

研究活動報告

〔 目 次 〕

分子生理研究系

神経機能素子研究部門.....	11
概 要	
スプライシングの違いにより同一遺伝子から作られる新規代謝型受容体蛋白と分泌蛋白の発現解析 (久保義弘, 山本友美)	
サブユニット間相互作用による代謝型グルタミン酸受容体の機能制御機構 (立山充博, 久保義弘)	
ホヤ KCNQ1 ホモログを用いた KCNE1 による KCNQ1 機能調節機構の探索 (中條浩一, 久保義弘, 西野敦雄, 岡村康司)	
代謝型グルタミン酸受容体 mGluR1 と STIM1 の相互作用の解析 (伊藤政之, 久保義弘)	
TRPA1 チャンネルの種特異的カフェイン応答に関する機能決定部位の同定 (長友克広, 久保義弘)	
GABA _B 受容体の活性化にともなうサブユニットの配置変化 (松下真一, 立山充博, 久保義弘)	
P2X ₂ チャンネルの膜電位と ATP 濃度に依存したゲート機構に役割を果たすアミノ酸残基の同定 (Batu Keceli, 久保義弘)	
KCNK13 はプルキンエ細胞における GABA _B 受容体活性化 Cs ⁺ イオン透過性 K ⁺ チャンネルの候補の一つである (石井 裕, 久保義弘)	
プレスチンの動的構造変化のパッチクランプ - 全反射照明下 FRET 解析 (Kristin Rule, 立山充博, 久保義弘)	
分子神経生理研究部門.....	14
概 要	
グリア細胞の発生・分化 (小野勝彦, 竹林浩秀, 等 誠司, 成瀬雅衣, 後藤仁志, 稲村直子, 臼井紀好, 池田一裕)	
神経幹細胞の生成と維持 (等 誠司, 成瀬雅衣, 松下雄一, Akhilesh Kumar, 石野雄吾, 池田一裕)	
神経細胞の移動・軸索ガイダンス (小野勝彦, 竹林浩秀, 稲村直子, 臼井紀好, 池田一裕)	
グリア細胞の機能と病態 (田中謙二, 李 海雄, 竹林浩秀, 清水崇弘, 馬 堅妹, 池田一裕)	
脳における N-結合型糖鎖の構造決定と機能解析 (吉村 武, 等 誠司, Akhilesh Kumar, 東 幹人, Senthilkumaran Balasuburan, Jan Sedzik, 伊藤磯子, 小池崇子, 池田一裕)	
細胞内代謝研究部門.....	16
概 要	
細胞における機械刺激受容機構の研究 (曾我部正博, 平田宏聡)	
プロトンシグナリング機構の研究 (久野みゆき)	

ウニ卵受精時の一酸化窒素 (NO) の増加と受精膜硬化の研究 (毛利達磨, 曾我部正博, 経塚啓一郎)	
神経ステロイドによる脳虚血障害の保護作用 (曾我部正博)	
ナノ形態生理研究部門.....	18
概 要	
Aharonov-Bohm 効果を応用した位相差電子顕微鏡用位相板の開発 (大河原浩, Radostin Danev, 永山國昭)	
DNA/RNA 塩基配列の電子顕微鏡 1 分子計測法の開発 (香山容子, 永田麗子, 永山國昭, 片岡正典)	
膜タンパク質の構造解析 (重松秀樹, Radostin DANEV, 曾我部隆彰, 富永真琴, 永山國昭, 飯田秀利, 本間道夫)	
Zernike 位相差電子顕微鏡法の“複雑な”生物試料への応用 (福田善之, Radostin DANEV, 深澤有吾, 重本隆一, 永山國昭)	
脳組織凍結割断レプリカの二重標識電顕法の開発 (Alexandre Loukanov, Radostin Danev, 釜澤尚美, 重本隆一, 永山國昭)	
位相差低温トモグラフィの開発 (Radostin Danev, 永山國昭)	
漢方薬-丹参-の灌流ラット顎下腺に対する水分分泌促進機構 (村上政隆, 魏 睦新)	
In vitro および In vivo における分泌唾液蛋白の相違 (村上政隆, Massimo Castagnola, Chiara Fanali, Rosanna Inzitari, Irene Messana, Alessandro Riva, Francesca Testa-Riva, Jörgen Ekström, 吉垣純子, 杉谷博士)	
エンドソーム-ゴルジ細胞内膜系の選別輸送のメカニズムと生理機能 (大橋正人, 三寶千秋, 木下典行)	

細胞器官研究系

生体膜研究部門.....	24
概 要	
てんかん関連リガンド LGI1 の生理機能の解明 (深田優子, 岩永 剛, 深田正紀)	
PSD-95 パルミトイル化酵素によるシナプス機能制御 (則竹 淳, 深田優子, 岩永 剛, 松田尚人, 深田正紀)	
Gα パルミトイル化酵素の同定と性状解析 (堤 良平, 深田優子, 深田正紀)	
分泌蛋白質 BDNF, および LGI1 の分泌機構の解明 (松田尚人, 深田優子, 則竹 淳, 深田正紀, Mu-ming Poo)	
神経細胞におけるパルミトイル化酵素ファミリーの制御機構の解明 (奥慎一郎, 堤 良平, 岩永 剛, 深田優子, 深田正紀)	
機能協同研究部門.....	26
概 要	
プロトンチャネルとしての TRPM7 : その分子基盤 (沼田朋大, 岡田泰伸)	
成熟心筋細胞 ATP 放出性マキシアニオンチャネルは T 管開口部に局在する (DUTTA Amal K, SABIROV Ravshan Z, 岡田泰伸)	

アストロサイトからの虚血性・細胞腫脹性 ATP 放出はマキシアニオンチャネルから行われる (LIU Hongtao, SABIROV Ravshan Z, 岡田泰伸)	
Hypertonicity-Induced Cation Channel (HICC) の活性化はアポトーシスを救済し、その抑制はアポトーシスを誘導する (沼田朋大, 佐藤かお理, WEHNER Frank, 岡田泰伸)	
細胞生理研究部門.....	29
概 要	
TRPA1 チャネルの細胞内アルカリ化による活性化 (藤田郁尚, 内田邦敏, 富永真琴)	
Off channel としての酸感受性 PKD チャネル複合体 (稲田 仁, 富永真琴)	
ショウジョウバエ <i>painless</i> は熱感受性チャネル (曾我部隆彰, 門脇辰彦, 富永真琴)	
表皮ケラチノサイトにおける TRPV4 の生理機能の解析 (曾我部隆彰, 福見-富永知子, 富永真琴)	
オレキシン神経の電気生理学的解析 (山中章弘, 常松友美)	
光活性化タンパク質を用いたオレキシン神経活動の光制御 (常松友美, 山中章弘)	

生体情報研究系

感覚認知情報研究部門.....	33
概 要	
初期視覚系における輪郭線の折れ曲がりの表現 (伊藤 南, 浅川晋宏, Yi Wang)	
サル下側頭皮質への電気刺激が色判断行動に及ぼす効果 (鯉田孝和, 小松英彦)	
下側頭皮質後部における色情報の表現 (坂野 拓, 小松英彦)	
サル頭頂間溝皮質の細胞タイプ間での視覚グルーピング検出課題への寄与の差 (横井 功, 小松英彦)	
サル下側頭皮質における色選択的活動分布 : fMRI 研究 (郷田直一, 原田卓弥, 平松千尋, 伊藤 南, 小松英彦, 小川 正, 豊田浩士, 定藤規弘)	
神経シグナル研究部門.....	35
概 要	
蛋白質リン酸化による学習・記憶の制御 (山肩葉子, 柳川右千夫, 井本敬二)	
グルタミン酸輸送体の発現・機能調節と小脳異種シナプス間拡散性クロストークの生理的連関 (佐竹伸一郎, 井本敬二, 小西史朗, 宋 時榮)	
<i>Tottering</i> マウスにおける欠神発作と大脳基底核回路との関係 (加勢大輔, 井上 剛, 井本敬二)	
<i>In vivo</i> パッチクランプ法を用いた痛覚シナプス伝達の解析 (古江秀昌)	
神経分化研究部門.....	36
概 要	
ラット大脳皮質視覚野の微小神経回路網の経験依存的発達 (吉村由美子, 森 琢磨)	

ゼブラフィッシュ逃避行動において、脊髄に存在する特殊なクラスの交差型抑制性介在ニューロンが大事な役割を果たす
(佐藤千恵, 木村有希子, 東島眞一)

統合生理研究系

感覚運動調節研究部門.....	39
概 要	
4 種の感覚モダリティにおけるユニモダル過程からマルチモダル過程への活動の移行に関する電気生理学的研究 (田中絵実, 乾 幸二, 木田哲夫, 柿木隆介)	
ヒトの体性感覚 OFF 反応 (山代幸哉, 乾 幸二, 大鶴直史, 木田哲夫, 赤塚康介, 柿木隆介)	
体性感覚刺激 Go/No-go 課題における異なる運動遂行過程：事象関連型 fMRI による検討 (中田大貴, Ferretti A, Perrucci MG, Del Gratta C, Romani GL, 坂本貴和子, 柿木隆介)	
大腿部を刺激した際の痛覚関連誘発脳磁場 (中田大貴, 宝珠山稔, 田村洋平, 齋藤洋一, 山本隆充, 片山容一, 坂本貴和子, 赤塚康介, 平井真洋, 乾 幸二, 柿木隆介)	
体性感覚刺激 Go/No-go 課題における反応抑制過程：事象関連型 fMRI による検討 (中田大貴, Ferretti A, Perrucci MG, Del Gratta C, Romani GL, 坂本貴和子, 柿木隆介)	
機能的 MRI を用いた二点識別感覚の研究 (赤塚康介, 野口泰基, 原田宗子, 定藤規弘, 柿木隆介)	
バイオロジカルモーションにおける局所, 大局運動情報処理の異なる皮質処理 (平井真洋, 柿木隆介)	
Point-light walker 知覚に関連した神経応答 (平井真洋, 金桶吉起, 中田大貴, 柿木隆介)	
感情情報を含むオブジェクト・風景刺激による顔表情処理の変調 (平井真洋, 渡辺昌子, 本多結城子, 三木研作, 柿木隆介)	
視覚的ブライミング課題における視覚誘発成分の時間的特性と反応時間の関係 (橋本章子, 乾 幸二, 渡辺昌子, 柿木隆介)	
知識による錯視の修正効果 (野口泰基, 柿木隆介)	
脳波における側頭部徐波の信号源推定—双極子追跡法を用いて (元村英史, 乾 幸二, 柿木隆介)	
ヒト舌体性感覚処理機構の検討 (中田大貴, 坂本貴和子, 柿木隆介)	
ヒト舌二次体性感覚野における感覚処理機構の検討 (中田大貴, 坂本貴和子, 柿木隆介)	
痒み誘発電位 (望月秀紀, 乾 幸二, 山代幸哉, 大鶴直史, 柿木隆介)	
生体システム研究部門.....	44
概 要	
運動課題遂行中のマカクサル視床下核の活動様式 (畑中伸彦, 高良沙幸, 橘 吉寿, 南部 篤)	
淡蒼球脳深部刺激療法的作用機序の解析 (知見聡美, 南部 篤)	
大脳基底核内情報伝達におけるドーパミン D2 受容体の機能 (太田 力, 知見聡美, 笹岡俊邦, 勝木元也, 黒川 信, 南部 篤)	

- 線条体ドーパミン D2 受容体ニューロンの運動制御機能
(佐野裕美, 知見聡美, 小林和人, 南部 篤)
- 上肢到達運動課題遂行中の線条体介在ニューロンの活動
(高良沙幸, 畑中伸彦, 南部 篤)

大脳皮質機能研究系

脳形態解析研究部門.....	47
概 要	
グルタミン酸受容体のシナプス内分布様式とそれらのシナプス伝達へ与える影響 (足澤悦子, 深澤有吾, 松井 広, 重本隆一)	
小脳運動学習の記憶痕跡 (王 文, Wajeeha Aziz, 足澤悦子, 深澤有吾, 重本隆一)	
記憶・学習とグルタミン酸受容体の局在調節機構の役割 (深澤有吾, 重本隆一)	
樹上突起スパイン内アクチン細胞骨格系の可視化 (深澤有吾)	
海馬シナプスの左右差 (篠原良章, 川上良介, 重本隆一)	
Calyx of Held シナプス成熟過程における受容体配置の変化と機能 (釜澤尚美, 松井 広, 重本隆一)	
GABA _B 受容体とイオンチャネルの共存 (Akos Kulik, 深澤有吾, 重本隆一)	
前脳基底核と黒質-線条体ドーパミン系の電気生理学的および形態学的解析 (靱山俊彦)	
シナプス-グリア複合環境の動的変化による情報伝達制御 (松井 広)	
大脳神経回路論研究部門.....	51
概 要	
連続超薄切片観察による神経組織の高精度 3 次元再構築法 (窪田芳之, 畑田小百合, 川口泰雄)	
大脳皮質における錐体細胞と抑制性介在細胞の結合特異性 (大塚 岳, 川口泰雄)	
前頭皮質 5 層錐体細胞と抑制性細胞の結合特性 (森島美絵子, 川口泰雄)	
徐波・ガンマ波における FS 細胞の発火様式 (Victoria Puig, 牛丸弥香, 川口泰雄)	
心理生理学研究部門.....	53
概 要	
異種感覚間の周波数情報処理に関わる神経基盤 (林 正道, 田邊宏樹, 定藤規弘)	
視覚系と運動系に共通する動作表象の神経基盤 (佐々木章宏)	
時間的予告効果の神経基盤の解明: 機能的 MRI 研究 (吉田優美子, 田邊宏樹, 林 正道, 河内山隆紀, 定藤規弘)	
相互模倣の神経基盤 (岡本悠子, 北田 亮, 佐々木章宏, 守田知代, 板倉昭二, 河内山隆紀, 田邊宏樹, 定藤規弘)	

- 触覚による顔表情の識別に関わる神経基盤
(北田 亮, Ingrid S. Johnsrude, 河内山隆紀, Susan J. Lederman)
- 対連合学習過程の解剖学的・機能的結合解析
(田邊宏樹, 定藤規弘)
- 聴覚-視覚の時間弁別に関与する神経基盤: 機能的 MRI 研究
(村瀬未花, 田邊宏樹, 林 正道, 河内山隆紀, 定藤規弘)
- 盲人における異種感覚領野を繋ぐ effective connectivity の可塑的变化
(藤井 猛, 田邊宏樹, 河内山隆紀, 定藤規弘)
- 感情認知における他者視点取得に関連する神経基盤の解明
(間野陽子, 原田宗子, 杉浦元亮, 齋藤大輔, 定藤規弘)
- 向社会的意思決定におけるヒト線条体の役割の検討
(出馬圭世, 齋藤大輔, 定藤規弘)
- 「漢字」と「かな」における意味処理機構の違いの検討
(松本 敦)

発達生理学研究系

- 認知行動発達機構研究部門..... 57
- 概 要
- 第一次視覚野の損傷は急速眼球運動のコントロールおよび意思決定の過程に影響を及ぼす
(吉田正俊, 高浦加奈, 加藤利佳子, 池田琢朗, 伊佐 正)
- 上丘浅層 wide field vertical cell の GABA 作動性ニューロンによる活動制御機構
(金田勝幸, 伊佐 正)
- バリレン電極を用いた麻酔下ラット皮質脳波の多点同時計測
(渡辺秀典, 坂谷智也, 戸川森雄, 吉田正俊, 伊佐 正, 長谷川功, 鈴木隆文)
- 一次視覚野損傷サルにおける視覚誘導性サッケードに対する上丘 inactivation の影響
(加藤利佳子, 高浦加奈, 池田琢朗, 吉田正俊, 伊佐 正)
- 幼若時片側除皮質ラットにおける皮質脊髓路の大規模変化
(梅田達也, 伊佐 正)
- サッケード眼球運動における補正制御機構〜一次視覚野除去による研究
(池田琢朗, 吉田正俊, 伊佐 正)
- 把握運動に関与する脊髓ニューロンの役割 -Spike-triggered averaging を用いた検討-
(武井智彦, 関 和彦)
- The circuit for saccadic suppression in the superior colliculus studied in vitro
(Penphimon Phongphanphanee, Tadashi Isa)
- 片側一次視覚野切除サルにおける空間作業記憶の検討
(高浦加奈, 吉田正俊, 伊佐 正)
- 生体恒常機能発達機構研究部門..... 61
- 概 要
- 神経伝達物質のスイッチング
(石橋 仁, 中畑義久, 西巻拓也, 山口純弥, 鍋倉淳一)
- 細胞内 Cl⁻ 制御機構 KCC2 による GABA の興奮-抑制スイッチ制御の分子機構の解明
(渡部美穂, 石橋 仁, 平尾頭三, 鍋倉淳一)
- In Vivo 多光子顕微鏡を用いた大脳皮質神経細胞の微細構造の可視化技術の確立と神経細胞・グリアの生体内動態の観察
(金 善光, 和氣弘明, 高鶴裕介, 稲田浩之, 江藤 圭, 鍋倉淳一)
- 脳梗塞障害時における対側半球の回路再編機構
(高鶴裕介, 吉友美樹, 鍋倉淳一)

生殖・内分泌系発達機構研究部門.....	62
----------------------	----

概 要

摂食調節に関わる視床下部生体分子センサーの研究

(箕越靖彦, 岡本土毅, 志内哲也, 塩田清二, 影山晴秋, 矢田俊彦)

レプチン, 神経ペプチド, BDNF による糖・脂質代謝調節機構の解明

(箕越靖彦, 志内哲也, 李 順姫, 戸田知得, 斉藤久美子)

肝-膵臓器間作用を介する膵 β 増殖促進機構の発見

(片桐秀樹, 箕越靖彦, 志内哲也, 岡本土毅)

行動・代謝分子解析センター

遺伝子改変動物作製室.....	65
-----------------	----

概 要

トランスジェニックラットの作製効率における前核注入法と顕微授精法の比較

(加藤めぐみ, 平林真澄)

ラット ROSI において新鮮精子細胞と凍結精子細胞のどちらを用いるかで卵活性化処理の適期が異なる

(加藤めぐみ, 平林真澄)

大脳皮質第一次視覚野上に存在する遠近感の認知に必須の機能ユニット

“眼優位カラム” の可塑的形成メカニズムの解明に向けて

(富田江一, 三宝 誠, 山内奈央子, 平林真澄)

多次元共同脳科学推進センター.....	67
---------------------	----

概 要

脳機能計測・支援センター

形態情報解析室.....	68
--------------	----

概 要

小腸絨毛上皮下線維芽細胞におけるサブスタンス P 受容体の局在

(古家園子)

超高压電子顕微鏡トモグラフィー2 軸解析について

(有井達夫, 濱 清)

生体機能情報解析室.....	69
----------------	----

概 要

注意に関係する脳活動の研究

(遠本 徹)

多光子顕微鏡室.....	69
--------------	----

概 要

動物実験センター.....	71
---------------	----

概 要

計算科学研究センター.....	73
-----------------	----

概 要

ユニバーサル核酸の創生

(片岡正典)

全塩基修飾型核酸標識－塩基置換法

(片岡正典, 永山國昭)

全塩基修飾型核酸標識－塩基拡張法

(片岡正典, 永山國昭)

技術課	75
概要	

(大庭明生, 大河原浩)

施設の運営状況

①統合生理研究系

(1) 生体磁気計測装置室

(竹島康行)

②脳機能計測センター

(1) 形態情報解析室

(加藤勝己)

(2) 生体機能情報解析室

(佐藤茂基)

(3) 多光子顕微鏡室

(前橋 寛)

(4) 電子顕微鏡室 (生理研・基生研共通施設)

(山田 元)

(5) 機器研究試作室 (生理研・基生研共通施設)

(佐治俊幸)

③情報処理・発信センター

(1) ネットワーク管理室

(吉村伸明, 村田安永)

④岡崎共通研究施設

(1) 動物実験センター

(伊藤昭光, 廣江 猛, 窪田美津子)

分子生理研究系

神経機能素子研究部門

【概要】

イオンチャネル、受容体、G 蛋白質等の膜関連蛋白は、神経細胞の興奮性とその調節に重要な役割を果たし、脳機能を支えている。本研究部門では、これらの神経機能素子を対象として、生物物理学的興味から「その精妙な分子機能のメカニズムと動的構造機能連関についての研究」に取り組み、また、神経科学的興味から「各素子の持つ特性の脳神経系における機能的意義を知るための個体・スライスレベルでの研究」を進めている。

今年度、これまでに引き続き、神経機能素子の遺伝子の単離、変異体の作成、tag の付加等を進め、卵母細胞、

HEK293 細胞等の遺伝子発現系における機能発現の再構成を行った。また、2 本刺し膜電位固定法、パッチクランプ等の電気生理学的手法、細胞内 Ca^{2+} イメージング・全反射照明下での FRET 計測等の光生理学的手法、細胞生物学的研究手法により、その分子機能調節と構造機能連関の解析を行った。また、外部研究室との連携により、精製レコンビナント蛋白を用いた単粒子構造解析、遺伝子改変マウスの作成も継続して進めている。以下に今年度行った研究課題とその内容の要約を記す。

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

久保義弘，山本友美

我々は、遺伝子データベースの検索により、スプライシングの違いにより同一遺伝子から、オーファン受容体 (Long-Prrt3) と、その N 末端の細胞外部分のみからなる分泌蛋白 (Short-Prrt3) の両方がつくられる機能未知の新規分子 Prrt3 を見出した。今年度、これらの蛋白のマウスにおける発現分布を解析した。Long-Prrt3 を認識する抗体により免疫染色したところ、脳内では小脳プルキンエ細

胞層直下の cerebellar pinceau と呼ばれる basket 細胞のシナプス前終末がある部分に発現がみられた。また、正中隆起の表面に存在する下垂体隆起葉において強い発現が見られた。Short-Prrt3 を認識する抗体によりその発現を解析したところ、脳室の脈絡膜上皮細胞にほぼ限定して発現が観察された。さらに、マウス脳脊髄液を採取して Western blot を行ったところ発現が検出された。

サブユニット間相互作用による代謝型グルタミン酸受容体の機能制御機構

立山充博，久保義弘

代謝型グルタミン酸受容体 I 型 (mGlu1 α) は、複数の G 蛋白質 (Gs, Gq, Gi) と共役して多様な細胞応答をもたらすことが知られている。mGluR1 はホモ二量体で構成されるが、mGluR1 サブユニットの一つがグルタミン酸に結合すると、そのサブユニット (シス型) のみならずもう一方のサブユニット (トランス型) によっても Gq 蛋白質が活性化された。それに対し Gi/o 経路は、シス型単独で

もトランス型単独でも活性化されることが明らかになった。さらに、一方のサブユニットに G 蛋白質との共役を抑制する変異を導入することによっても、同様の結果が得られた。mGluR1 を介する多様なシグナル伝達経路は受容体サブユニット間の相互作用により制御されるという可能性が示唆された。

ホヤ KCNQ1 ホモログを用いた KCNE1 による KCNQ1 機能調節機構の探索

中條浩一, 久保義弘

西野敦雄 (大阪大学大学院理学研究科)

岡村康司 (大阪大学大学院医学系研究科・生命機能研究科)

電位依存性 K^+ チャネル KCNQ1 は KCNE1 の結合によってその電流の性質を大きく変える。ユウレイボヤゲノムには KCNE1 に相当する遺伝子が存在しないため、Ci-KCNQ1 は KCNE1 による調節を受けないことが想定され、そうであれば、ヒト KCNQ1 チャネル上で、KCNE1 による調節を受けるために重要な部位を同定できると考えた。実際 Ci-KCNQ1 は KCNE1 によって引き起こされる電位依存性のポジティブ電位方向へのシフトが見られ

なかった。そこで電位依存性のシフトを指標として、ヒトとホヤの KCNQ1 キメラ変異体、点変異体の作成により、KCNE1 による機能調節に重要な箇所の同定を試みた。その結果、ヒト KCNQ1 上の S5 セグメントのグリシン、S6 ドメインの2つのバリンが重要な役割を担っていることがわかった。同定したアミノ酸を KCNQ1 の構造モデルにマッピングすると、すべてタンパク質の外側、すなわち細胞膜側に向かっていた。

代謝型グルタミン酸受容体 mGluR1 と STIM1 の相互作用の解析

伊藤政之, 久保義弘

小脳プルキンエ細胞で見られる mGluR1 によって活性化される slow EPSC は mGluR1 と TRPC1 または TRPC3 の複合体によるものであることが知られている。一方、STIM1 は TRPC ファミリーのストア作動性チャネルとして機能に重要な分子として近年注目されている。そこで STIM1 の mGluR1-TRPC1 または C3 複合体に対する作用を明らかにするため、mGluR1 と直接相互作用するのか解析を行った。in vitro の発現系を用いた免疫沈降法によ

り mGluR1-STIM1 の相互作用が検出された。また STIM1 は、mGluR2 とは結合するが、GABA_B 受容体と M1 受容体にはほとんど結合しないことが分かった。一方、STIM1 による mGluR1 の機能修飾について検討を行ったが、有意な差は見られなかった。今後は発現系を用いた実験に加え、プルキンエ細胞で見られる mGluR1-slow EPSC に対する STIM1 の機能阻害抗体の効果の解析等も併せて行い、機能的な意義の解明につなげたい。

TRPA1 チャネルの種特異的カフェイン応答に関する機能決定部位の同定

長友克広, 久保義弘

我々は、これまでにマウス腸由来神経内分泌細胞 STC-1 のカフェイン応答に、TRPA1 が関与していること、この TRPA1 チャネルのカフェイン応答には種差による違いがあり、マウス TRPA1 はカフェインにより活性化され、ヒト TRPA1 は抑制されることを見いだした。今年度、このカフェイン応答の種差を決定する部位を明らかにするために、マウスとヒトのキメラチャネルを作成し解析を行った。N 末端領域を入れ替えたキメラを作成したと

ころ、N 末端にそれぞれの機能を決定する部位が存在することが明らかになった。ヒト TRPA1 を基本骨子としてマウスの N 末端を徐々に短くしていくキメラを作成すると、287A.A.まではカフェインによる活性化が見られたが、230A.A.まで短くするとカフェインによって抑制されるようになった。以上の結果から、機能に重要な部位が 231-287A.A.にあることが分かった。

GABA_B 受容体の活性化にともなうサブユニットの配置変化

松下真一, 立山充博, 久保義弘

GABA_B 受容体の活性化時の構造変化を明らかにするために, GABA_B 受容体を構成する 2 種のサブユニット GB1a および GB2 それぞれの細胞内ループに蛍光蛋白を挿入し, リガンドによる活性化にともなう FRET 変化を計測した。その結果, GB1a のループ 2 と GB2 のループ 1 または 2 との間で分子間 FRET の減少が起きることがわかり, これは, mGluR1α の場合の分子間 FRET 変化とは様式が大きく異なる。これに対して, GB1a と GB2 そ

れぞれの内部に FRET pair を導入して分子内 FRET 変化を計測したところ, 各サブユニットにおいて膜貫通部位の動きはほとんど見られず, この点では mGluR1α の結果と共通している。これらから, Family C 受容体におけるシグナル伝達とは, 各サブユニットの膜貫通部位の構造変化ではなく, 2 つのサブユニットの配置状態に大きく依存するものであることが示唆された。

P2X₂ チャンネルの膜電位と ATP 濃度に依存したゲート機構に役割を果たすアミノ酸残基の同定

Batu Keceli, 久保義弘

ATP 受容体チャンネル P2X₂ は, 膜電位センサーを有しないが膜電位依存的活性化を示す。今年度, 膜電位に依存するゲート機構の構造基盤を明らかにするために変異体解析を行った。(1) ATP 結合部位と同定されている領域の変異体の解析を行ったところ, K308R では G-V 関係が過分極側に大きくシフトしており, また活性化速度が速かった。(2) ATP による活性化に関与することが知られている膜貫通部位の細胞外側端の変異体の解析を

行ったところ, T339S 等は低い ATP 濃度では遅い膜電位依存的活性化を示し, 高い ATP 濃度では膜電位に依存しない恒常的活性化を示した。(3) 質的に逆向きの変化を与えた K308R と T339S の 2 重変異体の解析を行ったところ, 野生型に近い性質を示した。以上の実験結果から, P2X₂ の膜電位依存的ゲートには, ATP- ATP 結合部位複合体と膜貫通部位細胞外側端が複合的に寄与していることが示唆された。

KCNK13 はプルキンエ細胞における GABA_B 受容体活性化 Cs⁺イオン透過性 K⁺チャンネルの候補の一つである

石井 裕, 久保義弘

小脳スライス標本においてプルキンエ細胞の GABA_B 受容体を活性化すると外向き K⁺電流が観察される。この電流の解析を行ったところ, Cs⁺によって阻害されず, GABA_B 受容体とのカップルがよく知られている GIRK 電流ではないことが示唆された。KCNK ファミリーには Cs⁺イオンを透過するチャンネルがあるので, データベース上でプルキンエ細胞における発現が示されている

KCNK13 が候補分子として想定された。電気生理学的解析から, KCNK13 電流は G_{βγ}サブユニットの共発現・GABA_B 受容体活性化によって増加し, また, Cs⁺イオン透過性を示した。以上から, KCNK13 が小脳プルキンエ細胞における GABA_B 受容体活性化 Cs⁺透過性 K⁺チャンネルの候補の一つであることが示された。

プレスチンの動的構造変化のパッチクランプ - 全反射照明下 FRET 解析

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

内耳外有毛細胞は、速い膜電位変化に追従して細胞長を変えるが、プレスチンがその役割を果たす分子として知られている。我々は、プレスチンを対象として電位依存的構造変化の解析を進めている。C 末細胞内領域に蛍光蛋白を付加したプレスチンを HEK 細胞に共発現させ、4 量体であるプレスチンのサブユニット C 末端間の FRET を全反射照明下でモニターした。Bath に高 K^+ 液を投与することにより細胞を脱分極させたところ有意な FRET

の減少が観察された。この FRET の変化が真に膜電位変化によるものであるかどうかを確定するために、外液交換なしにパッチクランプによる迅速な膜電位コントロール下での全反射照明下-FRET 解析を行った。その結果、プレスチンの膜電位依存的構造変化の指標と考えられている非線型容量とよく類似した膜電位レンジ依存性を示す FRET の低下が観察された。

分子神経生理研究部門

【概要】

分子神経生理部門では哺乳類神経系の発生・分化、特に神経上皮細胞（神経幹細胞）からどのようにして全く機能の異なる細胞種（神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトなど）が分化してくるのか、について研究を進めている。また、得られた新しい概念や技術は臨床研究への応用を視野に入れながら、病態の解析にも努力している。

脳神経系では他の組織とは異なり多様性が大である。大げさに言えば、神経細胞は一つ一つが個性を持っており、そのそれぞれについて発生・分化様式を研究しなければならない程である。また、均一であると考えられてきたグリア細胞にも性質の異なる集団が数多く存在することも明らかとなってきた。そのため、他組織の分化研

究とは異なり、細胞株や脳細胞の分散培養系を用いた研究ではその本質に迫るには限界がある。われわれは *in vitro* で得られた結果を絶えず *in vivo* に戻して解析するだけでなく、神経系の細胞系譜の解析や移動様式の解析をも精力的に行っている。

近年、成人脳内にも神経幹細胞が存在し、神経細胞を再生する能力を有することが明らかとなった。この成人における神経幹細胞数の維持機構についても研究している。

糖蛋白質糖鎖解析法を開発し極めて微量な試料からの構造解析が可能となった。脳内において、新しい糖鎖構造を発見し、その生理学的意義について検討している。

グリア細胞の発生・分化

小野勝彦, 竹林浩秀, 等 誠司, 成瀬雅衣, 後藤仁志, 稲村直子, 臼井紀好, 池中一裕

中枢神経系において、神経細胞の多様性は発生期に形成されることが知られている。その一方でグリア細胞の発生メカニズム、発生起源、及び発生期に規定付けられる機能的多様性については未だ不明な点が多い。

本研究室ではグリア細胞の発生を規定する分子として Olig2 転写因子に着目し、グリア細胞の発生・分化機構

の解明を試みている。グリア細胞において Olig2 がどのような分子機構で発生・分化を制御するかは未だ不明な点が多い。これらを解明するために *yeast two hybrid* 法や *in vitro pull down* 法により Olig2 結合蛋白質の解析を進めている。

また、昨年度に引き続き、前脳オリゴデンドロサイト

の背側と腹側の境界領域に位置する発生起源についても解析を進めるとともに、小脳オリゴデンドロサイトの発生起源に関しても解析を行っている。

更に、アストロサイトにも発生する場所に応じてサブタイプが存在する可能性を想定し、脊髄をモデルとした解析系の確立をニワトリ胚を用いて行っている。

神経幹細胞の生成と維持

等 誠司, 成瀬雅衣, 松下雄一, Akhilesh Kumar, 石野雄吾, 池田一裕

神経幹細胞は全ての神経細胞・グリア細胞の供給源であり、脳の構築に非常に重要であるにもかかわらず、その生成の分子機構は不明な点が多い。本グループは早期胚の *epiblast* において神経幹細胞の前駆細胞である未分化神経幹細胞の培養に成功し、神経幹細胞の誘導に Notch シグナルの活性化が必須であることを解明した。さらに、Notch シグナルの活性化の初期段階を *glial cells missing 1/2* 遺伝子が担っていることを明らかにし、詳細な分子機構の解明を進めている。そこで得られた知見を ES 細胞に適応し、試験管内での ES 細胞から神経幹細胞の誘導を試みる。一方、神経幹細胞は成体脳においても

一部の領域(海馬や嗅球など)に新生神経細胞を供給し、脳機能維持に必要であることが示唆された。特に、海馬における神経新生は、記憶や学習といった脳の高次機能と関係する可能性が指摘されている。本グループでは、躁うつ病の治療に用いられる気分安定薬が成体脳における神経幹細胞の自己複製能を高めること、それが Notch シグナルの活性化によることを明らかにした。今後は、気分安定薬の Notch シグナルにおける分子標的の同定や、神経幹細胞の増加が気分を安定させるそのメカニズムの解明に取り組む。

神経細胞の移動・軸索ガイダンス

小野勝彦, 竹林浩秀, 稲村直子, 臼井紀好, 池田一裕

脊髄の組織構築形成をモデルとして、回路網形成と細胞移動の制御機構を解析するために、脊髄の回路網形成および視床網様核の細胞の移動について研究を行った。今までに、一次求心性線維の脊髄内における回路網形成においては、脊髄背外側部で一過性に発現する *netrin 1* が抑制的に作用して *waiting period* を形成することを明らかにした。今年度、増田知之博士(福島県立医大)との共同研究から、一次求心性線維が後根神経節から脊髄背側部まで向かう際にも(つまり脊髄に入る前の段階でも)、*netrin 1* が反発性因子として作用していることを見出した。また、感覚神経の軸索ガイダンスについては、*Olig2*

ノックアウトマウスで感覚ニューロンの軸索ガイダンスの異常がみられ、それが運動ニューロンの欠損によると推測され、詳しい解析を進めている。腹側視床の形成については、発生中の視床網様核において、*Zona limitans intrathalamica* 周囲の *Olig2* 陽性細胞から分化したニューロンの局在が、発生が進むにつれて脳室側から外側方向(軟膜側)へと変化していた。このことは、発生中の腹側視床ではニューロンが脳室側から軟膜側へ移動して視床網様核を形成している可能性が考えられ、経時観察による解析を検討している。

グリア細胞の機能と病態

田中謙二, 李 海雄, 竹林浩秀, 清水崇弘, 馬 堅妹, 池一中裕

グリア細胞の重要な機能の一つにシナプス伝達の調節がある。近年, グルタミン酸と ATP がアストロサイトから放出され, シナプス伝達を調節することが提唱されているが, その放出部位, 放出頻度など不明な点が多い。名古屋大学 (現 東京大学) 廣瀬教授の開発したプローブを用いて培養アストロサイトから放出されるグルタミン酸を可視化することに成功した。また名古屋大学 曾我部教授のグループと共同で, ルシフェリン発光を利用し, 培養アストロサイトから放出される ATP の可視化に

も成功した。これらのイメージングの解析から, ATP 刺激によるグルタミン酸放出, グルタミン酸刺激による ATP 放出が確認されたが, これらの放出は培養アストロサイトの 1~10% の細胞だけで観察されること, その放出時間が数十秒あることなどが分かった。今後は, 放出に関わる分子の同定, 放出の観察されるアストロサイトの特徴抽出, ATP とグルタミン酸との同時測定が課題となった。

脳における N-結合型糖鎖の構造決定と機能解析

吉村 武, 等 誠司, Akhilesh Kumar, 東 幹人, Senthilkumaran Balasuburan, Jan Sedzik,
伊藤磯子, 小池崇子, 池一中裕

糖鎖を有する分子は細胞表面や細胞外に存在し, 細胞間相互作用やシグナル伝達に深く関わっている。これまでに我々は (1)脳内糖鎖発現パターンが発生時期に劇的に変化すること, (2)いくつかの糖鎖の発現量が顕著に変化すること, (3)シアル酸付加糖鎖の構造解析から, 大脳皮質の発達過程において劇的に変化する新規シアル酸糖鎖が存在することを明らかにした。本年度は 3 種類の HPLC を使った N-結合型糖鎖の微量解析法を開発し, 1 μ g

未満の糖蛋白質から糖鎖構造を決定できるように改良した。この解析法を用いて, 生検資料や精製した中枢神経や末梢神経由来の髄鞘の糖鎖構造を決定した。

我々は N-結合型糖鎖解析過程で Lewis X 糖鎖構造の合成に関わる新規フコース転移酵素 (FucT10) を見出した。その機能解析を行い, 糖蛋白質糖鎖にフコースを転移することや神経細胞移動に関与することを明らかにした。

細胞内代謝研究部門

【概要】

生命は, 環境感知機構と細胞内シグナル機構に支えられた適切な細胞応答で実現されている。本部門では, 電気生理学と先端バイオイメーキングを用いてイオンチャネルや細胞内シグナル分子の動態を測定し, 細胞応答に至るシグナルネットワークの時空間統御機構の解明を目指している。特に細胞の機械刺激感覚 (細胞力覚) に注目し, メカノセンサーの分子実体 (イオンチャネル・細胞骨格/接着斑など) とその仕組みの解明, および細胞運動や細胞形態調節における役割を調べている。また, 破

骨細胞におけるプロトンシグナリングや受精における NO/Ca²⁺カルシウムシグナリングに関する基礎的研究を行っている。一方で, 神経ステロイドによる記憶促進/虚血傷害保護作用のシグナル機構を調べながら, 臨床医学への橋渡的研究を展開している。

なお細胞内代謝部門は 2008 年度をもって終了いたしました。これまでの皆様のご指導とご支援に対してスタッフ一同より感謝申し上げます。

細胞における機械刺激受容機構の研究

曾我部正博, 平田宏聡

主要課題の一つは、細胞メカノセンサーの代表格である機械受容 (MS) チャネルのゲーティング機構の解析です。今年度は細菌の MS チャネルである MscL のゲーティング機構について解析しました。これまでに MscL の閉構造は分かっていたが開構造は謎でした。常時開口していると思われるミュータントはありますが、これを大腸菌に発現すると致死性であるため、大量の開状態 MscL 蛋白質が得られないためです。そこで我々は開チャネルミュータント蛋白質を試験管合成してその構造を電子顕微鏡で観察し、それを元に MscL ゲーティングのモデル (IRIS モデル) を提唱しました (Yoshimura et al., PNAS, 105(10):4033-4038, 2008)。このモデルを検証するために分子動力学モデルを構成し、MscL がどのようにして膜張力を受容して開口するかを全プロセスをシミュレーションしています (Sawada et al., in preparation)。このモデルは野生型や種々のミュータントの実験結果を良く

説明するので、我々は MscL ゲーティング機構の究極理解に近づきつつあると思っています (曾我部)。

接着性細胞は細胞内外の力学環境 (細胞が発生する収縮力や基質の硬さなど) に応じて細胞骨格や接着構造を変えて最終的に形態の変化を惹起します。しかしこのときの力学環境の感知機構は不明で、最終応答に至るシグナル機構は謎のままです。我々は、力学的負荷により、接着斑でのアクチンの重合が活性化することを発見し、このアクチン重合の活性化には、接着斑タンパク質 zyxin の力学的負荷に応答しての接着斑へのリクルートが関わっていることを明らかにしました (Hirata et al., J Cell Sci, 121:2795-2804, 2008)。現在、力学負荷依存的に zyxin と相互作用するタンパク質の同定を進め、接着斑におけるメカノトランスダクション機構を明らかにしようとしています (平田)。

プロトンシグナリング機構の研究

久野みゆき

細プロトンは様々な細胞機能に影響を与える重要なシグナルイオンです。破骨細胞はプロトンポンプ (V-ATPase) によって酸を分泌し骨組織を融解し (骨吸収)、骨リモデリングや生体 Ca 代謝の調節に貢献しています。破骨細胞では骨から溶け出したカルシウム (Ca) に暴露されると骨吸収を抑制するネガティブフィードバック応答が起こり行き過ぎを防いでいますが、その Ca 感受機構はよくわかっていません。私達は、これまでに高濃度の Ca に暴露されると V-ATPase 活性が抑制されるこ

とを見出していましたが、同時に endocytosis が促進されることが、この過程が V-ATPase のブロッカーで抑制されることが明らかにしました。私達は V-ATPase が細胞内小胞と細胞膜の間を移動して活性を調節しており、Ca によって細胞膜から細胞内への移行が促進し酸分泌能が低下することが骨吸収抑制の一端を担っているのではないかと考えています。これらの結果は投稿中で、現在、V-ATPase 取り込みに関わる更に詳細なメカニズムを検討しています (久野)。

ウニ卵受精時の一酸化窒素 (NO) の増加と受精膜硬化の研究

毛利達磨, 曾我部正博

経塚啓一郎 (東北大大学院生命科学(附) 浅虫海洋生物学研究センター)

ウニ卵受精時の一酸化窒素 (NO) 増加について卵活性化の引き金なのか, どんな働きがあるのか検討しました。NO 増加と内外イオンの関係を調べるために電位固定法と NO 感受性蛍光色素によるイメージングとの同時測定を行いました。NO 増加は受精の引き金ではなく細胞内カルシウム増加の後に増加することを確認しました。受精膜硬化を抑制することが報告されている CN⁻や NADPH 産生酵素の阻害剤 DPI も NO 増加を完全に抑制しました。このことから NO の働きとして受精膜硬化が強く示唆されたので, この観点で研究を展開しました。また NO 吸収剤 PTIO を用いて, NO 増加を抑制した時とそうでない時とで酸素消費, Redox 変化 (NADH/NADPH),

H₂O₂ 産生を測定しました。酸素消費を酸素電極で測定したところ, PTIO 存在下では全体の酸素消費量はコントロールに比べて減少していました。NADH/NADPH の自家蛍光シグナルも PTIO 存在下ではその増加が抑制されました。また酸素消費の原因である H₂O₂ の産生を蛍光試薬 Amplex Red で測定したところ, PTIO 存在下では H₂O₂ の産生は抑制されていました。さらに, PTIO 存在下では化学的機械的刺激により受精膜はコントロールに比べて遥かに弱くなっていました。これらのことから NO の役割として受精膜硬化を促進する働きについて論文にまとめ発表しました (Dev Biol, 322; 251-262) (毛利)。

神経ステロイドによる脳虚血障害の保護作用

曾我部正博

近年種々のステロイドホルモンが中枢で合成され, 様々な機能を発揮することが分ってきました。特に学習記憶行動の促進やアミロイド・脳虚血による神経障害の保護作用が注目を集めていますが, その分子・シナプス機構は不明です。我々は, 海馬スライス標本に膜電位イメージングを適用して, 代表的神経ステロイドであるエストロゲンや PREGS, DHEA などの作用機序を調べています。本年度は DHEA の神経保護作用について解析しました。閉経前の女性は閉経後の女性や同年齢の男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が知られています。そこで性ホルモンが脳卒中の予防や予後に効果があると考えられ, 事実そうであることが分かって

います。しかし何時発症するか分からない脳卒中のために性ホルモンを投与し続けることは危険です。我々は卒中に伴う虚血による神経細胞死が発症後 2-7 日に亘る遅延性であることに注目し, 発症後にステロイド (DHEA) を投与しても神経細胞死を防げるのではないかと考えました。結果は, 予想通りで, 一過的脳卒中において発症後 6 時間から 48 時間の間であれば, DHEA の一回投与で神経細胞死をほぼ完全に防止できることが分かりました (Li, et al., J Cerebral Blood Flow Metabol, 29:287-296, 2009)。この手法が人間にも適用できれば大きな福音です。現在治験の可能性を検討しています (曾我部)。

ナノ形態生理研究部門

【概要】

「構造と機能」という分子生物学のパラダイムは生物の機能が生体高分子, 特に蛋白質の独自の構造によって支

えられていることを明かにして来た。本部門では細胞内超微小形態を高分解能, 高コントラストで観察する新し

い電子顕微鏡の開発を背景に細胞の「構造と機能」を研究している。

永山グループは位相差電子顕微鏡の開発と、その応用としての DNA1 分子の塩基配列直読法開発、チャンネルを中心とした蛋白質の電子線構造解析，“複雑な”生物試料への Zernike 位相差法の応用、脳組織凍結切断レプリカの二重標識法開発を行った。また、位相差低温トモグラフィの開発と応用を新たに開始した。

物質輸送に関する研究が主眼である村上グループは、南京医科大学と共同研究で漢方薬の唾液分泌促進効果について、摘出ラット唾液腺を用い調査を継続発展した。カソリック大学ローマ校とイエテボリ大学と協力して灌流顎下腺と in situ 顎下腺の分泌唾液を比較検討するため、唾液中のペプチド/蛋白の質量分析を開始した。

大橋グループはエンドソームーゴルジ細胞内膜系の選別輸送のメカニズムと生理機能の研究を行った。

Aharonov-Bohm 効果を応用した位相差電子顕微鏡用位相板の開発

大河原浩, Radostin Danev, 永山國昭

昨年に続き、薄膜位相板を用いた場合の短所電子線損失を解決できる, Aharonov-Bohm (AB) 効果, を応用した位相板の開発を行った。AB 効果位相板は極めて細い一本の棒磁石を絞りに橋かけし, 磁石が作り出すベクトルポテンシャルを利用する。昨年度用いた電子線ホログラフィー用のパイプリズムに替り, 10 μ m 直径白金線から極細線を刀様に FIB で切り出しその刃の上に永久磁石材料を蒸着する棒磁石作製法を開発した。その結果,

500nm 幅 $\times$ 10 μ m 厚 $\times$ 50 μ m 長の日本刀様極細線を切り出し, その刃の上に 10 $\sim$ 20nm 厚の磁石材料 (コバルト, ニッケル) を蒸着できた。この AB 効果位相板の性能テストを 120kV 位相差専用電顕で行い, 位相変化を計測した。位相変化は棒磁石左右の平面間では差がありかつそれぞれの平面内では一様となることが期待されたが, 左右差は認められたが, 平面内一様性の達成には至らなかった。

DNA/RNA 塩基配列の電子顕微鏡 1 分子計測法の開発

香山容子, 永田麗子, 永山國昭
片岡正典 (計算科学研究センター)

DNA/RNA の塩基配列決定の高速化を図るため, 電子顕微鏡技術を基軸に新しい方法論を開発している。この方法は i) 全核酸塩基の化学修飾による体積・電子密度差の増幅と DNA/RNA の一本鎖への解離, ii) 完全伸長した多数の一本鎖 DNA/RNA 分子の一方方向整列によるアレイ作成, iii) アレイ化した一本鎖 DNA/RNA の電顕による観察と識別, iv) 修飾塩基間のコントラスト差から塩基配

列の解読, の 4 つの要素技術により成り立っている。T と U を除く 3 種の構成塩基全てを塩基選択的に化学修飾することに成功し, 各塩基間の体積と電子密度差の増幅が可能となった。これらの修飾 DNA を単層グラフェンまたは薄層グラファイトを基盤として担持し, 背景信号を限りなく少なくして一重鎖 DNA 分子の電子顕微鏡観察を試みた。

膜タンパク質の構造解析

重松秀樹, Radostin DANEV, 曾我部隆彰, 富永真琴, 永山國昭
飯田秀利 (統合バイオ客員教授), 本間道夫 (名古屋大学大学院理学系研究科)

結晶化の困難な膜蛋白質の構造を電子顕微鏡像から決定する手法として単粒子解析に取り組んでいる。3種類 (TRPV4, MCA1, MCA2) の膜蛋白質については、組み換え発現系を構築し、精製蛋白質の構造を界面活性剤可溶化状態で構造解析を行った。その結果 TRPV4 については 35Å 分解能の立体構造が得られ、論文投稿中である。

また MCA2 についても 24Å 分解能の立体構造が得られ、学会発表行い、論文投稿を行った。また、新たに、Vibrio 菌由来のモータ蛋白質複合体 HBB について、構造解析を始めた。氷包埋試料の単粒子解析および新たな試みとして低温位相差トモグラフィにも取り組んでいる。

Zernike 位相差電子顕微鏡法の“複雑な”生物試料への応用

福田善之, Radostin DANEV, 深澤有吾, 重本隆一, 永山國昭

これまで Zernike 位相差電子顕微鏡観察は蛋白質やウイルス等の小さい構造体に応用されてきたが、細胞や組織切片など“複雑”な試料には応用されていなかった。本研究ではガラス状に凍結した細胞、組織切片の Zernike 位相差電子顕微鏡観察を行った。従来使用している中心孔径 700nm の位相板を応用したところ、位相差法により微細構造のコントラストは改善されるものの、短周期のハロの出現及び、観察像の粒状性などにより、微細構造をはっきりと観察することが出来なかった。そのため、Zernike 位相板の中心孔径を従来の 700nm から 300nm に縮小したものを作製し、それを用いた位相差観察像の検討を行った。その結果、中心孔径を縮小することにより位相差法に伴うコントラストが増加するとともに、ハロの周期が長くなり、結果的に観察像へのハロの影響が抑

えられることが確認できた。

通常電顕観察において、マウス海馬初代培養神経細胞急速凍結試料とマウス大脳皮質ガラス質凍結超薄切片では生体分子分布に基づく微細構造を低分解能でしか観察出来ない。中心孔径 300nm の Zernike 位相板を使用することで、マウス海馬初代培養神経細胞急速凍結試料においては細胞内の様々な細胞骨格蛋白質の分布が、またマウス大脳皮質ガラス質凍結超薄切片では細胞骨格蛋白質や細胞膜間架橋分子などがより高い分解能で観察された。大脳皮質ガラス質凍結超薄切片では電子染色を行った樹脂包埋脳組織超薄切片と同程度のコントラストで微細構造を観察できた。本研究は生理学専攻の博士論文として提出され受理された。

脳組織凍結切断レプリカの二重標識電顕法の開発

Alexandre Loukanov, Radostin Danev, 釜澤尚美, 重本隆一, 永山國昭

電子顕微鏡法はその高分解能性故に分子レベルでの定量的研究には幅広い応用可能性が残っている。本研究では以下の電子顕微鏡法につき定量化を行った。

i) 新規な光顕・電顕相関イメージングのための共通ラベル剤 (標識薬) の開発: 金属種の選択と粒子径の制

御により多彩な発色が可能である Q-dot を応用した。特に ZnS, CdSe につき、3~5nm 径の Q-dot を合成し七色の発色を確かめた。

ii) 新規ラベル法に適した電子顕微鏡手法の開発: ZnS, CdSe 等は、従来の金コロイドに比べ原子量が低く、

電顕的に低コントラストである。そのため重金属を用いる電子染色試料や白金炭素レプリカ法への適用は不可能とされてきた（背景の方が Q-dot より高コントラストのため）。そこで白金という重金属を排する新しい低元素レプリカ手法、炭素レプリカ法を開発した。炭素膜に担持された受容体への抗体 Q-dot ラベル観察を可能とするため、走査透過電顕 (STEM) と元素弁別イメージング法 (EDX) の組み合わせという新規手法を開発した。そのことにより、ZnS Q-dot では 5nm, CdSe Q-dot では 3nm,

金コロイドでは 1.4nm までの微小ナノ粒子のラベル剤適用が可能となった。

iii) i)と ii)を用いた神経細胞表面の受容体タイプ選択的標識法の開発：神経末端の受容体の種類 (NMDA と AMDA) の弁別的ラベルがこの研究でのターゲットである。特に同一サイズの Q-dot または金コロイドを EDX に用いることで定量的に元素弁別でき、従来法のサイズ分布に伴う曖昧さを完全に払拭できた。本研究は生理学専攻の博士論文として提出され受理された。

位相差低温トモグラフィーの開発

Radostin Danev, 永山國昭

CREST の経費で導入された 200kV 位相差電顕 (JEM2200F) を用いて低温トモグラフィーの開発を行った。特に位相差法とトモグラフィーの組み合わせは世界最初の事例であったが両者の特質がシナジーティックに

働き約 3nm 分解能の立体的解析システムを構築できた。このシステムを各種蛋白質、各種ウイルスに適用し高いコントラストと高分解能の立体構造を得ることができた。

漢方薬-丹参-の灌流ラット顎下腺に対する水分分泌促進機構

村上政隆

魏 睦新 (南京医科大学第一附属医院 中医内科)

唾液分泌低下に対して治療効果のある漢方薬が多く知られているが、これらの薬物が直接唾液腺に作用するのかどうか？ また直接作用があるとすれば、唾液を誘発するのかあるいは唾液水分分泌速度を増強するのかを摘出ラット顎下腺の血管灌流標本を用い、水分分泌速度を測定し検討してきた。2005-2007 年度に漢方薬 20 種類を検討し、15 種類で唾液分泌の増強が観察された。雄性成体ラットから顎下腺を摘出、血管灌流標本作製。分泌導管にカニニューレを施し、これを電子天秤上のカップに導き、分泌された唾液重量を時間微分して分泌速度を求めた。漢方薬は、薬物は灌流液中に推定治療血液濃度で添加、遠沈後上清を 0.45 ミクロンフィルターを通したものを使用した。唾液分泌刺激の対照としてカルバコール 0.2 μ M を用いた。

2008 年度は、自発分泌を起した甘草と丹参について自律神経ブロッカーを用い、どの受容体が刺激を受けてい

るかを検討した。その結果、アトロピンにより、甘草による水分分泌は完全に抑制され、甘草がムスカリン受容体を刺激していることが明らかになった。一方、丹参により誘発される水分分泌はアトロピン投与でも抑制されず、フェントラミンでも抑制されなかった。このことは、丹参は、唾液腺で水分分泌を誘発するとされるムスカリン受容体も α アドレナリン受容体も刺激しないことになる。細胞内に移行せず、傍細胞経路を通過し分泌されるルシファーイエロー蛍光色素の分泌時間経過を観察した。顎下腺ではカルバコールなどのムスカリン刺激により、水分分泌とともに傍細胞経路が開く。0.2 μ M カルバコール刺激と丹参刺激を比較すると、水分は、丹参でカルバコールより多く分泌された。一方、蛍光色素はカルバコールの方が丹参より多く分泌された。以前報告 (Murakami, J. Physiol, 537: 899, 2001) のように傍細胞輸送経路には半径 5 Å以下の分子を通す小さな経路と色々な分子量の分

子を通す大きな経路の二つがあることが推定されたが、今回用いた蛍光色素は後者の経路を通過すると考えられる。従って丹参は小さな経路をより開いたのではないかと考察され、丹参の唾液分泌増強のひとつに傍細胞経路

の開放があげられた。細胞内Ca 増加が傍細胞経路を開くことと関連する実験結果が共同研究でも示され、今後細胞内 Ca との関係について詳細な実験を進めてゆく必要がある。

In vitro および In vivo における分泌唾液蛋白の相違

村上政隆

Massimo Castagnola, Chiara Fanali, Rosanna Inzitari, Irene Messana (カトリック大学医学部ローマ校)

Alessandro Riva, Francesca Testa-Riva (カリアリ大学医学部細胞形態学)

Jörgen Ekström (イエリテボリ大学神経科学および生理科学部)

吉垣純子, 杉谷博士 (日本大学松戸歯学部生理学)

唾液腺から分泌されるタンパク質/ペプチドの種類は、高分解二次元電気泳動によると耳下腺では数百といわれる。耳下腺腺房細胞でのタンパク分泌経路は大きく、顆粒分泌とベシクル分泌の経路に大別されるが、唾液中のタンパク質/ペプチドがどの経路を使うかは定かではない。本プロジェクトは、ローマチームの質量分析技術、イエリテボリチームの唾液腺 in vivo 耳下腺実験技術、生理研の in vitro 摘出耳下腺唾液腺灌流、日大松戸歯学部チームの分泌顆粒精製技術が共同して、この問題に取り組んできた。ラット耳下腺からは PSP (rat parotidsecretory protein, Swiss Prot Code Q63471) が分泌される。まず、麻酔下のラットを用い耳介側頭神経(副交感)を電気刺激して10分毎、120分にわたり唾液を採取して、質量分析(RP-HLPC-ESI-MS)で分析すると、PSP由来の二つのペプチド(分子量、1211.7と928.5Da)を、前者はPSPのN端から1-12のアミノ酸からなるペプチド(PSPFr-A)、後者はN端から3-12のアミノ酸からなるペプチド

(PSPFr-B), と同定した。そして長時間刺激でPSPFr-Aは増加、反対にPSPFr-Bは減少することが分かった。摘出灌流耳下腺からの唾液でも同様の反応が見られ、これらのペプチドは循環血由来のペプチドではない事が裏付けられた。タンパク合成阻害剤を与えた耳下腺の唾液にはPSPFr-Aは見つからず、PSPFr-Bは減少した。タンパク分解酵素aprotininを与えたラットでは、PSPFr-B分泌はほとんど無くなった。一方PSPFr-Aは阻害剤を入れる前より増加した。一方、無刺激の場合には、精製した分泌顆粒にはPSPFr-AもPSPFr-Bペプチドも、見つからなかった。これらの結果は、顆粒経路とベシクル経路の少なくとも二つの経路関わるペプチド産生の問題であり、PSPFr-Aは、顆粒/ベシクル両経路の最初の切断産物である。PSPFr-Bはおそらく最後の段階で顆粒のPSPFr-Aより生成されると考えられた。裏づけには形態的な裏づけが必要とされる。将来的には他のペプチドについても解析を続けてゆく計画である。

エンドソームーゴルジ細胞内膜系の選別輸送のメカニズムと生理機能

大橋正人, 三寶千秋

木下典行 (基生研)

エンドソームーゴルジ系などの細胞内膜系が、極性細胞の形態形成シグナル制御において果たす役割を解析するため、上皮系細胞の未だ数の限られているエンドソームーゴルジ細胞内膜系マーカー分子の、FL-REX

(fluorescence localization-based retrovirus-mediated expression cloning) 法による探索・同定を進めてきた。極性上皮細胞からcDNA-GFP融合ライブラリーを構築し、上皮細胞株に発現させ、エンドソームーゴルジ細胞内膜

系様の局在を示す細胞をクローン化した。得られた GFP 融合蛋白質を解析したところ、これらはもとになった細胞の cDNA ライブラリー内容を反映すると考えられる特徴的な膜蛋白質群からなり、特定の GFP 融合ライブラリーからは、発生における形態形成シグナル制御に関わっていることが既知である複数の膜蛋白質も得られた。また、特定の膜オルガネラに局在するいくつかの機能詳細不明の蛋白質を同定した。

これまでに、強制発現やアンチセンスモルフォリーノオリゴを用いた機能解析実験の結果、FL-REX 法によりエンドソームーゴルジ系に局在することの判明した膜蛋白質の中から、初期発生に関与する新たな機能分子の候補を挙げることに成功した。また、これらの蛋白質の作用メカニズムを解明するため、蛋白質への変異導入により、エンドソームーゴルジへの局在シグナルとその制御についての解析が進んでいる。

細胞器官研究系

生体膜研究部門

【概要】

脳の興奮性シナプス伝達を司る AMPA 型グルタミン酸受容体の動態や機能を制御する機構を以下の 2 点に着目して解明し、シナプス可塑性およびてんかんなどの脳神経疾患発症のメカニズムの理解を目指す。

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

機構を分子細胞生理学的、遺伝学的手法を用いて統合的に明らかにする。

(2) パルミトイル化脂質修飾機構の全容解明

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

てんかん関連リガンド LGI1 の生理機能の解明

深田優子, 岩永 剛, 深田正紀

AMPA 型グルタミン酸受容体は脳内の主要な興奮性シナプス伝達を司り、神経活動に応じてシナプス伝達効率を動的に制御している。最近、私どもはシナプス足場蛋白質 PSD-95 複合体として痙攣・てんかんに関連のある AMPA 受容体附属サブユニット Stargazin, 膜蛋白質 ADAM22, および分泌蛋白質 LGI1 の 3 つを同定した。これまでに、私どもは LGI1 が ADAM22 のリガンドとして機能し、AMPA 受容体機能を促進することを報告した。

LGI1 の作用機構を明らかにするために、脳内 LGI1 複合体を精製、同定し、巨大な蛋白質複合体のネットワークを明らかにしつつある。さらに、LGI1 以外の LGI ファミリー (LGI2, -3, -4) および ADAM22 ファミリー (ADAM22, -23, -11) の生理機能、および機能解析を進めている。今年度は各ファミリー同士の結合特異性、および機能相補性を明らかにした。

PSD-95 パルミトイル化酵素によるシナプス機能制御

則竹 淳, 深田優子, 岩永 剛, 松田尚人, 深田正紀

今年度は PSD-95 パルミトイル化酵素 P-PAT (DHHC2, 3, 7, 15) の活性が神経活動により制御されているか、さらに P-PAT が何らかのシナプス可塑性を制御しているかを検討した。海馬培養神経細胞の神経活動を低下させると、PSD-95 のパルミトイル化レベルが大きく上昇し、シナプスにおける PSD-95 量が増加し、その結果、AMPA 受容体がシナプス後部に集積してくることを見出した。

この神経活動依存的な PSD-95 のパルミトイル化はシナプスに移行してくる DHHC2 によるものであり、ゴルジ体に限局する DHHC3 によるものではないことを見出した。このように DHHC2 を介した PSD-95 のパルミトイル化は AMPA 受容体恒常性維持の表現型である Synaptic scaling に必須であることが明らかになった。

Gα パルミトイル化酵素の同定と性状解析

堤 良平, 深田優子, 深田正紀

3 量体 G 蛋白質 α サブユニット ($G\alpha$) は分子スイッチとして細胞内情報伝達の要として機能する。 $G\alpha$ は古くからパルミトイル化を受けることが知られており、パルミトイル化が細胞膜への集積や機能の発揮に重要であることが示唆されてきたが、 $G\alpha$ パルミトイル化酵素は同定されていなかった。私どもは DHHC3 および DHHC7 を $G\alpha$ パルミトイル化酵素として同定し、アゴニスト依存

的な α_{1A} アドレナリン受容体・ $G\alpha_q$ を介した情報伝達系に DHHC3 および DHHC7 が必須であることを見出した。さらに、photoconversion 法や FRAP 法を利用し、 $G\alpha_q$ が常に細胞膜に静的に局在するのではなく、パルミトイル化依存的にゴルジー細胞膜間を shuttling していることを見出した。現在、脱パルミトイル化酵素の脳組織からの精製、同定に取り組んでいる。

分泌蛋白質 BDNF, および LGI1 の分泌機構の解明

松田尚人, 深田優子, 則竹 淳, 深田正紀

Mu-ming Poo (カリフォルニア大学パークレー校 分子細胞生物学部)

神経栄養因子 BDNF は神経分化や神経活動依存的なシナプス可塑性に重要な役割を果たしている。BDNF は合成後、デンスコア小胞として軸索、樹状突起の両方に輸送され、分泌される。しかし、BDNF の分泌機構については殆ど明らかになっていない。私どもは海馬培養神経細胞からの BDNF の分泌過程を全反射顕微鏡を用いるこ

とにより可視化することに成功した。興味深いことに、軸索、樹状突起からの分泌過程はそれぞれ神経活動により、異なる様式で制御されていることを明らかにした。同様の手法を用いててんかん関連分泌蛋白質 LGI1 の分泌制御機構の解明にも取り組んでいる。

神経細胞におけるパルミトイル化酵素ファミリーの制御機構の解明

奥慎一郎, 堤 良平, 岩永 剛, 深田優子, 深田正紀

パルミトイル化修飾は多くの機能蛋白質にみられる脂質修飾であり、外界刺激依存的に可逆的に代謝回転し、生体の恒常性や可塑性を精密に制御していると考えられている。最近、私どもはパルミトイル化脂質修飾酵素 (23 種類) をゲノムワイドに同定し、次々と新しい酵素-基質ペアを明らかにしている。しかし、パルミトイル化酵素群の活性制御メカニズムに関しては未だ殆ど不明である。最近、私どもは 23 種類の酵素群がいくつかのサブファミ

リーに分類されることを見出し、サブファミリー毎に異なる局在、制御を受けることを見出しつつある。そこで、DHHC 蛋白質サブファミリー特異的な輸送・局在化メカニズムの解明を試みている。今年度はサブファミリー特異的な結合蛋白質を網羅的に生化学的に精製、同定した。今後、これら結合蛋白質の性状解析を通じて新規パルミトイル化酵素群のサブファミリー特異的な制御機構を明らかにする。

機能協関研究部門

【概要】

脳神経系など生体機能のもととなる細胞機能のすべては、細胞膜におけるチャネル（イオンチャネル、水チャネル）やトランスポーター（キャリア、ポンプ）、バイオ分子センサーの働きによって担われ、支えられている。私達は容積調節や吸収・分泌機能や環境情報受容、網膜における光受容と視覚情報処理など最も一般的で基本的な細胞活動のメカニズムを、チャネル、トランスポーター、レセプター、センサー、メッセンジャーなどの機能分子の働きとして細胞生理学的に解明し、それらの異常と疾病や細胞死との関係についても明らかにしようとしている。主たる研究課題は次の通りである。

(1)「細胞容積調節の分子メカニズムとその生理学的役割」：細胞は（異常浸透圧環境下においても）その容積を正常に維持する能力を持ち、このメカニズムには各種チャネルやトランスポーターやレセプターの働きが関与している。これらの容積調節性膜機能分子、特に外向整流性容積感受性クロライドチャネル (VSOR) やそのシグナルの分子同定を行い、その活性メカニズムと生理学的役割を解明する。

(2)「アポトーシス、ネクローシス及び虚血性細胞死の

誘導メカニズム」：容積調節能の破綻は持続性の容積変化をもたらして細胞死を誘導する。多くの細胞のアポトーシス、ネクローシス、更には脳神経細胞や心筋細胞の虚血性細胞死の分子メカニズムを解明する。特に、イオンチャネルの関与とそのメカニズムを明らかにし、「細胞死の生理学」という分野を切り開く。

(3)「バイオ分子センサーチャネルの分子メカニズムの解明」：イオンチャネルはイオン輸送や電気信号発生のみならず、環境因子に対するバイオ分子センサーとしての機能を果たし、他のチャネルやトランスポーター制御にも関与する多機能性蛋白質である。特に、アニオンチャネルや ATP チャネルや TRP カチオンチャネルの容積センサー機能、メカノセンサー機能およびストレスセンサー機能の分子メカニズムを解明する。

(4)「網膜における視覚情報処理のメカニズム解明」：網膜には、光感受性センサーなど様々な種類のバイオ分子センサーが発現し、初期の視覚の形成を担っている。とくに網膜神経節細胞での視覚情報の統合処理について、網膜組織培養法を活用したバイオ分子センサーの遺伝子操作および電気生理学的手法を用いて明らかとする。

プロトンチャネルとしての TRPM7：その分子基盤

沼田朋大, 岡田泰伸

TRPM7 は広範に発現する非選択性の陽イオンチャネルであり、細胞周期、細胞増殖、細胞死にかかわることが知られている。最近私達は、メカノセンサーとしても働き、細胞容積調節にも重要な役割を果たすことを明らかにした (Am J Physiol Cell Physiol 292: C460, 2007)。現在まで、TRPM7 は 1 価カチオンおよび 2 価カチオンを透過させるチャネルであるという報告はあるがプロトンそのものの透過については、知られていない。本研究では、TRPM7 を発現させた HEK293T 細胞でプロトンの透過の有無を検討した結果、内向き整流性の比較的大きなプロトン電流がパッチクランプ法で観察された (図 1A)。また、このプロトン電流に対する生理的濃度の Ca^{2+} と Mg^{2+} の影響から、pH5.5 付近でプロトンは 2 価カチオンと同

じ結合サイトを競合して透過することが分かった。そこで、TRPM7 におけるプロトンの通り道と考えられるポア領域の負電荷アミノ酸を中性化する点変異 (E1047A, E1052A, D1054A, D1059A) を導入した結果、D1054A では、電流が大きく抑制され、E1052A, D1059A では、部分的に抑制された (図 1B)。これらのことより、プロトンは TRPM7 のポア領域における負電荷アミノ酸部位 (図 1C) を介して流入していることが明らかとなった。ところで、子宮頸部では、常に pH4 から pH5 付近に保たれているので、子宮頸部上皮由来の HeLa 細胞を用いて実際に TRPM7 の活性を確認した。この結果、発現系と同様のプロトン電流が観察され、siRNA を用いたノックダウンによってこれが大きく抑制された。これらの結果よ

り、子宮頸部で TRPM7 を介するプロトン流入が生理的条件においても機能している可能性が示唆された。さらに、TRPM7 は心臓や脳でも発現が見られるので、酸性化

がもたらされる虚血や炎症などの病的状況で機能している可能性も示唆された。この結果は次の論文に報告：J Biol Chem 283: 15097-15103, 2008.

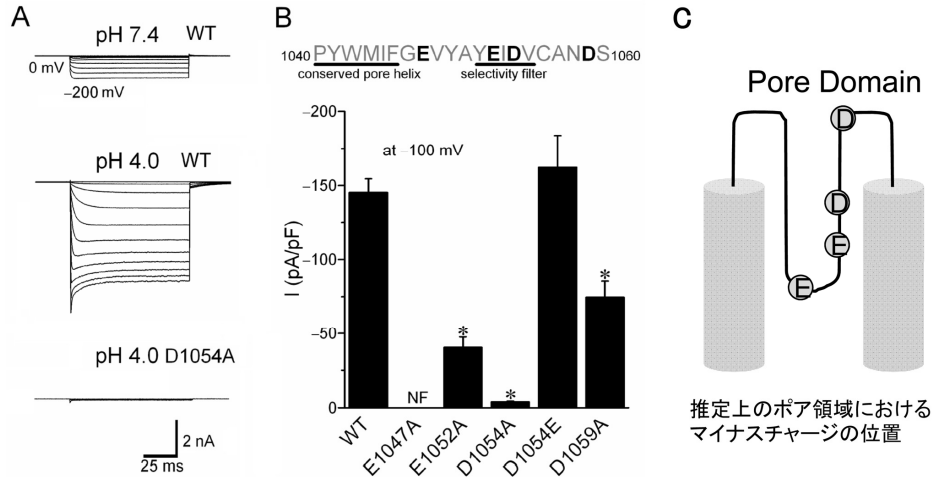


図 1 TRPM7 のプロトン電流とその分子基盤。(A) hTRPM7 を発現した HEK293T 細胞で記録したプロトン電流。(B) ポア領域の負電荷アミノ酸の中性化点変異によるプロトン電流の抑制。(C) TRPM7 の S5-S6 間の推定上のポア領域を示す模式図。

成熟心筋細胞 ATP 放出性マキシアニオンチャネルは T 管開口部に局在する

DUTTA Amal K, SABIROV Ravshan Z, 岡田泰伸

大型のポアを持つマキシアニオンチャネルは、細胞内から細胞外に ATP を放出する通路を与える。新生仔ラット心筋細胞は虚血条件下でこのチャネルが活性化されて、ATP を放出することを既に私達は報告している。ところが成熟ラット心筋細胞は、同様に虚血性 ATP 放出を示すにもかかわらず、マキシアニオンチャネルを発現していないと報告されて来た。今回私達は、走査イオンコンダクタンス顕微鏡法による微細構造観察下においてパッチ

クランプ単一チャネル記録を行うという「スマートパッチ法」を適用し、マキシアニオンチャネルが T 管開口部とその付近の乙帯線上という大変狭い領域にのみ局在することを始めて明らかにした (図 2)。これによって長年にわたる矛盾が解決し、成熟心筋細胞の虚血性 ATP 放出にもマキシアニオンチャネルが関与することが明らかとなった。この結果は次の論文に報告：Biophys J 94, 1646-1655, 2008.

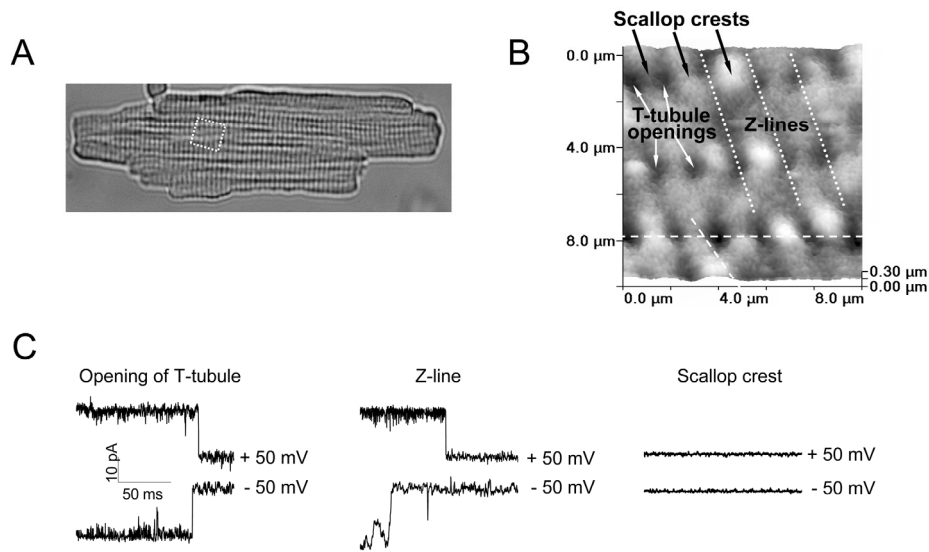


図2 スマートパッチ法による成熟心筋細胞上のマキシアニオンチャネルの局在観察

アストロサイトからの虚血性・細胞腫脹性 ATP 放出はマキシアニオンチャネルから行われる

LIU Hongtao, SABIROV Ravshan Z, 岡田泰伸

グリアからニューロンへのシグナル伝達物質 (gliotransmitter) の 1 つである ATP は、種々の刺激によってアストロサイトから放出される。その放出路としては、エキソサイトーシス、アニオンチャネル、ABC トランスポータ (MDR, MRP, CFTR), P2X₇ レセプター, ギャップジャンクションヘミチャネル (コネキシン Cx, パネキシン Px) などの種々のものが候補に挙がっていた。今回、マウスアストロサイトの虚血 (酸素・グルコース除去) 刺激や低浸透圧刺激による細胞腫脹時における ATP 放出の通路を調べた。この ATP 放出は、エキソサイトーシス, MDR1, MRP1, CFTR, Cx, Px, P2X₇ レセプター及び容積感

受性外向整流性アニオンチャネル (VSOR) などの阻害剤には影響を受けないが、マキシアニオンチャネルの阻害剤 (Gd^{3+} やアラキドン酸) によって著しく抑制されることが判明した。また、アストロサイトのマキシアニオンチャネルは実際に ATP 透過に伴う ATP⁴⁻ 電流を発生させることがわかった。それゆえ、このときの主たる ATP 放出路はマキシアニオンチャネルによって与えられることが明らかとなった (図 3)。これらの結果は次の 2 つの論文で報告: Purinergic Signalling 4: 147-154, 2008; Cell Res 18: 558-565, 2008.

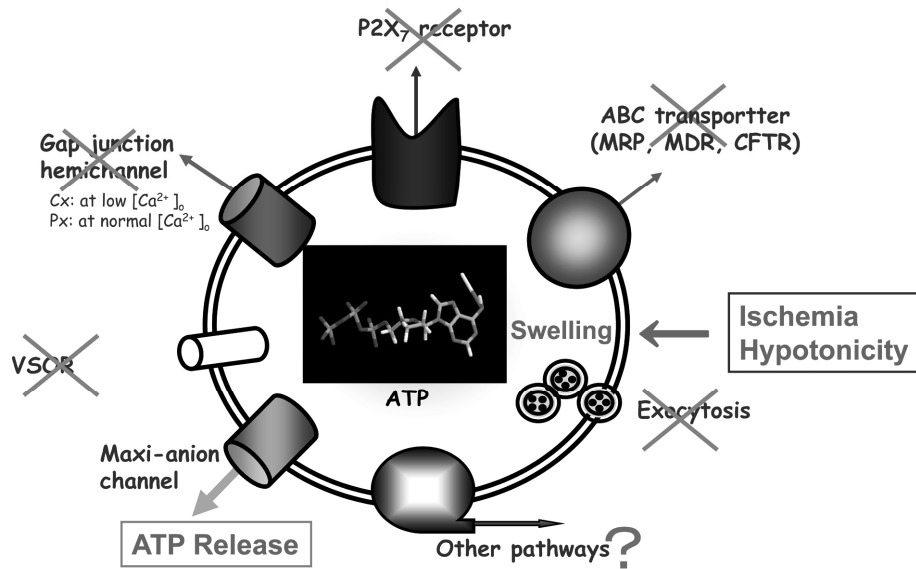


図3 アストロサイトの虚血／低浸透圧刺激による ATP 放出の通路

Hypertonicity-Induced Cation Channel (HICC) の活性化はアポトーシスを救済し、
その抑制はアポトーシスを誘導する

沼田朋大, 佐藤かお理, WEHNER Frank, 岡田泰伸

アポトーシス誘導時には細胞縮小後の容積調節 (Regulatory Volume Increase: RVI) が破綻していることを私達は以前示した (FEBS Lett 580: 6513, 2006)。RVI には細胞縮小時に活性化されるカチオンチャネル (HICC) が関与するので、アポトーシス時には HICC が抑制されている可能性が考えられる。事実、今回、スタウロスポリ

ン (STS) で HeLa 細胞にアポトーシスを誘導した時には HICC の抑制が見られることが判明した。逆に、事前に高浸透圧刺激を与えて HICC を活性化させておくと、その後の STS 投与によるアポトーシスの誘導は著しく抑制されることが明らかとなった。この結果は次の論文に報告: Apoptosis 13: 895-903, 2008.

細胞生理研究部門

【概要】

細胞は、それを取り巻く環境の大きな変化の中で、その環境情報を他のシグナルに変換し、細胞質・核や周囲の細胞に伝達することによって環境変化にダイナミックに対応しながら生存応答を行っている。細胞が存在する臓器・組織によって細胞が受け取る環境情報は異なり、従って細胞が持っている環境情報を受信する機能も異なる。それらセンサー蛋白質は環境の変化に応じてダイナミックに感受性や発現等を変化させてセンシング機構の

変化からよりよい生存応答を導く機能を有している。これらのセルセンサー蛋白質は種々の化学的、物理的情報を受容し、センサー間の相互作用を行い、多くは最終的に核への情報統合を行う。これらの細胞環境情報センサーの分子システム連関を解明していくことは、個体適応の理解のための基本単位である「細胞の生存応答」を解明するうえで極めて重要である。この細胞外環境情報を感知するイオンチャネル型のセンサー蛋白質の構造機能

解析, 活性化制御機構の解析を通して細胞感覚の分子メカニズムの解明を目指している。特に, 侵害刺激, 温度刺激, 機械刺激の受容機構について TRP チャネルに焦点をあてて解析を進めている。

また, 本能機能を司る視床下部ペプチド作動性神経に注目し, 摂食行動や睡眠覚醒を制御する神経機構について明らかにする研究を行っている。

TRPA1 チャネルの細胞内アルカリ化による活性化

藤田郁尚, 内田邦敏, 富永真琴

生体の細胞内外の pH は中性付近に保たれているが, 病態において酸性化あるいはアルカリ化すると痛み感覚の発生をもたらす。TRPA1 を強制発現させた HEK293 細胞に細胞外アルカリ刺激 (pH 8.5) やアンモニウムクロライドの投与によって細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇がもたらされた。パッチクランプ法を用いて解析すると, 細胞内アルカリ化, 細胞外アルカリ化, アンモニウムクロライド投与によって外向き整流性を有し, ルテニウムレッドやカンファーで阻害される TRPA1 に特徴的な全細胞電流の活性化が観察された。Inside/out モードでの単一チャネル電流記録で, 細胞内ドメインのアルカリ化による TRPA1 単一チャネルの開口増大が確認された。アンモニウムク

ロライドによる応答は後根神経節細胞でも観察され, アンモニウムクロライド投与による活動電位発生も確認された。アンモニウムクロライド応答は AITC 感受性の細胞でしか観察されず, TRPA1 欠損マウスの後根神経節細胞ではみとめられなかったことから, TRPA1 を活性化しているものと考えられた。マウスの後肢足底にアンモニウムクロライドを投与することによって痛み関連行動が観察され, それがルテニウムレッドで抑制され, TRPA1 欠損マウスではみとめられなかったことから, アンモニウムクロライドによる TRPA1 活性化が痛み感覚を惹起しているものと推定された。

Off channel としての酸感受性 PKD チャネル複合体

稲田 仁, 富永真琴

以前に報告した味細胞に発現して酸味受容に関わる TRP チャネルである PKD2L1/PKD1L3 複合体の活性化機構を解析した。PKD2L1/PKD1L3 複合体を発現した HEK293 細胞は, 酸刺激の後にのみ細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加を示した。パッチクランプ法を用いて全細胞電流を解析すると, 酸の投与時間を 1-15 秒に変えても, 酸を除去した後に活性化電流が観察された。電流がみられた時に再び酸を投与すると速やかな電流の消失が観察された。この現象は outside/out モードの単一チャネル電流記録でも同様であった。よって, PKD2L1/PKD1L3 複合体の活性化には酸への曝露が必要であるが, チャネル開口には,

酸の除去が欠かせないと結論した。従来のリガンド作動性チャネルをリガンド存在時にのみ開口する on channel ととらえると, PKD2L1/PKD1L3 複合体は off channel とみなすことができる。この PKD2L1/PKD1L3 複合体活性化は弱酸, 強酸のどちらでも認められ, 純粋に pH に依存しているものと考えられた。電流と pH の同時測定によって活性化 pH の閾値を求めたところ, 先ず pH2.5 以下への酸刺激が必要だが, その後 0.3 の pH 増加でチャネルが開口することが明らかになった。変異体を作成して解析することによって, PKD1L3 の大きな細胞外ドメインが酸の感知に関わっていることが明らかになった。

ショウジョウバエ *painless* は熱感受性チャネル

曾我部隆彰, 門脇辰彦, 富永真琴

painless は強い熱刺激に対して抵抗性のあるショウジョウバエ変異体から単離された遺伝子のコードする蛋白質で TRPA サブファミリーに属するイオンチャネルである。TRPA1 チャネルは種々の侵害刺激によって活性化するイオンチャネルである。*Painless* を HEK293 細胞に発現させて解析したところ, *painless* が Na^+ の 40 倍以上の Ca^{2+} 透過性を有する熱感受性チャネルであることが明らかとなった。その活性化温度閾値は約 42.6 度で, 活性化温度閾値, 活性化キネティクス等が細胞内 Ca^{2+} 濃度に

よって変化した。活性化温度閾値は細胞内に Ca^{2+} が存在するときに低く, 繰り返し熱刺激によっても低下した。パッチ膜だけの状態でも *painless* の単一チャネル電流は観察され, おそらく熱によって直接活性化しているものと考えられた。*Painless* の熱活性化電流は, ruthenium red や camphor によって抑制され, 哺乳類の TRPA1 と類似の化学物質感受性を示したが, AITC や冷刺激によつては活性化されなかった。加えて, *painless* の熱活性化電流の細胞内 Ca^{2+} による制御に関わるアミノ酸を同定した。

表皮ケラチノサイトにおける TRPV4 の生理機能の解析

曾我部隆彰, 福見-富永知子, 富永真琴

温度感受性 TRP チャネルの TRPV4, TRPV3 は表皮ケラチノサイトに強く発現しているが, TRPV3 がより主に表皮での温度感知に関わっていることを観察している。TRPV4 の温度感知以外のケラチノサイトでの機能を明らかにする目的でケラチノサイト cDNA ライブラリーを用いて TRPV4 の細胞内ドメインと結合する蛋白質のスクリーニングを行い, 興味深い結合蛋白質を得た。その結果, TRPV4 がアドヘレンスジャンクションでコンプレックスを形成してケラチノサイトの細胞接着能を制御して, 皮膚のバリアー機能に影響を及ぼしていることが明らかとなった。TRPV4 欠損マウスの皮膚では, 注入した

色素がタイトジャンクションを越えて野生型マウスより速やかに移動すること, それを防ぐために角質層が肥厚していること, 表皮からの水分漏出が有意に多いことが判明した。25 度ではなく 37 度において細胞外に Ca^{2+} を投与してからの細胞内 Ca^{2+} の増加が TRPV4 欠損マウスのケラチノサイトに比べて野生型マウスのケラチノサイトで有意に大きいことが分かった。表皮ケラチノサイトでは, 細胞外 Ca^{2+} 濃度の上昇に応じて TRPV4 を通って Ca^{2+} が流入し, 細胞間接着能を高めているものと推定された。

オレキシン神経の電気生理学的解析

山中章弘, 常松友美

オレキシンは視床下部の少数の神経(オレキシン神経)において産生される神経ペプチドであり, オレキシン神経は, 脳のほとんどの領域に軸索を投射している。オレキシン遺伝子欠損マウスの解析から, オレキシンが睡眠覚醒調節に重要な役割を担っていることが明らかになってきた。すなわち, オレキシン神経への入出力系を明ら

かにすることによって, 未だによく分かっていない睡眠覚醒調節に関わる神経回路網の解明が期待された。そこで, オレキシン神経特異的に緑色蛍光タンパク質を発現する遺伝子改変マウスを作成し, スライスパッチクランプによって, 入力する神経とその神経伝達物質に対する応答について解析を行った。まず, 神経ペプチドを中心

に解析を行ったところ、オレキシン神経が神経ペプチドバソプレシンによって活性化されることを明らかにした。また、行動薬理的解析により、この神経回路が絶水な

どの生命危機に陥った時に、新たな水源を探索するために重要であることが示唆された。

光活性化タンパク質を用いたオレキシン神経活動の光制御

常松友美, 山中章弘

近年、光によって神経活動の制御を可能にする分子であるチャネルロドプシン2 (ChR2) やハロロドプシン (Halo) が報告された。摂食行動や睡眠覚醒などの本能機能は、個体でのみ生じる生理現象のため、それらを調節する神経機構の解明には、個体を用いた解析が欠かせない。そこで、睡眠覚醒調節に重要な視床下部のオレキシン神経特異的に光活性化タンパク質を発現させた遺伝子改変マウスを作成し、インビボにおいてその活動の制御を行い、その結果表出する行動を解析することによって、睡眠覚醒を調節する神経機構の解明を試みている。既に

オレキシン神経特異的に Halo を発現する遺伝子改変マウスを作成しており、組織化学的手法を用いて特異的発現を確認している。また、スライスパッチクランプなどのインビトロ解析によって、オレンジ光照射が約15mVの過分極を誘導できることと、また、それに伴い自発発火を完全に抑制できることを確認した。このマウスを用いると意識下行動中のマウスにおいて、オレキシン神経活動を任意のタイミングで抑制することが可能となるため、個体を用いた睡眠覚醒調節に関わる神経機構の解明に大きく前進した。

生体情報研究系

感覚認知情報研究部門

【概要】

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

択性や、異なる種類の刺激への反応の分布を調べている。具体的な課題として (1) 初期視覚野における輪郭とその折れ曲がりの表現, (2) 大脳皮質高次視覚野における色選択性ニューロンの分布やその活動と知覚の関係, (3) 大脳皮質におけるグルーピングと視覚的注意のメカニズム, (4) fMRI によるサル大脳視覚野活動計測, などに関する研究を行った。

初期視覚系における輪郭線の折れ曲がりの表現

伊藤 南, 浅川晋宏

Yi Wang (中国科学アカデミー)

我々は物体の形状を認識する過程を明らかにする為に、図形の輪郭に含まれる折れ曲がりに対する反応選択性を初期視覚野で調べている。麻酔下の第二次視覚野でも折れ曲がり刺激に選択的に反応するニューロンが記録されるので、これらの細胞の性質を詳細に検討した。記録部位で局所的な薬物注入を行うために、多連管型電極を作成し、記録用電極に取り付けたガラス微小管から抑制性シナプスの拮抗阻害剤である Gabazine を微量注入して

折れ曲がり選択性の変化を調べた。薬剤の注入により自発発火頻度および刺激に対する反応の発火頻度が上昇した。長い直線刺激に対するエンドストップ型の抑制が失われて折れ曲がり選択性が変化するものと、折れ曲がり選択性がそのまま保持されるものとが存在した。これらの結果は第二次視覚野およびその入力源である第一次視覚野がともに折れ曲がり刺激選択性形成に寄与することを示唆する。

サル下側頭皮質への電気刺激が色判断行動に及ぼす効果

鯉田孝和, 小松英彦

サル下側頭皮質には色選択性ニューロンが密集して存在する領域があり、この小さな領域が色認知に重要であると考えられる。この仮説を検証するために本研究では、微小電気刺激による色判断行動への効果を測定した。サルはサンプル色を見て、赤いか黄色いかなどの予め学習した判断基準に基づいて色を判断する課題を行う。電気刺激はサンプル色の呈示期間中に50%の確率で行った。

その結果、微小 (20 μ A) な電気刺激であっても大きな色判断のシフトが生じることが分かった。大きな効果を生じるのは皮質上の限られた領域であり、その領域は色選択性ニューロンが密集している場所に対応していた。電気刺激の効果は判断基準がずれるような形で現れており、ノイズが生じるような形ではなかった。この結果は、電気刺激によって色判断に関わるシグナルが発生したこと

を示しており，下側頭皮質のニューロン活動が色判断に 因果関係を持っていると言える。

下側頭皮質後部における色情報の表現

坂野 拓，小松英彦

下側頭皮質は破壊によって色弁別が重篤に障害されることが知られており，これまでの我々の研究により，下側頭皮質前部の TE 野と後部の TEO 野に強く鋭い色選択性を示すニューロンが集中して存在する領域が存在することが示されている。このうち，TEO 野の領域は後中側頭溝 (PMTS) 付近に存在し，大ざっぱな網膜部位対応をもつことも分かっている。しかし，その網膜対応部位領域全体に色選択細胞が分布するのか，局在するのかなど

詳細については不明であった。そこで我々は更に詳細にこの領域における色選択細胞の分布を調べた。刺激には CIE-xy 色度図上で均等に分布する色を用い，形は 11 種類の単純な幾何学図形から選んだ。詳細なマッピングの結果，この領域には強い色選択性を持つ細胞の固まって存在する部分と，色選択性をあまり持たない細胞の固まって存在する部分の両方が見られ，内部に更に構造を持つことが示唆された。

サル頭頂間溝皮質の細胞タイプ間での視覚グルーピング検出課題への寄与の差

横井 功，小松英彦

視覚グルーピングの神経メカニズムについて調べるために，グルーピングを必要とする検出課題を設定し，頭頂間溝皮質 (IPS) から単一細胞外記録を行った。視覚刺激は白または黒の 5 つのドットが離散的に配置して構成される。サルは同じコントラストのドットが水平または垂直に並んだ刺激をターゲットとして検出する。記録されたニューロンを活動電位の持続期間に従って 2 つに分類した。錐体細胞と考えられる長い波形の活動電位の

細胞はターゲットの方位の特徴について選択的な応答を示し，その活動は行動パフォーマンスと相関していた。一方，介在細胞と考えられる短い波形の活動電位の細胞はそのよう選択的応答を示さなかったが，ターゲット刺激に対してノンターゲットよりも強く反応する傾向を示した。これらの結果は IPS の 2 つの細胞タイプは視覚グルーピングに関して異なった機能的役割を果たしている可能性を示唆する。

サル下側頭皮質における色選択的活動分布：fMRI 研究

郷田直一，原田卓弥，平松千尋，伊藤 南，小松英彦

小川 正 (京都大学)

豊田浩士，定藤規弘 (心理生理学)

我々はサル下側頭皮質において色選択性ニューロンがどのように分布しているかを明らかにするため，機能的 MRI (fMRI) を用いて色選択性の計測を行ってきた。前年度までに，無彩色刺激よりも有彩色刺激により強く反応する領域 (色選択的反応領域) は下側頭皮質前部及び後

部外側面のそれぞれ数 mm の小領域に局限していることを明らかにしてきた。本年度は，色選択的反応の分布に関する解析をさらに進め，下側頭皮質における色選択的反応の分布は視覚刺激の輝度コントラスト強度には依存しないことを明らかにした。従って，得られた反応分布

は色相・彩度に選択的なニューロンの分布を反映していると考えられる。さらに、下側頭皮質における色選択的反応分布は、視覚刺激の色の構成や形状に依存すること

が明らかになった。以上の結果は、空間的・形状選択性の異なる色選択的ニューロンが下側頭皮質内のそれぞれ異なる場所に集積している可能性を示唆する。

神経シグナル研究部門

【概要】

神経シグナル研究部門では、分子レベルの研究からより生体に近づいた研究を目指し、*in vivo* 実験系の導入を進めてきた。2008 年度は、*in vivo* パッチクランプの開発者である古江博士が准教授として当部門に加わり、*in vivo* の実験を高い水準で行えることになった。従来から行ってきた脳スライスを用いた神経回路の詳細な研究と、*in vivo* の研究を巧みに組み合わせることにより、神経系

機能の理解がより一層深まると期待される。

また分子の異常とより高度な脳神経活動の関係を検討するには、さまざまな行動様式の解析が必要である。山肩博士が長年にわたって作成・機能解析を行ってきた CaMKII ノックインマウスは著明な記憶力障害を呈しており、諸条件下における記憶力の検討を行うことにより、複雑な記憶過程の一環が明らかになってきている。

蛋白質リン酸化による学習・記憶の制御

学習・記憶をはじめとする高次脳機能制御には、脳内蛋白質リン酸化が重要な働きをしていると考えられている。中でも、Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMKII) は、脳内の主要な蛋白質リン酸化酵素として、注目を集めている。我々は、CaMKII の主要なサブユニットである CaMKII α の不活性型ノックインマウス (K42R) を作製し、その解析を進めている。K42R ホモマウスでは、学習・記憶の基本モデルとされる、海馬 CA1 領域におけるシナプスの長期増強 (LTP) が障害されているのみならず、海馬 LTP と相関が深い受動的回避テストでも顕著な障害が観察された。1 回刺激のトレーニングでは、24 時間後のみならず、40 分後、さらには、

山肩葉子，柳川右千夫（群馬大学），井本敬二

トレーニング直後にも全く回避行動が観察されなかったことから、K42R ホモマウスでは学習自体が成立しないと考えられた。しかしながら、複数回のトレーニングを行うと、ある程度の回避行動が観察されたことから、何らかの代償作用が機能している可能性がある。また、K42R ヘテロマウスにおいては、24 時間後には一定程度の回避行動が認められたものの、1 ヶ月後には、回避行動がほとんど消失していたことから、記憶の保持に異常がある可能性が考えられた。これら学習・記憶障害について、さらに詳しい検討を行うために、恐怖条件付け学習のパラダイムを導入し、検討を加えつつある。

グルタミン酸輸送体の発現・機能調節と小脳異種シナプス間拡散性クロストークの生理的連関

佐竹伸一郎，井本敬二

小西史朗，宋 時榮（徳島文理大学香川薬学部）

脳幹の下オリーブ核から小脳プルキンエ細胞へ投射する登上線維は、反復刺激 (5 Hz, 1 s) に伴い、小脳皮質

介在ニューロン（籠細胞）から同じプルキンエ細胞に入力する GABA 作動性シナプス伝達を抑制することを報

告した。この異種シナプス抑制は、登上線維終末からシナプス外に拡散した興奮性神経伝達物質（グルタミン酸と推定）が、介在ニューロンの軸索終末に存在するAMPA型グルタミン酸受容体を活性化することにより惹起されたと推定している。こうした背景に基づき、今年度は異種シナプス抑制を仲介する拡散過程とグルタミン酸輸送体の関係について検討を行った。スライスパッチクランプ実験に薬理的解析手法ならびに免疫組織染色法を適用して、(1) ニューロン型輸送体 EAAT4（プルキンエ細胞特異的に発現）とグリア型輸送体 GLAST（シ

ナプスを被覆するバグマングリアに発現）は、グルタミン酸が登上線維終末から介在ニューロン終末に拡散していく過程をそれぞれ独立に制御できること、さらに(2) EAAT4 は、プルキンエ細胞における発現量の差異と神経活動に伴う機能変化に強く依存した様式で、異種シナプス抑制を逆行性にコントロールしていることを示唆する結果を得た。引き続き“拡散というユニークな神経伝達経路”が、ニューロンやグリア細胞のグルタミン酸輸送体 (EAAT4, GLAST, GLT-1) によって制御される分子の基盤やその生理的意義について検討を進めている。

Tottering マウスにおける欠神発作と大脳基底核回路との関係

加勢大輔, 井上 剛, 井本敬二

われわれは、これまでに *in vivo* の実験により大脳皮質-視床下核-黒質回路が欠神発作の発生に関与していることを示している。本年度はまず昨年見出した視床下核神経細胞の興奮性増強が、過分極活性型陽イオン (HCN) チャネル電流の減少を一因としていることを *in vitro* の

実験により示した。さらに視床下核における HCN チャネル電流の減少が欠神発作に与える影響を検討すべく、*in vivo* の実験を行った。その結果、視床下核の HCN チャネルを阻害あるいは活性化させることで、欠神発作の持続時間が変化することが判明した。

In vivo パッチクランプ法を用いた痛覚シナプス伝達の解析

古江秀昌

麻酔下に椎弓切除を行い、腰部脊髄表面より記録電極を刺入し、後角細胞からパッチクランプ記録・解析を行った。*In vivo* パッチ法は電流固定下の膜電位変化に加え、電位固定下の興奮性や抑制性シナプス後電流 (EPSC や IPSC) を安定して長時間記録でき、更に、得られた応答の S/N 比は良好で、スライス標本から記録される応答と遜色はなかった。本法は皮膚へ生理的な感覚刺激によって誘起されるシナプス応答の定量解析ができるため、行

動薬理学実験とスライス標本を用いた実験の中間に位置し、行動の変化や遺伝子操作動物、種々のモデル動物で観察される異常行動の成因を、シナプスレベルの変化として説明するために極めて有用な方法である。また、本法に用いた *in vivo* ブラインド法は組織深部の記録にも適しているため、今後、脊髄後角のみならず、あらゆる神経系への応用を検討している。

神経分化研究部門

【概要】

吉村らを中心とする研究グループは、大脳皮質視覚野の神経回路特性と経験依存的発達機構を明らかにする目

的でラットやマウスから作成した脳切片標本や麻酔動物を用い、レーザー光局所刺激法や電気生理学的手法を組

み合わせて解析している。本年度は主に実験システムの立ち上げを行った。また、これまでに、大脳皮質視覚野内に非常に微細な神経回路網が形成されていることを報告しているので、その経験依存的発達についての解析を行った。

また、東島らを中心とするグループは、ゼブラフィッシュを用い、脊髄神経回路の形成機構および、回路の作

動機構の解析を進めている。脊髄内の特定のクラスの神経細胞を GFP を用いて可視化し、それら GFP 陽性細胞の発生と機能を追求している。本年度は主として、ゼブラフィッシュの逃避運動の際に機能する CoLo と呼ばれる特殊なクラスの交差型抑制性ニューロンの機能解析を行った。

ラット大脳皮質視覚野の微小神経回路網の経験依存的発達

吉村由美子，森 琢磨

これまでに、我々は、ラット視覚野スライス標本を用い、ケージドグルタミン酸による局所刺激法と 2 個の 2/3 層錐体細胞からの同時ホールセル記録法を組み合わせ解析を行い、2/3 層錐体細胞へ入力を送る細胞の空間分布を調べた。その結果、興奮性結合している錐体細胞ペアは、別の 2/3 層錐体細胞や 4 層細胞からも高い割合で共通の興奮性入力を受けており、非常に微細なスケールの神経回路網が形成されていることを見いだした。視覚野ニューロンの視覚刺激に対する反応選択性は、生後発達期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。そこで、本年度は、この微小神経回路網が、視覚反応と同様に、生後の視覚経験に依存して形成されるかを調べた。生後直後からの暗室飼育により視覚体験を一切経ていないラット視覚野の神経

回路を解析した結果、2/3 層錐体細胞間の興奮性結合の発達が著しく阻害されており、微小神経回路網も観察されなかった。また、生後約 2 週齢の開眼時期に両眼の眼瞼を縫合することにより、明暗刺激は受けるが、形体に関する視覚刺激を受けない状態で飼育した視覚野についても同様な解析を行った。その結果、個々の神経結合の検出確率や結合強度は、正常な視覚野と有意な差は認められなかったが、選択的な神経結合による微小神経回路網の形成は著しく阻害されていた。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。

ゼブラフィッシュ逃避行動において、脊髄に存在する特殊なクラスの交差型抑制性介在ニューロンが大事な役割を果たす

佐藤千恵，木村有希子，東島眞一

硬骨魚類の後脳にはマウスナー細胞と呼ばれる、一対の大きな細胞が存在する。マウスナー細胞は、その軸索を反体側の脊髄にまで伸ばし、脊髄の中で運動ニューロンなどとシナプスを作っている。マウスナー細胞が発火すると、魚の逃避運動が引き起こされる。逃避運動と同時に、脊髄の反対側にはすばやい抑制がかかることが示されていた。しかし、この素早い抑制が行動レベルでどのような役割を果たすかは明らかとなっていなかった。

我々は、今回、ゼブラフィッシュにおいて、脊髄にお

いてある種の介在神経（以下、CoLo とよぶ；CoLo は、Commissural local の略；軸索が比較的短いためこのように名付けた）が GFP で標識されているエンハンサートラップライン Tol-056 の解析を行った。CoLo ニューロンの詳しい解析を行ったところ、これらはマウスナー細胞から電気シナプスの入力を受けてすぐさま発火する交差型抑制性ニューロンであることが分かった。すなわち、CoLo ニューロンは、逃避運動の際に反対側にすばやい抑制を送る神経細胞であったわけである。

CoLo ニューロンの行動レベルでの機能を調べるため、レーザー照射により CoLo ニューロンを除去し、その幼魚の逃避運動を調べた。音・振動刺激により逃避運動を引き起こすと、コントロール幼魚は左右どちらかへスムーズに逃避運動を行うが、CoLo を除去した幼魚は、しばしば硬直してどちらにも動けない、という表現型を示した。CoLo を除去すると同時に、左右のマウスナー細胞のどちらか一方をレーザー除去しておくと、このような表現型はいつい見られなかった。したがって、硬直の表現型が起きるときは、左右のマウスナー細胞の両方が

発火していることを強く示唆している。すなわち今回の研究により、(1) 幼魚が逃避運動を行う際には、左右のマウスナー細胞の両方が発火することが起こりうること、(2) マウスナー細胞の両方が発火してしまっても、CoLo 細胞が担う素早い抑制のおかげで、魚は左右のどちらかへ逃避運動を行うことが可能である、の 2 点が示された。すなわち、逃避運動の際には、脳内の情報処理のみならず、脊髄レベルでの下降性コマンドの取捨選択が非常に重要な役割を果たしていることを示すことに成功した。

統合生理研究系

感覚運動調節研究部門

【概要】

2008 年度は NIH に留学していた木田哲夫君が帰国して再び仲間に加わった。逆に、総研大学生の坂本貴和子さんが総研大を卒業し、学振 PD として日本大学医学部に移った。また、博士研究員の望月秀紀君がドイツのハイデルベルグ大学に、平井真洋君がカナダのクイーン大学に留学した。このように人事はかなり変動しているが、常に 20 名近くの研究者が共に研究にいそしんでいる。

医学（神経内科、精神科、小児科など）、歯学、工学、心理学、言語学、スポーツ科学など多様な分野の研究者が、体性感覚、痛覚、視覚、聴覚、高次脳機能（言語等）など広範囲の領域を研究しているのが本研究室の特長であり、各研究者が自分の一番やりたいテーマを研究している。こういう場合、ややもすると研究室がバラバラになってしまう可能性もあるが、皆互いに協力し合い情報を提供しあっており、教室の研究は各々順調に行われている。脳波と脳磁図を用いた研究が本研究室のメインテーマだが、最近はそれに加えて機能的磁気共鳴画像

(fMRI), 近赤外線分光法 (NIRS), 経頭蓋磁気刺激 (TMS) を用いた研究も行い成果をあげている。

共同研究も順調に進んでいる。国際的にはドイツ、ミュンスター大学の Pantev 教授の研究室、トロントの Rotman Institute の Ross 教授の研究室、NIH の Hallett 教授の研究室、イタリア、キエッティ大学の Romani 教授のグループと、国内では生体磁気共同研究が 6 件行われており、また中央大学とは乳児の NIRS 記録により興味ある結果を得つつある。

2008 年度から 5 年間の予定で、文部科学省新学術領域研究に、私が領域代表者として「学際的研究による顔認知メカニズムの解明」がスタートした。責任を痛感している。他に文部省科研費、厚生労働省、環境省などからの研究費を含めて、多くの競争的外部資金を得ている。研究員一同、より一層の努力を続けて質の高い研究を目指していきたいと思っている。

4 種の感覚モダリティにおけるユニモダル過程からマルチモダル過程への活動の移行に関する電気生理学的研究

田中絵実, 乾 幸二, 木田哲夫, 柿木隆介

聴覚 (1000Hz 純音), 体性感覚 (示指への電気刺激), 視覚 (単純な幾何図形), 痛覚 (手背表皮内電気刺激) の感覚入力による脳波誘発反応の長潜時成分の特性について明らかにするために、誘発脳波記録および信号源推定を行い、その時間動態を調べた。その結果、どの感覚モダリティにおいても、帯状回前部と海馬に信号源が推定された。帯状回前部の活動は、主要なモダリティ固有の活動から 30-56ms 遅れて最初のピークを示し、それから

さらに 117-145ms 遅れて二つ目のピークを示した。海馬の活動は、帯状回前部の第 2 成分のピークから 43-77ms 遅れてピークを示した。これらの結果から、感覚固有の過程からマルチモダルな過程への処理過程の時間動態が、聴覚、体性感覚、視覚、痛覚という 4 種の感覚モダリティ間で類似していることが明らかになった。(BMC Neuroscience 2008, 9 : 116)

ヒトの体性感覚 OFF 反応

山代幸哉, 乾 幸二, 大鶴直史, 木田哲夫, 赤塚康介, 柿木隆介

ヒトや動物は生存のために、身の周りに起こる変化を瞬時に検出する皮質ネットワークを備えていると推察される。変化検出の皮質ネットワークが存在するならば、文字通りの刺激の変化のみならず、刺激の呈示(ON)や刺激の消失(OFF)に対しても脳活動が記録されるはずである。本研究では、変化検出に関わる脳活動を記録するために数秒間持続するトレイン電気刺激のONとOFFを用いて実験を行った。結果、ON・OFF 刺激に共通して刺

激後 100-150ms 付近に陽性と陰性の脳活動(P100・N140)が記録された。脳が変化を検出するためには比較のための前事象が必要不可欠であり、ON 反応の場合は無刺激状態、OFF 反応の場合はトレイン刺激が前事象となり P100・N140 が誘発されたと考えられる。よって、これらの活動は短期記憶によって保持された変化前の事象と最新の事象との比較により誘発される変化検出反応であると示唆された。(Neuroimage. 2009, 44 : 1363-8)

体性感覚刺激 Go/No-go 課題における異なる運動遂行過程：事象関連型 fMRI による検討

中田大貴 (名古屋大学医学部保健学科)

Ferretti A, Perrucci MG, Del Gratta C, Romani GL (キエーティ・ダヌンチオ大学生体応用工学部)

坂本貴和子, 柿木隆介

本研究では、体性感覚刺激 Go/No-go 課題において、Go 刺激の際に異なる運動出力(ボタン押し、もしくは計数)を行なった際の運動遂行過程について、事象関連型 fMRI を用いて検討した。Go 刺激(左手正中神経)ならびに No-go 刺激(左手尺骨神経)は 50% : 50% で、呈示された。ボタン押し課題と計数課題の共通の活動部位として、背外側前頭前野(DLPFC)、腹外側前頭前野(VLPFC)、補足運動野(SMA)、後頭頂葉(PPC)、下頭頂小葉(IPL)、島皮質 (Insula)、上側頭回 (STG) に活動が見られた。ボ

タン押し課題と計数課題の脳活動に関する直接比較では、一次体性感覚野-運動野 (SMI)、補足運動野、前帯状回 (ACC) が、ボタン押し課題において計数課題よりも優位な活動を示した。また、腹外側前頭前野は、計数課題の方がより優位な活動を示した。我々の結果は、運動遂行機能には2つの神経ネットワークが存在し、反応遂行方法(ボタン押しなのか、計数なのか)に共通する部位と、共通しない部位があることを示唆した。(Brain Research Bulletin, 2008, 77, 197-205)

大腿部を刺激した際の痛覚関連誘発脳磁場

中田大貴, 宝珠山稔 (名古屋大学医学部保健学科), 田村洋平 (東京慈恵会医科大学神経内科)

齋藤洋一 (大阪大学医学部脳神経外科), 山本隆充 (日本大学医学部応用システム神経科学)

片山容一 (日本大学医学部脳神経外科学講座)

坂本貴和子, 赤塚康介, 平井真洋, 乾 幸二, 柿木隆介

一次体性感覚野と後頭頂葉は、痛覚刺激によって活動することが報告されている。しかし、脳磁図を用いた神経生理学的研究では、手を刺激した際に、一次体性感覚野と後頭頂葉の活動を分離することは非常に困難である。その理由として、脳内における手の一次体性感覚野と後

頭頂葉の位置が、非常に隣接しているためであると考えられる。そこで我々は、これらの活動部位を分離するため、痛覚刺激を大腿部に与えた際の脳磁場を測定した。その結果、刺激対側の一次体性感覚野、二次体性感覚野、刺激同側の二次体性感覚野、刺激対側の後頭頂葉の活動

が記録され、痛覚刺激後それぞれ 152, 170, 181, 183 ミリ秒で活動することがわかった。後頭頂葉の活動部位は、下頭頂小葉であり、ブロードマン 40 野に相当した。

本研究は、痛覚処理過程に関する活動部位の時間経過を明らかにした。(NeuroImage, 2009, 42, 858-868)

体性感覚刺激 Go/No-go 課題における反応抑制過程：事象関連型 fMRI による検討

中田大貴（名古屋大学医学部保健学科）

Ferretti A, Perrucci MG, Del Gratta C, Romani GL（キエーティ・ダヌンチオ大学生体応用工学部）

坂本貴和子，柿木隆介

不適切な行動を抑制することは、ヒトにおいて不可欠な能力であるが、この抑制過程に関わる脳部位については、まだ詳細に明らかにされていない。本研究では、事象関連型 functional MRI を用い、体性感覚刺激 Go/No-go 課題における No-go 試行時の脳活動部位について検討した。課題は、Go 刺激が呈示された際にボタン押しを行なう (1) 動作課題、Go 刺激の数を数える (2) 計数課題を行なった。その結果、2 つの課題において、背外側前頭前

野(DLPFC)、腹外側前頭前野(VLPFC)、前補足運動野(pre-SMA)、前帯状回 (ACC)、下頭頂小葉 (IPL)、島皮質 (Insula)、temporoparietal junction (TPJ) といった部位が共通して活動することがわかった。これらの部位は視覚刺激 Go/No-go 課題を遂行中した際の脳活動部位とほとんど一致することから、抑制過程は刺激のモダリティーには依存せず、共通の神経ネットワークがあると考えられる。(NeuroImage 2008, 39, 1858-1866)

機能的MRIを用いた二点識別感覚の研究

赤塚康介，野口泰基，原田宗子，定藤規弘，柿木隆介

ヒトの体性感覚を研究していく上で有用な方法として二点識別閾測定法がある。これまでの先行研究より、二点識別閾に関しては末梢の受容器はもちろんであるが、大脳皮質や高次の認知機能も関係しているということが分かってきている。しかしながら、その二点識別に関する詳しいメカニズムはいまだにはっきりとは分かっていない。そこで、本研究では二点識別時に特有に活動する皮質内の神経基盤を明らかにすることを目的として機能

的核磁気共鳴画像法 (fMRI) を用いた実験を行った。その結果、二点識別課題時に左の IPL が有意に活動していた。今回の実験では、二点識別課題と強度識別課題において同じ電気刺激、同じ応答反応を用いており、二点識別課題時に IPL が有意に活動していたことは、ヒトが与えられた刺激を一点か二点かを識別するときには IPL が重要な役割を担っていることを示唆するものである。(Neuroimage. 2008, 40 : 852-8)

バイオロジカルモーションにおける局所、大局運動情報処理の異なる皮質処理

平井真洋，柿木隆介

光点運動からヒトの運動を知覚可能なバイオロジカルモーション (Biological motion, 以下 BM) 知覚処理には、各光点運動からヒトの形を統合する (shape-from-motion) のほかに局所的な運動 (local motion) 処理も関与することが指摘されているが、それぞれの処理が神経活動とどの

ように対応付けられるかについては不明であった。本研究では Adaptation パラダイムを導入することにより、二つの ERP 成分がそれぞれ局所運動、大局運動処理に関与する可能性を示した。(Journal of Vision, 2008, 8 : 2.1-17.)

Point-light walker 知覚に関連した神経応答

平井真洋, 金桶吉起, 中田大貴, 柿木隆介

光点運動のみからヒト歩行運動を知覚可能な刺激 (point-light walker; PLW) は, わずかな呈示時間でも知覚可能であるにもかかわらず, その神経活動の時間動態については不明な点が多い。本研究では各光点の初期位置をランダム化した刺激から PLW 刺激へと切り替わる刺激を用い, PLW 知覚処理に関連した神経応答を時間分解能に優れた脳磁計 (MEG) を用いて調べた。結果, ラン

ダム化した光点運動からヒト歩行運動に切り替わってから約 300-400ms 後に単峰性の応答が見られ, その信号源は後部上側頭溝付近に推定された。これは PLW 知覚処理のうち shape-from-motion にかかわる応答である可能性が示唆された。(Clinical Neurophysiology, 2008 : 119 : 2775 - 2784)

感情情報を含むオブジェクト・風景刺激による顔表情処理の変調

平井真洋, 渡辺昌子, 本多結城子, 三木研作, 柿木隆介

感情情報は顔表情だけでなく非顔刺激にも含まれているが, 非顔刺激における感情情報が顔表情知覚処理を「いつ」「どのように」変調するかについては十分に明らかにされていない。本研究では, あらかじめ心理評定において選別したオブジェクト・風景画 (中立・恐怖) を提示後すぐに顔刺激 (中立・恐怖) を提示し, 顔刺激によって誘発される事象関連電位の成分が直前のオブジェク

ト・風景画によってどのように変調されるかを調べた。結果, 顔刺激提示後 260 ミリ秒後付近において計測された陽性成分 (P2) が直前に提示されたオブジェクト・風景画によって変化した。この結果は, 提示刺激のカテゴリが異なっているにもかかわらず, 感情情報を含む刺激が直後の顔表情処理に影響を与えることを示唆する。(Brain Research Bulletin, 2008, 77 : 264-273)

視覚的プライミング課題における視覚誘発成分の時間的特性と反応時間の関係

橋本章子, 乾 幸二, 渡辺昌子, 柿木隆介

注意の影響を被らない視覚情報処理の特性を検討するために, プライミング課題を使って MEG 計測を行った。prime 刺激と target 刺激の時間間隔 (SOA) を変化させ, 注意機能を反映する行動指標として target の反応時間を計測した。その結果, 反応時間は, SOA の長さに関係なく, prime の提示によって短くなった。これは, prime が警告信号として機能したためと推察される。同じ実験設定で, 注意を中心点に集めて target には注意を向けない状況下で, 視覚誘発成分 (VEF) を記録した。その結果, VEF の頂点潜時に現れるプライミング効果は SOA の長さによ

って異なった。プライミング効果の違いを招く SOA の長さを決定する要因は, prime 提示後 180ms 周辺の VEF (1M) であると推察された。すなわち, 1M より前に target を提示すると, target を単独で提示した場合に比較して, target の VEF (2M) の頂点潜時は短くなるが, 1M より後に提示すると頂点潜時は長くなった。これらの結果から, 視覚野のプライミング効果と, 行動面に現れる注意機能を反映するプライミング効果は乖離することが示唆され, とりわけ 1M が後続刺激の処理に大きな影響を与えることが推察された。(Neuroscience Research, 2008, 60 : 244-9)

知識による錯視の修正効果

野口泰基, 柿木隆介

ある物体が左から右に動いている最中、その直下に一瞬フラッシュを光らせると、物体はフラッシュよりも運動方向（右）へずれているように見える。つまり実際は両者が垂直方向に並んでいるにも関わらず、ずれた像が知覚される。これをフラッシュ・ラグ錯視 (FLI) という。本研究では運動物体とフラッシュを漢字のパーツに変えることによって、FLI が弱まることを見出した。例えば運動物体の形を「雷」という字の上半分（雨）とし、フラ

ッシュの形を同じ字の下半分（田）とすると、FLI が消去される。これは FLI による両者の位置ずれが、脳に記憶されている「雷」という形（上下がずれていない）と干渉したために起こったと考えられる。つまり頭のなかの「知識」に沿って、錯視像が再構成（修正）されたということになり、イメージ形成における錯視と知識の相互作用を端的に示した。(Journal of Cognitive Neuroscience, 2008, 20 : 513-525)

脳波における側頭部徐波の信号源推定—双極子追跡法を用いて

元村英史（三重大学医学部附属病院精神科神経科）

乾 幸二, 柿木隆介

脳波は現在においても日常臨床における有用な検査であるが、十分に解明されずに臨床的意義が曖昧で境界領域とされる脳波波形はいくつもある。高齢者によくみられる側頭部徐波もそのひとつである。

本研究では、健常高齢者（6名）にみられた側頭部徐波について被験者ごとにその加算平均波形を作成し、双極子追跡法による単一信号源推定を行った。その信号源は側頭部徐波と同側の側頭葉内側面に推定され、一部の被

験者においては、被験者自身の MRI 上に推定された信号源を重量した。

今回、推定された海馬およびその近傍は虚血に対して脆弱な部位であり、軽微な脳血管性障害との関連を指摘する従来の報告に一致する。高齢者によくみられる側頭部徐波はおそらく軽微な脳血管性障害によりもたらされる側頭葉内側面の機能不全を示唆する脳波所見と考えられる。(Neuropsychobiology, 2008, 57: 9-13)

ヒト舌体性感覚処理機構の検討

中田大貴（名古屋大学医学部保健学科）

坂本貴和子, 柿木隆介

本研究では実験遂行に先立ち、まず2つの刺激装置を開発することで明確な脳反応の記録を目指した。一つ目に、口腔内における電流の拡散を抑制する効果を期待して、口腔内に設置可能な同心円電極を開発した。二つ目に、電極が容易に着脱可能で、かつ顎位を無理なく固定することの可能な口腔内装具を開発した。この装置を用いて、舌の前後、左右のそれぞれ4箇所を刺激した際の、一次体性感覚野における舌体性感覚誘発脳磁場反応

(SEFs) の計測を行い、各々の脳活動を比較検討した。結果、一時体性感覚領域による体性感覚誘発脳反応は、舌のどの領域を刺激した場合にも両側半球によってみられた。加えて対側半球における応答潜時は、同側半球と比べ、全ての刺激部位において顕著に短かった。また信号源推定の結果より、舌前方刺激時と後方刺激時では、領域に明確な差はみられなかった。(Clinical Neurophysiology, 2008, 119, 1664-1673)

ヒト舌二次体性感覚野における感覚処理機構の検討

中田大貴 (名古屋大学医学部保健学科)

坂本貴和子, 柿木隆介

本研究では, 二次体性感覚野における舌の反応部位と特性の検索を目的とし, 実験を行った。一般的に二次体性感覚野の反応振幅は, 刺激間隔を長くすればする程より大きな振幅が得られることが知られている。今回我々は刺激間隔を3秒と設定して実験を行った。刺激部位は, 舌は左側前方と後方, 手は左側正中神経, 足は左側脛骨神経を狙い, 各々100回刺激呈示した。結果, 舌の前方と後方の磁場強度や潜時に有意差はなく, また舌の領域は最も外側, 前方, 下方に位置することが分か

り, 二次体性感覚野における舌領域を確認することが出来た。また刺激対側半球は刺激同側半球より約10ミリ秒早いことが判明した。二次体性感覚野における舌の信号源の位置は, 手や足に比べて最も外側, 前方そして下方に位置することが分かった。この結果より, 一次体性感覚野にホムンクルスがあるのと同様, 二次体性感覚野においても体部位再現性があると考えられる。(Clinical Neurophysiology, 2008, 119, 2125-2134)

痒み誘発電位

望月秀紀, 乾 幸二, 山代幸哉, 大鶴直史, 柿木隆介

皮膚に微弱な電気を流すことで痒みを誘発できる(通電痒み刺激法)。この刺激法は刺激のOn/Offをミリ秒単位で制御できるため, これまで不可能であった脳波(EEG)や脳磁図(MEG)を用いた痒みの研究に有効と考えられた。そこで, 我々は, EEGと通電痒み刺激を用いて, 実際に, 痒み関連の脳活動(痒み誘発電位)が計測できるのかどうかを調べた。右手首と右前腕前面に痒み刺激を各40回与え, そのときの誘発電位を頭皮上の電極(Fz, FCz, Cz, CPz, Pz)から記録した。手首や前腕前面の刺激

により痒み誘発電位が記録された。その頂点潜時は963ミリ秒と772ミリ秒であった。頂点潜時の時間差と手首と前腕前面の距離から推定された伝導速度は約1m/秒であった。以上のことから, 通電痒み刺激法はEEGやMEGの研究に有効であることがわかった。また, 推定した伝導速度から, 通電による痒みは, 生理的な痒みと同様に, C線維によって伝達されることも明らかとなった。(Pain, 2008; 138 : 598-603)

生体システム研究部門

【概要】

私達を含め動物は, 日常生活において周りの状況に応じて最適な行動を選択し, あるいは自らの意志によって四肢を自由に動かすことにより様々な目的を達成している。このような随意運動を制御している脳の領域は, 大脳皮質運動野と, その活動を支えている大脳基底核と小脳である。逆にこれらの領域に異常があると, パーキンソン病やジストニアに見られるように, 随意運動が著しく障害される。本研究部門においては, このような随意

運動の脳内メカニズムおよびそれらが障害された際の病態, さらには病態を基礎とした治療法を探ることを目的としている。

そのために, ①大脳基底核を巡る線維連絡を調べる, ②課題遂行中の霊長類の神経活動の記録を行う, ③大脳基底核疾患を中心とした疾患モデル動物(霊長類・げっ歯類)からの記録を行う, ④このような疾患モデル動物に様々な治療法を加え, 症状と神経活動の相関を調べる,

⑤様々な遺伝子改変動物の神経活動を記録することにより、遺伝子・神経活動・行動との関係を調べることを行っている。

運動課題遂行中のマカクサル視床下核の活動様式

畑中伸彦，高良沙幸，橘 吉寿，南部 篤

大脳基底核は大脳皮質－基底核連関の一部として、運動の遂行、企画、運動のイメージ、習慣形成などに関わるとされている。大脳基底核の入力核のひとつである視床下核は大脳皮質からの興奮性入力を受け、淡蒼球内節・外節と黒質網様部に興奮性の出力を送る（ハイパー直接路）。また視床下核は淡蒼球外節からの抑制性入力（間接路）を受けており、大脳基底核の出力核である淡蒼球内節および黒質網様部に時間的に差のある2種類の出力を送ることになる。このように、視床下核は大脳基底核の入力核でもあり、介在部でもある複雑な働きをして

いると考えられる。われわれはサル視床下核ニューロンを大脳皮質運動野にある一次運動野近位領域および遠位領域、補足運動野上肢領域に対する刺激への応答様式から分類し、その後、そのニューロンの遅延期間付き3方向への上肢到達運動課題を実行中の活動様式を記録した。また、単一ニューロン記録と薬物の微量注入を併用し、視床下核ニューロンへの興奮性・抑制性入力をブロックした場合の運動課題実行中の活動様式を観察し、興奮性・抑制性の入力がどのように影響を与えていたかを検討中である。

淡蒼球脳深部刺激療法の作用機序の解析

知見聡美，南部 篤

近年、大脳基底核の出力部である淡蒼球内節 (GPi) に慢性的に電極を埋め込み、高頻度電気刺激を与える淡蒼球脳深部刺激療法 (GPi-DBS) が、ジストニアやパーキンソン病の症状を顕著に改善させることがわかってきたが、その作用機序については明らかにされていない。本研究では、正常なサルの GPi に2本の電極を刺入し、一方の電極により電気刺激を与えた際、近傍の GPi ニューロンの応答を記録することにより、GPi-DBS の作用機序を検

討した。単発刺激は、GABA_A 受容体を介した短い抑制を惹起した。高頻度連続刺激は、GABA_A および GABA_B 受容体を介した長い抑制を惹起し、その間の自発発火は完全に抑制された。また、大脳皮質の刺激によって惹き起こされる GPi ニューロンの3相性の応答は、高頻度連続刺激の間、消失した。これらの結果から、GPi-DBS は、GPi を介した情報伝達を遮断することが示唆された。

大脳基底核内情報伝達におけるドーパミン D2 受容体の機能

太田 力，知見聡美，笹岡俊邦（基生研），勝木元也（基生研），黒川 信（首都大），南部 篤

大脳基底核は運動制御の高次中枢である。大脳基底核内のドーパミンの枯渇により、パーキンソン病でみられるような重篤な運動障害を生じることから、ドーパミンによる神経伝達が重要な役割を果たすことが知られてい

るが、ドーパミン D1 および D2 受容体を介した神経伝達がどのような機能を果たすかなど、詳細については不明な部分が多い。本研究では、大脳基底核内情報伝達におけるドーパミン D2 受容体の機能を明らかにすることを

目的として、D2 受容体ノックアウトマウスの大脳基底核ニューロンの活動を覚醒条件下で記録した。淡蒼球外節および内節ニューロンにおいて、バーストや活動休止などの異常な発火パターンが観られた。また、大脳皮質の

電気刺激に対して、外節では正常マウスに比べて著しく長い興奮が、逆に内節では長い抑制が誘発されることがわかった。今後、さらに解析を進め、大脳基底核内情報伝達における D2 受容体の役割を明らかにしたい。

線条体ドーパミン D2 受容体ニューロンの運動制御機能

佐野裕美, 知見聡美, 小林和人 (福島県立医大), 南部 篤

線条体の投射ニューロンは、D1 受容体をもち淡蒼球内節・黒質網様部に投射する直接路ニューロンと、D2 受容体をもち淡蒼球外節に投射する間接路ニューロンとに分けられる。遺伝子改変マウスを用いイムノトキシン細胞標的法により、D2 受容体を発現しているニューロンを破壊すると、運動量が増加することがわかっている。このメカニズムを探るため、覚醒下において淡蒼球外節と黒質網様部の神経活動を調べた。イムノトキシン細胞標的

法により間接路ニューロンを破壊しても、淡蒼球外節・黒質網様部ニューロンの発射頻度・パターンは変化しなかった。しかし、大脳皮質運動野を刺激して得られる早い興奮+抑制+遅い興奮の3相性応答うち、淡蒼球外節では、抑制と遅い興奮が、黒質網様部では遅い興奮が消失する傾向が見られた。以上の結果から、黒質網様部すなわち大脳基底核の出力核で見られる遅い興奮の消失が、運動量増加をもたらしたのではないかと考えられる。

上肢到達運動課題遂行中の線条体介在ニューロンの活動

高良沙幸, 畑中伸彦, 南部 篤

線条体は、大脳皮質運動野に生じた運動情報を受け取る大脳基底核の入力核のひとつである。多くは GABA 作動性の投射ニューロンから成り立っているが、少数ではあるが介在ニューロンが存在し、投射ニューロンの活動に大きな影響を与えていると考えられている。しかし、実際の運動中にどのような役割を担っているのかは、未解明である。線条体ニューロンのうち、1) 自発発射頻度が高く、2) スパイクの持続時間が短く、3) 大脳皮質刺激に

対し短潜時で応答するニューロンの一群があり、これはパルブアルブミン陽性 GABA 作動性の介在ニューロンと考えられる。サルに上肢到達運動課題を遂行させ、このニューロンの活動を調べた。その結果、到達運動の方向やタスクイベントには依存せず、非特異的に課題遂行時に発射活動が増加することがわかった。このことは、本介在ニューロンが運動に際し、広く周囲の投射ニューロンを抑制している可能性を示唆する。

大脳皮質機能研究系

脳形態解析研究部門

【概要】

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

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

基礎となる可塑的变化に伴う動きを可視化し、その制御メカニズムと機能的意義を探索。3) 脳の NMDA 受容体局在の左右差とその生理的意義を探索。4) 前脳基底核、黒質-線条体ドーパミン系等の情動行動に関与する脳内部位のシナプス伝達機構および生理活性物質によるその修飾機構を電気生理学的手法を用いて解析し、それらの分子の基盤を明らかにする。5) 大脳基底核関連疾患の治療法の確立のため、神経幹細胞移植による細胞の分化、シナプス再構築や神経回路の再建に関する形態学および電気生理学の解析を行なう。6) シナプス-グリア複合環境の動的変化による情報伝達制御のメカニズムを明らかにする。

グルタミン酸受容体のシナプス内分布様式とそれらのシナプス伝達へ与える影響

足澤悦子，深澤有吾，松井 広，重本隆一

グルタミン酸性シナプス伝達は中枢神経系における主要な興奮性伝達機構である。これまでに電気生理学的手法や免疫電子顕微鏡法を用いてシナプス後膜に発現するグルタミン酸受容体の発現量や機能解析がなされてきた。しかし、シナプス後膜にグルタミン酸受容体がどのように分布し、それがシナプス伝達にどのように関わっているかは、技術的な限界のために不明な点が多い。そこで我々は、故藤本和教授（福井県立大学）により開発された凍結切断レプリカ免疫標識法 (SDS-digested freeze - fracture replica labeling, SDS-FRL) を改良し、ラット外側膝状体のリレー細胞に形成される機能的に異なる 2 種類のシナプスにおける AMPA 受容体の 2 次元的な分布様式を解析した。その結果、AMPA 受容体はシナプス内で cluster

を形成し、シナプス内に不均一に分布していること、その程度が 2 種類のシナプスで異なることが明らかになった。さらに SDS-FRL 法より得られた実際の AMPA, NMDA 受容体分布情報と各受容体の kinetic model を用いたシミュレーションを組み合わせ、受容体局在とシナプス応答の関係を検討した結果、この不均一分布が個々のシナプス伝達の大きさの不均一性に与える影響は小さく、発現する受容体数に依存して個々のシナプス特性が規定されることか明らかになった。これらの結果により、シナプスに発現するすべてのグルタミン酸受容体がシナプス応答に寄与できるほど十分小さく、これによりシナプス応答が安定化されるように作られていることが示唆された。

小脳運動学習の記憶痕跡

王 文, Wajeeha Aziz, 足澤悦子, 深澤有吾, 重本隆一

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

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

記憶・学習とグルタミン酸受容体の局在調節機構の役割

深澤有吾, 重本隆一

神経細胞はシナプスを介して機能的に結合し、情報伝達することで、脳の情報処理機構を担い、また、その機変化が学習・記憶の細胞レベルの素過程であると考えられている。グルタミン酸を介したシナプス伝達は、脳内の主要な興奮性シナプス伝達であり、シナプス前細胞から放出されたグルタミン酸がシナプス後細胞のグルタミン酸受容体に結合することで、興奮が伝達される。従って、シナプス後に発現するグルタミン酸受容体の種類や量、また、その分布が個々のシナプスでの伝達特性の調節に深く関与し、これらの変化が記憶形成に重要な役割を持つと考えられる。本研究課題では、AMPA 型グルタミン酸受容体を中心にグルタミン酸受容体の細胞膜上分布を凍結切断レプリカ標識法を用いて明らかにすると同時に、学習時や実験的シナプス可塑性（長期増強現象）誘導時の受容体局在を観察することで、記憶・学習現象

と受容体局在との関連性や因果関係を明らかにすることを目的としている。これまでに海馬歯状回シナプスの長期増強現象誘導後にシナプス内 AMPA 受容体密度が一過性に増加することを見出し、新規探索課題後にも同様な変化が起きていることを確認し、受容体レベルのシナプス再構築が動物の行動時に広範に起きていることを示唆する結果を得ている。また、シナプスに発現する AMPA 受容体密度変化が短期的な記憶痕跡であり、AMPA 受容体密度変化を可視化することで、脳内の記憶形成領域を可視化できることも示唆された。今後は、短期記憶痕跡を脳内の広範な領域でマップ化できる基礎技術を確立し、学習・記憶形成の場を明らかにすると同時に、シナプスの機能的変化が神経細胞ネットワークの活動にどのような影響を与え、それがどのように記憶形成に関与するのかについて明らかにしたいと考えている。

樹上突起スパイン内アクチン細胞骨格系の可視化

深澤有吾

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

見られ、アクチン細胞骨格に富む点で特徴的である。既にこのスパイン内アクチン細胞骨格の動態と、学習・記

憶（神経可塑性）との機能的関連性を示す知見が多く得られているが、その分布や調節機構は明らかにされていない。この樹状突起スパインは長さ1ミクロンほどの構造物であり、その内部構造や細胞膜表面の分子分布を明らかにするには電子顕微鏡レベルの定量的な分子局在解析技術が必要である。そこで、電子顕微鏡レベルの新規技術を駆使して、スパイン内アクチン細胞骨格を多角的に可視化し、その局在を詳細に捕らえることを目指している。具体的には、1) 従来通りの固定標本を試料として、電子顕微鏡断層撮影法を行い、その内部構造を可視化する。

（国立精神・神経センター神経研究所 諸根信弘博士との共同研究）、2) 凍結切断レプリカエッチング法を用いてスパイン細胞膜直下の裏打ち構造を可視化する。3) 培養神経細胞の無固定・無染色標本のスパインを位相差電子顕微鏡法で観察し、その内部構造を明らかにする（生理研・ナノ形態 永山國昭教授との共同研究）。

これらの解析を通して、樹状突起スパイン内の微細構造を明らかにし、神経伝達関連分子の局在情報と合わせて考察する事で、シナプス機能の調節メカニズムを明らかにしたい。

海馬シナプスの左右差

篠原良章，川上良介，重本隆一

脳の機能的な左右差はヒトでよく知られているが、その分子基盤はほとんど知られていない。我々は九州大学の伊藤功助教授らとの共同研究により、マウスの海馬NMDA受容体サブユニットNR2Bが左右の海馬の対応するシナプスで非対称に配置されていることを発見した。さらにシナプス形態や他のグルタミン酸受容体の左右差を調べたところ、CA1放射状層においては、右から入力を受けるシナプスが、左から入力を受けるシナプスに比べ、サイズが大きく mushroom type のスパインが多く、AMPA型グルタミン酸受容体GluR1サブユニットの密度

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

Calyx of Held シナプス成熟過程における受容体配置の変化と機能

釜澤尚美，松井 広，重本隆一

脳における情報処理が正常に機能するためには、シナプス伝達効率の最適化が必要である。聴覚系のシナプスでは特に、数百 Hz 以上の速度で送られてくる信号を正確に伝達する機能が必要である。ラットでは、生後3週間で聴覚系の機能が完成するが、それまでの間にシナプスの成熟が迅速に行なわれる。我々は calyx of Held（前蝸牛核神経終末端）と MNTB（台形体核）主要神経細胞が形成する巨大シナプスの発達過程に着目し、このシナプスにおける受容体配置の最適化の過程について、昨年度に引き続き解析を行った。Calyx of Held は杯状の形態

を示し、MNTB 細胞体上にグルタミン酸作動性シナプスを形成する。このシナプスは、凍結切断レプリカ像では、大きな細胞体とその周囲に密着した扁平な構造として観察されるため、受容体の2次元的配置を解析するのに適している。レプリカ標識法によるAMPA受容体・NMDA受容体に対する標識は、主要細胞の細胞体E-face上に存在する膜内粒子(IMP)のクラスターとその周辺に認められた。生後1週間ではグルタミン酸受容体のクラスターのIMP密度は低く、抗AMPA単独、抗NMDA単独で標識されるクラスターと、両者に対する標識が混在するク

ラスターが観察された。生後3週間ではIMPクラスターの凝集密度は上昇し、NMDA受容体に対する標識はほとんど存在しなくなった。一方、同様の発育段階のスライス標本で、MNTB主要細胞から電気生理学的記録を行ったところ、ひとつひとつのシナプス小胞の開口放出に対する応答 (mEPSC) が検出され、AMPA受容体、NMDA受容体それぞれに由来する成分が確認された。ところが、E-face上に得られた抗AMPA標識を使って、シナプス応答をシミュレーションしたところ、実際に記録されるAMPA受容体由来の応答より、はるかに小さい応答しか再現できないことが明らかになった。これまで我々は、小脳シナプスのレプリカ標本では、シナプ스에発現しているAMPA受容体数のほぼ100%がE-face側に検出されることを示してきた。しかし、今回の研究では、MNTB細胞では、E-face側に検出できる受容体数の、少なくとも1.8倍のAMPA受容体数がシナプスに存在する可能性

が示唆された。そこで、相補的なレプリカ面 (P-face) へのAMPA受容体 (GluR2/3) 標識を行なったところ、P-faceにも十分な標識数が認められた。同様にNMDA受容体のNR2B標識もP-faceに認められた。発育期のMNTB細胞では、AMPA受容体・NMDA受容体ともに、凍結切断時に、E-faceとP-faceの両方に分配されうることが示されたので、今後は、P-face抗体の標識効率を検討し、MNTB細胞体でのAMPA受容体・NMDA受容体の発現数・分布等を明らかにしていきたい。さらに、レプリカ標識法と電気生理学から得られる情報、伝達物質拡散の数理的シミュレーションを併せて用いることで、発育にともなうシナプス後細胞の受容体配置の変化に加えて、前細胞のグルタミン酸放出部位とシナプス後細胞の受容体配置が空間的に制御される過程を明らかにすることを目指す。

GABA_B受容体とイオンチャネルの共存

Akos Kulik (University of Freiburg), 深澤有吾, 重本隆一

脳内における主要な抑制性伝達物質であるGABAには、イオンチャネル型のGABA_A受容体とG蛋白共役型のGABA_B受容体が存在する。我々は、免疫電子顕微鏡法を用いて小脳、視床、海馬におけるGABA_B受容体の異なる局在を報告してきた。GABA_B受容体は海馬錐体細胞の樹状突起においてカリウムチャネルと共役し、ゆっ

くりとした過分極をおこすことが知られていたが、我々は、GABA_BR1とGIRK2サブユニットが、海馬錐体細胞の棘突起シナプス周辺で特異的な共局在を示すことを明らかにした。さらにGABA_B受容体と電位依存性カルシウムチャネルやmGluR受容体とカリウムチャネルの共存について解明を目指す。

前脳基底核と黒質－線条体ドーパミン系の電気生理学的および形態学的解析

初山俊彦

前脳基底核は中枢アセチルコリン性ニューロンの起始核であり、記憶、学習、注意等の生理的機能と密接に関係するとともに、その病的状態としてアルツハイマー病との関連が示唆されている。現在アセチルコリン性ニューロンへの興奮性および抑制性シナプス伝達機構および修飾機構の生後発達変化につき、ニューロン同定の新たな手法を導入しつつ、電気生理学的解析、形態学的解析を行なっている。

黒質－線条体ドーパミン系は随意運動調節に関与し、この系の障害とパーキンソン病等の大脳基底核関連疾患とが関係していることが示唆されている。脳虚血後のシナプス結合や神経回路の再建に関する基礎的知見はこれまで非常に少なかった。現在、線条体に虚血処置を加えたラットの新生細胞の分化、シナプス再構築について形態学的および電気生理学的解析を行なっている。

シナプス-グリア複合環境の動的変化による情報伝達制御

松井 広

シナプス前終末部から放出された伝達物質は細胞外空間を拡散し、その広がり方によって、神経細胞間の情報伝達の特徴は決定される (Matsui and von Gersdorff, 2006)。伝達物質の拡散を制御し、学習や記憶に重要とされるシナプス辺縁の受容体の活性化を制御できる格好の位置に、グリア細胞が存在する。我々は、シナプス-グリア複合環境の動的変化が、伝達物質濃度の時空間特性にどう影響するのか調べている。これまで、シナプス前細胞から

グリア細胞のほうに向けて異所性のシナプス小胞放出があり、これがニューロン-グリア間の素早い情報伝達を担っていることを示してきた (Matsui and Jahr, 2006)。この情報伝達によってグリア細胞の形態や機能が制御されている可能性を、二光子励起イメージングによって解析している (Matsui, 2006)。グリア細胞によるシナプスの包囲率の相違が、シナプス伝達にどんな影響を与えるのかを、電気生理学・電子顕微鏡法も組み合わせて解明する。

大脳神経回路論研究部門

【概要】

大脳皮質は多くの領域から構成され、それぞれが機能分担をすることで知覚、運動、思考といった我々の知的活動を支えている。大脳皮質がどのようにしてこのような複雑な情報処理をしているかは未だに大きな謎になっている。この仕組みを知るためには、皮質内神経回路の構造と機能を明らかにする必要がある。新皮質回路を構成するニューロンは形態的に極めて多様であることが知られているが、この多様性を理解することが皮質機能の解明には不可欠であると考えている。

本部門では、皮質出力がどのように作られるという観点から、皮質局所回路の構築原理を解明することを目標としている。そのために、多様な皮質領域や皮質下構造に投射する前頭皮質を構成する錐体細胞野、GABA 作働

性介在細胞のニューロンタイプを、分子発現・生理的性質・軸索投射・樹状突起形態など多方面から同定した上で、これらの神経細胞間のシナプス結合を電気生理学・形態学の技術を組み合わせて調べている。皮質振動現象におけるニューロンタイプの発火様式や、皮質外シナプス入力パターンの解析も併せて行うことで、大脳システムでの前頭皮質局所回路の機能的役割を理解したいと考えている。現在は主に、各ニューロンタイプの樹状突起分枝ルール、その上のシナプス配置、錐体細胞サブタイプ間のシナプス結合特性、非錐体細胞サブタイプから錐体細胞への神経結合選択性、徐波におけるニューロン活動様式を定量的に解析している。

連続超薄切片観察による神経組織の高精度 3 次元再構築法

窪田芳之, 畑田小百合, 川口泰雄

神経細胞上のシナプス結合を解析する方法として、連続超薄切切片の電子顕微鏡観察から、神経組織を 3 次元再構築する方法があげられる。私達は、この方法に関して、下記の 2 つの問題点に気がついた。1) 超薄切切片の厚みの正確な測定が、3 次元再構築像の質を大きく左右する。2) 切片面に平行あるいは平行に近い角度に存在す

るクレフト面を持つシナプス結合は、従来のシナプス結合の定義では見逃してしまう。これらの問題点を改善する方法を開発した。超薄切切片の厚み測定方法であるが、z 軸方向に 0.01nm の解像度を持つ干渉光顕微鏡を使えば、信頼できる測定が可能であることを確認した。また、シナプス結合の同定に関して、切片面に平行あるいは平行に

近い角度のクレフト面を持つシナプス結合は、連続切片で、従来のシナプス結合の同定の為の定義の順序通りに

シナプス結合の要素が観察できる場合はシナプス結合と判断して良い事を、tomography 解析等により見出した。

大脳皮質における錐体細胞と抑制性介在細胞の結合特異性

大塚 岳, 川口泰雄

皮質回路では、錐体細胞間で特異的に結合がなされサブネットワークを形成していることが知られている。今回、錐体細胞と 5 層の介在細胞間の結合特異性についてスライスパッチ法を用いて検討した。5 層の介在細胞は、Fast Spiking (FS) 細胞と non-FS 細胞に分類した。5 層の錐体細胞と介在細胞から同時に記録し結合の有無を調べた結果、FS/錐体細胞ペアでは両方向の結合が多く見られたが、non-FS/錐体細胞ペアでは両方向の結合が殆ど見

られなかった。グルタミン酸刺激法を用いて 2/3 層錐体細胞から共通入力を受ける確率を調べた。その結果、5 層の non-FS/錐体細胞間に結合がある場合に 2/3 層錐体細胞からの共通入力確率が高くなり、FS/錐体細胞間では結合の有無に依存しないことがわかった。以上から、5 層の介在細胞は細胞タイプに依存して錐体細胞と層内・層間のサブネットワークを形成することが明らかになった。

前頭皮質 5 層錐体細胞と抑制性細胞の結合特性

森島美絵子, 川口泰雄

これまでに前頭皮質における 2 種類の 5 層錐体細胞、橋核投射細胞 (CPn 細胞) と対側線条体投射細胞 (CCS 細胞) と 5 層 FS 細胞の結合特性について調べてきた。本年度は、トランスジェニック蛍光標識した GABA 細胞より発火様式にて同定した FS 細胞と、蛍光逆行性標識した 2 種類の錐体細胞を多重ホールセル記録することによって、FS 細胞から 2 つの錐体細胞への発散入力パターンについて調べた。その結果、単一 FS 細胞から CPn 細胞/CPn 細胞、CCS 細胞/CPn 細胞、CCS 細胞/CCS 細胞の 3 通りのグループへの入力確率は、それぞれの錐体細胞間の結合の有無にはよらなかった。また、単一 FS 細胞からの 2 個の錐体細胞での抑制の強さは、サブタイプの組み合わせ、錐体細胞間結合方向性、FS 細胞への興奮結合の有無・強度に依存する可能性があることが示唆された。

細胞/CPn 細胞、CCS 細胞/CPn 細胞、CCS 細胞/CCS 細胞の 3 通りのグループへの入力確率は、それぞれの錐体細胞間の結合の有無にはよらなかった。また、単一 FS 細胞からの 2 個の錐体細胞での抑制の強さは、サブタイプの組み合わせ、錐体細胞間結合方向性、FS 細胞への興奮結合の有無・強度に依存する可能性があることが示唆された。

徐波・ガンマ波における FS 細胞の発火様式

Victoria Puig, 牛丸弥香, 川口泰雄

新皮質ニューロンは睡眠中に脱分極 Up 状態と過分極 Down 状態の徐波リズムで振動している。UP 状態には、視床由来の 7 から 14 ヘルツのスピンドル波と、皮質自身が作る 30 から 80 ヘルツのガンマ波がのっている。これらのリズム制御には抑制性ニューロンが重要な働きをすると考えられている。そこで、抑制性ニューロンで最も

数が多い FS 細胞で、徐波時に現れる 3 種類のリズムでの発火パターンを調べた。Up での発火時期をみると、前半と後半のどちらかで発火しやすい FS 細胞があることがわかった (Early と Late FS 細胞)。Early FS 細胞は徐波から脱同期化すると発火頻度が下がり、逆に Late FS 細胞は脱同期化すると発火頻度が上がった。この二種類の FS

細胞は Up 上のスピンドル・ガンマ波の異なる位相で発火した。Early FS 細胞は Late FS 細胞よりスピンドル波

に強くカップリングし、振動の早い位相で発火した。

心理生理学研究部門

【概要】

認知、記憶、思考、行動、情動などに関連する脳活動を中心に、ヒトを対象とした実験的研究を推進している。脳神経活動に伴う局所的な循環やエネルギー代謝の変化をとらえる脳機能イメージング（機能的 MRI）と、時間分解能にすぐれた電気生理学的手法を統合的にもちいることにより、高次脳機能を動的かつ大局的に理解することを目指す。特に、機能局在と機能連関のダイナミック

な変化を画像化することにより、感覚脱失に伴う神経活動の変化や発達および学習による新たな機能の獲得など、高次脳機能の可塑性（＝ヒト脳のやわらかさ）のメカニズムに迫ろうとしている。最近では、言語・非言語性のコミュニケーションを含む人間の社会行動の神経基盤とその発達過程に重点をおいて研究を進めている。

異種感覚間の周波数情報処理に関わる神経基盤

林 正道，田邊宏樹，定藤規弘

我々は物体の特徴を認知する際、様々な感覚モダリティに入力される情報を統合することで信頼性を向上させている。例えば物体表面の粗さを認知する際には、触覚と聴覚に入力される刺激の周波数情報を利用していることが分かっている。本研究では触覚と聴覚に入力される刺激の周波数情報の符号化、統合・比較に関わる神経基盤を fMRI によって検討した。被験者は触覚-触覚間、及び聴覚-触覚間において低周波刺激の周波数比較課題を

行った。解析の結果、周波数情報の符号化には刺激が入力される感覚モダリティに依存せず、前補足運動野、左下前頭回、右小脳が賦活された。周波数情報の統合・比較には条件に依存せず、右半球の前頭-後頭ネットワーク、大脳基底核、視床、左半球の下頭頂小葉、小脳が賦活された。これらの結果から、周波数情報の符号化及び統合・比較は感覚モダリティに依存しない共通のシステムによって処理されていることが示された。

視覚系と運動系に共通する動作表象の神経基盤

佐々木章宏

後部頭頂葉は視覚運動情報の統合に重要な役割を果たすことが知られている。近年、ミラーニューロンと呼ばれる他者動作の視覚情報と動作遂行に関連した運動情報の両方に対して反応を示すニューロンが前頭葉と頭頂葉に存在し、両者が構成するネットワークがヒトの模倣行為の神経基盤とされてきた。しかし、脳損傷患者の研究から頭頂葉損傷が模倣行為の消失や失行症などの障害を引き起こすのに対し、前頭葉損傷では過度な模倣行為が

起こることが報告されており、頭頂葉と前頭葉の機能的差異が示唆されている。そこで我々は、模倣に関連した他者動作の視覚情報と動作遂行のための運動情報が統合される脳領域を機能的 MRI 用いた実験により検討した。動作遂行と他者動作の観察に共通した活動は左側下頭頂小葉および左側頭頂間溝前方部で見られた。これらの結果は、下頭頂小葉および頭頂間溝領域が視覚系と運動系の動作表象を統合していることを示唆する。

時間的予告効果の神経基盤の解明：機能的MRI研究

吉田優美子, 田邊宏樹, 林 正道, 河内山隆紀 (国際電気通信技術研究所), 定藤規弘

課題を行う際、ターゲットを提示する直前に予告刺激を提示すると、行動成績が向上することが知られている(予告効果, warning effect)。先行研究から、予告効果は注意の警戒状態を引き起こし、運動処理を増進することが明らかにされており、注意の神経基盤をターゲットが現れる空間的方向、時間間隔などに分類し、それぞれの神経基盤を特定する研究が行われてきている。しかし、これまでに時間的予告に関する研究はあまり行われて

きていない。そこで、機能的MRIを用いて、時間的予告に関連した領域を明らかにするため、予告刺激とGo/NoGo課題を組み合わせて実験を行った。この結果、両側側頭－頭頂部接合部(TPJ)、右下前頭接合部(IFJ)、前補足運動野、左小脳が時間的予告に関連して賦活することが分かった。これらの結果から、時間的な注意の切り替えには大脳皮質－小脳ネットワークが深く関わっていることが示唆された。

相互模倣の神経基盤

岡本悠子, 北田 亮, 佐々木章宏, 守田知代 (科学技術振興機構)
板倉昭二 (京都大学大学院文学研究科心理学研究室)
河内山隆紀 (国際電気通信基礎技術研究所), 田邊宏樹, 定藤規弘

相互模倣(他者の模倣をすること/他者から模倣されること)は乳児にとって中心的なコミュニケーション手段で、自閉症児の社会性を向上させることが示唆されている。我々は、相互模倣時の「自己の動作と他者の動作の同一性の認識」に関わる神経基盤をfMRIを用いて検討した。正常な被験者は右手を用いて数字を表す動作を行い同様のビデオを観察した。課題は1) 動作の同一性(一致/不一致)及び、2) 自己と他者の動作順序(先行/後行)

の2×2の実験計画法を用いた(先行一致:模倣される,後行一致:模倣する)。動作の順序に関わらず、自己と他者の動作が同じときに、両側のExtrastriate body area(EBA)が活動した。さらに、自閉症傾向が高い被験者では、模倣される際にEBAの活動が低下した。これらの結果より、EBAが自己と他者の動作の同一性をコードし、他者とコミュニケーションをとるうえで重要な役割を果たすと考えられる。

触覚による顔表情の識別に関わる神経基盤

北田 亮, Ingrid S. Johnsrude¹, 河内山隆紀², Susan J. Lederman¹
(¹Queen's University, ²国際電気通信基礎技術研究所)

ヒトは触覚でも他者の顔が表出する感情表現を識別できる。しかし触覚による顔表情の認識に関与する脳内メカニズムは不明である。我々はfMRIを用いて、触覚による顔表情の認識に関与する神経基盤を調べた。晴眼被験者が感情表情を表出したマスクと靴の模型を、触覚か視覚のいずれかで識別した。顔表情の識別条件は靴の識別条件に対して、左側中側頭回・左側下側頭頂小葉・左側下前頭回・両側中心前回は、視覚でも触覚でも活動さ

せた。それとは対照的に左側上頭頂小葉の下内側部は、視覚に比べて触覚による顔表情の識別によって賦活した。また舌状回や上前頭回を含む他の脳領域は、触覚に比べて視覚の顔表情の識別で高い活動を示した。この結果は触覚と視覚による顔表情の識別には、下前頭回・下側頭頂小葉・上側頭溝後部周辺が共通に関与することを示すだけでなく、視覚と触覚による顔表情の処理にはお互いに異なる脳領域も関与していることを示唆している。

対連合学習過程の解剖学的・機能的結合解析

田邊宏樹，定藤規弘

我々はこれまでに、連合学習を成立させる神経基盤について検討するため、遅延型対連合学習 (PA) 課題を遂行中の脳活動を機能的 MRI により計測し、上側頭溝前方部の活動が学習の初期に活動が高く学習が進むにつれて減衰すること、作業記憶に関わると考えられる両側の背外側前頭前野と頭頂間溝、左腹外側前頭前野 (VLPFC) の活動がみられること、さらに、これらの領域内で難しい PA 課題の被験者の成績と相関するのは VLPFC のみであ

ることを明らかにした。本年度はこれらの領域がどのような解剖学的・機能的結合を持つのかを明らかにするため、拡散強調画像法 (DTI) による領域間の解剖学的結合解析ならびに Dynamic Causal Modelling (DCM) による領域間の機能的結合解析の基礎的検討を行い、対連合学習過程における上記の脳活動領域のシステムとしての振舞いを検討した。

聴覚-視覚の時間弁別に関与する神経基盤：機能的 MRI 研究

村瀬未花，田邊宏樹，林 正道

河内山隆紀（国際電気通信基礎技術研究所），定藤規弘

異なる感覚信号の同時性を認識することは、環境の一貫した知覚表象をつくるために重要である。本研究では、2 つの異なる感覚入力をうける多感覚領域が、異種感覚（聴覚-視覚）による同時性の知覚表象を符号化するという仮説を証明するため、健康な被験者に同時性判別課題による機能的 MRI 実験を行い、2 つの刺激を同時と感じる閾値下と、非同時と感じる閾値上の聴覚-視覚刺激に対する脳活動を計測した。

同時性/非同時性の閾値は、聴覚刺激が先行するとき $70.3 \pm 5.8\text{ms}$ 、視覚刺激が先行するとき $79.4 \pm 5.2\text{ms}$ であった。多感覚領域である右上側頭溝、下前頭回、左後頭頂間溝は、刺激が閾値下のとき、閾値上のときに比べ有意な活動抑制を示し、この抑制は、同時性判断課題で特異的に観察された。これらの結果は、上側頭溝、下前頭回、後頭頂間溝が、聴覚と視覚による異種感覚刺激の意識的な同時性判断に重要な役割を担うことを示唆する。

盲人における異種感覚領野を繋ぐ effective connectivity の可塑的变化

藤井 猛，田邊宏樹，河内山隆紀（国際電気通信基技術研究所），定藤規弘

早期に失明した盲人が点字を読む際に、一次視覚野が活動することが知られているが、一次視覚野への信号の入力経路は明らかになっていない。そこで、早期失明者の点字弁別課題遂行中の一次視覚野への入力経路を明らかにする目的で fMRI データへ dynamic causal modeling を適用して賦活部位間の関連性 (effective connectivity) を解析した。ベイジアンモデル選択によると、一次体性感覚野と一次視覚野の直接経路を含まないモデルの方が

含むモデルよりも優れていた。また早期失明者は視覚の背側経路の connectivity が後期失明者や晴眼者より強かった。これらの結果は視覚の背側経路を通る皮質-皮質間のフィードバック経路が早期失明者における一次視覚野への主な入力経路であり、この経路の可塑的变化が早期失明者の一次視覚野の視覚から触覚処理への機能的変化に関与していることが示唆された。

感情認知における他者視点取得に関連する神経基盤の解明

間野陽子, 原田宗子, 杉浦元亮, 齋藤大輔, 定藤規弘

他者視点取得は他者の知覚を取得し理解する能力であり他者の感情を認知する際に必要となる。我々は他者の感情に共感する際の他者視点取得の神経基盤を fMRI を用いて検討した。被験者は二文から構成される状況文を読み、主人公の感情を推測する課題を行った。一文目の主人公が二文目の出来事と同じ場所に存在する場所一致条件と、別の場所に存在する場所不一致条件を用いて他者視点取得の作業負荷（ワークロード）を実験的に操作した。被験者に提示される二文目は条件間で同じ内容に設定し文脈効果により変化する脳活動を計測した。その

結果、場所不一致条件において主人公の感情を推測する際の神経基盤が場所一致条件時と比較して後部帯状皮質と右側側頭頭頂連結部での賦活が確認された。後部帯状皮質は他者視点取得と感情語の評価に関連することが知られており、側頭頭頂連結部は他者の心的表象の理解と同様に空間的な他者視点取得に関与することが知られている。我々は後部帯状皮質と右側側頭頭頂連結部の両領域が他者の感情を認知する際の他者視点取得のワークロードに関与することを示唆する。

向社会的意思決定におけるヒト線条体の役割の検討

出馬圭世, 齋藤大輔, 定藤規弘

日常における個人の行動は食べ物や金銭などの物質的報酬だけでなく、他者からの評判・称賛といった社会的報酬にも動機づけられる。社会的状況における意思決定では金銭報酬と社会的報酬などの異なる報酬を同じスケールに変換し比較する必要がある。本研究ではそのようなプロセスにおける線条体の役割を検討した。被験者には fMRI 装置内において寄付するかしないかの意思決定課題を行わせ、その際にその選択が他者から見られているか否かも操作した。そうすると他者から見られている

場合に寄付する場合（高い社会的報酬を期待）と、他者が見ていない場合に寄付せずお金を自分のものにする場合（社会的コストなしで金銭報酬の獲得を期待）に特に高い活動が両側の腹側線条体で見られた。この結果は線条体において様々な報酬が「脳内の共通の通貨」として処理されていることを示しており、日常の社会的意思決定において線条体が重要な役割を果たしていることが示された。

「漢字」と「かな」における意味処理機構の違いの検討

松本 敦

漢字とかなは脳内において異なった処理機構によって処理が行われていることは多くの研究によって証明されている。しかし、それらは主に形態的なものであって、音韻処理や意味処理は共通の脳領域によって行われることが想定されている。本研究では漢字とかなでは異なった意味処理のネットワークを有しているのではないかとという仮説をもち、意味プライミング課題を用いて検討を行う。意味プライミング課題では被験者がターゲット語

に対して意味判断課題を行うが、その際直前にターゲット語と意味的に関連する語が呈示されると処理が促進される。その際脳内では意味ネットワークに関する領域が adaptation を起こすことが知られている。実験の結果、漢字とかなでは異なった領域にプライミング効果が観察され漢字とかなでは異なった意味処理機構が存在することが明らかとなった。

発達生理学研究系

認知行動発達機構研究部門

【概要】

平成 20 年度は新たに文部科学省の脳推進戦略推進プログラムが開始し、伊佐は課題 C「独創性の高いモデル動物の開発」の拠点長となり、霊長類脳でのウィルスベクターによる遺伝子導入技術を開発して、霊長類における高次脳機能の分子基盤、および分子ツールを用いた高次脳機能解明を行う研究パラダイムの開発に乗り出すことになった。そのため、動物実験センターの一部に霊長類用の遺伝子導入施設の設置を開始した。一方、同プログラム課題 A の「日本の特長を生かしたブレインマシンインターフェイスの開発」(拠点長：川人光男 ATR 脳情報研究所長)にも乗り出すことになり、サル脳の多チャンネルの神経活動記録・解析システムを用いて皮質脳波(EEG)と多数の単一神経細胞活動記録を行い、腕や手の運動軌道をデコードするためのデータを取得するために実験室をセットした。一方、科学技術振興機構の

CREST プロジェクトも 4 年目を迎え、理化学研究所基幹研究所および産業技術総合研究所のグループとの共同研究により、皮質脊髄路損傷サルでの機能回復過程における大脳皮質での遺伝子発現解析を行う実験が大きく展開している。また Human Frontier Science Program での共同研究も最終年度を迎え、カナダのクイーンズ大学のグループや米国の南カリフォルニア大学のグループとの共同研究により、一次視覚野損傷サルの free viewing 時のサッカード運動の解析による損傷視野内でのサリエンシーの検出能力の検証実験および、上丘の水平断切片における上丘局所回路のマップ構造における周辺抑制の検証実験などで大きな進展がみられた。

本年度新規に渡辺秀典君、大屋知徹君、金社希さんが博士研究員として新たにグループに参加した。

第一次視覚野の損傷は急速眼球運動のコントロールおよび意思決定の過程に影響を及ぼす

吉田正俊、高浦加奈、加藤利佳子、池田琢朗、伊佐 正

マカクザルの第一次視覚野(V1)を片側的に除去して作成した盲視動物モデルにおいて、急速眼球運動(サッカード)への V1 除去の影響を調べた。課題には視覚誘導性急速眼球運動課題を用いた。損傷視野における検出輝度の閾値は正常視野の対応する位置と比べて上昇していた。正常視野と損傷視野の視覚標的への弁別能と同程度になるように条件を揃えたところ、損傷視野へのサッカードの終止点は正常視野へのものと比べてばらついていた。

サッカード軌道の解析から、この結果がサッカード開始時の方向成分のばらつきを充分補償されないためであることを示唆された。サッカードの潜時の分布は損傷視野では狭くなっていた。計算論モデルによる解析から、この結果が意思決定過程においてサッカード開始を行う閾値が下がっているためであることが示唆された。以上のことは、V1 を介した情報伝達が正確な眼球運動の制御および意思決定の過程にも関わっていることを示している。

上丘浅層 wide field vertical cell の GABA 作動性ニューロンによる活動制御機構

金田勝幸、伊佐 正

上丘浅層の wide field vertical (WVF) cell はその樹状突

起を浅層の広い領域に伸ばし、動く物体の認知に関与す

る。これまでに我々は WFV cell のバースト発火が上丘局所回路でのバースト発火の生成に重要であることを示唆してきた。本研究では、このような WFV cell の活動を局所 GABA ニューロンがどのように制御しているのかを調べた。スライス標本において WFV cell からホールセル記録を行い、視神経を連続電気刺激してもバースト発火は起こらなかった。これは、単シナプス性の EPSC に続く二シナプス性の IPSC が WFV cell の過興奮を抑制するためと考えられた。シナプス前ニコチン受容体に作用し

GABA の遊離を促進するアセチルコリンを WFV cell の遠位ではなく近位樹状突起に局所投与すると、顕著な IPSC が誘発された。これに一致して、GABA_A 受容体アンタゴニストを近位樹状突起に局所適用すると、視神経の連続刺激により強いバースト発火が誘発された。以上の結果は、上丘局所 GABA ニューロンから近位樹状突起へのフィードフォワード抑制が WFV cell の活動を制御する上で重要であることを示している。

パリレン電極を用いた麻酔下ラット皮質脳波の多点同時計測

渡辺秀典, 坂谷智也, 戸川森雄, 吉田正俊, 伊佐 正,
長谷川功 (新潟大・医・生理), 鈴木隆文 (東大院・情報理工)

本研究では大脳皮質における組織学的・機能学的階層間における神経活動の相互相関の解明を目指す。そのために脳皮質電位 (Electrocorticogram, 以下 ECoG) を計測する必要がある。そこで我々は電極間隔 1mm の Poly 製多点電極アレイを開発し、その性能を麻酔下ラット体性感覚野の自発神経活動の計測により検証した。記録された信号について周波数解析を行い、同一試行内において電極間に周波数選択性及び感度に差がないことを明らかにした。次にヒゲ刺激に誘導される ECoG 波形を解析し、

電極間隔が受容野に対して小である場合、ECoG における最大応答振幅によって刺激弁別が可能であることを明らかにした。更に我々は ECoG の発生機構を明らかにするために、ECoG と脳表面に対して垂直方向における神経活動を同時記録した。その結果、皮質スパイクの発生と ECoG 波形における陽性電位について正の相関を明らかにした。以上の一連の成果は、皮質脳波の発生機構についての理解を助ける。

一次視覚野損傷サルにおける視覚誘導性サッケードに対する上丘 inactivation の影響

加藤利佳子, 高浦加奈, 池田琢朗, 吉田正俊, 伊佐 正

一次視覚野損傷後、脳への視覚情報の入力経路は網膜から上丘浅層への直接投射が、特にサッケードの形成においては重要であることが予想される。また、我々の研究室では、これまでに上丘浅層からサッケードの形成に関与する上丘中間層への投射を報告しており、一次視覚野損傷後のサッケードシステムにおいて、上丘中間層の役割が重要であることが考えられた。そこで、我々は、片側一次視覚野を除去したサルの上丘中間層にムシモルを注

入し、上丘の活動を抑制し、視覚誘導性サッケードに対する影響を調べた。V1 損傷側と対側の上丘を抑制した時は、視覚誘導性サッケードへの影響は、サッケードの振幅、速度の低下と反応時間の増大に留まった。これに対し、V1 損傷側と同側の上丘を抑制した場合は、注入部位に対応した視野へのサッケードが、完全に抑えられることが観察された。

幼若時片側除皮質ラットにおける皮質脊髄路の大規模変化

梅田達也, 伊佐 正

幼若時片側除皮質ラットでは、成熟時において対側上肢の運動機能に異常が少ない。その代償機構の解明のため、解剖学的・電気生理学的手法を用いて、幼若時片側除皮質ラットにおける下行性神経回路を調べた。損傷と対側運動野に順行性トレーサーBDAを導入した結果、対側の上丘・赤核・橋核、同側の後索核・脊髄灰白質といった通常とは反対側の領域にも軸索が確認された。逆行

性トレーサーを用いた実験から、同側の脊髄に投射する細胞は対側には投射していない事が明らかとなった。更に、両側の運動ニューロンから錐体刺激に対する多シナプス性の応答が惹起され、脊髄介在ニューロンを介する経路と網様脊髄ニューロンを介する経路によって伝わっていた。以上の結果は、幼若時片側除皮質後、代償的な神経回路が広範囲で形成される事を示唆する。

サッケード眼球運動における補正制御機構～一次視覚野除去による研究

池田琢朗, 吉田正俊, 伊佐 正

サッケード眼球運動は極めて速く正確な運動であり、我々の日常的な視覚認知において重要な役割を果たしていることが知られている。しかしながら、数十ミリ秒という短い時間の中で行われる運動でありながらどのようにその正確性が保たれているのかは未だに明らかではない。

我々は一次視覚野を除去し、視覚情報を制限したニホンザルを用いてサッケード眼球運動課題による行動実験を行い、運動制御についての解析を行った。この結果、

一次視覚野除去下においてもサッケード眼球運動の実行自体は可能であるものの、運動遂行中の補正的な制御が失われることを発見した。この結果は、一次視覚野を介した視覚情報がサッケード眼球運動の補正制御に必要であることを意味しており、サッケード眼球運動が上丘を中心とした実行系と一次視覚野を介した情報による補正制御系による並行制御を受けていることを示唆している。

把握運動に関与する脊髄ニューロンの役割 -Spike-triggered averaging を用いた検討-

武井智彦, 関 和彦

我々は、把握運動の制御における脊髄神経機構の役割を解明するために、ニホンザルを対象とした電気生理学の実験を行っている。本年度はサルに把握運動を行わせ、その際の脊髄介在ニューロンの活動様式を明らかにすること、またそれらの活動電位を用いて Spike-triggered averaging をおこなう事により、単一脊髄介在ニューロンの筋出力パターンを調べることを目的とした。

2 頭のニホンザルに対して示指と拇指でレバーを摘む課題を訓練し、さらに外科的手技により脊髄 LFP を記録するためのチャンパー及び EMG 記録用のワイヤー電極を装着した。そして、把握運動遂行中の脊髄単一介在ニ

ューロンの活動を細胞外電位記録法によって記録し、次に脊髄介在ニューロンのスパイク活動をトリガーにして、同時に記録される筋活動の加算平均を行った (spike-triggered averaging)。

3 頭のサルの下位頸髄から、合計 199 個のニューロン活動が記録された。そのうち、大半のニューロンは運動に依存した発火頻度の変化を示した (n=160, 80%)。さらに、解析対象となった 3920 のニューロン-筋ペアに対して Spike-triggered averaging を行った結果、30 ニューロンが 56 の有意な筋出力を示した。その内訳は 51 ニューロンが促通効果、5 ニューロンが抑制効果であった。さら

に,いくつかの基準によってそれらの内21ニューロンが純粋な筋出力効果をもつpremotor介在ニューロンと定義した(PreM-INs)。これら21 PreM-INsの多く(13ニューロン, 62%)は精密把握に関わる複数の筋に出力効果を

示していた。この結果は脊髄ニューロン一つによっても,把握運動時に必要な筋群の共興奮を引き起こすことが可能なことを示唆していた。

The circuit for saccadic suppression in the superior colliculus studied in vitro

Penphimon Phongphanphanee¹ and Tadashi Isa^{1,2,3}

¹ Department of Developmental Physiology, National Institute for Physiological Sciences

² School of Life Science, The Graduate University for Advanced Studies

³ Core Research for the Evolutionary Science and Technology (CREST), JST)

“Saccadic suppression” is known as the suppression of the neuronal activity in the superficial layer of the superior colliculus (SCs) during saccades. It might play a role in prevention of perceptual blur during eye movements. However, the mechanism underlying saccadic suppression is still not clear. We have proposed that the premotor cells in the intermediate layer (SCi), which command saccades, also form local connections within SCi that activate the neighboring GABAergic neurons to inhibit the visuosensory neurons in the SCs. We have tested this model by stimulating the premotor axons at the predorsal bundle and recording the response with

whole-cell patch-clamp technique in coronal SC slices obtained from GAD67-GFP knock-in mice. The following evoked responses support the model. First, monosynaptic excitatory postsynaptic currents could be evoked in the SCi GABAergic neurons; second, inhibitory postsynaptic currents were evoked in SCs non-GABAergic neurons. Both responses were completely eliminated by application of glutamate receptor antagonists. Thus, the findings in both cell types comprise direct evidence for a circuit model of saccadic suppression.

片側一次視覚野切除サルにおける空間作業記憶の検討

高浦加奈, 吉田正俊, 伊佐 正

本研究では「盲視」のモデル動物とされている片側一次視覚野(V1)を切除したサルでの空間作業記憶について検討を行っている。「盲視」とは, V1の損傷後に一部の患者が「視覚的な気付きとは乖離した残存する視覚情報処理能力」を示す現象であり, 視覚情報を利用するうえで「視覚的な気付き」が必ずしも必要ではないことを示唆している。しかし一方で一部の視覚情報処理は「視覚的な気付き」なしでは成立し得ないとも言われており, 作業記憶と呼ばれる「ある目的を持った一連の行動の中で,

必要な情報を一時的に保持する能力」はその代表的なものである。

本研究では片側 V1 切除サルでの検討の結果, 盲視の状況下でも空間作業記憶が利用可能であること, さらにその神経相関に相当する活動が損傷同側の上丘で観察されることなどが示された。本研究の結果は現在まで広く受け入れられてきている「視覚的な気付き」と作業記憶との関係について再考を促すものである。

生体恒常機能発達機構研究部門

【概要】

当部門は、発達および障害回復の過程で一旦形成された機能的神経回路に起こる再編成のメカニズムを回路レベルで解明することを主な目標に研究をしている。そのため、3つのサブテーマについて研究を進めている。

1) 発達期における再編のメカニズムとして、シナプスレベルにおいて、伝達物質のスイッチング、2) 細胞内イオン環境の変化による GABA の興奮性から抑制性へのスイッチとその制御機構について細胞内 Cl⁻ イオンくみ出し分子 KCC2 の機能制御を中心に、神経栄養因子、環境/回路活動による制御を検討している。3) 神経回路の可塑的变化を生体で観察するため、フェムト秒パルスレー

ザーを用いた多光子励起法を利用して、マウス大脳皮質細胞やシナプスの可視化技術の確立および技術向上をおこなった。その結果、マウス大脳皮質全層における神経細胞・グリア細胞およびその微細構造を可視化することが可能となった。これらの技術を利用して、現在、神経回路の微細構造の長期変化の観察を試みている。人事として、本年 10 月に和気弘明 JST 研究員が名古屋市立大学に転出した。本年度 10 月に韓国慶熙大学から金善光氏が JSPS 研究員として、また、中畑義久氏が総研大 5 年一貫制 1 年次大学院生として加わった。

神経伝達物質のスイッチング

石橋 仁，中畑義久，西巻拓也，山口純弥，鍋倉淳一

ラット聴覚系中経路核である外側上オリーブ核に内側台形体核から入力する伝達物質自体が未熟期の GABA から成熟期のグリシンに単一終末内でスイッチすることを明らかにした。この伝達物質のスイッチングは、発達期における主要な再編成機構である余剰回路の除去や伝達物質受容体の変化と並ぶ大きなカテゴリーの変化と考えられる。現在、何故未熟期には GABA である必要がある

のかを、GABA の未熟期における興奮性および GABA_B 受容体の発達変化と関連機能について GABA_B 受容体遺伝子改変動物を用いて検討している。GABA_B 受容体ノックアウト動物では抑制性シナプス機能の均一な発達が阻害されていることが判明した。GABA からグリシンへスイッチするメカニズムについても検討を神経終末内 GABA およびグリシン濃度の変化の観点から開始した。

細胞内 Cl⁻ 制御機構 KCC2 による GABA の興奮－抑制スイッチ制御の分子機構の解明

渡部美穂，石橋 仁，平尾顕三，鍋倉淳一

未熟期および虚血や傷害後早期に GABA は興奮性伝達物質としての作用を獲得する。これは GABA_A 受容体に内蔵するチャネルを流れる Cl⁻ イオンの向きによって決定されるため、細胞内 Cl⁻ イオン濃度によって GABA は興奮性/抑制性が決定される。この細胞内 Cl⁻ イオン濃度は神経細胞特異的に発現する K⁺-Cl⁻ トランスポーター

である KCC2 によって主に決定されている。発達期や再生期における KCC2 の発現、およびその機構を検討している。KCC2 の発現制御に関して、障害により、KCC2 の脱リン酸化と内在化、その後の蛋白発現の消失により GABA 作用は短時間で脱分極作用へスイッチすることが判明した。細胞内制御分子の探索を行なっている。

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

金 善光, 和氣弘明, 高鶴裕介, 稲田浩之, 江藤 圭, 鍋倉淳一

神経回路の発達および脳障害の回復期における神経回路の可塑性の研究を遂行するにあたり、究極的に生体での観察が不可欠である。そのため、生体における神経回路の可視化のため、長波長短パルスレーザーを利用して生体深部の微細構造を観察可能な多光子励起法を種々の神経細胞に蛍光蛋白が発現している遺伝子改変動物に適用し、大脳皮質微細構造の可視化している。光路の開発・調節、頭蓋骨に適用する特殊アダプターの開発などを行い、マウスにおいて、大脳皮質表面から1ミリの深部まで観察可能な技術を行い、大脳皮質錐体細胞を全層にわ

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

脳梗塞障害時における対側半球の回路再編機構

高鶴裕介, 吉友美樹, 鍋倉淳一

脳梗塞後の回復期におこる機能代償機構の解明のため、レーザーによる光誘発血栓作成法を用いて片側大脳皮質感覚野に虚血脳梗塞を作成し、対側の体性感覚野におこるシナプス再編性および回路機能再編成と皮膚感覚回復過程の対応を行った。障害直後から対側感覚野全般の活動が上昇し、同側末梢四肢からの感覚入力が増進した。その後1-2週間の限定した期間にスパイン構造のターンオーバー率が亢進していることを2光子顕微鏡で観

察した。その後、同側末梢刺激による大脳皮質における電気活動のパターンの再編がおこり、対側末梢四肢（正常入力側）からの入力処理パターンと類似したパターンが形成することが判明した。この新たな活動再編に伴い、障害された末梢感覚は回復した。この結果から、障害と対側の大脳半球で両側の末梢感覚を処理する回路が再編・形成されることが判明した。

生殖・内分泌系発達機構研究部門

【概要】

本研究部門は、視床下部による摂食行動の調節と末梢組織における代謝調節機構の解明を目指して研究を行っている。視床下部は、摂食行動（エネルギー摂取）とエネルギー消費機構（栄養代謝）を巧みに調節することによって生体エネルギーを一定に保つ重要な働きを担う。しかし、近年、この調節機構の異常が肥満、糖尿病、高血圧など、生活習慣病の発症と密接に関連することが明らかとなってきた。当部門では、視床下部における生体

エネルギー代謝の調節機構を分子レベルで解明し、その分子機構を通して生活習慣病など様々な疾患の原因・治療法を明らかにしたいと考えている。本年度実施した主たる研究課題は次の通りである。1) 摂食調節に関わる視床下部生体分子センサーの研究、2) レプチン、神経ペプチド、BDNFによる糖、脂質代謝調節機構の解明、3) 肝一腺臓器間作用を介する膵β増殖促進機構の解明。

摂食調節に関わる視床下部生体分子センサーの研究

箕越靖彦，岡本土毅，志内哲也

塩田清二，影山晴秋（昭和大学医学部第一解剖学教室）

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）

我々は、AMP キナーゼが、レプチンやアディポネクチンなどホルモンによって活性化し、骨格筋における脂肪の利用を促進すること、視床下部 AMP キナーゼが摂食行動を制御することを明らかにしている。今回、視床下部 AMP キナーゼによる生体エネルギー代謝の調節機構を明らかにするため、活性型並びに不活性型 AMP キナーゼを視床下部にレンチウイルスを用いて発現させ、摂食行動に及ぼす影響を調べた。その結果、マウス視床下部室傍核に活性型 AMP キナーゼを発現させると、摂食量が増加、肥満することに加え、食餌に対する嗜好性が変化することを見出した。さらにその作用発現には神経細胞での脂肪酸代謝に関わることを見出した。

一方、グレリンによる NPY ニューロン活性化が、少なくとも一部、AMP キナーゼを介することを、単離細胞を用いた実験から明らかにした (Kohno D., Sone H., Minokoshi Y., Yada T.: Biochem Biophys Res Commun. 366(2):388-392, 2008)。AMP キナーゼ活性化剤 AICAR を添加することにより、弓状核ニューロンの AMP キナーゼが活性化し $[Ca^{2+}]_i$ を増加させた。この $[Ca^{2+}]_i$ 増加は、外液 Ca^{2+} 除去および L 型 Ca チャネル阻害剤添加によって有意に抑制されたが、N 型 Ca チャネル阻害剤および小胞体 Ca ポンプ阻害剤は影響しなかった。AICAR によって $[Ca^{2+}]_i$ 増加を示した細胞の 40% は NPY ニューロンであり、POMC ニューロンは $[Ca^{2+}]_i$ 増加を示さなかった。

レプチン，神経ペプチド，BDNF による糖・脂質代謝調節機構の解明

箕越靖彦，志内哲也，李 順姫，戸田知得，斉藤久美子

我々は、レプチンが摂食行動を抑制するだけでなく、視床下部—交感神経系を介して、褐色脂肪組織や骨格筋などエネルギー消費器官でのグルコースおよび脂肪酸の利用を促進することを明らかにしている。今回我々は、レプチンによるグルコースの取り込み促進作用に視床下部のメラノコルチン受容体が必須であることを明らかにした。

さらに、レプチンが、視床下部腹内側 (VMH) に作用を及ぼすと、視床下部弓状核のメラノコルチンニューロンを活性化して、褐色脂肪組織並びに骨格筋、心臓でのグルコースの利用を促進することを見出した。その他の神経核にレプチンを投与しても末梢組織でのグルコース

の取り込みはほとんど変化しなかった。また、メラノコルチン受容体作動薬は、レプチンと同様に VMH に作用をさせると褐色脂肪組織並びに骨格筋、心臓においてグルコースの取り込みを促進させた。室傍核に作用させた場合には、褐色脂肪組織のグルコース取り込みのみを促進した。その他の視床下部神経核では効果はなかった。以上の実験結果から、レプチンは、VMH ニューロンに作用を及ぼすと弓状核メラノコルチンニューロンを活性化し、その結果、腹内側核、室傍核のメラノコルチン受容体を活性化することによって末梢組織のグルコースの取り込みを促進することが明らかとなった。

肝－膵臓器間作用を介する膵 β 増殖促進機構の発見

片桐秀樹（東北大学大学院医学研究科再生治療開発分野）

箕越靖彦，志内哲也，岡本土毅

糖尿病発症の一つの原因はインスリン分泌の低下にあり，インスリン分泌臓器である膵臓 β 細胞の再生・増殖のメカニズムを解明することは大きな研究課題である。今回，東北大学大学院医学研究科片桐教授との共同研究により，肝臓の代謝情報が神経を介して膵臓に伝えられ，

これにより β 細胞が増殖することを見出した。本研究成果は， β 細胞を増殖させる生理機能を見出した点に大きな意義があるだけでなく，その調節作用に肝臓での代謝変化と自律神経系が関与することを明らかにした。本研究は，*Science* 322: 1250-1254, 2008 に掲載された。

行動・代謝分子解析センター

遺伝子改変動物作製室

【概要】

脳が機能を発揮するということは、個体の行動・精神活動に直結する。それ故、脳機能を研究する際には個体レベルでの解析が必須となる。特に、分子生物学的技術と発生工学的技術を駆使して作製する遺伝子改変動物を利用することは非常に有益な解析手段といえる。マウスにおいてジーンターゲティング法は確立しているが、脳研究分野で古くから汎用されてきたラットにおいては、この技術はいまだ未開発であり、非常に切望されている。遺伝子改変動物作製室では遺伝子改変動物（マウス、ラット）の作製技術を提供しつつ、遺伝子ターゲティングによるノックアウトラットの作製、さらには、作製した遺伝子改変動物の脳研究への積極的応用を目指してい

る。これまでに ES 細胞や精原細胞の株樹立を試みるとともに、核移植や顕微授精など、ラットにおける発生工学的技術の高度化に加えて、遺伝子改変動物を利用した高次脳の発達形成メカニズムの解明に取り組んできた。研究課題のうち下記の3題について具体的に示す。ラットの発生工学技術の高度化に向け、(1) 遺伝子導入法の違いによる Tg 作製効率の比較、(2) 円形精子細胞を授精させるための活性化処理法の最適化を検討した。さらに、遺伝子改変マウスの脳研究への応用を目指して、(3) 大脳皮質第一次視覚野上に存在する遠近感の認知に必須の機能ユニット“眼優位カラム”の可塑的形成メカニズムの解明研究を進めた。

トランスジェニックラットの作製効率における前核注入法と顕微授精法の比較

加藤めぐみ，平林真澄

実験小動物ゲノムへの外来遺伝子導入に汎用されているのは前核期受精卵への顕微注入法 (PNMI) だが、精子に外来遺伝子を付着させてから顕微授精 (ICSI) する方法でもトランスジェニック (Tg) 動物が作製できる (ICSI-Tg 法)。本研究では用いた外来遺伝子の種類と調製ロット、ラット系統、ならびに顕微操作技術者が同じ実験条件下で PNMI-Tg 法と ICSI-Tg 法の直接比較がなされた3つのケースを検討し、どちらの方法が Tg ラットの作製にとって有効かを明らかにしようとした。PNMI-Tg 法では、前核期卵に 5 ng/μl 濃度の外来遺伝子

溶液を顕微注入し、ICSI-Tg 法では、未受精卵に 0.1～0.5 ng/μl 濃度の外来遺伝子溶液に室温で 1 分間曝した精巢上体尾部精子を顕微注入した。その結果、ホスト系統が SDR の場合、PNMI-Tg 法での Tg 産仔/総注入卵 (=Tg 作製効率) は、ICSI-Tg 法に比べ低値だった。DLF1 がホスト系統の場合、PNMI-Tg 法より ICSI-Tg 法の作製効率が高くなる傾向が認められたが、Wistar 系統に導入した場合は PNMI-Tg 法でしか Tg ラットが取れなかった。以上のことから、Tg ラットの作製効率に基づいては2つの方法に優劣はつけられなかった。

ラット ROSI において新鮮精子細胞と凍結精子細胞のどちらを用いるかで卵活性化処理の適期が異なる

加藤めぐみ，平林真澄

凍結保存したラット円形精子細胞の顕微授精による産仔作製を報告してきたが、精巢から調製したばかりの新

鮮精子細胞を用いると産仔率は顕著に低かった。一般的な ROSI プロトコールでは、活性化処理により第二減数

分裂後期～終期に進めた排卵卵に円形精子細胞を顕微注入する。本研究では円形精子細胞（凍結 vs 新鮮）、活性化処理開始のタイミング（ROSI 前 vs ROSI 後）、そして活性化方法（DC パルス vs イオノマイシン）がラット ROSI に及ぼす影響を調べた。その結果、DC パルスで活性化誘起した場合、凍結精子細胞を用いるときは ROSI 前に、新鮮精子細胞を用いるときは ROSI 後に、活性化

処理を開始した方が高い産仔率が得られた。これと同じ傾向はイオノマイシンで活性化誘起した場合にも認められた。以上のことから、ラット ROSI 胚の産仔発生において新鮮精子細胞を用いる場合は ROSI 後に、凍結精子細胞の場合は ROSI 前に活性化することが望ましいと結論づけた。

大脳皮質第一次視覚野上に存在する遠近感の認知に必須の機能ユニット “眼優位カラム”の可塑的形成メカニズムの解明に向けて

富田江一, 三宝 誠, 山内奈央子, 平林真澄

大脳皮質第一次視覚野には、視覚の認知に必須と考えられている機能ユニットが多数存在する。中でも、遠近感の認知に重要と考えられる眼優位カラムは、発生研究および可塑性研究の一番の対象である。第一次視覚野において、同側眼から視覚入力をうける神経細胞群と反対側眼から入力を受ける神経細胞群それぞれは、別々にクラスターを形成している。さらに、これら同側眼クラスターと反対側眼クラスターは交互にパッチ上に並びカラム状構造をとっているため、各々同側・反対側眼優位カラムと呼ばれている。同側・反対側眼優位カラムは、出生前後の発生期、互いに混ざり合い各々見分けがつかない状態だが、発達期になると、外部からの視覚入力に促されて互いに分離を始め、成人期には同側・反対側が完全に分かれたカラム構造となる。しかしながら、この過程における詳細な分子メカニズムは明らかにされてい

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

多次元共同脳科学推進センター

【概要】

多次元共同脳科学推進センターは本年度4月に設置され、自然科学研究機構（生理学研究所，基礎生物学研究所）の複数の教授が併任し運営を開始した。また，プログラムオフィサーを公募，選任し，吉田明特任教授が8月に着任した。さらに外部研究機関から，基礎的な脳科学及びその関連分野（臨床医学，工学，心理学，倫理学）を専門とする客員教授，客員准教授を8月から11月にかけて選任し，外部の研究機関と連携した研究環境を整えつつある。

具体的活動としては，多次元共同脳科学推進センターキックオフシンポジウム，異分野連携的な若手脳科学研究者育成プログラムを立案するための模擬講義，脳科学の新領域を探るブレインストーミングを開催した。

＜多次元共同脳科学推進センターキックオフシンポジウム＞

キックオフシンポジウムを平成20年4月16日から18日にかけて開催した（参加者292名）。前半では，日本のブレイン・マシン・インタフェイス研究，霊長類を用いた脳研究の今後の展開という2つのテーマについて，「脳内情報抽出表現研究」（BMIの計測，デコーディング，外部機器制御技術），「霊長類脳基盤研究開発」（遺伝子導入技術とマーマセットの生殖工学技術）の最新動向の講

演及び討論を行った。また，後半では，若手ニューロサイエンスプログラムモデル講義を行い，このようなコースを継続して行っている意義が広く認められた。

＜多次元共同脳科学推進センターシンポジウム＞

平成20年12月6日に，多次元共同脳科学推進センターシンポジウム「総合的に脳科学を理解する人材育成に向けて」を開催し，若手研究者に対する分子から細胞，組織，個体にわたる脳科学のモデル講義を行った（参加者156名）。脳科学を含めた多様な生命科学を専門とする参加者に加え，工学や人文社会科学を専門とする参加者が半数近くを占め，また，企業の研究者も多数参加し，このような脳科学レクチャーに対して多様な専門分野から要求があることが再確認された。

＜多次元共同脳科学推進センターブレインストーミング＞

若手研究者を中心に，神経機能分子と神経発生，神経回路，神経システム，融合領域，神経疾患の病態といった視点から今後の脳科学の方向性について話題提供をしていただき，それをもとに脳研究分野において将来取り組むべき重要な研究テーマについて議論を行った。

脳機能計測・支援センター

形態情報解析室

【概要】

形態情報解析室は、形態に関連する超高圧電子顕微鏡室（別棟）と組織培養標本室（本棟2F）から構成される。

超高圧電子顕微鏡室では、医学生物学用超高圧電子顕微鏡（H-1250M型；常用1,000kV）を、昭和57年3月に導入して同年11月よりこれを用いての共同利用実験が開始されている。平成20年度は共同利用実験計画が27年目に入った。本研究所の超高圧電顕の特徴を生かした応用研究の公募に対して全国から応募があり、平成20年度は最終的に13課題が採択され、実施された。このうち5件は、国外の研究者による研究あるいは国外の研究者が関係するものである。これらは、厚い生物試料の立体観察と三次元解析、薄い試料の高分解能観察等である。共同利用実験の成果は、超高圧電子顕微鏡共同利用実験報告の章に詳述されている。超高圧電子顕微鏡室では、上記の共同利用実験計画を援助するとともに、これらの課題を支える各種装置の維持管理及び開発、医学

生物学用超高圧電子顕微鏡に関連する各種基礎データの集積および電子顕微鏡画像処理解析法の開発に取り組んでいる。電子線トモグラフィーによる手法には、コロラド大で開発されたIMODプログラムでの方法などを用いて解析を進めている。

本年度の超高圧電顕の利用状況の内訳は、共同利用実験等131日、修理調整等60日である（技術課脳機能計測・支援センター形態情報解析室報告参照）。電顕フィルム等使用枚数は7,064枚、フィラメン点灯時間は409時間であった。平成20年度は、装置は72%の稼働率で利用され、試料位置で 10^{-6} Pa台の高い真空度のもとに、各部の劣化に伴う修理改造を伴いながらも高い解像度を保って安定に運転されている。

組織培養標本室では、通常用およびP2用の培養細胞専用の培養機器と、各種の光学顕微鏡標本の作製および観察用機器の整備に勤めている。

小腸絨毛上皮下線維芽細胞におけるサブスタンスP受容体の局在

古家園子

小腸絨毛上皮下線維芽細胞はアクチンに富んだ星状の細胞で細胞突起間がギャップ結合でつながった細胞網を形成している。上皮、毛細血管、神経、平滑筋や免疫細胞と隣接し、機械的刺激に応答してATPを放出し、絨毛上皮下において情報伝達とその制御を担っている。培養した上皮下線維芽細胞はATPやエンドセリンだけでなく、サブスタンスPにも反応して細胞内 Ca^{2+} 濃度が上

昇するが、生体内においてサブスタンスPに反応するのか、受容体（NK1）が局在するかなど、明らかになっていなかった。光顕及び電顕免疫組織化学にて、NK1受容体は小腸絨毛の上皮下線維芽細胞に局在し、陰窩の上皮下線維芽細胞や大腸陰窩の上皮下線維芽細胞には局在しないこと、細胞突起にNK1受容体が多いことが明らかになった。

超高圧電子顕微鏡トモグラフィー2軸解析について

有井達夫，濱 清

電子線トモグラフィー手法に関しては、現在は、米国コロラド大で開発されたIMODプログラムでの方法を用

いて解析を進めている。ゴルジ染色したラット脳におけるアストロサイトのデータ（J. Neurocytol. 33, 277-285

(2004) ; 2 軸傾斜した一連の傾斜像) を IMOD プログラムにより、2 軸トモグラフィー解析することができてい

る。今後、解析精度との関連での研究成果が期待される。

生体機能情報解析室

【概要】

随意運動や意志・判断などの高次機能を司る神経機構の研究が進められた。サルを検査対象として大脳皮質慢

性埋込電極を利用し、大脳皮質フィールド電位の記録解析を行っている。

注意に関係する脳活動の研究

達本 徹

「注意」の神経機序を解明する目的で陽電子断層撮影法を用い、前頭前野・前帯状野・海馬の脳血流量が想定される意欲の変化と一致した変動を示すことを明らかにした。大脳辺縁系と前頭前野の「意欲」への関与を示唆する知見である。さらに一歩進めて、この脳領域でどのような神経活動が行われているのかを解明するために、運動課題を行うサルの大脳皮質フィールド電位を記録した。その結果、前帯状野 32 野と前頭前野 9 野のシータ波活動が「注意」や「意欲」などの executive attention に相関し

ていると解釈可能な知見を得た。両部位のシータ波は高いコヒーレンスを示し、これらの部位が機能的に一体となって活動していることを示唆する。この活動はヒトの脳波で観察される Frontal midline theta rhythms に相当すると考えられる。埋め込み電極による高い空間分解能を活かして、現在、32 野と 9 野の間の情報の流れについて解析を行うとともに、さらに別の課題での記録を試みている。

多光子顕微鏡室

【概要】

多光子顕微鏡室は旧脳機能計測センター・生体情報解析室から、ネットワーク管理室と分離し、専任の独立准教授 1 名（根本知己）、技術職員 1 名（前橋寛）からなる部門として改組された。多種多様な由来を持つ光学顕微鏡関連機器を統一的に管理し効率的な運用を図る共に、研究所の内外への技術協力を行っている（技術相談、見学等 20 件以上）。

多光子顕微鏡は、低侵襲性で生体および組織深部の微細構造および機能を観察する装置であり、近年国内外で急速に導入が進んでいるが、安定的な運用を行うためには高度技術が必要であるため、共同利用可能な研究機関は本室が国内唯一である。またこの学際的な新手法を普及させるため、研究所枠を越えた勉強会、セミナー等を

定期的実施した。根本准教授のグループでは (1) 非線形光学や光化学を活用した新しいバイオ分子イメージング手法の開発、(2) 小胞輸送、開口放出・分泌現象などの分子細胞生物学的基盤とその生理機能の研究を中心に研究を推進している。以下、主な研究項目について述べる。計画共同研究 3 件については別項に記載した。

・ in vivo イメージング手法の展開

レーザー光学系の独自の改良により、生体脳において深さ約 1mm の構造を 1 μ m 以下の解像度で観察できる性能を実現した。生体内神経細胞の Ca²⁺動態イメージング技術の確立および長時間連続イメージングのための生体固定器具の開発を行うとともに、同一個体・同一微細構造の長期間繰り返し観察技術の確立を行った。

・生体肝代謝活性の in vivo 測定法の開発

企業との共同研究により、新たに 2 光子 in vivo FRAP 法の開発に成功し、麻酔下のマウス生体肝細胞における代謝活性を非侵襲的に定量することを可能とした。

・身体左右差獲得の Ca^{2+} イメージング

バイオ分子センサープロジェクトにより、基礎生物学研究所野中茂紀准教授と実施した。哺乳動物の身体の左右非対称性はノード流の一方向性に由来するが、その細胞生理学的な分子機構は不明である。そこで、マウス初期胚の Ca^{2+} イメージングからその分子機構を検討し、非対称な Ca^{2+} 振動の存在が明らかになった。

・膵臓外分泌腺の開口放出における水チャネルの生理機能

東京医科歯科大腎臓内科グループの作成した AQP12 ノックアウトマウスを用いて、水チャネルの開口放出における生理的な役割について Ca^{2+} 依存性開口放出の可視化解析による検討を行った結果、急性膵炎発症の初期過程と強く関係することが明らかになった（科学研究費

特定領域研究）。

・マイクロチップレーザーによる多光子励起過程の検証

機構内連携「レーザーバイオロジー」プロジェクトにより、分子科学研究所平等拓範准教授グループの開発した超小型高出力の近赤外ピコ秒パルスレーザーの生体イメージングへの応用を検証するため、蛍光タンパク質等の多光子励起過程による活性化を試みた。

・ベクトルレーザービームによる超解像イメージング法の開発

新しい光ベクトルレーザー光を用いて、古典的な光の回折限界を打ち破る蛍光ナノイメージング法の開発に着手した (JST, CREST)。

その他、グルコース輸送体の小胞輸送による生理機能制御、ノックアウト動物による SNARE 分子複合体の機能、新規多光子顕微鏡システムの開発などについても着手した。

動物実験センター

【概要】

1. 全般

平成 19 年 2 月 23 日に機関内規程「大学共同利用機関法人自然科学研究機構動物実験規程」が制定され、2 年目の動物実験が実施された。平成 20 年度の動物実験センターにおける目標として、当初は明大寺地区地下 SPF 化および明大寺地区新館のクリーン化の二つを掲げ、機関内規程に則った動物実験ができる施設となることを目指した。しかし、実際には明大寺地区地下 SPF 化、明大寺地区本館・新館施設の清浄化、病原体の定期的モニタリング実施、霊長類遺伝子導入実験室の設置、水生動物室の改修、施設の老朽化対策など諸問題が次々に現れ、これらの対応に多くの時間と労力が向けられた。職員の変更や増員が功を奏し、概ね、適切な対応が果たせたと判断しているが、次年度に引き継ぐ事項もある。

研究開発業務も軌道に乗りつつあり、皮膚科学および形成外科学領域を中心とした病態モデルの作出、モルモットを用いた妊娠中毒症の研究、伴侶動物の肥満症の病態研究、実験動物飼育管理技術の開発などを進めている。技術職員も各技術課題に取り組める体制をとることができた。

また、当センターで長年維持続けてきた Hirschsprung disease のモデルラット 2 系統 (AR-*Ednrb*^{Sl}/Okkm[cc], LE-AR-*Ednrb*^{Sl}/Okkm) を The Institute for Laboratory Animal Research (ILAR) に登録し、ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」に寄託完了した。有用な動物資源を残すことができ、今後多くの方々に活用していただくことを期待する。さらに、ホームページを大幅に改め、利用者にとって役立つものとした。定期モニタリングの状況や講習会の内容、センターからの情報提供、さらには霊長類の取扱い方法に関する DVD の配信などを行った。

2. 明大寺地区地下 SPF 化

昨年度、明大寺地区地下 SPF 化計画が完了した。山手地区 SPF 施設とは異なり、個別換気ケージシステムによる SPF 施設と実験室を併せ持つ新しいタイプの動物実験設備である。試験稼働の矢先、明大寺地区に感染症 (Mouse hepatitis virus, *Mycoplasma pulmonis*, *Bordetella bronchiseptica*) が存在することが判明し、SPF 化業務を一

時停止せざるを得なくなった。この間、SPF 施設の整備さらにケージの充当を図り、来るべきオープンを目指し準備を進めた。ケージの自動洗浄・サーマル殺菌装置を期待していたが導入が難しく、現有のラック 4 基の範囲で稼働実績を積み上げる方向を選択した。2009 年度に本格稼働する予定で最終準備を進めている（なお、2009 年 6 月より稼働している）。

3. 明大寺地区本館・新館施設の清浄化

明大寺地区の普通環境施設における病原微生物・寄生虫の清浄化を目的として、新館 3 階クリーン化に着手した。ところが、施設の汚染状況を調査したところ、Mouse hepatitis virus, *Mycoplasma pulmonis*, *Bordetella bronchiseptica* の感染が本館と新館で見つかった。過去の記録を調べると、これらの病原体が 2002 年には侵入していたことがわかり、恐らく 10 年近く以前、施設に定着していたものと推測された。急遽、事故対策委員会を開き、病原微生物の撲滅を図った。感染状況を再度チェックするとともに、感染飼養保管施設の消毒および封じ込め対策を実施した。人・物品・実験動物については動線を定め、病原体の拡散防止に努めた。第一期・二期に分けて、消毒作業を行ったが、感染の広がりはなく、2008 年 12 月末をもって終息を見た。一部、汚染が疑われた研究部門内の飼養保管施設も消毒が完全になされた。今後 1 年間、注意深く定期的モニタリングを行う予定である。1 年間の検査結果が陰性であることが証明できた時点で、完全撲滅宣言としたい。

センター清浄化事業に約 1 年間の期間を費やしたが、明大寺地区の清浄度は、普通動物施設でありながら、“国動協の示す SPF レベル (minimum status) + 蟻虫・一部消化管原虫フリー”をクリアした。国動協のいうところの 카테고리 A, B の病原体を排除することを想定したが、他大学の SPF 施設と同等の清浄レベルに達することができた。生理学研究所および基礎生物学研究所の皆様のご協力に対して、深く感謝申し上げる次第です。今後、この清浄度レベルを維持して、前述の病原体に関して完全撲滅としたい。

4. 病原体の定期的モニタリング

かねてより、山手地区 SPF 施設では定期的に病原体の

検査を行い、SPF 環境維持の確認を続けている。上述の明大寺地区地下 SPF 化および明大寺地区本館・新館の清浄化に伴い、各研究部門内で飼養保管している実験動物についても、病原体の定期的モニタリングを開始した。2008 年 7 月より、動物実験センター本館・新館、明大寺地区（生理学研究所および基礎生物学研究所）および山手地区研究部門の 3 エリアに分けてモニタリングを順番に進めている。3 か月毎の検査であるが、現時点で問題となる病原体は検出されていない。この業務の担当者も 1 名置き、円滑に仕事を進める手続きをとった。

当研究機構では、実験動物を飼養保管しているすべての施設で定期的モニタリングを行うこととなり、感染症侵入を未然に防げるのではないかと期待している。また、昨年度より搬入・搬出した実験動物の traceability もとれるようになり、両手段で環境の清浄化維持に努力したい。

5. 霊長類遺伝子導入実験室

「脳科学研究戦略推進プログラム・独創性の高いモデル動物の開発」の遂行にあたり、霊長類遺伝子導入実験室を動物実験センター内に設置する必要性が生じた。2008 年 3 月から検討に入り、当初新館 4 階や 3 階、はたまた 2 階など、いくつもの候補地が精査された。しかし、実験室の容積が足りず、感染症の検出やマウス・ラットを研究に用いている利用者の問題もあり、場所の選定に苦慮した。最終的に、本館 1 階の動物検収室を主体とする 112, 113, 114, 115-A, 115-B および 115-C から成る 6 室を導入実験室に供することとした。

このため、動物実験センターの機能を他室に移動することとなった。受理室の新設、本館屋上イヌ運動場の改装・倉庫の設置、本館 2 階 215, 216 室の改修、マウス・ラット一時飼養保管施設の設置および MRI 用サル一時飼養保管施設の設置が必要となった。今のところ、胚操作関係の仕事や物品の搬入に不都合が生じている。2008 年度内に受理室を設置することができず、外気がそのまま侵入する危険にも曝されている。また、霊長類遺伝子導入実験室より出される廃棄物および死体の処理についても結論に達していない状況にある。

6. 水生動物室の改修

基礎生物学研究所の耐震補強工事に関連して、水生動

物室の改修工事を行った。従来は大型水槽やイカの円形水槽を主体とした大型魚類用の施設であったが、今次の改修により、メダカ、ゼブラフィッシュの小型魚類およびアフリカツメガエルなどの両生類の飼養保管に耐える施設に移行した。水槽や飼育形態を改め、さらに遺伝子組換え生物の拡散防止措置も講じた施設とした。排水は二重のトラップを施し塩素を注入して、使用した水は消毒し、さらに漏れ出た稚魚や卵は殺滅処理を行う。今後、魚類および両生類が実験動物として取り扱われることを考慮した改修工事となった。

この反面、いくつか予期せぬ問題が生じてきた。水生動物の搬入について報告がなくなり、現在いる水生動物がいつどのような経路で搬入されたのかわからない状況である。また、従来水槽とは飼育形態が異なるため、利用者に対する徴収金が集めにくくなってしまった。当面は、利用者の占有面積あたりで飼養保管費を負担していただく方向で進める。

7. 施設の老朽化

動物実験センターの開設後、約 30 年が経過して、明大寺地区施設の老朽化がかなり目立ち始めている。空調機器のトラブル、ボイラーの不具合およびエレベーター・ダムウェーターの障害などが大きな問題である。前任の専任教官から引き継いでから、これらの手直しを図り、機器の延命に努めている。また、人命にかかわる事故などは起こさないように定期点検等をお願いし、小さな修理を繰り返している。空調関係機器の能力がかなり低下し、冬期・夏期において温度・湿度の制御に苦慮している。冷温水をバイパスに繋ぐ等の緊急処置で回避を試み、漸くその場をしのいでいる状況である。実験動物施設として、必要最低限の環境が保持できないことは許されないことではあるが、マスタープラン等の大型設備予算に改善事項を計上し、一つ一つ問題解決を図りたい。その一歩として、エレベーターおよびダムウェーターについては、来年度更新を予定している。特に、ダムウェーターは人が乗り降り可能な小型エレベーターに改修し、動線等も変更して快適な動物実験施設に改善を図る予定である。安全快適な利用しやすい動物実験センターに近づける所存である。

計算科学研究センター

【概要】

様々な機能性生体様物質の創生を目指している。なかでも核酸の塩基対構造に注目し、4種類の天然塩基を区別することなく塩基対を形成する動的構造変化型ユニバーサル塩基とそれをオリゴヌクレオチドに導入したユニバーサル核酸、高い塩基認識能と塩基対形成能および様々な機能を有する人工核酸塩基、核酸中の全塩基を塩基選択的に標識する手法を開発している。それら人工の

核酸塩基を利用して、塩基対構造を深く理解するとともに、電子顕微鏡をはじめとする各種計測装置を利用した一分子核酸配列解析技術への応用についても研究を進めている。人工核酸塩基と反応剤の設計・評価に計算科学研究センターに設置された大型計算機とプログラムライブラリーを利用する。

ユニバーサル核酸の創生

片岡正典

報告者の開発した、相対する塩基に呼応して動的に構造変化して天然型核酸塩基4種すべてと塩基対を形成する動的構造変化型ユニバーサル塩基をペプチド核酸型のオリゴヌクレオチドへの導入に成功した。天然のオリゴヌクレオチドとの会合体形成について吸収スペクトル

で調査したところ、如何なる配列であっても安定な複合体を形成することが明らかとなった。核酸配列を全く認識せず、核酸に対して特異的に複合体を形成する人工核酸の例はなく、その波及効果は計り知れない。

全塩基修飾型核酸標識－塩基置換法

片岡正典，永山國昭

核酸中の同種の塩基全てを化学的に標識する手法を開発した。本法は塩基選択的に塩基を分解、遊離させてリボースを生成させる第一段階とリボースに対して標識剤を導入する第二段階からなり、一度の操作で核酸中の同種の塩基全てを標識できる。本法は塩基選択的の反応を組み合わせ、標識を4度繰り返すことで塩基ごとに異なる標識を施すことも可能である。また、標識剤は1級ある

いは2級のアミノ基を有している標識剤を導入できるため、目的に応じて標識剤を自由に選択できる特長も有している。実際に本法を用いて11個の金からなる金属クラスターによってオリゴヌクレオチドの多点標識に成功しており、透過型電子顕微鏡を用いた配列解析技術など様々な応用が期待される。

全塩基修飾型核酸標識－塩基拡張法

片岡正典，永山國昭

塩基置換法とは異なる、核酸中の同種の塩基全てを化学的に標識する手法を開発した。置換法に比して装置の

要求度は高いものの安価・簡便な操作で標識を完了し、顕微鏡などの一分子観察技術を用いて4種の塩基を識別

可能とする。本法は塩基を構成するヘテロ環を増環する修飾反応に基づいており、塩基選択的であることから様々なパターンで各塩基を標識できる多様性も有する。また、解離剤を用いなくとも直接二重鎖 DNA を標識反

応に供することができ、標識後は自動的に一本鎖に解離する。本法は塩基置換法と同様に核酸中の同種の塩基全てを標識できる、これまでに類を見ない標識法である。

技術課

大庭明生，大河原浩

【概要】

今年度、研究所組織は多次元共同脳科学推進センターの新設、脳機能計測・支援センターと情報処理・発信センターの設置による既存施設の大きな再編が行われた。脳機能計測センター生体情報解析室の2光子顕微鏡イメージング研究とコンピューター・ネットワーク管理はそれぞれ、脳機能計測・支援センター多光子顕微鏡室と情報処理・発信センターネットワーク管理室に改編改称された。また、生理研・基生研共通施設の電子顕微鏡室および機器研究試作室は脳機能計測・支援センター、さらに広報展開推進室および点検連携資料室は情報処理・発信センターに再編された。これを機会に課も、従来の研究部門の研究状況や本人の専門を越えて、研究所の今後の研究方針や重点課題に対応した、また課員に業務の新たな自己適正の発掘と資質向上を図らせ、新しい技術課題に挑戦させる観点から、課員13名の所内異動を行い、研究支援体制の活性化を進めた。異動部署は次のとおりである。市川修班長 行動様式解析室、加藤勝己係長 形態情報解析室、小原正裕係長 生体システム部門、前橋寛係長 多光子顕微鏡室、伊藤昭光係長 動物実験センター、伊藤嘉邦係長 心理生理学部門、山口登係長 大脳神経回路論部門、戸川森雄主任 認知行動発達部門、佐治俊幸主任 機器研究試作室、森将浩係員 神経分化部門、高木正浩係員 感覚認知情報部門、小池崇子係員 分子神経生理研究部門、山田元係員 電子顕微鏡室。また、課長の選考方法と課長補佐制の導入について検討され、「技術課長および課長補佐に関する申合わせ」が作成された。申合わせに従い、技術課長候補者推薦委員会が立ち上げられた。

課の研究活動への寄与と貢献を一層進めるため下記の事業を実施した。

①生理科学実験技術トレーニングコースでの技術指導

生理学研究所が毎年主催し、実施している生理科学実験技術トレーニングコースで、『生理学実験のための電気回路・機械工作・プログラミング』をテーマに、『PICマイコンによる温度コントローラーとバスチェンバーの作製』と『C言語によるPICプログラミング』の2コースを担当し、7名の若手研究者の技術指導を行った。

②生理学技術研究会の開催

全国の大学等技術職員の技術連携と交流を目的に第31回を、基礎生物学研究所・技術課と合同で開催した（平成21年2月19日－20日）。会では、口演発表が23題、ポスター発表が45題あり、研修講演として『細胞内の情報伝達メカニズムの解明へ向けて生細胞イメージングとプロテオミクスを用いた解析』（深田 正紀，生理学研究所 生体膜研究部門教授），特別講演として『大学共同利用機関・技術課はどこへ行くのか』（大庭 明生，生理学研究所技術課）を行った。これらの報告は『生理学技術研究会報告（第31号）』にまとめた。

③奨励研究採択課題技術シンポジウムの開催

時代要請に対応した技術認識と向上に立った技術職員の業務の社会的開示を推進するために奨励研究採択者による第5回の報告会（平成21年2月20日）を12演題で行った。この報告は『生理学技術研究会報告（第31号）』にまとめた。

④自然科学研究機構技術研究会の参加

自然科学研究機構技術職員の業務の紹介と技術連携を目的に、第3回を核融合科学研究所で開催した（平成20年7月24－25日）。会では22演題の発表があり、詳細は『第3回自然科学研究機構技術研究会集録』としてまとめた。

⑤東海北陸地区技術職員研修の開催

東海北陸地区における大学等の技術職員の技術交流と向上を目的に毎年当番校により行われている技術研修で、平成20年度は自然科学研究機構岡崎3機関が担当し、物理・化学コースを開催した（平成20年9月2日（火）－4日（木））。全体で15名の参加者があり、講義「大学共同利用機関と技術課」と実習「炭素薄膜の製作、加工、観察」を担当した。課の実習コースに1名を受け入れ、生物系の電子顕微鏡観察で一般的に用いられる炭素薄膜を製作し、薄膜のFIB装置加工、透過電子顕微鏡を使った簡易的な炭素薄膜の厚み計測、膜面の観察などの実習を行った。

⑥研修会等の受講と参加

高エネルギー加速器研究機構技術職員シンポジウム（高エネルギー加速器研究機構，1名），京都大学・大阪大学・神戸大学連携シンポジウム（大阪大学，4名），天

文学に関する技術シンポジウム(国立天文台松本, 2名), 国際規制物質の使用に関する申請等の講習会(大阪, 1名), 国立大学法人動物実験施設協議会(沖縄, 1名), サル取扱い事前講習会(東京, 1名), 日本神経科学大会(東京, 1名), 超高压連携ステーション国際ワークショップ(東京, 1名), 日本分光学会(東北大学, 1名), 電子顕微鏡の使用法に関する講習課(東京, 1名), ライフサイエンス分野の特許セミナー(名古屋大学, 2名), 予防衛生協会シンポジウム(東京, 2名), 秋田大学総合技術部研修(秋田大学, 1名), 総合技術研究会(京都大学, 1名)に参加し, 業務の研究支援力の強化を図った。

⑦放送大学利用による専門技術研修の受講

研究の高度化と多様化の進むなかで技術職員の研修は重要な課題である。今回研修科目として(1)脳科学の進歩(2名), (2)人体の構造と機能(2名), (3)初歩からの生物学(2名), (4)物質・材料工学と社会(1名), (5)光と電磁場(1名), (6)社会技術概論(1名), (7)実験科学とその方法(1名)を選び, 10名が受講した。

⑧科学研究費補助金(奨励研究)の採択

業務を展開, 推進していくための問題意識の養成, その解決のための計画および方法の企画能力の養成, さらにその表現力と説明力の養成を通じて, 業務上の技術力の総合的な向上を図ることを目的に標記の申請を行い, 下記の4課題の採択を得た。

- (1) 齊藤久美子: 細胞内脂肪代謝産物アシル CoA の測定法の開発
- (2) 吉友美樹: 2光子 in vivo イメージングへの応用を指向した骨細胞染色法の開発
- (3) 福田直美: 温度制御チャンバーの作製 - アフリカツメガエル卵母細胞の膜電流測定用
- (4) 石原博美: 神経トレーサを用いたマウスにおける

施設の運営状況

①統合生理研究系

(1)生体磁気計測装置室

【概要】

2008年度における生体磁気計測装置の稼働率を下表に示す。本装置における研究成果については, 統合生理

大脳基底核からの出力経路の解析

⑨業務のデータベース化事業の促進と表彰制度の整備

課員の出向先研究部門での業務成果は, 課内での業務報告会による共有化, 技術課主催の生理学技術研究会, 出向先部門での学会発表により所外に発信されているが, より広く活用され, 即時的に発信するために, 優れた業務成果をデータベース化する事業を技術課が研究部門と進め, その一部をすでに技術課ホームページで試験運用しているが, 今年度から, その編集を技術班長による専任とし, その更新を進めた。こうした事業の推進のなかで, 優れたデータベースには生理学実験技術データベース賞として表彰授与を所長より行った。こうした事業の推進により, 研究者との連携を深め, 業務の活性化を進めた。

⑩安全衛生技能講習等の受講と参加

研究所の安全衛生を課業務として充実するために, 第1種衛生管理者講習(名古屋, 1名), エックス線作業主任者技能講習(名古屋, 1名), 高压ガス製造保安責任者講習(名古屋, 1名), 防火管理者講習(岡崎, 2名), 職場巡視セミナー(名古屋, 2名)を受講した。

⑪岡崎3機関技術課長会と機構技術会議の開催

岡崎3研究所の動向の意見交換を, 事務センターの総務課長, 施設課長を交え毎月1回開催している。また核融合科学研究所, 時に国立天文台も交え毎月1回の相互訪問による情報交換も行っている。

⑫職場体験の受け入れ

広報展開推進室の活動支援として, 岡崎中学校生徒(6中学校, 17名)の職場体験を受け入れ, 電子顕微鏡室, ネットワーク管理室, 機器研究試作室, 動物実験センター等の技術職員が指導した。

竹島康行

研究系感覚運動調節研究部門の研究活動報告に記載されている。

装置の整備内容については、ワークステーションのハードウェアの故障による障害への対応として、1) データサーバーのハードディスクおよび電源周辺の部品交換、2) 解析装置のハードディスクおよびメモリの交換などをおこなった。この復旧に要した時間は1～2日であり、事項1については計測と解析などの研究作業を中断して

おこなった。また、計測装置の障害発生の予防策として電源周辺の部品交換をおこなった。

視覚刺激装置の液晶プロジェクタの保守部品の供給が無くなるため、これに替わるプロジェクタの選定をおこない、従来の後継機種にあたるCHRISTIE社のMirage 3000を設置した。

2008年度 生体磁気計測装置稼働率

年 月	総日数	休日数	点検日数	総利用日数	稼働率(%)	共同利用日数			備考（点検の主な作業内容）
						所外	所内	合計	
2008年 04月	30	9	2	14	74	2	3	5	定期点検、解析装置障害対応
05月	31	11	1	16	84	3	2	5	解析装置障害対応
06月	30	9	0	21	100	1	2	3	
07月	31	9	4	18	100	6	5	11	定期点検、電源障害対応
08月	31	10	2	17	89	2	1	3	サーバー障害対応
09月	30	10	0	16	80	1	2	3	
10月	31	9	2	17	85	0	16	16	定期点検
11月	30	12	0	12	67	1	9	10	
12月	31	12	0	13	68	2	6	8	
2009年 01月	31	12	3	12	75	1	6	7	定期点検、プロジェクタ設置調査
02月	28	9	1	13	72	1	11	12	サーバー (RAID) 障害対応
03月	31	10	1	9	45	5	0	5	視覚刺激プロジェクタ納入調整

*総利用日数は、計測装置を使用した日数であり、解析装置の使用日数は含んでいない。

また、保守作業などの計測外使用も含まない。

*稼働率 = 利用日数 / (総日数 - (休日数 + 点検日数)) × 100

②脳機能計測センター

(1)形態情報解析室

加藤勝己

【超高压電子顕微鏡利用状況】

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

圧電子顕微鏡の改良・修理としては、フィルム送り用マイクロスイッチの交換、ファラディゲージのよごれが原因と思われるビームふらつき現象修正のための点検、分解、洗浄、調整作業、イオンポンプ交換、コンデンサー絞り交換などが行われた。

2008年度 超高压電顕月別稼働率

年 月	総日数	休日	調整日	使用可能日数	所内利用	所外利用	計	稼働率	備 考
2008年 4月	30	9	5	16	4	0	4	25%	
5月	31	11	5	15	11	0	11	73%	
6月	30	9	5	16	6	0	6	38%	
7月	31	9	4	18	6	5	11	61%	
8月	31	10	5	16	5	8	13	81%	修理 1日

年 月	総日数	休 日	調整日	使用可能 日数	所内利用	所外利用	計	稼働率	備 考
9 月	30	10	5	15	9	1	10	67%	
10 月	31	9	14	8	5	0	5	63%	修理 10 日
11 月	30	12	4	14	10	2	12	86%	
12 月	31	12	4	15	2	7	9	60%	
2009 年 1 月	31	12	4	15	5	10	15	100%	
2 月	28	9	0	19	1	18	19	100%	
3 月	31	10	5	16	1	15	16	100%	
計	365	122	60	183	65	66	131	72%	

フィラメント点灯時間 409 時間
使用フィルム枚数 7,064 枚

(2) 生体機能情報解析室

佐藤茂基

【概要】

平成 20 年度の主な装置利用および整備状況は次の通りである。

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

リアルタイム装置本体においては RF ユニットが 7 月に故障し修理を行った。1 月には傾斜磁場用冷却装置が

故障し、その修理を行った。リアルタイム装置の所外利用者は 3 グループあり、装置利用の有効性から日程を重ねて使用している。

平成 20 年度の fMRI 装置とリアルタイム装置利用実績を別表に記す。

【機器利用率】

平成 20 年度 fMRI 装置月別稼働率

年月	総日数	保守	稼働日	所内 利用	所外 利用	総計	左のうち 土日実施	稼働率	備考
2008 年 4 月	21	6	15	1	8	9	0	60%	冷凍機消耗品交換、 マグネット中心磁場調整
5 月	20	0	20	1	21	22	2	105%	
6 月	21	2	19	5	13	18	0	95%	H20 年度 第 1 回 定期保守 液体ヘリウム補給
7 月	22	0	22	2	17	19	1	84%	
8 月	21	0	21	5	14	19	0	90%	
9 月	20	1	19	3	15	18	2	89%	液体ヘリウム補給
10 月	22	2	20	6	13	19	0	95%	H20 年度 第 2 回 定期保守
11 月	18	2	16	11	4	15	3	84%	液体ヘリウム補給
12 月	19	0	19	11	10	21	6	95%	
2009 年 1 月	19	0	19	8	12	20	4	95%	
2 月	19	3	16	2	15	17	1	103%	H20 年度 第 3 回 定期保守 液体ヘリウム補給
3 月	21	0	21	2	20	22	1	102%	
年間	243	16	227	57	162	219	20	92%	
*土・日に実施された実験は 0.5 日分を平日に振り替えて計算。							土日祝 利用	所内	10 日
								所外	10 日

平成 20 年度リアルタイム装置月別稼働率

年月	総日数	保守	使用可能 日数	所内利用 日数	所外利用 日数	計	利用率	備考
2008 年 4 月	21	1	20	0	3	3	15%	
5 月	20	1	19	0	2	2	11%	
6 月	21	1	20	0	4	4	20%	
7 月	22	6	16	0	3	3	19%	RF ユニット故障
8 月	21	8	13	0	2	2	15%	RF ユニット交換修理
9 月	20	3	17	0	6	6	35%	計画停電
10 月	22	3	19	0	3	3	16%	計画停電
11 月	18	1	17	0	0	0	0%	
12 月	19	1	18	0	0	0	0%	
2009 年 1 月	19	8	11	0	0	0	0%	定期点検, 冷却器故障・修理
2 月	19	2	17	0	0	0	0%	
3 月	21	1	20	0	3	3	15%	
年間	243	36	207	0	26	26	13%	

*土・日に実施された実験は平日に振り替えて計算。

*同一日に利用者が複数あった場合でも、利用日数は 1 日とした。

(3) 多光子顕微鏡室

前橋 寛

【概要】

平成 20 年度から、生体情報解析室の 2 光子顕微鏡イメージンググループから、多光子顕微鏡室となり、専任の技術職員 1 名が電子顕微鏡室から多光子顕微鏡室へ配置換えとなった。共同研究（表 1 参照）および特定領域研究（生体膜トランスポートソームの分子構築と生理機能）、クレスト研究（研究課題：ベクトルビームの光科学とナノイメージング）が予定されるため、超短パルスレーザー（20 年度利用時間 約 1008 時間 利用率 51.8%）の保守契約が行われた。その他、ゼブラフィッシュ飼育

用水槽棚の作製、多光子顕微鏡室のコンピュータの調査と 1000baseT 化、ゼブラフィッシュ飼育のための動物実験飼養保管施設設置承認申請、多光子顕微鏡室（511 号室）の P1A 申請、光学顕微鏡に関する勉強会（週一回）、バイオイメージングの勉強会（月 1 回程度）参加、分子研ピコ秒レーザーによる色素および蛍光タンパクの 2 光子励起測光実験補助、ソニーとの共同実験の補助（パルス幅の測定、ヒータの加工、特殊レンズ接着）等が行われた。

表 1 平成 20 年度多光子顕微鏡室共同研究

所属	研究者名	課題名
ソニー（株）	岸本 拓哉	多光子励起過法を用いたイメージングによる肝臓・代謝機能の研究
関西医大	木梨 達雄, 片桐 晃子, 片貝 智哉, 戎野 幸彦	多光子励起過法を用いた in vivo イメージングによる免疫細胞動態の研究
東京医科歯科大	頼 建光, 太田 英里子	2 光子顕微鏡を用いた外分泌腺における開口放出・溶液輸送の分子機構と生理的機能に関する研究
九州大	兼松 隆	2 光子顕微鏡を用いた内分泌腺におけるホルモン分泌の分子機構と生理的機能に関する研究
北海道大	永井 健二, 竹本 研	魚類胚を用いた細胞死の分子メカニズムの解明

(4) 電子顕微鏡室 (生理研・基生研共通施設)

山田 元

【概要】

明大寺地区に設置されている JEM-1200EX の利用頻度がかなり下がった為、本機の保守契約を今季限りで解約することが決定した。これにより、保守契約により管理を行う電子顕微鏡は JEM-1010 のみとなる。

また、これまで、ナノ形態生理部門に貸与されていた JEM-1200EX が電子顕微鏡室に返還され、山手地区にて電子顕微鏡室が管理する電子顕微鏡は JEM-1010, JEM-1200EX の 2 台となった。

さらに、電子顕微鏡室においては電子顕微鏡写真のデジタル化が頻繁になった為、PC, スキャナー, インクジェットプリンターをもう 1 セットを導入し、デジタル化作業の効率化を図った。

他の機器に関しては、明大寺地区の走査型電子顕微鏡 S-800 に真空漏れ等の問題が発生したが、修理により現在は正常に稼働している。共焦点顕微鏡 LSM-510, 並びに臨界点乾燥器, イオンスパッター等の機器は快調に稼働している。

【研究内容一覧表】

本年度、電子顕微鏡室を利用した研究者は生理学研究所 23 人, 基礎生物学研究所 8 人, 機構外は 3 人の計 34 人であった。

下記に利用者の所属研究所, 研究部門, 研究内容の一覧を示す。

研究所, 大学	研究部門	研究内容
生理学研究所	脳形態解析	カルシウムチャンネルの分布の解明
		シナプス可塑性のメカニズムの解明
		視機性眼球運動学習に伴う神経回路網再構築の解析
		痛み記憶に関する amygdala 神経回路網の解析
		海馬シナプス可塑性の分子基盤の解析
		電位依存性カルシウムチャンネルの脳局在の解析
		外側膝状体神経回路網の解析
		小脳神経回路網のシナプス可塑性に伴う形態変化の解析
		脳の左右差についての電子顕微鏡レベルでの形態学的解析
		シナプス前イオンチャンネル型神経伝達物質受容体の局在解析
	ナノ形態生理	薄膜位相板の膜厚測定及び表面解析
		電子顕微鏡による膜蛋白質の立体構造解析
		蛋白質の電子顕微鏡観察
		蛋白質, 高分子の電子顕微鏡観察
		細胞切片の電子顕微鏡観察
		ナノカーボン上に担持したラベル化 DNA の観察
	生体膜	てんかん関連分子の局在解析
基礎生物学研究所	生物進化	シロイナズナの組織の観察
		Observation of plant nuclei
	植物発生遺伝学	葉の発生進化に関する研究
	分子細胞生物学	酵母細胞におけるオートファゴの形態観察及び関連蛋白質の局在解析のため
	生殖生物学	性ホルモンによる卵巣分化誘導の分子機構
		Molecule sex-differentiation of the gonads in medaka
琉球大学		魚類の生殖腺の性的可塑性の形態学的研究
大阪府立大学		DNA が形成する特殊構造の観察
藤田保健衛生大学		培養細胞の電子顕微鏡観察と位相差電子顕微鏡像との比較検討

(5) 機器研究試作室（生理研・基生研共通施設）

佐治俊幸

【概要】

機器研究試作室は多種多様な医学・生物学用実験機器の開発と改良，それに関わる技術指導，技術相談を室の役割とし，生理研・基生研の共通施設として運営されている。

新しい研究には新しい研究機器を作るという『ものづくり』が希薄になっている状況下，一方では，研究の多様化は室に新たな役割の模索が迫られている。そうした認識のもと、『ものづくり』能力の重要性の理解と機械工作ニーズの新たな発掘と展開を目指すために，2000年度から，医学・生物学の実験研究に使用される実験装置や器具を題材にして，機械工作の基礎的知識を実習主体で行う機械工作基礎講座を開講してきた。

本年も汎用工作機械の使用方法を主体に実習する初級コース（リキャップ台）と応用コース（簡易型一軸式マニピュレータ）の2コースを開講した。参加希望者は，2コース合わせ生理研6名，基生研18名で，初級コースは半日を1回，応用コースはガイダンスの後，マンツーマンで3回の講習を行った。

また，生理学研究所では，山手地区に移転した研究室のために，2005年4月に工作室を開設し，利用者のための安全及び利用講習会を，毎年機器研究試作室が依頼を受けて実施している。

なお，機器研究試作室の平成20年度の利用状況は，以下の通りである。

平成20年度 機器研究試作室 利用報告

機器研究試作室 部門別のべ利用状況

感覚認知情報	130 名	神経シグナル	7 名	NBR 事業推進室	2 名
認知行動発達機構	84 名	機能協関	6 名	神経機能素子	2 名
形態情報解析室	30 名	多光子顕微鏡	6 名	多次元共同脳科学推進センター	2 名
生体膜	28 名	動物実験センター	6 名	分子神経生理	2 名
大脳神経回路論	26 名	神経分化	5 名	機能協関（樞原）	1 名
ナノ形態生理	25 名	技術課	4 名	機能情報解析室	1 名
心理生理学	9 名	細胞生理	3 名	生体恒常機能発達機構	1 名
生体システム	8 名	細胞内代謝	3 名	生体情報解析室	1 名
行動様式解析室	7 名	脳形態解析	3 名		
時空間制御	11 名	形態形成	3 名	脳生物学	2 名
所長室付	9 名	高次細胞機構	3 名	RI 実験センター	1 名
ERATO 分化全能性進化	6 名	戦略室	3 名	分子細胞生物学	1 名
植物器官形成	5 名	人工気象室	2 名		
バイオリソース	4 名	統合神経生物学	2 名		

機器研究試作室利用人数表

月	生理研	基生研	その他	合計	延べ時間
4	22	1	0	23	23
5	41	4	0	45	70
6	39	10	0	49	67
7	38	12	0	50	114
8	43	3	0	46	84
9	34	4	0	38	47
10	58	1	0	59	96
11	23	4	0	27	52
12	33	2	0	35	33
1	22	0	0	22	25
2	26	9	0	35	43
3	26	4	0	30	47
合計	405	54	0	459	706

機器研究試作室利用機器表 (件数)

月	フライス盤	ボール盤	横切盤	コンタマシ	NCフライス盤	旋盤	ベルトグラインダ	切断機	その他	計
4	8	3	5	7	1	4	0	1	5	34
5	17	8	13	11	1	11	0	5	10	76
6	15	11	15	15	0	10	3	6	13	88
7	28	16	17	15	2	19	10	13	13	133
8	21	11	4	12	0	22	2	1	5	78
9	12	7	9	12	1	5	1	4	11	62
10	14	9	17	10	1	7	3	2	8	71
11	9	7	6	8	5	5	2	2	9	53
12	14	4	8	4	1	7	0	2	7	47
1	7	4	9	6	0	1	0	4	6	37
2	11	5	6	7	0	3	1	2	5	40
3	13	11	8	5	0	8	1	4	5	55
合計	169	96	117	112	12	102	23	46	97	774

③情報処理・発信センター

(1) ネットワーク管理室

吉村伸明, 村田安永

【概要】

年度初頭に生体情報解析室は二分され, 2 光子顕微鏡イメージンググループは多光子顕微鏡室となり, コンピューター・ネットワークグループはネットワーク管理室として情報処理・発信センターに移った。ここでは後者の報告を行う。

生理学研究所における当施設の利用形態は, 生体情報解析システム(後述), 情報サービス(e-mail, WWW等), プログラム開発及びメディア変換などに分類することができる。また, これらを円滑に運用していくためには,

所内 LAN の管理, 整備や情報セキュリティの維持も重要である。このような現状をふまえたうえで, 岡崎情報ネットワーク管理室とも連携しながら, 施設整備を進めている。

生体情報解析システムは, データ解析・可視化, 信号処理, 画像処理, 数式演算, 統計処理, 電子回路設計などの多くのネットワークライセンス用アプリケーションを備えている。ネットワーク認証により各部門施設の PC 上でこれらアプリケーションが供用できる。登録者

は 106 名で、研究推進のための積極的な利用がある。

生理学研究所のネットワーク利用状況は、メール登録者が 481 名。WWW 登録者が 69 名。LAN の端末数が 2,003 台。VPN サービスは 53 回/週、147 時間/週の利用

④ 岡崎共通研究施設

(1) 動物実験センター

【概要】

本年度は、明大寺地区陸生動物室の地下 SPF 飼育室の本運用に向けての準備を進めるとともに、一般飼育室及び実験研究棟飼育室・実験室等の病原微生物対策とクリーン化を推し進めた。また、霊長類遺伝子導入実験施設の立ち上げに伴い、明大寺地区の小動物検疫室が使用できなくなったため、マウス検疫室の移設、一般飼育室の改修、イヌ運動場の改修等を行った。次年度には更に、小動物受理室、緊急時用一時飼育室の設置も計画している。

明大寺地区・一般飼育室のクリーン化をはかるために、昨年行われた一斉微生物モニタリングで、病原微生物 (MHV, *Mycoplasma pulmonis*, *Bordetella bronchiseptica*) が検出された。感染症対策委員会の決定により一般飼育室は Minimum requirement カテゴリー A, B の病原性微生物がいない環境を目指すことになり、汚染のあった 6 飼育室について、飼育室および動物のクリーンアップを行った。クリーンアップ後は、一般飼育室でも 3 ヶ月に 1 度の微生物モニタリングを義務づけた。

実験動物の授受に関し、年間でのべ 73 件の導入と 71 件の供与があった。平均すると毎週 3 件の授受が行われており、それに伴う条件や書類の確認、ユーザーへのアドバイスに費やされる時間が増大している。

尚、本年度には大きな人事異動があり、2 名の技術職員が移動し、1 名が補充されることとなった。SPF 飼育室の本運用や微生物モニタリングなど、センター業務が広がりを見せる中、技術職員の負担が増す傾向にあるため、人の配置や業務の見直しなどの必要性を感じている。

【受精卵凍結・クリーンアップ事業】

実施件数としては、明大寺および山手とも合わせて受精卵凍結保存がのべ 41 件、クリーンアップ兼受精卵凍結保存 18 件、過去に当センターで受精卵凍結した系統

があった。

所外からのメール受信数は 15,000 通/週。所外へのメール発信数は 13,000 通/週。WWW は 4,500 台/週の端末から 86,000 ページ/週の閲覧があった。

伊藤昭光，廣江 猛，窪田美津子

の融解・移植の依頼 5 件を行った。

また病原微生物汚染のクリーンアップを行い、クリーンアップ兼受精卵凍結保存 6 件、融解・移植 6 件、受精卵凍結保存 1 件を行った。

【明大寺地区 陸生動物室】

平成 20 年度の飼育室利用部門数は、19 部門（生理研 12 部門、基生研 5 部門、統合バイオサイエンスセンター 1 部門、共通研究施設 1 部門）であった。動物飼育数は、一般飼育室のクリーンアップに伴い、マウス、ラットで減少した。

一般飼育室にカテゴリー A, B の病原微生物がいない飼育環境を目指し、入退室方法の変更、動線の明確化、着衣の徹底などを行った。また病原微生物に汚染された飼育室の清掃消毒は外部業者に委託し、マウスのクリーンアップは当センターで行い、ラットは、NBR 事業に委託することにより、飼育室および動物のクリーンアップを完了した。平成 20 年 7 月以降、一般飼育室において、3 ヶ月に 1 度の微生物モニタリングを行っているが、カテゴリー A, B に該当する異常は検出されなかった。

【山手地区 動物実験センター分室】

平成 20 年度の飼育室利用部門数は、13 部門（生理研 5 部門、基生研 1 部門、統合バイオサイエンスセンター 6 部門、共通研究施設 1 部門）であった。

利用者講習会を毎月開催するとともに、陸生動物利用者には実務講習会を実施している。各受講者はそれぞれ 40 名、31 名であった。

統合バイオサイエンスセンター教授転出のため、SPF 飼育室 1 部屋の使用が終了したので、ホルマリン燻蒸を行い部屋のクリーニングを行った。

全 SPF 飼育室およびマウス一時保管室 1、マウス・ラット一時保管室 2 の病原微生物モニタリングが、3 ヶ月に 1 回のペースで実施され、異常は検出されなかった。

【明大寺及び山手地区 水生動物室】

平成 20 年度の明大寺地区は、基礎生物学研究所の耐震補強工事に伴う水生動物室の改修工事が行われたため、特に利用の集計は行っていない。耐震補強工事の終了後、飼育水槽等の設置や部門の利用が進んでいるが、センターとしての施設運用は、平成 21 年 4 月からを予定している。

平成 20 年度の山手地区の利用状況は、統合バイオサイエンスセンター 4 部門で、基礎生物学研究所の耐震補強工事に伴う水生動物室の改修工事のため、基生研の 1 部門が水槽を利用している。

8 月に、塩素除去装置の配管が破損し、一時淡水を供給できなくなった。

陸生動物 部門別・動物種別搬入数（平成 20 年度）

部門 \ 動物種	明大寺地区			山手地区	
	マウス	ラット	サル	マウス	ラット
神経機能素子	21				
生体膜		2		791	112
機能協関	188	45			
機能協関（椋原）		5			
分子神経生理	158			1,131	2
神経シグナル				2,560	25
感覚認知情報			5		
生体システム	63		5		
認知行動発達機構	124	43	6		
脳形態解析				1,101	536
大脳神経回路論					163
形態情報解析室		17			
多光子顕微鏡室	73	4			
生殖内分泌系	932	6			
生体恒常機能	585	162			
行動様式解析室	16				
動物実験センター	219			275	
機器研究試作室	1				
形態形成	10				
統合神経生物学	80			133	
脳生物学	226	36			
細胞社会学	177				
時空間制御	63	75			
分子発生	100			533	
神経分化				217	
ナノ形態生理		59			44
分子環境生物学				161	
細胞生理				3,041	2
遺伝子改変動物作製室				549	514
生体分子情報	2				
合 計	3,038	454	16	10,492	1,398