

岡崎国立共同研究機構

# 生理学研究所年報

第22卷



2001

# はじめに

平成12年度の生理学研究所年報をお届けします。

平成12年4月に、岡崎国立共同研究機構の3研究所に共通の研究施設として、「統合バイオサイエンスセンター」が発足しました。本機構では、生理学研究所と共に、分子科学研究所、基礎生物学研究所がそれぞれの領野について独自の研究活動を展開してきました。一方、生命科学の観点から3研究所が重なり合う部分も既に多く、新しい研究領野の展開と推進に協力することも議論されてきました。幸い、文部省（現文部科学省）がその趣意を理解され、本センターが機構共通施設として設立されました。3研究領野として、戦略的方法論、時系列生命現象、生命環境を立て、各研究所が責任を持ってそれぞれの領野の教官人事を行いました。また、分子科学研究所から計算科学センター、生理学研究所と基礎生物学研究所から動物実験センターとアイソトープ実験センターを機構の共通施設として管理運営することになりました。これらの機構共通施設のための建築工事は、我々の研究所のキャンパスから数百メートル離れた「E地区」（元の愛知教育大学運動グラウンド）で進行中です。

生理学研究所からは、3名の教授、3名の助教授、2名の助手が配置転換または新規選考され、統合バイオサイエンスセンター、動物実験センター等に移籍または着任されました。これらの教官はすべて、引き続きまたは新規に生理学研究所兼務となっただき、今後も生理学研究所の構成員として、お互いに密接に協力することになっています。

以上、生理学研究所に関連した、本機構内の最近の変化の説明をいたしました。一方、11年度の年報でも触れましたように、国立大学の法人化問題と併行して、我々の大学共同利用機関の法人化に関しても、この一年間種々論議され、ようやくその中間報告にたどり着こうとしています。ここで記載できるほどは未だ煮詰まっていますが、大学共同利用機関は国立大学と基本的には同質の法人として、それぞれの学術分野の研究と教育に一層邁進できる制度改革がなされるよう、強く希望し、期待している所です。

本年報は、生理学研究所の全構成員の平成12年度における努力の結果ですが、なお一層の努力と改善が必須であることも自覚しております。大方の御批判、御指導、御鞭撻をお願い申し上げます。

平成13年12月

生理学研究所長 佐々木 和 夫

# 生理学研究所年報

## [ 目 次 ]

職 員 ( 2000 年度 ) .....	i
研究活動報告	
分子生理研究系 .....	11
細胞器研究系 .....	20
生体情報研究系 .....	24
生体調節研究系 .....	32
大脳皮質機能研究系 .....	40
統合生理研究施設 .....	47
脳機能計測センター .....	57
統合バイオサイエンスセンター .....	61
動物実験センター .....	62
技 術 課 .....	64
研究発表	
発 表 論 文 .....	77
学 会 発 表 .....	93
一般共同研究報告 .....	111
計画共同研究報告 .....	129
磁気共鳴装置共同利用実験報告 .....	135
超高压電子顕微鏡共同利用実験報告 .....	141
生体磁気計測装置共同利用実験報告 .....	155
研究会報告 .....	161
国際シンポジウム	
COE 国際シンポジウム .....	291
セミナー報告 .....	301
大学院特別講義 .....	321

## 職員 (2000 年度)

所 長

佐々木 和 夫

分子生理研究系

神経化学研究部門

教 授 小 幡 邦 彦

日本学術振興会特別研究員

助 授 柳 川 右千夫

季 鳳 雲

助 手 山 肩 葉 子

(2000.4.1~)

" 兼 子 幸 一

大学院学生 山 中 創

非常勤研究員 蒔 苗 公 利

" 海老原 利 枝

(2000.4.16~.9.30)

" 常 川 直 子

超微小形態生理研究部門

教 授 永 山 國 昭

文部省外国人研究員 Gurkov, Theodor Dimitrov

助 授 村 上 政 隆

(2000.10.2~)

" 村 田 昌 之

大学院学生 近 藤 明 子

客員助教授 Danov, Krassimir

" 森 誠 之

(~ 2000.5.14)

" Danev, Radostin

助 手 東 晃 史

特別共同利用研究員 石 堂 美 和 子

" 大 橋 正 人

" 杉 谷 正 三

" 高 橋 卓 也

" 加 納 心 み

" 村 田 和 義

非常勤研究員 松 本 友 治

細胞内代謝研究部門

客員教授 宮 崎 俊 一

助 手 毛 利 達 磨

客員助教授 吉 田 繁

(2000.7.1~)

細胞器官研究系

生体膜研究部門

教 授 河 西 春 郎

特別共同利用研究員 岸 本 拓 哉

助 手 久木田 文 夫

" 松 崎 政 紀

" 筒 井 泉 雄

" 木 村 良 一

" 根 本 知 己

" 早 川 泰 之

" 高 橋 倫 子

" 劉 婷 婷

機能協関研究部門

教 授 岡 田 泰 伸

助 手 赤 塚 結 子

客員教授 Bell, Phillip Darwin

非常勤研究員 清 水 貴 浩

助 授 Sabirov, Ravshan

(2000.7.1~)

助 手 森 島 繁

" 森 信 一 郎

" 樫 原 康 博

(2000.4.16~)

特別共同利用研究員 鍋 倉 隆  
 文部省外国人研究員 Zhang, Xiaodong  
 (~ 2000.6.14)  
 " Wang, Jun  
 (2000.6.1~)  
 科学技術振興事業団招聘研究員  
 Zhou Shi-Sheng  
 科学技術振興事業団研究員  
 三 好 毅 志  
 " 金 関 恵

科学技術振興事業団研究員  
 出 崎 克 也  
 大学院学生 前 野 恵 美  
 " 茫 海 天  
 " Abdullaev, Iskandar  
 " 浦 本 裕 美  
 " 真 鍋 健 一  
 " 井 上 華  
 " 奥 田 日 実 子  
 " Dutta, Amal Kumar

能動輸送研究部門

客員教授 中 西 重 忠  
 客員助教授 横 田 義 史  
 (~ 2000.8.31)

助 手 中 嶋 善 明  
 (~ 2000.9.30)

生体情報研究系

神経情報研究部門

教 授 池 中 一 裕  
 助 教 授 八 木 健  
 (~ 2000.5.31)  
 助 手 中 平 健 祐  
 (~ 2000.12.31)  
 " 岩 崎 靖 乃  
 " 藤 本 一 朗  
 非常勤研究員 和 田 圭 樹  
 (2000.4.16~)  
 " 柴 田 理 一

リサーチ・アソシエイト  
 鄭 且 均  
 (2000.9.1~)  
 大学院学生 柴 崎 貢 志  
 " 石 橋 智 子  
 " 長 谷 川 明 子  
 " 中 平 英 子  
 " 池 田 武 史  
 " 清 水 健 史  
 特別共同利用研究員 河 野 洋 三  
 " 片 倉 浩 理

液性情報研究部門

教 授 井 本 敬 二  
 助 教 授 森 泰 生  
 助 手 中 井 淳 一  
 " 若 森 実  
 非常勤研究員 山 田 久 信  
 (2001.1.1~)

リサーチ・アソシエイト  
 山 田 久 信  
 (2000.10.1~12.31)  
 大学院学生 松 下 か お り  
 " 原 雄 二  
 特別共同利用研究員 山 田 久 信  
 (2000.4~9)  
 " 松 本 信 幸  
 " 山 田 和 徳  
 (2000.10~)  
 特別協力研究員 石 井 正 和  
 (2000.8.1~)

日本学術振興会特別研究員

大 倉 正 道  
 " 岡 田 峯 陽  
 リサーチ・アソシエイト  
 Md. Kadrul Huda  
 " 森 誠 之  
 (2000.4.1~)

## 高次神経機構研究部門

客員教授	八木 健 (2000.11.1~)	大学院学生	武藤 哲司
		"	多田 基紀
助手	鹿川 哲史	"	平山 晃斉
"	先崎 浩次 (2000.11.16~)	"	牧野 初音
非常勤研究員	田 仲 祐介	受託研究員	須藤 文和
日本学術振興会特別研究員		"	杉野 英彦
	竹井 豊	受託技術員	濱田 俊
"	先崎 浩次 (~2000.11.15)	特別協力研究員	三寶 千秋
"	安田 利栄	民間等共同研究員	濱田 香世子
			柳瀬 浩

## 情報記憶部門

客員教授 西野 仁雄

## 生体調節研究系

## 高次神経性調節研究部門

教授	小松 英彦	リサーチ・アソシエイト	
助教授	伊藤 南		鯉田 孝和
助手	花澤 明俊	大学院学生	近藤 秀樹
"	小川 正	"	杉原 弘記
リサーチ・アソシエイト		"	谷 利樹
	木下 正治 (~2001.1.9)	特別協力研究員	Bhalodia, Vidya M. (2000.6.27~8.16)

## 生体システム研究部門

教授	森 茂美	大学院学生	橘 篤導
客員教授	Jankowska, Elzbieta (~2000.7.15)	特別協力研究員	Janos, Palhalmi (2000.9.18~12.17)
助手	宮下 英三	"	Arpad, Dobolyi (~2000.5.26)
"	中 隼 克己	"	Kekesi K. Adrienna (2000.7.21~12.12)
"	森 大志		
非常勤研究員	奥村 哲		

## 高次液性調節研究部門

客員教授	宮下 保司	特別共同利用研究員	
客員助教授	永雄 総一 (1999.10.1~)		伊原 毅
助手	納家 勇治	特別協力研究員	吉田 正俊
		"	柴田 愁子

大脳皮質機能研究系

脳形態解析研究部門

教授 重本 隆一  
 助教授 初山 俊彦  
 客員助教授 Zaborszky, Laszlo  
 (2000.5.15 ~ 8.14)  
 助手 木下 彩栄  
 " 初山 明子  
 (2000.10.1 ~ )  
 非常勤研究員 馬 杉 美和子  
 日本学術振興会招聘外国人研究者  
 Lujan-Miras, Rafael  
 (2000.3.7 ~ 5.6)  
 文部省外国人研究員  
 Kulik, Akos,  
 (2000.7.25 ~ 8.25, 10.24 ~ 11.28)

大学院学生 納 富 拓 也  
 民間等共同研究員 初山 明子  
 (~ 2000.9.30)  
 特別協力研究員 三 苦 博  
 " Chan, Savio ChiYung  
 (2000.9.7 ~ 11.6, 12.28 ~ )  
 " Wu, Yue  
 (2000.9.16 ~ )  
 科学技術振興事業団招聘研究員  
 Nyiri, Gabor  
 (~ 2000.8.25)

大脳神経回路論研究部門

教授 川口 泰雄  
 助手 根 東 覚

助手 北川 洋史  
 (~ 2001.1.31)

心理生理学研究部門

教授 定藤 規弘  
 助教授 本 田 学

助手 岡田 知久

統合生理研究施設

高次脳機能研究プロジェクト

教授 伊 佐 正  
 助手 斎藤 康彦  
 (~ 2001.1.31)  
 " 小 林 康  
 非常勤研究員 遠藤 利朗

日本学術振興会特別研究員  
 井上 由香  
 大学院学生 坂谷 智也  
 " 山下 哲司  
 " 勝田 秀行

感覚・運動機能研究プロジェクト

教授 柿木 隆介  
 助教授 金桶 吉起  
 助手 小山 幸子  
 " 山崎 浩  
 " 渡邊 昌子  
 非常勤研究員 川上 治  
 " 王 麗紅  
 リサーチ・アソシエイト  
 大草 知裕  
 " Lam, Khanh

リサーチ・アソシエイト  
 乾 幸二  
 (2000.9.1 ~ )  
 大学院学生 軍司 敦子  
 " 藤岡 孝子  
 " 三木 研作  
 特別共同利用研究員 糸見 和也  
 (~ 2000.9)  
 " 二橋 尚志  
 " Tran, Diep T

脳機能計測センター	形態情報解析室			
	助 教 授 有 井 達 夫	助 手	古 家 園 子	
	生体情報処理室			
	助 教 授 坪 川 宏	大学院学生	高 木 佐知子	
	機能情報解析室			
	助 教 授 達 本 徹	助 手	今 野 卓 (~2000.5.31)	
機構共通施設 (生理学研究所関連)	統合バイオサイエンスセンター			
	教 授 永 山 國 昭 (2001.2.1~)	助 手	中 平 健 祐 (2000.4.1~12.31)	
	助 教 授 村 田 昌 之 (2001.2.1~)	"	高 橋 卓 也 (2000.4.1~2001.1.31)	
	" 挾 間 章 博 (2000.4.1~)			
	動物実験センター			
	助 教 授 尾 崎 毅 (2000.4.1~)			
	計算科学研究センター			
	助 手 高 橋 卓 也 (2001.2.1~)			
技術課	課 長 大 庭 明 生			
研究系技術班	分子生理研究系技術係			
	係 長 大 河 原 浩	技 官	神 原 叙 子	
	技 官 高 木 正 浩	"	吉 友 美 樹	
	細胞器官研究系技術係			
	係 長 小 原 正 裕	技 官	山 本 友 美	
	技 官 神 谷 絵 美	"	伊 集 院 良 祐	
	生体情報研究系技術係			
	係 長 伊 藤 嘉 邦	技 官	齊 藤 久 美 子	
	技 官 水 谷 裕 美 (~2000.6.30)	"	関 口 直 美	
		"	三 寶 誠	

生体調節研究系技術係

係長	伊藤昭光	技官	高須千慈子
主任	戸川森雄	"	高橋直樹
技官	森将浩		

大脳皮質機能研究系技術室

(市川修)	(神谷絵美)
(伊藤嘉邦)	

研究施設技術班

班長 市川修

統合生理技術係

係長	永田治	技官	佐々木千香
技官	竹島康行		

脳機能計測技術係

係長	山口登	技官	村田安永
技官	吉村伸明	"	佐藤茂基

動物実験技術係

主任	佐治俊幸	技官	廣江猛
"	小木曾昇		

電子顕微鏡技術係

係長 前橋寛

工作技術係

係長 加藤勝己

研究支援推進員	村瀬伸江	技術補佐員	鹿川彰子
"	伊藤磯子	"	小林麻澄
"	深津恵子	事務補佐員	松澤敬子
"	土屋勝代	"	足立貴美
"	朝倉幸孜	"	向和子
"	福田阿由子	"	浅井明代
"	伊佐かおる	"	岩木陽子
"	大場多津子	"	杉浦未記
	(2000.4.16~)	"	梅林宏江
		"	杉浦郁代

# 【 研究 活動 報告 】

# 研究活動報告

## [ 目 次 ]

### 分子生理研究系

#### 神経化学研究部門 ..... 11

##### 概 要

恐怖記憶によりマウス扁桃体で発現する遺伝子の検索

( Oliver Stork , Simone Stork , 小幡邦彦 )

GABA ニューロンを GFP で標識した遺伝子改変マウスの開発

( 柳川右千夫 , 兼子幸一 , 神原叙子 , 戸塚昌子 , 八木 健 , 小幡邦彦 )

ヴェシクル型 G A B A トランスポーター

( 柳川右千夫 , 季 鳳雲 , 海老原利枝 , 蒔苗公利 , 山肩葉子 , 小幡邦彦 )

グリシントランスポーター 2 の遺伝子構造と発現

( 柳川右千夫 , 小幡邦彦 )

遺伝子変異動物による  $Ca^{2+}$ /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II の機能解析

( 山肩葉子 , 柳川右千夫 , 小幡邦彦 )

急性神経活動によるシナプシン I のリン酸化調節

( 山肩葉子 , 小幡邦彦 )

GABA 合成酵素 (GAD65)欠損の扁桃体局所回路への影響

( 兼子幸一 , 小幡邦彦 )

#### 超微小形態生理研究部門 ..... 13

##### 概 要

複素電子顕微鏡の開発

( Radostin Danev , 杉谷正三 , 村田和義 , 大河原浩 , 永山國昭 )

融合タンパク質による電子顕微鏡用分子ラベルの開発

( 村田和義 , 高木正浩 , 永山國昭 )

電子顕微鏡による筋肉 L 型カルシウムチャネルの構造解析

( 村田和義 , 小田原成優 , 永山國昭 , 國安明彦 , 中山 仁 )

位相差電子顕微鏡によるリアノジン受容体の一分子観察

( 松本友治 , 村田和義 , 大河原浩 , 永山國昭 , 國安明彦 , 中山 仁 )

細胞機能の可視化・マニピュレーション技術を用いた細胞・オルガネラの形態形成機構の研究

( 村田昌之 , 加納ふみ , 永山國昭 )

エンドサイトーシス選別輸送のメカニズムの解析

( 大橋正人 , 石堂美和子 , 永山國昭 , 山本章嗣 )

溶媒環境と蛋白質の安定性, および構造形成問題

( 高橋卓也 , 永山國昭 )

灌流ラット顎下腺における傍細胞輸送経路

( 村上政隆 , 大河原浩 , Bruria Sachar-Hill , Adrian E. Hill )

唾液分泌過程における微細構造の三次元電子顕微鏡観察

(村上政隆, 高木正浩, 前橋寛, Alessandro Riva)

細胞内代謝研究部門 ..... 17

概要

マウス卵  $Ca^{2+}$  オシレーションにおける  $Ca^{2+}$  流入と  $Ca^{2+}$  遊離の解析およびその数値シミュレーション

(毛利達磨, 宮崎俊一, 白川英樹, 尾田正二)

マウス卵への mRNA 注入による蛋白質発現法の確立

(毛利達磨, 吉友美樹, 宮崎俊一, 淡路健雄, 會田拓也, 尾田正二)

機能不明新型  $Na^+$  チャネル( $Na_v$ )の生理機能解析

(吉田 繁, 檜山武史, 渡辺栄治, 野田昌晴)

難治てんかんに対する脳梁離断術のラットによる実験学的考察

(吉田 繁, 藤村幸一, 小野智恵)

細胞器研究系

生体膜研究部門 ..... 20

概要

神経, 分泌細胞のカルシウム依存性開口放出機構の研究

(河西春郎, 根本知己, 高橋倫子, 岸本拓也, 劉 婷婷, 木村良一)

多光子励起法を用いた神経機能の研究

(河西春郎, 松崎政紀, 早川泰之)

Kチャネルの開状態ではボア内容積は減少する

(久木田文夫)

Chelophyes における興奮収縮連関

(筒井泉雄)

機能協関研究部門 ..... 21

概要

細胞容積感受性クロライドチャネルのカルシウムレセプターによる制御

(清水貴浩, 森島 繁, 岡田泰伸)

細胞膨張誘起性 ATP 放出の CFTR による調節

(挟間章博, 范 海天, I. Abdllaev, 前野恵美, 田中彰子, 赤塚結子, 岡田泰伸)

細胞膨張誘起性 ATP 放出による容積調節性  $K^+$  チャネルの調節

(出崎克也, 津村剛彦, 前野恵美, 岡田泰伸)

アポトーシス誘導における細胞容積調節異常の役割

(前野恵美, 石崎泰樹, 金関 恵, 挟間章博, 岡田泰伸)

## 生体情報研究系

神経情報研究部門 .....	24
概 要	
小脳顆粒細胞の発達過程における電位依存性 K <sup>+</sup> チャンネルの発現と役割	
( 中平健祐, 柴田理一, 柴崎貢志, 池中一裕 )	
オリゴデンドロサイト発生制御機構の解析	
( 鹿川哲史, 和田圭樹, 中平英子, 清水健史, 池中一裕 )	
アストロサイト分化因子としてのシステインプロテアーゼインヒビター	
( 岩崎靖乃, 長谷川明子, 池中一裕 )	
脳内 N-結合型糖蛋白質糖鎖の機能解明	
( 池田武史, 伊藤磯子, 池中一裕 )	
腫瘍特異抗原 MAGE-E1 のゲノム構造及び機能解析	
( 河野洋三, 中平健祐, 片倉浩理, 池中一裕 )	
有髄軸索上のイオンチャンネルクラスタリング機構の解析	
( 石橋智子, 中平健祐, 池中一裕 )	
液性情報研究部門 .....	27
概 要	
受容体活性化 Ca <sup>2+</sup> 透過性カチオンチャンネルの機能解析	
( 若森 実, 山田久信, 原 雄二, 森 泰生 )	
カルシウムチャンネル変異マウスの解析	
( 森 泰生, 若森 実, 松下かおり, Kadrul Huda, 井本敬二 )	
興奮収縮連関のメカニズムの解析およびカルシウムプローブの開発	
( 中井淳一 )	
電位依存性 Na <sup>+</sup> チャンネルに対する DHEAS の効果	
( 森 誠之, 井本敬二, 栗原照幸 )	
高次神経機構研究部門 .....	29
概 要	
CNR ファミリー多重欠損マウスの作製	
( 先崎浩次, 八木 健 )	
CNR ファミリーの細胞接着活性に関する解析	
( 武藤哲司, 八木 健 )	
CNR mRNA の体細胞変異の解析	
( 平山晃斉, 八木 健 )	
ゼブラフィッシュ CNR ゲノム構造の解析	
( 多田基紀, 八木 健 )	
マウス嗅球での周波数帯によって分離される独立な 2 つの経路	
( 田仲祐介, 八木 健 )	
マウスにおける新規 CNR ファミリーの単離と分子機能の解析	
( 竹井 豊, 八木 健 )	

情報記憶研究部門 ..... 31

概要

生体調節研究系

高次神経性調節研究部門 ..... 32

概要

初期視覚系における面の表現 光計測による解析

(谷 利樹, 横井 功, 伊藤 南, 小松英彦, 田中 繁)

初期視覚系における奥行き知覚の解析 単眼性の手掛かりと両眼視差の相互作用

(伊藤 南, 小松英彦)

多次元視覚探索課題を遂行中のサルV4野のニューロン活動

(小川 正, 小松英彦)

マカクザルV4野における陰影からなるテクスチャの表現

(花澤明俊, 小松英彦)

網膜電図(ERG)による二色性マカクザルの波長感受特性の測定

(花澤明俊, 小松英彦, 三上章允, 竹中 修, 後藤俊二, 加藤啓一郎, 近藤 彩, 小池 智, 大西暁士, 山森哲雄, Puti Sulisty Angelika, Bambang Suryobroto, Achmad Farajallah)

生体システム研究部門 ..... 34

概要

サル視覚誘導性上肢到達運動における一次運動野神経細胞の情報表現

(宮下英三)

歩行運動により賦活される脳領域の同定: サル直立二足歩行モデルを用いた糖代謝PETによる研究

(森 大志, 中崎克己, 橘 篤導, 高須千慈子, 達本 徹, 塚田秀夫, 森 茂美)

大脳皮質運動野-体幹・下肢筋群へのシグナル伝達様式: 経頭蓋磁気刺激法を用いた研究

(森 大志, 中崎克己, 高須千慈子, 森 茂美)

若齢期二ホンサルの身体成長に伴う直立二足歩行運動の獲得機序

(橘 篤導, 森 大志, 高須千慈子, 中崎克己, 森 将浩, 森 茂美)

ネコ小脳歩行誘発野の微小破壊と歩行運動時における運動分節の協調障害

(中崎克己, 森 大志, 森 将浩, 森 茂美)

ネコ室頂核-視床路終末線維の視床内分布と形態的特徴

(奥村 哲, J. Czarkowska-Bauch, 中崎克己, 森 茂美)

ラット腰髄に分布するアセチルコリンエステラーゼ陽性神経細胞の生後発達

(奥村 哲, Arpad Dobolyi, 森 大志, 森 茂美)

ラット線条体カルパコール刺激によって誘発される回旋運動と脳内c-Fos発現パターン

(奥村 哲, Janos Palhalmi, Katalin Kekesi, 森 大志, 森 茂美)

ネコ線条体の出力細胞, 介在神経細胞両者に対するセロトニン神経支配様式

(奥村 哲, Arpad Dobolyi, 松山清治, 森 大志, 森 茂美)

高次液性調節研究部門 .....	37
概要	
対連合記憶課題遂行中のサル 36 野と TE 野における記憶関連細胞の空間分布	
( 納家勇治, 吉田正俊, 伊藤昭光, 柴田愁子, 宮下保司 )	
ニホンザル下部側頭皮質 TEav 野-36 野間の局所結合と電気生理学的特性	
( 吉田正俊, 納家勇治, 宮下保司 )	
サル下部側葉における宣言的記憶形成にともなう BDNF の上昇	
( 徳山 宣, 奥野浩行, 宮下保司 )	
サル嗅皮質における脳由来神経栄養因子, ニューロトロフィン 3 とその受容体メッセンジャーRNA の発現	
( 橋本隆紀, 宮下保司 )	
大脳皮質機能研究系	
脳形態解析研究部門 .....	40
概要	
GABA <sub>B</sub> 受容体の脳内局在と機能解析	
( Akos Kulik, 重本隆一 )	
mGluR3 と AQP4 の共存と生理的意義の解析	
( 馬杉美和子, 藤本 和, 重本隆一 )	
HCN channel の脳内局在の解析	
( 納富拓也, 重本隆一 )	
シナプス前ドーパミン D2 型受容体と N 型カルシウムチャネルとの選択的共役	
( 初山俊彦 )	
mGluR1 の活性化を阻害する自己抗体による小脳失調症	
( 木下彩栄, 重本隆一 )	
ラット脊髄視床路ニューロン活動性の解析	
( 初山明子 )	
大脳神経回路論研究部門 .....	42
概要	
線条体介在ニューロン軸索終末におけるシナプス接合部の定量的解析	
( 川口泰雄, 窪田芳之 )	
アセチルコリン投射系による大脳皮質局所回路の修飾	
( 根東 覚, 川口泰雄 )	
心理生理学研究部門 .....	43
概要	
感覚脱失による脳の可塑的变化	
( 定藤規弘 )	
新生児期における脳可塑性の画像化	
( 定藤規弘 )	

- パーキンソン病における思考速度の低下  
(本田 学, 澤本伸克)
- そろばん熟練者の暗算能力の神経基盤  
(本田 学, 花川 隆)
- ヒトの可聴域上限をこえる空気振動に対する感受性についての研究  
(本田 学, 大橋 力)
- 多変量自己回帰モデルをもちいた補足運動野 - 一次運動野間の機能連結評価  
(本田 学, 加藤比呂子)
- 一次視覚野における周波数依存性反応: 1.5 テスラと 3 テスラでの比較  
(岡田知久)

## 統合生理研究施設

### 高次脳機能研究プロジェクト ..... 47

#### 概要

- サッカーを指標としたコリン作動性入力による動機付けの制御の解析  
(小林 康, 井上由香, 伊佐 正)
- 上丘局所回路の興奮伝播の動的機構  
(斎藤康彦, 伊佐 正)
- ラット上丘浅層ニューロンに発現する AMPA 型グルタミン酸受容体サブタイプ  
(遠藤利朗, 伊佐 正)
- 中脳ドーパミンニューロンにおけるニコチン型アセチルコリン受容体の活性化に伴うカルシウム感受性電流成分の活性化  
(山下哲司, 伊佐 正)

### 感覚・運動機能研究プロジェクト ..... 48

#### 概要

- 後頭部及び肩部刺激による体性感覚誘発脳磁図  
(糸見和也, 宝珠山 稔, 柿木隆介)
- 耳刺激による体性感覚誘発脳磁図  
(二橋尚志, 宝珠山 稔, 柿木隆介)
- Attention and visual interference affect somatosensory processing  
(Lam Khanh, Kakigi Ryusuke, Mukai Tomohiro, Yamasaki Hiroshi)
- 近位筋振動刺激による末梢側神経刺激誘発電位への影響  
(宝珠山 稔, 柿木隆介)
- 短潜時体性感覚誘発脳磁場成分と脳電位成分との対応  
(宝珠山 稔, 柿木隆介)
- 電気及び CO<sub>2</sub> レーザー刺激を用いた新しい方法による A-beta, A-delta, C 線維の伝導速度計測  
(Tran Tuan Diep, Lam Khanh, 宝珠山 稔, 柿木隆介)
- CO<sub>2</sub> レーザーによる C 線維刺激法を用いた脊髄視床路伝導速度(間接法)  
(Tran Tuan Diep, 乾 幸二, 宝珠山 稔, 柿木隆介)
- CO<sub>2</sub> レーザーによる C 線維刺激法で計測した脊髄視床路伝導速度(直接法)  
(秋 云海, 乾 幸二, 王 曉宏, Tran Tuan Diep, 柿木隆介)

- 表皮内針電極を用いたヒト皮膚 A-delta 線維の選択的刺激  
 ( 乾 幸二, Tran Tuan Diep, 宝珠山 稔, 柿木隆介 )
- 表皮内電気刺激法を用いた痛み関連誘発脳磁場  
 ( 乾 幸二, Tran Tuan Diep, 秋 云海, 王 曉宏, 宝珠山 稔, 柿木隆介 )
- 中心視野への注意によるパターンリバーサル視覚誘発電位への影響  
 ( 宝珠山 稔, 柿木隆介 )
- A first comparison of the multifocal visual evoked magnetic field and visual evoked potential  
 ( Wang Lihong, Kakigi Ryusuke, Kaneoke Yoshiki, Okusa Tomohiro, Barber Colin )
- 脳波と脳磁図を用いた「倒立顔認知」の研究  
 ( 渡辺昌子, 柿木隆介 )
- 自分の声 ( own voice ) に関連する聴覚誘発脳磁図  
 ( 軍司敦子, 宝珠山 稔, 柿木隆介 )
- 高周波純音による聴覚誘発脳磁場  
 ( 藤岡孝子, 柿木隆介, 軍司敦子, 竹島康行 )
- 音の想起に関連する初期の脳反応  
 ( 宝珠山 稔, 軍司敦子, 柿木隆介 )
- Neural activities during Wisconsin Card Sorting Test-MEG observation  
 ( Wang Lihong, Kakigi Ryusuke, Hoshiyama Minoru )
- 語音に対する誘発脳磁場反応：聞き分けトレーニング効果の検討  
 ( 小山幸子, 軍司敦子, 山田玲子, 矢部博興, 久保理恵子, 大岩昌子, 柿木隆介 )

## 脳機能計測センター

- 形態情報解析室 ..... 57
- 概要
- 超高压電子顕微鏡用広視野高解像度対物レンズの結像特性  
 ( 有井達夫 )
- ラット小脳の生後発達におけるエンドセリン受容体の発現と局在  
 ( 古家園子, 尾崎 毅, 堀 清次 )
- 生体情報処理室 ..... 58
- 概要
- 樹状突起活動電位の伝播調節メカニズムの解析  
 ( 坪川 宏 )
- 細胞内シグナル伝達系の活性とニューロン活動との時間的・空間的關係の解析  
 ( 坪川 宏, 高木佐知子 )
- 中枢ニューロンの容積調節と興奮性調節の機能的カップリングの解析  
 ( 高木佐知子, 坪川 宏 )
- 機能情報解析室 ..... 60
- 概要
- 静電的相互作用で駆動されるアミロイド誘起性蛋白質凝集機構  
 ( 今野 卓 )

意欲に関する脳活動の研究

( 達本 徹 )

統合バイオサイエンスセンター ..... 61

概 要

細胞膨張性グルタミン酸放出機構

( 挟間章博 )

動物実験センター ..... 62

概 要

技術課 ..... 64

1. 概要

( 大庭明生 )

2. 施設の運営状況

統合生理研究施設

(1)生体磁気計測装置室

( 永田 治, 竹島康行 )

脳機能計測センター

(1)形態情報解析室

( 山口 登 )

(2)機能情報解析室

( 佐藤茂基 )

(3)生体情報処理室

( 吉村伸明, 村田安永 )

動物実験センター

( 佐治俊幸, 小木曾 昇, 広江 猛 )

共通施設

(1)電子顕微鏡室

( 前橋 寛 )

(2)機器研究試作室

( 加藤勝巳 )

# 分子生理研究系

## 神経化学研究部門

### 【概要】

前年につづいて脳機能の分子レベルでの理解を深めるため、以下のように、情動反応にともなう遺伝子発現、シナプス小胞型抑制性神経伝達物質トランスポータの遺

伝子発現と機能、シナプス蛋白のリン酸化、GABA 合成酵素ノックアウトマウスの機能変化について研究した。

### 恐怖記憶によりマウス扁桃体で発現する遺伝子の検索

Oliver Stork\*, Simone Stork\*, 小幡邦彦

マウスに音刺激と電気ショックを組み合わせると(1分間隔で3回), 2週間後に音だけの刺激に恐怖反応を示す。その6時間後に扁桃体基底外側核で発現増加している遺伝子を検索した。対象は最初に音だけで電気ショックを与えないものとした。すなわちパンチアウトした組織から cDNA を作成し, subtraction hybridization して候補の遺伝子をとらえ, さらに reverse Northern blot analysis, virtual Northern blot, in situ hybridization によっ

て解析した。蛋白の sorting/ubiquitination factor である Praja 1 とモノアミン代謝酵素の aldehyde reductase の発現増加が見いだされた(それぞれ3倍, 2.2倍に)。前者の機能として新規合成されたシナプス蛋白のシナプス部への sorting を推測した。この成果を Learning & Memory 8: 209, 2001 に発表した。\*現所属: Otto-von-Guericke 大学, ドイツ, マグデブルグ市。

### GABA ニューロンを GFP で標識した遺伝子改変マウスの開発

柳川右千夫, 兼子幸一, 神原叙子, 八木 健, 小幡邦彦  
戸塚昌子(科学技術振興事業団, C R E S T)

GABA 合成酵素のグルタミン酸脱炭酸酵素(GAD; GAD65 と GAD67 の2型存在)は, 脳では GABA ニューロン特異的に発現する。生体において GABA ニューロンを標識することを目的として, GAD67 遺伝子に発光オワンクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質(GFP) 遺伝子をノックインした遺伝子改変マウスを遺伝子標的法により作成した。このマウスの脳組織標本について, GFP 自家蛍

光の観察および抗 GFP 抗体, 抗 GAD67 抗体を用いた免疫組織化学について検討した結果, GFP の蛍光が GABA ニューロンに認められることが明らかになった。この遺伝子改変マウスの利用により, GABA ニューロンの電気生理学的解析や発生過程の解析が進捗することが期待される。

## ヴェシクル型 GABA トランスポーター

柳川右千夫, 季 鳳雲, 海老原利枝, 蒔苗公利, 山肩葉子, 小幡邦彦

ヴェシクル型 GABA トランスポーター (VGAT) は, GABA をシナプス小胞へ蓄積させる。GABA 作動性神経伝達における VGAT の役割を明らかにする目的で, VGAT 遺伝子プロモーターの解析, 染色体マッピング, VGAT 結合分子の探索を行った。マウス VGAT 遺伝子プロモーターをルシフェラーゼ遺伝子に連結した融合遺伝子を培養細胞に導入して解析した結果, 転写開始点から 161 bp

の領域が基本転写活性に必要であることを明らかにした。また, マウス VGAT 遺伝子は, 第 2 染色体 H-13 領域に認められた。酵母の two hybrid 法を用いて VGAT 結合分子の探索を行い, 単離した候補分子について, 免疫沈降法を用いて解析を行っている。これらの分子を解析することにより, VGAT 分子が細胞内においてシナプス小胞への移動或いは局在する分子機序を明らかにする。

## グリシントランスポーター 2 の遺伝子構造と発現

柳川右千夫, 小幡邦彦

グリシントランスポーター 2 (GlyT2) は, 神経終末から放出された伝達物質, グリシンの再取り込みを行う。その発現は, 中枢神経系ではグリシン作動性ニューロンに認められる。マウス GlyT2 の発現調節機構を明らかにする目的で cDNA を単離し, 塩基配列を決定した結果, マウス GlyT2 蛋白は 798 個のアミノ酸から構成されることが予測された。マウス脳発生過程における GlyT2 遺伝

子発現を RT-PCR 法で解析した結果, 胎生 10.5 日齢で初めて検出され, 発達段階特異的に発現量が増加することを観察した。さらに, マウス GlyT2 遺伝子を BAC ライブラリーから単離し, 構造解析を行った。遺伝子の全長は, 約 55 kb で, 16 個のエクソンから構成されていることを明らかにした。この遺伝子構造は, 遺伝子標的法を用いたノックアウトマウスの作成に有用な情報となる。

## 遺伝子変異動物による Ca<sup>2+</sup>/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ の機能解析

山肩葉子, 柳川右千夫, 小幡邦彦

Ca<sup>2+</sup>/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ (CaMK) は, 中枢神経系に豊富に存在する多機能型のプロテインキナーゼで, 神経活動の制御やシナプス可塑性に深く関わると考えられている。我々はこれまでに, 生体内における神経活動と CaMK の活性状態との関連を明らかにしてきた。本研究においては, CaMK の主要なサブユニットである の遺伝子を不活性型に変異させたマウスの作製を試み, その解析によって, 生体内に

おける CaMK の果たす役割について新たな知見の獲得をめざしている。本年度は, 点変異の導入, 薬剤耐性遺伝子, ネガティブ遺伝子を含むターゲティングベクターの ES 細胞への導入を行い, 相同組換え型の ES クローンを複数獲得した。現在, これら陽性クローンを用いて, マウス胚へのマイクロインジェクションを行い, キメラマウスを作製中である。

## 急性神経活動によるシナプシンのリン酸化調節

山肩葉子, 小幡邦彦

シナプシンは神経終末に局在するシナプス小胞結合蛋白として、リン酸化状態依存的に、神経伝達物質の放出調節や神経終末の形態変化に関与すると考えられている。我々は、生体内におけるシナプシンリン酸化の調節機構を明らかにするために、ラットに電撃いれん刺激を与え、海馬、大脳皮質ホモジネート中のシナプシンのリン酸化状態を、リン酸化部位特異抗体を用いて測定した。その結果、刺激直後にリン酸化の減少が起こっ

た後に、site 4/5 では 5 分にピークを持つ急激なリン酸化の増加が認められ、site 6 では 20 分にピークを持つ緩やかな増加が認められた。MAP キナーゼ (MAPK) の活性化を阻害する SL327 を前投与すると、site 4/5 のリン酸化の増大は抑制されたが、site 6 の増大は有意には抑制されなかった。このことから、シナプシンの site 4/5 のリン酸化は、生体内においても MAPK による調節を受けることが明らかとなった。

## GABA 合成酵素 (GAD65) 欠損の扁桃体局所回路への影響

兼子幸一, 小幡邦彦

GAD65 欠損マウス扁桃体では野生型に比べて GABA 含量が約 40% 減少しており、欠損マウスは扁桃体が関係する情動行動の亢進を示す。GAD65 欠損がシナプス機能に与える影響を検討するため、扁桃体外側核(LA)の抑制性及び興奮性シナプス伝達をスライスパッチクランプ法で解析した。低頻度刺激で誘発される抑制性シナプス後電流(IPSCs)には野生型と変異型の差がなかったが、

高頻度(100 Hz)刺激の場合には重畳した IPSCs の減衰の特定数は変異型で小さく、GABA 放出の低下が認められた。恐怖条件付け刺激に関連する視床から LA への興奮性入力を高頻度刺激して誘導した NMDA 受容体依存性シナプス可塑性(長期増強)も変異型で亢進し(野生型 33% vs 変異型 70%)であり、高頻度刺激時の GABA 放出量低下が興奮性シナプスの可塑性を促進することが示された。

## 超微小形態生理研究部門

## 【概要】

「構造と機能」という分子生物学のパラダイムは生物の機能が生体高分子、特に蛋白質の独自の構造によって支えられていることを明かにして来た。一方細胞より上の階層では組織、器官を見ると構造が機能と直結しているのはむしろ自明である。しかし生体高分子と組織・器官の中間に位置する細胞にはそのレベル独自の「構造と機能」が明確でない。細胞は一見オルガネラと各種小胞のランダムな集まりのように見える。しかし私達はこれら微小器官の集積の背後に、実は明確に細胞構造を規定する実体があると考え。特に細胞内オルガネラ形成を通して見た「細胞の形と働き」に興味がある。細胞レベルの生理現象の背後には活動維持や、形態維持のための

巧みな情報と物質の輸送機構がある。この物質、情報の拡散および非拡散輸送の結果としてオルガネラ編成と骨格系の編成が行われ、さらに情報伝達経路が確定すると考える。こうした方針のもとに行われた具体的報告を以下に記す。

外分泌腺では分泌刺激により水輸送と開口分泌が両方活性化されるが、それぞれのエネルギー要求性/相互作用は *in vitro* での蛋白分泌と水分分泌の同時測定が不可能であるため不明であった。村上是は唾液腺血管灌流系を材料に分泌時間経過、形態観察、開口放出関連蛋白、分泌物質の運動性の 4 チームの共同研究グループを組織し、研究を展開した。その結果は 5 月、9 月に岡崎カンファレン

スセンターにて開催した研究集会 Coupling mechanisms of fluid secretion and exocytosis および 2001 年 2 月ゴードン会議において、発表 / 議論された。

国内共同研究については一般共同研究報告に記載した。本稿では生理学研究所およびケンブリッジ大学、カリアリにて実施された研究を報告する。

### 複素電子顕微鏡の開発

Radostin Danev, 杉谷正三, 村田和義, 大河原 浩, 永山國昭

従来の顕微鏡の限界を破る新しい原理として、量子現象の波動関数を直接観察する複素観測法を見出した (Nagayama, 1999)。この方法を電子波を使う電子顕微鏡の分解能とコントラスト向上に応用するため、平成 9~11 年度に導入した極低温分析型電子顕微鏡の一部改良を行った。まず位相差法を確立するため Zernike 位相板の作成をカーボン薄膜を用いて行った。通常の真空蒸着膜を多孔絞り (50 μm) にのせ、各穴をはる薄膜に 1 μm

の穴をフォーカスイオンビームであけて Zernike 位相板とした。これを用いて位相差電子顕微鏡像が撮られた。この方法と通常電子顕微鏡を組み合わせ、同一試料に対し、2 回の測定を行い、波動関数そのものを振幅と位相の複素像として表示することに成功した。そして電子顕微鏡の収差やピンボケを数値的に取り除くことができた。さらに従来の顕微鏡法との性能の差を見極めるため標準サンプルの測定とシミュレーションを行った。

### 融合タンパク質による電子顕微鏡用分子ラベルの開発

村田和義, 高木正浩, 永山國昭

タンパク質分子を in vitro または in vivo で電子顕微鏡観察する場合、目的のタンパク質がどこに存在し、またどのように他の分子と相互作用しているかを知るために目的のタンパク質を特異的にラベルする必要がある。本研究では、多数の金属と結合を行うタンパク質を用いて融合タンパク質を発現させ、後から適当な重金属を取り

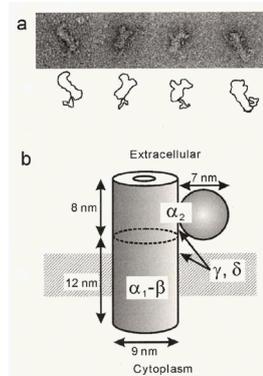
込ませることによってタンパク質のを特異的にラベルする分子ラベルの開発を行う。予備実験の結果一分子当たり 7 つの金属イオンを取りこむ金属結合タンパク質メタロチオネインが適当であるとの結論に至ったので今年度はそのクローニングと大量発現系の確立を図った。

### 電子顕微鏡による筋肉 L 型カルシウムチャネルの構造解析

村田和義, 小田原成優, 永山國昭  
國安明彦, 中山 仁 (熊本大・薬)

本研究ではウサギ骨格筋を精製し、5 つのサブユニット (  $\alpha_1, \alpha_2, \beta, \gamma, \delta$  ) からなる完全な L 型チャネルを得て電子顕微鏡の 1 分子構造解析を行った。まず  $\alpha_1$  のみからなる部分コンプレックスを解析し、12nm 長の中空台形構造を持つことを見出し、4 つの非対称ドメインで囲まれたチャネルポアを確認した。次に完全コンプレックスを解析し、それが 20nm 長の円筒構造を持ち、かつ球形部を修飾付着させていることを確認した。  $\alpha_1$  サブユニットの完全コンプレックス内の位置を見るた

めベータサブユニットの抗体を用いてその同定を行ったところ、修飾部位から離れた所が  $\alpha_1$  部位であると認められた。そして  $\alpha_1$  部位が膜貫通部位と推測された。この結果より L 型カルシウムチャネルの非対称構造を図のように推定した。



## 位相差電子顕微鏡によるリアノジン受容体の一分子観察

松本友治, 村田和義, 大河原 浩, 永山國昭  
國安明彦, 中山 仁 (熊本大学・薬学部・生体機能科学)

本研究ではリアノジン受容体の負染色試料に対し, 位相差像の撮影を試みた。通常の電子顕微鏡像では, なるべく高い空間周波数成分まで拾うようにフォーカスを合わせるとコントラストが低下してしまう。一方, 位相差電子顕微鏡像では, 対物レンズの後焦点面近傍に配置された位相板の中心孔を光軸上に合わせた場合にはコントラストのついた位相差像が得られ, リアノジン受容体粒子の輪郭が際立つようになった。得られた画像のパワースペクトルの動径平均からコントラスト伝達関数を推定したところ, 位相差像では原点近傍で高い値をとる  $\cos$  関数型の変調を受けていることが確かめられた。

## 細胞機能の可視化・マニピュレーション技術を用いた細胞・オルガネラの形態形成分子機構の研究

村田昌之, 加納ふみ, 永山國昭

光学顕微鏡下の単一細胞内で GFP 融合タンパク質の輸送・ターゲティング及び GFP 標識オルガネラのダイナミクスを定量的に解析し, かつ生化学的に関連因子を探索するため, 「GFP 可視化技術」と形質膜を一部透過性にした「セミインタクト細胞系」をカップルさせた顕微測光アッセイシステム (エパネセント光学系と W-VIEW 検出系を組み合わせ) を作成した。本システムを用い, (i) 細胞分裂期 (M 期) における CHO 細胞のゴルジ体, 小胞体 (ER) の形態変化・娘細胞への分配とオルガネラ再構築過程を GFP 可視化し, その分子基盤として  $cdc2$  キナ

ーゼに制御された NSF 及び  $p97/p47$  による細胞周期依存的な膜融合反応があることを世界に先駆けて証明した。  
(ii) 単一のセミインタクト細胞内で  $ER \rightleftharpoons$  ゴルジ体 形質膜間小胞輸送の各素過程を可視化・再構成に成功した。間期・M 期の細胞質を用い, 細胞周期依存的な各輸送過程のキネティックスを定量的に解析し, M 期にはゴルジ体 ER の逆行輸送以外は全て停止する ( $cdc2$  キナーゼ依存的) こと, その結果, ゴルジ体の一部が ER へ吸収され娘細胞に分配されることを明らかにした。

## エンドサイトーシス選別輸送のメカニズムの解析

大橋正人, 石堂美和子, 永山國昭  
山本章嗣 (関西医大)

エンドサイトーシス経路は, 細胞のさまざまな環境応答の前線となっている膜動輸送系である。我々は, エン

ドサイトーシス経路による細胞の情報伝達の統合とそのメカニズム, またその異常による病態などの解明を目指

し、この経路の哺乳類細胞の変異株をもちいて、細胞生物学的、体細胞遺伝学的アプローチを加えている。フローサイトメトリーによりエンドサイトーシス経路を解析し、その特性に基づいて細胞を分離する方法を開発し、これまでに後期エンドソーム過程に変異を持つ表現型の異なる複数の相補群に分類される独自の CHO 変異株を

得ている。本年度は CHO 細胞において、レトロウイルスベクターによる発現クローニング法を確立し、変異株のこの方法を含む解析により、後期エンドソームに特徴的な構造である多胞体(マルチベシキュラボディー:MVB)からゴルジに向かう受容体の、MVB からの選別・搬出にコレステロールが必要である事を明らかにした。

### 溶媒環境と蛋白質の安定性、および構造形成問題

高橋卓也, 永山國昭

生体高分子の安定性は溶媒組成を変えることにより変化させることが可能である。そこでアミノ酸の各種溶媒に対する相互作用エネルギーを測定し、それらを基にして蛋白質の安定性を予測できる理論及び計算手法を開発

している。水の安定性への影響を統計力学的理論及び分子動力学シミュレーションで研究した。また蛋白質の構造形成原理や各種溶媒環境における静電相互作用の効果を明らかにした。

### 灌流ラット顎下腺における傍細胞輸送経路

村上政隆, 大河原 浩

Bruria Sachar-Hill, Adrian E. Hill (ケンブリッジ大学生理科学部)

種々の分子量の標識デキストランをプローブとして唾液腺腺胞部の傍細胞経路の大きさを検討した。血管灌流ラット顎下腺の灌流系に  $^3\text{H}$  デキストランを加え、アセチルコリン刺激により分泌した唾液を採取、size exclusion chromatography にて唾液、灌流液、細胞間液に分布するデキストラン分子のサイズを決定した。

分子径に対する分泌プローブの唾液 / 灌流液比は二つの成分に分けることができた。1) 自由拡散 (Stokes-

Einstein) 双曲線成分に一致する大きな通過経路を示す。2) 5 に切片をもつ直線成分で溶媒牽引による。直線成分は唾液 / 灌流液比は水の分子径 1.5 でほぼ 1 の値に外挿された。このことは水のほとんどが細胞間隙 / tight junction を通過することを強く示唆した。

原唾液は細胞の中からの分泌と傍細胞経路を通過した成分との混合物であり、細胞経路の分泌信号系に加え、傍細胞経路の調節機構の研究を展開する必要がある。

### 唾液分泌過程における微細構造の三次元電子顕微鏡観察

村上政隆, 高木正浩, 前橋 寛

Alessandro Riva (Cagliari 大医, 細胞形態学)

腺房細胞における分泌界面は二つの細胞間に存在する分泌細管 intercellular canaliculi (IC) である。管腔側膜は細胞の頂部のみならず、大部分はこの IC であり、透過電子顕微鏡による二次元的観察に加え、走査型電子顕微鏡観察による三次元観察が必要である。耳下腺の血管灌流

標本を用い、光学・透過電子・走査電子顕微鏡を以て、IC と周辺微細構造を観察した。ムスカリン受容体刺激では IC 周辺の rER の拡張、mitochondria 電子密度増加、まばらな開口放出像、microvilli 減少、IC の初期一過性拡大を観察した。アドレナリン性受容体を同時に刺激す

ると、IC に多くの開口分泌がみられ、その周辺にさらに分泌顆粒が開口分泌する像が観察された。また microvilli は消失し、IC 周辺の rER の拡張、mitochondria 電子密度増加も同時に観測された。分泌活動時の、rER の拡張は細胞内 Ca 代謝と、mitochondria 電子密度増加はエネルギー代謝増加と関連づけられた。また、開口分泌像の

増加は管腔膜面積の増大を示すが、同じ刺激条件下で水分泌の促進は観察できなかった。これは、管腔への水輸送経路が、膜面積の増大によるものではなく、アクアポリンなどの水輸送蛋白の活性化あるいは傍細胞輸送経路の開通による可能性を示唆している。

## 細胞内代謝研究部門

### 【概要】

細胞内代謝部門では、生物活性物質や細胞 - 細胞間刺激に対する細胞の刺激受容機構、細胞内情報伝達機構、細胞機能発現機構を対象とし、特に細胞内カルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) の動態を画像解析装置でとらえ詳細に解析して、これらのメカニズムの解明を目指している。毛利と宮崎は白川英樹、尾田正二(東京女子医大)とともに、マウス卵内への精子抽出物注入によって起こる  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションにおける細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入と小胞体からの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離に関する解析を継続して行い、論文にまとめて発表した。また毛利、吉友、宮崎は淡路健雄(東京女子医大)らとともに、マウス卵における蛋白質強制発現の方法を確立する実験を行った。吉田は、基礎生物学研究所の檜山武史、渡辺栄治、野田昌晴とともに、長らく不明であった新型  $\text{Na}^+$  チャネル( $\text{Na}_x$ )の生理機能を研究し

た。また藤村幸一、小野智恵(長崎大)とともに、難治てんかんに対する脳梁離断術の効果を解析した。

共同研究については、宮崎は卵活性化因子の同定と作用機序に関する共同実験を行った。また、飯野正光(東京大大学院医学系研究科教授)らと卵細胞における  $\text{IP}_3$  動態の可視化に関する実験を行った。矢田(前助教授、自治医科大学教授として転出)は塩田清二(昭和医科大学教授)らと神経ペプチド PACAP の神経細胞分化誘導作用と細胞内とシグナル伝達機構に関する共同実験を行った。また河原克雅(北里大学医学部教授)を代表者として「 $\text{Ca}^{2+}$ シグナルと膜輸送体の発現および機能調節」と題する研究会を開催した。さらに宮崎がオーガナイザーとなって国際シンポジウム "Mechanisms of Cell Signaling in Early Development" を開催した。

### マウス卵 $\text{Ca}^{2+}$ オシレーションにおける $\text{Ca}^{2+}$ 流入と $\text{Ca}^{2+}$ 遊離の解析およびその数値シミュレーション

毛利達磨, 宮崎俊一

白川英樹, 尾田正二 (東京女子医大)

マウス卵の受精時あるいは卵内への精子抽出物注入によって、反復性の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  増加反応 ( $\text{Ca}^{2+}$  オシレーション) が誘発される。個々の  $\text{Ca}^{2+}$  増加は小胞体からの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離によるが、 $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションの持続には細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入が必要である。マウス卵に  $\text{Ca}^{2+}$  結合性蛍光色素 Fura-2 を予め取り込ませ、細胞外液に  $\text{Mn}^{2+}$  を添加したのち精子抽出物を注入し、 $\text{Ca}^{2+}$  流入系を介して細胞内に流入した  $\text{Mn}^{2+}$  による Fura-2 の蛍光の減少 (quenching) を測定した。 $\text{Ca}^{2+}$  遊離に伴って  $\text{Mn}^{2+}$  流入が

起こり、やがて  $\text{Mn}^{2+}$  オシレーションが起こり始めた。細胞膜を介する流入・排出および小胞体膜を介する遊離・再取り込みの過程で  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mn}^{2+}$  が競合的に移動すると仮定して Fura-2 蛍光強度変化の数値シミュレーションを行ったところ、実験結果とよく一致した。持続的に流入した  $\text{Mn}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$  が小胞体に取り込まれたのち遊離されることを示すもので、 $\text{Ca}^{2+}$  流入と  $\text{Ca}^{2+}$  遊離の機能関連が明らかにされた。

## マウス卵への mRNA 注入による蛋白質発現法の確立

毛利達磨, 吉友美樹, 宮崎俊一  
淡路健雄, 會田拓也, 尾田正二 (東京女子医大)

哺乳動物卵の受精に関連する蛋白質の発現や, 小胞体内  $Ca^{2+}$  濃度測定プローブ蛋白質を発現させることを目標として, まず実験法を確立する試みを行った。green fluorescent protein (GFP) の変異体 EYFP の mRNA にミトコンドリア移行配列を付加し, さらに約 250 個の 3' polyA tail を付加してマウス未成熟卵に注入し, EYFP の発現を蛍光観察によって追跡した。注入 3 時間後から EYFP の

発現が認められ, 時間とともにほぼ直線的に増加して 12 ~ 15 時間でプラトーに達した。ミトコンドリアへの移行は MitoTracker によるラベルされたミトコンドリアの分布との一致から確認できた。この強制発現により, 卵の受精能は影響を受けなかった。この方法を利用して, 小胞体への移行配列を付加した  $Ca^{2+}$  測定用プローブ CAMELEON をマウス卵に発現させる実験を行った。

## 機能不明新型 $Na^+$ チャンネル( $Na_x$ ) の生理機能解析

吉田 繁  
檜山武史, 渡辺栄治, 野田昌晴 (基生研)

電位感受性を示す  $Na^+$  チャンネル( $Na_v1$ ) のクローニングの過程で,  $Na_v$  とは一次構造相同性は低い (50% 弱) もの同範疇に属すると思われるものが見つかり  $Na_v$  と名付けられた。しかし, その後の研究で  $Na_v2$  が膜電位変化では開かないことが判明し, 機能不明チャンネル  $Na_x$  ( $x = unknown$ ) という新名称を与えられた。マウスの後根神経節細胞には, この  $Na_x$  が多量に存在していることと, 細胞外の  $Na^+$  濃度上昇によって開くイオンチャンネルが報告されていることから, 「 $Na_x$  は  $Na^+$  濃度感受性  $Na^+$  チャネ

ルである」との仮説を立てて実験を始めた。 $Na^+$  感受性蛍光色素で細胞内  $Na^+$  濃度変動を観察すると, 細胞外液の浸透圧ではなく  $Na^+$  濃度の変化に応じることが判明した。同様の結果は脳弓下器官 (subfornical organ) 神経細胞でも得られた。しかし,  $Na_x$  ノックアウトマウスでは反応が観察されなかった。 $Na_x$  の生理機能が判明したので, 「濃度感受性ナトリウムチャンネル  $Na_c$  ( $c = concentration$ )」と改称することを提唱した。

## 難治てんかんに対する脳梁離断術のラットによる実験学的考察

吉田 繁  
藤村幸一, 小野智恵 (長崎大)

薬物治療に抵抗を示すヒトの難治てんかんに対して「脳梁離断術」が試みられており, 術後の脳波所見では発作波の一側化や非同期化だけでなく, 発作波自体の頻度減少ないしは完全消失さえ得られている。この脳梁離断術の効果は, 一側皮質の発作波が対側に伝わる伝導路を断つことにあるとされているが, それ以外に「脳梁が大腦

皮質の興奮性を高めているのを遮断する」効果もあるのではないかと我々は考えた。この仮説を検証するために, 全身麻酔下ラットの右脳梁線維および左視床外側腹側核に刺激電極を左前頭皮質に記録電極をそれぞれ配置し, 視床皮質反応を大脳皮質の興奮性の指標として, 持続的経脳梁入力 (低頻度脳梁反復刺激) の存在下で増強が見

られるかどうかを観察した。その結果、持続的経脳梁入力の存在下では視床皮質反応の増強が見られ、「脳梁は大

脳皮質の興奮性を高めている」という仮説は正しいと考えられた。

## 細胞器官研究系

### 生体膜研究部門

#### 【概要】

平成 12 年 1 月より前任地東京大学大学院医学系研究科より 2 光子レーザー顕微鏡や電子顕微鏡を含む研究機器群の搬入を行い, 3 月までに機器の移動・調整を完了し, 次のテーマについての研究を開始した。1) 神経, 分泌

細胞のカルシウム依存性開口放出機構の研究, 2) 多光子励起法を用いた神経機能の研究。また, 久木田文夫助手はイオンチャネルの動力学的研究を, 筒井泉雄助手は興奮収縮連関の系統発生的研究を引き続き進めている。

#### 神経, 分泌細胞のカルシウム依存性開口放出機構の研究

河西 春郎, 根本 知己, 高橋 倫子, 岸本 拓也, 劉 婷婷, 木村 良一

カルシウム依存性の開口放出を特徴とする培養神経細胞, 膵臓ベータ細胞, 膵臓外分泌腺細胞, 副腎髄質細胞, PC12 細胞などの神経・分泌細胞にケイジドカルシウム試薬を用いて一定のカルシウム上昇与えたときの開口放出の過程を系統的に検索している。外分泌腺及びベータ細胞においては 2 光子励起法を用いる新しい開口放

出の可視化に成功し, 現在では in vivo に近い状態の標本で開口放出を直接観察できる。副腎髄質細胞や PC12 細胞においては, 膜容量測定と独立して膜面積変化を測定する方法を開発し, 定量的な比較を行っている。更に, 副腎髄質細胞の電子顕微鏡観察に向けての作業を進めた。

#### 多光子励起法を用いた神経機能の研究

河西 春郎, 松崎 政紀, 早川 泰之

活動状態依存的な神経回路の可塑性は多くの脳機能の基盤をなす。神経可塑性の誘発因子としてはシナプス後部の細胞内カルシウム濃度の上昇があり, 単一シナプスの重みが, 記憶をコードしていると推察されてきた。この記憶機構を定量的に明らかにするために, 新たなケイジドグルタミン酸の合成に成功し, シナプス後部の受容体の機能分布を 2 光子励起法を用いて単一シナプスレベルでマップする方法の応用を進めている。これにより, シナプスの重みがどのように空間的に分布しているのか,

また, 可塑性誘起時に重みの変化はどのような広がりを持つのかを検討している。また, 神経可塑性は比較的高濃度の細胞内カルシウム動態で調節されている可能性が高く, その時間的空間的の広がりには神経可塑性誘発の鍵となると考えられる。そこで, カルシウム濃度分布の定量的測定, 細胞内カルシウム緩衝能, シナプス後部のミトコンドリアの役割を, 2 光子励起法を用いて定量的に調べている。

#### K チャネルの開状態ではポア内容積は減少する

久木田 文夫

神経の膜電位依存性イオンチャネル・ポアは親水性であり、開状態でイオンを透過することは自明のことである。従って、開状態ではポアの親水性の程度や親水性部分の容積が増大する(但し、ポア内でゲートの扉が移動する場合は容積の変化はない)ことも、当然だと思われる。イカ巨大軸索の実験で、イオン透過性が大きいことが直ちに親水性ポアの容積が増大することを意味しないことが明らかになった。ポアに侵入できない大きな非電解質で、ポア内の水の関与する自由エネルギーを下げる

とすると、親水性ポアの容積は減少する。この浸透圧の効果は Na チャネルでは閉状態を、K チャネルでは開状態を安定化する。イオン透過性はポアの細い部分で決定され、広い意味のゲート機構(ポアの内部構造が変わること)にはポア全体が寄与するので、ポアが複雑な 3 次元構造を持つほど、上記の原則は当てはまらない。イオンチャネルの構造ゲノム的な分類には、ポア内容積変化のデータが不可欠であると思われる。

## Chelophyes における興奮収縮連関

筒井泉雄

筋収縮と弛緩は細胞内オルガネラ(SR, ER, T管)での  $Ca^{2+}$  移動によって制御されていて、収縮連関機構に関連した小胞体(SR)とT管の役割の解明は動物の筋細胞の進化を探る上で重要な意味を持っている。骨格筋において筋収縮に先立ち  $Ca^{2+}$  放出をつかさどるSRの機構がどのようにして派生してきたかについての解明はいまだ成されていない。今回、SRとT管を併せ持つ海生動物 sagitta を用い無脊椎動物に残されているT管とSR機構の役割について研究した。sagitta においてはT管は

脊椎動物と同様に Na スパイクを発生する。またSR器官はリアノジン受容体を持っているが、筋収縮に先立つ  $Ca^{2+}$  放出には関与していないことが判明した。脊椎動物骨格筋様の機能を持っていても、連関機構は完成しておらず、脊椎動物型の  $Ca^{2+}$  放出能の発現は、原索動物以降であることが確認された。このことはSRの  $Ca^{2+}$  放出機構が骨格筋の発現と密接に関連していることを示して、現在SRにおける  $Ca^{2+}$  放出因子を検討中である。

## 機能協関研究部門

### 【概要】

機能協関研究部門では、容積調節や膜輸送や環境情報受容などのように最も一般的で基本的な細胞活動のメカニズムを、チャネル、トランスポーター、レセプターなどの膜機能蛋白分子の働きとして細胞レベルで統合的に解明し、それらの異常と疾病や細胞死との関係についても明らかにしようとしている。また、チャネルやトランスポーターの多機能性や、両者間の構造的・機能的相関についても分子生理学的に研究している。

主たる研究テーマは次の通りである。

「細胞容積調節機構と細胞死機序」: 細胞は正常容積を維持する能力を持ち、その破綻は細胞死(アポトーシスやネクローシス)に深く関与している。これらのメ

カニズムの研究を行い、その破綻防御の方策を探求する。

「心筋・脳神経アニオンチャネルの虚血応答の分子機構」: 虚血の影響が最も重大な心筋と脳においてアニオンチャネルがその障害と防御にいかに関与しているかを解明する。「イオンチャネルの多機能性の分子機構」: イオンチャネルはイオン輸送や電気信号発生のみならず、環境因子に対するバイオ分子センサーや、他チャネル/トランスポーター制御にも関与する。この多機能性のメカニズムの解明を行う。「消化管上皮細胞の分泌・吸収機能と分子メカニズム」, 「腎密集斑細胞 NaCl センサー機能と分子メカニズム」などについても研究している。

細胞容積感受性クロライドチャンネルのカルシウムレセプターによる制御

清水貴浩, 森島 繁, 岡田泰伸

殆どの細胞は内外の浸透圧変化に曝されても、膨張や収縮が強いられた後に正常容積へ復帰する Regulatory Volume Decrease (RVD) や Regulatory Volume Increase (RVI) 能力を持つ。RVD は多くの細胞で  $K^+$  及び  $Cl^-$  チャンネルの活性化によって達成される。本研究では Intestine 407 株細胞における容積感受性  $Cl^-$  チャンネルの調節に、G 蛋白共役型の膜レセプターであるカルシウムレセプター (CaR) が関与することを証明した。浸透圧性膨張時には細胞内  $Ca^{2+}$  濃度が上昇し、Caポンプの働きで細胞外膜近傍の領域でも  $Ca^{2+}$  濃度増が起こり、CaR は RVD をオートクリン的に刺激するものと推定された。これを図 1 右半分に模式的に要約した。本研究成果は次の論文に発表した (Shimizu, Morishima & Okada 2000 J. Physiol. 528, 457-472)。

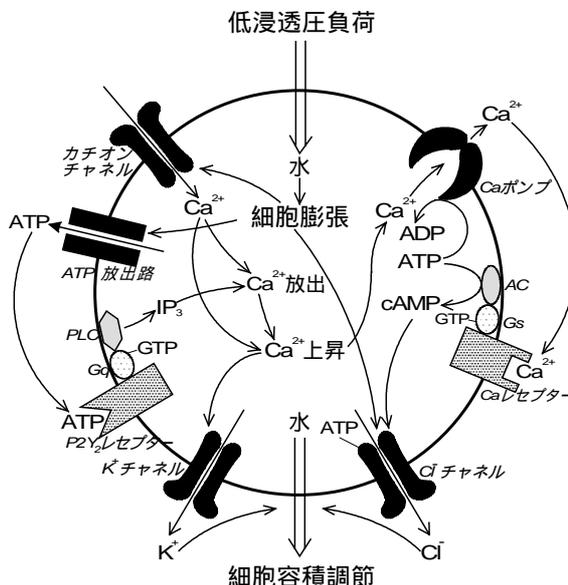


図 1 . RVD の分子メカニズムの模式図

細胞膨張誘起性 ATP 放出の CFTR による調節

挾間章博, 范 海天, I. Abdllaev, 前野恵美, 田中彰子, 赤塚結子, 岡田泰伸

浸透圧性膨張時には ATP が細胞外へと放出されるが、CFTR がこの放出に関与する可能性が提起されたので、この点を検討した。CFTR を強制発現させると C127 乳腺株細胞からの浸透圧性膨張時の ATP 放出は著しく亢進した。しかし、cAMP で CFTR  $Cl^-$  チャンネルを活性化させても ATP 放出が見られず、CFTR  $Cl^-$  チャンネル阻害剤 glibenclamide は細胞膨張誘起性 ATP 放出に何の影響も与

えず、逆に ATP 放出阻害剤  $Gd^{3+}$  は CFTR  $Cl^-$  チャンネル活性に何らの影響も与えなかった。従って、CFTR は ATP 放出を亢進させはするが、それ自体が ATP 放出路を与えるものではないことが明らかとなった。これらの結果は次の論文に報告した (Hazama, Fan, Abdullaev, Maeno, Tanaka, Ando-Akatsuka & Okada 2000 J. Physiol. 523, 1-11)。

細胞膨張誘起性 ATP 放出による容積調節性  $K^+$  チャンネルの調節

出崎克也, 津村剛彦, 前野恵美, 岡田泰伸

Intestine 407 細胞の RVD は ATP 水解酵素 apyrase や  $P2$  レセプター阻害剤 suramin の細胞外投与によって部分

的に抑制され、 $\mu M$  レベルの細胞外 ATP の添加によって亢進された。Intestine 407 細胞には  $P2Y_2$  レセプターが発

現していることが確認された。P2Y<sub>2</sub> レセプター刺激によって細胞内 Ca<sup>2+</sup> 動員がもたらされ、Ca<sup>2+</sup> 依存性 K<sup>+</sup> チャネルの活性化が引き起されるが、Cl<sup>-</sup> チャネルの活性は引き起されなかった。従って、細胞膨張時の Ca<sup>2+</sup> 動員は放出 ATP による P2Y<sub>2</sub> レセプター刺激で亢進され、Ca<sup>2+</sup> 依

存性 K<sup>+</sup> チャネルの著しい活性化をもたらして RVD 達成を促進するものと結論された。これらは図 1 の左半分に模式的にまとめてある。本研究結果は次の論文に発表した (Dezaki, Tsumura, Maeno & Okada 2000 Jpn. J. Physiol. 50, 235-241)。

### アポトーシス誘導における細胞容積調節異常の役割

前野恵美, 石崎泰樹, 金関 恵, 挟間章博, 岡田泰伸

アポトーシスにおいて細胞断片化前に見られる apoptotic volume decrease (AVD) はカスパーゼ活性化に先行し、カスパーゼ阻害剤で抑制されなかった。AVD 進行中の細胞では低浸透圧下の容積調節 RVD が著しく促進していた。RVD を実現させる容積感受性 Cl<sup>-</sup> チャネルと K<sup>+</sup> チャネルに対するブロッカーで前処理すると AVD 発生も RVD 促進も阻止された。また、AVD 阻止によってチトクローム c 放出、カスパーゼ活性化、DNA ラダーや形態的アポトーシス像の発生も消失し、細胞死は阻止された。従って、AVD はアポトーシスに不可欠の初期反応であり、これには容積調節性チャネルの活性化が伴われているものと結論された (図 2)。本研究結果は次の論文に発表した (Maeno, Ishizaki, Kanaseki, Hazama & Okada 2000 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 9487-9492)。

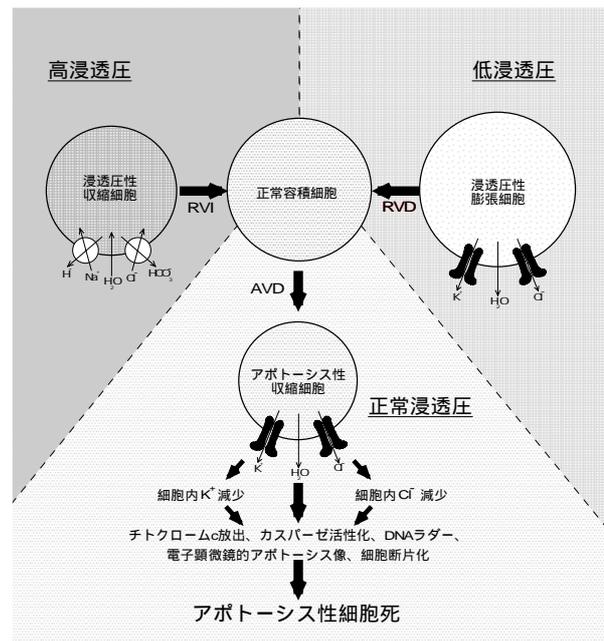


図 2. 細胞容積調節メカニズムと、その破綻によるアポトーシス性細胞死誘導の模式図

# 生体情報研究系

## 神経情報研究部門

### 【概要】

われわれの研究室では哺乳類神経系の発生・分化機構について研究している。特に神経上皮細胞(神経幹細胞)からどのようにして全く機能の異なる細胞種(神経細胞, アストロサイト, オリゴデンドロサイトなど)が分化してくるのか, について興味を持って研究を進めている。また, 得られた新しい概念や技術はできるだけ社会の役に立てよう努めており, 臨床研究への応用を視野に入れながら, 病態の解析にも努力している。

脳神経系の発生・分化を考えると, 内因的要因(遺伝子に支配されるもの)および外因的要因(外部からの刺激・情報により分化方向が規定されるもの)に分けて考えるのは当然であるが, 脳神経系では他の組織の発生とは異なり特徴的なことがある。それは多様性である。一言に神経細胞と言っても顆粒細胞, 錐体細胞などいろいろな形態の細胞があるし, 大脳皮質の錐体細胞はどの領域の細胞かによりその機能が異なる。また, 神経伝達物質の種類も様々である。大げさに言えば, 神経細胞は一つ一つが個性を持っており, そのそれぞれについて発

生・分化様式を研究しなければならない程である。また, 均一であると考えられてきたグリア細胞(アストロサイト, オリゴデンドロサイト)にも性質の異なる集団が数多く存在することも明らかとなってきた。そのため, 他の多くの細胞種や組織の分化研究とは異なり, 細胞株や脳細胞の分散培養系を用いた研究ではその本質に迫るには限界がある。われわれは *in vitro* で得られた結果を絶えず *in vivo* に戻して解析するだけでなく, 神経系の細胞系譜の解析をも精力的に行っている。

脳神経系への遺伝子導入系として開発した高力価レトロウイルスベクターは癌の遺伝子治療に最適なベクターであるので, グリオーマや肺癌をターゲットとした応用を考えた研究を進めており, 臨床応用も間もなくスタートできそうである。また, 癌治療の新たなターゲット分子も見いだしたので, その応用も検討中である。

ヒト血清糖蛋白質糖鎖の解析により肺癌患者で有意に上昇している糖鎖を発見し, 臨床検査の有用性も検討している。

### 小脳顆粒細胞の発達過程における電位依存性 $K^+$ チャネルの発現と役割

中平健祐, 柴田理一, 柴崎貢志, 池中一裕

Kv4.2 遺伝子は小脳顆粒細胞の最終分裂後に発現し, 樹状突起とシナプス後膜に分布することで入力情報のプロセッシングに関わっていると考えられている。小脳顆粒細胞の培養系では, 細胞の形態的な成熟に伴い Kv4.2 の発現が観察されるが, 発現した Kv4.2 蛋白質は細胞体にとどまる。この細胞を橋核細胞と共培養すると, 両者の間にシナプスが形成され, 顆粒細胞において Kv4.2 の樹状突起及びシナプスへの局在が観察された。このシナプ

スへの局在は APV と CNQX により阻害され, また, シナプス前膜側の放出を抑制する試薬により阻害された。また, 顆粒細胞のみの培養系においても Glu の添加により Kv4.2 の樹状突起への局在が観察され, この応答は NMDA 受容体と AMPA 受容体を介していた。以上の結果は, シナプス形成期における Kv4.2 の局在が神経活動依存的に制御されている可能性を示唆している。

## オリゴデンドロサイト発生制御機構の解析

鹿川哲史, 和田圭樹, 中平英子, 清水健史, 池中一裕

脊椎動物中枢神経系は多様な細胞の協調によって高次神経機能発現を可能としている。これまでに神経細胞の多様性を生み出す機構の一つとして、モルフォジェンの濃度勾配が知られている。本年度、我々は背側からオリゴデンドロサイトの分化を抑制する活性を見いだした。グリア細胞であるオリゴデンドロサイトの前駆細胞も背腹両方からの因子による調節で腹側の限局した領域からのみ発生することが示唆された。このように、神経細胞に限らずグリア細胞も含めた神経系全体の多様性が少数のモルフォジェンによって作り出されていることを提唱した。

モルフォジェンなどによって幹細胞から多様に分化した神経系前駆細胞は適所に細胞移動することが必要であ

る。しかし、神経系前駆細胞は盛んに分裂するため、従来の細胞標識法では希釈され移動をトレースすることは困難であった。本年度、我々は生きた胎仔脳にプラスミド DNA を導入する子宮内エレクトロポレーション法を確立した。胎生 12 日ないしは 14 日目のマウスの側脳室にガラスピペットを用いてプラスミド DNA を注入後、子宮の外側からパルス電圧をかけることによってプラスミド DNA を脳室層の細胞に取り込ませた。さらに、胎仔を再び親マウスの体内に戻し発育させることに成功した。今後はエレクトロポレーション法にターゲティングマウスの手法を組み合わせた独自の恒久的細胞標識法を開発する。これらの新しい技術を用いて細胞移動経路を明らかにし、中枢神経系構築の過程を解明したい。

## アストロサイト分化因子としてのシステインプロテアーゼインヒビター

岩崎靖乃, 長谷川明子, 池中一裕

アストロサイトの発生分化機構を探索する目的でそのマーカー蛋白質として知られている GFAP のプロモーターを指標としてファンクショナルクロニングを行った結果単離された Cystatin C (シスタチン C) が、アストロサイトの発生分化にどの様に関わっているかを昨年引き続き研究している。昨年までにグリア前駆細胞株を用いた解析によりシスタチン C の持つシステインプロテアーゼインヒビターの活性がアストロサイトの分化を促進することに関わっていることを報告したが、今年度は脳の初代培養系に対してもアストロサイトの分化を促

進するかについて検討を行った。また、シスタチン C は FGF-2 と協調し、神経幹細胞の生存維持を促進するとの報告があったことより、我々の見ているアストロサイトへの分化誘導活性が糖鎖修飾に依存しないものであることを示すため、鶏卵由来のシスタチン(糖鎖修飾のないシスタチン)を用いて解析している。更にシステインプロテアーゼインヒビターの活性に依存した現象であることを示す目的で、システインプロテアーゼインヒビターの活性測定系を確立した。

## 脳内 N-結合型糖蛋白質糖鎖の機能解明

池田武史, 伊藤磯子, 池中一裕

我々のグループはこれまで N-結合型糖蛋白質糖鎖の系統だった解析法を自動化することに成功し、その発現パターン解析と機能解明を行ってきた。当研究室では主に

脳内に発現する糖鎖に注目し、研究を進めている。脳内の糖鎖発現パターンは時期・領域を限定すると固体差なく常に一定であることから、脳の機能を維持するために

はその厳密な制御が必要であると考えられる。

まず正常マウス脳内の糖鎖発現パターンを検討し、主要糖鎖構造の決定を行った。その情報をもとにヒトの各種神経疾患における糖鎖発現パターンの解析を行い、病態との関連について検討を行っている。

また脳特異的に発現している BA-1, BA-2 と呼ばれる糖鎖の生理機能を解明する目的で、その生合成に参与するガラクトース転移酵素 を過剰発現させたトランスジェニックマウスを作製し、その解析を行っている。

### 腫瘍特異抗原 MAGE-E1 のゲノム構造及び機能解析

河野洋三, 中平健祐, 片倉浩理, 池中一裕

我々は、以前 Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) 法を用いて悪性グリオーマに高発現する腫瘍特異抗原 MAGE-E1 をクローニングした。その後 Human BAC clone を用いたゲノム構造解析にて、その構造は MAGE-D に酷似しており、遺伝子座に於いても Xp11 と同一であることを見出した。またそのプロモーター領域のシーケンス解析にて AML-1a や GATA-1 など血球系の分化や形質転換に関与する転写因子結合部位の存在が考えられた。後に白血球における MAGE-E1 の発現が RT-PCR 法にて確認された。

MAGE-E1 に高い相同性を持つ MAGE-D はその機能の一部が報告されている。NRAGE (neurotrophin receptor-interacting MAGE homolog) は MAGE-D の別称であるが、

神経細胞において TrkA と拮抗的に働き、p75NTR (neurotrophin receptor) を介した細胞死を促進する。また IAP (inhibitor of apoptosis protein) と結合しその機能阻害により細胞死を促進すると報告されている。我々は、MAGE-E1 に関しても同様に細胞死や細胞周期調節へ関与していると仮定し、強制発現系やアンチセンスオリゴを用いた発現抑制系を用いた機能解析を行っている。また MAGE-E1 抗体を作成し、悪性腫瘍切除標本を用いた免疫染色や上記 in vitro の系での細胞群における Western blot による蛋白発現量の確認を行っている。MAGE-E1 の細胞死や細胞周期調節への関与を明らかにすることにて、癌治療の臨床において診断に、更に遺伝子治療の分子標的として応用できるものと考えている。

### 有髄軸索上のイオンチャネルクラスタリング機構の解析

石橋智子, 中平健祐, 池中一裕

有髄神経軸索ではミエリン形成に伴い、軸索上に均一に存在していた電位依存性 Na<sup>+</sup> および K<sup>+</sup> チャネルがそれぞれランヴィエ絞輪周辺に特徴的に集積する。この局在化には軸索とミエリンが接する部位 (paranode) における junction 形成が重要であることが分かった。そこで、この junction 形成に関与しているミエリン側分子を明らかにするために、様々なミエリン遺伝子欠損マウスを解析した。その結果、ミエリンの主要脂質の一つであるス

ルファチド、ミエリン最外層に存在する膜蛋白 CD9 のそれぞれ欠損マウスでは、ともにチャネル局在化部位が異常であること、また明らかな junction 形成不全があることを見出した。さらに CD9 は paranode にも局在していることが分かった。したがってスルファチドおよび CD9 が paranodal junction 形成に関与している重要なミエリン側分子であることが明らかになった。

## 液性情報研究部門

### 【概要】

液性情報部門では分子生物学的手法と電気生理学的手法を組み合わせ、神経系の情報伝達に大きな役割を果たすイオンチャネルの機能解析とイオンチャネルを通して細胞質内に流入し種々の生理的役割を果たすカルシウムイオンの動態について研究を行っている。今年度も受容体活性化カルシウム透過型チャネルの生物物理的な解析を引き続き行った。また従来研究を行ってきた電位依存性カルシウムチャネルが多くの神経疾患に関与している

ことが明らかとなっており、われわれもこの課題に積極的に取り組んだ。rolling Nagoya 小脳失調症マウスはよく知られている遺伝性失調症マウスであるが、本マウスの遺伝子異常を明らかにし、その異常が P/Q 型カルシウムチャネルに対する影響、さらには小脳の神経回路に及ぼす影響を系統的に検討した。

若森 実助手が 3 月 1 日付けで鹿児島大学医学部に助教として転出した。

### 受容体活性化 Ca<sup>2+</sup>透過性カチオンチャネルの機能解析

若森実, 山田久信, 原雄二, 森泰生

神経伝達物質受容体の刺激にともない、従来知られているイオンチャネル以外に、カルシウムを通すイオンチャネルが活性化されることが、電気生理学の実験より知られていたが、このイオンコンダクタンスを担う分子の実体は不明であった。この種類のチャネルは、進化的にも古くまた非常に多様であり、神経細胞の活動のみならず、いろいろな細胞の活性調節に関与していると考えられてきた。TRP チャネルは受容体活性化型カルシウム透過性チャネルの分子の実体のひとつであり、TRP1-7 のクローニングがわれわれのグループを含めていくつかの研究

室で行われた。

これまでに TRP5 を HEK 細胞に発現させ、ATP, thapsigargin などによるチャネル活性を検討し、TRP5 は従来言われていたカルシウムストア枯渇とは異なる機構によって活性化されることが明らかにしてきた。今年度は、TRP5 チャネルの単一チャンネル記録を行い、チャネルの透過性と開口の電位依存性に関する検討を行った。またイオン透過性に関する詳細な測定とチャネル孔の性質の解析も行い、チャネル孔の大きさ・静電的性質などの推定を行った。

### カルシウムチャネル変異マウスの解析

森泰生, 若森実, 松下かおり, Kadrul Huda, 井本敬二

脳には複数の種類の電位依存性カルシウム「チャンネル」が共存しているが、P/Q タイプは N タイプとともに神経伝達物質放出やカルシウム「スパイク」生成にかかわる脳の主要なカルシウム「チャンネル」であり、小脳で多く発現している。P/Q タイプカルシウムチャネルの変異は、マウスにおいて小脳変性症を来すことが報告されている。小脳失調症マウス小脳プルキンエ細胞を急性単離しパッチクランプ法によりカルシウムチャネル電流の特性を検討した結果、失調症マウスのプルキンエ細胞では電流密

度が低下していること、またチャネル開閉のキネティクスが変化しており、その変化を組換え発現系によって再現できることから、カルシウムチャネル 1 サブユニット遺伝子の変異が直接的に失調症マウスの表現形を関係していることが明らかとなった

rolling ナゴヤは、名古屋大学織田先生により発見された小脳失調症マウスであり、これまでに小脳変性症治療薬の検定などに使用されてきたマウスである。遺伝学的解析により遺伝子座は tg と同じで P/Q 型カルシウムチャ

ネル $\alpha$ 1A サブユニット遺伝子にあることが知られていたが、変異の正確な部位は知られていなかった。われわれは塩基配列を決定し、変異が電位センサー部位のアルギニンをグリシンに置換することを見出した。Hodgkin-Huxley モデルで予測されるとおり、本変異を持つカルシウムチャネルは、組換え発現系でも急性分離したプルキンエ細胞においても、活性化の電位依存性が減弱していた。この変異のためにプルキンエ細胞の発火パターンが異常をきたしていた。正常プルキンエ細胞では刺激の強さに応じて頻度が増加するように活動電位を発生することが出来るが、変異細胞では強い入力刺激に対しては活動電位

を発生しないことが示された。変異マウスのプルキンエ細胞は、低頻度の入力に対しては正常に出力できるが、高頻度の入力には対応できないことを示唆している。

tg は小脳失調症のみならず小発作様のてんかん発作を起こすことが知られている。このてんかんの病態を明らかにするために、大脳皮質と視床が含まれる脳スライス標本を用いて視床と大脳皮質の間の神経伝達を検討した。視床から大脳皮質への興奮性の入力はほぼ正常に保たれているが、抑制性の入力著減しているという結果が得られたため、現在その現弱の原因がどの部位にあるかを検索中である。

### 興奮収縮連関のメカニズムの解析およびカルシウムプローブの開発

中井淳一

カルシウムイオンは細胞内のセカンドメッセンジャーとしてシグナル伝達の一翼を担っている。骨格筋の興奮収縮連関においては、細胞膜の脱分極は細胞膜の電位依存性カルシウムチャネル ( $\alpha$ 1s) DHPR を介して小胞体膜上のリアノジン受容体(カルシウム放出チャネル)RYR に伝えられ、小胞体からカルシウムが放出されることによって筋肉の収縮が誘発される。これら 2 つの分子は骨格筋においては直接結合していると想像されており、これまでの我々の研究からこれらの間には DHPR から RYR への正方向のシグナルと RYR から DHPR への逆方向のシグナルが存在することが明らかとなっている。筋肉の興奮収縮連関の分子機構をさらに明らかにするため、正方向のシグナルは受け取れないが、逆方向のシグナルを発することができる RYR のミュータント (R9) を作成

し、RYR1 を人工的に破壊した dyepedic muscle cell に発現させ、freeze-fracture 法を用いて電子顕微鏡的に 2 つの分子の結合状態を観察した。その結果 DHPR の tetrad 構造が観察できた。tetrad 構造は骨格筋に特徴的に認められる構造で、DHPR と RYR の直接的な結合がない心筋ではこのような tetrad 構造はみられない。したがって R9 に含まれる逆方向シグナルを構成するために必要な RYR1 のアミノ酸領域 2659-3720 が DHPR と RYR の物理的結合に寄与していることが明らかとなった。またこの実験とは別に、細胞内のカルシウムイオン濃度の変動を *in vivo* で観察することを目指して GFP とカルシウム結合蛋白質であるカルモジュリンを用いた蛍光カルシウムプローブの開発に着手した。

### 電位依存性 $\text{Na}^+$ チャネルに対する DHEAS の効果

森誠之、井本敬二

栗原照幸 (東邦大学医学部)

血中に生理的に存在するステロイドホルモンである Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) は、骨格筋ナトリウムチャネルを直接的にブロックする。しかしその作用機序は、ミオトニアに使用される mexiletine の作用機

序とは異なることが示唆されている。このため本研究では、DHEAS と mexiletine のナトリウムチャネルに対する作用の比較検討を行った。

ナトリウムチャネル分子は、静止膜電位にある状態、

活性化してチャンネルが開いた状態，不活性化した状態，そしてその他のいくつかのコンフォメーションをとる事が知られている。mexiletine や lidocaine などの局所麻酔剤の場合，不活性化した状態に比較的选择性があるとされているのに対して，DHEAS は不活性化したチャンネルには選択的ブロックを示さないことが示された。また

短時間脱分極させたチャンネルには著明なブロッキングを示したことから，DHEAS が脱分極状態にあるナトリウムチャンネルを認識しブロックすることが推測された。しかしながら，このように短時間にブロック作用起こすには比較的高濃度の DHEAS が必要であり，臨床応用上の問題点である。

## 高次神経機構研究部門

### 【概要】

本研究部門ではヒトが含まれる哺乳動物の脳機能がどのような分子メカニズムにより形成，制御されているかを解明する目的で，神経回路網形成，再編成に関する分子を探索するとともに，関連遺伝子を欠損させたマウスを作製することにより解析を行っている。特に Fyn 欠損マウスでは，哺乳行動を含めた行動異常が認められたことより，Fyn の介する情報伝達系に注目している。最近我々は Fyn 結合タンパク質の解析より新規カドヘリンである

CNR ファミリーの単離に成功した。この CNR ファミリーはシナプスに存在する多様化分子であり，ゲノム構造が免疫系での記憶に関する免疫グロブリンの遺伝子クラスターと類似していることが明らかとなった。この CNR ファミリーの解析により，脳形成や機能発現の系統進化及び個体発達での多様化機構も明らかになるのではないかと考えている。

### CNR ファミリー多重欠損マウスの作製

先崎浩次，八木 健

CNR ファミリーが Reelin の多重受容体としてマウス大脳皮質層構造形成機構に関与していることが示唆されている。マウス大脳皮質形成機構における CNR ファミリーの分子機能を生体マウスで明らかにすることを目的として CNR 多重欠損マウスの作製を行っている。マウス CNR 遺伝子のゲノム構造解析からマウス CNR は細胞外領域と膜貫通領域及び細胞内領域の一部を含む約 2.5kb の大きな第 1 エクソンと各 CNR に共通に用いられる細

胞内領域 C 末端側部分が 3 つの小さなエクソンとして存在しスプライシングにより CNR 全体がつくられることが明らかにされた。また，CNR 第 1 エクソンはマウスゲノム上に並んで存在しており，この CNR ゲノム構造上の 2 カ所に loxP 配列を導入し Cre-loxP 系により第 1 エクソンを欠損させることにより CNR 多重欠損マウスの作製を行っている。

### CNR ファミリーの細胞接着活性に関する解析

武藤哲司，八木 健

CNR ファミリーはカドヘリンスーパーファミリーに属し，細胞接着活性を有すると考えられる。CNR はマウス生体内においてシナプス膜に存在する。ところが他のカ

ドヘリンファミリーで接着活性測定のために用いられている細胞株に CNR を強制発現すると細胞内膜系に CNR 蛋白質が凝集してしまう。種々の細胞株での CNR 蛋白

質の局在を解析した結果、細胞形質膜に CNR 蛋白質の局在が認められる細胞株を見いだした。この細胞株を用いて CNR の細胞接着活性の測定系の開発を行った。この CNR 細胞接着活性の測定の過程で CNR と結合する膜

分子の存在が見いだされた。現在、この膜分子と CNR との接着性についての解析を進め、CNR の接着分子としての機能解析を行っている。

### CNR mRNA の体細胞変異の解析

平山晃斉, 八木 健

CNR のゲノム構造は免疫系での記憶に関する免疫グロブリンや T 細胞受容体の遺伝子クラスターと類似していることが明かにされている。CNR 遺伝子において免疫グロブリンや T 細胞受容体遺伝子に認められる体細胞変異がみられるかについて解析を行った。その結果、CNR mRNA においてアミノ酸置換のおこる CNR 塩基配列変化が認められ、さらに、この塩基配列の変化がマウス発生・発達過程において細胞外領域ドメイン構造により異なるこ

とが見いだされた。特に出生前と後での変化が大きく、CNR の Reelin 結合部位近傍での変化に差が認められ、この結果は Reelin 受容体としての CNR の機能との関連性で大変興味深い現象である。この突然変異のゲノム上での解析を行うとともに、発生・発達過程での CNR の構造変化と機能との関係を明らかにするべく CNR の機能解析を進めている。

### ゼブラフィッシュ CNR ゲノム構造の解析

多田基紀, 八木 健

マウスにおいて CNR は Reelin の受容体とし機能し大脳皮質構造形成に参与していることが示唆されているが、マウスと脳構造の異なる脊椎動物であるゼブラフィッシュにおける CNR 遺伝子の全体像を明らかにするためにゼブラフィッシュ CNR ゲノム構造の解析を行った。ゼブラフィッシュゲノム BAC ライブラリーより CNR 遺伝子配列を含む BAC クローンの単離を行い、ショットガンシーケンス法により塩基配列を決定した。マウス CNR ゲノム構造と比較解析の結果、ゼブラフィッシュ CNR ゲノム領域はマウス CNR ゲノム領域の約 3 分の 1 の長

さであったが、CNR 遺伝子の数はマウスとほぼ同数の 13 であった。しかし、マウス CNR ゲノム構造上において共通領域エクソンに最も近位に存在し、他の CNR と比べホモロジーが比較的低い 2 つの CNR (mCNRc1, mCNRc2) がゼブラフィッシュでは 1 つ (zCNRc) しかないことが明かにされた。また、ゼブラフィッシュ CNR は Fyn 結合部位が保存されていたが、Reelin 結合領域の配列は異なっていることが示された。現在、ゼブラフィッシュ CNR の分子機能解析を進めている。

### マウス嗅球での周波数帯によって分離される独立な 2 つの経路

田仲祐介, 八木 健

遺伝子と行動との関係を明らかにするために、マウスはターゲティングなどの遺伝的・分子生物学的な手法

を用いて、個体レベルでの表現型としての行動異常の解析が可能である。しかし、行動を制御しているのは中枢

神経であり、処理を行うのはそこでの神経回路網である。この観点から、In vivo でのマウス中枢神経系からの神経活動の記録・解析系を確立させた。この過程の中で、マウス嗅球にて低濃度刺激によって誘発される神経活動 (LFP) を見いだした。この活動は、従来に報告されている嗅覚性誘発活動 (誘起波) より低い周波数帯 (7-14Hz) にピークが見られる。さらに垂直多点電極を用いて、こ

の活動が糸球体層と僧帽細胞層の間に由来することを見いだした。また、この低周波活動中でのスパイクの有意な増大は見られなかったが相関を示した。これらの結果は、嗅球において周波数帯によって分離される独立な 2 つの経路が存在することを示し、低周波発振器 (Low Frequency Oscillator) として中枢神経系において機能していることが示唆される。

## マウスにおける新規 CNR ファミリーの単離と分子機能の解析

竹井 豊, 八木 健

CNR ファミリー遺伝子は可変領域と定常領域から構成されている。ゲノム上では 5' 側に 15 種類の可変領域がタンデムに並んでおり、3' 側では三個のエクソンに分かれた定常領域が存在する構造を有している。新規 CNRc1 及び CNRc2 の可変領域はゲノム上で定常状態に最も近接した場所に位置する。また、CNRc1 及び CNRc2 分子のアミノ酸一次配列はカドヘリン配列及び CNR 定常領域を完全に保持しているが、細胞外領域は他の CNR に対して、ホモロジーの低い分子だった。CNR が Reelin と結

合する際に、CNREC1 ドメイン中の RGD 配列を含む Reelin Binding Domain (RBD) が重要であることが明らかになっているが、新規 CNRc1 及び CNRc2 の EC1 ドメイン中には RGD 配列が含まれておらず、更に新規 CNRc1 及び CNRc2 の EC1 ドメインを Reelin を免疫沈降しないことが明らかとなった。現在、CNRc1 及び CNRc2 に対する特異抗体の作製、CNRc1 及び CNRc2 の機能解析を in vivo で行うため、遺伝子改変マウスの作製を進めている。

## 情報記憶研究部門

### 【概要】

神経細胞移植による脳機能の再建というテーマで研究を行った。神経幹細胞は、FGF 存在下の無血清培地中で無限に増殖するので、大量に調整することが出来、有力なドナー細胞候補である。胎仔ラットの中脳腹側部から得た神経幹細胞を、FGF 存在下で増殖させ、片側パーキンソン病モデルラットの両側の線条体に移植すると、正常側の線条体より、ドーパミン入力を欠如した側の線条体で、より強く TH 陽性ニューロンへ分化した。これは、ドーパミン入力を欠如した線条体の環境が、中脳神経幹細胞をドーパミンニューロンへ分化・生着させるのに適

していることを示している。この作用物質候補として、IL-1, FGF, GDNF, グリア由来因子等が想定され、現在、細胞培養, ELISA, Blotting, DNA microarray, SAGE 等で解析中である。一方、3-ニトロプロピオン酸投与によるハンチントン病モデル動物とコラゼナーゼ注入による線条体出血モデル動物の開発、その病態及び発症機序を解析した。また、脳梗塞モデル動物の病態とグリア及びニューロン死に対するメラトニンの保護作用を明らかにした。

# 生体調節研究系

## 高次神経性調節研究部門

### 【概要】

高次神経性調節部門は視知覚および視覚認知の神経機構を研究対象としている。我々の視覚神経系は複雑な並列分散システムである。そこでは数多くの脳部位が異なる役割を果たしつつ、全体として統一のとれた視知覚を生じる精巧な仕組みがあると考えられる。また網膜に映る外界の像は二次元であるにもかかわらず、その三次元的な構造を正しく理解するための仕組みもそなわっている。視知覚におけるこれらの問題を解明するために、主に大

脳皮質視覚野ニューロンの刺激選択性や、異なる種類の刺激への反応の分布を調べている。具体的な課題として(1)初期視覚野における奥行き手掛かりの表現、(2)視覚野における陰影テクスチャの表現、(3)選択的注意による視覚野ニューロン活動の変容、(4)ネコ初期視覚野において一様な面の表現に特化した領域があるかどうか、(5)二色性のサルの特異点の同定、などに関する研究を行った。

### 初期視覚系における面の表現 光計測による解析

谷 利樹, 横井 功, 伊藤 南, 小松 英彦, 田中 繁(理研)

初期視覚系のニューロンは線や境界部分に選択的に反応し、輪郭線の表現に関係すると考えられている。近年、面の明るさに選択的に反応するニューロンも存在することが報告されている。我々は面情報解析の神経メカニズムを探ることを目的として、面刺激に特異的に反応する領域がネコの初期視覚系に存在するかどうかを内因性信号による光計測により調べた。ディスプレイの画面を一枚の面と考え、その輝度を矩形波状に交互に反転させた。その結果 18 野に面の輝度反転により活動する領域が 17

野と 18 野の境界に沿うようにいくつかに分かれて存在することが分かった。18 野は 17 野と同様に線または縞刺激の傾き(方位)に対して選択的な反応を示す。その選択性の分布と比較すると、面の輝度反転に反応する領域が方位選択性地図の特異点とよく重なることが明らかになった。この結果は面の表現の情報処理が初期視覚系に存在し、かつ輪郭線の処理と何らかの関係を持つことを示唆する。

### 初期視覚系における奥行き知覚の解析 単眼性の手掛かりと両眼視差の相互作用

伊藤 南, 小松 英彦

物体の三次元的な構造を知覚する際に必要となる奥行き情報は、両眼視差以外にも輪郭の形状や遮蔽等の単眼性手掛かりによっても得られる。輪郭線の折れ曲がりや分岐はこうした手掛かりを与える重要な刺激要素であるが、従来の初期視覚系研究においては線や縞刺激の傾きに対する選択性が重視されてきた。我々はサルを訓練

して、注視課題遂行中のサルの第一次視覚野および第二次視覚野から細胞外記録を行った。輪郭線の折れ曲がりや接合パターンを受容野の中心に呈示して神経細胞の反応を調べたところ、第一次視覚野の神経細胞は最適方位の直線に対してのみ強い反応を示したが、第二次視覚野の神経細胞は輪郭線の折れ曲がりや分岐に対して緩やか

な反応選択性を示すことを見出した。また、ある特定の角度の折れ曲がりに対して強い抑制を示すものが存在することを見出した。このことは第二次視覚野が輪郭線の

折れ曲がりや分岐を検出する最初のステップであることを示唆する。

### 多次元視覚探索課題を遂行中のサル V 4 野のニューロン活動

小川正, 小松英彦

色や形などの特定の特徴次元に選択的に注意を向けているときに前頭連合野などから視覚連合野に及ぼされるトップダウン的な作用を調べるため、新たに考案した視覚探索課題を 2 頭のサルに訓練させ、課題に習熟した 1 頭の V 4 野からニューロン活動を記録することを開始した。課題では 2 種類の色と形から成る刺激が 6 個呈示され、その中に色、または形次元で目立つ刺激が 1 つずつ存在し(例えば、1 つの , 1 つの , 4 つの ), サル

は教示条件に応じて、色(または形)次元で目立つ刺激に向かってサッカードを行わなければならない。目標刺激の色と形は試行ごとに変化するため、特定の色と形の刺激を探す方法では正しく目標を選択することはできない。少数ではあるが視覚応答特性のある V 4 野のニューロン活動を解析した結果、受容野に同じ色と形の刺激が呈示された場合でも、それが目標刺激となる場合は妨害刺激である場合よりも活動が増強される細胞があった。

### マカクザル V 4 野における陰影からなるテクスチャの表現

花澤明俊, 小松英彦

石や木などの物体表面がもつ細かい凹凸によって生じるテクスチャは、その表面の材質や摩擦についての重要な情報源であり、マカクザルの V 4 野にはそのようなテクスチャー要素の大きさや密度などの特徴に選択性をもつニューロンが多く見い出される。このようなテクスチャは凸凹によって生じる陰影により作られるので、照明の方向により、テクスチャー要素の輝度勾配の方向は変化

する。テクスチャー刺激に選択的に反応するニューロンにおいて、要素の輝度勾配の方向に対する選択性を調べたところ、単一の方向にのみ選択的に反応する細胞が見い出された。これらの細胞が最も強く反応した輝度方向は水平から 90 度または 270 度、つまり上下方向に優位に多く分布していた。このような特性はヒトの陰影からの構造復元に見られる方位の不均一性とよく一致する。

### 網膜電図 (ERG) による二色性マカクザルの波長感度特性の測定

花澤明俊, 小松英彦

三上章允, 竹中修, 後藤俊二, 加藤啓一郎, 近藤彩 (京大霊長研)

小池智 (都神経研) 大西暁士 (京大理), 山森哲雄 (基生研)

Puti Sulistyng Angelika, Bambang Suryobroto, Achmad Farajallah (ボゴール農大)

分子遺伝学的手法により、網膜の長波長感受性(L)色素をコードする遺伝子を欠損した 2 色型の遺伝子型を持つカニクイザルがインドネシアで発見された。網膜電図

(ERG) によって網膜の赤色光と緑色光に対する相対的感度をフリッカーフォトメトリーにより測定し、2 色型と 3 色型の個体を比較することによって、2 色型の遺伝

子型を持つ個体とその表現型においても2色型、つまり網膜のL錐体を欠損しているか否かを調べた。麻酔下の個体の片眼を525nm(緑色)および644nm(赤色)の発光ダイオード光による30Hzの逆位相フリッカーによって刺激した。各色光の輝度を変化させ、ERG応答の最も小さ

くなる輝度比からERG応答に対する刺激の実効強度を求め、相対感度とした。2色型の遺伝子型を持つ個体の赤色光に対する感度は3色型の4分の1であり、長波光に対する感度が非常に低いことがわかった。

## 生体システム研究部門

### 【概要】

生体システム研究部門では、歩行運動の高次制御にかかわる中枢神経機序の解明を目的として多角度からの研究を進めてきた。無拘束な幼若サルを用いた研究においては、直立二足歩行能力の学習獲得機序を、約2年間にわたって運動力学的観点から詳細に解析し、直立姿勢の獲得が二足歩行の実行に必須な要因であることを明らかにした。またその能力を獲得した成サルにおいてはPET法を用いて、グルコースの代謝亢進部位を同定した。そして得られた成績を同一サルの四足歩行時に得られた成績と比較し、直立二足歩行時にその活動を特異的に増強する大脳および小脳領域を同定することができた。そして歩行パターンとの対応において複数の領域がその活動

パターンを変化することを見出した。ネコを用いた研究においては四足歩行運動の発動にかかわる小脳歩行誘発野に注目し、この部位の選択的微小破壊によって誘発される姿勢・歩行の変化を解析した。得られた研究成績は小脳歩行誘発野が数多くの運動分節の動きを時間的・空間的に協調する際に重要な役割を果たしていることを示唆した。その一方では小脳歩行誘発野の基本的構成要素である室頂核に注目し、室頂核視床路の微細投射様式を組織学的に解析した。この上行路は室頂核から始まる下行路とは異なり、終末ブートを視床核内にブドウの房状に分布した。室頂核は歩行運動発動信号の efference copy を大脳皮質に伝達していることが推定できた。

### サル視覚誘導性上肢到達運動における一次運動野神経細胞の情報表現

宮下英三

視覚情報をもとにして手の運動命令を生成する脳内機構を解明するための第一歩として、サル一次運動野神経細胞の発火活動が何を表現しているのかを解明するために手の運動パラメータとの時間相関性を解析した。

二関節マニピュランダムハンドルの操作することにより、コンピュータ画面上にハンドルの位置として提示されたカーソルを同一画面上に提示される視標に1.0秒以内に到達させることを一頭のサルに習得させた。この

課題遂行中の神経細胞の発火頻度を、手の加速度・速度・位置の線形和として近似すべく線形重回帰解析を行った。肘関節あるいは肩関節の受動的な動きに反応する161個のユニットのうち118個のユニットの発火頻度が手の運動パラメータの線形和として近似できた。

この結果は、一次運動野神経細胞の発火頻度が手の運動パラメータあるいは手の動力学パラメータを表現している可能性を示唆しており、さらに解析を進めている。

### 歩行運動により賦活される脳領域の同定：サル直立二足歩行モデルを用いた糖代謝PETによる研究

森 大志, 中隼克己, 橋 篤導, 高須千慈子, 達本 徹, 塚田秀夫(浜松ホトニクス株), 森 茂美

報酬条件付け運動学習によりニホンサル (*M. fuscata*) は二足歩行能力を獲得する。本研究ではこの動物モデルを用い、糖代謝 PET 法によりサル高次脳内で二足および四足歩行運動の実行に伴って賦活される脳領域の同定を試みた。トレッドミル上での歩行運動をすでに学習したサルに<sup>[18F]</sup>FDG (fluoro-deoxyglucose) を投与し、トレッドミル上での二足・四足歩行運動課題を実行させた。チェア上での座位の維持を対照課題とした。歩行運動・対照

課題の実行後に糖代謝測定を行い、それぞれの歩行運動課題と対照課題とを比較して糖代謝が亢進している脳領域を同定した。二足・四足歩行課題ともに対照課題に比べ、小脳・大脳皮質視覚関連領域・運動野に優位な糖代謝の亢進が観察された。これらの結果から複数の運動分節の機能統合を要する歩行運動は高次脳内の様々な要素的神経制御機構を動員して実行されていることが示唆された。

### 大脳皮質運動野 - 体幹・下肢筋群へのシグナル伝達様式：経頭蓋磁気刺激法を用いた研究

森 大志, 中崎克己, 高須千慈子, 森 茂美

ニホンサル (*M. fuscata*) は報酬条件付け運動学習により二足歩行能力を獲得する。本研究ではこの動物モデルを対象として、大脳皮質運動野から脊髄への下行性シグナルがどのように歩行運動実行器官である体幹・下肢筋群へ伝達されるかを経頭蓋磁気刺激法を用いて非侵襲的に検討した。ケタミン麻酔下でサル頭部 (一次運動野) に磁気刺激を加え、刺激により導出される下肢筋活動を記録した。刺激の局所化をはかる目的で本研究では独自

に開発した 8 の字コイルを用いた。得られた誘発筋電図を複数回加算平均し、応答潜時、振幅などの定量解析に用いた。得られた成績から二足歩行運動を学習したサルでは近位筋に対しより早い伝導速度でシグナルを伝達していることが明らかとなった。ヒトを対照とした研究でも同様な結果が観察されることから、サル歩行モデルはヒトと類似した大脳皮質から脊髄への下行性伝導経路を確立していると推察される。

### 若齢期ニホンサルの身体成長に伴う直立二足歩行運動の獲得機序

橋 篤導, 森 大志, 高須千慈子, 中崎克己, 森 将浩, 森 茂美

本研究では若齢ニホンサル (*M. fuscata*) が報酬条件付け運動学習を行うと流れベルト上で直立二足歩行運動能力をどのように獲得するのか検討を行った。サルの身体成長と対応させ 425-882 日の縦断的な運動力学的解析を行った結果、4 相の学習期が観察された。第 1 にサルは立ち・歩くが体幹と下肢の運動分節の協調ができない準備期 (学習期間 1-24 日)、第 2 に二足歩行時における体幹および下肢の運動分節の協調を学習し始める学習初期

(19-78 日)、第 3 に下肢において大腿など近位部運動分節の協調は完成するが下腿と遠位部運動分節の協調はまだ完成していない学習中期 (64-214 日)、第 4 に遠・近位部ともに運動分節の機能的協調が完成し安定した歩行ができる学習後期 (194 日~) が示された。この過程でサルは二足歩行に関わる多運動分節の独立した動きを時間的・空間的に機能統合する中枢神経機序を獲得したことが示唆された。

### ネコ小脳歩行誘発野の微小破壊と歩行運動時における運動分節の協調障害

中崎克己, 森 大志, 森 将浩, 森 茂美

左右の小脳室頂核からは同側性および交叉性の室頂核遠心路が始まる。この交叉性遠心性線維は小脳白質正中中部で交叉して鉤状束を形成する。鉤状束は室頂核網様体路、室頂核前庭路、室頂核上丘網様体路、室頂核脊髓路と室頂核視床路を含む。除脳ネコにおいてこの鉤状束の正中中部（小脳歩行誘発野 cerebellar locomotor region, CLR）を連続微小電気刺激すると流れベルト上で制御歩行が誘発できる。本研究では CLR の機能的意義を解明す

るため正常ネコの CLR を微小破壊した。その結果、ネコが体幹と頭部の位置を低くして注意深く歩くこと、前後肢の協調運動は阻害されること、ネコが方向転換時にバランスを崩して転倒することが明らかとなった。以上の結果は姿勢および歩行運動の制御に際して室頂核からの交叉性遠心路を介した運動指令情報が頭頸部、体幹および四肢運動分節の動きを時間的、空間的に協調している可能性を示唆する。

### ネコ室頂核-視床路終末線維の視床内分布と形態的特徴

奥村 哲, J. Czarkowska-Bauch (Department of Neurophysiology, Nencki Institute of Experimental Biology, Warsaw), 中隲克己, 森茂美

ネコを用いて室頂核-視床路終末線維の視床における分布様式と形態的特徴を解析し、室頂核-網様体路、同-前庭路終末線維の特徴と比較した。1側の室頂核に神経標識物質（BDA）を微小注入し、12日間後にネコを安楽死させ全脳標本を摘出した。この標本の前額断連続切片（50  $\mu\text{m}$ ）を作成し、間脳および脳幹に存在する室頂核に起始する軸策線維を順行性に標識した。室頂核-視床路では軸策線維は両側に存在したが交叉性の投射が優位であり、

主として髄板内核群と腹側核群に分布していた。軸策線維は終末部付近で細かく分枝し、各枝には多数の膨大部（ $1.5\text{-}2.5\ \mu\text{m}$ ）がブドウの房様に集合して存在した。視床では各膨大部の神経細胞体に対する光顕的近接像（close apposition）は少なかったが、脳幹網様体および前庭神経核では多く膨大部が大型細胞の細胞体と樹状突起の起始部付近に close apposition を形成していた。

### ラット腰髄に分布するアセチルコリンエステラーゼ陽性神経細胞の生後発達

奥村 哲, Arpad Dobolyi (Department of Physiology and Neurobiology, Eötvös Lorán University, Budapest, Hungary), 森大志, 森茂美

AChE 組織化学法を用いてラット腰髄の AChE 陽性細胞の生後発達様式を解析した。その結果 AChE 陽性細胞として運動神経細胞(MN)、交感神経細胞に加えて、灰白質中間質の内・外側に存在する2種類の partition neurons (PN)、中間質の中央に存在する大型細胞、後角第I層に存在する小型で扁平な細胞を同定した。それらの生後発達について検討したところ、PNは生後1~8日目から存在し、他の細胞に比べてAChEを強く発現していた。P

NはAChEを強く発現する樹状突起の枝を主として内外側方向に、一部を吻尾側方向に拡げており、MNプールの方向にのびる fiber も観察された。近年、中枢神経系においてAChEが trophic function を持つことが明らかにされてきた。我々の結果は、PNがMNなどの脊髄の神経細胞/回路の生後発達に関連して trophic な機能を持っている可能性を示唆する。

## ラット線条体カルバコール刺激によって誘発される回旋運動と脳内 c-Fos 発現パターン

奥村 哲, Janos Palhalmi (Department of Physiology and Neurobiology, Eötvös Lorán University, Budapest, Hungary), Katalin Kekesi (Department of Physiology and Neurobiology, Eötvös Lorán University, Budapest, Hungary), 森 大志, 森 茂美

本研究では線条体コリン作動性介在神経細胞の働きを明らかにする目的でマイクロダイアリシスプローベを両側のラット線条体に埋め込み, 右側をアセチルコリンのアゴニストであるカルバコール(10-50 mM)を溶解した生理的人工脳脊髄液で持続的に灌流した。灌流開始から約 30 分後からラットは全身の抗重力筋活動を著しく増強するとともに, 刺激側(右側)と反対方向(左側)への回旋運動(4~6 回/min)を始めた。線条体のカルバコール

灌流開始から 30 分, 60 分, 90 分後にラットを安楽死させ全脳標本を速やかに摘出した。これらの標本から神経細胞活動の程度を反映すると考えられている c-fos タンパクの発現様式を全脳の前額断切片(厚さ 50 μm)上で定量的に解析した。その結果, 刺激側(右側)の感覚-運動皮質を含む広範な皮質領域, 線条体, 淡蒼球, および視床で強い c-fos タンパクの発現を確認した。

## ネコ線条体の出力細胞, 介在神経細胞両者に対するセロトニン神経支配様式

奥村 哲, Arpad Dobolyi (Department of Physiology and Neurobiology, Eötvös Lorán University, Budapest, Hungary), 松山清治(札幌医科大学第 2 生理学), 森大志, 森茂美

本研究は, ネコ線条体の出力細胞に対する 5-HT 神経支配様式を明らかにすることを目的とした。そのため神経標識物質(BDA)を線条体出力細胞の主たる投射先である淡蒼球, 黒質網様部, 脚内核にそれぞれ微小注入し出力細胞を逆行性に標識・同定し, さらに 5-HT 線維を 2 重に標識した。出力細胞は 4~6 本の樹状突起をもつ中型で有棘の細胞であった。出力細胞は多くの 5-HT 線維に囲まれており, 両者間に多くの光顕的近接像(close

apposition)を観察した。close apposition は主に出力細胞の樹状突起に観察され, 20~30%はその近位に, 60~70%は遠位に存在した。この分布の特徴には出力先による差は認められなかった。昨年度までの研究成果と併せて考えると, 線条体ではセロトニンは出力細胞, 介在神経細胞の両者を神経支配し, 大脳基底核全体の正常機能の維持に貢献していると考えられる。

## 高次液性調節研究部門

### 【概要】

我々は視覚性認知記憶の大脳メカニズムについて研究を行っている。記憶対象の脳内表現は大脳側頭葉連合野に貯えられ, 側頭葉連合野への各々の入力経路が記憶形

成, 想起の過程において独自の機能を果たしているとの作業仮説の検証を行っている。

## 対連合記憶課題遂行中のサル 36 野と TE 野における記憶関連細胞の空間分布

Naya Y, Yoshida M, Ito A, Shibata S, Miyashita Y

In our previous studies, neurons in area 36 (A36) and area TE showed stimulus-selective responses that provided mnemonic linkage between different stimuli during the pair-association task. In this study, we examined the spatial distribution of these neurons within A36 and TE. We recorded neuronal responses from both areas in three macaque monkeys (three hemispheres) and isolated 406 neurons (A36, 100; TE, 306) that showed stimulus-selective responses ( $P < 0.01$ ). After the recording session, we histologically reconstructed the positions of the recorded neurons and projected them to layer IV. The projected positions were plotted on a two-dimensional

unfolded map. We found that the stimulus-selective neurons tended to aggregate into several clusters on the map. We observed a single cluster in A36 and two to four clusters in TE for each map. To characterize mnemonic role of these clusters, we defined the pair-coding index (PCI) for each stimulus-selective neuron and quantified the single-cell code of linkage between the paired stimuli. The PCI values for the neurons in the A36 clusters were significantly greater ( $P < 0.05$ ) than those in the TE clusters that showed the highest PCI values of all the TE clusters in the individual maps.

## ニホンザル下部側頭皮質 TEav 野-36 野間の局所結合と電気生理学的特性

吉田正俊 納家勇治 宮下保司

本研究は視覚情報を記憶情報に変換して記録する過程であると考えられている下部側頭葉の機能的構造と解剖学的特性の関連を調べることを目的とした。我々は対連合記憶課題遂行中のニホンザルの下部側頭皮質から単一ニューロン活動を記録し、傍嗅野内の 36 野に刺激選択性を持つニューロンが局在している領域(以下、ホットスポットと呼ぶ)があることを見出した。またさらに、36 野内のホットスポットおよびこれに近接する前後の対照領域の合計 3 箇所へそれぞれ別の種類の逆行性標識色素を注入して、TEav 野において標識されたニューロンの分布

と、刺激選択性を持つニューロンの分布とを比較した。その結果、TEav 野の刺激選択性を持つニューロンは、1) 36 野のホットスポットへ投射する領域で多い、2) またさらにこの領域の中でも、36 野のホットスポットへのみ投射し、他の対照領域へは投射していない領域で多い、ということを見出した。この結果は、TEav 野で刺激選択性を持つニューロンの多い領域は 36 野で刺激選択性を持つニューロンの多い領域へと選択的に投射していることを示唆する。

## サル下部側葉における宣言的記憶形成にともなう BDNF の上昇

Tokuyama W, Okuno H, Miyashita Y

In primates, visual long-term memory of objects is presumably stored in the inferior temporal (IT) cortex. Because brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is involved in activity-dependent neural reorganization, we tested the hypothesis that BDNF would be upregulated in IT cortex during formation of visual pair-association memory. To eliminate genetic and cognitive variations between individual animals, we used split-brain monkeys for intra-

animal comparison in PCR-based mRNA quantitation. The monkeys learned a pair-association (PA) task using one hemisphere and a control visual task using the other, to balance the amount of visual input. We found that BDNF was upregulated selectively in area 36 of IT cortex during PA learning, but not in areas involved in earlier stages of visual processing. *In situ* hybridization showed that BDNF-expressing cells were localized in a patchlike cluster. The results suggest

that BDNF contributes to reorganization of neural circuits for visual long-term memory formation in the primate.

サル嗅皮質における脳由来神経栄養因子,ニューロトロフィン 3 と  
その受容体メッセンジャーRNA の発現

Hashimoto T, Miyashita Y

The primate rhinal cortex, consisting of areas 36 and 35 of the perirhinal cortex and the entorhinal cortex (area 28), plays a crucial role in perception and memory. We investigated the expression of messenger RNAs for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3, as well as those for their respective tyrosine kinase receptors, TrkB and TrkC, in the monkey rhinal cortex. Results from *in situ* hybridization revealed that each of these messenger RNAs was expressed in neurons with distinct laminar and areal patterns of distribution. Brain-derived neurotrophic factor messenger RNA was principally detected in layers V/VI of area 36, and layers II/III and V of the entorhinal cortex. Some of the messenger RNA-positive cells in the deep layers of the rhinal cortex were confirmed to exhibit a

pyramidal cell-like morphology.

Neurotrophin-3 messenger RNA expression was confined to layers II/III of the entorhinal cortex. In contrast, *trkB* and *trkC* messenger RNAs were expressed rather homogeneously and abundantly throughout the rhinal cortex. The laminar and cellular distributions of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 messenger RNAs indicate the predominant expression of these neurotrophins in projection neurons. These results suggest that brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 regulate neuronal connectivities of forward and backward projections from the rhinal cortex and contribute to functional reorganization underlying the formation and maintenance of long-term memory in primates.

# 大脳皮質機能研究系

## 脳形態解析研究部門

### 【概要】

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

具体的な研究テーマとしては、1) グルタミン酸受容体およびGABA受容体と各種チャネル分子の脳における電子顕微鏡的局在、共存と機能との関係を解析する。2) これらの分子の発達過程や記憶、学習の基礎となる可塑的

変化に伴う動きを可視化し、その制御メカニズムと機能的意義を探る。3) 中脳辺縁系、前脳基底核等の情動行動に関与する脳内部位とこれらから大脳皮質への出力機構についてシナプス伝達機構および生理活性物質によるその修飾機構を電気生理学的手法を用いて解析し、それらの分子的基盤を明らかにする。4) ヒトの脳神経症状を引き起こす自己抗体のうち、受容体やチャネル分子などに作用するものをスクリーニングし、機能阻害のメカニズムを探るとともにそれらの分子の脳の高次機能や統合機能における生理的役割を明らかにしていく。5) 脊髄視床路ニューロン活動性の調節とその侵害刺激受容機構における意義を解明する。

### GABA<sub>B</sub> 受容体の脳内局在と機能解析

Akos Kulik, 重本隆一

脳内における主要な抑制性伝達物質であるGABAには、イオンチャネル型のGABA<sub>A</sub>受容体とG蛋白共役型のGABA<sub>B</sub>受容体が存在する。GABA<sub>A</sub>受容体は、GABA作動性シナプスに主に存在することが知られていた。我々は、免疫電子顕微鏡法によりGABA<sub>B</sub>受容体が小脳ではGABA作動性シナプスではなく、興奮性のグルタミン酸作動性シナプスの周囲により集積していることを見いだ

した。また、視床においてはいずれのシナプスとも強い関連なく広範に分布しているが、GABA作動性シナプス周囲により密度が高い。これらの結果は、GABA<sub>B</sub>受容体が脳の部位により異なる役割を持っていることを示唆している。今後これらの受容体によって活性化される機能分子の共存や機能調節機構を解析することにより、さらにGABA<sub>B</sub>受容体の脳における役割の解明を目指す。

### mGluR3 と AQP4 の共存と生理的意義の解析

馬杉美和子, 藤本和 (福島県立大学), 重本隆一

我々は藤本によって開発されたSDS-FRL法をさらに改良し、細胞膜上機能分子の局在や共存を解析するスクリーニングを開始した。SDS-FRL法は、従来細胞膜の構造を観察するために用いられてきたFreeze Fracture Replicaを金標識でラベルする方法で、複数の細胞膜上分

子の分布を2次元的に解析するのに適した利点を持っている。この方法により代謝調節型グルタミン酸受容体mGluR3と水チャネルであるAQP4が、アストロサイトの細胞膜上で共存することを見いだした。そこで、この共存の生理的意義を確かめるためにCHO細胞に両分子

を発現させ、共存を確認している。さらに、この共存は mGluR3 を活性化することで消失する事を明らかにした。

今後、これらの分子の集合離散を引き起こすメカニズムやその機能的な意義について解析をすすめる。

### HCN channel の脳内局在の解析

納富拓也, 重本隆一

Hyperpolarization Cyclic Nucleotide-gated (HCN)チャネルは神経の発火周期に深く関与していると考えられている。現在、HCN1 から 4 までのチャネル遺伝子がクローニングされている。本研究では HCN チャネルに特異的な抗体を作製し、光学顕微鏡・電子顕微鏡レベルでの局在分布を検討している。各 HCN チャネルは、それぞれ特異的な脳内分布を示し、軸索終末、細胞体、樹状突起

などに多様な免疫陽性像が認められた。HCN1 と HCN2 については、大脳皮質および海馬において錐体細胞の特に遠位の樹状突起に強い陽性像が認められ、電気生理学的に報告されている所見に呼応している。今後は、さらに電子顕微鏡的な観察をすすめ、シナプスや各種電位依存性チャネルとの位置関係を解析し、HCN チャネルによる神経細胞の活動性調節機構を探る。

### シナプス前ドーパミン D2 型受容体と N 型カルシウムチャネルとの選択的共役

初山俊彦

線条体のアセチルコリン性介在ニューロンは、運動調節に関与する大脳基底核におけるアセチルコリンの主たる供給源である。このニューロンは、黒質緻密部からのドーパミン性入力を受けているが、線条体におけるドーパミンとアセチルコリンのバランスが、運動機能を制御する上で重要と考えられている。本研究では、線条体アセチルコリン性ニューロンから記録した GABA 性抑制性シナプス後電流が、シナプス前 D2 型受容体を介して抑制されること、その抑制機構はシナプス前終末の N 型カ

ルシウムチャネルの選択的遮断であることを見出した。さらに、上記線条体シナプスにおいては生後 60 日目までに N 型チャネルの関与が徐々に減少し、D2 タイプ受容体を介する抑制の程度も減少することを見出した。

今後は、シナプス前終末における D2 型受容体と N 型および P/Q 型カルシウムチャネルの位置関係、受容体活性化に伴うその動態、それらの生後発達について解明をすすめる。

### mGluR1 の活性化を阻害する自己抗体による小脳失調症

木下彩栄, 重本隆一

ヒトのホジキン病患者で小脳失調症を併発する例のあることが知られていた。我々はこのような症例の一部に代謝調節型グルタミン酸受容体 mGluR1 の活性化を阻害する自己抗体が存在する事を突き止めた。この自己抗体をマウスの小脳付近のくも膜下に注入することにより、小脳失調症状を再現することに成功し、受容体阻害抗体

が機能的にヒトの脳神経症状を引き起こすことを初めて証明した。さらに、患者の臨床検査やこの自己抗体を注入した動物を用いた実験から、運動学習や心拍除脈条件付けなどにおける mGluR1 の役割が明らかとなってきた。また、他の受容体やチャネル分子などの機能分子に作用するものをスクリーニングし、ヒトの病態に関係のある

ものを見つけたとともに、機能障害のメカニズムを探ることを目指している。

### ラット脊髄視床路ニューロン活動性の解析

初山明子

末梢組織から脊髄へ入力された侵害信号出力は脊髄視床路ニューロン軸索から上位中枢である視床の中継核へ送られる。視床の VPL 核に蛍光ラテックスビーズを注入することによって、脊髄視床路ニューロンを逆行性に標識し、腰髄スライス標本においてこれを同定してパッチクランプ記録を行った。脊髄視床路ニューロンの細胞内通電による発火特性は adaptation を伴う規則的な発火パターンを示した。また脊髄視床路ニューロンには HCN

チャンネル活性がみられ、これが EPSP や IPSP の入力に引き続くダイナミックな膜電位変化に貢献していることが示唆された。さらに、EPSP の低頻度繰り返し刺激を行うと、脊髄視床路ニューロンの興奮性が次第に増強し、誘発されるスパイク数が増加する、いわゆる wind-up が観察され、これは NMDA 受容体のブロッカーの投与によって抑制された。wind-up の詳しい発生機構について、現在検討中である。

## 大脳神経回路論研究部門

### 【概要】

大脳皮質の機能を理解するためには、皮質のそれぞれの領域に存在している機能単位としての内部回路の構造とその中で行われている情報処理に関する知識が必要となるが、今のところ、あまり解明されていない。たとえば、皮質の神経回路は種々のタイプの神経細胞から構成されていることは知られているが、個々の神経細胞の情報処理方式・空間配置や、また、それらの神経結合の法則性に関してはほとんど理解されていない。さらに、神経細胞は、信号の伝達的手段として軸索終末から化学物質を放出するが、化学物質の種類によりそれらが回路網にどのような影響を与えるかについても明らかにする必要があり、本部門では、大脳皮質の内部回路の構造的・

機能的解析を行ない、その回路の意味を理解することを目的としている。そのために、局所回路における神経細胞の生理的・化学的特徴、機能的単位構造、各神経細胞間のシナプス結合様式などを電気生理学・免疫組織化学・形態学の技術を用いて調べ、皮質のモデル化のための基礎的データを得ることを目指している。現在は、GABA 作働性の介在ニューロンに重点をおいて、サブタイプごとの生理的性質や神経結合を定量的に解析している。本年度は、線条体介在ニューロンのシナプス構造を定量的に解析するとともに、及びアセチルコリン投射系による大脳皮質局所回路の活動修飾を調べた。

### 線条体介在ニューロン軸索終末におけるシナプス接合部の定量的解析

川口泰雄

窪田 芳之（理化学研究所）

線条体の介在ニューロンのうち、パルプアルブミン陽性の FS 細胞とソマトスタチンを発現する LTS 細胞の終末に GABA が存在することを見つけたので、これら二種

類の GABA 作働性細胞の機能的差を明らかにするために、軸索終末の後シナプス要素を調べた。FS 細胞は樹状突起と細胞体にシナプスを作るのに対して、LTS 細胞は主に

樹状突起にシナプスしていた。少数ながら、スパインにシナプスしている終末も両方にあった。シナプス前ブトンの体積、シナプス接合部の面積、シナプス後部の樹状突起の周径の関係を調べた。FS 細胞の軸索終末のシナプス接合部の面積は、樹状突起が太くなれば、それに比例

して大きくなるのに対して、LTS 細胞のシナプス接合面は、樹状突起の太さにあまり関係なく、比較的一定であった。シナプス接合部の面積は、シナプス後要素の大きさに依存して変わるが、その依存性は GABA 細胞のサブタイプによって異なることがわかった。

### アセチルコリン投射系による大脳皮質局所回路の修飾

根東 覚  
川口泰雄

大脳皮質の重要な入力は、他の皮質と視床からの興奮性投射である。この他に、大脳基底部からのアセチルコリン、青斑核からのノルアドレナリン、縫線核からのセロトニンなどの投射があるが、これらは皮質の活動状態を調節している。これらの伝達物質は錐体細胞に直接作用するだけでなく、GABA 細胞を介して間接的に錐体細胞に影響すると考えられる。カルバコールやムスカリンをある程度持続的に脳切片標本にかけると、抑制性シナプス電流の増大のパターンには、持続的に増えているの

と、0.1 から 0.3 ヘルツの周期でバースト状に上昇するものの二種類があることがわかった。このうち周期的に増大する抑制性電流については、同一切片上の 2 つの細胞から同時に記録された場合には、低周波のバーストリズムは同期していたが、個々の抑制性電流は、同期していないことが多かった。アセチルコリン投射系は、GABA 介在細胞に作用をおよぼし、局所回路の興奮性や周期的活動を調節していると考えられる。

## 心理生理学研究部門

### 【概要】

PET や機能的 MRI など人間を対象とした非侵襲的脳機能画像と、電気生理学的手法を組み合わせ、短期および長期の学習に伴う脳の可塑的变化、高次脳機能の加齢変化と脳における代償機構の関連を明らかにすることを目的に、機能画像法の整備から始め、撮影からデータ解析まで一貫した方法論を確立した。本年度は、福井医科大学高エネルギー医学研究センターとの共同研究で高磁場研究用 3 TMR 装置を利用し、高い信号雑音比を

利した脳賦活検査を継続、さらに近赤外線画像装置(NIR)を用いて、乳幼児に適用する前段階として、他の脳血流測定装置との比較を開始した。また、脳領域間の機能連関の程度を客観的かつ適切に評価する方法の開発をはじめとする、機能画像の統計処理に関する研究を行った。なお脳機能計測センターに最新型 3 TMRI が導入されることを受けて、機能的 MRI に対応するための諸準備を行った。

### 感覚脱失による脳の可塑的变化

定藤 規弘

視覚：触覚から視覚系への可塑性を詳細に調べる目的で、晴眼者および盲人における、探索運動を伴わない点

字触覚弁別に要する神経回路の活動を、3 TMR 装置を用いて計測した(福井医科大学との共同研究)。盲人の点字

読において、一次視覚野の賦活には年齢依存性がある一方、視覚連合野のそれには年齢依存性がないことをしめした。

聴覚：健聴者における読唇により多感覚領野である中上側頭溝の賦活が見られることから、この部位が視聴覚統合に関連していると目されている。聴覚脱失によりこの視聴覚統合をになう神経回路に可塑的变化が起こるか

を検証するために、早期失聴者と健聴者を対象に機能的MRIを試行した。健聴者は、読唇でのみ中上側頭溝の賦活がみられ、一方聴覚障害者では、いずれの課題においても賦活された。早期失聴により両入力拮抗的バランスが視覚入力に傾いたものと推測された。(福井医科大学、福井大学との共同研究)

### 新生児期における脳可塑性の画像化

定藤 規弘

新生児期における可塑的变化に関連して、機能的MRIを用いて新生児の一次視覚野及び外側膝状体の光反応性の経時変化を詳細に検討するとともに、MR信号に関するモデルを用いてシミュレーションを行った。さらに白質髄鞘化との比較を行った。これらにより生後2カ月を

境に変化するの是一次視覚野におけるシナプス過形成に伴う酸素代謝であることが示唆された。これに基づき乳幼児における脳賦活を近赤外線計測により計測する試みを開始した(福井医科大学との共同研究)

### パーキンソン病における思考速度の低下

本田 学

澤本伸克(京都大学医学研究科附属高次脳機能総合研究センター)

大脳基底核は、出力標的の一つである視床を介して広範な大脳皮質に情報を発すると同時に、入力部には大脳皮質からの精緻な情報が収斂し、大脳皮質との間にループ回路を形成し、一連のループ回路のなかで統合処理された情報が、完成された運動指令として脳幹や脊髄に伝達される。また大脳基底核は、一次運動野をはじめ、運動前野、補足運動野、前補足運動野、帯状皮質運動野などさまざまな運動関連領野とループ回路を形成するだけでなく、高次脳機能に関連の深い前頭前野をはじめとする大脳皮質連合野とも密接な神経線維連絡をもつことが知られている。こうした解剖学的知見をふまえ、近年、大脳基底核が思考をはじめとするヒトの非運動性機能に

はたす役割が注目されてきている。運動速度の影響を排して思考速度を評価するための行動課題を開発し、パーキンソン病における思考速度の評価をおこなった。その結果、パーキンソン病においては、思考を制御する視覚刺激の呈示速度が遅いときには、健常者群と正答率に差がないものの、刺激呈示速度の上昇にともなって有意に正答率が低下した。こうした傾向は、空間的な表象をもちいた思考課題よりも、より抽象的な言語表象をもちいた思考課題においてより顕著であった。これらの所見は、パーキンソン病で機能低下の見られる大脳基底核が、運動のみならず思考の制御にも重要な役割をはたすことを示唆するものと考えられる。

## そろばん熟練者の暗算能力の神経基盤

本田 学

花川 隆 (京都大学医学研究科附属高次脳機能総合研究センター)

暗算によるそろばん (心内そろばん) に関わる脳内基盤を、磁気共鳴機能画像 (fMRI) を用いて検討した。そろばん熟練者 6 名及びそろばんの経験のない対照被験者 8 名が、MRI (1.5 T) にて全脳をカバーするエコープラナー像を撮像中に、視覚刺激に基づく暗算課題 (熟練者 1 - 6 桁、対照被験者 1 桁)、空間表象操作課題、言語表象操作課題を行った。30 秒間の各課題を注視課題と交互に繰り返し、各課題終了時に課題遂行の確認を

行った。解析にはSPM99を用いた。空間表象操作課題と言語表象操作課題に伴う脳賦活はそろばん熟練者群と対象者群で同様であった。暗算課題では、そろばん被験者が、空間表象操作課題遂行時と非常によく似た賦活を示したのに対し、対照群は言語情報操作課題と似た賦活の分布を示した。運動を実行せずとも、心内で忠実にイメージすることができる心内そろばんの能力は空間情報を操作する脳内機構に基づいている。

## ヒトの可聴域上限をこえる空気振動に対する感受性についての研究

本田 学

大橋 力 (ATR人間情報通信研究所感性脳機能特別研究室)

ヒトの可聴域上限をこえる空気振動の有無が可聴域音の音知覚におよぼす影響とその神経機構についての検討を行った。音響工学の分野では、デジタル・オーディオのフォーマット策定に関連して、人間の音質知覚に影響をおよぼす空気振動の周波数上限が20kHzをこえるかどうかについて、歴史的な議論が繰り広げられてきた。私たちは、可聴域上限を超える音と可聴域音とを互いに干渉することなく呈示可能な信頼性の高い実験系を構築した上で、脳電位記録および脳血流測定を用いて、音質に対する主観的評価とは独立に脳活動をとらえた。その結果、可聴域を超える高周波成分を豊富に含む音を聞いているときには、それを含まない音を聞いている時に比

較して、視床および脳幹の血流が有意に増加し、またその活性と有意に相関して脳波後頭部優位律動のパワーが増大することを発見した。さらにこうした現象の時間特性を十分に考慮して音質評価実験をおこなうと、高い有意性と再現性をもって音質差が知覚されうることを証明した。ハイパーソニック・エフェクトと名付けられたこうした一連の現象についての研究成果は、音響工学分野で現在世界的なトピックスになっているSACDおよびDVDオーディオの市場化をはじめとするハイデフィニション・オーディオの新規格開発の直接の導火線となった。

## 多変量自己回帰モデルをもちいた補足運動野 - 一次運動野間の機能連結評価

本田 学

加藤比呂子 (NTTコミュニケーション科学基礎研究所)

脳が発達や学習にともなって新たな機能を獲得したり、損傷によって失った機能を代償したり回復したりする過程で、脳の異なる領域間の機能的な関連性の強さ (機能

連関) の変化が決定的に重要な役割をはたすと考えられる。異なる脳領域間に双方向性の神経線維連絡が存在しフィードバックシステムが想定される場合には、領域間

機能連関の評価法として現在広く用いられている脳波・脳磁図のコヒーレンス解析は不適切な可能性がある。そこで双方向性神経線維連絡をもつ複数の運動関連皮質から直接記録された脳波を対象として、赤池らによって提唱された多変量自己回帰モデルをもちいたフィードバックシステム解析を行った。てんかんの外科的治療を目的として留置された硬膜下電極をもちいて、右上腕筋の等尺持続収縮中の大脳皮質脳波を運動対側の左一次運動野

および左補足運動野より皮質脳波を記録した。ユーロウオーカー法により多変量自己回帰係数をもとめ、それに基づいて領域間のインパルス応答関数ならびに相対ノイズ寄与率を算出した。その結果、一次運動野と補足運動野の間には、相互フィードバック関係が存在し、補足運動野が一次運動野に及ぼす影響は、逆方向の影響に比べて有意に大きいことが明らかとなった。

### 一次視覚野における周波数依存性反応：1.5 テスラと 3 テスラでの比較

岡田 知久

機能的磁気共鳴画像法(fMRI)で用いられる血中酸素濃度依存性(BOLD)コントラストによる信号増加は静磁場強度の1～2乗に比例して増加するとされているが、その増加量は報告により異なる。これらの違いの原因としては撮像条件や比較条件の違いの他に、個々の実験間の再現性がMRIではあまり高くない事があげられる。CohenとDuBois(1999)は予測される信号変化と実際の信号変化の間で回帰直線を描き、その傾きを比較する事でより再現性のある比較が可能である事を示した。そこで一次視覚野では周波数に応じて直線的な信号変化を示す事を利

用して1.5テスラと3テスラMRIにおける信号変化量を比較した。

通常の撮像条件で比較した結果、静磁場強度が2倍になっているのに対して、2倍以上にはならず1.79倍の信号増加が得られたのみであった。しかし、統計処理の際には信号増加量を経時的な信号変動量(広義のノイズ)と比較する事で有意水準が導かれる。この点を考慮した場合には、2.39倍という更に大きな相対的信号変化としてみとめられる事が判り、超高磁場MRI装置の有用性が明らかとなった。

## 統合生理研究施設

### 高次脳機能研究プロジェクト

#### 【概要】

1996年1月に伊佐が着任して5年目を迎えたが、着実に研究者の数も増加し、プロジェクトの幅も広がっている。伊佐の他、斎藤康彦、小林康の助手2名に加え、遠藤利朗、井上由香が博士研究員、大学院生はD2に坂谷智也、山下哲司、D1に勝田秀行という陣容で技官は鈴木(佐々木)千香、研究技術支援推進員に伊佐かおる、研究補助に平山徳子、瀬尾道、秘書が山本淳子という体制であった。しかし年度後半の2月より斎藤は群馬大学医学部講師に栄転した。これまで注意のシステムによる眼球のサッカー運動の修飾という問題をボトムアップ的に解決するために、サッカー運動遂行中のサルの脳幹におけるニューロン活動記録(小林、井上)とサッカー

ード運動制御の中枢である中脳上丘の局所回路をスライス標本で解析する研究(斎藤、遠藤)を柱に行ってきたが、中脳ドーパミン細胞をめぐる神経回路とシナプス受容体の研究(山下及び旭川医大・高草木、斎藤博士との共同研究)、マウス上丘電気刺激によるサッカー誘発実験(坂谷)、麻酔下のラットにおける上丘局所回路の信号伝播機構(勝田)など次第に研究の幅を広げている。また本年度より伊佐が研究代表者となり、Human Frontier Science Programの共同研究グラントを得て、スウェーデン・ウメオ大学のAlstermark教授と霊長類及びげっ歯類の脊髄介在ニューロンによる運動制御機構に関する共同研究をこれまで以上に展開することになった。

#### サッカーを指標としたコリン作動性入力による動機付けの制御の解析

小林 康, 井上 由香, 伊佐 正

サルのサッカー反応時間を指標にしてコリン作動性システムによる動機付けのメカニズムを解析した。サルの視覚誘導性サッカー課題において、報酬量を増加させると課題の成功率が上昇すると同時に課題開始時に点灯する注視点に向かうサッカーの反応時間が減少するという行動実験の結果を得た。さらに、報酬量を変化させると注視点へのサッカーの反応時間が変化すると同時に脚橋被蓋核(PPTN)ニューロンの注視点点灯に対

する視覚応答が変化するという実験結果を得た。この反応は注視点に向かうサッカーの反応時間や課題の遂行度合い〔成功率〕という動機付けやglobal attentionを反映する指標と密接に関係していると思われる。また、PPTNにおいて報酬に対する直接の反応と報酬に対する予測反応を得たが、この活動は、黒質緻密部ドーパミン作動性ニューロンの報酬に対する予測的反応の形成に寄与していると考えられる。

#### 上丘局所回路の興奮伝播の動的機構

斎藤康彦, 伊佐 正

上丘の細胞集団における興奮性結合様式を明らかにするため、ラット上丘のスライス標本を用いて、2個の上丘中間層細胞から同時にホールセル記録を行い、自発的膜電位の変化を調べた。中間層細胞のペアにおいて、

Bicucullineを投与し外液のマグネシウムを低くすることにより、同期した脱分極が高頻度で生じた。上丘スライスから中間層のみを含む小片を取り出し、その小片内の2個の細胞からホールセル記録を行ったところ、同期し

た脱分極が見られたが、その頻度は低かった。ところが、浅層も含む小片を取り出し2個の中間層細胞から同時記録を行うと、同期した脱分極が高頻度で観察された。このことから、同期した脱分極は中間層内で生じうるが、

それを引き起こすためには、中間層の外（例えば浅層）からの入力が必要であることが示唆された。中間層における同期的活性化機構は、眼球運動等の運動指令の生成に重要な役割を持つものと考えられる。

### ラット上丘浅層ニューロンに発現する AMPA 型グルタミン酸受容体サブタイプ

遠藤利朗, 伊佐 正

AMPA 型グルタミン酸受容体には  $Ca^{2+}$  透過型と非透過型があり、これらの機能的意義が注目されている。本研究では、ラット上丘のスライス標本において上丘浅層ニューロンからホールセル記録を行い、発現している AMPA 型受容体サブタイプを調べた。 $Ca^{2+}$  透過型は内向き整流性、非透過型は外向き整流性を示すことから、カイニン酸に対する AMPA 型受容体を介した電流応答の整流特性

を指標とした。その結果、horizontal cell および wide field multipolar cell と呼ばれる、接線方向に広く樹状突起を伸ばす抑制性介在ニューロンにおいて  $Ca^{2+}$  透過型受容体を強く発現する細胞が多いことが明らかになった。このことから、 $Ca^{2+}$  透過型 AMPA 型受容体が周辺抑制など、視覚地図上での側方抑制作用に関与することが示唆される。

### 中脳ドーパミンニューロンにおけるニコチン型アセチルコリン受容体の活性化に伴うカルシウム感受性電流成分の活性化

山下哲司, 伊佐 正

中脳のドーパミン細胞は線条体に投射し、強化学習における誤差信号を送る働きが報告されている。

このドーパミン (DA) 細胞は、興奮性入力として脚橋被蓋核よりアセチルコリン (ACh) 作動性線維の投射を受け、ニコチン型アセチルコリン受容体 (nAChRs) を介する速い興奮性伝達が行われている。我々はこれらの DA 細胞において ACh 投与に対して起きる速い内向き電流の

中に fulfenamic acid (FFA) に感受性を示すおそらく calcium-activated-nonspecific cation channel (CAN channel) による電流成分が存在する所見を得た。この電流成分の活性化には nAChRs の subtype のうち 7 型と非 7 型の両方の成分が必要であること、また、その電流-電圧特性は -40 から -80 mV の間で negative slope conductance を示したことが明らかとなった。

## 感覚・運動機能研究プロジェクト

### 【概要】

本研究室では大型脳磁計を用いたヒト脳機能の研究を行っている。様々な種類の刺激に対する認知機構の解明と高次脳機能の解明が主要研究テーマである。体性感覚系では、後頸部、後頭部、肩といった homunculus では明らかにされていない部位の体性感覚野における受容野を明らかにした。また干渉条件を用いて、耳の受容野が

顔の領域と後頸部の両方に存在することを確認した。体性感覚認知に対する注意と視覚刺激の影響について報告した。体性感覚誘発脳磁図初期反応の発現機序を trigger point の変更及び 2 発刺激によるいわゆる recovery curve を解析して明らかにした。痛覚系では、無髄の C 線維を選択的に刺激する方法を確立し、末梢神経と脊髄の伝導

速度がともに 1-3 m/秒であることを明らかにした。また表皮の自由神経終末を選択的に刺激できる針を開発し痛覚関連脳波・脳磁図を記録した。簡便でほとんど痛みも出血も伴わない点が最大の長所である。視覚系では、中心視野と周辺視野に対する格子縞反転刺激視覚誘発脳磁図に対する注意の影響を明らかにした。顔認知において特異的反応とされる「倒立顔効果」が左半球側頭葉下面における特殊作用によって出現する可能性を指摘した。聴覚系では、「自分の声」をリアルタイムで聞く時と録音されたものを聞く場合の聴覚誘発脳磁図を比較し、受容野が有意に異なることを報告した。4000Hz 以上の高周波数の音による聴覚誘発脳磁図は、周波数増大に応じて減少し、潜時には延長傾向があった。15000Hz 以上の

音には反応が見られなかった。ハンマーが金床に振り下るされるビデオを見せ、音は聞こえないが心の中で音をイメージさせて音の想起に関する活動部位を解析し、前頭葉深部から島に掛けての部位に活動が見られた。言語認知の研究を誘発脳磁場成分ミスマッチフィールド (MMF) を用いて行っている。MMF は 1 秒前後の短い間隔で繰り返し提示される同一の音 (標準刺激) の中に、それとは異なる音響的特性を持つ逸脱刺激がまれに挿入された場合に、逸脱刺激に対して特異的に出現する誘発脳磁場成分である。日本語特有の /l/r/ の発音区別の困難が、トレーニングによって改善しそれが左半球で行われることを明らかにした。

### 後頭部及び肩部刺激による体性感覚誘発脳磁図

糸見和也 (名古屋大学医学部・小児科), 宝珠山稔 (名古屋大学医学部), 柿木隆介

Penfield が発表した第 1 次体性感覚野 (S I) の受容野分布, いわゆる homunculus の中で, 非常に奇妙な印象を受けるのは, 後頭部及び肩部が顔の部位よりも離れて体幹に近い部位に描かれていることである。Homunculus は脳外科手術中の刺激実験によって描かれたものである。後頭部などは制約が大きく確認が困難であったことが予想されるため, 体性感覚誘発脳磁図 (SEF) を用いて再確認作業を行った。電気刺激を肩, 乳様突起 (後

頭部) 頰の 3 箇所を与えて活動部位を同定した。すると, 肩刺激では homunculus の体幹領域に近い部位に, 頰刺激では顔の領域に推定された。しかし, 乳様突起 (後頭部) 刺激では, 16 名中 11 名では体幹領域に近い部位に, 5 名では顔の領域に推定された。この結果は, 後頭部領域の特異性による個人差を反映していることを示唆している。(Itomi et al: Brain Topography, 14: 15-23, 2001)

### 耳刺激による体性感覚誘発脳磁図

二橋 尚志, 宝珠山稔 (名古屋大学医学部), 柿木隆介

Penfield らにより人の第一次体性感覚野 (SI) 局在が初めて報告され, 近年, 非侵襲的にヒト脳機能を検査する方法 (脳磁図, functional MRI, PET) により研究がすすんでいる。しかし, 現在までに一次体性感覚野における耳の受容野に関する報告はない。脳磁図をもちいて第一次体性感覚野 (SI) における耳の局在を検討した。

左耳の耳輪, 耳垂, 耳珠の 3 箇所に電気刺激を加え。この時の脳活動を脳磁図をもちいて計測した。脳磁図は BTi 社製脳磁計 (Magnes, 37 channel) を用い, 脳磁計の

中心は右側 SI の頰部及び顔の領域の活動を記録する目的で国際 10-20 法の C4 に配置した。解析には単一電流双極子モデル及び複数電流双極子モデルを用いた。13 名中 7 名にのみ刺激対側に短潜時成分 (刺激後 20msec, M20 及び 40msec, M40) を認め, この 7 名を解析した。耳輪は全例, 電流双極子は SI の頰部領域に推定された。耳垂では, 4 名は頰部領域に推定されたが, 1 名は顔の領域に, 2 名は顔及び頰部領域の両方に推定された。耳珠では, 2 名は頰部領域に, 5 名は顔及び頰部領域の両

方に推定された。発生学的には外耳は前半部，後半部それぞれ3つずつよりなる隆起より形成される。前者は三叉神経により支配され，後者は頸神経より支配を受けている。発生がすすむに従い後者がより優位になる。した

がって，耳のSIにおける極在は頸部領域だが，三叉神経の貢献が強くなる前方の部分（耳垂，耳珠）では頸部及び顔領域に存在する例があると考察した。(Nihashi T et al: Neuroimage, 13: 295-304, 2001)

### Attention and visual interference affect somatosensory processing

Lam Khanh, Kakigi Ryusuke, Mukai Tomohiro, Yamasaki Hiroshi

Bilateral median nerves were stimulated unilaterally, and subjects were asked to count left median nerve stimulation while visual interference (cartoon) was applied. Five components (1M-5M) were identified in the hemisphere contralateral to the stimulated nerve and only one component (MI) was found in the ipsilateral hemisphere. Summarizing the results of our previous and present studies, (1) visual interference enhanced the 3M and 4M but reduced the MI, (2) attention enhanced the 3M, 4M, 5M and MI. As a result, (3) visual

interference with attention enhanced the 3M and 4M more, and showed no significant change in the 5M and MI. This was compatible with a summation of the effects caused by visual interference alone and attention alone. We considered there were significant interactions of activities relating to somatosensory, visual stimulation and cognitive function, in both the primary (SI) and secondary somatosensory cortex (SII) in humans. (Lam et al: Neuroscience, 104: 689-703, 2001)

### 近位筋振動刺激による末梢側神経刺激誘発電位への影響

宝珠山稔（名古屋大学医学部）

柿木隆介

一つの運動を行う際には，主動筋の運動に先行した姿勢の決定や保持のために近位筋の運動が認められる場合がある。随意運動と感覚情報処理の関連を解析する上で末梢からの感覚信号がそれより中枢側の筋感覚信号によって影響をうけるかどうかはしばしば問題となる。手指筋，円回内筋，上腕二頭筋，上腕三頭筋，僧帽筋のそれぞれに振動刺激を与えつつ正中神経刺激による体性感覚

誘発脳電位（SEP）を記録した。手指筋以外の全ての筋への刺激はSEP成分（N20-P25-N33, P20-N30）の振幅，潜時に影響を及ぼさず，少なくとも近位筋のIa紡錘筋を主体とする筋感覚入力は末梢神経刺激によるSEPには影響がないことが示された。（Hoshiyama et al: Clinical Neurophysiology, 111: 1607-1610, 2000）

### 短潜時体性感覚誘発脳磁場成分と脳電位成分との対応

宝珠山稔（名古屋大学医学部）

柿木隆介

体性感覚の研究では体性感覚誘発脳電位(Somatosensory evoked brain potential, SEP)について多くの知見の蓄積

があるものの，近年進歩しつつある体性感覚誘発脳磁場(Somatosensory evoked cortical magnetic field, SEF)との

対応は明らかではない。正中神経刺激による短潜時 SEF 成分と SEP 成分の対応を、Inter-potential interval (IPI) の Jitter 現象を解析し明らかにした。SEF 成分で刺激語後 20ms と 30ms に認められる 1M と 2M 成分はそれぞれ SEP 成分、N20 (C3, F3, P3, 国際 10-20 法) と P30 (P3) 対

応していた。C3 より記録される P25, N33 に対応する SEF 成分は同定できなかった。また、1M と 2M の間には時間的な相関はなく、1M と 2M は刺激に対して独立な反応であることが推察された。(Hoshiyama et al: Brain Research, 908:140-148, 2001)

#### 電気及び CO<sub>2</sub> レーザー刺激を用いた新しい方法による A-beta, A-delta, C 線維の伝導速度計測

Tran Tuan Diep, Lam Khanh, 宝珠山稔, 柿木隆介

A-beta 線維, A-delta 線維の末梢伝導速度は比較的容易に計測できるが、C 線維の場合神経遮断などの特殊な状況でなければ計測できなかった。近年皮膚の非常に狭い領域に弱いレーザー刺激を行うことで C 線維の選択的刺

た。各刺激を 20 名の被験者の手背及び前腕に与え、記録される誘発脳電位の頂点潜時差より伝導速度を算出した。得られた伝導速度の平均値はそれぞれ 69.1m/s, 10.6m/s, 1.2 m/s であった。3 種類の線維の伝導速度を同時に計測できる本方法は非侵襲的かつ簡易であるため、研究領域のみならず臨床的にも有用であると思われる。(Tran et al.: Neurosci Lett, 301: 187-190, 2001)

#### CO<sub>2</sub> レーザーによる C 線維刺激法を用いた脊髄視床路伝導速度 (間接法)

Tran Tuan Diep, 乾 幸二, 宝珠山稔, 柿木隆介

CO<sub>2</sub> レーザー刺激による痛み関連誘発脳電位は研究目的のみならず臨床的にも応用されている。この方法を用いた A-delta 線維関連の脊髄視床路伝導速度の研究は既に行われているが、C 線維関連の脊髄視床路伝導速度計測は本研究が初めての報告である。既に報告した極小野低強度レーザー刺激法 (Tran et al., 2001) を用いて上下肢それぞれの 2 箇所

A-delta 線維について既に報告されている Kakigi (1991) の方法を用いて脊髄伝導速度を計算した。伝導速度の平均値は 2.9m/s であり、末梢 C 線維の信号は脊髄視床路の C 線維を介して視床に伝達されるものと考えられた。本方法は、知覚障害を呈する種々の脊髄疾患における臨床応用にも使用できる有用な方法であると思われる。(Tran et al., Pain, 95: 125-131, 2002)

#### CO<sub>2</sub> レーザーによる C 線維刺激法で計測した脊髄視床路伝導速度 (直接法)

秋 云海, 乾 幸二, 王 曉宏, Tran Tuan Diep, 柿木隆介

従来 C 線維を選択的に刺激する方法がなかったためヒト C 線維関連の研究は困難であったが、Tran ら (2001) は皮膚極小野に低強度 CO<sub>2</sub> レーザー刺激を行う方法で、C 線維の末梢伝導速度計測に成功し、ついで上下肢にこ

の方法で刺激を行うことにより間接的に脊髄伝導速度を算出できることを報告した。本研究では極小野低強度レーザー刺激法を用いて C7 から T12 脊椎の範囲で皮膚正中線上を刺激し、C 線維に関わる脊髄視床路伝導速度を

計測した。伝導速度は、誘発脳電位の陽性頂点の潜時差より算出した。比較のため通常のレーザー刺激を同様にを行い、A-delta 線維に関わる脊髄伝導速度を算出した。極小野刺激での伝導速度は 11 名の平均値で 2.2m/s であり、

通常のレーザー刺激の 10.0m/s より明らかに遅かった。この結果は、末梢 C 線維で伝達される興奮は、脊髄においても C 線維を上行することを示すものである。(Qiu et al., *Neurosci Lett*, 311: 181-184, 2001)

### 表皮内針電極を用いたヒト皮膚 A-delta 線維の選択的刺激

乾幸二, Tran Tuan Diep, 宝珠山稔, 柿木隆介

ヒト皮膚 A-delta 線維の選択的刺激を目的に表皮内電気刺激用の針電極を作成し、その有用性を誘発脳電位を用いて検討した。針の長さは 0.2mm であり、皮膚に電極を刺入すると針の先端が表皮内に位置するようになっている。左手背および上腕を 0.1-0.3mA, 0.5ms で刺激し、得られた誘発電位の陽性成分頂点潜時より末梢伝導速度を計算した。比較のため同様の刺激を CO<sub>2</sub> レーザー (LS), 通常の経皮的電気刺激 (TS) でも行った。算出された末

梢伝導速度は表皮内電気刺激 (ES) で 15.3m/s であり、LS による伝導速度 (15.1m/s) と相関した。一方 TS による伝導速度は 44.1m/s であり、有意に早かった。ES および LS の値は両者の興奮伝導が A-delta 線維を介することを示している。本方法は特殊な機器を必要とせず、扱いも極めて簡便である。また出血や熱傷もなく非侵襲的である。従ってヒト痛覚関連の研究に有用であると考えられる。(Inui et al., *Pain*, 96: 247-252, 2002)

### 表皮内電気刺激法を用いた痛み関連誘発脳磁場

乾幸二, Tran Tuan Diep, 秋云海, 王曉宏, 宝珠山稔, 柿木隆介

我々は、独自に作成した針電極を用いて表皮内を電気刺激することでヒト皮膚 A-delta 線維を選択的に刺激できることを報告した (Inui et al., 2002)。本研究では、表皮内電気刺激法 (ES) による痛み関連誘発脳磁場を検討した。0.1-0.3mA, 1.0ms の条件で手背および前腕に ES を行い、脳磁場を記録した。13 名の被験者のうち、8 名では単一雙極子モデルでの解析が可能であり、8 名全ての被験者で雙極子は両側第 2 次体性感覚野 (SII) に推定された。残りの 5 名では時間的にオーバーラップする 2

つ以上の電流源があると考えられ、多信号源解析ソフトを用いて解析したところ、両側 SII に加え、それとほぼ平行して活動する第 1 次体性感覚野 (SI) にも電流源が推定された。手背および前腕刺激で得られた磁場成分の潜時差より末梢の伝導速度は 15.6m/s と算出された。これらの結果は、既に報告されている多くの痛み関連脳磁場研究結果と一致するものであり、本方法は痛み関連誘発脳磁場においても有用な刺激方法であると考えられる。(Inui et al., *Clinical Neurophysiology*, 113: 298-304, 2002)

### 中心視野への注意によるパターンリバーサル視覚誘発電位への影響

宝珠山稔 (名古屋大学医学部)

柿木隆介

中心視野および周辺視野のパターンリバーサル刺激による視覚誘発電位 (Pattern-reversal visual evoked potential, PRVEP) が中心視野への注視や意識の集中の度

合いによってどのように影響を受けるかを解析した。中心視野への単純な注視, 努力的凝視, 中心視野への反応信号の提示による注視の 3 条件について中心視野と周辺

視野, 全視野刺激による PRVEP を測定した。努力的凝視と課題提示にて中心視野刺激による PEVEP 成分は振幅の増大を示し, 周辺視野刺激による PRVEP 成分は減衰を示した。全視野では条件による差は認められなかつ

た。中心視野への注意の程度により中心視野と周辺視野刺激に対する脳反応は reciprocal に facilitation と suppression が生じている可能性が示唆された。(Hoshiyama et al: Brain Topography, 13: 293-298, 2001)

#### A first comparison of the multifocal visual evoked magnetic field and visual evoked potential

Wang Lihong, Kakigi Ryusuke, Kaneoke Yoshiki, Okusa Tomohiro,  
Barber Colin (Medical Physics Department, Queen's Medical Centre, Nottingham, UK)

Our objective was to determine the feasibility of recording reliable multifocal visual evoked magnetic fields (mfVEFs), to investigate the maximum stimulus eccentricity for which the mfVEF responses can be obtained, and to study how this changes with checksize (spatial frequency tuning). Using an initial checksize of 30', we recorded pattern-onset mfVEFs and multifocal visual evoked potentials (mfVEPs) under the same conditions. Eccentricity changes with spatial frequency

were studied using six kinds of different checksizes. We obtained, for the first time, reliable mfVEFs, and found they could be elicited from more peripheral stimulus elements than could mfVEPs. The larger the checksize, the greater the eccentricity reached. The mfVEF can to some extent overcome the limitation of the mVEP and record both foveal and more peripheral responses. (Wang et al: Neuroscience Letters, 315:13-16,2001)

#### 脳波と脳磁図を用いた「倒立顔認知」の研究

渡辺昌子, 柿木隆介

これまで, ヒトの顔認知機構について「正立した顔」や「目の動き」を刺激として研究してきた。引き続き今年, 「倒立顔を見るときには正立顔を見るときと異なる情報処理が脳内で行われる」という説 (face inversion effect) について, 脳磁図と脳波を用いて解析した。正立顔, 倒立顔及び object の刺激画像をそれぞれ半視野に提示し, 刺激提示視野対側半球から脳磁場を記録することで左右半球間の違いを調べた。その結果, 左半視野刺激 (右半球) では倒立顔に対して反応の潜時が延長するのに対し, 右半視野提示 (左半球) では逆に短くなる傾向があった。このことから 倒立顔に対しては左半球優位, 正立顔に対しては右半球優位であることが示唆された。

Object 刺激に対する反応は倒立顔刺激に対する反応とパターンが異なり, 「倒立顔は object として情報処理される」という仮説と適合しない結果であった。また, 複数双極子モデル (BESA) 及び脳波の結果より, 顔認知活動には側頭葉下面と外側の 2 箇所が関与することが示唆された。倒立顔と正立顔に対する反応の活動源位置に有意な違いはなかった。倒立顔に対する反応の, 潜時延長は側頭葉下面で有意であり振幅増大は脳波 (主に側頭葉外側の活動を反映) で明瞭だったことから, 側頭葉下面は主に個々の顔の同定に, 側頭葉外側は顔の様々な要素の検出に深く関与しているのではないかと考察した。

#### 自分の声 (own voice) に関連する聴覚誘発脳磁図

軍司敦子, 宝珠山稔, 柿木隆介

ヒト発声時の脳活動には呼吸や発声器官を制御する運動や、発声後の自己の声による聴性の反応が含まれると考えられている。本研究では、単純な発声時における脳磁場反応から聴覚反応成分を分離し、その発生源を推定した。健常者 10 名を対象に、4-6 秒間隔で単母音 (/u/) を繰り返し発声する課題を実施し、発声関連脳磁場 (vocalization related cortical field: VRCF) を自分の声が聞こえない状態の masking 条件と通常 (control) の条件下で記録した。VRCF は、発声開始後およそ 90 ms でピークを示し、その振幅は masking 条件より control で有意に大きかった ( $p < 0.05$ )。control-masking 条件間の差分波形を求めたところ、発声開始後  $81.3 \pm 20.5$  ms に頂点を示す 1M 成分が得られた。1M 成分は、音声を聴取した

時に出現する auditory evoked magnetic field (AEF) の M100 成分に対する発生源と同様、聴覚野付近に推定されたことから、この成分が M100 と同様の成分で自分の声に対する反応であると推察された。また、左半球において、1M 成分は M100 成分よりも約 1 cm 中心寄りに解析された ( $p < 0.05$ )。発声時には、生成しようとした音声と実際に発した音声とを照合するためのプロセスが関与し、単純に外界からの音刺激を聴取する場合とは異なる過程が存在することが考えられる。それは、外界からの音を聴取するときに活動する皮質活動とは異なる過程を呈するのかもしれない。(Gunji A et al: Clin Neurophysiol, 112:514-520, 2001)

### 高周波純音による聴覚誘発脳磁場

藤岡孝子, 柿木隆介, 軍司敦子, 竹島康行

ヒト聴覚野における聴覚誘発脳磁場反応 (Auditory Evoked Field, AEF) で中域可聴音を用いたトノトパイ (周波数局在性) 存在が報告されている。本研究では、健常成人可聴域上限までの高周波および超音波を用いて聴覚刺激を加え、AEF を計測し、長潜時成分 N1m について検討した。すなわち、周波数として 4000 から段階的に 14000Hz まで、および超音波として 15000Hz, 20,000Hz, 40,000Hz の純音を健常成人 12 名に与えた。この結果、14000Hz まではほぼ全員に N1m 反応が認められたが、15,000Hz 以上の超音波に対する N1m は得られなかった。また、N1m の振幅は周波数増大に応じて減少し、潜時に

は延長傾向があった。左右半球間差として右半球で左半球より振幅が有意に大きく、N1m の信号源位置は有意に前方かつ外側また ECD 向きは、左で頭頂方向に対してより垂直であった。また左半球では周波数増大に応じた比例関係がみとめられた。これらの結果は、N1m 反応の中域可聴音によるこれまでの報告における右半球優位性および周波数依存性とほぼ同様の傾向にしたがっていると考えられた。すなわち、今回の研究により、高周波可聴域においても、ヒト聴覚野のトノトパイが保持されていることが確かめられた。(Fujioka T, et al.: Neuroscience, in press)

### 音の想起に関連する初期の脳反応

宝珠山稔 (名古屋大学医学部)  
軍司敦子, 柿木隆介

音の想起に関する脳反応は機能画像的研究を中心に行なわれ、いくつかの活動部位が報告されているが、反応各部の時間的關係は明らかではない。音を想起する課題により誘発される脳反応を脳磁計を用いて計測すること

により、音の想起に関連する初期の脳反応を同定した。音を生じる場面を視覚的に提示し音を想起させると、課題提示後約 150ms に想起に特異的な反応成分 (R1) を認め、反応は右半球優位であった。R1 に対する信号源は個

人差が認められたものの聴覚野とは明らかに分布が異なり、信号源は Pre-frontal sulcus の深部から Insula にかけての領域に推定された。音の想起に関する早期の成分に

ついては 1 次聴覚野以外の領域の活動が含まれると考えられた。(Hoshiyama et al: NeuroReport,12: 1097-1102,2001)

### Neural activities during Wisconsin Card Sorting Test–MEG observation

Wang Lihong, Kakigi Ryusuke, Hoshiyama Minoru

Taking the advantage of high temporal resolution of magnetoencephalography (MEG), we dissociated the neural activities related to shift attention processing and to the working memory and decision making processing involved in the Wisconsin Card Sorting Test (WCST). Significantly larger activities to the wrong signals compared with those to the correct signals were found at 460–640 ms after the presentation of the feedback signals in the dorsolateral prefrontal cortex and the middle frontal cortex. Comparison of the MEG recordings to the card presentations processed by the wrong and by the correct feedbacks revealed that different

activities occurred in the period of 190–220 ms and 300–440 ms mainly at the supramarginal gyrus, the dorsolateral prefrontal, and the middle and inferior frontal gyrus. Our results proved that the WCST task activates a broad frontal area and the parieto-frontal network across time streaming. Both shifting attention to the wrong feedback and enhanced visual working memory to the sorting shifting condition of the card presentation occur in the same areas at different time points. (Wang et al: Brain Research Cognitive Brain Research, 12: 19-31, 2001)

### 語音に対する誘発脳磁場反応：聞き分けトレーニング効果の検討

小山幸子、軍司敦子、山田玲子（株）ATR 人間情報科学研究所）、矢部博興（弘前大学医学部）、久保理恵子（株）ATR 人間情報科学研究所）、大岩昌子（名古屋外国語大学外国語学部）、柿木隆介

語音の構成は言語によって異なるために外国語学習時には、母語に存在しない音素の認識、聞き分けが学習者にとって大きな課題となる。山田らの検討により、成人でも、トレーニングによって米語の /l/r/ など日本語に含まれない音素の聞き分けを学習できることが確認されている。我々は /l/ と /r/ の聞き分けの学習に関与する神経基盤を探るために、学習の前後に誘発脳磁場成分ミスマッチフィールド（MMF）を記録した。MMF は 1 秒前後の短い間隔で繰り返し提示される同一の音（標準刺激）の中に、それとは異なる音響的特性を持つ逸脱刺激がまれに挿入された場合に、逸脱刺激に対して特異的に出現する誘発脳磁場成分である。逸脱刺激と標準刺激の間の心理的な距離が大きくなるのに従って、MMF の振幅は増大し、その潜時は短縮する。我々は右手利きの日本語話者 16 名にトレーニングを行い、トレーニング

の前後に脳磁場を測定した。1 セッション約 30 分のトレーニングを 45 セッション、23-50 日かけて行った。3 名の話者に対する聞き分け率をトレーニングの前後に測定したところ、3 名の話者全員に対して聞き分け率が 15% 以上向上した 9 名の被験者のうち 8 名では左大脳半球から記録された脳磁場に以下の変化が認められた。4 名の被験者では、トレーニング前には出現しなかった MMF 成分が出現した。4 名の被験者では、トレーニング後に MMF 潜時が短縮した。これらの MMF の発生源は聴覚野に推定された。聞き分け率の向上が話者によってばらつきがみられた被験者にはこのような変化が認められなかった。本検討から語音の獲得には左大脳半球が関与していることが示唆された。

Koyama et al., (2000) Neuroreport 11: 3765-3769

Koyama et al., (2000) Brain Research Cognitive Brain

Research 10: 119-124.

12: 39-48

Yabe et al. (2000a) Brain Research Cognitive Brain Research

Yabe et al. (2000b) Brain Research 897: 222-227

# 脳機能計測センター

## 形態情報解析室

### 【概要】

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

はじめに超高圧電子顕微鏡室に関連する事項を、記述する。医学生物学用超高圧電子顕微鏡(H-1250M型)が昭和57年3月に導入されて、同年11月よりこれを用いての共同利用実験が開始された。平成12年度は共同利用実験計画が19年目に入っている。本研究所の超高圧電顕の特徴を生かした応用研究の公募に対して全国から応募があり、平成12年度は最終的に12課題が採択され、実施された。これらは、厚い生物試料の立体観察と三次元解析、薄い試料の高分解能観察等である。米国および韓国からの研究者による実験も行われている。共同利用実験の成果は、超高圧電子顕微鏡共同利用実験報告の章に詳述されている。

超高圧電子顕微鏡室では、上記の共同利用実験計画を

援助するとともに、これらの課題を支える各種装置の維持管理及び開発、医学生物学用超高圧電子顕微鏡に関連する各種基礎データの集積および電子顕微鏡画像処理解析法の開発に取り組んでいる。本年度の超高圧電顕の利用状況の内訳は、共同利用実験等169日、修理調整等67日である(技術課脳機能計測センター形態情報解析室報告参照)。電顕フィルム使用枚数は7,028枚、フィラメン点灯時間は477.1時間であった。装置は、平均93%の稼働率で利用されており、試料位置で $10^{-6}$ Pa台の高い真空度のもとに、各部の劣化に伴う修理改造を伴いながらも、高い解像度を保って安定に運転されている。

組織培養標本室は通常用およびP2用の培養細胞専用の培養機器と、各種の光学顕微鏡標本の作製および観察用機器の整備に勤めている。平成12年度の利用者は所内11部門33名、所外1名であった。

### 超高圧電子顕微鏡用広視野高解像度対物レンズの結像特性

有井達夫

医学生物学用としての超高圧電子顕微鏡(H-1250M)は、出来るだけ低倍( $\times 1,000$ )において、広い視野を、高解像度に撮影することが必要である。導入当初は、高分解能を兼用した対物レンズとして導入されており、1,000倍において使用できる対物絞りに限界があり、また観察視野がフィルムの大きさに比較して制限されていた。そこでより広い視野を高コントラストで撮影することが出来るように低倍対策用対物レンズポールピース( $f_{obj} = 5.0$  mm,  $C_c = 3.9$  mm,  $C_s = 5.5$  mm)を試作し、1994年6月に設置した。これに合わせて結像系内の光軸上の固定絞りの径を変更している。これらの結果、1,000倍の倍率において、導入時には、対物絞り直径 $50 \mu\text{m}$ を用いても試料観察視野直径 $\sim 65 \mu\text{m}$ であったが、変更後は、視野直径 $\sim 78 \mu\text{m}$ 内の領域を、対物絞り直径 $10 \mu\text{m}$ を用いても、観察可能と改善された。

このとき、対物レンズの前磁場の前で、ほとんど平行に照射される条件で過不足焦点の量( $z$ )に応じた倍率( $M$ )変化量を測定すると、

$$M = 2.2 \times 10^{-4} (\mu\text{m}^{-1}) M \cdot z$$

であり、像回転の変化量( $\theta$ )は、

$$\theta = 2.0 \times 10^{-4} (\text{rad} \cdot \mu\text{m}^{-1}) z$$

である。倍率変化量は約1/2となり、像回転は、約10%減と、改善された。

また、サイドエントリーホルダーによる試料傾斜駆動範囲を、 $\pm 45$ 度から、 $\pm 60$ 度まで傾斜できるように改造することができた。これらの結果、厚い生物試料の電子線トモグラフィーにも、有利な仕様となっている。しかし改造に伴い、現在、傾斜軸は、フィルムの長辺に対して約10度傾斜している。

## ラット小脳の生後発達におけるエンドセリン受容体の発現と局在

古家園子, 尾崎 毅

堀 清次 (大阪バイオサイエンス研究所)

強力な血管作働性物質として発見されたエンドセリンは発生の過程において、種々の細胞の増殖や分化を促進することが知られている。エンドセリン受容体にはETAとETBが知られており、小脳にはETBが局在していることがin situ hybridization法にて明らかにされている。そこで、正常ラットおよびETB突然変異ラットについて小脳の生後発達過程におけるエンドセリン受容体の発現と局在を、抗ETB抗体、抗ETA抗体を用いた電顕免疫組織化学法にて観察した。

ETBは正常ラットでは生後5日から、バーグマングリアおよび顆粒層のアストロサイトに発現した。細胞質全体および形質膜に免疫反応が認められたが、特にゴルジ装置に強い反応性が認められた。生後14日では、ETBはバーグマングリアのゴルジ装置、および細胞突起の形

質膜へ局在した。生後3週以降では、バーグマングリアのゴルジ装置にのみ局在した。顆粒層のアストロサイトにおいては、生後3週間以内にETBは認められなくなった。ETAは正常ラットにおいては、生後9-14日にバーグマングリアや顆粒層のアストロサイトに発現し、3週齢までに消失した。ETB突然変異ラット(sl/sl)においては、生後7-14日にETAが発現した。ETAは細胞質全体に一樣に存在したが、正常ラット、sl/slラットともに、生後3週までに消失した。sl/slラットでは、正常ラットより2日はやくETAが発現したことから、ETAがETBの機能を代償している可能性も考えられる。エンドセリンおよびエンドセリン受容体の役割については、今後の説明が待たれる。

## 生体情報処理室

### 【概要】

脳における情報処理には、ネットワークを構成している個々のニューロンの発火パターンが意味を持つデジタル的過程と、非線形素子としてのニューロンの興奮性変化が意味をもつアナログ的過程がある。後者には種々の細胞内情報伝達系の活性化が密接に関与しており、それらの活性の量的な違いやバランスの変化は、ニューロン回路で行われているデジタル的処理にも大きな影響を及ぼしている。それゆえ、特定のニューロン・ネットワークへの入力と同様であっても、ある場合は学習・記憶の生成・保持などが起こり、他の場合は成熟・老化、疾患や細胞死が起こるなど、多彩な結果が生じていると予想される。当室では、外界からの刺激または侵襲に対する、

受容体の変化 - 細胞内の分子の動き - 生化学的变化 - 興奮性の変化 - 神経機能の変化 - 脳機能・脳機能障害の発現、という一連の過程をニューロン・ネットワーク上で総合的に捉え、脳における情報処理の基本的な仕組みを理解することを目指している。現在は、中枢ニューロンの興奮性調節機構に関して、以下の3テーマを中心に研究を行っている。

なお当室では、吉村・村田両技官が中心となり、所内共用施設として、SGIOrigin2000を核とする生体情報解析システム、および、各種所内ネットワークサービスの運用を行っている。これらについての詳細は技術課の項を参照されたい。

## 樹状突起活動電位の伝播調節メカニズムの解析

坪川 宏

樹状突起は、種々のシナプス入力を統合してニューロンの出力を決定するための AD コンバーターとして、情報処理上の重要な役割を担っている。シナプス統合のメカニズムは脳内のニューロンにより異なるが、大脳皮質や海馬の錐体細胞では、細胞体側より逆行性に伝播してくる樹状突起活動電位の寄与が大きいことが近年明らかになってきている。樹状突起における活動電位の特性は、樹状突起に存在する種々の電位依存性イオンチャネルやトランスポーターの活性により精密に調節され、さらにこれらの機能分子は細胞内のシグナル伝達系により直接・間接にコントロールされていると考えられる。この

調節機構の詳細を明らかにするため、イオン・イメージングをはじめとした光学的手法と、パッチクランプ法等の電気生理学的手法を併用し、海馬スライス標本上の錐体細胞を用いて、樹状突起活動電位の解析を行っている。これまで、この活動電位とそれに伴う細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の増加が G タンパクを介する細胞内情報伝達系の活性化により調節されることを報告してきた。今年、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の増加による CaMKII の活性化が樹状突起活動電位の伝播を長時間促進しうること、またこの効果は 3 量体 G タンパク  $G_q$  の サブユニット欠損マウスでも見られることを報告した (Tsubokawa H et al., J Neurosci, 20 : 4878-84.)

## 細胞内シグナル伝達系の活性とニューロン活動との時間的・空間的關係の解析

坪川 宏, 高木佐知子

細胞内シグナル伝達系の活性変化は、シナプス伝達の長期増強や長期抑圧といった可塑的变化に重要な役割を果たし、また一方では細胞死を導く要因にもなりうるということが知られている。ニューロン機能におけるシグナル伝達役割をより明確にして行くために、タンパク質リン酸化酵素をはじめとした酵素群の動態と種々のニューロン活動との時間的・空間的關係を詳細に解析することは必要不可欠と考えられる。本研究は、中枢ニューロンの一つのモデルとして海馬スライス標本上の錐体細胞を用

い、3 量体 G タンパク質  $G_q$  及び  $G_{11}$  のカスケードにつながるタンパク質リン酸化酵素、PKC の活性変化を可視化し、ニューロン活動やそれに伴う細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化と PKC の活性変化との時間・空間的關係を明らかにすることを目指している。今年、PKC の薬理的活性化に伴う細胞内移動を、PKC 結合性蛍光色素を単一ニューロン内へ注入して検出することを試みた (Tsubokawa H, Jpn. J. Physiol. 50: S118, Tsubokawa H, Takagi S, Soc. Neurosci. Abs. 26: 876.)

## 中枢ニューロンの容積調節と興奮性調節の機能的カップリングの解析

高木佐知子, 坪川 宏

脳細胞では、てんかん発作、虚血侵襲の急性期などに swelling bleb などと呼ばれる細胞膨張が見られる。また、海馬 CA1 野における遅発性細胞死やアポトーシスの過程では持続的な容積減少 (shrink) が観察される。しかしながら、これらの容積変化が神経障害の過程でどのような意味を持つのか不明である。本研究では、種々のニュー

ロン活動の変化と容積変化との関係を解析し、興奮性調節と容積調節の両メカニズムに關与する分子の機能連関を明らかにすると共に、それらの破綻と病態との関連を明らかにすることを目指している。

海馬など細胞が高密度に存在する脳内部位では、細胞が容積変化を起こすと、一定体積あたりの細胞と細胞間

隙の占有パターンが変わり、それに応じて近赤外光の透過率が変化することが知られている。この性質を利用して、海馬スライス標本のニューロンから電気生理学的記

録を行うと共に、内因性光学シグナルのイメージングを行ない、様々なストレス負荷で起こる興奮性変化と容積異常の時間的・空間的特性を解析している。

## 機能情報解析室

### 【概要】

二つの分野で研究が行われた。

1) 分子レベルでの生理・病理機能発現の基礎となる蛋白質構造物性の研究が今野により進められた。研究内容は、a) 溶液環境の変化に应答する蛋白質分子構造変化の解析、b) 細胞内蛋白質分解系に關与する蛋白質群の構造・物性解析、c) アミロイド凝集体の形成機序の解析、等である。これらの研究のために、遺伝子工学・蛋白質

工学・諸分光法・X線散乱法・電子顕微鏡法・その他の物理測定法が総合的に適用されている。

2) 脳の高次機能を司る神経機構の研究が遠本により進められた。随意運動や思考に關連する脳活動を、サルとヒトを検査対象にして、大脳皮質電位の直接記録・PET(陽電子断層撮影法)・脳磁図・脳波等を併用して解析している。

### 静電的相互作用で駆動されるアミロイド誘起性蛋白質凝集機構

今野 卓

アミロイド凝集体と他の蛋白質分子との相互作用は、アミロイド關連病理機構の解明に不可欠である。その相互作用の物理化学的性状の一般解明に寄与するため、細胞毒性をもつアルツハイマー病關連ペプチドがつくるアミロイドと多種類の可溶性蛋白質との間の相互作用を検討した。その結果、このアミロイドは、広範囲の蛋白質種に対して破壊的に働き、凝集・沈殿を引き起こすこ

とが觀察された。さらに、変異体ペプチドを使った実験などから、その現象を引き起こす相互作用が、静電的力で駆動されていることも示された。総括として、アミロイドと蛋白質間の相互作用とそれに続く蛋白質構造の崩壊についての一般的スキームを提案した。(Biochemistry (2001) 40, 2148-2154 に発表)

### 意欲に關する脳活動の研究

遠本 徹

「意欲」の神経機序は不明な点が多い。報酬を得るために運動課題を遂行するサルの意欲は、客観的には測定不可能であるが、様々な要因で変動することが推察される。例えば課題を継続して行くと、報酬を獲得していくのに伴って、課題遂行への意欲は減退していくと考えられる。また、報酬がより望ましいものに変更されれば、意欲は増加するであろう。認知運動課題遂行中のサルの前頭前

野・海馬・前帯状野の脳血流量が、想定される意欲の変化と一致した変動を示すことが陽電子断層撮影法(PET)を用いた実験で明らかになった。大脳辺縁系と前頭前野の「意欲」への関与を示唆する知見と考えられる。この脳活動の詳細を調べるため、大脳皮質電位記録法とPETによる解析を進めている。

## 総合バイオサイエンスセンター

### 【概要】

生体内において細胞は、細胞自身の置かれている環境に対して応答反応を起こしながら環境に適応している。細胞は、平常と異なる浸透圧条件下に置かれた時、膨張や収縮を起こした後に次第に元の体積へと回復していく。この現象も細胞における環境適応現象の 1 つといえる。低浸透圧条件下において、細胞が一旦膨張した後に元の体積へと回復していく細胞体積調節メカニズムについては、細胞膨張時に活性化されるイオンチャネルの研究を中心として明らかにされてきた。また、細胞膨張時にはイオンチャネル開口による  $K^+$  や  $Cl^-$  のイオン流が発生するばかりでなく、種々のアミノ酸を始めとして、様々な細胞内分子が細胞外へ放出されることが知られている。

これら放出された分子は、放出した細胞あるいは周囲の細胞に対して、細胞外から作用を及ぼすことになる。細胞膨張時に活性化されるイオンチャネルの研究に比して、他の分子の放出機構については、未だ研究が進んでいない。また、細胞膨張は、細胞外の低浸透圧条件下のみならず、例えば低酸素条件や細胞障害時にも起こることが知られていて、その様な条件下でも種々の細胞内分子は細胞から放出され、周囲の細胞に影響を及ぼす。本部門では、細胞膨張時に放出されるアミノ酸の中でも特にグルタミン酸に着目してグルタミン酸の放出経路の同定を目指している。

### 細胞膨張性グルタミン酸放出機構

挾間章博

細胞に低浸透圧刺激を加えると速やかに膨張するが、その際に種々のアミノ酸の放出が起こることは既に知られているが、それらの分子の膜透過経路については不明である。現在、低浸透圧性膨張に伴うグルタミン酸放出経路の同定を目指している。まず、グルタミン酸脱水素酵素と NAD に対する発色基質を用いて、グルタミン酸をプレートリーダーを用いて容易かつ迅速に測定できるシステムを確立した。このシステムを用いて、グリオーマ

細胞株 C6 に低浸透圧刺激を与えると、細胞外液のグルタミン酸は刺激前の数  $\mu M$  から、 $10 \mu M$  以上にまで増大することが観察された。このグルタミン酸放出は  $Cl^-$  チャネルの阻害剤を加えても抑制されず、低浸透圧性 ATP 放出を抑制することが知られている  $Gd^{3+}$  を加えても抑制されなかった。これらの結果から、C6 より放出されるグルタミン酸は、 $Cl^-$  チャネルでもなく ATP 透過路とも別の透過経路より細胞外に放出されることが示唆された。

## 動物実験センター

尾崎 毅

### 【概要】

生理学研究所動物実験施設は平成12年4月より、統合バイオサイエンスセンターの設置に伴って岡崎国立共同研究機構動物実験センターとして再出発した。統合バイオサイエンスセンターにおける研究領域は、生命現象の基本に関わる基礎的研究分野が予定されており、その中には環境因子とその生体応答などの課題も含まれている。動物実験センター棟はこれらの研究のための実験環境を用意する支援施設として建設されるもので、建物は第2期工事を予定していたが、平成13年度補正予算に盛り込まれこととなり、当初の予定を繰り上げて建設することが決まった。建物の建設に当たっては、動物センターの全ユーザーを対象としたアンケート調査に基づいて、現状の把握と将来予測を行い、山手地区動物センター棟建設のための基礎資料とした。また、山手地区周辺住民の理解と協力を得るための資料づくりを行う一方、住民説明会に向いて大方の理解を得ることにつとめ、無事着工にこぎ着けることができた。建物は延べ床面積2,650 m<sup>2</sup>、地上4階鉄筋コンクリート造りで、1階に検疫動物、無脊椎動物、水生動物などを収容し、2階に管理事務室と検疫室、3、4階にラット、マウス飼育室、飼育準備室などで構成することとした。また、遺伝子改変動物が多い現状と微生物学的見地から3、4階をSPFエリアとすることとし、搬入動物はクリーンアップを前提とした。建築計画が繰り上がったことに伴い、機器の整備計画も急遽繰り上げて実施することとなり、設備機器の仕様の策定から機種を選定、予算要求文書の作成など膨大な作業の中で着々と準備は進んでいる。

なお、動物実験センターが機構共通施設に組織替えになったことに伴って、センターの運営方法も、これまでの動物室委員会を改組して動物実験センター運営委員会と動物センター利用委員会に分けることになり、それぞれの役割が明快に区分された。

生命科学を研究する場において動物実験センターの果たす役割は多岐にわたるが、近年実験動物の福祉に関連した動きが内外から様々な形で現れるようになってきている。平成11年度には「行政機関の保有する情報の公開に関する法律」が制定され、動物愛護団体による動物実験攻撃の動きが一段と活発になることが予想される。自治体

からのイヌ、ネコの払い下げ廃止にみられるように、生命科学の現場で必要とする実験動物を巡る攻防はいよいよ切実なものとなっており、動物センターでは、全国的な連絡網と連携して情報の収集につとめると共に、的確な対応を行うよう関係者に働きかけを行っている。

生理学、基礎生物学両研究所の研究人口の増大と、活発な研究活動を反映して動物センターの利用はますます拡大し、マウス、ラットの飼育室は慢性的な過剰飼育状態が続いている。このためセンター業務の様々な部分でひずみが生じており、山手地区の動物センター棟の稼働するのをひたすら待っているのが現状である。こうした中、偶然見つかったマウスの蟻虫卵から、調査の結果、大多数のマウス飼育室での大規模な蟻虫の汚染のあることが判明した。これは、頻繁に行われている動物施設間における系統動物の授受の際に、見逃されて入ってきたものが、洗浄室の作業を介して拡大したのではないかと推測される。マウス蟻虫に対しては、これまでさしたる被害がみられないことから軽視されてきたことも一因としてあげられ、実態は不明であるものの全国的な規模で相当の施設に汚染があるものと推測される。汚染の除去の方法については現在検討中である。

近年、動物施設間における系統動物の授受が増えたことによって、搬入動物による微生物汚染の危険は以前にも増して高まっている。また、遺伝子改変マウスの利用が実験件数の20パーセントを超え、維持系統の数も減少する気配はない。これらの問題に対処するには、受精卵の移植技術を用いた微生物学的浄化と凍結保存が唯一の方法といえる。動物センターでは、かねてよりこのような事態がくることを予想して胚操作技術の導入に取り組み、ユーザーの協力を得て積極的に受精卵の凍結保存、体外受精、移植などを行ってきた。また、外注委託による系統動物の維持も試み、飼育室の清浄度の維持には効果がみられたものの、飼育スペース不足の緩和に対しては期待したほどの効果がみられていない。このことは飼育中の動物の多くが実験に使用されつつあるもので、予備もしくは実験終了後の動物がほとんど存在しないことを意味している。このため平成12年度の実験委員会は、動物申請のあった動物センターで収容しきれないマウス

の飼育室 1 室と、行動観察のためのマウス飼育実験室 2 室を新たに動物実験区域として認可した。科学的かつ倫理的な動物実験を行うためには設備機器と共に組織体制の整備が必要であり、動物実験区域の指定は動物センター以外の場所における動物の飼育を条件付きで認めるための方策として、これを制度化したものである。動物実験の専用区域として用意された区域に比してこれらの区域は設備の面でも組織の面でも万全とは言い難く過渡的な措置として位置づけるほかはない。今後に残された課題である。

実験用のニホンザルの供給については未だ不安定な状態のままであるが、追い打ちをかけるように平成 12 年 12 月にはマスコミを通じて、有害駆除されたニホンザルの違法取引の問題が取り上げられ、動物実験に対して厳しい目がむけられることとなった。有害駆除されたニホンザルを取り扱う際に所定の法的手続きが必要なことはもちろんであるが、解決の方向性を示さず動物愛護団体の主張をそのまま取り上げるマスコミの安易な姿勢も問題である。それにも増して、再現性の高い動物実験を行うためには、形質のそろった健康な実験動物が安定的に供給される必要があり、研究用ニホンザルの繁殖コロ

ニーの一刻も早い構築が望まれる。現在流通しているニホンザルは動物園や野猿公園など人為的な飼育環境下で繁殖されたものが大部分で、健康状態のチェックも以前に比べて改善されてきてはいるが、栄養状態や個体のばらつきは相変わらず大きいのが実状である。なお、動物実験センターでは、平成 11 年度より行っているサルの健康管理のための血液検査サービスを 12 年度も継続しておこなっているが、よりよい獣医学的ケアのためには臨床獣医師の配置もしくは嘱託契約などを考慮することが望まれる。

設立以来 20 年を経て、設備機器の老朽化によるトラブルも深刻である。平成 12 年度においては、ボイラーのトラブルにより空調機の加湿停止と、飼育資材滅菌用のオートクレーブ 1 台が 1 ヶ月間使用不能になり、関係者をやきもきさせたほか、水生動物室では F R P 製貯水槽の塗装が溶出したり、加熱冷却ユニットの損耗が続発した。いずれも機器の耐用年数を過ぎたことが主な原因であり、計画的な機器の更新が望ましい。今後は現在進行中の山手地区動物センター棟の竣工に照準を追わせて、設備においても組織においても、名実共に新しい動物実験センターをめざして再編強化をすすめていきたい。

## 技術課

大庭明生

### 1. 概要

4月に伊藤嘉邦、永田治、山口登各主任の係長への昇任、小木曾昇、戸川森雄各係員の主任への昇任、神谷絵美係員の脳形態解析部門への配置替えを行った。6月に神経情報部門水谷裕美係員の退職があった。

本年度から新たな技術テーマのもと9技術部会（将来検討部会、バイオ技術部会、可視化技術部会、科学英語表現部会、エレクトロニクス工作部会、実験安全部会、WWW技術部会、機械工作部会、実験サル部会）の設置を決め、その活動に入った。また生理学概論、植物学研究、非侵襲研究領域をテーマに、第3回技術課セミナーを開催した。さらに課員の研究活動への貢献を一層進めるために下記の事業も立ち上げた。(1)生理科学実験技術トレーニングコースの担当と技術指導 (2)科学研究費補助金(奨励研究(B))申請の推進 (3)課題報告型技術シンポジウムの開催 (4)機械工作基礎講座の開講 (5)放送大学利用による職員研修の開催

課は研究支援活動の過去5年間の報告を点検評価委員会から求められ、(1)技官の配置と研究支援推進員の活用、(2)生理科学実験技術トレーニングコースにおける技術指導、(3)国内外の学会等への積極的な参加の奨励、(4)技術部会による研修、(5)研究施設系におけるあらたな職務の

創出、(6)課の組織改革の推進の6項目を報告し、今後の課題として、(1)課員の自己研修能力を一層の強化する、(2)課活動を研究推進のための積極的な貢献に発展せる、(3)研究の国際競争下に対応せる課のあり方に変革する、の3点をあげた。

一方、大学・大学共同利用機関独立行政法人化問題に対して自然科学系・大学共同利用機関による『大学共同利用機関における技官の独法化に関する検討会』を設置し、議論を重ね、①技官組織の確立、②教官と技官の相補的、協調的な職務遂行の確立、③技官に相応しい給与体系の整備と技術評価の確立、④研修制度の整備と適切な人事交流制度の導入を提言としてまとめた。生理学技術研究会は第23回を開催し、今回は基礎生物学研究所技術課主催の第12回生物学技術研究会と合同開催し、研究所の枠を外し、技術系職員の技術本位の交流の場としての拡充した。また機構長招聘三技術課合同セミナーの第2回を『ナノ・マイクロテクノロジー』をテーマに開催した。

これらの活動は『生理学技術研究会報告』『生理学研究所技術課報告』『三技術課合同セミナー報告書』としてまとめた。



第24回生理学技術研究会・第12回生物学技術研究会合同開催

## 2. 施設の運営状況

## 統合生理研究施設

## (1) 生体磁気計測装置室

永田 治, 竹島 康行

## 【概要】

生体磁気計測装置 (MEG) の利用率は表 1 に示すようにほぼ 100% の稼働率であり今後も高い需要が見込まれる。装置の維持管理としては導入後 10 年を経過することもあり、機械系および電気装置各部に経年変化による損傷および劣化が見られるため徐々に修理頻度が上昇している。センサにおいては SQUID 素子のノイズレベル増加は見られないので問題ないと思われるが、構造上デュワーの真空度はほぼ 3 年周期で低下するため、本年度においては下部センサの真空引を実施している。また、シールド

ルームは材質劣化の影響が最も懸念されるため、電波・磁場の漏洩性能試験を実施した。結果を図 1・2 に示す。ドア部分に部材の経年変化による歪みが確認されたが、ほぼ竣工時の性能を維持しており良好な結果を得た。ただし、パーマロイ合金の着磁と応力劣化が多少見られるため全体のレベルが上昇しているため、消磁作業を行った方がよいが、センサを撤去しなければならないためしばらくは現状で運用する。

年 月	総日数	休 日	点検調整	所内利用	稼働率	所外利用	備 考
2000 年 04 月	30	10	2	17	100%	1	
05 月	31	11	7	10	100%	3	センサ B 修理 5 日
06 月	30	8	2	14	100%	4	
07 月	31	11	2	16	100%	2	トレーニングコース 1 日
08 月	31	8	2	19	100%	2	トレーニングコース 4 日
09 月	30	10	2	16	100%	2	
10 月	31	10	2	17	100%	2	
11 月	30	10	2	16	100%	2	
12 月	31	11	3	17	100%	0	
2001 年 01 月	31	12	2	16	100%	1	
02 月	28	9	2	14	100%	3	
03 月	31	10	2	17	100%	2	

\* 稼働率 = 利用日数 / (総日数 - (休日 + 点検調整日)) × 100

表 1 . 生体磁気計測装置稼働率表 (平成 12 年度)

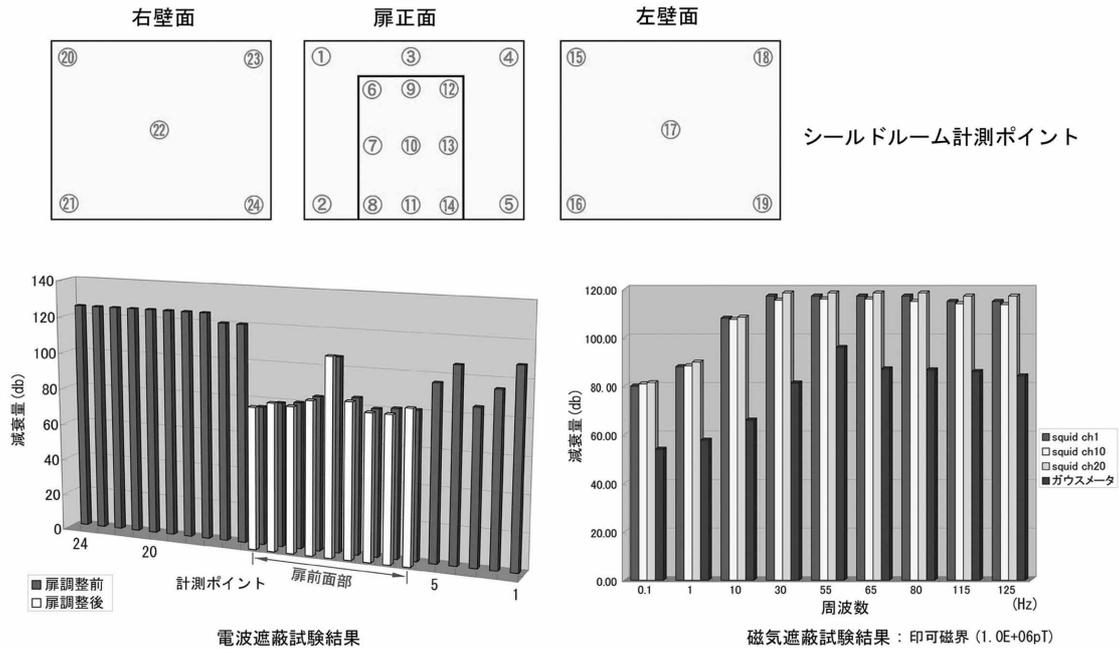


図 1

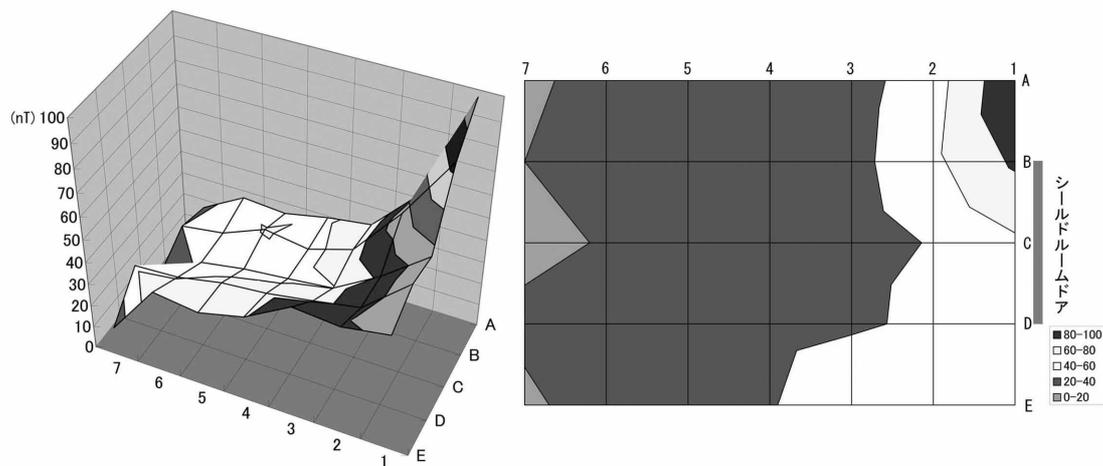


図 2 残留静磁界計測結果

## 脳機能計測センター

### (1) 形態情報解析室

山口 登

#### 【概要】

今年度における超高压電子顕微鏡共同利用実験は、合計 12 課題が採択され、全ての課題が実施された。これらの共同実験の成果は、超高压電子顕微鏡共同利用実験報告の章に詳述されている。超高压電子顕微鏡の年間の利用状況を表にまとめたので下記に示す。稼働率は、利

用日数と使用可能日数より求めている。本年度の主な超高压電子顕微鏡の改良・修理としては、レンズ用電源の修理，モード切り替え用基板の交換，サイドエントリーホルダーの修理が行われた。

2000年度 超高压電顕月別稼働率

年月	総日数	休日	調整日	使用可能日数	所内利用	所外利用	計	稼働率	備考
2000年4月	30	10	4	16	9	4	13	81%	
5月	31	11	11	9	8	1	9	100%	修理 8日
6月	30	8	4	18	10	3	13	72%	
7月	31	11	11	9	10	5	15	167%	修理 8日
8月	31	8	5	18	12	6	18	100%	修理 1日
9月	30	10	4	16	9	1	10	63%	
10月	31	10	4	17	7	3	10	59%	
11月	30	10	4	16	8	2	10	63%	
12月	31	11	10	10	11	3	14	140%	修理 7日
2001年1月	31	12	3	16	6	8	14	88%	修理 2日
2月	28	9	2	17	3	16	19	112%	
3月	31	10	2	19	9	15	24	126%	
計	365	120	64	181	102	67	169	93%	

フィラメント点灯時間 477.1時間  
 使用フィルム枚数 7,028枚

## (2) 機能情報解析室

佐藤茂基

## 【概要】

長年利用されてきた、生体画像解析装置が12年度を最後に運用を停止し、新しいMR装置(fMRI)の導入が決まった為、生体画像解析装置は毎年1月に行っている定期点検を今回行わず、新規装置導入まで装置を稼働させる予定であった。しかし、平成13年2月9日に装置が

ら異常音が発生し、13日に循環冷却器の故障が判明したため、装置利用を停止した。修理に相当な費用と時間が掛かる見込みから修理を断念し、20日に安全性を考慮し装置の運用を終了させた。

平成12年度のMR装置利用実績を別表に記す。

## 【各機器利用率】

平成12年度生体画像解析装置月別稼働率

年月	総日数	保守	使用可能	所内利用	所外利用	計	利用率	備考
2000年4月	30	0	30	5	0	5	17%	
5月	31	1	30	2	0	2	7%	
6月	30	0	30	3	0	3	10%	
7月	31	3	28	2	0	2	7%	
8月	31	0	31	3	1	4	13%	
9月	30	1	29	1	1	2	7%	停電
10月	31	2	29	6	1	7	24%	停電
11月	30	0	30	2	0	2	7%	
12月	31	1	30	3	0	3	10%	窒素補充
2001年1月	31	2	29	6	1	7	24%	
2月	20	7	13	1	0	1	8%	冷却機故障
3月	0	0	0	0	0	0		運用終了
計	326	17	309	34	4	38	12%	

\*保守以外の祝祭日は、使用可能日に含めた。

平成 12 年度リアルタイム装置月別稼働率

年月	総日数	保守	使用可能	所内利用	所外利用	計	利用率	備考
2000 年 4 月	30	1	29	0	5	5	17%	
5 月	31	1	30	0	0	0	0%	
6 月	30	1	29	0	1	1	3%	
7 月	31	1	30	0	5	5	17%	
8 月	31	1	30	0	5	5	17%	
9 月	30	2	28	0	5	5	18%	停電
10 月	31	3	28	0	5	5	18%	停電
11 月	30	1	29	0	6	6	21%	
12 月	31	2	29	0	11	11	38%	
2001 年 1 月	31	4	27	0	0	0	0%	保守
2 月	28	1	27	1	0	1	4%	
3 月	31	1	30	0	3	3	10%	
計	365	19	346	1	46	47	14%	

\*保守以外の祝祭日は、使用可能日に含めた。

### (3) 生体情報処理室

吉村伸明, 村田安永

生理学研究所における中央コンピュータの利用形態は、生体情報解析システム（高機能ワークステーション + アプリケーション, 高画質フルカラープリンタ等）、情報サービス（e-mail, net-news, WWW 等）、ファイルサービス（ftp 等）、プログラム開発及びメディア変換などに分類することができる。また、これらの利用形態を円滑に運用していくためには、所内 LAN の管理、整備も重要である。このような現状をふまえたうえで、中央コンピュータの整備を進めている。

生体情報解析システムは、平成 11 年 2 月に導入を行い

約 2 年が経過した。利用登録者は 62 名で、各部門施設より研究推進のための積極的な利用がある。高画質フルカラープリンタは 2,661 枚の利用があった。

ネットワーク利用状況は、メール登録者が 337 名。WWW 登録者が 30 名。LAN の端末数が 800 台。所外からのメール受信数は 6,982 / 週。所外へのメール発信数は 4,127 / 週。WWW は一年間に 66,093 の端末からアクセスがあり、総アクセス数は 168 万回。所内向けのダイヤルアップサービスは 222 回 / 週、38 時間 / 週の利用があった。

### 動物実験センター

佐治俊幸, 小木曾昇, 広江 猛

#### 【概要】

【陸生動物室】平成 12 年度の飼育室利用部門数は、28 研究部門（生理研 18 部門、基生研 10 部門）であった。例年どおり脳研究の材料としたマウスやラット、ネコの飼育数が増加傾向を示した。一方サル、および抗体作製を目的としたウサギの飼育数が減少傾向を示した。所外から導入されるマウス（遺伝子改変動物中心）は件数が増えた反面、微生物モニタリング基準に適合するマウス

系統が少ないため、胚操作技術を利用したクリーン化（病原微生物除去、11 件）および受精卵凍結事業（15 件）を行った。また、ラットを用いた Tg の作製および受精卵凍結を試みている。技術指導では、マウスにおける胚操作関連技術（胚の採取、体外受精等）や系統維持方法が増えつつある。

【水生動物室】

平成 12 年度の水生動物室利用状況は、生理研・基生研両研究所あわせて 6 部門・施設、40 件の利用があった。

加熱冷却ユニットの動作不良が 8 件あったが、代替フロンを用いる小型コンプレッサーの入手の目処が立ち、順次修理を行っている。地下貯水槽の海水水位計の故障及び揚水ポンプ動作不良のため、一時的に海水の使用が出来ない時期があった。現在も、この故障は続いており、2 台設置してある揚水ポンプの内、1 台のみでの片肺運転を続けている。

【E 地区動物実験センター】

E 地区へ動物実験センターを建設することが決定され、基本設計を行った。

概要としては、

5 F : 設備機械室

4 F : S P F 飼育室(8), S P F 実験室, 胚操作室

3 F : 洗浄室関連, S P F 飼育室(5)

2 F : 管理事務室, 実験室(4), 検査室, 手術室, 解剖室

1 F : C V 動物飼育室, 水生動物室

となり、平成 14 年 3 月竣工予定である。

陸生動物 部門別・動物種別搬入数(平成 12 年度)

動物種 部門	マウス	TG マウス	ハム スター	ラット	ウサギ	モル モット	ネコ	サル	マーモ セット	合計
神経化学	60	996		17						1,073
超微小形態生理		25		99						124
細胞内代謝	259		3	8						270
生体膜	166			36		4				206
機能協関	123			228	6	108				465
能動輸送				2	6	8				16
神経情報	785	95		2						882
液性情報	83	44		1	12	4				144
高次神経機構	496	3,097		117	3					3,713
高次神経性調節				3			15	5		23
生体システム				34			19	2		55
高次液性調節								1		1
感覚・運動機能				6						6
高次脳機能	41	18		84				4		147
動物実験センター	330	22		293						645
脳形態解析	42	98		74	30	68				312
大脳神経回路論				47						47
形態情報解析室				2						2
細胞機構	2	6			16					24
生殖	10									10
細胞分化	495	1,381		10		3				1,889
感覚情報	289	565		12						866
行動制御	13	4		611						628
種分化第一	119	44		121	14			2	6	306
大型スペクトロ グラフ室	48									48
細胞器官培養	216	7								223
形質転換生物	95	172								267
合 計	3,672	6,574	3	1,807	87	195	34	14	6	12,392

陸生動物 月別・動物種別搬入数(平成 12 年度)

動物種 \ 月	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	合計
マウス	370	312	313	222	275	180	378	346	280	326	276	394	3,672
TGマウス	565	619	765	459	484	403	494	597	358	524	637	669	6,574
ハムスター							3						3
ラット	118	131	159	163	146	112	155	169	135	150	167	202	1,807
ウサギ	5	2	17	9	3	2	15	5	19	8		2	87
モルモット	25	18	18	6	3		6	20	35	40	24		195
ネコ		14	4		6					4	6		34
サル					6	1	3			4			14
マーモセット											6		6
合計	1,083	1,096	1,276	859	923	698	1,054	1,137	827	1,056	1,116	1,267	12,392

水生動物 月別・動物種別搬入数(平成 12 年度)

動物種 \ 月	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	合計
ゼノバス	35			50			20				10		115
メダカ		1,000											1,000
ウニ												60	60
ヒトデ		238	450					1,220					1,908
キンギョ		410	350										760
アユ		500				530							1,030
タイ				150									150
ウナギ			20		20		20	20		20			100
海水(t)			8		8			12			16		44
合計	35	2,148	820	200	20	530	40	1,240	0	20	10	60	5,123

## 共通施設

### (1) 電子顕微鏡室

前橋 寛

#### 【概要】

一昨年度から始まった電子顕微鏡講習会は、3日コース(凍結超薄切片作製法と電子顕微鏡観察)に13名の参加があり盛況であった。その第1日目の午前は昨年度東京大学から移転された100kV透過電子顕微鏡(日本電子JEM-1010)を使っての取扱い講習会を行い、午後から今年度設置(2000年6月)の120kV透過型電子顕微鏡(フィリップスTecnai-12)の取扱い説明、試料の撮影実習を行った(フィリップスアプリケーションラボラトリー 小林恵美子講師)。第2,3日目は、ビデオやマイクローム用ビデオカメラを用いた凍結超薄切片作製講義および実習が行われた(日製産業(株)科学機器セン

ター 伊藤喜子講師)。なお、1日コース(電子顕微鏡の取扱い)の参加者はなかったので取り止めとなった。

暗室に、設置されていた印画紙用自動現像機(フジFPSB1460C)が老朽化のため同タイプの現像機(エフシーFSP-1435B)に更新された。

#### (B) 研究内容一覧表

本年度、室を利用してなされた研究の総件数は42件であった。機構内では30件あり、機構外は、国内で6件、国外ではイタリア、スペイン、ハンガリー、中国の研究者による利用が6件あった。下記の表はその研究部門・施設、大学、研究所と研究内容の一覧表である。

## 利用内容一覧表 ( 1 )

## 三研究所

研究所	部門・施設	研究内容
生理研	機能協関	・浸透圧調節に伴う培養細胞容積変化の微細構造的解析 ・分泌刺激に応じた上皮細胞膜の形態変化の観察 ・発生過程における標的細胞依存の運動神経細胞の形態学研究
	超微小形態生理	・DNA 観察 (高分解能観察の予備実験) ・複素電子顕微鏡の位相板の観察 ・灌流唾液腺における傍細胞輸送調節機構
	生体膜	・ケイジドカルシウム試薬を用いた閉口放出に伴う微細形態変化の研究
	液性情報	・チャネル蛋白質の細胞内局在の観察 ・カルシウム測定
	神経情報	・組織切片を用いての軸索上の K <sup>+</sup> channel clustering の変化の観察 ・システインプロテアーゼの阻害とアストロサイトの分化誘導についての研究
	高次神経機構	・セロトニン 2A 受容体欠損マウスの作成と機能解析
	脳形態解析	・受容体・チャネルの免疫電顕 ・膜上機能分子の動態変化と生理的機構の解析
	組織培養標本室	・小腸絨毛上皮細胞下繊維芽細胞の免疫組織学的研究
	技術課	・コメツキムシの走査像微細構造観察 ・脊髄前角ニューロン細胞体の 3 次元解析
	基生研	形態形成
生殖		・キンギョ卵母細胞核マトリクス内に存在するアクチン繊維の構造解析
細胞機構		・植物細胞においてストレスにより変化する細胞内小器官の電子顕微鏡観察 ・mutant ( Arabidopsis ) の形態的観察
種分化機構第二		・ヒメツリガネゴケの形態形成遺伝子の解析 ・地衣類の無性生殖器, 有性生殖器の観察
細胞増殖		・ショウジョウバエ脳における神経細胞の微細形態の観察
感覚情報処理		・ノックアウトマウスを用いた PTPS の機能の解析 ・神経細胞の axon の trace
遺伝子発現統御第一		・イネに斑入り模様を引き起こす突然変異体の解析
細胞内エネルギー - 変換機構		・酵母の自食作用過程における分子動態の形態学的研究
機構 共通施設	統合バイオサイエンスセンター	・シロイヌナズナのシュート頂分裂組織および葉の形態の観察

## 利用内容一覧表 ( 2 )

## 所外 ( 国内 )

大学・研究所	研究代表者名	研究内容
富山大学	唐原一郎	エンドウ上胚軸のカスバリー線形成の光による調節 - R・FR 領域の解析 -
理化学研究所 (播磨)	瀧 景子	赤血球裏打ち細胞骨格構造に含まれるアクチンセグメントの解析
鶴見大学	尾口仁志	ヒト歯間上皮細胞と各種生体材料との細胞生物学的検討
東京歯科大学	橋本貞光	灌流唾液腺における傍細胞輸送調節機構
京都府立大学	瀬尾芳輝	神経細胞変性の形態学的検討
名古屋市立大学	馬場広子	グリア細胞による神経伝達調節機構の解明

## 所外 ( 国外 )

国名, 大学, 研究所	研究者名	研究内容
イタリア カリアリ大学	Marcello, Peppi	唾液腺における傍細胞輸送機構
スペイン ミゲル・エルナンデス大学	Lujan, Rafael	膜上機能分子の局在解析
ハンガリー デブレツェン医科大学	Akos, Kulik	膜上機能分子の局在解析
ハンガリー ハンガリー科学アカデミー	Nyiri, Gabor	膜上機能分子の局在解析
中国 香港中文大学	Savio Chan	海馬興奮性シナプスの動態と微細形態
中国 大連医科大学	Wu, Yue	海馬興奮性シナプスの動態と微細形態

(2) 機器研究試作室

加藤勝己

【概要】

機器研究試作室は多種多様な医学・生物学用実験機器の開発と改良，それに関わる技術指導，技術相談を室の役割としている。今，我々の周りには便利な物品があふれ，自分で工夫して作ったり，改良する機会が少なくなり，新しい研究には新しい研究機器を作るという『ものづくり』が希薄になり，一方で，最近の研究の多様化は室に新たな役割の模索を迫っている。そうした認識のもと，『ものづくり』能力の重要性の理解と機械工作ニーズの新たな発掘と展開を目指すために，室では，2000年度から，医学・生物学の実験研究に使用される実験装置や器具を題材にして，機械工作の基礎的知識を実習主体で行う機械工作基礎講座を開講した。参加希望者は，生理研8部門21名，基生研11部門27名と多く，ガ

イダンスの後9グループに分けて，1グループ4回で行い，一人のけが人も無く無事に講習を終了した。2001年度は，講習会参加者のアンケートを下に，簡易電気泳動装置の製作を題材に準備検討を行い，実施のための準備が整った。

今年度当施設で製作した実験機器・部品としては，各種動物実験用器具，各種凍結切断機用関連部品，光学顕微鏡用各種ステージ，マニピュレーター近傍部品，各種分光用キュベット，各種プリズム及びフィルターホルダーなどの各種部品などがある。

なお，機器研究試作室の平成12年度の利用状況は，以下の通りである。

機器研究試作室利用機器表（件数）

月	フライス盤	ボール盤	コンタマシ	旋盤	横切盤	グラインダー	切断機	NCフライス盤	その他	計
4	35	34	22	11	17	4	6	1	74	204
5	20	21	15	9	13	0	6	0	61	145
6	30	30	29	21	31	9	5	4	76	235
7	25	25	20	15	16	4	5	1	48	159
8	17	12	19	18	7	4	3	0	32	112
9	28	22	21	15	9	6	7	2	54	164
10	23	22	23	25	16	16	1	0	59	185
11	7	14	7	1	3	1	4	3	21	61
12	6	10	5	5	5	3	2	2	32	70
1	13	13	6	9	6	1	1	2	34	85
2	5	4	2	3	9	2	1	2	16	44
3	10	7	7	16	11	3	3	2	30	89
合計	219	214	176	148	143	53	44	19	537	1553

機器研究試作室利用人数表

月	生理研	基生研	その他	合計	延べ時間
4	93	6	0	99	139
5	68	3	0	71	88
6	105	6	0	111	143
7	61	6	0	67	104
8	39	8	0	47	92
9	57	11	0	68	128
10	42	26	0	68	151
11	21	8	0	29	35
12	35	4	0	39	57
1	43	4	0	47	45
2	24	4	0	28	34
3	44	2	0	46	88
合計	632	88	0	720	1111

## 機器研究試作室部門別利用状況

高次神経性調節	1 1 1 名	統合生理研究施設	7 5 名	機能情報解析室	7 5 名
生体膜	6 3 名	脳形態解析	6 0 名	生体システム	4 1 名
形態情報解析室	3 9 名	超微小形態生理	3 1 名	統合バイオ	2 5 名
動物実験施設	2 5 名	心理生理学	2 3 名	神経化学	1 7 名
神経情報	1 5 名	機能協関	1 1 名	液性情報	1 0 名
高次液性調節	4 名	生体情報処理室	3 名	技術課	2 名
高次神経機構	2 名				
-----					
感覚情報処理	2 0 名	大型スペクトロ	1 1 名	R I 実験施設	8 名
遺伝子発現統御第一	7 名	種分化機構第一	7 名	細胞情報	6 名
細胞機構	5 名	形態形成	4 名	人工気象室	4 名
情報制御	3 名	エネルギー変換	3 名	種分化機構第二	3 名
細胞分化	2 名	細胞増殖	2 名	生殖	1 名
環境耐性植物実験室	1 名	技術課	1 名		
-----					
分子研その他	0 名				

# 【 研 究 発 表 】

- a . 発表論文
- b . 学会発表

## a . 発表論文

## 〔 目 次 〕

神経化学研究部門 .....	78
超微小形態生理研究部門 .....	78
細胞内代謝研究部門 .....	80
生体膜研究部門 .....	81
機能協関研究部門 .....	81
神経情報研究部門 .....	82
液性情報研究部門 .....	83
高次神経機構研究部門 .....	83
情報記憶研究部門 .....	85
高次神経性調節研究部門 .....	85
生体システム研究部門 .....	86
高次液性調節研究部門 .....	86
脳形態解析研究部門 .....	87
大脳神経回路論研究部門 .....	88
心理生理学研究部門 .....	88
高次脳機能研究プロジェクト .....	90
感覚・運動機能研究プロジェクト .....	90
形態情報解析室 .....	91
生体情報処理室 .....	92
機能情報解析室 .....	92
動物実験センター .....	92

## 発 表 論 文

### 《神経化学研究部門》

(1) 英文原著論文

1. Yamanaka H, Maehira F, Oshiro M, Asato T, Yanagawa Y, Takei H, Nakashima Y (2000) A possible interaction of thioredoxin with VDUP1 in hela cells detected in a yeast two-hybrid system. *Biochem Biophys Res Commun* 271: 796-800.
2. Stork O, Ji FY, Kaneko K, Stork S, Yoshinobu Y, Moriya T, Shibata S, Obata K (2000) Postnatal development of a GABA deficit and disturbance of neural functions in mice lacking GAD65. *Brain Res* 865: 45-58.
3. Stork O, Welzl H, Wolfer D, Schuster T, Mantei N, Stork S, Hoyer D, Lipp H, Obata K, Schachner M (2000) Recovery of emotional behaviour in neural cell adhesion molecule (NCAM) null mutant mice through transgenic expression of NCAM180. *Eur J Neurosci* 12: 3291-3306.
4. Ishibashi H, Kojima N, Obata K (2000) Decreased locomotor activity in mice carrying transgenic fyn tyrosine kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 276: 707-709.
5. Makinae K, Kobayashi T, Kobayashi T, Shinkawa H, Sakagami H, Kondo H, Tashiro F, Miyazaki J, Obata K, Tamura S, Yanagawa Y (2000) Structure of the mouse glutamate decarboxylase 65 gene and its promoter: Preferential expression of its promoter in the GABAergic neurons of transgenic mice. *J Neurochem* 75: 1429-1437.

(2) その他

1. Obata K, Yanagawa Y, Makinae K (2000) Glutamic acid decarboxylase and GABA transporter as GABAergic neuron markers. "Control and Diseases of Sodium Dependent Transport Proteins and Ion Channels." (Eds.

Suketa Y et al.) Elsevier, Amsterdam. pp.377-381.

2. 小幡邦彦, 井本敬二, 高田明和編 (2000) 脳・神経研究のための分子生物学技術講座. 188pp. 文光堂.
3. 小幡邦彦, 外山敬介, 高田明和, 熊田 衛著 (2000) 新生理学 第3版. 592pp. 文光堂.
4. 小幡邦彦 (2000) 発生, 分化関連物質 “廣川ニューロサイエンス3 新しい神経伝達研究法”. (三木直正, 野村靖幸編) pp.63-66, 廣川書店, 東京.
5. 児島伸彦, 小幡邦彦 (2000) 抗体による cDNA クローニング “廣川ニューロサイエンス3 新しい神経伝達研究法” (三木直正, 野村靖幸編) pp.118-124, 廣川書店, 東京.
6. 小幡邦彦 (2000) GABA とてんかん. *神経研究の進歩* 44: 5-12.
7. 小幡邦彦 (2000) GABA 合成酵素グルタミン酸デカルボキシラーゼのアイソフォーム機能と遺伝子発現. *蛋白質核酸酵素* 45: 362-367.
8. 小幡邦彦 (2000) アミノ酸 “脳神経科学イラストレイテッド” (森 寿, 真鍋俊也, 渡辺雅彦, 岡野栄之, 宮川 剛編) pp.176-180, 羊土社, 東京.
9. 小幡邦彦, 柳川右千夫 (2000) 2種類のGADの機能. *CLINICAL NEUROSCIENCE* 18:105.
10. 山肩葉子 (2000) 神経活動による蛋白質リン酸化の測定法. *CLINICAL NEUROSCIENCE* 18: 372-373.
11. 柳川右千夫, 小幡邦彦 (2000) 神経伝達物質を決定する遺伝子. *脳の科学* 22: 1031-1034.
12. 小幡邦彦 (2000) グルタミン酸デカルボキシラーゼ・ノックアウトマウスでみた GABA のはたらき. *自律神経* 37: 191-194.
13. 小幡邦彦 (2000) 神経系: 神経伝達物質の合成と代謝. *生体の科学* 51: 447-448.

### 《超微小形態生理研究部門》

(1) 英文原著論文

1. Ohashi M, Miwako I, Yamamoto A, Nagayama K (2000) Arrested maturing multivesicular endosome observed in a Chinese hamster ovary cell mutant, LEX2, isolated

by repeated flow-cytometric cell sorting. *J Cell Sci* 113: 2187-2205.

2. Kano F, Sako Y, Tagaya M, Yanagida T, Murata M (2000) Reconstitution of brefeldin A-induced Golgi-tubulation

- and fusion with the ER in semi-intact CHO cells. *Mol Biol Cell* 11: 3073-7087.
3. Kano F, Takenaka K, Yamamoto A, Nagayama K, Nishida E, Murata M (2000) MEK and Cdc<sup>2</sup> Kinase Are Sequentially Required for Golgi Disassembly in MDCK Cells by the Mitotic *Xenopus* Extracts. *J Cell Biol* 149: 357-368.
  4. Kano F, Nagayama K, Murata M (2000) Reconstruction of the Golgi reassembly process in semi-intact MDCK cells. *Biophysical Chemistry* 84: 261-268.
  5. Mori M, Konno T, Ozawa T, Murata M, Imoto K, Nagayama K (2000) Novel Interaction of the Voltage-Dependent Sodium Channel (VDSC) with Calmodulin: Does VDSC Acquire calmodulin-Mediated Ca<sup>2+</sup> Sensitivity? *Biochemistry* 39: 1316-1323.
  6. Kondo A, Hashimoto S, Yano H, Nagayama K, Mazaki Y, Sabe A (2000) A new paxillin-binding protein, PAG3/Pap / KIAA 0400, bearing an ARF GTPase-activation protein activity is involved in paxillin recruitment to focal adhesions and cell migration. *Mol Biol Cell* 11: 1315-1327.
  7. Murata K, Mitsuoka K, Hirai T, Walz T, Agre P, Heymann J B, Engel A, Fujiyoshi Y (2000) Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* 407: 599-605.
  8. Murata K, Okamoto M, Suzuki T (2000) Morphological change of cell membrane-integrated crystalline structure induced by cell shape change in *Euglena gracilis*. *Protoplasma* 214: 73-79.
  9. Schmidt-Krey I, Mitsuoka K, Hirai T, Murata K, Cheng Y, Fujiyoshi Y, Morgenstern R, Hebert H (2000) The three-dimensional map of microsomal glutathione transferase 1 at 6 Å resolution. *EMBO J* 19: 6311-6316.
  10. Yoshimori T, Yamagata F, Yamamoto A, Mizushima N, Kabeya Y, Nara A, Miwako I, Ohashi M, Ohsumi M, Ohsumi Y (2000) The mouse SKD1, a homologue of yeast Vps4p, is required for normal endosomal trafficking and morphology in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 11: 747-763.
  11. Fujiwara M, Kato T, Yamazaki T, Yamasaki K, Nagayama K (2000) NMR Structure of Ribonuclease HI from *Escherichia coli*. *Biol Pharm Bull* 23:1147- 1152.
  12. Yoshimura K, Murakami M, Segawa A (2000) Carbachol-induced [Ca]<sub>i</sub> increase, but not activation of protein kinase C, stimulates exocytosis in rat parotid acini. *J Physiol* 522: 403-416.
  13. Seki Y, Naruse S, Seo Y, Kitagawa M, Ishiguro H, Wang Y, Murakami M & Hayakawa T (2000) Time-course magnetic resonance imaging of rat pancreatic cyst after experimental pancreatitis. *Magn Reson Imaging* 18: 1003-1010.
  14. Murakami M, Yoshimura K, Segawa A, Loffredo F, Riva A (2000) Relationship between amylase and fluid secretion in the isolated perfused whole parotid gland of the rat. *Eur J Morphology* 38(4): 243-247.
  15. Yoshimura K, Murakami M, Segawa A (2000) Carbachol-induced Ca increase, but not activation of protein kinase C, stimulate exocytosis in rat parotid acini. *J Physiol*, 522: 403-416.
  16. Seki Y, Naruse S, Seo Y, Kitagawa M, Ishiguro H, Wang Y, Murakami M, Hayakawa T (2000) Time-course magnetic resonance imaging of rat pancreatic cyst after experimental pancreatitis. *Magn Reson Image* 18: 1003-1010.
- (2) その他
1. Murata M (2000) Caveolin is a cholesterol-binding protein. In *Lipoprotein Metabolism and Atherogenesis*. (eds. T. Kita and M. Yokode) Springer-Verlag pp. 130-136.
  2. Nagayama K (2000) Two-Dimensional Protein Ordering by Capillary Forces. in *Protein Architecture*. (eds. Y. Luvov and H. Moehwald) Marcel Dekker Inc. New York pp. 75-89.
  3. Kralchevsky P, Nagayama K (2000) Capillary interaction between particles bound to interfaces, liquid films and biomembranes. *Adv Colloid Interface Sci* 85: 145-192.
  4. Murakami M, Yoshimura K, Sugiyama H, Segawa A, Loffredo F, Testa-Riva (2000) Fluid and amylase secretion by perfused parotid gland: physio-morphological approach. *J Korean Med Sci* 15 (Suppl): S38-S39.
  5. 永山國昭 (2000) 水から始まる生理機能の熱力学. シリーズ・ニューバイオフィジックス II 2 巻 “水と生命 - 熱力学から生理学へ” (永山國昭 編) 共立出版 1-14.
  6. 高橋卓也 (2000) イオンと水. シリーズ・バイオフィ

- ジックス II2 巻 “水と生命 - 熱力学から生理学へ” . (永山國昭 編) 共立出版 47-65.
7. 永山國昭 (2000) 複素顕微鏡と1分子構造生物学. 生物物理 40: 258-261.
  8. 村田昌之, 加納ふみ (2000) セミンタクト細胞を用いたタンパク質の細胞内ターゲティングとオルガネラバイオジェネシスの研究. GFP とバイオイメージング - 原理・応用・検出のすべて -. (宮脇敦史 編) 羊土社 259-265.
  9. 加納ふみ, 村田昌之 (2000) セミンタクト細胞と GFP を用いた細胞内トラフィックのモニタリングとマニピュレーション 生物工学 78: 392-397.
  10. 村田昌之, 加納ふみ (2000) 細胞内小胞輸送ネットワークにおけるゴルジ体のダイナミクス. シリーズ・ニューバイオフィジックス II4 巻 生体膜のダイナミクス. (八田一郎, 村田昌之 編) 共立出版 119-138.
  11. 村田昌之 (2000) メンブレントラフィック研究の視点から細胞・オルガネラの形態形成を観る. 細胞工学 19: 982-986.
  12. 加納ふみ, 村田昌之 (2000) 膜の動きを観て, 操作する-GFP とセミンタクト細胞を用いたトポバイオジェネシス研究. 細胞工学 19: 1023-1029.
  13. 村田昌之 (2000) 物質の取り込みと細胞内消化. 現代医学の基礎 2 巻. (石川春律, 高井義美, 月田承一郎 編) 岩波書店 印刷中.
  14. 加納ふみ, 村田昌之 (200) 細胞内イベントを操作するセミンタクト細胞系 - 新しいナノテクノロジーの基盤デバイスとして - 生体の科学 52: 30-346.
  15. Murakami M, Yoshimura K, Sugiyama H, Segawa A, Loffredo F, Testa-Riva F, Riva A (2000) Fluid and amylase secretion by perfused parotid gland: physiomorphological approach. J Korean Med Sci 15 (Suppl): S38-S39.
  16. Murakami M, Seo Y (2000) NMR studies on electrolyte transport and energy metabolism in salivary gland. Symposium on Membrane Transport in Health and Disease at Physiological Society of Thailand 29: 85-95.
  17. 村上政隆 (2000) 臓器灌流法による水・イオン輸送及びタンパク分泌機構へのアプローチ. 日本唾液腺学会誌 41 : 12-13.

## 《細胞内代謝研究部門》

- (1) 英文原著論文
  1. Deguchi R, Shirakawa H, Oda S, Mohri T, Miyazaki S (2000) Spatiotemporal analysis of  $Ca^{2+}$  waves in relation to the sperm entry site and animal-vegetal axis during  $Ca^{2+}$  oscillations in fertilized mouse eggs. Dev Biol 218 : 299-313.
  2. Kaji K, Oda S, Shikano T, Ohnuki T, Uematsu Y, Sakagami J, Tada N, Miyazaki S, Kudo A (2000) The gamete fusion process is defective in eggs of *Cd9*-deficient mice. Nature Genet 24 : 279-282.
  3. Kobori H, Miyazaki S, Kuwabara Y (2000) Characterization of intracellular  $Ca^{2+}$  increase in response to progesterone and cyclic nucleotide in mouse spermatozoa. Biol Reprod 6 : 113-120.
  4. Uramura K, Yada T, Muroya S, Shioda S, Shiratani T, Takigawa M (2000) Methamphetamine induces cytosolic  $Ca^{2+}$  oscillations in the VTA dopamine neurons. Neuro Report 11 : 1057-1061.
  5. Nakamura T, Uramura K, Nambu T, Yada T, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T (2000) Orexin-induced hyperlocomotion and stereotypy are mediated by the dopaminergic system. Brain Res 873 : 181-187.
  6. Uramura K, Yada T, Muroya S, Takigawa M. (2000)  $Ca^{2+}$  oscillations in response to methamphetamine in dopamine neurons of the ventral tegmental area in rats subchronically treated with this drug. Ann New York Acad Sci 914 : 316-322.
  7. Yada T, Sakurada M, Filipsson K, Kikuchi M, Ahren B (2000) Intraperitoneal PACAP administration decreases blood glucose in GK rats, normal and high-fat diet mice. Ann New York Acad Sci 921 : 259-263.
  8. Arahira S, Kusao M, Shioda S, Yada T (2000) PACAP activates pancreatic  $\beta$ -cells in a glucose-independent manner. Ann New York Acad Sci 921 : 438-442.
  9. Yada T, Nakata M, Shioda S (2000) Insulinotropin PACAP potentiates insulin action: stimulation of glucose

uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Ann New York Acad Sci* 921 : 473-477.

## (2) その他

1. 矢田俊彦 (2000) KATP チャンネルの分子制御—イン

スリン分泌調節と破綻— . *医学のあゆみ* 192 (5) : 348-353.

2. 室屋真二, 浦村一秀, 矢田俊彦 (2000) オレキシンによる摂食行動の制御 . *組織培養工学* 26 (12) : 10-13.

## 《生体膜研究部門》

## (1) 英文原著論文

1. Kukita F (2000) Solvent effects on squid sodium channel are attributable to movements of a flexible protein structure in gating currents and to hydration in a pore. *J Physiol (Lond)* 522: 357-373.
2. Nakanishi K, Kukita F (2000) Intracellular [Cl<sup>-</sup>] modulates synchronous electrical activity in rat neocortical neurons in culture by way of GABAergic inputs. *Br Res* 863: 192-204.
3. Kato K, Furuya K, Tsutsui I, Ozaki T, Yamagishi S (2000) Cyclic AMP-mediated inhibition of nonadrenaline-induced contraction and Ca<sup>2+</sup> influx in guinea-pig vas deferens. *Exp Physiology* 85: 387-398.

4. Tsutsui I, Inoue I, Bone Q, Carre C (2000) Activation of locomotor and grasping spine muscle fibres in chaetognaths: a curious paradox. *J Muscle Res Cell Motil* 21: 91-97.

## (2) その他

1. 高橋倫子 (2000) カルシウムシグナルとインスリン分泌「医学のあゆみ」 192 (5): 354-358. 医歯薬出版 .
2. 根本知己, 河西春郎 (2000) 「細胞機能」顕微鏡フル活用術 イラストレイテッド, 秀潤社 .
3. 久木田文夫 (2000) 膜電位依存性イオンチャンネルの開機構に対する水の効果 *生物物理* 40: 185-190.

## 《機能協関研究部門》

## (1) 英文原著論文

1. Hazama A, Fan H, Abdullaev I, Maeno E, Tanaka S, Ando-Akatsuka Y, Okada Y (2000) Swelling-activated, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-augmented ATP release and Cl<sup>-</sup> conductances in C127 cells. *J Physiol (London)* 523: 1-11.
2. Dezaki K, Tsumura T, Maeno E, Okada Y (2000) Receptor-mediated facilitation of cell volume regulation by swelling-induced ATP release in human epithelial cells. *Jpn J Physiol* 50: 235-241.
3. Morishima S, Shimizu T, Kida H, Okada Y (2000) Volume expansion sensitivity of swelling-activated Cl<sup>-</sup> channel in human epithelial cells. *Jpn J Physiol* 50: 277-280.
4. Maeno E, Ishizaki Y, Kanaseki T, Hazama A, Okada Y (2000) Normotonic cell shrinkage due to disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis.

*Proc Natl Acad Sci USA* 97: 9487-9492.

5. Shimizu S, Morishima S, Okada Y (2000) Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor-mediated regulation of volume-sensitive Cl<sup>-</sup> channels in human epithelial cells. *J Physiol (London)* 528: 457-472.
6. Tadjibaeva G, Sabirov RZ, Tomita T (2000) Flammutoxin, a cytolysin from the edible mushroom *Flammulina velutipes*, forms two different types of voltage-gated channels in lipid bilayers membranes. *Biochim Biophys Acta* 77901: 1-13.

## (2) その他

1. Suketa Y, Carafoli E, Lazdunski M, Mikoshiba K, Okada Y, Wright EM (eds) (2000) "Control and Disease of Sodium Dependent Transportation Proteins and Ion Channels" Elsevier, Amsterdam.
2. Hazama A, Ando-Akatsuka Y, Fan H-T, Tanaka S,

- Okada Y (2000) CFTR-dependent and -independent ATP release induced by osmotic swelling. In: "Control and Disease of Sodium Dependent Transportation Proteins and Ion Channels" (eds Suketa Y, Carafoli E, Lazdunski M, Mikoshiba K, Okada Y, Wright EM), Elsevier, Amsterdam, pp 429-431.
3. Shimizu T, Morishima S, Okada Y (2000) Effect of extracellular  $Ca^{2+}$  on volume sensitivity of the swelling-activated  $Cl^{-}$  channel in human epithelial cells. In: "Control and Disease of Sodium Dependent Transportation Proteins and Ion Channels" (eds Suketa Y, Carafoli E, Lazdunski M, Mikoshiba K, Okada Y, Wright EM), Elsevier, Amsterdam, pp 271-272.
  4. Fan H-T, Kida H, Morishima S, Okada Y (2000) Phloretin inhibits a regulatory volume decrease in human epithelial cells. In: "Control and Disease of Sodium Dependent Transportation Proteins and Ion Channels" (eds Suketa Y, Carafoli E, Lazdunski M, Mikoshiba K, Okada Y, Wright EM), Elsevier, Amsterdam, pp 281-282.
  5. Okada Y, Hazama A, Abdullaev I, Tanaka S, Ando-Akatsuka Y, Shimizu T, Sabirov RZ, Hayashi S, Fan H-T (2000) Cell volume-sensitive  $Cl^{-}$  channel and ATP release. In: "Control and Disease of Sodium Dependent Transportation Proteins and Ion Channels" (eds Suketa Y, Carafoli E, Lazdunski M, Mikoshiba K, Okada Y, Wright EM), Elsevier, Amsterdam, pp 261- 264.
  6. 岡田泰伸, 前野恵美 (2000) 細胞容積調節破綻とアポトーシス - クロライドチャネルの役割 -. 細胞工学 19:1334-1337.
  7. 岡田泰伸 (2000) 浸透圧と細胞の容積調節能. 生体の科学 51:530-535.
  8. 岡田泰伸 (2000) 実験事実と証拠能力のはざままで. 日本生理学雑誌 62:273-275.
  9. 岡田泰伸 (2000) 細胞の容積調節. "シリーズ・ニューロバイオフィジックス" "水と生命 - 熱力学から生理学へ". (永山國昭 編) 140-151, 共立出版.

## 《神経情報研究部門》

### (1) 英文原著論文

1. Tanaka F, Otake Y, Nakagawa T, Kawano Y, Miyahara R, Li M, Yanagihara K, Nakayama J, Fujimoto I, Ikenaka K, Wada H (2000) Expression of polysialic acid and *STX*, a human polysialyltransferase, is correlated with tumor progression in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 60: 3072-3080.
2. Wada T, Kagawa T, Ivanova A, Zalc B, Shirasaki R, Murakami F, Iemura S, Ueno N, Ikenaka K (2000) Dorsal spinal cord inhibits oligodendrocyte development. *Dev Biol* 227: 42-55.
3. Shibata R, Nakahira K, Shibasaki K, Wakazono Y, Imoto K, Ikenaka K (2000) A-type  $K^{+}$  current mediated by the *Kv4* channel regulates the generation of action potential in developing cerebellar granule cells. *J Neurosci* 20: 4145-4155.
4. Yanagisawa M, Nakashima K, Arakawa H, Ikenaka K, Yoshida K, Kishimoto T, Hisatsune T, Taga T (2000) Astrocyte differentiation of fetal neuroepithelial cells by interleukin-11 via activation of a common cytokine signal transducer, gp130, and a transcription factor,

STAT3. *J Neurochem* 74: 1498-1504.

### (2) その他

1. 池田一裕 (2000) レトロウイルスを用いた遺伝子導入 第5章遺伝子導入による遺伝子機能解析 基礎生化学実験法 第4巻核酸・遺伝子実験 II 応用編 (株)東京科学同人 192-196.
2. 池田一裕 (2000) 神経系の発生と再生 特集: 発生と再生の化学 現代化学, (株)東京化学同人 18-21.
3. 池田一裕 (2000) 5.2A 遺伝子導入 - ウィルスベクター 5 遺伝子治療とは 斎藤英彦, 吉田純編「遺伝子医療 - 基礎から応用へ - 」 名古屋大学出版 105-117.
4. 鹿川哲史, 池田一裕 (2000) 2.ニューロンとグリアの分化 3章 神経系の発生と分化 森寿, 真鍋俊也, 渡辺雅彦, 岡野栄之, 宮川剛編「脳神経科学イラストレイテッド」 羊土社 107-113.
5. 鹿川哲史, 池田一裕 (2000) グリア細胞の分化, 脳の科学, 星和書店 22(5): 579-582.
6. 南木浩二, 池田一裕 (2000) one point 実験法 高力 価レトロウイルスベクター調整法, 実験医学, 羊土社, 18(6): 803-805.

## 《液性情報研究部門》

## (1) 英文原著論文

1. Bichet D, Cornet V, Geib S, Carlier E, Volsen S, Hoshi T, Mori Y, De Waard M (2000) The I-II loop of Ca<sup>2+</sup> channel alpha-1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit. *Neuron* 25:177-190.
2. Iwasa K, Takamori M, Konami K, Mori Y (2000) Recombinant calcium channel is recognized by Lambert-Eaton myasthenic syndrome antibodies. *Neurology* 54: 757-759.
3. Yamada H, Wakamori M, Hara Y, Takahashi Y, Konishi K, Imoto K, Mori Y (2000) Spontaneous single-channel activity of neuronal TRP5 channel recombinantly expressed in HEK293 cells. *Neurosci Lett* 285: 111-114.
4. Mori Y, Wakamori M, Oda S, Fletcher CF, Sekiguchi N, Mori E, Copeland NG, Jenkins NA, Matsushita K, Matsuyama Z, Imoto K (2000) Reduced voltage sensitivity of activation of P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channels is associated with the ataxic mouse mutation rolling nagoya. *J Neurosci* 20:5654-62.
5. Nishimura S, Iizuka M, Akiba I, Wakamori M, Imoto K, Barsoumian EL (2000) Stable expression of human homomeric and heteromeric AMPA receptor subunits in HEK293 cells. *Receptors Channels* 7:139-150.
6. Iizuka M, Nishimura S, Wakamori M, Akiba I, Imoto K, Barsoumian EL (2000) The lethal expression of the GluR2flip/GluR4flip AMPA receptor in HEK293 cells. *Eur J Neurosci* 12: 3900-3908.
7. Yakehiro M, Yuki T, Yamaoka K, Furue T, Mori Y,

Imoto K, Seyama I (2000) An analysis of the variations in potency of grayanotoxin analogs in modifying frog sodium channels of differing subtypes. *Mol Pharmacol* 58:692-700.

## (2) その他

1. 古市 貞一, 森 泰生 (2000) 電位依存性カルシウムチャンネル. *Clinical Neuroscience* 18: 267-273.
2. 井本 敬二 (2000) 電位依存性ナトリウムチャンネル. *Clinical Neuroscience* 18: 274-277.
3. Ertel E, Campbell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori Y, Perez-Reyes E, Schwartz A, Snutch T, Tanabe T, Birnbaumer L, Tsien RW, Catterall WA (2000) Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 25: 533-535.
4. 井上隆司, 森泰生, 伊東祐之 (2000) 新しい標的分子としての TRP 関連蛋白質: 受容体作動性陽イオンチャンネルとの分子的相関. 蛋白質核酸酵素 (4 月増刊号: 最先端創薬・戦略的アプローチと先端的医薬品: 長尾拓, 成宮周, 加藤隆一, 宮本英七 編) 45: 1038-1046.
5. 森泰生, 若森実 (2000) 電位依存性チャンネル." 脳神経科学イラストレイテッド"(森寿, 真鍋俊也, 渡辺雅彦, 岡野栄之, 宮川剛 編) 羊土社 145-151.
6. Imoto K (2000) Structure and function of voltage-dependent Na<sup>+</sup> channel. in "Handbook of Experimental Pharmacology", Volume 147, Pharmacology of ionic channel functions: activators and inhibitors (ed. Endo M, Kurachi Y, Mishina M) Springer-Verlag, Heidelberg, 3-26.

## 《高次神経機構研究部門》

## (1) 英文原著論文

1. Sugino H, Hamada S, Yasuda R, Tuji A, Matsuda Y, Fujita M, Yagi T. (2000) Genomic organization of the family of CNR cadherin genes in mice and humans. *Genomics* 63 (1): 75-87.
2. Kitazawa H, Katoh A, Yagi T, Nagao S. (2000) Dynamic characteristics and adaptability of reflex eye movements

of Fyn-kinase-deficient mice. *Neurosci Lett* 280 (3): 179-82.

3. Yamazaki Y, Yagi T, Ozaki T, Imoto K. (2000) In vivo gene transfer to mouse spermatogenic cells using green fluorescent protein as a marker. *J Exp Zool* 286 (2): 212-218.
4. Seiwa C, Sugiyama I, Yagi T, Iguchi T, Asou H. (2000)

- Fyn tyrosine kinase participates in the compact myelin sheath formation in the central nervous system. *Neurosci Res* 37 (1): 21-31.
5. Yagi T, Takeichi M. (2000) Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity. *Genes Dev* 14 (10): 1169-80.
  6. Shima T, Yagi T, Isojima Y, Okumura N, Okada M, Nagai K. (2000) Changes in circadian period and morphology of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus in fyn kinase-deficient mice. *Brain Res* 870 (1-2): 36-43.
  7. Huang GZ, Ujihara H, Takahashi S, Kaba H, Yagi T, Inoue S. (2000) Involvement of complexin II in synaptic plasticity in the CA1 region of the hippocampus: the use of complexin II-lacking mice. *Jpn J Pharmacol* 84 (2): 179-87.
  8. Ito T, Kagoshima M, Sasaki Y, Li C, Udaka N, Kitsukawa T, Fujisawa H, Taniguchi M, Yagi T, Kitamura H, Goshima Y. (2000) Repulsive axon guidance molecule Sema3A inhibits branching morphogenesis of fetal mouse lung. *Mech Dev* 97(1-2): 35-45.
  9. Kawase E, Yamazaki Y, Yagi T, Yanagimachi R, Pedersen RA. (2000) Mouse embryonic stem (ES) cell lines established from neuronal cell-derived cloned blastocysts. *Genesis*. 28 (3-4): 156-63.
- (2) その他
1. 八木 健 (2000) マウス個体における遺伝子ノックアウトマウス. 脳・神経研究のための分子生物学技術講座. (小幡邦彦, 井本敬二, 高田明和 編): pp.136-144 文光堂.
  2. 先崎浩次, 小川正晴, 八木 健 (2000) マウス大脳皮質層構造形成機構における新たな分子メカニズムの解明. *実験医学* 18: 784-787.
  3. 先崎浩次, 八木 健 (2000) CNR 遺伝子の発見からみた脳. *遺伝子医学* 4 (2): 76-85.
  4. 三宝 誠, 八木 健 (2000) ノックアウトマウス. 脳神経科学イラストレイテッド. (森 寿, 真鍋俊也, 渡辺雅彦, 岡野栄之, 宮川 剛 編): pp.339-344 羊土社.
  5. 八木 健 (2000) 遺伝子変換技術の考え方. ジーンターゲティングの最新技術. (八木 健 編): pp.14-19 羊土社.
  6. 三宝千秋 (2000) 安定した ES 細胞培養法. ジーンターゲティングの最新技術. (八木 健 編): pp.20-28 羊土社.
  7. 八木 健 (2000) 効率と将来性を考えたターゲティングベクター作成法. ジーンターゲティングの最新技術. (八木 健 編): pp.29-33 羊土社.
  8. 三宝千秋 (2000) エレクトロポレーションによる ES 細胞への遺伝子導入法. ジーンターゲティングの最新技術. (八木 健 編): pp.34-41 羊土社.
  9. 三宝千秋 (2000) 効率よく安全で安定した遺伝子組換え体の解析法. ジーンターゲティングの最新技術. (八木 健 編): pp.42-49 羊土社.
  10. 三宝 誠 (2000) ES 細胞の同級によるキメラマウス作成法. ジーンターゲティングの最新技術. (八木 健 編): pp.50-77 羊土社.
  11. 藤田まさみ (2000) ゲノミック DNA のスクリーニングと塩基配列決定について. ジーンターゲティングの最新技術. (八木 健 編): pp.50-77 羊土社.
  12. 八木 健 (2000) コンディショナルターゲティング法. ジーンターゲティングの最新技術. (八木 健 編): pp.115-120 羊土社.
  13. 濱田香世子, 濱田 俊 (2000) 解剖学的解析法. ジーンターゲティングの最新技術. (八木 健 編): pp.132-142 羊土社.
  14. 山内奈央子 (2000) ラットを用いたモノクローナル抗体作製法. ジーンターゲティングの最新技術. (八木 健 編): pp.143-155 羊土社.
  15. 先崎浩次 (2000) *in situ* ハイブリダイゼーション法. ジーンターゲティングの最新技術. (八木 健 編): pp.156-162 羊土社.
  16. 牧野初音 (2000) whole mount *in situ* ハイブリダイゼーション法. ジーンターゲティングの最新技術. (八木 健 編): pp.163-170 羊土社.
  17. 八木 健 (2000) 遺伝的背景と遺伝子変換マウスの行動との関連性. ジーンターゲティングの最新技術. (八木 健 編): pp.187-189 羊土社.

## 《情報記憶研究部門》

## (1) 英文原著論文

1. Nishino H, Hida H, Kumazaki M, Shimano Y, Nakajima K, Shimizu H, Ooiwa T, Baba H (2000) The striatum is the most vulnerable region in the brain to mitochondrial energy compromise : a hypothesis to explain the specific vulnerability. *J Neurotrauma* 17(3): 251-260.
2. Nishino H, Hida H, Takei N, Kumazaki M, Nakajima K, Baba H (2000) Mesencephalic neural stem (progenitor) cells develop to dopaminergic neurons more strongly in dopamine depleted striatum than the intact striatum. *Exp Neurol* 164: 209-214.
3. Yamada, Y, Fukuda, A, Tanaka, M, Shimano, Y, Nishino, H, Muramatsu, K, Togari, H, Wada Y (2000) Immature stage of intracellular Cl<sup>-</sup> homeostasis regulated by cation- Cl<sup>-</sup> cotransporters in rat neocortical neurons. *Nagoya Medical Journal* 43: 179-190.
4. Ninomiya Y, Nakashima K, Fukuda A, Nishino H, Sugimura T, Hino A, Danilova V, Hellekant G (2000) Responses to umami substances in taste bud cells innervated by the chorda tympani and glossopharyngeal nerves. *J Nutrition* 130: 950s-953s.
5. Borlongan CV, Yamamoto M, Takei N, Kumazaki M, Ungsuparkorn C, Hida H, Sanberg PR, Nishino H (2000) Glial cells survival is enhanced during melatonin-induced neuroprotection against cerebral ischemia. *FASEBJ* 14: 1307-1317.

6. Imamura N, Aihara N, Yamada K, Hida H, Nishino H (2000) Delayed microglial appearance in substantia nigra after intrastriatal hemorrhage in rats. *Neurotrauma Res* 12: 48-51.

## (2) その他

1. Nishino H, Borlongan CV (2000) Restoration of function by neural transplantation in the ischemic brain. In: *Functional Neural Transplantation* (Dunnett S & Bjorklund A eds.) *Prog Brain Res* 127: 461-476.
2. Furuyama F, Kuroshima A, Shido O, Yahata T, Tanaka E, Ikemoto A, Okuyama H, Nishino H (2000) Different characteristics of the inbred FOK rat in addition to genotypic resistance adaptation to a severe hot environment. In: *ICSB2000, Proceedings of The First International Conference on Systems Biology (The 9th JST International Symposium)*, edied by Kitano H, pp 142-147.
3. 西野仁雄, 馬場広子 (2000) 神経移植による機能再建. 小特集 - 中枢神経の再生が可能になる -. *科学* 70: 474-477.
4. 西野仁雄, 馬場広子 (2000) 神経移植研究の進歩 - 治療法 - *Annual Review 神経* pp 61-68.
5. 石田和人, 西野仁雄 (2000) 神経移植による運動機能の再建. *運動の神経科学 - 基礎から応用まで -* (西野仁雄, 柳原 大 編) ナップ 東京 pp 188-198.

## 《高次神経性調節研究部門》

## (1) 英文原著論文

1. Kondo H, Komatsu H (2000) Suppression on neuronal responses by a metacontrast masking stimulus in monkey V4. *Neuroscience Research* 36: 27-33 .
2. Hanazawa A, Komatsu H, Murakami I (2000) Neural selectivity for hue and saturation of colour in the primary visual cortex of the monkey. *European J. Neuroscience* 12: 1753-1763 .
3. Komatsu H, Kinoshita M, Murakami I (2000) Neural responses in the retinotopic representation of the blind spot in the macaque V1 to stimuli for perceptual filling-

in. *J. Neuroscience* 20: 9310-9319 .

## (2) その他

1. 小松英彦 (2000) 脳における色情報処理. *OplusE* 22(4): 447-453 .
2. 小松英彦 (2000) 大脳皮質における視覚情報処理. *学術月報* 53(4): 12-17 .
3. 小松英彦 (2000) MT, MST 野. *脳科学大事典* (甘利俊一, 外山敬介編) pp 109-115. 朝倉書店. 東京.
4. 小松英彦 (2000) V4 野. *脳科学大事典* (甘利俊一, 外山敬介編) pp 115-120. 朝倉書店. 東京.

5. 小松英彦 (2000) 視覚系生理の基礎 . 視覚情報処理ハンドブック (日本視覚学会編) pp 64-77. 朝倉書店. 東京.
6. 小松英彦 (2000) 視覚による運動の認知 . 運動の神経科学 (西野仁雄, 柳原大編) pp 72-87 . ナップ . 東京.

## 《生体システム研究部門》

### (1) 英文原著論文

1. Mori S, Matsui T, Mori F, Nakajima K, Matsuyama K (2000) Instigation and control of treadmill locomotion in high decerebrate cats by stimulation of the hook bundle of Russell in the cerebellum. *Can J Physiol Pharmacol* 78: 945-957.
2. Matsuyama K, Drew T (2000) Vestibulospinal and reticulospinal neuronal activity during locomotion in the intact cat. I. Walking on a level surface. *J Neurophysiol* 84: 2237-2256.
3. Matsuyama K, Drew T (2000) Vestibulospinal and reticulospinal neuronal activity during locomotion in the intact cat. II. Walking on an inclined plane. *J Neurophysiol*

84: 2257-2276.

4. Nakajima K, Maier MA, Kirkwood P, Lemon RN (2000) Striking differences in transmission of corticospinal excitation to upper limb motoneurons in two primate species. *J Neurophysiol* 84: 698-709.
5. Okumura T, Dobolyi A, Matsuyama K, Mori F, Mori S (2000) The cat neostriatum: relative distribution of cholinergic neurons vs. serotonergic fibers. *Brain & Dev* 22: S27-37.

### (2) その他

1. 宮下英三 (2000) 大脳皮質運動野のシナプス可塑性 . 西野仁雄 他編「運動の神経科学」ナップ pp 126-136.

## 《高次液性調節研究部門》

### (1) 英文原著論文

1. Tokuyama W, Okuno H, Hashimoto T, Li Y.X, Miyashita Y (2000) BDNF upregulation during declarative memory formation in monkey inferior temporal cortex. *Nature neuroscience* 3: 1134-1142.
2. Embick D, Marantz A, Miyashita Y, O'Neil W, Sakai K.L (2000) A syntactic specialization for Broca's area. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 6150-6154.
3. Hashimoto T, Okuno H, Tokuyama W, Li X.Y, Miyashita Y (2000) Expression of brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3 and their receptor messenger RNAs in monkey rhinal cortex. *Neuroscience* 95: 1003-1010.
4. Hashimoto R, Homae F, Nakajima K, Miyashita Y, Sakai K.L (2000) Functional differentiation in the human auditory and language areas revealed by a dichotic listening task. *Neuroimage* 12: 147-158.
5. Sekihara K, Nagarajan S.S, Poeppel D, Miyauchi S, Fujimaki N, Koizumi H, Miyashita Y (2000) Estimating neural sources from each time-frequency component

of magnetoencephalographic data. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 47: 642-653.

6. Miyashita Y, Hayashi T (2000) Neural representation of visual objects : encoding and top-down activation. *Current Opinion in Neurobiology* 10: 187-194.

### (2) その他

1. Naya Y, Yoshida M, Ihara T, Nagao S, Miyashita Y (2000) Spatial distribution of memory-related cells in monkey area 36 and area TE during pair-association task. *Soc. Neurosci. Abstr.* 26: 286.
2. Yoshida M, Naya Y, Ito A, Shibata S, Miyashita Y (2000) A combined study of tract-tracing and electrophysiological mapping in area TE and area 36 of macaque monkeys. *Soc. Neurosci. Abstr.* 26: 286.
3. Tokuyama W, Okuno H, Hashimoto T, Li Y.X, Takahashi E, Miyashita Y (2000) Induction of BDNF mRNA during visual paired associate learning in the inferior temporal cortex of macaque monkeys. *Soc. Neurosci. Abstr.* 26:

- 286.
4. Okuno H, Tokuyama W, Hashimoto T, Li Y.X, Koyama M, Miyashita Y (2000) Induction on ZIF268 mRNA in perirhinal cortex during memory formation for visual paired associated in macaque monkeys. *Soc. Neurosci. Abstr.* 26: 546.
  5. Li Y.X, Hashimoto T, Tokuyama W, Miyashita Y, Nagao S, Okuno H (2000) BDNF induction in vestibulo-olivary network following unilateral labyrinthectomy in rats as revealed by quantitative RT-PCR analysis. *Soc. Neurosci. Abstr.* 26: 844.
  6. Fukushima T, Hasegawa I, Miyashita Y (2000) Modulation of neuronal activities in macaque dorsal periarculate area by target-shift cues. *Soc. Neurosci. Abstr.* 26: 1074.
  7. Ohbayashi M, Miyashita Y (2000) Linkage of visuospatial information and saccade preparation in monkey premotor cortex during an oculomotor sequence task. *Soc. Neurosci. Abstr.* 26: 1074.
  8. Hashimoto T, Li Y.X, Okuno H, Tokuyama W, Takahashi E, Miyashita Y (2000) BDNF mRNA expression in rat inferior olive after unilateral labyrinthectomy: in situ hybridization analysis. *Soc. Neurosci. Abstr.* 26: 1493.
  9. Li X.Y, Tokuyama W, Hashimoto T, Miyashita Y, Okuno H (2000) Induction of BDNF in rat brainstem after unilateral labyrinthectomy revealed by quantitative RT-PCR. *Neurosci. Res.* 24 (Suppl) S21.
  10. Hashimoto T, Okuno H, Tokuyama W, Li X.Y, Miyashita Y (2000) Expression pattern of ZIP268 mRNA in monkey inferior temporal cortex during formation of visual pair-association memory. *Neurosci. Res.* 24 (Suppl) S31.
  11. Tokuyama W, Okuno H, Hashimoto T, Li X.Y, Miyashita Y (2000) Induction of BDNF mRNA during visual paired associate learning: quantitative analysis using split-brain monkeys. *Neurosci. Res.* 24 (Suppl) S31.
  12. Fukushima T, Hasegawa I, Miyashita Y (2000) Modulation of neuronal activity in macaque prefrontal cortex by shifts of the saccade target. *Neurosci. Res.* 24 (Suppl) S55.

## 《腦形態解析研究部門》

### (1) 英文原著論文

1. Sillevius Smitt P, Kinoshita A, De Leeuw B, Moll W, Coesmans M, Jaarsma D, Henzen Logmans S, Vecht C, De Zeeuw C, Sekiyama N, Nakanishi S, Shigemoto-R (2000) Paraneoplastic cerebellar ataxia due to autoantibodies against a glutamate receptor. *New England Journal of Medicine* 342 (1): 21-27.
2. Ichise T, Kano M, Hashimoto K, Yanagihara D, Nakao K, Shigemoto R, Katsuki M, Aiba A (2000) mGluR1 in cerebellar Purkinje cells essential for long-term depression, synapse elimination, and motor coordination. *Science* 288 (5472): 1832-1835.
3. Li J, Wang D, Kaneko T, Shigemoto R, Nomura S, Mizuno N (2000) The relationship between neurokinin-1 receptor and substance P in the medullary dorsal horn: a light and electron microscopic immunohistochemical study in the rat. *Neurosci Res* 36 (4): 327-34.
4. Li JL, Wang D, Kaneko T, Shigemoto R, Nomura S, Mizuno N (2000) Relationship between neurokinin-1 receptor and substance P in the striatum: light and electron microscopic immunohistochemical study in the rat. *J Com Neuro* 418 (2): 156-63.
5. Boudin H, Doan A, Xia J, Shigemoto R, Haganir RL, Worley P, Craig AM (2000) Presynaptic clustering of mGluR7a requires the PICK1 domain binding site. *Neuron* 28(2): 485-97.
6. Perroy J, Prezeau L, Duwaard M, Shigemoto R, Bockaert J, Fagni L (2000) Selective blockade of P/Q-type calcium channels by the metabotropic glutamate receptor type 7 involves a phospholipase C pathway in neurons. *J Neurosci* 20 (21): 7896-904.
7. Koga E, Momiyama T (2000) Presynaptic dopamine D2-like receptors inhibit excitatory transmission onto rat ventral tegmental dopaminergic neurones. *J Physiol (Lond.)* 523: 163-173.
8. Momiyama A (2000) Distinct synaptic and extrasynaptic NMDA receptors identified in dorsal horn neurons of the adult rat spinal cord. *J Physiol* 523: 621-628.
9. Iwasaki S., Momiyama A., Uchitel O.D., Takahashi T. (2000) Developmental changes in calcium channel types

mediating central synaptic transmission. *J Neurosci* 20: 59-65.

(2) その他

1. Shigemoto R, Mizuno N (2000) Metabotropic glutamate receptors-immunocytochemical and in situ hybridization analyses. In: *Handbook of Chemical Neuroanatomy, Volume 18: Glutamate* (Ottersen OP and Storm-Mathisen J, ed), pp63-98. New York: Elsevier.
2. Momiyama T (2000) Function of monoamines and peptide in the vestibular complex. *Equilibrium Res.* 59: 1-8.
3. 重本隆一 (2000) シナプスの構造と受容体, 脳神経

科学イラストレイテッド (森 他, 編): 49-57, 羊土社 .

4. 初山俊彦 (2000) モノアミン, 脳神経科学イラストレイテッド (森他, 編): 186-192, 羊土社 .
5. 初山明子 (2000) 電気生理学的手法. 脳神経科学イラストレイテッド(森他, 編): 314-321, 羊土社 .
6. 木下彩栄 (2000) 代謝調節型グルタミン酸受容体抗体と傍腫瘍性小脳失調症, *Brain Medical* 12, 187-193, メディカルレビュー社 .
7. 木下彩栄 (2000) 代謝調節型グルタミン酸受容体抗体による傍腫瘍性小脳失調症, *神経内科* 53, 212-218, 科学評論社 .

## 《大脳神経回路論研究部門》

(1) 英文原著論文

1. Kubota Y, Kawaguchi Y (2000) Dependence of GABAergic

synaptic areas on the interneuron type and target size. *J Neurosci* 20: 375-386.

## 《心理生理学研究部門》

(1) 英文原著論文

1. Iidaka T, Sadato N, Yamada H, Yonekura Y (2000) Functional asymmetry of human prefrontal cortex in verbal and non-verbal episodic memory as revealed by fMRI. *Brain Research Cognitive Brain Res* 9: 73-83.
2. Omata N, Murata T, Fujibayashi Y, Waki A, Sadato N, Yoshimoto M, Wada Y, Yonekura Y (2000) Hypoxic but not ischemic neurotoxicity of free radicals revealed by dynamic changes in glucose metabolism of fresh rat brain slices on positron autoradiography. *J Cereb Blood Flow Metab* 20: 350-358.
3. Uematsu H, Maeda M, Sadato N, Matsuda T, Ishimori Y, Yamada H, Kimura H, Kawamura Y, Matsuda T, Hayashi N, Yonekura Y, Ishii Y (2000) Vascular permeability: quantitative measurement with double-echo dynamic MR imaging-theory and clinical application. *Radiology* 214: 912-917.
4. Murata T, Omata N, Fujibayashi Y, Waki A, Sadato N, Yoshimoto M, Wada Y, Yonekura Y (2000) Neurotoxicity after hypoxia/during ischemia due to glutamate with/

without free radicals as revealed by dynamic changes in glucose metabolism. *Brain Res* 26: 259-263.

5. Yamada H, Sadato N, Konishi Y, Muramoto S, Kimura K, Tanaka M, Yonekura Y, Ishii Y, Itoh H (2000) A milestone for normal development of the infantile brain detected by functional MRI. *Neurology* 25: 218- 223.
6. Tsuchida C, Kimura H, Sadato N, Tsuchida T, Tokuriki Y, Yonekura Y (2000) Evaluation of brain metabolism in steno-occlusive carotid artery disease by proton MR spectroscopy: a correlative Study with oxygen metabolism by PET. *J Nucl Med* 41: 1357-1362.
7. Narumoto J, Yamada H, Iidaka T, Sadato N, Fukui K, Itoh H, Yonekura Y (2000) Brain regions involved in verbal or non-verbal aspects of facial emotion recognition. *Neuroreport* 11: 2571-2576.
8. Murata T, Omata N, Fujibayashi Y, Waki A, Sadato N, Yoshimoto M, Wada Y, Yonekura Y (2000) Posthypoxic reoxygenation-induced neurotoxicity prevented by free radical scavenger and NMDA/non-NMDA antagonist in tandem as revealed by dynamic changes in glucose

- metabolism with positron autoradiography. *Exp Neurol* 164: 269-79.
9. Morita T, Kochiyama T, Yamada H, Konishi Y, Yonekura Y, Matsumura M, Sadato N (2000) Difference in the metabolic response to photic stimulation of the lateral geniculate nucleus and the primary visual cortex of infants: a fMRI study. *Neurosci Res* 38: 63-70.
  10. Shiozaki T, Sadato N, Senda M, Ishii K, Tsuchida T, Yonekura Y, Fukuda H, Konishi J (2000) Noninvasive estimation of FDG input function for quantification of cerebral metabolic rate of glucose: optimization and multicenter evaluation. *J Nucl Med* 41: 1612-1618.
  11. Takahashi N, Fujibayashi Y, Yonekura Y, Welch MJ, Waki A, Tsuchida T, Sadato N, Sugimoto K, Itoh H (2000) Evaluation of  $^{62}\text{Cu}$  labeled diacetyl-bis ( $\text{N}^4$ -methylthiosemicarbazone) as a hypoxic tissue tracer in patients with lung cancer. *Ann Nucl Med* 14: 323-328.
  12. Omori M, Murata T, Wada Y, Yamada H, Tanaka M, Sadato N, Iidaka T, Wada Y, Yonekura Y (2000) Altered brain activation in schizophrenia during visually guided motor selection revealed by fMRI. *Schizophrenia Res* 45: 261-263.
  13. Okada T, Tanaka S, Nakai T, Nishizawa S, Ishii T, Sadato N, Yonekura Y, Konishi J (2000) Naming of animals and tools: a functional magnetic resonance imaging study of categorical differences in the human brain areas commonly used for naming visually presented objects. *Neurosci Lett* 296: 33-36.
  14. Sadato N, Ibanez V, Deiber M-P, Hallett M (2000) Gender difference in premotor activity during active tactile discrimination. *Neuroimage* 5: 532-40.
  15. Nakai T, Matsuo K, Kato C, Takehara Y, Isoda H, Moriya T, Okada T, Sakahara H (2000) Post-stimulus response in hemodynamics observed by functional magnetic resonance imaging-difference between the primary sensorimotor area and the supplementary motor area. *Magn Reson Imaging* 18: 1215-1219.
  16. Sawamoto N, Honda M, Okada T, Hanakawa T, Kanda M, Fukuyama H, Konishi J, Shibasaki H (2000) Expectation of Pain Enhances Responses to Nonpainful Somatosensory Stimulation in the Anterior Cingulate Cortex and Parietal Operculum/Posterior Insula: an Event-Related Functional Magnetic Resonance Imaging Study. *J Neurosci* 20: 7438-7445.
  17. Nakamura K, Honda M, Okada T, Hanakawa T, Fukuyama H, Konishi J, Shibasaki H (2000) Attentional modulation of parieto-occipital cortical responses: implications for hemispatial neglect. *J Neurol Sci* 176: 136-43.
  18. Nakamura K, Honda M, Okada T, Hanakawa T, Toma K, Fukuyama H, Konishi J, Shibasaki H (2000) Participation of the left posterior inferior temporal cortex in writing and mental recall of kanji orthography: A functional MRI study. *Brain* 123: 954-67.
  19. Dong Y, Fukuyama H, Honda M, Okada T, Hanakawa T, Nakamura K, Nagahama Y, Nagamine T, Konishi J, Shibasaki H (2000) Essential role of the right superior parietal cortex in Japanese kana mirror reading: An fMRI study. *Brain* 123: 790-9.
  20. Inui T, Tanaka S, Okada T, Nishizawa S, Katayama M, Konishi J (2000) Neural substrates for depth perception of the Necker cube; a functional magnetic resonance imaging study in human subjects. *Neurosci Lett* 282: 145-8.
  21. Oohashi T, Nishina E, Honda M, Yonekura Y, Fuwamoto Y, Kawai N, Maekawa T, Nakamura S, Fukuyama H, Shibasaki H (2000) Inaudible high-frequency sounds affect brain activity: hypersonic effect. *J Neurophysiol* 83: 3548-3558.
  22. Toma K, Nagamine T, Yazawa S, Terada K, Ikeda A, Honda M, Oga T, Shibasaki H (2000) Desynchronization and synchronization of central 20-Hz rhythms associated with voluntary muscle relaxation: a magnetoencephalographic study. *Exp Brain Res* 134: 417-425.
  23. Wharton CM, Grafman J, Flitman SS, Hansen EK, Brauner J, Marks A, Honda M (2000) Toward neuroanatomical models of analogy: a positron emission tomography study of analogical mapping. *Cognit Psychol* 40: 173-197.
- (2) その他
1. 米倉義晴, 定藤規弘 (2000) PET 及び機能的 MRI を用いたヒト高次脳機能の可塑性の解明. *学術月報* 53: 417-421.
  2. 湊小太郎, 佐藤哲大, 定藤規弘, 米倉義晴, 梶沢宏之 (2000) 画像解析の最前線 - MR 拡散テンソル画像と神経束抽出. *診断と治療* 88: 1723-1727.
  3. 岡田知久, 定藤規弘, 米倉義晴 (2000) 超高磁場 ( 3

- テスラ)MRIを用いた脳機能画像. 日本磁気共鳴医学会雑誌 20: 266-271.
4. 定藤規弘(2000) 局所脳血流測定で見る脳の可塑性 医学のあゆみ 192: 1169-1170
  5. 田中雅人, 上坂秀樹, 河村泰孝, 小室裕冉, 伊藤晴海, 石井 靖, 米倉義晴, 定藤規弘, 小倉久和 (2000) 分散環境下における放射線画像管理のシステムの試み. Medical Imaging Technology 18: 149-157.
  6. 岡田 知久 (2000) 正常解剖. 「脳・頭頸部のMRI」(編集:三木幸雄,メディカルビュー社): 6-16 頁.
  7. 本田 学,村田 昇 (2000) 独立成分分析(9)MRI画像解析への応用: Computer Today 95.

## 《高次脳機能研究プロジェクト》

- (1) 英文原著論文
  1. Saito Y, Isa T (2000) Voltage-gated transient outward currents neurones with different firing properties in rat superior colliculus. Journal of Physiology (London) 528: 91-105.
  2. Tsuzuki K, Isa T, Ozawa S (2000) Subunit composition of AMPA receptors expressed by single hippocampal neurons. Neuroreport 11: 1-5.
- (2) その他
  1. 伊佐 正 (2000) 注意の脳内表現へのボトムアップ的アプローチ. VISION 12 (3): 123-130 .

## 《感覚・運動機能研究プロジェクト》

- (1) 原著論文
  1. Gunji A, Hoshiyama M, Kakigi R (2000) Identification of auditory evoked potentials of own voice. Clinical Neurophysiology 111: 214-219.
  2. Hoshiyama M, Kakigi R (2000) After-effect of transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) on pain-related evoked potentials and magnetic fields in normal subjects. Clinical Neurophysiology 111: 717-724.
  3. Sekiguchi T, Koyama S, Kakigi R (2000) The effect of word repetition on evoked magnetic responses of the human brain. Japanese Psychological Research 42: 3-14
  4. Gunji A, Kakigi R, Hoshiyama M (2000) Spatiotemporal source analysis of vocalization-associated magnetic fields. Brain Research Cognitive Brain Research 9: 157-163.
  5. Itomi K, Kakigi R, Maeda K, Hoshiyama M (2000) Dermatome versus homunculus: Detailed topography of the primary sensory cortex following trunk stimulation. Clinical Neurophysiology 111: 405-412.
  6. Naito T, Kaneoke Y, Osaka N, Kakigi R (2000) Assymetry of the human visual field in response to apparent motion. Brain Research 865: 221-226.
  7. Yamasaki H, Kakigi R, Watanabe S, Hoshiyama M (2000) Effects of distraction on pain-related somatosensory evoked magnetic fields and potentials following painful electrical stimulation. Brain Research Cognitive Brain Research 9: 165-75.
  8. Lam K, Kaneoke Y, Gunji A, Yamasaki H, Matsumoto E, Naito T, Kakigi R (2000) Response of the human extrastriate cortex in detection of coherent and incoherent motion. Neuroscience 97: 1-10.
  9. Kawakami O, Kaneoke Y, Kakigi R (2000) Perception of apparent motion is related to the neural activity in the human extrastriate cortex as measured by magnetoencephalography. Neuroscience Letters 285: 135-138.
  10. Okusa T, Kakigi R, Osaka N (2000) Cortical activity related to cue-invariant shape perception in humans. Neuroscience 98: 615-624.
  11. Wang Y, Sakuma K, Kakigi R (2000) The dynamic processes for word and picture encoding in the human brain as revealed by magnetoencephalography. Neuroscience Letters, 289: 135-138.
  12. Nakamura M, Kakigi R, Okusa T, Hoshiyama M, Watanabe K (2000) Effects of check size on pattern reversal visual evoked magnetic field and potential.

- Brain Research 872: 77-86.
13. Hoshiyama M, Kakigi R (2000) Vibratory stimulation of proximal muscles does not affect cortical components of somatosensory evoked potential following distal nerve stimulation. *Clinical Neurophysiology* 111: 1607-1610.
  14. Koyama S, Gunji A, Yabe H, Oiwa S, Akahane-Yamada R, Kakigi R, Naatanen R (2000) Hemispheric lateralization in an analysis of speech sounds. Left hemisphere dominance replicated in Japanese subjects. *Brain Research Cognitive Brain Research* 10: 119-124.
  15. Bundo M, Kaneoke Y, Inao S, Yoshida J, Nakamura A, Kakigi R (2000) Human visual motion areas determined individually by magnetoencephalography and 3D magnetic resonance imaging. *Human Brain Mapping* 11: 33-45.
  16. Koyama, S., Gunji, A., Yabe, H., Yamada-Akahane, R., Oiwa, S., Kubo, R. Kakigi, R (2000) The masking effect in foreign speech sounds perception revealed by neuromagnetic responses. *NeuroReport* 11: 3765-3769.
- (2) その他
1. Kakigi R, Watanabe S, Yamasaki H (2000) The pain-related somatosensory evoked potentials. *Journal of Clinical Neurophysiology* 17: 295-308.
  2. Kakigi R, Hoshiyama M, Shimojo M, Naka D, Yamasaki H, Watanabe S, Xiang J, Maeda K, Lam K, Itomi K, Nakamura A (2000) The somatosensory evoked magnetic fields. *Progress in Neurobiology* 61: 495-523.
  3. Berg P, Kakigi R, Koyama S, Dobel C, Zobel E, Scherg M (2000) Searching for the oddball response in the EEG and MEG. "Biomag 96 Proceedings of the Tenth International Conference on Biomagnetism." (Eds. Aine CJ, Okada Y, Stroink G, Swithenby S, Wood CC), Springer Press, New York, pp709-712.
  4. Kakigi R, Kitamura Y, Koyama S, Hoshiyama M, Shimojo M, Watanabe S, Takeshima Y, Nagata O (2000) MEG traces of painful processes "Biomag 96 Proceedings of the Tenth International Conference on Biomagnetism." (Eds. Aine CJ, Okada Y, Stroink G, Swithenby S, Wood CC), Springer Press, New York, pp1018-1025.
  5. Kakigi R, Watanabe S, Yamasaki H (2000) Pain-Related somatosensory evoked potentials. *Journal of Clinical Neurophysiology*, 17: 295-308.
  6. 田村 守, 柿木隆介 (2000) 光 CT 及び脳磁図を用いた高次脳機能の研究 光と磁気で脳の働きを探る 学術月報 54: 87-91.
  7. 大草知裕, 柿木隆介 (2000) 脳磁図によるヒトの形態視知覚機構の解明. 脳の科学 22: 653-660.
  8. 柿木隆介 (2000) 痛みの評価・診断法 3) Magnetoencephalography (MEG) 整形外科 51: 908-913.
  9. 金桶吉起, 文堂昌彦, 川上治, 柿木隆介 (2000) 仮現運動刺激による誘発脳磁場. 臨床脳波 42: 288-293.

## 《形態情報解析室》

- (1) 英文原著論文
1. Furuya S, Hiroe T, Ozaki T, Takimoto M, Hori S (2000) Localization of endothelin A receptors in the rat pituitary TSH cells. *Cell Tissue Res* 325: 85-94.
- (2) その他
1. Hama K, Arii T, Ito Y (2000) High-voltage electron microscopy in neurocytology. *J Electron Microsc.* 49: 1-4.
  2. 浜 清, 有井達夫 (2000) 超高圧電子顕微鏡. 電子顕微鏡 35: 141-143.
  3. Sengoku M, Ohno T, Arii T (2000) High-voltage and high-resolution electron microscopy of fine organic particles. In Proc. of the 7th Asia-Pacific Electron Microsc. Conf Physical Sciences, pp233-234.
  4. 笠原秀浩, 有井達夫, 鈴木武雄, 鶴原 喬 (2000) Acanthamoeba の低真空 SEM および超高圧 TEM 観察. 原生動物学雑誌 (Jpn. J. Protoz.) 33: 61.

## 《生体情報処理室》

(1) 英文原著論文

1. Tsubokawa H, Offermanns S, Simon M, Kano M (2000) Calcium-dependent persistent facilitation of spike backpropagation in the CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 20: 4878-84.
2. Sahara Y, Gotoh M, Konno K, Miwa A, Tsubokawa H, Robinson H P, Kawai N (2000) A new class of neurotoxin from wasp venom slows inactivation of sodium current.

*Eur J Neurosci* 12: 1961-70.

(2) その他

1. 坪川 宏 (2000) 樹状突起活動電位. *脳の科学* 22 : 85-90.
2. 川合 述史, 坪川 宏, 小黒 恵司 (2000) 虚血性神経細胞死における受容体変化. *蛋白質 核酸 酵素* 45: 507-514.

## 《機能情報解析室》

(1) 英文原著論文

1. Mori M, Konno T, Ozawa T, Murata M, Imoto K, Nagayama K (2000) Novel Interaction of the Voltage-Dependent Sodium Channel (VDSC) with Calmodulin: Does VDSC Acquire Calmodulin Mediated  $Ca^{2+}$ -Sensitivity?. *Biochemistry* 39: 1316-1323.
2. Konno T, Kamatari Y, Tanaka N, Kamikubo H, Dobson M. C, Nagayama K (2000) A partially unfolded structure of the alkaline-denatured state of pepsin and its implication for stability of the zymogen-derived protein. *Biochemistry* 39: 4182-4190.
3. Konno T, Iwashita J, Nagayama K (2000) Fluorinated

alcohol, the third group of cosolvents that stabilize the molten-globule state relative to a highly denatured state of cytochrome c. *Protein Sci* 9: 564-569.

4. Häckel Marko, Konno T, Hinz Hans-Jürgen (2000) A new alternative method to quantify residual structure in "unfolded" proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1479: 155-165.
5. Tanaka, Ikeda C, Kanaori K, Hiraga K, Konno T, Kunugi S (2000) Pressure effect on the conformational fluctuation of apomyoglobin in the native state. *Biochemistry* 39: 12063-12068.

## 《動物実験センター》

(1) 英文原著論文

1. Kato K, Furuya K, Tsutsui I, Ozaki T, Yamagishi S (2000) Cyclic AMP-mediated inhibition of noradrenaline-induced contraction and  $Ca^{2+}$  influx in guinea-pig vas deferens. *Experimental Physiology* 85:387-398.
2. Naruse S, Wang Y, Kitagawa M, Ishiguro H, Seki Y, Ozaki T, Hayakawa T (2000) Long-Term Effects of Nafamostat and Imipenem on Experimental Acute Pancreatitis in Rats. *Pancreas* 21: 290-295.
3. Yamazaki Y, Yagi T, Ozaki T, Imoto K (2000) In Vivo Gene Transfer to Mouse Spermatogenic Cells Using Green Fluorescent Protein as a Marker *J. Exp. Zoology*

286: 212-218.

4. Furuya S, Hiroe T, Ozaki T, Takimoto M, Hori S (2000) Localization of endothelin A receptors in the rat pituitary TSH cells: Light- and electron-microscopic immunohistochemical studies. *Cell Tissue Res* 302: 85-94.

(2) その他

1. 小木曾 昇, 廣江 猛, 山崎由起子 (2000) マウス胚と精子の凍結保存法. 羊土社「別冊実験医学 ジーンターゲットングの最新技術」: 96-114.

## b . 学会発表

## 〔 目 次 〕

神経化学研究部門 .....	94
超微小形態生理研究部門 .....	94
細胞内代謝研究部門 .....	96
生体膜研究部門 .....	97
機能協関研究部門 .....	98
神経情報研究部門 .....	99
液性情報研究部門 .....	100
高次神経機構研究部門 .....	101
情報記憶研究部門 .....	101
高次神経性調節研究部門 .....	102
生体システム研究部門 .....	103
高次液性調節研究部門 .....	104
脳形態解析研究部門 .....	105
大脳神経回路論研究部門 .....	105
心理生理学研究部門 .....	105
高次脳機能研究プロジェクト .....	107
感覚・運動機能研究プロジェクト .....	108
形態情報解析室 .....	109
生体情報処理室 .....	110
動物実験センター .....	110

## 学 会 発 表

### 《神経化学研究部門》

1. 小幡邦彦(2000.3) 動物と人間で共通な脳のはたらき．世界脳週間 in 岡崎(岡崎).
2. 柳川右千夫, 季 鳳雲, 蒔苗公利, 小幡邦彦(2000.3) 神経発生とヴェシクル型 GABA トランスポーター．第 77 回日本生理学会(横浜).
3. 小幡邦彦(2000.3) GABA の初期発生へのかかわり．第 77 回日本生理学会サテライトシンポジウム「ニューロバイオロジー」(東京).
4. 常川直子, 丁 日高, 小幡邦彦(2000.9) 口蓋形成における GABA の役割．第 23 回日本神経科学大会(横浜).
5. 関野祐子, 張 捷, 加藤邦夫, 池田真行, 小幡邦彦, 白尾智明(2000.9) アデノシン A<sub>1</sub> 受容体による海馬 C A<sub>2</sub> 領域に特異的な興奮伝播制御．第 23 回日本神経科学大会(横浜).
6. 柳川右千夫, 海老原利枝, 蒔苗公利, 小幡邦彦(2000.9) マウスヴェシクル型 GABA トランスポーター遺伝子の構造と発現調節機構．第 23 回日本神経科学大会(横浜).
7. 兼子幸一, 小幡邦彦(2000.9) グルタミン酸脱炭酸酵素 65 ノックアウトマウス扁桃体外側核における興奮性シナプス伝達の亢進．第 23 回日本神経科学大会(横浜).
8. 蒔苗公利, 小幡邦彦, 柳川右千夫(2000.9) マウス脳発生過程におけるヴェシクル型 G A B A トランスポーターの発現．第 23 回日本神経科学大会(横浜).
9. Ding R, Tsunekawa N, Kaneko K, Kanbara N, Asada H, Obata K (2000.11) Cleft palate induced by GABA deficiency in mice. 30th Annual Meeting of Society for Neuroscience (New Orleans, USA).
10. Kaneko K, Obata K (2000.11) An increase in excitatory synaptic transmission in the lateral amygdala of adult GAD65 knockout mice. 30th Annual Meeting of Society for Neuroscience (New Orleans, USA).
11. Makinae K, Obata K, Yanagawa Y (2000.11) Developmental expression of vesicular GABA transporter in mouse brain. 30th Annual Meeting of Society for Neuroscience (New Orleans, USA).
12. Stork O, Stork S, Pape HC, Obata K (2000.11) Differential gene-expression in the amygdala during consolidation of fear memory. 30th Annual Meeting of Society for Neuroscience (New Orleans, USA).

### 《超微小形態生理研究部門》

1. 永山國昭 (2000.3) “小さな自然の大きな世界” - サイエンスレンジャー講演に見る子供たちの反応．春期第 47 回応用物理学関係連合講演会 (東京).
2. Kuniaki Nagayama (2000.5) Complex Electron Microscopy- A New Biophysical Tool for Molecular and Cellular Physiology. Third East Asian Biophysics Symposium (Korea).
3. 今野卓, 鎌足雄司, 田中直毅, C.Dobson, 永山國昭 (2000.6) ペプシンのアルカリ変性状態の構造．蛋白合同年会 東京 2000(第 51 回タンパク質構造討論会, 第 12 回日本蛋白工学会年会, 第 7 回タンパク質立体構造の構築原理ワークショップ)(東京).
4. 高橋卓也, 永山國昭 (2000.6) 蛋白質熱変性シミュレーションにおける溶媒の変性過程への影響．蛋白合同年会 東京 2000(第 51 回タンパク質構造討論会, 第 12 回日本蛋白工学会年会, 第 7 回タンパク質立体構造の構築原理ワークショップ)(東京).
5. 森誠之, 今野卓, 井本敬二, 永山國昭 (2000.6) Apocalmodulin と IQ モチーフペプチドの結合部位の同定．蛋白合同年会 東京 2000(第 51 回タンパク質構造討論会, 第 12 回日本蛋白工学会年会, 第 7 回タンパク質立体構造の構築原理ワークショップ)(東京).
6. ダネフ・ラドスチン, 杉谷正三, 大河原浩, 村田和義, 永山國昭 (2000.6) 複素電子顕微鏡 II - コントラストおよび分解能向上の定量解析．蛋白合同年会 東京 2000(第 51 回タンパク質構造討論会, 第 12 回日本蛋白工学会年会, 第 7 回タンパク質立体構造の構築原理ワークショップ)(東京).

7. Nagayama K, Danev R, Okawara H, Murata K (2000.6) Complex Electron Microscopy Surmounting The Scherzer Limit. 7th Asia-Pacific Electron Microscopy Conference "Perspective Imaging" (Singapore).
8. Nagayama K, Danev R, Sugitani S, Okawara H, Nagayama K (2000.6) Aberration-free Electron Phase Microscopy. 7th Asia-Pacific Electron Microscopy Conference "Perspective Imaging" (Singapore).
9. Majorovits E, Nagayama K, Schroeder R R (2000.7) Assessment of the experimental constraints for phase contrast EM and complex object reconstruction. 12th European Congress on Electron Microscopy (Czech Republic).
10. Nagayama K, Danev R, Okawara H, Murata K (2000.7) Complex electron microscopy. 12th European Congress on Electron Microscopy (Czech Republic).
11. 今野卓, 岩下潤, 永山國昭 (2000.9) 低濃度フッ素アルコールによる cytochrome c のコンパクトな変性状態の特異的安定化. 日本生物物理学会第 38 回年会 (宮城).
12. 永山國昭 (2000.9) 生命・情報系の究極的測定システム. 日本生物物理学会第 38 回年会 (宮城).
13. 高橋卓也, 永山國昭 (2000.9) Protein G B1 domain の熱変性シミュレーションにおける溶媒の寄与. 日本生物物理学会第 38 回年会 (宮城).
14. 永山國昭 (2000.9) Complex Electron Microscopy-Toward the Single Molecule Structural Analysis. The Nagoya COE-RCMS Conference (名古屋)
15. 永山國昭 (2000.9) 電子顕微鏡の新しい波 - 1 分子構造解析への道. 分子構造総合討論会 (東京).
16. 永山國昭 (2000.11) 位相差電子顕微鏡と複素観測. 日本電子顕微鏡学会第 45 回シンポジウム (岡崎).
17. Murata M, (2000.10) MEK and Cdc2 kinase are sequentially required for Golgi disassembly in MDCK cells by the mitotic Xenopus extracts. 第 73 回日本生化学会大会シンポジウム「脂質超分子形成と膜のトポジェネシス」(横浜).
18. 村田昌之 (2000.10) GFP 可視化技術とセミインタクト細胞系を用いたオルガネラ膜ダイナミクスの研究. 第 53 回日本細胞生物学会大会シンポジウム「細胞機能を見て, 知る」(博多).
19. 加納ふみ 村田昌之 (2000.11) セミインタクト MDCK 細胞を用いた M 期ゴルジ体ディスアッセンブリー過程の再構成. 第 53 回日本細胞生物学会大会シンポジウム「小胞体-ゴルジ体のメンブレン・トラフィックとバイオジェネシス」(博多).
20. 村田昌之 (2000.12) セミインタクト CHO 細胞を用いた, 単一細胞内での ER—ゴルジ体間小胞輸送過程の再構成とその解析. 第 23 回日本分子生物学会年会シンポジウム「細胞内の分子識別と輸送のメカニズム」(神戸).
21. 村田昌之 (2000.12) セミインタクト細胞を用いたオルガネラバイオジェネシスの研究. 第 41 回日本組織細胞化学会総会・学術集会シンポジウム「生体膜の構造と機能解析」(高知).
22. 加納ふみ, 佐甲靖志, 多賀谷光男, 柳田敏雄, 村田昌之 (2000.10) セミインタクト CHO 細胞における BFA 誘導によるゴルジチューブ形成と ER 膜との融合過程の再構成 第 73 回日本生化学会大会(横浜).
23. 加納ふみ, 近藤久雄, 細川暢子, 永田和宏, 村田昌之 (2000.12) 小胞体ネットワークの細胞周期依存的膜ダイナミクスの再構成. 第 23 回日本分子生物学会年会 (神戸).
24. 広田毅, 鍵和田聡, 笠原和起, 岡野俊行, 村田昌之, 深田吉孝 (2000.10) プレフェルジン A を用いたニワトリ松果体細胞のメラトニン分泌機構の解析. 第 73 回日本生化学会大会一般講演 (ポスター)(横浜).
25. Hirota T, Kagiwada S, Kasahara T, Okano T, Murata M, Fukada Y (2000.8) Effect of brefeldin A on melatonin secretion of chick pineal cells. Gordon Research Conference on Pineal Cell Biology 一般講演 (ポスター)(Oxford, UK).
26. 石堂 美和子, 山本 章嗣, 北村 俊雄, 永山 國昭, 大橋 正人 (2000.10) 後期エンドソームからトランスゴルジネットワークへの輸送におけるコレステロールの必要性. 第 53 回日本細胞生物学会大会 (福岡).
27. 大橋正人, 石堂美和子, 山本章嗣, 北村 俊雄, 永山國昭 (2000.10) 後期エンドソーム変異株 LEX2 の発現クローニング法による解析. 第 73 回日本生化学会大会 (横浜).
28. 松本友治, 村田和義, 大河原浩, 國安明彦, 中山仁, 永山國昭 (2000.11) 位相差電子顕微鏡によるリアノジン受容体の一分子観察. 日本電子顕微鏡学会第 45 回シンポジウム (岡崎).
29. 村上政隆, 吉村啓一, 瀬川彰久, Loffredo F, Riva A (2000.3) 灌流ラット耳下腺唾液分泌と細胞間分泌細

- 管形態の関係 . 第 77 回日本生理学会大会 ( 日吉 ).
30. 吉村啓一, 村上政隆 ( 2000.3 ) 耳下腺開口分泌における分泌顆粒の priming には二つの過程がある . 第 77 回日本生理学会大会 ( 日吉 ).
  31. 古山富士弥, 大岩隆則, 村上政隆, 西野仁雄 ( 2000.3 ) 温熱性唾液分泌遺伝的高進への顎下腺の関与の有無 . 第 77 回日本生理学会大会 ( 日吉 ).
  32. Murakami M, Yoshimura K, Sugiya H, Segawa A, Loffredo F, Testa-Riva F, Riva A ( 2000.4 ) Fluid and amylase secretion by perfused parotid gland: physio-morphological approach. International symposium on Exocrine Glands (Seoul, Korea).
  33. Riva A, Murakami M ( 2000.5 ) Fluid and protein secretion by perfused salivary glands: physio-morphological approach. (part 1) 3<sup>rd</sup> meeting of International Collaborative Research Project on Coupling Mechanisms of Fluid Secretion and Exocytosis (Okazaki)
  34. Murakami M, Seo Y ( 2000.5 ) NMR studies on electrolyte transport and energy metabolism in salivary gland. Symposium on Membrane Transport in Health and Disease at Physiological Society of Thailand (Phitsanulok, Thailand ).
  35. Murakami M, Riva A, Segawa A, Yoshimura K, Sugiya H ( 2000.9 ) Fluid and protein secretion by perfused salivary glands: physio-morphological approach (part 2). 3<sup>rd</sup> meeting of International Collaborative Research Project on Coupling Mechanisms of Fluid Secretion and Exocytosis (Okazaki).
  36. 村上政隆 ( 2000.12 ) 臓器灌流法による水・イオン輸送及びタンパク分泌機構へのアプローチ . 第 44 回日本唾液腺学会シンポジウム ( 東京 ).

### 《細胞内代謝研究部門》

1. Mohri T, Oda S, Sato M, Miyazaki S ( 2000.3 ) Analysis of  $Ca^{2+}$  influx and  $Ca^{2+}$  oscillations in mouse eggs. 第 77 回日本生理学会大会 ( 横浜 ).
2. Kobori H, Kuwabara Y, Miyazaki S ( 2000.3 )  $Ca^{2+}$  responses to progesterone and cyclic nucleotides in mouse spermatozoa. 第 77 回日本生理学会大会 ( 横浜 ).
3. Shirakawa H, Miyazaki S ( 2000.3 ) Optical measurement of endoplasmic reticulum membrane potential during  $Ca^{2+}$  release. 第 77 回日本生理学会大会 ( 横浜 ).
4. Ogata M, Awaji T, Iwasaki, N, Iwamoto Y, Miyazaki S ( 2000.3 ) Functional studies of wild-type and mutant HNF-4 in living cells. 第 77 回日本生理学会大会 ( 横浜 ).
5. Miyazaki S ( 2000.3 )  $Ca^{2+}$  signal and egg activation. 第 77 回日本生理学会大会 ( 横浜 ).
6. 小堀宏之, 桜井明弘, 佐藤雄一, 中野義宏, 武内裕之, 桑原慶紀, 宮崎俊一 ( 2000.4 ) Progesterone および cyclic nucleotide によって誘起される精子細胞内  $Ca^{2+}$  増加反応の解析. 第 52 回日本産婦人科学会 ( 徳島 ).
7. 白川英樹, 宮崎俊一 ( 2000.9 )  $IP_3$  誘発性 Ca 遊離に伴う小胞体膜電位変化. 第 38 回日本生物物理学会 ( 仙台 ).
8. 毛利達磨, 白川英樹, 尾田正二, 佐藤真, 御子柴克彦, 宮崎俊一 ( 2000.10 ) 精子抽出物顕微注入による  $Ca^{2+}$  振動時のマウス卵の  $Ca^{2+}/Mn^{2+}$  ダイナミックス . 第 53 回日本細胞生物学会大会 ( 福岡 ).
9. Miyazaki S ( 2000.11 ) Cell signaling in early development. Seiriken Internatl Symp on Mechanisms of Cell Signaling in Early Development (Okazaki, Japan).
10. Deguchi R ( 2000.11 ) Spatiotemporal patterns of  $Ca^{2+}$  increases at fertilization in bivalve and mouse eggs. Seiriken Internatl Symp on Mechanisms of Cell Signaling in Early Development (Okazaki).
11. Mohri T ( 2000.11 )  $Ca^{2+}/Mn^{2+}$  influx and release during  $Ca^{2+}$  oscillations in mouse eggs. Seirilen Internatl Symp on Mechanisms of Cell Signaling in Early Development (Okazaki).
12. Deguchi R, Shirakawa H, Oda S, Mohri T, Miyazaki S ( 2000.11 ) Spatiotemporal analysis of  $Ca^{2+}$  waves during  $Ca^{2+}$  oscillations in fertilized mouse eggs. Seiriken Internatl Symp on Mechanisms of Cell Signaling in Early Development (Okazaki).
13. Shirakawa H, Mohri T, Miyazaki S ( 2000.11 ) Numerical simulation for  $Mn^{2+}$  quenching of fura-2 during  $Ca^{2+}$  oscillations in mouse eggs. Seiriken Internatl Symp on Mechanisms of Cell Signaling in Early Development (Okazaki).

14. Shirakawa H, Miyazaki S (2000.11) Dual-wavelength ratiometric fluorescence measurement of endoplasmic reticulum membrane potential using voltage-sensitive dyes. Seiriken Internatl Symp on Mechanisms of Cell Signaling in Early Development (Okazaki).
15. Sato M, Yoshitomo M, Mohri T, Sakurai A, Miyazaki S (2000.11)  $Ca^{2+}$  dynamics in mouse eggs after ICSI. Seiriken Internatl Symp on Mechanisms of Cell Signaling in Early Development (Okazaki).
16. Ogonuki N, Sankai T, Yagami K, Shikano T, Oda S, Miyazaki S, Ogura A (2000.11) Activity of a sperm-borne oocyte-activating factor in sperm and spermatogenic cells from cynomolgus monkeys and its localization after oocyte activation. Seiriken Internatl Symp on Mechanisms of Cell Signaling in Early Development (Okazaki).
17. Kaji K, Oda S, Shikano T, Ohnuki T, Uematsu Y, Sakagami J, Tada N, Miyazaki S, Kudo A (2000.11) Cd9 on mouse egg microvilli participates in sperm-egg fusion. Seiriken Internatl Symp on Mechanism of Cell Signaling in Early Development (Okazaki).
18. Mohri T, Shirakawa H, Oda S, Sato MS, Mikoshiba K, Miyazaki S (2000.12)  $Ca^{2+}/Mn^{2+}$  dynamics during  $Ca^{2+}$  oscillations in mouse eggs injected with sperm extract. 40th Annual Meeting of American Society for Cell Biology (San Francisco, USA).
19. Yada T, Muroya S, Takigawa M (2000.3) Insulin activates glucose-responsive neurons in the mediobasal hypothalamus. 第 77 回日本生理学会大会 (横浜).
20. Uramura K, Yada T, Muroya S, Takigawa S (2000.3) Orexins activate  $Ca^{2+}$  signaling in dopamine neurons in the ventral tegmental area. 第 77 回日本生理学会大会 (横浜).
21. 矢田俊彦, 副島典子, 室屋真二, 滝川守国 (2000.5) 摂食中枢応答ニューロンのインスリンによる活性化とシグナル伝達 第 43 回日本糖尿病学会 (名古屋).
22. 矢田俊彦, 加計正文, 中崎満浩, 八重倉和朗, 鄭忠和 (2000.0) ミトコンドリアと小胞体によるカルシウムシグナリングと分泌の制御ムインスリン分泌-細胞を例として. 第 73 回日本薬理学会シンポジウム (横浜).
23. 中田正範, 矢田俊彦, 加計正文 (2000.3) HMG-CoA 還元酵素阻害薬による膵細胞  $Ca^{2+}$  チャネル・ $Ca^{2+}$  シグナリング・インスリン分泌の抑制. 第 73 回日本薬理学会シンポジウム (横浜).
24. 矢田俊彦, 室屋真二, 塩田清二, 桜井武, 滝川守国 (2000.3) 摂食調節物質オレキシン, レプチンの神経情報伝達経路とクロストーク. 第 105 回日本解剖学会シンポジウム (横浜).
25. 舟橋久幸, 矢田俊彦, 塩田清二 (2000.3) 視床下部における摂食中枢, 満腹中枢の機能形態学. 第 105 回日本解剖学会 (横浜).
26. 矢田俊彦, 室屋真二, 滝川守国, 塩田清二, 桜井武 (2000.3) レプチン・オレキシン・NPY の摂食情報伝達経路と POMC の役割. 第 27 回日本神経内分泌学会シンポジウム (神戸).

## 《生体膜研究部門》

1. 根本知己, 木村良一, 立川光, 伊藤公一, 飯野正光, 宮下保司, 河西春郎 (2000.3) 多光子励起法による外分泌腺開口放出の可視化. 第 77 回日本生理学会 (東京).
2. 高橋倫子, 門脇孝, 河西春郎 (2000.5) インスリンのカルシウム非依存的分泌と Ca/PKA センサー機構. 第 43 回糖尿病学会 (名古屋).
3. 久木田文夫 (2000.6) チャネルポアの 3 次元構造に基づく「水の効果」の検討. 第 38 回日本生物物理学会年会 (仙台).
4. Kasai H (2000.7) Quantitative  $Ca^{2+}$  imaging of cerebellar Purkinje neurons and their  $Ca^{2+}$  buffers. 総合脳国際ワークショップ (岡崎).
5. 松崎政紀, Graham C. R. Ellis-Davies, 宮下保司, 飯野正光, 河西春郎 (2000.8) 2 光子励起法による小脳プルキンエ細胞のグルタミン酸感受性の空間的高解像度解析. 第 23 回日本神経科学大会 (横浜).
6. 中西圭子, 久木田文夫 (2000.8) 培養大脳皮質ニューロンの自発同調活動に対する細胞内 Cl<sup>-</sup>濃度の影響. 第 23 回日本神経科学学会 (横浜).
7. Matsuzaki M, Tachikawa A, Ellis-Davies GCR, Miyashita Y, Iino M, Kasai H (2000.11) Two-photon functional

- mapping of glutamate receptors in living hippocampal neurons. Soc. Neurosci. (New Orleans) .
8. 河西春郎 (2000.11) カルシウム結合蛋白質によるカルシウムシグナルの統合 . 第 73 回日本生化学会大

会 (横浜) .

9. 河西春郎, 根本知己, 高橋倫子, 松崎正紀 (2000.12) 多光子励起法による新しい生体機能解析 . レーザー顕微鏡研究会 (東京) .

## 《機能協関研究部門》

1. Okada Y (2000.1) Roles of anion channel and ABC transporter in cell volume regulation. International Symposium on the Role of Transporters in the Host Defense Mechanism (Tokyo, Japan).
2. 前野恵美, 金関 恵, 岡田泰伸 (2000.1) 浸透圧性細胞収縮によるアポトーシスの誘導 . 第 46 回中部日本生理学会 (Nagoya, Japan).
3. Maeno E, Kanaseki T, Ishizaki Y, Okada Y (2000.3) Role of cell shrinkage in apoptotic cell death. 第 77 回日本生理学会大会 (Yokohama, Japan).
4. Dezaki K, Maeno E, Okada Y (2000.3) Fluorescence measurements of intracellular  $\text{Cl}^-$  concentration during cell apoptosis. 第 77 回日本生理学会大会 (Yokohama, Japan).
5. Shimizu T, Morishima S, Okada Y (2000.3) Regulation signaling of volume-sensitive  $\text{Cl}^-$  channels: Involvement of  $\text{Ca}^{2+}$ -sensing receptors. 第 77 回日本生理学会大会 (Yokohama, Japan).
6. Morishima S, Zhang W-J, Ohara M, Okada Y (2000.3) Nuclear volume regulation under hypotonic conditions observed by multi-photon laser microscopy *in vivo*. 第 77 回日本生理学会大会 (Yokohama, Japan) .
7. Sabirov R, Lapointe J-Y, Bell PD, Okada Y (2000.3) Patch-clamping macula densa: a nifedipine-sensitive Ca-activated cation channel. 第 77 回日本生理学会大会 (Yokohama, Japan).
8. Okada Y, Lapointe J-Y, Sabirov RZ, Hayashi S, Bell PD (2000.3) A maxi- $\text{Cl}^-$  channel in macula densa cells and its role in ATP release. 第 77 回日本生理学会大会 (Yokohama, Japan).
9. Okada Y, Sabirov RZ, Hayashi S, Lapointe J-Y, Bell PD (2000.3) A  $\text{Cl}^-/\text{ATP}$  channel in macula densa cells as a  $\text{Na}^+$  sensor. 第 77 回日本生理学会大会 (Yokohama, Japan).
10. Peti-Peterdi J, Morishima S, Miyoshi T, Bell PD,

Okada Y (2000.4) Macula densa cell water transport assessed by two-photon laser scanning microscopy. Experimental Biology 2000 (San Diego, USA).

11. Bell PD, Lapointe J-Y, Sabirov R, Hayashi S, Okada Y (2000.4) Maxi-chloride channel in macula densa cells: possible pathway for ATP release. Experimental Biology 2000 (San Diego, USA).
12. Morishima S, Zang W-J, Ohara M, Okada Y (2000.4) Cell volume measurements by the two-photon laser imaging system. Experimental Biology 2000 (San Diego, USA).
13. Shimizu T, Morishima S, Okada Y (2000.4) Extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of swelling-activated  $\text{Cl}^-$  currents. In relation to  $\text{Ca}^{2+}$ -sensing receptor. Experimental Biology 2000 (San Diego, USA).
14. Okada Y (2000.6) Volume-sensitive chloride channels and cell volume regulation. Symposium on Sensors and effectors in cell volume regulation and their physiological role in secreting epithelia. The 21<sup>st</sup> Congress of the European Society for Comparative Physiology and Biochemistry (Liege, Belgium).
15. 岡田泰伸 (2000.7) 細胞容積調節に關与する容積センサーチャンネルとレセプター . 第 18 回内分泌・代謝学サマーセミナー (Chitose, Japan).
16. Okada Y (2000.9) Volume-activated ATP release. XXth Congreso Latinoamericano de Ciencias Fisiologicas (Cancun, Mexico).
17. 真鍋健一, 出崎克也, 森島繁, 岡田泰伸 (2000.10) カルバコール刺激による大腸上皮 T84 細胞の形態変化と  $\text{Ca}^{2+}$  動員 . 第 47 回中部日本生理学会 (Kanazawa, Japan).
18. 森信一郎, 森島繁, 岡田泰伸 (2000.10) 神経系培養細胞における容積感受性クロライド電流 . 第 47 回中部日本生理学会 (Kanazawa, Japan).
19. Abdullaev I, Sabirov R, Dezaki K, Okada Y (2000.10)

Volume-sensitive  $Cl^-$  currents in C127 cells stably transfected with CFTR. 第 47 回中部日本生理学会 (Kanazawa, Japan).

20. Maeno E, Kanaseki T, Ishizaki Y, Okada Y (2000. 11)

Normotonic cell shrinkage is an early prerequisite to apoptotic cell death. 第 53 回日本細胞生物学会大会 (Fukuoka, Japan).

## 《神経情報研究部門》

1. 中平健祐, 柴田理一, 柴崎貢志, 池中一裕 (2000.3) 電位依存性カリウムチャンネルと小脳顆粒細胞の成熟過程. 第 77 回日本生理学会大会 (横浜).
2. 馬場広子, 飛田秀樹, 池中一裕, 西野仁雄 (2000.3) 高力価レトロウィルスを用いた神経幹細胞への遺伝子導入. 第 77 回日本生理学会大会 (横浜).
3. 池中一裕 (2000.3) ランビエ絞輪周辺への電位依存性カリウムチャンネル集積機構とその生理的意義. 第 5 回大阪大学蛋白質研究所 COE セミナー (大阪).
4. 池中一裕 (2000.3) 中枢ミエリン形成細胞の発生と分化. 第 77 回日本生理学会大会サテライトシンポジウム (東京).
5. 池中一裕 (2000.6) Glial development in the rodent central nervous system. 日本生化学会春季シンポジウム (福岡).
6. Wada T, Kagawa T, Ivanova A, Zalc B, Shirasaki R, Murakami F, Iemura S, Ueno N, Ikenaka K (2000.7) Dorsal spinal cord inhibits oligodendrocyte development. Gordon Research Conference (Rhode Island, USA).
7. Wada T, Kagawa T, Zalc B, Shirasaki R, Murakami F, Ikenaka K (2000.8) Dorsal spinal cord inhibits oligodendrocyte development. International Society Developmental Neuroscience (Heidelberg, Germany).
8. 柴崎貢志, 柴田理一, 中平健祐, 池中一裕 (2000.9) 発達期小脳顆粒細胞における電位依存性  $K^+$  チャンネルの局在化機構. 第 23 回日本神経科学大会・第 10 回日本神経回路学会大会合同大会 (横浜).
9. 柴田理一, 中平健祐, 柴崎貢志, 池中一裕 (2000.9) 小脳顆粒細胞の分化過程における  $K^+$  チャンネルの役割. 第 23 回日本神経科学大会・第 10 回日本神経回路学会大会合同大会 (横浜).
10. 秋田裕美, 中平健祐, 鹿川哲史, 池中一裕 (2000.9) 脱髄性疾患における神経細胞異常の分子病態. 第 23 回日本神経科学大会・第 10 回日本神経回路学会大会合同大会 (横浜).
11. 中平健祐, 佐々木学, 河野洋三, 吉峰俊樹, 清水恵司, 池中一裕 (2000.9) グリオーマに強発現する遺伝子 MAGE-E1 のクローニングと解析. 第 23 回日本神経科学大会・第 10 回日本神経回路学会大会合同大会 (横浜).
12. 大竹洋介, 田中文啓, 和田洋巳, 池中一裕 (2000.10) 非小細胞肺癌患者血清特異的 N 結合型糖蛋白糖鎖の検索. 第 59 回日本癌学会総会 (横浜).
13. 佐々木学, 河野洋三, 吉峰俊樹, 清水恵司, 池中一裕 (2000.10) SAGE プロファイルでグリオーマ特異的に発現していた新規遺伝子 MAGE-E1 のクローニング. 第 59 回日本癌学会総会 (横浜).
14. 池中一裕, 長谷純宏 (2000.10) 脳内 N 結合型糖鎖の発現と機能. 第 73 回日本生化学会大会 (横浜).
15. 穴栗政行, 福原俊介, 中北慎一, 長束俊治, 池中一裕, 長谷純宏 (2000.10) マウス脳特異的糖鎖に対するレセプターの検索. 第 73 回日本生化学会大会 (横浜).
16. 中北慎一, 長束俊治, MENON, Krishna K, 池中一裕, 長谷純宏 (2000.10) マウス脳特異的糖鎖とその生合成に関与する“脳型”ガラクトース転移酵素. 第 73 回日本生化学会大会 (横浜).
17. 池中一裕 (2000.10) グリア細胞の機能と起源の多様性. 第 43 回日本神経化学学会大会 (金沢).
18. 鹿川哲史, 斎藤哲一郎, 和田圭樹, 中平英子, 池中一裕 (2000.10) HLH 型転写因子によるオリゴデンドロサイト発生分化の調節. 第 43 回日本神経化学学会大会 (金沢).
19. 長谷川明子, 岩崎靖乃, 山田真久, 小川正晴, 池中一裕 (2000.10) システインプロテアーゼインヒビターによるアストロサイトの分化誘導機構の解明. 第 43 回日本神経化学学会大会 (金沢).
20. 中平英子, 鹿川哲史, 和田圭樹, 池中一裕 (2000.10) 中枢神経系におけるオリゴデンドロサイト前駆細胞発生の起源. 第 43 回日本神経化学学会大会 (金沢).

21. 石橋智子, 池前一裕, 平原幸恵, 本家孝一, 西野仁雄, 馬場広子 (2000.10) 有軸索上の電位依存性 Na<sup>+</sup> および K<sup>+</sup> channel 局在におけるスルファチドの重要性. 第 43 回日本神経化学学会大会 (金沢).
22. Nakakita S, Ikenaka K, Hase S (2000.10) Detection of tissue specific sugar chains by a 2-dimensional HPLC sugar mapping of pyridylaminated sugar chains. 弘前国際医学フォーラム (弘前).
23. 長谷川明子, 岩崎靖乃, 山田真久, 小川正晴, 池前一裕 (2000.11) システインプロテアーゼの内因性阻害因子によるアストロサイトの分化誘導機構. 第 5 回グリア研究会 (名古屋).
24. 佐々木学, 中平健祐, 河野洋三, 吉峰俊樹, 清水恵司, Seung U. Kim, 池前一裕 (2000.11) グリオーマ特異的に強く発現する遺伝子 MAGE-E1 のクローニングと発現. 第 5 回グリア研究会 (名古屋).
25. 佐々木学, 中平健祐, 河野洋三, 森内秀祐, 宮尾泰慶, 清水恵司, 吉峰俊樹, 池前一裕 (2000.11) グリオーマに特異的に強く発現していた melanoma-associated antigen gene family にホモロジーのある新規遺伝子 MAGE-E1 のクローニング. 第 5 回グリア研究会 (名古屋).
26. 馬場広子, 石橋智子, 西野仁雄, 池前一裕 (2000.11) オリゴデンドロサイトによる軸索タンパクの局在化調節. 第 5 回グリア研究会 (名古屋).
27. 池前一裕 (2000.11) グリオーマ: 高力価レトロウイルスによる遺伝子治療. 第 13 回日本ヒト細胞学会・秋期国際シンポジウム (新潟).

## 《液性情報研究部門》

1. Protaso F, Franzini-Armstrong C, Takekura H, Wang Y, Nakai J, Allen PD (2000.2) The RYR1 2659-3720 (R9) region is sufficient to restore RYR-DHPR link. Biophysical Society 44th Annual Meeting (New Orleans).
2. O'Brien JJ, Proenza C, Nakai J, Allen PD, Beam KG (2000.2) Role of RYR1 residues 1837-2154 in reciprocal communication with 1s. Biophysical Society 44th Annual Meeting (New Orleans).
3. Ohkura M, Imoto K, Nakai J (2000.2) Sorting signal sequence of triadin, an associated protein of ryanodine receptor/ Ca<sup>2+</sup> release channel. Biophysical Society 44th Annual Meeting (New Orleans).
4. 若森実, 山田久信, 岡田峯陽, 井本敬二, 森泰生 (2000.3) HEK293 細胞に発現させた TRP5 チャネルの自発活性の解析. 第 73 回日本薬理学会年会 (横浜).
5. 原雄二, 工藤純, 清水信義, 井本敬二, 森泰生 (2000.3) マウス TRPC7 ホモログの分子機能解析. 第 73 回日本薬理学会年会 (横浜).
6. 森泰生, 若森実 (2000.3) 受容体活性化 TRP Ca<sup>2+</sup> 透過チャネルの Ca<sup>2+</sup> センサー機能. 第 77 回日本生理学会大会 (横浜).
7. 若森実, 森泰生, 井本敬二 (2000.3) 小脳変性症マウスのカルシウムチャネル. 第 77 回日本生理学会大会 (横浜).
8. 井本敬二, 若森実, 森泰生 (2000.3) 電位依存性 Ca<sup>2+</sup> チャネルと神経疾患. 第 77 回日本生理学会大会 (横浜).
9. Nakai J, Ohkura M, Beam KG (2000.6) Excitation-Contraction coupling depends on conformational change not reflected in charge movement. Gordon Research Conference (New England, New Hampsher).
10. 神吉秀明, 木下真理子, 赤池明紀, 佐藤公道, 森泰生, 金子周司 (2000.9) マウス TRP5 チャネルの IP<sub>3</sub> 受容体活性化による開口. 第 23 回日本神経科学学会・第 10 回日本神経回路学会合同大会 (横浜).
11. 松下かおり, 若森実, 森泰生, 織田銃一, 松山善次郎, 井本敬二 (2000.9) Rolling Nagoya における P 型 Ca<sup>2+</sup> チャネル活性の変化. 第 23 回日本神経科学学会・第 10 回日本神経回路学会合同大会 (横浜).
12. 森泰生 (2000.10) PI 応答に関連したカルシウムチャネル群の分子実体と機能. 第 73 回日本生化学学会大会 (横浜).
13. 南和志, Seagar MJ, 大竹敦子, 高橋正身, 森泰生, 佐藤一紀 (2000.10) P/Q 型 Ca チャネル特異的-conotoxin MVIIC アナログ合成のための Thr11 置換. 第 73 回日本生化学学会大会 (横浜).
14. 大倉正道, 井本敬二, 中井淳一 (2000.10) リアノジンリセプター/カルシウム遊離チャネルの付随蛋白であるトリアジンのソーティングシグナル配列. 第 73 回日本生化学学会大会 (横浜).

15. 森誠之, 今野卓, 永山國昭, 井本敬二 (2000.10) Calmodulin と IQ モチーフ peptide (NaIQ) の相互作用の解析. 第 73 回日本生化学会大会 (横浜).
16. 佐々木大介, 清水俊一, 内藤慎二, 森泰生, 木内祐二 (2000.10) NO による転写因子 Ets-1 発現促進における細胞内  $Ca^{2+}$  の役割. 第 73 回日本生化学会大会 (横浜).
17. Kang MG, Chen CC, Felix R, Letts VA, Frankel WN, Mori Y, Campbell KP (2000.11) Inhibition of neuronal voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels by  $\alpha_2$  subunit. Society for Neuroscience 30th Annual Meeting (New Orleans).
18. Yoshinaga T, Ino M, Wakamori M, Nishizawa Y, Tanaka I, Niidome T, Sawasa K, Mori Y (2000.11) Altered function of the sympathetic nerve in mice with disrupted  $\alpha_1B$  subunit of N-type calcium channel. Society for Neuroscience 30th Annual Meeting (New Orleans).
19. Akiba I, Seki T, Mori M, Iizuka M, Nishimura S, Imoto K, Barsoumian EL (2000.11) Stable expression and characterization of human PN1 and PN3 sodium channels. Society for Neuroscience 30th Annual Meeting (New Orleans).
20. Matsuyama Z, Hozumi I, Inuzuka T, Wakamori M, Mori Y, Imoto K (2000.11) Apoptosis induced by polyglutamine expansion of the P/Q type  $Ca^{2+}$  channel. Society for Neuroscience 30th Annual Meeting (New Orleans).
21. Okada T, Shimizu S, Wakamori M, Yamada H, Imoto K, Mori Y (2000.11)  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent myosin light chain kinase is essential for the activation of neuronal TRP5 channels. Society for Neuroscience 30th Annual Meeting (New Orleans).
22. Yamada H, Wakamori M, Hara Y, Imoto K, Mori Y (2000.11) Spontaneous single-channel activity of recombinant TRP5 channel expressed in HEK293 cells. Society for Neuroscience 30th Annual Meeting (New Orleans).
23. 原雄二, 工藤純, 清水信義, 井本敬二, 森泰生 (2000.12) Molecular cloning and characterization of mouse homologue of TRPC7 (mTRPC7). 第 23 回日本分子生物学会年会 (神戸).

## 《高次神経機構研究部門》

1. 八木 健 (2000.10) Fyn 結合型新規カドヘリン(CNR) の解析. 第 73 回日本生化学会大会シンポジウム (横浜).
2. 先崎浩次, 小川正晴, 八木 健 (2000.10) 大脳皮質形成過程における新たな分子メカニズムの解析. 第 73 回日本生化学会大会シンポジウム (横浜).
3. 八木 健 (2000.9) 大脳皮質層構造形成における分子メカニズムの解析. 第 23 回日本神経科学大会・第 10 回日本神経回路学会大会合同大会 (横浜).
4. 濱田香世子, 八木 健 (2000.8) 哺乳行動と Fyn 欠損マウス. 2000 年国立遺伝学研究所研究会「動物行動の遺伝学」(三島).
5. 八木 健, 杉野英彦, 平山晃斉, 濱田 俊, 先崎浩次 (2000.8) 行動に関わるゲノム構造の解析. 2000 年国立遺伝学研究所研究会「動物行動の遺伝学」(三島).
6. Yagi T (2000.8) Signalling cascade of CNR cadherins (reelin receptors) in the mammalian brain. Society for Experimental Biology, SEB Annual Symposium (Cambridge).
7. Yagi T (2000.8) Fyn regulates NMDA-receptor activity and couples a novel cadherin (CNR) family at a synaptic complex. ISBRA Symposium (Yokohama).

## 《情報記憶研究部門》

1. Imamura N, Hida H, Aihara N, Nishino H, Yamada K (2000.11) Degeneration of substantia nigra accompanying with microglial invasion in collagenase-induced intrastriatal hemorrhage model rats. Society for Neuroscience (Florida).
2. Hida H, Baba H, Nakajima K, Kodama Y, Nishino H (2000.11) Dopamine-depleted striatum offers a good condition for mesencephalic neuronal precursor cell differentiation to dopaminergic neurons. Society for Neuroscience (Florida).
3. 西野仁雄 (2000.1) 生理学からの展望. 第 10 回日本

- 病態生理学大会（福島）。
4. 山田恭聖, 福田敦夫, 田中正樹, 岡部明仁, 西野仁雄, 戸苅創, 和田義郎 (2000.3) 無酸素無グルコースに対する大脳皮質スライス各層の神経細胞内  $Ca^{2+}$  応答の光学的測定による比較. 第 77 回日本生理学会大会（横浜）。
  5. 馬場広子, 飛田秀樹, 池中一裕, 西野仁雄 (2000.3) 高力価レトロウイルスを用いた神経幹細胞への遺伝子導入. 第 77 回日本生理学会大会（横浜）。
  6. 飛田秀樹, 馬場広子, 武井教恵, 熊崎路子, 西野仁雄 (2000.3) ドパミン入力欠如した線条体における中脳神経幹細胞に対するドパミン神経への分化誘導作用. 第 77 回日本生理学会大会（横浜）。
  7. 中島京也, 飛田秀樹, 熊崎路子, 櫻井輝美, 西野仁雄 (2000.3) 黒質破壊後の線条体抽出液に含まれる bFGF 及び GDNF 量の経時的変化. 第 77 回日本生理学会大会（横浜）。
  8. 今村暢希, 飛田秀樹, 相原徳孝, 西野仁雄, 山田和雄 (2000.3) 線条体出血モデルラットの黒質二次的変性. 第 77 回日本生理学会大会（横浜）。
  9. 石田和人, 飛田秀樹, 西野仁雄 (2000.3) 海馬へのイボテン酸投与により出現する Argyrophil 陽性ニューロンとその経過. 第 77 回日本生理学会大会（横浜）。
  10. 飛田秀樹, 中島京也, 児玉裕司, 馬場広子, 西野仁雄 (2000.6) 中脳由来神経幹細胞に対するドパミン神経分化誘導因子. 第 15 回神経組織・再生・移植研究会学術集会（名古屋）。
  11. 今村暢希, 飛田秀樹, 相原徳孝, 西野仁雄, 山田和雄 (2000.9) ラット線条体出血モデルにおける黒質ミクログリアの活性化. 第 23 回日本神経科学大会（横浜）。
  12. 飛田秀樹, 中島京也, 児玉祐司, 馬場広子, 西野仁雄 (2000.9) ドパミン入力のない線条体での神経幹細胞に対する分化・栄養因子の増加. 第 23 回日本神経科学大会（横浜）。
  13. 石田和人, 飛田秀樹, 西野仁雄 (2000.9) Dark neuron は非可逆的に細胞死に至る（海馬へのイボテン酸投与による検討）. 第 23 回日本神経科学大会（横浜）。
  14. 最上美保子, 飛田秀樹, 郡 健二郎, 西野仁雄 (2000.10) 胎生期性ホルモン環境の実験的変化による線条体障害性の検討. 第 47 回中部日本生理学会大会（金沢）。
  15. 児玉祐司, 馬場広子, 飛田秀樹, 鄭 且均, 西野仁雄 (2000.10) パーキンソン病モデルラットへの移植を目的とするラット胎児由来神経幹細胞への TH (チロシン水酸化酵素) 遺伝子導入. 第 47 回中部日本生理学会大会（金沢）。

## 《高次神経性調節研究部門》

1. 小松英彦 (2000.1) 20 世紀における視覚研究の足跡と展望 - 視覚の生理研究の展開. 日本視覚学会 2000 年冬季大会（東京）。
2. Komatsu H (2000.9) Visual information processing across multiple visual areas. 第 23 回日本神経科学学会（横浜）。
3. 木下正治, 小松英彦 (2000.9) サル第一次視覚野ニューロンの一様な面刺激に対する応答の時間特性. 第 23 回日本神経科学学会（横浜）。
4. 花澤明俊, 小松英彦 (2000.9) マカクザル V4 野におけるテクスチャー特徴の抽出. 第 23 回日本神経科学学会（横浜）。
5. 杉原弘記, 小松英彦 (2000.9) 回転面の傾きに関連したサル MST 野神経細胞の活動. 第 23 回日本神経科学学会（横浜）。
6. Kinoshita M, Komatsu H (2000.11) Temporal dynamics of the neural responses to the luminances of the surface stimuli in macaque striate cortex (V1). 30th Society for Neuroscience Meeting (New Orleans, U.S.A.).
7. Hanazawa A, Komatsu H (2000.11) Extraction of texture features in macaque area V4. 30th Society for Neuroscience Meeting (New Orleans, U.S.A.).

## 《生体システム研究部門》

1. 森 茂美, 森 大志, 中隋克己, 高須千慈子, 森 将浩, 橘 篤導, 松山清治 (2000.3) 成サルにおける四足歩行から直立二足歩行の変換機序. 第 77 回日本生理学会大会 (横浜).
2. 宮下英三 (2000.3) 水平面上上肢二関節到達運動遂行中のサル一次運動野神経細胞活動は何をエンコードするのか?. 第 77 回日本生理学会大会 (横浜).
3. 森 大志, 橘 篤導, 高須千慈子, 松山清治, 森 茂美 (2000.3) 障害物歩行時のサル直立二足歩行運動における反射適応・予測制御の動員. 第 77 回日本生理学会大会 (横浜).
4. 奥村 哲, Arpad Dobolyi, 松山清治, 森 大志, 森 茂美 (2000.3) ネコ尾状核における cholinergic-GABAergic-serotonergic interaction: 免疫組織化学的検索. 第 77 回日本生理学会大会 (横浜).
5. 橘 篤導, 森 大志, 高須千慈子, 松山清治, 森 茂美 (2000.3) 幼若期二ホンサルの起立姿勢と直立二足歩行運動の学習. 第 77 回日本生理学会大会 (横浜).
6. 奥村 哲, Arpad Dobolyi, 森 大志, 松山清治, 森 茂美 (2000.7) ネコ線条体の介在神経細胞・出力細胞両者に対するセロトニン神経支配様式. 第 15 回日本大脳基底核研究会 (茨城県美浦村).
7. 森 茂美, 中隋克己, 森 大志, 橘 篤導, 高須千慈子, 森 将浩 (2000.9) トレッドミル上での歩行運動を学習した成二ホンサルにおける歩容の変換機序. 第 23 回日本神経科学大会 (横浜).
8. 宮下英三 (2000.9) 上肢到達運動遂行中のサル運動野神経細胞活動の運動パラメータによる線形重回帰解析. 第 23 回日本神経科学大会 (横浜).
9. 渡邊 正, 郷原一寿, 宮下英三 (2000.9) ニューロダイナミクスにおける状態依存性の実験的検証. 第 23 回日本神経科学大会 (横浜).
10. 中隋克己, 森 大志, 奥村 哲, 橘 篤導, Elzbieta Jankowska, 森 茂美 (2000.9) Synaptic actions of fastigial neurons on lumbar motoneurons via reticulospinal neurons in acute decerebrate cats. 第 23 回日本神経科学大会 (横浜).
11. 奥村 哲, Dobolyi A, 森 大志, 松山清治, 森 茂美 (2000.9) ラット腰髄に分布するコリンエステラーゼ陽性神経細胞の生後発達. 第 23 回日本神経科学大会 (横浜).
12. 橘 篤導, 森 大志, 中隋克己, 高須千慈子, 森 茂美 (2000.9) 幼若期及び若齢期二ホンサルの成長・発達過程における起立姿勢, 直立二足歩行運動の学習. 第 23 回日本神経科学大会 (横浜).
13. Mori F, Tachibana A, Takasu C, Nakajima K, Mori S (2000.10) A new Japanese monkey model for the study of bipedal locomotion: strategies for obstacle clearance and recovery from stumbling. IX International Symposium on Motor Control (Varna, Bulgaria).
14. Mori S, Nakajima K, Mori F, Tachibana A, Takasu C, Mori M (2000.11) Hip strategy involves in the conversion from quadrupedal to bipedal walking in the Japanese monkey (*M. fuscata*). 30th Annual Meeting of Society for Neuroscience (New Orleans, USA).
15. Mori F, Tachibana A, Nakajima K, Takasu C, Okumura T, Mori M, Mori S (2000.11) When walking bipedally, the Japanese monkey (*M. fuscata*), employs anticipatory and reactive neural mechanisms to adjust to external perturbations. 30th Annual Meeting of Society for Neuroscience (New Orleans, USA).
16. Okumura T, Dobolyi A, Matsuyama K, Mori F, and Mori S and Ogawa T (2000.11) Serotonergic innervation of output neurons in the caudate nucleus of the cat. 30th Annual Meeting of Society for Neuroscience (New Orleans, USA).
17. Tachibana A, Mori F, Nakajima K, Takasu C, Mori M, and Mori S (2000.11) Developmental features of the acquisition of an upright standing posture and bipedal locomotion by the Japanese monkey, *M. fuscata*. 30th Annual Meeting of Society for Neuroscience (New Orleans, USA).
18. 森 大志, 中隋克己, 森 茂美 (2000.12) ニホンサル (*M. fuscata*) の直立二足歩行運動: 運動力学的解析. 第 30 回日本臨床神経生理学会学術大会 (シンポジウム「歩行の臨床神経生理学」)(京都).

## 《高次液性調節研究部門》

1. 納家勇治, 吉田正俊, 伊藤昭光, 柴田愁子, 伊原 毅, 永雄総一, 宮下保司 (2000.3) サル下部側頭葉における記憶想起に関係する神経活動の時間経過: 36野とTE野の比較. 第77回日本生理学会大会(東京).
2. 福島徹也, 長谷川 功, 宮下保司 (2000.9) 目標転換に伴うニホンザル弓状溝領域の神経細胞活動. 第22回日本神経科学大会 第10回日本神経回路学会大会合同大会(横浜).
3. 保前文高, 橋本龍一郎, 中嶋京一, 宮下保司, 酒井邦嘉 (2000.9) 文の異なる感覚入力に伴うブローカ野の機能分化. 第22回日本神経科学大会 第10回日本神経回路学会大会合同大会(横浜).
4. 李 悦欣, 橋本隆紀, 徳山 宣, 宮下保司, 奥野浩行 (2000.9) 片側前庭破壊後のラット脳幹における脳由来神経栄養因子 BDNF の発現誘導. 第22回日本神経科学大会 第10回日本神経回路学会大会合同大会(横浜).
5. 橋本隆紀, 奥野浩行, 徳山 宣, 李 悦欣, 宮下保司 (2000.9) ニホンザル傍嗅野における視覚性対連合記憶形成に関連した *zif268* の特異的発現パターン. 第22回日本神経科学大会 第10回日本神経回路学会大会合同大会(横浜).
6. 徳山 宣, 奥野浩行, 橋本隆紀, 李 悦欣, 宮下保司 (2000.9) 視覚性対連合記憶形成における BDNF mRNA の発現誘導: 大脳半球離ザルを用いた定量的解析. 第22回日本神経科学大会 第10回日本神経回路学会大会合同大会(横浜).
7. 内田以大, 亀山征史, 竹中 暁, 石浦浩之, 桔梗英幸, 宮下保司 (2000.9) イメージ生成過程の大脳皮質機能マップ: 機能的磁気共鳴画像法による解析. 第22回日本神経科学大会 第10回日本神経回路学会大会合同大会(横浜).
8. Naya Y, Yoshida M, Ihara T, Nagao S, Miyashita Y (2000.11) Spatial distribution of memory-related cells in monkey area 36 and area TE during pair-association task. 30th Annual Meeting of Society for Neuroscience (New Orleans, USA).
9. Yoshida M, Naya Y, Ito A, Shibata S, Miyashita Y (2000.11) A combined study of tract-tracing and electrophysiological mapping in area TE and area 36 of macaque monkeys. 30th Annual Meeting of Society for Neuroscience (New Orleans, USA).
10. Tokuyama W, Okuno H, Hashimoto T, Li Y.X, Takahashi E, Miyashita Y (2000.11) Induction of BDNF mRNA during visual paired associate learning in the inferior temporal cortex of macaque monkeys. 30th Annual Meeting of Society for Neuroscience (New Orleans, USA).
11. Okuno H, Tokuyama W, Hashimoto T, Li Y.X, Koyama M, Miyashita Y (2000.11) Induction on ZIF268 mRNA in perirhinal cortex during memory formation for visual paired associated in macaque monkeys. 30th Annual Meeting of Society for Neuroscience (New Orleans, USA).
12. Li Y.X, Hashimoto T, Tokuyama W, Miyashita Y, Nagao S, Okuno H (2000.11) BDNF induction in vestibulo-olivary network following unilateral labyrinthectomy in rats as revealed by quantitative RT-PCR analysis. 30th Annual Meeting of Society for Neuroscience. (New Orleans, USA).
13. Fukushima T, Hasegawa I, Miyashita Y (2000.11) Modulation of neuronal activities in macaque dorsal periarculate area by target-shift cues. 30th Annual Meeting of Society for Neuroscience (New Orleans, USA).
14. Ohbayashi M, Miyashita Y (2000.11) Linkage of visuospatial information and saccade preparation in monkey premotor cortex during an oculomotor sequence task. 30th Annual Meeting of Society for Neuroscience (New Orleans, USA).
15. Hashimoto T, Li Y.X, Okuno H, Tokuyama W, Takahashi E, Miyashita Y (2000.11) BDNF mRNA expression in rat inferior olive after unilateral labyrinthectomy: in situ hybridization analysis. 30th Annual Meeting of Society for Neuroscience (New Orleans, USA).

## 《脳形態解析研究部門》

1. Shigemoto P, Masugi M, Fujimoto K (2000.9) Ultrastructural localization of metabotropic glutamate receptors in the rat CNS as revealed by conventional and replica immunogold labeling. International Symposium for Morphological Sciences (Kyoto, Japan).
2. 棚山俊彦 (2000.3) 中枢ドーパミン D2 タイプ受容体と共役するイオンチャネルの多様性. 第 73 回日本薬理学会年会シンポジウム (横浜).
3. 馬杉美和子, 納富拓也, 渡辺雅彦, 重本隆一 (2000.9) SDS-FRL 法による細胞膜上機能分子の共存の解析. 第 23 回日本神経科学大会, 第 10 回日本神経回路学会大会 合同大会 (横浜).
4. 高田昌彦, 金田勝幸, 今西美知子, 徳野博信, 南部篤, 重本隆一 (2000.9) パーキンソン病モデル動物における大脳基底核の代謝型グルタミン酸受容体の発現変化. 第 23 回日本神経科学大会, 第 10 回日本神経回路学会大会 合同大会 (横浜).
5. Momiyama A (2000.9) Control of the excitability of identified spinothalamic tract neurons via metabotropic glutamate receptors. The Japan Neuroscience Society, 23rd Annual Meeting (Yokohama, Japan).

## 《大脳神経回路論研究部門》

1. Kawaguchi Y (2000.7) Specific synaptic connections and firing characteristics in cortical interneuron types. 22<sup>nd</sup> CINP Congr (Brussels, Belgium).
2. Kawaguchi Y (2000.7) Synaptic connections and firing patterns of GABAergic interneuron types. GABA 2000 Int. Conf. on GABA and Glycine Receptors (Cairns, Australia).
3. Kawaguchi Y (2000.8) Morphology and physiology of CCK interneurons in the rat prefrontal cortex. Gordon Research Conf. on Neuronal Cholecystokinin (Oxford, UK).
4. 根東覚, 川口泰雄 (2000.9) 大脳皮質抑制性神経回路におけるシナプス電流の同期化. 第 23 回日本神経科学大会 (横浜).
5. 鈴木和美, 窪田芳之, 苅部冬紀, 川口泰雄 (2000.9) 大脳皮質の CRF 陽性細胞の形態とシナプス結合様式. 第 23 回日本神経科学大会 (横浜).
6. 窪田芳之, 川口泰雄 (2000.9) 大脳皮質の非錐体細胞のシナプス結合様式. 第 23 回日本神経科学大会 (横浜).
7. Kawaguchi Y (2000.11) Synaptic connections and synchronized firing of cortical interneuron. Physiology and anatomy of the local circuit of the brain (岡崎).
8. Kondo S, Kawaguchi Y (2000.11) Slow synchronized bursts of inhibitory postsynaptic currents in the rat frontal cortex in vitro. 30<sup>th</sup> Annual Meeting of Society for Neuroscience (New Orleans, USA).
9. 川口泰雄 (2000.12) 単一神経活動から見た脳波律動. 第 30 回日本臨床神経生理学会学術大会 (京都).

## 《心理生理学研究部門》

1. 土田龍郎, 高橋範雄, 伊藤春海, 西澤貞彦, 米倉義晴, 定藤規弘 (2000.2) 標準入力曲線を用いた非侵襲的脳ブドウ糖代謝量の測定 原理と精度に関する検討. 第 50 回 日本核医学会中部地方会 (愛知).
2. 村本 聡, 大山信幸, 岡田謙一郎, 高橋範雄, 土田龍郎, 吉本光喜, 藤林靖久, 定藤規弘, 米倉義晴, 伊藤春海 (2000.2) <sup>11</sup>C-acetatePET による前立腺癌転移巣の描出能の検討. 第 50 回 日本核医学会 中部地方会 (愛知).
3. 吉本光喜, 脇 厚生, 藤林靖久, 定藤規弘, 米倉義晴 (2000.2) [1-<sup>11</sup>C]Acetate の腫瘍内代謝. 第 50 回日本核医学会 中部地方会 (愛知).
4. 植松秀昌, 前田正幸, 定藤規弘, 木村浩彦, 越元佳郎, 山田弘樹, 河村泰孝, 石森佳幸, 米倉義晴, 伊藤春海,

- 久保田紀彦 (2000.2) Quantitative measurement of vascular permeability of gliomas by double echo dynamic MRI. 第 11 回福井 MR 研究会 (福井).
5. Uematsu H, Sadato N, Maeda M, Matsuda T, Koshimoto Y, Kimura H, Yamada H, Kawamura Y, Yonekura Y, Itoh H (2000.4) Quantitative measurement of an extraction fraction by double echo dynamic MRI. International Society for Magnetic Resonance in Medicine, Eighth Scientific Meeting and Exhibition (Denver, USA).
  6. Uematsu H, Maeda M, Sadato N, Matsuda T, Koshimoto Y, Kimura H, Yamada H, Kawamura Y, Yonekura Y, Itoh H (2000.4) Underestimation in MR measurement of blood volume of brain tumors. International Society for Magnetic Resonance in Medicine, Eighth Scientific Meeting and Exhibition (Denver, USA).
  7. 村本 聡, 大山伸之, 高橋範雄, 藤林靖久, 定藤規弘, 米倉義晴, 伊藤春海 (2000.4) C-11 acetate PET による前立腺癌イメージング. 第 59 回日本医学放射線学会学術発表会 (横浜).
  8. 山田弘樹, 村本 聡, 伊藤春海, 大森昌夫, 村田哲人, 定藤規弘, 米倉義晴 (2000.4) 運動選択課題を用いた脳の fMRI: 大脳皮質賦活領域および抑制領域の検討. 第 59 回日本医学放射線学会学術発表会 (横浜).
  9. 椋沢宏之, 高橋良行, 岡田知久, 定藤規弘, 米倉義晴 (2000.5) 拡散テンソル画像撮像における超高磁場装置の有用性. 第 8 回日本 MR Angiography 研究会 (愛媛).
  10. Ishizu K, Nakamura S, Shiozaki T, Sadato N, Takahashi N, Sugimoto K, Fujibayashi Y, Yonekura Y (2000.6) Increasing rate of FDG uptake from early to delayed PET images in lung tumors. Scientific Abstracts of the 47th Annual Meeting of the Society of Nuclear Medicine (St.Louis, USA).
  11. Omata N, Murata T, Fujibayashi Y, Waki A, Sadato N, Yoshimoto M, Wada Y, Yonekura Y (2000.6) Age-related changes in energy production in the brain slices of senescence-accelerated mouse as revealed by positron autoradiography technique. The 47th Annual Meeting of the Society of Nuclear Medicine (St.Louis, USA).
  12. Murata T, Omata N, Fujibayashi Y, Waki A, Sadato N, Yoshimoto M, Wada Y, Yonekura Y (2000.6) Neurotoxicity caused by hypoxia/reoxygenation as revealed by dynamic changes in glucose metabolism of living rat brain slices with a positron autoradiography technique. The 47th Annual Meeting of the Society of Nuclear Medicine (St. Louis, USA).
  13. Tsuchida T, Sadato N, Nishizawa S, Yonekura Y, Itoh H (2000.6) Effect of postprandial hyperglycemia in noninvasive measurement of cerebral metabolic rate of glucose in non-diabetic subjects. Scientific Abstracts of the 47th Annual Meeting of the Society of Nuclear Medicine (St.Louis, USA).
  14. 土田龍郎, 伊藤春海, 西澤貞彦, 米倉義晴, 定藤規弘 (2000.6) 標準入力曲線を用いた非侵襲的脳ブドウ糖代謝量の測定 食後高血糖の影響について. 第 51 回 日本核医学会 中部地方会 (岐阜).
  15. 田中雅人, 上坂秀樹, 小室裕由, 伊藤春海, 米倉義晴, 定藤規弘, 小倉久和 (2000.8) マルチエージェントサーバーによる医用画像管理システム (動画像への対応). 第 19 回日本医用画像工学会大会 (大阪).
  16. 吉本光喜, 脇 厚生, 藤林靖久, 定藤規弘, 米倉義晴 (2000.8) [1-C-11]acetate の腫瘍内代謝. PET サマーセミナー (舞子).
  17. 土田龍郎, 伊藤春海, 西澤貞彦, 米倉義晴, 定藤規弘 (2000.11) 非侵襲的脳ブドウ糖代謝量測定における食後高血糖の影響. 第 40 回日本核医学会総会 (神戸).
  18. 石津浩一, 定藤規弘, 米倉義晴 (2000.11) ガンマカメラ型 PET を用いた高感度断層撮影の開発. 第 40 回日本核医学会総会 (神戸).
  19. Sadato N, Yonekura Y (2000.11) Plasticity of higher brain function: tactile to visual modalities. Second International Workshop on Biomedical Imaging (FUKUI-2000) (Fukui, Japan).
  20. Sadato N, Okada T, Honda M, Yonekura Y (2000.11) Cortico-cortical circuitry of the cross-modal plasticity in the blind during Braille discrimination tasks. The 30th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (New Orleans, USA).
  21. 吉本光喜, 脇 厚生, 藤林靖久, 定藤規弘, 米倉義晴 (2000.11) [1-<sup>11</sup>C]Acetate の腫瘍内集積メカニズムに関する基礎的検討. PET 研究会 (京都).
  22. Sadato N. (2000, 12) Cortico-cortical circuitry of the cross-modal plasticity in the blind during Braille discrimination tasks. 2<sup>nd</sup> ISM International Symposium

- on Frontiers of Time Series Modeling (Nara, Japan).
23. Sadato N, Yonekura Y (2000.12) Cortico-cortical circuitry of the cross-modal plasticity in the blind during Braille discrimination tasks. International Symposium on Inter-areal Functional Coupling (Kyoto, Japan).
  24. Hanakawa T, Honda M, Okada T, Sawamoto N, Fukuyama H, Shibasaki H (2000.0) Rostral dorsolateral premotor activation in human cognitive tasks does not result from innerspeech. (New Orleans, USA).
  25. Sawamoto N, Hanakawa T, Honda M, Shibasaki H (2000.0) Cognitive Processing is slow in Parkinson's Disease. (New Orleans, USA).
  26. 本田 学 (2000.12) 事象関連 fMRI の方法論と応用 . 第 30 回日本臨床脳生理学学会シンポジウム「事象関連電位と事象関連 fMRI の接点」(京都).
  27. 本田 学, 加藤比呂子, 大原信司, 池田昭夫, 井上有史, 三原忠紘, 馬場好一, 柴崎 浩(2000.9)多変量自己回帰モデルをもちいた運動皮質間機能連関の解析 . 第 23 回日本神経科学大会・第 10 回日本神経回路学会合同大会 (横浜).
  28. 花川 隆, 本田 学, 岡田知久, 福山秀直, 柴崎 浩 (2000.9) そろばん熟練者の暗算の神経機構 . 第 23 回日本神経科学大会・第 10 回日本神経回路学会合同大会 (横浜).
  29. 本田 学 (2000.8) Imagine ~ 脳のイメージ機能 ~ : 脳と心のメカニズム第 1 回夏のワークショップ (京都).
  30. 本田 学 (2000.7)「運動」から「思考」へ ~ パーキンソン病の脳機能賦活検査に学ぶ . 第 15 回日本大脳基底核研究会 (霞ヶ浦).
  31. 本田 学, 仁科エミ, 前川督雄, 不破本義孝, 森本雅子, 八木玲子, 中村 聡, 河合徳枝, 大橋 力 (2000.3) 新世代オーディオ技術の評価 ハイパーソニック・エフェクトについて . 日本音響学会春期研究発表会 (船橋).
  32. 河合徳枝, 本田 学, 中村 聡, 不破本義孝, 森本雅子, 前川督雄, 仁科エミ, 大橋 力 (2000.3) ハイパーソニックエフェクトの脳波による検討 . 日本音響学会春期研究発表会 (船橋).
  33. 中村 聡, 本田 学, 仁科エミ, 河合徳枝, 不破本義孝, 仁科エミ, 大橋 力 (2000.3) ハイパーソニックエフェクトの領域脳血流による検討 . 日本音響学会春期研究発表会 (船橋).
  34. 仁科エミ, 不破本義孝, 森本雅子, 河合徳枝, 本田学, 大橋 力 (2000.3) ハイパーソニック・エフェクトの対比較法による検討 . 日本音響学会春期研究発表会 (船橋).
  35. 大橋 力, 本田 学, 前川督雄, 河合徳枝, 仁科エミ (2000.3) ハイパーソニックエフェクトの二次元知覚モデル . 日本音響学会春期研究発表会 (船橋).

## 《高次脳機能研究プロジェクト》

1. 遠藤利朗, 伊佐正 (2000.9) ラット上丘浅層の異なるニューロン種における AMPA 型グルタミン酸受容体サブタイプの分布 . 第 23 回日本神経科学学会大会, 第 10 回日本神経回路学会大会 (横浜).
2. 山下哲司, 伊佐正 (2000.9) ラット中脳ドパミン細胞におけるニコチン型アセチルコリン受容体 (nAChRs) の活性化に伴うカルシウム感受性電流 . 第 23 回日本神経科学学会大会, 第 10 回日本神経回路学会大会 (横浜).
3. 斎藤康彦, 伊佐正 (2000.9) 上丘層内, 層間のニューロン集団における興奮性結合 . 第 23 回日本神経科学学会大会, 第 10 回日本神経回路学会大会 (横浜).
4. 井上由香, 小林康, 相澤寛, 伊佐正 (2000.9) ニホザル脚橋被蓋核におけるサッカーボール課題への動機付けや報酬に関連したニューロン活動 . 第 23 回日本神経科学学会大会, 第 10 回日本神経回路学会大会 (横浜).
5. Alstermark B, Isa T, Ohki Y, Saito Y (2000.11) C3-C4 propriospinal neurons mediate disynaptic pyramidal excitation to forelimb motoneurons in macaca fuscata. Annual Meeting of Society for Neuroscience (New Orleans, USA).
6. Kobayashi Y, Inoue Y, Yamamoto M, Aizawa H, Isa T (2000.11) Coding of multimodal signals in the pedunculopontine nucleus neurons related to performance of visually guided saccade task. Annual Meeting of Society for Neuroscience . (New Orleans, USA).

7. Saito Y, Isa T (2000.11) Intra- and interlaminar excitatory connections among neuronal populations in rat superior colliculus. Annual Meeting of Society for Neuroscience (New Orleans, USA).

## 《感覚・運動機能研究プロジェクト》

1. Watanabe S, Kakigi R, Koyama S, Kirino E (2000.1) Human Face Perception A Magnetoencephalographic Study. Asian-Oceanian Symposium of Clinical Neurophysiology (Manila, Philippines).
2. Hoshiyama M, Kakigi R (2000.1) The New Smallest Multi-Channel Gradiometer. Application for Peripheral Conduction. Asian-Oceanian Symposium of Clinical Neurophysiology (Manila, Philippines).
3. Lam K, Kaneoke Y, Kakigi R (2000.1) Response Properties of the Human Visual System to Global Motion. Asian-Oceanian Symposium of Clinical Neurophysiology (Manila, Philippines).
4. Gunji A, Kakigi R, Hoshiyama M (2000.1) Spatiotemporal Source Analysis of Vocalization-Associated Magnetic Fields. Asian-Oceanian Symposium on Clinical Neurophysiology (Manila, Philippines).
5. Itomi K, Kakigi R, Maeda K, Hoshiyama M (2000.1) Dermatone Versus Homunculus; Detailed Topography of the Primary Somatosensory Cortex Following Trunk Stimulation. Asian-Oceanian Symposium on Clinical Neurophysiology (Manila, Philippines).
6. Nakamura M, Kakigi R, Okusa T, Hoshiyama M (2000.1) Effects of check size on pattern reversal visual evoked magnetic field (VEF) and potential (VEP). Asian-Oceanian Symposium on Clinical Neurophysiology (Manila, Philippines).
7. Koyama S, Sekiguchi T, Yamasaki H, Kakigi R (2000.8) Cortical magnetic responses from the left superior temporal area associated with visual word recognition. 12<sup>th</sup> International conference on Biomagnetism (Helsinki, Finland).
8. Kaneoke Y, Kawakami O, Kakigi R (2000.8) Magnetic response property of the human extrastriate cortex to various speed of real motion. 12<sup>th</sup> International conference on Biomagnetism (Helsinki, Finland).
9. Watanabe S, Kakigi R, Puce A (2000.8) Cortical regions responding to eye movement: a magnetoencephalographic study. 12<sup>th</sup> International conference on Biomagnetism (Helsinki, Finland).
10. Nishashi T, Kakigi R, Kawakami O, Hoshiyama M, Itomi K, Inao S, Yoshida J (2000.8) Somatosensory evoked magnetic fields following electrical stimulation of the ear. 12<sup>th</sup> International conference on Biomagnetism (Helsinki, Finland).
11. Wang L, Kakigi R, Hoshiyama M, Koyama S, Watanabe S, Gunji A (2000.8) Neural activities during Wisconsin card sorting test-MEG observation. 12<sup>th</sup> International conference on Biomagnetism (Helsinki, Finland).
12. Gunji A, Hoshiyama M, Kakigi R (2000.8) Identification of auditory evoked magnetic fields (AEF) of subject's own voice. 12<sup>th</sup> International conference on Biomagnetism (Helsinki, Finland).
13. Kawakami O, Kaneoke Y, Kakigi R (2000, 8) Assessment of the magnetic response from the human extrastriate cortex to apparent motion compared with real motion. 10<sup>th</sup> European Congress of Clinical Neurophysiology, (Lyon, France).
14. Lam K, Kakigi R, Mukai T, Yamasaki H (2000.8) Somatosensory evoked Magnetic fields (SEFs) are affected by both attention and interference caused by visual stimulation. 10<sup>th</sup> European Congress of Clinical Neurophysiology (Lyon, France).
15. Kakigi R (2000.8) Magneto- and electro-encephalographic studies for pain perception in humans. 10<sup>th</sup> European Congress of Clinical Neurophysiology (Lyon, France).
16. 金桶吉起 (2000.3) 脳磁図を用いたヒト視覚系の研究. 第2回ヒト脳機能マッピング研究会学術集会(東京).
17. 宝珠山 稔 (2000.3) 体性感覚誘発脳磁場を用いたマッピング. 第2回ヒト脳機能マッピング研究会学術集会(東京).
18. 内藤智之 (2000.3) ヒト MT 領野活動の上下視野差. 第2回ヒト脳機能マッピング研究会学術集会(東京).
19. 文堂昌彦 (2000.3) 運動視関連領域の Transcallosal Connection と半球優位性に関する脳磁図による検

- 討・第 2 回ヒト脳機能マッピング研究会学術集会 (東京).
20. 関口貴裕 (2000.3) 漢字単語に誘発された脳磁場に対する音韻反復の効果. 第 2 回ヒト脳機能マッピング研究会学術集会 (東京).
  21. 渡邊昌子 (2000.3) 「目の動き」認知に関する脳部位局在. 第 2 回ヒト脳機能マッピング研究会学術集会 (東京).
  22. 軍司敦子 (2000.3) 聴覚マスキング条件下の発声関連電位. 第 2 回ヒト脳機能マッピング研究会学術集会 (東京).
  23. 中村みほ, 柿木隆介, 大草知裕, 宝珠山 稔 (2000.3) パターンリバーサル視覚誘発脳磁界に対するチェックサイズの影響. 第 2 回ヒト脳機能マッピング研究会学術集会 (東京).
  24. 系見和也, 柿木隆介, 宝珠山 稔, 前田多章 (2000.3) 体幹の皮膚分節別刺激による体性感覚誘発脳磁図. 第 2 回ヒト脳機能マッピング研究会学術集会 (東京).
  25. 中村みほ, 柿木隆介, 大草知裕, 宝珠山 稔 (2000.3) パターンリバーサル視覚誘発脳磁界に対するチェックサイズの影響. 日本脳電磁図トポグラフィ研究会 (北九州).
  26. 系見和也 (2000.3) パターンリバーサル視覚誘発脳磁界に対するチェックサイズの影響. 日本脳電磁図トポグラフィ研究会 (北九州).
  27. 王 麗紅, 柿木隆介, 宝珠山 稔 (2000.6) 脳磁図を用いた Wisconsin Card Sorting Test 試行中の脳内情報処理過程の検討. 第 26 回性格・行動と脳波研究会 (宮古).
  28. 軍司敦子, 宝珠山 稔, 柿木隆介 (2000.3) 発声時の自分の声に対する脳磁界反応. 第 23 回日本神経科学学会 第 10 回日本神経回路学会大会合同大会 (横浜).
  29. 王 麗紅, 柿木隆介, 宝珠山 稔 (2000.3) 脳磁図を用いた Wisconsin Card Sorting Test 試行中の脳内情報処理過程の検討. 第 23 回日本神経科学学会 第 10 回日本神経回路学会大会合同大会 (横浜).
  30. 文堂昌彦, 金桶吉起, 稲尾意秀, 吉田 純, 中村昭範, 柿木隆介 (2000.3) 運動視刺激に反応するヒト脳局在: 脳磁図と 3 次元 MRI による同定. 第 23 回日本神経科学学会, 第 10 回日本神経回路学会大会合同大会 (横浜).
  31. 柿木隆介, 宝珠山 稔 (2000.12) Transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) 後の痛覚関連脳反応の変化. 第 22 回日本疼痛学会 (京都).
  32. 柿木隆介 (2000.12) MEG を用いた後頭側頭葉の機能評価. 第 12 回日本脳循環代謝学会総会 (仙台).
  33. 柿木隆介 (2000.12) 痛覚刺激による脳波と脳磁図反応. 第 30 回日本臨床神経生理学会学術大会 (シンポジウム「痛みの神経生理学」)(京都).
  34. 金桶吉起 (2000.12) 運動視と視覚誘発脳磁界. 第 30 回日本臨床神経生理学会学術大会 (京都).
  35. 川上 治 (2000.12) 脳磁図を用いた仮現運動視知覚の神経機構の検討. 第 30 回日本臨床神経生理学会学術大会 (京都).
  36. 渡辺昌子 (2000.12) 倒立顔認知: 脳波と脳磁図を用いた研究. 第 30 回日本臨床神経生理学会学術大会 (京都).
  37. 大草知裕, 柿木隆介, 宝珠山稔, 王麗紅 (2000.12) 閃光視覚誘発脳磁場の睡眠による変化. 第 30 回日本臨床神経生理学会学術大会 (京都).

## 《形態情報解析室》

1. 古家園子, 尾崎毅, 堀清次 (2000.3) ラット脳下垂体および小脳におけるエンドセリン受容体の局在. 第 105 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (横浜).
2. 有井達夫 (2000.9) 超高压電顕によるイメージングプレート像の特性 VI. 日本物理学会第 55 回年会 (新潟).
3. Sengoku M, Ohno T, Aarii T (2000.6) High-voltage and high-resolution electron microscopy of fine organic particles. The 7th Asia-Pacific Electron Micros. Conf., Phys. (Singapore).
4. 一海孝光, 有井達夫 (2000.9) アクチン溶液中に形成される微小結晶状粒子の超高压電子顕微鏡回折像. 日本生物物理学会第 38 回年会 (仙台).
5. 吉村亮一, 遠藤泰久, 有井達夫, 佐々木泰治 (2000.9) シナプシンのリン酸化と分泌小胞: PC12 細胞の超高压電子顕微鏡観察. 日本動物学会第 70 回大会 (山

- 形)。  
6. 片桐展子, 片桐康雄, 有井達夫 (2000.11) 無脊椎動物 (腹足類) の外套組織にみられる筋繊維の超高压

電顕観察 . 日本電子顕微鏡学会第 45 回シンポジウム (岡崎)。

### 《生体情報処理室》

1. Tsubokawa H (2000.3) Non-uniform distribution of  $\text{Na}^+$ -influx through  $I_h$  channels in the hippocampal CA1 pyramidal neurons. 日本薬理学会 (横浜)。
2. Tsubokawa H, Oguro K, Shimazaki K, Robinson H P C, Masuzawa T, Kawai N (2000.3) Contribution of inositol 1, 3,4,5-tetrakisphosphate to the abnormal  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis in the hippocampal neurons after transient ischemia. 日本生理学会 (横浜)。
3. Tsubokawa H (2000.3) Optical imaging of the PKC-translocation in Single Neuron of the Hippocampal Slice. 日本生理学会 (横浜)。
4. Tsubokawa H, and Takagi S (2000. 11) Fluorescence imaging of the protein kinase C translocation in the hippocampal neurons. Society for Neuroscience 30th Annual Meeting (New Orleans, USA).

### 《動物実験センター》

1. Ishikawa K, Kono T, Ozaki T, Iwamoto J (2000.3) Direct evidence of NO production in LPS-sensitized rat hepatocytes and Kupffer cells. 77th Annual Meeting of Physiological Society of Japan (Tokyo)

# 【 一般共同研究報告 】

# 一般共同研究報告

## [ 目 次 ]

1. 脳内部位特異的ドレブリン A ノックアウトマウスの作製 (白尾智明ほか) .....	114
2. GAD および ChAT 遺伝子の発現制御における神経選択的サイレンサーの役割 (森 望ほか) .....	114
3. 細胞内 $Ca^{2+}$ 、サイクリック AMP、NO における水分泌・開口分泌の 細胞内制御機構 (村上政隆ほか) .....	115
4. 卵活性化精子因子の同定と作用機序 (宮崎俊一ほか) .....	116
5. 卵細胞における $IP_3$ 動態の可視化 (飯野正光ほか) .....	116
6. 神経ペプチド PACAP の神経細胞分化誘導作用と細胞内シグナル伝達機構 (矢田俊彦ほか) .....	117
7. 神経・分泌細胞の開口放出機構の研究 (河西春郎ほか) .....	117
8. 虚血性神経細胞死と容積調節チャネルの機能連関 (塩田清二ほか) .....	117
9. 非上皮性 CFTR $Cl^{-}$ チャネルの調節に關与する 新規プロテインフォスファターゼの同定 (高井 章ほか) .....	118
10. 正常発達及び病態における糖鎖構造の解析 (和田洋巳ほか) .....	119
11. レトロウイルスベクターを用いた胃癌関連遺伝子の 機能発現クローニング (奥村俊一郎ほか) .....	120
12. 電位依存性カルシウムチャネル $1A$ サブユニットの異常により引き起こされる 神経疾患の病態メカニズムの解明 (松山善次郎ほか) .....	121
13. $trp$ チャネルの開口制御機構に関する研究 (金子周司ほか) .....	121
14. 脊椎動物 TRP ホモログと G タンパク質共役型受容体で活性化される $Ca^{2+}$ 透過型 陽イオンチャネルの分子的相関に関する研究 (井上隆司ほか) .....	122
15. サルの味覚弁別行動に関する大脳皮質諸領野間の結合 (小川 尚ほか) .....	122
16. 歩行リズム制御における脳幹下行性投射系の役割 (青木 藩ほか) .....	123
17. 海馬興奮性シナプスの動態と微細形態 (岡部繁男ほか) .....	123
18. 非侵襲的脳機能計測法による高次脳機能可塑性の研究 (米倉義晴ほか) .....	124
19. 黒質 - 脚橋被蓋核系の機能構築及び動作特性 (高草木 薫ほか) .....	125
20. $CO_2$ レーザー光線を利用した軸索反射の研究 (小山なつほか) .....	125
21. ヒルシュスプルング病無神経節腸管における増生外来神経に関する研究 (葦澤融司ほか) .....	126
22. Hirschsprung 病コンジェニクラーットの作製 (安居院高志ほか) .....	126
23. 精巣輸尿管異常ラットの精子輸送機能停止に細胞間結合装置と cell communication は関係するか (山本正夫ほか) .....	127
24. 原索動物横紋筋の細胞内構造形成とカルシウム制御機構の系統発生 (井上 勲ほか) .....	128

## 1. 脳内部位特異的ドレブリンAノックアウトマウスの作製

白尾智明 (群馬大学医学部附属行動医学研究施設行動分析学部門)

小幡邦彦, 柳川右千夫

ドレブリンは脳神経細胞の樹状突起スパインに存在するアクチン結合蛋白であり, スパイン細胞骨格の再編成によるシナプス可塑性の調節因子として働いている可能性が高い。本研究では, この仮説を検証するために, ドレブリンAを部位特異的にノックアウトし, *in vivo*, *in vitro* で, シナプス機能の変化を解析することにより, シナプス機能における神経伝達物質受容体・細胞骨格連関の重要性が明らかになることを目指す。

昨年度の研究により, ドレブリンE及びAともに脳内領域特異的にノックアウトするためのターゲティングベクター pLox-D を作製した。また, ドレブリンの発現量を変化させずにドレブリンAアイソフォームの発現のみを脳内全体でノックアウトするためのマウス作成用のターゲティングベクター pDA を作製した。本年度は, これらのターゲティングベクターを用いてES細胞に相同組み換えを起こさせ, そのES細胞を使って mutant マウス作製を試みた。その結果, pLox-D により相同組み換えを起こさせたES細胞から

は4匹のキメラが誕生したが, 生殖細胞には組み替え遺伝子は入らなかった。そこで, 新たに pLox-D 相同組み換えES細胞の作成を行っている。また, pDAにより相同組み換えを起こさせたES細胞からはキメラは誕生しなかった。このことは, pDAによる相同組み換えにより, ドレブリンA以外に影響を受ける蛋白が存在する可能性を示唆していた。そこで, pDA 相同組み換えにより欠損する遺伝子配列 *ins2* のをもつ新たな cDNA のクローニングを RT-PCR 法を用いて行った。その結果, *ins2* 配列の後ろに新たに 319 塩基の配列が付け加わった新たな cDNA を同定することができた。この cDNA の塩基配列を決定したところ, ドレブリンA (約 77 kD) の C 末端領域を欠損した分子量約 42 kD の蛋白であることがわかった。そこで, この新規蛋白を S-ドレブリンA と名付けた。この結果, pDA 相同組み換えES細胞からできる動物はドレブリンAばかりでなく S-ドレブリンAの発現もノックアウトされることがわかった。

## 2. GAD および ChAT 遺伝子の発現制御における神経選択的サイレンサーの役割

森 望 (国立療養所中部病院長寿医療研究センター・分子遺伝学研究室)

David Saffen (東京大学大学院医学系研究科)

蒔苗公利 (弘前大学医学部耳鼻咽喉科学教室)

柳川右千夫

発達および老化過程での脳の機能維持には, 神経ネットワークの再編成能力の維持や神経の応答性の確保が重要である。その背後には神経細胞の中での様々な遺伝子発現が正常に遂行され, 迅速な転写応答性を維持する必要がある。神経伝達物質の合成酵素や受容体, トランスポーター, シナプス関連分子や細胞表層の接着因子, ニューロフィラメントや微小管等の神経骨格や GAP-43, SCG10 等の突起伸展開連分子, 等々, 神経の機能維持に直結した神経細胞 (ニューロン) 特異的遺伝子群は多種多様である。これらは, 非常に複雑な時間的空間的転写制御の支配下にあるが, 興味深いことに, その多くの

神経細胞特異的な遺伝子発現制御が神経選択的サイレンサー (NRS) とよばれる 22 塩基対の共通配列で制御される。この転写エレメント NRS には基本的に非神経細胞で発現されている NRSF (REST) とよばれる核内転写抑制因子が結合し, 非神経細胞中で一連の神経特異的遺伝子群は選択的な転写抑制を受ける。

NRSF が神経遺伝子のプロモーターを抑える仕組みの根幹は, コリプレッサー mSin3 とともにヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) をリクルートすることにある。HDAC はターゲットとなる遺伝子周辺のクロマチン構造を硬い状況に変換させ, 結果的に RNA ポリメラーゼが

作用しにくくなることにより、転写抑制を来たす。HDAC 阻害剤である TSA を作用させると、非神経細胞が ChAT mRNA も発現することがわかった。このように NRS-NRSF システムは神経の分化制御、神経伝達物質の発現制御に係わる。HDAC はクロマチン構造の維持に必要な酵素なので、老化過程における遺伝子制御に関しては大変重要な位置を占める。最近、出芽酵母の寿命制御に関し、ある種の HDAC (Sir2: NAD-HDAC) が重要であることが明らかとなった。Sir2 の変異により長寿命化したのである。HDAC は多種類存在するが、今後は、いろいろな HDAC の老化、寿命制御への効果が調べられるであろう。

う。

昨今、ヒトゲノムプロジェクトの終了にともない、ヒトゲノム中にある NRS および NRS 様配列を調査し整理した。その結果、従来想定されていた遺伝子に加え、新たに数十種類の遺伝子を特定した。これらの多くは進化上、遺伝子重複により創出され、神経機能獲得に特異化したものである。GAD (GAD65 と GAD67 の 2 型存在) 遺伝子もその重要なターゲットのひとつと考えられた。また、我々がマウス GAD65 遺伝子と GAD67 遺伝子を構造解析した結果、両遺伝子に NRS 様配列が認められた。

### 3. 細胞内 Ca, サイクリック AMP, NO による水分泌・開口分泌の細胞内制御機構

村上政隆, 吉村啓一 (北大歯), 瀬川彰久 (北里大医) 橋本貞充 (東京歯大)  
杉谷博士, 横山三紀, 吉垣純子, 道家洋子, 通川広美 (日大松戸歯)  
瀬尾芳輝 (京都府医大), 赤川公朗 (杏林大医)

外分泌腺は、分泌刺激を受けると水輸送機構と開口分泌が両方活性化されるが、細胞内 Ca, サイクリック AMP, NO の信号系を含む細胞内制御機構については不明な点が多い。本研究では、大量の水分泌と開口分泌を観察できる唾液腺を対象を限定し、血管灌流系及び遊離細胞系を用い、分泌経過に沿って水・アミラーゼ・ムチンの分泌・酸素消費を計測し種々の細胞内情報伝達系の協調機構を検討した。平成 12 年度は、1) 細胞内 Ca 信号による分泌反応に対する細胞内サイクリック AMP 信号による増強効果の存在の有無、2) ラット耳下腺腺房細胞における VAMP2 結合タンパク質の検索、3) 低分子量 GTP 結合タンパク質 Arf の役割、4) ウサギ顎下腺細胞における一酸化窒素 (NO) 産生調節、5) 傍細胞水輸送の制御因子と開口分泌活性化の関係について検討を行った。

1) ラット顎下腺血管灌流標本を作り、水分泌・ムチン分泌・酸素消費の時間経過を測定、平静 10-11 年度で明らかにならなかった アドレナリン受容体刺激による水分泌と酸素消費の増強効果を低濃度のカルバコールで刺激することにより確認することができた。従来の結果とあわせ、増強効果が細胞エネルギー供給系の能力により

制限される可能性が示唆された。

2) ラット耳下腺腺房細胞における VAMP2 結合タンパク質の検索に関しては、ラット耳下腺 cDNA ライブラリーを作成し、酵母を用いた 2 ハイブリッドシステムにより行った。Syntaxin4 が結合する結果は得られたが、新たな VAMP2 結合タンパク質はまだ得られていない。

3) Arf に関しては、可透過性耳下腺腺房細胞において Arf ペプチドが cAMP 依存性アミラーゼ開口放出を抑制した。このことから、開口放出に関連することが示唆された。

4) ウサギ顎下腺の NO 産生においては、Ca<sup>2+</sup> 依存性の NO 合成酵素が細胞質および細胞膜に局在することが認められ、細胞膜 NO 合成酵素の活性はイノシトールリン脂質により阻害を受けることから、NO 産生にはリン脂質代謝が関与することが示唆された。

5) ラット顎下腺血管灌流系を倒立顕微鏡システムに設置し、細胞間隙を蛍光色素マーカーが通過する観察を予備実験として実施、分泌刺激で制御される可能性が示された。また細胞間隙微細構造観察のため金関博士の指導を得てラット顎下腺血管灌流試料の凍結切断実験を開始した。

#### 4. 卵活性化精子因子の同定と作用機序

宮崎俊一, 白川英樹, 淡路健雄 (東京女子医大第二生理)

経塚啓一郎 (東北大浅虫臨実), 出口竜作 (宮城教育大)

黒田英世, 黒田 律 (富山大生物)

毛利達磨

受精時に卵子活性化の引き金になる細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇を誘発する機序, 精子の卵活性化因子の同定を目的として共同実験を行った。1) ハムスター精子あるいはブタ精巣から卵活性化蛋白質を精製した。活性のアッセイは, 精子抽出物を各種クロマトグラフィーにかけて部分精製した画分をマウス卵内に注入し, 反復性  $Ca^{2+}$  増加 ( $Ca^{2+}$  オシレーション) を高速  $Ca^{2+}$  画像解析装置 (ARGUS

/HiSCA, 浜松ホトニクス) を用いて記録した。現在精製途中である。2) 原索動物ホヤの粗精製した精子因子をホヤ卵内に局所注入した際の卵細胞内  $Ca^{2+}$  上昇を時・空間的解析し, 卵皮質が中心部に比べて高いことを明らかにした。3) ウニ卵内に注入した caged  $IP_3$ , caged cADP ribose を紫外線照射により瞬時に活性型に変換して卵を刺激した場合  $Ca^{2+}$  波が発生するか否かを観察した。

#### 5. 卵細胞における $IP_3$ 動態の可視化

飯野正光, 広瀬謙造, 山澤徳志子 (東京大・大学院医学研究科)

尾田正二, 河内 全 (東京女子医大第二生理)

尾松万理子 (滋賀医大・第二生理)

毛利達磨, 宮崎俊一

細胞内二次メッセンジャーであるイノシトール 1,4,5 三リン酸 ( $IP_3$ ) の動態を可視化して画像解析を行うことは, 細胞内情報伝達の研究上極めて有用である。本共同研究は, 広瀬らが開発・発表した  $IP_3$  用プローブ (Science, 1999, vol. 284) を卵細胞に適用し, 時・空間的に画像解析することを目的とした。ホスホリパーゼ C (PLC)  $\delta 4$  の PH ドメイン (PHD) に蛍光蛋白質 EGFP を連結した cDNA を用いて大腸菌で PHD-EGFP を合成し, マウス卵細胞に注入した。PHD は細胞膜のフォスファティディルイノシトール 4,5 二リン酸 ( $PIP_2$ ) に結合するが,  $IP_3$  に約 20

倍強い親和性を持つため, 細胞刺激により  $IP_3$  が産生された場合に  $PIP_2$  から解離して  $IP_3$  と結合する。 $PIP_2$  および  $IP_3$  に親和性のない変異 PHD-EGFP も同時注入し, PHD-EGFP との ratio imaging を行った。注入した PHD-EGFP は細胞膜直下に移行して局在し,  $IP_3$  を注入すると PHD-EGFP は細胞質に一過性に移行して,  $IP_3$  プローブとして働いていることが示された。しかしこの変化が認められる  $IP_3$  濃度は, 小胞体からの  $Ca^{2+}$  遊離を起こす濃度よりかなり高く, プローブの対  $IP_3$  感受性を高める改良が必要と考えられた。

## 6. 神経ペプチド PACAP の神経細胞分化誘導作用と細胞内シグナル伝達機構

矢田俊彦 (自治医科大・第二生理)

塩田清二, 舟橋久幸, 大滝博和 (昭和大・医・第一解剖)

土肥謙二 (昭和大・医・脳神経外科)

周 成基, 岩田武男 (早稲田大・理工・理学研究科)

橋口鈴子 (鹿児島大・医・第二内科)

浦村一秀, 室屋真二 (鹿児島大・医・精神科)

小幡邦彦, 八木 健, 毛利達磨

神経ペプチド PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide) の選択的受容体 PAC1-R はラット胎仔の 9 日目の神経上皮にすでに発現している。そこで、その機能的意義を明らかにすることを目的として、ラット初期胚の神経上皮細胞における PACAP の作用と細胞内シグナル伝達機構を検討した。ラット胎仔 9 日目の神経上皮細胞から単一細胞を分離し fura-2 蛍光画像解析により細胞内  $Ca^{2+}$  濃度 ( $[Ca^{2+}]$ ) を測定した。PACAP は  $10^{-10}$

$M-10^{-8} M$  で濃度依存性に  $[Ca^{2+}]$  を増加させたが、同濃度域の VIP は効果がなかった。この  $[Ca^{2+}]$  反応は、cAMP-PKA 系および PLC-PKC 系のアゴニストにより mimic され、これらのアンタゴニストにより阻害された。以上の結果より、PAC1-R は PKA および PKC を介して  $[Ca^{2+}]$  増加にリンクすることが示された。PACAP はこれら 3 つのシグナル伝達系の活性化を介して初期神経細胞分化に重要な役割をしていることが示唆される。

## 7. 神経・分泌細胞の開口放出機構の研究

河西春郎

阿部輝雄 (新潟大学脳研究所)

本田敦子 (新潟大学脳研究所)

神経系株細胞 PC12 の開口放出を膜容量測定と FM1-43 による膜染色法の 2 つを同時に組み合わせて、測定し比較した。速い膜容量増大相及び遅い膜容量増大相のそれぞれに同期した FM1-43 の蛍光増大が観察された。膜容量測定と蛍光測定は全く独立な校正を行っているにもかかわらず、速い膜容量増大は約 13% と非常によく一致し、速い膜容量増大相で沢山の開口放出が起きていることが確認された。この相では、モノアミンの放出が全くない

ので、速い開口放出はシナプス様小胞の開口放出を見ていると考えられる。これまで、速い膜容量相では比較的少数のアセチルコリンの量子的放出が見られなかったもので、それが開口放出を見ているのかどうか疑念があったが、今回の結果から、アセチルコリンを十分に含まないシナプス様小胞が沢山あり、この開口放出が速くおきていることが示唆された。

## 8. 虚血性神経細胞死と容積調節チャネルの機能連関

塩田清二, 舟橋久幸, 大滝博和 (昭和大医学部・第一解剖学)

土肥謙二 (昭和大医学部・脳神経外科) 矢田俊彦 (自治医科大学・生理学第 2 講座)

坪川 宏, 岡田泰伸

虚血性神経細胞死は炎症性サイトカイン, グルタミン酸, アラキドン酸, 接着分子, フリーラジカルや NO な

どのような因子が関与する。しかし、その詳細な機構については依然不明である。本研究は虚血性神経細胞死の誘導機構の解明を目的とし、3種類の炎症性サイトカイン(IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6)の遺伝子欠損(KO)マウスを用い、2種類の脳虚血再灌流モデルにより虚血性神経細胞死誘導作用の解明を試みた。IL-1およびIL-6 KOマウスは東京大学医学研究所 岩倉洋一郎先生より、TNF- $\alpha$  KOマウスは農林水産省 家畜衛生試験場 関川賢二先生より供与された。脳虚血モデルは臨床例で多く見られる局所脳虚血である中大脳動脈閉塞モデル(tMCAO)とアポトーシス様神経細胞死を誘導する前脳虚血(心停止モデル; HA, 総頸動脈閉塞モデル; 2-VO)を用い、形態学および生化学的手法により解析を試みた。tMCAO後の神経細胞死の比較は脳梗塞体積により行い、HAおよび2-VO後の神経細胞死の比較は海馬歯状回CA1領域をトルイジンブルー染色による形態学的正常細胞数と、アポトーシス細胞検出法の一つであるTUNEL染色の陽性細胞数の比較により行った。IL-1 KOはtMCAO後、脳梗塞巣が約40%減少した(図1)。HA後のTUNEL陽性細胞の染色性も減少した。この結果、IL-1は虚血神経細胞死誘導が示唆された。IL-1の神経細胞死誘導機構の解明のため、Griess法を用いNO代謝物(NOx)の測定を試みた。両虚血モデルにおいてIL-1 KOはNOx産生が低下した。更にtMCAO後のIL-1 KOはwildに比べ強力な酸化障害能を有するONOO<sup>-</sup>のマーカである3-nitrotyrosineの低下を認めた。この結果はIL-1の神経細胞死誘導機構に

NO産生を介する酸化障害の関与を示唆した。

TNF- $\alpha$  KOはtMCAOおよび2-VOの両モデルで神経細胞死の減少が認められた(図1)。その機構は免疫染色によりTNF- $\alpha$  KOは活性化カスパーゼ-3の陽性細胞数やカスパーゼ活性の減少を認めておりカスパーゼによる神経細胞死誘導が強く示唆された。IL-6 KOは神経細胞死が増加する傾向にある。しかし、その機構に関してはまだ明確ではない。

今後、容積調節チャンネルとこれらのサイトカインがどのように神経細胞死を制御しているか検討していく予定である。

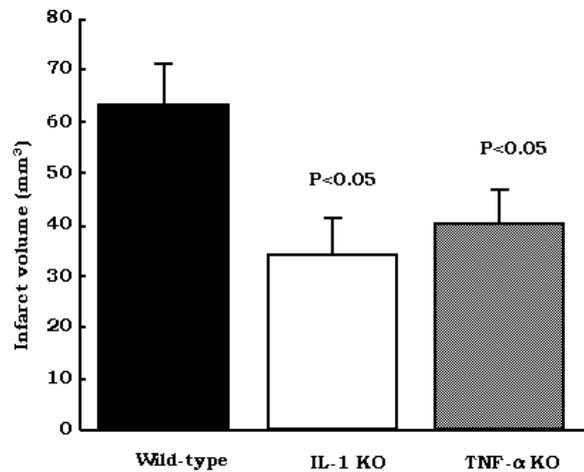


図1: tMCAO後48時間目における脳梗塞巣の比較

## 9. 非上皮性 CFTR Cl<sup>-</sup>チャンネルの調節に関与する新規プロテインフォスファターゼの同定

高井 章 (名大・院・医・分子動態)

上村大輔 (名大・院・理・有機化学)

木越英夫 (筑波大学・生物有機化学)

高井佳子 (名大医学部附属病院・眼科)

岡田泰伸

心筋 CFTR Cl<sup>-</sup>チャンネル活性はオカダ酸感受性フォスファターゼ(PP)と9-AC感受性PPの両者によって制御されている。前者はPP2Aであることが判っているが、後者の詳細は不明である。Mg<sup>2+</sup>感受性PPの関与を調べる目的で、細胞内Mg-ATPをミリモル以上に維持した上で細胞内遊離Mg<sup>2+</sup>濃度を変化させて、モルモット単離心室筋から全細胞電流記録を行った。その結果、cAMPで

活性化されるCFTR型Cl<sup>-</sup>電流は遊離Mg<sup>2+</sup>増によって濃度依存的・可逆的に抑制されること、そしてこの抑制は9-ACによって阻止されることが判った。さらには、内在性PP活性の9-AC感受性成分は、ミリモルオーダーの遊離Mg<sup>2+</sup>によって実際に活性化されることも明らかとなった(図1)。

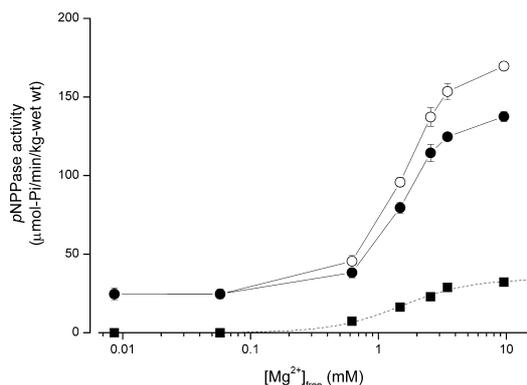


図 1 : 9-AC 感受性 PP 活性の Mg<sup>2+</sup> 依存性

心筋抽出液中の PP 活性を、p-ニトロフェニル燐酸 (pNPP; 2 mM) を基質とし、5 μM のマイクロシチン-LR (PP1 および PP2A の特異的阻害剤) の存在下で測定した。電気生理学的実験に使用したのと同じいろいろな濃度の遊離 Mg<sup>2+</sup> を含む液中 (pH 7.35) を用いた。測定は 9-AC (100 μ) 非存在下 (○) および存在下 (●) で行い、得られた活性値の差 (■) を 9-AC 感受性活性としてプロットした。

この 9-AC 感受性 PP の本体はまだ捉えられていない。本酵素は、主要なセリン/スレオニン PP (PP1, PP2A, PP2B および PP2C) に比べ細胞内含量が非常に少なく、通常の液クロ操作で精製することは困難であるので、9-AC をリガンドとしたアフィニティ担体の合成に着手した。そのためには、9-AC 分子のどこかに適当な長さの

ブリッジを挿入し、セファローズなどにつなぐ必要がある (図 2)。そこでまず、最適なブリッジの挿入部位を決定する目的で、9-AC の 1 位、2 位、3 位および 10 位などに、ブリッジとして用いる比較的短い直鎖状の構造 [例えば *N*-(6-amino-hexyl)-formamide など] を導入し、酵素活性阻害効果への影響を調べた。その結果、2 位について 1 位への挿入が最も有望であることがわかってきた。(ちなみに、10 位への導入は、9 位のカルボン酸の修飾とともに、9-AC の PP 阻害作用を完全に消失させることが判明した。) すでに、これらの部位に導入したブリッジを介してセファローズにつないだ 図 2 のような担体をいくつか合成しており、試料の吸着・溶出の条件を検討しているところである。

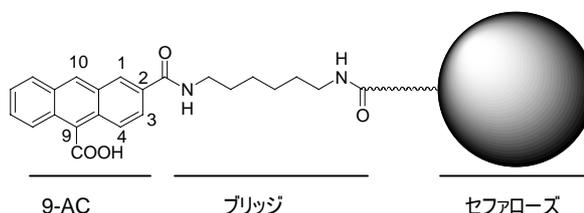


図 2 : 9-AC をリガンドとするアフィニティ担体合成の試み

9-AC 分子のいくつかの部位 (本図では 2 位) に直鎖状のブリッジを挿入し、それを介してセファローズにつないだ。

## 10. 正常発達及び病態における糖鎖構造の解析

和田洋巳 (京都大学医学部附属病院・呼吸器外科)  
 田中文啓 (京都大学医学部附属病院・呼吸器外科)  
 大竹洋介 (京都大学医学部附属病院・呼吸器外科)  
 中川達雄 (京都大学大学院医学研究科・大学院生)  
 長谷純宏 (大阪大学理学部・化学科)  
 長束俊治 (京都工芸繊維大学)  
 中北慎一 (大阪大学理学部・化学科)  
 池中一裕

細胞表面に存在する糖鎖は、細胞間における情報伝達や制御に大きな役割を果たしている事が次第に明らかになってきたが、糖鎖構造は極めて複雑且つ変化に富んでいるため、正常発達や病態における糖鎖構造の解析はあまり十分に進んでいない。また肺癌は本邦において悪性

腫瘍による死亡原因の第 1 位で、その早期発見が切に望まれる疾患である。昨年度までの本共同研究において、多検体中の糖鎖構造を短時間に系統的に解析しうるシステムが確立され、これを用いて健康人のと肺癌患者の血清蛋白に発現している糖鎖が統計学的に変化しているこ

とを示すことができた。すなわちヒト血清中に発現しているN結合型糖鎖の30種類,84.1%の構造が明らかにしたことを踏まえて,血清中糖鎖は,各々の構造の含有率のばらつきが少なく,その発現は極めて厳しく制御されていることを示した。またガラクトース付加N-アセチルグルコサミンの3本鎖を有するトリマンノシルコアの非還元末端にフコース側鎖を有する構造の糖鎖(A3G3Fo, 図1)が肺癌患者血清に有意に増加していた。(p<0.01)

以上のような結果から,本年度はプロスペクティブに非小細胞肺癌患者の術前術後の血清においてA3G3Fo構造糖鎖がどのように変化するか検討することを計画し,

実行中である。前年度の報告では患者総数は14例であったが,50例程度を目標に収集して検討し,非癌患者と比較して肺癌患者にてA3G3Fo構造糖鎖が血清内に有意に多く発現していることの追試と,外科手術によって腫瘍が体内から切除されることで,その発現がいかなる変化を示すかを検討する。切除患者が再発した際にこの構造の糖鎖発現も検討する。この構造の糖鎖発現が,腫瘍の切除によって低下し,再発によって上昇するなら,臨床応用されている腫瘍マーカーとは独立した新たなマーカーとして用いることができ,その可能性を検討する。

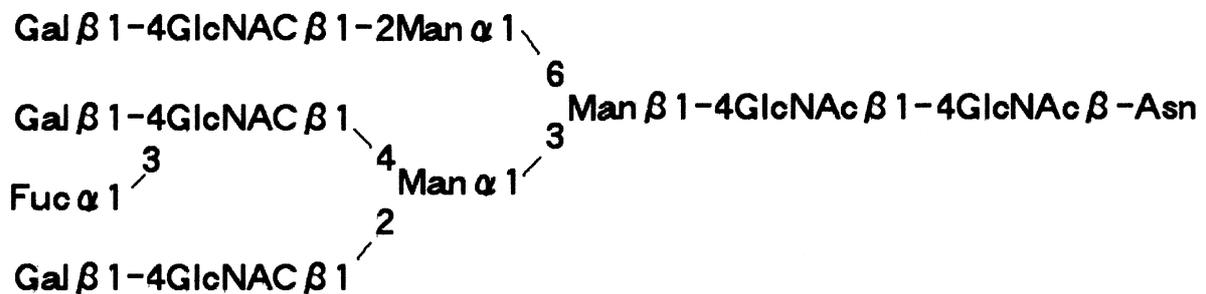


図 1

## 11. レトロウイルスベクターを用いた胃癌関連遺伝子の機能発現クローニング

奥村俊一郎 (関西医科大学第2外科)  
 中根恭司 (関西医科大学第2外科)  
 清水恵司 (高知医科大学脳神経外科)  
 栗山茂樹 (奈良県立医科大学第3内科)  
 松川則之, 湯浅浩之 (名古屋市立大学第2内科)  
 馬場広子 (名古屋市立大学第二生理学)  
 佐々木学 (大阪大学大学院医学系研究科)  
 山田 齊 (関西医科大学第1外科)  
 池前一裕

Functional cloning においては細胞への高い遺伝子導入効率が必要であり,エレクトロポレーション,リポフェクション,等の方法が行われてきた。しかし,いずれの方法も遺伝子の発現は一過性であり,長期間の安定した発現は望めない。そこでわれわれは,レトロウイルスベクターを使うことにより安定した遺伝子発現をはかると共に,改良したウイルス産生細胞により遺伝子導入効率も向上させ,より効率的なスクリーニングを行った。

【方法】胃癌新鮮切除標本より RNA を抽出し, cDNA を合成したのちレトロウイルスベクターに組み込み,胃癌 cDNA ライブラリーを作成した。改良型ウイルス産生細胞より得られた組換えウイルスライブラリーを正常 NIH3T3 線維芽細胞に transduction させ,機能発現は接触阻害性の消失を指標として重層して増殖する細胞塊を採取した。採取された細胞よりゲノム DNA を抽出した後,組み込まれた cDNA を PCR にて増幅して解析を行った。

【結果】作成された cDNA ライブラリーは  $1.8 \times 10^6$  個の独立クローンを含んでおり、産生されたウイルスの力価は  $2.0 \sim 3.0 \times 10^5/\text{ml}$  であった。Transduction 後 1~3 週の経過中に出現した細胞塊より得た遺伝子を用いて二次スクリーニングを行い、未知のものを含む数個のクローンを得たので解析を行った。シーケンス解析にて elongation factor 1 など既知の癌関連分子の遺伝子を含んでおり、今回のスクリーニング法は、癌の増殖能に関連する遺伝子のクローニングに適していると判断された。クローニング頻度の高かったクローンに注目し全長のシーケンスを行ったところ G-protein-coupled receptor 35 (GPR35) で

あることが確認され、新規にクローニングされた遺伝子のうち 1 つは GPR35 の alternative splicing であることが確認された。RT-PCR による半定量にてこれらの遺伝子の胃癌での発現を検討したところ、多くの症例の癌部で正常粘膜より高い発現が見られた。この遺伝子は正常大腸においては正常胃と同レベルにごく低い発現しか認められないにもかかわらず、正常小腸において高い発現を見ることから、腸上皮化生を経由する分化型胃癌の発生に深くかかわる可能性があるものと考え、さらに検討を進めている。

## 12. 電位依存性カルシウムチャネル 1A サブユニットの異常により引き起こされる神経疾患の病態メカニズムの解明

松山善次郎, 保住 功, 犬塚 貴 (岐阜大学医学部高齢医学講座)

森 泰生, 井本敬二

脊髄小脳変性症 6 型 (spinocerebellar ataxia 6: SCA6) は、電位依存性カルシウムチャネル 1A サブユニット遺伝子で CAG リピートが延長して生じることが知られている。しかし CAG リピートあるいはそれが翻訳されたポリグルタミンの延長がどのようにして神経障害を起こすについては、不明な点が多く残されている。特に SCA6 は他の CAG リピートにより起こる疾患と比較して CAG リピートが短い。

カルシウムチャネル 2 および サブユニットを安定

発現させた baby hamster kidney 細胞に、SCA6 を引き起こす変異を導入した 1A サブユニットの変異遺伝子を一過性に発現させ、核染色法およびヌクレオソームラダー検出法にて細胞死の程度を正常対照遺伝子を導入した群とで比較検討した。変異遺伝子導入群と正常対照群とでは、明らかな細胞死の程度の差は認められなかった。今後、アデノウイルスベクターなどを用いて初代培養ブルキン細胞へ変異遺伝子を導入し細胞死や局在の変化を検討していく予定である。

## 13. trp チャネルの開口制御機構に関する研究

金子周司 (京都大学大学院薬学研究科)

森 泰生

我々は、血管平滑筋細胞において、GTP 結合(G)蛋白質共役型受容体の刺激により活性化される、Ca 流入機構の実体を明らかにしてきた。7 つマウス TRP ホモログ (TRP1-7) を見出し、これらの TRP の組み換え発現により得た、単一分子種よりなる受容体活性化 Ca チャネル(RACC)の機能的解析を行った。受容体作動性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル (RACC) を形成する TRP5 の開口機構について、*Xenopus* 卵母細胞にマウス TRP5 を発現させて検討した。

TRP5 チャネル応答は、共発現させたムスカリン  $M_1$  受容体の  $\text{Ca}^{2+}$ -free 溶液中における acetylcholine (ACh) 刺激後、外液に  $\text{Ca}^{2+}$  を流した時の  $\text{Cl}^-$  電流として記録され、同様な TRP5 チャネル応答は G 蛋白質の直接的な活性化 (GTP S 注入) によっても惹起された。これらの ACh あるいは GTP S が惹起した TRP5 応答は  $G_{q/11}$  に対するアンチセンス DNA, Phospholipase C 阻害剤 U73122,  $\text{IP}_3$  受容体阻害剤 xestospongine C のいずれの前処置でも有意

に抑制された。IP<sub>3</sub>受容体の直接的な活性化(adenophostin A や IP<sub>3</sub>の注入) は TRP5 チャンネル応答を惹起したが、この応答は G<sub>q/11</sub> アンチセンス DNA や U73122 では抑制

されず、xestospongine C によって抑制された。以上の結果から、TRP5 の開口は IP<sub>3</sub>受容体の活性化に依存していることが示唆される。

#### 14. 脊椎動物 TRP ホモログと G タンパク質共役型受容体で活性化される Ca<sup>2+</sup>透過型陽イオンチャネルの分子的相関に関する研究

井上隆司 (九州大学大学院医学系研究科)

森 泰生

我々は、血管平滑筋細胞において、GTP 結合(G)蛋白質共役型受容体の刺激により活性化される、Ca 流入機構の実体を明らかにしてきた。7 つマウス TRP ホモログ (TRP1-7) を見出し、これらの TRP の組み換え発現により得た、単一分子種よりなる受容体活性化 Ca チャンネル (RACC) の機能的解析を行い、平滑筋の "native" RACC の実体を探った。G 蛋白質共役型受容体の活性化により惹起される組み換え TRP6 電流は、過分極側及び逆転電位付近での抑制、細胞外 Ca や一般的には阻害剤として使われる flufenamate による増強等、門脈平滑筋に存在する alpha1-アドレナリン受容体刺激により活性化

されるカチオン電流に非常に類似していた。また、門脈平滑筋細胞における各種 TRP RNA の発現を検討したところ、TRP6 が圧倒的に高発現しており、抗 TRP6 抗体によって単離門脈平滑筋細胞の形質膜付近への局在が見られた。さらに、TRP6 アンチセンスオリゴヌクレオチド処理により TRP6 タンパク質の発現を抑制すると、alpha1-アドレナリン受容体活性化カチオン電流および Ba 流入が阻害された。以上のことから、TRP6 が平滑筋の "native" RACC の実体の一つであることが明らかになった。今後は、平滑筋収縮の交感神経系調節において、TRP6 チャンネルが果たす役割を明確にしていきたい。

#### 15. サルの味覚弁別行動に関する大脳皮質諸領野間の結合

小川 尚, 伊藤真一, 井福裕俊, 中村民生, 平田真一 (熊本大学) 松山清治 (札幌医大)

森 茂美, 森 大志

サルでは視床味覚中継核である視床後内側腹側核小細胞部から大脳皮質前頭弁蓋部で体性感覚野 (area 3) 口腔再現領域と外側溝内の前頭弁蓋部と島皮質との移行部 (area G) の両者に投射する。さらに、ニホンザルに味覚弁別行動を行わせつつ大脳皮質前頭弁蓋部や前頭眼窩野のニューロン活動を記録すると、第一次味覚野とは異なる活動を示す領域が皮質外側面や眼窩面の領野で見られる。これらの領域は高次領域であると考えられる。そこで、これらの領野に逆行性および順行性トレーサーを注入して、高次および一次の味覚関連領野間の線維連絡を明らかにすることを目的とした。

平成 12 年度は、トレーサー注入用のニホンザルを新

たに入手することが困難であったため、前年度までの共同研究で蓄積された注入脳組織 (n=3) の切片標本作製並びにその解析を主として行なった。とくに逆行性トレーサーである蛍光色素 (ジアミディノ・イエロー) を前頭弁蓋部外側面にある高次味覚野の一つ中心前弁蓋部 (PrCO) に注入した 1 例については詳細に解析した。その結果、黄色の蛍光を発する細胞体が外側溝内の第一次味覚野 (area G) に多数見出されたが、area 3 には標識細胞を見出すことはできなかった。area G から PrCO へ投射していることが分かった。

これまで、高次味覚野の一つである前頭眼窩野は area G とその周辺部から投射を受けるといった解剖学的所見が

あるが、今回 1 例ではあるが、PrCO とする高次味覚野に area G からの投射があることを偶然にも見出した。PrCO は、同じ前頭弁蓋部外側面にある area 3 から投射

を受けるのではないかという我々の想像と相違していた。しかし、1 例に過ぎないので、今後例数を増やして確実な所見を得たいと思っている。

## 16. 歩行リズム制御における脳幹下行性投射系の役割

青木 藩, 松山清治, 小林 卓 (札幌医科大学医学部生理学第二講座)  
森 茂美, 森 大志

歩行リズム生成に関わる神経回路網は脊髄の各髄節内に存在し、これらは脊髄軸に沿って吻尾側方向に複数配置されていると考えられる。本研究ではこれら髄節性配置された脊髄歩行リズム生成回路が脳幹下行性投射系により如何なる統合を受けるかを解明することを目的としている。このため、本年度は代表的な脳幹下行系である網様体脊髄路及び外側前庭脊髄路の主投射領域に分布し、左右後肢歩行リズムの協調的発現に重要な役割を持つと考えられている腰髄 層交連細胞回路の髄節性配置様式について逆行性神経標識法を用いて解析した。

**実験方法:** 実験には成ネコを用いた。ネンブータル麻酔ネコを腰椎固定装置に固定し、椎弓切除術を施し腰髄硬膜を露出した。選択露出された左側後肢伸筋(大腿四頭筋または下腿三頭筋)支配神経に刺激用カフ電極を装着し、筋神経刺激で誘発される脊髄背面電位を硬膜上より記録した。脊髄背面電位が最大振幅値を示す腰髄部の硬膜に小孔を開け、これを通して記録電極と逆行性神経トレーサー(BDA)注入用ピペットから成る 2 連ガラスピペットを腰髄内に刺入した。筋神経刺激で誘発される逆行性および順向性フィールド電位記録をもとに左側後肢筋運動ニューロン(MN)層または介在細胞層(

層)を同定し、いずれかの部位 1 箇所 BDA(20%濃度)を微量(10nl)圧注入した。2-3 週間の生存期間後に動物を灌流固定し、脊髄を摘出した。腰仙髄部(L3-S2)の 50 μm 連続横断切片を作製し、これらを ABC/DAB 法により反応し、BDA 逆行性標識細胞を可視化した。これらの切片をもとに、標識細胞の腰髄内分布について解析した。

**実験成績:** すべての注入例において標識細胞は L3-S2 にかけて広範囲に分布していた。標識細胞の吻尾側および左右分布様式について以下の特徴が見出された。1) 全例において標識細胞数は BDA 注入髄節で最も多く、注入部位より離れるにつれて減少した。2) MN 層注入例では標識細胞数は注入側(左側)に極めて多く、層注入例では左右ほぼ同数であった。3) いずれの例でも標識細胞の多くは注入側では 層、反対側では 層に分布していた。以上より、左右の 層交連細胞回路は同一髄節内で強い連絡を持ち、左右の同名関節間における協調的歩行リズム発現に合目的な構成を持つことが示された。これらの成績の一部は、平成 13 年 3 月に開催された Okazaki COE International Symposium(岡崎)並びに第 78 回日本生理学会大会(京都)で発表した。

## 17. 海馬興奮性シナプスの動態と微細形態

岡部繁男(東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科)  
重本隆一  
久保義弘(東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科)  
藤本 和(福井県立大学・看護福祉学部)

海馬神経細胞培養系におけるシナプス構造の動態を解析する目的で以下の 2 項目について実験を行った。

1) GFP 分子の波長変異体を用いた複数のシナプス分

子の局在変化の同時観察

これまでの研究により、シナプス後肥厚部(postsynaptic density; PSD)に局在する NMDA 受容体結合分子である

PSD-95 の動態を，GFP 融合分子を作成する事により可視化する事が可能となった。更に GFP 分子とシナプス機能分子の融合蛋白質を用いた観察系を発展させるために，GFP 分子の波長変異体である YFP および CFP 分子とシナプス前部，シナプス後部の機能分子の融合蛋白質を作成し，複数の分子種の局在を時間軸に沿って観察する，多波長動態解析の手法を開発した。この方法を用いることにより，これまで明らかでなかった，シナプス形成過程における複数の分子のシナプスへの集合の順序を確定することが可能となった。PSD-95-YFP 分子と CFP 分子を同時に発現させることで，シナプス形成過程における spine 構造の形成とシナプス後肥厚部の形成の時間的關係について解析した。また，シナプス前部蛋白質である synaptophysin と CFP 分子の融合蛋白質を用いることで，PSD-95 と synaptophysin のシナプス部位への集積の時間関係も明らかにした。これらの実験により，新規シナプス部位への機能分子の集積は短時間で進行し，spine 構造の形成やシナプス前部へのシナプス小胞の集積は，

PSD-95 の集積よりわずかに先行して起こることが明らかになった。

## 2) 神経活動依存的なシナプス分子の局在変化

シナプス後部構造に局在し，代謝型グルタミン酸受容体と結合する PSD-Zip45 (Homer1c) 分子について，GFP との融合蛋白質を作成し，その動態を海馬神経細胞において解析した。PSD-Zip45 の動態は PSD-95 分子より活発で，数時間のタイムラプス観察でその分子クラスターの局在を大きく変化させた。更に GFP 分子で標識した PSD-Zip45 を発現する神経細胞を KCl およびグルタミン酸で刺激する事により，PSD-Zip45 の神経活動依存的な局在変化が観察された。薬理学的実験により，このような PSD-Zip45 の局在変化は細胞外からの NMDA 受容体および膜電位依存性カルシウムチャネルを介してのカルシウムイオンの流入により引き起こされる事が明らかになった。以上の実験から，PSD 蛋白質はその分子種特異的に，かつ神経活動に依存して局在制御を受けている事が明らかになった。

## 18. 非侵襲的脳機能計測法による高次脳機能可塑性の研究

米倉義晴 (福井医科大学高エネルギー医学研究センター)

定藤規弘

当センターでは，PET や機能的MRIなどの非侵襲的脳機能画像と電気生理学的手法を組み合わせ、短期および長期の学習に伴う脳の可塑的变化，高次脳機能の加齢変化と脳における代償機構の関連を明らかにすることを目的としている。本年度は，高磁場研究用3TMR装置による，高い信号雑音比を利用した脳賦活検査をさらに推し進めた。さらに近赤外線画像装置(NIR)を導入し，乳幼児に適用する前段階として，機能的MRIとの比較を開始した。

盲人の点字読において，一次視覚野の賦活には年齢依存性がある一方，視覚連合野のそれには年齢依存性が無いことをしめした。健聴者における読唇により多感覚領

野である中上側頭溝の賦活が見られることから，この部位が視聴覚統合に関連していると目されている。聴覚脱失によりこの視聴覚統合をになう神経回路に可塑的变化が起こるかを検証するために，早期失聴者と健聴者を対象に機能的MRIを試行した。健聴者は，読唇でのみ中上側頭溝の賦活がみられ，一方聴覚障害者では，いずれの課題においても賦活された。早期失聴により両入力拮抗のバランスが視覚入力に傾いたものと推測された。

新生児期における可塑的变化に関連して，機能的MRIを用いて新生児の一次視覚野及び外側膝状体の光反応性の経時変化を詳細に検討するとともに，MR信号に関するモデルを用いてシミュレーションを行った。

## 19. 黒質 - 脚橋被蓋核系の機能構築及び動作特性

高草木薫, 斎藤和也 (旭川医科大学, 生理学第二)

伊佐 正

本年度は, 基底核の出力核である黒質網様部 (SNr) から脚橋被蓋核のコリン細胞および黒質緻密部のドーパミン細胞に対する抑制作用の有無を検討した。実験にはラット脳幹スライス (400  $\mu$ m) を用い, whole cell patch clamp 法により各々の細胞内活動を記録した。その結果, SNr 刺激は (1) A-電流を持つ脚橋被蓋核細胞 (コリン細胞と考えられる) に対して GABA<sub>A</sub> 受容体を介する抑制作用を (2) 黒質緻密部の細胞に対して GABA<sub>A</sub> 及び,

GABA<sub>B</sub> 受容体を介する抑制作用を誘発すること (3) 各々の抑制作用は SNr 刺激頻度が 50-100 Hz で顕著であること, の 3 点を明らかにした。SNr 細胞の発射頻度が 50-100Hz であることを考慮すると, 本研究の結果は脳基底核がコリン系・ドーパミン系の双方を抑制的に制御することを示唆する。上記成果の一部は, 第 80 回日本生理学学会北海道地方会にて公表した。

20. CO<sub>2</sub> レーザー光線を利用した軸索反射の研究

小山なつ (滋賀医科大学生理学第一講座)

横田敏勝 (聖徳栄養短期大学)

柿木隆介

【研究目的】軸索反射は, 当初機械刺激による血管拡張反応としてとらえられたが, その後ヒスタミンによる軸索反射性血管拡張が臨床診断に利用された。痛み刺激による軸索反射は, 無髄 C 線維の末梢終末部からの神経ペプチドの放出により生じるので, C 線維機能を他覚的に検査することができる。最近われわれは, ハチ毒の発痛物質メリチンによる軸索反射性皮膚温の上昇をサーモグラフィーで解析し, 現在 C 線維の他覚的機能検査法としての有用性を検討している。ヒトでは, 刺激強度 5W, 持続時間 5msec の CO<sub>2</sub> レーザー光刺激は, 針で刺すような痛みを生じる。CO<sub>2</sub> レーザー光による熱刺激は非接触刺激のため, 機械受容器を刺激しない。刺激はパルス状で, 刺激強度や持続時間を変えることができる。本研究の目的は, 「非接触性の CO<sub>2</sub> レーザー光による侵害性熱刺激が軸索反射を誘発するか」を検討することである。

【実験方法】ペントバルビタールナトリウムで麻酔したラットを実験の対象とした。片側の足蹠に, CO<sub>2</sub> レーザー光刺激の持続時間 (20msec, 50msec, 100msec) を変えて, 0.3Hz, 5W で 1 分間刺激した。ラットの下半身の皮膚温の変化をサーモグラフィー (NEC 三栄 TH51-101)

で記録し, 熱画像処理プログラム (TH51-101) で解析した。

【実験結果】CO<sub>2</sub> レーザー光刺激で, 刺激側の後肢の皮膚温が上昇した。刺激の持続時間を 20msec にすると, 足蹠の皮膚温は 刺激停止後が最大で 徐々に下がった。50msec, 100msec では, 刺激了約 3-5 分後まで, 皮膚温の上昇がみられ, 約 20 分後に元のレベルに戻った。メリチンによる軸索反射性皮膚温上昇に, 用量依存性がある。CO<sub>2</sub> レーザー光 50 msec, 100 msec 刺激による皮膚温の上昇は, メリチン 5  $\mu$ g 投与による皮膚温の上昇と同程度であるが, 持続時間はそれより短かった。

【結論】非接触性の CO<sub>2</sub> レーザー光刺激は痛覚受容器を刺激し, A 線維を介する速い痛みを生じさせるだけではなく, C 線維を介する遅い痛みを生じさせると同時に軸索反射性に皮膚温を上昇させることが確認された。

(結果は, 第 24 回神経科学第 44 回日本神経化学合同大会で発表した。小山なつ, 柿木隆介, 横田敏勝 (2001・9) CO<sub>2</sub> レーザー光刺激と発痛物質メリチン刺激による軸索反射 抄録集 p.327)

## 21. ヒルシュスプルング病無神経節腸管における増生外来神経に関する研究

葦澤融司 (杏林大学医学部小児外科学)

赤川公朗 (杏林大学医学部生理学)

尾崎 毅

ヒト・ヒルシュスプルング病では神経節細胞が欠損する病変部狭小腸管では仙骨神経由来の外来神経が増生し狭小化した腸管平滑筋に対し興奮性の神経支配を有している。これまでこの外来神経の増生する原因は不明であった。われわれは神経発芽を抑制的に制御する HPC-1/syntaxin1A に着目し、無神経節部狭小腸管ではこの蛋白が欠損していることを確認した (Nirasawa Y, Akagawa K et al: Altered immunoreactivity of HPC-1/ syntaxin 1A in proliferated nerve fibers in the human aganglionic colon of Hirschsprung's disease. J Mol Neurosci 2001 16:13-19)

一方ヒト・ヒルシュスプルング病は endothelin-B-receptor gene (EDNRB) の遺伝子異常により発生する例があること (Nirasawa Y et al : Japanese patients with sporadic Hirschsprung: mutation analysis of the receptortyrosine kinase proto-oncogene, endothelin-B receptor, endothelin-3, glial cell

line-derived neurotrophic factor and neurturin genes: a comparison with similar studies. Eur J Pediatr 2000 Feb 9; 159 (3):160-167)およびラット・ヒルシュスプルング病も EDNRB の遺伝子異常から発生することから aganglionosis rat はヒト・ヒルシュスプルング病のモデル動物として適切と考え、外来神経の増生に関して aganglionosis rat を用いて HPC-1/syntaxin1A の染色実験を行ってきた。染色した腸管は縦軸方向に直角の切片として光学顕微鏡にて観察したが、増生神経を見い出せずにいた。

近年、腸管の神経支配に関する組織学的研究は whole mount 標本によるものが多く発表され、aganglionosis rat 腸管も whole mount 標本によれば増生した神経を確認できることから今後は標本の作製方法を whole mount に変更し実験を行う予定である。

## 22. Hirschsprung 病コンジェニックラットの作製

安居院高志 (名古屋市立大学医学部実験動物研究教育センター)

尾崎 毅

ヒト Hirschsprung 病モデル動物 AR ラットは日本国内では現在岡崎国立共同研究機構生理学研究所動物実験施設のみで維持されている。最近この原因遺伝子がエンドセリンタイプ B (*Ednrb*) の突然変異であることが、我々及び他の研究グループにより明らかにされた。AR ラットは生後約 3 週間で全例死亡し、モデル動物としての利用が限定されていた。しかしながら、バックグラウンドを Long-Evans (LE) で置き換える予備的実験において症状の発現が緩和され、ホモラットにおいても繁殖年齢まで

生き永らえることが判明した。そこで、*Ednrb* 遺伝子の変異を PCR により検出しながら、AR ラットと LE ラットとの間で 8 世代に渡り戻し交配を繰り返し変異 *Ednrb* 遺伝子を LE ラットに導入したコンジェニックラットの作製を試みた。現在 8 世代目のヘテロラットが丁度作製されたところである。今後このヘテロラットを掛け合わせホモ変異ラットを作製し、その病態を調べる予定である。

## 23. 精巢輸出管異常ラットの精子輸送機能停止に細胞間結合装置と Cell Communication は関係するか？

山本正夫（呉大学・看護学部・人体構造学）

筏井 洋（ドリトル動物病院）

尾崎 毅

本研究で使用した TE ラットは精巢輸出管内に形成された精子瘤により精子および精巢分泌液の輸送が阻止されるため生後 10 週から精子数減少を生じ、15 週から著明な精巢肥大と無精子状態に移行する。この原因として若干の遺伝子異常（1 組の優性遺伝子と 2 組の劣性遺伝子）と体液性因子（抗精子 IgG）の存在が精子瘤形成に関与する可能性が示唆されてきた。

我々はこれまで主として形態学的観察により精巢輸出管異常ラットの精巢輸出管の細胞間結合装置と Cell Communication について検討を加え、その肉眼病理、病態生理、光顕、超薄切片やフリーズフラクチャ - 法による電子顕微鏡学観察は以下のような所見を与えている。

1. 精子輸送停止異常の過程は生後 7 - 8 週に始まり、10 週目で輸出管内の局所的凝集塊形成が著明となり、以後精子数の極端な減少をもたらす。
2. 生後 4 - 8 週までほぼ十分なバリアー機能を示していた精巢輸出管上皮細胞のタイト結合とギャップ結合はそれ以後の炎症部位で消失と置換（3 で説明）を生じ、やがて管腔内の精子塊形成に伴いマクロファージ由来と思われる貪食細胞（管腔内と上皮細胞間）やリンパ球（輸出管周囲の粘膜固有層内）が多数出現し、精子貪食像が多数見られた。
3. 今年度の新たな結果は精巢輸出管上皮細胞が剥離し管腔内で貪食されることを伺わせる像は少ないにも関わらず、閉塞部では上皮細胞の極端な皮薄化が生じていること。また正常上皮細胞では多数の小型ギャップ結合を伴った発達の悪いタイト結合がバリアーを形成しているが、閉塞部ではタイト結合がほとんど消失したり、極

めて脆弱なタイト結合を残すのみになっており、ギャップ結合はほぼ完全に消失している。

タイト結合とギャップ結合の崩壊の機序と精子瘤形成

Suzuki and Nagano(1978)は精巢輸出管上皮細胞のタイト結合は元来発達悪く、容易にトレーサーが通過してしまうことを報告している。従って抗精子抗体の精巢輸出管上皮細胞間からの漏出が精子瘤形成の原因となっている可能性が強く考えられる。

また山本ら(1999)の肝培養上皮細胞の結果は TJ 領域での GJ 出現は細胞増殖の際の細胞質分裂に一致してあらわれ、以後の過程で消失またはさらに大型のギャップ結合形成への核となることを示している。しかしながら本研究においてはギャップ結合はほとんどタイト結合内にも外側細胞膜にも観察されなかった。この事実は細胞増殖過程が大きく損なわれるか、細胞増殖がひどく低下している可能性を捨てきれないことを示している。

異常発現機構の可能性

1. 細胞増殖過程の異常を示している可能性がある。
2. 特殊な GJ Dependent Trans-epithelial Transport の存在とその異常を示しているのかもしれない。
3. 精巢輸出管は活発な再吸収と分泌を行い精子液組成を大きく変える部位であり、かつバリアー機能のよわい特殊なタイト結合を形成しており、自己抗原性の発現を生ずる可能性が高いと考えられる。
4. 管腔内に多数観察されるマクロファージやリンパ球のタイト結合部通過により、なんらかの機構を介してタイト結合がさらに脆弱化してしまった可能性がある。

## 24. 原索動物横紋筋の細胞内構造形成とカルシウム制御機構の系統発生

井上 勲 (徳島大学分子酵素学研究センター)

筒井泉雄(一橋大学・生物学研究室)

尾崎 毅

骨格筋は、神経信号を受け収縮にいたる情報伝達過程(興奮・収縮連関)に独特な機能を獲得した。それは、収縮(筋小胞体(SR)からのカルシウムイオンの放出による)のために細胞外からのカルシウムイオンの流入を必要とせず、筋膜(T-管膜)の脱分極が直接SRからのカルシウムイオン放出をトリガする機構(Depolarization Induced Calcium Release, DICR)である。信号伝達担体はT-管膜にある膜電位センサーで、これが脱分極により膜内を移動することがSRのカルシウム放出チャンネル(Ryanodine 受容体)へ伝わる信号となる。

我々は系統発生的にどの段階でこの機構が獲得されたかを探った。系統発生樹を辿り、それぞれの進化の段階に位置する代表的な動物種の横紋筋(Twitch muscle)細胞について、DICR機構の存在を調べた。その結果DICR獲得は、原索動物、頭索類と脊椎動物、無顎類の間で不連続的に起きたことが判った(Inoue et al. 1994)。DICR機構獲得直前に位置する頭索類、Amphioxus(ナメクジウオ)と直後の無顎類Lamprey(ヤツメウナギ)の遊泳筋(体側筋)はよく似た層構造を持ち、遊泳行動も大変よく似ている。しかし両者では興奮・収縮連関機構が質的に異なる。Amphioxusにおいては、心筋同様、L-型カルシウムチャンネルを介して細胞内に流入するカルシウムイオンが収縮に必須である。すなわち横紋筋は骨格筋同様、運動神経に支配される随意筋であるが、興奮・収縮連関機構は心筋に近い。

進化前に位置する原索動物の横紋筋には、進化の準備のさまざまな試行が見られる。種によって、単核・多核、T-管、SRのあらゆる組み合わせがある。SRのカルシウムイオン制御にも進化が見られる。進化の準備が整った中で、膜電位センサーの獲得が最後の引き

金を引いたといえる。すなわち、進化は遺伝子レベルではより連続的に進んでいた事を示唆する。

我々の実験結果を以下に示す。

### 1. Sagitta(ヤムシ)カルシウム制御機構

Sagittaは最も原始的な捕食動物である。頭部の捕食毛を動かす横紋筋にはナトリウムチャンネル、L-型カルシウムチャンネルが存在すること、また対側筋にはナトリウムチャンネルは無く、L-型カルシウムチャンネルが存在することが確かめられた。どちらもSRを持ち、蛍光リアノジンで蛍光染色される。しかし、カフェイン、リアノジンの薬物効果は全く認められなかった。それらの結果は、Sagitta横紋筋に於いては、リアノジン受容体は存在するものの、細胞内カルシウム放出チャンネルとしては機能していないことを示唆する。

### 2. Doliolids(ウミタル)のカルシウム制御機構

Doliolids横紋筋はSR、T管ともに欠いた特殊な単純構造を持つ。横紋筋細胞からL-型カルシウム電流が記録された。細胞にカルシウム蛍光色素(Fluo-3)をロードし、細胞外のカリウムイオン濃度を上昇し脱分極すると、細胞内のCa<sup>2+</sup>濃度の上昇(蛍光強度の上昇)が記録された。細胞外にコバルト、またはニフェジピンを加え、カルシウムチャンネル電流を阻害すると、脱分極による細胞内カルシウムイオン濃度の上昇は全く起こらなかった。また、カフェイン、リアノジンによる細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇、または阻害は全く起こらず、これらの存在化で脱分極によりCa<sup>2+</sup>濃度の上昇は正常におきた。また、細胞内外のNa<sup>+</sup>をLi<sup>+</sup>に置きかえると可逆的な細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇が認められた。これらの結果は、筋収縮はL-型カルシウムチャンネルを通して流入したCa<sup>2+</sup>のみを利用し、Ca<sup>2+</sup>排出はNa<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>によることを示す。

# 【 計畫共同研究報告 】

# 計画共同研究報告

## [ 目 次 ]

1. コンディショナルジーンターゲティングによる GnRH ニューロンの機能解析 (佐久間康夫ほか) .....	132
2. 新規の神経突起伸長遺伝子 norbin のノックアウトマウス作成による生理機能の解析 (丸山 敬ほか) .....	132
3. フラムトキシンの形成する膜孔の性質および膜孔形成による腸管上皮細胞の体積変化 (富田敏夫ほか) .....	133
4. セロトニン 2 A 受容体欠損マウスの作成と機能解析 (濱田 俊ほか) .....	133
5. Fyn ノックアウトマウスにおける快感報酬系 A10 ドーパミン神経の依存性薬物・ 神経伝達物質応答の解析 (滝川守国ほか) .....	134

## 1. コンディショナルジーンターゲティングによる GnRH ニューロンの機能解析

佐久間康夫, 加藤昌克, 七崎之利 (日本医科大学第一生理学教室)

小幡邦彦

本研究の目的は GnRH ニューロンの役割を個体レベルで明らかにすることである。その研究に用いるターゲティングマウスの作成を進めてきた。約 10kb のマウス GnRH 遺伝子をクローニングし, それに loxP とスクリーニング用のネオマイシン耐性遺伝子 (PGK-neo) を組み込み, ターゲティングベクターを作成した。すなわち, PGK-neo をエクソン 4 の下流に組み込みその両端に loxP を組み込んだ。さらにもう一つの loxP をエクソン 1 の上流に組み込み, ターゲティングベクターとした。このベクターをエレクトロポレーション法によりマウス由来の

ES 細胞に導入し, ネオマイシン耐性の有無によって相同組み換えをおこした ES 細胞を分離した。この ES 細胞を増殖し, 72 個の細胞に Cre recombinase を作用させ PGK-neo のみを欠失した ES 細胞を選別した。選別は PCR 法とサザンプロット法を併用して行った。PCR 法で PGK-neo のみを欠失した ES 細胞を 7 個選別し, サザンプロットで最終的に 5 個の陽性クローンを選別した。以上の如くターゲティングベクターの作成から導入, ES 細胞の選別まで終了した。今後はマウス胚に今回選別した ES 細胞を導入しキメラマウスの作成を行う。

## 2. 新規の神経突起伸長遺伝子 norbin のノックアウトマウス作成による生理機能の解析

丸山 敬 (埼玉医科大学・医学部・薬理学教室)

久米秀明 (東京都精神医学総合研究所)

小幡邦彦

反復刺激後にシナプスの伝導効率の上昇が長期に持続する現象 LTP (長期増強) は記憶のモデルとして注目されている。K チャンネル阻害剤 tetraethylammonium によって誘因されるラット海馬スライスの LTP 様現象に関連した遺伝子の特定を目指し, 神経組織に特異的な遺伝子 (KW8, norbin) を特定した。KW8 は, 分化関連の転写因子に多く見られる basic helix-loop-helix 領域を持つ新規の遺伝子であった。KW8 は中枢神経に特異的に発現しており, 現在は NeuroD2 と命名され, そのノックアウトマウスが報告された (Olson JM ら, *Devel. Biol.* 2001, 234, 174-)。norbin の核酸配列ならびに蛋白質の推定アミノ酸配列は, データベースのホモロジー検索では新規の遺伝子であった。その発現は神経細胞に特異的であり, 海馬スライスでは, TEA 処理によってその発現が増大した。また, 反復電気刺激を行った海馬スライスの発現も ISH で観察すると上昇する傾向が見られている。HE5 の cDNA を神経系培養細胞である Neuro 2a に遺伝子導入によって過剰発現したところ, 神経突起の伸長が誘引され

た。我々の報告から 2 年後, 軟骨のハイドロキシアパタイト吸収促進活性をもち軟骨と神経に発現している因子として neurochondrin (Ishiduka Y ら *Biochim Biophys Acta.* 1999 1450:92) として norbin が報告された。末梢神経での norbin の発現を再検討したところ, 末梢の神経細胞, 特に腸管神経叢に発現していることが確認された。

本共同研究によって数年来 norbin ノックアウトマウスの作成を目指してきた。使用するノックアウト・ベクターを 5 種類作成し, 数千個の ES 細胞のクローンをスクリーニングしたが相同組換え体を得ることができなかった。2001 年 7 月になって, ランダムインサクションによりノックアウトマウスを網羅的に作成するプロジェクトを行っているドイツの GSF-Institute of Mammalian Genetics より, norbin ノックアウトマウスが得られたことから共同研究の提案があった。今後はこのノックアウトマウスを解析することによって, norbin の生理機能の解析を目指す。

## 3. フラムトキシンの形成する膜孔の性質および膜孔形成による腸管上皮細胞の体積変化

富田敏夫, Gulnora TADJIBAEVA (東北大学大学院農学研究科)

Rabshan SABIROV

エノキタケ子実体に存在する溶血性タンパク質, フラムトキシンは白血球などの標的細胞に膜孔を形成して細胞崩壊, あるいはアラキドン酸代謝など細胞機能の亢進をおこす。腸管上皮細胞に対しては細胞を膨潤させてタイトジャンクションの物質透過性を高める。本研究では, このフラムトキシンによる細胞体積増加の仕組みを解明するために, フラムトキシンの形成する膜チャネルの性質を検討した。フラムトキシンの形成する膜孔の実体は, このタンパク質分子が細胞膜において自己集合して形成する外径 10 nm, 内径 5 nm のリング状構造体であった。フラムトキシンは脂質二重層膜(Planar lipid bilayer)に大小 2 種類の電位依存的に開閉する陽イオン選択的チャネルを形成した。大きいチャネルは実効内径約 5 nm の親水性の孔であり, フラムトキシンが形成するリング状構

造体であった。一方, 小さいチャネルの形成はフラムトキシンの添加直後に起こることから, その分子の実体はリング状構造体に至る中間体であると考えられるが, 詳細は不明である。また, ヒト腸管上皮細胞, HeLa 細胞などにフラムトキシンを作用させると, パッチクランプ法によってフラムトキシン特有のチャネル活性が検出された直後から細胞膜の盛り上がりによる bleb 形成および細胞の膨潤が観察された。フラムトキシンのチャネル形成と細胞体積変化およびその後起こる細胞崩壊の関連についてさらに検討している。

Tadjibaeva G, Sabirov R, Tomita T (2000) Flammutoxin, a cytolysin from the edible mushroom *Flammulina velutipes*, forms two different types of voltage-gated channels in lipid bilayer membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1467: 431-443.

## 4. セロトニン 2A 受容体欠損マウスの作成と機能解析

濱田 俊 (筑波大学基礎医学系)

奥田 糧子 (大阪大学基礎工学部)

田口 祐介 (奈良先端科学技術大学)

金子 涼輔 (京都大学大学院農学研究科)

八木 健

(目的) セロトニン 2A 受容体は中枢神経系の広範な領域で発現しており, うつ病などの精神障害や動物の情動行動に関与していると想定されている。またセロトニン 2A・2C 受容体拮抗薬の投与はセロトニン線維の投射領域のシナプス密度を減少させることが報告されている。セロトニン 2A 受容体の個体レベルにおける作用はこれまで受容体拮抗薬を用いて解析されてきた。しかし薬物濃度のコントロールが困難な個体レベルの実験においては他のセロトニン 2 型受容体ファミリーへの影響を無視できず, セロトニン 2A 型受容体単独の個体レベルでの機能を解析する上での障害となっている。本研究では遺伝子標的法を用い, セロトニン 2A 型受容体欠損マウスを作成し, 個体レベルでの行動解析およびシナプス形成に与える影響を検討することを目的とした。

(方法と結果) 昨年度の研究で, 組み換え体 ES 細胞が得られなかったため, 本年度はまずターゲティングベクターの改良を行った。セロトニン 2A 受容体遺伝子の翻訳開始点の直下に 1.8kb のネオマイシン耐性遺伝子を挿入する形式に変更し, これにより 3'側相同領域を 1.6kb 延長し, 5'側に 6kb, 3'側に 2.8kb の相同領域を確保したターゲティングベクターを新たに作成した。このベクターを電気穿孔法により ES 細胞に導入し, 700 クローン以上のネオマイシン耐性クローンについて, サザンブロット法によるスクリーニングをおこなったが, 組み換え体 ES 細胞は得られなかった。

(考察・今後の予定) これまでに 2 種類のターゲティングベクターを用い, 1200 クローン以上についてスクリーニングを行ったが, 組み換え体 ES 細胞は得られなかつ

た。原因は不明であるが、今後はセロトニン 2A 型受容体と考えると考えられる。  
体の他の領域を標的としたベクターを用いる必要がある

### 5. Fyn ノックアウトマウスにおける快感報酬系 A10 ドーパミン神経の依存性薬物・ 神経伝達物質応答の解析

滝川守国 (鹿児島大学医学部)

浦村一秀 (鹿児島大学医学部)

矢田俊彦 (自治医科大学医学部)

八木 健

(目的) Fyn ノックアウトマウスでは情動行動の異常やアルコール感受性の亢進が認められている。一方、中脳腹側被蓋野 A10 ドーパミン神経は依存性薬物の標的であり、快感・報酬系の中核として情動に密接に関与している。本研究は、Fyn と情動・快感・報酬の関連をニューロンレベルで明らかにすることを目的とする。

(方法と結果) Fyn ノックアウトマウスの快感報酬系腹側被蓋野から神経細胞を単離し、細胞内遊離 Ca 濃度を画像解析により測定し、依存性薬物および神経伝達物質 (グルタミン酸、オレキシンなど) の効果を観察し、これ

らの細胞を抗 tyrosine- hydroxylase 抗体を用いて免疫染色しドーパミンニューロンを同定した。この解析結果を野生型マウスと比較検討したが、Fyn ノックアウトマウスにおいて有意な差異は認められなかった。

(考察・今後の予定) 快感報酬系 A10 ドーパミン神経の細胞レベルの解析において Fyn ノックアウトマウスにおいて著明な変化が見られなかったことから、Fyn が情動行動に関与する脳の部位として A10 ドーパミン神経以外が考えられる。

【 磁 気 共 鳴 装 置  
共同利用実験報告 】

# 磁気共鳴装置共同利用実験報告

## [ 目 次 ]

1. マイクロイメージング法による脳機能画像 (fMRI) 法の基礎的研究と神経回路形成過程の 三次元的構成に関する研究 (荻野孝史ほか) .....	138
2. 磁気共鳴イメージングによる内蔵求心神経の中樞投射の同定 (森田啓之ほか) .....	139
3. MRI による聴覚野の観察と電極定位 (力丸 裕ほか) .....	140

## 1. マイクロイメージング法による脳機能画像 (fMRI) 法の基礎的研究と 神経回路形成過程の三次元的構成に関する研究

荻野孝史 (国立精神・神経センター神経研究所), 中村 俊 (国立精神・神経センター神経研究所),  
瀬尾芳輝 (京都府立医科大学), 鷹股 亮 (京都府立医科大学), 松永 是 (東京農工大学),  
永山國昭, 村上政隆

本研究は, 生理学研究所に設置されている動物用高磁場磁気共鳴装置, Bruker BIOSPEC 4.7 Tesla MR 装置の特徴を最大限に活用し, 1) 脳機能の空間的, 時間的发展を可視化, 画像化することを可能とする高空間分解能, 高速マイクロイメージング脳機能画像法を開発し, 脳機能の無侵襲的解析を行うと共に, fMRI 信号変化の機構を明かにすること, 2) 開発した高空間分解能マイクロイメージング法を用い, 神経回路を形成しつつある神経細胞の移動を無侵襲的かつ三次元的に観察する技術を開発し, 神経回路形成過程を可視化, 画像化すること, 3) その他, 種々の生理過程を三次元的に可視化, 画像化し, その過程を無侵襲的に研究することを目的としている。

本報告は, 平成12年度磁気共鳴装置共同利用実験のもとで上記の研究課題のひとつとして行われた「T1 緩和時間 MRI 法によるラット脳室周囲器官の測定に関する研究」の成果を取りまとめたものである。

脳室周囲器官群 (Circumventricular organs, CVO's) は, Blood-Brain Barrier (BBB) に開いた「窓」であり, 脳神経細胞は, この部位を経由して血漿, 脳脊髄液の情報を採取している。とりわけ水, 電解質代謝に重要な血漿浸透圧は, CVO's である 脳弓下器官 (SFO) や終板器官 (OVLT) あるいは視索上核 (SON) が, 受容体部位として考えられてきた。組織学的研究や色素を用いた透過性の検討が行われ, これらの部位が高い水透過性を持つことが予測されてきたが, 実際にこれらの部位の水透過性を測定した研究はない。本研究では, ラット脳について CVO's の検出と水透過速度の測定を試みた。正常の BBB を透過しないことが知られている Gd-DTPA を血管内に連続投与し, 血管内の水の緩和時間を短縮させた。血管

壁を介しての水の透過性が高ければ, 水の交換により, 血管外組織の水緩和時間は短縮される。この短縮を, T<sub>1</sub> 強調画像法で検出することから始めた。SFO が高信号に検出されたが, 視床下部には優位な領域は検出されなかった。また, OVLT や交連下器官 (SCO) は部位が小さく, 血管や脳室が隣接し部位の同定が困難であった。また, 下垂体, 正中隆起, 最終野などは, 今回用いた検出コイルでは S/N が充分ではなかった。SFO については, i) 三次元血管造影 (3D MRA) を行い, 同部位に隣接した大きな動静脈が無いことを確認した。ii) 長時間造影でも高信号領域が拡大しないこと, また, bolus injection の造影によりこの部位の信号強度の変化が血管内の Gd-DTPA の濃度変化に時間遅れなく追従する事から, Gd-DTPA の血管外への漏出がないことを確認した。すなわち, SFO では, 血管壁を介した水の交換により, 組織の水の T<sub>1</sub> 緩和時間が短縮し T<sub>1</sub> 強調画像により高信号に検出されていると結論した。水透過係数の決定には T<sub>1</sub> 緩和時間の決定が必要である。表面コイルを用いる場合, RF 強度が部位によって異なるために, 困難な場合が多い。T<sub>1</sub> 測定パルス系列に Adiabatic pulse を導入することにより, 高精度の測定を可能とした。

また, 上記の研究課題のひとつとして別に行われた「ラット脳室灌流モデルを用いた脳脊髄液灌流測定に関する研究」の成果は, Jpn. J. Physiol. 51(5): (2001, in press) に発表した。これは, ラット脳室灌流モデルを作成し, T<sub>1</sub> 強調 MRI 法を用いて脳脊髄液灌流過程を空間的に可視化, 画像化することにより, 髄液産生に対する 1) 動脈血二酸化炭素分圧 (PaCO<sub>2</sub>) の変化の影響, 2) 脳室内での炭酸脱水酵素阻害の影響を検討したものである。

## 2. 磁気共鳴イメージングによる内蔵求心神経の中樞投射の同定

森田啓之, 藤木通弘 (岐阜大学)

荻野孝史 (国立精神・神経センター研究所)

瀬尾芳輝, 鷹股 亮 (京都府立医科大学)

村上政隆

【目的】1997年 Lin と Koretsky は  $Mn^{2+}$  造影剤を用いた T1-weighted MRI により, 体性刺激に対する皮質興奮部位が同定できることを報告した。この方法は神経細胞興奮時に  $Ca^{2+}$  チャンネルから流入した  $Mn^{2+}$  による T1 緩和時間変化によりコントラストを作成する, 血行動態に依存しない MRI 画像法である。本年度の研究では,  $Mn^{2+}$  造影 MRI の自律神経系研究における妥当性を検討するため, この方法により自律神経系興奮時の視床下部興奮が同定できるかどうかを確かめた。自律神経系刺激には高浸透圧刺激を用い, MRI 画像と Fos 発現により同定された興奮部位とを比較した。

【方法】全ての実験は Wistar 系雄ラット (320 ~ 450 g) を用いて行った。エンフルラン (1%),  $O_2/CO_2 - N_2O$  (1:1.5) 吸入麻酔下に, 左大腿静脈から下大静脈へ  $MnCl_2$  投与用カテーテルを, 左大動脈から腹部大動脈へ血液サンプル採取用カテーテルを挿入した。麻酔薬投与用カテーテルを腹腔に挿入した。右外頸動脈から総頸動脈に向けカテーテルを挿入し, 先端部は総頸動脈 内頸動脈分岐部に固定した。手術終了後, 腹腔内に クロラロース (50 mg/kg) + ウレタン (450 mg/kg) を投与し, エンフルランを中止した。ラットをアクリル製頭部固定装置に固定した後, 23 mm の表面コイルを bregma の尾側 4 mm の場所に中心を合わせて設置した。pH 調整したバッファに溶解した  $MnCl_2$  (120 mM, 2 ml/h) を静脈内に投与しながら, 25% マンニトール溶液 (5 ml/kg) を右内頸動脈から投与して右側血液脳関門を破壊した。 $MnCl_2$  投与開始 26 分後に, 高浸透圧刺激として 1.5 M NaCl 溶液 (1 ml/kg) を内頸動脈から投与した。磁気共鳴施設の ABX Biospec 47/40 (Bruker 社, 4.7 T) を用い, 刺激前, 刺激中, 刺激後と連続して T1-weighted MRI 画像を撮影した (視野: 25 × 25 mm, データ画素数 128 × 128, スライス厚 1 mm, 16 スライス, TR/TE: 150/4.2 ms)。刺激後の density と刺激前の density とを t 検定し, 刺激により有意に density が増加した部位を求めた。また, 同

様の高浸透圧刺激により興奮する中枢部位を Fos 免疫染色により同定し, MRI 画像と比較した。

【結果と考察】図 1 に高浸透圧刺激にตอบสนองした部位を示す。皮質に加え, 視床および視床下部の室傍核, 視索上核等に有意な density 増加部位が見られた (図 1 左)。一方, 対照実験として行った, 内頸動脈等張 NaCl 溶液投与ではこのような応答は見られなかった (図 1 右)。

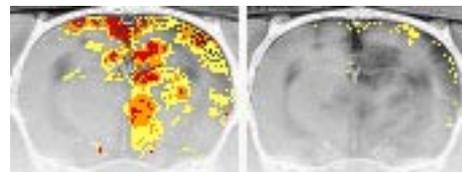


図 1: 内頸動脈内 1.5 M (左), 0.15 M (右) NaCl 溶液投与に対する応答。

図 2 に第 3 脳室室傍核における density の経時変化を示す。 $MnCl_2$  投与では明らかな増加は見られなかったが, マンニトールにより血液脳関門を破壊することにより, 10 ~ 20 % 程度の density 増加が見られた。さらに, 高張 NaCl 溶液内頸動脈投与により, 2 倍以上に増加した。

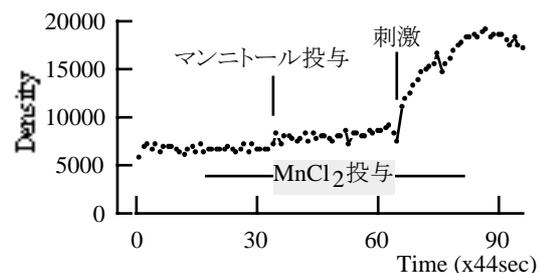


図 2: 視床下部室傍核に相当するピクセルでの density の経時変化。

血液脳関門が破壊されていない左側では, 視床下部における density の変化は認められなかった。右側で見られた density 増加部位は, Fos 染色で確かめた興奮部位とよく一致しており,  $Mn^{2+}$  造影 MRI の自律神経系研究における有用性が確認された。

### 3. MRI による聴覚野の観察と電極定位

力丸 裕 (同志社大学工学部知識工学科)

小松英彦

石川高司 (同志社大学工学研究科)

我々は、サルの中枢における聴覚情報処理機構を探求するために神経生理学的実験を行っている。目標となる一次聴覚野や多くの関連聴覚領野は外側溝内に存在し、正確な電極定位は直視では困難である。そこで、MRI により脳構造の可視化を行った。MRI 画像を用いて慢性実験用のチャンバを外側溝上に取付けた後、微小電極を用いた神経生理学的実験を行った。笑気ガスとフォールの混合麻酔下で、系統的に周波数と強さを変化させる音刺激を用いて一次聴覚野と推測される部位のニューロン

の性質を計測した結果、音圧レベルが閾値付近では前後方向へのトノトピーが確認された。また、閾値よりも数 10dB 高い音圧レベルでは、ニューロンの時間発火パターンは、周波数により全く異なり、複雑になることがわかった。この事実は、聴覚野においては、単純なトノトピーではなく、周波数同調特性が時々刻々と変化することを示唆している。聴覚野での音の時間情報と周波数情報の統合に関して、今後検討したい。

【 超高压電子顯微鏡  
共同利用実験報告 】

# 超高压電子顕微鏡共同利用実験報告

## [ 目 次 ]

1. 無脊椎動物腹足類の外套組織にみられる筋繊維の立体再構築 (片桐展子ほか) .....	144
2. 軟X線顕微鏡像と超高压電子顕微鏡像との比較 (眞島利和ほか) .....	145
3. アクチンフィラメントの高分解能観察 (一海孝光ほか) .....	145
4. 超高压電子顕微鏡による有機物微粒子の高分解能観察 (大野 完ほか) .....	146
5. ギャップ結合で連結した網膜ニューロンの樹状突起の構造 (日高 聡) .....	147
6. ゴルジ装置の新生過程の立体像 (野田 亨ほか) .....	148
7. 神経突起のバリコシティの微細構造観察 (遠藤泰久ほか) .....	149
8. 老化に伴う神経細胞の微細構造変化についての超高压電子顕微鏡的観察 (小澤一史ほか) .....	149
9. 嗅球ニューロン樹状突起の定量的三次元形態解析 (樋田一徳) .....	150
10. 中枢神経系ニューロン、グリアの三次元構造解析：マウス海馬 astrocyte の形態学的及び定量的解析 (緒方勝也ほか) .....	151
11. 小脳変性症マウスにおける小脳プルキンエ細胞形態変化の超微細 3 次元的観察 (RHYU, Im Joo ほか) .....	152
12. 星状グリア細胞突起の三次元定量解析 (濱 清ほか) .....	152

1. 無脊椎動物腹足類の外套組織にみられる筋細胞の立体再構築

片桐展子 (東京女子医科大学・総合研究所・研究部), 片桐康雄(同・看護学部・基礎科学系)

有井達夫

イソアワモチの外套の背面には大小の疣状突起 (Papillae) が多数存在する。小さな陰影を外套の一部に与えるとその陰影下に局所的な収縮が起こる。外套の皮下組織には多数の平滑筋細胞が諸方向に走行する。平滑筋細胞は横断像では楕円形、縦断像では直線状や波状を示し、核周囲部が最も太く、多くは一端または両端で分岐する。平滑筋細胞は外套組織における位置によって3グループに大別された(生理研年報 21)。これらの中に長い突起をもつ多棘形の長大な筋細胞を Papillae の結合組織内に、また、この筋細胞の付近に眼外光受容器である皮膚光覚細胞を認めた。この巨大な特異な形の筋細胞の全容を連続切片の超高压電顕観察とその立体再構築によって明らかにした。

**材料と方法:** 海産の腹足類 *Onchidium sp.* の幼動物(体長 10mm)を2%オスミウム酸水溶液で40, 48時間加温処理、脱水過程において酢酸ウランでブロック染色、エポン樹脂に包埋した。0.4 μm厚さの準薄切連続切片を超高压電顕(H-1250M, 1000kV)で観察した。同倍率の電顕写真をもとに、画像解析装置 OZ-95 によって筋細胞を三次元立体再構築した。

**結果と考察:** 外套の Papillae の皮下組織に長大で多数の突起をもつ特異な形の筋細胞がグループで存在する。これらの筋細胞は細胞の中央に1個の核と多数の長い突起を有する。立体再構築した1例では筋細胞は8本の長い突起を多方向に伸ばし、一部の突起の末端は表皮細胞の基底膜に達していた。筋細胞の大きさは最も長く伸びた突起の先端間で長さ 50 μm、核のある部位が最も太く幅 6 μm あり、上下には 14 μm の範囲に位置していた。筋細胞はその突起を上下と水平面で広く延ばし多棘の星形を呈した(図 1-4)。この筋細胞の面積を細胞の輪郭を一平面上に投影して VM32 ソフトを用いて二次元的に求めたところ、Papillae の結合組織(3,870mm<sup>2</sup>)の約 9.5% を占めるが、筋細胞から延びる多数の突起の先端が囲こむ領域は 38%であった(図 4)。この筋細胞から延びる

突起はグループ内の他の星形筋細胞の突起と接し、全体として籠状のネットワークを形成して皮膚光覚細胞や神経束を囲んでいた。巨大な星形の筋細胞は他の筋細胞と連携して、光受容細胞からの情報をもとに外套上の Papillae を局所的に収縮させると推測される。

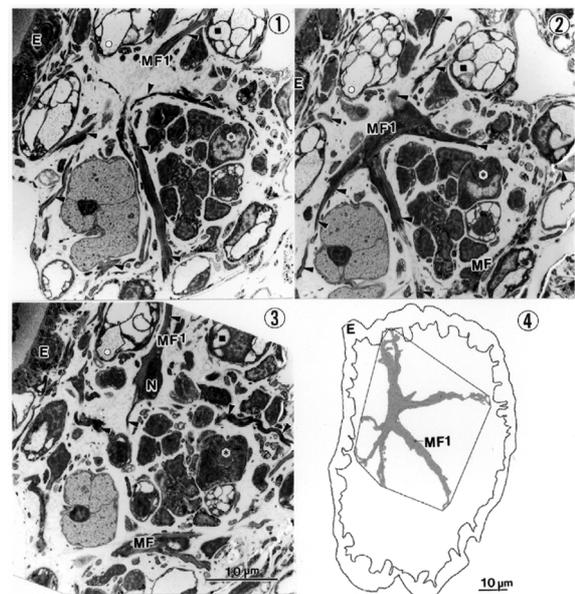


図 1-3 イソアワモチの外套の小突起 Papilla にみられる筋細胞の超高压電顕写真(連続写真の一部)

Papilla のほぼ中央に大形で多棘の筋細胞(MF1)があり、多数の突起状の枝を伸ばしている。MF1 と他の平滑筋細胞(MF)の突起はネットワークを形成、内側に皮膚光覚細胞(\*)や神経束を囲んでいる。位置の基準として同一の粘液細胞に( )を付した。E, 表皮。

図 4 平滑筋細胞(MF1)の立体再構築像

MF1 の全体像を連続切片の超高压電顕写真を一平面上に重ねて示す。VM32 ソフトを用いて二次元的に MF1 自身の面積(355 μm<sup>2</sup>)、MF1 の突起の先端を結んだ領域の面積(1,458 μm<sup>2</sup>)を求めた。Papilla の結合組織の面積は(3,780 μm<sup>2</sup>)であった。

## 2. 軟 X 線顕微鏡像と超高压電子顕微鏡像との比較

眞島利和 (産業技術総合研究所)

清水秀明 (香川大学)

軟 X 線顕微鏡により得られる画像は X 線の高い透過性を活かした投影像であるため、厚み方向のデータのすべてが一つの画像にふくまれている。この点は電子線や可視光線の透過性が低いために試料の(超薄)切片を作成して観察する必要のある電子顕微鏡や光学顕微鏡などにより得られる画像と異なり、投影像である X 線顕微鏡像は一般的には解釈が難しいものになっている。産業技術総合研究所で研究開発を行ってきた密着型フラッシュ軟 X 線顕微鏡は、水中で生きている微生物の X 線像の観察ができるが、こうして得られた X 線像に特徴的にふくまれている情報とはなにかが問題となっている。

超高压電子顕微鏡像との比較をおこなうために、緑藻類のクラミドモナスの観察を行った。超高压電子顕微鏡用の試料は、定法に従いグルタルアルデヒドで固定、アルコール置換により脱水、t-ブチルアルコール法により凍結乾燥を行った。今回得られた、超高压電子顕微鏡によるクラミドモナスの電子線投影像も、X 線投影像と同様に厚み方向の情報をすべて含んでいる点では同様である。生理学研究所の超高压電子顕微鏡は、試料ステー

ジを傾けることにより同一試料に異なる方向から電子線照射をおこない投影像を得ることができるので、クラミドモナスの投影像の立体視をおこなった。

軟 X 線顕微鏡の場合には照射した軟 X 線は試料に含まれる炭素原子や酸素原子に吸収され、最終的には熱エネルギーに変換されて試料を変性させるために、同一の試料を二度測定することはできない。しかしながら、X 線源となるプラズマを同時に二つ作らせることにより、異なる方向から X 線照射された同一試料の X 線像を得ることは密着型フラッシュ軟 X 線顕微鏡においても原理的に可能であるが、試料のサイズや記録媒体と試料の配置など技術的な問題点があり一般的ではない。

超高压電子顕微鏡で得られたクラミドモナスのステレオ像を参照することにより、平均的な内部構造についての知見を得ることができた。今後は、超高压電子顕微鏡によるステレオ像や蛍光顕微鏡像との比較により得られた知見を利用して、クラミドモナスの X 線顕微鏡像に現れる細胞器官の像の帰属を決定することが重要であると考えている。

## 3. アクチンフィラメントの高分解能観察

一海孝光 (愛知県立芸術大学)

有井達夫

照射損傷を少なく出来るという HVEM (1000kV) のメリットを生かしてタンパクのクリスタルからの電子線回折像を観察しようとする試みをこれまで行ってきた。低いイオン強度のアクチン溶液中には過剰な ATP によって形成されるアクチンフィラメントが存在する。このフィラメントがアクチンのクリスタルをつくることを蛍光顕微鏡や、偏光顕微鏡によって観察した。そこでアクチンフィラメントのクリスタルからの電子線の回折像を得ることを試みてきた。昨年度の年報でこのアクチンクリスタルと考えられる結晶状のものを酢酸ウランで染色してメッシュに載せて観察すると、約 10 の格子定数に対応する反射が得られる場合があることを報告した。ところ

でアセトン下で形成される結合水の少ないアクチンクリスタルの回折像を HVEM を用いて観察すると単位格子定数が  $61 \times 41 \times 33$  ( ) であるという報告がこれまでになされている (1)。しかし我々の観察では小角散乱の反射が得られないのでその理由を今年度は調べてきた。アクチンよりも照射に強いと思われる Acto\*DNase1 のクリスタルをつかい、酢酸ウラン染色をせずに少量の照射線量にして回折像を観察した。この場合水銀を含む PCMB でアクチンの表面にあるアミノ酸を標識しておいた。約 4 に相当する回折斑点近辺での細かい反射のみが、主に観察され、照射損傷によって消えていくのがみられた(図 1, 図 2)。細かい斑点間の距離は 70 の構造

を反映しているものと考えられる。これらの回折斑点は冷却により寿命が長くなる。ところで ATP によって形成されていると思われるアクチンフィラメントを含む溶液から得られる微細粒子の回折像の場合には約 10 に対応した反射が得られている。この反射は標識する PIA や PCMB に応じて変化する場合があるのでアクチンからの反射であることを示唆していると思う。この結晶を作る溶液には ATP が存在するため ATP の加水分解によって生じる磷酸がカルシウムと結合して磷酸カルシウムを作り、それがフィラメントに沈着してこのよう

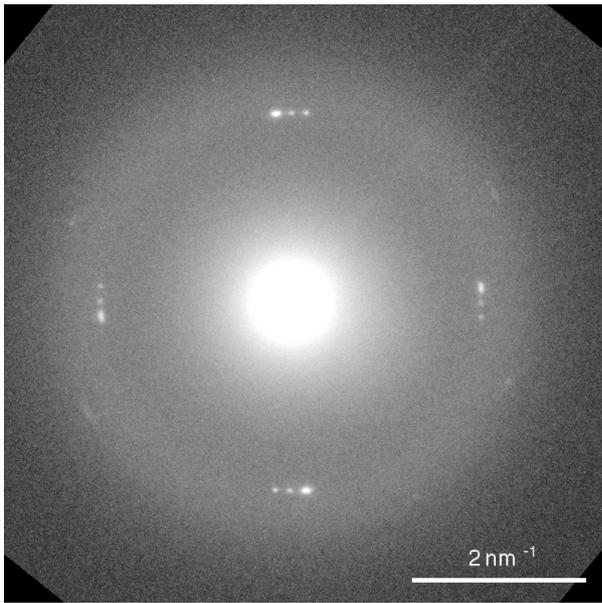


図 1 . 水銀を含む PCMB で標識した Acto\*DNase1 と考えられる結晶状の試料からの電子回折像：1 度目の露光

な 10 の短い格子定数の反射を出している可能性がある(2)。一方 Acto\*DNase1 の結晶の場合には ATP が入っていないので磷酸カルシウムの結晶への結合はない。しかしアクチン分子の表面には標識した PCMB があることと、DNase1 と結合しているため脱水が抑制されて構造がこわれにくくなり、より長い 70 の構造を反映する反射が得られるようになったものと思われる。

1. T. Taniguchi, Y. Kamiya, Nuclear Instruments and Methods 208, 541-544 (1983)
2. Hartgerink, J.D. et al, Science 294, 1684-1688(2001)

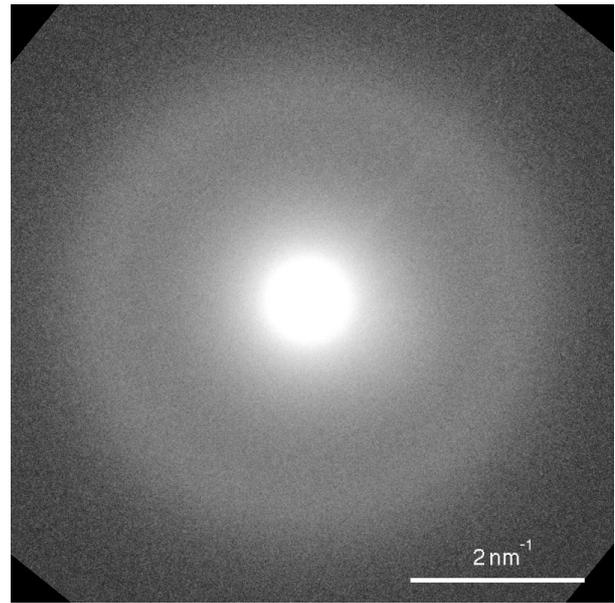


図 2 . 図 1 の試料の 2 度目の露光による電子回折像

#### 4. 超高压電子顕微鏡による有機物微粒子の高分解能観察

大野 完, 仙石昌也 (愛知医科大学)  
有井達夫

昨年度に引き続き、ガス中蒸発法によって作成した有機物微粒子を超高压電子顕微鏡で観察した。使用した試料は、ペリレン (C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>) 微粒子である。一番安定なペリレンの結晶構造は単斜晶であり、板状結晶になる。昨年度は板の一辺のサイズが約 1 μm の微粒子を観察したが、今年度はより小さいサイズ (100nm ~ 400nm 程度) の微粒子の観察を行った。その試料はガス中蒸発での生成条件を変更して作成した。生成された微粒子のモルフ

オロジーは、1 μm 以上のサイズの微粒子でははっきりとした晶癖を持つものが多く見られたが<sup>1)</sup>、サイズが小さくなるにつれて晶癖が観察されにくかった(図 1)。しかし、これらの微粒子の電子線回折像を調べると、晶癖のはっきりとした微粒子のものと同様な回折パターンが得られ、高分解能観察においてもいくつかの粒子で格子縞が観察できた。晶癖がなくなる理由として考えられることは、(1) 観察している状態がまだ結晶の平衡形に達

しておらず成長過程の途中である,(2)微粒子はバルク、薄膜などに比べて表面エネルギーの不利があり、電子線照射によって表面分子の一部が蒸発して晶癖が無くなったため観察できなかった,(3)今回はこのような微粒子が生成される実験条件であった、等が挙げられる。薄膜に比べ、微粒子は電子線照射に対して弱く、例えばピレン( $C_{16}H_{10}$ )の場合は薄膜では電子線回折像がTEMで観察できるのに対し、微粒子になると観察中に蒸発しそのままでは観察できないことが分かっている。<sup>1)</sup>これらは照射に対してさらに弱い物質の微粒子についても起こりうる問題であり、今後も継続して研究していく必要があると思われる。

また、コロネン( $C_{24}H_{12}$ )微粒子を生成し観察した。コロネンはペリレンと同じ芳香族炭化水素であり、薄膜では電子線照射に対してペリレンよりもさらに安定であり高分解能観察は容易であると考えられたが、微粒子は針状

結晶(図2)であり、支持膜との接触面積が小さいため電子線を照射すると粒子が移動し安定せず予想以上に観察は困難であった。

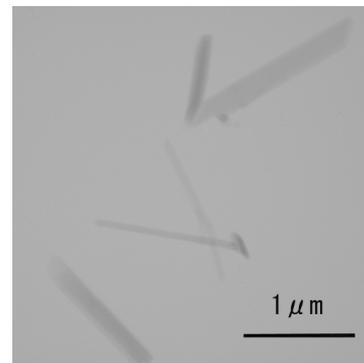


図2．コロネン微粒子

#### 参考文献

- 1) M.Sengoku, S.Sawai and T.Ohno, Micron 32 (2001) 447

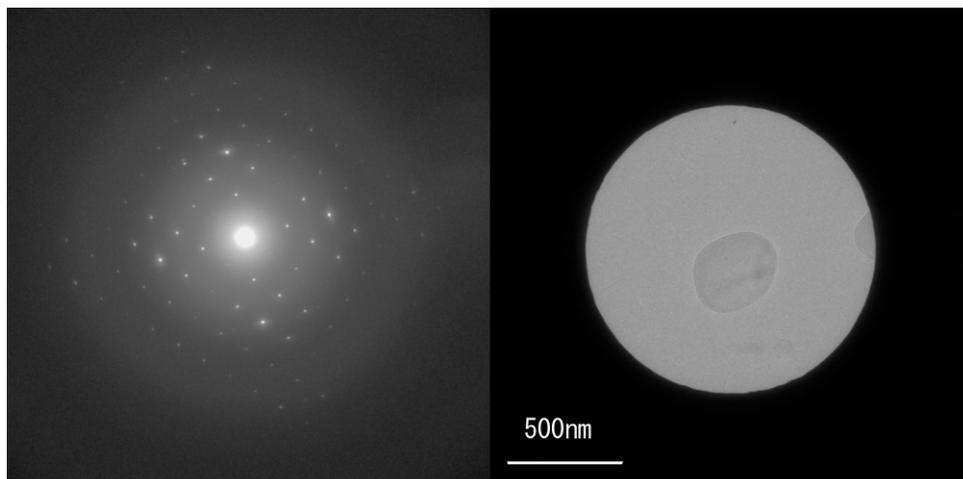


図1．ペリレン電子回折像(左)とペリレン微粒子(右)

## 5. ギャップ結合で連結した網膜ニューロンの樹状突起の構造

日高 聡(藤田保健衛生大学・医学部・生理学第二)

宮地栄一(藤田保健衛生大学・医学部・生理学第二)

光受容神経組織である網膜のニューロンの二次元的な配列様式は各々のタイプによって異なっており、それらの分布の解明は光情報処理の神経機構の解析にとって重要である。これまでに、双極細胞、アマクリン細胞及び神経節細胞が同一タイプの間で特定のモザイクを呈しながらギャップ結合で連結していることを明らかにした。我々は、電気生理学的手法によってニューロンの活動を

解析した後に、神経活動をギャップ結合で連結した神経突起の形態と相関して、各タイプに特徴的なギャップ結合の視覚機能上の意義を調べている。電気生理学的に同定した網膜ニューロンを細胞内標識し、超高压電子顕微鏡を用いて、厚さ数 $\mu\text{m}$ の樹脂包埋切片を解析することによってギャップ結合で連結した神経突起の三次元形態を解明することが本研究の目的である。

平成 12 年度は昨年度に引き続いて、これまでに視覚生理学的に調べて来た網膜神経節細胞について、ラット網膜を用いて解析した。成熟 Wistar 系ラットから剥離した全載網膜標本を用いて核染色色素 DAPI で標識した  $\beta$ -神経節細胞を形態学的に同定し 37 °C で  $O_2/CO_2$  を供給した AME'S 溶液で灌流しながら微小電極法またはパッチクランプ法によって電流注入に対するスパイク列応答を解析した後に、電極内に充填したルシファー黄とピオチン複合物を用いて細胞内注入法によって細胞を標識した。ピオチン複合物を注入した標本の電子顕微鏡解析のための処理（日高と橋本, 1993）を経て、光学顕微鏡によって注入細胞と周囲の標識細胞との接触突起を同定した後、エポキシ樹脂包埋した標本から、1-5  $\mu m$  の厚さの網膜切片を作成し、ギャップ結合で連結した樹状突起の三次元構造を超高圧電子顕微鏡で 1000kV で解析した。

電気生理学的に解析した神経節細胞をルシファー黄の標識から同定した。 $\beta$ -神経節細胞は回りの細胞へのルシ

ファー黄の拡散 (dye coupling) を示さなかったが、同時に注入したピオチン複合物の局在を組織化学反応によって検出した結果、注入細胞から回りの同型の細胞へ tracer coupling を示した。光学顕微鏡での観察から、標識された  $\beta$ -神経節細胞の樹状突起の先端同士の間で直接の接触の可能性が観察されたが、光学顕微鏡の分解能の限界に直面した。そこで、標識された  $\beta$ -神経節細胞の樹状突起間の接触部位を、厚さ数  $\mu m$  の厚切り切片を用いて超高圧電子顕微鏡で解析している。超薄切片での解析では、標識される  $\beta$ -神経節細胞の樹状突起と非標識突起との間でギャップ結合を同定したが、非標識突起の細胞起源（結合の相手）は同定できていない。電気生理学的解析の後、標識突起の反応産物の電子線密度を増強する方法を探索しながら、現在も解析を続けている。

[文献]

日高 聡, 橋本葉子 (1993) 日本生理誌 55: 241-254。

## 6. ゴルジ装置の新生過程の立体像

野田 亨 (京都大学大学院医学研究科生体構造医学講座)

培養細胞 (RBL-2H3) に小胞体からゴルジ装置への蛋白輸送が抑えられると考えられる brefeldin A (BFA), nordihydroguaiaretic acid, cycloheximide などの薬剤を投与し、その後一定時間を置いてからこれらの薬剤を含まない正常の培地に戻し、小胞体からゴルジ装置への蛋白輸送を再開させ、薬剤によるゴルジ装置の形態変化とゴルジ装置の再形成過程を経時的に観察しようとした。ゴルジの形態変化の追求はゴルジ膜蛋白とゴルジ基質蛋白の酵素抗体法で行った。BFA 投与後 30 分のもものでは通常のゴルジ装置は小胞化し、シスゴルジ層板のマーカー蛋白である mannosidase II は蛍光抗体法では小胞体に拡がった局在を示したが、電顕では明瞭な局在を認めることはできなかった。通常培地に戻すと 10 分後より次第にゴルジ層板に近い構造が形成され始め、それらの一部にマーカー蛋白の局在を認めるようになる。通常培地に戻して 30 分後では層板形態も mannosidase II の局在もほ

ぼ正常に近い状態に戻った。一方、トランスゴルジのマーカーである TGN38 はゴルジ野に残存する小胞あるいは小管の一部に局在していた。BFA 以外の薬剤では nordihydroguaiaretic acid 投与群, cycloheximide 投与群ではゴルジ層板の乱れは認められたものの mannosidase II, および TGN38 の局在に大きな変化は認められなかったが、いずれの場合もゴルジ装置の全体の縮小傾向が認められた。

さらにそれぞれの試料の厚切り切片を超高圧電顕で観察したが、形成中のゴルジ層板の立体的特徴を酵素抗体法で描出したゴルジ蛋白の分布から把握することは困難であった。しかし、BFA 処理後の試料ではゴルジ形成では細胞の中心体付近から形成中のゴルジ層板が放射状の立体的配列しているものも多く観察され、ゴルジ層板形成にはかなり小胞や小管構造が微小管に沿って集合してきていると考えられた。

## 7. 神経突起のバリコシティの微細構造観察

遠藤泰久, 末次妙子 (京都工芸繊維大学繊維学部応用生物学科)

有井達夫

神経突起の途中に形成される数珠状のふくらみ, バリコシティ (varicosity) は, 神経伝達物質を含むシナプス小胞や有芯小胞が蓄積することから, 神経終末として機能すると考えられているが, その形成機構はほとんど解明されていない。今回, 我々は中枢神経系におけるバリコシティの構造と形成機構を解明する目的で, ラットの脳スライス培養系を用い, 細胞骨格タンパクの免疫染色後, 厚切切片を超高圧電顕で 3 次元的に解析することを試みた。

新生ラット (生後 5 - 10 日) を氷冷麻酔し断頭後, 脳を摘出し, 間脳の部位を厚さ 400 $\mu$ m の前額断にティッシュチョッパーを用いてスライスした。スライスを直径 35mm のフィルターインサート上に移し, 6 ウェルプレートで 2 - 3 週間培養した。バリコシティ形成におけるチュブリンの影響を調べるため, チュブリン mRNA のアンチセンスオリゴヌクレオチド (15mer) を 50mM の濃度で 48 時間作用させた。対照にはセンスオリゴヌク

レオチドを用いた。4%パラフォルムアルデヒドで固定後, チュブリンの特異抗体で免疫染色 (ABC - HRP 法) し, 発色にはジアミノベンジジンに硫酸ニッケルアンモニウム (10mM) を加えた。その後, オスミウム酸で後固定, エタノール脱水, エポキシ樹脂包埋を施した。厚さ 1 および 2  $\mu$ m の厚切切片を作製し, サンドイッチメッシュにはさみ, 超高圧電顕 H-1250M により加速電圧 1000kV で観察した。

視床下部室傍核の大型神経分泌ニューロンには, チュブリンの特異抗体によく反応するバリコシティが多数観察された。細胞体および神経突起内部の微小管を厚切切片で十分に観察できるコントラストが得られた。チュブリン mRNA のアンチセンス処理により, 細胞体およびバリコシティ内部のチュブリン免疫反応の減少が観察された。今後, バリコシティ内部のより詳細な細胞骨格の構成を明らかにするため, ステレオ観察の結果を詳しく解析する予定である。

## 8. 老化に伴う神経細胞の微細構造変化についての超高圧電子顕微鏡的観察

小澤一史, 謝 蔵霞, 河田光博 (京都府立医科大学第一解剖学教室)

生体への様々なストレスに対しては, 視床下部 - 下垂体 - 副腎軸 (HPA axis) を中心とした神経・内分泌系に免疫系の働きも加わり, これらの系が十分に機能して対応している。ところが老化に伴い, 寒冷や暑さによるストレス応答能力が低下し, また怪我などによる傷の修復が遅延することがあるが, これらは神経・内分泌・免疫系を中心とした生体防御機構の低下が原因と考えられる。

老化に伴って脳の神経細胞にも多くの変化が生じることが知られている。特に大脳皮質や海馬では神経細胞の数の減少が見られ, 細胞そのものの形態変化も観察される。

老化に伴い, ラットでは血中のコルチコステロン値が上昇するが, 大脳皮質や海馬をはじめ, 脳の広い領域では逆に GR の発現低下が観察される。GR のみならず, 転写共役因子である p300 や SRC-1 などの発現も顕著に

低下している様子が観察される。これは老化による GR の発現低下によりコルチコステロイドのネガティブフィードバックが働かなくなったことを意味するものと考えられる。これは, グルココルチコイドとその受容体および cofactor 蛋白の複合体が一括して低下, 神経機能発現に大きな影響を及ぼしていることを意味する。これらの神経細胞の微細構造を観察すると, 神経細胞体の細胞質には多数のリポフチン顆粒の蓄積, 細胞密度の現象, 細胞小器官の縮小化, 神経分泌小胞の減少などが観察され (図 1), 機能低下を示す像と考えられる。さらに, 加速電圧 1000kV にて厚め (5  $\mu$ m) の試料を超高圧電子顕微鏡でステレオ観察する方法により, これらの GR 発現が低下した神経細胞の樹状突起の様子を観察すると, 棘 (spine) の数や大きさ, 形の明らかな変化が認められる (図 2)。このような樹状突起の変化は細胞表面積の減少

を示すものであり、シナプスの数の低下を意味するものである。このことは神経細胞そのものの生存は維持されているが機能が低下していることを意味する上、細胞内

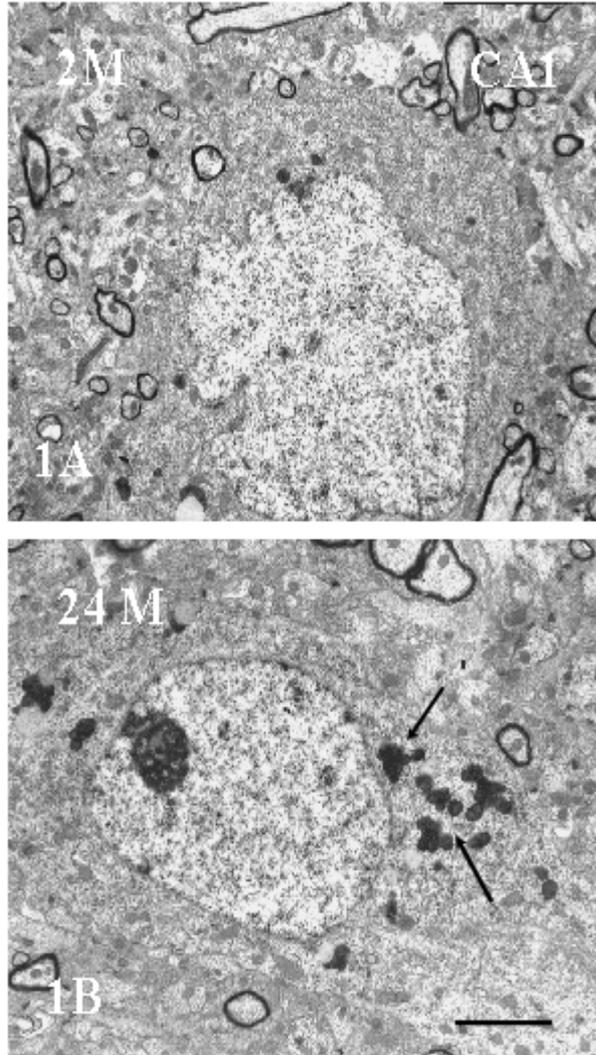


図1：海馬錐体細胞 CA1 領域の透過型電子顕微鏡像；若いラット(A, 2ヶ月令)に比べて老令ラット(B, 24ヶ月令)では細胞全体の縮小, リポフチン顆粒の集積, 細胞小器官の未熟化, 神経分泌小胞の現象などが観察される。Bar=1 μm

いる。長期にストレス負荷をかけたラットでは、老化に伴う海馬の変性が一層著しいことから、老化のメカニズムには上位中枢としての海馬を中心に、これに深く連絡する HPA axis が深く関与していると考えられる。

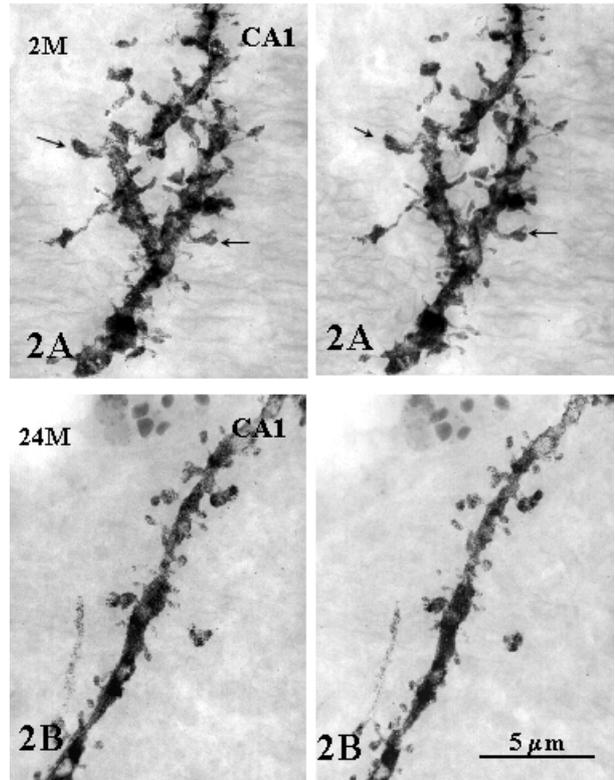


図2：海馬錐体細胞 CA1 領域の樹状突起の超高压電子顕微鏡ステレオ像；若いラット(A, 2ヶ月令)に比べて、老令ラット(B, 24ヶ月令)では棘 (spine) の数の減少や形状の変化が顕著に観察される。Bar=5 μm

### 9. 嗅球ニューロン樹状突起の定量的三次元形態解析

樋田一徳（徳島大学医学部解剖学第一講座）

嗅覚の一次中枢嗅球は、複雑な脳神経回路の基本的構造の特徴を有していることから、魅力的な脳研究対象として注目されている。特に最近、特定な匂い刺激に対して嗅球表層に存在する糸球体が特異的に反応することが判り、嗅覚の機能的単位としての糸球体に関心が集中し

ている。一方、糸球体内での情報処理機構解明には、糸球体ニューロン構成と局所神経回路シナプス構築の詳細な解明が不可欠となる。

糸球体内に樹状突起を分布して投射ニューロン（嗅球からの出力）と嗅受容細胞終末（嗅球への入力）との間

にシナプス結合を形成する傍系球体介在ニューロンは、局所神経回路において重要な役割を演ずると考えられるが、その多くは系球体内で複雑な樹状突起網を形成し、共焦点レーザー顕微鏡でも正確な三次元構造は明らかにならない。そこで超高圧電子顕微鏡の高解像力による解析の有効性が期待できるが、超高圧電子顕微鏡による解析の領域が厚さ 5 ミクロン・縦横数 10 ミクロンに限定されること、そして従来の重金属増感 DAB・免疫細胞化学法では十分なコントラストが得られないなど、解析が困難であった。

これらの問題を克服するために、今年度報告者は金コロイド粒子を用いた免疫細胞化学法の応用を試みた。まず厚さ 50-100 ミクロンのピプラトーム切片に、各種一次抗体、ビオチン化二次抗体、1.4 ナノメートル金コロイド及び FITC 同時標識ストレプトアビジン (NanoProbe)

による染色を施し、同標本を共焦点レーザー顕微鏡で三次元的に広範囲に解析した後、金コロイド粒子を 10-30 ナノメートルに銀増感し、更に重金属増感 DAB 法を加えた。その結果、従来に比べコントラストが飛躍的に向上し像質が高まった。また予め共焦点レーザー顕微鏡で記録しているために、全体像のどの部分を解析しているか把握も可能である。

今年度は主要な傍系球体ニューロンである Tyrosine Hydroxylase (TH) ニューロンの解析を行い、共焦点レーザー顕微鏡では解析し得なかった複雑な系球体内突起構造が観察された。(付図)

今後は、各種ニューロンの三次元構造解析とともに、同法を用いて金コロイド標識による諸々の物質の細胞内三次元的局在の解析を行う予定である。

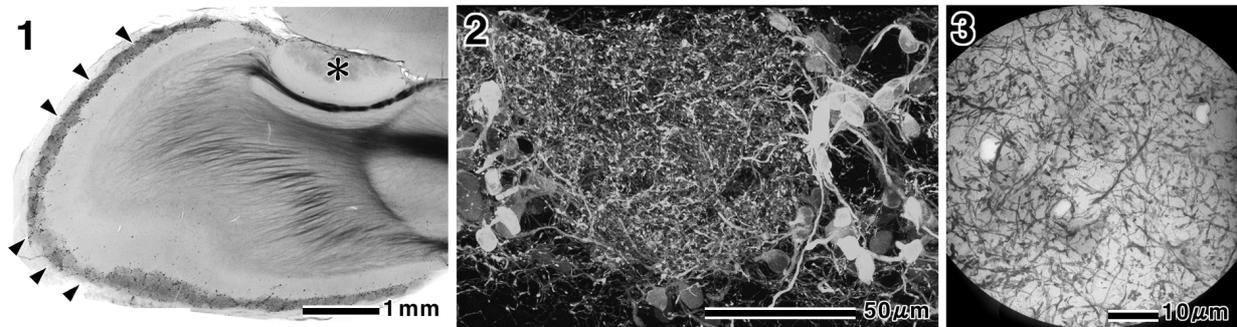


図 1 : TH の嗅球内分布 (arrow heads)

図 2 : TH ニューロンの共焦点レーザー顕微鏡像

図 3 : TH ニューロンの超高圧電子顕微鏡像

#### 10. 中枢神経系ニューロン, グリアの三次元構造解析: マウス海馬 astrocyte の形態学的及び定量的解析

緒方勝也, 小坂俊夫 (九州大学大学院医学研究院神経形態学)

We revealed the structural features of astrocytes by means of light microscopy, confocal laser scanning microscopy and high voltage electron microscopy, and estimated their numerical densities in the mouse hippocampus. The high voltage electron microscope examinations of Golgi-impregnated astrocytes clearly disclosed their fine leaflet-like processes in the masses occupied by individual astrocytes. The intracellular injection of two different fluorescent tracers into two neighboring astrocytes revealed that each astrocyte occupied a discrete area with a limited overlap only at its peripheral portion. In a quantitative analysis using an optical disector,

the numerical densities of astrocytes identified as S100-immunoreactive cells were only slightly different in their areal and laminar distributions. The numerical densities were higher in the stratum lacunosum-moleculare and dentate hilus, while they were slightly lower in the principal cell layers than the average ( $24.2 \times 10^3 / \text{mm}^3$ ) in whole hippocampal regions. As for the dorsoventral difference, the numerical densities were significantly larger at the ventral level in the dentate gyrus, whereas such tendency was not apparent in the hippocampus proper. The projection area of the astrocytes estimated from Golgi-impregnated samples was roughly in

inverse relation to the numerical densities; the areas in the stratum lacunosum-moleculare were somewhat smaller than the other layers, where the numerical densities were high.

The present study indicates that astrocytes are distributed rather evenly without any prominent areal or laminar

differences and that the individual astrocytes have their own domains; the periphery of the domain of a given astrocyte is interdigitated intricately with the processes of adjacent astrocytes whereas its inner core portion is not penetrated by them.

## 11. 小脳変性症マウスにおける小脳プルキンエ細胞形態変化の超微細 3 次元的観察

RHYU Im Joo ( Korea 大学医学部)

井本 敬二, 有井 達夫

P/Q 型電位依存性カルシウムチャンネル サブユニット 遺伝子の変異により, ヒト・マウスに小脳変性症を含むいろいろな神経疾患が生じることが知られている。Rhyu 博士はこれまでに, 小脳変性症マウスである tottering や rolling の小脳で, 一つの神経終末に対して数個の棘突起がシナプスを形成するという異常を報告しているが, その 3 次元的な定量的観察はまだ行われていない。3 次元観察には, 超高压電子顕微鏡が有力な手段であり, Rhyu 博士が生理学研究所を訪れ, 本研究を行うこととなった。

平成 12 年度は免疫染色による樹状突起の spine の解析

を試みたが, 染色方法に問題があり十分な成果をあげる事が出来なかった。免疫染色の欠点は, (1) 十分なコントラストを得ることが出来ない, (2) すべての樹状突起が染色してしまうため, 解析が困難である, という点にあった。これらの問題点を解決するため, Golgi 染色標本を作成し観察を行ったが, 年度内には十分な解析を行うことが出来ず, 平成 13 年度にプロジェクトが持ち越された。

超高压電子顕微鏡での観察と平行して, Stargazer などあらたな小脳変性症マウスの形態解析を開始した。

## 12. 星状グリア細胞突起の三次元定量解析

濱 清

Ellisman M, Martone M, Yamada N (Univ. Calif. NCMIR)

我々は高い電子線透過能と, 5 ミクロンを越える生物試料でも 4 - 5 ナノメターの解像力が期待できる 1000kV 超高压電子顕微鏡の特性を利用して, 主として Golgi 染色を行ったラット CNS における星状グリア細胞突起の 3 次元立体計測を行っている。

海馬及び, 大脳皮質で球形の細胞枝ドメインを形成する細胞質性星状グリア細胞の突起を 4 ミクロンの切片を用いて, 2 種類の観察を行った。

1) 光顕像と超高压電顕像を複雑度を比較するため, 画像処理によって 2 値化した同じ視野の写真について周

辺長と面積を計測し面積/周辺長複雑度の指標 (KI) とした。超高压電顕像の KI 値は, 光顕像のほぼ 2 倍であった。この事は光学顕微鏡の解像力は星状グリア細胞突起の精密な定量解析には不十分であることを示唆する。

2) 同様の試料に付いて, 超高压電顕を用いて - 60 度から + 60 度まで 2 度間隔で連続傾斜撮影を行い, トモグラフィ解析を行っている。現在なお実験例を追加しているが, 計測できた体積/表面積の値は小脳バークマングリア細胞に付いての報告より遙かに大きな値を取ることが明らかとなった。

## &lt;&lt;超高压電子顕微鏡共同利用実験での業績リスト&gt;&gt;

## A) 発表論文

## 1. 英文原著論文

- 1) Hama K, Arii T, Ito Y (2000) High-voltage electron microscopy in neurocytology. *J Electron Microsc.* 49: 1-4.
  - 2) Martone M.E, Deerinck T.J, Yamada N., Bushong, E, Ellisman M.H. (2000) Correlated 3D light and electron microscopy and electron tomography for imaging large biological structures. *J Histotechnol* 23: 261-270.
2. その他
- 1) 浜 清, 有井達夫 (2000) 超高压電子顕微鏡 . 電子顕微鏡 35: 141-143.
  - 2) 笠原秀浩, 有井達夫, 鈴木武雄, 鶴原 喬 (2000) Acanthamoeba の低真空 SEM および超高压 TEM 観察 . 原生動物学雑誌 (Jpn. J. Protoz.) 33: 61.
  - 3) Sengoku M, Ohno T, Arii T (2000) High-voltage and high-resolution electron microscopy of fine organic particles. In Proc. of the 7th Asia-Pacific Electron Micros. Conf., Physical Sciences, pp233-234.

## B) 学会発表

- 1) Hama, K. (2000.6) Special Lecture. The 7th Asia-Pacific Electron Micros. Conf., Biol (Singapore) .
- 2) Sengoku M, Ohno T, Arii T (2000.6) High-voltage and high-resolution electron microscopy of fine organic particles. The 7th Asia-Pacific Electron Micros. Conf., Phys (Singapore) .
- 3) 吉村亮一, 遠藤泰久, 有井達夫, 佐々木泰治 (2000.9) シナプシンのリン酸化と分泌小胞: PC12 細胞の超高压電子顕微鏡観察 . 日本動物学会第 70 回大会 (山形) .
- 4) 一海孝光, 有井達夫 (2000) アクチン溶液中に形成される微小結晶状粒子の超高压電子顕微鏡回折像 . 日本生物物理学会第 38 回年会 (仙台) .
- 5) 濱 清 (2000.11) Structural biology と顕微鏡の解像力 . 日本電子顕微鏡学会第 45 回シンポジウム (岡崎) .
- 6) 片桐展子, 片桐康雄, 有井達夫 (2000.11) 無脊椎動物 (腹足類) の外套組織にみられる筋繊維の超高压電顕観察 . 日本電子顕微鏡学会第 45 回シンポジウム (岡崎) .
- 7) Hidaka S, Nishikawa C, Kato T, Yamauchi M, Miyachi E.-I. (2000.11) Expression of neuronal gap junction channel protein connexin36 in the mammalian retina. 30th annual meet. of "Society for Neuroscience" (New Orleans, LA).

【 生体磁気計測装置  
共同利用実験報告 】

# 生体磁気計測装置共同利用実験報告

## [ 目 次 ]

1. 脳磁図を用いたヒト感覚・運動機能の研究 ( 寶殊山稔ほか ) .....	158
2. 聴覚系における Temporal integration 機構 (時間) と Stream segregation 機構 (周波数) ( 矢部博興ほか ) .....	158

## 1. 脳磁図を用いたヒト感覚・運動機能の研究

宝珠山稔 (名古屋大学医学部保健学科)

柿木隆介

本研究では、ヒトの体性感覚情報処理機構を明らかにするために、体性感覚誘発脳磁場 (Somatosensory evoked magnetic fields, SEF) を用いて各 SEF 成分の Recovery function を測定し、第 1 次体性感覚野内の信号処理過程について検討した。

健常成人を対象として、刺激間隔 (Inter-stimulus interval, ISI) が 0~100ms の Paired pulse を 1s ごとに正中神経に与え SEF を記録した。Single pulse (ISI=0) による SEF 波形を Paired pulse による SEF 波形から減じることにより Paired pulse の 2 発目の刺激 (S2) に対する SEF を抽出した。解析は通常の正中神経 SEF において刺激後 20ms (1M) と 30ms (2M) に認められる短潜時皮質 SEF について行った。

S2 刺激に対する各 SEF 成分は ISI が短くなるにつれて振幅が減少し、潜時の延長を認めた。1M 成分は ISI が 100ms 以下では Single pulse による反応より振幅が小さくなり 10ms 以下では消失したが、2M 成分は ISI が 3ms でも認められ、その振幅は Single pulse による反応の約 60% であった。1M および 2M の信号源はいずれも中心溝近傍の第 1 次体性感覚野手の領域と考えられる部位に推定され、短い ISI において減衰した各成分の推定信号源位置も同様であった。

これまで、体性感覚誘発電位 (Somatosensory evoked potential, SEP) を用いて感覚誘発反応の Recovery function の研究がなされてきたが、SEP は体積伝導により皮質下構造から電位成分を含んでおり、特に潜時や波形が ISI によって変化していく Recovery function の解析では、皮質成分の同定が困難である場合がある。脳磁計が時間分解能に優れると同時に主に皮質からの信号を記録していることから、本研究での波形の同定と解析は極めて容易であった。これまでの研究では、より潜時の長い誘発反応ほど振幅の回復には長い ISI が必要であると報告されており、脊髄や皮質下での反応はそれがあてはまる。しかし、皮質内の反応である 1M および 2M については潜時の長い 2M のほうが短い ISI で振幅の回復をみており、2M に先行する 1M が全くない ISI にも明瞭に 2M が記録された。このことは、2M が 1M の後に続いて生じる連続した 2 次反応ではなく、独立した反応であることを示している。大脳皮質内の情報処理過程では信号の並列処理が行われていることは推察されているが、本研究結果は、第 1 次体性感覚野内では刺激後 20-30ms に認められる初期の反応から並列的な処理過程が含まれている可能性を示唆するものである。

## 2. 聴覚系における Temporal integration 機構(時間)と Stream segregation 機構(周波数)

矢部博興 (弘前大学医学部附属病院神経科精神科)

小山幸子, 軍司敦子, 柿木隆介

【目的】MMN (Mismatch Negativity) は、一次聴覚野近傍の感覚記憶に貯蔵された頻発音の neural trace と逸脱音との比較処理に由来する脳反応である。感覚記憶には、temporal window of integration(TWI)機構が存在し、研究代表者ら (1998) はその長さが 160-170ms であることを証明した。一方、Bregman(1990)が提案して注目された Auditory scene analysis という心理行動学的概念は、TWI 機構と Stream Segregation(SS)機構を会話認知の基盤としている。Sussman ら(1999)によれば、High と Low tone

が交互に連続呈示された時に、100ms 程度の短い SOA の時のみ、High tone 系列と Low tone 系列との分離(SS)が生じるという。本実験の目的は、TWI と SS のいずれが優先する機構かを明らかにする事である。【対象】健常被験者 10 名。【方法】High(3000Hz)と Low tone(500Hz)を連続刺激として交互に用い、稀に起こる欠落音(X)に対する MMN の有無を検討した。防磁室の壁に映写される無音映画に集中する被験者の左側耳に、連続音刺激(強度 70dB)が 125ms の一定の SOA で呈示された。【結果およ

【考察】従来の結果と同様に, HHHHXL..系列中のXはMMNを誘発したが, HLHLXL..系列は, 誘発しなかった。TWIよりもSSが優先されるならば, HLHLXL..系列は, H系列とL系列に分離された結果, 各系列のSOAが250msとなり, Xは先行音によって生じるTWIの範

囲から外れ, MMNを誘発しない。反対にTWIが優先されるならば, HHHHXL..系列と同様にMMNを誘発すると思われる。【結論】従って, Stream segregation機構は, TWI機構に優先する(Yabe et al., Brain Research (897) 222-227, 2001)。

# 【 研 究 会 報 告 】

# 研究会報告

## [ 目 次 ]

1. シナプス可塑性の分子機構 (代表者: 真鍋俊也 2000年6月15日~6月16日)	165
2. イオンチャネルの細胞局在化と機能制御に関する研究 (代表者: 倉智嘉久 2000年8月17日~8月18日)	174
3. ATP受容体による生体機能制御とその分子メカニズム (代表者: 古家喜四夫 2000年8月24日~8月25日)	184
4. ポストゲノム時代の脳科学 (代表者: 畠中 寛 2000年9月28日)	193
5. $Ca^{2+}$ シグナルと膜輸送体の発現および機能調節 (代表者: 河原克雅 2000年9月28日~9月29日)	195
6. 神経科学研究の新しいアプローチ (代表者: 畠中 寛 2000年9月29日~9月30日)	201
7. シナプス伝達の機能と分子の接点を探る (代表者: 工藤佳久 2000年10月26日~10月27日)	208
8. 中枢神経系における局所回路とその機能特性 (代表者: 三上章允 2000年11月21日~11月22日)	222
9. 定量的高分解能電子顕微鏡法 (代表者: 藤吉好則 2000年11月21日~11月22日)	235
10. 生殖細胞の構造と機能発現 (代表者: 年森清隆 2000年11月24日~11月25日)	238
11. 心・血管系イオンチャネルの発生分化とその適応 (代表者: 當瀬規嗣 2000年11月28日~11月29日)	244
12. 脳磁場ニューロイメージング (代表者: 栗城眞也 2000年11月29日~12月1日)	254

13. シナプスの形成・維持・可塑性 （代表者：武内恒成 2000年12月7日～12月8日） .....	273
14. 消化管機能 （代表者：鈴木裕一 2000年12月14日～12月15日） .....	278
15. 脳の情報統合と行動発現のメカニズム - 感覚知覚から生体反応形成まで - （代表者：泰羅雅登 2001年1月11日～1月12日） .....	285

## 1. シナプス可塑性の分子機構

2000 年 6 月 15 日- 6 月 16 日

代表・世話人：真鍋俊也（神戸大学・医学部）

所内対応者：森泰生（岡崎国立共同研究機構  
統合バイオサイエンスセンター）

- ( 1 ) 小脳顆粒細胞の成熟過程における電位依存性カリウムチャンネル Kv4.2 の発現と役割  
中平健祐（統合バイオサイエンスセンター，生理学研究所）
- ( 2 ) P/Q 型  $Ca^{2+}$  チャンネル異常を伴う小脳変性症マウスの分子神経生理学的解析  
若森 実（生理学研究所）
- ( 3 ) 神経栄養因子によるグルタミン酸受容体発現調節とその分子メカニズム  
斎藤真子（新潟大学脳研究所）
- ( 4 ) 神経栄養因子による神経伝達物質放出の制御  
大西浩史（三菱化学生命科学研究所）
- ( 5 ) シナプス可塑性における脳由来神経栄養因子の役割  
津本忠治（大阪大学医学部）
- ( 6 ) 新しい発生工学技術の開発によるアミノ酸変異導入マウスの作成  
笹岡俊邦（国立精神神経センター）
- ( 7 ) プルキンエ細胞特異的に代謝型グルタミン酸受容体 mGluR1 を発現する  
mGluR1-レスキューマウスの作成および解析  
饗場 篤（東京大学医科学研究所）
- ( 8 ) GABA ニューロンを標識する遺伝子改変マウスの開発  
柳川右千夫（生理学研究所）
- ( 9 ) 中枢神経シナプスの活性化による，シナプス前・後膜接着分子 N-cadherin の存在様式の変化  
田中秀和（大阪大学医学部）
- ( 10 ) カドヘリンスーパーファミリー：ゲノム構造と機能  
八木健（大阪大学細胞生体工学センター，生理学研究所）
- ( 11 ) 終脳特異的細胞接着分子のシナプス可塑性，参照記憶，sensorimotor gating における役割  
中村和裕（順天堂大学医学部）
- ( 12 ) PDZ 領域 1 回とアクチン線維結合領域を持つ足場蛋白 Neurabin および Afadin の局在と機能  
溝口 明（京都大学医学部）

### 【参加者名】

田中秀和（大阪大学・医・情報薬理），藤本崇宏（大阪大学・医・情報薬理），真鍋俊也（神戸大学・医・生理学第一），志牟田美佐（神戸大学・医・生理学第一），駒井章治（神戸大学・医・生理学第一），新里和恵（神戸大学・医・生理学第一），篠江徹（神戸大学・医・生理学第一），北村宏幸（神戸大学・医・生理学第一），饗場篤（東京大学・医科学研究所），中村和裕（順天堂大学・医），狩野方伸（金沢大学・医・生理学第二），新石健二（金沢大学・医・生理学第二），福留優子（金沢大学・医・生理学第二），

吉田隆行（金沢大学・医・生理学第二），笹岡俊邦（国立精神神経センター・神経研究所），松田由喜子（国立精神神経センター・神経研究所），尾藤晴彦（京都大学・医・神経細胞薬理），高橋正身（三菱化学・生命科学研究所），大西浩史（三菱化学・生命科学研究所），古賀毅（三菱化学・生命科学研究所），井ノ口馨（三菱化学・生命科学研究所），深澤有吾（三菱化学・生命科学研究所），斎藤真子（新潟大学・脳研究所），永野聖聖（新潟大学・脳研究所），溝口明（京都大学・医），津本忠治（大阪大学・医・

神経生理), 小原圭吾 (大阪大学・医・神経生理), 北村明彦 (大阪大学・医・神経生理), 惣谷和広 (大阪大学・医・神経生理), 中平健祐 (生理学研究所), 森泰生 (生

理学研究所), 井本敬二 (生理学研究所), 若森実 (生理学研究所)

### 【概要】

シナプス可塑性やそれに関連する記憶・学習といった脳高次機能に興味をもって研究を進めている多くの分野の研究者が一堂に会して, 脳の可塑性を分子レベルで明らかにするためにどのようなアプローチが可能かを議論し, 同分野の今後の展望を探った。具体的には, 最近特に注目されている細胞接着分子や神経栄養因子のシナプス可塑性における機能に焦点を当て, これらの分子を出

発点として, 脳高次機能の全体像を解明するための手がかりが得た。また, 異なる分野の研究者が集まることにより, 次世代に向けた新たな研究法の模索やそれに基づいた新たな共同研究への発展も視野に入れた。方法論という点からは, 最近多くの研究室で新しいタイプの遺伝子改変動物の作製が試みられているが, このような点についても議論した。

## (1) 小脳顆粒細胞の成熟過程における電位依存性カリウムチャンネル Kv4.2 の発現と役割

中平健祐<sup>1,2</sup> (岡崎国立共同研究機構<sup>1</sup> 統合バイオサイエンスセンター,<sup>2</sup> 生理学研究所・神経情報)

小脳顆粒細胞では, 前駆細胞の段階から遅延整流型のカリウムチャンネル遺伝子 Kv3.1 が発現し, 最終分裂後の内顆粒層への移動に伴い A-type チャンネルの Kv4.2 が発現する。培養系では, この A-type 電流成分と同時期にナトリウムチャンネルも発現し, 活動電位が観察されるようになる。A-type カリウムチャンネルは, 低い膜電位で開いて脱分極を抑制し, ひとたび脱分極状態になると不活性化する特徴を持つため, 樹状突起においては入力シグナルの取捨選択に関わるゲートの役割を果たす可能性があり, また, 細胞体からのバックプロパゲーションを制御することでシナプス伝達の可塑性に関わっている可能性が考えられている。

我々は小脳顆粒細胞の培養系を用いて, この A-type 電流成分が実際に Kv4 サブファミリーによって担われていることを示した。また, Kv4.2 ドミナントネガティブ変異体を用いた特異的阻害実験から, この電流成分が活動

電位のスパイク発生を抑制するように働くことを明らかにした。この成分は静止膜電位等には関わっておらず, この成分を阻害した小脳顆粒細胞は培養下で正常な形態変化を示した。

我々の用いている培養細胞系における Kv4.2 蛋白質の発現は細胞体に局在しており, これはちょうど内顆粒層へ移動した直後の顆粒細胞と同様である。in vivo ではこの後, 樹状突起に移行してシナプス形成の場である glomeruli に局在するようになる。培養系で樹状突起への移行が見られない理由としては苔状線維からの入力の欠除, グリア細胞との相互作用がないことなどが可能性として考えられるが, 最近, グルタミン酸による刺激が Kv4.2 蛋白質の樹状突起への移行を促すことを示唆する結果が得られた。まだ予備的なデータではあるがこれについても発表したい。

## (2) P/Q 型 Ca<sup>2+</sup>チャンネル異常を伴う小脳変性症マウスの分子神経生理学的解析

若森 実, 森 泰生, 松下かおり, 井本敬二 (生理学研究所, 液性情報)

電位依存性 Ca<sup>2+</sup>チャンネルのうち, P 型 Ca<sup>2+</sup>チャンネルをコードする  $\alpha_1A$  サブユニットに変異が入ることにより, ヒトで Episodic ataxia-2, Familiar hemiplegic migraine,

SCA6 等の中枢神経疾患が引き起こされる (Ophoff et al, *TIPS* 19, pp121-127, 1998)。しかし, 変異による P 型 Ca<sup>2+</sup>チャンネルの性質変化や, その変化と疾病との関係は不明

である。これらの点を解明するため、3種類の小脳変性症モデルマウス (*tottering* (*tg*), *leaner* (*tg<sup>la</sup>*), *rolling* (*tg<sup>rol</sup>*)) を入手した。まず、変異が不明であった *tg<sup>rol</sup>* マウスの変異を探索し、リポート III の S4 に位置する 1262 番目のアルギニン(R)がグリシン(G)に置換していることを明らかにした(Mori et al, JNS in press)。次に、急性単離小脳ブルキンエ細胞の  $Ca^{2+}$  チャンネル電流を測定するとともに、組換え DNA を用いて発現させた変異  $Ca^{2+}$  チャンネルの機能を解析した。マウス小脳 Purkinje 細胞を急性単離しパッチクランプ法で解析したところ、電流密度は Normal > *tg<sup>rol</sup>* (76%) > *tg* (55%) > *tg<sup>la</sup>* (37%) マウスの順であった。薬理的検討から、低下している成分は P 型  $Ca^{2+}$  チャンネルであり、他の高閾値活性化型  $Ca^{2+}$  チャンネルがこの P 型  $Ca^{2+}$  チャンネルの低下分を補償することはなかった。*tg* の活性化曲線は Normal と重なったが、*tg<sup>la</sup>* の活性化曲線は約 9mV 脱分極側に平行移動した。また、*tg<sup>rol</sup>* の活性化曲線

は約 8mV 脱分極側に移動すると伴に傾きが緩くなった。これら電流密度の低下と活性化曲線の変化は baby hamster kidney (BHK)細胞に強制発現させた変異  $Ca^{2+}$  チャンネルに於いても認められたことから、 $\alpha_1A$  遺伝子の変化が直接的にチャンネルの変化を引き起こしていることが判明した。また、電流密度の低下と活性化曲線の変化を総合したチャンネル活性の低下の度合いは症状の重さ (*tg* < *tg<sup>rol</sup>* < *tg<sup>la</sup>*) と相関があった。更に、スライス標本を用いて発火パターンを検討したところ、Normal では  $Na^+$  spike と  $Ca^{2+}$  spike が認められたが、*tg<sup>rol</sup>* では  $Na^+$  spike しか記録できなかった。以上の結果より、 $Ca^{2+}$  チャンネル活性の低下が神経疾患を引き起こしている可能性が示唆された。

これらのモデルマウスはシナプス可塑性に対する P/Q 型  $Ca^{2+}$  チャンネルの寄与を検討するのに良い標本であり、今後さらなる検討を加えたい。

### (3) 神経栄養因子によるグルタミン酸受容体の発現調整とその分子メカニズム

斎藤真子, 永野忠聖, 那波宏之 (新潟大学脳研究所分子神経生物学分野)

神経栄養因子は神経分化や神経細胞死ばかりでなく、シナプス伝達の可塑性にも関与することが報告されているが、その分子メカニズムは依然として不明である。我々は、神経栄養因子のうち、ニューロトロフィン類の BDNF (脳由来神経栄養因子) を連日、培養大脳皮質神経細胞に添加すると 5 日目の時点で mRNA レベルに影響することなく AMPA 受容体蛋白発現量を上昇させることを発見した (Proc Natl Acad Sci. U.S.A. vol. 96 P2461-2466, 1999)。AMPA 受容体蛋白は、GABA 作動性神経細胞に強く発現されることが免疫染色によって確認された。またパッチクランプ法により GABA 作動性神経細胞における AMPA 電流の上昇を認め、機能的な AMPA 受容体チャンネルの発現上昇が確認された。BDNF 遺伝子欠損マウスの大脳皮質の PSD (シナプス後肥厚部) を豊富に含む画分においても AMPA 受容体蛋白発現量が、低下傾向を示していることから、in vivo においても BDNF が AMPA 受容体蛋白の正常な発現に必要であることを確認した (Neuroscience. vol. 88 p1009-1014, 1999)。AMPA 受容体蛋白発現量の上昇は神経細胞に作用する成長因子のうち PDGF (血小板由来成長因子) によっても認められた。

そこで、BDNF, PDGF の下流で共通に活性化されるカスケードについて検討した結果、Src ファミリーチロシンキナーゼが AMPA 受容体蛋白発現量の上昇に関与することを確認した。さらに Fyn 遺伝子欠損マウスの培養大脳皮質神経細胞では BDNF の効果が認められなかったことから、Src ファミリーチロシンキナーゼのうち Fyn キナーゼが重要であることが示唆された。in vivo においても生後 14 日の Fyn 遺伝子欠損マウスの大脳皮質において AMPA 受容体蛋白発現量が低下していることを確認した。また HEK293 細胞に TrkB, GluR1, GluR2 を CMV (cytomegalovirus) プロモーター下で発現させた系でも、BDNF によって GluR2 の受容体蛋白発現量が上昇することが再現された。現在、BDNF がその受容体であるレセプター型チロシンキナーゼ、TrkB に結合した後に起こるシグナルカスケードに注目し、こうしたカスケードが AMPA 受容体および AMPA 受容体関連タンパク質、細胞骨格蛋白等をどのように制御し AMPA 受容体蛋白発現量を上昇させるのか、その分子メカニズムに重点を置いて研究中である。

#### (4) 神経栄養因子による神経伝達物質放出の制御

大西浩史<sup>1,3</sup>, 網野真也<sup>2</sup>, 板倉 誠<sup>1</sup>, 山森早織<sup>1</sup>, 高橋正身<sup>1,2,3</sup> (<sup>1</sup>三菱化学生命科学研究所,  
<sup>2</sup>東京大学大学院, <sup>3</sup>科学技術振興事業団 (CREST))

増殖・分化・生存維持活性をもつ多くの細胞栄養因子・成長因子が神経回路の形成・維持に深く関わっていることはよく知られている。驚いたことに、それらの多くが中枢神経系においてシナプス伝達効率を変化させ、脳の高次機能を調節するという全く新しい活性を有する事が近年明らかになってきた。これら因子によるシナプス調整の分子メカニズムについては、蛋白質リン酸化を介した速い反応、あるいは遺伝子発現を介した遅い反応により、前シナプス、後シナプスの機能が修飾・変化をうけていることが予想される。我々は神経栄養因子による前シナプス制御の可能性に注目し、神経のモデル細胞、PC12細胞を用いた解析を行った。NGFで処理したPC12細胞では、Ca<sup>2+</sup>依存性の神経伝達物質放出が増強し、またこの作用は短時間の処理で急性に誘導されるものであった。神経伝達物質放出はCa<sup>2+</sup>流入とその後の開口放出過程により引き起こされるが、増強作用はイオノマイシンによって強制的にCa<sup>2+</sup>流入を引き起こした場合にも見られたため、NGFの作用点はCa<sup>2+</sup>流入過程ではなく、

開口放出過程にあると考えられた。さらに培養神経細胞に対して神経栄養因子BDNFが同様の神経伝達物質放出増強作用を持つことも明らかとなり、神経栄養因子が実際に神経細胞に作用し、前シナプス機能を急性に調整することが分かった。また同様な増強作用はIGF-1, EGFといった神経栄養因子以外の細胞成長因子でも確認され、これら因子の多くが開口放出過程を制御しうる可能性が示された。次に神経栄養因子がどのようなメカニズムで神経伝達物質放出を制御するのかを解析するため、阻害剤あるいは変異遺伝子を用いた解析を行ったところ、増強作用は神経栄養因子のリセプターであるTrkファミリーチロシンキナーゼのキナーゼ活性に依存しており、また細胞内シグナル伝達経路としてMAPK経路とPI3K経路が重要であることが分かった。これらのシグナル経路がどのように開口放出過程を制御しているのかという問題については現在まだ明らかではない。シンポジウム発表ではいくつかの可能性についてディスカッションしたい。

#### (5) シナプス可塑性における脳由来神経栄養因子の役割

津本忠治 (大阪大学大学院医学系研究科バイオメディカル教育研究センター高次神経医学部門)

神経栄養因子は従来想定されてきた神経細胞の分化、突起伸展、生存維持といった機能の他に、シナプス伝達効率を急速に変える、あるいはシナプス長期増強や長期抑圧に関与するなど、シナプス可塑性における役割が注目されている。我々は、可塑性に関する知見が集積している大脳皮質視覚野においてスライスや培養細胞標本を使用し、神経栄養因子の中でも脳由来神経栄養因子 (Brain-derived neurotrophic factor, BDNF) に的を絞って、その役割や関与メカニズムについて調べている。今回は主に、この研究の背景、実験結果及びその意義について以下の点を中心に述べたい。

1) スライス標本を用いた実験。BDNFのシナプス伝達に対する急性作用を、幼若ラットあるいはマウス視覚野のスライス標本において、IV層刺激に対するII/III層

錐体細胞のシナプス反応を指標として調べた。その結果、200 ng/mlの濃度ではシナプス伝達を急速に増強すること、20 ng/mlの濃度では通常のシナプス伝達には影響を及ぼさないが、低頻度連続刺激によるシナプス長期抑圧の誘発を阻止することを見出した。また、BDNFノックアウトマウスから作製した標本では、正常では長期抑圧を起こさない刺激で長期抑圧を起こすことも見出した。以上の結果から、BDNFは、生後発達期には、連続入力によってシナプスが抑圧されることを防ぐ作用があることが示唆された。さらに、抗BDNF抗体、TrkB-IgG及び受容体型チロシンキナーゼの阻害薬を使った実験からこれらの作用はTrkB受容体を介することが示唆された。

2) 幼若ラットあるいはマウス視覚野から孤立神経細胞培養標本を作製し、誘発シナプス (autapse) 反応

(evoked EPSC), 及び自発性活動 (いわゆる miniature EPSC, mEPSC) を指標として調べた。その結果, BDNF は mEPSC 頻度の増大を起こすが, 振幅は変えないことが判明した。この結果は, BDNF の作用部位はシナプス前であることを示唆していると考えられた。一方, 誘発反応の方は, 培養日数の増加につれて BDNF が無効となる傾向が見られた。この結果は, 神経細胞の成熟につれて誘発シナプス反応を起こすメカニズムと mEPSC を起

こすメカニズムが乖離してくることを示唆している。

3) 上述した BDNF の急性作用が, 従来報告されてきた慢性作用に如何に関係しているかを明かにする一環として, 孤立神経細胞培養標本に BDNF を慢性投与した時のシナプス機能及び形態の変化を電気生理学及びシナプス前部に取り込まれる蛍光色素 (FM1-43) を用いて調べている。この実験結果についても述べる予定である。

## (6) 新しい発生工学技術の開発によるアミノ酸変異導入マウスの作成

笹岡俊邦<sup>1</sup>, 江隅英作<sup>2</sup>, 松田由喜子<sup>1</sup>, 鍋島曜子<sup>3</sup>, 三品昌美<sup>4</sup>, 鍋島陽一<sup>3</sup> (<sup>1</sup>国立精神・神経センター 神経研究所 疾病研究第七部, <sup>2</sup>国立精神・神経センター 神経研究所 遺伝子工学研究部, <sup>3</sup>京都大学大学院 医学研究科 腫瘍生物学, <sup>4</sup>東京大学大学院 医学系研究科 薬理学・分子神経生物学)

(研究目的) ヒトゲノムプロジェクトの進歩により, 遺伝性疾患の原因遺伝子の分離および変異の同定が急速に進みつつあり, 多くの遺伝子疾患では原因遺伝子の特定アミノ酸の変異が観察され, 特定アミノ酸配列の持つ機能の解析が疾患の理解に不可欠であることが明らかになってきた。また多くの遺伝子は複数の場面で重要な機能をもつため, 動物個体の個別の場面で遺伝子機能を解析できる新たな方法の開発が必要である。我々はこれらの問題点の解決のため従来のマウス発生工学技術を一歩進めて, 「目的とする組織や発生段階で 対象分子にアミノ酸置換を導入する新たなシステム」の開発を進めてきており, 遺伝子の機能の理解, 疾患の理解に最もふさわしいモデル動物を作成し, 詳細な解析を可能とする実験系を構築している。

(研究方法) NMDA 受容体の Ca イオン透過性を調節するアミノ酸置換を, 特定細胞において導入することを対象とし, 新たな実験系を開発をおこなった。(1) 特定アミノ酸の変異を導入する方法の開発: NMDA 受容体 1 遺伝子の正常配列エクソンと変異配列エクソンを並列に配置し, 正常型エクソンの両側に loxP を配置し, 2 つのエクソン間に人工イントロンを挿入した相同組換えベクターを構築し, マウス胚幹(ES)細胞を用いた相同組換えによりベクターを組み込んだマウス個体 (NMDA/loxP マウス) を作成した。この状態では 2 つのエクソン間のイントロンの性質により, 絶えず正常配列エクソンのみを選択させることが可能であるが, 正常配列エクソンを欠失させると変異配列エクソンが利用され, 転写産物に変

異が導入される。正常配列エクソンを欠失させる方法として Cre-loxP システムを利用する。(2) 特定細胞におけるアミノ酸置換の導入: Nestin プロモーターの発現調節のもとで神経細胞で Cre リコンビネースを発現するトランスジェニックマウス (Cre マウス) と NMDA/loxP マウスを掛け合わせ, NMDA/loxP-Cre マウスを作成し, 神経細胞特異的にアミノ酸置換をおこなった。(3) 電気生理実験による NMDA 受容体の機能解析: スライスパッチクランプ法を用いて海馬錐体細胞における NMDA 受容体の機能を解析した。

(結果と考察) (1) 特定アミノ酸の変異を導入する方法の開発: 上記の方法により作成した NMDA/loxP マウスはホモ接合体であっても, 成長・繁殖は野生型と変わらず, 運動異常などを示さなかった。NMDA/loxP マウス脳の NMDA 受容体 1 サブユニット mRNA はの正常配列エクソンを読み取っていた。Nestin プロモーターにより神経細胞に Cre リコンビネースが発現するトランスジェニックマウス (Cre マウス) と掛け合わせ, NMDA/loxP-Cre マウスを作成し, マウスの各臓器における変異導入の様式を調べたところ, 脳及び脊髄で変異導入がみられた。脳の各部位での組換えを調べると効率の差はあるが, 広い領域で組換えが起っていた。さらに, NMDA 受容体 1 遺伝子 mRNA を調べたところ, Cre-loxP の作用により正常配列エクソンが欠失し, 変異配列エクソンが利用され変異導入が行われていた。この NMDA/loxP-Cre マウスは, 発育不全と運動機能異常を示し, NMDA 受容体に Ca イオン透過性を上昇させるアミノ酸置換の導入によ

る神経細胞活動性異常が示唆された。(2)電気生理実験による NMDA 受容体の機能解析: マウス脳スライスパッチクランプ実験では, 計画通りに海馬 CA1 領域錐体細胞の NMDA 受容体の Mg ブロック機能が変化していた。われわれの NMDA/lox-Cre マウスにより, 特定場面で NMDA

受容体の Mg ブロック機能を個体レベルで詳しく解析することが可能となった。特に NMDA 受容体の Mg ブロックの解除による Ca の過剰な流入は, 神経細胞死の初期過程に関連すると考えられており, 病態の理解にも貢献できると考えられる。

### (7) プルキンエ細胞特異的に代謝型グルタミン酸受容体 mGluR1 を発現する mGluR1-レスキューマウスの作成および解析

饗場 篤 (東京大学医科学研究所ヒト疾患モデル研究センター高次機能研究分野)

我々は代謝型グルタミン酸受容体 mGluR1 を欠損したマウス [mGluR1(-/-)マウス] をジーンターゲット法により作成し, mGluR1(-/-)マウスでは平行線維-プルキンエ細胞シナプスでの長期抑圧が欠失していること, 登上線維によるプルキンエ細胞の多重支配が生じていること, 運動協調ができなくなっていること等を明らかとした。一方では, mGluR1 は小脳プルキンエ細胞以外の細胞でも発現しており, 通常のノックアウトマウスの解析からは上記の表現型が, プルキンエ細胞に発現している mGluR1 の欠損によるものか, もしくは他の領域で発現している mGluR1 の欠損によるものかを区別することはできなかった。そこで我々はプルキンエ細胞特異的なプロモーターを用い, mGluR1 がプルキンエ細胞だけで発現するマウスを作成し, mGluR1 ノックアウトマウスで見られた表現型が復活するかどうかを検討した。L7 遺伝子プロモーター下にラット mGluR1 cDNA を発現する

ような DNA を構築し, mGluR1(+/-) 受精卵にマイクロインジェクションし, mGluR1(+/-)L7-mGluR1 トランスジェニック(Tg)マウスを作成した。さらにこれらのマウスを mGluR1(+/-) マウスと交配し, 内在性のマウス mGluR1 遺伝子の発現がない mGluR1(-/-)L7-mGluR1 Tg マウスを作成した。作成した 8 系統の独立な Tg マウスのうち, 1 系統では mGluR1(-/-) マウスの運動協調能が復活していた。この mGluR1 レスキューマウスでは mGluR1 が小脳プルキンエ細胞だけで発現しており, 長期抑圧 登上線維のシナプス除去が正常に起こっていた。従って, プルキンエ細胞に存在する mGluR1 が長期抑圧, 登上線維のシナプス除去, 運動協調に必要であることを明らかとすることができた。この講演では通常のノックアウトマウスに加え, 組織特異的なプロモーターによるトランスジーンを組み合わせたマウスの解析の実際について議論したいと思う。

### (8) GABA ニューロンを標識する遺伝子改変マウスの開発

柳川右千夫 (岡崎国立共同研究機構 生理学研究所 神経化学部門)

中枢神経系においては, リズミクな神経活動, 神経が同期して活動する現象, あるいは学習や記憶の素過程と考えられているシナプス可塑性の形成には, GABA ニューロンが抑制性インターニューロンとして行う神経情報処理が重要な役割を果たしていると考えられている。しかしながら, インターニューロンは, 中枢神経系に存在し, 比較的少数であることから, in vivo において正確に同定することは困難であった。

一方, グルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) は, L-グル

タミン酸から GABA を合成する酵素であり, 分子量の違う GAD65, GAD67 の 2 種類のアイソザイムの存在する。これらのアイソザイムは異なる遺伝子にコードされ, 生化学的性質や細胞内局在が異なることが報告されている。GAD の発現様式については, GAD65 及び GAD67 が脳では GABA ニューロン特異的に発現している。

我々は, (1) GABA ニューロンを標識すること, (2) GABA ニューロン特異的な発現調節機序を解明することを目的として, マウス GAD(mGAD65, mGAD67)遺伝子を単

離し、構造と発現について検討した。特に、mGAD65 遺伝子あるいは mGAD67 遺伝子のプロモーターを含む上流域に lacZ レポーター遺伝子を連結した融合遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作成して解析した結果、それぞれのプロモーターが組織及び GABA ニューロン特異的発現に必須な役割を果たしていることを明らかにした。しかしながら、両 GAD 遺伝子ともすべての GABA ニューロンの発現には、遺伝子上流域のみでは不十分であり、さらに他の遺伝子領域が必要と考えられた。

これらの結果を背景にして、in vivo で GABA ニューロンを正確に標識するために mGAD67 遺伝子に遺伝子標的法を用いて発光オワンクラゲ由来の Green fluorescent protein (GFP) 遺伝子をノックインしたマウス(GAD 遺伝子 GFP ノックインマウス)の作成を試み、現在キメラマウスを得ている。今後は、交配することにより GAD 遺伝子 GFP ノックインマウスのヘテロを得ることにより、GABA ニューロンの電気生理学的解析や発生過程の解析に使用できることを期待している。

### (9) 中枢神経シナプスの活性化による、シナプス前・後膜接着分子 N-cadherin の存在様式の変化

田中秀和 (大阪大学医学部情報薬理学 (旧第一薬理))

中枢神経細胞間のコミュニケーションの場であるシナプスは、シナプス前・後膜の接着を中心構造とし、その前後に伝達物質の分泌機構や受容体等の機能ドメインを配置する。そのシナプスの接着構造の形成と維持に、カドヘリン・ファミリーが、重要な役割を担っていることが近年わかってきた (Fannon and Colman, 1996; Uchida et al., 1996; Benson and Tanaka, 1998; Kohmura et al., 1998)。

我々は、シナプスのカドヘリンが、単なる静的な接着性構造分子ではなく、動的でシナプス活動性依存的な調節を受ける機能分子であることを示唆する知見を得た。培養ラット海馬神経細胞において、神経型 (N) カドヘリンは、シナプス部位に高密度に発現し、その結果点状の分布を示す。このシナプスを膜脱分極で刺激すると、5 分以内に N カドヘリンは細胞膜上を拡散し、線状の分布に変わった。また、同様の刺激により、シナプスの N カ

ドヘリンが、単量体から二量体の状態にシフトし、トリプシン等の蛋白質分解酵素に対して強い耐性を獲得することも見いだした。N カドヘリンの機能は、隣あった N カドヘリン分子同士の結合 (シス二量体) と単量体との間の平衡状態により制御されることが知られている (Shan et al., 2000)。従って、このシナプス活動性依存的な N カドヘリンの平衡状態のシフトは、シナプスにおける N カドヘリン機能の変化・修飾を意味し、その結果、シナプス間隙の環境が制御されている可能性が示唆される。

Benson and Tanaka (1998), J Neurosci 18, 6892-6804.

Fannon and Colman (1996), Neuron 17, 423-434.

Kohmura et al. (1998), Neuron 20, 1137-1151.

Shan et al. (2000), J Cell Biol 148, 579-590.

Tanaka et al. (2000), Neuron 25, 93-107.

Uchida et al. (1996), J Cell Biol 135, 767-779.

### (10) カドヘリンスーパーファミリー：ゲノム構造と機能

八木 健 (阪大 細胞生体工学センター・岡崎 生理学研究所)

カドヘリンは選択的細胞接着活性をもたらす分子として竹市雅俊博士等により単離解析され、細胞の自己組織化に関わる細胞接着分子である。我々は哺乳類脳の機能に関わる遺伝情報の解析を行う過程で、新たなカドヘリン (CNR) ファミリーを得た。この CNR ファミリーは、シナプスに存在し、Fyn チロシンリン酸化酵素と共役し、

Reelin タンパク質の受容体として機能していることが明らかとなった。また、ゲノム構造の解析より CNR ファミリーは免疫グロブリンと類似した新たな遺伝子クラスターを形成していることも明らかとなっている。

reference

1. Yagi, T. and Takeichi, M. (2000) Cadherin superfamily

genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity. *Genes & Development* 14, 1169-1180.

2. Sugino, H, Hamada, S., Yasuda, R., Tuji, A., Matsuda, Y., Fujita, M., and Yagi, T. (2000) Genomic organization of the family of CNR cadherin genes in mice and human. *Genomics* 63, 75-87.

3. Senzaki, K., Ogawa, M. and Yagi, T. (1999) Proteins of the CNR family are multiple receptors for Reelin. *Cell* 99, 635-647.

4. Yagi, T. (1999) Molecular mechanisms of Fyn-tyrosine kinase for regulating mammalian behaviors and ethanol sensitivity. *Biochem. Pharmacol.* 57, 845-850.

5. Kohmura, N., Senzaki, K., Hamada, S., Kai, N., Yasuda, R., Watanabe, M., Ishii, H., Yasuda, M., Mishina, M. and Yagi, T. (1998) Diversity revealed by a novel family of

cadherins expressed in neurons at a synaptic complex. *Neuron* 20, 1137-1151.

日本語総説

1. 先崎浩次, 小川正晴, 八木 健 (2000) マウス大脳皮質層構造形成機構における新たな分子メカニズムの解明 - CNR ファミリーは Reelin の多重受容体である - . *実験医学* 18, 784-787.

2. 八木 健 (1999) 免疫系多様化分子群と類似性を示す中枢神経系の新規カドヘリン (CNR) ファミリー. *脳の科学* 21, 923-936.

3. 八木 健 (1998) 脳の機能と遺伝情報. *脳の科学* 20, 555-558.

4. 八木 健 (1997) 脳の進化をもたらした遺伝子の探索 - 情動形成に関わる分子メカニズムによる研究 - . *細胞工学* 16, 1140-1149.

#### (11) 終脳特異的細胞接着分子のシナプス可塑性, 参照記憶, sensorimotor gating における役割

中村和裕 (順天堂大学医学部第2病理)

中枢神経系に発現する細胞接着分子は発達段階においては神経回路形成に, また, 成体においてはシナプス可塑性, 学習などの脳機能に役割を果たすと提唱されている。免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞接着分子テレンセファリン (TLCN) の発現は生後に始まり, 部位は終脳内ニューロンの細胞体, 樹状突起に局限している。そのため TLCN 欠損マウスの機能解析を行い, 終脳特異的細胞接着分子 TLCN が成体の脳機能に果たす役割を解析した。

TLCN 欠損マウスは正常に发育し, 交配も可能であった。Nissl 染色による終脳内領域の形態, 大脳皮質での樹状突起の発達, 電顕による海馬 CA1 のシナプス密度の解析の結果, TLCN 欠損マウスで発生, 形態異常は認められなかった。しかし海馬 CA1 領域でのシナプス伝達長期増強 (LTP) を調べたところ TLCN 欠損マウスで LTP が

上昇していた。更に LTP の飽和レベルの上昇が認められた。しかし低頻度刺激によりひきおこされる興奮性後シナプス電位は変化なかった。また, 行動解析の結果, 有害刺激を使う学習テストである文脈依存的学習テスト, 水迷路テストでは野生型マウスと比較して変化なかったが, 報酬を使った学習テストである放射迷路テストで参照記憶の能力が向上していた。また, 同様に報酬を使うテストである水探索テストにおいてもパフォーマンスが亢進していた。また startle response の prepulse inhibition が亢進していたため, sensorimotor gating が亢進していることが明らかとなった。

従って TLCN は生体内で海馬シナプス可塑性の可変域, 参照記憶, sensorimotor gating の制御に役割を果たしていることが明らかとなった。

#### (12) PDZ 領域 1 回とアクチン線維結合領域を持つ足場蛋白 Neurabin および Afadin の局在と機能

溝口 明 (京都大学医学部)

シナプス形成における標的細胞選択機構や活動依存性

シナプス強度調節機構に関して, Cadherin 系や Integrin

系のような細胞間接着機構が重要な役割を担うことが知られている。これらの細胞間接着機構はいずれも細胞接着分子とアクチン線維が、Catenin や Vinculin などの膜下蛋白質によって連結されるという基本構造を持っている。そこで私共は、アクチン線維と結合活性を持つ新規の膜下蛋白質を発生段階の脳において探索した。その結果、Neurabin I, Neurabin II, および 1-Afadin が同定された。これらの膜下蛋白質は、アクチン結合領域と PDZ 領域を一カ所持つという共通の分子構造を持っていた。

Neurabin I は脳特異的に発現しており、完成したシナプスでは、主としてポスト側のスパインに局在していた。発生期の脳では、成長円錐のうち最先端を走るもの (Pioneer Growth Cones) には軽度の、後方を束となって走るもの (Follower Growth Cones) には、高度の Neurabin I の発現を認めた。また、培養神経細胞において、アンチセンス RNA によって Neurabin I の発現を抑制すると、神経突起の発芽が阻害された。これらの結果から、Neurabin I は神経突起の発芽、束化およびスパインの運動に関与すると考えられる。

1-Afadin は、全身の多くの臓器に存在し、小腸や肝臓などの非神経組織では、主としてアドヘレンスジャンクションに Cadherin 系と共存していた。一方、胎児では、1-Afadin は、E6.5 日から発現しており、外胚葉と内胚葉上皮のアピカル領域に局在していた。さらに、E7.5 日では、

外胚葉の中でも神経外胚葉と中胚葉に発現が高まっていた。Afadin ノックアウトマウスでは、E7.5 日で外胚葉の上皮構造の乱れと外胚葉上皮から中胚葉間葉細胞への遊離が障害されていた。このことから、Afadin は、外胚葉上皮が全体として上皮構造を維持しつつ、しかも原始線条においてのみ細胞が上皮から遊離して中胚葉の間葉細胞へと変化するという形態形成過程に必須であることが示唆された。

脳では、1-Afadin は、海馬 CA3 領域の苔状線維終末-錐体細胞樹状突起間のシナプスの Puncta Adhaerentia Junction に両側対称性に局在していた。そこで 1-Afadin と結合する細胞接着分子をイーストツーハイブリッド法で検索した結果、イムノグロブリンスーパーファミリーに属する Nectin を見出した。Nectin は、細胞外領域に Ca 非依存性細胞接着活性を持ち、細胞内領域の C 末端で 1-Afadin の PDZ 領域と結合する。

Nectin は、1 型、2 型、3 型のアイソフォームからなり、各アイソフォーム同志がホモフィリックに結合するだけでなく、3 型は、1 型および 2 型とヘテロフィリックにも結合できる。Nectin もシナプスの Puncta Adhaerentia Junction に局在していることから、Nectin-1-Afadin 系接着機構は、シナプスの形態形成に重要な役割を果たしていると考えられる。

## 2. イオンチャネルの細胞局在化と機能制御に関する研究

2000年8月17日 - 8月18日

代表・世話人：倉智嘉久（大阪大学医学系研究科情報薬理）

所内対応者：井本 敬二（液性情報）

(1) Paracellular pathway における物質輸送を制御する分子機構：

タイトジャンクションを構成する膜タンパク質クローディングファミリー

古瀬幹夫<sup>1</sup>，片平じゅん<sup>2</sup>，堀口安彦<sup>2</sup>，月田承一郎<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>京都大学大学院医学研究科，<sup>2</sup>大阪大学微生物病研究所)

(2) 内向き整流性 K<sup>+</sup> channel, Kir4.1 の細胞内局在の多様性と細胞機能

藤田秋一<sup>1,2</sup>，東佳代子<sup>1</sup>，種本雅之<sup>1</sup>，稲野辺厚<sup>1</sup>，倉智嘉久<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>大阪大学医学系研究科情報薬理，<sup>2</sup>大阪府立大学農学部獣医薬理)

(3) Ca<sup>2+</sup>チャネル活性化機構における極在化と輸送

森 泰生（生理学研究所）

(4) CIC-3 クロライドチャネルの神経細胞分化の過程における細胞内局在化

河崎雅暢<sup>1</sup>，水谷顕洋<sup>2</sup>，御子柴克彦<sup>2</sup>，山内小津枝<sup>1</sup>，新保 斎<sup>1,3</sup>，佐々木成<sup>1</sup>，丸茂文昭<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>東京医科歯科大学医学部第2内科，<sup>2</sup>医科学研究所化学科，<sup>3</sup>理学研究所神経病理科)

(5) 異物排除における MRP トランスポーターファミリーの役割

杉山雄一（東京大学大学院薬学系研究科・製剤設計）

(6) Na<sup>+</sup>-非依存性アミノ酸トランスポーターファミリー（SLC7）のトランスポーターの

細胞膜移行における1回膜貫通型糖タンパク質の役割

金井好克（杏林大学医学部・薬理学，科学技術振興事業団さきがけ研究21）

(7) NMDA 受容体の集積に関わる神経シナプス裏打ち蛋白質 S-SCAM

畑 裕（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・病態代謝解析学）

(8) 三量体 G 蛋白質(G<sub>βγ</sub>)-感受性 PI3-キナーゼに結合する活性型 Rab5 と小胞のベクトル輸送

黒須 洋，紺谷園二，堅田利明

（東京大学大学院薬学系研究科・生理化学）

(9) mitsugumin29 と骨格筋興奮収縮連関

竹島 浩（久留米大学・分子生命研究所・細胞工学研究部門）

(10) 胃プロトンポンプのサブユニット構造

竹口紀晃，浅野真司，木村 徹，森井孫俊，鈴木秀博

（富山医科薬科大学薬学部）

(11) チャネル蛋白相互作用の分子構造基盤

中村春木（大阪大学蛋白質研究所）

(12) 2光子励起法を用いた新しい細胞機能の可視化

根本知己，河西春郎（生理学研究所）

(13) 核包標本からのイオンチャネルと細胞機能

丸山芳夫，大佐賀敦，佐藤功造，大城社子

（東北大学大学院医学研究科・細胞生理学）

(14) 神経因性疼痛とイオンチャネル発現制御

田邊 勉（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・高次機能薬理学）

## 【参加者名】

倉智嘉久(大阪大医),丸山芳夫(大城社子(東北大医)),  
金井好克(杏林大学医),杉山雄一,堅田利明,紺谷園二,  
黒須洋(東京大薬),畑裕,田邊勉,佐々木成,河崎雅暢  
(東京医歯大),田辺秀(中外製薬),加藤由充(協和発酵),  
増田典之(山之内製薬),松山善次郎(岐阜大医),竹口  
紀晃,浅野真司,酒井秀紀,森井孫俊,田淵圭章,鈴木  
智之(富山医薬大薬),古瀬幹夫(京都大医),堀口安彦,  
片平じゅん(大阪大微研),石井優(大阪大医),中村春

木(大阪大蛋白研),藤田秋一(大阪府大農),茶珍元彦  
(日本ベーリンガーインゲルハイム),森豊樹(大塚製薬),  
竹島浩(久留米大分子生命研),河西春郎,根本知己,赤  
塚結子,出崎克也,森泰生,大橋正人,重本隆一,馬杉  
美和子,石井正和,池中一裕,柴田理一,中平健祐,柴  
崎貢志,中井淳一,原雄二,大倉正道,若森実,森誠之,  
松本信幸,井本敬二(生理研)

## 【概要】

神経細胞や上皮細胞など極性をもった細胞では,イオンチャネルなどの機能分子が各膜ドメインに特異的に局在している。これはシナプスにおける神経伝達や上皮細胞によるイオン・小分子の一方方向性輸送など,重要な細胞・組織機能を支える基本的な機構である。最近,世界的には神経細胞シナプス後膜におけるグルタミン酸受容体の局在やシナプス伝達強度制御における PDZ ドメインを持つアンカー蛋白の役割が,急速に明らかになって

きている。しかしながら,他のイオンチャネルやトランスポーター・膜受容体については,それらの細胞膜ドメインへの局在の分子構築基盤・その制御シグナル機構・細胞機能における役割など,不明な点が多い。本研究会では種々のイオンチャネル・トランスポーター・アンカー蛋白の研究者が集まり,この問題にそれぞれの立場から焦点をあて情報を交換し,この領域が総合的に発展することを目的としている。

(1) Paracellular pathway における物質輸送を制御する分子機構：  
タイトジャンクションを構成する膜タンパク質クローディングファミリー

古瀬幹夫<sup>1</sup>, 片平じゅん<sup>2</sup>, 堀口安彦<sup>2</sup>, 月田承一郎<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>京都大学大学院医学研究科, <sup>2</sup>大阪大学微生物病研究所)

多細胞動物の体は,上皮細胞のシートによって様々なコンパートメントに分けられており,個々のコンパートメントがそれぞれ特有の環境を維持することが,各器官の機能発現には必須である。apical-basal 方向に明瞭な極性をもつ上皮細胞は,細胞上に偏って分布するトランスポーターによって方向性をもった物質輸送を行うことで,細胞シートの両側にそれぞれ特有の環境からなる2つのコンパートメントを形成する。一方で,細胞同士の隙間(paracellular pathway)を介した物質の自由な拡散,いわゆる「漏れ」を制限して,これらの2つの環境が混ざらないように維持することも上皮細胞シートのきわめて重要な役割である。脊椎動物において,この役割を担うのがタイトジャンクション(以下TJ)と呼ばれる細胞間接着装置である。TJは,隣り合う細胞膜が完全に密着したように見える構造で,細胞周囲を取り巻くことによって,上皮細胞シートにおける細胞と細胞の隙間をシ-

ルして paracellular pathway における物質透過を制限している。これまでの形態学および生理学的手法による研究から,TJは完全なバリアではなく,イオン等の小分子を通す開いたり閉じたりする小孔が存在すると考えられること陽イオンを通しやすいこと,TJのバリア機能の特性が上皮の種類に応じて様々であることなどが明らかにされてきた。しかしながら,TJの分子構築,特にバリア構造をつくる膜タンパク質が明らかにされていなかったために,分子レベルでのTJの機能解析はほとんど進んでいなかったと言える。

私たちはこの問題にアプローチするために,TJを構成する分子の同定を試みてきたが,最近,新しい膜タンパク質「クローディング」の同定に成功してその機能解析を行っている。クローディングはTJに局在する分子量約23 kDの4回貫通型膜タンパク質で,遺伝子ファミリーを形成している。1)本来TJをもたない線維芽細胞に

クローデインを強制発現させると、細胞は接着能を獲得し、クローデインは細胞間に濃縮して発達したTJを形成すること、2) 特定のクローデインを受容体とするウェルシュ菌の毒素 Clostridium perfringens enterotoxin を上皮細胞に投与すると、そのTJが壊れてバリア機能が低下することから、クローデインがTJの構造と機能を直接担う分子であることが明らかになった。また、クローデインファミリーの各タイプは、それぞれ特有の組織発現パターンを示し、多くの器官で一つの上皮細胞に複

数のクローデインタイプが発現している。よって各組織の上皮細胞は固有の組み合わせのクローデインファミリーを発現しており、このことが組織の違いによるTJのバリア特性の多様性を生み出す要因となっていると推測される。今後、クローデインの機能解析を進めることによって、paracellular pathwayにおける物質透過の選択性の分子基盤、個体におけるTJバリアの意義が明らかにされてゆくと思われる。

## (2) 内向き整流性 K<sup>+</sup> channel, Kir4.1 の細胞内局在の多様性と細胞機能

藤田秋一<sup>1,2</sup>, 東佳代子<sup>1</sup>, 種本雅之<sup>1</sup>, 稲野辺厚<sup>1</sup>, 倉智嘉久<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>大阪大学医学系研究科情報薬理, <sup>2</sup>大阪府立大学農学部獣医薬理)

膜2回貫通型である内向き整流性 K<sup>+</sup> channel (Kir) family は現在までのところ、7つの subfamily に分類されている。その内 Kir4.1/Kir1.2/K<sub>AB</sub>.2 はグリア細胞および上皮系細胞に分布し、グリア細胞では K<sup>+</sup> siphoning に、上皮細胞では Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase あるいは H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase への K<sup>+</sup> recycling に関与すると考えられている。

各組織での Kir4.1 の細胞内局在を免疫組織染色法(光学および電子顕微鏡的手法)を用いて検討したところ、ラット脳および網膜では、どちらも血管、神経細胞樹上突起およびシナプス周囲を取り囲むグリア細胞(脳: アストロサイト, 網膜: ミュラー細胞)の、またミュラー細胞では水晶体に接する終足に分布していた。いずれも血管周囲および水晶体を取り囲む基底膜または神経細胞膜に接する細胞膜ドメインに限局した局在を示した。これら Kir4.1 の局在は水チャネルの AQP4 の局在とよく一致することから、Kir4.1 が K<sup>+</sup> siphoning に、そして AQP4 がそれに伴う水の移動に関与すると考えられる。また、腎臓尿細管および内耳血管条上皮細胞では Kir4.1 は basolateral 側に局在するのに対し、同じ上皮細胞である網膜色素上皮細胞、胃の壁細胞では apical 側に局在していた。これら上皮細胞における Kir4.1 の局在は腎臓尿細管、内耳血管条上皮細胞および網膜色素上皮細胞での Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase の局在と、胃の壁細胞での H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase の局在に一致する。これらのことから Kir4.1 は Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase および H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase の活性維持に重要

とされる K<sup>+</sup> recycling に関与すると考えられる。

Kir4.1 はその C 末端に PDZ ドメインが結合するモチーフを持ち、実際に SAP97 および PSD-95 がこのモチーフを介して結合することがわかっている。Kir4.1-GFP 融合蛋白質を MDCK 細胞に発現させたところ、Kir4.1 は basolateral 側に局在した。C 末端の PDZ 結合モチーフ(-SNV)を欠損させた Kir4.1(-SNV)-GFP 融合蛋白質は basolateral 側には局在がみられず、核周辺の細胞内器官に集積した。このことから、Kir4.1 の C 末端と PDZ ドメインを持つアンカー蛋白質が結合することは Kir4.1 の basolateral 膜への局在に重要な役割を果たすと考えられる。

上皮細胞での Kir4.1 の局在が細胞種により異なることから、局在決定の機構が各細胞種間で異なることが予想されるが、少なくとも basolateral 側への Kir4.1 の局在決定は、PDZ ドメインとの結合が重要であると考えられる。またグリア細胞での Kir4.1 の局在に関する機構に関しては現在のところ不明であるが、単離ミュラー細胞において SAP97 と Kir4.1 のクラスタの局在が一致することから、グリア細胞においても Kir4.1 の局在決定に PDZ ドメインとの結合が重要と考えられる。今後、各細胞種において Kir4.1 の局在に関するアンカー蛋白を同定し、そして腎臓介在細胞での H<sup>+</sup>ポンプと Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>交換系の局在のスィッチング機構にみられるような上皮細胞における Kir4.1 の局在決定の機構を解明したいと考えている。

(3) Ca<sup>2+</sup>チャネル活性化機構における極在化と輸送

森 泰生 (生理学研究所)

形質膜越えのカルシウム流入は、最も重要な細胞内カルシウムイオン濃度調節機構の一つである。なかでも、受容体刺激により惹起される PI 応答に関連した、Receptor-activated calcium channel (RACC) 群が注目を集めつつあるが、その活性制御機構に関しては未解明な課題が多い。最近我々は、RACC 研究に関するいくつかの興味深い知見を得た。

RACC の分子の実体である 7 つの TRP は、protein kinase C 非依存的に diacylglycerol によって活性化される TRP3, 6, 7, カルシウムによって活性化される TRP5, カルシウムストアの枯渇に関連した容量性カルシウム流入を調節する TRP1 等、に機能分類される。中でもカルシウムによる TRP5 活性制御は、チャネル開口確率の上昇及び、myosin light chain kinase 活性による形質膜への

タンパク質組み込みの 2 つの機序により司られていることがわかってきた。また、TRP1 欠損細胞を用いることにより、TRP1 が容量性カルシウム流入を担う Ca release-activated Ca channel を構成するのみならず、endoplasmic reticulum に存在する IP3 受容体をも機能修飾することが示された。さらには、カプサイシン受容体の他に、アラキドン酸により活性化されるカチオンチャネルも加え、TRP は非常に大きなスーパーファミリーを形成していることも明らかになった。

このように、その活性制御機構が細胞内の位置情報やタンパク質輸送機序と関連していることは、TRP 関連チャネルが特定の生体応答に必要なカルシウムシグナルの空間的・時間的パターンを制御する、重要な基盤をなすことを示唆している。

## (4) CIC-3 クロライドチャネルの神経細胞分化の過程における細胞内局在化

河崎雅暢<sup>1</sup>, 水谷顕洋<sup>2</sup>, 御子柴克彦<sup>2</sup>, 山内小津枝<sup>1</sup>, 新保 斎<sup>1,3</sup>, 佐々木成<sup>1</sup>, 丸茂文昭<sup>1</sup>( <sup>1</sup>東京医科歯科大学医学部第 2 内科, <sup>2</sup>医科学研究所化学科, <sup>3</sup>理学研究所神経病理科)

容量感受性外向き整流性クロライドチャネル(CIC-3)の機能解析を目的として、CIC-3 の細胞内領域 C 末端 178 アミノ酸の GST 融合タンパクを作成し、抗体作成を行った。この抗体により脳においては以前報告した in situ hybridization と同様、CIC-3 は脳内の広い領域にわたり発現していることが明らかになった。最も発現の多い小脳において詳細な観察を行ったところ、CIC-3 は Purkinie 細胞の樹状突起、特に棘突起に局在することから、ラット海馬神経初代培養細胞を用いて分化の過程における CIC-3 の局在変化及び細胞骨格との関連について調べた。

神経細胞が未熟な 2, 3 の突起を出した球状の細胞にあるときは、核周囲に CIC-3 は存在していた。培養開始 1 週間後、軸索や樹状突起が成長する時期には、CIC-3 は細胞体及び樹状突起の膜直下に多く存在するようにな

った。培養 3 週間以上経過し、成熟した神経細胞では細胞体や樹状突起にはほとんど存在せず、棘突起に局在した。シナプス関連蛋白に対する抗体を用いた二重染色では、CIC-3 は synaptophysin と対をなし、drebrin と共存しており、CIC-3 はシナプス後膜に集積していると考えられた。棘突起のアクチンフィラメントをラトルンクリン A で脱重合させると drebrin と同様に CIC-3 は棘突起から消失した。以上より CIC-3 の局在化には棘突起内のアクチンフィラメントが大切であり、シナプス後膜において CIC-3 が重要な役割を果たしていることが示唆された。現在、我々は CIC-3 の棘突起における機能と局在化シグナル領域の検索、アクチンと複合体を形成するであろう CIC-3 結合蛋白の検索及び樹状突起における膜蛋白輸送系を構成する分子群の検索を行っている。

(5) 異物排除における MRP トランスポーターファミリーの役割

杉山雄一 (東京大学大学院薬学系研究科・製剤設計)

生物は、有害な環境物質や薬物などの生体外異物（ゼノバイオティクス）に対し、長い進化の過程で防御機構を備えるに至ったと考えられる。本発表では、医薬品を含む広範な異物に対して生体が、免疫機構とは異なる防御機構として獲得した排除機構を、主に、分子輸送（トランスポーター）による排除機構と分子変換（代謝酵素）による排除機構という観点から考察してみたい。低分子性異物の排除に関わる代謝酵素や輸送担体に見られる特徴として、これら蛋白が一般的に多くのメンバ-より構成されており、適応進化による多様化の側面を持つことが挙げられる。また細胞の生死に直接関与する蛋白ではないが故に、遺伝子変異の penetrance が高く、遺伝子多型が多く見られる。これが薬物動態の個体差に反映し、副作用の原因となっていることが幾つかの代謝酵素、輸送担体（トランスポーター）について証明されつつある。肝、腎における胆汁中、尿中排泄は異物の解毒機構として重要であることが旧くから知られてきたが、この 7 年ほどの間に排泄機構を支配する実体である輸送担体についての解明が急速に進んだ。例えば、第 2 相代謝反応の結果生じる各種抱合代謝物の胆汁排泄に関与するトランスポーターの存在、トランスポーターを欠損する遺伝的

疾患を持ったヒト、実験動物が発見されるという最近の成果を挙げることができる。こうした解毒機構の持つ多様性、大きな種差、遺伝的多型の存在は、医薬品の安全性の確保を極めて困難にしており、信頼あるヒトでの薬物動態予測法の開発が切望されている現状である。肝臓は種々の異物を血液側から取り込み、肝実質細胞内で代謝し、胆汁中に排泄することにより解毒化する重要な臓器である。これまで多くの医薬品の肝胆系移行が担体輸送によることが証明され、現在では輸送蛋白、遺伝子の同定を目指した研究が世界中で展開されている。我々の研究グループでも、最近、胆管側の有機アニオン輸送体、cMOAT/rMRP2 のクローニングを行い、その基質認識特異性を明らかにするとともに、一連の一次性能動輸送担体は、保存性の高い ATP binding cassette (ABC) 領域を有すること、類似のトランスポーターが複数存在することなどを明らかにしている。さらにその後、一連の MRP family 蛋白が、我々を含め国の内外でクローニングされ、その臓器分布、基質特性の解析から、種々の臓器における異物解毒に関与することが実証されつつある。当日は、その現状について整理する。

(6) Na<sup>+</sup>-非依存性アミノ酸トランスポーターファミリー（SLC7）のトランスポーターの細胞膜移行における 1 回膜貫通型糖タンパク質の役割

金井好克 (杏林大学医学部・薬理学, 科学技術振興事業団さきがけ研究 2 1)

細胞への糖やアミノ酸などの親水性栄養物質の輸送は、細胞膜脂質二重層に埋め込まれた膜蛋白質であるトランスポーター（輸送体）を介して行われる。1980 年代半ばから、トランスポーター研究の分野にも分子クローニングの手法が導入され、種々のトランスポーターの分子実体が明らかにされてきたが、アミノ酸輸送系の約半数を形成する Na<sup>+</sup>-非依存性アミノ酸トランスポーターに関する手掛かりは長い間得られていなかった。われわれは、一群のトランスポーターは複数のサブユニットを必要とし、それが単一因子のみを追跡する従来の方法でのクローニングを困難にしている可能性を考え、アミノ酸

トランスポーターの活性化因子（補助サブユニット）と考えられていた細胞表面抗原 4F2hc (4F2 heavy chain: CD98) と cDNA ライブラリーの共発現を行う発現クローニングを試み、機能発現に 4F2hc を必要とする 12 回膜貫通型のトランスポーター（LAT1: L-type amino acid transporter 1）を単離した。LAT1 は、1 回膜貫通型の糖タンパク質である 4F2hc とジスルフィド結合を介して連結する古典的 4F2 light chain に相当するタンパク質であり、4F2hc と共存することにより、Na<sup>+</sup>-非依存性中性アミノ酸輸送系 L の機能活性を示す。

LAT1 の同定に続き相同配列の探索を行い、LAT1 と類

似構造を持ち、輸送基質選択性の異なる一群の Na<sup>+</sup>-非依存性アミノ酸トランスポーターが同定され、Na<sup>+</sup>-非依存性アミノ酸トランスポーター (SLC7) ファミリーが確立された。このうち、LAT1 を含む 6 種が 4F2hc と連結し、残りの 1 種 (BAT1: b0,+ -type amino acid transporter 1) は、4F2hc と類似構造を持つ 1 回膜貫通型タンパク質 rBAT (related to b0,+ -type amino acid transporter) と連結することが明らかになった。

4F2hc と rBAT は、トランスポーターの細胞膜移行を推進するシャペロン機能を有する補助因子であると考えられ、両者は上皮細胞において興味深い役割分担を示す。すなわち、4F2hc は上皮細胞において側底膜に、rBAT は管腔側膜に細胞内輸送され、このため 4F2hc と連結するタンパク質は側底膜に、rBAT と連結するタンパク質は管腔側膜へと輸送されることになる。従って、上皮細胞

におけるアミノ酸トランスポーターの配置は、上皮細胞内の特定の膜ドメイン (管腔側膜あるいは側底膜) にトランスポータータンパク質を輸送するシャペロン機能を持った 1 回膜貫通型補助因子 (rBAT 及び 4F2hc) と、特定の 1 2 回膜貫通型トランスポーターの連結により決定されると考えられる。すなわちこの系は、1 回膜貫通型補助因子が細胞膜移行のシグナルを担い、1 回膜貫通型補助因子との連結が特異的であることにより、12 回膜貫通型トランスポーターが細胞内のどの膜ドメインへ移行するかが運命付けられるという特徴がある。現在われわれは、1 回膜貫通型補助因子 4F2hc と rBAT のキメラ解析を進行させており、その解析により 1 回膜貫通型補助因子の特定のトランスポータータンパク質認識機序、および 1 回膜貫通型補助因子に内在すると考えられる膜移行シグナルを明らかにすることができると期待される。

#### (7) NMDA 受容体の集積に関わる神経シナプス裏打ち蛋白質 S-SCAM

畑 裕 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・病態代謝解析学)

リガンド型カルシウムチャネルである NMDA 受容体は、哺乳類の中樞神経の興奮性シナプスの主要な神経伝達物質受容体である。NMDA 受容体の一部は、前シナプスに局在することが報告されているが、大多数は後シナプスの後シナプス肥厚部 (PSD) に集積している。NMDA 受容体の PSD への集積に重要な役割を果たす分子としては、PSD-95 がよく知られている。PSD-95 は 3 つの PDZ 領域、1 つの SH3 領域、1 つのグアニル酸キナーゼ領域をもち、これらの蛋白質結合領域を介して、一酸化窒素合成酵素や低分子量 G 蛋白質の制御因子などシナプス可塑性に関わる分子や細胞骨格と相互作用している。私共は、神経シナプスの裏打ち蛋白質を探索し、PSD-95 と

類似の分子構造をもつ新規分子 S-SCAM を発見している。S-SCAM は 6 つの PDZ 領域、2 つの WW 領域、1 つのグアニル酸キナーゼ領域をもち、PSD 局在している。S-SCAM は C 末端の PDZ 領域を介して NMDA 受容体のサブユニットに結合し、また、C 末端の 2 つの PDZ 領域を介してホモダイマーを形成する。この他、S-SCAM は、細胞接着因子や、MAP キナーゼのシグナル伝達系に関与する分子を結合し、さらに、PSD-95 とも相互作用している。したがって、S-SCAM は PSD-95 と共に、NMDA 受容体の集積に関わり、NMDA 受容体に細胞骨格の裏打ちを与え、NMDA 受容体を介するシグナル伝達に関与していると想定される。

#### (8) 三量体 G 蛋白質 (G<sub>βγ</sub>)-感受性 PI3-キナーゼに結合する活性型 Rab5 と小胞のベクトル輸送

黒須 洋, 紺谷 園二, 堅田 利明 (東京大学大学院薬学系研究科・生理化学)

イノシトールリン脂質 (PI) の 3 位水酸基をリン酸化する脂質キナーゼである 2 量体型 PI 3-キナーゼ (p110/p85) は、p85 調節サブユニットに存在する SH2 領域を介して、チロシンリン酸化された増殖因子受容体

あるいはアダプター蛋白質と結合し、p110 触媒サブユニットのキナーゼが活性化される。我々は先に、p110 触媒サブユニットがサブタイプからなる 2 量体型 PI 3-キナーゼ p110/p85 が、p110/p85 サブタイプとは異なる

り、チロシンキナーゼ型とG蛋白質共役(GPCR)型の2種の異なる受容体の共刺激によって相乗的に活性化されることを報告した。このユニークな特性を示すp110/p85 PI3-キナーゼについてさらに検討を加え、以下に示す知見を得た。

1) 非受容体チロシンキナーゼによってリン酸化され、p110/p85と結合する新規アダプター分子として100-kDa蛋白質を見出した。このアダプター蛋白質は、Tyr残基に加えて、GPCR刺激によってさらにSer/Thr残基がリン酸化された。2) p85に存在する2つのSH2ドメインの内部配列をp110のN末端側に付加して、構成的に活性化型のPI3-キナーゼを作製し、それと相互作用する分子を酵母のtwo-hybrid系を用いて検索した。その結果、低分子量GTP結合蛋白質のRab5をp110結合分子として同定した。p110と低分子量GTP結合蛋白質との結合は、GTP結合型のRab5に特異的であり、GDP結合型のRab5及びRabファミリーの他のメンバーとは結合しなかった。また、p110とRab5との結合は認められなかった。3) PKB/AktはPI3-キナーゼの産物であるPIP3によって活性化されるが、インスリン刺激で上昇するPKB/Aktの活性化は、活性化型Rab5(S29V, Q79L)の遺伝子導入により増強され、不活性化型Rab5(S34N)によって抑制された。4) 活性化型Rab5と相互作用する分子を、さらにtwo-hybrid系を用いて検索し、SH2ドメインをもつ新規分子を同定した。共焦点レーザー顕微鏡による解析から、このRab5結合蛋白質は細胞内の小胞に局在化しており、クラスリン被覆小胞から初期エンドソームへの輸送において、Rab5のエフェクターとして融合装置に果たす役割が期待される。

#### (9) mitsugumin29 と骨格筋興奮収縮連関

竹島 浩 (久留米大学・分子生命研究所・細胞工学研究部門)

骨格筋においては、細胞表層膜上のジヒドロピリジン受容体と細胞内Ca<sup>2+</sup>ストアである筋小胞体膜上のリアノジン受容体が蛋白-蛋白相互作用による機能的なカップリングを行うことで、脱分極シグナルを筋小胞体Ca<sup>2+</sup>放出による細胞質のCa<sup>2+</sup>濃度上昇変換すると考えられる。この骨格筋のシグナル変換は表層膜と筋小胞体膜が近接構造を形成する三つ組構造中で起こり、両受容体はそこに局在する。我々の以前の実験結果から、ジヒドロピリジン受容体とリアノジン受容体が機能的なカップリングをするためには表層膜と筋小胞体膜の近接

構造が必要であり、両受容体はその形成に寄与しないことが示された。しかしながら、三つ組構造構築の分子機構やその構造のCa<sup>2+</sup>シグナリングへの寄与はまったく不明である。

最近我々は、mitsugumin29と名付けた新規膜蛋白質を骨格筋三つ組構造中に見出した。本発表においては、その構造的特徴、三つ組構造の膜構築に対する役割、その欠損によるCa<sup>2+</sup>シグナリングの異常について紹介する。

#### (10) 胃プロトンポンプのサブユニット構造

竹口紀晃, 浅野真司, 木村 徹, 森井孫俊, 鈴木秀博 (富山医科薬科大学薬学部)

胃酸分泌細胞は、細胞の管腔側に酸(H<sup>+</sup>)を、漿膜側にアルカリ(OH<sup>-</sup> + CO<sub>2</sub> → HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>)を分泌する。酸分泌開始シグナルにより、細胞内オルガネラの再配置がおき、管腔側細胞膜表面積が数倍増加するという細胞形態の変化がおきる。胃プロトンポンプ(H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase)は胃酸分泌を最終的につかさどる。このポンプは分泌停止状

態では、細胞内の細管小胞に存在する。酸分泌刺激により、細管小胞間に細い連結管(neckという)が形成され、その連結された細管小胞の一端は管腔側細胞膜と融合する。ポンプは活性化し、管腔内に酸を分泌する。酸分泌中、細管小胞は絶えず融合・脱融合を繰り返し、働いているポンプと休んでいるポンプの交代がおきる。ポンプ

分子は膜を 10 回貫通する サブユニット(1033 個のアミノ酸からなる)と、膜を 1 回貫通し、細胞外ドメインに糖鎖を有する サブユニットからなる(291 個のアミノ酸)。

我々は、A) プロトンポンプのイオン認識・輸送機序を分子レベルで解明すること、B) 細管小胞の管腔側細胞膜との極性ある融合・脱融合を決定する要因は何かを解明すること、C) 細管小胞内に存在するリン脂質輸送 flippase の分子的实际体とその役割を解明することなどを目指して研究をおこなっている。

分子構造的に極めて類似している  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase と

胃プロトンポンプがなぜそれぞれ漿膜側膜と管腔側膜へと移動するのかを分子内ドメイン解析から明らかにすることは、細胞内機能分子の極性のある移動機構解明に大きく寄与する。そこで、 $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase の サブユニットとの間のキメラ体 cDNA を多数作成し、 $\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase サブユニット cDNA とともに、HEK 細胞に導入した。形成される遺伝子改変ポンプの発現、細胞内移動、ポンプ機能を調べ、サブユニットの細胞内・膜貫通部位・細胞外ドメインのどこがどのような役割を担っているかを明らかにする試みを行っている。本講演では、これらについて我々の研究成果について述べる。

## (11) チャネル蛋白相互作用の分子構造基盤

中村春木 (大阪大学蛋白質研究所)

### 1. 序

これまで、チャネル蛋白質によって維持・制御されている小分子のベクトル輸送に関しては、チャネル蛋白質分子の立体構造が不明であったため、構造的な議論ができず、抽象的なモデルによってしか輸送機構の解析がなされなかった。しかし、近年になって、バクテリアの  $\text{K}^+$  チャネルおよび機械受容性イオンチャネルの膜貫通部位(サブユニット)の X 線結晶解析がなされ、またショウジョウバエ (shaker) の N 末細胞質ドメインの四量体構造、ラットの  $\text{K}^+$  チャネル サブユニット(細胞質側)の四量体構造などが、続々と決定されている。

チャネル蛋白質では、その機能と構造に広い多様性はあるものの、サブユニットのポア部分やサブユニットのコア部分のアミノ酸配列は、バクテリアからほ乳動物にいたるまで良く保存されており、その部分の立体構造もほぼ保存されていると考えられる。立体構造をもとにしたチャネル機能の議論を始めたいと考えている。

講演では、コンピュータによるモデリングの手法とその精度と新しい技術について紹介し、倉智らによる Kir チャネルの機能解析への応用と、イオントロピック・グルタミン酸受容体の構造モデリングについて紹介する。

### 2. Kir チャネルの機能解析と構造モデル

内向き整流型  $\text{K}^+$  チャネル (Kir) は、ほ乳類において、立体構造解析が行われたバクテリア (KcsA)  $\text{K}^+$  チャネルに相当する  $\text{K}^+$  チャネルであり、イオン透過を行うポアを形成する H5 と呼ばれる領域とその前後の

膜貫通ヘリックス (M1, M2) とから構成される。Kir6.1 と Kir6.2 はアミノ酸配列上 70% のホモロジーを有し、同一のサブファミリーのチャネル・タンパク質であるが、Kir6.2 では Kir6.1 の 2 倍以上のコンダクタンスを持ち、高い  $\text{K}^+$  イオンの透過性が観測されている。

倉智らは、Kir6.1 と Kir6.2 とでは、H5 ポア領域のアミノ酸配列は同一であることから、Kir6.2 において、アミノ酸配列の異なる M1-H5 間のリンカー領域 (Lk1) および H5-M2 間のリンカー領域 (Lk2) でのアミノ酸置換を導入し、それら変異体タンパク質を HEK293T 細胞で発現させ、インサイドアウト法によって単一チャネル・コンダクタンスを測定した。その結果、Kir6.2 における Ser113-His115 および Val138 が、高い透過性に直接関与していることを示している (Repunte, V.P. et al. (1999) EMBOJ., 18, 3317-3324)。

KcsA の  $\text{K}^+$  チャネル構造をもとに Kir6.2 の立体構造モデルを作成したところ、(1) Val138 はチャネルの入り口部位に位置し、直接  $\text{K}^+$  イオンの拡散に関わること、(2) Ser113 はチャネル入り口からは離れた場所に存在するが、側鎖の大きなアミノ酸ではコンダクタンスが有意に低下することから、タンパク質内部のパッキングを変化させる可能性があること、が考察された。

### 3. イオントロピック・グルタミン酸受容体の構造モデル

中西らによってクローニングされた NMDA 受容体は、イオンチャネル型のグルタミン受容体であり、主要な

脳機能である記憶や学習の基礎過程と考えられるシナプスの形成・可塑性に関与していると考えられている (Moriyoshi, K. et al. (1991)Nature 354, 31-37)。この NMDA 受容体は、アミノ酸配列解析によって、細胞外ドメインに bacterial periplasmic-binding protein 様の構造を持つことが示唆され、その細胞外ドメインにある 2 つの Lobe 間に挿入されたイオンチャンネル部分には、K<sup>+</sup>チャンネルとの相同性が見いだされていた。

K<sup>+</sup>チャンネルとの比較的高い相同性と 4 量体形成を

示唆する実験とから、バクテリア K<sup>+</sup>チャンネルの構造と水溶性の基質結合部位の結晶構造とを基に、NMDA-R1 受容体の立体構造モデルを作成した。その結果、bacterial periplasmic-binding protein において観測されている基質結合により生じるヒンジ回転が、グルタミン酸やグリシンの結合によってやはり起こるとすると、細胞外ドメインに接続した膜貫通ヘリックスの変位が生じ、チャンネルの開閉が制御されるという機構が推察された。

## (12) 2 光子励起法を用いた新しい細胞機能の可視化

根本知己，河西春郎（生理学研究所）

多光子励起法を用いて、膵臓外分泌腺腺房標本の開口放出を可視化し定量的に測定した。コレシストキニン (CCK) による開口放出は、酵素源顆粒が 3 光子励起紫外蛍光をもつ物質を含みこれが放出されること、及び細胞外の極性トレーサー (SRB, Texas red-dextran, Lucifer Yellow) が 状に細胞内に陥入することで測定した。これらのことは共焦点顕微鏡では観察不可能だった。状の開口放出像は Ca 振動に同期して発生し、CCK 濃度にベル型に依存した。状の開口放出は元よりあった腺腔面のみでなく、既に形成された構造の上に頻繁に形成され、開口放出が連続的に起きる逐次開口放出が主たる開口放出の様式であることがわかった。開口放出の際、単一の顆粒の大きさ以上の構造が形成されたことはなく、顆粒の融合には細胞膜因子が不可欠であり、顆粒間の融合は生理的条件下では禁止されていると考えられた。開口放出に要する時間は一次的な顆粒でも二次的な顆粒

でも約 1 3 秒と一定であり、内層に存在して細胞膜に接していない顆粒も、細胞膜に接した顆粒と同じ準備状態にあると考えられた。開口放出を起こす Ca 振動においては 5 マイクロモル以上の Ca 濃度上昇が顆粒領域内層にまで及び、これが逐次開口放出を誘発していると考えられた。こうして、外層の顆粒が開口放出するとその内側の顆粒が自動的に開口放出完了状態となる逐次充填機構の存在が明らかとなった。この開口放出方式は重積した分泌顆粒の内容を最小の形態変化で、小さな細胞膜の一領域から、顆粒の移動を伴わずに、早く放出するのに適した方式と考えられ、外分泌腺と同様の構造をとる内分泌腺や神経終末においても刺激条件によっては用いられている可能性がある。このように、2 光子励起法の深部到達性は厚みのある生体標本の生理的機能解析には極めて有効である。

## (13) 核包標本からのイオンチャンネルと細胞機能

丸山芳夫，大佐賀敦，佐藤功造，大城社子（東北大学大学院大学医学研究科・細胞生理学）

体細胞の内膜系標本よりイオンチャンネルの同定を試みた。粗面および滑面小胞体膜を対象に、それらの比率が比較的高いとされる膵腺腺房細胞および肝実質細胞を用いた。細胞膜を低浸透圧下に破壊し核包標本を得た。膵腺腺房細胞の核包には、電位と管腔 Ca により制御されイベリオトキシンに感受性のある 220-250 pS の K チャネ

ル (large K チャネル) と 5-10pS 程度の Cl チャネル (Cl チャネル) が存在し、肝実質細胞のそれには電位に依存する 300-600 pS のアニオン選択性チャネル (アニオンチャネル) が存在した。Large K チャネルは唾液腺等の外分泌腺腺房細胞膜、大腸粘膜細胞、尿細管細胞等、分泌上皮細胞に豊富に存在し、溶液分泌機能の主要部を担

っている。しかしこの Large Kチャンネルは、マウスおよびラット膵腺腺房細胞細胞膜上には存在しない。また、アニオンチャンネルの肝実質細胞細胞膜上での存在も考えにくい。これらチャンネルはここでとりあげる個々の細胞においては、内膜系に特有のチャンネルであろうと思われる。膵腺腺房細胞細胞レベルにてKチャンネルおよびClチャンネル（あるいはKイオンおよびClイオン）に操作を施せば、細胞の電氣的反応を様々に変化させうる。細胞内のNaCl, TEA-Cl 溶液での灌流実験, から, また

イペリオトキシンの細胞内注入から, これらチャンネルの存在理由の一部は, 小胞体 Ca の放出と取り込みにおけるカウンターイオン通路として機能することであると推測される。

分泌上皮細胞膜上の large Kチャンネルにつき, 単一電流振幅を Rb イオンの干渉効果の側面から調べた。その電圧・振幅関係はKイオン濃度に依存するが, Rb 干渉効果による不可解な挙動を示した。

#### (14) 神経因性疼痛とイオンチャンネル発現制御

田邊 勉 (東京医科歯科大学大学院歯学総合研究科・高次機能薬理学)

痛みは臨床上最も頻度の高い訴えであり, 患者が病院を訪れる動機の筆頭理由である。全成人の6人に1人が何らかの痛みを苦しんでいると言われ, そのコントロールは極めて重要な医学的研究課題であるとともに, 有効な痛みのコントロール法の確立が社会・経済的利益に及ぼす影響は計り知れない。しかし, 治療の基礎となる痛みの分子機構については未解明な点が多い。痛みはその原因により侵害受容体性疼痛, 神経因性疼痛, 心因性疼痛に大きく分けることができる。このうち侵害受容体性疼痛は組織の傷害に伴って発生する痛みで, 特に急性の生理的な侵害受容体性疼痛は外部からの侵害性刺激や体内の病変に対する生体防御機構として働き, 生命維持に重要な警告反応である。一方, 慢性の侵害受容体性疼痛や神経因性疼痛は病的な慢性疼痛であり, 治療を必要とするものである。これらの疼痛は機械的および熱的侵害

刺激に対する閾値を下げて痛覚過敏現象を引き起こすばかりでなく, 本来痛みを誘発しない触覚刺激が痛みを誘発する異痛現象(アロディニア)をしばしば伴い, 疼痛管理に難渋する主要な原因となる。痛覚過敏やアロディニアの発症機構として, 末梢侵害受容器の感作, 侵害受容線維の機能変化, 脊髄後角における可塑性変化及び感覚神経回路網の再構築等が重要であると考えられるが, その基盤に様々なイオンチャンネルの発現変化および機能変化が想定されている。

我々は種々の神経因性疼痛モデル動物を作製し, これらを用いて神経因性疼痛の発現, 維持とイオンチャンネル発現との関係の解析, イオンチャンネル活性制御による疼痛制御の可能性を検討している。本研究会においては, 電位いぞんせいNaおよびCaチャンネルに関しこれまでに得られた研究成果を報告する。

### 3. ATP 受容体による生体機能制御とその分子メカニズム

2000年8月24日 - 8月25日

代表・世話人：古家 喜四夫（科学技術振興事業団 細胞力覚プロジェクト）

所内対応者：井本 敬二（液性情報）

(1) Over View

井上 和秀（国立衛研・薬理）

(2) ATP 受容体によるカルシウム動員の細胞周期依存性

- 網膜神経上皮での共焦点顕微鏡による解析 -

杉岡 美保, 山下 勝幸（奈良医大・第一生理）

(3) 妊娠ラット子宮筋における P2 receptor の遺伝子発現と収縮反応の変化

鈴木 庸介, 松岡 功\*, 浅野 仁覚, 大川 敏昭, 柳田 薫, 佐藤 章

（福島医大・医・産婦人科, \*薬理学）

(4) G タンパク共役型 ATP 受容体により惹起されるカチオン電流

森 泰生（生理学研究所・液性情報部門）

(5) 低浸透圧刺激によるアストロサイトからの ATP 放出と細胞内 Ca<sup>2+</sup>動員機構との関連

上野 伸哉, 山田 博美, 佐藤 千江美, 桂木 猛（福岡大学・医・薬理）

(6) アフリカツメガエルの卵胞細胞膜上の ATP 受容体刺激による FSH 受容体応答と

アデノシン受容体応答の抑制

藤田 玲子<sup>1</sup>, 木村 眞吾<sup>2</sup>, 川崎 敏<sup>2</sup>, 高島 浩一郎<sup>2</sup>, 松本光比古<sup>3</sup>, 佐々木 和彦<sup>2</sup>

（<sup>1</sup>岩手医大・教養部, <sup>2</sup>岩手医大・医・一生理, <sup>3</sup>弘前大医短・物理）

(7) アデノシン A1 受容体と P2Y 受容体間のヘテロダイマー形成

吉岡 和晃, 斉藤 修, 中田 裕康（東京都神経研・生体機能分子）

(8) PPADS 感受性 ATP 受容体による容量性 Ca<sup>2+</sup>流入機構の抑制

尾松 万里子, 松浦 博（滋賀医大・第二生理）

(9) 低浸透圧刺激による血管内皮細胞のカルシウムレベル上昇と ATP 遊離について

篠塚 和正, 川崎 久美子, 田中 直子, 水野 英哉, 窪田 洋子, 中村 一基,

\*橋本道男, 国友 勝（武庫川女子大・薬・薬理, \*島根医大・生理学第一）

(10) ラット尾動脈内皮細胞でのニコランジルによる ATP 遊離作用には細胞内 Ca<sup>2+</sup>増加を伴う

橋本 道男, 篠塚 和正\*, 田中 直子\*, 窪田 洋子\*, 紫藤 治, 国友 勝\*

（島根医大・医・生理学第一, \*武庫川女子大・薬・薬理学）

(11) ATP 受容体刺激によるミクログリアからの IL-6 放出メカニズム

重本 由香里, 井上 和秀（国立衛研・薬理）

(12) ATP 刺激細胞応答連関における細胞外 ATP 代謝酵素による情報転換

- アフリカツメガエル卵母細胞に発現されたアデノシン A2B 受容体の性質 -

松岡 功, 大久保 聡子\*, 木村 純子

（福島県立医大・医・薬理, \*東北大学院・薬学・細胞情報薬学）

(13) ラット前立腺交感神経終末部のプリン受容体とノルアドレナリン遊離調節機構について

森川 亜美, 篠塚 和正, 田中 直子, 水野 英哉, 窪田 洋子,

中村 一基, 国友 勝（武庫川女子大・薬・薬理）

(14) 脳幹シナプス前プリン受容体によるグルタミン酸放出の制御

加藤 総夫, 繁富 英治（東京慈恵会医大・薬理学第2）

(15) Neuronal Ca<sup>2+</sup>-sensor 1 による P2Y 受容体を介した開口放出増強機序の解明

小泉 修一・井上 和秀 (国衛研・薬理)

## (16) ウシ副腎皮質細胞の adenylate cyclase と関連した ADP 受容体

西 晴久, 堀 誠治, 正木 英二, 川村 将弘 (東京慈恵会医大・薬理学第 1)

## (17) ATP 刺激細胞応答連関における細胞外 ATP 代謝酵素による情報転換

松岡 功, 大久保 聡子\*, 木村 純子

(福島県立医大・医・薬理, \*東北大学院・薬学・細胞情報薬学)

## 【参加者名】

古家 喜四夫( 科学技術振興事業団「細胞力覚プロジェクト」), 藤田 玲子 (岩手医大教養), 木村 純子, 綿野 智一, 緑川 早苗, 小野 秀成, 亀岡 弥生, 佐藤 薫, 熊坂 忠則, 浅野 仁覚, 松岡 功, 鈴木 庸介 (福島医大), 栗原 琴二 (明海大歯), 西 晴久, 加藤 総夫, 川村 将弘, 堀 誠治 (慈恵医大), 井上 和秀, 小泉 修一, 重本 由香里 (医薬品食品衛生研), 中田 裕康, 吉岡 和晃 (東京都神経研) 林 一己 (山之内製薬) 鈴木 裕一 (静岡県立大), 多久和 陽, 薄井 莊一郎 (金沢医大), 村松 郁延 (福井

医科大), Fernando Lopez-Redondo ( 科学技術振興事業団「細胞力覚プロジェクト」), 松浦 博, 尾松 万里子, 豊田 太 (滋賀医大), 山下 勝幸, 杉岡 美保 (奈良医大), 森 際 克子 (大阪大医), 森川 亜美, 篠塚 和正, 川崎 久美子 (武庫川女子大薬), 河野 剛志, 西村 誠一郎, 山中 直樹 (日本ベーリンガーインゲルハイム), 仲田 義啓 (広島大医総合薬学), 橋本 道男 (島根医科大), 桂木 猛, 上野 伸哉, 佐藤 千江美 (福岡大医), 森 泰生, 若森 実, 真鍋 健一, 大倉 正道, 井本 敬二 (生理研)

## 【概要】

ATP 受容体は他の受容体と同様イオンチャネル型である P2X プリン受容体と代謝調節型 (G 蛋白共役型) である P2Y プリン受容体に分類され, それぞれ 7 種及び 8 種類のサブタイプがすでにクローニングされている。ATP 受容体は現在多種多様の組織, 細胞系で発現していることが知られており, その機能的役割については炎症反応, 神経伝達, カルシウムシグナリングの媒介作用, 細胞増殖などきわめて生理的に重要な働きをすることが報告されている。その数は急速に増大しつつあるが, その全体像はまだ明らかにはなっていない。受容体を持った

細胞の多様性, その機能の多様性からその研究者も多様な分野に属し, 通常の学会ではなかなか情報交換する機会がないのが現状である。本研究会はそのような現状に鑑み, 生理学, 薬理学をはじめとする広範な領域からの研究者を集め, 相互に最新のデータと情報を交換し, 研究の進展を図ることを目的とする。研究会の内容は ATP 受容体が果たす機能的な役割を中心に, 受容体の分子構造, 細胞内情報伝達機構及び ATP の放出機構を含んだ総合的なものとなる。

## (1) Over View

井上 和秀 (国立衛研・薬理)

この 1 年間に ATP 受容体研究の中でとくに興味深かった報告について私見を交えて概観してみた。生理機能に関する研究では, ノックアウトマウスを使った報告が散見され, いずれも受容体の発現分布から予測された結果が得られた。例えば, P2X1 ノックアウトマウスでは射精能が極端に低下しており, 子孫を残しづらくなっていた。P2X3 ノックアウトマウスでは痛みに対する感受

性が鈍っており, 痛みと P2X3 受容体の密接な関与を支持している。ATP 受容体と痛みに関する論文は非常に多く, 欧米では一種のトレンドになっているようである。さらに, 神経細胞以外では, アストロサイトやマイクログリアでの機能が注目され, MAPK や転写因子活性へのシグナル伝達に関する報告が目をつけた。さらに, 特異的リガンドの開発に関する論文も散見され今後の充実が期

待される。

### (2) ATP 受容体によるカルシウム動員の細胞周期依存性 - 網膜神経上皮での共焦点顕微鏡による解析 -

杉岡 美保, 山下 勝幸 (奈良医大・第一生理)

網膜神経上皮細胞の増殖・分化にともなう細胞内カルシウムシグナリングの変化を, カルシウム感受性蛍光色素を用いた光学的測定により解析した。増殖期に特異的なカルシウムシグナリング系として, 細胞外のアデノシン三リン酸 (ATP) により活性化される系を見出し, この系は P2 型 ATP 受容体を介することにより細胞増殖を促進することを明らかにした。また, 網膜神経上皮細胞は細胞周期の進行に従って神経上皮内をエレベーター運

動する。即ち, 最外層部で分裂し(M 期), 最内層部で DNA 合成する(S 期)。そこで, 細胞内カルシウム濃度の変化を共焦点レーザー蛍光顕微鏡によって測定し, 網膜神経層の光学的断面像から細胞周期と細胞内カルシウムシグナリングの関係を調べた結果, ATP 受容体の活性化による細胞内カルシウム上昇は S 期の細胞で顕著であり, M 期の細胞, 及び, 最終分裂を終えた細胞では急激に低下することが明らかになった。

### (3) 妊娠ラット子宮筋における P2 receptor の遺伝子発現と収縮反応の変化

鈴木 庸介, 松岡 功\*, 浅野 仁寛, 大川 敏昭, 柳田 薫, 佐藤 章  
(福島医大・医・産婦人科, \*薬理学)

ATP 受容体である P2 受容体(P2-R)の遺伝子発現及び P2-R 刺激剤による子宮筋収縮反応を妊娠時期別に検討した。非妊娠 (NP), 妊娠 10 日 (P10), 14 日 (P14), 17 日 (P17), 21 日 (P21), 分娩後 1 日 (PD1), 4 日 (PD4) のラット子宮筋を用いて, P2-R の mRNA を RT-PCR にて測定した。NP において, P2X1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, P2Y1, 2, 4, 6 の 11 種類の P2-R 遺伝子発現が認められた。妊娠経過に伴う変化は, P2X1 では妊娠経過中及び PD1 で減少し, PD4 で増加した。P2X4 では妊娠経過中は変化せず, P21 及び産褥期に増加した。P2X6 では妊娠経過中は減少し, 産褥期に増加した。また, P2Y1 では妊娠経過と共に増加し, P17 で最大となり, 以後漸減した。NP, P14, P21, PD4 の子宮筋を用いて, 各種 P2-R 刺激剤 (ATP,

ADP, UTP, 2-MeSATP,  $\gamma$ -MeATP)投与により, Magnus 装置にて等尺性の収縮を観察した。収縮の強さは, NP では P2X1-R が, P14 では P2Y1-R が, P21 では P2X4-R が, PD4 では P2X6-R が各々優位に機能していた。以上より, P2-R サブタイプにおける mRNA の発現と収縮反応による機能的優位性は, 妊娠及び分娩後の各時期において共に同様な変化を認めた。このことは, ATP を介した妊娠子宮筋の収縮制御機構に重要な役割を果たしていると考えられる。特に, P2Y1-R は妊娠中期に上昇するため, 子宮収縮を抑制し妊娠維持に, また, P2X4-R は妊娠後期に上昇するため, 分娩発来に深く関与すると示唆された。

### (4) G タンパク共役型 ATP 受容体により惹起されるカチオン電流

森 泰生 (生理学研究所・液性情報部門)

G タンパク共役型受容体刺激により惹起される PI 応

答に関連した, Receptor-activated cation channel (RACC)

の分子の実体である TRP タンパク質群が注目を集めつつある。我々は、組み換え発現系として HEK 細胞を用い、内在性の G タンパク共役型 ATP 受容体を刺激することにより、TRP によるカチオン電流に関するいくつかの興味深い知見を得た。RACC の分子の実体である 7 つの TRP の中でも、細胞外カルシウムによる TRP5 活性制御は、チャネル開口確率の上昇及び、myosin light chain kinase 活性による形質膜へのタンパク質組み込みの 2 つの機序により司られている。ATP 受容体刺激あるいは、G タンパク活性化はカルシウム感受性を増すことにより、TRP 活性を正制御することが明らかになった。また、

TRP3, 6, 7 は、ATP 受容体による PLC-beta 活性化を経て、protein kinase C 非依存的に diacylglycerol によって活性化される。さらには、相同組み換えにより作製した TRP1 欠損細胞を用いることにより、TRP1 が容量性カルシウム流入を担う Ca release-activated Ca channel を構成するのみならず、endoplasmic reticulum に存在する IP3 受容体をも機能修飾することを見出した。活性制御機構が細胞内の位置情報やタンパク質輸送機序と連関していることは、TRP 関連チャネルが特定の生体応答に必要なシグナルの空間的・時間的パターンを制御する、重要な基盤をなすことを示唆している。

#### (5) 低浸透圧刺激によるアストロサイトからの ATP 放出と細胞内 $Ca^{2+}$ 動員機構との関連

上野 伸哉, 山田 博美, 佐藤 千江美, 桂木 猛 (福岡大学・医・薬理)

低浸透圧刺激による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇と ATP 放出の関連を探るため、培養アストロサイトを用いた。培養には生後 1-2 日のラット大脳皮質を取り出し、酵素処理後フラスコに細胞を播いた。培養 24 時間後にフラスコをたたき、接着性の低い細胞群を洗いながし、アストロ細胞を精製した。培養 10-14 日のコンフルエントになった状態の細胞を用いた。 $[Ca^{2+}]_i$  変化をカルシウムインジケーターである fura2 を用いて測定した。細胞への薬物投与はバ

ス液の灌流によっておこなった。灌流液をフラクションコレクターにて集め、液中の ATP をルシフェリン・ルシフェラーゼの化学発光を利用し測定した。この系により  $[Ca^{2+}]_i$  変化と ATP 放出を同時に観察できるようにした。この系をもちいて、細胞内 Ca 動員に関する薬物、細胞骨格系と関与する薬物、Cl<sup>-</sup>チャンネルブロッカー等をもちいて細胞内 Ca 変化と ATP 放出の関連を検討した。

#### (6) アフリカツメガエルの卵胞細胞膜上の ATP 受容体刺激による FSH 受容体応答とアデノシン受容体応答の抑制

藤田 玲子<sup>1</sup>, 木村 眞吾<sup>2</sup>, 川崎 敏<sup>2</sup>, 高島 浩一郎<sup>2</sup>, 松本 光比古<sup>3</sup>, 佐々木 和彦<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>岩手医大・教養部, <sup>2</sup>岩手医大・医・一生理, <sup>3</sup>弘前大医短・物理)

アフリカツメガエルの卵細胞に二本のガラス微小電極を刺入して -60 mV に膜電位固定下、卵胞細胞のもつ種々の受容体の性質とこれらの間の相互作用について調べた。1 microM の ATP と UTP を投与すると両者の場合、内向きの ATP 応答は 100 microM suramine 投与で半減したが、UTP 応答はあまり抑制されなかった。一方、5.7 microM の FSH 又は 1 microM の Ade を投与するとゆっくりとした外向きの K<sup>+</sup>電流応答を発生した。この K<sup>+</sup>電流応答は

細胞内に cAMP を注入すると mimic された。1 microM ATP 又は 1 microM UTP を 30 秒間前投与すると上記 FSH 又は Ade 受容体刺激及び cAMP 注入で発生する K<sup>+</sup>電流応答は著しく抑制され、30 分間 wash out すると回復した。ATP 受容体刺激による FSH, Ade 受容体応答の抑制様式は非競合的であった。FSH, Ade 応答に対する抑制の作用部位は細胞内 cAMP の生成後、K<sup>+</sup>channel までのステップであると推論した。

## (7) アデノシン A1 受容体と P2Y 受容体間のヘテロダイマー形成

吉岡 和晃, 斉藤 修, 中田 裕康 (東京都神経研・生体機能分子)

【目的】最近,ある種の G タンパク質共役型受容体では,受容体間でホモあるいはヘテロダイマーを形成することによって,その性質をダイナミックに変化させることが報告されている。そこで本研究では,A1 アデノシン受容体 (A1R) と P2Y1 受容体 (P2Y1R) を共発現させた培養細胞系を構築し,タンパク質レベルおよび受容体活性の解析からプリン受容体間でのダイマー形成の可能性を探った。

【方法】 HA-Tag を付加した A1R (HA-A1R) および myc-Tag を付加した P2Y1R (myc-P2Y1R) の cDNA をそれぞれ単独もしくは一緒に HEK293T 細胞へ導入し,培養 48 時間後の細胞膜画分を分析した。各受容体の発現やヘテロダイマー形成の有無は,抗 HA 抗体および抗 myc 抗体によるウエスタンブロッティングと免疫共沈実

験によって解析した。

【結果・考察】 両受容体を同時に発現させた HEK293T 細胞膜の抽出画分の抗 HA 抗体免疫沈降物中に,抗 myc 抗体で検出されるタンパクバンドがウエスタンブロッティングで観察された。このバンドは myc-P2Y1R のバンドと同じ位置であり,HA-A1R を単独で発現させた細胞では見られなかった。更に,共発現細胞抽出画分の抗 myc 抗体による免疫沈降物中にも HA-A1R と同じサイズの抗 HA 抗体に反応するバンドが検出されたことから,HA-A1R と myc-P2Y1R は発現細胞膜上においてヘテロダイマーを形成することが示唆された。リガンド結合活性及びエフェクター活性の変化について検討した結果も併せて報告する。

## (8) PPADS 感受性 ATP 受容体による容量性 $Ca^{2+}$ 流入機構の抑制

尾松 万里子, 松浦 博 (滋賀医大・第二生理)

ラット褐色脂肪細胞において,細胞外 ATP (10  $\mu$ M) は「一過性の細胞内  $Ca^{2+}$  上昇」と「容量性  $Ca^{2+}$  流入抑制」の 2 つの現象を引き起こす。今回,この容量性  $Ca^{2+}$  流入抑制が ATP 受容体を介するものであるかどうかを P2 受容体阻害剤を用いて検討した。suramin は ATP による細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇と容量性  $Ca^{2+}$  流入を同時に容量依存性に阻害した。一方,PPADS は,低濃度 (1  $\mu$ M) では

容量性  $Ca^{2+}$  流入のみを抑制し,高濃度 (500  $\mu$ M 以上) で初めて細胞内  $Ca^{2+}$  上昇を抑制した。これらのことから,容量性  $Ca^{2+}$  流入抑制に関与する PPADS 感受性 ATP 受容体の存在が示唆された。現在,RT-PCR 法により,褐色脂肪組織における P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 受容体の発現を確認しているが,容量性  $Ca^{2+}$  流入抑制に関与する受容体サブタイプの特性が今後の課題であると思われる。

## (9) 低浸透圧刺激による血管内皮細胞のカルシウムレベル上昇と ATP 遊離について

篠塚 和正, 川崎 久美子, 田中 直子, 水野 英哉, 窪田 洋子, 中村 一基,  
\*橋本 道男, 国友 勝 (武庫川女子大・薬・薬理, \*島根医大・生理学第一)

【目的】我々は,血管内皮細胞が低浸透圧刺激により ATP を遊離することを報告してきた。今回は,この ATP 遊離と細胞内カルシウムレベル ( $[Ca^{2+}]_i$ ) との関係について検討した。

【方法】実験標本としてラット尾動脈の初代培養内皮

細胞を用いた。ATP 量は HPLC 蛍光検出器にて測定し,  $[Ca^{2+}]_i$  は Calcium Green-1-AM を指示薬として共焦点レーザー顕微鏡および画像解析装置を用いて測定した。

【結果】1) ラット尾動脈内皮細胞において,低浸透圧刺激により ATP 遊離に加え著明な  $[Ca^{2+}]_i$  上昇が観察

され、この  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇は P2 受容体拮抗薬の PPADS 及び PLC-inhibitor の U-73122 により一部抑制された。2) P2 受容体作動薬の 2-mSATP によっても  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇が観察され、この上昇は PPADS 及び U-73122 により抑制された。3) 低浸透圧刺激は細胞容積を増大させ、その増大は PPADS により増強され、2-mSATP により抑制され

た。

【考察】 ラット尾動脈内皮細胞において、低浸透圧刺激により遊離される内因性の ATP は P2Y1 受容体を介して  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇に寄与するとともに、細胞容積の調節に関与している可能性が示唆された。

#### (10) ラット尾動脈内皮細胞でのニコランジルによる ATP 遊離作用には細胞内 $Ca^{2+}$ 増加を伴う

橋本 道男, 篠塚 和正\*, 田中 直子\*, 窪田 洋子\*, 紫藤 治, 国友 勝\*  
(島根医大・医・生理学第一, \*武庫川女子大・薬・薬理学)

【目的】 ニコランジル (NIC) は、ATP 感受性  $K^+$  チャネル開口作用と nitrate 様作用とを併せもつ薬剤である。最近我々は、NIC や NO 供与物質によるブタ冠動脈内皮細胞からの ATP 遊離作用を報告した。今回、NIC による血管内皮細胞からの ATP 遊離作用機序を解明する為に、細胞内  $Ca^{2+}$  レベルと ATP 遊離作用との関係について検討を行った。

【方法】 実験材料としてはラット尾動脈の培養内皮細胞を用い、細胞内  $Ca^{2+}$  レベルは、カルシウムグリーンをプローブとして、共焦点レーザー顕微鏡および画像解析装置を用いて測定した。ATP とそのプリン誘導体は HPLC-蛍光検出法で測定した。

【結果】 NIC はラット尾動脈内皮細胞において、細胞内  $Ca^{2+}$  レベルを有意に上昇させ、内皮細胞からの ATP 遊離をも促進した。これらの作用は ATP 感受性  $K^+$  チャネル開口阻害剤である glibenclamide により有意に抑制された。また、この細胞内  $Ca^{2+}$  レベル上昇と細胞内 ATP レベルの間には、有意な負の相関が認められた。

【考察】 ニコランジルによる血管内皮細胞からの ATP 遊離作用には、内皮細胞内  $Ca^{2+}$  の上昇を伴うことが明らかにされた。この細胞内  $Ca^{2+}$  上昇作用には、ATP 感受性  $K^+$  チャネル開口にともなう過分極方向への膜電位変化が、ドライビングフォースとなりうることを示唆された。

#### (11) ATP 受容体刺激によるミクログリアからの IL-6 放出メカニズム

重本 由香里, 井上 和秀 (国立衛研・薬理)

近年、ATP が、脳の貪食細胞、免疫細胞とし知られるミクログリアの活性を制御することが報告されている。これまでに我々は細胞外 ATP がラットミクログリアから多量の plasminogen 遊離をひきおこすことを見出し、ATP が神経保護作用を有する可能性を明らかにした (Inoue et al. 1998)。本研究では、中枢において神経細胞の分化、生存、修復に重要な役割を果たしている IL-6 に注目し、ATP がミクログリアから IL-6 遊離を引き起こす

か否かミクログリア株細胞 MG-5 を用いて検討した。MG-5 において細胞外 ATP は、濃度依存的に IL-6 mRNA 及び蛋白を増加し、P2 レセプターの活性化により IL-6 が de novo 合成されることが示された。さらにその遊離メカニズムについて検討した結果、ATP は PTX 非感受性 P2Y レセプターと P2X7 に作用し、細胞外からの持続的な  $Ca^{2+}$  流入を引き起こし、p38 を活性化し、その結果 IL-6 産生を誘導する可能性が示唆された。

(12) ATP 刺激細胞応答連関における細胞外 ATP 代謝酵素による情報転換  
- アフリカツメガエル卵母細胞に発現されたアデノシン A2B 受容体の性質 -

松岡 功, 大久保 聡子\*, 木村 純子  
(福島県立医大・医・薬理, \*東北大学院・薬学・細胞情報薬学)

我々は NG108-15 および C6Bu-1 細胞において ATP 刺激により cAMP 産生の亢進を認め、その作用機構を解析してきた。最近、この ATP の作用は細胞膜上で産生されたアデノシン (Ade) がアデノシンデアミナーゼ (ADA) 抵抗性に A2A および A2B 受容体を刺激した結果であることが示唆された。この可能性を検証するため、細胞外 ATP 代謝酵素を有するアフリカツメガエル卵母細胞に A2B 受容体と A キナーゼでリン酸化され活性化する CFTR を共発現させ A2B 受容体を介する cAMP 産生応答

を CFTR 電流を指標に検討した。卵母細胞に発現された A2B 受容体は Ade のみならず ATP や , -methylene-ATP ( MeATP)にも応答し、 MeATP の作用は Ade の作用を消失させる量の ADA では抑制されず、5'-nucleotidase 阻害薬の MeADP で抑制された。以上の結果から、P2 受容体刺激薬は細胞膜上で迅速に代謝され、局所に蓄積した Ade が ADA 抵抗性に効率良く A2B 受容体を活性化する機構が示唆された。

(13) ラット前立腺交感神経終末部のプリン受容体とノルアドレナリン遊離調節機構について

森川 亜美, 篠塚 和正, 田中 直子, 水野 英哉, 窪田 洋子,  
中村 一基, 国友 勝 (武庫川女子大・薬・薬理)

【目的】 ラット摘出前立腺の交感神経終末部プリン受容体の薬理的性質とその生理的役割について検討した。

【方法】 前立腺標本に 2 Hz の電気刺激 (ES) を加え、遊離されるノルアドレナリン (NA) 量を HPLC・電気化学検出器により測定した。

【結果】 1) P1 作動薬の CPA と P2 作動薬の 2-mSATP はともに NA 遊離抑制作用を示し、いずれの作用も P1 拮抗薬の DPCPX により減弱した。一方、P2 拮抗薬の suramin は CPA の作用には影響せず、2-mSATP の作用を

減弱させた。2) DPCPX は 2 Hz の ES による NA 遊離には影響を示さなかったが、8 Hz の ES による NA 遊離を増強した。また、8 Hz の ES によってのみ有意なプリン遊離が観察された。

【考察】 1) 前立腺交感神経には P1, P2 作動薬により刺激される抑制性のプリン受容体が存在すること、2) 高頻度の神経興奮に伴って遊離されるプリン物質はこの受容体を介して神経伝達を調節していることが示唆された。

(14) 脳幹シナプス前プリン受容体によるグルタミン酸放出の制御

加藤 総夫, 繁富 英治 (東京慈恵会医大・薬理学第2)

延髄孤束核 (NTS) は、生体内環境に関する神経性および液性の一次情報を受容・統合し、呼吸・循環などの自律機能ネットワークへ出力する自律情報中継核である。NTS には各種プリン受容体タンパク、同 mRNA、取込み・代謝・不活性化タンパク群が高密度に発現している。NTS ネットワーク内シナプス伝達制御におけるプリン

受容体の役割を脳幹スライス標本における膜電流記録によって検討した。孤束核 2 次求心性小形ニューロンに収斂するグルタミン酸作動性シナプス入力が、その放出様式および起源に応じて異なるシナプス前プリン受容体によって弁別的に制御されている事実を見出した。これらの制御には、ATP からアデノシンへのダイナミックな

変換や, シナプス前 P2X 受容体による直接的グルタミン酸放出などのさまざまな分子機構が関与していることが確認された。

### (15) Neuronal $Ca^{2+}$ -sensor 1 による P2Y 受容体を介した開口放出増強機序の解明

小泉 修一・井上 和秀 (国衛研・薬理)

Neuronal  $Ca^{2+}$ -sensor 1 (NCS-1) は, ショウジョウバエの神経特異的  $Ca^{2+}$  結合蛋白質 frequenin のホモログであり, 神経伝達調節物質として注目されている。NCS-1 を強制発現させた PC12 細胞を用い NCS-1 の開口放出に対する作用とその機序の解明を試みた。NCS-1 の分布は形質膜及びシナプス小胞膜に局在していた。NCS-1 は, UTP 刺激による P2Y2 受容体を介した  $[Ca^{2+}]_i$  上昇の閾値及び ED50 値を約 10 倍低下させ, 最大応答の増加を引き起こした。同様の  $Ca^{2+}$  応答の亢進は, bradykinin B2 受容体を介する応答でも認められたが, caffeine 及び high  $K^+$  による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇には全く影響を与えなかった。共焦点レーザー顕微鏡による解析では, NCS-1 による

InsP3-R からの局所的な  $Ca^{2+}$  遊離“puff” 発現頻度の顕著な増大が観察された。FM1-43 による開口放出測定では, NCS-1 は UTP により惹起される細胞外  $Ca^{2+}$  依存性の開口放出を有意に増加させたが, high  $K^+$  によるそれには影響を与えなかった。さらに NCS-1 は, PI 含量に影響せず, その下流の PIP 及び PIP2 量を増大させ, また UTP 刺激時の InsP3 産生量を 2 倍以上に亢進させた。以上, NCS-1 はおそらく, PI から PIP の経路に働く PI4kinase に作用し, PIP 及び PIP2 レベルの亢進, PLC 共役型受容体刺激による InsP3 産生量を増大させ, その結果  $Ca^{2+}$  遊離及び容量性  $Ca^{2+}$  流入の増大を惹起し, 開口放出を亢進させることが強く示唆された。

### (16) ウシ副腎皮質細胞の adenylate cyclase と関連した ADP 受容体

西 晴久, 堀 誠治, 正木 英二, 川村 将弘 (東京慈恵会医大・薬理学第 1)

ウシ副腎皮質細胞 (BA 細胞) において ATP および UTP をはじめとした細胞外ヌクレオチドは, PI レスポンスを介してコルチゾールの産生を促進する。この反応は P2Y2 受容体を介していると考えられている。また, 細胞外 ADP は ATP とともに BA 細胞において cyclic AMP (cAMP) の産生を促進したが, UTP は促進しなかった。さらに ADP は PKA 活性作用を有し, H89 によってこの ADP の作用は阻害された。これより同細胞には Gq タンパク共役型の P2Y2 以外に, Gs タンパクと共役した P2Y

受容体も存在することが考えられた。しかしながら, ATP アナログ等による cAMP 産生の活性順位が異なることや mRNA が検知できないことから, ADP および ATP は P2Y11 を介して cAMP を促進するのでは無いと考えられた。また, ATP は P2Y2 にも作用することから, この受容体は ADP 特異的な P2Y 受容体の可能性がある。すなわち BA 細胞には Gs と共役した新しい P2Y 受容体の存在が示唆された。

### (17) ATP 刺激細胞応答連関における細胞外 ATP 代謝酵素による情報転換

松岡 功, 大久保 聡子\*, 木村 純子  
(福島県立医大・医・薬理, \*東北大大学院・薬学・細胞情報薬学)

我々は NG108-15 および C6Bu-1 細胞において ATP 刺激により cAMP 産生の亢進を認め, その作用機構を検討

してきた。この反応は P1 受容体阻害薬で抑制されるものの、アデノシンデアミナーゼ(ADA)処理で影響されず、種々の P2 受容体刺激薬でも同様な作用が発現し、かつ P2 受容体阻害薬で抑制されるという性質を示した。このような ATP の反応は、種々の生体組織でも報告されており P1 受容体阻害薬に感受性を持つ ATP 受容体の存在が想定されている。我々も未知の受容体の存在を仮定し解

析を行ってきたが、最近、細胞外 ATP 代謝の検討結果から、この ATP の作用は細胞膜上で産生されたアデノシンが ADA 抵抗性に A2A および A2B 受容体を刺激した結果であることが示唆された。今回は、細胞外 ATP 代謝様式とこれに関わる酵素群について示し、アデノシン受容体ならびにアデノシン産生に関わる酵素を発現させた細胞で得られた結果を報告したい。

## 4. ポストゲノム時代の脳科学

2000 年 9 月 28 日

代表・世話人：畠中 寛（大阪大学蛋白質研究所・蛋白質生合成部門）

所内対応者：池中 一裕（岡崎国立共同研究機構・生理学研究所・神経情報部門）

## (1) カルシウムチャネル遺伝子変異と神経疾患

井本 敬二（岡崎国立共同研究機構・生理学研究所・液性情報部門）

## (2) 活性酸素による核酸の酸化障害とその防御機構 - 脳神経変性への関わり -

中別府 雄作（九州大学・生体防御医学研究所, CREST）

## (3) スフィンゴ糖脂質による神経系の制御

古川 鋼一（名古屋大学・医学部生化学）

## (4) シナプス可塑性とシナプス前機能

高橋 正身（三菱化学生命科学研究所）

## (5) 複素電顕, 位相差電顕そして微分干渉電顕 - 電子顕微鏡の新しい波 -

永山 國昭（岡崎国立共同研究機構・生理学研究所・超微小形態生理部門）

## (6) 蛋白質のフォールディング反応と生物学的意義

後藤 祐児（大阪大学蛋白質研究所・溶液）

## (7) 遺伝子産物のプロセッシングと神経変性疾患

岩坪 威（東京大学大学院・薬学系研究科臨床薬学）

## (8) APP-カスパーゼ系によるニューロン死の制御

吉川 和明（大阪大学蛋白質研究所・機能制御）

## (9) 機能生物学, 二つの道

三品 昌美（東京大学大学院・医学系研究科薬理学・分子神経生物学）

## (10) 脳内情報分子の細胞内ダイナミクス

御子柴 克彦（東京大学・医科学研究所脳神経発生・分化分野）

## 【参加者名】

古川 鋼一（名古屋大・医・生化学第二）, 石川 保幸（大阪大・蛋白研）, 谷口 直子（大阪大・蛋白研）, 江上 洋平（大阪大・蛋白研）, 柏井 宏之（大阪大・蛋白研）, 吉田（長寿医療研究センター）, 御子柴 克彦（東京大学医科学研究所）, 工藤 卓（大阪工業技術研）, 保坂 早苗（上智大・生命科学研）, 沼川 忠広（大阪大・蛋白研）, 藤井 聡（山形大・医・第2生理）, 小幡 邦彦（生理研）, 畠山 淳（生理研）, 中別府 雄作（九州大・生体防御医学研究所）, 洪 東杓（大阪大・蛋白研）, 工藤 佳久（東京薬大・生命科学）, 榊原 厚（東海大・開発工学）, 清末 和之（大阪工業技術研）, 畠中 寛（大阪大・蛋白研）, 土屋 礼美（東京薬大・生命科学）, 植田 敦子（大阪工業技術研究所）, 川合 亮（東海大）, 白尾 智明（群馬大・医）, 高橋 正身（三菱化学生命研）, 植村 慶一（慶応大・医）, 熊倉 鴻之助（上智大・生命研）, 山本 秀

幸（熊本大・医）, 井上 和秀（国立医薬品食品衛生研）, 田口 隆久（通産省・工業技術院）, 石本 哲也（大阪工業技術研）, 山岸 覚（大阪大・蛋白研）, 横幕 大作（大阪大・蛋白研）, 榎戸 靖（大阪大・蛋白研）, 岸本 拓哉（生理研）, 吉川 和明（大阪大・蛋白研）, 林 靖亨（豊田中央研究所）, 井本 敬二（生理研）, 井上 華（生理研）, 小清水 久嗣（大阪大・蛋白研）, 後藤 祐児（大阪大・蛋白研）, 氷見 敏行（東京医科歯科大）, 澤田 浩秀（藤田保健衛生大・総医研）, 郷津 真代（大阪大・蛋白研）, 樋口 誠逸（信州大・医・精神医学）, 若森 実（生理研）, 永山 國昭（生理研）, 佐藤 託実（OBI）, 藤江 三千男（浜松医科大）, 白田 信光（藤田学園）, 岩坪 威（東京大・薬）, 永井 克也（大阪大・蛋白研）, 古山 富士弥（名古屋市大）, 三浦 正幸（大阪大・医）, 日下 永子（大阪大）, 福永 典子（大阪大・蛋白研）,

桑子 賢一郎(大阪大・蛋白研), 櫻井 一正(大阪大・蛋白研), 三品 昌美(東京大大院・医学系研究科薬理学・分子神経生物学), 馬場 聡(浜松医大・医・病理第二),

藤森 一浩(大阪工業技術研), 林 光紀(上智大・生命科学研), 山中 創(生理研)

**【概要】**

肝機能発現のためには多くの分子が協調的に機能する必要がある。今回、遺伝子からの転写後にこれら機能分子がどのように修飾されるか、に絞って研究会を開催した。

本研究会は大阪大学蛋白質研究所との合同で開催することで、両研究所の合意を得たものである。

ヒトゲノムプロジェクトが完了すると、我々の1次的

な遺伝情報は完全に明らかとなる。しかしながら、遺伝子産物は更に複雑なプロッシングを受けて本来の機能を果たすようになる。21世紀には1次遺伝情報から如何にして機能分子が生成されるかを理解することが大きなテーマとなる。このよな情勢に鑑み、今回脳機能分子が転写後調節によりどのような修飾を受けるか、良い情報交換の場となった。

## 5. Ca<sup>2+</sup>シグナルと膜輸送体の発現および機能調節

2000 年 9 月 28 日- 9 月 29 日

代表：河原克雅 (北里大・医・生理)

世話人：宮崎俊一 (生理研)

(1) 2光子励起法による外分泌腺開口放出の研究

根本知己\*, 木村良一, 伊藤公一, 立川 光, 宮下保司,  
飯野正光, 河西春郎\* (\*生理研・生体膜, 東京大・医学系研究科・薬理)

(2) アセチルコリンによる膵  $\beta$ -cell の脱分極発生機構: Ca<sup>2+</sup>の Ca<sup>2+</sup>流入に対する positive feedback system

泉井 亮, 菅世智子, 菅野隆浩 (弘前大・医・生理)

(3) 単一膵細胞におけるインスリン分泌の解析

最上秀夫, 張 恵, 山田聡子, 小島 至 (群馬大・生体調節研)

(4) BCR を介するカルシウムシグナルの分子的解析

黒崎知博 (関西医大・肝研・分子遺伝)

(5) マウス卵の Ca<sup>2+</sup> oscillation における Ca<sup>2+</sup>/Mn<sup>2+</sup> influx・release

毛利達磨<sup>1</sup>, 白川英樹<sup>2</sup>, 尾田正二<sup>2</sup>, 宮崎俊一<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>生理研・細胞内代謝, <sup>2</sup>東京女子医大・医・第二生理)

(6) Ca<sup>2+</sup>-ATPase のチャンネル活性

老木成稔, 清水啓史, 豊島 近 (福井医大・生理, 東京大・分子細胞生物研)

(7) カルシウムシグナルのコーディングとデコーディング機構

飯野正光 (東京大・医学系研究科・細胞分子薬理)

(8) 細胞の機能調節におけるプロトンチャンネルの役割

久野みゆき, 森畑宏一, 森 啓之 (大阪市大・院・医・分子細胞生理)

(9) 恐山湖産ウグイの酸性適応機構の解明

平田 拓<sup>1</sup>, 小野俊浩<sup>1</sup>, 仲里猛留<sup>1</sup>, 猿田洋子<sup>1</sup>, 金子豊二<sup>2</sup>, 平野哲也<sup>2</sup>,  
若林繁夫<sup>3</sup>, 重川宗一<sup>3</sup>, 広瀬茂久<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>東京工業大・生命理工学研・生体システム専攻, <sup>2</sup>東京大・海洋研究所, <sup>3</sup>国立循環器病センター・分子生理)

(10) 内向き整流性 K<sup>+</sup>チャンネル Kir7.1 の生理機能解明に向けて

鈴木喜郎, 中村信大, 大方香代子, 藤乗嗣泰, 河原克雅, 広瀬茂久  
(東京工業大・生命理工, 東京大・医・腎臓内分泌内科, 北里大・医・生理)

(11) 血管系に発現するスフィンゴシン-1-リン酸受容体群による細胞運動調節とそのシグナリング

多久和陽, 岡本宏之, 多久和典子, 杉本直俊, 櫻田惣太郎 (金沢大・医・第一生理)

(12) 新規亜鉛バイオイメーキングプローブ

菊地和也, 平野智也, 長野哲雄 (東京大・大学院薬学系研究科)

(13) “TBA”

宮脇敦史 (理化学研究所・脳科学総合研究センター)

【参加者名】

河原克雅 (北里大・医), 宮崎俊一, 尾田正二, 河内全  
(東京女子医大), 泉井亮, 菅世智子 (弘前大・医), 小島  
至, 最上秀夫, 山田聡子, 張恵 (群馬大・生体調節研),

毛利達磨 (生理研・細胞内代謝), 菊地和也 (東京大・大  
学院薬学系研究科), 飯野正光, 橋本彰子, 富田太一郎 (東  
京大・医学系研究科), 広瀬茂久, 平田拓, 鈴木喜郎 (東  
京工大・生命理工学), 河西 春郎, 根本知己, 高橋倫子

(生理研・生体膜), 多久和陽, 龍泰治, 桜井華奈子, 有川佳代(金沢大・医), 老木成稔(福井医科大), 黒崎知博(関西医大), 久野みゆき, 森畑宏一, 森 啓之(大阪

市大・院・医・分子細胞生理), 宮脇敦史, 水野秀昭, 日野美紀, 沢野朝子(理化学研・脳科学総合研究センター・細胞機能), 吉田繁(長崎大・医)

### 【概要】

Ca<sup>2+</sup>シグナル研究会は, 細胞内 Ca<sup>2+</sup>シグナルの持つ多彩な機能調節を上回る, 多様な機能研究者集団である。Ca<sup>2+</sup>の持つ広範な細胞機能の調節能力をいろんな角度から議論し, 有益な情報を交換する。細胞内 Ca<sup>2+</sup>振動と Mn<sup>2+</sup>の役割,あるいは細胞内 Zn<sup>2+</sup>イメージング技術の開発など, Ca<sup>2+</sup>の調節能を側面から調べる重要性を示し,

Ca<sup>2+</sup>研究の新しい展開を予感させた。一方, Ca<sup>2+</sup>シグナルコーディングとデコーディングは, Ca<sup>2+</sup>シグナルの多彩な機能調節の仕組みを読み解く「鍵」を提示し, 示唆に飛んだ内容であった。新しい実験技術の紹介と実験データの解釈を巡った質の高い議論は, 元祖「Ca<sup>2+</sup>シグナル研究会」の魅力である。

## (1) 2光子励起法による外分泌腺開口放出の研究

根本知己\*, 木村良一, 伊藤公一, 立川 光, 宮下保司, 飯野正光, 河西春郎\*

(\*生理研・生体膜, 東京大・医学系研究科・薬理)

膵臓外分泌腺腺房標本の開口放出を多光子励起法を用いて可視化した所, 状態の開口放出は元よりあった腺腔面のみでなく, 既に形成された構造の上に頻りに形成され, 開口放出が連鎖的に起きる逐次開口放出が主たる開口放出の様式であることがわかった。開口放出を起こす Ca<sup>2+</sup>振動においては5マイクロモル以上の Ca<sup>2+</sup>濃度上昇が顆粒領域内層にまで及び, これにより内層への逐次

開口放出が誘発される。一方, 培養プルキンエ細胞では, カルビンディンの飽和によりマイクロモル以上の Ca<sup>2+</sup>濃度上昇が非線型に起きる。この様に生理的な範囲の Ca<sup>2+</sup>濃度上昇は fura-2 や fluo-3 を飽和させる程大きいことがあるが, in vivo の R<sub>max</sub> や F<sub>max</sub> は in vitro より小さいのでこの飽和は見逃されやすい。

## (2) アセチルコリンによる膵 $\beta$ -cell の脱分極発生機構: Ca<sup>2+</sup>の Ca<sup>2+</sup>流入に対する positive feedback system

泉井 亮, 菅世智子, 菅野隆浩(弘前大・医・第一生理)

アセチルコリン (ACh) は, ラット膵  $\beta$ -cell のインスリン分泌を促進する。この過程では脱分極に伴って  $\beta$ -cell に流入する Ca<sup>2+</sup>の役割が大きいが, ACh による脱分極発生メカニズムやこれに関係する細胞内情報伝達機構については明らかではない。そこでこの点を電気生理学の手法を中心に検討した。その結果, 1) ACh (0.01-10  $\mu$ M) は whole-cell mode で記録された ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel (K<sub>ATP</sub>) 電流を, 電極液の EGTA が 0.5mM のときは抑制したが, 10mM では抑制しなかった。2) ACh によ

る電流抑制は GDP S, U73122, heparin によって消失した。3) Inside-out mode で膜内側の Ca<sup>2+</sup>を 10nM から 10  $\mu$ M にすると KATP 活性は減少した。これらの結果から, ACh による脱分極は IP<sub>3</sub> によって放出される Ca<sup>2+</sup>が KATP の ATP 感受性を促進することで KATP 活性が低下することによると考えられる。この脱分極は L-type Ca<sup>2+</sup> channel を開口して Ca<sup>2+</sup>流入を促進する。すなわち, ACh によるラット膵  $\beta$ -cell の Ca<sup>2+</sup> signaling では Ca<sup>2+</sup>の Ca<sup>2+</sup>流入に対する正のフィードバック機構が働いている。

## (3) 単一膜 細胞におけるインスリン分泌の解析

最上秀夫, 張 恵, 山田聡子, 小島 至 (群馬大・生体調節研)

目的: 細胞内カルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 濃度の上昇とジアシルグリセロール (DG) により活性化される conventional PKC(cPKC)は, 広範な細胞機能の調節に関与している。今回, 我々はインスリン分泌細胞においてグルコースによるインスリン分泌活性化機構を細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 動態と cPKC 一つである PKC の活性化の観点から検討した。

方法: インスリン分泌細胞 (INS-1) に PKC -GFP を導入して, 細胞質から細胞膜への PKC -GFP の translocation とインスリン分泌を PKC の活性化の指標

にした。同時に fura-2 にて細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 動態をモニターした。

結果: 脱分極刺激による  $\text{Ca}^{2+}$ influx により惹起される  $\text{Ca}^{2+}$ オシレーションによって PKC の活性化が起こった。PKC の活性化には 400nM 以上の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇が必要であった。高濃度グルコース存在下でその活性化はさらに高まった。

結論: インスリン分泌細胞においてグルコースによる PKC の活性化を介したインスリン分泌活性化機構の存在が示唆された

## (4) BCR を介するカルシウムシグナルの分子的解析

黒崎知博 (関西医大・肝研・分子遺伝)

私達は既に, BCR により誘起されるカルシウム動員には PLC- 2 と Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) の二つの経路が活性化されることが必須であることを明らかにしてきた。今回 DT40 B 細胞を用いて遺伝学的・生化学的解析を行うことにより 2 つのことを明らかにしてきた。

1) PLC- 2, PI3K が活性化されるためには刺激依存性に cholesterol-rich な特殊な膜各群である GEM fraction に移行することが重要であり, アダプター分子 BLNK,

BCAP はその移行に必須の役割を担っている。GEM fraction には Trp channel が豊富に存在しているという報告もなされており, GEM fraction がカルシウムシグナル発生に重要な分子群を集積する場として機能していることが予測される。2) DT40 B 細胞に Trp1 channel が発現しており, この欠損細胞は ER からの calcium release も細胞外からの calcium influx も阻害され, 重要な機能を担っていることが示された。

(5) マウス卵の  $\text{Ca}^{2+}$  oscillation における  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$  influx・release毛利達磨<sup>1</sup>, 白川英樹<sup>2</sup>, 尾田正二<sup>2</sup>, 宮崎俊一<sup>1,2</sup>(<sup>1</sup>生理研・細胞内代謝, <sup>2</sup>東京女子医大・第二生理)

ハムスター精子抽出物 (SE) をマウス卵に顕微注入し受精時と同様な  $\text{Ca}^{2+}$ 振動を起させ,  $\text{Mn}^{2+}$ による Fura-2 の蛍光消退を用い  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ 動態を測定した。細胞内  $\text{Mn}^{2+}$ 濃度の増加につれそれぞれの  $\text{Ca}^{2+}$ 増加に伴う  $\text{Mn}^{2+}$ 振動が見られた。この時  $\text{Mn}^{2+}$ 流入は持続的であり静止時に比べ 2-3 倍増大していた。この結果は  $\text{Ca}^{2+}$ と  $\text{Mn}^{2+}$ の競合的阻害条件下で, 流入排出を仮定したモデルで数値的にシミュレーションできた。すなわち, 細胞内に流入し

た  $\text{Mn}^{2+}$ も  $\text{Ca}^{2+}$ と同様に ER に取り込まれさらに遊離されることを示した。イノシトール三リン酸 ( $\text{InsP}_3$ ) の注入による一過的な  $\text{Ca}^{2+}$ 増加は, 一過的な  $\text{Mn}^{2+}$ 流入のみを誘起した。また  $\text{Ca}^{2+}$ ストアの枯渇による顕著な  $\text{Mn}^{2+}$ 流入は容量性  $\text{Ca}^{2+}$ 流入機構の存在を示唆した。結論として, マウス卵の  $\text{Ca}^{2+}$ 振動時には最初の大きな  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離時に, 容量性  $\text{Ca}^{2+}$ 流入機構により,  $\text{Ca}^{2+}$ 流入が引き起こされ, 持続的な  $\text{Ca}^{2+}$ 流入が継続されることがわかった。

## (6) Ca<sup>2+</sup>-ATPase のチャネル活性

老木成稔・清水啓史・豊島 近

(福井医大・生理, 東京大, 分子細胞生物研)

筋小胞体 Ca<sup>2+</sup>-ATPase は, ある条件下では Ca<sup>2+</sup> の受動的な輸送路となることが筋小胞体ベシクルを用いた Ca<sup>2+</sup> 流束の実験から示されてきた。Ca<sup>2+</sup>-ATPase の一次構造上, ポンプ活性に関わる負電荷残基が同定され, これらの残基は Ca<sup>2+</sup> チャネルの選択性フィルター部に相同な構造を持つ。Ca<sup>2+</sup>-ATPase の受動輸送機構を明らかにするために精製 Ca<sup>2+</sup>-ATPase を用いて実験を行った。精製 Ca<sup>2+</sup>-ATPase をリポソームに再構成し, pyrene

maleimide (PMI: システイン残基修飾剤) で修飾すると Ca<sup>2+</sup> 流束が著明に増大した。脂質平面膜に再構成し電圧固定法でイオン電流を測定した。電位ステップによって時間非依存性電流が測定でき, その電流 - 電圧特性は弱い整流性を示した。この電流は流束実験に一致して, thapsigargin や Ca<sup>2+</sup> で抑制された。Ca<sup>2+</sup>-ATPase の立体構造をもとに Ca<sup>2+</sup> の透過機構について検討する。

## (7) カルシウムシグナルのコーディングとデコーディング機構

飯野正光 (東京大学医学系研究科・細胞分子薬理)

細胞内カルシウムシグナルは, カルシウムウエーブ・オシレーションといった時間的・空間的ダイナミズムを示し細胞機能を制御している。細胞に対する入力に応じてカルシウムシグナルがどのようにコードされるか, またそれが細胞機能へどのようにデコードされるかは, 細胞の生理機能制御を理解するうえで基本的に重要な問題である。多種の細胞応答では, 細胞内イノシトール三リン酸 (IP<sub>3</sub>) に引き続いてカルシウムシグナルが生じる。このコーディング機構においてカルシウムシグナルが,

自身の形成機構にフィードバックをかけることが重要であることを我々は示してきた。すなわち, IP<sub>3</sub> 受容体自身及び IP<sub>3</sub> 産生機構に対するフィードバック効果である。このメカニズムの分子レベルの解明が進んでいる。さらに, 複雑なカルシウムシグナルをデコードするメカニズムについて, カルシウム依存性転写因子である NF-AT について解析を進めたところ, 特徴的な検出機構があることが明らかになってきた。

## (8) 細胞の機能調節におけるプロトンチャネルの役割

久野みゆき, 森畑宏一, 森啓之 (大阪市大・院・医・分子細胞生理)

膜電位依存性プロトン (H<sup>+</sup>) チャネルは, 脱分極によって開口し短時間に大量の H<sup>+</sup> 排出能をもつユニークな pH 調節機構である。中枢神経系の phagocyte であるミクログリア, 骨組織の H<sup>+</sup> 分泌細胞である破骨細胞, ヒスタミン分泌細胞であるマスト細胞はいずれも H<sup>+</sup> チャネルを発現している。通常は pH の変動による feedback 機構で制御されているが, いずれの細胞でも H<sup>+</sup> チャネル電

流量は phenotype によって大きく異なり, また記録中に電流量の fluctuation が見られるなど, チャネル活性は細胞内外の環境に鋭敏に反応して変動する。起電性 H<sup>+</sup>-ATPase の H<sup>+</sup>-translocation 能を担う c-subunit と比較すると, H<sup>+</sup> チャネルは細胞内アシドーシスからの迅速な回復に威力を発揮した。

## (9) 恐山湖産ウグイの酸性適応機構の解明

平田 拓<sup>1</sup>, 小野俊浩<sup>1</sup>, 仲里猛留<sup>1</sup>, 猿田洋子<sup>1</sup>, 金子豊二<sup>2</sup>平野哲也<sup>2</sup>, 若林繁夫<sup>3</sup>, 重川宗一<sup>3</sup>, 広瀬茂久<sup>1</sup>( <sup>1</sup>東工大・生命理工, <sup>2</sup>東大・海洋研,<sup>3</sup>国立循環器病センター・研・分子生理)

恐山(青森)のカルデラ湖に生息するウグイは pH3.5 という極めて過酷な硫酸酸性に適応する能力を持つ。この恐山ウグイの酸性適応機構解明の手がかりを得るために、外界とのイオン輸送に重要な役割を果たしていると考えられる鰓で、 $H^+$ と  $HCO_3^-$ の輸送がどのように行われているかを、各々のイオン輸送を行っていると考えられる  $Na^+/H^+$  exchanger 3 (NHE3)  $Na^+/HCO_3^-$  cotransporter (NBC) に注目し調べた。ノーザン解析より、酸性適応に

ともない NHE3 と NBC の発現量が顕著に増大しており、また、免疫組織染色より、NHE3 は塩類細胞の頂端部に、NBC は基底膜側に特異的に発現していることを確かめた。鰓の塩類細胞において、NHE3 は外界から  $Na^+$ を取り込むのと交換で  $H^+$ を排出し、NBC は取り込まれた  $Na^+$ と一緒に pH 緩衝剤として働く  $HCO_3^-$ を血中に送り込むことで、効率よく血液及び体液の酸性化を防ぎ、生存を計っているものと推定される。

(10) 内向き整流性  $K^+$ チャネル Kir7.1 の生理機能解明にむけて鈴木喜郎<sup>1,3)</sup>, 中村信大<sup>1)</sup>, 大方香代子<sup>1)</sup>,藤乗嗣泰<sup>2)</sup>, 河原克雅<sup>3)</sup>, 広瀬茂久<sup>1)</sup>( <sup>1</sup>東工大・生命理工 <sup>2</sup>東大・医・腎臓内分泌内科<sup>3</sup>北里大・医・生理)

内向き整流性  $K^+$ チャネル Kir7.1 は、近年 EST データベースより同定され、特徴的なポア配列を持つこと、および甲状腺、小腸粘膜、脈絡叢などに発現していることから、新しい上皮型  $K^+$ チャネルとして注目されている。今回私達は、この  $K^+$ チャネルが細胞のどのような要求によって発現してくるのかを明らかにし、その生理機能を推定するために、ラット Kir7.1 遺伝子とそのプロモーター

領域の解析を行った。その結果、細胞内 cAMP 上昇により転写活性が増加した。さらに、甲状腺由来細胞株 FRTL-5 において、TSH 刺激により内源性 Kir7.1 の mRNA およびタンパク量が増加した。これらのことから Kir7.1 は甲状腺機能そのものに関与することが強く示唆され、ヨード輸送の際の  $K^+$ リサイクルを行っているのではないかと推測された。

## (11) 血管系に発現するスフィンゴシン-1-リン酸(S1P)受容体群による細胞運動調節とそのシグナリング

多久和陽, 岡本宏之, 多久和典子, 杉本直俊, 櫻田惣太郎

(金沢大・医・第一生理)

私達が以前に血管平滑筋よりクローニングした Orphan G タンパク共役型受容体 AGR16/EDG5 は、生理活性脂質 S1P に対する受容体であることを見出した。S1P は様々な細胞の増殖・分化・骨格・運動・サバイバ

ル、平滑筋トーンなどに影響する。S1P は血漿中に高濃度で存在し、また様々な活性化細胞によって細胞外に放出される。EDG5 は 8 つのメンバーからなる EDG ファミリーに属するが、EDG1, EDG3, EDG8 は EDG5 と同様

に S1P 受容体であり,これに対して EDG2, EDG4, EDG7 は LPA 受容体であることが明らかとなった。EDG1,3,5 はいずれも  $G_i$  もしくは  $G_q$  を介して PLC/ $Ca^{2+}$ /DAG, MAPK

系に共役するが, Rho ファミリー低分子量 G タンパクへの共役は EDG 受容体サブタイプによって様々に異なり, その結果細胞運動におよぼす作用が全く異なる。

## (12) 新規亜鉛バイオイメーjingプロープ

菊地和也・平野智也・長野哲雄 (東大・院薬)

細胞の内外に存在する遊離の  $Zn^{2+}$  が細胞死や神経伝達に関与していることが報告されてきたが, その動態, 作用機序に関しては仮説の段階である。そこで我々は, 生理的条件下で瞬時に反応する可視光励起型蛍光プロープ分子の開発を行った。 $Zn^{2+}$  のアクセプターとして  $Zn^{2+}$  と瞬時に選択的に結合する TPEN 類を選択し, 蛍光団として fluorescein 類を用いた蛍光プロープ (ZnAF-1, ZnAF-2) をデザイン・合成した。 $Zn^{2+}$  を加えることによ

り, ZnAF-1, ZnAF-2 とともに極大励起波長 (492 nm) 及び極大蛍光波長 (514 nm) は変化せず, 蛍光強度は容量依存的にかつ瞬時に増大した。中性付近の pH では蛍光強度は安定した。 $Ca^{2+}$  等の生体内に存在する金属イオンを加えても, 蛍光強度は変化せず, これらの金属イオンと  $Zn^{2+}$  を共存させてもほとんど影響を与えなかった。細胞応用についても報告する。

## (13) “TBA”

宮脇敦史 (理化研脳科学総合研究センター細胞機能探索技術開発チーム)

GFP をベースに  $Ca^{2+}$  指示薬を作製する際の, 2 つのアプローチを報告する。第 1 に, オワンクラゲ GFP の mutant の一つであるサファイアをドナー, 六放サンゴから得られた RFP をアクセプターにすると非常に効率のよい FRET が実現できることを見出した。サファイア, RFP を組み込んで作製された Red cameleon は, pH 変化が激しく起こる神経細胞での  $Ca^{2+}$  イメーjingに適す

ることが示された。第 2 に GFP の - can 構造にメスを入れたものに,  $Ca^{2+}$  センサーとしてのカルモデュリンとその標的ペプチドを組み込み,  $Ca^{2+}$  濃度に従って蛍光特性を変える GFP ‘pericam’ を創り出した。 $Ca^{2+}$  によって蛍光強度が増大する ‘flash-pericam’, 蛍光強度が減少する ‘inverse-pericam’, 色が変わる 2 波長励起 1 波長測光型の ‘ratiometric-pericam’ がある。

## 6. 神経科学研究の新しいアプローチ

2000 年 9 月 29 日 - 9 月 30 日

代表・世話人：畠中 寛 (大阪大学蛋白質研究所)

所内対応者：池中 一裕 (国立岡崎共同研究機構・生理学研究所)

- (1) NMDA 受容体発現細胞におけるキスカル酸の作用  
工藤 佳久 (東京薬科大学生命科学部)
- (2) エバネッセンス顕微鏡で見た GFP 標識顆粒の分泌動態  
坪井 貴司 (浜松医科大学光量子医学研究センター)
- (3) 初代培養神経細胞を用いたスパイン形成の解析  
白尾 智明 (群馬大学医学部行動分析学教室)
- (4) 痛みと ATP 受容体  
井上和秀 (国立医薬品食品衛生研究所薬理部, 九州大学大学院薬学研究院)
- (5) LTP, depotentiation, LTD の molecular dissection, substitution -  
"LTP - カクテル" と多重分子カスケードのスイッチング  
黒田 洋一郎 (東京都神経科学総合研究所・分子神経生物)
- (6) 脊髄背側からのオリゴデンドロサイト分化抑制因子の解析  
和田 圭樹 (国立岡崎共同研究機構・生理学研究所・神経情報部門)
- (7) 小脳顆粒細胞のアポトーシスにおける p38 の役割  
山岸 寛 (大阪大学蛋白質研究所蛋白質生合成部門)
- (8) 神経伝達物質放出における PI 3-キナーゼの役割  
板倉 誠 (三菱化学生命科学研究所)
- (9) 脳内での  $Ca^{2+}$  / カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II の多様性とその生理的意義  
山本 秀幸 (熊本大学医学部第一薬理)
- (10) In-vitro 条件付けによる神経細胞形態のダイナミックな変化  
川合 亮 (東海大学大学院理学研究科)
- (11) ニューロトロフィンによる神経伝達調節  
沼川 忠広 (大阪大学蛋白質研究所生合成部門)
- (12) 開口分泌機構への新しいアプローチ  
熊倉 鴻之助 (上智大学生命科学研究所)
- (13) グルタミン酸受容体サブユニット GluRB のカルボキシル末端の局在における役割の解析  
清末 和之 (大阪工業技術研究所 脳神経工学ラボラトリー)
- (14) シナプトソームに濃縮される mRNA の探索とその翻訳解析  
石本 哲也 (通産省・大阪工業技術研究所・脳神経工学ラボラトリー)
- (15) Differential display 法を用いた神経可塑性関連遺伝子群の探索とカタログ化  
松尾 亮太 (三菱化学生命科学研究所)

### 【参加者名】

松尾 亮太 (三菱化学生命化学研), 工藤 佳久 (東京薬大・生命科学), 坪井 貴司 (浜松医科大・光量子), 榎原 厚 (東海大・開発工学), 三浦 正幸 (大阪大・医), 清末 和之 (大阪工業技術研), 松本 知也 (大阪大・蛋白質研), 畠中 寛 (大阪大・蛋白質研), 土屋 礼美 (東京薬大・生命科学), 植田 敦子 (大阪工業技術研), 川合 亮 (東海大), 白尾 智明 (群馬大・医), 高橋 正身 (三菱化学生命研), 板倉 誠 (三菱化学生命研), 植村 慶

一(慶応大・医),黒田 洋一郎(東京都神経科学総合研・分子生物学),熊倉 鴻之助(上智大・生命研),山本 秀幸(熊本大・医),井上 和秀(国立医薬品食品衛生研),田口 隆久(通産省・工業技術院),関野 祐子(群馬大・医),石本 哲也(大阪工業技術研),工藤 卓(大阪工業技術研),寺川 進(浜松医科大・光量子),山岸 覚

(大阪大・蛋白研),横幕 大作(大阪大・蛋白研),沼川 忠広(大阪大・蛋白研)藤井 聡(山形大・医),榎戸 靖(大阪大・蛋白研),岸本 拓哉(生理研),畠山 淳(生理研),笹川 展幸(上智大・生命研),高橋 倫子(生理研),河西 春郎(生理研)

#### 【概要】

脳の形成とその機能を明らかにする上で、近年の技術の進歩と研究方法の多様化が重要な役割を果たしていることは論を待たない。分子生物学的手法による分子レベルの解析から、光学的手法、電気生理学的手法を用いた細胞レベルの解析、組織培養を用いた組織レベルの解析等、様々なレベルで多様な方法によりアプローチが行われ、新しい展開が行われている。したがって、このよう

な異なった角度からのアプローチをとる研究者が会して情報を交換し、成果の位置づけと今後の展開を討議することが重要である。

本研究会では、このような様々な角度から研究を行っている研究者がそれぞれの最新の成果に基づいて発表討議を行い、一層の発展を計ることを目的として行われた。

### (1) NMDA 受容体発現細胞におけるキスカル酸の作用

工藤 佳久(東京薬科大学・生命科学部)

NMDA 受容体の e1 サブユニットと z1 サブユニットの遺伝子上流に HSP70 を繋いだ遺伝子を導入した CHO 細胞に 43 で約 30 分熱刺激を与えることによって、NMDA 受容体を発現させた。この受容体の発現は NMDA を適用した場合の細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を指標として確認できた。この細胞に、AMPA や Kainate を適用してもまったくカルシウム濃度の変動は生じなかった。しかし、G-タンパク質連動型グルタミン酸受容体作用薬、t-ACPD を適用すると、わずかであるが細胞

内カルシウム濃度が上昇し、さらに、キスカル酸を適用すると明らかなカルシウム濃度の上昇が生じた。この作用は NMDA 受容体拮抗薬、APV で抑制され、また、G-タンパク質連動型グルタミン酸受容体拮抗薬、MCPG でも抑制された。さらに IP3 受容体の抑制薬である 2-APB でも抑制されることを確かめた。これらの結果は、NMDA 受容体は何らかの形で G-タンパク質と連動している可能性を示しており、NMDA 受容体を介した細胞内情報伝達に別の側面があることを示唆するものである。

### (2) エバネッセンズ顕微鏡で見た GFP 標識顆粒の分泌動態

坪井 貴司, 寺川 進(浜松医科大学光量子医学研究センター)

分泌顆粒膜と細胞膜とが融合する時の分泌顆粒の動態を、対物レンズ照明型エバネッセンズ顕微鏡を用いて観察し、解析を行った。ラット膵島細胞腫 INS-1 細胞の分泌顆粒をアクリジンオレンジで蛍光染色し、また、顆粒膜上に存在する蛋白である phogrin に GFP を融合させたベクターを作成し、これによる蛋白の強制発現後に膜近傍の GFP 分子の蛍光像も観察した。電気刺激により開口

放出反応を引き起こさせると、アクリジンオレンジ染色したインスリン顆粒は、突然蛍光強度をゼロにまで減らす反応を示した。この時、33~100 ミリ秒間その蛍光強度が一瞬増加するという反応が先行していた。一方 phogrin-GFP 融合タンパクの蛍光強度は、刺激後約半分に減少し、その後ゆっくりとした減少を続けて、30 秒後にほとんど観察できないレベルになった。以上から単一

顆粒の開口放出ダイナミクスを考察する。

### (3) 初代培養神経細胞を用いたスパイン形成の解析

白尾 智明, 関野 祐子 (群馬大学医学部・行動分析学教室)

樹状突起のフィロポディアからスパインに変換する際のアクチン細胞骨格の変化を初代培養神経細胞を用いて解析した。フィロポディアにおいてはアクチン束化蛋白ファッシンが主要なアクチン結合蛋白であるが、スパイ

ンの発達に伴い神経系に特徴的なアクチン結合蛋白ドレブリンがスパインに局在するようになることがわかった。また、ドレブリンの発現量を変化させることにより、スパインの形態変化が誘導されることもわかった。

### (4) 痛みと ATP 受容体

井上 和秀 (国立医薬品食品衛生研究所薬理部・九州大学大学院薬学研究院)

近年、痛みを伝える神経 (後根神経節 (DRG) ニューロン, 三叉神経節ニューロン) に限局して発現する ATP 受容体サブタイプ P2X3 が発見されて、ATP 受容体と痛みの関係がにわかに注目されるようになった。我々はこれまでに次のことを明らかにした。1. C-線維をもつ小型の DRG ニューロンでは P2X3 がホモマーのイオンチャネルを形成し、末梢での痛み発現と熱疼痛過敏反応、中

枢端での痛み伝達促進作用に貢献している。2. 中型の DRG ニューロンでは P2X3 と P2X2 がヘテロマーのイオンチャネルを形成し、異痛症 (アロディニア: 普通は痛みとして感じない触刺激を痛烈な痛みとして感じてしまう病態) を引き起こしてしまう。本会では、P2X3 の痛みに対する関与をさらにオリゴヌクレチド・アンチセンス法を *in vivo* に適用した結果を交えて報告し討論する。

### (5) LTP, depotentiation, LTD の molecular dissection, substitution - "LTP - カクテル" と多重分子カスケードのスイッチング

黒田 洋一郎 (東京都神経科学総合研究所・分子神経生物)

藤井 聡 (山形大学医学部・生理)

海馬切片で観察される LTP, depotentiation, LTD などは記憶の基礎過程と考えられ、その分子・細胞メカニズムについては多くのモデルや研究が発表されているが矛盾・相反・不明な点も多く、21世紀に持ち越されたこれからの分野である。シナプスの可塑的变化は刺激の頻度にも依存するので、刺激によってシナプス間隙に放出される分子群とその代謝物、および刺激頻度に依存するそれらの濃度が、これらの現象の trigger になっている。欧米中心のこれまでの研究では、この trigger 分子としてはグルタミン酸のみが考えられ、同時に放出されている ATP は無視されていた。演者らは ATP のシナプス形

成を含むシナプス可塑性への役割について検討し、ATP は ecto-protein kinase の基質となりシナプス膜機能蛋白の細胞外ドメインを磷酸化することによって、シナプス形成を促進している可能性にまず気付いた (Kuroda, et al., Neurosci. Lett. 135, 255, 1992)。LTP の長期保持に *denovo* のシナプス形成を含むシナプスの形態変化が重要なので、ATP の海馬 CA1 シナプス可塑性への影響を調べた。ATP 添加のみで長期に継続する LTP が誘導できることがわかり、この ATP-induced LTP は ecto-protein kinase 阻害剤添加で起こらなくなり、かつ電気刺激で誘導された LTP も同様に ecto-protein kinase

阻害剤で阻止された。(Fuji, et al. Neurosci. Let. 187, 130, 133, 1995)。しかし ATP-induced LTP はテスト刺激なしには起こらなかったため、電気刺激による LTP 形成を化学物質添加のみに置き換える "LTP - カクテル" ができるかどうかを試した。ATP と NMDA のみで電気刺激なしに LTP が形成された。ATP のシナプスでの分

解産物であるアデノシンも LTP 形成の調節, ことに E-Disassociation, に各種アデノシン受容体が関与している (Fuji, et al., J.Physiol. 521, 451, 1999) こともわかり, LTP をはじめとする海馬シナプス可塑性の分子・細胞メカニズムは, 時間経過の異なる多重な分子カスケードの巧みなスイッチングによるものと思われる。

#### (6) 脊髄背側からのオリゴデンドロサイト分化抑制因子の解析

和田 圭樹, 鹿川 哲史, 清水 健史, 池中 一裕  
(岡崎国立共同研究機構・生理学研究所・神経情報部門)

オリゴデンドロサイトは, 脳内で非常に限局した領域から発生してくることがこれまでに知られている。我々はオリゴデンドロサイトの領域特異的な発生がどのようにして制御されているのかを調べるために, マウス胎生 12 日目の延髄から頸部脊髄領域を用いる組織片培養を行った。その結果, 脊髄背側領域がオリゴデンドロサイト数を抑える活性を持つことを見いだした。そこで, 脊髄のループレートから分泌される因子として知られる骨形成因子 (BMP) をその一つの候補として調べたところ, 我々の培養系でのオリゴデンドロサイト分化抑制

因子としての活性を見いだすことが出来なかった。現在, 因子の同定を試みている段階である。

以前から, 脊髄でのオリゴデンドロサイト発生は腹側のフロアプレートからのソニックヘッジホッグやニューレギュリンにより促進的に制御されていることが報告されている。今回の発表では, 脊髄腹側からの分化促進因子と背側からのオリゴデンドロサイト分化抑制因子とのバランスによって, グリア細胞の脊髄での背腹軸に沿った分化制御が神経細胞同様に行われていることを提唱する。

#### (7) 小脳顆粒細胞のアポトーシスにおける p38 の役割

山岸 覚 (大阪大学蛋白質研究所・蛋白質合成部門)

培養ラット小脳顆粒細胞は, 脱分極刺激である高カリウム (26 mM) 条件下において長期間培養するに従って成熟する。成熟後, 培地中のカリウム濃度を下げる (5mM) ことにより, 急速なアポトーシスを誘導することができる。我々はアポトーシス誘導後 3 時間において p38 MAPK のリン酸化が顕著に上昇すること, そして p38 MAPK の特異的阻害剤である SB203580 が, 濃度依存的

にアポトーシスを抑制することを見出した。また, このアポトーシスの系において, SB203580 の添加により転写因子 c-Jun のリン酸化上昇が抑制されること, さらに, p38 MAPK が c-Jun をリン酸化し得ることを観察した。以上の結果は, p38 MAPK が小脳顆粒細胞の低カリウムによって生じるアポトーシスにおいて重要な役割を果たしていることを示唆している。

## (8) 神経伝達物質放出における PI 3-キナーゼの役割

板倉 誠, 大西 浩史, 関口 真理子, 山森 早織, 片岡 正和 (三菱化学生命研究所)  
 網野 真也 (東京大学大学院・総合文化)  
 高橋 正身 (三菱化学生命研究所, 東京大学大学院・総合文化)

イノシトールリン脂質は, さまざまな情報伝達系においてセカンドメッセンジャーとして働いている。神経伝達物質の放出においても PIP 5-キナーゼが産出する PI (4,5) P<sub>2</sub> がプライミングステップに関わっていると考えられている。そこで, 神経伝達物質放出への PI 3-キナーゼの関与について検討を行った。結果 NGF および IGF-1 処理による PI 3-キナーゼの活性化によって神経伝達物

質放出が促進された。しかしながら, その促進機構は少なくとも 2 つ存在すると考えられた。すなわち NGF による促進では PI 3-キナーゼと MAP キナーゼが協同して働くのに対し, IGF-1 による促進では MAP キナーゼの活性化は必要でなかった。さらに PI 3-kinase は細胞膜ではなく細胞質中, おそらくは分泌小胞膜上で働いていると思われる。

(9) 脳内での Ca<sup>2+</sup> / カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II の多様性とその生理的意義

山本 秀幸, 竹内 有輔, 田淵 博孝, 宮本 英七 (熊本大学・医学部・第一薬理学教室)

Ca<sup>2+</sup> / カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaM キナーゼ II) は脳内に多量に存在し, 神経可塑性や神経伝達物質の放出に関与することが示唆されている。CaM キナーゼ II には, 遺伝子の異なる 4 種類のサブユニットが見いだされている。それぞれのサブユニットについて, 調節領域の後に可変領域が存在し, この部位のスプライシングの違いにより複数のアイソフォームが形成

される。我々はデルタサブユニットの研究を中心として, 可変領域のアミノ酸配列により各アイソフォームの細胞内局在と生理機能が決定されている可能性を検討してきた。今回, アストロサイトや NG108-15 細胞および, インスリン分泌細胞などの培養細胞株で多量に発現しているアイソフォームと核移行シグナルを有するアイソフォームの細胞内局在と生理機能について報告する。

## (10) In-vitro 条件付けによる神経細胞形態のダイナミックな変化

川合 亮 (東海大学大学院・理学研究科)  
 榊原 学 (東海大学・開発工部・生物工学科)

我々は BDNF が培養小脳顆粒細胞より興奮性の神経伝達物質であるグルタミン酸の放出を引き起こすことを既に報告している。今回, BDNF によるグルタミン酸放出作用がいわゆる開口放出の機構ではなく, グルタミン酸トランスポーターの逆転によるものであることを見出した。グルタミン酸トランスポーターの阻害剤 (t-PDC) で BDNF のグルタミン酸放出効果は完全に抑制された。また, もう一つの阻害剤 DL-TBOA でも放出は完全に抑制された。グルタミン酸トランスポーターは Na とグル

タミン酸を共輸送する。そこで Na の細胞内動態を解析したところ BDNF により顕著な Na の流入が観察され, TTX で阻害された。以上の結果から BDNF は TTX 感受性の Na チャネルを介して Na 濃度を上昇させ, それによるトランスポーターの逆転機構でグルタミン酸放出を引き起こしていると思われる。BDNF は開口放出機構の調節だけでなく, 短期間においてトランスポーターを逆転させることでも興奮性シナプスの制御に関与している可能性がある。

### (11) ニューロトロフィンによる神経伝達調節

沼川 忠広 (東海大学大学院理学研究科)

畠中 寛 (大阪大学蛋白質研究所・生合成部門)

光と振動をそれぞれ条件刺激 (CS), 無条件刺激 (UCS) とするウミウシの連合学習は、摘出した単離脳標本でも、CS と UCS の組刺激により B 型視細胞で持続的な興奮性の増大が観察され、in-vivo と同じ生理学的特徴を示す。我々は、in-vivo で報告のある B 型視細胞軸索終末の focusing が、in-vitro 系でも起こるかどうか、起こるならその時間的な経過はどうか、B 型視細胞とシナプス結合する平衡胞有毛細胞との結合状態などを検討した。動的

な変化を観察するため、B 型視細胞と有毛細胞をそれぞれ Alexa-488, Alexa-594 で細胞内同時染色して、それらの機能的結合を確認した後、レーザー共焦点顕微鏡で形態の立体像を観察した。そのような標本に 5 回の CS-UCS 刺激対で条件付けを行い、その後の形態変化を時間経過に従い観察した。その結果、in-vitro 条件付けによっても focusing が起こること、その形態変化は予想した時間経過より早いものであることが明らかとなった。

### (12) 開口分泌機構への新しいアプローチ

熊倉 鴻之助 (上智大学・生命科学研究所)

我々はこれまで、開口分泌機構の研究手法として、高透過性クロマフィン細胞の内部環境を特異抗体や機能ペプチドの等によって操作し、分泌機能への影響を解析してきた。この手法は、分泌の素過程を解析できる点で効果的であるが、例えば機能障害抗体の作成が難しいこと、高透過性細胞の分泌過程が全く生理的であるか等の問題点もある。これらの問題点を克服して解析をする手法と

して、我々は CALI 法による SNAP-25 の不活性化の適用を試み、25%の機能障害を観察した。一方、分泌機能測定的手法として、単一細胞からの開口分泌をカーボンファイバー電極による電気化学的な測定解析、および蛍光標識分泌顆粒の可視的運動測定による解析を進めている。これらの手法でえられた結果を踏まえて、新しいアプローチについて考察する。

### (13) グルタミン酸受容体サブユニット GluRB のカルボキシル末端の局在における役割の解析

清末 和之, 田口 隆久 (大阪工業技術研究所・脳神経工学ラボラトリー)

受容体分子のシナプスへの局在機構、組み込み機構はシナプス機能発現、特に可塑性発現機構において重要である。近年の研究により、受容体分子と結合する分子が多く発見しているがその役割はほとんど解明されていない。我々は、海馬錐体細胞に GluRB 分子のカルボキシル末端 (C 末端) のリン酸化相同ペプチドを細胞内へ投与することによって長期増強の発現を増強される事を報告した。一つの可能性として、LTP 発現において多くの受容体分子をシナプスへ組み込んだことによることが考

えられ、GluRB の C 末端の受容体分子局在における役割を検討するため、GFP との C 末端の融合蛋白質を作成した。野生型 C 末端をもつ GFP のシグナルは、主に TGN に多く見られ、一方、変異型は、細胞膜に多く分布していた。この結果は、C 末端の 1 残基が受容体分子の細胞内外の局在において重要であることを示しており、リン酸化によって分布を制御するメカニズムの存在が示唆される。

## (14) シナプトソームに濃縮される mRNA の探索とその翻訳解析

石本 哲也, 田口 隆久 (通産省・大阪工業技術研究所・脳神経工学ラボラトリー)

神経細胞内において特定の数種の mRNA が樹状突起に選択的に輸送されることが近年明らかになってきた。これらの mRNA の神経細胞内での局在や翻訳調節機構を解析することは神経細胞の可塑的変化の分子メカニズムを解明するうえで重要である。Differential Display 法を用いて、3 週齢ラット前脳シナプトソーム内 mRNA と前脳全体から得られた mRNA の比較を行った結果、Ferritin H chain mRNA と未知の mRNA 1 種がシナプトソームに

濃縮されていることがわかった。また、培養神経細胞や海馬スライスを用いた in situ hybridization による解析の結果、これらの mRNA が樹状突起に存在していることが確認できた。以上の結果からこれらの mRNA がシナプス部位に輸送され、そこで翻訳されていると考えられる。さらに今回、実際に樹状突起中で翻訳が起きているかを解析するために、培養神経細胞と GFP を用いた実験系を構築した。そこから得られた結果についても報告する。

## (15) Differential display 法を用いた神経可塑性関連遺伝子群の探索とカタログ化

松尾 亮太, 村山 明子, 井ノ口 馨 (三菱化学生命科学研究所)

記憶の長期化には脳での遺伝子発現が必要であり、記憶の細胞レベルでの素過程と考えられている長期増強 (LTP) の維持にも遺伝子発現が必要であることが知られている。我々は長期記憶に必要な遺伝子群を明らかにする目的で麻酔下、および無麻酔自由行動下のラットの海馬に LTP を誘導し、この後に発現変化する遺伝子群を differential display 法によって網羅的に探索した。麻酔下のラット (急性 LTP) においては表示された約 70000 バンドのうち 80 バンドで再現性ある発現変化が認められ、これらはその経時的変化パターンから 7 つのグループに分類することができた。無麻酔自由行動下のラット (慢性 LTP) においては表示された約 72000 バンドのうち 17 バンドで再現性ある発現変化が認められ、クローニングの結果これらは 10 種類の遺伝子から成ることが判明した。これら 10 種の遺伝子は全て LTP 誘導後早い時期に発現上昇を示し、24 時間以内にもとのレベルに戻ってい

た。10 種の遺伝子のうち 5 種についてはこれまでに LTP に伴って発現誘導されることが報告されていなかったものであり、うち 3 種は機能未知の新規遺伝子であった。またこれら 5 種の遺伝子の発現誘導には LTP の誘導だけでなく持続との間にも相関が見られたことからこれらの遺伝子が LTP の持続に寄与している可能性が示唆された。我々はさらにこれら 5 種の遺伝子の発現臓器特異性および脳発生段階での発現特異性などの発現特性も解析した。我々は 3 種の新規遺伝子のうちのひとつとしてクローニングした RING finger タンパクを Potentin と名付け、これについてさらに詳細な解析を進めた。今回その発現 profile についても報告する。我々のスクリーニングによって、さらに多数の遺伝子が LTP により発現誘導を示す可能性が示唆され、遺伝子発現探索のツールとしての differential display の有効性が示された。

## 7. シナプス伝達の機能と分子の接点を探る

2000年10月26日 - 10月27日

代表：工藤 佳久（東京薬科大学生命科学部）

世話人：伊佐 正（岡崎国立共同研究機構生理学研究所）

- (1) マウス網膜内網状層における GABA<sub>C</sub> 受容体によるグルタミン酸の放出制御  
立花 政夫・松井 広（東京大学大学院・人文社会系研究科）
- (2) 開口放出を制御する神経終末蛋白分子  
持田澄子（東京医大・第一生理）
- (3) エバネッセンス顕微鏡法で解析した開口放出関連顆粒タンパクの動態  
坪井 貴司, 寺川 進（浜松医科大・光量子医学研究センター）
- (4) シナプス伝達における SNAP25 の磷酸化の役割  
<sup>1</sup>片岡正和, <sup>2</sup>桑原玲子, <sup>2</sup>高橋 正身（<sup>1</sup>信州大学・工学部, <sup>2</sup>三菱化学生命研）
- (5) 伝達物質放出可塑性の素過程解析  
八尾 寛（東北大学大学院・医学系研究科）
- (6) Sizes of vesicle pools, rate of mobilization and recycling at the larval neuromuscular junction of a temperature-sensitive *Drosophila* mutant, shibire  
Yoshiaki Kidokoro, Ricardo Delgado, Carlos Maureira, Carolina Oliva, Pedro Labarca  
（群馬大学・医）
- (7) 脳幹コリン作動性システムの標的と作用機構  
伊佐 正（生理学研究所）
- (8) 抑制性シナプス伝達の制御機構  
川口 真也, 平野 丈夫（京都大学理学研究科）
- (9) 海馬 CA1 錐体細胞におけるシナプス入力加算のイメージング  
榎木 亮介, 井上 雅司, 工藤 佳久, 宮川 博義（東京薬科大・生命科学）
- (10) グルタミン酸トランスポーターの神経活動に伴うエネルギー代謝促進作用における役割  
田中 光一（東京医科歯科大）
- (11) 哺乳動物巨大聴覚中継シナプス the calyx of Held の生後発達  
高橋 智幸（東京大学大学院医学系・神経生理学）
- (12) シナプス間結合の形成機構  
高井 義美（大阪大学大学院医学系研究科）
- (13) 脳皮質神経細胞移動の制御  
仲嶋 一範（東京慈恵会医科大・DNA 医学研・さきがけ研究 2 1）
- (14) Ca シグナリングによる CREB 依存性遺伝子発現調節とアクチン細胞骨格制御  
尾藤 晴彦（京都大学大学院医学研究科・高次脳科学）
- (15) シナプス可塑性とアクチン細胞骨格系の動態変化  
深澤 有吾, 斎藤 喜人, 山崎 美津江, 小澤 史子, 松尾 亮太, 井ノ口 馨（三菱化学生命科学研）
- (16) 海馬神経細胞への Ca<sup>2+</sup>透過性 AMPA 受容体強制発現によるシナプス伝達機能の変化  
岡田 隆<sup>1,2,3</sup>, 山田 伸明<sup>1,2</sup>, 掛川 渉<sup>1</sup>, 都筑 馨介<sup>1</sup>, 飯野 昌枝<sup>1</sup>, 田中 光一<sup>3</sup>, 小澤 澁司<sup>1,2</sup>  
（<sup>1</sup>群馬大・医・第二生理, <sup>2</sup>JST・CREST, <sup>3</sup>東京医科歯科大・難治研・分子神経科学）
- (17) シナプスでの Ca<sup>2+</sup>チャンネル Ca<sup>2+</sup>遊離チャンネル Ca<sup>2+</sup>受容分子連関  
秋田 天平<sup>1</sup>, 成田 和彦<sup>2</sup>, 久場 健司<sup>1</sup>（<sup>1</sup>名古屋大・医・生理, <sup>2</sup>川崎医大・生理）

## (18) パッチクランプ RT-PCR 法を用いた大脳皮質非錐体細胞のグループ化

都筑 馨介 (群馬大・医・第二生理)

## (19) シナプス活動依存的な神経細胞の生存培養 - 養小脳顆粒細胞実験系の一般性と特殊性

小倉 明彦 (大阪大学大学院理学研究科)

## (20) 海馬錐体細胞における spontaneous EPSCs の in vitro 虚血負荷による二相性変化

田中 永一郎 (久留米大・医・第一生理)

## 【参加者名】

工藤 佳久 (東京薬科), 成田 和彦 (川崎医科大),  
久場 健司 (名古屋大・医), 李 鳳霞 (名古屋大・医)  
曾我 総子 (名古屋大・医), 鎌田 真希 (東北大・医),  
八尾 寛 (東北大・医), 小澤 滯司 (群馬大・医), 城  
所 良明 (群馬大・医), Pedro Labarca (群馬大・医), 持  
田 澄子 (東京医科大), 杉原 泉 (東京医科歯科大),  
田中 光一 (東京医科歯科大), 岩淵 舞子 (東京医科歯  
科大), 岡田 隆 (東京医科歯科大), 松上瑠江子 (東京  
医科歯科大), 宮川 博義 (東京薬科大), 榎木 亮介 (東  
京薬科大), 立花 政夫 (東京大・人文), 細井 延武 (東

京大・人文), パークランド健 (東京大・人文), 坪井 貴  
司 (浜松医科大), 寺川 進 (浜松医科大), 片岡 正和  
(信州大), 高井 義美 (大阪大・医), 田中永一郎 (久留  
米大・医), 平野 丈夫 (京都大・理), 吉田 盛史 (京  
都大・理), 土田 洋 (京都大・理), 伊藤 淳 (京都大・  
理), 若勇 雅昭 (京都大・理), 矢和多 智 (京都大・  
理), 尾藤 晴彦 (京都大・医) 篠田 陽 (大阪大・理),  
小倉 明彦 (大阪大・理), 深澤 有吾 (三菱科学生命研),  
窪田 芳之 (理化研), 伊佐 正 (生理研), 斎藤 康彦  
(生理研), 遠藤 利朗 (生理研), 山下 哲司 (生理研)

(1) マウス網膜内網状層における GABA<sub>C</sub> 受容体によるグルタミン酸の放出制御

立花 政夫, 松井 広 (東京大学・大学院人文社会系研究科・心理学研究室)

マウス網膜からスライス標本を作製し, whole-cell clamp 条件下で, 光刺激によって誘発されるオンー過性型アマクリン細胞の EPSC を解析した。網膜では, 視細胞の光応答は代謝型グルタミン酸受容体を介してオン型双極細胞に伝達される。オン型双極細胞はグルタミン酸を放出し, オン型アマクリン細胞とシナプス結合している。本実験では, アマクリン細胞へのグルタミン酸作動性シナプス入力以外のシナプス入力を薬理的に阻害し, オン型双極細胞とオンー過性型アマクリン細胞間のシナプス伝達を調べた。

アマクリン細胞のグルタミン酸受容体のサブタイプを同定するためにアゴニストを直接投与した結果, AMPA 型と NMDA 型の共存が確認された。しかし, 全面照射光刺激を与えると, 主に AMPA 型が活性化された。双極細

胞軸索終末部には GABA<sub>C</sub> 型受容体が豊富に局在することが報告されている。そこで, GABA<sub>C</sub> 型受容体に対する特異的阻害剤 TPMPA ((1,2,5,6- tetrahydropyridin-4-yl) methylphosphinic acid) を投与した条件下で光刺激を与えると, アマクリン細胞の光誘発性 EPSC は増大し, AMPA 型のみならず NMDA 型受容体も活性化されることが明らかになった。双極細胞はアマクリン細胞からの GABA 作動性フィードバック信号を受けており, 双極細胞軸索終末部の GABA<sub>C</sub> 型受容体が活性化されるとグルタミン酸の放出量が減少すると考えられる。また, 双極細胞から放出されるグルタミン酸の多寡によって, アマクリン細胞で活性化される AMPA 型受容体と NMDA 型受容体の割合が変化することが示唆された。

## (2) 開口放出を制御する神経終末蛋白分子

持田 澄子 (東京医科大学・生理学第一講座)

神経終末への活動電位の到達に伴って膜電位依存性カルシウムチャネルから Ca (superscript: 2+) が流入するとシナプス小胞膜と神経終末膜の融合が起り、小胞内に蓄えられた化学伝達物質が速やかにシナプス間隙に放出される。神経終末内には、複合体を形成してシナプス小胞の動態を制御する多くの蛋白質が見つかるが、SNARE 蛋白質 (syntaxin, SNAP-25 と synaptobrevin) の複合体形成はシナプス小胞膜と神経終末膜との融合、すなわちシナプス小胞開口放出に必須と考えられている。SNAP-25 と特異的に結合する蛋白質としてシナプス小胞に見つかった snapin は、Ca<sup>2+</sup> 結合蛋白質で開口放出をトリガーすると考えられている synaptotagmin と SNARE 複合体との相互作用を増して、神経伝達物質放出を増強する働きをしていることが示唆される<sup>1)</sup>。また、syntaxin と結合する神経終末膜蛋白質の syntaphilin は、SNAP-25 が syntaxin と結合することを競合して SNARE 複合体形

成を阻害する<sup>2)</sup>。さらに、細胞内膜小胞を用いた物質輸送に関わる SNAP-29 は、神経終末において SNARE 複合体を解体する蛋白質のひとつと考えられている a-SNAP が SNARE 複合体へ結合することを阻害して、神経伝達物質放出を抑制する働きをしていることが示唆される<sup>3)</sup>。このように、SNARE 複合体を制御する SNARE 結合蛋白質によって、シナプス伝達効率が調節されることが伺われる。

- 1) Ilardi, J.M. et al. (1999) Snapin: a SNARE-associated protein implicated in synaptic transmission. *Nature neuroscience* 2, 119-124.
- 2) Lao, G. et al. (2000) Syntaphilin: a syntaxin-1 clamp that control SNARE assembly. *Neuron* 25, 191-201.
- 3) Su, Q. et al. (2000) SNAP-29: a syntaxin-1A binding protein implicated in synaptic transmission. *Soc. Neurosci.* 26, 347.

## (3) エバネッセンス顕微鏡法で解析した開口放出関連顆粒タンパクの動態

坪井 貴司, 寺川 進 (浜松医科大学光量子医学研究センター)

分泌顆粒を蛍光標識し、これを対物レンズ型エバネッセンス顕微鏡を用いて観察することによって、分泌顆粒膜と細胞膜とが融合する時の動態を解析した。ラット褐色細胞腫 PC-12 細胞とラット膵島細胞腫 INS-1 細胞の分泌顆粒膜上に存在する蛋白である VAMP-2 と phogrin に GFP を融合させたベクターを作成し、これによる蛋白の強制発現後に膜近傍の GFP 分子の蛍光像を観察した。電

気刺激により開口放出反応を引き起こさせると、VAMP-2-GFP 融合蛋白発現分泌顆粒は、突然蛍光強度をゼロにまで減らす反応を示した。一方、phogrin-GFP 融合蛋白の蛍光強度は、刺激後約半分に減少し、その後ゆっくりとした減少を続け、刺激 30 秒後にはほとんど観察できないレベルになった。以上から単一顆粒の開口放出ダイナミクスを考察する。

## (4) シナプス伝達における SNAP-25 のリン酸化の役割

片岡 正和<sup>1,2)</sup>, 桑原 玲子<sup>1)</sup>, 高橋 正身<sup>1)</sup> (<sup>1)</sup>三菱化学生命研, <sup>2)</sup>信州大 工)

蛋白質リン酸化は生体の様々な反応を制御している。シナプス活動の基盤の一つ、前シナプスにおける神経伝達物質の放出機構も関連分子のリン酸化によって制御されていることが容易に予想されるが、その詳細な制御機

構はいまだ明らかではない。我々は既に前シナプスのモデル細胞である PC12 細胞にホルボールエステルである PMA を作用させることにより、前シナプス部での開口放出に必須な蛋白質群のうち、SNAP-25 の Ser187 が特異

的にリン酸化を受けることを明らかにした。しかしながら、PMA の作用によるリン酸化は、候補分子の選定には好適であるが、細胞にとって超常状態である。現在、我々が最も知り得たいのは、生きている状態での制御である。本研究では抗リン酸化 SNAP-25 抗体を分子プローブとして、生きている状態、すなわち実際の生体内での SNAP-25 のリン酸化について我々が明らかにしてきた結果を紹介する。

PC12 細胞において、SNAP-25 の Ser187 は定常状態でもリン酸化されていた。このリン酸化は PC12 細胞を神経成長因子(NGF)で刺激することにより、亢進を受けたが、MAPK のリン酸化とは異なり、リン酸化が最大になるまで 36~48 時間を要した。この平衡がリン酸化に最大に傾くまでに要する時間は、NGF 刺激による PC12 細胞の神経突起伸長の盛んな時期と合致していた。また、PC12 細胞において、リン酸化亢進と同様の時間軸で、NGF 刺激依存的に SNAP-25 の細胞膜局在確率が上昇することを見だし、この局在変化に SNAP-25 のリン酸化が関与することを明らかにした。これらは全てモデル細胞での結果であり、脳機能での SNAP-25 のリン酸化の機

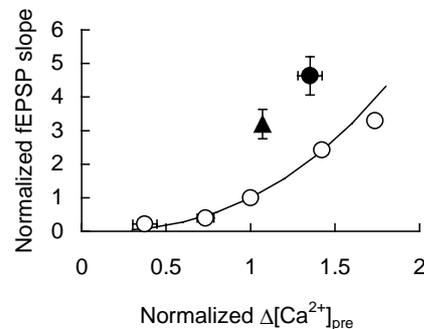
能解明には機能階層的に遠い。この生物機能的階層差を埋めるため、ラット脳における SNAP-25 のリン酸化について調べた。ラット脳においても SNAP-25 の Ser187 は基底状態でリン酸化を受けていた。また、初代培養細胞を PMA で処理すると、大幅なリン酸化の亢進が見られることより、ラット脳においても PC12 細胞と同様のキナーゼシステムが存在すると考えられた。発生に伴う SNAP-25 の発現及びリン酸化変化を調べたところ、両者は時間的に異なる上昇を示し、リン酸化は発生依存的であると考えられた。さらにラット海馬初代培養細胞においても同様の傾向が見られたことより、SNAP-25 のリン酸化は発生に伴う外力入力の上昇よりは、脳組織の場として時間的にプログラムされていると考えられる。また、脳の活性化に伴う SNAP-25 のリン酸化変化について調べたところ、カイニン酸処理によりてんかん症状を示したラット脳において、SNAP-25 の発現量上昇と脱リン酸化が確認できた。この事実はシナプス活動の活性化と SNAP-25 のリン酸化上昇が相反するものであることを示唆する。

## (5) 伝達物質放出可塑性の素過程解析

八尾 寛(東北大(院)・医・生体情報, CREST, JST)

シナプス前終末からの伝達物質放出は、シナプス小胞のドッキング、 $Ca^{2+}$ 流入、小胞と形質膜の融合、エンドサイトーシスなどの素過程の連鎖反応と考えられる。これらの素過程の中で開口放出を律速しているものが修飾されることにより、シナプス前終末の機能的可塑性が引き起こされると考えられる。A-キナーゼ (PKA)、C-キナーゼ (PKC)、G-キナーゼ (PKG) などは開口放出制御蛋白のリン酸化を介して素過程を修飾していることが期待される。マウス海馬スライスを用いて、苔状線維シナプス伝達がフォルボルエステル (PDA) により増強されるメカニズムを解析した。PDA は、ペアドパルス比 (PPR) の抑制をともなってフィールド EPSP (fEPSP) を増強した。PKC アンタゴニストの BIS-I により、PDA の増強効果が減少するが、BIS-I 抵抗性の fEPSP 増強は PPR の抑制をともなわなかった。すなわち、PKC 依存性の増強は、小胞と形質膜の融合確率の促進により説明される。融合確率の促進が  $Ca^{2+}$ 流入の増加により説明されるかを検

討する目的で、苔状線維シナプス前終末に  $Ca^{2+}$ 感受性色素 fura dextran を取り込ませ、シナプス前終末  $[Ca^{2+}]_i$  の活動電位性上昇 ( $\Delta Ca$ ) を測定した。PDA は PKC 依存的に  $\Delta Ca$  を促進したが、fEPSP の増強や PPR の抑制は、 $Ca^{2+}$ 流入の促進から予想される効果を上回った(図)。



Reference: Honda I, Kamiya H, Yawo H, J Physiol (in press).

Ca<sup>2+</sup>チャネルサブタイプ特異的なトキシンを用いて、苔状線維シナプス前終末において、N, P/Q, R-タイプをそれぞれ同定した。トキシンの有無にかかわらず、PDA (10 μM) は、Ca をコントロールの約 1.4 倍に増大した。すなわち、PDA の Ca 増大作用にサブタイプ特異性は

認められなかった。ゆえに、分泌と強く連関しているような Ca<sup>2+</sup>チャネルサブタイプを PDA が選択的に促進する可能性は除外された。PKC は、Ca を増大する以外に、Ca<sup>2+</sup>流入以外の開口放出機序を強化することが示唆された。

## (6) Sizes of vesicle pools, rates of mobilization and recycling at the larval neuromuscular junction of a temperature-sensitive *Drosophila* mutant, *shibire*

Ricardo Delgado, Carlos Maureira, Carolina Oliva, Pedro Labarca, Yoshiaki Kidokoro\*  
(Centro de Estudios Científicos, Chile, \*Gunma University School of Medicine)

Two vesicle pools, exo/endo cycling and reserve pools have been reported to be present at *Drosophila* neuromuscular junctions (Kuromi and Kidokoro, 1998). Using a temperature-sensitive mutant, *shibire<sup>ts</sup>* (*sh<sup>ts</sup>*), we determined these pool sizes and vesicle mobilization rates. In *sh<sup>ts</sup>* due to lack of endocytosis at 32 °C synaptic currents continuously declined during tetanic stimulation and eventually disappeared as the result of vesicle depletion. By then, 83,000 quanta were released. By analyzing the time course of decline of synaptic currents during tetanic stimulation we identified three components, namely, immediately releasable pool, readily releasable pool and

reserve pool. The size of immediately releasable pool was small, about 230 quanta. The vesicle mobilization rate of the reserve pool was measured independently using a dye, FM1-43, and was found to be 1/7 of the readily releasable pool at 10 Hz stimulation. Cytochalasin D inhibited mobilization of vesicles from the reserve pool allowing us to estimate the size of readily releasable pool as ~1/8 of all vesicles, about 10,000 vesicles. In wild-type, vesicle recycling maintained synaptic transmission during repetitive stimulation. The maximum recycling rate was 1000 vesicles/s, ~2 vesicles/release site/s.

## (7) 脳幹コリン作動性システムの標的と作用機構

伊佐 正, 斎藤 康彦, 山下 哲司 (生理学研究所)

中脳の脚橋被蓋核と背外側被蓋核にはコリン作動性ニューロンが多数存在し、視床、小脳、上丘、橋・延髄網様体、黒質緻密部および腹側被蓋野のドパミン細胞、前脳基底部などにコリン作動性投射を送り、注意、覚醒、動機付けなどに伴う脳の活動レベルの調節に関わっているとされる。これら脳幹のコリン作動性ニューロンが投射先において果たす作用機序を上丘および黒質緻密部・腹側被蓋野のドパミン細胞においてスライスパッチクランプ法を用いて解析した。上丘におけるターゲットである中間層の出力細胞は *in vivo*, *in vitro* いずれにおいても、GABA 作動性システムからの脱抑制が起きたときに、興奮性入力がある閾値を越えると長い脱分極とバースト状

のスパイク発火活動を示す。この現象は NMDA 受容体を介するシナプス伝達に依存する。上丘中間層に対するコリン作動性入力は非 7 型のニコチン型アセチルコリン受容体を活性化し、中間層出力細胞に脱分極を誘発するとともに EPSP の NMDA 成分を顕著に増強し、バースト的活動の閾値を下げるように作用することが明らかになった。このことはサッケード運動などの外界からの刺激に対する運動応答の開始を促進する作用がある。また、中脳ドパミン細胞においては 7, 非 7 型両方のニコチン受容体を活性化する。そして内向き電流と脱分極応答を引き起こすが、この内向き電流にはニコチン受容体を介して細胞内に流入する Ca<sup>2+</sup>によって 2 次的に活性化

する fulfenamic acid 感受性のカチオン電流成分が約 30% ほど含まれ、ドパミン細胞における脱分極反応を増強する作用があることが明らかになった。この過程はドパミ

ン細胞による報酬関連活動の振幅の調節過程に関与すると考えられる。

#### (8) 抑制性シナプス伝達の制御機構

川口 真也, 平野 丈夫 (京都大学理学研究科)

小脳皮質の抑制性介在ニューロン (IN) とプルキンエ細胞 (PN) 間の抑制性シナプスにおいて、PN への異シナプス性興奮性入力により誘起される脱分極により、シナプス伝達が長時間増強される事が知られている。我々は、シナプス前 IN からの入力によらずに誘導されるこのシナプス可塑性において、シナプス前細胞活性が何らかの役割を果たしているか否かを検討した。IN と PN 双方から同時にホールセルパッチクランプ記録を行い、そのシナプス伝達を記録した。evoked-IPSC は、PN に脱分極条件刺激 (0 mV for 500 msec, 5 回) を行うと 30 分間以上増強された。しかし、PN 脱分極と同期して IN を 20Hz で刺激する条件刺激を行うと、増強誘導が抑制された。従って、PN の脱分極時に IN が活性化すると、増強が抑制されることがわかった。GABA 或いは GABA<sub>A</sub> 受容体の作用薬である Muscimol の PN 樹状突起への直接投与により起こる応答も、PN の脱分極により増強した。このことから、PN の脱分極により GABA<sub>A</sub> 受容体応答が増強すると考えられる。一方、脱分極時に GABA 投与を行う組み合わせ条件刺激を行うと、PN の GABA<sub>B</sub> 受容体が活性化することにより増強誘導が抑制されることも明らかになった。PN の樹状突起の離れた 2 箇所にも GABA を投与してそれぞれの応答を調べる実験により、増強抑制は

部位特異的に発現することが分かった。また、この増強誘導の抑止は、脱分極中かその一秒後までに GABA 投与を行った場合にのみ認められた。以上より、PN の脱分極時に IN を活性化すると、その終末から放出された GABA が PN の GABA<sub>B</sub> 受容体を活性化することにより、部位特異的に増強誘導が抑制されると考えられる。

PN において GABA<sub>B</sub> 受容体が P 型 Ca<sup>2+</sup> チャネルを抑えることが報告されていたので、fura-2 を用いた Ca イメージングの実験を行った。GABA<sub>B</sub> 受容体による細胞内 Ca 濃度上昇の抑制は僅かであった。また、それと同程度の Ca 濃度上昇の減少が起こる条件 (細胞外 Ca 濃度が半分) でも、脱分極による増強誘導に支障は無かった。一方、Gi/Go protein の阻害や PKA 活性化により、GABA<sub>B</sub> 受容体の増強抑制が阻害され、また、PKA 阻害により増強誘導は抑えられることが分かった。以上から、GABA<sub>B</sub> 受容体は細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度上昇を抑えるのではなく、Gi/Go タンパクを介し、PKA 活性を下げることにより増強誘導を抑えると考えられる。さらに、増強の制御に PKA 以外にも CaMKII や、タンパク脱リン酸化酵素が関与することを示し、如何にして PN 内で増強誘導とその抑制が切り替えられているかを紹介する。

#### (9) 海馬 CA1 錐体細胞におけるシナプス入力加算のイメージング

榎木 亮介, 井上 雅司, 工藤 佳久, 宮川 博義 (東京薬科大学・生命科学)

神経細胞は発達した樹状突起を有し、数千ものシナプス入力を樹状突起のさまざまな部位に受け取る。ニューロンの出力はこれらの入力の加算によって決定されるので、シナプスの加算様式を知ることは、中枢神経系ニューロンにおける計算原理を理解する上で非常に重要である。

これまでの樹状突起の機能の理解は、樹状突起は電氣的に受動的であるという考えのものに成り立っていた。つまり樹状突起上の各シナプス部位に生じた EPSP がケーブル特性に基づいて受動的に細胞体まで伝播され、線形に加算されるというものである (Rall 1964)。しかしながら、近年の研究の結果、神経細胞の樹状突起には電気

的に能動的な性質を持つことが明らかとなってきた。樹状突起上には電位依存性チャンネルやリガンド依存性チャンネルが不均一に存在しており (Johnston et al. 1996), シナプス入力による電位変化がイオンの駆動力の変化やイオンチャンネルの活性化をもたらし, シナプス電流を増大, 減弱させると考えられる。それゆえに, 二つの独立なシナプス入力短い時間間隔で入ったとき, 入力の加算は非線型になると考えられる (Yuste and Tank 1996; Mel 1994)。

我々はすでにラット海馬の CA1 錐体細胞からのホールセル記録から, 二つの興奮性入力 (Perforant and Schaffer Collateral Pathway) が短い時間間隔において入力すると EPSP は単独入力の単純加算と比較して小さくなり, その加算は GABA 作動性入力により制御されるとい

う結果を得ている (R.Enoki.et.al.submitted)。

さらに我々は樹状突起での EPSP 加算様式を調べる為, ラット海馬スライスを膜電位感受性色素 (JPW1114) で染色し, 16×16 フォトダイオードアレイシステムにより EPSP 加算のイメージングを行った。また, コンパートメンタルモデルを用いたシミュレーター・NEURON により, 非線型加算に関与すると考えられるチャンネルの検討と, 実験結果の再現を試みた。その結果, 独立した二つの閾値下シナプス入力の加算は, CA1 錐体細胞全体に渡って sub-linear であり, かつ GABA 作動性入力により制御されていることが分かった。また, シミュレーションにより EPSP 非線型加算には A-type K チャンネルが関与していることが示唆された。

#### (10) グルタミン酸トランスポーターの神経活動に伴うエネルギー代謝促進作用における役割

田中 光一<sup>1</sup>, Pellerin L<sup>2</sup>, Magistretti PJ<sup>2</sup>, Bonvento G<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>東京医科歯科大学・難治研・分子神経科学, <sup>2</sup>Institute of Physiology, University of Lausanne,

<sup>3</sup>CNRS UPR 646, Universite Paris 7)

シナプス活動の増加により, 脳局所のエネルギー代謝が亢進することは古くから知られている。この現象は, 最近多く用いられている脳活動の非侵襲的イメージング法の, 基礎をなすものである。しかし, シナプス活動の増加とエネルギー代謝の促進を共役させる機序は, 不明な点が多い。最近この共役機序に, グリア細胞内に再吸収されたグルタミン酸が重要な役割 (グルコースの吸収促進と乳酸の産生を促す) を果たす可能性が示された。本研究では, 欠損マウスを用い, 神経活動の増加とグルコース消費増加共役におけるグリア型グルタミン酸トランスポーターの役割を検討した。

グリア型グルタミン酸トランスポーター欠損マウス (GLT1, GLAST 欠損マウス) から調整したアストロサイトを用い, グルタミン酸添加による 2-Deoxy-D-[1,2-<sup>3</sup>H] glucose (<sup>3</sup>H]2DG) 取り込み促進作用を解析した。GLT1, GLAST のいずれかを発現しているアストロサイトには, グルタミン酸による <sup>3</sup>H]2DG 取り込み促進が見られたが, 両者を発現していないアストロサイトには見られなかった。

In vivo におけるグリア型グルタミン酸トランスポーターの神経活動—エネルギー代謝共役における役割を明らかにするため, GLAST 欠損マウスの頬髭を刺激した時のグルコース取り込み量を, <sup>3</sup>H]2DG を注入し, 大脳皮質体性感覚野の脳スライス切片を用いたオートラジオグラフィで測定した。生後 6 週齢の GLAST 欠損マウスでは, 両側の C1, C2 の髭刺激による <sup>3</sup>H]2DG 取り込み量の増加 (39±2%; n=5) は, 野生型 (38±5%; n=5) と比べて有意差はなかった。しかし, 生後 10 日の GLAST 欠損マウス (n=4) では, 両側の C1, C2 の髭刺激による <sup>3</sup>H]2DG 取り込み量の増加は観察されなかった (生後 10 日の野生型マウスでは, 両側の C1, C2 の髭刺激により, <sup>3</sup>H]2DG 取り込み量が 30±13% (n=4) 増加した)。生後 10 日マウスの大脳皮質体性感覚野アストロサイトには GLT1 に比べ GLAST が有意に発現していることを考えると, GLAST は, 生後 10 日の大脳皮質体性感覚野において神経活動—エネルギー代謝共役に不可欠な分子であることが示唆された。

## (11) 哺乳動物巨大聴覚中継シナプス the calyx of Held の生後発達

高橋 智幸 (東京大学大学院医学系研究科機能生物学専攻・神経生理学教室)

げっ歯類は生後 10 日前後に聴覚系が完成して音を認識できるようになる。音源定位に 関与する the calyx of Held シナプスは生後 6 日にシナプス形成を完成させた後, 第 2 週に大幅なシナプス改造を行う。この間スプーン状の calyx 終末端は指状に変化し, 終末端の Ca チャネルのサブタイプは N<sub>R</sub>型が消失して P 型単独となる(1)。一方, 標的細胞である台形体核 (MNTB) 細胞ではシナプス後膜の NMDA レセプターに著しい減少が認められる。NMDA レセプターが減少することによって EPSP の時間経過が短縮し, その結果, 高頻度刺激下における高信頼性 (HiFi) シナプス伝達が獲得されることが明らかになった。更に興味深いことに, この生後発達変化は聴覚破壊によってブロックされることが分かり, 聴覚入力による生後発達の促進メカニズムが示唆された(2)。シナプス伝達効率に関しては, 生後第 2 週の間, 低頻度 (0.05 Hz) 刺激下の効率は不変で, 素量サイズも一定であったが, これと対照的に高頻度刺激下における伝達効率が著しく上昇した。この変化は伝達物質放出確率の低下と放出可能シナプス小胞プールサイズ (RRP) の増大を伴っていた(3)。無脊椎動物のシナプスでは伝達物質放出部位に近接する Ca チャネル内部の Ca 濃度は狭く分布しており (マイクロドメイン) 結合速度の速い Ca キレーター-BAPTA の注入によってブロックされるが, 遅いキレーター-EGTA ではブロックされないことが知られている(4)。しかしラットの calyx シナプスでは終末端に

注入した EGTA がシナプス伝達をブロックすると報告され, 哺乳類中枢シナプスの広い Ca ドメインを裏付ける証拠として話題となった(5)。しかし, この仕事に用いられたラットは生後 8-10 日であり, 生後発達の途上であることが危惧された。実際, 生後 2 週以降のラットの calyx 終末端にキレーター注入したところ, BAPTA は予想通りシナプス伝達をブロックしたが EGTA はシナプス伝達に全く影響を与えなかった(6)。この結果はマイクロドメインが生後 2 週に形成されることを示唆する。実際, 両棲類の神経筋接合部培養で形成直後のシナプスは Ca 依存性伝達を行うにもかかわらず Ca チャネルを代表する active zone を欠いており, シナプス形成後の改造過程で Ca チャネルの集積が完成すると考えられている(7)。これと同様のメカニズムが calyx シナプスでも働いていると推測される。

## 参考文献

- (1) Iwasaki S & Takahashi T (1998) *J Physiol* 509,419-423.
- (2) Futai K, Okada M & Takahashi T. unpublished observation
- (3) Iwasaki S & Takahashi T unpublished observation
- (4) Augustine GJ et al. (1991) *Ann N Y Acad Sci.* 635,365-81
- (5) Borst JGG & Sakmann B (1996). *Nature* 383, 431-434
- (6) Takahashi T & Iwasaki S. unpublished observation
- (7) Takahashi T et al. (1987). *J Neurosci* 7, 473-481.

## (12) シナプス間結合の形成機構

高井 義美 (大阪大学大学院医学系研究科・生体制御医学 生化学・分子生物学)

私共は, 細胞間接着形成における低分子量 G 蛋白質の制御機構を解明する過程で, カドヘリン・カテニン系とは異なる新しい細胞間接着機構を発見している。この接着機構は, 少なくとも接着分子のネクチンと, ネクチンをアクチン細胞骨格に連結させるアフアディンの 2 つの蛋白質より構成されている。ネクチン・アフアディン系

は種々の細胞に発現し, カドヘリンをベースとするアドヘレンスジャンクションに局在し, カドヘリン・カテニン系による細胞間接着をオーガナイズしている。このネクチン・アフアディン系はシナプス間結合にも存在しており, 本会では, ネクチン・アフアディン系を紹介し, 本系のシナプス間結合形成における役割を論議したい。

### (13) 脳皮質神経細胞移動の制御

仲嶋 一範 (東京慈恵会医科大学 DNA 医学研究所分子神経生物学研究部門科学技術振興事業団さきがけ研究 21)

脳は、1000億個の神経細胞とその10倍の数のグリア細胞からなる非常に複雑な細胞社会を構成している。発生期において、これらの神経細胞は、脳内の限られた特定の部位で誕生し、長い距離を移動して整然と配置される。各細胞は、誕生後、放射状線維などの構造を足がかりにして目指す方向に向かって移動を開始する。最終配置部位に達すると、それまでの細胞の極性を変換して移動を終了し、周囲の細胞との新たな関係を構築し始め、最終的には、見事な層構造を含む神経回路網を形作る。最近の発生神経生物学の進展により、リーリン及びその複数の受容体が、この過程に重要な役割を果たすことが明らかになってきた。リーリン及びそのシグナル伝達に

関わる分子の欠損は、大脳皮質層構造の全体的逆転など、神経細胞の異常な配列を生じ、結果として運動失調等の神経症状を示す。そのシグナル伝達の機構は未解明の部分が多いが、最近、リーリン受容体のみならず、リガンドそのものも実は複数種あること、また、リーリン同士が相互作用して複雑な制御機構を有しているらしいことがわかってきた。発生期脳における神経細胞の移動を可視化する最近の我々の試みを紹介するとともに、神経細胞の移動と停止、更に層構造形成における細胞極性のダイナミックな変化が、いかなる細胞間の相互作用によって制御されているのか、最近の知見をまじえて議論したい。

### (14) Ca シグナリングによる CREB 依存性遺伝子発現調節とアクチン細胞骨格制御

尾藤 晴彦, 古屋敷 智之, 成宮 周 (京大院・医・高次脳科学・神経細胞薬理)

シナプス可塑性に伴い、NMDA 型グルタミン酸受容体チャンネルを介したカルシウム流入がきっかけとなり、シナプス後肥厚部では数多くの情報伝達系が活性化され、多様なシグナルが発生することが報告されている。しかしながら、各シグナルがそれぞれどのような特異的役割を担っているか、詳細は未だ明らかになっていない。また、記憶が長期化する場合、シナプス伝達効率の変化がいかなる分子機構によって固定化されるかという点は謎につつまれている(1)。我々はこれらの問題にアプローチする目的で、シナプス活動によって引き起こされる、シナプスから核へのシグナリングや、シナプスから細胞骨格への情報伝達経路について解析を進めてきた。

その結果、シナプス刺激が転写因子 CREB を CaMKIV を含むリン酸化経路を介して活性化すること(2)、また CREB 活性化は一定の閾値を越えた刺激強度にのみ共役すること(3)、海馬樹状突起上の L 型 Ca<sup>2+</sup>チャンネルと NMDA 受容体に CREB リン酸化を促進する活性が強いこと(4, 5)が明らかになった。最近、神経可塑性への関与に加え、CaMKIV-CREB 系が神経細胞の生存に関与するシグナルを供給している可能性を示唆する知見を得たので報告する(6)。

一方、GFP-actin を用いたイメージングにより、神経活動が海馬錐体細胞のアクチン細胞骨格動態を修飾する様子を可視化することに成功した。この過程で、NMDA 受容体を介した Ca<sup>2+</sup>流入と種々の電位依存性 Ca<sup>2+</sup>チャンネルが、アクチン動態に対して全く異なる作用を及ぼすことが明らかになった(7)。

これらの実験データは、神経活動によって発生するカルシウム流入の組み合わせによって、シナプス可塑性を規定する重要な情報がコードされている可能性を示している。

#### 参考文献

1. Bito H (1998) The role of calcium in activity-dependent neuronal gene regulation. *Cell Calcium*, 23: 143-150.
2. Bito H, Deisseroth K, Tsien RW (1996) CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca<sup>2+</sup>- and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression. *Cell*, 87: 1203-1214.
3. Deisseroth K, Bito H, Tsien RW (1996) Signaling from synapse to nucleus: postsynaptic CREB phosphorylation during multiple hippocampal synaptic plasticity. *Neuron*, 16: 89-101, 1996.

4. Kavalali E, Zhuo M, Bito H, Tsien RW (1997) Dendritic  $Ca^{2+}$ -channels characterized by recordings from isolated hippocampal dendritic segments. *Neuron*, 18: 651-663.
5. Mermelstein PG, Bito H, Deisseroth K, Tsien RW (2000) Critical dependence of CREB phosphorylation on L-type calcium channels supports a selective response to EPSPs rather than action potentials. *J. Neurosci.*, 20: 266-273.
6. See V, Boutiller AL, Bito H, Loeffler JP (2000) Calcium-calmodulin dependent protein kinase type IV (CaMKIV) inhibits apoptosis induced by potassium deprivation in cerebellar granule cells. *FASEB J.*, in press.
7. Furuyashiki T, Bito H, Narumiya S. Submitted

### (15) シナプス入力とアクチン細胞骨格系の動態変化

深澤 有吾, 斎藤 喜人, 山崎 美津江, 小澤 史子, 松尾 亮太, 井ノ口 馨 (三菱化学生命科学研究所)

神経細胞はシナプスを介して互いに連絡しあい、複雑なネットワークを形成している。記憶はこのネットワークの中に蓄えられると考えられ、新たな情報が流れたシナプスで伝達効率に変化し(シナプス可塑性)、ネットワーク中の情報伝達経路が変化することが、記憶形成そのものであり、この変化が長期間維持されることが記憶の長期化に重要であると考えられている。

可塑的变化が見られる脳の領域には、アクチン細胞骨格に富む刺状のシナプス(刺シナプス)が多く存在し、可塑的变化に伴い形態変化することが知られ、棘シナプスの形態変化が記憶形成に重要な役割を持つことが古くから予想されてきた。近年、シナプス内に存在するタンパク質の同定が進み、神経伝達を担うチャネルや受容体のシナプス局在化や細胞内へのシグナル伝達を担う分子が次々に見出され、これらの多くがアクチン細胞骨格と結合能を持つことが明らかになってきた。

記憶の長期化には新たな遺伝子発現が必要であると考えられていることから、我々は長期記憶成立の分子機構を解明する目的で、神経活動や長期可塑性誘導時に発現誘導される遺伝子の単離同定を行った。この過程で同定された ves1/homer や synaptopodin は、アクチン細胞骨格と間接的または直接に結合することから、アクチン細胞骨格系の神経機能への重要性を再認識するに至った。このような背景からアクチン細胞骨格系の動態変化そのものがシナプス伝達や可塑性に重要な役割を担っていると考え

られるが、その役割や機構については不明である。そこで我々は、シナプス入力や可塑的变化とアクチン細胞骨格の動態変化の関係を明らかにする目的で、電極を慢性的に埋設したラットに無麻酔無拘束下で歯状回 LTP を誘導し、アクチン細胞骨格系の動態変化を組織化学的に検討した。

内側貫通線維に高頻度電気刺激を与え歯状回 LTP を誘導すると、入力を受けた中間分子層に重合アクチン(F-actin)の集積が見られ、外側貫通線維刺激時には外部分子層に集積が見られた。これらの変化は電気的な可塑的变化の持続している1週間後でも認められた。Phalloidin-eosin を用いた電子顕微鏡観察により、F-actinの集積は棘シナプスに見られ、シナプス前や樹状突起には見られなかった。高頻度電気刺激による F-actin の集積は、NMDA 受容体の阻害により顕著に抑制され、タンパク翻訳阻害では抑制されなかった。さらに、LTP 誘導依存的に発現誘導される ves1-1S/homer-1a や synaptopodin タンパク質の免疫陽性反応は、F-actin の集積部位で増加した。これらのことより、歯状回顆粒細胞の棘シナプスでは、NMDA 受容体から流入した  $Ca^{2+}$  依存的にアクチン動態が変化し、集積した重合アクチンを利用して長期可塑性関連タンパク質の局在が変化し、可塑的变化の長期化を誘導する可能性が考えられた。また、可塑的变化の持続時間とアクチン重合との関連性や、異シナプス性入力の影響などについても報告する。

### (16) 海馬神経細胞への $Ca^{2+}$ 透過性 AMPA 受容体強制発現によるシナプス伝達機能の変化

岡田 隆<sup>1,2,3</sup>, 山田伸 明<sup>1,2</sup>, 掛川 渉<sup>1</sup>, 都筑 馨介<sup>1</sup>, 飯野 昌枝<sup>1</sup>, 田中 光一<sup>3</sup>, 小澤 滯司<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>群馬大・医・第二生理, <sup>2</sup>JST・CREST, <sup>3</sup>東京医科歯科大・難治研・分子神経科学)

ある特定のタンパク質を細胞に強制発現させる方法として、ウイルスベクターによる遺伝子導入法が近年注目されている。特に Sindbis ウイルス (SIN) ベクターは神経細胞への感染効率が高い点で、その有用性が期待される。本研究では、Ca<sup>2+</sup>透過性 AMPA 受容体を wild type ではもたない神経細胞に強制発現させることが SIN ベクターを用いて可能かどうか、またシナプス後膜に Ca<sup>2+</sup>透過性 AMPA 受容体を強制発現させることによってシナプス伝達機能や動物の行動が変化するかどうかを検討した。

AMPA 受容体サブユニットの一つである未編集型 GluR2 サブユニット (GluR2Q) 遺伝子および GFP 遺伝子を組み込んだ SIN ベクター (SIN-eG-GluR2Q) を作成し、ラット海馬培養スライス標本の CA1 錐体細胞に感染させた。SIN ベクターによる GFP 発現の時間経過を調べたところ、感染後 36 ~ 48 時間でほぼ最大に達した。CA1 錐体細胞をホールセル膜電位固定し、AMPA の電気泳動的投与による応答の電流特性を調べたところ、SIN-eG-GluR2Q 非感染細胞においては Ca<sup>2+</sup>不透過性 AMPA 受容体応答の特徴である外向き整流性であったが、感染細胞の場合は Ca<sup>2+</sup>透過性 AMPA 受容体応答の特徴である内向き整流性を示した。また、Schaffer 側枝の電気刺激による CA1 シナプス応答も SIN-eG-GluR2Q 感染

細胞の場合にのみ内向き整流特性を示した。以上より、SIN ベクターによる GluR2Q サブユニット強制発現の結果、Ca<sup>2+</sup>透過性 AMPA 受容体が CA1 錐体細胞のシナプス後膜に新たに発現したと結論した。

Ca<sup>2+</sup>透過性 AMPA 受容体発現によるシナプス伝達機能変化について検討するため、Schaffer 側枝へのテタヌス刺激後に生じる CA1 シナプスの長期増強 (LTP) について調べた。SIN-eG-GluR2Q 感染標本の場合は非感染標本と異なり、d-APV による NMDA 受容体阻害下でテタヌス刺激をした場合にも LTP が誘導された。つまり、シナプス後膜への Ca<sup>2+</sup>透過性 AMPA 受容体強制発現の結果、CA1 シナプスにおける LTP が NMDA 非依存性にも生じるようになるというシナプス伝達機能変化がみられた。

ラットの空間学習課題遂行に対する Ca<sup>2+</sup>透過性 AMPA 受容体強制発現の効果を検討するため、海馬 CA1 野もしくは歯状回 (DG) に SIN-eG-GluR2Q ベクターを両側性に in vivo 注入し、Morris 水迷路課題の学習過程への影響を調べたところ、Ca<sup>2+</sup>透過性 AMPA 受容体を CA1 野に発現させた場合にのみ学習成績の向上がみられた。AMPA 受容体の Ca<sup>2+</sup>透過性増大がもたらす学習課題成績への影響は CA1 の場合と DG の場合とで異なることが示唆された。

### (17) シナプスでの Ca<sup>2+</sup>チャンネル-Ca<sup>2+</sup>遊離チャンネル-Ca<sup>2+</sup>受容分子連関

秋田 天平・成田 和彦・曾我 聡子・蜂須賀 淳一・叢 雅琳・竹内 晋平・徳納 博幸・久場 健司  
(名古屋大学・医・第1生理)

シナプスで多彩な制御作用をする細胞内 Ca<sup>2+</sup>([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) の上昇は、細胞膜の電位依存性 Ca<sup>2+</sup>チャンネルを通る Ca<sup>2+</sup>流入によることが一般に信じられてきたが、最近、この Ca<sup>2+</sup>流入により細胞内 Ca<sup>2+</sup>貯蔵部位からの Ca<sup>2+</sup>誘起性 Ca<sup>2+</sup>遊離 (CICR) が活性化され、Ca<sup>2+</sup>流入による生理作用を顕著に増大することが解ってきている。このような 2 重に調節された [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇により生理作用が発現されるためには、その機構に関与した Ca<sup>2+</sup>受容分子が [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇の起源近傍に存在する必要がある。

この発表では、シナプス前終末とシナプス後ニューロンで、Ca<sup>2+</sup>チャンネルとリアノジン受容体と Ca<sup>2+</sup>受容分子が密接な三重連関機構 (Functional triad) を形成することを報告する。カエル運動神経終末での開口放出機構を活動依存性 (プライミング依存性) に顕著に増強す

る CICR 機構では、そのプライミング分子 (カルモジュリン) は比較的多くの Ca<sup>2+</sup>チャンネルからの Ca<sup>2+</sup>流入による均一化した [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> に反応するのに対し、Ca<sup>2+</sup>遊離を起こすリアノジン受容体は Ca<sup>2+</sup>チャンネルと開口放出機構に密接に連関することが解った。又、ウシガエル交感神経節ニコチン性シナプスのシナプス前終末では、IP3 受容体を介する CICR により伝達物質放出の長期増強が起こるが、この機構では Ca<sup>2+</sup>チャンネルと IP3 受容体および IP3 産生する代謝依存性受容体との間に密接な連関機構 (IP3-assisted CICR) が存在する可能性がある。ウシガエル交感神経節ニューロンでの Ca<sup>2+</sup>/電位依存性 K<sup>+</sup>チャンネル (BK チャンネル) は活動電位スパイク下降相に関与し、もう一つの Ca<sup>2+</sup>依存性 K<sup>+</sup>チャンネル (SK チャンネル) は後電位発生に関与する。この 2 種の Ca<sup>2+</sup>

依存性  $K^+$ チャンネルは共に  $Ca^{2+}$ チャンネルを通る  $Ca^{2+}$ 流入とライノジン受容体を介する CICR により活性化されるが、その活性化様式と 2 種の  $Ca^{2+}$ 起源に対する依存性は著しく異なり活動依存性である。活動電位スパイク下降相に關与する BK チャンネルは  $Ca^{2+}$ チャンネルとライノジン受容体に近接して存在し (Functional triad),

その活性化は反覆興奮による CICR の活性化の不活性化と共に減少するのに対し、後電位発生に關与する SK チャンネルはこれらの  $[Ca^{2+}]_i$  上昇分子より比較的離れた所に存在し、その活性化は CICR の不活性化にも拘わらず、そのスパイク延長作用による  $Ca^{2+}$ 流入の増大と  $[Ca^{2+}]_i$  の蓄積効果により大きくなる。

#### (18) パッチクランプ RT-PCR 法を用いた大脳皮質非錐体細胞のグループ化

都筑 馨介<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>群馬大・医・第二生理, <sup>2</sup>科学技術振興事業団(CREST))

大脳皮質には多種類の抑制性ニューロンが存在するが、その機能的意義は明らかになっていない。そこで大脳皮質紡錘形介在ニューロンの分類をパッチクランプ RT-マルチプレックス PCR 法によって行った。生後 12-34 日齡のラット前頭頭頂葉の 300  $\mu$ m の急性スライスを作成し、まず、電気生理学的なプロファイルを測定した。脱分極性の通電によって活動電位を発生させ、入力抵抗・活動電位の振幅・発火間隔・後過分極の振幅など 14 項目を細胞の電気生理学的なパラメータとして解析した。さて、従来、非錐体細胞の分類はカルシウム結合蛋白や神経ペプチドなどの生化学マーカーの発現を免疫細胞化学法によって調べることによって行われている。そこで、生化学マーカーの mRNA の発現の有無とグルタミン酸受容体 (イオンチャネル共役型・代謝型) のサブユニット mRNA の非錐体細胞における発現パターンを RT-マルチプレックス PCR 法によって調べた。方法としては、電気生理学的実験の終了後、mRNA を含む細胞質をパッチ電極内に回収し、反応チューブに移し、ランダムプライマー (dN6) を用いて単一ニューロンの cDNA を合成した。GABA 合成酵素 GAD65, GAD67・カルシウム結合タンパク質 calbindin, parvalbumin, calretinin・神経ペプチド neuropeptide Y, vasoactive intestinal polypeptide (VIP), somatostatin, cholecystokinin・イオンチャネル共役型グルタミン酸受容体 GluR1-7, KA1-2, NR2A-D・代謝型グルタミン酸受容体 mGluR1-8 の mRNA の発現の有無を単一細胞で同時に観察するため、第一次増幅としてこれら 30 種の cDNA を増幅する 59 本のプライマーを加えてマ

ルチプレックス PCR を行った。そして、マルチプレックス PCR 産物を 30 本のチューブに分け、それぞれのチューブに各種 cDNA を増幅する一対のプライマーを加えて第二次増幅を行い、それぞれの遺伝子の発現の有無を調べた。本研究では、大脳皮質 II, III 層の 60 個の紡錘形介在ニューロンを対象として、14 種の電気生理学的パラメータ、9 種の生化学マーカーのパラメータ、25 種のグルタミン酸受容体のパラメータを元にクラスタ解析を行った。クラスタ解析が正しく行われていることのコントロールには形態的に明瞭に区別される錐体細胞 (9 個) と、特徴的な発火パターンを示す fast spiking cells (16 個) をおいた。クラスタ解析の手順は、まずパラメータの数だけ軸をもつ多次元空間上に個々の細胞のプロットした。次に、多次元空間上の細胞間の距離を測定し、距離の一番近い細胞の組を最初の群にした。次に、この群の中心と他の群の中心との距離と、それぞれの群内の分散とを比較して、これらが同一の群から得られたサンプルと考えられる場合には群を併合して大きくしていった。その結果、大脳皮質紡錘形介在ニューロンは 3 つのグループに分類された。第 1 グループは、発火パターンが順応を示し、somatostatin を発現する細胞で全体の 20% を占めた。第 2 グループは発火パターンは順応を示すが第 1 群とは異なっており、VIP の発現頻度が高い細胞で 53% を占めた。第 3 グループは残りの 27% の細胞で、発火間隔はイレギュラーであった。この細胞でも VIP の発現頻度が高かった。

(19) シナプス活動依存的な神経細胞の生存・培養小脳顆粒細胞実験系の一般性と特殊性

小倉 明彦 (大阪大学大学院理学研究科)

中枢神経細胞は発生期に過剰数生産され、そのうち正しい結合を作って作動したものが生存し、誤ったものや不活動なものが死滅する「淘汰」の過程を経て完成していく、と想定されている。この「淘汰」過程を解析するための実験系として、ラット新生仔から分離・培養した小脳顆粒細胞 (CGN) が好んで用いられる。

ラット培養 CGN は、通常の培養培地では長期に生存せず、KCl やグルタミン酸などを添加して脱分極してやってみてはじめて生存する。この脱分極がシナプス活動の mimicry と見なされるわけだが、私たちは KCl 添加による持続的脱分極がシナプス活動と等価かとの疑問をもち、以下の検討を始めた。CGN は、生体内ではグルタミン酸作動性の苔状繊維入力を受けるが、苔状繊維の源の一つである橋の切片を容器内に並置したところ、切片から伸び出した繊維に接触した CGN は、KCl の添加なしに生存した。橋切片を同容器内に置いて、フィルターで隔離すると生存増進効果は見られなくなる。また、TTX やグルタミン酸阻害剤を添加しても、橋切片の生存増進効果は見られなくなる。したがって、橋繊維は CGN とシナプスを作り、興奮性シナプス活動によって CGN を生存させる、と見ることができる。しかし、同じグルタミン酸作動性神経でも、海馬切片の共存では、伸出した繊維に接触していても、CGN の生存率は上がらなかった。こ

れは、単にグルタミン酸が放出されてシナプス後細胞の脱分極が起これば生存に足る、というわけではない可能性を示唆する。

上はラット CGN の場合であるが、マウスの場合は事情が複雑である。C57Bl 系マウス CGN は、ラット CGN と同様に KCl 添加を必要とするが、BalbC 系マウスの CGN は KCl の添加なしに生存できる。これは、BalbC の CGN 同士がシナプスを作って自発的に活動するためかということ、そうとは限らず、BalbC の CGN はフィルターで隔離した C57Bl の CGN の生存をも増進させることができる。したがって、BalbC の CGN からは何らかの液性の生存因子が放出されていると見なされる。フィルターを透析膜に換えて共存培養を行い、この因子のおよその分子量を見積もると、3kD 以下となったが、グルタミン酸受容体阻害薬は無効なので、この因子はグルタミン酸そのものではない。ラット CGN の生存を増進する BDNF、NT3、PTHrP は無効なので、これらの既知因子やその断片でもない。

このように、活動依存的な神経生存機構の解析モデル系として頻用される培養 CGN の系も、さまざまな固有の事情をもっており、一つの系でえられた結論を一般化するには注意が必要である。

(20) 海馬錐体細胞における spontaneous EPSCs の in vitro 虚血負荷による二相性変化

田中 永一郎, 東 英穂 (久留米大学医学部第 1 生理学)

<目的>海馬 CA1 領域は虚血に対して最も脆弱な部位の一つで、虚血による選択的細胞壊死 (necrosis) には虚血時に異常放出された glutamate が関与すると考えられている。そこで、CA1 錐体細胞における evoked EPSC と spontaneous EPSCs に対する in vitro 虚血負荷の影響を調べた。

<方法>ラット海馬スライス標本を作成し、CA1 錐体細胞から 2M K-acetate 充填電極を用いて細胞内記録を、135mM CsSO<sub>4</sub> を主成分とする溶液を充填した電極を用いて Whole-cell patch-clamp を行なった。局所電気刺激は

タングステン電極を放射状層に留置して行ない、膜電位固定法を用いて evoked fast EPSC と spontaneous EPSCs を記録した。In vitro 虚血負荷は酸素・グルコース除去液の灌流投与で行なった。

<結果と結論>In vitro 虚血負荷を 4 分間与えると、CA1 錐体細胞の evoked fast EPSC 振幅はコントロールの 15% に抑制された。一方、glutamate 誘起内向き電流の振幅は in vitro 虚血負荷中に増加した。Evoked fast EPSC の抑制は adenosine 1 (A1) 受容体拮抗薬 (8-CPT, 0.3 - 10 μM) の前処置で拮抗された。これらの結果は、evoked fast

EPSC の抑制が A1 受容体を介するシナプス前性機序であることを示唆した。TTX (1  $\mu$ M) 存在下に spontaneous EPSCs を記録し, in vitro 虚血負荷を行うと, spontaneous EPSCs の振幅は変化しなかったが, 発生頻度は in vitro 虚血負荷後 2 分で減少し, 4 分で増加した。負荷 2 分後の発生頻度減少は A1 受容体拮抗薬の前処置で抑制されたが, 4 分後の発生頻度増加は A1 受容体拮抗薬では変化

せず, 細胞内  $Ca^{2+}$  放出抑制薬 (dantrolene, 20  $\mu$ M),  $Ca^{2+}$  誘起  $Ca^{2+}$  放出抑制薬 (ryanodine, 20  $\mu$ M) の前処置で抑制された。以上の結果は, in vitro 虚血負荷 2 分後の発生頻度減少が glutamate 含有神経終末上の A1 受容体活性化によって起こり, 4 分後の発生頻度増加は, 神経終末内で  $Ca^{2+}$  誘起  $Ca^{2+}$  放出が起こり,  $Ca^{2+}$  濃度が上昇するためと考えられた。

## 8. 中枢神経系における局所回路とその機能特性

2000年11月21日-11月22日

代表・世話人：三上 章允（京都大学霊長類研究所）

所内対応者：森 茂美（生理学研究所）

- ( 1 ) Local circuit in the cerebral cortex  
Takeshi Kaneko (Kyoto Univ., Japan)
- ( 2 ) Fast neuronal population oscillations in cortical networks in vitro  
Eberhard H. Buhl (Univ. of Leeds, UK)
- ( 3 ) Functional subdivisions of cortical neurons: Do interstitial cells in the white matter participate in the cortical circuit?  
Nobuaki Tamamaki (Kyoto Univ., Japan)
- ( 4 ) Anatomy, physiology, molecular and circuit properties of neocortical interneurons  
Henry Markram, Wang Yun, Anirudh Gupta & Maria Toledo (The Weizmann Institute of Science, Israel)
- ( 5 ) Depolarizing afterpotentials involved in rhythmogenesis in cortical pyramidal cells  
Youngnam Kang and Yo Kishi (Kyoto Univ., & Health Sci. Univ. of Hokkaido, Japan)
- ( 6 ) Electrophysiology and morphology of rat claustral neurons  
Hiroshi Shibuya and Tetsuro Yamamoto (Mie Univ., Japan)
- ( 7 ) Synaptic connections and synchronized firing of cortical interneurons  
Yasuo Kawaguchi, Yoshiyuki Kubota and Satoru Kondo (National Inst. for Physiol. Sci., & RIKEN, Japan)
- ( 8 ) Electrical synapses and networks of GABAergic neurons in the neocortex  
Shaul Hestrin and Mario Galarreta (Stanford Univ., USA)
- ( 9 ) Local circuit and representation of sound  
Wen-lie Song and Hideo Kawaguchi (Osaka Univ., & Hitachi, Ltd., Japan)
- ( 10 ) Classification of neuron types based on the firing patterns recorded in behaving monkeys  
Akichika Mikami, Keichiro Kato, Shunpei Unno and Yungnum Kang (Kyoto Univ., Japan)
- ( 11 ) Velocity and position guided orienting in unrestrained cats  
Shigeto Sasaki, Kazuya Yoshimura and Kimisato Natito (Tokyo Metropolitan Inst. for Neurosci., Japan)
- ( 12 ) Dynamic regulation of signal transmission in the local circuit of the superior colliculus  
Yasuhiko Saito and Tadashi Isa (National Inst. for Physiol. Sci., Japan)
- ( 13 ) Mutual inhibition in the premotor circuit controlling saccade  
Kaoru Yoshida, Y. Iwamoto, Sohei Chimoto and Hiroshi Shimazu (Univ. of Tsukuba, Japan)
- ( 14 ) Synchronous oscillatory activity of local field potentials and neurons in MI and SMA during bimanual movements of monkeys  
Takashi Kawashima, Thomas A. Knight and Eberhard E. Fetz (Gifu Univ., & Univ. of Washington, USA)
- ( 15 ) A new bipedally walking monkey model for the study of human bipedal locomotion  
Shigemi Mori, Futoshi Mori, Katsumi Nakajima, Atsumichi Tachibana, Masahiro Mori and Chijiko Takasu (National Inst. for Physiol. Sci., Japan)
- ( 16 ) Selective expression of Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptors in horizontal cells in the superficial layer of rat superior colliculus  
Endo, T. and Isa, T. (National Inst. For Physiol. Sci., Japan)

(17) Burst firing in layer III pyramidal neurons of cat sensorimotor cortex

Nishimura, Y., Shibuya, H., Asahara, T. and Yamamoto, T. (Mie Univ., Japan)

(18) Interaction of horizontal and vertical inputs to pyramidal cells in the superficial layers of the cat visual cortex

Sato, H., Yoshimura, Y., Imamura, K. and Watanabe, Y. (Osaka Univ., Osaka Biosci. Inst. & Nagoya Univ., Japan)

(19) Spatiotemporal interaction of response to multiwhisker stimulation in the barrel cortex neurons of rats

Shimegi, S., Akasaki, T. and Sato, H. (Osaka Univ., Japan)

(20) Functional Development of the Recurrent Inhibitory Network of the Mauthner Cell in Zebrafish larvae

Takahashi, M., Narushima, M., Murayama, Y. and Oda, Y. (Osaka Univ., Japan)

(21) Fluorescence imaging of the protein kinase C translocation in the hippocampal neurons

Tsubokawa, H. and Takagi, S. (National Inst. For Physiol. Sci., Japan)

(22) Calcium-sensitive cation current accompanying activation of nicotinic acetylcholine receptors

in rat mesopontine dopamine neurons

Yamashita, T. and Isa, T. (National Inst. For Physiol. Sci., Japan)

### 【参加者名】

E. Buhl (University of Leeds), H. Markram (University of California San Francisco), S. Hestrin (Stanford University), 森 茂美 (生理学研究所), 金子 武嗣 (京都大学大学院・医学研究科・高次脳科学講座), 玉巻 伸章 (京都大学大学院・医学研究科・高次脳科学講座), 姜 英男 (北海道医療大学), 山本 哲朗 (三重大学・医学部・生理学第二講座), 西村 嘉洋 (三重大学・医学部・生理学第二講座), 渋谷 浩司 (三重大学・医学部・生理学第二講座), 吉田 薫 (筑波大学・基礎医学系・生理), 川口 泰雄 (生理学研究所・大脳神経回路論研究部門), 根東 覚 (生理学研究所・大脳神経回路論研究部門), 窪田 芳之 (理化学研究所), 苅部 冬紀 (理化学研究所), 宋 文杰 (大阪大学・基礎工学部), 川口英夫 (日立基礎研究所), Oo HaiLiang (大阪大学・基礎工学部), 佐々木成人 (財) 東京都神経科学総合研究所・神経生理学部門, 内藤 公郷 (財) 東京都神経科学総合研究所・システム生理, 伊佐正 (生理学研究所・統合生理研究施設高次脳機能研究プロジェクト), 斎藤 康彦 (生理学研究所・統合生理研究施設高次脳機能研究プロジェクト), 遠藤 利朗 (生理学研究所・統合生理研究施設高次脳機能研究プロジェクト), 山下 哲司 (生理学研究所・統合生理研究施設高次脳機能研究プロジェクト), 坪川 宏 (生理学研究所・脳機能計測センター), 高木佐知子 (生理学研究所・脳機能計測センター), 深井 朋樹 (玉川大学・工学部), 川島 卓

(岐阜大学・医学部・反射研究施設), 三上 章允 (京都大学・霊長類研究所・行動神経研究部門), 海野 俊平 (京都大学・霊長類研究所・行動神経研究部門), 猿渡 正則 (京都大学・霊長類研究所・行動神経研究部門), 加藤啓一郎 (京都大学・霊長類研究所・行動神経研究部門), 山口 峻司 (山形大学・理工学研究科), 伊豆田 義人 (山形大学・理工学研究科), 増田 健 (山形大学・理工学研究科), 浜田 生馬 (財) 東京都神経科学総合研究所・神経生理学部門, 中村 泰尚 (東京医科歯科大学大学院・医歯学総合研究科・神経解剖学分野), 村越 隆之 (東京医科歯科大学・医学部・薬理), 田中 昌司 (上智大学), 佐藤宏道 (大阪大学・健康体育部), 七五三木聡 (大阪大学・健康体育部), 赤碓孝文 (大阪大学・健康体育部), 尾関宏文 (大阪大学・健康体育部), 田谷文彦 (大阪大学・健康体育部), 定金 理 (大阪大学・健康体育部), 木田 裕之 (大阪大学・健康体育部), 村越 隆之 (東京医科歯科大学・医学部・薬理学), 高橋 正治 (大阪大学・基礎工学部), 駒井 章治 (神戸大学・生理学第一講座), 武田 湖太郎 (慶應義塾大学・大学院理工学研究科・基礎理工学専攻), 林 民 (三重大学・医学部・生理学第二講座), 中世古幸成 (三重大学・医学部・生理学第二講座), 一戸 (弘前大学), 木村 (大阪大学), 青柳 (京都大学), 伊藤 (京都産業大学), 藤井 (京都産業大学), 伊藤 (愛知学院大学)

### 【概要】

中枢神経系では,異なる機能特性を持つ比較的少数の神経細胞の構成する規則的で局所的な回路が重要な役割

を演じている。局所的な神経回路は機能単位を構成し,この機能単位相互の情報交換と,遠方との神経結合によ

る情報交換が中枢神経系における複雑な情報処理の基礎となっている。このような過程の解明は、一人の研究者、一つの研究室で取り組むには膨大すぎる。本研究会では、分子から個体に至る異なる研究レベル、異なる手法による各研究室の取り組みを持ちより、中枢神経系における局所回路とその機能特性について討議し、こうした視点からの研究の推進を目指した。平成 10 年度から 3 年間の計画で取り組んだ研究会は、平成 12 年度、その最終年度に当たる。そこで今回は、文部省科学研究費特定領域研究 A「脳研究の総合的推進に関する研究」の支援を受け、3 人の海外からの参加者を招聘し、発表と討

論はすべて英語で行った。海外からの参加者が現在活躍中の第一級の研究者であったことも幸いし、多くの参加者を得て活発な討論が行われた。特に Henry Markram の膨大なデータと細胞タイプの詳細な分類には圧倒された。また、口頭発表のほかポスター発表も行い、若い研究者を中心に海外からの参加者や他の研究室の研究者との交流の場となった。本研究会が当初目指していた大型の研究プロジェクトの実現は起動に乗らなかったが、研究会の中から共同研究なども育ち、神経回路に依拠した機能研究の推進に一定の役割を果たすことができた。

### (1) Local circuit in the cerebral cortex

T. Kaneko (Department of Physiology, Faculty of Medicine, Kyoto University)

To reveal the mechanism of information processing in the cerebral cortex, we focused on the morphological analysis of its intrinsic circuitry. Recently, we developed a retrograde neuronal tracing method with Golgi-like somadendritic filling. By combining this method with the intracellular staining technique, local connection from layer III pyramidal cells to corticospinal and corticothalamic projection neurons were examined in the motor cortical slices of the rat.

Forty layer III pyramidal neurons stained intracellularly were of the regular spiking type, showed immunoreactivity for glutaminase, and emitted axon collaterals arborizing locally in layers II/III and/or V. Nine of them were reconstructed for morphological analysis; 15.2% or 3.8% of varicosities of axon collaterals of the reconstructed neurons were apposed to dendrites of corticospinal or corticothalamic neurons, respectively. By con-focal laserscanning and electron microscopy, some of these appositions were revealed to make synapses. These findings indicate that corticospinal neurons

receive information from the superficial cortical layers 4-fold more efficiently than corticothalamic neurons.

The connections were further examined by intracellular recording of excitatory postsynaptic potential (EPSP) that were evoked in layer V and layer VI pyramidal neurons by stimulation of layer II/III. EPSPs evoked in layer V pyramidal neurons showed short and constant onset latencies, suggesting their monosynaptic nature. In contrast, most EPSPs evoked in layer VI pyramidal neurons had long onset latencies and showed double-shock facilitation of onset latency, implying that they were polysynaptic.

The results suggest that information of the superficial cortical layers is transferred directly and efficiently to corticospinal neurons in layer V and thereby exerts an important influence on cortical motor output. Corticothalamic neurons are, in contrast, considered relatively independent of or indirectly related to information processing of the superficial cortical layers.

### (2) Fast neuronal population oscillations in cortical networks in vitro

Eberhard H. Buhl (The School of Biomedical Sciences, University of Leeds, United Kingdom)

Many neurons in the CNS are endowed with oscillatory

properties which allow them to discharge rhythmically

and, thus, entrain their neighbours and distant projection targets alike. However, rhythmic population oscillations may also arise as an emergent property of a neuronal network which is suitably interconnected with electrical and/or chemical synapses. It is feasible to analyse the timing of action potentials and synaptic events in pyramidal cells and interneurons by using the concomitantly recorded extracellular field as a temporal reference. It thus emerges that the discharge probability of pyramidal neurons increases concomitantly with the decay of inhibitory currents /potentials. While there is little doubt with respect to the role of synaptic mechanisms in governing the generation of synchronous activity, equally compelling evidence has been accruing that, in the absence of synaptic communication, gap junction-mediated electrical signalling is effective in gen-

erating network oscillations. Spontaneous, ultrafast (~200 Hz) ripples can, for example, be observed in hippocampal tissue *in vitro*. Moreover, transient depolarizations with high-molarity potassium solutions can trigger fast (~100 Hz) synchronous network activity in either nominally calcium-free solutions or the presence of GABA and glutamate receptor antagonists. Interestingly, when leaving synaptic transmission intact, such fast rhythms appear to be nested (i.e. phase-locked) in a slower gamma frequency population oscillation. These data therefore support the notion of non-synaptic (presumably a mixture of electrical and ephaptic effects) and synaptic mechanisms showing a complex interplay in the generation of complex neuronal rhythms which frequently, both *in vivo* and *in vitro*, span more than a single EEG frequency band.

### (3) Functional subdivisions of cortical neurons:

#### "Do interstitial cells in the white matter participate in the cortical circuit?"

Tamamaki, N. (Department of Morphological Brain Science, Graduate School of Medicine, Kyoto University)

Interstitial cells in the white matter of the neocortex is a remnant population of early generated neurons found in the intermediate zone of the developing neocortex of the rat. Most of these early generated neurons were reported as GABAergic neurons and might work as pioneer neurons projecting subcortically. Most of those early generated neurons were eliminated by cell death after birth. However, some of them remained in the white matter and retained axons and dendrites. We revealed the axon and dendritic

arbors of these interstitial cells by recombinant adenovirus infection followed by modified-GFP expression. We could divide the interstitial cells into two types and one of them were Martinotti cells. The other type was not described so far and regarded a new type of inter neurons of the neocortex. The new type of the interstitial cells had an axon arborized preferentially in the white matter. The terminals may be targeting on edges of basal dendrites or axons in the white matter.

### (4) Anatomy, Physiology, Molecular and Circuit Properties of Neocortical Interneurons

Henry Markram, Wang Yun, Anirudh Gupta & Maria Toledo

(Department of Neurobiology, The Weizmann Institute of Science, Israel)

Interneurons comprise a small fraction of the total neurons of the neocortex, but are critical for normal function. In this study we examined in detail a large number of interneurons in the somatosensory cortex of rats and developed methods to allow objective classification of

different types of interneurons in terms of their anatomy and physiology. Five major anatomical classes were examined: Large Basket Cells, Nest Basket Cells, Small Basket Cells, Martinotti Cells and Bitufted Cells. We derived a comprehensive morphology code (mCode) that was

used to examine the similarities and differences between LBCs, NBCs and SBCs. Clear anatomical identification of interneurons allowed examination of electrophysiological subtypes and we found that most interneurons expressed 1-5 subtypes of electrophysiological behaviors. We further examined the molecular expression patterns of these anatomical subtypes, and found that most subtypes expressed in 2-5 different ways. We also ventured to estimate the extent of the diversity of interneurons. In total, we predict that at least 15 anatomical classes of interneurons exist in each of layers 2-6, with an average of 3 electrophysiological subtypes each and of these a further

average of 4 molecular subtypes each. This suggests that each neocortical layer could contain around 180 different types of interneurons. The distribution of different types of interneurons varies from 1:1 to 1:20 with an average of around 1:5, indicating that around 675 interneurons are required in a given layer to provide comprehensive diversity of interneurons. The ratio of interneuron numbers across layers also varies on average 2 fold, suggesting that a column of cortex would need to hold around 9,000 interneurons or around 76,000 neurons. This is equivalent to about 7 cortical columns of diameter  $300 \text{ mm}^2$  or  $0.63 \text{ mm}^2$  of cortical surface.

### (5) Depolarizing afterpotentials involved in rhythmogenesis in cortical pyramidal cells

Youngnam Kang (Department of Physiology, Faculty of Medicine, Kyoto University,  
Department of Oral Physiology, Faculty of Dentistry, Hokkaido Health Science University),  
Yo Kishi (Department of Physiology, Faculty of Medicine, Kyoto University)

Regular spiking cortical pyramidal cells often display an early depolarizing spike afterpotentials (early DAP) immediately following spike repolarization, and an enhancement of the DAP led to a generation of fast rhythmic burst firing (FRB). This FRB is generally thought to underlie gamma-band EEG oscillation. On the other hand, the late DAP is also seen following spike-AHP in regular spiking pyramidal cells when metabotropic glutamate or muscarinic receptors are activated. This late DAP has been suggested to be associated with theta EEG rhythm. We have investi-

gated the ionic mechanisms underlying these early and late DAPs. The data suggest that the enhancement of the early DAP is mediated by an enhancement of the sensitivity of cationic channels to  $\text{Ca}^{2+}$  through the activation of CaMKII. On the other hand, we conclude that in the presence of muscarine, calcium influx through voltage-gated calcium channels triggers IP3 induced calcium release leading to a generation of calcium-dependent late DAP and excessive calcium influx results in a suppression of the late DAP through inactivation of IP3-receptors by the calcium-calmodulin complexes.

### (6) Electrophysiology and morphology of rat claustral neurons

Hiroshi Shibuya and Tetsuro Yamamoto (Department of Physiology, Faculty of Medicine, Mie University)

The electrophysiological and morphological properties of constituent neurons and fiber connections of the rat rostral claustrum gave some suggestions about its ontogenetic origin and function. All recorded neurons had action potentials with much higher maximum rates of rise than that of fall, and spike-frequency adaptation during long depolarizing pulses that could be classified as slow- and

fast-adapting, similar to the regular type reported in the neocortex. The somata of the claustral neurons resembled those of cortical layer VIb cells characterized by diversity. In addition, some of the dendrites of these extended toward the superficial layers of the ventrolateral and lateral orbital cortex (VLO/LO), and arborized profusely in the claustral partition and the VLO/LO. Furthermore, some single neu-

rons of the claustrum were shown to send their stem axons and collaterals to the VLO/LO, the agranular motor cortex (AgMCx) and other cortical areas by double staining with fluorescent dyes and intracellular staining. These findings strongly suggest that the rostral claustrum is a part of the layer VI of the adjacent cerebral cortex, i.e., VLO/LO, shares

input to the VLO/LO in addition to input to the claustrum itself, and integrates these two inputs. Considering the gelatino-orbital projection and connections among the claustrum, VLO/LO and AgMCx, the rostral claustrum may be an important region that integrates the affective-motivational aspects of pain and behavior.

### (7) Synaptic connections and synchronized firing of cortical interneurons

Yasuo Kawaguchi, Satoru Kondo (National Institute for Physiological Sciences)

Yoshiyuki Kubota (Bio-Mimetic Control Research Center, RIKEN)

GABAergic interneurons in the rat frontal cortex are divided into 2 groups according to the intrinsic firing pattern: FS (fast-spiking) cells and non-FS cells. FS cells show abrupt episodes of nonadapting repetitive discharges of short-duration spikes and are immunoreactive for parvalbumin. Non-FS cells are further classified on the basis of neuropeptide and calretinin content. Somatostatin cells include Martinotti cells with ascending axonal arbors, innervating thin dendritic branches or spines. VIP and/or calretinin cells include double bouquet cells with descending axonal arbors innervating dendrites. Large CCK cells have axonal arbors making multiple boutons on other cell bodies. In addition to intracortical synaptic connections, modulatory subcortical inputs may be

also different among the GABA cell subtypes. Carbachol or muscarine affects the activities of peptide-containing GABAergic cells more than parvalbumin FS cells. Somatostatin or VIP cells are depolarized with spike firing, whereas large CCK basket cells are hyperpolarized. Continuous application of carbachol or muscarine induces two patterns of the increases of inhibitory postsynaptic currents in cortical cells: continuous and periodic ones. The periodical increase induced by carbachol or muscarine was synchronized among cortical cells. A few nonpyramidal cells showed the slow periodical discharges in response to carbachol. Cholinergic afferents from the basal forebrain may affect cortical activities through GABA cell subtypes differentially.

### (8) Electrical Synapses and Networks of GABAergic Neurons in the Neocortex

Shaul Hestrin & Mario Galarreta (Stanford University, USA)

It has been suggested that GABAergic axo/dendritic and axo/somatic interactions among inhibitory neurons are critical in coordinating cortical activity. However, synaptic interactions among GABAergic cells and their relation to coordinated activity are only poorly understood. We have addressed these issues by recording simultaneously from pairs of fast-spiking (FS) cells, a kind of GABAergic neocortical interneurons. The FS cells were immunoreactive to parvalbumin and had local and horizontal axon projections making inhibitory contacts with both pyramidal neurons as well as other inhibitory neurons. We have found that in addition to GABAergic chemical

synapses FS cells were electrically coupled. Electrical synapses appear to be cell-type specific. We have not found evidence of electrical coupling among pairs of neighboring pyramidal neurons. Moreover, we have not found electrical synapses between FS cells and other types of neocortical cells. When both chemical and electrical transmission were present between two FS cells, a presynaptic spike generated a dual component response in the postsynaptic cell. The peak of the electrical synapse mediated response occurred earlier than that of the GABAA-receptor mediated IPSP. We found that the efficacy of signal transmission through

electrical synapse is frequency-dependent. Thus, we have directly demonstrated extensive electrical coupling among neocortical FS cells. The high degree of connectivity could establish a functional network of specific type of neurons

within the neocortex. Given that inhibitory neurons control other neurons these networks could organize cortical activity and promote synchrony.

### (9) Local circuit and representation of sound

Wen-Jie Song (Dept of Electronic Engineering, Osaka University)

Hideo Kawaguchi (Advanced Research Laboratory, Hitachi Ltd.)

Sound is decomposed in the cochlea into different frequency components. Each frequency component is detected by hair cells at a specific point of the basilar membrane. Components of lower frequencies are represented by the basilar membrane region close to the base of the cochlea, and components of higher frequencies are represented at regions close to the apex. Such spatial representation of sound frequency is often referred to as tonotopy. Tonotopy is maintained all through the central auditory pathway up to the

cortex. In the cortex, neurons of the same characteristic frequency tend to stay together, along a dorso-ventral axis, forming an isofrequency stripe. Traditionally, isofrequency stripes in the cortex have been thought to be formed due to topographic projection from the thalamus, along the frequency axis and along the isofrequency dimension. In our report, we show evidence that cortical local circuits contribute significantly to the formation of isofrequency stripes.

### (10) Classification of neuron types based on the firing patterns recorded in behaving monkeys

Akichika Mikami, Keichiro Kato, Shunpei Unno (Primate Research Institute, Kyoto University)

Youngnam Kang (School of Medicine, Kyoto University, Health Sciences University of Hokkaido)

In order to develop a new approach to classify neuron types applicable for the data taken in behaving monkeys, we measured the amplitudes of spikes, the duration of spikes, the inter-spike intervals and number of spikes within the bursting activities recorded in the frontal cortex of behaving monkeys. Following the results of the cluster analysis we could identify fast spiking (FS), fast rhythmic bursting (FRB) and intrinsic bursting (IB) neurons. FS neurons were characterized by shorter and relatively constant ISI (<5ms) and larger number of spikes (>6 spikes, often >10 spikes). FRB neurons were characterized by shorter and relatively

constant ISI (<5ms) and smaller number of spikes (<6 spikes, usually 2 or 3 spikes) within a burst. In addition, FRB neurons often showed 20-80 Hz fast rhythmic burst, which is consistent with the characteristics of FRB neurons reported previous studies. IB neurons were characterized by longer and variable ISI (fluctuating between 4-12 ms) and smaller number of spikes (<6 spikes, usually 2-4 spikes) within a burst. The data suggested the possibility to use this approach to analyses neuronal circuits related the behavior.

### (11) Velocity and Position Guided Orienting in Unrestrained Cats

Sasaki S., Yoshimura, K., Naito, K. (Dept. of Neurophysiology, Tokyo Metropolitan Institute for Neuroscience)

Moving and stationary visual stimulus may lead to elicit different types of orienting, because the moving visual stimulus activates retinal neurons sequentially along the trajectory of the moving stimulus, while the stationary stimulus activate neurons in a restricted area on which the the object projected on. We, thus, attempted to characterized the differences of orienting elicited by moving and stationary stimuli. Cats were trained to stand in a small box and to fixate at a light spot projected on a center of the panel and were required to orient to the light spot which jumped from the fixation point to a target or moved with various speed in a ramp-hold manner. When a light spot

jumped from a fixation point to a target, cats first moved their heads slowly toward the target with concomitant controversial eye movements due to the vestibulo-ocular reflex, resulting in a flat gaze traces and then made rapid head movements and saccades toward the target. Latencies of head movements were 100-200 ms. Switching from jumping to moving visual stimuli produced pronounced shortening of latencies of orienting and increases of head and gaze velocities. These results suggesting that there are two types of orienting, i.e., position guided and velocity guided orienting, which utilize position and velocity information of visual stimuli, respectively.

## (12) Dynamic regulation of signal transmission in the local circuit of the superior colliculus

Yasuhiko Saito & Tadashi Isa (Dept. Integrative Physiology, National Institute for Physiological Sciences)

To understand the mechanisms of generation of motor commands in the superior colliculus (SC), we investigated activation properties of neurons in the intermediate layer (SGI) using whole-cell patch clamp technique in the SC slices obtained from 17- to 22-day old rats. In the presence of bicuculline (Bic, 10  $\mu$ M), a single shock stimulation of the optic tract (OT) often induced the long-lasting depolarization with repetitive firings in SGI neurons. Moreover, when a local stimulation was applied in a small rectangle piece of slice isolated from the SGI, the SGI neurons in the rectangle exhibited the repetitive firings, suggesting the existence of

neural elements within the SGI, which yielded bursting properties when GABAergic inhibition was removed. To further investigate the structure of local excitatory connections in the SGI, we performed simultaneous recordings from a pair of SGI neurons. Application of Bic in addition to reducing extracellular  $Mg^{2+}$  induced synchronous spontaneous depolarization (> 20 mV) of neurons in the SGI frequently even when the two SGI neurons did not show the direct synaptic connections. All these results suggest that the local excitatory connections of the SGI neurons may be important in generation of the bursting motor command in the SGI.

## (13) Mutual inhibition in the premotor circuit controlling saccade

Yoshida, K., Iwamoto, Y., Chimoto, S. and Shimazu, H. (Department of Physiology, Institute of Basic Medical Sciences, University of Tsukuba, and CREST of JST)

The brain stem neural circuit that generates saccadic eye movements contains two essential classes of neurons, burst neurons (BNs) and omnipause neurons (OPNs). Since OPNs make direct inhibitory connections with BNs, it is believed that the duration of the BNs discharge is controlled by a pause of OPNs. Intracellular recordings were made from OPNs in

alert cats to elucidate postsynaptic events during saccades and thereby determine what patterns of afferent discharge impinge upon OPNs to cause their pause. The membrane potential of OPNs showed steep hyperpolarization in association with each saccade. The results indicate that the pause of activity in OPNs is initiated by an abrupt inhibition and maintained till

the end of the saccade by afferents encoding eye velocity signals. We suggest that the eye velocity-related afferents originate from BNs and that powerful mutual inhibitory

interactions between BNs and OPNs generate their complementary discharge patterns.

#### (14) Synchronous oscillatory activity of local field potentials and neurons in MI and SMA during bimanual movements of monkeys

Takashi Kawashima (Dept. Neurophysiol. Inst. of Equilibrium Res., Gifu Univ. Sch. of Med & Dept. physiol. and Biophys. and Regional Primate Res. Ctr., Univ. of Washington)

Thomas A. Knight, Eberhard E. Fetz (Dept. physiol. and Biophys. and Regional Primate Res. Ctr., Univ. of Washington)

Simultaneous local field potential (LFP) were recorded in the right and left primary cortex (M1) and supplementary motor cortex (SMA) and parietal cortex (Area7) of two macaca nemestrina performing visually guided bimanual tracking task. All LFPs showed oscillation at 20-40Hz that could become bilaterally synchronous during the bimanual movements. Averaged cross-correlation coefficient (ACCC) between the recording sites were compared in three behavioral states: 1) pre-movement periods, 2) during the bimanual tracking periods and 3)reward periods. Regarding the hemilateral connection, the values of ACCC were arranged in order

SMA-Area7 > SMA-MI > MI-Area7 in both hemispheres in any of these behavioral periods. Regarding the bilateral connection, no significant changes of ACCC were observed in SMA and MI between pre-movement and the bimanual tracking periods. In the reward period the coefficient values were highest in any recording sites. In addition to the ordinary averaging method, time course analysis of cross correlation of LFPs were also executed. Bilateral oscillatory synchronous activities of LFPs were observed in M1 and SMA in accordance with a rapid initiation or cessation of bimanual movements.

#### (15) A new bipedally walking monkey model for the study of human bipedal locomotion

Shigemi Mori, Futoshi Mori, Katsumi Nakajima, Atsumichi Tachibana, Masahiro Mori, and Chijiko Takasu (Department of Biological Control System, National Institute for Physiological Sciences)

To advance understanding of the CNS mechanisms in the human which control and integrate posture and bipedal locomotion, it is desirable to establish a non-human primate model. With such a model, it is possible to apply the state-of-the-art techniques of modern neuroscience to the problem of developing testable hypotheses on relevant CNS control mechanisms. By use of long-term operant conditioning, we have recently trained the normally quadrupedal young Japanese monkey (*M. fuscata*; estimated age; 3 to 4 years old) to stand upright and walk bipedally on a moving treadmill belt. After 3 to 4 months of regular locomotor training, they acquired a novel strategy of walking bipedally. With

continuation of the locomotor learning together with monkey's physical growth over time, the monkeys refined gradually their walking patterns with less fluctuation of body axis. We have already shown that the kinematic features of our model's bipedal treadmill walking resemble those used in human locomotion. We have also found that bipedally walking monkeys can clear the obstacles attached on the moving treadmill belt with the larger flexion of hip and ankle joints than that observed during treadmill locomotion without an obstacle. When the monkey failed to clear the obstacle and stumbled, it adopted a defensive posture with rapid extension of the forelimbs forward and

downward with lowering of the center of body mass to the treadmill surface. Our result indicates that "integrated" interactions of multiple body segments such as head, body, forelimbs and hindlimbs are necessary for preventing "stumbling" from "falling". All these results suggest that the monkey walking bipedally on a moving treadmill belt acquired a hip-knee strategy of recruiting and integrating both anticipatory and reactive neural mechanisms in the CNS to accomo-

date its posture and locomotion to the external perturbations. Our new model monkey seems to employ CNS mechanisms similar to those in human subjects. With the use of non-invasive method such as positron emission tomography (PET), we are now exploring the potential CNS mechanisms and operating principles for the elaboration of monkey's bipedal locomotion with an upright posture.

#### (16) Selective expression of $\text{Ca}^{2+}$ -permeable ampa receptors in horizontal cells in the superficial layer of rat superior colliculus

Toshiaki Endo, Tadashi Isa (Department of Integrative Physiology, National Institute for Physiological Sciences)

Rectification property and  $\text{Ca}^{2+}$ -permeability of AMPA-type glutamate receptors were investigated in six morphologically identified subclasses of neurons in the superficial layer of the superior colliculus (sSC) by whole-cell patch clamp recording technique in slice preparations obtained from rats (PND17-23). Both outwardly rectifying and inwardly rectifying current responses were observed to pressure application of kainate (KA). These currents were completely abolished by 100 mM GYKI 52466, indicating that the KA-induced currents were mediated by AMPA-type glutamate receptors. The inwardly rectifying KA responses

were suppressed by 1 mM spermine. The degree of inward rectification was inversely correlated with the reversal potential of KA responses in the isotonic  $\text{Na}^+$ -free, high  $\text{Ca}^{2+}$  solution, indicating  $\text{Ca}^{2+}$ -permeability was higher in inwardly rectifying AMPA receptors. The inwardly rectifying and  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable AMPA receptors were observed in a large proportion of horizontal cells with extensive dendritic arborization in the tangential direction. These results suggest that  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable AMPA receptors have specific role in regulation of lateral interaction in the visual field map in the sSC.

#### (17) Burst firing in layer III pyramidal neurons of cat sensorimotor cortex

Yoshihiro Nishimura, Hiroshi Shibuya, Toshihiro Asahara and Tetsuro Yamamoto (Department of Physiology, Faculty of Medicine, Mie University)

The ionic mechanisms underlying burst firing in layer III neurons from cat sensorimotor cortex were examined by intracellular recording in a brain slice. Regular spiking was observed in 77.4 % of 137 neurons in response to constant intracellular current pulses. The rest of the neurons showed burst firing. An initial burst followed by regular-spike firing was observed in 71.0 % of 31 bursting neurons. The rest of the bursting neurons ( $N=9$ ) showed repetitive bursting. In the bursting neurons, spikes were triggered from the

afterdepolarization (ADP) of the 1st spike of burst. The ADP was enhanced by a blockade  $\text{Ca}^{2+}$  channel. This enhanced ADP by  $\text{Ca}^{2+}$  channel blockade was apparent after blockade of the afterhyperpolarization by apamin or intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  chelation by EGTA. These agents switched the regular spiking pattern into a bursting one, but could not change a burst firing into a regular spiking. Four neurons responding with a single initial burst in control solution responded with repetitive bursting after application of these agents. The

ADP was blocked and the burst firing changed to regular spiking by tetrodotoxin (TTX) or intracellularly applied QX314. We concluded that a TTX- and QX314- sensitive

Na<sup>+</sup> current underlies the ADP and contributes to the burst firing of layer III neurons from the cat cortex.

### (18) Interaction of horizontal and vertical inputs to pyramidal cells in the superficial layers of the cat visual cortex

Hirohichi Sato (School of Health and Sport Sciences, Osaka University)

Yumiko Yoshimura (Department of Neuroscience, Osaka Bioscience Institute & Department of Visual Neuroscience, Research Institute of Environmental Medicine, Nagoya University)

Kazuyuki Imamura and Yasuyoshi Watanabe (Department of Neuroscience, Osaka Bioscience Institute)

The purpose of this study is to elucidate the integrative input mechanisms of pyramidal cells receiving horizontally projecting axon collaterals (horizontal projection) and vertical input from layer IV. We performed whole-cell recordings from pyramidal cells in layer II/III and focally activated other single pyramidal cells monosynaptically connected via long-distance horizontal (LH) projections (the distance between pre- and post-synaptic cells was 350-1200  $\mu$ m) in slice preparations of the kitten primary visual cortex. In addition, presynaptic single fibers in layer IV (vertical input) and/or short-distance horizontal (SH) inputs from neighboring single pyramidal cells (distance within 100  $\mu$ m) in layer II/III were activated. Unitary excitatory postsynaptic

potentials (EPSPs) evoked by the activation of LH and SH connections had smaller amplitude and larger coefficient of variation than those evoked by stimulating the vertical input. Paired-pulse stimulation of the LH and SH inputs caused the depression of the second EPSP, whereas that of vertical inputs caused either facilitation or depression of the second EPSP. The EPSPs evoked by simultaneous activation of LH and vertical inputs summated linearly at the resting membrane potential. However, the EPSPs evoked by stimulation of the two inputs were nonlinearly (supralinearly) summated when the postsynaptic membrane was depolarized to a certain level. Similar EPSP interaction was observed in response to simultaneous activation of the LH and SH inputs.

### (19) Spatiotemporal interaction of response to multiwhisker stimulation in the barrel cortex neurons of rats

Satoshi Shimegi, Takafumi Akasaki, Hirohichi Sato (School of Health and Sport Sciences, Osaka University)

To understand the physiological properties and anatomical organization of the spatiotemporal interaction of the responses to multiwhisker stimulation in neurons of the rat barrel cortex, single-unit recordings of 114 neurons were performed across all layers (layer II/III, n = 39; IV, n = 33; V/VI, n = 42) of the barrel cortex of anesthetized rats. Two neighboring principal and adjacent whiskers (PW and AW, respectively) in the same row were deflected rostrally or caudally at varying interstimulus intervals (ISIs). In 37% of the cells tested, multiwhisker stimulation exhibited response facilitation; the response to the combined stimulus was larger than the sum of the responses

to stimulation of the individual whiskers. Among them, 75% and 60% were selective for the combination of the PW with a particular AW and for a particular direction of whisker deflection, respectively. Most cases of facilitation were observed at short ISIs (<4 msec). Multiwhisker stimulation at longer ISIs (>8 msec) caused a suppression of the response to the second whisker stimulation. Facilitation was evoked predominantly in layer II/III cells (69%) and most of them were located close to the border between two columns, where strong excitatory inputs from the adjacent column were expected. Our results suggest that the spatiotemporal patterns of

multiwhisker stimulation, such as whisker combination, direction of deflection and timing, are expressed as different pattern and magnitudes of response interaction, which

depends on the location of the recorded cell including proximity of cells to home and adjacent barrel columns and lamination.

## (20) Functional Development of the Recurrent Inhibitory Network of the Mauthner Cell in Zebrafish larvae

Masaharu Takahashi (Lab. of BrainScience, Div. of Biophysical Engineering, Grad. Sch. of Engineering Science, Osaka Univ., JSPS Research Fellow)

Madoka Narushima, Yoshinobu Murayama (Lab. of BrainScience, Div. of Biophysical Engineering, Grad. Sch. of Engineering Science, Osaka Univ.)

Yoichi Oda (Lab. of BrainScience, Div. of Biophysical Engineering, Grad. Sch. of Engineering Science, Osaka Univ., and PRESTO 21)

Output of neuronal activity is restrained by the local network. The Mauthner (M-) Cell, a large reticulospinal neuron in the hindbrain, generates a single action potential that initiates the fast escape behavior of teleost fish from a sudden aversive stimulus. Activation of the single action potential of the M-cell in the adult goldfish is controlled, at least in part, by recurrent inhibition of the M-cell mediated through glycinergic interneurons. In the present study, we examined when the feedback circuit is established, with using confocal Ca imaging of the M-cell in the intact zebrafish larvae. The M-cells were retrogradly labeled with a fluorescent calcium indicator, Calcium Green Dextran, injected at the spinal cord of zebrafish 4-16 days post fertilization (dpf).

Stimulation of the spinal cord induced increase in fluorescence intensity in all-or-none manner, indicating antidromic (AD) activation of the M-cell. The intensity of the Ca response was reduced ( $88.6 \pm 3.3\%$ ,  $n=19$ ) when the second AD spike was evoked at 5ms after the first spike during the period of recurrent inhibition. Applying a glycine antagonist, strychnine, blocked the reduction of Ca response. Thus, the reduction of Ca response observed in zebrafish 4-16dpf indicates the shunt of AD spike produced by the inhibitory conductance of the M-cell recurrent network. These results suggest that recurrent inhibition of the M-cell becomes functional in zebrafish larvae before 4dpf.

## (21) Fluorescence imaging of the protein kinase C translocation in the hippocampal neurons

H. Tsubokawa and S. Takagi (National Institute for Physiological Sciences)

In neurons of the CNS, little is known about spatial and temporal profiles of the PKC activation in relation to neuronal activities. In this study, we tried to detect translocation of the PKC, which is followed by binding to the substrates. A combination of intracellular recording and fluorescence imaging was applied to CA1 pyramidal neurons of mouse hippocampal slices. Cells were loaded with 50  $\mu$ M fim-1, PKC-binding dye, through a patch-pipette. Bath application of 100 nM phorbol 12-myristate 13-acetate, an activator of the PKC,

reversibly changed the spatial pattern of the fim-1 fluorescence. The fim-1 fluorescence transiently decreased, then a bright area appeared around the cell membrane regions within 15 min. During this period, the amplitude of EPSCs induced by stimulation of Shaffer collateral / commissural fibers increased, and the paired pulse facilitation of the EPSCs was reduced. Train of action potentials induced similar transient decreases in the fim-1 fluorescence with increases in  $[Ca^{2+}]_i$ . In the presence of PKC inhibitors, pharmacological or electrical

stimulation did not induce significant changes in the spatial patterns of the fim-1 fluorescence without affecting changes in  $[Ca^{2+}]_i$ . These results suggest that optical imaging of

fim-1 fluorescence is useful for detecting activation of the PKC in specified neurons in the brain slice preparation.

## (22) Calcium-sensitive cation current accompanying activation of nicotinic acetylcholine receptors in rat mesopontine dopamine neurons

Tetsuji Yamashita, Tadashi Isa (Department of Integrative Physiology, National Institute for Physiological Sciences)

The mesopontine dopamine neurons receive cholinergic inputs from the pedunculo-pontine nucleus as a main excitatory input. We analyzed the current responses of dopamine neurons to the puff application of acetylcholine (ACh; 1mM) using whole cell patch clamp recording in the midbrain slices obtained from rats (PND 12-17) and clarified three points as follows; 1. The puff application of ACh induced fast inward current which was suppressed by mecamylamine, suggesting that the current was mediated by nicotinic ACh receptors (nAChRs). 2. The ACh-induced current was partially suppressed by flufenamic acid (FFA; 200 mM), an antagonist of  $Ca^{2+}$ -activated nonselective cation channels (CAN channels). However, FFA did not suppress the ACh-induced current in the  $Ca^{2+}$ -free extracellular

solution. These results suggested that we could exclude the possibility FFA suppressed the nAChR-mediated current itself, but instead FFA suppressed the  $Ca^{2+}$ -dependent current secondarily activated by the nAChR-mediated current. 3. Suppression of the ACh-induced current by FFA could be observed under the presence of thapsigargin (1mM), suggesting that the  $Ca^{2+}$  influx through the nAChRs could directly activate the FFA-sensitive current, presumably mediated by CAN channels. We have concluded that the ACh-induced current in the dopamine neurons contains FFA-sensitive  $Ca^{2+}$  dependent current that is subsequently activated by the  $Ca^{2+}$  influx through the nAChRs.

## 9. 定量的高分解能電子顕微鏡法

2000 年 11 月 21 日- 11 月 22 日

代表・世話人：藤吉好則（京都大学大学院理学研究科）

所内対応者：永山國昭（生理学研究所超微小形態生理）

- ( 1 ) Visualizing the strong binding state of myosin S1 to actin: Detecting structural changes in an 18 Å 3D reconstruction of decorated actin from Filter-Cryo-Electron Microscopy  
R.R. Schroeder ( Max Planck Institute for Medical Research)
- ( 2 ) 筋肉の細いフィラメントの Ca 制御の分子機構  
若林健之, 成田哲博, 安永卓生, 石川 尚, 真柳浩太 (東京大 理)
- ( 3 ) 機能中の蛋白質 1 分子の構造を探索  
片山栄作・小山智宏\*・宮林信治\*・市瀬紀彦・馬場則男\*  
( 東京大学医科学研究所・\*工学院大学 電気工学科)
- ( 5 ) 水チャネルアキュポリン 1 の電子線結晶構造解析  
村田和義<sup>1</sup>, 光岡 薫<sup>2</sup>, 平井照久<sup>2</sup>, Thomas Walz<sup>3</sup>, Peter Agre<sup>4</sup>, J. Bernard Heymann<sup>5</sup>, Andreas Engel<sup>5</sup>, 藤吉好則<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>生理研, <sup>2</sup>京大理, <sup>3</sup>Harvard Medical School, <sup>4</sup>Johns Hopkins University, <sup>5</sup>Univ. Basel)
- ( 6 ) ニコチン性アセチルコリンリセプターの構造解析  
宮澤淳夫 (理化学研究所・播磨研究所)
- ( 7 ) Structural Biology と顕微鏡の解像力  
濱 清 (生理学研究所)
- ( 8 ) 単量体分子モーター KIF1A の構造と作動機構  
吉川雅英\*, Elena P. Sablin#, 岡田康志\*, Robert J. Fletterick#, 廣川信隆\*  
( \*東京大・医学・細胞生物/解剖, #カリフォルニア大学サンフランシスコ校, 生化学・生物物理)
- ( 9 ) カベオリンと細胞膜ドメインの形成  
藤本豊士 (名古屋大学大学院医学研究科)
- ( 10 ) 神経成長円錐伸長機構とシナプス接着機構  
溝口 明 (京都大, 大学院, 生体構造医学講座)
- ( 11 ) 電圧感受性 Na チャネルの 3 次元構造の単分子解析法による再構成  
佐藤主税<sup>A</sup>, 上野 豊<sup>A</sup>, 高橋勝利<sup>B</sup>, 浅井 潔<sup>A</sup>, 佐藤雅彦<sup>C</sup>, Andreas Engel<sup>D</sup>, 藤吉好則<sup>E</sup>  
(<sup>A</sup>電総研, <sup>B</sup>北陸先端大, <sup>C</sup>伊藤ハム・中研, <sup>D</sup>univ. Basel, MIH, <sup>E</sup>京大・生物物理)
- ( 12 ) 筋肉の細いフィラメントの Ca 制御の分子機構  
若林健之, 成田哲博, 安永卓生, 石川 尚, 真柳浩太 (東京大・理)
- ( 13 ) Super-resolution microscopy using two color lasers beam - Microscopy for overcoming optical diffraction limit -  
Yoshinori Iketaki, Takashige Omatsu, Osamu Sato, Toshio Suzuki, Masaki Fujii  
(Olympus Optical Co., Ltd, Chiba Univ, Nippon Roper Co., Ltd.,)
- ( 14 ) 細胞膜に見る極性形成と情報伝達の 1 分子解析  
楠見明弘 (名古屋大学大学院・理)
- ( 15 ) 近接場顕微鏡によるインテグリン動態の解析  
曾我部正博, 辰巳仁史 (名古屋大・医)
- ( 16 ) 電子線と X 線による超分子の構造解析 - 細菌べん毛らせんのスイッチ機構 -  
難波啓一 (ERATO, JST & 松下電器先端技研)
- ( 17 ) 位相差電子顕微鏡と複素観測  
永山國昭 (生理研・超微小)

【ポスター発表】

- (1) バクテリアべん毛基体 FliF リング及び FliF-FliG リングの円筒平均構造  
鈴木博文 (ERATO 難波プロジェクト)
- (2) 直線型バクテリアべん毛フィラメントの電子線構造解析  
眞木さおり (ERATO 難波プロジェクト)
- (3) エナジーフィルター電子顕微鏡による蛋白質結晶回折データの評価  
米倉功治 (ERATO 難波プロジェクト)
- (4) 電子線結晶学によるバクテリオロドプシンの構造解析  
光岡 薫 (京都大学大学院・理)
- (5) ロドプシンの電子線結晶構造解析  
刑部伸彦 (京都大学大学院・理)
- (6) Gap Junction の結晶解析を目指したコネキシンの精製  
大嶋篤典 (京都大学大学院・理)
- (7) SDS-FRL による小脳におけるグルタミン酸受容体の発現解析  
馬杉美和子 (生理研・脳形態解析)
- (8) 膜蛋白質の人為的発現による細胞の形態変化  
廣明洋子 (京都大学大学院・理)
- (9) MgluR の集積機構を利用した 2 次元結晶化への試み  
西川幸希 (京都大学大学院・理)
- (10) 細胞の機能局在  
樋口純子 (山形大・医)
- (11) 細胞膜の細胞質側表面における膜骨格と膜貫通型タンパク質のトポグラフィー  
諸根信弘 (ERATO 楠見膜組織能プロジェクト)
- (12) 遠心偏光顕微鏡を用いた細胞内複屈折構造の形成と変化  
合田 真 (京都大学大学院・理科)
- (13) ヒト慢性根尖性歯周炎における HLA-DR 陽性細胞  
金子友厚 (東京医科歯科大学大学院・医歯学総合研究科)
- (14) I 型コラーゲン (アルファ I 鎖) リコンビナント遺伝子産物の電子顕微鏡的確認  
服部 宇 (名古屋大学大学院・医)
- (15) 無脊椎動物 (腹足類) の外套組織にみられる筋線維の超高压電顕観察  
片桐展子 (東京女子医科大・総合研究所)
- (16) 位相差電子顕微鏡によるリアノジン受容体の一分子観察  
松本友治 (生理研・超微小)
- (17) 複素電子顕微鏡の情報伝達度  
杉谷正三 (東京大学大学院・総合文化)
- (18) Practical aspects in the application of Zernike phase-plate in TEM  
Radostin Danev (生理研・超微小)
- (19) Retrieving 0.1nm resolution from HRTEM using blind deconvolution and Gpnhberg-Saxfov algorithm  
Fu-Rong Chen (National Tsing Hua Univ.)

【参加者名】

R.R. Schroeder (Max Planck Institute for Medical Research), 若林健之 (東京大・理), 片山栄作 (東京大 医科研), 村田和義 (生理研・超微小), 宮澤淳夫 (理化学研究所・播磨), 濱 清 (生理研), 吉川雅英参 (東京

大・医学・細胞生物/解剖), 藤本 豊士(名古屋大学大学院医学研究科), 溝口 明(京都大, 大学院, 生体構造医学講座), 佐藤主税(電総研), 池滝慶記(オリンパス), 楠見明弘(名古屋大学大学院・理), 曾我部正博(名古屋大・医), 難波啓一(ERATO, JST&松下電器先端技研), 鈴木博文(ERATO 難波プロジェクト), 眞木さおり(ERATO 難波プロジェクト), 米倉功治(ERATO 難波プロジェクト), 光岡 薫(京都大学大学院・理), 刑部伸彦(京都大学大学院・理), 大嶋篤典(京都大学大学院・

理), 馬杉美和子(生理研・脳形態解析), 廣明洋子(京都大学大学院・理), 西川幸希(京都大学大学院・理), 樋口純子(山形大・医), 諸根信弘(ERATO 楠見膜組織能プロジェクト), 合田 真(京都大学大学院・理科), 金子友厚(東京医科歯科大学大学院・医歯学総合研究科), 服部 宇(名古屋大学大学院・医), 片桐展子(東京女子医科大・総合研究所), 松本友治(生理研・超微小), 杉谷正三(東京大学大学院・総合文化), Radostin Danev(生理研・超微小), Fu-Rong Chen(National Tsing Hua Univ.)

## 10. 生殖細胞の構造と機能発現

2000年11月24日 - 11月25日

代表・世話人：年森清隆（宮崎医大）

所内対応者：有井達夫（生理研）

(1) マウス GC2 精原細胞株表面に発現している分子の検索

山本雅一，中野 匡，伊藤克彦，藤田 潤（京都大学大学院医学研究科・遺伝医学講座分子病診療学）

(2) ectoplasmic specialization：環境ホルモンおよび遺伝子ノックアウトからの新局面

外山芳郎（千葉大学医学部解剖学第2講座）

(3) 内分泌攪乱物質曝露におけるマウス精巣での遺伝子発現への影響

足達哲也<sup>1,2</sup>，櫻井健一<sup>2,3</sup>，深田秀樹<sup>1</sup>，芝山孝子<sup>1,2</sup>，井口泰泉<sup>1,4</sup>，森 千里<sup>1,2</sup>

（<sup>1</sup>科技団 CREST，<sup>2</sup>千葉大学医学部解剖学第一，<sup>3</sup>千葉大学医学部内科学第二，

<sup>4</sup>岡崎国立共同研究機構統合バイオサイエンスセンター生命環境）

(4) 先体反応前後に起こる精子頭部の膜表面構造の変化 - マウス精子の原子間力顕微鏡による観察

高野広子（北海道大学大学院医学研究科・生体機能構造学講座生態機能形態学分野）

(5) Aborted Cytokinesis and the formation of syncytial spermatids in mice

Manandhar, G.<sup>1</sup>, Toshimori, K.<sup>1</sup> and Schatten, G.<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Dept. of Anatomy, Miyazaki Medical College, <sup>2</sup>Oregon Regional Primate Research Center)

(6) 特別講演：生理的状态および病的状态の精巣間細胞

森 浩志（大阪医科大学医学部病理学第2講座）

(7) 哺乳動物の受精における精子セリンプロテアーゼの役割

山縣一夫（筑波大学応用生物化学系）

(8) 哺乳類初期胚の微細構造 - 高圧凍結置換固定法を用いて -

館 澄江（東京女子医科大学解剖学・発生生物学教室）

(9) 生殖幹細胞の特質

蓬田健太郎（大阪大学微生物病研究所）

(10) 特異的に発現する遺伝子から見た精巣生殖細胞の特徴

野崎正美（大阪大学微生物病研究所）

(11) Molecular interaction leading to sperm-oocyte fusion; role of acrin 3 (MC101) and an equatorin (MN9).

Saxena DK., Oh-oka T., and Toshimori K. (Dept. of Anatomy, Miyazaki Medical College)

### 【参加者名】

年森清隆（宮崎医大），高野広子（北海道大・医），外山芳郎（千葉大・医），高 圭範（千葉大・医），足達哲也（科技団 CREST），山縣一夫（筑波大），館 澄江（東京女子医大），桧山武史（基生研），向井徳男（基生研），山本雅一（京都大・医），蓬田健太郎（大阪大・微研），

西宗義武（大阪大・微研），野崎正美（大阪大・微研），笠原恵美子（大阪市大・医），増田 裕（大阪医大），森浩志（大阪医大），大岡唯祐（宮崎医大）Manandhar, G.（宮崎医大），Saxena D.K.（宮崎医大），有井達夫（生理研）

### 【概要】

本研究会では，精細胞の分化・成熟過程における形態変化，遺伝子/タンパク質レベルでの発現調節や関連する新規遺伝子の探索，内分泌攪乱化学物質の影響そして初

期胚発生に関する研究発表と討論を行った。その主な内容は次の通りであった。精巣生殖細胞に関しては，精細胞移植法を用いて生殖幹細胞の増殖・生存の特質が示さ

れた。精細胞分化に関しては、精原細胞株からの単クローン抗体作製と関連分子の検索、精細胞細胞質の分裂形態と合胞体細胞形成との関係、精巢生殖細胞に特異的に発現する遺伝子の探索とその特徴や内分泌攪乱物質との関係、そして精巢生殖細胞構造分化と内分泌攪乱化学物質との関係が発表された。受精に関しては、原子間力走査顕微鏡法による精子先体反応前後に起こる精子頭部膜表面構造の変化、精子先体内セリンプロテアーゼ（アクロシン）の受精との関係および先体内タンパク質と透明帯通過および受精能獲得との関係の解析例が報告された。哺乳類初期胚については、高圧凍結条件下での凍結置換

固定法を用いて、可能な限り自然な状態に近い状態での形態把握が試みられ、受精卵から胚盤胞期に至るまでの微細構造変化が示された。特別講演では、生理的状态および病的状態の精巢間細胞の構造と機能変化および精子形成への関与と病態変化（腫瘍誘発ホルモン異常による変化やアポトーシス）について詳細に解説された。

このように、本研究会では、精細胞の発生から胚子初期発生までに起こる形態変化や機能発現について、異なるアプローチを行っている研究者が多角的な面から発表・討論し、最近の生殖生物学の研究の動向や結果について有意義な議論がなされた。

### (1) マウス GC2 精原細胞株表面に発現している分子の検索

山本雅一，中野匡，金子嘉志，伊藤克彦，藤田 潤（京都大学大学院医学研究科遺伝医学講座分子病診療学分野）

哺乳類雄性生殖細胞の分化は、体細胞分裂を行う精原細胞が精母細胞へと分化して減数分裂し、更にハプロイドの精子細胞が成熟精子へと形態変化をとげる複雑な過程である。この過程を解析する細胞株としては、Hofmann と Millan の樹立したマウス精原細胞株 GC1, GC2 が有名である。特に GC2 は 32 度培養条件下で減数分裂を起こしハプロイド細胞になると報告され注目を集めた。（もっとも、その後この細胞株は減数分裂を起こさなくなってしまう。）しかし、GC2 がマウスの未分化な精子形成細胞株であることには変わりがなく、増殖因子、分化因子に対するレセプターを発現している可能性があ

る。そこでわれわれは、GC2 細胞膜表面に発現している分子を同定するために GC2 細胞を入手して、32 度培養後、膜分画を免疫原として雌マウスを免疫し、多数の hybridoma を作製。これらの hybridoma の培養上清を用いて、マウス精巢および肝、腎、脳、脾の免疫組織染色やフローサイトメーターによる GC2 細胞の免疫染色などのスクリーニングを行い、12 個のモノクローナル抗体を得た。現在ヌードマウスを用いて大量に抗体を産生させている途中である。今後この大量抗体を用い expression cloning で GC2 精原細胞株膜表面に発現している分子を同定する予定である。

### (2) Ectoplasmic Specialization : 環境ホルモンおよび遺伝子ノックアウトからの新局面

外山芳郎（千葉大学医学部解剖学第二講座）

Ectoplasmic Specialization (以下 ES と略) は 1) セルトリ細胞が精子細胞の頭部を取り巻く部分、2) 隣り合うセルトリ細胞間、の 2カ所に存在する。2) にはさらに密着帯が存在し、これは ES と共に血液・精巢関門を形成する。ES の機能はまだ解っていない。エストラジオールを成熟雄マウスに投与したところ、ステップ 8 以降の精子細胞の先体、核に形態異常が見られた。この精子細胞の頭部を取り巻く ES は不完全な形態をしていたので、この部分の ES は精子頭部の形態を決めるのかもしれない。

隣り合うセルトリ細胞間の ES には異常は見られなかった。また、新生仔雄ラットおよびマウスにジエチルstilbestロールを投与したところ血液・精巢関門の形成がコントロールに比べて約 4 週間遅滞した。この間は精母細胞が減数分裂の環境を得られないために、精子が作られなかった。basigin 蛋白の遺伝子ノックアウトマウスでは造精細胞が減数分裂中期で死ぬために無精子症である。この場合、隣り合うセルトリ細胞間の ES は正常であったが、精子細胞を取り巻くべき ES には精

子細胞が存在しないために種々の異常（異所発生）が見られた。

このように種々の実験条件下で ES を調べることで、その機能が解ることと思われる。

### (3) 内分泌攪乱物質曝露におけるマウス精巣での遺伝子発現への影響

足達哲也<sup>1,2</sup>，櫻井健一<sup>2</sup>，深田秀樹<sup>3</sup>，芝山孝子<sup>1),2</sup>，井口泰泉<sup>1,4</sup>，森 千里<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup> 科学技術振興事業団戦略的基礎研究推進事業 (CREST) 内分泌攪乱物質研究グループ

<sup>2</sup> 千葉大学医学部解剖学第一，<sup>3</sup> 深田生命科学研究所，

<sup>4</sup> 岡崎国立共同研究機構統合バイオサイエンスセンター生命環境)

【目的】今回我々は内分泌攪乱物質をマウス新生仔期に投与することによって，生殖能を有する時期において精巣で発現が変化する遺伝子を探索した。

【方法】1. 生後1日のICR雄性マウスに Diethylstilbestrol (DES)を 50 μg/mouse/day，Genistein (Gen)を 1 mg/mouse/day，または BisphenolA (BisA)を 0.2 mg/mouse/day を5日間皮下投与を行った。3か月後に精巣を摘出，RNAを調製し，DNA マイクロアレイ法にて対照群に対して発現に差のあるものを検索した。

2. 生後1日のICR雄性マウスにDESを 5 μg/mouse/day で5日間投与した。2か月後に精巣を摘出，RNAを調製し，cDNA サブトラクション法にて対照群に対して発現に差のあるものを検索した。

【結果】1. DNA マイクロアレイ法を用いた検討により，精巣において各化学物質投与によって発現に差が生じた遺伝子として，DESでは635種，Genでは388種，BisAでは455種が見い出された。2. cDNA サブトラクション法を用いた検討により，精巣で発現上昇を認めた遺伝子が3種得られた。

【結論】今回，内分泌攪乱物質曝露によって発現変化を引き起こす遺伝子を2通りの方法で検索した。DNA マイクロアレイ法を用いた検討では発現変化を引き起こす遺伝子を一挙に多数見出すことができた。また cDNA サブトラクション法を用いた検討では精巣において発現誘導される遺伝子の存在が認められた。

### (4) 先体反応前後に起こる精子頭部の膜表面構造の変化 マウス精子の原子間力顕微鏡による観察

高野広子（北海道大学・大学院医学研究科・生体機能構造学講座・生体機能形態学分野）

授精機構の解明のために，成熟精子の頭部の表面構造の違いを調べ，さらに，これらがキャパシテーションや先体反応に伴ってどのように変化するかを調べた。キャパシテーションした精子はマウス精巣上体尾部の精子（成熟精子）の培養により得た。先体反応を起こした精子は尾部精子の単独培養あるいは透明帯つき卵細胞との共培養によって得た。精子は遠心洗浄してグルタルで固定し，ガラスに貼り付け，臨界点乾燥して原子間力顕微鏡に表面構造を描出させた。成熟精子の頭部は直径 100 nm 以下の粒子で覆われていた。粒子を，直径 20~30 nm の小粒子と直径 40 nm 以上の大粒子に分けると，先体帽には，小粒子が主として分布し大粒子が所々にのって

た。赤道部は，成熟精子では粒子が不明瞭で表面はほぼ平滑であったが，キャパシテーション精子では輪郭が明瞭な小粒子で覆われていた。先体反応後，赤道部の小粒子は前縁から次第に大粒子に置き換わった。一方，先体後部は，先体反応以前は大粒子によって覆われていたが，先体反応後は大粒子が次第に小粒子へと置き換わった。

以上，本研究によって得られた先体反応前後に起こる精子頭部の膜表面構造の変化を示す原子間力顕微鏡像は，キャパシテーションによって精子膜が不安定化することや先体反応が起こった精子だけが卵細胞膜と膜融合するというようなこれまでよく知られた現象にたいして形態学的基盤を与えるものと考えられる。

## (5) Aborted cytokinesis and the formation of syncytial spermatids in mice

G Manandhar<sup>1,2</sup>, K Toshimori<sup>2</sup> and G Schatten<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>ORPRC, <sup>2</sup>Miyazaki Medical College)

Some spermatocytes of mice fail to divide by cytokinesis. They develop sparse and dispersed midzone spindles which however, undergo normal compaction but localize asymmetrically towards one side of the cell cortex. Actin myosin fibers associate with the midzone spindles and midbodies in the normal cytokinetic cells as well as those cells which fail to develop cytokinetic furrow. Anticentrin antibody labels the putative centrioles while anti-g-tubulin labels the minus-

ends of the midzone spindles in the normal and abortive cytokinetic cells. These observations implicate that syncytial bi- and tetranuclear spermatids form during mouse spermatogenesis without major cytological anomaly. Such spermatids displayed apparently normal nuclear morphology, chromatin condensation, manchette microtubules, axoneme and acrosome development during the early stages of spermiogenesis. Some syncytial spermatids degenerate during the late stages.

## (6) 特別講演：生理的状态および病的状态の精巢間細胞

森 浩志 (大阪医科大学病理学教室)

精巢間細胞 (Leydig 細胞: L 細胞) が産生する男性ホルモンは胎生期の内外性器の分化, 脳の男性化, 二次性徴の発現・維持および精子発生に不可欠である。男性ホルモン産生能の動物種属差は L 細胞の数・サイズのみならず, 滑面小胞体やミトコンドリアの量とともに, それらに局在する酵素活性の違いによってもたらされる。

ヒト L 細胞に特徴的な Reinke 結晶は, 中間径フィラメントが蜂窩状構造をとる六角柱であるが, これに機能的意味はなく, 一種の老廃物質と思われる。出生後の L 細胞に細胞分裂像をみることはきわめて稀であるが, 高齢者でも青年期の約 1/3 の数の L 細胞が存在する。Ethanedimethane sulphionate はある種の動物の L 細胞を選択的にアポトー

シスに陥らせるが, 1 月後には L 細胞の数は回復する。この薬剤の反復投与実験から, L 細胞に幹細胞が存在することが示唆された。L 細胞には自然発生的な腫瘍の他, 実験的に精巢の脾内移植, あるいは女性ホルモン持続投与によって発生させることができる。前二者では luteinizing hormone が, 後者では女性ホルモンが誘発因子である。精巢間細胞腫では正常細胞とは異なったホルモン合成状態となり, また腫瘍誘発ホルモンに対するレセプターの変化が生じていること, 一旦発生した腫瘍では誘発ホルモンの持続作用の有無が形態学的な変化を生じさせることが示された。

## (7) 哺乳動物の受精における精子セリンプロテアーゼの役割

山縣一夫, 馬場 忠 (筑波大学応用生物化学系)

われわれは精子の卵透明帯通過の分子機構を理解すべく, 精子アクロソームに存在する各種プロテアーゼに主眼を置いて研究を行ってきた。そのうちの一つ, アクロシンはトリプシン様セリンプロテアーゼであり, これまで卵透明帯の限定分解に関与していると考えられてきた。しかし, その欠損マウスの解析から主たる生体内機能は

アクロソーム反応の際に各種アクロソームタンパク質の放出を促進することであった。さらに, アクロシンとは別にマウス精子アクロソームにはトリプシン様セリンプロテアーゼである 42 キロダルトンプロテアーゼが存在し, それが透明帯通過に関与する可能性が示唆された。これらアクロソームプロテアーゼについて各種げっ歯動

物間で比較したところ、マウスで見られた42キログルトンプロテアーゼに相当するものはラット、ハムスターでは検出されなかった。一方、ラットやハムスターと比較するとマウスアクロシンのゼラチン分解活性は極端に低下していることが明らかとなった。

そこで、その原因について検討を行ったところ、マウ

スアクロシン特異的に存在するCys143が酵素の基質特異性に影響を与え、その結果ゼラチン分解活性の低下を引き起こしていると考えられた。このことはアクロシン欠損マウスの結果は必ずしも他の動物種へは反映できないことを示唆している。

#### (8) 哺乳類初期胚の微細構造 - 高圧凍結置換固定法を用いて -

館 澄江 (東京女子医科大学医学部解剖学・発生生物学教室)

哺乳類初期胚の微細構造をできるだけ人工的な操作を加えず観察することを目的とし、妊娠第1日から4日までのマウス胚(受精卵, 2細胞期, 8細胞期, 胚盤胞期)を高圧凍結(BAL-TEC HPM 010, Balzers AG)により物理的に固定し、2%OsO<sub>4</sub>・アセトン溶液中で凍結置換固定後、樹脂包埋を行ない、超薄切片を作成して微細形態の観察を行なった。その結果、初期胚の細胞質中には、従来の化学的固定法であるOsO<sub>4</sub>溶液単独の浸漬固定ではその構造が存在せず、グルタルアルデヒド溶液で前固定後、OsO<sub>4</sub>溶液で後固定(二重固定)した場合にのみ観察される、特有の格子構造(または線維状構造)(Schlafke & Enders, 1967)が観察されることが解った。この構造が

グルタルアルデヒドによる化学的固定の産物ではないことが明らかである。高圧凍結置換固定法では、Muller & Moor (1984) は表層から200 μm, また菅原(1997)は50-80 μmまでは氷結晶のできない硝子様凍結(vitrification)が可能と報告しているが、哺乳類胚は約80 μm径であるが胚子全体の硝子様凍結は不可能で、核と核小体、及び、割球と割球の隣接部近傍の細胞質に氷結晶が生じやすいこと、また、硝子様凍結が得られても細胞膜が細胞質から離脱しやすいこと、等の傾向がみられた。受精卵の場合は、周囲を厚い放射冠が囲むため、卵子は全て氷結晶が生じ良好な像は得られなかった。高圧凍結用試料キャリアの構造にも工夫が必要であると思われる。

#### (9) 生殖幹細胞の特質

蓬田健太郎 (大阪大学 微生物病研究所)

幹細胞の増殖と分化の制御機構を解析する上で、この生殖幹細胞系はいくつかの利点を有する。すなわち、1) 精細胞の分化段階の判別が組織学的に容易であること、2) さまざまな精細胞分化障害を示す変異マウスが利用可能であること、3) 精細胞移植法の確立により、幹細胞の特質の評価が可能となっていることなどである。さらに、我々はGFPで標識した精細胞を用いることにより、移植後の精細胞の動態を経時的に観察可能とすることに成功している。これにより、生殖幹細胞は、移植生着後、まず増殖してから分化することが示された。これは、幹細胞が非対称分裂をするのではなく、対称性分裂を行っ

ていることを示唆する。そこで、この増殖と分化の過程をさらに解析するために、c-kit/SCF (Stem cell factor) 系の変異マウスを利用した。SCFの変異マウスでは、生殖細胞の分化に必須であるSCFに異常があるため、未分化精原細胞から分化できない。このため、ここに精細胞を移植することにより幹細胞の増殖のみを評価することが可能となる。この結果、生殖幹細胞の増殖は、c-kit/SCF系によらないことが明らかとなった。さらに、内在性に精原細胞が存在すると移植効率が低下することから、生殖幹細胞の生着維持にはその存在部位(stem cell niche)が必要であることが示唆された。

## (10) 特異的に発現する遺伝子から見た精巣生殖細胞の特徴

野崎正美 (大阪大学微生物病研究所)

減数分裂以後の精子形成細胞の特徴を分子レベルで明らかにするために、この時期に特異的に発現する遺伝子群のクローニングを行い、80 以上の特異的遺伝子を得た。そのうち、26%は既に報告されているもの、32%は既知遺伝子との相同性を持つ新規遺伝子、残りの42%は相同性を持たない新規遺伝子であった。コードする蛋白質構造からこれらの遺伝子はクロマチン構造、シグナル伝達、精子形態あるいは運動性などに関与することが予想された。この結果は、考えられていた以上に重要な機能を持つ遺伝子が減数分裂以後に新たに発現することを示す。他の遺伝子との比較からこれらは体細胞で発現する遺伝子に対する精巣型アイソフォームと、生殖

細胞特有の構造を持つ遺伝子に大別された。また、遺伝子構造の解析から、半数体精子細胞で特異的に発現する遺伝子の半数はイントロンをもたないレトロポゾンと考えられた。レトロポゾンはイントロンを持つ別の遺伝子 mRNA が逆転写酵素により cDNA となりゲノム上に挿入されて生まれる。通常プロモーターを持たないために発現せず、変異が蓄積して偽遺伝子となる。ところがまれに転写されることがあり機能的遺伝子となることもある。精巣生殖細胞でこのような遺伝子が多く発現することは機能的な必要性もさることながら、特別なプロモーター配列を持たないこれらの遺伝子を高頻度で発現させる特有の発現制御機構の存在を示唆している。

## (11) Molecular interaction leading to sperm-oocyte fusion: Role of acrin3 (MC101) and an equatorin (MN9).

Saxena DK, Oh-oka T and Toshimori K (Department Of Anatomy, Miyazaki Medical College)

The major events of sperm-oocyte fusion are mediated by multiple ligand-receptor interactions. We examined the role of two sperm molecules, acrin 3 (MC101) and an equatorin (MN9) in the processes of gamete fusion using pertinent monoclonal antibodies mMC101 and mMN9. Both antibodies did not affect sperm motility or sperm-zona binding but affected fertilization in vitro. mMC101 inhibited and also delayed fertilization of the zona-intact oocytes, but did not affect the dispersal of acrosomal content during zona induced acrosome reaction. In contrast, fertilization of the zona free oocytes was inhibited significantly when sperm completed acrosome reaction in the presence of

mMC101 inseminated the zona-free oocyte. These findings indicate that acrin 3 may be involved in the zona penetration and might play some role in modifying the sperm plasma membrane during acrosome reaction for the development of fusibility (Saxena et al., 2000). Another antibody mMN9 also inhibited fertilization of both the zona-intact and zona-free oocytes. Further the percentage of oocytes with presence of many supernumerary sperm in perivitelline space was higher in the presence of mMN9. These findings suggest involvement of equatorin in the sperm-oocyte fusion (Toshimori et al., 1998).

## 11. 心・血管系イオンチャネルの発生分化とその適応

2000年11月28日～11月29日

代表者：當瀬規嗣（札幌医科大学・医学部・生理学第一講座）

所内世話人：岡田泰伸（生理学研究所・機能協関部門）

- (1) ATP感受性KチャネルのG蛋白質サブユニットによる調節  
和田義之，山下俊一，國分眞一郎（日本大学医学部・先進医学研究センター）  
浅野富子（愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・生化学）  
三浦玲子，額田敏秀（東京都精神医学総合研究所・神経化学）  
萩原誠久，笠貫 宏（東京女子医科大学附属日本心臓血圧研究所・循環器内科）
- (2) ATP感受性カリウムチャネルの構造的理解について  
倉智嘉久（大阪大学大学院・医・情報薬理学）
- (3) マウス洞房結節ペースメーカー細胞の電流系  
鷹野 誠，野間昭典（京都大学大学院医学研究科・細胞機能制御学）
- (4) 1Eサブユニットを発現させたウサギ培養心室筋のCa電流  
立山充博，大地陸男（順天堂大学・医・第二生理）  
宗 淑琴，田邊 勉（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・医学部・高次機能薬理学）
- (5) 再生心筋細胞におけるイオンチャネルの発現  
富田雄一，小川 聡（慶應義塾大学医学部・呼吸循環器内科）  
福田恵一（慶應義塾大学医学部・心臓病先進治療学）
- (6) マウス胎生初期心室筋のIfチャネル  
安井健二，劉 蔚然，児玉逸雄（名古屋大学・環境医学研究所）
- (7) 発生初期の心臓における自発性活動電位：光学的測定法によるアプローチ  
酒井哲郎（東京医科歯科大学大学院・機能協関システム医学）
- (8) 胎生期ラット心筋の細胞内Ca<sup>2+</sup>動態  
関 純彦，山田陽一，筒浦理正，當瀬規嗣（札幌医科大学・医・生理学第一）
- (9) 胎仔動脈管に存在するイオンチャネル  
沈 菁，中西敏雄（東京女子医科大学附属日本心臓血圧研究所・循環器小児科）  
勝部康弘（日本医科大学小児科）
- (10) 5つのLQT2遺伝子変異の電気生理学的機能解析と変異チャネルの細胞内局在  
吉田秀忠，堀江 稔（京都大学大学院医学研究科・循環病態学）
- (11) マウス心筋のCa<sup>2+</sup>チャネルとCICR  
塩谷孝夫（佐賀医科大学・生理学講座）
- (12) 特発性心室細動（Brugada症候群）Naチャネル変異の機能異常  
蒔田直昌，白井信正，北畠 顕（北海道大学・医・循環器内科）  
赤井 潤，木村彰方，平岡昌和（東京医科歯科大学・難治研・循環器病）
- (13) 虚血心筋再灌流傷害に対するブラジキニンの予防作用  
李 玉龍，佐藤俊明，清未達人，小野克重（大分医科大学・生理学第二生理）
- (14) Ca<sup>2+</sup>スパークで活性化されるCl電流について  
今泉裕治，稲吉 温，村木克彦，渡辺 稔（名古屋市立大学薬学部・薬物治療学）
- (15) サイクリン依存性キナーゼによるクロライドチャネルの調節機構  
古川哲史，鄭 雅娟，稲垣暢也（秋田大学医学部第一生理）

小倉武彦 (千葉大学医学部薬理)

土屋博之, 片山芳文 (東京医科歯科大学難治疾患研究所自律生理)

## (16) 圧負荷肥大心筋におけるストレッチ活性化クロライドチャンネル及び過分極活性化陽イオンチャンネルの発現の変化

平松幹男, 沢登 徹, 平岡昌和 (東京医科歯科大学・難治研・循環器病)

古川哲史 (秋田大学医学部・生理学第一講座)

## (17) ラット脳における TRP4 パリアント

佐藤栄作, 尾野恭一, 飯島俊彦 (秋田大学・医・薬理学)

## (18) 甲状腺ホルモンによる心臓イオンチャンネルの修飾

阿部 晃, 馬 梅膏, 相澤義房 (新潟大学医学部第一内科)

## (19) 心筋症ハムスター心筋細胞の電気生理学的特性変化に対するエンドセリン受容体遮断薬長期投与の影響

松本泰典, 中谷晴昭 (千葉大医学部薬理学講座)

## (20) 活性酸素種による心筋 L 型 Ca チャンネル修飾に影響を与える各種因子

山岡 薫, 瀬山一正 (広島大学医学部生理学第一)

## 【参加者名】

當瀬規嗣 (札幌医大), 山田陽一 (札幌医大), 関 純彦 (札幌医大), 筒浦理正 (札幌医大), 丹羽統子 (名大・環境医研), 神谷香一郎 (名大・環境医研), 児玉逸雄 (名大・環境医研), 日比野壮功 (名大・環境医研), 安井健二 (名大・環境医研), 松木泰典 (千葉大・医), 中谷晴昭 (千葉大・医), 重信弘毅 (東邦大・薬), 田中 光 (東邦大・薬), 古川哲史 (秋田大・医), 小野恭一 (秋田大・医), 佐藤栄作 (秋田大・医), 塩谷孝夫 (佐賀医大), 蒔田直昌 (北大・医), 今泉裕治 (名市大・薬), 村木克彦 (名市大・薬), 李 玉龍 (大分医大), 倉智嘉久 (阪大・

医), 酒井哲郎 (東医歯大・医), 中西敏雄 (東女医大), 沈 菁 (東女医大), 萩原誠久 (東女医大), 鷹野 誠 (京大・医), 堀江 稔 (京大・医), 吉田秀忠 (京大・医), 野間昭典 (京大・医), 渡邊泰秀 (福島医大), 木村純子 (福島医大), 山岡 薫 (広島大学), 勝部康弘 (日大・医), 和田義之 (日大・医), 大地陸男 (順天大・医), 福田恵一 (慶応大・医), 富田雄一 (慶応大・医), 相澤義房 (新潟大・医), 阿部 晃 (新潟大・医), 森 泰生 (生理研), 高橋倫子 (生理研), 森島 繁 (生理研), 浦本裕美 (生理研), 岡田泰伸 (生理研)

## 【概要】

心臓・血管系のイオンチャンネルの発生分化とその適応に関する最新の知見について発表討論が行われた。まず、イオンチャンネルの分子構造に関する最新の研究として ATP 感受性 K チャンネルの構造活性連関やカルシウムチャンネル, ペースメーカー機構に関する研究が発表された。次に, これらの知見をふまえて発生期における心血管系のイオンチャンネル機能の変化について集中的な発表討論が行われ, 蛍光指示薬による画像解析やチャンネル蛋白の発現の分子生物学的アプローチの有効性が示され, 再生心筋細胞の誘導についての興味ある知見も示された。さらに, イオンチャンネルの遺伝子異常による遺伝病に関する研究が示され, この方面のさらなる進展が展望された。

また, 心筋虚血, 心肥大などの病態におけるイオンチャンネル機能の役割や, 病態によるイオンチャンネル機能の修飾に関する研究も示された。最後に, 従来あまり注目されてこなかった心血管系のクロライドチャンネルに関する知見が示され, クロライドチャンネル研究の今後の発展が予感された。全国から多くの基礎・臨床の研究者が集い, 活発な討論が展開された。結果として, 心血管系のイオンチャンネル研究における発生分化の重要性や, 病態などでのイオンチャンネル機能の適応の解析を分子構造や発生分化の知見をふまえて行うことの重要性が示された。心血管系のイオンチャンネル研究は新たな地平に立っている。

### (1) ATP 感受性 K チャネルの G 蛋白質 サブユニットによる調節

和田義之, 山下俊一, 國分眞一郎 (日本大学医学部・先進医学研究センター)  
浅野富子 (愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・生化学)  
三浦玲子, 額田敏秀 (東京都精神医学総合研究所・神経化学)  
萩原誠久, 笠貫 宏 (東京女子医科大学附属日本心臓血管研究所・循環器内科)

リポフェクトアミン法を用いて COS-7 細胞膜上に ATP 感受性カリウムチャンネルを再構成し, チャンネル電流を inside-out patch 法で測定した。G 蛋白質 サブユニット(G $\beta$ )は細胞内 ATP の Kir6.2/SUR2A チャンネルに対する抑制作用を減弱させた。この作用は SUR2A 存在時の高 ATP 感受性チャンネルにおいてのみ認められた。in vitro では G $\beta$  は SUR2A のヌクレオチド結合領域の近傍に結合した。SUR2A 第 656 アミノ酸の Arg を Ala に

置換した点変異チャンネルでは G $\beta$  の作用を認めなかった。Kir6.2/SUR1 チャンネルでも, SUR2A 第 656 アミノ酸に相当する SUR1 第 665 アミノ酸の Arg を Ala に置換すると G $\beta$  の作用が消失した。G $\beta$  は SUR へ直接作用し, 細胞内 ATP の ATP 感受性カリウムチャンネルに対する抑制作用に拮抗することにより活性調節に関与している。

### (2) ATP 感受性カリウムチャンネルの構造的理解について

倉智嘉久 (大阪大学大学院・医・情報薬理学)

K<sub>ATP</sub> チャンネルは SUR と Kir6.2 のヘテロ 8 量体から構成される想定されている。SUR には SUR1, SUR2A, SUR2B の 3 種類が同定されており, この SUR サブタイプ依存性に種々の KCO や阻害薬が異なった作用を示すことが知られている。

(1) 我々は古典的な KCO の pinacidil, DZX 以外に nicolandil, MCC-134 などの種々の SUR/Kir6.2 チャンネルに対する効果を検討し, SUR サブタイプ依存性に KCO がチャンネル活性の増大ばかりでなく抑制を起こすことがあることを見いだした。

(2) さらに nicolandil や DZX が SUR2B/Kir6.2 チャンネルの活性化を起こすが, SUR 2A/Kir6.2 チャンネルの活性化には細胞内に高濃度の ADP が存在する必要があることを明らかにした。これは SUR の NBD2 を介した ADP による K<sub>ATP</sub> チャンネルの活性化が SUR の C 末端 42 個のアミノ酸配列により調節されているからであることを明らかにした。

(3) SUR の NBD2 の homology model を作成し ADP による活性化の SUR42C による制御機構を構造的に理解する試みを行っている。

### (3) マウス洞房結節ペースメーカー細胞の電流系

鷹野 誠, 野間昭典 (京都大学大学院医学研究科・細胞機能制御学)

遺伝子改変動物は主としてマウスに限られており, マウスが分子生物学・生理学実験における標準動物となりつつある。しかしながらマウス心臓の電気生理学性質には不明な点が多い。そこで本研究では 8~10 週齢のマウスから洞房結節を切除し, コラゲナーゼ・プロテアーゼ・

エラスターゼ処理によりペースメーカー細胞を単離する技術を開発した。単離ペースメーカー細胞の自発活動電位の頻度は  $294 \pm 59/\text{min}$ , 最大拡張期電位は  $-61.4 \pm 8.7\text{mV}$ , オーバーシュートは  $18.8 \pm 8.1\text{mV}$  であった。膜電位固定実験では過分極誘発陽イオン電流, 内向き整流 K 電流,

E4031 感受性をもつ遅延整流性 K 電流, 一過性外向き電流がみられたが, 293B 感受性の外向き K 電流はほとんど記録できなかった。このまた自動能を有する細胞での

ミニカルジピン感受性持続内向き電流 ( $I_{st}$ ) を記録することができた。

#### (4) 1E サブユニットを発現させたウサギ培養心室筋の Ca 電流

立山充博, 大地陸男 (順天堂大学・医・第二生理)

宗 淑琴, 田邊 勉 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・医学部・高次機能築理学)

Ca<sup>2+</sup>チャネル a サブユニットファミリーに属する a1E が心筋の T 型 Ca<sup>2+</sup>チャネルの主サブユニットであるか否かを, a1E, b2b, a2/d サブユニットを, T 型 Ca チャネルが存在せず, Ca<sup>2+</sup>チャネル機能発現の条件の備わっている培養ウサギ心室筋細胞に発現させて検討した。GFP をトランスフェクションのマーカーとした。GFP 単独発現は L 型 Ca<sup>2+</sup>電流を有意に減少した。a1E, b2b, a2/d の共

発現で全体の Ca<sup>2+</sup>電流が増大し, PN-200-110 (PN) は, この Ca<sup>2+</sup>電流を一部のみ抑制した。PN 存在下の Ca<sup>2+</sup>電流の活性化, 不活性化は T 型 Ca<sup>2+</sup>チャネルよりも脱分極側にあり, a1E の T 型電流への寄与は否定された。また, a1E 発現によって L 型 Ca<sup>2+</sup>電流の不活性化の時間経過が遅くなったが, これは b2b 共発現によって阻止された。

a1E と a1C が b2b を争奪することが示唆された。

#### (5) 再生心筋細胞におけるイオンチャネルの発現

富田雄一, 小川 聡 (慶應義塾大学医学部・呼吸循環器内科)

福田恵一 (慶應義塾大学医学部・心臓病先進治療学)

【目的】骨髄間葉系幹細胞由来の心筋芽細胞 (CMG 細胞) を分化誘導し, 心筋細胞に形質転換させた際のイオンチャネルの発現を解析しその機能的意義を明らかにする。【方法】CMG 細胞を 5-アザシチジンにより分化誘導し, 経時的に RNA を抽出する。In vivo 心筋を陽性対照とし, RT-PCR 法により  $I_{CaL}$ ,  $I_{K1}$ ,  $I_f$ ,  $I_{to}$ ,  $I_{kr}$ ,  $I_{ks}$ ,  $I_{K,ATP}$ ,  $I_{K,Ach}$  を構成するチャネルサブユニットの発現を観察した。分化誘導後 2 週より経時的に自己拍動する CMG 細胞の活動電位をガラス微小電極により記録した。【結果】 $I_{CaL}$  を構成する Ca<sub>v</sub>1C は分化誘導後 2 週より発現が観察された。 $I_{K1}$  を構成する IRK1 は分化誘導前より発現が一定で持続していた。IRK2 は 6 週で観察された。 $I_f$

を構成する HCN4 は 2 週で発現し, 4 週で発現が消失した。HCN1 は 6 週で発現が観察された。 $I_{to}$  を構成する Kv1.4 は 2 週, KV2.1 は 4 週, Kv4.2 は 6 週より発現が観察された。KV1.2, KV4.3 の発現は認められなかった。

$I_{kr}$  を構成する MERG の発現は分化誘導前より発現が持続していた。 $I_{ks}$  を構成する KVLQT1, KCNE1 は認められなかった。 $I_{K,Ach}$  を構成する GIRK1, GIRK4 の発現は見られなかった。 $I_{K,ATP}$  を構成する Kir6.1, SUR2A は分化誘導 4 週以後に観察された。分化誘導 2 - 3 週ではすべての細胞で洞結節型の活動電位が記録された。分化誘導 4 週以後一部の細胞で心室筋細胞型の活動電位が記録され, その比率は経時的に増加した。

#### (6) マウス胎生初期心室筋の $I_f$ チャネル

安井健二, 劉 蔚然, 児玉逸雄 (名古屋大学・環境医学研究所)

【目的】胎生初期マウス心室筋は自動能を示すが, その

イオン機序は不明である。我々は, 過分極活性化内向き

電流 (If) とそのイオンチャンネルをコードする HCN gene を検討した。【方法】胎生 9.5 ~ 18 日齢のマウスの培養心室筋からホールセルクランプ法にて膜電流を記録した。RT-PCR 法を用いて HCN mRNA の発現量を調べ、その type を同定した。【結果】胎生 9.5 日齢では大きな If (-130mV,  $7.9 \pm 1.2$  pA/pF) が記録できたが、その後発達に伴って If は減少し胎生 18 日齢では  $1.4 \pm 0.4$  pA/pF となった。胎生 9.5 日齢 If の 50% 最大活性化電位は -81mV,

Slope 係数は 8.9mV であり、18 日齢も同様であった。HCN mRNA 発現は、胎生 9.5 日齢で認められ、発達に伴い減少した。また胎生 9.5 日齢の If をコードする HCN gene は HCN4 がドミナントであり、HCN1 もわずかに発現していた。【総括】胎生初期マウス心室筋には大きな If が存在し自動能の発現に寄与し、HCN4 がドミナントな(少量の HCN1 発現を伴う)発現遺伝子である事が判明した。

## (7) 発生初期の心臓における自発性活動電位:光学的測定法によるアプローチ

酒井哲郎 (東京医科歯科大学大学院・機能協関システム医学)

膜電位感受性色素を用いた活動電位の光学的測定法を用いて、ニワトリおよびラット発生初期胚の自発興奮のイオン依存性を調べた。活動電位の形・大きさ・立ち上がり速度および自発興奮の頻度はテトロドトキシン投与中細胞外  $\text{Na}^+$  の除去で影響を受けないが、細胞外の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度には大きく影響を受ける。また、自発興奮は  $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$  などの重金属イオンや D-600 により抑制される。こ

のことから、発生初期胚の自発興奮は  $\text{Ca}^{2+}$  依存性の活動電位であり、またリズム形成にも細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  が深く関与していることが明らかとなった。すなわち、成体の心臓における “spike and plateau” 型活動電位は、個体発生の過程において、まず plateau 相の機構が機能して自発興奮を開始し、その後 spike 相の機構が加わり成立する。

## (8) 胎生期ラット心筋の細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 動態

関 純彦, 山田陽一, 筒浦理正, 當瀬規嗣 (札幌医科大学・医・生理学第一)

成熟した心筋では、電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルからの  $\text{Ca}^{2+}$  流入が即座に筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  放出チャンネルからの  $\text{Ca}^{2+}$  放出を誘発するため、急峻な  $\text{Ca}^{2+}$  トランジェントが観察される。また、この急峻な  $\text{Ca}^{2+}$  トランジェントの最小単位は、静止時に観察される  $\text{Ca}^{2+}$  スパークと考えられている。一方、胎生期心筋の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態についてはよく知られていない。そこで、我々は  $\text{Ca}^{2+}$  蛍光指示薬と共焦点レーザー顕微鏡を用いて検討した。

方法：胎生 12 日以降の各発達段階のラット心室筋を単離し、カルシウム蛍光指示薬 fluo-3 を負荷した。共焦点レーザー顕微鏡にて蛍光強度変化を観察した。また、膜感受性蛍光色素を負荷し、T 管の発達を観察した。

結果：ラット胎児心筋の  $\text{Ca}^{2+}$  トランジェントは、成体に比べて立ち上がりと消退が非常に遅いのが特徴であった。胎生 12 日の  $\text{Ca}^{2+}$  トランジェントは、タブシガルギンやリアノジンによる筋小胞体機能阻害によって抑制された。しかし、胎生期では  $\text{Ca}^{2+}$  スパークは観察されず、出生後数日で初めて膜直下に出現し、出生 10 日後以降にようやく細胞内でも観察された。この  $\text{Ca}^{2+}$  スパークの発達は、T 管の発達と一致していた。

結論：筋小胞体は胎生期にすでに機能しており、 $\text{Ca}^{2+}$  トランジェントの成因に大きく関与していることが示唆された。 $\text{Ca}^{2+}$  スパークの出現には T 管の発達が大きく関与していると考えられた。

## (9) 胎仔動脈管に存在するイオンチャンネル

沈 菁, 中西敏雄 (東京女子医科大学附属日本心臓血圧研究所・循環器小児科)

勝部康弘 (日本医科大学小児科)

肺動脈とは反対に, 動脈管は酸素で収縮する血管で, 胎生期にのみ開存している。妊娠満期のラットと家兔の胎仔から摘出した動脈管のリング標本は, 酸素, glibenclamide (Glyb), 4-aminopyridine(4-AP)で収縮し, 収縮に伴い細胞内 Ca 濃度は増加した。単離平滑筋細胞を用いた whole-cell patch clamp では, 酸素で増加する Ca 電流, 酸素や 4AP で減少する K 電流を認めた (Kv)。また, pinacilil で増加

し, Glyb で減少する ATP 感受性 K 電流 (KATP) も認められた。一方, 未熟な胎仔から摘出した動脈管は酸素や Glyb で収縮しなかったが, 4AP では収縮した。また単離細胞では Kv, KATP ともに認めたが, KATP は満期胎仔に比して有為に少なかった。動脈管には Ca, K チャンネルが存在し, 胎生期発達によって変化する。

## (10) 5 つの LQT2 遺伝子変異の電気生理学的機能解析と変異チャンネルの細胞内局在

吉田秀忠, 堀江 稔 (京都大学大学院医学研究科・循環病態学)

QT 延長症候群 (LQTS) において約 40% は HERG (LQT2) の変異であり, その病態の分子機序も解明されつつある。前々回 我々は HERG の pore 領域の変異 (N629K) を報告し, それは dominant negative 効果をきたすことを示した。今回, その細胞内局在について GFP を融合させた融合蛋白を用いて検討し, 新たに同定した 4 つの HERG の変異の電気生理学的特徴と細胞内局在について検討し

た。PCR-SSCP 法により先天性 LQTS において新たに Y611D, T613M, S641F の 3 つの HERG 変異を, また徐脈による 2 次性の LQTS において A490T の HERG 変異を同定した。その電気生理学的特徴は A490T は電流密度の減少がみられ, 他は単独の電流発現がみられなかった。また, 変異チャンネルに GFP を融合させ, 培養細胞に導入し共焦点走査顕微鏡にて, 形質膜までの発現を検討した。

(11) マウス心筋の Ca<sup>2+</sup>チャンネルと CICR

塩谷孝夫 (佐賀医科大学・生理学講座)

マウス心筋細胞の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> トランジェントを, それにより誘発される遅い内向き電流 (I<sub>si</sub>) をもちいて定量することを試みた。ホールセルクランプ下に膜電位固定したマウス心室筋細胞から I<sub>si</sub> を記象した。細胞に Use-dependent な Ca<sup>2+</sup>チャンネルブロッカーである D600 (1 μM) を投与して Ca<sup>2+</sup>チャンネルを抑制したところ, 細胞収縮の減弱と同時に, I<sub>si</sub> の振幅が減少した。I<sub>si</sub> の振幅は細胞収縮の大きさに強く依存し, したがって [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> トランジェ

ントの大きさを反映すると考えられた。細胞の Ca<sup>2+</sup>電流は Nifedipine (20 μM) の投与でほぼ完全にブロックできたが, この条件下でも I<sub>si</sub> は記録することができ, Ca<sup>2+</sup>チャンネルを抑制した状態でも [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> トランジェントが発生することが示された。この結果は, マウス心室筋細胞には, Nifedipine 感受性の Ca<sup>2+</sup>チャンネルの他にも CICR を誘発する細胞機構が存在することを示唆した。

## (12) 特発性心室細動 (Brugada 症候群) Na チャネル変異の機能異常

蒔田直昌, 白井信正, 北畠 顕 (北海道大学・医・循環器内科)  
赤井 潤, 木村彰方, 平岡昌和 (東京医科歯科大学・難治研・循環器病)

特発性心室細動のうち V1-3 の ST 上昇・右脚ブロックを特徴とする一群は Brugada 症候群とよばれる。Brugada 症候群の一部に心筋 Na チャネル サブユニット遺伝子 (SCN5A) 変異が同定された。【目的】心筋 Na チャネル病の病態を分子レベルで明らかにするために, Brugada 症候群変異 Na チャネル T1620M と, Brugada 様の ST 上昇が認められなかった特発性心室細動の変異 S1710L の Na チャネル機能異常を解析すること。【方法】正常心筋 Na チャネル(WT)または変異 Na チャネルプラスミドをヒト Na チャネル $\beta_1$  サブユニットとともに HEK にトランスフェクションし, whole-cell パッチクランプで全細胞 Na 電流を測定した。【結果】T1620M はほぼ WT とほぼ同様の電流 decay を示したが, 生理的に近い温度では slow

inactivation の亢進が認められて。S1710L は $\beta_1$  サブユニットの有無にかかわらず WT と比較して有意に速い電流 decay を示した。また活性化の膜電位依存性は WT よりも 18 mV 脱分極側に偏移し, 不活性化の膜電位依存性は逆に過分極側に 25 mV 偏移していた。さらに不活性化からの回復は WT より有意に遅延していた。【結論】Brugada 症候群 T1620M では slow inactivation の亢進が Na 電流を低下させ ST 上昇を引き起していると考えられた。一方 S1710L の機能変化も心筋 Na 電流を抑制する方向に働くと考えられるが, ST 上昇が認められなかった。S1710L では心臓の伝導障害が強く現れ, Brugada 症候群と PCCD の特徴を兼ね備えた特殊な Na チャネル異常である可能性が強い。

## (13) 虚血心筋再灌流傷害に対するブラジキニンの予防作用

李 玉龍, 佐藤俊明, 清未達人, 小野克重 (大分医科大学・生理学第二生理)

Ischemic preconditioning (IPC) は内因性虚血心筋防御機序であり多くの動物種で報告されている。しかし, そのメカニズムはまだ解明されていない。そこで, 我々はモルモット冠動脈灌流右室自由壁標本を用いて, IPC による心筋保護効果および bradykinin の虚血-再灌流に対する効果を検討した。Control 群では 20 分間の虚血後に 60 分間の再灌流すると, 再灌流 60 分後の収縮張力の回復は著しく低下した。1 $\mu$ M の bradykinin 群では再灌流後の収縮張力は著明に改善した。一方, B2 receptor antagonist である HOE 140, PKC inhibitor である chelerythrine,  $K_{ATP}$  channel blocker である glibenclamide 及び mito $K_{ATP}$  channel blocker である 5-HD を用いると, bradykinin の収縮張力改善作用は著明に抑制された。しかし, surface  $K_{ATP}$  channel

blocker である HMR 1098 の使用では, bradykinin の保護作用の抑制は見られなかった。一回の IPC だけでは再灌流早期の収縮張力は僅かに改善したが, 10 分以降の収縮張力は改善しなかった。低濃度 bradykinin (0.5 $\mu$ M) あるいは ACE inhibitor である enalapril 存在下では, 一回の IPC による収縮張力の改善作用が増強した。4 回の IPC では虚血再灌流による収縮機能障害に対する持続的な保護作用が認められた。しかし, HOE 140, chelerythrine 及び 5-HD の使用下では 4 回の IPC の心筋保護作用が著明に抑制された。以上の結果より, bradykinin または 4 回の IPC の心筋保護作用は B2 receptor を介する PKC の活性化が mitochondria の ATP 感受性  $K^+$  チャネル開口を促進したことによると考えられる。

(14)  $\text{Ca}^{2+}$ スパークで活性化される  $\text{Cl}^-$  電流について

今泉裕治, 稲吉 温, 村木克彦, 渡辺 稔 (名古屋市立大学薬学部・薬物治療学)

$\text{Ca}^{2+}$ スパークは筋小胞体と横行小管の接合部で生じる。横行小管系の発達が悪いウサギ心房筋細胞においては、 $\text{Ca}^{2+}$ スパークが細胞膜近傍で生じる確率が高い。ウサギ心房筋単一細胞に電位固定法と共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (ニコン RCM8000) による高速  $\text{Ca}^{2+}$ 画像解析法を適用し同時解析を行った。記録電極には Cs-aspartate 及び fluo-3 等を含む内液を充填した。保持電位 -50mV から -20mV 以上に脱分極させると  $\text{Ca}^{2+}$ スパークが細胞膜直下に多数生じ、さらに細胞内部へも  $\text{Ca}^{2+}$ wave として広が

り、興奮収縮連関が生じた。この時、 $\text{Ca}^{2+}$ 電流に続き一過性の  $\text{Ca}^{2+}$ 依存性  $\text{Cl}^-$  ( $\text{ClCa}$ ) チャネル電流が  $\text{Ca}^{2+}$ スパークと同期して活性化された。1つの  $\text{Ca}^{2+}$ スパークに対応した  $\text{Cl}^-$ 電流活性化は、 $\text{Cl}^-$ 平衡電位を 0mV に設定し -40mV において観測した場合にも記録できなかったが、 $\text{Ca}^{2+}$ wave となって細胞膜に沿って広がった場合には、対応した  $\text{Cl}^-$ 電流が観測された。 $\text{Ca}^{2+}$ スパークが  $\text{ClCa}$  チャネルを直接的に活性化している可能性が示された。

## (15) サイクリン依存性キナーゼによるクロライドチャンネルの調節機構

古川哲史, 鄭 雅娟, 稲垣暢也 (秋田大学医学部第一生理)

小倉武彦 (千葉大学医学部薬理)

土屋博之, 片山芳文 (東京医科歯科大学難治疾患研究所自律生理)

細胞周期はダイナミックな細胞容積変化を伴う生命現象であり、イオン電流変化が重要な役割を果たすと考えられる。容積調節性クロライドチャンネル  $\text{ClC}-2$  チャネルは M 期特異的キナーゼ  $\text{p}34^{\text{cdc}2}/\text{cyclin B}$  により直接リン酸化され、ツメガエル卵母細胞に発現させた  $\text{ClC}-2$  電流は

$\text{p}34^{\text{cdc}2}/\text{cyclin B} \cdot \text{protein phosphatase 1}$  により機能調節をうけた。M 期細胞周期エンジンによる  $\text{ClC}-2$  チャネル制御は M 期の急激な容積変化への適応機構であることが示唆される。

## (16) 圧負荷肥大心筋におけるストレッチ活性化クロライドチャンネル及び過分極活性化陽イオンチャンネルの発現の変化

平松幹男, 沢登 徹, 平岡昌和 (東京医科歯科大学・難治研・循環器病)

古川哲史 (秋田大学医学部・生理学第一講座)

【背景】肥大心で  $\text{Cl}^-$  電流及び過分極活性化陽イオン電流の増加が報告されている。その機序は明らかではないが、チャンネルの mRNA や蛋白の発現の増加が予想される。ラットの心臓のストレッチ活性化  $\text{Cl}^-$  チャネル及びその調節蛋白には  $\text{ClC}-2$ ,  $\text{ClC}-3$ ,  $\text{PICln}$  がある。過分極活性化陽イオンチャンネルは  $\text{HCN}2$  及び  $\text{HCN}4$  にコードされる。【目的】ラット肥大心での  $\text{ClC}-3$ ,  $\text{PICln}$ ,  $\text{HCN}2$ ,  $\text{HCN}4$  の mRNA の発現の変化を検討した。【方法・材料】心肥

大は雄性ラットの腹部大動脈を結紮し作成し、同時にシヤムを作成した。術後 8 週に心臓を摘出し湿重量を測定した。mRNA の発現量は競合的 RT-PCR 法にて測定した。【結果】肥大群の心体重比はシヤムの約 1.7 倍で有意差を認めた。肥大群で  $\text{ClC}-3$ ,  $\text{HCN}2$ ,  $\text{HCN}4$  の mRNA の有意な発現の増加を認めた。 $\text{PICln}$  の mRNA の発現には差を認めなかった。

### (17) ラット脳における TRP4 バリエーション

佐藤栄作, 尾野恭一, 飯島俊彦 (秋田大学・医・薬理学)

容量性カルシウム流入 (CCE) 機構は, 非興奮性細胞に広く備わっており, 生理機能の制御に重要な役割を果たしている。TRP 蛋白ファミリーのひとつである TRP4 は, ラット, ウシ, マウスおよびヒトからクローニングされており, ラット (RTRP) やウシ TRP4 を発現させた細胞で CCE を示すことから, CCE チャネルの分子本体の有力な候補と考えられている。RTRP は, 膜貫通領域 S2-S3 をつなぐ細胞内領域に対応するアミノ酸が 23 個欠如しているが, この領域を含めて CCE に関与するアミノ酸領域は, 未だにわかっていない。そこで本実験では, この領域に関わる意味を検討するために RT-PCR 法

を用いてラット脳 cDNA から TRP4 遺伝子のクローニングを試みた。この過程で, RTRP とは異なる 5 つの TRP4 バリエーション (a-e) が得られた。TRP4a は, アミノ酸レベルでマウス, ヒト TRP4 に対してそれぞれ 98.5%, 95.7% の相同性を示した。TRP4b は, 膜貫通領域 S2-S3 のリンカー部分を翻訳するヌクレオチドが 53-bp 欠如しており, フレームシフトにより機能的なチャネル蛋白を構成しない可能性が示唆された。また, GFP を N 末端に融合させた TRP4a は, 293 細胞を用いた発現実験において細胞膜に特異的な発現が確認された。他のバリエーションについては発現の有無および機能については不明である。

### (18) 甲状腺ホルモンによる心臓イオンチャネルの修飾

阿部 晃, 馬 梅膏, 相澤義房 (新潟大学医学部第一内科)

【目的】甲状腺ホルモンが心臓の電位依存性イオンチャネルの遺伝子発現に影響するのか甲状腺機能亢進と抑制時のイオンチャネル発現を調べる。また心房筋と心室筋での変化を比較し, 甲状腺ホルモンと心房細動発生の関わりについて考察する。【方法】ラットをコントロール群, 甲状腺ホルモン投与群 (T3), Propylthiouracil (PTU) を投与する群の 3 群に分け, 4 週連日経口投与後心房筋と心室筋から RNA を抽出した。Kv1.2, Kv1.4, Kv1.5, Kv2.1, Kv4.2, KvLQT1, r-erg, minK, L-type Ca channel, Sodium channel をプローブとして RNase Protection Assay で mRNA を定量し比較検討した。【結果】心房筋と心室筋

では T3 投与で Kv1.2 は著減, Kv1.5 は増加した。PTU 投与では Kv1.2 と Kv1.4 は増加, Kv1.5 は著減したが, これらの変化は Shaker 関連電位依存性カリウムチャネル (Kv1.2, Kv1.4, Kv1.5) で認められた。心房筋では T3 投与で minK の発現が著増し, r-erg の発現は約 2 倍に増加したが, 心室筋では変化を認めなかった。【結語】甲状腺ホルモンは心臓で Shaker 関連の発現を調節していた。また r-erg と minK は心房筋でのみ有意に発現が増加した。これは活動電位幅を短縮し心房細動を発生し易くするものと思われた。

### (19) 心筋症ハムスター心筋細胞の電気生理学的特性変化に対する エンドセリン受容体遮断薬長期投与の影響

松本泰典, 中谷晴昭 (千葉大医学部薬理学講座)

心筋症ハムスター BIO14.6 における心室筋細胞の  $K^+$  電流変化に対する  $ET_A$  受容体拮抗薬長期投与の影響について検討した。BIO14.6 の心室筋細胞をパッチクランプ法によって膜電流, 活動電位, 膜容量を測定し, 正常ハ

ムスター F1 と比較した。また, 20 週齢から 40 週齢まで BIO14.6 に  $ET_A$  受容体拮抗薬である TA-0201 を長期投与し, その影響について検討した。

40 週齢の BIO14.6 では F1 に比し膜容量は増大し  $I_{to}$ ,

IK1 及び  $I_{Ca}$  が減少し活動電位幅は延長した。BIO14.6 に対する TA-0201 の長期投与は  $I_{to}$ ,  $I_{Ca}$  の減少を回復させ、活動電位幅の延長, 膜容量の増大を軽減させた。TA-0201 の長期投与は BIO14.6 の生存率を改善させた。

心筋症ハムスターにおいて  $ET_A$  受容体遮断薬の長期投与は電気的リモデリングを軽減させ、心不全の生命予後を改善する可能性が示唆された。

## (20) 活性酸素種による心筋 L 型 Ca チャネル修飾に影響を与える各種因子

山岡 薫, 瀬山一正 (広島大学医学部生理学第一)

我々は酸化作用を有する SH 基修飾試薬が L 型 Ca チャネル電流を増大することをカエル心筋細胞において既に報告した。それは細胞内から作用し, cAMP の増大を必要としない。今回, 同様に強力な酸化作用を有し, 生体で産生されうる活性酸素種の一つである過酸化水素の L 型 Ca チャネルに対する効果のみをみた。過酸化水素 (3mM) は投与時間を 3 分以内とすれば電流の増大作用のみを示した。5~10 分の投与で電流の抑制と, forskolin

刺激に対する反応の抑制がみられた。この抑制効果は Ba 電流ではみられなかった。過酸化水素の電流増大作用は perforation-patch 法を用い電流を記録すると増強した。また whole-cell patch 電極液内の Ca-buffer (BAPTA) を減少させても増加した。したがって過酸化水素の刺激作用, 抑制作用とも Ca 依存性の機構を介することが推察された。

## 12. 脳磁場ニューロイメージング

2000年11月29日～12月1日

代表・世話人：栗城真也（北海道大学電子科学研究所）

所内対応者：柿木隆介（統合生理研究施設）

(1) 聴覚刺激間隔における 1/fn ゆらぎのミスマッチフィールド (MMF) 形成に及ぼす影響

原田暢善<sup>2</sup>, 増田 正<sup>1,2</sup>, 遠藤博史<sup>1,2</sup>, 中村亨弥<sup>1</sup>, 武田常広<sup>3,2</sup>

(<sup>1</sup>通商産業省工業技術院 生命工学工業技術研究所, <sup>2</sup>科学技術振興事業団 戦略的基礎研究推進事業, <sup>3</sup>東京大学大学院 新領域創成科学研究科)

(2) 脳磁図の臨床応用の試み - 側頭葉病変と残存神経機能評価について -

鎌田恭輔<sup>1</sup>, 喬 梵<sup>1</sup>, 竹内文也<sup>2</sup>, 栗城真也<sup>2</sup>, 原田達夫<sup>1</sup>, 北川道生<sup>1</sup>, 宝金清博<sup>1</sup>・岩崎喜信<sup>1</sup>, 三森研自<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>北海道大学 医学部 脳神経外科, <sup>2</sup>北海道大学 電子科学研究所, <sup>3</sup>北海道脳神経外科記念病院)

(3) 指の一次体性感覚野の発達の变化に関する検討:

タッピング刺激を用いた体性感覚誘発脳磁野の乳児例と成人例の比較

権藤健二郎<sup>1</sup>, 飛松省三<sup>2</sup>, 吉良龍太郎<sup>1</sup>, 鳥巢浩幸<sup>1</sup>, 原 寿郎<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>九州大学大学院医学研究院小児科, <sup>2</sup>脳神経病研究施設臨床神経生理)

(4) 感覚応答を伴わないヒトの認識関連磁場応答の観察

吉田秀樹<sup>1,2</sup> and Claudia D. Tesche<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup>Low Temperature Laboratory, Helsinki University of Technology, <sup>2</sup>東和大学工学部電気工学科

<sup>3</sup>Department of Psychology, Logan Hall, University of New Mexico, USA)

(5) 持続部分てんかんの病態生理: 脳磁図による検討

(飛松省三<sup>1</sup>, 大石文芽<sup>2</sup>, 重藤寛史<sup>1,2</sup>, 谷脇考恭<sup>1</sup>, 森岡隆人<sup>3</sup>, 吉良潤一<sup>2</sup>

(九州大学大学院医学研究院脳神経病研究施設臨床神経生理<sup>1</sup>, 神経内科<sup>2</sup>, 脳外科<sup>3</sup>)

(6) ニオイ刺激によるヒトの脳磁図の周波数分析

白石君男, 毛利 毅, 加藤寿彦, 原田博文, 周防屋祐司, 力丸文秀, 柿木隆介

(福岡大学医学部耳鼻咽喉科学教室, 岡崎国立共同研究機構生理学研究所)

(7) 視覚領野における色彩情報処理特性の差異

芝崎俊幸<sup>1</sup>, 大谷芳夫<sup>2</sup>, 岡村昇一<sup>3</sup>, 吉田佳一<sup>3</sup>, 外山敬介<sup>4</sup>, 江島義道<sup>5</sup>

(<sup>1</sup>京都工芸繊維大学大学院 工芸科学研究科, <sup>2</sup>京都工芸繊維大学 工芸学部

<sup>3</sup>島津製作所, 基盤技術研究所, <sup>4</sup>島津製作所, <sup>5</sup>京都大学大学院 人間・環境学研究科)

(8) ウェーブレット変換を用いた MEG ノイズ除去法とその適用

小野弓絵<sup>1</sup>, 石山敦士<sup>1</sup>, 外池光雄<sup>2</sup>, 山口雅彦<sup>2</sup>, 葛西直子<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>早稲田大学, <sup>2</sup>電子技術総合研究所)

(9) 純音刺激における中・長潜時聴覚誘発反応 P50m・N100m 信号源の比較

菅野彰剛<sup>1,2</sup>, 中里信和<sup>1</sup>, 永松謙一<sup>3</sup>, 岩崎真樹<sup>3</sup>, 畑中啓作<sup>4</sup>, 村山伸<sup>2</sup>, 吉本高志<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>広南病院東北療護センター, <sup>2</sup>熊本大学大学院自然科学研究科

<sup>3</sup>東北大学・脳神経外科, <sup>4</sup>(株)エレクトラ)

(10) 単一電流双極子法によるてんかん焦点推定の有用性と問題点

大石 誠, 亀山茂樹 (国立療養所西新潟中央病院てんかんセンター 脳神経外科)

(11) てんかん棘波の dipole 推定結果に及ぼす要因についての検討

芳村勝城, 渡辺裕貴, 白石秀明\*, 八木和一

(国立療養所静岡東病院(てんかんセンター), \*北海道大学医学部小児科)

- (12) 被験者間平均波形計算のための頭部標準位置への変換 頭部位置ズレによる脳磁界計測誤差と  
頭部標準位置への変換による誤差  
今田俊明 (日本電信電話 (株) コミュニケーション科学基礎研究所)
- (13) 日本語の文章理解時における MEG 応答  
中島利崇, 砂盃尚子, 竹内文也, 栗城真也 (北海道大学電子科学研究所)
- (14) 脳磁場計測と機能的核磁気共鳴画像法による味覚関連皮質(2)  
小早川達<sup>1</sup>, 綾部早穂<sup>2</sup>, 山内康司<sup>1</sup>, 溝口千恵<sup>1</sup>, 斉藤幸子<sup>1</sup>, 小川 尚<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup> 生命工学工業技術研究所, <sup>2</sup> 筑波大学心理学系, <sup>3</sup> 熊本大学医学部)
- (15) GO/NOGO 反応選択課題実行中に認められた posterior parietal cortex の活動  
柴田 忠彦, Andreas A. Ioannides (理化学研究所 脳科学総合研究センター  
認知脳科学研究グループ 脳機能ダイナミクス研究チーム)
- (16) 刺激強度が異なる味刺激に対する味覚一次野の磁場応答  
斉藤幸子<sup>1</sup>, 小早川達<sup>1</sup>, 後藤なおみ<sup>1</sup>, 小川 尚<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup> 通産省工業技術院・生命工学工業技術研究所, <sup>2</sup> 熊本大学・医学部)
- (17) Mesial temporal lobe epilepsy における MEG と EEG の比較検討  
(露口尚弘<sup>1</sup>, 森野道晴<sup>1</sup>, 服部英司<sup>2</sup>, 蔦田強司<sup>3</sup>, 下川原正博<sup>4</sup>, 原 充弘<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup> 大阪市立大学脳神経外科, <sup>2</sup> 小児科, <sup>3</sup> 老年科神経内科, <sup>4</sup> 金沢工業大学先端電子技術応用研究所)
- (18) 脳内の離れた部位間での脳磁シグナル協調活動検出の試み 第 2 報  
河津省司<sup>1,2,6</sup>, 中村昭範<sup>1</sup>, 右代谷昇<sup>3</sup>, 濱崎淳洋<sup>4</sup>, 堀部賢太郎<sup>5</sup>, 山田孝子<sup>5</sup>, 加藤隆司<sup>1</sup>, 伊藤健吾<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup> 長寿医療研究センター 生体機能研究部, <sup>2</sup> 名古屋大学医学部放射線科, <sup>3</sup> 和歌山工業高等専門学校  
<sup>4</sup> 京都学園大学 経済学部, <sup>5</sup> 国立療養所中部病院 神経内科, <sup>6</sup> トヨタ記念病院 放射線科)
- (19) 先天性難聴を有する小児の聴覚誘発磁場  
久保田雅也<sup>1</sup>, 広瀬宏之<sup>1</sup>, 榊原洋一<sup>1</sup>, 湯本真人<sup>2</sup> (<sup>1</sup> 東京大学小児科, <sup>2</sup> 同検査部)
- (20) 嗅覚に対する非侵襲計測と脳内の嗅覚神経路  
外池光雄\*, 山口雅彦\*, 浜田隆史\*, 瀬尾 律\*\*, 嘉悦 勲\*\*\*, 肥塚 泉\*\*\*\*  
(\*電総研大阪 LERC, \*\*瀬尾耳鼻咽喉科院, \*\*\*近畿大理工学部, \*\*\*\*聖マリアンナ医科大学耳鼻咽喉科)
- (21) 脊髄誘発磁界測定の実状と将来展望  
小森博達, 川端茂徳, 大久保治修, 四宮謙一  
(東京医科歯科大学 医歯学総合研究科 脊椎脊髄神経外科学)
- (22) MEG による記憶想起の研究  
嘉悦 勲\*, 須谷康一\*, 内田熊男\*\*, 外池光雄\*\*\*, 山口雅彦\*\*\*, 岩木 直\*\*\*  
(\*近畿大学大学院総合理工学研究科 \*\*近畿大学理工学部原子炉工学科  
\*\*\*電子技術総合研究所 大阪ライフエレクトロニクス研究センター)
- (23) fMRI の結果から位置を固定して MEG ダイポールを解く方法の検討  
藤巻則夫, 早川友恵, Matthew Nielsen, 宮内 哲 (郵政省 通信総合研究所)
- (24) 骨導超音波知覚時の脳活動計測  
中川誠司\*, 阪口剛史\*\*, 西村忠己\*\*\*, 山口雅彦\*, 外池光雄\*, 細井裕司\*\*\*, 今泉 敏\*\*\*\*, 渡辺好章\*\*  
(\*電子技術総合研究所, \*\*同志社大学, \*\*\*奈良県立医科大学, \*\*\*\*東京大学)
- (25) 12 歳の絶対音感保持者の脳磁場計測  
広瀬宏之, 久保田雅也, 榊原洋一 (東京大学医学部小児科), 湯本真人  
(東京大学医学部附属病院検査部), 榊原彩子 (一音会ミュージックスクール講師)

- (26) 後頭葉てんかんにおける発作症状の検討 ~Magnetoencephalographic study~  
山田康一郎<sup>1,2</sup>, 白石秀明<sup>1</sup>, 渡辺裕貴<sup>1</sup>, 八木和一<sup>1</sup>, 滝川守国<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>国立療養所静岡東病院(てんかんセンター) <sup>2</sup>鹿児島大学医学部神経精神科)
- (27) 両眼立体視時の誘発脳磁場に対する注意の影響  
大脇崇史, 武田常広 (東京大学大学院 新領域創成科学研究科 複雑理工学専攻  
科学技術振興事業団 戦略的基礎研究推進事業)
- (28) 口唇部電気刺激誘発磁界の一次皮質反応  
永松謙一, 中里信和\*, 隈部俊宏, 畑中啓作\*\*, 菅野彰剛\*\*\*, 吉本高志  
(\*東北大学脳神経外科, 広南病院脳神経外科, \*\* (株)エレクトラ, \*\*\*広南病院療護センター)
- (29) 脳機能解析統合ソフト開発の試み  
中村昭範<sup>1</sup>, 河津省司<sup>1</sup>, 右代谷昇<sup>2</sup>, 濱崎淳洋<sup>3</sup>, 山田孝子<sup>4</sup>  
堀部賢太郎<sup>4</sup>, 文堂昌彦<sup>1</sup>, 加知輝彦<sup>4</sup>, 加藤隆司<sup>1</sup>, 伊藤健吾<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>長寿医療研究センター生体機能研究部, <sup>2</sup>和歌山工業高等専門学校  
<sup>3</sup>京都学園大学経済学部, <sup>4</sup>国立中部病院神経内科)
- (30) 持続性部分てんかんの症例における脳磁図所見  
出店正隆, 中村文裕 (北海道大学医学部精神医学教室)
- (31) MEG でとらえた発作間欠期突発波の鏡像焦点  
岩崎真樹, 中里信和, 菅野彰剛, 畑中啓作, 吉本高志  
(東北大学脳神経外科, 広南病院脳神経外科, 広南病院療護センター, エレクトラ)
- (32) 光刺激と脳磁図における光突発反応の位相差について  
白石秀明<sup>1</sup>, 芳村勝城<sup>2</sup>, 渡辺裕貴<sup>2</sup>, 八木和一<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>北海道大学医学部小児科, <sup>2</sup>国立療養所静岡東病院(てんかんセンター))
- (33) 体性感覚誘発オン・オフ磁場反応  
湯本真人<sup>1,2</sup>, 齋藤 治<sup>2</sup>, 金子 裕<sup>2</sup>, 中原一彦<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東京大学医学部附属病院, <sup>2</sup>国立精神・神経センター武蔵病院)
- (34) 視覚/聴覚オドボール課題に関連する脳内神経活動の可視化  
岩木 直\*, 平田直也\*\*\*, 外池光雄\*, 山口雅彦\*  
(\*電子技術総合研究所 大阪ライフエレクトロニクス研究センター, \*\*近畿大学 理工学部)
- (35) 全脳型脳磁計を用いたてんかん解析時の工夫  
橋詰 顕, 栗栖 薫, 有田和徳, 花谷亮典, 飯田幸治 (広島大学医学部脳神経外科)
- (36) 日本語ピッチアクセントと音韻認知に関する一検討  
林 良子\*\*\*, 今泉 敏\*, 上野照剛\*, 森 浩一\*\*  
(\*東京大学大学院医学系研究科, \*\*国立身体障害者リハビリテーションセンター研究所)
- (37) 聴覚マスキング条件下の発声関連脳磁場  
軍司敦子, 宝珠山稔, 柿木隆介  
(生理学研究所統合生理研究施設)
- (38) 睡眠中のフラッシュ視覚誘発脳磁場  
大草知裕, 柿木隆介, 宝珠山稔, 王 麗紅 (生理学研究所統合生理研究施設)
- (39) 正中神経刺激による短潜時皮質体性感覚誘発脳磁界成分と体性感覚誘発脳電位成分の対応  
<sup>1,2</sup>宝珠山稔, <sup>2</sup>柿木隆介  
(<sup>1</sup>名古屋大学医学部保健学科, <sup>2</sup>生理学研究所統合生理研究施設)

## (40) SAM 解析による速波発生源とてんかん源性領域との関連の検討

二宮宏智, 加藤天美, 平田雅之, 新居康夫, 久村英嗣, 平野俊一郎, 谷口理章  
今井克美\*, 吉峰俊樹 (大阪大学 脳神経外科, \*小児科)

## 【参加者名】

浅田 博 (大阪府立大学総合科学部自然環境科学科), 石山敦士 (早稲田大学理工学部 電気電子情報工学科), 今田俊明 (日本電信電話 (株) コミュニケーション科学基礎研究所), 岩木 直 (電子技術総合研究所 大阪ライフエレクトロニクス研究センター), 岩崎真樹 (東北大学脳神経外科), 上野照剛 (東京大学大学院医学系研究科生体物理医学専攻医用生体工学講座 生体情報学教室), 鶴飼 聡 (大阪大学大学院医学系研究科神経機能医学講座・精神医学), 江島義道 (京都大学大学院 人間・環境学研究科), 遠藤博史 (生命工学工業技術研究所), 大石誠 国立療養所西新潟中央病院てんかんセンター 脳神経外科), 大草知裕 (生理学研究所統合生理研究施設), 太田 徹 (秋田大学医学部附属病院 脳神経外科), 大谷芳夫 (京都工芸繊維大学 工芸学部心理学研究室), 大脇崇史 (東京大学大学院 新領域創成科学研究科 複雑理工学専攻 生体複雑学研究室(武田研究室)), 岡本洋輔 (神戸大学工学部 安藤研究室所属), 小川朝生 (大阪大学大学院医学系研究科神経機能医学講座・精神医学), 沖屋康一 (高知医科大学 脳神経外科), 小野弓絵 (早稲田大学理工学研究科 超電導応用(石山敦士)研究室), 嘉悦 勲 (近畿大学大学院総合理工学研究科), 金桶吉起 (生理学研究所統合生理研究施設), 鎌田恭輔 (北海道大学医学部脳神経外科), 川口俊介 (大阪大学大学院医学系研究科神経機能医学講座・精神医学), 河津省司 (長寿医療研究センター 生体機能研究部), 川村博文 (広島県立保健福祉大学保健福祉学部理学療法学科), 菅野彰剛 (広南病院東北療護センター (熊本大学大学院自然科学研究科), 岸田邦治 (岐阜大学工学部応用情報学科), 北川道生 (医療法人社団 静和会 静和記念病院), 喬 梵 (北海道大学医学部 脳神経外科), 久保田雅也 (東京大学小児科), 栗城真也 (北海道大学電子科学研究所), 軍司敦子 (生理学研究所統合生理研究施設), 後藤 寛 (横河電機株式会社航機 MEG センター), 小早川 達 (生命工学工業技術研究所 人間情報部), 小森博達 (東京医科歯科大学 医歯学総合研究科 脊椎脊髄神経外科学), 近藤 亨 (有限会社サム) 権藤健二郎 (九州大学大学院医学研究院小児科), 斉藤幸子 (生命工学工業技術研究所 人間情報部), 芝崎俊幸 (京都工芸繊維大学大学院 工芸科学研究科),

忠彦 (理化学研究所 脳科学総合研究センター 認知科学研究グループ 脳機能ダイナミクス研究チーム), 下川原正博 (金沢工業大学先端電子技術応用研究所), 秋云海 (名古屋大学大学院医学研究科生物化学), 白石君男 (福岡大学医学部耳鼻咽喉科学教室), 白石秀明 (北海道大学医学部小児科) 鈴木まや (関西学院大学心理学研究室), 瀬尾 律 (電子技術総合研究所 大阪 L E R C), 添田喜治 (神戸大学大学院 自然科学研究科 地球環境科学専攻安藤研究室), 高田あゆみ (E L E K T A 株式会社), 高梨芳彰 (京都府立洛東病院 神経内科), 高島智則 (香川大学大学院教育学研究科), 竹内文也 (北海道大学電子科学研究所), 武原志帆 (大阪大学 人間科学部), 田中尚朗 (北海道大学医学部精神医学教室), 谷脇孝恭 (九州大学大学院医学研究院脳研臨床神経生理学), 田丸恒実 (信州大学医学部精神医学教室), 千葉和也 (E L E K T A 株式会社), 露口尚弘 (大阪市立大学脳神経外科), 出店正隆 (北海道大学医学部精神医学教室), 外池光雄 (電子技術総合研究所 大阪ライフエレクトロニクス研究センター), 飛松省三 (九州大学大学院医学研究院脳研臨床神経生理学), 中川誠司 (電子技術総合研究所大阪ライフエレクトロニクス研究センター), 中島利崇 (北海道大学電子科学研究所量子計測研究分野), 永松謙一 (東北大学脳神経外科), 中村昭範 (国立長寿医療研究センター 生体機能研究部), 新美 牧 (慶応大学病院 脳神経外科), 二宮宏智 (大阪大学医学部脳神経外科), 橋詰 顕 (広島大学脳神経外科), 畑中啓作 (E L E K T A 株式会社), 林秀彦 (北陸先端科学技術大学院大学), 林 良子 (東京大学大学院医学系研究科認知・言語医学講座), 原田暢善 (科学技術振興事業団生命工学工業技術研究所), 東山巨樹 (秋田大学医学部附属病院 脳神経外科), 広瀬宏之 (東京大学小児科), 深井英和 (岐阜大学工学部 応用情報学科), 藤井本晴 (高知医科大学 脳神経外科), 藤巻則夫 (通信総合研究所 知覚機構研究室 脳機能グループ), 宝珠山稔 (名古屋大学医学部保健学科), 堀部賢太郎 (国立療養所中部病院神経内科), 溝口千恵 (生命工学工業技術研究所 人間情報部), 森 浩一 (立身体障害者リハビリテーションセンター研究所), 八木和一 (国立療養所静岡東病院てんかんセンター), 柳田益造 (同志社大学工学

部 知識工学科), 山田康一郎(鹿兒島大学病院神経精神科), 山田孝子(国立療養所中部病院 神経内科), 山本千珠子(大阪大学大学院人間科学研究科行動生態学講座行動生理学研究分野), 山本雅清(大阪大学大学院医学系研究科神経機能医学講座・精神医学), 湯本真人(東京大

学医学部附属病院), 吉田秀樹(東和大学電気工学科医療電子教室), 芳村勝城(国立療養所静岡東病院てんかんセンター), 力丸文秀(福岡大学医学部耳鼻咽喉科学教室), 渡辺裕貴(国立療養所静岡東病院てんかんセンター)

## 【概要】

本研究会は, 平成12年11月29日(12時)~12月1日(13時)までの足かけ3日間にわたり岡崎コンファレンスセンターで開催された。世話人は筆者と, 統合生理研究施設の柿木隆介教授である。

この研究会の趣旨は, 現在30台以上の大型脳磁場計測装置が国内で稼働しているなかで, 病院を代表とする臨床研究と, 大学や研究所を中心とする基礎研究に携わる研究者が一同に会し, 十分な発表時間をもって自由にディスカッションしながら情報交換を行なうことを目的としている。

研究発表は「臨床応用」「体性感覚」「聴覚」「視覚」「味覚・嗅覚」「高次機能」「逆問題・信号解析」のセッションに分け, 計40演題の発表が行なわれた。さらに, 京都大学・人間・環境学研究所の江島義道教授による「視覚心理学的の立場から展望した脳イメージング装置による脳研究の将来」と, 東京大学・医学研究科の上野照剛教授による「磁気刺激および電氣的磁気共鳴イメージン

グでみる脳機能ダイナミクス」に関する特別講演2件があった。参加者の合計は90名である。

臨床応用では, てんかん応用が盛んであるが棘波とダイポール信号源の解析法について詳細な報告例が続いた。体性感覚では, 発達による指感覚野の変化の解析や脊髄誘発磁場の計測など新しい応用に関する発表が見られた。また, 聴覚や味覚・嗅覚, 視覚などの感覚系の計測では, 幅広い分野にわたって研究報告があった。絶対音感保持者の聴覚野の活動, 骨導超音波知覚, 発声に関連する磁場反応, 日本語のアクセントと音韻認知, fMRIを併用した味覚皮質活動の観察, 色彩情報処理, GO/NOGO活動磁場計測など, 特徴のある研究が数多く見られた。さらに, fMRIによるダイポール位置の限定, 複数信号源推定, 視聴覚高次機能の計測など, 解析法や計測法が着実に進展している様子が感じられた。

通常の学会では得られない突っ込んだ議論や詳細な実験・解析法の報告など, 貴重な内容の研究会であった。

## (1) 聴覚刺激間隔における $1/f_n$ ゆらぎのミスマッチフィールド (MMF) 形成に及ぼす影響

原田暢善<sup>2</sup>, 増田 正<sup>1,2</sup>, 遠藤博史<sup>1,2</sup>, 中村亨弥<sup>1</sup>, 武田常広<sup>3,2</sup>

(<sup>1</sup>通商産業省工業技術院 生命工学工業技術研究所

<sup>2</sup>科学技術振興事業団戦略的基礎研究推進事業, <sup>3</sup>東京大学大学院 新領域創成科学研究科)

ヒトが環境中の変動する刺激の中に存在する規則性を抽出する能力が, 脳内のどのような部位・機能に基盤を持つかについて明らかにしたいと考えた。ランダムに変動させた聴覚刺激間隔の中に規則性を増加させた時, すなわち, 刺激間隔のゆらぎを  $1/f_0$  ゆらぎ,  $1/f_1$  ゆらぎ,  $1/f_2$  ゆらぎ,  $1/f_\infty$  ゆらぎ(一定間隔), の4条件で与えたときに, 聴覚刺激により引き起こされるミスマッチフィールド(MMF)の形成がどのように変化するかについて検

討した。低頻度刺激条件と高頻度刺激条件の差分から得られる波形の振幅の二乗平均の値を, 各被験者, 各条件ごと計算し, ゆらぎのべき乗で比較したところ, ゆらぎのべき乗の増加とともに振幅の二乗平均の値が有意に増加することが明らかになった。このことから, ゆらぎのべき乗が変化すること, すなわち規則性が変化することが, MMFの形成に影響を与えることが明らかになった。

## (2) 脳磁図の臨床応用の試み - 側頭葉病変と残存神経機能評価について -

鎌田恭輔<sup>1</sup>, 喬 梵<sup>1</sup>, 竹内文也<sup>2</sup>, 栗城真也<sup>2</sup>, 原田達夫<sup>1</sup>, 北川道生<sup>1</sup>, 宝金清博<sup>1</sup>・岩崎喜信<sup>1</sup>, 三森 研<sup>3</sup>( <sup>1</sup> 北海道大学 医学部 脳神経外科, <sup>2</sup> 北海道大学 電子科学研究所, <sup>3</sup> 北海道脳神経外科記念病院)

脳磁図は限局した脳皮質活動を解析することが可能であるため、左右側頭葉機能を分離して観察することが可能である。今回我々は側頭葉病変による脳の損傷程度と脳磁図による聴皮質機能の評価について検討したので報告する。対象は側頭葉後半部の脳梗塞患者 13 例である。1000 Hz 純音刺激による聴覚誘発脳磁界 (AEF) を通常より長い 2.5 sec の潜時まで計測した。同様の刺激による

機能 MRI もあわせて施行した。失語の重症例では AEF および fMRI による反応は全く認めなかった。広範な虚血病巣が出現しているにも関わらず、劇的な症状の改善を認めた 2 症例では、左上側頭領域に AEF 信号が局在していた。また、患側では長潜時の (1 sec 以上) の AEF 応答を認め、障害半球に特異的な病的反応と考えられた。

## (3) 指の一次体性感覚野の発達的变化に関する検討：

タッピング刺激を用いた体性感覚誘発脳磁野の乳児例と成人例の比較

権藤健二郎<sup>1</sup>, 飛松省三<sup>2</sup>, 吉良龍太郎<sup>1</sup>, 鳥巢浩幸<sup>1</sup>, 原 寿郎<sup>1</sup>( <sup>1</sup>九州大学大学院医学研究院小児科, <sup>2</sup>同 脳神経病研究施設臨床神経生理)

乳児の体部位局在の発達的变化を検討した。対象は健康発達と判定された乳幼児 10 名 (6 - 8 生月) と健康なボランティア成人 5 名 (31 - 37 歳) である。成人も乳幼児と同様に抱水クロラール (30-50mg/kg) を用いて睡眠 II-III 段階に鎮静し母指と薬指の掌側を air-tapping 装置を用いて刺激し加算平均した。脳磁界の測定は 37 チャンネル脳磁計を用いた。SEP における N1 に相当する反応 (W1) に注目し、等価双極子電流源の三次元座標を母指、

薬指刺激それぞれにおいて算出し 2 点間の距離を求めた。乳幼児 10 例のうちノイズが少ない 5 例 (6 - 8 生月) と成人例 5 例を解析の対象とした。母指 - 薬指間距離は乳児群で平均  $3.9 \pm 0.85$  cm であるのに対し成人群では平均  $2.0 \pm 0.51$  cm と有意に距離が短かった ( $P < 0.01$ )。これは発達に伴って皮質の機能の局在化・特殊化が生じた可能性があると考えられた。

## (4) 感覚応答を伴わないヒトの認識関連磁場応答の観察

吉田秀樹<sup>1,2</sup> and Claudia D. Tesche<sup>1,3</sup> ( <sup>1</sup> Low Temperature Laboratory, Helsinki University of Technology, FINLAND, <sup>2</sup> 東和大学工学部電気工学科, <sup>3</sup> Department of Psychology, Logan Hall, University of New Mexico, USA)

例えば聴性情報処理は、呈示音の特徴抽出処理 (感覚応答) と、高次の認識関連処理に大別される。両情報処理過程は、殆ど同時に処理が実現されると共に、空間的にも一部重なり合っていることが指摘される。多チャンネル化した脳磁計が、単一ダイポールでは説明の難しい、複雑で緻密な磁場空間分布情報を提供する可能性は予想

に難く無い。我々の試みは、心理実験的手法により認識処理を感覚応答から分離し観察することにあつた。着目した部位は、音響識別に関わりが深いとされる右側の側頭葉上面であり、静寂時であっても磁場応答が観察された。

## (5) 持続部分てんかんの病態生理: 脳磁図による検討

飛松省三<sup>1</sup>, 大石文芽<sup>2</sup>, 重藤寛史<sup>1,2</sup>, 谷脇考恭<sup>1</sup>, 森岡隆人<sup>3</sup>, 吉良潤一<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>九州大学大学院医学研究院脳神経病研究施設 臨床神経生理, <sup>2</sup>神経内科, <sup>3</sup>脳外科)

持続部分てんかん (EPC) はてんかん焦点が 1 次運動野にあるとされる稀な疾患である。私共は EPC の病態生理を脳波, 脳磁図 (MEG), jerk-locked back averaging (JBA) 法で検討した。症例 1 は 69 歳, 男。右上肢のけいれんが持続し, 脳波では C3 を中心とする棘波を認めた。棘波の dipole は左運動野から前運動野にある皮質異形成の周辺に散在した。MEG の JBA により筋放電に関連した棘波の dipole を推定すると術中皮質脳波で認めた棘波の焦点とほぼ一致した。症例 2 は 32 歳, 女。右下肢の

律動性けいれんを認めた。脳波は正常であったが, 脳波の JBA により筋放電に先行する棘波を認めた。C2 付近に陰性棘波, C1 付近に陽性棘波があり, 接線方向の dipole の存在が疑われた。MEG の JBA により左下肢運動野に限局する接線方向の dipole が推定され, 脳波所見と一致した。MEG は EPC の棘波の電流源推定に優れているが, JBA 法を行うことによりさらにその精度が向上し, 病態の解明に有用となる。

## (6) ニオイ刺激によるヒトの脳磁図の周波数分析

白石君男, 毛利 毅, 加藤寿彦, 原田博文, 周防屋祐司, 力丸文秀 (福岡大学医学部耳鼻咽喉科学教室)

柿木隆介 (岡崎国立共同研究機構生理学研究所)

ヒトにニオイ刺激と無臭刺激を与えたときの脳磁図を記録し, それらの信号を高速フーリエ変換によって解析して, ヒトの脳活動がどのように変動するかを検討した。対象は右利きの嗅覚正常者 9 例とした。方法はテフロンチューブを右鼻腔に約 1cm 挿入し吸気時に刺激を提示した。臭素にはアミルアセテートを用い, 無臭刺激は窒素ガスを用いた。刺激圧力は 0.05mPa, 刺激時間 1 秒とし, 無臭刺激とニオイ刺激はそれぞれ 50% の頻度でラ

ンダムに, 3~5 呼吸に 1 回の割合で 30 回ずつ与えた。チャンネル毎に刺激開始後 3.93 秒間の脳磁図を解析し, 波, 1 波, 2 波, 波および 1Hz 毎のスペクトル密度をチャンネル別に算出した。その結果, 周波数によって無刺激と無臭刺激, 無刺激とニオイ刺激などの検討で, 反応の様相が異なっていた。これらの変動は, ニオイの認知や, 覚醒レベルの上昇, 注意力の集中, 体性感覚などが関与していると考えられた。

## (7) 視覚領野における色彩情報処理特性の差異

芝崎俊幸<sup>1</sup>, 大谷芳夫<sup>2</sup>, 岡村昇一<sup>3</sup>, 吉田佳一<sup>3</sup>, 外山敬介<sup>4</sup>, 江島義道<sup>5</sup>

(<sup>1</sup>京都工芸繊維大学大学院 工芸科学研究科, <sup>2</sup>京都工芸繊維大学 工芸学部  
<sup>3</sup>島津製作所 基盤技術研究所, <sup>4</sup>島津製作所, <sup>5</sup>京都大学大学院 人間・環境学研究所)

ヒトの脳視覚領野における色彩情報処理過程を明らかにするために, 等輝度赤 - 緑正弦波刺激に対する脳磁応答を, 刺激の色コントラスト, 提示時間, 空間周波数の関数として測定した。その結果, 潜時 100-140ms の初期応答と 140-200ms の後期応答が得られた。初期・後期成分について単一電流源推定法によって得られた電流源は

異なっており, 前者は第一次視覚野近傍に, 後者はその前頭腹側寄りに推定された。各応答の大きさおよび潜時は異なる刺激依存性を示し, 初期応答は後期応答に比べ, 応答の大きさに関して, コントラスト依存性が大きく, 時間加算効率が高く, 空間周波数選択性が強いことが明らかとなった。また潜時に関しては, 初期応答のコント

ラスト・提示時間・周波数依存性がいずれも後期応答よりも小さいことが示された。以上の結果は、各応答に関

与する視覚領野における色彩情報処理特性の差異を示すものである。

### (8) ウェーブレット変換を用いた MEG ノイズ除去法とその適用

小野弓絵<sup>1</sup>, 石山敦士<sup>1</sup>, 外池光雄<sup>2</sup>, 山口雅彦<sup>2</sup>, 葛西直子<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>早稲田大学, <sup>2</sup>電子技術総合研究所)

昨今, MEG 計測は脳のより高次の機能に応用されようとしている。このような高次機能に対する誘発脳磁界反応は, その大きさも一次応答などと比べると小さいために, 高い S/N での測定が難しい。また, 少ない加算平均回数で MEG 測定を行うことは, 被験者の頭の動きの影響を小さくすることができ推定精度の向上につながる。これらの理由から, MEG データの S/N を改善する目的で, ウェーブレット変換を用いた時間-周波数解析による

ノイズ除去法を開発した。従来のフーリエ解析と比べ, ウェーブレット解析は周波数情報と共に時間情報が得られるため, 時間軸に対して局所的な MEG 信号成分を抽出する手段として有利である。本ノイズ除去法を様々な S/N で測定された聴覚 MEG に適用してその有用性を検証し, さらに被験者の慣れの影響が大きくノイズを多く含んでしまう嗅覚 MEG に対してもこれを適用して精度の高い信号源推定をめざした。

### (9) 純音刺激における中・長潜時聴覚誘発反応 P50m・N100m 信号源の比較

菅野彰剛<sup>1,2</sup>, 中里信和<sup>1</sup>, 永松謙一<sup>3</sup>, 岩崎真樹<sup>3</sup>, 畑中啓作<sup>4</sup>, 村山 伸<sup>2</sup>, 吉本高志<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>広南病院東北療護センター, <sup>2</sup>熊本大学大学院自然科学研究科, <sup>3</sup>東北大学 脳神経外科, <sup>4</sup>(株)エレクト)

聴覚誘発反応における中・長潜時成分の信号源に差があるか否かは明確には示されていなかった。われわれはヘルメット型脳磁計を用い, 健常人 24 名を対象に, 純音刺激聴覚誘発磁界を計測した。P50m および N100m の頂点潜時の信号源を電流双極子モデルにより推定した。信号源はいずれも側頭葉上面に推定され, 前後, 左右, 上下の各軸方向すべてにおいて, 有意な位置の差を認め

なかった。従来は, 聴覚皮質の前後軸方向での信号源の差が議論されていたが, 本研究では, 両者の明らかな差を認めなかった。P50m, N100m の信号源には, ともにある程度の拡がりを考慮しなければならず, 両者の起源は同一か, あるいは多くを共有している可能性が示唆された。

### (10) 単一電流双極子法によるてんかん焦点推定の有用性と問題点

大石 誠, 亀山茂樹 (国立療養所西新潟中央病院てんかんセンター 脳神経外科)

MEG による非侵襲的なてんかん焦点の推定が期待されているが, まだ問題点も多い。当院の難治性てんかんに対する外科治療では, 慢性硬膜下記録により同定された焦点に対し, できる限り限局した切除を行って来た。2000 年 4 月の MEG 測定開始後 8 例の難治性てんかん症例 (新皮質焦点 7 例, 内側側頭葉てんかん 1 例) に手術

が施行された。これらの MEG 推定焦点と硬膜下記録・手術関連所見を合わせ, MEG の有用性と問題点を検討した。MEG 測定は Neuromag 204 で行い, 発作間欠時棘波の単一電流双極子により焦点推定した。6 例で MEG 推定焦点と硬膜下記録, 手術関連所見は一致した。前頭葉底部・大脳間裂内の焦点 (SMA) 例は MEG の弱点と

思われた。解析上は back ground と filter 処理が問題となり、GOF 値や dipole moment の評価も重要であった。手

術症例を通して MEG による推定焦点の信頼性を確認したが、解析においては一定の基準を作成すべき点多い。

### (11) てんかん棘波の dipole 推定結果に及ぼす要因についての検討

芳村勝城，渡辺裕貴，白石秀明\*，八木和一

(国立療養所静岡東病院(てんかんセンター)，北海道大学医学部小児科\*)

てんかん患者では、大脳の背景活動の乱れが大きく、てんかん棘波の dipole 解析はその影響を強く受ける。このため、背景活動をどのようにして除去するかが dipole 推定の結果の良し悪しを決めるもっとも重要な要因である。MEG を設置した病院が増えてきたことから、MEG によるてんかん焦点の推定もこれからより多くの施設で行われるようになるであろう。そこで、背景活動の除去、または背景活動と棘波との分離の問題は、われわれの施設のみでなく、全施設での共通の問題として、今後、重要になると考えられる。そこで、今回、われわれは、てんかん棘波の dipole 推定を行う前の適切な前処理法について考察してみた。まず、加算平均法について、側頭葉てんかん患者の海馬内電極から記録した棘波と、側頭部の MEG 棘波についてそれぞれを基準として加算をおこない、改善するかを調べた。その結果、海馬棘波を基準にして得られた MEG 加算波形の dipole 推定結果は良好であるが、頭蓋外の MEG を基準にして加算を行うと、

海馬棘波はつぶれてしまい、推定結果も海馬外となった。二番目に帯域通過フィルターによる背景活動の除去について検討した。その結果、1-100Hz 通過では、波形のゆがみは極めて少ないが、dipole の推定結果は患者により差があり、明らかに徐波の混入が多い患者では dipole のばらつきが大きくなってしまったことがあった。4-100Hz 通過ではやや波形のゆがみがみられるが、概して dipole の推定結果は臨床所見と符合する良好な結果が得られた。ただし、義歯や体動による巨大なアーチファクトが重畳する特殊な場合では dipole はばらばらになり結果はよくなかった。さらに 15-100Hz 通過では、波形はゆがみが大きく棘波も低振幅となってしまったことが顕著であった。最後のフィルターは、大きなアーチファクトに対して、dipole 分布のばらつきは小さくなったものの、一般にモーメントがかなり小さくなり、位置も頭皮下の浅い位置に推定され、臨床的な利用に耐えないと思われた。

### (12) 被験者間平均波形計算のための頭部標準位置への変換 頭部位置ズレによる脳磁界計測誤差と頭部標準位置への変換による誤差

今田俊明 (日本電信電話(株)コミュニケーション科学基礎研究所)

脳磁界計測の各セッションにおける被験者の頭部(脳)と磁界センサとの位置 関係が一定であることは少なく、頭部座標系自体に数 mm、数度の違いが生じる。まず、これまでの Neuromag-122 を用いた実験から、33 名の被験者の頭部の平均位置  $r$ 、標準偏差  $\sigma$  を求める。頭部が平均位置から  $1\sigma$ 、 $2\sigma$  ずれた時の計測磁界を平均位置の時と比較すると、goodness-of-fit が 75-96%となり、かなり誤差が生じることが分かる。一方、頭部が平均位置

から  $1\sigma$ 、 $2\sigma$  ずれた時の計測磁界を、頭部が平均位置にあるとした時の磁界値に変換した場合、その goodness-of-fit は 99-100%となり、平均位置への変換が効果があることが分かる。この変換を用いて、全被験者の頭部位置を標準位置にすることにより、被験者間の Grand Mean 波形を計算でき、被験者間に渡る全体的な傾向を波形上で比較することがある程度可能となる。

## (13) 日本語の文章理解時における MEG 応答

中島利崇, 砂孟尚子, 竹内文也, 栗城眞也 (北海道大学電子科学研究所)

日本語は、文章の述語のみを変える事によって、文法や意味の整合性を操作できる性質を持つ言語である。文章の文法理解、意味理解時の脳活動の差異を、204ch 全頭型磁束計を用いて観察した。刺激には、この日本語の性質を用い、同一の文章で述語(動詞)のみを替えて、3種類の文章(文法も意味も正しい200文、文法が間違っている100文、意味が間違っている100文)を作成した。

被験者は右利きの健常者で、与えられた刺激の文章が正しいかどうかを判断した。各文章に対して測定した MEG 反応を、種類別に加算平均した。意味が間違っている文章に対し、潜時 380~470ms において特徴的な活動が観察され、N400 の成分と推測された。一方、文法が間違っている文章に対する脳活動には、特徴的な活動が観察されなかった。

## (14) 脳磁場計測と機能的核磁気共鳴画像法による味覚関連皮質(2)

小早川達<sup>1</sup>, 綾部早穂<sup>2</sup>, 山内康司<sup>1</sup>, 溝口千恵<sup>1</sup>, 斉藤幸子<sup>1</sup>, 小川 尚<sup>3</sup>

(1 生命工学工業技術研究所, 2 筑波大学心理学系, 3 熊本大学医学部)

前回の発表においては、順応をさせずに数十秒の味刺激を与え続ける刺激法を開発し、fMRI を用いた味刺激による脳血流の変化の計測を行い、その実験の報告を行った。今回は被験者数を 12 人に増やし、SPM (statistical parametric mapping) を用いて解析を行った。この結果、島皮質、前頭弁蓋部、中心後回、角回、中前頭回などに活動が見られ、従来の MEG の短潜時、長潜時において推定された結果とよく一致していた。脳血流の変化が見られた部位の中で、従来の脳磁計を用いた味覚実験で短

潜時に推定される Area G (頭頂弁蓋部と島皮質の移行部) の活動が観測される頻度は全体の約 20% であった。また、この部位は 1 回の実験で得られる画像データを用いて統計処理を行った場合より、3 回の実験で得られる画像データを用いた場合に、より高い頻度で活動を見ることができた。この実験結果は Area G が他の味覚関連部位と比較した場合、その MR 信号の S/N 比が低いことを示唆していると思われる。

## (15) GO/NOGO 反応選択課題実行中に認められた posterior parietal cortex の活動

柴田忠彦, Andreas A. Ioannides (理化学研究所 脳科学総合研究センター  
認知脳科学研究グループ 脳機能ダイナミクス研究チーム)

近年 posterior parietal cortex (PPC) が高次運動関連中枢のひとつであり、特に空間情報処理との関連が動物実験等から示唆されているが、ヒトでの報告は少ない。空間選択と PPC の関連を調べるために、視覚刺激を用い GO 条件時の反応指を左右から選択する GO/NOGO 反応選択課題実行中の脳磁図を記録し (6 被験者), Minimum Norm Least squares 法 (CURRY4) を用いて解析を行っ

た。その結果、central sulcus 周辺の信号源に加えて、両側の superior parietal lobule (SPL) 付近に信号源が推定され、その強度は同側指の運動反応時よりも対側指の運動反応時に大きな活動を示し、両側指の運動時には両側 SPL が大きな活動を示した。これより、ヒトにおいて PPC が視空間選択課題における空間選択に関与していることが示唆された。

### (16) 刺激強度が異なる味刺激に対する味覚一次野の磁場応答

斉藤幸子<sup>1</sup>, 小早川達<sup>1</sup>, 後藤なおみ<sup>1</sup>, 小川 尚<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>通産省工業技術院 生命工学工業技術研究所, <sup>2</sup>熊本大学 医学部)

筆者らは脳磁場計測によって, 人間の第一次味覚野が  
大脳の頭頂弁蓋部の内側と島への移行部 (Area G) であ  
ることを報告した。今回は刺激強度が異なる味刺激によ  
る Area G の活動の違いを調べた。ここでいう刺激強度は,  
物理的濃度と心理的強度を含むものとする。被験者 8 人  
を対象に, 0.1, 0.3, 1 M NaCl に対する味覚誘発磁場を  
高速味覚刺激装置と 64ch ホールヘッド脳磁場計を用い  
て計測した。0.03M NaCl についてもこのうち 6 人が参加

した。データ解析の結果, Area G が確認された実験にお  
いて, 刺激開始から味覚誘発磁場が生じ始めるまでの潜  
時は濃度によって変わるとはいえなかった。一方 Area G  
に推定されたダイポールの大きさは物理的濃度と有意な  
相関を持ち, 濃度と共に増大する傾向を示した。もう一  
つの刺激強度である心理的強度と, 物理的濃度およびダ  
イポールの大きさの関係についても検討した。

### (17) Mesial temporal lobe epilepsy における MEG と EEG の比較検討

露口尚弘<sup>1</sup>, 森野道晴<sup>1</sup>, 服部英司<sup>2</sup>, 蔦田強司<sup>3</sup>, 下川原正博<sup>4</sup>, 原 充弘<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>大阪市立大学脳神経外科, <sup>2</sup>小児科, <sup>3</sup>老年科神経内科, <sup>4</sup>金沢工業大学先端電子技術応用研究所)

MEG では内側側頭葉てんかん Mesial temporal lobe  
epilepsy (MTLE) における焦点の同定は困難とする意見  
がある。今回我々は臨床症状, 持続脳波モニタリング,  
MR にて MTLE と診断した 7 例にたいし発作間歇期での  
MEG, EEG にててんかん焦点の評価を行った。装置は  
160ch 仰臥位全頭型脳磁計(横河電機)を用い, 同時に 12ch  
の脳波と心電図を記録した。脳磁はバンドパスフィルタ  
-3-200Hz, サンプリング周波数 500Hz で測定した。7  
例のうち 5 例で MR の所見と一致して内側側頭葉に焦点

を認めたと, 内側だけでなく同側側頭葉全体にも焦点が  
もどまった。また内側側頭葉由来のてんかん波は MEG  
のみに認め EEG では検出できない場合が多かった。逆  
に EEG におけるてんかん波で MEG により ECD を求め  
ると側頭葉内側には同定できない傾向にあった。側頭葉  
内側は脳表から深い位置にあるため頭皮脳波では検出困  
難なことが考えられる。またてんかん波自体の出力が小  
さいと MEG でも検出できない可能性がある。

### (18) 脳内の離れた部位間での脳磁シグナル協調活動検出の試み 第 2 報

河津省司<sup>1,2,6</sup>, 中村昭範<sup>1</sup>, 右代谷昇<sup>3</sup>, 濱崎淳洋<sup>4</sup>, 堀部賢太郎<sup>5</sup>, 山田孝子<sup>5</sup>, 加藤隆司<sup>1</sup>, 伊藤健吾<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>長寿医療研究センター 生体機能研究部, <sup>2</sup>名古屋大学医学部放射線科, <sup>3</sup>和歌山工業高等専門学校

<sup>4</sup>京都学園大学 経済学部, <sup>5</sup>国立療養所中部病院 神経内科, <sup>6</sup>トヨタ記念病院 放射線科)

我々は脳内の離れた部位での協調活動 (Synchronization)  
を MEG を用いて検出する試みを行っているため報告する。  
MEG データに対して脳内の Voxel での仮想的電流 Vector  
を MFT (Magnetic Field Tomography) を用いて時系列デー  
タを構成した。これに対し, 最近 EEG を用い Rodriguez (1)  
らが報告しているような, 時間周波数解析法を用いた解

析法による処理を行った。注目する周波数成分に関して  
Long distance synchronization と思われる現象を捉えつつ  
あると考えている。MFT による仮想的電流 Vector 構成  
の部分に理論的, 意味論的に未知な要素が考えられるも  
の, MEG データでの位置情報の精度は EEG に比べて  
圧倒的に有利であると考えられる。さらに MRI の解剖学

的位置情報との coregistration と normalization を適用したデータベース化と統計学的手法の導入も検討している。

(1) Rodriguez E et al. (1999) Perception's shadow: long-

distance synchronization of human brain activity. Nature 397: 430-433

### (19) 先天性難聴を有する小児の聴覚誘発磁場

久保田雅也<sup>1</sup>, 広瀬宏之<sup>1</sup>, 榎原洋一<sup>1</sup>, 湯本真人<sup>2</sup> (<sup>1</sup> 東京大学小児科, <sup>2</sup> 同検査部)

先天性サイトメガロウイルス感染症による難聴を呈する 7 才兄弟 ( 双子 ) の聴覚誘発磁場を記録したので報告する。症例 1 は両側、症例 2 は右側の高度難聴を認める。ABR(105dB)は症例 1 で両側、症例 2 で右側で無反応であった。両者とも普通学級に通学、症例 1 は言葉は出ないが他者の動作や口唇の動きを読みコミュニケーション可能、症例 2 の言語発達に遅滞はない。全頭型脳磁図測定装置 (Neuromag) にて聴覚誘発磁場を求めると症例 1 で

は 105dB,2kHz 純音で左聴覚野に、105dB,1kHz および 440Hz 純音、白色雑音では聴覚野に活性はなく、左一次感覚野に長潜時で活性を認めた。症例 2 では聴覚野での反応は認められたが、一次感覚野での反応はなかった。高度難聴者において振動刺激で一次感覚野、聴覚野の活性化の報告はあるが、純音で一次感覚野のみに反応を認めた報告はない。聴覚野-一次感覚野の発達上の変化が起こり、純音周波数成分に一次感覚野が反応した可能性がある。

### (20) 嗅覚に対する非侵襲計測と脳内の嗅覚神経路

外池光雄\*, 山口雅彦\*, 浜田隆史\*, 瀬尾 律\*\*, 嘉悦 勲\*\*\*, 肥塚 泉\*\*\*\*

(\*電総研大阪 LERC, \*\*瀬尾耳鼻咽喉科院, \*\*\*近畿大理工学部, \*\*\*\*聖マリアンナ医科大学耳鼻咽喉科)

これまでのヒトの嗅覚に関する中枢研究は、他の感覚神経研究に比べて遅れており、脳内の嗅覚野、並びに嗅覚神経路は未だ、十分に明らかにされていない。そこで、筆者らは、人間に対する種々の非侵襲的計測法に先駆けて取り組み、におい刺激法の開発・検討をはじめ、脳波、脳磁図、fMRI 等、異なる刺激手法や種々の計測法を用い

た研究を多面的に実施してきた。そこで、本発表ではこれらの研究結果を分析して、現在の時点での総括を行うとともに、他の研究者のデータ結果とも比較検討しながら、人間の嗅覚野、並びに脳内嗅覚神経路について考察する。

### (21) 脊髄誘発磁界測定の実況と将来展望

小森博達, 川端茂徳, 大久保治修, 四宮謙一

(東京医科歯科大学 歯学総合研究科 脊椎脊髄神経外科学)

我々は、昨年より磁界計測による脊髄機能診断装置の開発を目標に研究を開始している。現在、動物実験において脊髄刺激脊髄誘発磁界、末梢神経刺激脊髄誘発磁界、脳刺激脊髄誘発磁界を測定し、磁界計測による脊髄障害部位診断の可能性、臨床生理学的な知見について検討を重ねている。また、ヒトの脊髄磁界測定にも着手し、条

件付きではあるが脊髄磁界と考えられる磁界の測定に成功した。今研究会では、現在までのデータをもとに脊髄磁界測定の実況と解決すべき問題点について意見を交換するとともに、我々脊椎外科医の立場からみた脊髄磁界測定の将来性についてお話ししたい。

## (22) MEG による記憶想起の研究

嘉悦 勲\*, 須谷康一\*, 内田熊男\*\*, 外池光雄\*\*\*, 山口雅彦\*\*\*, 岩木 直\*\*\*

(\*近畿大学大学院総合理工学研究科 \*\*近畿大学理工学部原子炉工学科

\*\*\*電子技術総合研究所 大阪ライフエレクトロニクス研究センター)

記憶を探索して異種の記憶を結合する創造活動では、前頭葉と側頭葉の相互作用が重要と思われる。暗算のような意志的想起では前頭葉が側頭葉を賦活して記憶を想起し、ルールと照合して合目的性を判断しつつ、目的を達するまで両者間のフィードバック往復が行われると考えられる。無意志的想起では、コンセプトやアイデアが浮ぶ直感想起が重要であり、前頭葉が過去に賦課した未解決の課題を、無意識下で側頭葉が継続して探索した結果と推察される。本研究では、暗算のようにルールやカテゴリーの規制度が強い照合想起的タスクと、想起の自

由度の高い連想想起タスクを比較して、前者では脳活動に伴うダイポールが皮質内空間の限定された領域に分布するのに対し、後者では広域に不連続に分散して現われることを認めた。連想想起は意志的であるが前頭葉の合目的制御に束縛されないため、カテゴリーの多様さのため様々の中枢を経過する分散分布を示すと解釈される。本研究では波に着目したが、波は前頭葉優位の意志的想起活動の指標となる脳磁波と思われ、無意志的想起については、波のような低周波数脳磁波を解明する必要がある。

## (23) fMRI の結果から位置を固定して MEG ダイポールを解く方法の検討

藤巻則夫, 早川友恵, Matthew Nielsen, 宮内 哲 (郵政省 通信総合研究所)

[はじめに] "ill-posed"である MEG マルチダイポールの逆問題を解くため、fMRI の情報を利用することを検討した。[方法] 空間的に広がる fMRI 脳活動領域にどのようにダイポールを配置すべきかについて、シミュレーションで検討した。(1)ダイポール1つを模擬的に作成した脳磁界に対して位置固定の制約下でフィットし、磁場がよく合うための位置許容範囲を求めた。(2) 2つのダイポールをフィットし、互いの影響(crosstalk)が小さくなるための分離許容範囲を求めた。また(1)と(2)の結果を使い、内語課題の実験データ一例を解いた。[結果と考察] 最

小の位置許容範囲は磁場 correlation>85%の条件下で 2 cm, 最大の分離許容範囲は crosstalk<70%の条件下で接線方向に 4 cm であった。特に後者は、磁場のフィッティング特性に由来する空間的な異方性が強かった。これらの許容値を元に実測データを解いたところ、11個の有意なダイポール群が抽出できた。これらは左上側頭後部(潜時 203-210 ms)と左下前頭部(247-272 ms および 416-427 ms)の内語処理部位の活動を含んでおり妥当と思われる。

## (24) 骨導超音波知覚時の脳活動計測

中川誠司\*, 阪口剛史\*\*, 西村忠己\*\*\*, 山口雅彦\*, 外池光雄\*, 細井裕司\*\*\*, 今泉 敏\*\*\*\*, 渡辺好章\*\*

(\*電子技術総合研究所, \*\*同志社大学, \*\*\*奈良県立医科大学, \*\*\*\*東京大学)

超音波であっても骨伝導で知覚できる。さらに、この骨導超音波は高度難聴者であっても知覚できる場合があることが知られている。我々は、骨導超音波を利用した補聴システムの構築を目的として、その知覚特性の研究

を行ってきた。しかしながら、骨導超音波知覚の神経生理学的メカニズムには、依然として不明な点が数多く残されている。我々は、誘発脳磁界計測(聴覚健常者および高度難聴者)および誘発電位(聴性脳幹反応, 聴覚健

常者)計測を行い,骨導超音波知覚のメカニズムの解明を試みた。その結果,聴覚健常者,高度難聴者に関わらず明瞭な N1m 成分の出現が認められその等価電流双極

子は聴覚野内に推定された。また,聴性脳幹反応の II~V 波の出現を認めた。

### (25) 12 歳の絶対音感保持者の脳磁場計測

広瀬宏之,久保田雅也,榊原洋一(東京大学医学部小児科)

湯本真人(東京大学医学部附属病院検査部),榊原彩子(一音会ミュージックスクール講師)

絶対音感保持者に様々なタスクを与え脳磁場計測を行った。被験者は 12 歳男児,3 歳から 9 年間ピアノを習っている。1000Hz の純音を聞かせる課題では,100msec 付近で両側の聴覚中枢近傍に dipole が認められた。右側の方が反応は強く,より前方に位置していた。8 種類の純音(C4-C5)を聞かせて音名を当てさせる labelling 課題では,100msec 付近で両側の聴覚中枢近傍に dipole が認められ,200msec 以降で視覚中枢と頭頂後頭連合野付近に dipole が認められた。P300 に関しては,白色雑音と

純音(A4)のオドボール課題では,純音の標的刺激に対して明らかな P300 を 330msec 付近に認め,両側の視覚中枢近傍に dipole が認められた。二つの純音(C4 と E4)のオドボール課題では,P300 の振幅は低く潜時も延長していた。スクリーンに様々な音符を提示して音を想起させる課題では,視覚中枢の他に頭頂後頭連合野付近に dipole が認められた。絶対音感保持者の音処理過程では視覚中枢も関与している可能性が示唆された。

### (26) 後頭葉てんかんにおける発作症状の検討 ~Magnetoencephalographic study~

山田康一郎<sup>1,2</sup>,白石秀明<sup>1</sup>,渡辺裕貴<sup>1</sup>,八木和一<sup>1</sup>,滝川守国<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>国立療養所静岡東病院(てんかんセンター),<sup>2</sup>鹿児島大学医学部神経精神科)

視覚発作を有する 10 例の症候性後頭葉てんかん患者に対して脳波,脳磁図同時記録を施行し,脳磁図上の発作間歇時発射を解析して得られた単一等価電流双極子(single equivalent current dipole: 以下 ECD)の局在位置について検討した。ECD の局在位置と視覚発作症状との間に相関があり,後頭葉内側に ECD が局在する症例では要素性幻視を,後頭葉外側に局在する症例では複雑性

幻視を呈する傾向があった。この違いは後頭葉各部位の機能と関連していると思われ,後頭葉てんかんの診断上で視覚発作の内容吟味がてんかん焦点の局在位置を推定する際に有用であることが示唆された。また,視覚発作に続いておこる発作症状を調べることで発作波伝播の機序についても若干の考を行った。

### (27) 両眼立体視時の誘発脳磁場に対する注意の影響

大脇崇史,武田常広(東京大学大学院 新領域創成科学研究科 複雑理工学専攻 科学技術振興事業団 戦略的基礎研究推進事業)

random-dot stereogram(RDS)を用いて両眼視差刺激を被験者に提示すると,潜時 150ms から 400ms にピークを持つ誘発脳磁場応答が生じる。しかし,この応答が被

験者の奥行き知覚とどのような関係があるかは明らかではない。そこで本研究では,被験者に対して奥行き知覚に関連した注意課題を課し,被験者の注意状態が脳磁場

応答に及ぼす影響を調べた。提示した RDS は、一様な背景から正方形が手前に浮かんで見えるものとし、提示する位置 2 種類、奥行き 2 種類それぞれを組み合わせると合計 4 種類の RDS を用いた。注意の条件は、(1) 位置に注意する、(2) 奥行きに注意する、(3) 何も注意しない (コ

ントロール) の 3 種類とした。その結果、条件 (1)、(2) では条件 (3) に比べて脳磁場応答の強度が増大する傾向があり、特に視差が小さい場合に増大の度合いが大きかった。条件 (1)、(2) それぞれの脳磁場応答の間には明瞭な差はなかった。

## (28) 口唇部電気刺激誘発磁界の一次皮質反応

永松謙一，中里信和\*，隈部俊宏，畑中啓作\*\*，菅野彰剛\*\*\*，吉本高志  
(東北大学脳神経外科，\*広南病院脳神経外科，\*\* (株) エレクタ，\*\*\*広南病院療護センター)

目的：三叉神経刺激誘発磁界において、正中神経刺激 N20m にあたる、一次皮質反応の報告はなかった。刺激・測定条件を検討し、これを検出したので報告する。方法：対象は健康人 11 例。刺激強度を感覚閾値の 9 倍、刺激頻度を 0.7Hz とし、下口唇に対し電気刺激を行い、全頭型脳磁計を用い誘発反応を記録した。結果：刺激対側 22 半球中 20 半球で、潜時  $14.6 \pm 1.3$  ms に頂点潜時を持つ

反応 (N15m) を認めた。電流双極子は前上方を向き中心溝後壁に推定された。その位置は正中神経刺激誘発磁界の信号源位置と比較し、右半球で  $23.0 \pm 7.2$ mm、左半球で  $18.6 \pm 2.1$ mm 下方に推定された。考察：三叉神経刺激誘発磁界 N15m は、潜時、電流双極子の位置・方向から、正中神経刺激誘発磁界 N20m に相当する一次皮質反応である。

## (29) 脳機能解析統合ソフト開発の試み

中村昭範<sup>1</sup>，河津省司<sup>1</sup>，右代谷昇<sup>2</sup>，濱崎淳洋<sup>3</sup>，山田孝子<sup>4</sup>，堀部賢太郎<sup>4</sup>  
文堂昌彦<sup>1</sup>，加知輝彦<sup>4</sup>，加藤隆司<sup>1</sup>，伊藤健吾<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>長寿医療研究センター生体機能研究部，<sup>2</sup>和歌山工業高等専門学校  
<sup>3</sup>京都学園大学経済学部，<sup>4</sup>国立中部病院神経内科)

高次脳機能活動の解析を従来の双極子モデルのみで行うのは困難が多いが、近年は空間フィルター法や SPM-SAM 等の新しい分析法を用いたり、PET や fMRI 等の他のモダリティを併用したりすることによって道が広がりつつある。これらの方法は魅力的ではあるが、1) 高額なソフトウェアパッケージ、あるいは MEG そのものを購入しないと手に入らない。2) 自前で使って使いこなすには高度の数学的知識を必要とする。3) PET や fMRI が必要。等の問題があり、適用するにあたってはハードルが高い。そこで、PC 上で動き (安価)、Windows ベースの GUI で扱え (簡単)、恣意の入りにくいデータ排出 (客観性) ができるソフトの統合パッケージ開発を試み

ている。開発環境は Mathematica, Matlab, C 言語及び visual basic で、目標は以下の通りである。データ入力は、sensor layout, headshape, MEG data 等を ASCII file として受け取る。分析は、空間フィルター法を用いてメッシュ状に分割された virtual sensor 上で topographical に行われ、FFT, coherence, synchronicity 等の event-related な変化を捉えることができる。結果は個々人の MRI 上に overlay できるが、標準脳座標に変換して投影することも可能で、これにより個人間の共通項や相違点を明らかにしたり、PET や fMRI の報告と比較することができる。これらは開発途上であるが、これまでにできている部分について紹介する。

## (30) 持続性部分てんかんの症例における脳磁図所見

出店正隆, 中村文裕 (北海道大学医学部精神医学教室)

左手指の持続性けいれんが連続して数日から 1 週間続く持続性部分てんかん (EPC) の症例に対し, 全頭型 204 チャンネル脳磁図システム (Neuromag 社製) を用い, 発作時脳磁図および脳波を記録した。脳波および脳磁図上, 右前頭・頭頂部付近に棘波が認められ, 推定された

等価電流双極子は右中心後回の一部に比較的高密度に集積した。一般に EPC は前頭葉てんかんの一種と考えられているが, 本症例においては, てんかん源性焦点は頭頂葉に存在する可能性が示唆された。

## (31) MEG でとらえた発作間欠期突発波の鏡像焦点

岩崎真樹, 中里信和, 菅野彰剛, 畑中啓作, 吉本高志  
(東北大学脳神経外科, 広南病院脳神経外科, 広南病院療護センター, エレクタ)

頭皮上脳波と脳磁図の同時計測にて発作間欠時突発活動における両側同期性棘波の半球間伝播をとらえた 2 てんかん症例を報告する。【症例 1】27 才女性の複雑部分発作症例。両側同期性の側頭部棘波を高頻度に認めた。信号源は左右側頭葉後方に推定され, 活動のピークは全て右半球が左に対して平均 15ms 先行していた。【症例 2】21 才女性の全般性けいれん症例。両側独立もしくは同期性の中心側頭部棘波を高頻度に認めた。信号源は左右中

心溝に推定され, 同期性棘波においては左右半球の活動のピークに 15~40ms の時間差を認めた。2 例とも, 左右半球の信号源における局在と電流方向は鏡像関係にあった。【結論】ピークの半球間時間差は発作間欠時突発波の鏡像焦点への伝播を示唆する所見と考えられた。脳磁図は両側同期性の突発波を高い時間および空間分解能で識別する上で有利である。

## (32) 光刺激と脳磁図における光突発反応の位相差について

白石秀明<sup>1</sup>, 芳村勝城<sup>2</sup>, 渡辺裕貴<sup>2</sup>, 八木和一<sup>2</sup>( <sup>1</sup>北海道大学医学部小児科, <sup>2</sup>国立療養所静岡東病院 (てんかんセンター) )

<目的> 間欠的光刺激における, 頭皮上脳波の光突発反応 (PPR) と MEG 上の磁場変化を検討した。<症例・方法> 11 歳から 25 歳のてんかん症例で, 症例 1 が特発性全般てんかん, 症例 2・3 が症候性全般てんかん, 症例 4 が症候性局在関連てんかんであった。全例において Grass 社製光刺激装置 PS33 plus で脳波上, 両側広汎性棘・徐波, 多棘・徐波複合が出現し刺激終了後も少なくとも 100msec 以上反応が持続する, いわゆる classic PPR が出現していた。脳磁計は BTi 社製の 74ch 一次微分型 SQUID を用い, 頭皮上脳波を同時記録した。IPS は赤色発光ダイオード(LED)より発生したものを光ファイバーを用いて患者の眼前のゴーグル型投光装置に送り刺激を

行った。患者には眼球表面から, この装置の発光面までが約 2 cm となるように装着し検査を施行した。<結果> MEG 検査における LED の刺激では症例 2, 3, 4 で classic PPR が出現した。症例 1 では LED の IPS で, 両側広汎性棘・徐波は出現するものの, 光刺激終了後反応は持続しなかった。

各々の光刺激に対して出現した磁気棘の頂点における, 光刺激からの位相差を求めると, 症例 2・3 では種々の刺激頻度において, 光刺激を繰り返すにしたがって位相差は漸増し, やがて刺激周期と全く無関係となっていった。一方, 症例 1 と 4 では位相差はほぼ一定して推移していた。<まとめ> PPR の発現機構は, てんかん類型の

違い、光突発反応の形態の違いによって異なることが示唆された。

### (33) 体性感覚誘発オン・オフ磁場反応

湯本真人<sup>1,2</sup>, 齋藤 治<sup>2</sup>, 金子 裕<sup>2</sup>, 中原一彦<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 東京大学医学部附属病院, <sup>2</sup> 国立精神・神経センター武蔵病院)

6名の健常者を対象とし、右示指末節に8点点字ピン(KGS社製 Braille Cell を改変)が同時に突出(オン)および引入(オフ)する周期500msの反復刺激呈示時の誘発磁場反応を、Neuromag社製204Ch全頭型脳磁計により記録した。実験1:周期500ms中のオン,オフ期間をそれぞれ250msとして3000回加算した。N1on, P1on, N2on, P2on および N1off, P1off, N2off, P2off が得られ、

N1on, N1off 間および P1on, P1off 間に振幅の有意差, N1on, N1off の推定電流双極子の方向に有意差を認めた。実験2:オン,オフ期間をそれぞれ10,20,40,60,80,100,150,250msとして各400回加算し,先行するオン,オフ期間変化によるオフ,オン反応の振幅変化を比較検討した。Surらによるサルを対象とした報告に矛盾しない結果がヒトで得られた。

### (34) 視覚/聴覚オドボール課題に関連する脳内神経活動の可視化

岩木 直\*, 平田直也\*\*\*, 外池光雄\*, 山口雅彦\*

(\*電子技術総合研究所 大阪ライフエレクトロニクス研究センター, \*\*近畿大学 理工学部)

視聴覚における新奇刺激の検出処理に関して、これまでオドボール課題を用いた多くの研究が行われており、刺激呈示後300ms前後でP300と呼ばれる特徴的な成分が観測されることがよく知られている。しかしながら、この成分に対応する脳内活動分布の複雑さから、従来の少数個の電流双極子による解析ではその詳細を明らかにすることは非常に困難で、脳内の神経活動のダイナミクスは未だ明らかにされていない。本研究では、高次機能

に対応する複雑な脳活動を、MEG計測を用いて、一組の測定条件間における活動の差として視覚化する方法を提案し、これを用いて視覚および聴覚各モダリティにおける新奇刺激検出に関わる複雑な脳内神経活動分布の可視化を試みた。この結果、新奇刺激の検出には、潜時300ms前後における、刺激入力モダリティ依存/非依存の複数の脳内部位における神経活動が関与していることを示した。

### (35) 全脳型脳磁計を用いたてんかん解析時の工夫

橋詰 顕, 栗栖 薫, 有田和徳, 花谷亮典, 飯田幸治 (広島大学医学部脳神経外科)

てんかん患者の脳磁測定を行う場合、全脳型脳磁計では脳磁図の情報が膨大であり得られた情報を効率よく解析する方法が望まれる。Neuromag社製204ch脳磁計では204個の波形が得られるが、同時に測定した脳波・心電図・眼電図を参照しながらてんかん波のdipole推定を限られたモニター上で検討していくことは困難である。Neuromag社はEpilepsy Spike Search V2.1という

programを提供しているが、脳波の表示が十分でなく、あきらかな棘波以外の解析は困難である。そこで我々は脳磁計のセンサーを脳波の10-20法に準ずる形で19個に区分し、それぞれのroot mean square, 脳波のroot mean square, 心電図と眼電図を1画面に表示することでてんかん波形を解析することを試みた。この方法では脳波の棘波のみでなく棘波に先行する脳波の変化も反映してお

り、簡便にてんかん波形を捉えることができ有用である と思われた。

### (36) 日本語ピッチアクセントと音韻認知に関する一検討

林 良子\*\*\*・今泉 敏\*・上野照剛\*・森 浩一\*\*

(\*東京大学大学院医学系研究科 \*\*国立身体障害者リハビリテーションセンター研究所)

日本語ピッチアクセントが単語認知に果たす役割について、音韻処理過程と比較することで、脳磁図計測により検討した。プライムとして聴覚呈示されるなぞなぞ文の後に、2 モーラ語の正答、アクセント型が不適切な答、音韻の不適切な答を呈示した場合について、N400 電流双極子の潜時、モーメント、電流源推定部位を解析した。その結果、脳磁波形上では、3 群で異なった波形が左右側頭部で観察された。N400 成分では、音韻の間違った答

でより多くの被験者から電流双極子を推定することができたものの、アクセント型不適切群と潜時、モーメントの有意な差異は見られなかった。電流源は、両群とも右上側頭回、縁上回付近に推定された。これらの結果から、単語の意味的認知という観点では、アクセント型、音韻ともに等価の役割を果たしていると考えられるが、意味処理に至る過程には両者間に差異があることが示唆された。

### (37) 聴覚マスキング条件下の発声関連脳磁場

軍司敦子、宝珠山稔、柿木隆介 (生理学研究所統合生理研究施設)

健常者を対象に、自分の声が聞こえない masking 条件下の発声関連脳磁場 (vocalization related cortical fields: VRCF) と通常 (control) の VRCF を記録し、VRCF を構成する運動成分と聴覚成分について検討した。発声後に出現した成分の振幅は、masking 条件より control で有意に大きく ( $p < 0.05$ )、条件間の差分は発声開始後  $81.3 \pm 20.5$  ms で頂点となる 1M 成分を示した。1M 成分は音声

を聴取した時に認められる auditory evoked magnetic fields (AEF) の M100 成分に対する信号源と同様に聴覚野付近に推定されたことから、1M が自分の声に対する反応であり、M100 と同様の成分であると推察された。発声前の control-masked 条件間に有意差は無く、単純な発声の準備過程には masking の影響は小さいと考えられた。

### (38) 睡眠中のフラッシュ視覚誘発脳磁場

大草知裕、柿木隆介、宝珠山稔、王 麗紅 (生理学研究所統合生理研究施設)

【目的】睡眠中の視覚情報処理活動を明らかにするために、閃光刺激に対する視覚誘発脳磁場 (VEF) を覚醒時および睡眠時に記録し、その特性を比較した。【方法】10 名の健常被験者に 0.5Hz の頻度で閃光刺激を与え、覚醒時と睡眠時の VEF を後頭部から記録した。同時記録の脳波で睡眠深度を確認し、各被験者について覚醒時および睡眠国際分類の stage 1 と stage 2 における VEF を記録した。【結果】覚醒時の波形は個人差が大きかったが、共

通した成分として 1M (50ms)、2M (84ms)、3M (130ms) の 3 成分が認められた。睡眠時 (stage 1 および stage 2) において 1M は振幅減少と潜時遅延、2M は振幅増大と潜時遅延、3M は消失という変化を示した。【考察】これまでに睡眠中の体性感覚や聴覚における誘発脳磁場の変化が報告されている。今回の結果は、視覚においても覚醒時と睡眠時では刺激に対する脳内の反応機構に差異があることを示唆している。

(39) 正中神経刺激による短潜時皮質体性感覚誘発脳磁界成分と体性感覚誘発脳電位成分の対応

宝珠山稔<sup>1,2</sup>, 柿木隆介<sup>2</sup> ( <sup>1</sup>名古屋大学医学部保健学科, <sup>2</sup>生理学研究所統合生理研究施設)

【目的】正中神経刺激による短潜時体性感覚誘発脳磁界 (SEF) と体性感覚脳電位 (SEP) の対応する成分を明らかにした。【方法】正中神経刺激により対側半球より SEF (37 チャンネル) と SEP (Fz-Ai, C3-Ai, P3-Ai, P3-Fz) を同時記録した。1 回毎の刺激により同定される 1 M の頂点, 2 M の頂点をそれぞれ時間 0 として脳波と共に加算平均し, 得られた波形の SEP 各成分の広がり (TD)

を比較した。【結果】1 M での加算では SEP の N20-P20 (P3-Ai, P3-Fz) の TD が小さくなり, 2M での加算では N30 (Fz-Ai, P3-Fz) の TD が小さくなった。【考察及び結論】SEF の 1 M と 2 M は SEP の N20-P20 および N30 にそれぞれ対応する成分と考えられた。SEP の P25-N33 に対応する SEF 成分は認められず, P25-N30 は 1 野起源の radial dipole が発生源と考えられた。

(40) SAM 解析による速波発生源とてんかん源性領域との関連の検討

二宮宏智, 加藤天美, 平田雅之, 新居康夫, 久村英嗣, 平野俊一朗, 谷口理章, 今井克美\*, 吉峰俊樹  
(大阪大学 脳神経外科, \*小児科)

てんかん患者において, 帯域の連続する速波は, 皮質脳波において, seizure onset zone やその周囲に高頻度に観察される。そこで, MEG の 帯域の連続する速波の発生源と, てんかん源性領域との関連を検討した。症例は, 5 例 (海馬硬化をともなう内側型側頭葉てんかん 2 例, 海馬に腫瘍のあった側頭葉てんかん 1 例, 外側型側頭葉てんかん 1 例, 外傷性の前頭葉てんかん 1 例)。そのうちの 3 例では, 帯域の連続する速波は, 発作時に

観察された。これを SAM 解析法にて, その発生源を求めた。器質性変化のある 4 例は, その周囲から発生し, 外側型側頭葉てんかんでは, 側頭葉外側にその発生源がもつた。また, 手術の行われた 2 症例では, 皮質脳波により seizure onset zone と同定された部位に, その発生源はほぼ局在した。MEG の 帯域の速波の発生源は, てんかん源性領域との関連が高いと思われた。

## 13. シナプスの形成・維持・可塑性

2000 年 12 月 7 日- 12 月 8 日

代表・世話人：武内恒成（名古屋大学大学院理学研究科）

所内対応者：小幡邦彦（生理学研究所）

## (1) シナプスの形態変化と機能分子の動態

岡部繁男（東京医科歯科大学医歯学総合研究科）

## (2) シナプス小胞動態の可視化と応用

片岡正和<sup>1,2</sup>, 関口真理子<sup>1</sup>, 高橋正身<sup>1</sup> (<sup>1</sup>三菱化学生命科学研究所, <sup>2</sup>信州大学工学部環境機能工学科)

## (3) シナプス活動によるアクチン細胞骨格再構築過程の可視化

古屋敷智之, 尾藤晴彦, 成宮 周（京都大学大学院医学研究科高次脳科学）

## (4) 神経成長円錐のカルシウムシグナル制御機構

竹居光太郎（東邦大学医学部生理学第二）

## (5) エンドサイトーシスにおける膜脂質の機能と動態

竹居孝二（岡山大学医学部生化学）

## (6) 痛み刺激受容の分子機構：カプサイシン受容体とそのホモログの構造，機能と制御機構

富永真琴（三重大学医学部第一生理）

## (7) 単一嗅神経細胞における嗅覚応答の再構成及び嗅上皮における応答細胞の空間的分布

東原和成（東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学）

## (8) 酸味受容体遺伝子の同定と機能解析

島田昌一, 鷗川眞也, 植田高史（名古屋市立大学医学部第二解剖

## 【参加者名】

尾藤晴彦（京都大学大学院医学研究科），岡部繁男（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科），片岡正和（信州大学工学部），古屋敷智之（京都大学医学部），今泉美佳（杏林大学医学部），竹居光太郎（東邦大学医学部）竹居孝二（岡山大学医学部），富永真琴（三重大学医学部），東原和成（東京大学大学院新領域創成科学研究科）島田昌一（名古屋市立大学医学部），鷗川眞也（名古屋市立大学医学部），植田高史（名古屋市立大学医学部），白尾智明（群馬大学医学部），関野祐子（群馬大学医学部），田中聡一（群馬大学医学部），山崎博幸（群馬大学医学部），張 捷（群馬大学医学部），高橋秀人（群馬大学医学部），武内恒成（名古屋大学大学院理学研究科），玉田一生（名古屋大学大学院理学研究科），中田千枝子（名古屋大学大学院理学研究科），房岡恵理（名古屋大学大学院理学研究科），渡辺紀信（名古屋大学大学院理学研究科），狩野方伸（金沢大学医学部），辰巳仁史（名古屋大学医学部），宮津 基（名古屋大学医学部），真鍋俊也（神戸大学医学部），神谷温之（神戸大学医学部），志牟田美佐（神戸大学医学部），新里和恵（神戸大学医学部），小田洋一（大阪大学大学院

基礎工学研究科），高橋正治（大阪大学大学院基礎工学研究科），中山寿子（大阪大学大学院基礎工学研究科），鳴島 円（大阪大学大学院基礎工学研究科），森健太郎（大阪大学大学院基礎工学研究科），白木千津子（大阪大学大学院基礎工学研究科），山本亘彦（大阪大学大学院基礎工学研究科），丸山 敬（埼玉医科大学）山口和彦（理化学研究所脳科学総合研究センター），斎藤祐見子（東京都臨床医学総合研究所），畠 義郎（大阪大学大学院医学研究科），内田洋子（東京都老人総合研究所），時田義人（愛知県口口二-発達障害研究所），五味不二也（東京都老人総合研究所），玉巻伸章（京都大学大学院医学研究科），山田麻妃（東京大学大学院薬学研究科），池谷裕二（東京大学大学院医学研究科），小山隆太（東京大学薬学部），森本高子（東京大学大学院理学研究科），高坂洋史（東京大学大学院理学研究科），笛田由紀子（産業医科大学産業保健学部）下村敦司（藤田保健衛生大学医学部），吉田祥子（豊橋技術科学大学）藪中厚生（豊橋技術科学大学），和多和宏（東京医科歯科大学難治疾患研究所），尾崎まみこ（京都工芸繊維大学繊維学部），武井延之（新潟大学脳研究所），御

園生裕明(東京大学大学院医学研究科),佐藤栄人(順天堂大学医学部),金 明鎬(群馬大学医学部),七崎之利(日本医科大学),勝野達也(名古屋大学大学院理学研究科),山際貴雄(名古屋大学大学院理学研究科),畠中由美子(基礎生物学研究所)野田昌暁(基礎生物学研究所),前田信明(基礎生物学研究所),加藤 彰(基礎生物学研究所),河西春郎(生理学研究所),高橋倫子(生理学研

究所),根本知己(生理学研究所),鈴木智之(生理学研究所),真鍋健一(生理学研究所),井本敬二(生理学研究所),森 泰生(生理学研究所),大倉正道(生理学研究所),馬杉美和子(生理学研究所),小幡邦彦(生理学研究所),柳川右千夫(生理学研究所),山肩葉子(生理学研究所),兼子幸一(生理学研究所)

## 【概要】

シナプスの形成と維持,さらにその可塑性はいかにして行われるか,その分子基盤とあたらしい方法論を駆使した最近の研究を網羅することを目指した。また,演者と座長および参加者相互の討論にも大きく時間を割いて,今後の研究における問題点や展望を見いだすこともこの研究会においての目的とされた。

まず,セッション1では,神経科学におけるあたらしいイメージング技術の紹介と展望を検討した。シナプスの形成・維持はいかにして行われるかを,GFPを用い可視化することによって明らかになってきたこととこれからの展望を検討した。岡部繁男氏からシナプス後部骨格構造の時間的特異化・集積過程の解析,片岡正和氏からシナプス前部シナプス伝達分子の小胞放出過程の解析を,古屋敷智之氏からシナプス活動におけるアクチン細胞骨格の制御システムをいずれもシナプス形成・維持における重要課題でこの解析を通して,新しいイメージング解析の有効性と今後の問題点を見つめ直した。セッション

2では,生化学と電子顕微鏡技術を組み合わせたエンドサイトーシスにおけるシナプス小胞の動態観察(竹居孝二氏)と,CALIを用いた細胞内部位での空間的・時間的分子失活による生理機能解析(竹居光太郎氏)の演題を取り上げた。いずれの研究も微細な生理機構をいかに観察するかを先駆的な手法で取り組んでおり,これらの手法から何がどこまで解り,どのような展望があるか,他にいかなる技術と組み合わせれば何が見えてくるか,議論を重ねた。セッション3では,最近の神経科学のトピックである感覚受容の分子基盤を富永真琴氏,東原和成氏,島田昌一氏から,それぞれ,痛覚,嗅覚,味覚の内容での研究の最前線の講演を企画し,神経系の理解においてその基盤となる感覚受容の分子メカニズムの解析アプローチと展望をとらえた。全体にわたって,想像を上回る参加者と活発な討論がなされ,非常に有意義な研究会となった。

## (1) シナプスの形態変化と機能分子の動態

岡部繁男(東京医科歯科大学医歯学総合研究科)

海馬の錐体細胞上での興奮性シナプスは,活動依存性にその機能の変化を起こすことが知られている。シナプス機能の変化の基礎として,その分子構築の変化が存在する可能性が指摘されてきたが,近年,GFP分子をレポーターとして用いて細胞内機能蛋白質のイメージングを行うことが可能になった。培養海馬神経細胞では,培養後10日から20日の間に興奮性シナプスの局在が樹状突起のshaftからspineへと変化する。この間のシナプスの形態形成と機能分子の動態を解析する為に,シナプス後

肥厚部の分布,シナプス小胞の分布,spineの形態をGFPのvariantであるCFP,YFPの蛍光シグナルを用いて可視化する事を試みた。この方法により,シナプス後肥厚部の構成蛋白質が既に伸長したfilopodia/spineの中に集積し,シナプス後部構造の特異化が起こる過程が観察された。また,シナプス後肥厚部の形成とシナプス小胞の集積はお互いに時間的に相関して起こることも明らかになった。

## (2) シナプス小胞動態の可視化と応用

片岡正和<sup>1,2</sup>, 関口真理子<sup>1</sup>, 高橋正身<sup>1</sup> (<sup>1</sup>三菱化学生命科学研究所, <sup>2</sup>信州大学工学部環境機能工学科)

我々が前シナプス機能の基盤である神経伝達物質の開放機構を理解するために実施している, GFP, あるいはその変異体を利用したシナプス小胞動態可視化解析の結果を中心に紹介する。GFP ラベルしたシナプス小胞蛋白質の VAMP-2, 制御性分泌蛋白質のヒト成長ホルモン (hGH) を, PC12 細胞および, ラット海馬初代培養細胞で発現し, それらの生細胞での振る舞いを可視化した。PC12 細胞において, hGH の構成性分泌の瞬間を可視化

したところ, kiss and run モデルに合致する画像が得られ, また, 優先的分泌部位と考えられる領域が存在した。VAMP-2 の小胞膜上の位相, 小胞内の pH 環境, pH 感受性変異 GFP を組み合わせて利用し, 小胞内の pH 環境という視点から分泌現象, ならびに突起伸長と小胞分泌の関連を調べた。この場合においても kiss and run モデルに合致する分泌を確認し, さらに突起伸長時の膜供給にシナプス小胞が利用されていると考えられる結果を得た。

## (3) シナプス活動によるアクチン細胞骨格再構築過程の可視化

古屋敷智之, 尾藤晴彦, 成宮 周 (京都大学大学院医学研究科高次脳科学)

アクチン線維は興奮性シナプスにおける主な細胞骨格である。近年, アクチン線維がシナプスの形態制御やシナプス蛋白の局在, さらにはシナプス伝達効率の修飾に関与することが示唆されてきた。我々は GFP と beta-actin の融合蛋白 GFP-actin を用いて, 生きた海馬神経細胞のアクチン細胞骨格を可視化した。この方法により, シナプス活動によって海馬神経細胞のアクチン分子の分布が速やかに変化し, シナプスや細胞体周囲など機能的に異なる部位に集積することを明らかにした。この集積は数

分でピークに達する速やかな反応であるが, シナプスと細胞体周囲での集積の速度は大きく異なっていた。さらに, シナプスにおけるアクチン制御には NMDA 受容体が, 一方細胞体周囲の集積には電位依存性  $Ca^{2+}$  チャネルが特異的に関与することが示唆された。以上の結果は, 複数の  $Ca^{2+}$  流入源の活性化の組み合わせを介して, シナプス活動が多彩なアクチン分布を誘導する可能性を示唆している。

## (4) 神経成長円錐のカルシウムシグナル制御機構

竹居光太郎 (東邦大学医学部生理学第二)

神経系の発生や再生の過程において, 伸長する神経突起の先端には成長円錐と呼ばれる特殊な構造体が存在し, 成長円錐は周囲の微小な外界環境を感知しながら神経突起を正確に標的細胞に導く。神経細胞の分子基盤の解明は, 複雑緻密な神経回路網の形成機構理解する上で非常に重要な課題である。神経突起の成長発達において, 成長円錐内の細胞内  $Ca^{2+}$  は極めて重要な情報変換分子として働くことが知られている。神経細胞のように極度に発達した極性を持つ細胞における研究では, 細胞の局所

で特定分子を実験的に操作できるような研究技術が要求される。そのニーズに対応して, 我々はレーザー分子不活性化法 (CALI 法) を用いている。CALI 法とは, 抗体やリガンドによる特異的な結合によって標的分子を特定化し, 色素を介してレーザー照射によって生じるフリーラジカルで標的分子を機能的に不活性化させ得る新規の細胞生物学的研究手技で, 突起先端に存在する成長円錐のような細胞の特殊な局所領域での分子機能の解析には特に功を奏する。

### (5) エンドサイトーシスにおける膜脂質の機能と動態

竹居孝二 (岡山大学医学部生化学)

シナプス小胞は、分泌に続いて、エンドサイトーシスによる小胞膜の取込み、シナプス小胞再生のサイクルをくり返している。このためエンドサイトーシスはシナプスが機能するための重要な一過程であり、その過程においては細胞膜からの小胞形成が行われる。エンドサイトーシスの分子機構、特に膜脂質の機能動態を調べるため、膜成分と脳細胞質を反応させることにより、小胞形成を *in vitro* で再構成する実験系を確立した。

大型単層の人工脂質膜 (リポソーム) を膜成分として ATP, GTP, および脳細胞質と *in vitro* で反応させた後、電顕観察により小胞形成 (直径 < 200nm) を認めた。こ

の実験系を用いて、まず、膜のコレステロール含有量 (0-30% (w/w)) と小胞形成の相関を調べた。その結果、膜にコレステロールを含む場合には、全くコレステロールを含まない場合に比べ、形成される小胞の径が大きかったが、小胞形成量には差異はみられなかった。次に phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) 含有量の変化 (0-6% (w/w)) による小胞形成への影響を調べた結果、PIP<sub>2</sub> の増加による小胞形成量の増加が認められた。さらに、小胞形成に伴って PIP<sub>2</sub> は phosphatidylinositol (PI) に分解されることが、脂質組成分析により明らかにされた。

### (6) 痛み刺激受容の分子機構：カプサイシン受容体とそのホモログの構造、機能と制御機構

富永真琴 (三重大学医学部第一生理)

痛みは化学的・熱・機械的刺激によって感覚神経終末が活性化されることによって惹起されるが、こうした侵害性刺激受容体を有する感覚神経 (nociceptor) はトウガラシの主成分カプサイシンに感受性があることによっても特徴づけられるため、カプサイシン投与による細胞発現クローニング法を用いてカプサイシン受容体遺伝子が単離された。そして、カプサイシン受容体 (VR1) が Ca 透過性の高い 6 回膜貫通型の非選択性陽イオンチャネルであり、カプサイシンのみならず同じく痛みを惹起する 43 度以上の熱や酸 (プロトン) によっても活性化される痛み刺激に対する多刺激受容体として機能することが明らかとなった。

炎症関連メディエーターが感覚神経終末での痛み刺激受容体を制御することが知られているが、そのメカニズムは明らかではない。メディエーターの 1 つである細胞外 ATP の作用を検討した結果、代謝型 (P2Y) 受容体にも作用して、PKC を活性化を介して VR1 活性を制御していることが明らかとなった。細胞外 ATP はカプサイシン活性化電流、プロトン活性化電流を増大させるのみならず、熱活性化電流の活性化温度閾値を 42 度から 35 度に減少させた。これは、ATP が存在すれば体温でも VR1 が活性化して痛みを惹起しうることを示し、全く新しい疼痛発生メカニズムとして注目される。

### (7) 単一嗅神経細胞における嗅覚応答の再構成及び嗅上皮における応答細胞の空間的分布

東原和成 (東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学)

マウスで約千種類といわれている嗅覚受容体のクローニング当初は匂い物質と結合する証拠はなかったが、1998 年、ラット orphan 嗅覚受容体 I7 のリガンド決定がなされ、推定上の匂い受容体が匂い物質を認識すること

が証明された。一方我々は嗅覚受容体が匂い物質を認識するという証拠を得るために別のアプローチをとった。Ca<sup>2+</sup> イメージングを使って匂いに応答する嗅細胞を同定したのち各々の応答細胞から発現受容体をクローニング

し、アデノウイルスで受容体遺伝子を嗅細胞に導入して匂い物質に対する特異的応答を再構成することに成功した。また、HEK293 培養細胞を用いて受容体の再構成を行い、嗅覚受容体が Gs タイプの G タンパク質に共役し細胞内 cAMP 濃度を上昇させるという結果も得ている。さらに我々は、新生児マウスから生の前額断切片を作成し、嗅上皮上での匂い物質に対する応答を Ca<sup>2+</sup>イメージ

ングによって in situ で測定した。様々な匂い物質をこの生切片に与えたところ、応答細胞が嗅上皮上でどのように分布しているかが明らかになった。さらに、匂い物質の濃度を变化させたところ、濃度依存的に応答細胞数の増加が見られ、同一匂い物質でも濃度によって感じる香調が変わってくるという経験則を支持する結果が得られている。

## (8) 酸味受容体遺伝子の同定と機能解析

島田昌一, 鶴川眞也, 植田高史 (名古屋市立大学医学部第二解剖)

味覚の受容体は塩味, 酸味, 甘味, 苦味, うま味に対してそれぞれ特異的な様々なタイプの受容体が想定されてきた。最近単離された苦味受容体や, うま味受容体は G 蛋白と共役する代謝型受容体であるのに対して, 我々が同定した酸味受容体はイオンチャネル型である。我々は, 味覚の受容体を単離する目的でラット舌有郭乳頭より cDNA ライブラリーを作製し, 相同性によるスクリーニングとアフリカツメガエル卵母細胞による機能発現スクリーニングを組み合わせ, プロトンで開くアミロライド感受性陽イオンチャネルを単離した。そして全塩基配列を明らかにしたところ, 非翻訳領域は多少異なるも

の翻訳領域は最近脳から単離された mammalian degenerin (MDEG1) と一致するものであった。さらにこの受容体の他のサブユニットを同定するために, 相同性を用いたラット有郭乳頭の cDNA ライブラリーのスクリーニングや RT-PCR 法を行った結果, MDEG2 も味蕾に発現していることが分かった。次に MDEG1 と MDEG2 の関係について調べたところ, 免疫組織化学法で MDEG1 と MDEG2 は同一の味蕾細胞に共存して発現していることを明らかにした。また, 電気生理学的な解析で MDEG2 は, MDEG1 と共発現させると, チャネルの脱感作を修飾する働きがあることが分かった。

## 14. 消化管機能

2000年12月14日-12月15日

代表・世話人：鈴木裕一（静岡県立大学食品栄養科学部）

所内対応者：尾崎 毅（生理学研究所）

(1) 大腸プロピオン酸吸収機序

川俣幸一，鈴木裕一（静岡県立大学 食品栄養）

(2) 大腸上皮 T84 細胞の分泌性収縮と調節性容積増加

真鍋健一，出崎克也，森島 繁，岡田泰伸（生理学研究所 機能協関）

(3) 膵導管細胞の水分分泌に対するセロトニンの作用の検討

成瀬 達，石黒 洋（名古屋大学 医学部第2内科）

(4) Modulation of substance P-induced Ion transport by Adenosin

桑原厚和，唐木晋一郎（静岡県立大学 環境科学研究所）

(5) 排便反射障害と腰部交感神経

山内昌哉，高木 都（奈良県立医科大学 第1外科，第二生理）

(6) 胃粘液（胃ムチン）代謝

石原和彦，市川尊文，五艘行信（北里大学 医療衛生学部，医学部生化）

(7) 小腸カルニチン吸収機構

玉井郁巳，辻 彰（金沢大学 薬学部）

(8) ストレプトゾトシン誘発糖尿病動物における胃粘膜易損性の増大 - カプサイシン感受性知覚神経との関連

田嶋公人（京都薬科大学 薬物治療学）

(9) 小腸無機リン酸トランスポーターと高リン血症治療

宮本賢一（徳島大学医学部）

(10) ウナギの飲水行動に関与する筋の神経支配

安藤正昭，椋田崇生，小坂朋大（広島大学 総合科学部 総合生理）

(11) 核内受容体 PPAR を介した脂溶性栄養素吸収関連遺伝子の発現調節

合田敏尚（静岡県立大学食品栄養科学部）

(12) 大腸におけるトロンボキササン A<sub>2</sub> の病態生理機能

酒井秀紀（富山医科薬科大学薬学部）

(13) 腔腸動物ヒドラのぜん動運動について

清水 裕（国立遺伝学研究所，発生遺伝研究部門）

### 【参加者名】

川俣幸一（静岡県立大学），鈴木裕一（静岡県立大学），真鍋健一（生理学研究所），出崎克也（生理学研究所），森島繁（生理学研究所），岡田泰伸（生理学研究所），成瀬達（名古屋大学 医学部第2内科），石黒洋（名古屋大学 医学部第2内科），桑原厚和（静岡県立大学 環境科学研究所），唐木晋一郎（静岡県立大学 環境科学研究所），山内昌哉（奈良県立医科大学 第1外科），高木都（奈良県立医科大学 第二生理），石原和彦（北里大学 医療衛

生学部），玉井郁巳（金沢大学 薬学部），田嶋公人（京都薬科大学 薬物治療学），宮本賢一（徳島大学医学部），安藤正昭（広島大学 総合科学部 総合生理），合田敏尚（静岡県立大学食品栄養科学部），酒井秀紀（富山医科薬科大学薬学部），尾崎毅（岡崎国立共同研究機構動物実験センター），清水裕（国立遺伝学研究所，発生遺伝研究部門）

## 【概要】

消化管機能に関し、運動から上皮機能あるいは細胞生理学的側面にわたる幅広い分野からの報告がなされ、また活発な討論がなされた。また方法論も分子生物学から

形態学まで様々であった。これを機会に今後ますます消化管研究が発展する事が期待される。

## (1) 大腸プロピオン酸吸収機序

川俣幸一, 鈴木裕一 (静岡県立大学 食品栄養科学部)

大腸内では、食物繊維が腸内細菌の発酵作用を受け大量の短鎖脂肪酸(酢酸, プロピオン酸, 酪酸)が産生される。産生された短鎖脂肪酸は大腸で代謝されるか、あるいは吸収され体内で代謝される。われわれは、大腸での短鎖脂肪酸吸収のメカニズムを明らかにしようとする一連の研究を行っている。実験は、切り出したラット盲腸を Ussing chamber に装着し、短絡電流、プロピオン酸吸収速度 (HPLC で測定)、管腔側 Total CO<sub>2</sub> 蓄積 (炭酸ガス電極)、管腔側アルカリ化 (pH スタット)、等を測定した。得られた結果は、1) プロピオン酸吸収は短絡電流を伴わない非起電性のものである。2) 管腔側プロピオン酸吸収は重炭酸イオン (漿膜側) に依存する成分と依存しない成分がある。3) 重炭酸イオン依存性のプロピ

オン酸吸収速度におおよそ一致した大きさの、管腔内アルカリ加速度と Total CO<sub>2</sub> 蓄積速度が観察される。以上の結果より、管腔側膜に短鎖脂肪酸/HCO<sub>3</sub> 交換輸送体が存在すると考えられ、短鎖脂肪酸吸収の一部を担っているものと思われる。短鎖脂肪酸産生は大腸内を酸性化するので、短鎖脂肪酸吸収がアルカリ分泌とカップルして起こることは、大腸内酸塩基平衡を考える上でも興味深い。なお、この短鎖脂肪酸/HCO<sub>3</sub> 交換輸送体活性は、DIDS や NPPB でほとんど抑制されないの、Cl/HCO<sub>3</sub> exchanger である AE ファミリーや DRA (先天性 Cl 喪失性下痢症の原因遺伝子) とは異なるものと考えられる。

## (2) 大腸上皮 T84 細胞の分泌性収縮と調節性容積増加

真鍋健一, 出崎克也, 森島 繁, 岡田泰伸 (生理学研究所 機能協関)

モルモット小腸やラット大腸の腺上皮において、VIP による cAMP 仲介性 Cl<sup>-</sup> 分泌による細胞収縮と、それに つづくゆるやかな容積回復が見られることが報告されている (O'Brien et al. 1993; Diener, 1994)。我々は、Ca<sup>2+</sup> を介する分泌刺激物質であるカルパコールに対して、ヒト大腸上皮細胞株 T84 が同様の応答を示すことを報告した (第 47 回中部日本生理学会)。刺激直後に見られる細胞収

縮は、BAPTA による細胞内 Ca<sup>2+</sup>キレートや、Ca<sup>2+</sup>依存性 Cl<sup>-</sup> チャネルブロッカーであるニフルミン酸によって消失したので、Ca<sup>2+</sup>依存性 Cl<sup>-</sup> 分泌によるものと考えられた。収縮後の調節性容積増加 (Regulatory Volume Increase: RVI) は、ブメタニドによって抑制されたことから Na-K-2Cl シンポータ(NKCC)の関与が示唆された。

## (3) 膵導管細胞の水分分泌に対するセロトニンの作用の検討

成瀬 達, 鈴木 厚, 石黒 洋 (名古屋大学 医学部 第 2 内科)

モルモットの膵管上皮にはセロトニン (5-HT) 含有細

胞が存在するが、その機能は不明である。そこで、単離

小葉間腺管を用いて 5-HT の腺管細胞からの水分泌に及ぼす作用を検討した。単離腺管（径約 100 μm）を 3 時間培養すると両端が閉じ管腔は閉鎖腔になる。この腺管を 37 °C にて重炭酸緩衝液で表層灌流し、明視野像を 1 分間隔で取得した。管腔の面積の変化から、1 分毎の水分泌量を求め、単位上皮表面積あたりで表した。セクレチン（1 nM）刺激による水分泌（ $2.23 \pm 0.05$  nl min<sup>-1</sup> mm<sup>-2</sup>, mean  $\pm$  SE, n = 16）は、5-HT（0.1, 1, 10 mM）を灌流液に加えると、それぞれ、 $0.44 \pm 0.08$ ,  $0.42 \pm 0.13$ ,  $0.86 \pm 0.12$ , n = 4 と有意（P < 0.01）に抑制さ

れたが、5-HT（0.01 mM）では抑制されなかった。また、5-HT<sub>3</sub> アゴニストである 2-methyl 5-HT により有意に抑制されたが、5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>4</sub> アゴニストでは抑制されなかった。管腔内に 5-HT（1 mM）を注入した腺管では、セクレチン（1 nM）刺激による水分泌は変わらなかった。アセチルコリン（1 mM）刺激による水分泌（ $1.40 \pm 0.04$ , n = 4）は、5-HT（0.1 mM）を灌流液に加えると有意に抑制された（ $0.37 \pm 0.02$ , P < 0.01）。5-HT は腺管細胞からの cAMP および Ca<sup>2+</sup> 依存性の水分泌を基底膜上の 5-HT<sub>3</sub> 受容体を介して抑制する。

#### (4) Modulation of substance P-induced Ion transport by Adenosin

桑原厚和, 唐木晋一郎 (静岡県立大学 環境科学研究所)

モルモット下部大腸において、サブスタンス P の誘発するイオン輸送に対するアデノシン受容体作動薬の効果を短絡電流法によって解析した。下部大腸粘膜・粘膜下組織標本を作成し、膜の両側を Krebs-Ringer で灌流、短絡電流を測定して正味のイオン輸送の指標とした。選択的アデノシン A<sub>1</sub> 受容体作動薬、CCPA は、サブスタンス P の漿膜側投与により誘発される短絡電流の増加を有意に抑制した。選択的アデノシン A<sub>2A</sub> 受容体作動薬、CGS21680 は、サブスタンス P の誘発するイオン輸送を促進する傾向を示したが、有意な差は見られなかった。しかし、サブスタンス P を前投与し、CGS21680 を投与すると、短絡電流は増大し、この反応は、TTX 存在下でほとんど抑制された。非選択性（A<sub>1</sub> + A<sub>2A</sub> + A<sub>2B</sub>）アデノシン受容体作動薬、NECA は、サブスタンス P の反応を有意に促進した。TTX 存在下では、サブスタンス P を

単独投与したときの短絡電流増加はほぼ消失したが、NECA 前処理によって、サブスタンス P は短絡電流を増大させた。さらに、NECA は単独投与においても一次的な短絡電流の増大を示した。この反応は、TTX によって影響を受けなかったが、サブスタンス P 前投与によって、持続的な短絡電流増加を示し、TTX 及びサブスタンス P の両方を前処理すると、NECA の応答は有意に増強された。以上の結果より、1) アデノシン A<sub>1</sub> 受容体の刺激はサブスタンス P の誘発するイオン輸送を抑制し、2) A<sub>2A</sub> 受容体刺激は神経系を介して促進する。3) NECA は上皮細胞のアデノシン A<sub>2B</sub> 受容体を介して短絡電流を増大させ、4) サブスタンス P は上皮細胞レベルでアデノシン A<sub>2B</sub> 受容体刺激と相互作用し、短絡電流の増大を増強させることが示唆された。

#### (5) 排便反射障害と腰部交感神経

山内昌哉, 杉森志穂, 中川 正 (奈良県立医科大学 第一外科)  
高木 都 (第二生理)

高木らは(1980-1987)、モルモット、ネコの排便反射が引き起こされる際には、腰部交感神経を介する腰髄レベルの抑制反射が橋排便反射中枢より完全ではないが、強く抑制されることを明らかにした。今回我々は、より統合的な排便機構の解明をするために、直腸—直腸反射の

みならず、直腸—内肛門括約筋 (IAS) 反射も同時に記録し、両者の反射機構に対する腰部交感神経の役割を検討した。また、臨床において、直腸癌術後の排便機能障害が存在するので、腸管切除にともなう交感神経切除の影響についても検討した。

直腸を加圧伸展すると、骨盤神経を求心路とする直腸-直腸反射と直腸-IAS 反射が起こる。腰部結腸神経は腰髄レベルの抑制反射を引き起こしているが、その活動は橋排便反射中枢より抑制されているために、典型的な直腸反射性収縮と IAS 反射性弛緩を起こす。Th13 横断により上位中枢からの抑制がなくなると腰部結腸神経を介する抑制反射が働き、直腸-直腸反射および直腸-IAS 反射は

消失する。続いて腰部結腸神経を切断すると抑制がとれて再び直腸反射性収縮と IAS 反射性弛緩が出現する。また、intact なモルモットで腰部結腸神経を切断しても同様な効果が認められた。以上の結果から、腰部結腸神経切断が術後排便機能障害の一因となっていること、直腸-IAS 反射にも直腸-直腸反射と同様の排便機構が働いていることが示唆された。

## (6) 胃粘液 (ムチン) 代謝

石原和彦, 市川尊文, 五艘行信 (北里大学医療衛生学部生化学, 同医学部生化学)

胃粘膜には表層粘液細胞 (SMC) と粘膜深部の腺粘液細胞 (GMC) の少なくとも 2 種類の粘液産生細胞があり、これらは異なった性質をもつ粘液を産生・分泌している。また胃体部と胃前庭部にも独特の粘液が存在する。我々は、胃粘液の主要成分であるムチン (粘液糖タンパク質) に着目し、主として生化学的手法による研究を行なっている。

前回の本研究会では、産生細胞の異なるラット胃ムチンを特異的に認識するモノクローナル抗体の開発について報告したが、今回はこの抗体を用いて得られたいくつかの研究結果を報告する。前回の報告で NO がラット胃

体部表層のムチン合成亢進に關与することを示した。今回は胃体部粘膜から SMC の存在する部分を、残った GMC を含む胃粘膜層から物理的に剥離する方法を採用し、2 つの層について検討した。その結果、calcitonin gene-related peptide (CGRP) が NO を介して胃体部表層ムチン合成を亢進していることが明らかとなった。この反応は SMC 層のみを用いた場合でも観察できるが、SMC 層を剥離した深部胃粘膜を用いるとみられなくなることから、CGRP が SMC の NO 合成酵素に作用し、ガストリンで見られたものと同様にムチン合成を亢進していると考えられた。

## (7) 小腸カルニチン吸収機構

玉井郁巳, 辻 彰 (金沢大学薬学部)

カルニチンは脂肪酸代謝に必要な水溶性低分子のビタミンの一つで、その消化管吸収を含めた細胞膜透過にはトランスポーターを介する必要がある。我々は既にカルニチントランスポーターとして OCTN2 遺伝子を単離しその機能解析を行った。OCTN2 は有機カチオントランスポーターファミリーに属しており、有機カチオンをナトリウムイオン非依存的に輸送する一方で、ナトリウムイオン依存的にカルニチンを能動輸送する。我々は OCTN2 を多機能性トランスポーターとして位置づけ、生理的物質はナトリウムイオン依存的な吸収に、カチオン性の生体異物は排出に働くものと考えている。これまでカルニチンの小腸上皮細胞輸送については、担体介在

輸送の示唆はあるが、単純拡散との指摘もあり明確ではない。OCTN2 遺伝子は消化管にもそのシグナルが検出され、小腸でのカルニチン輸送に関わる可能性が考えられた。そこで、小腸上皮細胞刷子縁膜小胞を用いてカルニチン輸送特性を調べた。その結果、カルニチン輸送はナトリウムイオンによる取り込み促進を示した。また、OCTN2 を介したカルニチン輸送阻害剤による取り込み低下が観測された。しかし、完全には OCTN2 の特性とは一致せず、カルニチンの吸収は OCTN2 と類似した特性を持つトランスポーターによって生じていることが示唆された。

(8) ストレプトゾトシン誘発糖尿病動物における胃粘膜易損性の増大  
- カプサイシン感受性知覚神経との関連 -

田嶋公人 (京都薬科大学 薬物治療学教室)

ストレプトゾトシン (STZ) 誘発糖尿病ラットを用い、胃粘膜バリアー破壊に伴う胃粘膜血流 (GMBF) の増大反応および損傷発生に対する糖尿病の影響について、特にカプサイシン感受性知覚神経の関与を中心に検討した。雄性 SD 系ラットに STZ を処置し、血糖値が 350 mg/dl 以上を糖尿病動物とした。オメプラゾール処置後、ウレタン麻酔下に胃をチェンバーに装置し、50 mM 塩酸存在下に 20 mM タウロコレート (TC) を 30 分間適用し、胃粘膜電位差 (PD)、GMBF および酸の逆拡散量の変化を測定した。また、TC 適用後 90 分に胃粘膜上に発生した出血性損傷を観察した。一方、カプサイシン感受性知覚神経の選択的な刺激薬であるカプサイシンに対する GMBF 変化および摘出胃からのカルシトニン遺伝子関

連ペプチド (CGRP) の遊離量も測定した。糖尿病ラットは TC 適用による PD 低下および酸の逆拡散量に影響を与えなかったが、酸の逆拡散によって誘起される GMBF の増大反応は正常ラットに比べ有意に減弱していた。また TC 適用後、正常ラット胃粘膜では殆ど損傷は認められなかったが、糖尿病ラットでは重篤な出血性損傷が胃粘膜上に発生した。一方、カプサイシンによる GMBF 増大反応および摘出胃からの CGRP 遊離量は糖尿病ラットでは明らかに低下していた。STZ 誘発糖尿病ラットは酸に対する胃粘膜感受性を増大させ、易損性を高めることが判明した。このような現象はカプサイシン感受性知覚神経を介する GMBF 増大反応の調節異常に基づくことが推察された。

(9) 小腸無機リン酸トランスポーターと高リン血症治療

宮本賢一 (徳島大学・医学部・栄養化学)

慢性腎不全末期患者は、糖尿性腎症の増加により現在 20 万人を数えている。このほとんどが、血液透析患者であるが、透析技術の進歩に伴い長期生存が可能となった。それと同時に、はじめは問題とされなかった二次性副甲状腺機能亢進症などによりもたらされる骨合併症が新たに出現し、患者の予後を左右する重大な問題となっている。とくに透析技術で除去できない無機リン酸 (リン) 蓄積は、副甲状腺細胞を刺激して副甲状腺ホルモン PTH の分泌を亢進し、その結果二次性副甲状腺機能亢進症の発症をもたらす。慢性血液透析患者では、このような高リン血症が高頻度に観察される。血清リン濃度のコ

ントロールには、食餌によるリン摂取の制限や各種リン吸着薬投与による消化管からのリン吸収抑制が必要となる。しかしながら、いずれの方法も患者の負担が大きく、有効な高リン血症治療薬が望まれている。

小腸からのリン吸収を担うのは、ナトリウム依存性リン輸送トランスポーター (the type IIb Na/Pi transporter) であり、本輸送系を特異的に阻害することは、高リン治療に有効と考えられた。本講演では、私共の研究成果を中心に 1) 小腸リン吸収システムの調節機構、2) リン輸送トランスポーターの阻害剤、3) 透析患者の高リン血症の治療成績について述べる。

(10) ウナギの飲水行動に関する筋の神経支配

安藤正昭, 棕田崇生, 小坂朋大伸 (広島大学・総合科学部・総合生理)

大部分の陸上脊椎動物は、飲水行動によって水を摂取し、血液の恒常性を維持している。しかし陸上脊椎動物

の飲水行動は、「渴き」の後に「水場探索行動」、「水を口に含む行動」、「燕下」と続き、その解析が複雑であるこ

とが予想される。一方水中に棲む魚類は、呼吸のために絶えず水が口中にあるので、「燕下」のみで飲水行動は完結し、その神経回路は哺乳類より単純であることが期待できる。本研究はウナギの飲水行動の調節機構を明らかにし、哺乳類の飲水行動を理解する一助とすることを目的とする。

海水ウナギの静脈中に Angiotensin I (ANG I) を注入すると飲水速度は高まるが、Captopril (CP) で ANG II 合成を阻害すると ANG I の効果は消失する。また脱血によっても飲水は増大するが、この効果も CP 処理によって消失することから、ウナギも哺乳類と同様に、血液量の減少(血圧低下)によって Renin-Angiotensin 系が活性化し、ANG II によって飲水が惹起されると考えられる。しかし血液浸透圧の上昇に対してウナギは飲水量を低下させた。また ANG II 以外にも、種々の因子が飲水行動に関与していることを見つけた。次にこれらの調節因子を第 IV 脳室に投与したが、基本的な作用はよく似ていた。このことは、これらの因子が脳室周囲器官に作用していると考えれば説明できる。ウナギの脳室周囲器官を同定する目的で Evans blue (EB) を血中に射つと、Area postrema

と松果体が濃染された。ウナギの脳は小さく、摘出したままでも灌流液中で神経活動を記録できる。この系で、延髄背側部が ANG II や Atrial natriuretic peptide (ANP) に反応することを見つけた。このことはウナギの脳内に ANG II や ANP の受容体が存在していることを示している。

ウナギの食道輪走筋は Acetylcholine (ACh) によって収縮する。また短い duration の繰り返し電気刺激によっても収縮する。この電気刺激の効果は TTX や Curare によって抑えられることから、食道輪走筋は神経の支配を受けており、その伝達物質は ACh だと考えられる。次に食道筋に EB を注入し、この色素を取り込むニューロンを探したところ、延髄の Dorsal motor nucleus of the vagus (DMN) が染まった。また DMN は Choline acetyl transferase (ChAT) の抗体でも染まった。このことからウナギの DMN は ACh を合成し、食道輪走筋を収縮させることが考えられる。ウナギの食道輪走筋を弛緩させる因子はまだ見つけていないが、Isobutyl-methylxanthine (IBMX) で弛緩することから、弛緩因子はあると思っている。

### (11) 核内受容体 PPAR を介した脂溶性栄養素吸収関連遺伝子の発現調節

合田敏尚, 望月和樹, 駿河和仁 (静岡県立大学食品栄養科学部)

脂質ならびに脂溶性の栄養素はその吸収の過程で吸収細胞内の細胞質に存在する特異的な結合タンパク質による輸送を受ける。小腸には、肝臓型 (L-) と小腸型 (I-) の脂肪酸結合タンパク質 (FABP) が大量に発現しており、脂肪酸の細胞内輸送に関わっている。一方、細胞性レチノール結合タンパク質タイプ II (CRBP II) は吸収細胞内に取り込まれたレチノールを結合することによってビタミン A の吸収に携わるタンパク質であり、小腸に特異的に発現している。これらの脂溶性栄養素吸収関連タンパク質の発現は、いずれも高脂肪食摂取、特に長鎖不飽和脂肪酸の摂取により転写レベルで正に調節されていることをこれまで明らかにしてきた。脂肪酸のシグナルを核における遺伝子の転写へと仲介する核内受容体として、近年ペルオキシゾーム増殖因子活性型受容体 (peroxisome proliferator-activated receptor; PPAR) が注目されている。L-FABP と CRBP II の遺伝子の 5' 上流には PPAR 結合領域のコンセンサス配列と類似した領域が存在したので、ラ

ット小腸における PPAR のサブタイプの発現を調べてみたところ、小腸には PPAR と PPAR が発現していた。このうち PPAR は脂溶性栄養素吸収関連遺伝子の発現量が高まる時期 (離乳期や高脂肪食摂取時) に対応して発現量が増大していた。また、*in vitro* で転写・翻訳した PPAR と PPAR を用いたゲルシフト法により、長鎖脂肪酸は PPAR とこれらの PPAR 結合領域との結合を増強する作用を示すことが示された。さらに、PPAR または PPAR のリガンド結合ドメインと GAL4 の DNA 結合ドメインのキメラタンパク質発現ベクターを用いる One-hybrid assay 系により、PPAR が PPAR より多くの種類の脂肪酸をリガンドとして結合し、転写の活性化をもたらすとともに、小腸に特に多く発現している転写共役因子 p300 と強く相互作用することが明らかになった。従って、小腸に発現している PPAR の中でも特にサブタイプ が脂肪酸のシグナル伝達因子として脂溶性栄養素吸収関連遺伝子の発現調節に重要な役割を果たしている

と考えられる。

## (12) 大腸におけるトロンボキサン A2 の病態生理機能

酒井秀紀, 鈴木智之, 竹口紀晃 (富山医科薬科大学 薬学部 薬物生理学講座)

大腸において, 下痢の際には, 粘膜の Cl 分泌が異常に亢進していることが良く知られている。我々は, Ussing チェンバー法によるラット単離大腸粘膜標本の短絡電流測定, ホールセルパッチクランプ法による大腸腺クリプト細胞の膜電位測定, エンザイムイムノアッセイによるトロンボキサンの定量などにより, アラキドン酸代謝物のトロンボキサン A2 が, 大腸において Cl 分泌を引き起こす新規生理活性物質であることを発見した。

興味深いことに, トロンボキサン A2 は, プロスタグランジン E2 やアセチルコリンなどの場合と異なり, 正

常な状態では, 大腸のイオン分泌には全く寄与していなかった。しかし, 抗癌剤の塩酸イリノテカンが引き起こす激しい下痢 (Cl 分泌) は, トロンボキサン A2 の産生を介して引き起こされること, 潰瘍性大腸炎の際に病変組織で多量に検出される血小板活性化因子 (PAF) による Cl 異常分泌機構に, トロンボキサン A2 の産生が介在していることを発見した。したがってトロンボキサン A2 は, 大腸の病態生理機能に密接に関連しているものと考えられた。

## (13) 腔腸動物ヒドラのぜん動運動について

清水 裕 (国立遺伝学研究所, 発生遺伝研究部門)

ヒドラは淡水産の腔腸動物で細胞数は約十万個, しかし多細胞体制を有する動物としては最も下等なもののひとつと考えられてきた。発表者は, 高等動物の生理機能の大部分は進化的にヒドラまでさかのぼれるのではないかという観点から様々な基礎研究を行っている。ヒドラの体幹部は円筒形でそのまま消化管となっている。そしてその構造はほ乳類の消化管と非常によく似ている。縦方向と円周方向に互いに直交する平滑筋を持つこと, その内部に散在した神経集網が存在することなどである。ヒドラの消化過程を詳細に調べた例はこれまでなかった。

### 【本研究の概略】

我々はその過程が高等動物と比較してどう違うのかを

調べようと, もっぱらビデオ観察を行ってきた。その結果, 給餌後 30 分ないし一時間後からぜん動と考えられる現象が観察できた。その際, ヒドラの消化管は閉じているために (前口動物のため) 内容物は体腔内を行ったり来たりする往復運動に終始する。このぜん動機構を調べる過程で様々な事実が明らかになっている。そのひとつは神経が完全に欠失した無神経ヒドラでもぜん動が認められた点である。従来のは乳類の腸管を用いた研究から腸管内に散在する神経集網の関与が不可欠と考えられてきたが, 本実験結果はそれと相反する。研究はまだ初期段階であるが, これまでに得られた情報を発表し, 専門の方々の助言を頂戴したい。

15. 脳の情報統合と行動発現のメカニズム - 感覚知覚から生体反応形成まで -

2001 年 1 月 11 日 - 1 月 12 日

代表・世話人：泰羅雅登（日本大学・医学部・第一生理学教室）

森 茂美（生体調節研究系・生体システム部門）

- ( 1 ) 脳幹と小脳による眼球運動制御 - 眼位保持と視覚サッケードの神経機構  
岩本義輝（筑波大学・基礎医学系・生理）
- ( 2 ) 追従眼球運動と追跡眼球運動の神経機構  
小高 泰（電総研・情報科学部）
- ( 3 ) 前頭前皮質における選択的注意について  
射場美智代（北海道大学・医学部・機能分子学）
- ( 4 ) 刺激 - 運動 - 報酬連合に基づいた意思決定の脳内機構  
松元健二（理研・脳センター認知機能表現）
- ( 5 ) サル前頭眼窩野細胞の報酬期待活動  
彦坂和雄（東京都神経研・心理）
- ( 6 ) リスザルにおける脊髄運動細胞への大脳皮質興奮性出力様式  
~ C3 - C4 脊髄固有ニューロンのかかわり ~  
中隲克己（生理研・生体システム）
- ( 7 ) V4 野における陰影テクスチャーの特徴抽出  
花澤明俊（生理研・高次神経性調節）
- ( 8 ) 前部側頭皮質「顔」応答ニューロンによる「顔」空間の表現  
永福智志（富山医科薬科大学・医学部・第二生理）
- ( 9 ) 霊長類下部側頭葉における視覚記憶表現：記銘と想起について  
納家勇治（生理学研究所 高次液性調節部門）

【参加者名】

岩本義輝（筑波大学基礎医学系）、小高 泰（通産省工業技術院電子技術総合研究所 / 情報科学部）、松元健二（脳科学総合研究センター認知脳科学研究グループ認知機能表現研究チーム）、射場美智代（北海道大学大学院医学研究科・脳科学専攻・神経機能学講座・機能分子学分野）、彦坂 和雄（財団法人・東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・心理学研究部門）、永福 智志（富山医科薬科大学 医学部 生理学第二講座）、山田洋（大阪大学医学部医学修士課程 1 年）、渡邊 淳司（東京大学大学院 工学系研究科 計数工学専攻）、林 隆介（東京大学大学院 工学系研究科 計数工学専攻）、磯村宜和（（財）東京都医学研究機構 東京都神経科学総合研究所 統合生理研究部門）、宮地重弘（（財）東京都医学研究機構 東京都神経科学総合研究所 統合生理研究部門）、稲瀬正彦（近畿大学医学部）、高田昌彦（（財）東京都医学

研究機構 東京都神経科学総合研究所 統合生理研究部門）、佐藤多加之（理研・脳センター脳統合機能（筑波大学院））、山野辺貴信（北海道大学大学院医学研究科 生体機能学専攻統合生理学講座 認知行動学分野）、筒井健一郎（日本大学医学部第一生理学教室）、佐藤暢哉（日本大学医学部第一生理学教室）、高橋和巳（福島県立医科大学 医学部 生理学第二講座）、平場久雄（日本大学歯学部生理学教室）、鵬川紘征（日本大学歯学部生理学教室）、村上郁也（NTT コミュニケーション科学基礎研究所人間情報研究部）、泰羅雅登（日本大学医学部第一生理学教室）、村田 哲（近畿大学医学部第一生理）、伊澤栄一（名大院 生命農学 動物比較情報）、中嶋真也（名大院 生命農学 動物比較情報）、青木直哉（名大院 生命農学 動物比較情報）、福島 宏器（東大教養学部広域科学科 開一夫研究室）

## 【概要】

21世紀年最初の研究会として、1月11日、12日の両日、「脳の情報統合と行動発現のメカニズム - 感覚知覚から生体反応形成まで -」が開催され、若い研究者を中心に、全国から40名近い参加者があった。今回は、「眼球運動の制御」、「前頭前野 ワーキングメモリを越えて」、「運動野再訪」、「視覚認知から記憶へ」の

それぞれのセッションで2~3の話題提供をお願いし、討論をおこなった。発表されたテーマはどれも最新の情報であり、非常に内容の濃いものであった。毎年の研究会の反省でディスカッションが十分でないのご指摘を幾人かの方々からいただいたので、今回は特に十分なディスカッションの時間を用意し、活発な討論をおこなった。

### (1) 脳幹と小脳による眼球運動制御 - 眼位保持と視覚サッケードの神経機構

岩本義輝 (筑波大学・基礎医学系・生理)

サッケードと眼位保持は、視覚対象に視線を向けその像を網膜中心窩に固定するために不可欠の機能である。我々は、眼位保持に重要な神経積分器の実体を明らかにするため、覚醒ネコで眼球位置信号を持つニューロン間の結合を調べた。その結果、前庭神経核と中脳カハール間質核の相互結合・交連性結合が速度信号から位置信号への変換に重要であること、脳幹内の多重ループが積分機構を担うことが示唆された。さらに、橋正中部の

paramedian tract (PMT) ニューロンが眼球運動情報を小脳に伝え、小脳による積分機構の調節に寄与することを示した。視覚目標に向かうサッケードのゲイン (saccade size/target distance) は、反復する視覚誤差により可塑的に変化する。我々は、覚醒サルでゲイン適応に伴い小脳室頂核のニューロン活動が変化することを観察した。この予備的結果は、適応に室頂核が関与することを示唆する。

### (2) 追従眼球運動と追跡眼球運動の神経機構

小高 泰 (経済産業省・電子技術総合研究所 情報科学部 脳機能)

ヒトやサルのように網膜に中央に中心窩が発達した霊長類では、動く視標を追跡する時、追跡眼球運動 (smooth pursuit eye movement) が生じます。速度の遅い眼球運動には、もう一つ、追跡眼球運動 (ocular following response: OFR) がある。この眼球運動は、広い視野の動きに対して、網膜上の像が安定するように短潜時で生じる。自然な状態では、追跡眼球運動が生じると、視標以外の背景は、眼球運動によって生じた動きのため、眼の動きとは

逆向きの動きとして捕らえられる。しかし、我々は、日常、追跡眼球運動を行うことができる。サルを用いて、追跡眼球運動中に、背景の動きに対する反応を調べた。行っている眼球運動と同じ向きに動く背景の動きに対して大きな反応が見られたが、逆向きの動きに対しては反応が見られなかった。これは、脳内で、追跡眼球運動を行っている間、追従眼球運動の発現を抑える仕組みがあるためではないかと思われる。

### (3) 前頭前皮質における選択的注意について

射場美智代 (北海道大学大学院医学研究科・脳科学専攻機能分子学分野)

これまでの研究により前頭前皮質は意味のある情報を一時的に保持し、出力するという「ワーキングメモリ過

程」に関与する事が示されてきた。しかし、ワーキングメモリに入力される前段階の「意味のある情報の選択」

に関する研究はほとんどされてこなかった。記憶には容量があるため、雑多な情報の中から意味のある情報を選択する過程が存在すると考えられる。そこで、我々は前頭前皮質がターゲット選択のような選択的注意にいかに関与するかを明らかにするため、眼球運動を用いた視覚探索課題とムシモールによる局所機能脱落法を組み合わせ

せた実験や、単一ニューロン活動記録法を用いてこの問題に取り組んできた。これらの実験により、前頭前皮質が意味のある情報の選択に関与する事、その過程にはノルアドレナリン 2 受容体が関与する事、さらにこの分野には従来報告されてきた記憶システムに加えて選択的注意と結びついた記憶過程が存在する事が示唆された。

#### (4) 刺激 - 運動 - 報酬連合に基づいた意思決定の脳内機構

松元健二 (理研・脳センター認知機能表現)

合目的的行動の意思決定場面において、刺激、運動、報酬それぞれの情報がどのように処理統合されるのかを明らかにするため、刺激 - 運動 - 報酬の連合とその組み替えを必要とする視覚弁別課題遂行中のサル3頭の外側前頭前野および前頭眼窩野から単一細胞活動を記録した。いずれの領域とも視覚刺激呈示に際しては、刺激と報酬の影響を強く受けた。その後外側前頭前野では運動のみの影響を受ける細胞が、運動前の遅延期に一時的に増え

た。前頭眼窩野では、報酬のみの影響を受ける細胞が試行の終わりまで多く見られた。また、外側前頭前野細胞では、運動に向けては運動主効果が、報酬に向けては報酬主効果が安定したが、前頭眼窩野細胞では、いずれの主効果とも試行中安定していた。これらの結果は、視覚刺激に連合された報酬情報によって活性化された後、外側前頭前野は、運動の意思決定場面で運動情報を抽出し、前頭眼窩野は報酬情報を抽出、保持することを示唆する。

#### (5) サル前頭眼窩野細胞の報酬期待活動

彦坂和雄 (東京都神経科学総合研究所・心理)

前頭眼窩野は前頭連合野の腹側部に広がる領野であり、刺激 報酬間の連合機能や情動機能に関与している。サルに異なる報酬を一定の順序で与える課題を行なわせながら、前頭眼窩野細胞の報酬期待活動の性質を調べた。用いた課題は、3つの報酬試行と1つの無報酬試行からなる遅延付き反応時間課題である。4 試行を1つのブロックとして、報酬として(1)オレンジジュース、(2)水、(3)グレープジュース、(4)無報酬という順序で与えた。液体報酬のかわりにエサ報酬も用いた。遅延期

間中に見られる前頭眼窩野細胞の報酬期待活動には3つのタイプが見出された。報酬と無報酬の違いに関係する報酬期待活動 特定の報酬に関係する報酬期待活動 好む報酬と好まない報酬の違いに関係する報酬期待活動である。又、動物が特定の報酬を食べた試行と食べない試行で報酬期待活動が変化した。これらのことから、前頭眼窩野細胞の報酬期待活動は、動物の報酬に対するモチベーションに依存しており、特定の報酬価を期待する機能に関係していると考えられた。

#### (6) リスザルにおける皮質脊髄路興奮性出力の頸髄運動細胞への伝達様式 ~ C3-C4 脊髄固有ニューロンのかわり ~

中階克己 (生理学研究所・生体システム研究部門)

上肢運動制御において大脳皮質興奮性出力が皮質脊髄路

を介して上肢筋支配運動細胞へ到達する経路については、

運動細胞へ直接伝達される直接経路 (cortico-motoneuronal system : CM system) と、第 3 ~ 第 4 頸髄レベルに位置する脊髄固有ニューロン C3-C4 propriospinal neuron (PN) を介して伝達される間接経路 (PN system) とが明らかにされている。CM system をもたないネコでは PN system が発達している。一方霊長類では手指運動の精緻度に重要な役割を果たす CM system が発達している。最近手指の精緻運動能力の高いマカクサルにおいて PN system の発達度が低いことが報告された (Maier et al., 1998)。本研究の目的は、マカクサルに比べて手指運動の精緻度に劣りかつ CM system の発達度の低いリスザルにおいて皮質

脊髄路興奮性出力がどの程度まで PN system を介して上肢筋支配運動細胞へ伝達されるかを明らかにすることである。4 匹のリスザルにおいて chloralose 麻酔下で延髄対側の皮質脊髄路を刺激し、第 6 頸髄から第 1 胸髄レベルに位置する上肢筋支配運動細胞から細胞内記録を行った。その結果、PN system を介して誘発された EPSP を示す運動細胞の割合は 86% であり、この値はマカクサル (18%) より高かつネコ (100%) より低い。以上の結果は PN system の発達度と手指機能の発達度との間には負の相関が成立することが示唆された。

### (7) V4 野における陰影テクスチャーの特徴抽出

花澤明俊 (岩生理研・高次神経性調節)

物体表面のテクスチャーは、その物体を識別したり、表面の材質、摩擦などの属性を判断する上で有用な情報源である。テクスチャー特徴の抽出にマカクサル V4 野が関与するか否かを調べた。コンピュータ画面上に、輝度勾配 (陰影) によって粒子状の細かい凹凸があるように見えるテクスチャー刺激を提示し、要素の密度、大きさおよび陰影の方向を変化させ、神経細胞の応答を調べた。多くの細胞がこれらの刺激属性に選択性を示した。それらの一部は空間周波数選択性では説明のできない振

る舞いをした。まず、要素の陰影の方向に対し 1 方向性の選択性を示す細胞があった。上または下方向の陰影に選択的な細胞が多く、陰影からの立体知覚にみられる偏りに対応していた。また、粒子状のテクスチャーのみに応答し、正弦波格子やバー刺激に応答しない細胞があった。これらの結果から、V4 野が、陰影から復元される 3 次元構造を含む、テクスチャーの特徴抽出に関与していることが示唆された。

### (8) 前部側頭皮質「顔」応答ニューロンによる「顔」空間の表現

永福智志 (富山医科薬科大学・医学部・第二生理)

個体同定に基づく遅延見本合わせ課題 (I-DMS 課題) 遂行中のサル上側頭溝前部領域と下側頭回前部領域から「顔」応答ニューロンを記録した。I-DMS 課題では、サルが固視点に固視した後、見本「顔」刺激が呈示され、遅延期間の後、テスト「顔」刺激が呈示される。これら「顔」刺激は、サルにとって既知または新奇な人物の顔を 7 方向から撮影した画像であり、サルは同一人物の画像が呈示された場合、レバ - 押しを行うと報酬が与えられる。「顔」応答ニューロン全体の反応パターンに対する多

次元尺度分析 (Multi-dimensional scaling, MDS) に基づき、上側頭溝前部領域および下側頭回前部領域における「顔」空間を構成したところ、上側頭溝前部領域では「顔」の向きなど、「顔」の知覚情報が、下側頭回前部領域では「顔」の既知性やアイデンティティが、「顔」空間に表現されていることが示された。以上の結果より「顔」情報処理におけるサル上側頭溝前部領域と下側頭回前部領域の機能分化について考察する。

## (9) 霊長類下部側頭葉における視覚記憶表現：記銘と想起について

納家勇治 (生理学研究所 高次液性調節部門)

視覚性対連合記憶課題を遂行中のサルの下部側頭葉から単一ニューロン記録を行い、学習した 12 組 24 枚の各刺激図形を手がかり刺激として提示したときの、刺激提示期間中、並びに遅延期間中における神経活動を TE 野と 36 野で比較し、対連合記憶の記銘と想起に関する 2 つの知見を得た。初めに、個々のニューロンが示す刺激提示期間中の神経応答に対する対連合記憶の影響を評価するため、対連合指標 (PCI) を定義した。その結果、36 野のニューロンが示す PCI の値は TE 野に比べて有為

に高い ( $P < 0.01$ ) ことが示された。このことは対連合記憶の記銘に対し、TE 野から 36 野への順行性シグナル伝達の重要性を示唆する。次に試行中の各時点での神経活動に対する記憶想起の影響を評価するため、対想起指標 (PRI) を定義した。その結果、36 野のニューロンが示す PRI の値は TE 野に比べ有為に早く ( $P < 0.01$ ) 上昇し始めることが示された。このことは対連合記憶の想起に関しては、36 野から TE 野への逆行性シグナル伝達が重要であることを示唆する。

## 【 国際シンポジウム 】

## 第 27 回生理研国際シンポジウム

生理学研究所国際シンポジウム”Mechanisms of Cell Signaling in Early Development” (初期発生における細胞信号伝達機構) は, 生理学研究所が主催, 細胞内代謝研究部門宮崎俊一教授がオーガナイザーとなって, 平成 12 年 11 月 6 日から 8 日にかけて岡崎コンファレンスセンターで開催された。生殖細胞 (精子・卵子) の成熟, 受精, 胚発生開始を含む初期発生機序の解明は, 生物学上重要な研究課題であるばかりでなく, 医学・農学領域への応用の基礎になる有用な研究課題でもある。本シンポジウムは, 初期発生における細胞信号伝達機構に焦点を絞り, 特にヒトを含めた哺乳動物の受精のメカニズムを中心に, このテーマに関わる生物学・医学・農学の国内外の先端的研究者が最新のデータを持ち寄る機会を我が国で設け, 情報交換と今後の研究方向・ストラテジーを

討論することにより, さらなる相互研究協力関係を確立することを目的として開催された。生理学研究所, 内藤記念科学振興財団, 加藤記念難病研究助成基金から援助をいただいた。

本シンポジウムは比較的小さい国際シンポジウムであり, 参加者は約 60 名で, 海外から 7 名 (米国 4, 英国 2, フランス 1), 国内から 15 名の招待講演と, 21 題のポスター発表があった。シンポジウムは”discussion meeting”と位置づけ, また若手研究者の参画を呼びかけ, 活発な討論が行われて, 非常に有意義なものとなった。会期中に, 生理研の見学, 岡崎城見物, 懇親会などを折り込み, 最新研究情報の交換ばかりでなく, パーソナルコミュニケーションも充分でき, 所期の目的が充分達成された。

## SEIRIKEN (NIPS) International Symposium ”Mechanisms of Cell Signaling in Early Development”

November 6-8, 2000; Okazaki Conference Center, Japan

November 6 (Monday)

Welcome greeting Sasaki S (Director general, NIPS)

- 1) Miyazaki S (NIPS & Tokyo Women's Medical Univ) Opening remarks and “Cell signaling in early development”
- 2) Morisawa M (Univ of Tokyo) Cell signalings for sperm activation and chemotaxis in the ascidians, *Ciona intestinalis* and *C. savignyi*.
- 3) Okabe M (Osaka Univ) Sperm/egg fusion and surface proteins in mouse
- 4) Ogura A (Natl Inst of Infectious Diseases) Construction of diploid zygotes by micromanipulation using male germ cells
- 5) Kuroda H (Toyama Univ) Fertilization signals in sea urchin eggs
- 6) Kyojuka K (Tohoku Univ) Signal transduction during fertilization in Ascidian
- 7) Deguchi R (Miyagi Univ of Education) Spatiotemporal patterns of  $Ca^{2+}$  increases at fertilization in bivalve and mouse eggs”
- 8) Fissore RA (Univ of Massachusetts) Understanding how the sperm initiates life and death in mammalian oocytes
- 9) Swann K (Univ College London) A soluble sperm factor that generates  $InsP_3$  and  $Ca^{2+}$  oscillations in mammalian eggs

November 7 (Tuesday)

- 10) Stricker SA (Univ of New Mexico) Calcium and ER dynamics during oocyte maturation and fertilization in nemertean worms
- 11) Oda S (Tokyo Women's Med Univ) Physiological characterization of mammalian sperm factor
- 12) Kline D (Kent State Univ) Localization of the endoplasmic reticulum and generation of  $Ca^{2+}$  waves in the mouse egg

- 13) Mohri T (NIPS)  $Ca^{2+}/Mn^{2+}$  influx and release during  $Ca^{2+}$  oscillations in mouse eggs
- 14) Carroll D (Florida Inst of Technol) Tyrosine kinase and PLC involvement in egg activation during fertilization
- 15) Iwao Y (Yamaguchi Univ) Molecular mechanisms of egg activation in amphibians

November 8 (Wednesday)

- 16) Sardet C. (CNRS / Univ P M Curie) Cortical and cytoplasmic reorganizations of the ascidian zygote
- 17) Hamaguchi Y. (Tokyo Inst of Technol) Cleavage stimulus in relationship with the mitotic apparatus in echinoderm eggs
- 18) Whitaker M. (Univ of Newcastle upon Tyne) Calcium signalling in early embryos
- 19) Mikoshiba K. (Inst of Med Sci, Univ of Tokyo) The role of  $IP_3$  receptors in development
- 20) Kono T. (Tokyo Univ of Agriculture) Epigenetic modification during oocyte growth and embryo development
- 21) Okamoto H. (Natl Inst of Bioscience and Human-technol) FGF signaling and the neural induction in *Xenopus* early development
- 22) Takahashi K. (Meiji Pharmaceutical Univ) Differentiation of ion channels during development

Closing remarks Miyazaki S (NIPS)

Poster session (November 6 – 8)

- P-1 Nomura M, Yoshida M & Morisawa M (Misaki Marine Biol Station, Univ of Tokyo)  
Calcium/calmodulin and calmodulin-dependent protein kinase II regulates membrane hyperpolarization in the SAAF-induced motility activation-signaling cascade in sperm of the ascidian, *Ciona savignyi*.
- P-2 Tsutsui H<sup>1</sup>, Ishikawa M<sup>1</sup>, Cosson J<sup>2</sup>, Oka Y<sup>1</sup> & Morisawa M<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Misaki Marine Biol Station, Univ of Tokyo; <sup>2</sup>Observatoire Oceanologique de Villefrance-sur-Mer, CNRS)  
Two strategies for sperm chemotaxis in *Ciona* and siphonophores: A numerical simulation study
- P-3 Kanematsu D, Kuroda R & Kuroda H (Toyama Univ)  
A transient increase in  $[Ca^{2+}]_i$  during fertilization of *C. elegans* oocytes
- P-4 Stricker SA & Smythe TL (Univ of New Mexico)  
Serotonin triggers an increase in cAMP during oocyte maturation in nemertean worms
- P-5 Nakano T<sup>1,2</sup>, Nakashima T<sup>1</sup>, Kontani K<sup>3</sup>, Kurosu H<sup>3</sup>, Katada T<sup>3</sup>, Hoshi M<sup>4</sup> & Chiba K<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Ochanomizu Univ; <sup>2</sup>Tokyo Inst of Technol; <sup>3</sup>Univ of Tokyo; <sup>4</sup>Keio Univ)  
G-protein subunit-dependent phosphorylation of starfish oocyte
- P-6 Iwasaki H<sup>1,2</sup>, Chiba K<sup>3</sup>, Uchiyama T<sup>1</sup>, Yoshikawa F<sup>4</sup>, Suzuki F<sup>3</sup>, Ikeda M<sup>5</sup>, Furuichi T<sup>6</sup> & Mikoshiba K<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Univ of Tokyo; <sup>2</sup>Brain Science Inst, RIKEN; <sup>3</sup>Ochanomizu Univ; <sup>4</sup>Univ of California, San Francisco; <sup>5</sup>Tokyo Inst of Technol; <sup>6</sup>Dept of Mol Neurogenesis, Brain Science Inst, RIKEN)  
Molecular characterization of starfish  $IP_3$  receptor and its roles during oocyte maturation and fertilization
- P-7 Kumano M<sup>1,2</sup>, Albay D<sup>1</sup>, Carroll D<sup>3</sup> & Foltz K<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Univ of California, Santa Barbara; <sup>2</sup>Tokyo Inst of Technol; <sup>3</sup>Florida Inst of Technol)  
The regulation of MAP kinase during fertilization of echinoderm eggs
- P-8 Yoshida M (Misaki Marine Biol Station, Univ of Tokyo)  
Role of calcium in the egg activation in the ascidian, *Ciona savignyi*
- P-9 Yamamoto S<sup>1</sup>, Kubota HY<sup>2</sup>, Yoshimoto Y<sup>3</sup> & Iwao Y<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Yamaguchi Univ; <sup>2</sup>Kyoto Univ; <sup>3</sup>Kansai Med Univ)  
Injection of a sperm extract triggered egg activation in the newt, *Cynops pyrrhogaster*
- P-10 Whitaker M (Univ of Newcastle upon Tyne)  
cGMP and the fertilization calcium wave in sea urchin eggs
- P-11 Shirakawa H<sup>1</sup>, Mohri T<sup>2</sup> & Miyazaki S<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Tokyo Women's Med Univ; <sup>2</sup>NIPS)

- Numerical simulation for  $Mn^{2+}$  quenching of fura-2 during  $Ca^{2+}$  oscillations in mouse eggs
- P-12 Shirakawa H<sup>1</sup> & Miyazaki S<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Tokyo Women's Med Univ; <sup>2</sup>NIPS)  
Dual-wavelength ratiometric fluorescence measurement of endoplasmic reticulum membrane potential using voltage-sensitive dyes
- P-13 Parrington J<sup>1</sup>, Jones M<sup>2</sup>, Rice A<sup>1</sup>, Rhee SG<sup>3</sup>, Katan M<sup>2</sup> & Swann K<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Univ College London, <sup>2</sup>CRC Centre for Cell and Mol Biol; <sup>3</sup>NIH)  
Characteristics of the sperm factor and its associated PLC activity
- P-14 Deguchi R<sup>1</sup>, Shirakawa H<sup>2</sup>, Oda S<sup>2</sup>, Mohri T<sup>3</sup> & Miyazaki S<sup>2,3</sup> (<sup>1</sup>Miyagi Univ of Education; <sup>2</sup>Tokyo Women's Med Univ; <sup>3</sup>NIPS)  
Spatiotemporal analysis of  $Ca^{2+}$  waves during  $Ca^{2+}$  oscillations in fertilized mouse eggs
- P-15 Sato M<sup>1</sup>, Yoshitomo M<sup>1</sup>, Mohri T<sup>1</sup>, Sakurai A<sup>2</sup> & Miyazaki S<sup>1,3</sup> (<sup>1</sup>NIPS; <sup>2</sup>Juntendo Univ; <sup>3</sup>Tokyo Women's Med Univ)  
 $Ca^{2+}$  dynamics in mouse eggs after ICSI
- P-16 Ogonuki O<sup>1,2,3</sup>, Sankai T<sup>2</sup>, Yagami K<sup>3</sup>, Shikano T<sup>4</sup>, Oda S<sup>4</sup>, Miyazaki S<sup>4</sup> & Ogura A<sup>1</sup> (<sup>1</sup>National Inst of Infectious Diseases; <sup>2</sup>Tsukuba Primate Center; <sup>3</sup>Univ of Tsukuba; <sup>4</sup>Tokyo Women's Med Univ)  
Activity of a sperm-borne oocyte-activating factor in spermatozoa and spermatogenic cells from cynomolgus monkeys and its localization after oocyte activation
- P-17 Kline D & Miller D (Kent State Univ)  
Development of an in vitro culture system for ovarian follicles suitable for imaging
- P-18 Kaji K<sup>1</sup>, Oda S<sup>2</sup>, Shikano T<sup>1</sup>, Ohnuki T<sup>3</sup>, Uematsu Y<sup>3</sup>, Sakagami J<sup>3</sup>, Tada N<sup>3</sup>, Miyazaki S<sup>2,4</sup> & Kudo A<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Tokyo Inst of Technol; <sup>2</sup>Tokyo Women's Med Univ; <sup>3</sup>Taisho Pharm CO LTD; <sup>4</sup>NIPS)  
Cd9 on mouse egg microvilli participates in sperm-egg fusion
- P-19 Haremaki T<sup>1</sup>, Tanaka Y<sup>2</sup>, Hongo I<sup>1</sup>, Okamoto H<sup>1</sup> (<sup>1</sup>National Inst of Bioscience and Human-technol; <sup>2</sup>Univ of Tsukuba)  
FGF dose-dependent expression of Xcad3 is mediated by elements in the 5'-flanking region and the first intron
- P-20 Tanaka-Kunishima M & Takahashi K (Meiji Pharmaceutical Univ)  
Ascidian neural oreEpidermal differentiation reflected in developmental profile of IRK channel gene promoter activity
- P-21 Ono Y<sup>1</sup>, Shimozawa N<sup>2</sup>, Ito M<sup>2</sup>, Kono T<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Tokyo Univ of Agriculture; <sup>2</sup>Central Inst for Exp Anim)
- Production of cloned mice by serial and single nuclear transfer

## COE 国際シンポジウム (第 28 回生理研国際シンポジウム)

本シンポジウムは姿勢と歩行運動の高次制御機序を解明することを目的とし、森茂美(生体調節系, 生体システム研究部門)を総括選任者, Wiesendanger 教授(フライブルグ大, スイス)および Stuart 教授(アリゾナ大, アメリカ)を国際諮問委員として開催した。会議にはアメリカ, カナダ, イギリス, フランス, スウェーデンなど 14 カ国からそれぞれの国を代表する先導的な研究者が参加するとともに, 我が国からも運動制御の研究分野における先導的研究者と次世代を担う若年研究者が参加し, それぞれ研究成果を講演するとともに全体討論に積極的に参加した。シンポジウムでは 1. Brainstem and Spinal Cord: Cellular / Systems Approaches, 2. Adaptive Brainstem and Spinal Mechanisms, 3. Rhythm Generation and Sensorimotor Brainstem Interactions, 4. Brainstem-Cerebellar Interactions, 5. Eye-Head-Neck Coordination, 6. Higher Nervous Mechanisms: Basal Ganglia, Sensorimotor Cortex, and Frontal Lobe, の 6 主題で最も基本的神経回路が内在する脊髄レベルから脳幹, 小脳, 基底核, 大脳レ

ベルまでの最新の研究成果を国内外の第一線研究者によって発表して頂きさらに討論した。また会議の早朝には Shik (イスラエル), Strick (アメリカ), Wiesendanger (スイス) 教授による Keynote Lecture が行われた。これらの研究発表・討論から 20 世紀に出された主要な研究成果を総括するとともに, それらを 21 世紀の研究者に広く理解して頂くことを目的として講演者が研究成果をミニレビューとしてまとめ, 国際的な専門誌に出版することの必要性が論じられた。幸いにも研究成果を Progress in Brain Research Series に出版することについて Elsevier 出版社(オランダ)の同意を得ることができた。諸外国では動物実験の制約などから脳研究に対するシステムアプローチ的研究がやや停滞している。本会議に参加した数多くの外国人研究者がこの研究分野における日本人研究者の高いレベルでの研究成果を再認識したことは今後の国際間における研究交流を進める上で本シンポジウムの大きな成果であったと考えられる。

### COE international symposium: The 28th SEIRIKEN International Symposium Higher Nervous Control of Posture and Locomotion: Parallel and Centralized Control Mechanisms

March 18-22, 2001, NIPS Conference Center  
NIPS, Japan

March 19 Monday

Opening Remarks Shigemi Mori (NIPS)

Welcoming Address Kazuo Sasaki (Director-General, NIPS)

- 1) Mark Shik (Tel Aviv Univ.) How the mesencephalic "Locomotor Region" recruits hindbrain neurons
- 2) Douglas Stuart (Univ. Arizona), Historical perspective: Integration of posture and locomotion: significance of the contributions of Sherrington, Hess, and Bernstein
- 3) Sten Grillner (Karolinska Institute) The intrinsic function of a neuronal network: From ion channels to motor behavior
- 4) Francois Clarac (Univ. Marseilles) Comparative aspects of the development of posture and locomotion in mammals: The neonatal rat
- 5) Norio Kudo (Tsukuba Univ.) Developmental changes in the spatial pattern of rhythmic motor activity in the rat fetus
- 6) Hans Hultborn (Univ. Copenhagen) Resetting as a tool to analyze the locomotor network in the mammalian spinal cord
- 7) Takashi Yamaguchi (Yamagata Univ.) Neuronal organization of cat forelimb CPG
- 8) Larry Jordan (Univ. Manitoba) Examining the role of 5-HT in the control of spinal locomotor neurons: Release, receptor

distribution, and the effects of antagonists

- 9) Keir Pearson (Univ. Alberta) Functional role of feedback from muscle afferents in the generation of motor activity in walking cats
- 10) Kiyoji Matsuyama (Sapporo Med. Univ.) Locomotor role of the reticulospinal-spinal interneuronal system
- 11) Peter Kirkwood (Univ. College London) Respiratory inputs, non-respiratory inputs and plateau potentials in hindlimb motoneurons of female cats: Modulation by oestrogen and implications for functional heterogeneity in nucleus retroambiguus.
- 12) Saburo Kawaguchi (Kyoto Univ.) Functional recovery from spinal cord injury: Effects of a repair graft in the neonate
- 13) Marion Murray (MCP Hahnemann Univ.) Some functions develop and some do not after transplantation into spinal cord transection sites in neonatal rats
- 14) Alan Tessler (MCP Hahnemann Univ.) Some functions recover and some do not after intraspinal transplantation in adult rats
- 15) Serge Rossignol (Univ. Montreal) Determinants of locomotor recovery after spinal injury in the cat

March 20 Tuesday

- 16) Peter L. Strick (Univ. Pittsburgh) New concepts about basal ganglia and cerebellar "loops" with the cerebral cortex
- 17) Yoshio Nakamura (Tokyo Medical and Dental Univ.) Brainstem rhythm generation for ingestive movements
- 18) Kazuhisa Ezure (Tokyo Metropolitan Institute for Neuroscience) Central control of respiration by brainstem neural networks
- 19) Edgar Garcia-Rill (Univ. Arkansas) Arousal mechanisms related to posture and locomotion: I. Descending modulation
- 20) Robert Skinner (Univ. Arkansas) Arousal mechanisms related to posture and locomotion: II. Ascending modulation
- 21) Tadashi Isa (NIPS) Saccade initiation and vigilance: Regulation by the brainstem cholinergic system.
- 22) Ryuichi Shigemoto (NIPS) Cerebellar ataxia in patients with Hodgkin's disease: Role of a metabotropic glutamate receptor
- 23) Vlastislav Bracha (Iowa State Univ.) Cerebellar involvement in eyeblink conditioning in humans
- 24) Shigemi Mori (NIPS) Fastigial control of multiple body segments for the integration of posture and locomotion
- 25) James Bloedel (Iowa State Univ.) The task- and condition-dependent nature of the cerebellum's contribution to motor learning is reflected in the modulation of cerebellar neurons
- 26) Thomas Thach (Washington Univ.) Cerebellar control of simple vs. compound movements
- 27) Barry Peterson (Univ. Arkansas) Neural control of head movements
- 28) Kikuro Fukushima (Hokkaido Univ.) Role of the frontal eye fields in smooth gaze tracking
- 29) Yoshio Uchino (Tokyo Medical and Dental Univ.) The role of cross-striolar and commissural inhibition in the vestibulocollic reflex
- 30) Yoshikazu Shinoda (Tokyo Medical and Dental Univ.) The neural control of gaze: Organization from the superior colliculus to ocular and neck motoneurons
- 31) Alexej Glantyn (CNRS/College de France) Control of orienting movements: Role of multiple tectal projections to the lower brain stem
- 32) Shigeto Sasaki (Tokyo Metropolitan Institute for Neuroscience) Velocity and position guided orienting in the unrestrained cats

March 21 Wednesday

- 33) Mario Wiesendanger (Univ. Berne) Hands: The quest to understand dexterity
- 34) George Stelmach (Arizona State Univ.) Coordination among multiple body segments involved in trunk-assisted

prehension

- 35) Roger Lemon (Univ. College London) Pathways for corticospinal control of motoneurons in different primate species.
  - 36) Eric Rouiller (Univ. Fribourg) Recovery of manual dexterity following lesion of the corticospinal system in the adult monkey
  - 37) Jun Tanji (Tohoku Univ.) Regional specialization within the premotor cortex of the non-human primate
  - 38) Jiping He (Arizona State Univ.) Cortical control of arm movement: Adaptation and learning by cortical neurons
  - 39) Fraser Wilson (Univ. Arizona) Spatially-directed responses and neuronal activity in freely moving monkeys
  - 40) Okihide Hikosaka (Juntendo Univ.) Neural control of voluntary saccades: Role of the basal ganglia
  - 41) Atsushi Nambu (Tokyo Metropolitan Institute for Neuroscience) Cortico-basal ganglia loop and Parkinson's disease
  - 42) Kaoru Takakusaki (Aasahikawa Medical College) Basal ganglia-brainstem systems that control postural muscle tone and locomotion in cats
  - 43) Trevor Drew (Univ. Montreal) Cortical and brainstem contributions to the control of locomotion
  - 44) Hiroshi Shibasaki (Kyoto Univ.) Neural control mechanisms for normal vs. disordered gait
  - 45) Gert Holstege (Univ. Groningen) The emotional motor system
  - 46) Paul Cordo (Oregon Health Sci. Univ.) Control of multijoint movement in a natural motor behavior
  - 47) Victor Gurfinkel (Oregon Health Sci. Univ.) Coexistence of stability and mobility in a natural motor behavior
  - 48) Jean Massion (Univ. Marseilles) Posture and movement: co-ordination and control
- Concluding remarks Douglas Stuart (Univ. Arizona), What have we learned in Okazaki?  
Closing remarks Shigemi Mori (NIPS)

Poster Presentations (March 20 Tuesday)

- P-1 Tetsuro Yamamoto (Mie Univ.)  
Mode of cerebellar activation of the motor cortical areas: Phylogenetic comparisons among mammals
- P-2 Satoru Kondo (NIPS)  
Inhibitory postsynaptic currents in the frontal cortex of the rat
- P-3 Md. Kadrul Huda (Gifu Univ.)  
Thalamocortical excitation of cat motor cortical neurons: Inhibitory modulation by dopamine
- P-4 Alstermark Bror (NIPS)  
C3-C4 propriospinal neurons mediate disynaptic pyramidal excitation to forelimb motoneurons in *Macaca Fuscata*
- P-5 Yuka Inoue (NIPS)  
Functions of the pedunculo-pontine tegmental nucleus: Reward-influenced modulation of a saccade task in the monkey
- P-6 Yasushi Kobayashi (NIPS)  
The performance of visually guided saccade tasks in monkeys: Contribution of pedunculo-pontine tegmental nucleus neurons
- P-7 Tetsu Okumura (NIPS)  
Microperfusion into the rat striatum: rotation movements and brain c-fos expression induced by carbachol
- P-8 Izumi Sugihara (Tokyo Med. Dent. Univ.)  
Cerebellar projection patterns of single climbing vs. mossy fibers
- P-9 Katsumi Nakajima (NIPS)  
Locomotor-driving signals to lumbosacral neurons: Role of CLR-activated reticulospinal cells
- P-10 Hiroshi Nishimaru (Tsukuba Univ.)  
Rhythmic, locomotor-like activity in the spinal cord of the neonatal mouse

- P-11 Arpad Dobolyi (NIPS & NIH)  
Acetylcholinesterase-positive neurons in the lumbar spinal cord of the developing and adult rat
- P-12 Julita Czarkowska-Bauch (Nencki Institute)  
BDNR and NT-4 immunoreactivity increase in spinal cord fibers following locomotor training in the adult rat
- P-13 Malgorzata Skup (Nencki Institute)  
Identification of spinal cells responding with an increased expression of Trk-B receptor protein to locomotor training in adult rats
- P-14 Yasunobu Itoh (Akita Univ.)  
Adult dorsal root regeneration into the adult spinal cord: Enhancement by neurotrophic factors
- P-15 Riyi Shi (Purdue Univ.)  
Polyethylene glycol repairs mammalian spinal cord axons after mechanical injury
- P-16 Giito Izuta (Yamagata Univ.)  
Postural control on stable and unstable support surfaces: Use of different self-paced movement strategies
- P-17 Mihai Tarata (Bucharest Univ.)  
A new technique for measuring muscle activity: The accelerometer MMG
- P-18 Carol Boliek (Univ.Arizona)  
Postural control and speech breathing in young children with neuromotor disorders
- P-19 Naomi Wada (Yamaguchi Univ.)  
Trunk movement in the cat: Level vs. upslope treadmill walking
- P-20 Atsumichi Tachibana (NIPS)  
Longitudinal study of the acquisition of operant-trained upright posture and bipedal locomotion by *M. Fuscata*
- P-21 Futoshi Mori (NIPS)  
Cerebral glucose metabolism during the bipedal locomotion of the Japanese monkey, *M. Fuscata*: A PET study

# 【 セ ミ ナ ー 報 告 】

## セミナー報告

### 1. CEREBELLUM AND THE NEURAL SUBSTRATES OF ASSOCIATIVE LEARNING

Vlastislav Bracha (Barrow Neurological Institute, Phoenix, AZ)

(2000.4.4)

Classical conditioning of the eyeblink response in the rabbit is one of the best understood models of learning and memory. The presentation will focus on the current advances in understanding the role of intermediate cerebellum-related circuits in learning and performing anticipatory protective responses. The data will illustrate our approach which combines research in two animal models and in human subjects. The objective of this approach is to examine the functionality of the involved circuits in animal models and then to examine the applicability of the acquired knowledge to humans.

The first part of the presentation will demonstrate that classical conditioning of the eyeblink response in the rabbit is under the control of intermediate cerebellum - related neural circuits. An emphasis will be made on current strategies used to elucidate the location of plastic changes which underlie this form of learning.

The second part of the presentation will show that the

circuits described in the rabbit eyeblink conditioning model are multi-functional. They are involved in the control of anticipatory protective responses in multiple effector systems (eyelids, forelimb and hindlimb) in several mammalian species (rabbit, cat and human). Moreover, these circuits seem to also be involved in other forms of learning, for instance instrumental conditioning.

The third part of the presentation will summarize our human studies which confirm that the core of the knowledge acquired using animal models closely corresponds to the cerebellum's function in humans. These studies, which employed unique experimental paradigms, were performed in normal human subjects and in patients with lesions restricted to the cerebellum. The presented data will demonstrate that similar to the rabbit model, the acquisition, retention and extinction of classically conditioned eyeblinks in humans are cerebellum dependent.

(担当: 森 茂美)

### 2. How Muscle Works: Determining the Interaction of Myosin and Actin from Electron Cryo-microscopy

Rasmus R. Schroeder (Senior Researcher, Max-Planck-Institute of Medical Research, Heidelberg, Germany)

(2000.4.5)

In recent years large steps forward to the understanding of muscle contraction- which is understood on the molecular level as the interaction of the two protein players myosin and actin-have been done. For both proteins the X-ray structures are available, in the case of the motor protein myosin a number of structures at different nucleotide states have also been determined. Electron cryo-microscopy provides now the means to determine the interaction of myosin with actin: Reconstructions from frozen hydrated samples of actin filaments decorated with myosin headsubfragment S1 are used to dock the known molecular structures. By doing this

one obtains a molecular model of the interaction complex. Using energy filtering electron microscopy, advanced image recording, and a new single particle image processing schemes for helical objects is now possible to achieve a resolution better than 20 Å for the acto-myosin complex. At this resolution first conformational changes of myosin between the monomeric X-ray structure and the docked interaction model are found. This movement appears to account for the kinetically determined difference between "weak" and "strong" binding.

(担当 : 永山國昭)

3. Dendritic signaling pathways involved in cerebellar long-term synaptic depression

George J. Augustine (Duke University Medical Center)

(2000.4.18)

G. Augustine 博士は現代のシナプス伝達研究の指導的研究者の一人である。今回は、小脳運動学習に関与すると考えられているプルキンエ細胞シナプス伝達の長期抑

圧のメカニズムについて最新の知見を紹介していただいた。

(担当：河西春郎)

4. Repolarization-induced inhibition of  $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$  release in skeletal myotubes

須田 憲男 (慈恵会医科大学 生理学第2)

(2000.4.27)

哺乳類骨格筋細胞では、形質膜が適度な強さで一定時間以上脱分極されていますと、高濃度カフェイン投与によって  $Ca^{2+}$  による  $Ca^{2+}$  遊離機構を介して筋小胞体からの  $Ca^{2+}$  放出を増強させても、引き続き再分極により  $Ca^{2+}$  放出が瞬時にしかも全面的に停止します (RISC 現象; PNAS 91, 5725-5729, 1994)。RISC (repolarization-induced stop of caffeine-induced  $Ca^{2+}$  release) を単純に解釈しますと、カフェインにより開口したリアノジン受容体 (RyR) チャネルがジヒドロピリジン受容体 (電位センサー) の支配下にあり、再分極により強制的に閉鎖されるということになります。再分極によってカフェインによる  $Ca^{2+}$  放出が実際に抑制されるのかどうかをさらに検討するため、マウス培養骨格筋細胞にホールセル

パッチクランプ法および蛍光色素による細胞内  $Ca$  濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) 測定法を同時適用し、脱分極パルス終了直後に初めて 5-20mM のカフェインを投与してみました。しかし再分極後 10 秒近くにわたり  $Ca^{2+}$  放出は起こらず、その効果は投与時の  $[Ca^{2+}]_i$  レベルに無関係でした。これとは対照的に、脱分極パルス終了直後でも形質膜の脱分極により  $Ca^{2+}$  放出は起こり、脱分極中および静止期には同濃度のカフェイン投与により  $Ca^{2+}$  放出が誘起されました。以上の結果から、再分極直後に確かに  $Ca^{2+}$  による  $Ca^{2+}$  遊離に対し何らかの抑制が働いていることが示唆されます。

(担当：井本敬二)

5. 神経栄養因子・サイトカインによる 抑制性神経細胞の発達、機能制御

那波 宏之 (新潟大学 脳研究所)

(2000.4.28)

脳神経系は、その特異的シナプス連絡網が完成した後でも、それだけで機能するものではない。実質的な脳機能獲得には正しい神経刺激のもとでのシナプスの成熟が必要だとされている。最近の研究によると、このシナプス成熟過程において神経栄養因子や細胞増殖因子といった多くの細胞間生理活性因子が重要な役割を果たしていることが判明している。これまで我々は、いくつかの神経栄養因子・分化因子が、脳神経細胞の神経伝達物質の合成を制御していることを明らかにしてきたが、最近、神経伝達物質の受容体や、その他のシナプス機能

修飾分子の発現をも調節しうることを発見した。なかでもニューロトロフィンや EGF ファミリーに代表されるタンパク因子は、前脳の抑制性神経細胞における神経伝達物質やその受容体の発現をダイナミックに調節し得る。実際、生理学的計測においてもこれらの現象が再現された。これらの結果を踏まえて、脳内サイトカインが果すシナプス発達可塑性における役割についても議論を深めたい。

(担当：河西春郎)

## 6. The Cognitive Neuroscience of Action

西谷 信之 (国立身体障害者リハビリテーションセンター研究所・  
感覚機能系障害研究部感覚認知障害研究室)

(2000.5.31)

視聴覚・体性感覚等の感覚情報と、それに基づく何らかの応答出力との一連の脳神経機構、すなわち感覚運動連関に関して、これまで霊長類を中心に多くの研究が行われ、卓越した知見が得られてきた。視覚入力と運動出力間の視覚運動統合 (Visuomotor Integration) における中枢機構についても、サルにおいて頭頂間溝 (Intraparietal Sulcus) や前頭眼野の機能解明が行われてきた [1, 2, 3]。また、何らかの動作を求められた時、例えばそれが単純な動作であっても、一人で言うよりも他人の同様の動作を見て行う方が容易であるということ、日常よく経験する。この動作の認知に関する研究では、サルの左 F5 野がその中枢であることが解明され、Mirror Neuron System として提唱されている [4, 5]。一方では、ヒトにおいても近年の技術進歩により非侵襲的にその脳機能が急速に解明されつつある。とりわけ時間的・空間的分解能に優れた脳磁場計測装置により、これまでになく多くの新たな知見が明らかにされつつある。そこで全頭型脳磁場計測装置を用いて、健常成人において視覚運動統合ならびに動作の認知に関する脳機構を明らかにしたので、それ

を供覧する [6, 7]。特に後者に関しては、言語機能との関連についても言及する。

- 1) Van Essen, DC., Maunsell, JH. & Bixby JL. (1981) *J. Comp. Neurol.* 199: 293-326.
- 2) Sakata, H., Taira, M., Murata, A. & Mine, S. (1995) *Cereb. Cortex* 5: 429-438.
- 3) Gottlieb, JP., Bruce, CJ. & MacAvoy, MG. (1993) *J. Neurophysiol.* 69: 786-799.
- 4) Rizzolatti, G., Camarda, R., Fogassi, L., Gentilucci, M., Luppino, G. & Matelli, M. (1988) *Exp. Brain Res.* 71: 491-507.
- 5) Rizzolatti, G. & Arbib, MA. (1998) *Trends Neurosci.* 21: 188-194.
- 6) Nishitani, N., Uutela, K., Shibasaki, H. & Hari, R. (1999) *J. Neurosci.* 19: 2647-2657.
- 7) Nishitani, N. & Hari, R. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 913-918.

(担当: 柿木隆介)

## 7. Recent observations on modulation of transmission in spinal neuronal networks.

Elzbieta Jankowska (Department of Physiology and Pharmacology,  
Göteborg University, Sweden.)

(2000.6.19)

Effects of neurones that modulate activity of spinal neuronal networks appear to depend to a great extent on properties of their target neurones. This is at least the case of 5-HT and NA releasing descending tract neurones and GABAergic interneurones in the cat, the former acting either pre- or post-synaptically and the latter mediating presynaptic inhibition. Our recent studies revealed considerable differences in modulatory actions at the level of the 1st order relay neurones in pathways from muscle spindle and tendon organ afferents:

qualitative (facilitatory or depressive) as well as quantitative. However, in the so far investigated networks modulatory actions exerted at different sites are integrated to assure the best operation of these networks. The disintegration of the 5-HT, NA or GABA modulatory actions may accordingly explain some of the motor deficits; their replacement could provide means for the treatment.

(担当: 森 茂美)

8. 小脳の抑制性神経結合とシナプス伝達

根東 覚 (生物学研究所 大脳神経回路論)

(2000.7.27)

(担当: 初山俊彦)

9. 延髄孤束核ネットワーク内シナプス伝達の ATP 受容体による制御

加藤 総夫 (東京慈恵会医科大学 薬理 2 神経機能研究グループ)

(2000.8.25)

延髄孤束核 (NTS) ならびに孤束複合体は、生体内環境に関する神経性および液性の一次情報を受容し、内因性ネットワークによって修飾した後、呼吸・循環・消化などの自律機能ネットワークへ出力する自律情報中継核である。低酸素・脳虚血などの病的状態に対する生体の自律応答の多くは細胞外プリンとその受容体を介して発現するが、NTS には各種プリン受容体タンパク、同 mRNA、取込み・不活性化タンパク群が高密度に発現しており、細胞外プリンを介した自律応答において中心的役割を担うと予想される。

NTS ネットワーク内情報処理におけるプリン受容体の意義を検討するため、脳幹スライス標本で、機能・形

態的に同定された孤束複合体ニューロンから興奮性および抑制性シナプス後電流を記録し、ATP 受容体および関連受容体活性化の影響を検討した。その結果、(1)入力ゲイン制御、(2)内因性 tonus 維持、および、(3)他神経構造への出力形成の三相を、シナプス前後に発現する ATP およびアデノシン受容体群がそれぞれ特異的に制御する事実を見出した。これらの制御には、シナプス近傍における ATP からアデノシンへのダイナミックな変換や、シナプス前 P2X 受容体による直接的グルタミン酸放出などのさまざまな分子機構が関与しており、これらをめぐる新知見について紹介する。

(担当: 初山俊彦)

10. 一分子生理学

木下 一彦 (慶応義塾大学理工学部)

(2000.8.28)

今や、たんぱく質ないし RNA でできた分子機械 1 個 1 個が働く様子を、光学顕微鏡の下で目の当たりにすることができる。さらに、分子内の構造変化も、機能しているその場での連続観察が可能になりつつある。分子 1 個を観察し操作することにより分子機械の働きの仕掛けを探る、「一分子生理学」が誕生しつつある。我々も、「一分子を見て初めて分かった」といえる成果によりこの学問の立ち上げに寄与してきたので、ビデオを中心に紹介したい。

ATP 合成酵素の一部である F1-ATPase が、たった一分子で働く回転モーターであることを、顕微鏡観察により直接示すことができた。このモーターは 120 度おきに回るステッパーモーターであり、ATP 分解の化学エネルギーから力学的仕事へのエネルギー変換効率は実に

100%近くに達することが分かった。120 度の回転 (構造変化) の間、角度によらず駆動力 (トルク) がほぼ一定であることも示せた。たんぱく質分子の出す力の詳細が明らかになった初めての例といえよう。このモーターの特性は電気モーターと多くの点で類似しており、回転機構も本質的に共通な部分があるのではないかと推定している。光ピンセットを使い、分子の紐 (アクチン線維ないし一本の DNA) に結び目を作ることができた。両端を引っ張ることにより、紐の曲がりやを自在に制御できる。アクチンは、曲がることにより簡単に切れてしまった。いっぽう DNA は丈夫で、細胞突起を縛るなどマイクロの手術糸として使える可能性がある。磁気ピンセットによる操作も可能で、現在、F1-ATPase を逆回転させて ATP を合成することを試みている。成功すれば、「力

学的操作による化学合成」を初めて成し遂げたことになる。

(担当：永山國昭)

#### 11. 脳の活動を司る GABA 作動性神経細胞：その仕組みを発生から探る

玉巻 伸章 (京都大学大学院医学研究科高次脳形態学)

(2000.8.28)

大脳皮質神経細胞の内 10% は GABA 作動性神経細胞だと考えられている。GABA の他の細胞に対する抑制は強く、他の GABA 作動性神経細胞の活動をも調節している。内側中隔核内 GABA 作動性神経細胞は、海馬内に存在するバスケット、シャンデリア細胞 (GABA 作動性) に選択的に投射し、中隔細胞が活動すれば、海馬錐体細胞に disinhibition を起こす。二重否定は肯定より強く、錐体細胞は burst firing を起こす。この様な投射する GABA 作動性神経細胞は、シナプス可塑性、オシレーションの同期、逆位相での活動、大脳皮質の活動レベルの調節などに関与している可能性がある。

投射する GABA 作動性神経細胞の存在、分布様式、結合様式の研究を、脳全体で網羅的に行うには、GABA 作動性神経細胞の発生と形態形成を調べるのが近道と考えられる。現在、大脳皮質の GABA 作動性神経細胞の多くは、大脳基底核原基より生じて接線方向への細胞

移動により供給されると考えられているが、移動の際に軸索を引きずる GABA 作動性神経細胞があり、これが投射する GABA 作動性神経細胞になる可能性が考えられる。また、接線方向に軸索を引きずりつつ移動する神経細胞は、新皮質の脳質帯からも生じることが分かっている。現在、本当に新皮質脳質帯から生じる GABA 作動性神経細胞は無いのか、新皮質の脳質帯から生じ接線方向に軸索を引きずりつつ移動する神経細胞はどのような神経細胞になるのかの点を明らかにする目的で、研究を進めている。その研究の一環として、脳質帯から GFP-Adenovirus を感染させることにより、radial cell migration と tangential cell migration の違いを観察した。その結果、両者はその移動のメカニズムで全く異なる現象で、特に radial cell migration の実態は神経科学の教科書に書かれたものとも異なることが明らかになった。

(担当：小幡邦彦)

#### 12. 伝達物質放出を制御する神経終末蛋白質の働き

持田 澄子 (東京医科大学 第一生理)

(2000.8.29)

神経終末への活動電位の到達に伴って膜電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルから  $\text{Ca}^{2+}$  が流入するとシナプス小胞膜と神経終末膜の融合が起り、小胞内に蓄えられた化学伝達物質が速やかにシナプス間隙に放出される。神経終末内には、複合体を形成して小胞の動態を制御するいくつかの蛋白質が見ついている。N型・P/Q型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの 1 サブユニットは膜融合に必須な SNARE 複合体を介してシナプス小胞に結合し、 $\text{Ca}^{2+}$  シグナルを素早くシナプス小胞に伝える。 $\text{Ca}^{2+}$  との結合部位である C2 ド

メインを有する蛋白質は、 $\text{Ca}^{2+}$  シグナルをシナプス小胞に伝える鍵蛋白質として機能しており、高濃度の  $\text{Ca}^{2+}$  に依存して SNARE 蛋白質に結合する synaptotagmin は小胞膜と終末膜の融合を駆動し、Doc 2 の Munc13 への結合は小胞の active zone への移送を駆動すると思われる。さらに、SNARE 蛋白質、SNARE 複合体との結合を介して syntaphilin や snapin は、シナプス伝達を修飾する。

(担当：岡田泰伸)

13.  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger の分子生理学：分子機能から細胞機能へ

若林 繁夫（国立循環器病センター研究所）

(2000.8.29)

容積調節・増殖・分化・収縮・分泌などのさまざまな細胞機能は、 $\text{H}^+$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ などのイオンバランスの微妙な制御の上に成り立っているといても過言ではない。その意味で、イオン代謝にあずかるタンパク質の機能を分子レベルで理解することは、統合細胞機能の理解に不可欠である。さて、多くのトランスポーターやチャンネルはタンパク質分子内に内蔵された種々のセンサーを通じて外界の情報を受容し、応答・適応する能力を持つと考えられる。たとえば、 $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換輸送体(NHE)はその分子内に内蔵されると考えられる細胞内 pH・容積センサーによってさまざまなホルモン・増殖因子・pH 変化・細胞容積変化を受容し、活性変化を通じて細胞内

pH や細胞容積を生理的に至適な範囲に維持する働きを持つ。私達はこれまで、NHE の pH・容積センシングに關与する領域を同定し、活性調節機構の一部を明らかにしてきた。本講演では、1)NHE の増殖因子・ $\text{Ca}^{2+}$ ・ATP・リン酸化による活性調節、2)NHE による細胞容積調節、さらには 3)NHE の膜トポロジーとイオン認識、4)NHE 結合タンパク質の生理機能といったいくつかの話題を通じて、NHE が細胞内シグナル伝達の形質膜上の最終ターゲットであり、かつ細胞の環境適応の担い手として大変興味深い分子であることを述べてみたい。

(担当：岡田泰伸)

14. 神経発生での電位依存性チャンネルの発現制御と役割

岡村 康司（通産省工業技術院生命工学工業技術研究所生体分子工学部，  
東京大学総合文化研究科大学院）

(2000.8.30)

電位依存性チャンネルは、神経分化の最終産物としての機能分子であると同時に、活動依存的な脳の発達を制御する因子である。当セミナーでは、これまでの海産無脊椎動物ほや胚を用いた解析を紹介し、複雑な高等脊椎動物の神経発生の理解への今後の展望について述べる。

ほやは海産無脊椎動物であるが、その幼生は脊椎動物に相同な体制を示し、300 個程度の細胞からなるシンプルな管状の中樞神経系を有する。初期神経分化が、特定の割球にて短時間でおこるため、ニューロンの分化に伴う膜興奮性の発達を詳細に解析できる。

これまで、この動物が、脊椎動物と同様に細胞接着による神経誘導現象を示し、膜興奮性の発達における細胞間相互作用の役割を解析できる点に注目し、細胞間相互作用による各電位依存性チャンネルの発現制御を、電気生理および、分子生物的手法を組み合わせ解析した。その結果、細胞接着の際に、各イオンチャンネルが、異なる分子機構により制御されると結論された（Na チャンネルは、主として神経細胞特異的な転写による制御、遅延整流性 K チャンネルは、転写以後での制御、Ca チャンネルは細胞接着に依存しない転写プログラムと、maternal

RNA によりコードされる別のアイソフォームによる発現抑制、内向整流性 K チャンネルは、転写の抑制により制御されるなど）。

また、この細胞間相互作用の効果は、bFGF の投与により再現され、神経分化の誘導での内在性 bFGF 様分子の関与が示唆された。

現在、これらの知見を参考にしつつ、複雑な脊椎動物の脳の発生を解析することを目指している。ほやでは、神経と非神経との違いを解析することで、活動電位形成に関わる制御を解析したのに対し、脊椎動物ではニューロンネットワークで役割が明確な特定のニューロンに注目し、個性的な興奮性の発達機構を検討することができると期待している。

また、ほや筋および神経分化の際、電位依存性 Ca チャンネルはもっとも最初に出現し、自立的な興奮性に伴う Ca 流入を通して、発生後期の分化に調節的な役割を果たすと考えられる。このような活動依存的な分化は、高等脊椎動物においても、脳の発達に重要な要素と考えられる。電位依存性 Ca チャンネルは、未熟なニューロンの電氣的興奮性と細胞内変化をリンクする分子であるが、

これまで実際の膜電位変動や Ca シグナルの詳細には不明な点が多い。これには、今後個々の Ca チャネル分子に基づいた解析が必要と考えられる。このためのいくつ

かの新しい方法論を紹介する。

(担当：伊佐 正)

#### 15. 膜発生の分子機構：Molecular Control of Vertebrate Retinal Development

古川 貴久 (The University of Texas Southwestern Medical Center for  
Developmental Biology)

(2000.8.30)

脊椎動物の中樞神経系は多様なニューロンおよびグリアから構成される。神経発生における細胞運命決定や形態形成のメカニズムの解明は、生物学的な興味だけでなく、ニューロンの再生を目指す上でも必須である。以前より、脊椎動物の網膜は中枢神経系の良いモデル系として知られてきた。しかし、その発生過程の細胞運命決定

や形態形成の分子メカニズムの解明は進んでいなかった。最近我々は、網膜の発生分化の鍵を握るいくつかの分子をクローニングし、生体レベルでの機能を明らかにしてきた。今回のセミナーでは、網膜の発生の分子メカニズムの現状について報告する。

(担当：池中一裕)

#### 16. The competition for cortical space and the consequences for the reorganizational plasticity of the auditory and somatosensory cortex in musicians

C. Pantev (Center of Biomagnetism, Institute of Experimental Audiology,  
University of Munster, Germany)

(2000.9.1)

The lifelong ability to adapt to environmental needs is based on the capacity of the central nervous system for plastic alterations. In a series of neurophysiological experiments we studied the impact of music and musical training in musicians on the specific functional organization in auditory and somatosensory representational cortex. In one such study subjects listened to music from which one specific spectral frequency was removed. This led to rapid and reversible adaptation of neuronal responses in auditory cortex. Further experimental evidence demonstrated that long years of practice and training by professional musicians to achieve their aptitudes is associated with enlarged cortical representations in the somatosensory and auditory domains. This tuning of neuronal representations was specifically observed for musical tones and was absent when pure sinusoidal tones were used as stimuli. In the somatosensory cortex plastic changes proved to be specific for the fingers frequently used and stimulated. These changes were not detected in the fingers of the hand that were not involved in playing the particular instrument. Neuroplastic

alterations also may be driven into a domain where they may become maladaptive. The clinical syndrome of focal hand dystonia that may occur in musicians who engage in forceful practice may be one such consequence. We will discuss the possibilities of reversing maladaptive responses leading to the successful treatment of focal hand dystonia, which relies on basic research about cortical reorganization. This example elucidates how neuroscientific progress can guide the development of practice guidelines and therapeutic measures for the benefit of professional musicians.

Elbert T, Pantev C, et al (1995) Increased cortical representation of the fingers of the left hand in string players. *Science* 270: 305-307

Sterr A, Muller MM, Elbert T, Rockstroh B, Pantev C, Taub E (1998) Perceptual correlates of changes in cortical representation of fingers in blind multifinger Braille readers. *Nature* 391: 134

Pantev C, Oostenveld R, Engelien A, Ross B, Roberts LE, Hoke M (1998) Increased auditory cortical representation in

musicians. Nature 392:811-814

Sterr A, Muller M, Elbert T, Rockstroh B, Pantev C, Taub E  
(1998) Perceptual correlates of changes in cortical represen-

tation of fingers in blind multifinger braille readers. J  
Neurosci 18: 4417-4423

(担当：柿木隆介)

17. Temporal and spatial interactions across the movement map in the superior colliculus

Robert H. Wurtz (National Institute of Health)

(2000.9.14)

Spread across the intermediate layers of the monkey superior colliculus is a map that represents the vectors for the end point of an impending saccade. The experiments described used simultaneous recordings at two locations on this collicular map while the monkey selected between two targets related to these locations. The neuronal activity was particularly revealing during saccades that curved from one target to the other; the activity was related to the trajectory

of the saccade, not just the end point. The change in saccade direction and the concomitant changes in the neuronal activity may parallel the monkeys decision to move to one target rather than the other. Further experiments use implanted wires for recording at over a dozen sites on the map and explore changes on the SC map following damage to it.

(担当：小松英彦)

18. New insight in the molecular organization of glutamate synapses.

Ole Peter Ottersen (Institute of basic medical sciences, University of Oslo, Norway)

(2000.9.21)

I plan to speak about glutamate receptor immunolocalization and will include our new data on freeze fracture immunogold labelling. I also plan to discuss the synaptic handling of glutamate.

In this context I will present some recent findings on the expression of glutaminase in central and peripheralsynapses.

(担当：重本隆一)

19. Cortical synaptic compartmentalisation as seen through the GABAergic innervation of hippocampal cells

Peter Somogyi (Oxford Univeristy, UK)

(2000.9.26)

(担当：重本隆一)

20. アクアポリン 1 における選択的水透過の分子機構

村田 和義 (生物学研究所, 超微小形態生理研究部門)

(2000.10.19)

ヒト赤血球膜にある水チャネルアクアポリン 1 の原子座標を電子線結晶解析により決定し, その水透過機構およびプロトン排除機構を推定することができた。そのチャネルポアの構造は膜の中心から両表面に向かって広

がる漏斗構造をしており, 2 年前に明らかになった K<sup>+</sup>チャネルのポアとは全く正反対の形状となっていた。そしてポアが最も狭くなる膜の中心付近ではその直径が水分子のサイズに近い 3 オングストロームであった。ポア

の内面は疎水性のアミノ酸残基によって占められており、これが水和したイオンや水分子よりも大きな分子を透過させない構造になっていると推定できた。また、アクアポリンの最大の謎である水透過の際のプロトンによる電荷移動を排除する機構については、このファミリーに保存された二つの NPA ボックスが大きくこれに関与することがわかった。アクアポリンはグリセロールチャネル

を含む非常に大きな膜透過蛋白質ファミリーを形成しており、この構造決定によってこのファミリーに属する他の蛋白質についてもそのメカニズムの解明に大きく貢献できるものと期待できる。

文献 : Murata, K. et al., Structural determinants of water permeation through aquaporin-1, *Nature*, in press (2000)

(担当 : 粕山俊彦)

## 21. Improved immunohistochemical detection of glutamate receptor channels by protease pretreatment

深谷 昌弘 (北海道大学大学院 医学研究科)

(2000.11.9)

In most excitatory neurons, ionotropic glutamate receptors are concentrated on dendritic spines, and are associated with various molecules constituting the postsynaptic density (PSD). A number of studies have reported a somato-dendritic pattern of immunohistochemical staining for a variety of glutamate receptor subunits and their anchoring proteins. We have noticed, however, that appropriate section pretreatment with proteases, such as pepsin, has led to qualitative and quantitative changes in light-microscopic immunohistochemical detection of these molecules. Pepsin pretreatment lowers the concentration of primary antibodies, while it greatly increases the intensity of immunoreaction. Moreover, the intensified immunoreactivities are detected as numerous tiny puncta in the neuropil. The specificity is verified by spatial distribution consistent with the mRNA, and also by negative staining in the

gene knockout brain. Based on these results, we conclude that antibody access and binding to ionotropic glutamate receptors and related PSD molecules are hindered by conventional immunohistochemistry, and that pepsin pretreatment effectively unmasks the postsynaptic epitopes.

Using this improved immunohistochemistry, we found that a certain NR2 subunit is selectively excluded from the stratum lucidum of the hippocampal CA3, where the induction of LTP is independent of NMDA receptor activation. We have also found that dendritic transport of NR2 subunits is impaired without NR1 subunit, and vice versa. The latter finding suggests that interaction of NR1 and NR2 subunits is essential to normal dendritic transport and synaptic localization in the brain in vivo.

(担当 : 重本隆一)

## 22. Saposin A is an essential component for normal metabolism of galactosylceramide:

Analysis with gene targeting technology

Kunihiko Suzuki (Neuroscience Center, University of North Carolina)

(2000.11.13)

Sphingolipid activator protein (SAP, prosaposin) gene generates four homologous proteins (saps, saposins) that activate in vivo degradation of sphingolipids with short carbohydrate chains. Each is relatively specific with respect to the sphingolipid it activates but some overlapping specificities are also indicated. Human patients with point mutations in the saposin B and C show phenotypes of metachromatic leukodystrophy and Gaucher disease, indicating that their primary in

vivo substrates are sulfatide and glucosylceramide, respectively. In addition, two mutations are known in humans that result in complete inactivation of all four saposins and prosaposin. Total saposin deficiency is a devastating disease with involvement of multiple organs and multiple sphingolipids. We earlier generated a mouse model of total saposin deficiency with the gene targeting technology. The model closely mimics the human disease. Experimental evidence exists to indicate that

saposin A may be an activator for galactosylceramidase and saposin D for ceramidase. Since no human diseases or animal models due to specific defects of saposin A or D are known, we decided to introduce mutations in these domains in order to obtain definitive answers regarding the in vivo functions of saposin A and D. To date, we have successfully generated mice with an amino acid substitution in the saposin A domain.

The targeting vector was constructed using appropriate mis-matched primers to introduce a mutation in exon 4 that changed the 4th cysteine in saposin A to phenylalanine and simultaneously to introduce a new restriction enzyme recognition site for convenient genotyping. All saposins have six strictly conserved cysteines. In humans a mutation in the 4th cysteine to phenylalanine in saposin C causes specific saposin C deficiency and a mutation of the 5th cysteine to serine in saposin B causes specific saposin B deficiency. The critical feature of the targeting vector was the Cre/ loxP system. The neomycin resistance (neo) gene inserted within an intron was flanked by the loxP sequence. This design allowed initial selection of targeted ES cells with neomycin and subsequent removal of neo by transient transfection with a Cre expression plasmid. Targeted ES cells after removal of neo were injected into blastocysts and the standard procedures followed to generate homozygous mice with the mutation. Clinically, homozygous mice appeared completely normal until about 45 days, at which time independent observers could identify them by their slight sluggishness but only with careful comparison with normal littermates. However, slowly progressive

hind leg weakness became apparent by 2.5 months. As the weakness and atrophy of hind legs progressed, affected mice stopped gaining weight. Twitching, prominently seen in twitcher and other myelin mutants, was not obvious. Both males and females were fertile, and mothers were able to raise their offspring normally at least twice. At 50 days, there were occasional typical globoid cells in the brain and spinal cord, and evidence of myelin degeneration was evident in the PNS. Similar to twitcher mice, there is a prominent accumulation of galactosylceramide in the kidney and of the seminolipid precursor (1-alkyl,2-acyl, galactosylglycerol) in the testis. In the brain, galactosylceramide and monogalactosyldiglyceride may be slightly increased, but this must be confirmed by more quantitative studies. Brain psychosine level at 60 days was approximately three times normal in contrast to the 15-fold increase in twitcher brain. These findings not only confirm the earlier in vitro evidence by Ó Brien, Wenger, Harzer and others that saposin A may be a galactosylceramidase activator but also establish that it is in fact essential for normal catabolism of galactosylceramide. However, the metabolic block due to saposin A deficiency appears less than complete because it causes a disease much milder than the complete inactivation of galactosylceramidase in the twitcher mouse. These findings may anticipate genetic saposin A deficiency among human patients with undiagnosed late-onset chronic leukodystrophy with normal Galactosylceramidase activity.

(担当：池中一裕)

### 23. ウシ毛様体筋におけるムスカリン作動性陽イオンチャネルの同定とその trp チャネルとの関連性の検討

高井 章 (名古屋大学 大学院医学研究科細胞科学講座 生理学教室)

(2000.12.25)

毛様体筋は視覚遠近調節に關与する典型的な副交感神経支配の平滑筋組織である。われわれは、ウシ毛様体から単離した筋細胞において、ムスカリン M3 受容体刺激に伴い開口する 2 種の非選択性陽イオンチャネルをパッチクランプ法により同定した。また、RT-PCR により、

この組織には、ムスカリン受容体刺激による活性化を受ける非選択性陽イオンチャネルを構成することで知られる trp3 と trp6 とが多く発現していることを明らかにした。

(担当：岡田 泰伸)

### 24. Ca<sup>2+</sup>チャネルの分子・機能的多様性とその生物学的意義

森 泰生 (生理学研究所・液性情報部門)

(2001.1.18)

形質膜越えの  $\text{Ca}^{2+}$  流入は多様な生体応答に必須である。  $\text{Ca}^{2+}$  流入経路を形成する  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルは多様であり、制御する生体応答に対応するために進化上、機能・分子的に精緻な分化を遂げている。この  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの生理学的多様性を支配するより普遍的な規則を探究するために、  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの分子実体及び機能的性質を明らかにし、形質膜上への分布制御機構の解明を携わってきた。まず、活動電位発生のみならず、活動電位を  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルへ変換するという中心的役割を担っている電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルに関して、P 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル遺伝子変異を原因とする rolling-Nagoya 等の行動異常

マウスにおける変異が、どのようにして神経機能異常を引き起こすかの機構解明研究をおこなった。また、副サブユニットや GTP 結合蛋白質等との相互作用機序を明らかにすることにより、  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルが生理的機能を発現する場の分子構築解明を行った。さらには、長い間、謎とされてきた、細胞生存と死或いは細胞増殖と分化を制御する、受容体活性化  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの分子実体である TRP タンパク質群を明らかにし、TRP が様々な細胞シグナルを統合し  $\text{Ca}^{2+}$  或いはカチオン流入に変換することを示した。

(担当：小幡 邦彦)

## 25. 水チャネル (アクアポリン 6) のイオン透過性

挟間 章博 (統合バイオサイエンスセンター)

(2001.1.24)

アクアポリン 6 は、腎尿管や腎系球体足細胞に発現し、細胞内ベジクルに局在する水チャネルである。アクアポリン 6 をアフリカツメガエル卵母細胞に発現させると、形質膜へ移行するが、水透過性は低い。しかし、水チャネルの阻害剤として知られる水銀を投与すると、水透過性の上昇が観察され、さらに、膜電位固定法により、膜コンダクタンスの増大も認められた。水銀投与により上昇した水透過性、膜コンダクタンス共に、還元剤である 2-mercaptoethanol を作用すると、元の状態へと回復した。また、水銀の結合部位と予想される cysteine を

alanine に置換したミュータントでは、水銀による水透過性、膜コンダクタンスの上昇は観察されなかった。水銀による膜コンダクタンス増大を担うイオン選択性については、細胞外液の NaCl 濃度を減少させた時の逆転電位の変化から、陽イオン、陰イオン共にポアを透過するが陰イオンの方がやや選択性が高いことが明らかになった。これらの結果から、アクアポリン 6 は、水銀が結合することでポアが開口し、水とイオンを透過させるものと考えられた。

(担当：初山俊彦)

## 26. Concurrent processing of alternative target locations in the superior colliculus leads to short inter saccadic latencies and curved trajectories

Edward L. Keller (Smith-Kettlewell Eye Research Institute, San Francisco, USA)

(2001.1.30)

Changes in the position of ocular fixation in a laboratory environment in the monkey normally occur with inter saccade intervals of 150 ms or greater. It has been reported by a number of laboratories that when competing stimuli are presented, two sequentially executed movements to different goals can be separated by much shorter intervals. We show with a simple visual search paradigm that monkeys routinely make saccades with inter saccade intervals less than 100 ms.

Furthermore, the first saccade in this sequence is often curved toward the competing vector of the closely following movement. We recorded activity in the deeper layers of the SC that can explain these observed behavioral results. When the first saccade is made to a distractor followed shortly by a saccade to the target, we observed maintained activity during the first saccade at sites in the SC that would normally code the retinotopically organized vector for a

saccade directly to the target. Curved saccades made directly to the target were associated with significant discharge just before saccade onset. We hypothesize that maintained activity at competing sites on the SC motor map allows parallel

programming of subsequent saccades thus shortening inter saccadic intervals. Curved trajectories result from concurrent activity at competing sites on the map.

(担当：伊佐 正)

## 27. Spatiotemporal patterns of task-relevant neural activity in hippocampus

Robert Hampson (Wake Forest University)

(2001.2.5)

The mammalian hippocampus is a key structure required for the encoding of current experience as well as the retention of past experience. Studies have shown that hippocampal neurons alter their firing rates in response to both spatial and nonspatial behavioral tasks. For many of these tasks, removal of the hippocampus does not impair behavior; however, recent results have demonstrated a short-term memory task that is sensitive to partial or complete removal of the hippocampus or adjacent brain areas.

Hippocampal neurons fire with specific patterns of activity during different trials of this Delayed-Nonmatch-to-Sample(DNMS) task. Analysis has shown that these neural responses encode information corresponding to spatial and nonspatial information within this task. Further, particular patterns of firing on error trials indicate that this encoding is critically related to the performance of such a short-term memory task.

Hippocampal and subicular ensembles have been analyzed and identified as to the type and content of DNMS task-specific information encoded by each neuron. These Functional Cell Types (FCTs) reveal temporal and anatomical segregation of encoding throughout hippocampus and dorsal subiculum. The hippocampal FCTs encoded task Phase, response Position, and combinations of factors as Conjunctive or Trial-type cells. The hippocampal neurons corresponding to particular FCTs are distributed anatomically into distinct segments along the length of the hippocampus. Each longitudinal segment of hippocampus contains clusters of neurons that become active when the animal makes a response within a given spatial

location (Position FCTs). Within these same segments are ordered arrangements of neurons that encode the strictly nonspatial aspects of the DNMS task (Phase FCTs) as well as FCTs appropriate to the coincidence of both spatial and nonspatial information (Conjunctive and Trial-type FCTs).

Further studies reveal a functional temporal segregation of this same information across hippocampus and subiculum. Subicular neurons have been classified with respect to four Delay types and a Trial-type FCT. Combined with the hippocampus, these subicular neurons encode information throughout the temporal span of a given DNMS trial. Information theoretic analysis of which FCTs were critical for correct identification of behavioral events reveals that DNMS task-critical information is shifted from hippocampus, to dorsal subiculum, then back to hippocampus during a single trial. Such sequential activation may account for the “memory” for task events required for correct behavioral performance.

This temporal and anatomic segregation of spatial information, together with the interleaved representation of nonspatial information, reveals a structural framework to the hippocampal formation that correlates to the information processed during a behavioral task. Although conflicting views exist regarding the role of hippocampus in representing spatial vs nonspatial memory, these results suggest that the hippocampus and surrounding brain areas process both types of information in a similar manner to form a composite mapping of position, time, and task-related events to facilitate the memory demands of the behavioral task.

(担当：伊佐 正)

## 28. Intracellular trafficking of AMPA receptors in synaptic plasticity

Yu Tian Wang (Department of Laboratory Medicine and Pathobiology University of Toronto)

(2001.2.5)

Dynamic modification of the efficacy of synaptic transmission between neurons in the brain is considered one of the essential mechanisms underlying the development of neural circuitry, learning and memory, and neuropathologies. In the last few decades, different forms of synaptic modification (plasticity) have been found throughout the mammalian central nervous system (CNS). The most extensively studied examples of such synaptic plasticity have been the long-term changes in synaptic efficacy observed at the glutamatergic synapses of the CA1 region of the hippocampus due to their potential roles in learning and memory.

High frequency stimulation of the Schaffer-collateral-commissural pathway induces a long-term potentiation (LTP) while prolonged lower frequency stimulation of the same pathway causes a long-term depression (LTD) of synaptic transmission at these synapses.

It is generally accepted that the induction of both LTP and LTD at the CA1 synapse is postsynaptic and dependent upon  $Ca^{2+}$  influx through activated NMDA subtype glutamate receptors. However, the mechanisms underlying the expression of LTP and LTD remain hotly debated, and likely involve both a presynaptic component via alteration of transmitter release and a postsynaptic one through the modification of AMPA subtype glutamate receptors.

Traditionally modifications of postsynaptic AMPA receptors have been thought to be achieved mainly by altering the

channel gating properties or conductance of the receptors. However, recent studies from our laboratory and others have provided substantial evidence suggesting that AMPA receptors are continuously recycling between the plasma membrane and the intracellular compartments via vesicle-fusion mediated plasma membrane insertion and clathrin-dependent endocytosis. Facilitating the vesicle-fusion dependent insertion of AMPA receptors into postsynaptic membranes can lead to a rapid increase in the number of postsynaptic AMPA receptors and hence an enhanced synaptic transmission, and increased AMPA receptor insertion does indeed appear to contribute to the expression of homosynaptic hippocampal CA1 LTP. Conversely, upregulation of the clathrin-dependent endocytotic removal of postsynaptic AMPA receptors results in a lasting reduction in the receptor-mediated synaptic efficacy and plays a critical role in the expression of certain forms of LTD, including hippocampal CA1 homosynaptic LTD. These results have allowed us to formulate a simple and unified mechanism involving the rapid addition or removal of functional AMPA receptors to and from postsynaptic domains in the expression of both LTP/LTD. Thus, controlling the number of postsynaptic receptors by regulating their intracellular trafficking and plasma membrane expression may be a common and important mechanism underlying synaptic plasticity in the mammalian CNS.

(担当 : 伊佐 正)

## 29. The molecular basis for experimental autoimmune demyelination; implication for multiple sclerosis

Claude C.A. Bernard (Neuroimmunology, La Trobe University)

(2001.2.6)

Multiple Sclerosis (MS) is an inflammatory disease of the central nervous system (CNS) which leads to selective destruction of myelin sheaths and/or oligodendrocytes. Clinically, different courses of the disease can be distinguished, suggesting that different pathogenic mechanisms may be operating in the formation of MS lesions. Although the etiology and pathogenesis of MS remains largely unknown, it is generally assumed that immune responses to myelin antigens contribute to the disease process. The exact sequences of events, as well as the molecular mediators that lead to myelin

destruction have yet to be defined. While considerable attention has been given to the T cell-mediated responses in MS, it should be emphasized that primary demyelination could also be mediated by autoantibodies. We have shown in Lewis rats that a single injection of myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG), a postulated target antigen in MS, produce a relapsing-remitting neurological disease with extensive demyelination reminiscent of MS. In these animals, the antibody response was highly restricted to the immunizing antigen, as no reactivity to other MOG peptides or myelin proteins

could be detected. In additional studies we investigated the encephalitogenicity of MOG in various strains of mice so as to further analyze the relative contributions of Th1 and Th2 cells in the disease process. An MS-like disease was induced in NOD/Lt mice and in C57BL/6 mice by either MOG, recombinant MOG or MOG35-55. The disease followed a relapsing-remitting course in the NOD/Lt mice, whereas C57BL/6 mice developed a chronic paralytic disease. Morphological features of lesions in our models resemble those observed in MS. Indeed, severe inflammation and demyelination coincide with the peak of clinical episodes while quiescent plaques characterize remissions. Furthermore, axonal damage is evident from the earliest stage of the disease and increases in severity with subsequent relapse. Significant DTH type reactions to MOG were only seen in MOG-susceptible animals. Such mice also showed specific antibody

responses to MOG35-55 but not to a panel of other MOG peptides or to other CNS antigens. In the CNS of C57BL/6 mice, gene expression of both proinflammatory and immunoregulatory cytokines increased during the course of the disease, indicative of a mixed Th1/Th2 response to MOG. Evidence that proinflammatory cytokines such as IFN- and TNF- are not essential for the pathogenesis of the MOG-induced disease was obtained using mice with targeted disruption of these cytokines. These findings support the notion that a synergistic effect between a T cell-response and anti-MOG antibodies is important for the development of severe demyelination. Furthermore, they suggest that manipulation of the B cell arm of the immune response may represent a novel therapeutic approach for MS.

(担当：池中一裕)

30. 霊長類における皮質脊髄路細胞興奮性出力の頸髄運動細胞への伝達経路と手指運動の巧緻度とのかかわり

中嶋 克己 (生体システム研究部門)

(2001.2.20)

皮質脊髄路は脳皮質と脊髄を連絡する主要下行路である。霊長類において皮質脊髄路線維の一部は運動細胞に直接終止し cortico-motoneuronal (CM) connection を形成する(直接経路)。この CM system はマカクサルなどの旧世界サル、類人猿およびヒト等で特に発達しており、その発達度は上肢随意運動の制御において手指運動の巧緻度 dexterity に反映されると考えられている。しかし皮質脊髄路線維終末は脊髄運動核以外の灰白質にも広く分布しており、このことは皮質脊髄路細胞からの運動司令が脊髄固有ニューロンや髄節性介在ニューロンを介して間接的にも頸髄運動細胞へ伝達されることを意味しており、間接経路の上肢運動制御における重要性を示唆する。間接経路の一例としては、ネコで第3～第4頸髄レベルに存在する脊髄固有ニューロン C 3-C4 propriospinal neuron が皮質脊髄路細胞からの下行性出力を頸部運動細胞へ伝達することが知られている(PN

system)。本研究では、手指運動の巧緻度と皮質脊髄路細胞興奮性出力の頸髄運動細胞への伝達経路とのかかわりを種差という観点から明らかにするために、マカクサルに比べて手指運動の巧緻度に劣りかつ CM system の発達度の低いリスザルにおいて、chloralose 麻酔下で延髄対側の皮質脊髄路を刺激し、第6頸髄から第1胸髄レベルに位置する上肢筋支配運動細胞から細胞内記録を行った。さらに得られた結果をマカクサルにおいて同一条件下で行われた実験結果(Maier et al., 1998)と比較した。その結果、手指運動の巧緻度がより高くかつ CM system のより発達した霊長類では、間接経路においてネコにみられるような PN system の発達度はより低く、髄節性介在ニューロンを介する経路がより優位であることが示唆された。

(担当：初山俊彦)

31. Development of Binocular Connections in the Primary Visual Cortex (V1) of Macaque Monkeys.

Yuzo M. Chino (Univ. Houston, College of Optometry)

(2001.3.14)

The binocular capacities of primates are severely limited near birth. Stereopsis, a highly sensitive measure of the functional status of binocular vision, is absent at birth, but suddenly emerges around 4-6 weeks of age in subhuman primates. Since many of the neural connections required for stereopsis and vergence control are known to be largely

determined by prenatal processes and functionally emerge without extensive visual experience, this talk will explore the neural factors that may constrain the emergence of stereopsis shortly after birth in normal monkeys.

(担当：小松 英彦)

### 32. 腸間膜微小動脈平滑筋細胞に dominant に存在する nifedipine 非感受性，急速不活性化型，高電位活性化型 $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの電気生理学的特性

森田 浩光 (九州大学大学院医学研究院生体情報薬理)

(2001.3.16)

我々は，モルモット腸間膜動脈最終分岐部及びそれより末梢の平滑筋細胞に，パッチクランプ法を適用して，これまでにないユニークな生物物理学的，薬理学的特性を示す，nifedipine 非感受性，急速不活性化型，電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル（電流）が存在していることを発見した。全  $\text{Ca}^{2+}$  電流に対する nifedipine 非感受性  $\text{Ca}^{2+}$  電流の割合は，腸間膜動脈の中枢部から末梢分枝部へ向け劇的に増加し，その最末梢分岐部では殆ど 100%を占めていた。この  $\text{Ca}^{2+}$  電流は，電荷担体として 5 mmol/L  $\text{Ba}^{2+}$  を用いた条件下で，-50 mV 付近から活性化され-10 mV 付近で最大活性化を示し，その 50%活性化値 および不活性化値はそれぞれ-11 mV 及び-52 mV であった。また，その活性化曲線と不活性化曲線の重なる範囲が -60 ~ -30 mV にあることから，静止膜電位付近で恒常的に活性化されている可能性が示唆された。

nifedipine 非感受性  $\text{Ca}^{2+}$  電流は rundown しにくく， $\text{Ca}^{2+}$  依存性不活性化を示さなかった。また  $\text{Ca}^{2+}$  より  $\text{Ba}^{2+}$  に対し約 2 倍高い透過性を示し， $\text{Ni}^{2+}$  より  $\text{Cd}^{2+}$  に

よってより強い阻害を受ける（50%阻害値（ $\text{IC}_{50}$ ）， $\text{Cd}^{2+}$  で 6  $\mu\text{mol/L}$ ， $\text{Ni}^{2+}$  で 68  $\mu\text{mol/L}$ ）など，高電位活性化型の電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルに特徴的な性質を示した。

更に N 型，及び P/Q 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの選択的阻害薬である  $\omega$ -conotoxin GVIA，MVIIC 及び  $\omega$ -agatoxin IVA（各々 1  $\mu\text{mol/L}$ ）に対して感受性を示さず，一方 nimodipine（10  $\mu\text{mol/L}$  で約 40%）及び T 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの一般的な阻害薬である amiloride（1 mmol/L で約 70%， $\text{IC}_{50}$ ；107  $\mu\text{mol/L}$ ）では部分的阻害を受けた。これらの特徴は R 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルを想起させるものであったが，RT-PCR 法によってモルモット腸間膜動脈から 1E の mRNA を検出することはできなかった。以上の結果から，全く新しい特徴を有する nifedipine 非感受性高電位活性化型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルが腸間膜動脈の末梢分岐部に優勢に発現しており，その血管緊張度の制御に深く関わっていることが強く示唆された。

(担当：井本 敬二)

### 33. Glial boundaries in *Xenopus* central nervous system

吉田 美加 (東北大学医学部分子生物学講座)

(2001.3.16)

Because a subpopulation of glial cells seems to establish boundary regions such as the roof plate of the spinal cord, the optic chiasm, and the anterior commissure, it is most likely that distinct subsets of glial cells play roles to generate the specific cellular domains in the hindbrain as well. Glial

intermediate filament proteins, vimentin and glial fibrillary acidic protein, are extensively coexpressed in radial glia in the developing *Xenopus* hindbrain and that subsequently two proteins define distinct rhombomere domains: vimentin is localized in radial glia at the rhombomere boundaries and

glial fibrillary acidic protein expression is restricted in those at the rhombomere center. Radial glia in the boundary regions selectively retain expression of a four transmembrane surface protein, DMg/M6b. This protein is very closely related to a neuronal protein expressed on migrating axons, DMb/ M6a, and is a gene product of the proteolipid protein gene family. The localized expression of DMg/M6b on boundary region radial glia may play a role in boundary definition and in guidance of axonal emigration from the hindbrain. Moreover,

the cellular arrangement in the boundary regions differs from that in the center regions; the boundary glia exhibit processes which extend upward and are encircled by the cell processes emanating from the central glia. These data suggest that an early event in determining rhombomere topology may be the specification of both morphologically and biochemically distinct subsets of radial glia.

(担当：池中一裕)

#### 34. Transgenic approaches to understanding oligodendrocyte survival and differentiation

Wendy B Macklin (Cleveland Clinic)

(2001.3.19)

The long range goal of these studies is understanding the molecular signals that regulate oligodendrocyte differentiation and myelin formation. The focus is on the expression of the myelin proteolipid protein (PLP) gene, which is primarily expressed in myelinating oligodendrocytes. The PLP protein and the closely related DM20 protein are the most abundant proteins of the CNS myelin membrane. Animals were generated using a PLP promoter-green fluorescent protein (GFP) transgene. These animals express an early version of GFP, which is not as strong as some of the more recent iterations of this transgene. This has been quite useful in that the transgene is detectable only in mature oligodendrocytes. Mature oligodendrocytes can be FACS sorted, which has not been possible before, in order to analyze gene expression in isolated, in vivo differentiated

oligodendrocytes. These animals are an excellent model for adult pathologies of oligodendrocyte function. Cultures from these animals are particularly useful for establishing how to enhance remyelination by mature oligodendrocytes. Additional transgenic animals have been generated that express enhanced GFP (EGFP) in oligodendrocytes and their progenitors at very high levels. All stages of oligodendrocyte differentiation are visualized in these mice, postnatally and in the embryo. Investigations on this lineage will be discussed. In other studies on oligodendrocyte differentiation, the mechanisms by which neuregulins enhance survival of oligodendrocytes and their progenitors are being analyzed, with a particular focus on the role of AKT in this survival pathway.

(担当：池中一裕)

#### 35. Quantal synaptic transmission in CNS

Nobutoshi HARATA (Stanford University School of Medicine)

(2001.3.27)

At central synapses, quantal release of neurotransmitter is generally regarded as an all-or-none process, whereby presynaptic changes in synaptic strength arise only from altered release probability, not from changes in the cleft neurotransmitter concentration generated by unitary exocytotic events. We looked for changes in cleft glutamate concentration ([glu]cleft) sensed by AMPA-type glutamate receptors at hippocampal synapses in response to varying external  $Ca^{2+}$  or to

paired-pulse modulation. Analysis of the effects of a rapidly equilibrating AMPAR antagonist ( $\gamma$ -DGG) was carried out for populations of excitatory synapses in autaptic microcultures or at single FM1-43- labeled boutons subjected to focal stimulation. In all cases, [glu]cleft was significantly modified in parallel with changes in release probability, whether elicited by manipulating  $Ca^{2+}$ , by paired-pulse facilitation (PPF), or paired-pulse depression (PPD). Modulation of

unitary event size was also directly observed in the absence of antagonist. At single synapses displaying PPD, quantal responses evoked by the second stimulation were significantly smaller than quantal responses to the first stimulus, even in trials when the first response was a failure. These results suggest that unitary release event at hippocampal synapses is subject to extensive modulation.

One of the possible mechanisms is by way of modulation of exocytosis kinetics. Neuroendocrine cells undergo a transient form of exocytosis by way of fusion pore formation. If this transient form exists also in mammalian central synapses, the temporal range of exo-endocytosis would be expanded considerably than currently thought, and would be a potential site of modulation. We have developed a new approach to test whether transient fusion pores are formed during exocytosis at hippocampal synapses. We monitored the fluorescence of green fluorescent protein (GFP), fused to the luminal domain of the vesicle protein VAMP (synaptobrevin-2), as it was quenched by

bromphenol blue (BPB), present in the extracellular solution. Only when the extracellular solution gained access to the vesicle lumen, was BPB allowed to enter the vesicle and quench GFP fluorescence. The rate of quenching was significantly faster in the presence of 2 mM BPB than in 0.5 mM BPB. Because 0.5 and 2 mM BPB were shown to attain similar submaximal quenching under a steady-state condition, these data suggest that some vesicular population was only partially filled with 0.5 mM BPB during exocytosis. Based on simple diffusion model, BPB filling time was calculated to be 4.1 msec for 0.5 mM (extracellular) BPB, whereas it was 0.4 msec for 2 mM BPB, strongly indicating a transient opening of fusion pore in the millisecond time domain. These results point to a possible presynaptic modulatory mechanism of quantal synaptic transmission in CNS.

(担当：井本 敬二)

### 36. Polarized trafficking, clustering and modulation of dendritic delayed rectifier Kv2 channels

James S. Trimmer (Department of Biochemistry and Cell Biology State University of New York)

(2001.3.28)

(担当：池中一裕)

# 【 大学院特別講義 】

## 大学院特別講義

1. 第 24 回 (2000.4.26)

演者: 生体膜研究部門 河西 春郎教授

演題: カルシウムシグナルによる細胞機能の調節 - 神経細胞の高親和性カルシウム結合蛋白の役割

2. 第 25 回 (2000.5.10)

演者: 心理生理学研究部門 定藤 規弘教授

演題: 断層画像を用いた神経機能解剖

3. 臨時 (2000.6.8)

演者: 感覚・運動機能研究プロジェクト 柿木 隆介教授

演題: 臨床神経症候学入門 1 - 歩行障害、失調、不随意運動

4. 第 26 回 (2000.6.14)

演者: 大脳神経回路論研究部門 川口 泰雄教授

演題: 大脳皮質ニューロンの多様性

5. 臨時 (2000.6.21)

演者: 心理生理学研究部門 本田 学 助教授

演題: 臨床神経症候学入門 2 - 高次脳機能障害 (失認、失行、失語)

6. 第 27 回 (2000.7.12)

演者: 高次神経機構研究部門 八木 健教授

演題: 遺伝情報からみた脳機能 - 遺伝子操作とゲノムプロジェクトにより凌駕される行動遺伝学

7. 第 28 回 (2000.9.25)

演者: 超微小形態生理研究部門 永山 國昭教授

演題: 電子顕微鏡による 1 分子構造生物学

8. 第 29 回 (2000.10.12)

演者: 神経化学研究部門 柳川 右千夫助教授

演題: 神経伝達物質を決定する遺伝子

9. 第 30 回 (2000.11.24)

演者: 感覚・運動機能研究プロジェクト 金桶 吉起 助教授・大草 知裕研究員

演題: 脳磁図は視覚生理学に貢献できるか?

10. 第 31 回 (2000.12.13)

演者: 液性情報研究部門 森 泰生 助教授

演題: 分子生理学特論 - イオンチャネルの分子遺伝学

11. 第 32 回 (2001.1.17)

演者：神経情報研究部門 池中 一裕教授

演題：グリア細胞の多様な機能

12. 第 33 回 (2001.2.21)

演者：佐々木和夫所長

演題：大脳-小脳連関と随意運動の学習

13. 第 34 回 (2001.3.14)

演者：機能協関研究部門 金関 恵研究員

演題：細胞生物学 - 微細構造の立場から

生理学研究所年報 第22卷

発行 2002年3月1日  
編集者 井本敬二  
発行者 岡崎国立共同研究機構

生理学研究所

〒444-8585 岡崎市明大寺町字西郷中 38  
電話 0564 55-7700  
FAX 0564 52-7913  
URL: <http://www.nips.ac.jp>