

自然科學研究機構

生理學研究所年報

第26卷



2005

はじめに

本年報は平成 16 年度（平成 16 年 4 月 1 日より平成 17 年 3 月 31 日）の生理学研究所の事業活動、とくに研究活動の報告書であります。

生理学研究所は、昭和 52 年（1977 年）5 月 2 日に創設されて以来、分子科学研究所および基礎生物学研究所と共に、岡崎国立共同研究機構を形成してまいりましたが、いわゆる“国立大学法人化”の流れの中で、岡崎国立共同研究機構の三つの研究所も、平成 16 年 4 月 1 日より、国立天文台および核融合科学研究所と共に、大学共同利用機関法人自然科学研究機構を形成することになりました。したがって、本年報は、大学共同利用機関法人自然科学研究機構の一機関としての生理学研究所の年報としては最初の年報となるわけです。しかし、生理学研究所の創設以来の使命、「人体の機能を総合的に解明することを究極の目標に、生体を対象として、分子レベルから個体レベルにわたる各階層において先導的な研究を推進する」というわれわれの使命は“法人化”によって変更されるべきものではない筈です。したがって、本年報は生理学研究所年報第 26 巻であります。

“法人化初年度”の生理学研究所では、“法人化”により新たに加わる煩雑な事務的業務の負荷に対処するために、その組織体制に変更が加えられました。例えば、副所長（部門長併任）が置かれたほか、これまで研究系ごとに設けられていた研究主幹にかわって、六つに分類された業務をそれぞれ担当する主幹が置かれました。

すなわち、共同研究担当（脳機能計測センター長併任）、動物実験問題担当（動物実験センター長併任）、安全衛生担当、研究連携担当、広報渉外担当、教育担当の主幹であります。また、これら以外にも、機構本部の委員会の委員をも兼ねる研究連携委員会委員（研究連携担当主幹併任）、知的財産委員会委員、評価に関するタスクホースの委員、広報に対するタスクフォースの委員、情報公開委員会委員等が新たに任命されることになりました。これらの委員が実際に行わなければならない業務の中には「研究・教育」と直接には結び付かないものも少なくなく、そのことが研究・教育活動に及ぼすであろう深刻な影響が危惧されたのでありますが、所員ひとりひとりの献身的な協力によって、平成 16 年度の生理学研究所の活動とその成果は、本年報の報告からも明らかなように、平成 15 年度のそれと比較して、優るとも劣らないものであります。

平成 16 年 5 月には、平成 15 年度にご着任いただいた鍋倉淳一教授、箕越靖彦教授、久保義弘教授に続いて、富永真琴教授にご着任いただきました。われわれ所員一同、心を一つに、「学の危機」においても生理学研究所の本来の使命を忘れることなく、さらに努力を重ねる覚悟であります。

平成 17 年 12 月

生理学研究所所長 水野 昇

生理学研究所年報

〔 目 次 〕

職 員 (2004 年度)	i
研究活動報告	
分子生理研究系	11
細胞器官研究系	21
生体情報研究系	26
統合生理研究系	32
大脳皮質機能研究系	39
発達生理学研究系	49
脳機能計測センター	55
統合バイオサイエンスセンター	59
動物実験センター	69
計算科学研究センター	71
技 術 課	73
研究発表	
発 表 論 文	87
学 会 発 表	103
一般共同研究報告	123
計画共同研究報告	141
磁気共鳴装置共同利用実験報告	151
超高压電子顕微鏡共同利用実験報告	165
生体磁気計測装置共同利用実験報告	179
研究会報告	185
国際シンポジウム	
未来開拓国際シンポジウム	401
セミナー報告	407
山手イブニングセミナー	425
大学院特別講義	429

職員 (2004 年度)

所 長

水 野 昇

分子生理研究系

神経機能素子研究部門

教 授 久 保 義 弘

ポストドク研究員 (井上財団) 中 條 浩 一

助 教 授 立 山 充 博
(2004.6.1~)

日本学術振興会特別研究員 藤 原 祐 一 郎

助 手 三 坂 巧
(~2005.1.31)

特別共同利用研究員 長 友 克 広

ポストドク研究員 (CREST) 立 山 充 博
(~2004.5.31)

総研大院博士 岩 井 博 正

分子神経生理研究部門

教 授 池 中 一 裕

大学院生 成 瀬 雅 衣

助 教 授 小 野 勝 彦

" 渡 辺 啓 介

" 等 誠 司

" 東 幹 人

助 手 竹 林 浩 秀
(休職中)

特別共同利用研究員 田 中 久 貴

リサーチ・アソシエイト 田 中 謙 二
(~2004.5.31)

" 政 平 訓 貴

助 手 田 中 謙 二
(2004.6.1~)

研 究 員 丁 雷

非常勤研究員 (生理研) 石 井 章 寛
(2004.4.1~)

特別協力研究員 中 島 弘 文

非常勤研究員 (科研費) 小 川 泰 弘

外国人特別研究員 馬 堅 妹
(~2004.12.31)

大学院生 古 性 美 記

客 員 教 授 Steaven Pfeiffer
(~2004.4.30)

特別共同利用研究員 鳥 居 知 宏

細胞内代謝研究部門

客 員 教 授 曾 我 部 正 博

助 手 毛 利 達 磨

客 員 助 教 授 久 野 みゆき
(2004.10.1~)

非常勤研究員 平 田 宏 聡

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 大 嶋 章 裕

助 手 根 本 知 己

" 安 松 信 明

" 高 橋 倫 子

" 緒 方 衝

" 松 崎 政 紀

特別協力研究員 劉 婷 婷

非常勤研究員 兒 島 辰 哉

大学院学生 野 口 潤

" 岸 本 拓 哉

" 本 蔵 直 樹

特別共同利用研究員 早 川 泰 之

日本学術振興会特別研究員

大学院学生 畠 山 裕 康

機能協同研究部門

教授	岡田 泰伸	文部科学省外国人研究員	KURBANNAZAROVA, Ranokhon (2004.10.18~2005.1.20)
助教授	SABIROV, Ravshan		
助手	清水 貴浩	"	KRASILNIKOV, Oleg V. (2004.9.1~2004.12.2)
"	高橋 信之	"	
"	檜原 康博	"	SUN, Xin (2005.1.25~)
非常勤研究員	森 信一郎 (~2004.4.30)	研究員(科学研究)	浦本 裕美
"	眞鍋 健一 (~2004.10.31)	科学技術振興事業団研究員	井上 華
		非常勤研究員	
文部科学省外国人研究員	SUBRAMANYAM, Muthangi V.V. (~2004.7.7)	学振外国人特別研究員	DUTTA, Amal kumar
"	TASHMUKHAMEDOV, Bekjan (~2004.5.13)	大学院生	Lee, Elbert Lan
"	BESSONOVA, Svetlana (2004.7.12~2004.10.14)	"	劉 洪 涛
		"	沼田 朋大
		"	温井 美帆
		"	TOYCHIEV, Abduqodir (2004.10.1~)

生体情報研究系

感覚認知情報研究部門

教授	小松 英彦	大学院生	松本 正幸
助教授	伊藤 南	"	安田 正治
助手	小川 正	"	横井 功
"	郷田 直一	"	松茂良 岳 広
非常勤研究員	鯉田 孝和		

神経シグナル研究部門

教授	井本 敬二	助手	山 肩 葉子
助教授	宮田 麻理子	"	井上 剛
助手	佐竹 伸一郎	非常勤研究員	佐々木 幸恵 (2004.10.1~)

高次神経機構研究部門

教授	八木 健	非常勤研究員	金子 涼輔
助教授	後藤 由季子	受託技術員	三寶 千秋
助手	平林 敬浩	"	山内 奈央子

統合生理研究系

感覚運動調節研究部門

教授	柿木 隆介	日本学術振興会外国人特別研究員	王 曉宏 (2004.9.1~)
助教授	金桶 吉起		
助手	乾 幸二	研究員	和坂 俊昭
"	渡辺 昌子	研究員	三木 研作 (2004.12.1~)
非常勤研究員	井原 綾		

大学院学生(総研大)	秋 云海 (~2004.9.30)	橋本章子
”	Nguyen Thi Binh	” 宮成愛
”	野口泰基	特別共同利用研究員 岡本秀彦 (~2004.10.31)
”	廣江総雄	” 辻健史
”	中田大貴	” 中村舞子
大学院学生(総研大)	赤塚康介	” 尾島司郎
”	田中絵実	” 藤岡孝子
”	本多結城子	
特別共同利用研究員	田村洋平 (~2004.8.31)	

生体システム研究部門

教授	南部篤	助手	橘吉寿
助手	畑中伸彦		

大脳皮質機能研究系

脳形態解析研究部門

教授	重本隆一	日本学術振興会特別研究員	篠原良章
助教授	粕山俊彦	”	馬杉美和子
助手	深澤有吾		

大脳神経回路論研究部門

教授	川口泰雄	大学院生	森島美絵子
助教授	窪田芳之	”	関川明生
助手	根東覚 (~2004.8.31)	”	平井康治
”	大塚岳 (2004.6.1~)	日本学術振興会外国人特別研究員	PUIG, Maria Victoria (2005.1.7~)
非常勤研究員	苅部冬紀 (~2004.9.30)		

心理生理学研究部門

教授	定藤規弘	研究員	荒牧勇
助教授	本田学	”	田邊宏樹 (~2004.11.30)
助手	神作憲司		
”	田邊宏樹 (2004.12.1~)	大学院生	原田宗子
非常勤研究員	齋藤大輔	”	田中悟志
研究員	山本幸子	特別共同利用研究員	中下悟 宮本順 (~2005.3.31)
”	豊田浩士		
”	中村聡 (~2004.11.30)		

発達生理学研究系

認知行動発達機構研究部門

教授	伊佐正	非常勤研究員	坂谷智也 (2004.12.1~)
助手	関和彦		
”	遠藤利朗	特別協力研究員	李鳳霞 (~2004.9.30)
”	吉田正俊		
文部科学省外国人研究員	Sooksawate Thongchai (~2004.5.4)	総合研究大学院学生	渡邊雅之 (~2004.9.30)
文部科学省外国人研究員	Nikolay Nikitin (~2004.6.10)	特別訪問研究員	Penphimon phongphanp (2004.9.12~2004.10.30)
”	Sergei Perfiliev (2004.6.6~2004.9.7)	特別共同利用研究員	武井智彦 (2004.7.1~)
非常勤研究員	西村幸男 (~2004.11.30)	”	木下雅恵 (2004.7.7~2004.8.28)
科学技術振興機構研究員	西村幸男 (2004.12.1~)	研究員(科学研究)	熊谷(柴田)愁子
		産学官連携研究員	宮地まり
科学研究研究員	坂谷智也 (~2004.11.30)	”	山根到 (2005.1.1~)

生体恒常機能発達機構研究部門

教授	鍋倉淳一	特別共同利用研究員	和氣弘明
助教授	張一成	大学院学生	西巻拓也
助手	前島隆司	技術補佐員	杉浦未記 (2004.8.1~)
非常勤研究員	渡部美穂		
特別訪問研究員	溝口義人	事務補佐員	比賀昌子 (2004.12.1~)
研究員(CREST)	北村明彦 (2004.12.1~)		

生殖・内分泌系発達機構研究部門

教授	箕越靖彦	助手	志内哲也
助手	岡本土毅		

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
-----	------	----	------

機能情報解析室

助教授	遠本徹
-----	-----

脳機能分子解析室

助教授	平林真澄	研究員(特定契約職員)	加藤めぐみ
日本学術振興会特別研究員	伊藤潤哉	技術支援員(臨時契約職員)	大西皆子

岡崎共通研究施設

(生理学研究所関連)

岡崎統合バイオサイエンスセンター

時系列生命現象研究領域

教授	岡村 康司	非常勤研究員	村田 喜理
助教授	東島 眞一	〃	中山(鹿本)希世美
助手	久木田 文夫	〃	西野 敦雄
〃	岩崎 広英	〃	木村 有希子

戦略的方法論研究領域

教授	永山 國昭	研究員	早坂 孝宏 (2004.8.1～)
客員教授	Tachev Krasimir	〃	重松 秀樹 (2005.1.1～)
助教授	村上 政隆	〃	新間 秀一 (2004.10.1～)
〃	瀬藤 光利	〃	安田 浩史 (2005.2.1～)
助手	大橋 正人	〃	安田 浩史 (2005.2.1～)
〃	片岡 正典	〃	安田 浩史 (2005.2.1～)
研究員	松本 友治 (～2005.1.31)	〃	安田 浩史 (2005.2.1～)
〃	杉谷 正三	研究員(民間)	尾田 千草 (2004.8.1～)
〃	Danev, S. Radostin		
〃	内田 仁		

生命環境研究領域

教授	富永 真琴	助手	柴崎 貢志
助教授	富永 知子		

動物実験センター

教授 尾崎 毅

計算科学研究センター

助手 片岡 正典

技術課

課長 大庭 明生

研究系技術班

班長 大河原 浩

分子生理研究系技術係

係員	高木 正浩	係員	山田 元
〃	山本 友美		

細胞器研究系技術係

係長	小原 正裕	代替係員	鈴木 恵 (～2004.9.22)
係員	神谷 絵美		
〃	高橋 直樹		

生体情報研究系技術係

係長	伊藤嘉邦	係員	三寶誠
主任	戸川森雄	"	野村博美
係員	福田直美		

統合生理研究系技術係

係長	伊藤昭光	係員	竹島康行
----	------	----	------

大脳皮質機能研究系技術係

(市川 修)	(鈴木 恵)
(伊藤嘉邦)	(~2004.9.22)
(神谷絵美)	

発達生理学研究系技術係

係長	永田治	係員	森将浩
係員	齋藤久美子	"	吉友美樹

研究施設技術班

班長	市川 修
----	------

脳機能計測技術係

係長	山口 登	係員	村田安永
係員	吉村伸明	"	佐藤茂基

動物実験技術係

主任	佐治俊幸	係員	高橋知子
"	小木曾昇		(~2004.12.31)
	(~2004.5.31)	"	窪田美津子
係員	廣江 猛		(2004.5.1~)

電子顕微鏡技術係

係長	前橋 寛
----	------

工作技術係

係長	加藤勝己
----	------

技術支援員	伊藤磯子	"	小林麻澄
"	土屋勝代	"	畑田小百合
"	伊佐かおる	"	大場眞由美
"	近藤千香		(~2004.7.31)
	(~2004.5.15)	"	岩瀬 恵
"	松永知子	"	小波蔵知子
"	深澤美津江	"	岡本道子
	(~2004.10.31)		(2004.6.1~)

技術支援員	鈴木登貴子	〃	大西皆子
〃	戸塚昌子 (2004.8.17~)	〃	伊藤俊幸
〃	益子靖毅	〃	浅井友理子 (2004.11.1~)
〃	澤栄恵		
事務支援員	松澤敬子	〃	和田百加
〃	向和子	〃	坂本愛
〃	浅井明代	〃	小林裕子
〃	梅林宏江	〃	吉田千菜美 (2004.9.1~)
〃	鈴木理恵 (~2004.8.31)	〃	久保木悠子
〃	杉浦友美		

【 研 究 活 動 報 告 】

研究活動報告

〔 目 次 〕

分子生理研究系

神経機能素子研究部門	11
概 要	
バキュロウイルス発現系による ATP 受容体チャネル P2X ₂ 蛋白の精製 (久保義弘, 山本友美, 三尾和弘, 佐藤主税)	
代謝型グルタミン酸受容体 E238Q 変異体を持つ遺伝子改変マウスの作成 (久保義弘, 山本友美, 新石健二, 饗場篤)	
グルタミン酸脱炭酸酵素 67 の条件付ノックアウトマウスの作成 (柳川右千夫, 山本友美, 海老原利枝, 有田早苗, 八木健)	
FRET 法による光生理学的解析による代謝型グルタミン酸受容体の構造・機能相関の研究 (立山充博, 久保義弘)	
高分子量 G タンパク質 mOPA 1 によるミトコンドリア形態変化機構の解明 (三坂巧, 久保義弘)	
M-チャネルのムスカリニック刺激による電流変化の分子機構 (中條浩一, 久保義弘)	
自身の膜上発現密度に依存して変化するイオンチャネルポアの解析 (藤原祐一郎, 久保義弘)	
内向き整流性 K ⁺ チャネル (Kir2.1) のポア内面の電荷を帯びたアミノ酸残基の機能的意義 (藤原祐一郎, 久保義弘)	
全反射顕微鏡による ATP 受容体チャネルのリガンド投与における動的構造変化の解析 (岩井博正, 久保義弘)	
Protein kinase C による G 蛋白質共役型内向き整流性 K ⁺ チャネル抑制の機構 (長友克広, 久保義弘)	
分子神経生理研究部門	14
概 要	
bHLH 型転写制御因子 Olig3 の機能と細胞系譜の解析 (丁雷, 小野勝彦, 渡辺啓介, 田中謙二, 池中一裕)	
時期特異的遺伝子組み換え法を用いた脊髄の Olig2 細胞の系譜解析 (政平訓貴, 丁雷, 小野勝彦, 池中一裕)	
前脳基底部の Olig2 細胞のコリナージックニューロンへの分化 (古性美記, 小野勝彦, 政平訓貴, 池中一裕)	
X-gal 反応産物の電顕観察法の改良 (小野勝彦, 政平訓貴, 丁雷, 池中一裕)	
神経構築形成における長距離ガイダンス分子の役割の解明 (渡辺啓介, 小野勝彦, 池中一裕)	
モデルマウスを用いた脱髄の病態解明 (田中久貴, 馬堅妹, 山田元, 田中謙二, 池中一裕)	
脱髄モデルマウスを用いた再生治療研究 (東幹人, 等誠司, 池中一裕)	

- 成体脳に存在する神経幹細胞の維持のメカニズム解明
(東幹人, 等誠司, 池前一裕)
- 神経幹細胞の発生の分子機構の解明
(等誠司, 池前一裕)
- アストロサイトの分化, 発生様式に関する研究
(成瀬雅衣, 小川泰弘, 等誠司, 池前一裕)
- アストロサイト機能不全モデルマウスの開発
(田中謙二, 池前一裕)
- 脳の発生と糖鎖
(石井章寛, 等誠司, 鳥居知宏, Steven E. Pfeiffer, 池前一裕)
- 3D-HPLC によるマウス大脳皮質発達におけるシアル酸付加 N-結合糖蛋白質の糖鎖構造解析
(鳥居知宏, 石井章寛, 等誠司, 池前一裕)

細胞内代謝研究部門 19

- 概要
- マウス未成熟卵母細胞自発的カルシウム振動に対するエストロゲンおよびビスフェノール A の抑制効果
(毛利達磨, 吉田 繁)
- 伸展刺激に対する細胞移動の研究
(毛利 達磨, 曾我部 正博)
- 機械的力に対する細胞骨格と接着構造の応答の分子機構
(平田 宏聡, 曾我部 正博)

細胞器研究系

生体膜研究部門 21

- 概要
- 2光子励起法による開口放出の研究
(河西 春郎, 根本 知己, 高橋 倫子, 岸本 拓也, 兒島 辰哉, 大嶋 章裕, 劉 婷婷, 畠山 裕康)
- 海馬錐体細胞スパインの研究
(河西 春郎, 松崎 政紀, 早川 泰之, 野口 潤, 安松 信明, 本蔵直樹)

機能協関研究部門 22

- 概要
- アポトーシス誘導性アニオンチャネル活性化における活性酸素種の役割
(清水貴浩, 沼田朋大, 岡田泰伸)
- 心筋細胞の容積感受性クロライドチャネルの分子実体は ClC-3 ではない
(Gong weiqin, 徐 洪涛, 清水貴浩, 岡田泰伸)
- マキシアアニオンチャネルと容積感受性クロライドチャネルのポアサイズの測定
(サビロブ・ラブシャン, 岡田泰伸)
- 大腸クリプトにおけるイオン分泌時の細胞容積調節機構の解明
(眞鍋健一, 清水貴浩, 森島 繁, 岡田泰伸)

生体情報研究系

感覚認知情報研究部門 26

- 概要
- 初期視覚系における輪郭線の折れ曲がりの表現
(伊藤 南)

下側頭皮質における色選択ニューロンの分布 (小松英彦, 安田正治, 鯉田孝和)	
色カテゴリー識別と色弁別時の下側頭皮質ニューロン活動 (鯉田孝和, 小松英彦)	
外側膝状体における色表現 (郷田直一, 小松英彦)	
V4 野と前頭眼野ニューロンにおける活動履歴の保存性 (小川 正)	
盲点における線分の補完知覚に対応したサル1次視覚野神経活動 (松本正幸, 小松英彦)	
神経シグナル研究部門	28
概要	
神経伝達物質のシナプス外拡散によって仲介される異種シナプス間相互作用 (佐竹伸一郎, 井本敬二)	
視床-大脳皮質神経回路の構造: 単一シナプスレベルでの構成 (井上 剛, 井本 敬二)	
不活性型 Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II α 遺伝子改変マウスを用いた脳機能解析 (山肩葉子, 井本敬二, 畑中伸彦, 八木 健, 小幡邦彦, 柳川右千夫)	
視床-大脳皮質ネットワークにおけるてんかん発生に関する研究 (佐々木 幸恵, 井本 敬二)	
視床興奮性シナプスのシナプス特性の解析 (宮田麻理子, 井本敬二)	
高次神経機構研究部門	30
概要	
CNR/プロトカドヘリン α 遺伝子の機能解析 (平林敬浩, 八木 健)	
プロトカドヘリン α 発現制御領域候補欠損マウスの作製 (金子涼輔, 八木 健)	

統合生理研究系

感覚運動調節研究部門	32
概要	
侵害刺激に伴う皮質活動の睡眠中の変化 (王晓宏, 乾幸二, 秋云海, 柿木隆介)	
ヒト第一次体性感覚野での顔の再現 (Nguym BT, Tran TD, 乾幸二, 宝珠山稔, 柿木隆介)	
事象関連電位を用いた二点識別認知過程の研究 (田村洋平, 宝珠山稔, 乾幸二, 中田大貴, 和坂俊昭, 尾島司郎, 井上聖啓, 柿木隆介)	
経皮的磁気刺激による A-delta 線維関連疼痛増強 (田村洋平, 宝珠山稔, 乾幸二, 中田大貴, 秋云海, 宇川義一, 井上聖啓, 柿木隆介)	
ヒト体性感覚野における階層的処理 (乾幸二, 王晓宏, 田村洋平, 金桶吉起, 柿木隆介)	
C 線維刺激に伴う皮質磁場反応に対する distraction の効果 (秋云海, 乾幸二, 王晓宏, Nguyen BT, Tran TD, 柿木隆介)	
体性感覚刺激による事象関連電位に対する Go/NoGo 課題の効果 (中田大貴, 乾幸二, 西平賀昭, 八田有洋, 坂本将基, 木田哲夫, 和坂俊昭, 柿木隆介)	

- 侵害刺激による皮質活動は運動によって修飾される
(中田大貴, 乾幸二, 和坂俊昭, 田村洋平, 秋云海, 王曉宏, Nguyen BT, 柿木隆介)
- ランダムドット仮現運動知覚の時間構造
(久保田哲夫, 金桶吉起)
- 視覚逆行性マスキング現象の脳活動: 後続刺激の提示時間の違いによる影響
(橋本章子, 渡辺昌子, 柿木隆介, 宝珠山稔)
- ヒト視覚腹側路における神経順応効果の時間的動態
(野口 泰基, 乾 幸二, 柿木 隆介)

生体システム研究部門 36

- 概要
- 脳深部刺激療法の作用機序に関する研究
(南部 篤, 橋 吉寿, 知見聡美, 高田昌彦, 喜多 均)
- 上肢到達運動課題実行中の線条体ニューロンの活動様式を解明する
(畑中 伸彦, 高良 沙幸, 橋 吉寿, 南部 篤)
- 顎運動に関わる多シナプス性神経回路の同定
(畑中 伸彦, 橋 吉寿, 南部 篤, 宮地 重弘, 高田 昌彦)
- “間接路”を介した淡蒼球内節への運動情報伝達様式の解明
(橋 吉寿, 南部 篤)

大脳皮質機能研究系

脳形態解析研究部門 39

- 概要
- グルタミン酸受容体の定量的解析
(田中淳一, 足澤悦子, 初山明子, 深澤有吾, 馬杉美和子, 重本隆一)
- 神経伝達物質放出関連蛋白質の局在
(萩原 明, 深澤有吾, 重本隆一)
- 海馬における長期増強現象とグルタミン酸受容体の密度変化
(深澤有吾, 重本隆一)
- 海馬 NMDA 受容体局在の左右差
(Wu Yue, 篠原良章, 重本隆一)
- GABA_B 受容体やイオンチャネルの脳内局在と機能解析
(Akos Kulik, 萩原明, 深澤有吾, 重本隆一)
- 前脳基底核と黒質-線条体ドーパミン系の電気生理学的および形態学的解析
(初山俊彦)

大脳神経回路論研究部門 41

- 概要
- 皮質介在ニューロンの樹状突起分枝の定量的解析
(川口泰雄, 荻部冬紀, 窪田芳之)
- VGLUT2 が入力する棘突起への抑制性入力について
(窪田 芳之, 根東 覚, 畑田 小百合, 川口 泰雄)
- calretinin 陽性樹状突起への抑制性シナプス入力と興奮性シナプス入力の割合
(関川 明生, 窪田 芳之, 川口 泰雄)
- 皮質線条体システムにおける錐体細胞の多様性
(森島美絵子, 川口泰雄)

心理生理学研究部門 43

概要

空間パターンへの触覚弁別に関する脳神経基盤の非対称性

(原田 宗子, 定藤 規弘)

話し言葉における視聴覚間の感覚統合に関する神経基盤: fMRI を用いた研究

(斎藤大輔, 定藤 規弘)

ピアノ学習に伴う視覚聴覚統合に関与する神経活動

(長谷川 武弘, 定藤 規弘)

聴覚-視覚刺激対連合学習における脳活動変化

(田邊 宏樹, 定藤 規弘)

発達期における聴覚脱失による可塑的変化の年齢依存性

(定藤 規弘)

ICA による task-related motion artifact の除去

(河内山隆紀, 定藤規弘)

機能的 MRI を用いた脳局所間結合度の解析手法の開発

(山下宙人, 尾崎 統, 定藤 規弘)

触覚による粗さ評定に関する神経基盤の解析

(北田 亮, 定藤 規弘)

視覚刺激に対する NIR, fMRI 同時計測

(豊田浩士, 定藤規弘, 柏倉健一, 笠松眞吾, 岡沢秀彦, 藤林靖久, 米倉義晴)

運動学習転移における小脳の役割

(河内山隆紀, 松村道一, 米倉義晴, 定藤規弘)

マッカーロー効果をもちいたヒト色感覚にかかわる神経機構の解明

(守田知代, 松村道一, 米倉義晴, 定藤規弘)

両手協調運動における相転移現象に関わる神経基盤

(荒牧勇, 定藤規弘)

ブロードマン 6 野のもつ部位特異的認知機能とその有意性の検討

(本田 学, 田中 悟志)

超可聴域超高周波成分による行動制御メカニズムの基礎的検討

(本田 学, 中村 聡, 八木玲子, 森本雅子, 前川督雄, 仁科 エミ, 河合徳枝, 大橋 力)

カウンティングにおける運動前野の役割

(神作 憲司, Marie-Laure Grillon, 定藤 規弘, Ari Johnson, Mark Hallett)

単純反応時間課題遂行時の脳内情報処理

(神作 憲司, Mark Hallett)

発達生理学研究系

認知行動発達機構研究部門 49

概要

ラット上丘浅層からの投射ニューロンの樹状突起での活動電位開始の過分極活性化陽イオンチャネルによる調節

(遠藤利朗, 納富拓也, 足澤悦子, 重本隆一, 伊佐正)

上丘中間層 GABA 作動性ニューロンの特性

(Thongchai Sooksawate, 伊佐かおる, 伊佐 正, 小幡邦彦, 柳川右千夫)

遺伝子改変マウスを用いたサッカーボール運動制御機構の解析

(坂谷智也, 伊佐正)

皮質脊髄路損傷後における手の巧緻運動の機能回復
 (西村幸男, 伊佐正, 森近洋輔, パーフィリエフ・セルゲイ, 尾上浩隆, 塚田秀夫)

サルを用いた盲視 (blindsight) の神経機構の解明
 (吉田 正俊, 伊佐 正)

生体恒常機能発達機構研究部門 51

概要

発達期における神経伝達物質のスイッチング
 (鍋倉淳一, 張 一成, 前島隆司, 石橋 仁)

細胞内 Cl⁻制御機構 KCC2 による GABA の興奮-抑制スイッチと分子機構の解明
 (鍋倉淳一, 張 一成, 渡部美穂, 福田敦夫)

BDNF による大脳皮質細胞における GABA 受容体の細胞内動態と分子機構
 (鍋倉淳一, 溝口義人, 平田雅人, 兼松 隆)

クリプトン-YAG レーザーを用いた脳虚血障害モデル動物作成技術の開発
 (鍋倉淳一, 八尾博史)

生殖・内分泌系発達機構研究部門 53

概要

AMP キナーゼによる生体エネルギー代謝の調節機構
 (箕越 靖彦, 岡本 士毅, 志内 哲也)

レプチン, 神経ペプチドによる糖・脂質代謝調節機構の解明
 (箕越 靖彦, 志内 哲也, 斉藤 久美子)

視床下部腹内側核におけるエネルギー代謝調節作用とシグナル伝達機構
 (箕越 靖彦, 岡本 士毅, 諸橋 憲一郎)

脳機能計測センター

形態情報解析室 55

概要

フォルムバル膜の膜厚安定性の検討
 (山口 登, 有井達夫)

小腸絨毛上皮下線維芽細胞と吸収上皮細胞間の細胞間コミュニケーション
 (古家園子, 古家喜四夫)

機能情報解析室 56

概要

意志に関する脳活動の研究
 (達本 徹)

脳機能分子解析室 57

概要

外来 DNA に曝露した精子の顕微授精によるトランスジェニックラットの作製
 (加藤 めぐみ, 金子 涼輔, 平林 真澄)

ドナーとレシピエントのラット系統は 1 細胞期卵から体外発育した桑実胚~胚盤胞の産仔発生に影響する
 (加藤 めぐみ, 平林 真澄, 保地 眞一)

ラット M 期体細胞の核移植によるクローン個体作製の試み
 (平林 真澄, 加藤 めぐみ, 保地 眞一)

統合バイオサイエンスセンター

時系列生命現象研究領域 59

概要

新規電位依存性タンパク VSP の分子機能

(岩崎 広英, 村田 喜理, 岡村 康司, 稲葉 一男)

中枢神経細胞の自発発火特性を規定する電位依存性ナトリウムチャネルの制御機構

(岩崎 広英, 岡村 康司, 高木 正浩, 白幡 恵美, 早坂 清)

ゼブラフィッシュ脊髄神経回路形成機構の解析

(東島 眞一, 木村 有希子)

尾索動物の運動機能を司る構成と原理の解明

(西野 敦雄, 東島 眞一, 岡村 康司, 勝山 裕)

戦略的方法論研究領域 61

概要

位相差電子顕微鏡の改良

(Radostin Danev, 杉谷正三, 永山國昭)

位相板用炭素薄膜の材料科学的研究

(内田 仁, 伊藤俊幸, 大河原 浩, 永山國昭, 宇理須恆雄)

DNA/RNA 塩基配列の電子顕微鏡 1 分子計測法の開発

(Krassimir Tachev, 高橋佳子, 大河原 浩, 永山國昭, 片岡正典, 田坂基行)

膜タンパク質 TRPM2 のフッ化界面活性剤による可溶化

(松本友治, 佐々木悠, 永山國昭, 原 雄二, 森 泰生)

灌流ラット顎下腺における水分調節機構

(村上政隆, 大河原浩, 細井和雄, Kwartarini Murdiastuti, Bruria Sachar-Hill, Adrian E. Hill)

灌流ラット顎下腺の細胞間分泌細管の各種薬剤による形態変化

(村上政隆, 前橋 寛, Alessandro Riva, Felice Loffredo, Francesca Testa-Riva)

質量分析顕微鏡の開発と応用

(瀬藤光利, 新聞秀一, 永山國昭, 吉田圭一, 小河 潔, 古田 大, 市村克彦)

単アミノ酸側鎖付加の分子機構の解明

(瀬藤光利, 新聞秀一, 福田義之, 池上 浩司, 松本 峰男, 矢尾育子)

エンドサイトーシス選別輸送のメカニズムと生理機能

(大橋正人)

生命環境研究領域 65

概要

カプサイシン受容体のリン酸化機構の解析

(Sravan Mandadi, 村山奈美枝, 富永知子, 富永真琴)

プロスタグランジンによる炎症性疼痛発生メカニズムの解析

(森山朋子, 東智広, 富樫和也, 杉本幸彦, 富永知子, 成宮周, 富永真琴)

TRPV4 結合蛋白質の解析

(東智広, 森山朋子, 富永知子, 富永真琴)

TRPV4 の体温制御機構への関与の解析

(三村明史, 森山朋子, 鈴木誠, 富永真琴)

新規温度感受性 TRP チャネルの探索

(富樫和也, 東智広, 富永知子, 森泰生, 富永真琴)

中枢神経系における温度感受性 TRP チャネルの発現と機能解析

(柴崎貢志, 富永真琴)

mDia 結合タンパク質の探索と機能解析

(島貫恵実, 富永知子)

神経回路形成における mDia を介する情報伝達経路の役割

(島貫恵実, 柴崎貢志, 富永知子)

動物実験センター 69
概要

計算科学研究センター 71
概要

核酸塩基識別子の設計と合成

(片岡正典, 永山國昭)

ユニバーサル核酸の創生

(片岡正典)

カルボン酸を用いる新規オリゴヌクレオチド合成法の開発

(片岡正典)

技術課 73

1. 概要

(大庭明生)

2. 施設の運営状況

①統合生理研究系

(1) 生体磁気計測装置室

(永田 治)

②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)

③生理研・基生研共通施設

(1) 電子顕微鏡室

(前橋 寛)

(2) 機器研究試作室

(加藤勝己)

④動物実験センター (岡崎共通研究施設)

(佐治俊幸, 廣江猛, 高橋知子, 窪田美津子)

分子生理研究系

神経機能素子研究部門

【概要】

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

今年度, 昨年度に引き続き, 神経機能素子の遺伝子の

単離, 変異体の作成, 光ラベルの付加等を進め, 卵母細胞, HEK293 細胞等の遺伝子発現系における機能発現の再構成を行った。また, 2 本刺し膜電位固定法, パッチクランプ等の電気生理学的手法, 細胞内 Ca^{2+} イメージング・全反射照明下での FRET 計測等の光生理学的手法, 細胞生物学的研究手法により, その分子機能調節と構造機能連関の解析を行った。また, 外部研究室との連携により, 構造生物学的アプローチ, 遺伝子改変マウスの作成も進めた。以下に具体的な研究課題とその内容を記す。

バキュロウイルス発現系による ATP 受容体チャネル P2X_2 蛋白の精製

久保義弘, 山本友美

三尾和弘, 佐藤主税 (産総研, 脳神経情報)

ATP 受容体チャネル P2X_2 は, 状況に依存して著しい構造変化を起こすことが示唆されているが, その 3 次元構造は明らかにされておらず, ストイキオメトリーについてさえ, 決定的な結論は出ていない。 P2X_2 受容体チャネルの動的構造変化を知るというゴールに向け, 単一粒子構造解析によりアプローチすることを目的として P2X_2 受容体チャネル蛋白の精製を行った。まず, P2X_2 の N-もしくは C-末端に FLAG tag を付加したコンストラクトを作成し, 電気生理学的解析により, 正常な機能を

持つことを確認した。その後, cDNA をバキュロウイルスベクターに組み込み, 昆虫細胞 Sf9 に感染させ, 細胞膜上での蛋白発現を確認した。大量スケールでの感染 Sf9 細胞を回収し, FLAG 抗体によりアフィニティ精製した。SDS-PAGE の銀染色により単一の major band を確認した後, ゲル濾過により精製した。そのピーク分画を, 酢酸ウランにより負染色して電顕撮影したところ, 単一蛋白粒子と思われる像が観察された。

代謝型グルタミン酸受容体 E238Q 変異体を持つ遺伝子改変マウスの作成

久保義弘, 山本友美

新石健二, 饗場篤 (神戸大学大学院医学系研究科)

我々は先に, 代謝型グルタミン酸受容体 mGluR1 がグルタミン酸のみならず, 細胞外の Gd^{3+} によっても活性化されることを報告し, さらに, 点変異 E238Q によって, グルタミン酸に対する感受性は変わることなく, Gd^{3+} に

対する感受性が完全に消失することを見いだした。 Gd^{3+} は脳脊髄液中に含まれていないため, mGluR1 の持つ Gd^{3+} 感受性の生理的意義は明らかでない。この点にアプローチするため, E238Q 変異を持つ遺伝子改変マウスの作成

に取り組んだ。mGluR1 の exon 2 を含む genomic clone に点変異を導入し、さらに cre-loxP 配列, DT-A 配列を挿入することにより target vector を作成した。これを ES 細胞

に遺伝子導入し、相同組み換え陽性の細胞株を同定した。これをマウス初期胚に注入し、オスのキメラマウス 2 匹を得、現在、交配を進めている。

グルタミン酸脱炭酸酵素 67 の条件付ノックアウトマウスの作成

柳川右千夫, 山本友美, 海老原利枝, 有田早苗, 八木健 (高次神経機構)

グルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD)67 は、グルタミン酸から GABA を合成する酵素である。GAD67 単純型ノックアウトマウスは、口蓋裂を示し、出生日致死となる。出生日以降の脳高次機能における GAD67 の役割を明らかにする目的で、テトラサイクリンシステムを利用した条件付 GAD67 ノックアウトマウス作成を目指した。最初に、GAD67 遺伝子にテトラサイクリンアクティベーター

を挿入したターゲティングベクターを構築した。このターゲティングベクターを ES 細胞に導入し、Southern 法で相同組み換えのおこった ES クローンを同定した。今後、この ES クローンを用いて、条件付 GAD67 ノックアウトマウスを得る。そして、同ノックアウトマウスについて行動解析などを行う。

FRET 法による光生理学的解析による代謝型グルタミン酸受容体の構造・機能相関の研究

立山充博, 久保義弘

代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR) は神経の可塑性に関わる膜機能蛋白質であり、複数の G 蛋白質 (Gq, Gs, Gi) と共役し様々な細胞応答をもたらす。Gq の活性化は細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) を上昇させ、Gs の活性化は細胞内 cAMP 濃度 ($[cAMP]_i$) を増加させる。 Ca^{2+} および cAMP は、それぞれ細胞内でのセカンドメッセンジャーとしてシグナル伝達に重要な働きを示す因子である。我々は、光生理学的手法により $[Ca^{2+}]_i$ と $[cAMP]_i$ を同時に測定す

ることで、mGluR による二つのシグナル伝達経路の活性化が、mGluR に対する作用物質のタイプにより異なることを見出した。また、FRET (Fluorescent resonance energy transfer) を用いることで、蛋白分子の構造変化を捉えることが出来るため、「作用物質のタイプによりもたらされる受容体の立体構造の差異が活性化されるシグナル伝達経路に差異を生じさせる」という可能性について検証を行っている。

高分子量 G タンパク質 mOPA1 によるミトコンドリア形態変化機構の解明

三坂巧, 久保義弘

ミトコンドリアに局在する高分子量 G タンパク質 (mOPA1) は、遺伝子導入した COS-7 細胞中においてミトコンドリアの形状を粒状へと大きく変化させる働きを持つ。細胞内において mOPA1 タンパク質は 2 種の長さを示す (約 90, 80 kDa) が、本年度はこれら長さの異なる mOPA1 タンパク質の機能的差異について解析を試みた。アミノ酸点変異体を用いた解析より、2 種の長さをもつ

mOPA1 が 2 種類の N 末端のプロセッシングにより生ずること、およびその切断に関与するアミノ酸残基を明らかにした。また COS-7 細胞に遺伝子導入した際に観察されるミトコンドリア形態変化は、90 kDa のみと 80 kDa のみを発現させたときには大きく異なったことより、N 末端プロセッシングによる mOPA1 の機能調節機構の存在が示唆された。

M-チャンネルのムスカリニック刺激による電流変化の分子機構

中條浩一, 久保義弘

M 電流を担う KCNQ チャンネルはムスカリン性アセチルコリン受容体の活性化によって抑制をうけることが知られているが、この抑制機構には、PIP₂の分解によるものであるという説と、PKCによるリン酸化によるものであるという説が存在する。そこで、アフリカツメガエルの卵母細胞に KCNQ チャンネルを発現させ、PKC を活性化した場合と PIP₂ 量を減らした場合で KCNQ チャンネルにどのような変化が生じるかを検討した。PMA によ

て PKC のみを活性化させた場合、KCNQ チャンネル電流の G-V (コンダクタンス-電圧) 関係が脱分極側に+20mV シフトした。一方、PIP₂の量を wortmannin によって減少させると、それに伴って最大電流量が減少したが、G-V 関係には変化が認められなかった。以上の結果、PIP₂、PKC とともに KCNQ チャンネルの抑制に関わるが、それぞれ異なる機構でチャンネルを抑制していることが明らかとなった。

自身の膜上発現密度に依存して変化するイオンチャンネルポアの解析

藤原祐一郎, 久保義弘

P2X₂ 受容体は ATP をリガンドとするイオンチャンネル型受容体で、神経系に広く分布し速いシナプス伝達を司る神経伝達素子として機能する。我々は ATP 投与後の定常状態における P2X₂ 受容体の電流を 2 本刺し膜電位固定下で記録し、その整流性のバラツキを解析したところ、「発現密度の上昇にともない整流性が減弱する」ということを発見した。これを手がかりに P2X₂ 受容体の種々

の性質(リガンド感受性やイオン選択性など)を発現レベルとの関連において解析した。それにより「膜上に存在する「開状態」のチャンネルの密度に依存して P2X₂ 受容体はポアの上において構造変化を引き起こし、ポアの性質やリガンド感受性が動的に変化する」という結果を得た。

内向き整流性 K⁺チャンネル (Kir2.1) のポア内面の電荷を帯びたアミノ酸残基の機能的意義

藤原祐一郎, 久保義弘

近年の構造生物学の進歩によって内向き整流性 K⁺チャンネル (Kir) はその他の K⁺チャンネルと異なり、膜貫通領域だけでなく細胞内領域にもポアを持ち、その内壁には正、あるいは負に帯電したアミノ酸残基が複数存在することが明らかとなった。我々は、解かれた Kir3.1 の構造を鋳型としてホモロジーモデリングを Kir2.1 細胞内領域に対して行い、あわせて網羅的に変異体を作成し電気生理学的手法を用いて、Kir2.1 の細胞内ポア表面に存在する

電荷の役割を解析した。それにより、「細胞内に延びた長いポアの表面が負に帯電していることでたくさんの K⁺が溜まり、ブロックがかかる際に静電場を横切る総電荷数が増えるため強い電位依存性ブロックが生じる」という結果を得た。これは Kir に特徴的な負に帯電した長いポアが心筋活動電位 IK₁ 電流の発生に効果的に寄与していることを示唆する。

全反射顕微鏡による ATP 受容体チャネルのリガンド投与における動的構造変化の解析

岩井博正, 久保義弘

ATP 受容体チャネル P2X は, ATP 投与後の時間経過と共に ion selectivity が著しく変化することが知られている。この ATP 投与後の時間経過に伴う動的構造変化の解析を試みた。P2X₂ サブユニットの N もしくは C 末端の細胞内領域に YFP を融合させた蛋白を発現させる cDNA を作成し, 培養細胞に発現させて検討を行った。その結果, C 末端に YFP を融合させたコンストラクトにおいては, 全反射顕微鏡による膜表面の発現蛋白の蛍光強度が,

ATP 投与後の時間経過に伴って減少し, その減少は可逆的なものであるという知見を得た。一方, N 末端に YFP を付加したコンストラクトでは蛍光強度の変化は見られなかった。以上より, ATP 投与後, 時間経時的に C 末端が膜から遠ざかる方向へ動くことが示唆された。今後 CFP と YFP の両方を付加したコンストラクトを作成し FRET 法による詳細な解析を進める計画である。

Protein kinase C による G 蛋白質共役型内向き整流性 K⁺チャネル抑制の機構

長友克広, 久保義弘

Gq 応答後の G 蛋白質共役型内向き整流性 K⁺チャネル (GIRK) の抑制機構を Protein kinase C リン酸化による側面から検討した。今まで指標とされていた GIRK 電流量の変化だけでなく GIRK への Gβγ の結合度合に注目した。Gi 系作用薬添加による GIRK 電流の増加相から結合速度 (τ_{on}) が, また作用薬除去による GIRK 電流の減少相から解離速度 (τ_{off}) が分かる。前もって Gq 刺激 (前 Gq 処理) を行うことにより, Gi 刺激時の GIRK 電流量が減少し,

τ_{on} が遅くなり, τ_{off} が速くなった。PKC の影響を調べるために, PMA による前処理を行ったところ, 前 Gq 処理と同様の結果が得られた。電流量抑制に重要な PKC リン酸化部位を変異させた点変異体では, 各パラメータに対する前 Gq 処理, PMA 処理による効果は見られなかった。以上の結果から, リン酸化により Gβγ 結合サイトに構造変化が生じ, Gβγ が結合しにくく, 外れやすくなったことが示唆された。

分子神経生理研究部門

【概要】

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

脳神経系では他の組織とは異なり多様性が大きい。大きさに言えば, 神経細胞は一つ一つが個性を持っており, そのそれぞれについて発生・分化様式を研究しなければならない程である。また, 均一であると考えられて

きたグリア細胞にも性質の異なる集団が数多く存在することも明らかとなってきた。そのため, 他組織の分化研究とは異なり, 細胞株や脳細胞の分散培養系を用いた研究ではその本質に迫るには限界がある。われわれは *in vitro* で得られた結果を絶えず *in vivo* に戻して解析するだけでなく, 神経系の細胞系譜の解析や移動様式の解析をも精力的に行っている。

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

糖蛋白質糖鎖の解析法を開発し、その生理学的意義について検討している。ヒト正常脳においてはその発現パターンが個人間で驚くほど一定に保たれており、現在考えられているより、もっと重要な役割を果たしている

と思われる。事実各種神経変性疾患においてその発現パターンが変化していた。病態時における糖鎖異常にも着目して研究している。

bHLH 型転写制御因子 Olig3 の機能と細胞系譜の解析

丁雷, 小野勝彦, 渡辺啓介, 田中謙二, 池の中一裕

発生期の脊髄では、背側部と腹側部からの形源分子により、その濃度依存的に特異的な転写因子を発現するようになり、細胞特異的分化が引き起こされる。Olig3 遺伝子は bHLH 型転写調節因子で、脊髄では背側端部より発現が始まる。その機能や細胞系譜を明らかにするため、Olig3-lacZ ノックインマウスを作製し解析を行ってきた。その結果、脊髄背側部に由来する Olig3 細胞は、胎齢 9.5 日までさらに出現して腹側方向への移動を開始し、24 時

間後には脊髄の腹側部まで到達することが示唆された。これらの細胞は、転写因子の発現パターンから介在神経に分化する可能性が示された。これらに加えて、Olig3 系譜細胞が後正中中隔(アストログリアの一種により構成される)を構成することも示された。したがって脊髄背側部の Olig3 系譜細胞が背側部介在神経およびアストログリアに分化することが明らかになった。

時期特異的遺伝子組み換え法を用いた脊髄の Olig2 細胞の系譜解析

政平訓貴, 丁雷, 小野勝彦, 池の中一裕

Olig2 は bHLH 型の転写因子で、その欠損マウスの脊髄では運動ニューロンとオリゴデンドロサイトの両方を欠くことから、その両者の分化誘導に必須であることが明らかにされた。我々は、タモキシフェン誘導型 Cre リコンビナーゼを Olig2 遺伝子座にノックインされたマウスとレポーターマウスと交配させて時期特異的遺伝子組み換えを誘導し、Olig2 系譜細胞を解析した。

その結果、胎生早期の Olig2 細胞からは運動ニューロ

ンおよびオリゴデンドロサイト、アストロサイト、上衣細胞が分化した。一方、胎生中後期のものからはグリア細胞のみ分化した。Olig2 系譜の細胞がアストロサイトや上衣細胞に分化することは、この実験で初めて明らかにされた。今後は、単一 Olig2 細胞が 3 ないし 4 種のすべての細胞種を産生するのか、または Olig2 細胞が、すでにニューロン系譜、グリア系譜がわかれているかという課題について検討していく。

前脳基底部の Olig2 細胞のコリナージックニューロンへの分化

古性美記, 小野勝彦, 政平訓貴, 池の中一裕

Olig2 は発生期のすべての中枢神経領域で発現しているが、脊髄と後脳の一部を除いて、細胞系譜や機能に関してほとんど解析が進んでいない。発生期の終脳領域ではその腹側部で強い Olig2 の発現が見られる。脊髄や後

脳後部では Olig2 細胞の一部がコリナージックニューロン(Ch 細胞)に分化することから、終脳における Olig2 系譜の細胞の Ch 細胞への分化を調べた。その結果、胎生早中期に Olig2 を発現している細胞の中に、前脳基底部

におけるCh細胞に分化するもの見い出された。少なくとも一部のOlig2細胞は前脳基底部分でもコリナージックニューロンに分化することが明らかとなった。Olig2欠損マウスでは、前脳基底部分におけるCh細胞の分化調節転写因

子(Nkx2.1, Lhx8等)の発現に大きな変化が見られないことから、Olig2はこれらの転写因子とは独立もしくは相補的に機能している可能性が考えられる。

X-gal 反応産物の電顕観察法の改良

小野勝彦, 政平訓貴, 丁雷, 池田一裕

X-gal 組織化学染色した組織を電子顕微鏡で観察する場合に、通常の手順でエポキシに包埋すると弱い反応産物は消失することが知られていた。メタクリル酸ヒドロキシプロピルは、従来よりプラスチック皿の上で培養された細胞をエポキシ樹脂に包埋する際に用いられてきた透徹置換剤で、プラスチックを溶かすこと無しに細胞を包埋することができる物である。我々は、これをX-gal染色された組織に透徹置換剤として用いることにより、

X-gal 反応産物をほとんど減弱することなく電顕用に処理することができることを見出した。その結果、X-gal陽性を示す脳室面の細胞がいわゆる幼弱な放射状グリアではなく、成熟した上皮細胞であることを微細形態の特徴から明らかにした。この手法は、40年近く前に培養細胞の観察法として報告されていた方法をそのまま適用したものであるが、X-gal染色後の電子顕微鏡観察に広く有効なものであると思われる。

神経構築形成における長距離ガイダンス分子の役割の解明

渡辺啓介, 小野勝彦, 池田一裕

Netrin-1(Ntn1)は発生期に神経管の腹側正中部(底板)に発現し、軸索を誘因または反発させることで神経回路の形成に深く関わる。我々は、Ntn1欠損マウスを入手し、その詳細な解析を行った。その結果、脊髄背側において一次求心性線維(DRG axon)によって形成される後索が著しく乱れていることを見出した。さらに、この乱れがDRG axonの脊髄後角への投射が野生型より早期におこることによるためであること、Ntn1はDRGからの突起

形成を抑制すること、を明らかにした。この結果から、脊髄後角でみられるNtn1の一過性発現の欠損により線維投射異常が生ずる可能性が強く示唆された。DRG axonの脊髄への投射時期にみられるwaiting periodの分子機構をin vivoで説明できる分子は長い間不明であったが、この結果からNtn1がその候補分子であることが強く示唆された。

モデルマウスを用いた脱髄の病態解明

田中久貴, 馬堅妹, 山田元, 田中謙二, 池田一裕

脱髄モデルマウスであるPLPトランスジェニックマウス(PLPTg)は2ヶ月齢までに一度髄鞘がほぼ正常に形成され、Na⁺チャンネル、K⁺チャンネルはそれぞれ正常にクラスタリングする。5ヶ月齢頃から脱髄が始まり、K⁺チャネ

ルのクラスタリングが崩れはじめ、8ヶ月齢までにNa⁺チャンネルのクラスタリングも崩壊していく。これらの変化と跳躍伝導の相関を調べるために、中枢神経系(後索路、前庭・網様体脊髄路、錐体路)の解析を行ったところ、

野生型に比べPLPTgでは2ヶ月齢においても著明な伝導速度の低下と相対不応期の延長を認めた。PLPTg2ヶ月齢で、paranodeの構造異常が認められた。

跳躍伝導速度の低下が、行動にどのような変化として

現れるか、京都大学 宮川剛博士と共同で行動解析を行った。一般の運動能力、探索行動、不安行動、情動反応は野生型と比べて変化がなかった。唯一の有意な変化はバーンズ迷路で参照記憶の障害が見られたことであった。

脱髄モデルマウスを用いた再生治療研究

東幹人, 等誠司, 池田一裕

神経幹細胞は自己複製能と多分化能を持つ未分化な細胞である。脳の発生期だけでなく、正常の成体の脳においても特定の領域に存在し続け、神経新生を行っている。多発性硬化症を代表とするヒトの脱髄性疾患は、神経軸索を覆って保護するとともに跳躍伝導を可能にしている髄鞘が破壊され、迅速な神経伝達が失われる病態である。我々は上述の脱髄モデルマウスを用いて、脱髄病態における神経幹細胞の動態と、神経幹細胞移植による再ミエリン形成のメカニズムの解明を行っている。この際、

5-bromo-2'-deoxyuridine(BrdU)をもちいて病態脳での内在性神経幹細胞を検出し、また移植では成熟したオリゴデンドロサイトで発現するプロモーター配列の下流にLacZレポーター遺伝子をもつマウスから神経幹細胞を調製し、脱髄モデル動物にこのレポーター遺伝子を持つ神経幹細胞の移植を行っている。この結果、移植した神経幹細胞は脳内に生着し、成熟したオリゴデンドロサイトへの分化が認められた。

成体脳に存在する神経幹細胞の維持のメカニズム解明

東幹人, 等誠司, 池田一裕

発達期の脳のみならず、成体の脳にも神経幹細胞は存在し、脳の一部の領域（海馬や嗅球など）に新生神経細胞を供給していることが近年明らかになった。特に、海馬における神経新生は、記憶や学習といった脳の高次機能と関係する可能性が指摘されている。成体脳の側脳室周囲組織に存在する神経幹細胞は、さまざまな条件（変化に富む飼育環境や運動・学習負荷など）によって変動

することが報告されているが、本グループはストレスに注目して神経幹細胞に対する効果を検討している。強制水泳などのストレス負荷マウスモデルを用い、ストレスが神経幹細胞の自己複製能を低下させる可能性や、抗うつ薬や気分安定薬などの向精神薬が神経幹細胞の減少を回復させる可能性を示唆するデータを得ており、そのメカニズムも含めて今後も精力的に解析していく。

神経幹細胞の発生の分子機構の解明

等誠司, 池田一裕

我々はこれまでに、ES細胞から神経幹細胞を誘導する技術を確立した。脳に存在する神経幹細胞に比べてより高い多分化能を示すことから、神経幹細胞の前段階にある未分化神経幹細胞と考えられる。未分化神経幹細胞は

発生初期の胚の中にも存在する。早期胚のepiblastをleukemia inhibitory factor存在下で培養すると、浮遊細胞塊を形成することで未分化神経幹細胞が検出できる。未分化神経幹細胞はin vitroで神経幹細胞へと分化させる

ことができ、この過程に Notch シグナルの活性化が必須であることも解明した。今後はこの *in vitro* 分化系を利用して、ES 細胞から未分化神経幹細胞、未分化神経幹細胞から神経幹細胞への分化過程で発現変化する遺伝子群を同

定し、その役割の解明を進めていく。また、ES 細胞から神経幹細胞への分化に従って発現が変化する糖鎖構造の同定およびその機能解明を行なう。

アストロサイトの分化、発生様式に関する研究

成瀬雅衣, 小川泰弘, 等誠司, 池田一裕

中枢神経系発生過程において、神経幹細胞はまず神経細胞を産生し、その後グリア細胞を産生する。神経幹細胞/神経前駆細胞からアストロサイト・オリゴデンドロサイトへの運命決定の機構に関しては、不明な点が多い。われわれはプロテアーゼインヒビターであるシスタチン C に着目して研究をおこなってきた。シスタチン C は、アストロサイトの発生・分化を制御する因子として当研究室で独自に単離された因子である。シスタチン C は、胎仔期の神経幹細胞の増殖、生存に促進的に作用する機

能を持つこと、アストロサイトの分化を促進し、オリゴデンドロサイトの分化を抑制する機能を有することが培養系において示された。またオリゴデンドロサイトが発生する時期のマウス胎仔脳においてシスタチン C とオリゴデンドロサイトの発生に関係が深い転写因子 *Olig2* の発現が相補的な部位が観察された。以上の点からシスタチン C が *Olig2* の発現を制御することで神経幹細胞/神経前駆細胞からアストロサイト・オリゴデンドロサイトへの運命決定の一部を担っている可能性が示唆された。

アストロサイト機能不全モデルマウスの開発

田中謙二, 池田一裕

アストロサイト特異的疾患として知られている Alexander 病のモデルマウスを作出し、その表現型を解析することによって、アストロサイトの *in vivo* における機能発現を調べることを目的とした。

Alexander 病の原因遺伝子である変異 GFAP をマウス GFAP プロモーター制御下で発現するトランスジェニックマウスを作出した。海馬などの GFAP プロモーターの活性の高い部位において Rosenthal fiber 類似の GFAP 凝集体を形成し、Alexander 病の病理所見を再現するものと

考えられた。GFAP 凝集体の存在が、アストロサイトのどのような機能を障害しているか調べるために、けいれん薬に対する応答を検討した。カイニン酸投与では、より低い投与量でけいれん誘発が有意に観察され、けいれん後の海馬錐体細胞死も有意に認められた。

このような神経伝達調節の異常が、脳機能発現、すなわち行動や情動反応にどのような変化をもたらすのか検討していく予定である。

脳の発生と糖鎖

石井章寛, 等誠司, 鳥居知宏, Steven E. Pfeiffer, 池田一裕

すべての細胞表面は糖鎖で覆われており、細胞間相互作用やシグナル伝達に深く関わっている。これまでに我々は(1) マウス、ヒト脳内に発現する糖鎖の割合は高

い類似性示すこと、(2) 脳内糖鎖発現パターンは個体発生の各時期で劇的に変化することを明らかとした。マクロアレイ解析システムを開発し、神経変性疾患、細胞の分

化などに伴う糖鎖パターンの変化を遺伝子発現レベルでも理解できるようになった。

本年度は髄鞘における糖鎖の意義を解明するために、髄鞘形成時、形成前後の正常マウスからスクロースグラジエント法を用いて髄鞘を抽出し、糖鎖の発現解析を行った。その結果、全脳に比べて髄鞘に増加あるいは減少

する糖鎖構造がある事が分かり、髄鞘形成と糖鎖発現の関係を明らかにできる。さらに、脳の形成、発達における糖鎖の意義を解明するために、発達期マウス脳における糖鎖発現を解析した。その結果、いくつかの糖鎖の発現量が顕著に変化することが明らかとなった。

3D-HPLC によるマウス大脳皮質発達におけるシアル酸付加 N-結合糖蛋白質の糖鎖構造解析

鳥居知宏, 石井章寛, 等誠司, 池田一裕

これまで当研究室では、大脳皮質に発現している糖鎖の解析を 2D-HPLC で網羅的に行い、主要な糖鎖の骨格を同定してきた。しかし糖鎖の末端に付加し細胞間接着や運動などに関与しているシアル酸の重要性から、さらに詳細な解析方法である 3D-HPLC でシアル酸付加糖鎖の構造解析を行った。このシステムにより酸性糖鎖の解析が可能になり大脳皮質の発達過程において劇的シア

ル酸付加する酸性糖鎖を同定した。その糖鎖は胎生期ではシアル酸が付加されているものの成体の大脳皮質では全く付加されていない。この結果よりその糖鎖や付加されている蛋白質の重要性が示唆され、その蛋白質を同定しその機能解析を行い糖鎖の生理的意義を明らかにする。

細胞内代謝研究部門

【概要】

細胞がエネルギーを消費しながら、刺激に対し適切に応答する細胞シグナリング機構を解明することは生命科学の最終目標の一つであり、本部門もそれを目指している。本部門では、電気生理学と先端バイオイメージングを用いてイオンチャネルや細胞内シグナル分子の動態を測定し、細胞応答に至るシグナルネットワークの時空間

統御機構の解明を行う。これまで受精時の Ca^{2+} 増加や Ca^{2+} 振動機構の研究を通して受精機構の研究、卵成熟機構の研究をおこなってきた。特にマウス卵母細胞の自発的 Ca^{2+} 振動機構、内分泌攪乱物質（エストロゲン）の卵母細胞への影響について調べた。さらに、機械刺激に対する細胞シグナリング機構の研究を展開している。

マウス未成熟卵母細胞自発的カルシウム振動に対するエストロゲンおよびビスフェノール A の抑制効果

毛利達磨

吉田 繁（近畿大学・理工学部・生命科学科）

哺乳類の成熟卵は受精時にカルシウム振動をすることが知られているが未成熟卵母細胞（以下単に卵母細胞と呼ぶ）も自発的カルシウム振動を示していることが報告された。しかしそのカルシウム振動の機構については不明である。卵母細胞は受精能を獲得するために様々なホルモンの制御を受けて卵巣内で成熟する。卵母細胞の成

熟や卵胞の発達は卵胞刺激ホルモンや黄体形成ホルモンの制御によりなされるが、詳しい機構についてはまだ不明な点が多い。例えば、エストロゲンの濃度の増加は排卵の引き金である黄体形成ホルモンの一過性分泌を引き起こすが、どのように卵母細胞の発達に関係しているのかははっきりしていない。従って、エストロゲン類似内分

泌かく乱物質の卵母細胞に対する作用を調べることは生殖毒性学の研究としてだけでなく基礎的な生殖生理学にとっても重要な課題である。本研究でエストロゲン以外

に内分泌攪乱物質ビスフェノールAのカルシウム振動に対する抑制効果を確認した。

伸展刺激に対する細胞移動の研究

毛利 達磨
曾我部 正博

細胞の移動は損傷した組織の修復や血管の新生のためだけでなくあらゆる細胞が組織の形態をなすために普遍的な反応である。多細胞生物の組織は、細胞と細胞外マトリックス(コラーゲンなどの線維状タンパク質, 基質)によってできており, それらの接着はインテグリン(接着蛋白質)を中心に細胞膜を貫き細胞外マトリックスと結合して細胞接着斑を形成している。細胞移動(運動)は細胞の連続的な変形なので, 細胞の形やその運動を考える時, 接着斑やストレス線維, 微小管などの細胞骨格タンパク質の分布を知ることは非常に重要である。移動中の細胞ではストレス線維の配向や接着斑の分布変更が起こり, 移動の先端部の薄く延びたラメリポディアでは絶えず膜がラフリングの形態を示している。基質上に

臍帯静脈血管内皮細胞を2次的に培養し, 傷をつけてその治癒過程, 即ち細胞の移動過程を研究した。創傷部位を含む組織全体を創傷の方向と直角に機械的持続的に伸展しておく, 細胞の移動は伸展しない場合に比べて著しく促進することがタイムラプス記録の解析から認められた。この機構については不明であるが, 細胞には外界の力の場を常にモニターするセンサーがあり, そのシグナルを統合して反応する仕組みがあると考えられる(仮説)。この仮説に基づき, 持続的伸展刺激に対する細胞移動時の接着斑と細胞骨格の動態の解析から機構解明を目指している。そのため, 細胞接着斑, 細胞内カルシウム, および細胞骨格動態のライブイメージングを始めた。

機械的力に対する細胞骨格と接着構造の応答の分子機構

平田 宏聡
曾我部 正博

接着性細胞は周囲の力学環境に応じて細胞骨格や接着構造をリモデリングする。例えば, 内皮細胞は一軸周期伸展刺激に対して細胞が伸展軸に垂直に伸張する応答を示すが, この際, 細胞内のストレスファイバーとそれにリンクした接着斑は伸展軸に垂直になるように分布を変える。しかし力学環境の感知機構が不明であり, 力学環境変化に対する細胞骨格・接着構造の応答の分子機構は謎のままである。我々はこれまでに, 細胞膜に穴をあ

け細胞質中の可溶成分を除いたセミインタクト細胞を用いて, アクチンフィラメントとミオシンからなる網目構造が, そこにかかる張力に応じてストレスファイバー様の構造に再編成されることを明らかにした。現在は, 細胞接着を担うインテグリン分子及びその結合タンパク質に着目して, 機械的力を感知する分子機構について明らかにしようと研究を進めている。

細胞器官研究系

生体膜研究部門

【概要】

当部門では、開口放出とシナプス機能を2光子顕微鏡法を活用し、更に分子生物学的方法論、パッチクランプ、ケイジド試薬や電子顕微鏡を組み合わせ可視化定量化する研究を推進している。本年度は、脳スライス標本内の中枢神経細胞において、ケイジドグルタミン酸の光活性化法により、単一シナプスレベルで刺激を与え、形態可

塑性の誘発に成功した。この可塑性には長期増強という機能可塑性が随伴していることが明らかとなった。また、2光子励起法による開口放出測定とGFP標識蛋白質の蛍光観察を組み合わせた結果、膵臓ランゲルハンス島において、SNARE分子が膵臓線細胞においてはアクチンが開口放出に伴い動く様子を初めて捉えることに成功した。

2光子励起法による開口放出の研究

河西 春郎, 根本 知己, 高橋 倫子, 岸本 拓也, 兒島 辰哉, 大嶋 章裕, 劉 婷婷, 畠山 裕康

2光子励起法による定量的開口放出測定に、GFP標識蛋白質を用いた同時染色により、開口放出関連蛋白質の動態を明らかにする研究を推進した。膵臓ランゲルハンス島標本においては、逐次開口放出現象が稀に見られることを見出した。これを利用して、逐次開口放出と開口放出関連蛋白質SNAP25の関連を調べた結果、小胞が逐次開

口放出を誘発した場合にのみSNAP25が側方拡散により顆粒膜に入ることを可視化するのに成功した。これは、開口放出に伴うSNAREの動きを捉えた初めての研究となった。また、膵臓外分泌腺標本において開口放出に伴うアクチン細胞骨格の新しい再編成機構を解明し、急性膵炎の発症に関係する可能性を明らかにした。

海馬錐体細胞スパインの研究

河西 春郎, 松崎 政紀, 早川 泰之, 野口 潤, 安松 信明, 本蔵直樹

学習刺激に伴うシナプスの形態可塑性については多くの報告があったが、どのような形態変化がシナプスの機能変化を伴うかは不明だった。我々は、2光子励起法による単一スパインへのグルタミン酸による反復刺激と脱分極の同時投与(2光子ペアリング)により、刺激したスパイン選択的に頭部が速く増大し、その後長期間安定化する事実と、その際グルタミン酸感受性の増大を伴うことを見出した。この研究は、単一シナプスレベルで長期増強

(LTP)の誘発に成功した初めての研究であり、長期増強の基盤となる形態変化があること、そしてシナプスの独立可変性を初めて立証したものである。面白いことに、大きいスパインの増大は長期化せず、大きいスパインは安定であり記憶痕跡として働く可能性が示唆された。一方、小さなスパインは長期可塑性の好発部位で不安定であり、学習過程により特化していると考えられる。

機能協関研究部門

【概要】

細胞機能のすべては、細胞膜におけるチャネル(イオンチャネル, 水チャネル)やトランスポータ(キャリア, ポンプ)の働きによって担われ、支えられている。機能協関研究部門では、容積調節や吸収・分泌機能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、これらの機能分子の働きとして細胞生理学的に解明し、それらの異常と疾病や細胞死との関係についても明らかにしようとしている。主たる研究課題は次の通りである。

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

②「アポトーシス、ネクロシス及び虚血性細胞死の誘導メカニズム」: 容積調節能の破綻は細胞死(アポトーシスやネクロシス)にも深く関与する。これらの細胞死誘導メカニズムを分子レベルで解明し、その破綻防御の方策を探求する。特に、脳神経細胞や心筋細胞の虚血性細胞死の誘導メカニズムを生理学的に解明する。

③「イオンチャネルの多機能性のメカニズム」: 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、他のチャネルやトランスポータの制御にも関与する多機能性タンパク質である。特に、CFTRの他チャネル制御メカニズムやATPチャネルの容積センサーメカニズムやNaClセンサーメカニズムについての研究を行う。

④「消化管上皮細胞の分泌・吸収メカニズム」についても研究する。

アポトーシス誘導性アニオンチャネル活性化における活性酸素種の役割

清水貴浩, 沼田朋大, 岡田泰伸

細胞死と細胞容積調節機構は密接に関連している。アポトーシス初期に観測される細胞縮小化(Apoptotic Volume Decrease: AVD)は、細胞がアポトーシス死するためのきわめて重要な現象であり、主に K^+ と Cl^- コンダクタンスの増加によるイオン流出の結果として生じる。しかしながら、どの種のアニオンチャネルが関与しているのかについてはほとんど知られていなかった。今回我々は、ミトコンドリア系およびデスレセプター系アポトーシス誘導剤が容積感受性外向き整流性 (Volume-Sensitive

Outward Rectifying: VSOR)アニオンチャネルの活性化を生じたことから、VSORチャネルの異常活性化がこのAVDの原因であることを明らかにした。また、ミトコンドリア仲介性アポトーシス誘導の場合のVSORアニオンチャネル活性化シグナルは活性酸素種(ROS)であり、このROSの除去や産生阻害によりAVD及びアポトーシス死が抑制されることが明らかとなった。本研究結果は次の論文に発表された: Shimizu, Numata & Okada 2004 PNAS 101:6770-6773.

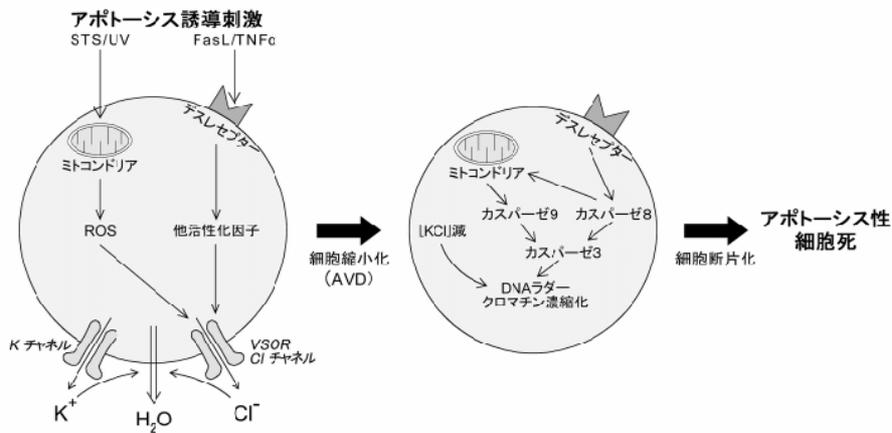


図1：アポトーシス誘導メカニズムにおけるアニオンチャネル及びROSの役割

心筋細胞の容積感受性クロライドチャネルの分子実体はCIC-3ではない

Gong weiqin, 徐 洪涛, 清水貴浩, 岡田泰伸

容積感受性外向整流性 Cl⁻チャネル (VSOR) は心筋細胞を含めて殆んどすべての動物細胞に発現し、浸透圧性膨張後の容積調節や細胞分裂やアポトーシス死にも関与する重要なチャネルであることが知られているが、その分子実体の同定は未だ行われていない。VSOR の分子実体候補としてこれまで3種の蛋白がいずれも Nature 誌で提唱された。即ち、P 糖蛋白 (Valverde et al. 1992 Nature), pI_{Cl} (Paulmichl et al. 1992 Nature), CIC-3 (Duan et al. 1997 Nature) である。前2者ではないことは、本研究の出発点です。すでに私達や Nilius のグループを中心にして明らかにされていた (see Okada 1997 Am J Physiol)。その後、広く信じられるようになったのが CIC-3 説であるが、私達は同定基準のすべてを満たさないで、未だ結論には留保すべきであると主張してきた (Okada et al. 1998 J Gen Physiol)。その後、CIC-3 ノックアウトマウスを用いた研究によって肝細胞や膵腺細胞の VSOR 活性に影響の見られないことが Jentsch のグループによって報告され

(Stobrawa et al. 2001 Neuron), そもそも CIC-3 説の出所であった心筋においてのみ CIC-3 が VSOR である可能性が残っている状況となった。そこで、私達は東医歯大の佐々木・内田のグループとの共同研究によって心筋細胞における VSOR は CIC-3 によって担われるかどうかを、CIC-3 ノックアウトマウスを用いて検討した。その結果、CIC-3 ノックアウトマウスから単離された心室筋細胞 (-/-) も、正常の Wild type マウスから単離された心室筋細胞 (+/+) も、共に浸透圧性細胞膨張によって活性化される Cl⁻チャネル電流を示し、それらは全く同一の電気生理学的性質 (例えば、電圧依存性: 図 2A) と薬理的性質 (例えば、キナーゼ活性化剤 PMA による活性亢進: 図 2B) を示すことが明らかになった。それゆえ、CIC-3 は心筋細胞においても VSOR の分子実体ではないことが確定した。これらの結果は次の論文に報告された: Gong, Xu, Shimizu, Morishima, Tanabe, Tachibe, Uchida, Sasaki & Okada 2004 Cell Physiol Biochem 14:213-224.

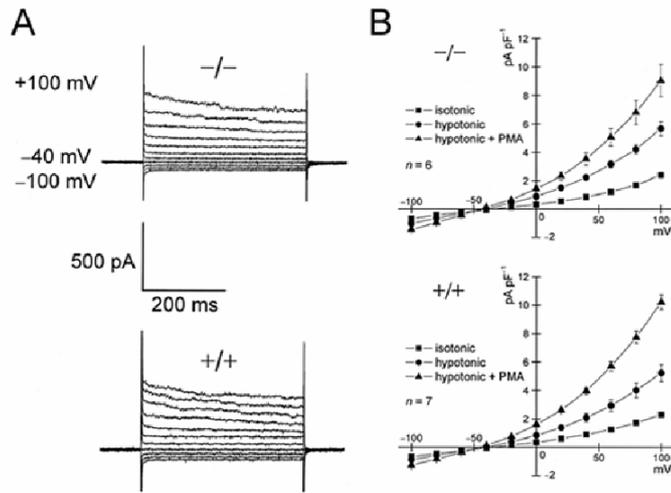


図2：正常マウス(+ / +)及びCIC-3ノックアウトマウス(- / -)の心筋細胞における細胞膨張で活性化されるCl⁻チャンネル電流の全細胞記録A、電圧ステップパルスに対する電流応答B、電流電圧特性とPMA効果

マキシアニオンチャンネルと容積感受性クロライドチャンネルのポアサイズの測定

サビロブ・ラブシャン, 岡田泰伸

ストレス時に細胞内から放出されるATPは細胞間シグナル伝達に重要な役割を果たす。その放出機序はエキソサイトーシスによるものとそうでないものがある。後者の通路としてマキシアニオンチャンネルが多くの場合に関与することを私達は提唱してきた(Sabirov et al. 2001 J Gen Physiol; Sabirov & Okada 2004 Jpn J Physiol)。今回、非電解質有機分子(PEGなど)のポア内侵入によるシングルチャンネルコンダクタンスの減少(図3)を指標にポアサイズを測定したところ、このチャンネルのポアは半径約1.3 nmでありATPのサイズ(半径約0.6 nm)より充分に大きいことが明らかとなった(図4)。これらの結果は次の論

文に報告された：Sabirov & Okada 2004 Biophys J 87:1672-1685。

一方、容積感受性外向整流性Cl⁻チャンネル(VSOR)は、細胞容積の調節のみならず、細胞からのATPの放出にも関与する可能性が以前指摘された(Hisadome et al. 2002 J Gen Physiol)。そこでVSORがATPを通すに充分な大きさのポアを持つかどうかについて同様の方法で調べたところ、半径0.63 nmであることが明らかとなり、ATPのサイズとほぼ同じ大きさであることが判明した。これらの結果は次の論文に報告された：Ternovsky, Okada & Sabirov 2004 FEBS Lett 576:433-436。

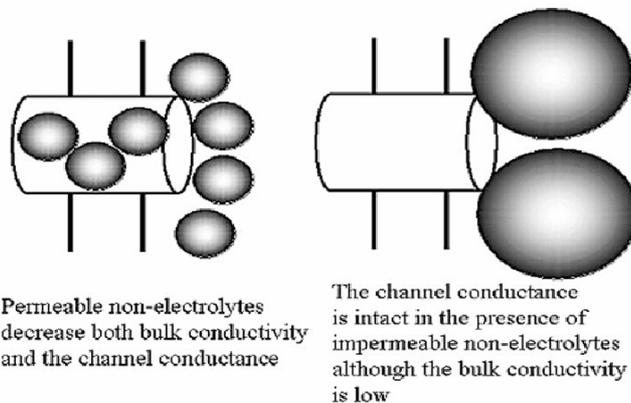


図3：非電解質分配法によるチャンネルポアサイズ測定原理

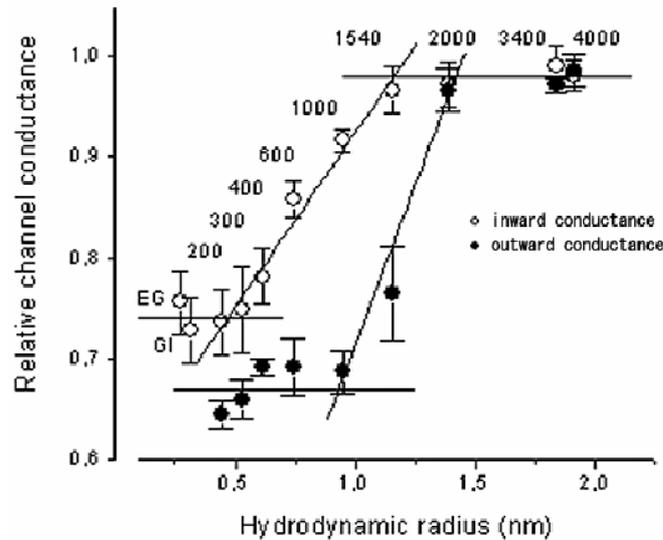


図4：種々の大きさのポリエチレングルコース(PEG)を膜の内側又は外側から与えたときのマキシアニオンチャネルの単一チャネルコンダクタンスの変化

大腸クリプトにおけるイオン分泌時の細胞容積調節機構の解明

眞鍋健一，清水貴浩，森島 繁，岡田泰伸

消化管における粘液分泌は消化物の流動性を保つ役割を果たしており，宿主防御機構の一端も担っている。これまでに大腸における Cl^- 分泌はクリプト(陰窩)で行われ，分泌時にはクリプト全体の収縮(secretory volume decrease: SVD)が生じる事が知られていた。しかしながら，クリプト内部の個々の細胞レベルでの細胞容積調節機構については，ほとんど知られていなかった。我々は二光子レーザー顕微鏡システムを用いることにより，モルモット大腸から単離したクリプト内部の細胞を可視化することに成功し，コリン様刺激によってクリプト基底部の細胞のみが収縮する様子を捉えた。またコリン刺激

時のクリプト細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は，同様に基底部に於いて著しかった。したがって，大腸クリプトにおいては，基底部だけで細胞内 Ca^{2+} 濃度依存的に Cl^- が分泌され，分泌性収縮が生じることが明らかとなった。また我々は，そのクリプト細胞が分泌性収縮後， $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ コトランスポーター (NKCC) 活性を介した調節性容積増加(regulatory volume increase: RVI)機構によって細胞容積を回復できることも明らかにした。本研究結果は次の論文に発表された：Manabe, Shimizu, Morishima & Okada 2004 Pflugers Arch Eur J Physiol 448:596-604.

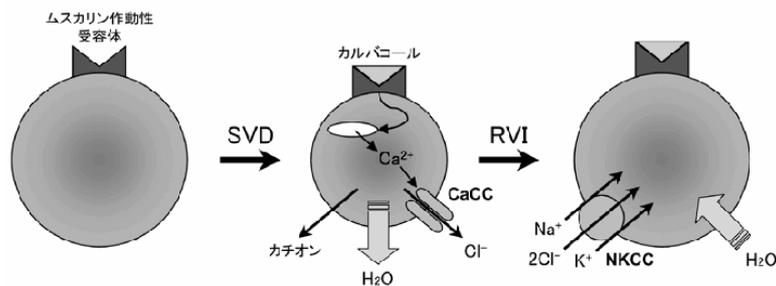


図5：大腸における分泌性細胞容積調節時のイオンメカニズム (CaCC : Ca^{2+} 依存性 Cl^- チャンネル)

生体情報研究系

感覚認知情報研究部門

【概要】

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

性や、異なる種類の刺激への反応の分布を調べている。具体的な課題として(1)初期視覚野における輪郭とその折れ曲がりの表現, (2)大脳皮質高次視覚野における色情報の表現, (3)色情報の変換過程, (4)大脳皮質における情報の時間的蓄積過程, (5)盲点における線分の補完知覚に対応したサル 1 次視覚野神経活動, などに関する研究を行った。

初期視覚系における輪郭線の折れ曲がりの表現

伊藤 南

我々は、輪郭線の折れ曲がりに対して選択的な反応を示す細胞が第二次視覚野に多数存在することを見いだした。そうした選択性が形成されるメカニズムを探るために、本年度は折れ曲がり刺激に対する反応と刺激中の半直線成分を単独で提示した際の反応とを比較検討した。各半直線成分に対する反応の線形モデルに方位選択的な抑制性入力と整流作用による非線形性の要素を導入したところ、折れ曲がり刺激に対する反応選択性がよく説

明された。推定された抑制性反応には最適な半直線成分と同一方向に抑制をかけるものと、異なる方向に抑制をかけるものがみられた。後者は折れ曲り刺激に対するチューニングを鋭くすると考えられる。以上の結果は、第二次視覚野における輪郭線の折れ曲がりの検出が、個々の半直線成分に対する興奮性ないしは抑制性の反応の線形和に強く依存することを示唆する。

下側頭皮質における色選択ニューロンの分布

小松英彦, 安田正治, 鯉田孝和

下側頭皮質は破壊によって色弁別が重篤に障害されることが知られており、この部位で色情報がどのように分布しているかを知ることは、そこでの色処理を理解する上で重要な問題である。このために注視課題を行っているサルの下側頭皮質からニューロン活動の記録を行った。電極は垂直に刺入し、実験前に撮影した MRI 画像と、各電極の刺入時に撮影した X 線画像を比較することにより、記録部位の同定を試みた。刺激には CIE-xy 色度図上

でカラーディスプレイの 3 原色 (RGB) が囲む三角形を均等に分割する色を用いた。それぞれの輝度は一定にし、ディスプレイの灰色背景より明るい刺激セットと暗い刺激セットの両方を用いた。刺激の形は異なる特徴をもつ 7 個または 11 個の単純な幾何学図形を用いた。実験の結果、強い色選択性を持ちあまり形選択性を持たないニューロンが前中側頭溝 (AMTS) のやや外側付近の TE 野に集中して存在することが分かった。

色カテゴリー識別と色弁別時の下側頭皮質ニューロン活動

鯉田孝和, 小松英彦

弁別とカテゴリー化は視知覚の二つの異なる側面である。これは色知覚においても顕著に見られる。色知覚におけるこれらの二つの側面が下側頭皮質の色選択ニューロンの活動にどのような影響を及ぼすかを調べるために、色弁別課題と色カテゴリー課題を訓練したサル TE 野から単一ニューロン活動の記録を行った。刺激は CIExy 色度図上でカラーディスプレイの R(赤)と G(緑)の間を均等に分割する等輝度の 11 色を用いた。いずれの

課題でも最初に一つの刺激(テスト刺激)が呈示され、弁別課題ではその後呈示される二つの色刺激からテスト刺激と同じものを選び、カテゴリー課題ではテスト刺激が赤か緑かによって NOGO 反応または GO 反応を選択することが要求された。テスト刺激に対するニューロンの応答に対して、さまざまな解析を行ったが、カテゴリー課題の時に選択性がカテゴリーを反映するように変化する傾向は認められなかった。

外側膝状体における色表現

郷田直一, 小松英彦

網膜の錐体によって受容された色情報は、V1 野、V4 野、TEO 野、TE 野を含む大脳視覚領野において変換される。これら各領野における色情報の変換様式の理解を目的とし、本年度においては、網膜から大脳へ至る経路に位置する外側膝状体(LGN)における色表現モデルの構築を行った。様々な色に対する LGN ニューロンの活動を解析し、これらニューロン集団がつくる特徴表現空間(色空間)を求めた。この色空間上での距離は、ニューロ

ン集団応答の差に対応する。求められた LGN の色空間は、錐体レベルにおける色空間と比較して、紫領域の表現が圧縮されており、錐体応答が非線形的に変換されていることを示すものであった。さらに、LGN の色空間と自然画像データベースから得られた自然界の色分布との関係を解析した結果、LGN において、入力分布に最適化された色表現がされていることが示唆された。

V4 野と前頭眼野ニューロンにおける活動履歴の保存性

小川 正

大脳皮質がもつ情報の時間的保持・蓄積機能を調べるため、視覚探索課題における注視期間中の V4 野と前頭眼野(FEF)のニューロン活動を解析した。各ニューロンにおいて情報の時間的保持・蓄積機能の程度を推定するため、注視期間中の前半部で得られた活動状態と後半部のそれを各試行ごとに求め、2 つの期間におけるニューロン活動レベルの相関性を定量化した。その結果、FEF 野の一部のニューロン群は高い相関値を示し、注視期間

中の活動レベルが時間的に保持されていることを示唆した。しかしながら、V4 野においてはそのような高い相関値を示すニューロン群は見出せなかった。2 つの領野における差異は、感覚信号を実時間で表現する必要のある V4 野(short-time storage)と、感覚信号を時間的に蓄積して行動指令を出力しなければならない FEF 野(long-time storage)の機能的な役割の違いを反映していると考えられる。

盲点における線分の補完知覚に対応したサル1次視覚野神経活動

松本正幸, 小松英彦

盲点で補完知覚が生じる時、サル大脳皮質一次視覚野(V1)で盲点に対応する視野を表現している領域(盲点表現領域)のニューロンが活動変化を示すことを既に見出ししている。このような補完に伴う活動変化がどのような回路により生じているかを知るために、反応の時間経過と潜時の解析を行った。盲点を突き抜ける長い線分に対する応答を左右眼で比較すると、盲点側の眼で潜時

が12ms長く、これは皮質上では58mm/sという極めて遅い伝導速度に対応することがわかった。一方、盲点側の眼において短い線分と長い線分に対する潜時には差はなく、補完に対応する活動変化が早い経路で生じていることが分かった。V1内の水平結合とV2を介するフィードフォワード、フィードバック経路の両方を使うと、これらの時間特性を矛盾なく説明できることがわかった。

神経シグナル研究部門

【概要】

部門名と研究内容が不一致とこれまで幾度となく指摘されてきたため、2004年4月、液性情報より部門名を変更し神経シグナルとした。また4月末に明大寺地区より山手地区3号館9階に移転した。従来は分子生物学と細胞レベルの電気生理学を中心とした研究を進めてきたが、ここ約2年間にスタッフのほとんど全員が入れ替わったのを機会に、生体システムにおける分子の役割という観

点から考え、局所神経回路機能の研究を主な研究対象とすることとした。新たに加わったスタッフの研究は順調に進捗している。しかしながら生理研着任後に新しい研究プロジェクトを開始しているため、論文として発表されるまでには至らず、外面的な研究業績は不十分であった。

神経伝達物質のシナプス外拡散によって仲介される異種シナプス間相互作用

佐竹伸一郎, 井本敬二

下オリーブ核から小脳への登上線維を反復刺激すると、籠細胞-プルキンエ細胞間のGABA作動性シナプス伝達が抑制される(即ち、脱抑制)。この異種シナプス抑制は、籠細胞終末のカルシウム非透過性AMPA型グルタミン酸受容体で仲介されるシナプス前抑制の様式で起こることを示唆する結果を得た。脳スライス-パッチクランプ法を用いて、登上線維の伝達物質が籠細胞のAMPA受容体を活性化する過程を検討した。低親和性-グルタミン酸受容体競合阻害薬 γ -DGGは、登上線維-プルキンエ細胞シナプスの興奮性シナプス後電流よりも、登上線維刺激に伴う脱抑制を強く阻害した。低親和性拮抗薬は、高濃度のグルタミン酸で誘発されるシナプス伝達には阻害作用

が弱く、拡散のように低濃度グルタミン酸で仲介される過程に対して強い阻害作用を示したと考えた。また、dextranで灌流液の粘性を高めて物質拡散を阻害すると、脱抑制も有意に減弱した。以上の結果から、登上線維の興奮性伝達物質は、放出部位から拡散して、籠細胞終末のAMPA受容体を活性化すると結論した。一方、グルタミン酸回収タンパク質阻害薬TBOAは、脱抑制を顕著に増強した。登上線維と籠細胞の間で見られる異種シナプス抑制はグルタミン酸回収機構によって常に阻害されているものの、登上線維から大量に放出された伝達物質は回収機構の能力を超えて籠細胞のAMPA受容体を活性化できることが示唆された。

視床-大脳皮質神経回路の構造：単一シナプスレベルでの構成

井上 剛, 井本 敬二

感覚情報は視床を介して、大脳皮質へと転送される。しかし、視床-大脳皮質の神経回路がどのように構成されているのか、単一シナプスレベルでの構成は明らかではない。その解明を目指し、我々はマウス体性感覚野における視床-大脳皮質連結スライス標本を作製し、大脳皮質4層神経細胞からトリプルパッチクランプ記録を行い、その条件下においてさらに単一視床神経細胞刺激を複数の視床細胞に適用することにより、多対多の視床-

大脳皮質神経結合を単一シナプスレベルで調べた。その結果、シナプス結合という構造的側面から見ると、視床から大脳皮質興奮性細胞 (regular spiking [RS] cell) と抑制性細胞 (fast spiking [FS] cell) への視床-大脳皮質連結パターンには違いはほとんど観察されなかった。しかし一方でシナプス強度も考慮した機能的側面から見ると、その視床-大脳皮質連結パターンには RS 細胞と FS 細胞間で大きな違いが観察されるようになった。

不活性型 Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II α 遺伝子改変マウスを用いた脳機能解析

山肩葉子, 井本敬二, 畑中伸彦

八木 健 (大阪大学), 小幡邦彦 (理化学研究所), 柳川右千夫 (群馬大学)

中枢神経系に豊富に存在し、神経活動の制御やシナプス可塑性に深く関与する代表的な蛋白質リン酸化酵素、 Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMKII) を不活性型に置換したノックイン型遺伝子改変マウス CaMKII α (Lys42Arg) を作成した。このマウス脳では、CaMKII α のプロテインキナーゼ活性のみが選択的に消失するが、蛋白としての発現は維持されていた。出生率は正常で、繁殖能力にも問題がなかったが、死亡

率が高く、内外の侵襲に対する脆弱性が示唆された。一部のマウスに自然発症のけいれんが認められ、また、けいれん惹起物質に対する過剰反応が認められた。さらに、情動行動の調節をつかさどる大脳辺縁系の一部で、神経活動の低下が認められた。これらの結果より、神経活動を正常状態に維持するためには、CaMKII α のプロテインキナーゼ活性が重要な役割を果たすことが示唆された。

視床-大脳皮質ネットワークにおけるてんかん発生に関する研究

佐々木 幸恵, 井本 敬二

てんかんは比較的罹患率の高い神経疾患であり、薬物によるコントロールが進んだ現在も十分なコントロールが出来ない患者が数多く存在し、またてんかんが薬物によりコントロールされても、眠気・ふらつきなど薬剤の副作用に悩まされている患者も多い疾患です。

てんかんの一種である欠神発作は、特徴的な脳波が大脳皮質全体に同期して認められる事から、その原因として、大脳皮質と視床を結ぶ神経ネットワークの異常によ

り生じると考えられています。しかし、その発症メカニズムは現在のところわかっていません。

本研究は、自然発症てんかんモデルマウスを用い、視床-大脳皮質シナプス伝達特性をスライスパッチクランプ法により検討を行いました。その結果、視床から大脳皮質への入力層である大脳皮質4層において抑制性シナプス電流が、欠神発作発症に伴い減少している事を明らかにしました。

視床興奮性シナプスのシナプス特性の解析

宮田麻理子, 井本敬二

感覚情報は末梢から情報は内側毛帯シナプスを介して VB 核投射細胞に入力する一方、皮質からは大量のフィードバック投射(皮質視床シナプス)を受ける。感覚情報は内側毛帯入力と皮質視床シナプス入力との統合により処理され大脳皮質に投射されると考えられる。しかし、これらシナプスの特性を詳細に解析した報告はなく、不明な点が多い。マウス視床 VB 細胞において、皮質視床シナプスの EPSCs に、NMDA 受容体、AMPA 受容体に

加えてカイニン酸受容体成分が存在することを見出した。一方、内側毛帯シナプス EPSC には、カイニン酸受容体成分は存在しなかった。また、皮質視床シナプスには NMDA 受容体を介する EPSC が non-NMDA 受容体を介するものより、2 倍ほど大きい一方で、内側毛帯ではその逆であった。これらのグルタミン酸受容体構成の違いが VB 細胞の発火の時間的特性に深く関わっていることを見出した。

高次神経機構研究部門

【概要】

脳神経系は遺伝情報をもとにつくられ生きる環境の中で発達する。脳神経系は多様化した細胞種からなり、各細胞が多数のシナプス結合を作ることにより、莫大に多様化した神経回路を構成し、複雑性を保ちながら高度に組織化されている。本研究部門では、この神経回路の多様化と組織化をもたらす遺伝情報を探求することにより、記憶と情動と意識、ヒト精神神経疾患の分子的基盤を明らかにすることを目的とし、脳構造形成および神経回路網形成に関わる遺伝子を欠損させたマウスの作製を行ってきた。以前の研究で、Fyn 遺伝子ノックアウトマウスを作製・解析した結果、同遺伝子が神経回路形成、シナプス機能制御、脳機能制御に重要な役割を果たしていることを見いだした。そこで Fyn との結合活性を指標に新

規分子をスクリーニングしたところ、新規カドヘリン様細胞接着分子 CNR (Cadherin-related neuronal receptor)/プロトカドヘリン α を単離する事が出来た。また他のグループの研究で、CNR 遺伝子クラスターとよく似たゲノム構造と相同性を示す近縁分子、プロトカドヘリン β 、 γ ファミリーが見いだされ、これらは CNR とともにさらに大きな遺伝子クラスター構造を取っていることが明らかになった。これまでの研究結果から同分子群はシナプスでの選択的細胞接着と多様化機構を有し、神経回路網形成に重要な役割を演じていることが示唆されている。そこでこれらの分子機能の解析により、神経細胞の多様化機構の分子メカニズムが明らかになるのではないかと考え、現在は同遺伝子欠損マウスの作製を中心に進めている。

CNR/プロトカドヘリン α 遺伝子の機能解析

平林敬浩, 八木 健

本新規カドヘリン様接着分子 CNR/プロトカドヘリン α は染色体上にタンデムに並んだ 13 個の変領域エクソンと 3 つのエクソンからなる共通領域からなるクラスター構造を有し、各 CNR ファミリーはそれぞれひとつの変領域エクソンと共通領域から転写されていることが明らかになっている。この転写様式は T 細胞受容体やイ

ムノグロブリン遺伝子群と類似しており、このことは同分子がシナプスでの選択的細胞接着と多様化機構の両特徴を兼ね備えた分子であり、中枢神経系における多様化と組織化をもたらす分子であることを示唆している。本研究では CNR 分子の多様性の意義を解明することを目的とし、同遺伝子ファミリーのうち 1 分子種のみを発現

する遺伝子ターゲティングマウスの作製を試みている。作製後は、野生型マウスおよびすでに作製されている CNR ファミリー全遺伝子欠損マウスと表現型の差違を

解析することで同分子の機能が明らかになると考えている。

プロトカドヘリン α 発現制御領域候補欠損マウスの作製

金子涼輔, 八木 健

マウスプロトカドヘリンは α 型 14 種類, β 型 22 種類, γ 型 22 種類が 18 番染色体にクラスター構造を取って存在している。 α 型においてはアレル特異的な発現制御がなされている可能性が示されており, その発現制御メカニズムに興味を持たれる。そこで, α 型プロトカドヘリンの発現制御メカニズムを明らかにすることを目的として研究を行った。まず各種生物のプロトカドヘリン領域

ゲノム配列データを異種間での相同性を指標にして精査した。その結果, α 型プロトカドヘリン領域上流の非翻訳領域に異種間で高い相同性を示す領域を発見した。次いで, この領域のプロトカドヘリン発現制御における役割を解析するために欠損マウスの作製を行った。ターゲティングベクターを作製し, ES 細胞へ導入したところ相同組換え ES 細胞が取得された。

統合生理研究系

感覚運動調節研究部門

【概要】

2004年度は6名の大学院生(総合研究大学院大学3名, 他大学大学院からの国内留学3名)と1名の博士研究員(和坂利昭君)が新たに仲間に加わった。医学(神経内科, 精神科, 小児科など), 歯学, 工学, 心理学, 言語学, スポーツ科学など多様な分野の研究者が, 体性感覚, 痛覚, 視覚, 聴覚, 高次脳機能(言語等)など広範囲の領域を研究しているのが本研究室の特長であり, 各研究者が自分の一番やりたいテーマを研究している。こういう場合, ややもすると研究室がバラバラになってしまう可能性もあるが, 皆互いに協力し合い情報を提供しあっており, 教室の研究は各々順調に行われている。脳波と脳磁図を用いた研究が本研究室のメインテーマだが, 最近はその

に加えて機能的磁気共鳴画像(fMRI)及び経頭蓋磁気刺激(TMS)を用いた研究も行い成果をあげている。

計画班員を務めていた特定領域「先端脳」(テーマ: 痛覚認知研究)が2004年度に終了した。しかし, 2004年度から新たに, 日本宇宙フォーラムから3年間の研究費をいただくことになり(テーマ: 様々な環境における脳活動の研究), また科学技術振興機構の「社会技術研究: 脳科学と教育」に採択され(テーマ: 顔認知機構), 研究代表者として3年間勤めることになった。環境省, 厚生労働省の班研究も続けて行っており, 研究員一同, より一層の努力を続けて質の高い研究を目指していきたいと思っている。

侵害刺激に伴う皮質活動の睡眠中の変化

王曉宏, 乾幸二, 秋云海, 柿木隆介

痛みは侵害刺激により誘発される不快な感覚的, 情動的体験であり, 侵害受容系の活性化の結果生じる。本研究では覚醒時と睡眠時で皮質反応を比較することにより, 認知に関わる成分を同定することを試みた。

10名の健康成人男性を対象に実験を行った。左手背への表皮内電気刺激に対する皮質反応を脳磁計を用いて記録し, コントロールとした。刺激の数をカウントさせる注意条件下と睡眠条件下で記録を同様に行い, 比較した。

コントロール条件では第一次および第二次体性感覚野,

島, 内側部側頭葉および前部帯状回に活動が認められた。注意条件下では全ての活動が有意に増強し, 睡眠中には有意に減弱した。この結果はこれらの活動が全て認知に関わることを示す。サルを用いた研究では視床 VPM 核の侵害受容細胞が注意により活動を増強させること, 視床 VPL 核の侵害受容細胞が覚醒レベルに影響を受けることが示されており, 我々が観察した変化が, 視床レベルで生じた可能性を示唆する。

(Wang et al., Neuroscience 2004)

ヒト第一次体性感覚野での顔の再現

Nguyen BT, Tran TD, 乾幸二, 宝珠山稔, 柿木隆介

顔面皮膚の第一次体性感覚野(SI)での再現を脳磁図を用いて検討した。左顔面皮膚領域の6カ所, 下唇および第一指を air puff を用いて機械的に刺激し, 誘発脳磁場を記録した。初期成分について単一信号源推定法による活

動源位置推定を行い, SI内での部位について比較を行った。

第一指のSI内再現部位は最も内側, 上方に, 下唇は最も外側, 下方にあり, 顔面皮膚領域はその中間に位置し

た。従って、一般に知られる体部位再現を確認する結果である。6カ所の顔面領域を三叉神経支配により3群に分けて比較したが、SIでの双極子位置に有意な差はなく一定した配列は見いだせなかった。しかし顔面領域を外側と内側に分けた場合、SI内では外側顔面が内側に、内

側顔面は外側の位置していた。この結果は、顔面皮膚の分節レベルに従う規則的配列がSI内に存在することを示唆する。

(Nguyen et al., Neurosci Res 2004)

事象関連電位を用いた二点識別認知過程の研究

田村洋平, 宝珠山稔, 乾幸二, 中田大貴, 和坂俊昭, 尾島司郎, 井上聖啓, 柿木隆介

皮質での二点識別処理過程を、事象関連電位を用いて検討した。左手背外側部に6個の銀ボール電極を配置し、その中の二つを対にして二点の同時刺激を行った。5種類の刺激があり、電極間の距離はそれぞれ1.0, 1.5, 1.5, 2.0, 2.0mmである。5種類の刺激はランダムに呈示した。実験条件は二点識別タスク(TPD)とカウントタスク(SC)の二種類であり、TPDでは刺激毎にそれが一点であったか二点であったかを述べさせた。SCでは刺激回数を数えるように指示した。

SCと比較し、TPDでは有意に刺激後140ミリ秒の陰性電位(N140)が増強した。さらに、300および500ミリ秒で頂点となる二つの陽性成分(LPC-1とLPS-2)がTPD条件でのみ記録された。LPC-2は被験者の判定の安定度と関連した。いずれの成分も一点か二点かの判断には影響されなかった。N140は注意効果を反映したものと考えられた。後期陽性成分はそれぞれ、P3aとP3bに相当すると考えられた。

(Tamura et al., Clin Neurophysiol 2004)

経皮的磁気刺激によるA-delta線維関連疼痛増強

田村洋平, 宝珠山稔, 乾幸二, 中田大貴, 秋云海, 宇川義一, 井上聖啓, 柿木隆介

運動野への連続的経皮的磁気刺激(rTMS)が急性、慢性疼痛に影響を及ぼすことが知られている。本研究ではレーザー刺激(A-delta線維関連)による誘発電位に対するrTMSの効果を検討した。

刺激には右手背へのYAGレーザー刺激を用い、Czより誘発電位(N2-P2)を記録した。N2-P2の振幅をrTMS前、直後、10、20、30分後で記録した。rTMSは1Hzで10分間行った。対照として、磁気刺激は行わず同じ時間経過で誘発電位を記録する条件(コントロール)と磁気刺激の

代わりに同部位を電気刺激する条件(sham)を設定し、rTMSそのものの効果を検討した。結果は、主観的な痛みの程度とN2-P2振幅の両者がrTMSにより増強することを示した。さらに、振幅と痛みの程度は関連していた。N2-P2の潜時に変化はなかった。この結果よりA-delta線維関連の侵害受容においても運動野への磁気刺激と痛覚受容が関連することが示唆された。

(Tamura et al., Neurology 2004)

ヒト体性感覚野における階層的処理

乾幸二, 王曉宏, 田村洋平, 金桶吉起, 柿木隆介

触覚刺激に伴う皮質活動の時間経過を脳磁図を用いて詳細に検討した。サルを用いた単一細胞記録の研究や各

皮質部位間の連絡を検討した解剖学的研究は情報の階層的処理を示唆しているが、各皮質部位の活動タイミング

はほとんど知られていない。左手背皮膚表面への電気刺激により、刺激反対側半球の3b野、4野、1野、5野および第二次体性感覚野(SII)領域に活動が認められた。それぞれの立ち上がり潜時は、14.4、14.5、18.0、22.4、21.7ミリ秒であった。これらの活動の有意な潜時差は、中心

後回を後方へ向かう階層的情報処理を示唆する(3b野-1野-5野)。また、この経路とは別に、第一次体性感覚野-SII間の連続的処理経路の存在も示唆する。

(Inui et al., Clin Neurophysiol 2004)

C線維刺激に伴う皮質磁場反応に対する distraction の効果

秋云海, 乾幸二, 王曉宏, Nguyen BT, Tran TD, 柿木隆介

C線維関連の疼痛(second pain)に対する distraction の効果を検討した。13名の被験者左手背に炭酸ガスレーザーによるC受容器刺激を行い、誘発脳磁場を記録した(コントロール)。Distraction条件では被験者に暗算課題を課した。

刺激によりおよそ刺激後700-1000ミリ秒に安定した磁場活動が誘発され、責任活動部位として第一次(SI)お

よび第二次(SII)体性感覚野、帯状回および内側部側頭葉が同定された。全ての皮質部位の活動強度は distraction 条件で減弱した。特にSIIと帯状回で減弱が著しかった。この結果より、これらの皮質部位がC線維関連疼痛の受容に関わることを示す。

(Qiu et al., Clin Neurophysiol 2004)

体性感覚刺激による事象関連電位に対する Go/NoGo 課題の効果

中田大貴, 乾幸二, 西平賀昭, 八田有洋, 坂本将基, 木田哲夫, 和坂俊昭, 柿木隆介

Go/NoGo 課題による事象関連電位は通常聴覚や視覚刺激を用いて記録されており体性感覚を用いた報告はない。本研究では簡便な触覚刺激を用いて明瞭な nogo 関連電位を記録できた。

リング電極による電気刺激を第二指と第五指に与えた。前者を go 刺激、後者を nogo 刺激とする課題を行わせ、その際の電位変化を頭皮上に配置した電極より記録した。何もタスクのない条件(コントロール)、go 刺激の数を数える条件(カウント)および go 刺激の際に右手を握る

条件(運動)の3条件を比較した。N140が全ての条件で、P300がカウントと運動条件で記録された。nogo 刺激による140-200ミリ秒の陰性電位とN140の電位は go 刺激に伴うそれらの電位よりも有意により陰性であり、運動条件での nogo 刺激の P300 は有意に go 刺激のそれよりも振幅が大きかった。これらの結果は聴覚や視覚を用いた研究結果と一致し、nogo 関連の皮質活動が使用する感覚系を問わず類似することを示唆する。

(Nakata et al., Clin Neurophysiol 2004)

侵害刺激による皮質活動は運動によって修飾される

中田大貴, 乾幸二, 和坂俊昭, 田村洋平, 秋云海, 王曉宏, Nguyen BT, 柿木隆介

体性感覚誘発脳電位あるいは脳磁場に対する運動の影響はよく研究されているが、痛覚に関してほとんど知られていない。本研究では侵害刺激による皮質活動に対す

る運動の効果を検討した。

YAG レーザー刺激を左手背に与え誘発磁場反応を記録し、刺激対側 SI および両側 SII の活動を同定した。以

下の4条件での比較を行った。コントロール条件（刺激に注意するのみ）、同側能動条件（左第二、三指の運動を自分のペースで行う）、対側能動条件（対側の運動を同様に行う）、および同側受動条件（実験者が指の運動を行う）の4条件である。1) 同側能動条件では刺激対側のSIとSIIの反応が有意に抑制された。2) 対側能動では刺激対

側SIIが抑制された。3) 同側受動ではSIが抑制された。SIへの抑制はレーザー刺激による信号と運動による（感覚）信号がSIレベルで干渉した結果と考えられる。SIIへの影響は、運動の遂行に関わる脳活動からの影響と考えられる。(Nakata et al., Pain 2004)

ランダムドット仮現運動知覚の時間構造

久保田哲夫, 金桶吉起

仮現運動は、例えば二つの異なる場所にある光が交互に点滅することで知覚される。実際の刺激には運動はないのにどういった神経機構が働いて滑らかな運動を知覚するのであろうか？ また単なる光の点滅の知覚とどのように区別されて知覚されるのであろうか？ 我々はランダムドットパターンを刺激に使い、MEG反応の時間構造を運動知覚するときと点滅知覚するときとで比較、検討した。この刺激では、パターンのずれの大きさが小さいと運動を、大きいと点滅を知覚する。すなわち、物理的（輝度、空間周波数、コントラスト、密度など）にはま

ったく刺激は同一にもかかわらず、異なる知覚が起こる。よって、MEG反応が知覚に伴って変化するとすれば、それはそれぞれの知覚の神経活動の違いを反映している。運動知覚に伴うMEG反応は、110, 140, 210msをピークに、点滅知覚に伴う反応より有意に振幅が大きかった。反応の信号源はヒトMT/V5付近に推定された。これらの結果は、点滅と運動の知覚の神経機構はそれぞれ早期から競合しつつ局所的な運動検出結果をもとに最終的な知覚に至ることを示唆している。(Kubota T., et al. Neurosci. Res, 48, 111-118, 2004)

視覚逆行性マスティング現象の脳活動：後続刺激の提示時間の違いによる影響

橋本章子, 渡辺昌子, 柿木隆介
宝珠山稔 (名古屋大学医学部保健学科)

時間的に連続して二つの視覚刺激が提示されたとき最初の刺激が知覚されない現象を視覚逆行性マスティング現象という。我々は、見え方を判断する行動実験と視覚誘発脳磁図を使い、後続刺激の提示時間を変化させたときのマスティング現象を検討した。その結果、刺激間隔は一定であっても後続刺激の提示時間の長さによってマスティングの起こり方が変化することが示された。さらに、各刺激条件に対する視覚誘発脳磁場の大きさと潜時を検討した。その結果、単一刺激条件とマスティング刺激条件を比較すると、第一刺激の知覚の有無にかかわらず誘発

磁場活動の時間的経過には差がなかった。このことから、意識的に見えていない刺激であってもそれに対して視野は活動していることが示された。また、意識的な知覚の有無に関わらず、第一刺激の存在が第二刺激の処理を促進している可能性が示唆された。刺激が明確に知覚されるためにはある閾値(提示時間)が必要で、その閾値に達しない状況では、最初の刺激は後続刺激の提示によって処理が干渉されやすく、意識的に知覚できないマスティング現象や、2つの刺激を同時に知覚する現象が発生するのではないかと考察した。

ヒト視覚腹側路における神経順応効果の時間的動態

野口 泰基, 乾 幸二, 柿木 隆介

同じ視覚刺激が2回連続で提示される時、2回目の提示に対する脳の視覚反応は1回目におけるそれよりも減衰したものになる。Neural adaptation (以下NA)と呼ばれるこの効果はヒトやサルで頻りに報告される現象の1つであるが、その詳しい時間的動態については従来殆ど知られていなかった。本研究では時間分解能に優れた脳磁図を用い、ヒトの視覚腹側路におけるNAを、視覚反応の①ピーク振幅、②ピーク潜時、③反応の持続時間、という互いに独立な3つの観点から調べた。その結果、NAの効果を受けた視覚反応は、受けていない反応

に比べて有意に小さなピーク振幅・短いピーク潜時を示した。だが一方、反応の持続時間においては、NAの有無による有意な差は見られなかった。以上の結果は、(1) 視覚腹側路におけるNAが従来提唱されていた反応強度の低下に加え、時間的速化を伴うこと(2) この時間的速化は視覚反応そのものの時間幅を短縮させるよりは、むしろ反応の立ち上がり時間の短縮というかたちで見られること、などを示している。(Noguchi Y et al. J Neurosci., 2004)

生体システム研究部門

【概要】

私達を含め動物は、日常生活において周りの状況に応じて最適な行動を起こしたり、あるいは自らの意志によって四肢を自由に動かすことにより様々な目的を達成している。このような随意運動を制御している脳の領域は、大脳皮質運動野と、その活動を支えている大脳基底核と小脳である。本研究部門においては、脳をシステムとして捉え、これらの脳領域が互いに協調して働くことによって随意運動を可能にしているかを、とくに大脳基底核

を中心に神経生理学的・神経解剖学的手法を用いて明らかにすることを目指している。

平成16年度は南部 篤が赴任して3年目にあたり、研究環境も整備され、本格的に研究が始動し始めた。平成17年1月からポスドクとして知見聡美が研究グループに加わった。また、喜多 均教授(米国テネシー大学)も昨年度と同様に平成16年7月、平成17年1月～3月まで滞在し、精力的に共同研究を行った。

脳深部刺激療法の作用機序に関する研究

南部 篤, 橘 吉寿, 知見聡美

高田昌彦(東京都神経科学総合研究所)

喜多 均(テネシー大学医学部)

近年、薬剤でコントロールが困難な重症パーキンソン病に対して、視床下核に慢性的に刺激電極を埋め込み高頻度電気刺激を加えるという、視床下核-脳深部刺激療法(STN-DBS)が有効であることがわかってきたが、その作用機序については不明である。本研究においては、正常なサルを用い視床下核(STN)に単発刺激あるいは連続刺激を加え、淡蒼球外節(GPe)・淡蒼球内節(GPi)から単

一ニューロン活動を記録することにより、STN-DBSの作用機序を検討した。STNの単発刺激では、GPeニューロン・GPiニューロンとも興奮する傾向にあった。連続刺激を加えると、GPeニューロンは興奮性が重畳するが、GPiニューロンは抑制される傾向にあった。GPiニューロンは、GPe、STN両者から入力を受けており、その興奮制は、GPe-GPi投射(抑制性)とSTN-GPi投射(興奮性)の

バランスで決まることになる。GPI ニューロンの近傍にグルタミン酸や GABA のブロッカーを局所注入し反応の変化を調べたところ、STN の単発刺激では STN-GPI 投射による影響が GPe-GPI 投射よりも優位であるが、連続刺激においては GPe-GPI 投射による影響が STN-GPI

投射よりも優位になり、その結果、GPI ニューロンが抑制される傾向にあることがわかった。以上の結果から、STN-DBS のメカニズムのひとつとして、STN-GPe-GPI 投射による GPI 抑制が考えられる。

上肢到達運動課題実行中の線条体ニューロンの活動様式を解明する

畑中 伸彦, 高良 沙幸, 橘 吉寿, 南部 篤

大脳基底核は大脳皮質-基底核連関の一部として、運動の遂行、企図、運動のイメージ、習慣形成などに関わるとされている。これまでの神経トレーサーを用いた解剖学的な、あるいは大脳皮質に埋入された慢性刺激電極からの応答を調べた電気生理学的な研究で、大脳皮質から大脳基底核への主な投射先である線条体では、一次運動野 (MI) や補足運動野 (SMA) からの入力に内外側に分離し、中央部で一部重なり合うことが示されている。また、線条体ニューロンには視床正中中心核-束傍核複合体 (CM-PF) からの入力があることが知られており、線条体直接路ニューロンと間接路ニューロンで CM-PF から

の入力様式が異なることも示唆されている。

しかし実際にサルが運動を行っている時に、MI や SMA だけから入力を受けている線条体ニューロンと両者から入力を受けているニューロンではどのような活動の差があるのか確認したデータや、CM-PF からの入力の有無によって活動の差があるのかについての報告は未だなされていない。本年度は上肢の遅延期間付き到達課題を学習したサルの MI, SMA に慢性刺激電極を埋入し、実際に運動を行っているサルの線条体ニューロンの活動特性と、それぞれが入力を受ける大脳皮質運動野の組み合わせについて実験を行っている。

顎運動に関わる多シナプス性神経回路の同定

畑中 伸彦, 橘 吉寿, 南部 篤

宮地 重弘 (東京都神経科学総合研究所)

高田 昌彦 (東京都神経科学総合研究所)

狂犬病ウイルスは神経細胞に感染し、逆行性に感染を広げていくことが知られており、逆行性神経トレーサーとして、神経経路を多シナプス的に同定することが出来ると期待されている。本年度はラットの開口筋である顎二腹筋前腹と閉口筋である咬筋それぞれに狂犬病ウイルスを注入し、逆行性に感染するウイルスを経時的に追跡調査し、開口筋、あるいは閉口筋に投射する神経経路を同定した。その結果、大脳皮質には三叉神経運動核開口筋ニューロンへ直接投射しているニューロンの存在が示され、閉口筋運動ニューロンではそのような直接投射は

見出されなかった。また、大脳皮質-大脳基底核-脳幹へ間接的に投射する系において線条体背外側部に開口筋へ投射する系が見いだされたが、この部位は閉口筋へは投射していなかった。また、免疫染色を組み合わせることによって、開口筋に投射する興奮性インターニューロンが青斑核に投射を送る領域である外側巨大細胞性網様体傍核に多く見られた。今後は上肢や下肢の筋に狂犬病ウイルスを注入し、それぞれを比較検討していく予定である。

“間接路”を介した淡蒼球内節への運動情報伝達様式の解明

橋 吉寿, 南部 篤

大脳皮質運動野から生じた運動情報は、大脳基底核で処理された後、視床を介して再び大脳皮質に戻る。このような神経回路において、大脳基底核の出力部である淡蒼球内節は GABA 作動性ニューロンを介して視床を持続的に抑制している。これに対し、直接路(線条体-淡蒼球内節路)が働くことで淡蒼球内節ニューロンは一時的に抑制され、続いて視床・大脳皮質が脱抑制されることで運動が生じると考えられている。他方、間接路(線条体-淡蒼球外節-視床下核-淡蒼球内節路)が運動発

現に及ぼす影響についての報告は極めて少ない。今回、淡蒼球外節に Muscimol (GABA_A 作動薬)、視床下核に Gabazine (GABA_A 阻害薬)を局所的に作用させることで、皮質刺激に対する淡蒼球内節ニューロンの応答様式が変化するのを記録することに成功し、また不随意運動の発現も観察しえた。これらのことから、間接路は淡蒼球内節ニューロンの時空間的発射パターンをコードし、正確なタイミングでの運動発現に寄与していると考えられる。

大脳皮質機能研究系

脳形態解析研究部門

【概要】

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

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を定量的に解析し、機能との関係を明

らかにする。2) これらの分子の発達過程や記憶、学習の基礎となる可塑的变化に伴う動きを可視化し、その制御メカニズムと機能的意義を探索する。3) 前脳基底核、黒質-線条体ドーパミン系等の情動行動に関与する脳内部位のシナプス伝達機構および生理活性物質によるその修飾機構を電気生理学的手法を用いて解析し、それらの分子的基盤を明らかにする。4) 大脳基底核関連疾患の治療法の確立のため、神経幹細胞移植による細胞の分化、シナプス再構築や神経回路の再建に関する形態学および電気生理学の解析を行なっている。

グルタミン酸受容体の定量的解析

田中淳一，足澤悦子，初山明子，深澤有吾，馬杉美和子，重本隆一

脳内における主要な興奮性伝達物質であるグルタミン酸には、イオンチャネル型の AMPA 受容体、NMDA 受容体、Kainate 受容体と G 蛋白共役型の代謝調節型グルタミン酸受容体が存在する。我々は、従来の免疫電子顕微鏡法や新たに開発したレプリカ標識法により、グルタミン酸受容体各サブタイプの局在を高解像度で定量的に解析している。レプリカ標識法を用いた AMPA 受容体の

解析では、小脳の登上線維-プルキンエ細胞間シナプスなどにおいて平方ミクロンあたり1000個を超える金粒子の標識を達成し、従来法に比べ桁違いの高感度と2次元的可視化を実現した。また、ノイズ解析を用いた電気生理学的計測と組み合わせ、機能的な AMPA 受容体数とほぼ同数の金粒子の標識数が得られることを明らかにした。

神経伝達物質放出関連蛋白質の局在

萩原 明，深澤有吾，重本隆一

脳内における神経伝達物質の放出にはさまざまな機能分子が関与している。この中で我々は代謝調節型グルタミン酸受容体や電位依存性カルシウムチャネルなどの放出部位における局在を免疫電子顕微鏡法で明らかにした。またレプリカ標識法を用いることによって、従来法では放出部位に検出することが困難であった tSNARE 蛋白質

についても、神経終末や軸索に広く分布すると同時に放出部位にも同様の密度で存在することを明らかにした。またこの研究の過程でレプリカ標識法において、CAST などの CAZ 蛋白質や小胞性グルタミン酸トランスポーターが、放出部位や神経終末を同定するためのマーカーとして非常に有用であることを明らかにした。

海馬における長期増強現象とグルタミン酸受容体の密度変化

深澤有吾, 重本隆一

海馬における長期増強現象には、イオンチャネル型の AMPA 受容体, NMDA 受容体等のグルタミン酸受容体が関与している。我々は、新たに開発したレプリカ標識法により、これらグルタミン酸受容体各サブタイプの局在を高解像度で定量的に解析している。レプリカ標識法を用いた海馬 CA1 や歯状回の AMPA 受容体の解析では、シナプスのみならずシナプス外に高密度の標識が認めら

れた。シナプスの AMPA 受容体密度は大きなバラツキを持って分布していたが、in vivo でテタヌス刺激により長期増強現象を誘導すると、AMPA 受容体密度の低いシナプスの数が減少する。今後受容体サブタイプによる動態の違いや、シナプス外受容体プールとの間の関係などについて、さらに検討する。

海馬 NMDA 受容体局在の左右差

Wu Yue, 篠原良章, 重本隆一

脳内における左右差はよく知られているが、その分子基盤はほとんど知られていなかった。我々は九州大学の伊藤功助教授らとの共同研究により、海馬 NMDA 受容体サブユニット NR2B が左右の海馬の対応するシナプスで非対称に配置されていることを発見した。この左右差は NR2A ノックアウト動物で増強されており、電子顕微

鏡的な解析で錐体細胞シナプスにおける NR2B 標識密度の左右差を検出した。この左右差は介在神経細胞上のシナプスには存在せず、同種の神経軸索が作るシナプスにおいても、神経後細胞の種類の違いによって非対称性の有無が決まることが明らかとなった。今後はこの左右非対称性の生理学的意義を解明することを目指す。

GABA_B 受容体やイオンチャネルの脳内局在と機能解析

Akos Kulik, 萩原明, 深澤有吾, 重本隆一

脳内における主要な抑制性伝達物質である GABA には、イオンチャネル型の GABA_A 受容体と G 蛋白共役型の GABA_B 受容体が存在する。我々は、免疫電子顕微鏡法により GABA_B 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や、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となどを

報告した。これらの結果は、GABA_B 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。その後、GABA_B 受容体はその効果器分子であるカリウムチャネル GIRK サブユニットと海馬錐体細胞の棘突起シナプス周辺で共局在を示すことが明らかとなった。さらに GABA_B 受容体の機能調節機構や脳における役割の解明を目指す。

前脳基底核と黒質－線条体ドーパミン系の電気生理学および形態学的解析

初山俊彦

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

黒質－線条体ドーパミン系は随意運動調節に関与し、この系の障害とパーキンソン病等の大脳基底核関連疾患

とが関係していることが示唆されている。大脳基底核関連疾患の治療法の一つとして神経幹細胞移植法が期待されているが、移植によるシナプス結合や神経回路の再建に関する基礎的知見はこれまで非常に少なかった。現在、Enhanced GFP 遺伝子導入トランスジェニックラットから胎生 10.5 日目ラットを摘出し、中脳胞部由来神経板組織を成熟ラットの線条体内に移植して、ドナー細胞の分化、シナプス再構築について形態学的および電気生理学の解析を行なっている。

大脳神経回路論研究部門

【概要】

大脳皮質の各領域は、基本的に同じ構成の回路を出入力の違いに応じて変えることで、柔軟で多様な情報処理をしている。皮質はコラムとよばれる基本単位からできていると考えられているが、その内部回路についてはあまり解明されていない。皮質の中でも前頭皮質は、それが投射する線条体とともに、精神活動や運動・行動にとって重要な場所である。私たちはこれまでに前頭皮質や線条体ニューロンを、軸索投射・発火・物質発現パターンからいくつかのグループに分類し、それらの生理的性質・神経結合・伝達物質作用などを解析してきた。その結果、局所回路の基本的構成を定性的に明らかにできた。現在は、これらの構成要素から皮質回路がどのような原

則で組み上げられているかを明らかにすることを目指して、各ニューロンタイプの軸索・樹状突起上におけるシナプス配置・スパイン分布、錐体細胞サブタイプ間のシナプス結合特性、非錐体細胞サブタイプから錐体細胞への神経結合を生理学的・形態学的に定量的に解析している。これらの過程を積み重ねることで、皮質回路の神経結合選択性、皮質ニューロンの生理的・形態的多様性の意味、各ニューロンタイプの役割を理解したい。そして前頭皮質における回路解析に基づいて、皮質から線条体に信号を送る錐体細胞の活動がどのように決められているかを明らかにすることを目標にしている。

皮質介在ニューロンの樹状突起分枝の定量的解析

川口泰雄，荻部冬紀，窪田芳之

前年度までに、非錐体細胞の定量的分類、サブタイプごとの軸索分枝・シナプスブトン形成の定量的解析を終えたので、今年度は樹状突起分枝、スパイン形成の定量的解析を、FS バスケット細胞、ニューログリアフォーム細胞、マルティノッティ細胞、CCK 陽性大型バスケット

細胞、小型バスケット細胞について行った。分枝間角度分布は軸索のと同じ関数で近似することができ、サブタイプ間でも分布に大きな差がなかった。分枝・シナプスブトン・スパインの間隔分布どれも指数関数で近似できた。細胞体から出る樹状突起の数、伸長方向、平均分枝

間隔, スパイン密度から, 樹状突起の形態パターンには3種類あることがわかった。突起の屈曲とシナプス形成の関係をみるために, 軸索・樹状突起分枝ごとの屈曲度

と分枝上のブトン・スパイン密度を計測した。ブトン・スパイン分枝密度の平均値はサブタイプごとに異なるが, 分枝長や屈曲度とは相関していなかった。

VGLUT2 が入力する棘突起への抑制性入力について

窪田 芳之, 根東 覚, 畑田 小百合, 川口 泰雄

大脳皮質の錐体細胞の棘突起は, 主に興奮性を入力を受ける事が知られている。しかしながら, その5%程度のものは, 興奮性入力と抑制性入力の2つが同時に入力している事(DI spine)を我々は見いだした。DI spineを神経支配している興奮性入力, 他の錐体細胞なのか, それとも視床からの興奮性入力なのかを明らかにする為, 検討を重ねた。皮質では, vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1)は, 皮質の錐体細胞の神経終末に発現してい

る。一方で, VGLUT2は視床由来の興奮性神経終末に発現している事が報告されている。今回, これを利用して, DI spineには, どちらのVGLUT発現神経終末が入力するかを検討した。全ての層から1500余の棘突起を電子顕微鏡で観察した結果, VGLUT2陽性神経終末が入力する棘突起の約10%が抑制性入力を同時に受けている事がわかった。

calretinin 陽性樹状突起への抑制性シナプス入力と興奮性シナプス入力の割合

関川 明生, 窪田 芳之, 川口 泰雄

大脳皮質の非錐体細胞には, 多くの種類があるが, そのサブタイプの一つである calretinin 陽性細胞にシナプス入力する神経終末の密度と, 興奮性のもので抑制性のもとの割合を求めた。まず, 還流固定した脳の切片を使って, preembedding immunohistochemistry法で, calretinin 陽性樹状突起をDAB ニッケル法で染色した。EPONに包埋した

後, 電子顕微鏡観察用に80nm厚で超薄切片を作製し, postembedding immunohistochemistry法で, GABA染色を施した。電子顕微鏡観察の結果, calretinin 陽性樹状突起にシナプス入力しているGABA陽性神経終末は, 全体の3-4割程度で, 残りは, 非対称性の膜の肥厚を示す興奮性の神経終末である事がわかった。

皮質線条体システムにおける錐体細胞の多様性

森島美絵子, 川口泰雄

前頭皮質から線条体に投射する錐体細胞は多様であると考えられているが, その機能的構成やシナプス結合特異性についてはほとんどわかっていない。今年度は先ず, 線条体に投射する錐体細胞(皮質線条体ニューロン)の形態的特徴を解析した。前頭皮質の皮質線条体ニューロンは大きく二つのグループからなる。一つは同側の脳幹に下行投射する5層錐体細胞で, 途中で線条体に側枝を出す。もう一つは, 同側の線条体だけでなく, 対側の線条

体に投射する錐体細胞で, 脳幹には投射しない。これらを, それぞれ対側の線条体, 同側の橋核に蛍光トレーサーを注入して逆行性に蛍光標識した。その後, 脳切片標本を作成して, 蛍光標識された錐体細胞を細胞内染色した。先端樹状突起タフトの起始部の位置, 分枝数, 総分枝長, 空間的拡がりから, 両側線条体に投射する錐体細胞は二種類からなっており, どちらの形態も橋核に投射する細胞とは異なることがわかった。

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としている。感覚脱失における可塑的变化から派生

して、異種感覚統合の脳内機構の解明を目指すとともに、触覚弁別の非対称性、言語処理、学習、認知機能にわたる幅広い研究を行った。さらに機能的MRIの時系列データ解析手法の開発にも取り組んだ。

空間パターンの触覚弁別に関する脳神経基盤の非対称性

原田 宗子, 定藤 規弘

点字読などの研究から、触覚形状弁別において左手が有利であることが知られており、左右半球における処理の非対称性を示唆するとされてきたが、その神経基盤は明らかでなかった。触覚弁別課題における神経活動の左右非対称性を調べる目的で、19人の被験者を対象に、機能的MRIを行った。受動的触覚弁別の際、右手左手を問

わず、前頭前野、頭側補足運動野、頭頂葉後部にわたり、右半球優位の活動が見られた。一方右手による課題遂行時には、左手の場合に比べ左運動前野尾側部により強い活動がみられた。これは右手による触覚形状弁別において、半球間相互作用に非対称性の存在することを示唆する。

話し言葉における視聴覚間の感覚統合に関する神経基盤: FMRI を用いた研究

斎藤大輔, 定藤 規弘

多くの人の行動には、異なる脳部位からの情報の統合が必要であり、特に、聴覚と視覚における異種感覚の情報処理は、対面での情報伝達に重要である。そこで、聴覚と視覚の異種感覚統合が行われる神経基盤を、同時に提示された話し言葉と発声動作の照合課題を行うことにより検討した。機能的核磁気共鳴画像法 (fMRI) を用いて実験を行った。課題は3条件で、それぞれ、聴覚-聴覚、視覚-視覚、聴覚-視覚間の照合課題を行い、被験者は、

音声刺激と発声動作の刺激の組み合わせが、一致か不一致かの照合を行った。聴覚と視覚の異種感覚統合が行われる神経基盤として、両側腹側運動前野と後部頭頂葉が示唆された。また、この領域には情報を統合するだけでなく、注意の分配にも関与していることが考えられる。そこで、聴覚と視覚刺激の一致、不一致の差を見たところ、両側上頭頂葉と左側頭頂間溝が、聴覚と視覚の情報統合に深く関与していることが示唆された。

ピアノ学習に伴う視聴覚統合に関与する神経活動

長谷川 武弘 (東京女子医大), 定藤 規弘

健聴者においては、読唇により側頭平面の賦活が見られ、視聴覚統合の脳内表現と目されている。読唇にみられるような視聴覚統合が学習によるものである、という仮説のもと、ピアノの keyboard reading 課題を、ピアノ学

習者と未学習者に遂行させたところ、前者で側頭平面の賦活が観察されたが、後者では見られなかった。このことから、ある種の視聴覚統合は長期学習によって形成されることが示唆された。

聴覚-視覚刺激対連合学習における脳活動変化

田邊 宏樹, 定藤 規弘

学習に伴う視聴覚統合には、無関係な2つの情報を結びつける過程が存在しているとの仮説のもと、対連合学習課題を通して、記憶の形成と記憶されたものの表現に関わる可塑的な神経基盤を機能的 MRI を用いて検討した。「結びつけること」に関係している領域は学習の初期に活動が高く学習が進むにつれて活動が下がり、一方「結びついたものの表象」に関わる領域は、学習が進むにつれてその活動を増大されることが予想されるので、そ

のような学習に伴い増減する脳活動を全脳において網羅的に捉える Whole-brain cross-trial regression analysis を開発し、解析を行った。その結果、視聴覚情報の連合形成には上側頭溝前方部が、連合学習により形成されたペアの記憶は unimodal 領域と polymodal 領域に分散された形で表象され、さらに polymodal 領域がそのネットワークの結び目(node)となっていることが示唆された。

発達期における聴覚脱失による可塑的変化の年齢依存性

定藤 規弘

前年度までの研究で、聴覚脱失による可塑的変化の少なくとも一部は、聴覚連合野を含む、視聴覚統合をこなす神経回路により担われていることが示唆された。このような変化に年齢依存性があるかを明らかにするために、音声言語習得以降に聴覚障害をきたした群との比較を行った。早期失聴者(2歳未満)6名と手話を理解できる健聴者6名、晚期失聴者(5歳以降)5名を対象に機能的 MRI を試行した。課題は、手話による文章理解課題である。健聴者、聴覚障害者とも全ての課題において後上側頭溝の賦活がみられ、手や顔面の動きに関連するものと考えられた。その一方、上側頭葉の賦活は早期・晚期失

聴者の両者でみられたが、前上側頭溝の賦活は早期失聴者でより著明であった。中上側頭溝はヒトの音声に対して選択的に反応することが知られている。この領域は話者の特徴抽出などの複雑な音情報処理に関与し、そのような情報を異種感覚統合や長期記憶のため他の領域へ送る役目が想定されている。この結果から、言語習得以前の聴覚脱失により中上側頭溝の視覚反応性が増強することは、中上側頭溝本来の音声処理が視覚処理に置き換わったことを示唆している。このことは、逆にヒトの音声を認識する脳内機構形成における、早期(2歳未満)聴覚入力的重要性を示唆する。

ICA による task-related motion artifact の除去

河内山隆紀（香川大学），定藤規弘

機能的 MRI において体動は大きな雑音となり，とくにこれが課題と同期していると除去が困難である。この問題を解決するために，Independent component analysis を利

用したデータ解析法を開発し，実データにおいて体動により生じる雑音を効率的に除去できることを示した。

機能的 MRI を用いた脳局所間結合度の解析手法の開発

山下宙人（統計数理研），尾崎 統（統計数理研），定藤 規弘

機能的 MRI は脳全体にわたる膨大な時系列データを提供する。これを用いた局所間結合度の評価法を，multivariate autoregressive model を骨子として開発した。

本法の利点は影響の方向をあらかじめ設定する必要のない点であり，今後実際の実験データに適用していく予定である。

触覚による粗さ評定に関する神経基盤の解析

北田 亮（京都大学），定藤 規弘

触覚による粗さ弁別の神経基盤は，形状弁別のそれとは異なるとされているが，詳細は不明である。機能的 MRI を用いて，粗さ評定を遂行する際の神経活動を計測

したところ，両側 SII と島ならびに右前頭前野が，粗さと関連した活動を示した。前 2 者は感覚処理に，後者は粗さ評定に関連するものと推論された。

視覚刺激に対する NIR, fMRI 同時計測

豊田浩士，定藤規弘，柏倉健一（群馬県立医療短期大学），笠松眞吾（福井大学）
岡沢秀彦（福井大学），藤林靖久（福井大学），米倉義晴（福井大学）

刺激提示後の神経活動に伴う fMRI 信号変化に関しては未だ正確な機序は不明である。視覚刺激に対して NIRS, fMRI 同時計測を行い，両者の信号の反応曲線から fMRI 信号変化の成因を検討することを本研究の目的とした。
5 名の健常人を被験者とし，チェッカーボードを視覚

刺激として提示した。刺激提示時間を変化させ，それぞれを繰り返した。刺激持続時間と BOLD 信号の間には非線形性があり，その非線形性は NIRS から計算された oxygen extraction fraction に一致することが判明した。

運動学習転移における小脳の役割

河内山隆紀 (香川大学), 松村道一 (京都大学), 米倉義晴 (福井大学), 定藤規弘

2つのボールを掌上で回転させるという運動を学習する際の神経活動をO-15標識水PETをもちいて計測した。学習転移は右手から左手へ起こったが逆は見られなかった。いずれの手で学習する際でも、最初期に左小脳外側に強い賦活がみられた。一方左小脳傍矢状領域では、学

習に伴って徐々に活動が減弱することが観察された。これらの活動は、それ以前の学習がある場合に比べ、無い場合のほうが著明であった。これらのことから、左小脳半球は学習転移に関連していると考えられた。

マッカロー効果をもちいたヒト色感覚にかかわる神経機構の解明

守田知代 (京都大学), 松村道一 (京都大学), 米倉義晴 (福井大学), 定藤規弘

我々は、色彩豊かな世界に暮らしている。目に届くのは、ある波長成分を持つ光であるが、そこから特定の色の内的な経験(色感覚)を生み出しているのは、我々の脳である。実際の色を見ているときに、紡錘上解・舌状回を含む腹側後頭葉領域の賦活を伴うことは良く知られているが、これらの領域が色感覚と直接係るのかどうかはまだ明らかにされていない。本研究では、刺激を一定に保ったまま、異なる色感覚を作り出すために、マッカロー効果と呼ばれる錯覚現象を用いた。マッカロー効果とは、互いに直行する方向成分を持ち、補色関係にある縞模様刺激(誘導刺激)(例:緑色の水平縞,マゼンダ色の垂直縞)を交互に数秒ずつ合計数分間提示すると、その後、白黒の縞が方向によって誘導時の補色に薄く色づいて見える現象である。本実験では、誘導刺激提示の前後に、白黒からなる縞模様のテスト刺激を提示するセッションを設け、そのテスト刺激を見ているときの脳活動を

fMRIで測定した。ここで、2つのグループを用意した。誘導後のセッション中、色に注意を向けるようあらかじめ教示したINFORMEDグループと、特に何も教示しないUNINFORMEDグループの2つである。実験の結果、マッカロー効果が被験者全員にほぼ同程度誘導されていたことは実験終了後に確認できたにも係らず、UNINFORMEDグループの約半数の被験者はfMRI実験の最中に色が付いて見えることに気づいていたが、残り半数は気づいていなかった。実際の色刺激に対して有意な活動を示した両側の腹側後頭葉の中で左側V4 α に相当するV4の前方領域は、MRスキャン中に錯覚の色に気づいていたグループでは活動が見られたものの、気づかなかったグループでは活動がみられなかった。これらの結果より、色特異領域とされていたV4のなかでも、前方領域が特に色感覚に関与していることが示唆された。

両手協調運動における相転移現象に関わる神経基盤

荒牧勇 (科学技術振興機構) 定藤規弘

周期的な両手協調リズム運動においては、同位相モードと反位相モードという2つの安定なモードがある。この2つのモードの安定性は等価ではなく、運動周波数の増加などにより反位相モードから同位相モードへの突然の変化がおきる(相転移現象)。本研究はこうした運動パ

ターンの突然の転移に関連する脳活動を事象関連磁気共鳴画像法を用いて調べた。その結果、相転移現象に関連する領域は、前補足運動野、運動前野吻側、下頭頂葉といった、運動の計画に関与すると考えられている脳部位であった。一方、反位相モードや同位相モードの維持に

関連する領域は固有補足運動野、運動前野尾側、一次運動野といった、運動の実行に関与する脳部位であった。また、相転移に関連する脳活動は右半球優位であったが、この偏在は、行動データにおいて相転移時に左手の運動

が乱れる傾向があることと関係すると考えられ、両手協調運動において半球間の相互作用が非対称である可能性が示唆された。

ブロードマン6野のもつ部位特異的認知機能とその有意性の検討

本田 学

田中 悟志

これまでに独自に開発した厳密に運動制御要素を排除した心内表象操作課題をもちいて、運動の高次制御にかかわるブロードマン6野（運動前野）吻側部の機能が、非運動性の心内表象の操作にも関わっていることをポジトロン断層法、機能的磁気共鳴画像マッピング、事象関連磁気共鳴機能画像法を組み合わせて明らかにしてきた。そこで観察された活動が、真に心内表象操作に寄与しているのか、それとも単なる随伴活動であるかを検討した。その結果、空間表象を操作するときには外側の運動前野

の活動が、文字列表象を操作するときには内側の運動前野の活動が特異的に高まると同時に、それらの部位の機能を経頭蓋低頻度連続磁気刺激によって一過性に低下させることにより、課題選択的に成績が悪化することを発見した。これらの知見は、運動制御機構の重要な要素である運動前野が認知的操作においても必須の役割を果たしており、運動制御と同様に部位ごとに異なる役割分担をおこなっていることを示すものである。

超可聴域超高周波成分による行動制御メカニズムの基礎的検討

本田 学

中村 聡（科学技術振興機構）

八木玲子（総合研究大学院大学）

森本雅子（十文字学園大学）

前川督雄（四日市大学）

仁科 エミ（メディア教育開発センター）

河合徳枝（国際科学振興財団）

大橋 力（国際科学振興財団）

人間の耳に聞こえない超高周波成分を豊富に含む音は、音知覚を快適にする感性反応を誘導することが知られている。その神経基盤の全体像を探るため、ポジトロン断層撮像法をもちいて非可聴域超高周波成分を豊富に含む音を聴取時、同じ音源から超高周波成分を除去した音を聴取時、暗騒音（ベースライン）時の脳血流を計測し、主成分分析をもちいて互いに相関して活動する神経機能ネットワークの全体像を抽出した。その結果、第一成分として両側聴覚野を含む成分、第二成分として視床、視床下部、脳幹を中心として、前頭前野へと広がる成分が抽

出された。また超高周波成分を含む音の聴取時には、免疫活性を示す血中NK細胞活性が上昇するとともに、唾液中のクロモグラニンA、免疫グロブリンAが有意に上昇することを発見した。さらに公共空間に超広帯域音響呈示システムを設置し、音響信号を背景に流して不特定多数の利用者の質問紙調査を実施したところ、超高周波成分を豊富に含む音の呈示により快適性が向上するのに対して、同じ音源から作成した超高周波成分を除いた音の呈示では、むしろ音呈示がないときよりも快適性が低減することを示した。また音呈示を行っているときに被

験者に自由にボリューム調整させると、超高周波成分を含まない音よりも含む音のほうを、またさらに超高周波成分のみを+6dB 増強した音のほうを、より大音量で聞こ

うとすることを発見した。これらの知見は感性反応による刺激受容行動促進効果を示すものと考えられる。

カウンティングにおける運動前野の役割

神作 憲司, Marie-Laure Grillon, 定藤 規弘
Ari Johnson, Mark Hallett (NINDS)

数は最も普遍的な概念の一つであり、カウンティングは最も単純な数的情報処理の一つと考えられる。しかしながら、カウンティングの神経基盤は未だ良く分かっていない。多くの動物が小さな数を比較的正確に扱えることが分かっているが、大きな数を正確にカウンティングするのは、ヒトに特異的な能力と考えられる。これまで我々は、機能的磁気共鳴画像 (fMRI) を用いて、小さな数 (1-4) をカウンティングするとき比べて、大きな数

(10-22) をカウンティングするときに、ヒト運動前野 (左腹側運動前野上部) が強く活動することを見出し、さらにこの領域を経頭蓋磁気刺激 (TMS) にて刺激すると、大きな数が正確にカウンティング出来なくなることも明らかとした。現在は、カウンティングにおける運動前野の役割をより詳細に調べるために、連続した感覚刺激を明示的なカウンティングを行わずに知覚する場合との比較検討などを行っている。

単純反応時間課題遂行時の脳内情報処理

神作 憲司
Mark Hallett (NINDS)

単純反応時間課題は、単純な感覚運動変換のモデルとして広く用いられてきた。しかしながら、単純反応時間課題遂行をになう神経基盤は未だ良く分かっていない。我々は、単純反応時間課題遂行に必要な神経系は、入力感覚モダリティーや出力効果器によらず活動する、との仮説に基づき、機能的磁気共鳴画像 (fMRI) を用いた実験を行った。その結果、右上側頭回後部、右運動前野、左腹側運動前野、小脳虫部、内側前頭回にこうした脳活動

を見出した。さらに、右後部上側頭回と右運動前野が、運動出力を行わずに感覚刺激を受けるだけでも活動することも見出した。現在は、単純反応時間課題遂行に何らかの役割を持つことが示唆されたこれらの脳領域の機能をより詳細に調べるために、右後部上側頭回や右運動前野が外部環境の変化を一つの事象として検出する際に用いられるのか、などの点に注目した研究を行っている。

発達生理学研究室

認知行動発達機構研究部門

【概要】

2004年度は、タイ国出身で前年5月より1年間の予定で外国人特別研究員として留学していた Thongchai Sooksawate 博士が4月末で帰国した。またロシア国パヴロフ生理学研究所より1年間の予定で共同研究してきた Nikolay Nikitin 博士も7月末で帰国した。また客員教授としてスウェーデン王国・イエテボリ大学から Sergei Perfiliev 博士が6-9月まで3ヶ月間来日し、共同研究を行なった。また京都大学の博士課程大学院生の武井智彦君が受託大学院生として参加することになった。

大きな出来事としては3月に生理学研究所国際シンポジウムを開催したこと、部門の引越しを行なったことがある。前者については3月16-18日に岡崎コンファレンスセンターにおいて“Multidisciplinary Approaches to Sensorimotor Integration”と題する国際シンポジウムを海外からの出席者27名を含む220名の参加者を得て開催した。後者については、6月にそれまで5階と動物実験センター地下に分散していた研究室を統合して6階に移動

することができたことで、これまでの不便さを解消することができたのは大きかったと考えている。研究については、サルを用いて脊髄レベルでの皮質脊髄路の損傷後の機能代償機構を西村幸男君を中心とする研究グループ、大脳皮質一次視覚野損傷後のサルの認知行動機能の研究を吉田正俊君を中心とする研究グループ、中脳上丘の局所神経回路に関するスライス標本を用いた研究を遠藤利朗君と Sooksawate 博士を中心とするグループ、サルの上丘局所神経回路に関する麻酔下での電気生理実験を Nikitin 博士と伊佐が、またマウスのサッケード系に関する研究を坂谷智也君が、またサルの precision grip 遂行時の感覚・運動統合機構について関和彦君を中心とするグループが推進した。また、10月より科学技術振興事業団の戦略的創造研究推進事業 (CREST) の研究費を受領することができ、「神経回路網における損傷後の機能代償機構」のテーマで研究を推進することになった。

ラット上丘浅層からの投射ニューロンの樹状突起での活動電位開始の過分極活性化陽イオンチャンネルによる調節

遠藤利朗, 納富拓也, 足澤悦子, 重本隆一, 伊佐正 (認知行動発達機構, 脳形態解析)

Wide field vertical (WFV) cell は上丘浅層から視床や上丘中間層に投射する主要な出力ニューロンであり、視覚地図上で数十度にも相当する発達した樹状突起をもつ。このような形態はこのニューロンが受容野内を動く光刺激によく反応する性質と関係があると考えられている。我々は入力線維の電気刺激への反応の解析から、このニューロンでは入力に対して活動電位が樹状突起で開始されることを示す結果を得た。一方、我々は WFV cell は過分極活性化陽イオン電流 (I_h) を顕著に示すことを既に明

らかにしていたが、その活性化キネティクスの解析と免疫染色の結果から、WFV cell は I_h チャンネルのうちでも HCN1 を主に樹状突起に発現していると考えられた。 I_h を抑制すると、入力線維刺激に対する活動電位の生成にいたる確率の減少、または活動電位開始の遅れが観察された。このことから WFV cell において HCN1 は樹状突起の静止電位や膜の時定数の調節によって活動電位の開始または細胞体への伝導を促進していると考えられる。

上丘中間層 GABA 作動性ニューロンの特性

Thongchai Sooksawate, 伊佐かおる, 伊佐 正
小幡邦彦 (理化学研究所脳科学総合研究センター)
柳川右千夫 (群馬大学大学院医学系研究科)

上丘中間層ニューロンは高頻度発火によってサッケード運動などの指向運動の開始をトリガーすることが知られている。この高頻度発火の開始にあたって上丘中間層の出力細胞に対する持続的な GABA 作動性の抑制が減弱することが知られていること。従って上丘局所神経回路において GABA 作動性介在ニューロンは大変重要な役割を有していることになるが、これまでその性質はほとんど調べられてこなかった。今回、柳川、小幡らによって開発された GAD67-GFP ノックインマウス (生後 17-22 日齢) を用いて、上丘スライス標本において GFP の蛍光を有している GABA 作動性ニューロンから whole cell patch clamp 法による記録を行い、その電気生理学的

特性の解析とバイオサイチンの細胞内注入による形態学的特性の解析を行なった。その結果、定常電流通電に対する発火特性から、58% (135/231) が fast spiking neuron, 29% (67/231) が burst spiking neuron に分類された。その他は late spiking neuron が 8% (18/231), regular spiking neuron が 2% (4/231), rapid spike inactivation type が 3% (7/231) とごく少数であった。また軸索の投射様式から GABA 作動性ニューロンには (1) intra-laminar local neurons, (2) inter-laminar local neurons, (3) intra-laminar long range horizontal neurons, (4) commissural neurons, (5) projection neurons など、機能が異なると考えられる複数のサブグループが存在することも明らかになった。

遺伝子改変マウスを用いたサッケード運動制御機構の解析

坂谷智也, 伊佐正

興奮性神経伝達物質グルタミン酸の受容体構成因子である NRε4 (NR2D) サブユニットの生体における役割についてはこれまでのところほとんど知られていない。一方、NRε4 (NR2D) 遺伝子は上丘において強く発現していることが報告されている。そこで NRε4 (NR2D) 遺伝子欠損マウスを用いて、上丘の主要な機能であるサッケード眼球運動について解析した。我々が新たに開発したマウスのサッケード測定システムをもちいて自発サッケードについ

て解析したところ、野生型に比べてノックアウトマウスでは同振幅のサッケードにおける最高速度が有意に減少していることがわかった。この結果から NRε4 は眼球サッケードにおいて運動ダイナミクスの調節に関与していることが示唆された。現在、上記の NRε4 (NR2D) の機能が主として上丘内部におけるものであるのか、あるいは下流の脳幹系におけるものかを検討している。

皮質脊髄路損傷後における手の巧緻運動の機能回復

西村幸男, 伊佐正, 森近洋輔
パーフィリエフ・セルゲイ (イェテボリ大学)
尾上浩隆 (東京都神経研)
塚田秀夫 (浜松ホトニクス)

皮質脊髄路損傷後における手の巧緻運動の機能回復のメカニズムを検討した結果、(1) 母指と第二指とを対立

させて物体をつまむ運動 (precision grip) は、損傷後一週間で回復し始め、1-3ヶ月でほぼ正常に近いレベルまで回復

すること。(2) 健常なサルでは見られない錐体路由来の2シナプス性 EPSP が上肢筋運動ニューロンの半数で記録されたことを明らかにし、脊髄内の神経回路網の変化が機能回復に貢献している可能性を報告した。最近、より上位中枢の関与を検討するために precision grip 中に Positron Emission Tomography による脳機能イメージングを行った結果、損傷後一ヶ月では両側の一次運動野・体性感覚野において顕著な活動の上昇が見られた。三ヶ月後には依然、両側の一次運動野・体性感覚野の活動上昇

が観られ、更に運動前野腹側部の活動上昇が観られた。さらに、これらの領域が precision grip に関係しているか検討するために両側の一次運動野にムシモルを注入したところ、損傷の反対側(支配)では損傷の2週間後・三ヶ月後に効果が見られたが、同側では損傷の二週間では効果が見られたのに対し、三ヶ月後には効果が見られなかった。これは、回復の時期によって使われる大脳皮質の領域が異なっていることを示唆している。

サルを用いた盲視 (blindsight) の神経機構の解明

吉田 正俊, 伊佐 正

盲視の動物モデルとして片側の第一次視覚野を外科的に切除したニホンザルを二匹作成して、急速眼球運動を指標とした行動実験を行った。

(1) 強制選択型の視覚誘導性眼球運動課題を遂行できることを確認した。欠損半視野で弁別できる標的刺激の閾値は手術前と比べて上昇していた。また、急速眼球運動の終始位置は欠損半視野においてより不正確であり、眼球運動の速度プロファイルも欠損半視野へ向かうもの

と正常半視野へ向かうものとの間で顕著な差が見られた。(2) 時間的ギャップを(1)の課題に加えることで express saccade が起こることを見いだした。(3) yes-no 課題型の視覚誘導性眼球運動課題の成績が(1)の強制選択型課題の成績よりも悪いことを見いだした。(4) 記憶誘導性眼球運動課題を遅延時間2秒でも遂行できることを見いだした。このことは、視覚手掛かりの位置情報を短期記憶として保持できることを示している。

生体恒常機能発達機構研究部門

【概要】

当部門は2003年に新設され、2004年6月に明大寺地区A棟5回に研究室を立ち上げてから約1年が経過した。現座、発達の過程で一旦形成された神経回路に起こる再編成のメカニズムを回路レベルで解明することを目標に研究をしている。特に、発達期における再編のメカニズムとして、シナプスレベルにおいて、伝達物質のスイッチング、細胞内イオン環境の変化による GABA の興奮性

から抑制性へのスイッチとその制御機構、受容体の細胞内動態やこれらに対する神経栄養因子、環境/回路活動による制御を検討している。

また、傷害や虚血などの種々の障害後に一旦未熟期における回路特性が再現し、回復に伴い発達と同様な再編成過程が再現される可能性について、電気生理学的、分子生物学、組織学的手法を用いて研究を行なっている。

発達期における神経伝達物質のスイッチング

鍋倉淳一, 張 一成, 前島隆司
石橋 仁 (九州大学)

ラット聴覚系中経路核である外側上オリブ核に内側台形体核から入力する伝達物質自体が未熟期の GABA から成熟期のグリシンに単一終末内でスイッチすることを微小シナプス電流の特性の解析などの電気生理学的手法, 神経終末内の GABA, GAD やグリシン免疫電顕や免疫組織学的手法を用いて明らかにした。この伝達物質のスイッチングは, 発達期における主要な再編成機構であ

る余剰回路の除去や伝達物質受容体の変化と並ぶ大きなカテゴリーの変化と考えられる。現在, 脳の発達に対する GABA の重要性に注目が集められている。このモデル系および海馬において, 何故未熟期には GABA である必要があるのかを, GABA の未熟期における興奮性および GABA_B 受容体の発達変化と関連機能について検討している。

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

鍋倉淳一, 張 一成, 渡部美穂
福田敦夫 (浜松医科大学)

未熟期および虚血や傷害後早期に GABA は興奮性伝達物質としての作用を獲得する。これは GABA_A 受容体に内蔵するチャンネルを流れる Cl⁻イオンの向きによって決定されるため, 細胞内 Cl⁻イオン濃度によって GABA は興奮性/抑制性が決定される。この細胞内 Cl⁻イオン濃

度は神経細胞特異的に発現する K⁺-Cl⁻トランスポーターである KCC2 によって主に決定されている。発達期や再生期における KCC2 の発現, およびその機構を検討している。KCC2 の発現制御に関して, 細胞内制御分子の探索を行なっている。

BDNF による大脳皮質細胞における GABA 受容体の細胞内動態と分子機構

鍋倉淳一
溝口義人 (九州大学)
平田雅人 (九州大学)
兼松 隆 (九州大学)

脳由来神経成長因子である BDNF は未熟期 (生後 2 週目) には大脳皮質視覚野錐体細胞では, 数分という短時間で細胞膜表面の GABA_A 受容体の増加をともなう GABA 応答の長期増強を引き起こす。逆に, 同時期の海馬 CA1 細胞や成熟期の大脳皮質細胞では膜表面の受容体の減少を伴う GABA 応答長期抑制を起こす。この作用

は何れも細胞内 PLCgamma, Ca²⁺を介する。この部位差および age 差のメカニズムを検討するために, GABA 受容体のリサイクリングに関するメカニズムの解明のために GABA 受容体βサブユニットに作動する蛋白 (phospholipase C-related inactive protein) に注目し, 遺伝子改変動物などを用いて検討している。

クリプトン-YAG レーザーを用いた脳虚血障害モデル動物作成技術の開発

鍋倉淳一

八尾博史（国立肥前精神医療センター）

脳障害の回復期における神経回路の可塑性の研究を遂行するにあたり、生体において、程度の一定した脳障害モデルを作成する必要がある。任意の脳血管の閉塞・再開通を任意に行なうことができる技術を脳虚血作成技術に精通している八尾博史博士と共同で開発を行なう。具体的には、ローズベンガル色素を静脈注入後、任意の脳

血管にクリプトンレーザーを極短時間照射し、血栓形成による閉塞を作成する。任意の時間後に高エネルギーパルスレーザーである YAG レーザーを照射し、血管の再開通を起こさせる。この技術はマウスでは頭骸骨を駆けることなく、非観血的に閉塞・再還流が可能であり、脳虚血・障害の分野では画期的技術となる。

生殖・内分泌系発達機構研究部門

【概要】

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

体エネルギー代謝の調節機構を分子レベルで解明し、その分子機構を通して生活習慣病など様々な疾患の原因・治療法を明らかにしたいと考えている。現在実施している主たる研究課題は次の通りである。1) AMP キナーゼによる生体エネルギー代謝の調節機構の解明、2) レプチン、神経ペプチドによる糖・脂質代謝調節機構の解明、3) 視床下部腹内側核におけるエネルギー代謝調節機構とシグナル伝達機構の解明。

AMP キナーゼによる生体エネルギー代謝の調節機構

箕越 靖彦
岡本 士毅
志内 哲也

AMP キナーゼは、細胞内のエネルギーレベルが低下する危機的な環境で活性化し、エネルギー基質を動員して細胞内 ATP レベルを回復させる。しかし最近、我々は、AMP キナーゼがレプチンやアディポネクチンなどホルモンによって活性化して骨格筋における脂肪の利用を促進すること、視床下部 AMP キナーゼがレプチンなど摂食調節ホルモン、グルコースによって活性を変え、その作用を通して摂食行動を制御することを明らかにした

(Nature 2002, 2004)。このように AMP キナーゼは、細胞内エネルギーレベルを調節するだけでなく、レプチンなどホルモンの働きを介して生体全体のエネルギー代謝を調節している。本研究課題では、AMP キナーゼによる生体エネルギー代謝の調節機構を明らかにするため、活性型並びに不活性型 AMP キナーゼを視床下部の各種神経細胞や骨格筋にレンチウイルスを用いて特異的に発現させ、摂食行動、栄養代謝に及ぼす影響を調べている。

レプチン、神経ペプチドによる糖・脂質代謝調節機構の解明

箕越 靖彦

志内 哲也

斉藤 久美子

我々は、脂肪細胞産生ホルモン・レプチンが摂食行動を抑制するだけでなく、視床下部-交感神経系の働きを介して褐色脂肪組織や骨格筋などエネルギー消費器官でのグルコースおよび脂肪酸の利用を促進することを明らかにしてきた。レプチンは、脂肪萎縮症において発症する重篤な糖尿病を改善することが知られており、その作用の少なくとも一部は、上記調節機構が作動している可能性が高い。我々は、この作用がレプチンだけでなく、

視床下部に特異的に発現する神経ペプチド・オレキシンによっても惹起されることを見いだした。現在、骨格筋でのグルコース利用・インスリン感受性を亢進させるオレキシンの生理的意義を解析している。また、その作用機構を明らかにするため、カテコラミンβ受容体の(β1, β2, β3 受容体)ノックアウトマウスを用いて研究を行っている。

視床下部腹内側核におけるエネルギー代謝調節作用とシグナル伝達機構

箕越 靖彦

岡本 士毅

諸橋 憲一郎 (基礎生物学研究所)

視床下部腹内側核 (VMH) は古くから満腹中枢として知られるなど、生体エネルギー代謝に重要な調節作用を営むことが知られている。しかし、そのシグナル伝達機構は全く不明である。当部門では、VMHでの作用伝達物質と考えられるBDNF(brain-derived neurotrophic factor)の働きを中心に、VMHにおけるエネルギー代謝調節作用並びにそ

のシグナル伝達機構を調べている。また、脳の中でVMH特異的に発現する転写因子AD4BPの遺伝子エンハンサーを用いて様々なトランスジェニックマウスを作製し、生体エネルギー代謝に及ぼすVMHニューロンの調節作用を明らかにする研究を行っている。

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。

超高圧電子顕微鏡室では、医学生物学用超高圧電子顕微鏡（H-1250M 型；常用 1,000kV）を、昭和 57 年 3 月に導入して同年 11 月よりこれを用いての共同利用実験が開始されている。平成 16 年度は共同利用実験計画が 23 年目に入った。本研究所の超高圧電顕の特徴を生かした応用研究の公募に対して全国から応募があり、平成 16 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。共同利用実験の成果は、超高圧電子顕微鏡共同利用実験報告の章に詳述されている。超高圧電子顕微鏡室では、上記の共同利用実験計画を援助するとともに、これらの課題を支える各種装置の維持管理及び開発、医学生物学用超高圧電子顕微鏡に関連する各種基礎データの集積および電子顕微鏡画像処理解析法の開

発に取り組んでいる。電子線トモグラフィーによる手法には、UCSD、NCMIR による方法及びコロラド大で開発された IMOD プログラムでの方法を用いて解析を進めている。

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 123 日、修理調整等 52 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）。電顕フィルム等使用枚数は 5,436 枚、フィラメン点灯時間は 399 時間であった。装置は、平均 64% 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。

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

フォルムパール膜の膜厚安定性の検討

山口 登, 有井達夫

フォルムパール膜は、電子顕微鏡用の試料支持膜として用いられる高分子膜である。この膜は、作成が容易で、比較的耐電子線にも優れ、また機械的衝撃にも強いことから生物試料の低倍観察用として広く用いられている。フォルムパール膜の作成法には、一般に乾式引き上げ法が用いられる。この方式は、まずスライドガラスをフォルムパール溶液（溶媒：クロロホルム）に浸し、次にそのスライドガラスをモーターなどを用いてゆっくり引き上げることにより、その表面に非常に薄い膜を作成する方法である。ガラス表面の薄膜は、水面剥離法により剥離し、グリッドに張り付けて使用される。作成される膜の厚さは、引き上げる時の速度（高速時→厚い、低速時→薄い）と溶液の濃度（濃い→厚い、薄い→薄い）によって

制御が可能である。今回、作成される膜厚の安定性について検討した。約 20 度の室温で湿度 60% 程度の通常の実験室の条件で、引き上げ速度、溶液濃度とフォルムパール膜厚との関係を求めた。膜厚の測定には、金属顕微鏡を利用した干渉法を用いた。この方法は、膜厚（段差）によって生じる干渉縞のズレ量から厚さを算出する手法である。結果を図 1 に示す。環境（室温、湿度等）にもよるが、引き上げ速度と溶液濃度により、安定に膜厚が制御可能であることがわかった。当室ではできる限り振動を除去し、安定に膜を作成できる「自動膜作成装置」を各部に工夫をこらして製作しており、これを用いてより定量的な測定が可能となった。

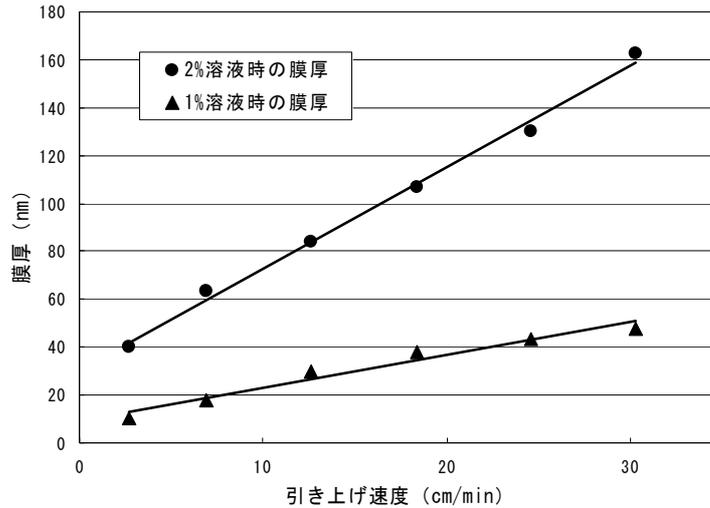


図1. フォルムバル膜厚と引き上げ速度の関係：溶液（溶媒：クロロフォルム）濃度を変化させて示す。

小腸絨毛上皮下線維芽細胞と吸収上皮細胞間の細胞間コミュニケーション

古家園子, 古家喜四夫 (科学技術振興機構 細胞力覚)

小腸絨毛上皮下線維芽細胞は消化管上皮の基底膜の下で細胞網を形成し、lamina propria を包んでいる特殊な線維芽細胞であり、血管や神経終末、絨毛の平滑筋とも隣接しており、絨毛におけるシグナル伝達の要の役割を果たしていると考えられる。我々はこの細胞が食物や水の摂取による機械刺激を感じるメカノセンサーであり、そのシグナルを知覚神経に伝達して摂食反射を引き起こしていることを culture 系で明らかにしてきた。

今回、小腸絨毛下線維芽細胞と上皮細胞由来の T84 細胞を co-culture した。タッチ刺激により発生した Ca^{2+} 波が小腸絨毛下線維芽細胞から T84 細胞に伝播することが明らかになった。

小腸絨毛上皮下線維芽細胞で感知した機械的な刺激や神経細胞からのシグナルは小腸絨毛上皮下線維芽細胞からの ATP 放出による Ca^{2+} 波の伝播という形で上皮細胞に伝播し、その機能を制御していると考えられる。

機能情報解析室

【概要】

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

フィールド電位の直接記録や陽電子断層撮影法などを併用して解析している。

意志に関する脳活動の研究

遠本 徹

「意欲」や「意志」の神経機序は不明な点が多い。これまでに陽電子断層撮影法を用いた研究で、前頭前野・前

帯状野・海馬の脳血流量が想定される意欲の変化と一致した変動を示すことを明らかにした。大脳辺縁系と前頭

前野の「意欲」への関与を示唆する知見と考えられる。さらに一歩進めて、この脳領域でどのような神経活動が行われているのかを解明するために、運動課題を行うサルの前頭前野や前帯状野の大脳皮質フィールド電位を記録した。その結果、この部位のシータ波活動が「意欲」

や「注意」に相関していると解釈可能な知見を得た。ヒトの脳波で「注意の集中」に関連して観察される前頭正中シータ波 (Frontal midline theta rhythms) に相当するものと考えられる。両者の対応関係やサルのシータ波の発生状況をさらに詳しく研究中である。

脳機能分子解析室

【概要】

脳機能に代表されるような複雑な生物反応機構の解明に、遺伝子改変動物の作製は必要不可欠である。とくにラットの遺伝子ターゲティング技術の開発は、脳神経系遺伝子を含む数万にも及ぶ遺伝子の役割を研究するために重要であり、切望されている。脳機能分子解析室では、遺伝子改変動物(マウス, ラット)の作製を進めるとともに、遺伝子ターゲティングによってノックアウトラットを作製することを究極の目的としている。これまでに、ES細胞, 精原細胞の細胞株樹立を目指した研究を

行うとともに、核移植や顕微授精など、ラットにおける発生工学的技術の高度化に取り組んできた。研究課題のうち下記の3題を具体的に示す。(1) トランスジェニック (Tg)ラットの作製効率を改善するため、顕微授精技術に応用した Tg ラットの作製法を開発した。(2) 円形精子細胞の顕微注入によって効率的にラット産仔を作出するため、卵母細胞の活性化誘起方法について検討した。(3) ラットの核移植技術を開発するため、M 期体細胞の核移植によるクローンラットの作製を試みた。

外来 DNA に曝露した精子の顕微授精によるトランスジェニックラットの作製

加藤 めぐみ, 金子 涼輔, 平林 真澄

卵細胞質内精子注入法 (ICSI) を応用してトランスジェニック (Tg)マウスを作製できると報告された。本実験では、DNA 溶液にさらしたラット雄配偶子を顕微注入することにより Tg ラットの作製を試みた。ラット精子を EGFP 遺伝子溶液(0~10ng/μl)に1分間さらした後、未受精卵子に顕微注入した。DNA の至適濃度は 0.5ng/μl で、

曝露精子の ICSI 後の生存率は 76%(327/452)であった。翌日、分割卵 75 個 (23%)を含む 286 個の胚を偽妊娠 1 日目の雌ラットに卵管移植したところ、25 匹 (9%)の産仔が得られ、そのうち 5 匹 (産仔の 20%) が EGFP 陽性の Tg 個体であった。以上、Tg ラットの作製に顕微授精技術が応用できることを証明した。

ドナーとレシピエントのラット系統は

1 細胞期卵から体外発育した桑実胚～胚盤胞の産仔発生に影響する

加藤 めぐみ, 平林 真澄, 保地 眞一 (信州大)

ラット体外培養胚の産仔発生率は 10%前後と低く、発生工学技術の開発遅延の一因となっている。本実験では、Wistar 系または 3 元交雑種 (SD x DA 系 F1 雌 x Wistar 系雄) の前核期卵を 96 時間培養後、偽妊娠 3 日目および

4 日目の Wistar または F1(SD x DA)雌の子宮に移植し、産仔発生能を比較した。前核期卵の桑実胚～胚盤胞への体外発生率は 3 元交雑種胚の方が Wistar 胚に比べて高かった (74 vs 66%)。Wistar 胚の産仔発生率は、Wistar 受卵

雌のとき13~24%, F1 受卵雌のとき24%だった。一方, 3元交雑種胚のそれは, Wistar系受卵雌よりもF1 受卵雌に移植したときの方が高かった(31~34 vs 42~59%)。も

っとも高い産仔発生率(59%)は5日目の3元交雑種胚を偽妊娠3日目のF1 受卵雌の子宮環境に戻したときに得られた。

ラットM期体細胞の核移植によるクローン個体作製の試み

平林 真澄, 加藤 めぐみ, 保地 眞一 (信州大)

2003年9月, Qi ZhouらはM期体細胞核を使ったクローンラットの作製を報告した。この原著を可能な限り忠実に再現し, クローンラットが作製できるかを検証した。ドナー細胞には胎齢12.5日目のDA系ラット由来線維芽細胞の細胞周期をデメコルシン処理によってM期に同調させたもの, レシピエント卵母細胞にはSD系雌ラット由来のMG132処理した裸化卵子を用いた。ドナー細胞核を注入し, ピペットを引き抜きながら卵母細胞の

MII核板を吸引除去した。再構築した卵子をブチルラクトン処理によって活性化誘起したところ, 分割はした(56%, 175/313)が, それ以降の体外発育例は得られなかった。67個の2細胞期胚を含む計166個の再構築胚を偽妊娠雌ラットに移植したが, クローン産仔はおろか着床痕も確認できなかった。この成績はこれまでのG0/G1期の体細胞核移植における発生率よりも低かった。

統合バイオサイエンスセンター

時系列生命現象研究領域

【概要】

3年前の研究室発足以来、発生、分化、再生などの時系列生物現象における生理学的変化(膜電位、イオン濃度)の役割を分子細胞レベルで明らかにすることを目指してきた。今年、昨年発見した新規電位センサータンパク VSP について、その分子機能の詳細を明らかにした。また、平成 15 年度後半から加わった東島助教授がゼブラフィッシュを用いた神経回路機能の研究系を立ち上げ、木村非常勤研究員とともにトランスジェニック技術

を用いた解析を軌道に乗せている。また、平成 16 年 4 月から加わった西野研究員(学振特別研究員)が比較生理学的なアプローチで、脊索動物の運動機能についての解析をスタートした。このように動物種としてホヤ、マウス、魚、を扱いながら、アプローチもゲノムインフォマティクス、比較生理学、トランスジェニックなどの複数の手法を横断的に扱える環境になってきた。

新規電位依存性タンパク VSP の分子機能

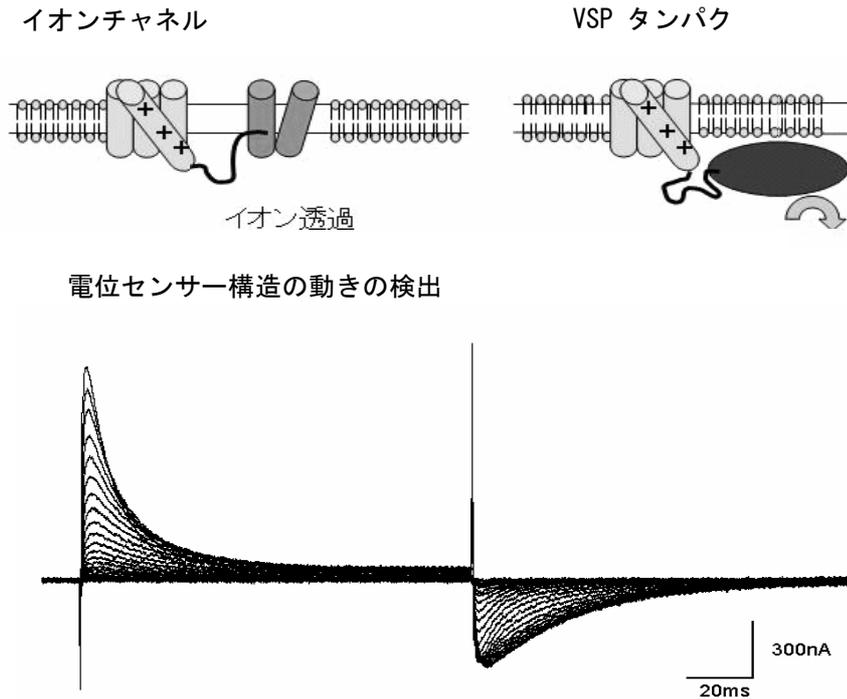
岩崎 広英, 村田 喜理, 岡村 康司
稲葉 一男 (筑波大学 下田臨海実験センター)

前年に我々は京都大学と共同でホヤゲノムからイオンチャンネル関連分子を網羅的にリストアップする作業を行ったところ、電位依存性チャンネルの電位センサーを有しながらイオンが通るポア領域を欠き、その代わりに C 末端側にガン抑制遺伝子として知られる PTEN と相同性の高い酵素ドメインを有する新規分子の発見に到った。今年、同定した電位依存性タンパク VSP について、細胞内ドメインの機能を明らかにするため、大腸菌に GST との融合タンパクとして発現させ、これについてマラカイトグリーンアッセイと TLC によるイノシトールリン脂質の脱リン酸化活性を定量した。その結果、VSP の細胞内ドメインが PIP3 を基質とした脱リン酸化活性を有することが明らかになった。

さらに、膜貫通ドメインの電位センサー機能が C 末端側の酵素機能とどのような連関があるかを明らかにするため、イノシトールリン脂質のうち PIP2 によって活性が変化することが知られている GIRK チャンネルまたは

KCNQ チャンネルを、VSP タンパクとともに、アフリカツメガエル卵母細胞へ強制発現させ、膜電位の測定と、酵素活性の測定を同一の細胞において同時に行う系を開発した。VSP が存在するときのみ、膜電位の変動に応じて GIRK チャンネルまたは KCNQ チャンネルの活性が変化し、電位センサー機能を失った VSP や、酵素活性をうしなつた変異体の VSP では、このようなカリウムチャンネルの活性の変動は見られなかった。これによりイオンチャンネル以外のタンパクで初めて、電位センサーによりタンパク機能が調節されることが明らかになった。

この分子がどのような生理機能に役に立っているかを知るために、VSP に対する抗体を作成して、局在をしらべたところ、精子の尾部の膜に分布することが明らかになった。このことから、精子の運動の制御や、形態の維持などに役に立っているのではないかと推察された。現在、ゼブラフィッシュなど脊椎動物の相同遺伝子についても機能解析を行っている。



中枢神経細胞の自発発火特性を規定する電位依存性ナトリウムチャネルの制御機構

岩崎 広英, 岡村 康司, 高木 正浩
白幡 恵美, 早坂 清 (山形大学医学部小児科学教室)

前年にクローニングしたヒト電位依存性 Na チャネル Nav1.6f は, アフリカツメガエル卵母細胞と tsA201 細胞発原型において顕著な持続性電流を呈した。Nav1.6 がランビエ絞輪部で活動電位の伝搬に働き完全な不活性化を示すことを考えると, ランビエ絞輪部において, 持続性

電流を負に制御する因子が存在するのではないかと考えられた。そこでランビエ絞輪に発現するいくつかのタンパクと Nav1.6 を共発現させ, 不活性化に及ぼす影響を検討した。

ゼブラフィッシュ脊髄神経回路形成機構の解析

東島 眞一, 木村 有希子

近年の脊髄神経発生研究により, いくつかの転写因子の発現に仲介されて, 形態学的に異なったタイプの介在神経細胞が分化してくることが示唆されている。しかしながら, これらの介在神経細胞が, 最終的に神経回路網の中で機能的にどのようなタイプの神経細胞へ分化していくかは, まだほとんど分かっていない。ゼブラフィッシュは, その脊髄神経回路が単純であることに加え, トラ

ンスジェニックフィッシュの手法を用いて, 特定の転写因子を発現する神経細胞を生きのままラベルできるため, 上記の課題を追求するためのよいモデル生物である。こういった背景の元, 我々は, 特定の転写因子の発現する神経細胞の, 発生分化および, 回路中での機能の解析を, ゼブラフィッシュを用いて進めている。

本年度は特に, Alx (哺乳動物 Chx10 のゼブラフィッ

シホモログ)に焦点を当てて解析を行った。Alx 陽性細胞でGFPを発現するトランスジェニックフィッシュを作製し、Alx 陽性細胞を可視化した。その結果、Alx 陽性細胞は、同側下行性の介在ニューロンであることが明らかになった。また、マーカー遺伝子との二重染色により、Alx 陽性細胞の大半(おそらくすべて)はグルタミン酸作動性の興奮性神経細胞であることを明らかにした。これらの結果は、Alx 陽性細胞が、ゼブラフィッシュの遊泳行動において、同側の運動ニューロンのフェージックな活動を直接制御するCPG (central pattern generator) ニューロンである、という可能性を強く示唆している。現在、この仮説を検証するべく、Alx 陽性細胞の電気生理学的な

記録を行っている。

また、Alx、および、他の転写因子に関して、その陽性細胞の神経伝達物質特性を簡便に調べるための系の作製に取り組んだ。すなわち、特定の伝達物質特性をもつ神経細胞をGFPあるいはDsRedで可視化して、トランスジェニックフィッシュの掛け合わせ(それぞれ違う色の蛍光タンパクを発現するものを用いる)で、転写因子陽性細胞の神経伝達物質特性を調べることができる系を確立することを目指している。現在、グリシン作動性神経、グルタミン酸作動性神経が可視化されているラインの確立に成功している。

尾索動物の運動機能を司る構成と原理の解明

西野 敦雄, 東島 眞一, 岡村 康司
勝山 裕 (神戸大学医学系研究科)

尾索動物は背側神経系や脊索を有し脊椎動物と類似した体制を示しながら、脊椎動物よりも遙かに少ない細胞構成(運動ニューロン数個、筋細胞数十個以下)で精妙な運動機能を示す。一方、尾索動物の中でもホヤのオタマジャクシ幼生とオタマボヤ、ウミタルとではその運動機能は大きく異なっている。動物ごとに共通の分子、細胞機能を持ちながら異なる運動システムを実現する原理は何か? また進化的に類縁な脊索動物種の間で、そのシステムが段階的にどのように変容していったか? これを理解することは、われわれ脊椎動物の生理機能獲得に到った進化史を理解することと、運動の基本構成原理を解

明することに繋がる。これまで運動ニューロンの数が最小(6個)のマボヤにおいて個々の運動ニューロンの構成や前駆細胞の運命決定の過程を明らかにしてきた。現在、ユレイボヤのオタマジャクシ幼生とオタマボヤ、ウミタルという運動システムの大きく異なる3つの尾索動物の運動発現の機構を明らかにする研究を行っている。これにはゲノムのアプローチ、分子生物学的解析、キネマティクス解析、電気生理学的解析のそれぞれを行い、まずは運動そのものを担う筋細胞の特性、次に運動を制御する神経回路について比較を行っている。

戦略的方法論研究領域

【概要】

「構造と機能」という分子生物学のパラダイムは生物の機能が生体高分子、特に蛋白質の独自の構造によって支えられていることを明かにして来た。本部門では細胞内超微小形態を高分解能、高コントラストで観察する新しい電子顕微鏡の開発を背景に細胞の「構造と機能」を研究している。

永山グループは位相差電子顕微鏡の開発と、その応用

としての1分子DNAの塩基配列直読法の開発、チャネル蛋白質の電子線構造解析、ウィルス、バクテリア、培養細胞の無染色観察を行った。

物質輸送に関する研究が主眼である村上グループは、健常者の唾液糖と血糖の関係を唾液分泌速度と共に測定し、ラット顎下腺における傍細胞輸送の成果を臨床応用に結び付けることが可能になった。ケンブリッジ大学、

カリアリ大学との共同研究も継続発展しカソリック大学ローマ校との共同研究も開始している。

瀬藤グループは質量分析イメージング法開発応用, 単アミノ酸側鎖付加の分子機構の研究, 新しい蛍光顕微鏡

Stick 顕微鏡のテストを行った。

大橋はエンドサイトーシス経路における選別輸送の研究を変異細胞を用いて行った。

位相差電子顕微鏡の改良

Radostin Danev, 杉谷正三, 永山國昭

電子位相顕微鏡の改良, すなわち Zernike 位相差法 ($\pi/2$ 位相板の利用), 微分干渉法相当のヒルベルト微分法 (π 位相板の利用) の改良を行った。特に位相板につき新しい帯電防止法が見つかり, 帯電問題を完全に解決できた。ソフトウェアについては前年に引き続き Virtual TEM の

設計とコーディングを行った。Virtual TEM は電子顕微鏡実験をコンピュータ内でおこなうもので, 対象物質の構造と元素組織がわかれば電顕像を通常法, 位相差法を問わずシミュレーションできる。特に 1 分子 DNA 塩基配列直読法のシミュレーションで有効性を発揮した。

位相板用炭素薄膜の材料科学的研究

内田 仁, 伊藤俊幸, 大河原 浩, 永山國昭
宇理須恆雄 (分子研)

位相板の帯電防止は電子位相顕微鏡にとって死命を制する重要な要素技術である。帯電の原因が位相板に付着した 3 種 (有機物, 酸化金属, マイカ粉) 汚れによることが一昨年度わかったので, その解決法を探求した。位相

板作成工程で不可避免に入るマイカ粉汚れについてはその帯電を完全に遮蔽する方法「炭素膜サンドイッチ法」が見出され, この問題に決着をつけることができた。

DNA/RNA 塩基配列の電子顕微鏡 1 分子計測法の開発

Krassimir Tachev, 高橋佳子, 大河原 浩, 永山國昭
片岡正典 (計算科学研究センター)
田坂基行 (東大院・理)

DNA/RNA の塩基配列決定の高速化を図るため, 電子顕微鏡技術を基軸に新しい方法論を開発している。この方法は i) DNA/RNA の一本鎖の利用, ii) 完全伸長した多数の一本鎖 DNA/RNA 分子の一方向整列によるアレイ作成, iii) アレイ化した一本鎖 DNA/RNA への単量体 A, T, G, C の有機溶媒中での特異的水素結合, vi) 単量体塩基にあらかじめラベルしたマーカー分子 (メタルクラスター)

の電顕による観察と識別, v) 識別したマーカー分子からの塩基配列の解読, の 5 つの要素技術により成り立っている。マーカーの識別には 0.3nm の空間分解能と定量的コントラスト測定 of 2 要件を満たす電子顕微鏡が必要である。日本電子と共同で JST の委託開発プログラムを利用し, 200kV の位相差電顕を開発した。

膜タンパク質 TRPM2 のフッ化界面活性剤による可溶化

松本友治, 佐々木悠, 永山國昭
原 雄二, 森 泰生 (京都大学大学院工学研究科)

カルシウム透過性カチオンチャンネル TRPM2 は細胞内レドックス状態の変化によって引き起こされる細胞死に関連があるものと考えられている。本研究では、バキュロウイルス-カイク系を用いて大量発現させたヒト TRPM2 をフッ化界面活性剤ペンタデカフルオロオクタン酸 (PFO) の添加によって可溶化し、アフィニティカラムならびに微量ゲル濾過により精製した。

精製試料に対する PFO-PAGE ならびにウェスタンブロットの結果、モノマーに対応するバンドの他、高分子量側にも TRPM2 抗体で染まるバンドが確認された。電子顕微鏡下の観察でも複数の粒子が寄り添うように見える

像が得られた。ショウジョウバエの TRP チャンネルとの配列類似性から、TRPM2 も 4 量体を形成するものと予想されているが、PFO によって可溶化された試料において TRPM2 オリゴマーがはじめて実験的に捉えられた。

しかしながら、これまでのところ PFO によって可溶化された TRPM2 では、カルシウムチャンネル活性、ADP リボースピロホスファターゼ活性とも必ずしも明瞭ではなく、可溶化された試料が生体中の TRPM2 と同じ活性、構造をどの程度保持できているかについては慎重な検討が必要と思われる。

灌流ラット顎下腺における水分泌調節機構

村上政隆, 大河原浩
細井和雄, Kwartarini Murdiastuti (徳島大学歯学部)
Bruria Sachar-Hill, Adrian E. Hill (ケンブリッジ大学生理科学部)

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、血液成分が唾液に移行するのはこのためである。標識デキストランをプローブとしてフィルター特性を分泌持続期に計測すると、水の分子半径 1.5 Å では 1 の値に外挿され、分泌持続期に水は細胞間隙/tight junction を通過できることが示された。また、collagenase 処理腺房における管腔内色素希釈過程と腺水分泌の比較から、刺激初期には水分泌は細胞経路成分が分泌量のほとんどを占め、刺激持続期には傍細胞経路が優位を示すことが明らかになった。ここに主に水分子を通過させると考えられてきた管腔側膜 AQP5 の機能に大きな疑問が生じた。

ショ糖により浸透圧変化を起こしてやるとラット顎下腺 (SMG) の水分泌速度は低下する。しかし浸透流理論から推測される分泌速度よりはるかに低下した。これらは AQP5 が傍細胞輸送を制御する理論 (Hill & Shachar-Hill, JMB, 2005 in preparation) と一致し、既報 (Murakami, 2001, JP 537:899) のデータからのパラメータを用いると AQP5 を浸透圧受容器とする定量モデルは高

浸透変化による分泌速度変化を予測することができた。

徳島大学で遺伝的に選択し開発された AQP5 低発現ラット (Western blotting で正常ラットの 1% 以下, Murdiastuti, 2002, Pflugers Arch, 445:405) を用い検討した結果、浸透圧変化を与えた後の分泌速度、その変化は正常ラットのものとは非常に似ていた。この結果は通常の分泌速度の場合 AQP5 は管腔膜を会する浸透流に寄与することはできないが、AQP5 が働いているフィードバック制御系は働いており細胞信号系のほかの要素が大きな増幅に関わっていることを示唆した。

一方、AQP5 を阻害する水銀を分泌導管より逆行注入し AQP5 を部分的に阻害すると水銀イオン濃度依存性に分泌速度の低下が見られた。さらに高浸透圧ショックの反応は浸透平衡系から予測される結果より大きくふれた。これは傍細胞輸送の AQP5 制御が消失し付加的な浸透圧による水分泌が減少したことを示している。この結果は上皮膜の定常状態での水分産生は浸透的ではなく、AQP5 を浸透圧受容器とするフィードバックモデルが関与していることを示している。

灌流ラット顎下腺の細胞間分泌細管の各種薬剤による形態変化

村上政隆, 前橋 寛

Alessandro Riva, Felice Loffredo, Francesca Testa-Riva (Cagliari 大医, 細胞形態学)

種々の薬剤が唾液分泌を起こすことが知られているが、臨床的な結果のみであり、作用点が不明なものが多い。逆に阻害剤を用いた実験で目的とする阻害以外の効果が出現する場合も多い。2004年度はこれらに関連して2つの形態観察/実験を行った。

Clozapine の作用点: 唾液分泌を誘発する臨床薬として精神疾患に用いられる Clozapine についてラット顎下腺の分泌効果と形態変化を観察した。Rivaらはヒト顎下腺標本を切り出し、incubateし、各種刺激薬による形態変化を観察してきたが、作用点についての明確な回答は得られなかった(Riva, 2003, EJM, 41: 83)。今回個体からの影響を切り離すためラット顎下腺を摘出、血管還流してclozapineによる刺激を行ったが分泌は誘発されず、高分解SEMにより細胞間分泌細管のmicrovilli pitの数減少、microbudsの数増加もわずかであり、蛋白分泌を示唆する形態変化もわずかであった。その結果、作用点が唾液腺の受容体にあるのではなく、中枢性の作用が神経系を介

し間接的に唾液分泌に連携していることが明らかになった。

水銀の細胞間分泌細管形態変化に及ぼす効果。AQP5を阻害する水銀を分泌導管より逆行注入しAQP5を部分的に阻害すると水銀イオン濃度依存性に分泌速度の低下が見られることを報告したが、水銀効果はAQP5のみに限定されないため、細胞間分泌細管の形態変化をosmium maceration法により検討した。10, 200, 1000 μ M水銀イオンを逆行性に注入したラット顎下腺細胞間分泌細管の細胞質側表面は10 μ Mでは変化が見られなかったが、200 μ Mでは細管の細胞質側表面が萎縮したような襞状の構造が出現しはじめ、1000 μ Mではこのひだ状の構造が顕著になった。1000 μ Mでは水分泌がほとんど阻害されていることから、細胞膜状の襞形成とa) AQP5機能の消失による経細胞膜輸送の消失、b) Clイオンチャネル機能喪失による浸透圧勾配の消失と傍細胞輸送の消失の両者が起こっていると考察された。

質量分析顕微鏡の開発と応用

瀬藤光利, 新聞秀一, 永山國昭

吉田圭一, 小河 潔, 古田 大, 市村克彦 (島津製作所)

島津製作所と共同で質量分析顕微鏡の設計および予備実験を開始した。質量分析顕微鏡は、従来の光や電子を用いた顕微鏡と異なり、物質の質量を用いた顕微鏡であり、観察と同定を同時に行うことができる我々の発明である。

2004年は高解像度化により顕微鏡とし、段階質量分析

シグナルを取ることで内部配列を読み物質同定を行える装置とするための設計を行った。

また、組織切片を用いたMALDI(マトリックスを用いたレーザーによるイオン化)によるイメージングの予備実験を行い、組織切片からの質量データ取得に成功した。

単アミノ酸側鎖付加の分子機構の解明

瀬藤光利, 新聞秀一, 福田義之
池上 浩司, 松本 峰男, 矢尾育子 (三菱生命研)

単アミノ酸側鎖付加はチューブリンなどに起こる翻訳後修飾である。神経細胞の発達に伴って亢進することが知られているが、その分子実体は明らかでない。われわれはグルタミン酸付加を行う新規酵素およびこの酵素活性に必要な補助蛋白を、大規模ランダムミュータジェネシスによる変異体マウスの解析とイーストツーハイブリッド法スクリーニングにより発見した。

驚いたことに α チューブリンのグルタミン酸付加酵素と

β チューブリンのグルタミン酸付加は近縁ではあるがそれぞれ異なる酵素であった。補酵素 PGs1 は α チューブリンのグルタミン酸付加にのみ必要であった。

それら新規酵素群のノックアウトマウスを作成、さらなる解析をすすめている。また、ノックアウトマウスの解析の予備実験として、神経細胞を生きたままのマウス脳内で観察する新しい蛍光顕微鏡 Stick 顕微鏡をオリンパス社と共同でベータサイトテストを行った。

エンドサイトーシス選別輸送のメカニズムと生理機能

大橋正人

エンドサイトーシス経路の生理機能とメカニズムの解明を目指している。これまでに、後期エンドソーム多胞体 (MVB) からゴルジに向かう受容体の、MVB からの選別にコレステロールが必要なこと、そこで必要なコレステロールを供給するコレステロール合成酵素である NAD(P)H ステロイド脱水素酵素様蛋白質 (Nsdhl) が、後期エンドソームでの選別機能蛋白質である TIP47 と細胞内脂肪滴 (LD) 表面で共存すること、胎児発生異常の原因変異 G205S を持つ Nsdhl は LD 上に局在できないこと、Nsdhl が、LD の有無により LD-小胞体間で二相的分布を示し、その局在により、コレステロールの生合成系が調節されることなどを示すデータを得た。以上の知見より、LD 表層ドメインがコレステロール代謝系と細胞内膜系での細胞シグナル分子選別機能を結びつける制御ブラッ

トフォームとして働いているという仮説を提唱した。本年度は、この仮説を柱に、細胞内膜系による細胞増殖分化シグナル制御のメカニズムを解き明かす事を目標とし、細胞増殖分化シグナリング分子として重要なソニックヘッジホッグの細胞へのシグナル入力メカニズムについて検討した。ソニックヘッジホッグの細胞シグナル入力はその受容体である Patched とシグナル変換分子である Smoothened の二つの膜貫通蛋白質の作用で行われる。そして、Patched の機能はコレステロールの機能と密接な関わりがあることが知られている。これまでに、脂肪滴表層に存在する Nsdhl に異常のある変異株を用いた解析により、Patched と Smoothened の細胞内膜系での動態がコレステロール合成系の異常によって影響されることを示すデータを得た。

生命環境研究領域

【概要】

細胞は、それを取り巻く環境の大きな変化の中で、その環境情報を他のシグナルに変換し、細胞質・核や周囲の細胞に伝達することによって環境変化にダイナミックに対応しながら生存応答を行っている。細胞が存在する

臓器・組織によって細胞が受け取る環境情報は異なり、従って細胞が持っている環境情報を受信する機能も異なる。それらセンサー蛋白質は環境の変化に応じてダイナミックに感受性や発現等を変化させてセンシング機構の

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

感知するイオンチャネル型のセンサー蛋白質の構造機能解析、活性化制御機構の解析を通して細胞感覚の分子メカニズムの解明を目指している。特に、侵害刺激、温度刺激、機械刺激の受容機構について解析を進めている。

細胞運動は tail の detach と front の伸展の協調メカニズムによって行われる。この細胞接着・細胞運動の時空間的制御機構の分子メカニズムの解明も目指している。

カプサイシン受容体のリン酸化機構の解析

Sravan Mandadi, 村山奈美枝, 富永知子, 富永真琴

カプサイシン受容体 TRPV1 は, TRP イオンチャネルスーパーファミリーの TRPV サブファミリーに属する侵害刺激受容体であり, カプサイシンのみならず, プロトンや熱によっても活性化する。TRPV1 は種々の蛋白質リン酸化酵素によってリン酸化されるが, 我々はこれまで PKC によるリン酸化機構を解析しており, このリン酸化が TRPV1 の感作のみならず, 脱感作後の再感作にも重

要であることを明らかにした。さらに, PKC ϵ が特に関与することを見出した。

また, PKC によってリン酸化した TRPV1 を特異的に認識するポリクローナル抗体を作製した。この抗体は, リン酸化された Ser800 を特異的に認識し, 痛み研究, 炎症研究に非常に有用であることが明らかになった。

プロスタグランジンによる炎症性疼痛発生メカニズムの解析

森山朋子, 東智広, 富樫和也, 杉本幸彦 (京都大学), 富永知子, 成宮周 (京都大学), 富永真琴

我々はこれまで, 種々の炎症関連メディエーターがそれらの Gq 共役型受容体活性化から PKC 依存的に TRPV1 活性を増強させることを報告してきた。炎症において中心的な役割を果たす炎症関連メディエーターの 1 つであるプロスタグランジン (PGE₂, PGI₂) も, その代謝型受容体 (EP₁, IP) に作用して主に PLC 活性化の下流で TRPV1

を PKC によってリン酸化させることによって TRPV1 の活性増強を引き起こすことを明らかにした。この TRPV1 とプロスタグランジン受容体の機能連関の重要性は, TRPV1 やプロスタグランジン受容体の欠損マウスにおいて熱性痛覚過敏が有意に抑制されるという結果から個体レベルでも確認された。

TRPV4 結合蛋白質の解析

東智広, 森山朋子, 富永知子, 富永真琴

温度感受性 TRP チャネルの 1 つ TRPV4 は, もともと低浸透圧で活性化するチャネルとして報告されたが, 我々が温度感受性も有することを報告した。TRPV4 は,

感覚神経のみならず表皮ケラチノサイトや視床下部で発現することが知られている。表皮は温度変化に直接曝露される部位であり, 視床下部は体液浸透圧や体温の調節

中枢として機能していると考えられている。そこで、TRPV4 の活性制御機構を明らかにする目的で皮膚の cDNA ライブラリー、脳の cDNA ライブラリーを用いて TRPV4 の細胞内ドメインと結合する蛋白質のスクリー

ニングを行い、興味深い結合蛋白質を得た。今後、両蛋白質の結合ドメインの解析、その結合の TRPV4 機能への影響の解析を進めていきたい。

TRPV4 の体温制御機構への関与の解析

三村明史, 森山朋子, 鈴木誠 (自治医科大学), 富永真琴

温度感受性 TRP チャネルの 1 つ TRPV4 は視床下部に発現しており、体温調節機能への関与が推察されている。そこで、野生型マウスと TRPV4 欠損マウスの腹腔内に温度計を埋め込み、自由行動下に体温の連続記録を行っ

た。無刺激の状態では、両マウス間で体温の概日周期に大きな変化はみられなかった。暑熱負荷等のストレスを加えたときの体温記録を行い、TRPV4 の体温制御機構への関与を明らかにしていきたい。

新規温度感受性 TRP チャネルの探索

富樫和也, 東智広, 富永知子, 森泰生 (京都大学), 富永真琴

哺乳類ではこれまでに 6 つの温度感受性 TRP チャネルが知られており、それらは TRPV, TRPA, TRPM サブファミリーに属する。新たな温度感受性 TRP チャネルの探索を目的として、既知の TRP チャネルの温度感受性のスクリーニングを行った。その結果、冷刺激受容体として知

られるメントール受容体 TRPM8 に最も相同性の高い TRPM2 に温度感受性があることを見出した。この TRPM2 の温度感受性の解析をパッチクランプ法、Ca²⁺-imaging 法を用いて進めている。さらに、この TRPM2 の温度感受性の生理学的意義の解明を進めたい。

中枢神経系における温度感受性 TRP チャネルの発現と機能解析

柴崎貢志, 富永真琴

温度感受性 TRP チャネルは、一般には感覚神経や表皮ケラチノサイトで温度受容に関わっていると考えられているが、TRPV1 等中枢神経系での発現がみられるものがある。そこで、知られている温度感受性 TRP チャネルの発現を検討したところ、海馬での強い発現を示す TRP チ

ャネルを見出した。この TRP チャネルの海馬での発現の時間経過、発現様式、生理学的意義の検討を海馬初代培養系に免疫細胞化学法、パッチクランプ法、Ca²⁺-imaging 法を適用して進めている。

mDia 結合タンパク質の探索と機能解析

島貫恵実, 富永知子

Rho の標的蛋白質である mDia の細胞運動における役

割の解明を目指している。Yeast-two Hybrid 法を用いてい

くつかの mDia 結合蛋白質を見いだしている。その 1 つは actin 結合蛋白質である。この蛋白質が mDia と協調することで細胞接着斑の安定化等に関与する可能性もある。また、文献的にこの蛋白質は細胞のがん化能に関与するとの報告もあるので、mDia とこの蛋白質の関連を、生化学的および細胞生物学的に解析している。

さらに、mDia の特性から mDia に結合することが予想される蛋白質は、Rac1,Cdc42 と関連することが予想される。よって両者の結合が確認できれば、Rho ファミリー蛋白質間の協調作用および細胞運動における役割をさらに明らかにできる可能性がある。

神経回路形成における mDia を介する情報伝達経路の役割

島貫恵実, 柴崎貢志, 富永知子

mDia および mDia を介する新たな情報伝達経路の解析によって、細胞運動の時・空間的制御機構を解明し、神経の成長円錐の形態維持・軸索伸長過程への寄与を検討している。新規 mDia 結合蛋白質 DIP が mDia による軸作伸展作用の下流で機能することを見いだした。また、mDia, DIP の中枢神経系での部位特異的な発現を発生初

期から *in situ* hybridization 法, 免疫組織化学法を用いて検討し、両者が中枢神経系の様々な部位で共局在することを確認した。現在、作製した DIP knock out mouse の中枢神経系の組織形成等における役割を個体レベル、および神経細胞初代培養系で検討中である。

動物実験センター

【概要】

平成 16 年度より岡崎国立共同研究機構は独立行政法人自然科学研究機構となり動物実験センターは岡崎 3 機関共通施設として再出発した。厚生省所管の労働安全衛生に関わる各種の規制が適用されることになり、設備機器の保守点検にあたる施設職員は取扱責任者、作業者はそれぞれ相応の資格が必要となった。このため施設の技術職員は各種の講習会、研修会などを受講して資格を取得するなど新体制に備えた。

動物実験センターにおいてはラット、マウスの処分に用いられていたエーテルの取り扱いをどうするかが大きな問題となったが安全を優先するため全面的に炭酸ガス麻酔に切り替えることとした。また小型圧力容器、EOG ガスなど施設が保有する機器設備、薬物などの取り扱いについても改めて点検し適正化をはかった。

<実験動物の輸入、飼育規制>

「感染症予防法に基づく輸入届け出制度」が平成 17 年 9 月より厚生労働省から、また「生物多様性の確保にかんするカルタヘナ条約」に基づく措置としてニホンザル以外のマカクザル等の特定外来生物の飼育規制が同 11 月より環境省からそれぞれ施行されることが示された。「輸入届け出制度」は感染症の疑いのある動物の輸入を規制することを目的として導入が検討されている制度であるが、医学生物学研究に用いられる実験動物のラット、マウスにまで適用されることになればその影響は極めて大きく、その取り扱いがどうなるか気がかりなところである。特定外来生物の飼育規制に関しては飼育施設としての許認可手続きを行うべく準備を進めているところである。カルタヘナ条約議定書に関連しては、従来「組み換え DNA 実験指針」として示されていた事項が法令として運用されることになり、関係者の間で遺伝子改変動物の授受における手続きの不備が指摘されるという事例が問題となった。遺伝子改変動物の授受に際しては相手方へ当該動物に関する情報を告知することが義務づけられているが、現在通知方法が個々バラバラに行われているためわかりにくく、早急に統一的な様式の整備が求められている。研究者にとって時に複雑で面倒な各種の法令ではあるが、透明性を保ちながら快適な研究環境を維持す

るためには迅速で的確な情報の提供も動物実験センターに期待される役割の一つであり現在組み換え DNA 実験安全委員会と連携しつつ必要な事務手続きの整備作業を行っているところである。

<飼育室、実験室の整備>

統合バイオサイエンスセンター棟へ移転予定の全部門引越しが完了し、山手地区動物センター棟はいよいよフル稼働状態を迎えた。山手地区動物センター棟がフル稼働になったことに伴い、動物飼育にかかる業務量も著しく増大した。このため委託作業員の配置転換を図ったほか新たに作業員 2 名を増員した。この措置により受精卵移植や胚凍結作業の一部を外注できるようになったほかセンター職員の業務の軽減もはかることが出来、実務の面ではなんとか業務を処理できる体制となったが、山手地区動物センターの管理運営体制は十分とはいえない。山手地区動物センター棟は原則的に SPF 動物のみを飼育するバリアー施設であり、微生物モニタリングや動物の飼育管理など様々な面で利用者の協力が不可欠である。ユーザーの理解と協力を得て幸いにもこれまでのところ感染事故は皆無であるが、国内のブリーダーにおいては平成 15 年度、16 年度とたてつづけに *P. Pneumotropica* 汚染騒ぎが起きている。施設に直接の影響はなかったもののこのような事故はいつ起きるか予測できないもので、事故の予防や適切な対応のためには経験のある実験動物の専門家を核とした恒常的な微生物学的な監視体制の構築と配置が望まれる。

一方、明大寺地区動物センターにおいては、山手地区動物センター棟と機能的に整合性のある運用のためにラット、マウス飼育室の SPF 化が現実的な課題となっており、陸生動物室本館地下 1 階を中心とした SPF 化のための施設改修計画を策定して概算要求をおこなっている。稼働中の他の飼育室の機能を損なうことなく改修を行うため、改修方法、改修対象となる飼育設備等について検討している。

このほか、平成 16 年度は明大寺地区動物センター棟にユーザーから要望のあった新館 4 回の P2 実験室を P2a 実験対応可能にしたほか、新たにトランスジェニックラ

ット飼育室2室を用意した。山手地区および明大寺地区の水生動物室においては室温と照明が調節できる恒温室をそれぞれ1室増設した。また、本館洗浄室の洗濯機を別室に移してクリーンエリアを確保し洗浄済み飼育機器の再汚染防止をはかった。

<主なトラブル>

大事には至らなかったが山手地区において凍結防止装置の作動によって空調用ダンパーが閉鎖するトラブルがあった。空調ダンパーの閉鎖は風量バランスの異常からバリアーの破綻につながる恐れのあることから何らかの対策をとる必要がある。

明大寺地区においては空調用ヒートポンプの冷媒中に水が入ることによる不調が続き、抜本的な対策が見いだせず対応に苦慮している。応急的に水抜きにより対応し

ているが将来に不安を残している。このほか水生動物室の揚水ポンプの劣化、検疫中のサルの死亡事故などがあったが大事に至るものはなかった。

<今後の課題>

統合バイオサイエンスセンターがフル稼働になったことにより、山手地区動物センター棟における飼育室の稼働率が上昇し業務量も増えている。センターでは職員の配置換えを行って対応しているが、異動や退職する職員が相次いだ上、微生物学的コントロールの必要な山手地区とコンベンショナル動物が中心の明大寺地区の業務を同一人が並行して行うことは管理上からも問題があり、まさに綱渡りのように危なっかしい状態が続いている。専任教員を含む組織体制の見直しと構築が望まれる。

計算科学研究センター

【概要】

様々な機能性生体様物質の創生を目指している。なかでも核酸中の塩基対に注目し、4種類の天然塩基を区別することなく塩基対を形成する動的構造変化型ユニバーサル塩基とそれをオリゴヌクレオチドに導入し、配列に拘わらず多重鎖の形成が可能なユニバーサル核酸、高い塩基認識能と塩基対形成能および様々な機能を有する人

工核酸塩基を開発し、それらを利用した核酸類の電子顕微鏡観察への応用について研究を進めている。

人工核酸塩基の設計と評価に計算科学研究センターに設置された大型計算機とプログラムライブラリーを利用している。

核酸塩基識別子の設計と合成

片岡正典, 永山國昭

透過型電子顕微鏡を用いる DNA 配列直読法は多数の DNA 断片を増幅することなく配列情報を画像化し、高速・低価格で配列解析を実現する方法である。この塩基配列解析法では一本鎖 DNA 断片中のすべての核酸塩基を正確に特定し、電子顕微鏡へ識別情報を提供する“核酸塩基識別子”の開発が鍵となる。核酸塩基識別子は核酸塩基を特定する認識部と識別情報を提供する指示部、それらを繋ぐ接続部から構成される。認識部には高い塩基選択性や識別子同士の会合抑制、各種溶媒に対する高い溶解性といった多くの要求が集中し、天然型核酸塩基の適用が困難であることが示唆された。報告者は上記要求を満たす新たな人工核酸塩基の開発を計画し、天然型

の塩基対構造を基盤として、1,4-デヒドロピラジンを水素供与体、1,4-ジオキシンを水素受容体とする三環性複素環を認識部として設定した。指示部としては透過型電子顕微鏡において4種の塩基の識別に必要な高い明暗差を得るために、電子密度差の大きな周期の異なる4種の重原子会合体を設定した。接続部にメチレン鎖を採用して認識部と指示部を結合することにより核酸塩基識別子の基本設計を完成させた。未だ全合成には至っていないが、核酸塩基識別子は一本鎖 DNA 中の核酸塩基1個を識別する分子であり、電子顕微鏡観察に止まらず、その応用範囲は極めて広い。

ユニバーサル核酸の創生

片岡正典

相対する塩基に呼応して動的に構造変化し、天然型核酸塩基4種すべてと塩基対を形成しうる動的構造変化型ユニバーサル塩基を設計し、合成に成功した。本塩基の物性を吸収スペクトルや核磁気共鳴によって調査したところ、天然塩基のいずれもと塩基対を形成することが示唆された。さらに本塩基をオリゴヌクレオチドへ導入を試みて、ペプチド核酸型8量体の合成にも成功した。現

在8量体の物性について調査中であるが、融解温度を指標とした種々の配列の天然型オリゴデオキシリボヌクレオチドとの複合体間に安定性に相違はほとんど見られない。

配列を全く認識しない人工核酸はこれまでに例はなく、その波及効果は計り知れない。

カルボン酸を用いる新規オリゴヌクレオチド合成法の開発

片岡正典

これまで、オリゴヌクレオチド合成はホスホロアミダイト法と呼ばれる、ヌクレオシドホスホロアミダイト単量体とヌクレオチドの 5'-水酸基の縮合反応を基盤とした方法が広く利用されており、市販のオリゴヌクレオチド合成装置でも採用されている。しかしこの縮合反応では活性化能力が低く高価で危険性の高いテトラゾール系活性化剤が使用されており、問題となっていた。報告者

はこれまでに、反応性のみに注目してイミダゾール-強酸複合体系の活性化剤を開発してきたが、今回高い安全性と低いコストに特化したカルボン酸系の縮合剤を新たに開発した。種々のカルボン酸について調査したところ、いずれもテトラゾール系活性化剤以上の反応性も示した。それらは安価に市販されており、安全性も高いことからテトラゾール系活性化剤に変わるものとして期待される。

技術課

大庭明生

1. 概要

今年度の人事は、平成16年度4月に分子生理研究系技術係・大河原浩係長を研究施設技術班長に昇任させ、野村博美、高橋知子を技術職員として採用し、生体情報研究系、動物実験センターに配置した。5月に小木曾昇技術主任の名古屋大学医学部動物実験施設への転出があり、窪田美津子を技術職員として採用し、動物実験センターに配置した。9月に育児休業にあった神谷絵美技術職員の職場復帰があった。それに伴い代替技術職員鈴木恵の契約終了があった。12月に高橋知子技術職員の退職があった。

第3期技術部会の活動を引き続き行い、非侵襲技術部会の活動報告を『非侵襲計測の基礎－MEG・fMRI・PET－』としてまとめた。

第4期技術部会立ち上げの準備として、第6回技術課セミナー（趣旨：今後の研究および研究体制の動向、研究を支える技術、その技術の今後の方向性と重要性、そのなかで技術職員の負うべき責任を基本テーマに、講演を研究者に依頼し、課のあるべき方向と今後の研究ならびに技術動向を探る）を井本敬二教授、平林真澄、瀬藤光利助教授、関和彦、神作憲司助手を講師に行った。

課の研究活動への貢献を一層進めるため下記の事業を本年度も引き続き実施した。

①生理科学実験技術トレーニングコースでの技術指導

電気生理の実験手法の一つであるパッチクランプ実験をテーマに、電気生理実験に有用な「サウンドモニター回路」とサウンドモニター回路動作「直流定電圧電源」、「アクリル製バスチェンバー」の作製コース『生理学実験のための電気回路・機械工作』を担当し、5人の若手研究者の技術指導に当たった。

②科学研究費補助金（奨励研究）申請の推進

業務を展開、推進していくための問題意識の養成、その解決のための計画および方法の企画能力の養成、さらにはその表現力と説明力の養成を通じて、業務上の技術力の総合的な向上を図ることを目的に標記の申請を行い、下記の7課題の採択を得た。

- (1) 加藤勝巳：凍結割断レプリカ作製装置の改良
- (2) 吉友美樹：クリプトン/YMG レーザーを用いた極

局所脳虚血－還流モデル動物の開発

- (3) 野村博美：マウス脳水平断アトラスの作製
- (4) 伊藤嘉邦：大脳皮質神経細胞の三次元構造解析プログラムの試作
- (5) 神谷絵美：GFP 発現トランスジェニックマウスを用いた教育用光学および電子顕微鏡試料作製
- (6) 佐藤茂基：遠隔動物実験用情報インポーズ装置の製作
- (7) 小原正裕：生細胞における容積測定のための全焦点顕微鏡法の確立

③奨励研究採択課題技術シンポジウムの開催

時代要請に対応した技術認識と向上に立った技術職員の業務の社会的開示を推進するために奨励研究採択者による第5回の報告会を14演題で行った。

④成茂神経科学研究助成基金の申請の推進

課の自立的運営のためには独自の運営資金の確保が重要な課題である。今回戸川森雄技術主任を代表者にして奨励研究採択課題技術シンポジウムの開催経費を標記の基金に申請し、採択を得た。

⑤放送大学利用による専門技術研修の受講

研究の高度化と多様化の進むなかで技術職員の研修は重要な課題である。今回研修科目として『ゲノム生物学』と『光電子技術とIT社会』を選び、5名が受講した。

⑥生理学技術研究会の開催

第27回を基礎生物学研究所・技術課と合同開催した（平成17年2月17日－18日）。会では、口演発表が24題、ポスター発表が40題、研修講演として『in vitro 発現系を用いた代謝型グルタミン酸受容体の機能制御機構と動的構造変化の解析』（久保義弘、生理学研究所）、『植物の微小管－可視化、微細構造、構築機構－』（村田隆司、礎生物学研究所）、特別講演として『サル頭頂連合野での20年と技術課題』（渋谷英敏、東京都神経科学総合研究所）を行った。これらの報告は『生理学技術研究会報告（第27号）』にまとめた。

⑦第5回機械工作基礎講座の開催

生理学実験に必要な機器を題材に工作技術を研修し、その作製機器が研究現場で活用できることを目的に第5

回を開催した(共通研究施設・機器研究試作室)。今回は初級コース(6名)、応用コース(9名)で行った。

⑧労働安全衛生資格取得および技能講習受講

法人化に伴う研究所の安全衛生を課業務として遂行するために下記の資格取得と技能受講を行った。

- (1) 衛生工学衛生管理者, (2) 第 2 種作業環境測定士, (3) 鉛作業主任者, (4) エックス線作業主任者, (5) 有機溶剤作業主任者, (6) 特定化学物質等作業主任者, (7) 普通第 1 種圧力容器取扱主任者, (8) 第 2 種酸素欠乏危険作業主任者

2. 施設の運営状況

①統合生理研究系

(1) 生体磁気計測装置室

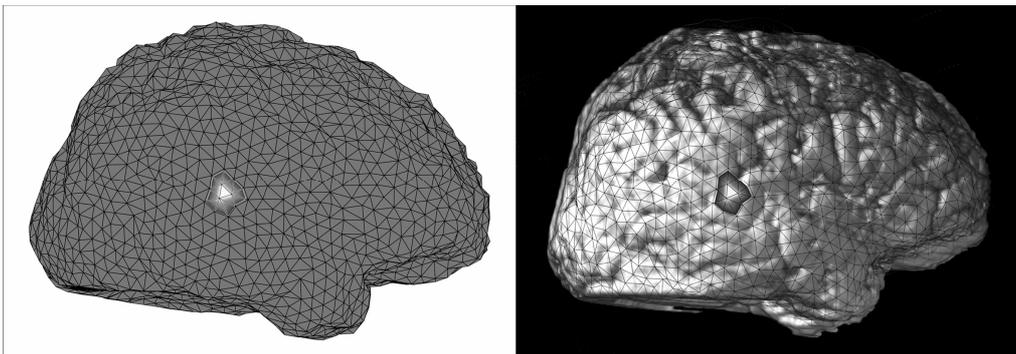
永田 治

【概要】

本年度は、全頭型生体磁気計測装置において各種実験が順調におこなわれており、大きなトラブルは報告されていないが、磁気光ディスクドライブの初期不良等の軽微な問題は数例発生している。維持管理については、一般的にハードサイクルと呼ばれる点検作業を3年周期程度でおこなうことが多いが、当施設では経費削減とセンサの負荷を軽減するため、LHeの蒸発量が適切である限りおこなわない方向で運営している。

解析システムにおいてもMRI画像を含めて環境整備が完了した。基本的には旧BTiシステムと同様の環境であるが、MRIファイルフォーマットがDICOMに統一されたためすべてのデータを更新した。

用意される画像データは、MRI断層画像、三次元再構成画像および再構成画像から作成されるメッシュモデルの3種類である。三次元画像データおよびメッシュモデルは脳部位抽出の後、小脳部を削除処理した画像で構築されている。メッシュモデルはMCE解析に対応するため各被験者固有のデータを1~10mmまで1mm間隔のレイヤーで作成した。三次元画像およびメッシュモデルの座標はすべてMEG座標系に変換されており、MEGデータと同様に画像データサーバにて一元管理され容易に利用できる環境である。ただし、新規の被験者を追加する場合は画像の加工変換作業を含めて1被験者あたり2時間程度の作業時間を要する。



メッシュモデルによるMCE画像とMRI三次元再構成画像の合成

平成16年度 生体磁気計測装置共同利用実験の実施状況について

年 月	総日数	休 日	点検日	利用日数	稼働率	外部利用日数	備 考
2004年04月	30	9	0	19	90%		
05月	31	13	0	18	100%		
06月	30	8	2	18	90%	3	
07月	31	10	0	20	95%		トレーニングコース使用5日(26~30日)
08月	31	9	0	22	100%	2	
09月	30	10	2	18	100%		
10月	31	11	0	17	85%		
11月	30	10	2	17	94%		
12月	31	12	0	17	89%	2	
2005年01月	31	12	2	14	82%		
02月	28	9	0	11	58%	3	
03月	31	9	2	18	90%	3	
04月	30	10	0	13	65%		

*総日数はセンサを使用した計測実験の総日数であり、解析装置の使用日数は含まれていない。

また、トレーニングなど実験以外の用途も含まれていない。

*稼働率=利用日数/(総日数-(休日+点検日))×100

②脳機能計測センター

(1) 形態情報解析室

山口 登

【超高压電子顕微鏡利用状況】

今年度における超高压電子顕微鏡共同利用実験は、合計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、コンデンサー絞り駆動部の修理、真空バルブ開閉用エアチューブの交換作業、サイドエントリーホルダーゴニオ部のクリーニング作業などが行われた。また、老朽化した空調機の更新を行った。

2004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
2004年4月	30	9	4	17	4	6	10	59%	
5月	31	13	4	14	3	0	3	21%	
6月	30	8	4	18	7	1	8	44%	
7月	31	10	4	17	8	5	13	76%	
8月	31	9	2	20	6	12	18	90%	
9月	30	10	4	16	5	2	7	44%	
10月	31	11	10	10	3	0	3	30%	修理6日
11月	30	10	5	15	5	2	7	47%	
12月	31	12	4	15	3	3	6	40%	
2005年1月	31	12	1	18	1	17	18	100%	
2月	28	9	4	15	4	10	14	93%	
3月	31	9	6	16	2	14	16	100%	空調工事5日
計	365	122	52	191	51	72	123	64%	

フィラメント点灯時間 398.6時間

使用フィルム枚数 5,436枚

(2) 機能情報解析室

佐藤 茂基

【概要】

今年度の装置整備状況は、主な事項として次の通りである。今年度、装置本体において長期間の修理を要する故障は起きず、比較的安定した稼働状態であった。

5月と8月に2台ある空調機がそれぞれ故障した為、その修理を行った。

9月に共鳴用チューニングユニットが故障した為、ユニットを交換し修理を行った。

共通機器であるフィルム自動現像機の整備点検を行った。

平成16年度のMR装置利用実績を別表に記す。

【機器利用率】

平成16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
2004年 4月	30	1	29	0	4	4	14%	
5月	31	1	30	0	4	4	13%	空調機故障, 修理
6月	30	1	29	0	8	8	28%	
7月	31	1	30	0	7	7	23%	
8月	31	1	30	0	7	7	23%	空調機故障, 修理
9月	30	1	29	0	6	6	21%	チューニング修理
10月	31	5	26	0	6	6	23%	停電
11月	30	1	29	0	6	6	21%	
12月	31	1	30	0	6	6	20%	
2005年 1月	31	1	30	0	7	7	23%	
2月	28	1	27	0	8	8	30%	
3月	31	2	29	0	7	7	24%	定期点検
計	365	17	348	0	76	76	22%	

*保守以外の祝祭日は、使用可能日に含めた。

(3) 生体情報解析室

吉村伸明, 村田安永

【概要】

生理学研究所における当施設の利用形態は、生体情報解析システム(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, WWW等), プログラム開発及びメディア変換などに分類することができる。また、これらを円滑に運用していくためには、所内LANの管理、整備や情報セキュリティの維持も重要である。このような現状をふまえたうえで、岡崎情報ネットワーク管理室とも連携しながら、施設整備を進めている。

生体情報解析システムは、データ解析・可視化、信号処理、画像処理、数式演算、統計処理、電子回路設計などの多くのアプリケーションを備え、これらは高機能ワ

ークステーション上での利用のみならず、各部門施設のPCに直接導入し、ライセンスサーバで認証を行うことでの利用も可能である。登録者は95名で、研究推進のための積極的な利用がある。

生理学研究所のネットワーク利用状況は、メール登録者が525名。WWW登録者が52名。LANの端末数が1,356台。所外からのメール受信数は7,900通/週。所外へのメール発信数は2,700通/週。検出したウィルスメールは1,100通/週。

WWWは760台/週の端末から46,000ページ/週の閲覧があった。所内向けのダイヤルアップサービスは43回/週、5時間/週の利用があった。

③生理研・基生研共通施設

(1) 電子顕微鏡室

前橋 寛

【概要】

今年度は、予算削減と利用者数、利用率を考慮して、透過型電子顕微鏡(日本電子 JEM-1200EX) 2台の内、1台と走査型電子顕微鏡(日立 S-800)の保守契約を中止し、明大寺地区の JEM-1200EX 1台と山手地区の透過型電子顕微鏡 JEM-1010 だけ保守契約(年1回点検)を継続した。

昨年度、新設された山手地区電子顕微鏡室には画像出力装置がないため、研究部門および研究施設から供出されたフルカラープリンタ(フジ、ピクトログラフィ 3000, 4000)を2台設置(実験室 B)し、1台には画像処理用の

PC と簡易型の電顕フィルム取り込み用のスキャナを新たに購入し設置した。

【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43件であった。機構内では30件あり、機構外は、国内で5件、国外ではスペイン、ドイツ、中国、ブルガリア、ハンガリー、チェコの研究者による利用が8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

二研究所

研究所	部門・施設	研究内容
生理研	機能協働	・運動神経細胞の生存機能維持機構の形態学的研究
	神経シグナル	・カルシウムチャンネル変異マウスの超微形態解析
	分子神経生理	・Olig2 陽性細胞の細胞系譜の解析の研究 ・背側神経管の細胞運命決定機構の分子生物学的解析 ・アストロサイト細胞系譜の多様性について ・イオンチャンネル染色像の撮影
	大脳神経回路論	・大脳皮質の神経回路の研究 ・非錐体細胞のシナプス連絡の観察 ・トランスジェニックラットへ導入した遺伝子の発現の解析 ・大脳皮質神経結合の解析
	脳形態解析	・ラット小脳における AMPA 受容体の分布の解析 ・小脳プルキンエ細胞における興奮性シナプスの観察 ・シナプス機能変化に伴うシナプス形態と受容体局在の変化の解析 ・マウス LGN における HCN channel の distribution を preembedding およびレプリカラベリング法を用いて明らかにする。
	統合バイオサイエンスセンター ナノ形態生理	・細胞、DNA タンパク質の電顕観察手法に関する研究 ・超分子表面へ導入した電顕マーカーの観察 ・電子顕微鏡によるカーボン等の膜厚及び膜表面の観察 ・唾液分泌における傍細胞輸送の調節機構
	形態情報解析室	・消化管におけるエンターセリン受容体の局在に関する免疫電顕
	技術課	・コメツキムシの走査像微細構造観察 ・凍結割断両面レプリカ免疫電顕法を用いた小脳グリア細胞の標識

研究所	部門・施設	研究内容
基生研	高次細胞機構	・高等植物のオルガネラ生成機構の解明
	生物進化	・植物細胞の微小管構築機構 ・ヒメツリガネゴケのプロトプラスト再生時における細胞内の極性観察
	分子遺伝学	・アサガオ種子の proanthocyanidin の位置の観察
	統合バイオサイエンスセンター	・3つの軸にそったイネの葉の極性・成長機構の解明
	植物発生遺伝学	・陽葉・陰葉の発生制御過程と葉肉細胞の軸性の解析
	性差生物学	・性腺の性分化に関する研究
	光情報	・植物細胞の葉緑体の観察
	形質転換生物	・Na チャネルの細胞内分布の探索

所外 (国内)

大学・研究所	研究代表者名	研究内容
水産総合研究センター 養殖研究所	小林 亨	魚類生殖腺の分化の分子機構の解明
大阪府立大学	加藤 幹男	DNA 構造解析
東京歯科大学	橋本 貞光	唾液腺傍細胞輸送経路の検討
新潟大学	林 八寿子	植物細胞内物質輸送系に関わる構造体の超微形態学的解析
ヤマハ発動機(株)	尾田 千草	配列させた金ナノ粒子の観察

所外 (国外)

国名, 大学, 研究所	研究者名	研究内容
スペイン Universidad de Cashilla-La Maucha	Rafael Lijan-Miras	GABA _B 受容体の脳内局在
スペイン	Guillermina Lopez-Bendito	GABA _B 受容体の脳内局在
ドイツ University of Freiburg	KULIK, Akos	SDS-FRL 法による膜内分子の局在解析
中国 K.Kleung Brain Research Centre	WEN, Wang	グルタミン酸受容体の小脳と海馬の分布の解析
中国 The Fourth Military Medical University	Yun-Qing Li	The local connections related to nociceptive information transmission and regulation within the superficial laminae of the spinal dorsal horn
ブルガリア University of Shoumen Universitetska	TACHEV, Krassimir, Dimov	DNA 観察
ハンガリー Department of Comparative Physiology University of Szeged, Faculty of Science	LÖRINCZ, Andrea	海馬における NMDA と AMPA 受容体の分布の解析
チェコ Institute of Parasitology Academy of Sciences of Czech Republic Laboratory of Electron Microscopy	HUCEK, Stanislav	タンパク分子の電子顕微鏡観察

(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、2005年度は、汎用工作機械の使用法を主体に実習する初級コースと応用コース（アクリル樹脂製パッチクランプ用チェンバー、簡易型一軸式マニピュレータ、レンズ及びフィルターホル

ダーの3テーマから受講希望者が選択）の二コースを開講する準備を進めている。参加希望者は、二コース合わせ生理研16名、基生研1名で、ガイダンスの後、マンツーマンで3～4回の講習を行う予定である。

また、生理学研究所では、山手地区に移転した研究室のために、工作室を整備することになり、2005年4月に開設し、現在利用者のための安全及び利用講習会を行っている。

なお、機器研究試作室の平成16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	フライ盤	ボール盤	横切盤	コンターマシン	旋盤	グラインダー	切断機	NCフライ盤	その他	計
4	5	11	19	5	3	10	1	0	23	77
5	8	7	5	5	7	1	1	0	12	46
6	10	20	9	9	5	4	1	0	13	71
7	25	16	16	13	4	4	7	0	24	109
8	17	7	9	5	2	2	0	0	12	54
9	16	15	17	14	10	6	4	2	26	110
10	21	14	16	11	16	3	3	0	40	124
11	6	3	6	4	6	2	4	0	7	38
12	10	2	3	4	5	2	3	0	12	41
1	14	7	15	9	14	7	4	0	17	87
2	9	12	4	15	8	4	4	0	23	79
3	9	16	8	5	2	5	8	0	16	69
合計	150	130	127	99	82	50	40	2	225	905

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	51	0	0	51	77
5	29	1	0	30	47
6	31	8	0	39	40
7	53	1	1	55	107
8	30	0	0	30	50
9	45	3	0	48	104
10	62	2	0	64	120
11	24	0	0	24	28
12	21	2	0	23	41
1	39	2	1	42	109
2	33	1	0	34	53
3	34	3	1	38	44
合計	452	23	3	478	820

機器研究試作室部門別利用状況

感覚認知情報	122 名	認知行動発達機構	80 名	ナノ形態生理	50 名
心理生理学	48 名	動物実験センター	34 名	形態情報解析室	22 名
生体膜	18 名	機能情報解析室	12 名	生体システム	10 名
生体恒常機能発達機構	10 名	神経分化	9 名	感覚運動調節	8 名
神経シグナル	8 名	技術課	6 名	脳形態解析	5 名
機能協関	3 名	大脳神経回路論	3 名	生殖・内分泌系発達機構	2 名
生体情報解析室	1 名				

エネルギー変換	5 名	生殖	5 名	RI 実験センター	3 名
植物発生	2 名	人工気象室	2 名	感覚情報処理	1 名
形態形成	1 名	細胞器官培養室	1 名	種分化機構第一	1 名
種分化機構第二	1 名	分析室	1 名		

分子研その他	3 名				

④動物実験センター(岡崎共通研究施設)

佐治俊幸, 廣江猛, 高橋知子, 窪田美津子

【概要】

山手地区動物実験センター分室が完全稼働し、全飼育室を使用して動物の飼育が開始され、飼育数も順調に増加している。また、感染事故等の大きな問題も発生していない。

明大寺地区陸生動物室のSPF化の要望があり、本館地下及び2FのSPF化構想を実現すべく改修計画の立案と予算要求を行った。

本年の法人化に伴い、労働安全衛生関連の資格取得及び設備改善を行った。資格としては、特定化学物質等作業従事者2名、第一種圧力容器作業従事者3名、有機溶剤作業従事者1名を確保することができ、第一種圧力容器7台の設置届け及び検査証の交付も受けた。

エーテルを用いたマウス・ラットの処分を廃止し、炭酸ガスによる処分方法を導入した。これに伴い、4セットの炭酸ガス処分機を生理研予算により組み上げ、従来より設置済みの機器と併せて、明大寺地区及び山手地区に各3セットを設置した。

P2A実験室の設置要求があり、山手地区に計画したが、場所の確保が困難であったため、明大寺地区新館4FのP2、3実験室内に動物の飼育設備を設置し、P2A実験室とした。利用方法は、P2A実験室利用者会議で決定していく予定である。

センターの拡充に伴う運営経費及び作業員の確保が難しく、新規事業の開始が行えず、ユーザーへのサービス低下が発生している。飼育費及び餌代の運営交付金以外からの徴収に関しては、科研費からの振り替えが可能になるよう、準備を進めている。

【受精卵凍結・クリーンアップ事業】

山手地区分室へ移動させるマウスのクリーンアップ作業は終了し、新規導入のためのクリーンアップ作業へと

移行した。

実施件数としては、クリーンアップ兼凍結が14件、凍結保存が32件、山手地区への移動のためのクリーンアップが2件であった。

【明大寺地区 陸生動物室】

平成16年度の飼育室利用部門数は、26研究部門（生理研16部門、基生研6部門、統合バイオサイエンスセンター4部門）であった。

動物飼育数は減少の傾向を示している。これは、センター利用の減少を示すものではなく、山手地区への移動に伴い一時的に飼育数が減少したためであり、新規部門の実験が軌道に乗り次第、増加へ転ずると予測される。

【山手地区 動物実験センター分室】

平成16年度の飼育室利用部門数は、14研究部門（生理研7部門、基生研1部門、統合バイオサイエンスセンター6部門）であった。

利用者講習会を毎月開催するとともに、陸生動物利用者には実務講習会を実施している。

全SPF飼育室の病原微生物モニタリングが、3ヶ月に1回のペースで実施され、異常は検出されなかった。

【明大寺及び山手地区 水生動物室】

平成16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11部門・施設、16件の利用があった。

両地区ともに恒温室の改修設置希望が出されたが、センター予算で支出することが出来なかったため、改修希望部門の予算で工事を行った。山手地区の新設恒温室は、TG魚飼育エリアである。

加熱冷却ユニットの動作不良が5件あり、順次修理を行った。

陸生動物 部門別・動物種別搬入数 (平成16年度)

部門	動物種	明大寺地区				山手地区		
		マウス	ラット	モルモット	ウサギ	サル	マウス	ラット
神経機能素子		96	0	0	0	0	0	0
細胞内代謝		27	0	0	0	0	0	0
生体膜		2	5	0	0	0	205	47
機能協関		622	186	0	0	0	0	0
能動輸送		0	0	0	0	0	0	0
分子神経生理		401	0	0	0	0	2,165	0
神経シグナル		25	0	0	0	0	962	26
高次神経機構		10	7	0	0	0	1,787	0
情報記憶		0	0	0	0	0	0	0
感覚認知情報		0	0	0	0	3	0	0
生体システム		0	5	0	0	5	0	0
計算神経科学		0	0	0	0	0	0	0
感覚・運動機能		0	0	0	0	0	0	0
認知行動発達機構		71	53	0	0	6	0	0
自律機能		0	0	0	0	0	0	0
脳機能計測センター		0	0	0	0	0	0	0
脳形態解析		239	22	8	0	0	1,285	223
大脳神経回路論		0	0	0	0	0	5	439
心理生理学		0	0	0	0	0	0	0
形態情報解析室		8	8	0	0	0	0	0
機能情報解析室		0	0	0	0	0	0	0
生体情報解析室		0	0	0	0	0	0	0
脳機能分子解析室		0	0	0	0	0	20	999
生殖内分泌系		348	86	0	0	0	0	0
生体恒常機能		5	132	0	0	0	0	0
動物実験センター		48	0	3	0	0	1,629	18
細胞機構		0	0	0	3	0	0	0
細胞内エネルギー変換		20	0	0	0	0	0	0
細胞増殖		0	0	0	0	0	0	0
細胞情報		0	0	0	0	0	0	0
細胞融合		0	0	0	0	0	0	0
生殖		0	0	0	0	0	0	0
細胞分化		64	0	0	0	0	0	0
形態形成		0	0	0	0	0	0	0
発生生物		0	0	0	0	0	0	0
感覚情報		43	0	0	0	0	832	0
計時機構		0	0	0	0	0	0	0
情報制御		0	0	0	0	0	0	0
行動制御		0	20	0	0	0	0	0
遺伝子第一		0	0	0	0	0	0	0
遺伝子第二		0	0	0	0	0	0	0
種分化第一		150	76	0	6	0	0	0

部門	動物種	明大寺地区					山手地区	
		マウス	ラット	モルモット	ウサギ	サル	マウス	ラット
種分化第二		0	0	0	0	0	0	0
大型スペクトログラフ室		0	0	0	0	0	0	0
細胞器官培養		130	0	0	0	0	0	0
RI 施設		0	0	0	0	0	0	0
形質転換生物		0	0	0	0	0	0	0
分子発生		75	0	0	0	0	842	0
発生遺伝		0	0	0	0	0	0	0
神経分化		0	0	0	0	0	514	3
ナノ形態生理		67	121	0	0	0	3	73
生命環境		0	0	0	0	0	550	0
植物発生		0	0	0	0	0	0	0
細胞生理		165	0	0	0	0	464	64
合計		2,616	721	11	9	14	11,263	1,892

水生動物 月別・動物種別搬入数（平成 16 年度）

種	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	合計
メダカ	1,050	100	500	500		500		500		1,000	500	500	5,150
ティラピア	16	800	503			9	3		12	89			1,432
クマノミ				2			3						5
キュウセン				3									3
スズメダイ				8									8
ハゼ							8						8
ベラ							14		55				69
ウナギ												40	40
ゼノパス	28	5	3							60			96
ヒトデ		150	18	100		62		140					470
ホヤ	50									80			130
海水(t)			8				8	8	4	20			48

【 研 究 発 表 】

- a. 発表論文
- b. 学会発表

a. 発表論文

〔 目 次 〕

神経機能素子研究部門	88
分子神経生理研究部門	88
細胞内代謝研究部門	89
生体膜研究部門	90
機能協関研究部門	91
感覚認知情報研究部門	91
神経シグナル研究部門	92
高次神経機構研究部門	92
感覚運動調節研究部門	93
生体システム研究部門	96
脳形態解析研究部門	96
大脳神経回路論研究部門	97
心理生理学研究部門	97
認知行動発達機構研究部門	98
生体恒常機能発達機構研究部門	99
生殖・内分泌系発達機構研究部門	99
形態情報解析室	100
脳機能分子解析室	100
時系列生命現象研究領域 神経分化	100
戦略的方法論研究領域 ナノ形態生理	101
生命環境研究領域 細胞生理	102
動物実験センター	102
計算科学研究センター	102

発 表 論 文

《神経機能素子研究部門》

1) 英文原著論文

1. Tateyama M, Abe H, Nakata H, Saitoh O, Kubo Y (2004) Ligand-induced rearrangement of the dimeric metabotropic glutamate receptor1 α . *Nature Struct Molec Biol* 11:637-642.
2. Fujiwara Y, Kubo Y (2004) Density dependent changes of the pore properties of P2X₂ receptor channel. *J Physiol* 558:31-43.
3. Jiang B, Kitamura A, Yasuda H, Sohya K, Maruyama A, Yanagawa Y, Obata K, Tsumoto T (2004) Brain-derived neurotrophic factor acutely depresses excitatory synaptic transmission to GABAergic neurons in visual cortical slices. *Eur J Neurosci* 20:709-718.
4. Yamanaka H, Yanagawa Y, Obata K (2004) Development of stellate and basket cells and their apoptosis in mouse cerebellar cortex. *Neurosci Res* 50:13-22.
5. Munsch T, Yanagawa Y, Obata K, Pape HC (2005) Dopaminergic control of local interneuron activity in the thalamus. *Eur J Neurosci* 21:290-294.
6. Takada N, Yanagawa Y, Komatsu Y (2005) Activity-dependent maturation of excitatory synaptic connections in solitary neuron cultures of mouse neocortex. *Eur J Neurosci* 21:422-430.
7. Tsunekawa N, Yanagawa Y, Obata K (2005) Development of GABAergic neurons from the ventricular zone in the superior colliculus of the mouse. *Neurosci Res* 51:243-251.
8. Ono M, Yanagawa Y, Koyano K (2005) GABAergic neurons in inferior colliculus of the GAD67-GFP “knock-in” mouse: Electrophysiological and morphological properties. *Neurosci Res* 51:475-92.
9. Nishimaru H, Restrepo CE, Ryge J, Yanagawa Y, Kiehn O (2005) Mammalian motor neurons co-release glutamate and acetylcholine at central synapses. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:5245-5249.
10. Tomioka R, Okamoto K, Furuta T, Fujiyama F, Iwasato T, Yanagawa Y, Obata K, Kaneko T, Tamamaki N (2005) Demonstration of long-range GABAergic connections distributed throughout the mouse neocortex. *Eur J Neurosci* 21:1587-1600.

2) その他

1. Saitoh O, Kubo Y (2004) Biochemical and physiological analyses of the RGS8 function. *Methods in Enzymology* 390:129-148.
2. 立山充博, 久保義弘 (2004) リガンド投与による代謝型グルタミン酸受容体細胞内領域の二量体構造の動的変化, *細胞工学*, 23:1062-1063.

《分子神経生理研究部門》

1) 英文原著論文

1. Ishibashi T, Ding L, Ikenaka K, Inoue Y, Miyado K, Mekada E, Baba H (2004) Tetraspanin protein CD9 is a novel paranodal component regulating paranodal junctional formation. *J Neurosci* 24:96-102.
2. Okumura S, Baba H, Kumada T, Nanmoku K, Nakajima H, Nakane Y, Koshiro H, Ikenaka K (2004) Cloning of a G-protein-coupled receptor that shows an activity to transform NIH3T3 cells and is expressed in gastric cancer cells. *Cancer Sci* 95:131-135.
3. Hirahara Y, Bansal R, Honke K, Ikenaka K, Wada Y (2004) Sulfatide is a negative regulator of oligodendrocyte differentiation: development in sulfatide-null mice. *Glia* 45:269-277.
4. Yokoo H, Nobusawa N, Takebayashi H, Ikenaka K, Isoda K, Kamiya M, Sasaki A, Hirato J, Nakazato Y (2004) Anti-human Olig2 antibody as a useful immunohistochemical marker of normal oligodendrocytes and gliomas. *Am J Pathol* 164:1717-1725.
5. Katakura H, Harada A, Kataoka K, Furusho M, Tanaka F, Wada H, Ikenaka K (2004) Improvement of retroviral vectors by coating with poly (ethylene glycol)-poly

- (L-lysine) block copolymer (PEG-PLL). *J Gene Med* 6:471-477.
6. Shibasaki K, Nakahira K, Trimmer J, Shibata R, Akita M, Watanabe S, Ikenaka K (2004) Mossy fiber contact triggers the targeting of Kv4.2 potassium channels to dendrites and synapses in developing cerebellar granule neurons. *J Neurochem* 89:897-907.
 7. Tanaka H, Ono K, Shibasaki H, Isa T, Ikenaka, K (2004) Conduction properties of identified neural pathways in the central nervous system of mice in vivo. *Neurosci Res* 49:113-122.
 8. Jung C, Hida H, Nakahira K, Ikenaka K, Kim H, Nishino H (2004) Pleiotrophin mRNA is highly expressed in neural stem (progenitor) cells of mouse ventral mesencephalon and the product promotes production of dopaminergic neurons from ES cell-derived nestin-positive cells. *FASEB J* 18:1237-1239.
 9. Kumada T, Hasegawa A, Iwasaki Y, Baba H, Ikenaka K (2004) Isolation of cystatin C via functional cloning of astrocyte differentiation factors. *Dev Neurosci*. 26:68-76
 10. Ono K, Yasui Y, Ikenaka K (2004) Lower rhombic lip-derived cells undergo transmedian tangential migration followed by radial migration in the chick embryo brainstem. *Eur J Neurosci* 20:914-922.
 11. Hitoshi S, Seaberg R M, Kosciak C, Alexson T, Kusunoki S, Kanazawa I, Tsuji S, van der Kooy D (2004) Primitive neural stem cells from the mammalian epiblast differentiate to definitive neural stem cells under the control of Notch signaling. *Genes Dev* 18:1806-1811.
- 2) その他
1. 田中久貴, 池田一裕 (2004) Ranvier 絞輪とイオンチャンネル, *Clinical Neuroscience*, 22:770-772.
 2. 中北慎一, 長束俊治, 池田一裕, 長谷純宏 (2004) 脳特異的糖鎖とその生合成に関わる“脳型”ガラクトース転移酵素, *生物物理化学*, 48:1-4.

《細胞内代謝研究部門》

1. Yoshimura, K., Nomura, T., Sokabe, M. (2004.2) Loss-of-function mutations in the lipid-protein interface of a mechanosensitive channel MscL. *Biophysical Society 48th Annual Meeting* (Baltimore, USA)
2. Naruse, K., Tang, Q.Y., Sokabe, M. (2004.2) STREX Exon makes Ca²⁺-activated big K channels mechanosensitive. *Biophys Soc. 48th Annual Meeting* (Baltimore, USA)
3. Hirata, H., Tatsumi, H., Sokabe, M. (2004.3) Formation of stress fibers from pre-existing actin filaments driven by mechanical stress in semi-intact cells. *First Asian Pacific Conference on Biomechanics (Abstr First Asian Pacific Conference on Biomechanics 1176 p225)* (Osaka, Japan)
4. Sokabe, M., Naruse, K., Tang, Q.Y. (2004.9) Force-sensing domain of mechanosensitive BK channels cloned from heart cells. *Symposium on “Mechanosensitive channels”. 28th Ann Meeting Aus Biophys Soc* (Perth, Australia)
5. Sokabe, M., Hayakawa, K., Tatsumi, H. (2004.11) Remote activation of MS channel *via* cytoskeleton and visualization of channel activation in endothelial cells. *Symposium “Cell engineering & cell mechanics”, Shanghai Int Conf Pyshiol Biophys* (Shanghai, China)
6. Naruse, K., Tang, Q.Y., Sokabe, M. (2004.11) STREX Makes Ca²⁺-activated Big K Channels Mechanosensitive, *Symposium on “Membrane and Cellular Biophysics”, Shanghai Int Conf Pyshiol Biophys* (Shanghai, China)
7. Sokabe, M., Cheng, L., Furuya, K., Miyamoto, Y., Mori, N. (2004.11) Neurosteroid PREGS induces a long-lasting facilitation of synaptic transmission in rat hippocampus: requirement of PKC-dependent ERK1/2 activation. *Shanghai Int Conf Pyshiol Biophys* (Shanghai, China)
8. Chen, L., Sokabe, M. (2004.11) Pregnenolone sulfate enhances presynaptic glutamate releases in rat hippocampal slices as studied by optical recordings, *Shanghai Int Conf Pyshiol Biophys* (Shanghai, China)
9. Sokabe, M. (2004.11) MS channels from hearts and toxin blockade. *The 2nd ICORP Symposium on Nanomechanosensing* (Nagoya, Japan)
10. Naruse, K., Tang, Q.Y., Sokabe, M. (2004.12) Mechanosensitive ion channel: molecules of mechanotransduction. *Int Workshop*

- on Muscle-Bone System (Nagoya Japan)
11. Sokabe, M., Naruse, K., Tang, Q.Y. (2004.12) Structure-Function of stretch-activated big K_{Ca} channel. Ion Channel Carnival (Valdivia, Chile)
 12. 曾我部正博 (2004.5)アルツハイマー病と脳の可塑性の関係, 金沢工業大学人間情報システム研究所・平成16年度第2回特別公開セミナー (金沢)
 13. 曾我部正博 (2004.5)命を守る細胞の形と力覚, 金沢工業大学人間情報システム研究所・平成16年度第2回特別公開セミナー (金沢)
 14. 曾我部正博, 陳 玲, 古家喜四夫(2004.6)神経ステロイド PREGS はラット海馬歯状回顆粒細胞のグルタミン酸誘導性 Ca^{2+} 流入を促進する, 第81回日本生理学会大会 (札幌) (Jpn J. Physiol. (Suppl) 54:S151)
 15. 曾我部正博 (2004.7)イオンチャネルの作動機構: 機械受容チャネルを中心に文部科学省科学研究費特定領域研究公開シンポジウム「膜輸送ナノマシンの構造・作動機構とその制御」(名古屋)
 16. 曾我部正博, 陳玲 (2004.7)神経ステロイドによる神経伝達物質放出の促進作用: グルタミン酸輸送体電位測定による検証, 日本比較生理生化学会第26回大会 (神戸)
 17. 曾我部正博 (2004.11)機械受容チャネル活性化における膜と細胞骨格の役割 日本顕微鏡学会, 第49回シンポジウム“ナイ, バイオ材料への応用から考えた最先端マイクロコピーの交流”(名古屋)
 18. 曾我部正博 (2004.11)細胞の変形能とメカノセンサーの関係: ソフトアーキテクチャーの制御機構: 細胞は自己を認識できるか? JST 異分野研究者交流領域探索研究会“制御生物学の可能性を探る”(東京)
 19. 曾我部正博, 早川公英, 辰巳仁史 (2004.11)細胞メカノトランスダクションの多様性: SA チャネル, 細胞骨格, 接着分子 第27回日本分子生物学会, ワークショップ“メカノバイオロジーにおける分子細胞生物学的展開の最先端”(神戸)
 20. 平田宏聡, 辰巳仁史, 曾我部正博 (2004.12)F-アクチンメッシュワークからの張力依存的なストレスファイバーの形成, 第42回日本生物物理学会 (京都)
 21. 曾我部正博, 陳 玲 (2004.12)海馬シナプスにおける神経ステロイド PREGS によるグルタミン酸放出促進のメカニズム, 第42回日本生物物理学会 (京都)
 22. 毛利達磨, 吉田繁 (2004.6)マウス未成熟卵母細胞自発的カルシウム振動に対するエストロゲンおよびビスフェノール A の抑制効果, 第81回日本生理学会大会 (札幌)

《生体膜研究部門》

- 1) 英文原著論文
 1. Takahashi N, Hatakeyama H, Okado H, Miwa A, Kojima T, Abe T & Kasai H (2004) Sequential exocytosis of insulin granules is associated with redistribution of SNAP25. *J Cell Biol*, 165:255-262.
 2. Matsuzaki M, Honkura N, Ellis-Davies GCR & Kasai H (2004) Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature*, 429:761-766.
 3. Nemoto T, Kojima T, Oshima A, Furuyashiki T, Bito H & Kasai H (2004) Stabilization of exocytosis by dynamic F-actin coating of zymogen granules in pancreatic acini. *J Biol Chem*, 279:37544-37550.
 4. Sakai N, Tsubokawa H, Matsuzaki M, Kajimoto T, Takahashi E, Ren Y, Ohmori S, Shirai Y, Matsubayashi H, Chen J, Duman RS, Kasai H & Saito N (2004) Propagation of gammaPKC translocation along the dendrites of Purkinje cell in gammaPKC-GFP transgenic mice. *Genes Cells*, 9:945-957.
- 2) その他
 1. 高橋倫子 (2004)インスリン分泌の分子機構, *Annual Review 内分泌代謝*, 中外医学社, 39-43.
 2. 高橋倫子, 河西春郎 (2004)インスリン開口放出機, *Diabetes Frontier*, 15:34-38.
 3. 畠山裕康, 高橋倫子, 根本知己, 河西春郎 (2004)インスリン開口放出の可視化から何がわかるか「糖尿病カレントライブラリー② インスリン分泌」, 文光堂, 39-42.
 4. 高橋倫子 (2004)インスリン開口放出の分子機構, *医学のあゆみ*, 特集号, 109-115.

《機能協関研究部門》

1) 英文原著論文

1. Hayashi S, Hazama A, Dutta AK, Sabirov RZ & Okada Y (2004) Detecting ATP release by a biosensor method. *Science STKE*, 2004: (pl-14) 1-12.
2. Ternovsky VI, Okada Y & Sabirov RZ (2004) Nano-sized pore of the volume-sensitive anion channel revealed by differential polymer partitioning. *FEBS Lett*, 576:433-436.
3. Dutta AK, Sabirov RZ, Uramoto H & Okada Y (2004) Role of ATP-conductive anion channel in ATP release from neonatal rat cardiomyocytes in ischemic or hypoxic conditions. *J Physiol (London)*, 559:799-812.
4. Manabe K, Shimizu T, Morishima S & Okada Y (2004) Regulatory volume increase after secretory volume decrease in colonic epithelial cells under muscarinic stimulation. *Pflugers Arch Eur J Physiol*, 448:596-604.
5. Sabirov RZ & Okada Y (2004) Wide nanoscopic pore of maxi-anion channel suits its function as an ATP-conductive pathway. *Biophys J*, 87:1672-1685.
6. Shimizu T, Numata T & Okada Y (2004) A role of reactive oxygen species in apoptotic activation of volume-sensitive Cl⁻ channel. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101:6770-6773.
7. Gong W, Xu H, Shimizu T, Morishima S, Tanabe S, Tachibe T, Uchida S, Sasaki S & Okada Y (2004) CIC-3-independent, PKC-dependent activity of volume-sensitive Cl⁻ channel in mouse ventricular cardiomyocytes. *Cell Physiol Biochem*, 14:213-224.
8. Zhang XD, Morishima S, Ando-Akatsuka Y, Takahashi N, Nabekura T, Inoue H, Shimizu T & Okada Y (2004) Expression of novel isoforms of the CIC-1 chloride channel in astrocytic glial cells in vitro. *Glia*, 47:46-57.

2) その他

1. Okada Y (2004) Ion channels and transporters involved in cell volume regulation and sensor mechanisms. *Cell Biochem Biophys*, 41:233-258.
2. Okada Y, Maeno E, Shimizu T, Manabe K, Mori S & Nabekura T (2004) Dual roles of plasmalemmal chloride channels in induction of cell death. *Pflugers Arch Eur J Physiol*, 448:287-295.
3. Sabirov RZ & Okada Y (2004) ATP-conducting maxi-anion channel: A new player in stress-sensory transduction. *Jpn J Physiol*, 54:7-14.
4. Okada Y, Maeno E & Mori S (2004) Anion channel involved in induction of apoptosis and necrosis. "Cell Volume and Signaling: Proceedings of the 2003 Dayton International Symposium." (Eds. Lauf PK & Adragna NC), Springer, NY, pp 205-209.
5. 長崎陽子, 萩原誠久, 岡田泰伸, 笠貫宏 (2004) 虚血負荷後のラット培養心筋細胞において PKC で活性化される Cl 電流, *東京女子医科大学雑誌*, 74:33-38.
6. 岡田泰伸 (2004) 調節性容積減少(RVD)とアポトーシス性容積減少(AVD), *BIO Clinica*, 19:944-948.
7. 岡田泰伸, 清水貴浩 (2004) アポトーシス誘導における細胞縮小化と Cl チャネルの役割, *実験医学*, 22:1488-1494.
8. 眞鍋健一, 岡田泰伸 (2004) 消化管上皮細胞の容積調節機能: Cl チャネルの役割, *膜*, 29:140-147.
9. 岡田泰伸, 清水貴浩, 森信一郎, 眞鍋健一, 井上華 (2004) 細胞死誘導におけるアニオンチャネルの役割, *日本病態生理学会雑誌*, 13:27-30.
10. 岡田泰伸 (記者代表) (2004) “ギャノング 生理学” (原書 21 版) 丸善, 東京.

《感覚認知情報研究部門》

1) 英文原著論文

1. Ito M & Komatsu H (2004) Representation of angles embedded within contour stimuli in area V2 of macaque

monkeys. *J Neurosci*, 24:3313-3324.

2. Ogawa T & Komatsu H (2004) Target selection in area V4 during multi-dimensional visual search task. *J*

Neurosci, 24:6371-6382.

3. Sato M, Yoshioka T, Kajihara S, Toyama K, Goda N, Doya K & Kawato M (2004) Hierarchical Bayesian estimation for MEG inverse problem. *Neuroimage*, 23:806-826.

2) その他

1. 小松英彦 (2004) 視覚の大脳生理 (後頭葉) : 色情報の処理, *神経研究の進歩*, 48:167-175.
2. 小松英彦 (2004) 神経生理学から見た感覚情報処理, *総合臨床*, 53:2604-2608.

《神経シグナル研究部門》

1) 英文原著論文

1. Inoue T, Inokuma Y, Watanabe S & Kirino Y (2004) In vitro study of odor-evoked behavior in a terrestrial mollusk. *J Neurophysiol*, 91:372-381.
2. Hartmann J, Blum R, Kovalchuk Y, Adelsberger H, Kuner R, Durand GM, Miyata M, Kano M, Offermanns S & Konnerth A (2004) Distinct roles of $G\alpha_q$ and $G\alpha_{11}$ for Purkinje cell signaling and motor behavior. *J Neurosci*, 24:5119-5130.
3. Yamagata Y & Obata K (2004) Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II is reversibly autophosphorylated, inactivated and made sedimentable by acute neuronal excitation in rats in vivo. *J Neurochem*, 91:745-754.
4. Matsuyama Z, Yanagisawa NK, Aoki Y, Black JL 3rd, Lennon VA, Mori Y, Imoto K & Inuzuka T (2004) Polyglutamine repeats of spinocerebellar ataxia 6 impair the cell-death-preventing effect of $CaV2.1$ Ca^{2+}

channel-loss-of-function cellular model of SCA6. *Neurobiol Dis*, 17:198-204.

2) その他

1. Imoto K (2004) Ion channels. "Encyclopedia of Endocrine Diseases" (Ed. Martini L), Elsevier Academic Press, Amsterdam, Boston.13: 103-107.
2. 井本敬二 (2004) カルシウムチャネル変異とシナプス伝達の変化。蛋白質核酸酵素, 49:405-410.
3. 宮田麻理子 (2004) 小脳のシナプス伝達と可塑性運動学習の分子基盤, *Molecular Medicine*, 41:1102-1108.
4. 宮田麻理子 (2004) 炎症性疼痛における視床 mGluR1-PLC beta 4 カスケードの役割, *神経研究の進歩*. 48:941-946.
5. 宮田麻理子 (2004) 大脳皮質 - 視床投射の動的機構。"ブレインサイエンスレビュー 2005", P236-250, クバプロ, 東京。

《高次神経機構研究部門》

1) 英文原著論文

1. Hamaguchi-Hamada K, Hamada S, Yagi T (2004) Exposure to hexanal odor induces extraordinary Fos expression in the medial preoptic area and amygdala of Fyn tyrosine kinase-deficient mice. *Brain Res Mol Brain Res* 130:187-190.
2. Kubota O, Hattori K, Hashimoto K, Yagi T, Sato T, Iyo M, Yuasa S (2004) Auditory-conditioned-fear-dependent c-Fos expression is altered in the emotion-related brain structures of Fyn-deficient mice. *Brain Res Mol Brain Res* 130:149-160.
3. Tada MN, Senzaki K, Tai Y, Morishita H, Tanaka YZ,

Murata Y, Ishii Y, Asakawa S, Shimizu N, Sugino H, Yagi T (2004) Genomic organization and transcripts of the zebrafish protocadherin genes. *Gene* 340:197-211.

4. Murata Y, Hamada S, Morishita H, Mutoh T, Yagi T (2004) Interaction with protocadherin- γ regulates the cell surface expression of protocadherin- α . *J Biol Chem* 279:49508-49516.
5. Sugino H, Toyama T, Taguchi Y, Esumi S, Miyazaki M, Yagi T (2004) Negative and positive effects of an IAP-LTR on nearby Pcdh-alpha gene expression in the central nervous system and neuroblastoma cell lines. *Gene* 337:91-103.

6. Hamaguchi-Hamada K, Sanbo C, Hamada S, Yagi T (2004) Exposure to hexanal odor influences maternal behavior and induces neonatal death in Fyn tyrosine kinase-deficient mice. *Neurosci Res* 48:259-267.
7. Yuasa S, Hattori K, Yagi T (2004) Defective neocortical development in Fyn-tyrosine-kinase-deficient mice. *Neuroreport* 15:819-822.
8. Ishii Y, Asakawa S, Taguchi Y, Ishibashi S, Yagi T, Shimizu N (2004) Construction of BAC library for the amphibian *Xenopus tropicalis*. *Genes Genet Syst* 79:49-51.
9. Yanase H, Sugino H, Yagi T (2004) Genomic sequence and organization of the family of CNR/Pcdh α genes in rat. *Genomics* 83:717-726.
10. Mutoh T, Hamada S, Senzaki K, Murata Y, Yagi T (2004) Cadherin-related neuronal receptor 1 (CNR1) has cell adhesion activity with beta1 integrin mediated through the RGD site of CNR1. *Exp Cell Res* 294:494-508.
11. Sugino H, Yanase H, Hamada S, Kurokawa K, Asakawa S, Shimizu N, Yagi T (2004) Distinct genomic sequence of the CNR/Pcdh α genes in chicken. *Biochem Biophys Res Commun* 316:437-445.
12. Sugino H, Miyazaki M, Yagi T (2004) Intron-less processed Pcdh alpha genes in the central nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* 313:775-783.
13. Oishi K, Kamakura S, Isazawa Y, Yoshimatsu T, Kuida K, Nakafuku M, Masuyama N, Gotoh Y (2004) Notch promotes survival of neural precursor cells via mechanisms distinct from those regulating neurogenesis. *Dev Biol* 276:172-184.
14. Kamakura S, Oishi K, Yoshimatsu T, Nakafuku M, Masuyama N, Gotoh Y (2004) Hes binding to STAT3 mediates crosstalk between Notch and JAK-STAT signalling. *Nat Cell Biol* 6:547-554.
15. Hirabayashi Y, Itoh Y, Tabata H, Nakajima K, Akiyama T, Masuyama N, Gotoh Y (2004) The Wnt/beta-catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells. *Development* 131:2791-2801.
16. Morishita H, Kawaguchi M, Murata Y, Seiwa C, Hamada S, Asou H, Yagi T (2004) Myelination triggers down-regulation of axonal CNR/Protocadherin- α family expression. *Eur J Neurosci* 20:2843-2847
17. Morihita H, Murata Y, Esumi S, Hamada S & Yagi T (2004) CNR/Pcdh- α family in subplate neurons, and developing cortical connectivity. *Neuroreport* 15:2595-2599
18. Ohno F, Watanabe J, Sekihara H, Hirabayashi T, Arata S, Kikuyama S, Shioda S, Nakaya K & Nakajo S (2004) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promotes differentiation of mouse neural stem cells into astrocytes. *Regul Pept* 126:115-122
19. Kato M, Ishikawa A, Kaneko R, Yagi T, Hochi S, Hirabayashi M (2004) Production of transgenic rats by ooplasmic injection of spermatogenic cells exposed to exogenous DNA: a preliminary study. *Mol Reprod Dev* 69:153-158

《感覚運動調節研究部門》

- 1) 英文原著論文
 1. Yabe H, Asai R, Hiruma T, Sutoh T, Koyama S, Kakigi R, Tervaniemi M, Kaneko S (2004) Sound perception affected by nonlinear variation of accuracy in memory trace. *Neuroreport* 15(18):2813-2817
 2. Inui K, Wang X, Tamura Y, Kaneoke Y, Kakigi R (2004) Serial processing in the human somatosensory system. *Cereb Cortex* 14(8):851-857
 3. Kubota T, Kaneoke Y, Maruyama K, Watanabe K, Kakigi R (2004) Temporal structure of the apparent motion perception: a magnetoencephalographic study. *Neurosci Res* 48(1):111-118
 4. Nakata H, Inui K, Wasaka T, Tamura Y, Tran TD, Qiu Y, Wang X, Nguyen BT, Kakigi R (2004) Movements modulate cortical activities evoked by noxious stimulation. *Pain* 107(1-2):91-98
 5. Hoshiyama M, Kakigi R, Tamura Y (2004) Temporal discrimination threshold on various parts of the body. *Muscle and Nerve* 29(2):243-247
 6. Nakata H, Inui K, Nishihira Y, Hatta A, Sakamoto M,

- Kida T, Wasaka T, Kakigi R (2004) Effects of a go/nogo task on event-related potentials following somatosensory stimulation. *Clin Neurophysiol* 115(2):361-368
7. Miki K, Watanabe S, Kakigi R, Puce A (2004) Magnetoencephalographic study of occipitotemporal activity elicited by viewing mouth movements. *Clin Neurophysiol* 115(7):1559-1574
 8. Tamura Y, Hoshiyama M, Inui K, Nakata H, Qiu Y, Ugawa Y, Inoue K, Kakigi R (2004) Facilitation of A δ -fiber-mediated acute pain by repetitive transcranial magnetic stimulation. *Neurology* 62(12):2176-2181
 9. Miki K, Watanabe S, Kakigi R (2004) Interaction between auditory and visual stimulus relating to the vowel sounds in the auditory cortex in humans: a magnetoencephalographic study. *Neurosci Lett* 357(3):199-202
 10. Qiu Y, Inui K, Wang X, Nguyen BT, Tran TD, Kakigi R (2004) Effects of distraction on magnetoencephalographic responses ascending through C-fibers in humans. *Clin Neurophysiol* 115(3):636-646
 11. Pantev C, Okamoto H, Ross B, Stoll W, Ciurlia-Guy E, Kakigi R, Kubo T (2004) Lateral inhibition and habituation of the human auditory cortex. *Eur J Neurosci* 19(8):2337-2344
 12. Noguchi Y, Inui K, Kakigi R (2004) Temporal dynamics of neural adaptation effect in the human visual ventral stream. *J Neurosci* 24(28):6283-6290
 13. Tamura Y, Hoshiyama M, Inui K, Nakata H, Wasaka T, Ojima S, Inoue K, Kakigi R (2004) Cognitive processes in two-point discrimination: an ERP study. *Clin Neurophysiol* 115(8):1875-1884
 14. Fujioka T, Trainor LJ, Ross B, Kakigi R, Pantev C (2004) Musical training enhances automatic encoding of melodic contour and interval structure. *J Cogn Neurosci* 16(6):1010-1021
 15. Nguyen BT, Tran TD, Hoshiyama M, Inui K, Kakigi R (2004) Face representation in the human primary somatosensory cortex. *Neurosci Res* 50(2):227-232
 16. Wang X, Inui K, Qiu Y, Kakigi R (2004) Cortical responses to noxious stimuli during sleep. *Neuroscience* 128(1):177-186
 17. Sekiguchi T, Koyama S, Kakigi R (2004) The effect of phonological repetition on cortical magnetic responses evoked by visually presented words. *J Cogn Neurosci* 16(7):1250-1261
 18. Okamoto H, Ross B, Kakigi R, Kubo T, Pantev C (2004) N1m recovery from decline after exposure to noise with strong spectral contrasts. *Hear Res* 196(1-2):77-86
- 2) その他
1. Kakigi R, Inui K, Tran TD, Qui Y, Wang X, Watanabe S, Hoshiyama M (2004) Human brain processing and central mechanisms as observed by electro-and magneto-encephalography. *J Chin Med Ass* 67(8):377-386
 2. Inui K, Kakigi R (2004) MEG response following epidermal needle stimulation. "Proceedings of the 14th International Conference on Biomagnetism". (Eds: Halgren E, Ahlhofer S, Hamalainen M & Cohen D), Biomag2004 Ltd., Boston, 47-48
 3. Qiu Y, Inui K, Tran TD, Wang X, Kakigi R (2004) EEG and MEG responses following stimulation of unmyelinated C fibers. "Proceedings of the 14th International Conference on Biomagnetism". (Eds: Halgren E, Ahlhofer S, Hamalainen M & Cohen D), Biomag2004 Ltd., Boston, 49-50
 4. Fujioka T, Trainor LJ, Ross B, Kakigi R, Picton TW, Pantev C (2004) Auditory memory trace encodes polyphonic melody. "Proceedings of the 14th International Conference on Biomagnetism". (Eds: Halgren E, Ahlhofer S, Hamalainen M & Cohen D), Biomag2004 Ltd., Boston, 501-502
 5. Oiwa S, Gunji A, Koyama S, Tajima K, Kato H, Kakigi R (2004) Phonetic memory representation for vowels as revealed by the mismatch negativity responses. "Proceedings of the 14th International Conference on Biomagnetism". (Eds: Halgren E, Ahlhofer S, Hamalainen M & Cohen D), Biomag2004 Ltd., Boston, 529-530
 6. Okamoto H, Ross B, Gunji A, Kakigi R, Kubo T, Pantev C (2004) Lateral inhibition and stimulus specific adaptation of the human auditory cortex. "Proceedings of the 14th International Conference on Biomagnetism". (Eds: Halgren E, Ahlhofer S, Hamalainen M & Cohen D), Biomag2004 Ltd., Boston, 531-532
 7. Wasaka T, Hoshiyama M, Kakigi R (2004) Pre-movement

- modulation of primary somatosensory cortex preceding self-initiated finger extension. "Proceedings of the 14th International Conference on Biomagnetism". (Eds: Halgren E, Ahlhojs S, Hamalainen M & Cohen D), Biomag2004 Ltd., Boston, 705-706
8. Tamura Y, Ugawa Y, Kakigi R (2004) Effects of transcranial magnetic stimulation on acute pain. "Proceedings of the 11th International Pain Clinic World Society of Pain Clinicians."(Eds: Hanaoka K, Yuge O, Namiki A) Medimond, Bologna, Italy, 285-291
 9. Kakigi R, Inui K, Qiu Y, Wang X, Watanabe S, Hoshiyama M (2004) Clinical application of LEPs. "Proceedings of the 11th International Pain Clinic World Society of Pain Clinicians."(Eds: Hanaoka K, Yuge O, Namiki A) Medimond, Bologna, Italy, 267-272
 10. Tamura Y, Ugawa Y, Kakigi R (2004) Effect of repetitive transcranial magnetic stimulation on acute pain. "Proceedings of the 15th World Congress International Society for Brain Electromagnetic Topography. (ISBET 2004)"(Eds: Nakagawa M, Hirota K, Koga Y, Nagata K) Frontiers in Human Brain Topography. ELSEVIER B.V., Amsterdam, 142-145
 11. Kakigi R, Inui K, Tran TD, Qiu Y, Wang X, Watanabe S, Hoshiyama M (2004) Pain processing in humans traced by EEG/MEG. 4th International Symposium on Functional Source Imaging Within the Human Heart and Brain. (NFSI2003)" (Eds: Romani GL & Pizzella V), Biomedizinische Technik. Verlag/Publishing Company, Berlin, 48:5-7
 12. Miki K, Watanabe S, Kakigi R, Puce A (2004) Magnetoencephalographic study of occipitotemporal activity elicited by viewing mouth opening movement. 4th International Symposium on Functional Source Imaging Within the Human Heart and Brain. (NFSI2003)" (Eds: Romani GL & Pizzella V), Biomedizinische Technik. Verlag/Publishing Company, Berlin, 48:221-223
 13. Tamura Y, Hoshiyama M, Inui K, Kakigi R (2004) Cognitive processes for two-point discrimination assessed by event-related potentials. 4th International Symposium on Functional Source Imaging Within the Human Heart and Brain. (NFSI2003)" (Eds: Romani GL & Pizzella V), Biomedizinische Technik. Verlag/Publishing Company, Berlin, 48:196-198
 14. Wang X, Inui K, Qiu Y, Kakigi R (2004) Cortical responses to noxious stimuli during sleep. 4th International Symposium on Functional Source Imaging Within the Human Heart and Brain. (NFSI2003)" (Eds: Romani GL & Pizzella V), Biomedizinische Technik. Verlag/Publishing Company, Berlin, 48:302-304
 15. Nakata H, Inui K, Kakigi R (2004) Movements modulate cortical activities evoked by noxious stimulation. 4th International Symposium on Functional Source Imaging Within the Human Heart and Brain. (NFSI2003)" (Eds: Romani GL & Pizzella V), Biomedizinische Technik. Verlag/Publishing Company, Berlin, 48:305-307
 16. 竹島康行, 金桶吉起, 柿木隆介(2004) 脳誘発反応測定における視覚刺激提示方法の諸問題 臨床神経生理学 32(3):240-242
 17. 柿木隆介, 乾幸二, 秋云海, 王晓宏, Tran Diep Tuan, 中田大貴 (2004)痛覚認知のイメージング 神経研究の進歩 48(2):261-273
 18. 柿木隆介, 乾幸二, 秋云海, 王晓宏, Tran Diep Tuan (2004)脳波と脳磁図を用いたヒト痛覚認知機構の研究 日本ペインクリニック学会誌 11(1):1-11
 19. 柿木隆介 (2004)ペインイメージング イメージング手法を用いたヒトの痛覚認知のメカニズムの研究ー 医学のあゆみ 211(5):449-452
 20. 寶珠山稔, 柿木隆介 (2004)正中神経刺激による体性感覚誘発電位の Recovery functionー 短時間 Interstimulus interval での検討ー 臨床脳波 46(7):424-429
 21. 軍司敦子, 柿木隆介, 寶珠山稔 (2004) 調音をとまなう発声時のヒト脳磁場反応 臨床脳波 46(8):487-491
 22. 三木研作, 渡邊昌子, 柿木隆介, Aina Puce (2004) 「口の動き」を見るときの脳活動 臨床脳波 46(9):568-573
 23. 乾幸二, 柿木隆介 (2004) :痛覚認知のメカニズム Anesthesia 21 Century 5:957-961

《生体システム研究部門》

1) 英文原著論文

1. Tachibana Y, Nambu A, Hatanaka N, Miyachi S & Takada M (2004) Input-output organization of the rostral part of the dorsal premotor cortex, with special reference to the corticostriatal projection. *Neurosci Res*, 48:45-57.
2. Takada M, Nambu A, Hatanaka N, Tachibana Y, Miyachi S, Taira M & Inase M (2004) Organization of prefrontal outflow toward frontal motor-related areas in macaque monkeys. *Eur J Neurosci*, 19:3328-3342.

3. Kita H, Nambu A, Kaneda K, Tachibana Y & Takada M (2004) Role of ionotropic glutamatergic and GABAergic inputs on the firing activity of neurons in the external pallidum in awake-monkeys. *J Neurophysiol*, 92:3069-3084.

2) その他

1. 南部篤 (2004) 定位脳手術のための生理学, 脳神経外科, 32:179-191.
2. 南部篤 (2004) 脳深部刺激療法の作用機序, 脳 21, 7:262-269.

《脳形態解析研究部門》

1) 英文原著論文

1. Kulik A, Nakadate K, Hagiwara A, Fukazawa Y, Lujan R, Saito H, Suzuki N, Futatsugi A, Mikoshiba K, Frotscher M, Shigemoto R (2004) Immunocytochemical localization of the $\alpha 1A$ subunit of the P/Q-type calcium channel in the rat cerebellum. *Eur J Neurosci*, 19:2169-2178.
2. Kogo N, Dalezios Y, Capogna M, Ferraguti F, Shigemoto R & Somogyi P (2004) Depression of GABAergic input to identified hippocampal neurons by group β metabotropic glutamate receptors in the rat. *Eur J Neurosci*, 19:2727-2740.
3. Notomi T & Shigemoto R (2004) Immunohistochemical localization of Ih channel subunits, HCN1-4 in the rat brain. *J Comp Neurol*, 471:241-276.
4. Somogyi J, Baude A, Omori Y, Shimizu H, Mestikawy SE, Fukaya M, Shigemoto R, Watanabe M & Somogyi P (2004) GABAergic basket cells expressing cholecystokinin contain vesicular glutamate transporter type 3 (VGLUT3) in their synaptic terminals in hippocampus and isocortex of the rat. *Eur J Neurosci*, 19:552-569.
5. Ferraguti F, Cobden P, Pollard M, Cope D, Shigemoto R, Watanabe M & Somogyi P (2004) Immunolocalization of metabotropic glutamate receptor 1alpha (mGluR1alpha) in distinct classes of interneuron in the CA1 region of the rat hippocampus. *Hippocampus*, 14:193-215.
6. Lopez BG, Shigemoto R, Kulik A, Vida I, Fairen A & Lujan R (2004) Distribution of metabotropic GABA

receptor subunits GABAB1a/b and GABAB2 in the rat hippocampus during prenatal and postnatal development. *Hippocampus*, 14:836-848.

7. Kang Y, Notomi T, Saito M, Zhang W & Shigemoto R (2004) Bidirectional interactions between H-channels and Na^+-K^+ pumps in mesencephalic trigeminal neurons. *J Neurosci*, 24:3694-3702.
8. Savio CC, Shigemoto R, Mercer JN & Surmeier DJ (2004) HCN2 and HCN1 channels govern the regularity of autonomous pacemaking and synaptic resetting in globus pallidus neurons. *J Neurosci*, 24:9921-9932.
9. Lujan R, Shigemoto R, Kulik A & Juiz JM (2004) Localization of the GABAB receptor 1a/b subunit relative to glutamatergic synapses in the dorsal cochlear nucleus of the rat. *J Comp Neurol*, 475:36-46.
10. Tanaka J, Matsuzaki M, Tarusawa E, Momiyama A, Molnar E, Kasai H & Shigemoto R (2005) Number and density of AMPA receptors in single synapses in immature cerebellum. *J Neurosci*, 25:799-807.
11. Uchida K, Momiyama T, Okano H, Yuzaki M, Mine Y & Kawase T (2005) Differentiation of grafted neuroepithelial stem cells into functionally active neurons in the normal brain environments. *Neurosci Res*, 52:276-86.

2) その他

1. 初山明子, 重本隆一 (2004) グルタミン酸受容体の分布とシナプスでの機能, 蛋白質核酸酵素, 49:287-294.

2. Lujan R, Shigemoto R & Lopez BG (2005) Glutamate and GABA receptor signalling in the developing brain. *Nueroscience*, 130:567-80.

《大脳神経回路論研究部門》

- 1) 英文原著論文
 1. Karube F, Kubota Y & Kawaguchi Y (2004) Axon branching and synaptic bouton phenotypes in GABAergic nonpyramidal cell subtypes. *J Neurosci*, 24:2853-2865.

《心理生理学研究部門》

- 1) 英文原著論文
1. Garraux G, Bauer A, Hanakawa T, Wu T, Kansaku K, Hallett M (2004) Changes in brain anatomy in focal hand dystonia. *Ann Neurol*, 55:736-739.
 2. Harada T, Saito DN, Kashikura K, Sato T, Yonekura Y, Honda M & Sadato N (2004) Asymmetrical neural substrates of tactile discrimination in humans: a functional magnetic resonance imaging study. *J Neurosci*, 24:7524-7530.
 3. Hasegawa T, Matsuki K, Ueno T, Maeda Y, Matsue Y, Konishi Y & Sadato N (2004) Learned audio-visual cross-modal associations in observed piano playing activate the left planum temporale. An fMRI study. *Brain Res Cogn Brain Res*, 20:510-518.
 4. Kansaku K, Hanakawa T, Wu T, Hallett M (2004) A shared neural network for simple reaction time. *Neuroimage*, 22:904-911.
 5. Kowatari Y, Yamamoto M, Takahashi T, Kansaku K, Kitazawa S, Ueno S, Yamane S (2004) Dominance of the left oblique view in activating the cortical network for face recognition. *Neurosci Res*, 50(4):475-480.
 6. Matsumura M, Sadato N, Kochiyama T, Nakamura S, Naito E, Matsunami K, Kawashima R, Fukuda H & Yonekura Y (2004) Role of the cerebellum in implicit motor skill learning: a PET study. *Brain Res Bull*, 63:471-483.
 7. Morita T, Kochiyama T, Okada T, Yonekura Y, Matsumura M & Sadato N (2004) The neural substrates of conscious color perception demonstrated using fMRI. *Neuroimage*, 21:1665-1673.
 8. Nomura M, Ohira H, Haneda K, Iidaka T, Sadato N, Okada T & Yonekura Y (2004) Functional association of the amygdala and ventral prefrontal cortex during cognitive evaluation of facial expressions primed by masked angry faces: an event-related fMRI study. *Neuroimage*, 21:352-363.
 9. Okada T, Honda M, Okamoto J & Sadato N (2004) Activation of the primary and association auditory cortex by the transition of sound intensity: a new method for functional examination of the auditory cortex in humans. *Neurosci Lett*, 359:119-123.
 10. Okada T, Tanaka M, Kuratsune H, Watanabe Y & Sadato N (2004) Mechanisms underlying fatigue: a voxel-based morphometric study of chronic fatigue syndrome. *BMC Neurol*, 4:14.
 11. Oouchida Y, Okada T, Nakashima T, Matsumura M, Sadato N & Naito E (2004) Your hand movements in my somatosensory cortex: a visuo-kinesthetic function in human area 2. *Neuroreport*, 15:2019-2023.
 12. Riera J, Bosch J, Yamashita O, Kawashima R, Sadato N, Okada T & Ozaki T (2004) fMRI activation maps based on the NN-ARx model. *Neuroimage*, 23:680-697.
 13. Sadato N, Okada T, Kubota K & Yonekura Y (2004) Tactile discrimination activates the visual cortex of the recently blind naive to Braille: a functional magnetic resonance imaging study in humans. *Neurosci Lett*, 359:49-52.
 14. Sadato N, Yamada H, Okada T, Yoshida M, Hasegawa T, Matsuki KI, Yonekura Y & Itoh H (2004) Age dependent plastic change in the superior temporal sulcus

- of deaf humans: a functional MRI study. *BMC Neurosci* 5(1):56.
15. Seki A, Okada T, Koeda T & Sadato N (2004) Phonemic manipulation in Japanese: an fMRI study. *Brain Res Cogn Brain Res*, 20:261-272.
 16. Uchida K, Kobayashi S, Yayama T, Kokubo Y, Nakajima H, Kakuyama M, Sadato N, Tsuchida T, Yonekura Y & Baba H (2004) Metabolic neuroimaging of the cervical spinal cord in patients with compressive myelopathy: a high-resolution positron emission tomography study. *J Neurosurg Spine*, 1:72-79.
 17. Wu T, Kansaku K, Hallett M (2004) How self-initiated memorized movements become automatic: a functional MRI study. *J Neurophysiol*, 91:1690-1698.
 18. Sadato N, Okada T, Honda M, Matsuki K, Yoshida M, Kashikura K, Takei W, Sato T, Kochiyama T & Yonekura Y (2004) Cross-modal integration and plastic changes revealed by lip movement, random-dot motion, and sign languages in the hearing and the deaf. *Cereb Cortex* (in press).
- 2) その他
 1. Hanakawa T, Honda M, Hallett M (2004) Amodal imagery in rostral premotor areas. *Behavioral and Brain Sciences*, 27:406-407.
 2. Sadato N (2004) Imaging higher brain functions in humans using magnetic resonance. *Trends Analytical Chem*, 23:416-421.
 3. Sadato N (2004) Cortical plasticity revealed by functional neuroimaging. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi*, 24 (4):217-219.
 4. 定藤規弘 (2004) fMRI による大脳機能代償の画像化, *日本神経精神薬理学雑誌*, 24:217-219.
 5. 本田 学 (2004) イメージ操作の神経基盤: 学術月報 57 (9):12-17.

《認知行動発達機構研究部門》

- 1) 英文原著論文
 1. Alstermark B, Ogawa J & Isa T (2004) Lack of monosynaptic corticomotoneuronal excitation in the adult rat: fast disynaptic excitation is mediated via reticulospinal neurones and slow polysynaptic excitation via segmental interneurons. *J Neurophysiol*, 91:1832-1839.
 2. Yamashita T & Isa T (2004) Enhancement of excitatory postsynaptic potentials by preceding application of acetylcholine in mesencephalic dopamine neurons. *Neurosci Res*, 49:91-100.
 3. Sakatani T & Isa T (2004) PC-based high-speed video-oculography for measuring rapid eye movements in mice. *Neurosci Res*, 49:123-131.
 4. Saitoh K, Isa T & Takakusaki K (2004) Nigral GABAergic inhibition upon mesencephalic dopaminergic cell groups in rats. *Eur J Neurosci*, 19:2399-2409.
 5. Saito Y & Isa T (2004) Laminar specific distribution of lateral excitatory connections in the rat superior colliculus. *J Neurophysiol*, 92:3500-3510.
 6. Sasaki S, Isa T, Pettersson LG, Alstermark B, Naito K, Yoshimura K, Seki K & Ohki Y (2004) Dexterous finger movements in primate without monosynaptic corticomotoneuronal excitation. *J Neurophysiol*, 92:3142-3147.
 7. Li F, Endo T & Isa T (2004) Presynaptic muscarinic acetylcholine receptors suppress GABAergic synaptic transmission in the intermediate gray layer of mouse superior colliculus. *Eur J Neurosci*, 20:2079-2088.
 8. Lemon R, Sasaki S, Naito K, Yoshimura K, Isa T, Seki K, Pettersson LG, Alstermark B & Ohki Y (2004) Cortico-motoneuronal system and dexterous finger movements. *J Neurophysiol*, 92:3601-3603.
 9. Watanabe M, Kobayashi Y, Inoue Y & Isa T (2004) Effects of local nicotinic activation of superior colliculus on saccades in monkeys. *J Neurophysiol* (in press).
 10. Saito Y & Isa T (2004) Organization of interlaminar interactions in the rat superior colliculus. *J Neurophysiol* (in press).
- 2) その他
 1. Isa T & Kobayashi Y (2004) Switching between cortical and subcortical sensorimotor pathways. In *Progress in Brain Research "Brain Mechanisms for the integration of posture and movement"*. (Eds. Mori S, Stuart DG,

- Wiesendanger M) 143:295-301.
2. Kobayashi Y, Inoue Y & Isa T (2004) Pedunculo-pontine control of visually guided saccades. In Progress in Brain Research "Brain Mechanisms for the integration of posture and movement". (Eds. Mori S, Stuart DG, Wiesendanger M) 143:439-445.
 3. Isa T, Inoue Y & Kobayashi Y (2004) Cognitive function of the brainstem cholinergic system. In International Congress Series 1250 "Cognition and Emotion in the Brain" (Eds. Ono T, Matsumoto G, Llinàs R, Berthoz A, Norgren R, Nishijo H, Tamura R) 397-406.
 4. Isa T & Sparks D (2004) Microcircuit of the Superior Colliculus: A Neuronal Machine that Determines Timing and Endpoint of Saccadic Eye Movements. Background paper for 93rd Dahlem Workshop on "Microcircuits; The interface between Neurons and Global Brain Function" (MIT Press) (in press).

《生体恒常機能発達機構研究部門》

- 1) 英文原著論文
 1. Shibata S, Kakazu Y, Okabe A, Fukuda A, Nabekura J (2004) Experience-dependent changes in intracellular Cl⁻ regulation in developing auditory neurons. *Neurosci Res* 48(2):211-220.
 2. Suzuki H, Kadowaki T, Maeda M, Sasaki H, Nabekura J, Sakaguchi M, Mihara K (2004) Membrane-embedded C-terminal segment of rat mitochondrial TOM40 constitutes protein-conducting pore with enriched b-structure. *J Biol Chem* 279:50619-50629.
 3. Nabekura J, Katsurabayashi S, Kakazu Y, Shibata S, Matsubara A, Jinno S, Mizoguchi Y, Sasaki A & Ishibashi H (2004) Developmental Switch from GABA to glycine release in single central synaptic terminals. *Nat Neurosci* 7:17-23.
- 2) その他
 1. 鍋倉淳一, 溝口義人 (2004) BDNF の GABA 応答修飾作用. *Clinical Neuroscience* 22 (3) 300-302, 中外医学社。
 2. 鍋倉淳一 (2004) 発達期における脳機能回路の再編成。子どもと発育発達 3152-156, 杏林書院。
 3. 鍋倉淳一 (2004) 神経回路形成と脳機能発達。チャイルドヘルス 7(3), 1344-1351, 診断と治療社。

《生殖・内分泌系発達機構研究部門》

- 1) 英文原著論文
 1. Kotani K, Peroni OD, Minokoshi Y, Boss O & Kahn BB (2004) Glut4 glucose transporter deficiency increases lipid production and peripheral lipid utilization. *J Clin Invest*, 114:1666-1675.
- 2) その他
 1. 箕越靖彦 (2004) AMP キナーゼ, *Diabetes Frontier*, 15:437-445.
 2. 箕越靖彦 (2004) AMP キナーゼとエネルギー代謝, *Diabetes Journal*, 32:65-72.
 3. 箕越靖彦 (2004) 視床下部によるエネルギー代謝・脂質代謝, *脳* 21, 7:366-371.
 4. 箕越靖彦 (2004) AMPK (5'AMP-activated protein kinase), 糖尿病カレントライブラリー1 インスリン抵抗性 (編集 春日雅人), 分光堂, 144-148.
 5. 箕越靖彦 (2004) AMPK, KEY WORD 糖尿病 (編集 河盛隆造, 春日雅人, 田嶋尚子), 先端医学社, 44-45.

《形態情報解析室》

1) 英文原著論文

1. Furuya S, Furuya K, Sokabe K, Hiroe T & Ozaki T (2004) Characteristics of cultured subepithelial fibroblasts in the rat small intestine. II. Localization and functional analysis of endothelin receptors and cell-shape-independent gap junction permeability. *Cell Tissue Res*, Published on line

DOI.10.1007/S00441-004-0958-7

2. Hama K, Arai T, Katayama E, Martone M & Ellisman MH (2004) Tri-dimensional morphometric analysis of astrocytic processes with high voltage electron microscopy of thick Golgi preparations. *J Neurocytol*, 33:277-285.

《脳機能分子解析室》

1) 英文原著論文

1. Kato M, Ishikawa A, Hochi S & Hirabayashi M (2004) Effect of activation regimens for rat oocytes on full-term development following round spermatid injection. *Contem Top Lab Anim Sci*, 43:13-15.
2. Kato M, Ishikawa A, Hochi S & Hirabayashi M (2004) Effect of rat strains for donors and recipients on full-term development of one-cell zygotes cultured into morulae/blastocysts. *J Reprod Dev*, 50:191-195.
3. Kato M, Ishikawa A, Kaneko R, Yagi T, Hochi S & Hirabayashi M (2004) Production of transgenic rats by ooplasmic injection of spermatogenic cells exposed to exogenous DNA: A preliminary study. *Mol Reprod Dev*, 69:153-158.
4. Ito J, Kawano N, Hirabayashi M & Shimada M (2004) The role of Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) on inactivation of MAP kinase and p34cdc2 kinase during fertilization and activation in pig oocytes. *Reproduction*, 128:409-415.
5. Hochi S, Terao T, Kamei M, Kato M, Hirabayashi M &

Hirao M (2004) High survival of pronuclear-stage rabbit zygotes after vitrification by an ultra-rapid cooling procedure. *Theriogenology*, 61:267-275.

6. Amemiya K, Iwanami Y, Kobayashi T, Terao T, Fukui Y, Ishikawa H, Ohsumi S, Hirabayashi M & Hochi S (2004) Acquisition of oocyte-activating factor in Antarctic Minke Whale (*Balaenoptera bonaerensis*) spermatogenic cells, assessed by meiosis resumption of microinseminated mouse oocytes. *J Mammal Ova Res*, 21:149-156.
7. Iwayama H, Hochi S, Kato M, Hirabayashi M, Kuwayama M, Ishikawa H, Ohsumi S & Fukui Y (2004) Effects of cryodevice type and donors' sexual maturity on vitrification of minke whale (*Balaenoptera bonaerensis*) oocytes at germinal vesicle-stage. *Zygote*, 12:333-338.

2) その他

1. 平林真澄, 保地真一 (2004) ラットにおける顕微授精技術, *実験動物技術* 39:13-18.

《時系列生命現象研究領域》

1) 英文原著論文

1. Nakajo K & Okamura Y (2004) Development of transient outward currents coupled with Ca²⁺-induced Ca²⁺ release mediates oscillatory membrane potential in ascidian muscle. *J Neurophysiol*, 92:1056-1066.
2. Katsuyama Y, Okada T, Matsumoto J, Ohtsuka Y,

Terashima T & Okamura Y (2005) Early specification of ascidian larval motor neurons. *Dev Biol* 278(2):310-322.

2) その他

1. Meinertzhagen I, Lemaire P & Okamura Y (2004) The neurobiology of the ascidian tadpole larva. *Ann Rev Neurosci*, 27:453-485

2. Brown ER, Bone Q & Okamura Y (2004) Properties of the neural net that controls swimming in the ascidian *C. intestinalis*. *Comp Biochem Physiol Part A*, 137, S3.
3. Okamura Y, Sasaki M, Iwasaki H & Murata Y (2004) Survey of ion channel molecules from *Ciona* genome. *Jpn J Physiol (supplement 54)*, S20.

《戦略的方法論研究領域》

1) 英文原著論文

1. Danev R & Nagayama K (2004) Complex observation in electron microscopy. IV. reconstruction of complex object wave from conventional and half plane phase plate image pair. *J Phys Soc Jpn*, 73:2718-2724.
2. Nagayama K (2004) Complex observation in electron microscopy. V. phase retrieval for strong objects with Foucault knife-edge scanning. *J Phys Soc Jpn*, 73:2725-2731.
3. Morita H, Ogino T, Fujiki N, Tanaka K, Gotoh TM, Seo Y, Takamata A, Nakamura S & Murakami M (2004) Sequence of forebrain activation induced by intraventricular injection of hypertonic NaCl detected by Mn²⁺ contrasted T1-weighted MRI. *Auton Neurosci*, 113:43-54.
4. Ueno T, Suzuki M, Goto T, Matsumoto T, Nagayama K & Watanabe Y (2004) Size-selective olefin hydrogenation by a Pd nanocluster provided in an apo-ferritin cage. *J Angew Chem Int Ed*, 43:2527-2530.
5. Murakami M, Sugiya H, Puxeddu R, Loffredo F & Riva A (2004) Dose-dependent morphological changes of intercellular canaliculi during stimulation with carbachol and isoproterenol in the isolated rat submandibular gland. *Eur J Morphol (in press)*.
6. Matsuki M, Hashimoto S, Shimono M, Murakami M, Yoshigaki J, Furuyama S & Sugiya H (2004) Involvement of Aquaporin-5 water channel in osmoregulation in parotid secretory granules. *J Membr Biol (in press)*.

2) その他

1. Ohashi M (2004) Cholesterol and endosomal sorting. *Recent Res Devel Cell Sci*, 1:112-116.
2. 永山國昭 (2004) 磁気共鳴イメージングー物理出身

と化学出身の二人の創案者に与えられた 2003 年ノーベル生理学賞一, 日本物理学会誌 59:47-48.

3. 永山國昭 (2004) 複素光学への道ー転身と天啓, *O plus E (新技術コミュニケーションズ)* 4月号, 445-446.
4. 永山國昭 (2004) 複素光学への道ー複素数の居場所, *O plus E (新技術コミュニケーションズ)* 5月号, 563-564.
5. 永山國昭 (2004) 複素光学への道ー複素表示, *O plus E (新技術コミュニケーションズ)* 6月号, 713-714.
6. 永山國昭 (2004) 複素光学への道ー複素波動, *O plus E (新技術コミュニケーションズ)* 7月号, 841-842.
7. 永山國昭 (2004) 複素光学への道ー波動方程式の古典解, *O plus E (新技術コミュニケーションズ)* 8月号, 956-957.
8. 永山國昭 (2004) 複素光学への道ー波動方程式の完全解, *O plus E (新技術コミュニケーションズ)* 9月号, 1108-1110.
9. 永山國昭 (2004) 複素光学への道ー2重積分の応用ー論争の解決と具体例, *O plus E (新技術コミュニケーションズ)* 10月号, 1242-1244.
10. 永山國昭 (2004) 複素光学への道ーエバネッセント波が結ぶ古典解と完全解, *O plus E (新技術コミュニケーションズ)* 11月号, 1375-1377.
11. 永山國昭 (2004) 複素光学への道ー複素観測 Iー観測の可逆性, *O plus E (新技術コミュニケーションズ)* 12月号, 1493-1495.
12. 永山國昭 (2004) 電子位相顕微鏡法による細胞内タンパク質・超分子の可視化, *生物物理 (日本生物物理学会)* 44:281-285.
13. 永山國昭 (2004) 無染色で"生"に迫る, *BIONICS* 12月号, 50-56.

《生命環境研究領域》

1) 英文原著論文

1. Moriyama T, Higashi T, Togashi K, Iida T, Segi E, Sugimoto Y, Tominaga T, Narumiya S, Tominaga M. (2005) Sensitization of TRPV1 by EP₁ and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins. *Molecular Pain* 1:3-12.

2) その他

1. Tominaga M & Caterina MJ (2004) Thermosensation and pain. *J Neurobiol*, 61:3-12.
2. Numazaki M & Tominaga M (2004) Nociception and TRP channels. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, 3:479-485.
3. Tominaga M (2005) Molecular mechanisms of trigeminal Nociception and sensation of pungency. *Chem Senses* 30:i191-i192.

4. 森山朋子, 富永真琴 (2004)カプサイシン受容体と TRP チャネル, *Molecular Medicine* 41:642-649.
5. 富永真琴 (2004)カプサイシン受容体ファミリー (TRPV ファミリー), *皮膚アレルギーフロンティア* 2:48-49.
6. 富永真琴 (2004)温度受容の分子機構—TRP チャネル温度センサー—, *日本薬理学雑誌* 124:219-227.
7. 富永知子 (2004)Rho-mDia-Src 系, *生体の科学* 55:430-431.
8. 富永真琴 (2005)痛みの受容メカニズム, *ファルマシア* 41:209-213.
9. 富永真琴 (2005)TRP チャネルと痛み, *ペインクリニック* 26:201-208.
10. 富永知子 (2005)細胞骨格制御における mDia の役割 *生化学会誌* 77:133-136.

《動物実験センター》

1) 英文原著論文

1. Hayashida K., Takeuchi T., Ozaki T., Shimizu H., Ando K., Miyamoto A., & Harada E. (2004) Bovine lactoferrin has a nitric oxide-dependent hypotensive effect in rats . *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286:R359-R365

2. Furuya S., Furuya K., Sokabe M., Hiroe T., & Ozaki T. (2005) Characteristics of cultured subepithelial fibroblasts in the rat small intestine. II .Localization and functional analysis of endothelin receptors and cell-shape-independent gap junction permeability. *Cell Tissue Res* 319:103-119

《計算科学研究センター》

1) 英文原著論文

- Tsukamoto M , Nurminen E J, Iwase T, Kataoka M, Hayakawa Y (2004) Internucleotide-Linkage Formation

via the Phosphoramidite Method using a Carboxylic Acid as a Promoter. *Nucleic Acids Symposium Ser.* 48:25-26.

b. 学会発表

〔 目 次 〕

神経機能素子研究部門	104
分子神経生理研究部門	104
細胞内代謝研究部門	105
生体膜研究部門	106
機能協関研究部門	107
感覚認知情報研究部門	108
神経シグナル研究部門	108
高次神経機構研究部門	109
感覚運動調節研究部門	109
生体システム研究部門	112
脳形態解析研究部門	113
大脳神経回路論研究部門	114
心理生理学研究部門	115
認知行動発達機構研究部門	117
生体恒常機能発達機構研究部門	117
生殖・内分泌系発達機構研究部門	118
形態情報解析室	118
脳機能分子解析室	119
時系列生命現象研究領域 神経分化	119
戦略的方法論研究領域 ナノ形態生理	120
生命環境研究領域 細胞生理	121

学 会 発 表

《神経機能素子研究部門》

1. 立山充博, 阿部秀樹, 久保義弘 (2004. 6) FRET 法による代謝型グルタミン酸受容体の動的構造変化の解析. 第 81 回日本生理学会大会 (札幌)
2. 三坂巧, 久保義弘 (2004.6) ミトコンドリア断片化に関わる高分子量 G タンパク質 mOPA1 のホモ多量体形成の解析. 第 81 回日本生理学会大会 (札幌)
3. 中條浩一, 久保義弘 (2004.6) KCNQ2 では起こるが KCNQ1 では起こらない PKC を介したコンダクタンス-電圧関係のシフト. 第 81 回日本生理学会大会 (札幌)
4. 藤原祐一郎, 久保義弘 (2004.6) 内向き整流性 K⁺チャネル(Kir2.1)のポア内面の電荷を帯びたアミノ酸残基の機能的意義. 第 81 回日本生理学会大会 (札幌)
5. 長友克広, 伊藤政之, 久保義弘, 齋藤修 (2004.6) メダカ由来 RGS タンパクの機能解析. 第 81 回日本生理学会大会 (札幌)
6. Yoshihiro Kubo (2004.7) Regulation mechanisms and structural rearrangements of metabotropic glutamate receptor. Young Researcher Umami Forum (Tokyo, Japan)
7. Fujiwara Y & Kubo Y (2004.7) Density Dependent Changes of the Pore Properties of P2X₂ Receptor Channel. 2004 Gordon Research Conferences "Ion Channels" (New Hampshire, USA)
8. 久保義弘, 山本友美, 三尾和弘, 佐藤主税 (2004.9) Purification of recombinant protein of ATP receptor P2X₂ using baculovirus expression system. 第 27 回日本神経科学大会・第 47 回日本神経化学会大会合同大会 (大阪)
9. 立山充博, 阿部秀樹, 中田康裕, 齋藤修, 久保義弘 (2004.9) リガンド結合による代謝型グルタミン酸受容体の二量体構造変化. 第 27 回日本神経科学大会・第 47 回日本神経化学会大会合同大会 (大阪)
10. Fujiwara Y & Kubo Y (2004.10) Density dependent changes of the pore properties of P2X₂ receptor channel. シンポジウム「Structure and function of ion channels」第 77 回日本生化学会大会 (横浜)
11. 上松正和, 柳川右千夫, 小幡邦彦, 吉田祥子 (2004.9) 培養小脳組織からの GABA 放出パターン. 第 27 回日本神経科学大会 (大阪)
12. 山肩葉子, 井本敬二, 戸塚昌子, 八木健, 小幡邦彦, 柳川右千夫 (2004.9) 不活性型カルモジュリンキナーゼ II α サブユニット遺伝子改変マウスの作成と解析. 第 27 回日本神経科学大会 (大阪)
13. 伊佐かおる, Thongchai Sooksawate, Mary Behan, 小幡邦彦, 柳川右千夫, 伊佐正 (2004.9) GAD67-GFP ノックインマウスを用いた上丘中間層 GABA ニューロンの電気生理学的及び形態学的特性. 第 27 回日本神経科学大会 (大阪)
14. 田中正彦, 柳川右千夫, 小幡邦彦, 丸野内棟 (2004.9) In vitro における小脳プルキンエ細胞樹状突起形成過程の経時観察. 第 27 回日本神経科学大会 (大阪)
15. 古川智範, 山田順子, 井上浩一, 天野賢, 柳川右千夫, 福田敦夫 (2004.10) GAD67-GFP ノックインマウスへの子宮内胎仔電気穿孔法により同定した皮質板細胞の GABA_A 受容体反応. 第 51 回中部日本生理学会 (静岡)

《分子神経生理研究部門》

1. Ogawa Y, Takebayashi H, Iwasaki Y, Osumi N, Watanabe M, Ikenaka K (2004.8) Diversity of radial glial cells is formed along the dorso-ventral axis in the developing mouse spinal cord. American Society for Neurochemistry 35th annual Meeting (New York, USA)
2. 馬堅妹, 田中謙二, 山田元, 松本路夫, 竹林浩秀, 池中一裕 (2004.9) 脱髄モデルマウスにおける脳内遺伝子変化の解析. 第 47 回日本神経化学会大会 (大阪)
3. 小川泰弘, 竹林浩秀, Rasband M, 岩崎靖乃, Trimmer J, 池中一裕 (2004.9) ラジアルグリア細胞とアストロ

- サイト, 脳室上衣細胞は alpha-actinin-1 を発現する, 第 47 回日本神経化学学会大会 (大阪)
4. 小野勝彦, 渡辺啓介, 竹林浩秀, 池田一裕 (2004.9) ネットリン1欠損マウス脊髄ではオリゴデンドロサイト前駆細胞の出現部位が腹側方向に変異する, 第 47 回日本神経化学学会大会 (大阪)
 5. 古性美記, 竹林浩秀, 政平訓貴, 小野勝彦, 池田一裕 (2004.9) 前脳の Olig2 陽性細胞は GABA 作動性ニューロンやオリゴデンドロサイト前駆細胞に分化する, 第 47 回日本神経化学学会大会 (大阪)
 6. 政平訓貴, 丁雷, 竹林浩秀, 小野勝彦, 清水恵司, 池田一裕 (2004.9) CreERTM/loxP システムを用いた Olig2 発現細胞の細胞系譜解析, 第 47 回日本神経化学学会大会 (大阪)
 7. 等誠司, Seaberg R, van der Kooy D, 池田一裕 (2004.9) Notch シグナルによる未分化神経幹細胞から神経幹細胞への分化制御, 第 47 回日本神経化学学会大会 (大阪)
 8. 丁雷, 竹林浩秀, 田中謙二, 小野勝彦, 千坂修, 池田一裕 (2004.9) 後脳と脊髄でみられる Olig3 系譜細胞の腹側方向への移動, 第 47 回日本神経化学学会大会 (大阪)
 9. 辰巳晃子, 竹林浩秀, 眞部孝幸, 池田一裕, 和中明生 (2004.9) ダブルトランスジェニックマウスを用いた凍結脳損傷後における Olig2 発現細胞の動態, 第 47 回日本神経化学学会大会 (大阪)
 10. 成瀬雅衣, 長谷川明子, 等誠司, 池田一裕 (2004.9) マウス中枢神経系発生過程におけるシスタチンCの発現と機能解析, 第47回日本神経化学学会大会 (大阪)
 11. 田中謙二, 竹林浩秀, 池田一裕 (2004.9) 変異 GFAP dynamics, 第 47 回日本神経化学学会大会 (大阪)
 12. 東幹人, 等誠司, 池田一裕 (2004.9) 脱随モデルにおける神経幹細胞のオリゴデンドロサイトへの分化, 第 47 回日本神経化学学会大会 (大阪)
 13. Tanaka K, Takebayashi H, Ikenaka K (2004.10) Mutated GFAP dynamics in mouse primary astrocytes., Society for Neuroscience 2004 (San Diego, USA)
 14. Furusho M, Takebayashi H, Masahira N, Ono K, Ikenaka K (2004.10) Olig2 positive cells differentiate into GABAergic neurons and/or Oligodendrocyte progenitors in the forebrain., Society for Neuroscience 2004 (San Diego, USA)
 15. Hitoshi S, Seaberg R, van der Kooy D, Ikenaka K (2004.11) The 17th Naito Conference on Molecular Basis for Maintenance and Differentiation of Stem Cells., (Kanagawa, Japan)

《細胞内代謝研究部門》

- 1) 英文原著論文
 1. Yoshimura, K., Nomura, T., Sokabe, M. (2004) Loss-of-function mutations at the rim of the funnel of mechanosensitive channel MscL. *Biophys. J.* 86(4):2113-2120
 2. Qi, Z., Kishigami, A., Nakagawa, Y., Iida, H., Sokabe, M. (2004) A Mechanosensitive Anion Channel in *Arabidopsis Thaliana* Mesophyll Cells. *Plant Cell Physiol.* 45(11):1704-1708
 3. Hirata, H., Ohki, K., Miyata, H. (2004) Dynamic change in the distribution of alpha5beta1 integrin on isolated ventral membrane: effect of divalent cation species. *Cell Motil. Cytoskeleton* 59:131-140
 4. Hirata, H., Tatsumi, H., Sokabe, M. (2004) Tension-Dependent Formation of Stress Fibers in Fibroblasts: a Study Using Semi-Intact Cells. *JSME Int. J. Ser. C-Mech. Syst. Mach. Elem. Manuf.* 47(4):962-969
 5. Tanaka, K., Naruse, K., Sokabe, M. (2004) Effects of mechanical stresses on the migrating behavior of endothelial cells. In *"Biomechanics at Micro and Nanoscale Levels, Volume I"* ed. Wada H. World Sci. Press, pp75-87.
- 2) その他
 1. 古屋喜四夫, 秋田久美, 曾我部正博 (2004) 乳腺における機械刺激と ATP 放出, *日本薬理学雑誌*, 123(6):397-402
 2. 曾我部正博, 成瀬恵治, 唐涼瑤 (2004) 新規 MS チャネル SAKCA と新規 MS チャネルブロッカー GsMTx-4, *日本薬理学雑誌* 124:383-392
 3. 曾我部正博 (2004) メカニカルストレスと血管内皮

- 細胞応答, 診療と新薬, 41(2):87-90
4. 曾我部正博 (2004)2003 年度・ノーベル化学賞, からの科学, 235:121
 5. 曾我部正博, K チャネル研究に授与されたノーベル化学賞の意味, 蛋白質核酸酵素, 49:165-170
 6. 曾我部正博 (2004)比較生理生化学の動向: 学術の動向, 2月号:82-85(2004)
 7. 曾我部正博 (2004)変形する細胞の“力覚”モデル, BioNics, 1(1):44-49

《生体膜研究部門》

1. 河西春郎 (2004.1)2 光子励起法を用いた脳研究。脳と心のメカニズム 第 4 回冬のワークショップ (北海道)
2. 根本知己 (2004.2)2 光子励起法を用いた開口放出分子機構の解析法の開発と応用。科学技術振興機構たんぱく質関連領域シンポジウム(さきがけライブ 2004) (東京)
3. 河西春郎 (2004.3)2 光子励起法によるシナプス可塑性のイメージング。基生研研究会「生体シグナルの可視化を目指して」(岡崎)
4. 高橋倫子 (2004.3)2 光子励起法を用いたインスリン分泌過程の解析。宮崎大学 21 世紀 COE シンポジウム“生理活性ペプチドと生体システムの制御”(宮崎)
5. 岸本拓哉, 木村良一, 劉ティテイ, 河西春郎 (2004.3)2 光子励起法を用いた副腎髄質における促進的逐次開口放出機構の解析。日本薬学会 (大阪)
6. 高橋倫子, 畠山裕康, 河西春郎 (2004.5)膵島における開口放出様式と SNARE 蛋白の動態。第 47 回日本糖尿病学会年次学術集会 (東京)
7. 畠山裕康, 高橋倫子, 河西春郎 (2004.5)インスリン開口放出における PKA の関与の 2 光子励起解析。第 47 回日本糖尿病学会年次学術集会 (東京)
8. 高橋倫子 (2004.6)インスリン開口放出機構の解析第 81 回日本生理学会 (札幌)
9. 高橋倫子, 河西春郎 (2004.6)インスリン開口放出様式と SNARE 蛋白の動態。第 77 回日本内分泌学会学術総会 (京都)
10. Kasai H (2004.6) Two-photon excitation imaging of Ca^{2+} -dependent exocytosis. 第 81 回日本生理学会 2nd Korea-Japan Joint Symposium (札幌)
11. Kasai H, Takahashi N, Liu T-T, Kishimoto T, Nemoto T (2004.6) Two-photon excitation imaging of Ca^{2+} -dependent exocytosis. 8th Asia-Pacific Conference on Electron Microscopy (Kanazawa).
12. Kasai H (2004.6) Two-photon excitation imaging of exocytosis and endocytosis. Gordon Research Conference on Cell Biology of the Neuron. (New London, NH, USA).
13. Matsuzaki M, Honkura N, Ellis-Davies GCR, Kasai H (2004.6) Structure-function plasticity of single spines of hippocampal pyramidal neurons induced by two-photon uncaging of a caged-glutamate compound. Gordon Research Conference on Cell Biology of the Neuron. (New London, NH, USA).
14. Kasai H (2004.6) Single-spine functions studied with two-photon photolysis of caged-glutamate. 日米情報交換セミナー Molecular Basis of Synaptic Plasticity: Synaptogenesis, Receptor trafficking and cytoskeleton proteins (New York, USA).
15. 高橋倫子 (2004.7)インスリン開口放出機構の 2 光子励起画像法による解析。第 4 回 Islet Biology 研究会 (東京)
16. Kasai H, Matsuzaki M, Ellis-Davies GCR, Noguchi J, Yasumatsu N, Honkura N (2004.8) Structural and functional plasticity of single dendritic spines in hippocampal CA1 pyramidal neurons. 国際解剖学会シンポジウム (京都)
17. 河西春郎 (2004.9)学習・記憶過程を見る。「脳の世紀」シンポジウム (東京)
18. Takahashi N, Hatakeyama H, Kasai H (2004.9) Sequential insulin exocytosis and redistribution of SNAP25 analyzed with two-photon imaging. 40th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes (Munich, Germany).
19. Kasai H (2004.10) Two-photon photolysis. EMBO course for multiphoton microscope (Munich, Germany).

20. 野口潤, 松崎政紀, 河西春郎 (2004.10) 2 光子グルタミン酸法を用いた単一スパインカルシウムシグナルのスパイン形態依存性の解析. 生理学研究所研究会 (岡崎)
21. Matsuzaki M (2004.10) Structural plasticity of dendritic spines associated with short- and long-term potentiation in hippocampal CA1 pyramidal neurons. 34th Annual Meeting of Society for Neuroscience (San Diego, USA).
22. Kasai H (2004.11) Motility and stability of dendritic spine underlying long-term potentiation. 18th Symposium of Japanese Cell Biology Society (Nagoya).
23. 大嶋章裕, 根本知己, 出島健司, 河西春郎, 久育男 (2004.11) モルモット鼻粘膜分泌細胞における分泌現象の可視化. 第 54 回日本アレルギー学会総会 (横浜)
24. 根本知己 (2004.11) 多光子励起過程を用いた開口放出の解析法の開発と応用. 基礎生物学会「光生物学の課題と光技術の展望」(岡崎)
25. 根本知己 (2004.12) 2 光子励起法による開口放出の可視化. 基礎生物学会「生体シグナルの可視化を目指して」(岡崎)

《機能協関研究部門》

1. 岡田泰伸 (2004.3) 嚢胞性線維症に関わる CFTR-チャネル及びレギュレータとしての ABC タンパク質. 公開シンポジウム「ABC 蛋白の多機能性と生命維持機構」(秋田)
2. Okada Y, Shimizu T, Maeno E, Mori S, Manabe K (2004.6) The role of volume-sensitive chloride channel in apoptotic and necrotic cell death. 第 81 回日本生理学会大会「チャネルを介した細胞死の制御: 細胞膜とミトコンドリア膜の役割」シンポジウム (札幌)
3. Xu H, Gong W, Shimizu T, Tanabe S, Uchida S, Sasaki S, Okada Y (2004.6) Volume-sensitive chloride currents in cardiomyocytes isolated from CIC-3 knockout mice. 第 81 回日本生理学会大会 (札幌)
4. Zhang X-D, Takahashi N, Morishima S, Ando-Akatsuka Y, Nabekura T, Inoue H, Shimizu T, Okada Y (2004.6) New isoforms of the CIC-1 chloride channel in astrocytic glial cells. 第 81 回日本生理学会大会 (札幌)
5. Shimizu T, Numata T, Sabirov R (2004.6) The role of reactive oxygen species in anion channel activation induced by a mitochondrion-mediated apoptosis inducer. 第 81 回日本生理学会大会 (札幌)
6. Terunovsky V, Okada Y, Sabirov RZ (2004.6) The pore size of volume-sensitive chloride channel probed with nonelectrolytes. 第 81 回日本生理学会大会 (札幌)
7. Inoue H, Okada Y (2004.6) Activation of volume-sensitive Cl⁻ channel in association with excitotoxic varicosity formation in cortical neurons. 第 81 回日本生理学会大会 (札幌)
8. Liu H, Inoue H, Okada Y, Sabirov R (2004.6) The role of maxi-anion channels in hypotonicity- and ischemia-induced glutamate release from astrocytes. 第 81 回日本生理学会大会 (札幌)
9. 赤塚結子, 清水貴浩, 岡田泰伸 (2004.12) 容積感受性 Cl⁻ チャネル制御因子の分子同定. 第 27 回日本分子生物学会 (神戸)
10. Inoue H, Okada Y (2004.9) Volume-sensitive Cl⁻ channels are involved in recovery from excitotoxic neuronal swelling. 第 27 回日本神経科学学会 (横浜)
11. Sabirov RZ, Okada Y (2004.2) Voltage-dependent ATP block, ATP permeability and pore size of VDACL maxi-anion channel. 48th Annual Meeting of Biophysical Society (Baltimore, USA).
12. Okada Y (2004.2) Cell volume regulation mechanisms: Roles of channels and transporters. Kyoto University International Symposium on “Leading Project for Biosimulation” (Kyoto).
13. Sabirov RZ, Okada Y (2004.4) Conductive ATP-releasing pathway as a new physiological role for VDACL maxi-anion channel. Experimental Biology 2004 (Washington DC, USA).
14. Okada Y (2004.6) ATP release and ATP-conducting maxi-anion channel. 4th International Symposium of Nucleosides and Nucleotides “Purines 2004” (Chapel Hill, USA).

15. Okada Y, Manabe K (2004.7) Mechanisms of cell volume regulation after shrinkage induced by muscarinic stimulation in colonic epithelial cells. The 3rd Symposium on Exocrine Glands Korea-Japan on “Frontiers of Epithelial Transport 2004” (Seoul, Korea).
16. Okada Y (2004.10) Sensor channels in the cell membrane. International Workshop on Surface- Bionics (Tokyo).

《感覚認知情報研究部門》

1. Komatsu H, Ogawa T(2004.5) Interaction between bottom-up and top-down attention mechanisms in area V4 of the monkey. Tamagawa-COE International Symposium on Attention and Decision (東京).
2. 小松英彦 (2004.7) 視覚野における面の表現と補完。日本視覚学会 2004 年夏季大会 (高知)
3. Mikami A, Onishi A, Hanazawa A, Terao K, A. Saito, S. Koike, M. Ida- Hosonuma, O. Takenaka, P.S. Angelika, A. Jayadi, K.A. Widayati, B. Suryobroto, A. Farajallah, H. Komatsu, K. Koida, T. Yamamori, Y. Shichida, T. Hasegawa, S. Goto, K. Kato, A. Kondo, M. Teramoto, T. Udono, Y. Emi, H. Kobayashi (2004.9) Color vision deficiency in the old world primates. International Congress of Eye Research (Sydney, Australia)
4. Komatsu H (2004.9) Bridging gaps at V1: neural responses for filling-in and completion. 第 27 回日本神経科学大会 (大阪)
5. 鯉田孝和, 小松英彦 (2004.9) 色カテゴリ課題と色弁別課題中の TE 野細胞の色選択性。第 27 回日本神経科学大会 (大阪)
6. 安田正治, 鯉田孝和, 小松英彦 (2004.9) サル下側頭皮質における色処理の局在。第 27 回日本神経科学大会 (大阪)
7. 小川正, 小松英彦 (2004.9) 多次元視覚探索課題遂行中の V4 野におけるボトムアップとトップダウン情報の相互作用。第 27 回日本神経科学大会 (大阪)
8. Yasuda M, Koida K, Goda N, Komatsu H (2004.10) Regional specialization for color processing in area TE of the monkey. 34th Society for Neuroscience Meeting(San Diego, U.S.A.)
9. Koida K, Komatsu H (2004.10) Invariant color tuning of area TE neurons for color categorization and color discrimination tasks. 34th Society for Neuroscience Meeting (San Diego, U.S.A.)
10. Ito M, Komatsu H (2004.10) Representation of angles and their line components in area V2 of the macaque monkey. 34th Society for Neuroscience Meeting (San Diego, U.S.A.)
11. Ogawa T, Komatsu H (2004.10) Dynamics of visual selection in V4 and FEF during a multi-dimensional search task. 34th Society for Neuroscience Meeting (San Diego, U.S.A.)
12. Koida K, Komatsu H (2004.11) Color tuning of area TE neurons for color discrimination and color categorization tasks. 3rd Asian Conference on Vision (Chongqing, China)
13. Komatsu H, Yasuda M, Koida K, Matsumora T (2004.11) Regional specialization for color processing in the anterior inferior temporal cortex of the monkey. 3rd Asian Conference on Vision (Chongqing, China)

《神経シグナル研究部門》

1. 宮田麻理子 (2004.3) 炎症性疼痛に於ける視床 mGluR1-PLC β 4カスケードの役割。第 36 回脳のシンポジウム (東京)
2. 井本敬二(2004.6.2-4)イオンチャネル疾患の発病メカニズム。第 81 回日本生理学会大会 (札幌)
3. Mariko Miyata (2004.8) Physiological role of thalamic PLC β 4 mediated by metabotropic glutamate receptor type 1 in inflammatory pain. 16th International Federation of Association of Anatomists (Kyoto)
4. 佐竹伸一郎, 井本敬二 (2004.9) ラット小脳皮質にお

- いて異種シナプス間抑制を仲介する AMPA 型グルタミン酸受容体の性質。日本動物学会第 75 回大会 (神戸)
- 井上剛, 井本敬二 (2004.9) 視床において同期的神経活動を誘発するシナプス結合様式。第 27 回日本神経科学・第 47 回日本神経化学合同大会 (大阪)
 - 井本敬二, 佐々木幸恵, 宮田麻理子, 下野健 (2004.7) Ca チャネルミュータント tottering マウスにおける欠振発作のネットワークメカニズム。第 27 回日本神経科学・第 47 回日本神経化学合同大会 (大阪)
 - 佐竹伸一郎, 井本敬二 (2004.9) 小脳 GABA 伝達のシナプス前抑制を仲介する AMPA 型グルタミン酸受容体の性質。第 27 回日本神経科学・第 47 回日本神経化学合同大会 (大阪)
 - 宮田麻理子, 井本敬二 (2004.9) マウス視床 VB 核の興奮性シナプス伝達に対する kainate 受容体の制御機構。第 27 回日本神経科学・第 47 回日本神経化学合同大会 (大阪)
 - Yamagata Y, Imoto K, Totsuka M, Yagi T, Obata K, Yanagawa Y (2004.9) Transgenic mice carrying inactivated α subunit of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II. 第 27 回日本神経科学・第 47 回日本神経化学合同大会 (大阪)
 - Miyata M, Imoto K (2004.10) Postsynaptic and presynaptic kainate receptors regulate dynamic properties of the corticothalamic synapses. The 34th Annual Meeting, Society for Neuroscience (San Diego, CA, USA)
 - Sasaki S, Miyata M, Shimono K, Imoto M (2004.10) A network mechanism of absence epilepsy in Ca channel mutant tottering mice. The 34th Annual Meeting, Society for Neuroscience (San Diego, CA, USA)

《高次神経機構研究部門》

- 石塚 徹, 荒木力太, 柳川右千夫, 阪上洋行, 小橋雄一, 明石 馨, 平林敬浩, 宮崎純一, 崎村建司, 八尾 寛 (2004.9) 遺伝子改変動物を用いた生体機能計測。Neuro2004 第 27 回日本神経科学大会・第 47 回日本神経化学会大会 合同大会 (大阪)
- 金子涼輔, 加藤めぐみ, 石川綾子, 平林敬浩, 濱田俊, 八木健, 平林真澄 (2004.11) アトピー性皮膚炎モデルラットの樹立と病態解析。第 21 回日本疾患モデル学会総会 (京都)
- 八木 健 (2004.11) CNR/プロトカドヘリン遺伝子の多様性。第 27 回日本分子生物学会年会 (神戸)

《感覚運動調節研究部門》

- Kakigi R, Tamura Y (2004.12) Effects of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) on acute pain. International Workshop on the Neural Mechanism of Musculoskeletal Pain (Nagoya, Japan).
- Gunji A, Ishii R, Okamoto H, Chau W, Kakigi R, Pantev C (2004.9) Cortical representation of event-related desynchronization (ERD) during singing in humans. 12th World Congress of Psychophysiology (Chalkidiki, Greece).
- Kaneoke Y, Noguchi Y, Kakigi R, Sadato N (2004.10) Higher order visual motion processing beyond the occipital cortex in humans. Society for Neuroscience 34th Annual Meeting (San Diego, USA).
- Kakigi R, Watanabe S, Miki K, Hoshiyama M, Puce A (2004.10) Human face perception traced by MEG and EEG. 8th International Evoked Potentials Symposium (Fukuoka, Japan).
- Kakigi R, Inui K (2004.10) EEG and MEG responses following epidermal stimulation. 8th International Evoked Potentials Symposium (Fukuoka, Japan).
- Hashimoto A, Watanabe S, Kakigi R (2004.10) Unconscious backward-masking phenomena: The effect of the second stimulus duration on the first stimulus recognition. 8th International Evoked Potentials

- Symposium (Fukuoka, Japan).
7. Kaneoke Y (2004.10) Properties of the human visual motion detection system revealed by the recent MEG studies. 8th International Evoked Potentials Symposium (Fukuoka, Japan).
 8. Ojima S, Kakigi R (2004.10) An ERP study of second language learning: effects of proficiency. 8th International Evoked Potentials Symposium (Fukuoka, Japan).
 9. Noguchi Y, Inui K, Kakigi R (2004.10) Temporal Dynamics of neural adaptation effect in the human visual ventral stream. 8th International Evoked Potentials Symposium (Fukuoka, Japan).
 10. Miki K, Watanabe S, Kakigi R (2004.10) Interaction between auditory and visual stimulus relating to the vowel sounds in the auditory cortex in humans: a magnetoencephalographic study. 8th International Evoked Potentials Symposium (Fukuoka, Japan)
 11. Miyanari A, Kaneoke Y, Ihara A, Watanabe S, Osaki Y, Kubo T, Kato A, Yoshimine T, Sagara Y, Kakigi R (2004.10) Odor evoked cortical activities as measured by magnetoencephalography in humans. 8th International Evoked Potentials Symposium (Fukuoka, Japan).
 12. Hiroe N, Kakigi R (2004.10) Cortical-muscular (MEG-EMG) oscillatory interaction during an isometric contraction task in humans. 8th International Evoked Potentials Symposium (Fukuoka, Japan).
 13. Wasaka T, Nakata H, Kakigi R (2004.10) Modulation of somatosensory evoked potentials caused by contraction of the contralateral homologous muscle during the preparatory period of self-initiated plantar flexion. 8th International Evoked Potentials Symposium (Fukuoka, Japan).
 14. Ihara A, Kakigi R (2004.10) Event-related desynchronization during visual perception of native and second language. 8th International Evoked Potentials Symposium (Fukuoka, Japan).
 15. Okamoto H, Ross B, Kakigi R, Kubo T, Pantev C (2004.10) Central masking of the different frequencies in the human auditory cortex. 8th International Evoked Potentials Symposium (Fukuoka, Japan).
 16. Qiu Y, Honda M, Noguchi Y, Wang X, Tamura Y, Nakata H, Tanaka S, Sadato N, Inui K, Kakigi R (2004.10) Brain processing of the signals ascending through A-delta and C fibers in humans: an Event-related fMRI study. 8th International Evoked Potentials Symposium (Fukuoka, Japan).
 17. Gunji A, Okamoto H, Kakigi R, Ishii R, Chau W, Pantev C (2004.10) Cortical rhythmic changes during singing in humans. 8th International Evoked Potentials Symposium (Fukuoka, Japan).
 18. Wang X, Inui K, Qiu Y, Kakigi R (2004.10) Cortical responses to noxious stimuli during sleep. 8th International Evoked Potentials Symposium (Fukuoka, Japan).
 19. Hoshiyama M, Kakigi R (2004.10) Functional changes of cortical components of somatosensory evoked responses by stimulus repetition. 8th International Evoked Potentials Symposium (Fukuoka, Japan).
 20. Nakamura M, Kaneoke Y, Watanabe S, Kakigi R (2004.10) Functions of the dorsal and ventral pathways of the visual system in Williams syndrome. 8th International Evoked Potentials Symposium (Fukuoka, Japan).
 21. Nakata H, Wasaka T, Kakigi R (2004.10) Gating effects on short- and long-latency somatosensory evoked potentials. 8th International Evoked Potentials Symposium (Fukuoka, Japan).
 22. Nguyen BT, Tran TD, Hoshiyam M, Inui K, Kakigi R (2004.10) Magnetoencephalographic study for face representation in the human primary somatosensory cortex. 8th International Evoked Potentials Symposium (Fukuoka, Japan).
 23. Inui K, Kakigi R (2004.8) MEG response following epidermal needle stimulation. 14th International Conference on Biomagnetism (BIOMAG2004) (Boston, USA).
 24. Qiu Y, Inui K, Tran TD, Wang X, Kakigi R (2004.8) EEG and MEG responses following stimulation of unmyelinated C fibers. 14th International Conference on Biomagnetism (BIOMAG2004) (Boston, USA).
 25. Fujioka T, Trainor LJ, Ross B, Kakigi R, Picton TW, Pantev C (2004.8) Auditory memory trace encodes polyphonic melody. 14th International Conference on Biomagnetism (BIOMAG2004) (Boston, USA).

26. Oiwa S, Gunji A, Koyama S, Tajima K, Kato H, Kakigi R (2004.8) Phonetic memory representation for vowels as revealed by the mismatch negativity responses. 14th International Conference on Biomagnetism (BIOMAG2004) (Boston, USA).
27. Okamoto H, Ross B, Gunji A, Kakigi R, Kubo T, Pantev C (2004.8) Lateral inhibition and stimulus specific adaptation of the human auditory cortex. 14th International Conference on Biomagnetism (BIOMAG2004) (Boston, USA).
28. Wasaka T, Hoshiyama M, Kakigi R (2004) Pre-movement modulation of primary somatosensory cortex preceding self-initiated finger extension. 14th International Conference on Biomagnetism (BIOMAG2004) (Boston, USA)
29. Fujioka T, Trainor LJ, Ross B, Kakigi R, Pantev C (2004.8) Static and dynamic representation of complex sounds: from tonotopy to musical notes 14th International Conference on Biomagnetism (BIOMAG2004) (Boston, USA).
30. Fujioka T (2004.8) The role of auditory coding in auditory processing: Static and dynamic representation of complex sounds: from tonotopy to musical notes. 14th International Conference on Biomagnetism (BIOMAG2004) (Boston, USA).
31. Kakigi R (2004.7) Clinical application of laser-evoked pain-related potentials (LEPs). In Symposium Evaluation of pain. 11th International Pain Clinic World Society of Pain Clinicians (Tokyo, Japan).
32. Kakigi R (2004.7) Human pain processing traced by magnetoencephalography (MEG). In Symposium Mechanism of pain. 11th International Pain Clinic World Society of Pain Clinicians (Tokyo, Japan).
33. Kakigi R (2004.7) Effects of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) on acute pain. In Symposium Ascending and descending pain control systems. 11th International Pain Clinic World Society of Pain Clinicians (Tokyo, Japan).
34. Noguchi Y, Kaneoke Y, Kakigi R, Sadato N (2004.6) Isolated cortical areas responsible for the perception of second-order motion. 10th Annual Meeting of the Organization for Human Brain Mapping (Budapest, Hungary).
35. Kakigi R (2004.6) Human brain processing and central mechanisms of observed by Electro-and Magneto-Encephalography. The annual meeting of the Chinese Medical Association (Taipei, Taiwan).
36. Nguyen BT, Tran TD, Hoshiyama M, Inui K, Kakigi R (2004.4) Magnetoencephalographic study for face representation in the human primary somatosensory cortex. 15th Congress of the International Society for Brain Electromagnetic Topography (Chiba, Japan).
37. Tamura Y, Ugawa Y, Kakigi R (2004.4) Effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on acute pain. 15th Congress of the International Society for Brain Electromagnetic Topography (Chiba, Japan).
38. 柿木隆介 (2004.11)脳波と脳磁図を用いた顔認知機構の解明 第63回日本矯正歯科学会大会 (福岡)
39. 橋本章子, 渡邊昌子, 寶珠山稔, 村瀬澄夫, 柿木隆介 (2004.11) Masking 課題における提示時間の効果: 意識的处理と無意識的处理の誘発脳磁場反応 第34回日本臨床神経生理学会学術大会 (東京)
40. 和坂俊昭, 中田大貴, 木田哲夫, 柿木隆介 (2004.11) 自発運動の準備過程における体性感覚誘発電位の遠心性抑制 第34回日本臨床神経生理学会学術大会 (東京)
41. 柿木隆介 (2004.11)脳波と脳磁図 fMRI 所見の相違点 第34回日本臨床神経生理学会 シンポジウム 23: 脳波と脳機能画像 (東京)
42. 岡本秀彦, 軍司敦子, 柿木隆介, 久保武, Bernhard Ross, Christo Pantev (2004.11)聴覚野における側方抑制と刺激特異的適応 第34回日本臨床神経生理学会 シンポジウム 15:MEG を用いた聴覚機能の解析 (東京)
43. 藤岡孝子 (2004.11)聴覚野からはじまる音楽認知 第34回日本臨床神経生理学会 シンポジウム 15:MEG を用いた聴覚機能の解析 (東京)
44. 柿木隆介 (2004.11)「脳波と脳磁図 fMRI 所見の相違点」シンポジウム「脳波と脳機能画像」第34回日本臨床神経生理学会学術大会 (東京)
45. 中田大貴, 和坂俊昭, 田村洋平, 木田哲夫, 柿木隆介 (2004.11)反応課題施行時の筋収縮強度がNogo電位に与える影響 第34回日本臨床神経生理学会学術大会 (東京)
46. 野口泰基, 乾幸二, 柿木隆介 (2004.9)ヒト視覚腹側

- 路におけるプライミング効果の時間的動態 第27回
日本神経科学大会 (大阪)
47. 柿木隆介 (2004.9)脳磁図を用いた高次脳機能の研究
第58回東北精神神経学会総会 (弘前)
48. 野口泰基, 乾幸二, 柿木隆介 (2004.6)ヒト視覚腹側
路におけるプライミング効果の時間的動態 第19回
日本生体磁気学会大会 (徳島)
49. 岡本秀彦, 軍司敦子, 柿木隆介, 久保武, Christo
Pantev (2004.6)ヒト聴覚野における側方抑制と刺激
特異的適応の経時変化 第19回日本生体磁気学会大
会 (徳島)
50. 柿木隆介 (2004.5)脳磁図を用いたヒト脳機能の研
究 第45回日本神経病理学会総会 (前橋)
51. 田村洋平, 寶珠山稔, 乾幸二, 宇川義一, 井上聖啓,
柿木隆介 (2004.5)ATM線維を介する痛みに rTMS が
及ぼす影響 第45回日本神経学会総会 (東京)
52. 寶珠山稔, 柿木隆介 (2004.5)正中神経反復刺激によ
る体性感覚誘発脳磁界の変化 第45回日本神経学会
総会 (東京)
53. 軍司敦子, 岡本秀彦, 石井良平, 柿木隆介 (2004.3)
ヒトの声を聴取した時の聴覚誘発脳磁場 第6回日
本ヒト脳機能マッピング学会大会 (東京)
54. 野口泰基, 金桶吉起, 柿木隆介, 定藤規弘 (2004.3)
高次視覚性運動処理に関する脳部位の fMRI による探
索 第6回日本ヒト脳機能マッピング学会大会 (東
京)
55. 岡本秀彦, 軍司敦子, 柿木隆介 (2004.3)ヒト聴覚誘
発磁場反応における Lateral inhibition と habituation
の影響 第6回日本ヒト脳機能マッピング学会大会
(東京)
56. 和坂俊昭, 柿木隆介 (2004.3)自発的な指伸展動作の
準備期における体性感覚誘発脳磁場の変動 第6回
日本ヒト脳機能マッピング学会大会 (東京)
57. 柿木隆介 (2004.2)ヒトにおける痛覚認知機構 第18
回宮崎痛みの研究会 (宮崎)

《生体システム研究部門》

1. Nambu A (2004.1) Dynamic model of the basal
ganglia functions and Parkinson's disease. International
Collaborative Symposium "Neuroscience: from Molecules
to Human" (Seoul, Korea).
2. Nambu A (2004.3) Dynamic model of the basal ganglia
functions and Parkinson's disease. The 31st NIPS
International Symposium (Okazaki, Japan).
3. Tachibana Y, Kaneda K, Nambu A, Imanishi M, Kita H,
Shigemoto R, Takada M (2004.3) Downregulation of
metabotropic glutamate receptor 1 α in the globus
pallidus of parkinsonian monkeys. The 31st NIPS
International Symposium (Okazaki, Japan).
4. 南部 篤 (2004.4)視床下核の解剖・生理: 視床下核
刺激がパーキンソン病に効く理由。第43回日本定
位・機能神経外科学会 (奈良)
5. 南部 篤 (2004.6)視床下核の機能。第12回九州・山
口機能神経外科セミナー (沖縄)
6. 宮地重弘, 高田昌彦, 南部 篤 (2004.7)大脳基底核
の体部位再現-狂犬病ウイルスの逆行性超シナプ
スラベルにより可視化された一次運動野への入力
様式。第19回日本大脳基底核研究会 (松山市)
7. 南部 篤 (2004.8)大脳基底核と随意運動-基礎と臨
床の間-第5回運動器科学研究会 (立山)
8. Nambu A, Tachibana Y, Kaneda K, Tokuno H, Takada
M (2004.9) Abnormal pallidal activity evoked by
cortical stimulation in the parkinsonian monkey.
International Basal Ganglia Society 8th Triennial
Meeting (Crieff, Scotland).
9. Kita H, Tachibana Y, Nambu A (2004.9) Response of
monkey pallidal neurons to single and burst electrical
stimulation of the subthalamic nucleus. International
Basal Ganglia Society 8th Triennial Meeting (Crieff,
Scotland).
10. Takada M, Kaneda K, Tachibana Y, Imanishi M, Kita H,
Shigemoto R, Nambu A (2004.9) Downregulation of
the metabotropic glutamate receptor 1 α in pallidal
complex of parkinsonian monkeys. International Basal
Ganglia Society 8th Triennial Meeting (Crieff, Scotland).
11. 南部 篤, 橋 吉寿, 金田勝幸, 喜多 均, 高田昌
彦 (2004.9)視床下核高頻度刺激が, パーキンソン病

- サルの淡蒼球ニューロンの活動に及ぼす影響。第 27 回日本神経科学大会（大阪）
12. 畑中伸彦, 宮地重弘, 橋 吉寿, 井上 智, 南部 篤, 高田昌彦 (2004.9) 顎運動に関わる多シナプス性神経回路の同定。第 27 回日本神経科学大会（大阪）
 13. 橋 吉寿, 金田勝幸, 南部 篤, 畑中伸彦, 今西美知子, 喜多 均, 重本隆一, 高田昌彦(2004.9)パーキンソン病における淡蒼球内代謝型グルタミン酸受容体の動作様式。第 27 回日本神経科学大会(大阪)。
 14. 高田昌彦, 宮地重弘, 陸 暁峰, 今西美知子 (2004.9) 被殻から一次運動野への多シナプス性入力様式ー狂犬病ウイルスの逆行性経シナプス輸送を用いた解析。第 27 回日本神経科学大会（大阪）
 15. 宮地重弘, 陸 暁峰, 今西美知子, 伊東由美, 南部 篤, 高田昌彦 (2004.9)サル前頭前野から一次運動野への多シナプス性入力ー狂犬病ウイルスの逆行性経シナプス輸送による可視化。第 27 回日本神経科学大会（大阪）
 16. 湯本直杉, 陸 暁峰, 南部 篤, 岡本 洋, 深井朋樹, 高田昌彦 (2004.9)時間認知課題に応答するサル前頭前野の神経活動。第 27 回日本神経科学大会(大阪)
 17. 南部 篤 (2004.10)大脳基底核の構造と機能。パーキンソン病 脳深部刺激療法 日米セミナー(横浜)
 18. 南部 篤 (2004.10)大脳基底核の回路と刺激部位について。第 6 回 Active Therapy Workshop (千里)
 19. Takada M, Miyachi S, Lu X, Inoue S, Iwasaki T, Koike S, Nambu A (2004.10) Organization of multisynaptic inputs to proximal vs distal parts of forelomb representation of primary motor cortex I prefrontal inputs. Society for Neuroscience, 34th Annual Meeting (San Diego, USA).
 20. Lu X, Miyachi S, Ito Y, Inoue S, Iwasaki T, Koike S, Nambu A, Takada M (2004.10) Organization of multisynaptic inputs to proximal vs distal parts of forelomb representation of primary motor cortex III cerebellar inputs. Society for Neuroscience, 34th Annual Meeting (San Diego, USA).
 21. Yumoto N, Lu X, Okamoto H, Nambu A, Fukai T, Takada M (2004.10) Prefrontal neuron activity during performance of time-reproducing task. Society for Neuroscience, 34th Annual Meeting (San Diego, USA).
 22. 南部 篤 (2004.11)大脳基底核の研究の現状ー生理学的立場からー 第 13 回パーキンソン病治療研究会（東京）
 23. 南部 篤 (2004.11)DBS に神経生理学が寄与できること。第 34 回日本臨床神経生理学会学術大会(東京)

《脳形態解析研究部門》

1. 初山俊彦, 勝木元也 (2004.3)中脳ドーパミン性ニューロンにおける D2 受容体を介する脱分極誘発性シナプス伝達抑制。第 77 回日本薬理学会年会（大阪市, 日本）
2. 初山俊彦, 内田耕一, 峯裕, 河瀬斌 (2004.6)神経上皮細胞移植による線条体シナプス再構築。第 81 回日本生理学会大会（札幌市, 日本）
3. Momiyama T, Zaborszky L (2004.7) Somatostatin-induced presynaptic inhibition of GABA release onto cholinergic neurons in the rat basal forebrain. 4th Forum of European Neuroscience (Lisbon, Portugal)
4. Shigemoto R (2004.8) Synaptic domains and activity-dependent dynamics of functional membrane molecules as revealed by replica immunolabeling. 16th International Congress of the IFAA (Kyoto, Japan)
5. Masugi-Tokita M, Fujimoto K, Shigemoto R (2004.8) Input-and target-cell specific distribution of AMPA receptor in the rat cerebellum as revealed by highly sensitive SDS-digested freeze-fracture replica labelling. 16th International Congress of the IFAA (Kyoto, Japan)
6. Wang W, Masugi-Tokita M, Nakadate K, Shutoh F, Fukazawa Y, Molnar E, Nagao S, Shigemoto R (2004.8) Adaptation of horizontal optokinetic response (HOKR) accompanied with the decrease of AMPA receptor density in parallel fibre (PF)-PURKINJE cell synapses in the cerebellar flocculus. 16th International Congress of the IFAA (Kyoto, Japan)
7. Hagiwara A, Fukazawa Y, Ohtsuka T, Shigemoto R (2004.8) Identification and characterization of the presynaptic active zone in freeze-fracture replica at the

- hippocampal CA3 area. 16th International Congress of the IFAA (Kyoto, Japan)
8. 初山俊彦, 内田耕一, 峯裕, 河瀬斌 (2004.9) 線条体に移植された神経上皮細胞の分化とシナプス再構築。第 27 回日本神経科学大会・第 47 回日本神経化学学会大会 合同大会 (大阪市, 日本)
 9. 深澤有吾, 斉藤喜人, 井ノ口馨, Elek Molnar, 重本隆一 (2004.9) 凍結割断レプリカ標識法による海馬歯状回 LTP 誘導後の AMPA 型グルタミン酸受容体の定量的解析。第 27 回日本神経科学大会・第 47 回日本神経化学学会大会 合同大会 (大阪市, 日本)
 10. 馬杉一時田美和子, 中館和彦, 首藤文洋, 王文, Elek Molnar, 永雄総一, 重本隆一 (2004.9) 小脳運動学習による平行線維シナプスの AMPA 受容体の減少。第 27 回日本神経科学大会・第 47 回日本神経化学学会大会 合同大会 (大阪市, 日本)
 11. 田中淳一, 松崎政紀, 足澤悦子, 初山明子, Molnar Elek, 河西春郎, 重本隆一 (2004.9) 幼若ラット小脳プルキンエ細胞単一シナプスにおける AMPA 受容体数および密度の推定。第 27 回日本神経科学大会・第 47 回日本神経化学学会大会 合同大会 (大阪市, 日本)
 12. Momiyama T, Zaborszky L (2004.10) Somatostatin-induced presynaptic inhibition of GABA and glutamate release onto cholinergic neurons in the rat basal forebrain. 17th Korea-Japan Joint Seminar on Pharmacology (全州市, 大韓民国).
 13. Shigemoto R, Nakadate K, Shutoh F, Wang W, Fukazawa Y, Molnar E, Nagao S, Masugi-Tokita M (2004.10) Reduction of AMPA receptor content in parallel fiber-purkinje cell synapses by cerebellar motor learning. Society for Neuroscience 34th Annual Meeting (San Diego, USA).
 14. Fukazawa Y, Saitoh Y, Inokuchi K, Molnar E, Shigemoto R (2004.10) Quantitative analysis of ampa receptors after LTP induction in the dentate gyrus in vivo. Society for Neuroscience 34th Annual Meeting (San Diego, USA)
 15. Shinohara Y, Fukaya M, Watanabe M, Shigemoto R (2004.10) Subunit-dependent asymmetrical left-right distribution of NMDA receptors in the mice hippocampus. Society for Neuroscience 34th Annual Meeting (San Diego, USA).
 16. Hagiwara A, Fukazawa Y, Ohtsuka T, Mizuno N, Shigemoto R (2004.10) Localization of T-snares in the presynaptic active zone as revealed by SDS-digested freeze-fracture replica labeling in the rat CA3 area. Society for Neuroscience 34th Annual Meeting (San Diego, USA).

《大脳神経回路論研究部門》

1. Kubota Y (2004.1) Postsynaptic structures of axon terminals of cortical double bouquet cells. Neuroscience-from Molecules to Human (Seoul, Korea)
2. Kawaguchi Y (2004.3) Axon phenotype and synaptic connections of cortical nonpyramidal cells. COE International Symposium on Development of Neural Network and Emergent Behavior (東京)
3. Kawaguchi Y (2004.3) Axon branching and synaptic bouton phenotypes in nonpyramidal cell subtypes. The Thalamocortical Assembly (Davis USA)
4. 窪田芳之, 川口泰雄 (2004.6) 大脳皮質 GABA 作働性ダブルブーケ細胞のシナプス構築。第 81 回日本生理学会大会 (札幌)
5. Kubota Y (2004.8) Postsynaptic structures of axon terminals of cortical double bouquet cells 16th International Congress of the IFAA Anatomical Science 2004 From Gene to Body (京都)
6. Kubota Y (2004.8) Local connections formed by nonpyramidal neurons. The Cortical Pyramidal Neuron in 2004 (和光)
7. 窪田芳之, 畑田小百合, 根東覚, 川口泰雄 (2004.9) VGLUT2 含有興奮性終末入力のある皮質棘突起のよく抑制性支配。第 27 回日本神経科学大会 (大阪)
8. 森島美絵子, 川口泰雄 (2004.9) 前頭皮質における線条体投射錐体細胞の皮質内結合選択性。第 27 回日本神経科学大会 (大阪)
9. 苅部冬紀, 窪田芳之, 川口泰雄 (2004.9) 大脳皮質非錐体細胞の軸索・樹状突起の分岐パターン。第 27

回日本神経科学大会（大阪）

10. Kubota Y, Karube F, Kawaguchi Y (2004.10) Postsynaptic structures of axon terminals of cortical double bouquet cells. Society For Neuroscience 34th Annual Meeting (San Diego, USA).
11. Kawaguchi Y, Karube F, Kubota Y (2004.10) Dendritic branching and spine formation patterns of cortical nonpyramidal cell subtypes. Society For Neuroscience 34th Annual Meeting (San Diego, USA).

《心理生理学研究部門》

1. Sadato N (2004.1) Cross-modal plasticity in the blind revealed by functional neuroimaging technique. BK21 (Seoul, Korea).
2. Aramaki Y, Honda M, Okada T, Sadato N (2004.3) Neural correlate of spontaneous phase transition in bimanual finger tapping. The 31st NIPS International Symposium (Okazaki, Japan).
3. Sawamoto N, Honda M, Hanakawa T, Fukuyama H, Shibasaki H (2004.3) Cognitive slowing associated with striatal hypofunctioning in Parkinson's disease. The 31st National Institute for Physiological Sciences International Symposium (Okazaki, Japan).
4. Tanaka S, Honda M, Sadato N (2004.3) Functional specificity of the rostral part of Brodmann area 6 in verbal and spatial mental-operation tasks: a repetitive transcranial magnetic stimulation study. The 31st National Institute for Physiological Sciences International Symposium (Okazaki, Japan).
5. 北澤茂, 高橋俊光, 神作憲司, 池田華子 (2004.3) 音声聴取時の脳活動の分離。老人性疾患病態治療研究センター研究発表会（東京）
6. 齋藤大輔, 吉村公美子, 河内山隆紀, 岡田知久, 本田学, 定藤規弘 (2004.3) 話し言葉における視聴覚間の感覚統合に関する神経基盤：fMRI を用いた研究。第6回日本ヒト脳機能マッピング学会大会（東京）
7. 野口泰基, 金桶吉起, 柿木隆介, 定藤規弘 (2004.3) 高次視覚性運動処理に関わる脳部位の fMRI による探索。第6回日本ヒト脳機能マッピング学会大会（東京）
8. 定藤規弘 (2004.3) 機能的 MRI による高次脳機能解析。日本薬学会第124年会シンポジウム（大阪）
9. Morimoto M, Nishina E, Yagi R, Kawai N, Nakamura S, Honda M, Maekawa T, Oohashi T (2004.4) Transcultural study on frequency and fluctuation structure of singing voices. Proceedings of The 18th International Congress on Acoustics, 55-58 (Kyoto, Japan).
10. Nakamura S, Morimoto M, Nishina E, Yagi R, Kawai N, Honda M, Maekawa T, Oohashi T (2004.4) Frequency and fluctuation structure of various environmental sounds. Proceedings of The 18th International Congress on Acoustics, 3459-3460 (Kyoto, Japan).
11. Nishina E, Morimoto M, Yagi R, Kawai N, Nakamura S, Honda M, Maekawa T, Oohashi T (2004.4) Structural analysis of musical instrumental sounds based on the biological concept of music. Proceedings of The 18th International Congress on Acoustics, 493-494 (Kyoto, Japan).
12. Sadato N (2004.5) Cross-modal plasticity and integration: functional MRI studies. Tamagawa-COE International Symposium on Attention and Decision (Tamagawa, Japan).
13. 本田学 (2004.5) イメージする脳。世界脳週間 2004 岡崎講演会（岡崎）
14. Aramaki Y, Honda M, Okada T, Sadato N (2004.6) Neural correlate of spontaneous phase transition in bimanual finger tapping. 10th Annual Meeting of the Organization for Human Brain Mapping (Budapest, Hungary).
15. Garraux G, McKinney C, Holmes N, Wu T, Kansaku K, Hallett M (2004.6) Preliminary results on the role of basal ganglia in manipulation of finger sequence timing versus order. 10th Annual Meeting of the Organization for Human Brain Mapping (Budapest, Hungary).
16. Honda M, Nakamura S, Yagi R, Morimoto M, Maekawa T, Nishina E, Kawai N, Oohashi T (2004.6) Functional

- neuronal network subserving the hypersonic effect. 10th Annual Meeting of the Organization for Human Brain Mapping (Budapest, Hungary).
17. Tanabe HC, Honda M, Sadato N (2004.6) Enhanced cross-modal linkage during arbitrary auditory-visual association learning as revealed by functional MRI. 10th Annual Meeting of the Organization for Human Brain Mapping (Budapest, Hungary).
 18. Tanaka S, Honda M, and Sadato N (2004.6) Functional specificity of the rostral part of brodmann area 6 in verbal and spatial mental-operation tasks: a repetitive transcranial magnetic stimulation study. 10th Annual Meeting of the Organization for Human Brain Mapping (Budapest, HUNGARY).
 19. Iidaka T, Matsumoto A, Nogawa J, Ozaki N, Iwata N, Sadato N (2004.6) Functional polymorphism of serotonin receptor gene modulates amygdala-hippocampal activity during face recognition task revealed by fMRI. 10th Annual Meeting of the Organization for Human Brain Mapping (Budapest, Hungary).
 20. Toyoda H, Sadato N, Kashikura K, Kasamatsu S, Okazawa H, Fujibayashi Y, Yonekura Y (2004.6) Simultaneous measurement of hemoglobin concentration changes and BOLD signal response during visual stimulation by NIRS and fMRI. 10th Annual Meeting of the Organization for Human Brain Mapping (Budapest, Hungary).
 21. 本田 学(2004.6)高次行動の機能要素と脳部位連関。第81回日本生理学会大会シンポジウム「高次認知行動と神経動作をつなぐ脳システム観」(札幌)
 22. 本田 学(2004.7)聞こえない音は感じない～音のサブリメント～三重県立津西高等学校社会人講演会(津)
 23. Tanaka S, Honda M, and Sadato N (2004.8) Domain specific working memory process of non-primary motor cortex: a combined fMRI and rTMS study. Second International Conference for Working Memory (Kyoto, JAPAN).
 24. 神作憲司, Carver B, Johnson A, Hallett M (2004.9) カウンティングにおける運動前野の役割。Neuro 2004 (第27回 日本神経科学・第47回日本神経化学合同大会) (大阪)
 25. 田邊宏樹, 本田学, 定藤規弘(2004.9)機能的 MRI を用いた聴覚～視覚刺激対連合学習における脳活動変化の解析。Neuro2004 (第27回日本神経科学・第47回日本神経化学合同大会) (大阪)
 26. Bengtsson SL, Ehrsson HH, Hashimoto T, Kito T, Ullen F, Naito E, Forssberg H, Sadato N (2004.10) Listening to rhythms; an fMRI study. The 34th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (San Diego, USA).
 27. Ehrsson HH, Kito T, Sadato N, Passingham RE, Naito E (2004.10) Body image in the brain: The neural substrate of body size perception. The 34th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (San Diego, USA).
 28. Iidaka T, Matsumoto A, Nogawa J, Ichikawa Y, Ohira H, Yamamoto Y, Sadato N (2004.10) A combined fMRI/ERP study of recognition memory for pictures. The 34th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (San Diego, USA).
 29. Kaneoke Y, Noguchi Y, Kakigi R, Sadato N (2004.10) Higher order visual motion processing beyond the occipital cortex in humans. The 34th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (San Diego, USA).
 30. Kansaku K, Carver B, Johnson A, Matsuda K, Hallett M (2004.10) Role of the left premotor cortex for large number counting. The 34th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (San Diego, USA).
 31. Kitada R, Hashimoto T, Kochiyama T, Kito T, Okada T, Matsumura M, Lederman SJ, Sadato N (2004.10) Graded response in the human brain for tactile roughness estimation of gratings: An fMRI study. The 34th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (San Diego, USA).
 32. Miyamoto J, Saito DN, Okada T, Honda M, Ohyama K, Sadato N (2004.10) The Somatosensory representation of orofacial area: a functional MRI study. The 34th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (San Diego, USA).
 33. Nakamura S, Honda M, Morimoto M, Yagi R, Nishina E, Kawai N, Maekawa T, Oohashi T (2004.10) Electroencephalographic evaluation of the hypersonic effect. Society for Neuroscience 34th Annual Meeting (San Diego, USA).
 34. Saito DN, Toyoda H, Kashikura K, Okada T, Honda M, Yonekura Y, Sadato N (2004.10) Neural substrate

- underlying tactile discrimination in mahjong experts: a functional magnetic resonance imaging study. The 34th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (San Diego, USA).
35. Tanaka M, Sadato N, Okada T, Mizuno K, Sasabe T, Saito DN, Onoe H, Kuratsune H, Watanabe Y (2004.10) Neural mechanism of central nervous system fatigue. The 34th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (San Diego, USA).
36. 本田 学 (2004.11) 後頭部優位律動脳波の神経基盤～脳血流画像による検討～第 34 回日本臨床神経生理学会学術大会シンポジウム「律動脳波の基礎と臨床」(東京)

《認知行動発達機構研究部門》

1. 伊佐 正 (2004.6) マカクザルバイオオリソースプロジェクトの現況と今後の展望。第81回日本生理学会大会 (札幌)
2. 小林 康, 伊佐 正 (2004.6) 動機づけに基づくサッカー運動制御の脳幹メカニズム。第81回日本生理学会大会 (札幌市)
3. ニコライ・ニキチン, 伊佐正 (2004.6) Release from GABAergic inhibition unmasks visual inputs to deeper layer neurons in the superior colliculus in macaque monkeys 第81回日本生理学会大会 (札幌市)
4. 小川潤, 伊佐正, ブロア・アルステルマーク (2004.6) ラットにおける上肢筋運動ニューロンに対する錐体路からの作用機構。第81回日本生理学会大会 (札幌市)
5. 伊佐かおる, Thongchai Sooksawate, Mary Behan, 小幡邦彦, 柳川右千夫, 伊佐正 (2004.9) GAD67-GFP ノックインマウスを用いた上丘中間層 GABA 作動性ニューロンの電気生理学的及び形態学的特性。第27回日本神経科学学会 (大阪)
6. Thongchai Sooksawate, Tadashi Isa (2004.9) Cholinergic responses of neurons in the intermediate layer of rat superior colliculus. 第27回日本神経科学学会 (大阪)
7. T.Endo; T.Notomi; T.Etsuko; R.Shigemoto; Tadashi Isa (2004.10). Hyperpolarization-activated cation current and its modification of dendritic spike initiation in wide field vertical cells of the rat superficial superior colliculus 34th Annual Meeting of Society for Neuroscience (San Diego).
8. Seki, K., Perlmutter, S.I., Fetzi, E.E. (2004.10) Task-dependent modulation of primary afferent depolarization in the spinal cord of behaving monkey. The 34th Annual Meeting of Society for Neuroscience (San Diego).

《生体恒常機能発達機構研究部門》

1. 鍋倉淳一 (2004.4) 発達期に起こる神経回路の再編成。第4回日本赤ちゃん学会 シンポジウム (京都)
2. 鍋倉淳一 (2004.4) Transmitter switching in developing Brain. 韓国神経科学会 招待講演 (テグ, 大韓民国)
3. 溝口義人, 鍋倉淳一 (2004.9) The action of BDNF on GABA_A currents changes from potentiating to suppressing in rat visual cortical neurons. 第27回日本神経科学大会 (大阪)
4. 溝口義人, 鍋倉淳一 (2004.11) The action of BDNF on GABA_A currents changes from potentiating to suppressing in rat visual cortical neurons. Society for Neuroscience 34rd Annual Meeting (New Orleans, USA).
5. 鍋倉淳一 (2004.12) 発達期に起こる神経伝達物質のスイッチング。先端脳シンポジウム (東京)

《生殖・内分泌系発達機構研究部門》

1. Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, Kim Y-B, Lee A, Xue B, Fougelle F, Mu, J, Ferreé F, Birnbaum MJ, Kahn BB (2004.6) Hypothalamic AMP kinase (AMPK) regulates food intake, body weight and expression of orexigenic neuropeptides. 第64回アメリカ糖尿病学会 (Orland, USA)
2. 箕越 靖彦 (2004.6) 摂食行動に及ぼす視床下部 AMP キナーゼの調節作用。第77回日本内分泌学会学術総会 (京都)
3. 箕越 靖彦 (2004.7) エネルギー代謝と AMP キナーゼ。第12回西日本肥満研究会 (松山)
4. 箕越 靖彦 (2004.7) エネルギー代謝と AMP キナーゼ。第3回東北生活習慣病研究会 (仙台)
5. 箕越 靖彦 (2004.7) AMP キナーゼと生体エネルギー代謝。インスリン抵抗性とメタボリックシンドロームに関する研究会 (東京)
6. 箕越 靖彦 (2004.8) AMP キナーゼと生体エネルギー代謝。長寿医療センター研究会セミナー (大府)
7. 箕越 靖彦 (2004.9) 視床下部 AMP キナーゼによる生体エネルギー代謝の調節機構。第1回 Neuroscience Frontier Research Conference (宮崎)
8. 箕越 靖彦 (2004.9) 生体エネルギー代謝と AMP キナーゼ。第38回日本小児内分泌学会 (神戸)
9. 箕越 靖彦 (2004.10) エネルギー消費のメカニズム。第25回日本肥満学会 (大阪)
10. 箕越 靖彦 (2004.10) 視床下部 AMP キナーゼと摂食行動。第25回日本肥満学会 (大阪)
11. 箕越 靖彦 (2004.10) 摂食行動に及ぼす視床下部 AMP キナーゼの調節作用。久留米大学分子生命科学研究所セミナー (久留米)
12. 箕越 靖彦 (2004.10) 肥満・糖尿病における新しい治療ターゲット—AMP キナーゼによる摂食・代謝調節作用—学術講演会メタボリックシンドローム～基礎と臨床研究の進歩と今後の展望～ (名古屋)
13. Minokoshi Y (2004.11) Regulatory role of AMP-activated protein kinase in body energy metabolism. The Autumn Symposium of Korean Diabetes Association (Jeju, Korea).
14. 箕越 靖彦 (2004.12) 生体エネルギー代謝に及ぼす AMP キナーゼの調節作用。メタボリズムのゲノムネットワーク研究会 (静岡)
15. 箕越 靖彦 (2004.12) 生体エネルギー代謝に及ぼす AMP キナーゼの調節作用。生理研研究会「消化管機能—吸収分泌機能の病態生理」(岡崎)
16. 箕越 靖彦 (2004.12) 生体エネルギー代謝に及ぼす AMP キナーゼの調節作用。第3回メタボリック症候群(生活習慣病)研究会 (京都)
17. 箕越 靖彦 (2005.1) 生体エネルギー代謝に及ぼす AMP キナーゼの調節作用。千里神経懇話会 (大阪)
18. 箕越 靖彦 (2005.2) 生体エネルギー代謝に及ぼす AMP キナーゼの調節作用。第23回高峰カンファレンス (品川)
19. Minokoshi Y (2005.2) Hypothalamic control of glucose and lipid metabolism in skeletal muscle. 2005 Seoul Symposium on Obesity and Diabetes (Seoul, Korea)
20. 箕越 靖彦 (2005.2) 生体エネルギー代謝に及ぼす視床下部の調節作用。神戸大学 COE 講演会 (神戸)
21. 箕越 靖彦 (2005.3) 生体エネルギー代謝に及ぼす AMP キナーゼの調節作用。筑波大学大学院特別講義 (筑波)
22. 箕越 靖彦 (2005.3) 摂食行動に及ぼす視床下部 AMP キナーゼの調節作用。第2回九州メタボリッククラブ (福岡)
23. 箕越 靖彦 (2005.3) 生体エネルギー代謝に及ぼす AMP キナーゼの調節作用。第6回 Osaka Bay Diabetes Forum (大阪)

《形態情報解析室》

1. Mun JY, Lee KE, Kim IS, Arii T, Hama K, Muller M, Han SS (2004. 5) Electron-Tomography of the adult retinal cells in drosophila melanogaster. 35th Korean Soc. Electron Micros. (Seoul, Korea)
2. Furuya K, Furuya S, Sokabe M: Subepithelial Fibroblasts Work as Mechano-sensor in the Intestine via

- Cell-Shape-Dependent ATP Release. Purines 2004: 4th International Symposium on Nucleosides and Nucleotides (2004. 6) (Chapel Hill)
- 古家喜四夫, 古家園子, 曾我部正博: 小腸絨毛下線維芽細胞は腸のメカノセンサーとして働く 第81回日本生理学会大会生理学会 (2004.6) (札幌)
 - Mun JY, Lee KE, Kim IS, Arie T, Hama K, Muller M, Han SS (2004. 6) Electron-Tomography of the adult retinal cells in drosophila melanogaster. 8th APEM (金沢)
 - Mun JY, Lee KE, Kim IS, T Arie T, Hama K, Muller M, Han SS (2004. 6) Electron-Tomography of the adult retinal cells in drosophila melanogaster. 1st KBSI-HVEM user Workshop (Daejeon, Korea)
 - Furuya S, Furuya K, Sokabe M: Subepithelial Fibroblasts as a Mechano-sensor in Rat Intestinal Villi. 16th International Congress of the IFAA (2004. 8) (Kyoto)
 - Ozawa H, Arie T, Akiyama K, Kawata M (2004. 8) Three-dimensional fine structure of dendritic spines of the hippocampal neurons in aged rats as revealed by high voltage electron microscopy. 第16回国際解剖学会議 (京都)
 - Mun JY, Lee KE, Kim IS, T Arie T, Hama K, Muller M, Han SS (2004. 8) Electron-Tomography of the adult retinal cells in drosophila melanogaster. XXII Intern. Congress Entomology (Brisbane, Australia)
 - 西田倫希, 吉村亮一, 陣内浩司, 遠藤泰久, 有井達夫: 神経栄養因子受容体の細胞内構造: 超高压電顕トモグラフィ。日本動物学会第75回大会 (2004.9) (神戸)

《脳機能分子解析室》

- 岩山 広, 保地 眞一, 平林 真澄, 石川 創, 大隅 清治, 福井 豊 (2004. 5) クロミンクジラ GV 期卵子のガラス化保存と体外成熟. 第45回日本哺乳動物卵巣学会 (大津)
- 伊藤 潤哉, 武内 歩, 伊藤 真由美, 加藤 めぐみ, 島田 昌之, 保地 眞一, 平林 真澄 (2004.5) ラット卵子の p34cdc2 kinase 活性と顕微注入細胞核に誘起される早期染色体凝集との関係. 第51回日本実験動物学会 (長崎)
- 加藤 めぐみ, 石川 綾子, 保地 眞一, 平林 真澄. (2004. 5) 顕微授精を介したトランスジェニックラットの作製効率に及ぼす精子膜崩壊処理および外来 DNA 溶液濃度の影響. 第51回日本実験動物学会 (長崎)
- 伊藤 潤哉, 武内 歩, 伊藤 真由美, 加藤 めぐみ, 島田 昌之, 保地 眞一, 平林 真澄 (2004. 9) ラット卵子の高い p34cdc2 kinase 活性が顕微注入体細胞核の早期染色体凝集誘起に必要である. 第97回日本繁殖生物学会 (東広島)
- 岩浪 亮人, 小林 俊寛, 加藤 めぐみ, 平林 真澄, 保地 眞一 (2004. 9) ラット A 型精原細胞とセルトリ細胞の共培養による円形精子細胞への分化誘導. 第97回日本繁殖生物学会 (東広島)

《時系列生命現象研究領域》

- 岡村 康司, 佐々木 真理, 岩崎 広英, 村田 喜理 (2004. 6) ホヤゲノムから見つかった新規膜電位センサー分子. 第81回日本生理学会大会 シンポジウム—イオンチャンネルが刻む時系列生命現象 (札幌)
- 白幡恵美, 林 長青, 岩崎 広英, 早坂 清, 岡村康司 (2004. 6) アンキリン G は発現系において電位依存性ナトリウムチャンネル Nav1.6 の持続性電流を抑制する. 第81回日本生理学会大会 (名古屋)
- 岩崎広英, 佐々木真理, 村田喜理, 岡村康司 (2004. 6) 膜電位感受性酵素 Ci-VSP の酵素活性. 第81回日本生理学会大会 (札幌)
- 佐々木真理, 岩崎広英, 村田喜理, 久木田文夫, 岡村康司 (2004. 6) 新規膜電位感受性タンパク質;

- Ci-VSPにおけるゲート電流の解析。第81回日本生理学会大会(札幌)
5. 大塚 幸雄, 岡村 康司(2004. 10)マボヤ表皮感覚神経分化における BMP の役割。日本動物学会(神戸)
 6. 岡村 康司(2004. 12)境界動物の生物学—脊椎動物への進化の研究最前線—イオンチャネル分子からみたユウレイボヤと脊椎動物の比較。東京大学海洋

科学研究所研究(東京)

7. 村田喜理, 佐々木真理, 岩崎広英, 岡村康司(2004. 6)Ci-VSP の膜電位感受性とホスファターゼ活性の相関, 第81回日本生理学会大会, 2004年6月2日。
8. 東島真一(2004. 9)ゼブラフィッシュにおける, Engrailed-1 発現細胞の脊髄神経回路中での機能。日本神経科学会第27回年会(大阪)

《戦略的方法論研究領域》

1. K. Nagayama (2004. 1)Terabase Sequencer and DNA Nanoarrays. Japan-USA Symposium on “Directed Self-Assembly and Self-Organization”(California, USA)
2. 村上政隆(2004. 2)開口放出と蛋白分泌の時間経過生理研研究会 Strategy of informatics, genomics and proteomics for salivary secretion research (Okazaki)
3. 永山國昭(2004. 3)ポストゲノムと電子位相顕微鏡観察—ゲノム, チャネル, 細胞の形成と情報の解析—第28回顕微鏡学会関東支部講演会(東京)
4. Ohashi, M., Mizushima, N., Kabeya, Y., Yoshimori T. (2004・5) The significance of the dual localization of Nsdhl between Lipid Droplets and the endoplasmic reticulum 第57回日本細胞生物学会大会(大阪)
5. 林 知也, 村上政隆, 根川常夫, 松山幸枝, 西川弘泰, 恵良聖一(2004. 6)ラット唾液腺の傍細胞経路における血清アルブミンの修飾。第81回日本生理学会大会(札幌)
6. 村上政隆, 橋本貞充, Loffredo F, Puxeddu R, Riva A (2004.6)ラット顎下腺における細胞間分泌細管の用量依存の形態変化。第81回日本生理学会大会(札幌)。
7. K. Nagayama (2004. 7) Contrast Enhancement with Phase Plates in Electron Optics. Max Planck Soc. & Howard Hughes Med. Inst. Workshop (Heidelberg, Germany)
8. 永山國昭(2004. 7)高大連携によるこれからの科学技術教育。SSH 研究開発事業報告会特別講演会(岡崎)
9. 永山國昭(2004. 7)透過型電子顕微鏡の原理と実践。岡崎高校 SSH 生物授業(岡崎)

10. Murakami M, Segawa S, Shinozuka N, Hashimoto S, (2004.7) Morphology and function of paracellular transport in the salivary glands. Frontiers in Epithelial Transport 2004 in co-op with The 3rd Symposium on Exocrine Glands Korea-Japan (Seoul)
11. K. Nagayama, R. Danev, N. Usuda and Y. Kaneko (2004. 8) Phase-Electron Microscopic Observation of Intracellular Structures. 16th International Congress of the IFAA, Anatomical Science 2004 From Gene to Body (京都)
12. T. Matsumoto, Y. Hara, R. Danev, Y. Mori and K. Nagayama (2004. 8) An Example of the Image Analysis for the Electron Microscopic Structural Study of the Calcium Channel Human TRPM2. 16th International Congress of the IFAA, Anatomical Science 2004 From Gene to Body (京都)
13. 永山國昭(2004. 8)生物物理という永久革命。第44回生物物理若手の会夏の学校(東京)
14. Murakami M, Segawa S, Shinozuka N, Hashimoto S, (2004.8) Functional morphology of paracellular transport for salivary secretion. The 16th International Congress of the IFAA (Kyoto)
15. 永山國昭(2004. 9)電子顕微鏡用マーカーとしてのナノドット。未踏科学技術協会第11回「生命をはかる」研究会(千葉)
16. 永山國昭(2004. 9)I. 先人たちの見たミクロの世界, II. 蛍光と生物。一宮高校 SSH 授業(一宮)
17. 瀬藤光利(2004. 9)受容体動態の分子病理。第1回 NEFRE.
18. 瀬藤光利(2004. 9)神経伝達物質受容体の輸送とそ

- の制御。第8回 Molecular Cardiovascular Conference (北海道)
19. K. Nagayama (2004. 10) Protein Array, DNA Array. The 1st FBNS (Fusion of Biotech, Nanotech, and Semiconductor Tech.) Workshop (京都)
 20. 永山國昭 (2004. 10) 電子顕微鏡の原理と実践。一宮高校 SSH 授業 (一宮)
 21. S. Motoki, F. Hosokawa, Y. Arai R. Danev and K. Nagayama (2004. 11) A Zernike phase plate system for 120kV and 200kV TEM. 8th Asia-Pacific Conference on Electron Microscopy (8APEM) (金沢)
 22. K. Nagayama, R. Danev, Y. Kaneko, N. Usuda, A. Nakazawa, K. Kametani and H. Okawara (2004. 11) Supramolecular and cellular biology opened with electron-phase microscopy. 8th Asia-Pacific Conference on Electron Microscopy (8APEM) (金沢)
 23. 永山國昭 (2004. 11) 電子位相顕微鏡による細胞内超分子の可視化。第50回顕微鏡学会シンポジウム (名古屋)
 24. 畠中貴弘, 瀬藤光利, Vadivel Ganapathy (2004. 11) アミノ酸トランスポーター ATB0,+の機能と発現変動。第10回創剤フォーラム若手シンポジウム (京都)
 25. 永山國昭 (2004. 12) 蛍光と生物。高崎高校 SSH 生物授業 ① (群馬)
 26. 永山國昭 (2004. 12) 電子顕微鏡の原理と実践。高崎高校 SSH 生物授業 ② (群馬)
 27. 永山國昭 (2004. 12) 科学文化の創造。第27回日本分子生物学会年会 (神戸)
 28. 永山國昭 (2004. 12) Hilbert 微分顕微鏡による細胞内ナノ構造の *in vivo* 観察。第42回日本生物物理学会年会 (京都)
 29. 橋本貞充, 村上政隆, 金関 恵, 杉谷博士, 松木美和子, 下野正基 (2004. 12) ラット顎下腺腺房細胞における傍細胞輸送経路の透過性と Tight Junction の超微構造変化。第49回日本唾液腺学会 (東京)
 30. 林 知也, 村上政隆, 根川常夫, 松山幸枝, 西川弘恭, 恵良聖一 (2004. 12) ラット顎下腺傍細胞経路での血清アルブミンの修飾。第49回日本唾液腺学会 (東京)

《生命環境研究領域》

1. 富永真琴 (2004.6) プロスタグランジンとカプサイシン受容体 TRPV1 の機能連関。第81回日本生理学会大会 (札幌)
2. 富樫和也, 東智広, 原雄二, 小西康信, 赤塚結子, 溝口明, 富永知子, 森泰生, 富永真琴 (2004.6) 新規熱活性化イオンチャネル TRPM2。第81回日本生理学会大会 (札幌)
3. 村山奈美枝, 沼崎満子, 富永真琴 (2004.6) 抗リン酸化 TRPV1 抗体の機能解析。第81回日本生理学会大会 (札幌)
4. 東智広, 森山朋子, 瀬木恵理, 富樫和也, 富永知子, 杉本幸彦, 成宮周, 富永真琴 (2004.6) プロスタグランジン E₂ によるカプサイシン受容体 TRPV1 の機能制御。第81回日本生理学会大会 (札幌)
5. Tominaga M (2004.6) Capsaicin receptor regulation by P2Y receptors. 4th International Symposium of Nucleosides and Nucleotides. (Chapel Hill, USA).
6. Tominaga M (2004.7) Molecular mechanisms of trigeminal nociception and sensation of pungency. The 14th International Symposium on Olfaction and Taste. (Kyoto).
7. Tominaga T (2004.7) DIP is a key regulatory molecule causing Rac activation and feedback inactivation of Rho in a Src dependent manner. FASEB Summer Research Conferences: Regulation and Biological Function of Small GTPases (Colorado, USA).
8. Tominaga M (2004.7) Capsaicin receptor regulation by prostaglandins. 第26回日本疼痛学会 (東京)。
9. 森山朋子, 東智広, 富樫和也, 瀬木恵理, 飯田陶子, 富永知子, 杉本幸彦, 成宮周, 富永真琴 (2004.9) プロスタグランジン E₂ による TRPV1 活性調節機構。第27回日本神経科学大会・第47回日本神経化学学会合同大会 (大阪)
10. 東智広, 森山朋子, 富樫和也, 瀬木恵理, 飯田陶子, 富永知子, 杉本幸彦, 成宮周, 富永真琴 (2004.9) プロスタグランジン I₂ による TRPV1 活性調節機構。

- 第 27 回日本神経科学大会・第 47 回日本神経化学会
大会合同大会 (大阪)
11. 村山奈美枝, 沼崎満子, 富永真琴 (2004.9) 抗リン酸化 TRPV1 抗体の機能解析。第 27 回日本神経科学大会・第 47 回日本神経化学会大会合同大会 (大阪)
 12. Tominaga M (2004.9) Molecular mechanisms of detecting physical stimuli: Focusing on thermosensation. 14th International Symposium of Itch (Tokyo).
 13. 富永真琴 (2004.10) 侵害刺激受容の分子機構。第 19 回日本整形外科学会基礎学術集会 (東京)
 14. Moriyama T, Higashi T, Togashi K, Iida T, Segi E, Sugimoto Y, Tominaga T, Narumiya S, Tominaga M (2004.10) Functional interaction of TRPV1 with EP₁: peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins E₂. 34th Annual meeting of Society of Neuroscience (San Diego, USA).
 15. Higashi T, Moriyama T, Togashi K, Iida T, Segi E, Sugimoto Y, Tominaga T, Narumiya S, Tominaga M (2004.10) Modulation of TRPV1 activity by prostaglandin I₂. 34th Annual meeting of Society of Neuroscience (San Diego, USA).
 16. Murayama N, Numazaki M, Tominaga M (2004.10) Functional analysis of anti-phosphorylated TRPV1 antibody. 34th Annual meeting of Society of Neuroscience (San Diego, USA).
 17. Tominaga M (2004.11) Thermosensation and pain. The 2nd Asian Pain Symposium (Seoul).
 18. Tominaga M (2004.12) TRP channels and nociception. International Workshop on the Neural Mechanism of Musculoskeletal Pain (Nagoya).
 19. 富永知子, 柴崎貢志, 福田直美, 島貫恵美 (2004.12) DIP (mDia Interacting Protein) の神経系における役割。第 27 回日本分子生物学会年会 (神戸)

【 一般共同研究報告 】

一般共同研究報告

〔 目 次 〕

1. 味覚順応を引き起こす味細胞 RGS タンパク質のクローニング (斉藤修ほか)	126
2. 神経細胞における電位依存症イオンチャンネル局在化調節機構の解明 (馬場広子ほか)	126
3. 肺癌における糖蛋白質糖鎖異常の系統的解析 (和田洋巳ほか)	127
4. 悪性グリオーマ特異的レトロウイルスベクターの開発と遺伝子治療の臨床応用に関する基礎的検討	128
(清水恵司ほか)	
5. シナプス・開口放出機構の2光子励起解 (阿部輝雄ほか)	128
6. 膜電位の光学的測定と Ca イメージングを組み合わせた複合的光学測定の開発とその虚血組織への適応	129
(酒井哲郎ほか)	
7. アルツハイマー病における Ca ²⁺ ホメオスタシス異常による神経細胞死メカニズムの解明	130
(松山 善次郎ほか)	
8. 誘導型グルタミン酸受容体 $\delta 2$ 欠損マウスを用いた小脳長期抑圧の分子機構解明 (竹内 倫徳ほか)	130
9. 脳の獲得的性質における CNR/プロトカドヘリン分子の機構解析 (八木 健ほか)	131
10. 大脳基底核を巡る線維連絡の研究 (高田昌彦ほか)	131
11. サル二足歩行モデルを用いた直立二足歩行運動の制御機序 (稲瀬 正彦ほか)	131
12. 海馬錐体細胞シナプスにおける NMDA 受容体サブユニットの左右非対称分布—そのメカニズムの解明	132
(伊 藤 功)	
13. 遺伝子改変動物を利用した大脳皮質介在ニューロンの解析 (川口泰雄ほか)	133
14. サッカー運動を指標とした神経回路に対する時空間的な信号抑制機構の解析 (小林康ほか)	133
15. クジラ体外成熟卵子への精子注入後の体外発生能 (福井 豊ほか)	134
16. ラット精原細胞の長期培養, ならびに分化誘導後の顕微授精 (保地 眞一ほか)	134
17. ラット体細胞クローン作製のための卵子活性化法に関する研究 (島田 昌之ほか)	135
18. Hirschsprung 病コンジェニックラット(LE-Ednr ^{sh})の病態解析 (安居院高志ほか)	135
19. イカ逃避行動における主脳, 視神経節, 星状神経節間の分散情報処理機構の解明 (筒井泉雄ほか)	136
20. 電子位相顕微鏡を用いた in situ での蛋白質局在性の証明 (白田信光ほか)	137
21. DNA 繰り返し配列が形成する特殊高次構造の電子顕微鏡による解析 (加藤幹男ほか)	137
22. 腺分泌におけるアルブミン分子の酸化・還元状態と高次構造解析 (恵良聖一ほか)	138
23. 唾液腺における微視的分泌反応から巨視的分泌反応への再構成 (村上政隆ほか)	138
24. 電位依存性 Ca チャネルの発現制御機構の解明 (大塚 幸雄ほか)	139
25. ホヤの分化・発生における TRP チャネル群の生理的意義解明 (森 泰生ほか)	140
26. ヒト末梢神経情報と電位依存性 Nav1.6 チャネルの機能に関する電気生理学的解析 (岡村 康司ほか)	140

1. 味覚順応を引き起こす味細胞 RGS タンパク質のクローニング

齊藤修, 増保生郎, 伊藤政之 (東京都神経科学総合研究所, 長浜バイオサイエンス大学)

齊藤実 (東京都神経科学総合研究所)

柳川右千夫 (群馬大学大学院医学系研究科)

石原健 (九州大学大学院理学研究院)

久保義弘 (生理学研究所)

近年の味覚研究によって, 多くの味覚の受容に G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) が関与していること, 更に苦味受容体 T2R ファミリー, 甘味・うま味の受容体 T1R ファミリーなどの存在が明らかになって, 味覚シグナルの概略が知られるようになってきた。しかし, 古くから知られる味覚の順応については, 分子的な機構はまだほとんど明らかにされていない。

これまでに, GPCR 系の調節因子としては, RGS と GRK のファミリーなどが発見されてきた。RGS は, 三量体 G 蛋白質の活性化された $G\alpha$ に結合してその不活性化を促進する GAP 作用を持つ分子群で, 一方 GRK は受容体をリン酸化するキナーゼファミリーであり, 両因子とも GPCR 系に抑制的に作用して脱感作などを引き起こす。本研究では, 味細胞に, 味覚順応を引き起こす RGS や GRK 分子が存在するものと考え, それらの探索を試みた。

味細胞は舌上に極少数で, さらに細胞株は樹立されていない。一方, ごく最近, 胃や腸などの消化器官で舌と同じ仕組みで苦味物質を感知しているらしいこと, さらに小腸由来の培養細胞 STC-1 が, 舌で発見された苦味受容体を発現していることが報告された。そこで私たちは,

この STC-1 細胞に注目して, まずこの細胞が, 実際に苦味物質に味細胞と同様に応答できるのかどうかを検討した。細胞内カルシウムの変動を指標に解析した結果, STC-1 細胞が舌で応答のみられる種々の苦味物質に顕著に応答することが確認された。そこで, この STC-1 細胞をモデルに, 味覚順応に関わると期待される如何なる RGS と GRK ファミリーが存在するのか, 混合プライマーPCR 法で検索した。その結果, STC-1 細胞に RGS9 と GRK2 が発現されていることが明らかになり, さらにそれらが実際に舌組織の味細胞にも存在することが判明した。

そこで, 次に RGS9 と GRK2 が, 味覚応答をどう調節するのか, STC-1 細胞に高発現させ, その効果を解析した。結果, RGS9 に関しては, 実験がまだ進行中である。一方, GRK2 については, その発現によって特定の苦味応答が抑制される事が判明した。即ち, GRK2 の味覚順応への関与が初めて示唆されることになった (Chem.Senses 30:281,2005)。今後は, さらに STC-1 細胞をモデルに味覚情報とその調節機構に関する研究を進めていきたい。

2. 神経細胞における電位依存症イオンチャンネル局在化調節機構の解明

馬場広子, 山口宣秀, 林明子, 梶ヶ谷仁志, 鈴木彩佳, 星登美子, 高橋ゆかり, 山田早織 (東京薬科大学)

山田真久 (理化学研究所脳科学総合研究センター)

渡辺修一, 中平健祐 (埼玉医科大学)

中平英子, 長谷川明子 (国立精神・神経センター神経研究所)

清水健史 (熊本大学発生医学研究センター)

朴華 (九州大学大学院医学研究院)

有髄神経軸索では, 興奮の発生に関与する電位依存性ナトリウムおよびカリウムチャンネルはランビエ絞輪周辺に局在化する。この特徴的な分布にはミエリン膜と軸索

の間の paranodal junction (PJ) が深く関わっている。我々はこの PJ の形成にミエリン膜糖脂質のスルファチドおよび4回膜貫通タンパク質である CD9 が関与することを

明らかにしてきた。また、PJの異常によってどのような分子が変化してくるのかを、遺伝子発現およびタンパク質レベルで解析した。まず、PJが欠損した場合の神経細胞上の遺伝子発現の変化を明らかにするため、野生型およびスルファチド欠損マウス間でサブトラクションライブラリーを作成した。この結果、スルファチド欠損マウスで減少しているcDNA7個、増加しているcDNA11個見だし、本年度これらの遺伝子を同定した。さらにこれらの発現部位および変化をin situ hybridizationで解析した。PJを欠損した場合のタンパク質レベルでの変化を明らかにするために、22週齢スルファチド欠損および野

生型マウスの脊髄ホモジネート(膜、可溶性画分)を2次元電気泳動し解析した結果、スルファチド欠損マウスで明らかに増加するもの4個および減少するもの1個を見出し、質量分析により同定した。増加するものの一つheat shock protein 27 (HSP27)に関してさらに解析したところ、4週齢では変化なく、チャンネルが消失する22週齢で明らかに増加していることがわかった。抗体を用いた組織染色の結果、軸索上のチャンネルの局在変化の時期に一致してアストロサイトの活性化が生じ、白質部分の活性化アストロサイトのみHSP27が増加していることが明らかになった。

3. 肺癌における糖蛋白質糖鎖異常の系統的解析

和田洋巳, 田中文啓, 佐久間圭一郎, 柳原一広 (京都大学大学院医学研究科)
 長谷純宏, 長束俊治, 石水毅, 青木孝文, 伊東伸子, 橋本周子, 藤原由加里 (大阪大学大学院理学研究科)
 梶本哲也 (京都薬科大学有機化学系)
 佐々木紀彦, 神山伸 (創価大学工学部)
 山中龍也, 土屋尚人 (新潟大学脳研究所)
 神奈木玲児 (愛知県がんセンター研究所)
 大平敦彦 (愛知県コロニー発達障害研究所)
 中北慎一 (香川大学総合生命科学実験センター)
 辻崇一 (お茶の水大学大学院糖鎖科学研究教育センター)
 東海林博樹 (香川大学医学部)
 本家孝一 (高知大学医学部)
 鈴木邦彦 (東海大学未来科学技術共同研究センター)

N-結合型糖鎖は主に細胞表面に存在し、他の細胞や細胞外基質との相互作用を介して数々の重要な機能を果たすことが知られている。我々はこれまでにマウスの正常発達過程やヒトのがん、神経変性疾患などを対象に糖鎖の発現パターンの研究を行ってきた。

我々はB16(マウスメラノーマ細胞)を用いて肺転移と肝転移モデルを作成し、両者の糖鎖パターンの比較から α 1,6-フコース構造が肺転移に特に多いことを見出した。同構造を認識するレクチンであるLCA (Lens culinaris agglutinin)によって同構造を多く持つ細胞集団と少ない細胞集団をB16からフローサイトメーターでソーティングしてマウスの尾静脈から注入したところ、前者の集団

は有意に多くの肺転移結節を形成したことから、 α 1,6-フコース構造は肺転移において重要な機能を持つことを報告した。本年度、ヒト臨床病理標本のLCA染色を行い、ヒトにおいても肺転移をした癌組織に α 1,6-フコース構造の多いことを見いだした。

α 1,6-フコース構造は正常の肺にも非常に多く見られる糖鎖構造である。この研究は、臓器の特徴的糖鎖構造がその臓器への癌転移を促進する可能性を示唆しており、非常に興味深いといえる。

また、癌の糖鎖解析を肝癌、グリオーマに関しても行い、特徴的な糖鎖パターンのあることを見いだした。

4. 悪性グリオーマ特異的レトロウイルスベクターの開発と 遺伝子治療の臨床応用に関する基礎的検討

清水恵司, 中林博道, 土屋孝弘, 八幡俊男, 豊永晋一, 中居永一, 朴啓彰 (高知大学医学部)
栗山茂樹, 出口章広, 峠哲男, 池田和代 (香川大学医学部)
中根恭司 (関西医科大学)
中村秀次 (兵庫医科大学)

グリオブラストーマは原発性脳腫瘍の約10%を占める, 非常に悪性度の高い脳腫瘍である。グリオブラストーマは高い増殖性と浸潤性を特徴とし, 発見されたときには広範に進展しており, 手術技術や放射線照射技術の進んだ現在でも, 完全な治療は困難である。また, 化学療法もこの10年間進歩は見られず, それゆえに新しい治療法の開発が待たれている。

近年, グリオブラストーマにおいて, オリゴデンドロサイト前駆細胞に特異的に発現する転写因子 *Olig1,2* が発現していることが報告された。オリゴデンドロサイト前駆細胞は脊髄の発生過程において腹側の限局した部分から発生し, 脊髄全体に移動するという高い機動性を持つ。我々はこの性質がグリオブラストーマの高い浸潤性に関与しているのではないかと考えた。

グリオブラストーマでの *Olig1,2* の発現を組織染色で調べるため, まずヒト *Olig1,2* に対する抗体の作成を行った。ヒト *Olig1,2* のアミノ酸配列において抗原性の高いと予想される部位に相当する抗原ペプチドを合成し, ウサギから抗血清を得た。

また, *Olig1,2* を発現しているグリオブラストーマでは,

Olig1,2 発現以降の正常な分化経路に異常があり, それが幼若な性格の維持に関与している可能性がある。特に *Olig2* 遺伝子は運動ニューロンとオリゴデンドロサイトの発生に必須であるため, 分化経路を正常化することにより腫瘍細胞を分化誘導できるのではないかと考えた。そこで我々は, *Olig2* の関与する細胞分化の分子的機構を明らかにするため, 時期特異的遺伝子組み換え法である *CreERTM/loxP* システムを用いてマウス胎仔において細胞系譜解析を行った。我々はすでに *Olig2* の遺伝子座に *CreERTM* をノックインしたマウスを作製している。このマウスを, *CreERTM* 依存的な組み換えによって, 永久的に *lacZ* 遺伝子を発現するマウスと掛け合わせるにより, 特定の時期に *Olig2* を発現している細胞を追跡できるダブルトランスジェニックマウスを作製した。そして解析の結果, これまで *Olig2* 陽性細胞からは運動ニューロンとオリゴデンドロサイトのみが発生してくると考えられていたが, それ以外にアストロサイトや上皮細胞も生じてくることを見出した。今後は, *Olig2* を発現しているグリオブラストーマ細胞に, 分化誘導因子を発現させ, 腫瘍細胞が分化していくかどうかを検討する。

5. シナプス・開口放出機構の2光子励起解

阿部輝雄 (新潟大学脳研究所)
白尾智明 (群馬大学医学部)
河西春郎 (生理研)

大脳皮質の錐体細胞樹状突起のスパインは2光子励起観察法やGFP導入の導入により, 形態や更にその機能の変化の長期的追跡が可能となってきた。我々は, 更に, 2光子励起グルタミン酸法によって, スライス培養標本において単一スパインの形態可塑性を誘発することを可能とし, これに機能変化が伴うことを見出している。

シナプス可塑性に関わる分子・超分子のダイナミズムが可視化定量するための分子標識法, 有効な追跡分子, 標本の選択などについて検討を行ってきた。本年度はこの手法を用いて, スパイン形成に重要と考えられているドレブリンを強制発現させ, スパイン形態や動態の変化を観察した。その結果, ドレブリン発現により異常に大

きなスパインの出現を見るが、ほとんどのスパイン形態は正常であること、しかしながら、このスパインをグルタミン酸で刺激してもほとんどスパイン頭部増大が見ら

れなくなることが明らかとなった。スパイン頭部増大に係わるシグナル分子に異常があることが推察された。

6. 膜電位の光学的測定と Ca イメージングを組み合わせた複合的光学測定の開発とその虚血組織への適応

酒井哲郎（琉球大学医学部・形態機能医科学講座生理学第2分野）

岡田泰伸

膜電位感受性色素を用いた細胞膜電位活動の光学測定法とCaイメージングを組み合わせた複合的光学測定システムの開発を目指した共同研究プロジェクトの第一段階として、本年度はまず、膜電位の光学測定をおこなうための基本的測定システムのセットアップをおこなった。作製した測定システムの概要は次の通りである。

測定システムの光学系には生理研の Olympus IX71 型倒立顕微鏡を用い、光源はタングステン・ハロゲンランプを直流安定化電源で点灯し、入射光の安定化をおこない、干渉フィルタ（700, 620, 570 nm, 朝日分光製）を介してステージ上の標本に照射した。×4 の対物鏡と×3.3 の写真用接眼鏡で作られる実像面にあわせて受光素子を置き、標本からの透過光の強度の変化を記録した。

受光素子にはフォトダイオード(Bell & Howell 509-10 型)を用い、出力は利得×2000の増幅器(自作)により増幅し、周波数可変型アクティブフィルタ (fc = 20 Hz, NF 回路設計ブロック製)を通してオシロスコープで記録をおこなった。

ラット心房標本を merocyanine-rhodanine 系膜電位感受性色素 NK2761 で染色し、ステージ上に置き、電気刺激を与えながら刺激により誘発される活動電位の光学測定をおこなった。なお、心筋収縮にともなうアーチファクトを抑制するため、細胞外液に筋収縮抑制剤として 2,3-butanedione monoxime (BDM, 20 mM)を添加した。

得られた光学的シグナルを図に示す。シグナルは波長 700 nm で活動電位に対して透過光の減少(吸光度の増大)を示し、620 nm でシグナルが消失し、570 nm でシグナルの方向が逆転するという膜電位感受性色素特有の波長依存性を示している。

今年度の共同研究により、膜電位感受性色素を用いた膜電位の光学測定のための最も基本的セットアップを作製することが出来た。今後このシステムをより実用的なものとするためには、蛍光膜電位感受性色素の導入や、Ca プローブとの組み合わせの開発などの課題が残されている。これらを次年度の課題として共同研究を進めていきたい。

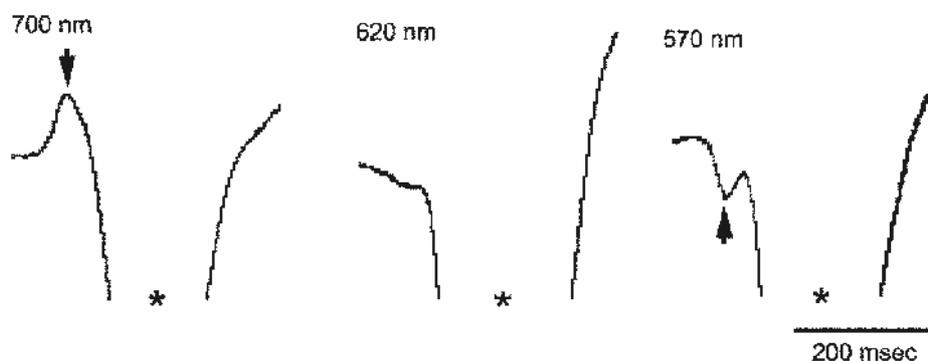


図 ラット心房標本から得られた光学シグナル。波長 700, 620, 570 nm での測定。矢印は活動電位由来の光学シグナルを示す。*の部分は筋収縮由来のアーチファクトのため振り切れている。

7. アルツハイマー病における Ca^{2+} ホメオスタシス異常による 神経細胞死メカニズムの解明

松山 善次郎, 橋爪 龍磨, 犬塚 貴 (岐阜大学医学部)

井本 敬二

アルツハイマー病に代表されるいわゆる変性性神経疾患では, いろいろな病態メカニズムにより神経細胞が細胞死に陥る。しかしその際, 細胞内の Ca^{2+} 代謝が, 細胞死に行くかそれとも細胞死を食い止めるかの運命決定に関係しているのではないかと推測されている。

われわれはこれまでに Ca^{2+} チャネル変異マウスの解析を進めてきたが, これらの変異マウスでは一般的に Ca^{2+} チャネルの機能が低下することから, 一般的に考えられている Ca^{2+} のオーバーロードが細胞死を招くのではなく, むしろ Ca^{2+} 流入量の減少が細胞障害に関係するのではないかと考えてきた。

本実験では, 培養細胞系で Ca^{2+} 代謝障害のモデルを構築し, Ca^{2+} 代謝を変えることにより細胞死がどのように

変わるかを検討した。

BHK 細胞に正常の P/Q 型 Ca^{2+} チャネルもしくは C 末にグルタミン酸リピートを持つ P/Q 型 Ca^{2+} チャネルを導入した。通常の培養条件では細胞死の率に差異は見られなかったが, serum starvation, Cdk 阻害, 高カリウム外液による脱分極という条件では, 細胞死の率に差を認められた。正常 Ca^{2+} チャネルによる細胞死防止効果は, P/Q 型 Ca^{2+} チャネルの特異的な阻害剤である ω アガトキシン IVA により減弱した。

これらの結果より, ある特定の条件化では, Ca^{2+} チャネルを介して流入する Ca^{2+} が細胞死を防止する役割を果たすと推測される。

8. 誘導型グルタミン酸受容体 $\delta 2$ 欠損マウスを用いた小脳長期抑圧の分子機構解明

竹内 倫徳 (東京大学大学院医学系研究科)

宮田 麻理子 (神経シグナル研究部門)

部位時期特異的ノックアウト法を用いることにより, 発生期の回路網形成と成体のシナプス可塑性, 運動学習とを切り離して解析することが可能である。グルタミン酸受容体 (GluR) $\delta 2$ はプルキンエ細胞 (Pu) のみに発現し, 特に, 小脳平行線維 (PF)-Pu 細胞間シナプス後膜に局在し, PF のシナプス形成や小脳 LTD に重要な働きをする分子である。本共同研究では成体での GluR $\delta 2$ の機能を予定するため, 誘導型 GluR $\delta 2$ 欠損マウスを用い, 小脳の平行線維 (PF)-Pu 細胞間のシナプス特性, および, シナプス長期抑圧 (LTD) を調べる目的で共同研究を開始した。GluR $\delta 2$ を成体 Pu 細胞でのみ欠失させるために, C57BL/6 系統由来の 3 種類のマウスの作製 (①小脳 Pu 細胞特異的に CrePR* (組換え酵素 Cre と変異型プロゲ

ステロン受容体ホルモン結合領域との融合蛋白質) を発現する DCP マウス, ②組換え酵素 FLP 発現マウス, ③ GluR $\delta 2$ のエクソンの両端に Cre 認識配列 loxP を導入した GluR $\delta 2$ マウス) を行った。これら 3 種類のマウスの交配を行い fGluR $\delta 2$ 遺伝子と DCP 遺伝子の両方を有するマウスを作製し, 薬剤誘導により GluR $\delta 2$ 蛋白が 90%減少することができた。しかしながら, 十分な欠損までに薬剤投与後少なくとも 3-5ヶ月かかることから, 高週齢マウスの脳スライスでの, ホールセルパッチクランプの解析に困難を極め, 安定した LTD の測定には至らなかった。PF-Pu 細胞間シナプスの基本的な電気生理学的解析を行い, 短期シナプス可塑性 (short-term depression) は概ね野生体と同じく正常であった。

9. 脳の獲得的性質における CNR/プロトカドヘリン分子の機構解析

八木 健, 平林敬浩, 金子涼輔 (生理学研究所 高次神経機構)

先崎浩次, 野口由起子 (国立精神神経センター神経研究所)

江角重行, 雲出 佑, 内村有邦 (大阪大学大学院生命機能研究科)

多様化したプロトカドヘリン α 遺伝子群 (Pcdha/CNR) は中枢神経系に多く発現している。そのゲノム構造は、免疫グロブリン (Ig) や T 細胞受容体 (TCR) 遺伝子と同様に、多数の変領域エクソンと 1 組の定常領域エクソンを含んでおり、ニューロンの識別にこの多様性が利用されている可能性がある。これまでの研究により、Pcdha 遺伝子はそれぞれの可変領域エクソンが片側対立染色体に由来しており、また複数の組合せ発現をしていることが示された。Pcdha 遺伝子のもつ多様な可変領域エクソンで対立遺伝子が組み合わさって発現することは、脳に

おけるニューロンの独自性を特徴づけるための機構である可能性がある。そこで、このユニークな発現様式を動物個体レベルで解析することを目的とし、各可変領域エクソンの上流に EGFP, HcRed などの蛍光タンパク質遺伝子をノックインした遺伝子改変マウスの作製を行った。現在までに CNRv6 および CNRv11 可変領域エクソンの上流に蛍光タンパク質遺伝子をノックインしたマウス作製が終了しており、その他の可変領域エクソンについても作製が進行している。今後はこれらのマウスを交配することで発現を制御する機構を明らかにする予定である。

10. 大脳基底核を巡る線維連絡の研究

高田昌彦 (東京都神経科学総合研究所)

泰羅雅登 (日本大学大学院総合科学研究科)

南部 篤

大脳基底核の機能を考える上で、大脳皮質との相互連絡、さらには大脳皮質間の線維連絡を知ることが重要である。従来の考え方では、随意運動の際には、前頭連合野からまず前補足運動野・帯状皮質運動野吻側部に神経情報が流れ、更にそこから補足運動野・運動前野・帯状皮質運動野尾側部を介して一次運動野に情報が流れると考えられていた。今回、これらの領域に標識物質を注入し、線維連絡を詳細に検討したところ、前頭連合野から前補足運動野・帯状皮質運動野吻側部への直接投射は弱

く、むしろ運動前野吻側部に投射していることがわかった。また、運動前野吻側部は前補足運動野・帯状皮質運動野吻側部・運動前野尾側部に投射していることもわかった。これらのことから随意運動に際しては、前頭連合野→運動前野吻側部→補足運動野・帯状皮質運動野尾側部→一次運動野、あるいは前頭連合野→運動前野吻側部→運動前野尾側部→一次運動野という経路によって情報が運ばれると考えられる。

11. サル二足歩行モデルを用いた直立二足歩行運動の制御機序

稲瀬 正彦, 中俣 克己 (近畿大学医学部)

森 大志 (山口大学農学部)

南部 篤

最近ヒトを対象とする脳機能画像法を用いた研究から、二足歩行の実行に関与する高次脳領域が注目を集めてい

る。しかしこれらの結果から、賦活された脳領域がどのような歩行運動の機能的側面を制御するかという問いに答えることはできない。ニホンサルは流れベルト上で二足歩行を学習できる。我々の糖代謝陽電子撮影法を用いた研究から、このサルの歩行中には一次運動野をはじめとする複数の大脳皮質運動関連領域が賦活されることが明らかとなってきた。本課題では二足歩行の大脳皮質制御機序の解明を目的として、無拘束サルの一次運動野から二足歩行中の神経活動を導出記録した。そしてその神経活動の修飾様式から、一次運動野の歩行制御における機能的役割の解明を試みた。

1頭のニホンサルを対象とし、一次運動野の下肢領域から歩行中の神経活動を記録した。記録にはタングステン電極を装着した4チャンネルマイクロマニピュレータを用いた。マニピュレータを1~2週間にわたり頭蓋上へ固定し、各電極を数百 μm /日ずつ進めることにより discrimination が可能なユニット活動を記録した。神経活動の記録に同期して歩行するサルをビデオ撮影 (250 frames/s) した。流れベルトの速度は 0.7~1.5m/s の範囲で変化させた。記録

部位に対しては皮質内微小電気刺激を行った。得られたビデオ画像から歩行周期 (遊脚相および着地相) を決定し、神経活動の修飾様式を歩行周期と流れベルトの速度変化に対応させて解析した。

無拘束の状態で導出された神経活動の殆んどは2時間以上にわたり安定して記録された。一次運動野から記録された神経細胞はすべて、歩行周期に伴い phasic または tonic にそれらの活動を修飾した。phasic に活動した神経細胞は1~2峰性の修飾パターンを示した。これらの修飾活動は歩行周期において主に着地相に認められたものが多く、遊脚相にみられた活動は比較的少なかった。記録された神経活動の多くは、流れベルトの速度の増加に伴ってそれらの発射頻度のピーク値を増加させた。

以上の結果は歩行制御において一次運動野が、下肢のリズム運動の制御に歩行周期を通して関与すること、特に着地相における体幹荷重の支持および推進力の生成に関わる可能性を示唆しており、サルの大脳皮質がネコなどの subprimate とは異なる様式で単純な歩行運動を制御することが示唆された。

12. 海馬錐体細胞シナプスにおける NMDA 受容体サブユニットの左右非対称分布 —そのメカニズムの解明

伊藤 功 (九州大学大学院理学研究院)

本共同研究により、我々は成獣マウス海馬神経回路に構造的・機能的非対称性が存在することを、はじめて分子レベルで明らかにした。この成果は米科学誌 Science (2003年) に掲載され、脳の左右差に明確な分子基盤の存在を示した研究として高く評価されている。我々は最近 NMDA 受容体サブユニットのノックアウトマウスを用い、上記の事実をさらに生理学的、解剖学的にも証明した。

我々の結果は、脳はその構造的階層性の各レベルで

様々な非対称性を持ち得ることも示唆している。脳内で明確な左右差を示すタンパク質分子が明らかにされたことにより、これを指標として、今後は (a) 脳の機能的、構造的非対称性が何時、どのようにしてできあがるのか。 (b) 左半球と右半球の神経細胞を特徴づけている性質は何か。 (c) 左と右という性質は複雑な脳の構造を作り上げ、それを適切に機能させるためにどのような意味があるのか。等の問題を明らかにすべく、分子レベルから行動レベルまでの研究を統合的に実施する計画である。

13. 遺伝子改変動物を利用した大脳皮質介在ニューロンの解析

川口泰雄（生理学研究所・大脳神経回路論研究部門）

小林和人（福島県立医科大学・生体情報伝達研究所）

柳川右千夫（群馬大学大学院・医学研究科）

森琢磨（京都大学・霊長類研究所）

根東覚（東京医科歯科大学大学院・医歯学総合研究科）

大脳皮質の GABA 作働性介在ニューロンには多数のサブタイプがあり、各サブタイプの機能的解析は、皮質回路網の神経結合解析やその形成を理解するのに不可欠である。しかし形態的・生理的多様性にも関わらず、その数は錐体細胞と比較して少なく、同定は容易ではない。介在ニューロンの同定を容易するためには、抑制性回路機能を正常に保ちつつ、GABA ニューロンや、そのサブタイプの細胞体・樹状突起が蛍光観察できるラットやマ

ウスが利用できることが望まれる。大脳皮質 GABA ニューロンの主要なサブタイプの一つにペプチドのソマトスタチンを発現する細胞がある。ソマトスタチン遺伝子に IRES シグナルを付けて GFP と IL-2R α の融合遺伝子を挿入したマウスを作製し、その大脳皮質での発現を調べた。また、GABA ニューロンが蛍光識別できる遺伝子改変ラット作成の準備を行った。

14. サッカーボール運動を指標とした神経回路に対する時空間的な信号抑制機構の解析

小林康（大阪大学大学院生命機能研究科）

渡邊雅之，伊佐正

眼前のいくつかの標的に対してヒトやサルは衝動性眼球運動(サッカーボール)とよばれる非常に速く、最適化された弾道的な眼球運動で視野を移動させる。サッカーボール制御には中脳の上丘や大脳皮質が重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。サッカーボール運動の実行には上丘におけるバースト活動の寄与が大きいと考えられているが、サッカーボール中の上丘におけるバースト活動は上丘中間層の運動マップに相当した特定のニューロン群で最初に生じ、次にそのニューロン活動はサッカーボール運動のダイナミクスによく似た時間経過で発火の増減が起きることが知られている。さらに、上丘の活動領域は時間とともにサッカーボール実行に関係する尾側のサッカーボール領域から吻側の固視領域へと移動していきことが知られている。この上丘内でのサッカーボール領域から固視領域にかけての興奮伝播の空間的な制御、発火頻度の時間パターンの調節が弾道的なサッカーボール運動の制御に必須であるとする仮説と、それを否定する仮説があり、未だに完全に決着がついていない。

本研究ではこのような神経回路内でのニューロン活動

の時空間的な伝播がサッカーボールという弾道運動制御のダイナミクスを作り出しているか否かということに対して答えを出していきたい。そこで、サルの上丘にアセチルコリンのアゴニストであるニコチンを微量注入し、上丘局所回路のニューロン活動の時空間パターンに擾乱を与えた時にサッカーボールがどのような影響を受けるか検討した。

上丘へのニコチンの微量注入後、注入部位の神経細胞群が表現する領域（注入部位表現領域）に向かう自発サッカーボールが頻発した。この結果は、ニコチンが上丘神経細胞活動を亢進させるという仮説と一致する。また、視覚誘導性サッカーボールにおいてサッカーボールの標的が上丘の注入部位表現領域近傍に呈示された場合、サッカーボールの反応潜時が短縮した。この結果もニコチンにより上丘の局所活動が亢進したことによると思われる。一方、サッカーボールの標的が注入部位表現領域から離れていた場合には上丘内の抑制性内在性回路による運動準備期間中の活動の抑制に起因する反応潜時の遅延が予想される。ところが、予想に反してニコチン注入後、反応潜時には変化

が生じなかった。この結果より上丘内の抑制性内在性回路が運動制御に及ぼす影響がそれほど強くないということが示唆された。

15. クジラ体外成熟卵子への精子注入後の体外発生能

福井 豊, 岩山 広 (帯広畜産大学・畜産学部・家畜増殖学研究室)
保地 眞一 (信州大学・繊維学部・資源生物学講座)
平林 真澄, 加藤 めぐみ (生理学研究所・脳機能分子解析室)

海棲哺乳類であるヒゲクジラ類 (ミンククジラなど) の体外受精, 特に顕微授精による受精卵作出の報告はない。本研究では, ガラス化されたクロミンククジラ卵子を加温後に体外成熟させ, 成熟卵子へ同種の凍結融解精子を用いて卵細胞質内精子注入 (ICSI) を行い, その後の体外培養により胚盤胞への発生能を検討することを目的とした。

平成16年度では, Cryotop および OPS (Open pulled Straw) を用いて GV 期のクロミンククジラ卵子のガラス化保存を試みるとともに, 体外成熟培地に浸透圧を 390 mOsM にまで高めた修正 TCM199 を用いて加温後の卵子成熟率について検討した。卵子は, 第16次 (2003/2004 年) 南極海鯨類捕獲調査で捕獲されたクロミンククジラ (成熟雌: 56 頭, 未成熟: 32 頭) から直径 2~15 mm の卵胞を吸引採取した。ガラス化保存は, Cryotop および OPS に凍結保護物質に 15% エチレングリコール+15% ジメチ

ルスルホキシドを用いた。加温後の卵子はガラス化保存容器 (Cryotop, OPS) およびクジラの成熟度 (成熟, 未成熟) の計 4 実験区において, 40~50 時間の体外成熟培養後の成熟率を比較検討した。

加温後の卵子形態正常率は, Cryotop 区 (成熟: 83.4%, 未成熟: 80.8%) が OPS 区 (成熟: 67.7%, 未成熟: 64.2%) に比べて有意に高かった ($P < 0.05$)。ガラス化保存容器による体外成熟率は, Cryotop/成熟クジラ区 (29.3%) が他の実験区 (10.1~13.2%) よりも有意に高かった ($P < 0.05$)。

体外成熟培養時間については, 50 時間よりも 40 時間で ICSI できる良好な正常卵子が得られた。しかし, その後の体外培養で 2~4 細胞期の胚が得られたが, それ以降の胚発生は休止した。今後, さらにクロミンククジラ卵子のガラス化保存法の改良とともに, 1) 卵子成熟培養時間の確定, 2) ICSI における卵子活性化処理の有無とその方法, 3) 体外培養系の改善を検討する予定である。

16. ラット精原細胞の長期培養, ならびに分化誘導後の顕微授精

保地 眞一, 岩浪 亮人 (信州大学・繊維学部)
平林 真澄, 加藤 めぐみ (自然科学研究機構・生理学研究所)

ラットは脳機能解析のモデルとして欠かせないが, 胚性幹細胞が樹立されていないことや安定したクローン個体の作製技術が未開発なことから, 特定の遺伝子機能を封じ込めたノックアウトラットを作製する手立てはない。本研究では, ラットから未分化の精原細胞を体外で培養し, 円形精子細胞に分化させてから顕微授精してラット産仔を得ることを試みた。ラット円形精子細胞の顕微授精による産仔作製には, 本共同研究に先立ってすでに成功しており (Mol Reprod Dev 2004, 69, 153-158; Contemp

Top Lab Anim Sci 2004, 43/2, 13-15), 体外での精子細胞への分化誘導技術を確立し, 当該幹細胞を株化できれば, 遺伝子組み換えした生殖幹細胞由来のラット個体を作製する道が開ける。

出生後 7.5 日目の雄ラット (精母細胞も精子細胞も未出現) の精巣から, コラゲナーゼとトリプシンを用いて Type-A 精原細胞を採取した。この精原細胞を同時に単離したセルトリ細胞のフィーダー上でドーム状にして 10 日間培養 (前半 3 日間は 37°C, 後半 7 日間は 34°C) した。

EGFP を発現するトランスジェニックラット（ヘテロ）の G1 産仔を用いた場合、培養 10 日目に 53.5%が EGFP の蛍光を発する形態的にも円形精子細胞様の細胞集団が得られた。培養過程における細胞の倍数性分布をフローサイトメトリーによって調べたところ、培養 6 日目から 1c のピークが出現していたことがわかった。そこで排卵ラット卵子 658 個にこれらの細胞核を顕微注射し、直流パルスと 6-DMAP の併用による人為的活性化処理を施した。計 375 個の顕微授精卵をレシピエントに移植したが、

27 個の着床痕が認められたのみで生存産仔は得られてこなかった。培養前後の細胞集団を RT-PCR で比較することにより、半数体細胞特異マーカー遺伝子の Protamine-2 が培養後の円形精子細胞様の細胞で発現していることを確認した。しかし、同じく半数体細胞特異マーカーである TP1/TP2 は発現していなかった。なお、ここまでの実験結果は大学院生を筆頭著者とした論文として Theriogenology 誌に投稿し、2005 年 5 月 13 日付けで正式受理されている。

17. ラット体細胞クローン作製のための卵子活性化法に関する研究

島田 昌之（広島大学大学院・生物圏科学研究科）

伊藤 潤哉，加藤 めぐみ，平林 真澄（自然科学研究機構・生理学研究所）

本研究では、クローンラット作製方法の確立およびその効率改善を目的として、ラットにおいてクローン作製を困難にしている原因の一つであるラット卵子の活性化機構について検討した。はじめに、他の動物種で核移植した胚において誘起される早期染色体凝集 (PCC) が、ラット再構築胚で認められない原因について追究した。その結果、ラット排卵卵子を体外で培養すると、自発的に第二減数分裂を再開し、それに伴って早期に低下した成熟促進因子 (p34^{cdc2} kinase) により、PCC の形成が起こらないこと、また除核した卵子ではさらに p34^{cdc2} kinase 活性が低下することを明らかにした。一方、プロテアソーム阻害剤で処理した核移植胚では p34^{cdc2} kinase 活性の低下は緩和され、PCC 誘起率は改善された。これらの結果により、p34^{cdc2} kinase 活性と PCC の形成との密接な関係が明らかにされた。次に、ラットの系統間における p34^{cdc2} kinase 活性の違いとその原因について検討したところ、Wistar 系統では著しい p34^{cdc2} kinase 活性の低下と Mos/MEK/MAPK の早期の不活性化が認められたが、

Sprague-Dawley (SD) 系統ではほとんど認められなかった。また、プロテアソーム阻害剤で処理した Wistar 卵子では、Mos および cyclin B (p34^{cdc2} kinase の制御部位) の低下も抑制された。さらに SD 卵子を MEK 抑制剤 U0126 で処理すると、p34^{cdc2} kinase, MEK/MAPK の両方の不活性化が起こり、多くの卵子が前核を形成した。以上のことから、ラットでは Mos および p34^{cdc2} kinase 活性が細胞周期停止因子 (CSF) として機能していること、また CSF の活性は系統によって大きく異なることが初めて明らかされた、さらに除核によって CSF 活性が減少する原因について検討したところ、除核直後では活性は低下しておらず、その後短時間のうちに Mos, cyclin B の減少による不活性化が起こることが明らかにされた。一方脱リン酸化抑制剤、プロテアソーム阻害剤の複合処理を行うことにより、除核卵においても CSF 活性を高く維持することに成功し、これらの再構築胚のほとんどで PCC が誘起された。今後これらの知見はクローンラットの作製に十分に活用できると考えられる。

18. Hirschsprung 病コンジェニックラット (LE-Ednrb^{sl}) の病態解析

安居院高志（北海道大学大学院獣医学研究科）

尾崎 毅（自然科学研究機構・動物実験センター）

aganglionosis rat (AR) は被毛色の欠損と腸管神経節欠

損のため巨大小腸・結腸症を呈するヒト Hirschsprung 病

のモデル動物である。原因遺伝子はエンドセリンレセプタータイプ B (*Ednrb*) 遺伝子の部分欠失であることが既に我々を含めた複数のグループにより明らかにされている。AR は巨大小腸・結腸症のために生後 3 週齢で全例死亡するが、我々のこれまでの研究から、他の系統ラット(LE)と遺伝背景が適度に混じりあうことで被毛色の欠損は起こるが、巨大小腸・結腸症が軽度となり 3 週齢で死亡することなく adult まで成長するラットが出現するという事実が発見された。この原因となっている遺伝背景の本体を明らかにすべく、LE-+/*Ednrb*^{sl} と AR-+/*Ednrb*^{sl} とを交配して得られる F2(LE.AR)-*Ednrb*^{sl}/*Ednrb*^{sl} を 2 週齢で sacrifice し、腸管神経節欠損の程度を数値化するとともに全ゲノムスキャンを行い、これらのパラメーターを用いて quantitative loci (QTL) 解析を行うことを計画した。

交配により解析に必要な個体を得るのは効率が低いために大変時間が掛かるが、現在までに約100匹の *Ednrb*^{sl} ホモ個体を得、それらの腸管神経節欠損の程度を測定し、同時に尾からゲノム DNA を調製した。当初は F2 における腸管神経節欠損の程度は複数の遺伝子座に支配されているであろうから連続的な値を取ることを予想していたが、これまでにサンプリングした F2 の腸管神経節欠損の割合のデータから、重症度のもものと軽症度のもものに 3:1 の比に分離していることが判明した。このことは腸管神経節欠損をレスキューしている遺伝子は 1 つないしは 2 つであることを示唆している。今後はマイクロサテライトマーカーとの連鎖解析によりこれらの遺伝子座を同定し、更には遺伝子の同定へと進んでいく予定である。

19. イカ逃避行動における主脳、視神経節、星状神経節間の分散情報処理機構の解明

筒井泉雄 (一橋大学)

井上 勲 (一橋大学)

尾崎 毅 (動物実験センター)

無脊椎動物の中でも極めて複雑な行動様式と学習能力を有する軟体動物の脳の情報処理システムの解明を目的として実験を行った。軟体動物の行動は主脳、視神経節、星状神経節の統合作用で行われている。イカは危険を感じると高速度で危険からの逃避行動を起こし、また獲物を見つけるとすばやく食腕を放出する。イカは普通の遊泳時には決して培養水槽の壁に激突することがないが、驚かせると非常に早い逃避行動を行い水槽の壁にしばしば激突する。ここには制御を伴った行動と急速な制御不能の行動が存在している。また食腕は高速度で獲物に向かって放出され高確率で獲物を捕獲する。食腕の吸盤が密生している先端部分は獲物に接触するや否や獲物を包み込むような複雑な行動を始める。餌の完全な捕獲後、餌は口器のところまで急速に食腕によって引き戻される。捕食行動はこのように捕獲のための早い行動と、正確な補足のための行動の二重支配によって制御されている。このようにイカは早い筋収縮を伴う行動と比較的緩やかな制御可能な行動の二種類の運動支配系を保持している。この行動制御がどのような神経系によって支配されているのかを今回解明した。

食腕は主として中央長軸沿いの縦走筋と周辺部にある輪走筋から成り立っている。輪走筋の収縮によって食腕の放出、縦走筋の収縮によって食腕の回収が行われている。食腕の吸盤が存在する先端部分と中央部を切り出し切片を作り、食腕先端部と中央部の縦走筋と輪走筋に対する神経伝達物質の作用機序を解明した。結果、先端部(吸盤集結部)をのぞいた輪走筋ではアセチルコリンによって単独の興奮性支配が行われているが、先端部ではアセチルコリンによる興奮性支配と、グルタミン酸による抑制性支配の二重支配が行われていることが判明した。さらに、逃避行動の主要因であるジェット噴射を行うマントルの輪走筋と縦走筋についても切り出し同様の実験をおこなった。結果、食腕と同様に輪走筋ではアセチルコリンによって単独の興奮性支配が行われているが、縦走筋ではアセチルコリンによる興奮性支配と、グルタミン酸による抑制性支配の二重支配が行われていることが判明した。

獲物を捕らえる触腕の投射や、急速な逃避行動は興奮性の筋肉制御のみが関与し、最大限の速度を出すように制御が行われ、微調整が必要な行動に対してのみ抑制性

の神経支配が関与することが今回明らかになった。さらに、抑制性は脳を通じて支配されているが、アセチルコリンを介する早い制御系は星状神経節を介して発火して

いる事も判明した。今後さらにイカを含む軟体動物における脳、神経節間における二重制御を可能とする微細運動機構、分散情報処理機構の解明を目指すものである。

20. 電子位相顕微鏡を用いた *in situ* での蛋白質局在性の証明

白田信光, 谷口孝喜, 中沢綾美, 厚沢季美江 (藤田保健衛生大学・医学部)
金子康子, 仲本準, 新田浩二 (埼玉大学・理学部)
中山耕造, 亀谷清和, 橋本 隆 (信州大学・医学部)
前島一博 (理化学研究所)
登阪雅聡 (京都大学・化学研究所)
永山國昭 (岡崎統合バイオ)

前年度に引き続き高コントラストを特徴とする電子位相顕微鏡法のうち微分干渉法(ヒルバート微分法)とゼルニケ位相差法を用いて種々のテストを行った。高加速の300kV電顕を用いた位相差法では、氷包埋を行った脊椎動物の細胞を材料として電子染色なしで高コントラストの電顕像が得られた。培養全載細胞観察においてはミトコンドリア等の細胞小器官と微小管等の細胞骨格が明確に認められた。血小板や精子においては細胞内部構造が立体的に観察された。同様の観察はウィルス・バクテ

リアにも適用可能であった (Kaneko Y et al., *J Electron Microscop* 54, 79-84, 2005)。本法の生物系への応用への可能性が強く示唆された。また、観察される構造を組織化学的に標識して、光学顕微鏡と電子位相顕微鏡と同一細胞を観察する試みを行っている。さらに、位相観察法を高分子材料にも適用した。電子染色法の適用が困難なゴムの観察に適用して、十分なコントラストの有る像が観察され、位相差電顕が、生物材料に加え高分子材料にも適用できることがわかった(化学工業日報, 日経産業新聞)。

21. DNA 繰り返し配列が形成する特殊高次構造の電子顕微鏡による解析

加藤幹男 (大阪府立大・総合科学)
永山國昭, 片岡正典, Radostin Danev (岡崎統合バイオ)

本研究では、生物ゲノムに存在する特徴的な塩基配列の、染色体構築と遺伝子機能制御における生理意義の解明を目的として、まずサテライト、ミニサテライトに代表される縦列型反復 DNA 配列に注目し、その高次構造特性の解析を進めている。ミニサテライト DNA 領域は、その縦列回数はきわめて多型性に富んでおり、その原因として不等交叉や複製時の伸長/欠失が想定されている。今回、海水魚 *Acanthopagrus latus* 由来の 30bp を単位鎖長とするミニサテライト配列が、*in vitro* 相補鎖合成 (PCR 反応) において、伸長/欠失を起こすことを見出したので、その原因となる構造因子を求めるために、電気泳動移動度解析、化学修飾解析、円偏光二色性スペクトル解析、

示差走査熱量測定等の生化学的解析に加えて、高分解能電子顕微鏡解析を試みた。その結果、相補鎖合成の鋳型となる一本鎖 DNA は、反復単位鎖長においてヘアピン様構造(ステム-ループ構造)を形成し、さらに、マグネシウムイオンの存在下では、塩基対形成を変化させることなく強く凝縮した構造を形成することがわかった。このような一本鎖 DNA の高次構造形成が、新生鎖と鋳型鎖のミスアライメントを誘発し、繰り返し数の変異をもたらすものと考えられる。今後、それぞれの相補鎖間において形成される微細構造の差異を、さらに高解像度の電子顕微鏡像を得ることによって明らかにするとともに、DNA の凝縮や弛緩を制御する要因をとらえたい。

22. 腺分泌におけるアルブミン分子の酸化・還元状態と高次構造解析

恵良聖一, 根川常夫 (岐阜大学大学院医学系研究科 分子生理学分野)

林 知也, 西川弘恭 (明治鍼灸大学 生理学)

村上政隆 (自然科学研究機構統合バイオサイエンスセンター ナノ形態生理学)

血液中に多量に存在する血清アルブミン分子には反応性の高いSH基が1個存在し, このSH基がフリーの状態のアルブミンを還元型アルブミン, 一方このSH基が酸化された状態のアルブミンを酸化型アルブミンと呼び, 通常は両者が混在している。単離したラット顎下腺を用いたこれまでの研究で, 血液中のアルブミンが傍細胞経路を通過して唾液中にわずかながら漏出されることが明らかにになり, さらにその際タンパク質の翻訳後修飾として, 一酸化窒素(NO)がSH基に結合したS-ニトロソアルブミンの存在が示唆された。今回はNO合成酵素阻害剤を用いて, これらのことの検証ならびに発生するNOが唾液分泌に対していかなる影響を及ぼしているかを検討した。

10~11週齢の雄性ウィスターラットの顎下腺を麻醉下で単離し, 市販のヒト血清アルブミン(HAS)を含むKrebs-HEPES緩衝液(pH 7.4, 37°C, 100% O₂)にて灌流した。カルバコールにて唾液分泌刺激を行い, 静脈液, 組織間液, 唾液を採取し, それぞれの溶液中のHSAの酸化・還元状態ならびにS-ニトロソアルブミン量を特殊なカラムを装着したHPLCによって分析した。NO合成酵

素阻害剤としてL-NAMEを用いた。

まずカルバコール刺激に加えてL-NAME存在下と非存在下での唾液分泌量($\mu\text{l}/\text{min}$)を調べたが, L-NAMEは唾液の分泌量に対してほとんど影響を与えなかった。またL-NAME非存在下ではS-ニトロソアルブミンの修飾が $16.2 \pm 11.6\%$, 不可逆的な酸化型アルブミンのそれが $14.8 \pm 9.7\%$ 程度観測されたが, L-NAME存在下ではいずれのタイプの修飾アルブミンもほとんど検出されなかった。Secretion/Perfusate (S/P)比(%)はL-NAME非存在下では $0.17 \pm 0.10\%$, 存在下では $0.52 \pm 0.80\%$ となり, 値のばらつきが大きくなった。

これらの結果から, HSAがラット顎下腺組織のタイトジャンクションのような傍細胞経路を通過するときアルブミンは明らかにNOによってニトロソ化修飾を受けていることが確認された。さらに, パイロットスタディとして行った, タイトジャンクションの開口を促進するとされるイソプロテレノールを用いたスタディによっても, アルブミン分子が傍細胞経路を通過して唾液中に漏出されていることが検証された。

23. 唾液腺における微視的分泌反応から巨視的分泌反応への再構成

村上政隆 (統合バイオ生理研)

橋本貞充, 松木美和子 (東京歯大) 杉谷博士, 勝俣 治 (日大松戸歯)

Alessandro Riva, Felice Loffredo, Francesco Loy (University of Cagliari)

従来, 単離腺細胞において分泌刺激に遅く反応するものと素早く開口分泌反応するものが共焦点レーザー顕微鏡により観察されていたが, 前者は多くの場合, 低機能あるいは病的と認識され棄却されてきた。しかし摘出灌流標本の電子顕微鏡観察においても一斉に分泌反応を起こすのではないこと, 静止時の電子顕微鏡観察でも開口分泌反応がごく一部にあることなどから微視的素分泌と巨視的分泌が異なる時間経過を持つ可能性があがった。本研究の目的は, 1) 新たに神経支配つき摘出灌流標本の

開発, 共焦点レーザー顕微鏡下で色素希釈, 開口分泌を観察し, 2) 生理的至適濃度の探索し, 新たに生理的範囲の巨視的水分分泌および蛋白分泌の時間経過を測定する。この実験を通じ 3) 電子顕微鏡レベルの微細構造変化を観察し, 巨視的機能の連係をはかる。

岡山大学よりラット顎下腺の神経分離法を導入, 生理研の単離標本作成技術とあわせ, 神経支配つき摘出灌流標本の作成を試行した。しかし, 副交感神経である節前繊維は導管周囲の結合組織内に散在するため, 導管自身

を電気刺激する計画に変更した。さらに電気刺激による分泌反応のばらつきが大きく、さらに試行を繰り返す必要がある。摘出灌流標本の Confocal Laser Microscope への設置を日大松戸歯学部で行うための第一段階として還流実験系の立ち上げを行った。電子顕微鏡標本で得られた微視的反応のデータを空間的な確率変化と捉える試みとしてカリアリ大学でラット顎下腺の高分解 SEM 標本から分泌細管表面面積あたりの microvilli pit 数および microbud 数を計数を開始した。開口分泌が活性化し、蛋白分泌が増加する場合には microvilli の消失が観察される。また microbud は開口分泌後の細胞膜の endocytosis

による回収を定量化するものと想定される。しかしこれらの分布は均一ではなく全体像として観測計測しなければならない。幸い maceration 法により細胞間分泌細管全体を細胞質側より SEM 観察ができるため、透過電子顕微鏡像のような超薄切片観察に比べ、定量的に評価が可能である。カリアリ大学ではヒト唾液腺スライスで刺激薬品を変えた実験を実施し、刺激の種類により microvilli pit 数および microbud 数が変化することを定量化した。継続して、ラット耳下腺および顎下腺の分泌蛋白とこれらの計数の比較を進めている。

24. 電位依存性 Ca チャネルの発現制御機構の解明

大塚 幸雄 (産業技術総合研究所)

亀山 仁彦 (産業技術総合研究所)

岡本 治正 (産業技術総合研究所)

岡戸 晴生 (東京都医学研究機構)

海老原 達彦 (産業技術総合研究所)

岡村 康司

前年度までに同定したマボヤ Ca チャネルの β サブユニットの役割を個体レベルで解明するため、 β サブユニットのアンチセンス DNA を受精卵に微小注入し、発生および運動機能に及ぼす影響を検討した。

まず、Ca チャネルの発現にどのような変化が生じるかを、B5.1 割球(筋細胞)の電位固定法による計測により検討したところ、 β サブユニットのアンチセンス DNA を導入した細胞ではほとんど Ca 電流が記録されなかった。

同じ条件でアンチセンス DNA を導入した胚について形態を観察したところ、囊胚に以上が見られたもの、尾部の伸張が見られないもの、形態的には正常だが運動機能を示さないもの、の3群に分類できた。これらのフェノタイプの重症度は注入した DNA の濃度に依存していた。また同様なフェノタイプは α サブユニットのアンチセンス DNA を導入した胚についても観察された。いく

つかのコントロール実験の結果、発生途中の Ca チャネル機能が形態形成に重要であることが示唆された。

更に、形態が正常であるが運動機能を示さない群についてそのメカニズムを明らかにするためファロイジン染色を行った。Ca チャネルのアンチセンス DNA を導入した胚で形態が正常なオタマジャクシ幼生では、尾部骨格筋の筋線維の走行がランダムになっており、また細胞膜表層部の分布が著明に減少していた。細胞同士のジャンクション領域のアクチン線維も減少していた。 δ -ツボクラリン投与、アクチンミオシン相互作用の阻害剤でも同様な効果が見られたことから、発達期の神経活動に依存した筋細胞膜の電氣的興奮性を介した Ca チャネルからの Ca 流入が、筋細胞のアクチンフィラメントの走行の構築には重要であることが示唆された。

25. ホヤの分化・発生における TRP チャネル群の生理的意義解明

森 泰生 (京都大学大学院工学研究科)
原 雄二 (京都大学大学院工学科)
清中 茂樹 (京都大学大学院工学科)
片野 正展 (京都大学工学研究科)
山本 伸一郎 (京都大学工学研究科)
西野 敦雄, 岡村 康司

ユウレイボヤゲノムからTRP 関連遺伝子を網羅的にリストアップする作業を行い, TRPM が 2 個, TRPC が 8 個, TRPV/N/A が 8 個, TRPP が 9 個, 合計 27 個の遺伝子が存在すると考えられた。そのうちほとんどは対応する EST の情報が存在していた。

特筆すべき点として, TRPM のグループを除いてホヤ独自の枝を形成する遺伝子の多様性が見られたことである。このことはホヤの独自の生理機能に特化する形で TRP 関連遺伝子の多様化が生じたことを強く示唆する。

また, TRPV ファミリーとしては, 脊椎動物の遺伝子

よりも線虫のものに近い二つの遺伝子が存在していた。TRPV/N/A についてはゼブラフィッシュで機械受容チャネルとして同定された分子である NOMPC のホモログ遺伝子がひとつ存在し, アンキリンリピートを有する TRPA (最近哺乳類の聴覚受容細胞での機械受容チャネルと報告された) と相同な遺伝子が 4 つも存在していた。現在これらの TRP 関連分子の cDNA クローニング, 及び機能の同定や発現パターンの解析に関する実験が進行中である。

26. ヒト末梢神経情報と電位依存性 Nav1.6 チャネルの機能に関する電気生理学的解析

岡村 康司, 高木 正浩
白幡 恵美 (山形大学小児科)
早坂 清 (山形大学小児科)
木島 和己 (山形大学小児科)
吉田 繁 (近畿大学)
川畑 篤史 (近畿大学)
関口 富美子 (近畿大学)

前年に見いだしたアンキリン G によるナトリウムチャネルの持続性電流の抑制のメカニズムを更に詳細に明らかにする実験を行った。神経系に発現するもう一つのアンキリンアイソフォームであるアンキリン B を Nav1.6 とともに tsA201 細胞に発現させたところ, 持続性電流の減少は起こらなかった。二つのアンキリンによる効果の違いがアンキリン分子のどの分子内領域の構造の違いに依

存するかを明らかにするため, 更にアンキリン B とアンキリン G とのキメラ分子を用いてホールセルパッチクランプによる記録を行った。その結果, N 末端側の膜結合ドメインがアンキリン G 由来であるときに限定して持続性電流の抑制が見られ, 持続性電流の制御には膜結合ドメインを介して Nav1.6 タンパクと結合することが必要であることが示唆された。

【 計画共同研究報告 】

計画共同研究報告

〔 目 次 〕

1. アストログリアにおける細胞容積感受性チャネルの役割 (塩田清二ほか)	144
2. 容積感受性Cl ⁻ チャネルの候補蛋白質の機能解析 (富永真琴ほか)	144
3. 脂肪細胞の細胞容積・肥大化をモニターする分子機構の解析 (河田照雄ほか)	145
4. 細胞の浸透圧感受機構の解明 (宮崎裕明ほか)	145
5. 統合失調症のカルシニューリン仮説に基づいた統合失調症発症のメカニズムの解明 (宮川 剛ほか)	146
6. CNR/プロトカドヘリン遺伝子クラスター改変マウスの作成と機能解析 (濱田 俊ほか)	147
7. 遺伝子改変マウスを用いたヒスタミン H1 受容体の中枢機能の解析 (福井裕行ほか)	147
8. ジーンターゲティングマウスを使った SIAH の神経系における役割の解明 (山下拓史ほか)	148
9. Pit-1 遺伝子を導入したトランスジェニックラットの作製 (鈴木 敦詞ほか)	148
10. 組織特異的にヒト成長ホルモン遺伝子を発現させた遺伝性侏儒症ラットの開発 (片上秀喜ほか)	149

1. アストログリアにおける細胞容積感受性チャネルの役割

塩田清二, 中町智哉, 鈴木隆介, 大滝博和 (昭和大学医学部・第一解剖学)

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, フリーラジカルや一酸化窒素(NO)などの様々な因子が関与する。しかし, その詳細な機構については依然不明である。近年, 細胞容積調節の異常がアポトーシス様細胞死誘導に先立って出現し細胞容積調節の破綻を抑制すると細胞死誘導が抑制されることが報告された (Maeno et al 2000)。また, 我々は, 容積感受性クロライドチャネルを抑制することにより海馬の虚血性神経細胞死が抑制しうることも明らかにした。脳において, 容積感受性イオンチャネルおよび水チャネルは恒常性の維持に重要な働きをする。一方で水チャネルのひとつであるアクアポリン4はアストログリアに発現していることが報告されており脳虚血時において, その過剰応答や応答の減少により, 細胞死誘導に関与することが示唆されている。しかし細胞性浮腫の誘導に関してアストログリアはまだ不明な点が多い。今回, 我々は中大脳動脈閉塞による局所脳虚血モデルを用い,

脳虚血後に生じるアストログリアの変化を GFAP の組織染色によりを用い経時的に明らかにした。さらに, 脳虚血性神経細胞死抑制作用が示されている, 神経ペプチド PACAP のレセプター PAC1R の特異的抗体を用いてアストログリアにおける PAC1R の発現を検討した。

脳虚血前, 大脳皮質において GFAP 陽性細胞は主に表層である分子層および血管周囲に認められる。脳虚血後その発現は徐々に強くなる。さらに, 1日後から脳梗塞周辺部に沿って GFAP 陽性細胞が強く認められはじめ, 2から4日ではその発現量, アストログリアの形態的な変化も生じる。PAC1R は脳虚血前には主に神経細胞に認められるが脳梗塞部位は時間に従い弱くなる。一方, 2日以降には脳梗塞周辺部に存在する活性化したアストログリアにおよび神経細胞における発現が強くなる。

これらの結果はアストログリアが脳虚血時に PAC1R を介し神経細胞死抑制に働く可能性を示唆する。

2. 容積感受性 Cl⁻チャネルの候補蛋白質の機能解析

富永真琴 (自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター)

赤塚結子 (三重大学医学部・生理学第一講座)

清水貴浩, 高橋信之, 岡田泰伸

細胞外及び細胞内の浸透圧変化に対応して自らの容積を一定に保とうとする働きは, 動物細胞が生命を維持する上で必要不可欠な機能であるが, 最近ではこの容積調節の破綻が細胞死につながる事が明らかとなっており, 細胞がいかに自らの容積をセンスし対応するかという点に注目が集まっている。細胞が一旦膨張した状態から元の体積に戻る調節性容積減少(regulatory volume decrease: RVD)の過程は, 細胞内の蛋白質による情報伝達を介して, 最終的には細胞内からの K⁺と Cl⁻流出が駆動力となって細胞内の水が細胞外に流出することによって達成される。特にこの場合の Cl⁻の通り道であるチャネルは細胞の容積上昇を感知して開口するために容積感受

性 Cl⁻チャネル(VSOR)と名づけられているが, 最近では正常浸透圧下でアポトーシス誘導剤や H₂O₂ によって VSOR が活性化されることによって, 細胞の持続性収縮が起こることが明らかとなり, 容積調節だけでなくアポトーシスにも深く関わっていることがわかってきている。VSOR の分子実体はいまだ不明であるが, VSOR 及び VSOR の制御因子はアポトーシスをコントロールするという観点からも重要な蛋白質であり, これら蛋白質群の分子同定によって細胞の容積調節やアポトーシスのメカニズムについてさらに多くの情報が得られることが期待される。

現在までに報告者らは, VSOR の調節蛋白質として

ATP-binding cassette(ABC)蛋白質スーパーファミリーに属する ABCF2 を同定しているが、今回の共同研究によって、ABCF2 が VSOR の電流を抑制することと、ABCF2 の発現によってRVDの遅延が起こることを明らかにしている。さらに、ABCF2 がアクチン結合蛋白質であるアク

チニン-4 と結合することも見出しており、アクチン-アクチニン-4-ABCF2 が相互作用し容積センサーとして働くことが明らかとなった。また、ABCF2 結合蛋白質の探索によって VSOR の候補蛋白質を見出し、その機能解析を進めている。

3. 脂肪細胞の細胞容積・肥大化をモニターする分子機構の解析

河田照雄, 井上和生, 江川かおり, 加藤壮太 (京都大学大学院農学研究科)

高橋信之, 岡田泰伸

脂肪細胞は「脂肪を貯める」ことが第一義的な生理機能である。そのために容積が約 1~2 万倍まで肥大化し、可逆的に維持しうる。このような特性は他の細胞に類を見ない。このことは生体のエネルギー供給の保証ともなり、また動物が獲得した進化特性でもある。しかしながら、飽食化した現代社会においては、生活習慣病を招来する主要因ともなっている。本研究では、脂肪細胞が、自身でその発達度合いをどのようにモニターして、その形態形成・容積維持・肥大化制御を行っているかを分子細胞生物学的に解明することを目的としている。

現在までに報告者らは、脂肪細胞が脂肪酸を初めとする様々な分子に細胞内カルシウムイオン濃度の上昇という応答を示すこと、またこのカルシウムイオンによる応答性が脂肪細胞の容積変化・肥大化と密接に関連しうることを明らかにしてきた。このことから脂肪細胞は自身の細胞容積ならびに肥大化を、細胞内カルシウムイオン濃度変化をもたらず分子を介してモニターしている可能

性が高いと考えられた。そこでまず、脂肪滴を貯め込んだ脂肪細胞を用いたカルシウムイメージング系の立ち上げを試みた。カルシウムイオン指示薬として Fura2 を、細胞内カルシウムイオン濃度を変化させる刺激としてカルシウムイオンフォアであるイオノマイシンを用いて、分化した脂肪細胞の細胞内カルシウムイオン濃度変化を検出する実験系を確立した。現在、この系を用いて、脂肪酸などのシグナル分子の細胞内カルシウムイオン濃度変化に対する作用を詳細に検討している。

またパッチクランプ法による、脂肪細胞の電気生理学的解析のための実験系も確立した。脂肪細胞は、細胞質に脂肪滴を貯め込んでいるため、パッチクランプが困難であったが、今後は脂肪細胞に発現するチャネルの特性を正確に解析することが可能となった。浸透圧変化による一時的な細胞容積変化に伴い活性化されるイオンチャネルが脂肪細胞に存在しているかなど、現在、検討中である。

4. 細胞の浸透圧感受機構の解明

宮崎裕明, 新里直美, 丸中良典 (京都府立医科大学大学院・生理機能制御学)

サビロブ ラブシャン, 清水貴浩, 岡田泰伸

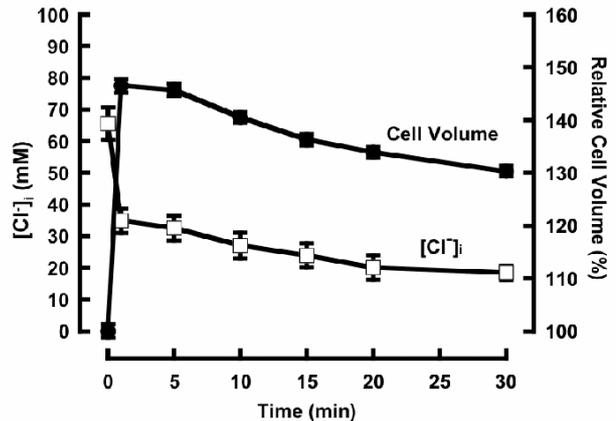
腎遠位尿細管上皮組織でのナトリウム再吸収は血圧調節や体液量維持にとって重要な機能であり、血漿浸透圧によって厳密に制御されている。しかし、細胞がどのように細胞外浸透圧変化を感受するのかという疑問に対する明確な回答は得られていない。一般的に、低浸透圧刺激により一過性の細胞容積膨張とそれに引き続く調節性

容積減少 (Regulatory Volume Decrease; RVD) という現象が観察されるが、RVD の生理的意義については明らかにされていない。我々は、低浸透圧刺激時により惹き起こされる RVD が、tyrosine phosphatase の活性化を制御し、腎遠位尿細管 Na^+ 再吸収に関与する上皮型ナトリウムチャネル (ENaC) の遺伝子発現を増大させることを報告した。一

一般的に、RVD 惹起時には、細胞からの Cl⁻ の efflux が活性化されることが知られており、それに伴った細胞内 Cl⁻ 濃度 ([Cl⁻]_i) 変化が想定される。すなわち、RVD によって引き起こされた [Cl⁻]_i 変化が、低浸透圧刺激に対する細胞内シグナルとして機能する可能性が強く示唆される。しかしながら、従来の蛍光 Cl⁻ indicator と蛍光顕微測光を用いた [Cl⁻]_i 測定法では、RVD のように細胞容積変化と [Cl⁻]_i 変化が同時に起こる場合、細胞内の蛍光 Cl⁻ indicator 濃度変化により、継時的な [Cl⁻]_i 変化を計測することは非常に困難であった。

そこで本研究では、腎遠位尿管上皮由来細胞である A6 細胞の容積変化と蛍光輝度を cell analyzer “Quanta” を用いて同時計測し、Cl⁻ indicator の蛍光輝度を細胞容積で補正することで、RVD 時における [Cl⁻]_i の測定を試みた。定常時(等浸透圧環境下) で約 65 mM であった [Cl⁻]_i は、低浸透圧刺激 (50%低浸透圧) 後の急激な細胞容積増大 (定常時の約 1.5 倍) に伴い、約 35 mM に減少した。その後、

RVD が惹起され、徐々に細胞容積は減少し、30 分後には定常時の約 1.3 倍にまで減少した。また、[Cl⁻]_i も RVD に伴い減少し、30 分後には約 20 mM まで低下した (図参照)。以上のことから、A6 細胞においては、低浸透圧刺激後の RVD による [Cl⁻]_i の変化が、細胞外浸透圧感受メカニズムの一つとして機能していることが示された。



5. 統合失調症のカルシニューリン仮説に基づいた統合失調症発症のメカニズムの解明

宮川 剛, 大貫宏一郎 (京都大学大学院 医学研究科)

八木 健, 平林敬浩 (生理学研究所 高次神経機構)

我々はこれまでカルシニューリン CN の前脳特異的ノックアウトマウスが統合失調症様の行動異常を示すことを見出し、さらに統合失調症患者のゲノム DNA を用いた相関解析により CN が統合失調症の感受性遺伝子であることを明らかにしてきた。本研究はこの知見に基づき、CN 情報伝達経路に関与する分子をターゲットとしたコンディショナルノックアウトマウスを作製し、統合失調症発症のメカニズムを解明することを目的とする。

本年度はターゲティングベクター作成に必要な材料 (ネオマイシン耐性遺伝子, DTA 遺伝子などのプラスミド DNA, 目的の遺伝子を含む BAC クローンなど) を入手し、各断片を順次ベクターに挿入してコンストラクト

を完成した。塩基配列に変異のないものを選択し、ES 細胞への相同組換え実験の検討を進めたが、残念ながら loxP の位置によって相同組換えが起こりにくくなる可能性があるという指摘を受け、現在、ノックアウトベクターの短腕、長腕のそれぞれの長さの不足を補うよう loxP の位置を変更したコンディショナルベクターを再構築しているところである。今後、ベクターが完成しだい、ES 細胞への遺伝子組み換えを行う。今年度はこれと並行して、tTA-tetO system と Cre-loxP system の両方を組み合わせることにより遺伝子発現部位・時期を調節するのに必要な各遺伝子改変マウスの系統を入手した。

6. CNR/プロトカドヘリン遺伝子クラスター改変マウスの作成と機能解析

濱田 俊 (大阪大学生命機能研究科)

八木 健, 平林敬浩, 金子涼輔 (生理学研究所 高次神経機構)

CNR/プロトカドヘリンファミリーは神経系で発現するプロトカドヘリン様分子群であり、特異な遺伝子クラスター構造をとる。マウスの場合、遺伝子クラスター全体では 50~60 種類のプロトカドヘリン分子がコードされており、その蛋白質は軸索やシナプスなどに局在し、神経回路形成に重要な役割を果たしていると考えられているが、まだ実験的な検証はほとんど進んでいない。CNR/プロトカドヘリンファミリーは 3 つの異なるサブファミリーからなるが、本研究ではこのうち CNR (Pcdha) の遺伝子改変マウスを作成し、その生体内機能を明らかにすることを目的としている。

本年度は、昨年度に引き続き、CNR の細胞内領域の大部分を占め、かつ全ての CNR が共通して利用する 3 つの定常領域エクソン全てを欠損させた CNR 遺伝子改変マウスの作成を行った。既に高次神経機構部門で作成済

みの定常領域エクソン上流に lox-P 配列を挿入した遺伝子改変マウス (G1) と、本計画共同研究で作成した定常領域エクソン下流に lox-P 配列を挿入した遺伝子改変マウス (CNRdA, CNRdB) および CAG プロモータ制御下で Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウス (CAG-Cre:大阪大学宮崎純一教授より供与) との交配を行うことにより、CAG-Cre トランスジーンを有し、CNR 遺伝子座において G1/CNRdA, G1/CNRdB の遺伝型をもつマウスを交配により作成し、生体内で CNR 遺伝子座における染色体間組換えを誘導した。この遺伝子改変マウスと野生型 C57BL/6 マウスとの交配を行い、F1 において定常領域エクソンが欠損しているマウスを PCR 法およびサザンブロット法により検索し、CNR 遺伝子定常領域エクソン欠損マウスを得た。今後、このマウスを用いて CNR の生体内における機能を解析する予定である。

7. 遺伝子改変マウスを用いたヒスタミン H1 受容体の中枢機能の解析

福井裕行, 堀尾修平 (徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部)

八木 健, 平林敬浩 (生理学研究所高次神経機構)

中枢においてヒスタミン H1 受容体は、睡眠・覚醒、学習・記憶、食欲の制御などの機能に関与することが指摘されている。また最近では、ストレス刺激時にヒスタミン神経系が活性化されること、環境の急激な変化への対応にヒスタミン H1 受容体が関与していることなど、さらに新しい知見も加わりつつある。そこで本研究では、ヒスタミン H1 受容体の中枢における機能をさらに詳しく解析するため、H1 受容体に関する遺伝子改変マウスを作製しその行動を解析することをめざしている。

本研究では遺伝子改変マウスとして、2 つの異なる系統を作製することを考えている。1 つは前年度から継続しているもので、H1 受容体を過剰発現させた遺伝子改変マウスの作製である。このためには、H1 受容体の脱感作 (ダウンレギュレーション) が全く生じない変異を H1 受容体遺伝子に生じさせた遺伝子改変マウスを作製する。

この遺伝子改変マウスでは、H1 受容体脱感作異常のため受容体発現レベルが増大し、ヒスタミン応答が過剰になると考えられる。

もう 1 つは、イムノトキシンを用いて、H1 受容体発現ニューロンのみを部位特異的に除去することにより、H1 受容体発現ニューロンの機能を調べようとするものである。

第 1 の遺伝子改変マウスについては、前年度までにキメラマウスが得られたので、まず C57BL6 マウスと交配することにより F1 マウスを得た。サザンブロット及び PCR 法により、ヘテロ遺伝子改変マウスが得られていることを確認した。その後さらに C57BL6 マウスとバッククロスを重ね、現在 F4 マウスまで得られている。

第 2 の遺伝子改変マウスについては、H1 受容体遺伝子部分をイムノトキシン用のカセット (ヒト IL-2R 発現カ

セット, 福島県立医科大学小林和人博士より授受)に置換えたターゲティングベクターを作製し, ES細胞に導入, サザンブロット法により相同組換え変異体を同定した。

400個余りのコロニーを検定した結果, 相同組換えをおこしたES細胞クローンが2個得られた。今後キメラマウスの作製をめざす予定である。

8. ジーンターゲティングマウスを使った SIAH の神経系における役割の解明

山下拓史, 中村 毅, 永野義人, 松本昌泰 (広島大学大学院脳神経内科)

高橋哲也 (翠清会梶川病院神経内科)

八木 健, 平林敬浩 (生理学研究所 高次神経機構)

平林真澄 (生理学研究所 脳機能分子解析室)

パーキンソン病 (PD) の発症機序については遺伝性 PD の原因遺伝子を中心に解析がすすめられているがまだ解明に至っていない。PD 剖検脳では黒質ドパミン神経の脱落と神経細胞内凝集体形成が特徴的であり, その形成過程の解明は PD 病態解明に重要である。凝集体形成には ubiquitin-proteasome system の異常が考えられており, それらの機能異常が凝集体形成に重要と考えられている。われわれは α -synuclein, synphilin を分解する新規タンパク質として E3 ubiquitin ligase の一つである Siah を yeast-two hybrid system により同定した。(Nagano, 2003) 凝集体の主要蛋白質には α -synuclein, synphilin-1, ubiquitin などが知られている。これまで α -synuclein タンパク質を過剰発現させる動物モデルやノックアウトマウスが複数の研究グループから報告されており, PD モデルとして解析されているが忠実に PD にみられる凝集体, 病理変化を再現したモデルは無い。Siah 蛋白質をノックアウ

トし凝集体形成への影響を検討するため, cre-loxp system を用いたコンディショナルノックアウトマウスのターゲティング遺伝子の作成を継続している。コンストラクト作製にあたりベクターに組み込む insert を BAC clone を用いて PCR 法にて構築中であるが, その過程において mutation を生じるなどの問題が生じ完成に至っていない。また, われわれは新たに凝集体の主要構成タンパク質の一つであり Siah の基質である synphilin-1 のトランスジェニックマウスの作製を試みている。Synphilin-1 の cDNA を MoPrP vector にサブクローニングし, マウス卵に導入することで, トランスジェニックマウスの作製を行っている。現在までに解析した 77 匹の仔においてトランスジェーンを有するものを 8 匹得ている。今後これらマウスの系統を確立し, 脳内タンパク質発現の確認, 凝集体形成をはじめとする病理学的変化, 行動解析を行っていく予定である。

9. Pit-1 遺伝子を導入したトランスジェニックラットの作製

鈴木 敦詞, 安田 啓子, 小野 保長 (藤田保健衛生大学・内分泌代謝内科)

平林 真澄, 加藤めぐみ, 金子涼輔 (自然科学研究機構・生理学研究所)

細胞外基質石灰化の中核をなす基質小胞でのリン酸取り込みを担う細胞膜 III 型 Na 依存性リン酸輸送担体 Pit-1 過剰発現ラットを共同研究にて作製した。Pit-1 トランスジェニック (Tg) ラットは, 骨格の成長には影響を認めないものの, 長期間飼育することにより腎臓で糸球体障害を惹起し, 低アルブミン血症に引き続き, 骨軟化症へと

進行することが観察された。その作用メカニズムとしては, 出生後の組織におけるリンの取込み増加が細胞障害を惹起し, 自然発症ネフローゼ症候群のかたちとなること, またその結果として, ヒトでも認められるような低蛋白血症に由来する骨軟化症が引き起こされることが示唆された。同時にこの Pit-1/Tg ラットは出生後約 4 週で

白内障を自然発症することが認められ、出生後にリンの取込み増加により蛋白質の変性が惹起されることが示唆された。

今後はさらに骨格、血管、腎臓ならびに水晶体における組織学的検討を加え、疾患発生メカニズムの解明を目的として研究をすすめる予定である。

10. 組織特異的にヒト成長ホルモン遺伝子を発現させた遺伝性侏儒症ラットの開発

片上秀喜（宮崎大学医学部第3内科）

平林 真澄，加藤 めぐみ（生理学研究所脳機能分子解析室）

成長ホルモン(GH)の作用は肝臓で作られるソマトメジン C(IGF-I)を介するものとされている。血中 IGF-I 濃度非依存性の GH の各臓器への直接作用は明らかではない。遺伝性侏儒症ラット(*dr*)は本邦で発見された GH 単独完全欠損症のモデル動物で、天然に存在する GH ノックアウトラットである。本研究では脂肪細胞・軟骨細胞の発生・分化と機能にあたる GH の組織特異的影響を明らかにするため、自然界に存在する GH・IGF-I ノックアウトラットである *dr* に着目し、ヒト GH 遺伝子を脂肪細胞や軟骨細胞などに特異的に発現させ、その生物作用を検討した。平成 16 年度に 2 つの遺伝子、ヒト *leptin* 遺伝子とヒト $\alpha 1$ -collagen 遺伝子のそれぞれ上流域数 kbp をヒトゲノム情報に従い、特異的なオリゴ primer を設計し、PCR で増幅し、pGEM ベクターに組み込み、PCR クローニングを行った。うち、ヒト *Leptin* 遺伝子上流域-3.6kbp とヒト GH 遺伝子 2.1kbp のキメラ遺伝子(Lep-hGH ; 7.6kbp)を調製した。遺伝性侏儒症ラットの未受精卵への

顕微注入は技術的に困難で、かつ、遺伝子注入後の受精卵は対照 SD ラットのそれと比較し、脆弱である。従来は遺伝性侏儒症ラットの生殖細胞系列に組み込むためには、Wild type の対照 SD ラット受精卵への注入(Lep-hGH-SD), *dr* との交配(Lep-hGH-SD/*dr*)という間接的手法を採用していた。今回は *dr* の受精卵に、キメラ遺伝子を注入し、効率よく、Lep-hGH-*dr* を作出する方法、すなわち、凍結ラット精子とキメラ遺伝子混合物をラット未受精卵に顕微注入する方法(Mol. Reprod. Dev. 69: 153-158, 2004)を採用した。207 個の *dr* 未受精卵に Lep-hGH キメラ遺伝子と *dr* 凍結精子混合液を顕微注入し、生存した 195 個をレシピエント雌に移植したところ 38 匹の産仔が得られた。PCR 解析の結果、3 匹の Lep-hGH-*dr* 個体が得られた。今後、Lep-hGH-*dr* 個体の解析を進めるとともに、残る Coll-hGH-*dr* の作出を予定している。

【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. MRIによる前頭連合野の観察と電極定位への応用 (船橋新太郎ほか)	154
2. ニホンザル上側頭溝内皮質のMRIによる構造観察 (藤田一郎)	154
3. 筋の痛みの脳内投射 (水村 和枝ほか)	155
4. 機能画像装置を用いた痒みの中枢性抑制ネットワークの解明 (谷内一彦ほか)	156
5. 磁気共鳴画像診断用新規造影剤の開発 (阪原晴海ほか)	156
6. 両手協調運動の発達と学習効果に関連する脳領域の解明 (白川 太郎)	157
7. ヒトの下頭頂葉および44野の脳内身体図式への関与 (内藤 栄一)	158
8. 非侵襲的脳機能検査による統語解析 (吉田晴世)	159
9. 非侵襲的脳機能検査による疲労・疲労感評価法 (渡辺恭良ほか)	159
10. マカクザルのMRIテンプレートの作成とPET研究への応用 (尾上浩隆ほか)	160
11. 血液-脳関門を温存したMnCl ₂ 造影磁気共鳴イメージング法 (森田啓之ほか)	161
12. マンガン造影を用いた、容量刺激、血圧変化に対する延髄および視床下部神経活動の解析 (鷹股 亮ほか)	162
13. MRIによる乱用薬物の耐性獲得、フラッシングの形成機序解明 (吉本寛司ほか)	163
14. 頭針治療による卒中易発症ラット(SHR-SP)卒中麻痺回復過程における脳内組織変化の非破壊追跡 (井上 勲ほか)	164
15. 磁気共鳴画像装置による脳賦活検査を用いたヒトの高次脳機能研究 (飯高哲也)	164

1. MRIによる前頭連合野の観察と電極定位への応用

船橋新太郎 (京都大学)

新田統昭 (京都大学)

渡邊慶 (京都大学)

小松英彦 (生理学研究所)

前頭連合野は外側部, 眼窩部, 内側部を含む広い領域であり, これらの部位によって大きく機能が異なる。前頭連合野の機能を理解する目的で主として背外側部より単一ニューロン活動を記録し, 解析してきたが, 背外側部を構成する主溝の背壁, 腹壁, 溝底に位置するニューロンの機能については十分に解析されていない。解剖学的研究により, これらの領域で入出力関係が異なること, また, 同じ領域でも前後軸に沿って入出力関係が異なることが報告されている。主溝内での部位の違いにより機能的な相違が存在するのか, このような違いが前頭連合野の機能にどのように反映されているのか, を明らかに

する研究を計画しているが, そのためには, 主溝の走行に関する解剖学的なデータが不可欠である。そのため, MRI画像により主溝の位置, 走行を確認した。

2頭のマカクザルの頭部MRI画像を撮影した。ネブプタール麻酔したサルを磁気共鳴装置内にセットし, 脳のMRI画像を撮影した。撮影後, SPM99を用いて外耳道, 眼窩を基準にした標準表示にした後, 前額断, 矢状断, 水平断の3方向の脳断面を作成した。これら3方向の脳断面を用いて, 主溝, 弓状溝の位置の確認, 主溝の3次元像の構築を行い, 記録電極の固定方法, 電極先端位置の定位方法を考案した。

2. ニホンザル上側頭溝内皮質のMRIによる構造観察

藤田一郎 (大阪大学大学院生命機能研究科)

霊長類の上側頭溝内皮質では, 視覚刺激の動き, 形に関する情報が収斂する。また, 顔, 視線, 動物のしぐさなど社会性意義を持つ視覚刺激に特異的に反応する細胞が存在することを示唆する生理学的証拠とヒトを対象とした脳機能イメージングにおける証拠が存在し, 社会性視覚シグナルの処理を行っていると思定されている。しかし, これらの研究の多くでは視覚刺激はヒトや動物の写真もしくはビデオを用いており, 反応選択性の解析は充分になされていない。したがって, 動作に反応するとされる細胞が, 真に動作を形成する動きのパターンに反応しているのか, 刺激に含まれる要素運動やほかの視覚属性に反応しているのかの十分な検討はなされておらず, 動作反応性細胞の存在はいまだ確立したものとは言いがたい。われわれは, 動物または人の関節部のみを光

点として提示したバイオリジカルモーション (BM) 刺激の処理に上側頭溝内皮質が関与しているかどうかをシングルユニット活動記録により解析することを計画している。BM刺激は形と動きの情報を含みまた社会性信号として機能している上に, 視覚刺激の定量的操作が可能である。この実験計画における困難の一つは, 上側頭溝内皮質の構造が複雑に湾曲しており, 目標の記録部位からの神経活動の導出や, 記録した神経細胞の位置の推定が困難なことである。電気生理学実験に先立ち, MRIを用いて当該個体の大脳皮質構造の精密な画像を得, また, 位置マーカーからの座標を得ておくことは, この研究において必須である。本年度は, この手法を適用するための準備を行った。

3. 筋の痛みの脳内投射

水村 和枝 (名古屋大学環境医学研究所 神経性調節分野・教授)

乾 幸二 (生理学研究所 感覚・運動調節研究部門・助手)

秋 云海 (生理学研究所 感覚・運動調節研究部門・大学院博士課程)

高橋 賢 (財団法人長寿科学振興財団・リサーチレジデント)

田口 徹 (名古屋大学環境医学研究所・大学院博士課程4年)

皮膚感覚刺激に対し応答する脳部位は知られているものの、筋の痛みに対して応答する脳部位は未だ不明である。本研究では、皮膚痛でなく筋痛に特異的に応答する脳部位をfMRIを用いて特定することを目的とした。

被験者として健常男性成人2名を用いた。皮膚および筋に対する痛み刺激として、左前脛骨筋部位の皮膚および筋に長さ48 mm、直径0.05 mmの針電極を刺入して電気刺激を行った。電極の刺入深度は皮膚で1.5 mm、筋で20 mmとした。刺激針より30 mm離れた部位に直径8 mmの皮膚表面電極を貼付して陽極とし、両電極間に1 msの矩形波刺激を与えた。刺激強度は実験前に被験者ごとに「刺激を感じるが、痛くない」と「適度に痛い」(皮膚・筋共にVAS 5程度)の2種類を決定した。fMRIスキャンは皮膚刺激実験と筋刺激実験の2つに分け、各々の実験において非痛み刺激および痛み刺激をそれぞれ30回ランダムに与えた。

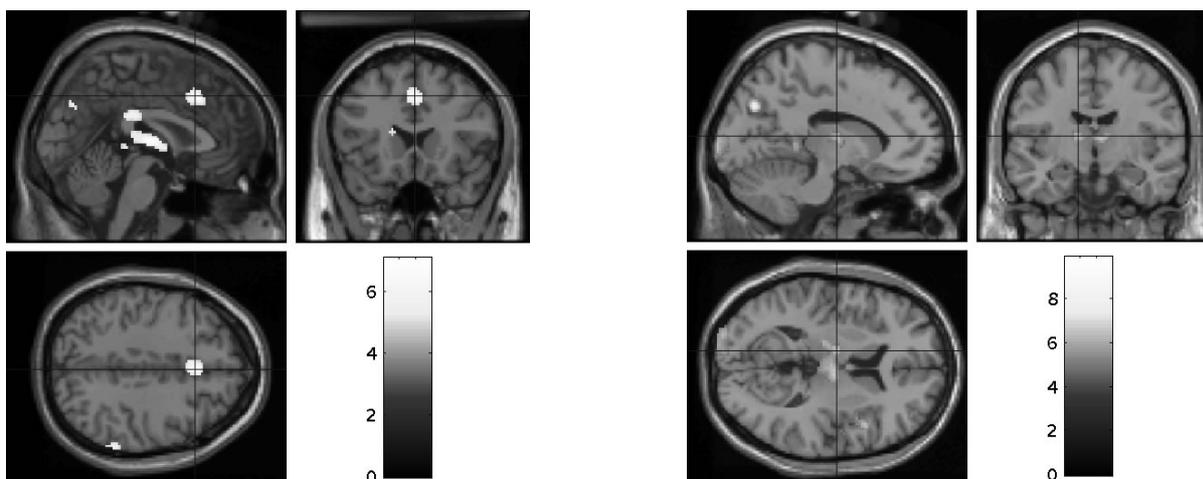
筋への電気刺激を行ったときに脳血流量が有意な応答を示した部位は、両側の前頭葉の下前頭回(Brodman area (以下 BA) 10)、両側の頭頂葉の下前頭小葉(BA 40)

および楔前部(BA7)、両側の辺縁葉の帯状回(BA32, 23)、左側の島(BA13)および右側の視床であった。

皮膚への電気刺激を行ったときに脳血流量が有意な応答を示した部位は、対側(右側)の前頭葉の下前頭回(BA 47)、刺激側(左側)の後頭葉の楔状葉(BA18)、両側の辺縁葉の帯状回(BA32, 23)および対側の視床であった。

皮膚痛に応答した脳部位を排他的にマスクした後に筋痛に応答した部位を解析した結果、刺激側の頭頂葉の下頭頂小葉(BA40)および縁上回(BA40)にわずかな部位の応答が見られた。

皮膚および筋への電気刺激で活動が見られた両側の辺縁葉の帯状回(BA32)、前頭葉の下前頭回(BA10)および島は痛み関連部位として知られており、痛み刺激に対してこの部位に応答が見られたことから実験のプロトコールおよびデータ解析の方法が妥当であることが示唆された。筋痛のみに特異的に応答する脳部位は、痛み刺激の同側(左側)においてわずかに認められた。現在被験者数を増やして筋痛特異的に応答する部位をより詳細に解析中である。



図：fMRI断層画像を解析して得られた脳断面図の例。

(左) 筋への痛み刺激に応答した脳部位の1例、(右) 皮膚への痛み刺激に応答した脳部位の1例。

4. 機能画像装置を用いた痒みの中枢性抑制ネットワークの解明

谷内一彦, 望月秀紀*, 田代学, 岡村信行 (東北大学大学院医学系研究科機能薬理学分野)

*現所属: 国立精神・神経センター 神経研究所モデル動物開発部

本研究の最終的な目的は, 中枢神経系を標的とした痒みの新たな治療法を開発することである。そのためには, 痒みの神経器質を同定する必要がある。特に, 神経メカニズムが酷似している痒みと痛みの脳内メカニズムの違いを明らかにすることが重要となる。本研究では高空間分解能の3テスラ機能的MRI装置 (fMRI) を用いることによって, 痒みと痛みの認知に係る脳活動の違いを可視化し, 痒み特異的な神経器質の同定を試みた。

本研究では健康成人男性15名を対象とした。痒み刺激として, 痒みを誘発する代表的な物質であるヒスタミンを用いた。ヒスタミン溶液 (ヒスタミンを生理食塩水に溶かしたもの, 濃度: 0.1%) を作成し, ヒスタミン溶液に浸した電極パットを左手首に固定し, イオントフォーレースを用いて20秒間通電 (1mA) することによって痒みを誘発した。痛み刺激として氷を左手首に与えた。痒み条件と痛み条件下でfMRI撮影を数分間行うことによって痒みと痛みの脳内活動を可視化した (図1)。図1は本研究によって得られた結果である。黄色の脳部位は痒みと痛みで共通して活動した脳部位, 赤色は痒み特異的な脳部位, 青色は痛み特異的な脳部位である。特に, 帯状回後部が痒みに選択性をもっていることは重要な発見であった。帯状回後部が心理的ストレスに関係すること, アトピー性皮膚炎患者において心理的ストレスが痒みの

症状を悪化させることなどが報告されている。帯状回後部の活動をコントロールすることによって痒みを軽減することができる可能性がある。今後, 帯状回後部の活動を中心に痒みを軽減する治療法開発を目指した研究を行う。自然科学研究機構生理学研究所の3テスラ高空間分解能fMRIを用いることによって, 世界で初めて痒みと痛みの神経器質の違いを明らかにすることに成功した。その結果, 痒みを抑制する治療法開発につながる重要な発見を得た。本研究結果は, 現在, 学術ジャーナルのPainに投稿中である。

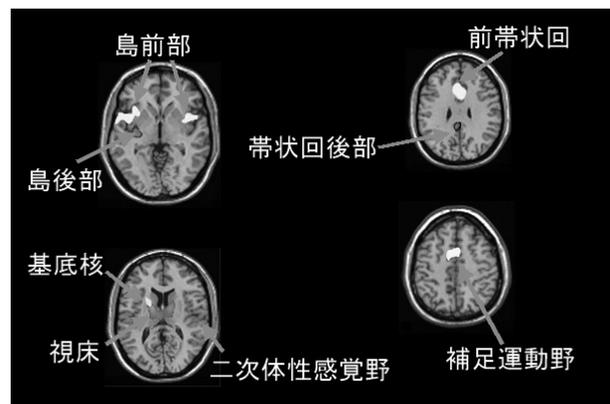


図1

5. 磁気共鳴画像診断用新規造影剤の開発

阪原晴海 (浜松医科大学医学部)

定藤規弘 (自然科学研究機構生理学研究所)

竹原康雄 (浜松医科大学医学部)

村松克晃 (浜松医科大学医学部)

本研究の目的は, 組織特異性あるいは病変特異性をもった, 磁気共鳴画像診断用の新しい造影剤の開発を行うことである。

【背景】肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma; HCC) の罹患率は世界的にみても増加している。肝細胞癌のMR診断

は Gd-DTPA などのガドリニウム造影剤を急速静脈注射後にパフォーマンスの高いMR装置で息止め下に高速撮像を行うことである。これは, ガドリニウム製剤が血管外漏出性のため, first pass での撮像が必要なためである。dendrimers DTPA-D1Glu (OH) (以下 dendrimers) は分

子量 1448.45D で、Gd-DTPA をコアとし、4 個の糖を側枝とする第一世代のデンドリマー型造影剤であり、静脈投与後に、時間単位で血液中に停滞する血液プール造影剤の性格を有している。このデンドリマー型造影剤を用いることにより、通常の spin-echo 法 (SE 法) で、富血性腫瘍の代表である肝細胞癌の検出が可能かどうか検討した。

【方法】 F344 ラットに 100 ppm の diethylnitrosamine を混和した蒸留水を給水して 109 日間通常飼育下で化学発癌 (肝細胞癌) を誘導した 3 匹、23 結節を対象に、Gd-DTPA (0.1mol/kg) による造影 T1 強調画像の連続撮影を 2 時間後まで SE 法 (250/9.1) により行った。6 時間以上間隔をあけて、引き続き同様の撮像をデンドリマー (0.05mol/kg) を用いて施行した。撮影後肝臓を摘出し、連続切片を製作、H&E 染色し、組織切片で判定した癌巣と MRI 上それに対応する結節を対照させ、結節、背景肝、画像の背景部分の信号の SD を計測し、コントラスト雑音比 (CNR) を計算した。

【結果】 デンドリマーでは通常の SE 法で肝細胞癌に対する十分な造影能を示した。デンドリマーでは造影後少なくとも 2 時間後まで、肉眼的に肝細胞癌の同定が容易であり、CNR としては 2 時間後まで Gd-DTPA に対し約 5 倍の造影能を維持した。デンドリマーを用いれば、パフ

オーマンズの低い MR 装置でも富血性肝細胞癌の全肝スクリーニングができる可能性がある。更に、イメージングウィンドウも広いため、撮像タイミングが柔軟となる可能性もある。

Time Course Changes of CNR of HCCs (lesion basis)

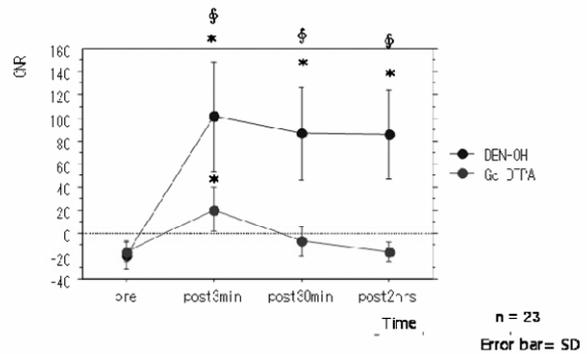


Figure1 は、デンドリマーおよび Gd-DTPA 投与後の肝細胞癌の背景肝に対する contrast to noise ratio (CNR) の推移を表示したものである。デンドリマー投与後少なくとも 2 時間まで有意の腫瘍増強効果が認められる。また、投与後全ての時相においてデンドリマーの造影能が Gd-DTPA のそれを有意に凌駕していることがわかる。

6. 両手協調運動の発達と学習効果に関連する脳領域の解明

白川 太郎 (京都大学医学部医学研究科)

両手協調機能は、日常生活動作において不可欠な役割を果たす。発達の初期段階では、両手を同期して動かす左右対称の動きを獲得し、発達が進むに従い、独立制御を獲得する。両手独立使用は、利き手と補助手という両手の機能分担に繋がり、巧緻性の発達の基礎として重要であると考えられる。

このように、両手協調動作の基本パターンの獲得は発達過程で重要な位置を占める。しかし、標準化されている発達検査での協調動作は、手と目の協調動作が大半であり、両手協調動作に焦点化した検査は殆どみられない。

そこで、脳賦活検査により、神経基盤が明らかにされ

ている両手運動の相転移現象の、発達指標としての可能性を探索することを目的として、4 歳児から 17 歳を被験者として、運動計測を行った。今回用いた指標では、長期学習効果は明らかとなったが、発達の年齢効果に関しては、統計的に有意な差は認められなかった。

発達段階にある児童・生徒に関しては、直接脳賦活検査を行なうのではなく、成人の脳賦活検査で神経基盤が明らかにされている現象を指標として、行動計測をすることが適している。そこで、現在、成人の両手協調運動の脳賦活検査を行い、発達指標として適切な行動指標の可能性を検討している。

7. ヒトの下頭頂葉および44野の脳内身体図式への関与

内藤 栄一 (京都大学大学院人間・環境学研究科)

研究代表者は、四肢の腱への振動刺激によって惹起される四肢の運動錯覚経験に関与する脳活動の研究を行ってきた (Naito 2004a,b; Naito et al.1999, 2002a,b, 2005 など)。この錯覚は振動刺激が興奮させる筋紡錘からの求心性 Ia 線維入力によって惹起され、四肢の動きを伴わずに被験者は明瞭な四肢運動を経験する。

四肢 (右手, 左手, 右足, 左足) の運動錯覚中には、運動領野の体部位再現部と四肢の相違に関わらず右半球44野, 下頭頂葉 (ip1, op1 野) などが関与する。これは (1) 運動錯覚が、実際の運動を伴わず、また運動の意図もない状態で、その運動を再現する運動領野をリクルートすること (知覚と運動の共通符号化), (2)四肢の位置変化など動的な身体図式の変化に右半球前頭-頭頂部に関与することを意味する。

さて、運動錯覚を経験している手が外界の物体と接触すると、閉眼被験者は手と一緒にその物体も動いているかのような一人称的な手-物体運動を知覚する。このとき、脳は手の運動情報を伝える筋紡錘入力と手掌から送られる物体との皮膚接触情報とを統合している。つまり、脳は振動刺激により動員される運動表象と外的物体という外部表象を統合している。この一人称的手-物体運動

知覚を惹起する運動内部表象と物体外部表象の統合に関与する脳領域を同定した。非接触条件で被験者が手の運動錯覚のみを経験している場合には、運動領野および右半球前頭-頭頂部に賦活を認めた。この右領域は左右の手で共通に賦活した。接触条件で被験者が手-物体運動知覚をしている場合、これらに加えて左半球前頭-頭頂部に賦活を認め、この両側前頭-頭頂部は左右の手で共通に賦活した (図1)。

非接触条件に比べて接触条件 (手-物体運動知覚) で有意に活動が増加した脳領域は、左手では左44野および下頭頂葉 (ip1/op1 野) (図2ピンク), 右手でも下頭頂葉であった (図2緑)。さらに、この左下頭頂葉活動は、接触条件のみで、実際に物体を操作する場合に賦活することが知られている (Binkofski et al. 1999) 左頭頂間溝後部の活動と有意に相関した。

本研究は、右半球の44野-下頭頂葉は四肢と無関係にその位置変化など動的な身体図式のアップデートに関与し、左半球のそれは手運動と外界物体との相互作用で、運動内部表象と物体外部表象の統合に関与することを明らかにした。

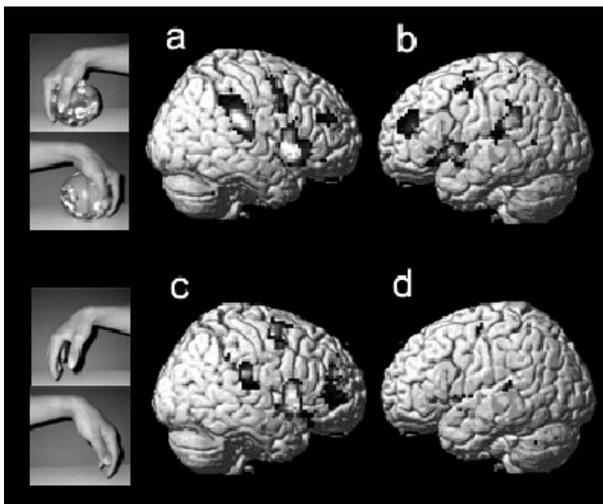


図1

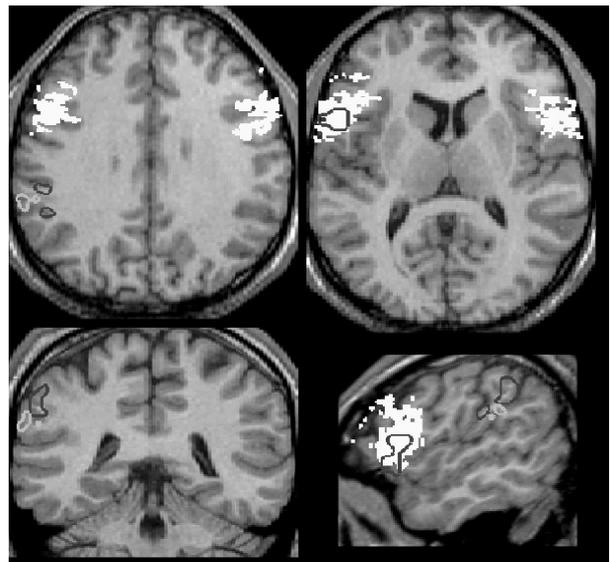


図2

8. 非侵襲的脳機能検査による統語解析

吉田晴世 (大阪教育大学)

非自国語の学習における統語解析 (syntax) の獲得過程を、行動学的指標とともに神経活動の変化を観察することにより解明することを目的とする。このために、統語解析課題を自国語 (日本語) において確立した後、機能的 MRI を用いて、脳神経活動を、血流変化を指標として計測する。ここで確立した方法を、非自国語 (英語) における同等課題に適用する。さらに、これらの実験パラダイムを自国語が英語、非自国語が日本語であるグループに適用し、外国語習得過程の違いを比較検討する。

今年度は、日本語の統語解析課題として作成した袋小路文 (garden path sentence) を用いて機能的 MRI を施行した。袋小路文は、文法的には正しいが、即座に意味理解をするのが難しい構文を持つ文の一種であり、文の途中で理解に行き詰まり、また始めにもどって理解し直す必要が出てくるため、袋小路文でないものにくらべ、余分の統語解析過程が要求される。現在 Broca area の活動に絞って脳血流により評価される、統語解析過程に関連する神経活動を解析中である。

9. 非侵襲的脳機能検査による疲労・疲労感評価法

渡辺恭良 (大阪市立大学・大学院・医学研究科・システム神経科学)

田中雅彰 (大阪市立大学・大学院・医学研究科・システム神経科学)

水野敬 (大阪市立大学・大学院・医学研究科・システム神経科学)

石井聡 (大阪市立大学・大学院・医学研究科・システム神経科学)

笹部哲也 (大阪市立大学・大学院・医学研究科・システム神経科学)

定藤規弘 (生理学研究所大脳皮質機能研究系心理生理学研究部門)

岡田知久 (生理学研究所大脳皮質機能研究系心理生理学研究部門, 神戸先端医療センター)

田邊宏樹 (生理学研究所大脳皮質機能研究系心理生理学研究部門)

齋藤大輔 (生理学研究所大脳皮質機能研究系心理生理学研究部門)

尾上浩隆 (東京都神経科学総合研究所心理学研究部門)

倉恒弘彦 (関西福祉科学大学健康福祉学部)

中枢疲労の神経メカニズムを解明するため、機能的磁気共鳴画像法を用いて疲労前後における脳の血流反応を測定した。疲労負荷前後のタスク関連脳部位に加えて、疲労負荷中のタスク非関連脳部位の血流反応についても検討を行った (Fig. 1)。疲労負荷として、一定の時間ごとにパソコンの画面に出現するランダムに配置された 15-25 個の数字の中から、目的の数字を探索するタスクを、健常人 7 名及び慢性疲労症候群 (CFS) 患者 6 名にそれぞれ 1 時間、30 分間施行した。タスク非関連脳部位の反応については、タスク施行下、磁気共鳴画像装置による雑音を 1 秒間消したときの血流反応を測定した。

疲労感の主観的指標である、Visual analogue scale

(VAS) 値は、疲労タスク前は CFS 患者の方が健常人より高く、また、疲労負荷課題により、両群とも有意に増加した。タスク関連脳部位として、視覚野、頭頂葉、Frontal eye field の反応が認められ、タスク関連脳部位である視覚野の血流反応は、健常人、CFS 患者ともに、疲労負荷後、減弱を認めたが、減弱率は、健常人と CFS 患者で差を認めなかった。一方、タスク非関連脳部位として、両側聴覚野の反応が認められ、健常人では疲労負荷中においてタスク非関連脳部位の血流反応の減弱を認めなかったが、CFS 患者では疲労負荷中において、タスク非関連脳部位の血流反応の減弱を認めた。さらに、この減弱率は、本実験施行前の VAS 値と有意な相関を認めた。また、

タスク非関連脳部位の血流反応が健常人と比べて、CFS患者において有意に減弱している部位を探索したところ、左側頭平面の血流反応が特異的に減弱していることが判

明した (Fig. 2)。

以上より、中枢疲労は、疲労負荷中の血流反応減弱として特徴づけることができると考えられた。

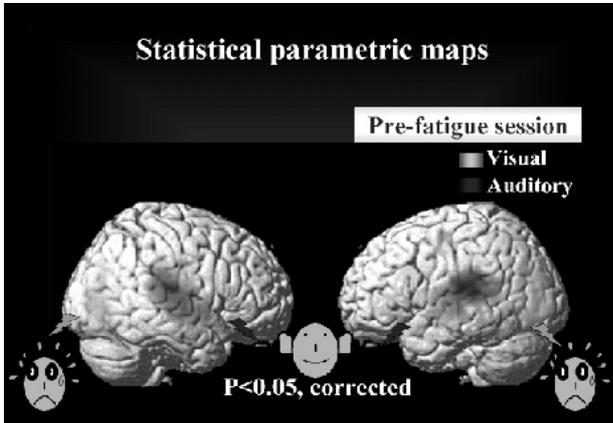


Fig.1

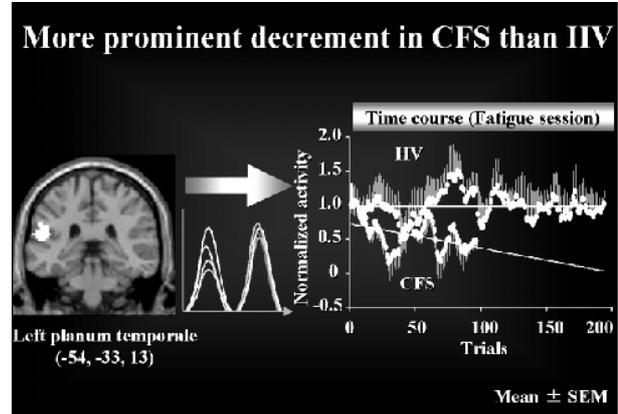


Fig.2

10. マカクザルの MRI テンプレートの作成と PET 研究への応用

尾上浩隆 ((財) 東京都医学研究機構 東京都神経科学総合研究所心理学部門)

横山ちひろ (京都府立医科大学精神医学教室)

これまでに我々は、マカクサル (アカゲサル) に陽電子断層撮像法 (positron emission tomography, PET) を用いた非侵襲的な脳機能イメージング法を適用して、視覚認知、時間知覚、記憶・学習などの脳高次機能に関わる神経機構について明らかにしてきた。ヒトのイメージング実験では、群間比較を行うために標準脳が作成されており、世界中のほとんどの研究者がこれを共用している。しかし、サルの場合は、このような標準脳は、一部の種で報告があるものの、我々が日頃使うアカゲサルやニホンザルでは実用性のあるものはなく、これまでの PET などの個々の解析データは、それぞれの個体の MRI に重ね合わせることによって処理してきた。今回、アカゲサル、ニホンザル、カニクイザルそれぞれ約 10 程度のデータをファ

インな形で撮像し、MRI テンプレートを作成、PET による賦活実験などのイメージング実験に応用できるかどうかを検討した。

雄のアカゲサル (5-7 才)、8 頭から得られた良好な画像を用いて作業を行った。それぞれの頭部画像から脳以外の部分を削る作業を行い、8 頭のサルの脳の部分の平均画像を作成した。この平均脳を仮のテンプレートとして、SPM のプログラムを用いてそれぞれの脳の形状を変形させ、再びこのデフォルメした個々のサルの脳画像から平均画像を作った結果、良好な画像が得られた。現在、これを今回の最終的なアカゲサルの標準脳として、複数のアカゲサルから得られた ^{18}F FDG などの PET 画像の群間比較が可能であるかどうかについて検討を行っている。

11. 血液-脳関門を温存した $MnCl_2$ 造影磁気共鳴イメージング法

森田啓之, 田中邦彦 (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 (独協医科大学)

鷹股 亮 (奈良女子大学)

村上政隆 (生理学研究所)

【目的】我々は 2000 年度から、 $MnCl_2$ 造影磁気共鳴イメージング法を用い、中枢の興奮部位同定を行ってきた。 Mn^{2+} は、神経細胞興奮時に電位依存性 Ca^{2+} チャネルから細胞内に取り込まれる。このため、血流量に依存せず、神経細胞興奮と直接リンクした画像描出が可能である。しかし、 Mn^{2+} は血液-脳関門を通過しないので、 Mn^{2+} を神経細胞周囲に分布させるために、血液-脳関門を破壊する必要がある。しかし、血液-脳関門破壊は、正常な応答を障害する可能性があり、血液-脳関門破壊を必要としない方法の開発が望まれている。したがって、本年度の研究目的は、血液-脳関門を破壊しない $MnCl_2$ 造影磁気共鳴イメージング法を確立することである。

【方法】全ての実験は Wistar 系雄ラット (200~280 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 α -クロラロース (25 mg/kg) + ウレタン (250 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。 $MnCl_2$ (100 mM, 2 ml/kg/h)

を静脈内に投与した。90~120 分間の投与により、 Mn^{2+} は血管内から脳室内へ、さらに脳室内から脳実質へと拡散する。実質内に十分拡散したことを確かめた後、刺激として、内頸動脈から高張溶液を投与した。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 T_1 -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, 9 スライス, $TR/TE : 150/4.2$ ms)。刺激前後の信号強度変化スピードを検定し、刺激により有意に信号強度が増加した部位を求めた。

【結果と考察】 $MnCl_2$ 静脈内投与時間に依存して T_1 緩和時間は減少する。その減少は、脳室内で最も速く、脳室からの距離に依存して遅くなる (図 1)。従って、静脈内投与された Mn^{2+} はいったん脳室に排出され、そこから脳実質に再拡散してくることが分かる。この状態で、高浸透圧刺激を行うと、皮質、視床、視床下部の広い範囲にわたり、信号強度が容量依存性に増加した (図 2)。以上の結果から、血液-脳関門を破壊しなくても、 $MnCl_2$ の投与時間を長くすることにより、血管-脳室-脳実質へと拡散して、刺激により興奮した部位に取り込まれることが確認された。この方法により、血液-脳関門を温存したより生理的な解析が可能になる。

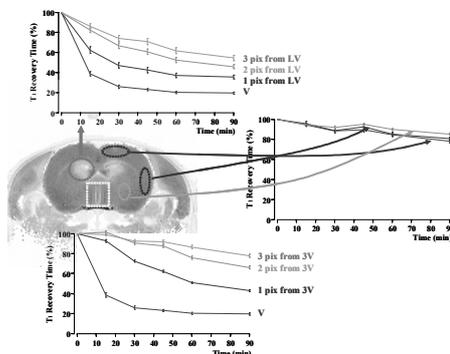


図 1. $MnCl_2$ 静脈内投与による T_1 緩和時間の変化。

上 : 側脳室内とその周囲, 下 : 腹側第 3 脳室内とその周囲, 右 : 大脳皮質と外側視床下部。

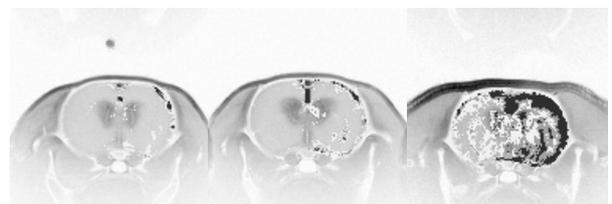


図 2. 120 分間の $MnCl_2$ 静脈内投与後、内頸動脈内高張

NaCl 溶液投与 (0.5 ml) に対する中枢興奮部位。左 : 0.3 M, 中 : 0.5 M, 右 : 1.5 M。

12. マンガン造影を用いた, 容量刺激, 血圧変化に対する延髄および視床下部神経活動の解析

鷹股 亮 (奈良女子大学・生活環境学部)

瀬尾芳輝 (獨協医科大学・生理学 (生体制御) 教室)

荻野孝史 (国立精神・神経センター神経研究所)

村上政隆 (生理学研究所)

細胞外液量, 血圧は, 低圧系/高圧系の圧受容器によりモニターされ, その信号が延髄に伝えられほぼ一定に調節されている。我々は, 脳室内に Mn^{2+} を持続的に投与して脳室周囲の脳実質に Mn^{2+} を分布させた後, 静脈内に高張性食塩水を注入して浸透圧刺激を加えると, 活性化されたニューロンにおいて Mn^{2+} が取り込まれ, 神経細胞内に取り込まれた Mn^{2+} を MRI を用いて画像化することにより, 浸透圧刺激時の脳室周囲の視床下部神経核の活動を *in vivo* で経時的に記録することに成功している。

そこで, この方法をさらに発展させ, 体液量調節, 血圧調節における視床下部および延髄, 特に弧束核の神経活動を観察することを目的とした実験を行った。

ウレタン-クロラロース麻酔下の雄ラット (200-250g) の側脳室内カニューレを留置し, このカニューレを介して $MnCl$ 溶液を $50\mu l/h$ の速度で持続的に投与し, 脳室からの拡散により視床下部および延髄の実質に Mn^{2+} を分布させた (1.5-2 h)。その後, 利尿剤であるフロセミドを静脈内投与 ($3mg/100g$ b.w.) して細胞外液量を選択的に減少させた。フロセミド投与による, 尿量は約 8ml であり, 実験に用いたラットの細胞外液量の 10-15% に相当した。その際の細胞外液量の減少にともなう延髄, および視床下部におけるニューロン活動を Mn 造影 T_1 強調画像を測定することにより定量化した。

また, 側脳室内に $MnCl$ を持続投与した後, 降圧剤であるニトロプルシド (SNP) を静脈内に, $3\mu g/kg/min$ の速度で注入して同様の実験を行った。この量の SNP 投与により, 平均動脈圧は約 60 mmHg 程度にまで低下した。

フロセミド, SNP 投与により延髄弧束核の信号強度の

上昇が確認された。これらの刺激により, 延髄弧束核における c-Fos 発現が確認されたことから, 延髄弧束核における神経活動の上昇が *in vivo* で MRI を用いて測定可能であることが示された。さらに, 視床下部室傍核における信号強度も上昇したことから, 圧受容器からの信号が延髄弧束核を介して, 視床下部に伝えられたものと考えられる。フロセミド投与による緩やかな細胞外液の減少と, SNP による急激な血圧の低下に対する延髄弧束核の反応の経時変化の違いに関しては現在解析中である。

我々はさらに, Mn^{2+} を機能的な神経接続を明らかにするためのトレーサーをして用いることが可能であるかを検討した。ペントバルビタール麻酔下のラットの終板器官 (OVL) に $100mM$ $MnCl$ を $1\mu l$ マイクロインジェクションし, 同時に $1.5 M$ $NaCl$ を皮下に $1ml/100g$ b.w. 注入することにより浸透圧刺激を負荷した。12-15 時間後, Mn 造影 T_1 強調画像を用いて観察すると, 室傍核において, 信号強度の上昇が観察されたが, その周辺部位においては信号強度の上昇は認められず, 室傍核において選択的に Mn^{2+} が取り込まれていることが示された。このことから, 浸透圧受容器が存在すると考えられる OVL に持続的に浸透圧刺激が加わることにより, 神経支配のある室傍核において神経活動が増加し, この神経活動の上昇をマンガン造影 T_1 強調画像により観察できると考えられる。

以上より, マンガン造影 T_1 強調画像により, 神経の活動部位および機能的神経接続を *in vivo* で明らかにできる可能性が示された。各種刺激負荷時の脳内神経活動部位および神経回路の解明への発展が期待出来る。

13. MRI による乱用薬物の耐性獲得, フラッシングの形成機序解明

吉本寛司 (京都府立医科大学・法医学教室)

瀬尾芳輝 (獨協医科大学・生理学教室 (生体制御))

荻野孝史 (国立精神・神経センター神経研究所)

村上政隆 (自然科学研究機構・生理学研究所)

本田 学 (岡崎国立共同研究機構生理学研究所)

今日の乱用薬物特に覚醒剤による犯罪, 異常行動は, 神経精神医学的また社会医学的に大きな問題である。2002 年の覚醒剤取締法違反件数は, 23474 件, 違反人員は 16964 人であり, 過去 5 年間 15000~20000 人の依然として高い違反人員数を示している。

覚醒剤乱用による異常行動は, その薬理生理学的作用による耐性獲得並びに再燃現象 (フラッシュバック) 作用が大きく関与しているが, その詳細は不明である。

今回, 覚醒剤の耐性獲得並びにフラッシュバックの形成機序解明を目的として, ヒト覚醒剤事犯者の覚醒剤摂取様態に外挿できる覚醒剤モデル動物を作成し, MRI を応用して脳神経活動変化を検討した。同時に脳各部位におけるドーパミン, セロトニン等神経伝達物質質量変化を神経薬理学的にも検討した。

覚醒剤モデル動物として, 覚醒剤連続投与後断薬し, 再び覚醒剤投与した群 (連続投与群) と覚醒剤単回投与群 (単回投与群) の 2 群について検討した。

連続群は, Wistar 系雄ラットに連続 5 日間 覚醒剤 6 mg/kg/day を腹腔投与し, 2 日間の覚醒剤断薬後再び覚醒剤 6 mg/kg を投与した。単回投与群は, 同量の生理食塩水を連続 5 日間投与し, 2 日間の投与中断後覚醒剤 6 mg/kg を単回投与した。

両群各 10 匹のモデル動物について, MRI を用いて脳神経活動を経時的にモニターした後, 断頭によりすばやく脳を摘出し, ラット脳マトリックス及びパンチを用い, 線条体 (C/P), 側坐核 (ACC), 前頭大脳皮質 (FC), 外側視床下部 (LH), 海馬 (HP), 扁桃核 (AMY), 中脳腹側被蓋野黒質 (V/S) 及び縫線核 (DRN) の 8 部位を採取した。すばやく液体窒素

にて重量測定後, 3,4-dihydroxybenzylamine (DHBA) を内部標準として, ドーパミン (DA), セロトニン (5-HT) 及びそれらの代謝物質 DOPAC, 5-HIAA を HPLC-ECD にて同時定量した。さらに各定量値から (DOPAC)/(DA) 比, (5-HIAA)/(5-HT) 比を算出し turnover Index として検討した。

I) MRI による脳血流速度: 単回投与群の FC 及び C/P の血流速度の増加が著明に認められた。一方連続投与群では, 同 FC 及び C/P の血流速度増加の抑制が見られ, 覚醒剤耐性獲得過程における脳血流機能変化が認められた。II) DA, DOPAC 及び (DOPAC)/(DA) について: 単回投与群に比べて, 連続投与群の AMY 及び C/P DA 量は増加し, FC, DRN 及び LH DA 量は減少傾向を示した。(DOPAC)/(DA) 比は, C/P 及び AMY において減少していた。III) 5-HT, 5-HIAA 及び (5-HIAA)/(5-HT) について: 連続投与群の C/P, ACC 及び FC 5-HT 量の増加に対し, AMY 5-HT 量の減少が認められた。さらに FC において (5-HIAA)/(5-HT) 比の減少が認められた。

連続投与群における C/P 及び ACC のドーパミン, セロトニン量増加を認めた。FC のセロトニンは, C/P, ACC 同様増加するが, ドーパミン量は減少した。覚醒剤連続群は, FC ドーパミン神経系の抑制を伴う C/P, ACC 及び FC セロトニン神経系の亢進が認められた。

以上, MRI による連続投与群の FC 及び C/P 血流反応増加の抑制結果を加味し, 一部 AMY 系を含めた C/P - FC 神経系機能変化が覚醒剤耐性・フラッシュバック形成機序に大きく関与していることが示唆された。

14. 頭針治療による卒中易発症ラット (SHR-SP) 卒中麻痺回復過程における脳内組織変化の非破壊追跡

井上 勲 (徳島大学分子酵素学研究センター)

荻野 孝史 (精神研究センター)

村上 政隆 (生理学研究所)

卒中易発症ラット (SHR-SP) は 1% 食塩水を与えた後 2-6 週の間 90% 以上が卒中を発症する。卒中発作後 1 日 10 分間 頭針 (Scalp Acupuncture : SA) を施すことにより、5 日以内に発作により現れた四肢の麻痺をほぼ完全に排除することが出来る。T-test による (SA をほどこさない) コントロールとの比較で P 値は 3 日目で 2.9×10^{-3} , 5 日目で 3.7×10^{-7} となり、SA 効果は統計的に有為である。この速い麻痺除去過程における脳内構造変化、特に浮腫の広がりの変化を T1-W 法で MRI 画像解析すべく本共同研究を開始した。しかし共同研究は不首尾であった。主な理由は以下に述べるとおり、計画が本共同研究の物理的な制約を満たさなかったことにあり、提案

者の責任である。

SHR-SP における卒中発作は自発性で、発症日をコントロールすることが出来なかった。このためこれまで準備した合計 24 匹中、あらかじめ決められた測定日に卒中発作が起きたことはなかった。また、現在の共同研究方式を取っている限り、今後改善できる見通しはない。脳の損傷部位は個体によって異なる。1 個体について連続観測が技術的にも達せられなかったことから、これまで記録した MRI 画像から、有為な結論を得ることは出来なかった。共同実験は、平成 16 年 6 月に一度行ったのを最後に、本共同研究は打ち切った。

15. 磁気共鳴画像装置による脳賦活検査を用いたヒトの高次脳機能研究

飯高哲也 (名古屋大学 大学院環境学研究科)

本年度は以下のような研究を行った。

大脳辺縁系と前頭前野の活動は、感情と認知に密接に関与していることが指摘されている。これらの部位は我々がヒトの顔を見ている時にも活動し、我々は刺激の持つ生物学的な重要性を自動的に判断していると考えられている。また脳内のセロトニン系は気分や不安、さらに精神神経疾患の病因との関連が指摘されている。セロトニン系と辺縁系・前頭前野の関係を明らかにするため、26 名の健常被験者に対して機能的 MRI (fMRI) と遺伝子解析を行った。fMRI では顔刺激を呈示することで扁桃体などの活動を測定した。また各被験者のセロトニン 3 型受容体遺伝子 (HTR3A) に関連する多型性 (C178T) を解析した。

遺伝子解析の結果で被験者を C/C 群 (15 名) と C/T 群 (11 名) に分け、fMRI の結果を群間で比較した。C/C 群は C/T 群よりも右扁桃体と前頭前野の活動が高く、顔に

対するボタン押しの反応時間が短かった。また C/C 群では扁桃体の活動と損害回避の性格傾向得点に有意な相関があった。これらの結果はセロトニン受容体の発現に関わるとされる遺伝子の多型性が、扁桃体と前頭前野の神経活動に影響を与えていることを示している。C178T 多型性はうつ病と対照で異なった割合を示し、また損害回避の性格傾向とも関連すると報告されている。本研究から健常被験者における辺縁系・前頭葉のセロトニン系の機能的変化がストレス脆弱性に関与している可能性が示唆された。

本年度は下記の論文が発表された。

A variant C178T in the regulatory region of the serotonin receptor gene HTR3A modulates neural activation in the human amygdala. Iidaka T, Ozaki N, Matsumoto A, Nogawa J, Kinoshita Y, Suzuki T, Iwata N, Yamamoto Y, Okada T, Sadato N, Journal of Neuroscience (in press)

【 超高压電子顕微鏡
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. 超高压電顕トモグラフィーによる感杆型光受容細胞内の光小胞の三次元観察.....	168
(片桐 展子ほか)	
2. ギャップ結合連結した網膜及び脳ニューロンの樹状突起の構造.....	168
(日高 聰)	
3. 消化管壁内ニューロンの樹状突起の三次元微細構造.....	169
(長浜真人ほか)	
4. 神経幹細胞の分化に伴う超微細形態学的変化の研究.....	170
(野田 亨)	
5. ステロイドホルモン動態と神経細胞の機能・形態変化に関する三次元的構造解析.....	171
(小澤一史)	
6. 神経系培養細胞における受容体などの3次元的構造解析.....	171
(遠藤 泰久ほか)	
7. 嗅球ニューロン樹状突起の三次元構造解析	172
(樋田一徳)	
8. 哺乳類 neuroepithelial cell からの非対称分裂による神経細胞生成	173
(小曾戸陽一ほか)	
9. 小脳顆粒細胞樹状突起の3次元再構築	174
(山田直子ほか)	
10. 3-D Reconstruction of the Crystalline Bodies and the Rhabdomere Formation during Development	175
(InSun Kim ほか)	
11. 壁細胞の細胞内細管および細管小胞の超高压電子顕微鏡による三次元的観察.....	176
(菅井尚則ほか)	
12. Cerebellar synaptic plasticity associated with motor skill learning	177
(Kea Joo Lee ほか)	

1. 超高压電顕トモグラフィーによる感杆型光受容細胞内の光小胞の三次元観察

片桐 展子 (東京女子医科大学・総合研究所・研究部)

片桐 康雄 (東京女子医科大学・看護学部・基礎科学系)

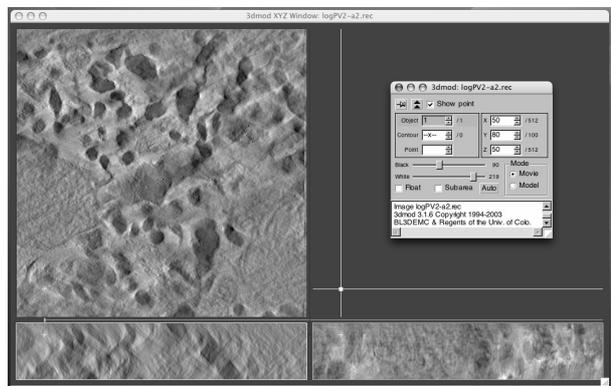
有井 達夫

光受容細胞内の光小胞 (photoc vesicle) は径 80nm の clear vesicles で小胞体 (ER) の特殊形の一つである。軟体動物・腹足類の感杆型光受容細胞内に多量に含まれ、感光性色素タンパク質レチノクロムの局在部位として知られる。軟体動物のロドプシン-レチノクロム系において、レチノクロムは視物質ロドプシンの再生に発色団 11-cis の供給源となる。光小胞は加温オスミウム染色で黒染し高コントラストとなるので、準薄切片を超高压で電顕観察できる。光小胞の形成過程を知るために、イソアワモチ類 (海産の腹足類) 幼動物を用い、未成熟な光受容細胞内における光小胞と ER やゴルジ層板との関連について超高压電顕トモグラフィー解析を試みた。

【方法】連続切片 (0.3 μ m 厚, 加温オスミウム染色処理, エポキシ樹脂包埋) を 1,500~10,000 倍で観察し, 撮影視野内に光受容細胞 (光小胞と周辺の小器官) を選択した。トモグラフィーによる解析のため, +60° ~ -60° まで, 2°C 間隔で, 15,000, 20,000 および 30,000 倍の 3 シリーズで超高压電顕により撮影した。予め撮影部位を, +60° ~ -60° まで傾斜させて X, Y, Z 軸を合わせておき, +60° から -60° へ一方向に角度を変えた。前の像の輪郭をモニター上に描き, 角度を変えた際の像を前の像に重なるように微小な位置合わせを行って撮影した。フィルムを現像し, スキャナーで取り込み, データをデジタル化した。デジタル化した一連のデータの位置合わせは画像解析ソ

フト DeltaViewer を用いた。

【結果と考察】各視野は焦点を変えて 2 - 3 枚撮影し, 1 シリーズは約 200 枚になった。このため, 観察中のフィルム交換 (3 - 4 回) やフィルム現像に伴って, 原フィルムに明暗, コントラストなどのムラを生じ, デジタル化後に photoshop による調整が必要であった。また, フィルムのデジタル化はスキャナーによる取り込みの条件などによってデータ量が大きくなった。解析部位を特定して画像の一部を切り取って適切な画像サイズの一連のデータとした。位置合わせには, 今回用いた試料がコロイドなどのマーカーをつけていないため, 位置合わせの機能 (容易で正確) に優れている DeltaViewer を用いた。位置合わせができたデータについて, トモグラフィー解析ソフト IMOD を用いて三次元解析を行った (図)。



2. ギャップ結合連結した網膜及び脳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教室)

Gap junctions represent an important means of direct cell-to-cell communication between coupled cells, which are aggregates of intercellular membrane channels formed by a family of connexins. Gap junctions are the major structural elements of electrical synapses in the connected cell population. Study of electrical synapses needs comprehensive

evidence showing functional significance by simultaneous dual patch-clamp recordings between neighboring cells of certain neuronal type and structural identification of gap junctions between the examined cells.

Electrical synapses in networks of inhibitory interneurons have been extensively studied. In contrast, studies of gap

junctions between excitatory neurons in major neuronal pathways are considered to be less copious and in fact might be relatively rare. In retinal ganglion cells, the occurrence of electrical synapses between neighboring cells has been proposed by electrophysiological recordings of distributed spikes. For a specific cell type, α -type ganglion cells (α -GCs), synchronous spike activity has been described in the cell population. In the present study, electrical synapses between α -GCs were detected using combined techniques of dual recordings, high-voltage electron microscopy and connexin immunocytochemistry in rat retina.

Measurement of tracer coupling between α -GCs resulted in preferentially homologous occurrence among cells of the same morphological type. In high-voltage electron microscopic analysis of 5- μ m-thick sections, direct dendrodendritic gap junctions (average size 0.86 μ m long) were present in contact

sites between tracer-coupled α -GCs. In dual recordings from pairs of neighboring α -GCs, bidirectional electrical synapses and precise temporal synchronization of spike activity were detected in the cell pairs. Connexin36 immunoreactivity was undertaken in Lucifer yellow-labeled cell pairs after patch-clamp recordings. Confocal laser-scanning imaging demonstrated that connexin36 is located at dendritic crossings between electrically coupled cells. These results give conclusive evidence for electrical synapses via dendrodendritic gap junctions in α -GCs of the same physiological type.

文献

Hidaka, S, Akahori, Y, & Kurosawa, Y (2004) Dendrodendritic electrical synapses between mammalian retinal ganglion cells. *Journal of Neuroscience*, Vol 24(No 46): pp 10553 - 10567.

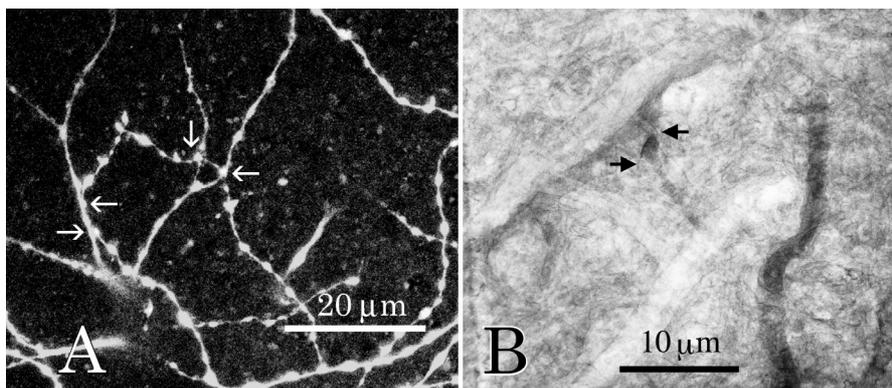


Figure 1. **A**, A confocal projected image demonstrating dendritic interconnections (arrows) in Lucifer Yellow labeling of a pair of electrically coupled α -GCs. This cell pair showed bi-directional electrical synapses by simultaneous dual patch-clamp recordings.

B, Electron micrograph showing the direct junctional contact between Neurobiotin-coupled neighboring α -GCs. The occurrence of dendrodendritic gap junction (arrows) was revealed by high-voltage electron microscopy at 1,000 kV in a tangential 5- μ m-thick section.

3. 消化管壁内ニューロンの樹状突起の三次元微細構造

長浜真人（三重大学医学部解剖学第二講座）

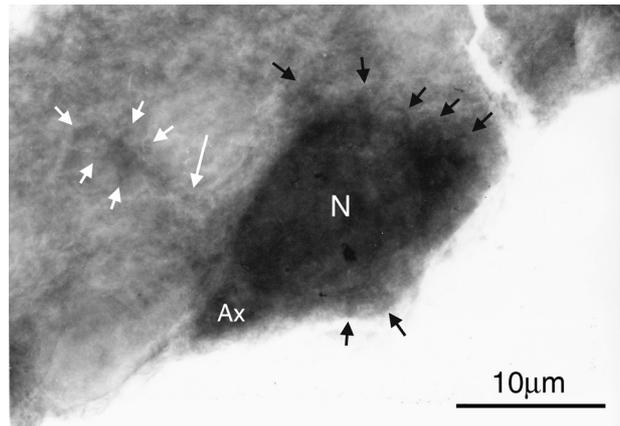
有井達夫

消化管壁内神経叢には多くのニューロンが含まれておりその数は脊髄に含まれるニューロン数に相当する。これらの壁内ニューロンは現在、種々の神経マーカーに

より多数のサブタイプに分類されているが、これらのニューロンは、長い軸索様突起と短い樹状突起の性状・数などにより、形態学的には主に3-4種類に分類されてい

る。PACAP や VIP を含有する抑制性ニューロンは一本の長い軸索様突起と細胞体周囲の複数の短い樹状突起を持つ Dogiel の Type I と言われる形態を示すものが多く認められる。既に私共の報告でこれらの樹状突起様突起には多数のシナプス入力を確認しているが、樹状突起の微細な三次元構築に関する解析はなかった。今回、我々は免疫染色 (ABC 法とにニッケル・コバルト増感法) を施したこれらの神経ペプチド含有ニューロンをプラスチック

ク包埋し、3-5 ミクロン切片を作製して超高压電子顕微鏡にて観察した。ニューロンの細胞体周囲に微細な突起を立体的に観察することができた。細胞周囲のごく短い樹状突起と、その遠位部に微細な突起を複数有する比較的長めの樹状突起を認めた (図)。今後、標識細胞のコントラストをより高くし、樹状突起の形態的な異同、分類、解析を計画している。



筋層間神経叢縁部に位置する Dogiel-I 型の PACAP 含有ニューロン(N)。PACAP 含有ニューロンには細胞体周囲に複数の短小樹状突起 (黒矢印) とやや長めの樹状突起 (長白矢印) が一本認められる。この長めの樹状突起の遠位部には複数の小突起 (短白矢印) が認められる。Ax は軸索突起の細胞体近位部。

4. 神経幹細胞の分化に伴う超微細形態学的変化の研究

野田 亨 (藍野大学医療保健学部理学療法学科)

出生直後のラット中枢神経組織には新たに神経細胞を生み出すことのできる神経幹細胞が存在すると言われていた。この細胞は神経細胞のみならず、中枢神経組織に見られるグリア細胞、すなわち、オリゴデンドロサイト (希突起膠細胞)、アストロサイト (星状膠細胞)、ミクログリア (小膠細胞) などにも分化する能力を有する。この点に着目して、神経幹細胞からそれぞれの細胞の分化過程を形態学的に捉え、それぞれの細胞の三次元構造上の変化をも超高压電顕で観察しようとした。

生後 1 日ラットの大脳側脳室直下 (SVZ) から採取した組織をトリプシン処理などで個々の細胞に分離し、EGF, bFGF, heparan sulfate 存在下で培養した。細胞は培養数日後に神経幹細胞塊 (neurosphere) を形成し始めた。この細胞塊を培養開始後、1 週間、2 週間、4 週間目

に 4%フォルムアルデヒドを含む固定液で固定し、OCT コンパウンドメディウムを浸透、凍結させ、それぞれの時期の neurosphere の凍結切片をクリオスタットで作製した。それらの切片に対して、まず神経細胞、オリゴデンドロサイト、アストロサイトなどの標識蛋白に対する抗体を用いて蛍光抗体法でそれぞれの蛋白の発現を検索した。

神経前駆細胞に見られる中間径フィラメントである nestin、神経細胞に発現する微小管のチューブリン type III などの蛋白は培養開始後 1 週ではやや不明瞭な発現を示したが、3 週で最も明瞭な局在を示した。またアストロサイトに発現する中間径フィラメントである GFAP は 2 週目以降の neurosphere に比較的安定して観察されたが、オリゴデンドロサイトを標識する O4 蛋白の発現は

不明瞭で安定した結果が得られなかった。次にこれらの試料について超高压電顕による観察を行うために同じ抗体を用いて、酵素抗体法により、種々の細胞の電子密度を上げる試みをしたが、必ずしもそれらの細胞の三次元構造についての明瞭な所見を得ることができなかつ

た。この理由にはそれぞれのマーカーとされる蛋白が最も強く発現するタイミングを捉えていなかったこと、培養条件が neurosphere の培養、分化に適していなかった可能性も考えられ、方法的に改善する余地があると思われ、さらに研究を継続する必要がある。

5. ステロイドホルモン動態と神経細胞の機能・形態変化に関する三次元的構造解析

小澤一史（京都府立医科大学・大学院医学研究科生体構造科学部門）

副腎皮質から分泌されるコルチコステロイドは脂溶性のホルモンであり、その化学的性状から容易に血液脳関門を通過して、受容体を介して神経系の細胞に直接作用する。脳内におけるコルチコステロイド受容体にはミネラルコルチコイド受容体 (mineralocorticoid receptor, MR) とグルココルチコイド受容体 (glucocorticoid receptor, GR) の2種類からなることが知られている。これらの2つの受容体は特に脳の海馬領域において豊富に分布していることが知られており、血中のコルチコステロンの変動に伴って、両者の受容体の機能調節が行われる。

血中コルチコステロン濃度の変化によって海馬の錐体細胞や顆粒細胞の構造変化が生じることが報告されているが、細胞の樹状突起、ことに棘 (spine) の形態変化に関する観察は、通常の透過型電子顕微鏡による二次元的観察では、情報量としての限界があり、このような場合には超高压電子顕微鏡を用いた三次元的解析が効果を示す。そこで、我々は sham 手術群 (コントロール) と副腎を摘出し、血中コルチコステロンが減少あるいは消失している群 (副腎摘出<ADX>群) を作成し、海馬錐体細胞

CA1, CA3 における尖側及び基底側の樹状突起棘の変化について超高压電子顕微鏡を用いたステレオ観察によって三次元的な解析を続けている。その結果、CA1 領域 (GR が発現) の錐体細胞の樹状突起の棘は、コントロール群では密に存在し、head と tail を有する典型的な形状を構築するのに対して、ADX 群では、密度の低下や形状の変化が認められ、シナプス形成の変化による神経機能反応の変化が生じている可能性が強く示唆された。この変化はコルチコステロンの補充によって回復する。一方、GR が発現していない、CA3 領域の神経細胞ではこのような変化は認められなかった。これらの現象は、通常の電子顕微鏡観察、共焦点レーザー走査型顕微鏡、免疫組織化学的検索によって、ある程度観察可能であるが、超高压電子顕微鏡による観察によって、明快にかつ定量的解析も加えて客観的に示すことが出来、大きな効果を示すことが出来る。これらの観察から海馬の神経細胞は血中コルチコステロン濃度の変動に部位特異的に反応し、GR 受容体を介して入力様式がホルモン環境によって修飾されることが強く示唆された。

6. 神経系培養細胞における受容体などの3次元構造解析

遠藤 泰久・西田 倫希 (京都工芸繊維大学)

有井 達夫

神経栄養因子のひとつである神経成長因子 (NGF) は神経細胞における突起伸長、シナプス形成、生存維持などに関与する分化促進因子であり、その作用は細胞膜に存在する受容体 TrkA と高親和的に結合することによって発現する。最近、受容体 TrkA がカベオラと呼ばれ

る細胞膜陥入部位に局在することを示唆する報告がなされたが、微細構造については不明な点があった。微細構造のレベルでの受容体 TrkA の局在を明確にするため、神経系培養細胞 PC12 細胞を用い、免疫細胞化学的に超高压電子顕微鏡により3次元立体的構造の検討を継続し

て実施している。その過程でカベオラではなく、クラスリン被覆の飲み込み小胞との関連を明らかにするため、クラスリン抗体を使った免疫電顕により3次元構造解析を行った。

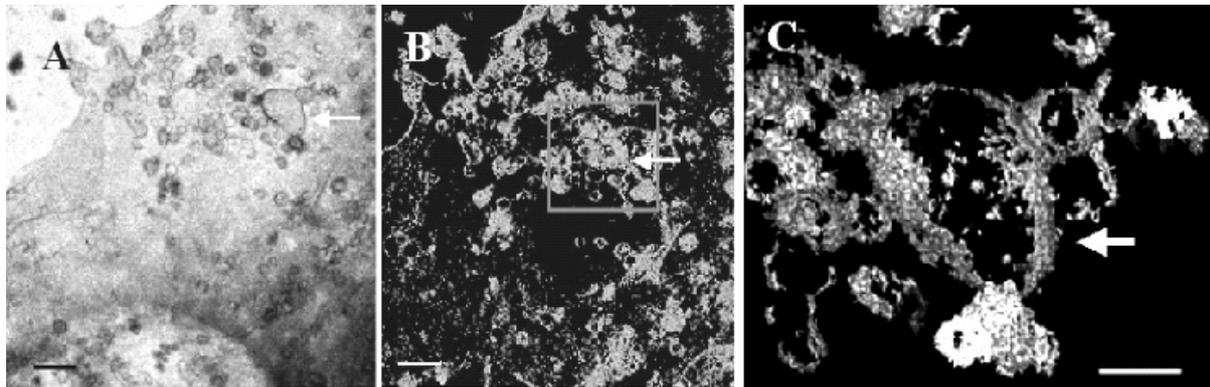
ホルムバル支持膜を張った金メッシュを70%エタノールで滅菌後、コラーゲンコートをし、PC12細胞をDMEM培地にNGF(最終濃度50ng/ml)を添加し4日間培養した。細胞をパラホルムアルデヒドで固定後、クラスリンの特異抗体を用い免疫染色を行い、ABC-HRP法によりDAB-硫酸ニッケルで発色し、臨界点乾燥した。超高圧電子顕微鏡(H-1250M 加速電圧1,000kV)により、試料の同一視野を-60度から+60度まで2度刻みの傾斜連続写真を撮影し、IMODにより3次元画像解析を行った。

PC12細胞の細胞膜上のクラスリン免疫反応は、球形の小胞および楕円形のエンドソームに観察された。小胞に

おけるクラスリン免疫反応は、ほぼ全面に見られるものだけでなく、球体の一部に反応がないものもみられた。後者は細胞膜に開口しているcoated pitsに相当するか、飲み込み小胞の表面のクラスリン被覆が均一でない可能性が考えられる。

小胞は集団をなしてみられることが多く、一部はエンドソームと思われる楕円形の構造の周辺に集積しており、密着しているものもしばしば観察された。これは飲み込み小胞がエンドソームに融合する瞬間をとらえているものと考えられる。

以上の結果は、これまで観察してきたTrkAの免疫反応に非常に類似しており、神経細胞における神経栄養因子受容体が発現後と結合した後、細胞内に飲み込まれる過程に、クラスリンが関与していることを示唆するものと考えられる。



A. PC12細胞のクラスリン免疫反応。金メッシュ上で培養した細胞を免疫染色し、臨界点乾燥後、超高圧電顕で撮影した。arrow, endosome. scale, 2 μ m
 B. コンピュータトモグラフィで3次元構築したクラスリン免疫陽性反応の構造。arrow, endosome. scale, 2 μ m
 C. 図Bの矩形部の拡大。陽性反応を示す小胞ごとに色分けして示す。arrow, endosome. scale, 1 μ m

7. 嗅球ニューロン樹状突起の三次元構造解析

樋田一徳 (徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部)

嗅覚の一次中枢・嗅球の糸球体は末梢(鼻粘膜)からの入力である嗅受容細胞から中枢への出力の投射ニューロンへシナプス結合する場であるが、両者間には種々の局所ニューロンが介在し、匂い識別等の糸球体機能を調節していると考えられている。今年度は、我々がこれまで嗅受容細胞と投射ニューロンとの間に特徴的なシナプス結合を形成する事を明らかにしてきた各種介在ニューロン

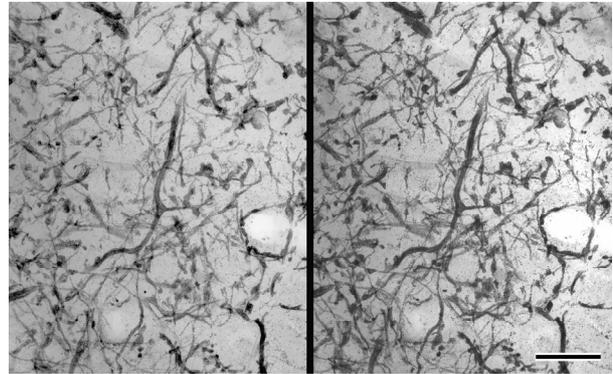
のうち、嗅受容細胞から高頻度にシナプス結合を受け異なる投射ニューロン樹状突起間に連続シナプスを形成するTyrosine Hydroxylase (TH) 各免疫陽性ニューロンについて焦点を絞り、超高圧電子顕微鏡により形態解析を行なった。

共焦点レーザー顕微鏡による解析が困難なTHニューロンは、重金属増感DAB法及び金粒子増感法によって超高圧電子顕微鏡下で観察に適した像が得られ、糸球体

内に広く突起を分布しているのが特徴である(生理学研究所年報第 23 巻 152-153 頁, 業績リスト-論文・学会)。今年度, 光顕トルイジンブルー染色の準超薄連続切片の解析により, TH ニューロンは糸球体内に存在する嗅受容細胞終末による小分画構造を横断していることが示唆された。この構造的特徴は更に超高压電子顕微鏡によって確かめられ, 抗体の浸透度の限りはあるものの(〜10 μm), 観察可能空間において, 1~2 μm 径と 0.1~0.5 μm 径の大小の太さの突起の多くは共に糸球体を横断していることが分かった(付ステレオ図)。

嗅受容細胞と投射ニューロン間の相互シナプス結合は, 匂い特異的に投射する嗅受容細胞の糸球体内の小区画的な存在様式に対応して存在していると考えられるが, TH ニューロンはこれらの小区画に, 特徴的な位置関係にあることが超高压電子顕微鏡によって示された。同定されたシナプス結合のタイプからも匂い識別に関する糸球体機能に重要な役割を演じている事が推測される。

厚い試料を高解像度で立体解析が可能な超高压電子顕微鏡は, ニューロンの複雑な樹状突起網やグリアの突起構造を解析するには極めて有用であり, 今後は, 各種ニューロンの受容体の局在や関連するグリアを含めたより詳細な三次元構造解析を行なう予定である。



ラット嗅球糸球体 TH ニューロンの樹状突起網のステレオ像($\pm 8^\circ$) Bar = 10 μm

8. 哺乳類 neuroepithelial cell からの非対称分裂による神経細胞生成

小曾戸陽一 (ドイツ・マックスプランク研究所・Molecular Cell Biology and Genetics)

樋田一徳, 清蔭恵美 (徳島大学大学院・神経情報医学部門・情報統合医学講座・形態情報医学分野)

有井達夫

Recent studies on the generation of neurons from their precursor cells (=neuroepithelial cell) in embryonic mammalian brain have revealed that these cells do not completely round up in mitosis, but retain a very thin basal process throughout cytokinesis. Using a mitosis-specific marker, we have also observed that the basal process of neuroepithelial cells dividing at the apical surface of the ventricle zone is maintained during mitosis, although it becomes quite thin (less than 0.5 μm in diameter) and long (more than 100 μm) extending to the basal lamina. We hypothesize that despite its thread-like shape, the basal process is actually divided during cell division.

We have established a method to visualize the ultrafine structure of the basal process. Since the basal process is too thin to obtain spatial information by light microscopy, and too long to be followed its entire length by conventional electron microscopy, we have used High-Voltage Electron Microscopy (H-1250M, NIPS), which enables us to observe thicker sections (up to 5 μm), combined with preembed antibody-DAB staining or Golgi

impregnation method. Thin processes have been observed extending from the mitotic cell body. Our results raise the possibility that the basal process of neuroepithelial cells may be divided during cytokinesis.

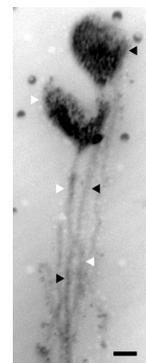


Fig. 1.

Basal process of mammalian neuroepithelial cell stained by Golgi impregnation. Note that two bulge structures (indicated by black or white arrowhead) are connected to the cell body (below the frame of the image). Bar=0.5 μm

9. 小脳顆粒細胞樹状突起の 3 次元再構築

山田直子, M.H.Ellisman (カリフォルニア大学, サンディエゴ校)

濱 清 (自然科学研究機構生理学研究所)

本研究は、小脳糸球の複合体である神経顆粒細胞樹状突起終末を超高圧電子顕微鏡 (UHVEM) で観察しコンピュータによる解析を行ったものである。

小脳における巨大シナプス複合体である小脳糸球 (すなわち神経顆粒細胞樹状突起, 苔状繊維終末, 星状グリア細胞突起, ゴルジ細胞及び神経突起等) の機能が全体機能の中でどのように作用しているかを理解する事を目的として 3 次元構築を試みた。小脳糸球の大きさは $100\sim 300\ \mu\text{m}^3$ であり、構成する複合体各々のサイズはほぼ $0.05\sim 10\ \mu\text{m}$ である。この巨大シナプス複合体を UHVEM のトモグラフィー観察法を用いて立体的構造を構築する事は糸球状シナプス結合を解明する上で有効な方法である。小脳糸球に豊富に含まれるシナプスの位置やサイズを立体的に再現する事は脳機能のシミュレーションに有効である。

3 次元トモグラフィー観察法は、電子顕微鏡 (EM) による微細な構造情報と光学顕微鏡 (LM) 観察による動的な

形態や物質情報の理解を繋ぐ大切な役割を果たすと考えられる。UHVEM 観察の 3 次元計測では、LM での 2 次元計測の実長の約 1.5 倍があり、UHVEM 観察の微細構造では Z 軸方向が高精度に観察された。

今回ラット神経顆粒細胞樹状突起の巨大で複雑に立体構成された全体像を観察する事が出来た。図 1 には樹状突起終末の小脳糸球のステレオ立体 UHVEM 像を示す。図 2 には図 1 を 3 次元トモグラフィー観察する事によって得られたデータをコンピュータ処理し立体構築した 3D 立体像を示す。厚切り切片 ($10\ \mu\text{m}\sim 6\ \mu\text{m}$) の UHVEM トモグラフィー観察は、薄切り切片 ($70\sim 100\text{nm}$) の連続切片から得られる 3 次元構築像に比べ、位置あわせのずれが無い事と物理的な物の欠損がない事から再現性が優れている。ステレオ立体像観察および 3 次元トモグラフィー観察によって得られた立体構築像は、複雑な構造を立体的に観察するのに有効であった。

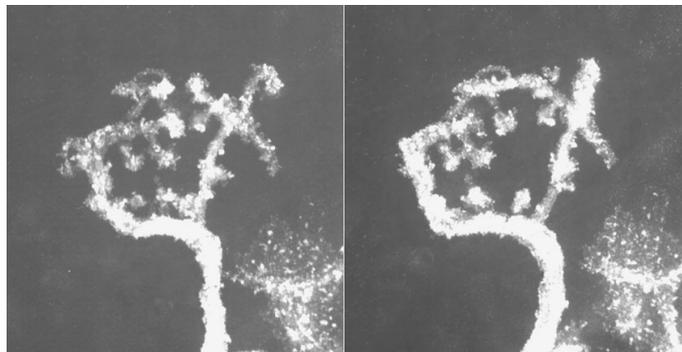


図 1. Stereopair of terminal granule cell dendrite viewed with UHVEM

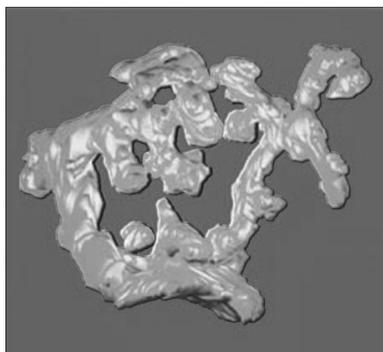


図 2. 3D reconstruction image of cerebellar glomerulus

10. 3-D Reconstruction of the Crystalline Bodies and the Rhabdomere Formation during Development

InSun Kim (Keimyung University)

Sung-Sik Han (Korea University)

Image processing by UHVEM and electron tomography has offered major contributions to research areas of both cellular and subcellular levels. Furthermore, such advancements have enabled improved analysis of 3-dimensional cellular structures. In the present study, we attempted to reconstruct the 3-dimensional plastid inclusion body which differentiates during CAM metabolism, using UHVEM from the National Institute for Physiological Sciences (NIPS) in Okazaki, Japan. The spatial relationship which forms between tubular elements and the thylakoidal membrane and/or starch grains have been investigated within the plastid inclusion bodies in CAM-performing *Sedum rotundifolium*. After fixation of immature mesophyll tissues through a high pressure freezing (HPF) technique and chemical processing, the specimens were cut into serial sections of ultra-thin (60-90nm) and semi-thick (0.15-1.0 μ m) sections, double stained, and carbon coated. They were examined primarily with the TEM, and tilted every two degrees from +60° to -60° to obtain 2-dimensional images with UHVEM. Diffraction patterns

were attained and digital image processing was performed on the elements of the lattice substructure within the inclusion bodies using tilting, tomography, IMOD, and finally UHVEM, to generate and reconstruct the 3-dimensional images on the cellular level.

The crystalline inclusion bodies were found to occur only in early development of mesophyll chloroplasts. The inclusion bodies were not membrane-bounded structures, but varied in shape and size even within the same chloroplast, if more than one inclusion were developed. They always occurred in the stroma and closely associated with thylakoids and starch grains. They consisted of tubular elements, ranging very small to large up to more than 10,000 elements. They exhibited a hexagonal arrangement of the six substructures with approximately 17.9-18.6nm periodicity distance between elements. They but usually were in close association with them. The inclusion bodies of the epidermal chloroplasts will be the subject of a following invest for comparison, since the latter appeared differ in structure and development.

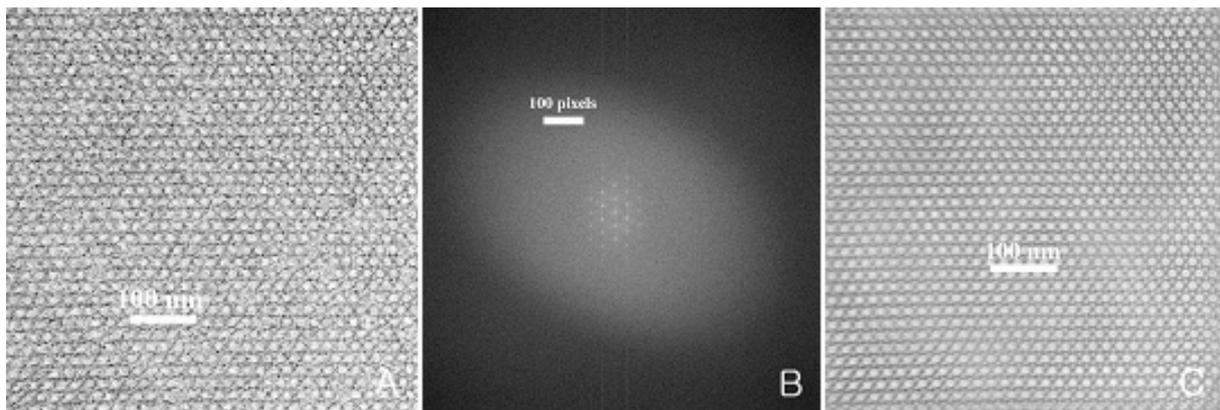


Fig 1. A, Original TEM Image, B, Fourier transformed Image (FTI), scattering Pattern, C. Inverse FFT (fast Fourier transformed) Image.

11. 壁細胞の細胞内細管および細管小胞の超高压電子顕微鏡による三次元的観察

菅井尚則 (福島学院大学短期大学部食物栄養科, 福島県立医科大学)

矢橋あつ子 (福島県立医科大学)

有井達夫

胃壁細胞は細胞内細管, 細管小胞という特徴的な構造を持つ。特に細管小胞の形態像をめぐり, 多くの研究者によりさまざまな形態像が報告されている。われわれは, 溶媒の浸透圧が 290mOsM 以上の固定液の逆行性灌流法と言う細管小胞の安定した形態像が得られる方法を明らかにした。この固定法によるラット胃壁細胞の観察結果は, 従来の報告通り, 細管と小胞の混合した電顕像を示したが, これらの小胞は細管の横断面を示している可能性も考えられた。そこで, 細管小胞について, 連続切片の通常電子顕微鏡による観察と厚切り切片の超高压電子顕微鏡による観察を行った。

【材料と方法】 Wistar 系ラット (雄, 8 から 10 週齢) を絶食させ, 下に示す方法で固定した。

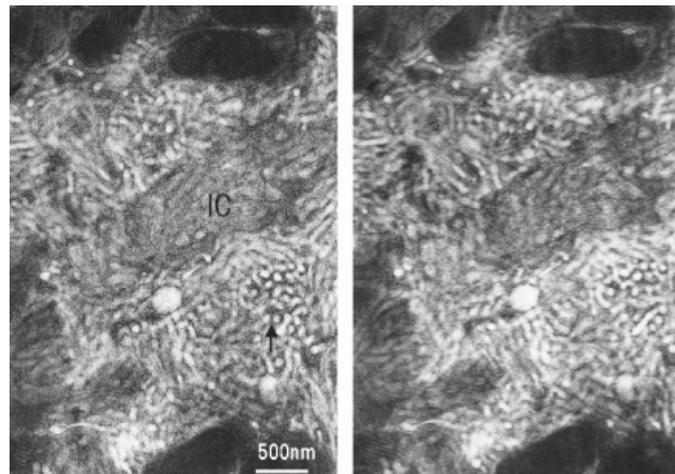
0.05M カコジレート緩衝液に蔗糖を加えて, 浸透圧計 (アドバンス社製) で計測し, 3%グルタルアルデヒド固定液の溶媒が 300mOsM 以上になるよう調整した。背側大動脈を横隔膜下で結紮, 腎動脈より遠位の背側大動脈から逆行性に灌流固定を行った。オスミウム後固定, ウラニール液によるブロック染色を行い, 脱水, エポンに

包埋。80nm の連続切片を作成し通常の電子顕微鏡 (100kV, 日本電子, 1200EX) で観察した。また, 0.5 μ m と 1 μ m の切片を撮影角度を変えながら超高压電子顕微鏡 (1,000kV, 日立, H-1250M) の観察を行い, 立体視を試みた。

【結果と考察】連続切片による観察では, 小胞が切片の 4 から 5 枚にわたる連続した像として観察された。また, 超高压電子顕微鏡を用いた立体視では, 枝分かれのほとんど認められない細長く伸びる細管が見られ, 小胞は見られなかった。これらの結果は, 細管と小胞の混合という従来の細管小胞像に疑義を示し, 細管小胞は単純な細管で形成されているとの結論を与える。いろいろな細管小胞像がこれまでに提示されてきたが, 単純な細管という細管小胞像こそ, 壁細胞における細管小胞の動態, 特に細管小胞のリクルート・リサイクル説をもっとも良く説明し得るものと考えられる。

文献

Naonori Sugai, Susumu Ito, Atsushi Ichikawa, and Misao Ichikawa: *J. Electron. Microsc.* **34**, 113-122, 1985



交差法ステレオ写真

図 1. 壁細胞の交差法ステレオ写真 (± 8 度) : 絶食ラットの胃壁細胞。細管小胞が細胞を満たしている。立体視すると, 2 次元的に小胞と観察された構造も細管であることが明らかである。細管と小胞の混じた構造として細管小胞の名称が与えられたが, 細管小胞は単純な細管よりなる構造で, 細管あるいは小管と呼ぶのがより真実を伝えると考えられる。

12.Cerebellar synaptic plasticity associated with motor skill learning

Kea Joo Lee, Hyun Kim, Im Joo Rhyu (Korea University)

Tatsuo Arie, Keiji Imoto (NIPS)

Dendritic spines are major postsynaptic sites that transmit most excitatory inputs in a mammalian CNS. The density, size, and shape of dendritic spines change in response to various physiological or pathological states. To investigate the motor learning-induced structural changes of dendritic spines in the Purkinje cells of rat cerebellum, morphological analyses were conducted from the rats trained in acrobatic condition demanding a significant motor coordination and balance (AC) using HVEM (H-1250M, NIPS, Okazaki, Japan). After animals were trained for 26 days, Golgi-stained cerebellar tissues were prepared for HVEM observation. For the morphological analyses of dendritic spines, the AC rats showed a statistically significant increase in spine density and length than control (MC) animals (For density, AC: $27.49 \pm 0.61/10\mu\text{m}$, MC: $22.82 \pm 0.51/10\mu\text{m}$, $p < 0.05$; For length, AC: $1.12 \pm 0.01\mu\text{m}$, MC: $1.03 \pm 0.01\mu\text{m}$, $p < 0.05$). Dendritic spines were also

classified into *thin*, *mushroom*, *stubby*, *branched*, and *unclassified type* by their distinct morphological features. On the tertiary branches of Purkinje cell dendrites, AC animals exhibited a tendency to have more *thin* and *branched* type spines, whereas a slight decrease in mushroom and stubby type was observed. The percentage increase in *thin* and *branched* type supports the result of increased spine length in AC group. These results suggest that motor learning increases the number of spines, implying that synaptogenesis occurs between parallel fibers and Purkinje cell spines. It is also plausible that the increased spine length could have an effect on the enhancement of contact probability between pre and postsynaptic sites in AC animals.

These data have not been published yet because other supplementary or additional experiments are ongoing.

《超高压電子顕微鏡共同利用実験での業績リスト》

発表論文

1. Hama K, Arie T, Katayama E, Martone M, Ellisman MH (2004) Tri-dimensional morphometric analysis of astrocytic processes with high voltage electron microscopy of thick Golgi preparations. *J. Neurocytol.* 33, 277-285.
2. Hidaka, S., Akahori, Y. and Kurosawa, Y. (2004) Dendrodendritic electrical synapses between mammalian retinal ganglion cells. *J. Neuroscience*, Vol 24 (No 47): 9718 – 9732.
3. Lee KJ, Kim H, Kim TS, Park SH, Rhyu IJ (2004) Morphological analysis of spine shapes of Purkinje cell dendrites in the rat cerebellum using high-voltage electron microscopy. *Neurosci. Lett.* 359: 21-24.

学会報告

1. Mun JY, Lee KE, Kim IS, Arie T, Hama K, Muller M, Han SS (2004.5) Electron-Tomography of the adult retinal cells in drosophila melanogaster. 35th Korean Soc. Electron Micros. (Seoul, Korea)
2. Toida K (2004.6) Three-dimensional structure of synaptic organization in the olfactory bulb constructed by chemically-defined neurons. 8th Asia-Pacific Conference on Electron Microscopy (金沢)
3. Mun JY, Lee KE, Kim IS, Arie T, Hama K, Muller M, Han SS (2004.6) Electron-Tomography of the adult retinal cells in drosophila melanogaster. 8th Asia-Pacific Conference on Electron Microscopy (金沢)
4. Hidaka, S., Miyachi, E. and Kato, T. (2004.6) 網膜アマクリン細胞間のギャップ結合. 第 81 回日本生理学会大会 (札幌)
5. Mun JY, Lee KE, Kim IS, T Arie T, Hama K, Muller M, Han SS (2004.6) Electron-Tomography of the adult retinal cells in drosophila melanogaster. 1st KBSI-HVEM user

Workshop (Daejeon, Korea)

6. Hama K (2004.6) HVEM application to biomedical science. 1st KBSI-HVEM user Workshop (Daejeon, Korea)
7. Mun JY, Lee KE, Kim IS, T Arii T, Hama K, Muller M, Han SS (2004.8) Electron-Tomography of the adult retinal cells in drosophila melanogaster. XXII Intern. Congress Entomology (Brisbane, Australia)
8. K. Toida, K. Kosaka, Y. Aika, T. Kosaka (2004.8) Synaptic organization of the rat olfactory bulb constructed by chemically-defined neurons. 16th Intern. Congress of the International Federation of Associations of Anatomists (第16回国際解剖学会議) (京都)
9. Ozawa H, Arii T, Akiyama K, Kawata M (2004.8) Three-dimensional fine structure of dendritic spines of the hippocampal neurons in aged rats as revealed by high voltage electron microscopy. 16th Intern. Congress of the International Federation of Associations of Anatomists (第16回国際解剖学会議) (京都)
10. 西田倫希, 吉村亮一, 陣内浩司, 遠藤泰久, 有井達夫 (2004.9) 神経栄養因子受容体の細胞内構造: 超高压電顕トモグラフィ。日本動物学会第 75 回大会 (神戸)
11. Toida K (2004.10) Structural features of interneurons in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb: 3. calretinin-immunoreactive neurons. 34th Annual meeting of the Society for Neuroscience (San Diego, USA)
12. 菅井尚則 (2004.10) 胃壁細胞に関する23の考察。第50回日本解剖学会北海道・東北地方連合学会 (札幌)
13. Han SS (2004.11) Electron-Tomography of the adult retinal cells in drosophila melanogaster. 36th Korean Soc. Electron Micros. (Seoul, Korea)
14. Kim IS (2004.11) Three dimensional analysis of plastid inclusion body using HVEM. 36th Korean Soc. Electron Micros. (Seoul, Korea)

【 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. 脳磁計を用いたヒトの感覚情報処理過程の研究 (寶珠山 稔)	182
2. 異言語話者による音声の脳内処理過程に関する検討 (大岩昌子)	182
3. Williams 症候群患者における認知機能 (中村みほほか)	183
4. 誘発脳磁場のウェーブレット変換による時間周波数成分可視化に関する基礎研究 (川田 昌武)	183
5. 前頭葉シータ波活動と脳高次機能 (佐々木和夫ほか)	184

1. 脳磁計を用いたヒトの感覚情報処理過程の研究

寶珠山 稔 (名古屋大学医学部保健学科)

感覚情報は刺激の種類 (モダリティー) によらず、感覚受容器の閾値を越えた刺激は末梢から脳へと神経信号として伝えられる。しかし、脳に伝えられた全ての神経信号が意識される情報として処理されるわけではなく、感覚情報処理過程各段階での閾値により最終的に認識され意識に上る情報は実際の刺激とは必ずしも一致していない。

これまで我々は、高い時間分解能と高い精度で空間的情報が得られる生体磁気計測装置 (Magnetoencephalography, MEG) の利点を生かし感覚情報が処理され意識にのぼる課程を明らかにするため、ミリ秒単位の刺激に対応した脳反応の記録を行ってきた。体性感覚誘発脳磁場 (Somatosensory evoked magnetic field, SEF) においては、2つの刺激に1ms以上の時間差があれば脳はそれぞれの刺激に対応して反応しており、それらは第一次感覚野での反応であることが明らかにされた。しかし、実際にヒトが短い時間間隔で与えられた2つの刺激を個々の刺激に弁別するためには2つの刺激に20ms程度の間隔が必要

であった (Hoshiyama et al., 2004)。SEFで観察される成分のうち、刺激を与えてから約20ms後に出現する第一次感覚野での成分が、2発の刺激の間隔が20msより長くなった場合に出現が明らかとなることから、SEF成分のうち意識される刺激の弁別や認知に関連する可能性のある成分とそうではない成分が考えられた。

加えて、本年度は視覚について、識別することのできない早い周波数で顔を含むいくつかの画像を呈示した後の事象関連脳磁場 (Event-related evoked magnetic field, ERF) を記録し、意識されない刺激処理が一定時間後の脳反応に影響を与えるのかについて観察し、その情報処理において顔認知処理の優位性を検出した (Hoshiyama et al., in submission)。これは、意識されない情報の一部が記憶に関連した処理過程に進んでいる可能性を示唆するものであった。

感覚情報処理過程において意識に至る情報処理と記憶処理との関連は重要な要素であり、今後の研究につなげていきたい。

2. 異言語話者による音声の脳内処理過程に関する検討

大岩昌子 (名古屋外国語大学)

【目的】本研究では、日本語に特殊モーラとして存在する長音に注目し、母語に長音を持たないフランス語話者と日本語話者における聴覚野の活動パターンに対する母語の影響を脳磁図 (MEG) を用いて生理学的に検討することを目的とした。なお本研究では、指標としてミスマッチフィールド (MMF) という、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を用いた。

【方法】被験者は日本語を母語とする右利き、聴力健全な成人7名 (男性4名、女性3名) およびフランス語を母語とする右利き、聴力健全な成人6名 (男性5名、女性1名)。日本語話者 (男性) によって発声された無意味単

語「エレペ」および「エレーペ」を聴取している (試行間間隔 800 ms) 際の脳磁場反応を、全頭型 306 チャンネル SQUID 脳磁計 (Neuromag) によって記録した。手続きとして、①「エレーペ」を逸脱刺激 (15%)、「エレペ」を標準刺激 (85%) としたシークエンス、②「エレペ」を逸脱刺激 (15%)、「エレーペ」を標準刺激 (85%) としたシークエンスの2つを設けた。各刺激音に対する加算平均波形を算出し、同一刺激音に対する逸脱刺激-標準刺激間の差分波形から MMNm 成分を同定した。

【結果および考察】日本語話者、フランス語話者ともに逸脱刺激「エレーペ」に対する MMNm (Long 条件)、逸脱刺激「エレペ」に対する MMNm (Short 条件) が左右大脳半球の側頭部に認められた。Short 条件でのダイポール強度 (|Q|) は、フランス語話者で、左右半球間に有意

差は認められなかった。日本語話者においては、左半球におけるダイポール強度 ($|Q|$) が右半球より大きく、Wilcoxon の符号順位検定を用いて比較した結果、半球間に有意な差が確認された ($p < 0.02$)。一方、Long 条件におけるダイポール強度 ($|Q|$) は、フランス語話者では、左半球の

方が右半球より大きい傾向が認められた ($p < 0.08$)。日本語話者では左右半球間に、有意差は認められなかった。このように日本語話者、フランス語話者において差が認められ、母語に弁別的な長母音を持つか持たないかで聴覚野の反応が異なることが示唆された。

3. Williams 症候群患者における認知機能

中村みほ (愛知県心身障害者コロニー 発達障害研究所)

渡辺昌子

柿木隆介

Williams 症候群は7番染色体に欠失を持つ隣接遺伝子症候群であるが、その認知機能のばらつきが大変に大きいことが知られており、認知能力のばらつきを脳機能との関連の元に明らかにすることは患者の療育ならびに QOL の改善の上から重要である。また、同時に、特異な症状をもたらす原因を脳機能の観点から検討する過程においてヒトの脳機能の解明に寄与しうる知見が得られる可能性がある。

我々は従来より、本症候群における視覚認知機能のばらつきに着目し検討を続けている。今年度も視覚認知腹側経路の機能の一つである顔の認知についての検討を継続した。これまでの我々の検討から、本症候群患者においては、正立の顔刺激に対しては健常成人と同様の脳磁場反応が確認されるのに対し、倒立の顔刺激に対しては健常成人に見られるような倒立効果【反応潜時の遅れ】が見られないことが確認されているが、今年度はさらにその点に関して再検討し、従来の結果を追認した。

さらに倒立効果の欠如をもたらす原因として、顔認知

処理にかかわるファクターの関与の度合いのばらつきが影響している可能性があると考え、以下の検討を開始した。顔の認知処理においては顔の構成要素の配置や相互の位置関係の認知処理にかかわるとされる **configural processing** と、構成要素の個々の形の認知処理にかかわるとされる **local processing** が想定され、倒立顔の処理においては **local processing** が優位であると一般に考えられている。そこで、本症候群における顔の認知処理において **local processing** と **configural processing** の関与の程度にばらつきがあるか否か、もしあればいずれが優位であるか、その結果が倒立効果の欠如を説明しうるものであるか否かについて検討を開始した。今年度は第一段階として、顔の構成要素の相互の位置関係の変化を認識することと構成要素の形の変化を認識することの難易を健常成人と対象患者について心理物理実験により比較検討することを開始し、健常成人において **local processing** と **configural processing** が同等の難易度を示す課題の作成に着手している。

4. 誘発脳磁場のウェーブレット変換による時間周波数成分可視化に関する基礎研究

川田 昌武 (徳島大学工学部電子工学科)

本研究課題では、誘発脳磁場に対してウェーブレット変換 (Wavelet Transform) を用いた時間周波数成分可視化を行い、その発現機序について新たな知見を得ることを目的としている。

これまでに、ウェーブレット変換を用いたヒト脳波

(運動関連脳電位) の時間周波数可視化を独自に進めた結果、本手法が脳波の発現機序を解明する上で有効であることを示した。本手法による結果の一例として、閉眼時の右人差し指のタッピング運動開始前後において、発生する周波数 10Hz 前後 (α 波帯域) の成分は、運動前が非

同期, 運動後が同期成分であることを明らかにした。なお, 周波数5Hz前後(θ帯域)の成分は, 運動開始前後ともに同期する成分であり, 運動開始後に減少することを明らかにした。すなわち, この時間周波数成分の運動開始前後の相違により, 運動開始時間が推定できると考えられる。

現在, 脳磁図データに対して本手法を適用するためのプログラム作成(全頭型306チャンネル, 信号発生源特定)を進めている。また, 本研究課題では, 誘発脳磁場発生源の特定精度も重要となることから, 他の信号処理手法(Adaptive Beamformer法, MUSIC法, 独立成分分析法等)の調査, 比較研究も進めている。

5. 前頭葉シータ波活動と脳高次機能

佐々木和夫(岡崎国立共同研究機構)

遠本 徹

これまでの研究から, 前頭葉のシータ波活動が, ヒトやサルのある種の脳高次機能に関係している可能性が示唆されている。このシータ波活動の本質をさらに解明することを目指して研究を行っている。サルの大脳皮質から直接記録を行うと「注意集中」に関連すると解釈可能なシータ波活動が前頭前野9野と前帯状野吻側端32野に観察されるため, ヒトで観察されるシータ波活動も, それに相当する部位の機能を反映している可能性が高い。しかし一言で「注意集中」と言っても多様なものを含んでいると考えられるため, その主たる要素を抽出することが望まれる。それにはヒトを対象として研究すれば, 動物実験におけるような精密な脳活動測定は困難であるが, そのかわりに主観的内観を報告できるというメリットがある。このような観点から, ヒトが各種作業課題を

行う際の脳磁場を解析し, シータ波の発生要因の検討と発生源推定を行った。その結果, 時間の持続感覚や意識集中に関連すると考えられるシータ波活動が脳磁場計測でも認められ, 主観的な集中の度合いとシータ波の発生はよく一致した。またその発生源は前頭葉背外側部および内側部に推定された。これはサルでの結果と矛盾しない。未解明である「意識」と前頭葉シータ波の関連を示唆する結果である。成果の一部は(1)国際誘発電位学会・市民講座(2004年10月6日福岡国際会議場)「脳と禅」講演, (2)臨床神経生理学学会・シンポジウム22・「律動脳波の基礎と臨床」(2004年11月19日ホテル日航東京)で発表した。また, NHK総合「ものしり一夜づけ」(2004年10月26日放送)で紹介された。

【 研 究 会 報 告 】

研究会報告

〔 目 次 〕

1. 糖鎖病態研究会 (代表者：等 誠司 2004年7月8日-7月9日)	189
2. 細胞内シグナル伝達機構の多角的・包括的理解 (代表者：宮脇 敦史 2004年10月7日-10月8日)	197
3. 細胞死の新たな生理機能とそのシグナル伝達 (代表者：三浦正幸 2004年11月29日-11月30日)	206
4. 消化管機能-吸収分泌機能の病態生理 (代表者：鈴木裕一 2004年12月16日-17日)	217
5. 上皮輸送の新たな展開：生体防御の最前線 (代表者：丸中良典 2004年11月16日-11月17日)	227
6. 視知覚への多角的アプローチ-生理, 心理物理, 計算論的アプローチ (代表者：塩入 諭 2004年6月17日-6月18日)	236
7. シナプス可塑性の分子機構研究と精神神経疾患研究の接点を探る (代表者：畑 裕 2004年5月27日-5月28日)	243
8. 痛み情報伝達における ATP およびアデノシンの生理機能 (代表者：井上 和秀 2004年8月26日-8月27日)	253
9. カルシウムシグナリング研究の新潮流 (代表者：山内 卓 2004年11月18日-11月19日)	278
10. 脳磁場計測によるヒト脳機能マッピング 第5回脳磁場ニューロイメージング (代表者：柿木隆介 2004年12月13日-12月14日)	290
11. 高次脳機能研究の新展開 (代表者：高田昌彦 2005年1月17日-1月18日)	305
12. 神経回路の機能の成り立ちに関する学際的研究 (代表者：久保義弘 2004年12月2日-12月3日)	314
13. 第3回 大脳皮質・視床・基底核の神経回路 (代表者：金子武嗣 2004年10月6日-10月7日)	320
14. 生理研研究会「機能的MRI研究会」 (代表者：程 康 2004年11月25日-11月26日)	324
15. 電子位相顕微鏡法の医学的・生物学的応用-Tomography への展開をめざして (代表者：白田信光 2005年3月24日-3月25日)	331
16. DNA 構造を基盤とするゲノム生理学の展開 (代表者：加藤幹男 2004年11月4日-11月5日)	342
17. 唾液腺研究からの生理機能研究, その戦略的展開 (代表者：杉谷博士, 村上政隆 2005年2月28日-3月1日)	352
18. バイオ分子センサー研究会 (代表者：富永真琴 2004年9月9日-9月10日)	360

19. Na チャネルと細胞機能 (代表者：緒方 宣邦 2004年6月24日-6月25日)	369
20. シナプス伝達の細胞分子調節機構 (代表者：小松由紀夫 2004年11月26日-11月27日)	377
21. 心臓血管系イオンチャネルの機能障害に基づく病態発症機構の解明とその治療戦略の構築 (代表者：松浦 博 2005年3月8日-3月9日)	392

1. 糖鎖病態研究会

2004年7月8日－7月9日

代表・世話人：等 誠司（自然科学研究機構・生理学研究所）

所内対応者：等 誠司（自然科学研究機構・生理学研究所）

- (1) サボシン D 変異マウスの作成とその表現型の解析: サボシン D 欠損マウスは腎および小脳にセラミド (HFA/d18:1)が蓄積し, 腎尿細管変性と小脳プルキンエ細胞特異的な神経細胞死を呈する
松田純子¹⁾, 木戸真希子¹⁾, 富永久美子¹⁾, 山崎明子¹⁾,
有富桂子²⁾, 石塚稲夫²⁾, 鈴木邦彦³⁾, 黒田泰弘¹⁾
(¹⁾徳島大学医学部発生発達医学講座小児医学分野, ²⁾帝京大学生化学,
³⁾東海大学未来科学技術共同研究センター・糖鎖工学研究施設)
- (2) 小脳性運動障害マウスの中樞神経組織における糖鎖構造の変化
中北慎一^{1,2)}, 長束俊治¹⁾, 岡本潤¹⁾, 池田一裕³⁾, 長谷純宏¹⁾
(¹⁾大阪大学・大学院理学研究科・化学専攻,
²⁾香川大学総合生命科学実験センター・糖鎖機能解析研究部門,
³⁾自然科学研究機構・生理学研究所・分子神経生理研究部門)
- (3) 脳特異膜貫通型パートタイムプロテオグリカン NGC の構造・発現様式・機能
大平敦彦^{1,2)}, 周尾卓也^{1,2)}, 時田義人¹⁾, 中西圭子¹⁾, 青野幸子¹⁾
(¹⁾愛知県心身障害コロニー・発達障害研究所・周生期学部,
²⁾名古屋大学大学院・医学系研究科・神経生化学)
- (4) Guillain-Barré 症候群と抗糖脂質抗体: 診断的および病因的意義について
楠 進, 森田大児, 平川美菜子 (近畿大学医学部神経内科)
- (5) 糖鎖修飾異常による先天性筋ジストロフィー
遠藤玉夫 ((財) 東京都高齢者研究・福祉振興財団・
東京都老人総合研究所・糖蛋白質研究グループ)
- (6) 造血細胞とラクトサミン糖鎖生物学
中村 充 (産業技術総合研究所・糖鎖工学研究センター・細胞制御解析チーム)
- (7) インフルエンザの糖鎖生物学
鈴木康夫 (静岡県立大学薬学部生化学教室)
- (8) 感染及び免疫をモジュレートする GPI アンカーグリカン
山下克子 (佐々木研究所・生化学部)
- (9) 構造・比較・機能グライコプロテオミクスのための装置およびシステム開発
平林 淳 (産業技術総合研究所・糖鎖構造解析チーム
(併) 香川大学総合生命科学実験センター・糖鎖機能解析 研究部門)
- (10) 2次元 HPLC および cDNA マクロアレイを用いた glyco-genomics 解析と応用
池田一裕 (自然科学研究機構・生理学研究所・分子神経生理研究部門)
- (11) 糖鎖の硫酸化によるがん転移の制御を目指して
本家孝一, 池田直樹 (高知大学医学部遺伝子病態制御学教室)
- (12) がん細胞における異常糖鎖の出現の機構
神奈木玲児 (愛知県がんセンター研究所・分子病態)

- (13) スフィンゴ糖脂質代謝酵素のノックダウンによって観察されるゼブラフィッシュ初期発生系の異常
伊東 信 (九州大学大学院 農学研究院 生物機能科学部門)
- (14) GAG 合成に関わる糖ヌクレオチド輸送体
西原祥子, 神山伸, 須田健 (創価大学, 工学部, 生命情報工学科)
- (15) ヒトの LacdiNAc 合成酵素, β 1,4GalNAc-T3, -T4 のクローニングと機能解析
佐藤 隆, 後藤雅式, 清原克恵, 成松 久
(産業技術総合研究所・糖鎖工学研究センター・糖鎖遺伝子機能解析チーム)
- (16) コア 3 合成酵素のクローニングと機能解析
岩井俊恵¹, 工藤崇^{1,2}, 川本理沙¹, 久保田智巳¹, 梅谷内晶^{1,2}, 川本徹³, 成松久¹
(¹産総研・糖鎖工学研究セ・糖鎖遺伝子機能解析チーム,
²NEDO, ³筑波大学臨床医学系消化器外科)

【参加者名】

辻 崇一 (お茶の水女子大学 糖鎖科学研究教育センター), 鈴木邦彦 (東海大学 未来科学技術共同研究センター), 長谷純宏, 長東俊治, 石水 毅, 青木孝文, 伊東伸子, 藤原由加里, 橋本周子 (大阪大学大学院理学研究科), 中村 充, 平松 淳, 岩井俊恵, 佐藤 隆, 藤井 崇, 成松由規, 佐藤麻衣子 (産業技術総合研究所 糖鎖工学研究センター), 山下克子 (佐々木研究所生化学部), 神奈木玲児 (愛知県がんセンター研究所), 楠 進, 高田和男 (近畿大学医学部神経内科), 森田大児, 平川美菜子 (東京大学大学院医学系研究科), 本家孝一 (高知医

科大学), 西原祥子, 神山 伸 (創価大学工学部), 大平敦彦 (愛知県コロニー発達障害研究所), 鈴木康夫, 青木千恵 (静岡県立大学薬学部), 遠藤玉夫 (東京都老人総合研究所), 伊東 信 (九州大学大学院 農学研究院), 松田純子 (徳島大学医学部), 梶本哲也 (京都薬科大学), 中北慎一 (香川大学総合生命科学実験センター), 田辺和弘 (三菱化学科学技術研究センター), 西巻拓也, 和気弘明, 溝口義人, 渡部美穂, 鳥居知宏, 東 幹人, 石井章寛, 田中謙二, 小野 勝彦, 池一中一裕, 等 誠司 (生理研)

【概要】

ゲノミクス・プロテオミクスに続いて, グライコミクスの時代と言われている。複合糖質の糖鎖発現は, 一連の糖鎖関連遺伝子発現および糖鎖生成/分解酵素の発現分布に左右されるため, その研究は困難な点を多く抱えている。しかし, 本邦の研究者が中心になって糖鎖関連遺伝子のクローニングが進められた結果, 糖鎖発現やその調節機構を遺伝子発現によって理解することができるようになった。さらに, 遺伝子発現を調節することによって糖鎖の発現調節も可能になり, 糖鎖の生物学的意義が次々に解明されている。実際, 複合糖質の糖鎖が生命現象や病態に関与していることを示す知見は多い。例えば今回の研究会でも, 神経筋疾患や感染症などヒトの病気に密接に関係する糖鎖の機能や病態が示され, また糖鎖関連遺伝子の改変マウスで観察される病態が発表された。正常発生にも糖鎖の働きが必須であることは今

や自明のことであり, マウス・ショウジョウバエ・ゼブラフィッシュなどのモデル動物を駆使した糖鎖研究が盛んになってきている。一方でこのような研究が進むにつれ, 糖鎖に関する情報は膨大なものになってきている。ハイスループットな糖鎖 (発現) 解析の手法が待望され, それらの結果を理解するためのバイオインフォマティクスも含む最適な方法の研究開発が進められている。糖鎖生物学の全体像を把握することが益々困難なものになってきている中で, 本研究会は, 糖鎖関連遺伝子のクローニングから糖鎖の微量解析まで, 各方面の専門家が一堂に会して活発な議論と情報交換をする場となっている。今回も, 第一線で活躍している研究者・医師が最新の知見を発表すると同時に, その手法が抱える問題点までも呈示して解決法を探る貴重な会であった。

(1) サポシン D 変異マウスの作成とその表現型の解析: サポシン D 欠損マウスは腎および小脳にセラミド (HFA/d18:1) が蓄積し, 腎尿細管変性と小脳プルキンエ細胞特異的な神経細胞死を呈する

松田純子¹⁾, 木戸真希子¹⁾, 富永久美子¹⁾, 山崎明子¹⁾,
有富桂子²⁾, 石塚稲夫²⁾, 鈴木邦彦³⁾, 黒田泰弘¹⁾

(¹⁾徳島大学医学部発生発達医学講座小児医学分野, ²⁾帝京大学生化学,
³⁾東海大学未来科学技術共同研究センター・糖鎖工学研究施設)

スフィンゴ脂質活性化タンパク質 (サポシン A,B,C,D) は共通の前駆体プロサポシンから誘導される相同性の糖タンパク質で, 多くの疎水性スフィンゴ脂質のリソゾームにおける分解に必須である。サポシン D は *in vitro* で酸性セラミダーゼの活性化タンパク質であるという報告があるが, ヒトでの特異的な欠損症の報告はなく, その生体内での機能は不明である。今回我々はサポシン D 特異的な欠損マウス (Sap-D^{-/-}) を作成し, その表現系を解析した。

Sap-D^{-/-} は生後 2 ヶ月ごろより多尿, 生後 4 ヶ月ごろより運動失調を呈し, 病理学的には, 腎臓では腎尿細管変性, 中枢神経系では, 小脳プルキンエ細胞の選択的脱落が特徴的であった。生化学的には, 腎臓と脳 (特に小脳) において脂肪酸に水酸基のついたセラミド (HFA/d18:1) の蓄積が認められた。以上より, サポシン D は生体内でも酸性セラミダーゼの活性化に関与していること, 生体内における HFA セラミドと細胞死の関連が示唆された。

(2) 小脳性運動障害マウスの中枢神経組織における糖鎖構造の変化

中北慎一^{1,2)}, 長東俊治¹⁾, 岡本潤¹⁾, 池田一裕³⁾, 長谷純宏¹⁾

(¹⁾大阪大学・大学院理学研究科・化学専攻

²⁾現・香川大学総合生命科学実験センター・糖鎖機能解析研究部門

³⁾自然科学研究機構・生理学研究所・分子神経生理研究部門)

【目的】小脳性運動障害マウス的大脑および小脳に発現している糖鎖と正常なマウスに発現している糖鎖との相違点について, ペリジルアミノ化法を用いてその糖鎖構造と発現量について調べた。

【方法および結果】3 週齢の ICR マウス (wild type) と 3 種類の小脳性運動障害マウス (*jimpy*, *staggerer*, *shiverer*) から大脑および小脳を摘出し, それぞれを凍結乾燥した。この凍結乾燥粉末を 100°C で 10 時間ヒドラジン分解を行

い, 糖鎖を切り出した。再 *N*-アセチル化後, ペリジルアミノ化法により蛍光標識し, ペリジルアミノ化糖鎖を得た。得られたペリジルアミノ化糖鎖を陰イオン交換 HPLC によって中性糖画分と酸性糖画分に分離した。酸性糖鎖画分はシアリダーゼ消化後, 再度陰イオン交換 HPLC で分離することでアシアロ糖画分を得た。小脳性運動障害マウスにおいて, 糖鎖の発現量および構造変化は主にコンプレックス型糖鎖で見られた。

(3) 脳特異膜貫通型パートタイムプロテオグリカン NGC の構造・発現様式・機能

大平敦彦^{1,2)}, 周尾卓也^{1,2)}, 時田義人¹⁾, 中西圭子¹⁾, 青野幸子¹⁾

(¹⁾愛知県心身障害コロニー・発達障害研究所・周生期学部,

²⁾名古屋大学大学院・医学系研究科・神経生化学)

プロテオグリカンは脳における主要な細胞表面複合糖

質であり, 近年, 脳の発達や損傷修復に関与する分子と

して注目されている。私達は、脳神経回路の形成機構を研究している過程で、新規な膜貫通型コンドロイチン硫酸プロテオグリカンを発見し、ニューログリカン C (NGC) と名付けた。NGC は、中枢神経特異的に発現しており、細胞外領域に酸性アミノ酸のクラスターと1個のEGF様ドメインを持つ。また、1本のコンドロイチン硫酸糖鎖を共有結合している。興味深いことに、小脳と網膜にお

いては、発達に伴い、プロテオグリカン型からコンドロイチン硫酸糖鎖を持たない非プロテオグリカン型へと構造が変化する。NGCの細胞外領域には神経突起伸長を促進する活性があることもわかった。遺伝子改変により作製した NGC 発現低下マウスには行動異常が認められたことから、NGCは脳の機能制御に関わる分子であることが示唆された。

(4) Guillain-Barré 症候群と抗糖脂質抗体：診断的および病因的意義について

楠 進, 森田大児, 平川美菜子 (近畿大学医学部神経内科)

Guillain-Barré 症候群 (GBS) は、急性の運動麻痺をきたす末梢神経障害であり、感染が先行することが多く、急性期を過ぎれば回復に向かう単相性の疾患である。しかし症状のピーク時には寝たきりとなったり、呼吸筋麻痺をきたしてレスピレータ管理が必要になる例もある。治療として、急性期の血漿交換と免疫グロブリン大量静注 (IVIg) が有効であるが、早期診断・早期治療開始がきわ

めて重要である。近年 GBS の急性期に高率 (約 60%) に抗糖脂質抗体が上昇することがわかり、補助診断マーカーとして用いられている。抗体産生の機序として、先行感染因子のもつ糖鎖に対する免疫反応が考えられている。ある種の抗体は、対応する抗原糖脂質の局在部位に特異的に結合して臨床病型を規定する。今後さらに未特定の抗原に対する抗体が見出されると予想される。

(5) 糖鎖修飾異常による先天性筋ジストロフィー

遠藤玉夫

(財団法人東京都高齢者研究・福祉振興財団 東京都老人総合研究所 糖蛋白質研究グループ)

最近特定の糖蛋白質、 α -ジストログリカンの *O*-Man 型糖鎖異常が、ある種の先天性筋ジストロフィーの原因であることが分かったので紹介したい。

我々は、これまでに *O*-Man 型糖鎖の合成に関わる protein *O*-mannose β 1,2 N-acetylglucosaminyltransferase (*POMGnT1*) の遺伝子が、先天性の筋ジストロフィーに眼奇形、神経細胞移動障害を伴う常染色体劣性遺伝病である muscle-eye-brain (MEB) 病の原因遺伝子であることを明らかにした。一方、MEB と類似の病態を示す Walker-Warburg syndrome (WWS) の原因遺伝子 *POMT1*

(protein *O*-mannosyltransferase 1) は、酵母の *O*-Man 転移酵素に相同性があることから糖転移酵素であろうと予想されていたが、詳細は不明であった。最近我々は、*POMT1* 及びもう一つのホモログ *POMT2* は *O*-Man 転移酵素であり、活性発現に *POMT1*-*POMT2* 複合体形成が必要であることを示した。

以上より、WWS と MEB は *O*-Man 型糖鎖不全であり、神経細胞移動障害を伴う筋ジストロフィーの発症機序に *O*-Man 型糖鎖が深く関わると考えられる。

(6) 造血細胞とラクトサミン糖鎖生物学

中村 充 (産業技術総合研究所・糖鎖工学研究センター・細胞制御解析チーム)

ヒト造血細胞では、2 型のラクトサミン (繰り返し) 構造が発現している。本構造は、糖タンパク質糖鎖・糖脂質糖鎖の骨格構造として生合成され、末端がルイス X・シアリルルイス X・硫酸基など、機能的糖鎖構造で修飾されている。本骨格構造は分岐しやすく、末端機能的糖

鎖構造が多価性 (ポリバレンシー) を示す。分岐することによって、対応する受容体との結合力が増している。今回は、ラクトサミンに関する我々の最近のトピックを紹介したい。

(7) インフルエンザの糖鎖生物学

鈴木康夫 (静岡県立大学薬学部)

インフルエンザは地球上に広く分布する人獣共通感染症であり、病原体であるインフルエンザウイルスの自然宿主はカモなどの野生水トリである。カモにはインフルエンザウイルスヘマグルチニン亜型 (H1~H15) およびノイラミニダーゼ亜型 (N1~N9) が全て貯留されており、カモのウイルスは、自然界で偶発的に他の動物に入り込む。今までヒトの間で世界的な大流行を起こしたインフルエンザウイルスは、ヒトと他の動物インフルエンザ

ウイルスとの遺伝子再集合体であり、ウイルスに大きな抗原変異がもたらされている。また、ウイルスは遺伝子点変異も常に起こしており、ウイルスが宿主細胞内で増殖すると同時に新しい変異ウイルスが生まれてしまう仕組みがある。私達は、ウイルスの変異や宿主の壁を越える機構が、シアル酸を含む糖鎖と深く関わることを見出して来た。今回、インフルエンザの流行やウイルスの宿主間伝播と糖鎖生物学との深い関わりを述べる。

(8) 感染及び免疫をモジュレートする GPI アンカーグリカン

山下克子 (佐々木研究所)

グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカーのグリカンは $\text{EtNH-PO}_3^- \rightarrow 6\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 4\text{GlcN-Inositol-PO}_3^-$ を基本骨格として生物界に広く存在することが知られている。我々は最近、ヒト胎盤アルカリホスファターゼの GPI アンカーグリカンの 2 番目のマンノースに $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow \text{PO}_3^-$ 残基が結合しているこ

とを見出した。この GPI アンカーの側鎖は少なくとも哺乳動物に共通して存在し、ある種の細菌感染のトリガーとなっていることを明らかにした。また、一連のサイトカインの中で、 $\text{TNF-}\alpha$ 及び IL-18 が GPI アンカーのグリカン鎖を認識し、生理活性をモジュレートしていることを紹介する。

(9) 構造・比較・機能グライコプロテオミクスのための装置およびシステム開発

平林 淳

(産業技術総合研究所・糖鎖構造解析チーム (併) 香川大学総合生命科学実験センター・糖鎖機能解析研究部門)

構造グライコミクスはタンパク質の翻訳後修飾として

起こる糖鎖修飾に関し基盤的情報を提供する。すなわち、

グライコプロテオミクスのための装置, およびシステム開発によって, ゲノム上にコードされるどの遺伝子の産物が (ゲノム情報), そのアミノ酸配列のどの位置に (位置情報), どのような糖鎖修飾が施されるのかを (構造情報) 精密かつ, ハイスループットに決定することが可能に成りつつある。また, 糖鎖構造を高速, 高感度に同定,

ないしプロファイリングするための方策として, 物理 (MS), 化学 (LC), ないし生化学的手法 (レクチン親和力) を選択できる。これらの手法は相補的であるため, 互いを効率よく組み合わせることが得策である。糖鎖機能を網羅的に解明する機能グライコミクスの本格稼働を睨み, 構造, および比較グライコミクスについて述べる。

(10) 2次元 HPLC および cDNA マクロアレイを用いた glyco-genomics 解析と応用

池中 一裕, 石井 章寛, 等 誠司

(自然科学研究機構・生理学研究所・分子神経生理研究部門)

これまでの糖鎖研究は主に生化学および細胞生物学手法を用いて行われ, 遺伝子のクローニングによって発現臓器, 基質特異性などが, 2次元 HPLC を用いて各種臓器, 糖タンパク質上の糖鎖構造解析が行われてきた。この結果, 糖鎖が (1)細胞間相互作用や外来性刺激の認識分子として機能する事, (2)個体の発生・分化, 組織形成とその維持などに必要である事, (3)N-結合型糖鎖の発現は個体差なく空間的, 時間的に非常に厳密に保たれている事などが明らかとなった。しかしながら, その制御機構, 生理学的意義については解明されてない。当研究室では糖鎖発現制御機構を解明するために2次元 HPLC システ

ムを用いた糖鎖構造解析系ならびに cDNA マクロアレイを用いた糖鎖修飾関連遺伝子の網羅的解析系を確立した。これらの解析系を用いる事で, 糖鎖生合成系の酵素遺伝子の発現および発現糖鎖にいくつかの相関関係がある事を見出した。例えば, Glucosidase I, II, ER-mannosidase および Goldi-mannosidase IB といった生合成経路の一連の酵素は同様の発現制御を受けている事が明らかとなった。現在, 我々は種々の検体の糖鎖発現解析ならびに糖鎖修飾関連遺伝子の発現解析を行っており, 本研究会にて紹介したい。

(11) 糖鎖の硫酸化によるがん転移の制御を目指して

本家 孝一, 池田 直樹

(高知大学医学部遺伝子病態制御学教室)

がんの血行性転移の最初のステップであるがん細胞の接着には, 血管内皮細胞上に発現する E-セレクトインとがん細胞上の糖鎖リガンドとの結合が重大な役割を果たす。この糖鎖リガンドとして, シアリルルイス a (CA19-9 抗原, sLe^a) とシアリルルイス x (sLe^x) が知られている。一方, ガラクトースの3位にシアル酸の代わりに硫酸基のついた 3'-sulfoLe^a や 3'-sulfoLe^x が正常の大腸組織や肺組織に存在する。シアリルルイス抗原とスルホルイス抗原を合成

するシアル酸転移酵素と硫酸転移酵素が競合し, がん化によって相対的な硫酸転移酵素の勢力が弱まることによって, シアリルルイス抗原ができるようになると想像させる。我々は, シアリルルイス抗原を高発現しているがん細胞に, 硫酸転移酵素 GP3ST の遺伝子を導入することにより, がん細胞表面の糖鎖構造を正常化させ, がん転移を制御することを目指している。

(12) がん細胞における異常糖鎖の出現の機構

神奈木玲児 (愛知県がんセンター研究所・分子病態)

細胞が悪性化するとさまざまな糖鎖異常が出現することは古くから知られている。悪性細胞に出現する異常糖鎖に機能上の病理的意義があるのかどうか、また、悪性細胞にどのような機構で糖鎖異常がもたらされるのか、が解明されるべき問題点である。悪性細胞の異常糖鎖の機能としては、細胞接着活性を持ち血行性転移に関与する、という一応の解答が出てきている。また最近では、腫瘍巣の血管形成への関与や、免疫監視における機能も

指摘され始めている。一方、悪性細胞に糖鎖異常をもたらすメカニズムについてはまだわからないことが多い。細胞の悪性化に伴う糖鎖変化の機構として古くから「糖鎖不全現象 *incompletesynthesis*」と「新規糖鎖の合成誘導 *neo-synthesis*」という二つのメカニズムが知られている。この糖鎖病態研究会の開かれる機会に、箱守博士らによって提唱されたこの古典的なコンセプトのもつ今日的な意味について考えてみたい。

(13) スフィンゴ糖脂質代謝酵素のノックダウンによって観察されるゼブラフィッシュ初期発生系の異常

伊東 信 (九州大学大学院 農学研究院 生物機能科学部門)

スフィンゴ糖脂質は、ゴルジ装置において脂質アンカーであるセラミドに単糖が順次転移することで合成された後、主として形質膜に輸送され、最終的にはリソソームに運ばれてエキソグリコシダーゼおよびセラミダーゼにより分解される。形質膜では、コレステロール依存性あるいは非依存的にミクロドメイン (*Raft*, *DIM*, *DIG*, *GEM*) を形成し、細胞間、細胞内シグナルの伝達、調節に重要

な役割を果たしている。スフィンゴ糖脂質の分解・合成の異常は、生物学的にも重大な機能異常を惹起すると考えられ、実際に幾つかの遺伝的代謝疾患が知られている。今回、スフィンゴ糖脂質の合成、分解酵素を特異的にノックダウンした時のゼブラフィッシュ初期発生系の異常について報告する。

(14) GAG 合成に関わる糖ヌクレオチド輸送体

西原祥子, 神山伸, 須田健 (創価大学, 工学部, 生命情報工学科)

合成されたタンパク質はゴルジ装置で、様々な糖転移酵素による糖鎖修飾を受ける。プロテオグリカンも例外ではなく、ゴルジ装置で、グリコサミノグリカン鎖が付加される。しかし、糖転移酵素の基質となる多くの糖ヌクレオチドや硫酸転移酵素の基質である PAPS は細胞質で合成され、それらが、糖鎖付加の場であるゴルジ装置内腔に供給されるためには、糖ヌクレオチド輸送体が必要となる。これらも、また、糖鎖合成を制御していると考えられる。

我々は、GAG 付加の各々のステップに関与する 2 種の輸送体を同定した。一つは、ショウジョウバエ *frc* のヒトホモログとして同定した *hfrcl* であり、UDP-GlcNAc 輸送活性を示し、ヘパラン硫酸鎖伸長へ関与が認められた。他は、硫酸転移酵素の基質である PAPS の輸送活性を示し、PAPS 輸送体と同定された。これらの 2 種の輸送体について、病態と関連する可能性をも含めて議論する。

(15) ヒトの LacdiNAc 合成酵素, β 1,4GalNAc-T3, -T4のクローニングと機能解析

佐藤 隆, 後藤雅式, 清原克恵, 成松 久

(産業技術総合研究所・糖鎖工学研究センター・糖鎖遺伝子機能解析チーム)

LacdiNAc 構造 (GalNAc β 1,4GlcNAc-) は黄体形成ホルモン (LH) や甲状腺刺激ホルモン (TSH)などの糖タンパク質ホルモンの *N*-結合型糖鎖に特異的に報告されている糖鎖構造であり, ホルモンの代謝において重要な役割を果たしている。

我々は β 1,4-結合モチーフをクエリー配列にデータベースを検索し, LacdiNAc 構造を合成する2つの糖転移酵素を見いだした。これらの酵素は, それぞれ999アミノ酸, 1039アミノ酸から構成されていたが, コンドロイチン硫酸合成酵素のように複数の糖転移酵素ドメインを持ってはいなかった。糖転移酵素の触媒部位と予想されるのはC末端側3分の1の領域で, β 1,4-結合モチーフとDXDと同じ機能を持つと予想されるDLHモチーフが存

在したが, N末端側3分の1の領域は既知のあらゆるアミノ酸配列と相同性を示さなかった。

これらのリコンビナント酵素をHEK293細胞で発現させ, 基質特異性を解析した結果, とともに β 1,4結合でGalNAcを転移し, GalNAc β 1,4GlcNAc-構造を合成する酵素であることがわかった。さらに様々な基質に関して活性を検討したところ, 2本鎖の*N*-結合型糖鎖やCore3やCore6などの*O*-結合型糖鎖も基質とした。これらの酵素は発現組織が大きく異なり, β 4GalNAc-T3は胃や大腸で遺伝子発現が見られたのに対し, β 4GalNAc-T4は脳や卵巣で高い発現が見られた。このことからLHやTSHに報告されているLacdiNAc構造は β 4GalNAc-T4が作っている可能性が考えられた。

(16) コア3合成酵素のクローニングと機能解析

岩井俊恵¹, 工藤崇^{1,2}, 川本理沙¹, 久保田智巳¹, 梅谷内晶^{1,2}, 川本徹³, 成松久¹

(¹産総研・糖鎖工学研究セ・糖鎖遺伝子機能解析チーム, ²NEDO, ³筑波大学臨床医学系消化器外科)

UDP-*N*-acetylglucosamine : GalNAc-peptide β 1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase (β 3Gn-T)によって合成される*O*-グリカンのcore3構造 (GlcNAc β 1-3GalNAc α 1-serine/threonine) は, ムチン生合成において重要な前駆物質である。我々がクローニングした β 3Gn-T6は, その基質特異性, 反応生成物の結合様式, 組織発現分布から, core3合成酵素であると結論した。次いで, 抗 β 3Gn-T6モノクローナル抗体 (G8-144 Mab) を作製し, 胃腸における β 3Gn-T6の発現を免疫組織染色法により調べたところ, 正常組織において β 3Gn-T6は上皮細胞のゴルジ領域に強い染色が見られたが, 癌組織での発現は顕著に低下して

いた。さらに家族性大腸ポリポーシス (FAP) における発現解析の結果, β 3Gn-T6が良性和悪性の境界病変を識別するマーカーとなりうる可能性が示された。また, Caco-2細胞の分化誘導時における β 3Gn-T6の発現量を調べた結果, β 3Gn-T6の発現は分化・脱分化の過程で厳密に調節されていることが示唆された。今後は, core3構造をキャリアーする蛋白の同定および糖タンパク質としての機能解析が課題である。本研究は, 経済産業省の産業科学技術研究開発制度の一環として, 新エネルギー・産業技術総合開発機構より委託を受けて実施したものである。

2. 細胞内シグナル伝達機構の多角的・包括的理解

2004年10月7日-10月8日

代表・世話人：宮脇 敦史（理化学研究所脳科学総合研究センター）

所内対応者：河西 春郎（生体膜部門）

- (1) Bリンパ球における Ras-Erk 活性化メカニズム
黒崎 知博（理化学研究所・免疫・アレルギー科学総合研究センター）
- (2) nNOS-GFP transgenic マウスの作製による腎マクラデンサ細胞機能の研究
安岡 有紀子, 鈴木 喜郎, 河原 克雅（北里大学医学部）
- (3) 生きている細胞内の1分子イメージングと分子定量解析
徳永 万喜洋（理化学研究所・免疫・アレルギー科学総合研究センター）
- (4) 2光子グルタミン酸法を用いた単一巢パインカルシウムシグナルのスパイン形態依存性の解析
野口 潤, 松崎 政紀, 河西 春郎（生理学研究所）
- (5) 一酸化窒素 (NO) シグナルによる神経活動でコーディングとシナプス可塑性: NO 可視化を用いたアプローチ
柿澤 昌, 並木 繁行, 廣瀬 謙造, 飯野 正光（東京大学大学院医学系研究科・細胞分子薬理）
- (6) 神経ステロイドによるシナプス可塑性の誘導: 膜電位イメージングによる解析
曾我部 正博, 陳 玲（名古屋大学大学院医学系研究科）
- (7) 破骨細胞プロトンシグナルの電位依存性調節機構
久野 みゆき, 酒井 啓, 川脇 順子, 森 啓之, 森畑 宏一, 翁 昌子
- (8) 心筋細胞における生理的な3量体G蛋白質サイクルモデルの構築
～ G蛋白質制御カリウムチャネルの電流特性より～
石井 優, 鈴木 慎悟, 倉智 嘉久（大阪大学大学院医学系研究科）
- (9) 小脳登上線維 - プルキンエ細胞シナプスの生後発達における電位依存性カルシウムチャネルの役割
橋本 浩一, 狩野 方伸（金沢大学大学院医学系研究科）
- (10) TRPM2 チャネルによるシグナル・生理応答制御
原 雄二, 山本 伸一郎, 片野 正展, 木内 祐二, 清水 俊一, 森 泰生
（京都大学大学院工学研究科）
- (11) マクロファージに発現する TRPV2 チャネル
長澤 雅裕, 小島 至（群馬大学生体調節研究所）
- (12) in vivo 血小板活性化機構のリアルタイム解析
最上 秀夫, 林 忠毅, 村上 祐介, 浦野 哲盟（浜松医科大学）
- (13) DGK と PKC の分子機能協働の解析
齋藤 尚亮, 白井 康仁, 山口 泰人, 松原 岳大
（神戸大学バイオシグナル研究センター）
- (14) PLCzeta と Ca^{2+} オシレーション
宮崎 俊一, 河内 全, 尾田 正二, 依田 綾子, 白川 英樹, 淡路 健雄
（東京女子医科大学）
- (15) Calyx of Held におけるシナプス小胞エンドサイトーシスの分子機構
山下 貴之, 髭 俊秀, 高橋 智幸（東京大学大学院医学系研究科）
- (16) 細胞内シグナル伝達機構の多角的・包括的理解
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】

黒崎 知博 (理研・免疫アレルギー科学総合研究センター), 宮崎 俊一 (東京女子医大), 伊藤 昌彦 (東京女子医大), 小島 至 (群大生体調節研究所), 長澤 雅裕 (群大生体調節研究所), 最上 秀夫 (浜松医大), 鈴木 優子 (浜松医大), 斎藤 尚亮 (神大バイオシグナル研究センター), 足立 直子 (神大自然科学研究科), 笈 朋子 (神大自然科学研究科), 河原 克雅 (北里大・医), 安岡 有紀子 (北里大・医), 久野 みゆき (市大大院医学研究科), 飯野 正光 (東大大院医学系研究科), 柿澤 昌 (東大大院医学系研究科), 林 健二 (東大大院医学系研究科), 高橋 智幸 (東大大院医学系研究科), 髭 俊秀 (京大大院理学研究科) 齋藤 直人 (東大大院医学系研究科), 堀 哲也 (東大大院医学系研究科), 山下 貴之 (東大大院医学系研究科) 渡邊 博康 (東大大院医学系研究科), 倉智 嘉久 (阪大大院医学系研究科), 石井 優 (阪大大院医学系研究科), 曾我部 正博 (名大大院医学研究科), 狩野 方伸 (金沢大大院医学系研究科), 橋本 浩一 (金沢大大院医学系研究科), 原 雄二 (京大大院工学研究科), 清中 茂樹 (京大大院工学

研究科), 三木 崇史 (京大大院工学研究科), 片野 正展 (京大大院工学研究科), 加藤 賢太 (京大大院工学研究科), 徳永 万喜洋 (理研・免疫アレルギー総合研究センター), 廣島 通夫 (理研・免疫アレルギー総合研究センター), 吉田 希美枝 (理研・免疫アレルギー総合研究センター), 宮脇 敦史 (理研脳科学総合研究センター), 水野 秀昭 (理研脳科学総合研究センター), 永井 健治 (理研脳科学総合研究センター), 宮内 崇之 (理研脳科学総合研究センター), 河西 春郎 (生理研), 岸本 拓哉 (生理研), 根本 知己 (生理研), 高橋 倫子 (生理研), 松崎 政紀 (生理研), 兒島 辰哉 (生理研), 木瀬 環 (生理研), 安松 信明 (生理研), 本蔵 直樹 (生理研), 畠山 裕康 (生理研), 野口 潤 (生理研), 緒方 衝 (生理研), 東島 眞一 (統合バイオ), 山田 早織 (東京薬科大), 梶谷 仁志 (東京薬科大), 加勢 大輔 (生理研), 川口 泰雄 (生理研), 山下 晶子 (日大), 一戸 紀孝 (理研), 宮田 麻理子 (生理研), 富永 真琴 (生理研), 富樫 和也 (生理研), 西野 敦雄 (生理研), 前島 隆司 (生理研)

【概要】

細胞内では, 外界刺激を受けて, 様々のカスケード反応が起こり, 細胞の分化, 移動, 分裂などの現象が実現される。こうした細胞内シグナル伝達系を多角的かつ包括的に理解するためには, ここに空間と時間軸を導入しなければならない。各事象が空間的, 時間的に巧妙に制御されているからである。また, 生化学, 遺伝子, バイオイメージングなどの技術を総動員し, さまざまな分野にまたがる知識をもとに議論することが重要である。

日本における細胞内シグナル伝達の研究は, 多くの研究者がそれぞれの研究の目的に適した, 異なった細胞(例えば神経細胞, 上皮細胞, 免疫細胞等)を用いて業績を挙げており, 国際的にも高く評価されている。しかしな

がら, 各研究者それぞれが異なる細胞を用いて専門的な研究を行っているがゆえに他の研究システムを用いての研究の成果, 及び異なった視点に立脚することが困難であり, 学際的情報, 及び学際的研究の重要性が強く望まれている。本研究会は細胞内シグナル伝達の研究において, 問題点, 課題点を多様な研究システム・研究視点から討論して解決すべきアプローチを見出していこうとして企画した。

その結果, 抄録にあるように, 分野を異にする多数の研究室から新しい未発表の成果の発表が積極的に行われ, それに対して活発な討論, 意見交換がなされ, 新しい研究の方向性をつかむ絶好の機会となった。また, 各研究室から多くの若手の参加があり深夜まで議論が続けられた。

(1) B リンパ球における Ras-Erk 活性化メカニズム

黒崎 知博 (理化学研究所・免疫・アレルギー科学総合研究センター・分化制御研究グループ)

ホスホリパーゼ (PLC)- γ 2 は PIP2 を水解して IP3 と DAG を産生する酵素であり, この酵素のノックアウトマ

ウスの解析より PLC- γ 2 が B リンパ球の分化・免疫応答に重要な役割を担っていることが明らかにされてきた。従っ

て BCR シグナルにおいて PLC- γ 2 の下流で、どのようなシグナル経路が形成され、その経路の総和として、どのような細胞反応が生じるかの研究の重要性はいうまでもない。

モデル B リンパ球 DT40 を用いて、まず、私たちは、Ras の活性化に従来考えられていた GEF ファミリーである Sos

とは異なり、主として RasGRP3 が用いられていることをあきらかにした。また、結合することにより、細胞膜へリクルートされ、リクルートされた RasGRP3 は PKC により、133 番目の Thr 残基がリン酸化されることにより、はじめて活性化されるというメカニズムを明らかにした。

(2) nNOS-GFP transgenic マウスの作製による腎マクラデンサ細胞機能の研究

安岡 有紀子, 鈴木 喜郎, 河原 克雅 (北里大学医学部・生理)

腎ネフロンは、ヘンループを経て元の糸球体に戻ってくる。この糸球体に接する部分の尿細管上皮（遠位直尿細管の血管極に面する部分）の細胞は、背が高く核が密集して見えるため緻密班と呼ばれている。緻密班は通過する濾液の流量を Cl⁻濃度により感知し、輸入細動脈を収縮/拡張させることにより糸球体濾過量をコントロールしている。緻密班細胞には COX-2, neuronal NOS (nNOS) の特異的発現も知られているが、腎尿細管細胞に占める細胞数が極端に少なく単離法が確立していないた

め、シグナル伝達の機序に未解明の部分が多い。緻密班の生理機能を隣接する他の細胞との相互関係を維持しながら調べるためには、腎スライスあるいは単離ネフロン状態で緻密班を同定する必要がある。本研究では、緻密班が nNOS を特異的に強発現していることに着目し、nNOS promoter+EGFP+IRES+Cre を含む vector (pNEIN) を構築し、培養細胞およびトランスジェニックマウス作製により、緻密班細胞を GFP で標識することを試みた。

(3) 生きている細胞内の1分子イメージングと分子定量解析 —1分子イメージングによる細胞質 - 核間輸送の分子機構—

徳永 万喜洋 (国立遺伝学研究所, 総研大, 理化学研究所・免疫センター)

生きている細胞での蛍光 1 分子イメージングおよび分子定量解析に必要な顕微鏡技術を開発している。例えば、マイクロインジェクションで、現在観察している細胞を狙い打ちして蛍光標識タンパク質を導入し、そのまま 1 分子イメージングすることもできている。

今本尚子博士 (遺伝研, 現: 理研・細胞核機能) との共同研究により、細胞質-核間輸送の 1 分子イメージングと定量解析を行ってきた。細胞質-核間輸送に関しては、これまでセミインタクト細胞を用い、1 分子イメージングによる分子機構の定量解析、1 細胞レベルでの輸送速度定量により分子機構を明らかにしてきた。これらの知見をもとに、細胞質-核間輸送の分子機構に関するモデルが考えられた。弱い結合部位は約 100 個の分子を集め、局所的に分子濃度を高めることにより、選択的な通過でありながら十分に速い速度が必要であるという、一見相反する機

能を実現している。約 8 個の分子を結合できる強い部位は、G タンパク質 Ran-GTP や輸送基質の有無により反応性が変化するとともに、Ran-GTP により反応がおこって核内に荷物を降ろす。

細胞レベルの定量解析により、細胞内での分子濃度を nM から μ M のレンジで計測することができる。核内移行の輸送活性を蛍光像から直接計測したところ、以上の 1 分子計測で求めた値から計算される活性値とよく一致した。

さらに、基質濃度の変化による解析を進め、生細胞での 1 分子イメージングとの比較を行い、分子機構を解明している。

これらの、生細胞における分子イメージング・定量解析技術を用い、例えば細胞膜における情報伝達の場の可視化、刺激による動的な変化など、シグナルの動的な変化を分子レベルで定量的に明らかにしてゆきたい。

(4) 2光子グルタミン酸法を用いた単一スパインカルシウムシグナルのスパイン形態依存性の解析

野口 潤, 松崎 政紀, 河西 春郎 (生理学研究所・生体膜部門)

大脳錐体細胞スパインの NMDA 受容体 (NMDAR) の発現及び NMDAR による Ca^{2+} シグナルのスパイン形態依存性を2光子グルタミン酸法及び2光子 Ca^{2+} 画像解析により海馬急性スライス標本の CA1 錐体細胞で調べた。NMDAR の発現は大きいスパインほど大きいですが、AMPA 受容体とは異なり小さいスパインにも発現が見られ、小さいスパインは所謂サイレントシナプスにほぼ該当することがわかった。大きいスパインでは NMDAR 発現量は大きいにも関わらず、 Ca^{2+} 上昇は小さかった。これはスパイン頭部体積による Ca^{2+} の稀釈効果によるのではない。何故ならば、スパインの Ca^{2+} 上昇に際しては Ca^{2+} がネックを介して本幹に流出するのが観察され、樹状突起のスパイン基部でも Ca^{2+} 上昇が見られたが、この本幹の Ca^{2+} 上昇は逆にスパイン頭部が大きい程大きかった。即

ち、スパインネックの形態によって決まる「ネックの Ca^{2+} コンダクタンス」は頭部が大きくなるにつれて（その二乗に比例して）増大し、この流出の増大により、頭部の Ca^{2+} 上昇が減少し、基部の Ca^{2+} 上昇が増加すると考えられた。ネックの形態は頭部よりも更に多様性に富み、ネック形態はスパインの Ca^{2+} シグナルを定量的に調節している決定的な因子である。更に、スパイン Ca^{2+} コンダクタンスは長期増強に伴うスパイン頭部長期増大に際して増大し、ネックも可塑的であることがわかった。また、スパイン頭部増大の長期化はネックが初期に小さいものに多く観察され、スパインネックはシナプス長期可塑性の発現や定着の調節因子である可能性もでてきた。この様にスパインの頭部やネックの形態はスパイン機能や可塑性の重要な決定因子であることが示唆された。

(5) 一酸化窒素 (NO) シグナル系による神経活動のデコーディングとシナプス可塑性： NO 可視化プローブを用いたアプローチ

柿澤 昌, 並木 繁行, 廣瀬 謙造, 飯野 正光 (東京大学大学院医学系研究科・細胞分子薬理)

一酸化窒素 (NO) はガス性の細胞間シグナル伝達因子で、様々な生命現象への関与が示唆されている。中枢神経系においては、シナプス可塑性などの神経機能調節への NO の関与が示唆されているが、神経活動依存的な NO 放出の時空間的挙動については、多くの点で不明である。そこで我々は、NO と特異的に結合する可溶性グアニル酸シクラーゼのヘム結合領域 (Heme-Binding Region) と GFP を融合させた蛍光性 NO 可視化プローブ、HBR-GFP を作成し、神経系における NO シグナル系のダイナミクスの解明を目指した。生後3週齢のマウス小脳プルキンエ細胞に、Sindbis virus を用いて HBR-GFP 遺伝子を導入し、急性スライス標本上で、HBR-GFP の発現が見られるプルキンエ細胞に入力する平行線維にバースト刺激 (BS: 5 pulses at 50 Hz) を繰り返し与えたところ (60 BS at 1 Hz)、HBR-GFP 蛍光強度の上昇が見られた。このシ

グナル上昇は、NO 合成酵素阻害薬、L-NAME により阻害されることから、平行線維刺激による NO 放出によるものと考えられる。蛍光強度上昇が見られた領域は、細胞内 Ca^{2+} シグナル上昇から推測されるシナプス入力領域とほぼ一致しており、NO はシナプス限局的にシグナルを伝達することが示唆された。また、この NO 放出刺激により、平行線維-プルキンエ細胞シナプスにおいて、刺激されたシナプス特異的に LTP が誘導された。さらに、BS 間の間隔を変えて刺激したところ、NO 放出量には、1Hz をピークとした二相性の周波数依存性が見られ、NO 放出が見られない周波数の刺激では、平行線維シナプス LTP も誘導されなかった。以上の結果から、二相性の周波数依存的な NO 放出制御機構を通じて、NO シグナル系は神経活動をデコードし、シナプス可塑性を入力特異的に制御していることが示された。

(6) 神経ステロイドによるシナプス可塑性の誘導：膜電位イメージングによる解析

曾我部 正博^{1,2,3}, 陳 玲² (1名古屋大学大学院医学系研究科・細胞生物物理, ²科技振・国際共同・細胞力覚プロジェクト, ³生理学研究所・分子生理系・細胞内代謝)

いくつかの神経ステロイドは、核内受容体を經由せずに、細胞膜受容体に急性に作用して、シナプス伝達を修飾することが明らかになりつつある。海馬での合成が知られている硫酸プレグネノロン (PREGS) を海馬に注入すると、若齢ラットの学習能力の促進、加齢マウス、ラットの記憶学習の改善、あるいはβアミロイド負荷ラットでみられる学習能力低下の防止効果などが報告されている。しかしながら、そのシナプス機構は不明で、PREGS の標的受容体も定まっていない。最近我々は、ラット脳海馬スライスに PREGS を急性投与すると、歯状回のシナプス伝達に用量依存的な長期増強 (LTP) が誘導されることを発見した。本研究では、膜電位感受性色素 (RH482, RH155) を負荷した 4 週齢ラット海馬スライスを用いて、歯状回顆粒細胞のシナプス後電位 (EPSP) と、その周囲に分布するグリア細胞の膜電位 (SIGD, 前終末からのグルタミン酸放出量を反映する)

をイメージングし、PREGS によるシナプス長期増強の誘導機構を薬理的に解析した。その結果、PREGS による長期増強は、少なくとも短期と中長期の 2 段階からなることが判明した。EPSP の短期増強は NMDA 受容体阻害剤 (AP5) の影響を受けず、低 Ca^{2+} の環境では抑制され、グリア細胞の膜電位増強を伴うことが判明した。また、この短期増強は Ca^{2+} 透過性 $\alpha 7$ ニコチン受容体の選択的阻害剤 (α -BTX) によって抑制された。PREGS は前終末の $\alpha 7$ ニコチン受容体の活性化と終末内 Ca^{2+} 上昇を介して、グルタミン酸放出機構の感作を導き、シナプス伝達の短期増強を誘導する可能性が強く示唆された。一方、中長期増強は、前述の短期増強に完全に依存するとともに、シナプス後膜の NMDA 受容体チャネル活性の亢進と、引き続き細胞内 Ca^{2+} の上昇-PKC-ERK というシグナルカスケードの活性化を必要とすることが分かった。

(7) 破骨細胞プロトンシグナルの電位依存性調節機構

久野 みゆき, 酒井 啓, 川脇 順子, 森 啓之, 森畑 宏一, 翁 昌子
(大阪市立大学大学院医学研究科・分子細胞生理学)

破骨細胞は proton の動きが main function に直結する細胞のひとつで、大量の酸 (H^+) を骨吸収窩に放出して骨を溶解し、骨リモデリングや生体 Ca ホメオスタシスに貢献している。 H^+ 分泌の主体は細胞膜に高密度に発現した Vacuolar type H^+ -ATPase (V-ATPase) と考えられているが、膜電位依存性 H^+ チャネル (H_v channel) も迅速に大量の酸を分泌し得る機構として共存している。 H_v channel の駆動は細胞内外の pH 勾配と電位によって決定される。一方、V-ATPase はエネルギーを消費して H^+ の up-hill transport を行うポンプとして働くが、その作用を調節する細胞要因についてはあまり知られていない。私達は、破骨細胞の H^+ 分泌測定結果から、 H_v channel のみならず V-ATPase を介する H^+ 分泌も電位によって調節され

ると推測した。そこで、破骨細胞 V-ATPase の膜サブユニットを COS 細胞に発現させて、 H^+ 分泌の電位依存性を検討した。Subunit-c 発現細胞では、脱分極下でのみ H^+ 分泌が起こったが、V-ATPase のブロッカー (DCCD) で抑制された。Subunit-c 発現細胞からは、細胞内 ATP 非存在下で電位依存性の DCCD-sensitive current が検出された。逆転電位より過分極電位で、僅かではあるが内向き電流が認められ、細胞外から細胞内へ H^+ を取り込む経路としても働く可能性が示唆された。これらの結果から破骨細胞では、 H_v チャネルだけでなく V-ATPase を介する H^+ シグナリングにおいても電位が調節因子として働いていることが明らかになった。

(8) 心筋細胞における生理的な3量体 G 蛋白質サイクルモデルの構築 ～G 蛋白質制御カリウムチャネルの電流特性より～

石井 優, 鈴木 慎悟, 倉智 嘉久 (大阪大学大学院医学系研究科・情報薬理学,
文部科学省リーディングプロジェクト「細胞・生体機能シミュレーション」)

3量体 G 蛋白質サイクルはホルモン・神経伝達物質などの膜受容体とイオンチャネルやアデニル酸シクラーゼ, ホスホリパーゼなど種々の効果器を連関し, 細胞外からの情報を細胞内へ伝達する最も基本的かつ重要な機構である。これまで G 蛋白質サイクルに関しては様々な数理モデルが立てられてきたが, いずれも不完全なものであった。その理由の多くは, G 蛋白質サイクルは多段階反応であり, 従来の生化学的手法では, それぞれのステップの時定数が十分な精度で測定することが困難であり, 恣意的な仮定に基づいていることにある。心筋や神経に発現する G 蛋白質制御カリウム (K_G) チャネルは, 3量体 G 蛋白質の $\beta\gamma$ サブユニットが結合することにより直接活性化する内向き整流性カリウムチャネルである。 K_G チャネルは, それ自体電位・時間依存性ゲート機構を持たないため, この電流をモニターすることにより, 3量体 G 蛋白質サイク

ルの状態を極めて高い時間分解能で捉えることができる。特に, 最近我々は Regulators of G protein signaling (RGS) 蛋白質と呼ばれる G 蛋白質サイクル制御分子が, 時間依存性にサイクルを調節し, これが K_G チャネルに以前から報告されていたある特徴的な現象を形作っていることを明らかにしてきた。この我々の結果に基づきパラメータフィッティングを行い, 3量体 G 蛋白質サイクルの新しい数理モデルを構築した。その結果, これまでの数理モデルでは再現できなかった現象 (K_G チャネルの急速な活性化や見かけ上の電位依存性性質) などが再構成できた。今後はこの数理モデルを活動電位モデルに組み込み, 心筋活動電位の生理的な副交感神経制御モデルの構築を目指す。またこの数理モデルをアデニル酸シクラーゼやホスホリパーゼなどの他の G 蛋白質システムについても応用していくことも現在検討中である。

(9) 小脳登上線維-プルキンエ細胞シナプスの生後発達における 電位依存性カルシウムチャネルの役割

橋本 浩一, 狩野 方伸 (金沢大学大学院医学系研究科・シナプス発達・機能学分野)

成熟動物の小脳プルキンエ細胞は, ほとんどの細胞が一本の登上線維によってのみ支配を受けるが, 発達初期には一時的に複数の登上線維による支配を受けている。生後発達に伴い, 徐々に登上線維の本数が減少し, マウスでは生後 21 日目までに一本支配に移行する。

これまでの我々の研究から, 生後 2~3 日のプルキンエ細胞は, シナプス強度が比較的同等な複数の登上線維により多重支配されているが, 生後 7 日目までに, 一本の強い登上線維入力とそれ以外の弱い登上線維入力の一つのプルキンエ細胞上で混在するようになることが明らかになった。これは, 最終的に残存してプルキンエ細胞を単一支配する登上線維と, 除去される登上線維の機能的選別の結果であると考えられる。

この過程の詳細な機構は現在のところ不明である。私

たちは, プルキンエ細胞の主要な電位依存性カルシウムチャネルである, P/Q 型カルシウムチャネルが重要であると仮定し, P/Q チャネルを構成する $\alpha 1A$ サブユニットノックアウトマウスを調べた。

$\alpha 1A$ ノックアウトマウスにおいては, プルキンエ細胞における高閾値型電位依存性カルシウム電流は大幅に減少しているが, 興奮性シナプス伝達は比較的正常であった。生後 18-29 日において, 80% 以上のプルキンエ細胞で登上線維の多重支配が残存していた。登上線維の生後発達過程を解析したところ, 生後 10 日目までに起こる登上線維除去過程が障害されていた。さらに, 多重登上線維間の強弱形成過程を解析した。その結果, 通常生後 1 週目に集中して起こるべき多重登上線維間の強弱形成が $\alpha 1A$ ノックアウトマウスで障害されており, 生後 20

日ころまでに徐々に強弱が形成されることが判明した。これらの結果は、生後発達初期に起こる登上線維の機能

分化に、P/Q型電位依存性カルシウムチャンネルが必要であることを示している。

(10) TRPM2チャンネルによるシグナル・生理応答制御

原 雄二¹, 山本 伸一郎¹, 森 恵美子¹, 片野 正展¹, 山村 みどり¹,
石井 正和², 木内 祐二², 清水 俊一², 森 泰生¹
(¹ 京都大学大学院工学研究科, ² 昭和大学薬学部)

TRP (Transient receptor potential) は細胞外の環境変化を感知し、それに対する適応を統合する陽イオンチャンネル群として注目を集めている。TRPM サブファミリーの一員である TRPM2 チャンネルは、細胞内レドックス状態変化により活性化される非選択的陽イオンチャンネルである。TRPM2C 末端には Nudix モチーフと呼ばれる ADP-ribose 水解ドメインが存在するが、Nudix モチーフの役割について詳細は不明であった。そこで我々は TRPM2 チャンネル活性化と Nudix モチーフとの関連について検討を行った。Nudix モチーフ点変異体、キメラタンパク質等の解析により、レドックス状態の変化により生成された ADP-ribose が直接 Nudix モチーフに作用して、TRPM2 チャンネルが活性化されることを明らかにした。また ADP-ribose 水解活性はチャンネル活性に必須ではないことから、ADP-ribose はエネルギー供与体ではなく、細胞内リガンドとしてチャ

ネル構造を変化させる分子であると考えられる。

さらに我々は TRPM2 チャンネルの生理的役割について検討を行った。炎症時、免疫系細胞では細胞内レドックス状態変化により、形質膜越えの Ca^{2+} 流入依存的なシグナリング経路が活性化される。そこで免疫系細胞における TRPM2 チャンネルの役割について着目した。単球細胞株 U937 では TRPM2 チャンネルは高発現しており、過酸化水素刺激により形質膜越えの Ca^{2+} 流入が見られた。興味深いことに、 Ca^{2+} 流入により NF- κ B を介した IL-8 産生が顕著に誘導されること、これらの効果は TRPM2 特異的 siRNA 導入により有意に抑制されることが明らかになった。IL-8 は免疫細胞の遊走誘導因子であることから、TRPM2 は感染に対する免疫応答に必須なイオンチャンネルであると考えられる。

(11) マクロファージに発現する TRPV2チャンネル

長澤 雅裕, 小島 至 (群馬大学生体調節研究所)

TRPV2 チャンネルは Purkinje 細胞などの神経細胞、肝臓・腎臓の上皮細胞、膝ランゲルハンス島の内分泌細胞や消化管の神経内分泌細胞、さらに肺・脾臓などに高発現している。肺・脾臓では主にマクロファージに局限して発現している。そこでマクロファージに発現する TRPV2 の機能とその調節機構を下垂体由来のマクロファージ細胞株である TtTM87 細胞を用いて検討した。まず TtTM87 細胞における TRPV2 の発現を RT-PCR により確認した。TRPV ファミリーに属する他のチャンネルの発現は極めて低かった。またパッチクランプ法により Ruthenium red 感受性の Cs^+ 電流を確認した。この電流は dominant-negative

型の変異 TRPV2 遺伝子導入により消失した。Tt87 細胞を fMLP で刺激すると一過性の細胞内カルシウム濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の増加とそれに続くオシレーションが観察された。GFP 標識した TRPV2 をモニターすると、fMLP の投与により TRPV2 は細胞膜にトランスローケーションした。Ruthenium red 投与あるいは dominant-negative 型変異 TRPV2 遺伝子導入により TRPV2 チャンネルを抑制すると、fMLP により惹起される $[\text{Ca}^{2+}]_i$ のオシレーションは抑制された。fMLP による TRPV2 チャンネルのトランスローケーションは PI3 キナーゼを抑制する LY294002 の投与により抑制され、また百日咳毒素の前処置によって消失した。以上

の結果から、マクロファージ細胞株 TtTM87 細胞には TRPV2 チャンネルが発現し、fMLP により PI3 キナーゼ依存的機構によって細胞膜にトランスローケーションする。

これが fMLP による $[Ca^{2+}]_c$ のオシレーションに関与していると考えられる。

(12) in vivo 血小板活性化機構のリアルタイム解析

林 忠毅, 村上 裕介, 最上 秀夫, 浦野 哲盟 (浜松医科大学・生理学第二)

血管内血栓形成過程は血管内皮細胞の障害部位における内皮下組織への血小板の粘着により開始される。粘着血小板は形態変化とともに細胞内カルシウム濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の上昇がトリガーとなりフィブリノーゲンを分子糊として血小板凝集塊を形成する (血小板血栓)。この血小板凝集塊を足場として血液凝固反応が惹起されフィブリノーゲンはフィブリンとなり、血小板血栓はより強固な凝固血栓に至る。凝固反応の開始には、血小板内 $[Ca^{2+}]_i$ の持続的上昇による phosphatidylserine (PS) の細胞内膜から外膜への exposure が必須である。我々は、in vivo 血流環

境下における血栓形成過程を検討するために、マウス腸間膜静脈を用いて細胞外膜への PS の exposure を血小板活性化の指標としてリアルタイム解析を行った。マウス腸間膜静脈においてレーザー照射により血管内皮細胞を傷害し GFP 標識血小板と PS の特異的なリセプターである alexa568 標識 annexin V 用いて血小板凝集及び血液凝固開始シグナルとして PS を可視化し、共焦点レーザー-蛍光顕微鏡にてそれぞれの蛍光強度の時間的・空間的变化をモニターした。これらの結果を in vitro の結果と合わせてお話しします。

(13) DGK と PKC の分子機能協働の解析

齋藤 尚亮, 白井 康仁, 山口 泰人, 松原 岳大 (神戸大学・バイオシグナル研究センター)

ジアシルグリセロール (DAG) は、細胞膜から産生される脂質メッセンジャーであり、様々な標的タンパク質に作用して、細胞内の情報伝達を調節する因子である。DAG の標的タンパク質の中でも、最もよく知られるものは PKC であり、DAG の産生は PKC の活性化を引き起こし、PKC によるリン酸化を介して、増殖・分化、遺伝子発現などの多くの細胞応答を調節している。細胞膜で産生された DAG はジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) によりリン酸化を受け、フォスファティジン酸 (PA) に変換され、その PKC の活性化物質としての機能を失う。つまり、DGK は間接的に PKC による伝達経路を終了させる酵素である。

我々はすでに DGK が PKC とともに、受容体刺激により、細胞膜に一過性にトランスローケーションすること、また、

そのトランスローケーションは、PKC のトランスローケーションとは時間的にわずかに異なっていることを明らかにし、この時間的ずれによって DGK が PKC の活性を巧妙に調節していることを示唆してきた。今回、この DGK による PKC の機能調節機構を明らかにすることを目的として、PKC と DGK の直接的な相互作用、機能調節機構について、検討した。その結果、DGK は PKC の活性に依存して、PKC に結合し、PKC によるリン酸化を受けること、また、PKC によるリン酸化部位は DGK の Accessory Domain に存在し、リン酸化によって、DGK 活性が上昇すること、が明らかになった。この相互作用により、DGK による時間的・空間的な PKC 活性化の巧妙な調節が、行われていると考えられる。

(14) PLC zeta と Ca^{2+} オシレーション宮崎 俊一¹⁾・河内 全¹⁾・尾田 正二²⁾・依田 綾子³⁾・白川 英樹¹⁾・淡路 健雄¹⁾¹⁾東京女子医科大学・第二生理, ²⁾東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学,³⁾順天堂大学医学部産婦人科)

様々な細胞において、持続的な刺激に対し、 IP_3 レセプターを介する小胞体からの反復性の Ca^{2+} 遊離に起因する Ca^{2+} オシレーションがあり、 Ca^{2+} 依存性の活性を維持する機構が作動する。受精から初期発生においても、反復性の Ca^{2+} spike が細胞周期依存性におこる。哺乳類では、精子—卵融合に際して卵に移行し Ca^{2+} オシレーションを誘起する精子因子があるとされ、その有力候補として phospholipase C の新規イソフォーム zeta (PLC ζ) が発見された。PLC ζ (蛍光蛋白質'Venus'と連結) の RNA をマウス卵に注入して PLC ζ を強制発現させた場合でも、recombinant PLC ζ 蛋白そのものをマウス卵に注

入した場合でも、精子 1 個～数個分の微量で Ca^{2+} オシレーションが誘起できる。recombinant PLC ζ の *in vitro* での PLC 活性 (PIP_2 分解活性) は、 Ca^{2+} が存在しないとゼロであり、100nM という低い濃度 (静止時の細胞内 Ca^{2+} レベル) でも最大活性の 70% を示す。即ち PLC ζ は極めて高い Ca^{2+} 依存性を有する。細胞内発現させた PLC ζ の経時的分布変化を Venus の蛍光で観察すると、前核形成とともに核内に蓄積されることが示された。即ち PLC ζ は核移行能を有する。これらの PLC ζ の特異的性質に関連づけて、 Ca^{2+} オシレーションの開始および停止機構を論ずる。

(15) Calyx of Held におけるシナプス小胞エンドサイトーシスの分子機構

山下 貴之, 髭 俊秀, 高橋 智幸 (東京大学大学院医学系研究科・神経生理学教室)

神経終末端における小胞エンドサイトーシスには、速さと分子機構が異なる複数のメカニズムが存在することが知られている。今回我々は、脳幹スライス標本を用いて Calyx of Held ターミナルにおける小胞エンドサイトーシスの速さと分子機構を膜容量測定によって調べた。ボツリヌス E 毒素を神経終末端に注入することにより、キス・アンド・ラン様の一過性膜容量変化は伝達物質放出と無関係であることが明らかとなった。伝達物質放出に關係する膜容量変化から測定される小胞エンドサイトーシスは、エキソサイトーシスの量が多くなるほど遅くな

り、時定数は 10~25 秒であった。神経終末端に非加水分解 GTP アナログやダイナミン・プロリン・リッチ・ドメイン・ペプチドを注入すると、エキソサイトーシスの量に關係なくエンドサイトーシスのほとんどがブロックされた。これらアナログおよびペプチドは、エキソサイトーシスに即座に影響を与えなかったが、使用依存的な抑圧を引き起こした。これらの結果から、Calyx of Held ターミナルにおける小胞エンドサイトーシスには、ダイナミンによる GTP 加水分解が不可欠であると結論された。

(16) 細胞内シグナル伝達機構の多角的・包括的理解

宮脇 敦史 (理化学研究所・脳科学総合研究センター)

細胞内シグナル伝達の時空間的制御の包括的理解を目指して、我々が蛍光イメージング技術を使ってできるこ

とを議論したい。

3. 細胞死の新たな生理機能とそのシグナル伝達

2004年11月29日-11月30日

代表・世話人：三浦正幸（東京大学大学院薬学系研究科）

所内対応者：岡田泰伸

- (1) 細胞死シグナル分子と増殖・分化シグナル間ネットワーク
米原 伸（京都大学大学院生命科学研究所 高次遺伝情報学分野）
- (2) TGF- β の Bim/caspase-9 を介する細胞死誘導シグナルは同時に異なったシグナルにより阻害されている
大串雅俊, 米原 伸（京都大学大学院生命科学研究所 高次遺伝情報学分野）
- (3) Apaf-1 様分子群を介したアポトーシスと NF- κ B 活性化のメカニズム
須田貴司（金沢大学がん研究所 分子標的薬剤開発センター）
- (4) 抑制性 Apaf-1 様分子群
木下 健, 須田貴司（金沢大学がん研究所 分子標的薬剤開発センター）
- (5) CD40 シグナルによる B リンパ球アポトーシス制御と自己免疫
鏝田武志（東京医科歯科大学大学院 疾患生命科学研究所）
- (6) キナーゼによる細胞死制御
後藤由季子（東京大学分子細胞生物学研究所 情報伝達研究分野）
- (7) AKT による生存促進機構の解析
青木一郎, 後藤由季子（東京大学分子細胞生物学研究所 情報伝達研究分野）
- (8) 神経回路再編成時におけるグリア細胞による軸索分岐の除去機構
栗崎 健（東京大学分子細胞生物学研究所 高次構造研究分野）
- (9) ショウジョウバエカスパーゼの活性化と生理機能
近藤 周, 三浦正幸（東京大学大学院薬学系研究科 遺伝学教室）
- (10) 無尾両生類の変態で退縮している尾の筋細胞死の分子機構
矢尾板芳郎（広島大学大学院理学研究科 附属両生類研究施設 発生遺伝学研究部門）
- (11) アポトーシス細胞の貪食
長田重一（大阪大学生命機能研究科 時空生物学専攻遺伝学）
- (12) ショウジョウバエにおけるアポトーシス細胞貪食反応の解析：線虫 CED-1 ホモログ Droper の役割
中西義信（金沢大学大学院医学系研究科 生体防御反応学）
- (13) 精巣セルトリ細胞によるアポトーシス精子形成細胞貪食除去の機構と意義
白土明子, 中西義信（金沢大学大学院医学系研究科 生体防御反応学）
- (14) 変異 SOD1 による運動ニューロン変性のメカニズム
高橋良輔（理化学研究所脳科学総合研究センター 運動系神経変性研究チーム）
- (15) 神経変性疾患における VCP の役割の解析
垣塚 彰（京都大学大学院生命科学研究所 高次生体統御学分野）
- (16) 神経軸索消失機構とポリグルタミン病
柳 茂（神戸大学大学院医学系研究科 機能ゲノム学分野）
- (17) 細胞死・変性シグナルの遺伝学的解析
三浦正幸（東京大学大学院薬学系研究科 遺伝学教室）

(18) ミトコンドリア仲介性アポトーシスと虚血・再還流性心筋細胞死における ROS 感受性クロライドチャンネルの役割

岡田泰伸 (生理学研究所 機能協関部門)

(19) Bcl-2 たんぱくによる non-apoptotic プログラム細胞死の制御

清水重臣, 辻本賀英 (大阪大学大学院医学系研究科 遺伝子学)

(20) ストレス応答性 SAPK/JNK の細胞死, 増殖, 老化制御における役割

仁科博史 (東京大学大学院薬学系研究科 生理化学教室)

(21) TNF α により誘導されるシグナル伝達経路

中野裕康 (順天堂大学医学部 免疫学教室)

(22) ASK ファミリーによるストレス応答機構

一條秀憲 (東京大学大学院薬学系研究科 細胞情報学教室)

【参加者名】

栗崎 健 (東大・分生研), 一條秀憲 (東大・院薬), 三輪崇志 (東大・院薬), 永井宏彰 (東大・院薬), 櫻井友子 (東大・院薬), 下菌利恵子 (東大・院薬), 岡田泰伸 (生理研), 清水貴浩 (生理研), 王 曉明 (生理研), 高橋信之 (生理研), 垣塚 彰 (京大・院生命), 大沼洋平 (京大・院生命), 小池雅昭 (京大・院生命), 嶋田深志 (京大・院生命), 後藤由季子 (東大・分生研), 青木一郎 (東大・分生研), 森永光一郎 (東大・分生研), 岩井謙一 (東大・分生研), 大橋淳一郎 (東大・分生研), 須田貴司 (金沢大・がん研), 木下 健 (金沢大・がん研), 長谷川瑞穂 (金沢大・がん研), 高橋良輔 (理研・脳セ), 辻本賀英 (阪大・院医), 清水重臣 (阪大・院医), 恵口豊 (阪大・院医), 鏑田武志 (東京医科歯科大・院疾患), 渡辺孝造 (東京医科歯科大・院疾患), 中西義信 (金沢大・院医), 白土明子 (金沢大・院医), 長田洋一 (金沢大・

院医), 倉石貴透 (金沢大・院医), 中野裕康 (順天堂大・医), 中島章人 (順天堂大・医), 長田重一 (阪大・院生命), 仁科博史 (東大・院薬), 北川大樹 (東大・院薬), 根岸崇大 (東大・院薬), 菅原美郷 (東大・院薬), 矢尾板芳郎 (広島大・両生類研), 中島圭介 (広島大・両生類研), 藤本健太 (広島大・両生類研), 柳 茂 (神戸大・院医), 米原 伸 (京大・院生命), 大串雅俊 (京大・院生命), 小林洋平 (京大・院生命), 中津海洋一 (京大・院生命), 黒木俊介 (京大・院生命), 三浦正幸 (東大・院薬), 嘉糠洋陸 (東大・院薬), 倉永英里奈 (東大・院薬), 竹本 研 (東大・院薬), 近藤 周 (東大・院薬), 菅田浩司 (東大・院薬), 殿城亜矢子 (東大・院薬), 近藤 隆 (富山医科薬科大・医), 趙 慶利 (富山医科薬科大・医)

【概要】

アポトーシスの基本的な実行因子が明らかにされると、研究の方向性はこれまでに得られた研究成果をいかに個体発生や疾患という生体で見られる細胞死の理解や応用に結びつけて行くかに移ってくる。このような流れの中で、素過程の研究から明らかにされた分子に関しては遺伝子ノックアウトや変異体を得て解析するという遺伝学的な手法を積極的に取り入れた研究がなされ、培養細胞系では得られなかった新たな分子機能が示されてきた。このような現象は、アポトーシスの生理機能を考える上で重要であり、アポトーシス研究は死の生物学という枠を越えて広がりを見せている。アポトーシス研究で

先端に行く我が国の研究者が、それぞれの専門領域を越えて一同に会し研究発表や密度の濃い討論を行った。キナーゼや活性酸素を介した細胞死シグナルに関する研究の進展、非アポトーシス細胞死の分子機構についての新たな研究が発表された。マウス、カエル、ハエといったモデル動物を用いた生体での細胞死研究の話題、特に食事の生理機能に関して興味深い研究成果が発表された。今後、生体を用いたアポトーシスシグナルの研究の進展によって細胞死の新たな生理機能が明らかにされると期待される。

(1) 細胞死シグナル分子と増殖・分化シグナル間ネットワーク

米原 伸 (京都大学大学院生命科学研究科 高次遺伝情報学分野)

caspase-8の活性化を抑制するFLIPの様々な機能について報告する。ヒト成人T細胞白血病ウイルスのがん遺伝子産物TaxはT細胞においてNF κ BとCREBの協調作用によってc-FLIPの発現を誘導した。また、bFGFの作用や活性化Rasの発現は、繊維芽細胞においてRas/ERK/AP-1の活性化を介してc-FLIPの発現を誘導した。これらのFas刺激に耐性を獲得した細胞はDISC形成がc-FLIPの働きで阻害されており、RNAi法でc-FLIPの発現を抑制することによってFas刺激に再感受性化した。がん遺伝子の働きによって発現誘導されるc-FLIPがFas刺激に耐性を付与する分子機構は、がん化した細胞の

生存維持に重要な意味を持つと考えられた。また、FLIPがWntシグナルと密接に関連することも明らかとなった。最近c-FLIP-Lが β -cateninの安定化を誘導すると報告された(293T細胞においてのみ我々も活性が検出できた)が、この系とは異なり、v-FLIP E8やK13は多くの細胞種において β -catenin安定化の下流に作用してWntシグナルを強く増強することが示された。v-FLIP E8の発現によってWntシグナルを増強すると、腫瘍由来細胞と3T3細胞において、Wnt刺激によって細胞増殖増強作用と抑制作用をそれぞれ導入する興味深い現象を見いだしたので紹介したい。

(2) TGF- β のBim/Caspase-9を介する細胞死誘導シグナルは同時に異なったシグナルにより阻害されている

大串雅俊, 米原 伸 (京都大学大学院生命科学研究科 高次遺伝情報学分野)

TGF- β は細胞増殖抑制をはじめとする多彩な生理活性を有するサイトカインとして知られており、細胞種に応じて様々な応答を誘起する。我々はTGF- β が胃上皮細胞に対しSmad \rightarrow Bim \rightarrow caspase-9という経路を介して細胞死を誘導することをこれまでに明らかとしてきたが、TGF- β 刺激に対する応答性を維持しながらも生存し続ける細胞も多く存在する。そのような細胞では細胞死抑制シグナルをTGF- β が同時に導入している可能性を考え、TGF- β が導入するSmad以外の活性を阻害する解析を行った。その結果、TGF- β 刺激より活性化が

誘導されるJNKを阻害した場合、TGF- β 刺激によってDNA断片化やカスパーゼ活性化を伴うアポトーシスが誘導されることを見いだした。このJNK阻害条件下におけるTGF- β 誘導アポトーシスは、Bimを介するミトコンドリア経路を経て実行されていた。これらの結果から、TGF- β がTNF- α と同様に、アポトーシス誘導シグナルと平行してそれを阻害する生存シグナルを活性化することが示唆された。TGF- β はJNK活性化を契機とする細胞死抑制シグナルを導入することにより、自らの選択的なアポトーシス誘導活性を制御していると考えられる。

(3) Apaf-1様分子群を介したアポトーシスとNF κ B活性化のメカニズム

須田貴司, 長谷川瑞穂, 松本則彦, 今村 龍 (金沢大学がん研究所・分子標的薬剤開発センター)
増本純也, 猪原直弘 (Department of Pathology, University of Michigan Medical School)

最近、Apaf-1に類似の構造をもつ蛋白をコードすると考えられる20種を超える遺伝子群が発見された。これらの遺伝子の一部は、アポトーシスや炎症のシグナル伝達

に働く分子と考えられている。Apaf-1様分子群に属すNOD1およびNOD2の両分子は細菌ペプチドグリカンの部分構造を認識して、転写因子NF κ Bを活性化すること

が判明している。他の Apaf-1 様分子はどのような上流シグナルに応答するのか不明であるが、複数の Apaf-1 様分子が ASC と呼ばれアダプター分子を介して下流へシグナルを伝達していることが判明している。我々は最近、Apaf-1 様分子と ASC を介したシグナル伝達の上流と下

流を解明することを目的とした研究を行っている。面白いことに Apaf-1 様分子と ASC を介したアポトーシスと NFκB 活性化の両方に caspase-8 が関与していることが判明した。

(4) 抑制性 Apaf-1様分子群

木下 健, 王 冶陶, 須田貴司 (金沢大学がん研究所 分子標的薬剤開発センター)

PYPAF ファミリーは N 末端に PYRIN ドメインを有する, Apaf-1 様分子である。PYPAF1, 5, 7 はアダプター分子 ASC を介して NFκB の活性化や caspase-1 依存性の IL-1β 活性化を誘導する。我々は新規 PYPAF ファミリーメンバー PYNOD を発見し, この分子が ASC 依存性 NFκB 活性化および caspase-1 依存性 IL-1β 活性化を抑制することを見いだした。また機能未知の PYPAF2, 3 についても検討したところ, PYPAF2 は NFκB 活性化を, PYPAF3 は IL-1β 産生をそれぞれ抑制した。免疫沈降試験では PYPAF3 は procaspase-1, proIL-1β 双方に結合し得た。

THP-1 単球系細胞株に PYPAF3 を安定発現させたところ, LPS 誘導 IL-1β 産生が顕著に抑制された。PYPAF2, 3 の mRNA は正常組織及び培養細胞で広範に発現していた。興味深いことに LPS や IL-1β で刺激した THP-1 細胞では PYPAF3 の発現が増加した。以上の結果は PYNOD, PYPAF2, 3 が抑制的 PYPAF サブファミリーを構成することを示唆する。また, 単球系細胞において PYPAF3 による IL-1β 産生のネガティブフィードバック機構が存在すると考えられる。

(5) CD40シグナルによる B リンパ球アポトーシス制御と自己免疫

鏑田武志 (東京医科歯科大学大学院疾患生命科学研究所)

CD40 は B リンパ球 (B 細胞) や抗原提示細胞に発現する TNF 受容体ファミリーのメンバーで, そのリガンド CD40L (CD154) は主に活性化 T リンパ球 (T 細胞) に発現する。B リンパ球は抗原刺激によりアポトーシスをおこなすが, 抗原刺激によるアポトーシスは CD40 を介するシグナルにより抑制され, 抗原刺激と CD40 を介する刺激の共存により B 細胞は活性化増殖する。このような T 細胞ヘルプ非存在下でおこなう抗原を介するアポトーシスは, 自己反応性 B 細胞の除去に関わると考えられる。また, 全身性エリテマトーデス (SLE) 患者やそのモデルマウスのリンパ球で CD40L の過剰発現や異所性発現が

報告されている。そこで, 我々は, B 細胞で CD40L を構成的に発現する CD40L トランスジェニックマウスを樹立し, このマウスが SLE 様の自己免疫疾患を発症すること, さらに, 自己抗体トランスジェニックマウスを交配することにより, 実際に生体内において自己反応性 B 細胞のアポトーシスを阻害していることを明らかにした。これらの結果は, 抗原刺激によるアポトーシスが自己反応性 B 細胞の除去に関与し, CD40L の過剰発現が, 抗原刺激によるアポトーシスを阻害することにより自己免疫を誘導することを強く示唆する。

(6) キナーゼによる細胞死制御

砂山 潤, 後藤由季子 (東京大学分子細胞生物学研究所 情報伝達研究分野)

JNKはMAPキナーゼファミリーに属し、紫外線照射・ERストレスなどの刺激により活性化されアポトーシスを誘導する。前年の本研究会にて、JNKは14-3-3を直接リン酸化すること、それによって細胞死促進型Bcl-2ファミリーメンバーであるBaxが14-3-3から遊離することを報告した。一方、Bad, Nur77, FOXO3などの細胞死促進因子は、Aktでリン酸化されると14-3-3と結合し、その細胞死促進活性を失うことが知られている。最近我々

は、14-3-3がJNKによってリン酸化されると、14-3-3とBadあるいは14-3-3とFOXO3の結合も低下することを明らかにした。JNKの活性化により、Badは細胞内で14-3-3から解離し、ミトコンドリア移行してBcl-2, Bcl-XLに結合し細胞死誘導に貢献することが示唆された。従ってAktの生存シグナルとJNKの細胞死シグナルは14-3-3を介して拮抗することが示唆された。

(7) AKTによる生存促進機構の解析

青木一郎, 小川原陽子, 後藤由季子 (東京大学分子細胞生物学研究所 情報伝達研究分野)

PI3K-Akt経路は様々な系で細胞の生存を促進することが知られている。例えば γ 線やエトポシドなどのDNA損傷により引き起こされるアポトーシスはAktの活性化により抑制される。我々はAktがDNA損傷によるアポトーシスを抑制する際のターゲットを検討し、以前にp53ユビキチンリガーゼであるMdm2をAktが直接にリン酸化し活性化することを報告した。すなわちAktによってリン酸化されたMdm2はp53をユビキチン化・分解し、

p53依存的なアポトーシス誘導を抑制する。癌抑制遺伝子p53を不活性化するというこの機能は、Aktによる癌化誘導作用の一部を説明すると考えられる。DNA損傷によるアポトーシス誘導はp53依存的経路だけでなく、p53非依存的な経路も存在するが、我々はAktが後者も抑制する事を見いだした。さらにp53非依存的経路のAktのターゲット候補も見いだしたので、本研究会ではこれについて報告したい。

(8) 神経回路再編成時におけるグリア細胞による軸索分岐の除去機構

栗崎 健 (東京大学分子細胞生物学研究所 高次構造研究分野)

発生過程において形成された神経回路網を個体制御のために適した機能的な状態に完成させるためには、回路の一部の局所的な作り替えが不可欠である。この過程では、すでに伸長した軸索分岐や樹状突起を特異的に除去したり再伸長させるプロセスが必要である。神経線維の一部が特異的に除去される現象は、神経回路を再編成する時だけでなく障害や発病などによっても生じることが知られている。しかしながらこうした神経線維除去の制御機構についてはほとんど分かっていない。私たちは変態期において再編成することが知られているショウジョウバエの幼虫キノコ体神経回路を実験系に用いて、神経

回路再編成時にいかにして不要になった軸索分岐が除去されるのか？この制御機構を明らかにすることを目的として研究を行っている。これまでに、(1) 軸索分岐の除去には周辺から浸潤するグリア細胞の貪食作用が必要であること、(2) スカベンジャー受容体をコードするdrpr遺伝子ならびにそのC末端部位と相互作用すると考えられるアダプター分子ced-6遺伝子がグリア細胞の浸潤・貪食作用に必要であること、(3) グリア細胞の貪食細胞としての分化ならびに軸索分岐の貪食標的としての分化はエクダイソンにより協調的に制御されていることを明らかにしたのでこれらについて紹介する。

(9) ショウジョウバエカスパーゼの活性化と生理機能

近藤 周, 三浦正幸 (東京大学大学院薬学系研究科 遺伝学教室)

広海 健 (国立遺伝学研究所 総合研究大学院大学 遺伝学専攻)

ショウジョウバエの胚をTUNEL法などで染色すると、多くの細胞がアポトーシスを起こしていることが観察される。しかしそれらの細胞の大部分に関しては、いったいそれがどの細胞なのか、その細胞死が組織構築にどのような意義を持っているのか全く分かっていない。ショウジョウバエの胚発生における細胞死の理解を目的として、現在我々は二つのアプローチで研究を行っている。一つ目は新たな細胞死の可視化手法の確立である。既存の細胞死検出方法はいずれも胚発生において細胞を同定するには時空間的解像度が不十分であった。単一細胞レベルにおいてアポトーシスの早い段階を検出するシステムとして、今回新たにカスパーゼの活性を検出する蛍光

タンパク質を作成した。当発表ではトランスジェニックバエを用いた観察結果を報告する。二つ目のアプローチは細胞死が起こらない変異体の解析である。ショウジョウバエにおいても全てのアポトーシスはカスパーゼに依存すると考えられているが、これまで細胞死に関わるカスパーゼの機能欠損変異体は得られていなかった。我々はショウジョウバエゲノム中に7個存在するカスパーゼのうち、新たに3個について機能欠損変異体を作成し、その内の2つがアポトーシスの実行に不可欠であることを見出した。現在までに行った表現型解析の結果について報告する。

(10) 無尾両生類の変態で退縮している尾の筋細胞死の分子機構

矢尾板芳郎, 中島圭介 (広島大学大学院理学研究科附属両生類研究施設 発生遺伝学研究部門)

無尾両生類幼生の変態において血中甲状腺ホルモン濃度が上昇することにより、ほぼ全身の再構成が生じる。体幹の2倍以上の長さの尾が1週間程で消失する。蛋白、RNA合成阻害剤により尾の退縮が抑制されることや甲状腺ホルモン受容体が転写因子であることから、新しい遺伝子発現により尾の細胞死が誘導されていると考えられている。しかし、尾の退縮に関係する遺伝子はまだ、同定されておらず、その分子機構さえも明らかにされていなかった。私たちは、まず、幼生尾由来の筋芽細胞株を樹立し、それが甲状腺ホルモンの存在下でアポトーシスをおこすことを見出し、細胞自律的な死(自殺)が誘

導されることを示した。両生類幼生の尾にドミナントネガティブ甲状腺ホルモン受容体(DNTR)発現型ベクターDNAを注入して甲状腺ホルモンシグナルを個々の筋細胞レベルで抑制して、それらの筋細胞を自然変態の前後で観察した。その実験結果に基づいて、甲状腺ホルモンは尾の退縮する前のNF stage 57-62の間では尾の筋細胞の自殺を誘導し、尾が急速に退縮するNF stage 62-64では筋細胞を早く完全に排除するために他殺と自殺の両方の機序を介して筋細胞死を執行するという仮説を提唱した。

(11) アポトーシス細胞の貪食

長田重一 (大阪大学生命機能研究科 時空生物学専攻遺伝学)

アポトーシス細胞のDNAは死細胞内で活性化されるCADによるばかりでなく、マクロファージに存在する

DNase IIによっても分解される。DNase II遺伝子欠損マウスの胎仔は胎生後期に死滅するが、このマウス胎仔の

種々の組織には死細胞由来の未分解DNAを蓄積したマクロファージが認められ、また胎仔肝の blood island を構成するマクロファージにも赤芽球由来の核DNAが未消化の状態で大량に残存する。DNase II 遺伝子欠損マウスが死滅する原因を明らかにするため、DNA マイクロアレイにより遺伝子発現の変化を調べたところ、DNase II-/-胎仔ではインターフェロン (IFN) 誘導遺伝子群の発現が特異的に増強していた。実際、IFN β および IFN γ の発現が確認された。特に IFN β 遺伝子は DNA を蓄積したマ

クロファージが特異的に発現していた。そこで IFN α , β のシグナルを媒介するタイプ I IFN レセプターと DNase II 遺伝子を共に欠損するマウスを作製したところ、このマウスはメンデルの法則に従い誕生した。以上の結果はアポトーシス細胞の DNA や赤血球前駆細胞から脱核した DNA が適切に分解されなければ、未分解 DNA を蓄積したマクロファージが IFN β を産生し、この因子が胎仔に対して致死的に作用することを示している。

(12) ショウジョウバエにおけるアポトーシス細胞貪食反応の解析： 線虫 CED-1ホモログ Draper の役割

真中純子，白土明子，東田陽博，中西義信（金沢大学医学系研究科）

倉石貴透，中井雄治（金沢大学自然科学研究科）

Peter Henson (National Jewish Medical and Research Center)

アポトーシス細胞貪食反応の機構と意義はおもに線虫と哺乳類で解析されているが、まだ統一的な理解はなされていない。線虫での遺伝学的解析では、貪食受容体とその下流の情報伝達経路が二通り存在することが示されている。しかし線虫には貪食を専門とする細胞は存在せず、マクロファージなどの専門食細胞を持つ哺乳類に線虫での様式があてはまることは自明ではない。私たちは、専門食細胞を持ち組織構築が哺乳類ほど複雑ではない昆虫を使って、線虫の貪食受容体 CED-1 のホモログである Draper の役割を検証した。

ショウジョウバエ幼虫食細胞由来の細胞株によるアポ

トーシス細胞貪食反応では、RNAi で Draper の発現を阻害すると貪食程度が半分以下に低下した。次に、新たに確立したショウジョウバエ胚丸ごとで貪食を検出する実験系を使った解析を行うと、RNAi での Draper 発現の阻害によって貪食が4割程度減少することが分かった。さらに、胚中の細胞を取り出して調べると、RNAi の適用でマクロファージ及びグリアによる貪食とも阻害されていた。これらの結果より、線虫 CED-1 のホモログがショウジョウバエの食細胞においてもアポトーシス細胞貪食受容体として働くことが明らかとなった。

(13) 精巣セルトリ細胞によるアポトーシス精子形成細胞貪食除去の機構と意義

白土明子，中西義信（金沢大学大学院医学系研究科 生体防御反応学）

個体の一生を通じて、体内で生じたアポトーシス細胞の貪食排除は組織恒常性や機能維持に必須であり、これは生殖細胞の形成時にも当てはまる。哺乳類の精巣で起こる精子形成過程では、精子形成細胞は哺育細胞であるセルトリ細胞からの分化情報を得て精子へと分化する。この途中で大多数の精子形成細胞がアポトーシスにより死ぬことが知られていたが、死の意義やその後の運命に

関する情報はこれまで十分ではなかった。演者は共同研究者とともに、ラットとマウスを用いて、精巣初代培養細胞による *in vitro* アッセイ系および生きた動物を使った *in vivo* アッセイ系を構築し、死んだ精子形成細胞の運命と死の意義とを解析した。その結果、精子形成細胞はセルトリ細胞にアポトーシス選択的に貪食され、この反応はアポトーシス精子形成細胞表層に出現する膜リン脂

質ホスファチジルセリンとセルトリ細胞表層のクラス B スカベンジャー受容体タイプ I との結合を介して行われると判明した。さらに、精子形成細胞の貪食を阻害すると精子形成の遅延が観察され、アポトーシス精子形成細胞

の貪食除去が精子形成過程の進行に必要なだと考えられた。これは、アポトーシス依存的な細胞貪食反応が生理的現象に必要なことを示す初めての研究成果となった。

(14) 変異 SOD1による運動ニューロン変性のメカニズム

高橋良輔, 館野美成子, 井上治久, 漆谷 真, 金 然正

(理化学研究所脳科学総合研究センター 運動系神経変性研究チーム)

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は選択的な全身の運動ニューロンの変性脱落を特徴とする難病であるが、約 10 年前に常染色体優性遺伝性の家族性 ALS (FALS) の病因遺伝子としてスーパーオキシドディスムターゼ 1 (SOD1) が同定されたことにより、分子機構の解明が進んでいる。SOD1 は ubiquitous に発現しているが、FALS において変性するのは運動ニューロン系を中心とした一部の神経系のみである。これまで同定された 100 種類以上の変異がほとんど点変異であり、タンパクを欠損する例はない。SOD1 は酸素ラジカルであるスーパーオキシドを解毒する酵素であるが、酵素活性がほぼ正常な変異ヒト SOD1 のトランスジェニックマウス (変異 SOD1 マウ

ス) でも ALS 類似の症状と病理所見を呈することなどから、変異によって酵素の機能低下でなく SOD1 に新たに細胞毒性が付与される (gain of toxic function) ことが運動ニューロン変性の原因になると考えられている。最近になって、変性部位でのみ変異 SOD1 がミスフォールド化し凝集形成する驚くべき現象が見出され、gain of function の実体と目されている。しかし部位特異的な構造変化を促進させる因子についてはよくわかっていない。本講演では我々が見出した SOD1 の構造変化を促進させる因子を紹介し、その ALS の病態への関連について議論する。

(15) 神経変性疾患における VCP の役割の解析

垣塚 彰 (京都大学大学院生命科学研究所 高次生体統御学分野)

ハンチントン病, Machado-Joseph 病 (MJD) 等の遺伝性神経変性疾患は原因遺伝子内の伸長した CAG リピートが作り出すグルタミンリピート (ポリグルタミン) の凝集によって発症すると考えられるため、「ポリグルタミン病」と呼ばれる。しかし、何故ポリグルタミンが神経細胞変性や細胞死を引き起こすかは十分に解明されていない。我々は当初より異常タンパク質の蓄積・凝集が神経変性・神経細胞死を引き起こす本体であると考え、ポリグルタミンをモデルに用いて神経変性疾患の発症メカニズムの解析を行ってきた。その結果、AAA ATPase 蛋白質の一つ p97/VCP が神経変性疾患において重要な役割を果たす可能性を見出した。本発表では、1) ATPase

活性の消失した VCP は、細胞に空胞変性と細胞死を誘導すること、2) VCP がいろいろな蛋白質修飾を受けること、3) 神経変性疾患で共通する VCP の蛋白質修飾が起きている可能性があること、4) 蛋白質修飾によって VCP の ATPase 活性が制御されること、5) ショウジョウバエのポリグルタミン病モデルにおいて蛋白質修飾をうける VCP のアミノ酸を変異させた VCP を強制発現させた場合におこるショウジョウバエの複眼の変性に対する影響を紹介し、VCP が関わる神経変性疾患に共通する発症機構と神経変性疾患の治療ターゲットとしての VCP の可能性を議論する。

(16) 神経軸索消失機構とポリグルタミン病

柳 茂 (神戸大学大学院医学系研究科 機能ゲノム学分野)

神経回路形成の反発因子セマホリンは軸索の反発と不要な軸索を除去する。今回、セマホリンのシグナル伝達に関与する CRMP の結合蛋白質として新規 GTPase CRAG (CRMP-Associated GTPase) を同定した。CRAG は UV などの活性酸素種 (ROS) を発生するストレスによって核移行し、ユビキチンを伴う封入体を形成する。そして核内において PML と結合し、PML body の形態変化 (Large ring-like structure) と PML のユビキチンリガーゼを活性化することが見いだされた。その結果、核内転写調節によるストレス応答を伝達することにより、細胞の生存に有利に作用しているものと推測される。一方、CRAG

は ROS 依存性にポリグルタミン変性蛋白質の核封入体形成とユビキチン・プロテアソーム経路による分解を促進することにより、ポリグルタミン病の病態に関与していることが示された。また、セマホリンによる ROS 発生依存性に、CRAG は CRMP とともに封入体を形成し、細胞外へと放出されるという軸索消失機構と関連する現象を観察した。今回の CRAG の発見により、軸索消失機構とポリグルタミン病において ROS シグナルという共通の分子メカニズムと新しいシグナル伝達機構の存在が示された。

(17) 細胞死・変性シグナルの遺伝学的解析

三浦正幸 (東京大学大学院薬学系研究科 遺伝学教室)

我々は, Reaper の作用機序に含まれる細胞死制御因子を同定する目的で, Reaper の細胞死誘導活性に基づく表現型を指標に, ゲノムの 80% 以上をカバーする染色体欠失系統のスクリーニングを行った。その結果それぞれ JNK 経路を活性化する能力を有する *Drosophila* ASK1 (DASK1) と *Drosophila* TRAF1 (DTRAF1) が Reaper の細胞死誘導活性に関与するものとして同定された。さらに, DTRAF1, DASK1 を介した JNK の活性化がどのようにして Reaper に制御されているのか知るために, 遺伝学的・生化学的な解析を行ったところ,(1) DTRAF1 による細胞死誘導と JNK の活性化は DIAP1 により制御され, その

抑制は E3 ユビキチン ligase 活性を持つ DIAP1 による DTRAF1 の分解に依存していること,(2) Reaper の発現で DIAP1 はユビキチン化が亢進されて分解されるため, DTRAF1 が安定化して JNK カスケードの活性化が見られる事が明らかとなった。我々のスクリーニングにより新たに同定された APTX7 は, キナーゼドメインを持ち JNK 活性化能を有していた。さらに APTX7 タンパク質は DIAP1 の分解を促進し Reaper と同程度に細胞死を誘導する事が明らかになった。今回, 個体レベルでの研究により遺伝学的に明らかとなった, IAP 分解機構と細胞死実行カスケードに関与する JNK の活性化機構について報告したい。

(18) ミトコンドリア仲介性アポトーシスと虚血・再還流性心筋細胞死における ROS 感受性クロライドチャネルの役割

清水貴浩, 高橋信之, 前野恵美, 王 曉明, 田辺 秀, 浦本裕美, 沼田朋大, 岡田泰伸
(生理学研究所 機能協関部門)

スタウロスポリン (STS) によるミトコンドリア刺激の場合も, Fas リガンドや TNF α によるデスレセプター

刺激の場合にも, カスパーゼ活性化に先んじて細胞丸ごとの縮小化 (apoptotic volume decrease: AVD) が多くの細

胞で発生する。この AVD は Cl⁻ チャネルブロッカーによって阻止され、このときにはその後のアポトーシス諸反応も消失する。培養心筋細胞に STS を投与したときも同様の結果が得られた。DIDS の効果は外液からの HCO₃⁻ 除去によっても全く影響を受けず、アニオンエキスチェンジャーに作用しているものではないことが結論された。HeLa 細胞に STS や Fas リガンドや TNF α を投与すると AVD 発生時期に対応して Cl⁻ 電流の活性化が認めら

れた。STS の場合には ROS 産生がこれに共役しており、スカベンジャーで Cl⁻ 電流活性化も AVD 発生も阻止された。Fas リガンドや TNF α の場合にはそのような早期 ROS 産生もスカベンジャーの Cl⁻ 電流阻止効果も認められなかった。心筋細胞の虚血・再灌流性アポトーシス死の場合にも、ROS 産生とスカベンジャー感受性が認められた。

(19) Bcl-2 たんぱくによる non-apoptotic プログラム細胞死の制御

清水重臣, 辻本賀英 (大阪大学大学院医学系研究科 遺伝子学)

アポトーシスのシグナル伝達機構にはミトコンドリアの膜透過性変化が関与しており, Bcl-2 ファミリー蛋白質はこれを調節することにより細胞死を制御している。Bcl-2 ファミリー蛋白質のうち, Bax/Bak はアポトーシスに不可欠であることが, ダブルノックアウトマウスの解析より明らかにされている。我々は, これを確認するために Bax/Bak ダブルノックアウトマウスを作製し, embryonic fibroblast や胸腺細胞の解析を詳細に行った。その結果, ①これらの細胞にアポトーシス刺激を加えて

も, アポトーシスは観察されないが, non-apoptotic な細胞死は観察されること, ②この細胞死には, オートファジー様の形態変化を伴うこと, ③オートファジーを抑制することにより緩和されること, を見いだした。これらの結果より, Bcl-2 ファミリー蛋白質はアポトーシスのみならず, non-apoptotic な細胞死をも制御している可能性が示された。この細胞死に関する詳細な解析結果, ならびにミトコンドリアの膜透過性亢進機構に関する最新の知見を報告する。

(20) ストレス応答性 SAPK/JNK の細胞死, 増殖, 老化制御における役割

仁科博史 (東京大学大学院薬学系研究科・生理化学教室)

我々は, ストレス応答性 SAPK/JNK 系シグナル伝達系の生理的な役割を解明する目的で, 2 種類の活性化因子 SEK1/MKK4 や MKK7 を欠損するマウスや細胞を作ってきた。その結果, 1) SEK1 や MKK7 欠損マウスは肝形成不全を伴う胎生致死となること, 2) SEK1, MKK7 \rightarrow SAPK/JNK \rightarrow c-Jun シグナル伝達系が細胞周期制御因子 CDC2 の遺伝子発現を誘導して肝芽細胞の増殖を制御すること, 3) SEK1, MKK7 \rightarrow SAPK/JNK \rightarrow c-Jun シグナル伝

達系は繊維芽細胞の増殖を促進し, また細胞老化を抑制すること, 4) ES 細胞では SAPK/JNK 活性化はストレス誘導性のアポトーシスに必須ではないこと, 5) SEK1 や MKK7 を欠損し SAPK/JNK 活性化が著しく低下している繊維芽細胞を継代するとストレス誘導性アポトーシスに耐性の細胞株が出現することを見出した。これらの結果は, SAPK/JNK シグナル伝達系が細胞の増殖, 老化, 生死の制御に深く関与していることを示している。

(21) TNF α により誘導されるシグナル伝達経路

中野裕康 (順天堂大学医学部・免疫学教室)

これまでの研究により ER ストレスと酸化ストレスとのクロストークが示唆されているものの、その詳細なメカニズムは明らかとなっていない。そこで、本研究では TNF α 刺激により ROS 依存性にネクローシスの誘導される L929 細胞を用いて、TNF α 刺激がこの細胞に ROS 依存性に ER ストレスを誘導するかを検討した。TNF α 刺激により ER ストレス時に活性化される 3 つの経路 (すなわち PERK, ATF6 および IRE1/XBP1 経路) のすべてが活性化されることが明らかとなった。この活性化は TNF α 刺激によって ROS 産生の認められない野性型の胎児線

維芽細胞 (MEF) では誘導されず、さらに抗酸化剤である BHA でほぼ完全に抑制されたことより、TNF α 刺激により L929 細胞に誘導される ER ストレス応答は ROS 依存性であることが明らかとなった。一方、興味深いことに、ER ストレスを誘導することの知られている tunicamycin で細胞を前処理することにより、その後の TNF α 刺激により誘導される ROS 産生が著明に抑制されることより、ER ストレス時に誘導される遺伝子群の中に TNF α 刺激により誘導され、ROS 産生を抑制する遺伝子が存在することが明らかとなった。

(22) ASK ファミリーによるストレス応答機構

一條秀憲 (東京大学大学院薬学系研究科 細胞情報学教室)

Apoptosis Signal-regulating Kinase (ASK)1 は JNK と p38MAP キナーゼの上流に存在する MAPKKK である。これらの MAP キナーゼ経路は、様々な環境ストレスに応答して細胞の生死や分化をはじめとする多様な生物活性をコントロールするためのシグナル伝達系として機能している。ASK1 ノックアウトマウスの解析により、ASK1 が酸化ストレスや小胞体ストレスによるアポトーシスに必要なシグナルであることが明らかになり、また ASK1 がポリグルタミン病やアルツハイマー病にお

いて認められる神経細胞死のメディエーターとしてこれらの疾患に関わっていることも示唆されている。一方、ASK1 は一部の Toll-like Receptor の下流で主に p38 の活性化を選択的に担うことによって自然免疫応答に必須の働きをすることも明らかになってきた。本講演では、活性酸素 (ROS) による ASK1 の新たな活性制御機構について紹介するとともに、ASK ファミリー経路を介するストレス応答機構ならびにその病態生理的役割について討論したい。

4. 消化管機能一吸収分泌機能の病態生理

2004年12月16日-17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：岡田泰伸

- (1) 胃酸分泌機構に関与する塩素イオン輸送蛋白質
酒井秀紀, 高橋佑司, 大平裕太, 藤井拓人, 森井孫俊, 竹口紀晃
(富山医科薬科大学 薬学部 薬物生理学)
- (2) *Vibrio mimicus* の溶血毒が腸管上皮細胞イオン輸送に与える影響
高橋 章 (徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部
生体システム栄養科学部門 医療栄養科学講座 代謝栄養学分野)
- (3) 海水ウナギの上部食道括約筋の収縮調節：飲水行動の調節
安藤正昭 (広島大学 総合科学部 総合生理学研究室)
- (4) 飲酒行動に関与するコレシストキニン受容体
宮坂京子, 細矢博子, 関目綾子, 高野紗恵子, 太田稔, 金井節子
(東京都老人総合研究所 生体機能調節と加齢研究グループ)
- (5) 消化管におけるβカロテン開裂酵素遺伝子の発現とその調節
合田敏尚, 駿河和仁 (静岡県立大学 食品栄養科学部 栄養生理学研究室)
- (6) 小腸絨毛上皮下線維芽細胞ネットワークは小腸のメカノセンサーか
古家喜四夫¹, 古家園子², 曾我部正博^{1,3,4}
(¹ 科学技術振興機構 細胞力覚プロジェクト, ² 生理学研究所 脳機能計測センター,
³ 名古屋大学大学院医学研究科, ⁴ 生理学研究所 細胞内代謝部門)
- (7) 消化管上皮の細胞代謝を制御する membrane-type serine protease 1
都築 巧 (京都大学大学院農学研究科)
- (8) マウス胚性幹細胞から分化誘導した腸管様細胞塊
高木 都, 中山晋介*, 三澤裕美, 中川 正
(奈良県立医科大学医学科 第二生理学, *名古屋大学大学院医学研究科 医学部細胞科学)
- (9) ペプチドミルク哺育ラットにおける膵消化機能発達の遅延
木ノ内 俊, 矢島 高二 (明治乳業 (株) 食機能科学研究所)
- (10) 生体エネルギー代謝に及ぼす AMP キナーゼの調節作用
箕越靖彦 (生理学研究所 生殖・内分泌系発達機構研究部門)
- (11) 若齢および老齢ラットにみられる NPY, orexin, ghrelin の摂食促進効果の相違
高野紗恵子^{1,2}, 金井節子¹, 細矢博子¹, 太田 稔¹, 植松 宏², 宮坂京子¹
(¹ 東京都老人総合研究所 生体機能調節と加齢研究グループ,
² 東京医科歯科大学 高齢者歯科学)
- (12) 胃幽門線粘液開口放出の調節機構
中張隆司 (大阪医科大学 第一生理)
- (13) 上皮膜における CFTR クロライドチャンネルと SLC26 クロライド重炭酸イオン交換輸送体の機能連関
洪 繁, 石黒 洋*, 成瀬 達
(名古屋大学大学院 病態修復内科学, *名古屋大学大学院 健康栄養医学)

(14) 膵導管細胞の管腔膜を介する重炭酸イオン輸送

石黒 洋¹, 洪 繁², 近藤孝晴¹, 成瀬 達²

(¹名古屋大学大学院医学系研究科 健康栄養医学 (総合保健体育科学センター),

²名古屋大学大学院医学系研究科 病態修復内科学)

(15) 耳下腺での重炭酸イオン分泌機構 (逆転電位測定グラミシジン穿孔パッチ法による解析)

廣野 力, 柴 芳樹, 杉田 誠, 岩佐 佳子

(広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 病態探究医科学講座 口腔生理学研究室)

(16) 複合培養細胞系を用いた腸管上皮細胞と免疫系細胞の相互作用解析

薩 秀夫, 清水 誠

(東京大学大学院農学生命科学研究科 応用生命化学専攻食糧化学研究室)

(17) ラット小腸杯細胞が産生する酸性ムチンの変動—寄生虫感染とカテキン投与

石原和彦^{1,2}, 伊東祐子², 高野裕子², 中村 健³

(¹北里大学 医療衛生学部 病態生化学, ²北里大学大学院医療系研究科 生体制御生化学,

³北里大学 医学部 寄生虫学)

(18) マウス盲腸における HCO₃⁻分泌とプロピオン酸吸収

鈴木裕一, 林 久由, 川俣幸一 (静岡県立大学 食品栄養科学部)

【参加者名】

古家喜四夫(科学技術振興機構 細胞力覚プロジェクト), 薩 秀夫 (東京大学大学院 農学生命科学研究科), 宮坂京子, 太田 稔, 細矢博子, 関目綾子, 高野紗恵子 (東京都老人総合研究所 生体機能調節と加齢研究グループ) 成瀬 達, 洪 繁 (名古屋大学大学院 医学系研究科), 石黒 洋 (名古屋大学 総合保健体育科学センター), 柴 芳樹, 廣野 力 (広島大学大学院 医歯薬総合研究科口腔生理学), 宮本賢一 (徳島大学大学院 ヘルスバイオ研究部分子栄養分野), 石原和彦 (北里大学医療衛生学部 同大学院医療系研究科), 桑原厚和, 三井 烈 (静岡県立大

学 環境科学研究所), 山本 武 (富山医科薬科大学 和漢薬研究所), 高木 都 (奈良県立医科大学 第二生理), 都築 巧 (京都大学大学院 農学研究科), 安藤正昭 (広島大学 総合科学部), 高橋 章 (徳島大学大学院 ヘルスバイオ研究部代謝栄養学), 鈴木裕一, 合田敏尚, 林 久由, 内山尚和 (静岡県立大学 食品栄養科学部), 中張隆司, 藤原祥子, 加藤益美 (大阪医科大学 生理学), 酒井秀紀, 藤井拓人 (富山医大 薬学部薬物生理), 矢島高二, 木内 俊 (明治乳業 食機能化学研究所), 箕越靖彦, 岡田泰伸 (生理学研究所)

【概要】

研究会は12月16日と17日の2日間行われ, 34名の参加を得た。1日目の午後に10演題の発表, 2日目の午前に8演題の発表が行われた。その内容として, 腸管栄養素吸収, 分泌腺からの分泌, 上皮下線維芽細胞等に関する基礎的な研究の発表が行われた。発生分化や比較生理学的な側面の発表もあった。寄生虫感染, 細菌感染, 炎症モデル系の開発に関する発表もあった。また, 食欲や代謝調節といった, 消化管と極めて密接に関連した内

容の発表も行われた。ほぼ総ての発表において, 多かれ少なかれ病態生理との関連が議論された。病態生理的側面の研究は, 治療に結びつく応用面での効果のみならず, 学問発展の上で極めて有効なアプローチの一つであることが明らかになった。また, 総ての発表に関してきわめて活発で suggestive な討論が行われた。今後の消化管の研究の発展につながる有意義な研究会であった。

(1) 胃酸分泌機構に関与する塩素イオン輸送蛋白質

酒井秀紀, 高橋佑司, 大平裕太, 藤井拓人, 森井孫俊, 竹口紀晃

(富山医科薬科大学 薬学部 薬物生理学)

胃酸 (HCl) のプロトンは H^+ , K^+ -ATPase により分泌されることがわかっているが, 塩素イオンの分泌機構については未確定である。これまで, 米国のグループにより塩素イオン分泌の分子実体としては CIC-2 塩素イオンチャンネルが提唱されている。我々は CIC-2 の胃における発現と分布を調べ, 胃酸分泌への関与を検討した。また, CIC-5 の発現についても検討した。CIC-2 導入細胞の膜タンパク質をポジティブコントロールとしたウェスタンブロットの結果, ウサギとラットの胃粘膜には CIC-2 は検

出できなかった。ラット胃粘膜における免疫組織染色においても CIC-2 のシグナルは検出できなかった。これらの結果から, CIC-2 が塩素イオン分泌の分子実体ではないと考えられた。一方, 我々は H^+ , K^+ -ATPase に富むブタ胃ベシクルに CIC-5 が多く発現していることを見出した。ブタ胃粘膜において CIC-5 と H^+ , K^+ -ATPase との細胞内局在部位が一致した。また, 胃ベシクルを用いた免疫沈降により, CIC-5 と H^+ , K^+ -ATPase が分子会合していることが示唆された。

(2) *Vibrio mimicus* の溶血毒が腸管上皮細胞イオン輸送に与える影響

高橋 章 (徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部)

生体システム栄養科学部門医療栄養科学講座 代謝栄養学分野)

細菌性食中毒の主要な臨床症状の一つとして下痢が挙げられる。下痢が起こるとき, 腸管での物質分泌吸収に変化が起こると考えられる。このとき腸管でのイオン分泌吸収も変化すると考えられる。本研究では, *vibrio mimicus* の産生分泌する溶血毒 (VMH) が, 腸管上皮細胞のイオン輸送に与える影響について解析を行った。フィルター上に単層培養したヒト培養腸管上皮細胞 (Caco-2 細胞) に $1 \mu\text{g/ml}$ の VMH を添加すると, 短絡電流の増加を認

め, また Caco-2 細胞からの ^{125}I の流出を促進した。これは Caco-2 細胞からの Cl^- 分泌を促進するためであると考えられた。VMH は細胞内 Ca^{2+} 濃度と細胞内 cAMP 量を増加させた。さらに VMH による短絡電流の増加や ^{125}I の流出促進は, 細胞内 Ca^{2+} 濃度増加阻害や Rp-cAMP の前投与により阻害された。これらのことより, VMH は細胞内 Ca^{2+} 濃度増加や cAMP 量増加に依存的に腸管上皮細胞からの Cl^- 分泌を促進させると考えられた。

(3) 海水ウナギの上部食道括約筋の収縮調節：飲水行動の調節

安藤正昭 (広島大学 総合科学部 総合生理学研究室)

飲水行動は大部分の陸上脊椎動物や海産魚にとって, 生命維持のための必須の行動である。海水ウナギは水中に棲むので, 上部食道括約筋 (UES) が弛緩すれば水は消化管に入る。そのぶん神経回路も単純で, モデルとしては哺乳類より優れていると思われる。UES は延髄の Glossopharyngeal vagal motor complex (GVC) によって Cholinergic innervation を受けている。迷走神経は延

髄を出た後 10 本の分枝に別れるが, そのうち 5 番目の分枝 (X5) のみが UES を支配していた。X5 の至適周波数は 20 Hz 付近で, 同様の至適周波数は除神経した UES 筋でも見られ, それは温度や Ca^{2+} -ATPase 阻害剤の影響を受けた。延髄の GVC ニューロンの自発発火も 20 Hz 付近であった。このことはウナギの UES は通常強く収縮し, 水が消化管に入らないようになっていることを示唆

する。一方 UES 筋は Isotocin (IST) によって濃度依存的に弛緩する。この効果は Oxytocin 受容体の Antagonist である (d(CH₂)₅¹, Tyr(Me)², Thr⁴, Orn⁸, Tyr-NH₂⁹) Vasotocin によって完全に抑えられた。また 8Br-cAMP, Forskolin, IBMX も IST と同様な効果を示すことから, IST は cAMP

を介して弛緩を惹起していると考えられる。IST はまた神経刺激による UES の収縮を増強させた。以上の結果から, IST は迷走神経の効果にコントラストをつけていることが考えられる。

(4) 飲酒行動に関与するコレシストキニン受容体

宮坂京子, 細矢博子, 関目綾子, 高野紗恵子, 太田 稔, 金井節子
(東京都老人総合研究所 生体機能調節と加齢研究グループ)

慢性膵炎のうち特に男性ではアルコールに起因する頻度が高く, 70% 近くを占めている。しかしアルコール多飲(依存症)者の 90% 以上が肝臓障害を伴うのに比較し, 慢性膵炎と診断される割合は~5% に留まっている。このギャップの原因は, 遺伝的要因の相違が関係することが予測されているが明らかでない。アルコールや薬物に対する嗜好性は, 脳における mesolimbic dopamine neuron が重要である。この経路には約 40~50% に CCK が混在し, 側坐核では CCK-A 受容体 (R) が dopamine release を調節している。そこで CCK-AR 遺伝子多型 (A-81G, G-128T) の分布をしらべたところ, -81G アリルの頻度がアルコール依存症で有意に高く, -81G アリルを持つ依存症の個体は, より難治性であった。しかし, 慢性膵炎では

対照群と差を認めなかった。Cell line 化された CCK-AR を発現するヒト細胞が存在しないため, マウス由来 STC-1 細胞で検討したが, 変異は転写活性をわずかに減少させたのみで有意ではなかった。そこで, CCK-AR (-/-) マウスを用いて解析した。CCK-AR (-/-) マウスは, 飲酒量, 飲水量が共に増加していた。また, CCK-AR (-/-) マウスは夜間の行動量が高い傾向を示した。側坐核の dopamine2R を Western blot で測定すると, CCK-AR (-/-) マウスでは, dopamine2R 発現量が有意に増加していた。ドーパミン 2R (-/-) マウスは, 行動量や意欲が低下し, 酒を嫌うという報告があることから, CCK-AR 欠損がドーパミン系の機能を変化させたことが関係していると考えられる。

(5) 消化管におけるβカロテン開裂酵素遺伝子の発現とその調節

合田敏尚, 駿河和仁 (静岡県立大学 食品栄養科学部 栄養生理学研究室)

βカロテン開裂酵素 (以下 BCMO) は, β-カロテン 1 分子から 2 分子のレチナールを産生する 15, 15'-BCMO と 1 分子のβ-アポカロテナールを産生する 9', 10'-BCMO が存在し, 最近, ヒトやラットなどからそれぞれの cDNA がクローニングされた。本研究では, ラットの各組織および腸管各部位における 2 種類の BCMO 遺伝子についてその発現量をリアルタイム RT-PCR 法により定量的に解析した。7 週齢の SD 系雄ラットの各組織の 15, 15'-BCMO mRNA 量は, 肝臓に比べて小腸では高く, その中でも空腸上部で最も高かった。9', 10'-BCMO mRNA 量は, 小腸上部と肝臓で同じ程度の発現量を示したが, 空腸上部の

9', 10'-BCMO mRNA 量は 15, 15'-BCMO の 10% に過ぎなかった。ラットに 19% コーン油食を経口投与し, 投与 6 時間後に空腸におけるこれら 2 種類の BCMO の mRNA 量を調べたところ, 15, 15'-BCMO mRNA 量が脂肪投与により減少していた。ヒトとラットの 15, 15'-BCMO 遺伝子の 5' 上流域には TATAbox 近傍に DR-1 型の核内レセプター応答領域があり, HNF4 が顕著に結合していた。摂取したβカロテンは, 小腸では主に 15, 15'-型の BCMO によってレチナールに転換していると考えられるが, 脂肪の摂取はその転換を抑制する可能性が考えられた。

(6) 小腸絨毛上皮下線維芽細胞ネットワークは小腸のメカノセンサーか

古家喜四夫¹, 古家園子², 曾我部正博^{1,3,4}

(¹ 科学技術振興機構 細胞力覚プロジェクト, ² 生理学研究所 脳機能計測センター, ³ 名古屋大学大学院医学研究科, ⁴ 生理学研究所 細胞内代謝部門)

小腸絨毛上皮下線維芽細胞 (Subepithelial Fibroblasts) は、上皮基底層直下でネットワークを形成しており、平滑筋や血管にもその突起を伸ばし、エンドセリン、ATP、Sub-P など多様な受容体を持ち、細胞内 cAMP 濃度に応じて細胞の形態を変化させる等の特徴を持つ。さらにこの細胞はタッチやストレッチといった機械刺激に反応し、細胞内 Ca^{2+} 上昇と ATP の放出そして周りの細胞の P2Y1 受容体活性化による細胞間 Ca^{2+} 波を誘起する。この機械的刺激に対する応答性は細胞の形態に依存しており星状になった細胞では抑制された。このような性質から小腸絨毛下線維

芽細胞は絨毛の機械的性質や物質の透過性を制御していると考えられる。また、小腸は水や食物による機械刺激を感知し蠕動運動を開始するなど感覚器とも考えられているが、このメカノセンサーはまだ明らかではない。小腸絨毛の知覚神経終末は絨毛下線維芽細胞のネットワーク直下まで入り込んでおり P2X イオンチャンネル型の ATP 受容体を持っている。小腸絨毛下線維芽細胞は、絨毛の動きを感受し ATP を放出しこの神経の P2X を活性化することによって、小腸におけるメカノセンサーとして機能していることが示唆される。

(7) 消化管上皮の細胞代謝を制御する membrane-type serine protease 1

都築 巧 (京都大学大学院農学研究科)

Membrane-type serine protease 1 (MT-SP1) は上皮細胞で発現する膜結合性のセリンプロテアーゼである。本酵素は悪性腫瘍の浸潤・転移に関与すると考えられているが、正常組織における生理的役割については十分に明らかでない。著者らは正常ラットを用いた検討により MT-SP1 の mRNA が小腸絨毛の先端部で最も強く発現していることをみいだした。In vitro においてリコンビナント MT-SP1 はフィブロネクチンやラミニンといった基底膜を構成する蛋白質を分解することや、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーターを活性化することもわかった。正

常組織における本酵素の細胞内局在は完全にはわかっていないが、Caco-2 細胞を用いた検討から、本酵素は基底膜側 (バソラテラル側) にソートされるということがわかった。活性化後は ectodomain shedding により膜から遊離するので、本酵素は基底膜に接触することが可能であることが示唆された。著者らは本酵素が上皮細胞と基底膜の接着を制御し、このことによって上皮細胞の増殖・分化または細胞死 (細胞代謝) に大きな役割を果たしているものと推察している。

(8) マウス胚性幹細胞から分化誘導した腸管様細胞塊

高木 都, 中山晋介*, 三澤裕美, 中川 正

(奈良県立医科大学医学科 第二生理学, *名古屋大学大学院医学研究科 医学部細胞科学)

私たちはこれまでマウス胚性幹 (ES) 細胞から分化誘導した腸管様細胞塊 (ES 腸管) が、1) 蠕動様の自発運動を起こすこと、2) 形態学的には粘膜、ペースメーカー

細胞 (ICC)、平滑筋層、ギャップジャンクション等が誘導されていること、3) 電気生理学的にはプラトー電位や電氣的な徐波 (slow wave) を発生させること、4) Ca イメー

ジング法により Ca オッシレーションを起こしていること等を報告してきた (Stem Cells 2004; 20: 41-149, Am J Physiol Cell Physiol 2004; 286: C1344-1352)。しかし、蠕動様の運動の発生に必須と思われる壁内神経系 (壁内神経節からなるネットワーク) は見いだすことができなかった。そこで、ES 腸管における蠕動様の自動運動における壁内神経系の関与を解析するために、ES 腸管に壁内神

経系を構築する方法を ES の培養方法を工夫することによって分化誘導する方法を見つけることができた (詳細は特許出願予定のため省略)。ついで、壁内神経系を分化誘導できた ES 腸管において、蠕動様の運動のビデオ記録を始めとして ES 腸管の壁内神経系が生理的な機能を果たしているかどうかの解析を試みたので、その予備的な結果を報告する。

(9) ペプチドミルク哺育ラットにおける膵消化機能発達の遅延

木ノ内 俊, 矢島高二 (明治乳業 (株) 食機能科学研究所)

乳児用ミルクの中には、乳タンパク質の代わりに原料として低アレルゲン性のペプチドを利用したものがある。そこで、ペプチドミルクの膵消化機能発達に対する影響について検討した。その結果、1) 乳タンパク質分解ペプチドの膵酵素分泌促進作用は未分解の乳タンパク質に比べて顕著に弱いことが確認された。2) 膵臓重量はいずれの日齢においてもペプチドミルク群が有意に低く、膵ア

ミラーゼ量、膵トリプシン量はペプチドミルク群が顕著に低いことが確認された。3) ペプチドミルク群は摂取タンパク質に応答して膵消化酵素分泌量を増加させる機能が明らかに弱いことが示された。以上の結果から、ペプチドミルクでの哺育は膵消化機能発達の遅延の原因となる可能性があることが示唆された。

(10) 生体エネルギー代謝に及ぼす AMP キナーゼの調節作用

箕越靖彦 (生理学研究所 生殖・内分泌系発達機構研究部門)

AMP キナーゼ (AMP-activated protein kinase) は、5'-AMP によって活性化される serine/threonine kinase である。AMP キナーゼは、細胞内のエネルギーレベルが低下 (AMP/ATP 比が上昇) によって活性化し、代謝、イオンチャネル活性、遺伝子発現を変化させて細胞内 ATP レベルを回復させる。しかし最近の研究により、AMP キナーゼは、メトホルミンやチアゾリジン系誘導体などの糖尿病治療薬、運動、レプチンやアディポネクチンなどのホルモン、さらには自律神経系によって活性化することが報告され、細胞内エネルギー代謝だけでなく、個体全体

の糖・脂質代謝調節ならびにエネルギー消費の調節に関与することが明らかとなった。さらにごく最近、視床下部 AMP キナーゼが摂食行動に対して制御作用を営むことが判明し、AMP キナーゼは摂食行動とエネルギー消費機構の両調節に関わるシグナル分子として注目されている。本発表では、脂肪細胞産生ホルモン・レプチンの調節作用に関する私どもの研究成果を中心に、生体エネルギー代謝調節における AMP キナーゼの働きについて紹介する。

(11) 若齢および老齢ラットにみられる NPY, orexin, ghrelin の摂食促進効果の相違

高野紗恵子^{1,2}, 金井節子¹, 細矢博子¹, 太田 稔¹, 植松 宏², 宮坂京子¹¹東京都老人総合研究所 生体機能調節と加齢研究グループ,²東京医科歯科大学, 高齢者歯科学)

加齢に伴う食欲低下は健康な高齢者においてもしばしば認められ、食物摂取に関する液性あるいは神経性調節の加齢変化による生理的現象として出現する。

そのメカニズムを探るため、摂食促進因子である orexin-A, -B, NPY, および ghrelin の脳室内投与による効果を若齢, 老齢ラット間で比較検討した。Orexin-A と NPY は若齢ラットにおいて用量依存的に食物摂取を増加させたが, 老齢ラットでは全く効果がみられなかった。Ghrelin はどのラットにおいても用量依存的に摂食行動を亢進させた。Orexin-B はどのラットでも有意な摂食量

の増加を認めなかった。

老齢ラットで orexin-A の摂食促進効果が欠如した原因を調べるため、視床下部における orexin 受容体 (OX1R, OX2R) のタンパク発現量を Western blotting により測定した。OX1R は若齢ラットと比べて老齢ラットでは有意に減少しており, OX2R は若老間で有意な変化は見られなかった。

老齢ラットにおける orexin-A の摂食促進効果の欠如には視床下部の OX1R の減少が関与していることが示唆される。NPY, ghrelin についても今後実験を進める予定である。

(12) 胃幽門線粘液開口放出の調節機構

中張隆司 (大阪医科大学 第一生理)

胃幽門腺粘液細胞開口放出は一過性の高い開口放出頻度を持った初期相と持続的な低い頻度の定常相からなる Ca^{2+} -調節性開口放出により主に調節されている。一方 cAMP-調節性開口放出の頻度は Ca^{2+} -調節性開口放出の 5-10%低い, Ca^{2+} -調節性開口放出の二つのステップを修飾することにより著明に増強している。さらに, アセチルコリンによる細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇はプロスタグランジン E_2 (PGE₂) 産生, 放出を増加させていた。細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は Ca^{2+} 調節性開口放出のみならず, PGE₂

を介した autocrine mechanism により, 開口放出を増強していることが明らかとなった。この autocrine mechanism は, PGE₂ 合成阻害薬である indomethacin (IDM), 或は aspirin (ASA) により抑制される一方で, IDM 単独では開口放出を僅かではあるが活性化した。また AA は胃幽門線において開口放出を活性化した。以上より, 胃幽門腺粘液細胞では, ACh 刺激時には PGE₂ による autocrine mechanism により維持されていることが明らかとなったが, さらに AA により修飾されていることが示唆された。

(13) 上皮膜における CFTR クロライドチャネルと SLC26 クロライド重炭酸イオン交換輸送体の機能連関

洪 繁, 石黒 洋*, 成瀬 達

(名古屋大学大学院 病態修復内科学, *名古屋大学大学院 健康栄養医学)

外分泌上皮膜はクロライドイオン (Cl⁻) と重炭酸イオン (HCO₃⁻) を分泌する。最近この Cl⁻ と HCO₃⁻ 輸送に CFTR Cl⁻チャネルと SLC26 陰イオン輸送体が重要な役割を果たしていると考えられている。以前我々は SLC26 に属す

る DRA の陰イオン輸送活性が CFTR により著明に活性化されることを報告したが, これらの蛋白間相互作用部位についてはわかっていない。そこで今回は SLC26 輸送体のうち DRA と CFTR の蛋白間相互作用部位および

SLC26 が CFTR に及ぼす影響について検討した。HEK293 細胞に CFTR 及び SLC26 輸送体を遺伝子導入により発現させ、その機能を細胞内 pH 測定法およびパッチクランプ法にて測定すると DRA の陰イオン交換活性は約6倍に、CFTR Cl⁻ 電流は約2.5倍に増加した。DRA

の細胞内ドメインである STAS のみを CFTR と共に細胞に発現させても CFTR Cl⁻電流は約3倍に増加した。遺伝子変異 (I668ins) を導入した STAS は逆に CFTR Cl⁻電流を抑制した。以上より SLC26 輸送体は CFTR とその STAS を介して結合し、機能的に連関していると考えられた。

(14) 膵導管細胞の管腔膜を介する重炭酸イオン輸送

石黒 洋¹, 洪 繁², 近藤孝晴¹, 成瀬 達²

¹名古屋大学大学院医学系研究科 健康栄養医学 (総合保健体育科学センター),

²名古屋大学大学院医学系研究科 病態修復内科学)

モルモットの膵臓から単離した小葉間膵管は、管腔内を高濃度 (125 mM) の HCO₃⁻溶液で満たした状態でも、secretin で刺激すると HCO₃⁻を管腔内に分泌する。この時、細胞内 HCO₃⁻濃度 (BCECF による pH 測定) は約 20 mM, 細胞内電位 (微小電極による) は約 -60 mV であり、管腔膜を介する HCO₃⁻の電気化学勾配は細胞内から管腔に向かう。今回は、細胞内 pH 測定による管腔膜 HCO₃⁻ conductance の概算を試みた。単離膵管の表層を

HCO₃⁻-free 溶液で、管腔を 125 mM HCO₃⁻溶液で灌流し、表層灌流液には H₂DIDS と methyl-isobutyl-amiloride を加えて基底側膜を介する HCO₃⁻輸送を阻害した。この状態で、表層灌流液の K⁺濃度を 70 mM に上げて脱分極 (-40 mV) させると、細胞内 pH は上昇した。この管腔膜を介する起電性の HCO₃⁻流入速度から HCO₃⁻ conductance を概算した。

(15) 耳下腺での重炭酸イオン分泌機構 (逆転電位測定グラミシジン穿孔パッチ法による解析)

廣野 力, 柴 芳樹, 杉田 誠, 岩佐佳子

(広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 病態探究医科学講座 口腔生理学研究室)

ラット耳下腺でのカルバコール (CCh) による陰イオン分泌をグラミシジン穿孔パッチ法で解析したところ、腺房細胞では Cl⁻が分泌され HCO₃⁻の分泌は少ないこと、導管細胞では主に HCO₃⁻が分泌されることが示唆された。導管での HCO₃⁻分泌における Cl⁻チャンネル透過性と HCO₃⁻濃度の関与を明らかにするため、-80 mV に電位固定した条件下で陰イオン電流とコンダクタンスを測定し、陰イオン電流の逆転電位を計算した。CCh により陰イオン電流の誘導とコンダクタンスの増加が起こり、陰イオン電流の逆転電位が -80 mV から数 mV 正の方向に上昇した。炭酸脱水酵素阻害剤メタゾラミドはコンダク

タンスを抑制せず CCh による逆転電位の上昇と陰イオン電流を抑制したことから、この逆転電位の上昇は細胞内 HCO₃⁻濃度の上昇を反映していることが示唆される。CCh 刺激により HCO₃⁻産生亢進による HCO₃⁻濃度の上昇とイオンチャンネル透過性の亢進のもとで HCO₃⁻分泌が維持されていると推定した。HCO₃⁻電流の逆転電位を求めたところ -80 mV 付近から約 -60 mV に変化した。以上より -80 mV で静止時の細胞内 HCO₃⁻濃度はほぼ平衡 (1.2 mM) になっているが、刺激時には HCO₃⁻産生系の活性化で HCO₃⁻濃度が 2 倍に上昇する結果 HCO₃⁻が分泌されることが示唆された。

(16) 複合培養細胞系を用いた腸管上皮細胞と免疫系細胞の相互作用解析

薩 秀夫, 清水 誠

(東京大学大学院農学生命科学研究科, 応用生命化学専攻食糧化学研究室)

腸管上皮細胞とその直下に存在する免疫系細胞との間では、サイトカインなど液性因子を介した相互作用が起きていることが考えられる。そこで我々は腸管上皮細胞とマクロファージ様細胞の複合培養細胞系を構築し、このモデル系において両者の間でどのような相互作用が起きているか解析することとした。腸管上皮細胞のモデルとしてヒト結腸癌由来株化細胞 Caco-2 を用い透過性膜上で単層培養して小腸上皮様に分化させた。またマクロファージ様細胞のモデルとして THP-1 を用い、PMA 処理によりマクロファージ様に分化させた。THP-1 の接着したプレート上に Caco-2 を分化させた透過性膜を移す

ことで、複合培養を開始した。その結果 THP-1 細胞と複合培養した Caco-2 細胞について、LDH 毒性試験及び経上皮電気抵抗 (TER) を測定したところ、複合培養 48 時間以降で LDH 放出率の増加及び TER 値の低下が認められた。そこで、複合培養時に THP-1 が分泌することが確認されたサイトカイン類の中和抗体を加えたところ、抗 TNF- α 抗体によって Caco-2 細胞の LDH 放出率の増加及び TER 値の低下が有意に抑制された。これより THP-1 との複合培養による Caco-2 の細胞障害は、THP-1 が分泌した TNF- α に起因することが示唆された。

(17) ラット小腸杯細胞が産生する酸性ムチンの変動—寄生虫感染とカテキン投与

石原和彦^{1,2}, 伊東祐子², 高野裕子², 中村 健³ (¹北里大学 医療衛生学部 病態生化学,
²北里大学大学院医療系研究科 生体制御生化学,³北里大学 医学部 寄生虫学)

消化管の病態生理とムチンの量的・質的変動との関係を研究するため、我々は抗ムチンモノクローナル抗体 (mAb) を開発して来た。今回は、酸性ムチンの特定の糖鎖を認識する mAb である PGM34 (スルホムチンと反応) と、HCM31 (シアロムチンと反応) を主として用いた。齧歯類腸管寄生線虫 *Nippostrongylus braziliensis* (N.b) は感染成立後、宿主小腸粘膜の粘膜抵抗性によって排除され、再感染を試みても最終寄生部位に定着することはない。N.b の排虫現象には宿主小腸粘液の量的・質的変動が関与するといわれている。方法: Wistar 系ラットに N.b 第 III 期幼虫を感染させ経時的に宿主消化管を採取した。mAb を用いた免疫組織化学染色で消化管を観察すると

共に、消化管の各部位からムチンを抽出・分離し、その量的変動および ELISA を用いた mAb との反応性の変化を調べた。結果: 最終寄生部位である小腸上部の重量、ムチン量は N.b 感染後増加し、虫体排除が完成する感染 15 日目で最大となり、その後減少した。組織染色および ELISA の結果から、杯細胞における HCM31 陽性ムチンの産生が 15 日前後で顕著となったのに対して、PGM34 陽性ムチンの変動は乏しかった。また虫体排除後に再感染を試みた場合、投与 6 日目前後に同様の変動が見られた。まとめ: 腸管寄生虫の感染に伴って、特定の化学的性質をもつ酸性ムチンが宿主小腸の特定の部位で大きく変動することがわかった。

(18) マウス盲腸における HCO₃⁻分泌とプロピオン酸吸収

鈴木裕一, 林 久由, 川俣幸一 (静岡県立大学 食品栄養科学部)

未消化の糖質は大腸で腸内細菌の発酵作用により短

鎖脂肪酸 (酢酸, プロピオン酸, 酪酸) となる。その

一部は大腸で代謝され残りの大部分は吸収される。今回 Ussing chamber でマウス盲腸プロピオン酸吸収を検討した。管腔側液プロピオン酸 25 mM 存在下での ^{14}C -プロピオン酸吸収速度は（漿膜側液はプロピオン酸を含まない）、漿膜側液が HEPES 緩衝系 (100% O_2) のときに比較し、 $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ 緩衝系 (95% $\text{O}_2/5\% \text{CO}_2$) のほうが大きく、またこの増大は炭酸脱水酵素阻害剤で抑制された。同様に、漿膜側液 $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ 依存性の管腔側アルカリ分泌速度と管腔側 total CO_2 分泌速度が観察され、いずれも

炭酸脱水酵素阻害剤で抑制された。 $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ 依存性・炭酸脱水酵素感受性のプロピオン酸吸収速度、管腔側アルカリ分泌速度、および管腔側 total CO_2 分泌速度の3者はほぼ等しい値であった。漿膜側液 $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ 依存性・炭酸脱水酵素感受性のプロピオン酸吸収は短絡電流変化を引き起こさなかった。結論：マウス盲腸でのプロピオン酸吸収の少なくとも一部は、非起電性のプロピオン酸/ HCO_3^- 交換輸送により起こる。

5. 上皮輸送の新たな展開：生体防御の最前線

2004年11月16日－11月17日

代表・世話人：丸中良典（京都府立医科大学生理機能制御学）

所内対応者：岡田泰伸（細胞器官研究系機能協関部門）

- (1) Meniere's disease（内リンパ水腫）の病態生理と新しい治療法の開発
河原 克雅, 川田 英明（北里大学医学部・生理）
長沼 英明, 岡本 牧人（北里大学医学部・耳鼻科）
- (2) 高浸透圧刺激による活性化するカチオンチャンネルの上皮細胞容積調節における役割
清水 貴浩, 岡田 泰伸, サビロブ ラブシャン（生理研・機能協関）
ベーター フランク（生理研・機能協関, マックスプランク・分子生理）
- (3) アミノ酸トランスポーターの上皮細胞における極性集積と細胞膜移行を規定する因子の探索
金井 好克（杏林大学医学部・薬理学）
- (4) 骨シアロタンパク質の転写に対するフラボノイドの影響
小方 頼昌（日本大学松戸歯学部・歯周病学講座）
- (5) ヘリコバクター・ピロリ菌病原因子 CagA による SHP-2 シグナルの脱制御
畠山 昌則（北海道大学遺伝子病制御研究所・分子腫瘍分野）
- (6) 血圧調節における腎遠位尿細管細胞でのナトリウム再吸収の制御機構
新里 直美, 青井 渉, 宮崎 裕明, 丸中 良典
（京都府立医科大学大学院・生理機能制御学）
- (7) 胃幽門線粘液 Ca^{2+} 調節性開口放出のインドメサシンによる修飾；アラキドン酸による活性化
中張 隆司（大阪医科大学・第一生理）
- (8) 変異解析とホモロジーモデリングによる胃酸分泌プロトンポンプの構造機能相関の解明
浅野 真司（立命館大学・情報理工学部）
森井 孫俊（富山医科薬科大学・薬学部）
- (9) 大腸イオン輸送と Protease-activated receptor
鈴木 裕一, 池原 修（静岡県立大学・食品栄養科学部）
- (10) 抗酸化性食品成分による消化管粘膜ホモジネート酸化抑制作用
室田 佳恵子, 寺尾 純二
（徳島大学大学院・ヘルスバイオサイエンス研究部食品機能学分野）
- (11) 生体内で有効なポリフェノール・フラボノイド
金沢 和樹（神戸大学農学部・生物機能化学科・食品・栄養化学教室）
- (12) ヘリコバクター・ピロリの空胞化致死毒素の作用機序
和田 昭裕（長崎大学・熱帯医学研究所・病原因子機能解析分野）
- (13) 偽性低アルドステロン症 II 型原因遺伝子 WNK4 キナーゼの膜輸送体局在機構に対する影響
内田 信一, 楊 松 昇, 山内 小津枝, 佐々木 成
（東京医科歯科大学・腎臓内科）
- (14) Isoliquiritigenin の大腸がん予防効果に向けて—ILTG の COX-2 依存性アポトーシス誘発効果—
高橋 徹行, 馬場 正樹, 奥山 徹（明治薬科大学・天然薬物学）
西野 輔翼（京都府立医科大学・分子生化学）

【参加者名】

河原 克雅 (北里大学医学部・生理), 川田 英明 (北里大学医学部・生理), 長沼 英明 (北里大学医学部・耳鼻科), 岡本 牧人 (北里大学医学部・耳鼻科), 清水 貴浩 (生理研・機能協関), サビロブ ラブシャン (生理研・機能協関), 岡田 泰伸 (生理研・機能協関), ベーナー フランク (生理研・機能協関, マックスプランク・分子生理), 金井 好克 (杏林大学医学部・薬理学教室), 小方 頼昌 (日本大学・松戸歯学部・歯周病学講座), 畠山 昌則 (北海道大学・遺伝子病制御研究所・分子腫瘍分野), 新里 直美 (京都府立医科大学大学院・生理機能制御学), 青井 渉 (京都府立医科大学大学院・生理機能制御学), 宮崎 裕明 (京都府立医科大学大学院・生理機能制御学), 丸中 良典 (京都府立医科大学大学院・生理機能制御学), 中張 隆司 (大阪医科大学・第一生理), 浅野 真司 (立命館大学・情報理工学部), 森井 孫俊 (富

山医科薬科大学・薬学部), 鈴木 裕一 (静岡県立大学・食品栄養科学部), 池原 修 (静岡県立大学・食品栄養科学部), 室田 佳恵子 (徳島大学大学院・ヘルスバイオサイエンス研究部・食品機能学分野), 寺尾 純二 (徳島大学大学院・ヘルスバイオサイエンス研究部・食品機能学分野), 金沢 和樹 (神戸大学農学部・生物機能化学科・食品・栄養化学教室), 和田 昭裕 (長崎大学・熱帯医学研究所・病原因子機能解析分野), 内田 信一 (東京医科歯科大学・腎臓内科), 楊松 昇 (東京医科歯科大学・腎臓内科), 山内 小津枝 (東京医科歯科大学・腎臓内科), 佐々木 成 (東京医科歯科大学・腎臓内科), 高橋 徹行 (明治薬科大学・天然薬物学), 馬場 正樹 (明治薬科大学・天然薬物学), 奥山 徹 (明治薬科大学・天然薬物学), 西野 輔翼 (京都府立医科大学・分子生化学)

【概要】

上皮組織は, 生体における外部からの刺激に対する種々のバリアーとなり, また体内環境の恒常性を保つ上で, 重要な役割を担っている。体血圧や体液量といった生命維持に不可欠な要素は上皮組織におけるナトリウム吸収により制御されている。さらに, 呼吸器における防御機構はクロライド分泌を通じた水分分泌により制御されており, クロライド分泌異常により, 種々の感染が引き起こされ, 生体機能の重篤な失調を引き起こす。体内環境恒常性維持および生体防御という観点において, 上皮組織は, その経上皮輸送を介して, 重要な働きを担っている。

上皮輸送に関する多くの研究は, 内分泌系および神経系といった内因性の制御という観点からなされてきた。しかしながら, 外因的な制御物質探索という観点からの研究成果はほとんどない。生体防御および疾病予防の観点から種々の生理活性・薬理活性を有する物質の発見が望まれている。種々の生理活性を有した物質の探索を含め, 種々の研究分野で発見されつつある物質の生理活性に関する研究を, 生体防御および疾病予防の観点からの研究へと発展させること, および参加者間の共同研究推進を目的として, 本研究会の開催した。

(1) Meniere's disease (内リンパ水腫) の病態生理と新しい治療法の開発

河原 克雅, 川田 英明 (北里大学医学部・生理)
長沼 英明, 岡本 牧人 (北里大学医学部・耳鼻科)

メニエール病 (Dr P Meniere, 1799-1862) は, めまい, 難聴, 耳閉塞感を伴う内耳の病気である。病理組織学的には, 内リンパ水腫-膜迷路内圧の増加による Reissner 膜の伸展や破断が観察される。ホルモンと水電解質バランスの異常およびさまざまな身体的ストレス (疲労, 感染, 精神的圧迫) が発症要因と考えられるが, その詳細は不明である。最近の動物実験 (Kumagami et al, 1998) や臨床

的研究 (Takeda et al, 1995) によれば, 血中 ADH (抗利尿ホルモン) 濃度の増加が, 内リンパ水腫をひきおこしていることを示唆している。われわれは, ABR (聴性脳幹反射) と微小電極法を用い, (自発呼吸) 麻酔下ラット腹腔に ADH を投与後, 聴力と内リンパ電位 (EP) の一過性低下と, さらに, EP の電位振幅増大 (一過性) を観察した。今回用いた ADH 用量は, 実験的 (病理組織学的) 内リンパ

水腫の発症に必要な ADH 用量の 1/10 以下であった。これらの結果は、血中 ADH の生理的増加が、内リンパ水腫と Reissner 膜の破断を引き起こさないで、内耳血管条などの内リンパ産生に必要なイオン輸送機構において病

的状態をひきおこし、EP 低下と聴力低下を引き起こしたことを示す。われわれは、動物実験の結果を元に、メニエール病の新しい治療法の開発を推進している。

(2) 高浸透圧刺激による活性化するカチオンチャンネルの上皮細胞容積調節における役割

清水 貴浩, 岡田 泰伸, サビロブ ラブシャン (生理研・機能協関)
ベナー フランク (生理研・機能協関, マックスプランク・分子生理)

ほとんどの上皮細胞において、高浸透圧刺激により生じる細胞収縮後でも、細胞容積は元に戻る。このメカニズムは、調節性容積増加 (RVI) と呼ばれ、NaCl の取り込みに伴う水の流入によって成し遂げられる。この過程には、様々なイオン輸送経路が関与していることが知られている。今回我々は、ヒト上皮 HeLa 細胞において高浸透圧刺激時に活性化するイオンチャンネルを見出したので、その電気生理学的性質と RVI への寄与について検討した。この高浸透圧刺激により活性化されるチャンネル活性は電位と時間に非依存的であり、イオン選択性

は $\text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Cs}^+ \gg \text{Ca}^{2+}$ であった。また非選択性カチオンチャンネルブロッカーである amiloride, Gd^{3+} , flufenamate, SKF96365 を投与してみたところ、amiloride には感受性がなかったが、その他のブロッカーにより阻害された。RVI 過程もこれらブロッカーによって抑制された。これらの結果から、HeLa 細胞の RVI 過程には、高浸透圧刺激後の細胞収縮により活性化される Ca^{2+} 非透過性非選択性カチオンチャンネルが重要な役割を果たしていることが示唆された。

(3) アミノ酸トランスポーターの上皮細胞における極性集積と細胞膜移行を規定する因子の探索

金井 好克 (杏林大学医学部・薬理学)

SLC7 (solute carrier 7) ファミリーに属する 12 回膜貫通型タンパク質は、その細胞膜移行に 1 回膜貫通型糖タンパク質を必要とする。この 1 回膜貫通型タンパク質としては、4F2hc (4F2 heavy chain) と rBAT (related to $\text{b}^0, +$ -type amino acid transporter) の 2 つが知られ、両者はそれぞれ特定の 12 回膜貫通型トランスポーターとジスルフィド結合を介して連結し、ヘテロ二量体型アミノ酸トランスポーターを形成する。腎尿管及び小腸の上皮細胞においては、4F2hc は側基底側に分布し、rBAT は管腔側に分布する。4F2hc, rBAT による 12 回膜貫通型トランスポーターの認識は、膜貫通領域周辺により行われ、管腔側/側基底側ソーティングが 1 回膜貫通型タンパク質の細胞内ドメインにより決定されることが、4F2hc と rBAT のキメラ解析により示唆された。

1 回膜貫通型タンパク質 rBAT は、12 回膜貫通型トラ

ンスター-BAT1 と連結し、腎近位尿管管腔側膜のシスチントランスポーターを形成する。その遺伝的欠損であるシスチン尿症の症例から、BAT1 の C-末端細胞内ドメインの変異が見い出された。BAT1 の C-末端には電位依存性 Ca チャンネル Cav1.2 の "targeting domain" と相同な配列があり、この部分の deletion によりパートナーである rBAT の糖付加が阻害され、膜移行が障害されることが明らかとなった。BAT1 の C-末端には複数のタンパク質間相互作用に関わるドメインがあり、これを介して多様な調節を受ける可能性が示唆された。

ほとんどの上皮細胞において、高浸透圧刺激により生じる細胞収縮後でも、細胞容積は元に戻る。このメカニズムは、調節性容積増加 (RVI) と呼ばれ、NaCl の取り込みに伴う水の流入によって成し遂げられる。この過程には、様々なイオン輸送経路が関与していることが知ら

れている。今回我々は、ヒト上皮 HeLa 細胞において高浸透圧刺激時に活性化するイオンチャンネルを見出したので、その電気生理学的性質と RVI への寄与について検討した。この高浸透圧刺激により活性化されるチャンネル活性は電位と時間に非依存的であり、イオン選択性は $\text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Cs}^+ \gg \text{Ca}^{2+}$ であった。また非選択性カチオンチャンネルブロッカーである amiloride, Gd^{3+} , flufenamate, SKF96365 を

投与してみたところ, amiloride には感受性がなかったが, その他のブロッカーにより阻害された。RVI 過程もこれらブロッカーによって抑制された。これらの結果から, HeLa 細胞の RVI 過程には, 高浸透圧刺激後の細胞収縮により活性化される Ca^{2+} 非透過性非選択性カチオンチャンネルが重要な役割を果たしていることが示唆された。

(4) 骨シアロタンパク質の転写に対するフラボノイドの影響

小方 頼昌 (日本大学松戸歯学部・歯周病学講座)

骨シアロタンパク質 (BSP) は, 石灰化初期に石灰化結合組織特異的に発現し, アパタイト結晶形成能を有することから石灰化における役割が注目されている。さらに BSP は, 乳ガン, 前立腺ガン病巣で異所性に発現し, 骨転移に関与することが報告されている。本研究では, BSP の転写に対するフラボノイドの影響を検索した。

骨芽細胞様細胞 (ROS17/2.8 細胞) をフラボノイドで刺激し, ノーザンプロット解析を行った結果, BSPmRNA 量はイソフラボンである genistein, daidzein および flavone (50 μM , 12h) 刺激により上昇した。次に, BSP 遺伝子プロモーターの長さを調節して作成したルシフェラーゼプラスミドおよび塩基配列を一部変化させた変異ルシフェラーゼプラスミド使用して, フラボノイドの BSP の転

写に対する効果を検索した結果, genistein 刺激で転写開始位置より-116塩基対上流までの BSP プロモーターを含むコンストラクト (pLUC3) とそれよりも長い配列を含むコンストラクトで転写活性が上昇した。同様に daidzein, flavone および flavanone 刺激で pLUC3 の転写活性が上昇した。pLUC3 の変異ルシフェラーゼプラスミドを用いてフラボノイドの影響を検索した結果, 逆方向の CCAAT 配列が関与すると考えられた。CCAAT 配列に結合する転写因子は NF-Y であることがすでに同定されているが, 逆方向の CCAAT 配列に対する NF-Y 転写因子の結合は, フラボノイド刺激前後で変化しなかった。以上の結果から, フラボノイドは BSP の転写を促進し, その効果は, 逆方向の CCAAT 配列を介していると考えられた。

(5) ヘリコバクター・ピロリ菌病原因子 CagA による SHP-2シグナルの脱制御

畠山 昌則 (北海道大学遺伝子病制御研究所・分子腫瘍分野)

胃癌発症に重要な役割を果たすピロリ菌病原因子 CagA は, IV 型分泌機構を介して菌体内から接触した胃上皮細胞内に直接注入され, Src ファミリーキナーゼによりチロシンリン酸化を受ける。チロシンリン酸化 CagA は SH2 ドメインを介して SHP-2 チロシンホスファターゼと特異的に結合し, その酵素活性を著しく増強する。CagA による SHP-2 の脱制御は, 胃上皮細胞の運動性の亢進と細胞質の著しい伸長を引き起こす。CagA のチロシンリン酸化部位は Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA) サイトの存在で特徴づけられる。一般に CagA は保存された EPIYA-A サイ

トならびに EPIYA-B サイトを有し, その COOH 末側に欧米型ピロリ菌由来 CagA 特異的な EPIYA-C サイトないし東アジア型ピロリ菌由来 CagA 特異的な EPIYA-D サイトが出現する。チロシンリン酸化 EPIYA-C サイトは低親和性 SHP-2 結合部位を, またチロシンリン酸化 EPIYA-D サイトは高親和性 SHP-2 結合部位を形成する。CagA の SHP-2 結合能は病原因子としての CagA 活性を反映するものと考えられる。本発表では, CagA により活性化された SHP-2 の基質分子に関する最近の研究成果を報告する。

(6) 血圧調節における腎遠位尿細管細胞でのナトリウム再吸収の制御機構

新里 直美, 青井 渉, 宮崎 裕明, 丸中 良典 (京都府立医科大学大学院・生理機能制御学)

腎遠位尿細管におけるナトリウム再吸収は、体液量や血圧調節にとって重要な役割を担っていることが知られており、ホルモンや血漿浸透圧により緻密に制御されている。一方、フラボン（ケルセチン）は、高血圧を正常血圧に戻す働きがあることが知られているが、その詳細なメカニズムは明らかにされていない。本研究では、食塩感受性高血圧症ラット（Dahl salt-sensitive rat; DS ラット）をモデルとした個体レベルでの血圧調節に対するケルセチンの作用機序、及び遠位尿細管上皮細胞（A6 細胞）をモデルとした細胞レベルでのナトリウム再吸収に対するケルセチンの作用機序についての研究結果を踏まえ、血圧調節における上皮型ナトリウムチャンネル（epithelial Na^+ channel; ENaC）の生理的意義と制御機構について報告する。DS ラットでは、高食塩食による血圧上昇をケルセチンが抑制し、その際、腎臓における ENaC の転写レベルでの減少が認められた。そこで、血圧調節に重要な役割を果たしている遠位尿細管でのナトリウム再吸収が、ケルセチンによる血圧降下に寄与しているかを A6 細胞において検討した。その結果、ケルセチンは

alpha-ENaC を転写レベルで抑制し、経上皮のナトリウム再吸収を ENaC の活性低下を伴って減少させることが明らかとなった。我々は、A6 細胞において、ケルセチンは $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter を活性化してクロライド分泌を亢進することを見い出しており、この cotransporter 活性化による細胞内クロライド濃度の上昇がナトリウム再吸収抑制機序に関与している可能性について検討するため、ケルセチンとクロライドチャンネル阻害剤を用いた。その結果、alpha-ENaC mRNA は、ケルセチンとクロライドチャンネル阻害剤を単独で作用させたときより、同時に作用させたときに最も抑制されることが示された。これらの結果から、ケルセチンによる血圧降下作用は、細胞内クロライド濃度の上昇を介した ENaC の転写抑制による遠位尿細管でのナトリウム再吸収抑制がその一因として考えられた。

This work was supported by Grants-in-Aids from Japan Society of the Promotion and Science (15590189), the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (15659052, 15790120).

(7) 胃幽門腺粘液 Ca^{2+} 調節性開口放出のインドメサシンによる修飾；アラキドン酸による活性化

中張 隆司 (大阪医科大学・第一生理)

アセチルコリン (ACh) は、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を介し、幽門腺粘液細胞開口放出を活性化すると同時に、プロスタグランジン E_2 (PGE_2) 産生を増加させる。 PGE_2 は cAMP の集積を介して Ca^{2+} 調節性開口放出を増強している。 PGE_2 合成阻害薬である indomethacin (IDM) は ACh による開口放出を抑制したが、IDM 単独では開口放出を活性化しなかった。本研究では、IDM の開口放出に対する効果について、コラゲナーゼ処理により得られた幽門腺粘液細胞の開口放出をビデオ顕微鏡を用い検討した。

IDM (10 μM or 100 μM) は、開口放出を活性化しなかった。一方で、IDM は ACh による開口放出を 30% 抑制した。cAMP の阻害剤 (20 μM H89), PGE_2 receptor 阻害剤 (100 μM ONO8713) は ACh による開口放出を 50% 抑制

した。また、H89 (20 μM) に IDM を加えることにより、開口放出は増加し IDM と同じレベルになった。COX は arachidonic acid (AA) から PGH と 15(R)-HETE を合成する。IDM は PGH と 15(R)-HETE の二つの合成を阻害する。このことは IDM では AA が蓄積することを示唆している。一方で、aspirin (ASA) は PGH 合成を阻害するが 15(R)-HETE を合成は保たれることが知られている。ASA は ACh による開口放出を 50% 抑制したが、20 μM AA or IDM を ASA に加えると ACh による開口放出は増加し IDM と同じレベルになった。

【結論】 IDM はモルモット胃幽門腺粘液細胞の ACh による開口放出に対し PGE_2 合成阻害による開口放出抑制だけで、AA 蓄積を介して開口放出を活性化していた。

(8) 変異解析とホモロジーモデリングによる胃酸分泌プロトンポンプの構造機能相関の解明

浅野 真司 (立命館大学・情報理工学部)

森井 孫俊 (富山医科薬科大学・薬学部)

胃は消化管における生体防御の最前線にあり、胃酸分泌酵素であるプロトンポンプによって酸分泌が行われ、一次消化や殺菌が行われる。私達は胃酸分泌酵素の作動、調節機構を研究すると共に、これに対する可逆的な阻害剤 (Acid Pump Antagonists:APA) の結合部位の探索を行った。

プロトンポンプの α 、 β 鎖の cDNA を HEK-293 細胞に導入すると、膜画分に H^+ 、 K^+ -ATPase 活性が検出でき、安定発現細胞はプロトンポンプ阻害剤に対して感受性の Rb イオンの取り込み、プロトンの細胞外への輸送を示した。

ポンプの膜貫通領域を中心に変異導入を行い、上記の系に発現させたところ、M4、M6 領域の酸性アミノ酸な

どがカリウムイオンの親和性を決定することが明らかになった。また、APA 感受性を検討したところ、M5 領域に存在する Tyr-801、Leu-811 などの側鎖が APA との反応に関与することが明らかになった。

これらのアミノ酸残基の立体的な配置を明らかにするために、骨格筋のカルシウムポンプの立体構造を元にホモロジーモデリングを行ってプロトンポンプの立体構造モデルを構築した。その結果、イオン親和性を決定するアミノ酸残基は膜中でクラスターを作り、イオン結合部位を構成すること、APA 感受性に関与するアミノ酸残基は、管腔側の表面に位置して APA がフィットする cavity 構造を形成することが確認された。

(9) 大腸イオン輸送と Protease-activated receptor

鈴木 裕一、池原 修 (静岡県立大学・食品栄養科学部)

Protease はヒトでは五百数十種類もあり、細胞内外で様々な生理的役割を果たしている。この中で最近、thrombin や trypsin などの細胞外 protease 活性化される G タンパク共役型の受容体 (PAR1~4) の働きが注目されている。われわれは、切り出したマウス盲腸を用い Ussing chamber 実験系で、trypsin の短絡電流 (Isc) に及ぼす効果と、さらに PAR の関与を検討した。得られた結果：漿膜側に投与した trypsin は粘膜下神経活性化を介して粘膜上皮 Cl イオン分泌を活性化した。この反応は、ムスカリン受容体阻害剤の atropin や NK1 受容体阻害剤で抑制された。また、P450 の阻害剤で抑制された。trypsin の効果は

PAR を介するか否かを次に検討した。PAR1-AP (PAR1 受容体活性化ペプチド) は、trypsin 同様粘膜下神経を解して上皮 Cl イオン分泌を活性化した。また PAR1-AP によるこの反応は、atropin、NK1 受容体阻害剤、および P450 の阻害剤で抑制された。さらに、trypsin と PAR-AP による Cl イオン分泌活性化は、相互に少なくとも一部 cross desensitization が見られた。結論：粘膜下神経に PAR1 が存在し、その活性化により、粘膜防御作用を持つと信じられている Cl イオン分泌が惹き起こされることが明らかになった。生理的にどのような protease が関与しているのかについては今後検討する必要がある。

(10) 抗酸化性食品成分による消化管粘膜ホモジネート酸化抑制作用

室田 佳恵子、寺尾 純二 (徳島大学大学院・ヘルスバイオサイエンス研究部食品機能学分野)

消化管粘膜は常に食品由来のプロオキシダントに暴露された状態にある。食事由来のものを含めさまざまな要

因により蓄積する脂質過酸化物質から生ずるより有害な二次生成物は、消化管粘膜において炎症やガン化に関与す

るとの報告がある。食物中に含まれる代表的な抗酸化成分であるフラボノイドは、一部は吸収されるものの大部分はそのまま消化管下部へと移行するため、消化管管腔に高濃度で存在していると推定される。すなわち、消化管粘膜は食事性フラボノイドが抗酸化性を発揮する生理的標的であると考えられる。本研究では、ラット消化管粘膜ホジネートをモデルとして用い、鉄イオン誘導酸化ストレスに対するフラボノイドの防御作用について検討した。

植物性食品中のフラボノイドは主に配糖体として存在

するが、代表的なフラボノイドであるケルセチンにおいて配糖体はアグリコンよりは弱いものの鉄イオンによる脂質過酸化を抑制した。特に、4'位配糖体 (Q4'G) は3位配糖体 (Q3G) に比べて抗酸化性が強かった。反応後の溶液の分析結果より、Q4'GはQ3Gに比べアグリコンに変換されやすいことが明らかとなった。配糖体はアグリコンに比べてラジカル捕捉活性が弱く、また金属イオンキレート能も弱いことから、ケルセチン配糖体が消化管粘膜に存在するグルコシダーゼ活性によりアグリコンへと変換され抗酸化性を発揮したことが示唆された。

(11) 生体内で有効なポリフェノール・フラボノイド

金沢 和樹 (神戸大学農学部・生物機能化学科・食品・栄養化学教室)

食品に含まれるポリフェノールは百万種類以上と言われ、多様な機能が知られている。種類が多いのは、アグリコンと呼ばれる骨格構造に糖が結合した配糖体として存在し、糖の種類と結合様式が多様だからである。しかし、生理活性はアグリコン部位にある。抗酸化能とタンパク質機能調節作用に分けられるが、アグリコンの構造で整理すると活性は理解しやすい。生体内でも有効な抗酸化能を示すのはカテコール構造を持つものだけである。体内吸収時に希釈されるので低濃度でも強い活性のものが有効であり、また吸収時に活性部位の水酸基が抱合を受けるからである。タンパク質機能調節とは、受容体にアンタゴニズムを示す、あるいは酵素活性を調節する作用

である。タンパク質のポケットに作用するので、そのサイズに合う立体構造が要求される。フラボンとフラボノール類はアリアル炭化水素受容体や CYP 酵素類に顕著な作用を示す。イソフラボン類はエストロゲン受容体に、カテキン類はグルコース輸送担体に作用が顕著である。しかし、ポリフェノールは生体にとっては異物であり、吸収時に小腸細胞で速やかにグルクロン酸あるいは硫酸抱合される。その体内半減期は 2-9 時間であり、ほとんどのポリフェノールがヒト体内では生理活性を示さない。しかし、有効なものもある。今回の発表では、有効なもの例をいくつかあげて議論する。

(12) ヘリコバクター・ピロリの空胞化致死毒素の作用機序

和田 昭裕 (長崎大学・熱帯医学研究所・病原因子機能解析分野)

ヒトの胃に棲息するグラム陰性桿菌であるヘリコバクター・ピロリは胃炎、消化性潰瘍、MALT リンパ腫などの各種消化器疾患に関与し、胃癌との関連も指摘されている。本菌の病原因子のうち、空胞化致死毒素 (VacA) は標的細胞の細胞質内に空胞を形成させ、細胞を死滅させる毒素であり、本菌の病原性との関わりが指摘されている。現在までに、VacA の宿主細胞への初期作用を理解するため、ヒト腎臓癌由来株化細胞 G401 細胞あるいは

ヒト胃癌由来株化細胞 AZ-521 細胞より VacA 受容体を精製して、VacA 受容体が 2 種の受容体型チロシンフォスファターゼ (RPTP), RPTP α と RPTP β であることを明らかにした。さらに、これら 2 種の RPTP のうち RPTP β を KO したマウスでは VacA 投与によって認められる胃炎や潰瘍を発症しないことを明らかにした。一方、VacA の細胞障害のシグナル伝達の流れを分子レベルで明らかにすることを目的に、VacA の空胞化形成にダイナミン

とシンタキシン7が関与していることを、VacAがミトコンドリア障害を引き起こすことを報告した。

VacAがその受容体であるRPTPβとの結合にいかなる構造が重要であるのか明らかにするために、RPTPβの細胞外領域を削った種々のデリージョン変異体を作製した。RPTPβ-Bのデリージョン変異体とVacAとの結合は、VacAおよび抗VacA抗体を用いた免疫沈降法にて

VacA結合活性の解析をおこなった。その結果、746残基めのセリン残基までを欠損させたRPTPβ変異体(Δ747)はVacA結合活性が認められたが、752残基めのプロリンまでを欠損させたRPTPβ変異体(Δ747)はVacA結合活性が認められなくなり、747-752残基のアミノ酸配列(QTTQP)が、VacA結合に重要であることがわかった。

(13) 偽性低アルドステロン症II型原因遺伝子WNK4キナーゼの膜輸送体局在機構に対する影響

内田 信一, 楊松 昇, 山内 小津枝, 佐々木 成 (東京医科歯科大学・腎臓内科)

偽性低アルドステロン症II型は高血圧, 高K血症, アシドーシスをきたし優性遺伝形式で発症する疾患である。原因としてWNK4のコイルドメイン付近に集中した3つのミスセンス変異ならびにWNK1のイントロン部分の欠損により引き起こされることが判明しているものの, その病態メカニズムは明らかでない。昨年, 我々はWNK4キナーゼの標的因子の一つとしてclaudinを同定し, さらに変異型WNK4はMDCK細胞において細胞間クロライド透過性を上昇させることを報告した。一方, oocyte発現系においては, サイアザイド感受性Na-Cl co-transporter (NCC) やROMK channelの膜表面への移行をWNK4が阻害することを示した報告もあり, 輸送体を直接制御する可能性も示唆されている。今回我々は, これら輸送体への作用を極性をもつ上皮細胞内で検証するため, 1) MDCK細胞にNCCとWNK4キナーゼの共発現安定細胞株を作成し, NCCの局在への影響を観察した。

2) CLCNKB遺伝子プロモーターを用いて, 変異型WNK4を腎臓遠位側尿細管に発現するトランスジェニックマウスを作成し, 生体内での変異型WNK4発現の影響を検討した。

結果として, MDCK細胞ではNCCおよびROMKのapical側への局在が, 野生型, 変異型いずれのWNK4発現によっても阻害された。このことは変異型WNK4にはNCCの膜局在阻害作用がないというoocyteでの報告と異なっていた。トランスジェニックマウス腎臓内でのNCCおよびROMK細胞内発現部位は, 変異型WNK4発現に関わらず, apical側への局在に変化はなかった。

以上の結果よりWNK4の輸送体細胞内局在に対する影響は, 発現する細胞の種類による異なる可能性がある。真の影響を検討するためには, ヒトと同じ変異を持つノックインマウスの作成が必須と思われた。

(14) Isoliquiritigeninの大腸がん予防効果に向けて—ILTGのCOX-2依存性アポトーシス誘発効果—

高橋 徹行, 馬場 正樹, 奥山 徹 (明治薬科大学・天然薬物学)
西野 輔翼 (京都府立医科大学・分子生化学)

【目的】 Isoliquiritigenin (ILTG)は甘草, アルファルファ, ラッキョウ等に含有されている黄色のフラボノイドである。Genistein, Apigenin等のフラボノイドが*in vitro*及び*in vivo*の様々な化学発がんを抑制する報告がされている事から, 今回我々はILTGの大腸がん予防物質としてのポテンシャルについて, 各種検討を行った。

【方法】 1. 大腸発がんにおける重要な因子としてCyclooxygenase-2 (COX-2)の過剰発現が提唱されている。これに基づき, Lipopolysaccharide (LPS) 処理によるCOX-2過剰発現誘導系を用い, ILTG共処理が及ぼす影響をRT-PCR, Western Blot, ELISA (Prostaglandin E2, PGE2)により検討した。

2. マウス大腸癌細胞 Colon 26 (COX-2 恒常発現株) に対する直接的な増殖抑制作用を MTT 法にて検討し, 更に FACS 解析によりアポトーシス細胞の増加を検討した。

3. 限外希釈法により, Colon 26 をクローニングし, COX-2 高発現株を得た。これを用いて ILTG 誘発アポトーシスに対する感受性を親株との比較を行う事により検討した。比較する項目は, FACS 解析によるアポトーシス細胞の増加, Western Blot による PARP, Caspase-3 の開裂を選択した。

4. Azoxymethane (AOM) 誘発大腸粘膜異常腺窩巢 (ACF) に対する ILTG 混餌投与による抑制作用を ddY マウス及び F344 ラットを用いて行った。ILTG は試験期間中自由摂取させた。

【結果】 1. ILTG 共処理は COX-2 mRNA 発現には影響を及ぼさなかったが, COX-2 タンパクの発現誘導を用量依存的に抑制した。また, 産生される PGE2 量も有意に減少させた (IC50=1.17 μ M)。

2. ILTG 処理により用量依存的な増殖抑制の傾向が認められた。更にアポトーシス細胞の顕著な増加が認められた (約 40%)。

3. クローニングにより得られた COX-2 高発現株 (Co26-18) は Colon 26 に比して約 2.2 倍 COX-2 発現レベ

ルが亢進していた。ILTG 処理によるアポトーシス細胞の割合は親株が 46.97%, Co26-18 は 30.14%とアポトーシス誘発に抵抗性が認められ, 開裂型 PARP 及び Caspase-3 も親株に比して減少傾向が認められた。また, ILTG のアポトーシス誘導は lipoxigenase inhibitor 処理下では増強され, PGE2, Prostaglandin I2 (PGI2), Thromboxane B2 (TXB2) の共処理によってその増強は打ち消された。しかし, Co26-18 のアポトーシス誘発抵抗性は保持されていた。

4. ddY マウスにおいては, 総 ACF 数が対照群 72.4 \pm 30.0 個に対し ILTG 投与群が 45.4 \pm 16.8 個であった。F344 ラットにおいては対照群 172.3 \pm 54.9 個に対し ILTG 投与群が 108.8 \pm 30.1 個であった。

【まとめ】 ILTG は COX-2 発現誘導によるプロスタノイド産生系を COX-2 タンパクレベルで抑制し, また COX-2 タンパク発現レベルが ILTG 誘導アポトーシスを抑制的に調節している事が示された。これより, ILTG 誘発アポトーシスの作用点の一つにアラキドン酸代謝経路が関与する事が示唆された。また, ILTG 混餌投与が AOM 誘発大腸 ACF 形成をマウス, ラット両種において抑制した事より, ILTG が大腸発がん予防に有効である可能性が示唆された。

6. 視知覚への多角的アプローチ - 生理, 心理物理, 計算論的アプローチ

2004年6月17日 - 6月18日

代表・世話人: 塩入 諭 (千葉大学工学部)

所内対応者: 小松英彦 (生理学研究所)

- (1) 視知覚と皮質局所神経回路の構造
田村 弘 (大阪大学大学院生命機能研究科)
- (2) 視覚的注意の空間分布
塩入 諭 (千葉大学工学部メディカルシステム工学科)
- (3) 選択的注意課題における, 非注意次元情報の処理
坂上 雅道 (玉川大学学術研究所脳科学研究施設)
- (4) 両眼対応とエピソード拘束 - 垂直視差の機能的役割
朝倉 暢彦 (金沢工業大学人間情報システム研究所)
- (5) 多次元視覚探索課題における V4 野のニューロン活動
ーボトムアップ性とトップダウン性注意による相互作用ー
小川 正 (生理学研究所)
- (6) イベントの視覚認知における知覚と記憶の相互作用
齋木 潤 (京都大学大学院情報学研究科)
- (7) モジュールを超えた時空間統合
西田 眞也 (NTT コミュニケーション科学基礎研究所)
- (8) 視覚系細胞の高次刺激に対する反応と受容野構造について
大澤 五住 (大阪大学大学院生命機能研究科脳神経工学講座)
- (9) 両眼視差を用いた奥行き弁別のメカニズム
宇賀 貴紀 (順天堂大学医学部生理学第一講座)
- (10) 図方向決定の皮質メカニズム - 計算論的アプローチ
酒井 宏 (筑波大学電子・情報工学系)
- (11) 読書の心理物理と網膜疾患
小田 浩一 (東京女子大学現代文化学部)
- (12) 下側頭葉視覚連合野における図形特徴の組み合わせを使った物体像の表現
谷藤 学 (理化学研究所脳科学統合研究センター 脳総合機能研究チーム)
- (13) 視覚的注意特性と安全性
三浦 利章 (大阪大学大学院人間科学研究科)

【参加者名】

塩入 諭 (千葉大・工), 宇賀 貴紀 (順天堂大・医),
大澤 五住 (阪大院), 田村 弘 (阪大院), 酒井 宏 (筑
波大・電子・情報工学), 谷藤 学 (理研), 坂上 雅道
(玉川大), 小川 正 (生理研), 西田 眞也 (NTT 科学
基礎研), 齋木 潤 (京大院), 朝倉 暢彦 (金沢工大),
小田 浩一 (東京女子大), 三浦 利章 (阪大院), 佐藤
雅之 (北九州市大), 松原和也 (千葉大院), 内川恵二 (東

京工大院), 永井岳大 (東京工大院), 椎橋哲夫 (東京工
大院), 福屋貴之 (東京工大院), 我妻信彦 (筑波大),
勝又詩織 (筑波大), 辻 義尚 (筑波大), 眞田尚久 (阪
大院), 大谷智子 (聖心女子大), 瀬川かおり (産業技
術総研), 藤井正樹 (中京大院), 十河宏行 (京大院),
竹井成和 (東大院), 宮川尚久 (東京医科歯科大), 丸谷
和史 (東大), 天野薫 (東大), 小濱 剛 (愛知県立大),

篠島良太(愛知県立大), 豊田敏裕(豊橋技科大), 杉之原英嗣(阪大院), 堺 浩之(RIKEN-BS I), 菊池真之(東京工科大), 則武樹郎(東京工科大), 田中祥平(東京工科大), 増田智洋(産業技術総研), 細田謙二(東大), 末光厚夫(筑波大), 柴田和久(奈良先端大), 下谷篤史(奈良先端大), 藤原祐介(奈良先端大), 廣川純也(基生研), 松崎政紀(生理研), 田中絵実(生理研), 中村舞子(生理研), 本多結城子(生理研), 葭田貴子(JSPS・千葉大), 古春雅郎(デンソーアイティラボラトリ), 赤崎孝文(阪大), 木原 健(京大・文・心), 高橋伸子(愛知淑徳大), 行松慎之(中京大), 大杉尚之(中京大), 河本健一郎(中京大), 鈴木一隆(浜松ホトニクス), 西村聡生(東大), 金谷英俊(東大), 妹尾武治(東大), 中内茂樹(豊橋技科大), 観音隆幸(豊橋技科大), 西 由

紀子(豊橋技科大), 西本伸志(阪大), 木村豊(阪大), 鬢櫛一夫(中京大), 高瀬慎二(中京大), 前田青広(京都大), 下ノ村和弘(阪大), 斉藤孝(松下電工株), 福島邦彦(東工大), 松本有央(産総研), 西崎誠(松下電器), 遠山和也(東京工科大), 八木哲也(阪大), 深井英和(岐阜大), 近藤光展(中京大), 安松信明(生理研), 河合徹弥(中部大), 高木康一(中部大), 平田豊(中部大), 古田充平(中部大), 山本麗子(中部大), 中村慎佑(中部大), 伊藤嘉秀(愛知学院), 志村敦(デンソー), 川嶋英嗣(愛知淑徳大), 小松英彦(生理研), 伊藤南(生理研), 郷田直一(生理研), 鯉田孝和(生理研), 松本正幸(生理研), 横井功(生理研), 安田正治(生理研), 松茂良岳広(生理研)

【概要】

生理学研究所研究会, 視知覚への多角的アプローチ-生理, 心理物理, 計算論」は, 平成16年6月17日, 18日に岡崎コンファレンスセンターにおいて開催された。参加者は予想を上回り100名近くに達したため, 会場は少々手狭な感があったが関係諸氏の対応により問題なく進行できた。参加者は大学院生を含む若手の研究者が多く見受けられたが, 若い研究者の多くの参加は, この分野への関心の高さと学際的講演会の重要性, さらに将来性を示すものであろう。17日には8件の講演と懇親会, 18日は5件の講演があり, 活発な議論が行われた。講演は, 生理学, 心理物理学, 計算論の立場の気鋭の研究者を中心とした興味深い内容で占められ, 各研究領域の熱気が伝わるものばかりであった。講演内容は幅広い視機能に渡り, 多様なアプローチの研究を含み, 通常の学会や研究会では得ることが難しい多くの新鮮な話題に満ちていた。生理学的研究では, 隣接する皮質神経細胞間情報のやり取りといった構造に主眼をおいた研究から課題依存の選択的注意に関わる高次, 低次の視覚処理系の神経活動, 2次特徴量(テクスチャーなど)や相対視差また図形特徴の組み合わせに対する感度を持つ神経

細胞の特性などについての研究があり, ますま複雑な機能計測が実現していることが理解された。心理物理学研究では, 注意の空間分布, 垂直視差の機能, オブジェクトの保持機能, 視覚情報の時空間統合など従来手法では簡単には扱えないテーマについて新規の手法を提案しての研究や自動車運転時など直接安全性に関わる注意機能の評価や視野欠損のある患者の読書の方略とその裏付けという視覚研究の応用的展開に繋がるものまで視覚研究の新しい切り口のものが多かった。また計算論の研究としては, 周辺刺激による応答の修飾から輪郭の所属の問題を解くモデル, スパースコーディングによるテクスチャー情報の圧縮, また両眼対応のエピポーラ拘束と垂直視差の関係など生理実験, 心理物理実験のみからでは予測が難しい問題をうまく扱い, 生理実験や心理物理実験との対応を示しているものがあり, 研究の方向性を考える上でも重要であった。全体を通してみて, 視覚研究者の学際的な意見交換の場として非常に有益な研究会であり, 今後の視覚研究分野の発展に貢献するものと信じている。

(1) 視知覚と皮質局所神経回路の構造

田村弘 (大阪大学大学院・生命機能研究科・認知脳科学研究室)

皮質神経細胞への入力約 50% は近傍の細胞に由来する。よって、視知覚の神経基盤の解明には、近傍細胞を結ぶ局所神経回路の様子を明らかにする必要がある。そこで、サル V1 野と TE 野において、局所神経回路の構造を複数神経細胞活動同時計測技術と相互相関解析法で調べた。コラム構造から予想されるように、V1 野、TE 野ともに、局所によく似た刺激に反応する細胞が集まっていた。しかし、かなりの割合で異なる刺激に反応する

細胞も存在した。V1 野、TE 野において興奮性結合は似た刺激に反応する細胞間に、抑制性結合は異なる刺激に反応する細胞間によく観察され、これらの神経結合は刺激選択性の鋭敏化に貢献すると考えられる。また、少数ではあるが、V1 野、TE 野で最適刺激が異なる細胞間に共通入力または興奮性結合が存在した。これらの結合は、多様な性質の細胞を結びつけ、より複雑な視覚刺激に対する反応の獲得に貢献すると考えられる。

(2) 視覚的注意の空間分布

塩入 諭 (千葉大学)

視覚の空間的注意に関する研究は、注意を向けた位置の視覚処理の促進を示すのみではなく、促進効果がある空間範囲があることも示している。我々は、コントラスト感度、仮現運動時の見かけ位置、注意の捕捉効果、サッカーボールなどへの注意の影響から、注意位置の測定方法を開発してきた。本講演では、それらの測定方法は注意の位置のみならず、注意の範囲の推定にも利用できることを示し、その結果から明らかになった点について

述べる。そのひとつは、運動刺激の追跡課題を課した実験条件において、複数の手法で求められた注意の範囲は類似した特性を示すことである。

これは、これらの測定方法が共通のメカニズムを捉えていることを支持する。もうひとつは、注意の範囲は、追跡刺激のみではなく検査刺激の呈示範囲の影響も受けることである。これは、視覚系は課題に応じた注意の範囲を設定していることを示唆する結果である。

(3) 選択的注意課題における、非注意次元情報の処理

Summer Sheremata, 渡邊武郎 (ボストン大学心理学科)

坂上雅道 (科学技術振興機構「さきがけ21」)

(玉川大学学術研究所脳科学研究施設)

反応決定のプロセスは、完全にシリアルではない。複数の刺激-反応処理が並列的に働き、最も適切なものが選ばれる。そのため、しばしば Stroop 現象のような刺激-反応コード間の干渉がおこる。どのような刺激が干渉を起こしやすいのであろうか？ ヒトを被験者とし、色付のランダムドットを用いた選択的注意課題における刺激の saliency の干渉効果への影響を解析した。動き課題ではランダムドットの動く方向によって、色課題では色によっ

て左あるいは右のボタンを押すことを要求された。色課題では非注意次元であるドットの動く方向が判断に干渉を起こした。saliency はランダムドットの coherency で制御された。この干渉は、coherency が閾値を越えたとたんに発生し、驚くことに coherency が上がるほど少なくなった。このことは、salient な刺激ほど注意による抑制が働きやすいことを示唆する。

(4) 両眼対応とエピポーラ拘束—垂直視差の機能的役割

朝倉暢彦（金沢工業大学 人間情報システム研究所）

両眼対応問題の計算論的研究においては、両眼対応の多義性を解消する方略として、エピポーラ拘束がしばしば用いられる。エピポーラ拘束を適用することにより、対応候補の探索を1次元のエピポーラ線上に制限することが可能となり、大幅な計算量の削減と偽対応の回避が実現される。エピポーラ拘束の適用には、両眼位置情報が必要であるが、この情報は眼球位置に関する視覚の手がかりである垂直視差から得ることができる。本研究では、

視野周辺に呈示した垂直視差により、視野中心の多義的な両眼対応が解消されることを心理物理学的に示すとともに、その過程が、垂直視差からの両眼位置情報に基づいたエピポーラ拘束の適用として理解できることを示す。この結果は、両眼対応決定後の水平視差の較正の段階で機能すると考えられてきた垂直視差が、対応問題を解決する段階においてもエピポーラ拘束として機能することを示唆している。

(5) 多次元視覚探索課題におけるV4野のニューロン活動—ボトムアップ性とトップダウン性注意による相互作用—

小川 正（生理学研究所）

ある刺激が周囲の刺激と異なる色や形を持っている場合、その刺激は目立ち、注意が自動的に惹きつけられる（ボトムアップ性）。日常の視覚環境下では、そのような刺激が複数存在し異なる次元で目立つ。しかしながら、目標となる刺激がどの次元で目立つかを知っていれば、その次元に対して注意を向ける（トップダウン性）ことにより目標刺激を選択することができる。これら2つの注意がV4野のニューロン活動に与える影響を視覚探索課題を用いて調べた。実験では6つの刺激が同時に呈示され、その中

には色及び形次元で異なる刺激が1つずつ含まれる。サルは教示された次元（色または形）で目立つ刺激に向かってサッカードを行うと報酬がもらえる。受容野内の刺激が目標となる場合、V4野ニューロンの活動が増大したが、この増強は特定の次元（色または形次元）で目立つ刺激が目標となる場合にのみ生じた。この結果は、ボトムアップ性とトップダウン性注意の相互作用がV4野で生じていることを示唆する。

(6) イベントの視覚認知における知覚と記憶の相互作用

齋木 潤（京都大学大学院情報学研究所）

物体やシーンの理解の研究において、我々は4個程度の視覚的オブジェクトを短期的に保持できるとされている。しかし、オブジェクトの重要な特性である属性のバインディングと、（運動を含む）変化に伴う表象の更新の過程は厳密に検討されていない。この点を明確にするため、複数の運動物体を用いて属性のバインディングと運動に伴う表象の更新を同時に検討する多物体恒常性追跡法を用いたところ、我々が保持できる視覚的オブジェ

クトは2に満たないことがわかった。限られたオブジェクトの記憶で外界を効率的に認知するために我々は選択的注意のメカニズムを効率的に活用していると考えられる。多物体恒常性追跡法を用いて視覚記憶と視覚的注意の相互作用を検討した心理物理実験、属性情報と位置情報が統合されたオブジェクト表象の神経基盤を検討したfMRI実験を紹介し、これらの知見と視覚認知機構におけるバインディング問題との関連を議論する。

(7) モジュールを超えた時空間統合

西田眞也 (NTT コミュニケーション科学基礎研究所)

モジュール性は脳の処理の大きな特徴の一つであり、異なる感覚モダリティ (視覚・聴覚など) や、各モダリティにおける異なる感覚属性 (視覚における形や動きなど) は別個の神経メカニズムで処理されると考えられている。しかし、モジュール間の境界は曖昧であり、モジュール間の相互作用の仕組みには多くの謎が残されている。物理世界において、また感覚世界において、異種情報が統合的に表現される場が時空間である。ここでは、

時空間の情報統合という視点から、モジュール構造の意味を考え直した最近の我々の研究をいくつか紹介する。一つは、マルチスリット視の特性を分析し、形態知覚に運動情報の処理が密接に関わり合っていることを示した研究である。もう一つは、異なるモジュール間で処理されたイベントの時間判断のメカニズムに関する研究である。後者には、視聴覚の同時性の判断が順応によって変化するという新しい現象の発見も含まれる。

(8) 視覚系細胞の高次刺激に対する反応と受容野構造について

大澤五住 (大阪大学大学院生命機能研究科脳神経工学講座)

テクスチャー強度を空間上で変化させた刺激は2次の刺激、エンベロープ刺激などと呼ばれる。このような刺激を利用することにより、視覚神経系での高次の受容野構造を探ることができる。2次視覚野ではエンベロープ刺激に反応する細胞があることは従来から知られているが、その両眼特性については生理学的には検討されていない。ネコの18野において、高空間周波数 carrier を正弦波エンベロープで振幅変調した刺激と通常の輝度正弦

波グレーティング刺激を両眼に各種の組合わせで提示し、両眼間の刺激位相差に対する細胞の反応を測定した。エンベロープ刺激に反応する細胞のうち輝度刺激の位相差に選択性を持つ細胞は、エンベロープ刺激についても同じ位相差選択性を持っていた。このことは、細胞がテクスチャーと輝度について同じ両眼視差選択性を持つことを示す。

(9) 両眼視差を用いた奥行き弁別のメカニズム

宇賀貴紀 (順天堂大学医学部生理学第一講座)

立体視とは両眼視差、すなわち物体が両眼に落とす網膜像の位置のズレから生じる奥行き知覚のことである。立体視は従来、大脳皮質視覚野の背側 (空間視) 経路の機能であると言われてきた。しかしごく最近、腹側 (物体視) 経路にも立体視機能があることがわかった。本研究では、2つの視覚経路での立体視機能の違いを理解するため、サルに情報処理過程が異なる2つの奥行き弁別課題 (絶対視差および相対視差弁別課題) を課し、背側

経路 MT 野での微小電気刺激がそれぞれの弁別課題の遂行にどのような影響を与えるか検討した。その結果、絶対視差弁別課題では知覚判断に影響が見られたのに対し、相対視差弁別課題では影響は見られなかった。以上の結果から、MT 野は絶対視差を用いた奥行き弁別には関与するが、相対視差を用いた奥行き弁別には関与しないと考えられ、絶対視差と相対視差の情報処理が、2つの大脳皮質視覚経路で並列に行われていると考えられる。

(10) 図方向決定の皮質メカニズム—計算論的アプローチ

酒井 宏・西村 悠 (筑波大学 大学院 システム情報工学研究科)

視野中のどの部分に対象とする物体 (図) があるかを決め、背景 (地) から分離することは、物体認識などの高次プロセスの基礎となる重要な問題である。最近の生理学的研究により、V2・V4 に図方向 (DOF) に選択性を持つ神経細胞が存在することが報告された (e.g. Zhou et al., J. Neurosci, 2000)。本研究では、境界線分の周囲のコントラスト情報から図方向を決定する皮質メカニズムを提

案する。初期視覚領野の神経細胞に見られる、古典的受容野の外側からの周辺抑制・促進は、多くの場合に空間的な非対称性を示す (e.g. Jones, et al, J. Neurophysiol, 2002)。計算論的研究から、このコントラスト情報の文脈依存性が、図方向決定に主要な役割を果たしている事が示唆された。このメカニズムに基づく回路網モデルは、Zhou らの報告した DOF 選択性細胞の特徴を定量的によく再現した。

(11) 読書の心理物理と網膜疾患

小田浩一 (東京女子大学)

読書は高次認知活動と一般にはみなされるが、視覚の次元に生じた障害によって大きな影響を受けることもまた知られている。ロービジョンと読書困難の研究である。そこに視覚次元で読書を心理物理的に扱う可能性があり、読書行動に必要な視覚の刺激次元が明らかになってきた。ここでは、その中で、比較的最近注目されている網膜疾患と読書の関係について取り上げる。先進国で失明原因のトップになっている加齢黄斑変性という疾患

では網膜中心部に感度低下が起こり、読書が著しく阻害される。このことは、網膜中心部と周辺部の処理の違いを疑わせている。また、Scanning Laser Ophthalmoscope を用いて視覚刺激が網膜のどの部位を刺激しているのかを in vivo でモニタしながら読書をさせる方法からは、障害された網膜の使い方によって読書の成績が変わってくるのが分かってきた。

(12) 下側頭葉視覚連合野における図形特徴の組み合わせを使った物体像の表現

谷藤 学, 内田豪, 角田和繁, 山根ゆか子 (理化学研究所脳科学総合研究センター)

サル下側頭葉 TE 野は物体像の知覚とそれに基づく認識に関わる連合皮質である。この領野の細胞が中程度に複雑な図形特徴によく反応することは知られているが、それらの組み合わせとして物体像がこの領野でどのように表現されているかについてはわかっていない。我々は内因性信号のイメージング法を用いることによって、物体像のイメージがその物体像を構成する図形特徴に選択的な TE 野のカラムの組み合わせとして表現されていることを明らかにした。

この研究は一部の細胞が物体像のイメージの局所的な図形特徴—空間的に局在している特徴—を表現して

いることも示唆している。IT 野の細胞の中に部分的な特徴を表現するものがあるとすると、それらの空間的な位置関係を特定するメカニズムが必要になる。我々は IT 野の細胞の一部が空間的な関係を表現するための図形特徴を表現しているという可能性をイメージング法によって検討した。その結果、部分と部分の空間的な配置に対して選択性を持つが、それぞれの部分を特徴付けるために必要な様々な視覚属性 (たとえば、色、形、きめ) に対してはそれほど選択性の高くない細胞群がカラムを作っていることが明らかになった。この結果は、TE 野の細胞が空間的に局所的な図形特徴ばかりでなく、部分の空間

的な配置のような物体像のもつ全体的な特徴も表現できることを示している。この結果から即座に、**Structural Description** すなわち「パーツとパーツの空間的な配置」によって物体像が表現されることを結論することができないが、少なくとも部分的にはこのような表現方法を使っていると考えられる。

自然な条件の下では、多くの物体像が同時に視野に入る。これらの物体像が同時に上に述べたようなカラムの組み合わせとして分散的に表現されているとすると、何らかの方法で、活動しているカラムの内どれがどの物体像の部分特徴に関係しているかを明らかにしなければな

らない。我々はそのひとつのメカニズムとして細胞同士の同期的発火に着目した。その結果、(1) 自発的な発火活動について同期の見られなかった2箇所細胞について、両者を興奮させる視覚刺激を提示すると同期的な発火が生じること、(2) 自発的な発火活動について同期発火の見られる2箇所細胞について、片方についてのみ興奮を引き起こす視覚刺激を提示すると、同期的な発火が失われることを見出した。本講演ではこのような同期的な発火の出現と消失の背景にある神経メカニズムについても考察する。

(13) 視覚的注意特性と安全性

三浦 利章 (大阪大学・人間科学研究科・適応認知行動学研究分野)

視覚的注意の三側面について、自動車運転時の視覚的注意に関する実験結果から述べる。1) 視覚的注意の二次元特性、すなわち眼球運動と有効視野について。課題要件(注意の必要性)の高い場合に有効視野が狭窄すること、有効視野での処理の広さと深さのトレード・オフが示された。2) 視覚的注意の三次元特性、すなわち奥行き方向での注意の移動特性について。注意移動の遠近での異方性 (rubber band metaphor) が見いだされた。3) 視覚

的注意の時間的特性について。具体的にはカーナビゲーションの使用前後で視線が前方に向けられていても注意が劣化することが見いだされた。

これら行動場面における視覚的注意研究より、注意機構の新しい知見と研究手掛かり、および一般的な安全性問題の解決手掛かりが得られる。視覚的注意に関するこのような行動場面での基礎研究が待たれている。

7. シナプス可塑性の分子機構研究と精神神経疾患研究の接点を探る

2004年5月27日－5月28日

代表・世話人：畑 裕（東京医科歯科大学）

所内対応者：井本 敬二（神経シグナル）

- (1) SNAP-25 変異マウスの解析－情動異常の分子基盤の解明に向けて－
高橋 正身（北里大学医学部・代謝蛋白質学）
- (2) デルタ2受容体によるシナプスの維持と可塑性の新しい分子機構
柚崎 通介（慶應義塾大学医学部生理学）
- (3) 樹状突起スパイン形成におけるアクチン細胞骨格の役割
－ドレブリン依存的シナプス分子の集積とその神経活動依存性－
高橋 秀人（群馬大学医学研究科・高次細胞機能学）
- (4) 神経伝達を調節する Ca^{2+} 依存性の蛋白質間相互作用
五十嵐 道弘（新潟大学・医歯学系・分子細胞機能学（医学部生化学第二））
- (5) シナプス刺激依存的な局所的翻訳における新規タンパク質 RNG105 の機能解析
椎名 伸之（国立遺伝学研究所・構造遺伝学センター）
- (6) NMDA 受容体のヘテロオリゴメリゼーションとシナプス局在制御
深谷 昌弘，渡辺雅彦（北海道大学大学院医学研究科解剖発生学分野）
- (7) プロスタノイド受容体によるストレス行動制御
古屋敷 智之¹，松岡 陽子¹，溝口 明²，鍋島 俊隆³，成宮 周¹
(¹ 京都大医神経・細胞薬理，² 三重大医第一解剖，³ 名古屋大薬剤部)
- (8) 統合失調症責任候補遺伝子 DISC1 と神経発達
尾関 祐二（滋賀医科大学精神医学講座）
- (9) シグナル伝達と統合失調症
宮川 剛（京都大学医学研究科 先端領域融合医学研究機構）
- (10) 幻覚・妄想状態の発症・再発モデルとしての長期持続性行動感作現象の分子機構
西川 徹（東京医科歯科大学）
- (11) 脆弱 X 遺伝子 FMR1 は RNAi/miRNA 分子経路に関与する？
岡村 勝友（徳島大学ゲノム機能研究センター）

【参加者名】

畑 裕（東医歯大・院・医歯学総合），深谷 昌弘，渡邊雅彦（北大・院・医），白尾 智明，高橋 秀人（群大医），柏 淳，金子 雄二郎，桜井 新一郎，島津 奈，竹林 裕直，谷口 豪，西川 徹，山本 直樹（東医歯大・院・医歯学総合），有馬 史子，泉 寛子，尾藤 晴彦，小林 静香，中村美智子，新里 和恵，真鍋 俊也，李 勝天，渡部 文子，竹本 さやか，奥野 浩行（東大・院・医），柚崎 通介（慶大・医），板倉 誠，片岡 正和，高橋 正身（北里大・医），井ノ口 馨，岡田 大助，斎藤 喜人（三菱化学生命科学研），椎名 伸之（遺伝研），五十嵐 道弘（新大・院・医歯学

総合），狩野 方伸，鳴島 円，橋本 浩一，橋本谷 祐輝（金沢大・院・医），高岸 芳子（名大・環研），溝口 明（三重大医），大貫 宏一朗，中野 真人，古屋敷 智之，宮川 剛（京大・院・医），三木 崇史，森 泰生，若森 実，山崎 浩史（京大・院・工），尾関祐二，藤井 久彌子（滋賀医大），八木 健（阪大・院・生命），岡村 勝友，塩見 春彦（徳島大・ゲノム機能研究センター），宮田 麻理子，東 幹人，成瀬 雅衣，橋爪龍磨，西巻 拓也，溝口 義人，渡部 美穂，本蔵 直樹，重本 隆一，田中 謙二，萩原 明，鍋倉 淳一，深澤 有吾，等 誠司，河西 春郎，井本 敬二（生理研）

【概要】

近年、分子生物学・細胞生物学・遺伝学的手法を用いた基礎研究により、シナプス可塑性に関わる分子機構について飛躍的に情報が増大し、なお新たな発見が続いている。臨床的側面からは、統合失調症や自閉症が、シナプス可塑性に関わる分子の機能異常と関連する可能性が指摘されている。また、Fragile X syndrome に代表される種々の精神発達遅滞において、シナプス可塑性の成立する場である樹状突起の構造異常が共通して認められることも注目されている。これらの知見は、シナプス可塑性

の障害が神経回路の fine tuning を攪乱し、脳の高次機能の異常をもたらすことを示唆している。

この現況を踏まえて、本研究会では、シナプス可塑性に関わる最近の意欲的な基礎研究を紹介すると同時に、その成果を脳の高次機能異常の理解に結びつける方途を幅広く議論することを目的とした。

上記の目的に添って、発表をもとに、解剖学・生化学・生理学・細胞生物学領域の多彩な研究者を集めて議論を展開した。

(1) SNAP-25変異マウスの解析—情動異常の分子基盤の解明に向けて—

高橋正身 (北里大学医学部・代謝蛋白学)

シナプス伝達は、神経前終末から開口放出機構によって放出される、神経伝達物質によって担われている。神経伝達物質の放出は、短期的には様々なリン酸化酵素により促進的あるいは抑制的に制御されており、このような制御がシナプス可塑性の重要な機構の一つであると考えられている。

これまでに我々は、株化されたラット副腎髄質細胞腫細胞である PC12 細胞を用い、プロテインキナーゼ C (PKC) の活性化によって神経伝達物質放出が促進される際に、神経伝達物質放出に必須なタンパク質である SNAP-25 の Ser187 が特異的にリン酸化されること、PKC によるリン酸化依存的に細胞膜への分泌小胞の移行が促進されることなどを明らかにしてきた。PKC 依存的な SNAP-25 のリン酸化が、どの様な脳機能の制御に関わっているかを明らかにするため、リン酸化部位である Ser187 を Ala に置換したノックインマウスを作成し解析を行った。

ヘテロマウスを掛け合わせてホモマウスの作成を行うと、出生したホモ個体の数はメンデル則で予想される数の約 7 割でしかなく、部分的な胎生致死が起こっていると考えられた。さらに出生したホモ個体も、生後 2 週目から 3 週目の 1 週間に約 30% が死亡した。しかしこれらの時期を過ぎると順調に生育した。

ホモマウスは非常に怖がりやすく、少しの環境変化でフリージング行動を引き起こす特徴を示した。オープンフィールドでの自由行動試験を行うと、野生型やヘテロマウスは顕著な探索行動を行いフィールド全体をくまなく歩き回るのに対し、ホモマウスは 2 種類の特異な行動様式を示した。半数以上のホモマウスは、殆どの時間を壁際で過ごすばかりではなく、実験開始後しばらくすると行動を停止した。しかし、一部のホモマウスは全く異なる行動様式を示し、実験期間中、常に壁際に沿って動き回るといふ多動性を示した。このような行動様式の違いは、同腹のホモ個体間でも見られることがあった。不安感の行動試験である明暗選択テストを行うと、野生型やヘテロマウスは暗室のみならず明室でも盛んな探索行動を示したが、ホモマウスは殆どの時間を暗室で過ごしていた。これらの実験以外でも、恐怖条件付け実験や、高架式迷路実験などでもホモマウスでは不安感が亢進していることを示唆する結果が得られている。

我々が作成した SNAP-25 のノックインマウスは、遺伝的変異とそれによって生じる行動様式の変化が明確であり、今後不安感などの情動行動を分子レベルで解析していく上での非常によい実験系になると考えられる。

(2) デルタ2受容体によるシナプスの維持と可塑性の新しい分子機構

柚崎通介 (慶應義塾大学医学部生理学)

グルタミン酸受容体 (GluR) は、脳神経系の発達や、成熟脳における記憶・学習、更に様々な病態における神経細胞死に大きく関与していることが知られている。従って GluR を介する信号伝達系の調節機構の解明は、シナプス可塑性や、さまざまな精神神経疾患の病態の理解のために必須である。近年、GluR 信号伝達系の調節機構として、シナプス後膜における GluR の選択的輸送系が注目を集めている。例えば、神経活動亢進後に、AMPA 型グルタミン酸受容体サブユニット GluR1 が選択的にシナプス後膜に輸送されることが、海馬におけるシナプス伝達効率の長期増強現象 (LTP) の成立の本体であると考えられている。一方、GluR2 サブユニットがシナプス後部から選択的にエンドサイトーシスされることにより、海馬や小脳におけるシナプスの長期抑圧現象 (LTD) が成立するとされている。このような受容体の選択的トラフィッキングの調節過程については未解明な点が多い。

デルタ2型グルタミン酸受容体 (GluRδ2) は、小脳において平行線維—プルキンエ細胞シナプス後膜にほぼ選択的に発現している。GluRδ2 欠損マウスでは、著名な小脳失調と、小脳に依存した学習障害や LTD の障害が見られることから、GluRδ2 はこれらの過程に重要な役割を果たしているものと考えられる。しかし、GluRδ2 のリガンドが未だに不明であることから、その細胞内信号伝達機構については全く分かっていなかった。最近、私たちは、GluRδ2 のリガンド結合予想部位に対する抗体が、プルキンエ細胞における GluR2 の選択的エンドサイトーシスを引き起こすことにより、LTD の誘発を阻害することを発

見した。また、この抗体を成熟マウスの小脳に投与すると一過性の小脳失調を引き起こすことから、GluRδ2 は成熟した小脳においても機能していることを明らかにした。このように、GluRδ2 はシナプス後膜において GluR2 のエンドサイトーシス過程を制御することにより、シナプス可塑性を調節するユニークな分子である。

GluR や、その進化的な祖先である細菌のアミノ酸結合蛋白質においては、リガンド結合部位は非常によく保存されており、この部位は GluRδ2 にも存在する。驚くべきことに、このリガンド結合予想配列を変異させた GluRδ2 を、GluRδ2 を欠損したプルキンエ細胞に導入したところ、GluRδ2 欠損マウスの表現型が回復することを、私たちは最近明らかにした。これらのことから、GluRδ2 の内因性リガンドは典型的なアミノ酸ではないことが明らかとなった。

GluRδ2 は、プルキンエ細胞の遠位樹状突起のシナプス後膜に、非常に効率的に輸送される。このような効率的な輸送は、GluRδ2 の C 末端部に、様々な分子が結合することにより成立していることを私たちは明らかにした。このような選択的輸送機構は GluRδ2 に特異的なものではなく、他の伝達物質受容体においても機能している可能性がある。即ち、GluRδ2 信号伝達経路や、その選択的輸送経路を解明することにより、他の GluR の細胞内トラフィッキングやシナプス可塑性機構の理解を大幅に進めることができるものと期待される。更に、小脳以外の脳においても、特に幼若時には GluRδ2 の類似分子である GluRδ1 が発現していることから、私たちの得た知見は更に普遍化できる可能性がある。

(3) 樹状突起スパイン形成におけるアクチン細胞骨格の役割 —ドレブリン依存的シナプス分子の集積とその神経活動依存性—

高橋 秀人 (群馬大学医学研究科・高次細胞機能学)

樹状突起スパインは、中枢神経系の興奮性シナプスの入力受容器であり、発生初期に多くみられる細長い樹状突起フィロポディアから形成されることがわかって

きた。さらに、スパインの形態がシナプス機能と関連していることも明らかになってきた。よって、発生過程におけるスパイン形成のメカニズムは、シナプス機能の発

現や可塑性に重要であると考えられる。スパインは、シナプス後肥厚部 (PSD) とアクチン細胞骨格の二つの主要な構造体でできている。最近、PSD-95 などの PSD 関連蛋白がスパイン形成に関与しているという報告が数多くなされた。その一方で、スパインの形態形成は PSD-95 のシナプス集積よりも早いという報告や、PSD-95 欠損マウスのスパイン構造は正常であるといった報告もあり、アクチン細胞骨格が優位にスパイン形成を支配している可能性が考えられる。

これまでに我々は、スパイン頭部の主要なアクチン結合蛋白であるドレブリンに関して、スパインのアクチンに作用しスパインの形態を制御していることや、シナプス形成期にアイソフォーム変換 (ドレブリン E→ドレブリン A) が生じることなどを明らかにしてきた。今回、ドレブリンによるスパインアクチン細胞骨格形成が、スパイン形成のメカニズムにおいて主導的立場にあること、さらに、ドレブリンのスパイン集積が神経活動依存的であることを明らかにしたので報告する。

1) ドレブリンは、樹状突起フィロポディアで F-アクチンとともに集積する。

低密度分散培養の海馬神経細胞を培養 7, 14, 21 日目まで免疫染色し解析した結果、ドレブリンの集積は、シナプス前終末と接触したフィロポディア内で生じており、その部位には F-アクチンが必ず集積していた。アンチセンス法でドレブリン A(DA) の発現を抑えると、ドレブリンと F-アクチン両方のシナプス集積が抑制された。

2) PSD-95 のシナプス集積は、先行するドレブリンのシナプス集積により制御される。

培養 14 日目において、ドレブリンはシナプス結合を有するフィロポディアの 88% で集積していたのに対し、PSD-95 は 57% しか集積していなかった。一方、

シナプス結合を有するスパインでは、ドレブリン・PSD-95 ともそれぞれ、87%, 90% と同等に高い率で集積していた。アンチセンス法で DA の発現を抑えると、PSD-95 のシナプス集積は阻害された。さらに、DA の発現を抑えたのち、GFP-DA の発現ベクターを導入して発現量を回復させたところ、GFP-DA の集積部位に一致して、PSD-95 のシナプス集積が再現された。

3) ドレブリンのスパイン集積は、AMPA および NMDA 受容体による二方向性制御を受ける。

GYKI52466 で AMPA 受容体活性を培養 7 日から 14 日目まで阻害すると、単位樹状突起長あたりのドレブリン集積数は減少した (control の 75%)。また、ドレブリンが瀰漫性に分布する未成熟なフィロポディア (diffuse-type filopodia) の割合が増加 (control: 23%→GYKI: 47%) し、スパインの割合が減少した (control: 52%→GYKI: 31%)。一方、APV で NMDA 受容体活性を同期間阻害すると、diffuse-type filopodia の割合が減り (control: 23%→APV: 17%)、スパインの割合が増加した (control: 52%→APV: 72%)。ドレブリン集積を介したフィロポディアからスパインへの形態変化は、AMPA 受容体活性により促進し、NMDA 受容体活性により抑制されることがわかった。

これらの結果から、ドレブリンは、PSD 構造の形成に先立ち、シナプス後部の基盤構造であるスパインアクチン細胞骨格を形成すること、さらに、この過程が AMPA 及び NMDA 受容体により二方向に制御されていることが明らかとなった。このように、スパイン形態は、神経活動依存的に制御されるドレブリンの集積を介して可塑的に変化すると考えられる。ドレブリンによるスパイン形成機構は、スパインの形態異常が知られている精神疾患 (ダウン症、精神遅滞など) の病態解明にも結びつくと考えられる。

(4) 神経伝達を調節する Ca^{2+} 依存性の蛋白質間相互作用

五十嵐 道弘 (新潟大学・医歯学系・分子細胞機能学 (医学部生化学第二))

神経伝達の基盤は SNARE 機構によるシナプス小胞と形質膜の間の蛋白質間相互作用 (SNARE 複合体形成) である。この機構はそれ自体が細胞内小胞輸送の特殊形態であるため、伝達物質の放出が Ca^{2+} 依存性であるためには、さらに Ca^{2+} 濃度を検知する機構が必要となる。この

ような Ca^{2+} センサーのうち、もっともよく調べられているのは synaptotagmin ファミリーであるが、これらは十分高濃度の Ca^{2+} に対応し、膜融合の過程に直接関わる可能性が示唆される。一方、シナプス小胞のリサイクリングに関する Ca^{2+} 依存性の機構においては、少なくとも複数

の異なる Ca^{2+} 濃度要求性の過程があることが示唆されている。

われわれはこの点を明らかにするために、SNARE 機構の中核分子 syntaxin 1A に 10^{-6} M 程度の Ca^{2+} 依存性に結合する蛋白質を見出し、その結合の特性を解析した^{1),2)}。1つは Ca^{2+} /カルモジュリン依存性蛋白質キナーゼII (CaMKII) で、この結合は自己リン酸化した CaMKII のみに起こり、脱リン酸化と Ca^{2+} 濃度の低下によって結合は解離する可逆的な反応であった。この結合は、syntaxin の立体構造を閉状態から開状態に変換させ、SNARE 複合体を形成させる linker domain で起こり、CaMKII は syntaxin を開状態に固定する役割を有すると考えられる結果を得た。この結合を阻害すると開口放出の確率は半減したことから、syntaxin-CaMKII 複合体の形成が神経伝達の調節に寄与すると考えられる。

もう1つの結合蛋白質は小胞のアクチン依存性モーター分子 myosin-V であった。ミオシン V は $\text{pCa} \leq 6.6$ で syntaxin の H3 domain (SNARE 蛋白質の結合部位) に結合した。この結合はミオシン V が通常、膜蛋白質と相互作用をする globular tail domain はまったく関与せず、軽鎖 (大部分が CaM) が結合して運動性を調節する neck

部分で生ずることを、分子生物学的手法ならびに AFM (原子間力顕微鏡) 等による可視化で明らかにした。ミオシン V は Ca^{2+} 依存性にカルモジュリンを解離する性質を持っているが、われわれはこの解離にリンクして、syntaxin が neck 部分に結合することを突き止めた。この結合はミオシン V の運動性には影響しないが、ATPase の Ca^{2+} 依存性増大を抑制した。この結合を neck 部分に対する抗体や競合阻害ペプチドで阻害すると、伝達物質放出が阻害されたことから、内因性のミオシン V-syntaxin 複合体の寄与が明らかとなった。小胞と膜に SNARE 複合体が形成される前に tethering という段階が想定されており、ミオシン V と syntaxin の結合はこの過程に関与するものと考えている。

以上の結果に基づき、CaMKII とミオシン V は、それぞれ CaM 結合蛋白質である (CaM 結合部位は異なる) ことから、神経伝達に関与する小胞リサイクリングにおいて CaM の Ca^{2+} 感受性が何がしかの寄与を果たしている可能性が考えられる。

(文献)

- 1) Ohyama A et al. (2002) *J Neurosci* **22**: 3342-3351
- 2) Watanabe M et al., submitte

(5) シナプス刺激依存的な局所的翻訳における新規タンパク質 RNG105の機能解析

椎名 伸之 (国立遺伝学研究所・構造遺伝学センター)

中枢神経細胞において、mRNA が樹状突起へ輸送されることが知られている。これら mRNA はシナプス可塑性に関与するタンパク質をコードしており、これらがシナプス刺激依存的に局所的に翻訳されることが、個々のシナプスの長期増強に必要であり、また記憶や学習に必須のメカニズムであることが明らかになってきた。mRNA の樹状突起への輸送と局所的タンパク合成の制御には、RNA granule と呼ばれる macromolecular な複合体が中心的な役割を担っている。

我々は、海馬および大脳新皮質神経細胞における RNA granule の新規構成タンパク質として RNG105 (RNA granule protein 105) を同定した。RNG105 は RNA 結合モチーフをもち、直接 mRNA に結合する活性をもつことを明らかにした。RNG105 が局在する RNA granule には、シナプス可塑性に必須の役割を果たす CaM キナ

ーゼ II α , BDNF, TrkB などの mRNA が局在していることも明らかにした。また、培養細胞での大量発現実験により、RNG105 が *in vivo* で翻訳を抑制する活性をもつことを見いだした。この活性は、RNA granule がシナプス刺激のない条件下で翻訳静止状態であるという結果とよく一致した。さらに、シナプス刺激 (BDNF 刺激) によって RNG105 が mRNA および RNA granule から解離することを見いだした。この解離は、RNA granule 近傍での局所的タンパク合成の活性化と密接に関連していた。以上の結果から、RNG105 は樹状突起内を輸送中の RNA granule においてタンパク合成を抑制し、シナプス付近に到達すると刺激依存的に mRNA および RNA granule から解離し、その結果個々のシナプスにおける局所的タンパク合成が起こる、というモデルを考えている。

現在、マウスの脳から、RNG105 に直接結合する mRNA

の同定をマイクロアレイ解析により網羅的にこなっている。また、RNG105 のノックアウトマウスを作成中である。

これらの解析の経過についても紹介したい。

(6) NMDA 受容体のヘテロオリゴメリゼーションとシナプス局在制御

深谷 昌弘, 渡辺 雅彦

(北海道大学大学院医学研究科解剖発生学分野)

NMDA 型グルタミン酸受容体 (NMDA 受容体) は、中枢神経系におけるシナプス可塑性を基盤としたシナプス回路発達や高次脳機能発現において中心的な役割を果たしている。この受容体の機能発現には、必須サブユニットの NR1 (GluR ζ 1) と調節サブユニットの NR2A-D (GluR ϵ 1-4) からなるヘテロメリック複合体形成が不可欠である。本研究では、NMDA 受容体のチャネル形成からシナプス発現に至る過程におけるそれぞれのサブユニットの役割に焦点をあて、それぞれのサブユニット欠損下での他方のサブユニットの細胞発現と細胞内局在を分子組織化学的、生化学的に解析した。

その結果、海馬 CA1 特異的 NR1 ノックアウトマウスの解析から、NR1 欠損錐体細胞では、NR2A, 2B サブユニット mRNA の発現量は影響を受けないが、NR2A, 2B サブユニットともにシナプスから消失し、錐体細胞の細胞体に集積することが明らかとなった。細胞体に集積した NR2 サブユニットは、膜タンパクの翻訳装置である粗面小胞体内腔の顆粒 (intracisternal granule) として集積していた。この結果は、NR2 単独では樹状突起へ輸送されず、NR1 サブユニットとの小胞膜上での複合体形成

が必要であることを示している。次に、NR2A/2C ダブルノックアウトの小脳顆粒細胞での解析から、NR2 サブユニット欠損顆粒細胞では、NR1 サブユニットの細胞体貯留は認められなかったが、NR1 サブユニットの C 末端のスプライシングカセット (C2, C2') に関係なくシナプス発現が消失していることが明らかとなった。また、NR2 サブユニット欠損下での NR1 サブユニットの各スプライシングカセット (C1, C2, C2') の定量的な生化学的解析を行ったところ、PSD 分画での減少量をもっとも顕著であり、細胞内膜系に存在することが示された。この結果は、NR1 サブユニット単独でも樹状突起へ輸送されるが、シナプス局在には NR2 サブユニットが必要であることを示している。

以上の結果より、NMDA 受容体にとって NR1 サブユニットの存在は小胞膜・ゴルジ装置・樹状突起の輸送段階に必須であり、NR2 サブユニットの存在はシナプス局在の段階に必須であることが明らかとなった。このように、NMDA 受容体は異なる局在制御能を持ったサブユニットがヘテロメリック複合体を形成することで精緻にシナプスへ輸送され、機能発現できるのである。

(7) プロスタノイド受容体によるストレス行動制御

古屋敷 智之¹, 松岡 陽子¹, 溝口 明², 鍋島 俊隆³, 成宮 周¹

(¹京都大医神経・細胞薬理, ²三重大医第一解剖, ³名古屋大薬剤部)

恒常性の破綻は動物にストレスを惹起する。ストレスは内分泌反応や交感神経系の活性化といった生理的变化とともに攻撃性の亢進や逃避行動など行動変化も引き起し、これをストレス反応と呼ぶ。ストレス反応は損傷や疾病などの物理的な要因によっても新しい社会や環境への暴露など心理的な要因によっても誘導される。ストレ

ス反応は適応的なメカニズムであり、その制御の破綻はストレス障害を引き起こす。これまでストレス反応やストレス障害にモノアミンや神経ペプチド、ステロイドといった複数の脳内物質の関与が示唆されてきたが、それらの物質の変化を統合するメカニズムはまだ知られていない。我々はプロスタノイド受容体のストレス反応における

役割を研究してきた。プロスタノイドはアラキドン酸より産生される脂質メディエーターであり、その一つであるプロスタグランジン(PG)E₂は疾病に伴う発熱や内分泌反応における関与が示唆されてきた。我々は PGE₂ の 4 種の受容体である EP1-EP4 の各種欠損マウスを作成し、それら受容体のストレス反応における役割を解析してきた。その結果、細菌内毒素である LPS による発熱反応に EP3 が、ACTH 分泌には EP1 と EP3 の両方が関与していることが示された。これらの生理的なストレス反応に加え、EP1 欠損マウスでは社会ストレス・環境ストレスといった心理的ストレスに対する行動にも異常が観察された。すなわち EP1 欠損マウスでは社会行動が減弱し攻撃性が亢進する。また音に対する驚愕反応の亢進や断崖回避反応の異常など環境変化に対する行動にも異常が観察された。神経生化学的な解析では EP1 欠損マウスの前脳・線条体においてドパミン代謝が亢進し、脳微小還流法により EP1 欠損マウスの線条体において細胞外ドパミン濃度が上昇していることが示唆された。さらに、ド

パミン受容体の阻害薬により EP1 欠損マウスの攻撃性や音に対する驚愕反応の亢進が改善した。これらの結果は、EP1 欠損マウスのストレス行動異常がドパミン系の活性亢進によることを示唆している。

以上の知見は、PGE₂ が発熱・内分泌反応といった生理的反応に加え、心理的ストレスに対する行動変化にも重要であることを示している。それでは PGE₂ はどのように多彩なストレス反応を制御するのであろうか。免疫染色を行ったところ、EP1 は視床下部・扁桃体・中脳黒質のシナプスに存在し、特に視床下部の CRH 陽性細胞や黒質のドパミン細胞上のシナプス終末にも発現が確認された。これらの結果から、PGE₂ が EP1 を介してさまざまな脳部位のシナプス伝達を制御し、複数のストレス反応を統合している可能性が示唆される。面白いことに、ACTH 分泌異常や行動異常はストレス障害の一つである PTSD の患者にも共通して認められる。プロスタノイド受容体がストレス障害克服の新たなターゲットとなる可能性について議論する。

(8) 統合失調症責任候補遺伝子 DISC1 と神経発達

尾関 祐二 (滋賀医科大学 精神医学講座)

統合失調症の遺伝学的研究(連鎖研究, 相関研究)により、最近ようやくいくつかの統合失調症感受性候補遺伝子が挙げられるようになってきた。しかしそれらの多くの遺伝子に対する直接的障害、すなわち genetic variation と疾患の発症に明確な関連性は見出されていない。一方、DISC1 (Disrupted-In-Schizophrenia-1) は遺伝子内の直接的な障害が精神疾患の発症と連鎖することが示されている遺伝子であり、現在の精神疾患研究においては、変異遺伝子、変異蛋白から病態研究に結びつきうる唯一といってもよい貴重な窓口である。

DISC1 は、スコットランドにおける精神疾患多発家系で世代を経て受け継がれていた t(1;11) (q42.1;q14.3) 直接的に障害を受ける 1 番染色体上の未知の遺伝子として報告された。DISC1 タンパクは、その染色体転座によって全 854 アミノ酸のうち C 末端側 257 アミノ酸を失う。この転座を持つ 37 人中 29 人で統合失調症や躁うつ病といった精神疾患 (major mental illnesses) が発病しているのに対し、転座を持たない 38 人中では精神疾患を 1 例も認め

ない。その後、独立した複数の研究グループが、連鎖解析と相関研究により、スコットランド家系以外の統合失調症においても DISC1 が重要であることを示してきている。

我々は DISC1 の機能を明らかにすることが、統合失調症の分子レベルでの病態生理を知る大きな手がかりになると考え、その解析を行った。以下に我々の研究を御紹介する。

DISC1 蛋白は、中枢神経系、特に神経発達時期に強く発現している。DISC1 は発見時には機能未知とされていたが、我々は、神経細胞の遊走に重要な NUDEL, LIS1 や、後シナプスにあってその形態やグルタミンレセプターの働きと関連する CITRON と相互作用することが主に yeast two-hybrid 法などで見いだされた。我々のデータは、DISC1 が NUDEL, LIS1 などと共にダイニン系を通じた微小管構築の調節に重要であることを示している。

【スコットランド家系で見いだされた変異 DISC1】 DISC1 同士は直接結合し、特に変異 DISC1 も正常 DISC1 に結合できる。この結果として、変異 DISC1 は正常 DISC1 の細胞

内局在を変化させてしまい、それは正常 DISC1 の機能の喪失につながる。すなわち、変異 DISC1 は dominant negative として働きうることがわかった。

【培養細胞を用いた機能解析】 ダイニン系を通した微小管構築の調節を細胞レベルで評価するために、我々は PC12 細胞における突起伸長を用いた。内在性 DISC1 の発現はその突起伸長時に増強する。正常 DISC1 をさらに発現させるとダイニンが MTOC にさらに集中し、DISC1 が突起伸長傾向に微小管のダイナミクスを調節することが示唆される。これを RNAi で抑制すると突起伸長はおさえられる。一方、スコットランド変異 DISC1 の強制発現もこの突起伸長をおさえる。これらの結果は、DISC1 のダイニン系を通した微小管構築の調節にかかわり、かつ変異 DISC1 が dominant negative としての形質を作りうることを示している。

【動物モデルを用いた機能解析】 統合失調症で最も重要な病理は、大脳皮質構築の小さいが確実に起こっている乱れであり、これは神経発達期におこった結果を反映するものだろう、と考えられている。しかしこうした神経病理のコンセンサスがあるのにもかかわらず、その分子機構はこれまで全く明らかでなかった。

一方、ダイニン系を通した微小管構築の調節は、大脳皮質構築、特に神経細胞の遊走、基礎的なシナプス構築時に必須の役割をはたす。従って、我々は統合失調症の遺伝的モデルである DISC1 の機能を大脳皮質構築に注目

して、in utero gene transfer 法を用いて検討した。

RNAi をうちこむことで DISC1 レベルを抑制すると、神経細胞遊走、配置に異常が認められた。DISC1 を抑制できる多種類の RNAi を使う事で、DISC1 抑制レベルと病理との関連を検討したところ、dose dependent な影響が認められた。スコットランド変異 DISC1 の強制発現は、DISC1 が大変マイルドに抑制された場合に一致する病理であり、それは、これまで統合失調症の神経病理で報告されてきた剖検脳の異常の本質に合致するものであった。

すなわち、DISC1 のダイニン系を通した微小管構築の調節、変異 DISC1 の dominant negative としての機能を支持する結果を、さらにはそれらが統合失調症の神経病理を説明しうる示唆的結果も得た。

【結論】 統合失調症の遺伝的モデルである DISC1 の機能解析は、この異常が神経病理のコンセンサスに合致する結果をもたらしうる事を支持した。さらにはスコットランド変異 DISC1 が dominant negative として機能することがわかったことにより、DISC1 の loss of function につながりうる種々の異常(多くは SNP などによるマイルドな影響だろう)が、ユニークな家系での統合失調症だけでなく、一般の統合失調症の危険因子として働きうることを示唆している。

なお本研究はジョンスホプキンス大学精神医学部門・神経科学部門、澤明をメインに、ロックフェラー大学 Hatten 研究室、慶応大学 仲嶋研究室の共同で行われている。

(9) シグナル伝達と統合失調症

宮川 剛 (京都大学医学研究科 先端領域融合医学研究機構)

要旨：演者は、これまで、各種遺伝子改変マウスに対して、幅広い領域をカバーした行動テストバッテリーを行うことにより、各種遺伝子の新規機能を見出してきた。最近、マサチューセッツ工科大学の利根川進博士らとの共同研究によって、この行動テストバッテリー戦略を用いることにより、カルシニューリン (CN) の前脳特異的ノックアウトマウスが顕著な作業記憶の障害、注意の障害、社会的行動の障害などを含む統合失調症様の行動異常を示すことを見だし (Zeng et al.,2001; Miyakawa et al., 2003), さらに、統合失調症患者のゲノム DNA サンプルを用いた相関解析により CN の遺伝子が統合失調症

と強く相関していることも報告した (Gerber et al., 2003)。これらの知見に基づき、演者らは CN が関与するシグナル伝達機構の異常が統合失調症の発症メカニズムに決定的な役割を果たしているであろうことを初めて提唱した。CN はドーパミン受容体や NMDA 受容体の下流に位置しており、統合失調症の CN 仮説は、ドーパミン仮説や NMDA 受容体仮説と高い整合性を持つ。CN ミュータントマウスでは、海馬錐体細胞の樹状突起の長さが短く、数も少ないなど、統合失調症の神経発達障害仮説ともよく一致している。さらに、統合失調症患者の免疫系の異常、心臓疾患による高い突然死率、糖尿病の高い罹患

率, リウマチの低い罹患率など従来の仮説では説明がつかなかった現象までうまく説明することもできる。シグナル伝達分子であるカルシニューリンについては, 既に多くの知見が蓄積されている。これらの知見と統合失調症をシグナル伝達機構の異常ととらえる作業仮説にもとづき, 遺伝子改変マウスと行動テストバッテリーを利用することによって, 今後どのようにして統合失調症の発症メカニズムを解明していくかについての演者の研究戦略も紹介する。

参考文献

Zeng, H., Chattarji, S., Barbarosie, M., Rondi-Reig, L., Philpot, B.D., Miyakawa, T., Bear, M.F. Tonegawa, S., Forebrain-specific calcineurin knockout selectively impairs bidirectional synaptic plasticity and working/episodic-like memory, *Cell* **107** (2001) 617-629.

Miyakawa, T., Leiter, L., Seeger, T., Gerber, D.J., Gainetdinov,

R.R., Sotnikova, T.D., Zeng, H., Caron, M.G., Tonegawa, S., Conditional Calcineurin Knockout Mice Exhibit multiple abnormal behaviors related to schizophrenia, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100** (2003) 8987-92.

Gerber, D. J., Hall, D., Miyakawa, T., Demars, S., Gogos, J. A., Karayiorgou, M. Tonegawa, S., Support for association of schizophrenia with genetic variation in the 8p21.3 gene, PPP2CC, encoding the calcineurin gamma subunit *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100** (2003) 8993-8.

Adler E.M., A signal deficit in schizophrenia? *Science* 301(2003) 737 (in Editors' Choice: Highlights of the recent literature)

Manji, H.K., Gottesman, I.I., Gould, T.D., Signal transduction and genes-to-behaviors pathways in psychiatric diseases, *Science's STKE* **207** (2003) pe49

(10) 幻覚・妄想状態の発症・再発モデルとしての長期持続性行動感作現象の分子機構

西川 徹 (東京医科歯科大学)

行動感作現象 (behavioral sensitization: 逆耐性現象 (reverse tolerance))は, アンフェタミン類(覚醒剤)・コカインに代表される中枢刺激薬を単回または反復使用した後に, 長期間にわたって, これらの薬物に対する感受性が亢進し, 行動の異常や統合失調症様の幻覚・妄想状態が生じやすくなる変化をさす。行動感作が成立した動物およびヒトは, 使用した薬物以外の中枢刺激薬やストレスに対しても過敏になることや, 断薬後における薬物またはその代謝産物の長期持続する脳内蓄積を示さないことなどから, この現象は脳の可塑的变化と関係があると推測されている。また, 一群の統合失調症では中枢刺激薬やストレスによって幻覚・妄想状態が容易に再燃することから, 行動感作現象の分子機構の解明により, 統合失調症の発症や再燃の神経機序の解明や予防・治療法開発につながる可能性がある。

私たちは, 1) 中枢刺激薬による統合失調症様の症状は児童期には出現し難い, 2) 実験動物でも行動感作現象は一定の発達時期以降に成立する, などの現象に注目し, ラット脳において行動感作現象に関連する神経回路および遺伝子を探索している。すなわち, ラット脳において生後発達に伴って中枢刺激薬に対する反応が変化する脳

部位を調べ, そこで発達依存的応答変化を示す遺伝子を検索した。

生後 8~56 日令のラットに覚醒剤 (methamphetamine (MAP)) を投与し, 神経活動の指標である c-fos 遺伝子産物 (c-Fos) の前脳部における発現を調べたところ, 発達に伴う分布パターンの変化が認められた。この変化は, 大脳新皮質と線条体で著しく, 他の部位では目立たなかった。また, 行動感作が成立するようになる生後 3 週頃に成熟期のパターンに移行することがわかった。また, 可塑性関連遺伝子のひとつである tissue type plasminogen activator mRNA の発現を検討し, MAP その他の行動感作を誘導する薬物の急性投与後に, 帯状回から線条体内側部に投射するニューロンの一団の細胞体に発現誘導が生ずることが観察された。これらの所見は, 大脳新皮質や線条体が行動感作に関連した神経回路を含むことを示唆している。そこで, 大脳新皮質において MAP に対する応答が生後 8 日令では見られないが生後 56 日令では発現が変化する遺伝子をスクリーニングし, 新規転写産物 mrt1 (MAP responsive transcript 1) を検出した。mrt1 について, 1) Mrt1 蛋白は PDZ および PX ドメインをもつ, 2) MAP によって発現が増加するバリエーションはシナプ

トゾーム画分に存在する Mrt1 イソフォームをコードしている, 3) 生後3週以降に MAP への応答が出現する, 4) 成熟期では, コカインにも応答し, MAP 投与後の発現誘導は行動感作形成を阻害する D1 ドーパミン受容体

遮断薬で抑制される, などの特徴が明らかになった。以上の結果から, mrt1 は行動感作の形成に関与する神経回路内の分子カスケードを構成している可能性が示唆された。

(11) 脆弱 X 遺伝子 FMR1 は RNAi/miRNA 分子経路に関与する?

岡村 勝友 (徳島大学ゲノム機能研究センター)

脆弱 X 症候群は精神遅滞を伴う遺伝病であり, その発症は FMR1 遺伝子の機能喪失による。FMR1 蛋白質は, RNA 結合蛋白質であり, ある一群の mRNA の発現を翻訳レベルで調節していると考えられているが, その詳細な機能は不明である。我々はショウジョウバエをモデル生物として用い, FMR1 蛋白質の機能の解明を試みている。

我々はこれまでにショウジョウバエ FMR1 (dFMR1) 欠損ショウジョウバエを作成し, dFMR1 変異体で概日リズムの異常を見いだしており, ショウジョウバエにおいても dFMR1 が脳神経系の機能に重要な働きを持っていると考えられる。さらに dFMR1 蛋白質の生化学的な解析により, dFMR1 蛋白質が RNA interference (RNAi) 関連因

子と共沈降することを明らかにしてきた。このことから dFMR1 が, RNAi 経路やその類似機構として最近発見された microRNA (miRNA) 経路に代表される小分子 RNA による遺伝子発現制御機構に関わっているのではないかと考え, 解析を行っている。現在までに dFMR1 蛋白質と共沈降する RNAi 必須因子の一つである Argonaute2 (AGO2) 欠損ショウジョウバエを作成し, RNAi 経路における機能, 脳神経系での機能, dFMR1 との相互作用について検討を行っている。小分子 RNA による遺伝子発現制御機構が脳神経系においてどのように機能しているか, またこれらの系に FMR1 蛋白質がどのように関わっているのか, これまでの解析結果を中心に報告したい。

8. 痛み情報伝達における ATP およびアデノシンの生理機能

2004年8月26日-8月27日

代表・世話人：井上 和秀（国立医薬品食品衛生研究所，九大・院・薬学）

所内対応者：井本 敬二（神経シグナル）

- (1) 青斑核 P2X₃ 受容体を介した痛覚抑制機構
南雅文，福井真人，中川貴之，金子周司，佐藤公道（京大院・薬・生体機能解析学）
- (2) 神経因性慢性疼痛による扁桃体シナプスの可塑的变化
池田亮^{1,2}，藤井克之¹，加藤総夫²（慈恵医大・¹整形外科，²神経生理）
- (3) 神経因性疼痛モデルにおけるグリア細胞の活性化様式
津田誠¹，国房恵美子¹，小泉修一²，井上和秀^{1,3}
（国立衛研・¹代謝生化学，²薬理，³九大・院・薬・分子制御）
- (4) 脊髄後角シナプス後細胞に発現する P2X 受容体の機能意義
塩川浩輝¹，中塚映政²，古江秀昌¹，吉村恵¹
（¹九州大・医・統合生理学，²佐賀大・医・神経生理）
- (5) ラット脊髄後角の痛覚情報伝達に及ぼすアデノシンのシナプス前性および後性作用
柳涛，楊鯤，勞力軍，藤田亜美，中塚映政，熊本栄一（佐賀大・医・神経生理）
- (6) 実験的脊髄損傷後疼痛に対するアデノシンの効果
尾形直則，森野忠夫，堀内秀樹，濱本雄一郎，山本晴康（愛媛大・医・整形外科）
- (7) ラットアジュバンド関節炎モデルにおける Adenosine Deaminase (ADA) インヒビターの効果
中町祐司¹，小柴賢洋¹，小坂英和¹，辻剛¹，関信男²，黒坂昌弘³，熊谷俊一¹
（神戸大・院医・¹臨床病態免疫，³運動機能，²藤沢薬品探索研究所）
- (8) ATP release and activation of maxi-anion channel in rat cardiomyocytes in hypotonic, ischemic or hypoxic conditions
Amal K. Dutta, Ravshan Z. Sabirov, Hiromi Uramoto and Yasunobu Okada（生理研・機能協同）
- (9) 膀胱上皮における ATP 放出機構について - TRPV1 欠損マウスを用いた検討 -
中村靖夫¹，Lori A. Birder²，Michael J. Caterina³，河谷正仁¹，William C. de Groat²
（¹秋田大・医・機能制御医学，²Dept. of Pharmacol., Univ. of Pittsburgh Sch. of Med.,
³Dept. of Biological Chemistry and Neuroscience, Johns Hopkins Univ. Sch. of Med.）
- (10) 自身の発現密度に依存する ATP 受容体 P2X₂ の性質の変化
藤原祐一郎，久保義弘（生理研・神経機能素子）
- (11) マウス網膜コリン作動性アムクリン細胞の P2X₂ 受容体応答
金田誠¹，石井勝好²，森島陽介³，赤木巧²，山崎泰広²，中西重忠³，端川勉²
（¹慶應大・医・生理，²理研・脳センター・神経構築，³京大・院医・生体情報科学）
- (12) 海馬ネットワーク興奮性制御における介在ニューロン P2Y₁ 受容体の役割とその機構
川村将仁¹，加藤総夫²（¹慈恵医大・薬理 1，²神経生理）
- (13) 表皮の P2X 受容体と皮膚バリアー再生の関係
傳田光洋，藤原重良，井上かおり（資生堂ライフサイエンス研究センター）
- (14) 脂肪細胞における P2Y 受容体の機能
尾松万里子，松浦博（滋賀医大・第2生理）
- (15) α,β -methyleneATP はウサギ脳底動脈の UTP 収縮を増強する
宮城靖¹，佐々木富男¹，John Zhang²（¹九大・医・脳外，²ミシシッピ大学・脳外）

- (16) ラット培養マイクログリアからのフリーラジカル・サイトカイン放出に対する ATP の効果
森野忠夫, 尾形直則, 堀内秀樹, 濱本雄一郎, 山本晴康 (愛媛大・医・整形外科)
- (17) 脳スライス培養系での ATP γ S による MCP-1 産生誘導機構に関する検討
片山貴博, 伊藤美聖, 神谷明裕, 山崎裕子, 金子周司, 佐藤公道, 南雅文
(京大・薬・生体機能解析)
- (18) アデノシンは濃度依存性にヒト単球由来樹状細胞の分化を抑制する
小柴賢洋, 中町祐司, 中澤隆, 辻剛, 熊谷俊一 (神戸大学臨床病態・免疫学)
- (19) ATP によるアストロサイトの酸化ストレスからの細胞保護作用
篠崎陽一^{1,3}, 小泉修一², 井上和秀^{1,3}
(国立衛研・¹代謝生化学, ²薬理, ³九大・院・薬・分子制御)
- (P 1) 頭痛と脳血管調節能
山田真久 (理研・脳科学・山田ユニット)
- (P 2) 末梢神経傷害モデルラットにおける DRG 神経細胞の P2X 受容体に対する noradrenaline の作用
圓尾圭史², 足立克², 山本悟史¹, 立石博臣², 西崎知之¹
(¹兵庫医大・医・生理学第2, ²整形外科学)
- (P 3) ラット脊髄・後根神経節・交感神経節における Adenosine 受容体 mRNA の発現と坐骨神経切断後の変化
小林希美子, 福岡哲男, 山中博樹, 野口光一 (兵庫医科大学・解剖2)
- (P 4) P2X₇ 受容体活性化による細胞死の誘導に小孔の形成は必要か?
月本光俊, 原田均, 五十里彰, 高木邦明 (静岡県立大・薬)
- (P 5) 孤束核シナプス伝達制御におけるアデノシン受容体の下流機構: Ca channel is all?
繁富英治¹, 山崎弘二¹, 西田基宏², 森泰生³, 加藤総夫¹
(¹慈恵医大・神経生理, ²九州大院・薬・薬物中毒, ³京大院・工・合成・生物化学・分子生物化学)
- (P 6) MNTB ニューロンにおける内因性の ATP による抑制性シナプス後電流の制御
綿野智一, 松岡功, 木村純子 (福島医大・医・薬理)
- (P 7) ATP による血管周皮細胞ペリサイト-アストロサイト連関
小泉修一¹, 藤下加代子², 井上和秀^{2,3}
(国立衛研・¹薬理, ²代謝生化学, ³九大・院・薬・分子制御)
- (P 8) 脳スライス細胞外 ATP の可視化
加藤総夫, 川村将仁, 繁富英治 (慈恵医大・神経生理)
- (P 9) アデノシンによる MDCK 細胞からの ATP 放出とそのシグナリング
右田啓介, 趙玉梅, 桂木猛 (福岡大・医・薬理)
- (P 10) ラット脳視床下部スライス標本の細胞外 ATP におよぼす UTP の作用
小野委成, 松岡功 (福島医大・医・薬理)
- (P 11) 細胞外マトリックスとマイクログリアの P2 受容体
国房恵巳子¹, 多田薫², 小泉修一², 津田誠¹, 井上和秀^{1,3}
(国立衛研・¹代謝生化学, ²薬理, ³九大・院・薬・分子制御)
- (P 12) ATP 受容体および新規 $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体によるマイクログリアの活性制御
鈴木智久, 松原明代, 秀和泉, 仲田義啓 (広島大・院・薬効解析)
- (P 13) $\beta 1$ インテグリンを介するマイクログリアの増殖・ケモタキシスと P2Y₁₂ 受容体
多田薫¹, 小泉修一¹, 井上和秀^{2,3}
(国立衛研・¹薬理, ²代謝生化学, ³九大・院・薬・分子制御)

(P14) P2Y₆受容体活性化によるミクログリア細胞のファゴサイトーシス能の増大

重本-最上由香里¹, 小泉修一², 多田薫², 津田誠¹, 井上和秀^{1,3}
 (国立衛研・¹代謝生化学, ²薬理, ³九大・院・薬・分子制御)

(P15) アデノシン A_{2A}受容体と P2Y 受容体のヘテロダイマー形成

小柳洸志, 津賀浩史, 神谷敏夫, 中田裕康 (東京都神経研・生態機能分子)

(P16) アデニル酸シクラーゼの内因性阻害物質 3'-AMP の産生酵素の生体内分布

藤森廣幸, 芳生秀光 (摂南大・薬・衛生分析化学)

(P17) マウス味蕾細胞基底膜の ATP 受容体分布

早戸亮太郎, 吉井清哲 (九州工大・院・生命体・脳情報)

(P18) レチノイン酸による皮膚 P2Y₂受容体の発現制御

藤下加代子¹, 小泉修一², 井上和秀^{1,3}
 (国立衛研・¹代謝生化学, ²薬理, ³九大・院・薬・分子制御)

(P19) ATP による大腸癌細胞の増殖抑制作用の検討

西藤勝, 山本悟史, 西崎知之 (兵庫医科大学・医・生理学第2)

【参加者名】

井上 和秀 (国立衛研, 九大・院・薬), 中村 靖夫 (秋田大・医), 松岡 功, 小野 委成, 綿野 智一 (福島医大), 加藤 総夫, 池田 亮, 繁富 英治, 川村 将仁, 河野 優, 山本 清文, 安井 豊 (慈恵医大), 津田 誠, 最上 由香里, 藤下 加代子, 篠崎 陽一, 戸崎 秀俊, 國房 恵巳子, 長谷川 茂雄, 小泉 修一, 多田 薫 (国立衛研), 小柳 洸志, 津賀 浩史, 中田 裕康 (東京都神経研), 山田 真久 (理研・脳科学), 金田 誠 (慶応大・医), 傳田 光洋 (資生堂ライフサイエンス研), 早乙女 秀雄 (Wyeth Discovery Research), 鈴木 隆一郎 (医療福祉システム研究所), 月本 光俊, 原田 均 (静岡県立大・薬), 篠田雅路, 水村和枝, 肥田朋子, 田口徹 (名大・環研), 平田 洋子 (岐阜大), 山下 勝幸 (奈良医大), 松浦 博, 尾松 万里子 (滋

賀医大), 南 雅文, 片山 貴博 (京大・薬), 市川 純 (関西医大), 藤森 廣幸 (摂南大・薬), 小柴 賢洋, 中町 祐司 (神戸大学・医), 野口 光一, 西崎 知之, 山本 悟史, 西藤 勝, 圓尾 圭史 (兵庫医大・医), 仲田 義啓, 秀 和泉, 鈴木 智久 (広島大・院・薬), 尾形 直則, 森野 忠夫 (愛媛大・医), 吉村 恵, 塩川 浩輝, 宮城 靖 (九大・医), 早戸 亮太郎 (九工大・院・生命体), 桂木 猛, 右田 啓介 (福岡大・医), 熊本 栄一, 中塚 映政, 藤田 亜美 (佐賀大・医), 富永 真琴 (岡崎統合バイオ), 岡田 泰伸, Ravshan SABIROV, Amal Kumar DUTTA, 温井 美帆, 藤原祐一郎, 立山 充, 久保義弘, 西巻 拓也, 和氣 弘明, 岩井 博正, 加勢 大輔, 佐竹 伸一郎, 東 智弘, 井本敬二 (生理研)

【概要】

近年著しい発展が認められる ATP およびアデノシン受容体を介する痛み情報伝達解明に関連して, 我が国でも国際的なリーダーシップをとれる質を備えた研究がなされており, 2003年でも Nature (Tsuda et al.), PNAS (Koizumi et al.)あるいは J. Neuroscience (Moriyama et al.)などの一流国際誌に優れた報告が数多く認められ, その隆盛ぶりがうかがい知れる。また, アデノシン (ATP 製剤として) を鎮痛薬として臨床使用するグループも現れた。そこで,

このような優れた研究成果をあげられている研究グループを一堂に会して, 情報交換を密にし, 一気に研究レベルを高めることができれば, 我が国のこの分野への国際貢献に資することができると思った。

具体的には, 中枢・末梢での痛み情報伝達に関する基礎研究, および関連する臨床知見, そして情報伝達メカニズム解明に寄与しうる基礎研究の発表と討論で構成した。

(1) 青斑核 P2X₃受容体を介した痛覚抑制機構

南雅文, 福井真人, 中川貴之, 金子周司, 佐藤公道
(京大・院・薬・生体機能解析学)

我々はこれまでに, ATP および α,β -meATP (1 - 30 nmol), Bz-ATP (1 - 30 nmol) の側脳室内投与により, 一過性の機械的侵害受容閾値の上昇が惹起されること, この α,β -meATP による侵害受容閾値上昇は, β アドレナリン受容体拮抗薬 propranolol (10 mg / kg) の皮下への前処置, さらには β 2アドレナリン受容体拮抗薬 butoxamine (100 nmol) および ICI-118551 (100 nmol) の側脳室への前投与により有意に抑制されることを報告し, 脳内 P2X 受容体を介してアドレナリン (NA) 神経系を活性化させることによる中枢性痛覚抑制機構が存在する可能性を示してきた。今回は, α,β -meATP の作用点および作用機構を明らかにすることを目的として研究を行った。

青斑核由来の NA 神経を比較的選択的に破壊する神経毒 DSP-4 を腹腔内に前処置すると, α,β -meATP による鎮痛作用は有意に減弱された。さらに, α,β -meATP の両側青斑核への微量投与は, i.c.v.投与の場合よりも低用量 (0.2, 2 nmol) において, 有意かつ顕著な鎮痛作用を惹起した。またその鎮痛作用は, P2X 受容体拮抗薬 PPADS (1 nmol) の青斑核内への同時投与により有意に拮抗された。

次に, 青斑核内での作用機構を明らかにするために, 青斑核におけるグルタミン酸およびその受容体の関与を検討した。In vivo マイクロダイアリシス法により測定した青斑核における細胞外グルタミン酸量は, 灌流液中への α,β -meATP (500 μ M) 適用によって有意に増加した。また, α,β -meATP (2 nmol) の両側青斑核への微量投与による鎮痛作用は, NMDA 受容体拮抗薬 MK-801 (2, 20 nmol) の同時投与により有意に抑制されたが, AMPA/kainate 受容体拮抗薬 CNQX (20 nmol) によつては影響を受けなかった。これらの結果から, 脳内 P2X 受容体を介した鎮痛作用には, 青斑核内における P2X 受容体刺激を介したグルタミン酸遊離とそれによる NMDA 受容体の活性化が関与していることが示唆された。さらに, P2X₃ 受容体拮抗薬 A-317491 (1 nmol) の側脳室内投与により, ホルマリンのラット足底内注射により惹起される疼痛行動, および酢酸の腹腔内注射により惹起されるライジング行動が共に有意に増加したことから, 内在性の ATP が脳内において, 侵害受容に対して抑制的に機能している可能性が示された。

(2) 神経因性慢性疼痛による扁桃体シナプスの可塑的変化

池田 亮^{1,2}, 藤井 克之¹, 加藤 総夫²

(¹ 東京慈恵会医科大学 整形外科学講座, ² 神経生理学研究室)

神経因性疼痛は, 灼熱痛, 発汗異常, 血管運動障害とともに, 非侵害性刺激によって誘発される痛覚過敏状態 (異痛症) を生じる。このような疼痛に対する有効な治療法はなく, 理学療法, 投薬, 精神科的治療などの対症療法が中心となっている。治療に難渋する原因として, 損傷部位での組織的変化と主訴としての痛覚症状の発現に隔たりがあるなどの複雑な疼痛感覚形成機構の関与があげられる。他の感覚性入力と異なり, 疼痛は特異的な「不快感・嫌悪感」を個体に生じさせるため, その成立には中枢神経系内の情動関連神経機構が関与していると考えられる。神経因性慢性疼痛成立時に, 情動に関与する上

位中枢ネットワークにおけるシナプス伝達の可塑的な変化が生じている可能性を検討した。

扁桃体中心核外側亜核および外包核は, 橋外側結合腕傍核からの興奮性入力を受けており, この投射経路は脊髄由来の侵害受容性情報を選択的に伝達する。我々はこの扁桃体中心核に投射する疼痛関連シナプス入力に注目した。異痛症の成立と扁桃体シナプス伝達との間の関係を検討するため, Wistar rat において左側 L5 脊髄神経結紮慢性疼痛モデルを作成し, 術後 6-7 日目に, von Frey filament 刺激による異痛症発現評価を行い, 直後に麻醉下に断頭して, 扁桃体脳スライスを作成し, 扁桃体中心

核外包核 (CeA) ニューロンから外側結合腕傍核からの入力線維刺激によって誘発される興奮性シナプス後電流 (誘発 EPSC) を記録した。結紮モデルの結紮対側 CeA から記録された誘発 EPSC 振幅は、健側対側、および、Sham 手術群におけるそれよりも有意に高値であった。Paired-pulse 刺激による「paired-pulse ratio (PPR)」には、左右の差が認められなかったため、結紮対側における誘発 EPSC 振幅増大は主にシナプス後性機構の変化によるものと推定される。さらに、健側対側 CeA における誘発 EPSC 振幅に対する結紮対側 CeA の誘発 EPSC 振幅の比は、von Frey 法で計測した異痛症性応答閾値の低下と相関を示した (Spearman's rank correlation, -0.79)。ATP (100 μ M) および adenosine (100 μ M) は、誘発 EPSC 振幅を約

40% 減少させたがこの効果には著明な左右差は認められなかった。

これらの結果は、神経因性慢性疼痛の成立が、情動応答に関与する上位中枢神経核におけるシナプス伝達の変化を伴う事実を初めて示したものである。また、慢性疼痛動物モデルにおける「仮性疼痛反応」の亢進が、単に侵害入力性脊髄反射の亢進を反映しているのではなく、脳内の情動に関与する神経構造の活動の変化を伴う、主観的な慢性的「痛み」と類似した生体反応である可能性も示している。このようなシナプス伝達の可塑的变化の成立に関与する分子機構の解明は、神経因性慢性疼痛の治療法の開発につながるものと期待される。

(3) 神経因性疼痛モデルにおけるグリア細胞の活性化様式

津田誠¹, 国房恵美子¹, 小泉修一², 井上和秀¹
(国立衛生研究所・¹代謝生化学, ²薬理)

神経損傷により発症する神経因性疼痛は、損傷後に起こる一次求心性感覚神経や脊髄後角さらには脳で神経化学的な再構築が原因と推定されている。従来までは、それらの部位における神経細胞での変化のみに焦点が当てられてきたが、最近では脊髄後角におけるグリア細胞に注目が集まっている。我々は、ATP 受容体サブタイプの P2X4 受容体の発現が神経損傷後に活性化したミクログリアで増加し、P2X4 受容体の活性を阻害することにより、アロディニアを抑制できることを見出し、神経因性疼痛におけるミクログリアの必要性を明確にした。そこで今回は、末梢神経損傷後の脊髄後角ミクログリアの活性化様式について紹介する。ミクログリアの活性化は、そのマーカーである OX42 の染色レベルと形態学的変化

をもとに解析した。正常ラットの脊髄後角において OX42 レベルは低く維持されているが、L5 脊髄神経を損傷すると、その発現レベルは著しく増加した。その増加の経時変化は、損傷 1 日後より観察され、7 日から 14 日後にピークとなった。また、損傷 1 日後で細胞体の肥大化や突起の退縮など、活性化型へ移行する形態上典型的な変化が観察され、2~3 日後には細胞分裂を起こした。脊髄後角の活性化ミクログリアは、表層部 (第 I 層や第 IIo 層) にはあまり見られず、むしろ深層部 (第 III 層や第 IV 層) で著明だった。以上の結果より、ミクログリアの活性化は、脊髄全体に一樣に誘発するものではなく、空間・時間的に非常に制御された反応であることが示唆される。

(4) 脊髄後角シナプス後細胞に発現する P2X 受容体の機能意義

塩川 浩輝¹, 中塚 映政², 古江 秀昌¹, 吉村 恵¹
(¹九州大学医学部大学院統合生理学, ²佐賀大学医学部医学科生体構造機能学講座)

ATP P2X 受容体は末梢における痛覚受容に関与するだけでなく、脊髄後角においても侵害感覚情報を増強する

ことが明らかとなり、大変注目されている。P2X 受容体は脊髄後角細胞のシナプス前に発現しており、その活性

化に伴ってグルタミン酸の遊離増強が生じ、その結果、痛覚過敏を惹起する。脊髄後角細胞のシナプス前のみならず、P2X受容体は脊髄後角表層のシナプス後細胞においても発現していることを示唆されている。しかしながら、その機能的意義は明らかでなく、特に脊髄後角深層細胞に関して、P2X受容体のシナプス後細胞における役割は全く知られていない。

今回、ラット脊髄スライス標本を用いたパッチクランプ記録を行い、脊髄後角深層細胞のシナプス後細胞におけるATP受容体の役割を検討した。代謝安定型のATP受容体広作動域作動薬であるATP- γ S (100 μ M) を灌流投与すると、約40%の脊髄後角深層細胞において内向き電流と興奮性シナプス後電流の発生頻度の増強効果が観察された。一方、 α,β -methylene ATP (100 μ M) の灌流投与を行うと内向き電流は観察されず、興奮性シナプス後電流の発生頻度の増強効果のみが観察された。ATP- γ Sによ

り生じた内向き電流は、各種P2Y受容体作動薬の灌流投与によって再現されなかった。また、細胞膜G蛋白質阻害薬存在下において、ATP- γ S灌流投与による内向き電流は抑制されなかった。さらに、ATP- γ S灌流投与によって生じた内向き電流ならびに興奮性シナプス後電流の発生頻度の増強効果は、P2X受容体拮抗薬であるPPADS (10 μ M) の存在下において完全に阻害されたが、TNP-ATP (20 μ M) の存在下において影響されなかった。

以上の結果から、ATP P2X受容体は脊髄後角深層細胞のシナプス前のみならず、シナプス後細胞においても発現しており、シナプス前とシナプス後細胞に発現しているP2X受容体は異なるサブタイプであることが明らかとなった。さらに、脊髄後角深層細胞のシナプス後細胞に発現するP2X受容体は、薬理学的特性からP2X₅あるいはP2X_{2,6}のいずれかであることが示唆された。

(5) ラット脊髄後角の痛覚情報伝達に及ぼすアデノシンのシナプス前性および後性作用

柳涛, 楊鯤, 勞力軍, 藤田亜美, 中塚映政, 熊本栄一
(佐賀大学医学部生体構造機能学講座神経生理学分野)

アデノシンは中枢シナプス伝達の修飾物質として様々な生理作用に重要な役割を果たしているが、その作用の一つに痛み情報伝達の抑制がある。アデノシンの作用部位の一つとして、侵害刺激の情報伝達制御の要である脊髄後角の膠様質が知られている。我々は脊髄スライスの膠様質細胞にパッチクランプ法を適用してシナプス伝達に及ぼすアデノシン作用を調べ、次のことを明らかにした。(1) アデノシンは濃度依存性 (EC_{50} = 177 μ M) にTEA非感受性でBa²⁺や4-APにより抑制されるK⁺チャネルを活性化した。この膜電流は整流性を示さなかった。(2) アデノシンは後根刺激により誘起される単シナプス性のグルタミン酸作動性EPSC振幅をシナプス前性に減少させ、その程度はA δ 線維とC線維を介するEPSCの間で差はなかった。A δ 線維EPSC振幅抑制の EC_{50} は217 μ Mであった。自発性EPSCについて、その振幅の変化なしに発生頻度が減少した (EC_{50} = 277 μ M)。(3) 脊髄後角の

局所電気刺激により誘起されるGABAおよびグリシン作動性IPSCもシナプス前性にアデノシンにより濃度依存性に抑制された。これらの EC_{50} はそれぞれ14.5 μ Mと19.1 μ Mで、いずれの値も(1)と(2)の作用より小さかった。自発性IPSCについても、その振幅の変化なしに発生頻度が減少した。以上の(1)~(3)と同様な作用はCPAによりみられ、また、これらのアデノシン作用はDPCPXにより抑制されたことより、いずれの作用もアデノシンA₁受容体の活性化を介するものであることが示された。以上の結果より、脊髄膠様質においてアデノシンはシナプス前性に興奮性や抑制性のシナプス伝達を抑制する一方、シナプス後性に膜を過分極させると結論された。アデノシンによる膠様質細胞の膜興奮性すなわち痛み伝達の制御はその濃度に依存することが示唆された。

(6) 実験的脊髄損傷後疼痛に対するアデノシンの効果

尾形直則, 森野忠夫, 堀内秀樹, 濱本雄一郎, 山本晴康
(愛媛大・医・整形外科)

【目的】脊髄損傷後の痛覚異常は有効な治療法も乏しく、治療に難渋する病態である。この病態に対し、我々は脊髄圧迫にて下肢に hyperalgesia を引き起こすモデルを開発し、一昨年の本学会において報告した。今回はアデノシンという物質に着目した。アデノシンは中枢神経系における内因性神経調節物質であり、神経細胞を過分極させることにより、細胞興奮を抑制する機能がある。本研究ではこのモデルを用いて脊髄損傷による痛覚過敏に対するアデノシンの効果を検討した。

【方法】Wistar 系雌ラットを用い、第 11 胸椎レベルで椎弓を切除し、20g の重錘を硬膜上に 20 分間置くことによって脊髄に障害を加えた。痛覚閾値の測定は脊髄損傷 3 日後に足底部の熱刺激による withdrawal latency の変動をモニターすることにより行った。アデノシンの効果を検討するため non selective adenosine receptor agonist である Cl-adenosine, および、adenosine A1 receptor の selective な agonist, antagonist を痛覚測定の前 1 時間前に硬膜内投与した。

【結果】normal ラットに adenosine A1receptor antagonist

(DPCPX10 μ g) を投与すると、疼痛閾値の低下が認められた。脊髄圧迫モデルは、圧迫後 2-5 日目まで両足底部に有意な hyperalgesia が発生する。脊髄圧迫 3 日後に Cl-adenosine 10 nmol を投与した群では、hyperalgesia が有意に抑制されていた。adenosine A1receptor antagonist (DPCPX10 μ g) は Cl-adenosine の痛覚過敏抑制効果を阻害した。また、脊髄圧迫モデルに adenosine A1receptor agonist (R-PIA10nmol) を投与すると、疼痛閾値改善がみられた。

【考察】本研究では圧迫を行っていないラットにおける adenosine A1receptor antagonist 投与により痛覚過敏が出現したことから、アデノシンは生理的状態において抑制系物質として作用しているのではないかと考えられた。また、脊髄損傷モデルにおいて Cl-adenosine 投与より痛覚過敏が抑制されたことから、脊損後疼痛においてアデノシンの抑制効果が低下している可能性が考えられた。これらの結果より adenosine receptor agonists は疼痛緩和のための治療薬として有効である可能性が示唆された。

(7) ラットアジュバンド関節炎モデルにおける Adenosine Deaminase (ADA) インヒビターの効果

中町祐司¹, 小柴賢洋¹, 小坂英和¹, 辻剛¹, 関信男², 黒坂昌弘³, 熊谷俊一¹
(神戸大・院医・¹臨床病態免疫, ²藤沢薬品探索研究所, 神戸大・院医・³運動機能学)

【目的】関節リウマチ (RA) は滑膜の異常増殖、炎症細胞の関節への浸潤および関節破壊をともなう病因不明の慢性疾患である。RA に有効な抗リウマチ薬であるメトトレキサート (MTX) は、炎症局所の細胞外アデノシン濃度を上昇させ浸潤細胞数を減少させること、またラットアジュバンド関節炎では、アデノシン受容体アンタゴニストであるテオフィリンやカフェインが MTX による抗炎症作用を抑制することが知られており、細胞外アデノシンが MTX の抗リウマチ作用のエフェクター-分子であると考えられる。

われわれは、アデノシンを不活性のイノシンに分解するアデノシンデアミナーゼ (ADA) が RA の関節液および

滑膜細胞で高活性であることを見出した。このことは炎症局所における ADA の増加が内因性アデノシンの作用を減弱させ、RA の病態に促進的に作用していると考えられる。

そこで、今回われわれはラットアジュバンド関節炎モデルに ADA インヒビターを投与し、その効果を検討した。

【方法】関節炎は、7 週齢の雄 Lewis ラットの尾根部に Mycobacterium tuberculosis 含有不完全 Freund アジュバンドを皮下投与し誘導した (発症率 100%)。ADA インヒビターは FR242685 (FR; 藤沢薬品) をラット右後踵部に連日投与した。

関節炎は、発赤および関節腫脹の程度により、1 足当

たり、1 から 4 の 4 段階 (最大 16) で判定した。また、抗関節炎効果の指標として全身状態を反映する体重を測定した。関節炎を誘導後 30 日目に屠殺し、骨破壊の程度をレントゲン写真で検討し、病理組織学的評価を HE 染色標本で行った。

【結果】 1) FR 投与群は、非投与群に比べ関節の腫脹が抑制された。2) FR 投与群は、非投与群に比べ体重の増加

が見られた。3) FR 投与群は、非投与群に比較し骨破壊の抑制を認めた。4) FR 投与群は、非投与群と比較し関節腔の狭窄が軽度であった。5) FR 投与群は、非投与群と比較し滑膜の増殖および炎症細胞の浸潤が軽度であった。

【考察】 ラットアジュバンド関節炎モデルでは、ADA インヒビター投与により細胞外アデノシン濃度が上昇することにより、関節炎を抑制することが示唆された。

(8) ATP release and activation of maxi-anion channel in rat cardiomyocytes in hypotonic, ischemic or hypoxic conditions

Amal K. Dutta^{1,2}, Ravshan Z. Sabirov^{1,2}, Hiromi Uramoto^{1,2}, and Yasunobu Okada^{1,2}

(¹Department of Cell Physiology, National Institute for Physiological Sciences, and ²School of Life Science, The Graduate University for Advanced Studies (SOKENDAI))

The level of ATP in the interstitial space within the heart during ischemia or hypoxia is elevated due to its release from a number of cell types, including cardiomyocytes. However, the mechanism by which ATP is released from these myocytes is not known. In the present study, we examined a possible involvement of the ATP-conductive maxi-anion channel in ATP release from neonatal rat cardiomyocytes in primary culture upon hypotonic, ischemic or hypoxic stimulation. Using a luciferin-luciferase assay, we found that ATP was released to the bulk solution when the cells were subjected to chemical ischemia, hypoxia or hypotonic stress. The swelling-induced ATP release was inhibited by carboxylate- and stilbene-derivative anion channel blockers, arachidonic acid and Gd^{3+} , but not by glibenclamide. The local concentration

of ATP released near the cell surface of a single cardiomyocyte, measured by a biosensor technique, was found to exceed the micromolar level. Patch-clamp studies showed that ischemia, hypoxia or hypotonic stimulation induced activation of single-channel events with a large unitary conductance (~ 390 pS). The channel was selective to anions and showed significant permeability to ATP^{4-} ($P_{ATP}/P_{Cl} \sim 0.1$) and $MgATP^{2-}$ ($P_{ATP}/P_{Cl} \sim 0.16$). The channel activity exhibited pharmacological properties essentially similar to those of ATP release. These results indicate that neonatal rat cardiomyocytes respond to ischemia, hypoxia or hypotonic stimulation with ATP release and that the ATP-conductive maxi-anion channel serves as the conductive pathway for ATP release.

(9) 膀胱上皮における ATP 放出機構について — TRPV1 欠損マウスを用いた検討 —

中村靖夫¹, Lori A. Birder², Michael J. Caterina³, 河谷正仁¹, William C. de Groat²

(¹秋田大・医・機能制御医学, ²Dept. of Pharmacology, Univ. of Pittsburgh Sch. of Med.,

³Dept. of Biological Chemistry and Neuroscience, Johns Hopkins Univ. Sch. of Med.)

【背景】 正常膀胱においては伸展により、ATP が放出され、それが尿路上皮や求心性神経における mechanosensory mechanism に関与しているであろうと報告されている。TRPV1 がその ATP 放出機構に関与していることを示唆

する知見を得られたので、報告する。

【目的】 TRPV1 は膀胱に存在することが知られている。カプサイシンはその受容体である TRPV1 を刺激し、脱感作を引き起こすため、脊髓損傷患者の排尿筋過反射に

対する治療に使われている。しかし TRPV1 が正常な膀胱機能に果たす役割はまだはっきりわかっていない。そのため、我々は TRPV1 null mutant mice の膀胱機能および膀胱からの ATP 放出量を評価した。

【方法】TRPV1 null および wild type mice にウレタン麻酔下で膀胱瘻を作成し、そのカテーテルより生理的食塩水を一定速度 (0.5 ml/hr) で順に注入しながら、膀胱内圧を測定した。また、膀胱を伸展させた時の脊髄における c-fos の発現も測定した。さらに、摘出膀胱標本を伸展させた時および培養尿路上皮細胞に低浸透圧刺激を与

えた時の ATP の放出量を luciferin-luciferase 法で測定した。

【結果】膀胱内圧測定において、wild type mice と比較して、TRPV1 null mice の膀胱容量は有意に高値を示したが、膀胱充満による脊髄における c-fos の発現は低値であった。摘出膀胱標本を伸展させた時および培養尿路上皮細胞に低浸透圧刺激を与えた時の ATP の放出量はいずれも TRPV1 null mice の方が有意に低値であった。

【結語】これらの所見より、TRPV1 が膀胱伸展の感知、おそらく尿路上皮や求心性神経における mechanosensory mechanism に関与していることが示唆された。

(10) 自身の発現密度に依存する ATP 受容体 P2X₂ の性質の変化

藤原 祐一郎, 久保 義弘

(生理学研究所・神経機能素子研究部門)

イオンチャンネル型の ATP 受容体 P2X は、時間依存的にイオン選択性が変化することや、記録ごとにうち向き整流性の強度がばらつくなどの特徴あるポアの性質を持つことが知られている。我々は P2X₂ 受容体の整流性の分子機構を明らかにする目的で、アフリカツメガエル卵母細胞に P2X₂ を発現させ 2 本刺し膜電位固定下で ATP 投与後の電流を記録した結果、内向き整流性のばらつきが発現密度に相関することを見いだした。これを手がかりとして今回、受容体の種々の性質を発現レベルとの関連において解析し以下の知見が得られた。

(1) P_{K+}/P_{Na+} の発現密度に依存した変化は観察されなかったが、P_{NMDG+}/P_{Na+} は発現密度と負の相関を示した。(2) 内向き整流性の強弱は発現密度と負の相関を示した。脱分極パルス直後に観察される外向き電流 (I_{initial}) は、経時的に減衰し定常レベルに (I_{steady}) に達した。I_{initial} および I_{steady} の、内向き電流の大きさに対する割合はどちらも

チャンネルを高発現にすることによって増加した。(3) 高濃度の ATP (100 μM) により弱い内向き整流性電流を呈する発現密度の高い細胞に、低濃度 ATP (3 μM) を投与するとその内向き整流性は増強した。(4) [ATP] - 応答関係の K_d の値は発現密度と負の相関を示した。Hill 係数は発現密度に相関なく一定値 2 であった。(5) ポア上部の点変異 I328C により上記の発現密度に依存したポアの性質の変化がほぼ消失した。

以上の結果をまとめると、「P2X₂ 受容体の内向き整流性等の性質は、膜上に存在する「開状態」のチャンネルの密度に依存して動的に変化する。」と表現できる。我々は「ATP 投与により開状態に入った、ごく近傍にある P2X₂ 受容体チャンネル間の相互作用によりポア上部においてなんらかの構造変化が起こり、ポアの性質やリガンド感受性が変わる。」というイメージが、最も自然にかつ矛盾なくデータを説明できると考えている。

(11) マウス網膜コリン作動性アムクリン細胞の P2X₂ 受容体応答

金田 誠¹, 石井 勝好², 森島 陽介³, 赤木 巧², 山崎 泰広², 中西 重忠³, 端川 勉²

(¹慶應大・医・生理, 理研・²脳センター・神経構築, ³京大・院医・生体情報科学)

網膜では外来性に投与した ATP が ACh の放出を抑制することが報告されている。ACh の放出は薬理学的実験

から P2X 受容体を介する抑制機構が関与すると考えられているが、どのサブタイプが関与しているのかは明らか

となっていない。これは網膜における P2X 受容体の分布について体系的に検討されていないことが大きな原因となっている。本研究では、マウス網膜の P2X₁, P2X₂, P2X₄, P2X₇ 受容体の分布について免疫組織化学的手法を用いて検討し、コリン作動性ニューロンに存在する P2X 受容体のサブタイプに注目してそのシナプス部位における局在を immunotoxin-mediated cell targeting technology (IMCT) 法を用いて検討した。またコリン作動性アマクリン細胞が選択的に GFP 陽性像を示す transgenic mouse を用いて、コリン作動性アマクリン細胞にパッチクランプ法を適用し、そのプリン受容体応答について検討した。

免疫組織化学的には、P2X₁ 受容体は内顆粒層と内網状層の境界部付近に点状に分布する陽性所見が観察された。P2X₂ 受容体は一部のアマクリン細胞の細胞体と内網状層のサブミナ a で強い免疫反応陽性像が観察された。P2X₄ 受容体は、神経節細胞層で強い免疫反応陽性像が観察された。P2X₇ 受容体は内顆粒層と神経節細胞層の細胞体で陽性所見が観察され、内顆粒層の陽性細胞は硝子体側と強膜側に存在していた。P2X₂ の免疫反応はコリン作動性ニューロンのマーカーである ChAT の免疫反応と一

致した。また P2X₂ の免疫反応はコリン作動性ニューロンに GFP シグナルを発現する transgenic mouse においても一致した。Transgenic mouse に IMCT 法を適用してコリン作動性ニューロンを選択的に細胞死させると、GFP シグナルが消失した領域のみで P2X₂ の免疫反応が消失した。このことから P2X₂ の免疫反応は starburst アマクリン細胞の樹状突起上に選択的に発現しているものと考えられる。

ホールセルクランプ下に ATP をコリン作動性アマクリン細胞に投与し、発生した ATP 応答を GABA 応答で正規化して、OFF 型コリン作動性アマクリン細胞と ON 型コリン作動性アマクリン細胞の ATP 応答の大きさを比較した。OFF 型コリン作動性アマクリン細胞で観察される ATP 応答は ON 型コリン作動性アマクリン細胞で観察される ATP 応答より大きかった。また α,β -methyleneATP では ATP 応答が惹起されず、PPADS 存在下で ATP を投与したときにも応答は生じなかった。

以上の結果から、マウス網膜において ATP は網膜内網状層では P2X₂ 受容体を介して OFF 経路のアセチルコリン信号伝達に関与するが、ON 経路のアセチルコリン信号伝達には関与しない可能性が示唆された。

(12) 海馬ネットワーク興奮性制御における介在ニューロン P2Y₁ 受容体の役割とその機構

川村将仁¹, 加藤総夫²

(¹ 慈恵医大・薬理学第 1, ² 慈恵医大・神経生理)

海馬には各種 ATP 受容体, アデノシン受容体, および, ATP からアデノシンへの細胞外変換酵素系が豊富に発現している。細胞外プリンによる海馬ネットワークの興奮性制御におけるこれらの機能分子群の役割を解明するためには、これらの分子を発現するニューロンおよびグリア細胞の空間的細胞構造が in situ に近い状態で維持されている急性スライス標本を用いた検討が必須である。現在までに、海馬急性スライス標本における細胞外 ATP の効果とその機序を薬理学的手法および遺伝子ノックダウン法を用いて検討した報告が多くなされているが、その大部分は、海馬初代培養細胞を用いた研究の結論とは異なり、海馬スライスにおいて ATP はアデノシンに加水分解された後にアデノシン受容体活性化を介してシナプス伝達を修飾する、と結論している。

我々はこれらの海馬スライス標本を用いた研究の大部

分が錐体細胞への興奮性シナプス入力のみを検討していることに着目した。海馬錐体細胞の興奮性は、興奮性シナプス入力のみならず、周囲の介在ニューロンからの抑制性シナプス入力によっても制御されている。昨年、本研究会で細胞外 ATP がアデノシンに代謝された後、アデノシン A₁ 受容体の活性化を介して CA3 錐体細胞の EPSC 頻度を減少させる事実を報告した。この時、同時に観察された IPSC の頻度は ATP により有意に増加した。今回は、ATP によるこの IPSC 頻度増大効果の分子機構の解明を試みた。以下の 4 つの実験成績に基づき、ATP による IPSC 頻度増加は、介在ニューロンに発現する P2Y₁ 受容体を介した介在ニューロンの直接的興奮によると結論された。(1) IPSC 頻度増加は 2meSATP により最も強く引き起こされ、MRS2179 によりほぼ完全に抑制された。(2) P2Y₁ 受容体のノックアウトマウスでは、2meSATP

による IPSC 頻度の増加が観察されなかった。(3) 2meSATP は介在ニューロンに内向き電流を生じさせ、これは MRS2179 により抑制された。またこの内向き電流は、介在ニューロンを脱分極させ、錐体細胞の IPSC 頻度増加と時間的に一致して活動電位を発生させた。および、(4) 海馬スライスにおける細胞内カルシウム濃度イメージングを行ったところ、2meSATP は錐体細胞層外に局在する一部の介在ニューロンの $[Ca^{2+}]_i$ を細胞外 Ca^{2+} 依存的に増加させた。2meSATP はアストロサイトの $[Ca^{2+}]_i$ も増加させたが、これは細胞外カルシウム非存在下にも生じた。いずれも MRS2179 により抑制された。2meSATP は

錐体細胞の $[Ca^{2+}]_i$ に変化を及ぼさなかった。

以上の結果は、ATP が介在ニューロンの P2Y₁ 受容体の活性化を介して介在ニューロンを直接的に興奮させ、錐体細胞への抑制性入力を増加させることを証明したものである。この効果は、同時に起こるアデノシン受容体の活性化と協働的にはたらき、海馬ネットワークの興奮性を低下させると結論された。また、本研究は、中枢神経系の神経細胞において P2Y₁ 受容体の活性化が直接的にイオンチャネルを活性化させ、ニューロンの興奮を引き起こす事実を示した初めての報告である。

(13) 表皮の P2X 受容体と皮膚バリアー再生の関係

傳田光洋, 藤原重良, 井上かおり

(資生堂ライフサイエンス研究センター)

陸上の生命にとって皮膚は生体と環境の境界であるだけではない。皮膚は、太古海で生まれ、今なおその海と同様流れる水に満ちた組織を、環境から保護するバリアーでもある。これが火傷などで損傷すると生体は水を喪いたちまち死に至る。このバリアーは皮膚表面に形成されているわずか 10-20 ミクロンの層状構造、角質層によって担われている。角質層は表皮細胞が分化して死んだ細胞とその間隙を埋める脂質によって構成される複合素材である。それは他のあらゆる生体膜より 1000 倍も水を透し難い、同じ厚さのプラスチック膜に匹敵するバリアー機能を持っている。このバリアー機能はセラテープや有機溶媒による処理によって容易に破壊されるが、健康な皮膚では、その後、一連のホメオスタティックな修復システムが加速され、速やかにもとのバリアー機能の回復が起こる。しかしアトピー性皮膚炎などの多くの皮膚疾患ではこのバリアー機能の恒常的な低下が認められる。今回、我々はこのバリアー機能の修復過程と ATP との関連について検討した。

ヘアレスマウスの皮膚角質層をセラテープで剥がして皮膚バリアー機能を破壊すると、直ちに表皮から ATP が放出された。またバリアー機能破壊後、皮膚表面に ATP を塗布するとバリアー回復が遅延した。P2X 系のアゴニスト α, β -methylene ATP の塗布も回復を遅延させた。一方、Suramin, および P2X 特異的アンタゴニスト PPADS, TNP-ATP の塗布はバリアー回復を促進させた。P2X 受容

体アンタゴニストの Reactive Blue2 の塗布はバリアー回復速度に影響しなかった。

ヒトケラチノサイト培養系では α, β -methylene ATP がケラチノサイト内のカルシウム濃度を上昇させ、その変化が TNP-ATP によってブロックされることが確認された。これらの結果は表皮を形成するケラチノサイトに P2X 受容体が存在することを示唆している。表皮の免疫染色および RT-PCR による観察では P2X₃ が存在することを示唆する結果が得られた。

我々は以前、乾燥環境下で軽微なバリアー破壊を起こした場合、アトピー性皮膚炎や乾癬、接触性皮膚炎などに共通して観察される表皮増殖性異常を惹起することを見出している。今回、この系でバリアー破壊後、TNP-ATP を塗布したところ、表皮増殖性異常が抑制されることが見出された。

以上の結果は表皮のバリアー機能の恒常性や表皮ケラチノサイト増殖に ATP および P2X 受容体が関与していることを示している。そして ATP による情報伝達系の制御が皮膚疾患の臨床において新しい治療法を創出する可能性を示している。

参考文献

J Invest Dermatol **119**:1034-1040, 2002

J Invest Dermatol **111**:873-878, 1998

(14) 脂肪細胞における P2Y 受容体の機能

尾松万里子, 松浦 博
(滋賀医大・第2生理)

マウス胎児由来前駆脂肪細胞 3T3-L1 細胞は、脂肪細胞分化のモデルとして最もよく研究されている株細胞である。この細胞を成熟脂肪細胞に分化させるためには、コンフルエントになるまで培養して接触障害により細胞周期を停止した後、dexamethasone, 1-methyl-3-isoxanthine 及び insulin を分化誘導因子として加える手法が最も一般的に行われている。

我々は、3T3-L1 前駆脂肪細胞における細胞外 ATP の作用を調べたところ、ATP (10~100 μ M) が約 30%の低い細胞密度において分化誘導因子による成熟脂肪細胞への分化を促進することを見出した。この脂肪細胞分化促進作用が ATP の他に ADP 及び UTP によっても引き起こされること、P2 受容体阻害剤スラミンならびに PPADS に

よって阻害されること、及び phospholipase C 阻害剤 U73122 によって阻害されることから、P2Y 受容体を介すると考えられた。一方、駆脂肪細胞において、細胞運動が活発になり、離れた場所にある脂肪細胞クラスターへの移動が盛んになることで脂肪組織の増大が起こることは古くから報告されているため、ATP, ADP ならびに UTP の効果について調べてみたところ、濃度依存性に細胞遊走を促進することがわかった。今回、P2Y 受容体による脂肪細胞分化促進作用に関与する細胞内情報伝達機構を調べるために、脂質ラフト分画を抽出し、プロテオミクスの手法を用いて細胞内シグナル分子の同定を開始したので、その経過について報告する。

(15) α,β -methyleneATP はウサギ脳底動脈の UTP 収縮を増強する

宮城 靖¹, 佐々木富男¹, John Zhang²
(¹九州大・医・脳外, ²ミシシッピ大学・脳外)

くも膜下出血では、くも膜下腔に放出された血液成分が頭蓋内主幹動脈を刺激し、遅発性に異常収縮を惹起し、重篤な脳循環障害を発生させる(脳血管攣縮)。血腫中の ATP や UTP は脳血管の P2 受容体を非選択的に刺激すると考えられる。ウサギ脳底動脈において ATP 収縮は非常に弱く一過性で、UTP 収縮は強力であるが持続性に乏しい。我々は UTP 収縮に関与する P2 受容体の特性を薬理的に検討した。その結果、 α,β -methyleneATP そのものはウサギ脳底動脈に対して全く収縮作用がないが、 α,β -methyleneATP の同時刺激が UTP 収縮を約 1.5 倍に増強

することを発見した。その機序として、 α,β -methyleneATP による細胞外 ecto-nucleotidase 阻害の作用が考えられたが、Ni²⁺添加や Ca²⁺除去、Evans blue 前処置はいずれも、 α,β -methyleneATP による UTP 収縮増強作用を消失させ得なかった。また、 α,β -methyleneATP は ecto-nucleotidase 抵抗性の ATP γ S 収縮に対しても増強効果があった。以上の結果から、脳動脈では UTP 受容体(おそらく P2Y₄)をヌクレオチドによる過剰刺激から防御するための、 α,β -methyleneATP 感受性の機構が存在することが示唆された。

(16) ラット培養マイクログリアからのフリーラジカル・サイトカイン放出に対する ATP の効果

森野忠夫, 尾形直則, 堀内秀樹, 濱本雄一郎, 山本晴康
(愛媛大, 医, 整形外科)

【目的】脊髄が傷害を受けたときには、軸索の断裂や組織の浮腫等の急性期のダメージに引き続いて、傷害後数時間以後に起こってくる遅発性の神経障害過程があり、この一つとして傷害された組織内でのマイクログリアの増殖、活性化が注目されてきている。本研究ではこのマイクログリアの機能を抑制することによって神経を保護する方法を開発する目的で、マイクログリアから放出されるフリーラジカル・サイトカインの量を測定し、機能抑制の候補物質の効果を評価した。

【方法】ラット胎仔の脊髄より採取した培養マイクログリアを Lipopolisaccharide (LPS) で刺激したときにマイクログリアから放出されるサイトカインである TNF- α 及び IL-6 の量を ELISA 法で、NO 放出量を Griess 法で測定した。

【結果】培養マイクログリアは 24 時間の LPS(100ng/ml) 暴露により、培養液中に多量の TNF- α 及び IL-6 を放出するが、この量は LPS 暴露時に ATP を同時投与することにより ATP の濃度依存性に抑制された。一方、LPS 暴露

による NO 放出量は ATP を加えても明らかな変化は見られなかった。P2y レセプターのアゴニストである 2-Methylthio-ATP は、ATP と同様に LPS により誘導されるマイクログリアからの TNF- α 及び IL-6 放出を濃度依存性に抑制した。

【考察】ATP は細胞のエネルギー源となることの他に、P2 receptor を介して、様々な生理活性を持っている。我々はこの物質が神経障害の軽減に有用ではないかと考えた。マイクログリアは神経組織内の免疫を司る細胞であるが、虚血などの際に病的に活性化され、傷害性の強いサイトカインや NO などのフリーラジカルを放出し、神経障害を増悪させると考えられている。本研究では、ATP 及び P2y レセプターアゴニストが炎症性サイトカインである TNF- α 及び IL-6 の産生を抑制することがわかった。一方、NO については効果が観られなかった。P2y レセプターアゴニストは炎症を伴う急性の神経障害の治療薬として有効である可能性が示された。

(17) 脳スライス培養系での ATP γ S による MCP-1 産生誘導機構に関する検討

片山貴博, 伊藤美聖, 神谷明裕, 山崎裕子, 金子周司, 佐藤公道, 南雅文
(京大・院・薬・生体機能解析学)

Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1, CCL2) は脳虚血や多発性硬化症、頭部外傷など、様々な病的条件下の脳内で産生誘導され、細胞傷害の増悪への関与が示唆されているケモカインの 1 つである。一方で、脳組織切片培養系は、細胞構築や個々の細胞の活性化状態が分散培養系と比較して、より *in vivo* に近い状態にあるため、活性化状態の違いが細胞の反応性を大きく左右するグリア細胞の研究に非常に有用であると考えられる。本研究では、MCP-1 産生誘導に対する ATP γ S の効果について、この脳切片培養系を用いて検討を行った。

生後 2-3 日齢 Wistar/ST ラットの脳皮質-線条体領域から冠状切片 (300 μ M 厚) を作製し、10-11 日間静置界面培養後、実験に用いた。

ATP γ S 処置により、mRNA レベル、タンパクレベルともに濃度依存的な MCP-1 発現誘導が観察された。そのタイムコースは、処置開始後 1 時間で既に観察され、3-4 時間をピークとする一過性のものであった。また、その主な産生細胞はアストロサイトであった。一度 NMDA 処置により、切片内の神経細胞を特異的に傷害、除去した切片においても、同様に MCP-1 産生誘導が惹起された。この ATP γ S による MCP-1 産生・遊離に対する P2 受容体拮抗薬の効果を検討したところ、PPADS はほぼ完全な抑制効果を示したのに対し、Reactive Blue 2 は部分的な抑制を示し、suramin に関しては全く影響を与えなかった。最後に MAP キナーゼ阻害薬の効果を検討したところ、ATP γ S による MCP-1 の培地中への遊離は、MEK 阻

害薬 PD98059 および JNK 阻害薬 SP600125 により部分的に抑制され、反対に p38 MAP キナーゼ阻害薬 SB203580 によって増強された。また、PD98059, SP600125 は MCP-1 mRNA 発現に関しても同様に抑制効果を示した。

以上の結果より、脳組織切片培養系において ATP γ S は、アストロサイトに直接作用し、アストロサイトでの

MCP-1 産生・遊離を惹起することが明らかとなった。また、この ATP γ S による MCP-1 産生誘導に関して、複数のサブタイプのプリン受容体が関与していること、また ERK および JNK キナーゼは促進的に、逆に p38MAP キナーゼは抑制的にそれぞれ関与していることが示された。

(18) アデノシンは濃度依存性にヒト単球由来樹状細胞の分化を抑制する

小柴賢洋, 中町祐司, 中澤隆, 辻剛, 熊谷俊一
(神戸大・院医・臨床病態免疫学)

【目的】関節リウマチ (RA) の病因は不明であるが、自己免疫機序による関節滑膜の炎症性増殖とそれに引き続く関節構造の破壊が、その病理組織学的特徴とされている。現在最も頻用されている抗リウマチ薬の一つ、メトトレキサート (MTX) は炎症局所の細胞外アデノシン濃度を上昇させ浸潤細胞数を減少させる。またラット関節炎モデルにおいてアデノシン受容体アンタゴニストであるテオフィリン、カフェインが MTX の抗リウマチ作用を抑制する。以上のことから、細胞外アデノシンが MTX の抗リウマチ作用のエフェクター分子であると考えられている。しかしながらアデノシンが作用する細胞や受容体に関する詳細は不明である。

樹状細胞 (DC) は関節リウマチ (RA) の病態形成に重要な役割を果たしていると考えられているので、ヒト末梢血単球から DC の分化に与えるアデノシンの影響を *in vitro* で検討した。

【方法】健常人末梢血中の CD14 陽性細胞を、磁気ビーズを用いて分離精製した。この細胞を GM-CSF と IL-4 の存在下に 5 日間培養し、未熟 DC (iDC) へと分化誘導した。さらに TNF- α 存在下で iDC を 48 時間培養し、成熟 DC (mDC) へ分化させた。この分化誘導の際に ADA 抵抗性のアデノシンアナログである NECA を同時に投与し、その影響を主に細胞表面マーカーの発現により解析した。

【結果と考察】(1) 単球からの分化過程に NECA が存在すると CD1a, CD80, CD83 の発現が iDC, mDC とともに抑制された。(2) この発現抑制は NECA の濃度に依存性であった。(3) iDC から mDC への分化段階においては NECA はほとんど影響しなかった。以上の結果から、アデノシンの抗リウマチ作用機序の一つとして、単球から DC への分化を抑制的に制御することにより RA における免疫応答を抑制することが考えられた。

(19) ATP によるアストロサイトの酸化ストレスからの細胞保護作用

篠崎陽一^{1,3}, 小泉修一², 井上和秀^{1,3}

(国立衛研・¹代謝生化学, ²薬理, ³九大・院・分子制御)

細胞外 ATP は中枢神経系の gliotransmitter 及び glia-neuron transmitter として、グリア細胞間及びグリア-ニューロン間の情報伝達を担う重要な因子である。しかし ATP 及び P2 受容体を介するこれら情報伝達の生理的意義については不明な部分が多い。本実験では gliotransmitter としての ATP に注目し、特にアストロサイトの細胞死・機能維

持の観点から、その生理的役割を追求した。

過酸化水素 (H₂O₂) は様々な脳の疾患時における酸化ストレスの原因物質の一種である。H₂O₂ は濃度依存的にラット初代培養アストロサイトの細胞死を引き起こした。ATP (1~1000 μ M) は濃度及び処理時間依存的にこのアストロサイトの細胞死を抑制した。薬理的な検討に

より、この細胞保護作用の責任受容体は、P2Y₁受容体であることが明らかとなった。GeneChipを用いた解析の結果、P2Y₁受容体活性化による抗酸化ストレス関連遺伝子の発現亢進が明らかとなった。また神経細胞死に対して強力な保護効果を有する adenosine はアストロサイトの細胞死には全く影響しなかった。更にアストロサイトの gliotransmitter としても知られる興奮性伝達物質グルタミン酸には、細胞保護効果は認められなかった。一方、H₂O₂により誘発されるアストロサイトの細胞死には、MAP キナーゼ ERK1/2 の持

続的な活性化が強く関与していた。ATP/P2Y₁受容体の活性化によるアストロサイト保護効果は、この ERK1/2 リン酸化を抑制することに起因していた。

以上 ATP は、アストロサイトに対する強力な細胞保護因子であり、この保護作用は神経細胞保護因子 adenosine や他の gliotransmitter グルタミン酸では再現されなかった。ATP はアストロサイトの保護及び機能を維持することにより、中枢神経系のグリア-ニューロン連関を保持している可能性が考えられる。

(P1) 頭痛と脳血管径調節能

山田真久 (理化学研究所 脳科学総合研センター 山田研究ユニット)

頭痛発症において、血管の炎症とともに血小板から放出されるセロトニンが脳内血管を収縮させることから始まり。この血管収縮が血管周囲の炎症を引き起こし、脳血管の拡張とともに放出される発痛物質が三叉神経を刺激して痛みを伝達すると考えられている。このように血管の拡張収縮能は、頭痛の発症機序に深く関与している。従って、脳血管の拡張収縮能をコントロールすることは、頭痛予防に重要であると考えられる。予防薬の開発においては、慢性投与による脳機能の変化を予測する必要がある。この研究では、慢性的に脳血管の拡張能を失った遺伝子組換えマウスを用いて、脳血流量の低下による脳機能への影響を検討した。

アセチルコリンは ATP と同様に血管内皮細胞に作用して、一酸化窒素 (NO) を放出し、脳血管を拡張させる働きを持っている。我々は、ムスカリン性アセチルコリン受容体の M5 受容体遺伝子欠損マウスを作成したところ、このマウスは脳梗塞を伴わない慢性的脳血管拡張障害マウスであることを示した (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98 (2001) 14096-14101)。このマウスは、脳循環の自動調節能の破綻や神経突起の萎縮などの特徴を示した。さらに、神経突起の萎縮に相関し、海馬依存記憶学習機能に異常を示した。本研究によって、脳循環は、脳機能を保持する為に重要な役割を担っていることが示唆された。

(P2) 末梢神経傷害モデルラットにおける DRG 神経細胞の P2X 受容体に対する noradrenaline の作用

圓尾圭史², 足立 克², 山本悟史¹, 立石博臣², 西崎知之¹
(兵庫医科大・医・¹生理学第2, ²整形外科)

末梢神経傷害後に発生する allodynia をはじめとする神経因性疼痛は、組織の創傷治癒後も持続する難治性の病態である。この疼痛の発生機序は未だ不明であるが、末梢神経傷害が交感神経節後ニューロンの発芽を誘起し、その軸索が脊髄後根神経節 (dorsal root ganglion; DRG) に到達しているという事がわかっている。また、DRG 神経細胞には疼痛発生への関与が示唆されている ATP 受容体が発現していることも知られている。これら

の事実より、交感神経終末から放出された noradrenaline (NA) が DRG 神経細胞のカテコールアミン受容体を介して、ATP 受容体機能を変化させて疼痛制御に関わっている可能性があると考えられる。そこで今回の研究では、末梢神経傷害モデルラットを作製し、神経傷害後 DRG 神経細胞の ATP 受容体 (P2X 受容体) 機能に対する NA の作用について電気生理学的に検討したので報告する。

(P3) ラット脊髄・後根神経節・交感神経節における Adenosine 受容体 mRNA の発現と坐骨神経切断後の変化

小林希実子, 福岡哲男, 山中博樹, 野口光一
(兵庫医科大学・解剖学第2講座)

痛み情報伝達における ATP・Adenosine の役割を解明するための基礎的情報として、我々はこれまでに ATP 受容体 (P2X, Y) のラット脊髄・後根神経節 (DRG) における詳細な発現パターンの解析を施行し、各サブタイプ別の特異的な発現パターン、神経障害に対する動態などを報告してきた。

Adenosine は ATP の代謝産物としてエネルギー代謝に関与するだけでなく、種々の組織・細胞の機能制御に関わることが知られている。Adenosine 受容体はラットでは A1, A2a, A2b, A3 の4種類がクローニングされており、Gタンパク共役型受容体で、A1, A3 受容体が Gi と、A2a, A2b 受容体が Gs と共役している。

末梢神経から脊髄後角に至る痛み情報伝達が Adenosine により抑制されることが報告されているが、Adenosine 受容体の詳細な分布についての報告は少ない。そこでラットの脊髄、DRG、交感神経節での Adenosine 受容体の発現を in situ hybridization 法を用いて詳細に検討した。

その結果、DRG ニューロンでは A1, A2a, A2b 受容体が

発現しており、A3 受容体は発現していなかった。A1 受容体は約7割のニューロンで見られ、多くは小型・中型 neuron であった。A2a 受容体は約3割のニューロンに発現し主に小型から中型に発現しており、A2b 受容体は小型 neuron 中心に約2割の neuron に発現していた。交感神経節では A1 受容体のみがほぼ全ての neuron に発現しており、そのほかの A 受容体は発現していなかった。脊髄では A1 受容体が灰白質のほぼ全ての neuron に発現し、A2a 受容体が motoneuron に発現していた。A2b, A3 受容体は脊髄では発現が見られなかった。

また、坐骨神経切断モデル7日後では、DRG では A1, A2a, A2b 受容体すべて、発現細胞数が減少した。脊髄では A1, A2a, A2b の発現は変化が見られなかったが、A3 受容体が術側の glia で発現が見られるようになった。

以上のことから、坐骨神経損傷後の脊髄において A1 や A3 受容体が Adenosine を介した neuron-glia 細胞間又は glia-glia 細胞間の情報を制御する役割を果たしていることが示唆される。

(P4) P2X₇受容体活性化による細胞死の誘導に小孔の形成は必要か？

月本光俊, 原田均, 五十里彰, 高木邦明
(静岡県立大・薬)

【目的】 P2X₇ 受容体の活性化は陽イオンの流入を誘導するとともに分子量約 900 Da 程度までの分子を通す小孔を形成する。また、多くの細胞系において細胞死を誘導する。しかしながら、細胞死誘導の詳細な機構は明らかでない。今回我々はラット P2X₇ cDNA をニワトリ B 細胞由来 DT40 株に導入して得られた P2X₇ 受容体強制発現株 (DT40/P2X₇ 細胞) を用い小孔の形成と細胞死誘導との関連について解析した。

【方法】 細胞の大きさの変化はフローサイトメーターを用いて前方散乱光および側方散乱光を測定することにより

解析した。小孔の形成は臭化エチジウム (EB) の取り込みを指標とした。また、細胞障害性は細胞外に漏出した乳酸脱水素酵素 (LDH) の活性を測定することにより調べた。

【結果および考察】 生理的イオン存在下 DT40/P2X₇ 細胞の細胞径に対する P2X₇ 受容体選択的アゴニスト 2'-&3-O-(4-benzoyl-benzoyl)-ATP (BzATP) 処置の影響を調べたところ、処置濃度ならびに時間に依存したアポトーシスの初期の特徴である細胞の縮小が観察された。この細胞の縮小に対する細胞外イオンの影響を検討したところ、Na⁺ を除去すると受容体刺激後 10 分程度の早い段

階で Na^+ 存在下では見られなかった一過性の細胞の膨張が観察された。P2X₇ 受容体活性化による小孔の形成に細胞外の Na^+ が関与するとの報告がある。そこで小孔の形成について検討したところ、 Na^+ 非存在下で膨張した細胞において特に小孔の形成が増強していた。また、著しく小孔を形成するスクロース緩衝液中では受容体刺激による細胞膨張はより顕著であった。しかしながら、細胞外に Na^+ が存在する生理的条件下では小孔の形成はそれほど顕著でないにもかかわらず細胞の縮小は上述の通り進行する。また、細胞外液中から Ca^{2+} あるいは Mg^{2+} を除去することにより受容体をより活性化しやすくした場合には細胞の縮小が顕著に認められたのに対して小孔の形成には大きな変化はなかった。一方、興味深いこと

に細胞外液中から Cl^- を除去すると細胞の縮小が抑制された。さらに、細胞障害性に及ぼす影響を調べたところ、細胞外 Cl^- 非存在下で受容体活性化による細胞障害性の上昇は抑制され、 Na^+ 非存在下では増強された。

以上の結果より、1) P2X₇ 受容体による細胞死は生理的条件下では細胞の縮小を伴うアポトーシス様のものが主で細胞外の Cl^- によって制御される、2) 細胞の縮小には強い小孔の形成が必須ではない、3) 細胞外の Na^+ 濃度が低い小孔が形成しやすい条件下ではネクロトーシス様の細胞膨張も生じ細胞死を増強する、ならびに 4) 細胞外の Na^+ による小孔の形成抑制の作用点は受容体活性化より下流にあることが明らかになった。

(P5) 孤束核シナプス伝達制御におけるアデノシン受容体の下流機構 : Ca channel is all?

繁富 英治¹, 山崎 弘二¹, 西田 基宏², 森 泰生³, 加藤 総夫¹

(¹ 慈恵医大・神経生理, ² 九州大院・薬・薬物中毒学, ³ 京都大院・工・合成・生物化学・分子生物化学)

中枢神経系に広範に発現するアデノシン A₁ 受容体の多くはシナプス前に局在し、神経伝達物質、特にグルタミン酸の放出の制御に関与している。海馬 CA1, 小脳、内側台形体核、舌下神経核を含む多くの神経核において、神経終末の電位依存性カルシウムチャネル (VDCC), 特に N 型 VDCC の抑制が A₁ 受容体活性化による伝達物質放出抑制の主たる細胞内メカニズムである事実が示されている。

内臓知覚情報の中継・統合核である延髄孤束核における 1 次求心線維→孤束核 2 次ニューロン間の興奮性シナプス伝達 (以下、孤束核シナプス) も、細胞外アデノシンによるシナプス前 A₁ 受容体活性化によって抑制される (Kato & Shigetomi, J Physiol, 2001; Tsuji & Kato, 2003)。一方、この孤束核シナプスにおけるグルタミン酸放出の約半分の成分がシナプス前 N 型 VDCC からの Ca^{2+} 流入に依存している (Yamazaki, Shigetomi & Kato, 2003)。孤束核シナプス前 A₁ 受容体によるグルタミン酸放出の制御における VDCC の関与を同定するため、N 型 VDCC ノックアウトマウス ($\alpha 1\text{B}^-/-$ マウス) の孤束核スライスにおいて、1 次求心線維電気刺激によって誘発される興奮性シナプス後電流 (eEPSC) を記録し、アデノシンによる抑

制に及ぼす各種 VDCC 遮断の影響を検討した。

$\alpha 1\text{B}^+/+$ マウスにおいてアデノシン (100 μM) は eEPSC 振幅を $30.4 \pm 3.5\%$ 抑制した。この抑制は、omega-conotoxin GVIA (CgTx) によって $12.5 \pm 4.0\%$ まで有意に減少した。 $\alpha 1\text{B}^-/-$ マウスにおいて、CgTx は eEPSC 振幅を変化させなかったが、アデノシンは wild type とほぼ同程度まで ($35.6 \pm 2.5\%$) eEPSC 振幅を減少した。この抑制効果は CgTx によって影響されなかった (CgTx 存在下 $32.3 \pm 3.7\%$)。この結果は、 $\alpha 1\text{B}^-/-$ マウスにおけるシナプス前 A₁ 受容体による eEPSC 振幅の減少が、N 型 VDCC 抑制以外のメカニズムを介していることを示唆する。そこで、中枢神経系の伝達物質放出に関与する他のタイプの VDCC 遮断の影響を検討した。 $\alpha 1\text{B}^-/-$ マウスにおけるアデノシンによる eEPSC 振幅抑制は、omega-agatoxin GIVA, NiCl_2 および nifedipine によって影響を受けなかった。したがって $\alpha 1\text{B}^-/-$ マウスにおける A₁ 受容体活性化の下流機構として、P/Q, R, および L 型 VDCC が関与する可能性は低いと結論した。これらの結果は、シナプス伝達抑制に関与する A₁ 受容体活性化の標的となる標的分子機構が、シナプス前 VDCC のタイプおよびタンパク質発現量により、flexible に変化する可能性を示している。

(P6) MNTB ニューロンにおける内因性の ATP による抑制性シナプス後電流の制御

綿野 智一, 松岡 功, 木村 純子
(福島医大・医・薬理)

Medial nucleus of the trapezoid body (MNTB) は脳幹において音源定位に関わる聴覚中継に重要な働きをしている神経である。我々は MNTB ニューロンにおいて、プリン受容体を介するシナプス後電流の制御について検討し、外から添加した ATP や ATP γ S が adenosine に分解されることにより、抑制性誘発シナプス後電流 (eIPSC) を抑制することを見出し昨年の本研究会で発表した。しかし、内因性の ATP あるいはその分解産物である adenosine がこのような制御を行っているかどうかは明らかにされていない。今回我々は内因性の ATP による制御の有無を明らかにするため、eIPSC に対する ecto-ATPase 阻害薬の ARL67156 および adenosine A1 受容体アンタゴニストの DPCPX の作用を検討した。9-14 日齢の Wistar 系ラット脳幹より 180-200 μ m のスライスを作成し、ホールセルパッチクランプ法により電流を記録した。昨年度報告したように、二極性の白金刺激電極を MNTB ニューロンから離れた正中線において刺激すると eIPSC の電流値は小さく、ばらつきも大きいため電流値の増強を見る

のは困難であった。しかし、刺激電極を MNTB ニューロンの近傍に置くことにより安定した eIPSC を記録することができ、評価が可能になった。刺激により同時に発生する興奮性誘発シナプス後電流(eEPSC)は kynurenic acid で抑制し eIPSC のみを記録した。ARL67156 (50 μ M) は eIPSC を増強し、DPCPX (10 および 100 nM) も濃度依存的に eIPSC を増強した。これらの増強作用は薬物添加後直ちに観察されたことから、正常状態で常に ATP が遊離し ecto-ATPase および他の分解酵素により adenosine にまで分解され A1 受容体を介して eIPSC を抑制していると考えられた。また、外から加えた GABA により誘発される電流は ARL67156 および DPCPX で影響されなかったことより、これらの制御部位はプレシナプスであることが明らかとなった。しかし、その制御を行っている ATP が神経終末から放出されたものか、グリア細胞から遊離したものか、あるいはそれ以外の機序によるのかは明らかでなく今後の検討課題である。

(P7) ATP による血管周皮細胞ペリサイトーアストロサイト連関

小泉修一¹, 藤下加代子², 井上和秀²
(国立衛研・¹薬理, ²代謝生化学)

グリア細胞、特にアストロサイトが、中枢神経系のシナプス伝達に積極的に関与していることが明らかとなり、グリア-ニューロン連関の研究は近年大変盛んになってきている。アストロサイトはシナプスとのコミュニケーションを司る一方、他方で血管系にも手足を伸ばしている。アストロサイトは、血管内皮細胞、血管周皮細胞(ペリサイト)と共に BBB 形成能に強い影響を与える。また、近年の報告では、ニューロンの活動がアストロサイト由来の細胞外液性因子の情報に置き換わり、これが脳血管の血流を制御するとの報告もなされている (Zonta et al., Nat Neurosci., 6, 43-50, 2003)。我々はこれまでに、アストロサイトが細胞外 ATP を介し、近傍ニューロンのシ

ナプス伝達をダイナミックに制御していることを報告してきた。今回、このアストロサイトと血管系の関係を、特にペリサイトとの関連で明らかとしたので報告する。

ヒトペリサイトは各種 P2 受容体を発現しており、P2X₄, P2X₇, P2Y₂ 及び P2Y₆ 受容体が主たる受容体であった。ペリサイトは自身も収縮能を有するが、常に血管の収縮・弛緩による機械刺激にさらされている。ペリサイトに機械刺激を与えると、ペリサイト間に Ca²⁺ wave が伝播し、これは apyrase 及び P2 受容体拮抗薬により消失した。また、ペリサイトは機械刺激に反応して ATP を放出した。従って、ペリサイトは血管の物理的な形態変化に反応して ATP を放出し、周辺細胞とコミュニケーションを取っ

ている可能性が示唆された。さらに、海馬の初代培養系の免疫組織学的検討により、この培養系にはニューロン、アストロサイトに加え、ペリサイトが存在していることが明らかとなった。ペリサイトに刺激を与えると、その情報は、ATP 依存的にアストロサイトに伝わった。Zontaらは、シナプス伝達が、glutamate→アストロサイト→NOの経路で血管系に伝わって血管の弛緩を引き起こすことを報告したが、我々は、逆に血管周皮細胞ペリサイトの

機械刺激（伸展刺激）がアストロサイトに伝わること、またこのとき ATP が重要な役割を果たしていることを示した。さらに本実験結果は、血管系に端を発するペリサイト→アストロサイト→シナプスへのフィードバックシグナルが存在する可能性、またそのフィードバック経路における細胞外 ATP の重要性を示唆する興味深い結果であると考えられる。

(P8) 脳スライス細胞外 ATP の可視化

加藤総夫, 川村将仁, 繁富英治

(東京慈恵会医科大学神経生理学研究室)

中枢神経系における細胞外 ATP シグナリングの意義を理解する上で、ATP の細胞外放出機構を解明することは避けられない重要課題である。特に、in situ あるいは脳スライスなどの ex vivo 標本における細胞外 ATP 動態は、ATP がどのような状況下において細胞間シグナルとして機能するのかを解明する上で重要な情報をもたらす。現在までに、1) スライス灌流液中の ATP 含量の luciferin-luciferase 法による定量 (very bad time resolution - no spatial information), 2) スライス内に刺入した 2 層酵素バイオセンサーを用いた細胞外 ATP もしくはアデノシンのリアルタイム定量 (not yet commercially available), 3) 電気刺激および薬理的単離によるシナプス後 P2X 受容体電流の計測 (not found everywhere), 4) 連続的高頻度刺激後に観察される ATP 投与と類似した反応の観察 (unidentified source of release), あるいは、5) photomultiplier 管を用いた ATP 依存性生物発光の計測 (no spatial information), などの手法によって脳スライス内での ATP 放出を観察したとする報告がある。我々は、超高感度フォトン・カウンティング CCD カメラを用いて、luciferin-luciferase 反応によって生じる ATP 依存性生物発光を検出することによって脳スライスにおける ATP 放出の画像化を試みた。ラット孤束核、海馬、大脳皮質スライスを作成し、luciferin-luciferase を含む人工脳脊髄液中に浸して電気刺激を行った。生物発光をイメージインテンシファイアーで増感し VIM カメラで撮像した (露出時間, 2.5 - 30 s; 空

間分解能, 0.48 micron/pixel; 640 by 480 pixels)。下記の結果を得た。(1) 0.5 - 1 mA, 10 Hz, 10-30 s の電気刺激で、細胞外 ATP 濃度の上昇を表す発光検出密度 (以下 [ATP]_o) の増大が刺激電極設置部位の近傍で認められた。(2) 最高 2.5 s の時間分解能で [ATP]_o の増大およびその減衰の経時的变化を検出し得た。(3) 求心性線維の刺激によって、線維の終末部ではなく刺激部の近傍において [ATP]_o の上昇が認められた。(4) 刺激電極近傍の [ATP]_o 上昇は、TTX 1 μM あるいは細胞外 Ca²⁺ 除去によって消失しなかった。(5) 20 mM KCl 投与によって [ATP]_o は上昇しなかった。ならびに、(6) [ATP]_o 上昇は海馬において、部分的に 5-nitro 2-(3-phenylpropylamine) benzoic acid (NPPB) で減弱したが、皮質ではその影響はなかった。以上の結果から、1) シナプスにおいて放出される ATP は、本法の検出限界以下である、および、2) 連続的電気刺激は非シナプス性に神経興奮を介さない ATP 放出を惹起する、可能性が示された。現在までの研究において用いられてきた脳スライスにおける連続電気刺激 (例、海馬 LTP) は、刺激部位近傍において放出された ATP の効果を含んでいる可能性がある。

参考文献

Hamann M & Attwell D (1996). Non-synaptic release of ATP by electrical stimulation in slices of rat hippocampus, cerebellum and habenula. *Eur J Neurosci* **8**, 1510-1515

(P9) アデノシンによる MDCK 細胞からの ATP 放出とそのシグナリング

右田啓介, 趙玉梅, 桂木猛
(福岡大・医・薬理)

【背景】多くの非神経細胞から, ATP の細胞外放出が確認されている。放出された ATP は細胞外の ATP 代謝に関わる ecto-nucleotidase により, ADP, AMP, アデノシンへと代謝される。最終産物のアデノシンは, 細胞外での重要な情報伝達の役割を果たしている。今回, 我々はアデノシンにより ATP が細胞外へ放出されることを MDCK 細胞で見出した。そこで, 本研究では, アデノシン刺激による ATP 放出における細胞内シグナルについて検討した。

【方法】実験には MDCK 細胞を用いて, 灌流実験を行った。アデノシン刺激により灌流液中に放出された ATP 量は, ルシフェリン・ルシフェラーゼを用いて測定した。また, 灌流実験により, Fluo-4/AM を用いて細胞内カルシウムの測定を行った。

【結果および考察】10 μ M アデノシンを灌流すると, MDCK 細胞から ATP の遊離がみられた。この遊離は, 10 μ M CPT (アデノシン A1 受容体拮抗薬) により抑制され, 10 μ M

DMPX (A2 受容体拮抗薬) では抑制されなかった。また, ATP の放出は, 10 μ M U-73122 (ホスホリパーゼ C 拮抗薬), 50 μ M 2-APB (IP3 受容体拮抗薬), 1 μ M thapsigargin (Ca²⁺-ATPase 阻害剤) および 50 μ M BAPTA/AM (細胞内 Ca²⁺キレート剤) で優位な抑制がみられた。また, 細胞内カルシウム測定実験から, 10 μ M アデノシンにより細胞内カルシウムの上昇がみられ, その反応は 10 μ M CPT により抑制され, 10 μ M DMPX および 10 μ M MRS-1191 (A3 受容体拮抗薬) では抑制されなかった。さらに, アデノシンによる細胞内カルシウムの上昇は 10 μ M U-73122, 50 μ M 2-APB, 1 μ M thapsigargin で優位に抑制されたが, 10 μ M nifedipine (L 型カルシウムチャネル拮抗薬) では抑制されなかった。これらの結果から, アデノシン刺激により引き起こされる A1 受容体を介した ATP の細胞外放出は, IP3 受容体を介した細胞内カルシウムの上昇が必須であること, および ATP 放出におけるその代謝産物による positive feedback 機構の存在が示唆された。

(P10) ラット脳視床下部スライス標本の細胞外 ATP におよぼす UTP の作用

小野 委成, 松岡 功
(福島県立医科大学・医学部・薬理学講座)

中枢神経系には多くの ATP 受容体サブタイプが分布し, 神経伝達の制御に関与することは明らかであるが, ATP がどのように放出されるかについては未だ不明である。これまで私達は, 電気刺激によるラット脳スライス標本からの ATP 放出反応は, 末梢神経系と異なりテロドトキシン抵抗性で, Cl⁻チャネル阻害薬で抑制されることを報告した。本研究では, ラット脳視床下部スライス標本を用いて, 細胞外 ATP 動態におよぼす種々の生理活性物質の作用を検討し, UTP が細胞外 ATP を上昇させることを見出したのでその作用機序について検討した。Wistar 系雄性ラット(3-16 W)の脳から視床下部スライス標本作製し, 灌流装置のグラスファイバーフィルター上に保持し Krebs-Ringer 液で表面灌流した。薬物は, 灌

流液中に添加し, 2 本のリング状白金電極を介して電気刺激を行った。灌流液中の ATP 量は, ルシフェリン・ルシフェラーゼ法で測定した。視床下部スライス標本をノルアドレナリン, ドパミン, カルバコール, ニコチン, グルタミン酸, GABA, ブラジキニンで刺激しても細胞外 ATP 量の上昇は認められなかった。これに対し, UTP(10 μ M)は, それ自身で灌流液中の ATP 量を増加させるとともに電気刺激による ATP 放出量を増強した。しかし, UDP (10 μ M)ではこれらの作用は認められなかった。一方, ADP (10 μ M)もそれ自身で著明に灌流液中の ATP 量を増加させたが, ADP 特異的な受容体にアゴニストとして作用する ADP β S(10 μ M)では ATP 量は変化しなかった。さらに, 他のヌクレオチド三リン酸(CTP, GTP)でも灌流液中の

ATP量の増加が認められたことから、UTPの作用はP2Y受容体を介したものではないと考えられた。低濃度のADP(10 nM)存在下にUTPを作用させるとATP量の上昇は著しく増強された。このADPの効果はADPβSでは認められなかった。[3H]Adenineで標識したスライス標本を用いて内因性のアデニンヌクレオチドの放出を測定し

た結果、UTP(10 μM)は、それ自身でわずかな放射活性の放出を生じたが、ADP(10 nM)による放射活性放出の増強は認められなかった。以上の結果から、UTPは細胞外に存在するヌクレオチド変換酵素の基質となり、スライス標本に微量に存在するADPをATPに変換し、細胞外ATP量を上昇させることが示唆された。

(P11) 細胞外マトリックスとミクログリアのP2受容体

国房恵巳子¹, 多田薫², 小泉修一², 津田誠¹, 井上和秀^{1,3}
(国立衛研・¹代謝生化学, ²薬理, ³九大・院・薬・分子制御)

【緒言】ミクログリアは中枢神経系に特化した細胞で、様々な障害に応答することで脳内の恒常性維持に重要な役割を果たしている。ミクログリアの活性化因子の一つに細胞外ATPが挙げられる。ATPは、ミクログリアに発現しているP2XやP2Y受容体を活性化し、ミクログリアのATPの濃度勾配に従った走化性やサイトカインの産生及び放出を引き起こす。中枢神経系の障害部位では、ATPの他にも細胞外マトリックスのフィブロネクチンやラミニンが増加し、また、活性化型ミクログリアはそれらの受容体であるインテグリン分子も多く発現している。しかし、細胞外マトリックスのインテグリンを介したシグナルが、P2XやP2Y受容体発現に与える影響は不明である。そこで今回、初代培養ミクログリアを用いて、ATP受容体の遺伝子発現に対するフィブロネクチンの効果について検討した。

【方法】実験にはウィスター系新生仔ラットの前脳から初代培養したミクログリアを用いた。ATP受容体mRNA発現量は、リアルタイムRT-PCR法により定量化した。P2X₄

受容体タンパク質は、ウェスタンブロッティングにより検出した。ATPによるミクログリアの細胞内カルシウム応答は、Fura-2蛍光法によりカルシウムイメージングにより観察した。

【結果】ミクログリア細胞をフィブロネクチン上で培養することにより、ミクログリアのP2X₄受容体mRNAの発現が増加し、一方、P2Y₆受容体の発現は低下した。また、P2X₄受容体は発現タンパク質レベルも増加した。さらに、ATP50μMに対する細胞内カルシウム応答も増大し、そのカルシウム応答は細胞外カルシウムイオンを除外することでその殆どが消失した。

【結論】ミクログリアにおいて、フィブロネクチンは、おそらく細胞接着分子インテグリンを介したシグナルにより、P2X₄受容体およびP2Y₆受容体の発現を制御していることが示唆され、フィブロネクチンがそれらP2受容体の発現変化を介してミクログリア機能を制御している可能性が予想される。

(P12) ATP受容体および新規α7ニコチン性アセチルコリン受容体によるミクログリアの活性制御

鈴木智久 松原明代 秀 和泉 仲田義啓
(広島大・院・医歯薬総合・薬効解析)

グラム陰性菌の細胞膜構成成分であるリポポリサッカライド(LPS)はその特異的受容体TLR4を介してミクログリアを強力に活性化し、大量のTNFを放出させることにより炎症性組織破壊を誘導する。それに対し、ATP

はミクログリアのP2X₇受容体を介して適度なTNF放出を引き起こし、グルタミン酸神経毒性に対し保護作用を発揮する。私達は昨年の当研究会において、おもに神経細胞に発現し神経保護などの機能制御を担うα7ニコチン

ン性アセチルコリン受容体 ($\alpha 7$ 受容体) がラット脳ミクログリアにも発現し, LPS 誘発 TNF を抑制する一方, ATP 誘発 TNF を促進することを報告した。今回さらに, ミクログリアの $\alpha 7$ 受容体は神経に発現するイオンチャンネル型 $\alpha 7$ 受容体とは異なり, 細胞外 Ca^{2+} に依存せず phospholipase C の活性化を介し IP3 感受性 Ca^{2+} 貯蔵部位から Ca^{2+} 遊離を引き起こすことを明らかにした。また, ニコチンはこの新規 $\alpha 7$ 受容体を介して, LPS 刺激による JNK および p38 活性化を抑制し, TNF 産生の転写後調節の段階を抑制することが示された。一方, ATP および P2X_7 受容体アゴニスト BzATP はニコチンと同様, あらかじめミクログリアを活性化することにより LPS 誘発 TNF 遊離を著しく抑制し, この効果は P2X_7 受容体遮断薬 Brilliant Blue G で抑制された。

以上の結果から, P2X_7 受容体は神経保護作用を発揮する TNF の放出を引き起こすが, $\alpha 7$ 受容体はこの P2X_7 受容体の機能を高めること, さらに P2X_7 受容体と $\alpha 7$ 受容体はいずれも LPS による有害な TNF 放出を抑制することにより炎症を抑える可能性が明らかとなった。従って, P2X_7 受容体と $\alpha 7$ 受容体はともにこれら複数のメカニズムを介してミクログリアの性質を神経保護に向け制御することが示唆された。

(P13) $\beta 1$ インテグリンを介するミクログリアの増殖・ケモタキシスと P2Y_{12} 受容体

多田 薫¹, 小泉修一¹, 井上和秀^{2,3}

(国立衛研・¹薬理, ²代謝生化学, ³九大・院・分子制御)

ミクログリアは中枢神経系における免疫担当細胞として知られ, その神経保護作用と過剰な活性化による神経ダメージの二面性が注目を浴びている。インテグリンは α 鎖と β 鎖から成るヘテロダイマーの接着分子であるが, ミクログリアは $\beta 1$ インテグリンを介してフィブロネクチンに接着し活性化を受ける事が知られている。フィブロネクチンは細胞外基質分子の一つで, 生体での役割は細胞の接着, 移動, 分化など多岐にわたる。CNS 内ではその発現は限られており, フィブロネクチンやその他の細胞外基質分子は CNS 形成時に特にアストロサイトによって産生され, その後は特に CNS の傷害・病態時に発現されることがわかっている。細胞外ヌクレオチドは信号伝達物質としての作用を有するが, 近年 ATP と ADP が Gi/o-coupled P2Y を介し, ミクログリアの遊走誘導因子 (chemoattractant) として機能していることが判明した (Honda. et.al. J. Neurosci. 2001)。 P2Y_{12} 受容体は P2Y ファミリーに属する Gi 共役型の受容体で, 血小板やミクログリア上で多く発現されている。前回の報告では, ADP により誘導されるケモタキシスの責任受容体が P2Y_{12} 受容体である事を確認し, このケモタキシスはフィブロネクチン存在下では $\beta 1$ インテグリンに依存的である事, ADP 刺激により $\beta 1$ インテグリンはメンブレン・ラフリングへ translocation を起こし, これは cAMP/PKA 依存的な抑制制御を受けている事を示した。

今回我々は, フィブロネクチンや $\beta 1$ インテグリンのクロスリンクがミクログリアの増殖を促進する事を見出した。ADP を $\beta 1$ インテグリンのクロスリンク培養系に加えるとその増殖が失われる事より, ADP はミクログリアの増殖に対して抑制的であることがわかった。この ADP の抑制作用は ARC-69931 で阻害される事より, ミクログリア増殖の抑制には P2Y_{12} 受容体からのシグナルが関与していることが示唆された。更に, $\beta 1$ インテグリンによるミクログリア増殖は KT-5720 を加えると失われる事より, PKA が増殖促進に関与している事が示された。

ミクログリアのケモタキシスと増殖は CNS 内の様々な障害, 病態と深く関わっている。そのメカニズムや制御機構の解析は重要であり, この2つの細胞機能における PKA を介しての P2Y_{12} 受容体の関わりは非常に興味深い。

(P14) P2Y₆受容体活性化によるミクログリア細胞のファゴサイトーシス能の増大

重本-最上由香里¹, 小泉修一², 多田薫², 津田誠¹, 井上和秀^{1,3}
(国立衛研・¹代謝, ²薬理, ³九大院・分子制御)

ミクログリアは脳の病態時や損傷時に活性化し神経組織の再生修復など、さまざまな役割を果たしている。この活性を制御する主要な伝達系として近年、P2受容体が注目されている。前回我々はラットミクログリアにおいて、これまでに報告されていたP2受容体に加え、機能的なP2Y₆受容体が発現していることを報告した。また、P2Y₆受容体アゴニストUDPは、濃度依存的にミクログリアのCa²⁺上昇およびMAPKの活性化、細胞膜のラフリングを引き起こした。さらにP2Y₆受容体活性化にともなう細胞膜の変形によりビーズの細胞膜への接着が増大し、結果として、ミクログリアのファゴサイトーシス能が増大している可能性を報告した。

今回我々は、フローサイトメトリーを用いて、ミクログリアのファゴサイトーシス能を定量的に測定することを試みた。その結果、UDPは5μMと低濃度から、濃度依存的にミクログリアのファゴサイトーシスを増大した。さらにこの反応はP2Y₆受容体アンタゴニストおよび、

PLC阻害剤U73122, ストアのCaを枯渇するthapsigargin, PKC阻害剤staurosporinによって有意に抑制された。一方、PI3Kinase阻害剤であるwortmannin及びLy294002は、ほとんど影響を与えなかった。以上の結果から、ミクログリアにおいて、P2Y₆受容体活性化によりPLC活性化、[Ca²⁺]_i上昇、PKC活性化といったシグナルを介して、ファゴサイトーシス能が増大していることが示唆された。さらに、Fc受容体の凝集によって生じるファゴサイトーシスに重要なシグナルであるPI3Kinaseは、この反応には関与していなかった。以上、ミクログリアのファゴサイトーシス能とP2Y₆受容体及びその細胞内シグナル経路の一端が明らかとなった。現在、脳の病態・損傷時におけるミクログリアのファゴサイトーシスとP2Y₆受容体の関与についての検討が進行中であり、病態とP2Y₆受容体の直接的な連関についても考察する予定である。

(P15) アデノシン A_{2A}受容体と P2Y 受容体のヘテロダイマー形成

小柳洸志, 津賀浩史, 神谷敏夫, 中田裕康
(東京都神経研・生態機能分子)

【目的】 血小板中には、種々のプリン受容体 (P2Y₁受容体, P2Y₁₂受容体, P2X₁受容体, アデノシン A_{2A}受容体) が存在して、血液凝固系をコントロールしていると考えられているが、その詳細、とりわけプリン受容体間の相互作用は不明なところが多い。そこで、これらのプリン受容体系のモデルとして、今回はP2Y₁受容体とアデノシン A_{2A}受容体を共発現させた HEK293T 細胞を用い、免疫沈降法、Binding assay を利用し、受容体間の直接的な相互作用の解析を行った。

【操作】 myc-P2Y₁受容体と HA-A_{2A}受容体の cDNA をそれぞれ単独もしくは一緒に HEK293T 細胞に導入し、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 myc 抗体及び抗 HA 抗

体などによる Western blotting と免疫共沈降法によって解析した。

【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免疫沈降を行い、Western blotting で分析したところ、P2Y₁受容体と A_{2A}受容体が共沈降することが確認できた。また、P2Y₂受容体と A_{2A}受容体を共発現させた系でも両受容体が共沈降することが確認できた。これらの結果、培養細胞系においては、P2Y₁受容体と A_{2A}受容体、および P2Y₂受容体と A_{2A}受容体のヘテロダイマー形成の可能性が示唆された。あわせて受容体共発現による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も報告する。

(P16) アデニル酸シクラーゼの内因性阻害物質3'-AMPの産生酵素の生体内分布

藤森 廣幸, 芳生 秀光
(摂南大・薬・衛生分析化学)

ATPの代謝産物の一種である adenosine (Ado) は細胞外から Ado 受容体を介して adenylylase 活性を調節しているが, adenylylase 本体の" P "サイトを介して cAMP の産生を抑制することも薬理的には知られている。Ado の 3' 位の水酸基にリン酸が結合した 3'-AMP は内因性の" P "サイト阻害物質に分類されており, その adenylylase 阻害活性は Ado より強いことが知られている。しかし, 3'-AMP の生体内運命あるいは生体内意義は未だ不明である。

細胞内の 3'-AMP は, 基質となりえる各種のリボ核酸からリボ核酸分解酵素 (RNase) により産生されることが推定される。最近, 我々は偶然に肝ミトコンドリア内で exo 型の RNase により 3'-AMP が産生されることを見だし, この RNase を 3'-AMP 産生酵素と呼ぶことにした。今回は, 3'-AMP 産生酵素の生体内意義解明の一端として, まず 3'-AMP 分析系を確立した後, マウスの臓器中の

3'-AMP 産生酵素の生体内分布について検討した。

組織中の 3'-AMP 等を含む酸可溶性物質を過塩素酸で抽出した。3'-AMP 産生酵素活性は基質 poly(A) を用いて測定した。3'-AMP 等の adenine 類は標識試薬 chloroacetaldehyde で蛍光化した後, HPLC 法により分離・定量した。

脾臓, 胸腺, 肝臓, 脳, 心臓, 脾臓等のマウス臓器中の遊離 3'-AMP は 5'-AMP 含量より低いが, 比較的多量に存在していることが明らかとなった。脳中の 3'-AMP 含量は生後1週間後に最大となり3週齢まで持続したが, 5週齢では約 1/5 に減少した。3'-AMP 産生酵素活性は 3'-AMP を含む諸臓器中には存在することが明らかとなった。以上の結果より, 3'-AMP は ATP 等の 5'-AMP 系とは異なった代謝経路で産生され, その産生酵素は脳を含む諸臓器の機能に影響を及ぼしていることが示唆された。

(P17) マウス味蕾細胞基底膜の ATP 受容体分布

早戸亮太郎 吉井清哲
(九州工業大学大学院・生命体工学研究科・脳情報専攻)

味蕾は, 味情報を受容し生体信号に変換して脳に情報を伝達する。哺乳類の味蕾は, 約 50 個の味蕾細胞から構成されている。我々の研究により, 味刺激に対し, 約 50% 味蕾細胞が脱分極性あるいは過分極性応答を示すこと, 応答を示した細胞はその受容器電位の極性に従ってグルーブを形成すること, がわかった。この結果は, 味蕾細胞間にネットワークが存在する事を示唆する。

ATP 受容体が味蕾細胞内に存在する事はすでに報告されている。そこで我々は, 細胞内カルシウム濃度変化を

指標として, マウス味蕾細胞基底膜の ATP 受容体分布を光学的に測定した。その結果, 8 味蕾中 4 味蕾で ATP による細胞内カルシウム濃度増加が生じること, ATP に応答を示した細胞数は応答した 1 味蕾あたり 4.5 ± 1.7 (mean \pm SD) 個であること, ATP に応答を示す細胞は味蕾内中心部に多く分布していることがわかった。これらの結果は, ATP を用いた味情報修飾が, 味蕾内で行われていることを示唆する。

(P18) レチノイン酸による皮膚 P2Y₂ 受容体の発現制御藤下 加代子¹, 小泉 修一², 井上 和秀^{1,3}(国立衛研・¹代謝生化学部, ²薬理部, ³九州大学・院・薬・分子制御)

皮膚は、分化に伴い、基底細胞層から角質層までの層構造を形成している。現在のところ、各分化段階に特異的な P2 受容体の発現が知られており、各々が異なるシグナルを伝達することにより、細胞の分化や増殖を制御する可能性が示唆されている (J. Invest. Dermatol., 2002, 120(3): 440-447; J. Invest. Dermatol., 2003, 120(6): 1007-1015)。皮膚は乾燥や紫外線などの外部刺激に直接曝されることから、ダメージを受けやすい組織であるが、その対処法の 1 つとして、ビタミン A の活性代謝物であるレチノイン酸 (RA) を使用した化粧品や医薬品が臨床で実際に応用されている。そこで、ヒト正常表皮角化細胞 (NHEKs) を RA 及びその類似化合物で処置した時、P2 受容体の遺伝子発現や蛋白質の機能にどのような変化が誘導されるのか、検討を行なった。

RA 処置後、NHEKs における mRNAs の発現量変化を DNA chip 及びリアルタイム RT-PCR を用いて検討

した。RA は基底細胞層の増殖と強く関連している P2Y₂ 受容体 (J. Invest. Dermatol., 2003, 120(6): 1007-1015) mRNA の発現量を濃度及び処置時間依存的に著しく増加させた。また、fura-2 法に基づく Ca²⁺ imaging 法により細胞内 Ca²⁺ 濃度を測定すると、RA 処置後の NHEKs では、P2Y₂ 受容体アゴニストに対する Ca²⁺ 応答が増大することが明らかとなった。この作用は、RAR (retinoic acid receptor) 合成アゴニスト Am80 でも再現された。NHEKs は機械刺激依存的にも自発的にも ATP を放出し、NHEKs 細胞間に Ca²⁺ wave を発生させる。RA は機械刺激依存的な ATP 放出能には影響しなかったが、刺激非依存的な ATP 放出量を低下させた。本研究より、RA が機能的な P2Y₂ 受容体を増加させる一方で細胞外 ATP 放出量を制御し、表皮の増殖/分化を巧妙に調節していること、またこれら P2Y₂ 受容体増加及び ATP 放出量の制御が RA の臨床効果と関係している可能性が示唆された。

(P19) ATP による大腸癌細胞の増殖抑制作用の検討

西藤 勝, 山本悟史, 西崎知之

(兵庫医科大・医・生理学第 2)

本研究は Caco-2 ヒト大腸癌細胞株の細胞増殖に対する ATP の効果を検討した。ATP は Caco-2 細胞生存率を濃度および処理時間依存性に、有意に減少させた。この ATP 効果は非アポトーシス性であり、細胞増殖を S 期でとめる作用によるものであることが明らかとなった。ATP と同様の効果が 2-methylthio ATP, UTP で認められたが、 α,β -methylene ATP, β,γ -methylene ATP では認められなかった。また、ATP の効果は suramin で抑制されたが、PPADS では影響されなかった。これらの結果は、ATP が P2Y 受容体を介して Caco-2 細胞増殖を抑制すること

を示唆している。現在クローニングされているほとんどの P2Y 受容体は Gq 蛋白質と共役しており、PKC の活性化に関与している。しかしながら、ATP の効果は PKC 阻害剤で増強され、逆に PKC 活性化剤で抑制された。さらに、ATP は Caco-2 細胞における PKC 活性ならびに MAP キナーゼ活性を抑制していた。このように、ATP は新しい P2Y 受容体を介して PKC 活性を低下させ、その結果、PKC の下流標的の一つである MAP キナーゼ活性を低下させることにより Caco-2 細胞増殖を抑制しているかもしれない。

9. カルシウムシグナリング研究の新潮流

2004年11月18日-11月19日

代表・世話人：山内 卓 (徳島大・薬)

所内対応者：井本 敬二 (神経シグナル)

- (1) カルモデュリンの構造と機能
矢沢 道生 (北大)
- (2) カルモデュリン結合認識の多様性
松原 守 (カルナバイオサイエンス棟)
- (3) penta-EF ハンドカルシウム蛋白質 ALG-2 の相互作用因子とメンブレントラフィック制御
牧 正敏 (名大院)
- (4) S100 の新しい機能 -シャペロン活性-
小林 良二 (香川大・医)
- (5) トロポニンの結晶構造と筋収縮調節メカニズム
武田 壮一 (国立循環器病センター)
- (6) カルパインの新しい Ca^{2+} -結合モチーフと構造・機能相関
反町 洋之 (東京都臨床医学総合研究所)
- (7) シナプス機能調節における CaM kinase II の役割
山内 卓 (徳島大)
- (8) 不活性型 CaM kinase II α 遺伝子改変マウスを用いた脳機能の解析
山肩 葉子 (生理研)
- (9) 神経系における CaM kinase I の発現と機能
阪上 洋行, 近藤 尚武 (東北大)
- (10) CaM kinase カスケードのシグナル伝達と生理機能
徳光 浩, 小林 良二 (香川大)
- (11) CaM kinase ファミリーを中心としたプロテインキナーゼの網羅的検出と解析
亀下 勇, 末吉 紀行 (香川大)
- (12) 神経型 NO 合成酵素のリン酸化による調節
渡邊 泰男, 徳田 雅明 (香川大)
- (13) 14-3-3 による CaM KK の調節
市村 徹 (都立大)
- (14) シナプス後肥厚部におけるタンパク質相互作用のリン酸化による調節
鈴木 龍雄, 田 慶宝, 宮沢 昌子 (信州大)
- (15) Homer-3 の CaM kinase II によるリン酸化
水谷 顕洋, 御子柴 克彦 (JST・カルシウム振動), 古市 貞一 (理研・脳研)
- (16) タウの CaM キナーゼ II によるリン酸化反応のアルツハイマー病への関与
山本 秀幸 (熊本大)

【参加者名】

山内 卓 (徳島大・院・ヘルスバイオサイエンス研究部), 阪上 洋行 (東北大・院・医), 鈴木 七緒 (埼玉大・理),
矢沢 道生, 中澤 晶子, 高橋 さおり (北大・院・理), 水谷 顕洋 (東大・医科研), 市村 徹, 阿部 高秋,

垣内 一恵 (東京都立大・理), 湯本 史明 (慈恵医大), 反町 洋之 (東京都臨床研), 鈴木 龍雄 (信州大・院・医), 牧 正敏, 柴田 秀樹, 大河内 進, 和田 文孝, 寄川 千晴, 市岡 史高, 堀井 美緒 (名大・院・生命農学), 武田 壮一, 五十嵐 智子 (循環器病センター研), 松原 守 (カルナバイオサイエンス), 吉村 好之, 一瀬 竜也, 塚根 まり子, 有永 和代, 村田 宣昭, 森田 秀樹, 櫻田 巧,

友廣 真也, 畑 政孝 (徳島大・薬), 徳田 雅明, 渡辺 泰男, 山口 文徳, 杉本 勝良, 波多野 直哉, 宋 濤, 門脇 加枝, 久米 広大, 小林 良二, 徳光 浩 (香川大・医), 亀下 勇, 末吉 紀行 (香川大・農), 山本 秀幸 (熊本大・院・医), 山肩 葉子, 西巻 拓也, 加勢 大輔, 佐竹 伸一郎, 温井 美帆, 井上 剛, 北村 明彦, 井本 敬二 (生理研)

【概要】

ヒトゲノムの解読も終了し、遺伝子の構造も判明した今、細胞機能をタンパク質機能の総合的制御という観点から知ることが重要になっている。我々はこの試みを、カルシウムシグナリング研究において当てはめ展開する。

カルシウムシグナリングにおいては、カルシウム結合蛋白質がシグナルを受容し、それを次の蛋白質・酵素との相互作用により実現することが一般的である。1980年代から1990年代にかけては、シグナル伝達の大潮流として世界中で多くの研究がなされたが、1990年代後半からは研究者の数も減り、「カルシウムシグナリング」という名において体系的な整理が十分になされていない状態である。しかしながら現在においても、カルシウムシグナルは非常に多くの生理機能において重要な役割を果たしていることに変わりはない。そして研究課題の解析法・アプローチ法の一部として、カルシウム濃度を測定したり、カムキナーゼによるリン酸化による効果解析などを用いることは一般的であり、カルシウムシグナル系

を扱っている研究者数は、潜在的には決して少なくない。

本セミナーでは、そのように重要な機能を有しているカルシウムシグナリングにおいて、ダイナミックな情報処理基礎過程を担う重要な分子の制御機構と働きに注目して、最新の知見の発表と議論を行う。そしてこのセミナー全体をとおして、再びカルシウムシグナリングを中心に据えた形での体系化を試みたい。こうしてかつてのブームから10余年経った今、我々の手で、カルシウムシグナリング研究の新しい潮流を築くことを目的としている。

第一部では『EFハンドカルシウム結合蛋白質の新たな展開』として、(1)~(6) 課題で、カルモデュリンをはじめ最近注目されている EF ハンドカルシウム結合蛋白質のカルシウム受容機構とその後のシグナル伝達様式および新しい機能を紹介する。それを受けて、第二部では『カルモデュリン依存性酵素の新しい展開』として、(7)~(15)の課題で、カムキナーゼを中心としたカルモデュリン依存性酵素の機能およびそのシグナリング機構を、神経組織ばかりでなく様々な組織において全容の解明に迫る。

(1) カルモデュリンの構造と機能

矢沢 道生, 中富 晶子 (北大・院・理)

カルシウムシグナリングの歴史を考えると、まずカルシウムイオンの細胞内シグナル伝達物質としての役割の生化学的な認識があり、それは江橋らの骨格筋筋肉収縮制御蛋白質トロポニンの発見に始まる。Kretsingerによるコイ筋肉パルプアルブミンの立体構造の解析結果は、この蛋白質がカルシウムイオンを結合していることを明らかにしたばかりではなく、カルシウムイオンを特異的に結合する構造モチーフ—EFハンド構造—を提唱し、それが広く受け入れられる結果となった。その後、トロポ

ニン複合体のカルシウムイオン結合成分であるトロポニンCの一次構造中にもEFハンドモチーフが4カ所で確認された。これと相前後して、筋収縮以外の細胞生理機能の調節にカルシウムイオンが鍵を握るという事実が生化学的に示され、トロポニンとは異なるカルシウムイオン結合蛋白質としてカルモデュリンが発見された。カルモデュリンの一次構造中にも4カ所でEFハンドモチーフが確認された。トロポニンCは横紋筋の収縮制御に特化しているが、カルモデュリンは真核細胞の多様な生理

機能のカルシウムシグナル制御因子として機能しており、EFハンドカルシウム結合蛋白質の典型、またはプロトタイプとしてとらえることができる。この講演では、まず、カルモデュリンの分子構造の組み立てについて、カルシウムイオン結合構造、および生理機能発現に至る標的酵素の認識・活性化の構造的要因といった面から、我々の得た酵母カルモデュリンについての結果も紹介しながら復習する。後半では、カルモデュリン依存性プロテインホスファターゼ カルシニューリンを例にとって他のシグナル伝達機構とのクロストークについて紹介し、細胞の生理機能の調節過程をより体系的に理解する流れについてふれる。T細胞の活性化過程で起きる転写因子 NF-AT の核内移行は、カルシウムシグナルによりカルシニューリンが活性化し NF-AT が脱リン酸化されることで進行する。一方で、NF-AT のリン酸化レベルを維持・増強して細胞質内に留めたり戻したりする過程は、カルシウムシグナルとは別の経路で制御されるという。

このように、カルシウムシグナルは他のシグナル伝達過程と協調して調節過程を作りあげている。精子形成過程では、カルシニューリンは減数分裂直後に精細胞核内に顕著に観察できる。我々は、カルシニューリンの機能を明らかにしようとする過程で新規カルシニューリン結合蛋白質(CaNBP75)を発見した。CaNBP75はカルシニューリンと特異的に結合するばかりではなく、そのC末端ドメインで核内外輸送制御タンパクとして知られる低分子量G蛋白質Ranとも結合し、さらに核膜孔複合体に見いだされるFXFGモチーフを3つもつことが明らかになった。この蛋白質の機能を解明する過程で、精子形成過程でのカルモデュリンを介したカルシウムシグナルと、これとクロストークするRanを介するシグナル伝達過程の新たな協調が明らかになると考える。カルシウムシグナリング研究の新潮流の1例としてこれらの結果について紹介したい。

(2) カルモデュリン結合認識の多様性

松原 守 (カルナバイオサイエンス株式会社)

カルモデュリン (CaM) は、細胞内シグナル伝達に不可欠なカルシウム結合蛋白質で、100種類以上にもおよぶ蛋白質と結合することにより様々な細胞機能を調節している。CaMがどのようにして標的蛋白質を認識するのかについては、CaMと標的蛋白質複合体の様々な立体構造から、非常に多様性のあることが明らかになっている。一般的には、ミオシン軽鎖キナーゼ、CaMキナーゼIIやCaMキナーゼキナーゼのCaM結合ドメインペプチドで見られるように、 α ヘリックス構造をとってCaMと結合し、10残基以上離れた特定の2箇所が存在する疎水性残基が、CaMのN末端ドメインとC末端ドメインに存在する疎水性ポケットにはまり込むようになっている。2箇所の疎水性残基の位置から1-10、1-14、1-16モチーフと呼ばれており、似たようなモチーフをもつ領域はCaM結合ドメインであると予想されている。一方、近年、このような結合認識とは異なった新しいタイプのCaM結合蛋白質も見つかってきた。Ca²⁺-activated K⁺ channel, Edema factor, glutamate decarboxylaseとCaMとの複合体の構造は非常にユニークなものである。本発表では、更

に新しい結合認識を持つCaM結合蛋白質として、我々がこれまで解析してきたMARCKSとCAP-23/NAP-22を取り上げて議論する。

MARCKSはprotein kinase C (PKC)の主要な基質の一つで、胎児期の中枢神経系の発達に不可欠な蛋白質である。分子のほぼ中央部にCaM結合ドメインがあり、CaM以外にも細胞膜やアクチンなどとも結合できる。これらの結合はPKCのリン酸化で抑制される。CaM結合ドメインの機能構造を理解するために、このドメインとCaM複合体のX線結晶構造解析を行った。2Åで解かれた構造から、一部に α ヘリックス構造は含むものの、大部分に2次構造が存在しなかった。これまでのCaM結合ドメインが α ヘリックスを形成して結合するという認識機構と全く異なるものであった(1-3)。

CAP-23/NAP-22も脳神経系で特異的に発現しているPKCの基質蛋白質であり、CaMと結合する。CaMとの結合にはN末端のミリスチル基が必須である(4)。どのようにしてCAP-23/NAP-22のミリスチル基がCaMを認識しているのかを明らかにするために、N末端ミリスチル

基を含む9残基のペプチドとCaMの複合体を2.3Åの分解能で構造決定した。その結果、ミリスチル基はCaMのN末端ドメインとC末端ドメインから形成される疎水性ポケットの真ん中を貫通するという全く新しい蛋白質間認識であった(5)。このように、今回得られた2つの複合体の構造から、CaMと標的蛋白質の認識機構は、従来考

えられてきた以上に複雑であることが明らかとなった。

1. Matsubara, M. et al. (1998) *FEBS Lett.* **421**, 203-207
2. Yamauchi, E. et al. (2003) *Nature Struct. Biol.* **10**, 226-231
3. Matsubara, M. Et al. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 48898-48902
4. Takasaki, A. et al. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 11848-11853
5. Matsubara, M. et al. (2004) *EMBO J.* **23**, 712-718

(3) penta-EF ハンドカルシウム蛋白質 ALG-2 の相互作用因子とメンブレントラフィック制御

牧 正敏 (名大・院・生命農学)

当初、カルパインは、C末端側にカルモジュリン様の連続した4つのEFハンドをもつと考えられていたが、そのすぐ上流にさらにもう一つのEFハンドが存在することが判明した。現在、このような5つの連続したEFハンドモチーフは、penta-EFハンド(以下、PEFと略す)と呼ばれている¹⁾。ALG-2はapoptosis-linked gene 2として発見されたが²⁾、演者らは、ALG-2もPEF蛋白質であることを見出し¹⁾、以来、この蛋白質の生理機能とその相互作用因子に注目して研究している。

PEF蛋白質は、構造的特徴によりグループI(ALG-2, peflin)とグループII(カルパイン大小サブユニット, sorcin, grancalcin)に分類され、ALG-2は進化的に最も古く真核生物に広く存在するPEF蛋白質である³⁾。ALG-2はホモダイマーおよびpeflinとのヘテロダイマーとして存在し⁴⁾、EF5がダイマー形成部位となっている^{5,6)}。ALG-2の生理機能は不明な点が多いが、カルシウム存在下で膜画分に移行することから、メンブレンを介した何らかの制御に関与していると思われる。

ALG-2のカルシウム依存的相互作用因子として、Alix(別名AIP1)、アネキシンVII、アネキシンXIが同定され、PPIIヘリックス構造が予想されるPxYの繰り返し配列が

ALG-2の認識モチーフの一つとなっている⁷⁾。最近、このようなモチーフをもつリン脂質スクランブラーゼとも結合することが明らかになった⁸⁾。一方、Alixの相互作用因子として、エンドサイトーシスおよびエンドソームにおける選別輸送に関与する因子群が見つかった⁹⁾。また、細胞性粘菌は多細胞構築のモデル下等真核生物であるが、Alixホモログの遺伝子を破壊すると、低カルシウム環境下での分化・発生に異常が認められた¹⁰⁾。最近の知見も含め、ALG-2とその相互作用因子について話題を提供したい。

- 1) Maki et al. (1997) *Biochem. J.* **328**, 718.
- 2) Vito et al. (1996) *Science* **271**, 521.
- 3) Maki et al. (2002) *Biochim. Biophys. Acta* **1600**, 51.
- 4) Kitaura et al. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 14053.
- 5) Jia et al. (2001) *Structure* **9**, 267.
- 6) kitaura et al. (2002) *Arch. Biochem. Biophys.* **399**, 12.
- 7) Shibata et al. (2004) *J. Biochem.* **135**, 117.
- 8) 柴田ら 2004年度日本生化学会大会。
- 9) Katoh et al. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 39104.
- 10) Ohkouchi et al. (2004) *Gene* **337**, 131.

(4) S100の新しい機能 -シャペロン活性-

小林 良二 (香川大・医)

現在までに約20種のS100タンパク質(S100, 低分子EF-handタンパク質)が同定されているが、S100の細胞内シグナル伝達における役割については明確な答は得ら

れていない。少なくとも20-30種のS100の標的分子が想定されているが、S100受容体(RAGE)の発見およびS100A1によるtwitchin kinaseの活性化が確度の高い研究

として挙げられるのみである。私達は、(1) S100 の標的分子を同定し、S100 による機能調節の仕組みを解明する。(2) S100 の選択的拮抗薬 (S100 antagonist)を見だし、これを利用することにより S100 の生理的役割を明らかにすることを目的に研究を進めている。

最近の研究⁽¹⁾において、S100A1 が細胞内の分子シャペロン複合体の新たな構成分子であり、同時に S100A1 そのものが強力な分子シャペロン機能を有することを見いだしたので話題として提供したい。分子シャペロン複合体は、HSP70, HSP90 に加え、co-chaperone と呼ばれる一群のタンパク質 (Hop, FKBP52, Cyclophilin40, p23 など) によって構成され、細胞内タンパク質の folding, refolding, translocation などに関与している。S100A1 は Hsp70, FKBP52, Cyclophilin40 とカルシウム非依存的に複合体を形成し、Hsp90 とはカルシウム依存性に結合する。In vitro (GST-pull down, BIAcore) での結合のみならず、組織抽出物の IP によっても結合が認められ S100 A1 とシャペロン分子は生理的条件下でも複合体を形成するものと思われる。Citrate synthase または rhodanese を基質とするシャペロン活性測定系において、S100A1, S100A2, S100B は強いシャペロン活性を示す。Cos7 細胞への S100A1 と β -galactosidase または luciferase の共発現系においても S100A1 は強いシャペロン活性を示し、intact cell 内でも

S100A1 が分子シャペロンとして作動している可能性が高い。また、S100A12 はその結合タンパク質である aldolase, GDPDH, isocitrate dehydrogenase などの熱安定性を制御している⁽²⁾などから、少なくとも数種の S100 は分子シャペロンとして機能している可能性が高い。Calmodulin や neuronal calcium sensor protein にはシャペロンとの結合性は認められず、シャペロン活性も無い。従って、S100 のシャペロン機能は、この family に特有なシグナル経路と考えられる。一方、Calmodulin などとは相互作用を持たず S100 family に選択性の高い拮抗薬の探索においては、抗アレルギー薬 (DSCG, amlexanox, olopatadine) が S100 antagonist である可能性を見いだした^(3,4,5,6)。この中で、DSCG, amlexanox は Hsp90 や 14-3-3 との拮抗作用を持つ⁽⁷⁾ため、intact cell には応用しにくい。oloapatadine の選択性は高く、S100 antagonist のリード化合物となりうると思われる。

- (1) Okada et al (2004) *J Biol Chem* **279**, 4221
- (2) Hatkeyma et al (2004) *Eur J Biochem* **271**,3765
- (3) Shishibori et al (1999) *Biochem J* **338**,583
- (4) Oyama et al (1997) *Biochem Biophys Res Commun* **240**,341
- (5) Okada et al (2002) *Biochem Biophys Res Commun* **292**,1023
- (6) Okada et al (2003) *Biochem J* **375**,87
- (7) Okada et al (2003) *Biochem J* **374**,433

(5) トロポニンの結晶構造と筋収縮調節メカニズム

武田壮一 (循環器病センター研, 理化研・播磨)

【発表要旨】1970年代に筋繊維のX線回折の結果を基に「立体障害仮説」が提案され、現在まで筋収縮制御機構の基本モデルとしてしばしば引用されている。この提案では、カルシウムイオンの結合に伴いトロポニン (Tn) が繊維状分子トロポミオシン (Tm) のアクチン上での位置を変化させモーター分子ミオシン頭部のアクチンへの相互作用を立体障害的に調節するとしているが、X線回折データの解釈に Tn/Tm がアクチンらせん上に等しく質量分布することを仮定している点で矛盾を抱えている。筋収縮制御機構の本質的な理解のために制御分子 Tn/Tm についての高分解能の立体構造情報が必須となっている。一方、若年者の突然死の主原因の一つである肥大型心筋症 (Hypertrophic cardiomyopathy, HCM) や心

臓移植を必要とする拡張型心筋症 (Dilated cardiomyopathy, DCM) における原因遺伝子の解析から筋節 (サルコメア) を構成するタンパク質群の異常が見つかってきている。これらトロポニンを含む心筋タンパク質群の異常はいずれも心筋張力発生のカルシウム感受性の変化、即ち TnC の第二カルシウム結合部位の親和性の変化として表現されることがスキンドファイバーを用いた実験等で示され、心筋症の発症過程にカルシウム感受性の変化に应答した張力発生の異常が関与していることが示唆されている。したがって Tm/Tn によるカルシウム調節機構の解明は、心筋症発症のメカニズムの理解や将来の創薬への応用展開という点でも重要な意味を持つ。

我々は Tn/Tm 複合体の X 線結晶構造解析に取り組み、

制御機構の要となるヒト心筋 Tn コアドメインのカルシウム結合型の結晶構造を明らかにすることに成功した (Takeda et. al. Nature 424, 35-41 (2003))。その結果, Tn コアドメインはさら数のサブドメインから成ること, に複それぞれのサブドメインがフレキシブルなリンカー構造で結ばれていることが明らかになった。TnT/TnI 間に形成される coiled-coil 構造を核とした長い (-80 Å) サブドメイン, IT-arm はその長軸の両端部に Tm 結合部位を有し, 調節頭部 (RH, TnC の N 末端ドメイン) を「細い繊維」に繋ぎ止めている。RH へのカルシウム結合は

TnI/TnC 間の相互作用を変え, TnI の調節領域 (TnIreg) とアクチンとの結合をスイッチングすると考えられる。これらの結果から Tn へのカルシウム結合は Tn とアクチン及び Tm 間の結合を 3 点から 2 点結合へと変化させ, IT-arm を介して Tm 分子の構造および性質 (柔らかさ, あるいは動きやすさ) を変えてアクチン・ミオシン相互作用を調節している可能性が見出された。

本講演ではヒト心筋トロポニンコアドメインの結晶構造と考えられるカルシウム調節機構を中心に最近のトロポニン研究について紹介する予定である。

(6) カルパインの新しい Ca^{2+} - 結合モチーフと構造・機能相関

反町洋之, 小野弥子, 秦勝志, 小山傑, 尾嶋孝一 (東京都臨床医学総合研究所)

【発表要旨】カルパインは細胞質内に存在して, 細胞機能を, そしてその集合体である生体機能を制御する「モジュレータ・プロテアーゼ」の代表である。即ち, カルパインは Ca^{2+} にレスポンスして, 細胞骨格系, 情報伝達系, 膜輸送系などに関与する基質タンパク質の構造・機能・活性を調節・変換するために, 極めて限定的な「切断(プロセッシング)」を行う。その機能の重要性は, カルパイン遺伝子の変異により胎性致死や筋ジストロフィーが生じることなどで明白であるにもかかわらず, カルパインの作用機序については現状ではほぼ不明である。カルパインはヒトで 14 種存在し, その中で組織普遍的に発現して量的にも多いものが μ -及び m-カルパインである。これらは, 4 つのドメイン (I~IV) からなる活性サブユニットと 2 つのドメイン (V 及び VI) からなる調節サブユニットのヘテロダイマーで構成される。ドメイン IV 及び VI は, 各々 5 つの EF-ハンドモチーフを有する Ca^{2+} -結合ドメイン (PEF ドメイン) であり, カルパインの Ca^{2+} 依存性を担うと考えられてきた。その後, m-カルパインの Ca^{2+} -非存在下の立体構造が解明され, (1) プロテアーゼ活性ドメイン (II) は, 2 つのサブドメイン (IIa 及び IIb) に分割され, Ca^{2+} -非存在下では活性中心が形成されていない, (2) 一次構造上全く相同性の見いだせなかったドメイン III が Ca^{2+} -結合型 C2 ドメインの立体構造に極めて類似していた, (3) ドメイン IV 及び VI はダイマー形成を担い, 活性ドメインからは最も離れた位置に存在した, 等が明らかとなった。

さらに, 生化学実験によりドメイン III が Ca^{2+} を結合することが示され, このドメインが, カルパインの Ca^{2+} 依存的な膜移行を含め, Ca^{2+} による制御の中心的役割をすることが強く示唆された。また, 活性サブユニットの N 末端のドメイン I は, 調節サブユニットの 2 つの EF-ハンドとの塩橋形成によりヘテロダイマー安定化に寄与し, かつ, Ca^{2+} の EF-ハンドへの結合による塩橋破壊に起因するサブユニット解離に重要な役割を果たすことが示された。この事実は, カルパインのドメイン I における自己消化の生理的意義を明確にし, 自己消化がサブユニット解離や基質特異性の変化を引き起こすことを明らかにした。さらに, カルパインのプロテアーゼドメインを組換えタンパク質として発現させたものを解析した結果, 予想に反して Ca^{2+} 依存的な活性が観察された。その後, プロテアーゼドメインの Ca^{2+} 結合型 (活性型) の立体構造も報告され, 実際にサブドメイン IIa 及び IIb に 1 分子ずつ結合していることが明らかとなった。このプロテアーゼドメインに見出された Ca^{2+} 結合モチーフは, 今までに例のない構造であり, カルパインファミリーが進化的に新規に獲得したものと考えられた。

このように, カルパインは分子全体として 10 分子以上の Ca^{2+} を結合し, 高度に調節を受けていることが明らかとなった。カルパインは, 上述のように生理的に重要な機能を担っているため, その基質認識や活性制御の分子的なメカニズムの解明が大きく期待されている。その重要な因子である Ca^{2+} を基にしてこれらの点も議論したい。

(7) シナプス機能調節における CaM kinase II の役割

山内 卓 (徳島大学大学院・薬学部)

Ca²⁺/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaM kinase II) は、大脳や海馬に多く存在し、記憶分子として注目されている。私達は CaM kinase II がシナプス伝達の中心部位であるシナプス後肥厚 (PSD) の主要構成分子であることに注目して、シナプス機能調節を解析した。

(1) PSD における CaM kinase II とシグナル伝達分子

CaM kinase II と PSD の関係を調べ、CaM kinase II は自己リン酸化に依存して PSD に移行すること、PSD に移行した酵素は多くの PSD タンパク質をリン酸化することを明らかにした。さらに、PSD における CaM kinase II の基質タンパク質 28 種類を同定した。一方、プロテオミクス解析により、PSD に存在するタンパク質 492 種類を同定した。PSD で報告されていたタンパク質の 75% 以上を同定するとともに、新たに約 350 種類のタンパク質を同定し、PSD の全体の構成成分の多くが明らかになった。PSD の主要な構成分子は、シグナル伝達に関わる分子と構造タンパク質であった。今後、シナプス可塑性における PSD の役割が解明に役立つと考えられる。

(2) 神経突起伸長の CaM kinase II のよる調節

CaM kinase II cDNA を導入した神経芽細胞をシナプス可塑性のモデルと考えて CaM kinase II の役割を解析した結果、CaM kinase II を過剰発現することにより突起伸長が促進されること、CaM kinase II の自己リン酸化型が

関与することが明らかとなった。さらに、培地から血清を除去することにより突起伸長を起こす CAD 細胞では、血清除去により CaM kinase II も誘導され、内在性のリン酸化が増加した。しかし、内在性 CaM kinase II を siRNA によりノックダウンすると、突起伸長が阻害され、そこに CaM kinase II を導入することにより、突起伸長能が回復することが明らかになった。これらの結果から、CaM kinase II は突起伸長に重要な役割を果たすことが明らかとなった。

(3) PSD タンパク質による CaM kinase II 作用の調節

PSD タンパク質が CaM kinase II の作用に影響与えるか調べるために、前初期遺伝子産物 Arc (activity-regulated cytoskeleton-associated protein) に注目した。Arc は、mRNA が CaM kinase II と同様に樹状突起に存在すること、神経活動依存的に誘導されることから、CaM kinase II との相互作用があると考え解析した。その結果 Arc は PSD に局在すること、細胞内で CaM kinase II と相互作用し、CaM kinase II の突起伸長作用を増強することが明らかとなった。

以上の結果から、CaM kinase II が、記憶・学習の一連の過程、すなわち、シナプス形成、シナプス後細胞における機能調節等、において中心的な役割を果たすと考えられる。

(8) 不活性型 CaM Kinase II α 遺伝子改変マウスを用いた脳機能の解析

山肩葉子, 井本敬二, 八木 健, 小幡邦彦, 柳川右千夫
(生理研, 総研大, CREST, 阪大, 理研, 群大)

【発表要旨】 Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMKII) は、中枢神経系に豊富に存在するプロテインキナーゼとして、神経活動の制御やシナプス可塑性、特に、学習・記憶を始めとする高次脳機能に、また、てんかん発作の発現の抑制、脳虚血の際の脳障害の抑制に重要な働きをされると考えられている。CaMKII 蛋白には、大きく分けて、(1) 他の蛋白質をリン酸化するプロテインキナーゼとしての機能、(2) Ca²⁺ 結合蛋白である

カルモジュリンを結合する機能、(3) CaMKII サブユニット同士が結合して、あるいは他の蛋白質と結合して構造蛋白として働く機能、という三つの異なる作用機序が存在する。このうち特に重要と考えられるプロテインキナーゼとしての生体内での作用を解明し、脳機能への関与を明らかにするために、キナーゼ活性を失活させた機能的ノックアウトマウスの作成を行った。

具体的には、CaMKII の前脳での主要なサブユニット

である α (アルファ) をターゲットとして、ATP 結合に必要な 42 番目のアミノ酸残基、リジン (Lys-42) をアルギニン (Arg-42) に置き換えた点変異型のノックインマウスを作成した。ホモ接合型の変異マウスの前脳ホモジネートにおける CaMKII 活性は、野生型に比べて約 60% 減少していたが、CaMKII α ならびに CaMKII β の蛋白レベルには、顕著な変化は認められなかった。CaMKII の残

存活性は正常な CaMKII β によるものと考えられた。一方、 α に比べて β が優位である小脳ホモジネートにおいては、CaMKII 活性はほぼ正常に保たれていた。従って、作成したノックインマウスにおいては、CaMKII α の蛋白としての発現は保たれているものの、その活性のみが選択的に失活しているものと考えられた。現在このマウスを用いた様々な脳機能の解析を行っている。

(9) 神経系における CaM kinase I の発現と機能

阪上 洋行 (東北大・院・医)

【発表要旨】 CaM kinase I は、1980 年代にシナプシン I に対するリン酸化能により脳から精製されたにも関わらず、その機能解析は、他の多機能型 CaM kinaseII 及び IV に比べて驚く程遅れている。しかしながら、近年、CaM kinase I が、少なくとも 4 つの分子種(α , β , γ , δ)よりなる分子ファミリーを形成し、CaM kinase IV とともに CaM kinase kinase による特異なリン酸化カスケードによる活性化調節機構が存在することが明らかとなり、その分子多様性と生理機能の解析がようやく始まった感がある。本発表では、これまで行ってきた神経系における発現解析のうち、CaM kinase I γ と δ 分子に関する最近の所見を中心に発表する。

CaM kinase I γ は、横倉らの部分的な cDNA が単離され、その存在が明らかになったものであるが、我々は、PCR クローニングにより、2 つの alternative splicing variant を見だし、 γ 1, γ 2 分子と名付けた。 γ 1 分子は、477 アミノ酸残基よりなる推定分子量約 53 kDa よりなり、 α , β 1 β 2 分子とそれぞれ 63%, 64%, 61% の相同性を示したのに対して、 γ 2 分子は、カルモデュリン結合部位を含む C 末領域が欠損し、477 アミノ酸残基、推定分子量 43kDa よりなることが明らかになった。次に、成熟期ラット神経系における γ 分子の遺伝子発現局在を検討した結果、視床腹内側核と松果体に際立った強い発現が検出された。この γ 分子の遺伝子発現様式は、神経細胞に広く分布す

る α 分子や脳幹領域に比較的限局する β 2 分子のそれと大きく異なるもので、特異な神経機能に関与する可能性が示唆された。

一方、CaM kinase I δ は、顆粒球に特異的に発現する CaM kinase I-like kinase (CKLiK) の splicing variant として、Hela 細胞から、石川らにより単離されたものである。遺伝子発現分布を検討した結果、CaM kinase I δ は、特に海馬錐体神経細胞に際立った強い発現を示した。初代海馬神経培養細胞に遺伝子導入した CaM kinase I δ は、大部分の神経細胞 (80%) において、細胞質と神経突起に局在し、残りの 20% の神経細胞では、核と細胞質に均一に分布した。次に、グルタミン酸及び脱分極によるカルシウム刺激を与え、その細胞内局在の変化を検討した結果、核に局在を示す神経細胞の割合が刺激前の 20% から刺激 1 分後に 40% と増加した。この核への局在は、刺激後 30 分以内にすみやかに basal level に戻った。また、CaM kinase I δ を過剰発現した PC12 細胞において、脱分極刺激により CRE luciferase 活性が増加すること、また、CREB のリン酸化が増強していることより、CaM kinase I δ は、神経活動依存性に核内に移行し、核に恒常的に局在している CaM kinase IV とともに、CREB などの転写因子のリン酸化を介した遺伝子発現の調節に関与している可能性が考えられた。

(10) CaM kinase カスケードのシグナル伝達と生理機能

徳光 浩, 小林 良二 (香川大・医)

多様な細胞応答においてタンパク質リン酸化酵素によるカスケード反応は重要な細胞内情報伝達機構として機能する。本研究会のテーマである細胞内カルシウム情報伝達経路においても CaM-KK/CaM-KI, CaM-KK/CaM-KIV の独立した 2 つの CaM キナーゼカスケードの存在が明らかとなっている。本発表では、これまでに得られている解析結果から導き出された CaM キナーゼカスケード

のシグナル伝達の分子メカニズムについて報告するとともに、その生理機能のひとつである遺伝子発現制御機構についても最近の知見を紹介する。また独自に開発した CaM-KK 阻害剤 (STO-609) を用いた CaM キナーゼカスケードの生理機能解析法について、阻害剤研究の問題点である特異性評価や、その解析結果も含めて議論したい。

(11) CaM kinase ファミリーを中心としたプロテインキナーゼの網羅的検出と解析

亀下 勇, 末吉 紀行 (香川大学・農学部)

タンパク質リン酸化反応は様々な生命現象と深い関わりを持っており、その反応に関与するプロテインキナーゼ (PK) の数は数百種類以上も存在することが知られている。生命現象のメカニズムを明らかにするためには、様々な状況下の細胞内で発現している PK の全貌を知ることが重要である。そこで我々は、細胞内に存在する PK を広く検出するための網羅的解析法について検討してきた。本研究では細胞内に存在する多様な PK を同時に検出するための抗体を作製し、その利用法について検討した。

PK の触媒ドメインには、アミノ酸配列が保存された 12 ヶ所のサブドメインが存在し、その中でも特にサブドメイン VIB 配列が高度に保存されている。そこで CaMKII のサブドメイン VIB のアミノ酸配列に基づく様々なペプチドを抗原として合成し、マウスを用いて抗体の作製を試みた。得られた抗血清を用いてウェスタンブロットを

行ったところ、長さが 10 個以下のアミノ酸からなるペプチドを抗原として免疫したマウスでは、抗体産生がみられなかったが、14 から 16 アミノ酸のペプチドを抗原として用いた場合に広い反応性を示す抗体が得られることがわかった。作製したモノクローナル抗体 (Multi-PK 抗体) は、ウェスタンブロットで CaMKI, II, IV, CaMKK, PKA, MAPK, MAPKK をはじめとして様々な PK を検出できるだけでなく、細胞抽出液中に含まれる種々の PK の免疫沈降にも利用できることが確認された。さらに様々な生物から調製した cDNA 発現ライブラリーを Multi-PK 抗体でスクリーニングしたところ、CaMK ファミリーを含む様々な既知の PK だけでなく、新規の PK の遺伝子を単離することができた。

本研究では、Multi-PK 抗体の性質について紹介するとともにその利用例についても併せて報告する予定である。

(12) 神経型 NO 合成酵素のリン酸化による調節

渡邊泰男, 徳田雅明 (香川大・医)

【発表要旨】多彩な生理作用を有する一酸化窒素 (NO) シグナルは NO 産生を触媒する NO 合成酵素 (NOS) の活性制御はカルモデュリン (CaM) 結合とリン酸化によって調節されている。これまで nNOS の Ser741, Ser847 が

それぞれ CaM キナーゼ I (CaM-KI), CaM-KII によってリン酸化される部位として同定され、共に CaM との親和性の低下によって NOS 活性が阻害されることが判明している (1, 2, 3)。Thr1296 も CaM-KII によってリン酸化を

受け、その結果活性が阻害された。リン酸化擬似体 nNOS (Thr1296 を Asp に置換した変異型: Thr1296Asp) の酵素学的解析や、Thr1296 リン酸化 nNOS の生化学的性質より活性阻害は補酵素の 1 つである NADPH に対する親和性の低下 (Km 値が 20 倍) によるものであった。Ser1412 も CaM-KII によるリン酸化部位であったが、現時点で酵素学的意義は見いだせていない。脱リン酸化酵素による可逆的調節も観察され、少なくとも protein phosphatase 2A の関与が示唆されている (4)。生理学的意義の解析では、ラット脳一過性虚血モデルを用いて、虚血シグナルで海馬神経の介在神経において Ser847 リン酸化が一過性に CaM-KII により触媒されていた。この現象が皮質ではみられないことより海馬神経での虚血耐性における nNOS の Ser847 リン酸化の関与が示唆された (5)。神経細

胞のカルシウムシグナルによるリン酸化応答現象をシナプスに存在するクラスタリング分子との相互作用に着目して解析した結果、中枢神経系では直接結合を介して nNOS のシナプス後膜での局在化機構の中心的役割を担っている post synaptic density 95 が Ser 847 リン酸化の調節因子として細胞内で機能していることが判明した (6)。In vitro ならびに分子薬理的な解析により、以上のリン酸化反応はカルシウムシグナル以外のキナーゼによっても部位選択的に触媒されていることが分かってきた。以上のように、nNOS は同じ CaM を活性化因子として利用する CaM-K のリン酸化によりその活性をダイナミックにコントロールされていることに加え、複数のキナーゼによってより複雑に制御されているものと考えられる。

(13) 14-3-3 による CaMKK の調節

市村 徹, 松永 耕一, 笹本 要, 磯辺 俊明 (東京都立大)

CaM キナーゼキナーゼ (CaMKK) は、CaM キナーゼカスケードの最上流に位置する蛋白質キナーゼであり、カルシウムを 2 次メッセンジャーとする細胞内シグナル伝達、とりわけ神経細胞におけるカルシウムシグナリングに重要な役割を担っている。また、CaMKK はカルシウム以外のシグナリング (例えば cAMP シグナリング) の標的分子としても知られており、シグナル伝達のクロストーク、フィードバックといった観点からも注目されている。一方、14-3-3 蛋白質も特に神経細胞に豊富に存在する蛋白質であり、キナーゼが調節するリン酸化反応に依存して多彩な蛋白質と複合体を形成することで、細胞内シグナル伝達経路の反応に深く関わることが知られている。本講演では、14-3-3 を bait として用いた機能プロテオミクス解析によって新規に見出した“14-3-3-CaMKK α 複合体”の性質を検討したので報告する。

大腸菌で発現した CaMKK α とグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) との融合蛋白質として発現した 14-3-3 η を用いたプルダウン実験により、PKA でリン酸化した CaMKK α が 14-3-3 η と直接結合することが明らかとなった。一方、この相互作用はリン酸化しなかった CaMKK α や CaM を加えることで自己リン酸化した CaMKK α では起こらなかったことから、PKA によるリン

酸化に特異的であることが示唆された。次に、CaMKK α と GST-14-3-3 η を発現するヒト腎臓由来の培養細胞を PKA の活性化剤で処理したところ、PKA の活性化に依存して GST- η -CaMKK α 複合体が細胞内でも形成されることが分かった。またこの相互作用は CaMKK β アイソフォームでも同様に検出された。

CaMKK α は CaMKI または CaMKIV を効率良くリン酸化し活性化することが知られている。一方、こうした CaMKK α の活性は PKA によるリン酸化で低下することが報告されている。そこで、14-3-3 η との複合体形成が CaMKK α のキナーゼ活性に影響を及ぼすのかを GST-CaMKI (1-293) K49E を基質として用いた in vitro リン酸化実験で検討した。その結果、14-3-3 η と複合体を形成した CaMKK α のキナーゼ活性は単体のものと比べてさらに低下することが分かった。さらに、この 14-3-3 による効果は、高濃度の CaM を反応系に加えることで抑制されたことから、CaM との競合阻害効果である可能性が示唆された。

以上の結果より、14-3-3-CaMKK α 複合体は PKA による CaMKK α のリン酸化に依存して形成されること、さらに CaM の CaMKK α への結合を阻害することでそのキナーゼ活性を負に制御していると推測した。

(14) シナプス後肥厚部におけるタンパク質相互作用のリン酸化による調節

鈴木 龍雄, 田 慶宝, 宮沢 昌子 (信大・院・医)

著者らは5年以上前から、新規のシナプス後部タンパク質およびそれらをコードする遺伝子を発見・同定するプロジェクトを行っている。シナプス後部に存在するタンパク質種の全貌についてはまだ明らかになっておらず、未発見のものもかなりあると予想される。シナプス伝達の制御や可塑性、また、シナプス機能に起因する脳や精神の疾患の理解する上で、これら未知の分子を発見し、機能を明らかにすることが大きな役割を果たすと考えられる。本シンポジウムでは、このプロジェクトの中で新たに同定したシナプス後肥厚部 (postsynaptic density, PSD) タンパク質について、タンパク質-タンパク質相互作用の観点から現在までの知見を総括する。

本講演では以下のタンパク質について述べる。1) p55 protein, 2) TANC (protein containing TPR domain, ankyrin repeat and coiled-coil region), 3) LRP4 (LDL receptor-related protein 4), 4) synArfGEF (synaptic GEF for Arf), 5) NIDD (nNOS-interacting DHHC-containing protein with dendritic mRNA) 6) BAALC 1-6-8 (brain and acute leukemia, cytoplasmic).

p55 protein は Membrane-associated guanylate kinase (MAGuK) family の一員である。このタンパク質は赤血球

においては membrane と細胞骨格-膜裏打ちタンパク質をクロスリンクする役割を果たしていることがよく知られているが、シナプス後部においても同様の機能を果たしていることが示唆された。TANC は新規 protein で、p55 protein とともに PSD において scaffold protein (足場タンパク質) の役割を果たしていることが示唆された。LRP4, synArfGEF および NIDD は、C 末端部分に PDZ domain 結合配列を有することが特徴である。これらタンパク質のうち、LRP4, synArfGEF はその C 末配列を介して PSD-95, SAP97 などと結合したが、NIDD protein はこれらとは結合せず、nNOS に特異的に結合した。また、LRP4 については、カルモジュリンキナーゼ II によってリン酸化を受け、C 末 PDZ domain-binding motif 近傍の Ser 残基のリン酸化により、PSD-95 や SAP97 との相互作用が制御される可能性が示された。BAALC 1-6-8 protein はある種の急性白血病と正常では脳に特異的に発現されているタンパク質であるが、カルモジュリンキナーゼ II と特異的に結合することが明らかになった。

以上の新規のシナプス後部タンパク質の PSD protein との相互作用とその制御について述べる。

(15) Homer-3 の CaM kinase II によるリン酸化

水谷 顕洋, 御子柴 克彦 (JST・カルシウム振動), 古市 貞一 (理研・脳研)

Homer 蛋白質ファミリーは3種類の遺伝子からコードされ、いずれも中枢神経系 (神経細胞) に高度に発現し、主に、興奮性シナプスのポストシナプスに局在している。N-末の EVH1 domain には、種々の分子 (mGluRs, IP3Rs, RyRs, TRPC, drebrin, SHANK) が結合し、C-末部分で multimer を形成することで、ポストシナプス領域に於いて上記結合分子群を物理的にカップルさせていると考えられている。

我々は、小脳 Purkinje 細胞の spine に極めて豊富に発現・局在する Homer-3 蛋白質の、顆粒細胞平行繊維-Purkinje 細胞間のシナプス可塑性における機能について研究を進めているが、最近、Homer-3 にはリン酸化フォ

ームが存在し、このリン酸化フォームは、非リン酸化フォームに比して、可溶性画分に回収されやすいことを見出した。in vitro リン酸化実験によって CaM kinase II が Homer-3 の3箇所の Ser 残基をリン酸化し、これによって結合分子との親和性を低下させることを発見した。また、リン酸化部位特異的抗体を用いることで、これらのリン酸化が Purkinje 細胞内で神経活動依存的に起きることを見出した。これらの事実は、Homer-3 のリン酸化によって、spine 内の分子間相互作用が調節され、顆粒細胞平行繊維-Purkinje 細胞間シナプスの構造的可塑性を調節している可能性を示唆している。

(16) タウの CaM キナーゼ II によるリン酸化反応のアルツハイマー病への関与

山本 秀幸 (熊本大・院・医薬)

Ca²⁺/カルモデュリン依存性蛋白質リン酸化酵素 II (CaM キナーゼ II) は、脳の神経細胞に多量に存在し、神経細胞の活性化によって引き起こされる様々な神経細胞機能に関与している^(1,2)。本酵素の異常が、種々の精神神経疾患の病態生理に関与している例も報告されてきた。我々は、本酵素が微小管附随蛋白質の中のタウをリン酸化してその機能を阻害することを見出した。最近、質量分析法によりリン酸化部位を同定した。その結果、チューブリン結合部位にある 262 番目と 356 番目のセリンがリン酸化されることが明らかになった⁽³⁾。さらにタウのリン酸化によりチューブリンとの結合が阻害された。また、416 番目のセリン (S416) も CaM キナーゼ II によりリン酸化されることが報告されている。我々の検討から、本部位を含む合成ペプチドは調べた酵素の中では CaM キナーゼ II によってのみリン酸化されることが明らかになった。そこで、S416 がリン酸化されたペプチドを合成し、家兎に免疫して、リン酸化特異抗体を作製し精製した。蛋白質脱リン酸化酵素阻害剤を含まない条件でラット脳から調製した粗抽出液を用いた免疫プロットでは、*in vitro* で CaM キナーゼ II でリン酸化した時にのみ、タウが抗体と反応した。これに対し、蛋白質脱リン酸化酵素阻害剤を含む条件では、粗抽出液中のタウが抗体と反応した。すなわち、*in vivo* で S416 がリン酸化されることが確認された。本部位のリン酸化は、生後 10 日以

内の脳で著明に認められた。また、出生前のラット脳から培養した神経細胞での免疫染色により、タウが細胞体でリン酸化されていることが明らかになった。なお、アルツハイマー病脳では、過剰にリン酸化されたタウが paired helical filaments (PHF) を形成して神経細胞体と神経突起内に蓄積していることが知られている。リン酸化特異抗体を用いた検討から、アルツハイマー病脳から調製した PHF タウでは S262 と S356 に加えて S416 もリン酸化されていることが明らかになった。さらにアルツハイマー病脳の免疫組織学的検討により、細胞体に存在する PHF タウで S416 のリン酸化が認められた。これに対し、神経突起内の PHF タウではリン酸化は認められなかった。これらの結果から、胎児期及び出生直後の脳では、神経細胞体でタウが CaM キナーゼ II によりリン酸化されていることが示唆された。また、アルツハイマー病脳では、神経細胞体での CaM キナーゼ II によるタウのリン酸化が過剰に起こっている可能性が示唆された。現在、培養神経細胞を用いて CaM キナーゼ II によるタウのリン酸化反応の調節機構と生理的意義を検討している。

1. Matsumoto, K. et al. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 2053-2059
2. Takeuchi, Y. et al. (2000) *J. Neurochem.* **74**, 1913-1922
3. Yamamoto, H. et al. (2002) *Arch. Biochem. Biophys.* **408**, 255-262

10. 脳磁場計測によるヒト脳機能マッピング 第5回脳磁場ニューロイメージング

2004年12月13日-12月14日

代表・世話人：柿木隆介（自然科学研究機構生理学研究所）

所内対応者：柿木隆介（自然科学研究機構生理学研究所）

(1) 海馬硬化症例におけるてんかん波の電流モーメントと、WAIS-R 所見との関係

芳村勝城, 渡辺裕貴（独立行政法人国立病院機構療養所静岡てんかん・神経医療センター）

(2) 光刺激による命令嚙下時の事象関連磁場について

長崎信一¹, 橋詰 顕², 柴 芳樹³, 山科 敦¹, 藤原百合¹, 末井良和⁴, 栗栖 薫², 谷本啓二¹

(¹ 広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 病態情報医科学 (歯科放射線学),

² 先進医療開発科学 (脳神経外科学), ³ 病態探求医科学 (口腔生理学),

⁴ 広島大学病院 (歯科放射線科)

(3) 体性感覚刺激時の事象関連脱同期

橋詰 顕, 栗栖 薫, 志々田一宏

(広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 創生医科学専攻先進医療開発科学講座)

(4) Angelman 症候群における体性感覚誘発磁場所見

江川 潔¹, 朝比奈直子¹, 白石秀明¹, 須藤 章¹, 香坂 忍¹, 斉藤伸治¹, 中根進児², 有働康代²

(¹ 北海道大学大学院 小児科, ² 北海道大学病院 臨床検査部)

(5) マウス用脳磁図・心磁図計測システムの開発

小野弓絵¹, 白井健吾¹, 中村 祐¹, 葛西直子², 石山敦士¹

(¹ 早稲田大学大学院 理工学研究科 電気・情報生命工学専攻, ² 産業技術総合研究所)

(6) 統計的基準による MEG 順モデル選択

吉岡 琢¹, 佐藤雅昭^{1,3}, 梶原茂樹², 外山敬介²

(¹ ATR 脳情報研究所, ² 島津製作所 基盤技術研究所, ³ 科学技術振興機構 CREST)

(7) 複数信号源の時間相関に対してロバストな Beamformer 法の開発

栗山紘明¹, 星野大介¹, 中村 祐¹, 白井健吾¹, 小野弓絵¹, 石山敦士¹, 葛西直子²

(¹ 早稲田大学大学院 理工学研究科 電気・情報生命工学専攻, ² 産業技術総合研究所)

(8) 脳磁図の空間時間的クラスタリングを用いたモデル次数推定

星野大介¹, 栗山紘明¹, 白井健吾¹, 中村 祐¹, 小野弓絵¹, 石山敦士¹, 葛西直子²

(¹ 早稲田大学大学院 理工学研究科 電気・情報生命工学専攻, ² 産業技術総合研究所)

(9) 母音刺激による誘発磁場 N1m の検討

尾形エリカ, 湯本真人, 伊藤憲治, 関本荘太郎, 狩野章太郎, 伊藤 健, 加我君孝

(東京大学大学院 医学系研究科 脳神経医学専攻 感覚・運動神経科学講座)

(10) 音声ミスマッチング課題の MEG のフラクタル次元解析

金子 裕, 岡崎光俊, 湯本真人

(国立精神・神経センター武蔵病院 脳神経外科・臨床検査部,

国立精神・神経センター武蔵病院 精神科,

東京大学医学部附属病院検査部)

- (11) 音の高さ(ピッチ)の明瞭性に関わる脳磁界反応
添田喜治, 中川誠司, 外池光雄
(独立行政法人 産業技術総合研究所 人間福祉医工学研究部門 暮らし情報工学グループ)
- (12) 聴性 40Hz 応答がもたらす位相同期の検討
田中慶太, 川勝真喜, 阿部雅也 (東京電機大学)
- (13) 気体刺激のリアルタイムモニタリングによる嗅覚誘発電位・磁場の同時計測
秋山幸代^{1,2}, 斉藤幸子¹, 後藤なおみ¹, 小林剛史^{1,3}, 小早川達¹
(¹産業技術総合研究所 脳神経情報科学部門, ²日本体育大学, ³文京学院大学)
- (14) 高濃度食塩水による三叉神経応答の有無
小見山彩子^{1,2}, 池田 稔², 斉藤幸子¹, 後藤なおみ¹, 小早川達¹
(¹産業技術総合研究所 脳神経情報科学部門, ²日本大学医学部 耳鼻咽喉科学教室)
- (15) 脊髄誘発磁界測定の実状報告
富澤将司 (東京医科歯科大学 整形外科)
- (16) 指先電気刺激による体性感覚の感覚的強度と MEG 信号強度の比較
川西雄一郎, 井口義信, 多喜乃亮平, 根本正史, 木村友昭, 関原謙介, 橋本 勲
(東京都立科学技術大学大学院 工学研究科 システム基礎工学専攻)
- (17) 体性感覚野での階層的情報処理
乾 幸二, 柿木隆介 (生理学研究所)
- (18) 縦書き, 横書きの文字および視覚刺激に関する脳磁場研究
山川恵子¹, 伊藤憲治¹, 湯本真人², 狩野章太郎³, 加我君孝^{1,3}
(¹東京大学 医学部 認知・言語医学,²東京大学医学部附属病院 検査部,³東京大学医学部附属病院 耳鼻咽喉科)
- (19) 音高と音韻の視聴覚間照合の脳磁場: 音楽家 vs 非音楽家
湯本真人¹, 伊藤憲治², 宇野 彰³, 狩野章太郎⁴, 斉藤 治⁵, 金子 裕⁶, 松田真樹⁷, 加我君孝⁴
(¹東大病院検査部, ²東大医学部認知・言語医学, ³筑波大学人間総合科学,
⁴東大病院耳鼻咽喉科, ⁵国立精神神経センター武蔵病院精神科,
⁶国立精神神経センター武蔵病院脳外科, ⁷東京芸大大学院音楽研究科)
- (20) 言語流暢性課題遂行時のβ帯域活動の相互相関
志々田一宏¹, 橋詰 顕², 上田一貴¹, 山下英尚¹, 岡本泰昌¹, 栗栖 薫², 山脇成人¹
(¹広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 精神神経医科学,
²広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 脳神経外科学)
- (21) 視覚認知における先行刺激の影響; 周波数解析を用いた検討
岡崎光俊 (国立精神・神経センター武蔵病院 精神科)
- (22) 刺激間隔における 1/fm ゆらぎの視覚誘発脳磁図反応に対する影響の検討
原田暢善, 中川誠司, 岩木 直, 山口雅彦, 外池光雄 (産業技術総合研究所 人間福祉医工学部門)
- (23) アルファ波電流ダイポールの左右半球間の位相差
川端啓介¹, 内野勝郎², 村田和優³, 外池光雄⁴
(¹大阪府立大学, ²平成医療学園, ³藍野学園短大, ⁴産総研関西センター)
- (24) フィードバックシステム論的解析と正中神経刺激による誘発磁場について
岸田邦治¹, 篠崎和弘², 深井英和¹, 鶴飼 聡³, 石井良平³
(¹岐阜大学工学部 応用情報学科, ²和歌山県立医科大学 精神医学教室,
³大阪大学大学院 医学研究科 神経機能医学講座)

(25) Magnetoencephalography (MEG) -Beamformer 法をもちいた解析

—主に側頭葉てんかんを中心とした臨床症例の検討—

露口尚弘¹, 田中博昭², 下川原正博², 関原謙介³

(¹大阪市立大学大学院医学研究科脳神経外科学, ²横河電機 MEG センター,

³東京都立科学技術大学電子システム工学科)

(26) 聴性誘発磁場 N100m に対するスペクトル包絡の影響

水落智美¹, 湯本真人², 狩野章太郎³, 伊藤憲治⁴, 山川恵子⁴, 加我君孝^{1,3}

(¹東京大学大学院 医学系研究科 感覚運動神経科学, ²東京大学医学部附属病院 検査部,

³東京大学医学部附属病院 耳鼻咽喉科, ⁴東京大学大学院 医学系研究科 認知・言語医学)

(27) 脳磁界応答から見た聴覚逆方向マスキング現象

阿部雅也, 川勝真喜, 田中慶太, 小谷 誠 (東京電機大学大学院 工学研究科)

(28) ミスマッチフィールドの計測による骨導超音波知覚特性の検討

中川誠司¹, 竹形理佳^{1,2}, 外池光雄¹

(¹産業技術総合研究所 人間福祉医工学研究部門, ²Department of Psychology, University of Helsinki)

【参加者名】

吉岡琢 (ATR 脳情報研究所), 高田あゆみ (エレクトラ株式会社), 杉山尚 (かなえ・めでいす), 下川原正博 (横河電機株式会社), 田中博昭 (横河電機株式会社), 萬谷惇 (関西大・工), 木野元裕一 (関西大大院・工), 岸田邦治 (岐阜大・工), 浦川智和 (宮崎大・工), 松林潤 (京都大大院・医), 川西雄一郎 (都立科学技術大大院・工), 後藤純信 (九州大大院・医), 田代研之 (九州大大院・医), 飛松省三 (九州大大院・医), 前川敏彦 (九州大大院・医), 山崎貴男 (九州大大院・医), 緒方勝也 (九州大大院・医), 黒田智美 (九州大大院・医), 中島大輔 (九州大大院・医), 設楽直也 (群馬大大院・医), 荻野祐一 (群馬大大院・医), 荒木康智 (慶應義塾大・医), 青山敦 (慶應義塾大大院・理工), 中村茉莉 (慶應義塾大学・理工), 船津誠也 (広島女子大・生活科学), 志々田一宏 (広島大大院・医歯薬学総合), 長崎信一 (広島大大院・医歯薬学総合), 橋詰頭 (広島大大院・医歯薬学総合), 岡崎光俊 (国立精神・神経センター武蔵病院), 金子裕 (国立精神・神経センター武蔵病院), 藤本礼尚 (西新潟中央病院てんかんセンター), 芳村勝城 (静岡てんかん・神経医療センター), 渡辺裕貴 (静岡てんかん・神経医療センター), 岩木直 (産総研・人間福祉医工学), 添田喜治 (産総研・人間福祉医工学), 外池光雄 (産総研・人間福祉医工学), 中川誠司 (産総研・人間福祉医工学), 原田暢善 (産総研・人間福祉医工学), 秋山幸代 (産総研・脳神経情報科学), 小見山彩子 (産総研・脳神経情報科学), 小早川達 (産総研・脳神経情報科学), 斉藤幸子 (産総研・脳神経情報科学),

村山真紀 (鹿児島大大院・医歯学総合), 高田橋篤史 (八日会藤元早鈴病院), 藤田賢太郎 (八日会藤元早鈴病院), 藤巻則夫 (情報通信研究機構), 中村祐 (早稲田大大院・理工学), 福田大輔 (早稲田大大院・理工学), 本間俊道 (早稲田大大院・理工学), 小野弓絵 (早稲田大大院・理工学), 栗山紘明 (早稲田大大院・理工学), 星野大介 (早稲田大大院・理工学), 白井健吾 (早稲田大大院・理工学), 露口尚弘 (大阪市立大大院・医), 川端啓介 (大阪府立大学), 吉田恵 (筑波大大院・体育), 木田哲夫 (筑波大大院・体育), 高林俊幸 (筑波大大院・体育), 富澤将司 (東京医科歯科大), 小森博達 (東京医科歯科大), 別所央城 (東京歯科大), 渡邊裕 (東京歯科大), 大櫛哲史 (東京歯科大・市川総合病院), 久保浩太郎 (東京歯科大), 坂本貴和子 (東京歯科大), 仲村圭太 (東京大大院・総合文化), 山川恵子 (東京大学・医), 尾形エリカ (東京大大院・医), 水落智美 (東京大大院・医), 田中慶太 (東京電機大・先端工学研究所), 阿部雅也 (東京電機大大院・工), 湯本真人 (東京大・病院検査部), 川田昌武 (徳島大・工), 鶴澤礼実 (福岡大・医), 江川潔 (北海道大大院・医), 白石秀明 (北海道大大院・医), 山田由美 (北陸先端科学技術大学院大・知識科学), 柿木隆介 (生理研), 金桶吉城 (生理研), 渡辺昌子 (生理研), 乾幸二 (生理研), 井原綾 (生理研), 王曉宏 (生理研), 秋雲海 (生理研), 三木研作 (生理研), 和坂俊昭 (生理研), 廣江総雄 (生理研), 中田大貴 (生理研), 野口泰基 (生理研), 赤塚康介 (生理研), 田中絵美 (生理研), 本多結城子 (生理研),

Nguyen Thi Binh (生理研), 辻健史 (生理研), 尾島司郎 (生理研), 橋本章子 (生理研), 中村舞子 (生理研), 宮成愛 (生

理研), 宝珠山稔 (生理研), 中村みほ (生理研), 関和彦 (生理研), 郷田直一 (生理研)

【概要】

本年度は、所外から 77 名、所内から 26 名、計 103 名の研究者が参加し、例年にも増して盛況であった。

発表演題数は 28 題であり、計算理論的な発表から、各種感覚刺激（体性感覚、痛覚、視覚、聴覚など）に対する脳反応の解析、言語機能などの高次脳機能に関する研究、さらには「てんかん」を初めとする臨床疾患への応用など、広範囲に及んだ。

本研究会の特徴として、大学院生の参加が多く若手研究者の意見交換の場としての役割を果たしている事、20 分ないしは 30 分の口演であり、余裕を持った発表ができ、しかも十分な討議の時間があること、コーヒープレークの時間を十分にとってフロアでの活発な討議を可能にしていること、などがあげられ、通常の学会では考えられないような、濃密で person-to-person の意見交換が可能である事があげられる。この特色（長所）は本年度も十分に生かされていた。

幸い日本では脳磁図研究が盛んであり、稼動する脳磁計の数は世界一を維持している。しかし、世界的にみれば、ニューロイメージング研究分野では、機能的磁気共鳴画像 (fMRI) の空前のブームは未だ衰えを知らず、脳磁図研究はかなり押されている事は間違いない。また、最近では近赤外線分光鏡 (NIRS) を使った研究が盛んになってきており、今後、脳磁図研究をどのように進めるかは大きな課題として残っている。

脳磁図の持つ高い時間分解能を十分に生かした研究が今後の主流となるべきであろうし、また Brain rhythm と称される周波数分析による研究も、脳磁図独自の手法として今後の発展が期待される場所である。幸い、本年度の研究会では今後の展開が期待される演題も多く発表されており、柔軟な発想を持つ若手研究者の頑張りに期待している。

(1) 海馬硬化症例におけるてんかん波の電流モーメントと、WAIS-R 所見との関係

芳村勝城, 渡辺裕貴 (独立行政法人国立病院機構療養所静岡てんかん・神経医療センター)

言語優位側に海馬萎縮があるてんかん患者 23 例について、脳磁図によって等価電流双極子が側頭葉に推定されたてんかん波の電流モーメントと Wechsler Adult Intelligence Score-Revised 所見との関係について調べた。

その結果、病変側側頭葉に等価電流双極子が推定されたてんかん波の電流モーメントの平均と、全知能指数および言語性知能指数との間に正の相関が認められた (相関係数それぞれ 0.51, 0.60)。また言語性知能指数が 80

未満で、両側にてんかん波の等価電流双極子が推定された 5 例では、健常側側頭葉におけるてんかん波の電流モーメントの平均値が病変側側頭葉に比較して有意に高かった ($p < 0.05$)。

これらの結果から、電流モーメントの低下は海馬硬化を伴った側頭葉における発作間欠時てんかん放電の減少を反映していると考えられ、言語性知能指数の低下との関連が示唆される。

(2) 光刺激による命令嚥下時の事象関連磁場について

長崎信一¹, 橋詰 顕², 柴 芳樹³, 山科 敦¹,
藤原百合¹, 末井良和⁴, 栗栖 薫², 谷本啓二¹

¹ 広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 病態情報医科学 (歯科放射線学),

² 先進医療開発科学 (脳神経外科学), ³ 病態探求医科学 (口腔生理学),

⁴ 広島大学病院 (歯科放射線科))

【目的】命令嚥下運動時の各周波数帯域における事象関連磁場を明らかにする。

【対象と方法】嚥下障害の既往ならびにその症状を認めない, 成人男性12人 (右利き9人)。1mlの蒸留水を口腔に保持し, 光刺激により嚥下を50回行った。全頭型204chの脳磁計を用いて, 各嚥下における表面筋電図とMEGのデータを同時収集した。嚥下開始を頤下表面筋電図の立ち上がり時とした。脳磁計の各センサーで, Band-pass

filterを用いて2Hzずつ, 0-40HzのTime frequency chartを作製した。脱同期および同期の基準は嚥下開始前-3500ms~-1000msの各センサーの各周波数の平均とした。

【結果】嚥下運動開始前は, 中心前回付近と頭頂小葉付近において, 右側が左側より広範囲でβ帯域の脱同期を認めた。

【結論】嚥下運動の脳活動に左右差がある可能性が示唆された。

(3) 体性感覚刺激時の事象関連脱同期

橋詰 顕, 栗栖 薫, 志々田一宏

(広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 創生医科学専攻先進医療開発科学講座)

【目的】体性感覚刺激時の背景脳磁場活動の変化を調べる。

【対象と方法】成人男性5人に右正中神経を8~10秒間隔で約50回電気刺激し, 脳磁場活動を測定した。覚醒レベルを保つため, 検査中被験者はビデオを見るよう指示された。オフラインで0~50Hz, 2Hz刻みで周波数解析を行い, 解析結果をセンサー単位で被験者の脳表に投射した。

【結果】5人全員でS1およびS2を認める明瞭な体性間隔誘発磁界が認められた。5人中3人で右半球を中心にベータ波帯域で刺激後約2秒持続する脱同期が認められた。ガンマ波帯域の変化は明らかでなかった。

【結論】電気刺激が対側の背景脳磁場活動に及ぼす影響はわずかである。

(4) Angelman 症候群における体性感覚誘発磁場所見

江川 潔¹, 朝比奈直子¹, 白石秀明¹, 須藤 章¹,
香坂 忍¹, 斉藤伸治¹, 中根進児², 有働康代²

(¹ 北海道大学大学院 小児科, ² 北海道大学病院 臨床検査部)

【目的】Angelman 症候群 (AS) は精神遅滞, てんかん等を来す遺伝性疾患で, 15q11-q13の母性発現遺伝子UBE3Aが原因遺伝子である。発現機序には15q11-q13欠失, 父性片親ダイソミー, 刷り込み変異, UBE3A変異がある。15q11-q13にはGABRB3が存在し, 欠失例では中枢神経

におけるGABA receptorの発現に異常を認める。遺伝学的に診断されたAS症例において, SEF所見を検討した。

【方法】AS患者9例 (6~27歳: 欠失例7例, 刷り込み変異例1例, UBE3A変異例1例)で, 正中神経刺激によるSEFを204ch全頭型脳磁計にて測定した。

【結果】：欠失例では全例 N1m 頂点潜時が平均 32.1ms と遅延し、その onset は約 20ms で中潜時までなだらかな 1 峰性の波形を呈した。刷り込み変異例では、N1m は軽度遅延し、後期成分は増大していた。UBE3A 変異例では正

常反応を認めた。結論：AS における SEF は特に欠失例で特徴的な異常を認め、中枢神経活動の病態を示していること示唆された。

(5) マウス用脳磁図・心磁図計測システムの開発

小野弓絵¹, 白井健吾¹, 中村 祐¹, 葛西直子², 石山敦士¹

(¹早稲田大学大学院 理工学研究科 電気・情報生命工学専攻, ²産業技術総合研究所)

近年、脳神経・循環器疾患の機序解明や早期予防法の確立を目的として、遺伝子改変技術を応用した種々の疾患モデルマウスが作製されている。これらの疾患モデルマウスに対する脳磁図・心磁図等の生体磁気計測は、ヒトと同じモダリティに表れる疾患情報の知見を与えるものとして重要だと考えられる。我々は、高感度、高空間分解能を備えたマウス用生体磁気計測システムを開発した。体躯の小さいマウスの脳や心臓から発する電気生理

学的信号を高空間分解能で計測するため、有効直径 0.3mm のマグネットメータを用いた。また、デュワー底部と検出コイルとのリフトオフ距離を 0.7mm とすることで、空間分解能と磁気感度の向上を図った。本システムの最小空間分解能は 0.5mm であり、ノイズレベルは $1.3\text{pT}/\sqrt{\text{Hz}}$ (10Hz~10kHz)であった。実際にマウスの心磁図・脳磁図計測実験を行い、本システムの有用性を検討した結果について発表する。

(6) 統計的基準による MEG 順モデル選択

吉岡 琢¹, 佐藤雅昭^{1,3}, 梶原茂樹², 外山敬介²

(¹ATR 脳情報研究所, ²島津製作所 基盤技術研究所, ³科学技術振興機構 CREST)

MEG 逆問題は一般に解が一意に定まらない不良設定問題であり、何らかの事前知識を導入することに解を定めている。事前知識の一つとして、MRI 画像から抽出した皮質上に電流双極子を配置する方法がある。このとき SQUID センサの位置と頭の位置の関係が計測誤差などにより正しく計測されていない場合、誤った順モデルを用いて逆問題を解くことになり、その結果推定した脳活

動部位もずれてしまう。我々は変分ベイズ推定を用いて MEG 逆問題を解く方法を提案している。変分ベイズ推定では自由エネルギーにより順モデルを統計的に評価することができる。自由エネルギーを用いることにより、センサと頭の位置関係のずれを補正できることをシミュレーションによって示す。

(7) 複数信号源の時間相関に対してロバストな Beamformer 法の開発

栗山紘明¹, 星野大介¹, 中村 祐¹, 白井健吾¹, 小野弓絵¹, 石山敦士¹, 葛西直子²

(¹早稲田大学大学院 理工学研究科 電気・情報生命工学専攻, ²産業技術総合研究所)

聴覚反応や視覚反応などが混合している MEG データにおいて、全ての反応が同時刻にピークを迎えることは

まれであり、Multi-Dipole Fitting やノルム最小化推定などの Non-Adaptive な推定手法では時間的に安定した解を得

ることが難しい。そこで我々は、データの時間変化を推定に考慮する Adaptive な空間フィルタ法である Beamformer 法について研究している。Beamformer 法は、時間的に安定した解を得ることができ、またノイズにも強いというメリットを持つので非常に有用な方法である。しかし、信号源間に時間相関が存在すると推定解が干渉してしまい、歪んだ時間変化が求まってしまうというデメリット

がある。そこで、データ共分散行列の信号空間固有ベクトルを個々の成分に分解することにより、時間相関成分を除去する手法を試みた。この手法により、MEG データに含まれる複数の反応がいかなるピーク時刻を持っていても、Beamformer 法を用いて信号源を推定することが可能となり、時間的に安定した解を得られることを示せた。

(8) 脳磁図の空間時間的クラスタリングを用いたモデル次数推定

星野大介¹, 栗山紘明¹, 白井健吾¹, 中村 祐¹, 小野弓絵¹, 石山敦士¹, 葛西直子²

(¹早稲田大学大学院 理工学研究科 電気・情報生命工学専攻, ²産業技術総合研究所)

これまでに多くの脳磁図の複数信号源推定手法が提案されている。複数信号源推定手法は優決定的手法と劣決定的手法に大まかに分類でき、このうち計算磁場と測定磁場の間に誤差を許容する優決定的手法はノイズの影響を受けにくく、S/Nの低い脳磁図の信号源推定に適すると考えられる。しかし、優決定的手法では信号源の数を事前に仮定する必要がある。そこで、我々は優決定的信号源推定手法の適切な使用を可能にするために、空間時

間情報を利用したクラスタ分析と主成分分析を組み合わせた信号源数推定手法を開発した。提案手法は二つのステップに分かれており、第1ステップではクラスタ分析により空間的時間的に近い波形をグループ化し、第2ステップにおいて各グループでの信号数を求めることにより、最終的に全体の信号源数を求める。今回は、提案手法をシミュレーションデータ及び聴覚刺激実データに適用したので、その結果について検討する。

(9) 母音刺激による誘発磁場 N1m の検討

尾形エリカ, 湯本真人, 伊藤憲治, 関本荘太郎, 狩野章太郎, 伊藤 健, 加我君孝

(東京大学大学院 医学系研究科 脳神経医学専攻 感覚・運動神経科学講座)

健聴者8名を対象とし、母音刺激による誘発磁場を204チャンネル全頭型脳磁計を用いて計測した。女性話者の発話による日本語5母音を擬似ランダムに両耳提示し、/e/でボタン押しをするよう教示し、各母音250回以上加算した。/e/を除く各母音に対する誘発磁場 N1m の局在推定を行い、局在推定座標に対し半球毎に分散分析を行った所、各母音間で有意な差は認められなかった。更に、母音間の局在推定座標の乖離が大きかった1名の被験者に

対し、同様の計測を反復して6回施行した。その結果、左半球では、/o/は/u/より約2mm前方、/a/, /o/は/i/, /u/より約5mm上方にあった。右半球では、/i/は/a/, /o/より約5mm内側、/i/, /o/は/u/より約5mm前方、/a/, /o/は/u/より約8mm上方にあった。局在推定座標は個人間では一定の傾向は見られなかったものの、個人内での再現性が示唆された。

(10) 音声ミスマッチング課題の MEG のフラクタル次元解析

金子 裕, 岡崎光俊, 湯本真人

(国立精神・神経センター武蔵病院 脳神経外科・臨床検査部,
国立精神・神経センター武蔵病院 精神科, 東京大学医学部附属病院検査部)

ひらがなを先行して視覚呈示し, これを読み上げる際に 15% の確率で間違えて読み上げるといった音声ミスマッチング課題を行った。Neuromag 社製 204 チャンネル脳磁計を用いて MEG を測定し, MATLAB を用いて解析した。周波数解析を行う一方, フラクタル次元の解析を行った。フラクタル次元は波形の複雑性を表すパラメータである。

右利きの 9 名の健常ボランティアを被検者に実験を行

った。周波数解析で聴覚野近傍で左右差が得られたのは 2 名のみであった。一方, フラクタル次元解析では 5 名で聴覚野近傍で左右差が得られ, その内容は 300-500msec 付近で incongruent のフラクタル次元が低下 (単純化) するというものであった。周波数解析で明らかにならない変化でもフラクタル次元解析で明らかにできる可能性が示され, また, 言語機能の左右差を求める一つの方法となることも示唆された。

(11) 音の高さ (ピッチ) の明瞭性に関わる脳磁界反応

添田喜治, 中川誠司, 外池光雄

(独立行政法人 産業技術総合研究所 人間福祉医工学研究部門 暮らし情報工学グループ)

音の高さ (ピッチ) は, 音声認識や音楽の知覚において重要な要素である。本研究ではピッチの明瞭性に注目し, 繰り返しリプル雑音を用いて脳磁界計測を行った。繰り返しリプル雑音とは, 雑音信号を遅延し, もとの信号と加算する過程を N 回繰り返すことによって作る信号である。遅延時間に対応したピッチが知覚され, その明瞭性は繰り返し数 N に伴い増加する。本研究では繰り返し数 N を 0, 1, 4, 16 で変化させた。刺激は, 継続時間 0.5 s,

刺激間隔 1.5 s でランダムな順序で呈示し, 各刺激について 50 回以上の加算平均を行った。被験者は, 聴覚健常者 10 名で, 計測中は映画 (音声なし, 字幕付き) を見るように教示した。解析の結果, 繰り返し数 N が増加するほど N1m 振幅は大きくなる傾向が見られた。N1m 潜時, 信号源推定により求めたダイポールの位置に関しては, 繰り返し数 N の変化に対応する反応は見られなかった。

(12) 聴性 40Hz 応答がもたらす位相同期の検討

田中慶太, 川勝真喜, 阿部雅也 (東京電機大学)

連続的あるいは定常的な聴覚刺激により, gamma 帯域 (約 40Hz) 応答を出現することが確認されている。それには一時的な 40Hz 応答と steady-state 応答に分類され, 一時的な 40Hz 応答は注意に対して関連する。しかし, Auditory Steady-State Response (以下 ASSR) の機能的意味は明確になっていない。そこで本研究ではヒトが聴覚刺激に注意しているとき, そうでないときの ASSR の聴

覚刺激に対する位相同期を調べることで ASSR の注意に対する影響を検討した。その結果, ASSR は刺激時に非注意条件に比べ注意条件において, 刺激波形に位相同期することが確認された。このことから ASSR は, 聴覚刺激周波数 (40Hz) への位相同期が注意に関連することを示唆する。

(13) 気体刺激のリアルタイムモニタリングによる嗅覚誘発電位・磁場の同時計測

秋山幸代^{1,2}, 斉藤幸子¹, 後藤なおみ¹, 小林剛史^{1,3}, 小早川達¹

(¹産業技術総合研究所 脳神経情報科学部門, ²日本体育大学, ³文京学院大学)

本研究は、我々のグループで開発した超音波ガスセンサーを用い、気体刺激をリアルタイムにモニターすることによって誘発された嗅覚誘発電位と脳磁場を同時に計測し、検討することを目的とした。ニオイ刺激は Kobal 式の嗅覚刺激装置を用い、被験者の右側の鼻孔に提示した。ニオイ物質にはバニリンを用い、刺激提示時間は 200 ms, 刺激間隔は 40s として 30 回提示した。得られた誘発電位から従来の嗅覚刺激装置の電磁弁が開いた時点

および、超音波ガスセンサーの出力が最大の 70% を超えた時点をオンセットとし、それぞれ加算し比較した結果、後者において各成分のピーク潜時が早かった。また、誘発電位の各成分に対応する潜時において脳磁場でも応答が認められた。活動部位の推定を行った結果、島皮質や上側頭溝に活動が観察された。以上から、これまでに報告されている嗅覚誘発電位の各成分の潜時は、再考する必要がある事が示唆された。

(14) 高濃度食塩水による三叉神経応答の有無

小見山彩子^{1,2}, 池田 稔², 斉藤幸子¹, 後藤なおみ¹, 小早川達¹

(¹産業技術総合研究所 脳神経情報科学部門, ²日本大学医学部 耳鼻咽喉科学教室)

味覚障害の中には医療用の味覚検査キット(テーストディスク)の 4.32M の食塩水を知覚できないケースがある。その場合でも患者がピリピリ感や温覚などを訴えない。一方でラットを用いた実験では 0.4M 以上の食塩が鼓索神経の他に三叉神経も活動させることが報告されている。食塩がどの濃度でヒトの三叉神経を刺激するかについては不明であり、この解明には鼓索神経と三叉神経の活動の分離を行う必要がある。健常者を用いた実験では鼓索神経経路の応答と三叉神経経路の応答の区別は困

難である。そこで我々は真珠腫性中耳炎の手術のため両側鼓索神経を切断された被験者を用いた。本被験者の舌の先端に刺激を行った場合、刺激に対する応答が鼓索神経経路で伝えられないことが保証され、純粋な三叉神経の応答計測が可能である。

この被験者に対し高濃度(3M)の食塩水を舌の先端に提示を行い、三叉神経刺激による応答が出現するか脳磁場計測を行うことで検討した。

(15) 脊髄誘発磁界測定の実況報告

富澤将司(東京医科歯科大学 整形外科)

我々は磁界計測による脊髄機能診断法の確立に向けて研究を進めている。2001 年度の本研究会において、ネコの上行性脊髄誘発磁界を測定することで脊髄障害部位診断が可能なること、脊髄内伝導路をマッピングすることができたことを報告したが、今回はウサギ末梢神経を刺激しその髄節高位でのシナプス活動をとらえることができ

たこと、ウサギ脊髄の 3 次元成分の磁界を測定し、神経周囲に生じる体積電流による磁界を含め電流源の時間的・空間的経過を 3 次元的に把握することが可能であったので報告する。

また、臨床応用としてヒト頸髄での誘発磁界測定に成功したのであわせて報告する。

(16) 指先電気刺激による体性感覚の感覚的強度と MEG 信号強度の比較

川西雄一郎, 井口義信, 多喜乃亮平, 根本正史, 木村友昭, 関原謙介, 橋本 勲
(東京都立科学技術大学大学院 工学研究科 システム基礎工学専攻)

本研究では, 感覚閾値上の指先電気刺激 (示指, 示指と中指の2本指同時刺激, 示指・中指・薬指の2本同時刺激) によって誘発された体性感覚誘発脳磁界を計測し, 体性感覚の感覚的強度と MEG 信号強度の対応を調べた。MEG の信号強度には, 得られた磁気信号のピーク時における各センサ値の二乗平均若しくは信号源推定による推定信号強度を用い, 感覚的強度には, ヒトの主観的な感覚量を表すマグニチュード推定値を用い, 2本同時刺激

の際に感じる強度を標準刺激として, この刺激に対する感覚量を 10 とした時の主観的感覚量を任意の数字で報告させた。そして, 指の本数を標本の大きさ n , MEG の信号強度を標本 X_n , 感覚的強度を標本 Y_n とし, 被験者 (健康な男女 7 名 (年齢 18-42 歳)) ごとの 2 次元標本分布を求め, 相関を取って比較・検討を行った結果, $N50$ において平均で標本相関係数 $r_{xy}=0.988$ という高い値を得ることができた。

(17) 体性感覚野での階層的情報処理

乾 幸二, 柿木隆介 (生理学研究所)

【目的】サルを用いた単一細胞記録や解剖学的連絡の研究は体性感覚野での階層的処理様式を示唆しているが, 各皮質活動の時間的關係を検討した研究は少ない。本研究ではヒト触覚情報の皮質内処理様式を検討した。

【方法】健康成人男性 13 名の左手背皮膚表面に電気刺激 (感覚閾値の 3 倍) を与え, 右半球から 37 チャンネル脳磁計 (Bti) を用いて誘発磁場を記録した。記録磁場は多信号源解析ソフト, BESA を用いて解析した。

【結果】右半球の 3b 野, 4 野, 1 野, 5 野および第二次体性感覚野 (SII) 領域に活動が認められ, それぞれの立ち上

がり潜時は 14.4, 14.5, 18.0, 22.4, 21.7 ミリ秒であった。

【考察】3b 野と 4 野の活動潜時に差はなく, 両者が視床からの投射により活動したものと考えられた。3b 野-1 野間, 1 野-5 野間の潜時差はそれぞれ 3.7 ミリ秒, 4.4 ミリ秒であり, これらの部位の連続的活動を示唆した。SII の活動は 3b 野よりも 7.3 ミリ秒, 1 野よりも 3.7 ミリ秒遅く, 第一次体性感覚野 (SI) - SII 間の連続的活動を示唆した。

【結論】ヒト触覚情報処理の早期過程では, 中心後回を後方へ向かう経路と SI から SII へ向かう経路の少なくとも二つの階層的処理経路が存在する。

(18) 縦書き, 横書きの文字および視覚刺激に関する脳磁場研究

山川恵子¹, 伊藤憲治¹, 湯本真人², 狩野章太郎³, 加我君孝^{1,3}

(¹ 東京大学 医学部 認知・言語医学, ² 東京大学医学部附属病院 検査部,

³ 東京大学医学部附属病院 耳鼻咽喉科)

縦書き, 横書き表記された単語, シンボル, ラインを中心視野に提示し, 視覚誘発脳磁場の比較を行った。全頭および左右側頭部の被験者全員の RMS (Root Mean Square) を算出し, およそ 5ms 毎に縦・横×刺激の種類 (2×3) の分散分析を行い, 条件ごとの反応における有意

差を検討した。その結果, 刺激提示後約 140ms から 400ms までの間に単語の処理において出現する刺激提示後 150ms あたり, 180-190ms あたり, 250ms あたり, 380ms あたりをピークとする 4 つの成分が観察された。中でも 180-190ms の反応については, 縦書きの方が信号強度が

強く、潜時も遅かった。また電源推定の結果では、この成分の反応は左右紡錘状回に求められた。縦書き文字の処理が横書きに比べ困難なこと、また縦書きと横書きの

書式の弁別にはこの時間帯の紡錘状回が関わるのが、これらの結果から示唆された。

(19) 音高と音韻の視聴覚間照合の脳磁場：音楽家 vs 非音楽家

湯本真人¹，伊藤憲治²，宇野 彰³，狩野章太郎⁴，斉藤 治⁵，金子 裕⁶，松田真樹⁷，加我君孝⁴

(¹東大病院検査部，²東大医学部認知・言語医学，³筑波大学人間総合科学，

⁴東大病院耳鼻咽喉科，⁵国立精神神経センター武蔵病院精神科，

⁶国立精神神経センター武蔵病院脳外科，⁷東京芸大大学院音楽研究科)

音楽家，非音楽家各8名を対象とし，視聴覚間音高・音韻照合を課した際のMEGを204ch全頭型脳磁計により記録した。音高課題は1オクターブ内12音のランダム音列（音韻課題はカナ9字のランダム文字列）を用い，楽譜（文字列）を視覚提示した上で音高（音韻）逸脱（約13%）を含む聴覚刺激を每秒1音の速度で提示し，被験者に視聴覚間不一致に注意して聴くよう教示した。聴覚刺激の立ち上がりをトリガに，視聴覚間の一致音，不一

致音別に誘発脳磁場を加算平均した。楽譜（文字列）を視覚提示せず，聴覚刺激のみに対する反応を予め記録した。MCE (Minimum Current Estimates) 法および電流双極子法を用いて電源解析した結果をMRIに投影し評価した。音楽家に対する音高課題のみ，聴覚誘発N1mの振幅が視覚提示により顕著に低下し，逸脱課題により頭頂に誘発される活動の音高，音韻課題間の局在の相違が確認された。

(20) 言語流暢性課題遂行時のβ帯域活動の相互相関

志々田一宏¹，橋詰 顕²，上田一貴¹，山下英尚¹，岡本泰昌¹，栗栖 薫²，山脇成人¹

(¹広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 精神神経医科学，

²広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 脳神経外科学)

【目的】：言語流暢性課題施行中に，Broca野などにおいてBOLD信号上昇，β帯域活動の脱同期が見られる。Broca野が他の領域とどのような関連性を有しているのかを相互相関を用いて調べた。

【方法】被験者にひらがな1文字を呈示し，その文字で始まる名詞を想起させ，そのときの脳磁場を204ch脳磁計にて記録した。個人毎に合わせたβ帯域でバンドパスし，グラジオメータの1対ごとに絶対値を平均し，さらに移動平均を行った。刺激呈示前後の1秒間を抽出し，約30

回の試行を連ねてセンサーごとにベクトルとした。3-D構築したMRIにてBroca野に最も近いセンサーを選択し，他のセンサーとの間の相関係数を計算した。

【結果】刺激提示後，Broca野近傍のセンサーとの相関係数は一旦低下し，その後，個人差が見られたが，500ms～2000msにおいて近傍のセンサーとの相関係数が高まる例があった。

【考察】言語流暢性課題におけるBroca野の役割を示唆すると思われた。

(21) 視覚認知における先行刺激の影響；周波数解析を用いた検討

岡崎光俊（国立精神・神経センター武蔵病院 精神科）

だまし絵（2通りの絵に見えるあいまいな絵）をより具体化した2種類の絵を先行刺激として呈示したときに得られる2条件において、Neuromag社製204チャンネル全頭型脳磁計を用いて、それぞれ周波数・統計解析を行った。スペクトログラム上健常被験者12名中11名で潜時300-350ミリ秒・後頭-頭頂領域をピークとする20-40Hzのガンマパワー値の上昇を認めた。さらに潜時250-500ミリ秒で統計的有意差の得られたチャンネルを空間的にマッピングしたところ、 α 、 β 、 γ の各周波数帯

域で後頭-頭頂-後側頭領域に有意差が認められた。一方、同じ潜時における誘発磁場では2つの刺激間に明らかな差を認めなかった。潜時300ミリ秒付近の後頭領域に出現するガンマバンド活性は知覚の統合や表現および記憶における情報の維持に関係していると考えられており、今回の我々の結果は、形態的に同一の視覚刺激が先行刺激の影響を受けて後続する刺激が脳内で異なる処理を受ける可能性があることを示唆している。

(22) 刺激間隔における $1/fn$ ゆらぎの視覚誘発脳磁図反応に対する影響の検討原田暢善，中川誠司，岩木直，山口雅彦，外池光雄
（産業技術総合研究所 人間福祉医工学部門）

視覚刺激間隔における $1/fn$ ゆらぎの視覚誘発脳磁図反応に対する影響について検討を行った。刺激間隔に、 $1/f_0$ 、 $1/f_1$ 、 $1/f_2$ 、および $1/f_\infty$ （一定間隔）のゆらぎを導入し、平均刺激間隔を600msとし、視覚誘発脳磁図反応の加算平均波形に対するゆらぎのべき乗 n の影響について検討を行った。後頭領域において、加算平均波形の約100msの成分の振幅が標準刺激および比較刺激において、 $1/fn$ ゆらぎのべき乗 n の増加とともに増加する傾向

が観察された。これまで刺激間隔における $1/fn$ ゆらぎの影響を聴覚刺激で検討した結果においては、約100msの成分の振幅は、 $1/fn$ ゆらぎのべき乗 n の増加とともに減少する傾向が観察されており、視覚刺激においては $1/fn$ ゆらぎのべき乗 n の効果が丁度逆になっていることが観察された。

結果を報告するとともに、これら現象について議論を行いたい。

(23) アルファ波電流ダイポールの左右半球間の位相差

川端啓介¹，内野勝郎²，村田和優³，外池光雄⁴（¹大阪府立大学，²平成医療学園，³藍野学園短大，⁴産総研関西センター）

昨年この研究会で演者らはpatriel部分にlocalなアルファ波を発見しその挙動を報告した。その要点は、(1)電流dipoleは左右の両半球に一個づつありアルファ波の周波数で振動する、(2)この振動には90度の位相差がある、(3)これらは等磁場ループマップ上に直接に且つ明確に示される、(4)このマップ上の優勢な方のdipoleの位置はsingle-dipole-modelにより求めたものと一致する、で

ある。2個のdipoleでありながら、single-dipole-modelが良く合うということは、90度の位相差があるので、一方が最大るとき他方は最小になる時間が存在することに依る。このようなdynamicsの直接観察はlocalなアルファ波の存在により初めて可能となった。よく知られている閉眼時に後頭部に現れるアルファ波については図から直接には判断できないが、single-dipole-modelにより上と同じ

ような左右交替が現れることを報告した。今回は、これが直接観察でも可能であることを報告する。側頭、後頭で上述のような従来報告されなかった dynamics が存在

することは、直接観察により確信を持って言える様になった。さて、この結果は脳がなぜ90度の位相差を選ぶかという興味ある問題を提出する。

(24) フィードバックシステム論的解析と正中神経刺激による誘発磁場について

岸田邦治¹, 篠崎和弘², 深井英和¹, 鶴飼 聡³, 石井良平³

(¹ 岐阜大学工学部 応用情報学科, ² 和歌山県立医科大学 精神医学教室, ³ 大阪大学大学院 医学研究科 神経機能医学講座)

【方法・目的】正中神経繰り返し刺激の誘発磁場データには繰り返し周期なる時間構造があるので、それを手掛かりにして誘発磁場を分離した。そのデータをフィードバックシステム論的手法で解析し、結果はこれまで2度報告した。今回は被験者数を増やした結果をまとめて報告し、その過程で気づいた以下の点について主に発表する。【考察・結果】加算平均波形の応答が機械的か否かに興味がある。数学辞典にもあるように Wold の分解定理とし

て定常過程が決定的か否かは大切な分類である。前者が確定性をもつことで加算平均波形として取り扱われて、後者が確率的であり、統計的にそのダイナミクスは相関関数で扱われる。フィードバックシステム論的手法は後者を取り扱っている。誘発磁場データから確定周期分を除去するとデータのガウス性が向上し、同定モデルの最小位相性も増し、報告済みの結果が補強された。

(25) Magnetoencephalography(MEG)-Beamformer 法をもちいた解析 —主に側頭葉てんかんを中心とした臨床症例の検討—

露口尚弘¹, 田中博昭², 下川原正博², 関原謙介³

(¹ 大阪市立大学大学院医学研究科脳神経外科学, ² 横河電機 MEG センター, ³ 東京都立科学技術大学電子システム工学科)

臨床の場合においては、脳機能マッピングやてんかん焦点の同定にたいし dipole model による解析が主に用いられる。誘発脳磁場のように局所に強い電流源が単一に集積しているような場合は信頼性が高いが、てんかんのようにならば広範囲での磁場活動があるような場合は dipole で判断するには困難な場合がある。今回の発表では側頭葉てんかんを対象を絞り dipole 解析と空間フィルタを用いた解析—adaptive beamformer 法—を比較した。症例は内側

側頭葉てんかんと診断された15例で、160チャンネルMEGにて頭蓋内脳波を同時記録し、二つの方法を用いて解析した。また一部の症例でSEFを施行し同様の解析をおこなった。その結果 beamformer 法を利用することにより dipole 法では解析できなかった異常磁場を検出することができたが、それが臨床的にどのような意味があるのかをSEFと比較しながら考察したい。

(26) 聴性誘発磁場 N100m に対するスペクトル包絡の影響

水落智美¹, 湯本真人², 狩野章太郎³, 伊藤憲治⁴, 山川恵子⁴, 加我君孝^{1,3}

(¹ 東京大学大学院 医学系研究科 感覚運動神経科学, ² 東京大学医学部附属病院 検査部,
³ 東京大学医学部附属病院 耳鼻咽喉科, ⁴ 東京大学大学院 医学系研究科 認知・言語医学)

音色の定常的な要素を構成し、音の重要な情報を伝えるスペクトル包絡の音処理への影響を明確にするために、3つのカテゴリー (vocal, instrumental, linear) のスペクトル包絡と、2つの基本周波数 (110, 220Hz) 以外は要素が全て一致した24種類の複合音を、無視条件下で両耳提示した時のN100mを記録した。各半球、各基本周波数、各スペクトル包絡に対するN100mのピーク潜時、

振幅、等価双極子の局在を分析した結果、潜時は220Hzより110Hzの方が長かった。振幅はvocal及びinstrumentalの方がlinearより大きく、この差は左半球で明白にみられた。双極子は両半球のHeschl回周辺に現れ、vocal及びinstrumentalの方がlinearより前方だった。以上よりスペクトル包絡の複雑さが、N100mに反映する音処理を特に左半球で増強する事が示唆された。

(27) 脳磁界応答から見た聴覚逆方向マスキング現象

阿部雅也, 川勝真喜, 田中慶太, 小谷 誠 (東京電機大学大学院 工学研究科)

先行する小さな音 (信号音: maskee) のすぐ後に大きな音 (マスク音: masker) が呈示された場合、小さな音が聞こえにくくなる。これを、聴覚逆方向マスキング現象という。今回、この逆方向マスキングに着目してペア音、マスク単独音の聴覚刺激に対する脳磁界反応を計測した。マスク音の大きさを変化させたときのペア音、マスク単独音の、刺激呈示後100ms付近のN1mピーク振

幅の影響を調べた。得られた脳磁界波形からペア音とマスク単独音を比較した結果、マスク音の大きさを大きくさせていくにつれてペア音とマスク単独音の波形相関は高くなるという結果がみられた。またマスク音を大きくさせていくにつれて潜時が短くなったことから、後続するマスク音の反応が徐々に支配的になっていくと考えられる。

(28) ミスマッチフィールドの計測による骨導超音波知覚特性の検討

中川誠司¹, 竹形理佳^{1,2}, 外池光雄¹

(¹ 産業技術総合研究所 人間福祉医工学研究部門,
² Department of Psychology, University of Helsinki)

骨導で呈示された20kHz以上の高周波 (骨導超音波) は重度感音性難聴者にも知覚される。また、骨導超音波を振幅変調することで、言語音や環境音の伝達までもが可能であることが報告されており、この現象を応用した重度難聴者用の補聴器開発が試みられている。本研究では、このような骨導超音波知覚の時間分解能の検証を目的として、刺激音持続時間の変化に対するミスマッチフィールド (Mismatch Field: MMF) の計測を行った。以下

の4種類のバーストを異なるセッションで呈示した:1kHz気導音 (AC), 30 kHz骨導超音波 (BCU), 1kHz正弦波で振幅変調された30kHz骨導超音波 (AM-BCU), 1kHzおよび12kHzを混合した気導音 (Complex-AC)。なお、刺激AM-BCUと刺激Complex-ACはほぼ等価なピッチを有している。各セッション内では、標準刺激 (持続時間75 ms, 出現確率85%) と3種類の逸脱刺激 (持続時間52.5 ms, 37.5 ms, および22.5 ms, 各刺激の出現確

率 5%) がランダムに呈示された。各逸脱刺激に対する MMF ピークにおいて、等価電流双極子 (ECD) を推定した。

MMF 強度 (ECD モーメント) にはセッション間の有意差が観察された (AC: BCU: AM-BCU: Complex-AC = 1.0: 0.53: 0.91: 0.92)。ピッチがほぼ等しい AM-BCU および

Complex-AC に対しては、ほぼ等しい大きさの MMF が観察されたことから、MMF は刺激の知覚メカニズムというより、聞こえの違いを反映していると考えられる。また、AM-BCU の MMF 強度は気導音の 90% 程度に達していることから、骨導超音波補聴器による聞こえが、実用的な時間分解能を有することが示唆される。

11. 高次脳機能研究の新展開

2005年1月17日-1月18日

提案代表者：高田昌彦（東京都神経科学総合研究所）

所内対応者：南部 篤（生理学研究所）

- (1) サル前頭前皮質における反応結果の再現 一過去の行動文脈と将来の時間予測—
辻本悟史（北海道大学）
- (2) 時間弁別課題遂行中のサル前頭前野の神経活動
生塩研一（近畿大学）
- (3) 連続眼球運動課題遂行中の前頭前野と基底核からの神経細胞活動
及びローカルフィールドポテンシャルの同時記録
藤井直敬（理化学研究所）
- (4) 報酬と嫌悪に基づく行動計画の線条体表現
山田 洋（京都府立医科大学）
- (5) サル頭頂連合野の CIP 野ニューロンによる，三次元曲面の表象
勝山成美（日本大学）
- (6) 視覚系における周期的同期発火の機能的意義の検討
雁木美衣（東京大学）
- (7) 運動性視床によるサッカード発現の時間調節
田中真樹（北海道大学）
- (8) MST ニューロンは空間内の動きをコードしている
稲場直子（産業技術総合研究所）
- (9) 皮質脊髄路損傷後における手指の巧緻運動の機能回復と脳の再組織化
西村幸男（生理学研究所）
- (10) 前頭前野から一次運動野への多シナプス性入力様式
宮地重弘（東京都神経科学総合研究所）
- (11) 顎運動に関わる神経回路の解析
畑中伸彦（生理学研究所）

【参加者名】

高田昌彦（東京都神経科学総合研究所），稲瀬正彦（近畿大学），泰羅雅登（日本大学），塚田 稔（玉川大学），丹治 順（東北大学），雁木美衣（東京大学），宮地重弘（東京都神経科学総合研究所），稲場直子（産業技術総合研究所），辻本悟史（北海道大学），生塩研一（近畿大学），山田 洋（京都府立医科大学），田中真樹（北海道大学），勝山成美（日本大学），藤井直敬（理化学研究所），海野俊平（日本大学），土師知己（日本大学），湯本直杉（東

京都神経科学総合研究所），榎本一紀（京都府立医科大学），奈良重俊（岡山大学），倉持真人（山口大学），一戸紀孝（理化学研究所），喜多 均（テネシー大学），山森哲雄（基礎生物学研究所），（以下，生理学研究所）伊佐 正，関和彦，吉田正俊，遠藤利朗，坂谷智也，熊谷愁子，西村幸男，武井智彦，南部 篤，畑中伸彦，橘 吉寿，知見聡美，窪田芳之，平井康治，小川 正，小松英彦，鯉田孝和，松本正幸，伊藤 南，松茂良岳良，橋本章子

【概要】

われわれは行動する際，視覚・聴覚・体性感覚などの外部（感覚）情報や学習・記憶・情緒などの内部（自己）情報に基づいて，もっとも適切な運動あるいは動作様式

を選択，決定，実行する。日常的に設定されたさまざまな行動目標を達成するため，脳はこれら多種多様な情報を状況に応じて有機的に統合し，運動情報として運動野

に出力しなければならない。また、物を掴む、腕を伸ばすなど、われわれが日常的に行う個々の動作は、長年にわたる経験や習慣に基づき脳内で形成された運動プログラムに従って、ほとんど無意識のうちに実行されている。状況に応じて意識的かつ目的のある特定の行動を企画、遂行しようとする際、脳はそれまでに学習、獲得してきた無数の運動プログラムや認知・思考パターンの中から状況に最も適合したものを選び出し、それらを時系列的に順序よく組み合わせて、まとまりのある一連の行動として出力しなければならない。しかし、このような行動の組織化の神経機構については未だ明らかになっていない。

すなわち、脳科学は本来、脳機能をシステムとして理解し、究極的には“個体の組織化された行動発現のメカニズム”の解明をめざす学問領域である。しかし、現在の脳科学は、研究の進展とともに、研究テーマがそれぞれの専門分野ごとに細分化されるようになった結果、個々の分野の研究者がカバーあるいはフォローできる学

問領域も狭小化し、各専門分野を横断的かつ統合的に捉え、相互理解を深めることがきわめて困難な状況になってきた。個々の研究領域にのみ注目していると、個体としての脳機能の全体像を見失う恐れがあり、生命現象を統合的に理解しようとする脳科学の基本的立場に基づいた研究姿勢が必要不可欠である。したがって、“個体レベルでの高次脳機能を系統的に理解する”ためには、要素としての個々の神経機構を詳細に解析するだけでなく、それらを統合的に機能させる神経システムの解明が重要であり、そのような視点から研究が展開されなければならない。

「高次脳機能研究の新展開」と題した本研究会では、神経解剖学、神経生理学、分子生物学、情報工学など、多岐にわたる専門分野の若手あるいは中堅の研究者が、運動、感覚、認知、及び情動の各分野に関する最新の知見を紹介し、各分野における研究の趨勢、問題点、及び今後の展開に関して討論を行った。

(1) サル前頭前皮質における反応結果の再現 —過去の行動文脈と将来の時間予測—

辻本 悟史 (北海道大学大学院医学研究科 高次脳機能学分野)

私たちは、あらかじめ決められた行動を繰り返すだけでなく、状況に応じて柔軟に行動を制御することができ。前頭前皮質の背外側部 (DLPFC) は、このような認知能力に必須であると考えられてきた。しかしながら、そのシステム的理解はあまり進んでいない。本研究では、この問題にアプローチするために、報酬情報に注目して一連の実験を行った。

まず、報酬獲得までの行動文脈が獲得後の活動によって如何に再現されるかを調べるために、記憶誘導性と視覚誘導性のサッカド課題を遂行中のサル DLPFC からニューロン活動を記録した。これらの課題では、サッカドの後すぐ (0.5 秒後) に報酬が与えられる条件と遅れて (2 秒後) 与えられる条件が 50%の確率でランダムであり、サルは報酬のタイミングを予測できなかった。その結果、多くのニューロンのサッカド後の活動がサッカドの方向と報酬有無の両方に影響を受けた。また、これらの多くは、そのような活動を記憶誘導性あるいは視覚誘導性のいずれか一方の課題のみで示した。すなわ

ち、これらのニューロンの活動は、直近の過去の3つの要因、(1) 反応に用いた情報 (記憶 or 視覚)、(2) 反応の方向、(3) 反応結果 (即時 or 遅延報酬) に影響を受けた。これらの結果は、DLPFC のニューロン群が反応結果を行動文脈依存的に再現することを示唆する。

続いて、将来の報酬が‘いつ’獲得できるかという時間的予測のニューロン機構を調べるため、記憶誘導性サッカド課題をさらに改変し、視覚刺激によって報酬のタイミングを予測できるようにした。そうすると多くのニューロンが、視覚刺激提示中および遅延期間中に、報酬の予測時間に依存して異なる活動を示した。これらのニューロンの中には、一方よりも‘早い’または‘遅い’といった相対的な時間を反映するものと、‘0.5 秒’や‘2 秒’といった絶対的な時間を反映するものが存在した。これらにより DLPFC のニューロン群が将来の報酬の相対的および絶対的な時間予測を再現することが示唆される。

過去の反応結果の文脈依存的再現は、状況に応じた適切な行動を発現するために役割を果たすと考えられる。

また、将来の報酬の時間的予測は、反応の選択のみならず、反応結果（報酬）を行動文脈と結びつけるためにも役割を持つかもしれない。このように DLPFC は、動的に変

化する環境に柔軟に適応するための神経基盤を有するようである。

(2) 時間弁別課題遂行中のサル前頭前野の神経活動

生塩 研一, 千葉 惇, 稲瀬 正彦 (近畿大学医学部第一生理)

時間認知の神経機構は、いま注目を集めているテーマである。これまで、心理学的行動実験やヒトのイメージング実験などにより、認知モデルの提案や時間情報処理に関わる領野の推測もなされてきた。しかし、十分な理解に至らず、ユニット記録実験が切望されていた。最近、そのユニット記録実験として、サルの頭頂葉や前頭前野から神経活動を記録した実験がいくつか報告され始めた。我々は、独自の時間弁別タスクでサル前頭葉のユニット記録実験を進めており、実験で得られた結果のいくつかを紹介する。

2 頭の雄のニホンザルを用いた。サルには呈示時間が異なる 2 つの視覚刺激 C1 と C2 (青か赤の四角形) を引き続いて呈示した後、長い時間呈示された方を選択するように訓練した。それぞれの視覚刺激の後には遅延期間 D1 と D2 を設けた。サルの成績が充分に良くなった時点で、前頭葉からユニット記録実験を行った各ニューロンの各期間 (C1, D1, C2, D2) について、C1 が長い試行群と

C2 が長い試行群との間での神経活動を比較した。その結果、あるニューロンは C1 と C2 のいずれが長いかに関わらず C1 の開始から一定の時間後に phasic に発火した (基準時間をコード)。他のニューロンは C1 が長い試行の D1 のみで有意な活動を示し (C1 が長いことをコード)、また別のニューロンは C1 が長い試行の C1 と C2 が長い試行の C2 で有意な活動を示した (長い刺激をコード) など、時間情報処理に関わる複数のタイプのニューロングループを見出した。

ユニット記録実験から、前頭前野には基準の時間をコードするニューロンやその基準と比較した結果をコードするニューロンがあり、それらが時間弁別課題の遂行に関わっていると考えられる。サルはトレーニングの過程で視覚刺激呈示時間の長短を区別する基準の時間を設け、まず C1 が長いかどうかを判断する戦略を獲得したと推測される。

(3) 連続眼球運動課題遂行中の前頭前野と基底核からの神経細胞活動及びローカルフィールドポテンシャルの同時記録

藤井 直敬 (理化学研究所・象徴概念発達研究チーム)

脳は外界から受け取る情報の様々な側面を、多数同時に抽出し、それを統合することで、高度な認知機能を実現している。その情報処理機構は、解剖学的結合から見ると、非常に複雑な情報処理ネットワークをベースに行われていることは明らかである。しかしながら、脳の最も重要かつ、不可欠な、そのネットワーク機能という側面から、脳機能を明らかにしようという試みは未だあまり成功していない。一つには、解剖学的に結合している複数の領野を同定し、その特定の領野から記録すること

が、著しく難しいこと。また、たとえその記録に成功しても、記録できる神経細胞活動の数が少ないため、記録されたデータにサンプリングバイアスが強くかかる可能性があるためである。今回の報告では、脳のネットワーク機能の一部として、前頭前野—基底核ループを取り上げ、神経細胞活動の記録と合わせて、ローカルフィールドポテンシャル (LFP) の記録を同時に行い、前頭前野、基底核の課題遂行中の機能的結合様式を明らかにする。

(4) 報酬と嫌悪に基づく行動計画の線条体表現

山田 洋, 松本直幸, 木村 實 (京都府立医科大学)

線条体は従来より動機づけから行動の計画・発現へと到る過程に重要な役割を果たすことが示唆されているがそのメカニズムは十分明らかではない。報酬と嫌悪に基づく行動発現課題を遂行中のサルは線条体から電気生理学的に同定される PANs (投射細胞) と TANs (コリン作動性介在細胞と推定) の活動を記録し、動機づけから行動計画とその発現過程における PANs と TANs の役割を検討した。サルは手元のレバーを自発的に押して課題を開始し、GO 刺激を合図に素早くレバーを放すことが要求された。あらかじめ、レバー放しの後に報酬の水、ピープ音が与えられるのか、またはレバー放しが遅れると顔面へ空気が吹きつけられる (嫌悪刺激) ことを視覚刺激によって教示した。報酬条件でのレバー放しは反応時間が短く、エラーが少ないのに対して、嫌悪条件では GO 刺激が現れる前にレバーを離してしまうエラーが多かったことにより、サルは教示刺激によって動機づけ文脈を検出・識別して、文脈に対応した行動計画を行っていたことを確認した。

PANs は課題遂行中に現れるそれぞれの感覚運動事象に特異的に応答する様々なタイプのものが観察されたのに対して、TANs は動機づけの教示と GO 刺激に対してのみ応答した。TANs と PANs は共に報酬や嫌悪などの教示刺激の違いを区別して応答し、それに続く運動の実行直前には報酬が得られるかどうかを選択的に応答を示した。したがって、TANs と PANs は動機づけ刺激の検

出と識別を行い、それに続く動機づけに基づく行動計画と発現の初期の過程に重要な、固有の役割を果たすことが明らかにされた。一方、過去約 6 試行での報酬履歴から高い確率で報酬の教示が期待される試行では、サルは極めて素早く試行を開始して教示刺激の出現を待った。このことは、サルが各試行の開始から動機づけの教示までの間、過去の履歴に基づく報酬期待をもって臨み、教示刺激が実際に現れると教示された動機づけ文脈で行動計画を行っていたことを示す。課題開始のためのレバー押しと教示刺激の出現と関連する PANs の持続的な放電の増大は報酬履歴から予測される報酬確率と有意に相関した。一方、動物の行動も PANs の活動も嫌悪の履歴にはほとんど依存しなかった。教示刺激の提示以後のレバー放し、報酬やピープ音に関連する活動は履歴依存的ではなかった。

これらの実験から線条体の介在細胞である TANs は現在の環境から得られる感覚刺激のもつ動機づけ情報を検出・識別し、その情報を投射細胞である PANs に伝えることで、動機づけに基づく行動の計画から発現に貢献すると考えられる。一方、PANs は現在の環境から得られる情報に加えて、過去の経験から得られる情報、特に報酬履歴に基づいて行動の計画から発現に重要な役割を果たすと考えられる。

(5) サル頭頂連合野の CIP 野ニューロンによる、三次元曲面の表象

勝山成美¹, 長沼朋佳¹, 酒田英夫², 泰羅雅登³

(¹日本大・院・医・応用システム神経科学, ²聖徳栄養短期大, ³日本大・総合科学研究所)

サル大脳皮質の CIP (caudal intraparietal) のは頭頂間溝の外側壁後部に位置する視覚領野の一つである。これまでの研究によって、この領野のニューロンは空間内における軸や平面の傾きに特異的に反応することが示されており、また平面の傾きに特異に反応するニューロンの中には、ランダムドットステレオグラム (RDS) に加えて、スポットや線分などからなるテクスチャの勾配によって表現された平面の傾きにも反応するものが存在すること

が明らかとなっている。このようなことから、CIP 野は三次元物体の知覚にとって重要な領野であることが示唆されている。今回我々は、この領野のニューロンが軸や平面の傾きに加えて、三次元曲面の形状にも特異的に反応することを見出したので、報告する。

コンピュータグラフィックスにより、ランダムドットステレオグラムで表現した三次元曲面刺激を画面上に呈示し、曲面刺激を注視しているサルの CIP 野に微小電極

を刺入して、単一ニューロン活動を記録した。視覚刺激には、オランダの心理学者 J. J. Koenderink が提案した方程式によって表現される曲面を用いた。この方程式は、曲面の形状を規定する Shape index と、その最大視差を決定する Curvedness という 2 つのパラメータを用いて、さまざまな形状および凹凸の度合いをもつ三次元の曲面を表現するもので、Shape index が -1.0 から 1.0 の間を動く間に、刺激の形状が凹の球面→凹の円柱→鞍馬型→凸の円柱→凸の球面と連続的に変化する。今回の実験においては、9 つの Shape index と 3 種類の Curvedness による合計 27 種の曲面刺激を呈示した。

まず Shape index に対する反応では、9 つの Shape index に対する反応を Gabor 関数で近似したところ、多くのニューロンが高い相関係数を示した。Gabor 関数のピークを各ニューロンの最適 Shape index としたところ、それらが負の値（凹面を含む曲面）、0 の周辺（鞍馬型）および正の値（凸面を含む）をもつニューロンがそれぞれ得られた。しかし、最適 Shape index の分布は一律ではなく、0 から正の値に偏った分布を示した。複数の Curvedness

を呈示したニューロンにおいて、最適の Shape index を Curvedness ごとに求めて比較したところ、その値はよく一致していた。これらのことは、CIP 野のニューロンが三次元曲面刺激の形状に対して選択的に反応していることを示している。次に、それぞれの刺激を front parallel 面内で回転させた際の反応を調べたところ、約半数の Shape index 選択性 (SIS) ニューロンでは回転の角度によって反応が変化したが、残りの半分のニューロンでは刺激が回転しても Shape index に対する選択性が変化しなかった。このことは、CIP 野の SIS ニューロンが刺激の局所的な視差に反応しているのではなく、三次元曲面の形状そのものに応答していることを示唆している。最後に、一部の SIS ニューロンは、ランダムドットステレオグラムと同じ曲面形状を、二次元的なスポットの密度勾配で表現した刺激にも反応することが見出された。以上の結果は、サル CIP 野には視覚の手がかりによらない三次元曲面の表象が存在し、この領野が三次元物体の知覚に重要な役割を果たしていることを示唆している。

(6) 視覚系における周期的同期発火の機能的意義の検討

雁木美衣, 石金浩史, 本田祥子, 立花政夫

(東京大学大学院・人文社会系研究科・心理学研究室)

様々な神経系において、複数細胞が γ 帯域 (20-80 Hz) の周期的なリズムを伴って同時に発火する現象 (周期的同期発火) が報告され、その機能についての議論がなされている。視覚系においては、これらの同期発火がゲシュタルト的な知覚統合に関与するのではないかという仮説が提唱されているが、実際に視覚情報処理において機能的な役割を果たしているのかどうかは今なお明らかになっていない。

カエル網膜の OFF 持続型神経節細胞であるディミング検出器 (dimming detector) においても、複数細胞間の周期的同期発火が観察される。また、カエルは視覚誘発性の逃避行動を示すことが知られており、ディミング検出器は大きな影に対してよく応答することから、逃避行動との関連が示唆されている。そこで、ディミング検出器の応答を薬理的に操作し、逃避行動の変化を検討することで、周期的同期発火の機能的意義を検討した。

逃避行動は黒スポットが拡大する刺激をモニター上に呈示することで誘発できた。GABA_A 受容体の阻害剤である Bicuculline をカエルの眼球内に注入すると、逃避行動が強く抑制され、逆に GABA_C 受容体の阻害剤である TPMPA を注入すると逃避行動は促進された。またこれらの阻害剤を注入したとき、逃避行動以外の視覚誘発性行動である、矩形波縞に対する追従運動には影響がなかった。次に、剥離網膜標本を作製し、マルチ電極を用いてディミング検出器の応答を記録した。Bicuculline を灌流投与するとディミング検出器の周期的同期発火が抑制され、逆に TPMPA を灌流投与すると周期的同期発火が増強された。また、発火数、および同期発火数はいずれの阻害剤においても増加した。したがって、逃避行動と対応するのは周期的同期発火であり、周期的同期発火が逃避行動の誘発に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

(7) 運動性視床によるサッカード発現の時間調節

田中真樹 (北海道大学・医学研究科・認知行動学分野)

自発的に運動を行うためには、①どのような運動を、②いつ行うか、を決定する必要がある。運動の発現に関わるこれらふたつのパラメータが、ある程度異なった神経機構によって制御されている可能性が、最近の機能画像を用いた研究により示唆されている。特に後者の時間的調節には大脳皮質のみならず、大脳基底核や小脳が関与することが明らかになりつつあり、これは神経学的によく知られた Parkinson 病や小脳障害患者における運動開始異常の所見と一致する。運動の決定そのものが大脳皮質、とくに前頭葉皮質でなされることを考えると、これら皮質下中枢は自発的な運動のタイミングを調節するための情報を大脳皮質に供給していると考えられる。運動性視床は皮質下の情報を前頭葉皮質につたえる上行性経路として重要であり、本研究では同部がサッカード眼球運動発現の時間調節に関与しているかどうか、単一ニューロン記録と局所の破壊実験によって調べた。

従来の記憶誘導性サッカード課題では、運動の空間的な情報は記憶から読み出される必要があるが、運動のタイミングは固視点が消えることによって外部から与えられる (externally triggered 課題)。そこで、手がかり刺激が消えてから 800-1600 ミリ秒の期間内に自発的にサッカ

ードを行わせる internally triggered 課題を導入し、サルの前頭葉から記録された時間経過のことなる 2 種類の神経活動について検討した。

Externally triggered 課題の 1 秒間の遅延期間中にみられた buildup activity は固視点が消えた直後でピークに達した。この活動は遅延期間を 1.5 秒に延長してもそれ以上増加せず、固視点が消えると予測される時間にあわせて活動を上昇させていることがわかった。さらに同じニューロンが internally triggered 課題で運動に先立って活動を変化させた。一方、サッカードに関連した burst activity は視覚誘導性サッカードよりも記憶誘導性サッカードで大きな活動を示したが、多くのニューロンでは externally triggered 課題と internally triggered 課題で活動の大きさに差がなかった。

記録部位周囲に微量のムシモールを注入したところ、反対側に向かう記憶誘導性サッカードの潜時が延長し、その効果は internally triggered 課題で顕著であった。これらのことから視床は自発的に起こるサッカードの発現に関与することが示され、遅延期間中の buildup activity が運動のタイミングの調節に寄与する可能性が示唆された。

(8) MST ニューロンは空間内の動きをコードしている

稲場直子^{1,2,3}, 山根茂^{1,2}, 竹村文¹, 河野憲二^{1,4}

(¹産業技術総合研究所, ²筑波大学大学院, ³日本学術振興会, ⁴京都大学医学研究科)

我々の眼が視標を追いかけて動いているとき、背景で静止している物体であってもその網膜上の像は動いている。しかしながら、我々は、網膜像の動きが目の動きにより受動的に生じたものであるか、実際に物体が空間内で動いていることによるものかを区別して知覚することができる。このメカニズムを理解するために、我々は眼球運動遂行中のサルに動き刺激を呈示し、頭頂葉 MT 野 (middle temporal area) および MST 野 (medial superior temporal area) から単一ニューロン活動を記録した。眼球運動課題には、固視、記録したニューロンの適刺激方向

またはその反対方向への追跡眼球運動 (20deg/s) を用いた。サルの前面に置いたスクリーンにランダムドットパターンを投影し、-40~60deg/s (ニューロンの適刺激方向を正とする) の速度で動かすことにより、眼球運動遂行中のサルに動き刺激を与えた。MT ニューロンおよび MST ニューロンの動き刺激への反応を解析することにより、眼球運動中に生じた網膜像の動きに対し、どのような反応を示すかを調べた。その結果、ほとんどの MT ニューロンが網膜像の動きに応答するのに対し、MST ニューロンでは、網膜上では適刺激方向への動きがない条

件でも応答する、または網膜像が適刺激方向に動いていても、スクリーン上で動いていない場合には応答しないものが多く存在することが明らかになった。すなわち、MST ニューロンはスクリーン上での動き刺激の速度に

応答することが明らかとなった。この結果により、MST ニューロンは網膜座標上の速度をコードしているのではなく、空間内での速度をコードしているということが示唆された。

(9) 皮質脊髄路損傷後における手指の巧緻運動の機能回復と脳の再組織化

西村幸男¹, 伊佐 正¹, Sergei Perfiliev², 大石高生³, 肥後範行⁴, 村田弓⁴, 尾上浩隆⁵, 塚田秀夫⁶

(¹生理研・認知行動発達,²イエテボリ大学・生理,³京都大・霊長研・器官調節,
⁴産総研・脳神経情報,⁵東京都神経研・心理学,⁶浜松ホトニクス)

皮質脊髄路は霊長類において顕著に発達し、単シナプス性の Corticomotoneuronal Connection が見られるようになる。従来より、この単シナプス性の Corticomotoneuronal Connection の確立が霊長類において、precision grip などの個々の手指を独立に動かすことのできる「巧緻性」が発達した原因であると考えられてきた。この説はサルにおいて錐体路の切断が precision grip を恒久的に消失させるという実験結果 (Lawrence and Kuypers 1968 など) や多くのヒトでの臨床所見による。しかしこれらの皮質脊髄路の切断・損傷はいずれも延髄より高位で起きた事例である。近年、霊長類においても皮質脊髄路からの信号を 2 シナプス性に手指筋運動ニューロンに伝達する脊髄介在ニューロン (PN) が C3-C4 髄節に存在が報告された (Altermark et al. 1999)。従って、皮質脊髄路から運動ニューロンへの直接結合を断った際に、これらの PN 系によって手指の巧緻運動の機能代償が行なわれる可能性がある。そこで、我々は上肢による到達一把持 (precision grip) を訓練したサルにおいて脊髄 C4/C5 髄節で側索背側部を切断することで皮質脊髄路を完全に遮断し、かつ PN を介する伝達経路を残した場合に手指の巧緻運動がどの程度回復するのか、またその機能回復にはどのような中枢神経機構が作用しているか検討した。

6頭のマカクザル (ニホンザル4頭, アカゲザル1頭) において C4/C5 髄節で側索背側部を切断した。これらのうち切断が皮質脊髄路に局限していた 2 頭においては precision grip は切断後 1 週間以内に出現し、運動は 1 ヶ月程度でほぼ正常に近いレベルまで回復した。切断が側索全体に及んでいた 2 頭では precision grip の出現に 3-4 週間を要し、3-4 ヶ月で運動の回復がほぼ正常レベルに

達した。回復過程の初期において、把持の直前の preshaping が消失、第 2 指による接触の後第一指と二指の間隔を開けその後把持開始されるという所見が観察された。これらのサルの行動観察が終了後、 α クロロロースによる麻酔下で上肢筋運動ニューロンから細胞内記録を行い、反対側錐体路を電気刺激したところ、約半数の運動ニューロンで 2 シナプス性の EPSP が記録された。健康な動物では先行する IPSP のためにこのような 2 シナプス性の EPSP はほとんど記録されないことから、機能回復過程において 2 シナプス性の興奮性経路ないしはそれに対する抑制系に何らかの変化が生じたものと考えられた。

次にこの機能回復過程における大脳皮質など、より上位中枢で再組織化が起きている可能性を検討するため、3頭のサルにおいて上肢の到達一把持運動遂行中の Positron Emission Tomography による脳賦活イメージングを行なった。すると 1 ヶ月後には両側の一次運動野、体性感覚野、補足運動野、および切断の同側の小脳において顕著な活動の上昇が見られた。3 ヶ月後には両側の一次運動野と運動前野腹側部において活動の増大が残存した。また 1 頭のサルにおいて切断後 3 ヶ月に脳を灌流固定し、成長関連タンパク質の遺伝子発現を in-situ hybridization 法によって調べたところ、切断の反対側の一次運動野の手指領域および運動前野において切断の同側に比して GAP-43 の mRNA の発現量が 2 倍程度に増加していた。上記の結果から、皮質脊髄路切断後の機能代償過程において両側の一次運動野や運動前野など上位中枢において大規模な再組織化が起きている可能性が示唆された。

(10) 前頭前野から一次運動野への多シナプス性入力様式

宮地重弘 (東京都神経科学総合研究所・統合生理研究部門)

我々の日々の活動,特に外界の対象への操作において,上肢の運動はきわめて重要である。これはヒト以外の霊長類についても同様で,たとえばサル、の毛づくろい、餌の採集など巧緻な運動を必要とする操作は,すべて上肢を用いて行われる。このような巧緻な運動には,多くの認知情報が必要であると考えられる。このことは,大脳皮質の解剖学的構造にも反映されており,例えば一次運動野の体部位再現地図では上肢が他の体部位に比べて非常に広い領域を占める。補足運動野,前補足運動野など,より高次の運動関連領域では,この傾向はより顕著になる。では,行動制御の最高次中枢とされる前頭前野から運動野への入力はどうなっているのだろうか。運動野の上肢領域は,他の領域に比べて特に多くの入力を前頭前野から受けているのだろうか。また,上肢の中でも特に到達運動を行う近位部(肘,肩)と,到達運動のみならず,対象への操作に重要な遠位部(手,指)では,関連する前頭前野の領域が異なるであろうか。これらの点を明らかにするため,我々は,狂犬病ウイルスを逆行性経シナプス神経トレーサーとして用い,サル前頭前野から一次運動野への多シナプス性入力様式を調べた。

マカクザル一次運動野を電気生理学的にマッピングし,下肢領域,上肢領域全体,上肢近位部領域,あるいは上肢遠位部領域に狂犬病ウイルスを微量注入し,注入

後4日目に灌流固定,脳を摘出し,作成した薄切切片において免疫組織化学的にラベルの分布を解析した。その結果,上肢領域への注入では,下肢領域への注入に比べて非常に多く(約10倍)のニューロンが前頭前野各領域においてラベルされた。下肢領域からのラベルは主に内側前頭前野(内側9野,24/32野)に集中していたが,上肢領域への注入では内側部に加えて背外側前頭前野に強いラベルが見られた。近位上肢領域(肘肩領域)と遠位上肢領域(手指領域)への注入を比較すると,遠位領域への注入の方が多くの前頭前野ニューロンがラベルされた。また,近位領域への注入では背外側前頭前野背側部(外側9野および46野の主溝内部)のラベルが比較的多かったが,遠位領域への注入では背外側前頭前野腹側部(ventral convexity)に非常に強いラベルが見られた。

以上の結果は,前頭前野からの認知情報が,一次運動野の異なる体部位を再現する領域に,必要に応じて配分される構造的基盤があることを示唆するものである。すなわち,一次運動野上肢領域は下肢領域に比べ,視覚情報に基づく行動決定に重要とされる背外側前頭前野からの入力を強く受け,中でも物体の操作を行う遠位上肢領域は物の形態の情報を持つ背外側前頭前野腹側部から非常に強い入力を受ける。

(11) 顎運動に関わる神経回路の解析

畑中伸彦¹ 徳野博信² 宮地重弘³ 南部篤¹ 高田昌彦³

(¹生理学研究所 生体システム研究部門, ²東京都神経科学総合研究所 脳構造研究部門,

³東京都神経科学総合研究所 統合生理研究部門)

顎運動を制御する神経回路を調べるために,(A)マカクサル前頭葉に存在する4つの顎運動関連領域の入出力様式の解明と,(B)狂犬病ウイルスを用いたラット咀嚼筋へ投射する神経回路の多シナプス性解析,を行った。

(A)さまざまな報告によって,マカクサルの前頭皮質に,一次運動野顎領域(MI),補足運動野顎領域(SMA),皮質咀嚼野主部(CMaAp),皮質咀嚼野深部(CMaAd)の4

つの顎運動関連領域が存在することが知られている。これらの領域を皮質内微小刺激法により電気生理学的に同定し,逆行性,順行性標識物質を用いてその入出力様式を解明した。その結果,(1)皮質一線条体投射の終末は被殻の腹側部,尾側2/3レベルに投射しており,4つの顎運動関連領域はそれぞれ独立した投射部位を持っていた。MIは外側部に,SMAは内側を中心に投射しており,

中央部で投射領域の重なりが観察された。CMAp は内側に限局して投射しており、SMA との重なりが大きかった。CMAAd は最腹側部に投射しており、その他の領域と完全に分離していた。(2)皮質-脳幹投射において、MI, SMA, CMAp からの終末は主に、三叉神経運動核へ投射する介在細胞が多く存在する外側被蓋野に認められた。ただしMIとCMApは反対側性投射が主であったが、SMAは両側性投射を示した。CMAAdからの終末は内側結合腕傍核とKölliker-Fuse核に多く、他の領域と異なっていた。(3)視床-皮質投射において、MI, CMApへ投射している細胞はVLoとVPLoに多く、SMAへ投射している細胞はVApcとVLoに多かった。CMAAdに投射している細胞はVPMpcに多く認められた。(4)皮質間連絡において、MIとCMApは他のすべての領域から入力を受けていたが、SMA-MI, CMAAd-MIは一方方向性でMIからの投射は認められなかった。SMAとCMAAdの間には線維連絡がほとんどなかった。またMIはSIから、SMAはCMArから、CMApは7野から、CMAAdは味覚野や島皮質からの投射を、それぞれ強く受けていた。以上の結果より、大脳皮質顎運動関連領域は体性感覚、臓器感覚、味覚、視覚など、さまざまな神経情報を受け取り、大脳皮質-脳幹の直接的な経路と、大脳皮質-大脳基底核-脳幹の間接的な経路を介して顎運動を制御していることが示唆された。

(B)さまざまな動物で顎運動を制御する神経回路が研究されてきたが、開口あるいは閉口をそれぞれ制御する

神経回路についての報告は少ない。また、これまで大脳皮質顎運動領域を皮質内微小刺激すると、開口運動が優位に生じ閉口運動は殆ど観察されないことが報告されている。このことは、一次運動野において開口筋と閉口筋の領域が均等に再現されていないことを示唆している。そうだとすれば、大脳皮質からの情報は、脳のどの領域で開口運動と閉口運動に変換されるのだろうか。経シナプ的に神経細胞を逆行性に感染する狂犬病ウイルスを利用して、ラットの開口筋、あるいは閉口筋へ投射する神経経路を同定した。その結果、(1)大脳皮質-脳幹投射において、外側被蓋野にある介在細胞を経由せず、三叉神経運動核から開口筋に投射している皮質細胞は、量的に少ないものの認められたが、閉口筋に投射する大脳皮質細胞は観察されなかった。一方、外側被蓋野の介在細胞を経由して開口筋、閉口筋を支配する大脳皮質細胞に関しては、両者の分布に明らかな差はなかった。(2)大脳皮質-大脳基底核-脳幹投射に関しては、開口筋、閉口筋とも線条体腹外側部-黒質背外側部-外側被蓋野が主な投射経路であったが、特に開口筋においては、線条体背側部-黒質腹外側部を経由する回路の存在が確認された。以上の結果から、大脳皮質顎運動領域刺激で開口運動が多く誘発されるのは、皮質から三叉神経運動核に対する直接投射によることや、大脳皮質運動野における顎運動情報は、脳幹で開口、閉口運動に変換される可能性が示唆された。

12. 神経回路の機能の成り立ちに関する学際的研究

2004年12月2日-12月3日

代表：久保義弘（自然科学研究機構 生理学研究所 神経機能素子）

所内対応者：重本隆一（自然科学研究機構 生理学研究所 脳形態解析）

(1) Cajal-Retzius 細胞と大脳皮質形成機構

田辺 康人（三菱化学生命科学研究所・神経構築研究チーム）

(2) 脳皮質形成における Cdk5 の役割について

大島 登志男（理化学研究所・脳科学総合研究センター・発生神経生物研究チーム）

(3) プルキンエ細胞の誕生・移動・配置の謎

宮田 卓樹（名古屋大学・院医・細胞生物学）

(4) アクチビンによるスパイン形態とシナプス可塑性の制御

井ノ口 馨（三菱化学生命科学研究所）

(5) α N-カテニン によるシナプス結合安定性の制御

安部 健太郎, 竹市雅俊（理化学研究所・発生再生科学総合研究センター）

(6) シナプス形成と可塑性を制御する古くて新しい分子 —デルタ受容体とシナプトトロフィン—

柚崎 通介, 松田 恵子, 飯島 崇利, 幸田 和久,
松田 信爾, 小川 康（慶応大学・医学部・生理学1）

(7) 線虫 *C. elegans* における感覚情報処理の分子機構

石原 健（九州大学大学院・理学研究院・生物科学）

(8) ショウジョウバエによる加齢性記憶障害の分子機構の解析

齊藤 実（東京都神経科学総合研究所・神経機能分子治療）

(9) 脳機能解析を目的とした遺伝子改変マウスの作成とその使い方

柳川 右千夫（群馬大学大学院・医学系研究科・遺伝発達行動学）

【参加者名】

小田 洋一, 小橋 常彦（大阪大学大学院生命機能研究科）, 吉田 祐美（岡山大学大学院医歯学総合研究科）, 狩野 方伸, 橋本 浩一, 鳴島 円（金沢大学医学系研究科）, 大塚 稔久, 井上 英二, 俵田 真紀, 武内 恒成（カン研究所）, 石原 健, 伊藤 功（九州大学大学院理学研究院）, 西村 陽, 稲葉 美枝（京都府立医科大学大学院医学研究科）, 柳川 右千夫, 白尾 智明, 関野 祐子, 花村 健次, 山崎 博幸, 高橋 秀人, 小林 千穂, 笹川 快生（群馬大学大学院医学系研究科）, 柚崎 通介, 松田 恵子, 松田 信爾, 飯島 崇利, 小川 靖裕（慶應義塾大学医学部）, 斎藤 祐見子（埼玉医科大学薬理学教室）, 岡部 繁男, 井上 明宏, 根東 覚, 梅田 達也, 壺岐 純子, 西田 秀子（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科）, 真鍋 俊也, 渡部 文子, 泉 寛子（東京大学医科学研究所）, 尾藤 晴彦,

布施 俊光, 山田 麻紀（東京大学大学院薬学系研究科）, 齊藤 実（東京都神経科学総合研究所）, 田淵 明子（富山医科薬科大学薬学部）, 高岸 芳子（名古屋大学環境医学研究所）, 宮田 卓樹, 村山 綾子, 西沢 祐治, 齋藤 加奈子（名古屋大学大学院医学系研究科）, 神谷 温之（北海道大学大学院医学研究科）, 田辺 康人, 井ノ口 馨（三菱化学生命科学研究所）, 五嶋 良郎（横浜市立大学医学部）, 大島 登志男（理化学研究所脳科学総合研究センター）, 安部 健太郎, 上村 允人, 曾根 正光, 門脇 正和（理化学研究所発生再生科学総合研究センター）, 鍋倉 純一, 北村 明彦, 平井 康治, 山肩 葉子, 久保 義弘, 立山 充博, 三坂 巧, 中條 浩一, 藤原 祐一郎, 岩井 博正, 長友 克広, 重本 隆一, 深澤 有吾, 篠原 良章, 萩原 明, 王文, 春日井 雄（生理学研究所）, 瀬藤 光利（統合バイオサイエンスセンター）

【概要】

脳神経系の機能は、神経回路が構築され、神経細胞間での情報の伝達が繰り返されることにより成立する。分裂停止後の神経細胞が予定された領域へ移動し、軸索と樹状突起の伸展・成熟過程を経てシナプスを形成する事で機能的な神経回路網が出来上がる。また、いったん形成されたシナプスも神経活動により絶えず修飾されていること、更に、神経回路形成の個々のステップは、多彩な情報伝達分子群が神経細胞内の多数のローカスで同時並行的に引き起こす複数のカスケードにより制御されていることが近年の研究により明らかにされてきた。したがって、この一連の分子機構を詳細に検討するためには、分子生物学、生化学、生理学、解剖学、細胞生物学、遺伝学、システム脳科学など異なる分野の人材の協同による学際的なアプローチとその統合が必要となっている。「神経回路の機能の成り立ちに関する学際的研究」と題した本研究会では、多分野の研究者を集め、情報交

換と交流を図ることを目的として、色合いの異なる3セッションを企画した。セッション「大脳と小脳における皮質形成」では、シナプス形成の第1段階である脳の領域特異性、層特異性、また神経細胞の誕生と移動について、討論を行った。セッション「神経活動による神経棘の形態制御とシナプス可塑性の制御」においては、シナプスの形態と機能を制御する立役者である分子に焦点をあてて、その制御の新側面について討論した。セッション「モデル動物の特徴を生かした遺伝子・遺伝子経路の機能解析」では、線虫、ショウジョウバエをそれぞれ用いた、感覚情報処理と加齢性記憶障害に関する研究、脳機能解析のための遺伝子改変マウスの作成についての研究の発表のあと、討論を行った。討議のプロセスにより、解決可能な新規の問題点を洗い出し、今後の領域横断的な研究のシーズを見いだすことができたと考えている。

(1) Cajal-Retzius 細胞と大脳皮質形成機構

田辺 康人 (三菱化学生命科学研究所・神経構築研究チーム)

Cajal-Retzius 細胞は、大脳皮質の発生過程において marginal zone を構成する主要な神経細胞であり皮質形成機構に重要な働きを示す事が示唆されているが、Cajal-Retzius 細胞の発生様式を解析することは長い間不問に付されてきた。我々は、Cajal-Retzius 細胞が GFP により蛍光標識されているトランスジェニックマウスを解析系に用い、電気的穿孔法を用いてマーカー遺伝子をマウス胎仔脳の様々な領域内へ導入していくことで、Cajal-Retzius 細胞の発生起源及びその発達の軌跡を詳細に解析した。その結果、この神経細胞群は、終脳の内側・尾側部に存在する cortical hem において発生し、そこから

皮質半球に対して接線方向に細胞移動していき、最終的に新皮質を含む大脳皮質全体に広く分布することを明らかにした。この結果は、皮質 GABA 作動性介在ニューロンと同様に、Cajal-Retzius 細胞の主要なものが新皮質にとり外来性の細胞である事を示す。また、Cajal-Retzius 細胞が皮質パターン形成のオーガナイジングセンターである Cortical hem から発生し皮質パターン形成の一つの軸である内・尾側-外・吻側軸に沿って細胞分布勾配を示すことは、皮質層形成機構のみならず皮質領域形成機構を考える上でも新しい視点を与える。

(2) 脳皮質形成における Cdk5の役割について

大島 登志男 (理研・脳科学総合研究センター・発生神経生物研究チーム)

大脳などの層の形成には、厳密にコントロールされた細胞増殖と移動・位置決定が必要で、ヒト滑脳症や変異

マウスの解析から、関与する分子がいくつか同定されている。我々はこうした分子のうち Cyclin-dependent kinase

5 (Cdk5) を中心に研究を進めている。Cdk5 はその活性化サブユニット p35, p39 が神経細胞特異的に発現し、神経細胞の特異的な機能に参与している。Cdk5 欠損マウスは胎生致死で、大脳皮質、小脳、海馬などの層構造が形成されず、脳幹部でも顔面神経核や下オリーブ核の形成が異常である。また軸索走行の異常があり、Cdk5 欠損 DRG ニューロンでは神経軸索ガイダンス分子 Sema3A に対

する成長円錐退縮反応が低下している。

Cdk5 欠損マウスが胎生致死であるため機能解析に制限があったが、コンディショナル KO マウスを作製・解析する事で、生後における脳の発達・機能発現に至る段階での Cdk5 の役割を解明する事が可能となった。現在複数の時期・領域特異的な cre マウスを用いて、Cdk5 の機能解析を進めている。

(3) プルキンエ細胞の誕生・移動・配置の謎

宮田卓樹 (名古屋大・院医・細胞生物学分野)

プルキンエ細胞は小脳皮質を構成する主要ニューロンであるが、前駆細胞に関する知見が無く、移動中のプルキンエ細胞の形態に関する情報も欠けている。大脳皮質ニューロンに対しては今世紀に入ってスライス培養下での解析や GFP 標識による生体内での解析が進み、発生時期および移動局面に応じてニューロンがさまざまな形態をとることが分ってきた。その形態的情報が、分子レベルでのニューロン移動機構の解析を裏打ちしている。プルキンエ細胞移動の研究もぜひ做すべきである。プルキンエ細胞の配置にはリーリンが重要であることが知られているが、リーリンの具体的作用については「誘引」「移

動停止信号」「いずれでもない」などの説があるものの、依然不明である。この問題の解決にも幼若プルキンエ細胞の形態を理解することが不可欠である。一方、私はプルキンエ細胞の移動～配置に線維（とシナプス形成？）が関与するかもしれないと夢想している。現在、(1)胎生 11-13 日マウス小脳原基のスライス培養において前駆細胞および幼若プルキンエ細胞の挙動を観察、(2)GFP ウイルスによる標識で生体内の細胞挙動を把握、(3)前庭神経節や脊髄などからの繊維の順行性標識など、プルキンエ細胞の移動・配置のメカニズムに挑むべく取り組んでいる。

(4) アクチビンによるスパイン形態とシナプス可塑性の制御

井ノ口 馨 (三菱化学生命科学研究所 (MITILS))

LTP などのシナプス可塑性に伴い樹状突起スパインの形態がダイナミックに変化し、それが LTP の誘導や持続に重要な役割を果たしていることなどが近年明らかになりつつある。我々のグループもスパインアクチンの動態やスパイン形態が LTP の後期相(L-LTP)に重要な役割を果たしていることを示してきた。

また、L-LTP や長期記憶の成立には遺伝子の発現が必要であることから、我々は海馬の L-LTP に伴い発現が調節される多数の遺伝子群を単離しそれらの機能を明らかにしてきた。それらのうちのアクチビンは TGF-βフ

ァミリーに属するリガンド蛋白質であり、LTP 誘発後 1 時間以上経過してから発現が誘導される。本研究会では、アクチビンがスパイン形態の制御を通じて L-LTP の保持に重要な役割を果たしていることをお話しするとともに、「LTP の誘導---アクチビン遺伝子の発現---スパインアクチン動態の変化---シナプス形態の変化---L-LTP の持続」という経路が L-LTP の一つのメカニズムであることを提唱して、「シナプス可塑性」と「シナプス形態の可塑性」に関する議論の種としたい。

(5) α N-カテニンによるシナプス結合安定性の制御

安部 健太郎, 竹市 雅俊

(京都大学・院・生命科学研究科, 理化学研究所発生・再生科学総合研究センター)

シナプスは新生・消失, 構造変化などを示すことが知られており, この構造的可塑性にともない, シナプスの結合構造はダイナミックに制御されると考えられるがその制御機構に関してはあまり知られていない。

α N-カテニンはカドヘリンとアクチン骨格と接続することによってカドヘリンの接着活性を制御する分子である。我々は, α N-カテニンのノックアウトマウスを作成し, 海馬初代神経細胞分散培養系を用いてシナプスへの影響を観察した。

α N-カテニンを欠損する神経細胞はスパインの形態に異常が見られた。また, 経時的観察により, スパイン

の動きを観察した結果, α N-カテニン欠損細胞ではシナプス結合が不安定であること, 逆に, α N-カテニンを過剰発現させるとより安定なシナプス結合を形成し, その結果として, スパインとシナプスの過剰形成が起きることを見出した。また, シナプスに集積する α N-カテニンの量は神経活動によって制御することを見出した。

これらの結果から, α N-カテニンにはスパインおよびシナプス結合を安定化する働きがあり, 神経活動に応じたスパインの形態変化を制御してシナプス可塑性になんらかの影響を及ぼしている可能性が示唆された。

(6) シナプス形成と可塑性を制御する古くて新しい分子 —デルタ受容体とシナプトトロフィン—

柚崎 通介, 松田 恵子, 飯島 崇利, 幸田 和久,

松田 信爾, 小川 康

(慶應義塾大学医学部・生理学 I)

δ 2 型グルタミン酸受容体とシナプトトロフィン(StpnI)は, 10-20 年前に発見された分子であり, 小脳プルキンエ細胞の遠位樹状突起部と, そこにシナプスを形成する平行線維を送る顆粒細胞にそれぞれ特異的に発現する。遺伝子欠損マウスの解析から, δ 2 受容体は平行線維—プルキンエ細胞シナプスの正常な発達に必要な不可欠であることがこれまでに分かっていたが, この受容体がどのようにして活性化され, どう機能するのかについてはよく分かっていなかった。私たちは, 機能阻害性抗体とトランスジェンによる δ 2受容体欠損マウスの表現型回復能を解析することにより, δ 2受容体は, 1) 発達段階のみでなく, 成熟動物においても活性をもつ, 2) シナプス後膜のAMPA受容体の数を調節する, 3) 細胞外からの信号により活性が制御される, 4) 他のグルタミン酸受容体とかな

り異なった形で活性化される, ことを明らかにした(Nature Neurosci '03; EMBO R, in press)。一方, StpnI の機能や信号経路も謎のままであったが。私たちは, 渡辺やMorganらと共同してStpnI 遺伝子欠損マウスを解析したところ, 1) シナプス可塑性 (LTD) の欠損, 2) プルキンエ細胞の登上線維による多重かつ遠位型支配, 3) 平行線維の結合しない「裸の棘突起」の出現, といった δ 2受容体欠損マウスと酷似した所見を得た(Nature Neurosci, in revision)。このように平行線維—プルキンエ細胞シナプスにおいて, シナプス前部と後部に発現しているこれらの2つの古くて新しい分子は, シナプス可塑性と形成に関与する新しいユニークな信号系を構成すると考えられる。

(7) 線虫 *C.elegans* における感覚情報処理の分子機構

石原 健 (九州大学大学院・理学研究院・生物科学)

動物は、環境から様々な情報を感覚神経を通じて受容し、神経回路上で情報処理を行い適切な応答をする。我々は、このような感覚情報処理に関わる新しい分子機構を明らかにすることを目的として、*C. elegans* をモデルとした遺伝学的解析を行っている。

我々が同定した *hen-1* 変異体は、二つの感覚情報の統合と一種の連合学習に異常を示す変異体である。この変異体の原因遺伝子産物 HEN-1 は、LDL 受容体モチーフを持つ分泌タンパク質であり、成熟した神経系において細胞非自律的に機能している。

C. elegans の受容体型チロシンキナーゼ SCD-2 は、ヒト ALK の相同タンパク質である。最近、ショウジョウバエ

の ALK 相同分子 DAlk は、ショウジョウバエの HEN-1 類似分子 *Jeb* の受容体として機能するが明らかになったことから、SCD-2 が HEN-1 の受容体である可能性がある。GFP 融合遺伝子の解析から、*scd-2* 遺伝子は多くの感覚神経と介在神経で発現していることが示唆された。また、*scd-2* 変異体は、感覚情報統合の行動測定系と、連合学習の行動測定系において、*hen-1* 変異体と類似の表現型を示す。さらに、SCD-2 は HEN-1 とは異なる介在神経で機能していることが推定された。これらのことより、SCD-2 は、HEN-1 の受容体として介在神経間の情報処理を制御しているのではないかと考えている。

(8) ショウジョウバエによる加齢性記憶障害の分子機構の解析

齊藤 実 (東京都神経科学総合研究所・神経機能分子治療)

いかなるヒトも老化に伴って起こる学習・記憶力の低下から逃れることは出来ない。このような加齢性記憶障害 (Age-related Memory Impairment, AMI) はどのような遺伝子の働き、失調により起こるのであろうか? AMI は学習による記憶情報の獲得から、その統合・安定化に至る複雑な学習記憶過程 (分子機構) の非特異的な障害と考えられてきた。しかし、従来の哺乳類モデルでは、例えばマウスでもその寿命が 2~3 年に及ぶことが障害となり、AMI の分子機構の解明は殆ど進んでこなかった。ショウジョウバエの遺伝子はその約 8 割が哺乳類と共通であり、哺乳類と極めてよく似た学習記憶の分子機構を持

つ。さらにショウジョウバエは寿命が約 1 ヶ月と短い。我々は寿命が短いショウジョウバエを新たなモデル動物として、AMI の行動遺伝学的解析を行ってきた。その結果、加齢により *amnesiac (amn)* という遺伝子に依存する記憶成分 (中期記憶) が、極めて特異的に障害されることを明らかにした。さらに興味深いことに *amn* 変異体は寿命が野生型と比べ約 40% も延びており、逆に長命変異体の中には *amn* 遺伝子依存性の中期記憶に障害を示すものがあつた。これらのことから脳の高次機能と老化とに共役した何らかの分子機構が示唆された。

(9) 脳機能解析を目的とした遺伝子改変マウスの作成とその使い方

柳川右千夫 (群馬大・大学院医学系研究科・遺伝発達行動学)

脊椎動物の脳には多種類の神経細胞が存在するが、特定の細胞を標的として遺伝子を発現させるのは簡単ではない。そこで、機能プローブを特定の細胞に容易に発現

させることを目的として、以下の 2 種類のシステムについて、検討した。

(1) (Cre-loxP システムを利用したトランスジェニックマ

ウス) シナプトフルオリン (SpH ; シナプス小胞内の pH 動態をモニターする) 遺伝子を組み込んだ loxP ターゲティングマウス (loxP-SpH マウス) を作成した。loxP-SpH マウス一方、海馬の顆粒細胞に Cre recombinase が発現する CaMKII-Cre マウスと交配して生まれた仔では、海馬の苔状線維に SpH の発現が観察された。以上の結果は、Cre-loxP システムに基づいて 2 種類のトランスジェニックマウスを使用することにより、機能プローブを特定の

細胞に発現できることを示している。

(2) (Thy-1 プロモーターを利用したトランスジェニックマウス) Thy-1 プロモーターの下流に SpH 遺伝子を配置したトランスジェニックマウスを作成した。6 ライン樹立して解析した結果、それぞれ異なる発現パターンを観察した。中でも、海馬錐体細胞、小脳顆粒細胞に SpH が発現することから、これらの細胞に機能プローブを発現させたい場合には有効なシステムであることが示唆された。

13. 第3回 大脳皮質・視床・基底核の神経回路

2004年10月6日-10月7日

代表・世話人：金子武嗣（京都大学大学院・医学研究科・高次脳形態学）

所内対応者：川口泰雄（大脳神経回路論研究部門）

(1) 大脳皮質発達過程における GABA 応答性の変化と制御機構

山田順子

(静岡大学大学院・電子科学研究科・生体情報処理講座)

(2) Depolarization wave による中枢神経系の機能発達制御

佐藤 勝重

(東京医科歯科大学大学院 細胞生理学分野)

(3) GABA 性シナプス入力と Glutamate 性シナプス入力の相互作用の非線形ダイナミクスとその数理モデル

森田 賢治

(東京大学大学院 新領域創成科学研究科 複雑理工学専攻)

(4) From neural stem cell to the human neocortex: A potential mechanism to produce the human thick neocortex

玉巻伸章

(熊本大学大学院 医学薬学研究部先端生命医療科学 脳神経科学講座 脳回路構造学)

(5) 視床微小神経回路における情報処理機構

井上 剛

(生理学研究所・神経シグナル研究部門)

【参加者名】

玉巻伸章（熊本大学院・医），小林真之（大阪大学院・歯），宋文杰（大阪大学院・工），金子武嗣，藤山文乃，中村公一，日置寛之，倉本恵梨子，田中康代（京都大学院・医）青柳富誌生，野村真樹（京都大学院・情報），黒谷亨，吉村由美子（名古屋大学・環境医学研），福田敦夫，窪田寿彦，古川智範，井上浩一（浜松医科大学・医），山田順子（静岡大学院・電子科学），森琢磨（京都大学・

霊長類研），山下晶子（日本大学・医），内田豪，小島久幸，一戸紀孝（理化学研究所），伊藤哲史（福井大学・医），坪泰宏（玉川大学・工），森田賢治（東京大学院），津元国親（ERATO 合原），井本敬二，鍋倉淳一，張一成，等誠司，川口泰雄，窪田芳之，大塚岳，荻部冬紀（生理学研究所）

【概要】

今年には浜松医大福田先生にオーガナイズをお願いして平成16年10月6～7日には以下の5人の方々による話題提供と議論を行いました。「大脳皮質発達過程における GABA 応答性の変化と制御機構」山田順子氏は，ラット生後間もない時期には大脳皮質細胞内の Cl 濃度が高く，GABA が脱分極性の反応を引き起こすこと，その原因として NaKCC1 という Cl 取り込みのトランスポーターが一過性に強く発現していることを示し，これと関連して「GABA 性シナプス入力と Glutamate 性シナプス入力の相互作用の非線形ダイナミクスとその数理モデル」森田賢

治氏は脱分極性の GABA 反応がもつシナプス伝達に対する影響を数理的に解析した議論を提供しました。「Depolarization wave による中枢神経系の機能発達制御機構」佐藤勝重氏は胎児期に脳幹全体に広がるゆっくりとした脱分極波が存在することを示し，その役割についての議論を誘い，「From neural stem cell to the human neocortex」玉巻伸章氏は大脳皮質のニューロンの発生の総括的な話しを自分の仮説を中心に提供しました。「視床微小神経回路における情報処理機構」井上剛氏は minimal 刺激 + double whole-cell clamp 法を用いて，視床あるいは大脳皮

質の局所神経回路の解析結果を報告しました。

昨年・一昨年と同じく主に比較的若い講演者に現在進行形的话题を提供していただき、参加者の多くが脳皮質・視床・線条体の神経回路について様々な議論を交わすことが出来ました。議論は白熱して1時間の持ち時間のところを実質1時間半ずつ議論すると云った学会な

どでは出来ないレベルの密度の高い討議が出来たものと感じています。また、システムの神経科学をボトムアップの方向で研究するという意味で志を同じくする研究者が集まって議論を交わすことにより、新たな着想を得る、客観的な批判にさらされるなど脳皮質・視床・線条体研究の発展に役立つ様々な効果があったと思います。

(1) 脳皮質発達過程における GABA 応答性の変化と制御機構

山田順子 (静岡大学大学院・電子科学研究科・生体情報処理講座)

中枢神経系において、主要な抑制性伝達物質であるはずの GABA が、脳の発達初期にはむしろ興奮性伝達を担っている可能性がある。我々はこの原因として、内向き Cl⁻トランスポーター NKCC1 と外向き Cl⁻トランスポーター KCC2 の作用が発達に伴い変わるため [Cl⁻]_i が変化し GABA_A 受容体を介する GABA 応答を変えているためではないかと考えた。そこで、Cl⁻トランスポーターの発達に伴う発現変化と GABA 応答性を調べる為、脳皮質形成期のラット脳スライス標本を用いて、グラミシジン穿孔パッチクランプ法により GABA 応答を記録し、[Cl⁻]_i を計測した。また、記録終了後細胞質を抽出し、単一細

胞における Cl⁻ 共輸送体 mRNA のタイプ別発現量の差を single-cell multiplex RT-PCR 法により解析した。Ca²⁺イメージング法を用い GABA 投与に対する [Ca²⁺]_i の変化も観察した。その結果、幼若細胞では [Cl⁻]_i は成熟細胞に比べ有意に高く、GABA による脱分極と [Ca²⁺]_i 上昇がみられた。また、[Cl⁻]_i と NKCC1 には正の相関が見られ [Cl⁻]_i と KCC2 には負の相関があることがわかった。以上の結果より、幼若期のニューロンでは NKCC1 が主に働き高い [Cl⁻]_i を維持し、発達に伴い KCC2 が優位に働くようになるため、GABA の応答性が変化するという可能性が示唆された。

(2) Depolarization wave による中枢神経系の機能発達制御

佐藤 勝重 (東京医科歯科大学大学院細胞生理学分野)

中枢神経系の個体発生過程は大きく2つの phase に分けられている。1つは遺伝情報に基づく activity-independent phase であり、他方はニューロン群の時空間的活動パターンに依存する activity-dependent phase である。後者に関して、視覚系で行われた研究で、critical period が存在することが示され、個体発生のある特異的な一時期に、ある特定のニューロン群が同期して発火することが、神経回路網形成の制御因子として重要であることが明らかにされた。

我々は、これまでニューロン電位活動の光学的イメージング法を用いて、中枢神経系の機能発生・機能形成・

機能構築過程について解析を行ってきた。その過程で、脳・脊髄神経を介した外来性入力、あるいは中枢神経系の自発興奮活動によって、大脳から脊髄まで中枢神経系のほぼ全領域にわたって広範に伝播する脱分極波 (depolarization wave) が誘発されることを発見した。この脱分極波は、発生のある一時期に特異的に出現し、これまで報告がない数々の特性を備えており、限局した領域の特定のニューロン群/シナプスに関して想定されていた従来の activity-dependent developmental regulation とは異なる、新しい機能的役割を担っているものと考えられる。

(3) GABA 性シナプス入力と Glutamate 性シナプス入力の相互作用の 非線形ダイナミクスとその数理モデル

森田 賢治 (東京大学大学院 新領域創成科学研究科 複雑理工学専攻)

近年、陰イオン濃度の攪乱を抑えた Gramicidin-perforated patch-clamp 法によって、成熟した大脳皮質錐体細胞の GABA_A 受容体チャネルの反転電位は静止電位よりも 10mV 程度高いことが報告された (Gulledge & Stuart 2003)。本研究では神経細胞の数理モデルを用いて、この事実の持つ機能的意義を推察する。まず二次元数理モデルによって Gulledge らの実験結果を定量的に再現できることを示す。その上で、脱分極性の GABA_A 入力単一神経細胞の入出力関係(興奮性入力-出力発火率の関係)

に及ぼす影響を調べた。その結果、入力が tonic な場合には、脱分極性でない(反転電位が静止電位と等しい) GABA_A 入力が subtractive な効果を持つものに対して、脱分極性の GABA_A 入力は all-or-none 的な効果を持つことが示唆された。また大きな揺らぎのある入力の場合には、脱分極性の GABA_A 入力は、それが興奮性入力と高い時間相関を持つ場合にのみ入出力関係に対して subtractive な効果を持つことが示唆された。

(4) From neural stem cell to the human neocortex: A potential mechanism to produce the human thick neocortex

玉巻伸章 (熊本大学大学院 医学薬学研究部先端生命医療科学
脳神経科学講座 脳回路構造学)

これまでの既成概念を少しの間忘れて語るならば、大脳皮質の形成は、神経上皮の肥厚化と特殊化により形成されたと考えることができる。神経上皮細胞は非常に長く伸びて放射状グリアと呼ばれるようになり、神経細胞は、神経上皮細胞体層と基底膜の間に、生まれた順番に堆積する。

これまでに、マウス大脳皮質で興奮性神経細胞と抑制性神経細胞がどのように分化してくるかを、ウイルスによる細胞標識を利用して調べてきた。結果、神経幹細胞が分裂して大脳皮質神経細胞が作られることは永くは続かず、多くの場合、中間の分裂能を保持した神経前駆細胞が作られることが明らかとなった。前駆細胞は分裂能

を保持しているが、興奮性神経細胞のみを産生したり、抑制性神経細胞を産生したりする。つまり、分裂能を保持しつつ一段階分化の階段を降り、分化の範囲が狭まった細胞が脳実質内に多く存在することを示唆していた。このような分裂能を保持した神経前駆細胞の性質を調べるためには、確認する標識が必要となるが、興奮性神経前駆細胞は、NEX (Math2) bHLH 分子を発現している細胞集団に含まれ、抑制性神経細胞は、GABA 合成酵素の GAD67 陽性細胞の集団に含まれていた。これらの標識分子の発現に伴って細胞運命は規定され、さらに分裂を繰り返す間に細胞運命の範囲が狭められるとする仮説を提唱する。

(5) 視床微小神経回路における情報処理機構

井上 剛 (生理学研究所・神経シグナル研究部門)

脳(神経回路)形成を理解するためには、神経細胞同士の1対1のシナプス結合(point-to-point connections)理解に加

え、多対多のシナプス結合(divergent/convergent connections)の理解が必須である。しかし後者を電気生理学的に調べ

るには最低でもトリプルパッチクランプ記録を必要とし、その技術的困難故に報告例は非常に少ない。ここで我々は、この発散性結合 (divergent connections) を容易に測定することが可能となる新しい実験手法を紹介する。我々は2つのポストシナプス細胞からのパッチクランプ同時記録と、単一のプレシナプス細胞由来繊維を刺激する“minimal stimulation”法を併用することにより、この問題を解決した。この手法を用いることにより、

nucleus reticularis 由来の単一抑制性繊維は体性感覚野における複数の視床神経細胞群 (thalamic relay cells) に投射していることがわかった。しかし対照的に、上行性の単一興奮性繊維 (lemniscal fiber) は複数の視床神経細胞群に投射していないことが明らかになった。これらの結果は、なぜ視床が感覚情報を大脳皮質に“リレー”し、またなぜ視床がその視床細胞群の神経活動を“同期”させるのか、そのシナプス結合様式を実証している。

14. 生理研研究会「機能的MRI研究会」

2004年11月25日-11月26日

代表・世話人：程 康 (理研)

所内対応者：定藤規弘 (生理研)

(1) Experimental design of event-related fMRI

河内山隆紀 (香川大学工学部)

(2) Innovation Approach to detecting connectivity in multivariate time series

Galka Andreas (統計数理研究所)

(3) Fusing EEG and fMRI based on a bottom-up model: Inferring activation and effective connectivity in neural masses

Riera J., Aubert E., Iwata K., Kawashima R., Wan X., Ozaki T. (NICHe, Tohoku University)

(4) Linear vs nonlinear influences of EEG rhythms on the fMRI

Fumikazu Miwakeichi¹⁾, Pedro A. Valdes-Sosa²⁾, Jorge Bosch²⁾, Hiroaki Mizuhara¹⁾, Yoko Yamaguchi¹⁾

(¹⁾RIKEN Brain Science Institute, Lab. For Dynamics of Emergent Intelligence ²⁾Cuban Neuroscience Center)

(5) Rhythm networks for cognitive processing revealed by a simultaneous fMRI and EEG

Hiroaki Mizuhara¹⁾, Li-Qun Wang²⁾, Koichiro Kobayashi^{3),1),4)}, Yoko Yamaguchi^{1),4)}

(¹⁾RIKEN Brain Science Institute, ²⁾Tokyo Denki University, ³⁾Iwate University, ⁴⁾CREST, JST)

(6) MRIにおける中心周波数(f_0)の役割とその変動のfMRIへの影響

島田育廣¹⁾, 藤本一郎¹⁾, 赤土裕子¹⁾, カラン明子¹⁾, 正木信夫¹⁾, 村瀬研也²⁾

(¹⁾(株)国際電気通信基礎技術研究所 脳活動イメージングセンタ

²⁾大阪大学大学院 医学系研究科 医用物理工学講座)

(7) 機能的MRIを用いた小児中枢性聴覚障害スクリーニング法の開発

中井昭夫, 川谷正男, 眞弓光文¹⁾, 柏倉健一²⁾, 藤原康博, 石森佳幸³⁾, 米倉義晴⁴⁾, 定藤規弘⁵⁾

(¹⁾福井大学 ²⁾群馬県立医療短期大学 ³⁾福井大学医学部付属病院放射線科

⁴⁾福井大学高エネルギー医学研究センター ⁵⁾生理学研究所)

(8) Decoding the perceptual and subjective contents of the human brain

Yukiyasu Kamitani (Computational Neuroscience Laboratories)

(9) Seeing a dreaming brain -Brain activation preceded rapid eye movements during REM sleep

Satoru Miyauchi, Masaya Misaki, Takahide Fukunaga, Shigeyuki Kan

(Brain Information Group, Kansai Advanced Research Center,

National Institute of Information and Communications Technology)

(10) fMRI内における指部への空気圧刺激を用いた系列運動課題実験

堀江亮太¹⁾, 平田智秋, R. Allen Waggoner²⁾, 上野賢一²⁾, 田中啓治²⁾, 程康²⁾, 谷淳¹⁾

(独立行政法人理化学研究所, 脳科学総合研究センター,¹⁾動的認知行動研究チーム,

²⁾認知機能表現研究チーム)

(11) Capillary level imaging of local cerebral blood flow in epileptic foci

Hajime Hirase (RIKEN Brain Science Institute Hirase Reserch Unit)

【参加者名】

Kang Cheng (程 康) (理研), R Allen Waggoner (理 研), 田中 優子 (理研), 水原 啓暁 (理研), 堀江 亮
研), Pei Sun (理研), 上野 賢一 (理研), 松田 佳尚 (理 太 (理研), 三分一 史和 (理研), Mauro Costagli (理研),

竹田 和良(理研), 平瀬 肇(理研), 平田 智秋(理研), 磯尾 綾子(理研・東京大学大学院), Jorge Riera(東北大), 渡邊 丈夫(東北大), 岩田 一樹(東北大), 中井 昭夫(福井大), 河内山 隆紀(香川大), 神谷 之康(ATR), 正木 信夫(ATR), 嶋田 育廣(ATR), カラン 明子(ATR), 藤本 一郎(ATR), 赤土 裕子(ATR), 柴田 和久(奈良先端大), 宮内 哲(情報通信研究機構), 三崎 将也(情報通信研究機構), 尾崎 統(統数研), Andreas Galka(統数研), 王 健歆(統数研), 定藤 規弘(生理研・心理生理), 本田 学(生理研・心理生理), 神作 憲司(生理研・心理生理), 荒牧 勇(生理研・心理生理), 田邊 宏樹(生

理研・心理生理), 豊田 浩士(生理研・心理生理), 田中 悟志(生理研・心理生理), 原田 宗子(生理研・心理生理), 宮本 順(生理研・心理生理), 中下 悟(生理研・心理生理), 牧 陽子(生理研・心理生理), 村瀬 未花(生理研・心理生理), 内山 祐司(生理研・心理生理), 大塩 立華(生理研・心理生理), 野口 泰基(生理研・感覚運動調節), 郷田 直一(生理研・感覚認知情報), 西巻 拓也(生理研・生体恒常機能発達機構), 溝口 義人(生理研・生体恒常機能発達機構), 井原 綾(生理研・感覚運動調節)

【概要】

This year's Seiriken Kenkyu Kai: fMRI: A Tool for Neuroscience Research was smoothly and successfully conducted on Nov. 25 and 26, 2004 at Seiriken. The meeting attracted more than 50 attendees from universities and research institutions. Eleven speakers, most of them junior researchers, presented their recent works on methodological aspects of functional magnetic resonance imaging (fMRI), including imaging techniques and statistical analysis methods, and physiological aspects of fMRI, including source localization of blood oxygenation level dependent (BOLD) signal and direct observation of changes in cerebral blood flow (CBF) as a consequence of focal neuronal activity.

Following the tradition of the previous meetings, Dr. Takanori Kochiyama and Dr. Andreas Galka extended their works on optimal experimental design of event-related fMRI and innovation approach to detecting connectivity in multivariate time series. These novel ideas have pragmatic implications in the optimisation of experimental designs and spatiotemporal modelling and interpretation of fMRI data.

Simultaneous measurements of EEG and fMRI has attracted special attention at the meeting. Three presentations, by Drs. Jorge Rieta, Hiroaki Mizuhara and Fumikazu Miwakeichi, addressed issues concerning fusing of EEG and fMRI data, rhythm networks for cognitive processing, and linear/nonlinear

influences of EEG rhythms on fMRI.

Other presentations covered topics ranging from assessing the influence of f0 fluctuation during data acquisition and its correction (Dr. Ikuhiro Shimada), fMRI data acquisition during rapid eye movement (REM) sleep (Dr. Satoru Miyauchi), development of an stimulation apparatus for simultaneous delivery of somatosensory stimuli and motor responses (Dr. Ryota Horie) to development of an fMRI protocol for screening hearing defects in infants (Dr. Akio Nakai).

We were also able to invite Dr. Yukiyasu Kamitani who introduced his elegant work showing that the modulation of a functional architecture can be revealed even though the architecture itself cannot be resolved with current spatial resolution of fMRI and Dr. Hajime Hirose who demonstrated, using 2-photon microscopy, that changes in CBF in the capillary bed can be directly observed and that the regulation of CBF changes is localized spatially following focal epileptic events.

In summary, this annual meeting has provided a useful forum for young investigators in the field of functional imaging in Japan to exchange and discuss new ideas. It is strongly felt that the meeting should be continued and a broader range of topics, including neurobiology-related issues, to be covered in the future meetings.

(1) Experimental design of event-related fMRI

河内山隆紀
(香川大学工学部)

近年、fMRI 実験における event-related design の利用が増えている。Event-related design は、刺激に対する血流動態の応答関数を推定できるだけでなく、刺激のシーケンスを自在に組むことができるので、特に高次認知機能に関する実験において慣れや予測の影響を抑えた実験が可能である。Event-related design は、脳機能画像法において非常に有用な実験計画法であるが、設計や解析に関して多くの注意点も存在する。中でも課題・刺激呈示のシーケンスは、その選択によって、興味ある脳活動に対

する計画行列の検出能力が大きく変わるため、実験前に何らかのシーケンス最適化の作業を行うことが推奨されている。先行研究では、あるコントラストに対して最適化された計画行列は、別のコントラストに対しては必ずしも最適ではないことが報告された。本研究では、(1) 複数のコントラストに関心がある場合の計画行列最適化に関する新しい評価関数と (2) 最適化された計画行列が、統計的第一種と第二種過誤をどの程度制御できるかを検証した。

(2) Innovation Approach to detecting connectivity in multivariate time series

Andreas Galk
(Institute of Statistical Mathematics Department of Prediction and Control)

This talk presents a new approach to inferring the connectivity structure of spatially extended dynamical systems (such as brain) by estimating mutual information between pairs of sites, based on spatiotemporal data sets (such as fMRI). This approach is based on explicit temporal and spatial modelling steps which aim at removing approximately all spatial and temporal correlations, at whitening the data, such that it is replaced by spatiotemporal innovations; thereby a link to the maximum-likelihood method is

provided and, for appropriately chosen models, the problem of having to estimate probability distributions of unknown shape is removed. Consequently mutual information can be reinterpreted in the framework of dynamical model comparison, since it is shown to be equivalent to the difference of the log-likelihoods of coupled and uncoupled models for a pair of sites. The practical application of this methodology is demonstrated by employing a simulated data set generated by a stochastic coupled-map lattice.

(3) Fusing EEG and fMRI based on a bottom-up model: Inferring activation and effective connectivity in neural masses

Riera J., Aubert E., Iwata K., Kawashima R., Wan X., Ozaki T.
(NICHe, Tohoku University)

The elucidation of the complex machinery used by the human brain to segregate and integrate information while performing high cognitive functions constitutes a subject of imminent future consequences. The most significant contributions in this field, named cognitive neuroscience, have been achieved up

today by using innovative neuroimaging techniques (such as EEG and fMRI), which measure variations in both time and space of some interpretable physical magnitudes. Extraordinary maps of the cerebral activation involving function-restricted brain areas and their graphs of functional connectivity have

been obtained from EEG and fMRI data by solving some sort of spatio-temporal inverse problems, in which constitutes a top-down approach. However, in many cases, a natural bridge between these maps/graphs and the causal physiological processes is lack, originating some misunderstandings in their interpretation. The recent advances in the comprehension of the underlying physiological mechanisms associated to different cerebral scales have provided to researchers with an excellent scenario to develop sophisticated biophysical models that permit an integration of these neuroimage modalities, which must share a common etiology. In this paper, a bottom-up approach,

involving physiological parameters in specific mesoscopic dynamical equations, is proposed. Further observation equations encapsulating the relationship between the meso-states and the EEG/fMRI data are obtained on the basis of the physical foundations of these techniques. A methodology for the estimation of parameters from fused EEG/fMRI data is also presented. In this context, the concepts of activation and effective connectivity are carefully revised. This new approach permitted us to examine some future prospects for the integration of multimodal neuroimages.

(4) Linear vs nonlinear influences of EEG rhythms on the fMRI

Fumikazu Miwakeichi¹⁾, Pedro A. Valdes-Sosa²⁾, Jorge Bosch²⁾, Hiroaki Mizuhara¹⁾, Yoko Yamaguchi¹⁾

(¹⁾RIKEN Brain Science Institute, Lab. For Dynamics of Emergent Intelligence ²⁾Cuban Neuroscience Center)

Concurrent EEG/fMRI offers the potential for achieving information about brain function with simultaneous high spatial and temporal resolution. One approach takes advantage of the temporal fluctuations of the EEG frequency spectrum by using its envelope as a reference signal in order to identify that portion of the BOLD signal related to oscillatory networks [Goldman et al. (NeuroReport 2002); Laufs et al.(NeuroImage 2003)]. We have recently shown that multi-linear statistical methods allow a fruitful exploration of these EEG/fMRI relations. Miwakeichi et al.[NeuroImage 2004] showed that Parallel Factor Analysis (PARAFAC) can perform a time/frequency/spatial (T/F/S) atomic decomposition that identifies fundamental modes of oscillatory EEG activity. Martinez et al.[NeuroImage 2004] then went on to relate these modes to spatial components of BOLD signal changes. A limitation of all these studies is the assumption of a linear relation of the EEG with a “standard”

hemodynamic response function (HRF) modeled as a sum of gamma functions. This study will examine these assumptions. The EEG of a subject was obtained for every 30 seconds during two conditions: resting and mental arithmetic task; and then transformed into a three dimensional T/F/S data set by a Morlet wavelet transform. The temporal signatures of the alpha and theta atoms were used to predict the BOLD signal. The model used for prediction was a semi-parametric auto-regression [Speckman(J. Roy Stat. Soc. B 1988)]. This allows the separation of the HRF into purely linear and nonlinear portions and to test which parts are present in the data. Additionally the nonlinear part is estimated non-parametrically, which allows examination of the type of nonlinearity that underlies the HRF. A segmentation of the brain into regions in which the HRF is linear and nonlinear will be shown.

(5) Rhythm networks for cognitive processing revealed by a simultaneous fMRI and EEG

Hiroaki Mizuhara¹⁾, Li-Qun Wang²⁾, Koichiro Kobayashi^{3),1),4)}, Yoko Yamaguchi^{1),4)}

(¹⁾RIKEN Brain Science Institute, ²⁾Tokyo Denki University, ³⁾Iwate University, ⁴⁾CREST, JST)

A number of electrophysiological and noninvasive brain

measurement studies in rodents and humans have suggested

the importance of phase synchronization in theta rhythm, local field potential oscillation in 4- to 8-Hz, in cognition, behavior and memory. Theta rhythm activities known to distribute over various cortices might integrate distant regions into a task-dependent coherent ensemble. In this paper, we hypothesize that phase synchronization of scalp electroencephalography (EEG) theta rhythm can index distant regional activities integrated with theta oscillations measured by functional magnetic resonance imaging (fMRI). By using simultaneous EEG and fMRI, we developed a method to abstract blood oxygen level dependent (BOLD) signals associated with the EEG phase synchronization. Firstly we identified phase synchronization indexes (PSI) of each pairs of EEG electrode by computing the angular dispersions of the phase differences, and tested the task-dependent increase of

phase synchronizations during a mental arithmetic task relative to that during the eye close resting. Based on the EEG PSI, we estimated the BOLD responses (expected BOLD) by convoluting the hemodynamic response function (HRF) to the time series of the EEG PSI. Thus, here we assumed that the long-range phase synchronization accompanied the local neuronal activities in the distant cortical regions, and the BOLD responses occurred after the proper neuronal activities with a time delay, which was decided by HRF. The regression values were computed between the measured BOLD and the expected BOLD. The results showed that long-range theta synchronization concerns with integration of a distant cortical network for cognitive task processing where positive and negative BOLD responses cooperate together.

(6) MRIにおける中心周波数 (f_0) の役割とその変動の fMRI への影響

島田育廣¹⁾, 藤本一郎¹⁾, 赤土裕子¹⁾, カラン明子¹⁾, 正木信夫¹⁾, 村瀬研也²⁾

(¹) (株) 国際電気通信基礎技術研究所 脳活動イメージングセンタ

²⁾ 大阪大学大学院 医学系研究科 医用物理工学講座)

中心周波数 (f_0) は MRI 画像の基本となる情報である。この変動が画像の位置ズレを生じることは良く知られているが、信号ドリフトとの関係についてはほとんど論じられてこなかった。fMRI データでしばしば報告される低周波の信号ドリフトは、この中心周波数の変動によって引き起こされると考えられる。試作 Phantom を用いた時

系列信号変動の再現実験を行ったところ、信号ドリフトはスキャンボリュームの全スライスで同一パターンを示さなかった。この結果は、fMRI 解析において、中心周波数変動の影響を補正するためには、位置ズレ補正のみでは不十分であり、脂肪抑制パルスの波形特性の影響を考慮する必要があることを示唆する。

(7) 機能的 MRI を用いた小児中枢性聴覚障害スクリーニング法の開発

中井昭夫, 川谷正男, 眞弓光文¹⁾, 柏倉健一²⁾, 藤原康博, 石森佳幸³⁾, 米倉義晴⁴⁾, 定藤規弘⁵⁾

(¹) 福井大学 (²) 群馬県立医療短期大学 (³) 福井大学医学部附属病院放射線科

(⁴) 福井大学高エネルギー医学研究センター (⁵) 生理学研究所)

【はじめに】先天性難聴に対し新生児スクリーニングが行われているが、一次聴覚中枢障害は ABR でも見落とされ、後にコミュニケーション・知能障害につながる。fMRI は強力な脳機能画像法だが、聴覚については機器からのノイズが問題となる。我々はこのノイズを利用し聴覚野の反応を画像化する方法を開発、中枢性聴覚障害の

スクリーニング法として有用か検討した。

【方法】本研究は倫理委員会の承認を得、文書による同意の得られたもののみを対象とした。健常成人による基礎的検討の後、ハイリスク新生児の頭部 MRI の際 fMRI を施行した。磁場コイルへの電流を一時的に停止し音圧を変化させ、これを聴覚刺激とした。

【結果】健常成人では一次聴覚野を含む両側聴覚野に賦活が観察され、同様の賦活は乳児でも認められた。

【考案】本法は従来困難であった中枢性聴覚機能を簡便に

検出可能でスクリーニング法として有用であると思われる。

(8) Decoding the perceptual and subjective contents of the human brain

Yukiyasu Kamitani

(ATR Computational Neuroscience Laboratories)

The conventional approach of neuroimaging examines how the brain encodes stimuli or cognitive states by mapping brain activity induced by experimental conditions. Here, I present a "decoding" approach where neuroimaging signals are used to predict, or decode, internal states of the subject. Unlike the conventional mapping approach, which localizes brain functions in an anatomically meaningful way using univariate statistics, our approach aims to extract information from apparently meaningless patterns of signals from multiple channels using statistical learning algorithms. I show that functional magnetic resonance imaging (fMRI) can measure reliable patterns of visual cortical activity that accurately predict the orientation of stimulus gratings, even though the representation of

orientation in the human visual cortex (in monkeys, < 1 mm interval between iso-orientation columns) is thought to be beyond the resolution of fMRI voxels (~3 mm cube). Next, I demonstrate an example of "mind-reading" where the fMRI activity patterns learned with single gratings can be used to predict the orientation to which the subject is paying attention in two overlapping gratings. These results indicate that fMRI signals in the human visual cortex allow for accurate prediction of detailed perceptual and subjective contents of our visual experience. I will also discuss possible sources of orientation information, and applications of this approach to other domains.

(9) Seeing a dreaming brain -Brain activation preceded rapid eye movements during REM sleep

Satoru Miyauchi, Masaya Misaki, Takahide Fukunaga, Shigeyuki Kan

(Brain Information Group, Kansai Advanced Research Center,

National Institute of Information and Communications Technology)

At the first meeting held two years ago at NIPS, we introduced "Be-fMRI (Brain event-related fMRI)" as a new method of fMRI experiments. In a Be-fMRI experiment, no stimuli are presented, and subjects are required to perform no specific tasks. Instead, other physiological indices (e.g. EEG, eye movements and so on) are simultaneously recorded with fMRI data. Also explored is brain activation that accompanies

spontaneous events defined by the physiological indices. A key point in Be-fMRI is that events are not experimentally defined stimuli or tasks, but spontaneously occurring events in the brain. It implies that the fMRI activation does not necessarily follow but may precede the event. As an example of such activation, we introduce brain activation that starts before the onset of rapid eye movements during REM sleep.

(10) fMRI 内における指部への空気圧刺激を用いた系列運動課題実験

堀江亮太⁽¹⁾, 平田智秋¹⁾, R. Allen Waggoner²⁾, 上野賢一²⁾, 田中啓治²⁾, 程康²⁾, 谷淳¹⁾
(独立行政法人理化学研究所, 脳科学総合研究センター,¹⁾ 動的認知行動研究チーム,²⁾ 認知機能表現研究チーム)

Serial reaction time (SRT) tasks, in which subjects respond to sequential stimuli by pressing corresponding buttons as fast and accurately as possible, are widely used in psychophysics experiments and imaging studies for investigating motor learning. It is known from previous psychophysics experiments that motor sequence learning is partially represented by the positions of responding digits. To exclude the cognitive processes involved in the visuo-motor transformation in the SRT task, we use tactile stimuli and deliver them to the corresponding digits directly. One difficulty in implementation is to deliver the stimulus to a digit and detect the response from that digit simultaneously. Additional difficulties in fMRI studies arise from the fact that metal and electrical devices cannot generally be used inside the magnet. To solve these problems,

we have developed a non-metal and non-electrical apparatus with air-puffs as stimuli. The apparatus has four cylinders (corresponding to the four digits of the right hand) attached to spring-like silicon rubbers. Air-puffs are delivered to a digit through a hole in the corresponding cylinder. When the cylinder is pressed in responding to an air-puff, it moves to block the light-path so the response timing can be recorded. Subjects were trained in an SRT task, in which sequences of stimuli were generated by a simple artificial grammar, for an extended period (15 to 29 days). Subjects were scanned before and after the training. In this presentation, we will report the design and configuration of the apparatus, along with some preliminary behavioral and fMRI results.

(11) Capillary level imaging of local cerebral blood flow in epileptic foci

Hajime Hirase (RIKEN Brain Science Institute Hirase Reserch Unit)

Vascular and neuronal activity coupling was predicted more than a century ago and is the basis of modern functional imaging techniques such as positron emission tomography (PET) and functional magnetic resonance imaging (fMRI). Despite the importance of local regulation of the blood flow, capillary level quantification of cerebral blood flow has been limited by the spatial resolution of functional imaging techniques and the depth penetration of conventional optical microscopy. Two-photon laser scanning microscope (2PLSM) has the necessary spatial resolution to image capillary red blood cell (RBC) flow in the depth of the cerebral cortex, when the serum is loaded with a dextran conjugated fluorescent dye (FITC). Using this technique, RBC flow in capillaries in layer 2/3 of

the mouse somatosensory cortex was examined in vivo. Basal capillary flux was quantified as ~ 30 RBCs/sec. When focal interictal (epileptiform) activity was induced by local infusion of bicuculline methchloride, the average RBC flux in the epileptic foci increased by approximately 50%. The increase of RBC flux decayed monotonically with the distance from the epileptic focus and reached the control level at ~ 300 micrometer from the center of the epileptic focus. These results indicate that hyper-synchronized neural activity is associated with increased capillary perfusion in a localized cortical area. Notably, the spatial spread of the RBC increase associated with the focal epileptic events is smaller than currently available spatial resolution of fMRI.

15. 電子位相顕微鏡法の医学的・生物学的応用—Tomography への展開をめざして

2005年3月24日—3月25日

代表・世話人：臼田信光（藤田保健衛生大学・医学部）

所内対応者：永山國昭（自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター）

- (1) 位相差電子顕微鏡の今昔
永山國昭（自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター）
- (2) 200 kV 透過電子位相顕微鏡の開発
新井善博（日本電子株式会社）
- (3) Applicability of Phase Contrast TEM to Biological Specimens
Radostin Danev（自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター）
- (4) 電子位相顕微鏡による細胞内構造の観察
厚沢季美江（藤田保健衛生大学・医学部）
- (5) 位相差像トモグラフィーの可能性
元木創平（日本電子株式会社）
- (6) 電子線トモグラフィの最新アプリケーション
青山一弘（日本エフイー・アイ株式会社・アプリケーションラボラトリー）
- (7) TEM トモグラフィによる3次元計測 3-Dimensional observations and measurements by TEM-Tomography
及川哲夫（日本電子株式会社）
- (8) 機能中のアクトミオシン複合体の3次元構造解析
片山栄作（東京大学・医科学研究所）
- (9) 電子顕微鏡による単粒子解析法の開発と IP3 受容体チャンネルの構造決定
佐藤主税（産業技術総合研究所）
- (10) クライオ電子顕微鏡法の可能性 — 位相顕微鏡からトモグラフィーまで —
木村能章（生物分子工学研究所）
- (11) 高配向高分子薄膜上へのナノスケールパターン形成
登阪雅聡（京都大学・化学研究所）
- (12) Structure of Carbon Nanotubes and Their Bio-medical application.
遠藤守信（信州大学・工学部）
- (13) HDC-TEM によるシアノバクテリア *Synechococcus* sp. PCC 7942 の微細構造観察
金子康子（埼玉大学・理学部）
- (14) 超高压電顕による細胞小器官の立体観察
野田 亨（藍野大学・医療保健学部）
- (15) 嗅球神経回路の三次元構造解析
樋田一徳（徳島大学大学院・ヘルスバイオサイエンス研究部）
- (16) 電子顕微鏡で染色体を見る
前島一博（独立行政法人理化学研究所）
- (17) プラスミドの運動を制御する螺旋状構造体
仁木宏典（国立遺伝学研究所・放射線・アイソトープセンター）
- (18) 微小管の枝分かれによる形成
村田 隆（自然科学研究機構・基礎生物学研究所）

(19) 膜電位センサーをもつ酵素

岡村康司 (自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター)

【参加者名】

青山一弘 (日本エフイー・アイ株式会社), 厚沢季美江 (藤田保健衛生大・医), 新井善博 (日本電子株式会社), 臼田信光 (藤田保健衛生大・医), 内田仁 (岡崎統合バイオ), 遠藤守信 (信州大学・工), 及川哲夫 (日本電子株式会社), 大河原浩 (生理研), 岡村康司 (岡崎統合バイオ), 片岡正典 (計算科学研究センター), 片山栄作 (東大・医科学研究), 加藤貴之 (科技構 ICORP 超分子ナノマシンプロジェクト (阪大)), 加藤幹男 (大阪府立大・総合科学), 金子康子 (埼玉大・理), 喜多山篤 (基生研), 木村能章 (生物分子工学研), 佐藤主税 (産総研), 重松秀樹 (岡崎統合バイオ), 瀬藤光利 (岡崎統合バイオ), 田中雅嗣 (東京都老人総合研), 樋田一徳 (徳島大院・ヘルスバイオサイエンス), 登阪雅聡 (京大・化学研), 仁木宏典 (遺伝研・放射線アイソトープセンター), 新田浩二 (埼玉大・

理), 野田亨 (藍野大・医療保健医学), 花市敬正 (株式会社花市電子顕微鏡技術研), 花市佳明 (株式会社花市電子顕微鏡技術研), 早坂孝宏 (岡崎統合バイオ), 福田善之 (総研大), 前島一博 (理化学研), 真柳浩太 (生物分子工学研), 水田龍信 (東京理科大・生命科学研), 村田隆 (基生研), 元木創平 (日本電子株式会社), 諸根信弘 (国立精神神経センター・神経研), 安田浩史 (岡崎統合バイオ), Radostin Danev (岡崎統合バイオ), 中沢綾美 (藤田保健衛生大・医), 深澤元晶 (藤田保健衛生大・医), 中杉光宏 (藤田保健衛生大・医), 水谷謙明 (藤田保健衛生大・医), 廣川秀夫 (上智大学名誉教授), 渡辺良雄 (株式会社八神製作所), 沖代美保 (科技構), 新聞秀一 (岡崎統合バイオ), 鈴木邦律 (基生研), 有田佳代 (岡崎統合バイオ), 伊東康支 (名大・医), 宮田裕貴 (日大)

【概要】

5年目を迎える今年の会合は節目の研究会となった。研究会と軌を一にして開発した300kVの位相差電子顕微鏡が順調に稼動し、2004年春から先進的な生物電顕のデータが撮れ始めたからである。これらの最新データをもとに位相差法の生物応用への将来性について、構造生物学、細胞生物学系、分子生物学、生理学、基礎医学など多様な分野において議論が行われた。

研究会は24日の午後から始まり、まず位相差法の方法論的側面について歴史と200kV最新鋭機の紹介があった。次に既設の300kV位相差電顕を用いた種々の応用例が紹介された。位相差法により生物試料の無染色観察が可能になったため、同一試料について“生”状態での光顕-電顕ハイブリッド観察が現実的なものとなり、将来の大きな発

展を予見させた。次に、位相差電顕の最大ターゲットとしてのトモグラフィー法の現状紹介が続いた。無染色生物試料を5nmの分解能で立体観察できれば全く新しい生物学がスタートすると言ってよい。その方向での議論が行われた。

2日目(25日)は方法の異なる3つの高分解能生物電顕の発表があり、その先端性が披露された。また生物の近辺分野である高分子材料への位相差電顕の応用例も紹介され、その威力が示された。午後は高次の生物系について位相差法の応用および生理研1,000kV電顕を用いた立体像観察の紹介があり、両者の結合も有効と予見させた。最後は位相差法がこれから応用されるであろう様々な分野のトピックスが集められ、各講演者からの位相差法への期待が寄せられ2日間の研究会の幕を閉じた。

(1) 位相差電子顕微鏡の今昔

永山國昭 (自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター)

位相差電子顕微鏡のアイデアは既に1940年代、電顕発明の当初から存在していたと思われる。不朽のCTF(コントラスト伝達関数)理論を打ち立てたScherzerの論文

(J. Appl. Phys. 20 (1949) 21)は、Zernikeの位相差法と完全に相補的であるし、またBoerschが電場制御による位相板のアイデアを提出したのが1947年である(Z.

Naturforsch. **2a**, 615)。その後 Kanaya らの実験報告が 1958 年に発表され, Farget ら(1962), Badde ら(1970), Unwin(1970), Johnson ら(1973), Willasch(1975), Krakow ら(1975)と続いた。しかし 1970 年代を最後に約 30 年間位相差電子顕微鏡は完全に沈黙した。

その背景には, 材料分野における, defocus phase

contrast 法とシミュレーション法の結合による定量解析の成功および生物分野における種々の染色法の成功があったと思われる。しかし位相物体を相手にする電子顕微鏡の正しい測定法は今も昔も位相板を使う位相差法であることに変わりはない。いくつかの具体例を岡崎で開発した位相差電子顕微鏡で示した。

(2) 200 kV 透過電子位相顕微鏡の開発

元木創平, 細川史生, 新井善博 (日本電子株式会社)

Radostin Danev, 永山國昭 (自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター)

200 kV TEM (JEM-2011) を基に, 専用型透過電子位相顕微鏡を開発した。

特徴は;

2つのミニレンズ (transfer doublet lens) を対物レンズ内に設け, 対物レンズの回折像と共役な回折像を中間レンズの前方位置に移動形成した。

①で形成した回折像面に位相板専用ステージ/ホルダーを設け, 位相板の精密駆動を可能とした。

位相板の汚染とチャージ防止のために, 位相板を試料加熱ホルダーに装着した。

通常の TEM 機能を全く損なわずに, 従来像と位相差像の両方を観察可能とした。

仕様は;

加速電圧: 200 kV 分解能: 0.23 nm

レンズ諸定数: f_0 : 2.3 mm, C_s : 1.0 mm, C_c : 1.55 mm

位相板: 最高加熱温度: 700°C, X-Y 移動精度: 0.01 μ m,

Z 移動精度: 1 μ m

最大倍率: 位相差像 約 50 万倍, 通常 mode 150 万倍
実験結果

位相差像として, カーボングラファイトの 0.34 nm 格子像, Au 箔膜の 0.204 nm 格子像, アモルファス Ge 試料で分解能 0.23 nm が確認できた。

*本装置の開発は「科学技術振興機構」からの「新技術委託開発事業」の一環として行っている。

(3) Applicability of Phase Contrast TEM to Biological Specimens

Radostin Danev, Kuniaki Nagayama (自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター)

Traditionally the observation of biological specimens by Transmission Electron Microscope (TEM) is done by using the defocus phase contrast technique. Recently a few new phase contrast techniques for TEM have been developed. In particular interest among these are the Zernike Phase Contrast TEM (ZPC-TEM) [1-3] and the Hilbert Differential Contrast TEM (HDC-TEM) [4-6]. Both have been successfully applied for the observation of various biological specimens.

In this work we compare the Conventional TEM (CTEM) utilizing defocus phase contrast with the ZPC and HDC TEMs. The advantages and disadvantages in the application

of each technique to various types of specimens are discussed. Theoretical simulations and experimental results illustrate the presented ideas.

1. K. Nagayama, *J. Phys. Soc. Jpn.*, **68** (1999) 811.
2. R. Danev, K. Nagayama, *Ultramicroscopy*, **88** (2001) 243.
3. R. Danev, K. Nagayama, *J. Phys. Soc. Jpn.*, **70** (2001) 696.
4. R. Danev, H. Okawara, N. Usuda, K. Kametani, K. Nagayama: *J. Bio. Phys.*, **28** (2002) 627.
5. R. Danev, K. Nagayama, *J. Phys. Soc. Jpn.*, **73** (2004) 2718.
6. Y. Kaneko, R. Danev, K. Nitta, K. Nagayama, *J. Electron Microsc.*, **54** (2005) 79.

(4) 電子位相顕微鏡による細胞内構造の観察

厚沢季美江, 中沢綾美, 臼田信光 (藤田保健衛生大学・医学部)

Danev Radostin, 永山國昭 (自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター)

細胞の構造は、電子線の吸収がほとんどない。位相情報を可視化する電子位相顕微鏡を用いて真核細胞を観察した。

細胞は、カーボン薄膜を張ったグリッド上に培養した。ヒト血液より血小板を分離してグリッド上に採取した。比較のためには、twice-cycled microtubule (微小管) と、蔗糖密度勾配超遠心法により得られた細胞小器官を用いた。これらに浸漬急速凍結固定を行い、液体ヘリウム冷却試料室に移した。ゼルニケ位相板および半円 π 位相板を装着した

JEM-3100FFC 電子顕微鏡により加速電圧 300kV で無染色で観察した。

培養細胞・血小板の細胞質中に細胞小器官が明瞭に観察された。微小管においては protofilament, 細胞小器官においてはその内部構造という小さな構造まで可視化された。細胞内構造の位相コントラストによる観察が可能であると示された。この方法により、染色を行っていない細胞の真の姿を可視化できると考える。

(5) 位相差像トモグラフィーの可能性

元木創平, 新井善博 (日本電子株式会社)

Radostin Danev, 永山國昭 (自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター)

透過電子顕微鏡 (TEM) を用いたトモグラフィー (TEMT) は、三次元形態観察の有力な方法として様々な研究分野で利用されている。トモグラフィーは、試料の二次元投影像 (TEM 像) を様々な方向から取得し、これらを逆ラドン変換することで三次元構造を取得する。TEM 投影像のコントラストは試料深さ方向の情報を含

んでおり、コントラストが小さな TEM 像から得られた 3D 再構成像からは、多くの情報を引き出すことは望めない。透過電子位相顕微鏡の位相差による高コントラスト像は、トモグラフィーの精度向上へ大きな役割を担える可能性がある。位相差像を用いたトモグラフィーの解釈および今後の可能性について議論した。

(6) 電子線トモグラフィの最新アプリケーション

青山一弘 (日本エフイー・アイ株式会社・アプリケーションラボラトリー)

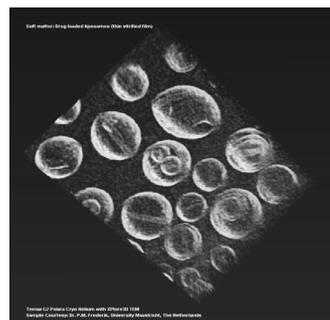
TEM を用いた電子線トモグラフィは電子顕微鏡法関連の手法の中でも比較的新しい手法であり、近年非常に注目され、大きな展開を見せている。これは、元々は生物試料向けに開発された手法ではあるが、半導体など無機材料などにも応用され、高分解能 3 次元構造情報が得られている。今回は、通常のトモグラフィに加え、最新のアプリケーションを紹介する。

STEM トモグラフィ STEM モードにおいてもトモグラフィの実行は可能であり、基本的なトモグラフィ取

得のシステムは通常の TEM モードと共通である。STEM トモグラフィは TEM と比較し 2 つの点において優れた特徴をもっている。第一に試料の結晶性による回折波が引き起こすコントラスト変化がおきないこと。第二に傾斜による同一像内のフォーカス不均一を回避できることである。

クライオトモグラフィ FEI では新しいコンセプトの液体ヘリウム冷却ステージを持つ極低温電子顕微鏡 TECNAI-Polara を開発した。Polara の一番重要な特徴は

ヘリウムステージでありながら 70 度という高傾斜のユーセントリックステージを実現していることである。Polara を用いれば生体細胞もしくは組織の凍結切片を用いたクライオトモグラフィが可能となる。さらに、クライオトランスファー機構をもつので、急速凍結→クライオセクションにより作成された氷包埋試料の観察も可能である。



Thin vitrified film of drug-loaded liposome vesicles

(7) TEM トモグラフィによる 3 次元計測 3-Dimensional observations and measurements by TEM-Tomography

及川 哲夫, 元木 創平 (日本電子株式会社)

清水 美代子, 古河 弘光 (日本電子システムテクノロジー)

透過電子顕微鏡 (TEM) は、ナノスケール・オーダーでの材料研究において最も有力な観察・分析装置として広く利用されており、その空間分解能は 0.1 nm 前後と極めて高いにもかかわらず、試料の厚み方向の情報を精度よく求めることは困難であった。そこでこの欠点を補うために、CT (Computed Tomography) 法の原理を応用した TEM-CT 法¹⁾ が最近一般化し、高分子材料²⁾ や生物試料などで応用が広まりつつある。この方法では試料内部の 3 次元構造の観察や計測ができるが、実際の応用では、いくつかの観察テクニックが必要である³⁾。本講演では、これらの技法を中心にその応用例を紹介した。

引用文献

Furukawa, H., Shimizu, M., Suzuki, Y. and Nishioka, H.; *JEOL News* **36** (2001) 12.

Yamaguchi, K., Takahashi, K., Hasegawa, H., Iatrou, H., Hadjichristidis, N., Kaneko, T., Nishikawa, Y., Jinnai, H., Matsui, T., Nishioka, H., Shimizu, M. and Furukawa, H.; *Macromolecules* **36** (2003) 6962.

S. Motoki, M. Naruse, T. Oikawa, N. Endo, K. Kawamoto, M. Shimizu, and H. Furukawa; *Proc. European Microscopy Congress* (2004). (Antwerp).

(8) 機能中のアクトミオシン複合体の3次元構造解析

片山栄作, 木森義隆 (東京大学・医科学研究所)

小口洋介, 野中和哉, 馬場則男 (工学院大学 電気工学科)

機能状態のアクトミオシンの立体構造解析は滑り運動分子機構の理解に必須であるが、複合体の結晶化は望み難く電子顕微鏡解析が中心となる。硬直複合体ではらせん対称性を利用できるが、ATP を加えると親和性が大きく低下し、細かい刻み、広範囲の傾斜角度で撮影した多数の画像を逆投影するトモグラフィ法以外には術がない。しかし、試料傾斜角度の制限のため高さ方向の分解能は著しく劣化し、滑り運動中ミオシン頭部の高分解能構造解析は事

実上不可能であった。われわれは *in vitro* 滑り運動アッセイ系を急速凍結ディープエッチレプリカ法と組み合わせで機能中のアクトミオシンの表面構造を捉え、その立体構造解析を進めてきたが、その過程で、従来の逆投影法とは全く異なる新しい原理の 3 次元再構成法の開発に至った。最近のアルゴリズムの改良により、その手法はレプリカ画像以外の奥行きのある構造物にも応用できる。原子モデルからシミュレーションした画像と蛋白質表面像のパター

ン比較による構造解析法を紹介した。

(9) 電子顕微鏡による単粒子解析法の開発と IP3 受容体チャネルの構造決定

小椋俊彦, 三尾和弘, 佐藤主税 (産業技術総合研究所・脳神経情報研究部門&生物情報解析センター)

IP3 受容体チャネルや電圧感受性 Na チャネルは 6 回膜貫通ドメインを基本単位とする 4 回対称の膜タンパク質である。このグループのタンパク質は結晶作成が難しく、電子顕微鏡を基にした単粒子解析によって構造が決定された。その構造は外殻と中心構造の 2 つの部分により構成されるベル型であった。これらの構造決定のため開発した方法と、それらを用いて行った IP3 受容体の構造解析について述べた。

結晶を用いずにタンパク質構造を決定する単粒子解析において、分解能を規定する最も重要な条件の一つは、粒子画像の枚数である。我々は人間が画像を拾い上げなくても良い完全自動拾い上げプログラムの作成に挑むために、情報工学的手法の一つである焼きなまし法 (SA 法) を応用した自動集積化法 (auto-accumulation 法) を開発した¹⁾。さらに、この方法により拾い上げた画像を、これまでに開発してきたニューラル・ネットワーク (NN)法の学習データとすることで、さらなる高精度化と高速化を達成した^{2,3)}。また、結晶を作成して構造を解析する従来法は、非常に高度な蛋白試料の精製を必要とす

るという問題点を含んでいた。その克服のため、我々が電顕画像用に改良・開発してきた NN 法の一つである GNG (Growing Neural Gas) を用いた分類プログラムをさらに改良した。その結果 3 次元的な向きの違いを分類・平均化できるだけでなく、精製が不十分で多少の混入タンパク質が存在する場合でも、それは別の分子として排除できるシステムを構築できた⁴⁾。

IP3 受容体は細胞内小胞に存在する Ca チャネルで、細胞内での情報伝達に重要な役割を果たしている。開発された新たな手法を用いて、その構造を決定した⁵⁾。本 IP3 受容体の構造は、藤吉研究室と御子柴研究室との共同研究である。

1. Ogura, T., Sato, C.: *J. Struct. Biol.*, **146**, 344-358 (2004).
2. Ogura, T., Sato, C.: *J. Struct. Biol.*, **136**, 227-238 (2001).
3. Ogura, T., Sato, C.: *J. Struct. Biol.*, **145**, 63-75 (2004).
4. Ogura, T., Iwasaki, K., Sato, C.: *J. Struct. Biol.*, **143**, 185-200 (2003).
5. Sato, C. et al: *J. Mol. Biol.*, **336**, 155-164 (2004).

(10) クライオ電子顕微鏡法の可能性—位相顕微鏡からトモグラフィーまで—

木村能章 (生物分子工学研究所・構造解析研究部)

生命科学の諸現象は、蛋白質などの生物由来の高分子の構造解析により、機能解明が急速に進んでいる。しかし、X 線結晶解析や多次元 NMR の解析には、結晶作成や高濃度均一溶液などの諸条件が必要だが、1990 年代を通じて急速に発展しているクライオ電子顕微鏡は、生理的条件下に近い状態の試料を急速凍結して測定し、複雑な蛋白や核酸などの共同作用の観測が可能である。しかし、クライオ法で観測する位相コントラスト像は、コントラストが非常に低いことから、応用も、分解能も限られて

いた。この問題は、結晶試料を用いることにより単一格子当たりの電子線 (従ってコントラスト) が限られていても、容易に積算ができ、様々な補正・修正が可能となり結果として現在は 2.4 オングストロームで X 線結晶解析と全く遜色のない構造解析が可能となっている。このことから、さらに結晶試料でない観察への道標ができ、位相顕微鏡からトモグラフィーまでのクライオ電子顕微鏡の可能性を紹介した。

(11) 高配向高分子薄膜上へのナノスケールパターン形成

登阪雅聡 (京都大学・化学研究所)

我々は配向の制御された100nm以下の周期をもつ格子状パターンを、広範な物質から比較的簡単な方法で作成できることを見出した。スライドガラス等の平滑な基板を加熱し、その表面に poly (tetrafluoroethylene) (PTFE) の棒を擦りつける事により、一軸配向した PTFE 薄膜が形成される。この PTFE 薄膜上に、高分子や低分子有機化合物など種々の物質から作成した希薄溶液をキャストす

ると、溶媒の蒸発後、格子状のパターンが観察された。パターンを形成する棒状構造の幅は 60nm 程度であり、格子の周期は 100nm 程度であった。Zernike 位相板を用いた TEM により撮影されたポリスチレンによるパターンの像から、格子状パターンは数本の分子が凝集して出来た粒子により形成されたと考えられた。このような構造が形成されるメカニズムについて現在検討中である。

(12) Structure of Carbon Nanotubes and Their Bio-medical application.

Morinobu Endo (Faculty of Engineering, Shinshu University)

Carbon nanotubes, which consist of rolled graphene layers built from sp^2 carbon units, have attracted the attention of scientists, not only from a fundamental point of view but also from technological grounds [1, 2]. In addition to numerous physicochemical properties of carbon nanotubes, such as their electronic, mechanical, optical and chemical characteristics, newly proved property, that is, high bio-compatibility of carbon nanotubes, make us possible to use carbon nanotubes in this promising field. Recently, we have fabricated micro-catheter prepared from carbon nanotube/nylon based composite [3]. In this presentation, carbon nanotubes will be described from the point of synthesis and structure. And then, I will evaluate the performance of nanotube-reinforced nanocomposite as microcatheter in terms of thrombogenicity and blood coagulation. The novel micro-catheter, fabricated by incorporating carbon nanotube into nylon-12, thereby improving the mechanical properties and reducing the thrombogenicity and coagulability, is very promising for use in medical applications, such as hemodialysis, cardiopulmonary bypass, intra-vascular catheters,

left ventricular support and vascular dilating devices. On top of that, the increased mechanical strength derived from the intrinsic nature of the carbon nanotubes resulted in a high resistance to fracture and highly improved handleability in operation. As well as the smoother intraluminal surface, the fact that no carbon nanotubes are exposed on the outer surface of the catheters means that the possibility of direct reaction of the carbon nanotubes with blood is small.

Reference

- A. Oberlin, M. Endo and T. Koyama, Filamentous Growth of Carbon through Benzene Decomposition, *Journal of Crystal Growth*, **32**, 335-349, (1976).
- M. Endo, Grow Carbon Fibers in the Vapor Phase, *CHEMTECH*, American Chemical Society, September, 568-576, (1988).
- M. Endo, S. Koyama, Y. Matsuda, T. Hayashi, Y. A. Kim, Thrombogenicity and Blood Coagulation of a Micro-Catheter Prepared from Carbon Nanotube-Nylon Based Composite, *Nano Letters*, **5**, 101-106 (2005).

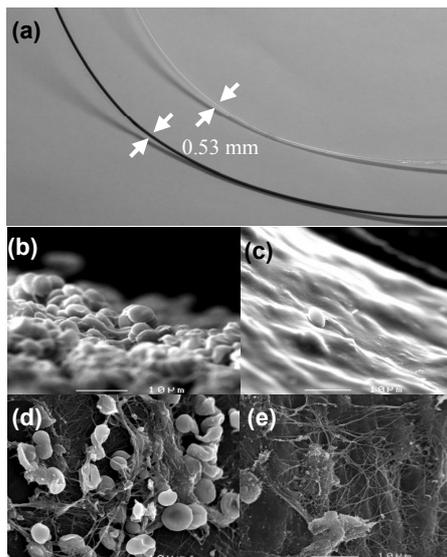


Figure 1 (a) Photographs of control catheter (transparent) and nanotube-incorporated catheter (black), SEM observations of outer (b), inner (d) surfaces of control and outer (c), inner (e) of nanotube-based catheter, respectively. It is noteworthy that novel catheter exhibit lower reactivity to blood.

(13) HDC-TEM によるシアノバクテリア *Synechococcus* sp. PCC 7942 の微細構造観察

金子康子 (埼玉大学理学部生体制御学科)

ヒルベルト高分電子顕微鏡法 (HDC-TEM) により、氷包埋したシアノバクテリア (*Synechococcus* sp. strain PCC 7942) を細胞ごと観察したところ、様々な細胞内微細構造を確認することができた。これにより、生物電子顕微鏡分野における積年の夢であった、実際に細胞内で活動している分子や微細構造をそのままの状態で捉えることが可能となった。しかし、ヒルベルト微分法により得られる像は従来法による透過電子顕微鏡像とは極めて異質

であるため、細胞内構造・分子の同定には慎重な検討を要する。シアノバクテリアのヒルベルト微分像を解読するために次の試みを行った。1)従来法である化学固定・樹脂包埋・超薄切片・電子染色像との詳細な比較、2) 蛍光顕微鏡像との比較、3)単離・精製分子のネガティブ染色像との比較、4)細胞内で大量発現させた分子の追跡。これらの検討結果をもとに、ヒルベルト微分法の可能性と今後の課題について考察した。

(14) 超高压電顕による細胞小器官の立体観察

野田 亨 (藍野大学医療保健学部理学療法学科)

超高压電顕を用いて、細胞の厚切り切片を観察することは、細胞を立体と捉え、その立体の投影像を得るということとほぼ同義である。そのためには観察する対象と背景との間に明瞭なコントラストをつける必要がある。その代表的方法が酵素組織化学とオスミウム等を用いた組織化学的方法である。酵素組織化学には鉛やオスミ

ウムブラックを最終的な反応産物とするものがあるが、ややコントラストが低く、これらが描出する小器官の立体像はやや不明瞭であったが、それに比べて、直接、還元オスミウムの沈着で描出される構造はより明瞭であった。また実際の試料を観察し、その中から意味のある細胞小器官の立体的な情報を得るためには、像のコントラ

ストのみならず、観察対象とする構造のサイズ、その構造の観察に適した切片の厚さ、そして適切な組織化学的

手法の選択等、いくつかの方法論の観点から総合的に検討し、目的に合った観察方法を選択すべきである。

(15) 嗅球神経回路の三次元構造解析

樋田一徳（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部）

分子レベルの解析により嗅球は嗅覚の一次中枢として匂い識別に関する高度な情報処理を行っていることがわかってきた。嗅球への入力と高次中枢への出力の間には多様な局所ニューロンが介在し、嗅覚情報処理に関係する嗅球神経回路を形成している。この神経回路機能の基礎となるシナプスは現時点においても電子顕微鏡（電顕）による同定が最も確実な手段であるが、電顕は解析領域が限られ、ニューロンの複雑な全体像のどの部分を解析

しているのかを知るのはいよいよ困難となることから、光学顕微鏡（光顕）によるニューロン像と電顕シナプス像の直接的な対応は神経回路の正確な理解には不可欠である。我々はこれまで、化学的性質と形態的特徴を光顕で同定した嗅球ニューロンのシナプス結合を電顕連続切片再構築法により直接解析することを試みてきた。今回はこれまで解析を進めてきたラット嗅球神経回路に関する知見を紹介し、電顕の有用性について論じた。

(16) 電子顕微鏡で染色体を見る

前島一博（理化学研究所・細胞核機能研究室）

染色体は細胞が分裂する際、複製された遺伝情報（DNA）を2つの娘細胞に正確に分配するために必須な構造体である。長さが合計2mにも及ぶヒトゲノムDNAをわずか数 μm の40数本の染色体に短時間に束ねるメカニズムは、まさに驚異的である。この染色体がどのようにして1本の長いDNAの糸から形成されるのか？という問題は長年に渡って生物学者たちの興味を集めてきた。この10年間、染色体が作られるのに必須な蛋白質複合体であるCondensinの単離など、染色体研究に著しい進歩があった。DNAがヒストンという塩基性蛋白質に巻かれてクロマチンとよばれる繊維になるのは周知の事実である。それではCondensinはどのようにクロマチンを折り畳んでいるのだろうか？この問いに答えるために、電子顕微鏡などを用いて、染色体中のクロマチンを実際に「見る」ことは非常に重要である。しかしながら、

通常の電顕はもとのイメージのprojectionを見ているので、空間的な情報は得られない。このため、私たちは比較的厚い切片を電子顕微鏡で角度を変えて撮影し、コンピュータで三次元再構築をおこなうtomographyというテクニックを使って、染色体構造の解明をおこなっている。厚さ200nmの染色体の「輪切り」を1度ずつ角度を変えて撮影し、再構築をおこなうと、個々のクロマチン繊維（直径30nm）がはっきりと見え、解析に十分な解像度を持つことがわかった。1本のクロマチン繊維に注目すると、1 μm 程度辿っていくことが可能である。染色体の末端では多くのループが中心部から放射線状にのびていることが観察され、中心部では2本のクロマチンの融合が見られた。これら得られた知見から考えられる染色体の構造について提案した。

(17) プラスミドの運動を制御する螺旋状構造体

仁木宏典 (国立遺伝学研究所)

今まで存在しないと思われていた細胞骨格系タンパク質が、原核細胞にも存在していることが次々と分かって来ている。まず細胞分裂の収縮環として知られていた FtsZ タンパク質がバクテリアチューブリンであること、さらに桿状の細胞形体形成に必須である MreB タンパク質がアクチンであることが明らかにされた。これらタンパク質は細胞内で重合し、繊維状の構造体を形成し、さらに螺旋状になる。これらの発見以降、螺旋状に分布す

るバクテリアタンパク質が今も新たに見つかっている。今回、紹介する SopA タンパク質も螺旋状構造を形成する。しかも、動的に重合・脱重合がおこり細胞内での極性を変えるものと思われる。SopA タンパク質は、大腸菌の F プラスミドの均等分配を司り、F プラスミドの移動のための、モータータンパク質と考えられている。SopA タンパク質の構造とその動態変化をさらに細かく見ることの意義について紹介した。

(18) 微小管の枝分かれによる形成

村田 隆 (自然科学研究機構・基礎生物学研究所)

高等植物の細胞は中心体を持たず、間期の微小管は細胞膜に沿って並ぶ。この微小管構造(表層微小管)は細胞の伸長方向を制御すると考えられている。我々は細胞質中の γ -チューブリンが既存の表層微小管に結合し、微小管に結合した γ -チューブリンから新たな表層微小管が枝分かれして作られることを明らかにした。GFP-チューブリンを発現させたタバコ培養細胞を用いて微小管の挙動を観察したところ、新たに生じた微小管の全ては微小管上、もしくは直前まで微小管の存在していた場所から生じた。細胞膜-微小管複合体を単離し、細胞質抽出液

とインキュベートすると細胞膜上の微小管から微小管が生じた。複合体に精製チューブリンを加えても微小管分枝は起こらないが、微小管重合阻害剤を含む細胞質抽出液で前処理すると抽出液中の γ -チューブリンが微小管に結合し、その後の精製チューブリン処理で微小管分枝が起きた。抗 γ -チューブリン抗体ビーズを用いて抽出液中の γ -チューブリンを除くと、微小管分枝は阻害された。今後は、微小管分枝の微細構造の解析と関与する因子の同定を行い、分子機構に迫る予定である。

(19) 膜電位センサーをもつ酵素

岡村康司, 村田喜理, 岩崎広英, 佐々木真理 (自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター)

従来、電位センサー構造はチャネル分子に固有のものであり、細胞の膜電位変化によるシグナル伝達は、すべてイオンチャネルの開口によって Ca²⁺ イオンなどが出入りすることにより起こると考えられてきた。今回、電位依存性チャネルの膜貫通領域と類似する領域を有するが、チャネルのポアの構造の代わりに酵素のドメインを有するタンパク (VSP: voltage sensor-containing protein) について報告した。

酵素ドメインのみからなる GST 融合タンパク質は、Malachite green assay 法による吸光度測定、及び TLC による解析により、リン脂質の脱リン酸化活性を有することが確認された。また、ツメガエル卵母細胞に cRNA を強制発現させたところ、数マイクロアンペアにも到る顕著な「ゲート電流」を認めた。この「ゲート電流」は、電位センサーの陽電荷を減らすようなアミノ酸置換により消失し、従って VSP は膜電位を感知する分子である。更

に、膜電位を変化させつつ酵素活性を検出する電気生理学的実験により、酵素活性が電位センサーの働きによって膜電位依存的に変化するという証拠を得た。VSPはホヤおよびマウスでは精巣に著明に発現が認められることから、VSPは膜電位変化を通じて精子の機能や形態形成の調節に関与することが推測された。

この分子は、膜電位変化により機能を変化させる膜タ

ンパクとして、イオンチャネル以外の経路の初めての例であり、従来イオンチャネルに限定した特質であると考えられてきた電位センサーが、より広い生理機能に使われている可能性が示された。また、現在チャネルの構造生物学分野で大論争になっている電位センサーの作動原理について新たな視点を提供した。

16. DNA 構造を基盤とするゲノム生理学の展開

2004年11月4日-11月5日

代表・世話人：加藤幹男（大阪府立大学総合科学部）

所内対応者：永山國昭（自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター）

- (1) 核酸塩基識別子の設計と合成
片岡正典（自然科学研究機構計算科学研究センター）
- (2) DNA インターカレーターを利用した核酸分析
竹中繁織（九州大学大学院工学研究院応用化学部門）
- (3) 特異な DNA 構造と相互作用因子
鳥越秀峰（東京理科大学理学部第一部応用化学科）
- (4) テロメア 1 本鎖 DNA 領域結合蛋白質とテロメア DNA との相互作用
古川亜矢子（東京理科大学理学部第一部応用化学科）
- (5) テロメア DNA 結合タンパク質の構造決定と核酸シャペロン活性
片平正人（横浜国立大学大学院環境情報研究院）
- (6) 繰り返し配列からなる一本鎖 DNA の立体構造特性
加藤幹男（大阪府立大学総合科学部自然環境科学科）
- (7) 転写による DNA 高次構造の変化と組換え
水田龍信（東京理科大学生命科学研究科分子生物学部門）
- (8) 光応答性遺伝子発現を制御するシス配列とトランス因子
朝山宗彦（茨城大学農学部分子遺伝学研究室）
- (9) DNA から見たヌクレオソームの相互作用と協調現象
木山亮一（独立行政法人産業技術総合研究所生物機能工学研究部門）
- (10) DNA 構造によるクロマチンの改変と転写制御
清水光弘（明星大学理工学部化学科）
- (11) コンフォメーションコードの解読に向けて
大山 隆（甲南大学理工学部生物学科）
- (12) 22 番染色体の全塩基配列解明と全遺伝子同定を目指した網羅的緻密解析
養島伸生（浜松医科大学光量子医学研究センター光環境医学研究分野）
- (13) ヒトゲノム解読から学ぶヒト遺伝子構造の特徴
浅川修一（慶応義塾大学医学部分子生物学教室）
- (14) polypurine/polypyrimidine 配列の比較ゲノム配列解析
田中宏幸（奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科）
- (15) 遺伝子重複によるゲノムの進化
黒川 颯（奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科）
- (16) ヒトセントロメアクロマチンファイバー上での動原体タンパク質 CENP-A 結合部位のマッピング
杉本憲治（大阪府立大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻）
- (17) 走査型光プローブ顕微鏡の開発と遺伝子検出への応用
吉野智之（独立行政法人食品総合研究所計測工学研究室）
- (18) 走査型光プローブ顕微鏡の染色体解析への適用
杉山 滋（独立行政法人食品総合研究所計測工学研究室）

(19) ゲノム生理学研究会 総括と展望

永山國昭（自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター）

【参加者名】

加藤幹男（大阪府立大学総合科学部），永山國昭（自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター），片岡正典（自然科学研究機構計算科学研究センター），竹中繁織（九州大学大学院工学研究院），鳥越秀峰（東京理科大学理学部），古川亜矢子（東京理科大学理学部），片平正人（横浜国立大学大学院環境情報研究院），水田龍信（東京理科大学生命科学研究所），朝山宗彦（茨城大学農学部），木山亮一（独立行政法人産業技術総合研究所生物機能工学研究部門），清水光弘（明星大学理工学部），大山隆（甲南大学理工学部），藁島伸生（浜松医科大学光量子医学研究センター），浅川修一（慶応義塾

大学医学部），田中宏幸（奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科），黒川頭（奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科），杉本憲治（大阪府立大学大学院農学生命科学研究科），吉野智之（独立行政法人食品総合研究所），杉山滋（独立行政法人食品総合研究所），岡部隆宏（甲南大学理工学部），西川純一（甲南大学理工学部），福江善朗（甲南大学理工学部），岩切良素（甲南大学理工学部），片山拓馬（東京理科大学理学部），内田仁（統合バイオ），早坂孝宏（統合バイオ），Krassimir Tachev（統合バイオ），Alexandre Loukanov（統合バイオ），Elbert Lee（総研大），金子涼輔（生理研）

【概要】

2003年4月になされたヒトゲノムシーケンス解析の実質的完了宣言をはじめとして，各種生物ゲノムの塩基配列解読が完成し，転写・複製・組換え等に代表されるゲノム機能の解析のための基盤情報が整備されてきている。その一方で，塩基配列に由来する構造シグナルの働きを真に理解するためには，現時点ではこれらの基盤情報が有効に利用されていないといえよう。本研究会では，DNA一次配列情報から高次構造情報へ，さらにその機能発現にいたる過程について活発に研究している研究者たちによる「DNA構造に基づくゲノム機能制御」を主題とする研究から，計19演題が報告された。DNA構造分析の新しい手法の開発，ゲノム配列に頻出する単純リピートの高次構造特性とその遺伝的不安定性への関連付け，

テロメアやセントロメア構築におけるDNA高次構造とそこに働くタンパク質因子，クロマチン構造を規定するDNA構造特性と転写活性，染色体局所におけるゲノム情報の偏りの生物学的意義，ゲノムクロマチン構造への遺伝子マッピング等の研究課題について，それぞれの研究グループが得意とする解析法を駆使して問題解決を目指している。これらの成果によって，膨大なゲノム配列情報からゲノム機能領域を抽出し，ゲノム機能の実態を構造動態として理解するための道筋が見えつつある。本研究会は，様々な解析手法による研究成果をもとに，ゲノム機能を制御調節する構造基盤に関して刺激的な議論を持つ良い機会となり，それぞれの研究の新たな展開の可能性を感じることができた。

(1) 核酸塩基識別子の設計と合成

片岡正典（自然科学研究機構計算科学研究センター）

永山により開発中の透過型電子顕微鏡を用いるDNA配列直読法は多数のDNA断片を増幅することなく配列情報を画像化し，高速・低価格で配列解析を実現する方法である。この塩基配列解析法では一本鎖DNA断片中のすべての核酸塩基を正確に特定し，電子顕微鏡へ識別情報を提供する“核酸塩基識別子”の開発が鍵となる。

核酸塩基識別子は核酸塩基を特定する認識部と識別情報を提供する指示部，それらを繋ぐ接続部から構成される。認識部には高い塩基選択性や識別子同士の会合抑制，各種溶媒に対する高い溶解性といった多くの要求が集中し，天然型核酸塩基の適用が困難であることが示唆された。報告者は上記要求を満たす新たな人工核酸塩基の開

発を計画し、天然型の塩基対構造を基盤として、1,4-デヒドロピラジンを水素供与体、1,4-ジオキシンを水素受容体とする三環性複素環を認識部として設定した。指示部としては透過型電子顕微鏡において4種の塩基の識別に必要な高い明暗差を得るために、電子密度差の大きな周期の異なる4種の重原子会合体を設定した。接続部に

メチレン鎖を採用して認識部と指示部を結合することにより核酸塩基識別子の基本設計を完成させた。未だ全合成には至っていないが、核酸塩基識別子は一本鎖 DNA 中の核酸塩基1個を識別する初めての分子であり、電子顕微鏡観察に止まらずその応用範囲は極めて広い。

(2) DNA インターカレーターを利用した核酸分析

竹中繁織 (九州大学大学院工学研究院応用化学部門)

DNA は、水溶液中ダイナミックにその構造を変化させている。この変化は、塩基対の opening, breathing などの小さな変化から三本鎖や四本鎖 DNA 形成にいたる大きな構造変化までさまざまである。このような DNA の構造変化は、DNA 配列に強く依存するが、DNA と相互作用するたんぱく質のみならずイオンや薬剤などにより誘起されることも知られている。演者は、これまで合成縫込み型インターカレーターについて研究を行ってきた。合成縫込み型インターカレーターは、ノガラマイシンに代表される天然の縫込み型インターカレーターと同様に DNA 二重らせんの塩基対の opening や breathing に強く依存し

ていることが明らかとなった。すなわち、縫込み型インターカレーターは塩基対開裂の隙間をぬって DNA 塩基対に平衡挿入 (インターカレーション) するものであった。また、これにより形成された複合体は二本鎖 DNA を強く安定化させることも明らかとなった。この考えに基づいて二本鎖 DNA ラベル化試薬としてのフェロセン化ナフタレンジイミドを設計・合成し、これを利用した DNA の電気化学的検出法を達成した。また、この分子は、テロメア四本鎖 DNA への結合できることも最近明らかとなり、この分子を利用することによりテロメラーゼ活性の電気化学的アッセイ法を達成した。

(3) 特異な DNA 構造と相互作用因子

鳥越秀峰 (東京理科大学理学部応用化学科)

外部から加えた1本鎖核酸が標的遺伝子の発現制御領域の2本鎖 DNA に特異的に結合して分子間3本鎖核酸を形成すると、立体障害で発現調節因子が当該領域に結合できず、下流の遺伝子発現が人工的に制御される。この原理に基づくアンチジーン法が注目されているが、生理条件では3本鎖核酸形成能が低いため、生体内の人工的遺伝子発現制御法としてこの方法は実用化されていない。我々はこの手法の実用化を目指し、生理条件において分子間3本鎖核酸形成能を上昇させるための研究を進めているので紹介する。

また、遺伝子発現制御領域の2本鎖 DNA の一部がほどこけて生じた1本鎖核酸が、他の2本鎖 DNA 領域に結

合することにより分子内3本鎖核酸を形成する可能性が指摘されている。分子内3本鎖核酸の生物学的意義を明らかにするために、3本鎖核酸に特異的に結合する STM1 蛋白質についても、我々は研究を進めているので紹介する。

一方、ヒトの遺伝子の一塩基多型 (SNP) が生活習慣病との関連などにおいて注目され、オーダーメイド医療の実現に向けて SNP に関する研究が精力的に展開されている。ミスマッチ塩基対と金属イオンとの特異的結合をはじめと見つけ、これを利用した SNP タイピングの新しい方法について、我々は研究を進めているので紹介した。

(4) テロメア1本鎖 DNA 領域結合蛋白質とテロメア DNA との相互作用

古川亜矢子, 鳥越秀峰 (東京理科大学理学部応用化学科)

真核生物の染色体末端のテロメアはG塩基に富む反復配列からなり, テロメアの3'末端は突出した1本鎖DNA構造である。テロメアの長さの変化は細胞の老化や癌化と密接な関係にあると考えられ, 注目されている。テロメアの長さの調節には, テロメア伸長酵素であるテロメラーゼと共に, テロメアの2本鎖DNA領域及び3'末端の1本鎖DNA領域に特異的に結合する蛋白質が関与する。

我々は, 解析が遅れている分裂酵母のテロメア1本鎖DNA領域の構造とこの領域に特異的に結合する蛋白質Pot1について解析を進めている。G塩基に富む1本鎖核

酸は, 一般的にNa⁺やK⁺イオンの存在下で折れ畳まり, G塩基4個が同一平面上に並んだ4本鎖核酸構造を形成することが知られている。分裂酵母のテロメアのG塩基に富む1本鎖DNA領域は, G塩基が3個以上連続すると, Na⁺イオンの存在下で折れ畳まり, 4本鎖核酸構造を形成し得ることを我々は見つけている。また, 分裂酵母のテロメアが形成する4本鎖核酸構造にPot1蛋白質を添加すると, 4本鎖核酸構造がほどける可能性を我々は見つけている。

(5) テロメア DNA 結合タンパク質の構造決定と核酸シャペロン活性

片平正人 (横浜国立大学大学院環境情報研究院)

hnRNP Dは, テロメア配列のDNA及びRNAに特異的に結合するタンパク質であり, テロメアDNAの維持やRNAの寿命の制御等への関与が示唆もしくは確立されている。我々はhnRNP DとテロメアDNAの複合体の立体構造をNMR法によって決定した。これによりhnRNP Dがテロメア配列のDNAを認識するメカニズムが明らかになった。

テロメアDNAは複製のたびに短くなるが, 生殖細胞等においてはテロメラーゼがテロメア配列DNAを付加する事によって, 元の長さが維持されている。テロメアDNAは生理的なイオン条件下で4重鎖を形成するが, 4重鎖の形成はテロメラーゼによる付加反応を阻害する。

我々はhnRNP Dが, テロメアDNAの4重鎖構造を1本鎖構造に“ほどく”活性を有している事を見出した。この際hnRNP Dは, あたかもDNAに対するシャペロン分子(DNAシャペロン)として機能している。hnRNP Dは, テロメラーゼによるテロメア伸長反応を, この活性により保障している可能性がある。また類縁のhnRNP A1タンパク質が, DNAの複製においてDNAシャペロンとして機能している事を見出したので, それについても報告する。

さらに真核生物のゲノムに広く見られるGGAトリプレットリピートが, 生理的なイオン条件下で, 特異な4重鎖構造を形成する事を見出した。この特異な4重鎖構造の, 複製, 組み換え等における意義を考察した。

(6) 繰り返し配列からなる一本鎖DNAの立体構造特性

加藤幹男 (大阪府立大学総合科学部自然環境科学科)

ミニサテライト, マイクロサテライトDNAに代表される単純繰り返し配列領域は, 生物ゲノム内に多数散在しており, それぞれの遺伝子座における縦列の回数は個体によって大きな多型を示す。このような多型をもたら

す要因として, 不等交叉や, 複製時の相補鎖スリップによる伸長や欠失が考えられている。本研究会では, 海水魚キチヌより単離したミニサテライト配列について, その一本鎖分子が形成する高次構造についての解析を報告

する。

材料としたミニサテライト DNA 配列は、30 塩基対を単位鎖長とし、ポリプリン/ポリピリミジン配列からなる 18 塩基領域と、75% (A+T) の 12 塩基領域に分けられる。ゲノムから単離した 6 縦列反復 (180 塩基対) を持つ DNA 断片 AL79 は、その両外側の配列をプライマーとして PCR 増幅を試みると、鋳型に由来する正しい鎖長の産物

に加えて、プラスマイナス (30 の整数倍) の鎖長を持つ、伸長分子と欠失分子の生成が観察された。この伸長・欠失の原因となると想定される鋳型一本鎖 DNA の特殊高次構造形成について、電気泳動移動度、電子顕微鏡、CD スペクトル、示差走査熱量測定、核酸塩基特異的の化学修飾の手法によって解析した。

(7) 転写による DNA 高次構造の変化と組換え

水田龍信 (東京理科大学生命科学研究分子生物学部門)

免疫グロブリン遺伝子クラススイッチ組換えは、各 C 領域上流イントロン内の、繰り返し塩基配列を特徴とする S (switch) 領域で起こる。遺伝子組換えに先立ち、S 領域 non-coding RNA の転写と、この転写産物の基質 DNA への結合が必要だとされている。我々は、この特殊な転写産物の機能を解析するために、S 領域塩基配列を組み込んだプラスミド DNA を基質に、様々な条件下、試験管内で転写させ、その産物を原子間力顕微鏡により分子レベルで可視化した。その結果、S 領域 non-coding RNA が基質 DNA と複合体を形成すること、この RNA-DNA

複合体は不安定で、その構造維持のためには陽イオンが必要であること、この複合体形成により、スーパーコイルプラスミド DNA が弛緩し、オープンサークル構造を呈すること、S 領域 non-coding RNA は凝集しやすく、グアニンに富んだ塩基配列が、その凝集のしやすさを決定していることが明らかとなった。以上、原子間力顕微鏡による一分子可視化技術により、S 領域 non-coding RNA と DNA の結合による染色体高次構造の特異的变化がクラススイッチ組換えの誘導に深く関与していることが示唆された。

(8) 光応答性遺伝子発現を制御するシス配列とトランス因子

朝山宗彦 (茨城大学農学部資源生物科学科分子遺伝学研究室)

地球上の生物の営みは、太陽光と光合成生物によって生産される酸素や有機物に依存している。藍藻の祖先は、地球上に酸素をもたらした最初の光合成生物とされ、また高等植物葉緑体の起源と考えられている。原核生物である藍藻は、培養も容易であり、遺伝学的・生化学的な解析も行えることから、光合成遺伝子などの発現調節機構を解明するための優れたモデル生物になっている。こうした観点から我々の研究グループは、光合成遺伝子 *psbA* 遺伝子の光応答性発現に注目し、その制御機構の仕組みを解析している。現在までに、転写レベルで働く「正」のシスエレメントとして、ベント DNA 構造 (NAR, 2002, 30:4658-4666) や UPE 配列 (BBB, 2003, 67:1382-1390) または転写装置である RNA ポリメラーゼ (シグマ因子)

が関与するプロモーター配列の同定に成功している (JMB, 2003, 325:857-872; GTC, 2004, in press)。また、シスエレメントに働くトランス因子として、光誘導性のシグマ因子を光合成生物において初めて発見した (FEBS Lett., 2003, 554:357-362)。一方、転写後レベルでの「負」の制御因子に関しては、暗黒条件下で mRNA の不安定性を引き起こす AU-box 配列 (NAR, 2001, 29:1835-1843) と、それを標的配列にして働くエンド型 RNase の同定と機能解析に取り組んでいる。今回は、これら光応答性遺伝子発現調節機構における転写・転写後レベルでの 2 段階制御モデルを報告すると共に、最近明らかになってきた藍藻の寿命に関与するシグマ因子の働きを、ゲノム構造の維持や代謝の面と絡めて論じた。

(9) DNA から見たヌクレオソームの相互作用と協調現象

木山亮一 (産業技術総合研究所生物機能工学研究部門)

クロマチン研究の難しさは、1 細胞中に存在するヌクレオソームの数が約 10^7 個あり、それらが隣り同士や離れた者同士の間で相互作用をしていることにある。クロマチンの形成は、DNA 複製や染色体形成の際だけでなく、転写反応の際に遺伝子の発現を活性化したり不活性化したりする場合や活性化クロマチンの境界を形成する際にも重要と考えられる¹。このような複雑なクロマチンの状態を解析するには、その基本となるヌクレオソームをある基準をもって分類することが重要な鍵になる²。特に、多くのヌクレオソームに関してある一定の基準があてはまるかを調べるためには、ゲノム構造を網羅的に調べて、コンピュータを用いた構造解析を利用する必要がある。我々は、今回、約 30 個以上のグロビン遺伝子プロモータ領域を解析することにより、進化的に保存された新たな制御領域を見いだした。この領域は、それぞれ

の遺伝子の転写開始点から 200~400bp 上流の領域で、A+T-rich で AA-あるいは TT-ジヌクレオチドの高い出現頻度を特徴とする。また、この領域は、ベント DNA 構造を示すだけでなく、実際にヌクレオソームの位相決定にも関与している³。このような領域が進化的に良く保存されていることは、ヌクレオソームの配置の情報が既にゲノム DNA に記されていることを意味すると考えられ、グロビン遺伝子の転写反応にとって重要な意味を持つことが示唆される。また、このようなヌクレオソームがゲノム DNA 上に存在することによりクロマチン全体の挙動を制御しているのではないかと考えられる。

1. Onishi & Kiyama. *Recent Devel. Nucl. Acids Res.* **1**, 131-150, 2004.
2. Kato et al. *J. Mol. Biol.* **332**, 111-125, 2003.
3. Wanapirak et al. *J. Mol. Evol.* **56**, 649-657, 2003.

(10) DNA 構造によるクロマチンの改変と転写制御

清水光弘 (明星大学理工学部化学科)

クロマチンの基本単位であるヌクレオソームは、遺伝子発現を制御する機能構造体としての役割を持っている。プロモーターなどの領域では、ヌクレオソームがしばしば正確な位置に形成されて、遺伝子の発現制御に関与していることが報告されている。一方、ヒトゲノムには、反復単位 11 塩基以下のマイクロサテライト配列が 65 万コピーも存在するが、その機能は不明である。このような単純な反復配列はヘアピン構造、左巻き Z-DNA, slipped structure, 三重鎖, 四重鎖などの特殊な non-B 型 DNA 構造を形成できる。我々は、出芽酵母ミニ染色体を

用いて、*in vivo* で単純反復配列がヌクレオソーム形成を阻害したり、また逆にヌクレオソーム形成を促進することを示した。すなわち、DNA の構造はゲノムにおけるクロマチンの構築の重要な因子の一つである。このような DNA の構造的性質を利用して、出芽酵母ゲノム a-細胞特異的遺伝子 *BARI* のプロモーター領域のクロマチンを改変し、 $\alpha 2/Mcm1p$ による転写抑制におけるヌクレオソームの機能について解析した。その結果、ヌクレオソームポジショニングは、細胞型決定に関与する遺伝子の転写制御に重要な役割を果たしていることが示された。

(11) コンフォメーションコードの解読に向けて

大山隆, 福江善朗, 隅田周志, 西川純一, 井上正太郎
(甲南大学理工学部生物学科, 甲南大学知的情報通信研究所)

DNA には, Watson と Crick の二重らせん構造の他にも, Z型 DNA, ベント DNA, 三重鎖・四重鎖 DNA など, 十数種類にも及ぶ多様な高次構造が存在する。加えて, DNA には柔軟な領域や硬い領域, それに“曲げ”に対する異方性をもつ領域が数多く存在する。最近になって, これらの高次構造や特性が遺伝情報の一つとなっていて, 世代を越えてクロマチン構造を再現するために機能したり, 遺伝子発現の制御に関与していることが明らかになってきた。また, 染色体の構築や, エピジェネティクスの制御にも関与している可能性が議論されはじめた。

我々はこれまでの研究で, 転写活性化因子などのアク

セスを保証するためのクロマチン構造の維持に負の超らせんを擬態したベント DNA 構造が寄与していることを明らかにしてきた。さらに最近, ヒトのプロモーター配列 1871 種とマウスの同配列 196 種を解析した結果, TATA ボックスとイニシエーターが, ゲノム上の他の領域には見られない共通の機械的特性を有していることを発見した。これらの特性は, TBP や TAF_{II}250, TAF_{II}150 の target-site selection に寄与している可能性がある。本研究会では, これらの知見を中心に我々の研究における最近のトピックスについて紹介した。

(12) 22番染色体の全塩基配列解明と全遺伝子同定を目指した網羅的緻密解析

養島伸生^{1,2}, 佐々木貴史², 塩濱愛子², 細野克博², 楊浩², 泉山朋大², 清水信義²

(¹浜松医科大学光量子医学研究センター光環境医学研究分野, ²慶應義塾大学医学部分子生物学教室)

22 番染色体の全塩基配列決定は慶應義塾大学と英米の共同研究で完遂し, ヒト染色体として初めて 1999 年 12 月に発表した。その際, 予測遺伝子も含めて 545 遺伝子の存在を報告した。その後, 同染色体上の全遺伝子の同定と機能解析を目指して, 手作業による塩基配列の「網羅的緻密解析」と実験による cDNA の単離を行っている。その結果, 現在までに長腕の約 50% に相当する 22cen-q12.2(16Mb) の解析を終了し, 新たに 16 個の遺伝子の存在を確証した。本演題では, 全塩基配列決定の詳細と「網羅的緻密解析」について報告するとともに, 上記 16 遺伝子の中から 2 遺伝子 (DGCR8, YPEL1) に関して発表する。DGCR8 は, 22q11.2 欠失症候群の最小共通欠失領域 1.5Mb の中から発見し, ヒト, マウスともに cDNA をクローニング

した。DGCR8 タンパクは WW モチーフ, 二重鎖 RNA 結合モチーフ (dsrm) を有する。マウス胚に対する *in situ* ハイブリダイゼーション実験で, 上記疾患の症状発生組織, 器官 (胸腺, 口蓋原基など) で特異的発現が見られ, 疾患との関連が注目される。一方, 同じく 22q11.2 上の YPEL1 は, 昆虫のタンパク質 Yippee に相同性を有し, ヒトゲノム上に他に 4 コピーのパラログ (YPEL2~ YPEL4) を持つので, この群の遺伝子を YPEL ファミリーと命名した。データベース検索により, YPEL ファミリー遺伝子はほとんどの真核生物 (動物, 植物, 真菌類) に存在することもわかった。培養細胞に対する免疫蛍光染色で, YPEL ファミリー遺伝子は細胞分裂に関連する機能を有する可能性が示された。

(13) ヒトゲノム解読から学ぶヒト遺伝子構造の特徴

浅川修一, 清水信義 (慶應義塾大学医学部分子生物学教室)

我々は国際共同研究の一員として、ヒト2番, 6番, 8番, 21番, 22番染色体の特定領域を対象にゲノムシーケンシングを推進し、合計45Mbの塩基配列を解読した。その過程で発見した家族性パーキンソン病原因遺伝子Parkinが約1.4Mbという超巨大遺伝子であることや、8番染色体から見いだしたCSMD3がCSMD1, CSMD2と遺伝子ファミリーを構成し、その平均サイズが1.3Mbという遺伝子ファミリーとして最大級のサイズであることなどを見いだした。一方、我々が21番染色体から見いだしたKAPファミリーは毛髪の主成分であるが、そのコード

領域が最小クラスの遺伝子ファミリーであった。本研究ではまずヒト遺伝子のゲノムサイズに注目して、その特徴を論じた。

また我々はヒトゲノムのタンパク質をコードする遺伝子全てについて、その転写領域、すなわちエキソンおよびイントロン部分の塩基組成を調べたところ、明らかなストランドバイアスがあることを見いだした。これらの遺伝子領域に見られるストランドバイアスについて、その生成のメカニズムや生物学的意義について論じた。

(14) polypurine/polypyrimidine 配列の比較ゲノム配列解析

田中宏幸, 黒川顕, 金谷重彦 (奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科比較ゲノム学講座)

polypurine/polypyrimidine 配列は、3重鎖構造 (triplex)、十字架型構造 (cruciform)、さらには4重鎖構造などの特殊な立体構造(本研究ではこのような特殊なDNAを非B型DNAと呼ぶ。)を構築と関係し、転写制御、クロマチンのリモデリングなどの複製機構を例とした分子生物学的機能との関連が示唆されている。ゲノムプロジェクトの進展に伴って、約160種のバクテリア、2種の酵母、5種の多細胞生物(線虫、キイロショウジョウバエ、シロイヌナズナ、ヒト)のゲノム配列が決定された。非B型DNA構造のゲノム多様性を把握する目的で、これらのゲノム配列データを基に polypurine/polypyrimidine 配列の出現特徴を解析した。それぞれのゲノム鎖に対して90%以上のAG%あるいは10%以下のTC%を有する300bp以上の領域(pur/pyr-stretchと呼ぶ)の頻度を検討したところ、バクテリア(96種)についてはpur/pyr-stretchがゲノム上に存在しないという結果が得られた。一方、シロイヌナズナでは4個、線虫では18個、キイロショウジョウバエでは2個のpur/pyr-stretchが得られた。さらに、ヒト染色体では全体で約5,500個、マウスでは約14,000個、

イヌでは約5,900個、ゼブラフィッシュでは約900個のpur/pyr-stretchが得られた。このように脊椎動物ゲノムにおいて特にpur/pyr-stretchが非常に多数存在するため、脊椎動物に特異的に見られるゲノムの立体構造に関わる因子であると推測される。それぞれのpur/pyr-stretchを3-6連続塩基の出現頻度に分解し、相關解析によりこのようなpur/pyr-stretchの類似性を検討した。ヒト染色体において相関係数0.99を閾値としてpur/pyr-stretchを分類したところ130個のグループに分類された。最も大きなグループは9個のpur/pyr-stretchから構成された。これらのpur/pyr-stretchはChr1-ID116, Chr3-ID110, Chr3R-ID130, Chr4R-ID121, Chr9-ID31, Chr12-ID116, Chr12-ID76, Chr18-ID34, Chr19R-ID99であり、ヒト染色体では異なった染色体に非常に類似性が高いpur/pyr-stretchが得られた。また、非常に類似性の高いpur/pyr-stretchが同一の染色体で多数存在するという結果も同時に得られた。脊椎動物ではpur/pyr-stretchが非常に多く存在し、染色体内あるいは染色体間を関連付ける立体構造因子であると推測された。

(15) 遺伝子重複によるゲノムの進化

山崎清¹, 金谷重彦², 黒川 顕² (¹大阪大学遺伝情報実験センターゲノム情報解析分野,
²奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科比較ゲノム学分野)

生命はバクテリアからヒトに至るまで、ポイントミューテーションだけにとどまらず、IS, Tn, プラスミド, ファージ, ウイルスなどによる遺伝子水平伝播, または遺伝子重複, 遺伝的交配などのさまざまな方法で進化を繰り返してきた。1995年, *Haemophilus influenzae*, インフルエンザ菌, 約1.8Mbpsのゲノム全配列が明らかにされて以来, 現在までに160を超える生命のゲノム全配列が解析されている。さらに, 2005年までには約300種にもおよぶ原核生物および真核生物のゲノム全配列が公開されようとしている。これらゲノム全配列が明らかとなっ

ている種の中で, 最も遺伝子数が少ないものは *Mycoplasma genitalium* で約500遺伝子である。しかしながら, ヒトにおける全遺伝子数はおよそ2~2万5千遺伝子とされており, *M. genitalium* の約60倍もの遺伝子をコードしている。生命が地球上に誕生してからヒトに至る約40億年におよぶ進化の途上で, どのようにしてこれだけの遺伝子のバリエーションを確保してきたのであろうか。本研究では, 遺伝子のバリエーション獲得の方法として遺伝子重複に着目し, ゲノム全配列が公開されている各生物種内における遺伝子重複の頻度を解析した。

(16) ヒトセントロメアクロマチンファイバー上での動原体タンパク質 CENP-A 結合部位のマッピング

杉本憲治 (大阪府立大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻)

ヒトアルホイド DNA は約170bpの繰り返し単位からなり, 染色体ごとに特異的な配列と繰り返し単位を持つ。しかも, 幾つかの染色体では同一染色体においてもこの繰り返しには違いが見られ, セントロメアタンパク質 CENP-B が結合する配列に富むものとそうでないものが存在することが知られる。あらかじめ動原体タンパク質 CENP-A を GFP 融合型タンパク質として発現させたヒト細胞株 MDA-AF8-A2 を作成し, 静止期核を界面活性剤を用いて穏やかに処理することでクロマチンファイバー標本を作成した。1番, 7番染色体についてそれぞれの2種のアルホイド DNA サブファミリー (A3-2, pSD1-1, D7Z1, D7Z2) をプローブに in situ ハイブリダイゼーションを行

いセントロメア DNA を検出するとともに, CENP-A を抗 GFP 抗体を用いて同時に検出し, これら3者の位置関係を解析した。1番染色体において CENP-A 結合部位は CENP-B 結合配列に富む A3-2 ファミリー上で, CENP-B 結合配列がまれな pSD1-1 ファミリーの末端付近にマップされ, 7番染色体では2ヶ所検出されたものの, 一つは D7Z1 上で D7Z2 と重なる部分の D7Z1 に近い位置にマップされた。さらに超音波処理したクロマチンを抗 GFP 抗体を用いて免疫沈降し, この画分を用いて染色体7番の2種のアルホイド DNA について PCR 増幅を行ったところ, D7Z2 配列が約2倍多く含まれていた。

(17) 走査型光プローブ顕微鏡の開発と遺伝子検出への応用

吉野智之 (独立行政法人食品総合研究所食品工学部計測工学研究室)

我々は, 走査型プローブ顕微鏡 (SPM) のひとつである走査型光プローブ顕微鏡 (SNOM または NSOM : Scanning near-field optical microscope) を生物学分野に応

用できるように改良した。SNOM は光ファイバを鋭く尖らせた探針 (光プローブ) を SPM と同じ原理で制御することで, 形状と同時に蛍光強度が計測できる。また, DNA-

nanoFISH 法は、FISH (Fluorescence in situ hybridization) 標識した DNA を直線的に基板に固定し、SNOM で直接的に DNA 上の遺伝子を解析する技術である。ここでは λ ファージ *ea47* 遺伝子の 15 塩基配列の PNA (peptide nucleic acid) と λ ファージ DNA の全長をそれぞれ Alexa532, YOYO-1 で染色した。この DNA を Methyltrimethoxysilane 処理したマイカ上に吸上げ法により配向させた後、大気

中、室温で SNOM 計測を行った。蛍光は APD (avalanche photodiode) で検出した。それぞれの蛍光像を重ねた結果、特定の DNA 部位に蛍光標識信号が検出できた。このように、蛍光標識信号の計測が可能なのは、従来の光学顕微鏡や電子顕微鏡では考えられなかった新たな情報の収集が可能になるものと期待できる。

(18) 走査型光プローブ顕微鏡の染色体解析への適用

杉山 滋 (独立行政法人食品総合研究所食品工学部計測工学研究室)

染色体は DNA とタンパク質が複雑に組み合わされた複合体であり、その機能と構造の相関にはまだ不明な点が多く残っている。染色体の構造の理解を深めるには、ナノレベルの分解能での高次構造解析を進めることが重要である。我々の研究室では、走査型光プローブ顕微鏡 (SNOM/AFM, scanning near-field optical/atomic force microscope) の生物学分野への適用を進めており、これまでに DNA, 染色体, 細胞などの生体試料の SNOM/AFM 観察を実現してきた。ここでは、SNOM/AFM を染色体構造解析に適用する試みについて紹介した。

これまでに、SNOM/AFM による FISH シグナル (テロメ

ア及び 45SrDNA) を行ない、通常の蛍光顕微鏡では一点としてしか観察されない FISH シグナルを約 250nm 離れた 2 つの領域として検出することに成功している。また、蛍光像と同時取得した形状像を比較することにより、蛍光強度の分布と染色体のクロマチンファイバー配置との関係についてのデータを得ることも可能である。これらに加えて、現在、単一遺伝子の FISH シグナル検出によるマッピングや免疫蛍光染色との組み合わせによる染色体タンパク質の局在解析も試みている。SNOM/AFM による高分解能観察には、試料の前処理法等の検討すべき点も多いが、将来的に染色体高次構造解析の有用なツールになりうると考えている。

(19) ゲノム生理学研究会 総括と展望

永山國昭 (自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター)

DNA の構造は今 2 つの言葉で語られている。1 つ目は「化学構造≡塩基配列」、もう 1 つは「物理構造≡トポロジー」である。両者は A-T, G-C という塩基間の特異結合を用いて翻訳される。いやむしろ、塩基配列を知ってトポロジーを推測するという翻訳法が主流だと言ってよい。しかし両言葉を媒介する特異結合は自然言語と同じように多義的である。すなわち A-A, G-G, A-G 等々の minor 結合も常に存在する。従って翻訳によるトポロジー推測は物理計測により実証されなければならない。その方法として DNA 研究で久しく忘れ去られていた電子顕微鏡を採用したい。こうした理念をかかげ、4 年前に府立大の加藤助教授が私の研究室を訪れた。本研究会はその

ときから始まった共同研究がきっかけとなり誕生した。

私の土俵である生物物理の立場からみると実はもう 1 つ構造の言葉がほしい。「物理構造≡立体構造」である。そして塩基配列⇔トポロジーという 2 大言語対応を塩基配列⇔立体構造の新言語対応に一気に昇華させたい思いがある。*in vitro* でのこうした研究は必ずやゲノム生理学の本丸である *in vivo* でのクロマチン立体構造/動態と遺伝子特異発現/機能の対応解明に導くと信ずる。

新規開発した電子位相顕微鏡が果たしてどの程度この研究会に寄与できるか、位相法の原理を解説し、位相法の応用 (蛋白質, ウイルス, バクテリア, 細胞, オルガネラ) を紹介した。

17. 唾液腺研究からの生理機能研究, その戦略的展開

2005年2月28日-3月1日

代表・世話人: 杉谷博士 (日大松戸歯) 村上政隆 (生理研・統合バイオ)

所内対応者: 村上政隆 (生理研・統合バイオ)

(1) のどの渇きと唾液分泌

稲永清敏 (九州歯科大学 健康促進科学専攻・生命科学講座生理学分野)

(2) ラット上唾液核細胞に対する下行性の興奮性および抑制性入力に関する電気生理学的研究

美藤純弘 (岡山大学大学院医歯学総合研究科 口腔生理学分野)

(3) ラット顎下腺からの求心性神経の経路と電気生理学的特性

松尾龍二 (岡山大学大学院医歯学総合研究科 口腔生理学分野)

(4) イメージングによる唾液腺細胞の機能解析・現状と将来展望・

谷村明彦 (北海道医療大学・歯学部 歯科薬理学)

(5) ラット顎下腺導管細胞におけるカルシウムシグナルの解析

東城庸介 (北海道医療大学・歯学部 薬理学)

(6) 耳下腺開口分泌における低分子量 GTP 結合タンパク質の役割

道家洋子 (日本大学・松戸歯学部 生理学)

(7) 耳下腺腺房細胞の分泌顆粒形成における syntaxin 6 の役割

吉垣純子 (日本大学・松戸歯学部 生理学)

(8) 耳下腺腺房細胞における cAMP 分解調節

杉谷博士 (日本大学・松戸歯学部 生理学)

(9) 外分泌腺導管の機能分化に必要な転写因子 CP2-like1

山口良文 (京都大学大学院生命科学研究所, 岡崎統合バイオ分子発生)

(10) 顎下腺の発生・分化・成熟と機能発現

赤松徹也 (徳島大学大学院 HBS 研究部摂食機能制御学口腔分子生理)

(11) 腎臓のアクアポリン水チャネルの分布・動態

高田邦昭 (群馬大学大学院医学系研究科生体構造解析学)

(12) 耳下腺分泌顆粒におけるアクアポリンの存在と浸透圧調節への寄与

松木美和子 (東京歯科大学 病理学)

(13) 耳下腺導管細胞における HCO_3^- 分泌機構—現在のモデルと今後の課題

広野 力 (広島大学大学院医歯薬総合研究所)

(14) クローディンファミリーによる細胞間隙の透過性の制御

古瀬幹夫 (京都大学 医研究科 分子細胞情報学)

(15) 細胞間隙の唾液分泌への寄与

村上政隆 (生理学研究所・統合バイオ)

(16) 急速凍結レプリカ法による唾液腺傍細胞輸送調節機構の検討

橋本貞充 (東京歯科大学 病理学)

【参加者名】

稲永清敏 (九州歯科大), 美藤純弘 (岡山大大学院医歯), 松尾龍二 (岡山大大学院医歯), 谷村明彦 (北海道医療大歯), 東城庸介 (北海道医療大歯), 道家洋子 (日本大松戸歯), 吉垣純子 (日本大松戸歯), 杉谷博士 (日本大松戸歯), 村上政隆 (生理学研究所・統合バイオ)

戸歯), 桜井 健 (日本大松戸歯), 古山俊介 (日本大松戸歯), 山口良文 (京都大大院, 岡崎統合バイオ), 赤松徹也 (徳島大大院), 高田邦昭 (群馬大大院医), 松木美

和子 (東京歯大), 橋本貞充 (東京歯大), 広野 力 (広島大大院医歯薬), 古瀬幹夫 (京都大大院), 村上政隆 (生理研・統合バイオ)

【概要】

唾液分泌機能の発現にかかわる部品および解剖学的経路の大半は一部分を除き存在が確定された。しかしこれら微視的材料研究の成果は再構成され, 分子レベルの知見は巨視的な機能に具体的に繋がらなければならない。これは唾液分泌研究に留まらず分子生理学研究の大きな目的である。本研究会は唾液腺を縦系に, 1) 身機能と唾液分泌と連関を自律神経/内分泌機能から観測, 2) 唾液腺

神経支配と細胞/細胞間隙機能の活性化, 3) 分泌顆粒内タンパク質の存在様式と維持/放出, 4) 遺伝子による分泌機能の維持と補修のテーマを討論することにより横系として紡ぎ, 巨視的唾液腺機能を従来別個に研究されてきた分子/細胞/神経機能の研究成果を具体的に統合することを目的とし開催された。

(1) のどの渇きと唾液分泌

稲永清敏¹, 佐藤奈緒^{1,2}, 小野堅太郎¹, 本田栄子¹, 芳賀健輔², 横田誠²

(¹九州歯科大学・生命科学講座・生理学分野, ²九州歯科大学・口腔治療学分野・歯周病制御再建学分野)

唾液腺には M3 受容体が存在し, 催唾剤であるピロカルピンが作用することにより唾液分泌が促進される。一方, 脳室周囲器官や視床下部にある口渇中枢にも M1/M3 受容体が存在し, 活性化されることにより口渇感を引き起こす。ラットの腹腔内にピロカルピンを注入すると唾液分泌ばかりでなく, 飲水行動が誘発されることが報告されている。誘発された唾液分泌促進効果は, 脳室への高濃度のアトロピン投与や脳室周囲器官の破壊により減弱されることから, ピロカルピンは中枢に作用し, 唾液

分泌を促進していると考えられていた。つまり, ラットでは, ピロカルピンが一方では, 口腔内の湿潤性を高め, もう一方では, 同じような経路を介して口渇感を誘発している可能性が指摘されていた。われわれは, 無麻酔・無拘束下で, ラットの腹腔内・脳室内ピロカルピン投与に対する飲水量および唾液分泌量を測定し, ピロカルピンの作用部位と生理的意義について検討した。スライス標本を用いた電気生理学的実験の結果と併せて報告する。

(2) ラット上唾液核細胞に対する下行性の興奮性および抑制性入力に関する電気生理学的研究

美藤純弘 (岡山大学大学院医歯学総合研究科 口腔生理学分野)

ラットが食物摂取をしているときには多量の唾液分泌が生じる。この唾液分泌には, 口腔領域からの感覚入力と摂食中枢などの上位中枢からの下行性入力の影響が考えられる。本研究では, 顎下腺に分布する副交感神経の一次中枢である上唾液核に対する下行性入力を電気生理学的に検討した。Wistar 系の幼若ラットの上唾液核細胞を逆行性に蛍光標識した。更に一部の動物は上位脳からの入力を遮断する為に記録側の除脳手術を行った。矢状断スライス標本を作成し, 標識細胞からホールセルパッ

チクランプ法により, 電気刺激による誘発性シナプス電流を記録した。除脳動物における多くの上唾液核細胞では, 興奮性および抑制性シナプス後電流の大きさが増加していた。この現象は, 除脳により上位中枢からの下行性神経が変性した為に神経伝達物質の放出が減少し, シナプス後膜受容体の感度が上昇したことが原因と考えられる。上唾液核細胞は上位中枢から下行性の興奮性および抑制性入力を受けていることが示唆された。

(3) ラット顎下腺からの求心性神経の経路と電気生理学的特性

松尾龍二 (岡山大学大学院医歯学総合研究科 口腔生理学分野)

唾液腺炎や唾石症のときに疼痛が発生することから、唾液腺には感覚神経が分布すると考えられている。本研究では、まずラット顎下腺を対象にして感覚神経の中枢への入力経路をWGA-HRPを用いて組織化学的に検索した。つぎに、感覚神経の活動様式を電気生理学的に分析した。その結果、1) 感覚神経は遠心路である交感神経と副交感神経の経路中を走行しており、交感神経の経路中の感覚神経は主に脊髄後根神経節を通過し、副交感神経の経路中の感覚神経は主に三叉神経節を通過することが分かった。2) これらの感覚神経にはともに自発活動は無く、顎下腺体を圧迫すると応答した。また顎下腺導管に

カニューレを装着し、逆圧を負荷すると圧に比例して放電頻度が増加した。3) 放電の閾値は最大分泌圧よりやや小さいものの、導管系にとっては大きな負荷であると考えられる。4) カニューレからBradykininなどの発痛物質を注入すると、高頻度で発火した。以前の組織化学的研究では、substance PとCGRPを含む線維(感覚神経)は腺体内の導管と血管の周囲に存在する。今回の結果から、唾液腺の感覚神経は圧や痛みの情報を伝達しており、導管内圧や血圧の過度な上昇を反射的に調節している可能性がある。

(4) イメージングによる唾液腺細胞の機能解析・現状と将来展望・

谷村明彦 (北海道医療大学・歯学部・歯科薬理学教室)

生きた細胞のダイナミックな変化をリアルタイムで可視化できるイメージングによって、 Ca^{2+} シグナルの詳細が明らかにされてきた。さらに近年、GFPなどの蛍光タンパク質を利用して、受容体、リン酸化酵素、転写因子など様々なタンパク質の分子動態の解析が可能になった。特に、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を利用した新しい分子センサーの開発やタンパク質相互作用の解析法によって、研究の可能性が広がっている。こうした蛍光タンパク質を用いた研究から、様々な細胞内分子の動態

が、時間・空間的に調節されている事がわかってきた。

これまで我々は、培養細胞や分離唾液腺細胞を用いたイメージングによって、細胞内情報伝達物質やそれらに関係するタンパク質の分子動態を調べてきた。現在、より生体に近い条件で機能解析を行うために、耳下腺スライスを用いたイメージングを試みている。これらの結果とあわせて、イメージングの現状や生きた動物を用いた「in vivo イメージング」への展望と課題について議論したい。

(5) ラット顎下腺導管細胞におけるカルシウムシグナルの解析

東城庸介 (北海道医療大学・歯学部・歯科薬理学教室)

カルシウムシグナルは唾液腺導管部の電解質輸送の調節に重要な役割を果たしていると考えられるが、導管細胞の単離調製が難しいことなどから導管部のカルシウム情報伝達機構の研究は腺房部の研究に比べて遅れている。我々は、Percoll遠心分離法によってラット顎下腺の単離導管細胞を調製し、受容体刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃

度($[Ca^{2+}]_i$)の変化を解析した。その結果、導管細胞には腺房細胞にはない β -受容体を介した Ca^{2+} 動員機構が存在することが示された。さらに、 Ca^{2+} イメージングシステムを用いてアゴニスト刺激による導管細胞と腺房細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 応答を同時に測定した。腺房細胞はサブスタンスPやムスカリン受容体アゴニストに対して高い反応性を

示したのに対し、導管細胞はエピネフリンに対して高い反応性を示すことが明らかになった。また、導管細胞と腺房細胞の受容体 mRNA 発現を RT-PCR 法により解析

し、 $[Ca^{2+}]_i$ 応答と mRNA 発現との相関性を比較したので、併せて報告する。

(6) 耳下腺開口分泌における低分子量 GTP 結合タンパク質の役割

道家洋子 (日本大学 松戸歯学部 生理学)

耳下腺腺房細胞では、 β アドレナリン受容体刺激によりサイクリック AMP (cAMP) が上昇し、アミラーゼの開口放出が引き起こされる。しかしその詳細なメカニズムは、まだ明らかではない。われわれは cAMP 依存性のアミラーゼ開口放出における低分子量 GTP 結合タンパク質(SMG)の役割に注目し、検討を進めている。今回はラ

ット耳下腺腺房細胞における SMG について紹介し、特に細胞内小胞輸送に関わっていることが知られている Arf1 の開口放出への関与と、細胞骨格系の制御に関わっていることが報告されている Rho の活性化が cAMP 依存性開口放出に関わることを報告する。

(7) 耳下腺腺房細胞の分泌顆粒形成における syntaxin6の役割

吉垣純子 (日本大学松戸歯学部生理学教室)

耳下腺腺房細胞において、アミラーゼは分泌顆粒に貯留され刺激依存的に分泌される。分泌顆粒は最初未成熟な物が形成され、徐々にアミラーゼが濃縮され成熟していくと考えられている。我々は分泌顆粒の形成過程の解析を試みた。ラット耳下腺分泌顆粒を、パーコール密度勾配遠心法により、低密度および高密度画分に分離した。低密度画分を未成熟な分泌顆粒、高密度画分を成熟分泌顆粒と予想し、解析を行った。膜タンパク質の分布を調べたところ、syntaxin6 および VAMP4 は低密度画分の方に

多く検出された。それに対して、VAMP2 および SNAP-23 は高密度画分に濃縮されていた。次に分泌顆粒形成における syntaxin6 の役割を調べるために、syntaxin6 遺伝子の欠失変異体を作成し、耳下腺腺房細胞の初代培養系に遺伝子導入を行った。その結果、変異遺伝子を導入した細胞では、他の細胞に比べ分泌顆粒の数が減少していた。したがって、分泌顆粒がゴルジ体から形成される際に、syntaxin6 が必要であると考えられる。

(8) 耳下腺腺房細胞における cAMP 分解調節

杉谷博士¹、西連寺央康²、古山俊介¹ (日本大学松戸歯学部¹生理学教室、²歯科麻酔学講座)

耳下腺腺房細胞においては β アドレナリン受容体の活性化は細胞内サイクリック AMP(cAMP)上昇を介し、糖質分解酵素であるアミラーゼの開口放出を引き起こす。細胞内 cAMP 濃度は、合成酵素であるアデニル酸シクラーゼと分解酵素であるサイクリックヌクレオチドホスホジエステラーゼ (PDE) により調節される。ウサギ耳下腺腺房細胞を用いて β 受容体刺激によるアミラーゼ分

泌は PDE 阻害剤であるロリプラム存在下で促進された。また、 β 受容体刺激による cAMP 濃度上昇もロリプラムにより促進された。ウサギ耳下腺腺房細胞より部分精製した cAMP-PDE 活性はロリプラムにより阻害された。これらのことから、ウサギ耳下腺腺房細胞において cAMP 依存性の開口放出にはロリプラム感受性の PDE アイソフォーム (PDE4) が関わっていることが示唆された。

(9) 外分泌腺導管の機能分化に必要な転写因子 CP2-like1

山口良文^{1,2}, 高田慎治²

(¹京都大学大学院生命科学研究科, ²岡崎統合バイオサイエンスセンター分子発生研究室)

外分泌腺の導管部は、腺房部で生成された分泌液から水や電解質の再吸収を行い分泌液の組成を調節するという共通の機能を持つ。従って外分泌腺導管部の機能分化には共通した遺伝子発現プログラムがあると推察されるが、その実体は不明である。私は ES 細胞を用いた遺伝子トラップ法により胚発生に関与する遺伝子を探索する過程で、唾液腺、涙腺などの外分泌腺の導管部と腎遠位側尿細管で特異的に発現する CP2L1(Transcription Factor CP2-like1)遺伝子座に遺伝子トラップベクターが挿入された変異マウスを得た。CP2L1 の生体内での機能を調べ

るため、我々はこの挿入変異をホモに持つ個体を作製した。生理学的解析からホモ個体では腎機能低下及び唾液腺導管部機能異常が示唆された。CP2L1 は唾液腺導管と腎集合管・遠位尿細管で発現する。挿入変異ホモ個体ではこれらの組織自体は認められたが、これらの部位で共通に発現するケラチン7の発現が消失していた。同様に CP2L1 の発現するその他の外分泌腺(涙腺、鼻腺)でもケラチン7の発現が消失していた。以上の結果から、CP2L1 は様々な外分泌腺導管部に共通の遺伝子発現を成立させるために必要な転写因子であると考えられる。

(10) 顎下腺の発生・分化・成熟と機能発現

赤松徹也, 細井和雄 (徳島大学大学院 HBS 研究部摂食機能制御学講座口腔分子生理学分野)

唾液腺は上皮-間葉相互作用により形成される。この過程では TGFβファミリー等の増殖因子群が重要な役割を果たしている。我々は増殖因子等の不活性型前駆体蛋白質の活性化に関わるプロセシング酵素 SPC と唾液腺の重要な生理機能である唾液分泌に関わる水チャネル AQP5 に着目し、ラット胎仔顎下腺器官培養系により顎下腺の発生・分化・成熟と機能発現の制御機構について解析している。胎生 15 日 SD ラット胎仔顎下腺を各種阻害剤等の存在下で培養し、形態変化、および AQP5 等の発現を RT-PCR により解析した。SPC に共通の阻害剤 Dec-RVKR-CMK 存在下で分枝形成と AQP5 発現が抑制されたが、他のトリプシン様セリンプロテアーゼ阻害剤

では抑制されなかった。この時、SPC ファミリーの PACE4 の発現も減少したが、同ファミリーの furin の発現は減少しなかった。PACE4 は furin と異なりヘパリン結合配列を有し細胞外マトリクスに局在することから、分枝形成へのヘパリンの影響を解析した結果、分枝形成と AQP5 発現は共に抑制された。また、PACE4 触媒領域に対する特異抗体でも分枝形成と AQP5 発現は共に抑制され、Dec-RVKR-CMK による分枝形成と AQP5 発現の抑制はレコンビナント BMP2 を加えることで回復した。以上より顎下腺の分枝形成は PACE4 により活性化される増殖因子等のシグナル伝達の結果促進され、AQP5 発現が誘導されることが示唆された。

(11) 腎臓のアクアポリン水チャネルの分布・動態

高田邦昭, 松崎利行, 多鹿友喜 (群馬大学大学院医学系研究科生体構造解析学)

腎臓には AQP1-4 をはじめとして複数の水チャネルアクアポリンが部位特異的に発現している。なかでも集合管主細胞に発現する AQP2 は、尿濃縮において決定的に

重要な役割を果たしている、AQP2 の変異は尿崩症の原因のひとつにもなっている。AQP2 は細胞内の小胞に貯蔵されていて、抗利尿ホルモン刺激により頂部細胞膜へと移

行し、その水透過性を上げる。AQP2 を発現させた MDCK 細胞を用いて、AQP2 の細胞内動態を観察することができると報告されている。非刺激時には AQP2 は、頂部細胞膜直下に位置する Rab11 陽性の頂部リサイクリングエンドソームに主として分布する。フォススコリン刺激によりこれらは頂部細胞膜へ移行するが、フォススコリンを除くと AQP2 はエンド

サイトシスにより、まず核上部に位置する EEA1 陽性の初期エンドソームに取り込まれ、ついで頂部リサイクリングエンドソームへと復帰する。このような AQP2 のトラフィックは、PI3 キナーゼ、アクチン、微小管、Rab11 などにより調節されている。

(12) 耳下腺分泌顆粒におけるアクアポリンの存在と浸透圧調節への寄与

松木美和子^{1,2}, 橋本貞充¹, 下野正基¹, 吉垣純子², 道家洋子², 古山俊介², 杉谷博士², 村上政隆³
(¹東京歯科大学 病理学・口腔科学研究センター, ²日本大学松戸歯学部 生理学, ³生理研・ナノ形態)

Aquaporin (AQP) は、様々な組織の細胞形質膜に存在する水チャネルで、唾液腺では AQP1, 4, 5, 8 の存在が報告されている。近年、AQP は細胞内小器官にも存在することが明らかとなりつつあることから、唾液腺腺房細胞の腺腔側膜に局在することが知られている AQP5 について詳細な検討を行った。形態学的観察と western blotting により、ラット耳下腺の分泌顆粒膜上に AQP5 が存在することが明らかとなった。そこで、分泌顆粒における AQP5 の機能を解明するため、Thevenod らの方法を用い、分泌顆粒の溶解を吸光度 540 nm にて測定し、抗 AQP5 抗体の影響を検討した。その結果、抗 AQP5 抗体は濃度依

存性および時間依存性に分泌顆粒の溶解を促進した。さらに、溶媒より Cl⁻イオンを取り除いたところ、抗 AQP5 抗体による分泌顆粒の溶解は完全に阻害された。同じ現象は、陰イオンチャネル阻害剤を用いても確認された。これらのことから AQP5 は、分泌顆粒の浸透圧調節に関与することが明らかとなった。さらにその他の AQP アイソフォームについても同様の方法で検討したところ、AQP6 が耳下腺に存在することが明らかとなった。そして、抗 AQP6 抗体により分泌顆粒の溶解が促進されることから、AQP6 もまた、分泌顆粒の浸透圧調節に関与することが示唆された。

(13) 耳下腺導管細胞における HCO₃⁻ 分泌機構—現在のモデルと今後の課題

広野 力, 柴 芳樹, 杉田 誠, 岩佐 佳子
(広島大学大学院 歯歯薬学総合研究科 病態探究医科学講座 口腔生理学研究室)

ラット耳下腺導管は HCO₃⁻ を分泌するが、その分泌機構には不明な点が多い。我々は、従来のホールセルパッチクランプ法に比べ格段に生理的条件に近い陰イオン環境で HCO₃⁻ 分泌を電流として測定できるグラミシジン穿孔パッチ法を用いて分泌機構を解析してきた。現在までに、グラミシジン穿孔パッチ法による膜電位固定下のラット耳下腺導管細胞では Ca²⁺系や cAMP 系の刺激で HCO₃⁻ は交換体ではなくイオンチャネルを介して分泌されること、経細胞的な輸送ではなく主に細胞内で産生された HCO₃⁻ が分泌されること、分泌刺激時に細胞内の HCO₃⁻

濃度が上昇し駆動力を増大させ積極的に分泌を促進していることが示唆された。さらにグラミシジン穿孔パッチ法により得られた細胞レベルの HCO₃⁻ 分泌量から耳下腺全体での分泌量を推定し、実際の唾液分泌量やイオン濃度の測定値と比較した結果や電気的中性を保つために HCO₃⁻ 分泌と同時に細胞外に放出される陽イオンあるいは HCO₃⁻ の代わりに細胞内に流入する陰イオンの候補および水分分泌駆動の可能性についての考察を行い、より生理的な分泌機構に迫りたい。

(14) クローディンファミリーによる細胞間隙の透過性の制御

古瀬幹夫 (京都大学大学院医学研究科分子細胞情報学講座)

上皮シートを横切る物質輸送経路のうち、細胞間隙を介する paracellular pathway では、タイトジャンクション (TJ) と呼ばれる細胞間接着構造が溶質の自由拡散を制限している。興味深いことに、この TJ の「バリア」は、上皮のタイプによって電気生理学的に測定できるコンダクタンスや電荷選択性が異なり、その違いが各々の上皮の生理機能に重要な役割を果たしているといわれる。TJ を構築する主要な接着分子であるクローディンは 20 以上

のタイプからなる遺伝子ファミリーを構成しており、TJ のバリア機能にも直接関与する。各組織は特有の組み合わせのクローディン分子を発現することによって paracellular pathway の輸送特性を調節していると予想され、実際に、特定のクローディンを強制発現させた上皮細胞株やクローディンの遺伝子欠失マウスの解析からこの考えが証明されつつある。

(15) 細胞間隙の唾液分泌への寄与

村上政隆

(自然科学研究機構生理学研究所 統合バイオ・ナノ形態生理学)

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、血液成分は唾液に移行するのはこのためである。ラット摘出血管灌流顎下腺を用い、標識デキストランをプローブとして分子径に対する分泌プローブの唾液/灌流液比を、muscarine 受容体刺激中に求めると、Stokes-Einstein の拡散式に従う通路と半径 5 Å 以下の分子を通すフィルター特性を持つ通路が見い出された。後者は、水の分子半径 1.5 Å で 1 の値に外挿され、水のほとんどが細胞間隙/tight junction を通過することを示唆した。一方、管腔に導入した蛍光色素の希釈経過から細胞経路の水分分泌を求め、灌流腺の分泌量と比較すると、刺激初期一過性に細胞内よりの水分放出が優位であ

り、持続刺激期には傍細胞輸送経路を通過する水分が腺を経由する水分より多いことが示された。これは分泌刺激経過に応じ水通過に対する細胞間隙の開閉が行なわれていることを示している。muscarine 受容体刺激に β -adrenergic 受容体刺激を重畳させると灌流液から移行する基質の唾液濃度が上昇することが知られていたが、分泌速度との比較が不十分であり細胞間隙の開閉の直接的な証拠にはならなかった。今回蛍光色素 Lucifer Yellow の唾液/灌流液の蛍光強度比が分泌速度に依存しわずかに上昇することが認められ、細胞間隙の開閉が開口分泌誘発時に起こることが支持された。

(16) 急速凍結レプリカ法による唾液腺傍細胞輸送調節機構の検討

橋本貞充, 村上政隆

(東京歯科大学病理, 自然科学研究機構生理学研究所・統合バイオ・ナノ形態生理)

ラット唾液腺における tight junction (TJ) を介した傍細胞輸送経路 (para-cellular pathway) による水および蛋白質の選択的透過の機構に焦点を当てその超微細構造の変化を検討した。実験には Wistar 系雄ラットより摘出した

顎下腺を用い、pH 7.4 の 10 mM HEPES 緩衝液にて灌流し、isoproterenol (1 μ M) と carbachol (1 μ M) 刺激時の TJ の構造変化について、新鮮組織の液体ヘリウム急速凍結試料を用いた freeze-fracture replica 法により検討した。

分泌刺激後では、分泌顆粒の細胞間分泌細管部の腺腔側膜への癒合にともなって microvilli が消失し、膜内粒子で構成される TJ の網目構造が基底側に広がるとともに、free end や terminal loop が増加した。さらに断面像では、TJ を構成する膜内粒子と細胞膜を裏打ちするごく短い微細線維を介して、分泌刺激後も直下の actin 線維

と直接結合しているのが認められた。これらのことから、分泌時の急速な細胞骨格系の改変にともない、TJ を構成する内在性膜蛋白と細胞膜裏打ち蛋白が、腺腔側膜直下の actin 線維との密接な関連を持ちながら局在を変化させることにより、傍細胞輸送経路の透過性が亢進している可能性が示された。

18. バイオ分子センサー研究会

2004年9月9日-9月10日

代表：富永真琴（岡崎統合バイオサイエンスセンター）

所内対応者：岡村康司（岡崎統合バイオサイエンスセンター）

(1) 新規の電位感受性酵素 VSP の構造と機能

岡村 康司, 村田 喜理, 佐々木 真理, 岩崎 広英
(岡崎統合バイオサイエンスセンター・神経分化)

(2) 新規温度感受性チャネル TRPM2 によるインスリン放出機構

富樫和也, 東智広, 富永知子, 富永真琴 (岡崎統合バイオサイエンスセンター・細胞生理部門)
原雄二, 森泰生 (京都大学大学院・工学研究科)
小西康信 (三重大学・医学部・生理学第一講座)

(3) 細胞の機械刺激受容の分子機構と形態変化

辰巳仁史, 清島大資, 河上敬介, 井上真寿美, 早川公英, 曾我部正博 (名古屋大学大学院・医学系研究科)

(4) TRPV4 は尿流量を感知する

鈴木誠, 谷口淳一, 鶴岡秀一, 水野敦子 (自治医科大学・薬理学講座)

(5) 心筋カバオラ局在イオンチャネルのバイオセンシング機構

古川哲史 (東京医科歯科大学・難治疾患研究所・生体情報薬理分野)

(6) アミノ酸トランスポーターを取り巻くタンパク質間相互作用

金井好克 (杏林大学・医学部・薬理学講座)

(7) 植物ステロール誘導体に反応するコレステロール代謝センサー LXR

榎島誠 (日本大学・医学部・生化学講座)

(8) 内因性一酸化窒素の直接酸化によるカルシウムチャネル TRPC5 の活性化

吉田卓史, 森泰生 (京都大学大学院・工学研究科)

(9) 共鳴ラマン分光法によるセンサーヘム蛋白質の構造化学的研究：可溶性グアニレートシクラーゼの最近の話題

北川禎三 (岡崎統合バイオサイエンスセンター・生体分子研究部門)

(10) ROS センサーアニオンチャネルとアポトーシス誘導

清水貴浩, 沼田朋大, 岡田泰伸 (生理学研究所・機能協関部門)

(11) 活動電位を発生するマウス味細胞の応答と発現分子の解析

吉田竜介, 重村憲徳, 安松啓子, ニノ宮裕三 (九州大学大学院・歯学研究院)

(12) 逆推定法による微細構造体内 cAMP 変動の実時間測定

竹内裕子, 倉橋隆 (大阪大学大学院・生命機能研究科)

(13) 脳内 Na⁺センサー：Na_x チャネルの生理的役割

檜山武史 渡辺英治 野田昌晴 (基礎生物学研究所・感覚情報処理部門)

(14) GFP を用いたカルシウムプローブ G-CaMP による平滑筋カルシウムの解析

中井淳一 (理化学研究所・脳科学総合研究センター・記憶学習機構研究チーム)

(15) プロトンチャネルの recruitment と活性振動

久野みゆき, 酒井啓, 川脇順子, 森畑宏一, 翁昌子, 森啓之 (大阪市立大学大学院・医学研究科)

(16) Rab3 エフェクターNoc2 の開口分泌における役割

三木隆司, 清野進 (神戸大学大学院・医学系研究科)

松本正成 (千葉大学大学院・医学研究院)

(17) リガンド投与による代謝型グルタミン酸受容体細胞内領域の二量体構造の動的変化

立山充博, 久保義弘 (生理学研究所・神経機能素子部門)

【参加者名】

森 泰生, 原 雄二, 清中 茂樹, 吉田 卓史, 飯沼 ゆり子, 三木 崇史, 吉留 徹, 瓜生 幸嗣 (京大大学院・工), 金井 好克 (杏林大・医), 松尾洋孝 (防衛医大), 吉田 竜介 (九州大大学院・歯), 古川哲史 (東京医科歯科大), 榎島 誠, 川名 克芳 (日本大・医), 鈴木 誠, 須崎 正隆 (自治医大), 中井 淳一 (理研), 三木 隆司 (神戸大大学院・医), 久野 みゆき (大阪市大大学院), 川脇 順子 (大阪市大), 辰巳 仁史, 町山 裕亮 (名古屋大大学院・医), 水村 和枝, 片野坂 公明 (名古屋大), 倉橋 隆, 竹内 裕子 (大阪大大学院), 小田-望月 紀子, 楠野 智幸 (立命館大), 久保 伸

夫, 大谷 真喜子, 沈 静 (関西医大), 野田 昌晴, 渡辺 英治, 檜山 武史 (基生研), 岡田 泰伸, R.Sabirov, 清水 貴浩, 高橋 信之, 井上 華, 沼田 朋大, 久保 義弘, 立山 充博, 藤原 祐一郎, 長友克広, 鍋倉 淳一, 西巻 拓也, 温井 美帆, 加勢 大輔, 本蔵 直樹, 箕越 靖彦, 緒方 衝 (生理研), 北川 禎三, 永山 國昭, 松本 友治, 木村 有希子, 岡村 康司, 岩崎 広英, 久木田 文夫, 村田 喜理, 佐々木 真理, 富永 真琴, 富永 知子, 柴崎 貢志, 森山 朋子, 富樫 和也, 東 智広, 村山 奈美枝, 三村 明史 (統合バイオ)

【概要】

生体内の全ての細胞は、細胞内外環境の大きな変化の中でその環境情報を他のシグナルに変換し、細胞内や周囲の細胞に伝達することによって環境変化に対応しながら生存している。細胞が存在する臓器・組織によって細胞が受け取る情報信号は異なり、従って細胞が備えている情報信号を受信する機能も異なる。最近、形質膜の代謝型受容体のみならず、チャネルやトランスポーターなどの膜輸送蛋白質も、さらには細胞質内タンパク質も情報センサーの働きをしていることが明らかになりつつある。これらのバイオ分子センサータンパク質は種々の化学的、物理的、生理的情報を受容して他のシグナルに速やかに変換する能力を持っている。バイオ分子センサータンパク質の構造と機能やそのシグナル変換機序を解明していくことは、生命科学の本質である「細胞の生存」を解明するうえで極めて重要である。バイオ分子センサ

ーの欠損・機能不全は細胞の機能不全を招来し、ひいては生体恒常性維持機構の破綻から疾患につながる。また、バイオ分子センサータンパク質の機能制御は細胞の生死を左右することから、機能制御機構の解明は種々の疾患の治療薬創成の礎となる。こうしたバイオ分子センサータンパク質の構造と機能の解明を、既に遺伝子の明らかになっている分子の研究を中心に新たな分子の探索も含めて、分子生物学、生化学、生理学、細胞生物学の融合的研究によって推進するためにこの研究会を開催した。17の演題発表があり、電位センサー、温度センサー、機械刺激センサー、アミノ酸センサー、脂質センサー、活性酸素種センサー、ガスセンサー、味物質センサー、匂いセンサー、 Na^+ センサー、 Ca^{2+} センサー、 H^+ センサーなど多岐にわたった。活発な討論、情報交換がなされ、「バイオ分子センサー」研究の発展に有益な会であった。

(1) 新規の電位感受性酵素 VSP の構造と機能

岡村 康司^{1,2,3}, 村田 喜理¹, 佐々木 真理^{1,3}, 岩崎 広英^{1,2,3}

(1) 岡崎統合バイオサイエンスセンター, (2) 生理学研究所, (3) 総合研究大学院大学)

ユウレイボヤゲノムから、電位依存性チャネルの膜貫通領域と類似する領域を有するが、チャネルのポアの構造が見当たらず、代わりに酵素のドメインを有するタンパク (VSP: voltage sensor-containing protein) をコードす

ると思われる遺伝子を得た。

酵素ドメインのみからなる GST 融合タンパク質を大腸菌で発現させて精製した。Malachite green assay 法による吸光度測定によって脱リン酸化反応の測定を行ったと

ころ、時間依存的な脱リン酸化活性が確認された。この活性は、活性中心と思われる部位を置換した分子や GST のみのタンパクでは認められなかった。

この分子の一次構造から予測される電位感受性を証明するため、ツメガエル卵母細胞に cRNA を強制発現させた。数 μ A に到る顕著な「ゲート電流」を認めた。この「ゲート電流」は、電位センサーの陽電荷を減らすようなアミノ酸置換により消失した。従って、VSP は電位依存

性チャンネルに見られるのと同様な電位センサーを有することが明らかになった。

VSP が電位を感知して、かつ酵素活性を有することから、酵素活性が膜電位によって制御されるのではないかと考え、更にツメガエル卵母細胞において、膜電位を変化させつつ酵素活性を検出する電気生理学的実験を行った。これにより、酵素活性が電位センサーの働きによって膜電位依存的に変化するという証拠を得た。

(2) 新規温度感受性チャンネル TRPM2 によるインスリン放出機構

富樫和也¹、原雄二²、東智広¹、小西康信¹、富永知子³、森泰生²、富永真琴³

(¹三重大学医学部、²京都大学大学院工学研究科、³岡崎統合バイオサイエンスセンター・細胞生理)

TRPM2 を強制発現させた HEK293 細胞では、パッチクランプ法による解析により、熱刺激によって陰性電位において内向き電流が観察された。これまで明らかにされていた有効刺激 β -NAD⁺、ADP-ribose (ADPR) によって活性化された電流は熱刺激によって著しく増強された。さらに、室温では TRPM2 を活性化しない cyclic ADPR (cADPR) は、熱刺激存在下にもみ大きな活性化電流をもたらす有効刺激であることが明らかとなった。この熱活性化 TRPM2 チャンネルはその活性化温度閾値がおよそ 36 度近傍であり、直線的な電流電圧関係を示す 2 価の陽イオンの透過性が大きい非選択性陽イオンチャンネルとして機能するこ

とも判明した。単一チャンネル電流記録から、熱によって直接 gate されること、Na⁺に対して約 60pS のコンダクタンスを有することも分かった。cADPR による活性化が見られることから膵臓における発現を検討したところ、膵 β 細胞特異的な発現が観察された。そこで、TRPM2 を発現するラットインスリンノーマ由来の RIN-5F 細胞に熱刺激を加えたところ、同じ特性を持つ熱活性化電流が観察された。また、ラット単離膵 β 細胞でも同様な熱活性化細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇が観察され、熱刺激によるインスリン分泌が確認された。

(3) 細胞の機械刺激受容の分子機構と形態変化

辰巳仁史^{1,4}、清島大資²、河上敬介^{2,3}、井上真寿美^{2,3}、早川公英⁵、曾我部正博^{1,5}

(¹名古屋大院・医学系・細胞情報医学、²名古屋大院・医学系・リハビリテーション、³名古屋大・医・保健、⁴CREST・JST、⁵ICORP・「細胞力覚」・JST)

細胞に機械刺激を加えると数秒内にアクチン繊維でできたストレスファイバーが切断または消失し細胞底面の接着斑に加わる力が減少する。そして、細胞底面の integrin が機械刺激後 clathrin 依存的な endocytosis によって細胞内に取り込まれ、接着斑が消失する。また、この現象には細胞外から細胞内への Ca²⁺ の流入が関与している。しかし、細胞底面の接着斑への機械刺激から integrin 取り込みまでの細胞内 signal 伝達は不明である。

血管内皮細胞を β 1 integrin の細胞外ドメインを認識する抗体で染色し、血管内皮細胞の上面に fibronectin を coat した直径 10 μ m の glass bead を接着させる。この bead を数 μ m 移動することにより細胞底面の接着斑へ局所的に機械刺激を加える。bead 移動後の integrin-cluster の動態や、細胞と細胞外基質との間の接着状態の変化は、近接場光顕微鏡や反射干渉顕微鏡を用いて細胞のライブ観察する。

この実験系から、bead 移動により機械刺激が負荷された接着斑の integrin-cluster は、数秒以内に細胞底面から消失を開始する。これは接着斑の integrin の clathrin 依存

的な endocytosis による細胞内への取り込みによるもので、この反応には接着斑構成蛋白質のチロシン脱リン酸化が関係していると考えられた。

(4) TRPV4は尿流量を感知する

鈴木誠, 谷口淳一, 鶴岡秀一, 水野敦子 (自治医大・薬理学)

TRPV4 は Ca 透過性メカノセンサーチャネルである。細胞内 Ca を測定し、swell-activated Ca increase が DCT で消失していることを確認した。

1. バランスケージで電解質測定を行った。定常状態では尿中 Na 濃度が低かった。Na 制限食, 負荷によってもこの変化は変わらなかった。
2. サイヤザイド, フロセマイドを負荷して, 尿流量の増加を図り, 特に流量に依存して, Na 濃度が変化する機構に異常がある可能性が考えられた。
3. 麻酔下点滴管理によりホルモンの修飾を取り除いた状態で計測した。フロセマイド+2%NaCl 投与で, Na 濃度, TcH₂O に差があり, K には差が無いことが明らかに

なった。

4. CCT を単離還流し, flow 圧を 5cm H₂O から 15cm H₂O に変化させた。JNa はこの flow の変化により, 上昇し, VT も深くなる。しかし, TRPV4 ノックアウトマウスではこの変化はまったく観察されなかった。TRPV4 の刺激薬である 4 α PDD10 μ M は, 15cm H₂O 下のワイルドマウスでのみ効果が明らかであった。

【結論】TRPV4 は flow-dependent Na flux に関与している。従来の考えと異なり, flow-dependent 機序は少なくともマウスにおいて, 尿中電解質の大きな変化はもたらさないといえる。

(5) 心筋カベオラ局在イオンチャネルのバイオセンシング機構

古川哲史 (東京医科歯科大学・難治疾患研究所・生体情報薬理分野)

我々は、カベオラにおける“チロシンキナーゼ型受容体刺激—PI3-kinase—Akt(PKB)—eNOS—イオンチャネル”という心血管系の新たなイオンチャネル制御のシグナル伝達経路を明らかにしたが、このシグナル伝達経路は以下のバイオセンシング機構に関与する。

1. 心筋細胞では、収縮を感知して活動電位にフィードバックすることにより収縮の強度を微調節する negative feedback 機構 “mechano-electrical feedback” が存在する。このメカニズムとして細胞外マトリックス・インテグリンを介する eNOS 活性化による心筋カリウム電流 I_{Ks} の活性化が関与する。

2. 心筋細胞では、細胞内 Ca²⁺ 濃度を感知して活動電位にフィードバックすることにより Ca²⁺ 流入量を微調節するフィードバック機構が存在する。eNOS は Akt あるいは calmodulin 依存性に活性化されるが、Ca²⁺によるイオンチャネル制御には calmodulin 依存性 eNOS 活性化が関与する。

3. 心血管系細胞では、性ホルモン受容体はカベオラに局在しており、遺伝子転写を介さず Akt 依存性に eNOS を活性化すること、すなわち non-nuclear (non-genomic) pathway がイオンチャネル制御に関与している。

(6) アミノ酸トランスポーターを取り巻くタンパク質間相互作用

金井好克 (杏林大学医学部・薬理学教室)

ヘテロ二量体型アミノ酸トランスポーターは、12回膜貫通型の活性サブユニットと、1回膜貫通型の補助サブユニットがジスルフィド結合により連結して形成される。補助サブユニットの1つである4F2hc (4F2 heavy chain; CD98) は、N-末端細胞内ドメインを介してインテグリンのbeta-鎖と相互作用し、アミノ酸トランスポーター、インテグリン、4F2hc からなる複合体を形成する。インテグリンのリガンドによりアミノ酸取り込み能が上昇し、この上昇はインテグリンの機能抑制や4F2hcの細胞内ドメインの過剰発現により阻止された。この効果は速やかに生じ、インテグリンシグナルを伝えるFAK (focal

adhesion kinase) のノックダウンにより影響されなかったことからFAKを介さない経路によることが示唆された。また、ヘテロ二量体型アミノ酸トランスポーターの活性サブユニットのC-末端には電位依存性CaチャンネルCav1.2の"targeting domain"と相同な配列があり、この部分のdeletionにより補助サブユニットとの連結が障害され、膜移行が障害されることが明らかとなった。活性サブユニットのC-末端のdeletionによる解析の結果、C-末端は複数のタンパク質間相互作用に関わるドメインがあり、これを介して多岐に渡る調節を受ける可能性が示唆された。

(7) 植物ステロール誘導体に反応するコレステロール代謝センサーLXR

榎島誠 (日本大学医学部生化学)

植物ステロールまたは代謝産物がLXRのリガンドとして機能しているとの仮説をたて、植物ステロール及びそれらの誘導体のLXRに対する効果を検討した。その結果、エルゴステロール誘導体(22E)-ergost-22-ene-1 α ,3 β -diol (YT-32) にLXR α 及びLXR β を活性化作用があることを見出した。マウスを用いて、非ステロイド性合成LXRアゴニストT0901317とエルゴステロール誘導体YT-32の効果を比較検討した。T0901317の経口投与は、肝臓でのステロール排出ポンプABCG5/G8や脂肪酸代

謝調節因子SREBP-1c、小腸でのABCA1、ABCG5/G8などのLXR標的遺伝子の発現を誘導した。コレステロールの吸収は抑制されたが、血漿中性脂肪は上昇した。一方YT-32の投与は、小腸においてステロール排出ポンプABCA1、ABCG5/G8の発現を誘導したが、肝臓での標的遺伝子はほとんど誘導しなかった。そして高中性脂肪血症を誘導することなく、コレステロールの吸収を抑制した。これらの結果は、LXRが植物ステロールのセンサーとして、小腸選択的な機能をしていることを示唆している。

(8) 内因性一酸化窒素の直接酸化によるカルシウムチャネルTRPC5の活性化

吉田卓史, 森泰生 (京都大学大学院・工学研究科)

TRPC5チャネル蛋白質をHEK293細胞およびウシ大動脈内皮細胞(BAEC)に一過的に発現させて電気生理学的手法、Ca²⁺インジケータfura-2を用いた細胞内Ca²⁺濃度([Ca²⁺]_i)測定を用いてTRPC5の活性を調べた。その結果、TRPC5発現HEK293細胞において一酸化窒素(NO)供与剤SNAP(100 μ M)、H₂O₂(100 μ M)、さらにシ

ステイン特異的酸化剤5-Nitro-2-PDS(30 μ M)の適用により細胞外Ca²⁺依存性の[Ca²⁺]_i上昇が見られた。この活性化は酸化物質によるTRPC5蛋白質内の特定システイン残基の直接酸化により引き起こされていることを明らかとした。またTRPC5を一過性に発現させたBAECにおいてATP(1 μ M)の刺激によるendothelial nitric oxide

synthase (eNOS) の活性化により産生した NO により $[Ca^{2+}]_i$ が TRPC5 を強制発現していないコントロールに対して有意に上昇することを見出した。この $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は eNOS の阻害剤である L-NAME によりコントロールレ

ベルまで抑えられる。以上の結果より内皮細胞において TRPC5 が NO により直接酸化されることにより活性化することを明らかとした。

(9) 共鳴ラマン分光法によるセンサーヘム蛋白質の構造化学的研究： 可溶性グアニレートシクラーゼの最近の話題

北川禎三（岡崎統合バイオサイエンスセンター）

分子の振動は分子立体構造に非常に敏感であるので、『そのスペクトル測定により分子構造変化を検出していく』というアプローチをとる。分子振動の測定法としてラマン散乱法を用いて可溶性グアニレートシクラーゼ (sGC) を調べた。

ウシの肺から単離・精製した cGMP は $\alpha\beta$ ダイマーで分子量 143,000、分子当り 1 個のプロトヘムをもち、それは $\beta 105$ -His に結合している。この分子に NO が結合すると活性は 200~400 倍高くなる。NO は生体中では L-アルギニンから NO 合成酵素により作られるが、ニトログリセリンのような薬剤として外から与えられることもある。

NO が Fe (II) ヘムに結合すると、Fe (II)-His ($\beta 105$) が切断される事が共鳴ラマン分光の研究より明らかになっている。しかし、CO がその位置に結合しても、Fe(II)-His ($\beta 105$)結合は切断されず、活性は 5 倍程度しか上がらない。したがって、Fe-His 結合の切断によるコンフォメーション変化が C 末端部にある触媒部位での GTP→cGMP 反応を促進するものと考えられる。

ところが、ある種のエフェクター分子(YC-1[3-(5'-hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzylindazole])が存在すると、CO も NO と同様の活性増大の効果を生むことがわかってきた。

(10) ROS センサーアニオンチャネルとアポトーシス誘導

清水貴浩, 沼田朋大, 岡田泰伸（生理研・機能協関）

アポトーシス性容積減少 (apoptotic volume decrease: AVD)は、細胞にアポトーシスを誘導する極めて重要な現象であり、主に K^+ チャネルと Cl^- チャネルの活性化によるイオン流出による。この AVD 誘導性 Cl^- チャネルについて検討した。HeLa 細胞を用いた全細胞記録において、ミトコンドリア系アポトーシス誘導剤 (staurosporine: STS)が Cl^- 電流を活性化した。その性質は、外向き整流性、脱分極電位での不活性化、容積感受性、細胞内 ATP 依存性、薬理的性質などの点で、これまで報告されている容積感受性 Cl^- チャネルと同一であった。また、STS が急速に細胞内活性酸素種 (reactive oxygen species:

ROS) を産生したことから、容積感受性 Cl^- チャネルのアポトーシス性活性化に ROS が関与している可能性について検討した。ROS スカベンジャーや NADPH オキシダーゼ阻害剤による ROS 産生抑制が、この STS による容積感受性 Cl^- 電流の活性化を抑制した。また、細胞外に投与した過酸化水素も、細胞膨張がないにもかかわらず容積感受性 Cl^- チャネルを活性化した。これらの結果から、アポトーシス時に活性化する Cl^- 電流が容積感受性 Cl^- 電流であること、また STS による Cl^- チャネル活性化は ROS 産生を介していることが明らかとなった。

(11) 活動電位を発生するマウス味細胞の応答と発現分子の解析

吉田竜介, 重村憲徳, 安松啓子, ニノ宮裕三 (九州大学大学院・歯学研究院・口腔機能)

活動電位を発生させる味細胞の味刺激への応答性を調べ、鼓索神経線維の応答性と比較した。マウス鼓索神経線維と同様に、NaClに反応する細胞はアミロライド感受性・非感受性のグループに分けられた。幾つかのMSGに反応する細胞では、IMPの添加により相乗効果が確認された。刺激により生じる活動電流頻度は刺激濃度依存的であった。味刺激に対する反応を記録できた78個の味細胞のうち、45個(58%)は4種の刺激(NaCl, サッカリン, HCl, キニーネ)のうち1種に、28個(36%)は2種に、5個(6%)は3種に反応した。エントロピー値を計算すると平均 0.207 ± 0.253 (SD)となり、この値はマウ

ス鼓索神経の値に近かった。また、個々の細胞の応答性の近似を示すデンドログラムや4基本味のうち特定の味刺激に反応する細胞の割合も味細胞と神経の間で類似していた。これらの結果は、活動電位を発生する味細胞が神経に味情報を伝えていることを示唆する。また、甘味反応を示すマウス味細胞のT1r3(甘味受容体)、gustducinの発現パターンを調べた。甘味反応細胞におけるT1r3とgustducinの発現パターンは多様で、T1r3とgustducinを共発現する細胞とT1r3あるいはgustducinのみを単独に発現する細胞がそれぞれ存在した。この結果は、マウスの甘味受容・情報伝達機構が複数存在することを示唆する。

(12) 逆推定法による微細構造体内cAMP変動の実時間測定

竹内裕子・倉橋隆 (大阪大学大学院 生命機能研究科)

cAMPは神経細胞や内分泌細胞で広くSignal Transductionの二次伝達物質として利用されているが、Signal Transductionの特性を定量的に知るためには、細胞内cAMP濃度変化を実時間測定する実験が必要となる。

そこで、従来より用いていたパッチクランプ記録とケージド化合物の光解離のコンビネーションによって、サブミクロン組織空間内のcAMP濃度推定を行う系を確立した。この方法を用いて、嗅細胞繊毛内での匂い反応時のcAMP濃度推定を行ったところ、ステップ状刺激に対して、線形に細胞内cAMP濃度が上昇するという結果を得た。細胞内PDE活性が一定であるなら、この結果は、

cAMP産生にかかわるアデニル酸シクラーゼ活性が定常活性を示すことを意味する。このことは、実際に、ケージドcAMPを用いた実験によって推定されている。ところで、従来、G蛋白介在性の情報伝達系として最も定量的な研究が進んでいるもののひとつに視細胞がある。視細胞では、effector酵素としてのPDEの活性は時間とともに線形的に増加すると予測されており、したがって細胞内cGMP濃度変化は指数関数的に変化すると予測されている。今回の嗅細胞における実測結果は、このような従来の予測と異なっており、その不整合性について考察する。

(13) 脳内Na⁺センサー：Na_xチャンネルの生理的役割

檜山武史 渡辺英治 野田昌晴 (基礎生物学研究所 感覚情報処理)

Na_xチャンネルは中枢神経系においては主に脳室周囲器官(CVOs)に発現していた。CVOsは個体の塩分摂取や水分摂取の制御に関わるとされる。脱水状態において、野生型マウスは水を大量に摂取し食塩水を回避するが、

ノックアウトマウスは味覚に異常が無いにも関わらず両者を区別無く摂取した。さらに、高張食塩水を脳室内に注入しCVOsを直接的に高Na液で刺激すると、野生型では食塩水忌避行動が出現するのに対し、ノックアウト

マウスではこれがみられなかった。

アデノウイルスを用いてノックアウトマウスの脳内に Na_x 遺伝子を再導入したところ、一部のマウスにおいて、脱水時における食塩水回避行動が回復した。回復したマウス全てにおいて CVOs の一つである脳弓下器官へのウイルス感染が確認された。また、 Na_x を発現している部位の初代培養細胞では 10 mM 程度の細胞外ナトリウム

イオンの上昇に応答して、細胞内ナトリウムイオン濃度が大幅に上昇した。この応答はノックアウトマウス由来の細胞では観察されなかったが、 Na_x プラスミドベクターの導入により応答が出現した。よって、 Na_x は体液塩濃度を検出するナトリウムレベルセンサーとして働いており、脳弓下器官が個体の塩分摂取行動制御の一次中枢として機能していると結論した。

(14) GFP を用いたカルシウムプローブ G-CaMP による平滑筋カルシウムの解析

中井淳一（理化学研究所 脳科学総合研究センター 記憶学習機構研究チーム）

数年前に GFP を元にした Ca プローブである G-CaMP を開発した。G-CaMP は 1 波長励起 1 波長測定のプロープで GFP とほぼ同様の蛍光波長特性を持つ。そこで、平滑筋に特異的に G-CaMP を発現するマウスを作成した。このマウスには特別な異常は認められず、正常に発育した。冠動脈を含む血管の平滑筋、膀胱平滑筋、腸管平滑筋、気管支平滑筋に GFP の発現が認められた。膀胱平滑筋をサポニンにて処理した後、外液の Ca 濃度を変えて用量-反応依存曲線を取ったところ、 K_d は 328 nM (Hill 係数 2.8) で *in vitro* の測定結果とほぼ一致した。そこで単離した平滑筋細胞にアセチルコリンおよびカフェインを

投与したところ蛍光の増加が観察された。次に膀胱を単離し神経を電気刺激して平滑筋の Ca 変動を観察したところ、Flash と Wave と呼ぶ 2 種類の Ca の変動が捕らえられた。Flash ではまず、P2X 受容体が活性化され細胞が脱分極することによってジヒドロピリジン感受性電位依存性 Ca チャネルが活性化され、細胞内に Ca が流入する。さらに流入した Ca によりリアノジン受容体が活性化され Ca-induced Ca release により Ca の上昇が引き起こされる。また Wave はムスカリン性アセチルコリン受容体を介した IP₃ の生成とその後の IP₃ 受容体の活性化によって Ca の上昇が起こることが明らかとなった。

(15) プロトンチャネルの recruitment と活性振動

久野みゆき、酒井啓、川脇順子、森畑宏一、翁昌子、森啓之
(大阪市立大学大学院医学研究科分子細胞生理学)

膜電位依存性 H^+ チャネルは、開口すると大量の H^+ を短時間で細胞外に放出する H^+ 選択性チャネルである。このチャネルは、細胞内外 pH のわずかな変動に即応して活性を変える極めて鋭敏な H^+ センサーであると同時に、 H^+ シグナルの強力な発信器としての役割も兼ね備えている。チャネル開口制御の第一要因は pH であるが、pH 環境を一定に維持しても、チャネル活性は様々な要因でダイナミックに変動する。こうした短時間で起こる可逆的な変動の中に、活性化チャネル数の変化、すなわちチャネルの recruitment 機構に基づくものが含まれている可能性を、チャネル活性の温度応答性から検討してみた。

H^+ チャネルコンダクタンスには温度依存性の高い相 (high Q_{10} phase) があり、ユニークな性質のひとつとして知られている。ところが、cell swelling を起こさせ H^+ チャネル電流を強く活性化させると、この high Q_{10} phase が消失する。またアクチン細胞骨格に作用し swelling を抑える働きのある cytochalasin や phalloidin によっても high Q_{10} phase が抑制されることから、high Q_{10} phase で H^+ チャネルの recruitment が生じていることが推測された。 H^+ チャネルの大きな活性振動には recruitment が大きな役割を果たしていると考えている。

(16) Rab3エフェクター Noc2の開口分泌における役割

三木隆司¹, 松本正成², 清野 進¹

(¹神戸大学医学系研究科・細胞分子医学, ²千葉大学医学研究院・細胞分子医学)

Noc2 は Rab3 のエフェクター分子として膵β細胞から同定され, 膵内分泌をはじめ, 内分泌組織・神経内分泌組織に強く発現しているがその生理的役割は不明であった。Noc2 KO マウスは外見上大きな異常は認めず随時血糖値も正常であったが, KO マウスはストレス下でのみ耐糖能障害を示した。KO マウスより単離した膵島からの Ca^{2+} 誘導性のインスリン分泌は明らかに障害されていたが, 三量体 G 蛋白質 Gi/o の阻害剤である百日咳毒素による処置で正常化した。Noc2 は Gi/o によるインスリン分泌抑制機構に拮抗的に働く分子であることが示された。野生型 Noc2 をアデノウイルスにより KO マウス

の膵島に導入すると Ca^{2+} 誘導性のインスリン分泌が改善するものの, Rab3 と結合しない変異型 Noc2 を導入しても分泌が改善しなかったことから, Noc2 は Rab3 との結合を介して機能していると考えられた。さらに, KO マウスの膵外分泌腺房細胞に分泌顆粒が極度に貯留していることが判明し, 単離膵腺房細胞からのアミラーゼの調節性分泌は著明に障害されていた。調節性分泌が惹起される他の腸管細胞でも同様の分泌顆粒の貯留が認められた。以上のことから, Noc2 は Rab3 と相互作用することにより, 内分泌・外分泌両者の調節性の開口分泌に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

(17) リガンド投与による代謝型グルタミン酸受容体細胞内領域の二量体構造の動的変化

立山充博, 久保義弘 (自然科学研究機構・生理学研究所・神経機能素子研究部門)

代謝型グルタミン酸受容体 mGluR1 の細胞外領域の結晶構造解析によって Gd^{3+} の結合部位が 2 量体サブユニット境界面の E238 を中心とする負電荷を持ったアミノ酸に富む領域に同定されたのを受け, この領域が Gd^{3+} による mGluR1 の活性化に実際に関与しているかどうかについての解析を行った。(1) E238Q 変異により, Gd^{3+} 感受性は完全に消失したが, グルタミン酸, Ca^{2+} に対する感受性は変化しなかった。(2) 前もって低濃度の Gd^{3+} を投与しておくことにより, 野生型ではグルタミン酸に対する感受性が上昇するが, E238Q 変異により, この増強作用も消失した。シナプス間隙に存在する何らかの物

質 X が Gd^{3+} の代わりに E238 に作用して mGluR1 の機能を修飾するという仮説の下に研究を継続している。

膜表面に発現している受容体の, リガンド投与による動的構造変化をリアルタイムで解析することを目的として, mGluR1 の細胞内領域を 2 色の蛍光蛋白でラベルし, 全反射照明下において, 蛍光物質間の距離の変化を評価する FRET 解析を行った。その結果, 2 量体で構成される mGluR1 の, サブユニット内の構造変化ではなく, 2 つのサブユニットの配置の変化が起きていることを明らかにした。

19. Na チャネルと細胞機能

2004年6月24日－6月25日

代表・世話人：緒方 宣邦（広島大学大学院）

所内対応者：岡村 康司（岡崎統合バイオサイエンスセンター）

- (1) Na⁺チャネルと生物進化の仮説提唱
吉田 繁（近畿大学・理工学部・生命科学科）
- (2) 電位センサーの動作原理
久木田 文夫（自然科学研究機構・統合バイオサイエンスセンター）
- (3) Slow removal of Na⁺ channel inactivation underlies the temporal filtering property in the teleost thalamic neurons
岡 良隆（東京大学大学院・理学系研究科）
- (4) マウス後根神経節ニューロンにおける電位依存性 Na チャネルの機能的分類
緒方 宣邦（広島大学大学院・医歯薬学総合研究科）
- (5) Na_x チャネルの生理機能
檜山 武史（自然科学研究機構・基礎生物学研究所）
- (6) 上皮型 Na チャネル (ENaC) 活性化因子プロスタシンによる腎臓での Na 再吸収調節
北村 健一郎（熊本大学大学院・医学薬学研究部・腎臓内科学）
- (7) 上皮型 Na チャネル (ENaC) の浸透圧による制御機構
丸中 良典（京都府立医科大学大学院・医学研究科）
- (8) Nav1.6 チャネルの持続性 Na 電流の制御機構
白幡 恵美（山形大学医学部発達生体防御学講座小児科医科学分野）
- (9) 軸索起始部とランビエ節に特異的なスペクトリン細胞膜骨格の機能
駒田 雅之（東京工業大学・大学院・生命理工学研究科）
- (10) 心筋 Na チャネル病の分子病態
蒔田 直昌（北海道大学大学院・医学研究科）
- (11) 心筋 Na チャネル遺伝子変異による致死性不整脈疾患の電気生理学とコンピューターシミュレーション
井本 敬二（自然科学研究機構・生理学研究所）
- (12) てんかんとナトリウムチャネル遺伝子変異
山川 和弘（理化学研究所・脳科学総合研究センター）
- (13) 寒冷誘発性低 K⁺性周期性四肢麻痺における変異 Na⁺ チャネルの温度依存性
杉浦 嘉泰（福島県立医科大学・医学部・神経内科学講座）
- (14) 骨格筋疾患と Na チャネル異常
高橋 正紀（大阪大学大学院・医学系研究科・神経機能医学講座）

【参加者名】

吉田 繁（近畿大・理工学）、山川 和弘（理化学研）、高橋 正紀（大阪大大院・医）、青池 太志（大阪大大院・医）、緒方 宣邦（広島大大院・医歯薬）、柿村 順一（広島大大院・医歯薬）、鄭 泰星（広島大大院・医歯薬）、松富 智哉（広島大大院・医歯薬）、中本 千泉（広島大大院・医歯薬）、檜山 武史（基生研）、清水 秀忠（基生研）、渡辺 英治（基生研）、野田 昌晴（基生研）、蒔田 直昌（北海道大学大学院・医）、杉浦 嘉泰（福島県立医科大・医）、柴野 健（福島県立医大・医）、岡 良隆（東京大大院・理）、田中 裕之（東京大大院・理）、羽田 幸祐（東

京大大学院・理), 駒田 雅之 (東京工業大大学院・生命理工), 鈴木 総一郎 (東京工業大大学院・生命理工), 丸中 良典 (京都府立医科大大学院・生理機能制御), 新里 直美 (京都府立医科大大学院・生理機能制御), 宮崎 裕明 (京都府立医科大大学院・生理機能制御), 倉富 忍 (京都府立医科大

大大学院・生理機能制御), 北村 健一郎 (熊本大大学院・医学薬), 安達 正隆 (熊本大大学院・医学薬), 實吉 拓 (熊本大大学院・医), 井本 敬二 (生理研), 白幡 恵美 (山形大・医), 久木田 文夫 (岡崎統合バイオサイエンスセンター), 岡村 康司 (岡崎統合バイオサイエンスセンター)

【概要】

電位依存性 Na チャネルは, 多細胞動物に普遍的に存在し, 神経筋の興奮性を決定する重要な素子分子である。近年の研究により Na チャネルの生理機能や分子種は, 従来考えられてきた以上に多様であり, 古典的な神経軸索での興奮伝導以外に中枢神経細胞での情報統合, リズム形成, 神経可塑性, 塩濃度調節などの役割が明らかにされてきた。その一方, 電位依存性 Na チャネルの機能異常は, てんかんなどの神経疾患, 心疾患, 筋疾患, 異常な痛覚の形成に深く関わり, また不整脈治療薬, てんかん治療薬や, 痛みの制御を始めとする創薬のターゲットとしても研究が盛んである。従来の電気生理学的, 分

子生物学的研究の蓄積は, 今後益々個体レベルでの生理機能や病態の理解へ向けて統合されることが期待されとおり, ゲノム情報, 生物物理学的解析, 発現制御機構, モデリング, 遺伝子改変動物, 遺伝病, 分子創薬など, 様々な観点からの研究が重要性を増している。今回の研究会は, 二日間に渡り開催するもので基本的には平成13年度に行なわれた生理研研究会「Na チャネルの構造と機能」に引き続く試みであるが, Na チャネルの生物物理特性だけでなく, 生理機構から病態までを含む研究内容を盛り込み, 統合生命科学としての将来への展望を探る。

(1) Na⁺チャネルと生物進化の仮説提唱

吉田 繁 (近畿大学・理工学部・生命科学科)

脳底部の形を複雑にしCSFの中に沈んでいる脳を頭蓋骨に嵌め込んで固定している。硬膜テントで仕切ることでより大脳・小脳等を固定している。脳の見かけの重量をCSFによって激減させ衝撃から守っている。第三脳室の底部を成すMEの上衣細胞層は, concentration-sensitive Na⁺ channel (Na_c; c = concentration) を含む tanocytes より成る。マウス脳スライスをNa⁺感受性蛍光色素SBFIで染色し [Na⁺]_o変化に対する [Na⁺]_i変動を観察した。Na_cは[Na⁺]_o上昇に反応するが, [Na⁺]_o下降・浸透圧変化・TTX 投与には無反応。上衣細胞層はNa⁺センサーであり脈絡叢の産生するCSFのNa⁺

濃度をモニターしている。外層は浸透圧センサーでありCSFの浸透圧をモニターしている。Na_cには2種類あり逆反応を示すNa_cは普段は開いているが[Na⁺]_o上昇で閉じる。脈絡叢の近くに存在する circumventricular organs (MEの上衣細胞層を含む) はNa_cを持ちCSFのNa濃度をモニターして脈絡叢のCSF産生制御に関係していると考えられる。脈絡叢から遠いMEの外層は脳室からクモ膜下腔に出たCSFの比重をモニターして脳の浮遊状態コントロールに関係していると考えられる。Na_cは動物進化に伴う脳の肥大化を推進した要因のひとつではないか?

(2) 電位センサーの動作原理

久木田 文夫 (自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター・神経分化部門)

溶液の粘性はゲート機構を遅くする。電位センサーの動きを決めるのは溶液の「粘性」であり脂質は重要な

な。Paddleモデルに対する多くの反論は水溶液からの親水性試薬のS4へのaccessibilityが重要な鍵になっている。

S4 の大部分は水界面に露出している。柔らかい構造モデルでは、溶液粘性を感じるためにタンパク質はサブナノ秒レベルの速い細かな運動が数百万回連続して起こりサブミリ秒のゲート機構を担っていることを主張している。S4 は自身の重心が電荷と共に膜電場を横切りながら、周辺の構造は不規則な構造から規則的な構造の間を変化することを示唆している。電位センサーに対する効果は粘性依存的に Hodgkin-Huxley Kinetics が遅くなることであるが Na チャネルでも K チャネルでも観察される。特に K チャネルでは時間経過を決める過程の中で粘性依

存性の部分が大半を占めている。ポア内の構造変化ないしはゲート電流が流れ終わってからポアが開く過程には浸透圧が関与しているが Na チャネルと K チャネルでは方向は逆である。浸透圧はポア内の水とないしは水を含む空隙の体積が変化する際の自由エネルギー変化があれば有効であるが Na チャネルでは自由エネルギーは僅かに増大し K チャネルでは大きく減少する。最終転移に対して浸透圧の増大は Na チャネルでポアを開きにくく K チャネルでは開きやすくすることが明らかになった。

(3) Slow removal of Na⁺ channel inactivation underlies the temporal filtering property in the teleost thalamic neurons

岡 良隆 (東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻)

筒井 秀和 (東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻)

大石 謙介 (協力者) (東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻)

魚類などの脊椎動物脳の神経核は基本的な構築原理は保たれているが構成ニューロン種が少なく単純な実験系である。カワハギの「第3型糸球体核」は視覚性を入力を受け視床下部下葉に投射する神経核で、細胞種が少なく(2種)明瞭な層状細胞構築を持ち巨大なシナプス後樹状突起を含み神経核機能の解析のモデル系になる。皮質核から糸球体核への入力線維の刺激に対する樹状突起先端部でのシナプス応答について解析したところ細胞体でのシナプス応答特性は両細胞で異なり大型細胞はシナプス入力に対して単発発火のみを示し小型細胞は入力依存的に tonic な発火を示した。時間間隔を変化させながらペアの入力を与え入力の時間的な様式に対する応答は、

大型細胞が長い時定数 (~100ms) の low-pass フィルター特性を持つのに対して小型細胞は速い入力パターンにも追従して発火した。大型細胞の細胞体の low-pass フィルター特性の基礎となるイオンチャネルとして Na チャネルが極めて遅い不活性化からの回復過程を示した (-80mv で >100ms)。各パラメーターを求め Boltzmann 関数指数関数で fit 及び連続化しプログラム NEURON 上で Na⁺チャネル機能の再構成を行ったところ Na⁺チャネルと Hodgkin-Huxley 型の K⁺チャネルの組み合わせで、大型細胞の基本的な単発発火特性及び low-pass filter 特性が再現できた。

(4) マウス後根神経節ニューロンにおける電位依存性 Na チャネルの機能的分類

緒方 宣邦 (広島大学大学院・医歯薬学総合研究科・神経生理学)

柿村 順一 (広島大学大学院・医歯薬学総合研究科・神経生理学)

松富 智哉 (広島大学大学院・医歯薬学総合研究科・神経生理学)

鄭 泰星 (広島大学大学院・医歯薬学総合研究科・神経生理学)

中本 千泉 (広島大学大学院・医歯薬学総合研究科・神経生理学)

後根神経節 (Dorsal root ganglion: DRG) などの一次知覚

ニューロンに存在する Na チャネルは細胞種特異性やカ

イネティクスの異なる7種のサブタイプから構成されている。そのうち NaV1.8 や NaV1.9 は、小型侵害受容ニューロンに特異的に発現することより、病的疼痛の発現に重要な役割を担っていると考えられている。しかし実際には、これらのサブタイプのみでは説明しがたい面も多く、病態の進展には、そのほかのサブタイプも含めた Na チャネル全体のホメオスタシスの変調による求心インパルスの質的および量的変化が重要であると思われる。また中心的役割を受け持つ Na チャネルサブタイプも慢

性疼痛の病期により変遷していくと予想される。Na チャネルの疼痛発現における役割は、実際のところ、まだまだ解明されていない状況であり、痛覚求心路における Na チャネルの生理機能を総合的に解明することが先決である。DRG における Na チャネル機能に関して、1) テトロドトキシン非感受性 Na チャネル、NaV1.9 の機能、2) 新規テトロドトキシン感受性持続型 Na 電流の生理学的性質、3) DRG における活動電位の発現メカニズムなどについての私たちの最近の研究結果を報告する。

(5) Na_x チャネルの生理機能

檜山 武史 (自然科学研究機構・基礎生物学研究所)

Na_x チャネルは電位感受性や不活性化に必須の配列が失われており機能が不明であった。そこで lacZ 遺伝子の挿入によるノックアウトマウスの解析を行った。Na_x チャネルは主に脳室周囲器官 (CVOs) に発現し、水と高張食塩水の摂取選択性を調べる行動実験を行った。脱水状態においては野生型マウスは水を大量に摂取し食塩水を回避するが、ノックアウトマウスは味覚に異常が無いにも関わらず食塩水を回避せず両者を区別無く摂取することがわかった。高張食塩水を脳室内に注入し CVOs を直接的に高 Na 液で刺激した時にも、野生型では食塩水忌避行動が出現するのに対しノックアウトマウスではみられなかった。アデノウィルスを用いてノックアウトマウ

スの脳内に Na_x 遺伝子を再導入したところ、一部のマウスにおいて、脱水時における食塩水回避行動が回復したことが確認された。また、Na_x を発現している部位の初代培養細胞を用いて細胞外液のイオン濃度を変化させたところ Na_x 発現細胞は 10 mM 程度の細胞外 Na の上昇に応答して、細胞内ナトリウムイオン濃度が大幅に上昇することを見出だした。この応答はノックアウトマウス由来の細胞においては観察されなかったが、Na_x プラスミドの導入により応答が出現した。Na_x は体液塩濃度を検出する Na センサーとして働いており、脳弓下器官が個体の塩分摂取行動制御の一次中枢として機能していると結論した。

(6) 上皮型 Na チャネル (ENaC) 活性化因子プロスタシンによる腎臓での Na 再吸収調節

北村 健一郎 (熊本大学大学院医学薬学研究部腎臓内科学)

富田 公夫 (熊本大学大学院医学薬学研究部腎臓内科学)

上皮型 Na チャネル (ENaC) は腎臓での Na 再吸収量を調節し、体液の恒常性や血圧の維持に重要な役割を果たしている。セリンプロテアーゼのプロスタシンをラット腎臓よりクローニングし、アフリカツメガエル卵母細胞にプロスタシンと ENaC を共発現させるとアミロライド感受性 Na 電流を著明に活性化する。免疫組織学的検討ではプロスタシンは近位尿細管および皮質集合尿細管の管腔側膜に強く発現し、皮質集合尿細管では主細胞の管

腔側膜において ENaC と共局在する。アルドステロンが ENaC およびプロスタシンの発現を増強し、相互作用によって Na 再吸収が増加し、原発性アルドステロン症患者の尿中に多量のプロスタシンが排泄され、副腎腺腫摘出によりプロスタシン排泄量が減少する。TGF-β1 は尿細管細胞においてアルドステロンによる Na 再吸収を阻害する作用があり、ENaC の発現抑制を伴っているという報告がある。TGF-β1 はプロスタシンの発現も抑制するこ

とが判明し, TGF- β 1 は ENaC およびプロスタシンの発現抑制を介して Na 利尿へ働く可能性が考えられた。セリンプロテアーゼ阻害剤であるメシル酸ナファモスタットがプロスタシンの発現抑制を介し Na 再吸収を抑制する

ことを *in vitro* および *in vivo* で明らかにし臨床におけるメシル酸ナファモスタットの副作用である低 Na 血症および高 K 血症の発症にプロスタシンが関与するかもしれない。

(7) 上皮型 Na チャネル (EnaC) の浸透圧による制御機構

新里 直美 (京都府立医科大学大学院・医学研究科・生理機能制御学)

丸中 良典 (京都府立医科大学大学院・医学研究科・生理機能制御学)

腎遠位尿細管上皮組織での上皮型 Na チャネルを介する Na 再吸収は, 血圧調節や体液量維持に重要な役割を果たすことが知られており, アルドステロン, 抗利尿ホルモンや血漿浸透圧により緻密に制御されている。我々はこれまでに遠位尿細管での Na 再吸収が低浸透圧 (血漿浸透圧低下) 刺激により促進されることを報告してきたが, そのメカニズムは十分に理解されていない。そこで, 本研究では, 低浸透圧刺激による Na 再吸収の制御機構を明らかにするために, 低浸透圧刺激により Na 再吸収に寄与する上皮型 Na チャネル (ENaC) の遺伝子発現を介するメカニズムについて検討した。我々は, 腎遠

位尿細管由来の培養細胞である A6 細胞に長時間の低浸透圧刺激を与えると, ENaC α -subunit (α ENaC) の mRNA が増大し, Na 再吸収が促進されることを見出した。さらに, この α ENaC の転写レベルでの増大は, Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter の活性化剤としてのフラボンや Cl チャネル阻害剤により著しく抑制され, 更にナトリウム再吸収も減少していた。これらの結果は, 低浸透圧刺激による Na 再吸収の制御機構に, クロライド輸送を介する細胞内クロライド濃度変化が関与していることを強く示唆している。

(8) Nav1.6チャネルの持続性 Na 電流の制御機構

白幡 恵美 (山形大学・医学部・発達生体防御学講座・小児医科学分野)

ヒト Nav1.6 遺伝子をクローニングし培養細胞系 (tsA201) に発現させパッチクランプ法を用いて検討した。Nav1.6 遺伝子単独発現により顕著な持続性内向き電流を認めた。持続性電流の成立は Nav1.6 チャネルによるデフォルトの性質であり軸索など持続性電流が認められない部位では何らかの因子により抑制されるのではないかと考え, ランビエ絞輪の Ankyrin G に着目した。Nav1.6 と Ankyrin G とを共発現させたところ, 持続性電流は著減しまた不活性化曲線は顕著なシフトを認めた。Ankyrin G により不活性化のゲーティングが変化することが示された。この変化は Ankyrin B や Ankyrin B/G キメラのうち

膜蛋白結合部位が Ankyrin B のものではみられなかった。 β 1 サブユニットの共発現でも認められなかった。Nav1.6 チャネルの細胞内リンカー部位にあるアンキリン結合ドメインを欠失させると Ankyrin G による持続性電流の減少効果は減弱していた。Nav1.6 が Ankyrin G の膜蛋白結合部位と直接作用してチャネルを膜表面に集族化させ不活性化ゲートを変化させると考えられた。Ankyrin G による持続性電流の抑制は成熟したランビエ絞輪での電流を反映し興奮を忠実に速く伝導するために必要な機構として理解できる。さらに脱髄による興奮性の変化にこの機構が関連している可能性がある。

(9) 軸索起始部とランビエ節に特異的なスペクトリン細胞膜骨格の機能

駒田 雅之 (東京工業大学大学院・生命理工学研究科)

ジーントラップと呼ばれる方法を用いてマウス ES 細胞にランダムな挿入変異を導入したところ、ホモ接合体が全身の細かな震えと後肢骨格筋の硬直を呈する変異体を得、 β -スペクトリンの新規メンバーである β IV-スペクトリンが欠損していること、その遺伝子発現が神経細胞にはほぼ特異的であること、さらに β IV-スペクトリンが神経細胞の軸索起始部とランビエ節に特異的に局在することを見出した。 β IV-スペクトリン欠損マウスの神経細胞における電位依存性 Na チャンネルとアンキリン G の局在

を調べた結果、その局在レベルが野生型マウスと比べて大きく低下していることが明らかとなった。 β IV-スペクトリンを含む膜骨格構造がアンキリン G との結合を介して軸索起始部とランビエ節における電位依存性 Na チャンネルの局在安定化に必須の役割を果たしていること、そしてその欠損マウスでは活動電位の発生と維持における異常が震えや骨格筋硬直といった症状を引き起こしていることが示唆された。

(10) 心筋 Na チャンネル病の分子病態

蒔田 直昌 (北海道大学大学院・医学研究科・循環病態内科学)

先天性 LQT3 変異: α KPQ, R1623Q: *Xenopus oocyte* に LQT3 変異 α KPQ チャンネルを発現させると持続性遅延電位が観察された。遅延電流に一致した burst 状のチャンネル再開が観察された。分子機構として modal gating が考えられた。LQT3 変異 R1623Q は、 α KPQ と同様の機能異常のほかに、電流 decay の遅延と活性化の膜電位依存性の低下が認められた。2, Brugada 症候群 T1620M: Brugada 症候群の病態として SCN5A の loss-of-function によって活動電位の初期成分において相対的に Ito が優位になり心内膜・外膜の電気勾配が増加する。T1620M を培養細胞 tsA-201 に α 1 サブユニットと共発現させ 32°C でパッチクランプをおこなうと, fast inactivation と slow inactivation

の中間の不活性化 (I_M) が亢進していた。3, 後天性 QT 延長症候群変異 L1825P: 普段は正常の心電図を示し薬剤などにより QT が延長し不整脈を発症するものを後天性 LQTS と呼ぶ。IKr ブロック作用を有するシサプリドによって発症した後天性 LQTS 症例に SCN5A 変異 L1825P を同定した。L1825P は、LQT3 に特徴的な遅延電流を示すと同時に不活性化の膜電位依存性の過分極方向へのシフト活性化の脱分極方向へのシフト I_M の亢進という loss-of-function を示した。「再分極予備能」によって代償され顕性化しなかったがシサプリドの IKr ブロック作用によって破綻し L1825P の機能異常が顕性化する。

(11) 心筋 Na チャンネル遺伝子変異による致死性不整脈疾患の電気生理学とコンピューターシミュレーション

伊藤 英樹 (生理学研究所・神経シグナル部門)

井本 敬二 (生理学研究所・神経シグナル部門)

抗不整脈薬は Na 電流を低下させ増悪させるがピルジカイニドの投与で ST 上昇を認めなかった Brugada 症候群に新変異 (N406S) を見出し、電気生理学的特徴を発現

系で解析した。活性化、不活性化の電位依存性は 16mV, 10mV 脱分極側へ偏っていた。N406S は速い不活性化からの回復は有意に促進していたが遅い不活性化からの回

復は遅延していた。シュミレーションで活性化の電位依存性の変化と遅い不活性化の亢進が本症例の病態に寄与していた。ピルジカイニドによる tonic block は N406S において変化を認めなかったが use-dependent block は消失していた。キニジンによる tonic block は増大しており use-dependent block も WT, 1797insD と比較して亢進していた。活性化の電位依存性の変化と遅い不活性化の亢進が原因であると考えられた。ピルジカイニドによる

use-dependent block は本変異で消失しており provocation test の結果との因果関係を示唆した。一方キニジンに対する薬剤反応は WT, 1797insD と比較して亢進していた。ある特定の 1 種類のみによる抗不整脈薬の反応が陰性であっても他の薬剤の反応は同様とは限らず本変異のように薬剤結合部位に関係する遺伝子異常では provocation test の判定には注意を要することが示唆された。

(12) てんかんとナトリウムチャンネル遺伝子変異

山川 和弘 (理化学研究所・脳科学総合研究センター・神経遺伝研究チーム)

SCN1A:熱性痙攣プラス (GEFS+) は, SCN1A の変異が報告された。重症乳児ミオクロニーてんかん (SMEI) でも SCN1A の変異が報告された。GEFS+患者で見られる SCN1A の疾患変異は全て優性遺伝するミスセンス変異であるのに対し, SMEI 患者ではほとんどが 2/3 がナンセンスもしくはフレームシフト変異であり, 1/3 がミスセンス変異である。GEFS+で見出された SCN1A 変異の電気生理学的解析は複数のグループにより行われている。SMEI 変異についてナンセンス変異で分断されたチャンネルで電流が流れなくなること, SMEI でみられたミスセンス変異を持つチャンネルでも電流が落ちることを確認した。SCN2A:

ナトリウムチャンネル $Na_v1.2$ をコードする遺伝子 SCN2A につき GEFS+患者で不活化の遅れ定常時不活化曲線の過分極側へのずれなどの異常を示す変異 R188W を見いだした。SCN2A のミスセンス変異は良性家族性新生児乳児けいれん (BFNIS) でも報告された。難治性てんかんを有する患者で SCN2A の de novo ナンセンス変異を見出し dominant-negative な効果を持つことを明らかにした。SCN1A の SMEI 変異では domi-nega 効果の報告は無いが, 組織内分布・細胞内局在に違いはあっても両者の遺伝子変異の間に, 共通する疾患メカニズムが存在することを示唆する。

(13) 寒冷誘発性低 K^+ 性周期性四肢麻痺における変異 Na^+ チャンネルの温度依存性

杉浦 嘉泰 (福島県立医科大学・医学部・神経内科学講座)

eyelid myotonia, grip myotonia が認められ寒冷曝露により血清 K^+ の低下と四肢筋力低下を呈する家系において $Na_v1.4$ の P1158S 点変異を報告した。気温と K^+ 濃度の相関が明らかで低温曝露により低カリウム血症と緩性麻痺を来し P1158S 変異チャンネルの温度依存性が示唆された。一方ミオトニアは反復運動で改善し気温との相関は明らかではなかった。P1158S $Na_v1.4$ cDNA を作製し変異 Na^+ チャンネルの温度と電気生理学的特性の関連を検討した。P1158S 変異では activation curve, inactivation curve が, 22°Cでは wild type に比して過分極側へシフトしたが 32°Cでは WT との有意差は認められず, P1158S 変異では

温度依存的な電位依存性の変化が明らかとなった。P1158S のゲート特性をコンピュータモデルに挿入し温度と神経症状の関係を検討した。P1158S 変異では細胞外 K^+ 濃度が低く膜の K^+ 透過性が低い場合 22°Cでは脱分極が持続し麻痺の状態となった。細胞外 K^+ 濃度が正常の場合反復放電が認められた。32°Cでは細胞外 K^+ 濃度に拘わらず P1158S では反復放電が認められた。症状をよく再現しており症状発現には変異の温度依存性と細胞外 K^+ 濃度が重要と考えられた。治療として経口カリウム製剤により低カリウム血症を補正すると麻痺発作の改善が認められた。

(14) 骨格筋疾患と Na チャネル異常

高橋 正紀 (大阪大学大学院・医学系研究科・神経機能医学 (神経内科))

骨格筋型 Na チャネル α サブユニット (SCN4A) の変異は筋強直 (ミオトニー) や一過性の麻痺を主徴とする疾患 (高カリウム性周期性四肢麻痺, 先天性パラミオトニー, カリウム惹起性ミオトニーなど) の原因である。fast inactivation とは別の不活性化 slow inactivation の生理病態的意義が注目されている。骨格筋型チャンネルでは高カリウム性周期性四肢麻痺において slow inactivation の障害が麻痺の出現に関与することなどが明らかとなってきた。ミオトニー症状の緩和のためには抗不整脈薬・抗てんかん薬などが有効であり投与のしやすさなどから臨床ではメキシレチン (mexiletine) が使用される。メキシ

レチンなどの抗不整脈薬は Na チャネルのドメイン IV などの膜貫通セグメント 6 を中心とする部位に結合しブロックすると推定されている。上述のミオトニーを呈する疾患の中にはこの部位に変異を有するものもある。これらの疾患変異チャンネルにおけるメキシレチン親和性を検討した。不活化 (fast inactivation) 状態に対する親和性が 2 倍程度増強ないし減弱している変異が認められた。実験で求められたパラメーターを用いて use-dependent block をシミュレーションし結果をよく一致することも確認された。

20. シナプス伝達の細胞分子調節機構

2004年11月26日-11月27日

代表：小松由紀夫（名古屋大学環境医学研究所）

所内対応者：伊佐 正（生理学研究所・認知行動発達機構）

(1) Roles of Synaptotagmin-1 C2B domain for synaptic transmission

Kidokoro, Y. and Tamura, T. (群馬大・医)

(2) トモシンによる神経伝達物質放出の制御

匂坂敏朗, 馬場威, 田中晋太郎, 泉鉉吉, 安見正人, 高井義美 (阪大・医・分子生理化学)

(3) G 蛋白を介した神経伝達物質放出制御

持田澄子 (東京医科大・生理第一)

(4) シナプス可塑性と高次脳機能における NMDA 受容体チロシンリン酸化の役割

真鍋俊也 (東大・医科研・神経ネットワーク)

(5) アクチン依存的な PSD 蛋白質の動態

岡部繁男 (東京医科歯科大・医歯学総合・細胞関連機構学)

(6) 逆行性シナプス伝達調節における phospholipase C β の役割

橋本谷祐輝, 少作隆子, 狩野方伸 (金沢大・医・脳医科学・シナプス発達・機能学)

(7) 小脳プルキンエ細胞における活動依存性 PKC 制御

鶴野瞬, 平野丈夫 (京大・理・生物物理)

(8) 抑制性シナプス可塑性の mGluR1 活性による PKA を介した制御

関優子, 川口真也, 平野丈夫 (京大・理・生物物理)

(9) 視覚野抑制性シナプス伝達の長期抑圧, 及び長期増強は異なる Ca²⁺チャネルサブタイプに依存する

黒谷亨, 小松由紀夫 (名大・環研・視覚神経)

(10) ミトコンドリアと滑面小胞体による容量性 Ca²⁺流入の制御とノルアドレナリンによる二面性制御

久場健司, 久場雅子, 須崎尚 (名古屋学芸大学・管理栄養学部解剖生理)

(11) 海馬苔状線維シナプスにおけるカイニン酸受容体の機能

神谷温之 (北大・医・脳科学・神経機能学・分子解剖)

(12) 小脳プルキンエ細胞の興奮性シナプス伝達におけるグルタミン酸トランスポーターの役割

小澤滯司 (群馬大・医・神経生理)

(13) 中隔核シナプス伝達におけるドーパミンの働き

赤須崇^{1,2}, 蓮尾博¹, 浅海安雄¹ (¹久留米大学医学部生理第二講座, ²久留米大学高次脳疾患研究所)(14) シナプス前 Ca²⁺チャネルとしての P2X 受容体

加藤総夫 (慈恵医大・神経生理)

(15) トランスジェニックマウスを用いたシナプトフルオリン開口放出計測システム

八尾寛^{1,2}, 荒木力太^{1,2}, 石塚徹^{1,2}, 柳川右千夫^{2,3}, 阪上洋行^{2,4},明石馨⁵, 平林敬浩⁶, 宮崎純一⁷, 崎村建司⁵(¹東北大院・生命科学, ²CREST・JST, ³群馬大院・医, ⁴東北大院・医,⁵新潟大・脳研, ⁶SORST・JST, ⁷自然科学研究機構・生理研, ⁷大阪大院・医)

(16) 海馬苔状線維終末からの BDNF 開口放出の測定

須山成朝, 小橋雄一, 石塚徹, 八尾寛 (東北大・生命科学・脳機能解析)

(17) 生後発達に伴う前シナプス活動電位変化のメカニズム

中村行宏, 高橋智幸 (東大・医・機能生物学・神経生理)

(18) キンギョ Mb1 型双極細胞における Ca^{2+} マイクロドメイン・シナプスリボン・開口放出部位の分布

緑川光春, 立花政夫 (東大・院人社・心理)

(19) リドカイン誘起てんかん様発射の発生機序

田中永一郎, 東英穂 (久留米大・医・生理学第一)

(20) マウスを用いた眼球サッケード運動系の解析

坂谷智也, 伊佐正 (生理研・認知行動発達機構)

(21) Changes of AMPA Receptor and Synapse Density in the Flocculus after Short-term and Long-term Adaptation of Horizontal Optokinetic Response

王文, 重本隆一 (生理研・脳形態解析)

【参加者名】

城所良明, 小澤滯司, 齋藤康彦, 吉田由香里, 高鶴裕介 (群馬大・医), 平野丈夫, 田川義晃, 大槻元, 髭俊秀, 鶴野瞬, 川口真也, 矢和多智, 吉田盛史, 津村健策, 関優子, 北川雄一, 宮脇寛行, 水野秀信, 渡辺聡史 (京大・理), 八尾寛, 宮崎憲一, 須山成朝 (東北院・生命科学), 持田澄子 (東京医科大), 岡部繁男, 栗生俊彦 (東京医科歯科大), 小松由紀夫, 黒谷亨, 高田直樹, 吉村由美子, 稲垣壮, 任鳴, 舟橋梨江, 稲葉三枝 (名大・環境), 立花政夫, 緑川光春 (東大・院人社), 高橋智幸, 山下貴之, 中村行宏, 金子雅博, 堀哲也, 山下慈郎, 水谷治央 (東大・医), 高井義美, 匂坂敏朗 (阪

大院・医), 成田和彦 (川崎医科大), 久場健司, 久場雅子, 須崎尚 (名古屋学芸大), 神谷温之 (北大・医), 真鍋俊也 (東大・医科研), 伊藤功 (九州大・理), 加藤聡夫 (慈恵医大), 赤須崇, 田中永一郎 (久留米大・医), 日暮陽子 (川崎医療短), 狩野方伸, 少作隆子, 橋本谷祐輝 (金沢大・医), 山本泰憲 (基生研), 重本隆一, 王文, 井本敬二, 窪田芳之, 前島隆司, 張一成, 岸本拓哉, 瀬藤光利, 宮田麻理子, 本蔵直樹, 深澤有吾, 萩原明, 西巻拓也, 伊佐正, 遠藤利朗, 坂谷智也 (生理研)

【概要】

平成16年11月26-27日の2日間にわたり自然科学研究機構・岡崎カンファレンスセンターにおいて「シナプス伝達の細胞分子調節機構」に関する研究会を開催した。この研究会は平成9年から毎年開かれており、今回は約60名が参加し、21の演題が発表された。伝達物質の放出とその制御機構、シナプス可塑性、シナプスと行動の関連等に関する新しい実験結果が報告された。伝達物質の放出とその制御については、シナプトタグミンとトモシンの開口放出における役割、伝達物質放出を引き起こす Ca^{2+} チャネル電流とその調節、グルタメイト・トランスポーターやG蛋白共役型受容体を介する制御に関する発表があった。また、開口放出の新しい光学的計測法やP2X受容体を介する Ca^{2+} 流入による新しいタイプの放出機構についても報告された。シナプス可塑性については、NMDA受容体のチロシンリン酸化とエンドカンナビノイドの役割、抑制性シナプスの可塑性、アクチン依存的

PSD蛋白の動態に関する発表があった。また、眼球運動制御における抑制性伝達の役割や、小脳AMPA受容体の可塑性変化が報告された。この研究会には、分子生物学者、電気生理学者、形態学者が参加しており、様々な観点から、これらの発表に対する活発な討論が交わされ、今後の共同研究の契機となる模様であった。発表者は、大学院生から長い研究歴をもつ者まで様々であったが、若手がかなりの割合を占めていた。昨今、神経科学や生理学会において、一般演題がほとんどポスターになり若手が講演をする機会に恵まれていない。過去4回の研究会で一研究室あたり2題までの発表を認めたこともあり、若手研究者の発表が増加した。若手の発表者が、様々な質問に対して的確に答えており、この会が次代を担う研究者の育成にも貢献していると感じた。来年度は岡部繁男教授が提案代表者となり、引き続きこの研究会の開催を計画することになった。

(1) Roles of Synaptotagmin-1 C2B domain for synaptic transmission

Kidokoro, Y. and Tamura, T.

(群馬大学医学部)

Between two Ca^{2+} -binding domains of Synaptotagmin I, the distal one, C2B, has two Ca^{2+} -binding sites, Ca1 and Ca2. We examined the effect of deletion of each binding site on synchronous nerve-evoked synaptic transmission and spontaneous quantal events in the *Drosophila* embryonic neuromuscular junction. Deletion of Ca1 completely abolished nerve-evoked synaptic transmission while spontaneous quantal events, miniature synaptic currents (minis), were still observed. On the other hand, elimination of the Ca2 binding site dramatically reduced the amplitude of synchronous synaptic currents but did not abolish synaptic transmission. The relation between the quantal content and external Ca^{2+} concentration $[\text{Ca}^{2+}]_e$ had a slope of 2.0 in the double logarithmic plot, while that of the control was 3.1. We next examined the Ca^{2+} dependency of mini frequency in high K^+

solutions. Deletion of the Ca2 binding site reduced the mini frequency compared with the control, but the frequency increased with $[\text{Ca}^{2+}]_e$. In contrast, deletion of the Ca1 binding site decreased the mini frequency with $[\text{Ca}^{2+}]_e$, suggesting that the negative regulation of spontaneous vesicle release occurs Ca^{2+} -dependently. When Sr^{2+} substituted Ca^{2+} in the high K^+ external solution, the mini frequency was higher than in Ca^{2+} solutions and increased with $[\text{Sr}^{2+}]_e$ in the control as well as in both transformants. No negative regulatory effect was observed even in the transformant lacking Ca1. We concluded that two Ca^{2+} binding sites in the C2B domain are crucially involved in synchronous transmitter release. Spontaneous release of transmitter is negatively regulated in a Ca^{2+} -dependent manner. Sr^{2+} does not substitute for Ca^{2+} in this negative regulatory function.

(2) トモシンによる神経伝達物質放出の制御

匂坂敏朗, 馬場 威, 田中晋太郎, 泉 鉦吉, 安見正人, 高井義美 (阪大院・医・分子生理化学)

神経伝達物質の放出において, まずシナプス小胞は, 軸索輸送によりシナプス前膜 (ターゲットとなる膜) に運ばれる (ターゲットイング)。シナプス小胞は, アクティブゾーンにおいて, シナプス前膜の Ca^{2+} チャンネルの近傍にドッキングした状態になり, さらに Ca^{2+} 濃度の上昇に応答できる状態に成熟する (プライミング)。 Ca^{2+} が流入した際, Ca^{2+} チャンネル周辺の局所的に上昇した Ca^{2+} 濃度に依存して, シナプス前膜とシナプス小胞の融合が起こり, シナプス小胞内の神経伝達物質が放出される。これまで, ターゲットイングには Rab3A 系の蛋白質, ドッキングと融合には普遍的膜融合装置を構成する SNARE 系の蛋白質, そしてプライミングにはアクティブゾーン構成蛋白質が関与していることが明らかにされている。これまで, 私共は, 神経伝達物質の放出に SNARE 系の活性制御タンパク質であるトモシンが抑制的に働くことを明らかにしている。トモシンが t-SNARE とトモシン複合体を形成し, 小胞融合に必須な 7S SNARE 複合体

の形成を抑制することにより, 神経伝達物質の放出を制御している。最近, トモシンがプライミングに関与していることが明らかにされつつある。一方, PKA が, ドッキングとプライミングを制御していることが知られている。ドッキングにおいては, SNAP-25 を PKA がリン酸化することにより調節することが知られているが, プライミングにおいての PKA のリン酸化基質は, 未だ同定されていない。そこで, 今回, PKA によるトモシンの活性調節を検討したところ, PKA がトモシンをリン酸化することにより, シンタキシン-1 との結合親和性を減弱させることがわかった。また, トモシンのリン酸化により, PC12 細胞における Growth hormone の分泌が制御されていることがわかった。他方, 神経細胞における軸索や樹状突起といった神経突起の伸長は, 小胞輸送により膜成分が突起の先端端へ運ばれて, そこで膜が融合することにより起こる。膜融合には, 普遍的な膜融合装置である SNARE 系タンパク質が関与している。最近, 私共は, ト

モシンが Rho-ROCK 系により活性調節を受け、非特異的な膜融合を抑制することによりアクチン細胞骨格の再構築と協調して神経突起の伸長を制御していることを明らか

かにしている。以上の結果から、トモシンは PKA と Rho-ROCK 系により活性調節を受けることにより、SNARE 系を介して小胞融合を制御していることが考えられた。

(3) G 蛋白を介した神経伝達物質放出制御

Gary Stephens (Dept. of Pharmacology, University College London)

持田澄子 (東京医科大・生理第一)

シナプス前終末からの伝達物質放出を調節する機構として、神経終末の G 蛋白共役型受容体の活性化を介した、 Ca^{2+} チャネルの抑制、 K^+ チャネルの活性化、あるいは、開口放出の阻害による伝達物質放出阻害が示唆されている。このような作用は、 $G\alpha\beta\gamma$ から解離した $G\beta\gamma$ によると考えられている。しかし、シナプス前終末での解析は calyx Held¹ と lamprey reticulospinal/motoneuron synapses² での報告があるのみである。ノルアドレナリンが上頸交感神経節のシナプス伝達を阻害することが古くから知られており、シナプス前終末の G 蛋白共役型受容体を介して伝達物質放出を阻害することが考えられる。そこで、培養上頸交感神経節細胞シナプスを用いて、シナプス前終末のノルアドレナリン受容体活性化に伴う $G\beta\gamma$ を介するシナプス伝達調節の機能解析を試みた。

①ノルアドレナリン (0.2-10 μ M) は、活動電位の duration、後過分極を減少させるとともに上頸交感神経節細胞シナプス伝達を濃度依存性に阻害した。②ノルアドレナリンの効果はヨヒンビン (2 μ M) で抑制され、クロニジン (10 μ M) はノルアドレナリンと同様の効果を引き起こした。③ PTX (500ng/ml) 前処理した上頸交感神経節細胞シナプスでは、ノルアドレナリンはシナプス伝達を抑制しなかった。④ $G\alpha$ transducin を過剰発現させた

シナプスでは、ノルアドレナリンによるシナプス伝達抑制が減弱した。⑤ $G\beta\gamma$ をシナプス前終末へ導入したところ、活動電位後過分極の減少、シナプス伝達の阻害が認められた。さらに、 $G\beta\gamma$ を導入したシナプスでは、ノルアドレナリンによるシナプス伝達抑制が認められなかった。⑥ノルアドレナリン、 $G\beta\gamma$ は、それぞれ細胞体から記録される Ca^{2+} 電流を抑制した。⑦ノルアドレナリンは、活動電位を介さない蔗糖による伝達物質放出を阻害しなかった。

上記の結果から、 $G\beta\gamma$ は上頸交感神経節細胞シナプス前終末の α_2 アドレナリン受容体活性化を介して Ca^{2+} チャネルを抑制することによってシナプス伝達を調節することが示唆される。

参考文献

Kajikawa Y, Saitoh N & Takahashi T (2001). GTP-binding protein $\beta\gamma$ subunits mediate presynaptic calcium current inhibition by GABA_B receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 8054-8058.

Blackmer T, Larsen EC, Takahashi M, Martin TFJ, Alford S & Hamm H (2001). G protein $\beta\gamma$ subunit-mediated presynaptic inhibition: regulation of exocytosis fusion downstream of Ca^{2+} entry. *Science* **292**, 293-297.

(4) シナプス可塑性と高次脳機能における NMDA 受容体チロシンリン酸化の役割

真鍋俊也 (東京大学 医科学研究所 神経ネットワーク分野)

中枢神経系における長期増強をはじめとするシナプス可塑性は、記憶・学習や情動などの高次脳機能の細胞レベルでの基礎過程であると考えられ、その分子機構の解明が盛んに進められている。グルタミン酸受容体の一種

である NMDA 受容体は、多くのシナプスにおいて、その可塑性の誘導に重要な役割を果たす。たとえば、海馬 CA1 領域における長期増強の誘導には、NMDA 受容体の活性化が必須であることが知られている。したがって、

NMDA 受容体の機能調節は、シナプス可塑性、ひいては、個体レベルでの脳機能の制御に直接関与するものと考えられる。中でも、NMDA 受容体 NR2 (GluRe) サブユニットのチロシンリン酸化は、シナプスにおける NMDA 受容体のチャンネル活性を調節することから、NMDA 受容体の機能調節機構における最も重要な要素のひとつである。本講演では、NMDA 受容体のチロシンリン酸化が、海馬や扁桃体でのシナプス可塑性や個体レベルでの高次脳機能にどのように関与するかについての、私たちの最近の研究成果を紹介したい。

参考文献

- (1) T. Manabe, A. Aiba, A. Yamada, T. Ichise, H. Sakagami, H. Kondo, and M. Katsuki. Regulation of long-term potentiation by H-Ras through NMDA receptor phosphorylation. *J. Neurosci.* **20**:2504-2511, 2000.
- (2) T. Nakazawa, S. Komai, T. Tezuka, C. Hisatsune, H. Umemori, K. Semba, M. Mishina, T. Manabe, and T. Yamamoto. Characterization of Fyn-mediated phosphorylation sites on GluRe2 (NR2B) subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor. *J. Biol. Chem.* **276**:693-699, 2001.

(5) アクチン依存的な PSD 蛋白質の動態

岡部繁男 (東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科)

イメージング技術の進歩により、シナプス形成・維持・リモデリングの過程において、複数のシナプス機能分子がその局在を変化させる事が明らかになった。PSD の足場蛋白質およびアクチン分子に関して活動依存的な局在制御機構が存在する事が報告されている。複数のシナプス後部蛋白質の分子動態を総合的に評価するため、4 種類の足場蛋白質の動態を同一の実験条件で定量し、その安定化に関与する因子を検索した。定量的な動態観察を行った結果、足場蛋白質は少なくとも三つの異なった動態を持つ分画から構成されると考えられた。すなわちターンオーバーの速度からほぼ自由拡散によると考えられる分画、数分の寿命を持つ分画、そして数分では置換されない分画であり、異なった種類の足場蛋白質では、三つの分画の存在比率が異なっている。膜蛋白質である NMDA 受容体や代謝型グルタミン酸受容体、更にパルミチル化によりシナプス後膜

に付着する PSD-95 分子を除去した標本においても、他の足場蛋白質の動態は変化せず、これらの分子は他の足場蛋白質の集積に大きな影響を与えない。一方 PSD の細胞質側に存在する動的な構造であるアクチン線維の脱重合により、数分の寿命を持つ動的な足場蛋白質分画が選択的にシナプスから除去された。更に活動依存的な PSD 分子の局在変化がアクチン線維の安定化により阻害される事から、アクチン線維が PSD 分子の構成変化にも必須である事が明らかになった。アクチン線維自体のシナプス後部でのターンオーバーは非常に速く、数分間でほとんど全ての分子がシナプス後部において置換される。またアクチン線維自体も活動依存的にシナプスにおける分布が変化する。従ってアクチン線維によるシナプス機能制御の分子機構の一つとして、PSD 分子の再構成を誘導する事が重要であると考えられる。

(6) 逆行性シナプス伝達調節における phospholipase C β の役割

橋本谷祐輝, 少作隆子, 狩野方伸 (金沢大学大学院医学系研究科 シナプス発達・機能学)

最近の研究により、脳の様々な領域において内因性カンナビノイド (eCB) が逆行性シグナルとして働き、シナプス伝達を調節していることが明らかとなった。eCB はシナプス後ニューロンから合成・放出され、それがシナプス前終末に存在するカンナビノイド受容体を活性化

し、神経伝達物質の放出を抑制する。eCB の合成・放出は、(1) 脱分極による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇、(2) グループ I 代謝型グルタミン酸受容体や M_1/M_3 ムスカリニック受容体などの Gq 共役型受容体の活性化、により引き起こされる。また、脱分極と受容体活性化が同時に起こる

と eCB の合成・放出は著しく促進される。この相乗効果のメカニズムはこれまで不明であった。Gq 共役型受容体はホスホリパーゼ C β (PLC β) を活性化し、一方、生化学的な過去の実験から、PLC β 活性は Ca²⁺ 依存的事であることが知られている。そこで我々は、脱分極と受容体活性化の相乗効果を PLC の Ca²⁺ 依存性で説明できるかどうか検討した。

培養海馬ニューロン・ペアより IPSC を記録し、受容体活性化による eCB の放出を IPSC の振幅を指標にして調べた。IPSC にはカンナビノイド感受性のものと非感受性のものがあるが、本実験ではカンナビノイド感受性 IPSC のみを使用した。ムスカリニック受容体アゴニスト (oxo-M) 投与により引き起こされる eCB の放出は細胞内 Ca²⁺ 濃度に強く依存し、脱分極による一過性の Ca²⁺ 濃度上昇により著しく増強された。また、同じ条件下での eCB の放出は PLC β 1 欠損マウスでは消失しており、この結果から eCB の放出に PLC β 1 が必須であることが判明した。

次に生きた細胞内の PLC の Ca²⁺ 依存性を調べるために、その代謝産物であるジアシルグリセロール (DAG) 産生量を、DAG 感受性の TRPC6 チャンネルを用いてリアルタイムで測定した。まず培養海馬ニューロンに強制発現させた TRPC6 チャンネルが DAG 感受性であり、且つ PLC β 1 依存的事であることを確認した。TRPC6 チャンネル電流を指標として、PLC β 1 活性を調べたところ、oxo-M 投与による PLC β 1 の活性化が細胞内 Ca²⁺濃度に強く依存し、また、脱分極による Ca²⁺濃度上昇により著しく増強されることが示された。

以上の結果より、eCB 合成・放出の律速酵素と考えられる PLC β 1 が Ca²⁺ 依存性であるため、細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇と受容体活性化が同時に起こることにより強く活性化され、それが相乗効果の原因であることが明らかとなった。受容体-PLC β シグナル伝達はさまざまな神経活動において重要な役割を担っており、本研究の結果から、それが生理的範囲の Ca²⁺ 濃度変化の影響を受ける可能性が示唆された。

(7) 小脳プルキンエ細胞における活動依存性 PKC 制御

鶴野 瞬, 平野 丈夫 (京都大学理学研究科生物物理学教室)

小脳プルキンエ細胞が平行線維と登上線維から同時に入力を受けると、平行線維—プルキンエ細胞間のシナプスにおける伝達が長時間減弱する小脳長期抑圧 (LTD) という現象が知られている。そして、LTD はシナプス後部の AMPA 型グルタミン酸受容体が C-キナーゼ (PKC) によりリン酸化されることによって引き起こされるとされている。また PKC は Ca イオンとジアシルグリセロール(DAG)によって活性化されることが知られており、登上線維入力に依存した脱分極により引き起こされる Ca イオン流入と、平行線維入力による mGluR1—G タンパク質—PLC の経路を介した DAG の生産が PKC で統合することによって LTD が発現する可能性が考えられている。そこで、私たちはプルキンエ細胞内における PKC の制御機構を調べるために以下の実験を行った。

PKC は活性化する際に細胞質から細胞膜へと移動する性質を持つため、その局在を観測することによって活性を推定することができる。培養プルキンエ細胞に GFP と PKC α の融合タンパク質を強制発現させ、共焦点顕微

鏡を用いて様々な刺激に対する PKC の局在変化をリアルタイムで観測した。PKC α は脱分極刺激によって樹状突起全体で一過的に細胞膜へ移動し、その後 30 秒程度で細胞質へ戻った。この移動は、Ca イオン結合能力を失った変異 PKC α では観察されなかった。また DAG を分解する DAG Lipase の阻害剤や膜透過性の DAG を投与した条件下で脱分極刺激を与えると PKC α は細胞膜に長く留まるようになり、DAG が活性の長期化に関与することが示唆された。しかし、mGluR1 のアゴニストである DHPG を投与しても PKC α の移動は見られなかった。さらに、脱分極時にグルタミン酸を投与しても、脱分極刺激のみを与えた場合と比較して PKC α の移動の程度に違いは認められなかった。また、細胞内に GTP γ S を投与して G タンパク質を活性化させた条件下で脱分極刺激を与えても違いは認められなかった。以上の結果から、培養プルキンエ細胞内において PKC α は主に脱分極による Ca イオンの流入によって制御され、mGluR1 ならびにその下流経路は PKC α の移動に影響を与えないと考えられる。

(8) 抑制性シナプス可塑性の mGluR1 活性による PKA を介した制御

関 優子, 川口真也, 平野丈夫 (京都大学理学研究科生物物理学教室)

小脳皮質の抑制性介在ニューロン (IN) はプルキンエ細胞 (PN) 上に GABA 性のシナプスを形成している。このシナプスにおける GABA_AR 応答は, PN の脱分極により生じる細胞内 Ca²⁺ 濃度 ([Ca²⁺]_i) 上昇によって長期間増大する (Rebound Potentiation (RP))。一方, 脱分極と同時に代謝型受容体である GABA_BR が活性化した場合, RP は負に調節されることが知られている。

mGluR1 活性化は, [Ca²⁺]_i 上昇や PKA 活性上昇を介して RP 制御に関わる可能性がある。そこで私達は, RP 誘導の調節において mGluR1 が果たす役割を解析することを試みた。PN における GABA 応答の変化を whole-cell patch clamp によって記録し, RP をモニターした。mGluR1 の拮抗薬である CPCCOEt の存在下で脱分極を行ったところ, RP が抑えられた。一方, DHPG により mGluR1 を活性化すると, GABA_BR による RP 抑制が起こらなくなった。以上の結果から mGluR1 の活性が RP 誘導に必要であり, GABA_BR の作用を相殺するような調節を行う事が明らかとなった。

なお, 上記の mGluR1 活性化による RP 誘導促進は, PKC

や PLC を阻害しても影響を受けなかった。ところで, GABA_BR は Gi/Go を介して PKA 活性を抑制することで RP を調節する。そこで, PKA を阻害したところ, mGluR1 活性化による RP 誘導の促進効果が消失した。以上から, mGluR1 による RP 調節のシグナル伝達には Gs を介した PKA の活性化が関与する事が示唆された。

この可能性をさらに検証するために, mGluR1 或いは GABA_BR の活性化による PKA 活性変化をリアルタイムで測定することを試みた。細胞内 cAMP 濃度を測定するために, 変異 CNG2 チャネルの cDNA を用いた。変異 CNG チャネルは細胞内 cAMP によって開き Ca²⁺ を含む陽イオンを通すので, [Ca²⁺]_i や電流を記録する事により細胞内 cAMP 濃度変化を推定できる。変異 CNG チャネルを発現させたニューロプラストーマ細胞において, Forskolin と IBMX により細胞内 cAMP 濃度を増大させると, [Ca²⁺]_i 上昇及び内向き電流が観察された。そこで, CNG チャネルを発現させたプルキンエ細胞において, [Ca²⁺]_i 及び電流の変化を記録することで mGluR1 或いは GABA_BR 活性化によって生じる PKA 活性変化の測定を試みた。

(9) 視覚野抑制性シナプス伝達の長期抑圧, 及び長期増強は異なる Ca チャネルサブタイプに依存する

黒谷亨, 小松由紀夫 (名古屋大学環境医学研究所 視覚神経科学)

我々は近年, 視覚野 5 層のニューロンを通電により高頻度発火させると, その細胞に生じる IPSP に長期抑圧 (LTD) が誘発されることを見いだした。また IR-DIC 観察下で, 視覚野 5 層の錐体細胞から whole-cell voltage clamp 記録を行い, 高頻度発火を模した脱分極パルスを与えることにより, IPSC の LTD が誘発されることも報告した。興味深いことに, 同一の脱分極パルスにより, 一部では IPSC の長期増強 (LTP) が生じることが判明した。IPSC の LTD 誘発には, L 型高閾値電位依存性 Ca チャネルの活性化が必要であることがわかっているが, LTP 誘発に関しては不明である。そこで今回は, L 型以外の電位依存性 Ca チャネルの, LTP 誘発への関与を調べた。錐体細胞における高閾値電位依存性 Ca チャネルの分布は, 細胞体と樹状突起では異なることが報告され

ている。例えば, 細胞体部では L 型及び R 型が主に分布するのに対し, 樹状突起では L 型に加え P/Q 型, N 型が存在する。この部位的相違を考慮し, 細胞体と樹状突起のシナプスを刺激し分ける手法, 及び電気泳動的に投与した GABA に対する電流応答を解析する手法などを用いた結果, 細胞体部の LTP 誘発には R 型が, 樹状突起の LTP には P/Q 型が寄与することが判明した。

高閾値電位依存性 Ca チャネルは, サブタイプにより活性化, 不活性化の電位依存プロファイルが異なる。これらを考え合わせると, 錐体細胞においては静置膜電位とそこからの脱分極の程度により, その細胞へ入力する抑制性シナプス伝達効率がダイナミックに制御されている可能性も考えられる。

(10) ミトコンドリアと滑面小胞体による容量性 Ca^{2+} 流入の制御とノルアドレナリンによる二面性制御

名古屋学芸大学管理栄養学部解剖生理 (久場健司, 久場雅子, 須崎 尚)

熱産生器官である褐色脂肪細胞は, 交感神経線維の支配を密に受け, β_1 受容体の活性化を介して, 脂質の β 酸化からミトコンドリアでの電子伝達の促進と同時に, 脱共役蛋白 (UCP) を活性化し, ATP を合成することなく熱を発生する。一方, α_1 受容体の活性化は, IP_3 による Ca^{2+} 遊離と容量性 Ca^{2+} 流入により細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) を一過性に上昇する。しかしながら, β_3 受容体を介する UCP の活性化により, ミトコンドリアの H^+ 勾配の短絡による膜電位の減少により, Ca^{2+} 遊離が起こることが期待されるが, これによる $[Ca^{2+}]_i$ の動態変化, β_3 受容体と α_1 受容体の活性化による $[Ca^{2+}]_i$ 応答の相互作用については全く未知である。

培養したラット褐色脂肪細胞に Ca^{2+} イメージング法と蛍光によるミトコンドリア膜電位測定法を応用した。 β 受容体の活性化により, 2 相性の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が起こり, 第 1 相はミトコンドリアの脱共役剤である FCCP により抑制され, ミトコンドリアの膜電位減少を伴い, 第 2 相は外液の Ca^{2+} 除去により消失した。FCCP は 2 相性の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を起こし, 第 1 相はミトコンドリアの膜電位減少を伴い, 第 2 相は無 Ca^{2+} 液により消失した。 β 活性化剤と FCCP による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の第 2 相中では, サブシガーギンは無効か逆に $[Ca^{2+}]_i$ を減少する。これらの結果は, ミトコンドリアからの Ca^{2+} 遊離により, 滑面小胞体の Ca^{2+} が減少し, 容量性 Ca^{2+} 流入が活性化されること

を示唆する。一方, α 及び β 活性化剤やサブシガーギンの作用により容量性 Ca^{2+} 流入が活性化された状態で, α 及び β 活性化剤や FCCP を投与すると, 容量性 Ca^{2+} 流入の活性化が抑制され, $[Ca^{2+}]_i$ は逆に減少する。このことから, 容量性 Ca^{2+} 流入は滑面小胞体の Ca^{2+} 濃度に 2 面性 (ベル型: 中程度の Ca^{2+} 減少で活性化, 強い減少で抑制) に依存することが示唆される。また, 夏に培養した褐色脂肪細胞では, 容量性 Ca^{2+} 流入が常時活性化され, 静止時の $[Ca^{2+}]_i$ レベルが高く, ノルアドレナリンの α 及び β 作用は $[Ca^{2+}]_i$ 減少効果のみであり, サイロキシンは, 秋・冬・春型の細胞でのノルアドレナリンの作用を夏型の応答へ変換することも解った。

以上の結果は, ミトコンドリアと滑面小胞体が機能的に連関し, 容量性 Ca^{2+} 流入を制御し, ATP の生成とエネルギー散逸のバランスを巧妙に制御する機構の存在を示唆し, この機構が α 及び β 受容体の制御下にあること, 更に, 季節により褐色脂肪細胞の静止時の $[Ca^{2+}]_i$ レベルを調節する遺伝子の発現が変化し, これが甲状腺ホルモンにより制御されている可能性を示唆する。また, UCP が骨格筋細胞やその他の細胞に存在することから, 褐色脂肪細胞で見られるミトコンドリアと滑面小胞体の機能的連関機構と容量性 Ca^{2+} 流入の制御は細胞一般に共通する機序である可能性がある。

(11) 海馬苔状線維シナプスにおけるカイニン酸受容体の機能

神谷温之 (北海道大学大学院医学研究科 神経機能学講座 分子解剖学分野)

イオンチャンネル型グルタミン酸受容体のうち, AMPA 受容体は興奮性シナプス伝達に, NMDA 受容体はシナプス可塑性に必須の分子であることが知られているが, カイニン酸受容体の機能については不明な点が多い。私たちはこれまで, 脳内で最も高密度にカイニン酸受容体を発現する海馬 CA3 野苔状線維シナプスを対象として, その生理的機能を追及してきた。この中で, カイニン酸受容体は特異的に苔状線維シナプス伝達を制御する機能を

有し, (1) ポストシナプスでの作用として, 低振幅で緩徐なシナプス後電位を生じ興奮性シナプス伝達の一部を担うこと, (2) プレシナプスでの作用として, 短期可塑性の増幅に寄与すること, などを示してきた。このうち, (2) のプレシナプス作用についてはこれまで直接的な証明がなされておらず, 苔状線維シナプスのプレシナプスにカイニン酸受容体が局在するか否かについて議論が分かれている。本研究では, 私たちのデータを中心に,

プレシナプスでのカイニン酸受容体の機能を示唆するこれまでの実験結果を紹介し、これらの結果を説明するさ

まざまな可能性を整理することで、カイニン酸受容体の生理的意義を検証するための方向性を明らかにしたい。

(12) 小脳プルキンエ細胞の興奮性シナプス伝達におけるグルタミン酸トランスポーターの役割

小澤瀨司 (群馬大学・神経生理学)

中枢神経系のグルタミン酸作動性シナプスでは、シナプス前細胞の興奮によって軸索終末からシナプス間隙に放出されるグルタミン酸は、放出後直ちに除去される。このグルタミン酸の処理には、グルタミン酸トランスポーターが重要な役割を果たす。脳のグルタミン酸トランスポーターには、GLAST (excitatory amino acid transporter 1; EAAT1), GLT-1 (EAAT2), EAAC1 (EAAT3), EAAT4 の4種類があり、興奮性シナプス伝達はこれらのグルタミン酸トランスポーターの活動によって大きな影響を受ける。

小脳のプルキンエ細胞 (Purkinje cell; PC) は登上線維 (climbing fiber; CF) 及び平行線維 (parallel fiber; PF) と樹状突起上に興奮性シナプスを形成し、これらのシナプスはベルクマングリア (Bergmann glia; BG) の突起により取り囲まれている。BG には、GLAST が濃密に発現しているが、GLT-1 もタンパク量にして GLAST の約 1/6 量程度存

在する。また、プルキンエ細胞のシナプス後部には、EAAT4 が豊富に存在する。一方、EAAC1 はニューロン性トランスポーターとして PC に発現するとされてきたが、最近 PC には存在しないとする研究結果も提出されている。

筆者らは、PC の興奮性シナプス伝達における、これらのグルタミン酸トランスポーターの役割分担の解明を目指して研究を進めている。今回は、主要なグリア性トランスポーターである GLAST 及び主要なニューロン性トランスポーターである EAAT4 それぞれのノックアウトマウスを対象として、CF 及び PF シナプスで興奮性シナプス後電流 (Excitatory postsynaptic current; EPSC) を記録し、それらの kinetics を野生型マウスと比較することにより、GLAST と EAAT4 の役割分担について考察した。なお、本研究で用いた GLAST, EAAT4 ノックアウトマウスは、東京医科歯科大学の田中光一教授から提供を受けた。

(13) 中隔核シナプス伝達におけるドーパミンの働き

赤須 崇^{1,2}, 蓮尾 博¹, 浅海安雄¹ (¹久留米大学医学部生理第二講座, ²久留米大学高次脳疾患研究所)

大脳辺縁系の一員として中隔核はさまざまな認知機能、怒りや不安などの情動機能さらには自律機能にも深く関与している。中隔核への主な入力線維は海馬の CA3 ニューロンの軸索であり、興奮性アミノ酸を伝達物質として EPSP を発生する。中隔核は主に GABA ニューロンから構成され、投射ニューロンは主に視床下部や脳幹の諸神経核を支配する。このうち介在神経は海馬からの興奮性ニューロンの投射を受け、中隔核ニューロン自体にも神経を送ることで、多シナプス性に fast IPSP と slow IPSP を発生する。Fast IPSP は GABA_A 受容体を介しており、slow IPSP は GABA_B 受容体を介して発生する。また中隔核は、中脳の腹側被蓋から投射されるドーパミン (DA) ニューロンを受ける。DA は攻撃的な行動を抑制

し、報酬系として働くことが知られており、海馬-中隔核-視床下部回路の重要な調節ニューロンである可能性が高い。しかし中隔核ニューロンに対する DA の働きについては、電気生理学的にこれまでほとんど検討されていない。われわれは海馬からの入力線維を保存したラット脳スライス標本を作成し、EPSP や fast IPSP と slow IPSP に対する DA の作用を検討した。低濃度 (1-30 μM) の DA を 5-15 分間灌流投与すると、中隔核ニューロンの膜電位には 1-2 mV 程度の過分極電位しか発生せず、膜抵抗もほとんど変化しないが、100 μM の濃度になると、著明な入力抵抗の減少を伴う約 8 mV の過分極電位が発生した。そこで、今回の実験では 30 μM 以下の濃度の DA の作用を検討した。通常的人工脳脊髄液中では、比

較的短時間 (5-15 分間) の DA 灌流によって EPSP が増大し, fast IPSP と slow IPSP は著明に抑制された。この EPSP の振幅の増大は fast IPSP をビククリンで完全に抑制するとみられなくなることから, fast IPSP の抑制による二次的な亢進といえる。DA は単シナプス性に発生させた fast IPSP を同程度に抑制したことから, 先行する興奮性シナプス伝達の抑制ではなく, 抑制性シナプス伝達を直接減弱させたといえる。DA 受容体は D1 と D2 ファミリーに分かれ, さらに D1 ファミリーは D1 と D5 受容体からなる。一方, D2 ファミリーは D2, D3, D4 受容体に分類される。種々の選択的アゴニストとアンタゴニストを用いた研究から, DA による IPSP の抑制は主に D4 受容体を介して発生することがわかった。DA は外部

から GABA を与えることによって発生させた電流 (I_{GABA}) や微小抑制性シナプス後電位 (miniature IPSP: mIPSP) の振幅には影響を与えないことから, シナプス後膜の $GABA_A$ 受容体には影響を与えないことがわかる。おそらくシナプス前終末の D4 受容体に働き, GABA の放出を抑制することで IPSP を抑制すると思われる。一般的に, D4 受容体は adenylate cyclase とネガティブに関連するといわれている。しかし, DA による IPSP の抑制は forskolin 投与によって抑制されず, PKA 阻害剤である H-89 は DA による IPSP の抑制作用をブロックしなかった。また PKC の関与も実験的に確認されず, 細胞内情報伝達系は現在のところ不明である。

(14) シナプス前 Ca^{2+} チャネルとしての P2X 受容体

加藤総夫 (東京慈恵会医科大学・総合医科学研究センター・神経科学研究部・神経生理学研究室)

アストロサイトやニューロンが様々な分子機構を介して ATP を細胞外に放出する事実が数多く報告されている。細胞外に放出された ATP は, (1) ニューロンおよびアストロサイトに発現する ATP 受容体を活性化し, さらに, (2) ecto-nucleotidase によって adenosine に変換された後, adenosine 受容体を活性化する, という二つの機構を介してシナプス伝達を多重に修飾する (Kato & Shigetomi, 2001; Kato et al., 2003; Kawamura et al., 2004)。ATP 受容体は, ATP-gated channel である P2X 受容体チャネルと代謝型の P2Y 受容体に大別されるが, なかでも P2X 受容体チャネルは, 中枢神経系に発現する受容体チャネルの中で静止膜電位レベルにおける最も高い Ca^{2+} 透過性を示すため (Egan & Khakh, *J Neurosci* 24:3413-, 2004), 中枢神経系における Ca^{2+} 流入源としての機能が予想されている。

内臓性求心情報が収斂し統合される延髄孤束核には, P2X 受容体タンパクが高密度に発現しているとともに, その局所的活性化が様々な呼吸循環応答を誘発する事実が *in vivo* 標本において報告されており, 中枢神経系における P2X 受容体チャネル活性化の意義を検討する上で優れた系である。

我々は, 幼若ラット脳幹スライス孤束核から誘発および自発 EPSC を記録し, 細胞外 ATP 濃度の上昇が, adenosine

受容体を介した誘発 EPSC 振幅の減少と, P2X 受容体を介した自発 EPSC 頻度の増加を引き起こす事実を報告した (Kato & Shigetomi, 2001)。TTX 存在下, 孤束核スライス 2 次ニューロンからは, 平均振幅約 10 pA, 頻度約 5-10 回/秒の微小 EPSC が観察される (basal mini)。その頻度は, P2X 受容体作動薬によって約 20-30 回/秒まで有意かつ著明に増加した。この増加は, Cd^{2+} によって影響されず, 細胞外 Ca^{2+} に依存していた。この時, 約 80% のニューロンで, 頻度増加に伴って, 高振幅微小 EPSC (large mini; 20-60 pA) が観察された。その振幅分布は basal mini のそれと有意に異なっていたが, kinetic には差がなかった。P2X 受容体作動薬による large mini の発生中も, AMPA 直接投与による電流の振幅は変化を示さなかった。Cyclopiazonic acid, ryanodine あるいは 2-aminoethoxydiphenyl borate 灌流下にも large mini は非灌流時と同様に観察された。一方, basal mini は, 電位依存性 Ca チャネル (VDCC) 遮断や細胞外 Ca^{2+} 除去によっても有意な影響なく観察された。P2X 受容体作動薬は, Cd^{2+} によって誘発 EPSP が完全に抑制された状態においても高頻度・高振幅微小 EPSP を惹起し, その時間的加重はシナプス後細胞に活動電位を発生させた。以上より, 孤束核興奮性シナプスにおけるシナプス前 P2X 受容体を介した軸索終末 Ca^{2+} 濃度上昇は, 高効率の同期的 Ca^{2+} 依存的グルタミン酸放出を

惹起し、シナプス前細胞の興奮（すなわち終末 VDCC からの Ca^{2+} 流入）を介さない「シナプス伝達」を起こして二次ニューロン以下の神経回路の興奮を引き起こす事実が示された。この事実は、孤束核ネットワークにおける細胞外 ATP 濃度上昇が、求心性興奮性シナプス入力と機能的に等価の情報となりうる可能性を示している (Shigetomi & Kato, 2004)。

参考文献：

Kato F, Shigetomi E, Distinct modulation of evoked and spontaneous EPSCs by purinoceptors in the nucleus tractus solitarii of the rat. *J Physiol (Lond)* **530**: 469-486 (2001).

Kato F, Kawamura M, Shigetomi E, Tanaka J, Inoue K, Synaptic purinoceptors: the stage for ATP to play its “dual-role”. *J Pharmacol Sci* **94**, 107 – 111 (2004).

Kawamura M, Gachet C, Inoue K, Kato F, Direct excitation of inhibitory interneurons by extracellular ATP mediated by P2Y₁ receptors in the hippocampal slice. *J Neurosci* **24**: 2004.

Shigetomi E, Kato F, Action potential-independent release of glutamate by Ca^{2+} entry through presynaptic P2X receptors elicits postsynaptic firing in the brainstem autonomic network. *J Neurosci* **24**:3125-3135 (2004).

(15) トランスジェニックマウスを用いたシナプトフルオリン開口放出計測システム

八尾 寛^{1,2}, 荒木力太^{1,2}, 石塚 徹^{1,2}, 柳川右千夫^{2,3}, 阪上洋行^{2,4},
明石 馨⁵, 平林敬浩⁶, 宮崎純一⁷, 崎村建司⁵

(¹東北大院・生命科学, ²CREST・JST, ³群馬大院・医, ⁴東北大院・医,
⁵新潟大・脳研, SORST・JST, ⁶自然科学研究機構・生理研, ⁷大阪大院・医)

シナプス前終末において、伝達物質は小胞中に蓄えられ、開口放出により細胞外に放出される。開口放出は細胞の基本的な機能だが、直接的な計測が難しく、研究の進展が阻まれていた。われわれは、シナプス前終末からの伝達物質開口放出を解析する目的で、コンディショナルエクプレッション法を応用して、pH 感受性機能プローブを部位特異的に発現する遺伝子改変マウスを作製した。このマウスを用いた研究法を紹介し、その将来性を展望する。

小胞膜タンパクのひとつである VAMP-2 の C 末に pH 感受性 GFP 誘導体のフルオリンを結合させた融合タンパク（シナプトフルオリン）を神経細胞に強制発現させることにより、シナプス前終末のアウトプットである開口放出を定量化することができることが報告されている^{1,2}。シナプトフルオリンを脳において部位特異的に発現させる目的で、シナプトフルオリン遺伝子を組み込んだ loxP トランスジェニックマウスを作製した。部位特異的なプロモータ制御下に Cre リコンビナーゼを発現するマウスと loxP マウスとの交配により産まれたリコンビナントマウスの脳組織において、期待された部位にシナプトフ

ルオリンの発現を認めた。シナプトフルオリンの分布から、シナプス前終末に局在していると考えられる。また、発現部位における蛍光変化を測定し、 NH_4Cl やパフィロマイシンに対する感受性から、この蛍光変化が開口放出に由来するものであることを検証した。

われわれが開発した開口放出測定法は、非侵襲的であり、生きた動物を用いて再現性良く繰り返し測定できる可能性がある。また、部位特異的・時期特異的・薬剤誘導特異的に Cre リコンビナーゼを発現するマウスと交配すれば、部位特異的・時期特異的・薬剤誘導特異的にシナプトフルオリンを発現させることも可能である。このような遺伝子改変動物を用いた生体機能計測法は、従来の測定法と比較して再現性、利便性、特異性、検出感度において格段に優れており、有用な解析手段になることが期待される。

1. Miesenböck G, De Angelis DA & Rothman JE (1998) *Nature* **394**:192-195
2. Sankaranarayanan S, De Angelis DA, Rothman JE & Ryan TA (2000) *Biophys J* **79**: 2199-2208

(16) 海馬苔状線維終末からの BDNF 開口放出の測定

須山成朝, 小橋雄一, 石塚 徹, 八尾 寛 (東北大学 生命科学研究科 脳機能解析分野)

中枢神経系において, 脳由来神経栄養因子 (BDNF) は神経細胞の発生, 分化, 成長等を調節する分子として同定されたが, 近年, 神経伝達物質放出の促進, LTP の発生, ナトリウムチャンネルを介した活動電位の発生等シナプス可塑性を調節する機能を有することが報告されている。BDNF などの神経ペプチドは, 神経細胞体で合成され, 有芯小胞 (LDCV) に充填される。LDCV は, 軸索終末において活動依存的に開口放出される。LDCV の開口放出を制御しているメカニズムの研究は, シナプス可塑性との関連において重要であるにもかかわらず, 未解明の部分が多く残されている。

本研究は BDNF の放出制御機構を解明することを目的とし, このために開口放出測定法の開発を行った。BDNF と黄色蛍光タンパク質変異体 (Venus) の融合タンパク質を海馬神経細胞に強制発現させ, シナプス前終末において LDCV の開口放出にともなう BDNF の拡散による蛍光強度の減少から, BDNF の開口放出を光学的に測定した。

BDNF-Venus は神経細胞特異性を有するシンドビスウイルスベクターを介して強制発現させた。実験には SD 系ラット E18-P1 の海馬の初代培養系及び海馬急性スライス系を用い, ウィルスベクター感染後 2-3 日で測定を行った。

BDNF-Venus シンドビスウイルスベクターに感染した海馬初代培養においては, ニューロン特異的に発現が確認された。蛍光は, 神経細胞体, 樹状突起, シナプス前終末に認められた。細胞体-樹状突起部位においては, 高カリウム刺激に応答して顕著な蛍光強度の減弱が観察された。この応答は細胞外液カルシウムに依存し, 細胞外カルシウムの除去によりほぼ完全に消失した。したがって, BDNF の開口放出によるものと考えられる。分散培養系では, シナプス前終末を同定することが困難なので, 海馬急性スライスで苔状線維終末を同定し, BDNF 開口放出を光学的に定量化することを試みた。脳定位固定法により海馬歯状回にウィルスベクターを注入し, 3 日後に歯状回顆粒細胞の軸索である苔状線維の終末に BDNF-Venus を同定した。高頻度の電気刺激によって単一の苔状線維終末において, BDNF-Venus の蛍光強度が活動依存的に減少すること, および, この応答が *N*-ethylmaleimide (NEM) により抑制されることを認めた。すなわち, 海馬のネットワークを形成しているシナプス前終末において BDNF が活動依存的に開口放出されることが示唆される。このようなフィードフォワードの BDNF の分泌はこれまでに知られている細胞体樹状突起部位からの分泌と異なる役割を担うと考えられる。

(17) 生後発達に伴う前シナプス活動電位変化のメカニズム

中村行宏, 高橋智幸 (東京大学大学院医学系研究科神経生理)

ラット脳幹の音源定位聴覚中継シナプス calyx of Held では, 聴覚が獲得される生後 1-2 週にかけシナプス特性に変化が生じ, 高頻度入力信号に対して忠実に対応する高信頼性 (HiFi) のシナプス伝達が獲得される。このシナプス伝達特性の変化は, 後シナプス細胞における NMDA 受容体発現量の減少 (Futai et al, 2001) を初めとする複数の要因によってもたらされると考えられている。生後 1-2 週にかけて生じる神経終末端の活動電位幅の短縮 (Taschenberger & vonGersdorff, 2000) もその一因である

が, 活動電位を制御するメカニズムは明らかでない。K チャンネル, Na チャンネルの生後発達変化が活動電位に変化をもたらす可能性を検討するために, 生後 7 日 (P7) および 14 日 (P14) の神経終末端より電位依存性 K⁺電流, Na⁺電流をパッチクランプ法によって記録し, それぞれの生後発達変化を解析した。

P7 に比べ P14 の前シナプス K⁺電流は, 速い活性化キネティクスと, 単位膜容量当たり大きな振幅を示した。しかし電位依存性に変化はなく, それぞれ 1 mM TEA,

10 nM margatoxin によって阻害される成分として求めた高閾値活性化型 (Kv3) 電流, 低閾値型 (Kv1) 電流の全 K^+ 電流に対する比率 (Ishikawa et al, 2003) にも差は認められなかった。

一方, 前シナプス Na^+ 電流は, 電流密度, 電位依存性, 活性化キネティクスのいずれの点においても発達変化を示さなかったが, P7 に比べて P14 における Na^+ 電流の不活性化キネティクスは速く, その差は統計的に有意であった。

以上の結果から, K^+ 電流密度の増加, K^+ 電流活性化時間の短縮, および Na^+ 電流不活性化時間の短縮がすべて, 生後発達に伴う前シナプス活動電位幅の短縮に寄与するものと結論される。

参考文献

Futai et al, (2001) *J.Neurosci.* **21**:3342-49

Taschenberger & vonGersdorff, (2000) *J.Neurosci.* **20**:9162-73.

Ishikawa et al, (2003) *J.Neurosci.* **23**:10445-53.

(18) キンギョ Mb1型双極細胞における Ca^{2+} マイクロドメイン・シナプスリボン・開口放出部位の分布

緑川光春, 立花政夫 (東大・院人社・心理)

キンギョ網膜の Mb1 型双極細胞の軸索終末部には, シナプスリボンと呼ばれる微細構造がある。シナプスリボンの周囲には多数のシナプス小胞が係留されており, その直下の細胞膜に Ca^{2+} チャネルが局在していると考えられている。双極細胞の開口放出には早い成分と遅い成分がある。本研究の目的は, Ca^{2+} 流入部位と開口放出部位を特定し, 2 相性開口放出の原因を探ることである。

本研究では, 単離した Mb1 型双極細胞を膜電位固定し, Ca^{2+} 流入部位と開口放出部位を近接場光顕微鏡で観察すると共に, 網膜の超薄連続切片を電子顕微鏡で観察し, 双極細胞軸索終末部のシナプスリボンとシナプス小胞の分布を調べた。

Mb1 型双極細胞に High K^+ 溶液に溶かした FM 色素を細胞外から投与してシナプス小胞に FM 色素を取り込ませた。この双極細胞にパッチ電極から蛍光性 Ca^{2+} 指示薬 (Fluo-5F, 200 μ M) を導入し, 膜電位固定下で Ca^{2+} 電流を計測すると共に, 近接場光顕微鏡で軸索終末部における Ca^{2+} 流入部位と開口放出部位を観察した。 Ca^{2+} 電流を活性化させると複数の部位で蛍光性 Ca^{2+} 指示薬の蛍光強度が局所的に急上昇し, Ca^{2+} 電流の持続時間を長くする

と蛍光は各部位を中心に同心円状に拡がった。したがって, これらは Ca^{2+} マイクロドメインであると考えられる。脱分極パルスで Ca^{2+} 電流を活性化させた時に生じる FM 色素の蛍光強度変化から, 開口放出のタイミングと場所を推定することができた。長い脱分極パルスで Ca^{2+} 電流を持続的に活性化させると, 早い成分に対応する開口放出は Ca^{2+} マイクロドメインの近傍で生じ, 遅い成分に対応する開口放出は Ca^{2+} マイクロドメインの近傍のみならず, そこから離れた場所でも生じた。

兵庫医科大学の塚本吉彦教授との共同研究により, キンギョ網膜の超薄連続切片を作成し, Mb1 型双極細胞軸索終末部を電子顕微鏡で観察した。形態的に計測したシナプスリボンの分布と近接場光顕微鏡で得られた Ca^{2+} マイクロドメインの分布を比較したところ, 両者は非常に類似していた。この結果は, Ca^{2+} チャネルがシナプスリボンの直下に局在しているとの仮説を支持している。

以上の結果から, 網膜 Mb1 型双極細胞においてシナプス小胞と Ca^{2+} チャネル集積部位 (シナプスリボン部位) 間の距離が 2 相性の開口放出を生じさせる重要な要因として示唆された。

(19) リドカイン誘起てんかん様発射の発生機序

田中永一郎, 東 英穂 (久留米大・医・生理学第一講座)

成熟ラット海馬スライス標本を作成し, CA3, および CA1

領域から細胞外記録を行い, 種々の濃度 (1~100 μ M) の局

所麻酔薬, リドカインを灌流投与すると, field PSPs (fPSPs) および field EPSPs (fEPSPs) の一過性抑制に引き続き持続性増強に伴うてんかん様発作放電がみられた。Presynaptic volley はリドカイン濃度 (>3 μM) 依存性に抑制された。fPSPs および fEPSPs (f(E) PSPs) の一過性抑制は A_1 受容体拮抗薬, DPCPX(1 μM) 存在下で消失した。CA1 錐体細胞から細胞内記録を行い, fast EPSPs および fast IPSP に対するリドカインの効果を検討すると, 両者ともリドカイン濃度依存性に持続的に抑制されたが, その平均 IC_{50} はそれぞれ 68 μM および 7 μM で, fast IPSP の方が感受性が高かった。Fast EPSPs と fast IPSPs を含む PSPs ではリドカイン低濃度(30 μM) 投与により fast and

late IPSPs 抑制に起因する fast EPSPs 増強がみられた。一方, Glutamate 誘起脱分極電位および GABA 誘起過分極電位はリドカインにより変化しなかった。さらに, fEPSPs のリドカイン誘起持続性増強は CA3 切除と CA2 領域 stratum oriens 切断によって著しく抑制された。これらの結果は, リドカインによる f(E) PSPs 一過性抑制は A_1 受容体活性化が関与すること, f(E) PSPs 持続性増強は GABA 性 feedforward および feedback inhibition の脱抑制によること, を示唆した。また, CA2, CA3 両領域から CA1 領域へのシナプス入力と CA3 領域内の反回興奮伝搬回路が fEPSPs の一過性抑制と引き続く持続性増強の発生に必須であるという結論を得た。

(20) マウスを用いた眼球サッケード運動系の解析

坂谷智也, 伊佐正 (自然科学研究機構・生理学研究所・発達生理学研究室・認知行動発達機構研究部門)

視線移動時にみられる高速の眼球運動 (サッケード) は, 脳により正確に制御される随意運動である。ヒトではサッケードの動的特性に注意・動機付けなどの精神状態が反映するとされている。この眼球運動を制御する神経システムの構造とその修飾機構を解明するにあたり, 個体での遺伝子操作が可能なマウスをモデル動物として扱うことはきわめて有用である。我々はこれまでに高速ビデオと汎用 PC, 独自の動画画像解析ソフトを組み合わせマウスの眼球運動測定システムを開発し, マウスのサッケードを定量的に測定・解析することに成功した (Sakatani & Isa 2004 Neurosci Res)。

【マウスにおける中脳上丘のサッケード運動地図の解析】

サッケード測定システムと併せて, 覚醒状態で頭部を固定したマウスの脳内を微小電流刺激する実験系を構築し, マウスにおいてもサルやネコと同様に, 中脳にある上丘を高頻度電気刺激することでサッケードが人工的に誘発されることを見いだした。この誘発サッケードについて以下のことを明らかにした。(1) サッケードの誘発と刺激強度の間に顕著な閾値効果がみられ, この閾値は上丘浅層では高く中間層・深層で低くなる (2) 誘発されるサッケードのベクトルは上丘の刺激位置に依存しており, 上丘吻側から尾側にかけて振幅が増大し, また内側から外側にかけて上方から下方へとサッケードの方向が

変化するといった運動地図が上丘に存在する (3) サッケードの振幅と最大角速度との間に正の強い相関関係がある。これらの結果はネコやサルで報告されているサッケードの誘発機構と酷似しており, 側眼動物であるマウスに関しても, 少なくとも上丘下流の神経回路について前眼動物であるネコやサルと基本的に類似のサッケード生成機構が備わっていることが示唆された。

【ノックアウトマウスを用いたサッケード制御系における GABA の機能解析】

サッケードの制御における各種神経伝達物質の役割については, これまでのところほとんど不明である。そこで上丘電流刺激によるサッケード誘発系を, 抑制性神経伝達物質 GABA の合成酵素である GAD65 のノックアウトマウスに適用し, サッケード制御システムにおける GABA の役割について解析した。その結果 GAD65KO マウスでは (1) 刺激中に眼球の不安定な振動が頻繁にみられ (2) サッケードの最大速度が上昇し (3) 振幅の大きなサッケードがみとめられなかった。以上の結果とサッケード制御の理論モデルに基づいた計算機シミュレーションの結果を比較することにより, サッケード制御系において GAD65 由来の GABA が主としてサッケードの振幅を計算するフィードバックの効率調節に関与していることが示唆された。

(21) Changes of AMPA Receptor and Synapse Density in the Flocculus after Short-term and Long-term Adaptation of Horizontal Optokinetic Response

Wen Wang and Ryuichi Shigemoto

(自然科学研究機構生理学研究 脳形態解析, 総研大, 科学技術振興機構 CREST)

AMPA receptor (AMPA) is an essential component in long-term depression of parallel fiber (PF)-Purkinje cell (PC) synaptic transmission underlying cerebellar motor learning. However, it has not been well demonstrated if physiological learning is accompanied with reduction of AMPA receptor content or synapse density in these synapses *in vivo*. Using SDS-digested freeze-fracture replica labeling, we quantitatively analyzed AMPAR and synapse density in PF-PC synapses before and after adaptation of the horizontal optokinetic response (HOKR) eye movement in adult C57BL/6J mice. PF-PC synapses were identified in the replica samples by double labeling for the GluR $\delta 2$ subunit. Immunogold particles for GluR1-4 and delta2 were concentrated on clusters of intramembrane particles, which indicate postsynaptic areas, on E-face of Purkinje cell dendritic membrane. In the middle one third of the flocculus, which is involved in this motor

learning, we found a significant reduction of AMPAR density at PF-PC synapses after one hour of HOKR training, accompanied with a significant gain increase of HOKR indicating short-term adaptation. No such difference in AMPAR density was detected in the flocculus of untrained animals or in the paraflocculus of the trained animals. Density and size of PF-PC synapses in the flocculus of the trained animals did not change significantly after the one-hour training. In contrast, after five-day consecutive daily training, which caused significant increase of basal gain values (long-term adaptation), density but not size of PF-PC synapses was significantly reduced. These results suggest that reduction of synaptic AMPAR and synapse number in the flocculus is involved in short-term and long-term HOKR adaptation, respectively.

21. 心臓血管系イオンチャネルの機能障害に基づく 病態発症機構の解明とその治療戦略の構築

2005年3月8日-3月9日

代表・世話人：松浦 博 (滋賀医科大学生理学第二講座)

所内対応者：岡田 泰伸 (自然科学研究機構・生理学研究所)

- (1) ノックアウトマウスを用いた心房筋および心室筋細胞における K_{ATP} チャネルの役割の解析
中谷 晴昭¹⁾, 三枝 紀子^{1),2)}, 斎藤 智亮¹⁾, 佐藤 俊明¹⁾, 三木 隆司³⁾, 清野 進³⁾, 小室 一成²⁾
(千葉大学大学院・医学研究院・薬理学¹⁾,
千葉大学大学院・医学研究院・循環病態医科学²⁾,
神戸大学大学院・医学研究科・細胞分子医学³⁾)
- (2) インスリンの ATP 感受性 K^+ チャネル活性化における細胞骨格の役割
河野 崇¹⁾, 庄野 加余子²⁾, ナザリーホセイン²⁾, 中屋 豊²⁾
(徳島大学・医学部・麻酔学教室¹⁾, 徳島大学・医学部・特殊栄養学講座²⁾)
- (3) モルモット心房筋と心室筋の I_{K1} の差異における Kir2.x サブユニットと細胞内ポリアミンの関与
Yan Ding-Hong, 穎原 嗣尚, 石原 圭子
(佐賀大学・医学部・生体構造機能学・器官細胞生理分野)
- (4) Ca 電流不活性化の β スイッチ仮説と心筋活動電位モデル
平野 裕司 (東京医科歯科大学・難治疾患研究所・循環器)
- (5) Modified sympathetic response of cardiac muscle in mice lacking the voltage-dependent Ca^{2+} channel $\beta 3$ subunit
尾野 恭一, 村上 学, 藤澤 進, 徐 峰, 飯島 俊彦
(秋田大学・医学部・機能制御医学講座)
- (6) 心筋 L 型 Ca チャネル活性に対する Jab1/CSN5 の関与
當瀬 規嗣¹⁾, 亀田 和利²⁾, 深尾 充宏¹⁾, 長島 雅人¹⁾,
小林 武志¹⁾, 筒浦 理正¹⁾, 山田 陽一¹⁾, 山下 敏彦²⁾
(札幌医科大学・医学部・生理学第一¹⁾, 札幌医科大学・医学部・整形外科²⁾)
- (7) 心筋細胞アポトーシスにおけるクロライドイオンチャネルの役割
高橋 信之¹⁾, 田辺 秀^{1),2)}, 王 曉明¹⁾, 浦本 裕美¹⁾,
寺社下 浩一²⁾, 内田 信一³⁾, 佐々木 成³⁾, 岡田 泰伸¹⁾
(自然科学研究機構・生理学研究所・機能協関部門¹⁾,
中外薬品・富士御殿場研究所²⁾,
東京医科歯科大学大学院・腎臓内科³⁾)
- (8) 薬物による HERG チャネル電流抑制機構について
保坂 幸男¹⁾, 木下 賢吾²⁾, 中村 春木²⁾, 倉智 嘉久¹⁾
(大阪大学大学院・医学系研究科・薬理学講座・分子・細胞薬理学¹⁾, 大阪大学・蛋白質研究所²⁾)
- (9) イヌ右室心筋切片を用いた Brugada 症候群モデルにおける心室細動発生機序の解明：高解像度光マッピングによる検討
相庭 武司¹⁾, 清水 渉²⁾, 日高 一郎¹⁾, 上村 和紀¹⁾, 稲垣 正司¹⁾, 杉町 勝¹⁾, 砂川 賢二³⁾
(国立循環器病センター研究所・循環動態機能部¹⁾,
国立循環器病センター・心臓血管内科²⁾,
九州大学大学院・医学研究院・循環器内科³⁾)

- (10) QT 延長症候群とブルガダ症候群症例における遺伝子変異検出率とチャネル変異の特徴
吉田 秀忠¹⁾, 竹中 琴重¹⁾, 牧山 武¹⁾, 大野 聖子¹⁾, 土井 孝浩¹⁾, 辻 啓子¹⁾, 堀江 稔²⁾
(京都大学大学院・医学研究科・循環病態学¹⁾, 滋賀医科大学・呼吸循環器科²⁾)
- (11) ヒト肺動脈平滑筋のイオンチャネルの分子生物学的及び電気生理学的検討
中島 敏明¹⁾, 飯田 陽子²⁾, 大沼 仁¹⁾, 岩沢 邦明²⁾, 城 大祐²⁾, 永井 良三²⁾
(東京大学医学部大学院・虚血循環生理¹⁾, 東京大学医学部大学院・循環器内科²⁾)
- (12) ウサギ肺静脈起源の異常興奮とイオンチャネル発現
山本 充¹⁾, 本荘 晴朗²⁾, 清水 敦哉²⁾, 堀場 充³⁾,
李 鍾国³⁾, 安井 健二⁴⁾, 神谷 香一郎²⁾, 児玉 逸雄³⁾
(名古屋大学大学院・医学系研究科・細胞生物物理学¹⁾,
名古屋大学・環境医学研究所・液性調節分野²⁾,
名古屋大学・環境医学研究所・循環器分野³⁾,
名古屋大学・環境医学研究所・生体情報計測・解析(スズケン)寄附研究部門⁴⁾)
- (13) 心筋ミトコンドリア Ca²⁺依存性 K⁺チャネルの性質・機能と作用薬
今泉 祐治, 大矢 進, 坂本 多穂, 桑田 有紀子, 村木 克彦
(名古屋市立大学大学院・薬学研究科・細胞分子薬効解析学分野)
- (14) 植物ステロール由来サポニンによる心血管系性ホルモン受容体の non-genomic 経路の特異的活性化
古川 哲史, 黒川 洵子, 白 長喜 (東京医科歯科大学・難治疾患研究所)
- (15) 心筋 I_{Ks} と KCNQ1/KCNE1 チャネルのメフェナム酸感受性の違い
豊田 太, 丁 維光, 松浦 博 (滋賀医科大学・生理学第二講座)

【参加者名】

松浦 博 (滋賀医大), 岡田 泰伸 (生理研), 中谷 晴昭 (千葉大院・医), 河野 崇 (徳島大・医), 中屋 豊 (徳島大・医), Yan Ding-Hong (佐賀大・医), 穎原 嗣尚 (佐賀大・医), 石原 圭子 (佐賀大・医), 平野 裕司 (東京医歯大・難治研), 尾野 恭一 (秋田大・医), 當瀬 規嗣 (札幌医科大・医), 高橋 信之 (生理研), 浦本 裕美 (生理研), 保坂 幸男 (大阪大院・医), 倉智 嘉久 (大阪大院・医), 相庭 武司 (国立循環器病センター), 吉田 秀忠 (京都大院・医), 牧山 武 (京都大院・医), 堀江 稔 (滋賀医大), 中島 敏明 (東京大院・医), 山本 充 (名古屋大院・医), 本荘 晴朗 (名

古屋大・環研), 神谷 香一郎 (名古屋大・環研), 児玉 逸雄 (名古屋大・環研), 今泉 祐治 (名古屋市中院・薬), 坂本 多穂 (名古屋市中院・薬), 波田野 紀之 (名古屋市中院・薬), 森村 浩三 (名古屋市中院・薬), 堀田 真吾 (名古屋市中院・薬), 森本 岳 (名古屋市中院・薬), 山崎 大樹 (名古屋市中院・薬), 山村 寿男 (名古屋市中院・薬), 大野 晃稔 (名古屋市中院・薬), 古川 哲史 (東京医歯大・難治研), 萩原 誠久 (東京女子医大), 沼田 明大 (生理研), 丁 維光 (滋賀医大), 豊田 太 (滋賀医大)

【概要】

心臓血管系の細胞膜に存在するイオンチャネルは、細胞膜の興奮性の制御を介してさまざまな心血管機能の発現やそれらの神経体液性の調節に関わっている。近年、多くのイオンチャネル遺伝子が単離・同定され、遺伝性 QT 延長症候群や Brugada 症候群などイオンチャネル遺伝子の変異に起因するイオンチャネル病の存在も明らか

にされている。チャネル遺伝子の変異による構造異常とそれにより招来されたチャネル蛋白の機能異常との関連についての解析が進み、チャネル蛋白の構造機能連関も明らかにされつつある。さらには、イオンチャネル病においてチャネル遺伝子異常と疾患表現系との関連 (genotype-phenotype correlation) やその症状発現機構につ

いての検討も進み、遺伝子変異に基づいた治療法の開発も行われはじめている。このように、分子生物学、遺伝子工学、電気生理学および薬理学などの手法を用いた学際的研究により、イオンチャネル蛋白の生理的さらには病態生理的意義について知見が集積しつつある。そこで、我が国の心血管系のイオンチャネル研究を更に発展させ、イオンチャネル蛋白の生理的意義の解明に加えその破綻に基づく病態発症機構の解明とその治療戦略の構築を目

指すとき、分子生物学、分子遺伝学、電気生理学、薬理学などのさまざまな専門分野の研究者が意見を交換し互いに協力して学際的に研究を押し進めていく必要がある。

本研究会には心血管領域の基礎および臨床研究者が多数集まり、さまざまな異なった研究手法を用いて得られた最新の成果が発表され、また活発な討論が行われた。本研究会で得られたこれらの成果を基盤として、今後新たな学際的共同研究が構築されることが大いに期待される。

(1) ノックアウトマウスを用いた心房筋および心室筋細胞における K_{ATP} チャネルの役割の解析

中谷 晴昭¹⁾, 三枝 紀子^{1),2)}, 斎藤 智亮¹⁾, 佐藤 俊明¹⁾, 三木 隆司³⁾, 清野 進³⁾, 小室 一成²⁾
(千葉大学大学院・医学研究院・薬理学¹⁾,
千葉大学大学院・医学研究院・循環病態医科学²⁾,
神戸大学大学院・医学研究科・細胞分子医学³⁾)

心筋細胞膜の ATP 感受性 K^+ (K_{ATP}) チャネルは、ポア成分の Kir6.2 とスルホニル尿素受容体の SUR2A から構成される。Kir6.2 遺伝子欠損 (KO) マウスを用い、心室における虚血時電気生理学的異常発現および心房における心房性利尿ホルモン (ANP) 分泌での K_{ATP} チャネルの役割を解析した。KO マウスの摘出灌流心室筋標本において灌流を停止し虚血とすると、野生型 (WT) 標本と異なり、活動電位幅は短縮しなかったが、細胞外 K^+ 濃度は WT 標本と同様に上昇し、静止膜電位が減少した。虚

血時の K_{ATP} チャネルの活性化は活動電位幅短縮に重要だが、細胞外 K^+ 蓄積の主たる要因ではない事が示唆された。KO マウスの心房筋細胞でも K_{ATP} チャネル活動は記録されず、細胞の膨化によっても活性化されなかった。KO マウスにおいて容量負荷を与えた時の ANP 分泌は WT マウスに比し高度であり、摘出心房筋標本に張力負荷を与えた時の ANP 分泌も KO マウス標本で大きく、 K_{ATP} チャネル活動が心房からの ANP 分泌を制御する事が明らかとなった。

(2) インスリンの ATP 感受性 K^+ チャネル活性化における細胞骨格の役割

河野 崇¹⁾, 庄野 加余子²⁾, ナザリーホセイン²⁾, 中屋 豊²⁾
(徳島大学・医学部・麻酔学教室¹⁾, 徳島大学・医学部・特殊栄養学講座²⁾)

膵臓 β 細胞での K_{ATP} チャネル活性はインスリン分泌に重要な役割を果たす。また、インスリン自体が種々の組織の K_{ATP} チャネル活性に影響を与えることも報告されている。今回われわれは、インスリンによる培養血管平滑筋細胞の K_{ATP} チャネル活性に及ぼすアクチン細胞骨格再編の影響を検討した。

【結果】パッチクランプ Cell-attached 法において、インスリンにより K_{ATP} チャネルの活性化が認められたが、この K_{ATP} チャネル活性化は 5-10 分後に急速に低下した (不活性化)。インスリンの K_{ATP} チャネルの活性化は、

Wortmannin (PI-3 kinases 阻害剤) の前処置で消失した。一方で、 K_{ATP} チャネル不活性化は、Cytochalasin D (アクチン重合阻害剤) の前処置で消失した。さらに、Cortactin (アクチン結合蛋白) mutant は、インスリンによる急速なアクチン骨格再編を抑制し、さらにインスリンによる K_{ATP} チャネル不活性化を抑制した。

【結論】インスリンは培養血管平滑筋細胞において、PI-3 kinases を介して K_{ATP} チャネルを活性化するが、その後の急速なアクチン細胞骨格の再編によって結果的に K_{ATP} チャネルを不活性化する可能性が示唆された。

(3) モルモット心房筋と心室筋の I_{K1} の差異における Kir2.x サブユニットと細胞内ポリアミンの関与

Yan Ding-Hong, 穎原 嗣尚, 石原 圭子

(佐賀大学・医学部・生体構造機能学・器官細胞生理分野)

内向き整流 K 電流 I_{K1} の外向き電流は心筋活動電位の再分極 (3 相) を担い、その振幅は細胞内ポリアミンや Mg^{2+} によるチャネルの電位依存性ブロックにより制御される。 I_{K1} 外向き電流は心室筋より心房筋で小さいが機序は不明である。我々はモルモット心房筋と心室筋の I_{K1} の差異における Kir2.x チャネルサブユニットと細胞内ポリアミン濃度の関与を検討した。穿孔パッチクランプ法で記録した I_{K1} の内向き整流性は心室筋より心房筋で強く、 I_{K1} の再分極誘発外向きトランジェントは心室筋のみに認められた。Kir2.3 電流と I_{K1} は細胞外 pH 感受

性と内向き電流活性化速度の点で性質が異なっていた。Kir2.1 電流と Kir2.2 電流は細胞内側に 0.6-1.1 mM Mg^{2+} と 5-10 μ M スペルミン共存下に外向きトランジェントを示したが、より高濃度のスペルミン又はスペルミジン共存下では振幅が小さくなった。モルモット心筋組織のポリアミン及びこれと結合する高分子や ATP 濃度を測定した結果、細胞内遊離ポリアミン濃度は心房の方が高いという結果を得た。従って心房筋と心室筋の I_{K1} の違いに細胞内ポリアミン濃度の違いが寄与する事が唆された。

(4) Ca 電流不活性化の β スイッチ仮説と心筋活動電位モデル

平野 裕司 (東京医科歯科大学・難治疾患研究所・循環器)

Findlay の β スイッチ仮説によれば、心筋の L 型 Ca 電流は生理的条件下 (コントロール) では膜電位依存性不活性化が主であり、交感神経 β 受容体刺激によって Ca 依存性不活性化が主要な役割を果たす状態に切り替わることになる (J.Physiol. 2002,2004)。これまでに発表されてきた心筋活動電位シミュレーションモデルにおいて、この仮説をどのように導入し得るか、またどのような役割を担い得るかを検討した。コントロールと β 受容体刺激下の L 型 Ca 電流膜電位依存性不活性化を Findlay のデータに基づいて設定し (例コントロール: +50mV において finf

0.2, 時定数 25msec, β 受容体刺激下: finf 0.55, 時定数 25msec), Luo-Rudy モデルに導入すると β 受容体刺激条件下での活動電位の再分極は極めて困難となった。一方、我々の Ca 依存性不活性化の新しい定式化を導入したモデル (Biophys.J.2003) では膜電位依存性不活性化の変化は Ca 依存性不活性化の増強に相殺され、APD の変化はより reasonable であったが、膜電位固定実験の再現などは不十分であった。これまでのモデルに細胞内 Ca 動態や CICR の新しい定式化を導入し、さらに検討を続ける必要がある。

(5) Modified sympathetic response of cardiac muscle in mice lacking the voltage-dependent Ca^{2+} channel β_3 subunit

尾野 恭一, 村上 学, 藤澤 進, 徐 峰, 飯島 俊彦 (秋田大学・医学部・機能制御医学講座)

電位依存性 Ca^{2+} チャネルは 5 つのサブユニットにより構成される複合体であり、薬理的には 5 種類に分類される。このうち β サブユニット、特に β_3 サブユニットは N 型 Ca^{2+} チャネル、平滑筋の L 型 Ca^{2+} チャネルの構成サ

ブユニットとしてチャネルの機能発現に重要な働きを担っていると考えられている。今回、交感神経終末における β_3 サブユニットの機能的役割を明らかにする目的で、野生型 (WT 群), β_3 サブユニット欠損 ($\beta_3^{-/-}$) 及び過剰

発現マウス (Tg) を用い、Field 刺激に対する心室筋の収縮変化を測定した。その結果、Field 刺激により心室筋の収縮は 3 群とも刺激強度に依存して増強し、 β アドレナリン受容体遮断薬あるいはレゼルピンの前処理により消失した。Filed 刺激に対する反応は β_3 -/-で WT に比べて有意に減弱し、Tg マウスでは有意に増強していた。単離心室筋細胞の Ca^{2+} 電流については、電流密度およびキネテ

イクスとも 3 群間で有意差は認められなかった。以上のことから、 β_3 -/-では交感神経末端からのノルアドレナリン放出が減弱し、逆に Tg では増強していることが示唆された。 β_3 サブユニットが交感神経末端における Ca^{2+} チャネルの機能的サブユニットを構成していることが示唆された。

(6) 心筋 L 型 Ca チャネル活性に対する Jab1/CSN5 の関与

當瀬 規嗣¹⁾, 亀田 和利²⁾, 深尾 充宏¹⁾, 長島 雅人¹⁾,
小林 武志¹⁾, 筒浦 理正¹⁾, 山田 陽一¹⁾, 山下 敏彦²⁾

(札幌医科大学・医学部・生理学第一¹⁾, 札幌医科大学・医学部・整形外科学²⁾)

L 型 Ca チャネルは、様々な細胞内タンパク分子と相互作用し、それによって生理反応を惹起している。例えば、G タンパクの一部は L 型 Ca チャネルを直接活性化すると、骨格筋では L 型 Ca チャネルとリアノジン受容体との相互作用が興奮収縮連関の鍵である。心筋 L 型 Ca チャネルの細胞内に露出している部分で、特定のタンパク分子の結合が報告されていない、II-III リンカーに相互作用を示す分子種の探索を行った。Yeast-two-hybrid 法により、II-III リンカーに結合するタンパク分子をヒト心筋ライブラリーで探索すると、細胞増殖にかかわる Jab1/CSN5 がスクリーニングされた。ウエスタンブロットにより Jab1/CSN5 がラット心筋細胞に実際に存在することを確

認した上で、免疫沈降法を行い、II-III リンカーを含む alpha1C サブユニットと Jab1/CSN5 が共沈することを確認した。さらにラット心室筋細胞を用いて免疫蛍光染色をすると、両分子が筋節にしたがって共存していた。次に心筋 L 型 Ca チャネルの全サブユニットを発現させた cos7 細胞でパッチクランプ法を行い、Ca 電流を測定した。この細胞で、siRNA 法により Jab1/CSN5 の遺伝子発現を抑制すると、Ca 電流は無処置あるいはスクランブル siRNA 処置の細胞に比較して約 2 倍大きくなっていった。Jab1/CSN5 は心筋 L 型 Ca チャネルに直接結合して、チャネル活動を抑制することにより、Ca 流入量を調節していると考えられる。

(7) 心筋細胞アポトーシスにおけるクロライドイオンチャネルの役割

高橋 信之¹⁾, 田辺 秀^{1),2)}, 王 曉明¹⁾, 浦本 裕美¹⁾,
寺社下 浩一²⁾, 内田 信一³⁾, 佐々木 成³⁾, 岡田 泰伸¹⁾

(自然科学研究機構・生理学研究所・機能協同部門¹⁾,
中外薬品・富士御殿場研究所²⁾,
東京医科歯科大学大学院・腎臓内科³⁾)

スチルベン誘導体である DIDS は、心筋細胞をはじめ様々な細胞系でスタウロスポリン (STS) 誘導性アポトーシスを抑制する。しかし DIDS は、 Cl^- チャネルと Cl^-/HCO_3^- 交換輸送体 (AE) のいずれにも作用する阻害剤である。そこでマウス心筋細胞を用いて、STS 誘導性

心筋細胞アポトーシスにおける DIDS の標的の同定を試みた。STS 誘導性心筋細胞アポトーシスは、AE が機能しない HCO_3^- 非存在下でも観察され、DIDS の添加により抑制された。さらに AE には作用しない Cl^- チャネル阻害剤である NPPB の添加でも、心筋細胞アポトーシスが

抑制された。また他の細胞系と同様に、心筋細胞でも STS 添加でアポトーシス性細胞容積減少 (AVD) が起こり、これが Cl^- チャンネル阻害剤によって抑制された。以上よ

り、心筋細胞のアポトーシスは、DIDS が Cl^- チャンネルに作用することで抑制できること、 Cl^- チャンネルが関与する AVD が重要な初期イベントであることが示唆される。

(8) 薬物による HERG チャンネル電流抑制機構について

保坂 幸男¹⁾, 木下 賢吾²⁾, 中村 春木²⁾, 倉智 嘉久¹⁾

(大阪大学大学院・医学系研究科・薬理学講座・分子・細胞薬理学¹⁾, 大阪大学・蛋白質研究所²⁾)

I_{Kr} 遮断薬であるニフェカラントは HERG 電流に対し block 効果だけでなく、低電位脱分極パルスにて facilitation 効果も有することが報告されている。また、III 群抗不整脈薬であるアジミライドにおいて、HERG 電流に対する facilitation 効果が、強い脱分極パルスによって起こる activation curve の左方偏位により引き起こされることが報告されている。今回、HERG チャンネルに対するニフェカラントの block 効果と facilitation 効果に関して、pore 領域のアミノ酸残基との関連を Alanine-scanning を用いて検討した。Y652 と F656 は block 効果と facilitation 効

果の両方に不可欠であった。また、Y652 と F656 以外の mutant の多くは、facilitation 効果を増強または減弱した。homology model において、これらのアミノ酸残基のうち、S624 と S649 のみが inner cavity に面し、channel pore の上方に pocket を形成していることが推測された。さらに、docking model において、ニフェカラントがその pocket にはまり込んでいることが推測された。以上より、ニフェカラントとの直接作用または open 構造の増強によりセリン残基が facilitation 効果を修飾している可能性が示唆された。

(9) イヌ右室心筋切片を用いた Brugada 症候群モデルにおける心室細動発生機序の解明： 高解像度光マッピングによる検討

中庭 武司¹⁾, 清水 渉²⁾, 日高 一郎¹⁾, 上村 和紀¹⁾, 稲垣 正司¹⁾, 杉町 勝¹⁾, 砂川 賢二³⁾

(国立循環器病センター研究所・循環動態機能部¹⁾,
国立循環器病センター・心臓血管内科²⁾,
九州大学大学院・医学研究院・循環器内科³⁾)

【背景】Brugada 症候群は心電図右側胸部誘導の ST 上昇と心室細動 (VF) を主徴とする疾患であり、その ST 上昇と VF 発生の機序については、右室流出路心外膜側の活動電位変化 (dome の消失) とそれに伴う phase 2 リエンタリー (P2R) が考えられている。しかし、どの程度の心外膜側活動電位の不均一性が VF の誘因となるのか、さらに P2R から VF への移行過程など未解明な点が多い。【方法】我々はイヌ右室心筋切片を用いた薬理的 Brugada 症候群モデルを作成し、膜電位感受性色素 (di-4-ANEPPS) を用いた空間・時間分解能に優れた光マッピングシステムにより、Brugada 型 ST 上昇時および P2R 発生過程における右室心外膜および心内膜側の活動

電位の不均一性と VF への移行過程を詳細に観察した。

【結果】右室心外膜側の機能的な活動電位の変化 (dome の消失と回復) が空間的な再分極時間のばらつきを増大を招き心電図上 ST 上昇を生じた。更に近接した細胞間での dome の有無による活動電位持続時間の差がある値 (閾値) を超えた場合、VF の起点となる P2R が発生することが確認された。さらに P2R から VF に移行するためには伝導の異常が関与すると考えられた。

【結語】Brugada 症候群の ST 上昇から VF 発生には、右室心筋の再分極異常と脱分極異常の双方が密接に関与することが示唆された。

(10) QT 延長症候群とブルガダ症候群症例における遺伝子変異検出率とチャネル変異の特徴

吉田 秀忠¹⁾, 竹中 琴重¹⁾, 牧山 武¹⁾, 大野 聖子¹⁾, 土井 孝浩¹⁾, 辻 啓子¹⁾, 堀江 稔²⁾
(京都大学大学院・医学研究科・循環病態学¹⁾, 滋賀医科大学・呼吸循環器科²⁾)

致死性心室性不整脈および突然死をもたらす心臓イオンチャネル病は、イオンチャネルとその関連遺伝子の突然変異が関与する。我々は、先天性 [Romano-Ward 症候群 (RW) と Jervelle-Lange-Nielsen 症候群 (JLN)] および後天性QT延長症候群, アンダーセン症候群 (AS), ブルガダ症候群 (BS) における遺伝子突然変異のスクリーニング検査をおこない遺伝子変異の頻度および遺伝子変異の部位について検討し, さらに変異チャネルの電気生理学的特徴を検討した。

【方法】患者末梢血白血球よりゲノム DNA を抽出し, PCR-SSCP あるいは PCR-WAVE 法にて遺伝子変異スクリーニング, 変異を同定した。さらに全細胞型パッチクランプ法にて電気生理学的特徴を検討した。

【結果】先天性および後天性 LQTS において 147 症例中 LQT1;31 例 LQT2;16 例 LQT3;9 例 LQT5;2 例, LQT7;1 例に遺伝子変異を認めた。2 家系の JLN において LQT1;1 例 (50%), AS では KCNJ11 変異を:7/7 (100%) の変異を検出した。BS において SCN5A;4/34 例に変異を認めた。LQTS 症例のなかに Compound 型変異を 4 例にみとめた。BS で同定された変異 SCN5A は パッチクランプ法にて電流の発現がみられなかった。

【結語】LQTS での変異検出率は約 40%であり, 他の遺伝子変異の関与が考えられ, 特に BS では変異検出率は低く他の遺伝子変異が関与している可能性がある。一方 AS については単一遺伝子の異常による症候群であると考えられた。

(11) ヒト肺動脈平滑筋のイオンチャネルの分子生物学的及び電気生理学的検討

中島 敏明¹⁾, 飯田 陽子²⁾, 大沼 仁¹⁾, 岩沢 邦明²⁾, 城 大祐²⁾, 永井 良三²⁾
(東京大学医学部大学院・虚血循環生理¹⁾, 東京大学医学部大学院・循環器内科²⁾)

肺高血圧の成因として電位依存性 K^+ チャネル (K_V) の異常が報告されているが, ヒト肺動脈平滑筋の K_V についてはいまだ不明である。そこで, ヒト肺動脈平滑筋細胞の K_V につき, 電気生理学的, 薬理的, 分子生物学的に検討した。細胞は, ヒトの主肺動脈より培養した肺動脈平滑筋細胞を用い, パッチクランプ法, reverse transcriptase/polymerase chain reaction (RT-PCR), 定量的 real-time RT-PCR 及び免疫染色法により検討した。電極内に 10 mM EGTA, 3 mM ATP を充填した状態で, 保持電位-80 mV より脱分極パルスを与えると一過性 (A 型) の K^+ 電流に続き, 遅延性外向き電流 (I_K) が活性化された。 I_A 電流は, 4-AP で用量依存的に抑制され, TEA に対する感受性により 2 つの成分に分けられた。TEA 感受性成分は, blood depressing substrate (BDS)-II により抑制され, 非感受性成分は phrixotoxin-II により阻害された。これら

の成分は, 電気生理学的 (不活性化曲線及び不活性化からの回復) にも, まったく異なる性質を示した。Flecainide は, TEA 非感受性成分を強く抑制した。RT-PCR では, I_K をコードする遺伝子 $K_V1.1$, $K_V1.5$, $K_V2.1$ とともに, I_A をコードする遺伝子 $K_V3.4$, $K_V4.1$, $K_V4.2$, $K_V4.3$ が検出された。定量的 RT-PCR 法では, $K_V4.2 > K_V3.4 > K_V4.3$ (long) $> K_V4.1$ であり, K_V4 の修飾蛋白である K^+ channel interacting- protein は, 主に KChIP3 が検出された。 $K_V4.3$ (short), KChIP1, KChIP4 は, 検出されなかった。 $K_V3.4$, $K_V4.2$, $K_V4.3$ 蛋白の発現は, 細胞免疫染色でも認められ, さらに, 正常ヒト肺動脈切片標本の免疫組織化学により確認された。以上より, 培養ヒト肺動脈平滑筋細胞の A 型電位依存性 K^+ チャネルは, 2 つの成分から構成され, これには, $K_V3.4$ 及び K_V4 -KChIP3 が関与していると考えられた。

(12) ウサギ肺静脈起源の異常興奮とイオンチャネル発現

山本 充¹⁾, 本荘 晴朗²⁾, 清水 敦哉²⁾, 堀場 充³⁾,
 李 鍾国³⁾, 安井 健二⁴⁾, 神谷 香一郎²⁾, 児玉 逸雄³⁾
 (名古屋大学大学院・医学系研究科・細胞生物物理学¹⁾,
 名古屋大学・環境医学研究所・液性調節分野²⁾,
 名古屋大学・環境医学研究所・循環器分野³⁾,
 名古屋大学・環境医学研究所・生体情報計測・解析(スズケン)寄附研究部門⁴⁾)

心房細動の発生・維持には肺静脈の異常興奮が重要な役割を果たしているが、その詳細な機序は明らかではない。本研究では肺静脈異常興奮の分子生物学的背景につき検討を行った。家兎心筋を用いて肺静脈 (PV), 洞房結節 (SAN), 右心房 (RA) における HCN1, HCN4, Kir2.1, Kir2.2, Nav1.5, Cav1.2, Cav1.3, RyR2, SERCA2a, ANP の mRNA 定量を行った。RA との比較で、PV では Kir2.2, Nav1.5, RyR2, SERCA2a, ANP の mRNA 発現の減少を認めたと、

HCN1, HCN4, Cav1.2, Cav1.3 は同程度の mRNA 発現を認めた。SAN では HCN1, HCN4, Cav1.3 の mRNA 発現増加と Nav1.5, Cav1.2, RyR2, ANP の mRNA 減少を認めた。肺静脈における異常興奮には Kir2.2, RyR2, SERCA2a 発現の減少が関与していると考えられるが、HCN1,4 や Cav1.3 の発現は低く、SAN のような自動能の関与は否定的であった。また、Nav1.5 の発現減少は興奮伝導の不均一性増加に関与していると考えられた。

(13) 心筋ミトコンドリア Ca²⁺依存性 K⁺チャネルの性質・機能と作用薬

今泉 祐治, 大矢 進, 坂本 多穂, 桑田 有紀子, 村木 克彦
 (名古屋市立大学大学院・薬学研究科・細胞分子薬効解析学分野)

最近、心筋ミトコンドリア内膜における大コンダクタンス Ca²⁺依存性 K⁺チャネル (BK チャネル) 様 K⁺チャネル (mitoK_{Ca} チャネル) の機能発現と BK チャネル開口薬による心筋保護作用が話題となっている。本研究では、哺乳類心筋に発現する BK チャネルβ1 サブユニット (BK β 1) に着目し、yeast two-hybrid 法によりヒト心筋由来 cDNA ライブラリーから BK β 1 結合タンパク質としてミトコンドリア呼吸鎖酵素シトクロム c 酸化酵素サブユニット I(Cco1)を同定した。また、蛍光タンパクやタグで標識した BK β 1, Cco1 を用いた可視化解析や免疫沈

降法により、両者が心筋ミトコンドリア内膜に共存することを見出した。さらに、ラット単離心室筋細胞を用いて、BK β 1 特異的 BK チャネル開口薬 17β -エストラジオールや東大院薬の大和田教授と共同開発した BK チャネル開口薬、12,14-dichlorodehydroabietic acid のミトコンドリア膜電位、フラボプロテイン酸化、実験的虚血心筋細胞の保護に対する作用を検討し、mitoK_{Ca} チャネル活性化によりミトコンドリア脱分極、呼吸増大及び心筋保護作用が発揮されることを見出した。

(14) 植物ステロール由来サポニンによる心血管系性ホルモン受容体の non-genomic 経路の特異的活性化

古川 哲史, 黒川 洵子, 白 長喜 (東京医科歯科大学・難治疾患研究所)

薬用人参 *Panax ginseng* は万能薬・長寿薬として最も人気のある herb medicines の 1 つであり、心血管系では虚

血一再還流障害に対して保護的に働くことが知られている。その主成分は植物ステロール由来サポニン

ginsenosides であり、ステロール環に2つの糖が結合している。Ginsenosides は細胞膜局在性ホルモン受容体に結合し、受容体→c-Src→PI3 キナーゼ→Akt→NOS3 の non-genomic pathway で NO を産生する。産生された NO は cGMP 依存性リン酸化により $I_{Ca,L}$ を抑制し、cGMP 非依存性タンパクニトロ化により I_{Ks} を活性化し、これらが活動電位短縮・ Ca^{2+} 過負荷予防に貢献する。糖を持たな

い植物ステロール β -sitosterol も同様の作用を示すが、 β -sitosterol は genomic pathway も活性化するが、ginsenosides は genomic pathway は活性化しない。これは糖の存在が核内移行を不可能にするためと推測される。以上より、ginsenosides は性ホルモンの膜型受容体特異的リガンド SERMs の天然素材として有望である。

(15) 心筋 I_{Ks} と KCNQ1/KCNE1 チャンネルのメフェナム酸感受性の違い

豊田 太, 丁 維光, 松浦 博 (滋賀医科大学・生理学第二講座)

モルモット心筋 I_{Ks} ならびに COS-7 に導入した KCNQ1/KCNE1 チャンネル電流におよぼすメフェナム酸の効果を全細胞パッチクランプ法により検討した。メフェナム酸 (0.1 mM) を細胞外から投与すると KCNQ1/KCNE1 電流は脱活性化キネティクスが著しく遅延し、刺激頻度依存性に脱分極パルスにともなう瞬時電流が増大し、時間依存性の電流成分が減少した。一方、メフェナム酸は心筋 I_{Ks} の脱活性化を少し遅延させたものの、脱分極パルス中の電流にはほとんど影響しなかったことから、心筋 I_{Ks} と KCNQ1/KCNE1 チャンネルはメフェナム酸の感受性が大きく異なることがわかった。KCNE1 の関連蛋白であ

る KCNE2 を KCNQ1 と共発現させると常時活性型の時間非依存性電流が記録され、これに対しメフェナム酸は明瞭な効果を示さなかった。KCNE1 と KCNE2 の両方を KCNQ1 と共発現させると KCNQ1/KCNE1 電流と同様に I_{Ks} に類似したキネティクスを示す時間依存性の電流が得られたが、メフェナム酸による脱活性化の遅延程度は KCNQ1/KCNE1 電流に比べ有意に低下した。このことは心筋 I_{Ks} と KCNQ1/KCNE1 チャンネルにおけるメフェナム酸感受性の違いの背景に KCNE2 が関与する可能性を示唆する。

【 国際シンポジウム 】

未来開拓国際シンポジウム (第 32 回生理研国際シンポジウム)

未来開拓国際シンポジウム・第 32 回生理研国際シンポジウム「正常および病的状態の成体脳における神経新生」は、2004 年 11 月 11 - 13 日の 3 日間に、自然科学研究機構・山手 3 号館 2 階大会議室および岡崎ニューグランドホテルにおいて開催された。ヒトを含む哺乳類の脳の一部領域では、終生にわたって神経新生が起きており、脳機能の修飾に寄与することが知られている。成体脳における神経新生は様々な条件（例えばマウスを刺激の多いケージで飼育することや、ストレスを与えること）で変動するが、その分子機構は不明な点が少なくない。そこで、胎子期から成体に至るまでの脳における神経細胞・グリア細胞の産生および再生という幅広い研究領域について、世界の一線で活躍している国内外の研究者の交流を目指して企画された。実際、最先端の研究を行なっている研究者（海外より 7 名、国内より 13 名）に講演していただき、正常脳において神経新生が維持されているメカニズムや、病的状態における神経新生の変化などのトピックスについて、活発な討論が交わされた。これらの講演に加えて、立食パーティーを兼ねたポスターセッションも行った。22 題のポスターが展示され、打ち解けた雰囲気の中で、しかし真剣なディスカッションが行われた。最終的な参加者は総勢 80 名（海外より 10 名、国内より 70 名）で、まとまりの良いシンポジウムになった。また、若手の研究者にとっても、最先端の研究成果に触れるとともに、新たな共同研究を立ち上げる良い場となった。



Thursday, November 11th

Opening Remarks

Session 1: The kinetics of adult neural stem/progenitor cells (Chairs: Derek van der Kooy / Seiji Hitoshi)

1. Derek van der Kooy (University of Toronto / Canada)
The control of adult neural stem and progenitor cell proliferation.
2. Masayo Takahashi (Kyoto University / Japan)
Neurogenesis in the damaged adult rat retina
3. Mari Dezawa (Kyoto University / Japan)
Specific differentiation of functional neurons from bone-marrow stromal cells and application for a rat model of Parkinson's disease.

4. Kazunobu Sawamoto (Keio University / Japan)
Migration of newly generated neurons in the adult mammalian brain.

Friday, November 12th

Session 2: Adult neurogenesis in neurological disorders (Chairs: Jeff Macklis / Katsuhiko Ono)

5. Hideyuki Okano (Keio University / Japan)
Self-renewal of neural stem cells and CNS-repair.
6. Jeff Macklis (Harvard University / U.S.A.)
Cellular repair of complex cortical circuitry by neural precursors and induction of neurogenesis.
7. Cindi Morshead (University of Toronto / Canada)
Adult neural stem cells and their role in stroke recovery.
8. Hidemasa Kato (Tohoku University / Japan)
Neural stem cell biotechnology as a tool for deciphering neurological problems.

Session 3: Molecular basis for neurogenesis and gliogenesis (Chairs: Cindi Morshead / Kazuhiro Ikenaka)

9. Stephen C. Noctor (Columbia University / U.S.A.)
Patterns of neurogenesis and cortical assembly.
10. Nobuaki Tamamaki (Kumamoto University / Japan)
Neurogenesis in the neocortical subventricular zone.
11. Ryoichiro Kageyama (Kyoto University / Japan)
Roles of bHLH genes in neural development.
12. John A. Kessler (Northwestern University / U.S.A.)
The role of β -catenin and BMP signaling in lineage commitment by neural stem cells.
13. Yukiko Gotoh (Tokyo University / Japan)
Fate regulation of embryonic neural precursor cells.

Saturday, November 13th

Session 4: Adult neurogenesis in psychiatric disorders (Chairs: René Hen / Kenji F. Tanaka)

14. René Hen (Columbia University / U.S.A.)
Contribution of hippocampal neurogenesis to the behavioral effects of antidepressants.
15. Shin Nakagawa (Hokkaido University / Japan)
Depression and Neurogenesis.
16. Seiji Hitoshi (Natl. Inst. Physiol. Sci. / Japan)
Neural stem cells in stress conditions.
17. Tatsuhiro Hisatsune (Tokyo University / Japan)
Regulation of early steps in adult neurogenesis.

Session 5: Neural fate determination in the developing brain (Chairs: John A. Kessler / Seiji Hitoshi)

18. Takaki Miyata (Nagoya University / Japan)
Asymmetric P/P divisions during CNS development: Their cytogenetic and histogenetic roles studied by slice culture.
19. Tetsuya Taga (Kumamoto University / Japan)
Neuronal versus glial fate determination by cross-interactions among transcription regulatory systems.

20. Magdalena Götz (Max-Planck Institute / Germany)

Pax6 as a master control gene for neurogenesis from stem cells.

Closing remarks**Poster Session 11-13 November, 2004**

- P-1. Takashi Namba^{1,2}, Hideo Namiki², Tatsunori Seki¹ (¹ Dept of Anat, Juntendo Univ Sch of Med, Tokyo, Japan, ²Integrative Biosci and Biomed Eng, Sch of Sci and Eng, Waseda Univ, Tokyo, Japan.)
Nature, cell-cell interaction and fate of hilar proliferating cells in the postnatal rat dentate gyrus
- P-2. Ryuta Koyama¹ Maki K. Yamada¹ Shigeyoshi Fujisawa¹ Ritsuko Katoh-Semba² Norio Matsuki¹ and Yuji Ikegaya¹ (¹Laboratory of Chemical Pharmacology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, Tokyo, Japan, and ²Institute for Developmental Research, Aichi Human Service Center, Aichi, Japan)
Brain-Derived Neurotrophic Factor Induces Hyperexcitable Reentrant Circuits in the Dentate Gyrus
- P-3. Masahiro Yamaguchi and Kensaku Mori (Department of Physiology, Graduate School of Medicine, University of Tokyo)
Critical period for sensory experience-dependent survival and death of newly-generated granule cells in the adult mouse olfactory bulb
- P-4. R.X. Yamada, M.K. Yamada, N. Matsuki and Y. Ikegaya (Lab Chem Pharmacol, Grad Sch Pharmaceut Sci, Univ Tokyo, Tokyo, Japan)
Sema3F-induced growth cone collapse: differential actions of cAMP on axons and dendrites of dentate granule cells
- P-5. S. Esumi and T. Yagi (KOKORO Biology group, Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University CREST, JST)
Monoallelic yet combinatorial expression of variable exons of the CNR/Protocadherin- α gene cluster in single neurons
- P-6. Hirofumi Morishita^{1,2}, Yoji Murata¹, Shigeyuki Esumi¹, Masahumi Kawaguchi^{1,2}, Sonoko Hasegawa¹, Chika Seiwa⁴, Shun Hamada¹, Hiroaki Asou⁴, Takeshi Yagi^{1,2,3} (¹KOKORO Biology Group, Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University ²Course of Medical Biosignaling, Graduate School of Medicine, Osaka University ³ Natl. Inst. Physiol. Sci. ⁴Department of Neurobiology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology)
DYNAMIC EXPRESSION OF AXONAL CNR/PROTODADHERIN α FAMILY PROTEIN IN THE DEVELOPING NERVOUS SYSTEM
- P-7. M. Kawaguchi, T. Tohyama, and T. Yagi (KOKORO Biology group, Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University)
The expression pattern of CNR/Pcdh α isoforms correlates with genomic methylation status.
- P-8. Masahiko Abematsu^{1,2}, Tetsushi Kagawa^{1,3}, Shinji Fukuda^{1,2}, Toshihiro Inoue^{1,2}, Hirohide Takebayashi⁴, Tetsuya Taga^{1,2} (¹Department of Cell Fate Modulation, Institute of Molecular Embryology and Genetics, Kumamoto University ²The 21st Century COE program, Kumamoto University ³Laboratory of Active Transport and ⁴Div. Neurobiol. Bioinfo. Natl. Inst. Physiol. Sci.)
bFGF Specifies Dorsoventral Cell Identity of Neuroepithelial Cells in Terms of Oligodendrocyte Differentiation Capacity
- P-9. Koji Shibasaki, Zhiyong Yang, and Lin Gan (Center for Aging and Developmental Biology, University of Rochester School of Medicine, Rochester, NY.)
Dlx1 and Dlx2 Homeobox Factor Interact with POU Transcription Factor Brn-3b in Developing Mouse Retina
- P-10. Kim H-J, Hida H, Jung C-G, Miura Y, Nishino H (Dept. of Neuro-Physiol. & Brain Sci., Nagoya City Univ. Grad. Sch. Med. Sci., Nagoya, Japan.)
Neuronal differentiation from neural stem/progenitor cells is promoted by the treatment with G1/S cell cycle blockers

- P-11. Shinsuke Shibata¹, Shin-ichi Sakakibara², Takao IMAI¹, Hiroataka J Okano¹, Hideyuki OKANO^{1,3}, (¹Department of Physiology, Keio University, School of Medicine, Japan. ²Department of Histology and Neurobiology, Dokkyo University, School of Medicine, Japan. ³CREST-JST, Japan)
In vivo function of Musashi Family in mammalian CNS development
- P-12. Y. Tozuka¹, S. Fukuda¹, T. Seki², T. Namba², M. Yoshida¹, Y. Miyamoto¹, T. Hisatsune¹ (¹Dept. Integrated Biosciences, Univ. Tokyo. ²Dept. Anatomy, Juntendo Univ.)
Excitatory GABAergic inputs accelerating cell-differentiation process in the early phase of adult hippocampal neurogenesis
- P-13. Toshihiro Inoue^{1,2}, Tetsushi Kagawa^{2,3}, Mikiko Fukushima¹, Hidenobu Tanihara¹, Tetsuya Taga² (¹Department of Ophthalmology and Visual Science, Graduate School of Medical Sciences, and ²Department of Cell Fate Modulation, Institute of Molecular Embryology and Genetics, Kumamoto University, Kumamoto, Japan. ³Division of Active Transport, Natl. Inst. Physiol. Sci., Okazaki, Aichi, Japan.)
Activation of canonical Wnt pathway promotes proliferation of retinal stem cells derived from adult mouse ciliary margin.
- P-14. Takeshi Shimizu¹, Tetsushi Kagawa¹, Shinji Takada², Tetsuya Taga¹ (¹Dept. Cell Fate Modulation, Inst. Mol. Embryol. Genet., Kumamoto Univ. ²Cent. Integ. Biosci., Okazaki)
- Extrinsic factors regulate proliferation and differentiation of neural stem cells via the glycogen synthase kinase3 β pathway.
- P-15. Atsushi Natsume¹, Marina Mata², Joseph C. Glorioso³, Hiroki Takeuchi⁴, Jun Yoshida⁴, and David J. Fink² (¹Nagoya University Hospital, Center for Gene and Regenerative Medicine, ²Department of Neurology, University of Michigan Ann Arbor, ³Department of Molecular Genetics and Biochemistry, University of Pittsburgh, ⁴Department of Neurosurgery, Nagoya University)
Prolonged biologically active GDNF expression driven by the HSV LAP2 promoter protects dopaminergic neurons from 6-OHDA-induced neurodegeneration.
- P-16. K.F. Tanaka, H. Takebayashi, K. Ikenaka (Div. Neurobiol. Bioinfo., Natl. Inst. Physiol. Sci., Okazaki, Japan)
Mutated GFAP dynamics in mouse primary astrocytes
- P-17. Yasuhiro Ogawa¹, Matthew Rasband², Hirohide Takebayashi¹, Yasuno Iwasaki¹, James Trimmer³, Kazuhiro Ikenaka¹ (¹ Natl. Inst. Physiol. Sci., ²UCONN, ³UC, Davis)
Radial glial cells, astrocyte and ependymal cells express alpha-actinin-1
- P-18. L.Ding, K.F. Tanaka, H. Takebayashi, K. Ono, O. Chisaka, K. Ikenaka (Div. Neurobiol. Bioinfo., Natl. Inst. Physiol. Sci., Okazaki, Japan,)
Dorsal-to-ventral migration of Olig3 lineage cells in the fetal mouse hindbrain and spinal cord
- P-19. N. Masahira^{1,2}, L. Ding¹, H. Takebayashi¹, K. Ono¹, K. Shimizu², K. Ikenaka¹, (¹Div. Neurobiol. Bioinfo., Natl. Inst. Physiol. Sci., Okazaki, Japan, ² Dept. Neurosurg., Kochi Med. Sch., Kochi, Japan)
A long-term lineage analysis of Olig2-expressing cells by CreERTM/loxP system
- P-20. Masae Naruse¹, Seiji Hitoshi¹, Rashmi Bansal², Kazuhiro Ikenaka¹ (¹ Natl. Inst. Physiol. Sci., ²Department Neuroscience, University of Connecticut Medical School)
Induction of ectopic *Olig2* expression in fetal cerebral cortex by FGF-2
- P-21. K. Watanabe^{1,2}, K. Ikenaka^{1,2} and K. Ono^{1,2} (¹Grad. Univ. Advanced Studies, Hayama, Japan, ²Div. Neurobiol. Bioinfo., Natl. Inst. Physiol. Sci., Okazaki, Japan)
The expression pattern of netrin-1, Sema3A and their receptors in the chick optic nerve
- P-22. Mikito Higashi, Seiji Hitoshi, Kazuhiro Ikenaka (Div. Neurobiol. & Bioinfo., Natl. Inst. Physiol. Sci., Okazaki, Japan)
Oligodendroglial differentiation of neural stem cells in a demyelination model

【 セ ミ ナ ー 報 告 】

セミナー報告

1. " Volitional control of neural activity: implications for brain-computer interfaces."

Eberhard E. Fetz (Dept. of Physiology and Biophysics, Washington National Primate Research Center,
University of Washington, Seattle WA, USA)

(2004.4.8)

The activity of many cortical neurons is modulated by appropriate sensory stimulation and/or during performance of behavioral tasks. In addition to these well-known sources of drive there appears to be an unappreciated additional modality that arises from internally generated activity and is under "volitional" control. This volitional drive appears in experiments in which monkeys were operantly trained to control the activity

of cortical neurons with biofeedback. It also appears in more recent brain-computer interface studies in which monkeys controlled the position of cursors or robotic arms with cortical activity under closed-loop conditions. This talk will review evidence from these and other studies that suggest a volitional modality for cortical neurons, and will speculate on the implications for implantable brain-computer interfaces.

(担当：関 和彦)

2. Signaling through ion channels: from molecules to behavior

Dr. Paul Slesinger (Assistant Professor, Peptide Biology Laboratory, Salk Institute for Biological Studies, USA)

(2004.5.19)

Part 1. GIRK channels are activated by different combinations of Gbg subunits in vitro but only couple to pertussis toxin (PTX) - sensitive G proteins in vivo. The molecular interactions underlying the formation of these distinct signaling pathways are not well understood. I will present evidence that the C-terminal domain of the GIRK channel plays a central role in organizing a PTX-sensitive G protein signaling complex. These results suggest that GIRK channels exist in a G protein signaling complex that may be specified by Gbg (*i/o*) binding to the C-terminal domain of GIRK channels. This region implicated in G binding overlaps with a segment in IRK1 channels involved in Andersen's disease, suggesting a possible mechanism for how Gbg subunits may alter channel gating. (Ref.: J. Physiol. (2004)

555, 643-657)

Part 2. The rewarding effect for drugs of abuse is mediated by activation of the mesolimbic dopamine (DA) system while putative anti-craving compounds inhibit the system. Interestingly, different GABABR agonists can exert similarly opposing effects on reward, but the cellular mechanisms involved are unknown. We found that the coupling efficacy (EC50) of GABABR to G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) currents was much lower in DA-neurons than in GABA-neurons of the ventral tegmental area (VTA). I will discuss these new findings within the context of drug addiction and G protein regulation of GIRK channels. (Ref.: Nature Neurosci. (2004) 7, 153-159)

(担当：久保 義弘)

3. Cell volume sensitive ion channels in the regulation of erythrocyte apoptotic cell death

(赤血球のアポトーシスと細胞容積感受性イオンチャネル)

Florian LANG (Department for Physiology, University of Tübingen, Germany)

(2004.5.25)

Cells entering programmed cell death or apoptosis destroy their genetic information by DNA degradation and expose phosphatidylserine to the outer leaflet of the cell membrane. Phosphatidylserine exposing cells are recognized by macrophages, which bind those cells engulf and degrade them.

Erythrocytes are devoid of DNA and have hitherto been considered not to undergo apoptosis. However, profound osmotic erythrocyte shrinkage, oxidative stress, energy depletion or lack of Cl^- activate a Ca^{2+} permeable unspecific cation channel with subsequent stimulation of a Ca^{2+} sensitive scramblase which leads to phosphatidylserine exposure at the cell surface. Ca^{2+} further activates the GARDOS K^+ channels leading to cellular loss of K^+ , subsequent cell shrinkage and further activation of the cation

channels and scramblase. Pharmacological inhibition of the cell volume regulatory cation channel or absence of extracellular Ca^{2+} blunts but does not abolish osmotically induced erythrocyte apoptosis pointing to the involvement of additional proapoptotic mechanisms.

Compelling evidence points to a role of premature apoptosis in the pathophysiology of several forms of anemia. Moreover, activation of cell volume regulatory cation channels may be important during infection of erythrocytes with *Plasmodium falciparum*, which imposes oxidative stress on the host cell membrane and thus activates several channels including the cation channel. Subsequent host cell apoptosis presumably accelerates the in vivo removal of the infected cell.

(担当：岡田 泰伸)

4. Zebrafish 行動異常 mutant にみるシナプスの形成と機能

Fumihito Ono (University of Florida, USA)

(2004.7.2)

我々は、ドイツで Large scale screening によって単離されてきた行動異常をしめすゼブラフィッシュの mutant を、遺伝学的手法でなく生理学的に解析していくことによって、channel や receptor の働きに関する新しい知見がえられないかと研究を始めた。行動異常といっても記憶などの高度の機能ではなくて、まったく体が動かなかつたり筋無力症状をしめしたりという、障害部位としては運動神経より末梢側が想定される mutant である。その結

果、rapsyn とよばれる ACh receptor (AChR) の神経筋接合部への集積にかかわる分子の mutant, AChR の 1 サブユニットの折りたたみの障害により膜上に AChR を全く発現しない mutant, receptor の点変異により ACh 電流の減衰がいちじるしく遅くなる mutant などを同定した。これらの mutant から得られた, AChR や rapsyn の新しい役割に関する知見や、以上の結果の延長としての今後の研究方向も含めてお話しする。

(担当：岡村 康司)

5. いわゆる primary evoked response について—脳磁図によるアプローチ (は可能か?)

乾 幸二 (生理研 感覚運動調節研究部門)

(2004.7.21)

脳磁図を用いて触覚、痛覚、聴覚、視覚のそれぞれの刺激に対する皮質活動時間経過を詳細に検討したところ、

以下のような共通点が見いだされた。1) 活動の主な流れは一定方向であり、近接する部位が順次活動する。2) あ

る部位の興奮が次の部位へ伝えられる潜時は概ね 5 ミリ秒である。3) おおよそ刺激後 50 ミリ秒以内に生じる活動は全て、10 ミリ秒間隔で活動の向きを 2 回逆転させる 3 相構造を示す。従って共通する層間伝導様式があるものと考えられる。4) 遅い潜時に開始する活動はこの 3 相構造を持たず経過が長い (100 ミリ秒前後)。この成分は刺激頻度や注意の影響を顕著に受ける。従って 3) とは異なる発生メカニズム, 異なる機能を有すると考えられる。3) は動物の脳表面から記録される初期誘発電位, いわゆる primary evoked response に相当すると考えられる。

同一皮質部位で向きの異なる双極子が形成されるためには, 異なる皮質層での異なる sink-source パターンが必要である。current source density analysis (CSD) の手法を用いた最近の動物での研究は, 初期第 4 層の活動とそれに続く 1-2 層の活動が feedforward pathway の活動様式の基本であることを明らかにしており, 脳磁図で観察された 3 相構造を持つ初期活動は, 順次信号を伝える feedforward pathway の複数層の活動を反映するものと考えられる。

(担当: 達本 徹)

6. 二光子励起イメージング法を用いたグリア・脳内血流機能の観察の試み

平瀬 肇 (理化学研究所・平瀬ユニット・ユニットリーダー)

(2004.8.2)

I would like to introduce our approaches to investigate neuron-glia-blood flow couplings using the in vivo two-photon microscopy technique. First, I will present our recent work on spontaneous calcium events among astrocytes in the neocortex (Hirase et al., PLoS Biology, 2003 --- www.plosbiology.org). In the second part of the talk, I would like to introduce capillary level circulation imaging in the neocortex in epileptic foci (Hirase et al., Neuroscience, in press). Abstracts of the two studies were pasted as below respectively.

Large and long-lasting cytosolic calcium surges in astrocytes have been described in cultured cells and acute slice preparations. The mechanisms that give rise to these calcium events have been extensively studied in vitro. However, their existence and functions in the intact brain are unknown. We have topically applied Fluo-4 AM on the cerebral cortex of anesthetized rats, and imaged cytosolic calcium fluctuation in astrocyte populations of superficial cortical layers in vivo, using two-photon laser scanning microscopy. Spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ events in individual astrocytes were similar to those observed in vitro. Coordination of $[Ca^{2+}]_i$ events among astrocytes was indicated by the broad crosscorrelograms. Increased neuronal discharge was associated with increased astrocytic $[Ca^{2+}]_i$ activity in individual cells and a robust coordination of $[Ca^{2+}]_i$ signals in neighboring astrocytes. These findings indicate potential neuron-glia communication in the intact brain.

Local hemodynamics of cerebral cortex is the basis of modern functional imaging techniques, such as fMRI and PET. Despite the importance of local regulation of the blood flow, capillary level quantification of cerebral blood flow has been limited by the spatial resolution of functional imaging techniques and the depth penetration of conventional optical microscopy. Two-photon laser scanning microscopic imaging technique has the necessary spatial resolution and can image capillaries in the depth of the cortex. We have loaded the serum with fluorescein isothiocyanate (FITC) dextran and quantified the flow of red blood cells (RBCs) in capillaries in layer 2/3 of the mouse somatosensory cortex in vivo. Basal capillary flux was quantified as $\sim 28.9 \pm 13.6$ RBCs/sec ($n=50$, mean \pm std) under ketamine-xylazine anesthesia and 26.7 ± 16.0 RBCs/sec ($n=31$) under urethane anesthesia. Focal interictal (epileptiform) activity was induced by local infusion of bicuculline methchloride in the cortex. We have observed that capillary blood flow increased as the cortical local field events developed into epileptiform in the vicinity of GABA receptor blockade (<300 micro meters from the administration site). Local blood flow in the interictal focus increased significantly (42.5 ± 18.5 RBCs/sec, $n=52$) relative to the control conditions or to blood flow measured in capillaries at distant (>1 mm from the focus) sites from the epileptic focus (27.8 ± 12.9 RBCs/sec, $n=30$). These results show that hyper-synchronized neural activity is associated with

increased capillary perfusion in a localized cortical area. This volume is significantly smaller than the currently available

resolution of the fMRI signal.

(担当：河西 春郎)

7. Oligodendrogenesis in Development and Disease

Bruce D.Trapp (The Lerner Research Institute The Cleveland Clinic Foundation:USA)

(2004.8.27)

This seminar will review data from the Trapp lab that characterizes oligodendrocyte production in developing rodent brain and in demyelinated lesions in the brain of individuals with Multiple Sclerosis (MS). In the developing rodent brain, oligodendrocytes appear in a temporal and spatial sequence that precedes myelination by several days. These cells, referred to as pre-myelinating oligodendrocytes (PMO), symmetrically extend multiple, myelin protein-positive processes. They are generated from oligodendrocyte progenitor cells (OPC's) that express the sulfated proteoglycan NG2. PMO's have a limited lifespan and either myelinate axons or die by apoptosis. As they begin to myelinate, PMO polarize their surface membranes and target proteins to distinct membrane domains. After oligodendrocyte production is complete, the NG2-positive OPC's remain as an abundant cell type in the mammalian CNS. Multiple Sclerosis (MS) is an inflammatory

demyelinating disease of the CNS. While some MS lesions can be remyelinated early in the disease process, most chronic MS lesions are not remyelinated. Remyelination requires generation of new oligodendrocytes. We investigated chronic MS lesions to determine if the failure of remyelination was due to absence of progenitors, failure of progenitors to produce new oligodendrocytes or failure of new oligodendrocytes to myelinate. We detected both oligodendrocyte progenitor cells and pre-myelinating oligodendrocytes in chronic MS lesions. The oligodendrocytes expressed myelin proteins but failed to remyelinate axons. They did, however, extend processes that associated with axons. Failure of remyelination in MS is due in part to lack of oligodendrocyte-axon interactions that induce the transition of the oligodendrocyte from a non-polarized to a polarized epithelial cell.

(担当：池中 一裕)

8. Transmitter effects on GIRK channels and on constitutively active KirNB channels in brain neurons.

Professor Yasuko Nakajima (Department of Anatomy and Cell Biology, University of Illinois at Chicago, College of Medicine)

(2004.8.27)

中島重広教授・泰子教授ご夫妻は、これまで、イオンチャンネル機能調節の分子機構と、神経系における生理的意義について連綿と研究を進めてこられました。近年は、特に、G蛋白質結合型内向き整流性 K⁺ チャンネルを対

象として、優れた研究成果を多数発表されていらっしゃいます。今回、国際解剖学会ご出席のため来日される機会を活かし、上記のセミナーをお願いいたしました。

(担当：久保 義弘)

9. Mechanisms of GIRK (Kir3) channel inhibition by transmitters

Professor Shigehiro Nakajima (Department of Pharmacology, University of Illinois at Chicago, College of Medicine)

(2004.8.27)

中島重広教授・泰子教授ご夫妻は、これまで、イオン

チャンネル機能調節の分子機構と、神経系における生理的

意義について連綿と研究を進めてこられました。近年は、特に、G 蛋白質結合型内向き整流性 K⁺ チャネルを対象として、優れた研究成果を多数発表されていらっしゃる

います。今回、国際解剖学会ご出席のため来日される機会を活かし、上記のセミナーをお願いいたしました。

(担当：久保 義弘)

10. Synfire Chains and Cortical Songs: Temporal Modules of Cortical Activity

Yuji Ikegaya (Department of Biological Sciences, Columbia University)

(2004.8.27)

How can neural activity propagate through cortical networks built with weak, stochastic synapses? We find precise repetitions of spontaneous patterns of synaptic inputs in neocortical neurons in vivo and in vitro. These patterns repeat after minutes, maintaining millisecond accuracy. Calcium imaging of slices reveals reactivation of sequences of

cells during the occurrence of repeated intracellular synaptic patterns. The spontaneous activity drifts with time, engaging different cells. Sequences of active neurons have distinct spatial structures and are repeated in the same order over tens of seconds, revealing modular temporal dynamics. Higher order sequences are replayed with compressed timing.

(担当：窪田 芳之)

11. Axon-glia interactions at the node of Ranvier

Elior Peles (The Weizmann Institute of Science: Israel)

(2004.9.6)

Efficient and rapid propagation of action potentials in myelinated axons depends on the molecular specialization of the nodes of Ranvier and particularly, on the clustering of Na⁺ channels at the nodes, which forms the molecular basis for saltatory. The nodal region is organized into several distinct domains, each of which contains a unique set of ion channels, cell adhesion molecules and cytoplasmic adaptor proteins. This organization is essential for the rapid propagation of action potentials and its disruption results in pathophysiological changes often seen in demyelinating diseases. The local differentiation of myelinated axons is tightly regulated by oligodendrocytes and myelinating Schwann cells. Two cell recognition molecules, Caspr and Caspr2 mediate axoglia interactions around the nodes and play an important role in the organization of the nodal environs by two different

mechanisms: Caspr and its associated protein contactin, participate in the generation of a barrier-like structure at the paranodal junction formed at both sides of the nodes, whereas Caspr2 associates with the contactin related TAG-1 and serves as a scaffold that maintains K⁺ channels at the nearby juxtaparanodal region. At the nodal axolemma Na⁺ channels are localized and associate with two cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily, NrCAM and Neurofascin-186 (NF186), as well as the cytoskeletal adaptor ankyrin G and the actin-binding protein spectrin βIV. Using an expression cloning strategy, we have recently identified a novel glial receptor for the nodal CAMs. This protein, termed Gliomedin, mediates axoglia interaction in PNS nodes and may play a role in the formation and maintenance of Na⁺ channel clustering at this site.

(担当：池中 一裕)

12. A novel GABAergic afferent system selectively controls thalamocortical cells in higher-order thalamic nuclei.

(1) Dr. Hajnalka Bokor (Institute of Experimental Medicine, Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary)

(2004.9.13)

In contrast to the exceedingly diverse cortical inhibitory networks, thalamus is characterized by a more simple GABAergic system dominated by afferents arising from the thalamic reticular nucleus (nRt). Here we describe a conceptually new type of GABAergic afferent pathway, distinct from nRt, that exerts powerful inhibitory effect selectively in higher order thalamic relays. Large GABAergic terminals formed by axons originating in the anterior pretectal nucleus (APT) selectively innervated the proximal dendrites of relay cells via multiple release sites. Stimulation of APT afferents revealed a GABAA -

receptor mediated, monosynaptic IPSC in thalamocortical cells in vitro and exerted pronounced inhibitory influence on relay cell activity in vivo. Juxtacellular recording and labeling in vivo disclosed APT neurons with firing properties phase-locked with or independent of EEG activity and justified the APT-thalamic pathway at the single cell level. Our data demonstrate a novel GABAergic component in thalamocortical networks that exert powerful and complex control on relay cells involved in higher order functions.

(担当 : 窪田 芳之)

13. Unprecedented target selectivity of endocannabinoid signaling and perisomatic inhibition in layer V of the somatosensory cortex

(2) Dr. Istvan Katona (Institute of Experimental Medicine, Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary)

(2004.9.13)

Retrograde synaptic signaling mediated by endocannabinoids plays a major role in controlling synaptic transmission between interneurons and principal neurons throughout the brain. We combined high-resolution anatomical analysis of CB1 receptor distribution with electrophysiological recordings to examine if there is a pattern in endocannabinoid signaling at distinct synapses of the somatosensory cortex or alternatively, all principal neuron types are able to control its own GABAergic input. Immunostaining for CB1 receptors in the rat somatosensory cortex revealed a striking layer-specific axonal and somatic labeling with highest densities in layers II and VI. Electron microscopic investigations showed that all CB1-positive boutons contain GABA and form symmetric synapses. Double-immunostaining for several neurochemical markers revealed that only large cholecystokinin-positive cells (57%) and calbindin-immunoreactive neurons (33%) express CB1 receptors. Since cholecystokinin and calbindin labeled

different neuronal populations, CB1 receptor-positive cells form two morphologically and neurochemically distinct populations in the rat somatosensory cortex. Finally, we found that endocannabinoid-sensitive GABAergic input from these two types of interneurons shows a striking postsynaptic selectivity. Although GABAergic IPSCs in a population of pyramidal cells in layer V and all pyramidal cells in layers II-III was regulated by cannabinoids and could undergo depolarization-induced suppression (DSI), we found an unprecedented population of pyramidal neurons in layer V, which did not receive perisomatic inhibition from cannabinoid-sensitive GABAergic axon terminals and could not undergo DSI. Thus, endocannabinoid signaling in the neocortex shows a striking synapse specificity depending on the identity of both the pre- and the postsynaptic element of the synapse.

(担当 : 窪田 芳之)

14. From Peppers to Peppermints: An Emerging Molecular Logic of Thermosensation

Dr. David Julius (University of California, San Francisco)

(2004.9.24)

We are interested in determining the molecular basis of somatosensation - the process whereby we experience touch and temperature - with an emphasis on identifying molecules that detect noxious (pain-producing) stimuli. We are also interested in understanding how somatosensation is altered in response to tissue or nerve injury. Our approach has been to identify molecular targets for drugs or natural products that mimic psychophysical effects of commonly encountered somatosensory stimuli, such as heat or cold. Using this strategy, we have identified two members of the TRP channel family, TRPV1 and TRPM8, which are activated by capsaicin and heat or menthol and cold, respectively. One of our main interests has been to determine the molecular mechanism(s) by which tissue injury and inflammation produces hypersensitivity of primary afferent neurons to heat (thermal hyperalgesia). We have elucidated two basic mechanisms that contribute to this process: one involving the direct interaction of inflammatory mediators with TRPV1 such that they serve

as positive allosteric modulators of this heat-activated channel, and another involving the potentiation of TRPV1 gating downstream of phospholipase C-coupled receptors. Insights into these mechanisms will be discussed. We have also examined the properties of another TRP channel, TRPA1, which we believe will play an interesting and significant role in inflammatory pain. Our recent studies have shown that TRPA1 is a major site of action of mustard oil (allyl isothiocyanate), the main pungent ingredient in wasabi. Mustard oil excites a subpopulation of capsaicin-sensitive, peptidergic trigeminal neurons, consistent with its ability to produce robust neurogenic inflammation. Our in vitro studies further suggest that TRPA1 functions as a receptor-operated channel, depolarizing sensory neurons in response to pro-algesic agents (such as bradykinin or ATP) that activate PLC-coupled receptors. These findings have significant implications for understanding mechanisms of inflammatory pain and identifying potential therapeutic targets.

(担当：富永 真琴)

15. 膜電位の光学的測定法による心臓興奮伝播パターンのマッピング

酒井 哲郎 (琉球大学医学部生理学第二分野)

(2004.9.29)

膜電位の光学的測定法は、膜電位感受性色素により細胞を生体染色し、細胞の膜電位活動を光学的 (吸光/蛍光) シグナルとして検出する測定技術である。この測定法には (1) 細胞内微小電極・パッチ電極の摘取が困難な微小・脆弱な細胞、(あるいは細胞の突起部) の膜電位変化の記録が可能であり、さらに、(2) 標本の多数の部位/

細胞からの膜電位変化の同時記録が可能である、という二つの大きな特徴がある。ここでは、この実験法の紹介とともに、われわれがおこなっているラット摘出右心房標本を用いた興奮伝播パターンのマッピングの最近の実験結果を紹介したい。

(担当：岡田 泰伸)

16. Real time dynamics of antigen-engaged B cells and interactions with helper T cells in lymph nodes

岡田 峯陽 (Postdoctoral fellow, Dept Microbiology & Immunology, UCSF/HHMI)

(2004.10.18)

Interactions between B and T cells are essential for most

antibody responses but the dynamics of these interactions are

poorly understood. By two-photon microscopy of intact lymph nodes, we have been studying real time migration of antigen-engaged B cells and dynamics of their interactions with helper T cells. In this seminar I would like to talk about

the studies showing many movies of cell migration in lymph nodes to conclude that antigen-engaged B cells undergo directional migration to the T-zone and form motile conjugates with helper T cells.

(担当 : 井本 敬二)

17. Phasic inhibition of cortical neurons by acetylcholine

Allan Gulledge (Division of Neuroscience John Curtin School of Medical Research, Australian National University)

(2004.11.1)

Cortical muscarinic acetylcholine receptor (mAChRs) activation is considered important for learning and memory. While the excitatory actions of acetylcholine (ACh) on cortical pyramidal neurons is well characterized, less is known about how phasic applications of ACh may influence information processing in the cortex. We use focal and transient application of acetylcholine (ACh) and carbachol to demonstrate that in neocortical pyramidal neurons phasic mAChR activation produces a delayed hyperpolarising response from rest. These hyperpolarising responses are

associated with an increase in membrane conductance due to transient activation of SK-type calcium-activated potassium channels. Importantly, phasic mAChR activation inhibits cortical neurons even in the presence of spontaneous activity induced by tonic mAChR stimulation with bath-applied carbachol. These findings suggest that the phasic bursting of cholinergic neurons may provide a transient inhibitory input to the neocortex while slower, Ach release may create a more general increase in neuronal excitability.

(担当 : 川口 泰雄)

18. A short history of caged compounds-using light to stimulate rapid cellular chemical reactions

Graham C.R. Ellis-Davies (Drexel University, Philadelphia, USA)

(2004.11.2)

Fox Talbot announced the flash photolysis method to the Royal Society, with a public demonstration of the technique in 1851. Since then, bursts of light have been used by scientists to record and manipulate our reality, culminating in the Nobel Prize awarded to Norrish, Porter and Eigen in 1967. Caged

compounds were invented in 1977, and since that time have been used by many physiologists and cell biologists to stimulate biochemical reactions in living cells. This lecture will give a short history of this technique, and will present our latest applications.

(担当 : 河西 春郎)

19. 「気道上皮表面液層におけるヌクレオチド放出の意義」

“Nucleotide release contributes to airway surface liquid homeostasis”

岡田 聖子 (Cystic Fibrosis/Pulmonary Research and Treatment Center, University of North Carolina at Chapel Hill)

(2004.11.5)

気道上皮表面液層において、ATP 及びその代謝物質は、受容体を介し、線毛運動および粘液分泌を促進する。ATP は恒常的にまた刺激に応じて放出され、細胞表面の水解

酵素によって迅速に分解され、この迅速な濃度調節が局所ホルモンとしての機能を可能とする。気道上皮表面における ATP 及びその代謝物質の濃度と生理学的意義に

ついて、我々の知見を論ずる。尚、細胞外ヌクレオチドの意義は確立されつつあるが、その放出機構は未だ明らかでない。

候補分子のひとつである、voltage-dependent anion channel-1 (VDAC-1) について論ずる。

(担当：岡田 泰伸)

20. Critical Period Mechanisms in Developing Visual Cortex

Dr. Takao K. Hensch (理化学研究所・脳科学総合研究センター グループ ディレクター)

(2004.11.16)

Neuronal circuits across several systems display remarkable plasticity to sensory input during postnatal development. Experience-dependent refinements are often restricted to well-defined critical periods in early life, but how these are established remains mostly unknown. A representative example is the loss of responsiveness in neocortex to an eye deprived of vision. We show that the potential for plasticity is retained throughout life until an inhibitory threshold is attained. In mice lacking an isoform of GABA synthetic enzyme (GAD65), as well as in immature wild-type animals before the onset of their natural critical period, benzodiazepines, enhancer of GABA mediated inhibitory transmission through acting to a specific GABA_A receptor, selectively reduced a prolonged discharge phenotype to unmask plasticity. Enhancing GABA-mediated transmission early in life rendered mutant animals insensitive to monocular

deprivation as adults, similar to normal wild-type mice. To examine whether a particular inhibitory network controls expression of the critical period, we use a mouse knock-in mutation to α subunits that renders individual GABA_A receptor insensitive to diazepam. Only α 1-containing circuits were found to drive cortical plasticity, but α 2-enriched connections separately regulated neuronal firing. It is known that GABA_A receptor α 1 subunits are preferentially enriched at synapses receiving input from parvalbumin (PV) positive large basket-cell terminals. Moreover, we show that impaired ocular dominance plasticity by gene-targeted removal of Kv3.1 contributing to PV-cell fast-spiking behaviour directly mimics the GAD65 knockout mouse phenotype in a cell-type specific manner. These results suggest that a threshold level of inhibition within the visual cortex trigger an experience-dependent critical period for a specific GABA_A circuit consolidation.

(担当：窪田 芳之)

21. A Hidden history of synapse

辻 繁 (元フランス CNRS 主任研究員, Departement de cytology, University, School of Medicine, USA)

(2004.11.19)

22. Representation of self-motion by cortical and subcortical neurons.

Dora Angelaki (Department of Anatomy and Neurobiology, Washington University, School of Medicine, USA)

(2004.11.19)

我々が自分あるいは周囲の運動の知覚には、視覚入力と前庭入力相互に影響しあう。これまで回転運動を用いた研究が行われてきたが、直線運動についての報告は少なかった。直線運動の認知には、回転運動とは異なり、被験者の注視点の位置などの様々な要素が影響する。

そこで直線運動の知覚に際して視覚入力と前庭入力が入力のように脳内で統合され、運動として認知されるかについて、サルを用いた行動学的実験、単一ニューロン活動記録、モデルによる検討などについて、話して頂いた。

(担当：南部篤, 伊佐 正)

23. 3 種類の SNARE 蛋白質阻害の伝達物質放出速度への影響

坂場 武史 (Max-Planck 生物物理化学研究所)

(2004.12.27)

SNARE 蛋白質 (Synaptobrevin, SNAP-25, Syntaxin) は細胞における膜融合を制御ないし調節すると考えられており, 生化学, 細胞生物学的なアプローチを用いた研究が盛んに行われている。また, SNARE 蛋白質の機能を阻害する毒素はシナプス伝達をほぼ完全に阻害するので, これらの蛋白質は伝達物質放出に重要な役割を果たしていると考えられている。一方で, 伝達物質放出の kinetics, Ca

感受性などにどのように影響を与えるかは不明の点が多い。そこで, 神経終末 (calyx of Held) にパッチ電極を介して毒素ないしペプチドを注入し, シナプス終末への Ca 流入ないし Ca-uncaging により誘発される伝達物質放出が阻害される過程で, 放出の kinetics がどのように変化するかを調べた (Stein/Jahn のグループとの共同研究)。(担当: 井本 敬二)

24. Prostaglandin D synthase expressed in glia is involved in spatial learning

江口 直美 ((財) 大阪バイオサイエンス研究所・分子行動生物学部門, 早稲田大学客員教授)

(2005.1.14)

(担当: 重本 隆一)

25. Reciprocal control between the prefrontal cortex and the raphe nuclei. Role of serotonin receptors

Dr. PUIG M. Victoria (Dept. of Neurochemistry Institute of Biomedical Research of Barcelona (IIBB)
Spanish Research Council (CSIC) Barcelona, Spain)

(2005.1.18)

The prefrontal cortex (PFC) is the most anterior portion of the frontal lobes and controls high-level brain functions such as cognition. In the mammalian brain the serotonergic system (which originates in the raphe nuclei) innervates the PFC and modulates its activity. Although the exact role of serotonergic neurotransmission in the PFC remains largely unknown, the PFC of the rodent and primate brain express serotonin 5-HT_{2A} (excitatory) and 5-HT_{1A} (inhibitory) receptor subtypes abundantly. As pharmacological evidences involve the PFC and the serotonergic system in severe psychiatric disorders, the main goal of our research has been to study the circuit between these structures in rodents at a physiological and neurochemical level. Our first results describe the complex regulation of serotonergic neuron activity by the PFC. We have demonstrated that the pharmacological activation of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors of the PFC markedly affects

serotonergic transmission in terms of 5-HT activity and release. Conflicting results have been reported for the cellular localization of 5-HT_{2A} receptors responsible for the excitatory effects of 5-HT in the PFC. Our experiments reveal that the excitatory effects of 5-HT_{2A} receptor activation are unrelated to thalamocortical terminals and suggest a main localization in pyramidal neurons. Moreover, double in situ experiments report a large co-expression of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in the same pyramidal neurons of the PFC. We have showed that the activation of these receptors by 5-HT exert opposite effects on pyramidal activity. However, the different segregation of 5-HT_{1A} (axon hillock) and 5-HT_{2A} (apical dendrites) receptors within the same pyramidal neuron could explain the overall inhibitory effect of 5-HT in the PFC.

(担当: 窪田 芳之)

26. 生体内凍結技法による“生きた動物臓器”の免疫組織化学的解析

大野 伸一 (山梨大学解剖学第1)

(2005.1.27)

近年細胞生物学分野での形態学的解析法の進歩は顕著であり、遺伝子工学的手法や免疫細胞化学法を併用し、生きた細胞内での特定蛋白質の合成や細胞内輸送等が明らかにされてきた。さらに細胞膜や細胞小器官等への特定蛋白質の局在が、光顕レベルで直接可視化もできるようになった。しかし一般的な光顕および電顕形態学的研究の試料作製法では、細胞組織の浸漬あるいは灌流固定、脱水、包埋、薄切、染色（色素や重金属）が必須であり、このような試料処理過程においては、形態学的変化が起こることが良く知られている。これらの形態学的変化を出来るだけ避けるために、特に電顕用観察には、切除した新鮮無固定生物試料を速やかに急速凍結し、凍結置換固定法や凍結切断エッチング法による超薄切片やレプリカ膜で検討することも行われてきた。最近では加圧凍結法も普及してきており、凍結良好な細胞組織の範囲が飛躍的に拡大し、今後ますます細胞組織の生体内構造と機能を明らかにしようとする研究が盛んになると思われる。

しかし実験動物の臓器によっては、脳や腎臓に代表さ

れるように生体内において循環血流の影響を強く受けていて、急速凍結するために組織試料を生体内から切り離すことによる形態変化が避けられないことが考えられた。すでに独自に開発した生体内凍結技法により、マウス脳や腎臓を直接生体内で凍結して微細構造を解析したが、従来の切除組織での急速凍結試料による微細構造とは異なることが明らかにされた。このような形態学的相違は、試料切除時に循環血流が遮断されて、血管内圧の極端な低下と酸素欠乏によるためと考えられた。従って生きた動物の脳や腎臓等の新鮮無固定試料を急速凍結しても、真の生体内微細構造を検索することにはならないことが明らかとなった。そこで21世紀の形態学的アプローチとして、生体内において生理的機能に対応した形態変化を明らかにするために、生体内凍結技法が有用であることをマウス各種臓器を例として報告する。さらにこの生体内凍結技法は、種々の機能状態下での“生きた動物臓器”の形態学的解析以外に、その特定蛋白分子局在の免疫組織化学的解析にも有効であることを示す。

(担当：重本 隆一)

27. Getting published in Nature Neuroscience: myths and facts about the editorial process.

I-Han Chou (Associative Editor of Nature Neuroscience)

(2005.2.1)

Nature Neuroscience is the highest impact primary research journal in neuroscience. We are a multidisciplinary journal, publishing papers in all areas of neuroscience, including molecular, cellular, systems and cognitive neuroscience, as well as psychophysics, computational modeling and diseases of the nervous system. We are highly selective, publishing

only the small fraction of our submissions that are of the highest quality and significance. I will present an overview of our editorial process, from selecting papers for review to final decision, and talk about effective strategies used by successful authors.

(担当：宮田 麻理子)

28. Functional architecture, oblique effect and feedback influence to areas 17 and 18

in the cat's visual cortex

Tiande Shou (Vision Research Laboratory, Center for Brain Sci. Res., Fudan University, Shanghai, China)

(2005.2.4)

Using intrinsic signal optical imaging and electrophysiological single unit recording methods neurons in cortical area 21a in the cat's visual pathway, which is corresponding to V4 in the monkey, were found to be organized in a columnar manner according to similarity of their orientation preference like neurons in areas 17 and 18. This functional architecture provided a neural basis of psychological "oblique effect",

which is a phenomenon showing that visual ability in horizontal and vertical meridians is better than that in oblique meridians.

The overall feedback effect of higher-order area 21a on lower-order areas 17 and 18 was found to be excitatory and spatial frequency-dependent when measured with inactivating of area 21a by GABA or lesion by liquid nitrogen.

(担当：小松 英彦)

29. Humour and the Brain

Prof. Vinod Goel (Dept. of Psychology, York University)

(2005.2.7)

Humour, a unique human characteristic, plays a critical role in thought, communication and social interaction. Successful jokes involve a cognitive juxtaposition of mental sets, resulting in surprise, followed by an affective feeling of amusement. The element of surprise, often derives from the fact that the alternative interpretation/resolution offered by the punchline of a joke is physically or socially forbidden. When I tell you a

joke, you may respond in one of several ways. You may (i) not get the joke; (ii) get the joke and find it funny; (iii) get the joke and not find it funny because you have heard it before; (iv) get the joke and not find it funny because it offends you. I will discuss several fMRI studies that explore the functional neuroanatomy of each of those possibilities.

(担当：本田 学)

30. 単一細胞または単一シナプスの特性から神経細胞集団またはシナプス集団の性質を予測する理論的方法

加藤 英之 (ニューヨーク大学 研究員)

(2005.2.17)

単一神経細胞および単一シナプスの動態が精密に特徴付けられてきたが、脳の機能は一般に、細胞集団、シナプス集団といった巨視的レベルで、実現されると考えられるため、微視的性質から巨視的性質への演繹する手法が重要となる。そのような手法として有用な Fokker-Planck

の方法を直感的に説明し、これによる、1) 細胞集団の同期的発火状態の解析、2) 単一細胞上にある多数のシナプスがスパイクタイミング依存可塑性で変化する様子の解析、さらにこの考え方に基づいて、細胞集団の膜電位状態を細胞外測定から予測する手法を紹介する。

(担当：宮田 麻理子)

31. Tangential Migration of Cortical Interneuron

Guillermina Lopez-Bendito (CSIC & Universidad Miguel Hernandez, Alicante, Spain)

(2005.2.21)

One of the most remarkable recent discoveries in developmental neuroscience is related to the observation that a substantial fraction of GABAergic cortical interneurons originates outside of the cerebral cortex and migrate tangentially to their final location within the cortical layers. Both repulsive and attractive cues seem to be involved in the regulation of cortical interneuron migration from ventral to dorsal areas of the telencephalon (Marin and Rubenstein, 2001; 2003). Furthermore, the guidance of these interneurons may also be influenced by neuronal activity. Indeed, several studies have described the early expression of GABA and glutamate receptors at the cerebral cortex before the formation of synapses (Metin et al., 2000; Lopez-Bendito et al., 2002a; 2002b; 2005). Some of these receptors can be activated in vitro by specific agonist, indicating that they may be

also activated in vivo by their natural ligands, also expressed at these early stages. For example, the metabotropic receptor for GABA, GABA_B, is highly expressed by tangentially migrating interneurons going to the cortex, and its blockade in vitro leads to a derailment of GABAergic interneurons within the neocortex (Lopez-Bendito et al., 2003).

Furthermore, stimulation of AMPA receptors in slice cultures induces neurite retraction and GABA release in tangentially migrating cells (Poluch et al. 2001, Poluch & Konig 2002). These and other additional studies suggest that in vivo, the activation of neurotransmitter receptors might be important for the migration of interneurons although the mechanisms controlling and underlying the activation of these receptors are yet unknown.

(担当：重本 隆一)

32. Precision and variability in the localization of neurotransmitter receptors and ion channels on the neuronal surface.

Dr. Rafael Lujan (Universidad de Castilla-La Mancha, Albacete, Spain)

(2005.2.23)

The impact of neurotransmitter receptors and its effector ion channel on synaptic transmission is largely dependent on their spatial distribution and density in the somato-dendritic compartments of central neurons and, in case of ion channels, on the subunit composition of the individual channels, which determines the single channel properties such as unitary conductance, open-time duration, and open probability. At synapses, it is still assumed that neurotransmitter receptors are located facing axon terminals, so they can bind quickly to the neurotransmitter released in the synaptic cleft. However,

this stereotyped view of synapses is more complex than previously thought. Neurotransmitter receptors and ion channels can be located at any subcellular compartment, though they are segregated depending on the subtype/subunit and also on the cell type. Therefore, my interest is to understand how synaptic transmission is mediated by neurotransmitter receptors by obtaining detailed qualitative and quantitative data on the distribution of functional glutamate and GABA receptors and its effector ion channels on the surface of central neurons.

(担当：重本 隆一)

33. 分散培養神経回路網における自己組織化された機能的ネットワーク

工藤 卓 (産総研 セルエンジニアリング研究部門, JST)

(2005.2.24)

脳から取り出され、分散培養された神経細胞は培養日数を経るに従って神経突起を伸張し、シナプス結合を形成し、複雑な神経回路網を自律的に構成していく。こうして再形成された生体神経回路網は、脳組織に於いてと同様に自発的な電氣的活動を呈し、何らかの情報処理を行いうるように見える。他方脳に於いては、ダイナミックに更新される神経細胞間の機能的結合によってグルーピングされた神経細胞群 (functional neuron assembly) の存在が報告され、その協調的活動が脳内における情報の表現に重要な役割を果たしていることが示唆されている。培養皿上に再構成された神経回路網に於いてもこのような機能的細胞集集体が構成されうるならば非常に興味深い。

そこで、培養に於ける自発的神経活動の時空間パターンを解析する系を確立した。胎生ラット海馬神経細胞を

2次元多点電極を有する培養皿上で培養し、記録された自発的活動電位の時空間パターンがいくつかのパターンにクラスタリングされるか検討した。さらに、神経細胞間の機能的結合を視覚化するために“Connection Map Analysis”を考案した。これは、相互相関関数を元に観測された神経細胞の全てのペアについて機能的結合の強度を推定し、2次元マップに表現するものである。

Connection Map に表現された機能的結合のネットワークは、スケール・フリーネットワークの構造をとり、多くの結合を持つ少数の「ハブ的」な神経細胞が存在することを示していた。これらの解析の結果が示すのは、分散培養された神経細胞は、“ランダムでない”、何らかの意味構造をもった、情報処理に適したネットワークを自己組織化によって構成するらしいということである。

(担当: 井本 敬二)

34. Tonic inhibitory conductances mediated by GABA_A receptors.

Dr. Alexy Semyanov (RIKEN, RIKEN Brain Science Institute, Unit Leader)

(2005.3.7)

GABA mediates fast inhibition by activating synaptic ionotropic GABA_A receptors. Low extracellular GABA concentrations also generate a tonic current mediated by high-affinity GABA_A receptors. Tonic inhibition occurs in brain slices, neuronal cultures and in vivo. It is developmentally regulated and is modulated by GABA uptake. We have shown that amplitude of tonic current is different in hippocampal interneurons and pyramidal cells. This has an important role in regulating network excitability and information processing. The pharmacological profile of tonic current also differs depending on extracellular GABA concentration which implies different subpopulations of receptors (binding sites of receptors) are involved. Such heterogeneity of GABA_A receptors may not only be the mechanism to extend the dynamic range of tonic current in response to different GABA concentrations, but also serve as a basis for adaptive plasticity. We have discovered that in both

normal and epileptic hippocampal slices tonic GABA_A receptor mediated current is similar at low GABA concentrations. However then ambient GABA is increased the magnitude of tonic current in pyramidal cells from epileptic animals was larger. Reference

Semyanov A, Walker MC, Kullmann DM, Silver RA.

Tonically active GABA A receptors: modulating gain and maintaining the tone.

Trends Neurosci. **27**:262-9 2004.

Semyanov A, Walker MC, Kullmann DM.

GABA uptake regulates cortical excitability via cell type-specific tonic inhibition.

Nat Neurosci. **6**:484-90 2003.

Semyanov A, Kullmann DM.

Kainate receptor-dependent axonal depolarization and action potential initiation in interneurons.

Nat Neurosci. **4**:718-23 2001.

Semyanov A, Kullmann DM.

Neuron. 25:663-72 2000.

Modulation of GABAergic signaling among interneurons by metabotropic glutamate receptors.

(担当：重本 隆一)

35. 神経活動長期抑制による伝達物質放出確率の変化

桂林 秀太郎 (Max-Planck, Bayler 大学, JSPS 海外研究員)

(2005.3.16)

神経伝達物質放出機構の活動依存性の伝達物質放出確率の変化について分子背景を含めて、最新の研究について

てセミナーを行なった。

(担当：鍋倉 淳一)

36. 精子の運動活性化・走化性機構

吉田 学 (東京大学大学院理学系研究科附属臨海実験所・講師)

(2005.3.17)

受精に先立ち、精子は卵より放出される因子によって活性化され、誘引されることが多くの動物で知られている。この卵に対する精子走化性は、多くの動物において種（または属）特異性があることが解っている。つまり精子走化性現象は、特に体外受精を行う生物において、受精の際に精子が同種の卵を選択し、かつ効率的に接近することを助けていると思われ、生物の生殖戦略を探る上でとても興味深い現象である。しかし、精子走化性についての研究はこれまで非常に少なく、精子誘引物質や

精子走化性の分子機構といった知見がほとんど得られていなかった。演者らはこの精子走化性現象が顕著にみられる原索動物のカタユレイボヤ *Ciona intestinalis* を主に用いて研究を行ってきた。そしてこれまでに、精子活性化と精子走化性は単一の物質で誘起されることを突き止め、その物質が新奇の硫酸化ステロイドであることを明らかとした。今回はこのユレイボヤの精子走化性機構にスポットを当て、精子誘引物質及び精子活性化・走化性の分子機構についての最近の知見について紹介する。

(担当：岡村 康司)

37. 機械受容チャネル開閉の分子機構

吉村 建二郎 (筑波大学大学院生命環境科学研究科構造生物科学専攻)

(2005.3.29)

触覚や聴覚などを担う機械受容は機械受容チャネルによって行われている。バクテリアの機械受容チャネルは細胞膜の張力に応じて開くチャネルである。このチャネ

ル分子には、外力による構造変化を許す緩さがあり、脂質からの力を感じるセンサーがある。

(担当：岡村 康司)

【 山 手 イ ブ ニ ン グ
セ ミ ナ ー 】

山手イブニングセミナー

1. 演題：動物の生殖細胞はどのようにできるのか？

日時：2005年3月1日

演者：小林 悟（岡崎統合バイオサイエンスセンター 発生遺伝研究室）

【 大学院特別講義 】

大学院特別講義

1. 第 67 回 (2004.4.14)
演者：分子生理研究系・神経機能素子研究部門 久保 義弘 教授
演題：代謝型グルタミン酸受容体の機能制御機構と動的構造機能連関
2. 第 68 回 (2004.5.12)
演者：岡崎統合バイオサイエンスセンター・戦略的方法論研究領域 瀬藤 光利 助教授
演題：細胞骨格
3. 第 69 回 (2004.6.9)
演者：生体情報研究系・神経シグナル研究部門 井本 敬二 教授
演題：イオンチャネル疾患の発病メカニズム
4. 第 70 回 (2004.7.14)
演者：発達生理学研究系・生殖・内分泌系発達機構研究部門 箕越 靖彦 教授
演題：視床下部とエネルギー代謝
5. 第 71 回 (2004.9.8)
演者：統合生理研究系・感覚運動調節研究部門 柿木 隆介 教授
演題：脳磁図 (MEG) を用いたヒト脳機能の研究：特に顔認知機構について
6. 第 72 回 (2004.10.13)
演者：発達生理学研究系・環境適応機能発達研究部門 梶 秀人 教授
演題：匂いの神経科学
7. 第 73 回 (2004.11.10)
演者：発達生理学研究系・生体恒常機能発達機構研究部門 鍋倉 淳一 教授
演題：抑制性神経回路の remodeling
8. 第 74 回 (2004.12.8)
演者：統合生理研究系・計算神経科学研究部門 川人 光男 客員教授
演題：脳とロボットを計算神経科学でつなぐ
9. 第 75 回 (2005.1.12)
演者：岡崎統合バイオサイエンスセンター・生命環境研究領域 今野 卓 客員助教授
演題：変性疾患関連連蛋白質凝集の分子機構とその制御因子
10. 第 76 回 (2005.2.9)
演者：岡崎統合バイオサイエンスセンター・時系列生命現象研究領域 東島 眞一 助教授
演題：下等脊椎動物の運動系神経回路ーゼブラフィッシュを中心として

11. 第77回 (2005.3.9)

演者：脳機能計測センター・脳機能分子解析室 平林 真澄 助教授

演題：実験動物と発生工学技術

生理学研究所年報 第26巻

発行 2005年12月1日
編集者 柿木隆介
発行者 自然科学研究機構

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>

印刷製本 株式会社 エニウェイ

〒171-0014 東京都豊島区池袋 2-19-3
万葉ビル 2F
電話 〈03〉 3988-5656