

自然科学研究機構プロジェクト 合同シンポジウム  
「脳神経情報の階層的研究」  
「機能生命科学における揺らぎと決定」

日時 : 2015年3月11日(水)

場所 : 生理学研究所(明大寺地区) 1階大会議室

世話人: 「脳神経情報の階層的研究」 生理学研究所生体恒常機能発達機構研究部門 鍋倉淳一  
「機能生命科学における揺らぎと決定」 生理学研究所神経機能素子研究部門 久保義弘

9:00 – 9:05 「挨拶」 所長

----- 第一部 「脳神経情報の階層的研究」 -----

9:05-9:10 「イントロダクション」

鍋倉淳一(生理学研究所・生体恒常機能発達機構研究部門)

9:10-9:45(発表 30 分+質問 5 分)

[「大脳皮質錐体細胞棘突起へ入力する抑制性シナプスの動態」](#)

窪田芳之(生理学研究所 大脳神経回路論研究部門)

9:45-10:20(発表 30 分+質問 5 分)

[「サリエンシーを検出する神経回路について」](#)

伊佐 正(生理学研究所 認知行動発達機構研究部門)

10:20 – 10:30 コーヒーブレイク

10:30-11:05(発表 30 分+質問 5 分)

[「大脳皮質の細胞系譜に依存した神経結合形成」](#)

吉村由美子(生理学研究所 視覚情報処理研究部門)

11:05-12:00(発表 45 分+質問 10 分)

[「複雑なニューラルネットワーク形成のメカニズム」](#)

[「クラスター型プロトカドヘリンによる神経細胞の個性化」](#)

八木 健(大阪大学大学院生命機能研究科 心生物学研究室)

12:00 – 13:00 昼食

13:00-13:35(発表 30 分+質問 5 分)

[「共有の記憶: 2個体動時計測 MRI 研究」](#)

定藤規弘(生理学研究所 心理生理学研究部門)

----- 第二部 「機能生命科学における揺らぎと決定」 -----

13:35 - 13:40 「イントロダクション」

久保義弘(生理学研究所・神経機能素子研究部門)

13:40 - 14:30(発表 40 分+質問 10 分)

「力計測から見えてきた分裂期紡錘体の可塑性と安定性」

島本 勇太(国立遺伝学研究所 定量メカノバイオロジー研究室、JST さきがけ)

14:30 - 15:20(発表 40 分+質問 10 分)

「生細胞のナノスケールでの形状イメージングを実現する

走査型イオンコンダクタンス顕微鏡の開発」

高橋康史(東北大学原子分子材料科学高等研究機構、  
東北大学環境科学研究科、JST さきがけ)

15:20 - 15:30 コーヒーブレイク

15:30 - 16:00(発表 25 分+質問 5 分)

「赤外差分分光法によるイオンチャネルタンパク質の分子機構研究」

古谷 祐詞、塚本 寿夫(分子科学研究所 生体分子情報研究部門)

16:00 - 16:30(発表 25 分+質問 5 分)

「新しいゲノム編集技術による遺伝子改変動物の作製」

平林 真澄(生理学研究所 行動・代謝分子解析センター  
遺伝子改変動物作製室)

16:30 - 17:00(発表 25 分+質問 5 分)

「傍細胞輸送を制御する細胞間接着構造の揺らぎ」

古瀬 幹夫(生理学研究所 脳形態解析研究部門)

17:00 - 17:30(発表 25 分+質問 5 分)

「痛みシグナルの揺らぎと、その中枢性制御機構」

古江秀昌、井本敬二(生理学研究所 神経シグナル研究部門)

17:30 - 17:35 「終わりに」 副所長

# 大脳皮質錐体細胞棘突起へ入力する抑制性シナプスの動態

窪田芳之

生理学研究所 大脳神経回路論

成熟した動物の脳の神経回路は安定しており変化がほとんどないと長い間考えられて来た。in vivo imaging 法で樹状突起やマーカーでラベルしたシナプスを観察する事等により、実際には、脳には、環境や経験によって、シナプス結合を変化させるという可塑性がある事が広く知られるようになった。学習の際の興奮性神経のシナプス結合の再構成は、樹状突起上にある棘突起の動態観察などで in vivo でも知られているが、抑制性シナプスの動態観察は行われてなかった。本研究では、マウスの大脳皮質視覚野の表層の錐体細胞の樹状突起や棘突起上の抑制性シナプスを Teal-gephyrin でラベルし、その動態変化を、in vivo で、2光子レーザー共焦点顕微鏡観察により明らかにした。その結果、樹状突起の幹と棘突起に Teal-gephyrin punctate が異なる分布密度で存在している事を認めた。また、それらは、抑制性シナプスを実際に形成している事を電子顕微鏡観察で確認した。さらに、棘突起の抑制性シナプスは非常にダイナミックな動態を示す事を見出した。その過程で、電子顕微鏡でシナプス構造にどのような変化があるのかをスナップショット的に解析した。

## サリエンシーを検出する神経回路について

伊佐 正

生理学研究所 認知行動発達機構研究部門

我々は非常にbusyな視覚環境で生きている。全てのものに注意を向けることは不可能であることから、このような空間的注意の根幹には特定の目立つ(サリエントな)刺激をポップアウトしながら周辺への注意を抑制する機構が必要であるとされている。このような「中心興奮、周辺抑制」という神経応答は中枢神経系の様々なレベルで観察されるが、サリエントな刺激を選択して視線を向ける機能については、サルを用いた実験において中脳の上丘を機能阻害ことによって障害を受けることから、上丘が重要な役割を果たしていると考えられてきたが、その神経機構は明らかでなかった。今回、まず、我々はマウス上丘の視覚入力層である浅層のみを含む水平断スライス標本を作成し、その局所回路を解析した。このような標本では、各層に含まれる視覚空間マップは維持されていると考えられる。このスライス標本を150ミクロン間隔で8x8=64極の刺激電極が配置されたディッシュの上に載せ、単一ニューロンからホールセル記録を行いつつ、周辺の各点の電気刺激効果を調べたところ、記録直下及びその近傍の電極からは興奮性応答が誘発されるのに対し、周辺の電極からは抑制応答が記録され、明確な「中心興奮—周辺抑制」という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。そして2点の同時刺激の間の相互作用を様々な組み合わせの2点同時刺激で調べたところ、距離が150ミクロン以内の近い2点同士は非線形的に促進し合うのに対し、それ以上離れている点同士では顕著な相互抑制が観察された(Phongphanphanee et al. 2014)。そこで次に、どのような神経回路によってこのような機能が実現されるのかについて、super computerを用いたspiking neuron networkを用いた大規模シミュレーションを行った。ここではAdEX型ニューロンという現実の神経細胞に近い膜特性を持つ興奮性、抑制性あわせて1万個のニューロンと600万個のシナプスを配置した人口スライス標本を想定して大規模なパラメタサーチを行ったところ、一番良くデータをフィットできるのは、興奮性ニューロンより広い範囲に投射を有する抑制性ニューロンが興奮性シナプスよりもより遅い時間経過の抑制作用を示す場合であることが推定された。そこで次に、この仮説を検証するために、GABAニューロンがGFP蛍光を発するGAD67-GFPノックインマウスを用いて麻酔下において上丘浅層から2光子レーザー顕微鏡を用いてニューロン集団の視覚応答を解析したところ、顕著なメキシカンハット型の機構が解析された。そして近接する興奮性ニューロンと抑制性ニューロンは例外なく同様な応答特性を示すことが明らかになった。このことは抑制性ニューロンがlong rangeの抑制を周辺に及ぼすことを示唆しており、上記の大規模シミュレーションの仮説を裏付ける結果となった。以上の結果から上丘において顕著な視覚刺激を検出するメカニズムの主要な部分が明らかにされた。

## 大脳皮質の細胞系譜に依存した神経結合形成

吉村由美子

生理学研究所 視覚情報処理研究部門

大脳皮質のニューロンは特定の細胞と選択的にシナプス結合し、情報処理の基盤となる神経回路を形成する。近年、胎生期に同じ神経前駆細胞から発生した大脳皮質ニューロンは、生後になって選択的に神経結合を形成することが報告されている。我々は、蛍光蛋白遺伝子を組み込んだ人工多能性細胞株 (iPS 細胞) をマウス胚に移植してキメラマウスを作製し、細胞系譜が蛍光ラベルされた大脳皮質バレル野4層の興奮性細胞間のシナプス結合を、スライス切片標本を用いた同時ホールセルパッチクランプ法により解析した。その結果、単一の4層バレル内にある、同じ神経幹細胞から発生したクローン細胞間には生後発達の一時期に高い確率でシナプス結合が見られ、その後、双方向性結合の割合が著しく増加した。一方、非クローン細胞間にもシナプス結合は観察されたが、チャンスレベルを越える確率での双方向性結合はみられなかった。さらに細胞系譜に依存した双方向性神経結合の形成には、発生期の Dnmt3b メチル化酵素によるエピジェネティックな遺伝子発現制御およびその制御を受ける細胞接着因子であるクラスター型プロトカドヘリンが関与していることを見出した。以上の結果は、大脳皮質バレル野4層の細胞系譜依存的な神経結合特異性は、胎生期のエピジェネティックな制御機構により規定されていることを示唆する。

## 複雑なニューラルネットワーク形成のメカニズム： クラスター型プロトカドヘリンによる神経細胞の個性化

八木 健

大阪大学・大学院生命機能研究科 心生物学研究室

ヒトの脳には、約 1000 億個の神経細胞があり、複雑なニューラルネットワークをつくっている。この複雑なニューラルネットワークが、一生にわたる莫大な情報を処理し、認知、記憶、創造、感情、運動をもたらす。また、これらの情報が統合され、意識や心が生まれる。個々の神経細胞は個性ある神経活動をもち、集団的活動により情報を処理し、記憶し、統合する。脳における内的な情報を表す神経細胞の集団的活動を担保し、統合をもたらす複雑なニューラルネットワークはどの様に形成され機能しているのだろうか？この疑問に答える為には、まず、脳において複雑なニューラルネットワークが形成されるメカニズムを明らかにする必要がある。興味深いことに、脳神経系で発現する多様化膜分子群であるクラスター型プロトカドヘリン(cPcdh)は、個々の神経細胞において異なった組み合わせ発現しており、発生過程における神経細胞の個性化に関わることが知られている。また、個々の cPcdh 蛋白質はヘテロ4量体を形成し、細胞間での特異的接着活性をもつことが明らかとなっている。この様な cPcdh 分子群のランダムな発現制御と特異的細胞接着活性が、複雑なニューラルネットワーク形成に関わっている可能性がある。

## 共有の記憶: 2 個体動時計測 MRI 研究

定藤規弘

生理学研究所 大脳皮質機能研究系 心理生理学研究部門

注意共有は、対面 2 者において相手（相互注視）あるいは第三者物（共同注意）へ注意を向けることであり、対面コミュニケーションの基盤である。社会性発達における注意共有の重要性はよく知られているが、にも関わらず注意共有が記憶として残存するのか、またどのように記憶されるのか、あるいはその神経基盤については知られていない。瞬きは、個人の注意状態に関係することが知られており、その同期は注意共有の指標となりうる。そのため共同注意課題遂行中に瞬きは同期するはずであり、神経記憶痕跡もこれに対応すると予想された。注意共有ならびにその記憶痕跡の神経基盤を明らかにするために、健常被験者ペアに相互注視課題、引き続き共同注意課題、数日後に相互注視課題を遂行させ、その間 2 台の MRI を用いて対面 2 者の神経活動を同時に計測した。一回目の相互注視課題では、瞬きは同期しなかったが、その後の共同注意課題遂行中に、瞬きは同期した。数日後に再び相互注視課題を遂行すると、瞬き同期が見られ、右下前頭葉の神経活動が二者間で同期し、これらの同期強度は正相関した。右下前頭葉は、共同注意を開始する場合にも、相手の視線に反応する場合にも活動することから、右下前頭葉の神経同期は共同注意課題における Hebb 学習の結果と考えられた。

## 力計測から見えてきた分裂期紡錘体の可塑性と安定性

島本 勇太

国立遺伝学研究所 定量メカノバイオロジー研究室、JST さきがけ

細胞の自己複製過程において染色体の等分配を担う有糸分裂紡錘体は、さまざまな大きさや方向、速さで働くメカニカルな力の‘ノイズ’にさらされながらその構造的・機能的安定性を維持している。分子細胞生物学による過去数十年の精力的解析により、紡錘体形成に関与する分子群が次々と同定され、またその相互作用の詳細が明らかにされてきた。しかしながら、この細胞装置がどのように力を受容し、また応答しながらシステムとしての integrity を保っているかは依然として不明のままである。その原因の一つは、紡錘体のような細胞内の構造物に対して、力の効果を有効に評価する計測ツールが欠如していることにある。そこで我々は、微小ガラスファイバーを基礎としたマイクロマニピュレーション技術と高解像度の蛍光ライブイメージング手法を融合し、アフリカツメガエル卵抽出液内で形成される紡錘体に規定された力を直接作用させ、その変形応答を定量計測できる実験系を構築した。これにより、分裂中期紡錘体は、力の作用する方向や速さに応じて、弾性的に変形して構造をもとの大きさと形に保つ回復力を発生し、あるいは粘性的に変形して力に適応するという、頑強かつ柔軟な力学特性が明らかとなった。さらに最近では、この特徴的な力学特性が、分裂中期から後期にかけて著しく変化することも分かりつつある。このシンポジウムでは、分子阻害実験と数理モデル解析の結果と合わせて、紡錘体がどのような設計原理によって力学的なロバスト性と可塑性を獲得し、またそれが細胞分裂時にどのように機能し得るかについて議論する予定である。

# 生細胞のナノスケールでの形状イメージングを実現する 走査型イオンコンダクタンス顕微鏡の開発

高橋康史<sup>1,2,3</sup>、珠玖仁<sup>2</sup>、末永智一<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>東北大学原子分子材料科学高等研究機構、<sup>2</sup>東北大学環境科学研究科、<sup>3</sup>JST さきがけ

ダイナミックに変化を繰り返す細胞膜表面を、ナノスケールかつ連続的に可視化するには、細胞を生きた状態で測定できる分析システムが必要となる。走査型プローブ顕微鏡（SPM）は、ナノスケールの探針を利用して、試料表面をなぞるように走査し、試料の表面形状や特性を評価する。

SPMの一種である原子間力顕微鏡（AFM）は、非常に尖ったカンチレバーを用いて、力学的な相互作用を利用し、生細胞のナノスケールの形状測定が可能である。また、ガン細胞と正常細胞の弾性率の違いなど力学特性の評価において実績を挙げてきた。

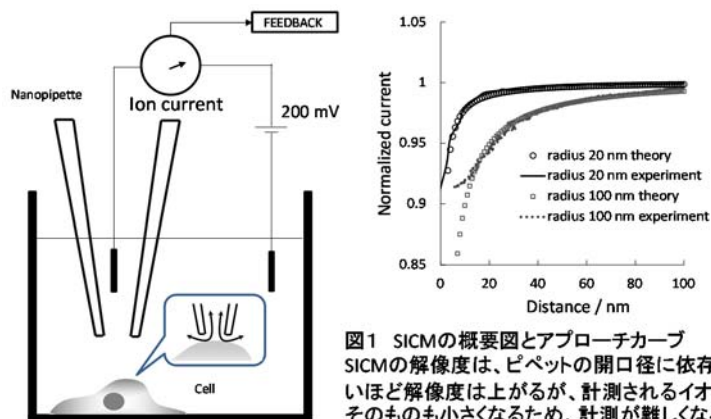


図1 SICMの概要図とアプローチカーブ  
SICMの解像度は、ピペットの開口径に依存し、小さいほど解像度は上がるが、計測されるイオン電流そのものも小さくなるため、計測が難しくなる。

今回の発表では、パッチクランプに利用されるガラスピペットをプローブに利用した走査型イオンコンダクタンス顕微鏡（SICM）を紹介する。SICMは、1989年にHansmaらにより開発され<sup>1</sup>、1990年代からKorchevらが、生細胞の形状測定を活発に行っている<sup>2</sup>。SICMの特徴は、イオン電流をフィードバック信号に利用した非接触かつナノスケールでの形状測定である。SICMの測定原理を図1に示す。ナノピペットとバス溶液に挿入したAg/AgCl間に、一定の電圧を印加すると、非常に安定したイオン電流が観察される。この状態で、ガラスピペットを試料にアプローチさせると、表面形状の影響で物理的にイオンの流れが阻害され、イオン電流が減少する。このイオン電流が、一定量減少するガラスピペットと試料との距離を保ち（その際の高さ情報を取得し）、試料表面を走査することで試料の表面形状をナノスケールで捉える。SICMの解像度は、光学顕微鏡の限界を超えており、これまで、水平方向の分解能は、3-6 nmほどの報告がある<sup>3</sup>。さらに、試料との接触を完全に回避するため、ガラスピペットをホッピングさせる走査手法が開発され、SPMでは計測が困難とされてきた神経細胞などのアスペクト比の高い試料の測定が可能となった<sup>4,5</sup>。また、計測により得られた位置情報を利用して、パッチクランプ<sup>6,7</sup>、共焦点顕微鏡とのハイブリットシステムが開発された<sup>8</sup>。さらに、エンドサイトーシスやマイクロ粒子の取り込みを可視化するための高速システムが開発されている<sup>9,10</sup>。さらに、ピペットを利用した細胞の回収およびmRNAの発現状態の評価も行われている<sup>11</sup>。

発表者は、これまで自作のSICMの開発を8年間行っており、ホッピングモードを採用することで、神経細胞の計測に関しては、Korchevらと同等のレベルの形状測定が可能となった(図2)。さらに、θ型ガラス電極の一方に、カーボンを熱焼成し、化学物質の局所的な計測を行う走査型電気化学顕微鏡(SECM)として利用するSECM-SICMを開発した。このシステムを用いて、生細胞表面の形状と化学物質の同時イメージングを行った。また、化学物質を局所的に評価できるため、化学物質の細胞膜の透過性、神経伝達物質の検出、膜タンパク質の検出、細胞の分化状態の評価を行った<sup>12-14</sup>。当日は、SECM-SICMについて、最近の研究成果に関しても報告する予定である。

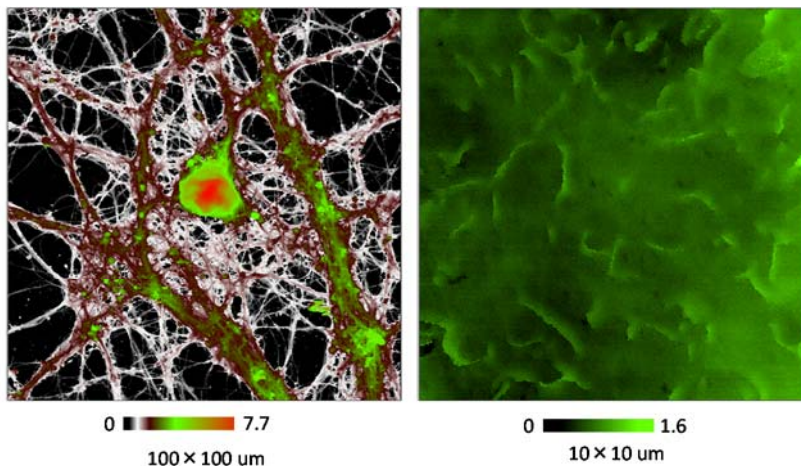


図2 海馬と上皮細胞(A431)のSICM像  
海馬ではスパインが、上皮細胞ではエンドサイトーシスの際の窪みを観察することができた。

## 参考文献

1. Hansma, P. K.; Drake, B.; Marti, O.; Gould, S. A. C.; Prater, C. B., *Science* **1989**, 243 (4891), 641-643.
2. Korchev, Y. E.; Bashford, C. L.; Milovanovic, M.; Vodyanoy, I.; Lab, M. J., *Biophys. J.* **1997**, 73 (2), 653-658.
3. Shevchuk, A. I.; Frolenkov, G. I.; Sanchez, D.; James, P. S.; Freedman, N.; Lab, M. J.; Jones, R.; Klenerman, D.; Korchev, Y. E., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45 (14), 2212-2216.
4. Novak, P.; Li, C.; Shevchuk, A. I.; Stepanyan, R.; Caldwell, M.; Hughes, S.; Smart, T. G.; Gorelik, J.; Ostanin, V. P.; Lab, M. J.; Moss, G. W. J.; Frolenkov, G. I.; Klenerman, D.; Korchev, Y. E., *Nat. Methods* **2009**, 6 (4), 279-281.
5. Takahashi, Y.; Murakami, Y.; Nagamine, K.; Shiku, H.; Aoyagi, S.; Yasukawa, T.; Kanzaki, M.; Matsue, T., *PCCP* **2010**, 12 (34), 10012-10017.
6. Korchev, Y. E.; Negulyaev, Y. A.; Edwards, C. R. W.; Vodyanoy, I.; Lab, M. J., *Nat. Cell Biol.* **2000**, 2 (9), 616-619.
7. Gorelik, J.; Gu, Y. C.; Spohr, H. A.; Shevchuk, A. I.; Lab, M. J.; Harding, S. E.; Edwards, C. R. W.; Whitaker, M.; Moss, G. W. J.; Benton, D. C. H.; Sanchez, D.; Darszon, A.; Vodyanoy, I.; Klenerman, D.; Korchev, Y. E., *Biophys. J.* **2002**, 83 (6), 3296-3303.
8. Gorelik, J.; Shevchuk, A.; Ramalho, M.; Elliott, M.; Lei, C.; Higgins, C. F.; Lab, M. J.; Klenerman, D.; Krauzewicz, N.; Korchev, Y., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, 99 (25), 16018-16023.
9. Shevchuk, A. I.; Novak, P.; Taylor, M.; Diakonov, I. A.; Ziyadeh-Isleem, A.; Bitoun, M.; Guicheney, P.; Lab, M. J.; Gorelik, J.; Merrifield, C. J.; Klenerman, D.; Korchev, Y. E., *J. Cell Biol.* **2012**, 197 (4), 499-508.
10. Novak, P.; Shevchuk, A.; Ruenaroengsak, P.; Miragoli, M.; Thorley, A. J.; Klenerman, D.; Lab, M. J.; Tetley, T. D.; Gorelik, J.; Korchev, Y. E., *Nano Lett.* **2014**, 14 (3), 1202-1207.
11. Actis, P.; Tokar, S.; Clausmeyer, J.; Babakinejad, B.; Mikhaleva, S.; Cornut, R.; Takahashi, Y.; Cordoba, A. L.; Novak, P.; Shevchuk, A. I.; Dougan, J. A.; Kazarian, S. G.; Gorelik, P. V.; Erofeev, A. S.; Yaminsky, I. V.; Unwin, P. R.; Schuhmann, W.; Klenerman, D.; Rusakov, D. A.; Sviderskaya, E. V.; Korchev, Y. E., *Acs Nano* **2014**, 8 (1), 875-884.
12. Takahashi, Y.; Shevchuk, A. I.; Novak, P.; Babakinejad, B.; Macpherson, J.; Unwin, P. R.; Shiku, H.; Gorelik, J.; Klenerman, D.; Korchev, Y. E.; Matsue, T., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, 109 (29), 11540-11545.
13. Takahashi, Y.; Shevchuk, A. I.; Novak, P.; Zhang, Y. J.; Ebejer, N.; Macpherson, J. V.; Unwin, P. R.; Pollard, A. J.; Roy, D.; Clifford, C. A.; Shiku, H.; Matsue, T.; Klenerman, D.; Korchev, Y. E., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50 (41), 9638-9642.
14. Takahashi, Y.; Shevchuk, A. I.; Novak, P.; Murakami, Y.; Shiku, H.; Korchev, Y. E.; Matsue, T., *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132 (29), 10118-10126.

## 赤外差分分光法によるイオンチャネルタンパク質の分子機構研究

古谷 祐詞、塚本 寿夫

分子科学研究所 生体分子情報研究部門

イオンチャネルは  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  等のカチオンや  $\text{Cl}^-$  などのアニオンを透過することで細胞の膜電位を変化させ、細胞の興奮や抑制といった生体電気信号の源としてはたらいっている。これらのイオンチャネルが機能する分子機構において、タンパク質構造の揺らぎが重要な役割を果たしていることが知られている。私たちは、タンパク質の構造揺らぎを捉えるため、赤外差分分光計測法を用いた研究に取り組んでいる。

ほ乳動物由来のカリウムイオンチャネルである TWIK-1 は、ポアドメインを2つもつ2量体からなり、擬4回対称構造となるイオン選択フィルターを構築している。また、条件によりナトリウムイオンを透過するため、どのような分子機構によって、カリウムイオン選択性が低下しているのかが興味深い。溶液中での計測を可能とする全反射赤外分光法を適用することで、カリウムイオンおよびナトリウムイオンを含む緩衝液を交互に流すことで、両条件の赤外差スペクトルを計測した。その結果、KcsA[1]と類似したイオン選択フィルターに特徴的な赤外差スペクトルの計測に成功した。講演では、カリウムイオン選択性が向上する T118I 変異体などの計測結果も合わせて報告する予定である。

### 【参考文献】

[1] Y. Furutani et al. *J. Phys. Chem. Lett.* 3, 3806-10, 2012.

### 【謝辞】

本研究は、生理研の久保義弘教授、中條浩一助教との共同研究として行いました。

## 新しいゲノム編集技術による遺伝子改変動物の作製

平林 真澄

生理学研究所 行動・代謝分子解析センター 遺伝子改変動物作製室

多能性幹細胞を用いた「再生医療」に大きな期待が寄せられているが、多種多様な細胞の立体的な集合体である臓器の発生過程を試験管内で再現することが困難なため、臓器そのものの再生はまだ実現していない。私たちは、臓器欠損ラット由来の受精卵に ES/iPS 細胞を注入することで臓器の再生を促し、このようにして作製したラット幹細胞由来の臓器を別の臓器欠損ラット個体に移植する実験を行っている。従来、ターゲッティングベクターを作製して ES 細胞に導入し、選択した相同組換えクローンを用いてキメラを作るというステップを踏んでいたため、ノックアウト/ノックイン (KO/KI) ラットのライン化までに1年以上を要した。しかし最近、人工ヌクレアーゼ (ZFN および TALEN) や RNA 誘導型ヌクレアーゼ (CRISPR/Cas9 システム) を利用することでゲノム上の任意の位置に二本鎖切断を入れることが可能となり、標的配列のデザインが簡便で実験手法も比較的容易なことから次世代の KO/KI 動物作製技術として注目されている。しかも ZFN や TALEN では 4～6ヶ月、CRISPR/Cas 法では1～2か月で KO/KI 動物を作製できる。本シンポジウムでは、TALEN および CRISPR/Cas9 法の適用により腓臓 (Pdx1 遺伝子 KO)、腎臓 (Sall1 遺伝子 KO) および胸腺 (FoxN1 遺伝子 KO) の欠損ラットを作製したので紹介したい。

## 傍細胞輸送を制御する細胞間接着構造の揺らぎ

古瀬 幹夫

生理学研究所 脳形態解析研究部門

上皮を横切る物質輸送は、上皮細胞の形質膜を通る経細胞経路と細胞間隙を通る傍細胞経路に分けることができる。傍細胞経路における輸送は受動輸送に限られ、その輸送特性は隣り合う上皮細胞同士の隙間をシールする細胞間接着装置タイトジャンクション(TJ)によって制御されている。TJの機能単位は、膜タンパク質クローディングが両細胞から細胞接着面に集積しつつ細胞膜内で紐状に重合した TJ ストランドとよばれる構造である。TJ ストランドのネットワークが帯状に細胞周囲を取り巻くことにより、TJ は傍細胞経路全域に切れ目なく存在する。

傍細胞輸送の評価には、 $\text{Na}^+$ 等の無機イオンの透過を電気生理学的に計測するとともに、蛍光標識したデキストラン等のより大きな分子の透過を測定することが一般的である。無機イオンの透過は特定のクローディングサブタイプが形成する TJ ストランド内の「チャネル」を介すると考えられている。一方、大きな分子が TJ を透過するメカニズムについてはまだ研究が遅れている。我々は、線維芽細胞に GFP クローディングを発現させて形成された TJ ストランドをモデルとして、その動態をタイムラプス観察した。その結果、TJ ストランドが端と端、あるいは端と側方で繋がったり切れたりする様子が観察された。この「チャネル」とは異なるモードの TJ ストランドの動的変化は、傍細胞経路における大きな分子の透過を説明する。さらに、傍細胞輸送においてコンダクタンスとフラックスが実験上必ずしも比例しないという観察にも矛盾しない。今後、上皮細胞の TJ で同様の現象がみられるか検討する必要がある。

## 痛みシグナルの揺らぎと、その中枢性制御機構

古江秀昌、井本敬二

生理学研究所 神経シグナル研究部門

生体は、生命が脅かされるなど特殊な状況において一時的に痛みを抑制し、闘争や逃避を可能にする防御システムを備えていることが知られている。戦場での負傷兵士の多くがまったく痛みを訴えない場合などがその例である。この系には大脳皮質、視床下部など複数の部位が関与していると考えられるが、最終的には青斑核など脳幹に存在する神経核から下行する線維によって、痛みの中枢への入り口である脊髄後角において、末梢からの痛みの入力を選択的にかつ有効に抑制されるものと推測されている。そこで、青斑核ノルアドレナリン神経を介した下行性痛覚抑制系に着目し、青斑核の活動に依存した脊髄における痛みの伝達／抑制のスイッチング機構を解析した。青斑核から *in vivo* パッチクランプ記録を行うと、青斑核ニューロンは自発性の活動電位を発生し、末梢の痛み刺激により発火頻度が上昇した。この発火頻度の上昇には緩徐な内向き電流が関与し、AMPA 受容体を介した EPSC など、速いシナプス入力の増加は観察されなかった。ノルアドレナリン神経を光遺伝学的に *in vivo* で活性化すると、脊髄において GABA などを介した抑制性シナプス電流の発生頻度と振幅が著明に増大し、脊髄後角表層の神経活動が抑制された。一方で、ノルアドレナリンを脊髄へ直接投与した時に発生する  $\alpha 2$  受容体を介した過分極や外向き電流は見られなかった。以上より、特殊な状況下で作動する生体防衛システムとしての下行性痛覚抑制能は脊髄 GABA ニューロンの賦活化により発揮されることが示唆された。