い温度を好む, ③頸部: 頭部と腹部の間の特徴を持つ④末梢部位: 同じ温度刺激に対して, 体幹部・頭部よりも皮膚温の変化は大きい, 強い快・不快感は生じない, という各部位の特長が明らかになった。そこで本研究では, これまでに調べていない脊部, 腰部, 上腕の特徴を明らかにするために, これまでと同様の方法で温度刺激実験を行った。

【方法】環境温 34℃ (暑熱環境) または 21℃ (寒冷環境) の人工気象室において, 健康な成人男性 11 名を対象とし, 脊部, 腰部, 上腕, 腹部の局所的加温・冷却を行った。全身及び刺激部位局所における温度感覚, 温熱的快

適感を被験者に申告させた。

【結果】すべての条件において, 刺激部位の局所的温熱的快適感 (脊部, 腰部, 腹部) の 3 部位間に有意差はなかったが, 暑熱環境での腹部冷却では快適感が小さく, 寒冷環境での腹部冷却では不快感が強い傾向が認められた。上腕は, どの条件においても皮膚温の変化が他部位と比べて大きい傾向があったが, 強い快・不快感は生じなかった。

【考察】脊部, 腰部, 腹部に局所的な快適感に差が認められなかったことから, 脊部, 腰部は腹部と似た特徴を持つと言える。しかし, 先行研究で明らかになった腹部の「高い温度を好む」傾向は, 体幹部の中でも特に腹部において強い。上腕は, これまでに調べてきた四肢末梢部位と同様, 同じ温度刺激に対して皮膚温の変化は大きい, 強い快適感 (不快感) は生じないということから, 温熱的快適感における感受性は比較的低いと言える。

(4) 寒冷暴露に備えた冷涼環境下での代謝調節

内田邦敏^{1,2}, 志内哲也^{2,3}, 稲田 仁¹, 箕越靖彦^{2,3}, 富永真琴^{1,2}

(¹ 岡崎統合バイオ (生理研), 細胞生理, ² 総研大, 生理科学, ³ 生理研, 生殖・内分泌)

生物は環境温度に順応しながら生きている。言い換えれば, 我々は無意識もしくは意識的に外界温度を感じ, その温度情報を元に体温など様々な生体の恒常性を調節している。低温環境下に関する研究のほとんどは寒冷暴露という侵害的ともいえるべき温度における検討であるが, 今回, 非侵害的な小さな温度低下でもその変化を感じて代謝機能を調節していることを, マウスを用いた研究によって見いだしたので報告する。

マウスを冷涼 (20℃) もしくは通常 (25℃) 環境で 10 日間飼育し, まず糖負荷試験を行ったところ, 冷涼環境下のマウスにおいてインスリン分泌量の低下と血糖値の上

昇が観察された。このインスリン分泌の低下は, 皮膚温が低下していること並びに血漿中ノルエピネフリン量が上昇していることから, 皮膚温度低下に伴う交感神経の活性化によるものと考えられた。また, 皮膚温低下と交感神経活性化から皮膚血管を収縮させて熱放散を抑制していることが予想された。

熱産生の有無を検討するために BAT の UCP1 mRNA 量を測定したところ, 冷涼環境下のマウスと正常マウスの間に差は認められず, BAT での熱産生は亢進していないと考えられた。WAT の UCP2 および骨格筋の UCP3 も UCP1 同様に変化はみられなかった。一方, GLUT4 の

発現量は WAT においてのみ有意に上昇しており、冷涼環境下のマウスでは WAT においてのみグルコースの取り込みが亢進していると考えられた。さらに WAT において脂肪代謝に関与する Dok1, Cd36 及び Lpl の mRNA 量が上昇しており、脂肪蓄積を促進させている可能性が示唆された。

以上の結果より冷涼環境下ではインスリン分泌を抑

制し、血糖値を高く維持することが明らかとなった。さらに、WAT においてのみグルコース及び脂肪酸の取り込みを増加させ、エネルギーを蓄積している可能性が示唆された。これは、さらなる環境温度低下（寒冷暴露）に備えて、熱産生に利用するエネルギーを蓄積するための代謝調節であると考えられる。

(5) ハムスターの褐色脂肪組織 (BAT) は冬眠行動に不可欠か？：低温下での BAT 機能

北尾直也, 橋本眞明 (旭川医科大学 生理学講座 自律機能分野)

環境温度付近の体温 (6℃) で冬眠中のゴールデンハムスターが覚醒を始める時、褐色脂肪組織 (BAT) による熱産生が重要と考えられているが、直接的な証拠は無い。この熱産生は主に $\beta 3$ アドレナリン受容体を介したものとされ、長期間の寒冷暴露など、慢性的な交感神経刺激が受容体の脱感作を引き起こすことも知られている。本研究では冬眠覚醒時の BAT 熱産生における $\beta 3$ アドレナリン受容体の役割を明らかにするとともに、低温下での BAT 機能と冬眠覚醒行動における意義について検討した。

室温 5℃, 恒暗条件下で冬眠を開始したハムスターの BAT 温度, 直腸温度, 心電図を記録しつつ, 慢性静脈留置カニューレから生理食塩水 (PBS), $\beta 3$ アゴニスト (CL 316, 243:CL) またはアンタゴニスト (SR59230A:SR) を持続的に投与し, 覚醒を促した。記録後, 冬眠を再開した動物から速やかに BAT を摘出, 1~2 mm 角の小片とし,

CL に対する酸素消費速度応答を 12℃と 36℃で測定, 室温 25℃ (L:D=12:12) で飼育中の個体から摘出した BAT と比較した。

CL 投与は冬眠からの覚醒時間を有意に短縮し, BAT 温度上昇速度も有意に増加した。SR は 8 例中 5 例で覚醒時間に影響しなかったが, 残り 3 例では, BAT 温度上昇が抑制され, 冬眠からの覚醒を妨げた。冬眠動物から摘出した BAT は CL に応答し, いずれの温度下でも酸素消費速度を増加させた。25℃飼育群から摘出した BAT と比較し, 36℃では差がなかったが, 12℃では CL に対しより強く応答した。結果は, 冬眠からの覚醒時に $\beta 3$ アドレナリン受容体を介した効率的な熱産生のため, BAT が低温下で機能するよう最適化されている可能性を示す。また, 選択的な BAT 機能抑制が冬眠からの覚醒を妨げたことは, 冬眠行動における BAT 機能の重要性を示唆する。

(6) ヒト褐色脂肪：寒冷下での体温・エネルギー消費の調節

米代武司¹, 会田さゆり¹, 松下真美², 斉藤昌之¹

(¹ 天使大学大学院 看護栄養学研究科, ² 天使大学 看護栄養学部)

【目的】褐色脂肪は、寒冷暴露や自発的多食に対応して活性化し、体温維持や余剰のエネルギー散逸に寄与する特殊な組織である。最近我々は、fluoro-deoxyglucose (FDG) を用いた positron emission tomography (PET) と X 線 CT を組み合わせた FDG-PET/CT により、ヒト褐色脂肪を検出・評価できること見出した (Diabetes 2009)。本研究では、

褐色脂肪の生理的役割、特に体温調節と全身でのエネルギー消費に対する寄与について検討した。

【方法】20~32 歳の健康な男性 15 名を被験者とし、6 時間以上絶食の後、室温 19℃・足氷冷の寒冷暴露を 2 時間行い FDG-PET/CT 検査を行った。検査結果から褐色脂肪を保有する群：(+) 群 8 名と保有しない群：(-) 群 7 名に

分け、ガスモニター（AR-1 O2 郎）を用いて室温 26℃・安静時と、室温 19℃・足氷冷の寒冷暴露を行った後のエネルギー消費量を測定した。同時に、温度データロガー（Thermochron）を用いて褐色脂肪部（鎖骨上部）と対照部（鎖骨下部）の体表温度変化を測定した。

【結果】室温 26℃・安静時のエネルギー消費量は、(+) 群と (-) 群とで差は無かったが、寒冷暴露を 2 時間行くと、(+) 群では有意に増加したが (1433 ± 96 vs. 1807 ± 238

$\text{kcal/d} \cdot p < 0.05$), (-) 群では変化しなかった (1434 ± 246 vs. $1475 \pm 206 \text{kcal/d}$: ns.)。体表温度低下は、対照部では両群で差は見られなかったが (-2.5 ± 0.7 vs. -2.31 ± 0.8 °C : ns.), 褐色脂肪部では (+) 群の方が有意に少なかった (0.0 ± 0.3 vs. -0.6 ± 0.2 °C : $p < 0.05$)。以上の結果から、ヒト褐色脂肪組織は急性寒冷刺激によって活性化し、体温維持とエネルギー消費に寄与することが示された。

(7) ヒト褐色脂肪：加齢に伴う変化

斉藤昌之¹, 米代武司¹, 会田さゆり¹, 松下真美²

(¹天使大学大学院 看護栄養学研究科, ²天使大学 看護栄養学部)

【目的】褐色脂肪は、寒冷暴露や自発的多食に対応して活性化し、体温維持や余剰のエネルギー散逸に寄与する組織である。我々は、fluoro-deoxyglucose (FDG) を用いた positron emission tomography (PET) と X 線 CT を組み合わせた FDG-PET/CT により、ヒト褐色脂肪を検出・評価してきた (Diabetes 2009)。本年は、加齢に伴う褐色脂肪や体脂肪の変化に焦点を当てて、これに関与する可能性のある因子などについて検討した。

【方法と結果】20～72 歳の健康な被験者について、6 時間以上絶食の後、室温 19℃・足氷冷の寒冷暴露 2 時間後に FDG-PET/CT 検査を行ったところ、褐色脂肪の検出率は、20 歳代では 55%であったが、加齢と共に減少し (30 歳代 47%, 40 歳代 29%) 50 歳代では 7%に過ぎなかった。加齢に伴い肥満も進展することは良く知られているが、20 歳代では褐色脂肪の有無で BMI や内臓脂肪量に差は

見られなかった。しかし、無い者は加齢に伴い肥満度が増加するのに対して、褐色脂肪を有する者は 40 才代になって 20 歳代と同程度の BMI や内臓脂肪量を維持していることが判明した。これらの結果は、加齢に伴う肥満に褐色脂肪が関与していることを示している。そこで次に、褐色脂肪の有無にかかわる因子を検索するために、熱産生タンパク質 UCP1 の遺伝子 SNP (-3826A/G) を調べたところ、野生型に比べて変異型では加齢に伴う褐色脂肪が著しいことが判った。更に、寒冷刺激時の自律神経応答を心拍変動から評価したところ、褐色脂肪を有する者は交感神経応答が強いことが明らかとなった。以上の結果から、ヒト褐色脂肪の加齢変化には、遺伝的要因に加えて寒冷刺激の強弱や交感神経の応答性の違いが関与している可能性が示された。

(8) レプチンおよびグレリンが絶食時の時間特異的体温調節反応に及ぼす影響

時澤 健, 尾上侑己, 内田有希, 森 久恵, 中村真由美, 永島 計
(早稲田大学 人間科学学術院 統合生理学研究室)

【背景】我々は絶食によって寒冷時の体温調節反応が弱められることを報告している。その反応は、マウスにおいて暗期と比べて明期に特に大きく弱められる。明期はマウスの非活動期であり、絶食によって大きく体温が低下するフェイズである。また絶食による視交叉上核の神経

活動の増加および室傍核の活動抑制が明期に顕著に見られるが、絶食によって引き起こされるどのような因子が時間特異的な反応を引き起こすのかは明らかではない。

【目的】絶食によって変化する摂食ペプチド (レプチンの低下, グレリンの増加) が時間特異的な体温調節反応に

関与しているか否かを検証する。

【方法】野生型およびレプチンを欠損する ob/ob マウスを、27℃の環境温で 12h-12h の明暗サイクルで飼育した。体温および活動の概日リズムが確認された後、20℃の寒冷暴露を明期または暗期に行った。また野生型マウスにおいて、腹腔内にグレリンを投与し、10℃の寒冷暴露を明期または暗期に行った。それぞれ寒冷暴露時の深部体温、酸素摂取量、活動量を測定した。また寒冷暴露直後に褐色脂肪組織および脳を採取した。

【結果】野生型マウスにおいては、寒冷暴露によって深部体温は変化しなかった。ob/ob マウスにおいて、寒冷暴

露により深部体温は有意に低下したものの、明期と暗期の間で有意な差は認められなかった。グレリンを投与した野生型マウスにおいて、明期に寒冷暴露によって深部体温は有意に低下した。一方暗期においては、寒冷暴露によって深部体温は低下せず酸素摂取量は有意に増加した。

【結論】レプチンの欠損は体温調節反応を弱めるが、絶食時に見られる時間特異的な体温調節反応の減弱には関与しないことが示唆された。一方グレリンの増加は、時間特異的に明期にのみ体温調節反応を弱める可能性が示唆された。

(9) プロスタグランジン E₂はどのようにして脳から消去されるか

松村 潔, 鈴木亜弥子 (大阪工業大学情報科学部)

前川真吾, 細川 浩, 小林茂夫 (京都大学・院・情報学研究科)

【背景と目的】プロスタグランジン E₂ (PGE₂) は感染・炎症時に脳血管内皮細胞で産生される。そして PGE₂ は脳の神経細胞に作用して発熱を引き起こす。それでは、どのようにして PGE₂ が脳から消去されるのか。この問題に対する明確な答えはまだない。これまでの研究によると、肺や腎臓において PGE₂ はプロスタグランジン脱水素酵素 (15PGDH) により代謝され、不活性化 (15-deoxyPGE₂) される。そこで本研究では、マウスの脳および脳脊髄液の流路における 15PGDHmRNA の発現を、定量的 RT-PCR および *in situ* hybridization 法で検討した。

【実験①脳脊髄液の流路】マウスの側脳室に墨汁 5μl を注入し 30 分後にその分布を調べた。墨汁は頸部リンパ節に集積していた。この結果および頭部切片の観察から、

脳脊髄液の流路を次のように結論した。脳室→脳底のくも膜下腔→嗅球周辺→鼻甲介→リンパ管→リンパ節→静脈。

【実験②15PGDHmRNA の定量的 RT-PCR】脳組織 (視床下部・線条体・大脳皮質を含み、脈絡叢・髄膜は含まない)、鼻甲介、肺の 15PGDHmRNA/β-actin mRNA を測定した。その結果、肺 1(1.8) > 鼻甲介 (0.63) > 脳 (0.16) となった。

【実験③15PGDHmRNA 発現細胞】*in situ* hybridization により、鼻甲介の一部の細胞が 15PGDHmRNA を発現していることを確認した。その細胞種はまだ特定していない。

【結論】以上の結果は脳脊髄液の流路に PGE₂ を不活性化する仕組みが存在することを示唆する。

(10) 終板器官周囲部でのノルアドレナリンの体温低下作用

大坂寿雅 (国立健康・栄養研究所)

ノルアドレナリンが視床下部視索前野に作用して体温調節に関与していることは古くから報告されているが、ノルアドレナリン注入によって体温は低下するという報告、上昇するという報告、低下-上昇の二相性反応

がおきるとする報告があり、一致していない。視索前野は様々な亜核から構成されており、ノルアドレナリン含有神経線維および受容体はこれらの部位に散在しているので、投与部位の細かな差異によって反応が異なるのか

もしれない。

正中視索前野や第三脳室周囲部を含む終板器官周囲領域には視索前野内で最もノルアドレナリン含有神経終末密度が高く、対寒反応誘起やプロスタグランジン(PG)E₂感受性の発熱誘起部位でもある。そこで、ノルアドレナリンによる体温調節系への影響の少なくとも一部はこの部位を介している可能性が考えられた。

ウレタン・クロラロース麻酔のラットの終板器官周囲領域にノルアドレナリンを微量注入したところ尾部皮膚温と足底部皮膚温が上昇し、酸素消費率・心拍数・結腸温度が低下した。熱放散の増加と熱産生の低下が協調的におきて深部体温が低下することが分かった。皮膚や結腸の温度変化は 1-100pmol の範囲で用量依存性であっ

た。 α_1 受容体作動薬であるメトキサミンを注入しても体温低下反応がおきたが、 α_2 受容体作動薬であるクロニジンや β 受容体作動薬であるイソプロテノールを注入しても反応はなかった。これらの反応は注入部位が終板器官周囲領域であるときに限られ、外側視索前野や尾側よりの内側視索前野に投与しても体温反応はおきなかった。ノルアドレナリン感受性部位に 130 fmol PGE₂ を注入すると熱産生・頻脈・体温上昇反応が誘起された。同じ部位にノルアドレナリンを前投与しておく、PGE₂ による反応は大きく減弱した。

ノルアドレナリンは終板器官周囲領域で α_1 受容体を介して体温低下をおこし、PGE₂ 発熱に拮抗することが分かった。

(11) 生存戦略としての生物時計—その分子・細胞メカニズム

本間さと（北海道大学大学院医学研究科生理学講座）

約 24 時間のリズムを自律的に発振する概日時計は、バクテリアからヒトまで共通したリズム発振やリズム同調機構をもつ。地球の自転に伴う 24 時間の明暗や温度周期に同調し、周期性を予測して体内の機能を整え、摂食、生殖、休息などの活動、およびそれに伴う体内環境を時間的に統合する概日時計は、生物の生存に必須の生体戦略である。概日時計は、さらに、中高緯度地帯における季節に伴う日長変化にも同調可能な光周性を示し、環境の様々な周期的変動に対応する時計として機能しうることが分かっている。

時計遺伝子 *Clock* のクローニングに始まる哺乳類分子時計研究は、ここ 10 年間にめざましい発展を遂げた。進展に大きく貢献した技術開発の 1 つに発光レポーターがある。自律振動が、時計遺伝子の転写促進と、蛋白産物によるその抑制の自律的な分子フィードバックによることから、遺伝子発現のルシフェラーゼレポーターによるリアルタイムモニタリングが威力を発揮する。発光レ

ポータートランスジェニック動物の培養組織における遺伝子発現リズムを計測した結果、従来哺乳類において概日時計が局在すると言われてきた視床下部視交叉上核(SCN)以外の脳内各部位や、心臓、肝臓、腎臓など全身の末梢臓器、さらには単一培養細胞にも概日時計があることが明かとなった。

我々は、最近、時計遺伝子 *Per1* 発現をルシフェラーゼでモニタリング可能な *Per1-luc* マウスの培養 SCN を用い、季節変化に同調する複数の時計細胞の局在を明らかにした。さらに、位相と周期の同時調節により 24 時間への同調を効率よく進めるのに SCN 内のリン酸化酵素が関与していることも分かった。一方、SCN に局在する光に同調する時計とは別に、食餌時刻に同調し、給餌時刻を予測する時計には、これまで報告された時計遺伝子は必須でないことも明かとなってきた。生存戦略としての、これら複数の時計と相互関係、それぞれの分子機構について述べたい。

(12) 温度受容と TRP チャネル

富永真琴 (自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター)

我々は日常的に多種多様の外部刺激にさらされている。そうした外部刺激を受容して電気情報に変換する分子として TRP (Transient Receptor Potential) スーパーファミリーに属するイオンチャネル群が注目を浴びている。TRP チャネルは6回の膜貫通領域を有し、第5, 6膜貫通領域の間にある短い脂溶性のループがポアを形成すると考えられている。ホモまたはヘテロ4量体として機能的なチャネルを形成すると推定されており、多くは高い Ca^{2+} 透過性を有する非選択性陽イオンチャネルである。*trp* 遺伝子は、1989年にショウジョウバエの眼の光受容器異常変異体の原因遺伝子として同定された。その後、*trp* のコードする蛋白質 TRP はイオンチャネルとして機能することが明らかとなり、これまでに多くの TRP ホモログが発見されている。現在、TRP スーパーファミリーは、哺乳類では大きく TRPC, TRPV, TRPM, TRPML, TRPP, TRPA の6つのサブファミリーに分けられている。

これらの中で、これまでに9つの TRP チャネルが温度感受性を有すると報告されており、Q10 値は10を超える。それぞれ特異な活性化温度域値を持ち、熱い温度によって活性化する TRPV1, TRPV2, 冷たい温度によって活性化する TRPM8, TRPA1, 温かい温度によって活性化する TRPV3, TRPV4, TRPM2, TRPM4, TRPM5 に分かれる。43度以上の高温, 15度以下の低温は痛み感覚を惹起すると考えられており、TRPV1, TRPV2, TRPA1 は侵害刺激受容体と捉えることもできるが、温度感受性 TRP チャネルは様々な生理機能に関わることが明らかになりつつある。このような温度受容体は哺乳類にかぎらず、多くの生物に広く存在する。しかし、温度刺激がどのようにしてチャネル開口をもたらすかは未だ明らかではない。

こうした温度感受性 TRP チャネルの構造と生理機能について概説したい。

(13) 体温調節の中樞神経メカニズム

中村和弘 (京都大学・生命科学系キャリアパス形成ユニット)

自律性体温調節を司る中樞として知られる視索前野では、局所温度に反応するニューロンが脳の温度をモニターしているほか、皮膚の一次求心性神経によって感知される外気温の情報も視索前野に伝達される。視索前野はこうした温度情報を統合し、体温を一定に保つ上で最も合理的な体温調節反応を行うための指令を様々な末梢効果器へと出力する。近年、体温調節システムの出力制御においては、視索前野から下向性に投射する抑制性ニューロンが鍵を握ることがわかってきた。熱産生などの対寒反応を起こす必要のないときには、この視索前野からの下向性シグナルが、対寒反応に促進的に作用する視床下部背内側核および延髄の淡蒼縫線核のニューロンを持続的に抑制しているが、視索前野に皮膚からの冷温度シグナルが入力したり、脳の局所温が低下したり、あるいは感染時に発熱物質 (プロスタグランジン E_2) が視索前野に作用すると、その下向性シグナルが減弱し、視床

下部背内側核および淡蒼縫線核のニューロンが脱抑制され、活性化される。そしてその興奮シグナルが交感神経節前神経 (非ふるえ熱産生および皮膚血管収縮) や運動神経 (ふるえ熱産生) の活性化を引き起こし、対寒反応を惹起する。

また、私達が最近同定した、体温調節に必要な皮膚温度情報を視索前野へと伝達する神経経路は、教科書的によく知られた、温度知覚に関わる脊髓視床皮質路とは異なった、新たな体性感覚経路であることがわかった。皮膚の一次求心性神経によって感知される冷覚および温覚の情報は脊髓後角でリレーされ、それぞれ脳幹の外側結合腕傍核に別々に分布する冷覚および温覚伝達ニューロン群へと伝達される。そしてそれらのニューロン群はその情報を視索前野に存在する冷覚および温覚伝達の局所ニューロン群へ伝達する。冷覚伝達の局所ニューロンは視索前野から下向性に投射する出力ニューロンを抑制す

ることで対寒反応を惹起したり対暑反応を抑制し、一方、温覚伝達の局所ニューロンはこの投射ニューロンを活性

化することで対寒反応を抑制したり対暑反応を惹起するものと考えられる。

(14) 「省エネ型体温調節」暑熱馴化の意義—個体レベルと社会レベルの観点から

紫藤 治, 松崎健太郎, 片倉賢紀, 丸山めぐみ, 李 光華 (島根大学医学部環境生理)

恒温動物がエネルギー消費を個体レベルで抑制するには体温を低下させるのが最も有効な方法と考えられる。事実、我々は熱産生発現閾値が極度に低下して変温性となっている特異な患者さんにおいて、冷涼環境下で患者さんの体温が下降するとそれに比例して代謝量が低下することを報告している。今回は恒温動物の体温調節機能を変温性へ誘導する可能性に言及すると共に、以下のように恒温動物の暑熱馴化とエネルギー代謝について考察する。

暑熱馴化により、様々な調節機構の変化が起こる。その一つとして核心温の低下がある。その低下の程度は $\sim 0.3^{\circ}\text{C}$ と僅かであるが、有意かつ確実に起こる。さらに、暑熱馴化により甲状腺ホルモンを含む種々の代謝性ホルモンが変化する。これらは、個体の代謝の抑制に繋がり、

個体レベルでのエネルギー消費の抑制に寄与する。特に長期暑熱馴化においては体温調節中枢のある前視床下部における神経細胞新生と新たな神経ネットワークの形成を伴う可能性が強く、長期的な馴化状態の維持による安定したエネルギー消費の減少が期待される。また、暑熱馴化により快適環境温度が上昇することが知られる。これは短期および長期暑熱馴化の両方で観察される。快適環境温の上昇は暑熱負荷時の行動性体温調節の発現を遅らせることになり、現代のヒトの行動性体温調節で顕著な地球エネルギーの消費を伴う暑熱刺激の回避行動（エアコンの使用）を抑制する。これは社会レベルでのエネルギー消費の抑制に寄与する。今後予想される環境温の上昇に対し、自己防衛とエネルギー消費の抑制の観点からもうまく暑熱に馴化することが望まれる。

(15) ハムスターの冬眠時体温調節機構と神経細胞保護

田村 豊 (福山大学薬学部)

Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*; 以下ハムスター) は、寒冷環境下 (5°C)、短日周期 (明期 8 時間, 暗期 16 時間) で飼育すると数週間の準備期間を経た後冬眠に入る。ハムスターの冬眠は、その体温変化により導入期、維持期、および覚醒期の 3 期に分類できるが、維持期ではハムスターの体温は約 6°C にまで低下する。しかし、音刺激あるいは触刺激を加えるとハムスターは冬眠状態から約 3 時間で正常体温に復帰する。これらの知見は、 6°C という低体温下においてもハムスターの神経機能が維持されていることを示唆している。これまでの研究により、冬眠導入期の体温下降は、 A_1 受容体を介する中枢アデノシン系が、維持期の低体温は μ 受容体を介するオピオイド系が、そして覚醒期の体温上昇には thyrotropin-releasing hormone (TRH) 系が重要な役割を果

たしていることを明らかにしている。そこで、冬眠時体温調節機構と神経機能維持機構の関係について検討を行った。

常法にしたがいハムスターの胎児より海馬初代培養大脳皮質ニューロンを調製した。培養 12 日目以降に培養温度を低下させると、 22°C 以下で温度依存性にアポトーシス様の神経細胞死が発現した。アデノシンおよび ATP は、 $1\sim 100\mu\text{M}$ の濃度において濃度依存性の神経保護作用を発現した。アデノシンと ATP の神経保護作用は A_1 受容体拮抗薬の 8-cyclopentyltheophylline および A_2 受容体拮抗薬の 3,7-dimethyl-1-propargylxanthine の併用により有意に減弱された。非選択的オピオイド受容体作動薬のモルヒネも $1\sim 100\mu\text{M}$ の濃度において濃度依存性の神経保護作用を発現した。モルヒネの神経保護作用は非選択

的オピオイド受容体拮抗薬のナロキソンの併用により有意に減弱された。一方、TRH は 100 μ M の濃度においても神経保護作用を発現しなかった。

以上の結果より、アデノシン系およびオピオイド系

は、冬眠時の体温下降や低体温維持に関与するだけでなく、低温による神経細胞死から神経細胞を保護することにより神経機能を維持していると考えられる。

(16) エネルギー代謝と体温調節の接点：昆虫の省エネ型体温調節

梅田真郷（京都大学化学研究所・超分子生物学研究領域）

体温は、生物が進化の過程で獲得した食性とエネルギー代謝系、温度環境や気候風土とも密接に関連しており、またその生物が生存できる土地を決める大きな要因でもある。生物はエネルギー状態を含めた体内環境をいかに把握・統合し、状況に応じた至適な体温を決めているのだろうか？「暑がり」と「寒がり」はどう違うのだろうか？このような疑問に答えるべく、ショウジョウバエ幼虫の体温調節行動に着目して研究を開始した。

従来、変温動物は環境温の変動に応じて体温が大きく変化することから、哺乳動物のような精密な体温調節システムを備えていない印象を与えがちであった。我々は、ショウジョウバエ幼虫の温度選択行動を定量的に測定する装置を開発し、ショウジョウバエ幼虫がその生育温度や餌の種類、さらには餌に含まれる脂質の種類によって微妙にかつ再現性良く選択する温度を変えることを見出

した。また、サーモグラフィー観察によりショウジョウバエ幼虫の体温はその選択した温度と一致することから、幼虫は体内の状態の変化を何らかのかたちで検知し、緻密に体温をコントロールしていると考えられた。

さらに、常に低温を好む低温選択性変異体 *atsugari* を同定し、その低温選択の分子機構について詳細な解析を進めた結果、ショウジョウバエ幼虫は、酸素濃度の変化を指標に体内のエネルギー代謝レベルを把握することにより、適正な温度環境（体温）を選択していることが示唆された。また、*atsugari* 変異体は顕著な低温耐性をも示すことが明らかとなった(*Science* **323**:1740, 2009)。

今回のシンポジウムでは、低温選択性変異体 *atsugari* の解析を中心に、ショウジョウバエのいわゆる「省エネ型」体温調節の分子機構について紹介したい。

23. 医学生物学用超高压電子顕微鏡 (H-1250M) の 30 年

2010 年 3 月 5 日 - 3 月 6 日

代表・世話人：有井達夫（生理学研究所）

- (1) 生理研超高压電子顕微鏡の特徴と三次元画像解析
有井達夫, 濱 清 (生理研)
- (2) エポン包埋切片の超高压電顕観察
片桐展子, 片桐康雄 (弘前学院大・看護), 有井達夫 (生理研)
- (3) 超高压電子顕微鏡を用いた生物試料観察, 特に神経細胞, 神経膠細胞観察への応用
小澤一史 (日本医大)
- (4) Application of the high voltage electron microscopy in neuroscience research
Im Joo RHYU (Korea Uni., Colleg. Med.)
- (5) 網膜ニューロン間の電気シナプスにおける開口チャネルの割合
日高 聡 (藤田保健大・医)
- (6) 医学生物分野における超高压電子顕微鏡の応用: 免疫組織化学染色法と逆行性標識法の適用例
坂本浩隆 (岡山大・理)
- (7) 300keV STEM (Titan) による 5 ミクロン厚切片の観察と超高压像との比較
重本隆一 (生理研)
- (8) 超高压電子顕微鏡との出会い
濱 清 (生理研)
- (9) E-PTA 染色を施したシナプスの超高压電子顕微鏡観察
五十嵐広明 (東邦大・医)
- (10) 超高压電子顕微鏡と組織化学
野田 亨 (藍野大・医療保健)
- (11) 神経成長因子受容体 TrkA の局在
西田倫希 (大阪大・超高压電顕センター)
- (12) 嗅球ニューロン・グリアの三次元構造解析
樋田一徳, 清蔭恵美 (川崎医大), 有井達夫 (生理研)
- (13) 神経突起のふくらみ(varicosity)の構造解析
遠藤泰久 (京都工芸繊維大・工芸科学)
- (14) 胎生期脳での神経新生に関わる細胞突起の形態・機能的解析
小曾戸陽一 (理化学研・CDB)

【参加者名】

Rhyu, Im Joo (Korea Univ.), 片桐展子 (弘前学院大), 小澤一史 (日本医科大), 五十嵐広明 (東邦大), 山西治代 (資生堂), 中村栄男 (名古屋大), 日高 聡 (藤田保健衛生大), 長浜真人 (鈴鹿医療科学大), 遠藤泰久 (京都工芸繊維大), 河田光博, 橋本 隆 (京都府立医科大), 野

田 亨 (藍野大学), 西田倫希, 森博太郎 (大阪大), 小曾戸陽一 (理化学研・CDB), 清蔭恵美, 樋田一徳 (川崎医科大), 小坂俊夫 (九州大), 有井達夫, 川口泰雄, 重松直樹, 重本隆一, 永谷幸則, 浜 清, 古家園子, 村田和義, 山口 登 (生理研)

【概要】

生理学研究所の超高压電子顕微鏡は、生理学研究所の昭和55年3月の研究会「医学生物学における超高压電子顕微鏡のあり方」を、具体化したものである。

医学生物学分野への応用を目的に昭和57年3月に搬入され、同年9月より全国に課題を公募して11月より使用が開始された。以来27年余が経過しているが、この間安定に稼働し、全国でも唯一の医学生物学専用機として装置は高い稼働率で利用されてきた。

今年は、この超高压電子顕微鏡の計画以来30年が経過するという節目の年に当たり、4年前の平成18年2月に

開催された研究会「超高压電子顕微鏡の医学生物学分野への応用」参加者を中心に参加を呼びかけて、研究会を開いた。

これまでの特徴的な研究を報告する機会を設け、平成22年4月から法人化後、第2期に入ることになる自然科学研究機構にとっての今後の展望を図るための良い機会ともなった。形態情報解析室の後任研究教育職員として村田和義准教授が平成21年12月に赴任されたので生理学研究所の医学生物学超高压電子顕微鏡を用いての成果を伝える良い機会ともなった。

(1) 生理研超高压電子顕微鏡の特徴と三次元画像解析

有井達夫, 濱 清 (生理研)

生理学研究所の超高压電子顕微鏡(H-1250M型)は、1981年に開発された東京工業大学の超高压電子顕微鏡(H-1250S型)のドライでクリーンな真空系と高分解能光学系を基に、医学生物学用に役立てるために各種の工夫をして導入された世界で初めての医学生物学専用機種である。医学生物学用としての超高压電子顕微鏡の重要な特徴は、厚い試料の立体観察($\pm 0^\circ$ の傾斜像による)と解析が可能なことである。このために、超高压電子顕微鏡にユーセントリックサイドエントリー試料傾斜機構を導入し、さらにローテーションフリーズーム機能を付加して、全ての倍率で傾斜軸をフィルムの長辺に平行となるように設定した。試料面内でユーセントリック機能を維持しつつ回転できる回転ホルダーや傾斜像撮影にあたって露光量を一様に制御する工夫と露光量を一様に制御しかつ未照射領域の一度の照射による結像を可能とするために、試料下と試料上に2個のメカニカルシャッターを超高压電子顕微鏡としては初めて導入している。

その後も液体窒素レベルのクライオトランスファーホルダー(Gatan 626特)など各種付属装置を導入している。1994年には低倍においてより広い視野を光軸に沿ってより平行な電子線で照射できるように対物レンズを試作し導入した(倍率調整の都合により、現在は、傾斜軸はフィルムの長辺より約 5° 回転している)。1035本の走査線を持つ高感度撮像管ハーピコン管を導入している。イメージングプレート(FDL5000)による撮影も可能とした。1995年には、 -60° から $+60^\circ$ まで 1° から 2° 間隔で連続傾斜した像からトモグラフィ再構築を行えるようにサイドエントリー試料傾斜台を改良して全国の医学生物学分野の研究者により一層の便宜を図っている。360度回転ホルダーも導入している。

本体は2010年3月現在で、試料位置で 7×10^{-6} Pa台の真空度を保って安定に稼働している。この装置を用いての3次元画像解析手法と問題点などを紹介した。

(2) エポン包埋切片の超高压電顕観察

片桐展子, 片桐康雄 (弘前学院大・看護学部)

有井達夫 (生理研)

イソアワモチ(軟体動物・腹足類)には多種類の光受

容系(柄眼, 背眼, 皮膚光覚, 神経光覚)が存在する。

そのうち、背眼内のレンズ細胞と皮下組織に分布する皮膚光覚細胞（DP 細胞）は他に例のない特異な感桿型光受容細胞である (Katagiri, Y. et al. 1985)。両細胞は大形で、互いに似た微細形態を有する。両細胞の軸索の有無など興奮伝達機構を明らかにする目的で、厚切りの連続切片を効果的に超高压電顕観察するための試料作製法を検討した。(1) 2%オスミウムリン酸緩衝液で4℃、2時間固定、(2) 2%オスミウム水溶液で、40℃、48時間処理、(3)背眼のレンズ細胞に HRP 注入後、および、(4) 背眼を含む組織を硝酸ランタン液に浸漬した後、(1)に従って固定。どの方法も脱水過程で酢酸ウラン染色し、エポン樹脂に包埋した。他にも多くの方法を試みたが、(2)の加温オスミウム染色が適当であった。その理由：①組織全体

が高コントラストになる。②無染色でグリッド上の切片の光顕観察ができる。③DP 細胞周囲にある筋線維が弛緩し、DP 細胞は球形を呈し、軸索起始部が見つけやすい。ただし、④組織全体は脆くなるので取り扱いには注意が必要、⑤膜構造の保存は劣る。多数枚の連続切片を扱う工夫：グリッドに載せた切片の上に支持膜を覆って切片を保護した。電子染色には、半切して中央に切り込みをいれた特製シリコンチューブを用い、切り込みに約 10 枚のグリッドを挟み、チューブを細いガラス管に入れて一括して染色、水洗を行った。準厚切連続切片の観察から DP 細胞側面から軸索が出ることや軸索が神経束に入るまでの走行を追跡できた。

(3) 超高压電子顕微鏡を用いた生物試料観察、特に神経細胞、神経膠細胞観察への応用

小澤一史（日本医科大学大学院医学研究科 生体制御形態科学分野、
大阪大学超高压電子顕微鏡センター）

微細構造を三次元で観察することは通常の透過型電子顕微鏡観察の世界、すなわち x, y の軸に加え、z 軸の情報を加えて観察することになり、その情報はより世界を広げて細胞、組織を観察することになる。この生物試料の微細構造の三次元観察を行うにあたって、超高压電子顕微鏡は圧倒的な可能性を提供し、極めて高い応用性も持つことが明らかになりつつある。

我々は主に神経細胞における情報伝達機構を観察する目的で、神経細胞の樹状突起の棘 (spines) の微細構造変化や神経細胞の補助、補佐作用を有する神経膠細胞の超微細構造変化を観察しているが、通常の透過型電子顕微鏡観察では二次元的断面の観察が出来ても、全体構造を立体的に捉えることは難しく、これを解決するためには連続切片の観察と画像収集というかなりの労力が求められる。超高压電子顕微鏡観察では、通常の透過型電子

顕微鏡観察のための試料に比べ、50～60 倍の厚さの切片を用いて観察することが出来る、すなわち 50～60 倍の Z 軸方向の情報を得ることが出来るので、三次元的視野がそれだけ広がることになる。これらの情報を、コンピュータで立体構成する電顕トモグラフィーを用いて、微細構造の三次元観察を行うことによって、神経細胞や神経膠細胞構築のダイナミックを効果的に描出することに成功した。特に神経膠細胞の細かなメッシュ状構造の精密さの観察に関しては、超高压電子顕微鏡による観察が最も詳細を観察できるものと言える。超高压電子顕微鏡は、神経系での観察例に限らず、その他の細胞や組織の観察にも様々な応用ができる可能性を持っており、今後その応用性の探究により更に医・生物学的分野への有用性が広がるものと確信する。

(4) Application of the High voltage electron microscopy in neuroscience research

Im Joo Rhyu (Department of Anatomy College of Medicine Korea University)

Brain tissue is very complicated network composed of

numerous neurons and glial cells in three dimensions.

Synapses are specialized interneuronal junctions where signals are propagated from one to another. Most excitatory synapses consist of presynaptic axon terminals and postsynaptic dendritic spines in a mammalian central nervous system, which are closely related with various neuronal activities.

With relative thick section serial sections of the cerebellum, efficient three dimensional reconstructions were possible compared with conventional TEM. I could observe detailed morphology of neuron and glial cells in cerebellar neurons including Purkinje cell, granule cell, basket cell and satellite cell could be observed in Golgi impregnated cerebellar slices with HVEM. Diverse Purkinje cell dendritic spine morphologies were categorized into thin, stubby, mushroom, and branched type and their normal distribution ratio and morphometric characteristics were determined. I have

investigated the characteristics of the spine after prolonged motor skill learning animal model. The three dimensional electron tomography of cultured neuron would contribute to detailed mechanism of synapse formation and pruning.

In addition to cells in the brain blocks, cultured neurons and glial cell morphology were analyzed successfully by investigating Golgi impregnated glial cells such as astrocyte and Bergman glial cell. Recently, I have analyzed mitochondrial morphology on the whole mount grid covered with of astrocyte. Thanks to strong penetration power of HVEM, diverse morphology of mitochondria could be analyzed without sectioning. Basic morphological parameters were measured and this could be used for linking function and morphology.

HVEM is one of the best options to explore nervous system.

(5) 網膜ニューロン間の電気シナプスにおける開口チャネルの割合

日高 聡 (藤田保健衛生大学医学部生理学教室)

本研究は、網膜水平細胞、アマクリン細胞と網膜神経節細胞の同型細胞間でのギャップ結合による連結について、ギャップ結合チャネルの分布とパッチクランプ法によってニューロン間で同時に記録された電氣的カップリングとの関係を解明することを目的とした。これらのニューロン間の電気シナプスにおける開口チャネルについて、神経科学実験法の多様な実験方法：2 連のパッチクランプ法、細胞内染色法、ギャップ結合チャネル蛋白・コネキシンについての免疫細胞化学法、凍結切断レプリカ法および超高压電子顕微鏡実験法を用いて解析した。ニューロン間のギャップ結合コンダクタンスを 2 連のパッチクランプ法を用いて各ニューロンのペアで測定した (最大コンダクタンス：水平細胞, 44.06nS ; アマクリン細胞, 5.48nS ; 網膜神経節細胞, 2.45nS)。細胞内染色されたニューロン間のギャップ結合連結の数とそれらのギャップ結合斑の大きさをレーザー共焦点顕微鏡と超高压電子顕微鏡実験法を用いて測定した。凍結切断レプリ

カ法では 1 つのギャップ結合斑にあるギャップ結合チャネル・コネクソン粒子の密度を同定することによって、1 つのニューロンのペアに存在するコネクソン粒子の全体数を推定した。それぞれのニューロン間のギャップ結合を構成するギャップ結合チャネル蛋白・コネキシンの型を同定し、単一チャネルのギャップ結合コンダクタンスの値を入力すれば、それぞれのニューロンのペアが発生すべきギャップ結合コンダクタンスの全体値が推定できる。このような方法を用いて、実際に電気生理学的に測定したニューロンのペアでの最大コンダクタンスから、それぞれの網膜ニューロンのギャップ結合における開口したチャネルの割合を同定した。水平細胞で 0.3%、アマクリン細胞で 0.1%であり、網膜神経節細胞では 0.7%であった。このようなギャップ結合における非常に少ない開口したチャネルの性質から、ギャップ結合チャネルを積極的に開口させる細胞内情報伝達系の関与が考えられる。

(6) 医学生物分野における超高圧電子顕微鏡の応用： 免疫組織化学染色法と逆行性標識法の適用例

坂本浩隆（岡山大学大学院自然科学研究科バイオサイエンス専攻）

ラット球海綿体筋を支配する球海綿体脊髄核 (SNB) は、腰部脊髄 (L5-L6) に存在し、雄優位の性的二型核を示す運動ニューロン群であり、陰茎勃起や射精など、雄の性行動に重要な役割を果たすことが知られている。一方、最近我々は、ガストリン放出ペプチド (GRP) ニューロンが、腰髄内に雄優位な神経ネットワークを構築し、雄の性機能を調節していることを明らかにした。これら雄優位の性的二型を示す脊髄 GRP 系と SNB ニューロンは、共に血中アンドロゲン濃度の影響を強く受けていることから、機能的連関がある可能性が示唆される。本研究では、GRP 免疫組織化学染色法と SNB ニューロンの逆行性標識法とを組み合わせることにより、超微形態学的に SNB ニューロンの樹状突起上に GRP 作動性のシナ

プスの入力が存在するかどうかを、超高圧電子顕微鏡 (日立: H-1250M, 生理学研究所) を用いて解析した。雄ラットの球海綿体筋から西洋ワサビペルオキシダーゼ結合コレラトキシン β サブユニットにより逆行性標識された SNB ニューロンをテトラメチルベンジジン法で、また、GRP 免疫組織化学染色を従来のジアミノベンジジン法でそれぞれを可視化した。その結果、SNB 運動ニューロンの樹状突起上に GRP を含む多くのシナプスが存在していることを、超高圧電子顕微鏡下、三次元的に明らかにした。球海綿体筋の収縮は陰茎勃起や射精に深く関与しており、SNB への求心性 GRP を含むシナプス入力を介して雄の性行動を制御している可能性が高い。

(7) 300keV STEM (Titan) による5ミクロン厚切片の観察と超高圧像との比較

重本隆一（生理研）

5 ミクロン程度までの厚切り標本を高解像度で観察するためには、超高圧電子顕微鏡が最も適していることが知られている。しかし、超高圧電子顕微鏡は極めて高価であり維持が困難であることから世界的に生物試料を観察できる装置は数少なくなっている。そこで今回は 300keV の走査透過型電子顕微鏡を厚切り標本に適用し、超高圧電子顕微鏡に代わる観察法としての可能性を試みた。使用した標本はマウス小脳のゴルジ染色標本でプルキンエ細胞の樹状突起を観察した。300keV STEM (Titan) によって-70 度から 70 度まで 2 度おきに画像を取得し、imod によるトモグラフィー解析も行った。その結果、

300keV の走査透過型電子顕微鏡によって 5 ミクロン厚切片に含まれるプルキンエ細胞の樹状突起を観察することは十分可能であり、試料の表面から 2 ミクロン程度までは超高圧電子顕微鏡に匹敵すると思われる解像度が得られることが分かった。しかし、それ以上の深度では試料内のビーム拡散によると考えられるボケが認められ、同じ標本を超高圧電子顕微鏡で撮影したものに比べるとはっきりとした差があることが判明した。以上より、300keV の走査透過型電子顕微鏡は 2 ミクロン程度の厚みの切片であれば、超高圧電子顕微鏡を代用することが出来ると考えられた。

(8) 超高圧電子顕微鏡との出会い

濱 清（生理研）

超高圧電顕 (HVEM) の高い分解能と高い透過能を切片

試料を用いて検討し、第1回国際 HVEM 学会で発表した。

此の研究によって初めて HVEM の医学, 生物分野への有効な応用の道が開かれたと評価された。

1982年に生理学研究所に設置された HVEM は, HVEM によって初めて可能と成った厚い試料の立体観察によって得られる形態情報の豊かさ (視野分解能の高さ) に着目し, 立体観察のみでなく, 3 次元の定量解析が可能な特性を備える世界で唯一の生物学専用の HVEM を目指したものであった。特に生物試料観察に重要な, Rotation free, zoom の光学系を持ち, 正確な傾斜角で Eucentric tilt を行う事が出来, しかも試料回転装置を備えた Side entry の試料台を採用する等の特性を持っている。此の HVEM

を用いて以下の様な実験を行った。

- 1) 立体画像による横紋筋, T-細管の 3 次元定量解析。
- 2) 立体画像による歯状回顆粒細胞の Denritic spine の 3 次元定量解析。
- 3) Computer tomography による astrocyte の微細突起の 3 次元定量解析等を行った。CT 解析の場合, 12.7 nm/pixel で 2 軸同時解析を行うと, 面積/体積は 48.6/μm であった。Astrocyte の表面には各種の channels, transporters, receptors 等を持つ事が知られているので, 非常に大きな表面で神経細胞に接し, 単なる支持ではなく, 中枢での神経情報の処理に関わる事を示唆している。

(9) E-PTA 染色を施したシナプスの超高压電子顕微鏡観察

五十嵐広明 (東邦大学医学部解剖学講座微細形態学分野)

シナプスを特異的に染色する ethanolic phosphotungstic acid (E-PTA) 染色を施したシナプスの超高压電子顕微鏡による観察が出来れば, 厚切り切片中に丸ごとのシナプスの観察も可能と考え, E-PTA 染色を施したシナプスの超高压電顕観察を試みた。材料にはラット大脳前頭皮質を用いた。原法が 1% E-PTA 1 時間染色であるので, 3% E-PTA あるは 5% E-PTA を, それぞれ 1 時間あるいは 3 時間染色し, 0.5 μm, 1 μm, 2 μm, 3 μm の切片を作製して超高压電顕で観察し, E-PTA に染色されたシナプスが観察出来るのか, 出来るのであれば最適な条件は何かを検索した。なお, 最小の 0.5 μm 厚の設定は, E-PTA 染色によるヒトあるいはモルモット等の大脳皮質のシナプスの直径が 0.24~0.42 μm と計測されていたことによる。観察したすべての厚さの切片でシナプスが観察出来た

が, 2 μm および 3 μm の厚切り切片ではコントラストが弱くて蛍光板での観察がしづらく, 更にシナプスの重なりも見られてシナプスの詳細な観察には適していなかった。最も薄い 0.5 μm の切片では比較的コントラストが強く, presynaptic dense projection (PDP), intracleft line, および postsynaptic density (PSD) が観察された。また, PDP が六角形あるいは三角形の分布様式をとって構成する presynaptic grid, および PSD に perforation も観察出来た。切片に 90° の傾斜をかけて同一のシナプスの正面像と側面像を得ることが出来, 丸ごとのシナプスであることも確認されたので, 超高压電顕によるシナプス観察には 5% E-PTA 3 時間染色, 0.5 μm 切片の観察が適していると結論した。

(10) 超高压電子顕微鏡と組織化学

野田 亨 (藍野大学 医療保健学部 理学療法学科)

超高压電子顕微鏡を用いて細胞を構成している形質膜, 核などの細胞内小器官を立体的に観察するためには 1~数 μm の厚みのある切片を直接, あるいはステレオ観察することが必要となる。しかし, 厚みのある切片を透過像で観察すると切片内に含まれる種々の構造が重なっ

て, 目的とする対象物の観察を困難にすることがある。そこで特定の細胞内の対象物を選択的に高電子密度に染め出すことのできる, 組織化学法が有効となる。

上記の目的に適した組織化学には大きく分けて, 3 種類あり, 酵素組織化学, オスミウムなどの重金属を用い

た染色法，そして免疫組織化学である。しかし，免疫組織化学のうちの酵素抗体法で標識された部位の可視化は酵素組織化学の一部とも考えられる。これらのうち細胞の形質膜や細胞小器官の立体構造の選択的可視化に適している方法としては単に標識がある対象物に存在しているだけでは充分ではなく，構造をくまなく，しかも高電子密度に染め出すものに限られる。本研究会ではこれま

で著者らが用いてきた ALPase, IDPase などの鉛法を用いた phosphatase 類, cytochrome oxidase, ferricyanide を含む四酸化オスミウム溶液, Zinc-Iodide Osmium (ZIO)法などいくつかの組織化学的方法を使って描出した実例を紹介し，超高压電子顕微鏡と組織化学を組み合わせた観察法の有用性を述べる。

(11) 神経成長因子受容体 TrkA の局在

西田倫希（大阪大学・超高压電子顕微鏡センター）

神経成長因子(NGF)は神経細胞におけるシナプス形成と生存維持に重要な分化誘導因子である。その作用は細胞膜に存在する受容体 TrkA と高親和的に結合することによって発現する。受容体 TrkA がカベオラと呼ばれる細胞膜陥入部位に局在することを示唆する報告がなされたが，微細構造については不明な点があった。TrkA 局在部位の細胞膜構造を明確にするため神経系培養細胞 PC12 を用い，免疫細胞化学的に超高压電子顕微鏡 3 次元トモグラフィーにより検討した。TrkA 免疫反応は細胞膜上で円形構造として見られ，膜直下には TrkA 免疫陽性な直径 50nm 以下の小胞が見られた。3D 画像解析より TrkA 陽性の細胞膜にラッフリングとカベオラ構造と異

なる直径 50 nm 以下の陥入構造の存在が示された。この膜領域は光学顕微鏡レベルでは斑点状に見られたことから，TrkA はカベオラではなく脂質ラフトのような特別な膜ドメインに局在する可能性が考えられた。また，カベオラ関連タンパク “カベオリン-1” の局在は細胞膜よりも細胞質に主に見られた。細胞質側では網目様構造を呈し，細胞膜側でカベオラ構造は見られず，免疫反応が集まりクラスター化していた。これら結果より TrkA とカベオリン-1 はそれぞれ異なる膜領域に局在し，カベオリン-1 は膜陥入形成と異なる機能を有する可能性が示唆された。

(12) 嗅球ニューロン・グリアの三次元構造解析

樋田一徳，清蔭恵美（川崎医科大学），有井達夫（生理学研究所）

広視野と高コントラストでの生物試料の撮影が可能な生理研超高压電顕を用いて，我々は嗅覚の一次中枢の嗅球のニューロンとグリアについて，その微細構造レベルの三次元構造解析を行なってきた。まず calbindin, tyrosine hydroxylase, calretinin の各免疫陽性ニューロンを解析した。方法は蛍光染色した後に PAP-Co/Ni-DAB 法で，また Streptoavidin-Fluorogold により蛍光標識後の銀増感法を用い，共焦点レーザー光顕像と超高压電顕像を比較解析した。光顕では解析し得ない細い突起や複雑な突起の絡み合いの中から単一の突起の追跡が超高压電顕では可能となり，電顕連続切片再構築データの裏付

けがなされた。一方，グリアは全体像を標識する適切なマーカーがないためにゴルジ染色を用い，ニューロンの細胞体と樹状突起を取り巻くアストロサイトの形態が，嗅球各層によって多様性を富んだ形態を示していることが明らかとなった。特に顆粒細胞を取り巻くグリアの形態は特徴的で，現在，トモグラフィー立体解析を行なっている。

ニューロンやグリアの標識は遺伝子レベルでの標識も可能となり，今後，超高压電顕の応用性と有用性は更に高まり，有効に使用したいと考えている。

(13) 神経突起のふくらみ (varicosity) の構造解析

遠藤泰久 (京都工芸繊維大・工学科学)

神経細胞の突起の途中に形成される数珠状の膨大部 (varicosity) はシナプス形成に関わるだけでなく、脳内や末梢組織における非シナプス的情報伝達部位として機能する。我々の培養細胞を用いた研究により、varicosity の形成頻度が標的細胞との混合培養によって増加し、微小管重合阻害剤 taxol により動きが抑制されることなどが明らかとなっているが、大きさは数 μm しかなく形成機構はほとんど不明である。ホルムバール支持膜を張った金メッシュ上に神経細胞株 (PC12 および NG108-15 細胞) を培養し細胞骨格タンパク質に対する抗体や軸索ガイド

分子受容体に対する抗体で免疫染色し臨界点乾燥した試料を、超高圧電子顕微鏡 (H-1250M, 加速電圧 1000kV) で-60 度から+60 度まで 2 度刻みの傾斜撮影し IMOD により 3 次元画像解析を行い、これまでに微小管、分泌小胞、軸索ガイド分子受容体ニューロピリンなどの分布を明らかにしてきた。varicosity の細胞膜には斑点状に受容体が集積し、糸状仮足も多数みられる。内部では微小管が疎らで走行方向が不ぞろいであり、多数の分泌小胞の蓄積と関連していると考えられる。

(14) 胎生期脳での神経新生に関わる細胞突起の形態・機能的解析

小曾戸陽一 (理化学研・CDB)

脊椎動物の発生期の脳形成過程で、中枢神経系の神経細胞は、神経管を縁取る脳室帯に存在する「神経前駆細胞」から生み出される。我々は生理学研究所・超高圧電子顕微鏡 (H-1250M) を用い、ゴルジ染色像の神経前駆細胞の形態学的な観察から細胞分裂時に、その basal process が分裂している可能性を提示した。

増殖中の神経前駆細胞では、その細胞核が「細胞周期」に従って脳室帯を往復運動することが知られている(“エレベーター運動”)。エレベーター運動の正常な進行と胎生期脳での神経新生には関連が示唆されており、この運動の特徴である「組織構造の秩序を保ちつつ、細胞周期に従った」核移行メカニズムの解明は、胎生期の脳形成

を理解する上で重要である。1930 年代の現象発見以来、その動作機構について不明な点が多かったエレベーター運動について、我々は包括的解析を試みた。本研究を始める上で、方向に依存した能動的及び受動的な細胞核の運動が、時(細胞周期)空間(上皮極性)的に秩序立った「組織の恒常性維持」に重要であるとの作業仮説を立てた。仮説の検証を目的として、細胞生物学的手法、マウス胎児脳組織を用いた定量的タイムラプス測定および生理学研究所・超高圧電子顕微鏡を用いた形態学的解析で特定の分子装置の役割を検討した。その結果、組織内での細胞運動を理解するための新規メカニズムが見出されたので、これを紹介する。

24. 光を用いた神経活動の操作 ー操作法開発から神経回路研究への応用ー

2009年9月3日ー9月4日

代表・世話人：西丸広史（筑波大学大学院人間総合科学研究科）

所内対応者：小泉 周（自然科学研究機構生理学研究所）

- (1) チャネルロドプシンの構造ー機能連関にもとづく光操作ツールラインアップ
八尾 寛（東北大学大学院生命科学研究科脳機能解析分野）
- (2) フェムト秒レーザーの発生と計測応用
杉田篤史（静岡大学工学部）
- (3) レーザー機器の安全な取り扱い
佐藤庸一（分子科学研究所分子制御レーザー開発研究センター）
- (4) エフェクター内蔵型微生物光センサー分子、光活性化アデニル酸シクラーゼ（PAC, パック）の
発見から展望まで
渡辺正勝（総合研究大学院大学先端科学研究科；基礎生物学研究所大型スペクトログラフ室）
- (5) GABA ニューロンを標的として機能プローブを発現させる遺伝子改変マウスの開発
柳川右千夫（群馬大学大学院医学系研究科遺伝発達行動学分野）
- (6) ダイナミッククランプ法を用いた局所神経回路網の操作
井上 剛（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科）
- (7) 視床下部神経活動の光操作による本能行動制御について
山中章弘（生理学研究所細胞生理部門）
- (8) 光によるアゴニスト投与と内因性リガンド可視化を用いた
脳内プリン作動性シグナリング機構の解析
加藤総夫（東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター神経生理学）
- (9) ChR2 遺伝子導入マウスを用いた大脳運動野神経回路の光制御
松崎政紀（東京大学大学院医学系研究科疾患生命工学センター）
- (10) いかにして光感受性チャネルを十分量発現させるか？
田中謙二（生理学研究所分子神経生理部門）
- (11) 多様なロドプシン類の性質と光スイッチへの適性
小柳光正（大阪市立大学大学院理学研究科生物地球系専攻）
- (12) メラノプシンの網膜遺伝子導入による視機能の回復
小泉 周（生理学研究所広報展開推進室）
- (13) 特定のグルタミン酸シナプス伝達を制御する神経の暗号
久原 篤（名古屋大学大学院理学研究科）

【参加者名】

西丸広史（筑波大学大学院人間総合科学研究科）、小泉周（生理学研究所広報展開推進室）、山中章弘（生理学研究所細胞生理部門）、田中謙二（生理学研究所分子神経生理部門）、八尾 寛（東北大学大学院生命科学研究科脳機能解析分野）、杉田篤史（静岡大学工学部）、佐藤庸一（分

子科学研究所分子制御レーザー開発研究センター）、渡辺正勝（総合研究大学院大学先端科学研究科；基礎生物学研究所大型スペクトログラフ室）、柳川右千夫（群馬大学大学院医学系研究科遺伝発達行動学分野）、井上 剛（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科）、加藤総夫（東京慈恵

会医科大学総合医科学研究センター神経生理学), 松崎政紀 (東京大学大学院医学系研究科疾患生命工学センター), 小柳光正 (大阪市立大学大学院理学研究科生物地球系専攻), 久原 篤 (名古屋大学大学院理学研究科), 榎木亮介 (北海道大学大学院医学系研究科先端光イメージング研究拠点), 清末和之 (産業技術総合研究所脳神経情報研究部門), 松尾直毅 (藤田保健衛生大学総合医科学研究科), 本蔵直樹 (大阪大学大学院生命機能研究科), 荒田晶子 (兵庫医科大学医学部), 斎藤良治, 小林 茂 (株式会社オリンパスエンジニアリング開発部), 本村伸二, 本田 進 (オリンパス株式会社 MIS 事業部), 石塚 徹 (東北大学大学院生命科学研究科), 赤崎孝文 (京都産業大学コンピュータ理工学部), 山野辺貴信 (北海道大学大学院医学研究科生理学講座), 野崎展史 (茨城県立医療大学保健医療学部), 太田宏之 (防衛医科大学医学部生理学

講座), 大塚稔久 (山梨大学大学院医学工学総合研究部), 大石 仁 (愛知医科大学医学部解剖学講座), 浅野航平 (東京大学大学院情報理工学系研究科), 檜山武史, 野田昌晴, 作田 拓 (基礎生物学研究所統合神経生物額研究所), 宇理須恒雄, 永廣武士, 浅野豪文, 藤原邦代 (分子科学研究所生体分子情報部門), 志内哲也, 松尾 崇, 岡本土毅, 横田繁史 (生理学研究所生殖内分泌系発達機構部門), 金田勝幸, 木下正治, 坂谷智也 (生理学研究所認知行動発達機構部門), 松田尚人 (生理学研究所生体膜部門), 富永真琴, 常松友美, 三原 弘, 内田邦敏 (生理学研究所細胞生理部門), 加勢大輔 (生理学研究所神経シグナル部門), 稲田浩之, 渡部美穂 (生理学研究所生体恒常機能発達機構部門), 松井 広 (生理学研究所脳形態解析部門), 東島眞一, 木村有希子 (生理学研究所神経分化部門), 稲村正子 (生理学研究所分子神経生理部門)

【概要】

神経科学研究, 特に神経回路の作動機序の研究とその知見の応用を進めていく上で, 単一の神経細胞や神経細胞集団の活動を人為的に制御できる技術の開発と応用は非常に重要な課題である。こうした技術のなかで, 光を感じて神経細胞の電気信号に変換することができるチャンネルロドプシン, ハロロドプシンやメラノプシンなどの光感受性電位変換色素を用いた研究が最近注目を集めている。今回, こうした光による神経活動の操作を用いた研究や実験手法, それによる神経機能研究における情報交換および議論を目的とした研究会を開催した。研究会では, 光センサー分子の生物学的な基礎研究, 光感受性電位変換色素の改良を目指したチャンネルロドプシン変異体の研究, 精緻な光制御には欠かせないレーザー機器の最新技術およびその安全な取り扱い, さらには光感受性電位変換色素を遺伝子改変マウスに発現させる技術の最前線の研究など, この光による神経活動の制御法を支え

る基本的な技術や知見に関する研究発表が行われた。また, 哺乳類の神経回路研究への応用として, 網膜, 延髄, 視床下部, 視床, 大脳皮質など神経系における幅広い範囲での研究成果の発表が行われた。さらに哺乳類だけでなく, 重要なモデル生物である線虫の神経回路においてハロロドプシンを用いた研究成果が発表され, この手法の有効性があらためて印象づけられた。各研究室の独自の取り組みが持ち寄られたこれらの発表をもとに活発な意見交換・議論が行われ, 光感受性電位変換色素による神経活動の操作の大いなる可能性が注目された。その一方で動物におけるこれらの分子の発現の効率的な発現や制御方法の問題点も数多く指摘された。この分野の日本国内における発展のために本研究会のような形で異なる分野の研究者間の交流を深めることの重要性が再確認され, 来年度以降の開催の必要性が強調された。

(1) チャンネルロドプシンの構造—機能連関にもとづく光操作ツールラインアップ

八尾 寛 (東北大学大学院生命科学研究科脳機能解析分野)

ロドプシンファミリータンパク質は光トランスデューサー分子の代表的なものである。7 回膜貫通部位を有するオプシントタンパク質の 7 番目の膜貫通部位に, レチ

ナールがシッフ塩基結合した共通の構造が, シアノバクテリアから哺乳類にいたる多くの生物に認められている。クラミドモナスなどの単細胞緑藻類においては, 原

核生物型のロドプシン（チャンネルロドプシン）が光受容に関与している。チャンネルロドプシンにおいては、光受容のオン・オフがイオンチャンネルのゲートを開閉するので、光信号を電気信号に変換するトランスデューサーとしての応用が期待される。クラミドモナスにおいては、チャンネルロドプシン 1(ChR1)と 2(ChR2)の 2 種類が報告されている。われわれの研究において、光受容とチャンネルゲーティングの双方に関与する構造が 5 番目の膜貫通

領域に存在することが示唆された。また、イオンフラックスに関与する構造が 2 番目の膜貫通領域と 3 番目の膜貫通領域のリンカードメインに存在することが示唆された。構造－機能連関研究により、光吸収特性、キネティクス、光電変換効率などにおいて、多様なチャンネルロドプシンを作り出すことができる。それらの応用例についても紹介した。

(2) フェムト秒レーザーの発生と計測応用

杉田篤史（静岡大学工学部）

フェムト秒レーザーは、励起源であるレーザーダイオードの製造技術の進歩に牽引され、近年急速に普及している。この光源技術を利用することにより多光子顕微鏡等のバイオメディカル応用、透明物質の内部加工、非熱加工等の産業応用等のユニークな光技術が誕生した。本講演ではフェムト秒レーザーの基盤技術である①光パルスの発生原理と物質中の伝播に関する基本性質、②非線形光学効果を利用した応用技術の 2 項目について発表する。光パルスの発生原理は、通常モードロック発振法といわれる手法が用いられる。この発生法の基本概念に

ついて議論した後、それを実現するためのレーザー媒質や共振器に求められる要請について触れたい。非線形光学効果を利用した応用技術として時間分光法、和周波法・差周波法による波長変換技術、多光子励起分光等について解説する。フェムト秒レーザーの性能は、通常発振波長、パルスエネルギー、パルス幅、発振繰返し周波数の 4 点より分類される。現在どのようなレーザーが利用可能か、またそれぞれのレーザーを用いるとどのような技術が実現することができるのかについても報告した。

(3) レーザー機器の安全な取り扱い

佐藤庸一（分子科学研究所・分子制御レーザー開発研究センター）

1960 年にレーザーが発明されてから近年に至るまで、レーザー技術はめざましい進歩を遂げてきた。レーザーの使用頻度は、研究用途のみならず医療、産業問わずに多くなり、またその使用法も多岐にわたってきている。一方でレーザー機器の安全性については、1986 年になってようやく労働省から「レーザー光線に寄る障害の防止対策について」が通達され、同年光産業技術振興協会からレーザー安全に関する JIS の原案が示されるに至った。これを底本として「JIS C6802 レーザ製品の安全基準」は 1988 年に制定され、レーザー技術の進歩に合わせて適宜改定がなされてきている。

しかしながら、実際にはレーザー機器による事故が多

く発生してきたのが現実である。今回の講演では、まず実際の事故例をいくつか紹介してレーザーの安全性に留意することの重要性を示した。その上で、どのようなレーザー光が人体にとって危険なものとなりうるかという基準（MPE：最大許容露光量）について説明する。その後、レーザー機器を安全に取り扱うために最低限必要な情報に関して、JIS C6802 に添って紹介した。

実際にレーザー事故を防ぐための最も重要な器具であるレーザー保護メガネに関しては JIS T8143 に制定されているが、この内容に加えて保護メガネの実際の選定法についても紹介した。

(4) エフェクター内蔵型微生物光センサー分子、光活性化アデニル酸シクラーゼ (PAC ; パック) の発見から展望まで

渡辺正勝 (総合研究大学院大学先導科学研究科 ; 基礎生物学研究所大型スペクトログラフ室)

PAC は真核微細藻類の一種であるミドリムシ (*Euglena gracilis*) の光逃避運動の光センサーとして基礎生物学研究所において発見された (Iseki *et al.* 2002, *Nature* 415, 1047-1051)。その特色は、青色光受容を司る FAD 結合ドメインと cAMP 生成を司るアデニル酸シクラーゼドメインよりなり、青色光刺激により cAMP を生成することである。この cAMP により鞭毛運動パターンの迅速な転換が引き起こされる。

この光誘導 cAMP 生成は GPCR 系の様な複数種類の蛋白質分子の協調を必要としないので、発見当初より、PAC を他種生物の多様な細胞・組織に生物工学的に導入すれ

ばそれらの多様な機能を青色光照射によってピンポイント的に制御出来る事が期待された。

その後数年にわたる国内外の共同研究によって、アフリカツメガエル卵母細胞・HEK293 細胞・キイロショウジョウバエ脳での PAC の機能発現と行動制御例 (Schroeder-Lang *et al.* 2007, *Nature Methods* 4, 39-42) やアメフラシ神経節での PAC 機能発現と活動電位制御例 (Nagahama *et al.* 2007, *Neurosci. Res.* 59, 81-88) が報告されるに至り、さらに多様な生物系においても多様な生物機能光制御が試みられつつある。

(5) GABA ニューロンを標的として機能プローブを発現させる遺伝子改変マウスの開発

柳川右千夫 (群馬大学大学院医学系研究科遺伝発達行動学分野)

脳は興奮性ニューロンと抑制性ニューロンから構成される神経ネットワークの集まりからできている。GABA ニューロンが抑制性ニューロンの代表であるが、中枢神経系に散在し、比較的少数なので、生のスライス標本で同定するのは容易ではない。最初に、GABA ニューロン特異的に緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現させるために、GAD67-GFP ノックインマウスを作製した。この遺伝子改変マウスでは殆どの GABA ニューロンが蛍光顕微鏡下で容易に同定できることから、GABA ニューロンの電気生理学実験や形態観察など様々な研究に利用され

ている。しかし、GAD67-GFP ノックインマウスでは GABA 合成酵素の GAD67 遺伝子が破壊されているために、特に幼若期の脳内 GABA 含量が減少する欠点がある。そこで、脳内 GABA 含量が野生型マウスと同等で、GABA ニューロンを黄色蛍光分子で標識したトランスジェニックマウス、VGAT-Venus マウスを作製した。GAD67-GFP ノックインマウスと VGAT-Venus マウスのそれぞれの使い道を紹介し、GABA ニューロンにチャンネルロドプシンなど機能プローブを発現させる遺伝子改変マウスの作出方法について考察した。

(6) ダイナミッククランプ法を用いた局所神経回路網の操作

井上 剛 (岡山大学大学院医歯薬学総合研究科)

局所神経回路は、神経細胞とシナプスによって構築され、その回路構造に従って信号処理が行われる。すなわち、「どのような神経回路配線が、どのような信号処理を行うことができるのか」、その構造-機能連関を明ら

かにすることは非常に重要である。この問題に取り組む上で、「神経活動や神経配線を研究者が任意に操作できる実験系」が有効であることは言うまでもなく、ケージド化合物やチャンネルロドプシンを用いた神経活動の光操

作が現在注目を浴びている。そこで本発表では、神経配線を任意に操作できる実験系として、ダイナミッククランプ法を用いたハイブリッド神経回路を紹介したい。このハイブリッド神経回路とは、脳スライス標本における複数の単一神経細胞からのパッチクランプ記録もしくは単一繊維刺激の条件下において、さらにダイナミックク

ランプ法による「人工シナプス」を組み込む方法である。この方法を用いると、ある特定の神経回路配線を持つ信号処理能力を調べることが可能となる。本発表では、ハイブリッド神経回路を用いて何を明らかにすることができたのか、その成果を報告した。

(7) 視床下部神経活動の光操作による本能行動制御について

山中章弘（生理学研究所細胞生理部門）

視床下部は自律機能や本能行動の中枢である。視床下部には神経ペプチドを神経伝達物質として含有する神経細胞が存在し、その神経ペプチドが本能機能発現の本態と考えられている。このことは、そのペプチド遺伝子の発現調節領域を用いて、チャネルロドプシンなどの光によって神経機能を制御出来る分子を発現させると、その神経活動を光で操作することが可能になり、ひいてはその神経ペプチドが担う本能機能自体を制御出来る可能性を示唆している。本能機能の中でも睡眠覚醒に重要な働きを持つ「オレキシン」神経は、視床下部外側野に細胞体が存在し、そこから脳内のほとんど全ての領域に軸索を投射している。オレキシン神経特異的に外来遺伝子を

発現させることが出来るオレキシンプロモーターを用いて、オレキシン神経に光活性化タンパク質（ハロロドプシン）を発現する遺伝子改変マウスを作成した。このマウスの脳スライス標本を用いた電気生理学的解析により、黄色光照射によってオレキシン神経の膜電位が約15mV 過分極し、自発発火が完全に抑制されることを確認した。また、電流注入による強制発火も抑制できた。今後このマウスを用いて、インビボにおいてオレキシン神経活動を光操作し、それによって表出する行動を解析することによって、睡眠覚醒調節におけるオレキシン神経の役割について明らかにした。

(8) 光によるアゴニスト投与と内因性リガンド可視化を用いた脳内プリン作動性シグナリング機構の解析

加藤総夫（東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター神経生理学）

脳内の多くのシナプスには ATP によって活性化する P_2 受容体、アデノシンによって活性化する A_1 受容体、ならびに ATP からアデノシンへの細胞外変換を促すエクトATP 代謝酵素系が高密度に発現しており、これらは細胞外プリンによるシナプス伝達制御系を構成している。延髄孤束核では、一次求心線維終末のシナプス前 $P2X$ 受容体活性化が Ca^{2+} 流入を介したグルタミン酸放出促進を、また、ATP の細胞外代謝産物アデノシンによる A_1 受容体の活性化がN型電位依存性カルシウムチャネルの抑制を介したグルタミン酸放出抑制を引き起こす (Kato & Shigetomi, 2001; Shigetomi & Kato, 2004; Kato et al.,

2004)。これらを活性化する内在性 ATP はおそらくアストロサイト由来であると想定される。我々は DMNPE-caged ATP をスライス内樹状突起近傍で laser photolysis 法により uncage し、シナプス周囲の局所的かつ速やかな ATP 濃度上昇によってグルタミン酸放出が即時に誘発される事実を証明した。一方、電気刺激による脳スライス中のATP放出を luciferin-luciferase 反応によって生じる光子を VIM カメラで検出することによって可視化し、最高 2.5 s の時間分解能で細胞外 ATP 濃度の変動を画像化することに成功した。

医学・獣医学相互への提言

ヒトと動物の腫瘍は多くの共通点を有している。本シンポジウムが起爆剤となって、日本においても医学と獣

医学が共同で骨肉腫をはじめとする各種瘍の研究体制が整備されることを切望する。

(9) ChR2遺伝子導入マウスを用いた大脳運動野神経回路の光制御

松崎政紀 (東京大学大学院医学系研究科疾患生命工学センター)

我々はこれまでケイジドグルタミン酸を用いたシナプス・細胞の光刺激法を開発してきたが、青色光を照射すると活性化されるカチオンチャネルタンパク質、チャネルロドプシン 2 (ChR2) にも注目し、この遺伝子導入マウスにおける神経細胞の光刺激を行っている。このマウスを麻酔下で頭部固定し、頭蓋骨越しに青色光を皮質運動野に照射することによって、照射領域の第 5 層 ChR2 発現細胞に活動電位を誘発させて、任意の肢の運動を誘発

させる非侵襲的な経頭蓋光刺激法を確立した。これを用いると、前肢・後肢の支配領域を皮質表面に対して 2 ヶ月間に渉る 2 次元マッピングが可能となった。光刺激によって明らかになった支配領域は皮質内電気刺激法による機能マッピングによる結果と一致していた。今後この刺激法が、個体レベルでの脳機能を司る神経回路網の計測・制御に重要な方法論となることが期待される。

(10) いかにして光感受性チャネルを十分量発現させるか？

田中謙二 (生理学研究所分子神経生理部門)

光感受性チャネルを脳内で発現させるにはいくつかの方法が考えられるが、どの方法を用いれば光操作を行うに十分な量を発現させることが出来るだろうか。Karl Deisseroth はレンチウイルスを用いて光操作可能な発現量を得ている。また Thy1 プロモーターを用いたトランスジェニックマウスでも光操作可能な発現量を得ている。ウイルスの欠点はウイルスを投与したところにしか遺伝子導入が出来ない点にあるが、光操作は光を当てたところでしか行えないのだから、光操作の欠点の中にウイルスの欠点がマスクされる。それ以外のウイルスの欠点としては、遺伝子導入効率が個体によって異なる点だ

ろう。では、遺伝子改変マウスはウイルスベクターに勝るであろうか。いわゆる tissue specific promoter に光感受性チャネルをつないだトランスジェニックマウスは、個体間の発現量、発現部位のばらつきが無く、細胞種特異性、領域特異性を獲得することが出来る。しかしほとんどの場合、その遺伝子発現量が十分でないことが多い。テトラサイクリン遺伝子誘導システムを用いた遺伝子改変マウスは、細胞種特異的に、光感受性チャネルを十分に発現させる。その利点と問題点について話題を供した。

(11) 多様なロドプシン類の性質と光スイッチへの適性

小柳光正 (大阪市立大学大学院理学研究科生物地球系専攻)

視覚や概日リズムの光同調の光受容体である視物質類似光受容タンパク質 (ロドプシン類) は、G タンパク質共役型受容体 (GPCR) のメンバーであり、光により G タ

ンパク質を活性化する唯一の受容体グループである。近年、ゲノム解読を中心に多数のロドプシン類遺伝子が同定され、その性質の多様性に注目が集まっている。それ

らは系統的に大きく 8 つのサブグループに分類することができるが、私たちは、そのうち主要な 6 サブグループのロドプシン類について、培養細胞発現系を確立し、光受容体としての基本的な性質である吸収波長域、光反応特性、活性化する G タンパク質を明らかにしてきた。その結果、視物質に代表される従来のロドプシン類にはな

い性質、例えば、生体内にユビキタスに存在するレチナール異性体を発色団として結合する、光吸収後に分解せず光によって再生する、Gq, Go について Gs タイプの G タンパク質と共役するなどの性質を見出した。これらの性質に基づいてロドプシン類の光スイッチとしての発展性を探りたい。

(12) メラノプシンの網膜遺伝子導入による視機能の回復

小泉 周（生理学研究所広報展開推進室）

メラノプシンは、ヒトなど動物の網膜の中の一種類の神経節細胞（視神経細胞、全網膜神経の 1%程度）に存在する光感受性物質で、TRP チャンネルなどの Ca 透過性チャンネルとカップルし光をうけて細胞を脱分極させることができる。この分子をさまざまな神経細胞やグリア細胞に強制発現させることで、脳神経活動を光によって制御できるであろう。同じような光感受性物質であるチャネロドプシンと違い (1) 光感受性が高い (2) 長い応答が得られる (3) Ca と関連している (4) もともと哺乳動物に

存在する、ことが特徴である。メラノプシンの遺伝子導入の応用例として、マウス網膜色素変性症後の網膜視神経細胞にメラノプシンを遺伝子導入し、これによって普通は光に応答しない網膜視神経細胞も光に応答できるようになり、視機能を再獲得した例を示す。今後、脳神経活動を光で操作するための基本ツールのひとつとして、遺伝子導入や遺伝子改変動物の作成などの応用が考えられる。

(13) 特定のグルタミン酸シナプス伝達を制御する神経の暗号

久原 篤, 森 郁恵（名古屋大学大学院理学研究科）

神経細胞は様々な種類のシナプス小胞をもち、外界の状況に応じて下流の神経細胞に最適な情報を伝達している。そのため、どのような神経活動の変化が特定のシナプス伝達の優先権を決定しているかを解明することは重要な課題である。本会では、線虫 *C. elegans* において、従来の分子遺伝学とハロロドプシン (HR) などの光学技術を駆使した解析から明らかになった、特定のグルタミン酸シナプス伝達に必須の神経活動パターンを報告する。主要な温度受容ニューロン AFD の活動が欠損した個

体は、温度勾配上で低温からランダムに移動する異常を示す(1-3)。ところが、AFD に HR を導入した個体に HR の励起光をパルス照射すると、AFD 欠損個体とは逆に、高温へ移動する異常が観察された。この異常は、AFD の小胞性グルタミン酸輸送体 (VGLUT) が欠損した変異体 (4) と同様の異常であった。さらに、カルシウムイメージングと遺伝学的解析により、特定のグルタミン酸シナプス伝達に必須なカルシウム濃度変化のパターンが示唆された。

25. 伴侶動物の臨床医学研究会（比較腫瘍学・造血系腫瘍への挑戦，麻酔）

2009 年 12 月 3 日－12 月 4 日

代表・世話人：丸尾幸嗣（岐阜大学応用生物科学部獣医臨床腫瘍学）

所内対応者：木村 透（動物実験センター）

（1）造血系腫瘍の病理学的概要（医学）

稲垣 宏（名古屋市立大学医学部臨床病態病理学）

（2）造血系腫瘍の病理学的概要（獣医学）

酒井洋樹（岐阜大学応用生物科学部獣医病理学）

（3）造血系腫瘍の臨床における現状（医学）

原 武志（岐阜大学医学部第一内科学）

（4）造血系腫瘍の臨床における現状（獣医学）

辻本 元（東京大学農学部獣医内科学）

（5）悪性リンパ腫の最新トピックス（医学）

楠本 茂（名古屋市立大学医学部腫瘍 免疫内科学）

（6）悪性リンパ腫の最新トピックス（獣医学）

佐藤雅彦（東京大学農学部獣医内科学）

（7）骨髄性白血病の最新トピックス（医学）

直江知樹（名古屋大学医学部血液内科学）

（8）骨髄性白血病の最新トピックス（獣医学）

久末正晴（麻布大学獣医学部内科学第二）

（9）教育講演：重症例における麻酔や疼痛管理の要点と話題（医学）

飯田宏樹（岐阜大学医学部麻酔 疼痛制御学）

（10）教育講演：重症例における麻酔や疼痛管理の要点と話題（獣医学）

今井彩子（日本小動物医療センター）

【参加者名】

代田欣二（麻布大学），内田和幸（東京大学），酒井洋樹（岐阜大学），稲垣 宏（名古屋市立大学），岡本芳晴（鳥取大学），森 崇（岐阜大学），辻本 元（東京大学），原武志（岐阜大学），直江知樹（名古屋大学），丸尾幸嗣（岐阜大学），佐藤雅彦（東京大学），楠本 茂（名古屋市立大学），鷺巣 誠（岐阜大学），今井彩子（日本小動物医療センター），飯田宏樹（岐阜大学），久末正晴（麻布大学），児玉篤史（岐阜大学），村井厚子（岐阜大学），中山萌（岐阜大学），村上 章（岐阜大学），山中洋一（岐阜大学），村上麻美（岐阜大学），星野有希（岐阜大学），山田名美（岐阜大学），横山須美江（岐阜大学），関根一哉（岐阜大学），岩谷 直（岐阜大学），野口俊助（岐阜大学），林 聡恵（中山獣医科病院），駒澤 敏（知多愛犬病院），高沼良征（新宿動物病院），高橋克典（ワシズカ獣医科），

原 一郎（岡崎南動物病院），中川史洋（なかがわアニマルクリニック），中川尚子（なかがわアニマルクリニック），藤本あゆみ（麻布大学），長谷晃輔（おざわ動物病院），近藤幸司（ロッキー動物病院），安藤仁志（ミドリペットクリニック），木下 現（メリアルジャパン），竹内康博（不明），高柳直哉（ホームどうぶつ病院），藤間裕子（吉永動物病院），橘田大典（まさき動物病院），河合 章（河合動物病院），須藤直人（ハート動物クリニック），大塚直樹（しんたに動物病院），大矢勇一郎（郡上八幡動物病院），水口永久（メリアルジャパン），大和田兼一（ヤマト動物病院），加藤 崇（麻布大学），根尾櫻子（麻布大学），後藤 淳（アニマルケア H&H），矢田治郎（日名わんにゃんクリニック），人見隆彦（日本動物医療センター），小藺江亮太（ハート動物クリニック），古橋秀成（ふるは

し動物病院), 若園多文 (ながまつ動物病院), 船木大志 (ワシズカ獣医科), 横井佐知 (あいち犬猫医療センター), 西谷 英 (ハート動物クリニック), 棕田昌友 (メリアルジャパン), 三上真一 (大日本住友製薬), 中島規子 (カ

ニエ動物病院), 櫻町育夫 (リアル動物病院), 勝野麻衣 (おおはし動物病院), 熊谷清隆 (しばた動物病院), 山本英森 (中根犬猫病院), 計 68 名

【概要】

本研究会では 2007 年乳がん, 2008 年骨軟骨腫瘍を取り上げ, 現状と課題について議論した。今回は造血系腫瘍をテーマにして, 前 2 回と同様に医学と獣医学からの講演者を課題毎にペアにして発表していただき, 両分野相互の観点から議論をした。今までの研究会を通しての主要テーマは、『比較腫瘍学』である。すなわち, 小動物臨床のゴールを動物とその飼主に限定せず, 人を視野に入れた学術領域を創成しようというものである。この試みは米国では既に 2003 年, NCI の Comparative Oncology Program として開始されており, そのキーパーソンは Dr. Chand Khanna である。臨床試験の多施設共同実施体制, 例えば Comparative Oncology Consortium や Animal Cancer Investigationなどを構築して, 臨床研究体制の整備と臨床研究の推進に努力している。わが国においても, 私事であるが, 岐阜大学応用生物科学部附属のセンターとして,

来年度より“比較がんセンター”を設置して活動を開始する予定である。

今回の内容は, 造血系腫瘍の病理学的概要, 造血系腫瘍の臨床における現状, 悪性リンパ腫の最新トピックス, 骨髄性白血病の最新トピックスを掲げ, 伴侶動物とヒトの情報を比較検討して, 今後の課題を見だし, これらの解決の糸口を探るものである。加えて, 参加者の多くが小動物臨床獣医師であるため, 小動物臨床における興味ある追加テーマとして麻酔を取り上げ, 教育講演を企画した。いずれの講演も従来に無い新鮮な内容であり, 有意義な議論が行われた。

本研究会を通して, 比較腫瘍学が新たな学術領域として発展し, ヒトと動物の健康と福祉に貢献できるきっかけとなればと願っている。

(1) 造血系腫瘍の病理学的概要 (医学)

稲垣 宏 (名古屋市立大学医学部臨床病態病理学)

ヒトの造血系腫瘍は骨髄系とリンパ系に分かれるが, それぞれの分類は学問の進歩とともに変遷している。

ここでは, 造血系腫瘍の分類を概説し, 造血系腫瘍はただ一つの疾患としてまとめることはできない多様な疾患からなることを, 病理学的分類によって示したい。すなわち, リンパ腫を例に挙げれば, 病理病態学的には現在適用されている WHO 分類では詳細な区別がなされているが, 分類されたそれぞれの疾患と臨床的予後との関係については, 必ずしも検証されていない。リンパ腫に

対する特異的治療は限られており, それぞれの病理学的分類による疾患に対する特異的治療は明らかとなっておらず, 病理学的分類に臨床が十分に追いついていないのが現状である。今後は病理学的分類をさらに精査進展させ, それぞれの疾患に対する最適の治療を見いだす努力が必要である。そのためには治療後の予後を詳細に分析し, 症例を蓄積していくことがより良い治療の確立に役立つものと思われる。

(2) 造血系腫瘍の病理学的概要 (獣医学)

酒井洋樹 (岐阜大学応用生物科学部獣医病理学)

伴侶動物における造血器系腫瘍は、医学における WHO 分類に準じた、Histopathological classification of hematopoietic tumors of domestic animals (2002) によって、病理学的に分類される。近年では、伴侶動物の造血器系腫瘍、特にリンパ系腫瘍については CD 抗原の免疫染色およびフローサイトメトリーや PCR によるクローナリティ解析による表現型の検索も一般的になり、治療方針の決定に寄与している。

一般的に、伴侶動物の造血器系腫瘍はリンパ系腫瘍が多くを占め、骨髄性腫瘍はまれである。また、リンパ系腫瘍のなかでも、リンパ腫の発生が多く、犬、猫ともに頻発する腫瘍のひとつに挙げられる。猫では、レトロウ

イルスである猫白血病ウイルスに起因するリンパ系腫瘍も多い。

造血器系腫瘍の診断においては、細胞学的診断もまた重要である。リンパ系腫瘍、特にリンパ腫は臨床的にも遭遇する機会が多く、体表リンパ節への針生検、体腔内リンパ節への画像ガイド下針生検などによって、細胞を採取し、細胞学的診断に供される。細胞学的診断については、非腫瘍性変化との鑑別、その後、腫瘍の分類がなされるが、現在、その分類には、個々の細胞形態をもとに腫瘍細胞の起源とグレーディングを合わせた新 Kiel 分類が比較的広く用いられている。

(3) 造血系腫瘍の臨床における現状 (医学)

原 武志 (岐阜大学医学部第一内科学)

白血病の罹患率は人口 10 万人に対し約 10 人、急性骨髄性白血病が約 50%、急性リンパ性白血病と慢性骨髄性白血病がそれぞれ約 25%を占めている。急性骨髄性白血病における寛解導入療法は Ara-C にアントラサイクリン系薬剤が標準的に用いられている。寛解導入後、地固め療法を施行する。また急性前骨髄性白血病では寛解導入療法として、全トランスレチノイン酸 (ATRA) による分化誘導療法が施行される。イマチニブは慢性骨髄性白血病の標準療法である。

悪性リンパ腫はリンパ系組織に主に存在する正常なリンパ系細胞がある分化段階で腫瘍化した疾患である。本邦で最も多いびまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫では

CHOP 療法が標準療法と考えられてきたが、近年抗 CD20 抗体であるリツキシマブが臨床導入され、現在では R-CHOP 療法が標準と考えられる。

多発性骨髄腫は B 細胞の終末分化段階である形質細胞の単クローン性増殖とその産物である単クローン性免疫グロブリンを特徴とする疾患である。多発性骨髄腫に対する治療としては、移植適応のない高齢者に対しては経口抗癌剤 (MP 療法) が選択され、腎障害を認める場合や早期の治療効果を期待する場合には VAD 療法が選択される。若年者に対しては VAD 療法による寛解導入療法に引き続き自己末梢血幹細胞移植を併用した大量化学療法が選択される。

(4) 造血系腫瘍の臨床における現状 (獣医学)

辻本 元 (東京大学農学部獣医内科学)

造血系腫瘍は、犬において皮膚腫瘍、乳腺腫瘍に次いで発生頻度の高い腫瘍であり、猫においては最も発生頻

度の高い腫瘍である。犬においてはその病因は明らかではないが、猫においては猫白血病ウイルス (feline

leukemia virus, FeLV) がある程度の頻度でその病因となっている。

犬や猫を含めた動物の造血系腫瘍に関しては、人における新 WHO 分類に基づいた動物における新 WHO 分類が公表され、それに沿った分類法が一般化しつつある。犬と猫の造血系腫瘍のなかでは、リンパ腫がもっとも高頻度に認められる。リンパ系腫瘍のなかでリンパ腫以外の疾患としては、急性リンパ芽球性白血病 (ALL), 慢性リンパ性白血病 (CLL), 多発性骨髄腫/形質細胞腫瘍などが認められる。また、骨髄系の腫瘍としては、慢性骨髄

増殖性疾患 (CMPD), 骨髄異形成症候群 (MDS), 急性白血病 (AML) の発生が認められる。

ここでは、犬のリンパ腫を中心として、以下の通りその臨床における現状を述べる。

1. 犬のリンパ腫の病型と臨床病期
2. 犬の多中心型リンパ腫に対する化学療法
犬における他の型のリンパ腫に対する化学療法
3. 犬のリンパ腫の予後と関連する因子
4. 犬のリンパ腫の病理組織学的分類および細胞診による細分類

(5) 悪性リンパ腫の最新トピックス (医学)

楠本 茂 (名古屋市立大学医学部腫瘍 免疫内科学)

悪性リンパ腫は血液のがんであり、造血器腫瘍のうち最も発生頻度が高く、全身のあらゆる部位から発生する性格を持つために様々な症状が出現する。その治療方針は病気の広がりによって異なり、局所放射線照射が可能な限局期においては化学療法と放射線照射の併用療法が選択されるのに対し、進行期においては全身化学療法が治療の主役となる。また、悪性リンパ腫はその病理組織所見によって 20 種類以上に分類され、そのタイプによって治療目標 (治癒が期待しうるか否か) や治療レジメン (抗がん剤の内容) が異なるため、正確な病理診断が欠かせない。

また、悪性リンパ腫はホジキンリンパ腫と非ホジキン

リンパ腫に大別され、さらに後者は B 細胞性, T 細胞性・NK 細胞性に分けられる。最近、分子標的治療薬であるリツキシマブ (抗 CD20 モノクローナル抗体) の登場により、B 細胞性リンパ腫の治療成績が大きく改善した。本発表では、悪性リンパ腫の代表的なタイプであるびまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫 (DLBCL) の治療方針について説明し、その標準的治療の変遷および副作用対策の重要性について述べる。一方、T 細胞性・NK 細胞性リンパ腫に対する治療成績の改善はいまだ十分ではないが、最近の新規治療開発の状況について述べる。最後に、悪性リンパ腫新規治療開発における分子標的治療薬の展望について述べてみたい。

(6) 悪性リンパ腫の最新トピックス (獣医学)

佐藤雅彦 (東京大学農学部獣医内科学)

犬の高悪性度リンパ腫は、基本的に多剤併用化学療法で治療が行われる。その完全寛解率は約 60-90%, 治療の開始から完全寛解までにかかる期間の中央値は 11 日, 平均値は 15 日と報告されており、多くの症例は治療開始後早期に完全寛解に至る。しかしながら、1 年生存率約 50%, 2 年生存率約 25%とほとんどの症例は治癒することなく再発、死の転機をたどる。リンパ腫治療における一つの問題点として、上述のように、治療開始後すぐに

病変が検出できなくなるため、治療効果を判定できずに抗癌剤治療を行っていることが挙げられる。

近年、分子生物学的技術の発達により、リンパ腫の微小残存病変 (Minimal Residual Disease: MRD) の検出が可能となった。MRD とは、抗癌剤などによる治療後に症例の体内に残るわずかな腫瘍細胞のことで、ほとんどの場合、それらが増殖して再発病変を形成する。これら腫瘍細胞は身体検査や血液検査、画像診断といった従来の検

査では検出できないが、リアルタイム PCR 技術を用いることにより検出および定量が可能となった。我々の研究室では犬リンパ腫において、腫瘍細胞特異的なプライマーとプローブを用いたリアルタイム PCR 系を確立し、

MRD の検出に利用している。

本講演では、当研究室で行われている犬リンパ腫における MRD 定量に関する研究結果をいくつか報告させていただく。

(7) 骨髄性白血病の最新トピックス (医学)

直江知樹 (名古屋大学医学部血液内科学)

ヒトの白血病の発症原因の一つとして、腫瘍ウイルスが関係していると考えられる。白血病の年齢別発症率は二相性のピークを示すことから、その発症要因については、多様な原因を考慮すべきであると思われる。

骨髄増殖性腫瘍については、慢性骨髄性白血病を中心にお話したい。慢性骨髄性白血病は急性転化をすることによって予後不良となるが、分子標的治療薬であるイマチニブの投与により、マーカー染色体であるフィラデルフィア染色体を持つ細胞は激減して、著効を示す。急性骨髄性白血病は、化学療法を実施するが、化学療法の強化と臨床的予後との関係が今のところ明らかとなっていない。現在、分子標的治療は成果を上げており、骨髄

移植は予後不良症例に対して有効となっている。急性前骨髄性白血病は亜ヒ酸およびビタミン A 活性型代謝産物により治療するが、DIC に移行することが多く、予後不良群の原因を遺伝子レベルで明らかにする必要がある。骨髄異形成症候群ではリスク別治療を考慮すべきであり、メチル化阻害薬が使用されている。

我が国における白血病症例数はリンパ腫症例数に比べて著しく少なく、白血病の臨床研究の進歩を阻害している。そこで、全国 55 大学を含む 185 施設に呼びかけ、名古屋大学が拠点となって、共同研究システムを構築した。今後、化学療法の有効性のエビデンスを蓄積するとともに、白血病治療の進歩に貢献したい。

(8) 骨髄性白血病の最新トピックス (獣医学)

久末正晴 (麻布大学獣医学部内科学第二)

急性骨髄性白血病 (Acute Myeloid Leukemia, AML) は造血細胞の悪性腫瘍であり、一般的に骨髄中の未分化な造血細胞 (芽球) がクローン性に増殖していく病態である。一方、骨髄異形成症候群 (Myelodysplastic Syndromes, MDS) とは、2 ないし 3 系統にわたる血球減少症を主徴とする難治性の血液疾患である。本疾患はヒトにおいて AML の前白血病段階の病態を指す疾患として定義されており、獣医学領域においても現在まで犬および猫においてその発症が認められている。さらに、これら血液疾

患は主にネコにおいて多く認められ、その多くはネコ白血病ウイルス (Feline leukemia virus; FeLV) の感染によって引き起こされていることが知られている。今回はそれぞれの疾患の診断および治療の問題点について概説し、その診断や治療についてはヒト医学領域の最新情報を提供する。また MDS/AML の病理発生に関して、その病原体である FeLV に関する最新知見について触れたいと思う。

(9) 教育講演：重症例における麻酔や疼痛管理の要点と話題（医学）

飯田宏樹（岐阜大学医学部麻酔 疼痛制御学）

従来の「意識がなければ痛みと認識しない」という発想に基づく鎮静薬を中心とした麻酔から、鎮痛薬を十分に投与し、「鎮痛が充分であれば、鎮静は最低限でよい」とするバランス麻酔の考え方が現在の麻酔臨床では中心となってきた。この転換には、コントロールのしやすい短時間作用性の種々の麻酔関連薬が開発されてきたことが大きい。特に、短時間作用性のオピオイドの使用は、術中のコントロールを容易にしたが、新たに術後痛対策の必要性が以前以上に増すことになった。現在本邦では、硬膜外麻酔を中心とした術後鎮痛法が普及しているが、

抗血小板薬や抗凝固薬を内服する患者の増加と共に、安全性の問題から異なる方法も考慮する必要性が出てきたので、これらの変化について紹介したい。また、ハイリスク患者における周術期管理の問題点を明確に示すために、それらの患者の代表である高齢者の身体的特徴・麻酔薬の使用上の注意点を概説すると共に、広く一般的にストレス反応を抑制するために用いられている薬物 (α 2adrenergic agonists や β adrenergic antagonists) の使用上の意義や注意点についても概説する。加えて、最近注目されている喫煙と周術期管理の問題にも触れたい。

(10) 教育講演：重症例における麻酔や疼痛管理の要点と話題（獣医学）

今井彩子（日本小動物医療センター）

重症患者：

獣医療に明確な定義は存在しないが、人の医療の基準のひとつである「治療なしには多臓器不全、そして死につながる代償不全状態」という患者が獣医療でもあてはまると思われる。全身麻酔の対象としては術前評価分類での評価が有効であり、その中の PS3 以上が重症患者にあてはまるであろう。

重症例における全身麻酔の要点：

重症患者ではその原因疾患に関わらず、共通して予備力の低下が起っている。通常、健康体であれば全身麻酔薬の抑制作用に対して、予備力をもってある程度それに打ち勝つことができる。全身麻酔の状態と体の恒常性を自ら均衡させることができる。麻酔を行う側は、動物の

その均衡した状態を維持するように管理を行っていく。しかしながら重症動物では打ち勝つ力（予備力）が原因疾患で使われてしまに残っていないため、全身麻酔の副作用が極端に大きく現れる場合が多い。この点がリスクの高さに結びついている。麻酔を行う側は予備力の代わりをすべく術中の管理を行う必要がある。

重症例における疼痛管理の要点：

重症例では健康症例と異なり、鎮静薬および全身麻酔薬の使用におのずと制限が加わる場合が多いため、周麻酔期には、その鎮静作用も含めて鎮痛薬の占めるウェイトが大きい。重症例であっても、麻酔前に興奮を示す患者は多く、その場合は、麻薬系オピオイドの鎮静作用をもって興奮を抑え、かつ先制鎮痛を行なうことが多い。