

平成 21 年度生理学研究所研究会

神経科学の新しい解析法とその応用

開 催 期 間:平成 21 年 7 月 16 日(木)～平成 21 年 7 月 18 日(土)

場 所:生理学研究所 山手 3 号館 2 階 西側セミナー室
(〒444-8787 愛知県岡崎市明大寺町東山 5-1)

提案代表者:高橋 正身(北里大学)

所内対応者:池中 一裕(分子神経生理部門)

平成 21 年度生理学研究所研究会
神経科学の新しい解析法とその応用

開 催 日：平成 21 年 7 月 16 日（木）～7 月 18 日（土）
場 所：生理学研究所 山手 3 号館 2 階 西側セミナー室
（〒444-8787 愛知県岡崎市明大寺町東山 5-1）
提案代表者：高橋正身（北里大学医学部）
所内対応者：池中一裕（生理学研究所 分子神経生理部門）

7 月 16 日(木)

13:00-13:10 開会挨拶 高橋正身

座長 吉田明（生理研）

13:10-13:35 清水健史 理研 CDB 体軸形成
「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」

13:35-14:00 中原聡一郎 東大 薬学 松木研
「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」

14:00-14:25 金谷繁明 慶應 解剖 仲嶋研
「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」

14:25-14:50 犬束歩 京大 藤吉研
「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」

14:50-15:05 coffee break

座長 吉村武（生理研）

15:05-15:30 佐藤千恵 岡崎統合バイオサイエンスセンター
「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」

15:30-15:55 梅田達也 生理学研究所 認知行動発達機構
「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」

15:55-16:20 山田玲 京都大学医学部神経生物学（大森研）
「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」

7月17日(金)

座長 和中明生（奈良県立医大 解剖）

8:50-9:15 市川淳也 東大 薬学 松木研
「KCC2による海馬顆粒細胞の主要樹状突起形成の制御」

9:15-9:40 大谷嘉典 東京薬科 馬場研
「アメボイドミクログリアにおける PLD4 の解析」

9:40-10:05 佐野坂司 奈良先端大・分化制御
「Cell-intrinsic program regulating astrocyte differentiation of mammalian neural precursor cells」

10:05-10:20 coffee break

座長 鹿川哲史（東京医科歯科）

10:20-10:45 森島寿貴 浜松医科大学 生理学第一講座
「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」

10:45-11:10 Lee, Hae Ung 生理研 池中研
「Mechanism underlying gliotransmitter release from cultured astrocytes」

11:10-11:35 鳥塚通弘 奈良県医大・精神医学
「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」

座長 田中謙二（生理研）

18:00-19:00 Akhilesh Kumar 生理研 池中研

「Identification and functional analysis of a novel LewisX-synthesizing
alpha1,3-fucosyltransferase gene in neural precursor cells.」

19:00-20:00 久原篤 名古屋大 理 生命理学

「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～」

7月18日(土)

座長 熊倉鴻之助（上智大）

9:00-9:55 松井広 生理研

「細胞間隙での伝達物質濃度推移が定める信号伝達特性」

座長 工藤佳久

10:00-10:55 山崎良彦 山形大学 生理学

「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」

座長 池中一裕

11:00-11:55 石井優 阪大フロンティア 生体イメージング

「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」

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。

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、GABAA 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。

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）。

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）

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チン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。

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。

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 ; 総合研究大学大学院、⁵ ; CREST、
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。

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。

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、そのが関与する可能性を検証した。生後 6 日齢の GFP 強制発現ラットから作成した海馬切片を作成し、歯状回門切片部位のみを単離し、野生型由来の海馬切片上に配置する共培養法により、幼若顆粒細胞のを可視化した。移動を中の幼若顆粒細胞を経時的に観察した。これにより、することにより、先導突起が主要樹状突起へ成熟に変化すること様子を明らかにした。次に、同系において確認した。GABAA 受容体の阻害薬であるビククリン (GABAA 受容体の阻害薬) を処置したところ結果、主要樹状突起数は増加した。、また、た分散顆粒細胞の初代培養系において詳細に GABA の作用を検証した結果、GABA は主要樹状突起以外の短い樹状突起の長をさを減少させた。さらに、次に、GABA は顆粒細胞の細胞体および神経突起におけるが KCC2 の発現を上昇させることを発見した。レベルを制御する可能性を検証するため、分散顆粒細胞に GABA を処置し、免疫蛍光強度を測定した結果、細胞体、突起部分で発現上昇が確認された。最後に、そして KCC2 の阻害薬であるフロセミド (KCC2 阻害薬) の処置により、主要樹状突起数のが増加することを確認した。した。以上の結果は、GABA がによって発現上昇した KCC2 の発現上昇を介してが主要樹状突起形成に関与することを示唆するものである。

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 を用いた貪食実験では、PLD1、4 のみが食胞に移行し、PLD2 の局在には変化がなかった。これらのことから MG6 の貪食作用には 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貪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 刺激したもののどちらの状態においても con-siRNA 群と比べて貪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 細胞の貪食に PLD4 が何らかの役割を果たしていることが示唆された。

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。

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、GABAA 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 GABAAR 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 GABAAR の役割について機能阻害実験により検討した。GABAAR 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。

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}

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

2. The Graduate University of Advanced Studies

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

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

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

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

7. Department 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 Ca^{2+} 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.

統合失調症の動物モデルの作成とその行動薬理的、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シ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。

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 lysate 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.

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

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。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。

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。

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・骨髄内の 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、骨髄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したい。