

研究会報告

〔 目 次 〕

1. イオンチャネル・トランスポーターと心血管機能：学際的取り組みによる新戦略 (代表者：古川哲史 2008年11月19日－11月20日)	213
2. 細胞機能を制御するシグナリング機構の普遍性と特異性 (代表者：久野みゆき 2008年10月2日－10月3日)	223
3. 膜機能分子ダイナミクスの分子機構解明に向けて (代表者：老木成稔 2008年9月4日－9月5日)	232
4. 糖鎖機能研究会・・・分子レベルでの解明を目指して (代表者：辻 崇一 2008年5月22日－5月23日)	240
5. 神経系の発生・分化・再生に関する研究の新展開 (代表者：宮田卓樹 2009年3月12日－3月13日)	251
6. 日本における脳科学研究および教育の現状と将来に関する検討会 (代表者：川人光男 2008年4月16日－4月18日)	261
7. シナプス可塑性の分子的基盤 (代表者：大塚稔久 2008年6月5日－6月6日)	265
8. 細胞死研究の多面的、包括的理解に向けて (代表者：清水重臣 2009年3月17日－3月18日)	271
9. 視知覚研究の融合を目指して－生理、心理物理、計算論 (代表者：西田眞也 2008年6月12日－6月13日)	281
10. 理論と実験の融合による神経回路機能の統合的理解 (2) (代表者：深井朋樹 2008年12月4日－12月5日)	288
11. 大脳皮質－大脳基底核連関と前頭葉機能 (第二回) (代表者：宮地重弘 2008年12月15日－12月16日)	294
12. シナプス成熟と可塑性のダイナミクス (代表者：渡部文子 2008年12月4日－12月5日)	302
13. 感覚刺激・薬物による快・不快情動生成機構とその破綻 (代表者：南 雅文 2008年11月27日－11月28日)	309
14. 大脳皮質機能単位の神経機構 (代表者：金子武嗣 2008年11月27日－11月28日)	320
15. 第2回 Motor Control 研究会 (代表者：五味裕章 2008年5月29日－5月31日)	324
16. 認知神経科学の先端・「動機づけと社会性の脳内メカニズム」 (代表者：松元健二 2008年9月11日－9月12日)	354
17. 新たなコンセプトでシナプス伝達機構を考える (代表者：福田敦夫 2008年9月19日－9月20日)	359
18. 病態と細胞外プリン－治療標的としての可能性を探る (代表者：加藤総夫 2008年9月4日－9月5日)	368

19. 上皮膜輸送制御の分子機構：体内環境恒常性維持機構解明を目指して (代表者：丸中良典 2008年7月16日－7月17日)	382
20. 中枢・末梢臓器間連携による摂食，エネルギー代謝調節 (代表者：矢田俊彦 2008年9月25日－9月26日)	390
21. 電子顕微鏡機能イメージングの医学・生物学への応用 (代表者：臼田信光 2008年12月20日－12月21日)	396
22. TRPチャネルの機能的多様性とその統一的理解 (代表者：森 泰生 2008年6月5日－6月6日)	407
23. 筋・骨格系と内臓の痛み研究会 (代表者：水村和枝 2009年1月22日－1月23日)	420
24. 体温調節，温度受容研究会 (代表者：小林茂夫 2008年9月18日－9月19日)	437
25. 第2回伴侶動物の臨床医学研究会 (代表者：丸尾幸嗣 2008年12月4日－12月5日)	450

1. イオンチャネル・トランスポーターと心血管機能：学際的取り組みによる新戦略

2008 年 11 月 19 日－11 月 20 日

代表・世話人：古川哲史（東京医科歯科大学難治疾患研究所生体情報薬理分野）

所内対応者：久保義弘（自然科学研究機構生理学研究所神経機能素子研究部門）

（1）血管平滑筋細胞で発生する Ca^{2+} スパークに関与する分子群の TIRF 画像解析

山村寿男，大矢 進，今泉祐治（名古屋市立大学 大学院薬学研究科 細胞分子薬効解析学分野）

（2）細胞配列のパターン化による興奮伝播の制御～骨格筋芽細胞・心筋細胞共培養系における

催不整脈性の検討

高成広起¹，李 鍾國¹，三輪佳子¹，井藤 彰³，中井淳一⁴，本多裕之²，児玉逸雄¹

（¹名古屋大学環境医学研究所 心・血管分野，²名古屋大学大学院工学研究科，

³九州大学大学院工学研究科，⁴理化学研究所 脳科学総合研究センター）

（3）ペースメーカーチャネル HCN4 は，筋特異的転写因子 MEF2 によって直接制御される

鷹野 誠¹，村松慎一²，島崎久仁子³，魚崎英毅⁴，倉富 忍¹，山下 潤⁴，桑原宏一郎⁵

（¹自治医大・生理学・生物物理学部門，²自治医大・神経内科，³自治医大・生理学・脳神経生理学部門，

⁴京都大学・再生医学研究所，⁵京都大学・医学研究科・内分泌代謝内科）

（4）拡張型心筋症における心室性不整脈のイオン機序：変異トロポニン T ノックインマウスを用いた解析

塩谷孝夫，森本幸生*，頼原嗣尚

（佐賀大学医学部 生体構造機能学講座 器官・細胞生理学分野，

*九州大学大学院医学研究院 生体情報科学講座 臨床薬理学分野）

（5）サイクリック AMP エフェクター，Epac による心臓線維化抑制作用

横山詩子¹，石川義弘¹，南沢 享²

（¹横浜市立大学大学院医学研究科循環制御医学，²早稲田大学先進理工学部生命医科学科）

（6）S-nitrosylation を介した β 受容体シグナル制御

松本明郎（大阪大学微生物病研究所疾患糖鎖学）

（7）心室細動誘発のトンネル伝播仮説：二相性ショックの優位性と関連して

芦原貴司（滋賀医科大学呼吸循環器内科・不整脈センター）

（8）心筋細胞ネットワークによるオンチップ・リエントリー・モデルを用いた期外収縮計測技術の開発

安田賢二，金子智行，野村典正（東京医科歯科大学・生体材料工学研究所）

（9）Cav1.2 Ca^{2+} チャネルの CaM による調節機構

郭 鳳，養部悦子，矢沢和人，Hadhimulya Asmara，韓 冬雲，はお麗英，亀山正樹

（鹿児島大学 大学院医歯学総合研究科 神経筋情報生理学，中国医科大学 薬学院薬理学教室）

（10）L 型 Ca^{2+} チャネルを介した心筋 Ca^{2+} シグナル制御と破綻の分子機構

赤羽悟美，中瀬古寛子，伊藤雅方，水流弘通（東邦大学医学部薬理学）

（11）心筋細胞におけるカルシウムチャネル不活性化モデル

村上慎吾，河津俊宏，イアンフィンドレイ，鈴木慎悟，赤羽悟美，野村泰伸，倉智嘉久

（大阪大学医学部薬理学講座）

（12）ヒト冠動脈平滑筋増殖における Amlodipine の作用と Polycystic Kidney Disease (PKD1) の役割

大場貴喜，村上 学，渡邊博之*，伊藤 宏*，尾野恭一

（秋田大学医学部機能制御医学講座，細胞制御学分野，*内科学講座循環器内科学分野）

（13） $\alpha 1$ 受容体を介する血管トーン制御機構：TRPC3/NCX1 共役系の役割

喜多紗斗美，伊豫田拓也，岩本隆宏（福岡大学医学部薬理学）

(14) アンジオポエチン-1/Tie2 受容体シグナルによる血管安定化・血管新生制御機構

福原茂朋, 望月直樹 (国立循環器病センター研究所・循環器形態部門)

(15) 圧負荷による心臓の線維化における $G_{12/13}$ 蛋白質の役割

西田基宏, 上村 綾, 仲矢道雄, 黒瀬 等 (九州大・薬・薬効安全性)

(16) ラット腱細胞での Na^+-Ca^{2+} 交換輸送体の発現と機能

坂本多穂¹, 色摩弥生¹, 大和田有紀¹, 岩本隆宏², 和栗 聡³, 和田郁夫⁴, 木村純子¹

(福島医大・医・¹薬理, ³解剖組織, ⁴細胞科学・²福岡大学・医・薬理)

(17) ナトリウム利尿ペプチドの心保護作用における TRPC6 の役割

木下秀之¹, 桑原宏一郎¹, 井上隆司², 西田基宏³, 黒瀬 等³, 清中茂樹⁴, 森 泰生⁴, 中尾一和¹

(¹京都大学大学院医学研究科内分泌代謝内科, ²福岡大学医学部生理学教室,

³九州大学薬学研究院創薬科学部門薬効安全性学,

⁴京都大学大学院工学研究科合成・生物化学専攻分子生物化学分野)

(18) モルモット肺静脈の電気生理学的特性

行方衣由紀, 恒岡弥生, 杉本貴彦, 竹田 潔, 高原 章, 田中 光 (東邦大学薬学部)

【参加者名】

鷹野 誠 (自治医科大学 生理学講座・生物物理学部門), 黒瀬 等, 西田基宏 (九州大学 大学院薬学研究院 薬効安全性学分野), 松本明郎 (大阪大学 微生物病研究所 疾患糖鎖学), 渡邊泰秀 (浜松医科大学 医学部看護学科 健康科学 医療薬理学), 村田光繁, 相澤義泰, 山川裕之 (慶應義塾大学 医学部 再生医学講座), 芦原貴司 (滋賀医科大学 呼吸循環器内科・不整脈センター), 亀山正樹, 蓑部悦子, 劉 彦 (鹿児島大学 大学院医歯学総合研究科 神経病学神経筋情報生理学分野), 桑原宏一郎, 木下秀之 (京都大学 医学研究科 内分泌代謝内科 心臓研究室), 安田賢二, 金子智行, 野村典正 (東京医科歯科大学 生体材料工学研究所), 坂本多穂 (福島県立医科大学 医学部 薬理学講座), 大場貴喜, 岡本洋介, 尾野恭一 (秋田大学 医学部 機能制御医学講座細胞制御学分野), 古川哲史, 黒川洵子 (東京医科歯科大学 難治疾患研究所 生体情報薬理分野), 村上慎吾 (大阪大学大学院 医学系研究科 薬理学講座), 田中 光, 行方衣由紀,

恒岡弥生 (東邦大学 薬学部 薬物学教室), 福原茂朋 (国立循環器病センター研究所 循環器形態部), 塩谷孝夫, 市島久仁彦 (佐賀大学 医学部 生体構造機能学講座 器官・細胞生理学分野), 南沢 亨 (早稲田大学先進理工学部 生命医科学科), 横山詩子, 赤池 徹, 片山綾子 (横浜市立大学 医学部 循環制御医学), 岩本隆宏, 喜多紗斗美 (福岡大学 医学部 薬理学), 赤羽悟美, 伊藤雅方, 坂倉智子, 藤 金風 (東邦大学 医学部医学科 薬理学講座), 李 鍾國, 高成広起 (名古屋大学 環境医学研究所 心・血管分野), 今泉祐治, 大矢 進, 山村寿男, 大野晃稔, 船橋賢司, 村田秀道, 加藤大樹, 谷口 賢, 橋爪圭吾, 藤高啓右, 山本清司, 鈴木良明, 仲村恵梨奈, 藤井将人, 村松 真 (名古屋市立大学 大学院薬学研究科 細胞分子薬効解析学分野), 久保義弘, 立山充博, 伊藤政之, 長友克広, 松下真一, Batu KECELI, 石井 裕 (生理研神経機能素子)

【概要】

平成20年度生理学研究所研究会「イオンチャネル・トランスポーターと心血管機能：学際的取り組みによる新戦略」を, 11月19日-20日の両日64名の参加を得て開催した。学際的取り組みということで, 特別講演としてナノスケールにおける心筋細胞ネットワークに関する発表を安田賢二先生 (東京医科歯科大学), 3次元コンピューターモデリングの発表を芦原貴司先生 (滋賀医科大学)

という工学的アプローチに取り組んでおられる2先生から発表をいただいた。心臓電気現象に関する多階層での工学的アプローチの知見を得ることができ, ウェット実験を主に行っている参加者との間で発展的な議論が交わされた。一般演題としては16題の発表があり, Ca^{2+} チャネル・ Na^+-Ca^{2+} 交換輸送体・TRPCチャネルを中心とした Ca^{2+} 動態に関する発表, 血管新生・増殖・トームス・安

定化や肺静脈の心筋スリーブの電気生理学的特性などの血管に関する発表、心臓線維化に関する発表などが主体であった。イオンチャネル・トランスポーター同士あるいは細胞内シグナル伝達分子との相互作用からなる“マクロ複合体による心臓電気現象の研究”へと新たな方向性が示された感があった。特筆すべきこととして、参加者間の共同研究による発表が4演題あり、この研究会が参加者間の実質的交流に大きく貢献していることを示しているものと考えられた。また、一般演題として本研究

会に初めて参加・発表した横山詩子先生(横浜市立大学)、松本明郎先生(大阪大学)、福原茂朋先生(国立循環器病センター研究所)は、それぞれ心臓のcAMPシグナル研究、NOシグナル研究、血管アンジオポエチンのシグナル伝達という本研究会としては若干領域を異にした研究の発表を行い、特別講演の2先生ともども今後の新たな共同研究の発展や新たな学術領域の創生のきっかけとなることが期待され、極めて有意義な研究会であった。

(1) 血管平滑筋細胞で発生する Ca^{2+} スパークに関与する分子群の TIRF 画像解析

山村寿男, 大矢 進, 今泉祐治 (名古屋市立大学 大学院薬学研究科 細胞分子薬効解析学分野)

平滑筋の細胞膜直下で起こる局所 Ca^{2+} 変動は、興奮収縮連関の引き金となることや生体の恒常性維持、病態時における帰還機構としても重要であると認識されている。平滑筋に Ca^{2+} 過負荷が生じると、筋小胞体からの自発的 Ca^{2+} 遊離が促進されて、 Ca^{2+} スパークが発生する。 Ca^{2+} スパークは、近傍に局在する大コンダクタンス Ca^{2+} 活性化 K^+ (BK) チャネルの活性化を介して Ca^{2+} 流入を制限した結果、筋緊張度を低下させる。本研究では、全反射蛍光 (TIRF) 顕微鏡下、血管平滑筋細胞で観察された Ca^{2+} スパークの発生部位に局在する分子を可視化解析した。静止膜電位付近で観察された Ca^{2+} スパークは、自発一過性外向き電流や過分極を誘発した。 Ca^{2+} スパーク発

生部位は、リアノジン受容体の局在と良く一致した。BK チャネルの分布は、 Ca^{2+} スパーク発生部位と TIRF 面において完全に一致はしなかったが、広がった Ca^{2+} スパークによって、BK チャネル活性が十分に惹起される位置に局在していた。また、細胞膜ラフト構造を形成するカベオリン分子は BK チャネルと良く共存し、 Ca^{2+} スパーク発生部位付近に局在していた。TIRF 画像解析によって、 Ca^{2+} スパークが発生するような Ca^{2+} マイクロドメインを構成すると考えられている分子集積を直接可視化したことは、平滑筋興奮収縮連関機構の解明に重要な知見を与えられる。

(2) 細胞配列のパターン化による興奮伝播の制御 ～骨格筋芽細胞・心筋細胞共培養系における催不整脈性の検討

高成広起¹, 李 鍾國¹, 三輪佳子¹, 井藤 彰³, 中井淳一⁴, 本多裕之², 児玉逸雄¹

(¹名古屋大学環境医学研究所 心・血管分野, ²名古屋大学大学院工学研究科,

³九州大学大学院工学研究科, ⁴理化学研究所 脳科学総合研究センター)

【背景】重症心不全に対する骨格筋芽細胞移植法においては、致死的不整脈の発生が問題となっている。本研究においては、細胞配列のパターニングが、骨格筋芽細胞・心筋細胞共培養系における、興奮生成と伝播に対するおよびす効果を調べた。

【方法】あらかじめ磁性ナノ粒子を取り込ませたヒト骨格

筋芽細胞 (SkMB) を、新生仔ラット由来培養心筋細胞 (CM) とともに多電極付培養皿上に共培養し、1) ランダムに播種した群 (Random 群), および 2) 培養皿底面下の一部に矩形磁石を静置し、SkMB をパターン化した群 (Pattern 群) に分類した。細胞外電位、細胞内 Ca^{2+} を測定し、自動能および興奮伝播パターンを観察した。

【結果】Random 群では、伝導速度が著しく低下し、渦巻き型伝導や伝導途絶などの異常伝導を認めた。また、自発興奮の部位は培養系の各部位からランダムに発生する傾向が電位、細胞内 Ca^{2+} 、いずれにおいても観察された。一方、Pattern 群では、自発興奮の発生部位は一点に固定され、SkMB 凝集部位で著しい電動遅延を生じたが、伝

導方向はほぼ均一であった。

【結論】骨格筋芽細胞のランダム播種群に比べ、パターン化した群では、安定した興奮生成と伝播が観察された。異なる電気生理特性を有する細胞を用いた移植治療においては、パターン化して細胞を移植する方法が、催不整脈性を予防する上で、利点があると考えられた。

(3) ペースメーカーチャネル HCN4は、筋特異的転写因子 MEF2によって直接制御される

鷹野 誠¹, 村松慎一², 島崎久仁子³, 魚崎英毅⁴, 倉富 忍¹, 山下 潤⁴, 桑原宏一郎⁵

(¹自治医大・生理学・生物物理学部門, ²自治医大・神経内科, ³自治医大・生理学・脳神経生理学部門, ⁴京都大学・再生医学研究所, ⁵京都大学・医学研究科・内分泌代謝内科)

過分極誘発陽イオンチャネル HCN4 は心臓ではペースメーカー細胞に特異的に発現しており、洞房結節の分子マーカーとして注目されている。その転写制御機構を解明するため VISTA GENOME BROWSER をもちいて hcn4 遺伝子の周辺約 100kb の非翻訳領域をスクリーニングし、種を超えて配列が保存されている領域 (CNS1~CNS16) を同定した。これを hcn4 最小プロモーターに連結した mini gene を作成し、ルシフェラーゼレポーターアッセイを実施した。その結果、MEF2 結合領域と AP-1

結合領域を有する CNS13 は強いエンハンサー活性を持つことが判明した。次にゲルシフトアッセイならびにクロマチン免疫沈降法により、実際に CNS13 に MEF2, AP-1 が結合することを証明した。更に MEF2 の優勢抑制性変異体を胎児心筋細胞に発現させると HCN4 の発現量は約 1/5 に低下した。これらの結果から hcn4 は心臓において MEF2 によって直接転写が活性化されていると結論した。

(4) 拡張型心筋症における心室性不整脈のイオン機序：変異トロポニン T ノックインマウスモデルを用いた解析

塩谷孝夫, 森本幸生*, 額原嗣尚

(佐賀大学医学部 生体構造機能学講座 器官・細胞生理学分野,

*九州大学大学院医学研究院 生体情報科学講座 臨床薬理学分野)

心筋型トロポニン T 遺伝子 (TNNT2) の $\Delta K210$ 変異に起因する家族性拡張型心筋症 CMD1D (OMIM 601494) では心室性不整脈が多発することが知られている。そのイオン機序を、 $\Delta K210$ 変異型トロポニン T 遺伝子を導入したノックイン (KI) マウスモデルを用いて検討した。実験には、ホモ KI マウスおよび同腹仔の野生型マウスから単離した心室筋細胞を用いた。フィールド刺激により誘発した無負荷時収縮の振幅は、すべての刺激頻度 (1.6-10 Hz) で KI マウスが野生型より有意に小さく、KI マウスにおける変異トロポニン T の発現を支持した。生

理的条件のホールセルクランプ下に誘発した KI マウスの活動電位には顕著なプラトー相 (ピーク電位 -19 ± 4 mV) が認められ、野生型 (52 ± 2 ms) よりも有意に長い持続時間 (APD 72 ± 3 ms) を示した。さらに、KI マウスではイソプロテレノール (100 nM) 投与で早期後脱分極をとまなう APD 延長や異常自動能が誘発された。いっぽう、同一条件で記録したホールセル電流では、KI マウスは野生型に比べて Ito および IK, slow の振幅に顕著な減少がみられ、また、Ca トランジェントにともなう内向き Na/Ca 交換電流のピーク振幅は有意に増大していた。これらの

膜電流の変化は KI マウスに生じた活動電位波形の変化

を支持し、CMD1D の催不整脈性との関連が示唆された。

(5) サイクリック AMP エフェクター, Epac による心臓線維化抑制作用

横山詩子¹, 石川義弘¹, 南沢 享²

(¹ 横浜市立大学大学院医学研究科循環制御医学, ² 早稲田大学先進理工学部生命医科学科)

【背景】セカンドメッセンジャーであるサイクリック AMP (cAMP) が慢性心不全の病態でもある心臓線維化を抑制することが示唆された。そこで cAMP の新しい標的分子である Exchange Protein Activated by cyclic AMP (Epac) の心臓線維化に及ぼす作用を検討した。

【結果】線維化誘導物質である Transforming growth factor beta1 (TGFβ1) は、ラット心臓線維芽細胞で Epac の 2 つのアイソフォームのうち Epac1 の発現を転写レベルで抑制した。TGFβ1 による Epac1 の発現低下は他の線維芽細胞 (肺, 皮膚, 肝臓) でも認められた。さらに Epac1 蛋白の発現はラット, マウスの心筋梗塞後の心臓線維芽細胞でも低下した。

Epac1 の過大発現は TGFβ1 による心臓線維芽細胞でのコラーゲン産生を抑制した。Epac は比較的低濃度の cAMP で活性化され, Rap1 を介して線維芽細胞の遊走を促進したが, Epac は Rap1 非依存性にコラーゲンの産生を抑制した。

【結語】Epac は心臓線維芽細胞の創傷治癒の初期過程である遊走を亢進させるが, コラーゲンの産生は抑制した。また Epac1 の低下は線維化に必要条件と考えられ, Epac の発現の制御は線維化の過程に重要な働きをすることが示唆された。

(6) S-nitrosylation を介したβ受容体シグナル制御

松本明郎 (大阪大学微生物病研究所疾患糖鎖学)

「S-nitrosylation を介したβ受容体シグナル制御」の演題にて以下の内容の発表を行なった。細胞内情報伝達系は、環境応答の惹起と、シグナルの適切な方向への伝達を行なうため、複数の制御系が関与する。なかでも、レドックス変化に基づく制御系はリン酸化に次ぐものとして重要である。一酸化窒素 (NO) によるシステインチオール基の特異的かつ可逆的な修飾反応である S-nitrosylation (SNO 化) はレドックス変化にともなうシグナル制御系のプロトタイプとして、タンパク質の活性・複合体形成・細胞内局在・転写因子・ユビキチン化の制御などに影響することが明らかにされてきた。さらに、近年、細胞膜受容体を介したシグナル伝達も SNO 化により制御され

ていることが明らかにされた。βアドレナリン受容体に対する継続的な刺激入力, その応答性を減弱させるが, その機構は不明であった。内在性 NO 合成酵素から産生された NO は, 受容体のリン酸化酵素である GRK2 の Cys340 を SNO 化し, リン酸化能を抑制する。結果として膜上に存在する受容体数が維持され, 脱感作を抑制し, 刺激応答性を維持するのに寄与していることが明らかとなった。これらの結果は, SNO 化により GPCR シグナルが制御されていることを明らかにしたのみならず, リン酸化と SNO 化とのクロストークが示されてきたことから重要である。

(7) 心室細動誘発のトンネル伝播仮説：二相性ショックの優位性と関連して

芦原貴司 (滋賀医科大学呼吸循環器内科・不整脈センター)

電氣的除細動が最初に報告されてから 100 年以上経つが、いまだそのメカニズムには不明な点が多い。電気ショックは心筋細胞を直接刺激するのではなく、細胞外液に電位勾配をかけることで間接的に刺激する。電気ショックではすべての心筋細胞が同時に脱分極すると考えられがちだが、実際には細胞内外の導電性の違いや、複雑な解剖学的構造のため、心筋各所で電流の収支にミスマッチが生じ、刺激電極から離れた領域でも仮想電極(VE)と呼ばれる脱分極や過分極が起こる。電氣的除細動が成功するには、(1) VE が細胞性興奮旋回のスパイラルリエントリー (SWR) を停止し、(2) VE から発生するショック後興奮 (PA) が新たな SWR を誘発しないことが求められる。概して (2) に必要なエネルギーは (1) よりも高いた

め、除細動閾値 (DFT) を下げるには PA 制御が近道である。PA には、ショックパルス開始とともに脱分極領域から広がる make 興奮と、ショックパルス終了直後に過分極領域が絡んで起こる break 興奮がある。それらの PA が、電気ショック直後に存在する興奮可能領域のトンネルを抜け出し (トンネル伝播仮説)、新たな SWR を誘発するとき除細動に失敗する。臨床では経験的に、単相性ショックよりも二相性ショックの方で除細動効率が良いと知られているが、我々の 3 次元ウサギ心室形状モデルを用いた *in silico* 実験に基づけば、二相性ショックは (1) PA 抑制と (2) トンネル伝播遮断の両効果により、優位性を示すと考えられた。

(8) 心筋細胞ネットワークによるオンチップ・リエントリー・モデルを用いた期外収縮計測技術の開発

安田賢二, 金子智行, 野村典正 (東京医科歯科大学・生体材料工学研究所)

既存の hERG 計測や QT 延長計測によって、候補薬が期外収縮などの副作用を発生する危険を予測することには限界がある。そのため、hERG 計測や QT 延長計測に続く新しい心毒性計測技術の確立が期待されている。われわれは、心筋細胞をチップ上に 1 細胞単位で構造的に配置して環状ネットワークを形成することで、期外収縮の発生を観測できるリエントリー・モデルを構築することを試みている。実際に細胞集団を環状に配置すると、2 次元シート状に配置した場合には観測されない期外収縮波形の発生が観測されることを確認できた。さらに心臓

臓器機能についても、1 細胞単位での細胞形状変化の光学計測、電位変化計測を組み合わせることによって、心拍出力、Na, K, Ca などのイオンチャンネルの状態を細胞ネットワークから計測することが可能であることも確認できた。本会では、上記、現在われわれが行っている研究のうち、心筋細胞集団の集団効果についてわかったこと、開発した心筋細胞ネットワークシステムの概要、このシステムの創薬、毒性検査への応用の可能性について報告を行った。

(9) Cav1.2 Ca^{2+} チャンネルの CaM による調節機構

郭 鳳, 蓑部悦子, 矢沢和人, Hadhimulya Asmara, 韓 冬雲, はお麗英, 亀山正樹
(鹿児島大学 大学院医歯学総合研究科 神経筋情報生理学, 中国医科大学 薬学院薬理学教室)

心筋 L 型 Ca^{2+} チャンネル (Cav1.2) の Ca^{2+} 依存性促進 (CDF) と不活性化 (CDI) にはカルモジュリン (CaM) が関

与するが、その機構については不明な点が多い。我々は、Cav1.2 チャンネルには CDF 用と CDI 用の CaM 結合部位が

別々に存在する(AおよびIサイト)という two-site model を提唱しているが、これは広く受け入れられている one-CaM model とは対立するものである。今回、two-site model を検証する目的で、CaM の Ca^{2+} 結合能を部分的に無くした変異体 (CaM12 と CaM34) の心筋 L 型 Ca^{2+} チャネルに対する濃度依存的な作用を inside-out パッチ法により検討した。ATP (3 mM) の存在下で、CaM12 と CaM34 (0.7-10 μM) は、Cav1.2 チャネルの開閉確率を濃度依存的

に増加させたが、より高濃度では抑制を示し、濃度-反応曲線は野生型 CaM と同様に bell 型となった。この曲線は、野生型 CaM では $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を増加させると低濃度側(左方)にシフトするが、両変異体では $[\text{Ca}^{2+}]_i$ による左方シフトは見られなかった。これらの結果は、A 及び I の両サイトには共に Ca^{2+} -free CaM (apoCaM) と Ca^{2+} /CaM が結合するが、 Ca^{2+} による親和性増大には CaM の 4 つ全ての Ca^{2+} 結合部位が必要であることを示唆している。

(10) L 型 Ca^{2+} チャネルを介した心筋 Ca^{2+} シグナル制御と破綻の分子機構

赤羽悟美, 中瀬古寛子, 伊藤雅方, 水流弘通 (東邦大学医学部薬理学)

心筋 L 型 Ca^{2+} チャネル α_1 サブユニットとして Cav1.2 と Cav1.3 が発現しており、心筋細胞の興奮性および Ca^{2+} シグナルの制御においてそれぞれ異なる役割を担っている。慢性心房細動の発症メカニズムの一つとしてこれらの電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャネルの活性低下が報告されている。

そこで我々は L 型 Ca^{2+} チャネルを取り巻くシグナル複合体 (Ca^{2+} シグナロソーム) の解明を目指して Cav1.2 と相互作用する蛋白を探索し、PCTP-L (phosphatidylcholine transfer protein-like protein, StarD10) を同定し解析を行っ

た。その結果、PCTP-L は Cav1.2 との特異的な相互作用を介してその活性制御に関わることを見出した。心房肥大に伴い PCTP-L の発現は減少し、また心房筋細胞の PCTP-L をノックダウンすると活動電位プラトー相の減少と活動電位幅の短縮および心房細動様の頻脈が観察された。以上の結果から、心房筋細胞において PCTP-L は L 型 Ca^{2+} チャネル Cav1.2 の活性制御に関わっており、その破綻は心房筋細胞の興奮性の異常を招くことが示唆された。

(11) 心筋細胞におけるカルシウムチャネル不活性化モデル

村上慎吾, 河津俊宏, イアンフィンドレイ, 鈴木慎悟, 赤羽悟美, 野村泰伸, 倉智嘉久
(大阪大学医学部薬理学講座)

心臓においてカルシウムは興奮、収縮に関与するイオンである。心筋細胞内でのカルシウム動態は心筋の機能に対して大きな影響を持つことが推測されているが、実験で定量的に計測することは難しい。そこで我々は不活性化に着目した L 型カルシウムチャネルとカルシウム動態のモデルを開発した。L 型カルシウムチャネルの不活性化過程には、電位依存性不活性化機構 (VDI) とカルシウム依存性不活性化機構 (CDI) がある。VDI は、 β 刺激条件下では弱まるということが実験的に明らかになっている。この効果をモデルに取り込み、L 型カルシウムチャネルの

モデル化を行ったところ、コントロール、 β 刺激条件下でのシミュレーション結果は実験値とよく一致した。さらに我々は、現在開発しているモデル構築支援システムを用い、心筋細胞におけるカルシウムチャネルおよびチャネル直下の細胞内微細構造に関連するカルシウム動態のシミュレーションを行った。T 管系、カルシウムチャネル、筋小胞体をモデル化し、より素過程に近いシミュレーションを行い、ダイアッド部における細胞膜内カルシウムイオンの時空間的動態を解析した。

(12) ヒト冠動脈平滑筋増殖における Amlodipine の作用と Polycystic Kidney Disease (PKD1)の役割

大場貴喜, 村上 学, 渡邊博之*, 伊藤 宏*, 尾野恭一

(秋田大学医学部機能制御医学講座, 細胞制御学分野, *内科学講座循環器内科学分野)

【背景】L型カルシウムチャネル阻害薬でもあるアムロジピンは血管平滑筋細胞の増殖を抑制することが知られているが、その機序は不明である。多発性嚢胞腎の原因遺伝子である PKD1 は細胞増殖の制御において重要な役割を持っていることが知られている。我々は冠動脈平滑筋細胞の増殖にアムロジピンの及ぼす影響と細胞内シグナルとして PKD1 関連経路の関与について検討した。

【方法と結果】ヒト冠動脈平滑筋細胞 (hCASMCs) を対象とした。血清刺激による hCASMCs の増殖はアムロジピン (10^{-9} to 10^{-6} M) により有意に抑制された。CDK インヒビターである p21^(Waf1/Cip1) の発現量はアムロジピン処置に

より増加した。このアムロジピンの効果は PKD1 強制発現により再現され、さらに PKD1 の dominant negative 変異体の R4227X を強制発現させることにより打ち消された。イムノブロット解析およびルシフェラーセアッセイでは、アムロジピンと PKD1 は Janus Kinase2 (JAK2) のリン酸化と STAT1 の転写活性を増加させた。

【結論】アムロジピンとそれに引き続く PKD1 関連経路の活性化は hCASMC の細胞増殖を抑制する。それは JAK2/STAT1 経路の活性化と p21^(Waf1/Cip1) の発現量増加を伴う。

(13) $\alpha 1$ 受容体を介する血管トーン制御機構 : TRPC3/NCX1 共役系の役割

喜多紗斗美, 伊豫田拓也, 岩本隆宏 (福岡大学医学部薬理学)

$\alpha 1$ 受容体を介する血管トーン制御機構の機序については未だ十分に解明されていない。最近、私達は $\alpha 1$ 受容体刺激による血管収縮に 1 型 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体 (NCX1) が関与することを示す実験的証拠を得た。具体的には、血管平滑筋特異的 NCX1 高発現マウスでは野生型マウスに比べてフェニレフリン刺激時の血管収縮 (細胞内 Ca^{2+} シグナル) が有意に増大していることを見いだした。この機序を解析する目的で、血管平滑筋細胞を用いた免疫沈降実験、免疫染色実験およびショ糖密度勾配分離実験を行ったところ、NCX1 は TRPC3 と相互作用しカベオラ分画に共存していることが示唆された。そこで、血管平滑筋特異的 TRPC3 高発現マウスを作製したとこ

ろ、フェニレフリン刺激時の血管収縮 (細胞内 Ca^{2+} シグナル) が顕著に増大することを観察した。一方、NCX1 ヘテロ欠損マウスおよび抑制型 TRPC3 高発現マウスでは、同刺激の細胞内 Ca^{2+} シグナルが有意に減弱していた。また、NCX1 および TRPC3 の高発現マウスに高濃度のノルエピネフリンを静脈内投与すると、共に冠スパスムに起因する心電図 ST 上昇が誘発された。この冠スパスムは NCX 阻害薬処置および抑制型 TRPC3 遺伝子導入により抑制された。これらの結果は、TRPC3/NCX1 共役系が $\alpha 1$ 受容体を介する血管トーン制御に重要な役割を果すことを示唆している。

(14) アンジオポエチン-1/Tie2 受容体シグナルによる血管安定化・血管新生制御機構

福原茂朋, 望月直樹 (国立循環器病センター研究所・循環器形態部門)

アンジオポエチン-1 (Ang-1) は血管内皮細胞に発現する受容体型チロシンキナーゼ Tie2 を介して血管構造安

定化と血管新生の両方の機能を制御している。しかし、これら二つの現象は細胞生物学的に異なった反応によっ

て制御されており、Ang1/Tie2 シグナルがどのような機構でこれら相反する機能を制御しているのか不明であった。今回我々はこの疑問を解明するため、Ang1 刺激による Tie2 の局在変化と、それに伴って活性化されるシグナル伝達系を解析した。その結果、成熟した血管で見られるような細胞間接着を有する内皮細胞を Ang1 で刺激すると、Tie2 は Ang1 を介して細胞間接着部位でトランス結合を形成し、Akt など血管安定化シグナルを活性化す

ることを発見した。一方、血管新生過程のように細胞間接着を持たない内皮細胞では、Tie2 は細胞-基質接着面で Ang1 及び細胞外マトリックスと複合体を形成し、MAK キナーゼなどの血管新生シグナルを活性化することを明らかにした。以上の結果から細胞間接着によって Ang1/Tie2 シグナルは空間的・機能的に制御されており、それにより“血管安定化”と“血管新生”という異なる機能を調節していることが明らかになった。

(15) 圧負荷による心臓の線維化における $G_{12/13}$ 蛋白質の役割

西田基宏, 上村 綾, 仲矢道雄, 黒瀬 等 (九州大・薬・薬効安全性)

慢性的な高血圧により誘発される心臓の形態変化 (リモデリング) は、心不全を引き起こす要因の 1 つとして考えられている。アンジオテンシン (Ang) やエンドセリン (ET), ノルアドレナリンなどで誘発される心肥大は、主に G_q 蛋白質を介して起こると考えられている。我々はこれまでに、ラット初代培養心筋細胞に発現する AT_1 受容体, ET_A 受容体, α_1 アドレナリン受容体が G_{12} ファミリー蛋白質 (G_{12}/G_{13}) と共役しうることを報告してきた。しかし、心臓における G_{12}/G_{13} の役割については未だ明らかでない。そこで、 G_{12}/G_{13} の α サブユニット ($G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$) の機能を阻害するポリペプチド (p115-RGS) を心筋特異的に発現させたトランスジェニック (TG) マ

ウスを作成した。マウスの横行大動脈を狭窄し、6 週間の圧負荷を行った結果、TG マウスでは野生型マウスと同程度の心肥大が引き起こされたものの、間質のコラーゲンの蓄積 (線維化) が有意に軽減されていた。さらに、圧負荷による $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ 活性化のメカニズムを調べたところ、 $P2Y$ 受容体の関与が示された。阻害剤を使った *in vivo* の結果や新生仔心室筋細胞を使った *in vitro* の結果と合わせ、機械的伸展負荷により心筋細胞から放出されたヌクレオチドが心筋細胞の $P2Y$ 受容体を介して $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ シグナリングを活性化し、線維化を誘導する可能性が示された。

(16) ラット腱細胞での Na^+ - Ca^{2+} 交換輸送体の発現と機能

坂本多穂¹, 色摩弥生¹, 大和田有紀¹, 岩本隆宏², 和栗 聡³, 和田郁夫⁴, 木村純子¹

(福島医大・医・¹薬理, ³解剖組織, ⁴細胞科学・²福岡大学・医・薬理)

【目的】腱細胞は、腱の損傷・炎症時に活性化し、遊走・増殖・収縮をおこす。これら生理応答には Ca^{2+} シグナルが関与する。本研究では、 Na^+ - Ca^{2+} 交換輸送体 (NCX) の、腱細胞での発現・機能を検討した。

【方法】ラットアキレス腱から、酵素処理で腱細胞を単離し、継代培養した。NCX の mRNA と蛋白質の発現解析は real-time RT-PCR 法と Western Blot 法で行った。細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) は、Fura-2AM を負荷し、測定した。腱細胞の収縮は、コラーゲンゲル中で培養し、その収縮

を指標とした。

【結果】腱細胞では、NCX1 の mRNA と蛋白質の発現が認められた。抗体染色すると、NCX1 は腱細胞の細胞膜、特に突起部に局在していた。細胞外 Na^+ 低下により $[Ca^{2+}]_i$ は上昇し、NCX 阻害薬 KB-R7943 は、これを抑制した。また KB-R7943 は定常 $[Ca^{2+}]_i$ も低下させた。NCX を介した Ca^{2+} 流入を示唆する。腱細胞を密に培養し、チップで傷つけると、腱細胞の遊走が観察できる。KB-R7943 存在下では、遊走速度は低下した。KB-R7943

は腱細胞のゲルの収縮も抑制した。

【考察】ラット腱細胞には NCX1 が発現しており, Ca^{2+} 流入経路として機能する。腱細胞の遊走および収縮が

NCX 阻害薬により抑制されることから, NCX は腱の損傷治癒過程に関与する可能性がある。

(17) ナトリウム利尿ペプチドの心保護作用における TRPC6の役割

木下秀之¹, 桑原宏一郎¹, 井上隆司², 西田基宏³, 黒瀬 等³, 清中茂樹⁴, 森 泰生⁴, 中尾一和¹

(¹ 京都大学大学院医学研究科内分泌代謝内科, ² 福岡大学医学部生理学教室,

³ 九州大学薬学研究院創薬科学部門薬効安全性学,

⁴ 京都大学大学院工学研究科合成・生物化学専攻分子生物化学分野)

【背景・目的】心肥大刺激に対するナトリウム利尿ペプチドの心保護作用の詳細な分子機序はまだ不明な点が多い。今回我々は病的な心筋リモデリングへの関与が最近示されている TRPC6 のナトリウム利尿ペプチドの心保護作用における標的分子としての可能性を検討した。

【結果】ラット新生仔心室筋細胞において, TRPC6 過剰発現や ET-1 刺激による MCIP1 (RCAN1) プロモーター活性化を ANP および 8Br-cGMP は抑制したが, PKG リン酸化部位を変異させた mutant TRPC6 (TRPC6T69A) 過剰発現による MCIP1 (RCAN1) プロモーター活性亢進は抑制しなかった。

TRPC6 発現 HEK293 細胞において OAG 刺激による Ca 流入を ANP は強力に抑制したが, TRPC6T69A による

Ca 流入は抑制しなかった。また TRPC6 発現 HEK293 細胞における TRPC6 電流を, ANP は同様に抑制した。さらにラット新生仔心室筋細胞においても Ang II や ET-1 刺激による Ca 流入増加を ANP は nitrendipine 非依存性, BTP-2 依存性に抑制した。

ANP・BNP 受容体 GC-A (NPR1) を欠失し高血圧と心肥大を呈するマウス (GCA-KO) において心室での TRPC6 発現が亢進しており, BTP2 投与は GCA-KO の心肥大を血圧非依存性に有意に軽減した。

【結論】ナトリウム利尿ペプチドによる心保護作用機序に, TRPC6 を介する心肥大シグナルに対する抑制効果が関与していることが考えられた。

(18) モルモット肺静脈の電気生理学的特性

行方衣由紀, 恒岡弥生, 杉本貴彦, 竹田 潔, 高原 章, 田中 光 (東邦大学薬学部)

心筋細胞層を有する肺静脈が心房細動の発生に関与していると報告されたこともあり, 肺静脈心筋がいかなる性質を有するのか注目されている。そこで本研究では, モルモット摘出肺静脈組織標本に微小電極法を適用し, 肺静脈心筋の電気生理学的特性を薬理学的に検討した。定頻度刺激 (1Hz) 下での肺静脈心筋の活動電位は左心房筋標本に比べ, 静止膜電位が浅く, amplitude が小さいものであった。ほぼすべての標本で第4相で緩徐な脱分極が観測され, その傾きは $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構 (NCX) の選択的阻害薬 SEA0400 により抑制された。自発活動を有する肺静脈に SEA0400 および ryanodine を処置すると, 自発

活動の頻度の減少と停止が見られた。自発活動を示さない肺静脈標本に ouabain を処置すると自発活動の出現が認められ, これらは SEA0400 および ryanodine によって抑制された。以上の結果からモルモット肺静脈心筋は心房筋とは異なる活動電位波形を有し, 自発活動を発生しやすい傾向があることが判明した。また, 筋小胞体から放出された Ca^{2+} が NCX の forward mode を活性化して緩徐な脱分極に寄与していること, 筋小胞体の Ca^{2+} 負荷量の増加によりこの機序が顕在化し, 自発活動につながることを示唆された。

2. 細胞機能を制御するシグナリング機構の普遍性と特異性

2008 年 10 月 2 日－10 月 3 日

代表・世話人：久野みゆき（大阪市立大学大学院医学研究科）

所内対応者：久保義弘（神経機能素子研究部門）

- (1) 単一シナプスレベルのグルタミン酸イメージングによるプレシナプス特性の解析
坂本寛和, 並木繁行, 飯沼 将, 廣瀬謙造（名古屋大・医）
- (2) シナプス前終末におけるカルシウムドメインサイズの生後発達変化
中村行宏, David DiGregorio, Angus Silver, 高橋智幸（同志社大・生命医科学, OIST）
- (3) 神経回路の形成と再編成を制御する新たな CaMK シグナリング機構
尾藤晴彦, 上田（石原）奈津美, 竹本一木村さやか, 奥野浩行（東京大・医）
- (4) 小脳皮質における登上線維微小帯域の in vivo 2 光子イメージングによる解析
喜多村和郎, 橋爪 幹, 狩野方伸（東京大・医）
- (5) スフィンゴシン 1 リン酸による破骨細胞前駆細胞の遊走・位置の制御機構
石井 優, Ronald Germain（大阪大・免疫学フロンティア研究センター）
- (6) 細胞膜プロトンポンプの turnover 制御機構
久野みゆき, 納富拓也, 川脇順子, 森浦芳枝, 酒井 啓（大阪市立大・医）
- (7) 酸塩基調節におけるヘンレループ髄質太い上行脚（管腔膜 NHE3）の役割
安岡有紀子, 小林瑞佳, 川田英明, 河原克雅（北里大・医）
- (8) ウニ受精時の一酸化窒素のシグナリングとその役割
毛利達磨, 曾我部正博, 経塚啓一郎
（生理研, 名古屋大・医, 東北大・院生命・浅虫海生研センター）
- (9) メカノ刺激による ATP 放出のリアルタイムイメージング
古家喜四夫, 曾我部正博（名古屋大・医）
- (10) B リンパ球における Ras-Erk シグナル
黒崎知博（大阪大・WPI 免疫フロンティア研究センター・理研）
- (11) リアノジン受容体を介するカルシウム放出活性の経時的なスイッチングがもたらす細胞間不均一性
中村直俊, 山澤徳志子, 大久保洋平, 飯野正光（東京大・医）
- (12) 膵β 細胞分化誘導因子ベータセルリンδ4 の作用機構
小島 至, 山田聡子, 小寺 力, 中川裕子, 長澤雅裕（群馬大・生体調節研究所）
- (13) 免疫応答細胞における酸化的ストレス感受性チャネル TRPM2 の生理的役割
山本伸一郎, 清中茂樹, 高橋重成, 森 泰生（京都大・工）
- (14) チャネルのゲート開閉におけるねじれ構造変化：KcsA チャネル一分子レベルでの動態
老木成稔, 清水啓史, 岩本真幸, 今野 卓, 佐々木裕次（福井大・医）
- (15) グリア細胞に発現する内向き整流性 K⁺チャネル Kir4.1 と薬物相互作用解析
古谷和春, 大野行弘, 稲野辺厚, 日比野浩, 倉智嘉久（大阪大・医）
- (16) カフェインの新しい作用機序ーカフェイン受容体としての TRPA1 チャネル
長友克広, 久保義弘（生理研）

【参加者名】

金丸和典, 中村直俊, 久保田淳（東京大学・大学院医学 系研究科・細胞分子薬理学教室）, 小島 至, 長澤雅裕,

中川祐子, 山田聡子, 小寺 力 (群馬大学・生体調節研究所・細胞調節分野), 高橋智幸, 中村行宏, 渡邊博康 (独立行政法人 沖縄科学技術研究基盤整備機構), 石井 優 (大阪大学・免疫学フロンティア研究センター), 森 泰生, 三木崇史, 加藤賢太, 高橋重成, 金子 雄, 香西大輔, 中島大志 (京都大学大学院・工学研究科, 合成・生物化学専攻・分子生物化学分野), 廣瀬謙造, 並木繁行, 坂本寛和, 滝川建司 (名古屋大学・大学院医学系研究科・細胞生理), 喜多村和郎, 狩野方伸, 橋爪 幹, 谷村あさみ (東京大学・医学系研究科・神経生理学), 黒崎知博 (理化学研究所・免疫・アレルギー科学総合研究センター・分化制御研究グループ), 河原克雅, 安岡有紀子 (北里大学・医学部・生理学), 古谷和春 (大阪大学・医学系研究科・

薬理学講座), 老木成稔 (福井大学医学部・分子生理), 尾藤晴彦 (東京大学・大学院医学系研究科・神経生化学教室), 最上秀夫 (浜松医科大学・生理学), 曾我部正博, 古家喜四夫 (名古屋大学大学院医学系研究科・細胞生物物理), 毛利達磨 (生理研・細胞内代謝), 久野みゆき, 納富拓也, 川脇順子 (大阪市立大学・大学院医学研究科・分子細胞生理学), 古家園子 (生理研生体情報解析室), 稲村正子 (生理研分子神経生理), 佐竹伸一郎 (生理研神経シグナル), 釜澤尚美 (生理研脳形態解析), 植田禎史 (生理研大脳神経回路論), 田中謙二 (生理研分子神経生理), 加塩麻紀子 (生理研細胞生理), 久保義弘, 立山充博, 伊藤政之, 長友克広, 松下真一, Batu KECALI, 石井 裕 (生理研神経機能素子)

【概要】

細胞機能を制御するシグナリング機構 (情報の流れ) の研究は, 「機能」の多様性を反映して非常に広い分野を包括する。本研究会は, 異なる分野で細胞シグナリングの研究に従事している研究者が自由に意見を交換する場を提供することを目的として企画された。本年も, 神経, 破骨細胞, 尿管細胞, 受精卵, 乳腺, Bリンパ球, 脾細胞, マクロファージ, など多様な細胞を用いた独創的な16演題が集まり, 触発されることの多い2日間であった。神経生理学入門ともいえるシナプス伝達や神経回路形成の機序については, 蛍光イメージングの空間・時間解像度が飛躍的に向上するにつれて, かねてより推測されていたメカニズムがまさに「見えてきた」ことを実感させられた。また, 中枢神経や骨への *in vivo* イメージング法の適用は, 培養細胞を用いた実験系で常にぶつかる「生体の中で細胞には実際に何が起きているのか?」とい

う問いに答えていこうとするこれからの研究方向のひとつであろう。プロトン, NO, ATP, Ca, Ras-Erkなどは普遍的なシグナリング因子であり, その制御には生命現象を支える本質的な問題が多く含まれている。それぞれ異なる機能に焦点をおいた発表から, シグナル応答の解明が裾野を広げつつより深く進行していることやカルシウムが多くのステージに深く関わっていることを再認識した。要となる機能分子のひとつであるイオンチャネルについても, TRPファミリーの関わる機能領域の広さや構造学的, 生物物理学的なアプローチの重要性が示唆された。本研究会の特徴のひとつは, その話題の多様性にある。発表は, 初めにバックグラウンドの紹介を付け加え, その分野を専門としない人々にも論点が理解されやすいように工夫されており, 会場から若い人々の積極的な質問が多く飛び出したことは収穫である。

(1) 単一シナプスレベルのグルタミン酸イメージングによるプレシナプス特性の解析

坂本寛和, 並木繁行, 飯沼 将, 廣瀬謙造 (名古屋大・医)

シナプス伝達の効率はプレシナプス特性に強く依存する。プレシナプス特性とその制御機構の解明にはシナプス伝達物質の直接的な測定が有効である。今回我々は, 海馬神経細胞のシナプスが放出するグルタミン酸を蛍光イメージングによって測定した。このシナプスは通常一つのアクティブゾーンしか持たないが, グルタミン酸放

出量は活動電位毎に大きく変動した。また, 活動電位が伝播してもグルタミン酸を放出しない現象 (failure) が頻繁に見られた。平均放出量と分散及び failure-rate との間に見られる関係は二項モデルに適合し, 単一シナプスが複数の放出単位を持つこと, つまり同時に複数の小胞を放出し得ることを示した。この結果を支持するように,

細胞外液の Ca^{2+} 濃度を上昇させると, failure-rate の減少と共にグルタミン酸放出量の増加が見られた。高頻度刺激とデコンボリューション解析によって推定した放出可能な小胞 (RRV: release ready vesicles) の個数は平均 5 個であり, 放出単位の個数よりも多かった。これら結果は,

RRV 個々の放出確率は不均一であり, RRV のサブセットが見かけ上の放出単位として機能していることを意味する。また, 小胞の放出確率を強固に制御する機構の存在を示唆する。

(2) シナプス前終末におけるカルシウムドメインサイズの生後発達変化

中村行宏, David DiGregorio, Angus Silver, 高橋智幸 (同志社大・生命医科学, OIST)

生後 7 日齢 (P7) ラットの脳幹聴覚中継巨大シナプス calyx of Held の EPSC は, EGTA のシナプス前終末端内注入によって抑制されるが, 生後発達に伴って EGTA の効果は弱くなり, 聴覚獲得後の P14 には消失する。一方, 100 倍以上速い Ca 結合速度を持つ BAPTA による EPSC 抑制作用はこの期間を通じて一定であることから, 発達に伴ってシナプス前終末の Ca マイクロドメインがナノドメインへ移行することが間接的に示唆されている。活動電位によって生じる calyx 前終末内の Ca 濃度変化の時空間的分布と, その生後発達変化を明らかにするため, Oregon Green BAPTA 5N を calyx 内に注入し, 共焦点顕

微鏡スキャンによって, 600 nm (半値幅) の解像度で Ca transients を記録した。前末端に活動電位を誘発すると, P7 calyx では, 放出側辺縁に沿って, サブミリ秒で立ち上がる (10-90%) Ca transient が, 一様に記録された。これに対して P14 の Ca transient は, その空間分布が疎になり, 振幅が減少した。TEA による活動電位幅増大の効果, ω -Agatoxin による Ca チャネル密度減少の効果を検討した結果, 生後発達に伴う Ca transient の変化は, 生後発達に伴う活動電位幅の短縮および Ca チャネル密度の減少によってもたらされると結論された。

(3) 神経回路の形成と再編成を制御する新たな CaMK シグナリング機構

尾藤晴彦, 上田 (石原) 奈津美, 竹本一木村さやか, 奥野浩行 (東京大・医)

神経細胞は遺伝的因子ならびに環境因子に基づき軸索と樹状突起を適切に発達させ, 神経回路を形成する。神経活動や神経成長因子などのリガンド刺激は, 細胞内 Ca^{2+} 上昇を介して形態変化を引き起こすことが提唱されているが, Ca^{2+} 上昇と神経細胞形態変化が連動する一連の分子機構の詳細は未解明である。我々は近年, プレニル化により膜にアンカーする新たな CaMK アイソフォーム CaMKIgamma/CLICK-III を同定し, 同キナーゼがさらにパルミトイル化され, 樹状突起に豊富な脂質ラフトへ

集積し, 樹状突起伸展に寄与することを見出した。さらに, 類似 CaMK による軸索伸展制御機構の存在も明らかにしている。

これらの知見は, 神経 CaM キナーゼが, チャネル活性制御, シナプス可塑性誘導や神経活動依存的遺伝子発現などに加え, 神経アクチン骨格の直接的再編成を介しても神経回路形成・成熟過程に重要な影響を与える可能性を示唆するものである。

(4) 小脳皮質における登上線維微小帯域の in vivo 2光子イメージングによる解析

喜多村和郎, 橋爪 幹, 狩野方伸 (東京大・医)

小脳皮質における複数プルキンエ細胞の登上線維応答は矢状面に沿って高い同期性を示す(微小帯域)。本研究では、微小帯域の生体内における詳細な活動パターンを明らかにすることを目的として、ラットおよびマウス個体における2光子励起カルシウムイメージングを行なった。自発の登上線維入力による個々のプルキンエ細胞の複雑スパイクの同期性は、側方に約200 μ mの距離定数で減衰し、過去の多電極細胞外記録の結果と一致した。また、自然刺激による登上線維応答の同期性の上昇が観察された。情報理論を用いた解析から、複数プルキンエ細胞における登上線維応答の空間パターンが、単なるスパイク数を考慮した場合と比較して、刺激に関するより多

くの情報量を持つことを定量的に示した。このことは、オリーブ-小脳間の回路が、微小帯域内において集団として感覚情報を表現していることを強く示唆する。次に、微小帯域内の集団活動の生理学的意義を明らかにするために、重篤な運動失調を呈するGluR δ 2サブユニットのKOマウスを用いて、微小帯域の活動イメージングを行なった。GluR δ 2KOマウスでは、登上線維応答の同期性が異常に亢進しており、かつ、側方への同期性の減衰がほとんど見られなかった。これより、正常な運動機能の発現には、微小帯域の形成とプルキンエ細胞の集団としての活動パターンが必要であることが示唆された。

(5) スフィンゴシン1リン酸による破骨細胞前駆細胞の遊走・位置の制御機構

石井 優, Ronald Germain (大阪大・免疫学フロンティア研究センター)

破骨細胞は単球系血液細胞から分化する多核巨細胞であり、骨を融解・吸収する特殊な能力を有する。これまで、破骨細胞分化・成熟に関与する多くの分子・機構が明らかにされているが、生体内で破骨細胞前駆細胞がいかにして骨表面にリクルートされるのか、またその遊走(ケモタキシス)がどのように制御されているかについては全く不明であった。本研究で、多光子励起レーザー顕微鏡を駆使して、生きたマウス骨組織内での破骨細胞をin vivo イメージングすることにより、前駆細胞の遊走・接着が血中に豊富に存在する脂質メディエーターであるスフィンゴシン1リン酸(S1P)によって生理的に制御されていることが明らかになった。前駆細胞はS1Pの受容

体であるS1P₁を発現し、これにより血中へ再還流する。単球系細胞でS1P₁を欠損したノックアウトマウスでは、前駆細胞の再還流が低下し、骨吸収が亢進することが分かった。また、S1Pアゴニストの投与により、骨粗鬆症モデルマウスでの骨塩低下が抑制され、新たな治療として有望であることが示された。本研究は、破骨細胞の前駆細胞の遊走・位置の制御が、破骨細胞分化調節における新規の、かつ臨床的に重要な作用点であることを初めて示したものである。本発表ではさらに、演者が開発・応用した骨組織内のin vivo ライブイメージングの方法論や今後の応用についても、ムービーを紹介しながら概説した。

(6) 細胞膜プロトンポンプの turnover 制御機構

久野みゆき, 納富拓也, 川脇順子, 森浦芳枝, 酒井 啓 (大阪市立大・医)

空胞型H⁺-ATPase (V-ATPase: H⁺ポンプ)は、リソゾーム, エンドゾーム, シナプトゾームなど細胞内小胞膜

に存在するH⁺ポンプであるが、破骨細胞では骨に接する細胞膜(ruffled membrane)へPI3 kinaseの作用を受けてリ

クルートされ骨基質を融解する酸分泌経路となる。培養破骨細胞にホールセルクランプ法を適用すると H^+ 電流から細胞膜 V-ATPase 活性を、また膜容量から細胞表面積の増減を定量的かつリアルタイムに測定することができる。骨基質から溶け出した高濃度の Ca^{2+} に暴露されると破骨細胞による骨吸収が抑制されることが知られており、V-ATPase 電流も Ca^{2+} によって可逆的に抑制される。私達は、この Ca^{2+} -sensing 応答における V-ATPase の細胞

内一細胞膜間の turnover を検討した。 Ca^{2+} 刺激で V-ATPase 電流と細胞面積は同時に減少した。この過程は V-ATPase のブロッカーや PI3 kinase のインヒビターで抑制され、functional な V-ATPase の存在が必要と推測された。定量的な検討から、endocytosis/exocytosis による V-ATPase の turnover は常時生じており、 Ca^{2+} は細胞膜 V-ATPase の endocytosis/internalization を促進し破骨細胞の酸分泌を抑制すると考えられた。

(7) 酸塩基調節におけるヘンレループ髓質太い上行脚（管腔膜 NHE3）の役割

安岡有紀子, 小林瑞佳, 川田英明, 河原克雅（北里大・医）

腎臓は、近位尿細管 (PT) における HCO_3^- 再吸収と、集合管間在細胞 (CD-IC) の H^+ 分泌によって HCO_3^- 新生を行い、血漿の酸塩基バランスを維持している。我々は、尿細管における HCO_3^- の再吸収/新生に不可欠な炭酸脱水酵素 (CA) のネフロン内局在と、代謝性アシドーシスによる発現量の変化を調べ、管腔膜 NHE3（髓質太い上行脚 MTAL）との機能的関連性を調べた。

【方法】10-12 週齢のマウス (C57BL/6J, 52 匹) を、コントロール (C) 群 (2%スクロース溶液飲水) と代謝性アシドーシス誘導群 (0.28 M NH_4Cl /2%スクロース溶液飲水) に分け、尿・血液の各種電解質濃度・pH 変化を測定した (0, 1, 3, 6d)。CA (CAII, CAIV, CAXII, CAXIV) mRNAs のネフロン内局在 (0d) と NH_4Cl 負荷 (6d) による発現量変化は、高感度 In situ hybridization (ISH) 法で調べた。

【結果】血漿 pH は、C 群 (7.37 ± 0.02) に比べ、 NH_4Cl 負荷群で一時低下し (7.17 ± 0.01 , 1d), 徐々に正常域に復した (7.26 ± 0.03 , 3d; 7.34 ± 0.02 , 6d)。この間、尿 pH は、 6.52 ± 0.04 から 5.87 ± 0.04 に低下し (1d), 6 日間持続した。CAII-CAXIV mRNAs (C 群) は、近位曲尿細管 (PCT), 細い下行脚 (DTL), MTAL, 皮質 TAL (CTAL), 遠位曲尿細管 (DCT), CD に発現していた。 NH_4Cl 負荷で発現が増加したのは、CAII (PCT), CAIV (PCT, MTAL), CAXII (PCT, CD-IC) であり、CAXIV は変化しなかった。

【結論】 NH_4Cl 負荷による NHE3 の発現量増加部位に一致したのは、MTAL の CAIV のみであった。MTAL 管腔膜の NHE3 は、細胞内 CA_{χ} と協調的に働き、尿中への酸分泌と血漿 pH の恒常性に貢献していると考えられる。

(8) ウニ受精時の一酸化窒素のシグナリングとその役割

毛利達磨, 曾我部正博, 経塚啓一郎（生理研, 名古屋大・医, 東北大・院生命・浅虫海生研センター）

ウニは古くから受精研究の代表的なモデル実験動物だが、受精時のシグナリングについてはまだ不明な点が多い。ウニ卵受精時にはカルシウム増加と同様に一酸化窒素 (NO) の増加も起こるが、その機能やシグナル伝達についてはまだほとんどわかっていない。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った。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起きることを確認した。受精時の NO 増加の役割を調べるために NO 吸収剤 PTIO や NO 増加の阻害剤を用いて、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), H_2O_2 産生を測定した。酸素消費を酸素電極を用いて測定したところ、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た。NO

増加を阻害すると NADH/NADPH の自家蛍光シグナルもその増加が抑制された。酸素消費の原因である H_2O_2 の産生は蛍光試薬 Amplex Red で測定した。NO 増加を阻害すると H_2O_2 の産生は抑制された。また、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た。これらのことから NO 増加は受精膜の硬化を促進する働きがあることが結論された。

(9) メカノ刺激による ATP 放出のリアルタイムイメージング

古家喜四夫, 曾我部正博 (名古屋大・医)

ATP は普遍的な細胞間情報伝達物質として数多くの生理機能に関与していることが明らかになってきている。ATP を用いるメリットは、すべての細胞が情報発信できることと、ほとんどの細胞が ATP 受容体 (代謝型 P2Y とイオンチャネル型 P2X ファミリー) を持ち、情報の受け手にもなりうることである。ATP 受容体に関してはかなり分かってきたが、ATP 放出経路については、 Ca^{2+} 細胞内情報伝達系における Ca^{2+} チャネルにも相当する、情報伝達系の根幹部分にもかかわらずほとんど分かっていない。多くの細胞や組織において ATP 放出は伸展や流れなどの機械刺激によって起こり、メカノシグナリングとの深い関わりが示唆されている。われわれは機械刺激に

よる ATP 放出の経路、制御機構を明らかにするため、Luciferin-Luciferase 反応による ATP ルミネッセンスを顕微鏡下で高感度カメラによってリアルタイムにイメージングできるシステムを構築した。この方法は現在 100ms の時間分解能で 10nM 程度の放出 ATP のイメージングが可能であり、実際、タッチやストレッチといった機械刺激によって、乳腺上皮細胞や小腸絨毛下線維芽細胞などの培養細胞や組織からの ATP 放出の様子が明らかとなった。また Luciferase を細胞表面に局在化させることにより、血管内皮細胞からの流れズリ応力による ATP 放出のイメージングも可能となった。

(10) B リンパ球における Ras-Erk シグナル

黒崎知博 (大阪大・WPI 免疫フロンティア研究センター・理研)

モデル B リンパ球 DT40 を用いて、まず、私たちは、Ras の活性化に従来考えられていた GEF ファミリーである Sos とは異なり、主として RasGRP3 が用いられていることを明らかにした。更に、RasGRP3, Sos が協調的に働き、Ras/Erk 活性化の迅速性を制御していることが明らかになった。

Ras/Erk シグナルの生理的意義を検索する目的で、

ERK1/ERK2 double knockout マウスを樹立解析した。B 細胞分化は、このマウスでは pro-B から pre-B ステージで停止しており、pre-BCR を介する増殖シグナルに Erk は必須であった。この pre-BCR を介する増殖シグナルには Erk によってリン酸化された Elk, CREB が、そのターゲット遺伝子である、c-Myc, ilf2, Mef2c, Mef2d の発現を介しておこなわれていることが強く示唆された。

(11) リアノジン受容体を介するカルシウム放出活性の経時的なスイッチングがもたらす細胞間不均一性

中村直俊, 山澤徳志子, 大久保洋平, 飯野正光 (東京大・医)

近年、遺伝的に同一な細胞集団を同じ環境に置いた場

合にも、個々の細胞が多様な表現型を示しうることが報

告されている。微生物を用いた研究で、転写・翻訳過程での微小なノイズの増幅が異なる表現型をもたらすという機構が示唆されているが、分化した哺乳類細胞にも同様の現象が存在するかはよくわかっていない。我々は、ヒト胎児腎由来の HEK293 細胞を限界希釈法でクローン化し、リアノジン受容体依存性 Ca^{2+} 放出を観察した。これらの細胞でリアノジン受容体発現レベルの細胞間不均一性は観察されなかったが、約 4 割の細胞だけが Ca^{2+} 放出を示すという表現型の分離現象が見出された。これを担う細胞内過程として、リアノジン受容体の Ca^{2+} による Ca^{2+} 放出メカニズムにより、 Ca^{2+} 応答が小胞体の Ca^{2+} 放

出および取り込み活性に対して閾値的な特性を示すことを明らかにした。この 2 つの活性の微小なノイズレベルの差が、2 つの表現型をもたらすことが強く示唆された。我々はさらに HEK293 細胞の長時間経時的 Ca^{2+} イメージングを行い、個々の細胞が平均約 60 時間で「 Ca^{2+} 応答陽性」と「 Ca^{2+} 応答陰性」を示す状態間を遷移するスイッチ現象を明らかにした。以上により、分化した哺乳類細胞においても遺伝的に同一な細胞が異なる表現型を示す現象が存在し、異なる表現型の間の経時的スイッチ現象によって細胞間不均一性がもたらされることが示された。

(12) 膵β細胞分化誘導因子ベータセルリンδ4の作用機構

小島 至, 山田聡子, 小寺 力, 中川裕子, 長澤雅裕 (群馬大・生体調節研究所)

インスリンを分泌する膵β細胞の分化誘導因子として、EGF ファミリーに属する増殖因子ベータセルリン (BTC) が知られている。BTC は分化誘導作用とともに強力な増殖促進作用をもつため、臨床応用の観点からは不利である。我々は BTC 前駆体遺伝子の第 4 エクソンを欠くスプライス変異体 BTCδ4 を同定した。BTCδ4 は、増殖促進活性をもたないが BTC と同様に分化誘導作用を発揮することから、臨床応用の観点から有望な因子である。そこで BTCδ4 のシグナル伝達経路について検討した。BTCδ4 は BTC と異なり ErbB1, ErbB4 に結合せず、これらの受容体や Shc をチロシンリン酸化しない。一方

BTCδ4 は、分子量約 75Kda の受容体に結合して緩徐に Erk を活性化し、これにより分化誘導作用を発揮する。Erk の上流を検討したところ、BTCδ4 により緩徐に Ras が活性化されることが判明した。そこで BTCδ4 受容体により Ras が活性化される経路を検討したところ、BTCδ4 により Ca^{2+} 流入が惹起され、Pyk2 を介して Ras が活性化されることが明らかになった。実際、 Ca^{2+} 流入を抑制することにより BTCδ4 による Erk 活性化は抑制された。BTCδ4 は Ca^{2+} 透過性チャネルを活性化し、 Ca^{2+} 流入を惹起して分化誘導作用を発揮するものと考えられる。

(13) 免疫応答細胞における酸化的ストレス感受性チャネル TRPM2の生理的役割

山本伸一郎, 清中茂樹, 高橋重成, 森 泰生 (京都大・工)

炎症部位において集積した血球細胞はサイトカインなど炎症性たんぱく質を放出する。そのサイトカインの主な産生源として単球/マクロファージが知られており、そのサイトカインの中で好中球などといった血球細胞を遊走させるサイトカインを特にケモカイン言う。炎症部位においては、様々な細胞から活性酸素種が産生されており異物除去に働くのと同時に、ケモカイン産生などを誘導するシグナル伝達物質としても機能している。

今回、活性酸素種によって活性化される TRPM2 チャネルが単球/マクロファージにおいて活性酸素種によるケモカイン産生に必須であることを明らかにした。さらにマクロファージにおける TRPM2 依存的なケモカインの産生が好中球の炎症部位への浸潤を惹起し、炎症組織の損傷を引き起こしていることが明らかになった。本研究で TRPM2 が単球/マクロファージにおいてケモカイン産生を引き起こし、好中球の浸潤を介して炎症を悪化さ

せるメディエーターとして機能していることを明らかにした。

以上、本研究では活性酸素種と炎症とを仲介する分子

実体として TRPM2 を明らかにし、TRPM2 が新規抗炎症薬の創薬ターゲット分子になる可能性を提示できた。

(14) チャネルのゲート開閉におけるねじれ構造変化：KcsA チャネル分子レベルでの動態

老木成稔, 清水啓史, 岩本真幸, 今野 卓, 佐々木裕次 (福井大・医)

イオンチャネルの本質的機能であるイオン透過とゲーティングについて、10 年前に解かれた K チャネルの結晶構造は何を教えてくれたのだろう。イオン透過については選択性フィルタの立体構造をもとにイオン透過機構に関する多くの知見が得られた。一方、ゲーティング機構に関しては、そもそもダイナミックな現象であり、結晶構造という静的イメージからゲートが開閉する様子を推測することは難しい。ゲーティングに際して起こる構造変化の遷移状態はどのようなものか、どのような構造変化の軌跡を辿るのか。私達は X 線回折点追跡法を KcsA カリウムチャネルに適用し、チャネルがゲーティングを行う際の構造変化を 1 分子レベルで捉えることに成功し

た。KcsA チャネルは pH 依存性であり、酸性 pH でゲートが開く。この時、チャネル分子は長軸のまわりに大きくねじれる構造変化を起こすことが明らかになった。ねじれ運動は膜貫通ドメインが起源となり、細胞質ドメインまで伝播することが明らかになった。多くのチャネル分子が α -ヘリックス束構造をもっており、ヘリックスのねじれ運動はチャネルゲーティングに共通する機構と考えられる。

Shimizu et al.: Global Twisting Motion of Single Molecular KcsA Potassium Channel Upon Gating. Cell 132: 67-78, 2008.

(15) グリア細胞に発現する内向き整流性 K^+ チャネル Kir4.1 と薬物相互作用解析

古谷和春, 大野行弘, 稲野辺厚, 日比野浩, 倉智嘉久 (大阪大・医)

イオンチャネルは蛋白質、脂質、あるいは薬物などの小分子化合物との相互作用によりその機能が修飾される。これはイオンチャネルの生理・病理・薬理学的制御において必須であるが、その構造的理解は十分進んでいない。近年我々は、代表的な三環系抗うつ薬及び選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRIs) がグリア細胞に発現し K^+ 緩衝作用を担う内向き整流性 K^+ (Kir) チャネル Kir4.1 を阻害することを示してきたが、詳細な作用機序は不明であった。今回我々は、電気生理学的手法と計算科学的手法を用い、チャネル側の薬物受容部位と薬物側の相互作用部位の両方の構造基盤を調べることによ

り、薬物相互作用を双方向性に解析した。今回の我々の結果は、Kir4.1 チャネルの central cavity に面している Thr128 および Glu158 と抗うつ薬の間でおこる水素結合およびイオン結合による相互作用が、チャネル機能阻害に必須であることを示している。Kir4.1 チャネルの薬物による阻害機構を構造的に理解することは、選択性と阻害作用の強い薬物の論理的ドラッグデザインを可能にし、Kir4.1 チャネルの生理機能及び病態への関与解明のための有効なツールの開発に繋がる可能性がある。さらに、Kir チャネルの生理的制御機構の理解も進める可能性がある。

(16) カフェインの新しい作用機序ーカフェイン受容体としての TRPA1チャネル

長友克広, 久保義弘 (生理研)

我々は, Masuho ら (2005) により報告された「マウス消化管由来の STC-1 細胞に, カフェインを投与した時に見られる $[Ca^{2+}]_i$ の増加」が, 細胞外 Ca^{2+} を除くと消失することを見だし, 「カフェインによって活性化される Ca^{2+} 透過性を持つチャネル」の存在を想定した。そして, *in vitro* 発現系を用いて種々の機能スクリーンを行い, マウスの TRPA1 チャネルがカフェインによって活性化されることを明らかにした。

次のステップとして, この知見が神経細胞や個体においても観察されるか否かを明らかにするために, まず, TRPA1 が内在的に発現しているマウスの DRG neuron を急性単離培養し, Ca^{2+}_i イメージングを行った。野生型マ

ウス (WT) の DRG neuron では, カフェイン投与により $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が起きたが, TRPA1 ノックアウト(KO)マウスの DRG neuron では, 応答は観察されなかった。

次に, 個体レベルでも, マウスが TRPA1 チャネルを介してカフェインを認識しているか否かを明らかにするために, 二瓶法を用いて, 水, およびカフェイン水の飲水量を測定する実験を行った。WT マウスではカフェイン水の消費量が有意に少なかったが, TRPA1-KO マウスでは違いは観察されなかった。

以上の結果から, マウスの神経細胞や個体においても, TRPA1 チャネルがカフェインによって活性化されることが示された。

3. 膜機能分子ダイナミクスの分子機構解明に向けて

2008年9月4日－9月5日

代表・世話人：老木成稔（福井大学医学部）

所内対応者：久保義弘（神経機能素子）

- (1) ベン毛モーターの回転駆動力を生み出すイオンチャネル複合体 (PomA/PomB) におけるイオン透過経路の解析
須藤雄気¹, 北出祐也², 吉住 玲¹, 古谷祐詞², 小嶋 勝¹, 小嶋誠司¹, 神取秀樹², 本間道夫¹
(¹名大院・理, ²名工大院・工)
- (2) 内向き整流性カリウムチャネル-ポリアミン相互作用の構造生物学的解析
大澤匡範¹, 村松隆宏¹, 横川真梨子¹, 木村友美¹, 嶋田一夫^{1,2}
(¹東大・院薬系, ²産総研・バイオメディシナル情報解析セ)
- (3) KCNE タンパク質による KCNQ1 チャネルの電位依存性ゲーティングの制御機構
中條浩一, 久保義弘（生理研）
- (4) ゲーティングキネティクスから予想された CFTR-NBD エンジンの四次構造変化サイクル
相馬義郎^{1,2}, 清水宏泰^{1,3}, M.-F. Tsai, T.-C¹. Hwang¹
(¹米国ミズーリ大・ダルトン研究所, ²慶大・医, ³大阪医大)
- (5) K チャネルのゲーティング構造変化について
老木成稔¹, 清水啓史¹, 岩本真幸¹, 今野 卓¹, 佐々木裕次² (¹福井大・医, ²Spring-8)
- (6) 機械受容チャネル MscL のメカノゲーティング機構：実験とシミュレーション
曾我部正博（名大院・医）
- (7) 一分子時系列情報から読み解く状態遷移ネットワーク-機械受容チャネル MscL を例に
小松崎民樹（北大・電子科学研）
- (8) モデルチャネルにおけるイオン透過のボトルネックとその起源
炭竈享司¹, 斉藤真司², 大峯 巖¹ (¹名大院・理, ²分子研)
- (9) 電位依存性プロトンチャネルにおけるプロトン透過の温度依存性 (Q10 値)
久野みゆき¹, 安藤博之², 森畑宏一¹, 酒井 啓¹, 森 啓之¹, 清水啓史², 岩本真幸², 老木成稔²
(¹大阪市大院・医, ²福井大・医)
- (10) 分子認識とアクアポリン：RISM/3D-RISM による研究
S. Phongphanphanee, 吉田紀生, 平田文男（分子研）
- (11) ロドプシンの特殊な水とプロトン化水クラスター
神取秀樹（名工大院・工）
- (12) 内向き整流性 K⁺チャネル Kir2.1 のゲーティングと細胞内 pH
石原圭子, Yan Ding-Hong（佐賀大・医）
- (13) MotB のペリプラズムドメインの結晶構造から考察する細菌ベン毛モーター固定子の機能
小嶋誠司¹, 佐久間麻由子¹, 須藤雄気¹, 児嶋長次郎², 南野 徹³, 難波啓一³, 本間道夫¹, 今田勝巳³
(¹名大院・理, ²奈良先端大・バイオ, ³阪大院・生命機能)
- (14) Inhibitor Cystine Knot モチーフのペプチドからムスカリン性アセチルコリン受容体リガンドを創る試み
小野世吾, 木村忠史, 久保 泰（産総研・脳神経情報）

【参加者名】

小松崎民樹（北大・電子科学研），清 一人（北大・電子科学研），大澤匡範（東大・院薬系），小嶋誠司（名大院・理），須藤雄気（名大院・理），石井孝広（京大・医学部），中島則行（京大・医学部），柳（石原）圭子（佐賀大・医学部），相馬義郎（慶應義塾大学・医学部），久野みゆき（大阪市立・大学院），老木成稔（福井大・医学部），清水啓史（福井大・医学部），岩本真幸（福井大・医学部），神取秀樹（名古屋工業大・大学院），川島崇睦（名古屋工業大・大学院），中妻亜弥（名古屋工業大・大学院），山田純也（名古屋工業大・大学院），渡邊彰英（名古屋工業大・大学院），久保 泰（産業総合研究所），木村忠史（産業総合研究所），小野世吾（産業総合研究所），瀬戸倫義

（滋賀医科大学・医学部），曾我部正博（名古屋大・大学院），斉藤真司（分子研），炭竈享司（分子研），平田文男（分子研），吉田紀生（分子研），S. Phongphanphanee（分子研），澤田康之（名大院・医学部），辰巳仁史（名大院・医学部），古谷祐詞（名古屋工業大・大学院），浅井祐介（名古屋工業大・大学院），北出祐也（名古屋工業大・大学院），村瀬雅樹（名大院・医学部），野村健（名大院・医学部），吉田 明（生理研），小林千草（分子研），久木田文夫（統合バイオ），久保義弘（生理研），立山充博（生理研），中條浩一（生理研），伊藤政之（生理研），長友克広（生理研），松下真一（生理研），石井 裕（生理研）

【概要】

生理研研究会「膜機能分子ダイナミクスの分子機構解明に向けて」も3年目を迎えた。この間，トピックスの変転に伴いメンバーも変化してきた。本年度の研究会は膜機能蛋白質分子研究のひとつの到達点を探ることを目指し，明快な2つのトピックスに話題を絞った。膜蛋白質の構造変化ダイナミクスとイオン輸送機構である。理論計算から分光学，構造生物学，電気生理学，1分子測定，計算機科学，新規の解析法，スクリーニング法など，さまざまな領域の研究者が集い，レベルのきわめて高い研究会であった。特にチャンネル分子研究に対するアプローチが多彩となり，膜蛋白質という範疇を越えて，蛋白質分子研究の先端を走る領域であることを実感することができた。チャンネルの発表以外にも，モーター蛋白などの知見が話題に広がりを与えた。イオン透過機構の研究に関しては様々な手法が出揃い，研究の流れは定まったように思える。一方，蛋白質の構造変化問題（チャンネル

ではゲーティング問題）は未だ模索状態であるとはいえ，新しい実験手法，計算機実験，解析理論が開発されつつあり，近い将来大きな展開が期待できる。ゆったりとスケジュールを組んだので議論の時間をたっぷりとることができ，活発な議論が噴出した。MacKinnonのKチャンネルの結晶構造決定から10年，ようやく日本でもこの成果を生かし，次のステップに踏み出す体制の核が出来上がりがつつある。特に生理学領域以外の若い研究者が参入しつつある。ただ分野間で相互の理解が未だ十分でないのも事実である。今後この領域の研究をさらに発展させるには，基本的な知識を補い，物理化学的な言語の共有化をはかるための教育的機会や相互乗り入れの研究会の機会を増やすことが不可欠である。研究のリソースとして世界に伍する十分なポテンシャルを持つことは明白であり，多くの人材を引き込むような魅力的な研究会として発展することを期待したい。

（1）べん毛モーターの回転駆動力を生み出すイオンチャンネル複合体（PomA/PomB）におけるイオン透過経路の解析

須藤雄気¹，北出祐也²，吉住 玲¹，古谷祐詞²，小嶋 勝¹，小嶋誠司¹，神取秀樹²，本間道夫¹
 （¹名大院・理，²名工大院・工）

膜蛋白質は全蛋白質の約30%を占め，生命活動に重要な役割を持つ。我々は膜蛋白質間の相互作用・構造変化・集合に興味を持ち研究を行っている。具体的には，外界

からの情報入力部位（光受容体）と出力部位（べん毛モーター）それぞれで重要な役割を果たす膜蛋白質複合体を研究対象としている。本発表では後者についての最近

の成果を報告した。

細菌はべん毛モーターを回転させ運動能を得る。回転駆動力は固定子複合体(PomAB)の Na^+ チャネル機能に伴う電気化学ポテンシャル差により生み出される。 Na^+ 透過経路の解明は機能理解に重要で、Asp24が Na^+ 結合部位を形成することが示唆されているものの、それ以外の情報は乏しい。本研究では、Asp24のヘリックス2ターン

分イオン取り込み側に位置するアミノ酸(Cys31)に着目し、 Na^+ 透過への役割を解析した。また、ATR-FTIR分光法を用いた解析から、長年の課題であった「Asp24- Na^+ の直接結合」を検出することに成功した。これらの結果から Na^+ 透過と構造変化について報告した。また、入力部位(光受容体)における最近の成果についても報告した。

(2) 内向き整流性カリウムチャネルーポリアミン相互作用の構造生物学的解析

大澤匡範¹, 村松隆宏¹, 横川真梨子¹, 木村友美¹, 嶋田一夫^{1,2}

(¹東大・院薬系, ²産総研・バイオメディシナル情報解析セ)

内向き整流性カリウムチャネル(Kir)は、静止膜電位、 K^+ 恒常性、心拍数、ホルモン分泌などを制御している。Kirは四量体を形成し、 K^+ 選択フィルターを有する膜貫通ポアと、一次配列上、膜貫通ポアドメインのNC両末端の領域からなる細胞内ポアドメインにより長い K^+ 透過路が形成されている。Kirの内向き整流性には細胞内ポリアミンあるいは Mg^{2+} が重要な役割を果たしている。これまでに部位特異的変異体を用いた電気生理学的研究から、脱分極時にはポリアミンが膜貫通ポアを塞ぐことにより外向き電流を遮断する機構が提唱されている。一方、分極時にはポリアミンは細胞内領域の酸性残基と結合しており、Kirの内向き整流性における細胞内領域で

のポリアミン結合の重要性が示されている。しかしながら、ポリアミンの結合部位・結合様式が直接解析された例は無い。そこで本研究では、Kir3.1細胞内ドメインとポリアミンとの相互作用様式を各種物理化学的手法により解析し、Kirの内向き整流性発現の分子機構を解明することを目的とする。

本研究会では、等温滴定型カロリメトリーにより明らかにした相互作用の熱力学的パラメータ、NMRにより同定した結合部位、スperlミン結合に伴うKir3.1の構造変化について報告した。これらの結果に基づき、スperlミンとKir3.1との相互作用様式と内向き整流性発現機構について、考察・意見交換を行った。

(3) KCNE タンパク質による KCNQ1チャネルの電位依存性ゲーティングの制御機構

中條浩一, 久保義弘(生理研)

電位依存性カリウムチャネルのKCNQ1は共発現するKCNEタンパク質によって、その電流の性質をさまざまに変化させる。特に有名なのは心臓や耳で共発現するKCNE1による制御であり、電流量の増大、活性化・脱活性化のキネティクスの遅延、G-Vカーブの脱分極側への大きなシフト(>50mV)などドラスティックな変化が引き起こされる。

今回我々は、ゲノム上にKCNE1に相当する遺伝子を持たない原索動物ユウレイボヤのKCNQ1オーソログであるciKCNQ1遺伝子を利用し、KCNE1によるKCNQ1

チャネルの制御メカニズムについて検討をおこなった。KCNE1とciKCNQ1をアフリカツメガエル卵母細胞に共発現させると、G-VカーブはciKCNQ1単独のものに比べるとむしろやや過分極側にシフトしており、KCNE1による制御が正常に機能していないことが示唆された。次にヒトのKCNQ1とciKCNQ1のキメラ変異体を作成し、S5-S6領域がKCNE1によるG-Vカーブのシフトに重要であることを示唆する結果を得た。さらに絞り込んだ結果、S5-Pリンカー領域と、S5上の272番目のグリシン、S6上の324番目と334番目のバリンが特に重要であ

ることが明らかとなった。本研究会では、電位依存性のカリウムチャネルの結晶構造を参照しながら、KCNE1

がどのように KCNQ1 チャネルに結合し修飾するのかを議論した。

(4) ゲーティングキネティクスから予想された CFTR-NBD エンジンの四次構造変化サイクル

相馬義郎^{1,2}, 清水宏泰^{1,3}, M.-F. Tsai, T.-C.¹, Hwang¹

(¹米国ミズーリ大・ダルトン研究所, ²慶大・医, ³大阪医大)

ABC トランスポータースーパーファミリーをメンバーである CFTR チャネルは2つの Nucleotide Binding Domain (NBD) を持ち、この2つの NBD は ATP 2 分子を挟み込んだ形での二量体の形成とその内の ATP 1 分子の加水分解に続く二量体の解離を繰り返して、二量体形成によってチャネルが閉から開状態に遷移し、二量体の解離に伴って閉状態に戻るという“NBD ゲーティングエンジン”仮説が提唱され認められている。

では、次の疑問として NBD エンジンは二量体状態と解離状態の2つの状態の間をどのような経路を辿って行き来しているのだろうか。今回、我々は Pyrophosphate

(PPi) の CFTR ゲーティングに対する開口増強効果を用いて、CFTR チャネルが閉状態から開状態へ移る場合と開状態から閉状態へ戻る場合とではそれぞれの異なった経路を辿り、それぞれに経路の途中で PPi によって再開口される中間的閉口状態の存在が確認できた。このことは NBD エンジンが、二量体状態と解離状態の2つの状態を単に行き来しているのではなく、行きと帰りは異なる経路を辿るサイクルを回っていることを示唆している。このサイクリックなゲーティングキネティクスにおける4つの状態は、それぞれ異なる NBD の四次構造と対応していると考えられた。

(5) K チャネルのゲーティング構造変化について

老木成稔¹, 清水啓史¹, 岩本真幸¹, 今野 卓¹, 佐々木裕次² (¹福井大・医, ²SPring-8)

10 年前に K チャネルの結晶構造が得られ、その後も着々とチャネルの構造データが蓄積している。これら静的な像からチャネルの機能する姿が具体的にイメージできる状況になってきた。特に、イオン透過については選択性フィルタの立体構造をもとにイオン透過機構に関する多くの知見が得られた。一方、ゲーティング機構に関しては、異なるチャネル種であるとはいえ、開状態と閉状態の結晶構造が得られている。従ってゲーティングの分子機構を明らかにするために現在求められている情報は構造変化のダイナミクスである。ゲーティングに際して起こる構造変化の遷移状態はどのようなものか、どの

ような構造変化の軌跡を辿るのか。私達は X 線回折点追跡法によりチャネルがゲーティングを行う際の構造変化を1分子レベルで捉えることに成功した。チャネル分子は長軸のまわりに大きくねじれる構造変化を起こす。この構造変化では膜貫通ドメインが起源となり、細胞質ドメインまで伝播することが明らかになった。単一分子運動軌跡から得られるダイナミック情報として、構造変化のエネルギー地形について検討した。

Shimizu et al.: Global Twisting Motion of Single Molecular KcsA Potassium Channel Upon Gating. Cell 132: 67-78, 2008.

(6) 機械受容チャネル MscL のメカノゲーティング機構：実験とシミュレーション

曾我部正博（名大院・医）

最も研究が進んでいる機械受容チャネルである細菌 MscL の活性化機構に関する最新知見を紹介する。MscL の高次構造（閉状態）は X 線回折法で解明され、膜の伸展（張力）のみで活性化（開口）することが分かっている。MscL はヘアピン状の膜 2 回貫通型のサブユニット（136 残基）がやや斜めに傾いて円筒状に会合したホモ 5 量体で、内側ヘリックス同士が脂質膜内葉で交差接触してポアの最狭部（ゲート）を構成する。問題は、脂質と接触する外側ヘリックスのどこで膜張力を感知し、それが如何にして蛋白質の構造変化を引き起こしてゲートを開くかである。膜面に接する外側ヘリックスの疎水性アミノ酸を逐一親水性アミノ酸に置換して伸展感受性に欠

陥が生じるアミノ酸を同定することで、張力感知部位が脂質膜外葉のグリセロール基近傍に位置するいずれかのアミノ酸であることが分かった。膜伸展によって、これらのアミノ酸が脂質に引っ張られて堅い膜貫通部位全体が膜面方向に引き倒されることでゲートが開くことが予想された。常時開口する MscL 突然変異体蛋白質の電子顕微鏡による一分子構造解析を行い、この予想と一致する結果が得られた。さらに分子動力学計算によって、脂質と最も強く結合する張力感知アミノ酸 (F78) が、膜張力の増大に応じて膜面方向に牽引され、内側ヘリックスが倒れながら交差部位がチャネル外周方向にずれることでゲートが開く過程が明らかとなった。

(7) 一分子時系列情報から読み解く状態遷移ネットワークー機械受容チャネル MscL を例に

小松崎民樹（北大・電子科学研）

現在、報告されているほとんどの生体分子系のキネティクスは、多様な時間・空間スケールに渡り複雑に絡み合った個々の分子ダイナミックスの集団平均として観測されている。近年、1 分子計測技術等の飛躍的な進展により、「観測」の在り方が大きな変貌を遂げようとしている。しかしながら、時系列情報から我々は何を学ぶことができるのであろうか？ 時系列データの観測値に対するヒストグラムを正規分布の線形結合でフィットする状態推定が（古典的に）よく用いられているが、局所平衡の成立を陰に前提としており、かつ、一般に「正規」分布の重ね合わせで表わされる保証はどこにもない。一方、多次元空間において定義されるべき「状態」を一次元に射影した時系列データの各時刻における数値から単

純に定義すると、状態遷移過程において見掛け上の履歴現象を引き起こすことも知られている。それゆえ、分布関数の形状、状態数、ならびに系についての性質を予め規定するのではなく、状態および状態間遷移を“時系列情報からできるだけ自然な形で学びとる”方法論が必要となる。本発表では、我々が近年開発した時系列情報から階層的なエネルギー地形および状態遷移ネットワークを再構成する新しい時系列解析理論 (Baba and Komatsuzaki, PNAS (2007), Li, Yang and Komatsuzaki, PNAS (2008)) を概説するとともに、パッチクランプ法による機械受容チャネル MscL 系の電位時系列データに適用した研究結果を報告した。本研究は名古屋大学曾我部正博氏、辰巳仁史氏らとの共同研究である。

(8) モデルチャネルにおけるイオン透過のボトルネックとその起源

炭竈享司¹, 斉藤真司², 大峯 巖¹ (¹名大院・理, ²分子研)

我々は分子動力学法によるシミュレーションにより、

モデルチャネルにおける K⁺イオンの透過のダイナミク

スを調べた。その結果、イオン透過の律速段階はイオンがチャネルにどのように入るかであることが分かった。チャネル入口に到達したイオンのうちチャネルを透過できたのは約 10%であり、すなわち、チャネル入口には自由エネルギー障壁が存在する。このモデルチャネルでは、 K^+ チャネルにおけるそのように、イオンと水が交互に一列に透過しており、したがって、近づいてきたイオンがチャネル内の水分子 (WAT1) へ配位することがイオン透過の必須条件になる。すなわち、元々 WAT1 に配位していた水分子 (WAT2) と近づいてきたイオンとの配位の交換がイオン透過に重要であることを示している。実際、

自由エネルギーをエネルギーとエントロピーに分解した結果、チャネル入口の自由エネルギー障壁はエントロピーに由来することが明らかになった。さらに、このエントロピー障壁は近づいてきたイオンとの相互作用により、WAT2 の配向が制限されることにより生ずることを解明した。

我々はまた、イオンの透過しやすさがモデルチャネル上の電荷とどのように関わっているのかも調査した。その結果、エネルギーとエントロピーの均衡が取れた場合に、最大のチャネルコンダクタンスが得られることを明らかにした。

(9) 電位依存性プロトンチャネルにおけるプロトン透過の温度依存性 (Q10値)

久野みゆき¹, 安藤博之², 森畑宏一¹, 酒井 啓¹, 森 啓之¹, 清水啓史², 岩本真幸², 老木成稔²

(¹大阪市大院・医, ²福井大・医)

電位依存性プロトンチャネル(voltage-gated H^+ channel)は脱分極によって開口しプロトン(H^+)を選択的に透過させる。多様な細胞に発現し強力な H^+ 排出(分泌)を担うが、その H^+ 透過メカニズムは未だ解明されていない。私達は高密度に H^+ channel を発現するマイクログリアを用いて、透過機構に関わる重要な特性と考えられる温度に対する応答を検討してきた。ホールセルクランプ下、数ミリ秒以内に温度変化を与えることのできる温度ジャンプ法によって得た open-state H^+ 電流の Q10 値は 25°C では 1.5 であったが、4°C から 49°C の範囲で温度が高くなるほど徐々に上昇した。更に電流振幅のアレニウスプロット

は湾曲を示し、チャネル内透過過程以外の要因が H^+ 電流の温度依存性に関与することが示唆された。そこでチャネルを介する H^+ 流出に伴う細胞内での H^+ 枯渇や細胞膜近傍で発生する濃度分極、チャネルポアへのアクセス抵抗の寄与を検討した。アクセス抵抗は高抵抗外液ジャンプ法により推定した。その結果、ホールセル H^+ 電流から得られた Q10 値はチャネルの H^+ 透過とアクセス抵抗の温度依存性の総和であることが判明した。アクセス抵抗を差し引くと、チャネルにおける H^+ 透過の正味の Q10 値は 2.6 と推測された。

(10) 分子認識とアクアポリン : RISM/3D-RISM による研究

S. Phongphananee, 吉田紀生, 平田文男 (分子研)

数年前、我々は蛋白質中の空孔に束縛された水分子を RISM/3D-RISM 理論に基づき「検出」することに成功した。^[1,2] これは極端な不均一場に置かれた流体に対して統計力学が適用可能であることを証明した最初の事例である。一方、この「発見」は生命活動における最も重要な素過程である「分子認識」を解明する上で強力な理論的武器を提供したことを意味する。

この方法のその後の展開において、我々は分子認識が本質的役割を演じる生体内分子過程に焦点を当ててきた。蛋白質による選択的イオン結合、酵素反応、水チャネル(アクアポリン)、蛋白質による不活性気体の選択的結合、蛋白質の圧力変成、などがその例である。

本講演では上に述べたいくつかのトピックス、特に、アクアポリンのイオン透過可能性に関する最近の研究成

果を紹介した。

References

[1] T. Imai, R. Hiraoka, A. Kovalenko, F. Hirata, *J. Am.*

Chem. Soc. (Communications), **127** (44), 15334 (2005).

[2] F. Hirata, ed., *Molecular Theory of Solvation*, Springer - Kluwer, 2003.

(11) ロドプシンの特殊な水とプロトン化水クラスター

神取秀樹 (名工大院・工)

イオンチャネルやポンプの機能発現において、水分子が重要な役割を担うことは自明であるが、これを実験的に捉えることは容易ではない。多くの膜輸送体においては、X線結晶構造解析が唯一の実験手法であり、静的な水の位置情報をもとにしたシミュレーションなどが活発に行われている。

光をエネルギーや情報へと変換する光受容蛋白質においては、機能発現過程を光駆動できるので、さらに特殊な解析が可能となる。我々は光駆動プロトンポンプであるバクテリオロドプシンに対する低温赤外分光解析を行い、X線結晶構造解析に先がけて内部結合水の存在やポンプ過程における重要性を明らかにしてきた。最近では、プロトンポンプ活性をもつロドプシンには必ず強い

水素結合を形成した水分子が存在することを発見し、ロドプシンのプロトンポンプ活性は1個の水分子が決定すると提唱している。

一方、バクテリオロドプシンのプロトン輸送経路に関して、細胞外側へのプロトン放出基が最後の未解明課題であったが、過去の時間分解赤外スペクトル信号をもとにプロトン化水クラスターであることが示唆されていた。我々は最近、注意深い水の同位体効果の実験から、この信号が水分子の振動情報を含むことを明らかにした。これにより永年の疑問に決着がついたわけであるが、蛋白質内部という疎水環境において、プロトンが2個のグルタミン酸ではなく水に存在するのは興味深い。

(12) 内向き整流性 K⁺チャネル Kir2.1のゲーティングと細胞内 pH

石原圭子, Yan Ding-Hong (佐賀大・医)

Kir2.1 内向き整流 K⁺チャネルは、内向き電流に比べて外向き電流が小さく、これは生理的な状態では細胞内液中のポリアミン (有機陽イオン) や Mg²⁺がチャネルを膜電位依存性にブロックするためであると考えられる。Kir2.1 チャネルが細胞内イオン・分子のブロックによらないチャネル固有の電位依存性ゲーティング機構を有するかどうかについては議論がある。我々は最近、インサイドアウトパッチクランプ法を用いた実験において、細胞膜内側液の pH を酸性にすると、Kir2.1 チャネルが非常にゆっくりとした膜電位依存性ゲーティングによって強い内向き整流性を示すことを見出した。この pH 依存性の遅いゲーティングは細胞膜内側液に加えたイオン・

分子によるブロックによるものとは考えられなかった。細胞質内領域のイオン透過孔内面に位置する酸性アミノ酸残基 (E224, E299) を中性アミノ酸に置換した変異体では、遅いゲーティングの膜電位依存性は負電位側にシフトし、内向き整流性がむしろ強くなった。しかし膜貫通領域のイオン透過孔内面に位置し、ポリアミン結合部位として知られている酸性アミノ酸残基 (D172) を中性化した変異体では遅いゲーティングは消失した。これらのことから、酸性 pH で誘発される遅いゲーティングには、細胞膜内面にトラップされた未知の細胞内分子 (アミン) によるブロックが関与するのではないかと推測した。

(13) MotB のペリプラズムドメインの結晶構造から考察する細菌べん毛モーター固定子の機能

小嶋誠司¹, 佐久間麻由子¹, 須藤雄気¹, 児嶋長次郎², 南野 徹³, 難波啓一³, 本間道夫¹, 今田勝巳³(¹ 名大院・理, ² 奈良先端大・バイオ, ³ 阪大院・生命機能)

サルモネラ菌べん毛モーターでは, MotA/MotB 固定子複合体中をプロトンが流れる際に起こる, 固定子-回転子間の相互作用によりトルクが発生する。固定子は MotB の C 末端ペリプラズム側ドメインに存在するペプチドグリカン結合 (PGB) モチーフを介して, 適切な位置に固定されると考えられている。我々は MotB のペリプラズム側可溶性断片 (MotB_{C6}) を作成してその機能や生化学的性質を解析し, 結晶構造を決定した。MotB_{C6} の N 末端側にシグナル配列を付加し野生株で発現すると, MotB_{C6} はペリプラズムに輸送され菌の運動能を阻害した。His タグを付加した MotB_{C6} を精製し, ゲルろ過クロマトグラフィー及び超遠心分析を行ったところ, MotB_{C6} は安定

なホモダイマーを形成していた。我々は MotB_{C6} の結晶化に成功し, SeMet 置換体の結晶を用いて SPring-8 のビームライン BL41XU において X 線回折データを回収し, 分解能 2.0 Å で構造を決定した。MotB_{C6} は 1 つのドメインで構成され, 二量体を形成していた。PGB ドメインを含むコア部分は, これまでに報告された Pal, RmpM, MotY といった PG 結合蛋白質の構造と非常に良く似ていた。コア部分の N 末端側にはβシートに続いて PGB ドメインから長く突き出るとなるαヘリックスが存在し, その先が MotB の N 末膜貫通部位へとつながって行くと考えられる。

(14) Inhibitor Cystine Knot モチーフのペプチドからムスカリン性アセチルコリン受容体リガンドを創る試み

小野世吾, 木村忠史, 久保 泰 (産総研・脳神経情報)

ある種の生理活性ペプチドでは, その同属間でアミノ酸配列を比較した時, 共通の分子骨格 (scaffold) を保持する一方, ループ部分では積極的にアミノ酸置換が導入される。このようなペプチドでは, 様々な物理化学的特性を持つアミノ酸側鎖の空間提示が可能になり, それに伴って広範な標的分子の認識が可能になると考えられる。今回は試験管内分子進化技術を使い, alpha-bungarotoxin を代表とする three-finger (3F) scaffold のペプチドを鋳型とするランダムペプチドライブラリから, 可溶性 interleukin-6 受容体を標的とするペプチドを単離し, それらが同受容体のアンタゴニストやアゴニストになることを示した。

我々は新たにクモ毒液から T 型 Ca²⁺チャネルをブロックするペプチド A4-1 を同定した。このペプチドは Inhibitor Cystine Knot (ICK) とよばれる特徴的なモチーフを有する。ICK ペプチドは種々の生物に存在し, その機能は酵素阻害やイオンチャネル阻害など多様である。現在, 我々は膜タンパク質を標的とするペプチドを選択する系の開発を行なっている。今回, ペプチド A4-1 を鋳型とするランダムペプチドライブラリから, 細胞膜表面に発現したムスカリン性アセチルコリン受容体 m2 サブタイプを標的とする ICK 型ペプチドを新たな分子進化技術により取得し, それらの特性解析を行った。

4. 糖鎖機能研究会・・・分子レベルでの解明を目指して

2008年5月22日－5月23日

代表・世話人：辻 崇一（東海大学糖鎖科学研究所）

所内対応者：池田一裕（分子生理研究系分子神経生理研究部門）

- (1) 放射光施設における糖鎖生物学
加藤龍一（高エネルギー加速器研究機構）
- (2) 担癌状態におけるムチンの生物学的機能
中田 博（京都産業大学）
- (3) 糖鎖の網羅的構造解析からシステム解析へ
長束俊治（大阪大学大学院理学研究科）
- (4) 糖タンパク質品質管理機構～合成糖鎖を駆使した分子レベル解析
戸谷希一郎（成蹊大学理工学部）
- (5) 糖鎖機能の分子的理解に有用な糖鎖合成法の開発
安藤弘宗（岐阜大学応用生物科学部）
- (6) フルオラス合成法による迅速糖鎖合成手法の開発
水野真盛（野口研究所）
- (7) プロテオグリカンの化学合成と生物活性
田村純一（鳥取大学地域学部地域環境学科）
- (8) コンドロイチン 6-O-硫酸基転移酵素-1 過剰発現マウスを用いた脳における
コンドロイチン硫酸鎖の機能解析
宮田真路（神戸薬科大学）
- (9) 血管・リンパ管新生におけるヒアルロン酸リッチ腫瘍微小環境と腫瘍関連マクロファージの作用
三好征司（信州大学大学院医学系研究科）
- (10) ゴルジ体とタンパク質輸送：ライブイメージングによるアプローチ
中野明彦（東京大学・理系・生物科学）
- (11) 二つの GDP-フコース輸送体の機能解析から明らかになった Notch の O-フコシル化の機能
松野健治（東京理科大学基礎工学部）
- (12) メダカ初期発生過程における糖鎖の機能解析
殿山泰弘（京都大学大学院 医学研究科）
- (13) 新生仔マウス小腸におけるスフィンゴ糖脂質の発現変化
米重あづさ（東海大学）
- (14) 実験的自己免疫性脳脊髄炎における複合型ガングリオシドの役割
宮本勝一（近畿大学医学部 神経内科）
- (15) GM1 ガングリオシドのエンドサイトーシス制御によるアルツハイマー病細胞モデルの構築
湯山耕平（国立長寿医療センター研究所）
- (16) ペロ毒素中和活性を有するスフィンゴ糖脂質 Gb3 類似体の合成
三浦 剛（千葉科学大学・薬学部）
- (17) 糖タンパク質の立体構造からみる糖鎖の機能
山口芳樹（理化学研究所・糖鎖構造生物学研究チーム）

(18) 糖タンパク質の細胞内運命を司るレクチンの分子認識

加藤晃一（岡崎統合バイオサイエンスセンター）

(19) 植物糖タンパク質糖鎖加水分解酵素の発現制御による生長制御

石水 毅（大阪大学大学院理学研究科）

【参加者名】

辻 崇一，松田純子，米重あづさ（東海大学糖鎖科学研究所），稲津敏行，高久博直，苫米地祐輔（東海大学工学部応用化学科，東海大学糖鎖科学研究所），鈴木邦彦（元）東海大学未来科学技術共同研究センター），梶本哲也（鈴鹿医療科学大学薬学部），長束俊治，石水 毅，稲本 基（大阪大学大学院理学研究科），田村純一（鳥取大学地域学部地域環境学科），加藤龍一（高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所放射光科学研究施設構造生物学研究センター），中野明彦（東京大理系生物科学），山口芳樹（理化学研究所糖鎖構造生物学研究チーム），岡 昌吾，殿山泰弘（京都大学医学研究科），戸谷希一郎（成蹊大学理工学部），松野健治，鮎川友紀（東京理科大学基礎工学研究科），安藤弘宗（岐阜大学応用生物科学部），湯山耕平（国立長寿医療センター研究所アルツハイマー病

研究部），中田 博（京都産業大学），三浦 剛（千葉科学大学薬学部），水野真盛（（財）野口研究所糖鎖有機化学研究室），宮田真路（神戸薬科大学），加藤晃一，神谷由紀子，内海真穂，西尾美穂，良川須美，山口拓実（岡崎統合バイオサイエンスセンター），矢木宏和，大野恵里菜，山本雅洋，金子琢磨，平野貴志，文庫有志，富田礼子（名古屋市立大学大学院薬学研究科），板野直樹，三好征司（信州大学大学院医学系研究科分子腫瘍学講座），宮本勝一（近畿大学医学部神経内科），上条真弘（生理研生殖内分泌），深沢有吾（生理研脳形態），東 幹人（三菱化学），小野勝彦，等 誠司，竹林浩秀，田中謙二，後藤仁志，稲村直子，松下雄一，李 海雄，石野雄吾，臼井紀好，清水崇弘（生理研分子神経生理）

【概要】

糖鎖が第三の生命鎖として脚光を浴びるようになって久しい。しかし，複合糖質糖鎖が直接的あるいは間接的に様々な現象に関与していることを示唆する知見が集積されてきてはいるが，糖鎖が実際に分子レベルでどのような機序で機能を発現しているのかという基本的かつ重要な問題に関しては，まだほとんど解明されてはいない。糖鎖が単独で機能を発現している場合が無いとはいき切れないが，多くの場合糖鎖と相互作用をする生体分子，特にタンパク質が介在しているはずである。これら生体分子の実態をも解明しなければ，糖鎖の基本問題が解けないということは明らかである。本研究会は，糖鎖のみならず相互作用をする相手の分子をも対象として検討を進め，現在抱えている問題点を顕在化し，問題解決への糸口を探ることにより，「糖鎖の持つ基本的な機能は何

か，特に分子レベルでどのように機能しているのか」という問題を解くことを目標としている。

今回は，最近の様々な学会・シンポジウムあるいは論文などで注目すべき発表をした方々を中心に多方面の研究者にお集まり頂き，糖鎖機能研究の現状と今後の問題点を探るとともに，それらの問題を克服するのに必要とされる技術開発のエキスパート，特に，放射光や NMR を用いた最新のタンパク質構造解析専門家，生きた細胞内の高感度観察を可能にしたバイオイメーシングアナリストにも参加を頂き，様々な角度から検討ならびに情報交換を行った。結果として，研究者間の相互理解が深まり，研究の新たな展開や共同研究の可能性が十分に期待できる成果を得ることができた。

(1) 放射光施設における糖鎖生物学

加藤龍一 (高エネルギー加速器研究機構・構物質構造科学研究所・
放射光科学研究施設・構造生物学研究センター)

高エネルギー加速器研究機構 (KEK)・放射光科学研究施設 (Photon Factory) では、日本で最初の放射光を用いたタンパク質 X 線結晶構造解析用の実験ステーションを建設後、現在に至るまで国内外から多くの研究者を迎え、タンパク質およびその複合体の立体構造解析のためのデータ収集が行われている。Photon Factory では、2000 年にインハウス研究の推進を目指して構造生物学研究グループを設置し、現在は構造生物学研究センターとして実験ステーションの建設運営から構造生物学研究まで行っている。

我々のセンターでは、(1) 細胞内輸送と (2) 糖鎖修飾に関わるタンパク質群の立体構造解析を通じて生命現象を分子レベルで理解することを目的の 1 つとしている。本口演では、糖鎖修飾に関するタンパク質群の構造機能解析の一例として、ビフィズス菌由来のフコシダーゼ触媒ドメインの X 線結晶構造解析の結果と、それから明らかになった水分子を介する新奇な酵素反応機構について紹介する。また、ガレクチン 9 と糖鎖との複合体の X 線結晶構造から、マウスとヒトという近縁種でも異なる糖鎖認識機構について紹介する。

(2) 担癌状態におけるムチンの生物学的機能

中田 博 (京都産業大学工学部生物工学科)

上皮性癌細胞の産生するムチンの特徴として、癌関連糖鎖抗原の発現に加えて、分泌部位の変化が挙げられる。すなわち、上皮組織の極性を消失した癌組織において、ムチンは組織全体に分泌され、さらに血流中にも検出されるようになる。また、ムチンは癌関連糖鎖抗原も含めて多様な O-グリカンを発現している糖タンパク質であること、タンデムリピート及び糖鎖のクラスターをもつことを特徴とする。これらの性質は、様々なレクチンと相互作用する可能性と血清中に多く存在する N-グリカンより親和性が高い可能性を示唆している。我々は、ムチンとスカベンジャーレセプター⁽¹⁻³⁾、シグレックファミリー^(4,5)との相互作用とその生物学的意義について検

討してきた。本研究会では、シグレック 2, 9 とそれぞれ分泌型ムチンと膜結合型ムチンとの相互作用に起因する生物学的作用について述べる。すなわち、前者については脾臓 B 細胞と分泌型ムチンの相互作用を通じて、B 細胞における情報伝達の抑制、後者については、膜タンパク質である MUC1 へのシグレック 9 の結合による MUC1 への β -カテニンのリクルートの亢進について述べる。

- 1) Inaba T et al. PNAS 100: 2736, 2003.
- 2) Yokoigawa N et al. Clin Cancer Res 11, 6127, 2005.
- 3) Sugihara I et al. Cancer Res 66, 6175, 2006.
- 4) Toda M et al. BBRC, in press.
- 5) Ishida A et al. Proteomics, in press.

(3) 糖鎖の網羅的構造解析からシステム解析へ

長束俊治 (大阪大学大学院理学研究科)

生体が持つ糖鎖分子の最も際立った特徴は、構造の微小不均一性である。その存在は、古くから知られているものの、その意味については、未だ誰も解答を得ていな

い。我々はこれまでに、糖鎖の多様性を網羅的に観察する手法を開発し、個体発生や系統発生における多様性の変遷を解析してきた。その結果、系統発生上の近縁と糖

鎖構造の類似性は相関しないこと、また個体発生において形態形成時期に糖鎖の多様性が生じていることを発見した。糖鎖多様性の意味に対するもう一つのアプローチとして、糖鎖とその関連タンパク質を含めた「糖鎖システム」という概念を仮定し、摂動を加えた際にそのシステムがどのように振舞うかを観測することを始めている。つまり、「糖鎖システム」の動態解析である。我々は

これまでに、糖鎖生合成酵素阻害剤による攪乱実験から、「糖鎖システム」がロバストである可能性を見出している。「糖鎖システム」は、現在のところあくまでも仮説であり、存在証明も未だ成されてはいないが、糖鎖に意味を求める研究者にとって、今後中心的な標的になると予想される。本発表では、私達の研究過程を軸に「糖鎖システム」解析に向けた内外の動向についても概説する。

(4) 糖タンパク質品質管理機構 ～合成糖鎖を駆使した分子レベル解析～

戸谷希一郎（成蹊大学・理工）

リボソームで合成されるタンパク質は、高マンノース型糖鎖修飾を受け粗面小胞体内に送り込まれる。一方、小胞体内にはタンパク質上の特定糖鎖構造を認識するレクチンシヤペロンや糖加水分解酵素、糖転移酵素が存在する。これらの糖鎖認識タンパク質は新生糖タンパク質に協奏的に働き、その折り畳み状態によって分泌経路への輸送、小胞体内での保持、分解系への輸送の三経路に分別することが分かってきた。この機構は糖タンパク質品質管理と呼ばれ、生体がタンパク質合成過程で複雑な糖鎖を付加する現象の合理的解釈として注目を集めている。

しかしながら本機構の分子レベル解析は、基質となる

糖タンパク質の糖鎖不均一性によって妨げられてきた。そこで我々は構造が確実な合成糖鎖プローブによって糖タンパク質品質管理機構を網羅的に解析することを目指し研究を行っている。

本講演では糖タンパク質品質管理の主要構成メンバーである UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase (UGGT), CRT および Glucosidase II の定量的基質特異性解析を通じて、本質管理機構の基質の流れを分子レベルで明らかにした最近の成果 [K. Totani *et al.* *Angew. Chem.* (2005) 44, 7950; *JBC* (2006) 281, 31502; *JACS* (2008) 130, 2101] について報告する。

(5) 糖鎖機能の分子的理解に有用な糖鎖合成法の開発

安藤弘宗（岐阜大学応用生物科学部，京都大学物質—細胞統合システム拠点）

糖鎖機能の分子理解には、化学と生物学の有機的な連携が不可欠である。特に糖質分子の構造多様性という障壁を乗り越える上で、糖鎖化学は、構造均一な糖鎖およびその複合体の供給という大きな役割を担っている。我々の研究室では、長年にわたりガングリオシドを中心とした機能性複合糖質の精密合成法の確立に専心し、700種に迫る糖質分子の化学合成およびそれらの生物学的機能解明への応用を展開してきた。本講演では、近年我々

が新たに確立した、効率的シアル酸グリコシル化反応を基軸とするシアル酸含有糖鎖の合成法とムチン型糖鎖、ガラクトシルセラミドに代表される α -ガラクトサミン、ガラクトースを含有する糖鎖の高立体選択的合成法を中心とした話題とともに、合成された糖鎖プローブが学際研究で活かされた事例を紹介し、新しい糖鎖プローブの可能性を提案させていただく。

(6) フルオラス合成法による迅速糖鎖合成手法の開発

水野真盛 (財団法人 野口研究所・糖鎖有機化学研究室)

糖鎖の機能を分子レベルで明らかにするためには構造明確な糖鎖標品の十分な量の供給が必須であることから、その化学合成が必要とされている。そこで当研究室では効率的かつより実用的な糖鎖合成法を確立するために、近年注目を集めているフルオラス合成法に着目した。フルオラス (fluorous) とは「親フルオロカーボン性」という意味の用語である。ペルフルオロヘキサン (FC-72) 等のフルオラス溶媒は水およびほとんどの有機溶媒とは混ざらずに分離層を形成し、さらに通常の有機化合物からフッ素含量の高い化合物を分配操作のみで選択的に抽出できる。フルオラス層への効率的な抽出には分子サイズの大きな (heavy な) フルオラストグが必要になることから、本手法は「ヘビーフルオラス法」とも称される。

当研究室ではヘビーフルオラス法を用いた効率的な糖鎖合成、およびその原料となる単糖ユニット合成について研究を行っているので、今回はそれらの成果について報告する。

更に最近の研究成果として、マイクロリアクターとヘビーフルオラス法を組み合わせ、反応時間と精製時間の両方を迅速化することに成功したので、あわせて報告する。

また、分子サイズの小さな (light な) フルオラストグを導入し、フルオラスシリカゲルを用いた固一液抽出により精製を行う「ライトフルオラス法」を糖鎖のコンビナトリアル合成等に応用したので、これらについても報告する。

(7) プロテオグリカンの化学合成と生物活性

田村純一 (鳥取大学 地域学部 地域環境学科)

プロテオグリカン (PG) は、コアタンパクに一つ以上のグリコサミノグリカン (GAG) が結合した分子である。一方、GAG は、コアタンパクに共有結合した共通四糖領域と繰り返し二糖領域からなり、後者のヘキシサミンの種類により、ヘパラン型とコンドロイチン型に類別される。これらは、分子レベルでの微細構造の違いにより、異なる生物活性をもつ。精密化学合成では、複雑な構造をした GAG や PG を作成できるので、特異タンパクとの相互作用や糖鎖の機能を調べることができる。ここでは、最近当研究室で合成された PG や GAG について述べる。

【GAG 生合成プライマー】

GAG 結合領域オリゴ糖が等間隔に配置された小型 PG を GAG 生合成プライマーとして合成した。PG には単一

の GAG が結合していないことが多いため、クラスター化した GAG の正確な機能調査に利用できる。

【コンドロイチン硫酸オリゴ糖】

コンドロイチン硫酸の多彩な生化学的機能の多くは、繰り返し二糖領域の分子構造に起因する。コンドロイチン硫酸の中でも、GalNAc4, 6 位が硫酸化されている E 型は、特異な生化学的機能をもつ。種々の活性に対する最適な糖鎖長を探索するため、鎖長の異なる一連のコンドロイチン硫酸 E オリゴ糖の効率的合成を行ない、六糖の大量合成や最長十糖の合成に成功した。合成したコンドロイチン硫酸 E 六糖を関節炎マウスに投与したところ、関節炎の治癒効果が確認された。

(8) コンドロイチン6-O-硫酸基転移酵素-1 過剰発現マウスを用いた脳におけるコンドロイチン硫酸鎖の機能解析

宮田真路（神戸薬科大学学生化学研究室）

コンドロイチン硫酸 (CS) を構成する GlcA と GalNAc の二糖繰り返し構造は種々の硫酸基転移酵素によって修飾され、多様な構造を示す。近年、*in vitro* の研究から CS が神経突起形成に関与すること、その作用は特定の CS 硫酸化構造が担うことが示唆されているが、*in vivo* で脳における CS の機能はよく分かっていない。そこで我々は、二糖繰り返し構造の GalNAc の 6 位の硫酸化を担うコンドロイチン 6-O-硫酸基転移酵素-1(C6ST-1) を過剰発現するトランスジェニック(Tg)マウスを用い、脳における CS 硫酸化の機能を検討した。C6ST-1 Tg マウス脳の CS は、野生型マウスと比べて、GlcA-GalNAc(6S)

および GlcA(2S)-GalNAc(6S) 構造が増加し、それに伴い、GlcA-GalNAc(4S) および GlcA-GalNAc(4S,6S) 構造が減少していた。C6ST-1 Tg マウス脳から単離した CS は、野生型の CS と比べ、初代培養神経細胞に対して樹状突起様の神経突起形成を促進させる作用が強かった。さらに、C6ST-1 Tg マウス的大脑皮質では層構造に異常があり、野生型に比べアポトーシス細胞が増加していた。これらの結果から、C6ST-1 による CS 硫酸化構造の合成が適切に制御されることが、正常な脳の発生に必要であると考えられた。

(9) 血管・リンパ管新生におけるヒアルロン酸リッチ腫瘍微小環境と腫瘍関連マクロファージの作用

三好征司, 小林宣隆, 板野直樹（信州大学大学院医学系研究科分子腫瘍学講座）

我々はヒアルロン酸 (HA) を過剰産生する乳癌自然発症モデルマウスを用いて、血管やリンパ管新生に対する HA 細胞外マトリックスと腫瘍関連マクロファージ (TAM) の作用を検討した。HA 過剰産生群の乳癌組織では、腫瘍間質における血管・リンパ管新生が顕著であった。そこで、これら脈管新生への間質細胞の関与を解明するため、乳癌組織より癌細胞と腫瘍関連線維芽細胞 (TAF) を樹立して、癌細胞単独あるいは TAF との共存下でヌードマウスに移植癌を形成した。TAF 存在下に形成された移植癌では、間質の形成とリンパ管の新生が促進されており、また、マクロファージのマーカーによる組織染色の結果、腫瘍間質への TAM の動員が顕著であった。そこで、TAM 動員に働く機構を解明するために、癌

細胞および TAF に対するマクロファージの接着性を検討し、マクロファージが TAF に対して優先的に接着すること、そしてその接着に HA 細胞外マトリックスが部分的に関与していることを見出した。一方、マクロファージを枯渇させたマウスにおいて上記移植実験を施行し、TAM 動員の低下が血管・リンパ管新生を抑制すること、さらに驚くべきことに、間質の形成も顕著に抑制することを明らかにした。

以上の結果は、TAM や TAF の間質細胞とそれらが形成する腫瘍微小環境が、血管やリンパ管の新生に重要であり、腫瘍間質を標的とした癌治療の有用性を示唆している。

(10) ゴルジ体とタンパク質輸送：ライブイメージングによるアプローチ

中野明彦（理化学研究所 基幹研究所／東京大学 大学院理学系研究科）

昨今の光学顕微鏡技術の進歩は著しく、蛍光タンパク

質技術の進歩と相まって、生きた細胞や組織の中で起こ

っている現象を、高い時空間分解能で観察することが可能になってきた。ライブセルイメージングという言葉も、細胞生物学だけでなく、さまざまなライフサイエンスの分野で定着しつつある。

時空間分解能を向上させるために、私たちは NEDO の委託を受け、横河電機のスピンニングディスク方式の高速度共焦点スキャナと NHK と日立国際電気の超高感度 HARP カメラを組み合わせたシステムを開発し、デコンボリューションと組み合わせて、ライブ観察で 3D 分解能 50 nm という、回折限界をはるかに越える性能を達成した。

さて、ゴルジ体は、糖鎖修飾の重要なオルガネラであると同時に、細胞内膜交通における選別センターとしての役割をもっていることはご存じの通りであるが、その機能の分子基盤はまだ多くが謎に包まれている。*cis* から *trans* へどのように積み荷が運ばれるかという問題については、上記の超高分解能共焦点顕微鏡を用い、槽成熟が起こっていることを証明して、とりあえずの論争には決着をつけた。しかし、この槽成熟の観察の過程でさらに次々に新しい謎が生じ、挑戦をそそられている。さらにどのようなアプローチで攻めていくか、最近の取り組みを紹介したい。

(11) 二つの GDP-フコース輸送体の機能解析から明らかになった Notch の O-フコシル化の機能

松野健治 (東京理科大学 基礎工学部 生物工学科)

Notch 受容体 (Notch) を介する情報伝達系は、細胞間の接触を解した細胞間情報伝達で機能し、細胞運命決定や形態形成などを制御している。Notch の細胞外ドメインの EGF-様リピートには、O-フコースグリカンが付加されている。O-フコシル化には、GDP-フコースが必要である。GDP-フコースは、細胞外で合成され、GDP-フコース輸送体によって、ゴルジ体や小胞体の内腔に輸送される。本研究では、ショウジョウバエ Notch の O-フコシル化で機能する GDP-フコース輸送体の同定を試みた。

その結果、ゴルジ体に局在する Golgi GDP-fucose transporter (Gfr) と、小胞体に局在する ER GDP-fucose

transporter (Efr) の GDP-フコース輸送体が、Notch の O-フコシル化に重複した機能をもつことがわかった。*Efr*, *Gfr*, *Gmd* などの突然変異体を用いた解析から、Notch の O-フコース単糖そのものが、Delta リガンドによる Notch の活性化に必須であるが、*Serrate* リガンドの機能には不必要であることが示唆された。この O-フコース単糖の修飾は、細胞自律的に機能しており、また、リガンドの下流、活性化型 Notch の上流で作用していた。したがって、O-フコシル化の標的は、Notch やその補助受容体であると予測できた。

(12) メダカ初期発生過程における糖鎖の機能解析

殿山泰弘 (京都大学大学院/医学研究科/人間健康科学系専攻/基礎検査展開学)

個体形成過程において糖鎖の発現は、時期特異的または組織特異的に厳密な制御を受けている。近年の分子遺伝学的なアプローチにより、いくつかの糖転移酵素をコードする遺伝子欠損マウスが作製されており、*GnT-I* 欠損マウスでは心臓発達、神経管形成、血管新生における異常を伴う胎生致死 (E9.5) がみられるという報告もある。これらのことは、糖タンパク質上に存在する糖鎖が発生過程で必須の機能を果たすことを強く示唆してい

る。しかし哺乳動物は、体内で発生が進むために詳細な解析を行うには困難が伴うことから、これまで発生と糖鎖の関連性は強く示唆されてきたものの、その機能に関しては未だ不明な点が多い。そこで演者は、個体発生における糖鎖の役割を明らかにすることを目的として、発生生物学のモデル動物であるメダカ (*Oryzias latipes*) を用いて、糖鎖の機能解析を行っている。本講演では、主に複合型糖鎖の合成に必須である β 1-4 ガラクトース転移

酵素 2 (β 4GalT2), 及び HNK-1 糖鎖の合成に必須である二種のグルクロン酸転移酵素 (GlcAT-P, GlcAT-S) について得られた最新の知見を紹介し, 発生過程における糖

鎖の機能解析にメダカが有用なモデル動物となりうることを提案したい。

(13) 新生仔マウス小腸におけるスフィンゴ糖脂質の発現変化

米重あづさ, 鈴木明身, 松田純子 (東海大学 糖鎖科学研究所)

スフィンゴ糖脂質は生体膜のマイクロドメインを形成する重要な脂質成分である。小腸上皮細胞は極性細胞で, その頂端側では活発な物質輸送が行われており, 小腸は膜輸送や細胞の極性形成におけるスフィンゴ糖脂質の機能を解明する上で有用なモデルといえる。

今回我々は小腸におけるスフィンゴ糖脂質組成の発達変化を TLC-MS を用いて解析し, スフィンゴ糖脂質代謝酵素および各種トランスポーターの発現変化との関連を検討した。生後 2 週齢までの小腸では GlcCer, GM3, GM1, GD1a が主要な糖脂質であるのに対し, 生後 3 週齢以降は GlcCer, GA1 (asialo GM1) となり, 生後 2-3 週齢の間に GM3, GM1, GD1a から GA1 への変換が起こることが判った。代謝酵素の発現変化を解析したところ, GM1 β -galactosidase と GM3 synthase の発現が生後 2-3 週齢の

間で急激に減少しており, 複数の酵素により GA1 発現が調節されていた。小腸の免疫組織染色では GM1 が生後 2 週齢の小腸上皮細胞内に存在するのに対し, GA1 は生後 4 週齢の小腸上皮頂端側膜に局在しており, これらの糖脂質は存在量だけでなく局在も変化していることが示唆された。更に, 小腸上皮細胞膜に存在する各栄養素のトランスポーターの発現も生後 2-3 週齢を境に発現変化が観察された。

マウスにとって生後 2-3 週齢は母乳から通常の餌への転換期であり, この時期に小腸上皮細胞膜は発達を遂げる必要がある。以上の結果は GA1 をはじめとする特定のスフィンゴ糖脂質の膜を介する物質輸送における重要性を示唆している。

(14) 実験的自己免疫性脳脊髄炎における複合型ガングリオシドの役割

宮本勝一, 楠 進 (近畿大学医学部 神経内科)

急性の四肢筋力低下を主徴とする末梢神経障害であるギラン・バレー症候群およびその亜型では複合型ガングリオシドに対する抗体が血清中で上昇し, 抗体が標的抗原の末梢神経における局在部位に結合して病態に直接関与すると考えられている。一方, 免疫性中枢神経疾患の病態とガングリオシドの関係については十分な検討は行われていない。我々は GM2/GD2 合成酵素欠損マウス (GM2/GD2-KO) と GD3 欠損マウス (GD3-KO) に対して, 多発性硬化症の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を MOG 35-55 (MOG) を用いて誘導し, ガングリオシドの意義を検証した。

GM2/GD2-KO に active immunization EAE を誘導すると野生型マウス (Wt) と比較して, 症状の重症度は同じだ

が発症が約 5 日間遅延した。Wt への adoptive transfer EAE (AT-EAE) では, Wt 由来 T 細胞移入と GM2/GD2-KO 由来 T 細胞移入とでは差がなかったが, 同じ Wt 由来 T 細胞を移入された GM2/GD2-KO は Wt よりも発症が遅延したことから, 複合型ガングリオシドは活性 T リンパ球の血液脳関門 (BBB) 透過やミエリン接着などに影響している可能性があると考えた。EAE 感作後 11 日目 (Wt のみ発症, GM2/GD2-KO は未発症) に脳脊髄を取り出し, 中枢神経内の CD4 陽性細胞数を比較したところ, GM2/GD2-KO では Wt に比べて有意に少なかった。血清中接着分子は両群で差がなく, MOG 反応性 T 細胞の recall response も細胞増殖反応や各種サイトカイン産生能ともに差がみられなかった。また抗原提示細胞が

GM2/GD2-KO 由来でも Wt 由来でも反応に差はなかった。なお、GD3-KO では EAE において Wt と差がみられなかった。

以上より、複合型ガングリオシドが欠損すると活性 T リンパ球の BBB 透過が遅延することが示された。複合型

ガングリオシドは接着分子の発現には影響がなく、複合型ガングリオシド自体が接着に関与している可能性が示唆された。一方 GD3 等は EAE の発症機序に関与しないと考えられた。今後、さらなる検証が必要である。

(15) GM1ガングリオシドのエンドサイトーシス制御によるアルツハイマー病細胞モデルの構築

湯山耕平, 柳澤勝彦 (国立長寿医療センター研究所・アルツハイマー病研究部)

アルツハイマー病 (AD) の主要な病変である老人斑は、主に、分子量約 4KDa のアミロイドβタンパク質 (Aβ) の重合体によって構成されている。我々は以前に、脳内における Aβの重合開始機構の解明を目指して研究を進めた結果、初期 AD 病変を示す脳に GM1 ガングリオシドと結合した Aβ (GM1-bound Aβ, GAβ) が選択的に形成されることを発見した。これまでの研究から「Aβは GM1 ガングリオシド (ドメイン) と結合して構造変化し、その結果 Aβの重合を促進するシードとなる」という仮説を支持する研究結果が得られている。

今回、我々は脳内での GAβの形成機構を検討するため、弧発性 AD 脳で観察されるエンドサイトーシス障害に注目し検討を行った。PC12 細胞において薬剤処理およ

びエンドソーム輸送タンパク質の発現制御によって、GM1 の細胞内輸送を阻害した結果、細胞表面とエクソソーム (エンドソーム由来の細胞外顆粒) 上で GM1 集積が起こった。これらに Aβを添加すると、GAβ依存性の Aβ重合が促進された。一方、エンドサイトーシスの開始過程を阻害すると細胞表面での GM1 集積は起こったが、Aβ重合は促進されなかった。これらの結果から、GAβ形成に関与する GM1 集積ドメインの形成は、GM1 量の増加だけでは不十分であることが示唆された。今回構築したエンドサイトーシス障害により Aβ重合を誘導する細胞は、AD の細胞病態の解明および治療薬の開発のための研究の有効なモデルになると期待される。

(16) ペロ毒素中和活性を有するスフィンゴ糖脂質 Gb3類似体の合成

三浦 剛 (千葉科学大学・薬学部)

発病性大腸菌 O-157 の産生するペロ毒素はヒト細胞表面に存在するスフィンゴ糖脂質 Gb2 および Gb3 を認識接着し、細胞内に侵入してその毒性を発現する。従って Gb2 および Gb3 の類似体はペロ毒素の細胞内への進入を食い止める中和剤として期待できる。発表者はこれまでに、セラミドの代用ユニットとして入手容易な Phosphatidylethanolamine (PE) が糖脂質類似体の開発に有効であることを明らかにしてきた。¹⁻³⁾そこで、Gb3 のセラミド部分を PE で代用した Gb3 類似体の合成を検討した。

時間と労力を要する Gb3 の糖鎖ユニットの合成には、パーフルオロヘキサンと有機溶媒で分配抽出するだけで

目的生成物を精製できるフルオラス合成法を利用し、Gb3 糖鎖誘導体 1 を迅速かつ簡便に調製した。⁴⁾Gb3 糖鎖誘導体 1 をオゾン酸化し、続く PE との還元的アミノ化、接触還元によって目的とする Gb3 類似体 2 を合成することに成功した。Gb3 類似体 2 は 1 型と 2 型のペロ毒素両方に対して中和活性を示した。⁵⁾

[文献]

- 1) C.-T. Guo, C.-H. Wong, T. Kajimoto, T. Miura, Y. Ida, L. R. Juneja, M. J. Kim, H. Masuda, T. Muramatsu, T. Suzuki, Y. Suzuki, *Glycoconjugate J.*, **15**, 1099 (1998).
- 2) Y. Inoki, T. Miura, T. Kajimoto, M. Kawase, Y. Kawase, Y. Yoshida, S. Tsuji, T. Kinouchi, H. Endo, Y. Kagawa,

- T. Hamamoto, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **276** (3), 1210 (2000).
- 3) Y. Higuchi, T. Miura, T. Kajimoto, Y. Ohta, *FEBS Lett.*, **579** (14), 3009 (2005).
- 4) T. Miura, S. Tsujino, A. Satoh, K. Goto, M. Mizuno, M. Noguchi, T. Kajimoto, M. Node, Y. Murakami, N. Imai, T. Inazu, *Tetrahedron*, **61** (27), 6518 (2005).
- 5) P. Neri, S. Tokoro, S. Yokoyama, T. Miura, T. Murata, Y. Nishida, T. Kajimoto, S. Tsujino, T. Inazu, T. Usui, H. Mori, *Biol. Pharm. Bull.*, **30** (9), 1697 (2007).

(17) 糖タンパク質の立体構造からみる糖鎖の機能

山口芳樹（独立行政法人理化学研究所・糖鎖構造生物学研究チーム）

タンパク質に結合している糖鎖は、そのタンパク質の溶解性や安定性を決定するばかりでなく、タンパク質機能部位の立体構造の構築に関与していることが明らかとなりつつある。糖鎖の役割を高次構造の観点から解明することは、糖鎖の様々な機能を解明するうえでも重要な課題となっている。しかしながら、糖タンパク質の立体構造解析数は、糖鎖の修飾を受けていない単純タンパク質の解析数と比較して圧倒的に少ないのが現状である。

こうした状況において、私たちは主に核磁気共鳴 (NMR) 法を利用した糖タンパク質の構造生物学研究の方法論の開発に取り組んできた。特に安定同位体標識技術を利用した NMR 法により、糖タンパク質の立体構造、ダイナミクス、相互作用様式を原子レベルの分解能で解析する方法を切り拓いてきた。本研究会では、糖タンパク質糖鎖の立体構造解析の現状と今後解決すべき課題について発表する予定である。

(18) 糖タンパク質の細胞内運命を司るレクチンの分子認識

加藤晃一^{1,2}, 神谷由紀子^{1,2}, 神谷大貴², 西尾美穂^{1,2}

(¹ 岡崎統合バイオサイエンスセンター, ² 名古屋市立大学大学院薬学研究科)

細胞内におけるタンパク質社会の秩序を維持するうえで、N 結合型糖鎖が本質的に重要な役割を演じていることが明らかとなってきている。小胞体内に生み出された糖タンパク質の立体構造形成を助ける分子シャペロン、小胞体-ゴルジ体間における糖タンパク質の選別輸送にかかわる積荷受容体、あるいは立体構造不全の糖タンパク質を小胞体から細胞質に逆行輸送してプロテアソームによる分解へと導く一連のタンパク質。これらはいずれも、高マンノース型糖鎖のプロセッシング過程に現れる様々な中間体を認識するレクチンとしての活性を有して

おり、それにより糖タンパク質の細胞内における運命決定のプロセスに深くかかわっている。

私たちは、糖鎖ライブラリーを活用した分析を通じてこれらの細胞内レクチンの糖鎖認識における特徴を詳細に比較するとともに、構造生物学的なアプローチによって糖タンパク質の細胞内における品質管理の制御機構の解明を目指す研究を行ってきた。本研究会では、こうした研究成果をもとに、糖タンパク質の細胞内運命を決定するメカニズムの分子基盤について議論する。

(19) 植物糖タンパク質糖鎖加水分解酵素の発現制御による生長制御

石水 毅, 榎本瑞希, 稲本 基, 長谷純宏 (大阪大学大学院理学研究科)

N-配糖体の代謝において, 植物では特有の分解経路が存在する。ハイマンノース型糖鎖の分解には, α 1,3 結合を優先的に加水分解する α -マンノシダーゼとエンド- β -マンノシダーゼが関わる。ハイマンノース型糖鎖の Man α 1-3Man β 結合を α -マンノシダーゼが加水分解し, 次いでエンド- β -マンノシダーゼが作用して, キトビオースにまで分解する^(1,2)。エンド- β -マンノシダーゼは液泡に局在しているので, この分解過程は糖タンパク質が液泡に輸送された後に起こる。これら生化学的イベントがどのような生理現象に関わっているか調べるため, エンド- β -マンノシダーゼ遺伝子を発現制御したシロイヌナズ

ナ変異体を作成し, 機能解析を行っている。

強制発現体および RNAi ノックダウン変異体を作成した。それらの変異体には植物体の生長に異常が見られた。現在, これらの表現型と *N*-配糖体糖鎖の構造変化の対応関係を調べている。当研究会では, これまでに得られた対応関係を発表し, 議論の対象とさせていただきたい。

1. Ishimizu, T., Sasaki, A., Okutani, S., Maeda, M., and Hase, S. *J. Biol. Chem.* **279**, 38555-38562 (2004)
2. Ishimizu, T. and Hase, S. *Trends in GlycoSci. Glycotechnol.* **18**, 39-47 (2006)

5. 神経系の発生・分化・再生に関する研究の新展開

2009 年 3 月 12 日－3 月 13 日

代表・世話人：宮田卓樹（名古屋大学大学院医学系研究科）

所内対応者：池中一裕（分子生理研究系分子神経生理研究部門）

- (1) Fgf8 may function cell-autonomously in the isthmus
鈴木 歩（東北大学大学院生命科学研究科脳構築学分野）
- (2) FGF signaling inhibitor Sprouty4 contributes to timing of neuronal progenitor cell differentiation
in early phase of development
柏木太一（熊本大学発生医学研究センター転写制御分野）
- (3) Sox21, a regulator of adult neurogenesis in mouse hippocampus
松田 賢（慶応義塾大学医学部生理学）
- (4) Prenatal stress affects the dendritic development of dentate granule cells
田村 誠（東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室）
- (5) Sensory input-dependent remodeling of cell composition in the adult olfactory bulb glomeruli
澤田雅人（名古屋市立大学（大学院医学研究科再生医学分野）院生（博士課程））
- (6) Quantitative morphological analysis of mice deficient for apoptosis signaling to reveal the relationship
between the change in cell number and the brain malformations
野々村恵子（東京大学大学院薬学系研究科遺伝学教室）
- (7) MicroRNA-9 is essential for neural differentiation in the mouse neocortex development
柴田幹士（神戸理化学研究所 CDB, ボディプラン研究グループ）
- (8) “Comprehensive analysis of the interkinetic nuclear migration in developing mouse brain”
小曾戸陽一（理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター研究員）
- (9) Mechanisms that regulate the onset of neuronal migration in the developing mouse neocortex
伊藤靖浩（東京大学分子細胞生物学研究所 情報伝達分野 後藤由季子研助教）
- (10) Mediolaterally arranged pathways of callosal projection neurons
錦見満暁（慶應義塾大学医学部仲嶋解剖学教室（仲嶋研）学部3年）
- (11) “Discovery of LOTUS as a novel axon guidance molecule”
佐藤泰史（三菱化学生命科学研究所脳梗塞研究グループ研究員）
- (12) A novel regulator of N-cadherin expression level in astrocyte
金丸和典（東京大学大学院医学系研究科細胞分子薬理学助教）
- (13) Axon patterning regulation by a novel ubiquitin ligase in Drosophila sensory neurons
森川 麗（国立遺伝学研究所 神経形態研究室（榎本研）ポスドク）
- (14) Formation of blood vessel network is controlled by the dorsal-ventral patterning of central nervous system
高橋輝明（奈良先端大院 分子発生生物学（高橋淑子研）院生（博士課程））
- (15) Brain function and regeneration in planarian
井上 武（京都大学・分子発生（阿形研）助教）
- (16) 神経幹細胞制御の変更による脳構造の進化
鈴木郁夫（国立遺伝学研究所 脳機能研究部門（平田研）
遺伝情報分析研究室（五条堀研）院生（博士課程））
- (17) Development of the cerebellar neurons revealed by in utero electroporation
喜多善亮（大阪大学大学院生命機能研究科（村上研）院生（博士課程））

(18) Mechanisms controlling polarized dendrite formation of Purkinje cells in the zebrafish cerebellum

田辺光志 (理研 CDB 体軸形成研究チーム 基礎科学特別研究員)

(19) “Inhibitory and excitatory subtypes of cochlear nucleus neurons are defined by distinct bHLH transcription factors, Ptf1a and Math1”

藤山知之 (京都大学医学研究科腫瘍生物学講座 (国立精神・神経センター
神経研究所診断研究部星野研) 院生 (博士課程))

(20) Auditory Input to CNS Is Acquired Coincidentally with Development of Inner Ear after Formation of Functional Afferent Pathway in Zebrafish.

谷本昌志 (名古屋大院 理学研究科 (小田洋一研) 院生 (博士課程))

【概要】

本研究会は、3月12日13時から13日15時にかけて行なわれ、165名の参加者を得た。内訳は、学部生9名(5.5%)、修士学生23名(14.0%)、博士学生38名(23.0%)、日本国外からの留学生4名を含む)、ポスドク・研究員・助教などの若手56名(33.9%)、准教授・教授・ラボ長など39名(23.6%)であった。交流促進の意図で大きな名札(5cm角の太字で参加者名を予め記載)を全員に配った。

口演発表は21題(初日に11題、2日目に10題)で、内訳は、学部生1名、修士学生2名、博士学生9名、ポスドク・研究員・助教などの若手が9名であった。発表(日本語、ただしスライドの表記に英語を配してもらった)の時間は10分を厳守してもらい、10分間の質疑応答とした。なるべく多くの人に質問機会をとの意図で質問を原則一つずつと限った。どの発表に対してもマイクに列がでず、活発な討論が繰り広げられた。

ポスター発表は61題であった(英語表記)。内訳は、学部生2名、修士学生15名、博士学生17名、ポスドク・

研究員・助教などの若手26名、教授1名であった。2日間を通じて貼りっぱなしとし、初日に奇数番号と偶数番号ごとに40分間の説明時間帯を設けたのに続き、2日目には1~34番(学生による演題、口演会場に掲示)と35番以降(廊下および別室)の2群に分けて、再び各40分間の説明とした。加えて、昼食・コーヒープレイクや懇親会の時間を利用しての討論も盛んに行なわれていた。

本研究会を生理学研究会として開催するにあたり、「発生」研究と「生理学」研究間の両方向性の刺激と、さまざまな系で諸問題に取り組む若手研究者たちの交流とを大きな目的として掲げ、会の開催案内と演題の募集にあたっては、過去1年間の各種国内学会における発表状況を考慮して、幅広い知的集団からの参加を促した。結果として、参加者の多様性は、ほぼ期待通りに得られ、既存の学会ではなし得なかったであろう交流が果たされたように感じられた。

(1) Fgf8 may function cell-autonomously in the isthmus

鈴木 歩 (東北大学大学院生命科学研究科脳構築学分野)

Fgf8は中脳後脳境界で発現し、中脳胞背側からは視蓋を、後脳胞背側からは小脳を誘導するオーガナイザー分子である。一般的にFgf8は分泌因子として作用し、受容体を介して下流のRas-ERK経路を活性化すると考えられるが、実際ERKの活性化領域はFgf8の発現領域よりも広い。しかし、Ras-ERK経路自体によって誘導され则认为られているSprouty2の発現はFgf8と一致していることから、Fgf8には細胞自律的な働きもあるのではな

いかと考えられた。そこで、Fgf8を強制発現し、その細胞内局在を抗Fgf8抗体による免疫組織化学により観察したところFgf8は核内に局在していることを発見した。またシグナルペプチドを欠失したコンストラクトを作成し、ニワトリ胚中脳胞に強制発現したところ、このフォームは殆ど核内に局在し、またSprouty2が異所的に誘導されていたため、Fgf8の細胞自律的経路が生体内に存在する可能性が示唆された。

(2) FGF signaling inhibitor Sprouty4 contributes to timing of neuronal progenitor cell differentiation in early phase of development

柏木太一（熊本大学発生医学研究センター転写制御分野）

神経幹細胞は多分化能を有し、中枢神経系を構成する主な細胞であるニューロンとグリア細胞（アストロサイト、オリゴデンドロサイト）を生み出す。神経幹細胞は *in vitro* 培養系では、bFGF を培養液中に添加することにより、比較的多分化能を維持したまま培養を行うことができる。そこで、bFGF シグナルに着目し、神経幹細胞培養系を用いて bFGF の存在下、非存在下における遺伝子発現を網羅的に調べるためにマイクロアレイ解析を行ったところ、発現に大きな差があった遺伝子群の中で、Receptor tyrosine kinase 経路の抑制因子である Sprouty4 が

in vitro 培養系において神経幹細胞の増殖、未分化性を顕著に抑制することを見いだした。さらに、生体の神経系発生の役割を調べるために Sprouty4 ノックアウトマウスの解析を行った。発生期での Sprouty4 ノックアウトマウス的大脑皮質において神経幹細胞の未分化性が野生型と比較して維持されており、ニューロンおよびアストロサイトへの分化が抑制されていた。これらの結果は、Sprouty4 が神経系の発生を制御していることを示唆するものである。

(3) Sox21, a regulator of adult neurogenesis in mouse hippocampus

松田 賢（慶応義塾大学医学部生理学）

Sox21 は HMB box を含む転写因子であり、Sox2 と同様に神経幹細胞に局在している。両者の DNA 結合ドメインの相溶性が高いことから、Sox21 も神経発生に何らかの影響を及ぼしていると予想されるが、依然として不明な点が多い。

そこで、Sox21 ノックアウト (KO) マウスを作成し、成体海馬におけるニューロン新生への Sox21 の寄与を *in vivo* で解析した。増殖性細胞の標識と、マーカー蛋白の発現解析の組み合わせにより、Sox21-KO マウスにおいては成体海馬でニューロン新生の効率が著しく低下して

いること、transient amplifying 細胞より先への分化が抑制されていることが明らかとなった。また、成体ラット由来神経前駆細胞株を用い、レトロウイルスベクターによって Sox21 を過剰発現した結果、前駆細胞の未分化性が解除されることを見出した。

以上の結果より、Sox21 は成体海馬に存在する幹/前駆細胞からの分化を促進する役割を担っていると考えられる。現在はメカニズムを解明する目的で、ChIP-シーケンシング法を用い、Sox21 の標的遺伝子の探索を網羅的に行っている。

(4) Prenatal stress affects the dendritic development of dentate granule cells

田村 誠（東京大学大学院薬学系研究科）

胎生期の環境は、成体期における行動や疾病の発症に影響を与える。特に、妊娠中にストレスに曝された母体から誕生した新生児では、将来的にうつ病に罹患する確率が高まるが、その原因は不明である。私は、母体ストレスが胎生期の神経発生に与える影響が、細胞形態の異

常として胎児の脳内に刻印されることで、将来的に脳機能の異常につながるとの仮説を立てた。そこで、うつ病において異常な萎縮が観察される「海馬」に着目し、海馬の発達への胎生期ストレスの影響について、個体動物（ラット）及びその培養切片を利用した実験によって検証

した。

その結果、胎生期ストレスが海馬顆粒細胞の樹状突起の形態成熟を阻害することを発見した。さらに、同細胞におけるストレスホルモンの受容体（ミネラルコルチコイド受容体）の発現量が胎生期ストレスにより減少する

こと、そして、この減少が樹状突起の成熟異常の原因であることを明らかにした。本研究は、胎生期ストレスによるうつ病の発症機構を知る上で重要な基礎知見となるだけでなく、顆粒細胞を標的とした新規抗うつ薬の創製につながる有用性も秘めている。

(5) Sensory input-dependent remodeling of cell composition in the adult olfactory bulb glomeruli

澤田雅人（名古屋市立大学大学院 医学研究科再生医学分野 博士課程 1 年）

成体哺乳類の嗅球では、介在ニューロンである傍糸球細胞及び顆粒細胞の入れ替わりが常に生じており、これが嗅覚の可塑性に関わっていると考えられている。近年、嗅球に供給された幼若な顆粒細胞の生存には嗅神経からの入力が必要であることが報告され、ニューロン新生の過程には嗅覚入力依存性の制御が関与していることが示唆されているが、傍糸球細胞については詳しく分かっていない。傍糸球細胞は、ドーパミン産生酵素である tyrosine hydroxylase (TH)、 Ca^{2+} 結合タンパク質である calbindin (CB) または calretinin (CR) を発現する細胞と

して三種類に分類できる。我々は、脱着可能な外鼻孔閉塞プラグを用いて入力を変化させた時の傍糸球細胞ターンオーバーの変化について、これらの細胞マーカーの抗体染色による固定切片の解析と二光子顕微鏡を用いた *in vivo* イメージングを行っている。

これまでの結果から、通常のターンオーバーでは CB 陽性細胞と CR 陽性細胞がサブタイプレベルで入れ替わっているのに対し、嗅覚入力の遮断及び再開過程では TH 陽性細胞の数が可逆的に変化することが明らかになった。

(6) Quantitative morphological analysis of mice deficient for apoptosis signaling to reveal the relationship between the change in cell number and the brain malformations

野々村恵子（東京大学大学院薬学系研究科遺伝学教室（東大・薬・遺伝））

アポトーシスは神経胚期の脳で多く観察されるが、その役割は脳の細胞数を調節することであると考えられてきた。アポトーシス実行因子（カスパーゼ 3, 9 及び Apaf-1）欠損マウスでは、神経上皮の細胞数増加を想起させる脳室の狭小や神経上皮の変形といった形態異常が認められたからである。我々は神経胚期の脳におけるアポトーシスと細胞数の関係をより詳しく調べるために、Apaf-1 欠損胚の脳全体に対し定量的形態解析を行った。胎生 10.5 日 Apaf-1 欠損胚の脳全体の形態は正常胚と大きく異なっていたが、連続切片上の神経上皮の断面積と

細胞密度は正常であり、胎生 10.5 日 Apaf-1 欠損胚の神経上皮の細胞数は正常であることが示唆された。脳室の狭小は同発生ステージにおいて既に顕著であり、神経上皮の細胞数増加に起因するものではないことが判明した。Apaf-1 欠損胚では、胎生 9.5 日から胎生 10.5 日に生じるべき脳室拡大が不全であったが、この異常は胎生 9.5 日から認められる神経管の閉鎖異常に関係している可能性が考えられる。これらの結果は脳の発生におけるアポトーシスの役割を問い直すものである。

(7) MicroRNA-9 is essential for neural differentiation in the mouse neocortex development

柴田幹士（神戸理化学研究所 CDB, ボディプラン研究グループ（相沢研））

発生における脊椎動物の脳には様々な microRNA が多く発現していることが知られているが, in vivo でのそれらの機能については不明な点が多い。我々は, 発生段階におけるマウスの端脳に発現する遺伝子スクリーニングを行った結果, microRNA-9 (miR-9) が皮質 (cortex) から皮質正中部 (medial pallium) にかけて高発現していることを見いだした。miR-9 の標的遺伝子の一つとして, Foxg1 が予想された。さらに我々は, miR-9 のノックアウトマウスを作成し, その表現型を解析した。その結果,

miR-9-2 のシングルノックアウトマウスでは, 初期の神経分化に大きな影響はみられなかったが, miR-9-2 と miR-9-3 のダブルノックアウトマウスでは, 1) Reelin, p73 といった初期に分化する Cajal-Retzius 細胞のマーカーの減少 2) 細胞増殖の亢進 3) Foxg1 タンパク質の増加。が見られた。以上のことから, microRNA-9 は発生において Foxg1 の発現制御を介して初期の神経分化において機能することが示唆された。

(8) “Comprehensive analysis of the interkinetic nuclear migration in developing mouse brain”

小曾戸陽一（理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター）

胎生期脳の神経前駆（上皮）細胞からの神経新生に影響を与える主要要素として, 個々の細胞の内因性因子, 細胞間のシグナル伝達, また細胞の空間的配置などが重要であることが示唆されている。特に空間的要素について神経上皮細胞が持つ大きな特徴として, その細胞核が「細胞周期」に従って組織内の上皮極性軸を往復運動することが知られている（「エレベーター運動」）。エレベーター運動の機構は, その現象の発見以来 70 年以上明らかにされていない。私は多角的な解析技術を用いて, 本現象の分子メカニズムの解明を試みている。

エレベーター運動の G2 期細胞核の基底膜→アピカル方向への移行には, 微小管・中心体が関わるのが近年報告されているものの, 最も鍵となる点であるアピカル方向への核移行が「G2 期に限定されて起こる」機構は不明である。この点について私は, 微小管及びダイニン等のモーター蛋白質による細胞核の運搬能力が細胞周期特異的に増大することで, アピカル方向への核移行能力が増加する機構を提案しており, 本討論会では最近の解析結果を報告する。

(9) Mechanisms that regulate the onset of neuronal migration in the developing mouse neocortex

伊藤靖浩（東京大学分子細胞生物学研究所 情報伝達分野 後藤由季子研）

大脳新皮質は脳の高次機能を担う器官で, 形態や機能の異なるニューロンからなる緻密な層構造をしています。大脳新皮質発生において, ニューロンは脳室帯と呼ばれる脳の内側の領域に存在する神経系前駆細胞から産生され, それから目的地である脳の表層側に向かって細胞体の何十倍以上にも及ぶ距離を移動します。このニューロン移動は大脳新皮質の層構造形成に必須の過程で, その制御機構の解明を目的とした研究が現在数多く行なわれています。しかし, 分化したニューロンがどのよう

にして移動を開始するかは不明でした。我々は, ニューロン移動の開始を制御する分子の候補を同定し, 神経発生討論会で発表をさせて頂きました。質疑応答では非常にすどい質問やコメントを頂き, 更に飲み会の席においてもシニアな先生や若手の研究者と忌憚なく話をする機会を得ることができ, 非常に有意義な時間を過ごす事が出来ました。このような素晴らしい討論会が今後も続いてゆくことを切に願っています。

(10) Mediolaterally arranged pathways of callosal projection neurons

錦見満暁, 大石康二, 仲嶋一範 (慶應義塾大学医学部解剖学教室 医学部3年生)

脳梁を通過する交連ニューロン軸索は, 高等動物において大脳の複雑な神経ネットワークを形成するのに重要な役割を果たしている。大部分の交連ニューロン軸索は反対側の同一の領域に投射しており, その形成過程は非常に厳密な制御を受けているものと考えられる。これまでに, 交連ニューロンの軸索伸長やガイダンス機構など, その基本的な性質についての研究は数多く行われてきた。特に, 交連ニューロン軸索のガイダンス機構として, 軸索が脳梁を通過する際の制御が重要であることが明らかにされつつある。しかしながら, 交連ニューロン軸索の最大の特徴である, ある特定の領域間での投射のメカ

ニズムに関しては, ほとんど明らかにされていない。

我々はまず, 大脳皮質の内側・外側で交連ニューロン軸索の蛍光標識を行い, その軸索の走行について詳細な解析を行った。その結果, 内側の軸索が脳梁において背側を, 逆に外側の軸索が腹側を通過することを見出した。本討論会ではこの特徴的な軸索の走行が, 何らかの分子的なメカニズムによるものでないか, さらにこの内側, 外側の脳梁での相互排他的な軸索の走行が最終的な投射先に関与しているのではないかといった可能性について議論する。

(11) “Discovery of LOTUS as a novel axon guidance molecule”

佐藤泰史 (三菱生命研・脳梗塞)

マウスの嗅索 (Lateral olfactory tract: LOT) は嗅球ニューロンの軸索束で, 終脳器官培養下で生体と同様に形成させることができるため, 神経回路形成の良いモデルである。一方, FITC ラベルした抗体と光照射を用いて抗原分子の機能を阻害できる FALI 法という技術がある。我々は LOT を抗原として網羅的に作製したモノクローナル抗体を用いて LOT 形成に関わる分子を探索した。MAb H24G11 を用いた FALI 法により, その抗原の機能を終脳器官培養で阻害すると, LOT の形成異常を引き起

こした。そこで我々は MAb H24G11 の抗原を同定し, この分子を LOT usher substance, LOTUS と名付けた。LOTUS はそのほとんどの部分が細胞外に位置する細胞膜分子と予想された。次に, LOTUS と細胞外で相互作用する分子として NgR1 (Nogo receptor 1) を同定した。FALI 法を用いて, 終脳器官培養で NgR1 の機能を阻害すると, LOTUS を阻害した時と同様な LOT の形成異常が見られた。これらの結果は, LOTUS と NgR1 が LOT 形成に関わることを示唆する。

(12) A novel regulator of N-cadherin expression level in astrocyte

金丸和典¹, 大久保洋平¹, 廣瀬謙造^{2,3}, 飯野正光¹

(¹ 東京大学大学院 医学系研究科 細胞分子薬理学,

² 東京大学大学院 医学系研究科 神経生物学,

³ 名古屋大学大学院 医学系研究科 細胞生理学)

【サマリー】アストロサイトは自発的な細胞内 Ca^{2+} 濃度変化 (Ca^{2+} シグナル) を示す。我々はこれまでに, この Ca^{2+} シグナルが神経突起伸長の促進作用に寄与し, アス

トロサイトの N-カドヘリン発現量維持が, その分子基盤の一つであることを示した。最近の研究から, このパスウェイの仲介因子を同定したので報告する。イノシトー

ル三リン酸の特異的分解酵素の導入により自発 Ca^{2+} シグナルを抑制したアストロサイトでは、因子 P の mRNA 量が増大することを DNA マイクロアレイ解析により確認した。この因子は N-カドヘリン発現を特異的に抑制する可能性が考えられたため、因子 P をアストロサイトに発現させたところ、内因性 N-カドヘリン発現量の有意な減

少が確認された。さらに、 Ca^{2+} シグナル抑制アストロサイトで起こる N-カドヘリン発現量の低下は、shRNA を用いた因子 P のノックダウンによりほぼ完全に消失し、通常の発現レベルまで回復した。これらの結果は、因子 P が、自発 Ca^{2+} シグナルによる N-カドヘリン発現維持機構のネガティブ制御因子であることを示す。

(13) Axon patterning regulation by a novel ubiquitin ligase in *Drosophila* sensory neurons

森川 麗 (国立遺伝学研究所 神経形態研究室 (榎本研))

ニューロンは発生時に、それぞれ固有な経路と標的を選択しながら神経回路を構築する。例えば、DRG の皮膚感覚ニューロンと自己受容感覚ニューロンの求心性の軸索は、脊髄にたどり着くまでは同じ経路を進むが、その後の側枝形成のパターンは全く異なる。このような軸索パターンニングの分子機構は、初期の軸索誘導が様々なガイダンス因子によって制御されることが明らかになっている一方で、それぞれのニューロンがなぜ固有の軸索パターンを示すのかという問題については未解明な点が多く残されている。我々はこの問題に対し、軸索パターンの可視化が容易で、かつ分子遺伝学的手法が可能なショウ

ジョウバエ感覚ニューロンを用いて研究を行った。ショウジョウバエ感覚ニューロンは、樹上突起の形態から 4 つのクラスに分類されるが、そのうちクラス IV のみが腹部神経節内で左右方向の軸索末端を形成する。そこで我々はこのような軸索パターンニングに異常を示す変異体を探索、同定し、*asap1* (Anomalies in Sensory Axon Patterning) と名付けた。*asap1* 遺伝子は新規ユビキチンリガーゼをコードすることが判明した。また、遺伝的解析の結果、*asap1* は軸索ガイダンス因子 Netrin とその受容体 *frazzled* を介する経路と相互作用することが明らかとなった。

(14) Formation of blood vessel network is controlled by the dorsal-ventral patterning of central nervous system

高橋輝明, 田所竜介, 高瀬悠太, 高橋淑子

(奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 分子発生生物学講座)

血管ネットワークは、脳や脊髄といった中枢神経系の組織内において酸素や栄養素をくまなく供給するために、正しく確立される必要がある。しかしながら、中枢神経内でどのようにして血管の 3 次元パターンが確立され、機能的な器官へと発達するのかという研究は、これまでほとんど行われていない。そこで本研究では、中枢神経の中でもシンプルな構造をもつ脊髄に注目し、脊髄の発生過程における血管の形成機構を明らかにすることを目的とする。

所属研究室が最近確立したトリ胚内血管ラベル法を用いて脊髄内の血管パターンの形成過程を詳細に調べたところ、血管網が存在する領域と存在しない領域が明瞭に区別できるという全く新しい知見を得た。同じ脊髄内でも、血管形成が起こる領域と起こらない領域では、何が異なるのだろうか？ 本発表では、血管網の形成領域が脊髄のパターンニングによって規定されるかを調べるために、脊髄のパターン形成に関わる転写因子を用いて解析した結果について報告する。

(15) Brain regeneration and function in planarian

井上 武 (京都大学理学研究科 分子発生学講座 (阿形研))

脳が神経回路を形成して機能する機構の研究について「Brain regeneration and function in planarian」というタイトルで、プラナリアの脳が再生および機能（光を認識して逃避行動をとる）を回復する過程をモデルとした研究について口頭発表をおこなった。具体的な内容としては、(1) 頭部を切断したプラナリアの視神経および脳が神経回路を形成して再生するだけでなく機能を回復するために必要な新たな機構が存在することを発見し、(2) その過程に必要な視神経の投射先の脳の神経細胞に発現する新規液性因子 (Dj_1020HH) を同定し、(3) この新規分

子は光刺激依存的に発現が誘導され、視神経と脳の神経細胞との間のネットワーク形成を強固なものとする働きをしている可能性を見いだした。

発表においては、回路形成と神経機能の解析にはプラナリアを用いた発生神経科学的なアプローチの有用性と今後の展望についても説明させていただいた。質疑応答中に指摘を受けた、Dj_1020HH が再生過程に必要な分子なのかまたは再生後の神経の機能維持に必要な分子なのかについては現在解析を進めている。

(16) 神経幹細胞制御の変更による脳構造の進化

鈴木郁夫 (国立遺伝学研究所 脳機能研究部門 (平田研) 遺伝情報分析研究室 (五条堀研))

大脳皮質の層構造は哺乳類に特異的であり、爬虫類や鳥類ではその相同領域に層構造は見られず、哺乳類大脳皮質層構造の進化的起原は未だにわかっていない。本研究では、層構造のないニワトリ大脳皮質相同領域 (外套) の発生を調べ、哺乳類大脳皮質の発生プロセスと比較することで、どのような発生プロセスの違いが大脳皮質相同領域の構造の違いを作るのかを明らかにした。ニワトリ外套においても哺乳類大脳皮質の上層タイプの細胞と下層タイプの細胞が同様の順序で分化することがわかった。また、ニワトリ外套においては哺乳類大脳皮質の上

層タイプの細胞と下層タイプの細胞が正中線側と側方に分かれて存在していて、それぞれは脳室帯上の異なる領域に由来することがわかった。このことから、ニワトリと哺乳類の間で神経新生の大部分は共通しているが、脳室帯上の位置によって神経分化の制御のされ方が異なることが示唆される。実際、ニワトリ外套領域の脳室帯では神経新生が時空間的に制御されていて、時間的に制御されている哺乳類大脳皮質の神経新生とは異なっていた。哺乳類と鳥類の神経幹細胞ダイナミクスの違いと、最終的な脳構造の違いには強い相関が見られる。

(17) Development of the cerebellar neurons revealed by in utero electroporation

喜多善亮 (大阪大学大学院生命機能研究科脳システム構築学研究室 (村上研))

中枢神経系において、膨大な数のニューロンとグリア細胞が突起を伸ばし、結合することで複雑な回路網を形成している。中枢神経系の中でも小脳には、限られた種類のニューロンとグリア細胞しかなく、個々の形態学的特徴が詳細に分かっている。

これらの小脳の細胞の発生については、近年の転写因

子を利用した細胞系譜解析によりその起源が明らかになりつつある。GABA 作動性ニューロンとアストロサイトが小脳脳室帯付近の *Ptf1a* 陽性細胞に由来し、グルタミン酸作動性ニューロンが菱脳唇付近の *Math1* 陽性細胞に由来することが示唆されている。しかしながら、小脳を構成するすべての細胞の起源は未だ明らかにはなってい

ない。

本研究では、子宮内エレクトロポレーション法を用い、小脳室帯と菱脳唇の細胞に直接遺伝子を導入し標識することで、これらの部位に由来する小脳の細胞を明らかにすることを目的として研究を行った。

本研究会ではこれまでに得られてきた結果について報告した。討論の時間において、建設的なご意見を数多く頂くことができた。頂いたご意見を参考にして、今後研究より発展させていきたい。

(18) Mechanisms controlling polarized dendrite formation of Purkinje cells in the zebrafish cerebellum

田辺光志（理研 CDB 体軸形成研究チーム）

小脳のプルキンエ細胞は細胞体から1本の樹状突起のみを伸ばす、高度に極性化した形態をとる。ゼブラフィッシュを用いて、プルキンエ細胞がどのようなメカニズムによって1本の一次樹状突起のみを持つようになるかを研究した。プルキンエ細胞は発生初期においては複数の突起を細胞体から伸ばすが、受精後4日目位までに1本の一次樹状突起を残して他は退縮させる。この形態的な極性化に対応して、ゴルジ体が一次樹状突起の根元に非常に局限して存在することを見出した。また、ゴルジ体は、多数の突起をもつ若いステージのプルキンエ細胞

においても、既に偏った局在を示した。この結果から、ゴルジ体が局在することで、局所的な樹状突起の形成が誘導されることが示唆された。極性を持った樹状突起形成を制御する分子的なメカニズムに関して、atypical PKC (aPKC) の変異体において、プルキンエ細胞が多数の一次樹状突起を保持することを見出した。また、この変異体ではプルキンエ細胞において、ゴルジ体が細胞質中に均一に分布しており、aPKC がゴルジ体を局在させることで局所的な樹状突起の形成を制御していることが示唆された。

(19) “Inhibitory and excitatory subtypes of cochlear nucleus neurons are defined by distinct bHLH transcription factors, Ptf1a and Math1”

藤山知之（京都大学医学研究科腫瘍生物学講座国立精神・神経センター神経研究所診断研究部）

哺乳類の聴覚を司る蝸牛神経核は、背側核と腹側核により構成され、それぞれが様々な種類の神経細胞を含んでいる。しかしながら、それらの神経細胞が生み出される正確な位置と、発生の分子機構については良く知られていなかった。本研究では、まず、bHLH 型転写因子 Ptf1a および Math1 が中央部後脳の特定の神経上皮領域で発現していることを見いだした。Ptf1aCre ノックインマウスを用いて遺伝学的に細胞系譜を標識したところ、蝸牛神経核の抑制性神経細胞は Ptf1a を発現する神経上皮(Ptf1a ドメイン) に由来することが明らかになり、加えて

Math1-Cre (Tg) マウスの解析より、興奮性神経細胞は Math1 ドメイン由来であるという結果が得られた。さらに、Ptf1a ノックアウトマウスにおいては抑制性神経細胞の多くが失われており、Math1 ノックアウトマウスにおいては興奮性神経細胞の多くが消失していた。以上から、蝸牛神経核の主要な抑制性神経細胞および興奮性神経細胞は、中央部後脳の Ptf1a および Math1 を発現する神経上皮から生み出されること、そしてその発生に Ptf1a および Math1 が関与していることが示唆された。

(20) Auditory Input to CNS Is Acquired Coincidentally with Development of Inner Ear after Formation of Functional Afferent Pathway in Zebrafish

谷本昌志 (名古屋大学理学研究科)

われわれ脊椎動物の聴覚は、音の振動を内耳の有毛細胞で電気信号へ変換し、聴神経を経て脳へ伝達して音として知覚する。本研究では、脊椎動物のモデルとしてゼブラフィッシュの胚や稚魚を用いて、動物がいつ・どのように聴覚を獲得するのかという問題へのアプローチを行った。緑色蛍光タンパク (GFP) を用いた胚のライブイメージングによって、受精後 27 時間に既に有毛細胞から聴神経を経てマウスナー細胞 (聴覚入力を受けて逃避運動を駆動する後脳ニューロン) への聴覚回路は形成されていることを明らかにした。また、マウスナー細胞から

の *in vivo* ホールセル記録によって、この時期の聴覚回路は機能しうることも明らかにした。一方、マウスナー細胞が聴覚応答を獲得するのは受精後 40 時間以降であり、内耳の有毛細胞の音に対する応答の獲得に伴うことを示した。以上は米国神経科学会誌 *The Journal of Neuroscience*, March 4, 2009, 29(9):2762-2767 に発表している。神経発生討論会における口頭発表において活発な討論の機会を与えていただき、今後の研究展開に大きな指針を得ることができた。

6. 日本における脳科学研究および教育の現状と将来に関する検討会

2008 年 4 月 16 日－4 月 18 日

代表・世話人：川人光男（国際電気通信基礎技術研究所 脳情報研究所）

所内対応者：池中一裕（分子生理研究系分子神経生理研究部門）

「脳内情報抽出表現研究」

（1）日本における BMI 研究が目指すもの

川人光男（国際電気通信基礎技術研究所脳情報研究所）

（2）侵襲型 BMI (1)

小池康晴（東京工業大学精密工学研究所）

（3）侵襲型 BMI (2)

長谷川良平（産業技術総合研究所）

（4）侵襲型 BMI (3)

北澤 茂（順天堂大学医学部）

（5）低侵襲型 BMI

吉峰俊樹，平田雅之（大阪大学医学系研究科）

（6）fMRI 信号のデコーディング

神谷之康（国際電気通信基礎技術研究所）

（7）NIRS+EEG

佐藤雅昭（国際電気通信基礎技術研究所）

（8）電極開発

鈴木隆文（東京大学大学院情報理工学系研究科）

（9）BMI を活用したリハビリテーション

牛場潤一（慶應義塾大学理工学部）

（10）BMI 型深部脳刺激法 (DBS)

片山容一（日本大学医学部）

（11）脳神経倫理

佐倉 統（東京大学大学院情報学環）

「霊長類脳基盤研究開発」

（12）霊長類を用いた脳研究の今後の展開

伊佐 正（生理学研究所）

（13）ウイルスによる遺伝子導入実験 (1)

高田昌彦（東京都神経研究所）

（14）ウイルスによる遺伝子導入実験 (2)

島田 隆（日本医科大学）

（15）ウイルスによる遺伝子導入実験 (3)

小林和人（福島県立医科大学）

（16）ウイルスによる遺伝子導入実験 (4)

山森哲雄（基礎生物学研究所）

- (17) マーモセット (1) 佐々木えりか (実験動物中央研究所)
- (18) マーモセット (2) 澤本和延 (名古屋市立大学医学部)
- (19) マーモセット (3) 中村克樹 (国立精神神経センター)
- 「研究連携に関する報告」
- (20) 地域連携に関する話題提供 佐野明人 (名古屋工業大学機会工学科)
- (21) 日米科学技術協力事業脳研究分野について 定藤規弘 (生理学研究所)
- 「Neuroscience Program モデル講義 (I)」
- (22) 米国の neuroscience program の現状 (1) 渡辺武郎 (ボストン大学)
- (23) 米国の neuroscience program の現状 (2) 佐々木由香 (ハーバード大学)
- (24) EU, 特にフランスの現状 池中一裕 (生理学研究所)
- (25) 脳機能イメージング 福山秀直 (京都大学)
- (26) 神経発生学入門 宮田卓樹 (名古屋大学医学系研究科)
- 「Neuroscience Program モデル講義 (II)」
- (27) 心理物理学入門 西田真也 (NTT コミュニケーション基礎科学研究所)
- (28) シナプス伝達入門 狩野方伸 (東京大学医学研究科)
- (29) システム神経科学入門 泰羅雅登 (日本大学総合科学研究科)
- (30) 精神医学入門 曾良一郎 (東北大学医学系研究科)
- (31) 計算論的神経科学入門 鮫島和行 (玉川大学脳科学研究所)
- (32) 分子生物学 貝淵弘三 (名古屋大学医学系研究科)
- (33) システム的神経解剖学入門 (模擬脳実習) 高田昌彦 (東京都神経研究所)

【参加者名】

川人光男 (ATR), 佐々木由香 (ハーバード大学), 小峯一晃, 原澤賢充, 森田寿哉 (NHK) 西田真也 (NTT), 伊藤雅幸, 塚原金二 (アイシンコスモス研), 九鬼陽介 (アイシン精機), 中村みほ (愛知県コロニー), 久保田裕 (朝日新聞), 市村好克 (キヤノン) 牛場潤一, 石井 拓, 加藤真樹, 山崎由美子, 能村幸太郎 (慶應大学), 小林誠一, 木下伸一, 石原幹也, 片桐和真, 曾我仁哉 (中部大学), 廣本建一 (トヨタ自動車), 猪股克弘, 柏原考爾, 橋本祥介, 佐野明人 (名古屋工業大学), 神田寛行, 寺澤靖雄 (ニデック), 永岡右章 (日本大学), 渡邊武郎 (ボストン大学), 中田 透, 寺田佳久, 森川幸治, 足立信夫 (松下電器産業), 石橋良太 (立命館大学), 斉藤広樹, 桜木雄一郎 (愛知県立大学), 永谷幸則 (岡山光量子科学研究所), 守田知代, 渡邊淳司, 吉田 明, 福士珠美 (科学技術振興機構), 寺尾将彦 (関西学院大学), 茅原拓朗 (宮城大学), 松橋眞生 (京都工芸繊維大学), 赤崎孝文, 高橋 晋, 伊藤浩之 (京都産業大学), 美馬達哉, 板倉昭二, 野村真樹, 廣瀬智士, 藤井進也, 鹿子木康弘, 櫻井芳雄, 原康治郎, 中園智晶, 福山秀直, 大石高生, 宮地重弘 (京都大学) 榎本一紀, 山田 洋, 山中 航 (京都府立医科大学), 山口良哉, 坂上雅道, 鮫島和行, 則武 厚, 松元健二, 渡辺秀典 (玉川大学), 小濱 剛, 吉田 久 (近畿大学), 越後亮介 (金沢大学), 江田英雄 (光産業創成大学), 神谷之康, 柴田和久, 武田祐輔, 玄 相晃, 森本 淳 (国際電気通信基礎研究所), 設楽 仁, 小俣 圭, 中村克樹, 山田大輔 (国立精神・神経センター), 武藤正紀 (三菱総合研究所), 金子秀和, 長谷川良平, 松本有央 (産業技術総合研究所), 長内洋介 (産経新聞社), 佐々木えりか, 疋島啓吾, 玉置憲一 (実験動物中央研究所), 北澤 茂, 大前彰吾 (順天堂大学), 寺園 泰, 成瀬 康, 大須理英子, 劉 国相 (情報通信研究機構), 長谷川功 (新潟大学), 沖田善光 (静岡大学), 奥村 哲 (静岡理工科大学), 吉田碧, 八木佑太圭 (早稲田大学), 坪井史治, 佐野香織, 佐々木哲也, 張 藍帆, 仲神友貴, 長倉彩乃, Akhilesh Kumar, 綾部友亮, 石野雄吾, 臼井紀好, 浦川智和, 岡本悠子, 加勢大輔, 坂本貴和子, 清水崇弘, 高浦加奈, 高原大輔, 高山靖規, 中川 直, 林 正道, 平尾顕三, 間野陽子, 谷中久和 (総研大), 渡辺康仁 (大阪バイオサイエンスセンター), 本蔵直樹, 平田雅之, 吉峰俊樹, 柳澤琢史, 小田正起, 小林康, 森 理也, 木村 壘 (大阪大学), 坂巻照夫 (大日本印刷), 塩見真一 (島津エスディー), 石川

亮宏, 河野 理 (島津製作所), 吉良信一郎 (東京医科歯科大学), 神原裕行, 小池康晴, 李 艶, 金 敬植, アヒタハ (東京工業大学), 大久保達夫, 青木隆太, 狩野方伸, 山田洋平, 小竹直樹, 佐倉 統, 伊藤孝佑, 鈴木隆文, 深山 理, 片平健太郎 (東京大学), 井上謙一, 遠藤 歩, 黒田呈子, 高田昌彦, 二宮太平, 湯本直杉 (東京都医学研究機構), 曾良一郎 (東北大学), 山田雅之, 松尾直毅, 宮川 剛 (藤田保健衛生大学), 大貫良幸, 鬼塚美帆, 鈴木裕輔, 為井智也, 宮本敦史, 堀川友慈, 太田 淳, 南部功夫 (奈良先端科学技術大学院大学), 島田 隆 (日本医科大学), 澁谷顕一 (日本女子体育大学), 山下晶子, 片山容一, 山本隆充, 泰羅雅登, 田部井賢一, 深谷 親, 角光一郎 (日本大学), 太田 智 (富士通), 小林和人 (福島県立医科大学), 繁樹博昭, 南 哲人, 後藤紀美子, 勝俣安伸, 牛流章弘, 池戸昭仁, 井上康之, 鬼丸真一, 竹井邦晴, 北崎充晃, 松寄直幸, 後藤紀美子, 横田悠右, 石垣将孝 (豊橋科学技術大学), 江部和俊 (豊田中央研究所), 末光厚夫 (北陸先端科学技術大学院大学), 猪股克弘, 船瀬新王, 田中由浩 (名古屋工業大学), 金子奈穂子, 澤本和延 (名古屋市立大学), 貝淵弘三, 中田大貴, 宮田卓樹 (名古屋大学), 島崎秀昭, 礪村宜和, 一戸紀孝, 篠崎隆志, 相馬りか, 西川 淳 (理化学研究所), 山森哲雄, 大澤園子, 小峰由里子, 檜山武史, 廣川純也, 渡我部昭哉, 渡辺英治, 定金 理, 小松勇介, 高司雅史, 松永 渉 (基生研), 池田琢朗, 後藤仁志, 関 和彦, 高良沙幸, 橋本章子, 村瀬未花, 山肩葉子, 吉田優美子, 池田一裕, 伊佐かおる, 伊佐 正, 市川奈穂, 伊藤 南, 井上 剛, 井本敬二, 岩室宏一, 梅田達也, 小野勝彦, 柿木隆介, 加藤智子, 加藤利佳子, 金田勝幸, 小泉 周, 鯉田孝和, 小松英彦, 齋藤紀美香, 坂谷智也, 定藤規弘, 佐野裕美, 重本隆一, 杉山容子, 武井智彦, 平井真洋, 平松千尋, 深澤有吾, 吉田正俊, 吉田優美子, 志内哲也, 田邊宏樹, Andren Jackson, 郷田直一, 永山国昭, 原田卓弥, 西尾亜希子, 上条真弘, 松本 敦, 坂野 拓, 池田芳久, 宮地まり, 橘 吉寿, 松尾 崇, 岡澤剛起, 鍋倉淳一, 久保義弘, 柴崎貢志, 岡本 壤, 南部 篤, 高良沙幸, 戸田知得, 佐野裕美, 知見聡美, 山根 到, 畑中伸彦, 中村徹, 植田禎史, 斉藤大輔, 稲村直子, 川口泰雄, 大鶴直史, 佐々木章宏, 長谷川裕一, 加塩麻紀子, 窪田芳之, 稲垣晴久, 箕越靖彦 (生理研)

【概要】

糖鎖が第三の生命鎖として脚光を浴びるようになって久しい。しかし、複合糖質糖鎖が直接的あるいは間接的に様々な現象に関与していることを示唆する知見が集積されてきてはいるが、糖鎖が実際に分子レベルでどのような機序で機能を発現しているのかという基本的かつ重要な問題に関しては、まだほとんど解明されてはいない。糖鎖が単独で機能を発現している場合が無いとは言い切れないが、多くの場合糖鎖と相互作用をする生体分子、特にタンパク質が介在しているはずである。これら生体分子の実態をも解明しなければ、糖鎖の基本問題が解けないということは明らかである。本研究会は、糖鎖のみならず相互作用をする相手の分子をも対象として検討を進め、現在抱えている問題点を顕在化し、問題解決への糸口を探ることにより、「糖鎖の持つ基本的な機能は何

か、特に分子レベルでどのように機能しているのか」という問題を解くことを目標としている。

今回は、最近の様々な学会・シンポジウムあるいは論文などで注目すべき発表をした方々を中心に多方面の研究者にお集まり頂き、糖鎖機能研究の現状と今後の問題点を探るとともに、それらの問題を克服するのに必要とされる技術開発のエキスパート、特に、放射光やNMRを用いた最新のタンパク質構造解析専門家、生きた細胞内の高感度観察を可能にしたバイオイメーシングアナリストにも参加を頂き、様々な角度から検討ならびに情報交換を行った。結果として、研究者間の相互理解が深まり、研究の新たな展開や共同研究の可能性が十分に期待できる成果を得ることができた。

7. シナプス可塑性の分子的基盤

2008年6月5日－6月6日

代表・世話人：大塚稔久（富山大学 医学薬学研究部）

所内対応者：深田正紀（生理学研究所）

- (1) SCRAPPER 依存的なユビキチン－プロテアソームシステムによるシナプス可塑性の制御
矢尾育子（三菱化学生命科学研究所 分子加齢医学研究グループ）
- (2) 傍シナプス膜領域に局在するセプチン・クラスターの同定と機能解析
木下 専（京都大学大学院医学研究科 生化学・細胞生物学グループ）
- (3) 線虫 *C.elegans* の匂い忌避行動の統合的解析－神経系が「系」として働くための原理解明を目指して
木村幸太郎（国立遺伝学研究所・構造遺伝学研究センター，さががけ）
- (4) CIN85 機能欠失は神経伝達物質受容体のエンドサイトーシスを低下させ多動を引き起こす
下川哲昭（群馬大学大学院医学系研究科 器官機能学分野）
- (5) リーリンによる脳の層構造形成制御の分子機構
服部光治（名古屋市立大学大学院薬学研究科 病態生化学分野）
- (6) 学習行動と関連した AMPA 型グルタミン酸受容体の挙動
松尾直毅（藤田保健衛生大学 総合医科学研究所）
- (7) シナプスのスケーリング発生機構の解明
井端啓二（理化学研究所 脳科学総合研究センター）
- (8) 網膜神経節細胞の非スパイン性樹状突起における PSD95 の分布を決める
小泉 周（生理学研究所 広報展開推進室）

【参加者名】

大塚稔久（富山大学 医学薬学研究部），矢尾育子（三菱化学生命科学研究所 分子加齢医学研究グループ），木下専（京都大学大学院医学研究科 生化学・細胞生物学グループ），木村幸太郎（国立遺伝学研究所・構造遺伝学研究センター，さががけ），下川哲昭（群馬大学大学院医学系研究科 器官機能学分野），服部光治（名古屋市立大学大学院薬学研究科 病態生化学分野），松尾直毅（藤田保健衛生大学 総合医科学研究所），井端啓二（理化学研究所 脳科学総合研究センター），小泉 周（生理学研究所 広報展開推進室），野中美応（東京大学 医学系研究科），尾藤晴彦（東京大学 大学院医学系研究科），真鍋俊也（東京大学 医科学研究所），三國貴康（東京大学 大学院医学系研究科），高橋正身（北里大学 医学部），渡部文子

（東京大学 医科学研究所），井ノ口馨（三菱化学 生命科学研究所），狩野方伸（東京大学 医学系研究科），安田圭一（北里大学 医療系研究科），菅谷大地（北里大学大学院 医療系研究科），谷村あさみ（東京大学 大学院医学系研究科），清中茂樹（京都大学 工学研究科），三木崇史（京都大学 工学研究科），瓜生幸嗣（京都大学 工学研究科），中島大志（京都大学 工学研究科），筒井秀和（大阪大学），瀬藤光利（浜松医大），梅田達也（生理研 認知行動発達機構），重本隆一（生理研 脳形態解析），深澤有吾（生理研 脳形態解析），長倉彩乃（基生研），稲村直子（生理研 分子神経生理），深田正紀，深田優子，岩永 剛，則竹 淳，堤 良平，高橋直樹（生理研 生体膜）

【概要】

学習や記憶，情動などの脳の高次機能は複雑な神経回路網のシグナル伝達によって厳密に制御されている。神経回路網の基本ユニットは神経細胞間の接着装置である

シナプスであり，シナプス可塑性は細胞レベルでの学習・記憶のモデル系として精力的に研究が行われてきた。特にシナプス後部に存在する各種神経伝達物質受容体の

シナプス可塑性に関する研究はかなり詳細な機構が明らかになりつつある。しかし、受容体以降のシグナル伝達機構（リン酸化、脂質修飾などの翻訳後修飾）やシナプス前部におけるシナプス可塑性についてはなおも不明な点が多い。本研究会はシナプス可塑性に関わりを持つ広い分野および世代の研究者が一同に集まり、分子レベルから個体レベルにいたる最新の研究成果を発表し、各発表に対し、十分な時間をかけて徹底的に議論するというスタイルをとった。結果として、様々な分子（受容体、翻訳後修飾酵素、細胞骨格蛋白質や足場蛋白質）を多彩な手法（電子顕微鏡、ライブイメージングを用いた分子

細胞生物学、生化学、電気生理学、遺伝学、システム生物学）で研究している若手研究者が集まった。あらためて、シナプス可塑性を解析するためには様々な分野の研究者との情報、意見交換が極めて有用であることを再認識させられた。若手大学院生から神経科学分野の先導者に至るまで、十分に自由な雰囲気で見聞が交わされた。日常取り組んでいる各々の研究を別の視点から見直し、別の切り口から発展させるきっかけとなることが期待された。さらに、今後のシナプス可塑性研究の方向性を模索するよい機会であったと実感できた。

(1) SCRAPPER 依存的なユビキチン-プロテアソームシステムによるシナプス可塑性の制御

矢尾育子（三菱化学生命科学研究所 分子加齢医学研究グループ）

神経細胞間の情報伝達時には、シナプス小胞はプレシナプスの細胞膜と“active zones”で融合する。引き続き、神経伝達物質が細胞外の空間に放出され、後シナプス側の細胞の“postsynaptic densities”に存在する細胞表面の受容体に結合することができるようになる。これら両側の特殊化された細胞内のサイトには、足場タンパク質、神経伝達物質の放出機構、受容体、イオンチャネル、シグナル伝達分子などの複合体が含まれている。これらのタンパク質複合体の量を調節することは、シナプス可塑性を調節する上で重要であるが、これらのシナプスタンパク質の量がどのように調節されているかは、まだ十分に解明されていない。我々はシナプスのタンパク質分解系に着目し、シナプスの活動性を調節する分解系の因子

として、E3 ユビキチンリガーゼ SCRAPPER を同定した。

SCRAPPER はプレシナプスの可塑性調節因子 RIM1 に結合し、ユビキチン化を行い、プロテアソームでの分解に誘導する。SCRAPPER 欠損マウスの神経細胞では RIM1 の半減期は長く、ユビキチン化は減少し、mEPSC の頻度が増加する。さらに、RIM1 の増加や mEPSC に与えるプロテアソーム阻害剤の効果は、SCRAPPER の欠損により阻害される。従って、SCRAPPER は RIM1 のプロテアソーム依存的な分解を介したシナプスの活性の調節に重要であることが明らかとなった。これらの知見は、局所での蛋白質分解が神経シナプス可塑性の分子基盤の 1 つとなることを示唆するものである。

(2) 傍シナプス膜領域に局在するセプチン・クラスターの同定と機能解析

木下 専（京都大学大学院医学研究科）

セプチン系は、アクチン系や微小管系と同様にヌクレオチド結合蛋白質ポリマーから成る細胞骨格系である。セプチン系は 2-5 種類の GTP 結合蛋白質のオリゴマーが非極性短線維を構成し、これらが単独で、または既存の構造物を鋳型として高次集合し、多様な構造体を形成するユニークなシステムである (1)。古典的なセプチン集

合体として知られる酵母のセプチンリングは細胞分裂関連分子群の集積や反応のための足場（スカフォールド）として細胞質分裂に必須の役割を果たす。また、分裂細胞間の膜蛋白質の非対称性分配のための拡散障壁の本体とも想定されている。しかし、脳などの非分裂細胞に大量に発現するセプチンの分子機能や制御機構には不明な

点が多い。当グループは哺乳類セプチン系の構成原理、神経機能、疾患における意義の解明を目指して、①逆遺伝学的手法、②微細形態学的手法、③蛍光分子イメージング手法、などを統合した解析を行っている。

①マウスの13種類のセプチン遺伝子のうち成熟脳特異的に発現する Sept4 を破壊し、網羅的行動解析によってドパミン神経伝達が減弱していることを見出した。これらのことから、ドパミン神経終末のセプチン系がドパミントランスポーターや tSNARE を安定化するスカフォールドとして機能することと、その破綻がパーキンソン病の病態に深く関わることが示唆された (2)。

②免疫電子顕微鏡 (immunogold 法) 連続切片像から細胞形状と金粒子の分布情報を抽出して in silico 3次元再構築を行い、シナプス近傍やグリア突起の特定の細胞膜ドメインの直下に集積する多様なセプチン・クラスターを同定した。これらの一部はシナプス近傍のグルタミン酸

トランスポーターGLASTなどと共局在していた (3)。一方、樹状突起棘起始部にあるものは構造的支持や隣接シナプス間の区画化に寄与する可能性がある (4)。

③培養神経細胞の細胞膜直下に集積した GFP-septin に対する FRAP (光退色後蛍光回復) 法により、セプチン集合体の安定性が示された。このユニークな特性は細胞膜形状の保持や、膜蛋白質のスカフォールドないし拡散障壁としての役割に適したものと考えられる。RNAi でセプチンを枯渇させた細胞では syntaxin-1 や GLAST のターンオーバーが亢進することから、②で同定されたセプチン・クラスターの一部は特定の膜蛋白質の局在や安定化に寄与するスカフォールドないし拡散障壁と推測される (3)。また、①の Sept4 欠損マウスのドパミン神経ではこの機構が破綻するために syntaxin-1 やドパミントランスポーターが欠乏するのかもしれない。

(3) 線虫 *C.elegans* の匂い忌避行動の統合的解析～神経系が「系」として働くための原理解明を目指して

木村幸太郎 (国立遺伝学研究所・構造遺伝学研究センター)

動物の感覚受容では、特定の刺激を経験した後にその刺激への応答性が低下する「慣れ」や「順応」が観察され、さまざまな実験系で詳細な研究が行われている。これに対して、刺激の経験による感覚応答の増強については、哺乳類の痛覚受容とアメフラシの鰓引き込み反射という物理的侵害刺激以外には、詳細な研究はほとんど行われていない。

我々は、匂い物質 2-ノナノンに対する線虫 *C. elegans* の忌避行動が、事前刺激によって増強されて遠くまで逃げるようになることを見出した。この事前刺激の効果は1時間以上「記憶」された。また匂い忌避行動増強は、*C. elegans* の多くの行動の可塑性において無条件刺激として作用する餌または飢餓の影響を受けなかった。感覚応答の増強に関する実験系は極めて限られていることから、この匂い忌避行動増強を研究する事によって、神経機能の新たな制御メカニズムを明らかにできる可能性が高いと考えられた。

遺伝学および薬理学的解析を行った結果、*C. elegans*

の匂い忌避行動増強にドーパミンが関与している事が明らかになった。ドーパミンは哺乳類において、認識・感情・報酬・薬物中毒といったさまざまな高次神経機能に関与しているが、in vivo での受容体下流のシグナル伝達機構は不明な点が多い。*C. elegans* の匂い忌避行動増強に関わるドーパミンシグナル伝達機構を明らかにするために、逆遺伝学的解析を現在行っている。

さらに本研究の次の段階として、匂いに対する適切な忌避行動とその可塑性がどのように実現されているかを明らかにしたい。すなわち、入力 (匂い刺激) に対して適切に出力 (忌避行動) を行うためには、どのニューロンとどのニューロンにどのような変化が起こり、その変化が行動の特定の側面にどう反映される事が必要なのか? 全神経回路網がすでに解明されている *C. elegans* の利点をいかしてこの問題を解決するために、匂い濃度変化のシミュレーション解析/軌跡追跡システムによる行動の経時変化解析/細胞内 Ca^{++} イメージングなどを進めている。

(4) CIN85機能欠失は神経伝達物質受容体のエンドサイトーシスを低下させ多動を引き起こす

下川哲昭 (群馬大学大学院医学系研究科 器官機能学分野)

EGF 受容体はリガンドとの結合後、二量体形成、自己リン酸化が引き起こされシグナルの伝達を開始する。その後エンドサイトーシスにより取り込まれエンドゾームを経てリソゾームでの分解やリサイクル過程に選別される。CIN85 (Cbl-interacting protein of 85 kDa) は RING 型の ubiquitin ligase として機能する Cbl と相互作用を持つアダプター蛋白質として同定され、現在その発現や機能が相次いで報告されている。我々は CIN85 が EGF の刺激後、EGF 受容体の膜輸送、特に Endocytosis による Down-regulation に関与していることを報告した。さらにこの分子の個体における生理的意義を明らかにする目的

で CIN85 ノックアウトマウスを作製した。このマウスは行動学的解析 (総移動量、移動速度、折り返し数、新規環境探索度等) のほぼ全ての項目において、野生型に比べて有意な行動量の上昇を示し表現型が「多動」であると認められた。現在、ドーパミン受容体の Down-regulation の異常に焦点をあてて解析を進めている。一方、CIN85 はヒト X 連鎖精神遅滞に関与する Oligophrenin-1 や scaffold protein である PSD-95 と dendritic spine で共存していた。本研究会では CIN85 欠損における表現型の解析結果を示すとともに、この分子が持つシナプスでの機能について討論したい。

(5) リーリンによる脳の層構造形成制御の分子機構

服部光治 (名古屋市立大学大学院薬学研究科 病態生化学分野)

哺乳動物の脳には類似した神経細胞からなる「層構造」が存在し、その破綻は滑脳症、統合失調症、難読症などの神経疾患の一因である。リーリンは分子量 430kDa 以上という極めて巨大な分泌蛋白質であり、脳における神経細胞の移動および神経細胞層構造の形成を最上位で司ると考えられている。しかし、その発見から 10 年以上たった今も、リーリンの具体的な機能についてはほとんどわかっていない。我々は、リーリンとその関連分子について詳細な生化学的・細胞生物学的解析を行うことで、リーリンの機能及び層構造形成の分子機構を理解することを目指している。

リーリン蛋白質は 3,461 アミノ酸からなり、三つの領域に分けられる。N 末端領域は多量体化に関与すると考えられており、また、機能阻害抗体 CR-50 が結合する。中央部分にはリーリンリピートと呼ばれる特徴的な繰り返し構造が 8 回存在する。このうち、5 番目と 6 番目のリピートが受容体 (後述) に結合する領域である。C 末端領域 (CTR) は塩基性アミノ酸に富み、その一次構造は魚類を除く全ての脊椎動物において一残基の違いもなく完全に保存されている。CTR は従来、リーリンの分泌に関与すると考えられてきたが、我々はこれが間違いであ

ることを証明した。そして、CTR は受容体への結合には直接関与しないにもかかわらず、下流シグナルの活性化には必須であることを発見した。さらに、CTR を特異的に欠損するノックインマウスを作製し、リーリンの機能には CTR 依存的なものと、そうではないものがあることを見いだした。CTR は何らかの細胞外マトリックスに結合し、シグナル強度・拡散・局在等の制御に関与していると考えられた。

リーリンの受容体は、血清リポ蛋白質のそれと同一 (アポリポ蛋白質 E 受容体 2: ApoER2, 及び超低比重リポタンパク質受容体: VLDLR) である。リーリンが、いつ、どの細胞に対して機能を発揮するのかを知るために、リーリンの受容体結合部位とアルカリホスファターゼの融合プローブを利用して、野生型マウスおよびリーリン欠損マウス脳におけるリーリン受容体の総和を定量的に解析した。その結果、リーリンの標的細胞には少なくとも二つあること、「表層側へ移動してきた神経細胞が、その最終段階で、カハール・レチウス細胞から分泌されるリーリンを受け取る」というモデルは、おそらく正しくないことが示唆された。これらは、近年他のグループから出された結果の多くとも符合するものであり、リーリ

ン機能の多面性・複雑性を表している。今後これを解き明かしていくためにどのような実験が必要かについて議

論したい。

(6) 学習行動と関連した AMPA 型グルタミン酸受容体の挙動

松尾直毅（藤田保健衛生大学 総合医科学研究所）

グルタミン酸は哺乳類の中樞神経系における主要な興奮性神経伝達物質であり、その速いシナプス伝達は AMPA 受容体により担われている。近年、主にスライス標本を用いた *in vitro* の解析により、GluR1 サブユニットを含んでいる AMPA 受容体が神経活動依存的にシナプスへ移行することが、シナプス可塑性に重要な役割を果たすことが示唆されている。しかし、*in vivo* における AMPA 受容体の動態に関しては、ほとんど明らかにされていない。特に、長期記憶が安定に保持されるためには、神経活動依存的な新しいタンパク質合成が必要であることが知られているが、細胞体で新しく合成された AMPA

受容体の脳内での挙動に関しては全く不明である。そこで我々は、神経活動依存的に発現する最初期遺伝子群のひとつ *c-fos* 遺伝子のプロモーター及び、テトラサイクリン誘導系の制御下で GFP 融合 GluR1 タンパク質 (GFP-GluR1) を発現するトランスジェニックマウスを開発した。このマウスを用い、恐怖条件付け学習刺激により活性化した海馬 CA1 錐体細胞内で新しく合成された GFP-GluR1 の挙動の解析を行った (Matsuo et al., Science 2008)。本研究会では、学習後の GFP-GluR1 の挙動と樹状突起スパインの形態、synaptic tag 仮説との関連について議論したい。

(7) シナプスのスケーリング発生機構の解明

井端啓二（理化学研究所 脳科学総合研究センター）

シナプスのスケーリングと呼ばれる現象は培養神経細胞を用いた実験で発見された。

その実験では、培養液にナトリウムチャネルの阻害剤である TTX を添加し、培養神経細胞のネットワーク活性をストップさせると、経時的に興奮性シナプスの強度が上昇し、逆に GABA 受容体の阻害剤である Bicuculline を添加し、ネットワーク活性を上げると経時的に興奮性シナプスの強度は下降する事が明らかにされた。また、LTP や LTD は一部のシナプス強度を変化させるのに対して、シナプスのスケーリングは神経細胞全体の興奮性シナプスの強度を上下させる事によって、各シナプス間の強度の差を維持しながら、神経細胞の発火頻度を一定に保つ働きをする事が示唆された。

現在までに、シナプスのスケーリングは培養細胞や個体レベルにおいて観察されているが、その発生機構は詳しく調べられていない。そこで本発表では、最近明らかになったシナプスのスケーリング発生機構について報告

する。

シナプスのスケーリングによるシナプス強度の変化が発生する部位を明らかにするために、神経細胞の活動を阻害する TTX を培養神経細胞に添加後、AMPA 受容体に対する抗体で免疫染色した実験、および、YFP を連結した GluR2 を発現させた培養神経細胞のタイムラプスイメージングの実験を行った。その結果、AMPA 受容体の数がポストシナプス側で増加する事が明らかになった。これまでの TTX 添加による神経細胞の活動阻害実験では、シナプスのスケーリングには神経細胞の発火を阻害する事が重要であるのか、入力を阻害する事が重要であるのかが区別出来ない。そこで、シナプスのスケーリングにはどちらがより重要であるかを明らかにするため、神経細胞の発火および神経細胞への入力をそれぞれ選択的に阻害し、興奮性シナプスの強度の変化をタイムラプスイメージングにより観察した。その結果、シナプスのスケーリングは神経細胞の発火を阻害した際に生じた

が、一方、神経細胞への入力を阻害した際には生じなかった。これらの結果から、TTX 添加によるシナプスのスケールリングは、神経細胞の発火が阻害される事によって誘導される事が明らかになった。

このシナプスのスケールリングによって神経細胞は発火頻度に応じて全体の興奮性シナプスの強度を上下させ、神経回路の特性を維持していると考えられる。

(8) 網膜神経節細胞の非スパイン性樹状突起における PSD95の分布を決める

小泉 周 (自然科学研究機構 生理学研究所 広報展開推進室)

網膜において視覚情報を最終処理し活動電位列に変換して中枢に送っている網膜神経節細胞は、興奮性細胞であるにもかかわらず樹状突起上にスパインをもたず、双極細胞からグルタミン酸による興奮性シナプス入力を受けとっている。この網膜神経節細胞は、形態と機能別に大きく12種類以上のサブタイプがあることが知られているが、グルタミン酸受容体が非スパイン性樹状突起上にどのように分布しているのか、サブタイプごとに違いがあるのか、明らかとはなっていない。

小泉らは、網膜神経節細胞の非スパイン性樹状突起におけるグルタミン酸作動性シナプスの分布を明らかにするために、PSD95-GFP を、新たに開発した網膜組織培養系に導入し (ref 1)、網膜神経節細胞上における分布をサブタイプごとに明らかとした。

その結果、PSD95 は、一定のルールをもって分布していることが明らかとなった。一定のルールとは、(1) 樹状突起上に非ランダムに規則的に分布している、(2) nearest neighbor の距離は、約 3 μm 間隔である、(3) 樹状突起分岐点の特異点として一定間隔のスタートポイント

となっている、である。また驚くべきことに、この一定ルールは、別々の機能をもつ網膜神経節細胞のサブタイプごとに違いはなく、網膜の内網状層におけるグルタミン酸作動性シナプスの分布に共通にみられた。さらに、BDNF 投与など、PSD95 を過剰に産生させる状況であっても、この共通ルールに変化はみられなかった。

以上より、非スパイン性の樹状突起であっても、網膜神経節細胞の樹状突起上では、グルタミン酸作動性シナプスの位置は、共通ルールに従って「決められて」いることがわかった。また、こうした一定間隔でシナプスが整列する仕組みは、網膜の神経細胞の“モザイク”状分布 (一定間隔の整列) を連想させる結果であり、統一的なメカニズムの存在を示唆している (ref 2)。

参考文献

Ref 1: Koizumi A, Zeck G, Ben Y, Masland RH, Jakobs TC. PLoS ONE. 2007 Feb 21;2(2):e221

Ref 2: Fuerst PG, Koizumi A, Masland RH, Burgess RW. Nature. 2008 Jan 24;451(7177):470-4.

8. 細胞死研究の多面的、包括的理解に向けて

2009 年 3 月 17 日－3 月 18 日

代表・世話人：清水重臣（東京医科歯科大学難治疾患研究所）

所内対応者：岡田泰伸（自然科学研究機構・生理学研究所）

(1) Fas 下流分子の多様な生理機能

米原 伸（京都大学大学院生命科学研究科）

(2) TNF シグナルに関与するアダプター分子による細胞死と炎症の制御

中野裕康（順天堂大学医学部）

(3) NLR ファミリー：新しい細胞死と炎症の接点

須田貴司（金沢大学がん研究所）

(4) ASC：新しいアポトーシスとネクロシスの接点

茂谷 康（金沢大学がん研究所）

(5) Impacts of Macrophage-Derived AIM (Apoptosis Inhibitor of Macrophage) on Metabolic Disease and Beyond

宮崎 徹（東京大学医学系研究科疾患生命工学センター）

(6) 膜形レクチン CD72 と B リンパ球アポトーシス

鏑田武志（東京医科歯科大学疾患生命科学研究部）

(7) 光タンパク質プローブを用いた生理機能の可視化と解析技術

小澤岳昌（東京大学大学院理学系研究科）

(8) 細胞死シグナルの多彩な生理機能

三浦正幸（東京大学大学院薬学系研究科）

(9) 新規に同定したオートファジー機構の生理機能解析

清水重臣（東京医科歯科大学難治疾患研究所）

(10) クロマチンリモデリングによるアポトーシスの回避機構

中山敬一（九州大学生体防御医学研究所）

(11) マウスの発生段階でのプログラム細胞死

長田重一（京都大学大学院医学研究科）

(12) アポトーシス性細胞縮小の役割とシグナリング

岡田泰伸（生理学研究所）

(13) オンチップ 1 細胞培養計測システムを用いた 1 細胞への刺激と応答の解析

安田賢二（東京医科歯科大学学生体材料工学研究所）

(14) Akt の選択的機能制御

後藤由季子（東京大学分子細胞生物学研究所）

(15) JNK/p38 MAPK 経路によるウイルス応答制御メカニズム

岡崎朋彦（東京大学分子細胞生物学研究所）

(16) 小型魚類を用いた SAPK/JNK シグナル伝達系の解析

仁科博史（東京医科歯科大学難治疾患研究所）

(17) パーキンソン病メダカモデル作製の試み

高橋良輔（京都大学大学院医学研究科）

(18) 異常蛋白質の蓄積がもたらすフィードバック機構

垣塚 彰（京都大学大学院生命科学研究科）

(19) 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) における小胞体ストレス

一條秀憲 (東京大学大学院薬学系研究科)

(20) マウス組織でみられるプログラム細胞死の解析

辻本賀英 (大阪大学大学院医学系研究科)

【参加者名】

一條秀憲 (東京大学大学院薬学系研究科), 山内翔太 (東京大学大学院薬学系研究科), 片桐一美 (東京大学大学院薬学系研究科), 服部一輝 (東京大学大学院薬学系研究科), Christopher Runchel (東京大学大学院薬学系研究科), 岡田泰伸 (生理学研究所), 小澤岳昌 (東京大学大学院理学系研究科), 垣塚 彰 (京都大学生命科学研究科), 福士順平 (京都大学生命科学研究科), 小池雅昭 (京都大学生命科学研究科), 大沼洋平 (京都大学生命科学研究科), 後藤由季子 (東京大学分子細胞生物学研究所), 岡崎朋彦 (東京大学分子細胞生物学研究所), 樋口麻衣子 (東京大学分子細胞生物学研究所), 須田貴司 (金沢大学がん研究所), 茂谷 康 (金沢大学がん研究所), 高橋良輔 (京都大学大学院医学系研究科), 田代善崇 (京都大学大学院医学系研究科), 辻本賀英 (大阪大学大学院医学系研究科), 鏑田武志 (東京医科歯科大学疾患生命科学研究部), 築地信 (東京医科歯科大学疾患生命科学研究部), 岩井佳子 (東京医科歯科大学疾患生命科学研究部), 中野裕康 (順天堂大学医学部免疫学), 中山敬一 (九州大学生体防御医学研究所), 西山正章 (九州大学生体防御医学研究所), 諸石寿朗 (九州大学生体防御医学研究所), 片山雄太 (九州大学生体防御医学研究所), 長田重一 (京都大学大学院医学

研究科), 仁科博史 (東京医科歯科大学難治疾患研究所), 平山 順 (東京医科歯科大学難治疾患研究所), 宮村憲央 (東京医科歯科大学難治疾患研究所), 畠 星治 (東京医科歯科大学難治疾患研究所), 三浦正幸 (東京大学大学院薬学系研究科), 倉永英里奈 (東京大学大学院薬学系研究科), 武石明佳 (東京大学大学院薬学系研究科), 明銘 (東京大学大学院薬学系研究科), 宮崎 徹 (東京大学医学系研究科疾患生命工学センター), 森 真弓 (東京大学医学系研究科疾患生命工学センター), 黒川 淳 (東京大学医学系研究科疾患生命工学センター), 安田賢二 (東京医科歯科大学学生体材料工学研究所), 林 真人 (東京医科歯科大学学生体材料工学研究所), 米原 伸 (京都大学生命科学研究科), 中津海洋一 (京都大学生命科学研究科), 高橋涼香 (京都大学生命科学研究科), 伊藤 亮 (京都大学生命科学研究科), 小林洋平 (京都大学生命科学研究科), 清水重臣 (東京医科歯科大学難治疾患研究所), 荒川聡子 (東京医科歯科大学難治疾患研究所), 山口啓史 (東京医科歯科大学難治疾患研究所), 長谷川裕一 (生理学研究所機能協関), 佐藤かお理 (生理学研究所機能協関), 鍋倉淳一 (生理学研究所生体恒常機能発達機構), 檜山武史 (基礎生物学研究所統合神経)

【概要】

細胞の生死に関する研究は、多様な生命現象や疾患病態を解明していく上で必要不可欠なテーマである。細胞死に関する研究は、アポトーシスの分子機構を中心に精力的になされ、主要な分子とその機能が同定されてきた。これらの研究成果は、さらなる研究の拡がりを促し、具体的には、新たな細胞死機構の同定、死細胞処理機構の生理的重要性、他の細胞機能との相互作用、細胞死の生理的意義、疾患克服への臨床応用、等々、細胞死研究において解明すべき事象が多面的となってきた。このよう

な状況において、細胞死を包括的に理解し、疾患克服に応用する為には、細胞死を様々な立場から論じ、各々の関連を理解する事が必要である。本会においては、このような趣旨に則り、我が国の細胞死研究の第一人者が一堂に会し、これらの諸問題に対して多面的、包括的に交流を行なった。活発な議論と情報交換は、細胞死研究の進捗に一定の効果を与えることになったものと考えている。

(1) Fas 下流分子の多様な生理機能

米原 伸（京都大学大学院生命科学研究科）

FLASHはFas誘導アポトーシスシグナルに関わるとして見いだされた分子であるが、その生理機能に関しては不明な分子である。多様なヒト細胞株において、FLASHの発現抑制を誘導すると細胞周期の進行がS期で停止した。その分子機構を解明するためにFLASHと会合する分子ARS2を同定した。ARS2の発現抑制を誘導しても、細胞周期の進行がS期で停止した。また、FLASHとARS2

は核内でCajal body様（Cajal bodyとは一致しない）の構造体を形成していることを示し、FLASHの発現抑制でもARS2の発現抑制でもS期特異的ヒストンの転写が抑制されることを明らかにした。さらに、ARS2と会合するFLASH分子の領域を決定したところ、FLASH中の13アミノ残基がその会合に必要十分であることが示された。

(2) TNF シグナルに関与するアダプター分子による細胞死と炎症の制御

中野裕康（順天堂大学医学部）

TNF レセプターを介するシグナル伝達に関与するアダプター分子である *traf2*^{-/-}マウスを解析した結果、*traf2*^{-/-}マウスは大腸炎が自然発症することを見いだした。*traf2*^{-/-}マウスは生後1週頃より野生型マウスに比較し、発育や体重増加の不良が認められ、生後約3週以内に全個体が死亡する。組織学的な検討の結果、大腸粘膜および粘膜下へのB細胞の著明な細胞浸潤が認められることが明らかとなった。また大腸局所におけるサイトカインの産生をreal-time PCRで解析したところ、*tnfa*, *il-6*, *ifn-γ*, *il-17*などの炎症性サイトカインの発現の上昇が認められたことより、TNFαの中和抗体を*traf2*^{-/-}マウスに投与し

たが腸炎は改善されず、さらに*il-17*ノックアウトマウスあるいは*ifn-γ*ノックアウトマウスとの二重欠損マウスを作製しても腸炎は改善しなかった。一方、これまで腸炎を抑制すると考えられてきた*il-10*の発現亢進が大腸で認められ、さらにその亢進は*traf2*^{-/-}マウスの胎生期の腸でも認められたことから、IL-10に対する中和抗体を全身投与したところ、予想外な事に腸炎の著明な改善が認められた。以上のことより、*traf2*^{-/-}マウスで認められる大腸炎は局所におけるIL-10産生の亢進の結果であることが明らかとなった。

(3) NLR ファミリー：新しい細胞死と炎症の接点

須田貴司（金沢大学がん研究所免疫炎症制御研究分野）

NLRファミリーは、人では20種類以上のメンバーからなる蛋白ファミリーで、その一部は細胞質に侵入した病原体を感知し、細胞死や炎症応答を誘導するパターン認識受容体として働く。また、一部のNLR蛋白の突然変異は、家族性自己炎症性疾患の原因となる。我々は、細胞質アダプター蛋白質ASCを介したNLRのシグナル伝達機構を解析し、アポトーシスやNF-κBの活性化にカスパーゼ8が重要な役割を果たすことを示してきた。しか

しその後、ASCはBAXと直接結合し、BAXをミトコンドリアにリクルートすることでアポトーシスを誘導するという報告がなされた。そこで、さらに検討した結果、ASCはBaxとは結合せず、イニシエーターカスパーゼとしては専らカスパーゼ8が働くが、タイプII細胞ではBidを介してミトコンドリア経路のアポトーシスを誘導することを明らかにした。また、ASCの活性化によりNF-κB以外にもAP-1が細胞自立的かつカスパーゼ8,

JNK, p38 依存性に活性化し、転写、炎症、細胞死に関する 遺伝子群の発現が誘導されることが判明した。

(4) ASC : 新しいアポトーシスとネクローシスの接点

茂谷 康 (金沢大学がん研究所免疫炎症制御研究分野)

我々は様々ながん細胞で ASC が活性化するとカスパーゼ 8 依存性のアポトーシスが誘導されることを示してきた。しかし、マクロファージでは細菌感染などで ASC が活性化すると、カスパーゼ 1 依存性の細胞死 (pyroptosis と呼ぶことが提唱されている) やカテプシン B 阻害剤 CA-074Me で阻害されるネクローシス様細胞死 (pyronecrosis と呼ぶことが提唱されている) が誘導される。しかし、何がこれらの細胞死の様態を決定するかは不明である。我々は NUGC4 ヒト胃癌細胞株と COLO205 ヒト大腸癌細胞株で ASC を活性化すると前者ではアポ

トーシス、後者ではネクローシス様細胞死が誘導されることを見出した。このネクローシス様細胞死はリソゾームの崩壊 (アクリジンオレンジ染色性の低下) を伴い、CA-074Me と V-ATPase 阻害剤 Bafilomycin A で細胞死とリソゾームの崩壊が共に阻止された。以上の結果から、1) ASC を介した細胞死の様態は細胞のタイプによって異なること、2) COLO205 細胞におけるネクローシス様細胞死は pyronecrosis に類似し、ASC の下流でカテプシンが活性化され、リソゾームが崩壊することにより誘導されることが示唆された。

(5) Impacts of Macrophage-Derived AIM (Apoptosis Inhibitor of Macrophage) on Metabolic Disease and Beyond

宮崎 徹 (東京大学大学院医学研究科 疾患生命工学センター)

既存の治療法では十分な制御が困難な疾患に対する新規治療法の開発を目指すにあたって、その疾患の病態メカニズムを新しい側面から明らかにする必要がある。その考え方に基き、私たちは、マクロファージが病態生理に重要な役割を果たしていると考えられるメタボリックシンドロームの様々な疾患群に対して、“病巣の劣悪な細胞環境においてもマクロファージはアポトーシス抵抗性である”というユニークな視点から、私たちの同定した AIM (Apoptosis Inhibitor of Macrophage) 分子の機能解析を元に取り組んでいる。動脈硬化巣においては、アポトーシス誘導性の酸化 LDL を取り込み、泡沫化することによって動脈硬化巣を形成するマクロファージが、核内受容体 LXR の活性化に際して AIM を発現し、自らのアポトーシスを抑制し病態発症に重要な役割を果たしていることが分かった。したがって、AIM を欠損した状態

では、動脈硬化巣においてマクロファージが激しくアポトーシスに落ちり、その結果、病変が著しく軽減するため、AIM の機能制御は動脈硬化の予防・治療に非常に有用である可能性があることが示唆される。さらに、肥満した個体の脂肪組織に浸潤したマクロファージもまた AIM を強発現しており、マクロファージの生存に重要である。興味深いことに、脂肪組織においては、AIM はマクロファージのみならず脂肪細胞にも直接作用しており、肥満のメカニズムに重要な役割を果たしていることが明らかになった。さらに、“病巣の劣悪な細胞環境におけるアポトーシス抵抗性”は一部の癌組織でも AIM を介し獲得されている可能性が高いことが分かった。今回は、これら AIM とアポトーシス抵抗性に関する新しい知見を紹介したい。

(6) 膜型レクチン CD72 と B リンパ球アポトーシス

鏑田武志（東京医科歯科大学疾患生命科学研究部）

CD72 分子は主に B リンパ球に発現する 45kD の 2 型膜タンパクで、細胞外領域には C 型レクチン様ドメインが、細胞内には抑制性チロシンモチーフ (ITIM) がある。B 細胞抗原受容体 (BCR) が架橋されると、CD72 の ITIM がリン酸化され、リン酸化 ITIM がチロシンフォスファターゼ SHP-1 を活性化することにより B リンパ球の活性化を制御する。また、CD72 は自己反応性 B リンパ球の除去に関与するとされている BCR 架橋によるアポトーシスを制御する。ヒト CD72 には多型があり、CD72*1 と CD72*2 のハプロタイプがある。CD72*2 は自己免疫疾

患全身性エリテマトーデス (SLE) のリスクを軽減する。ヒト CD72 には全長 CD72 (CD72fl) とエクソン 8 を欠くスプライスバリエント (CD72Δ8) の 2 つのアイソフォームがあり、CD72*2 では (CD72Δ8) の産生が増加している。CD72fl は BCR 架橋によるアポトーシスを制御するが、CD72Δ8 は CD72fl とは全く異なるメカニズムにより CD72fl よりも強く BCR 架橋によるアポトーシスを制御する。このような強いアポトーシス制御により、自己免疫疾患が制御されることが示唆される。

(7) 光タンパク質プローブを用いた生理機能の可視化と解析技術

小澤岳昌（東京大学大学院理学系研究科）

動植物個体内ではたらく「生体分子の機能および動態」を詳細に解析する分子イメージングは、基礎生命科学や医学研究の新たな基盤技術として大きな期待が寄せられている。このイメージング技術は、生きた細胞内におけるタンパク質の局在や動態、細胞内小分子の濃度変動、タンパク質間相互作用など、これまで細胞をすりつぶして解析していた生命現象が、リアルタイムにイメージングできる大きな利点を有している。我々は、二分した蛍光タンパク質 (GFP) あるいは発光タンパク質 (luciferase) を再構成させ、発光能を回復させる新たな技術－タンパ

ク質再構成法－を開発した。タンパク質再構成法の重要な特徴は、細胞内のシグナルを、蛍光・発光の大きなシグナル変化として直接検出できる点にある。これまでに、タンパク質間相互作用検出法、ミトコンドリアおよび細胞内小胞局在タンパク質の網羅的解析法、RNA の動態検出法、酵素活性検出法等を開発してきた。本シンポジウムでは、タンパク質再構成法の基本原理を概説し、生きた細胞や動物個体内で機能する生体分子の新たな可視化解析法について紹介する。

(8) 細胞死シグナルの多彩な生理機能

三浦正幸（東京大学大学院薬学系研究科）

ショウジョウバエの蛹期には大規模な組織再構築がおこることから、細胞死の研究テーマとして古くから取り上げられてきた。しかし組織崩壊や新たな器官構築時の細胞死パターンを取り上げた研究は少なくそのシグナルプロセスは不明である。生体での細胞死シグナルのダイナミクスを感度よくモニターすることが出来れば、細胞

死の生体調節機構を詳しく調べる事が可能になる。そこでカスパーゼ活性インディケーター SCAT (sensor for activated caspase based on FRET) 及び、DIAP1 の分解を検出するプローブ PRAP (pre-apoptosis probe by detecting DIAP1 degradation) を作成し、生体での細胞死シグナルのイメージング解析を行っている。その結果、1) 細胞死シ

グナルに組織中での伝播パターンがあること, 2) 細胞死は周りの組織増殖に関わること, さらに 3) カスパーゼが活性化されるタイミングによって細胞死か非細胞死か

の機能的な違いを細胞にもたらしことが明らかになった。

(9) 新規に同定したオートファジー機構の生理機能解析

清水重臣 (東京医科歯科大学難治疾患研究所)

マクロオートファジーは、細胞内のタンパク質を大量に分解するシステムとして、酵母から哺乳動物まで広く保存されているシステムである。このオートファジーに関連する遺伝子として ATG が出芽酵母の飢餓誘導によるオートファジーの欠損株を用いた研究により 30 近く同定され、それ以降哺乳動物についてもその相同遺伝子のノックアウトマウスの解析が詳細に行われるようになった。その結果、オートファジーは飢餓応答以外にも、細胞内タンパク質の恒常的な品質管理を行い神経細胞における機能の維持を担うこと、細胞内に進入した細菌の除去を行うこと、細胞死の制御に関わることなどが相次いで報告されてきた。一方で我々は、アポトーシスが誘

導されない Bax/Bak のダブルノックアウトマウス胎児由来繊維芽細胞に、抗ガン剤であるエトポシドを添加すると、(1) DNA 二重鎖切断によってストレス応答性のオートファジーが誘導されること、(2) このオートファジーを介して細胞死が誘導されることを明らかにしてきた。

今回我々は、ストレス誘導性オートファジーの特徴を把握すべく、電子顕微鏡を用いて詳細な形態解析を行った。その結果、エトポシドをマウス胎児由来繊維芽細胞の培地に添加すると、(1) オートファジーが大幅に亢進すること、(2) オートリソソーム内の内容物が蓄積していることなど、いくつかの特徴を見出した。

(10) クロマチンリモデリングによるアポトーシスの回避機構

中山敬一 (九州大学生体防御医学研究所)

p53 は細胞周期停止やアポトーシスを誘導する転写因子であると同時に、最も有名な癌抑制遺伝子産物である。われわれは最近 p53 機能をクロマチンリモデリング因子 CHD8 が強力に抑制することを発見した。CHD8 を過剰発現すると p53 によるアポトーシスが阻害され、逆に CHD8 を RNAi でノックダウンすると、アポトーシス感受性が亢進した。われわれは CHD8 ノックアウトマウスを作製したところ、胎生早期にアポトーシスの異常な亢進によりマウス胚が死亡することを発見した。さらに p53/CHD8 ダブルノックアウトマウスでは、胎生早期におけるアポトーシスが回避され、マウスは延命した。これらの遺伝学的証拠は CHD8 が p53 の強力かつ生理的な抑制因子であることを示している。

CHD8 はクロマチン上で p53 と結合し、さらにそこへ

ヒストン H1 をリクルートしてくる活性があることが明らかとなった。CHD8 は p53 による p21, Noxa, MDM2 遺伝子等の転写活性化を抑制するが、ヒストン H1 がいないとこの抑制効果は見られない。ChIP アッセイにより、p21 などの p53 依存的プロモーター上に p53/CHD8/ヒストン H1 複合体が形成されることが示された。この複合体形成が起こると p53 の活性は抑制され、アポトーシスは回避される。

胎生早期には細胞周期が高速度で回転しており、細胞は常に p53 誘導性のアポトーシスに陥る危険を伴っているが、CHD8/ヒストン H1 はこの時期におけるアポトーシスへの感受性を弱め、逆に胎生後期には CHD8 発現が減少することによって、組織形成に必要なアポトーシスが起こるようになるとわれわれは考えている。

(11) マウスの発生段階でのプログラム細胞死

長田重一（京都大学大学院医学研究科）

動物の発生過程では数多くの細胞が死滅する。しかし、死滅した細胞は速やかにマクロファージなどの貪食細胞によって貪食されることから、発生のどの時期にどのような細胞が死滅するか明らかになっていない。発生過程での細胞死の大部分はアポトーシスで進行すると考えられているがアポトーシスでは死細胞の染色体 DNA は死細胞内で CAD (caspase-activated DNase) によって分解されるとともに、死細胞がマクロファージによって貪食された後、リソソーム内の DNase II によってさらに分解される。私達はこれまでに DNase II 遺伝子のノックアウトマウスを作製し、このマウスは発生の後期に死滅するが、

その臓器には未分解の DNA を蓄積したマクロファージが散在することを見いだした。今回、この DNase II ノックアウトマウス胚を組織化学的、免疫化学的に解析することにより、未分解 DNA を蓄積したマクロファージは指間、大脳皮質の White Matter と呼ばれる層の細胞など規定された細胞であることを見いだした。また、DNase II と Apaf-1 両遺伝子を欠損したマウスを解析することにより、マウスの発生過程での細胞死は大部分、Apaf-1 に依存したアポトーシスであること、Apaf-1 が欠損すると細胞はネクロシス様の形態を持って死滅し、発生過程は一見正常に進行することを見いだした。

(12) アポトーシス性細胞縮小の役割とシグナリング

岡田泰伸（生理学研究所）

アポトーシス性細胞容積減少 (Apoptotic Volume Decrease: AVD) はアポトーシス死の初期過程に起こる特徴的な現象であり、容積感受性外向整流性アニオンチャンネル (VSOR) の活性化によってもたらされる。正常細胞は、容積縮小の後には調節性容積増加 (Regulatory Volume Increase: RVI) を示すが、アポトーシス性細胞ではこの RVI 達成のための Na^+ 流入を担うカチオンチャンネル (HICC) 活性化が抑制されており、持続性の細胞縮小を示してアポトーシス死に陥る。今回、HeLa 細胞におけるストレス応答性 MAP キナーゼカスケードと AVD 誘導及び RVI 抑制の関係を調べた。ASK1 ノックダウンや、p38 や JNK のブロッカーによってスタウロスポリン(STS) に

よる AVD 誘導は影響を受けなかった。一方、RVI 抑制は ASK1 ノックダウンによって大きく軽減された。HICC ブロッカー存在下で高浸透圧刺激を与えることによって物理的に生じさせた細胞縮小の持続によっても、p38 や JNK の活性化やそれにつづくカスパーゼの活性化が誘導された。以上の結果から、アポトーシス過程における ASK1 や p38 や JNK の活性化は AVD 誘導の下流に、ASK1 活性化は RVI 抑制の上流にあること、そして p38 や JNK の活性化は持続性細胞縮小の下流にあること、さらには持続性細胞縮小そのものがアポトーシス誘導の十分条件となりうるということが結論された。

(13) オンチップ 1細胞培養計測システムを用いた 1細胞への刺激と応答の解析

安田賢二（東京医科歯科大学生体材料工学研究所）

オンチップ 1細胞培養計測システムを用いた免疫細胞 (マクロファージ) や大腸菌等の 1細胞レベルでの刺激応答の計測結果についてシステムの構成の簡単な説明を交

えて研究紹介を行った。まず、マクロファージの 1細胞計測については、孤立化したマクロファージ 1細胞の表面の特定の位置に、餌 (ザイモサン) を光ピンセットを

用いて接触させ、その後起こる食食のダイナミクスの特性を検証した結果の幾つかについて紹介をした。マクロファージの細胞表面の異なる位置に複数の餌を接触させた時、それらの接触開始した時間差が 40 秒より短くなる場合には、これらの餌に対して同時に食食が起こり、40 秒より長い場合には、最初に接触した餌の食食が終わるまで 2 番目以降に接触した餌の食食を開始しなかった。また、この性質は、5 個の餌を順次、細胞表面の異なる位置にランダムに各 40 秒程度の時間差で接触させ

た場合にも成り立ち、その接触を開始した順番に従って食食を開始することがわかった。他方、細胞表面の同一位置に、繰り返し餌を与えた場であっても、細胞表面のその位置での、細胞の食食開始と食食にかかる時間について大きな変化はなく、この観点では食食現象自体がヒステリシスとして食食を行った細胞表面の特定の部位の反応性に変化を与えることは見当たらなかったことも明らかになった。最後に、これらの実験結果に基づいて、他の参加者たちと可能な機構についての議論を行った。

(14) Akt の選択的機能制御

後藤由季子 (東京大学分子細胞生物学研究所)

Akt は、細胞の増殖・生存・運動・糖代謝など、様々な過程において必須の役割を果たすキナーゼである。このような様々な機能を発揮する際、Akt は異なる基質をターゲットとしているが、それぞれのコンテキストにおいて Akt がどのようにして必要な基質を選んでいるのかは不明であった。我々は最近、セリン/スレオニンキナーゼ PAK が Akt および Akt の活性化因子 PDK1 に結合し、Akt の活性化を促進するスキファールド分子として機能することを見出した。そして興味深いことに、PAK は Akt の基質全てのリン酸化を促進するのではなく、一部

の基質のみのリン酸化を促進すること、さらに PAK が Akt のもつ様々な機能のうち、細胞運動・浸潤性に関わる機能を選択的に制御している可能性を示唆する結果を得た。このことは、スキファールド分子 PAK が Akt のターゲット特異性を制御している可能性を示唆している。これまで、Akt がどのようにして様々な機能をコンテキストにより使い分けているのか、というメカニズムはほとんどわかっていなかったが、今回我々はそのメカニズムの一つを明らかにした。

(15) JNK/p38 MAPK 経路によるウイルス応答制御メカニズム

岡崎朋彦 (東京大学分子細胞生物学研究所)

高等哺乳動物は、ウイルス感染の初期応答においてはインターフェロン (IFN) の誘導が中心的な役割を果たす。また一方で、感染細胞が自殺して感染の拡大を防ぐ事も示唆されていた。しかし、IFN の誘導と細胞死という二つの初期防御機構の間に何らかの分子的な関連があるのかについては全く知られていなかった。本研究により、ウイルス感染および dsRNA 刺激による IFN- β と細胞

死の誘導には RIG-I 経路を介した ASK1 の活性化が必須であることが初めて示され、IFN 誘導と細胞死誘導には共通の分子経路が関わっている事が明らかになった。更に ASK1 ホモオリゴマーは IFN を、ASK1/ASK2 ヘテロオリゴマーは細胞死を誘導することから、ASK2 の有無による抗ウイルス防御機構の使い分けの存在が示唆された。

(16) 小型魚類を用いた SAPK/JNK シグナル伝達系の解析

仁科博史（東京医科歯科大学難治疾患研究所）

ストレス応答性 SAPK/JNK シグナル伝達系は細胞増殖促進、細胞老化抑制、細胞死誘導など様々な細胞応答に関与することが知られている。また、SAPK/JNK は non-canonical Wnt シグナル伝達系により活性化され、初期胚の形態形成にも関与することが示されている。しかしながら、SAPK/JNK がどのような分子機構によって形態形成運動を制御しているのかについては不明な点が多い。

そこで申請者は、母体外で発生し初期発生過程の観察に適したゼブラフィッシュを用いて、SAPK/JNK 活性化因子 MKK4 および MKK7 の観点から、初期形態形成に

おける JNK シグナル系の役割解析を行った。その結果、1) ゼブラフィッシュには MKK4A, MKK4B および MKK7 の3種類の遺伝子が存在すること、2) モルフォリノアンチセンスオリゴを用いて MKK4B をノックダウンしたところ、原腸形成期における収斂伸長 (convergent and extension; CE) 運動に異常が認められること、3) MKK4B をノックダウン胚では上流分子である Wnt11 自身の遺伝子発現が亢進することなどを見出した。これらの結果は、MKK4B→JNK シグナル系が *Wnt11* 遺伝子発現を制御し、初期原腸胚形成に関与していることを示唆する。

(17) パーキンソン病メダカモデル作製の試み

高橋良輔（京都大学大学院医学研究科）

小型魚類であるメダカは純系があり、遺伝子変異導入法 (Targeting Induced Local Lesions In Genomes : TILLING 法) が確立しており、またマウスに比べると維持のコストが比較的安価である点から、遺伝性疾患モデル動物として期待がもてる。そこでメダカでパーキンソン病モデル作製の試みを行った。まずドーパミン神経毒として知られる MPTP を幼魚の時期に曝すと、ヒトの黒質に相当すると思われる線条体に投射する間脳腹側のドーパミンニューロンが選択的に変性、ドーパミンとその代謝産物である DOPAC も減少し、行動解析では自発運動量をはじめ、運動の指標が有意に低下していた。以上より始めてメダカのパーキンソン病モデル作製に成功した。次に常染色体劣性遺伝性パーキンソン病 PARK6 の原因遺伝子

PINK1 のノックアウト (KO) メダカを TILLING 法を用いて作製した。このメダカは、若干寿命が短縮傾向にあった。また野生型やヘテロのメダカと同じ水槽で飼育すると体重が減少する傾向がみられたが、KO 群を隔離して飼育するとそのような傾向は消失したことから餌の獲得で遅れをとる傾向があるためと解釈した。PINK1-/-メダカではドーパミンニューロン数は減少しなかったが、4-8 ヶ月令ではドーパミンの量が増加、12-18 ヶ月では自発運動量が低下し、一部のパーキンソン病様症状がドーパミン代謝異常を伴って出現することが注目された。今後はすでに作製済みの Parkin-KO の行動・病理組織学的解析を進めるとともに、PINK1/Parkin 二重変異メダカで表現型が増強するかどうか解析する予定である。

(18) 異常蛋白質の蓄積がもたらすフィードバック機構

垣塚 彰（京都大学大学院生命科学研究科）

優性遺伝型をとる遺伝性神経変性疾患では、ほとんどすべての場合、遺伝子変異によって凝集しやすい蛋白質

が産生され、そのような蛋白質の蓄積・凝集像が認められる。多くの孤発性神経変性疾患においても、病変部位

に異常蛋白質の蓄積・凝集が共通して認められる。したがって、このような孤発例では、遺伝子変異以外の原因で、ある種の蛋白質が易凝集性になっていることが推測される。我々は、神経変性疾患の発症には、このような異常蛋白質の凝集・蓄積に対する生体反応が深く関わると考え、それらの過程に関わる因子を検索してきた。その結果、VCP と呼ばれる ATPase が、異常蛋白質を認識し、凝集体の形成と除去に重要な働きを担っていることを示してきた。ポリグルタミンなどの異常蛋白質が細胞内に蓄積してくると、VCP はリン酸化やアセチル化の修飾を受け、核に移行して、ヒストンのアセチル化の抑制と転写の抑制を引き起こすこと、そしてその結果として、新規の蛋白質の合成が抑制させることを明らかにした。

この結果は、VCP は、上記に示したような異常蛋白質の蓄積を認知し、凝集体の生成・除去に直接関わるばかりでなく、核に移行することによって、新規蛋白質の合成を抑制するという新たなフィードバック経路の主要な担い手であることを示している。一方、小胞体に異常な蛋白質が蓄積した場合には、小胞体内での異常蛋白質の量を軽減させる種々の反応が引き起こされ、unfolded protein response (UPR) と呼ばれる。我々は、新たな UPR として、rRNA の転写が抑制されることを見いだした。rRNA の合成では大量の ATP が消費される。従って、この結果は、rRNA 合成での ATP の節約を通して、シャペロンや小胞体関連分解の方に ATP を回す機構が存在することを示唆している。

(19) 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) における小胞体ストレス

一條秀憲 (東京大学大学院薬学系研究科)

本研究は、神経細胞における細胞死耐性のメカニズムを小胞体ストレス応答シグナル伝達経路の破綻という観点から解析することを目的としている。特にストレス感受性 MAP キナーゼスーパーファミリーによるストレスシグナルの解析を通して、筋萎縮性側索硬化症の発症ならびに病態進行のメカニズムを明らかにすることを目標としている。具体的には、ストレス感受性 MAP キナーゼ系分子群としての ASK ファミリーの機能解析を軸に、ノックアウトマウスの作製ならびに変異型 SOD1g マウ

スとの交配を行い、ストレス感受性 MAP キナーゼスーパーファミリーが、筋萎縮性側索硬化症の発症・進展において果たす役割が明らかになりつつある。また、変異型 SOD1 が ERAD コンポーネントのひとつである Derlin-1 に結合することによって ERAD を阻害し、小胞体ストレスを惹起するメカニズムが明らかになりつつある。本発表では、家族性変異型 SOD1 が共通して Derlin-1 に結合することによって小胞体ストレスを誘導する新たなメカニズムについて報告する。

(20) マウス組織でみられるプログラム細胞死の解析

辻本賀英 (大阪大学大学院医学系研究科)

我々は、哺乳動物細胞が有する多様な細胞死機構の包括的な理解を目指し、培養細胞株を利用した実験系およびマウス個体を利用した実験系を用いて解析を行っている。特に、動物個体内で起こるプログラム細胞死の分子メカニズムを理解するために、プログラム細胞死が関与する生物現象の代表として、マウスの個体発生時の形態形成、成体の組織での細胞のターンオーバーなどを選び、それぞれに対応する多くの生命現象の中から適当なものをモデルとして選択し、そこで見られるプログラ

ム細胞死の詳細な解析を行ってきた。

本研究会では、特に、成体組織での細胞のターンオーバーのモデル系として選択し解析してきた小腸上皮細胞系に焦点を合わせた最近の解析結果を紹介する。ここで見られるプログラム細胞死の分子レベルでの詳細な解析のために、試験管内で培養でき、細胞のターンオーバーの観察が可能な器官培養系を確立したので、それを用いた解析結果も合わせて紹介する。

9. 視知覚研究の融合を目指して－生理，心理物理，計算論

2008 年 6 月 12 日－6 月 13 日

代表・世話人：西田眞也（NTT コミュニケーション科学基礎研究所）

所内対応者：小松英彦（生理学研究所）

- （1）運動物体における時空間的特徴帰属
河邊隆寛（九州大学大学院人間環境学研究院）
- （2）タスクスイッチ課題における MT 野情報の読み出し
宇賀貴紀（順天堂大学医学部）
- （3）視覚の生成モデル ―理論と実験から―
渡辺正峰（東京大学大学院工学系研究科）
- （4）注意の移動と前頭葉皮質の神経活動
田中真樹（北海道大学大学院医学研究科）
- （5）Bridget Riley の Op-art 作品におけるコントラスト錯視の構造
G.J.VanTonder（京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科）
- （6）ショウジョウバエの走光性行動を波長域ごとに制御する並列な視覚神経回路の解析
伊藤 啓（東京大学分子細胞生物学研究所）
- （7）骨格/テクスチャ非線形画像分解とイメージング IP パイプライン高度化への応用
―画像品質の自在コントロールを目指して―
齊藤隆弘（神奈川大学ハイテクリサーチセンター）
- （8）視覚刺激と解析法：ノイズ刺激から自然画像，サイン波まで
大澤五住（大阪大学大学院生命機能研究科）
- （9）視覚グルーピング課題時のサル頭頂間溝皮質ニューロン活動への注意の影響
横井 功（生理学研究所感覚認知情報部門）
- （10）チンパンジーにおける視覚認知 ―社会的刺激の処理を中心に―
友永雅己（京都大学霊長類研究所行動神経研究部門）
- （11）蛇の回転錯視への心理物理学的・計算論的・生理学的アプローチ
村上郁也（東京大学大学院総合文化研究科）
- （12）注意の時間的配分と知覚的構え
河原純一郎（産業技術総合研究所人間福祉医工学研究部門）
- （13）下側頭葉視覚連合野TEにおけるカラム構造と視覚情報表現
谷藤 学（理研 BSI 脳統合機能研究チーム）
- （14）質感知覚の心理物理学
本吉 勇（NTT コミュニケーション科学基礎研究所）

【参加者名】

河邊隆寛（九州大学大学院），宇賀貴紀（順天堂大学），
渡辺正峰（東京大学大学院），田中真樹（北海道大学），
G.J. Van Tonder（京都工芸繊維大学大学院），伊藤 啓（東
京大学分子細胞生物学研究所），齊藤隆弘（神奈川大学ハ
イテクリサーチセンター），大澤五住（大阪大学大学院），

横井 功（生理学研究所），友永雅己（京都大学霊長類研
究所），村上郁也（東京大学大学院），河原純一郎（産業
技術総合研究所），谷藤 学（理研 BSI），本吉 勇（NTT
コミュニケーション科学基礎研究所），西田眞也（NTT
コミュニケーション科学基礎研究所），松嶋藻乃（北海道

大学), 永福智志 (富山大学大学院), 林 隆 (理研 BSI), 内川恵二 (東京工業大学大学院), 武田二郎 (東京工業大学大学院), 北澤裕介 (東京工業大学大学院), 吹野徳彦 (東京工業大学大学院), 的場寛明 (東京工業大学大学院), 緒方康匡 (東京工業大学大学院), 北岡明佳 (立命館大学), 塩入 論 (東北大学電気通信研究所), 金子寛彦 (東京工業大学大学院), 水科晴樹 (東京工業大学大学院), 宇和伸明 (東京工業大学大学院), 根岸一平 (東京工業大学大学院), 藤井 芳孝 (東京工業大学大学院), 浅野拓也 (東京工業大学大学院), 南 明宏 (東京工業大学大学院), 前川 亮 (東京工業大学大学院), 宮内 浩 (東京工業大学大学院), 竹村浩昌 (東京大学大学院), 一戸紀孝 (理化学研究所), 沖山夏子 (花王株式会社), 田嶋達裕 (東京大学大学院), 今井千尋 (東京大学大学院), 瀧山 健 (東京大学大学院), 北園 淳 (東京大学大学院), 福島邦彦 (関西大学), 寺尾将彦 (NTT コミュニケーション科学基礎研究所), parshuram hotkar (国立遺伝学研究所), 近藤あき (京都大学大学院), 篠崎隆志 (理化学研究所), 新美亮輔 (理研 BSI), 鈴木 航 (理化学研究所), 竹内孝 (理研 BSI), 原澤賢充 (NHK 放送技術研究所), 勝亦憲子 (理研 BSI), 吉田 久 (近畿大学), 堺 浩之 (豊田中央研究所), 佐藤雅之 (北九州市立大学), 青木賢次 (東京工業大学), 今住優吾 (豊橋技術科学大学), 小濱剛 (近畿大学), 益田綾子 (関西学院大学), 新井賢亮 (京都大学), 佐藤直紀 (花王 (株)), 齋藤耕吉 (東京工業大学), 小村 豊 (産経研), 真塩海里 (東京大学大学院),

中村哲之 (京都大学), 嘉幡貴至 (神戸大学), 蒲池みゆき (工学院大学), 菊池 優 (愛知淑徳大学), 柴田秀美 (愛教大付属高校), 林 晴代 (愛知淑徳大学), 長谷川国太 (名古屋大学), 高橋伸子 (愛知淑徳大学), 伊藤鷹慎 (東京理科大学), 三枝千尋 (花王 (株)), 宮崎由樹 (首都大学東京大学院), 栗木一郎 (東北大学電気通信研究所), 原 一之 (東京都立産業技術高専), 観音隆幸 (理化学研究所), 篠森敏三 (高知工科大学), 小峰央志 (豊橋技術科学大学), 杉本史恵 (関西学院大学大学院), 阪口 豊 (電気通信大学), 金 秀明 (京都大学理学研究科), 高橋啓介 (愛知淑徳大学), 繁樹博昭 (豊橋技術科学大学), 下川史明 (京都大学理学研究科), 広川純也 (基生研), 川澄未来子 (愛知淑徳大学), 行松慎二 (中京大学), 高瀬慎二 (中京大学), 飯田宗徳 (東京大学大学院), 鶴原亜紀 (中央大学), 秦 重史 (京大院), 渡辺あゆみ (愛知淑徳大学大学院), 蘆田 宏 (京都大学), 岡田真人 (東京大学), 佐々木博昭 (東北大), 山川義徳 (京都大学), 高橋 励 (関学), 熊野弘紀 (順天堂大学), 佐々木亮 (順天堂大学), 荒木 修 (東京理科大学), 渡邊淳司 (JST), 下村智斉 (中京大学), 廣瀬信之 (京都大学), 大泉匡史 (東京大学), 大森敏明 (東京大学), 宮川尚久 (理研 BSI), 石橋和也 (神戸大学), 鈴木一隆

以下, 生理学研究所 田中絵実, 浦川智和, 林 正道, 綾部友亮, 岡さち子, 小松英彦, 伊藤 南, 郷田直一, 鯉田孝和, 平松千尋, 原田卓弥, 坂野 拓, 西尾亜希子, 岡澤剛起

【概要】

「視知覚研究の融合を目指して—生理, 心理物理, 計算論」は, 平成 20 年 6 月 12 日, 13 日に岡崎コンファレンスセンター中会議室において開催された。今回の参加者も 124 名と例年通りの盛会であった。14 件の講演の内訳は生理 6 件, 心理物理 6 件, 比較行動学 1 件, 画像工学 1 件。トップで河邊氏が時空間知覚に対するクロスモーダル情報統合の役割についての最新研究を報告すると, 宇賀氏はタスクスイッチという斬新な手法で知覚判断の神経メカニズムに迫った。渡辺氏はフィードバックの意味を理論と fMRI の両面から考察し, 田中氏は眼球運動の座である FEF の細胞が眼球運動を伴わない注意の移動においても重要な役目を果たしているという興味深い報告を行った。Tonder 氏は芸術作品に潜むトリックを初期視覚系のモデルによって分析し, 伊藤氏は遺伝子工学と

行動実験を見事に組み合わせてショウジョウバエの色覚の神経機構を解明してみせた。齊藤氏の提案する「骨格/テクスチャ非線形画像分解」は純粋な画像工学手法だが, これまでの視覚科学が依拠してきたフーリエ・ウェーブレット変換の限界を超える特性をもち, 近い将来に視覚研究の新しい流れを作ること予感させた。奇しくも直後に大澤氏が視覚刺激と解析法についての総合的な考察を行い, 視覚情報とは何か深く考える機会を得た。二日目は, まず横井氏がグルーピングの神経機構にメスを入れ, 続いて友永氏がこれまで彼らが長年行ってきたチンパンジーを使った比較行動学的な視覚研究をサーベイしてくれた。村上氏は今や世界一有名な錯視となった北岡氏の蛇の回転錯視のメカニズムを解説し, 河原氏は「注意の瞬き」についての新しい考え方を示してくれた。谷

藤氏はITのコラム構造に関する論争に終止符を打ち、最後は本吉氏が質感知覚の話題で締めくくった。視覚に関

する広範かつ最先端の研究が堪能できる大変有意義な研究会であった。

(1) 運動物体における時空間的特徴帰属

河邊隆寛（九州大学大学院人間環境学研究院）

視覚情報は、瞬目や眼球運動、自己運動によって離散的に与えられるが、そのことによって視覚において不連続や盲が生じることは殆どない。これは、視覚系が離散的情報を巧く対応づけ、対応間の情報を補完しているからであろう。本研究では、フレーム間で対象の大きさが

変化する仮現運動を刺激として用い、離散情報間の表象がポストディクシオン（回顧）に基づいて形成されている可能性を報告する。一方で、離散情報間表象が事前に提示された物体の特徴に基づくことを示した先行研究も紹介し、時空間離散情報間の表象形成について議論する。

(2) タスクスイッチ課題における MT 野情報の読み出し

宇賀貴紀（順天堂大学医学部生理学第一講座）

本研究では、同じ感覚情報をもとに異なった判断・行動をするときの「切り替え」が脳の中でどのように行われているのかを調べる実験を行った。ランダムドットステレオグラムのドットの運動方向あるいは奥行き of いずれかを答えるタスクスイッチ課題をサルに訓練し、大脳皮質 MT 野から神経活動を記録した。MT 野ニューロンの活動は、サルが運動方向・奥行き of どちらを答えてい

ても変化はなかった。しかし、MT 野ニューロンの活動とサルの答えとの相関を計算すると、サルが運動方向・奥行き of どちらに注目しているかに依存して相関値に変化が見られる場合があった。これは、MT 野ニューロンの情報の読み出し方を制御することで判断の「切り替え」が実現されていることを示唆する。

(3) 視覚の生成モデル —理論と実験から—

渡辺正峰（東京大学大学院工学系研究科）

視覚系の存在意義の一つとして「世界を正しく認識し、行動や意思決定につなげる」ことがあげられます。網膜に投影された二次元情報から三次元世界を再構築するためには、感覚情報のみならず、経験により獲得された視覚世界に関する“制約情報”が必要となります。本発表では、以上のような推論の脳メカニズムとして生成モデル (Mumford1992, Kawato et. al.1993) を取り上げます。生成モデルの特徴は、トップダウン神経投射が外界の順

光学過程（陰影、遮蔽等）を“シミュレート”し、実際の感覚入力との誤差が、認識に相当する高次表象の更新に用いられる点です。本発表では、遮蔽、位置不変性などの複雑な順光学過程を汎化的に獲得するアルゴリズムを提案し、さらに視覚的意識に関連して生成モデルの fMRI による検証を行います（理研の田中啓治、KangCheng、上野賢一、浅水屋剛らとの共同研究）。

(4) 注意の移動と前頭葉皮質の神経活動

田中真樹, 松嶋藻乃 (北海道大学医学研究科)

われわれは移動する物体に伴って連続的に、随意的に注意をむけることができる。こうした空間的注意のトップダウン制御には、前頭および頭頂葉の眼球運動関連領域が密接に関与すると考えられている。その神経機構を調べるために、注意の移動を要する行動課題 (Covert tracking 課題) をサルに訓練し、前頭眼野およびその周囲から単一ニューロン記録をおこなった。この課題では視野内を動き回る複数の視覚刺激のうち 1 つを選択し、眼

を動かさないでそれを内的に追跡する必要がある。得られた神経活動は逆相関法で解析した。前頭眼野ニューロンの多くは target の位置によって活動を変化させたが、前頭前野ではこれらに加えて distractor の位置やその移動方向によって発火頻度を変化させるものが見出された。こうした信号は distractor を能動的に無視し、target の選択と追跡を容易にするために役立っているのかもしれない。

(5) Bridget Riley の Op-art 作品におけるコントラスト錯視の構造

G.J. Van Tonder (京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科)

Despite its apparently simple composition, Fall, a representative Op art painting by Bridget Riley, evokes intriguing visual contrast effects. One such effect, transitory apparent contrast, is a perceptual phenomenon in which vivid illusory patterns of high contrast appear to involuntarily fluctuate within periodic line images. Since the first formal description of the effect (Purkinje, 1823), various explanations have been proposed, only with limited success. Here, we show that local alignment between stimulus structure and the vector field of object-stimulus relative displacement specifies the geometry of observed contrast loci,

proving that the contrast illusion occurs along locally stationary parts of the stimulus—strong evidence that the illusion is driven by the receptor stage in the retina.

Applying this model simulation to Fall, we show that the painting supports distinct compositional layers comprised of dynamic contrast loci, and a stable, multi-scale scaffold. We suggest that this structuring allows the perceptual embodiment of what Riley describes as the opposite experiences of visual tension and mental composure, that she attempts to recreate in her work.

(6) ショウジョウバエの走光性行動を波長域ごとに制御する並列な視覚神経回路の解析

伊藤 啓 (東京大学分子細胞生物学研究所高次構造研究分野)

ショウジョウバエは、単細胞生物等に見られるランダムな走光性ではなく、最初に光源の方向を定位してから一直線にその方向へ走る、ある程度複雑な走光性行動を示す。過去 40 年間の解析では、この行動を制御する脳神経回路に関する手がかりはなかった。我々は、低次視覚中枢と高次視覚中枢を結ぶ数十経路の神経回路のうちの特定の経路のみを、細胞特異的な遺伝子発現誘導を用い

て機能阻害し、さらに大型スペクトログラフを用いてごく狭い波長域の光への行動を解析した。その結果、2 種類の経路を阻害するとそれぞれ特定の波長域で走光性に異常が生じるが、わずか 30nm 離れた波長域では異常がないこと。また、光に向かう行動のみが阻害され、その波長の光の認識自体には影響がないことを発見した。異なる情報経路が相補的な波長について特異的に走行性行

動を並列制御することによって、混合光に対するロバストな応答が実現されていると考えられる。

(7) 骨格/テクスチャ非線形画像分解とイメージング IP パイプライン高度化への応用 —画像品質の自在コントロールを目指して—

齊藤隆弘（神奈川大学工学研究科/ハイテクリサーチセンター）

フーリエ解析に基づく信号処理は、音響信号のような振動的信号の処理に適しているが、不連続跳躍・緩やかな変動・振動的テクスチャ等、性質が異なる成分から構成された“自然画像”の処理に適したものではない。一方、我々の研究グループは、2000 年頃から、画像信号の性質に適合した新しい信号成分の分離表現法とその応用に関する研究をスタートさせ、画像を、不連続跳躍・緩やかな輝度変動・振動的テクスチャ等の構造的成分に分

解し、各分解成分にその性質に適合した処理を適用することで、古典的画像処理を高度化し、鮮鋭化と雑音除去のように互いに相反した処理課題を両立させながら効果的に実現できること、画像品質をある程度自在に制御し得ることを示してきた。本講演では、この構造的な非線形画像分解の考え方を紹介するとともに、テクスチャの白潰れの防止と暗部での雑音低減を同時に可能とした新たな DSC-IP パイプラインへの応用例も紹介する。

(8) 視覚刺激と解析法：ノイズ刺激から自然画像、サイン波まで

大澤五住（大阪大学大学院生命機能研究科）

視覚系のシステム解析的な研究では、刺激としてサイン波やノイズが良く利用されてきた。これに対し、最近の研究では自然画像や動画が刺激として利用されるようになった。高次視覚野の研究における、これらの刺激の利点と限界を考察する。初期視覚野とは異なり、高次視覚野では細胞の好む刺激特徴を強く含まないノイズ刺激は細胞を十分に発火させることができないとされる。反面、ノイズ刺激は細胞の特性に最適化されていないため、

反応レベルは低くても多領野の多くの細胞を一様に活性化することができ、解析法を工夫することにより、当初の目的を超えた解析を既存のデータから引き出すことも可能である等の利点も多い。これらの特徴をふまえ、当研究室ではノイズ刺激により、どのような特性まで実際に計測可能であるかを実証するための一連の研究を行っている。これらの内、視覚野細胞の曲率選択性と両眼特性を精密に求める実験に関して述べ、将来を展望する。

(9) 視覚グルーピング課題時のサル頭頂間溝皮質ニューロンへの注意の影響

横井 功¹，小松英彦^{1,2}（¹自然科学研究機構生理学研究所，²総合研究大学院大学生命科学研究科）

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タスクを設定し、サル頭頂間溝皮質（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 つの正方形ドットが十字に配置して構成される。同じコントラストのドットが水平または垂直に並ぶパターンをターゲット刺激とした。ター

ゲット刺激には方位とコントラストの特徴が含まれるが、このうち縦または横の方位に選択的な注意を向けさせて、IPS ニューロンへの注意の影響を調べた。記録した大部分のニューロンがターゲット刺激のコントラストよりも方位について選択的な反応を示した。方位の選択性は注意を向けている方位とターゲットの方位が一致す

る条件で増強した。さらに、選択性強度の増強はターゲットの検出時間と相関した。この結果は IPS のニューロ

ンが注意によって影響される視覚グルーピングに重要な役割を担っていることを示唆する。

(10) チンパンジーにおける視覚認知—社会的刺激の処理を中心に—

友永雅己 (京都大学霊長類研究所行動神経研究部門)

これまで、ヒトの進化的隣人であるチンパンジーを対象に、その視覚的認知能力の諸相について、比較認知科学的な観点から検討を進めてきた。最近は特に、ヒトとチンパンジーの間で無視できない差異が存在する社会的認知の知覚的基盤に興味をもって研究を進めてきた。今回はその中から、顔や視線、さらにはそれに関連するいくつかのトピックについての最近の成果を概観したい。トピックとしては以下のようなものを考えている。1) 顔刺激の効率的探索：チンパンジーは顔刺激を雑多なオブ

ジェクトの中からきわめて効率的に検出できる。これは顔刺激を「顔」として処理した上で起こっている。2) 視線の視覚探索：ヒト同様チンパンジーでも自分の方を見つめている顔のほうが視線のそれた顔よりも見つけやすい。ただし、効率的な探索とは言いがたい。その一方で他者間でやり取りされている視線については物体に視線を向けていない状態の方が物体を見ている状態よりも容易に検出できることがわかった。

(11) 蛇の回転錯視への心理物理学的・計算論的・生理学的アプローチ

村上郁也 (東京大学大学院総合文化研究科)

ある特定の光強度パターンを繰り返し配置した静止図形を見ると、特定方向に運動が感じられる。蛇の回転錯視とも呼ばれる本現象の生成機序を解明する実証研究を行ってきた。まず、錯視は逆方向の実際運動によって相殺できたことから相殺速度をもって錯視を定量化したところ、錯視量は被験者の眼球の微動や図形自身の画面上の微動による網膜上の図形の揺れが大きくなると増加し、偏心度が大きくなると増加し、網膜照度が低くなる

と減少することがわかった。これらから、時間周波数帯域通過特性をもつ処理過程の関与が示唆されるため、視覚系初期段階に仮定される時間微分器の特性の歪みから錯視運動が発生して高次段階で運動統合されるという計算モデルを立てた。実際の錯視観察時の脳活動を機能的MRI で測定すると、hMT+野で錯視観察時に賦活量の増大を認め、V1 野では差異はみられなかった。これらのアプローチの進捗を報告し可能な理論枠組みを議論する。

(12) 注意の時間的配分と知覚的構え

河原純一郎 (産業技術総合研究所)

会話や自動車の運転のように、それぞれが習熟した行動であっても、これらを同時に実行しようとするときうまくできなくなる。注意の瞬き (attentional blink) 現象は、そうした二重課題場面での認識不全の典型であり、われわれが注意を時間的に近接したイベントに配分する能力

には限界があることを示している。具体的には、視覚刺激を 1 秒に 10 個程度のペースで逐次呈示し、その中に含まれる 2 つの標的を探す場合は、第 1 標的を検出すると、その後 500ms 程度は第 2 標的の見落としが生じてしまう。本講演では、知覚的構えの切り替えと維持がこのよ

うな高速視覚逐次事態での知覚不全に及ぼす役割について議論したい。特に、知覚的負荷が誤った構えの切り替えを誘発することで注意の瞬き現象が生じると考えるモ

デルを紹介するとともに、知覚的構えの選択とその意識的モニタリングが乖離している可能性を示唆する研究結果について述べる。

(13) 下側頭葉視覚連合野 TE におけるカラム構造と視覚情報表現

谷藤 学, 佐藤多加之, 内田 豪, Michel Vidal-Naquet, 宮川尚久
(理研 BSI 脳統合機能研究チーム)

TE 野の細胞の物体像に対する選択性を定量的に調べた最近の研究では、隣接する細胞であっても物体像の選択性が大きく異なるという結果が示された。この結果は TE 野にカラム構造があるという考えと一見矛盾する。光学計測によって可視化されたスポットから単一神経細胞, MUA を多数記録し, カラム構造の存在を物体像の選択性という立場から詳細に検討し, 隣接する細胞は物体像に対して異なる応答を示すが, その選択性にはある共通性があることを示した。一方, TE 野の任意の小領域を選んで, 同様の記録を行った結果をみると, 光学的に

同定されたスポットで見られる細胞の反応の共通性とは共通性の程度において異なっていた。このことから, TE 野のカラム構造は均一ではないらしい。さて, 個々の細胞の物体像に対する反応性に違いがあるとすると, 物体像は必ずしもカラムの組み合わせで表現されている必要はなく, 個々の細胞の物体像に対する反応性を基にした細胞の組み合わせで物体像を表現することも可能になる。カラム構造の有無に関わらず, 二つの表現(カラムレベルの分散表現と単一神経細胞レベルの分散表現)のどちらが本質的であるかについても議論する。

(14) 質感知覚の心理物理学

本吉 勇 (NTT コミュニケーション科学基礎研究所)

人間は物体表面の色や明度のみならず, 光沢や透明度などを容易に見分けることができる。表面の画像が複雑な光学プロセスの産物であることを考えると, この質感知覚の能力は非常に高度な視覚情報処理に基づくようにみえる。しかし最近, 視覚系は低次のメカニズムで検出できる単純な画像特徴を手がかりにして質感を推定していることが明らかになりつつある。たとえば, われわれは知覚的な光沢度が画像のもつ局所的な輝度ヒストグラ

ムの歪度に依存することを評定実験や錯視(光沢残効)を用いて示した (Motoyoshi, Nishida, Sharan & Adelson, 2007, Nature)。本講演では, この光沢実験の結果や未解決の問題, 単純な画像特徴を操作するだけで見かけの透明感や金属感を劇的に変化させるデモなどを通して, さまざまな質感の知覚を支えている視覚プロセスについて考察する。

10. 理論と実験の融合による神経回路機能の統合的理解 (2)

2008年12月4日－12月5日

代表・世話人：深井朋樹（理化学研究所 脳科学総合研究センター）

所内対応者：井本敬二（神経シグナル）

(1) 聴覚時間情報処理神経細胞におけるNaチャンネル局在の機能的意義

久場博司（京都大学 大学院 医学研究科）

(2) 樹状突起分枝の特性が神経回路の機能において果たし得る役割に関して

森田賢治（理化学研究所 脳科学総合研究センター）

(3) 大脳棘シナプスの統計動力学と神経回路機能

河西春郎（東京大学 大学院 医学系研究科）

(4) 樹状突起形態形成と遺伝子ネットワークへの数理的アプローチ

望月敦史（理化学研究所 基幹研究所）

(5) 大脳皮質における特異的な興奮性結合回路

大塚 岳（生理学研究所）

(6) 心的過程の神経機構：スパイク統計性に対する理論からの予言と検証

岡本 洋（富士ゼロックス）

【参加者名】

深井朋樹, 森田賢治, 竹川高志, 坪 泰宏, 寺前順之介, 篠崎隆志（理化学研究所 BSI）, 望月敦史（理化学研究所 基幹研）, 太田桂輔, 角田敬正, 毛内 拓, 小松靖直, 青西 亨（東京工業大）, 大森敏明, 深山 理, 伊藤孝佑, 安松信明, 小濱卓也, 河西春郎（東京大）, 岡本 洋（富士ゼロックス）, 野村真樹（科学技術振興機構）, 伊藤嘉房（愛知医科大）, 神山斉己, 桜木雄一郎, 斉藤広樹（愛

知県立大）, 駒澤 敏（岐阜大）, 青柳富誌生, 久場博司（京都大）, 北野勝則（立命館大）, 中野高志（奈良先端科学技術大学院大）, 米原圭祐（基生研）, 窪田芳之, 大塚 岳, 渡辺秀典, 中川 直, 加勢大輔, 金田勝幸, 佐竹伸一郎, 稲田浩之, 川口泰雄, 森島美絵子, 桧山武史, 井本敬二（生理学研究所）

(1) 聴覚時間情報処理神経細胞におけるNaチャンネル局在の機能的意義

久場博司（京都大学・医学研究科・生命科学系キャリアパス形成ユニット）

動物は両耳に到達する音の僅かな時間差（両耳間時間差：ITD）を検出することにより音の方向を判別する。トリでは音の時間情報は聴神経から大細胞核（NM）を介して両側の層状核（NL）へと送られ、ここで左右の耳からの情報が比較されITDが検出される。正確なITDの検出にはNM細胞が正確な中継細胞として働くことと、NL細胞が両側シナプス入力 of 正確な同時検出器として働くことが重要である。これまで我々は、正確なITD検出を実現するために、NM細胞とNL細胞では膜やシナプスの特性が特徴周波数（CF）に応じて分化しているこ

とを明らかにしてきた。今回は特に、これらの細胞の軸索起始部におけるNaチャンネル分布のCFに応じた違いとその機能的意義について紹介する。

NMでは軸索起始部のNaチャンネル分布の長さや密度が低いCFの細胞ほど大きい。このことと相関してNMではシナプス入力の数やサイズもCFに応じて異なり、低いCFの細胞ほど多数の小さな入力を受ける。そこで、コンピューターシミュレーションにより活動電位発生のタイミングに対するNa電流量の影響を調べたところ、多数の小さな入力が増加する場合にはNa電流量が大き

いことが正確なタイミングでの発火に重要であることが分かった。これは入力が増加される場合には EPSP の立ち上がりが遅くなり Na チャネルの不活性化と K チャネルの活性化を生じるが、Na 電流量が大きいと活動電位発生の潜時が短くなり、この効果を減少させるためであると考えられた。

一方、NL では軸索の Na チャネルは高い CF の細胞ほど細胞体から離れた場所に分布する。このことは NL 細胞へのシナプス入力の頻度が CF に応じて異なることと関係していると考えられる。つまり、NL では高い CF の

細胞ほど高頻度のシナプス入力を受けるため、その空間的加重により細胞体で大きな持続的脱分極が生じる。従って、高い CF の NL 細胞において Na チャネルが細胞体から離れて分布することは、この脱分極により軸索の Na チャネルが不活性化することを防ぐことで正確な ITD の検出を可能にすると考えられた。

これらの結果から、軸索の Na チャネルはシナプス入力に応じて細胞毎に最適に配置されることにより、細胞機能を精巧に調節している可能性が示唆された。

(2) 樹状突起分枝の特性が神経回路の機能において果たし得る役割に関して

森田賢治（理化学研究所 脳科学総合研究センター）

神経細胞の入出力関係、すなわち入力強度と発火率の関係は、細胞や細胞集団の振る舞いに大きな影響を及ぼす。大脳皮質スライス中の錐体細胞に一定電流を加えた場合は、電流がある閾値に達するまで発火は起こらず、その後ほぼ線形に発火率が増加し、徐々に飽和していくのが普通である。しかし *in vivo* では、細胞は激しく時間変動する入力を受けていると思われ、その場合、入力の時間平均がさほど大きくなくても瞬時に入力が増える（興奮が増えるか抑制が減る）と発火が起こるため、入力の時間平均と発火率の関係は、一定電流の場合と比べて立ち上がりの部分が左側に尾を引いて下に凸なカーブを描くと考えられる (Shu et al. 2003 *J Neurosci* 23:10388)。この「下への凸性」が、皮質機能、具体的には、遅延活動を示す細胞集団における自発発火状態の安定性 (Amit & Brunel 1997 *Cereb Cortex* 7:237) や、選択的注意による神経活動の掛け算的増加 (multiplicative gain modulation, c.f., Ardid et al. 2007 *J Neurosci* 27:8486。大まかには、下への凸性が指数関数のそれと近ければ $\exp(I + a) = \exp(I) \times \exp(a)$ というように入力に modulatory input (式の a) が加算されると発火率は掛け算的に増える) 等に関わると考えられてきた。

上述のように入力の時間的揺らぎが盛んに研究されてきたのに対して、入力の空間的揺らぎ、すなわち枝分かれした樹状突起上の入力の空間分布が入出力関係に与える影響については余り顧みられてこなかった。これは、時間に関してはサブミリ秒精度の解析・記述が行われて

きたのに対して、空間に関しては概ね、実験では細胞一つにつき多くても数個の電極、理論では多くて数個のコンパートメントからなるモデルが用いられてきたことと無縁では無いように思われる。もっとも樹状突起が単に入力を線形に足し合わせるだけならば、どの場所に入力が入っても違いはなく、実際そうだとする主張もある (Yuste & Urban 2004 *J Physiol Paris* 98:479)。しかし、百本程度ある錐体細胞の細い樹状突起分枝の各々で、入力が時空間的にある程度以上集積すると dendritic spike と呼ばれる大きな脱分極が起こるため、分枝への入力強度と細胞体で生じる電位上昇の関係はシグモイド型の非線形性を示すという知見は少なくなく (Larkum & Nevian 2008 *Curr Opin Neurobiol* 18:1), *in vivo* で個々の細胞の発火率が非常に低いとしても尚、dendritic spike 発生に十分な入力の集積は起こるとの主張もある (Major et al. 2008 *J Neurophysiol* 99:2584 の Discussion の最後)。もしその主張が正しければ、入力の空間分布は、細胞の入出力関係に大きな意味を持ちうる。簡単のために樹状突起分枝の非線形性が dendritic spike 発生の閾値を持つ閾値線形関数で表されるとし、入力及び閾値が分枝ごとにばらつくとして、入力の空間（全分枝）平均が増えるにつれて、閾値以上の入力を受ける分枝の数（割合）が徐々に増え、その結果、入力の空間平均と細胞の発火率の関係は、加速度的上昇、すなわち下に凸なカーブを描く可能性が示唆される。これが事実とすれば、上述のような凸性の効果—自発発火の安定性や multiplicative gain

modulation—も期待され(参考文献[1-4]), 皮質機能を考える上で無視し難いと思われる。

樹状突起と皮質機能の関わりに関しては, 樹状突起上の入力分布が可塑性によっていかに形成・修飾されるかも大きな問題である。近くの細胞同士の間相互興奮が働くとなると, Hebb 的可塑性によって近い入力(似通った挙動を示す入力)は近い細胞にマップされると期待され, それが機能的皮質回路の形成に重要だと考えられてきたが, 最近, 単一の錐体細胞の樹状突起上でも, 可塑性に際して電氣的・生化学的な近接相互作用が働くことが明らかとなり, 近い入力は樹状突起上の近い場所にマップされる可能性が示唆されている(Larkum & Nevian 上記)。それを活かして単一の錐体細胞が皮質機能において大きな役割を果たしている可能性が考えられる(Archie & Mel 2000 *Nat Neurosci* 3:54, [5])。ほか, 単一細胞と細胞集団という異なるレベルでの自己組織化がいかに連携しうるかも興味深い([6])。また例えば γ 振動のような神経活動の時間構造を考える際にも, 長ければ数ミリ秒にも及ぶと思われる樹状突起や軸索上の伝播遅れなど, 空間的側面も同時に考慮することもあり意義と思われる

る([7])。

- [1] Morita, Okada, & Aihara. Selectivity and stability via dendritic nonlinearity. *Neural Comput* **19**:1798 (2007)
- [2] Morita. Possible role of dendritic compartmentalization in the spatial working memory circuit. *J Neurosci* **28**:7699 (2008)
- [3] Morita. Cellular basis of working memory at a high spatial resolution. *Front Comput Neurosci* (Bernstein Symposium Abstract) (2008)
- [4] Morita. Multiplicative gain modulation via multiple dendritic branches. (to be submitted)
- [5] Morita. Dendritic origin of the Weber's law in the number sense. *Soc Neurosci Abstr* 682.18 (2008)
- [6] Morita. Computational implications of cooperative plasticity induction at nearby dendritic sites. (submitted)
- [7] Morita, Kalra, Aihara, & Robinson. Recurrent synaptic input and the timing of gamma-frequency-modulated firing of pyramidal cells during neocortical "UP" states. *J Neurosci* **28**:1871 (2008)

(3) 大脳棘シナプスの統計動力学と神経回路機能 Statistical dynamics of dendritic spines

河西春郎, 安松信明 (東京大学大学院医学系 構造生理学)

Long-term potentiation (LTP) of synapse strength requires enlargement of dendritic spines on cerebral pyramidal neurons. Long-term depression (LTD) is linked to spine shrinkage. Indeed, spines are dynamic structures: they form, change their shapes and volumes or can disappear in the space of hours. Do all such changes result from synaptic activity, or do some changes result from intrinsic processes? How do enlargement and shrinkage of spines relate to elimination and generation of spines, and how do these processes contribute to the stationary distribution of spine volumes? To answer these questions, we recorded the volumes of many individual spines daily for several days using two-photon imaging of CA1 pyramidal neurons in cultured slices of rat hippocampus between postnatal day 17 to 23. With normal synaptic transmission, spines often changed volume or were created or

eliminated, thereby showing activity-dependent plasticity. However, we found that spines changed volume even after we blocked synaptic activity, reflecting a native instability of these small structures over the long term. Such "intrinsic fluctuations" showed unique dependence on spine volume. A mathematical model constructed from these data and the theory of random fluctuations explains population behaviors of spines, such as rates of elimination and generation, stationary distribution of volumes and the long-term persistence of large spines. Our study finds that generation and elimination of spines are more prevalent than previously believed, and spine volume shows significant correlation with its age and life expectancy. The population dynamics of spines also predict key psychological features of memory.

References

1. Yasumatsu, N., Matsuzaki, M., Miyazaki, T., Noguchi, J. & Kasai, H. (2008). Principles of long-term dynamics of dendritic spines. *J. Neurosci.* In press.
2. Tanaka, J., Horiike, Y., Matsuzaki, M., Miyazaki, T., Ellis-Davies, G.C.R. & Kasai, H. (2008). Protein synthesis and neurotrophin-dependent structural plasticity of single dendritic spines. *Science* 319, 1683-1687.
3. Honkura, N., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Ellis-Davies, G.C.R. & Kasai, H. (2008). The subspine organization of actin fibers regulates the structure and plasticity of dendritic spines. *Neuron* 57, 719-728.
4. Noguchi, J., Matsuzaki, M., Ellis-Davies, G.C.R. & Kasai, H. (2005). Spine-neck geometry determines NMDA receptor-dependent Ca^{2+} signaling in dendrites. *Neuron* 46, 609-622.
5. Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G.C.R. & Kasai, H. (2004). Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* 429, 761-766.
6. Kasai, H., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Yasumatsu, N., Nakahara, H. (2003). Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *Trends Neurosci.* 4, 1086-1092.
7. Matsuzaki, M., Ellis-Davies, G.C.R., Nemoto, T., Miyashita, Y., Iino, M. & Kasai, H. (2001). Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptors expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nature Neuroscience* 4, 1086-1092.

(4) 樹状突起形態形成と遺伝子ネットワークへの数理的アプローチ

望月敦史

(理化学研究所・理論生物研究室／基礎生物学研究所・理論生物学研究部門／さがけ・JST)

ある種の神経細胞は、樹状突起を曲面上で、むら無く一様に分布させることから、*space filling type* と呼ばれる。この神経細胞は、樹状突起の一様分布形成に加えて、曲面を分布域で分割するタイリングや、一様分布の再生など、様々な空間秩序の性質を備えている。これらは突起間の抑制的相互作用に基づくと考えられ、(1) 直接の接触による成長の抑制と、(2) 拡散性の物質による抑制、という二つの仮説が提唱されてきた。第二の仮説に対しては、抑制物質を分泌する突起が自らの成長を妨げてしまい、突起が伸長できないのではないか、という批判がなされていた。我々は、あえて抑制因子仮説に基づいた数理モデルを構築し、樹状突起パターンが形成できることを示した。このモデルに基づき、樹状突起がもつ空間制御の性質、一様分布、空間分割、再生を、同一の仕組みから理解できる。本研究は、京都大学の上村匡教授、杉村薫研究員との共同研究である。Sugimura K. et al. (2007) Self-organizing mechanism for development of space-filling neuronal dendrites. *PLoS Comput Biol.* **3**(11), 2143-2154.

また、遺伝子ネットワークの構造と発現ダイナミクス

の関係を明らかにする研究も紹介する。生物の複雑な振る舞いの起源は、遺伝子が互いに相互作用しあい、形作る制御ネットワークであると考えられている。例えば発生における細胞分化は、制御ネットワークに基づいたダイナミクスが、細胞ごとに異なる遺伝子発現状態を作り出す過程だ、と理解できる。今回、ネットワークの構造と、発現ダイナミクスの定常状態との関係を示す理論を考案した。基本アイデアは、しごく簡単である。すなわち、各遺伝子の活性状態は、制御する遺伝子の活性状態だけに依存する。この事実だけから、発現ダイナミクスの振る舞いを絞り込み、遺伝子発現の定常状態数の上限を決定できる。また、遺伝子発現の多様性に貢献する重要な遺伝子を、ネットワークから抽出できる。現実のウニの初期発生にかかわる遺伝子ネットワークを解析し、多数の遺伝子の中から、遺伝子発現多様性に重要な少数の遺伝子を抽出できた。この理論は神経細胞ネットワークを理解する上でも有効かもしれない。Mochizuki A. (2008) Structure of regulatory networks and diversity of gene expression patterns. *J. theor. Biol.* **250**, 307-321.

(5) 大脳皮質における特異的な興奮性結合回路

大塚 岳, 川口泰雄 (生理学研究所 大脳神経回路論部門)

脳は神経細胞を素子とし、シナプスを介した神経回路によって機能を発揮する。従って、脳の情報処理を明らかにするには回路を構成する個々の細胞の機能を同定すると共に、機能的な結合を明らかにする必要がある。高次機能を担っている大脳皮質は、多様なニューロンタイプから構成されており、複雑な回路を形成している。興奮性の錐体細胞においても電気生理学的・形態学的に様々なサブタイプに分類できることが知られている。我々は、大脳皮質の情報処理を理解するために、錐体細胞サブタイプや介在細胞タイプに依存したサブネットワークについて解析している。

今回、5層錐体細胞の発火特性をニューロンタイプの指標とし、2/3層錐体細胞から5層錐体細胞への興奮結合における錐体細胞サブタイプ依存性について、ラットの前頭皮質でスライスパッチ法を用いて検討した。5層錐体細胞は電流注入に対する発火応答の違いから3種類に分類したが、逆行性蛍光トレーサーで投射先を同定し記録した結果、対側線条体と同側橋核に投射する5層錐体細胞では、投射先と発火パターンに相関が見られた。2/3層細胞から5層細胞へのシナプス結合を容易に見つけるために、2/3層錐体細胞にグルタミン酸を短時間投与し発火させ、その際に5層錐体細胞で起きるシナプス電流を検出する方法を用いた。この方法では、単一または、同時記録する複数の細胞へのシナプス前細胞を、多数の細胞の中から検索することができる利点がある。2/3層から5層への興奮結合経路が5層錐体細胞の多様性に依

存して選択的に分化しているのかを知るために、このグルタミン酸刺激法を使って、二つの5層錐体細胞が同一2/3層細胞から共通入力を受ける確率が、サブタイプの組み合わせやサブタイプ間のシナプス結合に影響されるのかを検討した。その結果、5層細胞が同一2/3層細胞から共通入力を受ける確率は、同じサブタイプペアの方が異なるサブタイプペアより高かった。さらに、同じ5層サブタイプペアでは、サブタイプ間でシナプス結合があるものが無いものより共通入力を受ける確率が高くなり、一方、異なるサブタイプペアが共通入力を受ける確率は5層間結合の有無に影響されなかった。また、5層の抑制性介在細胞と錐体細胞の細胞ペアについても2/3層錐体細胞から共通入力を受ける確率について同様な解析を行った。その結果、抑制性介在細胞タイプと5層の細胞ペア間の結合に依存して2/3層錐体細胞から共通入力を受ける確率が高いことがわかった。

以上から、2/3層から5層への興奮性結合は5層錐体細胞サブタイプやサブタイプ間の結合に依存してサブネットワークを形成していることがわかった。5層錐体細胞は皮質下構造に情報を出力するが投射先と発火パターンに相関が見られることから、皮質下構造に対応した選択的経路を作っていると示唆される。また、5層の介在細胞は、細胞タイプに依存して異なった様式で錐体細胞とサブネットワークを形成し、皮質回路を制御していると考えられる。

(6) 心的過程の神経機構：スパイク統計性に対する理論からの予言と検証

岡本 洋^{1,2}, 深井朋樹²

(¹富士ゼロックス(株)研究技術開発本部, ²理化学研究所 脳科学総合研究センター)

我々は時間的に変化する外界事象を目撃あるいは経験した後、外部からの誘導なしに同様な風景を心の中で再生することができる。また、我々の思考とは、心の中に自発的に生じた観念の時間的連鎖・変遷ととらえることができる。このような心の動きの仕組み、すなわち、

「心的過程」の神経機構を完全に解明することは、脳科学の究極の目標である。本講演では、心的過程の神経機構を「確率過程連続アトラクター力学」の枠組で記述することを提案する。

最初に、この枠組を導いた背景である「漸次的活性」

の現象に関する実験的・計算論的知見についてレビューする。次に、最もシンプルな心的過程として、情報の時間積分を取り上げる。シンプルではあるが、意思決定、識別、タイミングなど、広範にわたる認知・行動機能に深く関与する過程である。神経生理学的には、漸次的増加を示す神経活動がしばしば観測されている。このような神経活動は時間積分の過程を反映すると考えられる。時間積分の神経機構に関する筆者のモデルを紹介する。

【モデルの構成】興奮性ニューロンの相互結合を考える；個々のニューロンの入出力特性にヒステリシスを仮定する（すなわち、各ニューロンは ON/OFF 二つの安定状態を持つ）；個々のニューロンへの興奮性・抑制性のランダム入力を仮定する。ニューロンのヒステリシス特性により、ON ニューロンの個数が $n = 1, 2, 3, \dots$ である状態全てが安定不動点（アトラクター）となる、すなわち、モデルは連続アトラクターを持つ。ニューロンの集団活性を表す状態点は、連続アトラクターが構成する多様体上をノイズに駆動されてゆっくりと移動する。このよう

にして、モデルは数百ミリ秒～秒の時間スケールで増加する神経活性を再現する。この機構（ニューロンのヒステリシス特性に基づく確率過程連続アトラクター力学）は、漸次的に増加する神経活性のスパイク列から導かれる周波数分布が二峰性を示すことを予言する。Go/no-go 課題実行中のサルの帯状皮質から記録された漸次的増加活性のスパイク列を解析し、この予言と整合する周波数分布二峰性を確認した。この神経機構モデルをさらに詳しく調べた結果、心理学抽象モデルにおいて反応時間の統計性を定量的に説明するために仮定される perfect integration (non-leaky integration) の性質が備わっていることがわかった。

このように、時間積分という最もシンプルな例におけるモデル化、解析および実験との比較を通じて、心的過程の神経機構が確率過程連続アトラクター力学で記述できることが示唆された。より複雑な心的過程の神経機構のモデル化にこの枠組を適用する試みについても触れる。

11. 大脳皮質—大脳基底核連関と前頭葉機能 (第二回)

2008年12月15日—12月16日

提案代表者：宮地重弘 (京都大学霊長類研究所)

所内対応者：南部 篤 (生体システム研究部門)

(1) 行動計画の策定過程における前頭前野神経細胞活動

坂本一寛 (東北大・電気通信研)

(2) Local Field Potential を用いた自由行動下でのサルの行動の予測

竹中一仁 (東大・情報理工)

(3) 視床大脳経路による眼球運動の制御

田中真樹 (北大・医)

(4) 運動課題遂行中のサル線条体における神経活動とその GABA 作動性調節

畑中伸彦 (生理研・生体システム)

(5) 線条体のネットワークをパッチ・マトリックスの視点から

藤山文乃 (京大・医)

(6) サル扁桃核における種特異的情動情報の表現

倉岡康治 (国立精神・神経センター・神経研究所)

(7) セルフコントロールに関わる神経基盤の解明に向けて

—サル扁桃核における相対的価値の処理機構の解明

平井大地 (京大・霊長研)

(8) 皮質下領域ニューロンによる社会的認知

堀 悦郎 (富山大・医)

(9) 報酬獲得行動における内側前頭前野と側坐核の機能連関

石川晃教 (山口大・医)

【参加者名】

丹治 順, 鮫島和行, 星 英司 (玉川大学脳科学研究所), 高田昌彦, 桑島真里子 (東京都神経科学総合研究所), 宮地重弘, 額田大輔, 平井大地, 鴻池菜保 (京都大学霊長類研究所), 藤山文乃, 中村公一 (京都大学), 坂本一寛 (東北大学電気通信研究所), 田中真樹, 國松 淳 (北海道大学), 堀 悦郎 (富山大学), 中村加枝, 松崎竜一 (関西医科大学), 石川晃教 (山口大学), 竹中一仁 (東京大学), 倉岡康治 (国立精神・神経センター・神経研究所),

小高 泰 (産業技術総合研究所), 藤井直敬, 一戸紀孝 (理化学研究所 脳科学総合研究センター), 西垣 誠 (名古屋市立大学病院), 廣川純也, 渡我部昭哉, 中村 徹 (基生研), 南部 篤, 伊佐 正, 窪田芳之, 畑中伸彦, 知見聡美, 佐野裕美, 高良沙幸, 岩室宏一, 高原大輔, 太田力, 関 和彦, 吉田正俊, 池田琢朗, 渡辺秀典, 鯉田孝和, 武井智彦, 加藤利佳子, 出馬圭世, 高浦加奈, 佐々木章宏 (生理研)

【概要】

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

な研究から、徐々にではあるが着実に明らかになりつつある。

1) 主に霊長類を用いた研究から、大脳基底核は、適切な運動あるいは動作様式を選択、実行するのに関わっている。

2) また、工学的な手法によって解析したところ、大脳基

基底核の神経活動や神経回路は適切な行動の自立的な選択・学習に適している。

- 3) 霊長類の基底核回路を解剖学的に解析することにより、大脳基底核が運動機能ばかりでなく、認知機能や情動にも関わる事が明らかとなってきた。
- 4) 遺伝子改変動物（げっ歯類）を用いることにより、大脳基底核に発現している受容体や神経伝達物質と機能との関係が、個体レベルで調べられるようになった。
- 5) ヒトの大脳基底核疾患や、様々な大脳基底核疾患モデル動物の解析により、このような疾患の病態およびその基礎となる基底核の生理が明らかになりつつある。
- 6) 脳深部刺激療法 (DBS) や遺伝子治療など、大脳基底核疾患の新たな治療法も開発されてきた。

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

(1) 行動計画の策定過程における前頭前野神経細胞活動

坂本一寛（東北大学 電気通信研究所）

行動計画の重要な側面として、最終目標を達成するための具体的な行動を策定する過程が挙げられる。思考や問題解決に重要であると考えられてきた前頭前野は、行動計画の策定過程にも関与していると考えられる。そこで、われわれは、経路探索課題と呼ばれる一種の迷路課題をサルに学習させ、前頭前野から神経活動を記録した。その結果、ある細胞グループでは、行動計画期間の初期では、指示された最終ゴールの位置によって神経活動が選択的に変化した。後期では、1 手目どの方向にカー

ソルを動かすかに選択的な変化を示した。つまり、神経活動の選択性が、“最終ゴール” から“具体的な解決法”へと遷移した。さらに、そのような細胞を含み、かつ、よく同期発火する細胞ペアを集め解析したところ、神経活動の選択性が“最終ゴール”から“具体的な解決法”へと遷移する期間に同期発火が上昇することが確かめられた。ここで見られた現象は、行動計画の策定に前頭前野神経細胞が関与していること、また、その策定過程に同期発火現象が関係することを示唆している。

(2) Local Field Potential を用いた自由行動下でのサルの行動の予測

竹中一仁（東京大学 情報理工学系研究科 知能機械情報学専攻 博士課程）

実験室の限られた環境のみならず、日常の予測困難な環境において、脳内の各領域の神経活動がどのように関連し、どのような構造をもつのか。さらにその中でどのような順序で情報伝達が行われ、行動が選択されているかを解き明かすことは、脳機能の本質的理解に重要である。また、脳内の情報の流れを理解することは、行動のより早い段階で行動の意図情報を取得することにつながり、ブレンマシニンインターフェースなどの開発におい

て非常に有用である。

そのような複数の領域間での神経活動の性質の違い、情報の流れを解析するため、本研究では、課題遂行中のニホンザルの大脳皮質および皮質下から複数の慢性電極によって Local Field Potential (LFP) を計測した。課題は、二者択一のエサ獲得タスクと移動を伴うエサ獲得タスクの2種類である。これらの課題は特別な訓練期間を経ずともサルが即時的に行うことができた。記録された LFP

データはウェーブレット変換により、各周波数帯域のパワーに変換し、上記課題遂行中に左のエサを取った場合と右のエサを取った場合で比較し、領野間の周波数帯域毎の情報表現の違いを解析した。その結果、扁桃核、尾状核といった部位で、他領域よりも早い時期から左右差が生じていることがわかった。

さらに電極間の因果関係を、Granger Causality と呼ばれる統計的な指標を用いて定量的に評価した。因果関係解析では、“ある電極の情報を用いることで、他の電極の自己回帰による予測性能が向上するか”という指標を用いることで、原因と結果という方向性のある関係を評価

し、それが時間とともにどのように変化するかを解析した。その結果、行わせた 2 つのタスクのそれぞれの課題イベントの周辺で、扁桃核から尾状核へ向けての因果の強度が特徴的なパターンで変化することが観察された。

この結果は、領域間の因果関係を見るという新しい解析手法により、今まで連携させる事が難しかった各個別領域の脳機能に、情報の出入力という動的な情報を付け加えることで、それらを一つのネットワークシステムとして理解出来る可能性を示唆している。今後のさらなる解析手法の検討により、関係性を元に脳認知機能を理解する可能性を探りたい。

(3) 視床大脳経路による眼球運動の制御

田中真樹, 國松 淳, 吉田篤司 (北海道大学医学研究科・認知行動学分野, PRESTO・JST)

大脳・基底核ループには機能ごとのサブグループがあり、眼球運動に関係した経路の存在は 20 年以上も前から指摘されているが、その具体的な機能は明らかではない。眼球運動系に関しては、黒質から上丘への投射経路が重要であると考えられ、この系の中で大脳基底核はフィードフォワード経路を構成するとされている。最近の研究により、随意性眼球運動の発現に視床が関与することが示され、状況によっては基底核から視床を介した上行性の経路が重要な役割をはたすものと考えられる。本講演では、それらの研究の一部を紹介する。

①代表的な基底核疾患であるパーキンソン病では、自発的に運動を開始することが困難になることが知られており、こうした機能には基底核-視床大脳経路が関与すると考えられる。視覚刺激提示後、一定のタイミングで眼球運動を行なうようにサルを訓練し、視床 VA/VL 核の神経活動を調べたところ、視覚刺激提示から徐々に活動を上昇させるニューロン群がみつかった。神経活動の上昇率は運動の潜時と逆相関し、運動直前の発火率は、運動のタイミングにかかわらず、ほぼ一定であった。記録部位を不活化したところ、反対側にむかう自発性サッカ

ードの開始が遅れ、視床の信号が眼球運動のタイミング調節に重要であることが示された。また、同様の課題中に、これらの信号の投射先のひとつと考えられる補足視野に電気刺激を与えると、自発性課題の際に自発運動の開始時間に変化が生じた。これらのことから、基底核—視床—前頭葉内側部は自発性の眼球運動のタイミング調節に関与していると考えられる。

②日常生活の中では一定の刺激に対する反応を状況に応じて変化させる必要があるが、その神経機構を調べるための眼球運動課題として Antisaccade 課題がよく知られている。固視点の色によって視標に対する運動方向 (Antisaccade と Prosaccade) を切り替えるようにサルを訓練した。課題の種類によって活動を変化させるニューロンが淡蒼球と視床から多数記録され、両者いずれの不活化によっても課題の成功率が低下した。上丘では Antisaccade の際に神経活動が減弱することが知られているが、これらの部位では神経活動の増大がみられ、基底核の眼球運動信号の一部は視床を介して大脳皮質に送られていると考えられる。

(4) 運動課題遂行中のサル線条体における神経活動とその GABA 作動性調節

畑中伸彦¹, 高良沙幸¹, 高田昌彦², 南部 篤¹

(¹生理学研究所 生体システム研究部門 ²東京都神経研 統合生理研究部門)

線条体は脳基底核内部回路の起始部であり、線条体投射ニューロンの活動様式が脳基底核全体の活動に大きく影響していると考えられている。大脳皮質運動野－線条体投射の体部位再現は背腹側方向に完全に別れているが、内外側方向に分布する補足運動野領域、一次運動野領域は一部が重なり情報統合の可能性があると知られている。しかし、情報の統合がどのような様式なのか明らかにされていない。また、線条体の大部分を占める投射ニューロンの活動は、少数ではあるが様々な種類の介在ニューロンから修飾を受けると考えられている。なかでもパルブアルブミン陽性 GABA 作動性介在ニューロンは、齧歯類の *in vitro* 実験で投射ニューロンの興奮性に強く影響することが示唆されている。しかし、運動課題遂行中に、投射ニューロンの活動にどのように GABA 性抑制入力に関与しているのかの報告はない。これらの問題を解明するために以下のような実験を行った。ニホンザルに 3 方向への遅延期間付きの上肢到達運動課題を習得させ、一次運動野上肢近位領域 (Mlp), 同上肢遠位領域 (Mid), 補足運動野上肢領域 (SMA) を電気生理学的に同定し慢性刺激電極を埋入した。線条体から単一ユニット記録を行い、皮質刺激への応答から入力様式を決定した後に運動課題遂行中の活動を記録した。一部の実験では、薬物注入用チューブを貼り付けた電極をもちいて、記録中のニューロンの周囲に GABA 受容体や

グルタミン酸受容体の遮断薬を微量注入し、注入前後の活動の違いを観察した。記録した線条体ニューロンは皮質刺激に対する応答と発火パターンから、線条体投射ニューロンと思われる Phasically Active Neuron (PAN), コリン作動性介在ニューロンと思われる Tonically Active Neuron (TAN), パルブアルブミン陽性 GABA 作動性介在ニューロンと思われる Fast Active Neuron (FAN) に分類し解析した。その結果、PAN の活動様式は入力源である MI や SMA に類似しており、両者から入力を受ける PAN は両者の中間的な性質を示した。TAN は運動皮質から入力があっても、運動開始点などの課題イベント直後に活動の停止が観察された。FAN は運動期間中に方向に依存せずに高い発火頻度を示した。また、GABA 受容体遮断薬によって PAN の皮質刺激に対する応答潜時は変化しなかったが、応答の強度は増強した。また、コントロールでは応答しなかった皮質刺激にたいする応答も出現した。一方、運動課題遂行中の活動様式においては、GABA 受容体遮断薬局所投与によって単純に活動性が上がるだけでなく、応答のなかったイベントに対しても活動増加が観察された。これらのことから、PAN は複数の領域から入力を受けているが、GABA 性の抑制性入力によって不必要な活動が抑えられるなど、微細に調節されている事が示唆された。

(5) 線条体のネットワークをパッチ・マトリックスの視点から

藤山文乃 (京都大学大学院医学研究科 高次脳形態学教室)

大脳基底核の玄関口である線条体にはパッチ・マトリックスという生化学的なコンパートメント構造が存在するが、この二つのコンパートメントにどのようなネットワークの違いが存在しているのかは明確にされていない。また、パーキンソン病やハンチントン病など基底核変性疾患の理解の礎として直接路・間接路という概念が使われているが、この概念と、パッチ・マトリックス構造と

の関係も解明されていない。我々はこれらを明らかにするために以下のことを解析している。

A. 線条体パッチ・マトリックスへの入力

A-1. 視床線条体グルタミン酸入力

視床線条体投射はパッチとマトリックスとで量・質ともどのような違いがあるか。各々の領域に特異的に投射する視床亜核は存在するのか。あるとすればそのニュー

一ロンの樹状突起や軸索の形態学的特徴はどのようなものか。

A-2. 黒質線条体ドーパミン入力

一つの黒質緻密部のドーパミンニューロンは線条体にどのように投射するのか。パッチ・マトリックス領域に対する投射様式の違いは存在するか。

B. 線条体パッチ・マトリックスからの出力

B-1. シングルニューロントレースによる出力形態の解析

“パッチ領域は黒質緻密部に投射する”という教科書的な記述を検証する。パッチ領域には間接路ニューロンはいないのか、パッチの直接路ニューロンはどのような投射様式を持つのかをマトリックスのそれと比較する。

B-2. パッチ・マトリックスにおけるエンケファリンの発現の違い

間接路ニューロンに特異的に発現するエンケファリンの BAC トランスジェニックマウスを用いて見えて来たパッチ・マトリックス領域とエンケファリンの関係を提示する。

C. 線条体の局所回路

パルブアルブミンの樹状突起を特異的に可視化するトランスジェニックマウスを用いて、パルブアルブミン内在性ニューロンの局在がパッチとマトリックス領域のクロストークの役割を果たせそうかを調べる。また、パルブアルブミン内在性ニューロンに対する、大脳皮質および視床からのグルタミン酸入力様式、さらにアセチルコリン内在性ニューロンからの入力様式についても調べる。

以上 preliminary なデータを含む所見を提示し、ご意見を伺う。

(6) サル扁桃核における種特異的情動情報の表現

倉岡康治 (国立精神・神経センター・神経研究所 日本学術振興会)

ヒトを含めた霊長類は、種特異的な情動の伝達において、おもに表情や音声を用いている。伝達された情動を認識する際には、異なる感覚種 (視覚や聴覚) の情報からも同じ意味の情動を受け取ることができる。本演題では、このような情動情報の認識に注目し、情動情報に対するサル扁桃核ニューロンの応答について考察する。

他個体の情動表出に対して適切に反応するためには、「どのような種類の」という情報だけでは不十分で「誰の」という情報も不可欠である。そこで、3 個体を撮影した 3 種類の表情刺激 (合計 9 種類) を用いてこの問題に取り組んだ。サルが注視課題を行っている間に 1 秒のビデオ刺激が提示される。このときの扁桃核ニューロンの応答性を調べた。記録した 227 個のニューロンのうちおよそ 50% (116 個) がサルのビデオ刺激に対して応答した。詳細に調べることができた 77 個のニューロンのうちおよそ 4 分の 3 のニューロン応答は「どのような種類の」という情報の影響を受けた。また 3 分の 2 のニューロン応答は「誰の」という情報の影響を受けた。一方で全体のおよそ 2 分の 1 のニューロン応答は、「どのような種類の」と「誰の」という両方の情報の影響を受けた。この結果から、サル扁桃核は単に「どのような種類の情

動であるか」という処理を行っているだけではなく「誰の表出したものであるか」という処理も同時に行っていることが明らかになった。

つぎに、表情や音声といった感覚種を越えた情動情報の認識におけるサル扁桃核ニューロンの応答について検討した。表情や音声の刺激を 3 つの条件を設定して提示した。すなわち、表情動画と音声と同時に提示される視聴覚条件、表情動画のみが提示される視覚条件、音声のみが提示される聴覚条件である。視覚刺激を提示中のサル扁桃核ニューロンの応答に対して、聴覚情報がどのような影響を与えるかを検討するために、視聴覚刺激に対する応答が視覚刺激に対する応答とどの程度異なるかを比較した。その結果、視覚刺激に応答するサル扁桃核ニューロンのうち約半分 (39/77, 51%) は、視覚刺激と同時に聴覚刺激を提示することで、応答が有意に増強することが明らかになった。視聴覚刺激によって応答が増強する扁桃核ニューロンの活動は、多感覚種を用いて情動情報の検出をより確実なものにすることを反映しているのだろう。また、視覚情報および聴覚情報の処理に関わっていたニューロンの大部分は (88%, 14/16), 感覚種を超えて、同じ意味を伝達する種特異的な情動刺激に対して

強い応答を示した。このような扁桃核ニューロンの活動は、視覚や聴覚といった感覚種を越えた情動情報の認識に役立つものと考えられる。視覚情報および聴覚情報の処理に関わっていたニューロン群は (20%, 16/79), おもに中心核に分布していた。中心核は視床や視床下部、脳幹といった、情動反応を引き起こす他の脳領域へ神経投射していることが知られた核である。よって中心核で記録された感覚種を超えて情動刺激に応答するニューロン

の活動は、感覚種を越えた情動情報に対する適切な反応を行うために役立っていると考えられる。

このようにサル扁桃核は、単にどんな情動かだけでなく誰の情動か、あるいは視覚だけでなく聴覚を通して、というように様々な情報を合わせて、コミュニケーションにおける種特異的情動情報に対して動物が適切に対応するために、情報の意味の処理に関わっていると考えられる。

(7) セルフコントロールに関わる神経基盤の解明に向けて ーサル扁桃体における相対的価値の処理機構の解明

平井大地 (京都大学 霊長類研究所)

セルフコントロールとは、狭義では、待つという行為とそれにより得られる利得との関係を評価したうえで、自己の行動を制御することである。近年、依存症, ADHD, 人格障害がこの機構の障害に起因することが明らかとなったが、その詳細な神経機構は解明されていない。そこで、サルの細胞外活動記録の手法により、セルフコントロールに関わる大脳辺縁系ネットワーク (扁桃体, 前頭眼窩回, 側座核) の神経基盤を解明する。本研究は大きく2部に分かれる。まず初めに、報酬および嫌悪刺激を用いた学習課題遂行中のサル扁桃体から神経活動記録を行い、先行研究の前頭眼窩回 of データ (Hosokawa, 2007) と比較することで、状況に応じた価値評価における両者の役割と相違点を検討した。その結果、扁桃体は強化子の相対的な好ましさを表現することが明らかとなった。しかし、扁桃体では、前頭眼窩回で見られたような、ジュースあるいは水が予告される条件では水に、水あるいは電気刺激 (回避) が予告される条件では電気刺激に選択性を示し、報酬と嫌悪という特徴を超えた強化子一般 (より好ましくない強化子) を表現するような、より高次の価値評価に寄与する細胞は殆どなかった。待つことが一種の嫌悪であることを考えると、セルフコントロールを要する選択場面においても、報酬と嫌悪に対する同様の作動原理が働くと予測され、扁桃体は報酬量の比較に、前頭眼窩回は報酬までの待ち時間の比較に重要な役割を果たしていると期待される。そして両者の比較の結果が

側座核で統合されることで、状況に応じた適切な行動選択が可能となる。そこで次に、セルフコントロール事態における神経機構を明らかにするため、2頭のサルに眼球運動による選択課題を訓練した。サルが中央の注視点に視線を向け1秒経過すると注視点の両側に2つの色刺激を提示する。色刺激の色は報酬量 (報酬の回数: 0回, 1回, 2回) を予告し、サイズは報酬までの待ち時間 (0.3, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7秒) を予告する。大きい報酬あるいは小さい報酬を選択する条件 (報酬大小条件) と、報酬有りあるいは報酬無しを選択する条件 (報酬有無条件) を用意した。報酬大小条件では、課題に正答すると報酬が1回、もしくは連続2回獲得できる。一方、報酬有無条件では、正答により報酬が1回、もしくは報酬が与えられずに次の試行が開始する。各条件について報酬量と待ち時間の組み合わせの違いによる選択率を測定した。行動実験では、報酬量と待ち時間の相対価値に基づいて、サルが大きい報酬を待つ選択 (セルフコントロール選択) と待たずに小さい報酬を取る選択 (衝動的選択) を、柔軟に切り替えることを明らかにした。細胞活動記録実験では、課題遂行中のサル扁桃体から細胞記録を行い、眼球運動に先立って選択結果を反映して応答する細胞の存在を明らかにし、衝動的選択やセルフコントロール選択との関連性を調べることで、扁桃体の機能的役割を検討した。

(8) 皮質下領域ニューロンによる社会的認知

堀 悦郎, 西条寿夫 (富山大学 大学院医学薬学研究部 システム情動科学)

ヒトを含めた霊長類は、高度に発達した社会構造の中で生活している。この中にあって、他者の心的状態、すなわち情動を認知し、状況に即した適切な反応をする事は重要である。他者の情動を理解するためには、言語のみならず非言語的なコミュニケーション技術が必要となる。非言語的コミュニケーションには、顔表情、視線方向、ジェスチャーなどが含まれるが、中でも顔に含まれる情報はコミュニケーションにおいて中心的役割を果たす。最近の神経心理学的研究により、顔情報から他者の情動を推測するためには、前頭葉や頭頂葉とともに扁桃体が関係していることが示唆されている。

扁桃体へは、大きく分けて2系統で視覚情報が入力される。第1の経路は、大脳皮質の視覚領野を介する経路である。一方、第2の経路として、大脳皮質を介さず、上丘から視床枕を介して扁桃体へ入力される経路も知られている。しかし、これまでの情動的視覚情報処理および社会的認知に関する神経生理学的研究は、主に大脳皮質各領域が対象とされており、扁桃体、視床枕および上丘と言った皮質下経路に関する神経生理学的研究は少ない。そこで、本研究では、表情あるいは視線方向識別課題遂行中のサル扁桃体、視床枕および上丘からニューロ

ン活動を記録した。

サルに、顔表情あるいは視線方向に関する遅延非見本合わせ課題を行わせた。視覚刺激には、様々な表情および視線方向のヒトやサルの顔写真などを用いた。顔刺激の対照として、円形、四角形、十字形、三角形などの単純な図形を用いた。本課題を遂行中のサル扁桃体、視床枕あるいは上丘より、単一ニューロン活動を記録し、解析した。

その結果、扁桃体には、顔表情や視線方向に識別的に応答するニューロンが存在した。それらのニューロンは、顔写真のモデルによって応答性が異なり、実際に社会的な接点のあるモデルの顔に対してより識別的な応答性を示した。一方、扁桃体へ情報を送る視床枕でも、顔表情に識別的なニューロン活動が記録された。しかし、顔写真のモデルに対する明らかな選択的応答性は見られなかった。さらに、視床枕へ情報を送る上丘においては、顔刺激と顔以外の視覚刺激の間に弁別的な応答性が見られた。

これらの結果から、社会的認知過程における皮質下領域(扁桃体、視床枕および上丘)の役割を考察してみたい。

(9) 報酬獲得行動における内側前頭前野と側坐核の機能連関

石川晃教 (山口大学大学院医学系研究科 高次神経科学領域システム神経科学分野)

動物がその個体の生命を維持するためには、外部環境刺激に基づいて、これから起こる出来事を予測して行動する能力が必要である。外部環境刺激が報酬を予測させるものであるとき、動物はその刺激をおぼえ、報酬獲得のための適切な行動をおこななければならない。そのような報酬獲得行動には、側坐核、内側前頭前野、扁桃体、腹側被蓋野などの脳領域からなる神経回路が関与すると考えられている。これまでの研究から、二つの異なる音を弁別して、一方の音のときにレバーを押すことで報酬が得られる二音弁別報酬獲得課題の遂行には、報酬を予測させる音に対する側坐核ニューロン活動の興奮性・抑

制性反応が重要であることがわかっている。そこで私たちは、側坐核に興奮性入力を送っている内側前頭前野に注目して、内側前頭前野がどのように二音弁別課題の遂行と、そのときの側坐核ニューロン活動の変化にかかわっているかを調べた。二音弁別課題遂行中に内側前頭前野の背側を不活性化しておくと、報酬を予測させる音に対するレバー押し反応が強く減少したのに対し、内側前頭前野の腹側の不活性化では、報酬と関係しない音に対するレバー押し反応が逆に増加した。このことは、内側前頭前野の背側が、報酬を予測させる音に対する報酬獲得行動の発現に強く関与するのにに対し、内側前頭前野の

腹側は、報酬に関連しない音に対するレバー押し反応の抑制にかかわっていると考えられる。また、背側内側前頭前野の不活性化は、報酬を予測させる音に対する報酬獲得行動と同時に、側坐核ニューロン活動の興奮性及び抑制性応答を弱めた。さらに、片側の背側内側前頭前野の不活性化は報酬を予測させる音に対する報酬獲得行動

と同時に、同側の側坐核ニューロン活動の興奮性応答および対側の側坐核ニューロン活動の抑制性応答を抑えた。これらの研究結果は、報酬を予測させる外部感覚刺激の情報が、背側内側前頭前野から側坐核に入力して、側坐核ニューロン活動を変化させることで、報酬性獲得行動の発現を引き起こすことを示唆する。

12. シナプス成熟と可塑性のダイナミクス

2008年12月4日－12月5日

代表・世話人：渡部文子（東大・医科研・神経ネットワーク）

所内対応者：重本隆一（生理研・脳形態解析研究部門）

(1) Protrudin ノックアウトマウスにおける神経疾患と膜輸送との関連

白根道子（九州大・生体防御医学研究所 分子発現制御学分野）

(2) 小胞型アスパラギン酸トランスポーターの発見

宮地孝明（岡山大・薬学部 総合薬学科 分子細胞薬品科学）

(3) シナプス形成におけるアフアディンの機能

富樫 英（神戸大・医学研究科 生化学・分子細胞生物学講座 分子細胞生物学分野）

(4) 上丘の動き感受性視覚ニューロンの樹状突起における Ih 電流の機能的役割

遠藤利朗（スウェーデン王立カロリンスカ研究所）

(5) 無脊椎動物中枢ニューロンの樹状突起におけるシナプス統合作用の計算機シミュレーション

高嶋 聡（東京大学・先端科学技術研究センター）

(6) 一次体性感覚野における受容野の成熟と樹状突起の興奮性

駒井章治（奈良先端大・バイオサイエンス研究科）

(7) ラット運動野の錐体細胞と介在細胞の機能的活動の解析

磯村宜和（理研）

(8) 報酬予測と行動モニタリングにおけるげっ歯類眼窩前頭皮質の役割

古屋敷智之（京都大・医学系研究科）

ポスター

1. GPCR シグナル・クロストークによる小脳 LTD の制御

上窪裕二^{1,2}, 下村岳司³, 藤田洋介³, 田端俊英³, 櫻井 隆², 狩野方伸¹

(¹東大・院・医・神経生理, ²順天堂大・院・医・薬理, ³富山大・院・工・神経系情報処理)

2. 小脳プルキンエ細胞における AMPA 受容体トラフィックの速度論的解析と LTP/LTD のメカニズム

山口和彦（理研・脳センター・記憶学習）

3. 嗅索形成における新規軸索ガイダンス分子 LOTUS の機能解析

池谷真澄, 山口めぐみ, 有江裕子, 五嶋良郎, 竹居光太郎

（横浜市立大学医学部分子薬理神経生物学教室）

4. Cbln1 欠損マウスにおける瞬目条件付け学習障害は成熟後の Cbln1 投与により急速に回復する

江見恭一¹, 幸田和久¹, 掛川 渉¹, 川原茂敬², 柚崎通介¹

(¹慶応義塾大 医学部 生理学, ²富山大学大学院理工学研究部)

5. 成体ラット脳内における新生ニューロンへの放射線感受性の検討

水上喜久（群馬大学大学院医学系研究科 生命医科学専攻 神経薬理学）

6. ラットにおける海馬学習のメカニズム：CA1-CA3 シナプスで必要な AMPA 受容体のシナプス移行

美津島大, 石原康至, 紙谷義孝, 高橋琢哉（横浜市立大学大学院医学研究科生理学）

7. 視覚剥奪ラットのバレル皮質におけるセロトニンによる AMPA 受容体のシナプスへの移行促進

実木 亨, 高橋琢哉（横浜市立大学大学院医学研究科生理学）

8. 社会的隔離による経験依存的 AMPA 受容体のシナプス移行阻害

宮崎智之, 多田敬典, 高瀬堅吉, 高橋琢哉（横浜市立大学大学院医学研究科生理学）

9. Differential regulation of cortical dendritic and axonal development via distinct activation
of CaMKK-CaMKI pathways

上田（石原）奈津実, 竹本-木村さやか, 安達-森島亜希, 野中美広, 奥野浩行, 尾藤晴彦
(東大・医・神経生)

10. 海馬 CA1 錐体細胞の樹状突起における膜特性分布の推定とその機能的意義の検討

大森敏明^{1,2}, 青西 亨^{2,3}, 宮川博義⁴, 井上雅司⁴, 岡田真人^{1,2}
(¹ 東京大学大学院新領域創成科学研究科, ² 理化学研究所脳科学総合研究センター,
³ 東京工業大学大学院総合理工学研究科, ⁴ 東京薬科大学生命科学部)

11. Immunohistochemical localization of α 1G subunit of T-type calcium channel in the dorsal lateral geniculate nucleus
of mouse brain

Laxmi Kumar Parajuli (National Institute for Physiological sciences)

【参加者名】

上田（石原）奈津実（東大院・医），池谷真澄（横浜市大・医），磯村宣和（理研・BSI），江見恭一（慶大・医），遠藤利朗（スウェーデンカロリンスカ研究所），大塚稔久（富山大院・医薬），大森敏明（東大院・新領域），掛川 渉（慶大・医），狩野方伸（東大院・医），上窪裕二（順天堂大・医），川田慎也（東大院・医），喜多村和郎（東大院・医），駒井章治（奈良先端大・バイオサイエンス），崎村建司（新潟大・脳研），実木 亨（横浜市大・医），白根道子（九大・生体防御医学研），高嶋 聡（東大・先端研），高橋琢哉（横浜市大・医），竹居光太郎（横浜市大・医），竹本研（横浜市大・医），多田敬典（横浜市大・医），坪川宏（東北福祉大・健康科学），富樫 英（神戸大・医），野村寿博（慶大・医），林 康紀（理・BSI），古屋敷智之

（京大・医），堀之内和広（奈良先端大・バイオサイエンス），真鍋俊也（東大・医科研・神経ネットワーク），三國貴康（東大院・医），水上喜久（群馬大・医），美津島大（横浜市大・医），宮崎智之（横浜市大・医），宮地孝明（岡山大院・医歯薬），山肩葉子（生理研・神経シグナル），山口和彦（理研・BSI），柚崎通介（慶大・医），渡部文子（東大・医科研），Laxmi Kumar Parajuli（総研大），重本隆一（生理研・脳形態），初山俊彦（慈恵医大・薬理），渡辺雅彦（北大・医），松波謙一（中部学院大），深澤有吾（生理研・脳形態），鍋倉淳一（生理研・生態恒常機能発達），佐竹伸一郎（生理研・生体情報），中川 直（生理研・神経シグナル），渡辺秀典（生理研・認知行動），窪田芳之（生理研・大脳神経回路），他

【概要】

本研究会では，広範な分野の研究者，とりわけ若手研究者を集め，「シナプス成熟と可塑性のダイナミクス」のテーマの下，活発な質疑応答，情報交換が行われた。特に，分子レベル（セッション1），局所回路レベル（セッション2），個体システムレベル（セッション3）という多層的な切り口により，シナプス機能の成熟および可塑性の分子機序や生理的意義に関して，徹底的な議論が行われた点が非常に意義深いものであった。その他，11 演題から成るポスターセッションを行い，参加者の投票によって選出された上田（石原）奈津実氏（東大院・医）と美津島大氏（横浜市大・医）の口頭発表がセッション4として行われた。

記憶・学習や情動などの脳の高次機能は，複雑な神経回路網のネットワークによって担われており，その基盤

を成す基本ユニットが“シナプス”である。シナプスは，外界環境や経験依存的にその構造や機能を変化させる可塑性を有する。生後発達期および成熟期におけるシナプス形成と可塑性の分子機序を明らかにすることは，現代の神経科学における最重要課題の一つである。更に，これらの研究は基礎科学的重要性のみならず，広く社会的関心事でもある教育や学習効果の問題に対する科学的知見の提唱や，神経変性疾患などの神経系の病態発症機構の理解にも大きく貢献しうる。このような課題の研究遂行には，解剖学・生化学・生理学・遺伝学・システム脳科学など，異なる領域の有機的な融合が不可欠であり，最新情報と最高水準の研究手法を有する研究者らが密な共同研究を行うことが求められる。

本研究会を介して，このような共同研究体制の礎を築

くと共に、今後の神経科学研究の到達点と問題点を明らかにし、検証可能な魅力的かつ新規の課題を発掘する糸

口に一歩近づけた点が大きな収穫であった。

(1) Protrudin ノックアウトマウスにおける神経疾患と膜輸送との関連

白根道子 (九州大学・生体防御医学研究所)

神経細胞における小胞輸送は、軸索や樹状突起への特異的物質輸送や神経伝達物質放出など、多くの場面で重要な機能を担っている。

Protrudin はわれわれが近年発見した膜タンパク質で、限定方向への小胞輸送の制御により神経突起形成を誘導する分子である。この突起形成機能は Protrudin の N 末端側にある Rab11 結合ドメインによって制御されるが、一方でその C 末端側の脂質結合ドメインである FYVE ドメインの機能は今まで不明であった。

典型的な FYVE ドメインは PI(3)P に結合し小胞の膜融合促進に働くドメインとして知られているが、Protrudin の FYVE ドメインは PI(3)P との結合に重要なアミノ酸が保存されておらず、結合が認められなかった。そして、Protrudin の FYVE ドメインが、神経系に豊富に存在する硫酸化糖脂質に結合することを新たに見出した。この硫酸化糖脂質は神経機能調節に重要で、その代謝異常の患者では神経機能不全となり、一方でその欠損マウスでは有髄神経軸索のドメイン形成不全による進行性の麻痺を発症することが知られている。

われわれは、Protrudin と硫酸化糖脂質の結合の生理的意義を解析するために Protrudin ノックアウトマウスを

作製し、その異常を検討した。Protrudin ノックアウトマウスは外見上は正常に産まれてきたが、数ヶ月後より進行性の麻痺を呈することがわかった。

Protrudin ノックアウトマウスの神経細胞では、軸索が短く樹状突起が長くなるという極性形成の不全が見られた。そして、その極性形成に硫酸化糖脂質の関与が示唆された。また、Protrudin ノックアウトマウスではパラノード形成が不全で、それに伴い電位依存性イオンチャンネルの分布が乱れていた。

以上の結果から、Protrudin は Rab11 を介する小胞膜輸送と硫酸化糖脂質との結合により、神経軸索における選択的輸送を制御していることが示唆された。そしてその結果、正常な軸索ドメイン形成と電位依存性イオンチャンネルの分布に寄与していることが明らかになった。

近年、ヒト Protrudin の遺伝子変異が遺伝性痙性対麻痺の患者家系で発見された。われわれの作製した Protrudin ノックアウトマウスも同じ表現型を示したことより、この疾患は、Protrudin と硫酸化糖脂質の結合による小胞を介した軸索輸送の不全と、それに伴う軸索ドメインの形成異常が一因であることが予想された。

(2) 小胞型アスパラギン酸トランスポーターの発見

宮地孝明, 日浅未来, 越後典子, 森山芳則 (岡山大学大学院医歯薬学総合研究科)

アスパラギン酸は NMDA 受容体の天然のリガンドであり、海馬神経のシナプス小胞や松果体のシナプス小胞様オルガネラに含まれ、開口放出されることが知られている。しかしながら、どのような機構でアスパラギン酸が小胞内へ濃縮されるのか全くわかっていない。そのため、アスパラギン酸はグルタミン酸に次ぐ脳内に多量に存在する興奮性アミノ酸であるにも関わらず、アスパラ

ギン酸化学伝達が本当に存在するのか未だに議論されている。

我々は小胞内の濃縮を司る仮想小胞型アスパラギン酸トランスポーターの候補として、リソソームのシアル酸/H⁺トランスポーターであるシアリン (SLC17A5) に着目した。なぜなら、シアリンはリソソーム以外のオルガネラに広く分布しており、他の輸送機能も想定されたこ

と、シアリンが属する SLC17 ファミリーの他のメンバーはいずれも膜電位駆動型のアニオン輸送活性とともに Na^+/Pi 輸送という二つの輸送システムを示すからである。シアリンも膜電位をかけるとアスパラギン酸が輸送されるのではないかと考えた。

精製シアリンをリポソームに組み込み、膜電位をかけると、予想通りアスパラギン酸が輸送された。さらに、我々は、シアリンが海馬神経のアスパラギン酸含有シナプス小胞や松果体のシナプス小胞様オルガネラに局在しているおり、この部位でのシアリンの発現を RNA 干渉法で抑制するとアスパラギン酸の開口放出が抑制されることを実証した。以上の結果から、シアリンは小胞型アスパラギン酸トランスポーターであると結論した。シアリンはアスパラギン酸だけでなく、グルタミン酸も輸送したため、小胞型興奮性アミノ酸トランスポーター (Vesicular Excitatory Amino acid Transporter: VEAT) と名付けた。

シアリンが VEAT であるという結果は、シアリン遺伝

子の変異により引き起こされるシアル酸蓄積症の未解決問題を解く鍵となる可能性がある。シアル酸蓄積症は、乳児シアル酸蓄積症 (ISSD) とサラ病に分類される。ISSD は典型的なリソソーム病の特徴を示し、リソソームへのシアル酸蓄積による病変から生後二年ほどで死に至る。一方、サラ病は致死性ではないが強い神経障害を引き起こすことを特徴とする。サラ病を引き起こす変異シアリンのシアル酸輸送活性はある程度保たれているため、本来にサラ病の原因がシアル酸輸送活性の低下によるものなのか疑問視されていた。我々は、サラ病を引き起こす変異シアリンにアスパラギン酸、グルタミン酸輸送活性が全くないことと、ISSD を引き起こす変異シアリンにはシアル酸輸送活性が全くないが、アスパラギン酸、グルタミン酸輸送活性は保持されていることを見いだした。これはサラ病がアスパラギン酸とグルタミン酸化学伝達の欠損症であることを示唆している。

参考文献

Miyaji et al. PNAS 105 11720-11724 (2008)

(3) シナプス形成におけるアフアディンの機能

富樫 英¹, 出来祐子¹, 匂坂敏朗², 三好 淳³, 高井義美¹

(¹ 神戸大院・医・分子細胞生物学, ² 神戸大院・医・膜動態学,

³ 大阪府立成人病センター研究所・分子生物学)

神経シナプスはニューロン間の特殊な細胞間接着であり、その特異性と可塑性の制御には細胞間接着分子が重要な役割を果たしている。海馬においては、歯状回の顆粒細胞から軸索である苔状線維が伸びて CA3 に投射し、CA3 錐体細胞の頂上樹状突起とシナプスを形成している。このシナプスには synaptic junction (SJ) と puncta adherentia junction (PAJ) と呼ばれる二つの接着構造が存在する。PAJ は上皮の細胞間接着装置アドヘレンスジャンクション (AJ) と類似の構造であり、前、後シナプス膜が対称的な形態を保ち、細胞間接着分子が集積している。これまでに私達は、AJ の接着機構としてネクチン-アフアディン系を見出している。ネクチンは免疫グロブリンスーパーファミリーに属する接着分子で、細胞内裏打ち蛋白質アフアディンを介してアクチン細胞骨格系と連結し AJ の形成を促進する。ネクチン-アフアディン系は PAJ にも局在することが明らかにされている。そこで私共は、

シナプス形成におけるアフアディンの機能を調べるために、脳特異的にアフアディンをノックアウトしたコンディショナルノックアウトマウスを作製した。この変異マウスは生後まもなく、脳室における細胞間接着の形成不全による水頭症によって死亡した。さらに観察を行った結果、アフアディン変異マウスの海馬 CA3 領域においてはネクチンのみならず、カドヘリン・カテニン複合体の局在も見られなくなっており、PAJ がほぼ消失していた。また神経細胞のシナプスの形態を調べると本来きこ様の形態を示す樹状突起スパインが細長い糸状突起様になっていた。さらに、電子顕微鏡でシナプス結合を観察すると PSD の断片化 (perforated synapses) が多数見られた。また培養海馬神経細胞においてアフアディンを欠失させると、樹状突起スパインの変化とともに、シナプス分子の集積が減少していた。これらの結果から、アフアディンは PAJ の形成を制御すること、またシナプスの形態や

機能を制御することによりその形態的可塑性にも関わる と考えられる。

(4) 上丘の動き感受性視覚ニューロンの樹状突起における Ih 電流の機能的役割

遠藤利朗 (カロリンスカ研究所)

中脳の上丘は視覚定位行動や空間視に関わる中枢の一つである。上丘浅層のニューロンは受容野内に呈示された光刺激に対して反応するが、中でも主要な投射ニューロンの一つ Wide field vertical (WVF) cell は受容野内を動く視覚刺激に選択的に反応する。WVF cell は視覚地図上で数十度にも相当する範囲に多くの樹状突起を伸ばしている。視覚対象が受容野を横切るときに受容野内の各小部分から入力を受ける樹状突起が順次活性化されることにより動きに対する選択的応答性が生じていると考えられている。

これまでの研究から、WVF cell は Ih 電流を顕著に示すことが明らかになっている。本研究では、WVF cell における H 電流の役割について検討した。ラット上丘のスライス標本の WVF cell からのホールセルパッチクランプ記録による活性化キネティクスの解析と、免疫染色の所見から、WVF cell は Ih チャネル (HCN チャネル) のうちでも特に HCN1 を強く発現し、それらは主に樹状突起に分布していることが示唆された。一方 WVF cell は視神経線維の刺激に対して短潜時で活動電位応答を示す

が、これは樹状突起において電位依存性ナトリウムチャネルの活性化により開始されることを明らかにした。Ih 電流を抑制すると、視神経刺激に応答して樹状突起で活動電位が開始される確率が減少し、かわりにしばしば細胞体近辺で活動電位が発生し、その結果、活動電位の開始が遅れ且つタイミングのばらつきが大きくなった。Ih 電流は静止電位付近で持続的にある程度の活性化状態にあることから、Ih 電流が存在することにより樹状突起の膜電位が常に活動電位の閾値付近に固定され、そのことによって活動電位の開始ないしは細胞体への伝播が促進されていると考えられる。

大脳皮質や海馬の錐体細胞における研究から、Ih 電流には樹状突起においてシナプス後電位を時間的・空間的に限局させる働きがあることが知られている。WVF cell においては、同様の作用に加えて HCN チャネルが電位依存性ナトリウムチャネルと機能的にカップルすることにより遠位樹状突起への視覚入力に対する各樹状突起の応答を促進し、この性質が WVF cell が動く視覚刺激を検出する機構に寄与していると考えられる。

(5) 無脊椎動物中枢ニューロンの樹状突起におけるシナプス統合作用の計算機シミュレーション

高嶋 聡, 高畑雅一 (北海道大学大学院 生命理学部門 生命機能科学分野)

脊椎動物中枢ニューロンの樹状突起膜には種々の電位/リガンド依存性膜コンダクタンスが存在するが、その空間分布が樹状突起でのシナプス統合に及ぼす影響は必ずしも明確でない。節足動物のノンスパイキング介在ニューロン (NSI) も活動電位は生じないものの、その樹状突起膜には種々の電位依存性膜コンダクタンスが存在する。しかしその空間分布とシナプス統合における機能的意義の関係は不明である。

ザリガニ腹部最終神経節に存在する同定 NSI である LDS 細胞は、樹状突起の形態学的・生理学的性質が実験

的に詳しく調査されており、2 種類の一過性および 1 種類の持続性電位依存性外向膜コンダクタンスを持っていることが知られている。私たちはこれらの実験データに基づき、LDS 細胞のマルチコンパートメンタルモデルを作成し、シナプス活動を計算機シミュレーションにより再構成した。3 種類の電位依存性外向膜コンダクタンスは時間および電位依存性の Hodgkin-Huxley 型活性化/不活性化ゲートカイネティクスで記述してモデルに組み込んだ。これらコンダクタンスが樹状突起膜上に均一に分布していると仮定した時のシナプス活動をシミュレーショ

ンした結果、これら能動的膜コンダクタンスは脱分極性シナプス波形を時間的に短縮することが示唆された。また、感覚神経束を電気刺激したときに見られる特徴的なシナプス電位波形は LDS 細胞の多数の樹状突起末端に入力があった際にのみ現れ、単一のシナプス入力では生じないことが示された。さらに、3 種類の能動的膜コンダクタンスの樹状突起上でのさまざまな空間分布パター

ンがシナプス電位の波形とその拡散に及ぼす効果をシミュレーションにより体系的に調べた。その結果、シナプス電流の細胞内経路に沿った特定の分布様式がシナプス電位の波形とその拡散に有意な影響をもつ可能性が示唆された。以上の結果から、樹状突起膜の電気的特性がシナプス出力にどう影響を与えうるかを考察する。

(6) 一次体性感覚野における受容野の成熟と樹状突起の興奮性

駒井章治（奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科）

大脳皮質や海馬など多くの脳領域の神経回路は遺伝子による制御のみならず感覚活動や個体経験により大きく影響を受けていると考えられています。こういった活動・経験依存的な脳の変化の例として視覚野や体性感覚野では感覚遮断実験により神経細胞の支配領域が小さくなり、他の領域に取って代わることが知られています。またこれらの変化には神経可塑性が非常に重要な働きを担っていることが多くの研究から示されてきております。一方で神経細胞は高度に分化しており樹状突起や軸索といった多数の突起を持っています。なかでも樹状突起は主にシナプス前細胞からの入力を受け統合する働きを持っており、神経可塑性現象を含め情報統合の非常に重要な場であると考えられています。さらにこの樹状突起が単なる能動的ケーブルではなく、興奮性を有した積極的情報伝搬の素子であることが近年の研究により明らかになってきており、これら積極的情報伝搬の責任分子として（特に大脳皮質神経細胞では）ナトリウムチャンネルが挙げられております。

私たちはこの活動・経験依存性の神経可塑性における樹状突起の興奮性の役割を検証するためにレンチウイルスベクターを利用したRNAiにより樹状突起のナトリウムチャンネルの発現を抑制、この神経細胞から体性感覚受容野を記録計測しました。その結果、バレル皮質2/3層細

胞の樹状突起ナトリウムチャンネルを発現抑制した細胞では感覚刺激に対応したシナプス後電位の振幅が減少することが明らかとなりました。またこの変化は臨界期に特有な現象であり、臨界期後のナトリウムチャンネル抑制では受容野の変化を示さないことが明らかとなりました。さらにTurrigianoらの提唱する恒常的神経可塑性はこの例では見られず、活動性を抑制したにも関わらず微小興奮性シナプス後電流 (mEPSC) は振幅が減少、発生頻度も減少することが明らかとなりました。

以上の結果は樹状突起におけるナトリウムチャンネルは逆電位活動電位に影響し、タイミング依存的神経可塑性などの可塑性現象を介し、臨界期に正常な感覚受容野の形成・成熟に非常に重要な役割を果たしている事を示していると考えられます。また本研究課題でみられた可塑性現象（受容野形成・成熟）には恒常的神経可塑性は含まれないということを示していると考えられます。

現在は成熟個体脳における神経可塑性現象においても樹状突起の興奮性が必要なのか否かを検討する目的で、上記実験で使用したウイルスベクターの再構築を行うとともに、洞毛のトリミング、ペアリングなどの行動学的課題の検討を行っています。今後はこれら神経可塑性現象が一般的に脳の可塑性に重要な機能を持っているのか否かを検討してゆきたいと考えております。

(7) ラット運動野の錐体細胞と介在細胞の機能的活動の解析

磯村宜和 (理化学研究所 脳科学総合研究センター 脳回路機能理論研究チーム)

従来の単一ユニット記録法はさまざまな機能に関連する脳領域を特定することに大きな威力を発揮したものの、記録した神経細胞のサブタイプの同定をおこなうことは不可能に近かった。そのため一次運動野でさえ各層の錐体細胞や介在細胞が実際にどのような機能的役割を担っているのかほとんど解明されていない。一方、近年になって単一ユニット活動を記録し詳細な細胞形態も観察できる傍細胞記録法 *juxtacellular recording* や、多数の神経細胞からユニット活動を同時に記録できるマルチユニット記録法 *multiunit recording* が開発・改良されつつある。

そこで我々は、運動の実行を必要とする課題を訓練したラットにこれらの新しい記録技術を適用し、運動の発現に関与する大脳皮質の錐体細胞と介在細胞を機能的かつ形態的に同定して、運動機能を担う大脳皮質内の局所神経回路を解明することを目指してきた。まず、頭部を脳定位固定装置に固定した複数の被検ラットに単純なレバー押し課題の訓練を効率よく施す「脳定位固定オペラント訓練装置」を独自開発し、訓練完了ラットを毎週 2 頭の割合で記録実験に安定して供給する体制を確立した。このような被検ラットをもちいて、運動野の前肢領域から傍細胞記録法により課題に関連した単一細胞活動

を記録し、同時にテトロード電極やシリコンプローブをもちいたマルチユニット記録法により近傍にある複数の細胞活動を記録した。傍細胞記録中にバイオサイチンやニューロバイオチンを電気浸透的に負荷した記録細胞は、灌流固定後に介在細胞マーカーであるパルバルブミンやカルレチニンとの蛍光三重染色を施し、次いで ABC - DAB 法により細胞形態を再構築した。

その結果、課題遂行ラット 74 頭の運動野から運動関連活動を示す多数の錐体細胞や介在細胞を可視化した。錐体細胞は、運動の準備、開始、実行、停止に関連する発火応答を示すものがさまざまに観察された。一方、パルバルブミン陽性の *fast-spiking (FS)* 介在細胞のほとんどは、運動実行時に発火活動が上昇し、その方向選択性は錐体細胞よりも低かった。このような所見は併用したマルチユニット記録の結果からも支持された。本研究において開発された「慢性傍細胞記録法」は、行動に関連する神経細胞の各サブタイプの機能を直接的に調べることができる非常に有用な研究アプローチであるといえる。

最後に、国内の研究者がマルチユニット記録に積極的に挑戦できることを目指して試作した、小型で低コストの普及版マルチユニット記録システムを簡単に紹介したい。

(8) 報酬予測と行動モニタリングにおけるげっ歯類眼窩前頭皮質の役割

古屋数智之 (京都大学医学研究科神経細胞薬理学教室)

動物は外界の刺激に応じて入手可能な報酬を予測し、適切な行動を選択する。また行動の成否に応じて、報酬の予測は変化する。この報酬予測と行動制御の相互作用は報酬指向行動の柔軟性に不可欠であり、強迫性障害などの情動障害ではこの認知過程に障害が見られる。眼窩前頭皮質は前頭前野の一部であり、報酬指向行動の柔軟性に不可欠な脳領域である。また電気生理学的な解析により、この脳領域の神経細胞の多くは将来の報酬に関わる情報をコードすることが明らかにされた。一方、行動制御に関する神経活動は眼窩前頭皮質において十分解析されておらず、報酬予測の情報がどのように行動制御に

結び付くのかは不明であった。我々は報酬予測に関する神経活動と行動に関する神経活動を分離するための匂い分別課題を開発し、ラット眼窩前頭皮質における課題施行時の神経活動を解析した。その結果、ラット眼窩前頭前野では報酬予測に関する神経活動に加え、行動モニタリングに関わる神経活動がほぼ独立して観察された。本演題ではこれらの神経活動の特徴を説明し、報酬指向行動における眼窩前頭皮質の新しい役割を示唆する。現在、報酬予測と行動制御に関する神経活動の相互作用について、脳局所損傷と神経活動記録を組み合わせた解析を行っており、その最新の知見も報告したい。

13. 感覚刺激・薬物による快・不快情動生成機構とその破綻

2008 年 11 月 27 日－11 月 28 日

代表・世話人：南 雅文（北海道大学）

所内対応者：重本隆一（脳形態解析）

- （1）薬物依存の発達による変化から見た快・不快情動生成機構の障害
西川 徹（東京医科歯科大・医・精神行動医科学）
- （2）ストレス性精神障害の神経生理学的基盤-情動生成機構とその破綻
岡本泰昌（広島大・医・精神神経医科学）
- （3）恐怖条件付けにおけるセロトニンの役割
井上 猛（北大・医・精神医学）
- （4）情動行動のストレス適応におけるプロスタノイドの役割
古屋敷智之（京大・医・神経細胞薬理）
- （5）内臓刺激による不快情動生成機構とその破綻
福土 審（東北大・医・行動医学）
- （6）心の痛み：神経イメージングによる研究
柿木隆介（生理研・感覚運動調節研究部門）
- （7）痛みによる不快情動生成における分界条床核の役割
南 雅文（北大・薬・薬理）
- （8）慢性痛と扁桃体シナプス可塑性
加藤総夫（慈恵医大・神経生理）
- （9）恐怖記憶再固定化と消去のメカニズム
喜田 聡（東京農大・バイオサイエンス）
- （10）細胞内情報伝達系からみた恐怖情動記憶の形成と消去のメカニズム
湯浅茂樹，伊早坂智子（国立精神・神経センター神経研究所 微細構造研究部）
- （11）匂い分子が引き起こす嫌悪感や恐怖感を先天的に制御する神経回路
小早川高（東京大・理・生物化学）
- （12）味覚誘発行動・情動の生成機構の解明を目指す味覚伝導路構成ニューロンの可視化と機能解析
杉田 誠（広島大学・歯・口腔生理）
- （13）脳機能・分子イメージングによる情動のメカニズム研究
谷内一彦（東北大・医・機能薬理）

【参加者名】

西川 徹（東京医科歯科大学），岡本泰昌（広島大学），井上 猛（北海道大学），古屋敷智之（京都大学），福土 審（東北大），柿木隆介（生理学研究所），南 雅文（北海道大学），加藤総夫（慈恵会医科大学），喜田 聡（東京農大），湯浅茂樹（国立精神・神経センター），小早川高（東京大学），杉田 誠（広島大学），谷内一彦（東北大），板坂典郎（専修大学），野村 洋（東京大学），豊田 雄（東京大学），高橋由香里（慈恵会医科大学），原正道（慈恵会医科大学），池田和隆（東京都医学研究機構），

三井克邦（小野薬品工業），伊早坂智子（国立精神・神経センター），村山美穂（武田薬品工業），成宮 周（京都大学），北岡志保（京都大学），廣中直行（科学技術振興機構 ERATO），高野裕治（科学技術振興機構 ERATO），田中智子（科学技術振興機構 ERATO），田中崇裕（武田薬品工業），中道景子（大日本住友製薬），江里口義朗（大日本住友製薬），高田宜則（大日本住友製薬），田口良太（エーザイ），大河原美以（東京学芸大学）押淵英弘（東京女子医大），笠井慎也（東京都精神医学総合研究所），

等 誠司 (生理学研究所), 檜山武史 (基礎生物学研究所), 深澤有吾 (生理学研究所), 片寄洋子 (東北大学), 辛 龍

文 (放射線医学研究所), 西巻拓也 (生理学研究所), 阿部圭一 (セレボス)

【概要】

発表は13題である。セッション1では、まず、西川が、脳の発達がある段階まで達した後に、統合失調症などの精神疾患発症や薬物依存形成が起こることを示唆する、ヒトでの統計的データおよび動物での実験結果を示し、臨界期前後での脳内遺伝子発現を比較することで、精神疾患や薬物依存に関与する遺伝子を単離する試みを紹介した。次に、岡本は、不快な言語の認知処理への前頭前野-辺縁系経路の関与、長期の報酬見通しにおける脳内セロトニン神経系の関与、社会的排斥により生じる「こころ」の痛みに対する情緒的サポートの効果などに関して、ヒトでの脳機能画像解析手法を用いた最新の研究成果について報告した。井上は、うつ病に加え、不安障害の治療薬としても用いられるSSRIの作用機序を、ラット恐怖条件付けストレスモデルで検討し、扁桃体基底外側核でのセロトニン神経情報伝達亢進が、SSRIによる不安抑制作用の機序であることを示した。古屋敷は、プロスタグランジンEPI受容体ノックアウトマウスを用いた研究により、プロスタグランジンがドパミン神経系の調節を介して情動制御に関与していることを初めて示した。

セッション2では、福土が、代表的な心身症である過敏性腸症候群 (IBS) の病態生理に関する研究を突破口として、内臓感覚から情動形成に至る脳内過程をヒト脳機能画像解析を用いて検討した研究成果を報告した。柿木は、Aδ線維とC線維をそれぞれ選択的に刺激した際のヒト脳活動をMEGとfMRIで解析し、1次感覚野、2次感覚野、島、扁桃体、帯状回で順に活動が亢進することを示すとともに、「痛い」と感じそうな画像を見せることによっても、2次感覚野、島、帯状回の活動が亢進することを報告した。南は、条件付け場所嫌悪性試験を用いた行動薬理学的解析により、痛みによる不快情動生成に分界条床核でのノルアドレナリン神経情報伝達が重要な役割を果たしていることを示した。加藤は、神経因性疼痛モデル動物から作製した脳スライス標本を用いた電気生理学的研究において、慢性痛では、急性痛と異なり、腕傍核から扁桃体中心核外側外包部へのグルタミン酸神経情報伝達が可塑的に変化し、侵害受容と負情動を結ぶ情報伝達が亢進していることを報告した。

セッション3では、喜田が、恐怖記憶における「固定化」、「再固定化」、「消去」について説明し、CREBコンディショナル変異マウスを用いた解析により、CREBによる遺伝子発現誘導が再固定化および消去の過程に必要であることを示した。さらに、再固定化には海馬と扁桃体での、また、消去には扁桃体と前頭前野でのCREB活性化が重要であることを報告した。湯浅は、Fyn欠損マウスを用いた解析、およびFyn情報伝達経路における蛋白質リン酸化の生化学的な検討により、恐怖条件付け記憶の形成にFynが重要であることを示した。小早川は背側の糸球を除去することにより、腐敗物や天敵の匂いに対する忌避行動が消失することを報告した。さらに、脳内ストレス経路活性化やすみ行動に着目することにより、「嫌悪」と「恐怖」とを区別できることを示すとともに、天敵の匂いに含まれる「恐怖を惹起する成分」を同定し、その化合物がより強い恐怖反応を引き起こすことも示した。杉田は、快および不快情動とそれぞれ結びつきが強い、甘味および苦味の受容体遺伝子を用いたtWGA-DsRedトランスジェニックマウスを作成し、甘味と苦味の情報伝達に関わる神経回路の同定について報告した。谷内は、PETを用いた、神経情報伝達イメージング手法について概説し、抗ヒスタミン薬による眠気と認知機能障害のイメージング、痒みのイメージング、アレキシサイミア性格傾向と脳機能に関するイメージングなどの研究成果について紹介した。

「感覚刺激・薬物による快・不快情動生成機構とその破綻」というテーマについて、大変興味深い発表と活発な討論が行われ、『従来の学会では、異なったセッションやシンポジウムで研究成果発表や討論が行われてきたものを、「快・不快情動」をキーワードとして一堂に集め、密度の濃い研究成果発表と討論を行うことにより、本邦における情動研究のレベルを一気に高め、我が国のこの分野での国際貢献に資する。』という研究会の目的は十分に達成された。突っ込んだ討論を行うため、1演者あたり40分としたが、それでも討論の時間が不足していたことが大変残念である。本研究会は今回が初めてであるため、どの演者も研究の背景から話を始めなければならなかったことに原因の1つがあると考えられる。次回か

らは、本研究会での2回目以降の発表は40分、初めての発表は50分とするなど、時間配分を工夫する必要がある。また、今回、分子生物学、生理学、薬理学、精神医学、心身医学、脳機能イメージングなどの多様な分野か

らの発表があったが、今後さらに、心理学やゲノム科学などの異なった分野の研究者も交えた研究会とすることにより、本研究領域がさらに推進されることが期待できる。

(1) 薬物依存の発達による変化から見た快・不快情動生成機構の障害

西川 徹（東京医科歯科大・医・精神行動医科学）

薬物依存患者においては、薬物および関連する刺激が引き起こす快・不快情動の適切な処理がなされない障害が認められることから、その発症の少なくとも一部には、快・不快情動生成機構の異常が関与すると推測される。一方、成人では容易に依存が形成される methylphenidate を、多動性障害の児童に投与した場合には、依存が生じにくいことが知られている。PTSD による情動面での障害が小児と成人では異なること (DSMIV-TR) を考え合わせると、以上の所見は、依存性薬物の作用と関係する快・不快情動生成の分子細胞機構が発達によって変化することを示唆している。そこで、本シンポジウムでは、乱用の対象となっている、覚醒剤 (methamphetamine (MAP)), 麻薬 (cocaine, phencyclidine (PCP)) 等を投与したラットまたはマウスの脳における遺伝子発現の発達による変化を報告し、薬物による快・不快情動生成機構の破綻との関係を議論したい。

演者らは、依存性薬物に依存や精神病様症状およびそ

の動物モデルが、一定の発達時期-臨界期-以降に明確に形成されるようになる現象に注目し、これらの異常に特異的に関係する神経回路と分子カスケードを探索している。MAP や PCP が薬物依存モデルと考えられる成熟期型の行動異常を引き起こすようになる生後3週頃の臨界期の前後で、脳の活動性の指標となる c-fos 遺伝子発現を MAP や PCP 投与後で比較したところ、大脳新皮質、線条体または視床において発現パターンが著しく異なり、薬物依存形成に関与する神経回路の生後発達を反映していると考えられた。さらに、大脳新皮質あるいは視床から、臨界期以降に依存性薬物に有意な反応変化を示すようになる遺伝子を見出し、MAP 応答性遺伝子群 (mrts : MAP responsive transcripts) および PCP 応答性遺伝子群 (prts : PCP responsive transcripts) と名付け、各遺伝子の構造、コード分子、生理的機能、薬物による依存形成や精神症状発現における意義等を検討中である。

(2) ストレス性精神障害の神経生理学的基盤-情動生成機構とその破綻

岡本泰昌（広島大学大学院精神神経医科学）

ヒトや動物が環境との相互作用の中で、過剰な環境の要求や苦痛な刺激にさらされたときに引き起こされるストレスの反応過程は、生理的反応とともに心理的過程を伴っている。特にヒトのストレスの反応過程を考える上では心理的な要因を抜きにしては考えにくく、その生成機構には個人の認知的な処理が関与している。一方、生体がストレスに暴露されると、ストレス反応が生じるが、これはストレスがなくなると反応もおこらなくなる一時的な性質のものである。しかしストレスが慢性的であっ

たり頻繁に繰り返される場合や、さらに一時的な体験であってもストレスが強大である場合など、ストレスへの適応が困難な状態が引き起こされる。この脳での適応破綻の表現型が精神機能の障害と考えられる。このような観点から、われわれはストレス性精神障害の神経生理学的基盤や適応を強化するための方策を明らかにするために機能的磁気共鳴画像法 (fMRI) と脳磁場計測法 (MEG) といった脳機能画像解析手法を用いた検討を行っている。本発表ではこれらの研究成果について紹介する。

1) 心理社会的ストレスの認知機構

心理社会的ストレスは、それ自体が直接的にストレス反応を引き起こすのではなく、それがストレスとなるには、個人の認知的な処理過程が必要である。そこで不快な言語刺激に対する脳の活動を検討した。その結果、不快な言語の認知処理に前頭前野-辺縁系ネットワークが関与していること、さらに摂食障害ではこのネットワークの脳活動が変化し、症状形成に関与していることが考えられた。

2) ストレス制御の機構（報酬の見通しとセロトニン）

ラットの研究から、“報酬の見通し”がセロトニンによって調整されることが示唆されているが、ヒトにおいては明らかになっていない。そこで、健常者を対象に、セロトニンの前駆物質であるトリプトファン枯渇を行った上で、すぐに得られる小さな報酬と、時間をおいてもらえる大きな報酬のいずれかを選択している際の脳活動を測定した。その結果、“報酬の見通し”機能には前頭前

野-線条体のネットワークが関与し、セロトニン機能低下により、短期報酬予測に関連した回路の活動が主となり、報酬の見通しが低下し、短期の小報酬選択が増加すること、またうつ病では長期の報酬予測に関連した回路が活動していないことが明らかになった。

3) 情動による痛み制御の機構

痛みと情動は互いに密接な関係があるとされる。そこで、痛み刺激として電気刺激を、情動として顔表情を用いて情動が痛み知覚に与える影響について検討した。その結果、悲しく感じている時に同じ強度の痛みをより強く感じていると考えられた。次に、社会的排斥によって生じる“こころの痛み”に対して情緒的サポートはいかなる脳領域を介して苦痛を軽減するかを検証した。その結果、情緒的サポートは、側頭葉により相手の意図を読み取り、前頭前野における感情制御処理が促進され、それが前帯状回の活動を抑制することで心理的痛みを軽減する効果をもつと考えられた。

(3) 恐怖条件付けにおけるセロトニンの役割

井上 猛（北海道大学医学研究科座精神医学分野）

選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) はうつ病のみならず、不安障害のほとんどの亜型に対して有効であり、抗不安薬として広く用いられている。しかし、SSRIの抗不安作用の作用機序はこれまで十分に解明されてこなかった。我々は恐怖条件付けストレス conditioned fear stress (CFS; 以前に逃避不可能なフットショックを四肢に受けたことのある環境への再曝露) を不安・恐怖の動物モデルとして用い、恐怖とセロトニンの関連について検討してきた。

すくみ行動を恐怖の指標として用いると、ベンゾジアゼピン系抗不安薬やセロトニン 1A 受容体アゴニストと同様に SSRI はラットの CFS で抗不安作用を示す。フットショックによる条件付けの前に SSRI を投与しても、またショック箱への再曝露 (テスト) の前に SSRI を投与しても、すくみ行動は抑制される。一方、これまでの脳局所破壊実験によって、CFS においては扁桃体が必須かつ中心的な役割をはたしていることが明らかになってきた。我々の研究でも両側の扁桃体破壊は CFS による恐怖発現をほぼ完全に抑制した。以上のことから、SSRI

が扁桃体のセロトニンに作用して CFS で抗不安作用を惹起するという仮説を我々は立ててその検証を行った。

フットショックを負荷した翌日に SSRI あるいはセロトニン 1A 受容体アゴニストを両側扁桃体基底核周辺に局所投与し、CFS によるすくみ行動発現を解析したところ、両薬剤はいずれも抗不安作用を示した。さらに、CFS によって扁桃体基底核の c-Fos 蛋白発現は亢進し、SSRI 全身投与は CFS で抗不安作用を示すと同時に、CFS による c-Fos 蛋白発現を抑制した。なお、CFS で c-Fos 蛋白が発現する細胞はグルタミン酸作動性神経であることが免疫組織学的実験で明らかになった。これらの実験結果は、恐怖によって亢進した扁桃体 (特に基底核) の神経活動を SSRI が抑制して抗不安作用をもたらすことを示唆している。

CFS のときの扁桃体の細胞外セロトニンとすくみ行動の関連を検討する目的で、CFS の際の扁桃体細胞外セロトニン濃度を脳内微小透析実験によってモニターして、SSRI 局所投与の効果を検討した。その結果、扁桃体 (外側核・基底核周辺) の細胞外セロトニン濃度は CFS で増

加しなかったが、灌流液を介して SSRI を局所投与すると細胞外セロトニン濃度は顕著に増加すると同時に、すくみ行動発現を有意に抑制した。したがって、脳内微小

透析実験からも扁桃体のセロトニンは恐怖を抑制する機能的役割を有していることが示唆された。

(4) 情動行動のストレス適応におけるプロスタノイドの役割

古屋敷智之（京都大学医学研究科神経細胞薬理学）

社会的関係や新規環境といった心理的刺激や組織侵襲や感染症といった物理的刺激は生体の恒常性を破綻させる。このような恒常性の破綻はストレスと称され、自律神経系や内分泌系の制御に加え、社会行動の抑制や不安の亢進、快感感受性の低下など情動行動の変化を惹起する。非ステロイド系抗炎症薬の作用および種々の薬理実験から、プロスタグランジン(PG)E2 が疾病時の発熱、内分泌応答に重要であることが知られてきた。一方、心理ストレスによる生体応答、特に情動行動の変化に PGE2 が関与するかは全く不明であった。PGE2 はアラキドン酸から生成される生理活性物質であり、EP1, EP2, EP3, EP4 と呼ばれる七回膜貫通型受容体を介して作用を発揮する。我々は各種 PGE 受容体サブタイプを欠損した遺伝子改変マウスとサブタイプ特異的作用薬を用い、疾病・心理ストレスにおける PGE 受容体の役割を解析してきた。その結果、EP1 受容体が疾病や心理ストレス下に

おける情動行動に関与することが明らかとなった。すなわち EP1 欠損マウスでは、野生型マウスで見られる疾病による社会行動の抑制が起こらない。また EP1 欠損マウスの行動異常は疾病ストレスの非存在下でも認められ、新規幼若マウスに対する攻撃性の亢進と社会行動の減少、高所における断崖回避反応の消失といった「衝動性」が観察された。これらの行動異常の多くは PGE2-EP1 によるドパミン系制御の破綻によって引き起こされると考えられている。本口演では疾病・心理ストレス下における情動行動制御に関する PGE2-EP1 の作用とそのメカニズムについて報告する。心理ストレスに対する適応の破綻は、うつ病や PTSD など精神疾患の病態と深く関わる。最近我々はこれら精神疾患の小動物モデルにおけるプロスタノイドの作用を解析しており、その最新の知見も併せて紹介する。

(5) 内臓刺激による不快情動生成機構とその破綻

福土 審（東北大学大学院医学系研究科行動医学）

内臓痛は、限られた特殊な問題と捉えられて来た。しかし、内臓感覚、特に内臓痛は、重大な疾患を示唆する警告症状として多くの内科疾患患者の受診動機になるだけでなく、児童・思春期の不登校、青年期の社会不適応の重要な契機となり、その quality of life の低下、臨床検査に際しての苦痛の要因、医療費高騰の一因となる。また、疼痛制御の上でも、慢性で原因を特定することが困難な腹痛を除去し、また、癌性の腹痛を便秘異常を起こさずに除去することは、必ずしも容易ではない。過敏性腸症候群 (irritable bowel syndrome: IBS) の病態生理に関する研究を契機として、その普遍性と重要性が明らかに

されつつある。IBS は、腹痛もしくはその軽度の感覚である腹部不快感が一定期間持続し、それが便秘異常（下痢もしくは便秘）に関連しているという機能的消化管障害である。われわれは、代表的な心身症でもある IBS の病態生理を追求することにより、身体（内臓）感覚から情動形成に至る脳内過程の正常像と異常像を抽出できると考えて来た。大腸にバロスタットバッグを挿入し、伸展刺激を加え、同時に H₂¹⁵O を静注した時の positron emission tomography (PET) にて局所脳血流量 (rCBF) を測定すると、視床、前帯状回、前頭前野の活性化が認められる。この時、同時に内臓感覚と不快情動が惹起される。

健常者と IBS 患者には rCBF の賦活化様式に差が認められる。IBS の治療法として有効性が証明されている催眠により、内臓刺激下の前頭前野と前帯状回機能に変化し、内臓知覚も修飾される。また、corticotropin-releasing hormone (CRH) 拮抗薬は IBS 患者の大腸運動、腹痛、不安を改善し、CRH-R1 拮抗薬は IBS モデルラットに同様の効果をもたらす。健常者と IBS 患者の双方において、CRH 拮抗薬は辺縁系と前頭前野の賦活状態を修飾した。

IBS には消化管由来信号の脳内処理過程の異常が存在し、少なくともその一部に CRH の関与が示唆される。内臓痛の形成機序が明らかにされれば、IBS をはじめとする関連病態全ての問題を解決できる可能性があり、その意味でも、内臓知覚は普遍性の高い医学的問題である。IBS で見出された現象の脳科学と疼痛の生理学における普遍性が注目される。

(6) 心の痛み：神経イメージングによる研究

柿木隆介（生理学研究所・感覚運動調節）

ヒトでの脳内痛覚認知機構を、高い時間分解能（ミリ秒単位）を有する脳磁図 (MEG) と、高い空間分解能を有する機能的磁気共鳴画像 (fMRI) を用いて解析した。近年の科学技術の進歩により、小径有髄の A δ 線維 (first pain) と無髄の C 線維 (second pain) を選択的に刺激することが可能となってきた。

MEG は初期認知機構の解明に適している。A δ 線維刺激、C 線維刺激共に、左右の上下肢いずれの部位を刺激しても刺激対側の第 1 次感覚野 (SI) と両側の第 2 次感覚野 (SII)、島、扁桃体、帯状回が順に、しかし時間的にオーバーラップしながら活動する事が明らかとなった。対側 SI と両側の SII、島はほとんど同時に活動しており、これは触覚などの他の感覚とは明らかに異なる所見であった。

fMRI は視床、島、帯状回における活動部位の詳細な解析に適している。A δ 線維刺激、C 線維刺激共に、両側の視床、SII、島、帯状回に有意な活動上昇が見られた。島前部、帯状回の一部、pre-SMA では、C 線維刺激により特異的に活動が上昇しており、second pain 認知に特異的な部位である可能性が示唆された。このように、MEG と

fMRI を用いる事により、痛覚認知の古典的な仮説である Lateral system と Medial system の反応時間や反応様式の相違が明らかになってきた。

痛覚認知は、「注意」などの情動によって大きく影響される。瞑想中には痛みを全く感じないというヨガの達人を対象として MEG を記録したところ、瞑想中ではアルファ波が非常に増加している事、また通常の痛覚誘発反応が全く記録されない事がわかった。fMRI では同様に、瞑想中には視床、SI、SII、島、帯状回の活動が全く見られず、前頭葉、後頭葉、中脳などの血流増加が見られ、下行性抑制系の関与が示唆される所見を得た。

私達は、実際に痛み刺激を与えられなくても痛みと感じる時がある。それは「心の痛み」と称される場合が多い。そのメカニズムを調べるため、注射をされている時の写真や歯の治療をされている時のように、痛みと感じそうな写真を見せ、心の中で「痛い」と感じるように被験者に御願いして fMRI を記録した。すると、SII、島、帯状回などに、実際に物理学的な痛み刺激を与えた時と非常に良く似た部位の活動が見られた。「心の痛み」は実際に存在することが示唆された。

(7) 痛みによる不快情動生成における分界条床核の役割

南 雅文（北海道大学薬学研究院薬理学）

痛みは、侵害刺激が加わった場所とその強さの認知に関わる感覚的成分と侵害刺激受容に伴う不安、嫌悪、恐

怖などの負の情動（以下、不快情動と呼ぶ）の生起に関わる情動的成分からなる。痛みによる惹起される不快情

動は、私たちが病院へと赴かせる原動力であり、生体警告系としての痛みの生理的役割にとって重要である。しかしながら、慢性疼痛では、痛みにより引き起こされる不安、抑うつ、恐怖などの不快情動が、患者の QOL を著しく低下させるだけでなく、精神疾患あるいは情動障害の引き金ともなり、また、そのような精神状態が痛みをさらに悪化させるという悪循環をも生じさせる。北米での調査によると、慢性的な痛みを有している人では、気分障害、不安症、うつ状態などの精神疾患・情動障害を患う割合が有意に高くなることが示されており、持続的・反復的な痛みによる情動機構の可塑的变化がその根底にあるものと考えられる。しかしながら、慢性疼痛による情動機構の可塑的变化のメカニズムはおろか、痛みによる不快情動生成の神経機構についてもほとんどわかっていないのが現状である。

我々は、痛みによる不快情動生成機構について、これまでに、情動との関連が強く示唆されている扁桃体 (amygdala)、および扁桃体中心核た無名質とともに「extended amygdala」を構成する脳領域である分界条床核に着目して研究を進めている。これまでに、分界条床核において痛み刺激によりノルアドレナリン遊離が促進され、このノルアドレナリンによる β 受容体-アデニル酸シクラーゼ-PKA 系活性化が、痛みによる不快情動生成に重要であることを報告している。さらに、コルチコトロピン放出因子 (CRF) による神経情報伝達が、同様に、アデニル酸シクラーゼ-PKA 系の活性化を介して、痛みによる不快情動生成に関与していることを示す知見も得つつある。今後、これらの情報伝達系がどのように関連しあっているか、不快情動生成につながるのかを明らかにしていきたいと考えている。

(8) 慢性痛と扁桃体シナプス可塑性

加藤総夫 (東京慈恵会医科大学・神経生理学)

「痛み」の本質的な生物学的意義は警告信号としての働きにある。なぜ条件恐怖反応で、ある聴覚刺激の後に電気ショックの痛みを与えられたラットがその聴覚刺激を「悪い知らせ」と受けとめたかのような恐怖反応を示すのか。なぜ鍛え上げた筋骨隆々の大男プロレスラーが関節を痛めつけられたくらいで「ギヴ・アップ」してしまうのか。なぜ体罰が教育手段として有効な場合があるのか。また、それが生徒の心に傷を残してしまうことが往々にしてあるのか。なぜ耐えがたい拷問によって友情も信念も裏切ってしまうようなことがありうるのか。なぜそれは人道的によくないことである、と我々は直感的に感じるのか。

それはすべて、侵害受容器からの痛みシグナルが、単なる感覚を超えて、生命体にとってきわめて強烈な、耐え難いまでの「負の情動」をひきおこすことによって「警告信号」としての機能を果たすからだと考えられる。これらのエピソードは、この「痛み」と強烈な負情動とを結ぶ神経回路が脳内に存在し、これが「痛み」を強い「苦痛」にしていること、しかもその苦痛が長期にわたり記憶されることを意味している。

一方、負情動は、痛みのみならず、嗅覚や、味覚ある

いは内臓感覚によっても誘発される。また、条件恐怖反応のように、視床・皮質系による感覚処理や海馬などによる場所認識の結果が痛み刺激と連合されても負情動は誘発される。前者の痛み・嗅覚・味覚・内臓感覚による負情動と後者の視床・皮質系による感覚情報処理を経た後の負情動との重要な違いの一つは、前者がいずれも視床・皮質系を介さずに、直接、もしくは腕傍核 (nucleus parabrachialis, PB) のシナプスを介して扁桃体および拡張扁桃体に投射する経路を持っていることである。この事実、これらの感覚に関与するメカニズムが、単なる内・外環境の分析ではなく、直接負情動を生成して、生体に緊急事態を警告するという機能的役割を担って進化してきた可能性を示唆する。

我々は、脊髄後角膠様質および三叉神経脊髄路核膠様質から扁桃体中心核外側外包部 (laterocapsular part of the central nucleus of amygdala, CeLC) への直接的投射路の最終シナプスである PB→CeLC シナプスでのシナプス伝達が、慢性神経因性疼痛動物において痛み応答依存的に増強している事実を見出した (Ikeda et al., 2007)。CeLC は *in vivo* において選択的に侵害刺激に応答するため「疼痛受容性扁桃体」とも呼ばれており (Gauriau & Bernard, 2002;

Neugebauer et al., 2005), このシナプス伝達増強が, 慢性痛動物における痛み誘発情動応答増強の主要な基礎過程であるとの想定のもと, そのシナプス伝達増強機構を解析した結果, 慢性痛においては, 急性痛と異なり, 侵害

受容と負情動を結ぶ神経連絡における可塑的变化が機能的・形態学的に固定化 consolidate している可能性が示唆された。

(9) 恐怖記憶再固定化と消去のメカニズム

喜田 聡 (東京農業大学 応用生物科学部 バイオサイエンス)

恐怖記憶はトラウマや PTSD (心的外傷後ストレス) などの精神障害の原因となる。恐怖記憶制御は本来ヒトを含めた動物の本能的な防御機構であるため, 動物に共通する恐怖記憶制御基盤を解明することは, PTSD の発症メカニズムの解明及びその治療方法開発に大きく貢献できるものと期待される。不安定な短期恐怖記憶は遺伝子発現依存的な「記憶固定化」のプロセスを経て安定な長期記憶へと移行する。一方, 最近の研究から, 恐怖記憶が想起されると, 短期記憶と同様に不安定な状態となり, 再び安定化されて貯蔵されるために, 固定化と類似した「記憶再固定化」が必要とされることが明らかとなった。また, 恐怖記憶想起後には恐怖記憶から引き起こされる恐怖反応を軽減させる「記憶消去」のプロセスも存在する。以上の記憶想起後のプロセス群の存在は, 恐怖記憶を人為的に軽減する, あるいは, 破壊できる可能性を示すものである。我々は, マウスにおける恐怖条件付け文脈記憶 (Contextual fear memory) の再固定化及び消去制御のメカニズムの解明に取り組んでおり, 本発表では, 我々の最近の研究成果を紹介する。恐怖条件付け文脈学習課題を用いた解析では, 恐怖条件付け 24 時間後に, 条件付けした電気ショックチャンバーにマウスを再

度 3 分間戻して恐怖記憶を想起させると再固定化が誘導されるのに対して, 30 分戻した場合には消去が誘導される。この想起後の恐怖記憶制御のメカニズムを明らかにするために, 再固定化あるいは消去が誘導される際に活性化される脳内領域の同定を試みた。CREB コンディショナル変異マウスを用いた解析から, CREB による遺伝子発現誘導が再固定化及び消去に必要であったことから, CREB の 133 番目のセリン残基のリン酸化と CREB の標的遺伝子である Arc の発現を指標にして, 脳内活性化領域を解析したところ, 再固定化が誘導される際には海馬と扁桃体, 消去が誘導される際には扁桃体と前頭前野において, CREB を介する遺伝子発現が誘導されることが示された。さらに, これらの領域の役割を解析するために, タンパク質合成阻害剤アニソマイシンをこれらの領域に直接注入して, その影響を解析したところ, 海馬あるいは扁桃体の遺伝子発現を阻害すると再固定化が阻害され, 一方, 扁桃体あるいは前頭前野の遺伝子発現を阻害すると消去が阻害されたことから, 再固定化には海馬と扁桃体, 消去には扁桃体と前頭前野の機能が必要であることが明らかとなった。

(10) 細胞内情報伝達系からみた恐怖情動記憶の形成と消去のメカニズム

湯浅茂樹, 伊早坂智子 (国立精神・神経センター神経研究所 微細構造研究部)

恐怖情動記憶は条件刺激と電気ショックのような恐怖を引き起こす無条件刺激の連合によって形成される。この恐怖条件付けパラダイムを用いて, 記憶形成後に実験動物に条件刺激のみを提示したときに引き起こされる freezing の程度により, 記憶を定量的に計測することが

できる。情動記憶形成過程で海馬, 扁桃体においてシナプス伝達の可塑的变化 (長期増強現象) とグルタミン酸受容体の活性変化が起こり, このような電気生理学的ならびに生化学的变化が記憶形成のメカニズムと密接な関連があると考えられている。長期的記憶の形成には新規

の遺伝子発現、蛋白質合成に関わり、シナプス伝達機構の長期的変化が関与する。これに対して、記憶形成の初期過程では既存の蛋白質の修飾やこれと関連したシナプス伝達効率の変化が関わる。したがって記憶形成の初期過程の分子機構には細胞内情報伝達系が関わると考えられるが、恐怖記憶形成にかかわる生化学的機構の解明は未だ十分にはなされていない。我々は Fyn チロシンキナーゼ欠損マウスが海馬依存性の空間記憶障害を示すこと、海馬における LTP 形成が低下していることと Fyn が NMDA 受容体イオンチャネル活性を修飾することに着目し、海馬が関わる文脈的恐怖条件付けに Fyn シグナル伝達系がどのように関わるかを解析した。

Fyn 欠損マウスを用いて文脈的恐怖条件付けを行なうと、短期記憶、長期記憶の形成がともに障害されており、Fyn が恐怖記憶形成に必要であることが明らかになった。そこで、野生型マウスで文脈的恐怖条件付けを行ない、背側海馬における Fyn シグナル伝達系の変化を Western blot, 免疫沈降により生化学的に解析した。その結果、恐怖条件付け後に一過性に Fyn の特異的な活性化が起こり、NMDA 受容体 NR2B サブユニットのチロシンリン酸化も同様に一過性の上昇を示した。これらのリン

酸化の上昇は条件刺激と無条件刺激の連合に依存していた。さらに、Fyn, NR2B 以外にも条件づけに依存してチロシンリン酸化が亢進する蛋白質がいくつか認められた。これらの知見から、短期恐怖記憶の形成には Fyn チロシンキナーゼのシグナル伝達系が関与し、これが NMDA 受容体活性化を引き起こしてシナプス伝達効率の変化を引き起こすことが強く示唆された (Isosaka et al., Eur J Neurosci 2008)。一方、恐怖条件付けをおこなったのち、条件刺激のみを提示すると形成された恐怖記憶が消去される。この消去過程における背側海馬の Fyn シグナル伝達系を調べると、記憶形成過程とは逆に活性化型 Fyn が低下した。しかし、NR2B のチロシンリン酸化の減少は認められなかった。これらの知見から恐怖記憶の消去過程には Fyn シグナル伝達系の活性抑制が起こり、脱リン酸化酵素の活性化が関与することが推測される。また、消去過程における Fyn 下流分子は記憶形成過程と異なっていることが示唆された。今後、このような恐怖記憶の形成と消去の細胞内情報伝達系の分子的差異を明らかにすることにより、消去過程の障害による精神疾患治療の分子標的を見出すことが可能であると考えられる。

(11) 匂い分子が引き起こす嫌悪感や恐怖感を先天的に制御する神経回路

小早川高 (東京大学・理・生物化学)

匂い分子は鼻腔の奥に存在する嗅細胞によって感知され、その情報は脳の嗅球の表面に存在する糸球とよばれる構造体を活性化させる。脳は鼻腔内の匂い分子の情報を、匂い地図と呼ばれる糸球の活性化パターンの図形情報に変換して認識していると考えられている。しかし、匂い地図の情報を脳が読み解いて特異的な情動や行動を引き起こすメカニズムは解明されていなかった。私たちは、嗅覚情報を処理する神経回路の中から、自ら狙った神経細胞のみで、ジフテリア毒素が作り出されるように巧妙にデザインした遺伝子操作マウスを作成した。このマウスでは、ジフテリア毒素が作り出された神経細胞のみが細胞死によって除去され、脳や体の他の組織には直接的な影響が及ばない。私たちの実験方法によって、哺乳類の脳の中の特定の神経細胞を正確に除去した際の、情動や行動への影響を調べるという新しい研究を行える

ようになった。

腐敗物や天敵の匂い分子は、背側と腹側の糸球を同時に活性化する。従って、背側の糸球を除去したミュータントマウス (背側除去マウス) は、腹側の糸球を使うことで、これらの匂い分子を感知することができたとし、微妙な化学構造の違いを区別することもできた。しかし、背側除去マウスは、驚くべきことに、腐敗物や天敵の匂いを嫌なもの或いは危険なものとして忌避行動を示すことが全くできなかった。但し、後天的に学習させれば、背側除去マウスであっても匂いに対して忌避行動を示すことができた。逆に、腹側の糸球を除去したミュータントマウス (腹側除去マウス) は腐敗物の匂いを嫌なものとして判断して先天的な忌避行動を示した。これらの実験結果から、同じ匂いによって活性化される糸球であっても、嗅球の背側に位置するものは先天的な忌避反応を

引き起こしているのに対して、腹側に位置する糸球は後天的な匂いの学習などの全く別の機能を担っていることが初めて明らかになった。腐敗物の匂いは嫌悪、天敵の匂いは恐怖という異なる種類の情動を引き起こすと考えられる。しかし、これらの匂いは共に忌避行動を引き起こすので、単に忌避行動を指標にした行動実験では両者の情動を区別することができない。しかし、脳内のストレス経路の活性化や、すくみ(freezing)行動に着目することで嫌悪と恐怖とを異なる神経回路によって引き起こされる別々の情動として捉えられることが明らかになった。天敵の匂いを嗅がせると、野生型マウスにおいて分界条床核の中央領域と側方領域が同時に活性化されるが、背側除去マウスでは、側方領域のみが活性化される

ことが判明した。また、天敵の匂いによって野生型マウスではストレスホルモンの一種である ACTH の血中濃度が 10 倍程度上昇するのに対して、背側除去マウスでは変化がなかった。これに対して、腐敗物の匂いを嗅がせた際には、野生型と背側除去マウス共に分界条床核の側方領域のみが活性化され、ACTH の血中濃度の上昇は起こらなかった。

これまでの実験で、匂いに対する嫌悪や恐怖の情動や行動を引き起こす神経回路の開始点を糸球ドメインのレベルまで絞り込むことができた。現在、これらの情動や行動を引き起こす神経回路を機能的な最小単位まで絞り込む実験を行っており、その最新の研究成果についても報告する。

(12) 味覚誘発行動・情動の生成機構の解明を目指す味覚伝導路構成ニューロンの可視化と機能解析

杉田 誠^{1,2} (¹ 広島大学医歯薬学・病態探究医科学講座口腔生理 ²PRESTO, JST)

味覚感覚は、脳内の特定の神経回路を活性化し、対照的な嫌悪性・嗜好性の行動的反射や、快・不快の情動を惹起する。苦味感覚は嫌悪性行動と不快感を、甘味/うま味感覚は嗜好性行動と快情動を惹起する。ゆえに、嫌悪性・嗜好性行動の惹起、快・不快の情動の惹起が、脳内のいかなる細胞機能・分子基盤のもとに遂行されているかを解明するために、さらに快・不快の情動がいかに生得的行動(摂食等)を調節するかを解明するために、味覚感覚は非常に有効な感覚であると考えられる。本研究では特定の味覚情報を伝導するニューロン群の脳内での回路様式を、トランスジェニックマウスの作製を通して可視化することを試みた。苦味受容体もしくは甘味/うま味受容体を発現する味細胞に、それぞれ特異的に味覚受容体-GFP 融合タンパク質と経シナプス性トレーサー(tWGA-DsRed)を発現させ、味細胞から経シナプス性に輸送されるtWGA-DsRedにより標識されるニューロンの局在を可視化することにより、苦味および甘味/うま味情報を伝導する脳内神経回路を明らかにすることを試みた。tWGA-DsRedにより標識される脳内ニューロンの局在は前頭断連続切片より検出し、前頭断連続切片像の三次元立体再構築を行うことにより、二種の味覚伝導路を可視化した。味細胞から移行したtWGA-DsRedは延髄孤束核、橋結合腕傍核、視床後内側腹側核、大脳皮質味覚

野、扁桃体中の一部のニューロンと、嗅皮質および大脳皮質体性感覚野(顎・上唇領域)の一部のニューロンで観察された。延髄孤束核・視床後内側腹側核において、甘味/うま味受容体細胞からのtWGA-DsRedを受けとるニューロン群は、苦味受容体細胞からのtWGA-DsRedを受けとるニューロン群に比べ、より前方に配置しており、大脳皮質味覚野と扁桃体においては、前後軸的に部分的重複と分離がみられた。したがって可視化された二種の神経回路の異なりは、苦味・甘味の識別、嫌悪性・嗜好性の行動の惹起、不快・快情動の惹起を可能にする脳内神経基盤の一端を示していることが考えられた。可視化された二種の神経回路の異なりが、苦味・甘味の識別、嫌悪性・嗜好性の行動の惹起、不快・快情動の惹起に関与するかを明らかにするため、tWGA-DsRed 標識ニューロンの細胞体・樹状突起の三次元的空間配置と、tWGA-DsRed 標識ニューロンが保有する細胞機能の連関を比較することを、現在遂行しています。延髄孤束核内において、甘味/うま味伝導路構成ニューロンに比べ後方に分離して集積する苦味伝導路構成ニューロンには、樹状突起を rostral 側に伸張するニューロン、caudal 側に伸張するニューロン、rostral・caudal 両側に伸張するニューロンが分類観察された。免疫組織化学的解析の結果、延髄孤束核内の苦味伝導路構成ニューロンは tyrosine

hydroxylase を発現するカテコールアミン作動性ニューロンであることが示唆された。

(13) 脳機能・分子イメージングによる情動のメカニズム研究

谷内一彦（東北大学・院医学系研究科・機能薬理学）

Positron emission tomography (PET) は消滅 γ 線を用いて正確な微量 3 次元情報を得ることから ART (Annihilation Radiation Tomography) とも呼ばれている。例えば、 ^{18}F -フルオロデオキシグルコース (^{18}F FDG) は生体内のグルコース代謝量を画像化する。腫瘍細胞や心筋、骨格筋など活発に活動する細胞はたくさんのグルコースを消費するため、 ^{18}F -FDG の高い集積を示す。 ^{18}F FDG を用いた PET 検査で数ミリ程度の極早期のガンでも発見することが可能であるため、最近ではさまざまな医療施設で PET 装置が導入されている。PET が特に威力を発揮するのはドパミン、アセチルコリン、ヒスタミン、オピエートなどの神経伝達物質やアミロイド $\text{A}\beta$ タンパクなどの異常タンパク質の分子のイメージングであり、各種脳疾患の機序解明や中枢を標的とした薬剤開発への応用が活発に行われている。

^{15}O H₂O (半減期 2 分) も PET に用いられる放射性標識薬剤で、その拡散性を利用して脳血流を画像化する。

脳内の神経細胞が活動するとその周辺の局所脳血流量が増加するので脳機能イメージングが可能である。ヒトの脳機能イメージングでは現在 fMRI や近赤外光イメージングが主流になっているが、我々は PET による脳賦活研究も必要と考えている。その理由は、①重要な研究テーマについては異なる測定方法で比較研究をする必要がある。②脳の基底部などの血管の多い部位では ^{15}O H₂O-PET 法のほうが fMRI と比較してノイズが少ないことである。

我々は ^{15}O H₂O-PET 法を用いて、抗ヒスタミン薬による眠気と認知機能障害のイメージング、痒みのイメージング、アレキシサイミア性格傾向と脳機能、運転シミュレーション・ゲームを遂行中の脳活動、2 重干渉課題における前頭前野の役割、音の美的印象の脳内基盤などの認知神経科学的研究を行っている。本シンポジウムでは、最近の我々の脳機能・分子イメージングによる情動のメカニズム研究を主に紹介したい。

14. 大脳皮質機能単位の神経機構

2008年11月27日－11月28日

代表・世話人：金子武嗣（京都大学大学院・医学研究科）

所内対応者：川口泰雄（大脳神経回路論研究部門）

（1）In vivo パッチクランプ法を用いた痛覚伝達回路の解析

古江秀昌（九州大学大学院・医学研究院・統合生理学）

（2）マウスを用いたステップパターン学習課題：走行するマウスの神経活動の解析

木津川尚史（大阪大学大学院・生命機能研究科）

（3）軸索終末と終末シュワン細胞はいかに皮膚感覚受容器を構築しているか

榎原智美（明治国際医療大学・医学教育センター・解剖学ユニット）

（4）非合理行動とシナプス学習則

酒井 裕（玉川大学・脳科学研究所）

（5）線条体ストリオソーム/マトリックスの局所神経回路

三浦正巳（東京都老人総合研究所・老化ゲノム機能研究チーム）

【参加者名】

宋 文杰（熊本大学大学院・医学研究科），福田孝一，古江秀昌（九州大学医学研究院），木津川尚史（大阪大学生命機能研究科），金子武嗣，藤山文乃，古田貴寛，日置寛之，中村公一，雲財 知，越水義登，田中琢真（京都大学大学院・医学研究科），青柳富誌生，野村真樹，太田絵一郎（京都大学情報学研究科）榎原智美（明治国際医療大学・医学教育センター）三浦正巳（東京都老人

総合研究所），小島久幸（東京医科歯科大学・医歯学総合研究科），山下晶子（日本大学医学部），酒井 裕（玉川大学・脳科学研究所），坪 泰宏，一戸紀孝（理化学研究所），川口泰雄，窪田芳之，大塚 岳，森島美絵子，重松直樹，植田禎史，平井康治，牛丸弥香（生理学研究所）

【概要】

「大脳皮質機能単位の神経機構」第4回は、狭い意味の大脳皮質神経回路にとらわれず、大脳皮質機能に関わる様々な機能を多角的に検討する会になりました。まず、感覚系の話題提供を古江 秀昌先生（九州大学大学院・医学研究院・統合生理学），榎原 智美先生（明治国際医療大学・医学教育研究センター・解剖学ユニット）にお願いし、体性感覚の情報処理機構について解説していただきました。前者は脊髄および皮質での痛覚情報処理について in vivo パッチクランプ法を用いて解析する話題であり、後者は末梢神経における機械感覚受容の多様性を形態学的に探索したという話題でした。残りの3題は運動系に関わる話題であり、まず木津川 尚史先生（大阪大学大学院・生命機能研究科）には、複雑な運動学習に伴う皮質運動野・線条体のニューロンの活性化について議論していただき、三浦 正巳先生（東京都老人総合研究所・

神経回路動態）には線条体の局所神経回路とニューロンの特性について議論していただきました。酒井 裕先生（玉川大学）には行動学習とシナプス学習則について理論的な話題を提供していただきました。この研究会の最終年度において、いままで詳しく探って来た大脳皮質の機能をもう一度、神経系の機能の全体像の中で見直すことができましたように感じます。

この研究会の顕著な特徴となっているのが、講演中での活発な議論であり、1時間の講演時間に対して概ね1時間半を超す講演と議論になっていました。また、議論の中心も金子・川口等の世代の人ばかりでなく、若年層の研究者による質問・議論が盛んになりつつあります。この研究会では話を遮って質問して良いのだという姿勢が浸透してきているようでして、こうした「がちゃんこ」議論は、通常の学会等では行うことができませんので、

それを可能にする当生理研研究会は貴重な存在であろうと感じています。

(1) In vivo パッチクランプ法を用いた痛覚伝達回路の解析

古江秀昌（九州大学大学院・医学研究院・統合生理学）

最近、炎症モデルにおいて痛覚回路の器質的変化が生じる事が明らかにされ、触刺激を痛みと感じるアロディニア（異痛症）や痛覚過敏の発症機序として注目されている。本研究では、炎症初期の *in vivo* 標本からパッチクランプ記録を行い、脊髄や大脳皮質における痛覚伝達に如何なる変化が生じるかを解析した。

ウレタン麻酔下に、痛みの伝達や修飾に重要な役割を果たす脊髄後角表層、膠様質（第Ⅱ層）細胞から記録を行い、皮膚への生理的な痛み刺激によって誘起される興奮性シナプス後電流 (EPSC) を解析した。行動学的解析から炎症患部へ機械的刺激を加えると逃避行動の閾値が著明に減少した。炎症患部に受容野を持つ膠様質細胞か

ら記録を行うと、振幅が大きく、TTX 感受性の自発性 EPSC が観察された。機械的痛み刺激を加えると EPSC の発生頻度と振幅が著明に増大した。一方、同じ髄節レベルの膠様質細胞で炎症患部から離れた皮膚に受容野を持つ細胞から記録を行うと、振幅の大きな自発性 EPSC の発生頻度も低く、刺激誘起の応答も小さかった。また、これらの EPSC の電流-電圧曲線から、患部に受容野を持つ細胞に誘起される EPSC に Ca^{2+} 透過性 AMPA 受容体を介するものが多く含まれる事が示された。また、大脳皮質第 1 次体性感覚野では炎症患部に受容野を持つ細胞のなかに自発性の活動電位を発生し、痛み刺激によって活動電位の発生頻度が増大する細胞が多く観察された。

(2) マウスを用いたステップパターン学習課題：走行するマウスの神経活動の解析

木津川尚史（大阪大学大学院・生命機能研究科）

楽器の演奏や発話、歩行など、複数の動作が連続してリズムカルに行われることによってはじめて意味をなす行動があります。そのような運動の遂行には、要素となる一つ一つの動作が正確に行われることはもちろん、それらの動作が順序よく正確なタイミングで行われることが要求されます。

私たちは、そのような運動やその学習の神経機構を解明することを目的として、マウスのステップパターンを制御するホイール走行装置を作製しました。この装置では、一定のスピードで回転するホイール中を、特定のステップパターンで走るようにマウスは訓練されます。マウスのステップ一歩一歩は単純な運動ですが、複雑に組

み合わされた一連のステップを効率よく走り続けないと、報酬である水を飲み続けることができません。未経験のパターンに遭遇した時にはマウスは最初うまく走れませんが、しばらくするとかなり複雑なパターンでもステップを空間的・時間的に調節して走れるようになることがわかってきています。

また、大脳皮質運動野と線条体がこのステップ走行学習に関与している可能性が高いことを組織化学的手法により見出しています。現在、走行するマウスの脳のこれらの部位から神経活動の記録を行っており、この結果についても紹介したいと思います。

(3) 軸索終末と終末シュワン細胞はいかに皮膚感覚受容器を構築しているか

榎原智美 (明治国際医療大学・医学教育センター・解剖学ユニット)

皮膚感覚を末梢端で担う感覚受容器の形態的最小単位は、自由神経終末の一部を除き、有髄線維が末端でミエリンを失う地点 (terminal point (TP)) より先で、軸索終末 (axon terminal (AT)) と終末シュワン細胞 (terminal Schwann cell (TSC)) により構成される。ATは多様に分岐し、肥厚することが多い。TSCsは、ATsから少し離れた細胞体から複数の突起を伸ばし、個々のATに、ミエリンのないシュワン鞘を与える。この最小単位の形態的特徴により、受容器は分類される。近接する複数の最小単位が集積したものが、しばしば、ひとつの受容器とみなされる。

(参照: <http://pns.ucsd.edu/Winkelman.images/index.html>)

ネコの指先皮膚ヒダで、1本の剛毛を取り囲む約130個のメルケル細胞を包括する毛盤の、TPは15を数えた。ATsは、TPの末梢側で、それぞれさらに網状に分岐し、複数のメルケル細胞に小盤を付着させてメルケル終末を形成し、求心側では、唯1本の基幹有髄線維に収束した。顔面ヒゲ洞毛には、1TPの先で分岐しない短い棍棒状の終末もあり、毛包の特殊な位置に、毛軸と平行に整然と配列する。なお、複数のTPsを連携するTSCsもある。

神経終末の特徴的な形態と、基幹線維に至るまでに經由するRanvierの絞輪のtopologyが、その受容器の反応特性を示唆している。

(4) 非合理行動とシナプス学習則

酒井 裕 (玉川大学・脳科学研究所)

動物はしばしば、報酬を最大化するような合理的な意思決定の仕方を学習できずに、非合理的な行動を示すことがある。しかも、非合理的な意思決定の仕方は無数に存在する中で、特定の法則性を示すことがある。このような法則性を生み出す学習アルゴリズムを絞り込むことで、報酬最大化という本来の目的以外の脳の学習原理を探っていくことができる。さらにその学習原理を実現するシナプス学習則に必要な性質を導くことができる。

ここでは、確率的に報酬が与えられる単純な選択課題に

おいて観測される非合理行動として知られているマッチング行動に注目する。その法則性が出る学習アルゴリズムに共通の性質を明らかにし、シナプス学習則として必要な性質を導く。また、この種の学習戦略は、一見、非合理的ようであるが、意思決定に用いる情報源を適切に探索するメカニズムと共に用いれば、最終的に報酬最大化できることが示せる。つまり、マッチング行動を生む学習戦略自体は合理的であるが、適切な情報源を探索できていない段階で非合理的な行動が顕れるのではないかと考えられる。

(5) 線条体ストリオソーム/マトリックスの局所神経回路

三浦正巳 (東京都老人総合研究所・老化ゲノム機能研究チーム)

線条体のストリオソーム (パッチ) とマトリックスは、解剖学的、神経化学的に多くの違いがあるため、機能的コンパートメントといわれている。近年、両者の神経活動のバランスの崩れと運動異常の関係が示唆された。しかし、ストリオソーム/マトリックス間には直接の投射が

ないので、両者が協調して働くとすれば、インターニューロンを介して影響を及ぼしあっている可能性がある。例えば、ストリオソームとマトリックスの境界に偏在するコリン作動性インターニューロンが、コンパートメント間の情報伝達の仲立ちをするモデルが提唱されて

きた。

しかしながら、ストリオソーム/マトリックスをとりまく局所神経回路は、ほとんど生理学的には調べられていない。そこで、ストリオソームを EGFP で識別できるトランスジェニックマウスを用い、ペアレコーディングなどの手法で、局所神経回路を解析した。ストリオソーム

に発現しているミューオピオイド受容体によるシナプス伝達の調節作用、コリン作動性インターニューロンと投射ニューロンの関係、また、アセチルコリンが GABA 性シナプス伝達について及ぼす影響について報告し、ストリオソーム/マトリックスの局所神経回路モデルについて考察したい。

15. 第2回 Motor Control 研究会

2008年5月29日－5月31日

提案代表者：五味裕章 (NTT 基礎研)

世話人：田中真樹 (北大医学研究科)

所内対応者：伊佐 正, 関 和彦 (生理研・認知行動発達)

特別講演 大脳皮質の神経生理学的研究—40年の流れ

酒田英夫 (東京聖栄大学)

(1) 視覚運動変換学習に関連したサル脳部位のPETによる同定

宮下英三 (東工大院・総理工)

(2) 一時間の試行中断によるプリズム順応の固定

落合哲治 (順大・医・生理学)

(3) 反対側上肢運動に応じた運動学習メモリの切り替わり

横井 惇 (東大院・教育・身体教育学)

(4) 力場環境下における内部モデルの不完全性とインピーダンス制御による適応

登美直樹 (東工大院・総理工・知能システム科学)

(5) 徐々に生じる視覚運動適応学習の座標系

山本憲司 (放医研・分子神経イメージング)

(6) 上肢到達運動における座標変換と筋活動選択を行うニューラルネットワークモデル

平島雅也 (東大院・教育・身体教育学)

(7) 奥行き方向の注視距離が到達運動の速さおよび正確さに与える影響

國部雅大 (京大・院・人間環境)

(8) 姿勢の安定性に伴う視覚誘導性腕反射応答のゲイン変化

門田浩二 (ST-ERATO 下條潜在脳機能プロジェクト)

(9) 運動皮質 - 視床下核投射が運動制御において果たす機能の解明

額根大輔 (京大・霊長研・行動発現分野)

(10) 運動実行・認知処理頻度の制御に関わる基底核皮質活動

花川 隆 (NCNP・神経研・疾病研究第七部)

(11) 眼球運動の随意性制御における運動性視床の関与

國松 淳 (北大院・医・認知行動学)

(12) 多段階報酬の学習と比較による行動決定

鮫島和行 (玉川大・脳研)

(13) 熟練ドラム奏者の最速スティッキング制御

藤井進也 (京大・院・人間環境)

(14) 熟練ピアニストの打鍵動作における重力の利用

古屋晋一 (関学・理工・情報科学)

(15) 心理的ストレスがピアノ奏者の筋活動及び打鍵強度に及ぼす影響

吉江路子 (東大・院・総合文化)

(16) 個々の指の運動機能に対する長期的訓練の効果

青木朋子 (熊本県立大・環境共生)

(17) 視覚情報に依存した左右指運動を規定する基準座標系

櫻田 武 (東工大院・総理工・知能システム科学)

- (18) 片腕・両腕運動時の運動学習過程の数学モデル：空間構造と時間的動態の密接な関係
野崎大地（東大・院・教育）
- (19) 車体型 BMI「ラットカー」における運動皮質および大脳基底核の同時計測系
深山 理（東大・情理）
- (20) Stop Signal 課題における運動抑制の体部位局在性
美馬達哉（京大院・医・高次脳）
- (21) 磁気共鳴機能画像 (fMRI), 筋電図 (EMG), 経頭蓋磁気刺激 (TMS) の同時計測に関する基礎的検討
設楽 仁（精神・神経センター研）
- (22) 適応機能を有する筋電義手を用いた運動機能再建に関する研究
加藤 龍（東大院・工・精密機械）
- (23) 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（生理研・認知行動発達）
- (24) 一次運動野の機能脱失にともなう鏡像運動の生成機構
坪井史治（総研大院・生命・生理, 生理研・認知行動発達）
- S (1) 視覚と運動感覚を用いた手の位置知覚
羽倉信宏（NICT/ATR 脳情報研）
- S (2) 環境適応的な随意運動を可能とするリアルタイム制御機構
富田 望（東北大学・電気通信研究所）
- S (3) Frontal activity and intelligence in action
Xiaofeng Lu（陸 曉峰）（順大・医・生理）
- (25) 他者の手の力発揮の視覚情報が自己の力発揮に与える影響
廣瀬智士（京大・院・人間環境）
- (26) 7b 野・VIP 野の多種感覚領ニューロンによる自他身体のマッチング機能
石田裕昭（近畿大, 医, 第一生理）
- (27) サル AIP 野における手操作関連神経活動の情報量解析
石田文彦（電通大院・情報システム学）
- (28) MST 野の破壊が短潜時腕応答に及ぼす影響
竹村 文（産総研・脳神経）
- (29) 手を動かす視覚, 眼を動かす視覚
五味裕章（NTT コミュニケーション科学基礎研究所, 下條 ERATO プロジェクト）
- (30) 複雑な運動における軌道計画
小池康晴, 神原裕行（東京工業大学精密工学研究所, JST CREST）
- (31) サルのトレッドミル歩行に伴う一次運動野の神経細胞活動
中岡克己（近畿大・医・生理 1）
- (32) 下肢ペダリング運動が上肢皮膚反射に及ぼす影響
笹田周作, 田添歳樹, 中島 剛, 小宮山伴与志
（東京学芸大院・連合学校教育, 国立身障者リハセンター・運動機能系障害, 千葉大・教育）
- (33) 受動歩行時における足関節屈筋および伸筋の皮膚反射動態について
中島 剛, 上林清孝, 高橋 真, 小宮山伴与志, 中澤公孝（国リハ研・運動障害部）
- (34) 求心路の可逆的遮断のための冷却方法の提案
原 昌宏¹, 宮下英三², 阪口 豊¹
（¹電通大院・情報システム学・人間情報学, ²東工大院・総理工・知能システム）

- (35) 表面筋電信号に基づいた神経疾患における運動機能の定量的な評価に関する研究
李 鍾昊, 笥 慎治 (東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所, 認知行動研究部門)
- (36) 末梢神経信号の方向別信号分離—末梢神経を介した運動制御を目指して—
伊藤孝佑, 鈴木隆文, 満洲邦彦 (東大院・情報理工・システム情報)
- (37) 短期間の関節固定・非荷重が脳波-筋電図コヒーレンスに与える影響
遠藤隆志¹, 花村 学², 牛場潤一³, 米田継武⁴, 櫻庭景植⁴
(¹国リハ研・運動機能, ²順大院・スポーツ健康科学, ³慶大・工・生命情報, ⁴順大・スポーツ健康科学)
- (38) 脊髄内微小刺激によって把握運動を誘発する
関 和彦, Andrew Jackson, 鈴木隆文, 竹内昌治, 武井智彦, 五條理保
(生理研・認知行動, ニューカッスル大学, 東大・情報理工, 東大・生産研)
- (39) 手首運動における小脳 Golgi 細胞の活動と役割
戸松彩花, 笥 慎治 (東京都神経科学総合研究所, 認知行動研究部門)
- (40) 運動学習の分散効果と運動記憶の転移
岡本武人, 白尾智明, 永雄総一
(群馬大学大学院・神経薬理, 理研脳センター・運動学習制御研究チーム)
- (41) 大脳-小脳連関の謎 I. 橋核での中継
笥 慎治, 角田吉昭, 戸松彩花, 李 鍾昊 (東京都神経研・認知行動)
- (42) 小脳プルキンエ細胞におけるニューロン活動の regularity の解析
小林 康, 岡田研一, 河野憲二, 竹村 文
(大阪大学・生命機能研究科, 京都大学・医学研究科, 産業技術総合研究所)
- (43) サル前頭前野内側皮質における時間長の認知と検出
湯本直杉, 陸 曉峰, 宮地重弘, 南部 篤, 深井朋樹, 高田昌彦
(東京都神経研・統合生理, 順天堂大・医・第一生理, 京大霊長研・行動神経,
生理研・生体システム, 理研・BSI・脳回路機能理)
- (44) Missing 刺激を用いた時間情報処理機構の探索
田中真樹, 田代真理 (北大院・医・認知行動, JST・さきがけ)
- (45) 離散運動と周期運動の間の非対称な学習転移
池上 剛, 平島雅也, 多賀巖太郎, 野崎大地 (東大・教育)
- (46) 前頭前野腹側部から運動前野背側部への経シナプス投射
高原大輔, 星 英司, 宮地重弘, 井上謙一, 南部 篤, 高田昌彦 (東京都神経研・統合生理,
生理研生体システム, 総研大・生命科学, 玉川大・脳科学研究所, 京大霊長研・行動発現)
- (47) 視覚運動変換における運動前野背側部と腹側部の機能的差異
星 英司, 中山義久, 山形朋子 (玉川大学・脳科学研究所)
- (48) 系列指運動課題セットの切り替えに関わる脳活動
細田千尋, 花川 隆 (神経研・疾病研究第七部, 東京医科歯科院)
- (49) 歩行運動の中枢制御機構: システム構成原理の解明
松山清治 (札幌医大・保健医療・作業療法)
- (50) 二足歩行運動に大脳皮質機能は必要なのか?
森 大志, 中階克己 (山口大学・獣医・生体システム科学, 近畿大学・医・生理)
- (51) 遺伝子改変マウスを用いた歩行 CPG の研究
西丸広史 (筑波大院・人間総合科学・基礎医学系・生理)

(52) 随意運動の空間表現は不随意的な実時間運動制御に影響を与えるか？

安部川直稔, 五味裕章 (NTT コミュニケーション科学基礎研究所・人間情報研究部,
JST・ERATO 下條潜在脳プロジェクト)

(53) ヒトの視覚誘導性 switching 運動と一次視覚野

大木 紫, 渋谷 賢, 関口浩文, 門田 宏, 竹内成生, 中島八十一 (杏林大・医・生理,
国立リハセンター研究所・感覚障害部, 早稲田大・科健機構, 芝浦工大院・工・機能制御)

(54) 脳梁間線維を介した連合性対刺激法による運動皮質の可塑性誘導

小金丸聡子, 美馬達也, 中塚昌博, 植木美乃, 福山秀直
(京大院・医・高次脳機能総合研究センター)

(55) サルを対象とした脳活動からの行動予測

竹中一仁¹, 長坂泰勇², 入来篤史², 國吉康夫¹, 藤井直敬²
(¹ 東大院・情報理工・知能機械, ² 理研・BSI)

(56) 硬膜外電位計測による運動意図推定技術の研究

上嶋健嗣, 藤井俊行, 瀧田正寿, 横井浩史 (東大院・工・精密機械工, 産総研・人間福祉医工学)

(57) 随意運動を生ずる意思の脳機構

松橋眞生, Mark Hallett, 美馬達哉, 福山秀直
(京工繊大・ベンチャーラボ, 京大院・高次脳センター, HMCS/NINDS)

S(4) 腕到達運動の視覚誤差情報に応じた学習戦略の変化

西條直樹, 五味裕章 (NTT コミュニケーション科学基礎研究所, ERATO 下條潜在脳プロジェクト)

S(5) 価値と戦略に基づいて選択の結果を評価する線条体神経細胞活動

山田 洋, 井ノ川仁, 木村 實 (京都府立医科大学・神経生理学)

S(6) 脊髄は手の運動をどのように制御しているのか？

武井智彦 (生理学研究所)

【参加者名】

酒田英夫 (東京聖栄大学), 福士珠美 (JST), 高原大輔 (総研大), 五味裕章 (NTT 基礎研), 山田 洋 (京府大・神経生理), 小林 康 (阪大・生命機能), 木下 博 (阪大・医), 青木朋子 (熊本大・環境共生), 松山清治 (札幌医大・保健医療), 國松 淳 (北大・院・医), 岡本武人 (群大・院・医), 宮下英三 (東工大・院・総理工), 小幡哲史 (阪大・院), 程 殷傑 (東工大・院・総理工), 櫻田 武 (東工大・院・総理工), 中原裕之 (理研・脳総研), 坪井史治 (総研大), 設楽 仁, 細田千尋, 花川隆 (精神・神経センター研), 大前彰吾 (順大・院・医), 中村加枝 (関西医大・第二生理), 西條直樹 (NTT 基礎研), 大木 紫 (杏林大・医), 阪口 豊 (電通大・院・情報システム), 野崎大地 (東大・院・教育), 西丸広史 (筑波大・院・人間総合科学), 戸松彩花 (都神経研・認知行動), 田代真理 (北大・院・医), 石田文彦 (電通大・情報システム), 山本憲司 (放医研・分子イメージング), 小金丸聡子 (京大・高次脳機能), 登美直樹 (東工大・院・総合

理工), 横井 惇 (東大・教育), 田中真樹 (北大・院・医), 笹田周作 (学芸大・院・連合学校教育), 原 昌宏 (電通大・情報システム), 羽倉信宏 (NICT/ATR) 池上 剛 (東大・院・教育学), 高草木薫 (旭川医大・医), 星 英司 (玉川大・脳科学), 中階克己, 村田 哲 (近大・医), 大須理英子 (NICT/ATR), 宮地重弘 (京大・霊長研), 小池康晴 (東工大・精密工学), 上林清孝 (筑波大・院・システム情報工学), 内藤栄一 (NICT/ATR), 平島雅也 (東大・院・教育学), 北澤 茂 (順大・医), 中島 剛 (国立リハ研・運動機能), 古屋晋一 (関学大・理工), 竹中一仁 (東大・院・情報理工), 深山 理 (東大・院・情報理工), 湯本直杉 (都神経研・統合生理), 廣瀬智士 (京大・院・人間環境), 竹村 文 (産総研・脳神経情報), 上原信太郎 (京大・院・人間環境), 森 大志 (山口大・農学獣医), 額額大輔 (京大霊長研), 小原一樹 (京大・院・人間環境), 石川拓海 (電通大・院・情報システム), 渋谷 賢 (杏林大・医), 寛 慎治 (都神経研・認知行動),

國部雅大 (京大・院), 伊藤孝佑 (東大), 美馬達哉 (京大), 大藤智世 (筑波大), 落合哲治 (順大), 吉安亮介 (京大), 陸 暁峰 (順大), 松橋眞生 (京都工芸繊維大), 香川高弘 (名大), 宇野洋二 (名大), 中尾和子 (関西医科大学), 遠藤隆志 (国立リハ研), 内田雄介 (早大), 上嶋健嗣 (東大・院), 鈴木隆文 (東大), 池田琢朗 (生理研), 門田浩二 (JST), 加藤 龍 (東大), 鹿内新平 (東大), 松崎竜一 (関西医大), 大築立志 (東大・院), 平野 剛 (東大・院), 近藤玄大 (東大), 三浦哲都 (東大・院), 富田 望 (東北大), 藤井進也 (京大), 吉江路子 (東大), 石田裕昭 (近大・医), 藤井直敬 (理研), 鮫島和行 (玉川大・脳科学), 関 和彦 (生理研), 安部川直稔 (NTT・

基礎研), 福井隆雄 (NTT・基礎研), 李 鍾昊 (都神経研), 南部功夫 (奈良先端大), 村岡哲郎 (早大), 鈴木裕輔 (奈良先端大), 水口暢章 (早大・院), 有村奈利子 (名大), 杉本健治 (愛知県厚生連 足助病院後), 石田文彦 (電通大), 鯨井 隆 (山形県立保険医療大), 大見健輔 (岡崎東病院), 鈴木啓介 (理研 BSI), 一戸紀孝 (理研 BSI), 南部 篤, 畑中信彦, 橋本章子, 加勢大輔, 平松千尋, 佐々木章宏, 渡辺秀典, 鯨井加代子, 原田卓弥, 定藤規弘, 斉藤紀美香, 上條真弘, 金田勝幸, 平井真洋, 郷田直一, 小松英彦, 岡本悠子, 吉田優美子, 岡澤剛起, 武井智彦, 梅田達也, 杉山容子 (生理研)

【概要】

平成 19 年に開催された当該研究会には合計 130 人, 平成 20 年度には 108 名の参加があった。前年度の世話人は北海道大学の田中真樹 (准教授) であった。参加者の平均学位習得後年は 3.8 ± 7 年であり, また工学・体育・リハビリテーションなど学際分野からの参加者が大半をしめた。従って, 若手・中堅中心の学際分野を含めた参加者が多数集まるという目的は達成されていると考えられる。また本研究会ではボトムアップ的な運営を行うという方針から, 希望者には全員口演発表をしてもらうという新たな試みを行った。その結果, 合計 57 の口演+ポスター発表があり, 活気のある議論が行われた。さらに, 研究会以降も参加者同士のコミュニケーションや議論を活発化する意図で, 統合脳 5 領域が口演している「神経科学者 SNS」内の「生理研 MotorControl 研究会コミュニティ」を立ち上げた。その結果, 参加者のほとんどがコミュニティメンバーとして登録があり, 研究会直後から

活発な議論が交わされた。さらにベストプレゼンテーション賞などの新たな試みも第 2 回で定着してきた。また今回新たに行った, 特別講演では長年頭頂葉の研究に関わり, 世界の研究をリードされてきた酒田英夫先生にお願いし, 若い世代研究者にとっては今後の研究生活のよい指針となった。さらに新たに行ったランチョンシンポジウムでは, 生理学だけでなく工学・心理学など学際分野で活躍している PD や若手研究者に講演をいただいた。普段の学会シンポジウムでは聞くことのできない多様な分野の話が聞けると, 参加者にも好評であった。以上のように, 今年度の本研究会の目的は達成され, ほとんどの参加者から次年度以降の参加の意思表示があった。本研究会によって, これからの我が国の, 学際分野としての運動制御研究の基盤となる研究者が一同に会することができた意義は大きい。今後, この交流を基盤に当該研究分野が飛躍的に発展することが期待される。

特別講演 大脳皮質の神経生理学的研究—40年の流れ

酒田英夫 (東京聖栄大学)

私が東大脳研生理 (医学部脳研究施設生理学部門) の大学院に入学したのが 1960 年, ちょうど 60 年安保と呼ばれる日米安全保障条約に対する反対運動が空前の盛り上がりを見せている最中でした。それから 2000 年に日大医学部を定年退職するまでの 40 年間に大脳皮質の神経生理学的研究は大きな変貌を遂げ, 研究の中心は第 1 次

運動野と感覚野から連合野に移りその中でもより高次の領域に広がりつつあります。そこでこの機会に私自身が研究した頭頂連合野を中心に研究の流れを振り返ってみたいと思います。

1960 年に私が手がけたテーマは海馬の CA1 領域の樹状突起に活動電位が発生するかどうかという問題でした。

先輩の藤田安一郎さんの手伝いで始めた研究でしたが、そもそも海馬がどういう機能を持つ領域なのか何も知らず、藤田さんも何も教えてくれないまま闇雲に細かい層別分析などをしていました。実は私に脳研究の面白さを教えてくれた時実利彦先生は1960年に「よろめく現代人一相争う二つの心をどう操るか」という本を講談社のミリオンブックスの一冊として出版しました。その第11章「体験と知識」（記憶はどうして作られるか）の中で先生はただ一度だけの体験が長い間印象として残るのは「古い皮質」の海馬に直接貯えられるからである。それに対して反復して覚える知識としての記憶は「新しい皮質」の側頭葉を介して貯えられると述べています。今で言うエピソード記憶には海馬が不可欠であり、知識としての意味記憶は必ずしも海馬を必要としないという臨床神経心理学の新しい理論とよく一致します。その証拠として海馬刺激によって犬がなにかを探すような探索行動を起す実験を図示しています。せっかく記憶の座である海馬の神経活動を記録しながら、記憶とのつながりを調べようとしなかったわが身の愚かさを今になって痛感しています。

という訳で私の大脳皮質の神経生理学的研究は大学院を修了して大阪市立大学医学部の浅沼広先生との共同研究に参加してから始まったというべきでしょう。浅沼さんは大脳皮質運動野を微小電極で刺激する ICMS (intracortical microstimulation) という方法を開発し運動野の体部位局在を細かく調べ同時に同じ電極で運動野ニューロンの活動を記録して入出力関係を明らかにしようとししました。目標は運動野で機能的コラムを証明することでした。当時 V.B. Mountcastle が体性感覚野で発見した機能的コラムと Hubel & Wiesel が視覚野で発見した方位コラムが良く似ていることから大脳皮質の情報処理の基本単位としてコラム構造が脚光をあびていたからです。確かに同じ運動を起す領域が縦に並ぶ傾向は見られましたがその機能的意義ははっきりしませんでした。

1967年に私は Johns Hopkins 大学の V.B. Mountcastle 教授のところに留学して体性感覚野ニューロンの振動刺激に対する反応を分析しました。その実験の中で皮膚表面の動きに反応する方向選択性ニューロンが見つかりました。大学院入学のころ発表された Hubel & Wiesel の視覚野の単純細胞と複雑細胞の論文に深い感銘を受けていた私は、体性感覚野にも似たようなニューロンがあることを知って大変興味を惹かれぜひ詳しく調べてみたいと

提案しました。しかし Mountcastle 先生はあまり乗り気ではありませんでした。そこで、いっそのこと日本に帰ったら体性感覚野より高次の頭頂連合野でもっと複雑な刺激に反応するニューロンを調べてみようと考えてしばらく待つことにしました。1968年の秋に帰国してみると70年安保と大學紛争が重なってとても研究どころではなく、まもなく基礎医学棟は封鎖され日本赤軍の拠点になってしまいました。こんな時に、開所したばかりの京大霊長研で共同研究員の募集があり、時実先生と久保田さんの御好意でサルの実験を始めることができたのは大変幸運でした。この時最初に手を付けたのは体性感覚野のすぐ後ろにある Brodmann5野の体性感覚ニューロンでした。そこで驚くほど複雑で多彩なニューロンが記録されました。主なものは関節組み合わせニューロンと関節皮膚組み合わせニューロンで、もっとも複雑なのは両方の手または手と足を擦り合わせたときに最適の反応を示すニューロンでした。

1972年に東京都神経研に移った私は再度 Mountcastle のところに留学しました。今度は行動するサルで下頭頂小葉 (Brodmann7野) のニューロン活動を記録する実験に参加しました。ここは5野とは全く違って体性感覚刺激に反応するニューロンはほとんどなく到達運動 (Reaching) や把握運動、追跡眼球運動や注視運動など手や眼の運動に関係の深いニューロンが記録されました。Mountcastle は運動との関係を重視して指令機能に関係があるという解釈を取りましたが、私は頭頂葉が後連合野に属することから、むしろ知覚との関係が深いのではないかと考えました。帰国してから始めた実験で追跡ニューロンが背景の網膜像の動きに反応することから視覚性のニューロンであることを証明しました。同様に注視ニューロンも大部分が目標の空間的位置を表象する知覚性のニューロンであることを明らかにしました。

1982年に発表された Ungerleider & Mishkin の「大脳皮質の二つの視覚経路」の考えはその後の視覚関連領域の神経生理学的研究に大きな影響を与えました。私たちも頭頂連合野が空間視の中核であるという考えに共鳴して純粋に視覚的ニューロンを探してまず MST 野が運動視の高次中枢であることを明らかにしました。特に回転運動に選択的に反応するニューロンの中には奥行き回転に選択的に反応するニューロンもあって MST が空間の中の運動を知覚する領域であることが明らかになりました。

80年代後半には前からの懸案であった手の把握運動

の視覚的制御に関係する AIP 野のニューロン群を記録して手の運動と視覚のどちらにより深い関係があるニューロンかをあきらかにしました。特に意外な発見は純粋に視覚的なニューロンの中に対象の三次元的な形に選択的に反応するニューロンがあったことです。

最も新しい研究は立体視の高次中枢である CIP 野の発見です。これは空間視の心理物理学的研究で有名な J.J.

Gibson の研究を基礎にした David Marr の視覚の計算論から導かれた奥行き知覚の理論を実証する研究です。今までのところ「両眼視差の勾配から平面の傾きへ」と「肌理の勾配から平面の傾きへ」を計算しているニューロンが見つっていますが3次元図形の知覚という最終目標のための情報処理の実態は将来の課題です。

(1) 視覚運動変換学習に関連したサル脳部位の PET による同定

宮下英三, 小松三佐子, 程 殷杰, 塚田秀夫, 尾上浩隆

(東工大院・総理工, 浜松ホトニクス・中央研究所, 理研・分子イメージング)

本研究は視覚運動変換学習に関連したサルの脳部位を同定することを目的とする。視覚運動変換学習課題遂行中のサル1頭の脳血流量(CBF)を陽電子照射断層撮影装置(PET)を用いて計測した。PET計測環境下で課題遂行が可能ないように開発した二次元 SPIDAR (Space Interface Device for Artificial Reality)を用いて、中心から周辺8方向への到達運動を右手でサルに訓練した。学習課題として、画面中心を座標原点として反時計回りに45°回転し

た位置に提示された手先位置の視覚フィードバックを用いて到達運動を遂行させた。学習課題遂行中の CBF を解析した結果、左半球の一次体性感覚野、5野、内側頭頂間溝皮質では学習の進行に伴って CBF が減少したのに対し、右半球の眼窩前頭前皮質尾側部、側坐核、7m野、および、左半球の V4 野、外側後頭頭頂皮質では学習の進行に伴って CBF が増加した。

(2) 一時間の試行中断によるプリズム順応の固定

落合哲治, 北澤 茂 (順大・医・生理学)

標的への手の到達運動は、プリズムにより視覚入力情報をシフトさせると誤差が生じることが知られている。この運動誤差は試行を繰り返すことにより学習により修正され、小脳がこの過程に重要であると考えられている。その後プリズムを取り除くとプリズム順応の after-effect により逆方向の誤差が出現する。我々は以前にニホンザルを用いた実験で、250 試行の学習の後に 24 時間経過す

ると after-effect はほぼみられないが 500 試行の学習の後であれば72時間経過しても after-effect が観察されることを報告した。今回、我々は 300 試行のプリズム順応の途中でニホンザルに1時間試行を強制的に中断させてその効果を観察した。結果、同回数(300 試行)のプリズム順応を時間的に連続して行った場合より有意に大きな after-effect が認められた。

(3) 反対側上肢運動に応じた運動学習メモリの切り替わり

横井 惇, 平島雅也, 野崎大地 (東大院・教育・身体教育学)

両腕を協調させて動かして外界に働きかける場合、一方の腕の運動は物体や環境を介して他方の左腕が置かれ

ている力学的状況を変化させる。このような複雑な力学的相互作用のもとで運動を行うためには、一方の腕の運動学習のための脳内過程（メモリ）が他方の運動状況によって切り替わる仕組みが必要である。我々はこの仮説を検証するため、両腕リーチングにおける運動学習中に右腕の運動方向を変化させる実験を行い、右腕の運動方向が左腕の運動学習に及ぼす影響を検討した。まず被験

者は両腕リーチング課題中に左腕にかけられる力場を学習する。次にランダムに力場を切るキャッチ試行を行い、右腕の運動方向を左腕と同方向 (parallel) と逆方向 (anti) として、後効果の大きさを調べた。その結果、parallel 条件と anti 条件では後効果の大きさに有意な差がみられ ($P<0.05$), 上記運動学習メモリ切り替わり機構の存在が示唆された。

(4) 力場環境下における内部モデルの不完全性とインピーダンス制御による適応

登美直樹, 郷古 学, 伊藤宏司 (東工大院・総合理工・知能システム科学)

対象物操作など、外力拘束環境下で腕運動を行う際には、人間の中枢神経系は、内部モデルを用いた制御と筋の粘弾性を利用したインピーダンス制御をフィードフォワード的に協調させて動作させる必要がある。本研究では、腕に加わる外力パターンを複雑化させた際に、人間が学習する環境の内部モデルが不完全となり、その状況下で補完的にインピーダンス制御が使用されることを実験的に示す。実験課題として、被験者には力場環境下で

の2点間到達運動学習を行わせた。この際、回転性の速度依存力場と位置依存力場を線形に足し合わせて合成力場を構成し、これに対する到達運動の適応プロセスを解析した。実験を行った結果、被験者は合成力場に関する正確な内部モデルを学習しておらず、運動前半の速度依存の負荷に対してはインピーダンス制御、運動終盤の位置依存の負荷に対しては内部モデルを用いた制御を主要な補償法として適応していることが示された。

(5) 徐々に生じる視覚運動適応学習の座標系

山本憲司, ドナ・ホフマン, ピーター・ストリック
(放射線医学総合研究所・分子神経イメージング, ピッツバーグ大学医学部神経生物学部)

徐々に生じた視覚運動適応の後効果は長く続いた (Yamamoto et al., 2006)。この適応の生じる座標系を調べた。ヒト被験者は、手の平が下の状態 (pronation: Pro) と手の平が横の状態 (midway: Mid) で手首運動用バーを握り、モニター上のカーサーを中心ターゲットから周辺 8 方向のターゲットに入れるために手首を動かした。Pro での左上への手首の動きは、Mid では外部、筋肉、関節座標系でそれぞれ左上、上、右上への手首の動きに相当

する。Pro で左上ターゲットに繰り返し手首を動かすときに、バーとカーサーの動きの間に徐々にずれを与え 120 試行で 40 度のずれを作った。Pro では左上方向に大きな後効果が生じた。Mid でも多くの被験者が左上に動かすときに大きな後効果を示した。この結果は、徐々に生じる視覚運動変換適応は空間座標系で運動をコードする脳部位で生じることを示唆する。

(6) 上肢到達運動における座標変換と筋活動選択を行うニューラルネットワークモデル

平島雅也, 野崎大地 (東京大学・大学院教育学研究科・身体教育学)

目標到達運動を行うには、空間内での運動表現から身体座標での運動表現に変換する必要がある。また、ヒトの冗長な筋骨格系においては、無数の解の中からある 1 つの筋活動パターンを選ぶ必要がある。本研究では、この 2 つの問題を同時に解決する皮質ニューラルネットワークモデルを提案する。本モデルでは、一次運動野 (M1) ニューロンは後頭頂葉 (PPC) からの入力で発火し、各々が多数の筋に接続している。また、誤差フィードバック

によって PPC から M1 へのシナプスの重みが修正される。このモデルに、到達動作の初期加速度を生成する課題を学習させたところ、筋の機械的作用方向 (MD) と最適方向 (PD) のずれや、M1 ニューロンの PD 分布の偏りなど、特徴的な知見を再現することができた。これらの結果は、誤差フィードバックの備わった M1 の多入力多出力構造が、座標変換と筋活動選択のための神経基盤であることを示唆している。

(7) 奥行き方向の注視距離が到達運動の速さおよび正確さに与える影響

國部雅大, 小田伸午 (京大・院・人間環境)

奥行き方向に対して肢の到達運動を行う際には、両眼が非共役的に動いて奥行き注視の調節を行う輻輳及び開散眼球運動が重要となる。本実験では、注視点を予め近方および遠方に向けることが、奥行き方向への到達運動の制御に与える影響を調べることを目的とした。被験者は右手示指を前方 20cm に位置させた状態で、近方 (20cm) あるいは遠方 (60cm) の LED を注視して準備し、前方 3 ヶ所 (30, 40, 50cm) に呈示された LED ターゲット

への眼球運動と到達運動を行った。その結果、遠方注視条件では、近方注視条件に比べて有意に手の到達運動が速く、空間的なばらつきが小さかった。また到達運動中の眼球運動は、輻輳が開散に比べて安定していた。さらに眼球運動のみの測定においても、輻輳が開散に比べ速くかつ安定していた。奥行き方向への到達運動を制御する際には、輻輳及び開散眼球運動が影響を与える可能性が示唆された。

(8) 姿勢の安定性に伴う視覚誘導性腕反射応答のゲイン変化

門田浩二, 五味裕章

(ST-ERATO 下條潜在脳機能プロジェクト, NTT コミュニケーション科学基礎研究所)

到達運動中に視野背景が運動すると、その運動方向に追従する腕応答が観察される (視覚誘導性腕反射応答, Manual following response: MFR)。MFR の機能的役割の 1 つとして姿勢の動きに起因する腕運動誤差の修正が考えられているが、それを直接的に支持するデータは示されていない。そこで本研究では、姿勢や支持面の安定性が異なる環境下で到達運動を行った際の MFR を計測し、その変化から MFR の機能的特性を検討した。その結果、

立位時の MFR 振幅は座位時と比較して増大した。またこの傾向は視野背景の運動速度によって異なり、姿勢動揺に起因するものに近い、比較的低速度の背景運動においてより大きな振幅増加が認められた。さらに立位時における支持面の安定性の低下は MFR 振幅を増大させた。以上から MFR のゲインは姿勢動揺と密接に関連して調整されており、到達運動の正確性向上に貢献していると考えられる。

(9) 運動皮質 - 視床下核投射が運動制御において果たす機能の解明

額田大輔, 宮地重弘 (京大・霊長研・行動発現分野)

マウスの運動皮質→Stn 投射を選択的に破壊することで大脳基底核内の経路のうち「ハイパー直接路」だけを遮断し, 生理学的, 行動学的なレベルでの変化を調べた。まず GPe で皮質電気刺激に対する細胞活動を記録した。正常なマウスの GPe は皮質刺激に対して早い興奮-抑制-遅い興奮の三相性の反応を示す。しかし皮質→Stn 破壊マウスでは早い興奮だけが抑えられた。また運動量の測定を行ったところ正常マウスに比べて運動量が増加し

ていた。これは皮質→Stn 投射を破壊したことでまず大脳基底核の出力部である GPi の活動が弱まり, GPi から視床への抑制性の出力の程度が小さくなり, 続いて視床から皮質への興奮性の出力が大きくなり, 結果として運動皮質の活動を増強することによるものと考えられる。以上の結果は「ハイパー直接路」が運動皮質の不必要なニューロン活動を抑制する役割を持つという考えを支持するものと思われる。

(10) 運動実行・認知処理頻度の制御に関わる基底核皮質活動

花川 隆 (NCNP・神経研・疾病研究第七部)

パーキンソン病には, 古典的な運動速度低下に加え, 非運動依存性の心内操作速度の低下が存在することが明らかとなり, 基底核の機能が運動実行速度だけでなく認知処理速度制御にも関わることを示唆されている。20 歳-80 歳代の被験者計 36 名に, 様々な視覚刺激提示頻度に応じた手指系列運動の実行, 想像並びに暗算課題を行わせた。磁気共鳴機能画像により, 課題頻度依存性を示す脳活動を測定すると, それぞれの課題に特異性の高い基

底核皮質ループが同定された。暗算頻度に相関するループは, 運動頻度に相関するループより前方に存在し, 想像頻度に相関するループは中間部に認められた。基底核の活動は加齢要因だけでは低下を示さなかった。基底核皮質ループは, 運動と認知を含む行動一般の処理速度の制御に関わる可能性がある。その円滑な遂行とドパミンレベルの関係を今後明らかにしていく。

(11) 眼球運動の随意性制御における運動性視床の関与

國松 淳, 田中真樹 (北大院・医・認知行動学, JST・さきがけ)

大脳による随意運動の制御には視床を介した皮質下入力が必要であることがよく知られている。周辺視野に現われた視覚刺激にむかう反射的な眼球運動 (pro-saccade) と, 反対側にむかう随意的な眼球運動 (anti-saccade) を, 試行ごとに与えられるルールに従って切り替えるようにサルを訓練した。運動性視床の多くのニューロンでは pro-saccade 中と比べて anti-saccade 中に活動が増大してい

た。記録部位を薬理的に不活化したところ, anti-saccade の成功率の低下と, 成功試行での運動パラメータの変化が認められた。これらの結果から, 運動性視床が anti-saccade の発現に関与していることが明らかとなった。また, 同様の課題を用いた先行研究および解剖学的な知見から, anti-saccade の制御には運動性視床を介した上行性経路による情報処理が必須であると考えられた。

(12) 多段階報酬の学習と比較による行動決定

鮫島和行 (玉川大・脳科学研究所)

報酬に基づく行動選択の計算論的モデルである強化学習では、選択結果の予測 (行動価値) の差分に基づいて確率的な行動選択を行い、結果フィードバックと予測の誤差によって学習を行う。これまでの研究では、2段階の報酬予測 (報酬の有無・大小・確率の高低) 間の選択状況のみで調べられていた。この場合、2段階の行動価値の学習途上に起因する確率性と、行動価値の差分が小さいことによる確率的選択を分離することができない。

今回、2頭のサルを用いて4段階の報酬量と刺激属性 (色または形) の間の学習を動物に行わせた時の、選択行動およびその学習による変化を研究した。2頭のサルに、4種類の色と形からなる16種類の視覚刺激から2つのターゲット刺激を提示しその1つを選択させる課題を行わせ、毎ブロック新しい連合関係を学習させたときの選択行動を観察した。その結果、行動選択確率は行動価値の差によってよく説明できることを示す。

(13) 熟練ドラム奏者の最速スティッキング制御

藤井進也¹, 工藤和俊², 大築立志², 小田伸午³

(¹京大院・東大院・学振特別研究員, ²東大院, ³京大院)

熟練したドラム奏者は日々たゆまぬ鍛錬をおこない、感銘的なパフォーマンスを発揮する。その運動制御機構の解明は、(自分も含め)ドラム実践者の観点から興味深いのはもちろん、運動制御研究の観点からしても、長期的な運動学習が感覚運動系にもたらす影響を調査するのによいモデルといえる。われわれはこれまでに、ドラム奏者の基本的な演奏技術のひとつである、すばやく叩く動作に着目し研究してきた。過去の運動制御研究では、

一般にヒトの上肢の運動周波数の限界は5-7Hz (1秒間に5-7回叩く動作) とされていたが、われわれは世界最速ドラマーコンテストの優勝者が、この運動周波数の限界を大幅に上回っていることを明らかにした。本研究会では、この世界最速ドラマーのパフォーマンスをはじめ、われわれがこれまでにこなってきたドラム奏者の筋電図学的調査や非線形力学系モデルを用いた両手協調動作制御機構の検討等について発表する。

(14) 熟練ピアニストの打鍵動作における重力の利用

古屋晋一¹, 片寄晴弘¹, 木下 博²

(¹関学・理工・情報科学, ²阪大・医・予防環境医学)

本研究は、熟練度の違いがピアノ打鍵時の肘の筋活動パターンに及ぼす影響について明らかにすることを目的とした。7名の熟練ピアニストと同数のピアノ初心者に打鍵動作を行わせ、その際の上肢関節運動と筋活動を計測した。さらに、逆動力学計算によって、筋力由来トルクを算出した。打鍵動作に伴う肘関節伸展動作の開始に先行し、重力に拮抗する肘の屈曲トルクの減少が双方のグループで認められた。それに伴う肘の伸筋の活動の開

始は、ピアニストに比べ初心者の方がより早くに認められた。一方、ピアニストでは、肘の屈曲筋の抗重力的な筋活動の顕著な減少が認められた。したがって、肘関節を伸展させるために初心者は伸筋を収縮させており、ピアニストは抗重力筋である屈筋を弛緩させていることが明らかとなった。これらの結果は、長期的な訓練に伴い、ピアニストは重力を利用し、筋力の仕事量を軽減するような運動制御方略を獲得していることを示唆している。

(15) 心理的ストレスがピアノ奏者の筋活動及び打鍵強度に及ぼす影響

吉江路子, 平野 剛, 三浦哲都, 工藤和俊, 大築立志 (東京大・院・総合文化)

演奏不安とは、心理的ストレスの高い音楽演奏場面で喚起される状況特異的不安であり、その過度の高まりによって巧みな運動制御が損なわれることがあるため、多くの演奏者を悩ませる深刻な問題となっている。本研究では、演奏中の筋活動に着目し、パフォーマンスが低下するメカニズムを解明することを目指した。低ストレス/高ストレス条件下で熟練ピアノ奏者 12 名にアルペジオを演奏してもらい、主観的不安強度、平均心拍数、足底

の精神性発汗量、上肢の筋電図、MIDI 信号を記録した。その結果、高ストレス条件下では主観的不安、心拍数、発汗量が増加し、ストレス操作の妥当性が確認された。高ストレス条件では前腕、上腕、肩の筋活動が増加しており、さらに前腕筋活動の増加が打鍵強度の増大につながる傾向が認められた。心理的ストレスによって筋活動及び力発揮が増大することで、芸術的パフォーマンスに重要な弱音制御が損なわれる可能性が示唆された。

(16) 個々の指の運動機能に対する長期的訓練の効果

青木朋子 (熊本県立大学環境共生学部)

一般成人 12 名とピアニスト 13 名を対象に、1 指及び 2 指 (交互操作) による最速タッピング課題を実施した。実験条件は 1 指のみでの 5 条件、2 指すべての組み合わせの 10 条件であった。両群ともに、1 指課題では人差指のタッピングが最も速く、薬指で最も遅かった。2 指課題では人差指&中指が最も速く、薬指&小指で最も遅いという結果であった。群間の比較では、1 指課題のすべての条件、2 指課題の 10 条件のうち 7 条件で、ピアニス

トの方が有意にタッピングが速く、その結果、ピアニストでは 1 指課題での指間差、2 指課題での組み合わせ間の差が一般成人に比べて小さくなっていることがわかった。これらの結果から、ピアニストでは、ピアノの長期的訓練によって、指の運動に関わる中枢神経系の機能が発達し、指間差を生じさせる、筋の構造や指間の解剖学的結合などの比較的先天的な要因の影響が小さくなっていることが示唆された。

(17) 視覚情報に依存した左右指運動を規定する基準座標系

櫻田 武¹, 五味裕章², 伊藤宏司¹

(¹東工大院・総合理工・知能システム科学, ²NTTCS 研・人間情報・感覚運動)

左右身体部位を制御する場合、脳半球間にまたがる情報処理が必要となり、この時、左右脳半球間では共通の座標系により運動が規定されていることが予想される。本研究では、左右示指のリズム運動により、脳半球間で使われる基準座標系について検討した。実験では、左右示指を体幹に対して前後および左右方向に曲げ伸ばしする異なる姿勢条件を設定し、被験者は各条件において、左右屈曲・伸展位相差が 0° (in-phase) と 180° (anti-phase)

の運動を行った。この時、運動中の右示指運動変化が、左示指運動に及ぼす影響を評価した。結果、in-, anti-phase 運動中における左示指への影響の強さが、姿勢条件間で逆転した。これは、本タスク条件下で左右示指の協調関係を組み立てるために使われる座標系は、筋指令や直接的な体性感覚レベルではなく、視覚や作業空間レベルの外部環境に依存した座標系であることを示唆している。

(18) 片腕・両腕運動時の運動学習過程の数学モデル：空間構造と時間的動態の密接な関係

野崎大地 (東京大学大学院教育学研究科)

手先速度依存性の力場を課した状況へのリーチング運動の適応過程を調べた我々の先行研究から、運動学習のための「メモリ」が片腕運動・両腕運動の間で部分的に切り替わることが明らかになった。この結果に基づき、片腕運動専用、両腕運動専用、共用メモリ領域が存在し、また、それぞれに含まれる要素過程の内部状態が運動遂行の度に更新されるという数学的モデルを構築した。「全ての要素過程が運動誤差という共通情報を内部状態

の更新に用いる」というモデルでのみ、学習曲線の時間的動態も含め先行研究の結果がほぼ全て再現された。複数のメモリが共用部分を有しながらも乖離しているという構造、要素過程の内部状態が運動誤差という共通情報に応じて更新される、という二つの特徴によって片腕運動と両腕運動の運動学習の間に複雑な相互作用が生じ、学習の時定数の変化や運動順序の効果などが産み出される事を示す。

(19) 車体型 BMI「ラットカー」における運動皮質および大脳基底核の同時計測系

深山 理¹, 谷口徳恭², 鈴木隆文¹, 満渕邦彦¹ (¹東大・情理, ²東大・医)

我々は、車体形状の brain-machine interface として、ラットカー (RatCar) と呼ぶシステムの開発を行っている。これは、運動中枢に神経電極を慢性刺入したラットを車体上に搭載し、その意図に応じた車体駆動制御を目指したものである。これまでに、自由行動ラットの運動皮質を計測部位として、歩行速度および方向変化の概形を推定したが、神経系から得られる信号の生理学的意味づけは明らかでなく、推定精度も限定的であった。そこで、

本発表では計測対象として大脳基底核を加え、両領域に対して一括刺入できるよう構造化した神経電極を開発し、これが目的の部位に対して精度良く到達できることを確認した。また、歩行動作との相関および推定誤差分散の観点から計測信号を逐次的に解析できる処理系を構築し、本質的に異なる機能を担う両領域における、信号特性差の検討を行った。

(20) Stop Signal 課題における運動抑制の体部位局在性

美馬達哉, Rea Badry, 福山秀直 (京大院・医・高次脳機能総合研究センター)

Stop Signal 課題では、被験者は視覚提示された Go 刺激に対して左か右のボタンを押すように指示される。内 20%では Go 刺激から 50-400 ミリ秒の時間差で Stop 刺激が提示され、被験者はボタン押しを抑制しなければならない。時間差はコンピュータ制御で、成功率 50%になるように調整されている。昨年度は、Stop Signal 課題中の M1 興奮性の時間的変化を、経頭蓋的磁気刺激法 (TMS) によって検討した。今回は、課題遂行する上肢とは反対

側の上肢筋および下肢筋に対応した M1 皮質脊髓路興奮性の変化を検討した。その結果、上肢での成功した Stop 課題においては、課題遂行に関わる筋だけでなく、反対側上肢と下肢でも皮質脊髓路興奮性の低下が認められた。この結果は、本課題における運動抑制では体部位局在が弱いことを示しており、皮質下の抑制性回路の関与を示唆する。

(21) 磁気共鳴機能画像 (fMRI), 筋電図 (EMG), 経頭蓋磁気刺激 (TMS) の同時計測に関する基礎的検討

設楽 仁, 花川 隆, 本田 学 (国立精神・神経センター 神経研究所 疾病研究第七部)

TMS, fMRI, EMG 同時測定システムの基礎的検討を行った。被験者 8 名の右母指・小指外転筋から EMG をモニターし, 安静時運動域値 120% (TMS120), 活動運動域値の 90% (TMS90), 機械出力の 30% (TMS30) の強度で単発 TMS を加え (頻度 $\sim$ 0.1 Hz), stepping stone sampling 法による同時計測を行った。TMS30 条件では自発運動を行わせ, 運動強度の指標として EMG 積分値を計算した。

TMS30 と TMS120 では運動対側の一次運動野と体性感覚野を中心に脳活動を認めた。TMS90 ではこれら領域の活動を認めなかったが, 補足運動野の活動は全条件で観測された。運動強度指標と相関する脳活動として, TMS120 で体性感覚野, TMS30 では運動前野の活動が検出された。TMS, fMRI, EMG 同時測定システムは, 随意・誘発運動の発現メカニズムの解明に有用であると思われる。

(22) 適応機能を有する筋電義手を用いた運動機能再建に関する研究

加藤 龍, 横井浩史 (東大院・工・精密機械工学)

本研究では, 手指を失った切断者の運動機能再建を目的とした筋電義手開発を行ってきた。この義手は, 筋電位を用いた長期安定的な多動作意図識別, 手指機能を補う五指ハンド(筋骨格系), 人工触覚(感覚系)という3つの身体代替機能を提供する。特に制御機能の実現は最重要と捉えており, 信号の個人差や時変性に適応するオンライン学習法を採用することで長期安定的な動作意図の推定を可能にしてきた。そこで本発表では, 適応機能を有する義手が, 切断者の運動機能再建にどのように影響

するかを検証するため脳科学的側面と臨床的側面の両方から解析を行った。前者では, 義手使用時の使用者の脳活動を fMRI により計測し, 習熟が与える運動野への影響や人工触覚が与える感覚野への影響などを明らかにしている。また, 後者では日常生活で行う手指機能を用いる動作事例に関して日常生活動作 (ADL) 評価をすることで, 手首動作と手指動作の複合動作の重要性を示している。

(23) 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¹, 高橋雅人², ワタナチャン・アニュサラ³, 伊佐かおる¹, 伊佐 正¹
(¹生理研・認知行動発達, ²杏林大・整形外科, ³プラモンクットカラオ大・生理)

幼若脳は可塑性に富む事が知られている。幼若時に片側除皮質したラットでは, 成熟時において対側上肢の運動機能に異常が少ないと報告されている。本研究では, その代償機構の神経メカニズムを調べるため, 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いて形成された下行性の神経回路を調べた。損傷皮質と対側の運動野に順行性トレーサーBDAを導入した結果, 導入領域と対側の上丘・赤核・橋核, 同側の後

索核・脊髄灰白質といった通常の投射領域とは反対側の領域にも軸索投射が確認された。更に, 錐体を電気刺激した結果, 両側の運動ニューロンから多シナプス性の活動が惹起された。同側運動ニューロンへのシグナルは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, 上肢運動を制御する代償的な神経回路が広範囲で形成される事を示唆する。

(24) 一次運動野の機能脱失にともなう鏡像運動の生成機構

坪井史治¹, 西村幸男², 斎藤紀美香³, 伊佐 正³

(¹総研大院・生命・生理, ²ワシントン大学・生理・生物物理学, ³生理研・認知行動発達)

鏡像運動は脳卒中や脊髄損傷等で中枢神経系に障害を負った際に発現し, その出現時には両側の感覚運動野の活動が上昇するとの報告があるが, この活動が鏡像運動の生成に寄与しているか不明である。本研究では, 脳損傷時に発現する鏡像運動を, サル一次運動野 (M1) の一時的な機能脱失モデルによって再現し, 鏡像運動生成に関与する中枢機序を調べた。機能脱失には GABA_A 受容体のアゴニストであるムシモルの微量注入を用いた。サ

ルに右手を固定した状態による左手の把持運動を行わせ, 上肢筋の EMG 活動とビデオ撮影によって動作を記録した。右の M1 指領域へムシモルを注入した結果, 左手の機能が障害され右手に鏡像運動が出現した。更に, 左の M1 へムシモルを注入したところ, この右手の鏡像運動は消失した。以上の結果は反対側の M1 が鏡像運動に関与している事を示し, M1 ムシモル注入によって, 反対側の M1 の活動が高まった可能性を示唆した。

S (1) 視覚と運動感覚を用いた手の位置知覚

羽倉信宏 (NICT/ATR 脳情報研究所)

ヒトは様々な感覚情報によって自己身体の状態を知る。その中で, 身体部位の位置を脳に伝える主な求心性情報として運動 (固有) 感覚情報が挙げられるが, 視覚情報も同時にその伝達に寄与することができる。両情報は異なる感覚器官から入力されるため, それぞれの伝える身体位置が完全に一致するとは限らない。よって, 感覚間で統一された身体を維持するためには, 両情報の統合が重要となる。本発表では視覚と運動感覚情報を用いた手位置知覚をとりあげ, 1) どのような性質の視覚情報が自己の手位置情報として統合されるのか, そして 2) 視覚および運動感覚が伝える手位置情報を統合する際にはどの脳領域の働きが介在するのか, について私たちが行ってきた研究を紹介する。

研究を行うにあたり, 私たちは被験者が腱への振動刺激によって惹起される運動錯覚を経験しながら様々な視覚情報を観察する, という状況を設定した。もしある視覚情報が自己の手位置情報として処理されるなら, その視覚情報は運動感覚情報と統合され, 運動錯覚経験を修飾するはずである。

行動学実験から, 視覚情報は, i) それが手位置情報を伝えていることを被験者が知っているとき, および ii) 運動感覚情報の入力を受けている手と同じ視覚的特徴をもっているとき, 運動錯覚経験を修飾することが分かった。

また, iii) 視覚的特徴が一致しているときには, 視覚情報の運動方向が運動感覚の伝える方向と一致する場合に, とくに運動錯覚経験に対する影響を強くすることも示された。fMRI を用いた脳活動測定からは, 運動方向の一致した手の視覚と運動感覚情報が与えられる場合, 左小脳-右下頭頂小葉間の大脳-小脳連関が介在することで両者が統合されることが示唆された。

適切な視覚刺激の選択および上述の脳領域間の活動協調によって, 多感覚によって伝えられる身体情報間の整合性が保たれ, 空間内で統一された身体像が維持されると考えられる。

Related Articles

Hagura N, Oouchida Y, Aramaki Y, Okada T, Matsumura M, Sadato N, Naito E; “Visuo-kinesthetic perception of hand movement is mediated by cerebro-cerebellar interaction between left cerebellum and right parietal cortex.” *Cerebral Cortex*

(in press; Open access at <<http://cercor.oxfordjournals.Org/cgi/content/full/bhn068v1>>)

Hagura N, Takei T, Hirose S, Aramaki Y, Matsumura M, Sadato N, Naito E; “Activity in the posterior parietal cortex mediates visual dominance over kinesthesia.” *The Journal of Neuroscience*. 27:7047-53; 2007

S (2) 環境適応的な随意運動を可能とするリアルタイム制御機構

富田 望, 矢野雅文 (東北大学・電気通信研究所)

生命システムを取り囲む環境は常に予測不可能的に変化する無限定環境である。そのような環境でも生物は運動目的を達成するため、柔軟かつ適切に運動を実現している。しかし、この環境適応的な運動生成メカニズムは未だに解明されていない。これまで生命システムにおける運動制御の問題は、環境とシステムとを分離し、環境をあらかじめ限定しモデル化することで解かれてきた。しかしながら、運動遂行中においても環境及びシステムの状態は予測不可能的に変化するため、全ての環境変化を事前に観測・モデル化することは事実上不可能である。また、生物のもつ適応性を学習システムのみに結論づけることも適切ではない。学習システムは試行錯誤的に身体や環境をモデル化し、環境適応性を後天的に獲得することができるが、その適応性は学習の時間スケールより十分遅い環境変化に限定される。そのため、個体の生存のためには学習によらない即時的な環境適応機構が必要である。

この問題を解くにあたり、生物が持つ様々なレベルの冗長性と自律性は有用である。冗長性は多様な運動パターン生成を保証し、あらゆる状況に対応しうる可能性をもたらす。また各階層の自律性により、適切な運動パタ

ーンの決定が自律分散的に可能になると考えられる。その一方で、システムが冗長性を持てば、なんらかのルールに基づいて運動パターンを一意に決定する必要がでてくる。この問題は不良設定問題、もしくは自由度問題と呼ばれ、解くためには拘束条件が必要となる。これら問題を解決できる機構として、学習を必要とせずリアルタイムに運動パターンを生成できる自律分散制御機構が有効な手段となる。この制御機構を実現するための設計手法の一つが、我々が提案している「拘束条件生成充足法」である。この設計手法においては、パターンの多様性を実現するための、(1) 多形回路性、パターンを一意に決定し、且つリアルタイム最適化を実現するための、(2) 競合・協調関係 (抑制性・興奮性結合)、環境との即時的な関係性を実現するための、(3) 特性調節機構の3つが重要な設計要素となる。

シンポジウムでは、上記3つの設計要素を満たした制御機構として、「6足歩行ロボットにおける歩容パターン生成」、「2足歩行ロボットにおける環境適応」、「リーチングにおける自律分散的な随意運動制御」について紹介する。

S (3) Frontal activity and intelligence in action

Xiaofeng Lu (陸 曉峰) (順天堂大・医・生理)

I. Area 9 cells contribute to temporal processing.

Time is a fundamental element in living system. Without time, there is no past, present or future. In other words, time is a fundamental element of existence since everything exists in time. Several areas of the brain including parietal cortex, prefrontal cortex, basal ganglia and olivo-cerebellar system are known to reflect the different aspect of the temporal processing. We describe a group of prefrontal cells (chiefly in area 9) that became active with a specific elapsed time (1, 2, 4, 5, or 7 second) but weaker activity with other times (post-time-instruction activity). Another group of cells

showed higher activity only when reproduced a specific time but not other times. Moreover, the post-time-instruction activity during performance of the successful trials was significantly greater than that during the failed trials. These results suggest that prefrontal cortex plays a key role in both sensing and reproducing time.

II. Supplementary eye field (SEF) cells tell where is good to go.

A group SEF cells became active during the period of reward delivery in the specific target location but weaker activity in other locations even though the same amount of

reward was given in each location. Moreover, the reward position dependent activity varied following the modulation of the reward size. Our results suggest that the SEF cells may play an important role in providing the value of each saccade according to their spatial target location. In other words, SEF cells provide information of where is good to go.

III. SEF cells provide information necessary to act in the best timing.

To initiate a voluntary action smoothly, it is always important to sense anticipated and elapsed time to events like “Go-signal”. We now describe a number of cells in the SEF with phasic, delay activity and postdelay activity modulation that varied with the length of the delay period. This variation occurred in two manners: cells became active with the shorter delay periods (GO signal presented earlier); cells became active with the longer delay periods (GO signal presented later). These results suggest that the delay-dependent activity

may reflect anticipated and elapsed time during performance of a delayed saccadic eye movement.

IV. Frontal cells generate procedures of multiple actions to reach the goal.

We perform limited forms of movements in various serial orders to achieve a large number of the volitional goals. How does the brain present such sequences? A group of cells in the primary motor cortex (M1) was found to display higher activity with a specific arm movement direction, but only when this direction is within a specific sequence. Yet, many neurons in the supplementary eye field (SEF) became active with a specific target direction or a specific target/distractor combination. Furthermore, such activity was often selective for one among several sequences that included the combination. These results suggest that the M1 and SEF cells are involved in generating arm and eye movement in memorized sequences.

(25) 他者の手の力発揮の視覚情報が自己の力発揮に与える影響

廣瀬智士¹, 大内田裕², 松村道一¹, 内藤栄一³

(¹京大院・人環・共生人間, ²東北大院・医・肢体不自由学, ³NICT)

他者の運動を観察しながら運動を実行すると、他者運動の視覚情報が運動実行に影響を与えることが知られている。本研究では 1) 移動を伴わない力発揮(等尺性運動)を行う他者の効果器の視覚情報が自己の力発揮に影響するか、2) その影響が効果器特異的であるか、を調査した。16名の健常男性が実験に参加した。被験者は、他者が力発揮と脱力を繰り返す顔、足、手の映像を見ながら、精密把握による弾道的な力発揮を行った。映像が力発揮を

行っているときに同時に力を発揮する条件を同位相条件、映像が脱力しているときに力を発揮する条件を逆位相条件とした。被験者の発揮した力は手の映像を観察中かつ同位相条件でのみ大きくなった。本研究により、他者の等尺性運動の視覚情報も自己の力発揮に影響を及ぼすことが明らかになった。またこの際、視覚情報が干渉するのは、体部位再現性を持つ運動領域における運動生成の過程であることを強く示唆した。

(26) 7b野・VIP野の多種感覚領ニューロンによる自他身体のマッチング機能

石田裕昭, 稲瀬正彦, 村田 哲(近畿大・医・第一生理)

頭頂連合野は視覚と体性感覚情報を統合し、運動を制御するために自己の身体周辺空間や身体表象に関わる。さらに頭頂葉損傷による身体失認の患者の一部は、自己に加えて他者の身体認識が障害されることが報告され

ている。こうしたことは自他の身体知覚に、頭頂葉にある共通した神経基盤が関わっている可能性を示唆する。われわれは、行動下のサルの下頭頂小葉(7b)および頭頂間溝底部(VIP)から、自己および他者の身体をマッ

グする視覚-触覚バイモーダルニューロンを記録した。これらは 1) 自己および他者の身体周辺空間 (<30cm) を符号化し, 2) 受容野が, 自己と他者の身体で, 鏡像的に位置するものが多く, 3) 他者の身体部位上にある受容野

は, 自己から見た他者の身体の位置に依存しないこと(身体部位中心の符号化) が明らかになった。これらのニューロンは脳内で自他の身体を対応付け, 他者の行為理解に関与すると考えられる。

(27) サル AIP 野における手操作関連神経活動の情報量解析

石田文彦¹, 清水崇司¹, 村田 哲², 阪口 豊¹ (¹電通大院・情報システム学, ²近畿大・医・第一生理)

ヒトや動物が環境中で適切に行動するには, 行動決定や運動発現に関わる情報処理が環境と同等の時間スケールで行われなければならない。本発表では, 感覚入力から運動発現までの脳内過程を環境の物理的時間に沿って理解することを目指し, 3次元物体の手操作運動中に AIP 野で観察された神経活動の情報量解析の結果について述べる。本研究では, 3次元形状による操作対象分類と神経活動間の相互情報量を一定の時間幅ごとに計算するこ

とにより, 神経活動に含まれる対象形状に関する情報が課題遂行に応じて変化する様子を分析し, その可視化を試みた。その結果, AIP 野神経活動の情報量の時間変化は大まかに5つのタイプに分類されることがわかった。さらに, 視覚入力と運動情報表現によって活動が異なるニューロン群ごとに情報量の変化を追跡することにより, 視覚運動変換過程においてこれらのニューロン群が担う情報表現と機能的役割の考察を行った。

(28) MST 野の破壊が短潜時腕応答に及ぼす影響

竹村 文, 大藤智世, 安部川直稔, 河野憲二, 五味裕章
(産総研・脳神経, 筑大院・感性認知, NTT・CS 基礎研, 京大院・医, ERATO・下條潜在脳機能)

最近の研究で, 上肢を正確に目標に到達させるために機能している2つの視覚入力で生じる修正運動が明らかにされた。1つは, 小さな視標に向かう到達運動中, 視標がジャンプしてずれた状況で生じる運動で, その潜時はサルで約100ミリ秒(ヒト:約140ミリ秒)である。もう1つは, 到達運動中に背景が動いたときに生じる運動で, 背景にひきずられるように腕が動く。この修正運動の潜時はさらに短く, サルにおいては背景が動いてか

ら約70ミリ秒(ヒト:約110ミリ秒)で生じる(MFR:Manual Following Response)。サル脳皮質 MST 野にムシモールを注入し, これら腕の修正運動に及ぼす影響を観察した結果, 視標のジャンプに対する初期反応は減少し, MFRは消失した。このことから, MST 野が, 腕の短潜時応答のための視覚-運動変換に関与する領域であることが示唆された。

(29) 手を動かす視覚, 眼を動かす視覚

五味裕章 (NTT コミュニケーション科学基礎研究所, 下條 ERATO プロジェクト)

運動には様々な視覚情報が使われる。脳の細分化された視覚情報処理では, 入力の特長によってのみ解析機能の分離分担を行っているばかりではなく, 知覚と運動の

ための視覚情報処理も分離していることが, 近年の脳研究で明らかになってきた。さて, このような視覚処理系の分離は, 知覚と運動の間に限られたことであろうか?

我々はこれまでの研究で、腕到達運動中に広い視野が動くとその方向に短潜時で手が動く Manual Following Response (MFR) について報告してきた。その視覚解析の特徴は、視覚運動によって誘発される眼球運動 (OFR) と酷似しており、共通の視覚処理系の関与が示唆された。

しかし、目と手では視覚運動情報の空間統合特性が異なることを最近突き止めた。この結果は、それぞれの運動系に応じた視覚解析があることを示唆しており、目的に応じた視覚解析システムの分離はより一般的なものであることが予想される。

(30) 複雑な運動における軌道計画

小池康晴, 神原裕行 (東京工業大学精密工学研究所, JST CREST)

これまで、腕の運動計画については、始点、終点、運動時間などの情報を基に最適規範により運動軌道を計画し実行しているとする脳のモデルが提案されている。しかし我々のグループでは、2点間到達運動のような簡単な運動は終点だけの情報で軌道計画をすることなしに実行が行えるモデルを提案し、実際に人の運動を矢状面に於いて再現できることを確認した。このモデルを用いて経路点のある運動などより複雑な運動を実現する場合に

は、経路点を通るためにどのように運動を切り替えなければいけないかを計画する必要がある。しかし、この場合でも始点と経路点、経路点と終点の間の軌道については計画する必要が無い。本報告では、経路点のある矢状面に於いて運動をどのように計画するかについて提案モデルを用いて計算機シミュレーションを行い、実際の人の運動と比較した結果について述べる。

(31) サルのトレッドミル歩行に伴う一次運動野の神経細胞活動

中階克己 (近畿大・医・生理1)

霊長類の脳皮質における歩行制御機序の解明を目的として、トレッドミル上を無拘束の状態で四足歩行するサルの一次運動野から単一神経細胞活動を記録した。また体幹と四肢から筋活動を記録した。そしてベルトの速度を段階的に変化させ、記録された神経細胞の活動様式に対するベルト速度の効果を明らかにしようと試みた。ベルト速度を増加させると、サルは歩幅と歩行周期頻度を増加させた。またこのような肢運動の変化に伴って前

後肢の筋活動は増加した。一方、一次運動野・下肢領域から記録された神経細胞は、歩行周期に一致した相動的な活動様式を示した。これらの細胞の多くは、ベルト速度の増加に伴って発射頻度を増加させた。以上の結果は、サルの一次運動野が脊髄リズム生成神経回路網の出力を直接的/間接的に制御することによって推進力の生成に関わることを示唆する。

(32) 下肢ペダリング運動が上肢皮膚反射に及ぼす影響

笹田周作, 田添歳樹, 中島 剛, 小宮山伴与志
(東京学芸大院・連合学校教育, 国立身障者リハセンター・運動機能系障害, 千葉大・教育)

近年ヒトにおいても頸髄と腰髄に中枢パターン発信器 (CPG) が存在し、さらに両 CPG を連結する神経機構の存

在が示唆されている。これまで皮膚反射は CPG の影響下にあり、上肢もしくは下肢ペダリング運動によって強い

修飾を受けることが明らかにされている。そこで本研究では、下肢ペダリング運動が上肢皮膚反射に及ぼす影響について検討を加えた。被験者（13名）は上肢の筋を随意収縮し、エルゴメーターによる下肢ペダリング運動を行った。皮膚反射は浅枝橈骨神経を手関節部で刺激（1ms×3発、333Hz、知覚閾値 2-2.5 倍）することで得た。下肢ペダリング運動は上肢皮膚反射の短潜時成分へ筋特異

的に影響を及ぼした。特に、その効果は上肢筋の背景 EMG 量と回転数に依存した。しかし、上肢皮膚反射は下肢のサイクル相に依存せず、また下肢の等尺性筋収縮の増加による影響も見られなかった。これらの結果は下肢 CPG の活動は上肢皮膚反射を構成する神経回路に影響を及ぼす可能性を示唆する。

（33）受動歩行時における足関節屈筋および伸筋の皮膚反射動態について

中島 剛, 上林清孝, 高橋 真, 小宮山伴与志, 中澤公孝（国リハ研・運動障害部）

本研究は、ヒトの歩行に関連した感覚情報が足関節屈筋および伸筋の皮膚反射動態にどのような影響をあたえるのかについて検討した。特に、歩行時の荷重に関連した感覚情報に着目した。受動歩行は動力型歩行補助装置を用い、トレッドミル上での受動歩行 (TS) と完全免荷による空中受動歩行 (AS) の 2 課題であった。皮膚反射（脛骨神経刺激）は、受動歩行の立脚相に着目し、前脛骨筋 (TA) および内側腓腹筋 (MG) から導出した。その結果、

AS 課題では両筋ともに皮膚反射の振幅は歩行位相に依存しなかった。しかしながら荷重が脚部に加わる TS 課題では TA の促通成分は立脚相後半で増大し、MG の抑制成分は荷重が脚部に加わる位相である立脚前半から中盤にかけて促通に転じた（反射の逆転現象）。これらの結果から、受動歩行時における皮膚反射の歩行位相依存性は荷重情報に関連して生じ、その動態は足関節屈筋および伸筋で異なることがわかった。

（34）求心路の可逆的遮断のための冷却方法の提案

原 昌宏¹, 宮下英三², 阪口 豊¹

（¹電通大院・情報システム学・人間情報学, ²東工大院・総理工・知能システム）

本研究では、随意運動制御における固有感覚の役割を調べることを目的として、脊髄神経後根の神経伝達を可逆的に遮断する冷却装置を開発し、その能力を検証した。本装置は、冷却源としてペルチェ素子を用いており、温度の電子制御が可能である。また、神経に接する冷却プローブはグラファイトシートを珪素樹脂で覆ったものを開発した。このプローブは柔軟性に優れ、繰り返し使用可能であるうえ、高い生体適合性が期待できる本装置の

神経伝達遮断性能を麻酔下のラットを用いて試験した。露出させた第 7 頸神経後根に冷却プローブを接触させ、その周辺部分を冷却すると共に、同側の前肢に外力を加えて上腕三頭筋に伸張反射を誘発させ、その筋活動を計測した。その結果、脊髄神経後根の冷却と脱冷却により伸張反射を可逆的に抑制できることを確認した。今後、本装置を慢性的に埋め込み、覚醒した動物の感覚フィードバックを遮断する装置へ発展させていきたい。

(35) 表面筋電信号に基づいた神経疾患における運動機能の定量的な評価に関する研究

李 鍾昊, 箕 慎治 (東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所, 認知行動研究部門)

我々は、種々の神経疾患における運動機能を表面筋電信号に基づいて運動指令レベルから定量的に把握できる方法を確立することを目指した。つまり疾患の病態をより根本的に評価するには、動きの原因である運動指令(筋活動)の異常を捉えることが望ましい。そこで我々は、手首運動を利用して異常運動だけではなく、その原因である筋活動の異常も同時に分析できるシステムを開発し、これまで手首運動に関わる4個の筋活動(ECR, ECU,

FCU, FCR)の中に、異常運動を十分に説明できる情報が含まれていることを確認した。今回は、4個の筋活動から各疾患における病態の評価及び疾患の診断に有用なパラメータを抽出することを試みた。特に、これらのパラメータは単独でも筋活動のパターンを特徴付ける固有の機能的意味を持つが、組み合わせて評価することにより、疾患の位置づけや治療のためのナビゲーションへも応用できると期待される。

(36) 末梢神経信号の方向別信号分離—末梢神経を介した運動制御を目指して—

伊藤孝佑, 鈴木隆文, 満洲邦彦 (東大院・情報理工・システム情報)

上肢切断患者の上肢運動機能を代行する義手はその入力情報として、従来筋電信号が用いられてきたが、損傷の程度により対象部位の筋自体が失われる事もある。こうした場合の解決策に、末梢の運動神経の情報そのものを利用した義手が考えられる。しかし末梢神経は感覚情報を含む求心性信号と運動情報を担う遠心性信号が混在しており、運動情報を抽出するには遠心性信号のみを選択的に取得する事が望まれる。以前の発表では、遠心性

及び求心性信号の混在する末梢神経信号を伝搬方向別に分離する手法の概念を述べた。末梢神経の走行方向に複数の電極を配置し神経信号を取得する場合、各電極における信号の間には伝播遅延が発生する。この遅延が伝播方向により異なる事を利用して、各電極で計測される信号から伝播遅延を推定し、伝播方向別に信号を弁別するアルゴリズムである。そこで本発表では、そのアルゴリズムの詳細及びその後の進捗を含めて報告する。

(37) 短期間の関節固定・非荷重が脳波-筋電図コヒーレンスに与える影響

遠藤隆志¹, 花村 学², 牛場潤一³, 米田継武⁴, 櫻庭景植⁴

(¹国リハ研・運動機能, ²順大院・スポーツ健康科学, ³慶大・工・生命情報, ⁴順大・スポーツ健康科学)

本研究では、固定・非荷重による短期不活動が、運動制御機構に与える影響を脳波-筋電図コヒーレンス法を用いて明らかにすることを目的とした。健康な成人男性10名を対象とし、被験者の左足関節をギプス固定し、松葉杖による免荷を1週間行った。その固定期間の前後に下腿周囲径および筋断面積、足関節底背屈における等尺性最大トルクを計測した。また、両足それぞれで持続的筋力発揮課題を行い、このときの脳波および筋電図を測

定し、コヒーレンス解析を行い、周波数領域における両者の相関を算出した。固定解放後に下腿両側の筋の形態に変化はみられなかったが、固定側の等尺性最大トルクは有意に低下した。持続的筋力発揮課題中に固定側のみで有意なコヒーレンスの低下が観察された。これらの結果は、短期不活動による神経系の機能低下の一部として、皮質運動野および脊髄運動ニューロン活動における同期性の低下も含まれる可能性を示唆する。

(38) 脊髄内微小刺激によって把握運動を誘発する

関 和彦, Andrew Jackson, 鈴木隆文, 竹内昌治, 武井智彦, 五條理保
(生理研・認知行動, ニューカッスル大学, 東大・情報理工, 東大・生産研)

我々は脊髄介在ニューロン群に手の運動の筋シナジーが表現されているのではないかと考えている。もしこの仮説が正しいとすれば、脊髄内電気刺激 (ISMS) によって機能的な手の運動が誘発できるはずである。そこで我々は最近、1頭のサルを対象とした急性実験を行い、ISMSによってどのような把握運動が誘発されるかを調べた。単発刺激では主に示指、拇指の単収縮が誘発され、それらは複数の脊髄内部位への刺激によって非線形的加重を示す場合があった。また連続刺激を与えると、把握様運

動など多様な運動が誘発された。次に2頭のサルの脊髄にステンレス線電極及び MEMS 技術を用いて開発された柔軟神経プローブを複数埋込み、刺激効果の持続時間を比較した。その結果、刺激効率も柔軟神経プローブの方が有意に長く持続した(一ヶ月以上)。これらの結果は、把握運動の制御における脊髄神経回路の重要性を示していた。また、ISMS は上肢麻痺患者の再建のための基盤技術となる可能性が示された。

(39) 手首運動における小脳 Golgi 細胞の活動と役割

戸松彩花, 笥 慎治 (東京都神経科学総合研究所, 認知行動研究部門)

ゴルジ細胞は小脳における介在細胞の1つで、その波形および発火頻度より他のニューロンと明確に弁別することが可能である。小脳では、小脳外→苔状線維→顆粒細胞→平行線維→プルキンエ細胞→小脳核→小脳外、という流れがメイン経路である。ゴルジ細胞は、苔状線維および平行線維から興奮性入力を受け、顆粒細胞に対して抑制性投射を持つ。すなわち顆粒細胞は、苔状線維か

ら興奮性入力を、ゴルジ細胞から抑制性入力を受けることになる。小脳の入力経路に働きかける位置を占めるゴルジ細胞は、従来からその役割について注目されてきた。今回は、手首による8方向の運動にともなう、右 lobule5,6 のゴルジ細胞の活動特徴を報告するとともに、その作用に関して考察してみたい。

(40) 運動学習の分散効果と運動記憶の転移

岡本武人, 白尾智明, 永雄総一
(群馬大学大学院・神経薬理, 理研脳センター・運動学習制御研究チーム)

適度な間隔をあけた学習と集中的な学習とでは、その効果が前者のほうがより長期間持続する。心理学ではこれを「分散効果」と呼ぶが、そのメカニズムは知られていない。私たちは、マウスに5つの異なったスケジュールで視機性眼球運動の訓練を行い、運動学習の分散効果を調べた。①群には800周期の訓練を1時間集中的に行い、②～③群には、200周期の訓練を0.5～1時間の間隔で4回続けて行い、④～⑤群には100～200周期の訓練を24

時間間隔で8～4回続けて行った。訓練直後、全群に同程度の運動学習が生じたが、①群の学習のみは24時間で減衰した。さらに訓練直後に局所麻酔剤を用いて、小脳皮質の出力遮断をしたが、①群の学習は消去されたが、②群の学習は変化しなかった。これらの所見は、小脳皮質から前庭核への記憶痕跡の移動が、訓練開始後の早い時期におこり、それが分散効果に関与することを示唆する。

(41) 大脳—小脳連関の謎Ⅰ. 橋核での中継

寛 慎治, 角田吉昭, 戸松彩花, 李 鍾昊 (東京都神経研・認知行動)

運動に際し, 多数の筋活動を適切なタイミングと強さに協調させて初めて, 我々は目標に到達する。この協調過程に大脳—小脳連関が必須であることは今や定説である。大脳と小脳が協調してタイミングを制御するには, 様々な時間情報を正確にやり取りする必要がある。しかしながら大脳ニューロンの多様な活動は, 橋核での中継に際して高度な発散と収束により重ね合わされ平均化され, 大脳ニューロンがコードする情報のエントロピーは

時間的・空間的に小脳到達前にかなり失われてしまう可能性がある。実はこの問題は高次中枢での情報伝達全般に共通する潜在的問題でもある。われわれは手首運動課題を行うサルの小脳皮質半球部で, 大脳入力用小脳に中継する単一苔状線維の活動を分析した。驚くべきことに苔状線維の活動は入力元の運動野ニューロンに酷似する多様な時空間パターンを保持し, 大脳皮質情報の正確なコピーが小脳に到達することが明らかになった。

(42) 小脳プルキンエ細胞におけるニューロン活動の regularity の解析

小林 康, 岡田研一, 河野憲二, 竹村文
(大阪大学・生命機能研究科, 京都大学・医学研究科, 産業技術総合研究所)

視覚運動変換過程でのニューロンの発火頻度とスパイク間隔の変遷から脳内情報表現の変化を考察した。広い視野の動きによって誘発される追従眼球運動時の, 大脳 MST 野, 橋 DLPN 核, 小脳腹側傍片葉のプルキンエ細胞のニューロン活動を解析した。大脳 MST 野, 橋 DLPN 核のスパイク間隔は irregular で, 小脳プルキンエ細胞(単純スパイク)のスパイク間隔は regular であることがわか

った。プルキンエ細胞の発火の regularity には活動電位の不応期が関与しており, さらにプルキンエ細胞は毎試行の発火が regular であっても, 多試行の発火頻度の時間パターンで高時間分解能の情報が保持されていることが確かめられた。この結果を細胞アンサンブルで考えると, 小脳での大規模な情報の発散, 収束があることが示唆される。

(43) サル前頭前野内側皮質における時間長の認知と検出

湯本直杉, 陸 曉峰, 宮地重弘, 南部 篤, 深井朋樹, 高田昌彦 (東京都神経研・統合生理, 順天堂大・医・第一生理, 京大霊長研・行動神経, 生理研・生体システム, 理研・BSI・脳回路機能理)

時間長の情報が脳においてどのように処理されているか調べるため, 時間再生課題を構築し, 課題遂行中のサル前頭前野皮質から神経活動記録を行った。課題において提示される時間情報は2秒, 4秒, もしくは7秒間であり, Instruction Cue LEDの点灯持続時間によって表される。Go Signal 出現後, サルは Instruction Cue によって提示された期間と同じ時間長だけ待機した後にボタンを

押す。この課題を遂行中のサル前頭前野内側面(9野)から時間長に特異的な神経活動が記録された。試行結果の正否により, Post-instruction 期間中の発火率に有意な差が見られ, また9野へGABAアゴニストであるムシモールを注入した結果, 課題試行時の失敗率に有意な増加が見られた。これらの結果から, 前頭前野皮質が時間情報の認知と再生に大きく関わっている可能性が示唆される。

(44) Missing 刺激を用いた時間情報処理機構の探索

田中真樹, 田代真理 (北大院・医・認知行動, JST・さきがけ)

時間の情報処理には小脳や基底核などの皮質下構造が関与することが知られている。その神経機構を調べる目的で、一定間隔で繰り返し提示される視聴覚刺激を小脳患者 (SCA6)、健常人、サルに提示し、突然あらわれる oddball 刺激 (deviant または missing 条件) に対する反応時間を調べた。Missing 刺激を検出するためには、刺激が現われるタイミングを正確に予測し、これを感覚入力と比較する必要があると考えられる。健常人では 600～

1200 ミリ秒の刺激間隔ではふたつの条件間で反応時間に差がみられなかったが、小脳患者では deviant に較べて missing 条件で潜時の延長を認め、タイミングの予測に小脳が関与する可能性が示唆された。また、健常人でより短い刺激間隔での反応時間を比較すると、多くの被験者では 300 ミリ秒以下で条件による違いを認めた。今後、サルに同様の課題を行なわせ、神経活動を探索する。

(45) 離散運動と周期運動の間の非対称な学習転移

池上 剛, 平島雅也, 多賀巖太郎, 野崎大地 (東大・教育)

同じ動作でも、一回一回の動作を単発で行う運動 (離散運動) の方が、周期的な繰り返し運動 (周期運動) に比べてより広範囲の脳活動を伴う (Schaal et al., Nat Neurosci 2004)。運動制御と学習の神経過程間の関連を考慮すると、この脳活動の違いが運動学習動態に影響する可能性がある。この仮説検証を目的に、視覚運動変換 (30 度回転) 条件下で、被験者が単一標的へのリーチング運動を離散運動 (30 試行) および周期運動 (連続 100 試行) として行

ったときの、両運動課題間の学習の転移を調べた。その結果、離散運動で獲得された学習効果は、周期運動でもそのまま活用された。一方、100 試行もの周期運動で獲得されたはずの学習効果は、引き続き行われた離散運動ではほとんど活用されなかった。この両運動間の非対称な学習転移は、我々の仮説どおり、離散運動と周期運動の制御機構の違いを反映しているものと考えられる。

(46) 前頭前野腹側部から運動前野背側部への経シナプス投射

高原大輔, 星 英司, 宮地重弘, 井上謙一, 南部 篤, 高田昌彦 (東京都神経研・統合生理, 生理研生体システム, 総研大・生命科学, 玉川大・脳科学研究所, 京大霊長研・行動発現)

条件付き視覚運動変換過程に前頭前野腹側部 (PFv) と運動前野背側部 (PMd) の両方が関与していることが示されている。興味深いことに、PFv から PMd への直接的な投射は無いことが分かっている。そこで、我々は、PFv から PMd へ経シナプス性の投射があるとの仮説のもと本研究を行った。逆行性蛍光トレーサを PMd に注入したところ、前頭葉皮質の内側部と 46 野の背側部が PMd へ

直接投射することが明らかとなった。先行研究により、何れの領域も PFv から入力を受け取ることが示されている。次に、狂犬病ウィルスを PMd に注入し、一段階の経シナプス性の逆行性伝播を許したところ、PFv に標識された細胞が新たに現れることが分かった。以上の結果は、PFv から前頭葉皮質を経由して PMd へ到る経シナプス性の投射経路があることを示唆する。

(47) 視覚運動変換における運動前野背側部と腹側部の機能的差異

星 英司, 中山義久, 山形朋子 (玉川大学・脳科学研究所)

本研究は、視覚情報を運動情報に変換する過程への高次運動野（運動前野腹側部と背側部）の機能的関与を明らかにすることを目的として行われた。視覚運動変換には大きく分けて、ダイレクトな過程（視覚物体がそのまま動作の標的となる場合）とインダイレクトな過程（視覚物体は標的とはならず、動作内容を指示する場合）があるので、これら 2 つの要素を含む行動課題を行って、サルの前運動野より単一神経細胞活動の記録を行っ

た。その結果、運動前野腹側部にはダイレクトな過程が表現されているのに対して、運動前野背側部にはインダイレクトな過程が表現されていることが明らかとなった。更に、これらの結果を、頭頂葉ならびに前頭前野と形成されるネットワーク構造という観点から見ると、2 つの視覚運動変換過程に対応する 2 つの大きなネットワークがあることが示唆された。

(48) 系列指運動課題セットの切り替えに関わる脳活動

細田千尋, 花川 隆 (神経研・疾病研究第七部, 東京医科歯科院)

健康成人 18 名を対象に、複数の系列指運動課題セット間の切り替えに関わる脳活動を、機能的 MRI を用いて検討した。視覚刺激を 2.5 秒毎に提示し、背景色の変化で課題セットの切り替えを指示した。被験者は、右手の示指、中指、薬指の 3 指を用いて、2.4Hz の頻度で系列運動を行った。合計で 6 回のタッピングを基本単位とし、どの指を動かすかを空間配列、各指を動かす回数を数系列と定義した。課題セットとしてどちらかの系列要素が

複雑な固定系列運動（空間配列課題、計数系列課題）及び系列運動自由生成の 3 種類を用いた。計数系列課題から空間配列課題への切り替え時には、背側運動前野と中心後回に活動が見られたのに対し、空間配列課題から計数系列課題への切り替え時には、補足運動野での活動を認めた。空間配列課題と計数系列課題の切り替えに、異なる高次運動野の活動が関わっていることが示唆された。

(49) 歩行運動の中枢制御機構：システム構成原理の解明

松山清治 (札幌医大・保健医療・作業療法)

歩行運動は全身性に発現するリズム性協調運動であり、その発現・制御に関わる神経機構は脳から脊髄に至る中枢神経系広範囲に分散配置されている。本研究では中枢歩行制御機構のシステム構成原理を明らかにするため、歩行運動の基礎的発現・制御機構である脳幹～脊髄系に着目し、その構造及び機能的特徴について解明を進めてきた。脳幹～脊髄系の中でも、上位脳からの歩行駆動信

号を脊髄に中継伝達する網様体脊髄路は、これからの下行性入力を受ける脊髄介在ニューロン群とともに、基礎的な歩行発現・制御システムの基本骨格を成すと考えられる。今回はこれまでに行ってきた網様体脊髄路と脊髄介在ニューロン機構に関する構造的及び機能的解析から得られた成績について述べるとともに、これらが構成する脳幹～脊髄システムの役割について考察する。

(50) 二足歩行運動に大脳皮質機能は必要なのか？

森 大志, 中岡克己 (山口大学・獣医・生体システム科学, 近畿大学・医・生理)

歩行運動は姿勢制御と肢運動制御の統合・協調運動として表現される。この神経制御機序については、主に除脳ネコ標本による研究が進められ、1) 基底核-脳幹系の筋緊張制御への関与、2) 脳幹・小脳内の歩行運動誘発野の存在、3) 律動的な肢運動を生成する脊髄内神経機構の存在の可能性、などが示されてきた。これらの結果は四足歩行運動が脳幹・脊髄という下位神経機構によって達成され得ることを示唆する。一方、二足歩行運動は両下

肢での体幹支持と推進力産生により形成される。また、二足歩行はヒトや一部の霊長類にのみ観られ、四足歩行とは異なる制御機序を必要とする可能性がある。我々は二足歩行運動の中枢制御機序を解明する目的で、サル二足歩行モデルを確立した。一連の運動学的・機能画像・神経活動不活化、神経活動記録法などによる研究から、皮質運動野が二足歩行運動の基本的制御にも関与している可能性があることが明らかになりつつある。

(51) 遺伝子改変マウスを用いた歩行 CPG の研究

西丸広史 (筑波大院・人間総合科学・基礎医学系・生理)

歩行運動は足のそれぞれの筋肉が各関節をリズムミックスかつスムーズに曲げ伸ばしすることで生み出されている。これはそれぞれの筋群を支配する脊髄運動ニューロンが協調してリズムミックスに発火することによって実現されており、その基本的な発火パターンを形成する Central Pattern Generator (CPG; 中枢パターン発生回路) は脊髄に局在していると考えられる。しかしこの CPG によるリズムおよびパターン形成の神経メカニズムは依然として

不明であり、現時点で哺乳類の歩行 CPG の理解はブラックボックスに近い状態である。この歩行 CPG の神経機構の解明を目指して、私たちは遺伝子改変マウスを用いた生理学的研究に取り組んでいる。今回のシンポジウムでは脊髄摘出標本において歩行運動様リズム活動において筋活動パターンの異常を示す alpha-chimerin 欠損マウスおよび小胞型 GABA 輸送体 (VGAT) 欠損マウスを用いた研究を紹介する。

(52) 随意運動の空間表現は不随意的な実時間運動制御に影響を与えるか？

安部川直稔, 五味裕章 (NTT コミュニケーション科学基礎研究所・人間情報研究部, JST・ERATO 下條潜在脳プロジェクト)

視覚誘導性到達運動において、視線と到達目標の位置は重要な要素であり、空間情報が主に運動計画時に処理されるメカニズムについて多くの研究がなされてきた。本研究はこれら空間情報が運動遂行中に担う役割の解明を目的とする。具体的には腕運動中に視覚運動刺激によって生じる不随意的な腕応答 (MFR) に着目し、視線、到達目標、および視覚運動刺激の位置関係が MFR に与える影響を調べた。その結果、視線と到達目標の方向に近い

ほど、MFR は大きく誘発された。また、これら空間的關係性が位置知覚や眼球応答に対して与える影響は MFR に対してとは異なり、MFR のゲイン修飾は腕制御特有の処理系で行なわれていることが示唆された。更に、到達運動中にサッカードによる空間情報の更新を行なうと、その更新に応じた MFR の修飾が観察された。視線と到達目標の空間的關係性は、運動遂行中に実時間で MFR の修飾に反映されることが明らかになった。

(53) ヒトの視覚誘導性 switching 運動と一次視覚野

大木 紫, 渋谷 賢, 関口浩文, 門田 宏, 竹内成生, 中島八十一 (杏林大・医・生理,
国立リハセンター研究所・感覚障害部, 早稲田大・科健機構, 芝浦工大院・工・機能制御)

腕の到達運動中にターゲットの位置が変化すると, ヒトは素早く運動を修正し, 新ターゲットに到達できる。運動中の一次視覚野に経頭蓋磁気刺激 (TMS) を加え, この修正が意識下で起こる可能性を検証した。4 人の正常被験者が, 眼前に置かれたモニター中央に呈示されたターゲットに到達運動を行った。運動中に時々ターゲットが消え, 新ターゲットが左か右に短時間 (約 8ms) もしくは持続的に呈示された。新ターゲット呈示 100ms 又は

70ms 後に, 時々 TMS を加えた。各試行後被験者に, 新ターゲットが見えたか, その位置は左右どちらかを強制選択させた。TMS を加えない場合, 被験者は呈示時間に関わらず新ターゲットに運動修正できた。TMS を加えると新ターゲットを見落とす確率が増加した。遅延時間 100ms では, 見落としたターゲットに対する修正運動が観察された。また被験者は, 見落としたターゲットの位置をかなり正確に報告できた。

(54) 脳梁間線維を介した連合性対刺激法による運動皮質の可塑性誘導

小金丸聡子, 美馬達也, 中塚昌博, 植木美乃, 福山秀直 (京大院・医・高次脳機能総合研究センター)

SStefan らにより末梢神経電気刺激とその支配領域の運動皮質を経皮的磁気刺激法 (TMS) にて一定のタイミングで刺激する事で運動皮質の可塑性を誘導する連合性対刺激法が確立されている。連合性対刺激法の原理を用いて, TMS にて両側運動皮質を一定のタイミングで刺激する事で脳梁間線維を介して同様に運動皮質の可塑性が誘導されるかを検討した。【対象】健常試験者 10 人 (男 9, 女 1, 年齢 27~34 歳) 【方法】TMS にて両側 1 次運動野

における各母指外転筋の Hot spot を特定し, 一方の運動皮質を刺激後 15ms の刺激間隔で両側運動皮質の連合性対刺激を 30 分間行う。この前後及び 20 分後, 40 分後で皮質脊髄路の興奮性の評価として, Input-Output curve を測定する。【結果】介入前に比較し, 介入直後は有意に皮質脊髄路の興奮性が高まった。20 分後, 40 分後と徐々に介入前の状態に戻った。両側運動皮質の対刺激にて運動皮質の可塑性が誘導されたと考えられた。

(55) サルを対象とした脳活動からの行動予測

竹中一仁¹, 長坂泰勇², 入来篤史², 國吉康夫¹, 藤井直敬²
(¹ 東大院・情報理工・知能機械, ² 理研・BSI)

脳から直接情報を読み取るブレインマシンインターフェースは現在盛んに研究されているが, その多くが訓練を必要とし, 行われるタスクは自然環境の中の行動とはかけ離れている。本研究ではニホンザルを用い, サルが自律的に移動できる環境を構築し, その環境下でエサとりタスクを行わせることで自然な行動をしている際のサルの脳活動から行動を予測することを試みた。計測は多

点電極による複数領野からの同時計測を行い, 予測はフィールドポテンシャルを移動の開始および移動方向ごとに判別することで行った。また予測を各領野ごとに行うことで, 領野ごとの活動の違いを考察した。その結果, 移動の予測が可能であり, また領野によって予測性能のよい時間帯が異なることがわかった。

(56) 硬膜外電位計測による運動意図推定技術の研究

上嶋健嗣, 藤井俊行, 瀧田正寿, 横井浩史 (東大院・工・精密機械工, 産総研・人間福祉医工学)

計測した脳神経活動から個体の運動意図を推定する技術は、特に身体機能障害を補償する外部機器の操作等への応用が期待されている。しかし、通常の計測手法では電極を脳実質へ刺入するか硬膜下へ留置するため、神経細胞の損傷や感染症などの影響が懸念される。脳波、脳磁計測は非侵襲だが、信号が頭皮に到達するまでの重畳・減衰が著しく、運動意図推定の可否さえ危惧される。そこで我々は侵襲を硬膜外までに留め、頭蓋骨と硬膜の

間に電極を置くことで脳への損傷を防ぎ、硬膜外電位から運動意図推定することを試みた。本発表ではラットの運動状態に対応する複数同時計測した硬膜外電位データを周波数解析し、自己組織化マップによる可視化と人工ニューラルネットワークを用い解析した。推定精度が周波数帯に応じて異なることを予備的に見出しているが更に解析を進め、本計測方法による運動意図推定の可能性の詳細について報告する。

(57) 随意運動を生ずる意思の脳機構

松橋眞生, Mark Hallett, 美馬達哉, 福山秀直

(京工繊大・ベンチャーラボ, 京大院・高次脳センター, HMCS/NINDS)

視覚誘導性到達運動において、視線と到達目標の位置は重要な要素であり、空間情報が主に運動計画時に処理されるメカニズムについて多くの研究がなされてきた。本研究はこれら空間情報が運動遂行中に担う役割の解明を目的とする。具体的には腕運動中に視覚運動刺激によって生じる不随意的腕応答(MFR)に着目し、視線、到達目標、および視覚運動刺激の位置関係が MFR に与える影響を調べた。その結果、視線と到達目標の方向が近い

ほど、MFR は大きく誘発された。また、これら空間的關係性が位置知覚や眼球応答に対して与える影響は MFR に対してとは異なり、MFR のゲイン修飾は腕制御特有の処理系で行なわれていることが示唆された。更に、到達運動中にサッカードによる空間情報の更新を行なうと、その更新に応じた MFR の修飾が観察された。視線と到達目標の空間的關係性は、運動遂行中に実時間で MFR の修飾に反映されることが明らかになった。

S (4) 腕到達運動の視覚誤差情報に応じた学習戦略の変化

西條直樹, 五味裕章 (NTT コミュニケーション科学基礎研究所, ERATO 下條潜在脳プロジェクト)

プリズム眼鏡やコンピュータ環境などを利用して、視覚空間と運動空間のあいだに大きなずれを作ることができる。このような、視覚的な手先位置に誤差がある中で到達運動を学習するとき、突然大きな誤差が与えられる場合と比較して、小さな誤差から徐々に大きくなる誤差が与えられると、より大きな学習効果が得られると言われている。しかし、その学習効果の違いを生み出す運動学習の計算メカニズムはいまだ明らかではない。本研究ではそのメカニズムを、運動計画、フィードフォワード/

フィードバックコントローラから構成される一般的な到達運動の生成モデルに基づいて考察した。

被験者は、手先位置に回転座標変換を加えてスクリーン上に提示したカーソルを、始点の周囲 12 方向いずれかに提示される目標位置へカーソルを素早く動かす到達運動を繰り返し訓練した。そして、手先回転変換の学習前後で、到達運動開始までの反応時間と到達運動軌道の誤差、およびカーソルと手先の位置関係を運動中に変化させる視覚摂動に対する手先応答から推定した視覚フィー

ドバックゲインを比較した。

手先回転変換の回転角をある試行を境に突然大きくした場合 (sudden 条件), 学習後に反応時間が上昇し, 到達運動はほぼ直線的な軌道で適応した。一方で, 回転角をある試行数をかけて徐々に大きくした場合 (gradual 条件), 学習後も反応時間はあまり変化せず, 到達運動は曲がった軌道に収束した。このとき, カーソルを提示しない試行を学習後に与えると, 手先到達位置は目標位置から大きく外れた。さらに, 推定した視覚フィードバックゲインは学習後に上昇していた。これらの結果から, 到達運動の学習後, sudden 条件では主に運動計画が変化し, 一方の gradual 条件では視覚フィードバック制御を含む到達運動のコントローラが適応していたことが示唆される。

では, gradual 条件で運動中の視覚フィードバックが利

用できない場合, 到達運動は適応可能なのか。別の被験者に, gradual 条件において, 到達運動中にカーソルを提示せず, 到達運動終了直後からカーソルを提示した中で到達運動を訓練させた。すると, 学習後に視覚フィードバックゲインは減少し, 逆に反応時間は上昇して到達運動が達成されていた。つまり, gradual 条件であっても, オンラインの視覚フィードバックが利用できない場合には, フィードバックコントローラは利用せず, 主に運動計画を変化させて手先回転変換に適応していたことが示唆される。

これらの結果から, 到達運動の学習戦略が視覚的な到達運動の誤差情報に応じて柔軟に変化していることが示唆される。この学習戦略の変化が, 先行研究で示された学習効果の違いを生み出しているものと予想される。

S (5) 価値と戦略に基づいて選択の結果を評価する線条体神経細胞活動

山田 洋, 井ノ川仁, 木村 實 (京都府立医科大学・神経生理学)

人を含む動物は, 過去の経験から現在どの程度の報酬が得られるのか, 報酬の価値を推定して比較することで複数の選択肢から 1 つを選ぶ。その一方で, 過去の行動とそれに伴う報酬の経験から学習した行動の規則, すなわち行動戦略に従って意志を決めて行動する。報酬を求める行動の制御アルゴリズムは, 近年, 強化学習理論 (Sutton and Barto. 1998) として体系化され, 盛んに研究が行われている。

大脳基底核の線条体は報酬に基づく行動の選択と発現に重要な役割を果たす脳部位の一つで, 中脳ドーパミン細胞から“報酬の予測誤差信号”(報酬予測と実際に得た報酬との差; Schultz et al. 1997) を受け取り, 選択肢の価値の高低 (Kawagoe et al. 1998, Samejima et al. 2005) を学習する。線条体の背側部は大脳皮質の広範な領域から感覚・運動情報を受け取るが, 特に前頭前野から状況に応じた戦略の発現に関わる情報 (Genovesio et al. 2005, Barraclough et al. 2004) が送られる。我々は環境や他者の振舞いに応じて行動戦略を使い分けるが, 報酬に基づく単純な行動戦略として, 直前と同じ行動を行うか (Stay) 行動を変えるか (Switch) を, 報酬が得られたか (Win) 得られなかったか (Lose) に応じて選ぶ Win-Stay-Lose-Switch 戦略が知られている。価値に基づく行動も戦略に基づく

行動も, 選択結果の良し悪しを評価することが適切な行動に重要だが, そのメカニズムは十分に明らかでは無い。

価値と戦略に基づいて, 3 つの選択肢から報酬と結びついた 1 つを試行錯誤で探す課題を遂行中の 2 頭のサルの後側線条体から, 投射細胞と推定される 292 個の細胞を記録した。サルが手元のボタンを押し, その後点灯する 3 つのボタンから一つを選ぶと報酬の有無を知らせるビープ音が鳴る。サルはこの正と負の評価信号を手がかりに, Lose-Switch 戦略を使って試行錯誤で報酬の得られるボタンを探す。サルは一度目の選択で 33%, 2 度目で 50%, 3 度目で平均 85% の確率で報酬を獲得した。もう一度同じボタンを選ぶことで報酬を得られるので, サルは Win-Stay 戦略に従ってボタンを選び, 平均 95% の確率で繰り返しの報酬を獲得した。線条体の神経細胞は課題遂行中に現れる感覚・運動事象に一過性の放電応答を示した。ビープ音の直前に放電した細胞 128 個のうち 25% が, 報酬確率に正や負に相関する活動を示した。これら報酬の価値に基づいて評価信号を予測する細胞は, サルが選択したボタンの位置に依存して放電の強度を変え, 正か負の評価信号に対して放電を増減させた。その一方で, 25% の細胞が試行錯誤の Lose-Switch, もしくは繰り返しの Win-Stay 戦略を反映して評価信号をコードした。

この結果から、選択した行動の結果を評価する線条体の対照的な細胞群が、報酬に基づく意志決定と行動選択に

重要な役割を果たすと考えられる。

S (6) 脊髄は手の運動をどのように制御しているのか？

武井智彦（生理学研究所）

私たち人間をはじめとする霊長類は、手先を自由自在に使って物を掴んだり操ったりすることが出来る。我々の多くの社会的、文化的な営みが、これらの手の運動によって成し遂げられていると言っても過言ではない。それでは、どうして霊長類の手はこれほどまでに器用なのだろうか？

このような手の動きの多彩さは、他の身体部位では見られない特殊な解剖構造によって実現されている。ヒトの手の運動には 39 種類におよぶ骨格筋が関与し、さらに有効関節数は 18 個にも及んでいる。この高い自由度によって変幻自在な手の運動が実現されているのである。しかし一方で、このような自由度の高さは、制御側の中枢神経系に非常に複雑な力学的計算負荷を要求することになる。例えば、ボール状の物体を手で握ろうとすると、物体の形状に合わせて関節を動かすために各筋肉の活動を逐一決定しなければならない。この際、同じ手の姿勢を実現する筋活動の解は一義的に決定せず、正解となる筋活動のパターンは無数に存在してしまう。それなのに私たちはいとも簡単に、しかも非常に一貫した所作で何度でもボールを掴むことが出来る。それでは一体、

中枢神経系は自由度をどのように制御しているのだろうか？

この問題の解決には、今まで随意運動制御における「ブラックボックス」として存在して来た脊髄の神経機構に重要な手がかりが存在すると考えられる。我々のグループでは、把握運動（精密把握）中のサル（頸髄第 5 節～胸髄第 1 節）から単一ニューロン活動および局所電場電位の記録を行い、脊髄神経機構における把握運動制御の役割について研究を行ってきた。その結果 (1) 個々の脊髄介在ニューロンが手指の複数の筋肉に対して協働的に活動させる機能を持っていること、(2) 運動中の感覚入力脊髄介在ニューロンへとフィードバックされていることを示す結果が集まってきている。今回の発表では、これらの最近の実験結果を紹介しつつ、霊長類の手の運動制御における脊髄神経機構の機能的な役割について考察を行う。

(参考文献)

Tomohiko Takei, Kazuhiko Seki “Spinomuscular coherence in monkeys performing a precision grip task.” *Journal of Neurophysiology*, v 99, pp 2012-2020 (2008)

16. 認知神経科学の先端「動機づけと社会性の脳内メカニズム」

2008年9月11日－9月12日

代表・世話人：松元健二（玉川大学 脳科学研究所）

世話人：吉田正俊（生理学研究所 認知行動発達研究部門）

所内対応者：伊佐 正（生理学研究所 認知行動発達研究部門）

（1）対戦ゲーム中のサル前頭連合野ニューロン活動

細川貴之（東京都神経科学総合研究所 心理学研究部門）

（2）アレキシサイミア（失感情症）と社会神経科学

守口善也（国立精神・神経センター 心身医学研究部）

（3）脳機能マッピングの陥穽－脳神経科学の方法論を問い直す－

遠藤利彦（東京大学 教育学部 教育心理学コース）

（4）報酬量，報酬遅延，満足度に基づくモチベーション制御の脳内メカニズム

南本敬史（独立行政法人 放射線医学総合研究所 分子イメージング研究センター）

（5）ヒト線条体における社会的および金銭的報酬の処理

出馬圭世（生理学研究所 心理生理学研究部門）

（6）心理学と脳科学の動機づけ研究の融合

村山 航（東京工業大学 大学院社会理工学研究科 人間行動システム専攻）

【参加者名】

松元健二（玉川大学 脳科学研究所），細川貴之（東京都神経科学総合心理学研究部門），守口善也（国立精神・神経センター 心身医学研究部），遠藤利彦（東京大学 教育学部 教育心理），南本敬史（放射線医学総合研究 分子イメージング研究），村山 航（東京工業大学 大学院社会理工学），藤井直敬（理化学研究所 脳科学総合研究センター），小川 正（京都大学 大学院 医学研究科），村田 哲（近畿大学 医学部 生理学），永福智志（富山大学 大学院医学薬学），菅生康子（産業技術研究総合脳神経情報研究部），七五三木聡（大阪大学 大学院医学系研究），河村章史（平成医療専門学院作業療学科／畿央大学大学院健康科学研究科），鹿内 学（京都大学 認知行動脳科学分野），小川昭利（理化学研究所脳科学総合研究センター象徴概念発達研究チーム），山川義徳（京都大学大学院情報学研究科），平松千尋（生理学研究所 感覚認知情報部門），篠崎 淳（大阪大学社会経済研究所），吉田優美子（生理学研究所 心理生理学研究部門），長塚昌生（大阪大学経済学研究科），吉田慎一（江南厚生病院リハビリテーション科），高雄啓三（藤田保健衛生大学），三島友美（JA 愛知厚生連 江南厚生病院），藤本 淳（旭川医大医学部医学科），駒田致和（京都大学大学院医学研究科 先端技術センター生体遺伝子機能解析グループ

（宮川グループ）），桑原 優（RIKEN BSI 認知機能表現チーム），牧田 快（生理学研究所 心理生理学研究部門），二本杉剛（大阪大学経済学研究科），永井貴士（平成医療専門学院），桑島真里子（東京都神経科学総合研究所 心理学研究部門），松本惇平（富山大学大学院医学薬学研究部システム情動科学），西條辰義（大阪大学社会経済研究所），柴田和久（ATR 脳情報研究所），中原裕之（理化学研究所 脳科学総合研究センター 理論統合脳科学研究チーム），土井隆弘（大阪大学大学院 生命機能研究科 認知脳科学（藤田）研），高田昌彦（東京都神経科学総合研究所），平井大地（京都大学 霊長類研究所 行動発現分野），西田知史（奈良先端科学技術大学院大学 情報科学研究科 論理生命学講座），喜多いずみ（奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科 論理生命学講座），則武厚（玉川大学 脳科学研究所），野澤真一（東京工業大学），池谷裕二（東京大学・大学院薬学系研究科），杉山 崇（神奈川大学人間科学部），齋藤慈子（東京大学大学院総合文化研究科），仁木和久（産総研 脳神経情報研究部門），国里愛彦（広島大学大学院医歯薬学総合研究科精神神経医科学），福島 愛（東北大学加齢医学研究所脳機能開発研究分野），関口 敦（東北大学加齢医学研究所脳機能開発研究分野），小野田慶一（広島大学大学院医歯薬学総合

研究科), 廣本建一 (トヨタ自動車(株)FP 部), 岩崎麻衣 (慶應義塾大学大学院 理工学研究科), 宮崎由樹 (首都大学東京人文科学研究科), 雨宮 薫 (東京大学大学院), 大良宏樹 (東京工業大学総合理工学研究科知能システム科学専攻), 荻野正樹 (JST ERATO 浅田共創知能システムプロジェクト), 伊藤岳人 (東京工業大学大学院生命理工学研究科), 佐々木哲也 (基礎生物学研究所・脳生物学研究部門), 横井 功 (自然科学研究機構 生理学研究部 感覚認知情報部門), 鮫島和行 (玉川大学脳科学研究所), 佐柳信男 (国際基督教大学), 安藤史高 (一宮女子短期大学), 原 壘 (東京大学大学院総合文化研究科), 石津智大 (慶應義塾大学), 沖津健吾 (東京工業大学大学院 総合理工学研究科 知能システム科学専攻 三宅研究室), 江木 衷 (協和発酵フーズ), 内山 薫 (筑波大学), 宇賀貴紀 (順天堂大学医学部生理学第一講座), 田中あゆみ (同志社大学文学部心理学科), 権藤元治 (国立精神・神経センター精神保健研究所心身医学研究部), 御代田亮平 (東京大学大学院新領域創成科学研究科複雑理工学専攻 武田研究室), 住井泰介 (京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科情報工学専攻), 松元まどか (玉川大学脳科学研

究所), 大石 仁 (愛知医科大学医学部解剖学講座), 中原 潔 (国立精神・神経センター), 一戸紀孝 (理化学研究所 BSI), 出馬圭世 (生理研 心理生理), 小村 豊 (産業技術研究総合), 星 英司 (玉川大学 脳研), 伊藤 南 (生理研 感覚認知情報), 鈴木匡子 (山大・医・院・高次脳機能), 岡澤剛起 (生理研 感覚認知情報), 柴田智広 (NAIST), 小林 康 (大阪大学), 中村加江 (関西医大), 加藤利佳子 (生理研 認知行動発達機構), 筒井健一郎 (東北大学), 杉山容子 (生理学研究所 認知行動発達機構部門), 綾部友亮 (生理学研究所 感覚運動調節部門), 平井真洋 (生理学研究所 感覚運動調節部門), 佐野香織 (生理学研究所 心理生理学研究部門), 稲垣晴久 (生理学研究所 NBR), 金桶吉起 (生理学研究所 感覚運動調節部門), 伊佐 正 (生理学研究所 認知行動発達部門), 吉田正俊 (生理学研究所 認知行動発達部門), 梅田達也 (生理学研究所 認知行動発達部門), 渡辺秀典 (生理学研究所 認知行動発達部門), 坪井史治 (生理学研究所 認知行動発達部門), 高浦加奈 (生理学研究所 認知行動発達部門) (合計 98 人)

【概要】

人間の心の仕組みを脳を起点にして明らかにすることを目指す認知神経科学は, 神経生理学, 心理物理学, 脳機能イメージング, 計算論的神経科学といったさまざまな discipline からなる学際的領域であり, また実験対象も人間からサル, ラット, マウスと多様なものが扱われている。このような学際的領域を発展させるためには 1) 専門分野を超えた共同研究 (情報交換) の促進と 2) 研究者の層の厚みを増やすことが不可欠である。そこで本研究会では, 認知神経科学における 2 つの重要なトピック「動機づけと社会性」に絞ったうえで, 1) 共通するテーマに関連するさまざまな研究領域から, 2) アクティブに研究成果を出している実際上の研究実施者を中心に選り抜いて人選を行った。内訳は, サル電気生理 (2 名), 脳機能

イメージング (2 名), 心理学 (2 名) であり, 広範な領域から最新の話題を提供してもらった。発表では議論の時間を多く取ることによって, 特定のテーマについて様々な角度から議論を深める形式を採用した。また本研究会の特色として, 講演者以外にも指定討論者として研究活動のアクティビティが高い研究者を招き, より活発で深化した議論を目指した。さらに, 各講演に対して座長を 2 人配置することにより, 議論のリードがよりスムーズになるように配慮した。さらに総合討議の時間を 2 回それぞれ 60 分設けた。その結果, 活発で広範な分野からの質の高い議論がすべての講演で行われ, 研究会参加者から高い評価を得ることができた。

(1) 対戦ゲーム中のサル前頭連合野ニューロン活動

細川貴之 (東京都神経科学総合研究所 心理学研究部門)

我々は競争場面に特有のニューロン活動を調べるため, サルに対戦型シューティングゲームを行わせた。ゲーム

では、モンキーチェアに座った2頭のサルが、コンピュータモニタ上で互いに競い合った。ゲームが始まるとモニタの左右両端に砲台を模した三角形が表示され、サルは相手の砲台（ターゲット）を狙って互いに弾を撃ち合った。これら競争条件・非競争条件でサルがゲームをしているときに、前頭連合野背外側部から単一ニューロン活動を記録した。

その結果、サルの行動およびニューロン活動に競争条件と非競争条件で違いがみられることを見出した。たとえば、競争条件における命中率は非競争条件よりも高く、

競争条件においてサルがより集中していると考えられる。またニューロン活動では、競争条件で勝って報酬をもらったときの活動と、非競争条件で報酬をもらったときの活動に差があるニューロンが数多く見つかった。また逆に、競争条件で負けて報酬がもらえなかったときの活動と、非競争条件で報酬がもらえなかったときの活動に差があるニューロンも多く存在した。これらの結果は、行動レベルおよびニューロンレベルで競争事態と非競争事態が区別されていることを示している。

(2) アレキシサイミア（失感情症）と社会神経科学

守口善也（国立精神・神経センター 心身医学研究部）

心身の疾病の発症・増悪に関わる性格背景として、自己の情動の認知障害「アレキシサイミア（失感情症）」という概念が臨床のフィールドから提唱されている。この概念は「自己」の表象に関わる能力を指すが、自己にとどまらず、「他者」の表象に関わる精神疾患（例えば自閉症スペクトラム）やその研究においてもアレキシサイミアが関わっているという知見がある。さらに近年神経科学の領域では、ミラーニューロンや共感など、自己と他者の表象には共通項があることも知られるようになった。

そこで考えられるひとつの仮説は「自分の事がわからないひととは、他人の事もわからないのではないか？」というものである。そこで、脳機能画像を用いて、「自己」の情動の同定・表象困難であるアレキシサイミアを有する人々において、昨今の神経科学の領域で取り上げられている様々な他者理解のコンテキスト（心の理論、他者の痛みの評価、ミラーニューロン）において、脳の活動が異なるのかどうか、またどのように異なっているのかを検証してみた。

(3) 脳機能マッピングの陥穽 —脳神経科学の方法論を問い直す—

遠藤利彦（東京大学 教育学部 教育心理学コース）

話者の立ち位置は基本的に脳神経科学のはるか外に在る。無論、遠く外側から眺めても、脳神経科学、特にまさに今回の主要テーマである社会性や動機づけをターゲットとする、いわゆる"social neuroscience"の内部が相当に熱く喧しそうなことは、図書やメディアを通じたその夥しい知見発信から、否応なく伝わってくる。とりわけ、近年のミラーニューロンを巡る研究の飛躍的な進展には、これまで少なからず共感性や自他理解の起源と発達あるいは自閉症の中核的特異性などに関心を有してきた話者の目からしても、それこそ「目から鱗が落ちる」

ほどの衝撃性があったと言っても過言ではない。しかしながら、偽りなく言えば、話者にとって、こうした知的好奇心が大いに掻き立てられるような研究例はきわめて稀少であることを素直に述懐しておくこととしたい。むしろ、耳目に飛び込んでくる知見の大半は、興奮にはほど遠い、場合によっては「またか」という思いを強いてくるものばかりである。蓋し、こうした幾分冷めた印象は話者一人に限られたものではなく、脳神経科学の外に立つ者の多くに通底する思いなのかも知れない。果たして、それはいったい何故なのだろうか。

(4) 報酬量, 報酬遅延, 満足度に基づくモチベーション制御の脳内メカニズム

南本敬史 (独立行政法人 放射線医学総合研究所 分子イメージング研究センター)

モチベーション (動機付け) はヒトや動物を行動へ駆り立て、目標へ向かわせる脳内過程です。モチベーションは、行動の結果得られると予測される報酬の量やタイミングなどの外的要因である誘因 (incentive) と、その報酬を身体がどの程度欲しているかという内的要因である動因 (drive) の2要因によって脳内で制御されると考えられます。

我々は、このモチベーション制御の脳内機構を探るために、誘因を操作し、動因をモニタした状態で、サルに同じ行動を要求し、そのモチベーションを測定できるよ

うな行動課題を開発しました。サルに行動課題を、喉が渇いた状態から十分に水をもらって満足するまで行わせたところ、課題を開始してしばらくはほとんどミスなしに試行をこなすが、満足して課題をやめようかという頃には、特に報酬が少ない/遅延が長いと予測される試行において、バーを早く放してしまったり、放すのが遅かったりというエラーが多く観察されました。サルはこの課題をミスなしにこなす能力が有るにもかかわらず、状況によってミスをすることから、課題の成功率をモチベーションの指標となると考えられます。

(5) ヒト線条体における社会的および金銭的報酬の処理

出馬圭世 (生理学研究所 心理生理学研究部門)

ヒトが見せる血縁関係にない他者に対する利他的行動は、ヒト特有であると考えられていること、さらに自然淘汰の原理からは簡単に説明できない現象であることから、多くの研究者の注目を集めてきた。このような利他的行動は、行動は利他的ではあるが、その動機は利己的であるという見方が最も有力である。社会的交換理論によると、社会的な報酬を得ることが、利他的行動をとる一つの大きな理由であると考えられ、実際に社会心理学の研究からその考えを支持する証拠が報告されている。しかしながら、このヒトにとって重要な社会的報酬が脳内でどのように処理されているかは未だわかっていない。

そこで、本研究では、「自分に対する他者からの良い評判は、金銭報酬と同様に脳の報酬系を賦活させる」という仮説を検討した。fMRI 内で、自分に対する良い評判と金銭報酬を知覚させると、報酬系として知られる線条体の賦活が共通して見られた。これは、他者からの良い評判は、報酬としての価値を持ち、脳内において金銭報酬と同じように表象されているということを示している。この結果は、様々な異なる種類の報酬を比較し、意思決定をする際に必要である「脳内の共通の通貨」の存在を強く支持しており、複雑なヒトの社会的行動の神経科学的理解への重要な最初の一歩であると考えられる。

(6) 心理学と脳科学の動機づけ研究の融合

村山 航 (東京工業大学 大学院社会理工学研究科 人間行動システム専攻)

本発表では、心理学の動機づけ (またはその周辺領域) 研究を概観しながら、それらが脳科学の研究パラダイムにどのような影響を与えうるか (またはその逆) について、筆者自身の研究も交えて考察する。

動機づけという概念は一枚岩ではない。例えば、「○○

が好き」ということ1つをとっても、内発的に好きなのか、外的な報酬と連合しているから好きなのか (内発-外発の問題) という違いがあるし、また顕在的に好きだと言っている潜在的には好きではないかもしれない (潜在-顕在の問題)。Hedonic value から考えると明らかに

ネガティブなことを、好きだといって主体的に取り組む人もいる。そして、それぞれの概念に適切な指標が存在する。こうした概念の多元性は、モデルの構築や結果の解釈に大きな示唆を持つ。

動機づけ理論は、そうした最終的な「価値」を算出するモデルにどのような付加的なパラメータが必要なのか、ということに示唆を与えるだろう。例えば内発的動機づけ・好奇心という概念は、情報の探索行動にも何らかの

主観的価値が伴っていることを示している。これは実際に近年の脳科学研究において、そのようなことを数理モデル化する試みが行われている。また、外的報酬が学習者の動機づけを低下させるというアンダーマイニング効果の研究では、報酬が必ずしもその行動の価値を増加させない（むしろ低下させる）可能性があることを示唆している。

17. 新たなコンセプトでシナプス伝達機構を考える

2008 年 9 月 19 日－9 月 20 日

代表・世話人：福田敦夫（浜松医科大学生理学第一講座）

所内対応者：鍋倉淳一（生体恒常機能発達機構）

- (1) The lateral connections in the superficial layer of the mouse superior colliculus
Phongphanphanee Penphimon（総合研究大学院大学大学院生命科学研究科）
- (2) 経頭蓋蛍光イメージングによるマウス高次視覚機能の解析
澁木克栄（新潟大学脳研究所システム脳生理学分野）
- (3) マウス新生児脊髄反回抑制回路におけるシナプス結合様式
西丸広史（筑波大学大学院 人間総合科学研究科）
- (4) 2 型リアノジン受容体による海馬苔状シナプス前カルシウム動態の増幅
神谷温之（北海道大学大学院 医学研究科）
- (5) Presynaptic phenotype の基礎検討
桂林秀太郎（福岡大学薬学部）
- (6) グルタミン酸のシナプス小胞への取込機構
高森茂雄（東京医科歯科大学脳統合機能研究センター）
- (7) シナプス小胞エンドサイトーシス活動依存性加速メカニズムの生後発達
山下貴之（沖縄科学技術研究基盤整備機構大学院大学
先行研究プロジェクト細胞分子シナプス機能ユニット）
- (8) 運動神経終末の Ca 誘起性 Ca 遊離の特性とそのシミュレーション
久場健司（名古屋学芸大学 管理栄養学部）
- (9) プルキンエ細胞における AMPA 受容体双方向性トラフィッキングとモデルによる考察
山口和彦（理化学研究所脳科学総合研究センター）
- (10) コンピュータシミュレーションと生理学実験による小脳抑制性シナプス可塑性の
誘導閾値制御メカニズムの解析
北川雄一（京都大学大学院 理学研究科）
- (11) 海馬スライス培養系における神経細胞生後新生の系譜解析
横瀬 淳（東北大学大学院 生命科学研究科）
- (12) 頭部外傷後のシナプス可塑性障害に対するエダラボンの効果
蓮尾 博（久留米大学医学部）
- (13) 慢性痛による扁桃体中心核シナプス伝達の増強機構
加藤総夫（東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター）
- (14) 神経細胞体における Ca^{2+} 誘起性 Ca^{2+} 遊離の不活性化機構
秋田天平（生理学研究所機能協同研究部門）
- (15) 網膜双極細胞間に存在する電気シナプスの性質と働き
荒井 格（東京大学大学院人文社会系研究科）
- (16) 海馬 CA1 アストロサイトにおける GABA カレントと細胞内 Cl^- 濃度変化
江川 潔（浜松医科大学医学部第一生理学講座）

【参加者名】

久場健司 (名古屋管理栄養学部), 秋田天平 (生理学研究所機能協同研究部門), 山下貴之 (沖縄科学技術研究基盤整備機構大学院大学先行研究プロジェクト), 岩槻 健 (味の素 (株) ライフサイエンス研究所生理機能研究グループ), 北村明彦 (味の素 (株) ライフサイエンス研究所生理機能研究グループ), 荒井 格 (東京大学大学院人文社会系研究科), 田中雅史 (東京大学大学院人文社会系研究科), 神谷温之 (北海道大学大学院 医学研究科), 山口和彦 (理化学研究所脳科学総合研究センター), 畔柳智明 (京都大学大学院 理学研究科), 早戸亮太郎 (名古屋学芸大学管理栄養学部), 長井宏樹 (名古屋学芸大学管理栄養学部), 北川雄一 (京都大学大学院理学研究科), 西丸広史 (筑波大学大学院人間総合科学研究科), 山下愛美 (京都大学大学院理学研究科), 蓮尾 博 (久留米大学医学部), 桂林秀太郎 (福岡大学薬学部), 美藤純弘 (岡山大学大学院医歯薬学総合研究科), 平野丈夫 (京都大学大学院理学研究科), 金田勝幸 (生理学研究所認知行動発達機構), 本橋祥子 (沖縄科学技術研究基盤整備機構大学院大学先行研究プロジェクト), Phongphanphanee Penphimon (総合研究大学院大学大学院 生命科学研究科), 江川 潔 (浜松医科大学医学部), 高森茂雄 (東京医科歯科大学脳統合機能研究センター), 加藤総夫 (東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター), 関野祐子 (東京大学医科学研究所), 澁木克栄 (新潟大学脳研究所), 八尾 寛 (東北大学大学院生命科学研究科), 植田紘貴 (岡山大学大学院医歯薬学総合研究科), 横瀬 淳 (東北大学大学院生命科学研究

科), 江口工学 ((独) 沖縄科学技術研究基盤整備機構大学院大学先行研究プロジェクト), 上條真弘 (総合研究大学院大学大学院生命科学研究科), 中村行宏 (沖縄科学技術研究基盤整備機構細胞分子シナプス機能ユニット), 安藤 祐 (名古屋学芸大学管理栄養学部), 堀 哲也 (沖縄科学技術研究基盤整備機構高橋ユニット), 大塚稔久 (富山大学大学院医学薬学研究部), 川口真也 (京都大学大学院理学研究科), 高橋由香里 (東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター), 山本清文 (東京慈恵会医科大学大学院), 熊田竜郎 (浜松医科大学生理学第一講座), 村越隆之 (東京大学大学院総合文化研究科), 持田澄子 (東京医科大学), 和氣弘明 (生理学研究所生体恒常機能発達機構), 稲田浩之 (総合研究大学院大学大学院生命科学研究科), 西巻拓也 (総合研究大学院大学大学院生命科学研究科), 渡部美穂 (生理学研究所生体恒常機能発達機構), 山口純弥 (総合研究大学院大学大学院生命科学研究科), 齋藤直人 (同志社大学生命医科学部), 鍋倉淳一 (生理学研究所生体恒常機能発達機構), 石橋 仁 (生理学研究所生体恒常機能発達機構), 高鶴裕介 (生理学研究所生体恒常機能発達機構), 成田和彦 (川崎医科大学生理), 前野 巍 (島根医科大学生理学), 平尾顕三 (総合研究大学院大学大学院生命科学研究科), 江藤 圭 (生理学研究所生体恒常機能発達機構), Kim Sun Kwang (生理学研究所生体恒常機能発達機構), 森島寿貴 (浜松医科大学生理学第一講座), 古川智範 (浜松医科大学第一生理学講座), 福田敦夫 (浜松医科大学生理学第一講座)

【概要】

シナプスは化学的情報と電気的情報が直接的に関わり合う重要な場であり, シナプス機能の解明は中枢神経機能の分子基盤の解明そのものである。すなわちシナプスの機構解明は神経科学の命題の一つである。シナプス伝達の研究は, 遺伝子工学, パッチクランプ法, 光学的測定法などの技術導入により大きく進展し, 多くの知見が集積しつつある。しかし, 今後さらに発展させるためには, 多面的なアプローチと専門分野の境界を超えた共同研究が不可欠である。本研究会は, 生理学, 生化学, 形態学の立場からシナプス研究の最先端にある研究者が一堂に会して情報交換を行うことを目的とし, 平成20年9月19日(金) - 20日(土) の2日間開催された。

以下の5つのセッションが行われ, 合計16題の発表が

あり, それぞれの座長のもと活発な討議が行われた。システム (加藤総夫) ではインビボイメージングとスライスパッチクランプの異なる手法で解析されたシナプス伝達機構が議論された。シナプス前機構 (澁木克栄) では伝達物質放出のシナプス前調節とシナプス小胞への伝達物質取り込み, 小胞の終末へのエンドサイトーシスとパラエティのある発表であった。シミュレーション・モデル (平野丈夫) では運動神経や小脳を用いた実験結果のモデル化の試みとシミュレーションによるモデルの妥当性についての検証が紹介された。発達・可塑性のメカニズム (八尾 寛) では神経細胞の生後新生あるいは傷害による誘発という新しい観点でのシナプスの発達・可塑性が議論された。シナプス伝達の新展開 (関野祐子) では Ca^{2+}

誘起性 Ca^{2+} 遊離の不活性化機構, 電気シナプス, アストロサイトの Cl^- 調節によるシナプス伝達を調整など, ユニークな研究が紹介され, まさに研究の新展開を予感させ

た。全体を通して, 自由活発な討論と, 若手研究者の積極的な姿勢が目立ち, 新たな研究方向と共同研究の可能性が具体化した。

(1) The lateral connections in the superficial layer of the mouse superior colliculus

Phongphanphanee Penphimon^{1,2}, Robert Marino³, Katsuyuki Kaneda^{1,2},
Yuchio Yanakawa⁴, Douglas P. Munoz³, Tadashi Isa^{1,2,5}

¹Department of Developmental Physiology, National Institute for Physiological Sciences,

²Department of Physiological Sciences, School of Life Science, The Graduate University for Advanced Studies (SOKENDAI), Hayama, Japan,

³Department of Physiology, Centre for Neuroscience Studies, Canadian Institute of Health Research Group in Sensory-Motor Systems, Queen's University, Kingston, Ontario, Canada,

⁴Department of Genetic and Behavioral Neuroscience, Gunma University Graduate School of Medicine, Maebashi, Japan,

⁵The Core Research for Evolutionary Science and Technology (CREST), Japan Science and Technology Agency (JST), Kawaguchi, Japan)

The superior colliculus (SC), a layered midbrain structure, functions as a crucial integrative center for orienting behaviors such as saccadic eye movements. Lateral connections within this map have been proposed to mediate temporal and spatial competition among multiple visual stimuli that can simultaneously appear within different locations of the visual field. Furthermore, they propose that short-range excitation and a long-range inhibition shapes the distribution of neural activity in the SC map in a winner-take-all fashion. We have found short-range excitation surrounded by long-range inhibition in the local circuits of the SGS layer. When excitatory and

inhibitory interactions were separated and compared with voltage-clamp recordings at different holding potentials, inhibition exhibited a delayed onset and longer duration than the excitation. The differences in the temporal characteristics of the excitatory and inhibitory responses contributed to a center-surround receptive field map in the superficial layer. We conclude that local lateral interactions in the SGS layer play a key role in the competition of visual input in the SC local circuit proposed by the models for target selection process of saccadic eye movements.

(2) 経頭蓋蛍光イメージングによるマウス高次視覚機能の解析

澁木克栄 (新潟大学脳研究所システム脳生理学分野)

遺伝子改変操作は高次脳機能の分子メカニズムを研究する上で重要な手段である。しかし遺伝子改変操作が容易に出来るマウスの高次脳機能の解析は限定的であり, 高次脳機能が詳しく解析されている霊長類の遺伝子改変操作は困難である。このジレンマを解決するため, 我々は活動依存的な緑色フラビン蛋白蛍光シグナルを利用し

た経頭蓋蛍光イメージングによってマウスの皮質活動を可視化し, 高次脳機能の解析に取り組んでいる。この研究会では, 霊長類において詳細に解析が進んでいる高次視覚機能が, マウスでどこまで解析できるのか, 我々のデータを紹介したい。眼優位性変化を起こすもう一つの操作として, 斜視が知られている。そこでマウスの片目

に約 30 度光を屈曲させるプリズムを装着させ、実質的な外斜視状態を作り出し、視覚野応答への影響を解析した。4 週齢のマウスに 5-7 日間片眼プリズムを装着させると、斜視眼を介する視覚野の応答が、健常眼を介する視覚野応答と比較して有意に抑圧された。視覚野の応答が抑圧されるには、生後 4 週齢程度が効率が良く、6 週齢のマ

ウスでは観察されなかったもので、この可塑性には臨界期が存在すると思われる。マウスで実験する意義の一つは、冒頭で述べたように遺伝子改変技術が使用できることである。そこで遺伝子改変マウスを用いた我々の最新の知見についても紹介したい。

(3) マウス新生児脊髄反回抑制回路におけるシナプス結合様式

西丸広史 (筑波大学大学院人間総合科学研究科)

哺乳類の脊髄において Renshaw 細胞が運動ニューロンの軸索側枝から興奮性シナプス入力を受け、運動ニューロンを反回性に抑制することはかなり以前より知られている。しかし、この反回抑制回路を構成する二つのニューロン群の結合様式にはまだ不明な点が多い。脊髄内の神経結合をほぼ正常に保ったまま Renshaw 細胞をホールセルパッチクランプ記録し、複数の腰髄髄節の前根をガラス吸引電極により電気刺激することで、異なる運動ニューロン群からのシナプス入力様式を調べた。運動ニ

ューロンのホールセルパッチクランプ記録で前根を刺激すると中潜時 (6-8 ms) の IPSP が観察されるが、細胞体が局在する髄節の前根だけではなくその前後の髄節の前根の電気刺激によってもほぼ同じ振幅の IPSP が観察された。以上の結果から、Renshaw 細胞は興奮性入力を受ける運動ニューロン群とは異なる運動ニューロン群をも抑制していることが示唆された。この運動ニューロンと Renshaw 細胞の結合の非対称性はこの回路の機能的意義を探る上で非常に重要な知見と考えられた。

(4) 2型リアノジン受容体による海馬苔状シナプス前カルシウム動態の増幅

神谷温之 (北海道大学大学院医学研究科神経生物学分野)

海馬苔状線維シナプスにおける長期増強 (long-term potentiation : LTP) は、NMDA 受容体活性化を必要とせず、テタヌス刺激によるシナプス前部でのカルシウム上昇が可塑的な変化を誘発し、持続的な伝達物質放出の増大を引き起こすと考えられている。本研究では、軸索標識法によるシナプス前カルシウム動態測定と免疫組織学的解析を併用して、苔状線維シナプス前部のリアノジン受容体の活性化機構と分子局在について調べた。2 型 (心筋型) リアノジン受容体 (RyR2) は海馬に高密度に発現し、中でも苔状線維の走行する CA3 野透明層および歯状

回分子層に強い発現を認めた。各種マーカー分子との二重免疫染色により、CA3 野透明層における RyR2 の細胞内局在を解析したところ、RyR2 の標識は苔状線維終末のマーカーである小胞型グルタミン酸トランスポーター VGLUT1 や樹状突起マーカーの微小管関連タンパク MAP2 とは共存せず、軸索マーカーであるニューロフィラメント NF160 と強い共局在を示した。苔状線維軸索に発現する RyR2 がカルシウム誘発カルシウム放出 (CICR) の機構を介してシナプス前カルシウム動態を増幅する可能性が考えられた。

(5) Presynaptic phenotype の基礎検討

桂林秀太郎（福岡大学 薬学部 臨床疾患薬理学教室）

シナプスに関連する遺伝子改変動物の Synaptic phenotype を解析する際、標的遺伝子の Dysfunctional phenotype だけなのか、シナプスの発達異常 (Abnormal Synaptogenesis) を含む phenotype なのか判断することはシナプスの機能を理解する上で重要な課題である。Quantum size もしくは AMPA 受容体の感受性は培養初期から中期には変化を認めず、培養後期に増大した。加えて、活動電位発火に同期的な Synchronous release 成分と

非同期的な Asynchronous release 成分も発達とともに増加したが、両者の比率に発達変化は認められなかった。また、シナプス数は培養初期から中期にかけて急増し、中期から後期は微増する傾向が予測できた。以上の結果から、単一ニューロンの各種パラメーターの発達変化にはタイミングのズレがあることが分かった。これらの結果は遺伝子改変動物の Synaptogenesis と Synaptic phenotype の区別に有用であると考えられる。

(6) グルタミン酸のシナプス小胞への取込機構

高森茂雄（東京医科歯科大学脳統合機能研究センター）

酸性アミノ酸であるグルタミン酸は、哺乳類中枢神経系で最も主要な興奮性神経伝達物質として働く。ニューロンがグルタミン酸を神経伝達物質として用いるためには、グルタミン酸を分泌小胞であるシナプス小胞へと濃縮する必要がある。この過程を担うのが、小胞型グルタミン酸トランスポーター (VGLUT) である。他の神経伝達物質と同様に、グルタミン酸のシナプス小胞への輸送は、液胞型プロトン ATPase (V-ATPase) によって形成さ

れるプロトン電気化学勾配によって駆動されるが、そのエネルギー要求性や塩素イオンによる二層性の依存など、VGLUT の分子同定後も依然として多くの疑問を残したままである。本口演では、シナプス小胞のグルタミン酸輸送機構に関する現在までの歴史的な知見を総括するとともに、シナプス小胞膜の塩素イオン透過性の解明を契機として、最近我々が提唱するに至った「VGLUT の新しい輸送制御機構」に関して議論したい。

(7) シナプス小胞エンドサイトーシス活動依存性加速メカニズムの生後発達

山下貴之¹，江口工学¹，高橋智幸^{1,2}

(¹ (独) 沖縄科学技術研究基盤整備機構細胞分子シナプス機能ユニット, ² 同志社大学生命医科学部)

シナプス小胞エンドサイトーシスにおける神経終末端細胞内 Ca^{2+} の役割については、不明な点が多く残されている。今回我々は、聴覚中継シナプスである calyx of Held シナプスを用いてこの問題を検討した。聴覚獲得前の生後 7-9 日のラット calyx of Held シナプス前末端からホールセル記録を行い、脱分極パルス (20 ms) を連続的に与えて (1 Hz x20) Ca^{2+} 電流を誘発すると、膜容量測定法によって記録されるエンドサイトーシスの初速度が加速す

る。この加速は、細胞外 Ca^{2+} の Sr^{2+} による置換もしくはカルモジュリン (CaM) 阻害ペプチド (MLCK ペプチド) の神経終末内注入によって、著しく抑制された。 Ca^{2+} の Sr^{2+} 置換および MLCK ペプチドは、単一脱分極パルスで誘発されるエンドサイトーシスには作用を示さなかった。これらの結果は、連続刺激に伴うシナプス前末端内 Ca^{2+} の集積によって CaM が活性化されエンドサイトーシスを加速するメカニズムの存在を示唆する。

(8) 運動神経終末の Ca 誘起性 Ca 遊離の特性とそのシミュレーション

久場健司 (名古屋学芸大学, 管理栄養学部)

蘇我 (榊原) 聡子 (豊橋市民病院)

久保田正和 (京都大学医学部保健学科老年科)

鈴木慎一 (元名古屋大学医学部助手)

秋田天平 (生理学研究所, 細胞器官系, 機能協同研究部門)

成田和彦 (川崎医科大学生理)

カエル運動神経終末でのアセチルコリン (ACh) の放出は、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを介する細胞外からの Ca^{2+} によると信じられていたが、10 年程前より ACh 放出が Ca^{2+} 誘起性 Ca^{2+} 遊離 (CICR) により大きく促進されることが解ってきた。すなわち、CICR は、運動神経の低頻度の活動下では ACh 放出に寄与しないが、高頻度活動下では流入する Ca^{2+} により神経終末のリアノジン受容体 (RyR) が活性化しうる状態に変化 (プライミング) し、直ちに活性化され、更なる Ca^{2+} 流入により不活性化される

ことが明らかになった。従って、リアノジン受容体では、プライミング、活性化、不活性化の三つの状態への変化が Ca^{2+} により制御されることになる。細胞外 Ca^{2+} 濃度依存性と Ca^{2+} チャンネル密度依存性を調べ、実験データと比較した。シミュレーションは、実験による結論「RyR の活性化部位は Ca^{2+} マイクロドメイン内にあり、プライミングと不活性化の制御部位は bulk 相にあること」を証明した。

(9) プルキンエ細胞における AMPA 受容体双方向性トラフィックとモデルによる考察

山口和彦 (理化学研究所脳センター記憶学習)

記憶や学習の基礎メカニズムにシナプス可塑性があり、海馬や小脳の興奮性シナプスでは、AMPA 受容体の双方向性トラフィックにより、シナプス伝達が制御されている。海馬 CA1 錐体細胞では長い C 末を持つサブユニット GluR1/4 を含む AMPA 受容体が活動依存的にシナプス膜に挿入されることにより、長期増強 (LTP) が生じる。エクソサイトosis を介した IMP から SMP への速度定数は 0.15/min, エンドサイトosis を介した SMP から IMP への速度定数は 0.3/min であった。SMP と SSP

間の移動の速度定数は 0.0005/min と大変小さい。構成性および活動依存性増強では最大増強を約 180% に制限する“枠”の存在が推定された。LTD においては安定化プールからの脱安定化とエンドサイトosis 側への平衡のシフトが生じていることが想定された。小脳プルキンエ細胞における AMPA 受容体発現の双方向性可塑性ならびに構成性トラフィックは統一的なモデルを用いて理解することが可能となり、どの酵素がどのサブステップの調節に関与しているのかを今後、解明していく。

(10) コンピュータシミュレーションと生理学実験による小脳抑制性シナプス可塑性の誘導閾値制御メカニズムの解析

北川雄一, 平野丈夫, 川口真也 (京都大学大学院理学研究科)

小脳プルキンエ細胞に形成される抑制性シナプスでは、プルキンエ細胞が脱分極すると GABA_A 受容体を介

する応答が長時間にわたり増強される。この現象は Rebound Potentiation (RP) と呼ばれる (Kano et al, 1992)。

RP 誘導には細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 上昇と CaMKII 活性化が必要である。私たちは以前、プルキンエ細胞の脱分極時にシナプス前抑制性介在ニューロンが活性化すると、シナプス後 GABA_B 受容体を介して RP が抑制されることを見出した。シミュレーション解析により、CaMKII 長期活性化をもたらすのに必要な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇の閾値は、主に cAMP を分解する酵素である PDE1 により制御されることが示唆された。この理論予測をホールセルパッチ

クランプ法により検証し、RP 誘導に必要な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇の閾値は Ca^{2+} 依存性脱リン酸化酵素のカルシニューリンや Ca^{2+} 非依存性の PDE4 ではなく PDE1 により調節されることが確認できた。以上から、コンピュータシミュレーションと電気生理学実験を組み合わせることで、RP 誘導に必要な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇の閾値は PDE1 により決定されることが明らかになった。

(11) 海馬スライス培養系における神経細胞生後新生の系譜解析

横瀬 淳, 八尾 寛, 石塚 徹 (東北大学大学院生命科学研究科)

海馬歯状回顆粒細胞層下部で生後に起こるニューロン新生は、学習・記憶を始めとした海馬依存的な機能に寄与していることが示唆されてきている。本研究では、海馬スライス培養とレトロウイルスによる新生細胞標識法を組み合わせることにより、単一の前駆細胞がニューロンやグリア細胞へと分化する系譜を解析した。海馬スライス培養には生後 7 日齢の Wistar 系ラットを用いた。培養 14 日目のスライスに EGFP を組み込んだレトロウイルスを歯状回顆粒細胞層上脚部に感染させた。その後、EGFP 標識された子孫細胞を 4 週間追跡した。海馬スラ

イス培養で新生細胞に関する Critical period は、新生後 1~2 週間目で細胞消失が高まり、その後残存した細胞は成熟ニューロンへと発達していく傾向が示唆される。神経細胞の新生系譜に関しては数的に制御が働いており、その過程で他の細胞種より細胞死の影響が強く現れている可能性がある。生体内の研究では、新生細胞の生存に関する Critical period はシナプス発達期である新生後 2~3 週間目に認められるので、海馬スライス培養においても入出力シナプスの形成が生存の要因になっている可能性がある。

(12) 頭部外傷後のシナプス可塑性障害に対するエダラボンの効果

蓮尾 博 (久留米大学医学部生理学講座)

山下 伸, 重森 稔, 赤須 崇 (久留米大学医学部)

頭部外傷後の外傷性脳損傷 (traumatic brain injury: TBI) による後遺症として長期にわたる記憶・認知障害、外傷性てんかんなどがあるが、その発症機序や治療法についてはまだ不明な点が多い。TBI モデル動物/標本を用いた *in vitro* の研究でフリーラジカルが主な障害因子の一つであることが報告されている。本研究で、我々は TBI モデルラットから得られた脳スライス標本におけるシナプス可塑性障害に対する、フリーラジカル消去剤であるエダラボンの効果を検討した。NONOate 灌流投与により EPSP が増大した後に、高頻度刺激を与えても LTP

は観察されなかった。一方、エダラボン ($100 \mu\text{M}$) 存在下で NONOate 灌流投与した標本では EPSP の増大は見られなかったが、エダラボンを 60 分以上洗い流した後で高頻度刺激を加えたときは LTP が観察された。これらの結果から、海馬歯状回顆粒細胞における長期増強は NO に依存性であり、フリーラジカル消去剤であるエダラボンにより抑制されることが示唆された。TBI 後に投与したエダラボンがシナプス可塑性障害を減弱するのに有効であることが示唆された。

(13) 慢性痛による扁桃体中心核シナプス伝達の増強機構

加藤総夫, 高橋由香里, 岩瀬彩乃 (東京慈恵会医科大学総合医科研)

「痛み」の本質的な生物学的意義は警告信号としての働きにある。この「警告信号」としての機能は、痛み受容器由来の求心信号が中枢神経系で処理されて付与されると想定されるが、生体が「何か悪いことが起こっている」ことを認知する際に主要な役割を担う脳内表現は情動、特に、負情動であると考えられている。我々は、脊髄後角膠様質および三叉神経脊髄路核膠様質から扁桃体中心核外側外包部 (laterocapsular part of the central nucleus of amygdala, CeLC) への直接的投射路の最終シナプスである PB→CeLC シナプスでのシナプス伝達が、慢性神経因性疼痛動物において痛み応答依存的に増強している事実

を見出した。モデル作成の7日後、スライスを作成し、PB 由来経路刺激による誘発興奮性シナプス後電流を測定した。EPSC 振幅および paired-pulse ratio とその $[Ca^{2+}]_i$ 依存性、NMDA 受容体成分比の測定、 Sr^{2+} 投与による非同期的シナプス後電流振幅の測定、および、 θ ピペットを用いた minimal 刺激とそれによぼすアデノシン A_1 受容体活性化の影響などの解析結果は、本モデルにおける PB→CeLC シナプス伝達の増強が、主として単 1 求心神経終末における 1 活動電位誘発の同期的放出小胞数の増大によって生じているという解釈を支持した。

(14) 神経細胞体における Ca^{2+} 誘起性 Ca^{2+} 遊離の不活性化機構

秋田天平^{1,2}, 久場健司¹ (¹名古屋学芸大学管理栄養学部, ²生理学研究所機能協同研究部門)

あらゆる種類のシナプス後ニューロンにおいて、シナプス入力後に発生する細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 上昇が種々の機能発現に重要であることは周知の事実である。最近我々は、多くのニューロンで普遍的に認められる細胞内小器官構造を持つウシガエル交感神経節ニューロン細胞体において、細胞膜脱分極により引き起こされる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の実はほぼ全てが、小胞体膜上のライアノジン受容体 (RyR) を介する Ca^{2+} 誘起性 Ca^{2+} 遊離 (CICR) に由来することを明らかにし、またその CICR が Ca^{2+} 依存

性の不活性化 (inactivation) 機構を通じて制御されることにより、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が極めて厳密且つ巧妙に調節されていることを確定したので報告する。以上のことから、ニューロン内 CICR inactivation は Ca^{2+} 流入中の過剰な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を防止するのみならず、 Ca^{2+} 流入終了後もその低値に抑えられた $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の継続時間を事前の Ca^{2+} 流入継続時間に応じて延長させる役目も持っており、またそれらの調節は分子間の極めて至近距離内 (数十 nm オーダー) でなされていることが判明した。

(15) 網膜双極細胞間に存在する電気シナプスの性質と働き

荒井 格, 間嶋沙知, 田中雅史, 立花政夫 (東京大学大学院人文社会系研究科)

網膜双極細胞は光受容器である視細胞と網膜の出力細胞である双極細胞を繋ぐ存在神経細胞であり、網膜における情報処理に重要な役割を担っている。キンギョ網膜のスライス標本作製し、オン型の Mb1 型双極細胞 (Mb1-BC) と神経節細胞からホールセルクランプ法による同時記録を行い前者に短い脱分極パルスを与えたところ、

後者から時間経過の非常に長い誘発性シナプス後電流が観察された。このような長い誘発性シナプス後電流は、抑制性シナプス伝達の阻害剤を投与しても影響を受けず、ギャップ結合の阻害剤である mefloquine を投与することによって消失したことから、網膜内の電気シナプスによって生成されていることが示唆された。Mb1-BC

は明順応よりも暗順応下において Ca^{2+} スパイクによってより広い範囲で情報伝達を可能にしていることが示唆された。また、双極細胞が Ca^{2+} スパイクを、時間遅れをも

って次々と発生させることによって、非常に長い誘発性シナプス後電流を神経節細胞に発生させるということが示唆された。

(16) 海馬 CA1 アストロサイトにおける GABA カレントと細胞内 Cl^- 濃度変化

江川 潔¹, 山田順子², 古川智範¹, 福田敦夫¹

(¹ 浜松医科大学医学部第一生理学講座, ² 弘前大学医学部脳神経生理学講座)

アストロサイトはシナプスをタイトに包み込み、イオンあるいは伝達物質の自身への流入出を介して細胞外環境を変化させシナプス伝達を調整する。GABA 作動性シナプス伝達におけるアストロサイトの関与を検討するため、アストロサイトの GABA 応答 current と $[\text{Cl}^-]_i$ 変化を評価した。GABA (1mM) pressure application による検討では、picrotoxin 存在下でより電位依存性の低い inward current が残存した。この picrotoxin insensitive current は

GABA transporter (GAT)3 inhibitor (SNAP5114 20 μM) 投与により著明に減弱し、GAT current であることが示唆された。生理的に $[\text{Cl}^-]_i$ の高いアストロサイトにおいて、GABA は GABA_A receptor を介して Cl^- の流出を、 2Na^+ , 1Cl^- , 1GABA を共輸送する GAT を介して Cl^- の流入を来たすことが示された。これら両方向性の Cl^- flow は GABA 作動性シナプスにおける $[\text{Cl}^-]_o$ の変化を介してシナプス伝達を調整している可能性が考えられる。

18. 病態と細胞外プリン治療標的としての可能性を探る

2008年9月4日－9月5日

代表・世話人：加藤総夫（東京慈恵会医科大学）

所内対応者：鍋倉淳一（生体恒常機能発達機構）

(1) Vesicular ATP transport: update and perspectives

森山芳則（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科）

(2) インスリン開口放出のリアルタイム可視化解析

今泉美佳（杏林大学医学部）

(3) Conductive release of ATP through the maxi-anion channel

Sabirov Ravshan（生理学研究所細胞器官研究系機能協関）

(4) 血管内皮細胞の流れずり応力依存的な内因性 ATP 放出

山本希美子（東京大学大学院医学系研究科，科学技術振興機構さきがけ）

(5) 機械刺激による ATP 放出のリアルタイムイメージング

古家喜四夫（科学技術振興機構細胞力覚プロジェクト）

(6) アストロサイトの ATP 情報発信

小泉修一（山梨大学医学部薬理）

(7) 圧負荷による心臓の線維化における P2Y 受容体の役割

西田基宏（九州大学大学院薬学研究院）

(8) 眼の発生に関わる転写制御因子ネットワーク

大隈典子（東北大学大学院医学系研究科創生応用医学研究センター）

(9) 甘味の受容・伝達・調節機構と ATP

吉田竜介（九州大学大学院歯学研究院口腔機能解析学）

(10) 睡眠調節におけるアデノシンの役割

裏出良博（(財)大阪バイオサイエンス研究所・分子行動生物学部門）

(11) 細胞外 ATP による ASK1活性化が誘導する細胞応答

野口拓也（東京大学大学院薬学研究科）

(12) 脊髄におけるシナプス可塑性

池田 弘（福井大学大学院工学研究科）

(13) 神経因性疼痛発生における matrix metalloprotease の関与について

川崎康彦（佐賀大学医学部生体構造機能学講座）

(14) P2X₄受容体のポア開閉及びポア拡大に関連する構造変化の観察

篠崎陽一（NTT 物性科学基礎研究所生体機能）

(15) Ca オシレーションの同期化機構

山下勝幸（奈良県立医科大学医学部）

(16) P2X₂受容体活性化で発生するマウス網膜コリン作動性アクリン細胞のコリン電流

金田 誠（慶應義塾大学医学部）

ポスターセッション

(1) Vesicular nucleotide transporter (VNUT) in rodent: Gene organization, transporter function and localization

日浅未来（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科）

- (2) 新生ラット摘出脊髄における高炭酸によるアデノシン放出と反射電位抑制効果
乙黒兼一（北海道大学大学院獣医学研究科）
- (3) アデノシン A₁受容体による NMDA 受容体活性修飾
関野祐子（東京大学医科学研究所）
- (4) 後根神経節 P2X 受容体を介した神経因性疼痛発症機構
長谷川茂雄, 津田 誠, 井上和秀（九州大学大学院・薬学府・薬理学分野）
- (5) In vivo gene silencing 法による脳内シナプス前 P2X 受容体サブタイプの変換
田村友穂（東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター）
- (6) マウス網膜 P2X₂受容体で見られる特異な生後発達様式
霜田幸雄（東京女子医科大学総研）
- (7) P2Y₁₂を介したインテグリンβ1活性化によるミクログリア突起伸長調節
大澤圭子（国立精神神経センター）
- (8) ミクログリアにおける P2Y₆受容体発現量増加に関わるメカニズムの解明
藤下加代子（山梨大学医学部）
- (9) マウスマクロファージ J774細胞における UDP による持続的な細胞内 Ca²⁺濃度上昇に対する
プロスタグランジン E2の作用
伊藤政明（高崎健康福祉大学薬学部）
- (10) マウス T 細胞における P2X₇受容体を介した形質膜ブレブ形成と細胞死誘導
三坂 恒（静岡県立大学薬学部）
- (11) ヒト肺由来肥満細胞の IgE 受容体を介した脱顆粒に対する細胞外プリンの影響
西 晴久（東京慈恵会医科大学薬理学講座）
- (12) ラット骨髄間質細胞の P2Y₂受容体活性化による増殖効果と血清
市川 純（関西医科大学医学部）
- (13) ミクログリアからの ATP 誘発 MIP-2放出のメカニズム
吉武麻衣, 白鳥美穂, 齊藤秀俊, 津田 誠, 井上和秀（九州大学大学院薬学研究院薬理学）
- (14) Up-regulation of cell surface P2X₄ receptor by flow shear stress
小林 剛（名古屋大学大学院医学系研究科）

【参加者名】

小林希実子（兵庫医科大学解剖学講座）、山下勝幸（奈良県立医科大学医学部）、小泉修一（山梨大学医学部薬理）、乙黒兼一（北海道大学大学院獣医学研究科）、大澤圭子（国立精神・神経センター神経研究所）、金田 誠（慶應義塾大学医学部）、南 雅文（北海道大学薬学研究科大学院 薬学研究院）、西 晴久（東京慈恵会医科大学薬理学講座）、岩永ひろみ（北海道大学大学院 医学研究科）、霜田幸雄（東京女子医科大学総合研究所）、三坂 恒（静岡県立大学薬学部）、原田 均（静岡県立大学薬学部）、藤下加代子（山梨大学医学部）、西田基宏（九州大学大学院薬学研究院）、柴田圭輔（山梨大学大学院医学工学総合教育部）、川崎康彦（佐賀大学医学部生体構造機能学講座）、篠崎陽一（NTT 物性科学基礎研究所機能物質

科学研究部）、中塚映政（佐賀大学医学部生体構造機能学講座）、日浅未来（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科）、野口拓也（東京大学大学院薬学研究科）、小澤哲朗（山梨大学医学部大学院）、田中裕也（山梨大学医学部医学科）、長谷川茂雄（九州大学大学院薬学府）、市川 純（関西医科大学医学部）、山本希美子（東京大学大学院 医学系研究科）、吉武麻衣（九州大学大学院薬学研究院）、小林 剛（名古屋大学大学院 医学系研究科）、池田 弘（福井大学大学院 工学研究科）、齊藤秀俊（九州大学大学院 薬学研究院）、森山芳則（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科）、今泉美佳（杏林大学医学部）、今井利安（日本ケミファ創薬研究所）、Sabirov Ravshan（生理学研究所細胞器研究系）、尾松万里子（滋賀医科大学医学

部), 和光未加 (東京慈恵会医科大学), 永瀬将志 (東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター), 田村友穂 (東京慈恵会医科大学 総合医科学研究センター), 古家喜四夫 (科学技術振興機構細胞力覚プロジェクト), 関野祐子 (東京大学医学研究所), 裏出良博 (財団法人大阪バイオサイエンス研究所分子行動生物学部門), 大隅典子 (東北大学大学院 医学系研究科), 吉田竜介 (九州大学大学院歯学研究院), 上條真弘 (総合研究大学院大

【概要】

細胞外プリンによる生理機能調節をテーマとした研究会として通算第 13 回を迎えた今回は, プリン作動性細胞間情報伝達の治療標的としての可能性を探る方向を見出すべくミニ・シンポジウムを構成した。第 1 のセッションでは, 細胞外プリンの生理機能を解明しようとする研究において最も立ち遅れている領域である「ATP 放出機構」に焦点を当てた。ATP はいつ, どのような刺激によって, どのような機構で細胞外に放出され, それはどのように制御されているのか。この問題に答えることなく細胞外 ATP によるシグナル伝達の生理・病態生理的意義を解明することは不可能である。小胞性ヌクレオチド・トランスポーターを同定した岡山大・森山, TIRF による生理活性物質開口放出のリアルタイム可視化を成功させた杏林大・今泉, 分子実体未同定のマキシ・アニオン・チャンネルからの ATP 放出を証明した生理研(タシケント大)・シャピロフ, 細胞外 ATP 合成酵素による ATP 遊

学大学院 生命科学研究科), LOPEZ-REDONDO Fernando (東京慈恵会医科大学慈恵会医科研究センター), 高鶴裕介 (生理学研究所), 渡部美穂 (生理学研究所), 神谷明裕 (小野薬品工業株式会社研究本部薬理研究所), 鍋倉淳一 (生理学研究所), 津田 誠 (九州大学大学院薬学研究院), 加藤総夫 (東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター), 桂木 猛 (福岡大学医学部)

離という可能性を提唱した東京大・山本, アストロサイトからの ATP 放出機構を詳細に解析した山梨大・小泉らの講演があり, 白熱した討論が交わされた。次いで, 高血圧誘発心筋繊維化における P2Y 受容体の関与を巧みに証明した九州大・西田, 近年, P2Y 受容体の活性化が最上流にある事実が示された目の発生分子カスケードの第 1 人者東北大・大隈の報告があった。また, 内因性ヌクレオチドの生理機能として, 味覚 (九大・吉田), 睡眠 (大阪 OBI・裏出), 活性酸素応答 (東大・野口), 痛覚 (福井大・池田; 佐賀大・川崎), Ca オンシレーション (奈良医大・山下), 網膜 (慶應大・金田) などの発表が, さらに, P2X 受容体開口機構に関する分子生理学的研究 (NTT・篠崎) についての発表があり, それぞれ活発な討論がなされた。加えて, 14 題のポスター発表が行われ活発な意見交換が行われた。

(1) Vesicular ATP transport : update and perspectives

森山芳則 (岡山大学大学院医歯薬学総合研究科)

プリン性の化学伝達において ATP などのヌクレオチドがどのような機構によりプリン作動性細胞から放出されるのかは積年の問題であり, 複数のメカニズムが提唱されている。一部の神経分泌細胞においては ATP が分泌小胞に蓄積され開口放出されることから, 分泌小胞への濃縮を司る小胞型 ATP トランスポーターとでも呼ぶべきたんぱく質の存在が仮定されたが, その分子実体は不明であった。精製・再構成とは純化したトランスポーターをリポソームに組み込み輸送活性を測定することであり, 20-30 年前は頻繁に行われたが, 現在では廃れてい

るといってよい。私たちは, この精製・再構成法を徹底的に用いる事で仮想的な小胞型 ATP トランスポーターの実体を手にすることに成功した。このトランスポーターは ATP だけでなく ADP, GTP, UTP など小胞内に蓄積していることが知られているほとんどの (多分, 全ての) ヌクレオチドを輸送することができることから vesicular nucleotide transporter (VNUT) と命名した。しかも, VNUT は神経やアストロサイトや血小板などヌクレオチドを分泌することが知られているほとんどの細胞に高発現していることがわかってきた。

(2) インスリン開口放出のリアルタイム可視化解析

今泉美佳（杏林大学医学部）

インスリンは膵β細胞内の分泌顆粒に貯蔵され、開口放出によって細胞外へ分泌される。この開口放出機構の解明には、インスリン分泌顆粒動態の画像解析が有力なアプローチとなる。私達は、全反射蛍光顕微鏡を用いた画像解析システムにより、グルコース刺激による2相性インスリン分泌における分泌顆粒の動態すなわち、顆粒の形質膜への供給、ドッキング、フュージョン/開口を時間的空間的に解析することに成功している。このシステムにより、①インスリン分泌第1相はあらかじめ形質膜にドッキングしている顆粒からの放出であり、第2相は細胞内部に貯蔵されている顆粒からの放出により構成されていること、また、②インスリン分泌第1相は形質膜

蛋白質 Syntaxin 1A 依存性であり、第2相は Syntaxin 1A 非依存性であることから、分泌第1相と第2相におけるインスリン開口放出は共通のメカニズムではなく、空間的にまた関与する分子が異なる機構であることを明らかにした。現在、分泌第2相の機構解明に向けて、インスリン顆粒の細胞内トラフィックを詳細に研究する有力な手法として、入射角可変式全反射顕微鏡（レーザー入射角を高速に変化させることで、形質膜から約500nm細胞内部までを高速にZ scanさせながら経時蛍光測定する顕微鏡）を開発して解析を進めているので、合わせて報告する。

(3) Conductive release of ATP through the maxi-anion channel

Sabirov Ravshan^{1,2}, Yasunobu Okada¹

(¹Department of Cell Physiology, National Institute for Physiological Sciences,

²Laboratory of Molecular Physiology, Institute of Physiology and Biophysics, Acad. Sci. RUz and Department of Biophysics, National University)

The maxi-anion channel is widely expressed and found in almost every part of the body. We found that this channel is closed in the resting state and opens in response to various ATP-releasing stimuli, such as osmotic, ischemic and hypoxic stresses. A weak ATP-binding site with K_d of 12-13 mM located in the middle of the pore together with a wide pore with a radius of ~1.3 nm provides suitable environment to accommodate and pass ATP^{4-} and $MgATP^{2-}$ (~0.6-0.7 nm)

with P_{ATP}/P_{Cl} and P_{MgATP}/P_{Cl} of around 0.1. Thus the maxi-anion channel perfectly fits its physiological function as an ATP-conductive channel. This inference was supported by the pharmacological profile of the maxi-anion channel, which resembled that of the stimulated ATP release, and the coincidence of spatial distribution of cardiac maxi-anion channel with that of ATP-releasing site.

(4) 血管内皮細胞の流れずり応力依存的な内因性 ATP 放出

山本希美子^{1,2}, 古家喜四夫³, 曾我部正博^{3,4}, 安藤譲二¹

(¹東京大学大学院医学系研究科, ²科学技術振興機構さきがけ,

³科学技術振興機構細胞力覚プロジェクト, ⁴名古屋大学大学院医学系研究科)

内皮細胞は血流の変化に伴い、細胞の形態を変化させ、

生理活性物質を産生するなど、血管機能を維持する働き

があるが、内皮細胞が機械的刺激を感知する分子機構の詳細は明らかではない。本研究では $P2X_4$ がずり応力により活性化される分子機構について検討した。HPAECs にずり応力を負荷すると、内因性 ATP がずり応力の大きさに依存して、灌流液中に放出された。ATP 合成酵素の中和抗体や阻害剤により、ずり応力依存的な ATP 放出が約 20% に抑制されると共に、 $P2X$ を介した Ca^{2+} 流入反応が顕著に減少した。M β CD を HPAECs に作用させると、ATP

合成酵素と caveolin-1 の局在が一致なくなり、流れ依存的な ATP 放出及び、 Ca^{2+} 反応も有意に抑制された。流れずり応力の Ca^{2+} シグナリングを介したトランスデューサーである $P2X_4$ チャネルの活性化には、流れ誘発性 ATP 放出が関与し、内因性 ATP 放出反応には、カベオラ/ラフトに局在する ATP 合成酵素の働きが必須であると考えられる。

(5) 機械刺激による ATP 放出のリアルタイムイメージング

古家喜四夫¹、山本希美子²、古家園子³、安藤譲二²、曾我部正博^{1,4,5}

(¹ 科学技術振興機構細胞力覚プロジェクト, ² 東京大学医学部,

³ 生理学研究所脳機能計測センター, ⁴ 生理学研究所細胞内代謝, ⁵ 名古屋大学医学部)

ATP は普遍的な細胞外情報伝達物質として数多くの生理機能に関与していることが明らかになってきている。われわれは機械刺激による ATP 放出の経路、制御機構を明らかにするため、放出 ATP のイメージングを乳腺上皮細胞や小腸絨毛下線維芽細胞などの培養細胞や組織サンプルに適用し、タッチやストレッチといった機械刺激による ATP 放出のイメージングを行った。その結果、放出濃度は各種機械刺激および自発性による放出ともに数 μ M から 10 μ M であった。放出の持続時間は機械刺激に

よるものは 10 秒以下であり、自発性の放出の数十秒とは明らかに異なっていた。このことは同じ細胞でも刺激によって異なる放出機序が働いていることを示唆している。さらに空間解像度を上げるため、Luciferase を溶液中ではなく細胞表面に局在化させ ATP をイメージングする方法を用い、血管内皮細胞に流れズリ応力を与えたときに放出される ATP のリアルタイムイメージングにも成功した。

(6) アストロサイトの ATP 情報発信

小泉修一、藤下加代子 (山梨大学医学部薬理)

アストロサイトは液性因子「グリア伝達物質」を放出することにより、周囲のグリア細胞、神経細胞、血管系と積極的にコミュニケーションをとる。本研究では、アストロサイトのグリア伝達物質 ATP による即時的或いは長期的な脳機能制御、さらに ATP 放出の分子メカニズムについて述べ、アストロサイトの情報発信の重要性を改めて見直して見たい。先ず ATP 放出の分子メカニズムの検討する目的から、 Ca^{2+} wave 及び quinacrine 陽性シグナルの消失を指標とした間接法、並びに

luciferin-luciferase 法による直接法、を指標としてアストロサイトの ATP 放出能を検出した。機械刺激、ionomycin 及び thrombin 刺激により、アストロサイトから Ca^{2+} 依存的な ATP 放出及び quinacrine 陽性小胞の開口放出様現象が観察され、開口放出機構の存在が示唆された。また、ATP 含有小胞を染める quinacrine 陽性シグナルとも、共存が認められた。アストロサイトは自由拡散よりも調節性・積極性に富んだ開口放出による ATP 情報発信機構を有しているようである。

(7) 圧負荷による心臓の線維化における P2Y 受容体の役割

西田基宏, 上村 綾, 仲矢道雄, 黒瀬 等 (九州大学大学院薬学研究院)

慢性的な高血圧や虚血によって生じる心臓の線維化 (コラーゲンの蓄積) は, 心機能不全を引き起こす要因の 1 つとして考えられている。心臓の病態形成における三量体 G12 ファミリー蛋白質 (G12/G13) の役割を調べる過程で, 我々は G タンパク質共役型 P2Y 受容体が圧負荷による線維化形成のトリガーとなる可能性を見出した。マウスの横行大動脈を狭窄し, 6 週間の圧負荷を行ったところ, 野生型マウスと同程度の心重量の増大 (心肥大)

が確認された。さらに, 機械的伸展刺激による Rho の活性化は, P2Y₆ 受容体の阻害剤処置によって有意に抑制された。以上の結果から, 機械的圧負荷により心筋細胞から放出されたヌクレオチドが心筋細胞の P2Y 受容体を介して Gα12/Gα13 シグナリングを活性化し, 線維化促進因子を産生することで線維化を引き起こす可能性が示された。

(8) 眼の発生に関わる転写制御因子ネットワーク

大隈典子 (東北大学大学院医学系研究科創生応用医学研究センター)

眼の原基は, 表皮外胚葉と神経外胚葉の相互作用によって形成されるが, さらに中胚葉および神経堤由来の間葉も眼の発生に貢献する。まず, 器官形成のごく初期に神経外胚葉の前脳領域の一部が膨らんで眼胞となり, 表皮外胚葉に接するようになる。応答能を有する表皮外胚葉は眼胞から分泌される誘導シグナルを受けて水晶体ブラコードを形成し (組織間相互作用), やがて水晶体ブラコードは陥入し表皮外胚葉から分離して水晶体胞 (lens vesicle) となる。眼の発生は, 多数の転写制御因子が作用し合うネットワークにより進行する。中でも, Pax6

はカスケードの上位にいて, Rx1, Six3, Six6, Lhx2, Hes1 など多数の転写制御因子の発現に関わるために, 「眼の発生のマスターコントロール因子」と呼ばれることもある。実際に, ショウジョウバエやアフリカツメガエルを用いた実験により, Pax6 を強制発現させると, 異所性に眼が形成されることが報告されている。本講演では, 初期の誘導現象および網膜における神経幹細胞の維持と神経細胞のサブタイプ分化に関わる因子を中心にお話したい。

(9) 甘味の受容・伝達・調節機構と ATP

吉田竜介, 村田芳博, 安松啓子, 重村憲徳, 二ノ宮裕三
(九州大学大学院歯学研究院口腔機能解析学)

味覚は体内に取り込む物質を取捨選別するためのシグナルとして重要である。生体にとって必要なエネルギー源やミネラル (甘味, うま味, 塩味), 忌避すべき腐敗物や毒物 (酸味, 苦味) は味細胞により検出され, その情報は味細胞から味神経を介し中枢へと伝えられる。我々は, ヒトにおいてレプチンと甘味感受性の間に関連性があるかを調べるため, ヒトの味覚認知閾値と血漿レ

プチン濃度を比較した。その結果, 甘味の認知閾値は朝に最も低く夜に最も高くなり, レプチンと同様の日内変動を示した。ヒト甘味閾値と血漿レプチン濃度の日内変動の同期は, マウスでレプチンが末梢の甘味感受性の減少を引き起こすことと一致し, ヒトにおいても末梢の甘味感受性がレプチンにより調節されている可能性を示唆する。このように味細胞レベルで調節を受けた味覚情報

は味神経に伝達される。ATP 受容体である $P2X_2$ および $P2X_3$ を共に欠損したマウスでは味刺激に対する味神経応答が消失することが報告されていることから、味細胞から味神経への情報伝達物質として ATP が関与するこ

とが示唆される。甘味感受性味細胞-味神経間で ATP が情報伝達に関与するならば、味細胞の ATP 放出機構や味神経の ATP 受容体は甘味シグナルを調節する新たなターゲットとなりうる。

(10) 睡眠調節におけるアデノシンの役割

裏出良博 ((財)大阪バイオサイエンス研究所分子行動生物学部門)

アデノシンの脳内投与は睡眠を誘発し、大脳皮質と前脳基底部での濃度が断眠時間に依存して上昇し、断眠解除後の睡眠中に減少する。これらの実験結果から、アデノシンは睡眠物質の有力な候補と考えられてきた。脳には4種類のアデノシン受容体 (A_1 , A_{2A} , A_{2B} , A_3) が存在する。この中で A_1 受容体と A_{2A} 受容体が睡眠に関係すると考えられてきたが、それぞれの関与について議論が続いている。

コーヒー、茶、コーラなどの覚醒作用の主成分であるカフェインは、様々な受容体やイオンチャンネルに結合するが、アデノシン A_1 受容体と A_{2A} 受容体に最も低濃度

で結合して情報伝達を阻害する。我々は、カフェインの投与が A_1 受容体欠損マウスにも野生型マウスと同程度の覚醒を起こすが、 A_{2A} 受容体欠損マウスの睡眠には全く影響しないことを証明した。この報告以来、 A_{2A} 受容体説が有力になっている。我々がコーヒー3杯を飲んだ場合に摂取する量に相当する 15 mg/kg のカフェインを腹腔内投与すると、野生型マウスは投与後2時間程度、一睡もできない完全な不眠状態になる。この事実、アデノシン・ A_{2A} 受容体系が生理的な睡眠の維持に必須であることも示している。

(11) 細胞外 ATP による ASK1 活性化が誘導する細胞応答

野口拓也, 武田弘資, 一條秀憲 (東京大学大学院薬学研究科)

ASK1 は MAP3K ファミリーに属するセリン/スレオニンプロテインキナーゼである。ASK1 は様々なストレスによって活性化され、下流の JNK および p38 経路を選択的に活性化することで、さまざまな細胞応答を誘導している。今回我々は、マクロファージにおいて細胞外 ATP が ASK1 を強く活性化することを見だし、その分子機構および生理的役割について検討した。その結果、細胞外 ATP によって誘導される ROS 産生により ASK1-p38 経路が活性化されることがわかった。さらに、NADPH

オキシターゼファミリーのひとつである NOX2 のノックダウンにより ASK1-p38 経路の活性化が減弱するとともに ATP 誘導性アポトーシスに抵抗を示したことから、細胞外 ATP は NOX2 による ROS 産生を介して ASK1-p38 経路を活性化し、アポトーシスを誘導していることが示唆された。本会では、細胞外 ATP による ASK1 活性化が誘導する細胞応答について最新の知見を交えて議論したい。

(12) 脊髄におけるシナプス可塑性

池田 弘 (福井大学大学院工学研究科)

シナプス可塑性は、入力線維への繰り返し刺激などの条件刺激をきっかけに、シナプス伝達の効率が長期的に増強（長期増強）あるいは低下（長期抑圧）する現象であり、脊髄における長期増強は、痛覚過敏の神経メカニズムの1つであると考えられている。

本研究では、P2X 受容体のアゴニストである $\alpha\beta$ -methylene ATP ($\alpha\beta$ meATP) の還流によって引き起こされる長期増強のメカニズム、および炎症ラットに見られる神経興奮の増強へのグリア細胞の関与について調べ、脊髄神経興奮の増強が、炎症動物

で見られるかを、ノーマルラットと、CFA を注入した炎症ラットの脊髄スライス標本で見られる神経興奮の大きさを比較することによって調べた。その結果、CFA を注入してから1時間後、1日後、3日後のラットの神経興奮が脊髄膠様質の外側を中心にノーマルラットの神経興奮に比べて増大していることがわかった。さらに、CFA を注入してから早い段階での増大には、ギャップ結合が関与しており、遅い段階の増大には、ミクログリアが関与していることを示唆する結果が得られた。

(13) 神経因性疼痛発生における matrix metalloprotease の関与について

川崎康彦, 中塚映政, 藤田亜美, 熊本栄一, Ji Ru-Rong

(佐賀大学・医学部生体構造機能学講座・神経生理学分野, ハーバード医科大学疼痛研究所)

アロディニア症状など神経因性疼痛を呈する種々の難治性疼痛疾患があるが、神経因性疼痛に対する治療法は未だ確立していない。最近の知見により、脊髄での活性化されたグリア細胞が神経因性疼痛の発生に重要な役割を果たしていることが明らかになった。しかしながら、どのようにしてグリア細胞が活性化されるかは不明である。MMP-9 は神経因性疼痛の誘導に、MMP-2 は主に神経因性疼痛の維持に重要な役割を果たし、これら MMP の阻害により神経因性疼痛の異なる段階を対象とした新たな治療の可能性が示唆された。すなわち、神経因性疼

痛の機序として疼痛発生初期には MMP-9 発現が上昇し、炎症性のサイトカインである IL- β や TNF- α の断片化を行い、このサイトカインにより脊髄においてミクログリア細胞の活性化が起こる。また疼痛発生後期においては後根神経節のサテライト細胞で MMP-2 発現が上昇し、同様にサイトカインは断片化を受けて活性化し、脊髄のアストロサイト細胞の活性化を引き起こす。さらに、これら活性化されたサイトカインは脊髄後角神経細胞でのシナプス伝達の増幅に影響を及ぼしていることが推察された。

(14) P2X₄受容体のポア開閉及びポア拡大に関連する構造変化の観察

篠崎陽一¹, 住友弘二¹, 津田 誠², 小泉修一³, 井上和秀², 鳥光慶一¹

(¹NTT 物性科学基礎研究所生体機能, ²九州大学大学院薬学府, ³山梨大学医学部)

ATP は中枢神経系における重要な情報伝達物質であり、ATP 受容体は生理条件下及び病態時において多様な機能を発揮する事が知られている。ATP 受容体の機能的な重要性が明らかとなってきた反面、構造情報につ

いては不明な部分が多い。我々は P2X₄ 受容体の構造及び機能を原子間力顕微鏡 (AFM), カルシウムイメージング及び色素取り込みイメージング法を用いて明らかとする事を本研究の目的とした。AFM 観察では無刺激時には

P2X₄受容体は丸、もしくは三角形の形状であった。高速AFMを用いてタイムラプスイメージングを行ったところ、カルシウム非存在下ではP2X₄受容体はATP刺激後速やかに三量体構造へと変化し、その後各サブユニット間の距離が大きくなっていった。カルシウム存在下ではATP刺激後に fluo-3 蛍光の増加が観察されたものの、EtBr 取り込みは観察されなかった。一方、カルシウム非

存在下では EtBr 取り込みが観察された。以上、本研究より単一 P2X₄受容体の構造及びATP刺激による構造変化の直接観察とこの変化に相当する機能解析からカルシウム非存在下の P2X₄受容体のサブユニット間の距離の大きな増加は色素透過性の巨大ポア形成に相当する事が明らかとなった。

(15) Ca オシレーションの同期化機構

山下勝幸 (奈良県立医科大学医学部)

Ca オシレーションは、細胞増殖、細胞運動、分泌など様々な細胞機能の制御に関与する。Ca オシレーションが多細胞で生じる場合、細胞間にATPなどの伝達物質を放出して伝播する時はCaウェーブとして観察される。一方、多細胞間で同期してCaオシレーションが生じることが、発生初期の脳や網膜で観察されている。このような同期化の説明として、もし興奮性細胞であれば活動電位が同期し、電位依存性Caチャネルを介するCa流入が同期化すると考えられる。しかし、細胞外からのCa流入に非依存的にCaオシレーションが多細胞間で同期して生じることが報告されている。この場合、細胞内Ca

ストアからのCa放出が多細胞間で同期していると考えられ、その同期化メカニズムは不明である。今回、Caストアの膜電位変化にともなう蛍光強度変化をフォトマルチプライアによって高時間分解能で測定したところ、高周波数の変動がバースト状に繰り返し生じ、この時に一致してCa上昇が生じることが明らかになった。従来カメラで捉えていた蛍光強度の周期的上昇は、このバースト状変動を反映すると思われた。これらの結果から、Caストアの膜電位の高周波数変動が容量性結合により細胞間で同期することが、Caオシレーションの同期化メカニズムと考えられる。

(16) P2X₂受容体活性化で発生するマウス網膜コリン作動性アマクリン細胞のコリン電流

金田 誠 (慶應義塾大学医学部)

P2X₂型プリン受容体陽イオンチャネルは、巨大陽イオンに対してもイオン透過性を有することが報告されている。本研究では、コリン作動性アマクリン細胞に存在するP2X₂型プリン受容体チャネルが、細胞外コリンに対する透過性を有するかどうかについてパッチクランプ法を用いて検討した。実験にはGFPがコリン作動性アマクリン細胞特異的に発現する遺伝子改変マウス網膜の単離網膜神経細胞標本を用いた。ATPで誘発されるコリン電流の濃度反応曲線はEC50が46μM、Hill係数が1.9の曲線

でフィットできた。これらの値はNaCl溶液を用いたときにATPで誘発される陽イオン電流のEC50(36μM)、Hill係数(1.8)に近い値を示した。これらの薬理学的性質はマウス網膜P2X₂型プリン受容体の薬理学的性質と一致するものであった。コリンはアセチルコリン合成の前駆体であることからOFF型コリン作動性アマクリン細胞では、P2X₂型プリン受容体の活性化にともなってコリンが細胞内に取り込まれる機構が存在する可能性が示唆された。

ポスターセッション

(1) Vesicular nucleotide transporter (VNUT) in rodent: Gene organization, transporter function and localization

日浅未来, 澤田啓介, 森山芳則 (岡山大学大学院医歯薬学総合研究科)

ATP は生体内のエネルギー代謝に関わるだけでなく, 細胞間における情報伝達物質として機能し, 細胞表面にあるプリン受容体を介して様々な生理作用を現す。細胞外 ATP の由来は損傷細胞からの遊離だけでなく, 神経終末からの神経伝達物質としての放出, 種々の分泌細胞の脱顆粒等によるものが知られている。しかし, ATP が小胞に蓄積されるシステムは不明であった。我々はこのトランスポーターを vesicular nucleotide transporter, VNUT

と命名した。RNA 干渉により VNUT の発現を特異的に抑制すると ATP 分泌が低下することから, VNUT は ATP の放出に重要であると考えられる。今回我々は rodent VNUT の発現と機能について解析した。rodent VNUT のヌクレオチド輸送機能はヒトのそれと同じであった。また, rodent VNUT はプリン作動性の分泌細胞や神経に高発現している。

(2) 新生ラット摘出脊髄における高炭酸によるアデノシン放出と反射電位抑制効果

乙黒兼一, 伴 昌明, 太田利男, 伊藤茂男 (北海道大学大学院獣医学研究科)

二酸化炭素は麻酔作用を持っており, 素早い鎮静・鎮痛効果が得られるため動物の安楽殺に幅広く使用されている。最近, 高炭酸が中枢神経系でアデノシンの蓄積を生じることがわかってきた。本研究では, 高炭酸が脊髄の情報伝達経路に与える影響と, アデノシン放出のメカニズムについて検討した。新生ラットから摘出した脊髄

の腰部後根を刺激し, 対応する前根から脊髄反射電位を記録した。高炭酸は細胞内のアデノシン濃度を上昇させ, これが細胞外に放出されていると考えられる。アデノシン A₁ 受容体の活性化が, 高炭酸による脊髄情報伝達経路の抑制に関与していることが示され, 脊髄レベルでの麻酔作用をもたらしていることが示唆された。

(3) アデノシン A₁受容体による NMDA 受容体活性修飾

関野祐子 (東京大学医科学研究所)

アデノシンは細胞間隙に存在し神経活動を強力に抑制する神経調節因子である。シナプス前終末の A₁ アデノシン受容体 (ADOA1R) は伝達物質放出を抑制するが, シナプス後部の ADOA1R の機能は不明である。本研究では, シナプス後部 ADOA1R による NMDA 受容体機能修飾を検証する。さらに, CA3-CA1 間を Cut し Schaffer-CA1 シナプスの光学応答をピクロトキシン存在下で調べると, NMDA 受容体由来の光学応答の立ち上がり時間が遅

くなり, 持続時間が長くなった。ホールセルパッチクランプ法により, +40 mV に電位固定した CA1 錐体細胞から NMDA 電流を測定したところ, ADOA1R 阻害薬の 8-cyclopentyltheophylline (1 μ M) により振幅の増加のみならず, タウ値の増加が認められた。これらのデータより, NMDA 受容体活性がアデノシン A₁ 受容体から直接または間接的に修飾を受けている可能性が示唆された。

(4) 後根神経節 P2X 受容体を介した神経因性疼痛発症機構

長谷川茂雄, 津田 誠, 井上和秀 (九州大学大学院薬学府)

近年, 末梢の一次求心性神経に発現している P2X₃ および P2X_{2/3} 受容体と神経因性疼痛との関連が示唆されているが, その詳細なメカニズムは不明である。本研究では, Ca²⁺透過性を有する P2X₃/P2X_{2/3} 受容体を介した Ca²⁺依存性カスケードの活性化が痛覚伝達に変化を引き起こす可能性を想定し, 痛覚修飾を担う脂質メディエーターの産生に重要な Ca²⁺依存性酵素である細胞質型ホスホリパーゼ A2 (cytosolic phospholipase A2: cPLA2) の役割に注目した。cPLA2 活性化の下流に存在する脂質メディエタ

ーとして, 血小板活性化因子 (platelet-activating factor: PAF) を候補に挙げて, 神経因性疼痛との関連を検討した結果, PAF 受容体欠損マウスでは, 神経損傷によるアロディニアが抑制されるとともに, 損傷側 DRG において, 炎症性サイトカインである TNF α および IL-1 β の発現上昇が抑制された。以上の結果より, P2X₃/P2X_{2/3} 受容体により活性化された cPLA2 は PAF/PAF 受容体シグナルを介して神経因性疼痛に関与している可能性が考えられる。

(5) In vivo gene silencing 法による脳内シナプス前 P2X 受容体サブタイプの変換

田村友穂, 加藤総夫 (東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター)

脳内における P2X 受容体の重要な機能の一つはシナプス前における伝達物質放出の制御である。しかし, P2X 受容体には異なるサブユニット構成からなるそれぞれ異なる性質を持つサブタイプが存在し, 各シナプスにおいて特定の P2X 受容体サブタイプが発現することの機能的意義は大部分未解明である。TS-NTS シナプス前 P2X 受容体のサブタイプは P2X_{2/3} と想定されているが, そのサブユニット構成の人工的変換がグルタミン酸放出に及ぼす影響を検討した。幼若 Wistar ラット右頸部節状神経節 (rNG) に P2X₃ サブユニットに対する siRNA を導入した。

導入 7-15 日後, 孤束核における抗 P2X₃ サブユニット免疫活性は導入側においてのみ顕著に減少した。導入約 15 日後, 孤束核を含む急性脳スライス標本を作成し, 興奮性シナプス後電流頻度に及ぼす P2X 受容体アゴニストの効果を解析したところ, 導入側の孤束核では P2X₂ homomeric 受容体に近い薬理学的特性を示すニューロンが多く記録された。以上, in vivo における特定のサブユニットの gene silencing によってシナプス前 P2X 受容体の薬理学的表現型の変換に成功した。

(6) マウス網膜 P2X₂受容体で見られる特異な生後発達様式

霜田幸雄, 重松康秀 (東京女子医科大学総研)

金田 誠 (慶應義塾大学医学部)

網膜における各種受容体は生後開眼前に基本的な情報伝達経路の発生が終了する。これらの情報伝達経路は成長期には可塑性を持っており, 開眼後の視覚入力に依存して情報伝達経路の組替えが起こることが報告されている。われわれはマウス網膜において P2X₂ 型プリン受容体が OFF 型コリン作動性アムクリン細胞に存在すること,

また ATP が P2 型プリン受容体を活性化し OFF 型網膜神経節細胞における情報伝達を制御することを報告してきた。本研究では免疫組織化学的手法を用いて, P2X₂ 型プリン受容体の生後発達を検討した。また視覚入力に P2X₂ 型プリン受容体の生後発達にどのような影響を与えるかを検討した。マウス網膜 P2X₂ 型プリン受容体は, 1) 開眼

前には存在せず開眼後に情報伝達経路の形成が起こること、2) 開眼後の形成初期には ON 型アマクリン細胞にも P2X₂ 受容体が多く発現すること、3) OFF 経路特異的な

P2X₂ 型プリン受容体の分布は視覚入力依存的な調節を受けないことが明らかとなった。

(7) P2Y₁₂を介したインテグリンβ1活性化によるミクログリア突起伸長調節

大澤圭子¹, 中村泰子¹, 入野康宏², 鈴木恵理¹, 佐柳友規¹, 井上和秀³, 高坂新一¹

(¹国立精神神経センター神経研, ²神戸大学大学院医学研究科, ³九州大学大学院薬学府)

ミクログリアは、正常脳では長く多数に分岐した突起を持つラミファイド型であるが、脳障害時にはいち早く反応して形態を変化させ、障害部位へ移動・集積する。我々は三次元コラーゲングルを用いたラット初代培養ミクログリアの突起伸長アッセイ系を作成し、突起伸長を調節する分子について解析をおこなっている。今回、ATP が P2Y₁₂ を介してミクログリアのコラーゲングルに対する細胞接着性を高めたことから、細胞接着分子であるイ

ンテグリンの関与について検討を行った。RGD ペプチドと抗インテグリンβ1 機能阻害抗体の影響を調べたところ、細胞接着および突起伸長の活性化は両者により抑制された。以上のことから、P2Y₁₂ を介して引き起こされる inside-out なインテグリンβ1 の活性化が、細胞-細胞外マトリックス間接着を亢進することにより突起伸長を制御することが強く示唆された。

(8) ミクログリアにおける P2Y₆受容体発現量増加に関わるメカニズムの解明

藤下加代子¹, 中尾篤人², 小泉修一¹ (¹山梨大学医学部薬理, ²山梨大学医学部免疫)

私達はこれまでに、カイニン酸 (kainic acid : KA) 投与ラットの海馬障害領域において、ミクログリア特異的に P2Y₆ 受容体発現が亢進すること、ミクログリアは傷害部位から放出される UDP をこの P2Y₆ 受容体で認識し、食欲作用を呈すること、を報告してきた。今回、ミクログリアの P2Y₆ 受容体発現亢進における TGFβ-Smad シグナル経路の関与を検討した。ラット脳由来ミクログリアを TGF-β1 に暴露すると、処置時間及び濃度依存的に P2Y₆ 受容体 mRNA 発現量が増加した。TGF-β1 によるこの効

果は TGFβ1 型受容体キナーゼ (TβRI) 阻害剤により抑制された。また、KA 処理後の神経細胞-グリア細胞共培養系上清中でミクログリアを培養すると P2Y₆ 受容体 mRNA 発現量が増加し、この効果は TβRI 阻害剤により抑制された。以上より、KA 障害を受けた神経細胞-グリア細胞由来の TGF-β1 が、その後に惹起されるミクログリア P2Y₆ 受容体発現亢進を担う液性因子の一つである可能性が示唆された。

(9) マウスマクロファージ J774細胞における UDP による持続的な細胞内 Ca²⁺濃度上昇に対するプロスタグランジン E2の作用

伊藤政明, 松岡 功 (高崎健康福祉大学薬学部)

我々はこれまでにマウスマクロファージ J774 細胞において UDP が P2Y₆ 受容体を介して持続的に細胞内 Ca²⁺

濃度 ([Ca²⁺]_i) を上昇させること、さらにはプロスタグランジン (PG) E2 がその上昇を強力に抑制することを見出

しており、今回はそのメカニズムを検討した。PGE2 による Ca^{2+} 抑制の作用点は、 P2Y_6 受容体から小胞体までのシグナルの間にある可能性が考えられた。UDP は持続的にホスファチジルイノシトール (PI) を加水分解し、PGE2 は Ca^{2+} の抑制と同様に、後処理によってこの PI 加水分解

を抑制したことから、その作用点は PLC よりも上流であると考えられた。J774 細胞には PGE2 受容体として EP2 と EP4 の発現が認められた。以上のことから、UDP による持続的な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇に対する PGE2 の抑制は、EP2/EP4 受容体を介する PLC 抑制の関与が示唆された。

(10) マウス T 細胞における P2X_7 受容体を介した形質膜ブレブ形成と細胞死誘導

三坂 恒, 前畑真知子, 原田 均, 出川雅邦 (静岡県立大学薬学部)

P2X_7 受容体は、免疫担当細胞を含む多くの細胞・組織に発現する。マウス T 細胞においては、分化・成熟に伴って発現が上昇し、その活性化はカチオンチャネルの開孔/小孔の形成/形質膜のブレブ形成等を伴った細胞死を誘導する。今回、マウス脾臓由来 T 細胞における P2X_7 受容体を介した細胞の形態学的変化と細胞死誘導との関連について検討した。マウス脾細胞における ATP によるエチジウムイオンの取り込み促進を小孔形成活性としてフローサイトメーターを用いて解析したところ、ATP

(0.1mM) 10 分間処置により小孔形成が認められ、1mM では前方散乱光の低下を伴うより強い小孔形成が認められた。以上の結果より、 P2X_7 受容体活性化による細胞死誘導の初期過程では、比較的弱い小孔が形成し、その後前方散乱光の低下・形質膜ブレブ形成を伴う強い小孔形成が認められるようになることが明らかとなった。今後、前方散乱光の低下と形質膜ブレブ形成との関連とそれらの細胞死誘導への役割を調べることが重要と考えられる。

(11) ヒト肺由来肥満細胞の IgE 受容体を介した脱顆粒に対する細胞外プリンの影響

西 晴久¹, Amir Pelleg², Manfred Thiele³, Edward S. Schulman²

(¹東京慈恵会医科大学薬理学講座,

²Pulmonary & Critical Care Medicine, Drexel University College of Medicine, Philadelphia,

³Anästhesiologie, Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität München, München)

今回我々は cHLMC の $\text{Fc}\Sigma\text{RI}$ 活性化を介した HR に対する種々の細胞外プリンの作用を比較し、各種細胞外プリンが及ぼす呼吸器系アレルギー疾患への影響の可能性を検討した。ヒト肺組織を細切し、エルトリエータ細胞分離システムと percoll 濃度勾配法を用いて MC を単離後、5-8 週間初代培養して cHLMC を得た。 $\text{Fc}\Sigma\text{RI}$ の活性化には抗 $\text{Fc}\Sigma\text{RI}$ モノクローナル抗体である 22E7 を用い、脱顆粒の指標として HR を定量した。cHLMC では、複数種のプリン受容体の発現が認められたが、 P2Y_{11} 受容体

の発現は認められなかった。22E7 刺激による cHLMC の HR に対し、adenosine, inosine, および P2Y_{11} 受容体阻害薬の AMPS は、それぞれ促進と抑制の二方性、促進、そして著明な抑制を、いずれも濃度依存的に示した。5'-AMP は明らかな作用を示さなかった。AMPS は MC のプリン受容体に作用して I 型アレルギーを抑制する可能性が示唆された。これは気管支喘息の緩和・発作軽減といった臨床上の観点からも着目に値する。

(12) ラット骨髄間質細胞の P2Y₂受容体活性化による増殖効果と血清

市川 純 (関西医科大学第二生理)

ラット骨髄間質細胞は P2Y₂ 受容体を発現している。骨髄間質細胞は体性幹細胞としての性質を持ち、再生医療への応用課題の一つとして、より増殖効率の高い培養方法の開発が求められている。そこで P2Y₂ 受容体活性化が増殖に及ぼす影響について調べた。ATP や UTP は増殖因子としての働きはないものの、血清による増殖を促進する効果を持つことがわかった。さらに、蛍光色素を用いた細胞内 Ca²⁺濃度測定において、UTP と FCS で同時刺激

した際に Ca²⁺オシレーションの発生が観察された。UTP あるいは FCS 単独の刺激では一過性の Ca²⁺上昇しか起こらず、また UTP と無血清培地添加剤の同時刺激でも Ca²⁺オシレーションは起こらなかった。以上の結果から、通常培地において P2Y₂ 受容体活性化がもたらす増殖促進効果は、Ca²⁺オシレーション発生と密接に関わるのではないかと推測される。

(13) ミクログリアからの ATP 誘発 MIP-2放出のメカニズム

吉武麻衣, 白鳥美穂, 齊藤秀俊, 津田 誠, 井上和秀 (九州大学大学院薬学研究院薬理学)

ミクログリアは中枢神経系においてサイトカインやケモカインの放出及び産生ネットワークを制御する中心的な役割を担っている。本研究では、ATP 刺激がマウスミクログリア細胞株 BV-2 より CXC ケモカインの一つである MIP-2 mRNA の増加及び MIP-2 の放出を誘発することを新たに見出した。BV-2 細胞において全てのサブタイプ (NFAT 1-5) の NFAT mRNA が確認され、その 1 つであ

る NFAT1 (NFATc2) は ATP 1mM 刺激後 30 分での核内移行が観察された。さらに、MIP-2 産生増加・放出促進はカルシニューリン阻害薬により抑制されたことから、MIP-2 産生・放出にはカルシニューリン依存性 NFAT が関与していることが示唆される。以上のことから、P2X₇ 受容体を介した MIP-2 産生増加及び放出誘発に NFAT が関与することが示唆された。

(14) Up-regulation of cell surface P2X₄ receptor by flow shear stress小林 剛¹, Fernando Lopez-Redondo¹, 武田美江¹, 田中瑞奈¹,
古家喜四夫², 山本希美子³, 安藤譲二³, 曾我部正博^{1,4,5}

(¹名古屋大学大学院医学系研究科, ²科技振・ICORP/SORST・細胞力覚プロジェクト,
³東京大学大学院医学系研究科, ⁴科学技術振興機構細胞力覚プロジェクト, ⁵生理学研究細胞内代謝)

血管内皮細胞に発現した P2X₄ チャンネルは、shear stress 変化に応じて誘起される Ca²⁺流入に中心的な役割を果たす。この反応では細胞外 ATP を必要とすることから、P2X₄ は細胞膜上に局在し機能すると考えられた。GFP 融合 P2X₄ を細胞に発現させ、P2X₄ を含む細胞内小胞が細胞膜と融合する様子を全反射蛍光顕微鏡により観察したところ、リガンド刺激や shear stress 負荷直後に融合頻度

が顕著に上昇することがわかった。さらに、刺激後に細胞膜上へ移行した P2X₄ が機能していること、すなわち、チャンネル電流が増加することが、電気生理学的にも確認された。以上の結果から、P2X₄ による血量感知において、膜移行の亢進により細胞膜上の P2X₄ 分子の数を増加させる正のフィードバック調節機構の存在が示唆された。

19. 上皮膜輸送制御の分子機構：体内環境恒常性維持機構解明を目指して

2008年7月16日－7月17日

代表・世話人：丸中良典（京都府立医科大学大学院医学研究科）

所内対応者：鍋倉淳一（生体恒常機能発達機構）

- (1) $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交換輸送体 SLC26A3 における *N*-結合型糖鎖付加の役割

林 久由，山下裕香理，鈴木裕一（静岡県立大学食品栄養科学部）

- (2) アラキドン酸による胃幽門線粘液細胞 Ca^{2+} 調節性開口放出の増強：PPAR α /NOS1/cGMP

中張隆司（大阪医科大学生理学）

- (3) 胃酸分泌細胞の膜マイクロドメインの構成と機能

酒井秀紀（富山大学大学院医学薬学研究部）

- (4) V1aR ノックアウト (KO) マウスの体液量調節機構

小林瑞佳（北里大学大学院医療系研究科）

- (5) 本態性高血圧症の成因の分子病態生理

尿細管イオントランスポーターの調節因子と分子進化からの考察

石上友章（横浜市立大学大学院医学研究科病態制御内科学）

- (6) 新規腎特異的プロスタグランジン輸送体 OAT-PG の同定と生理機能の検討

波多野亮（大阪大学大学院医学系研究科）

- (7) 熱ショック転写因子による蛋白質ホメオスタシスの維持

林田直樹（山口大学大学院医学系研究科）

- (8) 食品由来脂溶性成分の腸管吸収に及ぼす共存物質の影響

室田佳恵子（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部食品機能学分野）

- (9) ヒト胃癌細胞株において細胞内 Cl^- は MAPK を介して G1/S 細胞周期チェックポイントを制御する

宮崎裕明（京都府立医科大学大学院）

- (10) セリンプロテアーゼ阻害薬による食塩感受性高血圧症治療の可能性

實吉 拓（熊本大学大学院医学薬学研究部腎臓内科学分野）

- (11) ヒト腎臓の経細胞性尿酸輸送分子機序：新規尿酸トランスポーター分子 URATv1

安西尚彦（杏林大学医学部薬理学教室）

- (12) Nek8 (NIMA-related kinase 8) と嚢胞性腎疾患

蘇原映誠（東京医科歯科大学医歯学総合研究科腎臓内科学）

- (13) 特定味覚情報を伝導する神経回路の発生工学的トレーシングと細胞機能の解析

杉田 誠（広島大学大学院医歯薬学総合研究科，PRESTO・JST）

- (14) 肺癌組織における水チャンネル（アクアポリン）発現の研究

佐久間勉（金沢医科大学呼吸機能治療学）

- (15) マウス耳下腺腺房細胞膜の水透過性の解析

瀬尾芳輝（獨協医科大学医学部）

【参加者名】

金井好克（大阪大学医学系研究科），鈴木裕一（静岡県立大学食品栄養科学部），河原克雅（北里大学医学部），小林瑞佳（北里大学医学部），安西尚彦（杏林大学医学

部），室田佳恵子（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部），酒井秀紀（富山大学大学院医学薬学研究部），藤井拓人（富山大学大学院医学薬学教育部），北村

健一郎（熊本大学大学院医学薬学研究部）、宮崎裕明（京都府立医大大学院医学研究科）、丸中良典（京都府立医科大学大学院医学研究科）、柿添 豊（熊本大学大学院医学薬学研究部）、中張隆司（大阪医科大学医学部）、杉田 誠（広島大学大学院医歯薬学総合研究科）、金沢和樹（神戸大学農学研究科）、波多野亮（大阪大学大学院医学系研究科）、實吉 拓（熊本大学大学院医学薬学研

究部）、中井 彰（山口大学大学院医学系研究科）、新里直美（京都府立医科大学医学研究科）、中島謙一（京都府立医科大学医学研究科）、山田敏樹（京都府立医大医学研究科）、平田 拓（杏林大学医学部）、瀬尾芳輝（獨協医科大学医学部）、佐久間勉（金沢医科大学呼吸機能治療学）、趙 希トウ（金沢医科大学呼吸機能治療学）

【概要】

上皮組織は、体内環境の恒常性を保つ上で重要な機能を果たしており、生体における外部からの刺激に対する種々のバリアーとしても重要な役割を担っている。体血圧や体液量は上皮組織におけるナトリウム吸収量により制御されており、一方、肺気道などの防御機構はクロライド輸送を通じた水分分泌により制御されている。このような、生命維持、生体環境恒常性維持に重要な意義を有する上皮組織におけるイオン輸送の制御機構に関する研究は、最近のイオンチャネルのクローニングを基盤として、急速な発展をみせている。しかしながら、上皮組織におけるイオン輸送の制御機構の解明は、上皮組織としての特殊性、すなわち頂部膜 (apical membrane) と基底側壁膜 (basolateral membrane) という極性を有して、しか

もこれらの2種類の膜を介して、イオン輸送が行われるという複雑な機構が存在することから、チャネルのクローニングのみならず、細胞内イオンチャネルトラフィックのメカニズムの解明等が不可欠なものとなって来ている。これらのことを踏まえ、上皮組織におけるイオン輸送制御の分子メカニズム解明を目指し、研究を推進するために、上皮膜輸送の制御機構解明に携わっている研究者に講演を行って頂いた。講演発表内容に対する活発な意見交流も行われ、今後の共同研究へと進展する可能性も生まれた。本研究会を開催したことによる今後の本分野の研究成果が生まれることが大いに期待されるところである。

（１） $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交換輸送体 SLC26A3における N-結合型糖鎖付加の役割

林 久由、山下裕香理、鈴木裕一（静岡県立大学食品栄養科学部）

SLC26A3 は消化管に発現している $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交換輸送体であり、 Cl^- 吸収を担っていると考えられている。SLC26A3 は糖タンパク質であるが、糖鎖の役割および付加部位については研究されていない。このため SLC26A3 のテトラサイクリン誘導発現系を用いて検討した。N-結合型糖鎖付加抑制剤であるツニカマイシン処理後にも細胞膜表面への発現が示唆され、 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交換輸送活性を測定した結果、細胞膜表面への発現が確認された。この条件下で、糖鎖除去された SLC26A3 のイオン輸送機能を評価した。 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交換活性は低下していたが、陰イ

オン選択性は糖鎖除去された SLC26A3 では変化は観察されなかった。糖鎖の役割としてタンパク分解酵素からの保護作用が報告されており、SLC26A3 が発現している消化管では多くの消化酵素が存在しているため、糖鎖除去した SLC26A3 のトリプシン感受性を検討したが、糖鎖除去によりトリプシン感受性が亢進した。N 結合型糖鎖付加がされるアスパラギン (N) をグルタミンに置換した点変異体作製により N 結合型糖鎖付加サイトを検討すると N153, N161, N165 が糖鎖付加される可能性が示唆された。

(2) アラキドン酸による胃幽門線粘液細胞 Ca^{2+} 調節性開口放出の増強: $\text{PPAR}\alpha/\text{NOS1}/\text{cGMP}$

中張隆司 (大阪医科大学生理学)

胃幽門線粘液細胞の Ca^{2+} 調節性開口放出は様々な物質により増強される。アラキドン酸 (AA, $2\mu\text{M}$) もその一つであるが、その信号経路は未だ明らかにされていないが、AAの効果は、少なくとも $[\text{Ca}^{2+}]_i$ と cAMP を介したものでなかった。AAを含む天然脂肪酸は程度の差はあるものの、PPARのリガンドとなることが知られている。本研究ではAAによる Ca^{2+} 調節性開口放出に増強がPPARを介したのではないかと考え、実験を行った。AAによる Ca^{2+} 調節性開口放出の増強は $\text{PPAR}\alpha$ の阻害剤 (MK886) により消失し、 $\text{PPAR}\alpha$ 刺激薬 (Eicosatetraynoic acid (ETYA), WY14643) により再現された。さらにAA及び $\text{PPAR}\alpha$ 刺激薬の効果は、L-NAME, PKG 阻害薬 (Rp8BrPET-cGMPS) により消失し、NO donor (NOC12),

8Br-cGMP により再現された。一方で、ACh 刺激により活性化した胃幽門線粘液細胞の開口放出は、MK886, Rp8BrPET-cGMPS, L-NAME より 2/3 に抑制された。また、胃幽門粘膜を用いた NO と cGMP の測定では、AA及び $\text{PPAR}\alpha$ 刺激薬は幽門粘膜における両物質の産生を増加せしめることが明らかとなった。免疫組織化学的検査により、胃幽門腺粘液細胞では、 $\text{PPAR}\alpha$ が存在し、且つ NOS1 も同時に存在していることが証明された。これらの結果から、胃幽門線粘液細胞では ACh 刺激による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇を介し AA の集積を引き起こす。このAAが $\text{PPAR}\alpha$ を刺激し NOS1 を活性化、引き続いて NO/cGMP の集積を引き起こし、開口放出を増強していることが示された。

(3) 胃酸分泌細胞の膜マイクロドメインの構成と機能

酒井秀紀¹, 藤井拓人¹, 高橋佑司¹, 森井孫俊², 竹口紀晃¹
(¹ 富山大学大学院医学薬学研究部, ² 鈴鹿医療科学大学)

我々は、胃酸分泌機構に関わる膜マイクロドメインの構成と機能を明らかにすることを目的とした。ブタ胃細管小胞に富むベシクル (TV) および分泌膜に富むベシクル (SA) を CHAPS で処理後、不溶性画分 (DRM) および可溶性画分 (non-DRM) の単離を行った。総リン脂質は、TV では大部分が DRM に分布していたが、SA では DRM, non-DRM に同程度に分布していた。TV では caveolin-1 が高発現しており、SA では flotillin-2 が高発現していた。これらの結果から、TV はカベオソームであり、SA にはラフトおよび非ラフト領域が存在するものと考えられた。TV に高発現している CLC-5 は、胃プロ

トンポンプと共に DRM に分布し、両者は免疫共沈降した。MβCD 処理により、CLC-5 とプロトンポンプは non-DRM に移行し、コレステロール添加により DRM へ再分布した。プロトンポンプ活性は、MβCD 処理により減少し、コレステロール添加により回復した。SA に高発現している KCC4 は、プロトンポンプと免疫共沈降した。KCC4 阻害薬は、SA におけるプロトンポンプ活性を阻害した。胃プロトンポンプ阻害薬は KCC4 による Cl⁻ 輸送活性を抑制した。以上の結果から、胃酸分泌細胞の分泌膜と細管小胞では、胃酸分泌に関わるマイクロドメインの構成が異なっていることがわかった。

(4) V1aR ノックアウト (KO) マウスの体液量調節機構

小林瑞佳¹, 安岡有紀子^{1,2}, 田上昭人³, 河原克雅^{1,2}
(¹ 北里大学大学院医療系研究科, ² 北里大学医学部生理学, ³ 国立成育医療センター薬剤治療研究部)

【背景・方法】バソプレッシン (AVP) の受容体 (V1aR, V1bR, V2R) のうち、腎ネフロンには V1aR と V2R が発

現している。Tanoue らは、V1aR^{-/-}マウスを作製し、血漿レニン活性 (PRA)・血漿アルドステロン濃度 (PAC)・循環血液量・体血圧が、野生型に比べ低下していることを報告した (Koshimizu T et al, 2006)。我々は、V1aR のネフロン内局在 (In situ hybridization 法)、低 Na⁺食 (NaCl 0.04%, 1 週間) で飼育した場合の血漿電解質濃度・PRA・PAC 変化を調べ、体液量調節における V1aR の役割を明らかにする。

【結果】V1aR は、糸球体と下位ネフロン (MTAL-IMCD) に発現していた (V1aR mRNA 発現量: CCD, MD > 糸球体, 他セグメント)。WT マウスの尿中 Na⁺排泄量は、240.6 μ mol/d (標準食, n=3) から 127.1 (低 Na⁺食, n=2) に減少

したが、KO マウスの尿中 Na⁺排泄量は、173.8 μ mol/d (標準食, n=2) から 112.9 (低 Na⁺, n=2) に低下した。血漿電解質濃度は、食餌、V1aR KO の違いによりあまり変化しなかった。PRA の結果は、既報 (Koshimizu T et al, 2006) を確認したが、PAC (KO マウス) は、低 Na⁺食で大いに増加した (379 $\rightarrow$ 1,920 pg/ml)。

【結論】標準食で飼育されたマウス (WT) は、V1aR の働きで尿中 Na⁺喪失を防止している可能性を確認した。低 Na⁺食で飼育された V1aR^{-/-}マウスの PAC 上昇は、Renin-Angiotensin-Aldosterone 系以外の体 Na⁺量調節系の存在を示唆する。

(5) 本態性高血圧症の成因の分子病態生理 尿細管イオントランスポーターの調節因子と分子進化からの考察

石上友章 (横浜市立大学大学院医学研究科病態制御内科学)

我々は、まず本態性高血圧症の特徴のひとつである、家族集積性、多因子遺伝性に注目し、候補遺伝子アプローチによる分子遺伝学的手法を用いることによって、原因遺伝子・疾患感受性遺伝子を明らかにした。

アンジオテンシノーゲン遺伝子は、近位尿細管に発現し、結合尿細管に発現するレニンと尿細管特異的なレニンアンジオテンシン (RA) 系として働いて、ナトリウム再吸収機構を調節しているモデルを提唱した。

尿細管 RA 系によって生成されたアンジオテンシン II (AII) が作用する集合尿細管では、上皮性ナトリウムチャネル (ENaC) と、その細胞膜発現を制御するユビキチンリガーゼ Nedd4L に着目した。ヒト Nedd4L のゲノム解析により、新規エクソンと SNP を明らかにし、SNP によって産生される isoform が、他の isoform に対して antagonistic に働く可能性を、in vitro に明らかにした。

(6) 新規腎特異的プロスタグランジン輸送体 OAT-PG の同定と生理機能の検討

波多野亮¹, 平田 拓², 安西尚彦², 松原光伸³, 武藤重明⁴, 永森収志¹, 遠藤 仁², 金井好克¹

(¹ 大阪大学大学院医学系研究科生体システム薬理学, ² 杏林大学医学部薬理学,

³ 東北大学大学院医学系研究科遺伝子医療開発分野, ⁴ 自治医科大学腎臓内科)

演者らは、SLC (solute carrier) 22 family に属する新たな有機アニオン輸送体 OAT-PG (Prostaglandin specific Organic Anion Transporter) を同定した。OAT-PG は、様々な有機アニオン化合物の中で Prostaglandin E₂ (PGE₂), PGF₂ α , PGE₁, PGD₂ などの代表的な Prostaglandin を輸送し、prostaglandin 特異的な輸送体であることが判明した。OAT-PG は腎近位尿細管の側基底膜に局在し、側基底膜上で PGE₂ 代謝酵素 15-hydroxy-prostaglandin dehydrogenase

(15-PGDH) と共局在していた。培養細胞における共発現実験において 15-PGDH の膜局在化には OAT-PG が必要であることが示され、両者の間の蛋白質間相互作用の存在が示唆された。以上より、OAT-PG は、15-PGDH との機能共役により、緻密斑細胞から放出され傍糸球体装置で作用する PGE₂ の周囲に拡散した成分を除去することにより、即時的な尿細管-糸球体フィードバック機構を保障していることが示唆された。

(7) 熱ショック転写因子による蛋白質ホメオスターシスの維持

林田直樹, 藤本充章, 王 倍倍, 大島功司, 新川豊英, 瀧井良祐, 中井 彰
(山口大学大学院医学系研究科)

上皮細胞を含むすべての細胞にとって, 蛋白質ホメオスターシスの維持は細胞機能の発現に必須である。その維持システムの中で, 蛋白質の合成・成熟の過程に重要な役割を演じているのが熱ショック蛋白質群の誘導を特徴とする熱ショック応答である。この応答は, 熱ショック転写因子 HSF1 によって統合的に制御を受ける。蛋白質ホメオスターシスの維持機構を凌駕する蛋白質の変性により, 神経変性疾患等をはじめとする病気を導く。我々は, 伸長したポリグルタミン蛋白質 (polyQ) が細胞内で

凝集体を形成することで蛋白質毒性を発揮するポリグルタミン病をモデルとして, HSF1 を介する蛋白質ホメオスターシスの維持機構のインパクトとその分子機構を解析してきた。その結果, HSF1 がポリグルタミン病モデルマウスの病態進行を著しく抑制していることを明らかにした。さらに, その分子機構として, 熱ショック蛋白質の誘導のみでなく, 様々な遺伝子発現を介して蛋白質ホメオスターシスの維持に寄与していることを示した。

(8) 食品由来脂溶性成分の腸管吸収に及ぼす共存物質の影響

室田佳恵子, 寺尾純二 (徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部)

食品中にはさまざまな脂溶性成分が存在しているが, これらは細胞膜との親和性が強く古くから単純拡散で細胞膜を通過し細胞へ取り込まれると考えられてきた。しかし近年では, 脂肪酸やコレステロールに対する膜輸送担体が見出され, 脂溶性成分についても細胞膜輸送のためには何らかのタンパク質が介在することが知られるようになり, 脂溶性成分の細胞取り込み, さらに腸管吸収機構が見直されつつある。脂溶性成分の腸管吸収においては, 腸管内でのフードマトリックスからの遊離, 腸内液 (水相) 中の輸送, 細胞膜通過, カイロミクロン合成とリンパ輸送, といった過程を経る必要があり, それぞれのプロセスにおいて内因性あるいは食事由来の共存

する分子の影響を受けることが推測される。そこで, 食事性脂質および代表的な脂溶性食品成分である α -トコフェロールと, 両親媒的な性質を持つフラボノイドについて, ヒト小腸 Caco-2 細胞株を用いて腸管吸収に及ぼす共存成分の影響を検討した。その結果, これらの成分は, 刷子縁側溶液中における溶解度の上昇をもたらす界面活性作用物質の共存により腸管吸収が促進されること, また構造類似体の共存により細胞取り込みおよび細胞内代謝が抑制されることを見出した。すなわち, 食品由来脂溶性成分の腸管吸収においては, 腸管管腔での輸送と細胞膜通過に関わる膜タンパク質との相互作用が重要であることが示唆された。

(9) ヒト胃癌細胞株において細胞内 Cl⁻は MAPK を介して G1/S 細胞周期チェックポイントを制御する

宮崎裕明, 大澤るみ, 塩崎 敦, 新里直美, 丸中良典
(京都府立医科大学大学院細胞生理学)

細胞周期の進行に伴って Cl⁻輸送体の活性・発現が変化することが報告されているが, Cl⁻輸送がどのように細胞増殖に関与しているかは明らかになっていない。近年の

我々の研究結果から, 細胞内 Cl⁻が細胞の生理機能に対する細胞内シグナルとして重要であることが明らかになった。そこで, Cl⁻輸送体を介した細胞内 Cl⁻濃度変化が,

細胞増殖の調節シグナルとして機能している可能性が強く示唆される。そこで本研究では、胃ガン由来細胞株である MKN28 細胞において、細胞内 Cl^- 濃度変化が増殖に与える影響について検証した。MKN28 細胞を、低 Cl^- 培地 (Cl^- を NO_3^- で置換) で培養を行ったところ、細胞周期の G_1 期から S 期への進行を遅延させ、細胞増殖を抑制した。また、 G_1 期から S 期への進行を抑制する p21 タンパクの発現量が有意に上昇していた。p21 発現調節経路

である MAPK 経路に対する低 Cl^- の影響を検討したところ、低 Cl^- 環境下では ERK, p38, JNK すべてのリン酸化レベルが亢進した。また、MAPK 特異的阻害剤の処理により、低 Cl^- 環境下における p21 発現亢進および細胞増殖抑制効果が消失した。以上の結果から、細胞内 Cl^- は MAPK 経路を介して p21 の発現レベルを調節することで細胞増殖を制御している可能性が強く示唆された。

(10) セリンプロテアーゼ阻害薬による食塩感受性高血圧症治療の可能性

實吉 拓, 柿添 豊, 富田公夫, 北村健一郎 (熊本大学大学院医学薬学研究部)

上皮型 Na チャネル (ENaC) は腎尿細管における Na 再吸収に重要な役割を果たしており、血圧や体液量調節に関わっている。私達は膜型セリンプロテアーゼであるプロスタシンが ENaC を活性化することを報告した。ENaC γ サブユニットはアルドステロン負荷により 85 から 70kD へ分子量変化を起し活性化される。DS rat は高食塩負荷で高血圧、腎機能障害を発症するが、この時 DS rat は低アルドステロン血症であるにも関わらず、ENaC γ サブユニットが 85 から 70kD へ分子量が変化していた。すなわち高食塩負荷に対し ENaC は奇異的に活性化状態

であった。DS rat に対して ENaC の阻害剤であるアミロライドは降圧、腎保護効果を認めたのに対し、選択的アルドステロン拮抗薬であるエプレレノンはこれを認めなかった。次にセリンプロテアーゼインヒビターであるメシル酸カモスタット (CM) について検討した。CM は組み換えプロスタシン蛋白の活性を抑制し、マウス集合尿細管細胞における Na 電流を抑制した。さらに DS rat へ CM を投与すると、降圧及び腎保護効果を認め、尿中 Na/K 比が上昇した。今後、新規クラス降圧薬としてセリンプロテアーゼインヒビターの臨床応用が期待される。

(11) ヒト腎臓の経細胞性尿酸輸送分子機序：新規尿酸トランスポーター分子 URATv1

安西尚彦 (杏林大学医学部)

腎臓の尿酸輸送は、その尿酸排泄亢進により腎性低尿酸血症を生じ、その排泄低下が高尿酸血症・痛風の原因となるため、これらの病態に重要と考えられていたが、長年その分子実体は明らかでなかった。2002 年、我々は腎近位尿細管管腔側膜に存在する尿酸トランスポーター URAT1 (SLC22A12) を同定したが、URAT1 により細胞内に取込まれた尿酸が、どのようにして血管側に送られるのか、その機序は未だ不明である。今回我々は、腎近位尿細管基底側に存在する一つのトランスポーター様分子に注目し、それが腎尿細管の尿酸排出路として働く可能性を検討した。同分子はアフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた検討により、RI 標識尿酸の時間依存性お

よび濃度依存性取込みを示す事 (K_m , 365 μM)、またその輸送は外液中 NaCl の KCl 置換により、尿酸輸送活性が増加するため、膜電位依存性である可能性が示された。さらに卵母細胞内に注入した RI 標識尿酸は時間依存性に排出されるため、我々は同分子を電位依存性尿酸トランスポーター URATv1 と命名した。腎性低尿酸血症患者の中で、URAT1 (SLC22A12) 遺伝子の変異のない患者を選び、ゲノム DNA 解析を行った所、URATv1 遺伝子の変異を同定した。以上より、URATv1 は生理的に、URAT1 が管腔内から細胞内に取込んだ尿酸の、基底側での排出経路となる可能性が示唆された。

(12) Nek8 (NIMA-related kinase 8) と嚢胞性腎疾患

蘇原映誠 (東京医科歯科大学医歯学総合研究科)

多発性嚢胞腎の病態生理についてはまだ多くは解明されていないものの、近年多くの嚢胞性腎疾患に関わる蛋白が繊毛へ局在することが報告されつつある。

Nek8 (NIMA-related kinase 8) とは serine/threonine kinase であり, jck マウスという多発性嚢胞腎モデルマウスにおける嚢胞発生の原因がこの Nek8 の変異であることが報告されたが, Nek8 の機能についてはよくわかっていない。我々はこの jck マウスを用いて, Nek8 の局在や他の嚢胞性腎疾患に関わる蛋白と Nek8 の関連についての検討を行った (J Am Soc Nephrol 2008)。

腎臓において Nek8 は細胞質内のみならず, 他の嚢胞

性腎疾患の原因蛋白と同様に腎集合管細胞の繊毛に局在し, それも繊毛の近位側に局限していた。

さらに共同免疫沈降によって, Nek8 と多発性嚢胞腎の原因蛋白である Polycystin-2 (PC2, TRPP2) との相互作用が確認され, Nek8 変異による jck マウスの嚢胞発生に PC2 が関係している可能性が考えられた。そこで, Jck マウスにおける PC2 を確認すると, 発現増加と過剰なリン酸化を認め, 同時に腎臓の免疫染色にて PC2 の繊毛への局在が強くなっており, PC2 のリン酸化が繊毛への局在, ひいては腎嚢胞の疾患メカニズムに影響している可能性を示唆した。

(13) 特定味覚情報を伝導する神経回路の発生工学的トレーシングと細胞機能の解析

杉田 誠 (広島大学大学院医歯薬学総合研究科, PRESTO・JST)

本研究では口腔内の味細胞で感知される特定味覚情報を伝導するニューロン群の回路様式を, トランスジェニックマウスの作製を通して可視化することを試みた。特定味覚受容体を発現する味細胞に, シナプス間を移動するトレーサタンパク質 (tWGA-DsRed) を選択的に発現させ, トレーサーにより標識される脳内ニューロンの局在を可視化した。延髄弧束核内において, 苦味受容味細胞から移行した tWGA-DsRed を保有するニューロンは, 甘味/うま味受容味細胞から移行した tWGA-DsRed を保有するニューロンに比べ, 後方に分離して集積した。

tWGA-DsRed により標識されたニューロンに Lucifer Yellow を注入することによりその樹状突起構造を可視化したところ, 延髄弧束核内の苦味伝導路構成ニューロン中には, 樹状突起を rostral 側に伸張するニューロン, caudal 側に伸張するニューロン, rostral・caudal 両側に伸張するニューロンが分類観察された。また延髄弧束核内の苦味伝導路構成ニューロンは tyrosine hydroxylase を発現するカテコールアミン作動性ニューロンであることが示唆された。

(14) 肺癌組織における水チャンネル (アクアポリン) 発現の研究

佐久間勉 (金沢医科大学呼吸機能治療学)

非担癌肺ではアクアポリン (AQP) 1 は肺血管内皮細胞に, AQP3 は肺胞 II 型上皮細胞と気管支上皮細胞に, AQP5 は肺胞 I 型上皮細胞と円柱細胞に多く発現する。今回, 肺癌組織における AQP の発現を 45 症例の切除肺癌で研究した。組織型は腺癌 27 例 (細気管支肺胞上皮癌 14 例,

高分化腺癌 4 例, 低分化腺癌 10 例), 扁平上皮癌 10 例, 大細胞癌 4 例, 小細胞癌 4 例であった。免疫組織学的に AQP1, 3, 5, ナトリウムチャンネルの発現を測定し, Laser-Capture Microdissection 法を用いて採取した肺癌組織で mRNA の発現を測定した。AQP1 は粘液産生性細気管支

肺胞上皮癌と高分化腺癌に発現が強かった。AQP3 は粘液非産生性細気管支肺胞上皮癌と扁平上皮癌に発現が強かった。AQP5 とナトリウムチャンネルは粘液産生性細気管支肺胞上皮癌と高分化腺癌に発現が強かった。

mRNA の発現は免疫組織学的な発現を裏付ける結果であった。この研究結果より AQP5 とナトリウムチャンネルが肺癌での肺胞内粘液貯留に関与していることが示唆された。

(15) マウス耳下腺腺房細胞膜の水透過性の解析

瀬尾芳輝，今泉好偉，横井実佳（獨協医科大学医学部）

佐藤慶太郎，松木美和子，杉谷博士（日本大学松戸歯学部）

マウス耳下腺腺房細胞細胞膜の水透過性を H-1 核磁気共鳴法により解析した。耳下腺腺房細胞浮遊液に磁気緩和試薬 (Gd-DTPA) を加え，水分子の磁気緩和 (T1 緩和) を解析した。29°C にて，細胞膜を介する水の流出速度係数（約 5/秒）を得た。細胞の表面積・体積比より，拡散水透過係数を 1.4×10^{-3} cm/秒と推定した。また，水透過

係数の温度依存性から水透過の活性化エネルギーは約 4.6 kcal/mol と推定した。これらの値は，AQP1 などの水チャンネルを介した水輸送を行っている細胞と，ほぼ同等の値であった。よって，耳下腺腺房細胞においても，何らかのチャンネルを介して水分子が細胞膜を透過していることが示唆された。

20. 中枢・末梢臓器間連携による摂食, エネルギー代謝調節

2008年9月25日-9月26日

代表・世話人: 矢田俊彦 (自治医科大学医学部生理学講座統合生理学部門)

所内対応者: 箕越靖彦 (生理学研究所発達生理学系生殖・内分泌系発達機構研究部門)

(1) 肝臓由来分泌タンパクセレノプロテインPが全身の糖代謝に及ぼす影響

御簾博文¹, 篁 俊成², 金子周一² (¹金沢大学大学院医学系研究科地域連携腫瘍内科学,
²金沢大学医薬保健研究域医学系恒常性制御学)

(2) 肝グルコキナーゼの核外移行促進による血糖上昇抑制

豊田行康¹, 森 茂彰¹, 熊澤良祐¹, 二村由里子¹, 梅村展子¹, 三輪一智¹, 徳田雅明², 村尾孝児³,
石田俊彦³ (¹名城大学薬学部病態生化学, ²香川大学医学部細胞情報生理学,
³香川大学医学部内分泌代謝・血液・免疫・呼吸器内科)

(3) Parathyroid hormone-related protein の摂食・消化管運動への作用

浅川明弘¹, 藤宮峯子², 新島 旭³, 藤野和典², 児玉典子⁴, 加藤郁夫⁵, 難波宏彰⁴, 乾 明夫¹
(¹鹿児島大学大学院医歯学総合研究科社会行動医学講座, ²札幌医科大学医学部解剖学第2講座,
³新潟大学医学部生理学講座, ⁴神戸薬科大学薬学部微生物化学講座, ⁵北陸大学薬学部生物薬品化学教室)

(4) 食欲調節ペプチドの臨床応用

中里雅光 (宮崎大学医学部内科学講座神経呼吸内分泌代謝学分野)

(5) 摂食と高次脳機能活性化

大村 裕 (九州大学医学部)

(6) The Brain-Adipose Axis (脳-脂肪細胞系) の役割: 匂い刺激による脂肪代謝調節

新島 旭 (新潟大学医学部)

(7) Nesfatin-1 の摂食抑制は室傍核オキシトシンニューロンを介する

前島裕子¹, Udval Sedbazar¹, 河野大輔¹, 須山成朝¹, 吉田なつ¹, 清水弘行², 森 昌朋²,
矢田俊彦¹ (¹自治医科大学医学部生理学講座統合生理学部門,
²群馬大学大学院医学系研究科病態制御内科学)

(8) PPAR γ -DNA-binding domain-interacting protein (PDIP)1 のクローニングと肥満代謝に及ぼす影響

佐藤哲郎, 吉野 聡, 森 昌朋 (群馬大学大学院医学系研究科病態制御内科学)

(9) レプチンは新規フォスファターゼ CIPP を介して視床下部弓状核の AMPK 活性を抑制する

鈴木 敦, 志内哲也, 箕越靖彦 (自然科学研究機構 生理学研究所 生殖・内分泌発達機構研究部門)

(10) IL-6/STAT3 経路による個体糖代謝調節

井上 啓 (金沢大学フロンティアサイエンス機構)

【参加者名】

大村 裕 (九州大学), 新島 旭 (新潟大学), 嶋津 孝 (愛媛大学), 児島将康 (久留米大学), 佐々木努, 森 昌朋 (群馬大学), 窪田直人 (東京大学), 乾 明夫, 浅川明弘 (鹿児島大学), 山田哲也 (東北大学), 幸田修一 (アスピオファーマ (株)), 中林 肇, 井上 啓, 御簾博文 (金沢大学), 中里雅光, 伊達 紫, 武藤絵里 (宮崎大学),

豊田行康, 熊澤良祐, 森 茂彰, 二村由里子, 梅村展子 (名城大学), 加藤郁夫 (北陸大学), 矢田俊彦, 前島裕子, 須山成朝, 岩崎有作, 安藤明彦, Udval Sedbazar, 吉田なつ (自治医科大学), 箕越靖彦, 鈴木 敦, 志内哲也, 岡本土毅, 李 順姫, 戸田知得, 江崎麻耶, 上條真弘, 藤野祐介, 松尾崇, Sanda Kyaw, 高山靖規 (生理学研究所)

【概要】

「中枢・末梢臓器間連携による摂食，エネルギー代謝調節」に関する生理学研究会は，平成 19 年度の研究会を発展する形で，平成 20 年 9 月 25 日－9 月 26 日に行われた。今回は，この分野の世界のパイオニアである大村裕，新島旭，嶋津孝の 3 先生にそろってご参加いただき，同時に多くの若手研究者・大学院生が参加し，文字通り 3 世代が集う研究会となり，学問の歴史と伝統を若手に伝えるという意味で極めて意義のある研究会となった。

発表された 10 演題の内容を大別すると，①中枢-末梢連携の生理学，②摂食・代謝調節に関与する新しい分子やメカニズム，③臨床応用に分けられた。①中枢-末梢連携に関しては，食事に伴い変動する摂食因子による高次脳機能調節，匂い刺激が脂肪代謝を調節する脳-脂肪細胞軸，ホルモンによる摂食・消化管運動の連携制御，中

枢インスリン作用による肝 IL-6/STAT3 系を介した肝糖産生抑制経路について紹介された。②摂食・代謝調節に関与する新しい分子やメカニズムに関しては，肝臓由来分泌タンパクセレノプロテイン P による全身の糖代謝調節，肝グルコキナーゼの核外移行による血糖上昇機構，新規の PPAR γ -DNA-binding domain-interacting protein (PDIP)1 やフォスファターゼ CIPP による代謝調節，新規満腹物質 Nesfatin-1 の摂食抑制神経経路について紹介された。また③臨床応用に関してはグレリンによる慢性閉塞性肺疾患 (COPD) とカヘキシアの治療について紹介があった。いずれも新しいデータや新しい概念を提出するものであり，夜遅くまで活発な質疑応答と学術交流が行われた。

(1) 肝臓由来分泌タンパクセレノプロテイン P が全身の糖代謝に及ぼす影響

御簾博文¹，篁 俊成²，金子周一² (¹金沢大学大学院医学系研究科地域連携腫瘍内科学，
²金沢大学医薬保健研究域医学系恒常性制御学)

【目的】肝臓は生体内最大の生理活性物質産生工場であり，各種の分泌因子を血中に放出することで体内の恒常性を維持している。そこで我々は，肝臓由来分泌タンパク“ヘパトカイン”のなかに，2 型糖尿病の原因物質があると仮説を立てその同定をこころみた。

【結果】糖尿病患者と耐糖能正常者の肝臓発現遺伝子プロファイルを包括的に解析した結果，微量元素セレンの輸送タンパクとして知られるセレノプロテイン P (以下 SeP) の肝遺伝子が，インスリン抵抗性の程度と比例して糖尿病状態で亢進することを見出した。精製 SeP タン

パクの投与実験の結果から，SeP が末梢細胞でのインスリンシグナル伝達を減弱させ，インスリン抵抗性，高血糖を誘導することが明らかとなった。この SeP 投与によって生じるインスリン抵抗性は，肝での AMPK 不活性化による脂肪酸 β 酸化の低下によって一部説明できることが明らかとなった。さらに，ノックアウトマウスを用いた検討から，SeP が中枢神経系における食欲制御に関連していることが示唆された。肝由来分泌タンパク SeP を介した臓器間連携が，2 型糖尿病の病態を形成する可能性について議論したい。

(2) 肝グルコキナーゼの核外移行促進による血糖上昇抑制

豊田行康¹，森 茂彰¹，熊澤良祐¹，二村由里子¹，梅村展子¹，三輪一智¹，
徳田雅明²，村尾孝児³，石田俊彦³

(¹名城大学薬学部病態生化学，²香川大学医学部細胞情報生理学，

³香川大学医学部内分泌代謝・血液・免疫・呼吸器内科)

肝グルコキナーゼは核/細胞質間を移行して肝糖代謝

の調節に関与している。肝グルコキナーゼの核から細胞

質への移行（核外移行）により、肝臓の糖利用が促進して食後の血糖上昇が抑制される。グルコキナーゼの核から細胞質への移行を促進する物質には、食後の血糖上昇抑制効果が期待できる。そこで、グルコキナーゼ活性化剤 (GKA) および希少糖の D-プシコースによるグルコキナーゼの核外移行促進作用とグルコース負荷時の血糖上昇抑制作用を調べた。

24 時間絶食した Goto-Kakizaki ラットに GKA を投与し、2g/kg グルコースを単回経口投与した。GKA 投与 30

分後において、GKA 未投与群と比べて有意なグルコキナーゼの核外移行促進が認められた。また、血糖上昇も有意な抑制効果が認められた。一方、0.2%D-プシコースを添加した 2g/kg グルコースを投与した場合においても、D-プシコース未添加 2g/kg グルコース投与群と比べて有意なグルコキナーゼの核外移行の促進と血糖上昇の抑制が認められた。GKA および D-プシコースは、肝グルコキナーゼの核外移行を促進して肝糖利用を高めることにより血糖上昇を抑制したものと考えられた。

(3) Parathyroid hormone-related protein の摂食・消化管運動への作用

浅川明弘¹，藤宮峯子²，新島 旭³，藤野和典²，児玉典子⁴，加藤郁夫⁵，難波宏彰⁴，乾 明夫¹

(¹ 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科社会行動医学講座，² 札幌医科大学医学部解剖学第2講座，³ 新潟大学医学部生理学講座，⁴ 神戸薬科大学薬学部微生物化学講座，⁵ 北陸大学薬学部生物薬品化学教室)

【目的】癌性悪液質においては parathyroid hormone-related protein (PTHrP) の血中レベルが上昇していることが知られている。我々は PTHrP の腸管運動，エネルギー代謝に与える影響に関して薬理学的な検討を行った。

【方法】マウスの腹腔内に PTHrP (3-300 pmol/mouse) を投与し、摂食、胃排出への影響を評価するとともに、視床下部における神経ペプチド、胃における ghrelin, leptin の発現を検討した。また、ラットに PTHrP を静脈内投与し、胃十二指腸の空腹期腸管運動、迷走神経求心路の電気活動を測定した。さらに、7 日間のマウスの腹腔内への PTHrP の持続投与を行った。

【結果】PTHrP は末梢投与により摂食抑制作用を示し、胃排出を遅延させた。PTHrP の摂食抑制作用は味覚嫌悪には影響しなかった。PTHrP 投与により視床下部の

urocortin 2 および 3、室傍核の c-fos は増加し、白色脂肪における adiponectin の発現は減少傾向を示した。

Urocortin 2 および 3 の抗血清の脳室内投与は、PTHrP の摂食抑制作用に拮抗した。PTHrP の静脈内投与は、迷走神経胃枝、肝臓枝の求心性の電気活動を上昇させ、迷走神経切断は PTHrP の摂食への作用を消失させた。PTHrP の末梢持続投与は、マウスの摂食量、体重を減少、脂肪、筋肉量を低下させた。

【結論】以上より、末梢における PTHrP は、生体内における消化管運動、エネルギー代謝の調節に重要な役割を果たしており、PTHrP 及びその受容体由来の創薬が、癌性悪液質などの疾患における消化管機能異常や食欲低下などに対して臨床応用される可能性が示唆された。

(4) 食欲調節ペプチドの臨床応用

中里雅光（宮崎大学医学部内科学講座神経呼吸内分泌代謝学分野）

グレリンは、ヒトとラットの胃から発見されたペプチドで、強力な成長ホルモン分泌作用や摂食亢進作用をはじめとする多彩な生理作用を有する。カヘキシアによりグレリン産生は増加し、エネルギー同化に対して代償的に働いている。

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) は、有毒な粒子やガスの吸入によって生じた肺の炎症により、進行性の気流制限をきたす疾患である。主たる症状は呼吸困難で、進行した患者では肺機能低下に伴ってのいそや筋力低下が著しく、軽度の労作も不可能となる。40 歳以上の日本人の約

530 万人が COPD に罹患し、今後も COPD 患者は確実に増加すると報告されている。呼吸筋の疲弊や全身ののいそうをきたした COPD 症例へのグレリン投与は、呼吸筋力、下肢筋力、運動耐応能を改善した。慢性下気道感染症は COPD や気管支拡張症などが基礎疾患となり、緑膿菌や非定型抗酸菌等による慢性感染と消耗をきたす。グレリンの持つ抗炎症やアナボリック作用は、良い治療適

応と考えられ、臨床応用研究を進めている。

グレリンはエネルギー同化を促進するだけではなく、交感神経活性を抑制することで異化を抑制する。グレリンには既存の治療薬とは異なる作用機序により、カヘキシアや筋萎縮などの病態を改善させる可能性があり、臨床研究の発展が期待される。

(5) 摂食と高次脳機能活性化

大村 裕（九州大学医学部）

摂食の中枢機構は視床下部にあるハード系とそれに作用するソフト系からなっている。ハード系は満腹系と摂食系である。前者は腹内側核、弓状核外側部および基底外側扁桃核、後者は外側視床下野、弓状核内側部および中内側扁桃核からなる。満腹系ニューロンの 3 割を占めるブドウ糖によりニューロン活動の上昇するブドウ糖受容ニューロンと、摂食系ニューロンの 3 割を占めるブドウ糖でニューロン活動の抑制されるブドウ糖感受性ニューロンそれぞれが、ソフトである満腹および空腹物質に反応する。摂食中に増加する満腹物質は、ブドウ糖、インスリン、グルカゴン、カルチトニン、CRH、2-buten-4olide などであり、また 1989 年に酸性線維芽細胞増殖因子 (aFGF) が、1994 年にレプチンが発見されている。空腹時に増加する空腹物質は、FFA、NPY、アグーチ関連タンパ

ク質、メラニン凝集ホルモン、2, 4, 5-trihydroxy-pentanoic acid γ -lactone など、また 1998 年にオレキシンが、1999 年にはグレリンが発見されている。ブドウ糖受容および感受性ニューロンが感知した化学情報は自律神経の最高中枢である眼窩前頭前野と背側前頭前野に送られ、これらの中枢が適切な摂食行動を指令する。

摂食調節物質は、さらに海馬に働き脳高次機能を促進あるいは抑制する。すなわち 2-buten-4olide, aFGF およびレプチンは CA1 ニューロンに作用して長期増強を促進して学習記憶を促進する。一方オレキシンは両者を抑制する。

このように摂食行動は生体のホメオスターシスに必須のものであると同時に、脳の高次機能の活性化にも必須のものである。

(6) The Brain-Adipose Axis（脳-脂肪細胞系）の役割：匂い刺激による脂肪代謝調節

新島 旭（新潟大学医学部）

最近脂肪代謝の調節系として The Brain-Adipose Axis（脳-脂肪細胞系）の役割が注目されている。脳から脂肪細胞へのシグナルは主として交感神経系により送られているが、交感神経は各種感覚受容器からの入力を受けている。その中で匂い刺激による脂肪代謝調節について実験した。

ラットを用いて自律神経活動、脂肪分解、熱産生、血圧、摂食量と体重に対するグレープフルーツ精油とラベンダー精油の匂い刺激効果を観察した。グレープフルー

ツ精油の匂い刺激は白色脂肪組織、褐色脂肪組織と副腎を支配する交感神経活動を促進し、胃を支配する迷走神経（副交感神経）活動を抑制した。一方ラベンダー精油の匂い刺激は白色脂肪組織、褐色脂肪組織と副腎を支配する交感神経活動を抑制し、胃を支配する迷走神経活動を促進した。これらの自律神経活動の変化から予想されるごとく、グレープフルーツ精油の匂い刺激は脂肪分解、熱産生を亢進させ、血圧を高め、摂食量と体重を減少させた。ラベンダーの匂い刺激は脂肪分解、熱産生を抑制

し、血圧を低下させ、摂食量と体重を増加させた。更に交感神経活動を活性化させ脂肪分解の亢進が期待される感覚刺激としては、強い光り、皮膚の痛み、冷刺激、音

(行進曲)、味(酸味など)があげられる。さらにレプチン、グレリンなどのホルモンの役割も期待される。

(7) Nesfatin-1の摂食抑制は室傍核オキシトシンニューロンを介する

前島裕子¹, Udval Sedbazar¹, 河野大輔¹, 須山成朝¹, 吉田なつ¹, 清水弘行², 森 昌朋², 矢田俊彦¹

(¹自治医科大学医学部生理学講座統合生理学部門, ²群馬大学大学院医学系研究科病態制御内科学)

【目的】近年発見された摂食抑制物質 Nesfatin-1 (Nes)は、視床下部摂食中枢核に局在し、レプチンと独立に作用することが報告されている。本研究はNesの摂食抑制作用の神経経路を明らかにすることを目的とした。

【方法】ラット脳室内にNesなどを投与し、摂食量を測定、免疫染色によりc-FOS発現を観察した。視床下部室傍核(PVN)から単離したニューロン内Ca²⁺濃度([Ca²⁺]_i)をfura-2蛍光画像解析により測定し、反応細胞を免疫染色し細胞種を同定した。

【結果】Nesの脳室内(ICV)投与によりPVN、孤束核に

c-FOSタンパクが発現した。NesのPVN局所投与で摂食が抑制された。また、Nes ICVによりPVNでc-FOSを発現する細胞の28%がオキシトシン(Oxy)ニューロンであった。さらにNesは、PVNから単離したOxyニューロンの[Ca²⁺]_iを増加させた。Nesの摂食抑制作用はOxy受容体拮抗薬で抑制された。さらに、PVNに局在するNesはOxyニューロンに共局在または隣接していた。

【結論】Nesによる摂食抑制にPVN Oxyニューロンの活性化が関与する。

(8) PPAR_γ-DNA-binding domain-interacting protein (PDIP)1のクローニングと肥満代謝に及ぼす影響

佐藤哲郎, 吉野 聡, 森 昌朋 (群馬大学大学院医学系研究科病態制御内科学)

核内受容体は、標的遺伝子プロモーターの応答配列および結合パートナーの様式により主として3型に分類される。2型に属するPPARは多彩な生理作用を有するが、中でも代謝調節作用は重要である。私達はヒトPPAR_γのDNA結合部位をbaitとするYeast-two hybrid systemによりクローニングした蛋白をPDIP1と命名した。PDIP1はPPAR_α, PPAR_δ, PPAR_γのco-activatorとして作用し、RNAiによるPDIP1発現knock-downによりPPAR_γのリガンド依存性転写活性化が消失したことから、PDIP1の生理学的重要性が示唆された。そこで、相同遺伝子組み換え法によりPDIP1ノックアウトマウス(KO)を作成し、野生型マウス(WT)と比較した。通常食ではPDIP1 KOの体重、耐糖能は正常で、血清中性脂肪が低下していた。一方、高脂肪食負荷では、PDIP1 KOの摂食量はWTと

差がなかったが、体重増加量と脂肪重量はWTに比較し有意に減少しており、耐糖能も悪化せず、インスリン感受性は亢進し、血清中性脂肪低下も認めた。定量的RT-PCR法において高脂肪食負荷のPDIP1 KO肝臓ではPPAR_αならびにPGC1_α mRNAが増加し、CPT-1a, CPT-1b, UCP2の発現も増加していたが、白色脂肪、筋肉および褐色脂肪におけるこれらエネルギー消費に関わる遺伝子発現には有意な変化を認めなかった。一方、肝臓のSREBP1c, ChREBP, ELOV16, GPAT, DGAT, MTPの発現は変化せず、SCD1およびAGPAT2発現が有意に低下していた。以上の成績より、PDIP1 KOは高脂肪食下では肥満抵抗性とインスリン感受性亢進性を示し、それは主として肝臓における脂肪酸β酸化能の亢進と中性脂肪合成能の低下に拠ることが判明した。

(9) レプチンは新規フォスファターゼ CIPP を介して視床下部弓状核の AMPK 活性を抑制する

鈴木 敦, 志内哲也, 箕越靖彦 (自然科学研究機構 生理学研究所 生殖・内分泌系発達機構研究部門)

レプチンは視床下部に作用を及ぼして摂食を抑制するが, その作用の少なくとも一部は視床下部 AMPK 活性を抑制することによって引き起こされる。今回, ヒト神経芽腫細胞株 SH-SY5Y を用いて, レプチンによる AMPK 活性抑制作用に関わる PP2C ファミリー新規フォスファターゼ CIPP (CaMKK β -AMPK cascade-inhibitory protein phosphatase) を発見した。レプチンは, SH-SY5Y において PI3 キナーゼ-Akt 依存性に CIPP をリン酸化した。その結果, CIPP は CaMKK β に結合してこれを脱リン酸化し, CaMKK β 活性を抑制した。CaMKK β 活性が抑制され

ることにより AMPK 活性が低下し, その結果 NPY の発現も低下した。また, CIPP が視床下部弓状核 (ARH) に選択的に発現しており, ARH での CaMKK β の活性抑制並びに AMPK の活性抑制作用に関わることを見出した。CIPP は, ヒト脳を含む様々な組織に発現するが, レプチンによって AMPK が活性化する骨格筋では発現していなかった。このように CIPP は, レプチン-CaMKK β -AMPK 経路に関わる重要な新規制御因子であることが明らかとなった。

(10) IL-6/STAT3経路による個体糖代謝調節

井上 啓 (金沢大学フロンティアサイエンス機構)

肝 IL-6/STAT3 は, 中枢神経インスリン作用のエフェクターとして糖産生制御に重要な役割を果たしている。一方, 肥満状態においては, 血中 IL-6 が増加し, 肝・骨格筋に作用し, インスリン抵抗性を誘導する可能性が指摘されている。本研究では, IL-6/STAT3 経路の個体糖代謝調節における役割を検討した。

IL-6 中和抗体投与により, 非肥満マウスでは肝 STAT3 活性低下とインスリンによる肝糖産生抑制の減弱を来した。肥満・インスリン抵抗性モデルである db/db マウスでは, 肝・骨格筋 STAT3 の活性低下と末梢糖利用亢進と耐糖能異常改善を呈した。肥満・インスリン抵抗性状態における肝・骨格筋 STAT3 の役割を検討するために, 肝特異的 STAT3 欠損 db/db マウス・骨格筋特異的 STAT3 欠損 db/db マウスを作製した。肝特異的 STAT3 欠損 db/db

マウスは対照 db/db マウスに比べ耐糖能異常の増悪・肝糖産生増加を呈し, 骨格筋特異的 STAT3 欠損 db/db マウスは, 対照 db/db マウスに比べ耐糖能の改善・末梢糖利用の増加を呈した。

野生型マウスに対し IL-6 持続投与を行い, 糖代謝に対する影響を検討した。IL-6 持続投与に伴い, 肝・骨格筋 STAT3 は活性化され, 肝糖産生は抑制されたが, 末梢糖利用には変化がなかった。

以上より, IL-6/STAT3 経路は肝ではインスリン感受性の亢進, 骨格筋ではインスリン抵抗性の誘導という 2 つの異なった作用を担うと考えられた。しかし, 骨格筋におけるインスリン抵抗性の発現には, IL-6/STAT3 経路の活性化に加え, 肥満・インスリン抵抗性に伴う何らかの要因が必要である可能性が示唆された。

21. 電子顕微鏡機能イメージングの医学・生物学への応用

2008 年 12 月 20 日－12 月 21 日

代表・世話人：臼田信光（藤田保健衛生大学医学部）

所内対応者：永山國昭（岡崎統合バイオサイエンスセンター）

- (1) 医学生物学用超高压電子顕微鏡の開発と応用
有井達夫（生理学研究所）
- (2) STEM トモグラフィーの生体試料への応用
青山一弘（日本エフイー・アイ（株）アプリケーションラボラトリ）
- (3) 生物分子トモグラフィーを目指して
宮澤淳夫（理化学研究所 播磨研究所）
- (4) 走査透過電子顕微鏡と電子エネルギー損失分光法による結晶構造観察
木本浩司（（独）物質・材料研究機構 ナノ計測センター）
- (5) 超高压電子顕微鏡の歴史と期待
濱 清（生理学研究所）
- (6) 電子波の位相情報の活用
丹司敬義（名古屋大学 エコトピア科学研究所）
- (7) 強位相物体の位相回復法－Iterative Complex Observation
永山國昭（生理学研究所）
- (8) Zernike Phase Contrast for Single Particles and Cryotomography
Radostin Danev（生理学研究所）
- (9) 3次元フーリエフィルタリング法と動的ホローコーン照明法の原理と応用
生田 孝（大阪電気通信大学工学部電子工学科）
- (10) 電子線ホログラフィーの最近の開発状況 ——多段電子線バイブリズム干渉法——
原田 研（日立製作所 基礎研究所）
- (11) 強相関電子系酸化物のローレンツ電子顕微鏡観察
浅香 透（（財）ファインセラミックセンター ナノ構造研究所）
- (12) 低加速電子回折顕微鏡の開発
上村 理（日立製作所 中央研究所）
- (13) X線回折顕微法
西野吉則（理化学研究所 播磨研究所）
- (14) X線位相イメージング
百生 敦（東京大学大学院新領域創成科学研究科物質系専攻）
- (15) X線マイクロナノトモグラフィーによる4D観察とその材料工学への応用
戸田裕之（豊橋技術科学大学生産システム工学系）
- (16) 放射光CTによる骨の形態・生理解析
松本健志（大阪大学基礎工学研究科機能創成専攻）
- (17) 時分解X線回折による溶接金属急冷組織形成過程のin-situ観察
米村光治（住友金属工業 総合技術研究所）

【参加者名】

金子康子（埼玉大学教育学部），一色俊之（京都工芸繊維大学大学院 工業科学研究科），亀井一人（住友金属工業（株）総合技術研究所），陣内浩司（京都工芸繊維大学），丹司敬義（名古屋大学 エコトピア科学研究所），青山一弘（日本エフイー・アイ（株）アプリケーションラボラトリー），宮澤淳夫（理化学研究所 播磨研究所），木本浩司（（独）物質・材料研究機構 ナノ計測センター），生田 孝（大阪電気通信大学工学部電子工学科），原田 研（日立製作所 基礎研究所），浅香 透（（財）ファインセラミックセンター ナノ構造研究所），上村 理（日立製作所 中央研究所），西野吉則（理化学研究所 播磨研究所），百生 敦（東京大学大学院新領域創成科学研究科物質系専攻），戸田裕之（豊橋技術科学大学生産システム工学系），松本健志（大阪大学基礎工学研究科機能創成専攻），米村光治（住友金属工業 総合技術研究所），磯田正二（京都大学化学研究所），加藤幹男（大阪府立大学），松田健

二（富山大学工学部），東 華岳（岐阜大学医学系研究科），藤田 真（島津製作所），佐々木勝寛（名古屋大学大学院工学研究科量子工学専攻），上山友幸（住友金属テクノロジー株式会社 物理解析室），山田博之（（財）結核予防会結核研究所 抗酸菌レファレンス部），瀬藤光利（浜松医科大学），箕田弘喜（東京農工大学共生科学技術研究員），臼井健悟（理化学研究所オミックス基盤研究領域），根岸豊（横浜市立大学 国際総合科学研究科 生体超分子化学），新井善博（テラベース（株）），陶山直樹（（財）材料科学技術振興財団分析評価部），関口浩美（日本エフイー・アイ株式会社アプリケーションラボラトリー），有井達夫（生理学研究所），濱 清（生理学研究所），臼田信光（森田保健衛生大学医学部），永山國昭（岡崎統合バイオサイエンスセンター），Radostin Danev（岡崎統合バイオサイエンスセンター）

【概要】

本研究会は平成 12 年よりスタートした電子顕微鏡の研究会（“定量的高分解能電子顕微鏡法”，“電子位相差顕微鏡の医学・生物学的応用”，“位相差断層電子顕微鏡の医学・生物学的応用”）を継承しており，本年度で 9 年目になる。今回は特に，これまでの多くの共同研究の成果を踏まえ，今後の進展の方向性について展望するための集中的な発表・討論を期した。

今年度は平成 20 年 12 月 20 日から 21 日に岡崎コンファレンスセンター小会議室で開催した。専門性を追求するために，平成 20 年度日本顕微鏡学会関西支部特別企画講演会「電子顕微鏡機能イメージング法の展開－生物科学・材料科学における立体像構築と位相情報抽出－」と共催し，延べ約 100 人が参加した。生理学研究所 有井達夫先生「医学生物学用超高压電子顕微鏡の開発と応用」の基調講演の後に 1. 超高压電子顕微鏡とクライオトモ

グラフィの出会い，2. 位相情報抽出とイメージング (I)，3. 位相情報抽出とイメージング (II)，4. X 線イメージング最前線の主題について，それぞれ約 4 演題ずつ，総計 16 演題の講演があった。材料系・生物系の双方から新規の位相情報抽出法の提案があった。さらに今後の新しい潮流となる X 線イメージングに対し，広い範囲を包括する性能について議論が行われ，技術革新について個々の具体的に必要の新規技術が提案された。

本研究会と呼応する形で岡崎で開発されてきた位相差電子顕微鏡法は，無染色の生物試料観察に特に威力を発揮し，従来法では観察が困難であった様々な生物試料の微細構造を明瞭に提示してきたが，生物科学・材料科学においてトモグラフィ観察と光顕・電顕の相関イメージングにおいて基軸となる研究手法であることが理解された。

(1) 医学生物学用超高压電子顕微鏡の開発と応用

有井達夫（生理学研究所）

生理学研究所の超高压電子顕微鏡は，1980 年 3 月の生理研研究会を経て導入された日本で最初の全国共同利用

の医学生物学用専用機種である。所外委員を含む機種選定委員会からの答申を経て機種が決められた。当時東京

大学医科研におられた濱清先生と協力して詳細を詰め、1982年3月に医学生物学用としての重要な特徴を持った三次元情報を得られる超高压電子顕微鏡 (H-1250M 型) として導入された。前年に開発された超高压電子顕微鏡 (H-1250S 型) のクリーンな真空排気系と高分解能光学系を基に、医学生物学用に役立てるために各種の新しい工夫をしている (例えば生理研年報 27, pp370, 2006)。

1994 年に低倍像をより重視した新対物レンズを製作して取り付けた。より広視野で照射電子線をより平行に照射できるようになっている。1995 年、設置当初には ± 45 度の範囲内でのサイドエントリー試料傾斜台を、トモグラフィ再構築を有効に行えるように、より高角度 (± 60 度の範囲内) まで傾斜できるように改良した。

このようにして開発された生理学研究所の超高压電子顕微鏡 (H-1250M) は医学生物学用超高压電子顕微鏡

として国内外の研究者に有効に活用され、26 年余のうちに、400 件を超える課題が実施され積極的な応用研究が行なわれて、これまでに 170 編を超える英文和文の論文を生み出してきている。

なかでも、この装置を用いての試料厚さ $5\mu\text{m}$ のエポン包埋切片によるねずみ脳内の神経細胞の立体観察および三次元解析や厚さ $3\mu\text{m}$ のエポン包埋切片によるグリア細胞突起を用いてのトモグラフィ手法による三次元定量解析などは、超高压電子顕微鏡を用いてはじめて可能となる研究である。光学顕微鏡では分解できない微細な構造を $5\mu\text{m}$ 程度までの厚い試料の状態では三次元再構築できる超高压電子顕微鏡は、脳神経疾患、細胞の癌化の過程の解明や老化のメカニズムの解明などの社会に役立つ情報をも発信できる大型装置として、ますます発展することが期待される装置であるといえる。

(2) STEM トモグラフィの生体試料への応用 —厚切り切片の3D 観察—

青山一弘 (日本エフイー・アイ(株) アプリケーションラボラトリー)

医学、生物学の分野において STEM はなじみの薄い結像法であるが、トモグラフィと組み合わせた場合、以下のような数々のメリットがある。

- 1) 試料に厚さに対して強い。ボケが少ない。
- 2) 傾斜時にも全視野にフォーカスが合う。
- 3) HAADF を含む暗視野が使いやすいため、高コントラストが得やすい。
- 4) コントラストがリニアである。

1) 厚い試料を観察する場合、STEM を用いれば TEM 像よりも鮮明な像が得られることは良く知られている。これは STEM では基本的に対物レンズの色収差の影響を受けないためである。トモグラフィに厚い試料を用いることができれば、当然のように、より多くの三次元情報を得ることができる。2) トモグラフィでは高角度まで試料を傾斜し像を撮影する必要があるが、試料を高傾斜した時、TEM では試料のごく一部にしかフォーカスをあわせることができない。これに対し、STEM ではフォーカ

スを変えながらプローブをスキャンすることにより像全体にわたりフォーカスをあわせることが可能である。3) TEM トモグラフィでは自動取得を行うにあたり条件を統一した暗視野像シリーズの取得が技術的に非常に困難であるが、STEM では環状暗視野像を容易かつ安定した条件で得ることが可能であり、また取り込む散乱角度の選択も容易である。4) STEM では対物レンズの球面収差の影響も受けず、またデフォーカスする必要も無いため、これらに由来するアーティファクトとは無縁である。

厚い切片を試料とすると、STEM-Tomography を用いれば TEM-Tomography と比較して鮮明な三次元再構築が可能であることが明らかとなった。また、加速電圧 300kV の通常市販タイプの顕微鏡でも、厚さ $2\mu\text{m}$ にも達する樹脂包埋切片の 3 次元構造再構築も可能であった。医学生物学分野においては STEM 自体があまり広く普及していないが、今後、この手法は大きく展開することが期待される。

(3) 生物分子トモグラフィーを目指して

宮澤淳夫（独立法人理化学研究所 放射光科学総合研究センター）

電子線トモグラフィーは、細胞内構造の三次元イメージを得ることができる観察法である。生体分子の同定には、一般に金コロイドを用いた免疫染色が用いられる。しかし、比較的厚い切片試料や凍結試料では、免疫反応が非常に困難である。そこで、光学顕微鏡法で用いられる蛍光分子 GFP のように、標的分子の遺伝子に直接組み込んで融合タンパク質として発現できる、電子顕微鏡で観察可能な分子標識法の開発を試みた。電子顕微鏡で観察できるのは原子散乱因子の大きい金属のクラスターである。そこで、金属クラスターを分子内に形成する金属結合タンパク質の一種、メタロチオネイン (MT) が分子標識として利用できるか検討を行った。標的タンパク質として、まず 1 分子がホモオリゴマーである大腸菌のシャペロンタンパク質、GroEL を用いた。1 サブユニットあたり 3 分子の MT (3MT) を融合させたものを、カドミウムを含む培地中で大腸菌にて発現、これを精製し、電子

顕微鏡で観察した。ネガティブ染色により、3MT を融合しても GroEL は 14 量体 (GroEL-14 (3MT)) を形成していることを確認した。また無染色条件では、GroEL-14 (3MT) の 1 分子と思われるコントラストが確認できた。次に、神経細胞のポストシナプスに存在する PSD-95 に、3MT を融合させたタンパク質 (PSD-95-3MT) の観察を試みた。PSD-95-3MT を海馬初代培養細胞に感染させ、細胞を固定する 1 日前にカドミウムを培地に添加した。無染色条件で観察した神経細胞には、PSD-95-3MT と思われる電子密度の高い領域がポストシナプスに見られた。また、3MT と融合しても、ポストシナプス肥厚部に集積し、神経伝達に関わるタンパク質と結合する PSD-95 本来の性質を保持していることを確かめた。これらの結果は、3MT が細胞内分子標識としての条件を満たしていることを示している。

(4) 走査透過電子顕微鏡と電子エネルギー損失分光法による結晶構造観察

木本浩司（物質・材料研究機構 ナノ計測センター）

走査透過電子顕微鏡 (scanning transmission electron microscopy: STEM) と電子エネルギー損失分光法 (electron energy-loss spectroscopy: EELS), および環状暗視野 (annular dark-field; ADF) 像を用いた最近の結果を紹介します。STEM-EELS は、TEM を基本とした EELS であるエネルギーフィルターTEMと比較しますと、色収差や非弾性散乱の非局在性の観点から、より高い空間分解能が期待できます。ADF 像では、元素識別能が高く、コントラストが結像条件や回折条件にあまり依存しない直視的な観察ができることが利点とされています。

我々は STEM-EELS を用いて、原子コラム毎の元素マッピングをはじめて実現することができました^[1,2]。また最近 ADF 像を使って結晶構造の投影原子位置を 10pm オーダーの精度で決定できることを報告しました^[3]。当日はこれらの結果を報告します。

ADF 像も STEM-EELS による元素マッピングも、基本

的には物体と入射電子とのインコヒーレントな散乱情報から、無機材料を中心とした結晶構造の投影像を観察しようとしています。換言すれば「非生物試料の投影像観察のための振幅情報抽出」ですので、本講演会のテーマ「生物科学・材料科学における立体像構築と位相情報抽出」と比べますと、観察する対象・目的・原理のすべてで異なっています。当初講演会の御案内を頂いた際、あまりに場違いではと逡巡しましたが、私自身の向学のためにも大変良い機会ではとも考え、発表させていただく所存です。御議論ご指導いただければ幸いです。

- [1] K. Kimoto, T. Asaka, T. Nagai, M. Saito, Y. Matsui, and K. Ishizuka, *Nature* **450**, 702 (2007).
- [2] K. Kimoto, K. Ishizuka, and Y. Matsui, *Micron* **39**, 257 (2008).
- [3] M. Saito, K. Kimoto, *et al.* *J. Electron Microsc.* **in print** (2008).

関連ホームページ

<http://www.nims.go.jp/AEMG/recent/eels-e.html>

<http://www.nims.go.jp/AEMG/index-j.html>

(5) 超高圧電子顕微鏡の歴史と期待

濱 清 (生理学研究所)

初期の長高圧電子顕微鏡 (HVEM) は電子線の高い透過能に注目した生物学者によって主として生鮮細胞の観察に使われたが、1966年の国際電顕学会発表まで見るべき成果が無かった。演者は薄い切片試料と厚い切片試料を用いて HVEM の分解能と透過能を検討し、薄い試料の高分解能観察では初めて電気シナプスの観察に成功し、厚い試料の観察では三次元の構造情報の素晴らしさを示すデータをj得て第一回国際超高圧電子顕微鏡学会 (1967) に発表した。HVEM の生物分野への有効な応用は

此の発表を契機として始まった。更に立体写真用いて行った神経細胞樹状突起棘の3次元定量解析では、正確でかつ重要な定量的データを得る事が出来た。星状グリア細胞突起についてはトモグラフィー解析を行い、正確な表面積と体積比を算定する途を開いた。生体分子の構造と機能の情報を細胞、組織、更に生体の機能解明に繋いで行く為のガイドとして、厚い試料、広い視野の HVEM トモグラフィー解析の将来の展開を期待している。

(6) 電子波の位相情報の活用

丹治敬義 (名古屋大学エコトピア研究所)

量子力学の教えるところ、電子は粒子の性質と波の性質とを併せ持っている。しかし、通常の透過電子顕微鏡像は、試料での吸収の差や、散乱・回折のされ方の違いにより像面に現れる電子の強度分布を記録したものである。だが、電子顕微鏡の観察対象には、主として電子波の位相のみを変化させるものが少なくない。図のように物質に入射した電子は一般に真空中よりも低いポテンシャルを感じ、その速度を増すことになる。従って、物質中を通過する電子の波長は真空中よりも短くなり、真空中を通過してきた電子と比べて波面に遅れが生ずる。また、電子線に垂直な電界や磁界がかかると、像面では曲げられた方に波面が遅れている。従来からも、弱位相物

体とみなされる超薄膜試料の高分解能観察時や、生体試料の観察時には、対物レンズの収差とデフォーカスを使って位相の観察がなされてきた。しかし近年、更に積極的にその位相情報を取り出し利用しようとする試みが盛んになってきた。特に、電界や磁界は最近のナノテクノロジーの進展において、数~数百ナノメートルの分解能での位相の観察が強く求められ出している。また、生体材料でも、焦点のあった状態でサブミクロンの構造観察が求められ、従来の焦点はずれを使った観察では対応できない所に来ている。本セッションでは TEM による位相情報抽出の各手法と応用の現状を紹介してもらう。

(7) 強位相物体の位相回復法 — Iterative Complex Observation —

永山國昭 (自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター)

位相差法を用いる電子顕微鏡は、一般に弱い位相物体、すなわち位相の相対変動が $\pi/4$ より小さい物体に適

用されるとされている。しかし、位相板を用いる我々の位相差法 (ゼルニケ位相差法、ヒルベルト微分法) では、

バクテリア丸ごとのような強い位相物体でもコントラストの回復が見られた。図1のシアノバクテリアでは、細胞の厚みは $1\mu\text{m}$ 近くなり、位相の絶対的変化は 10π 近く、相対変動でも 1π 近くなると予想される。従って、従来のゼルニケ位相差理論とは異なる新しい理論とさらに強い位相物体一般に適用可能な位相回復法が求められている。本講演では、次の4つのステップを踏みゼルニケの発明に端を発する従来型位相差法の枠組みを越えた新しい位相回復法について報告する。最終目標は、試料から射出される波動の複素振幅（波面とも射出波動関数とも呼ばれる）そのものの再生である。

ステップ1：波動現象のベクトル表示とオイラー公式併用による新表記法の導入。

ステップ2：新表記法によるゼルニケ位相差原理の説明と強い位相物体への拡張。ここで位相差法の背景にある波の可干渉性について触れ、

シアノバクテリアが可干渉光源に対しては、云わば弱い位相物体と同等になることを証明する。

ステップ3：可干渉光照射下でも強い位相物体としてふるまう場合について考え、0次光を特別視するゼルニケ法の枠組みを離れる。ホログラフィー法との対応で参照波-信号波干渉について考察し、次に回折法で用いられている再帰回復法について考察する。

ステップ4：干渉法と再帰回復法の融合を考え、ヒルベルト変換を基礎とした最も効率的な複素波動再生法を提案する。これは、1999年筆者により提案された複素観測法 (complex observation) の顕微鏡法一般、回折法一般への拡張である。

(8) Zernike Phase Contrast for Single Particles and Cryotomography

Radostin Danev (Okazaki Inst. for Integrative Bioscience, NINS)

In the last few years there is a growing interest in the development and applications of methods for in-focus phase contrast electron microscopy. The oldest such technique is the Zernike phase contrast TEM based on thin film phase plates. It was the first one to demonstrate the benefits of the in-focus phase contrast TEM. Few other approaches based on electrostatic or magnetic devices are under development but, despite its limitations, the thin film phase plate is currently the only method available for applications.

In order to explore the benefits of the in-focus phase contrast, we are working on applications in two major fields of biological cryo-microscopy: single particle analysis and cryotomography. At this point, the absence of automation software for unattended phase plate data collection negates most of the advantages provided by the in-focus phase contrast for single particle analysis. Large and medium size structures ($> \sim 200$ kDa) can, in most cases, be solved by defocus phase contrast (conventional TEM). The information loss due to CTF is compensated by the increased data volume provided by an unattended automated acquisition. The phase

plate techniques will open the doors to solving the structures of small particles ($< \sim 200$ kDa), as soon as the technology enables their seamless integration into the data acquisition routines.

Cryotomography is expected to have the largest benefit from the implementation of in-focus phase contrast techniques. A tomogram is based on tilt series of a specimen area using a limited dose. Assuming the specimen is a unique object; the information lost during the acquisition cannot be recovered at a later stage. The in-focus phase contrast, with its uniform spectral transfer characteristics, can reduce the information loss due to CTF. In addition, it provides an overall contrast increase, which could aid the alignment steps during reconstruction making possible the use of lower total doses, smaller angular steps or smaller fiducial markers. As a result, the application of in-focus phase contrast to cryotomography is expected to produce tomograms with higher resolution and more details.

Examples of applications of Zernike phase contrast to both, single particle analysis and cryotomography will be shown.

The discussion will include the current state and the future directions of the Zernike phase contrast based on thin film

phase plates.

(9) 3次元フーリエフィルタリング法と動的ホローコーン照明法の原理と応用

生田 孝 (大阪電気通信大学工学部電子工学科)

3次元結像理論 (N. Streibl, 1985) により, 結像光学系を通す以前の段階で試料後方伝搬波の干渉効果から, 試料の3次元散乱関数実部 (振幅), 虚部 (位相) 両成分に対して独立した対称および反対称型の3次元光学的伝達関数 (3DOTF) が定義できる。

デフォーカスシリーズ3次元収集画像に対し, 3次元フーリエ空間上でのフィルタリング操作によってエバルト球殻上のみの情報を抽出すると, 大部分の非線形結像成分が除去され, ほぼ線形結像成分のみが抽出できる。また結像光学系の波面収差関数による位相変化は, 3次元フィルターの複素係数を波面収差関数に対応させる事で補正出来る。さらにフィルター係数を両エバルト球に対して対称, 反対称に選ぶことで, 薄い試料に対して実部 (振幅)・虚部 (位相) 分離結像が実現される。本方式は波面収差関数が既知である必要があり, かつ現状では非実時間処理に留まる。

3次元結像理論から uv 平面上の3次元スペクトル情報のみの3次元像は焦点深度が無限であることが判る。逆

に焦点深度拡大処理は3次元スペクトル情報を uv 平面近傍に制限することになる。

さて傾斜照明での3DOTFのエバルト球対は uv 平面と8の字状に交差する。8の字領域上の線形結像スペクトル成分は回転不変波面収差に影響されていない。よって焦点深度拡大処理 (焦点位置移動平均や円環上対物瞳による) と8の字領域抽出フィルターにより無収差線形結像が可能になる。

8の字領域以外の情報欠落は, 傾斜照明のローテーションシリーズを収集し, 対応する方位の8の字領域抽出フィルターを独立に適用, 合成して補填する。これを動的ホローコーン照明法と呼んでいる。個別8の字抽出フィルターの段階で8の字の上下に対し同符号のフィルター係数を使えば実部 (振幅) 像が, 逆符号では虚部 (位相) 像が再構成される。虚部 (位相) 像についても焦点深度が拡大されるので, 高分解能位相 CT が実現できると期待される。

(10) 電子線ホログラフィーの最近の開発状況 ——多段電子線バイプリズム干渉法——

原田 研 (日立製作所 基礎研究所)

干渉顕微鏡法にとって重要な干渉像中のパラメータである干渉縞間隔 s と干渉領域幅 W は, 電子線バイプリズムを2段に構えた光学系を利用することにより, 独立したコントロールが可能となった。しかし, 未だ干渉縞の方位角 θ のコントロールに関しては, 電子線バイプリズムを回転させて対応することが一般的である。この方法は確実である反面, 2つの電子線バイプリズムをそれぞれ個別に回転させねばならない煩雑さへの対応と, 回転後にしかるべき参照波を得る空間が確保されていることが必要である。そこで本会では, 電子線バイプリズムを3段

に用いることによって, 干渉縞の方位角をもコントロールする干渉光学系とその取り扱い方法について紹介する。

図 1a に光学系の模式図を示す。上段, 中段の電子線バイプリズムを試料の像面に配置し, 例えば, フィラメント電極を互いに直交させることによって, 対角に位置する2つの波面に, 相対的に任意の角度関係 (傾斜) を与える。そして, 下段の電子線バイプリズムにてその対角に位置する2波を重畳させ, 干渉現象を観察・記録するものである。図 1b, c に干渉領域の下段のフィラメント電圧 V_3 依存性を示す。図 1c の干渉領域 (中央部矩形領域)

には、干渉顕微鏡像にとってノイズとなるフレネル縞が含まれていない。2 段電子線バイプリズム干渉計での利点の 1 つであったフレネル縞の発生回避が、この光学系においても踏襲されていることがわかる。図 1d, e, f に、本干渉光学系を用いた観察例として、MgO 微結晶の干渉顕微鏡像を示す。干渉縞の間隔 s 、および縞の方位角 θ が

独立にコントロールされていることがわかる。

以上の結果は、波面分割型干渉計であっても、操作自由度が十分に確保できることを示している。試料形状の都合上、物体波・参照波ともに定められた領域を用いなければならない半導体素子などの観察に適した干渉光学系と考えている。

(11) 強相関電子系酸化物のローレンツ電子顕微鏡観察

浅香 透 ((財) ファインセラミックセンター ナノ構造研究所)

(12) 低加速電子回折顕微鏡の開発

上村 理 (株式会社 日立製作所)

郷原一寿 (北海道大学大学院 工学研究科)

回折パターンから計算機処理で実像を再構成する回折顕微法は、近年 X 線を中心に急速に開発がすすめられており、電子ビームでも実証例が増え始めている。通常の結晶構造解析と異なり、回折顕微法では規則的な周期構造を有しない試料に対しても構造解析が可能となる。また、振幅像とともに位相像も再構成できることも本手法の特徴である。しかしこれを実現するためには、試料からの弾性散乱が精度よく記録された回折パターンの取得が必要で、非弾性散乱や装置からの散乱などを極力抑えることが重要である。

我々はこの回折顕微法を低加速電子ビームに適用し、試料ダメージが少なく、かつ高分解能な構造解析ができ

るよう研究および装置の試作を進めている。プロトタイプ実験機 (加速電圧 20 kV) による実験では、多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の再構成像を得ることで、低加速での回折顕微法の実証を行った。さらにこのプロトタイプ実験機で得た知見や課題をもとに、汎用 SEM (日立ハイテクノロジーズ製 S-5500) をベースとして、低加速電子回折顕微鏡を試作した。この装置では、高い分解能 (0.4 nm) での試料概観の観察と 30 kV 以下の加速電圧で回折パターンの取得が可能となっている。本発表では、これまで開発してきた低加速電子回折顕微鏡の概要、結果と課題を紹介する。

(13) X 線回折顕微法

西野吉則 (理化学研究所 播磨研究所)

X 線回折顕微法は、コヒーレント X 線で試料を照射した際に得られる回折パターンから試料像を再構成する斬新な X 線顕微法である^[1,2]。図に X 線回折顕微法の概念図を示す。X 線回折顕微法はレンズを必要とせず、高分解能が達成可能である。X 線は透過能が高いため、透過電子顕微鏡などでは不可能であったマイクロメートル以

上の厚さを持つ大きな試料に対しても、非破壊での三次元イメージングが可能となる。さらに、この手法はレンズによるコントラストの低下のない理想的な位相コントラスト顕微法であるため、無染色の細胞小器官など、X 線に対して透明な物体に対しても高いコントラストでのイメージングを行うことができる。

最近になって、我々は、細胞小器官の三次元観察に世界で初めて成功した。コヒーレント X 線回折データのみから、ヒト染色体の二次元像および三次元像が再構成され、高い電子密度を持つ軸状構造が観察された。軸状構造の観察は、染色や標識の処理をしない状態に対しては初めてであり、X 線回折顕微鏡が無染色の生物試料を高いコントラストで観測するのに有効であることが示された。

- [1] 西野吉則, 石川哲也: 放射光, **19**, 3 (2006).
- [2] 西野吉則, 石川哲也: まてりあ, **45**, 99 (2006).
- [3] Y. Nishino, Y. Takahashi, T. Ishikawa, N. Imamoto, and K. Maeshima, Phys. Rev. Lett., in press (2008).

この研究内容は Physics Today 誌で紹介される予定である。

(14) X 線位相イメージング

百生 敦 (東京大学大学院 新領域創成科学研究科)

硬 X 線領域では、弱吸収物体による位相シフト検出に基づくイメージング (X 線位相イメージング) を行うことにより、吸収コントラスト法に対して最大で約千倍の感度向上が実現する。1990 年代より、シンクロトロン放射光源の発展もあいまって、いくつかの X 線位相コントラスト生成法が実現されている。単に位相コントラストによる濃淡観察に留まらず、被写体による X 線位相シフトの定量計測が可能であることが重要であり、それに基づく三次元観察 (X 線位相トモグラフィ) も実現している。高分子材料や生体軟組織など、X 線透過画像が必ずしも有効とされない被写体に対して、こうした X 線位相イメージングの威力は魅力的であり、多くの応用研究が展開されるようになってきている。

硬 X 線領域の位相情報を利用することの利点は、吸収

と位相シフトの相互作用断面積の比較および複素屈折率から定量的に示される。これまでに X 線位相コントラストを生成するために提案・実現されている方式には、(a) Zernike microscope, シリコン結晶製 X 線干渉計を用いる (b) two-beam interferometry, フレネル回折 (あるいはデフォーカスによるコントラスト) を利用する (c) propagation-based method, および X 線の屈折を検出する (d) analyzer-based method などがある。(b) については、フレネルゾーンプレートを用いた X 線結像顕微鏡においても実現している。(d) については結晶によるブラッグ回折を用いる方法と、X 線透過格子を用いた Talbot 干渉計を用いる方式がある。これらの原理を実際の撮像結果を示しながら紹介する。

(15) X 線マイクロナノトモグラフィーによる4D 観察とその材料工学への応用

戸田裕之 (豊橋技術科学大学)

数年前から SPring-8 等における X 線 CT により、分解能 1 ミクロン前後の金属組織観察や各種その場観察が報告されている。本講演では、筆者らの金属材料の損傷・破壊特性のその場観察例を中心に紹介する。特に、3 次元像を定量解析することで、従来間接的な測定や表面観察で推測するより他に手段がなかった金属材料内部の各種事象が、3 次元、局所的、かつ高密度に定量評価できるようになってきたことを紹介する。

Fig.1 は、アルミニウム合金中の亀裂進展挙動をその場

観察したものである。破壊抵抗が低い Al-Si 共晶相では早期に亀裂進展開始しているのに対し、破壊抵抗が高い Al-Si 共晶相は、亀裂進展がより遅れて生じることが明らかである。このようなことは定性的には表面観察などで報告されていた。図中のプロットは、破壊力学で亀裂進展駆動力を表す物理量である亀裂先端開口変位を画像解析により求めたものである。これにより、材料内部の局所的な損傷破壊挙動と内部マイクロ組織との関連性について、直接的かつ定量的な情報が得られる。

これをさらに進め、材料内部に膨大な量含まれている粒子やポアをひずみマーカーとして追跡して材料内部の歪みなどの力学量を3次元的に計測した例も紹介する。通常は知り得ない材料内部の情報を高密度で、非破壊で、かつ3次元的に解析できるのがこの手法の長所である。歪みマッピングのほか、亀裂進展駆動力、変位、応力など様々な力学量がこの手法により測定されている。これ

により、材料のミクロ・ナノ構造と力学的性質など様々な材料特性の関係を局所的に評価できるとともに、イメージベースシミュレーションの結果を直接的に検証できる実験結果ともすることができる。最近では、これらを基に、結晶粒の抽出、各結晶粒の変形挙動、結晶粒内部の歪み分布計測などが可能な粒界トラッキング技術も開発されている。これらも合わせて紹介する。

(16) 放射光 CT による骨の形態・生理解析

松本健志（大阪大学 基礎工学研究科・生体工学領域）

マルチスケール性、異方性、不規則性や非一様性を呈する骨の形状・形態に基づく機能解析には、広範囲を高解像度で3次元イメージングすることが求められる。一方、骨モデリングやリモデリング、骨疾患の時間発展プロセスの解明、あるいは治療効果の精度の高い評価には、高分解能インビボ・イメージング/トラッキング技術を欠くことはできない。

放射光 CT は広い3次元領域を非破壊・高分解能で高速にイメージングできる骨形態計測に適した手法である。単色放射光を利用することで、吸収係数分布からアパタイト密度分布がほぼ正確に決定でき、吸収端を利用したサブトラクション CT による骨内血管の抽出も可能となる。さらに、短時間照射でも高い SN で再構成像を

得ることができ、高速インビボ CT も可能である。

筆者は放射光施設 SPring-8 の協力のもと、これら単色放射光 CT の利点を生かした骨形態解析に取り組み、ラボ CT マシンでは困難であったラット成長期における皮質骨孔ネットワーク形態の2相性変化や廃用性萎縮に伴う退行化を検出し、骨成長における骨循環の関与を示す重要な知見を報告した。さらに、インビボ放射光 CT による経日のイメージングに基づき、一個体内の骨形成/吸収を局所的に追跡する手法を確立し、局所的な骨密度変化を検出することにも成功した。本講演ではこれらの内容を中心に紹介し、骨-血管連関の理解に向けて現在着手している新しいジルコニア血管充填剤と非脱灰摘出骨における骨再生/血管新生の同時検出にも触れる。

(17) 時間分解 X 線回折による溶接金属急冷組織形成過程の *in-situ* 観察

米村光治（住友金属工業株式会社 総合技術研究所）

アーク溶接は、極めて急速な加熱・冷却を伴う過程であり、かつ、鋼材あるいは環境雰囲気に含まれる微量な元素に大きく影響される代表的な複雑系の現象である。そのため、溶接起因の破壊改善のためには、実験的な急冷過程での凝固形態の経時変化の把握が求められている。そこで放射光施設に実際に溶接機を持ち込み、回折結晶学的検討に基づいた装置開発により、溶接中に一方向成長するデンドライトからの微弱回折の複雑な変化を最速 0.01s の時間分解能で二次元時系列観測した。

図 1 に急冷過程で生じる代表的な低炭素鋼（亜共析

鋼）、ステンレス鋼、そして、炭化物析出型ステンレス鋼の二次元時間分解 X 線回折像を示す。まず、低炭素鋼では、1500℃付近にブロードなミスト状の $\delta 220$ の回折パターンが現れる (a)。つづいて $\delta \rightarrow \gamma$ の相変態 (b)、さらに α 相 (BCC) の回折ピークが出現し、 $\gamma \rightarrow \alpha$ の固相変態が始まる (c)。400℃までに、 α 相の回折強度が増大する一方、 γ 相の回折強度が減少する (d)。オーステナイト系ステンレス鋼では、 γ 相が初晶であり、1440℃以上の高温域で回折スポットがランダムに明滅する (e, f)。第二相 δ 相の回折スポットの出現により、 γ 相の回折も凝集する

(h)。さらに炭化物析出型では、まず液相を示すハローパターンから δ 相が晶出する(i)。つづいて γ 相も晶出し(j), NbC 晶出で液相が消滅する(k)。最終的に γ 相や δ 相はリング上に極大値を有する一方, NbC は均一なリング状に

分布する(l)。

本手法は実用的価値も高く, 溶接金属凝固過程や HAZ 形成過程の観測のみならず, 凝固初期・核生成観測や実空間可視化手法との融合など挑戦的な研究に展開している。

22. TRP チャネルの機能的多様性とその統一的理解

2008 年 6 月 5 日－6 月 6 日

代表・世話人：森 泰生（京都大学 大学院工学研究科）

所内対応者：富永真琴（生理学研究所・岡崎統合バイオサイエンスセンター）

（1）網膜 ON 型双極細胞における TRPM1 の機能

小池千恵子，古川貴久（大阪バイオサイエンス研究所 発生生物学部門）

（2）酸化ストレス感受性チャネル TRPM2 の生理的意義の解明

山本伸一郎，清中茂樹，高橋重成，森 泰生（京都大学工学研究科 合成・生物化学専攻）

（3）プロトンチャネルとしての TRPM7

沼田朋大^{1,2}，岡田泰伸¹（¹生理学研究所 機能協関部門，
²京都大学工学研究科 合成・生物化学専攻）

（4）TRPM8 による体温制御

細川 浩¹，田地野浩二¹，前川真吾¹，松村 潔²，小林茂夫¹
（¹京都大学 情報学研究科知能情報学 生体情報処理分野，²大阪工業大学 情報科学部）

（5）TRPM2 channel の単粒子解析による構造解明

丸山雄介¹，小椋俊彦¹，三尾和弘¹，清中茂樹²，加藤賢太²，森 泰生²，佐藤主税¹
（¹産業技術総合研究所 脳神経情報研究部門，²京都大学大学院 工学研究科 合成生物化学）

（6）TRPV1 チャネルの細胞外ナトリウムイオンによる活性調節

太田利男¹，今川敏明²，伊藤茂男¹
（¹北海道大学 大学院獣医学研究科 形態機能学講座，
²北海道大学 大学院先端生命科学院 先端細胞機能学）

（7）TRPV2 による細胞骨格・細胞運動の制御

小島 至，長澤雅裕，中川祐子（群馬大学 生体調節研究所細胞調節分野）

（8）細胞間接着に依存した皮膚バリア機能における TRPV4 チャネルの重要性

曾我部隆彰¹，島貫恵実¹，米村重信²，水野敦子³，富永真琴^{1,4}，福見一富永知子^{1,4}
（¹岡崎統合バイオサイエンスセンター（生理学研究所）細胞生理，
²理研 発生・再生科学総合研究センター，³自治医大 薬理学講座，
⁴総研大 生命科学専攻）

（9）Essential role of STIM1, ER calcium sensor, for store-operated calcium influx
and mast cell activation

馬場義裕，黒崎知博（大阪大学 免疫学フロンティア研究センター，
理研 免疫アレルギー科学総合研究センター）

（10）毛様体筋収縮調節に関与する非選択性陽イオンチャネルと TRPC チャネル

高井 章，宮津 基，安井文智（旭川医大 生理・自律機能分野）

（11）活性化アストロサイトにおける TRPC3 の生理的意義

白川久志，中尾賢治，杉下亜維子，中川貴之，金子周司
（京都大学 薬学研究科 生体機能解析）

（12）脊髄におけるシナプス前 TRPA1 チャネルの機能的意義について

中塚映政（佐賀大学 医学部生体構造機能学講座）

(13) TRPV4の活性化を介したアストロサイトの興奮：神経-グリア機能連関の解明

柴崎貢志^{1,2,3}, 富永真琴^{1,2,3}

(¹岡崎統合バイオサイエンスセンター 細胞生理研究部門, ²生理学研究所 細胞生理研究部門,
³総合研究大学院大学 生命科学研究科 生理科学専攻)

(14) PKC γ による TRPC3 の制御の異常と脊髄小脳変性症 (SCA14) 発症の関係について

齋藤尚亮 (神戸大学 バイオシグナル研究センター)

(15) エンドセリン A 型受容体を介した Ca²⁺シグナリングの多様性と TRPC チャネル

堀之内孝広, 三宅由美恵, 西屋 禎, 西本 新, 三輪聡一
(北海道大学大学院 医学研究科細胞薬理学分野)

(16) Snapin をアダプターとする受容体作動性 Ca²⁺流入機構

鈴木史子, 森島 繁, 田中高志, 村松郁延 (福井大学 医学部 薬理学領域)

(17) 副腎髄質細胞における Ca 流入経路と TRPC チャネル

井上真澄 (産業医科大学 医学部第2生理学)

(18) Counteracting effect of TRPC1-associated store-operated Ca²⁺ influx on TNF α induced

COX2-dependent PGE2 production in human colonic myofibroblasts

Hai Lin, Yasuhiro Kawarabayashi, Akira Honda, Ryuji Inoue

(Department of Physiology, Graduate School of Medical Sciences, Fukuoka University)

(19) 心筋細胞における P2Y 受容体-TRPC5 機能的共役の意義

西田基宏 (九州大学大学院 薬学研究院薬効安全性学分野)

【参加者名】

三輪聡一, 堀之内孝広 (北海道大学医学研究科), 太田利男 (北海道大学獣医学研究科), 高井 章, 宮津 基 (旭川医科大学生理学講座), 吉田卓史 (東北大学歯学研究科), 小島 至, 中川祐子, 長澤雅裕 (群馬大学生体調節研究所), 佐藤主税, 三尾和弘 (産業技術総合研究所), 小林俊介, 金子祐次, 垣花優子 (昭和大学薬学研究科), 森島繁 (福井大学医学部), 渡邊泰秀 (浜松医科大学医学部看護学科), 山村寿男, 大野晃稔, 船橋賢司, 村田秀道 (名古屋市立大学薬学研究科), 森 泰生, 沼田朋大, 山本伸一郎, 加藤賢太, 金子 雄, 眞本達生, 香西大輔, 澤口諭一 (京都大学工学研究科), 桑原宏一郎, 木下秀之, 栗原佳宏, 山田優子, 横井秀基 (京都大学医学研究科 内分泌代謝内科), 小林茂夫, 細川 浩, 澤田洋介 (京都大学情報学研究科 知能情報学専攻), 金子周司, 白川久志, 金野真和 (京都大学薬学研究科), 古川貴久, 小池千恵子

(大阪バイオサイエンス研究所), 齋藤尚亮 (神戸大学先端融合研究環バイオシグナル研究センター), 成瀬恵治 (岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科), 西田基宏 (九州大学大学院 薬学研究院), 井上真澄 (産業医科大学医学部), 海 琳 (福岡大学医学部), 飯山準一 (熊本保健科学大学保健科学部), 中塚映政 (佐賀大学医学部), 松下正之 (三菱化学生命科学研究所), 天野賢一 (持田製薬総合研究所), 長浦 健 (小野薬品工業株式会社), 辻田隆一 (旭化成ファーマ), 富永真琴, 山中章弘, 柴崎貢志, 稲田 仁, 曾我部隆彰, 梅村 徹, 小松朋子, Boudaka Ammar, 内田邦敏, 加塩麻紀子, 常松友美, 周一鳴, 高山靖規, 三原 弘, 川口 仁 (岡崎統合バイオサイエンスセンター), 佐藤かお理, 長友克広, 上條真弘, Toyehies (生理学研究所), 檜山武史, 張 藍帆, 西原 絵里 (基礎生物学研究所)

【概要】

平成20年6月5及び6日に研究会が行われた。19題の発表があり, TRPCチャネルについて8題, TRPVチャネルについて4題, TRPMチャネルについて5題, TRPAチャネルについて1題, STIM1につて1題であった。毎

年, 新しいTRPチャネル研究者が集い, このチャネル研究の広さをあらためて実感したが, お互いの研究内容についての討論・情報交換が行われた。具体的には, 大阪バイオ小池 (以下敬称略) が網膜双極細胞のTRPM1, 京

都大山本が免疫細胞の TRPM2, 生理研沼田が HeLa 細胞の TRPM7, 京都大細川が感覚神経細胞の TRPM8 の機能を発表し, 産総研の丸山が TRPM2 の単粒子解析による構造を示した。そして, 岡崎統合バイオの曾我部が表皮ケラチノサイトの TRPV4, 群馬大小島がマクロファージの TRPV2, 岡崎統合バイオの柴崎がアストロサイトの TRPV4 の機能に関して発表した。北海道大太田は TRPV1 の細胞外 Na^+ による制御機構を示した。佐賀大中塚は脊髄における TRPA1 の機能を報告した。旭川医大高井は毛様体筋の TRPC, 京都大白川はアストロサイトの TRPC3, 産業医大井上は副腎髄質細胞の TRPC の発現と

生理的意義を発表した。神戸大齊藤は $\text{PKC}\gamma$ による TRPC3 制御を, 北海道大堀之内はエンドセリン A による TRPC 制御を, 福井大森島は Snapi による TRPC6 制御を示した。また, 福岡大 Lin が結腸筋繊維芽細胞における $\text{TNF}\alpha$ による TRPC1 制御, 九州大西田が心筋細胞での ATP 刺激による TRPC3, TRPC5, TRPC6 を介した細胞内 Ca^{2+} シグナリングメカニズムを報告した。加えて, 大阪大馬場は注目を浴びている Stim1 のマスト細胞における機能を示した。いずれもレベルの高い発表であり, 日本における TRP チャンネル研究の発展を確信した。

(1) 網膜 ON 型双極細胞における TRPM1 の機能

小池千恵子, 古川貴久 (大阪バイオサイエンス研究所 発生生物学部門)

網膜視細胞において光は神経シグナルに変換される。神経シグナルは介在ニューロンである双極細胞を経て, 神経節細胞を介して視覚中枢へと伝達される。光刺激により網膜視細胞は過分極し, 神経伝達物質であるグルタミン酸の放出が減少する結果, ON 型双極細胞において mGluR6 が脱活性化し, 下流のカチオンチャンネルが開いて脱分極応答が発生する。現在までにこのカチオンチャンネルは同定されていない。我々は網膜内層に特異的に発現している遺伝子として TRPM1 を見いだした。TRPM1 は, メラノーマ細胞の転移能と発現が逆相関する遺伝子であり melastatin として知られていたが, その機能は不明であった。我々は TRPM1 long form の抗体を作成することにより, TRPM1 が ON 型双極細胞の細胞体と樹状突起の先端に発現し, mGluR6 と共局在することを明らかにした。TRPM1 ノックアウトマウスを作成したところ, ノックアウトマウスの網膜において層構造の異常は見ら

れず, また, 双極細胞の成熟分化マーカーの発現にも異常はみられなかった。しかし, TRPM1 ノックアウトマウスで電気生理学的な解析を行ったところ, ERG の b 波 (主として ON 型双極細胞由来) が欠如していることが明らかとなった。網膜スライス標本にホールセルクランプ法を適用した結果, TRPM1 ノックアウトマウス網膜においては ON 型双極細胞のみが光刺激に応答せず, さらに TRPM1 の活性を抑制する E3 抗体は, 野生型マウス網膜の光応答を抑制することが明らかとなった。さらに, TRPM1 強制発現細胞において Ca^{2+} influx 実験およびパッチクランプ実験を行ったところ, TRPM1 は Ca^{2+} 透過性を示すことが明らかとなった。以上の結果は, TRPM1 が長い間不明であった ON 型網膜双極細胞の mGluR6 シグナル下流に位置するカチオンチャンネルである可能性を強く示唆するものである。

(2) 酸化ストレス感受性チャンネル TRPM2 の生理的意義の解明

山本伸一郎, 清中茂樹, 高橋重成, 森 泰生 (京都大学工学研究科 合成・生物化学専攻)

Reactive oxygen species (ROS) induce chemokines responsible for the recruitment of inflammatory cells at inflamed sites in injury or infection. Here, we demonstrate

that the plasma membrane Ca^{2+} -permeable channel TRPM2 controls ROS-induced chemokine production in monocytes. In human U937 monocytes, H_2O_2 evokes Ca^{2+} influx

through TRPM2 to activate Ca^{2+} -dependent tyrosine kinase Pyk2 and amplify Erk signal via Ras. This elicits nuclear translocation of NF- κ B essential for the production of the chemokine interleukine-8 (CXCL8). In monocytes from Trpm2-deficient mice, H_2O_2 -induced Ca^{2+} influx and production of the macrophage inflammatory protein-2 (CXCL2), the mouse CXCL8 functional homologue, were impaired. In the inflammation model dextran sulfate

sodium-induced colitis, CXCL2 expression, neutrophil infiltration, and ulceration were attenuated by Trpm2 disruption. Thus, TRPM2 Ca^{2+} influx controls the ROS-induced signal cascade responsible for chemokine production which aggravates inflammation. We propose functional inhibition of TRPM2 channels as a new therapeutic strategy for treating inflammatory diseases.

(3) プロトンチャネルとしての TRPM7

沼田朋大^{1,2}, 岡田泰伸¹ (¹ 生理学研究 機能協関部門,
² 京都大学工学研究科 合成・生物化学専攻)

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。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、パッチクランプ法で 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観察された。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+} の影響の実験結果から、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。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 付近の強い酸性状態に保たれている。そこで、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。

(4) TRPM8による体温制御

細川 浩¹, 田地野浩二¹, 前川真吾¹, 松村 潔², 小林茂夫¹
(¹ 京都大学 情報学研究科知能情報学 生体情報処理分野, ² 大阪工業大学 情報科学部)

末梢神経に発現している TRPM8 は冷却や、冷感物質であるメンソールに応答することから、皮膚の冷受容器であると考えられている。恒温動物の芯部体温は、芯部温による調節と、皮膚温による調節により一定に保たれていると考えられるが、皮膚の冷受容器である TRPM8 が、どの程度調節に関与しているのかは明らかではない。本研究では、TRPM8 による芯部温の制御機構・及び体温

調節応答について検討した。TRPM8 のアゴニストであるメンソール塗布や低温暴露で引き起こされる芯部体温上昇が起こるが、この芯部体温上昇は、TRPM8 ノックアウトマウスでは見られなかった。低温環境下での行動性・自律性体温上昇応答を調べたところ、TRPM8 ノックアウトマウスでは、低温環境下での行動性体温調節は抑制されていた。低温環境下での末梢皮膚温度には変化がみら

れなかったが、低温環境への移行時の抹消皮膚温度低下応答が TRPM8 ノックアウトマウスでは抑制されていた。以上のことから TRPM8 は冷環境下での自律性・行動性

体温調節応答に関与し、芯部体温を調節していることが示唆された。

(5) TRPM2 channel の単粒子解析による構造解明

丸山雄介¹, 小椋俊彦¹, 三尾和弘¹, 清中茂樹², 加藤賢太², 森 泰生², 佐藤主税¹

(¹産業技術総合研究所 脳神経情報研究部門, ²京都大学大学院 工学研究科 合成生物化学)

TRP(transient receptor potential) channel super family に属する TRPM2 は、活性酸素種や温度を感知するチャンネルである。さらに ADPRase 酵素活性ドメイン (NUDT9-H ドメイン) を分子内に有し、このドメインへのリガンド結合によってもチャンネルの開閉が制御されるという極めてユニークなタンパク質である。我々はこの TRPM2 タンパク質を精製し、電子顕微鏡画像を用いた単粒子解析法よりその三次元構造を解析した。分子全体はベル形構造をしており、大きく膨れた細胞質側ドメインが特徴的であった。膨らんだ構造は、我々が以前解析した TRPC3 チャンネルでも保存されており、多種類

の刺激のセンサーとして働く TRP チャンネル全体に共通なのかもしれない。また TRPM2 チャンネルに特徴的な構造として細胞質端の中心部に大きな突起が見られた。この突起は角が丸い四角柱的な形状であり、TRPC3 チャンネルがもつ中心がへこんだ小さな突起とは対照的である。四角柱的な形状の突起は、そのサイズから制御部位である NUDT9-H ドメインの一部と考えられる。その位置は、膜貫通領域のイオンゲートとは遠く離れており、分子内での大掛りな立体構造変化の伝播が開閉を制御する可能性が示唆された。

(6) TRPV1チャンネルの細胞外ナトリウムイオンによる活性調節

太田利男¹, 今川敏明², 伊藤茂男¹

(¹北海道大学 大学院獣医学研究科 形態機能学講座,

²北海道大学 大学院先端生命科学院 先端細胞機能学)

TRPV1 は知覚神経細胞に発現し、capsaicin, 熱, 酸及び内因性パニロイドにより活性化されるポリモーダル侵害受容チャンネルとして痛覚シグナル伝達に重要な役割を果たしている。近年、このチャンネル活性が種々の陽イオンや浸透圧により調節を受けることが明らかにされている。我々は異所性に発現させた TRPV1 チャンネル及び知覚神経細胞を用いて、このチャンネル活性が細胞外 Na イオン ($[Na^+]_o$) により強い活性制御を受けていることを見出したので報告する。

【方法】GFP 融合ブタ及びヒト TRPV1 遺伝子を HEK293 細胞に一過性に発現させた。幼ブタ及び成熟マウス (wild 及び TRPV1 欠損 (TRPV1(-/-)) より背根神経節 (DRG) 細胞を分離培養した。TRPV1 活性の測定は Fura2 を用い

た細胞内 Ca^{2+} イメージング法及びホールセルパッチクランプ法による電流測定により行った。

【成績】TRPV1 を発現した HEK293 細胞を $[Na^+]_o$ 除去液 (Na^+ を NMDG⁺ に置換) に晒すと、細胞内 Na 濃度は低下したが、細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) は素早く増加し、この反応は $[Na^+]_o$ 除去の期間持続した。 $[Na^+]_o$ 除去による $[Ca^{2+}]_i$ 増加反応は TRPV1 アンタゴニスト (capsazepine, iodoresiniferatoxin, ruthenium red) により濃度依存性に抑制された。 $[Na^+]_o$ を他の一価陽イオンに置換した条件でも持続的な $[Ca^{2+}]_i$ 増加が生じ、これは細胞外 Ca^{2+} 依存性であった。低 $[Na^+]_o$ 条件 (112mM) では、それ自身で著明な $[Ca^{2+}]_i$ 増加反応は起こさなかったが、低濃度の capsaicin (30 nM), 熱 (46°C), 酸 (pH6.5) 及び内因性パニ

ロイド(15s)HPETE, 1 μ M) による $[Ca^{2+}]_i$ 増加反応を有意に増大させた。パッチクランプ法により膜電流と $[Ca^{2+}]_i$ の同時測定を行ったところ, $[Na^+]_o$ 除去により capsaicin と同様な $[Ca^{2+}]_i$ 増加と外向き整流性の電流が生じた。酸感受性を担うアミノ酸を中性アミノ酸に置換した TRPV1 変異体では, $[Na^+]_o$ 除去による $[Ca^{2+}]_i$ 増加反応は有意に減弱した。 $[Na^+]_o$ 除去による $[Ca^{2+}]_i$ 増加や電流反応は初代培養ブタ DRG 細胞, マウス DRG 細胞及びヒ

ト TRPV1 発現 HEK293 細胞においても見られたが, TRPV1 欠損マウスの DRG 細胞では生じなかった。以上の成績から, TRPV1 チャンネルは $[Na^+]_o$ により生理的な条件では tonic な抑制を受けていること, またその作用部位には酸感受性ドメインが関与していることが示唆された。代謝性疾患の一つである低ナトリウム血症で生じる疼痛にこのような $[Na^+]_o$ による TRPV1 調節の変調が関与している可能性が考えられる。

(7) TRPV2による細胞骨格・細胞運動の制御

小島 至, 長澤雅裕, 中川祐子 (群馬大学 生体調節研究所細胞調節分野)

TRPV2 は小脳 Purkinje 細胞, 肝・腎上皮細胞, 膵内分泌細胞, 消化管の神経内分泌細胞, 肺・脾臓のマクロファージなどに高発現している。マクロファージでは, 血清・fMLP などの刺激により PI-3 キナーゼ依存的に細胞膜に移行し, 持続的な細胞内カルシウムの上昇を生じる。細胞膜上の TRPV2 局在を検討すると, TRPV2 は focal complex の特殊な形態であるポドソーム周辺に集積する。ポドソームは細胞接着・遊走に重要な構造であるが, そこには Rho, Rac, Cdc42 などの低分子量 G 蛋白, gelsolin などのアクチン制御因子, Pyk2, src などのキナーゼなどが集積し TRPV2 と共局在している。細胞膜直下のカルシウム濃度 ($[Ca^{2+}]_{pm}$) をモニターすると, ポドソーム周辺で $[Ca^{2+}]_{pm}$ が大きく増加している。TRPV2 を抑制する ruthenium red の投与や TRPV2 ノック・ダウンによりポドソーム近傍の $[Ca^{2+}]_{pm}$ 増加が消失することから, ポドソ

ーム近傍の $[Ca^{2+}]_{pm}$ 増加が TRPV2 を介する Ca^{2+} 流入に依存していることがわかる。ポドソーム近傍の $[Ca^{2+}]_{pm}$ 増加によりカルシウム依存性キナーゼである Pyk2 の活性化が予想されるが, 実際 Pyk2 のリン酸化は TRPV2 のノック・ダウンにより抑制される。また TRPV2 のノック・ダウンによりポドソームの数は大きく増加する。一方, Pyk2 の dominant-negative 変異体を導入するとポドソームの数は大きく増加した。逆に ionomycin 投与により Ca^{2+} 流入を増加させるとポドソーム数は激減する。以上の結果から, ポドソームに集積した TRPV2 を介する Ca^{2+} 流入は Pyk2 を活性化し, これによりポドソームを消失させると考えられる。TRPV2 のポドソーム局在は, Ca^{2+} 流入増加・pyk2 活性化を介してポドソームのターンオーバーを制御し, これがマクロファージの接着, 細胞運動に重要であると考えられる。

(8) 細胞間接着に依存した皮膚バリア機能における TRPV4チャンネルの重要性

曾我部隆彰¹, 島貫恵実¹, 米村重信², 水野敦子³, 富永真琴^{1,4}, 福見一富永知子^{1,4}

¹ 岡崎統合バイオサイエンスセンター (生理学研究所) 細胞生理,

² 理研 発生・再生科学総合研究センター, ³ 自治医大 薬理学講座,

⁴ 総研大 生命科学専攻)

皮膚, 特に表皮は生体をシート状に覆い, 外的環境との間にバリアを形成している。バリア機能は, さまざまな感染・侵入などをシャットアウトするだけでなく, 体内からの水分蒸散を抑止して乾燥を防ぐ上でも非常に重

要である。主たるバリア機能は最終分化した角質細胞(ケラチノサイト) とその間を埋める脂質多層構造から成る角化層が担っているが, その直下に存在する細胞間接着構造も, 水分蒸散の調節に重要な役割を果たしている。

細胞間接着構造（タイトジャンクション，アドヘレンスジャンクション）は，基底層から分裂したケラチノサイトが分化する過程でアクチンの再編成や細胞同士の重層化を介して形成され，その過程には細胞内外のカルシウム濃度上昇が重要であると言われている。しかしながら，ケラチノサイト内のカルシウム濃度上昇に関わる分子メカニズムや，カルシウム上昇が細胞間接着形成に果たす役割については，詳しく分かっていない。今回，我々は，ケラチノサイトに発現するカルシウム透過性の TRPV4 チャンネルが，細胞骨格再編成を介して細胞間接着構造依存的なバリア機能の形成に寄与していることを明らかにした。我々はまず，TRPV4 に結合する因子として β カテニンを見出し，TRPV4 が細胞骨格と結合することを示した。野生型マウスと TRPV4 欠損マウスのバリア機能を

比較したところ，角質層依存的なバリアに違いはなかったが，細胞間接着依存的なバリアは TRPV4 欠損マウス皮膚で有意な障害が見られた。培養 TRPV4 欠損ケラチノサイトにおいては，細胞外カルシウム添加によるアクチン再編成および重層化に明らかな遅滞が観察され，細胞間隙の透過性が野生型と比較して有意に上昇していた。さらに，この透過性上昇は，細胞間接着構造の異常に基づくことを見出した。生理的な皮膚温下におけるケラチノサイト内のカルシウム濃度は，TRPV4 の欠損により有意に低下し，またアクチン骨格の破断によっても低下した。以上のように，本発表では，ケラチノサイトの温度感受性 TRPV4 チャンネルが皮膚のバリア機能に果たすユニークな役割について報告する。

(9) Essential role of STIM1, ER calcium sensor, for store-operated calcium influx and mast cell activation

馬場義裕，黒崎知博（大阪大学 免疫学フロンティア研究センター，
理研 免疫アレルギー科学総合研究センター）

カルシウムシグナルは様々な生理的現象において重要な役割を担っているが，細胞内カルシウムの上昇は主に二つの経路から供給される。一つは細胞内カルシウムストアである小胞体からのカルシウム放出，もう一つは細胞膜上のチャンネルを介した細胞外からのカルシウム流入である。免疫細胞の場合，細胞外からのカルシウム流入は小胞体のカルシウム枯渇が引き金となって引き起こされるカルシウム流入（ストア作動性カルシウム [Store-operated calcium: SOC] 流入）が主要なソースとなり，長時間の持続的シグナルを維持する上で重要であると考えられている。細胞内カルシウムストアの枯渇が，いかなる分子機序で SOC 流入を作動させるのかは長らく不明であったが，最近，小胞体カルシウムセンサーと

して STIM1 が同定され，SOC における STIM1 の役割に関する知見が蓄積しつつある。我々は，STIM1 遺伝子を欠損した DT40 B 細胞株を用い，STIM1 による SOC 活性化メカニズムの一端を明らかにしてきた。さらに，我々は SOC 活性が強いとされるマスト細胞に着目し，STIM1 ノックアウトマウスを用いて，SOC 流入の生理的役割を検討した。マスト細胞はアレルギー反応を引き起こす主要エフェクター細胞であり，アレルゲンの刺激によって脱顆粒やサイトカイン産生を引き起こし，アナフィラキシー反応が誘導される。これらの現象における SOC 流入の役割は不明であったが，本研究により，STIM1 が誘導するカルシウム流入がマスト細胞を介したアレルギー反応に必須であることが明らかとなった。

(10) 毛様体筋収縮調節に関与する非選択性陽イオンチャネルと TRPC チャネル

高井 章, 宮津 基, 安井文智 (旭川医大 生理・自律機能分野)

【背景】視覚遠近調節を司る毛様体筋は副交感神経支配の平滑筋である。この特殊に分化した筋組織には、伝達物質 (アセチルコリン) によるムスカリン受容体の刺激の続く限り一定の張力を保持し続ける特性があり、それが安定な焦点調節を可能にしている。昨年の本研究会でわれわれは、ウシ毛様体筋を用いた実験により M3 ムスカリン受容体刺激に応じて開講する 2 種類の非選択性陽イオンチャネル (NSCCL と NSCCS) が存在し、それらが持続的な筋収縮に必要な細胞外からの Ca^{2+} 流入の主要経路として機能することを示す知見を報告した[1,2]。今回は、これらの native なチャネルの電気生理学的特性と、その活性化に関連する信号伝達経路について新たに得られた実験結果を報告する。また、この組織で同定された 4 種類の TRPC と NSCCL/NSCCS との関連を示唆する知見を提示する。

【方法】膜電位固定法による全細胞膜電流の記録、および Fluo-4 蛍光法による細胞内 Ca^{2+} の記録には、酵素処理で単離したのち、fibronectin 処理したガラス小円盤表面で短期間 (1-5 日) 培養したウシ毛様体筋細胞を用いた。免疫染色には、培養細胞に低浸透圧下で超音波パルスを加えて細胞体を除去したあとガラス表面に付着したまま細胞内側を露出して残った細胞膜を用いた。

【結果と考察】単離細胞において、カルバコール (CCh; 0.5-2 μM) は NSCCL/NSCCS 電流の活性化と、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の

上昇を起した。Gq/11 阻害剤である YM-254890 (YM; 3・10 μM) の細胞外投与により、それらの初期相、持続相とも完全に抑制された。一方、多くの TRP チャネルにも抑制効果を示すことで知られる La^{3+} , Gd^{3+} および SKF-96365 は 1-100 μM の濃度範囲で持続相のみを濃度依存性に抑制した。TRPC6 電流を増強することが報告されている fulfenamate は、10-100 μM の濃度で NSCCL 電流にも増強作用を示した。20mM の caffeine の灌流により、NSCCS の開口によると見られる電流の可逆的活性化が観察された。この電流発生中に 1-10 μM の ryanodine を加えると caffeine 除去後も電流は減衰せずに持続した。NSCCS は、 Ca^{2+} 枯渇に伴って活性化される経路により調節される可能性がある。免疫染色による実験では、細胞膜標本の α アクチン陽性領域に集中して、M3R, Gq/11, TRPC1, TRPC3, TRPC4 および TRPC6 に特異的な抗体の結合を示す蛍光スポットが、いずれも 1 μm^2 以上という高密度で検出された [2,3]。また、抗 IP3 受容体 (subtype 1) 抗体により濃染される細胞内小胞体膜は、stromal interaction molecules subtype 1 (STIM1) に対する抗体によっても強く染色された。まだ検討すべき点は多いが、TRPC は NSCCL and/or NSCCS の有望な分子候補といえる。なお、NSCCS は、 Ca^{2+} 枯渇に伴って活性化される経路により調節される可能性がある。

(11) 活性化アストロサイトにおける TRPC3の生理的意義

白川久志, 中尾賢治, 杉下亜維子, 中川貴之, 金子周司

(京都大学 薬学研究科 生体機能解析)

Astrocytes, one of the three principal types of brain glial cells in the CNS, are pathologically activated on intracerebral hemorrhage, which cause astrogliosis accompanied with abnormal morphology and excessive cell proliferation. Thrombin, one of the major blood-derived serine proteases, leaks into brain parenchyma when blood-brain barrier is disrupted. Besides its physiologically important role in blood

coagulation, thrombin can induce brain injury and astrogliosis. Transient Receptor Potential Canonical (TRPC) channels are Ca^{2+} -permeable, non-selective cation channels and activated by receptor stimulation or intracellular Ca^{2+} store depletion induced by IP3 receptor activation. Although TRPC channels have been reported to be expressed in astrocytes and involved in Ca^{2+} influx after receptor

stimulation, their pathophysiological functions in reactive astrocytes remain to be elucidated. In this study, we focused on the pathophysiological role of TRPC in thrombin-activated primary cortical astrocytes. Twenty-four hour application of 1 U/ml thrombin induced significant TRPC3 up-regulation whereas TRPC1/6/7 expressions were less increased or not changed at all. TRPC3 up-regulation elicited by thrombin was time-dependent and mediated by stimulation of protease-activated receptor 1 (PAR1), one of the specific thrombin receptors, and required de novo protein synthesis. Pharmacological manipulations revealed that particular MAPKs cascades, i.e. ERK and JNK but not p38, and NF- κ B signaling were involved in the process. Furthermore, Ca^{2+} signaling blockers, such as BAPTA-AM, cyclopiazonic acid, 2-aminoethoxydiphenyl borate and pyrazole-3, a selective

TRPC3 inhibitor, attenuated TRPC3 up-regulation, suggesting that Ca^{2+} signaling including TRPC3 contributes to its up-regulation. Additionally thrombin induced the up-regulation of S100 β , marker of reactive astrocytes, and cell proliferation, both of which was inhibited by the above Ca^{2+} signaling blockers. Specific knockdown of TRPC3 using siRNA also suppressed thrombin-induced S100 β up-regulation, suggesting that TRPC3 contributes to astrocyte activation. In conclusion, these results suggest that thrombin evokes dynamical TRPC3 up-regulation, and that TRPC3 attributes to pathological activation of astrocytes accompanied with its up-regulation in a feed-forward induced expression mechanism. These findings are informative for elucidating the roles of TRPC3 in astrogliosis after intracerebral hemorrhage.

(12) 脊髄におけるシナプス前 TRPA1チャネルの機能的意義について

中塚映政 (佐賀大学 医学部生体構造機能学講座)

TRPA1 は後根神経節ニューロンにおいて TRPV1 と共発現し、炎症による痛覚過敏や神経因性疼痛に関与していることが示唆されている。近年、末梢神経系における TRPA1 の役割についての詳細な解析がなされてきたが、中枢神経系における関与は全く不明であった。今回、マスタードオイルの主成分で、TRPA1 選択的作動薬である allyl isothiocyanate (AITC) が、脊髄後角における興奮性シナプス伝達にどのような作用を及ぼすか調べた。実験は、成熟雄性ラットから作製した脊髄横断スライス標本の膠様質ニューロンにブラインド・ホールセル・パッチクランプ法を適用して行った。AITC の灌流投与によって、記録した約 7 割のニューロンで自発性興奮性シナプス後電流の振幅と発生頻度は有意に増加し、約半数のニューロンで内向き電流が誘起された。AITC による自発性興奮性シナプス後電流の増強作用は非 NMDA 受容体阻害薬 CNQX 存在下あるいは無カルシウム溶液中では抑制されたが、tetrodotoxin やランタンによって影響を受けなかった。また、非特異的な TRP チャネル阻害薬である

ruthenium red によって有意に抑制された。一方、AITC によって誘起される内向き電流は CNQX や tetrodotoxin に影響を受けなかったが、NMDA 受容体阻害薬 APV や ruthenium red 存在下では完全に阻害された。以上の結果から、TRPA1 は膠様質ニューロンに入力する興奮性シナプス前終末に発現しており、その活性化に伴って、電位依存性カルシウムチャネルの開閉なしにシナプス前終末へカルシウムが流入し、グルタミン酸含有シナプス小胞の開閉分泌が誘発される。その結果、シナプス下膜の AMPA 受容体のみならず、spill over したグルタミン酸によってシナプス外の NMDA 受容体が活性化され、膠様質ニューロンにおける興奮性シナプス伝達は増強することが明らかとなった。中枢神経系における TRPA1 の内因性リガンドは未だ不明であるが、細胞内で上昇したカルシウムが TRPA1 を活性化すると報告されている。これらのことから、脊髄後角におけるシナプス前 TRPA1 の活性化は、生理的な痛みの調節あるいは病態時の難治性疼痛に関与している可能性が示唆された。

(13) TRPV4の活性化を介したアストロサイトの興奮：神経-グリア機能連関の解明

柴崎貢志^{1,2,3}, 富永真琴^{1,2,3} (¹ 岡崎統合バイオサイエンスセンター 細胞生理研究部門,
² 生理学研究所 細胞生理研究部門,
³ 総合研究大学院大学 生命科学研究科 生理科学専攻)

我々は温度感受性 TRP チャンネルに属する TRPV4 (活性化温度閾値: 34°C以上) が海馬に高発現しており, 体温を介して海馬神経細胞の興奮性を向上させていることを見いだした (Shibasaki et al. J. Neurosci., 2007)。脳組織標本を詳しく解析したところ, 神経細胞の他, アストロサイトにも TRPV4 発現を認めた。非常に興味深いことに, アストロサイトのマーカーであるグリア酸性繊維性蛋白質 (GFAP) に陽性のアストロサイトの中に, TRPV4 陽性と陰性の二種類の細胞が存在していた。この結果は, TRPV4 の発現を指標にアストロサイトのサブクラスを分類できる可能性を示唆している。次に, アストロサイトに機能的な TRPV4 チャンネルが発現しているのかを Fura-2 を用いたカルシウムイメージング法で確認したところ, TRPV4 の mRNA や蛋白質発現と一致し, ある特定のアストロサイトのみが TRPV4 の特異的アゴニスト

(4 α -PDD) に対する応答性を示した。さらには, このごく一部の TRPV4 陽性アストロサイトの興奮に引き続き, 周囲のアストロサイトに激しいカルシウム波が引き起こされることを観察した。つまり, TRPV4 陽性アストロサイトは TRPV4 の活性化に伴い, 何らかの情報伝達物質を遊離し, 周囲のアストロサイトに興奮を伝播している可能性が示唆された。そこで, ホールセルパッチクランプ法を応用したバイオセンサー法を用いて, その伝達物質を同定した。このようなアストロサイトからの情報伝達物質の遊離は, アストロサイト TRPV4 の活性化→周囲のアストロサイトの興奮→神経細胞の興奮/抑制というカスケードが存在する可能性を強く示唆しており, 神経-グリアの機能連関を調べるのに TRPV4 が非常に有用なツールであることを強く示唆している。

(14) PKC γ による TRPC3の制御の異常と脊髄小脳変性症 (SCA14) 発症の関係について

齋藤尚亮 (神戸大学 バイオシグナル研究センター)

プロテインキナーゼ C (PKC) は, 活性化時に細胞膜にトランスロケーションすることが知られている。我々はこのトランスロケーションを PKC の活性化の指標として, どの PKC サブタイプが, 「いつ」「どこで」「どのようにして」活性化されるのかを解析してきた。コンフォーカルレーザー顕微鏡下での観察によって, PKC のトランスロケーションはサブタイプによりあるいは細胞刺激によって異なっていることが明らかとなった。さらに, 全反射顕微鏡を用いた PKC の 1 分子観察により, PKC 各分子が短い時間 (1 秒以下) の細胞膜との結合を繰り返すことにより, 数分間の PKC トランスロケーションを形成していることがわかった。脊髄小脳変性症 (SCA) 14 型は PKC γ のアミノ酸変異によって引き起こされる優勢遺伝型の神経変性症である。我々はこれらの変異が, この PKC のターゲティング部位, 膜結合時間, 活性に着目

し, これらの異常がどのような生理機能に影響を及ぼすのかを解析した。野生型 PKC γ 発現細胞では, 非発現細胞に比べ, 細胞刺激による細胞外からの Ca²⁺ 流入を速やかに終了させるのに対して, SCA14 変異体では延長したままであった。この Ca²⁺ 流入には TRPC チャンネルが関与しており, TRPC3 チャンネルは野生型 PKC γ によって in vitro においてリン酸化を受け, 抑制されることが分かった。しかし, SCA14 変異体は in vitro 活性測定において高い酵素活性を有したにもかかわらず, in vivo では TRPC3 をリン酸化しなかった。全反射顕微鏡を用いて, PKC γ の一分子における細胞質膜上での動態を観察したところ, 変異体の膜滞在時間が野生型に比べて有意に短縮していることを見出した。これらの結果より, in vitro で高い活性を示すものであっても, 十分な膜滞在時間を伴ったトランスロケーションを持たない変異 PKC では,

基質である膜蛋白質のリン酸化ができず、細胞機能調節が行えないことを示唆しており、生化学的には説明のつ

かなかった疾患発症メカニズムをイメージングにより始めて可能にした。

(15) エンドセリン A 型受容体を介した Ca^{2+} シグナリングの多様性と TRPC チャネル

堀之内孝広, 三宅由美恵, 西屋 禎, 西本 新, 三輪聡一
(北海道大学大学院 医学研究科細胞薬理学分野)

エンドセリン A 型受容体 (ETAR) は, $\text{Gq} \cdot \text{Gs} \cdot \text{G12}$ タンパク質と共役していることが知られている。私達は, 以前, ETAR を介して引き起こされる持続性の細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 上昇反応に, $\text{Gq} \cdot \text{G12}$ タンパク質や TRPC チャネルが関与していることを報告した。しかしながら, ETAR 刺激による $\text{Gq} \cdot \text{G12}$ タンパク質の活性化から TRPC を介した持続性 Ca^{2+} 流入へ至る一連のシグナルカスケードについては, 不明な点が多い。本研究では, ETAR を介して活性化される Ca^{2+} シグナリングの多様性を解明するため, ETAR 発現レベルが異なる 2 種類の CHO 細胞 (ETAR 高発現 : 32,000 fmol/mg protein (ETAR-H) 及び低発現 : 900 fmol/mg protein (ETAR-L)) を作製し, これらのクローンにおける ETAR シグナリングを, Ca^{2+} 測定実験, CytosensorTM microphysiometer を用いた酸排出速度測定実験及び Western blot 法による p38MAPK のリン酸化量測定実験により, 詳細に解析した。また, ETAR 及び TRPC を安定発現する HEK293 を用いて, ETAR を介した Ca^{2+} シグナリングにおける TRPC の機能的な重要性について検討した。ETAR-H において, ET-1 は, 一過性及び持続性の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇反応を引き起こした。一方, ETAR-L の場合, ET-1 刺激により, ETAR-H と同レベルの一過性 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇反応が生じたものの, 持続的な Ca^{2+}

流入は認められなかった。ETAR-H において活性化されるシグナル分子を解析したところ, (1) $\text{Gq} \rightarrow \text{PLC} \rightarrow \text{TRPC}$, 及び, (2) $\text{G12} \rightarrow \text{p38MAPK} \rightarrow \text{TRPC}$ 及び Na^+/H^+ exchanger (NHE), という 2 種類のシグナルカスケードが, 持続性の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇反応に必須であることが示された。一方, ETAR-L の場合, $\text{Gq} \rightarrow \text{PLC} \rightarrow \text{p38MAPK} \rightarrow \text{NHE}$ という経路が活性化されるため, 持続的な Ca^{2+} 流入が生じないと考えられた。これらの知見は, 細胞膜における受容体の発現レベルが, ETAR を介した Ca^{2+} シグナリングに多様性を持たせていることを示唆している。次に, ETAR を介した Ca^{2+} シグナリングを修飾する TRPC を同定するため, ETAR 及び TRPC を安定発現する HEK293 を用いて解析を行った。その結果, 細胞外 Ca^{2+} を除去した条件下で引き起こされる ET-1 による Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} の遊離及びその後の Ca^{2+} 添加により生じる細胞外 Ca^{2+} 流入は, TRPC1・3・4・5・7 を共発現させることにより, 増強された。また, このうち一部の TRPC は, ETAR と共沈降することが確認された。これらの知見から, TRPC が直接もしくは, 何らかのアダプター分子を介して ETAR と相互作用することにより, 受容体作動性に誘発される Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} の遊離や細胞外 Ca^{2+} 流入を増強していると考えられた。

(16) Snapin をアダプターとする受容体作動性 Ca^{2+} 流入機構

鈴木史子, 森島 繁, 田中高志, 村松郁延 (福井大学 医学部 薬理学領域)

われわれは, yeast two-hybrid 法を用いて, SNARE complex 関連タンパクである Snapin が, $\alpha 1\text{A}$ アドレナリン受容体と相互作用することを発見した。また, Snapin が共発現する細胞では受容体作動性 Ca^{2+} (ROC) 流入が増強されることや, 逆に RNAi 法にて内因性の Snapin をノ

ックダウンすると細胞外からの ROC 流入が著しく減少することを明らかにした。この Snapin を介する ROC 流入機構の分子機構を詳細に明らかにすることを目標として, Snapin と受容体やイオンチャネルの相互作用がどのようにして起こるかを調べた。まず, 我々は, 免疫沈降

法にて, Snapin は, $\alpha 1A$ 受容体のほかにも, ROC チャネルとして知られる TRPC6 と相互作用することを明らかにした。また, $\alpha 1A$ 受容体を活性化すると, $\alpha 1A$ 受容体-Snapin-TRPC6 複合体が形成され, TRPC6 が表面細胞膜にリクルートされることも明らかになった。さらに, BiFC (bimolecular fluorescent complementation) 法により, Snapin 同士はそれぞれのアミノ基側同士を介して, 2 量体を形成することが明らかになった。このことから, $\alpha 1A$

受容体活性化により形成される $\alpha 1A$ 受容体-Snapin-TRPC6 複合体は, $\alpha 1A$ 受容体-Snapin と Snapin-TRPC6 が Snapin 同士の結合によって, その形成が促進されることが明らかになった。Snapin と結合する膜蛋白には様々なものが知られているが, これらの実験結果より, Snapin に結合するタンパク同士が, Snapin の 2 量体形成を介して, 相互に結合する可能性が示唆された。

(17) 副腎髄質細胞における Ca 流入経路と TRPC チャネル

井上真澄 (産業医科大学 医学部第2生理学)

ラット副腎髄質細胞に SERCA pump 抑制薬の cyclopiazonic acid (CPA) を投与すると, 細胞外 Ca^{2+} 依存性に細胞内 Ca^{2+} 濃度が持続的に上昇した。この上昇は 1mM Ni^{2+} により完全に抑制されたが, 100 μM D600 ではわずかしこ抑制されなかった。一方, 40mM K^+ により誘発される Ca^{2+} 濃度の上昇は D600 により約 80% 抑制された。穿孔パッチクランプ法により -50mV で全細胞電流を記録すると, 1mM Ni^{2+} により見かけ上外向き電流が誘発されたが, D600 では誘発されなかった。 Ni^{2+} 誘発性外向き電流は保持電位が過分極するに従い減少した。CPA は保持電位 -50 mV での全細胞電流, 及び Ni^{2+} 誘発性外向き電流に影響を及ぼさなかった。膜電位固定化に caffeine によ

り細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位を枯渇させても, caffeine washout 後に内向き電流は発生しなかった。Caffeine による細胞内 Ca^{2+} 動員は, caffeine washout 後の Ni^{2+} の投与により抑制された。副腎髄質には, mRNA と蛋白レベルで TRPC1, TRPC5 と TRPC6 が発現していた。副腎髄質細胞における TRPC1 様免疫反応物の分布は, 主に小胞体マーカーの BODIPY-thapsigargin 結合部位と一致した。Stim1 の発現は, イムノプロット法及び免疫細胞化学法によりほとんど確認されなかった。これらの結果は, ラット副腎髄質細胞には貯蔵部位作動性 Ca^{2+} 流入機序は存在しないこと, そして TRPC1 チャネルの大部分は小胞体に存在し細胞膜には分布しないことを示唆している。

(18) Counteracting effect of TRPC1-associated store-operated Ca^{2+} influx on $TNF\alpha$ induced COX2-dependent PGE2 production in human colonic myofibroblasts

Hai Lin, Yasuhiro Kawarabayashi, Akira Honda, Ryuji Inoue

(Department of Physiology, Graduate School of Medical Sciences, Fukuoka University)

Most attention in inflammatory bowel disease (IBD) has focused on an proinflammatory cytokine $TNF\alpha$, and its functionally effective antibodies which are an important therapeutic innovation in recent years. One major cellular consequences of $TNF\alpha$'s action is increased release of prostaglandin E2 (PGE2) via induction of cyclooxygenase-2 (COX2) in myofibroblasts, which contribute to inflammatory and neoplastic processes in the gastrointestinal tract. Part of

the PGE2 release from myofibroblast has been shown to be dependent on Ca^{2+} , but what source contributes thereto remains entirely unclear. In this study, we therefore explored the potential role of transient receptor potential (TRPC) proteins for this process by evaluating their expression profiles and functions in the human colonic myofibroblast cell line CCD-18 $^{\circ}$ C. Treatment with $TNF\alpha$ of CCD-18 $^{\circ}$ C greatly enhanced store dependent Ca^{2+} influx with increased

expression of TRPC1 (but not the other TRPC isoforms) and also of COX2 (but not COX1) with subsequent increase in PGE2 secretion. These consequences occurred dose- and time-dependently, becoming significant several hours after TNF α treatment. Selective inhibition of TRPC1 expression by small interfering RNA (siRNA) targeting TRPC1 antagonized the enhancement of the Ca²⁺ influx by TNF α , but conversely potentiated the TNF α -induced PGE2 secretion from CCD-18 °C. In contrast, overexpression of TRPC1 in

CCD-18 °C produced the opposite consequences. Inhibitors of Ca²⁺-dependent transcription factor NF κ B attenuated PGE2 production enhanced by TNF α , whereas inhibition of another Ca²⁺-dependent transcription factor NFAT, further upregulated PGE2 production by TNF α . These results at least suggest that, in colonic myofibroblast cells, TNF α mediated up-regulation of TRPC1 negatively regulates PGE2 synthesis through NFAT activation.

(19) 心筋細胞における P2Y 受容体—TRPC5機能的共役の意義

西田基宏（九州大学大学院 薬学研究院薬効安全性学分野）

様々な神経体液性因子による心筋細胞の肥大応答において、Ca²⁺-NFAT シグナリング経路が極めて重要な役割を果たすと考えられている。ノルアドレナリン・アンジオテンシン (Ang) II・エンドセリン(ET-1)といった血管収縮性物質だけでなく、細胞外スクレオチド (ATP) もまた細胞内 Ca²⁺シグナリングを活性化することが知られている。ATP は、Gq 蛋白質共役型 (P2Y) 受容体を介して NFAT を活性化する。しかしながら、ATP 刺激によって心肥大は誘導されない。このことは、ATP が NFAT 経路だけでなく、心肥大を抑制するシグナル経路も活性化する可能性を示している。我々は以前、Ang II や ET-1 刺激による心肥大応答において、ジアシルグリセロール (DAG) 感受性 TRP チャネル (TRPC3/TRPC6) が関与することを報告した。また最近、TRPC6 チャネルの活性化が 8-Br-cGMP やホスホジエステラーゼ type V (PDE-V) 阻害剤によって抑制されることを見出している。そこで本研究では、ATP 刺激による細胞内 Ca²⁺濃度上昇が NO-cGMP-PKG 経路を活性化することで心肥大を抑制するのではないかと仮説を立てた ATP 刺激は ET-1 や Ang II 刺激よりも強く NFAT を活性化したが、心肥大の

指標である BNP 転写活性やタンパク合成を上昇させなかった。しかし、NO 合成酵素阻害剤 (L-NAME) を前処置しておく、ATP 刺激により BNP 転写活性は増加した。ATP 刺激は、ET-1 や AngII 刺激よりも強く NO 産生を惹起した。ATP 刺激による NO 産生は、IP3 受容体阻害剤 (xestospongine C) や TRPC5 siRNA 処置によって抑制され、TRPC6 siRNA 処置では抑制されなかった。さらに、TRPC5 siRNA を処置した心筋細胞において、ATP 刺激は BNP 転写活性を有意に増加させた。ATP 刺激による NFAT 活性化は、TRPC5 siRNA および TRPC6 siRNA 処置によりそれぞれ部分的に抑制された。以上の結果から、ATP 刺激による Ca²⁺シグナリングの活性化には、IP3-TRPC5 経路と DAG-TRPC3/TRPC6 経路の 2 つが関与すること、および IP3 経路を介した NO-cGMP-PKG 経路の活性化が、TRPC3/TRPC6 を介した心肥大シグナリングに対して抑制的に働くことを明らかにした。ATP は、機械的圧負荷や虚血によって細胞内から細胞外へと遊離される。P2Y 受容体—TRPC5 チャネルの機能的共役は、病的ストレスにより生じる過剰な Ca²⁺シグナリングに対する負の制御機構として働いているのかもしれない。

23. 筋・骨格系と内臓の痛み研究会

2009年1月22日－1月23日

代表・世話人：水村和枝（名古屋大学環境医学研究所）

所内対応者：富永真琴（生理学研究所・岡崎統合バイオサイエンスセンター）

(1) 三叉神経因性疼痛モデルによる冷痛覚過敏の解析

浦野浩子, 尾崎紀之, 篠田雅路, 杉浦康夫（名古屋大学大学院 医学系研究科 機能形態学講座）

(2) 糖尿病性神経因性疼痛を引き起こす因子の同定：低酸素/高血糖ストレスによる TRPV1 活性の増強

柴崎貢志^{1,2,3}, Violeta Ristoiu⁴, Maria-Luiza Flonta⁴, 富永真琴^{1,2,3}

(¹ 岡崎統合バイオサイエンスセンター・細胞生理, ² 生理学研究所,
³ 総合研究大学院大学・生理科学, ⁴ University of Bucharest, Romania)

(3) ラット角膜に分布する TRPV1 および IB4 陽性神経について

中川 弘¹, 樋浦明夫² (¹ 徳島大学病院小児歯科, ² 徳島大学歯学部口腔解剖)

(4) 神経根絞扼モデルラットにおける脊髄膠様質細胞の特性変化

寺島嘉紀¹, 田中 聡², 杉山大介², 川真田樹人²
(¹ 札幌医科大学整形外科, ² 信州大学麻酔蘇生科)

(5) ガラニンラット脊髄膠様質における興奮性シナプス伝達を濃度に依存して二相に制御する

熊本栄一, 岳 海源, 藤田亜美, 中塚映政（佐賀大学医学部 生体構造機能学講座）

(6) 成熟ラット脊髄膠様質における PAR-1 活性化は興奮性シナプス伝達を促進する

藤田亜美, 中塚映政, 熊本栄一（佐賀大学医学部 生体構造機能学講座）

(7) デクスメデトミジン ($\alpha 2$ 作動薬) の脊髄後角における作用

河野達郎, 石井秀明（新潟大学大学院 医歯学総合研究科 麻酔科学分野）

(8) パッチクランプ法を用いた脊髄電気刺激による鎮痛機構の解明

中塚映政, 谷口 亘, 藤田亜美, 熊本栄一（佐賀大学医学部 生体構造機能学講座）

(9) ラット腹膜切開モデルによる術後痛の検討

杉山大介, 田中 聡, 川真田樹人（信州大学 麻酔蘇生学講座）

(10) 骨格筋, および皮膚侵害受容器活動の加齢による変化

田口 徹, 松田 輝, 村瀬詩織, 太田大樹, 水村和枝
(名古屋大学環境医学研究所 神経系分野Ⅱ)

(11) 筋 C 線維受容器の ATP による機械反応抑制と酸に対する反応の増強

松田 輝, 田口 徹, 水村和枝（名古屋大学環境医学研究所神経系分野Ⅱ）

林 功栄, 尾崎紀之, 杉浦康夫（名古屋大学大学院医学系研究科機能形態学講座・機能組織学分野）

(12) ラット持続性筋痛モデルにおける神経成長因子の関与

林 功栄, 尾崎紀之, 杉浦康夫（名古屋大学大学院 医学系研究科機能形態学講座）

(13) 遅発性筋肉痛 (Delayed-onset Muscle Soreness: DOMS) の脳機能画像 —fMRI による検討—

柴田政彦¹, 松田陽一², 住谷昌彦³, 植松弘進², 大城宜哲⁴, 小山哲男⁵, 真下 節¹
(¹ 大阪大学大学院 医学系研究科疼痛医学講座,

² 大阪大学大学院 医学系研究科生体統御医学麻酔・集中治療医学講座,

³ 東京大学医学部附属病院麻酔科, ⁴ 仁寿会石川病院リハビリテーション科,

⁵ 西宮協立脳神経外科病院リハビリテーション科)

- (14) 繰り返し寒冷ストレスモデルにおける運動時の筋血流増加の変化
那須輝顕, 堀田典生, 水村和枝 (名古屋大学環境医学研究所神経系分野 II)
- (15) 痛みによる不快情動生成における分界条床核内コルチコトロピン放出因子の役割
大野篤志¹, 出山諭司^{1,2}, 片山貴博¹, 山口 拓³, 吉岡充弘³, 南 雅文¹
(¹北海道大学大学院 薬学研究科 薬理, ²京都大学大学院 薬学研究科 生体機能解,
³北海道大学大学院 医学研究科 神経薬理)
- (16) 神経因性疼痛モデルマウスにおける海馬 CA1 領域でのグリシン取り込みの増加と
シナプス長期増強現象への影響
兒玉大介, 小野秀樹, 田辺光男 (名古屋市大院・薬・中枢神経機能薬理)
- (17) GPR103 の内因性作動物質である 26RFa 脳室内投与の効果
山本達郎, 宮崎里佳 (熊本大学大学院医学薬学研究部 生体機能制御学)
- (18) 難治性疼痛における一酸化窒素 (NO) 標的分子の解析
陸 景珊, 片野泰代, 伊藤誠二 (関西医科大学医化学講座)
- (19) 抗癌薬オキサリプラチン誘発疼痛のマウスモデルにおける一次求心線維の自発神経活動の増加
安東嗣修¹, プナムガウチャン¹, 大森 優¹, 加藤 敦², 佐々木淳¹, 倉石 泰¹
(富山大学大学院医学薬学研究部 ¹応用薬理学, ²付属病院薬剤部)
- (20) ラット脊髄坐減モデルの疼痛行動とセロトニン 2C 受容体 RNA 編集の関与
中江 文, 柴田政彦, 萩平 哲, 高階雅紀, 真下 節
(大阪大学大学院医学系研究科 生体統御医学 麻酔・集中治療医学講座, 同 疼痛医学寄附講座)
- (21) マウス帯状疱疹痛と帯状疱疹後神経痛の動的触アロディニアにおける P2X₇受容体の関与
佐々木淳, 北見紀明, 金山翔治, 倉石 泰
(富山大学大学院 医学薬学研究部 (薬学), 応用薬理学)
- (22) 神経因性疼痛発症に関与するミクログリア P2X₄受容体発現増加のメカニズム解明
豊満笑加, 津田 誠, 齊藤秀俊, 井上和秀 (九州大学大学院薬学研究院薬理学分野)
- (23) メダカに対するメントールの効果: 冷侵害受容器を介する異常遊泳行動と GABA_A レセプターを
介する麻酔作用
笠井聖仙 (鹿児島大学理学部生命化学科)
- (24) 腰椎椎間板ヘルニアにおけるセロトニンと TNF- α の相互作用
小林 洋, 関口美穂, 加藤欽志, 菊地臣一, 紺野慎一
(福島県立医科大学整形外科講座)
- (25) 関節炎性疼痛モデルにおける ASIC3 の関与
池内昌彦¹, Sluka KA² (¹高知大学医学部整形外科, ²アイオワ大学)
- (26) 骨損傷時の圧痛メカニズムの解析 —神経成長因子の関与—
安井正佐也¹, 尾崎紀之¹, 白石洋介^{1,2}, 杉浦康夫¹
(¹名古屋大学大学院医学系研究科 機能形態学講座 機能組織学分野,
²日本伝統医療科学大学院大学 統合医療研究科)
- (27) 「特別講演」 Translational studies of musculoskeletal pain
Thomas Graven-Nielsen (Aalborg University, Center for Sensory-Motor Interaction)

【参加者名】

南 雅文 (北海道大・薬), 寺島嘉紀 (札幌医大), 矢吹 杉和秀, 吉田勝浩 (福島県立医大), 會澤重勝 (東京衛生
省司, 関口美穂, 小林義尊, 佐々木信幸, 小林 洋, 上 学園), 河野達郎 (新潟大・歯), 佐々木淳, 西川幸俊,

安東嗣修, 倉石 泰, (富大院・応用薬理), 水村和枝, 佐藤 純, 片野坂公明, 田口 徹, 堀田典生, 村瀬詩織, 松田 輝, 浦井久子, 久保亜抄子, 太田大樹, 那須輝顕, フェルナンド ケメ (名古屋大・環医研), Thomas Graven-Nielsen (Aalborg University), 田辺光男, 兒玉大介 (名古屋市立大・薬), 肥田朋子, 城由起子, 下 和弘 (名古屋学院大・医), 鈴木重行, 井上貴行, 松尾真吾, 井本晶太 (名古屋大・医), 松原貴子, 岩田全広 (日本福祉大), 仙波恵美子 (和歌山県立医大), 尾崎紀之, 林 功栄, 安井正佐也, 浦野浩子, 堀紀代美 (名古屋大・機能組織学), 小山なつ, 中江 文, 眞下 節 (滋賀医科大学), 吉村 恵, 井上和秀, 豊満笑加 (九州大・医), 川喜田健司, 神田浩里, 林 聖子, 久保恵梨香 (明治国際医療大), 柴田政彦, 岩下成人, 安澤則之 (大阪大学), 陸 景珊, 伊藤誠二,

片野泰代 (関西医科大), 樋浦明夫, 中川 弘 (徳島大・歯), 池内昌彦, 泉 仁 (高知大・医), 熊本栄一, 中塚映政, 藤田亜美, 川崎康彦 (佐賀大・医), 今井利安, 中田恵理子 (日本ケミファ株), 山本達郎 (熊本大・医), 吉田菜三夏 (武田薬品工業株), 丸山隆幸, 前川仁志 (小野薬品), 武内隆志 (持田製薬株), 野々村和彦, 奥村貴子, 大城博行, 渡邊修造 (ラクオリア創薬株), 富永真琴, 柴崎貢志, 山中章弘, 曾我部隆彰, 梅村 徹, 内田邦敏, 小松朋子, 周一鳴, Boudaka Ammar, 加塩麻紀子, 高山靖規, 川口 仁, 三原 弘, 水野秀紀, 志内哲也, 柿木隆介, 井本敬二 (生理研), 吉本隆彦, 森本温子, 大道美香, 牛田享宏 (愛知医科大・痛み), 辻田隆一 (旭化成ファーマ), 井原 賢 (基生研), 岩崎有作 (自治医大), 新庄勝浩 (生化学工業)

【概要】

痛みの中でも, 筋・骨格系の痛みと内臓の痛みは頻度が非常に高く, 臨床医学的な重要性が高い。皮膚表面痛とは異なった特徴, 例えばストレスの影響が大, 脊髄への入力系として皮膚よりも強力, 他部位への放散, 自律神経系への強い影響, などがあり, 異なる神経機構も示唆されるにもかかわらず, その実験的研究は国内外ともに極めて少なく, 疼痛研究領域のなかでも特に遅れている。そこで, 本研究会では筋・骨格系及び内臓の慢性痛の発生・維持のメカニズムについての研究を促進するため, この研究者ばかりでなく, 神経因性疼痛, 炎症痛研究者など, 幅広い痛み研究者の参加を要請して, 分子基盤を軸に領域横断的に研究成果を交流しあい, 意見・情報交換を行うことを目的とした。26 題の一般発表があり, 提案代表者と共同研究を行っているデンマークの

Graven-Nielsen 教授による筋・骨格系の痛みの translational study に関する特別講演が行われ, 筋・骨格系の痛みに対するヨーロッパでの研究の進展に驚かされた。一般演題では, イオンチャネル・トランスジューサー・末梢神経に関する演題 5 題, 脊髄における情報伝達機構に関して 4 題, グリアの役割に関する演題 2 題が発表された。筋・骨格系における痛み (6 題) については遅発性筋痛モデルや腰痛モデルにおける神経・解剖学的研究結果が報告された。また, 痛みに関わる情動の分子レベルでの解析結果も報告され, 末梢から中枢まで幅広い痛み関連の演題であふれた。筋・骨格系の痛みのいままで行われてきた皮膚表面痛や内臓痛との違いは参加者に強いインパクトを与え, その研究の必要性も参加者に広く認識される結果となった。

(1) 三叉神経因性疼痛モデルによる冷痛覚過敏の解析

浦野浩子, 尾崎紀之, 篠田雅路, 杉浦康夫

(名古屋大学大学院 医学系研究科 機能形態学講座 機能組織学分野)

【目的】三叉神経の損傷に伴う三叉神経因性疼痛は, 深刻な症状によって日常生活が障害されるが有効な治療法がなく, メカニズムの解析が急がれている。我々はこれまでに, ラット眼窩下神経の部分的な結紮により機械性ならびに熱性痛覚過敏をきたす三叉神経因性疼痛モデルを

報告してきた。本研究では本モデルにおける冷痛覚の変化を明らかにし, 亢進した冷痛覚における TRP チャネルの関与を明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】SD 系ラットの片側眼窩下神経を口腔内からアプローチし, 6-0 絹糸で半結紮した。vonFrey フィラ

メントによる機械刺激, THERMAL STIMULATOR による冷温度刺激をラット洞毛部の皮膚に加え逃避行動を観察することで機械性および冷痛覚の閾値を測定した。さらに TRP チャネルアンタゴニスト(Capsazepine)をラット洞毛部の皮下に投与し同部位皮膚の痛覚閾値の変化を観察した。

【結果】眼窩下神経の半結紮後 4 日目より冷痛覚の閾値が有意に上昇し冷痛覚過敏を示し, 結紮後 6 日目からは機

械性痛覚の閾値が有意に低下し機械性痛覚過敏を示した。亢進した冷痛覚は, TRP チャネルアンタゴニスト (Capsazepine) の局所投与によって有意に抑制された。

【結論】眼窩下神経の半結紮は顔面の機械性痛覚過敏および冷痛覚過敏をひき起こし, 三叉神経因性疼痛のモデルとして有用と思われた。本モデルにおける冷痛覚過敏には TRP チャネルの関与が考えられた。

(2) 糖尿病性神経因性疼痛を引き起こす因子の同定：低酸素/高血糖ストレスによる TRPV1 活性の増強

柴崎貢志^{1,2,3}, Violeta Ristoiu⁴, Maria-Luiza Flonta⁴, 富永真琴^{1,2,3}

(¹ 岡崎総合バイオサイエンスセンター 細胞生理, ² 生理学研究所,

³ 総合研究大学院大学・生理科学, ⁴ University of Bucharest, Romania)

カプサイシン受容体 TRPV1 は 1997 年に分子実体が初めて明らかとなった侵害刺激受容体であり, 現在までに急性疼痛, 様々な炎症性疼痛に関与することが明らかとなっている。近年, 糖尿病モデル動物で正常時に比べて TRPV1 活性が増強することが見いだされ, 糖尿病性神経因性疼痛への TRPV1 の関与が考察されている。しかしながら, 糖尿病の進行に伴って, どのような因子が TRPV1 活性の増強を引き起こし, 糖尿病性神経因性疼痛が惹起されるのかは全く不明である。我々は, 糖尿病に伴う高血糖により神経細胞に充分な量の酸素が供給されないことが, TRPV1 活性増強の引き金になるのではないかと仮説を立てた。そして, これを立証するために, ラット DRG 神経細胞を単離し, 人工的に低酸素・高血糖の条件を作製し (以下糖尿病条件と略, 4% O₂, 25 mM グルコース), 24 時間培養後に正常条件 (7% O₂, 7.4 mM グルコース) と TRPV1 活性を比較した。両群の細胞にカプサイシンあるいはプロトンを投与し, TRPV1 電流を記録したところ, 糖尿病条件群で TRPV1 電流の有意な増強を観察した。この結果は, 短期間の低酸素・高血糖ス

トレスが TRPV1 活性の増強を引き起こす主要因子であることを強く示唆している。培養細胞である HEK293 細胞に ratTRPV1 を発現させ, 同様の実験を行ったところ, この異所性発現系においても, 糖尿病条件下でカプサイシン電流の増強が認められた。我々は, TRPV1 の活性増強に PKCε による TRPV1 の Ser 残基 502/800 のリン酸化が関与することを報告している。そこで, Ser502/800 を Ala に置換した変異体を用いて実験を行ったところ, この変異体では糖尿病条件下での TRPV1 活性の増強は認められなかった。つまり, 糖尿病条件下での TRPV1 の PKCε によるリン酸化が引き起こされていることが強く示唆された。これを実証するために, Ser800 残基の TRPV1 リン酸化のみを検出する抗体を用いてウェスタンブロッティングを行ったところ, 糖尿病条件下で TRPV1 のリン酸化が増大していることを確認した。以上の結果より, 糖尿病性神経因性疼痛の発生機序として, 高血糖・低酸素状態の出現, PKCε 活性の増大, TRPV1 のリン酸化増大, 痛みの惹起というカスケードが存在すると考えられる。

(3) ラット角膜に分布する TRPV1 および IB4 陽性神経について

中川弘¹, 樋浦明夫² (¹ 徳島大学病院小児歯科, ² 徳島大学歯学部口腔解剖)

ラット角膜のアルデヒド固定全載標本で非特異的ア

セチルコリンエステラーゼ (NsAChE) に反応しない, 無染

色で確認できる神経様構造が見られる。それは何本もの線維から成る多数の束が角膜周辺部から中心部に向かって規則的に走行しながら、隣接の束の線維とつながり網目状を呈する。これらの線維が神経であるか否かを知るために、①カプサイシンに対する感受性、②カプサイシンレセター (TRPV1) の抗体とイソレクチン B4 (IB4) に対する反応性を調べた。生後2日のラットにカプサイシンを皮下投与 (50mg/kg) し、投与後15日に角膜を対照群 (溶媒のみ投与) と共に採取、固定した。無染色の角膜全載標本を作成して、比較・観察した。また、生後20日のラ

ット角膜 (両側) を麻酔下で摘出し、固定した。角膜はPBSで洗浄後、IB4-FITC (10 μ g/m) および TRPV1 (x 2000) で同時に反応させた。反応後 PBS で洗浄し、抗ウサギ IgG (Texas Red, x 400) で反応させた。ラット角膜に見られる NsAChE 法で染まらない規則的に走行する網目状の構造はカプサイシンで減少する。TRPV1 と IB4 陽性神経も同様な網目構造を示した。このことから、網目状の走行を示す線維は、カプサイシンに感受性で最小な侵害受容性の神経線維であると推測された。

(4) 神経根絞扼モデルラットにおける脊髄膠様質細胞の特性変化

寺島嘉紀¹, 田中 聡², 杉山大介², 川真田樹人² (¹札幌医科大学整形外科, ²信州大学麻酔蘇生科)

【はじめに】神経根性疼痛は腰椎椎間板ヘルニアや腰部脊柱管狭窄症などにみられる頻度の高い愁訴の一つである。特に罹病期間が長い症例において、感覚受容野を触っても感じない、触るだけで痛いというアロディニア、強い安静時痛を認める場合があり、脊髄痛覚伝達系に何らかの変化がおきている可能性が示唆される。我々は *in vivo patch clamp* 法を用いて二次ニューロンである脊髄膠様質細胞の特性変化を検討したので報告する。

【対象と方法】雄SDラット (6週齢) を使用した。神経根絞扼群 (以下、絞扼群) では右 L5 神経根を露出、8-0 nylon 糸で DRG より中枢側を tight に絞扼し、sham 群では神経根の露出のみを行った。アロディニア及び痛覚過敏反応を示している術後 10-14 日にウレタン麻酔下に脊髄膠様質細胞から *in vivo patchclamp* 記録を行い、感覚受

容野に air 刺激 (触覚刺激) と pinch 刺激 (痛覚刺激) を加え、その応答変化を記録した。

【結果】今回は電流固定法による結果のみを解析した。活動電位の発火頻度は絞扼群では sham 群と比較して有意に増加した。触覚刺激と痛覚刺激に応答する細胞の割合は変化し、絞扼群では痛覚刺激に対してのみ活動電位を発する Nociceptive type は減少し、触覚刺激、痛覚刺激に対して応答する Multi-receptive type が増加した。また刺激に全く応答しないニューロンを認めた。

【考察】神経根は絞扼することによりワーラー変性を起こし、脊髄膠様質細胞では自発発火が増大し入力様式が変化したと思われた。介在ニューロンを介して興奮は増強し、アロディニアや強い安静時痛が惹起されている可能性があると考えられた。

(5) ガラニンはラット脊髄膠様質における興奮性シナプス伝達を濃度に依存して二相に制御する

熊本栄一, 岳 海源, 藤田亜美, 中塚映政

(佐賀大学医学部生体構造機能学講座・神経生理学分野)

脊髄腔内へ投与したガラニンが濃度に依存して痛み行動を二相性に制御することはよく知られているが、その機序を細胞レベルで調べた研究は少ない。本研究では、皮膚末梢から脊髄に至る痛み伝達の制御に重要な役割を果たす脊髄後角第二層 (膠様質) ニューロンにおける興

奮性および抑制性のシナプス伝達に及ぼすガラニンの作用を調べた。実験は、成熟ラットの脊髄横断スライスの膠様質ニューロンにホールセル・パッチクランプ法を適用して行った。ガラニンは濃度に依存して異なった作用を示し、低濃度ではグルタミン酸作動性の自発性興奮性

シナプス後電流 (sEPSC) の振幅を変えずに発生頻度を増加させた一方 ($EC_{50} = 0.0029 \mu M$), 高濃度では $-70 mV$ で外向き膜電流を誘起した ($EC_{50} = 0.044 \mu M$)。これらのいずれの作用も Na^+ チャネル阻害薬であるテトロドトキシンにより影響を受けず, 前者の作用はガラニン受容体 (GalR)-2/3 作動薬 galanin2-11 により, 後者の作用は GalR-1 作動薬 M617 により特異的に見られた。この sEPSC の発生頻度増加は無 Ca^{2+} 液中や電位依存性 Ca^{2+} チャネル阻害剤 La^{3+} 存在下で見られなかった。ガラニンは GABA およびグリシンを介する自発性抑制性シナプス伝

達には作用しなかった。以上より, ガラニンは低濃度で GalR-2/3 を活性化して細胞外から細胞内への Ca^{2+} 流入量を増加させてグルタミン酸放出を促進する一方, 高濃度でシナプス後細胞の GalR-1 を活性化して膜過分極を起こすことが明らかになった。この結果は, ガラニンは低濃度で膠様質ニューロンの膜興奮性を増加させ, 高濃度で減少させることを示しており, この膜興奮性変化は, ガラニンが濃度に依存して痛み行動を二相性に制御するという行動生理学の実験結果を説明するかも知れない。

(6) 成熟ラット脊髄膠様質における PAR-1 活性化は興奮性シナプス伝達を促進する

藤田亜美, 中塚映政, 熊本栄一

(佐賀大学医学部生体構造機能学講座・神経生理学分野)

Proteinase-activated receptor (PAR) には PAR-1 から -4 までがあり, プロテアーゼによる切断によって新たに露出された N 末端が内蔵リガンドとなることで活性化される。一方, PAR-1, -2, -4 は, 内蔵リガンドに相当する合成ペプチドによってだけでも活性化される。PAR-1 や -2 は一次求心性感覚神経の末梢側で痛覚情報伝達に関与しているが, 中枢側の脊髄後角においても痛覚情報伝達に関与している可能性がある。脊髄後角, 特に第 II 層の膠様質は痛覚情報伝達の制御に重要な役割を果たしていると考えられている。今回, 膠様質ニューロンで起こるグルタミン酸作動性の自発性興奮性シナプス後電流 (sEPSC) に対して, PAR, 特に PAR-1 の活性化ペプチドがどのように作用するのかを検討した。実験は成熟雄性 SD ラットから作製した脊髄横断スライス標本の膠様質ニューロンにブラインド・ホールセル・パッチクランプ

法を適用して実施した。脊髄スライスに PAR-1 活性化ペプチドを灌流投与すると, sEPSC の振幅は変化せずに発生頻度だけが濃度依存的に増加した。この発生頻度の増加はテトロドトキシン存在下では変化しなかった一方, 無 Ca^{2+} の細胞外液中では抑制された。また, PAR-1 の内因性活性化プロテアーゼであるトロンビン灌流投与すると, ペプチドの場合と同様に sEPSC の振幅は変化せずに発生頻度のみが増加した。これらの外因性および内因性アゴニストによる興奮性シナプス伝達の促進作用は PAR-1 アンタゴニスト存在下では見られなかった。以上の結果より, 膠様質において PAR-1 活性化は細胞外液からの Ca^{2+} 流入を介したシナプス前終末からのグルタミン酸の放出を増加させ, 痛覚情報伝達を促進することが示された。

(7) デクスメデトミジン (α_2 作動薬) の脊髄後角における作用

河野達郎, 石井秀明 (新潟大学大学院医歯学総合研究科・麻酔科学分野)

【目的】デクスメデトミジンは選択性の高い α_2 アドレナリン受容体作動薬であり, 主に集中治療室における鎮静に使われている。しかし, デクスメデトミジンを硬膜外や髄腔内に投与し, 良好な鎮痛効果が得られたとする報

告もある。脊髄後角には α_2 受容体が多く存在し, 鎮痛作用に関与していることが知られている。しかし, デクスメデトミジンが脊髄後角でどのように作用し, 痛覚情報の伝達を制御しているのか明らかではない。そこで, 脊

髄後角第II層ニューロンにおけるデクスメドミジンの作用を調べた。

【方法】ラットから脊髄を切りだし、厚さ約 500 μ m の脊髄横断スライス標本を作製し、ニューロンからホールセルパッチクランプ記録を行った。

【結果】デクスメドミジンの灌流投与により、濃度依存性にほとんどのニューロンで過分極電流を誘起した。さらに、その電流は $\alpha 1$ 受容体拮抗薬で抑制されず、 $\alpha 2$ 受

容体拮抗薬で抑制されたことから $\alpha 2$ 受容体を介したものであることがわかった。また、電流の逆転電位は K^+ チャネルの平衡電位に近似していた。加えて、電極内液に G タンパク質阻害薬を加えると膜電流は誘起されなかった。これらの結果から、デクスメドミジンは $\alpha 2$ 受容体に作用し、G タンパク質を介した K^+ チャネルの開口によってニューロンの過分極を引き起こし脊髄後角でシナプス伝達を抑制すると考えられる。

(8) パッチクランプ法を用いた脊髄電気刺激による鎮痛機構の解明

中塚映政, 谷口 亘, 藤田亜美, 熊本栄一 (佐賀大学医学部生体構造機能学講座)

鎮痛薬や神経ブロック治療に対して抵抗性の難治性慢性疼痛に対して脊髄電気刺激による鎮痛法が臨床応用されているが、その鎮痛機構は未だ不明である。今回、我々は後根付き成熟ラット脊髄横断薄切片の膠様質ニューロンにパッチクランプ法を適用して、脊髄電気刺激による鎮痛機構を検討した。後根の反復性電気刺激により膠様質ニューロンに緩徐なシナプス応答は観察されなかったが、脊髄後角を局所的に反復性電気刺激すると約 30% の膠様質ニューロンにおいて緩徐な抑制性シナプス後電流 (slow IPSC) が発生した。この slow IPSC の振幅は刺激回数依存的に増大し、灌流液から Ca を除去することによって有意に減少した。また、slow IPSC の振幅は K チャネル阻害剤あるいは細胞膜 G タンパク質阻害剤の存在下では有意に減少し、GIRK チャネル阻害剤によって

有意に抑制された。さらに、slow IPSC の振幅はアデノシン受容体やオピオイド受容体阻害剤など様々な受容体阻害剤によって影響を受けなかったが、ソマトスタチン受容体阻害剤によって有意に抑制された。興味深いことに、ソマトスタチンの灌流投与によって外向電流が発生している間、slow IPSC の振幅は有意に減少した。以上の結果より、脊髄電気刺激によって脊髄介在ニューロンあるいは下行性抑制性神経線維終末から遊離される内因性のソマトスタチンによってソマトスタチン受容体が活性化する。その結果、細胞内 G 蛋白質を介して GIRK チャネルが活性化することによって膠様質ニューロンの膜が過分極することが明らかとなった。したがって、本機序が脊髄電気刺激による鎮痛機構に関与することが推察された。

(9) ラット腹膜切開モデルによる術後痛の検討

杉山大介, 田中 聡, 川真田樹人 (信州大学麻酔蘇生学講座)

【背景】整形外科手術などに比べて、開腹術後は疼痛が強いことが知られている。その機序として、腹膜や内臓への外科的侵襲が挙げられるが、詳細は不明である。そこで今回、腹膜切開による脊髄後角ニューロンの機能変化を検討し、開腹術後の疼痛の機序を検討した。

【方法】ウレタン麻酔下の雄性 SD ラット (180-300g) を用い、側腹部に受容野を有する胸部脊髄後角 wide dynamic range (WDR) ニューロンの単一活動電位を細胞外記録に

より導出し、自発活動と von Frey filament 刺激に応答する閾値を計測した。次いで、受容野中心を皮膚～腹膜までの切開や (以下、P 群)、あるいは皮膚・筋肉までの切開を加え (以下、S 群)、切開 2 時間後までニューロンの活動を記録した。

【結果】P 群では切開後、自発活動が次第に増加した。S 群では、自発活動は切開後、速やかに切開前値にまで低下し、有意な増加を認めなかった。一方、両群とも、切

開後 von-Frey filaments 応答する閾値が明らかに低下した。

【結論】開腹術後の自発痛は、腹膜に外科的侵襲がおよぶために増強することが示唆された。

(10) 骨格筋、および皮膚侵害受容器活動の加齢による変化

田口 徹, 松田 輝, 村瀬詩織, 太田大樹, 水村和枝
(名古屋大学環境医学研究所神経系分野Ⅱ)

これまでに、疼痛行動や痛覚系の加齢による変化はヒトやげっ歯類において数多く報告されているが、末梢侵害受容器の加齢による変化を体系的に調べた研究はない。本研究では、若齢 (10-14 w) および老齢ラット (125-133 w) から長指伸筋-総腓骨神経、および皮膚-伏在神経の取出し標本を作成し、骨格筋および皮膚 C 線維受容器 (伝導速度 1.6 m/s 以下) の機械, 化学, 温度 (冷・熱) 刺激に対する反応を単一神経記録法により記録し、加齢による影響を調べた。記録した骨格筋および皮膚 C 線維受容器の一般的な特徴 (伝導速度, 受容野の分布, 自発放電) には、若齢と老齢ラットの 2 群間で有意差がみられなかった。加齢ラットの骨格筋 C 線維受容器は、若齢ラットに比べ、機械刺激に対する反応閾値が有意に低下し (85 ± 8 mN (若齢群, $n = 33$) vs. 55 ± 5 mN (老齢群, $n = 29$), $p < 0.01$, Mann-Whitney U-test), 反応の大きさ

が増大する傾向を示した。しかし、行動レベルではランドル・セリットテストにより測定した筋機械逃避閾値に群間差はなかった。このことは、骨格筋 C 線維の機械反応の増大は逃避行動を変化させるのに十分な程度ではなかったか、あるいは逃避行動に必要な脊髄や運動ニューロンの加齢による変化 (鈍化) により、行動レベルに反映されなかったのか、疑問が残るところである。一方、加齢ラットの皮膚 C 線維受容器では、侵害熱刺激に対する反応の大きさが、若齢ラット群に比べて有意に減弱した (0.54 ± 0.13 imp/s (若齢群, $n = 25$) vs. 0.18 ± 0.07 imp/s (老齢群, $n = 25$), $p < 0.01$, Mann-Whitney U-test)。このことは、侵害熱刺激に対する逃避潜時が老齢マウスで延長し、伏在神経に含有される TRPV1 チャネルタンパク量が減少するという報告 (Wang et al. Neurobiol Aging. 27:895-903, 2006) とよく一致すると考えられた。

(11) 筋 C 線維受容器の ATP による機械反応抑制と酸に対する反応の増強

松田 輝, 田口 徹, 水村和枝 (名古屋大学環境医学研究所神経系分野Ⅱ)

【目的】ATP の皮下投与によって皮膚では痛みと熱・機械刺激に対する痛覚過敏を誘発することが知られている。加えて炎症や運動による細胞間質の pH の減少は痛みの原因のひとつであると考えられている。そこで、ATP と酸が筋の侵害受容器にどのような影響を及ぼすかを調べた。

【方法】10~13 週齢の雄性 SD ラットを用い、ペントバルビタール麻酔下で長指伸筋-総腓骨神経標本を取り出し、in vitro で C 線維の単一神経記録を行った。機械刺激 (10 秒間で 0~196 mN の鋸歯状刺激) を、10 分間隔で 4 回行い、反応閾値, 放電数を測定した。ATP1 μ M, 1mM あるいは Krebs 液 (コントロール) を 2 回目の機械刺激の 5

分前から投与した。その後、異なった pH (7.4, 7.0, 6.6, 6.2) 溶液を 30 秒間投与した。

【結果】ATP1mM 投与によって excitation を起こしたものは記録した筋 C 線維の約半数 (9/16) であった。コントロール群では機械刺激に対する反応は刺激を繰り返しても変化しなかったが、ATP1 μ M 投与は投与後の機械閾値を有意に上昇させ、放電数を有意に減少させた。ATP1 μ M 投与でも似た結果を示した。コントロール群では異なった pH 溶液に対しては放電数が多少増大する C 線維があったものの、記録した全線維の平均では放電数の有意な増加とはならなかった。ATP1mM 群では pH6.2 溶液に対する放電数が有意に上昇した。多くの C 線維受容器は、

熱, 発痛物質に反応するポリモーダル受容器であった。
【考察】ATP による抑制効果は以前の報告とは異なっている。しかし, ATP 受容体には Gi 共役型の P2Y₁₃, 14 がある。これらの受容体が関係しているかは今調べてい

るところである。ATP による酸に対する反応性の遅延性感作のメカニズムはまだわかっていないが今後, 調べる予定である。

(12) ラット持続性筋痛モデルにおける神経成長因子の関与

林 功栄, 尾崎紀之, 杉浦康夫 (名古屋大学大学院医学系研究科機能形態学講座・機能組織学分野)

【目的】持続性筋痛と筋硬結の触知, トリガーポイント痛が特徴である筋・筋膜性疼痛症候 (MPS) は罹患者も多く重要な病態であるが, 発症メカニズムの詳細は不明である。そこで今回, 伸張性収縮運動 (ECC) を用いて MPS の病態に近い持続性筋痛モデルを作成し, 筋の組織学的検索と痛覚亢進における神経成長因子 (NGF) の関与を調べた。

【材料と方法】ラット腓腹筋に ECC を 2 週間連続して負荷し, 筋の圧痛閾値, 筋硬結の出現及び筋硬度を計測した。HE 染色と Gomori 染色で筋の組織学的観察を行ない, 正常, 再生及び変性細胞数を計測した。筋における NGF 発現を免疫組織染色法及び ELISA 法を用いて評価し, NGF 受容体阻害薬である K252a を筋内投与し圧痛閾

値の変化を調べた。

【結果】圧痛閾値は ECC 開始翌日より有意に低下し, ECC 期間中持続した。ECC 開始後 3~8 日目に筋硬結が出現し, 硬結部は有意に高い硬度を示した。ECC 群の筋には再生及び変性細胞が有意に多く, 再生筋細胞部には NGF が発現し, NGF 蛋白量の増加も見られた。ECC により低下した圧痛閾値は K252a の筋内投与により有意に回復した。

【結論】ECC の繰り返しにより筋硬結を伴う持続性筋痛モデルを作成できた。本モデルにおける圧痛閾値低下には NGF 及びその受容体の関与が考えられ, これらは MPS 発症メカニズムにおいても重要と思われる。

(13) 遅発性筋肉痛(Delayed-onset Muscle Soreness: DOMS)の脳機能画像 —fMRI による検討—

柴田政彦¹, 松田陽一², 住谷昌彦³, 植松弘進², 大城宜哲⁴, 小山哲男⁵, 真下 節¹

(¹ 大阪大学大学院医学系研究科疼痛医学講座,

² 大阪大学大学院医学系研究科生体統御医学麻酔・集中治療医学講,

³ 東京大学医学部附属病院麻酔科, ⁴ 仁寿会石川病院リハビリテーション科,

⁵ 西宮協立脳神経外科病院リハビリテーション科)

【目的】臨床的には動きに伴って痛みを生ずることが多いが, その脳活動についてはほとんど知られていない。本研究では, ヒト DOMS モデルを作製し, 脳内の活動部位を fMRI で調べた。

【対象】健康成人 12 名 (男性 9, 女性 3)。

【方法】非利き手の上腕二頭筋に DOMS を作製, 求心性収縮時の最大筋力を測定しそれを 100%とした負荷で遠心性収縮運動を行わせた。痛みの評価は VAS, SF-MPQ

を用いた。2 日後に, 肘関節屈伸運動を fMRI 装置内で 0.5Hz, 30 秒間行うのを 1 タスクとし, 3 タスク行わせ撮像した。1 ヶ月以上あけて DOMS の消失した状態で同様のタスクを行った。SPM2 を用い random effect analysis にて DOMS 時, 筋痛消失時の脳活動を解析後, その差をとることにより運動時痛によって活動する脳局在を調べた。

【結果】肘の屈曲進展運動に伴う脳活動部位は DOMS

時、非 DOMS 時ともに対側一次運動野、中帯状回、両側二次体性感覚野、両側視床などであった。DOMS 時と非 DOMS 時の活動部位の差異は対側大脳皮質一次感覚野に見られた。(uncorrected paired test $p < 0.005$)

【考察】運動時痛のある際には対側の一次運動野がより活

動したが、その機序として痛みのある際には同じ動きを行うのに一次運動野のより大きな活動を必要とした可能性と運動時痛を一次運動野で encode した可能性とが考えられる。

(14) 繰り返し寒冷ストレスモデルにおける運動時の筋血流増加の変化

那須輝顕, 堀田典生, 水村和枝 (名古屋大学環境医学研究所神経系分野 II)

慢性筋痛を持った患者は多いが、その神経機構は不明な点が多い。繰り返し寒冷ストレス (RCS) は全身性の持続性の痛覚過敏や全身の循環系の変化などを生じ、線維筋痛症のモデルとして使われている。一方、線維筋痛患者では休息時の血流は健常者と変わらないが運動時の活動筋の血流増大が障害されているという報告がある。また慢性筋痛の圧痛症状には筋虚血の関与が示唆されているが、実験根拠に乏しい。そこで我々は蛍光マイクロスフェア法を用いて、RCS が安静時の局所血流と運動中の血流増大に与える影響をコントロール (CTR 群), RCS 暴露後 1 週間後 (1w 群), 最も痛覚過敏が増悪する RCS 暴露後 2 週間後 (2w 群) の 3 群で調べた。局所血流の安静時値は RCS 暴露の影響を受けなかった。下腿伸筋群の等

張性収縮運動 (SHC) によって RCS 無負荷の CTR 群の長指伸筋血流は有意に増加したのに対し、前脛骨筋血流には有意な増加は見られなかった。また非運動筋 (腓腹筋、ヒラメ筋) 血流は SHC の影響を受けなかった。一方、1w 群では運動によって長指伸筋血流は軽度増大したが有意ではなく、前脛骨筋の血流量は有意に増大した。2w 群では運動によって長指伸筋、前脛骨筋ともに血流量が有意に増大した。RCS 後の非運動筋の運動時血流量は減少傾向を示した。RCS 暴露後、運動時の血流増大反応が運動筋の中でも異なったことは、RCS によって運動時の局所血流分布が変化した可能性を示唆する。また RCS 暴露群における SHC 時の非運動筋の局所血流減少傾向は、筋血管に対する交感神経出力の亢進の可能性を示唆する。

(15) 痛みによる不快情動生成における分界条床核内コルチコトロピン放出因子の役割

大野篤志¹, 出山諭司^{1,2}, 片山貴博¹, 山口 拓³, 吉岡充弘³, 南 雅文¹

(¹北海道大学大学院 薬学研究科 薬理, ²京都大学大学院 薬学研究科 生体機能解析,

³北海道大学医学研究科 神経薬理)

「痛み」は痛いという感覚的成分と、不安、恐怖、嫌悪といった情動的成分よりなるが、情動的成分を担う物質的基盤に関する研究は未だ緒についたばかりである。我々はこれまでに、腹側分界条床核 (vBNST) における β アドレナリン受容体を介したノルアドレナリン神経情報伝達亢進が、痛みによる不快情動生成に重要であることを示唆する結果を報告している。本研究では、背外側分界条床核 (dlBNST) においてコルチコトロピン放出因子 (CRF) 含有神経の投射が多く存在することに着目し、dlBNST 内 CRF 神経情報伝達が痛みによる不快情動生成

に関与するか否かについて検討した。実験には雄性 SD 系ラットを用い、条件付け場所嫌悪性 (CPA) 試験により不快情動生成の評価を行った。CRF 受容体拮抗薬 α -helical CRF の dlBNST 内局所投与により、ホルマリン後肢足底内投与により惹起される CPA が用量依存的に減弱した。また、CRF 受容体を介した細胞内情報伝達の下流には protein kinase A (PKA) が存在するが、PKA 阻害薬 Rp-cAMPS の dlBNST 内局所投与によっても、CPA が有意に減弱した。さらに dlBNST 内 CRF 局所投与による条件付けを行った結果、CPA が有意に惹起された。以上

の結果から、dlBNST 内 CRF 情報伝達の亢進が痛みによる不快情動生成に重要な役割を担っていることが示唆された。

(16) 神経因性疼痛モデルマウスにおける海馬CA1領域でのグリシン取り込みの増加とシナプス長期増強現象への影響

兒玉大介, 小野秀樹, 田辺光男 (名古屋市立大学大学院 薬学研究科 中枢神経機能薬理)

慢性痛患者では痛みに加えて不安, うつ, 睡眠障害, 認知障害など様々な症状が現れることが知られている。我々はこれまでに坐骨神経の部分結紮によって作製する神経因性疼痛モデルマウス (Seltzer モデル) および sham 手術を施したマウスから海馬スライス標本を作製し, CA1 領域におけるシナプス伝達長期増強現象 (LTP) を記録した結果, Seltzer モデル群では sham 手術群に比べて LTP 強度の減弱が見られる事を報告した。また選択的グリシントランスポーター1 (GlyT1) 阻害薬 [3-(4'-fluorophenyl)-3-(4'-phenylphenylphenoxy) propyl]sarcosine (NFPS) の存在下では, Seltzer モデル群でも sham 手術群と同程度に LTP が維持されることを示した。今回はこの LTP の減弱についての詳細なメカニズムを検討するため, CA1 領域錐体細胞からホールセルパッチクランプ記録を行い,

NMDA 受容体を介した興奮性シナプス後電流 (NMDA-EPSCs) に対してグリシンや GlyT1 阻害薬 NFPS が与える影響を調べた。灌流適用したグリシンによる NMDA-EPSCs の増強作用は, Seltzer モデル群において sham 手術群に比べて低下していた。これに対し, NFPS の適用により増加した内因性グリシンによる NMDA-EPSCs 増強作用は Seltzer モデル群で強く現れた。また, fluoroacetate によりグリア細胞の代謝を阻害したスライス標本では, グリシンによる NMDA-EPSCs 増強作用に Seltzer モデル群と sham 手術群との間の差は見られなくなった。これらの結果は Seltzer モデルではグリア細胞に存在する GlyT1 によるグリシンの取り込みが増加している事を示唆しており, それが LTP の減弱につながる可能性が考えられる。

(17) GPR103 の内因性作動物質である26RFa 脳室内投与の効果

山本達郎, 宮崎里佳 (熊本大学大学院医学薬学研究部 生体機能制御学)

GPR103 は orexin, neuropeptide FF と相同性の高い G 蛋白共役型受容体である。その内因性作動物質として 26RFa, QRFP が知られている。26RFa は NPY Y1 受容体, NPFF2 受容体にも作用することが示されている。GPR103 は脊髄後角に強く発現しており, 髄腔内へ 26RFa を投与すると鎮痛効果があることが報告されている。さらに上位中枢では, 痛み刺激伝達に関係していることが知られている parafascicular thalamic nucleus, locus coeruleus, dorsal raphe nucleus, parabrachial nucleus に GPR103 が発現していることが報告されている。従って, 26RFa は上位中枢でも痛み刺激伝達に関与している可能性が示唆される。本研究では 26RFa をラット脳室内へ投与し, ホットプレートテスト, ホルマリンテストにおける鎮痛効果

を検討したので報告する。鎮痛効果検討の3日前に側脳室へカニュラを留置し, 薬物投与はカニュラを介して行った。52.5℃のホットプレートテストは, 飛び上がるか後肢をなめる行動を起こすまでの潜時を測定することにより評価した。ホルマリンテストは, 5%ホルマリンをラット後肢に皮下注射し, 足を振り回す行動の回数を測定することにより評価した。26RFa は, 投与量依存性にホルマリンテストでは鎮痛効果を示したが, ホットプレートテストでは鎮痛効果がなかった。26RFa の効果は, NPY Y1 受容体・NPFF2 受容体の拮抗薬である BIBP3226 により拮抗されなかった。さらに NPY, NPFF 脳室内投与によりホルマリンテストでの鎮痛効果は見られなかった。今回の結果から, 脳室内 26RFa 投与により鎮痛効果が確

認められ、この効果は GPR103 を介する可能性が高いことが示された。

(18) 難治性疼痛における一酸化窒素(NO)標的分子の解析

陸 景珊, 片野泰代, 伊藤誠二 (関西医科大学医化学講座)

【目的】我々は疼痛動物モデルを用いて、NMDA グルタミン酸受容体とその下流に位置する神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) の活性化が慢性痛の発生・維持に重要であることを明らかにしてきた。NO は cGMP/プロテインキナーゼ G 系を介するリン酸化による中枢作用を示すことがよく知られるが、リン酸化に加えて、最近、タンパクの Cys 残基のニトロシル化 (S-NO) が着目されている。痛覚伝達における脊髄後角での S-NO 化による機能調節の解明を目的とし、S-NO 化ターゲット分子を同定、機能解析を検討し、以下の知見を得た。

【結果および考察】マウス脊髄画分 (可溶性/不溶性) を *in vitro* で NO 放出剤 SNAP を用い S-NO 化した。S-NO 化タンパクの検出には、ビオチン-スイッチ法 (Nat. Cell Biol. 3:193-197, 2001) を用いた。複数の分子が、SNAP の

濃度依存的に S-NO 化され、また可溶性画分においてより S-NO 化が促進した。S-NO 化タンパクを pull down 精製し、その一つを、抗アクチン抗体を用いた western blot にてアクチンと同定した。また、精製アクチンは、SNAP 処理にて SNAP の濃度と反応時間に依存して S-NO 化した。さらに、アクチン S-NO 化は、ホルマリン注射による炎症性疼痛モデルの脊髄後角からも検出された。次にアクチンの S-NO 化による機能調節を明らかにするため、PC12 細胞を用いて神経伝達物質ドーパミン (DA) 遊離を HPLC にて測定した。その結果、SNAP は PC12 細胞からの自発的、および PACAP 刺激による DA 遊離を有意に抑制した。本解析は、痛覚伝達における脊髄後角での NO の新しい作用機序として、アクチン S-NO 化の関与を示唆するものである。

(19) 抗癌薬オキサリプラチン誘発疼痛のマウスモデルにおける一次求心線維の自発神経活動の増加

安東嗣修¹, プナムガウチャン¹, 大森 優¹, 加藤 敦², 佐々木淳¹, 倉石 泰¹
(富山大学大学院医学薬学研究部 ¹応用薬理学, ²付属病院薬剤部)

オキサリプラチンは、抗癌薬として用いられる白金製剤で、投与した患者のほぼ全例に末梢神経障害を誘発することが報告されている。末梢神経障害の発症機序は不明な点が多く、有効な治療法は確立されていないのが現状である。本研究では、オキサリプラチンをマウスに投与し、アロディニアと腓腹神経の活動への影響について検討した。実験には、雄性 C57BL/6 マウス (実験開始時 6 週令) を用いた。オキサリプラチンは、ヒトの臨床用量に相当する用量 (3mg/kg) を単回腹腔内注射した。von Frey 線維 (0.68 mN) の刺激に対する機械的アロディニア

が、投与後 3 日目には観察され、10 日目が最大となり、21 日目にはほぼ消失した。また、オキサリプラチン投与後 10 日目に、後肢の舐め動作時間 (自発的疼痛動作) が増加し、腓腹神経の自発発火と機械刺激 (刷毛によるブラッシング, 圧刺激, 0.68 および 9.8mN の強さの von Frey 線維) に対する誘発発火が有意に増加した。以上の結果より、オキサリプラチン誘発の神経障害性疼痛に、機械刺激感受性一次求心線維の自発神経活動と感受性の増加が少なくとも一部関与することが示唆される。

(20) ラット脊髄坐減モデルの疼痛行動とセロトニン2C 受容体 RNA 編集の関与

中江 文, 柴田政彦, 萩平 哲, 高階雅紀, 真下 節

(大阪大学大学院医学系研究科 生体統御医学 麻酔・集中治療医学講座, 同 疼痛医学寄附講座)

【背景】RNA 編集とは mRNA の塩基配列を変えることにより, 翻訳されるたんぱく質に変化をもたらす現象のことである。セロトニン 2C 受容体の RNA 編集は, 第2膜貫通部位でおこるため, 受容体機能に影響を及ぼすことで知られている。セロトニンを神経伝達物質とする系は脊髄において下行性抑制系に働くことで知られている。我々は脊髄坐減モデルにおいて, セロトニン 2C 受容体の RNA 編集がもたらす影響を調べた。

【実験方法と結果】6週令のオスのSDラットを用いた。障害は10gの錘を5cmの高さから落とすことにより行った。術後2週間で疼痛行動を評価するとモデルサンプルにおいて有意な疼痛閾値の低下が認められた。その後脊髄のサンプルを障害部位周囲1cm, その頭側1cm, その尾側1cmに分けて取り出し, セロトニン 2C 受容体の発

現量とセロトニン 2C 受容体の RNA 編集の解析を行った。その結果, セロトニン 2C 受容体の発現は障害部位より尾側で低下していた。RNA 編集の解析において, 受容体機能高いタイプのサブタイプが障害部位とその尾側のサンプルで増え, 低いサブタイプの減少が障害部位で認められた。

【考察】セロトニン 2C 受容体の RNA 編集は疼痛刺激に対しセロトニン伝達を有利な方向に誘導している可能性が考えられた。

【結語】脊髄坐減モデルに対し, セロトニン 2C 受容体の発現量と, RNA 編集の分析を行った。RNA 編集による受容体機能の変化が神経因性疼痛の病態に関与する可能性が示唆された。

(21) マウス帯状疱疹痛と帯状疱疹後神経痛の動的触アロディニアにおける P2X₇ 受容体の関与

佐々木淳, 北見紀明, 金山翔治, 倉石 泰 (富山大学大学院医学薬学研究部 (薬学), 応用薬理学)

近年, 炎症性疼痛および神経障害性疼痛の発現における ATP 受容体サブタイプの役割が注目されている。P2X₇ 受容体もそのひとつであるが, *in vivo* での詳細な研究はなされていない。そこで本研究では, 帯状疱疹痛と帯状疱疹後神経痛のマウスモデルを用いて, 動的触アロディニアの発現における P2X₇ 受容体の関与を検討した。選択的 P2X₇ 受容体拮抗薬 Brilliant Blue G (100 mg/kg) の腹腔内投与は, 帯状疱疹痛と帯状疱疹後神経痛の両時期において動的触アロディニアを抑制した。帯状疱疹痛と帯状疱疹後神経痛の両時期の脊髄において, P2X₇ 受容体 mRNA の有意な発現増加が生じた。脊髄後角の P2X₇ 受容体の免疫活性は, NeuN 陽性ニューロンおよび glial fibrillary acidic protein 陽性の活性化アストロサイトで観察されたが, CD68 陽性の活性化ミクログリアでは観察されなかった。また, 坐骨神経部分結紮処置によっても

脊髄で P2X₇ 受容体 mRNA の有意な発現増加が生じたことから, 末梢神経の損傷が P2X₇ 受容体の発現増加の引き金となっている可能性が考えられる。一次感覚ニューロンの損傷を示唆する遺伝子発現変化として, activating transcription factor 3 (ATF3) mRNA の発現増加および核におけるそのタンパク質の発現誘導が報告されている。帯状疱疹痛マウスの後根神経節においても, ATF3 mRNA の発現増加およびそのタンパク質発現が生じ, これらの変化は P2X₇ 受容体 mRNA 発現増加に先行して生じた。したがって, 一次感覚神経の損傷が P2X₇ 受容体発現増加に寄与することが示唆される。以上の結果から, 活性化アストロサイトおよび脊髄後角ニューロンに発現する P2X₇ 受容体が, 帯状疱疹痛と帯状疱疹後神経痛の動的触アロディニアの発現に関与することが示唆される。

(22) 神経因性疼痛発症に関与するミクログリア P2X₄ 受容体発現増加のメカニズム解明

豊満笑加, 津田 誠, 齊藤秀俊, 井上和秀 (九州大学大学院薬学研究院薬理学分野)

脊髄後角の活性化ミクログリアにおける ATP 受容体サブタイプ P2X₄ 受容体 (P2X₄R) の発現増加は神経因性疼痛の発症維持に非常に重要である。これまでに我々は、細胞外マトリックス分子の一つであるフィブロネクチン (FN) とその下流に存在する非受容体型チロシンキナーゼである Lyn がミクログリアにおける P2X₄R の発現増加に深く関わっていることを報告してきた。しかし、その細胞内分子メカニズムは依然として不明である。そこで本研究では、FN による P2X₄R 発現増加に関与する細胞内シグナル伝達経路の解明を目的に実験を行った。初代培養ミクログリア細胞を FN で刺激することにより、PI3K および ERK が活性化され、FN による P2X₄R タンパク質の増加は PI3K 阻害剤 LY294002 と MEK 阻害剤 U0126 により抑制された。興味深いことに、FN による P2X₄R

mRNA の発現増加は LY294002 により抑制されたが、U0126 では抑制されなかった。FN 刺激で活性化した PI3K は Akt の活性化を介して転写因子である p53 の発現レベルを低下させ、また p53 阻害剤を単独処置することで P2X₄R mRNA およびタンパク質の発現が共に増加した。一方で、FN 処置により翻訳開始因子である eIF4E の活性化が起こり、その活性化は U0126 では抑制されたが、LY294002 では抑制されなかった。また、eIF4E を阻害することにより FN の P2X₄R タンパク質の発現増加は抑制された。以上の結果は、FN が PI3K-Akt 経路依存的な p53 の抑制を介して P2X₄R 遺伝子発現を増加すること、および、MEK-ERK 経路依存的に P2X₄R タンパク質の翻訳を制御していることを示唆している。

(23) メダカに対するメントールの効果：冷侵害受容器を介する異常遊泳行動と GABA_A レセプターを介する麻酔作用

笠井聖仙 (鹿児島大学理学部生命化学科)

ヒトで低濃度のメントールもしくは icilin で冷感が起こり、高濃度のメントールでは痛みが引き起こされることはよく知られている。魚類に対するメントールの効果を調べた実験はなく、発表者はメダカに対するメントールの効果を調べる実験において、メントールが麻酔効果 (外科的麻酔) および激しい動き (異常遊泳行動) を引き起こすことを見出した。今回はこれら麻酔効果および異常遊泳行動を引き起こす濃度閾値を調べ、さらにどのような受容体を介して起こるのかについて検討した。メントールの効果はメダカをメントール水に全身暴露することで調べた。0.33 mM メントール (dl-menthol) では麻酔効果 (外科的麻酔) は見られなかったが、0.5 mM で 60% に麻酔効果がみられ、0.83 mM, 1.7 mM, 3.3 mM では全てのメダカに麻酔効果が観察され、その反応の潜時は容量依存

的に短くなった。この麻酔効果は Icilin (TRPM8 receptors agonist) および Allyl isothiocyanate (TRPA1 receptors agonist) のいずれの薬物でも誘起されなかった。GABA は麻酔効果を及ぼし、かつ GABA_A レセプターの特異的阻害剤である SR-95531 の前処置でメントールによる麻酔効果は減弱した。3.3 mM のメントールでは、異常遊泳行動のあと麻酔効果がみられた。異常行動は Allyl isothiocyanate 暴露により観察され、Icilin ではこの行動を示さなかった。これらの結果はメントールによる全身麻酔効果は少なくとも一部は GABA_A レセプターを介し、TRPM8-, TRPA1- レセプターを介さないこと、異常遊泳行動は TRPA1 レセプターを介することを示している。さらに、魚類に冷侵害受容が存在する可能性を示唆している。

(24) 腰椎椎間板ヘルニアにおけるセロトニンと TNF- α の相互作用

小林 洋, 関口美穂, 加藤欽志, 菊地臣一, 紺野慎一 (福島県立医科大学整形外科学講座)

【背景】セロトニンと TNF- α は、腰椎椎間板ヘルニアにおける神経炎症に関与する化学的因子である。しかし、両者の相互作用については不明である。

【方法】SD 系雌ラットを用い実験系を、対照群 (生理食塩水)、セロトニン群 (30 μ g)、TNF- α 群 (0.5ng)、混合投与群 (セロトニン+TNF- α)、および髄核留置群 (尾椎髄核) の5群に設定した。各物質を左第5腰部神経根の後根神経節 (DRG) 上に 100 μ l 投与した。機械的疼痛閾値の測定と左 L5DRG での神経細胞障害マーカーである ATF3 の発現を計測した。さらに、セロトニンの代謝産物である 5HIAA、TNF- α 、5HT2A 受容体、および TNFR1 受容体の発現を定量した。

【結果】機械的疼痛閾値は、セロトニン群と TNF- α 群では術後7日目まで、混合投与群では術後21日まで、髄核留置群では術後28日目まで、対照群と比較して有意に低

下していた。ATF3 陽性率は、セロトニン群と TNF- α 群では術後2日目まで、髄核留置群では術後7日まで、対照群に比べて有意に増加していた。Western blotting では、セロトニン群と NP 群における TNF- α の増加と、TNF- α 群と NP 群における 5HT2A 受容体の発現の増加が認められた。一方、TNFR1 の発現の増加はいずれの群でも認められなかった。5-HIAA の増加は NP 群でのみ認められた。【考察】外因性のセロトニンと TNF- α は、各々単独で神経細胞障害と疼痛閾値の低下を引き起こした。また、セロトニンは TNF- α を誘導し、TNF- α は 5HT2A 受容体発現を増加させるという相互作用が認められた。これらの結果から、両者は腰椎椎間板ヘルニアにおいて同時に存在することにより、疼痛閾値の低下をより長く持続させると考えられた。

(25) 関節炎性疼痛モデルにおける ASIC3 の関与

池内昌彦¹, Sluka KA² (¹高知大学医学部整形外科, ²アイオワ大学)

関節炎症状は、ときに炎症部位の疼痛にとどまらず、関節から離れた部位の疼痛 (関連痛) や痛覚過敏 (二次痛覚過敏) を伴う。われわれは筋骨格系疼痛における酸感受性イオンチャンネル ASIC3 の役割に注目しており、今回ノックアウトマウスを用いて ASIC3 と関節炎性疼痛の関係を検討した。マウス膝関節にカラゲナン関節炎を作り、tweezer による膝関節刺激と von Frey フィラメントによる足底刺激の2種類の機械的刺激に対する行動学的疼痛評価を行った。ベースラインにおいて各刺激に対する疼痛閾値は、ノックアウトと野生型マウスの間に差を認めなかった。関節炎惹起後、野生型マウスでは膝・

足底いずれの刺激に対しても疼痛閾値は低下したが、ノックアウトマウスでは足底における疼痛閾値の変化を認めなかった (二次痛覚過敏の欠如)。野生型マウスにおいて DRG 細胞の ASIC3 発現率を免疫組織学的に検討した結果、関節炎惹起後に ASIC3-ir ニューロンの数が約 50% 増しになっており、増加したニューロンの多くは CGRP と共存していた。ASIC3 は、関節炎性疼痛のうち炎症部位を離れた部位の疼痛閾値の低下 (二次痛覚過敏の発生) に関与しており、関節炎惹起後にみられる ASIC3 のアップレギュレーションが二次痛覚過敏を発生させる一因であることが示唆された。

(26) 骨損傷時の圧痛メカニズムの解析 ―神経成長因子の関与―

安井正佐也¹, 尾崎紀之¹, 白石洋介^{1,2}, 杉浦康夫¹(¹名古屋大学大学院医学系研究科 機能形態学講座, ²日本伝統医療科学大学院大学 統合医療研究科)

【目的】骨損傷時の圧痛メカニズムを解明するため、骨損傷モデルにおける損傷部の圧痛と神経分布の変化を観察し、神経成長因子 (NGF) とそのレセプターである TrkA の阻害薬が及ぼす痛覚の変化を観察する。

【方法】ラットの脛骨に、1) 皮膚、骨膜を切開しドリルで骨孔を開けた骨損傷群、2) 皮膚、骨膜切開を行った骨膜切開群、3) 皮膚切開のみ行った皮膚切開群、の3群を作製し、損傷部の機械刺激に対する逃避行動を観察した。また、治癒経過を HE 染色にて観察し、免疫組織化学的に標識した神経線維の長さを計測した。さらに anti-NGF と K252a (TrkA 阻害薬) を損傷部へ投与し痛覚の変化を観察した。

【結果】骨損傷群で 28 日間、骨膜切開群で 21 日間、皮膚

切開群で 5 日間、機械性痛覚過敏が観察された。骨損傷群で 28 日間、骨膜切開群で 21 日間、内軟骨性骨化が観察された。骨損傷群の損傷後 28 日目の仮骨及び骨膜に CGRP, TH, GAP43 陽性神経線維が著しく増加していたが、骨膜切開群では変化がなかった。anti-NGF および K252a は骨損傷群 7 日目および 28 日目の機械性痛覚過敏を抑制した。

【結論】脛骨に骨孔を作製する骨損傷モデルは、骨損傷および治癒経過における痛みのメカニズムの解析に有用と思われた。骨損傷時の痛みには、骨の治癒過程と、神経線維の発芽が関与しており、NGF-TrkA を介する知覚神経の感作が示唆された。

(27) 「特別講演」 Translational studies of musculoskeletal pain

Thomas Graven-Nielsen (Aalborg University, Center for Sensory-Motor Interaction)

Chronic pain conditions are today recognised as an independent healthcare problem. Between 12-17% of the world's population suffers from chronic pain. Especially musculoskeletal pain has a great socio-economic impact. Unfortunately chronic pain responds often inadequately to current treatment modalities and a better understanding of muscle pain mechanisms are crucial. Muscle pain is typically accompanied by a variety of characteristics such as referred pain to distant somatic structures and muscle hyperalgesia. Studies in animals or healthy volunteers can not be translated directly into the clinical application and act as proxies for clinical conditions but they can provide mechanistic knowledge providing better fundamental understanding of clinical signs and symptoms. Experimental pain research is one way to attain new knowledge on the mechanisms involved in muscle pain. In healthy subjects and patients standardised induction and assessment of muscle pain can reveal novel information about the normal and pathological

nociceptive system. Manifestations of referred pain, temporal summation of muscle pain, and deep tissue hyperalgesia can be assessed in humans and reflect sensitisation of peripheral and central neuronal components. Central sensitisation is fundamental in the transition from acute pain to chronic pain. Sensory manifestations of muscle pain are reported as a diffuse aching pain in the muscle, pain referred to distant somatic structures, and hyperalgesia in the painful areas. The sensation of acute muscle pain is the result of activation of group III and group IV muscle receptors (nociceptors) responding to strong (noxious) mechanical or chemical stimulation. The nociceptors can be sensitized by the release of substances from glia cells, neural, and muscular tissues. Eventually, peripheral sensitisation may lead to hyperalgesia and central sensitization of dorsal horn neurones manifested as prolonged neuronal discharges, increased responses to defined noxious stimuli, pain response to non-noxious stimuli, and expansion of the receptive field. Fundamentals of muscle

pain, muscle hyperalgesia and referred pain and how these characteristics can be assessed in experimental or clinical conditions will be presented. Referred pain and summation of muscle pain is based on central mechanisms and therefore likely to be enhanced by central sensitization. Quantitative sensory testing provides the possibility to evaluate these manifestations in a standardized way. In experimental human models it has been shown that prolonged conditions of muscle pain can facilitate the mechanisms of referred pain and

temporal summation of muscle pain. In musculoskeletal pain patients facilitated mechanisms for referred pain has recently been described together with a more expressed summation of pain from deep tissue. Novel models of prolonged muscle hyperalgesia by NGF injections show similar facilitation. Such translational steps can provide the basis for developing better diagnosis and targeted drug development hopefully providing better treatment of disabling chronic musculoskeletal pain conditions.

24. 体温調節，温度受容研究会

2008 月 9 月 18 日 - 9 月 19 日

代表・世話人：小林茂夫（京都大学 大学院情報学研究科）

所内対応者：富永真琴（岡崎統合バイオサイエンスセンター 細胞生理）

- (1) ショウガの辛味成分である **gingerol** の深部体温に及ぼす影響

上木史織，渡邊達生（鳥取大学医学部統合生理）

- (2) TRPV4 欠損とエネルギー欠損

楠堂達也¹，水野敦子²，鈴木 誠²，山下 均¹（¹中部大学 生命健康科学部
²自治医科大学薬学講座分子薬理学部門）

- (3) TRPM8 による体温調節

細川 浩，田地野浩二，前川真吾，松村 潔*，小林茂夫
（京都大学情報学研究科 知能情報学生体情報処理分野，*大阪工業大学情報科学部）

- (4) 皮膚温により温冷感，快適感を予測する Zhang モデルの可視化

江崎秀範¹，中村真由美²，彼末一之²
（¹本田技術研究所，²早稲田大学）

- (5) 生体信号を用いた温冷感計測

仲山加奈子（東芝研究開発センターヒューマンセントリックラボラトリー）

- (6) においとストレス応答

二階堂義和，中島敏博（京都工芸繊維大学大学院 工芸科学研究科）

- (7) ヒト褐色脂肪：寒冷応答における役割

斉藤昌之¹，岡松優子²，松下真美¹，米代武司¹，会田さゆり¹，河合裕子¹
（¹天使大学大学院看護栄養学研究科，²北海道大学大学院獣医学研究科，LSI 札幌クリニック）

- (8) 熱産生分子 UCP1 による食欲の調節：温度定常説の可能性？

岡松優子，斉藤昌之（北海道大学大学院獣医学研究科，天使大学大学院看護栄養学研究科）

- (9) ラット暑熱馴化の成立に視床下部神経前駆細胞の分裂と分化が関与する可能性

松崎健太郎，片倉賢紀，丸山めぐみ，原 俊子，橋本道男，紫藤 治（島根大学医学部環境生理学）

- (10) 脳内出血による発熱・動物モデルとその分子機構

松村 潔¹，堀あいこ²，山本知子²，細川 浩²，小林茂夫²
（¹大阪工業大学情報科学部，²京都大学情報学研究科）

- (11) レプチンの末梢組織グルコース取り込み促進作用に及ぼす視床下部メラノコルチン受容体の役割

戸田知得，志内哲也，李 順姫，大和麻耶，藤野裕介，鈴木 敦，岡本土毅，箕越靖彦
（生理学研究所 生殖・内分泌系発達機構）

- (12) 遺伝的に高温耐性を獲得したラットの生体防御

古山富士弥¹，大岩隆則²，山本晶子¹，西野仁雄¹
（¹名古屋市立大学大学院医学研究科脳神経科学，²同口腔外科）

- (13) 絶食時の体温概日リズム調節機構の解明

時澤 健，内田有希，永島 計（早稲田大学人間科学学術院統合生理学研究室）

- (14) 低照度環境下における強制的睡眠覚醒スケジュール時の身体運動が深部体温リズム

および睡眠脳波に与える影響

山仲勇二郎，橋本聡子，本間さと，本間研一
（北海道大学大学院医学研究科生理学講座時間生理学分野）

- (15) エストロゲンが摂食行動、体温の日内リズムに及ぼす影響

鷹又 亮 (奈良女子大学生生活環境学部)

- (16) 寒冷環境においてエストロゲンが体温調節に与える影響

内田有希¹, 時澤 健², 永島 計² (¹早稲田大学人間科学研究科,
²早稲田大学人間科学学術院・統合生理学研究室)

- (17) 寒冷曝露時の皮膚交感神経によるヒト体温調節の時系列解析

岩瀬 敏 (愛知医科大学生理学第2)

- (18) ハムスターの冬眠時体温を制御する中核神経機構

—冬眠維持期の体温制御における β -endorphinの役割—

田村 豊 (福山大学薬学部)

- (19) 視床下部内側視索前野に局所投与したエストロゲンが寒冷暴露時の熱放散に与える影響

土肥まどか, 内田有希, 時澤 健, 永島 計 (早稲田大学人間科学学術院 統合生理学研究室)

- (20) 冬眠動物の低体温に対する抵抗性は脳内アデノシン系により賦活化される

宮澤誠司, 椎名貴彦, 武脇 義, 志水泰武 (岐阜大学大学院連合獣医学研究科 獣医生理学教室)

【参加者名】

富永真琴 (岡崎統合バイオサイエンスセンター), 山中章弘 (岡崎統合バイオサイエンスセンター), 柴崎貢志 (岡崎統合バイオサイエンスセンター), 曾我部隆彰 (岡崎統合バイオサイエンスセンター), 小松朋子 (岡崎統合バイオサイエンスセンター), 梅村 徹 (岡崎統合バイオサイエンスセンター), 三原 弘 (岡崎統合バイオサイエンスセンター), 川口 仁 (岡崎統合バイオサイエンスセンター), 水野秀紀 (岡崎統合バイオサイエンスセンター), 内田邦敏 (岡崎統合バイオサイエンスセンター), 加塩麻紀子 (岡崎統合バイオサイエンスセンター), 常松友美 (岡崎統合バイオサイエンスセンター), 周一鳴 (岡崎統合バイオサイエンスセンター), 高山靖規 (岡崎統合バイオサイエンスセンター), 斉藤昌之 (天使大学大学院看護栄養学研究科), 岡松優子 (北海道大学獣医学研究科), 山仲勇二郎 (北海道大学医学研究科生体機能学専攻), 時澤健 (早稲田大学スポーツ人間科学学術院), 内田有希 (早稲田大学人間科学研究科修士課程), 志水泰武 (岐阜大学連合獣医学研究科), 椎名貴彦 (岐阜大学連合獣医学研究科), 平山晴子 (岐阜大学連合獣医学研究科), 宮澤誠司 (岐阜大学連合獣医学研究科) 嶋 剛士 (岐阜大学連合獣医学研究科), 古山富士弥 (名古屋市立大学医学研究科), 岩瀬 敏 (愛知医科大学学部生理学第2講座), 西村直記 (愛知医科大学学部生理学第2講座), 山下 均 (中部大学 生命健康科学部 生命医科学科), 楠堂達也 (中部大学

生命健康科学部 生命医科学科), 小林茂夫 (京都大学情報学研究科知能情報学専攻), 細川 浩 (京都大学情報学研究科知能情報学専攻), 堀あいこ (京都大学情報学研究科知能情報学専攻), 中島敏博 (京都工芸繊維大学), 二階堂義和 (京都工芸繊維大学), 黒田聡恵 (京都工芸繊維大学), 松村 潔 (大阪工業大学情報科学部), 鷹股 亮 (奈良女子大学生生活環境学部), 紫藤 治 (島根大学医学部生理学 (環境生理学)), 松崎健太郎 (島根大学医学部生理学 (環境生理学)), 渡邊達生 (鳥取大学医学部統合生理), 上木史織 (鳥取大学医学部統合生理), 田村 豊 (福山大学薬学部薬理学研究室), 門田麻由子 (福山大学薬学部薬理学研究室), 兼久智和 (日本たばこ産業株式会社), 江崎秀範 (本田技術研究所), 仲山加奈子 (株式会社東芝), 橋本公男 (サンスター株式会社), 御子柴茂郎 (ライオン株式会社), 八木 章 (江崎グリコ株式会社), 中矢ゆり (大正製薬), 井垣通人 (花王株式会社), 小田英志 (花王株式会社), 箕越靖彦 (生理学研究所 生殖内分泌), 岡本土毅 (生理学研究所 生殖内分泌), 井上一李 順姫 (生理学研究所 生殖内分泌), 戸田知得 (生理学研究所 生殖内分泌), 上條真弘 (生理学研究所 生殖内分泌), 江崎麻耶 (生理学研究所 生殖内分泌), 斉藤久美子 (生理学研究所 生殖内分泌), 松尾 崇 (生理学研究所 生殖内分泌), 藤野祐介 (生理学研究所 生殖内分泌)

【概要】

平成 20 年 9 月 18 及び 19 日に研究会が行われた。今回で 4 回目になる研究会は、代表提案者が京都大学小林(以下敬称略)にかわり、体温をテーマに分子、神経、心理生理学に至るまで様々な分野の研究者が集まり、研究発表、情報交換、議論、新たな研究テーマの模索を行った。TRP チャネルを中心とした体表の温度受容の分子機構およびその生理作用の基礎的研究、外部環境、内部環境の変化に対する体温調節反応の変化およびその神経機構の研究等について発表され、最後に冬眠時体温に関する発表があった。各々の項目についてセッションをもうけた。概略は下記の通りである。

18 日には TRP チャネルに関連して、鳥取大上木が gingerol の影響を、中部大学楠堂が TRPV4、京都大細川が TRPM8 について発表した。本田技術研究所の江崎がモデル可視化の試みを、東芝研究開発センターの仲山が生体信号を用いた温冷感計測を、京都工芸繊維大の二階堂がストレスと高体温について発表し、体温がヒトの快不快にどのように影響を及ぼしているかが議論された。

脂肪組織における熱産生に関して UCP に焦点をあてて天使大学斎藤と北海道大学岡松からデータが示された。ヒトにおいても大きな関与があるらしい。島根大の松崎はラットの暑熱順化に視床下部神経細胞の分裂が関与するという興味深いデータを示した。生理研の戸田は同じ視床下部のメラノコルチン受容体の役割を発表した。続いて、大阪工業大の松村が脳内出血と発熱について、名古屋市立大の古山が遺伝的に高温耐性を示すラットモデルについて発表した。

19 日には、体温概日リズムに関する発表が、早稲田大学時澤、北海道大学山仲、奈良女子大鷹股からなされ、鷹股はエストロゲンの影響を示した。続いて早稲田大内田が寒冷環境でのラットにおけるエストロゲンの影響について発表した。愛知医大岩瀬は寒冷曝露時の皮膚交感神経によるヒト体温調節メカニズムについて発表した。最後に、福山大田村と岐阜大志水がそれぞれ、冬眠時の体温制御における b-endorphin とアデノシンの関与を示した。

(1) ショウガの辛味成分である gingerol の深部体温に及ぼす影響

上木史織，渡邊達生（鳥取大学医学部統合生理）

私たちは、ショウガとその辛味成分である[6]-gingerol の全身投与によるラット深部体温の変化について検討した。ラットにショウガ入りの餌を 5 日間与えた。しかし、体温と身体活動の日内サイクルに変化は認められなかった。一方、ラットの腹腔内に[6]-gingerol (2.5 または 25 mg/kg) を投与すると、身体活動は変化しなかったが、深部体温は [6]-gingerol の容量に依存して著しく低下した(図 1)。[6]-gingerol (25 mg/kg) の腹腔内投与の直後に、

代謝率の顕著な低下が起こったが、熱放散には変化が認められなかった。以上の結果から、[6]-gingerol は代謝を低下させて低体温を引き起こすものと推察される。また、ショウガに含まれる[6]-gingerol 以外の活性成分が、[6]-gingerol の低体温誘導作用に拮抗したために、ショウガの投与では体温に変化が起こらなかった可能性が想定される。

(2) TRPV4欠損とエネルギー欠損

楠堂達也¹，水野敦子²，鈴木 誠²，山下 均¹

(¹中部大学 生命健康科学部，²自治医科大学薬理学講座分子薬理学部門)

【目的】Transient receptor potential (TRP)チャネルは全身に

広く分布しているカルシウムチャネルであり、ヒトでは

味覚や温度、痛みなどのセンシングに関与している。近年の盛んな研究により、各種センサーとしての役割については徐々に明らかにされてきているが、今なお不明な点が多く生体内における役割の解明が不可欠である。本研究では、温度、浸透圧受容体として知られている TRPV4 を欠損する TRPV4 遺伝子欠損マウスを用いて TRPV4 とエネルギー代謝の関係について検討した。

【方法】TRPV4 遺伝子欠損マウスと野生型コントロールマウスを通常食により飼育した後、4 ヶ月齢より高脂肪食を摂食させ経時的に体重と摂餌量を測定した。また、耐糖能試験、インスリン負荷試験、間接的熱量測定を行った。高脂肪食を12週間摂食させた後、マウスを屠殺し各種組織を採取し遺伝子発現解析を行った。

【結果と考察】TRPV4 遺伝子欠損マウスはコントロール

マウスと比較して体重増加の有意な抑制が認められ、総脂肪量及び内臓脂肪重量も有意に少なかった。TRPV4 遺伝子欠損マウスの血中インスリン濃度は有意に低く、インスリン負荷試験の結果からコントロールマウスと比較して高いインスリン感受性を持つことが示された。両マウスで摂餌量に差は認められなかったが、呼気ガス分析の結果、TRPV4 遺伝子欠損マウスにおいて酸素消費量の有意な上昇が認められた。代謝関連遺伝子の発現量を検討したところ、TRPV4 欠損マウスの骨格筋において、脂質代謝に重要な役割を担っている核内レセプター PPAR α や脂質及び糖代謝関連遺伝子の発現が上昇していることが示された。以上のことから、TRPV4 の欠損によって骨格筋におけるエネルギー代謝の亢進が引き起こされる可能性が示唆された。

(3) TRPM8による体温制御

細川 浩¹、田地野浩二¹、前川真吾¹、松村 潔²、小林茂夫¹

(¹京都大学報学研究科 知能情報学生体情報処理分野、²大阪工業大学 情報科学部)

末梢神経に発現している TRPM8 は、皮膚の冷受容器であると考えられている。恒温動物の芯部体温は、芯部温と、皮膚温による調節により一定に保たれていると考えられるが、TRPM8 の芯部温調節への関与は明らかではない。本研究では、TRPM8 による芯部温の制御機構・及び体温調節応答について検討した。TRPM8 のアゴニストであるメンソール塗布や低温暴露で引き起こされる芯部体温上昇が起こるが、この芯部体温上昇は、TRPM8 ノックアウトマウスでは見られなかった。低温環境下で

の行動性・自律性体温上昇応答を調べたところ、TRPM8 ノックアウトマウスでは、低温環境下での行動性体温調節は抑制されていた。低温環境下での末梢皮膚温度には変化がみられなかったが、低温環境への移行時の抹消皮膚温度低下応答が TRPM8 ノックアウトマウスでは抑制されていた。以上のことから TRPM8 は冷環境下での自律性・行動性体温調節応答に関与し、芯部体温を調節していることが示唆された。

(4) 皮膚温により温冷感、快適感を予測する Zhang モデルの可視化

江崎秀範¹、中村真由美²、彼末一之²

(¹本田技術研究所、²早稲田大学)

熱い、寒いといった温冷感を環境の等価温度で指標化しようとする試みが行われてきた。既存の温冷感を予測するモデル式の大部分は、均一で温度変化の限られた環境を適応範囲としている。しかしながら自動車内のように不均一で温度変化も大きく、さらに接触の影響を無視

できないシートなど体温との相互作用で温度が決定される複雑な温熱環境に対して、等価温度で温冷感を予測する手法を敷衍する戦略は効率が悪い。その上、その温冷感が快または不快であるか予測することは更に困難である。そこで熱い、寒いといった温冷感や快、不快といっ

た快適感とは、温度受容器からの信号を中枢で処理した結果生じる心理量であることに着目すると、温度受容器への入力となる皮膚温や体温といった生理量で感覚を指標化する戦略の方が実用的な条件のほとんどのに適應できて結果的に効率がよいと判断した。

今までにも部位の皮膚温とその温冷感または平均皮膚温と統合温冷感において高い相関があることは数多く報告されてきた。また皮膚温の上昇または降下の速さが温冷感に影響を与えることも報告されている。さらに同じ温冷感であっても快適かどうかは体温によって影響されることも報告されている。これらの結果に基づき、皮膚温や体温を入力として温冷感や快適感を予測できるモデル式の基となる被験者実験のために、皮膚温、熱流量、

温冷感、快不快感を多点計測し、実験結果を可視化する技術、深部温を簡便確実に測定する技術を準備し実験を開始した。その後 UC バークレーの Zhang が皮膚温分布などを入力として局所および総合的な温冷感と快適感を予測するモデルを開発したことが判明した。このモデルは、カルフォルニア大学バークレー校の環境試験室における不均一で過渡的な状況で実行された 109 名の被験者実験の結果から Zhang らが開発したものである。このモデルを直観的に理解できるよう三次元グラフで表現し、部位による特徴をわかり易く整理した。また早稲田大学と行っていた日本人被験者による実験結果との比較も行った。

(5) 生体信号を用いた温冷感計測

仲山加奈子（東芝研究開発センターヒューマンセントリックラボラトリー）

夏の暑さ、冬の寒さ、季節の変わり目など、不安定な温度変化が起こる環境をより快適に過ごす為に、家庭やオフィス、近年では小学校にも空調機が普及している。一方で、快適に過ごす為に導入した空調機の制御が不的確であることが原因で、自律神経失調症、睡眠中の中途覚醒などが起こっており、問題となっている。このような状態は、空調機利用者自身が空調機の制御ができない場合や、温度設定が不的確であることに気づかない場合に発生する。そこで、我々は、これまでに、不的確な温度設定を防ぐ空調機等の自動制御を目的とし、客観的に人の温冷感を計測する方法を検討してきた。前報では、人の温冷感適温域では、手の指先の皮膚温が、周期

30[sec]~180[sec]、振幅 0.1℃程度の揺らぎを持ち、この揺らぎを用いた温冷感計測の可能性について報告した。この末梢の体温揺らぎ反応は、核心温をより精密に制御するための末梢血管運動の結果である考えられる。

前報では接触型のセンサによる温冷感計測を目指してきたが、日常生活下での利用においては、接触型センサの装着は、ユーザにとって負担となっており、センサ装着によるストレスなどもあり、センサの非接触化が求められている。そのため、動静脈吻合血管の密集する部位では同じような反応が起こるものと考え、顔部位での反応を計測し、非接触型センサによる温冷感計測の可能性について検討した。

(6) においとストレス応答

二階堂義和、中島敏博（京都工芸繊維大学大学院 工芸科学研究科）

ストレス性高体温 (stress-induced hyperthermia) は、情動性発熱 (emotional fever) とも呼ばれるストレス刺激後に見られる一過性の体温上昇である。この体温上昇は、情動性のストレス刺激によって生じることが知られている。情動性のストレス刺激は、anticipatory anxiety stress

として実験動物の情動に影響を与え、stress-induced hyperthermia のほかに視床下部—下垂体—副腎系 (hypothalamic-pituitary-adrenal axis; HPA axis) のストレス応答を引き起こす。これらのストレス応答は、PTSD やうつ病などに関係していると考えられており、

stress-induced hyperthermia や HPA axis のストレス応答の発生機序や沈静化を調べることは重要である。多くの研究で、5-HT_{1A} receptor アンタゴニストや benzodiazepine receptor アンタゴニストの脳内投与によって、anticipatory anxiety stress-induced hyperthermia が減弱化されることが報告されている。しかし、これらの薬剤は、本来の作用とは別に、副作用による生体への影響があり、研究に用いることは出来ても、ヒトに応用することは簡単ではな

いといえる。そこで、我々は、より簡単にヒトに用いることができ、副作用も少ない方法として、におい物質に注目した。におい物質は嗅覚系から脳へ作用し、生体に影響を与えられられる。特に、ヒトにおいて P-300 と呼ばれる脳波や快適感を示すみどりの香りを用いて研究を行ってきた。今回は、今までに行ってきたみどりの香りと anticipatory stress-induced hyperthermia の研究について、現在までに得た結果とその考察を行う。

(7) ヒト褐色脂肪：寒冷応答における役割

斉藤昌之¹，岡松優子²，米代武司¹，松下真美¹，会田さゆり¹，河合裕子¹

(¹ 天使大学大学院看護栄養学研究科，² 北海道大学大学院獣医学研究科)

褐色脂肪は、ミトコンドリア脱共役タンパク質 UCP1 によって熱産生を行い、寒冷暴露時などの体温調節に寄与する特異的組織である。マウスなどの実験動物と異なりヒトでは新生児期を除いて褐色脂肪は存在しないとされてきた。最近、fluoro-deoxyglucose (FDG)を用いた positron emission tomography (PET) による腫瘍診断法が普及しつつあるが、X 線 CT を組み合わせるとヒト褐色脂肪を検出することが可能である。我々は昨年、健康被験者 57 名を対象に FDG-PET/CT をを行い、寒冷刺激の効果や年齢、体脂肪量との関係を検討し、1) 寒冷刺激により褐色脂肪が活性化・増生すること、2) 若年者 (20～35 歳) では半数以上に褐色脂肪が検出されるが壮年者 (38

～65 歳) では激減すること、3) 体脂肪量と逆相関することなどを発表し、ヒト成人でも褐色脂肪が高頻度に存在し、体温や体脂肪量の調節に関与する可能性を示した。今回は、さらに被験者を増やし総計 112 名について、1) 褐色脂肪の消長・活性に関与する遺伝的要因を探る一環として、候補遺伝子 (β3 アドレナリン受容体, UCP1) 一塩基多型との関係について解析した。更に、2) 体全体のエネルギー消費における褐色脂肪熱産生の寄与を明らかにするために、呼気分析による酸素消費量を測定し寒冷刺激への応答を調べた。これらの成績について、マウスでの知見やヒト褐色脂肪の組織学的検索の結果と併せて報告する。

(8) 熱産生分子 UCP1による食欲の調節：温度定常説の可能性？

岡松優子 (北海道大学大学院獣医学研究科)

斉藤昌之 (天使大学大学院看護栄養学研究科)

【目的】食欲調節に関する求心性機序として、古くから4つの仮説が提唱されている。脂肪恒常説、消化管ペプチド説、糖定常説については、レプチンやグレリン、グルコース感受性神経などによりそれぞれの分子メカニズムが説明されている。一方、「体温がセットポイントより低下すると食欲が増し、セットポイントより上昇すると食欲が抑制される」とする温度定常説 (thermostatic theory) に関しては、その実態や分子メカニズムは不明な

ままである。本研究では、代表的な摂食抑制因子であるレプチンの作用に、発熱分子である UCP1 が関与しているか否かについて、UCP1 欠損マウスを用いて検討した。【方法と結果】野生型マウスと UCP1 欠損マウスにレプチンを単回投与すると、何れのマウスでも摂食量が減少したが、その作用に野生型マウスと UCP1 欠損マウスの間で違いはなかった。しかし、レプチンの反復投与やアデノウイルスを用いて誘導した高レプチン血症など、慢性

的なレプチン刺激を与えると、UCP1 欠損マウスでは野生型マウスに比べて摂食抑制作用が小さかった。レプチンを慢性的に作用させると、褐色脂肪に加えて白色脂肪にも UCP1 が誘導されるので、この異所性に発現した UCP1 がレプチンの摂食抑制作用に関与する可能性が示唆された。そこで、野生型マウスに $\beta 3$ アドレナリン受容体作動薬を慢性投与し、白色脂肪での UCP1 異所性発現を誘導すると、レプチン単回投与による摂食抑制作用が

増強した。更に、UCP1 欠損マウスの白色脂肪にアデノウイルスを用いて人為的に UCP1 を発現させても、レプチン作用の増強が認められた。

【結論】白色脂肪に異所性に発現する UCP1 は、レプチンの摂食抑制作用（レプチン感受性）の調節に関与していることが明らかとなった。UCP1 が熱産生分子であることを考え併せると、食欲調節の温度定常説の機構解明の手がかりとなるかも知れない。

(9) ラット暑熱馴化の成立に視床下部神経前駆細胞の分裂と分化が関与する可能性

松崎健太郎, 片倉賢紀, 丸山めぐみ, 原 俊子, 橋本道男, 紫藤 治
(島根大学医学部環境生理学)

【目的】動物では、暑熱環境への持続的な暴露により、中枢および末梢に存在する温度受容器と効果器の機能的あるいは器質的变化が誘導され、耐暑熱性が亢進する。このような暑熱馴化の形成過程は、暑熱に暴露された期間により、長期暑熱馴化と短期暑熱馴化に分類され、それぞれ形成機構が異なることが知られている。ラットでは長期暑熱馴化は暴露開始から 30 日前後で形成される安定した位相の機構とされ、新たな体温調節機構の構築によって形成されることが示唆されている。しかし、その中枢における制御機構は解明されていない。本研究では、暑熱馴化形成の中枢機序解明を目指し、暑熱暴露されたラットの視床下部における神経前駆細胞の分裂と分化を解析した。

【方法】Wistar 系雄性ラット（5 週齢）を明暗周期 12:12 時間、自由摂食・摂水下、環境温 24℃で 2 週間飼育した後、32℃の高温環境に暴露した。暴露開始直後から

Bromodeoxyuridine (BrdU; 50 mg/kg/day) を腹腔内へ 5 日間連続投与した。暑熱暴露開始から 6, 13, 33, 43, 53 日目にラットをペントバルビタールで麻酔し、脳を摘出して切片を作成し、抗 BrdU 抗体および抗 NeuN 抗体を用いて免疫組織化学的に解析した。

【結果・考察】暑熱暴露により、ラット視床下部における BrdU 陽性細胞数が顕著に増加した。さらに、暑熱暴露によって誘導された BrdU 陽性細胞の一部は抗 NeuN 抗体によって染色され、その数は暑熱暴露開始後 33 日から 43 日の間に顕著に増加した。これらの結果より、ラット視床下部の神経前駆細胞は暑熱暴露により分裂が促進されることが明らかになった。また、暑熱暴露によって分裂した神経前駆細胞は暴露開始 30 日以降に機能的な成熟神経細胞に分化することが推察された。ラット視床下部における神経細胞新生が長期暑熱馴化における体温調節機能の形成に関与する可能性を考えた。

(10) 脳内出血による発熱：動物モデルとその分子機構

松村 潔¹, 堀あいこ², 山本知子², 細川 浩², 小林茂夫²
(¹大阪工業大学情報科学部, ²京都大学情報学研究科)

脳内出血にはしばしば体温上昇がともなう。しかしその機構は不明である。本研究の目的は次の 2 つである。
①脳内出血による体温上昇の動物モデルを確立する, ②脳内出血による体温上昇にプロスタグランジン E₂

(PGE₂) が関与しているという仮説を検証する。

①動物モデル ラットをフォーレンで麻酔し、脳定位装置に装着した。片側の視索前野に 30 ゲージの注射針でコラゲナーゼ（タイプ 4）を注入した。コラゲナーゼは

50 units/ml で生理食塩水に溶かし, 1.4 μ l を7分間で持続注入した。ラットを飼育ケージに戻し, あらかじめ腹腔に留置しておいた温度計で体温を記録した。体温はコラゲナーゼ投与後3時間から上昇をはじめ, 24時間以上, 38°Cから39°Cの高値を維持した。投与側の視索前野には明瞭な出血が認められた。これと比較して生理食塩水投与群では体温上昇は少なく, 出血も全くなかった。熱処理して不活性化コラゲナーゼでは, 体温上昇も出血も認められなかった。この結果は出血が体温上昇の原因であることを示唆する。これを脳内出血による体温上昇の動物モデルとした。

②プロスタグランジン系の関与 ジクロフェナック (非選択的 COX 阻害剤) の腹腔内投与はコラゲナーゼ脳内注入による体温上昇をほぼ完全に抑えた。また NS398 (COX-2 選択的阻害剤) も体温上昇を抑えた。コラゲナーゼ注入後4時間, 脳脊髄液と脳実質の PGE₂ 含量は有意に増加した。以上の結果から, 本実験モデルにおける体温上昇には PGE₂ が関与していることが明らかとなった。

本実験モデルにおける体温上昇は, 感染や炎症によるそれと同様に, 調節された発熱であることが示唆された。

(11) レプチンの末梢組織グルコース取り込み促進作用に及ぼす視床下部メラノコルチン受容体の役割

戸田知得, 志内哲也, 李 順姫, 大和麻耶, 藤野裕介, 鈴木 敦, 岡本土毅, 箕越靖彦
(生理学研究所 生殖・内分泌系発達機構)

【目的】レプチンを視床下部腹内側核 (VMH) に投与すると, 骨格筋, 褐色脂肪組織 (BAT), 心臓において選択的にグルコースの取り込みが増加する。近年, レプチンによる摂食・代謝調節作用にメラノコルチン受容体 (MC) が重要な調節作用を営むことが報告された。そこで本研究では, レプチンを VMH に投与した時の末梢組織でのグルコース取り込み促進作用に, 視床下部 MC 受容体がどのような調節作用を営んでいるかを調べた。さらに, 視床下部のどの神経核に発現する MC 受容体が関与しているかを調べた。

【結果】レプチンを VMH に投与すると, 6時間後に骨格筋, BAT および心臓においてグルコースの取り込みが増加した。MC 受容体のアンタゴニスト SHU9119 を脳室内に投与すると, レプチンによるグルコース取り込み促進作用が消失した。MC 受容体アゴニスト MT-II を脳室内

に投与すると, 骨格筋, BAT および心臓でグルコースの取り込みが増加した。次に, MT-II を VMH, 背内側核 (DMH), 室傍核 (PVH) に各々投与して末梢組織におけるグルコースの取り込みを調べた。VMH に MT-II を投与すると, 骨格筋, BAT および心臓においてグルコースの取り込みが増加した。PVH に MT-II を投与した場合には BAT においてのみグルコースの取り込みが増加する傾向を示した。DMH ではグルコースの取り込みは全く変化しなかった。さらに, SHU9119 を VMH に投与してレプチンによるグルコース取り込み促進作用を調べた。すると, 骨格筋, BAT, 心臓におけるレプチンのグルコース取り込み促進作用は何れも抑制された。

【結論】以上の実験結果から, 末梢組織でのグルコースの取り込み促進するレプチンの作用は, 主に VMH における MC 受容体を介すると考えられる。

(12) 遺伝的に高温耐性を獲得したラットの生体防御

古山富士弥¹, 大岩隆則², 山本晶子¹, 西野仁雄¹

(¹名古屋大学大学院医学研究科脳神経科学, ²名古屋大学大学院医学研究科同口腔外科)

我々は, 先天的な高温耐性のメカニズムの解明を目指して, 代々高温環境に適応して先天的に高温耐性を有す

る近交系 FOK ラットを開発した。今回は, 最初に FOK ラットの唾液分泌による蒸発性熱放散の調節に対する交

感神経の役割を調べた。次いで、唾液腺の HSP70 発現、血中脂質組成、視床下部に発現する遺伝子の特徴を高温非耐性の対照系（WKAH ラット）と比較した。

【方法】ラットは、つねに 25℃で飼育した。FOK ラットを ketalaral 麻酔し、自律神経薬または遮断薬を投与後に、体温を連続記録しながら 40℃に暴露して、唾液分泌量を逐次記録した。次いで、唾液腺の HSP70 発現を組織化学的に対象ラットと比較した。次いで、25℃で飼育中の血中脂質組成を対象系と比較した。次いで、視床下部に発現が増えている遺伝子と減っている遺伝子を探索した。

【結果】FOK ラットだけが体温上昇につれて唾液分泌による蒸発性熱放散が高進する。その分泌は、atropine でほぼ完全に抑制された。体温 39℃以上における分泌量

は、 α -blocker 単独投与で一部抑制された。FOK ラットの顎下腺では細胞質にも HSP70 が発現していた。FOK ラットの血中脂質濃度は、トリグリセリドが著しく低く、リン脂質は高かった。リン脂質中の脂質組成は DHA が増加していた。トリグリセリド中ではアラキドン酸と DHA が増加していた。視床下部において発現が増えていた遺伝子は AIM-1, aldosterone receptor, IREBP など、減少していた遺伝子は serine protease inhibitor, benzodiazepine receptor, IGF-BP3, 12-lipoxygenase などであった。

【考察】これらの結果から、遺伝的に高温耐性を獲得したラットが各種の生体防御法を獲得した事が示唆される。

(13) 絶食時の体温概日リズム調節機構の解明

時澤 健, 内田有希, 永島 計 (早稲田大学人間科学学術院統合生理学研究室)

【背景】われわれは、体温の概日リズムは調節された生理現象であることを明らかにしている。しかし絶食時には、非活動期に特異的な体温の低下が生じる。この時間特異的な体温低下がいかなるメカニズムで生じるかは明らかではない。

【方法】野生型および Clock 変異マウス（雄 2-3 ヶ月令, ICR 系）を、環境温 27℃において 12 時間の明暗サイクル（午前 7 時 lights-on）で飼育した。絶食開始時刻は午前 9 時もしくは午後 9 時とし、各この時間の 47 時間後、午前 8 時（明期）と午後 8 時（暗期）に、20℃, 180 分間の中等度寒冷暴露を行い、この間の深部体温 (T_c) および酸素摂取量 (VO_2) を測定した。また寒冷暴露直後に屠殺し、褐色脂肪組織および脳を採取した。

【結果】寒冷暴露時に野生型マウスにおいて、明期では T_c は有意に低下し (6.4 ± 1.5 °C), VO_2 は変化しなかった。一方、暗期の T_c 低下は明期と比較して有意に小さく ($2.0 \pm$

0.5 °C), VO_2 は有意に増加した。Clock 変異マウスにおいては、 T_c は有意に低下したものの（明期 1.8 ± 0.6 °C, 暗期 2.4 ± 0.9 °C）、明期と暗期の間に有意差は認められず、また VO_2 は明期と暗期ともに増加した。褐色脂肪 UCP1 mRNA は、野生型マウス暗期および Clock 変異マウスでは有意に増加したが、野生型マウス明期では変化は認められなかった。視索前野および室傍核における Fos 発現は、野生型マウス暗期および Clock 変異マウスの増加と比較して、野生型マウス明期では顕著に少なかった。野生型マウス明期の視交叉上核 Fos 発現は、絶食によって増加し、絶食状態の寒冷暴露でさらに増加した。

【総括】摂食条件は体温調節に大きく関わっており、絶食時には寒冷時の体温調節を時間特異的に抑制することが明らかになった。そのメカニズムとして、視交叉上核から視索前野および室傍核への情報伝達が関与している可能性が示唆された。

(14) 低照度環境下における強制的睡眠覚醒スケジュール時の身体運動が深部体温リズムおよび睡眠脳波に与える影響

山仲勇二郎, 橋本聡子, 本間さと, 本間研一 (北海道大学大学院医学研究科生理学講座時間生理学分野)

ヒトの概日システムは、外界の明暗周期を同調因子として深部体温リズム、血中メラトニンリズム等を駆動する振動体 I (視床下部視交叉上核, $\tau \approx 25h$) と社会的因子を同調因子として睡眠覚醒リズム等を駆動する振動体 II (局在不明, $\tau \approx 34h$ or $20h$) の 2 つの振動体により構成される (2 振動体機構) ことが想定されているが、その科学的根拠はまだ十分ではない。我々は、成人男性被験者を対象に振動体 I の同調が困難な明暗周期環境下において、通常就寝時刻を 8 時間位相前進させる強制的睡眠覚醒スケジュール (Forced Sleep/Wake Schedule: FSWS) を用いて強制的に 2 つの振動体を脱同調させる脱同調パラダイム実験から 2 振動体機構の構造解析を行ってきた。そして、現在までに FSWS を 8 日間与えると血中メラトニンリズム (振動体 I) の FSWS への同調は認

められないが、睡眠覚醒リズム (振動体 II) は FSWS へは同調が認められることを報告した (Hashimoto *et al.*, 2006)。さらに、強制的睡眠スケジュールを 4 日間与えた際に被験者に自転車運動を負荷すると睡眠覚醒リズムの再同調は促進されるが、運動を行わなかった被験者では FSWS への再同調は認められないことを報告した (体温温度受容研究会 2007 年 9 月; Yamanaka *et al.*, 2008, in submission)。これらの結果から、社会的同調因子である FSWS や身体運動は振動体 II に対して作用することが明らかとなった。しかし、振動体 II から振動体 I へのフィードバックの有無については今後のさらなる研究が必要である。本研究会では、4 日間の FSWS 時の深部体温リズムと睡眠脳波の解析結果について紹介する。

(15) エストロゲンが摂食行動、体温の日内リズムに及ぼす影響

鷹股 亮 (奈良女子大学 生活環境学部)

女性ホルモンであるエストロゲンは、生殖機能以外の様々な生理機能に影響することが明らかになってきている。エストロゲンは、摂食、飲水量を減少させる。摂食行動は明確な日内リズムを示すが、エストロゲンがこれら摂食行動と活動量、体温の日内リズムに及ぼす影響について検討した。また、日内リズム形成には光は最も重要な同調要因である。そこで、エストロゲンによる日内リズム変化における光の影響を明らかにすることを目的として、明期における光照射を行わない DD 条件がリズムの及ぼす影響についても検討した。7 週齢のメスラットの卵巢を両側摘出し、エストロゲンを補充するエストロゲン補充群 (E2 群) と vehicle のみの補充によりエストロゲンが欠乏したエストロゲン欠乏群 (Veh 群) の 2 群に分けた。補充開始 2 週間後、摂食量、飲水量、活動量、および腹腔内温度を測定した。その後、DD 条件でこれらの測定を行なった。更に、明期の初期と暗期の初期である 10:00 と 22:00 に灌流固定を行い、視交叉上核 (SCN) における c-Fos 発現を免疫組織化学的方法で検討した。E2 群では、摂食量は Veh 群に比べて明期にのみ有意に低い値を示した。しかし、DD 条件では、明期

に相当する時間の摂食量が E2 群でのみ有意に増加し、両群間での差が消失した。飲水量についてもほぼ同様の变化をした。活動量は、明期、暗期ともに両群間差が認められなかったが、DD 条件では両群で増加し、更に E2 群では、DD 条件で暗期に相当する時間での活動量が有意に低下し、明期と暗期の差が小さくなった。体温は、E2 群では Veh 群に比べ、明期の後半から暗期の前半にかけて低かった。DD 条件で、Veh 群では明期の始まりに相当する時間帯に体温が通常の光条件と同程度低下したが、E2 群では低下の程度が小さくなった。SCN における明期の c-Fos 発現細胞の数は、E2 群で veh 群よりも有意に多く、暗期では両群の差がなく、c-Fos 発現細胞数の明暗差は、E2 群で大きかった。DD 条件では、E2 群において明期に相当する時間における c-Fos 発現が減少したが、veh 群では変化無く、両群間の差が消失した。暗期の相当する時間における c-Fos 発現は、光照射条件の変化の影響を受けなかった。以上より、エストロゲンは主に光に対する SCN の感受性を変化させることにより日内リズムに影響していることが示唆された。

(16) 寒冷環境においてエストロゲンが体温調節に与える影響

内田有希（早稲田大学人間科学研究科）

時澤 健，永島 計（早稲田大学人間科学学術院）

【序論】我々の研究室では、寒冷環境において卵巣摘出ラットの体温調節反応が減弱すること、また、この減弱した体温調節反応は、エストロゲン投与により回復することを報告している。またエストロゲンの投与は、寒冷時にみられる脳視床下部内側視索前野 (MPO)、背内側部 (DMH) での cFOS 発現を有意に増加させ、褐色脂肪組織の UCP1 mRNA 発現量も増加させる。これらのことから、寒冷環境においてエストロゲンが体温調節反応に重要であることが示唆された。

【目的】寒冷環境の体温調節に関与するエストロゲンの作用機序を明らかにすることである。エストロゲンは中枢性に作用し、体温調節反応に影響するという仮説をたて、エストロゲンの脳視床下部局所投与が寒冷環境での体温調節反応に影響を与えるか否かを検証した。

【方法】9 週令卵巣摘出ラットの MPO, DMH に設置したガイドカニューレを用い 17- β エストラジオール ($E_2(+)$),

対照としてコレステロール ($E_2(-)$) を 4 時間局所投与した。投与 48 時間後、室温 10°C、対照として 25°C の環境に 2 時間おき、その間の体温をテレメトリーにて測定した。屠殺後、脳、褐色脂肪、血液を採取した。脳は cFOS 免疫組織化学法で染色し、免疫陽性細胞数を数えた。褐色脂肪は全 RNA 抽出後 RT-PCR にて UCP1 mRNA 発現量を定量した。

【結果】寒冷暴露時の体温は MPO 群においてのみ $E_2(+)$ 試行で有意な上昇がみられた。しかし、寒冷暴露時の cFOS 陽性細胞数、褐色脂肪の UCP1 発現量は $E_2(+)$ 試行と $E_2(-)$ 試行で有意差はみられなかった。

【結論】MPO へのエストロゲン局所投与は寒冷環境における体温調節に影響を与えることが示唆された。エストロゲンは中枢性に作用し体温調節反応に関与すると考えられたが、具体的な作用機序は未だ明確ではない。

(17) 寒冷曝露時の皮膚交感神経によるヒト体温調節の時系列解析

岩瀬 敏（愛知医科大学生理学第 2）

皮膚交感神経活動(SSNA)は、末梢神経の皮膚神経束からマイクロニューログラフィーにより記録される。その性質として、不規則で、心拍には同期しないが、呼吸性変動を有し、覚醒刺激に反応して、一定潜時をおいて反射性にバースト発射を生ずる、遠心性の神経発射活動であることがあげられる。その神経活動の中には、血管収縮性神経活動(VC)、発汗神経活動(SM)、血管拡張性神経活動(VD)を含む。VC と SM は、独立してバーストを発射するが、VD は SM と同じ神経活動で、末梢の神経伝達物質が異なると考えられている。VC と SM の分離には、末梢効果器である皮膚血流（レーザードブラー皮膚血流量計）と発汗（皮膚電位）を測定することにより、可能となる。SSNA の役割は、体温調節にあるが、スト

レスによっても誘発される。環境温を低下させると VC が増加し、上昇させると SM（同時に VD）が増加する。そのため中立温においては、活動は最低となる。体温調節において、SSNA の果たす役割は、発汗による蒸散作用、血管拡張による放熱促進、血管収縮による放熱抑制である。SSNA の調節は、おそらく皮膚表面から暖められた、あるいは、冷やされた血液が、脳に対流し、視床下部を介して行われる。これを対流性 feedback 系と呼ぶなら、暑熱あるいは寒冷ストレスにより皮膚温冷受容器→末梢神経→脊髄→視床→皮質→辺縁系→SSNA の賦活の経路は、神経性 feedforward 系の体温調節とも言えるだろう。対流性と神経性の体温調節系の相互作用を、時系列手法を用いて、検討する。

(18) ハムスターの冬眠時体温を制御する中枢神経機構 —冬眠維持期の体温制御における β -endorphin の役割—

田村 豊 (福山大学薬学部)

Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*; 以下ハムスター) は、寒冷環境下、短日周期で飼育すると冬眠行動をとる。ハムスターの冬眠は、その体温変化により導入期、維持期、および覚醒期の3期に分類できる。これまでの研究により、冬眠導入期の体温下降は、A1受容体を介する中枢アデノシン系が、維持期の低体温は μ 受容体を介する中枢オピオイド系が、そして、覚醒期の体温上昇には thyrotropin-releasing hormone 系が重要な役割を果たしていることを明らかにしている。本研究では、オピオイド系による冬眠維持期の体温制御機構について検討を行った。冬眠維持期のハムスターに抗 β -endorphin 抗体を側脳室投与すると、冬眠は中断されハムスターは覚醒した。しかし、抗 endomorphin-1, -2 抗体の投与では冬眠は中断されなかった。免疫組織化学的手法により、冬眠期間中の β -endorphin の動態変化を検討したところ、弓状核にお

いて、冬眠開始直後に細胞体における β -endorphin の免疫反応性の増加が観察され、冬眠開始 17 時間後の時点では、神経線維における免疫反応性の上昇が観察された。さらに、real-time PCR 法により β -endorphin の前駆体である proopiomelanocortin (POMC) の mRNA 発現量を調べたが、冬眠前後で有意な変化は観察されなかった。しかし、POMC から β -endorphin 産生に関わる prohormone convertase-2 (PC-2) の mRNA 発現量は、冬眠導入期で有意に上昇していた。また、western blotting 法により μ 受容体蛋白の発現量を検討したところ、冬眠維持期では有意に減少していた。以上の結果は、冬眠維持期の低体温は、冬眠直後に弓状核で産生された β -endorphin が軸索輸送により脳内各部位に運ばれ、 μ 受容体を活性化することで制御されていることを示唆する。

(19) 視床下部内側視索前野に局所投与したエストロゲンが寒冷暴露時の熱放散に与える影響

土肥まどか (早稲田大学人間科学研究科)

内田有希, 時澤 健, 永島 計 (早稲田大学人間科学学術院)

【背景】我々は卵巣摘出ラットにおいて、視床下部内側視索前野のエストロゲン局所投与が、寒冷暴露時の体温を上昇させることを報告した。この際、熱産生の指標として測定した褐色脂肪組織の UCP1(uncoupling protein 1) mRNA レベルに変化はなかった。

【目的】卵巣摘出ラットの視床下部内側視索前野エストロゲン局所投与が熱放散抑制に与える影響を明らかにすることである。

【方法】9週令メスラットを卵巣摘出し腹腔内に体温測定ラジオテレメトリーデバイスを留置した。術7日後、視床下部内側視索前野 (MPO) にガイドカニューレを設置

し、エストロゲン($E_2(+)$)またはコレステロール ($E_2(-)$) を4時間局所投与した。投与2日後、 10°C もしくは 26°C の環境に2時間おいた。この間、サーモグラフィで尾表面皮膚温を計測した。

【結果】寒冷暴露時、室温と尾皮膚温の差は $E_2(-)$ 試行より $E_2(+)$ の方が小さかった。また、ラットが体の下に尾を隠す行動は $E_2(-)$ 試行より $E_2(+)$ 試行で多くみられた。

【考察】脳視床下部内側視索前野へのエストロゲン局所投与は寒冷暴露時の尾部熱放散反応を抑制する作用があると考えられた。

(20) 冬眠動物の低体温に対する抵抗性は脳内アデノシン系により賦活化される

宮澤誠司，椎名貴彦，武脇 義，志水泰武（岐阜大学大学院連合獣医学研究科 獣医生理学教室）

ハムスターやリスなどの小型齧歯類の一部は、冬季の厳しい環境を乗り越えるために冬眠を行う。冬眠中のハムスターにおいては、体温が 10℃以下にまで低下し、心拍数は覚醒時の 350 回/分程度から 20 回/分以下に減少するが、心停止や細動、不整脈が発生することはない。すなわち、低体温下で心臓が障害を回避するメカニズムを解析するモデルとして冬眠動物は有用であるといえる。しかしながら、冬眠動物とラットやマウスなど非冬眠動物の比較をしたとしても、種差がつきまとうため具体的なメカニズムの解明には至らないと思われる。本研究では、冬眠中のハムスターが特殊な機序で心拍動を健常に維持しているのであれば、強制的に低体温を誘発しその機序が働かないようにすれば、心臓は障害を受けるはずであると考え、実験を行った。低体温を誘発する方法として、ネンブタール麻酔を用いた。ネンブタール麻酔後は、室温近くまで体温が低下すること、体温が 30℃付近にまで低下しても褐色脂肪組織を支配する交感神経活動

が亢進しないことから、体温調節中枢が抑制されていると判断した。ネンブタール麻酔下でハムスターを 2℃の環境に放置すると、冬眠状態と同等の低体温が誘発できた。人工的な低体温の場合には、冬眠時と同様の心拍数低下が認められたが、心電図上に J 波と呼ばれる異常な波形とともに完全房室ブロックの波形が記録された。J 波が低体温時に起こる心筋の異常を反映することを考えると、ハムスターの心臓も、致死的ではないにせよ、極度の低体温下では障害を受けると言える。すなわち、冬眠中に規則正しい拍動を維持するために、何らかの機序が働くということである。脳内のアデノシン系が冬眠の誘導に関与するという報告があるので、脳室内にアデノシン A1 受容体アゴニストを投与して低体温を誘発したところ、J 波や不整脈の発生は認められなかった。これらの結果より、冬眠動物の低体温に対する抵抗性は脳内アデノシン系により賦活化されることが考えられる。

25. 第2回伴侶動物の臨床医学研究会

2008年12月4日－12月5日

代表・世話人：丸尾幸嗣（岐阜大学応用生物科学部獣医臨床腫瘍学）

所内対応者：木村 透（動物実験センター）

（1）骨軟骨腫瘍の病理学的概要（医学）

廣瀬善信（岐阜大学医学部附属病院病理部）

（2）動物の骨軟骨腫瘍の病理学的概要（獣医学）

内田和幸（東京大学大学院農学生命科学研究科獣医病理学）

（3）骨軟骨腫瘍の臨床における現状（医学）

杉浦英志（愛知県がんセンター中央病院整形外科）

（4）骨軟骨腫瘍の臨床における現状（獣医学）

森 崇（岐阜大学応用生物科学部獣医臨床腫瘍学）

（5）ヒトにおける骨軟骨腫瘍の画像診断（医学）

西堀弘記（木沢記念病院放射線科）

（6）骨軟骨腫瘍の画像診断（獣医学）

夏堀雅宏（日本動物高度医療センター）

（7）骨軟骨腫瘍の課題（医学）

大島康司（岐阜大学医学部整形外科）

（8）獣医領域での骨軟骨腫瘍の課題（獣医学）

岡本芳晴（鳥取大学農学部獣医神経病・腫瘍学）

（9）悪性骨軟部腫瘍の臨床試験（医学）

大野貴敏（岐阜大学医学部整形外科）

（10）骨軟骨腫瘍の臨床試験と医学獣医学連携（獣医学）

小林哲也（日本小動物がんセンター）

【参加者名】

内田和幸（東京大学獣医病理学），廣瀬善信（岐阜大学医学部附属病院病理部），森 崇（岐阜大学獣医臨床腫瘍学），杉浦英志（愛知県がんセンター中央病院整形外科），夏堀雅宏（日本動物高度医療センター放射線部），西堀弘記（木沢記念病院放射線診断科），岡本芳晴（鳥取大学獣医神経病・腫瘍学），大島康司（岐阜大学医学部整形外科），小林哲也（日本小動物がんセンター），大野貴敏（岐阜大学獣医学部整形外科），酒井洋樹（岐阜大学獣医病理学），代田欣二（麻布大学獣医病理学），浅野和之（日本大学獣医外科学），藤田道郎（日本獣医生命大学獣医放射線学），宇塚雄次（岐阜大学獣医臨床放射線学），佐々木伸雄（東京大学獣医外科学），星野有希（岐阜大学応用生物科学部獣医学課程），児玉篤史（岐阜大学獣医病理学），武田聡（各務原動物病院），杉田恵子（ハート動物病院），柴田博

人（中郷動物病院），原田淳子（獣徳会動物医療センター），小山田和夫（松原動物病院），長南孝司（ダクタリ動物病院），長谷呉輔（おざわ動物病院），村上麻美（岐阜大学），島淵景子（おがわ動物病院），弘瀬 勝（桜山動物病院），鈴木秋沖（カニエ動物クリニック），檜山武史（自然科学研究機構基礎生物学研究所統合神経），須田 綾（いわた動物病院），稲垣 武（稲垣獣医科病院），近藤広紀（りんごの樹動物病院），山崎 愛（りょう動物病院），矢野将基（岐阜大学動物病院），中山 萌（岐阜大学動物病院），伊藤祐典（岐阜大学動物病院），松立大史（川瀬動物病院），矢田治郎（日名わんにゃんクリニック），高柳直哉（ホーミどうぶつ病院），東 豊子，蔵所宏好（ロッキー動物病院），栗林正伯（小野薬品工業（株）），関口智子（てらかど動物病院），高野弥佳（動物病院心恵堂），平手知洋（日

本全薬工業(株)), 岡野久美子(平成動物病院), 横井作知(あいち犬猫医療センター), 下谷真智子(つづき動物病院), 野口俊助(南が丘動物病院), 家村龍司((株)インターペット), 古川敬之(あいち犬猫医療センター), 服部光伸(アサギ動物病院), 吉崎友佳子(シュリングプラウアニマルヘルス(株)), 駒澤 敏(岐阜大学腫瘍), 若園多文(ながまつ動物病院), 古橋秀成(ふるはし動物病院), 岩谷 直(岐阜大 腫瘍), 後藤 淳(岐阜大 腫瘍), 戸田知得(生理研:生殖内分泌), 浴本久雄(テムリック(株)), 森 聡子(獣徳会 動物医療センター), 長坂真由(おざわ動物病院), 岩城周子(湯木どうぶつ病

院), 松浦里子(岐阜大学獣医病理学教室 6 年), 中島規子(カニエ動物病院), 中川史洋(なかがわ動物病院), 中川尚子(なかがわ動物病院), 原本美代子(大阪大学医学研究病態病理学研究室), 中山一也((有)中山犬猫病院), 上田綾子(東京大学院農学生命科学高度医療学研究室), 村上 章(岐阜大学), 鈴木義之(サンライズ動物病院), 高木 哲(北海道大学), 飯田恒義(岐阜 飯田動物病院), 松井多美子(ふみもと動物病院), 木村英夫(日本全薬工業(株)), 大矢勇一郎(郡上八幡動物病院), 瀬山 昇(NCA), 竹内康博, 村井厚子(湯木どうぶつ病院), 山本英森(中根犬猫病院)

【概要】

本研究会は昨年度にスタートし, 第 2 回目である。対象疾患として難治性疾患を取り上げ, 医学と獣医学の専門家をシンポジストとしてお招きし, 比較医学という立場で相互に議論を深め, 臨床医学・獣医学の発展に寄与することを目指している。将来的には, 医学・獣医学に加えて実験動物科学の専門家の参加を考慮し, 実験医学・獣医学・医学の流れを形成することによって, 基礎と臨床の交流を円滑にして, 難治性疾患の克服に寄与するのが究極の目標である。

今回は骨軟骨腫瘍を取り上げた。5 つのシンポジウムを企画し, 医学と獣医学の専門家にそれぞれ講演をいただいた。人と伴侶動物の骨軟骨腫瘍のテーマ毎の比較をして, それぞれの類似性, 相違性を議論し, それぞれの問題点を明らかにするとともに, 今後実施しなけれ

ばならない課題を確認した。

各シンポジウムは, 「骨軟骨腫瘍の病理学的概要」, 「骨軟骨腫瘍の臨床における現状」, 「骨軟骨腫瘍の画像診断」, 「骨軟骨腫瘍の課題」, 「骨軟骨腫瘍の臨床試験と医学獣医学連携」で構成した。

参加者は 80 名を越え, 活発な議論が行われ, 医学と獣医学の交流が実現した。参加者の専門分野は獣医学がほとんどであるが, シンポジストの医学領域, さらに少数ではあるが製薬企業の参加も得られ, 医学関連領域の交流のきっかけともなった。

今後は, 当面の課題として継続的に『がん』を取り上げ, 来年度の生理学研究会の申請を準備している。本研究会の補助に対して心より感謝する次第である。

(1) 骨軟骨腫瘍の病理学的概要(医学)

廣瀬善信(岐阜大学医学部附属病院病理部)

骨(骨内および骨膜)に発生する腫瘍について, その病理学的ポイントを概説する。

1) 疫学・病因

ヒト腫瘍の中では, 骨軟骨腫瘍は稀な部類に属する。その特徴として, 発生しやすい場所と年齢が比較的はつきりしている。発生原因はほとんど分かっていないが, 多分化能を有する間葉系幹細胞の存在が示唆されている。

2) 病理学的分類

骨軟骨腫瘍の病理学的分類としては, WHO 分類(2002)が頻用されており, 腫瘍組織に含まれる基質と腫瘍細胞の分化方向に基づいている。

3) 骨性腫瘍の病理各論

骨肉腫は 8 亜型に分類され, それ以外には類骨骨腫, 骨芽細胞腫がある。

4) 軟骨性腫瘍の病理各論

軟骨肉腫は 5 亜型に分類され, それ以外に内軟骨腫, 骨軟骨腫, 軟骨芽細胞腫, 軟骨粘液線維腫がある。

5) Ewing/PNET の病理各論

全悪性骨腫瘍の6%ほどの稀な腫瘍で、5~15歳男児に好発する。長管骨骨幹部の発生が多い。組織学的には大きな線維性隔壁に囲まれた小円形細胞の密な増殖から成る。遺伝子変異としてEWS/FLI-1のキメラ遺伝子の形成が知られている。

6) 生物学的特性

Ewing肉腫を除いてBrodersの分類を基にした組織学的gradingが行われており、4段階（あるいは3段階）に分類する。

7) 今後の課題・提言

この分野の腫瘍は、新規治療がそれほど成されていない現状があり、これからの新規治療戦略の可能性が大と思われる。

(2) 動物の骨軟骨腫瘍の病理学的概要（獣医学）

内田和幸（東京大学大学院農学生命科学研究科獣医病理学）

現在、動物の骨関節腫瘍は、1994年に改正されたWHO分類に基づき診断されている。本分類は、過去のWHO分類（1976年制定）を元に、改正までに動物で確認された病態が新たに加えられたほか、悪性腫瘍については、腫瘍発生部の解剖学的特性により骨内性と骨周囲性（骨膜性骨肉腫や傍骨性骨肉腫等）に大別し、さらに骨内性骨肉腫については、その優勢な細胞形態に基づいて、組織亜型分類（未分化型、骨芽細胞型、軟骨芽細胞型、線維芽細胞型、血管拡張型、巨細胞型）が設けられた。これらの骨肉腫の再分類にあたっては、ヒトの骨肉腫の知見を参考にされたものと思われる。

一方、対象動物が多岐にわたる獣医学領域では、動物

種ごとの生物学的特性の相違がしばしば問題になり、骨・軟骨腫瘍についても、発生状況やその種類は動物種により多様である。このため、動物の腫瘍を総括的に分類することには、問題も多い。現在のWHO分類の良性腫瘍は、ウシやウマ等大動物の骨疾患の知見に基づく情報が多く、逆に悪性腫瘍では、イヌやネコの小動物、特にイヌの骨疾患の知見が多く参照されている。今回の発表では、基本的に情報が多く蓄積されているイヌ、ネコ等の伴侶動物における骨・軟骨腫瘍の中でも、特に動物種特異性の高いと思われる病態を中心に紹介したいと考えている。

(3) 骨軟骨腫瘍の臨床における現状（医学）

杉浦英志（愛知県がんセンター中央病院整形外科）

1. 発生状況

原発性骨悪性腫瘍の疾患別発生件数、発生率、好発年齢、男女比、発生部位、ステージ分類について概説する。

2. 診断

骨腫瘍の診断にはX線検査が不可欠であるが、最終診断は病理診断によって確定されることになる。MRI検査は腫瘍進展範囲の評価に有用である。また、神経や血管と病巣との位置関係の把握に有用であり、切除範囲をより正確に判断できる。

3. 治療

骨肉腫の治療は化学療法と手術治療による集学的治療

を必要とする。1970年以前においては、全例患肢切断が行われ、生存率は10%程度であったが、化学療法の進歩、画像診断の発達、手術手技の確立により現在では患肢温存率は80%以上、生存率も60%以上である。

4. 今後の課題

骨悪性腫瘍に対する現状の問題点としては化学療法不応症例や初診時遠隔転移症例では治療成績が悪く、これらの症例に対する新しいアプローチが必要である。また、十分な切除縁が確保できない部位での治療法の開発が必要である。

5. 医学・獣医学相互への提言

人の骨悪性腫瘍がそのまま動物に適用は出来ないと思われるが、個々の動物に合った抗癌剤投与の仕方や手術法の開発が必要である。抗癌剤投与については全身投与が良いのか動注療法が良いのか、どの薬剤をキードラッ

グとして用いていくのが良いのか、また、手術法については切断術+装具療法が良いのか、患肢温存が良いのかなど考えていく必要があると思われる。

(4) 骨軟骨腫瘍の臨床における現状（獣医学）

森 崇（岐阜大学応用生物科学部獣医臨床腫瘍学）

1. 発生状況

動物の骨軟骨腫瘍の発生率、発生年齢、体重、好発犬種、去勢や避妊手術と発症率との関係、発生部位について概説する。

2. 臨床症状

四肢の骨肉腫では、跛行、疼痛、腫脹を認めるケースが多い。

3. 診断

最も一般的な変化はX線上での骨融解像である。確定診断には生検が必要であるが、骨融解を認めるタイプであれば、コア生検による生検が、骨融解を認めない場合は皮質骨の切開生検が推奨される。

4. 予後因子

7-10才の患者では、それよりも若年、あるいは10才以上の患者と比較して、予後が良い。血中ALPの上昇は、無病期間と生存期間の短縮と関連している。

5. 治療

犬の骨肉腫の場合、断脚は、疼痛除去が大きな目的となり、全身状態が改善することが多い。ただし、断脚後1年以内に90%が死亡する。一方、患肢温存手術も様々な方法が考案されているが、適応には限界がある。犬の骨肉腫の化学療法は、現在行われているどの治療法を行っても、生存率の劇的な改善が見込めない。犬の骨肉腫の放射線治療では、疼痛緩和目的で使用される。

6. 動物の骨肉腫治療の今後

犬の骨肉腫治療では、生存期間の延長がほとんど期待出来ない点が、最も大きな問題の1つである。

7. 医学・獣医学相互への提言

骨肉腫については、犬は人の骨肉腫と生物学的動態が類似していることから、この類似点をうまく利用することが今後の課題と思われる。

(5) ヒトにおける骨軟骨腫瘍の画像診断（医学）

西堀弘記（木沢記念病院放射線科）

1. はじめに

骨軟骨腫瘍における画像検査の役割のうち、今回は病変を正確に診断する事によって、良性病変に過度の侵襲を与えたり、浸潤傾向の高い病変を見過ごしたりしないようにするという事を中心述べてい。

2. 総論

我々放射線科医が骨軟骨腫瘍を分類するときに、およそ10項目にわたる要素を確認するようにしている。すなわち、患者の年齢、軟部への進展の有無、骨破壊のパターン、病変のサイズ、病変の部位、病変部と正常部分の

骨との移行帯、病変の辺縁の硬化の有無、基質の視認、骨の反応性変化、多骨性か単骨性か、の10項目である。これらを正しく評価する事が、正しい診断につながる。

画像診断では単純X線写真以外に、CT、MRI、シンチグラフィーなど、様々な画像診断のモダリティが発達しており、その役割は骨軟骨腫瘍診断においても非常に重要となりつつある。

3. 各論

線維性骨異形成、骨巨細胞腫、類骨骨腫、単純性骨脳腫、内軟骨腫、巨細胞腫、骨肉腫、軟骨肉腫、脊索腫に

ついでに画像所見特徴について、画像を供覧しながらシンポジウムにて述べたい。

4. 今後の課題

PET 診断の応用, MRS の汎用化, コンピューター支援診断の開発が課題である。

5. 医学・獣医学相互への提言

ヒトに対して保険適応や、様々な制限がある分野に関して、獣医学の分野がリードしていただきたいと考えている。

(6) 骨軟骨腫瘍の画像診断 (獣医学)

夏堀雅宏 (日本動物高度医療センター)

はじめに

骨軟骨腫瘍の標準的画像診断法は、対象とする罹患部位の正しい画像の作成とその画像に対する客観的・主観的評価のみならず、患者の病歴および他の検査結果と疫学的背景、品種、年齢を考慮して総合的に診断することが重要になる。

標準的画像診断法の総論

X 線検査/X 線 CT 検査:

早期疾患では腫瘍・非腫瘍性変化は鑑別できない。骨に対する変化は、骨溶解性、骨増殖性および混合性のいずれも起こりえる。また、原発性骨腫瘍の特徴は、単骨性の骨溶解像を基調とする変化であり、一方で滑膜肉腫などの軟部組織性腫瘍の骨浸潤では多骨性の骨溶解像を示す。

骨シンチグラフィ・PET

骨シンチグラフィ用放射性製剤として、 Tc^{99m} -MDP または Tc^{99m} -HDP が主に利用される。PET には F^{18} -FDG-PET による PET または PET-CT が用いられる。

各論

骨腫・外骨症・軟骨性外骨症などの良性腫瘍、悪性原発性骨腫瘍、傍骨性または骨外性骨肉腫、頭蓋骨に発生する多小葉性骨軟骨肉腫 (MLO)、骨髄由来腫瘍として骨髄腫・多発性骨髄腫・リンパ腫、転移性骨腫瘍についての画像所見を概説する。

今後の課題、医学・獣医学相互への提言

医学・獣医学

画像診断モダリティはほぼ同一である画像診断上の特徴から、ヒトと動物を含めた比較画像診断上の情報を共有することで、種を超えた共通性とともに明らかな種差も提示されていく可能性に期待したい。

(7) 骨軟骨腫瘍の課題 (医学)

大島康司 (岐阜大学医学部整形外科)

～骨肉腫を中心に～

(現状での問題点)

骨肉腫治療の基本は、術前、術後の系統的化学療法と外科的切除である。予後を左右する最も重要な因子は骨外転移、特に肺転移である。しかし、術前化学療法は、奏効性・根治率共に限界に達している。

(問題点に対する最新情報)

基礎研究においては、ゲノミクス解析が行われており、分子標的治療の候補遺伝子の探索に重要な役割を担っている。またプロテオミクスでは腫瘍マーカー、組織・予

後マーカーの探索がなされている。さらに、分子標的治療として、血管新生阻害剤、Ecteinascidin-743、ペプチド免疫療法などの治験も行われている。

臨床においては、術前化学療法の効果に応じて術後化学療法を変更する比較試験 (European and American Osteosarcoma Study: EURAMOS)、新しい人工関節の開発や肺転移に対する抗がん剤の吸入治療やレーザー治療なども試みられている。

(今後の方向性)

手術後の効果的補助療法が必要であり、新規薬剤や全

身治療法の開発・確立が急務である。また、不完全切除となった悪性骨軟部腫瘍の救済効果は否定的で、外科切除手技としての完全切除が原則であり、そのため、手術技術の確立、熟練が必要である。

(医学・獣医学相互への提言)

国内外の大規模な多施設共同研究を展開し標準的治療法の確立を行い、治療成績の改善を目指すべきである。

(8) 獣医領域での骨軟部腫瘍の課題 (獣医学)

岡本芳晴 (鳥取大学農学部獣医神経病・腫瘍学)

はじめに

今回、獣医領域における骨腫瘍、特に犬の四肢の骨肉腫に焦点を絞ってその問題点を提示する。またその問題点に関する最新情報を紹介し、今後の方向性について提言したい。

現状での問題点

骨肉腫を早期に確定診断することが現時点では困難となっている。治療については、四肢を温存するか、断脚するかの判断基準が現時点では明確ではない。抗がん剤の選択や化学療法以外の補助療法、特異タンパク質あるいはがん関連遺伝子等のより詳細な検討が必要である。

問題点に対する最新情報

X線検査のみならず、骨シンチグラフィや PET-CT が使用可能になることで、より早期に骨肉腫の診断が可能になると思われる。早期診断が可能となれば、断脚術

だけの選択肢でなく、同種骨移植という選択肢も可能となる。また、演者らも実施している自家がんワクチン療法などの免疫療法の可能性が以前より示唆されている。

今後の方向性

診断に関しては、遺伝子あるいは関連タンパク質の検出、治療に関しては、早期発見による患肢の温存手術がより発展することを期待したい。また免疫療法および分子標的薬についても今後さらに開発されるものと思われる。

医学・獣医学相互への提言

ヒトと動物の腫瘍は多くの共通点を有している。本シンポジウムが起爆剤となって、日本においても医学と獣医学が共同で骨肉腫をはじめとする各種腫瘍の研究体制が整備されることを切望する。

(9) 悪性骨軟部腫瘍の臨床試験 (医学)

大野貴敏 (岐阜大学医学部整形外科)

本シンポジウムでは、これまで行われてきた骨肉腫、ユーイング肉腫、悪性軟部腫瘍の臨床試験を紹介する。

1. 骨肉腫に対する化学療法の変遷

1970 年以前の骨肉腫の治療は患肢の切断であり、1970 年代に入り、アドリアマイシン (ADR) や、メソトレキセート大量療法 (HD-MTX) が骨肉腫に有効であることが示され、1983 年、Rosen らは術前から化学療法を導入するプロトコルを報告した。1980 年代後半には、イホスファミド (IFO) が骨肉腫に有効であることが示された。

2. 近年の臨床試験

術前に HD-MTX, CDDP, ADR を投与し、奏功しない

症例には術後 IFO とエトポシド (VP16) を投与したが、薬剤の変更は予後を改善しなかった。

3. ユーイング肉腫の臨床試験

腫瘍体積が大きい群での IFO の追加投与は、予後を改善した。さらに 5 剤にエトポシド (VP16) を加えたプロトコルで 5 年生存率 69 % まで改善した。

4. 悪性軟部腫瘍に対する臨床試験

四肢発生に限定した高悪性度非円形軟部肉腫に対して、エピルビシン (EP) と IFO 併用による術後化学療法が、手術単独に比較して有意に累積生存率を改善した。

5. 展望

今後は難治例に対する新規の治療法の開発が望まれる。また現在のプロトコールでは治療期間が長期にわた

り、患者の被る身体的精神的苦痛も大きい。今後これはいかに短縮・軽減するかも重要な課題である。

(10) 骨軟骨腫瘍の臨床試験と医学獣医学連携（獣医学）

小林哲也（日本小動物がんセンター）

犬の骨肉腫に関する臨床研究の現状

犬の骨肉腫に関する研究報告は比較的多いが、臨床試験と呼べる研究はまだ少なく、大部分が回顧的研究（後向き研究）である。犬の骨肉腫に関する代表的な既臨床研究を紹介する。

犬の骨肉腫に関する代表的な臨床試験

1. 犬の骨肉腫における術後補助治療としてのロバプラチンの効果
2. 多施設無作為化比較臨床試験：犬の自然発生骨肉腫におけるステルスリポソーム封入型シスプラチン (SPI-77) vs. カルボプラチンの効果
3. 犬の骨肉腫の補助治療：シスプラチンとリポソーム封入型 MTP (L-MTP-PE) を用いた無作為化比較臨床試験

獣医臨床試験に関する主な問題点

1. 費用：臨床研究を実施する際の経済的負担は？
2. 倫理：無作為化や盲検という考え方が日本の飼い主に許容されるか？
3. 人材：臨床研究を構築できる獣医師、あるいはデータ管理者の育成？
4. データ解析：臨床研究の構築、管理、解析する統計学者との連携？

医学・獣医学連携の可能性

獣医領域におけるもう一つの臨床研究の役割とは、犬や猫に自然発生した癌が人間の悪性腫瘍のモデルとなり得るかということ、すなわち小動物における臨床試験が人医の前臨床試験としての役割を担うことができるかということである。